

PD2) 대기 중 미세먼지에 대한 인체 영향 평가: 변이원성과 세포 독성 중심으로

Health Effects of Particulate Matter: Mutagenicity and Cytotoxicity Study

장지영 · 양지연 · 임은희 · 박민석 · 김수환 · 최인홍¹⁾ · 신동천

연세대학교 의과대학 환경공해연구소, ¹⁾연세대학교 의과대학 미생물학교실

1. 서 론

최근의 연구들에 따르면 전 세계적으로 환경오염이 증가하고 있는 추세이다. 특히 미세먼진의 흡입은 비염이나 천식과 같은 알레르기성 질환 및 염증성 폐질환 모두를 악화시킨다고 알려져 있다. TSP(total suspended particles; 총부유먼지)중 크기가 10 μ m 이하인 미세먼지(particulate matter 10; PM10)는 호흡기관 깊숙이 들어가 기관지와 폐포에 침착된다. PM의 흡입 시 폐포 대식세포와 폐 상피세포가 PM에 직접적으로 노출이 되고, 특히 폐 상피세포에서 염증성 cytokine의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있으며 이로 인해 호흡기 질환의 악화가 일어나는 것으로 추측되고 있다(김정호, 2006). 본 연구에서는 PM의 EOM(Extractable Organic Matter)에 의한 미생물 균주의 변이원성과 기관지 세포(BEAS-2B; Human Bronchial Epithelial Cell)의 생존률에 미치는 영향, cytokine의 생성 및 apoptosis(세포자살현상)관련성 정도를 평가하여 인체에 대한 영향 평가를 하고자 한다.

2. 연구 방법

연구대상 물질로는 대기 중의 PM10, PM2.5로 2006년 10월부터 2007년 2월까지의 기간동안 미세먼지 포집기로 포집하였다. 포집장소는 자동차 통행량이 많은 도로변(신촌 도로변)에서 포집하였으며 포집시간은 24시간을 기준으로 하였다. PM10은 High volume 포집기로 석영필터에, PM2.5는 Mini volume 포집기로 테플론 재질의 멤브레인 필터에 각각 포집하였다. 실험은 PM의 EOM추출물로 진행하였다. EOM 추출은 디클로로메탄과 메탄올을 1:1(v/v) 섞은 용액으로 1시간동안 sonication시킨 후 필터를 모두 제거하고 유기추출물은 남기고 용매를 제거하는 과정인 evaporation을 실시하였다.

변이원성 시험을 위해 Ames test(Ames et al, 1983)를 변형한 Yahagi 방법(Yahagi et al., 1997)을 이용하였으며, 사용한 균주는 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537을 이용하였다.

세포 생존율(cell viability) 분석은 세포주에 PM의 EOM을 처리한 후 CCK8 (Cell Counting Kit by WST8)를 이용하여 관찰하였다. 24시간동안 용량별로 처리 한 후 well 당 15 μ l의 CCK8 용액을 처리하여 발색반응 관찰 후 상층액을 microplate reader로 450nm 에서 측정하였다. Cytokine의 생성 여부는 ELISA를 이용하여 관찰하였다. Capture antibody를 코팅한 후 washing 과정을 거쳐 sample을 처리한다. Detection antibody와 AV-HRP를 blocking buffer와 배합한 후 well 당 100 μ l씩 첨가한 후 실온에서 1시간 반응시킨다. Sureblue 용액 첨가 후 푸른색으로 변하면 stop solution을 처리하여 450nm에서 측정한다. Apoptosis 관련성은 FACS(Fluorescence Activated Cell Sorter) 측정을 통하여 규명하였다. Plate에 분주된 세포를 2회 DPBS로 세척한 후 5 μ l의 Annexin-V FITC와 10 μ l의 PI를 첨가한 후 상온의 암실에서 15분 반응시켜 FACS Calibur를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

PM10에 대한 월별 변이원성을 비교해 보았을 때 1월이 가장 높게 관찰되었다. 이는 겨울이 봄, 가을보다 변이원성이 더 높다고 판단할 수 있다. 10월의 입자별 변이원성을 비교해 보았을 때 TA98(-S9)과 TA100(+S9)에서 PM2.5가 PM10보다 미약하게나마 더 높은 수치가 관찰되었다. 이는 입경크기의 영향이 어느 정도 관여하는 것으로 생각된다.

BEAS-2B(기관지) 세포에서 계절에 따른 세포 생존률 실험 결과 PM10은 계절에 따른 차이를 보였으나 PM2.5는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 전반적으로 PM2.5가 PM10보다 비교적 낮은 세포 생존율이 측정되어 독성이 더 높은 것으로 관찰되었다.

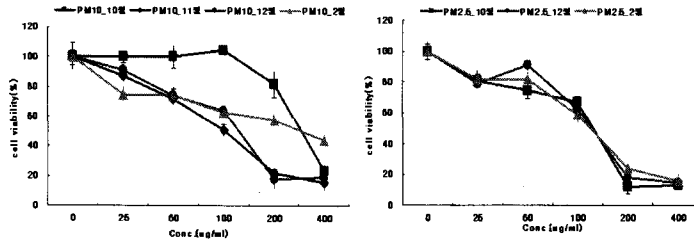


Fig. 1. Cell viability of BEAS-2B treated PM-EOM.

BEAS-2B(기관지)세포를 이용한 ELISA 실험 결과 IL-6와 IL-8에서 PM10, PM2.5 모두 뚜렷한 용량 반응 관련성이 관찰되었다. EOM의 처리 농도가 증가할수록 PM10보다 PM2.5에서 cytokine의 생성 정도가 높게 관찰되었다. IL-6와 IL-8 모두 EOM에 의해 생성된 농도가 적정 기준치보다 많이 측정되었다.

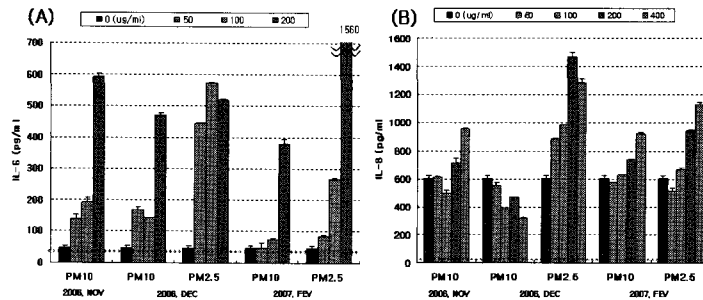


Fig. 2. (A) IL-6 release in BEAS-2B for PM-EOM, (B) IL-8 release in BEAS-2B for PM-EOM.

FACS 측정을 통한 Apoptosis 관련 실험 결과 PM10과 PM2.5 모두 EOM 처리 농도가 높아질수록 apoptosis 단계에 들어서는 세포수의 증가가 관찰되었다. 현재 추가 확증실험이 계속 진행 중이다.

미세먼지 포집은 계속 시행중이며 변이원성 실험에서 PM2.5에 대한 추가실험이 진행되어야 할 것이다. 세포실험에서는 다른 종류의 여러 세포주를 추가하여 실험을 진행할 계획이며 염증반응과 세포사에 대한 세부적인 실험이 추가로 더 진행될 계획이다.

참고 문헌

- 김정호 (2006) PM10이 A549 Cells에서 전염증성 Cytokine발현에 미치는 영향, Tuberculosis and Respiratory Diseases, 60(6).
- Baulig, A., S. Blanchet et al. (2007) Fine urban atmospheric particulate matter modulates inflammatory gene and protein expression in human bronchial epithelial cells, Front Biosci. Jan., 1(12), 771-82.
- Mazzarella, G., F. Ferraraccio et al. (2007) Effects of diesel exhaust particles on human lung epithelial cells, An in vitro study. Respir Med.