

김해시 공업지역의 대기 중 Methylethylketone 측정과 활성산소종 생성에 관한 연구

박 흥 재 · 정 성 욱 · 김 종 명^{*} · 안 원 근^{**}
인제대학교 환경공학부/생명환경연구소, ^{*}부경대학교 양식학과,
^{**}부산 대학교 나노메디컬 공학과
(2007년 6월 11일 접수; 2007년 7월 18일 채택)

Detection of Methylethylketone in the Ambient Air of Industrial Area in Gimhae City and Its Effect on the Generation of Reactive Oxygen Species

Heung-Jai Park, Seong-Wook Jeong, Jong-Myoung Kim^{*} and Won Gun An^{**}

School of Environmental Science and Engineering/Bio- Environmental Institute, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

^{*}Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

^{**}Department of Nanomedical Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

(Manuscript received 11 June, 2007; accepted 18 July, 2007)

This study assessed the characteristics of emission and cell toxicology of Methylethylketone(MEK) in ambient air of industrial area. MEK is produced by the oxidation of sec-butyl alcohol and used as the solvent for making ink, printing, coating of film, bonding material and drug extraction. The MEK concentrations in the ambient-air of industrial area in Gimhae City was detected in the range of 25.4~1,580 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ with an average 297.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. The concentration of MEK showed a descending tendency from April to August followed by its increased tendency since then. The effects of MEK on the human lung cancer A549 cells was examined by the generation of Reactive Oxygen Species(ROS) and cytotoxicity. The range of MEK concentration detected in the area induced ROS generation affecting the oxidation state with a little effects on the viability of the cells.

Key Words : Methylethylketone(MEK), Reactive Oxygen Species(ROS), Cytotoxicity

1. 서 론

자동차의 운행, 유류 및 유기용제의 사용 확대 등으로 휘발성이 강한 인위적으로 발생한 화학물질이 대기 중으로 배출되어 대기권에 여러 가지 영향을 미치고 있으며, 휘발성유기화합물(Volatile Organic Compounds; 이하 VOCs라 함)은 종류 및 대기 중의 반응의 형태에 따라 대류권 오존오염, 성층권·오존층 파괴 및 대기 중에서 적외선을 흡수하여 지구 온난화를 가중시켜 환경 및 건강에 영향을 초래한다. 또한 VOCs 자체의 성질로도 유해할 수 있고 대

기 중에서 질소 산화물과 함께 광화학반응에 참여하여 인체 및 동·식물에 유해한 2차 오염물질을 생성하는 등 환경에 막대한 영향을 미치고 있다.

VOCs의 배출원 중 가장 큰 부분을 차지하는 인위적인 배출원은 인간의 활동에 의한 것으로 이로 인한 오염 발생원은 매우 다양하고 복잡하며 이는 다시 고정 배출원(점과 면배출원)과 이동 배출원으로 크게 분류된다. 고정 배출원의 주 배출원은 유기용제 및 세정제 제조 또는 사용을 하는 공장, 주유소, 세탁소, 인쇄소 등이 포함되고, 이동 배출원은 주로 자동차가 대부분을 차지한다. 기타 인간의 일상생활과 밀접한 관계가 있는 VOCs 배출원으로서, 소비용품, 건축자재 및 개인적인 활동 등이 포함된다. 현재 환경대기 중으로 VOCs의 배출량은 자동차

Corresponding Author : Won Gun An, Department of Nanomedical Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Phone: +82-51-510-3025
E-mail: wgan@pusan.ac.kr

의 급격한 증가와 석유화학 공업의 발달과 더불어 증가하고 있는 추세이며^{1,2)} 이들 배출물질은 조성이 다양하며, 우리 생활환경 주변에서 쉽게 노출될 수 있는 특성이 있어 공단지역이 아니더라도 도시 대개의 어디에서든지 존재하며 직·간접적인 피해를 주며^{3,4)}, 그 자체도 발암성 물질을 비롯하여 인체에 유해한 물질을 많이 포함하고 있으므로 대기환경 규제지역 내에서 VOCs의 적정관리가 필수적이다. 외국의 경우에는 1980년대 초부터 각 지역에서의 환경대기 중의 농도 파악, 배출원별 발생량 및 배출원별 구성성분에 대한 조사 등 다양한 분야에서 다양한 시료채취 방법을 이용하여 VOCs에 대한 연속적인 연구가 이루어져 왔다. 또한 VOC의 Reactive Oxygen Species(ROS)에 대한 연구가 고조되면서, 활성산소의 의한 세포내의 독성 및 조절기전에 대한 연구 또한 활발히 이루어지고 있다. ROS는 일반적으로 세포의 산소호흡의 부산물로 생성되어 세포에 유해한 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 세포고사나 노화와 관련된 것으로 보고되고 있다^{4,5)}. ROS는 화학적으로 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 지니고 있는 강력한 산화작용을 하는 원자나 분자를 의미한다. ROS의 종류는 siglet oxygen, superoxide anion radical(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), lipid peroxide, nitric oxide(NO), peroxyxynitrite($ONOO^-$), thiyl peroxy radical(RSO_2^-), ferryl radical(FeO^{2+}), hydroxyl radical(OH^-) 등을 광범위하게 포함한다⁶⁻⁸⁾. 이들은 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 잃거나 혹은 주위로부터 전자를 얻어 보다 안정된 상태를 유지하려는 성질을 갖고 있기 때문에 매우 불안정하다. 따라서 주위의 화합물과 쉽게 반응하여 전자를 잃거나 얻으려하기 때문에 높은 반응성을 갖게 된다. 유기호흡을 하는 생명체에 있어서 산소는 세포내 효소작용, 환경적 요인 등에 의해 활성산소로 전환되면서 세포내 기관에 손상을 준다(Fig. 1)⁹⁾.

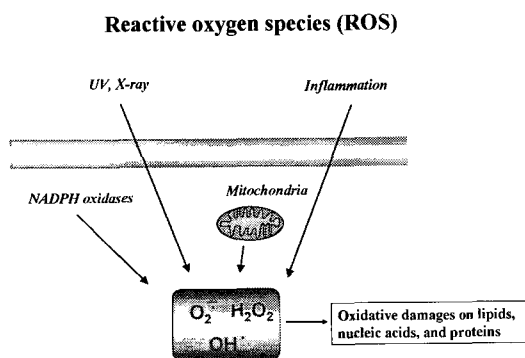


Fig. 1. Generation of ROS by various factors.

메틸에틸케톤(Methylethylketone, 이하 MEK)은 제2부탄올이 산화하면서 생성되는 알코올 산화물로써 니트로셀룰로오스·비닐수지·아세트산셀룰로오스 등의 우수한 용제(溶劑)이며 잉크, 접착제, 코팅, 향료/의약품추출, 인쇄 등에 사용 된다¹⁰⁾. 공업용으로 사용되는 MEK가 세포에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 공업지역의 대기중 MEK의 오염특성을 파악하고, 폐암세포주인 A549 세포에 MEK가 ROS 생성 및 세포독성에 관한 연구를 하고자한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 대기 중 오염 특성

2.1.1. 시료채취 장소 및 기간

본 연구의 조사지점은 오염원에서 배출되어 오염물질이 충분한 확산과 혼합이 이루어졌다고 판단되는 공업지역 3개 지점(월드카 주유소, 지내동, 공단파출소)을 선정하였으며, 2005년 4월~12월까지 2개월에 1회씩 조사하였다.

2.1.2 시료채취 및 분석방법

확산(diffusion)의 원리를 이용하는 passive sampler를 이용하여 시료를 채취하였으며, 회수된 sampler는 실험실로 운반하여, 분석 시까지 $-20^{\circ}C$ 에서 보관하였다. 고체흡착 용매추출법은 이황화탄소를 사용하여 sampler에 흡착된 대상화합물을 추출한 후 이 추출액 중 일정량을 gas chromatography(HP 6890, Hewlett Packard, USA)에 주입하여 MEK 농도를 분석하였다(Table 1).

2.2. MEK의 세포 독성평가

2.2.1. 세포배양

Human lung carcinoma cell인 A549 세포는 RPMI 1640 (GIBCO/BRL, Grand Island, USA)에 10% fetal bovine serum (GIBCO/BRL, Grand Island, USA)과 10% antibiotic-antimycotic (GIBCO/BRL, Grand Island, USA)을 첨가하여 3×10^6 cells/ml 세포의 밀도를 유지하면서 $37^{\circ}C$, 5% CO_2 의 세포 배양기에서 배양하였다.

Table 1. The operating parameters for GC

Parameter	Condition
Column	HP-1(50m×0.32mm×1.05μm)
Carrier gas	He gas 1.5ml/min
Inlet temperature	250°C
Oven temperature	35°C(10min) → 7°C/min → 150°C → 20°C/min → 220°C(6min)
Detector temperature	280°C

2.2.2. ROS 생성 측정

세포를 6-well plate에 4×10^4 cells/well 밀도로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. MEK를 농도별로 처리 후, DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate : H₂DCFDA, Molecular Probe, Eugene, Oregon, USA)를 10 µm 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 1시간 반응시켰다. 세포를 ice-cold PBS로 3회 수세 후, lysis buffer (protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Germany) 1 tablet/50 ml TNES buffer (1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl))를 100 µl 씩 첨가하여 단백질을 추출한다음 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 모았다. 분리된 상등액의 형광측정은 Fluorescence Victor3 V (PerkinElmer Life Sciences)를 이용하여, emission 535 nm, excitation 485 nm의 파장에서 측정하였다.

2.2.3. 세포 생존율 측정

35mm culture dish에 5×10^5 세포의 밀도로 분배하여 12시간 안정화시킨 후 MEK를 농도별로 처리하였다. 18시간 뒤에 ice-cold PBS로 수세하고 배지를 제거하여 Trypsin EDTA를 가한다. 3분 후에, 배지 1 ml를 첨가하고 피펫으로 균일화하여 100 µl

를 취해서 0.4% Trypan Blue 용액 100 µl를 가하여 hemacytometer로 세포의 수를 산정하였다. 처리된 culture dish 별로 각각 3회 이상씩 반복하여 시행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 김해 지역의 기상 특성

김해시의 측정 월 기상 현황은 Fig. 2에 나타내었다. 김해시의 평균 풍속은 3.08~4.17 m/sec, 평균 기온은 -0.01~25.6°C, 습도는 47.1~79.2%, 강수량은 21.0~244.08 mm로 조사 되었으며, 대기 오염물질의 확산되는 방향과 관련이 깊은 풍향은 4월, 6월, 8월의 경우에는 북서풍이 주 풍향으로 나타났으며, 10월, 12월에는 남풍이 주 풍향으로 나타났다.

3.2. MEK 농도 특성

본 연구를 통해 관측된 MEK의 농도 분포를 Table 2에 나타내었다. 공업지역에서 MEK 농도의 범위는 25.4~1,580 µg/m³로 나타났고, 전체 조사 지점의 평균은 297.4 µg/m³으로 조사되었다. 각 조사지점의 월 변화를 살펴보면 4월에서 8월로 갈수록 MEK 농도는 점차 감소하다가, 10월부터 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 10월과 12월의 남풍이 주풍을 이루고 있으며, 평균 풍속이 3.29 m/sec

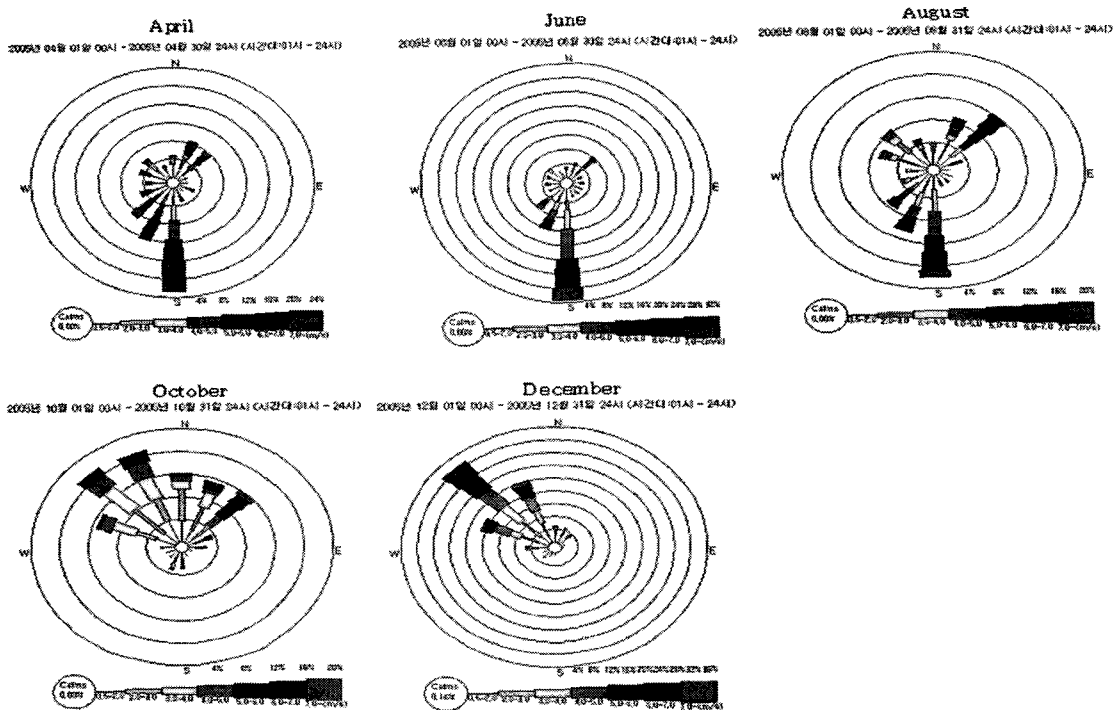


Fig. 2. Windrose in Gimhae.

Table 2. The concentration of MEK in ambient air

	April	June	August	October	December
Word car gas station	161.9	65.1	48.8	72.4	119.3
Ginae dong	367.0	236.5	177.4	66.1	114.4
Industrial complex police office	163.8	96.0	72.0	736.0	1,580.0

로 다른 조사기간의 평균 풍속 보다는 적어 확산이 잘 이루어지지 않은 것으로 사료된다.

3.3. MEK의 독성평가

ROS 생성을 조사하기 위해 세포막 투과성이 있는 DCF-DA dye를 사용하여 ROS의 생성 정도를 측정하였다. 형광을 띠지 않는 DCF-DA dye는 세포내에서 DCF로 가수분해가 되며, 이 가수분해가 된 dye는 세포내의 hydrogen peroxide 및 다른 peroxides들과 반응하여 높은 형광을 띠게 된다. 따라서 DCF-DA dye에 의한 형광의 정도는 세포내에 생성된 ROS의 양과 비례한다. MEK에 의한 세포내의 ROS 생성을 조사하기 위해 폐암세포주인 A549 세포에 MEK를 5 $\mu\text{l/ml}$, 15 $\mu\text{l/ml}$, 30 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도별로 18시간 동안 처리하였으며, 양성 대조물질로 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 사용하였다. MEK에 의한 세포내의 ROS 생성 정도는 농도에 비례하였으며, 30 $\mu\text{l/ml}$ 농도의 MEK 처리시 control에 비하여 2배 정도의 ROS가 생성되었다 (Fig. 3).

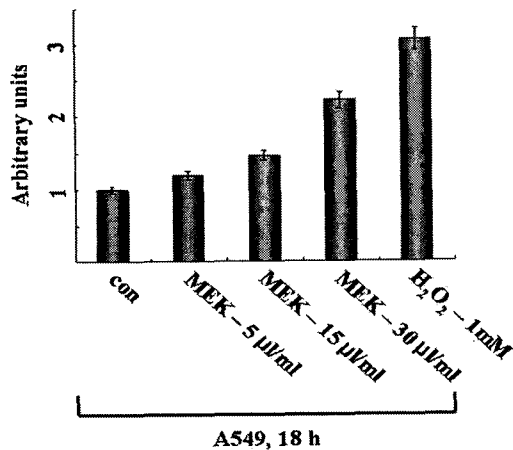


Fig. 3. Generation of ROS by MEK. A549 cells were treated with various concentration of MEK for 18 hours and the ROS was determined by using DCF-DA dye. Results are expressed as arbitrary units compared to the untreated control (mean \pm SE, n=3).

MEK에 의한 세포 생존에 대한 영향을 조사하기 위하여, 폐암세포주인 A549 세포에 MEK를 5 $\mu\text{l/ml}$, 15 $\mu\text{l/ml}$, 30 $\mu\text{l/ml}$ 의 농도별로 18시간 동안 처리하였다. 세포의 생존율은 Trypan Blue 방법으로 측정하였다. Trypan blue 입자는 세포막을 확산의 방법으로 통과하여 세포내부로 유입되는데 살아있는 세포는 ATP 에너지를 이용한 exocytosis로 trypan blue 입자를 다시 세포 외부로 배출하게 되나, 에너지를 발생할 수 없는 죽은 세포는 exocytosis를 할 수 없어 청색으로 염색된다. MEK는 A549 세포의 생존율을 농도와 무관하게 약 20% 정도 감소시켰다 (Fig. 4).

실험결과 MEK는 A549 세포에 ROS를 생성하여 세포내의 산화상태를 변화시켰다. MEK의 농도에 따라 세포내의 ROS 생성 정도는 증가 하였지만 세포의 생존율에는 영향을 미치지 못하였다. 이는 A549 세포내의 ROS가 증가하더라도 일정량 이상의 ROS는 세포의 생존율이나 세포의 대사조절에 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

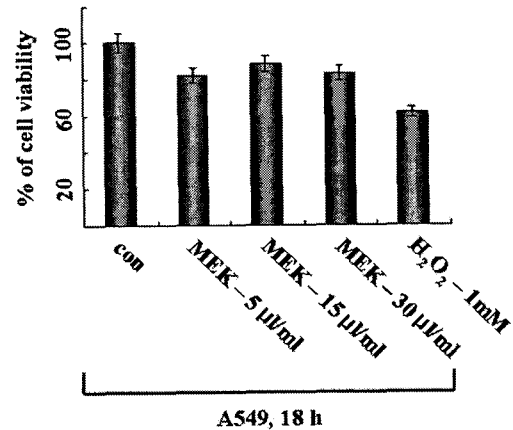


Fig. 4. Inhibition of proliferation by MEK. A549 cells were treated with various concentration of MEK for 18 hours and the viability was determined by Trypan Blue method. Results are expressed as percentages of proliferation compared to the untreated control (mean \pm SE, n=3).

4. 결 론

본 연구는 공업지역에서의 MEK의 오염 농도 특성과 폐암세포주인 A549 세포에 MEK가 ROS 생성 및 세포독성에 관한 연구결과 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1) 공업지역에서 MEK 농도의 범위는 25.4~1,580 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 로 나타났고, 전체 조사 지점의 평균은 297.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 으로 조사되었으며, 4월에서 8월로 갈수록 MEK 농도는 점차 감소하다가, 10월부터 다시 증가하는 경향을 나타내었다.

2) MEK는 A549 세포에 ROS를 생성하여 세포내의 산화상태를 변화시켰다.

3) MEK의 농도에 따라 세포내의 ROS 생성 정도는 증가 하였지만 세포의 생존율에는 영향을 미치지 못하였다. 이는 A549 세포내의 ROS가 증가하더라도 일정량 이하의 ROS는 세포의 생존율이나 세포의 대사조절에 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 부산대학교 교내 학술연구비(신임교수연구정착금)에 의한 연구임.

참 고 문 헌

- 1) 봉상훈, 2007, 김해지역 대기중 휘발성유기화합물 특성연구-김해시 동지역을 중심으로-, 석사학위논문, 환경공학부, 인제대학교, 김해.
- 2) 나광삼, 김용표, 문길주, 1999, 울산공단 대기에서 측정된 휘발성 유기화합물의 1997년과 1998년 결과비교, 한국대기환경학회지, 15(5), 567-574.
- 3) 김용표, 이종훈, 진현철, 문길주, 1997, 여천공단

대기중의 입자상 및 기체상 이온성분과 유기화합물의 농도, 한국대기보전학회지, 13(4), 267-277.

- 4) Le B. M., Clement M. V., Pervaiz S., Brenner C., 2005, Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death, *Histol. Histopathol.*, 20, 205-19.
- 5) Chen Q., Fischer A., Reagan J. D., Yan L. J., Ames B. N., 1995, Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 92, 4337-4341.
- 6) Moldovan L., Moldovan N. I., 2004, Oxygen free radicals and redox biology of organelles, *Histochem. Cell Biol.*, 122, 395-412.
- 7) Frossi B., Tell G., Spessotto P., Colombatti A., Vitale G., Pucillo C., 2002, H_2O_2 induces translocation of APE/Ref-1 to mitochondria in the Raji-cell line, *J. Cell Physiol.*, 193, 180-186.
- 8) Nohl H., Jordan W., 1980, The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide, *Eur. J. Biochem.*, 111, 203-210.
- 9) Mirza S., Miroshnyk I., Heinamaki J., Christiansen L., Karjalainen M., Yliruusi J., 2003, Influence of solvents on the variety of crystalline forms of erythromycin, *AAPS. PharmSci.*, 5(2), E12.
- 10) Gius D., Spitz D. R., 2006, Redox signaling in cancer biology, *Antioxid. Redox Signal.*, 8, 1249-1252.