

국내 디젤 차량 배기 입자가 쥐 대식세포에 미치는 세포독성 평가

이장한, 이용권¹, 이지영, 이승복², 김선화², 배귀남²,
이학성³, 임철수⁴, 정남현^{*}

고려대학교 생명공학과, ¹유한대학 식품영양과, ²한국과학기술연구원 지구환경센터,
³서원대학교 환경건설정보학과, ⁴국립환경과학원 교통환경연구소

Cytotoxicity of Diesel Exhaust Particles from Various Vehicles toward Macrophage Cells

Jang Han Lee, Yong Kwon Lee¹, Ji-Young Lee, Seung-Bok Lee²,
Sun-Hwa Kim², Gwi-Nam Bae², Hak-Sung Lee³,
Cheol-Soo Lim⁴ and Namhyun Chung^{*}

College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

¹*Department of Food and Nutrition, Yuhan University*

²*Global Environment Center, Korea Institute of Science and Technology*

³*Civil and Information System, Seowon University*

⁴*National Transportation Pollution Research Center,
National Institute of Environmental Research*

ABSTRACT

DEPs (diesel exhaust particles) like any other particles can be also inhaled into lung to participate in a damaging reaction to the organ. Possible damages might be apoptosis and inflammatory responses to the cells in respiratory track. The aim of this study was cytotoxicity evaluation of DEPs from five in-use diesel vehicles using a murine macrophage cell (RAW 254.7). We found that most DEPs have a considerable cytotoxicity compared to the control and SRM 2975. When measured by MTT assay and extents of apoptosis, DEPs of two high-mileage vehicles had higher toxicity than those of the other three low-mileage vehicles tested. Although mRNA expression level of TNF- α somewhat explains the trend of cytotoxicity and apoptosis, that of IL-1 β did not. Correlation studies among the extents of MTT assay, apoptosis, and TNF- α expression showed that the extents between apoptosis and TNF- α expression was most highly correlated ($r=0.96$). These results suggest that cytotoxicity of various DEPs could be compared easily by measuring the extent of apoptosis or TNF- α expression by DEPs.

Key words : Diesel exhaust particle, Macrophage, Cytotoxicity, Apoptosis, TNF- α expression

접수일: 2010년 1월 7일, 채택일: 2010년 6월 28일

^{*} To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-3290-3026, Fax: +82-2-953-0737

E-mail: nchung@korea.ac.kr

서 론

최근 산업단지에서 전반적인 대기오염도는 개선되고 있다. 그럼에도 불구하고, 운송 수단에 의한 오염은 여전히 대기오염에 문제가 되고 있으며, 이러한 오염은 해당지역뿐만 아니라 동시에 도시 대기오염의 매우 중요한 요인이다. 대기오염을 통해 사람들에게 많이 노출되는 유해화학물질의 주범은 자동차 배기가스이며, 그 중에서도 대기의 주요 오염원인 디젤 배기 입자(diesel exhaust particles; DEP)의 발생량도 줄어 들지 않고 있다(Nitta *et al.*, 1993).

DEP와 같은 미세입자가 생물학적인 반응을 보이는 것은 직경과 상당한 관계가 있다. 미세입자의 크기에 따라 PM₁₀ 및 PM_{2.5}(각각 직경이 10, 2.5 μm 이하)로 나뉠 수 있으며(Ahn *et al.*, 2008), 특히 대부분의 DEP는 공기역학적 직경이 2.5 μm 보다도 작기 때문에 DEP와 같은 작은 입자는 대기 중에 매우 오랜 시간 동안 머물러 있다(Squadrito *et al.*, 2001; Vinitketkumnuen *et al.*, 2002). 또한 디젤 배기 가스에는 입자상 물질(particulate matter; PM)과 함께 일산화탄소(CO), 이산화탄소(CO₂), 질소산화물(NO_x), 다환방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs) 등이 포함되어 있으며, 사람들의 호흡을 통해 위와 같은 디젤 자동차의 배기 물질들이 폐에 노출되는 계기가 된다(Spengler and Sexton, 1983; Hiura *et al.*, 1999). 특히 PAHs는 대표적인 환경독성물질이며 담배연기와 디젤엔진의 배기가스 등에 포함되어있는 물질로, DNA와 결합하여 유전적 손상을 줄 수 있을 뿐만 아니라 benzo[a]pyrene과 같은 PAH는 내분비계 장애까지도 초래할 수 있다. 벤젠고리가 다섯 개 이상인 PAH는 입자상으로 존재하여 직경 2 μm 이하의 깊이 침투 가능한 호흡성 분진과 연관되어 있다(Sheu *et al.*, 1997; Ravindra *et al.*, 2001; 김 현, 2002). 따라서 이는 호흡기 계통에 관련되어 암, 천식과 같은 만성적인 질병을 야기시키는 결과를 초래할 수 있다.

호흡을 통해 폐에 들어간 DEP는 폐의 표피세포에 심각한 손상을 입히게 되고 급성 염증반응과 면역반응을 야기시킨다. 이러한 반응의 결과로 염증반응에서 자가세포사멸까지 많은 효과를 가지고 있는 사이토카인인 interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, inter-

feron- γ 등과 함께 폐의 대식세포의 DEP 대식 작용을 통해서 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor alpha; TNF- α)와 인터루킨-1 β (IL-1 β)의 분비가 유발되어 더욱 심각한 결과를 초래할 수 있다(Steerenberg *et al.*, 1998; Fujii *et al.*, 2001; Donaldson *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2006). 따라서, 호흡을 통해 폐가 DEP에 노출되었을 시 폐의 표피세포에 심각한 손상을 입히게 되고 급성 염증반응과 면역반응을 일으킨다. DEP에 노출된 폐의 대식세포에도 위와 같은 영향을 미치거나, 활성화된 대식세포에 의해서 상피세포가 영향을 받을 수 있는 것으로 알려져 있다(Seaton *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2002). 즉 조직 손상 후 대식세포의 활성화로 분비되는 물질 중 종양 괴사 인자(TNF- α)와 인터루킨-1 β (IL-1 β)의 분비가 유발됨으로 인해 더욱 심각한 결과를 초래할 수 있다고 알려져 있다.

TNF- α 는 위에 언급한 것과 같이 사이토카인으로서는 염증 반응에서 자가세포사멸까지 많은 효과를 가지고 있다. 이러한 TNF- α 는 다양한 면역 관련 세포에서 생성되는데 대식세포는 물론 랑게르한스 세포, 활성화된 T 세포 등에서도 생성된다. TNF- α 는 초기 염증 반응 분자들(IL-1, IL-6, IL-8 NF- κ B)의 생성을 촉진시킬 뿐만 아니라 TNF- α receptor 1에 결합하는 것을 통하여 자가세포사멸을 증진시키기도 한다. 여러 인터루킨 중에 IL-1은 중요한 염증성 사이토카인으로 IL-1 α 와 IL-1 β 의 두 개의 작용제(agonist)가 있다(김종순 등, 2008). IL-1은 염증이나 감염이 있을 때 생산되며, IL-1이 과도하게 존재할 경우 여러 기관들에서 감염성질환이나 자가면역질환이 발생할 수 있다(Fujii *et al.*, 2001). IL-1 β 는 다른 사이토카인의 합성을 촉진하여 그 자체의 효과를 증진시키므로 염증반응을 퍼지게 한다. IL-1 β 역시 이러한 염증반응에 대한 작용이 세포막에 존재하는 특이적인 수용체를 통해서만 이루어지고 있으며, 면역반응 시 최초면역반응을 매개하는 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Dinarello and Thompson, 1991; Saito *et al.*, 2002).

위와 같은 사실을 바탕으로 본 논문에서는 여러 종류의 국산 디젤 차량에서 생성되는 DEP에 대한 독성을 비교하기 위해, 마우스 유래의 대식세포에 여러 가지 DEP를 노출시키면서 일반적인 세포독성 측정값, TNF- α 와 IL-1 β 의 세포 발현 정도, 그리고 대식세포의 자가세포사멸 사이에 어떤 관계가

있는지에 대해 살펴보았다.

재료 및 방법

1. Diesel exhaust particles(DEP) 준비

실험에서 사용한 디젤 차량은 5종으로 각 차종의 연식과 주행거리를 Table 1에 나타내었다. 위의 각 차종에 해당하는 DEP는 국립환경과학원 교통환경연구소의 차대동력계를 이용하여 4번의 기초주행모드(ECE)와 1번의 추가 도시주행모드(EUDC)가 결합된 ECE-EUDC 모드에서, 운전하는 총 19.7 분 동안 배기가스 희석터널(희석비: 10~30)에서 매 시험마다 채취하였다. ECE-EUDC는 유럽연합에서 개발된 것으로(Montazeri-Gh *et al.*, 2006), 국내 경유차 규제를 위해 사용되고 있다.

시험 차는 시험 전날 하루 동안 시동을 걸지 않은 상태로 보관한 후 다음날 첫 번째 시험을 시작할 때 시동을 걸어 총 3회 반복 시험을 실시하였다. 즉, 차종마다 첫 번째 시험은 냉간 시동(cold start) 조건에서 입자시료를 채취하였고, 그 이후 나머지 2회의 시험은 온간 시동(hot start) 조건에서 입자시료를 채취하였다. 일반적인 주행과 유사한 조건을 만들기 위해서 냉간 시동과 온간 시동 조건에서 각각 얻어진 시료를 일정 비율(1:2)로 혼합하여 독성 실험에 사용하였다.

통상적으로 시험 차에서 배출된 배기가스는 희석터널에서 수십 배 이상 희석된 후 질소산화물 및 입자상 물질과 같은 배기가스 규제 항목의 농도가 분석된다. 독성 실험에 필요한 DEP 시료를 충분히 확보하기 위하여 본 연구에서는 이러한 배기가스 시험 과정에서 입자의 크기를 분리하지 않은 채 직경이 70 mm인 테플론 필터에 90 L/min의 유량으로

채취한 DEP를 독성 실험에 사용하였다. 즉, 1회 시험을 수행하는 동안 약 11.3 m³의 배기가스로부터 채취한 DEP이다. 경유 버스에서 배출되는 PM₁₀ 중 약 96%가 PM_{2.5}에 해당하는 것으로 보고되고 있으므로(Keogh *et al.*, 2009), 본 연구에서 독성 실험에 사용한 DEP 입자의 특성은 화학조성을 분석하기 위해 채취한 PM_{2.5} 시료와 거의 비슷할 것으로 생각한다.

테플론 필터에서 채취한 DEP는 필터를 메탄올에 충분히 적신 후 스크래퍼(SPL, Korea)를 사용하여 추출하였고, 무균적으로 메탄올을 증발시켜 실험 사용 전까지 DEP 펠릿(pellet) 형태로 -20°C에 보관하였다.

2. DEP 분석

미량원소, 이온, 탄소, 입자상 다환방향족탄화수소 등의 화학조성을 분석하기 위한 시료는 자동차 배기가스 희석터널에서 동일한 4세트의 입자 채취 시스템을 이용하여 각각 10 L/min으로 2.5 μm 이하 입자(PM_{2.5})를 테플론 필터(미량원소와 이온) 또는 500°C 이상에서 3시간 이상 구운 석영 필터(탄소와 입자상 다환방향족탄화수소)에 채취하여 각각 X-ray fluorescence (XRF), thermal/optical transmittance (TOT), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 방법을 이용하여 분석하였다. 이 PM_{2.5} 입자 채취 시스템은 싸이클론(2000-30EN, URG, USA), 필터팩(2000-30FG, URG, USA), 유량계 및 진공펌프로 구성하였으며, 질량유량측정기(mass flow meter, TSI, USA)로 유량을 확인하였다.

미량원소의 경우 PM_{2.5}가 채취된 테플론 필터를 이용하여 Na부터 U까지 40종의 미량원소를 고감도 XRF로 분석한 결과이며, 상세한 성분은 Chow *et al.* (2003)에 제시되어 있다.

유기탄소(organic carbon) 및 원소탄소(elemental carbon) 성분의 경우 PM_{2.5}가 채취된 석영필터를 1.5 cm² 크기로 절단하여 Thermal/Optical Carbon Aerosol Analyzer(Sunset, USA)의 오븐에 넣고 헬륨 분위기 및 산소 분위기 조건에서 860°C까지 단계적으로 승온시키면서 휘발되는 탄소성분을 CO₂로 전환한 후 다시 메탄으로 환원시켜서 FID로 검출한 결과이며, 자세한 분석방법은 Na *et al.* (2004)에 제시되어 있다.

입자상 다환방향족탄화수소의 경우 PM_{2.5}가 채

Table 1. Identification of DEPs

Vehicles	Capacity (cc)	Vintage	Driving distances (km)
A	2,607	2003	227,047
B	2,874	1998	229,610
C	2,209	2004	99,693
D	1,991	2001	135,242
E	2,476	2003	134,270

Each DEP samples were obtained separately by ECE-EUDC driving mode.

취된 석영필터를 속시렛 장치를 이용하여 에테르:헥산(10:90) 용액을 용매로 16시간 동안 추출하여 회전증발 농축기로 5 mL 이하가 되도록 농축한 후, 질소 농축기를 이용하여 다시 1 mL까지 농축하였다. 최종 농축된 시료는 HP-5MS (30m × 0.25 mm ID × 0.25 μm film thickness) 분석컬럼을 사용하여 GC/MSD (HP 6890/HP 5973A) SIM (selected ion monitoring) 모드에서 분석하였다.

3. 세포배양

마우스 유래의 대식세포인 RAW 264.7 세포는 열처리 후 비활성화된 우태 혈청 (heat-inactivated fetal bovine serum, FBS, JRH, USA)이 10% 들어있는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, JBI, Korea)을 사용하여 95% 공기, 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포는 2 × 10⁵ cells/mL 농도로 세포 배양 접시 (SPL, Korea)에 접종하여 70~80%의 균락을 보일 때까지 배양한 후 Ca²⁺/Mg²⁺-free phosphate-buffered saline (PBS, JBI, Korea)으로 세포를 세척하여 실험에 사용하였다. 필요에 따라 DEP의 참조물질로서 standard reference material 2975 (SRM 2975, NIST, USA), titanium dioxide nanopowder (TiO₂ < 100 nm, Sigma, USA), zinc oxide nanopowder (ZnO < 100 nm, Sigma, USA)를 사용하여 실험을 수행하였다.

4. RAW 264.7 세포에 DEP, SRM 2975, TiO₂, ZnO 입자 처리

실험에 사용하기 전 DEP 현탁액을 FBS가 없는 상태의 DMEM 배지를 사용하여 1.0 mg/mL로 만들었고, 그 이후에 초음파 분쇄기를 사용하여 2분씩 2회 초음파 분쇄를 하였다. DEP를 세포에 처리하기 전에 매 실험마다 새롭게 만들어서 RAW 264.7 세포에 처리한 후 18시간 동안 배양하여 실험을 진행하였다. DEP 처리 후 RAW 264.7 세포는 스크래퍼를 사용하여 조심스럽게 긁어 모으고 상층액과 같이 원심 분리하여 세포를 가라 앉힌 뒤 다시 PBS를 사용하여 세포를 세척한 후 실험에 사용하였다.

5. MTT 분석법을 이용한 세포독성 평가

세포독성은 MTT[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,

5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma, USA]의 대사 환원에 근거한 MTT 분석법 (assay)으로 측정하였다 (Mosmann, 1983). 실험 방법을 간단히 서술하면, 96-well plate (SPL, Korea)에 RAW 264.7 세포를 접종한 후 70~80%의 균락을 보일 때 최종농도를 100 μg/mL로 하여 DEP 현탁액을 각 웰 당 0.2 mL씩 교체해준 뒤 추가적으로 18시간 동안 DEP에 노출시켜 배양하였다. 이후 0.5 mg/mL의 MTT reagent를 각 웰에 넣어주고 추가로 1시간 배양한 뒤 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용해 반응을 중단시킨 이후 microplate reader (EL800, Bio-Tek, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. DEP에 의한 세포독성은 다음의 식으로 나타내었다. Cytotoxicity (%) = [1 - (A_{570 nm} of sample - A_{570 nm} of blank) / (A_{570 nm} of control - A_{570 nm} of blank)] × 100

6. 자가세포사멸 측정

DEP의 처리에 따른 자가세포사멸성 손상 (apoptosis)에 대한 평가는 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Gibco, USA)를 사용하여 세포를 회수한 후 Apoptosis Detection kit (BD Biosciences, USA)을 사용하여 annexin-V-fluorescein isothiocyanate (FITC)와 propidium iodide (PI)로 세포를 이중 염색한 후 FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 분석하였다. Annexin-V-FITC의 형광 강도는 488/530 nm (excitation/emission)의 파장에서 분석하였고 PI는 488/617 nm (excitation/emission)의 파장에서 측정하였다 (Hiura *et al.*, 1999). 시료 간의 분석은 CellQuest Pro software (Becton Dickinson, USA)로 수행하였다.

7. RNA 분리와 역 전사 중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)

총 RNA 분리는 RAW 264.7 세포에서 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)를 사용하였으며, 추출된 총 RNA는 Ultraspec[®] 2001 Pro (Amersham Biosciences, UK)를 사용하여 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 농도와 순도를 계산하였다. 추출된 RNA는 AMV reverse transcriptase (Promega, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였고, 다음과 같은 specific primer (Bioneer, USA)를 이용하여 TNF-

α 와 IL-1 β 유전자를 증폭시켜 검출하였다. TNF- α ; forward 5'-ACTCAACAACTGCCCTTCTGAG-3', reverse 5'-TTACAGCTGGTTTCGATCCATTT-3', IL-1 β ; forward 5'-TGTGGCTGTGGAGAAGCTGT-3', reverse-5'CAGCTCATATGGGTCCGACA-3', β -actin; forward 5'-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTTG CCG-3', reverse 5'-TGGATGGCTACGTACATGG CTGGG-3'. PCR 산물은 ethidium bromide (EtBr)를 함유한 2.0% 아가로즈 겔에서 전개하였다. 이 후 전개된 DNA는 Alpha server ES40 (Alpha Innotech Co., USA)를 사용하여 UV-조명기 상에서 스캔하였고, ImageQuant v. 5.2 (Molecular Dynamics, USA)를 사용하여 정량하였다. 각각에 해당하는 밴드의 강도는 β -actin과 비교해서 평준화한 뒤 나타내었다.

8. 통계분석

DEP 샘플 간의 차이에 대한 통계적 유의성은 SPSS 프로그램 (ver. 12.0)을 사용하여 ANOVA로 조사하였고 Turkey HSD 사후검정을 이용하였다. *p*-value가 0.05 또는 0.01 이하일 때 유의성이 있다고

결정하였다.

결 과

1. DEP 화학 성분 분석

이번 실험에 사용된 5종의 디젤 차종에서 유래한 DEP의 성분을 분석하였다. 각 성분 중 S, Ca, Cr, Fe, Cu, Zn, Sr, Cd 등의 미량원소가 검출되었으며, 질량수치는 Table 2에 정리하였다. 유기탄소의 질량은 236.56~371.25 g/kg 범위이고 주행거리가 비슷한 경우 연식이 오래된 차량에서 더 많이 검출되었으며, 원소탄소는 375.23~708.22 g/kg 범위로 동일 차종에서 유기탄소에 비해 1.2~2.7배 가량 많이 검출되었다. 또한 각각의 PAHs 성분에 대한 함량을 Table 2에 표시하였다.

2. DEP에 따른 세포독성 평가

세포독성을 측정하기 위해 DEP를 RAW 264.7 세포에 처리하였고, 세포의 생존율은 MTT법을 이

Table 2. Chemical composition of DEP samples

Vehicles		A	B	C	D	E
Trace element (g/kg)	S	7.02	1.13	27.57	-	1.00
	Ca	1.32	1.83	3.68	0.70	0.56
	Fe	0.34	0.62	1.05	-	-
	Cu	0.04	-	0.58	0.02	-
	Zn	0.53	1.71	4.74	0.57	0.41
	Sr	0.04	0.04	0.10	0.05	0.06
	Cd	-	-	0.09	-	-
Carbon (g/kg)	Organic carbon	236.56	327.55	314.93	371.25	267.00
	Elemental carbon	581.04	518.13	375.23	494.43	708.22
PAHs (mg/kg)	Biphenyl	13.60	12.33	15.39	48.45	65.52
	Fluorene	18.86	18.43	20.16	-	-
	Phenanthrene	156.25	291.82	154.57	204.33	210.59
	Anthracene	-	26.50	12.72	138.89	178.44
	1-methylphenanthrene	-	29.76	19.69	-	191.19
	Fluoranthene	56.91	108.41	95.84	147.56	144.86
	Pyrene	59.22	218.74	108.96	233.84	135.46
	Chrysene	-	30.67	20.27	47.48	58.38
	Benzo[a]pyrene	-	4.44	-	-	-
	Benzo[k]fluoranthene	-	22.73	4.93	-	-
	Benzo[e]pyrene	-	50.80	8.49	-	-
Benzo[b]fluoranthene	-	23.98	12.49	-	-	
Benzo[g,h,i]perylene	-	7.71	5.28	-	-	

-, data not detected.

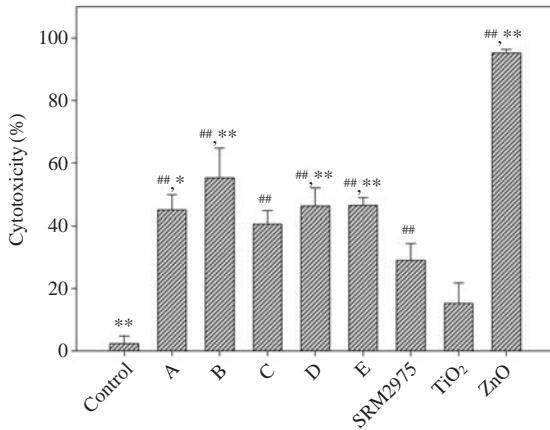


Fig. 1. Cell viability of RAW 264.7 cells as measured by MTT assay. Raw 264.7 cells were treated with DEPs (A-E) from vehicles as shown in Table 1, SRM 2975, TiO₂, and ZnO at the concentration of 100 µg/mL for 18 hr. Control cells cultured in DEP-free media were run in parallel to the treatment groups. The data are represented as mean ± S.D. of four independent experiments. Statistical significance from control is shown with # ($p < 0.05$) and ## ($p < 0.01$), and from SRM2975 with * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

용하여 분석하였다. 사용한 DEP의 노출농도가 100 µg/mL일 때 A, B, C, D, E 차종에서 45.0, 55.2, 40.6, 46.2, 46.4%의 세포독성이 나타났으며, 양성대조군인 SRM 2975, TiO₂, ZnO는 각각 29.0, 15.3, 95.2%의 세포독성이 관찰되었다. 특히 차종별 DEP에서는 B 차량에서 평균적으로 세포독성이 가장 강한 것으로 나타났으나 통계적으로 유의한 차이는 없었고, 연식이 가장 최근이고 주행거리가 가장 적은 C 차량을 제외한 전 차종의 DEP에서 참조물질인 standard reference material (SRM) 2975에 비해 유의적으로 세포독성이 높게 측정된 것으로 나타났다 (Fig. 1). SRM 2975는 미국국립표준기술연구소 (NIST)에서 DEP 연구의 표준을 제시하기 위해 만들어진 것으로 성분분석에 대한 정보는 <http://www.nist.gov/>에서 얻을 수 있다 (Bao *et al.*, 2007).

3. 대식세포의 자가세포사멸 평가

RAW 264.7 세포에 DEP 100 µg/mL과 양성대조군인 SRM 2975, TiO₂, ZnO를 노출시켜 그 여부를 평가하였다. 자가세포사멸 정도를 비교했을 때 A,

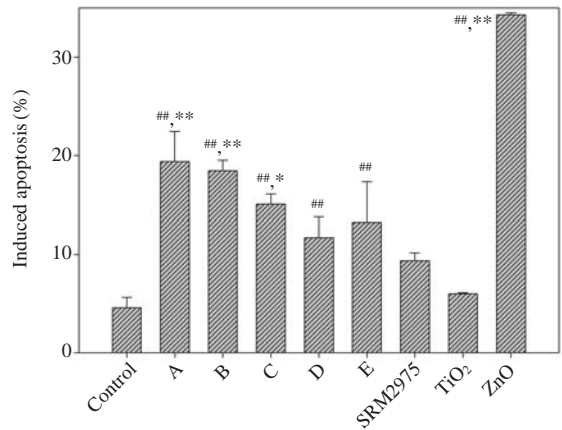


Fig. 2. Flow cytometric analyses to assess the effects of various DEPs on cellular apoptosis. RAW 264.7 cells were treated with 100 µg/mL of DEPs (A-E) from vehicles as shown in Table 1, SRM 2975, TiO₂, and ZnO for 18 hr. Extent of apoptotic damages indicated percentage of lower right and upper right in the quadrant relative to the control cultured in DEP-free media. The data are represented as mean ± S.D. of three independent experiments. Statistical significance from control is shown with # ($p < 0.05$) and ## ($p < 0.01$), and from SRM2975 with * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

B, C, D, E 차종에서 DEP를 처리하지 않은 대조군에 비해 각각 순서대로 4.2, 4.0, 3.3, 2.5, 2.9배 높게 유도된 것으로 나타났으며, 양성대조군인 SRM 2975, TiO₂, ZnO는 각각 2.0, 1.3, 7.5배로 높게 나온 것을 확인하였다. 특히 A 차량의 DEP에서 평균적으로 자가세포사멸의 정도가 제일 높게 평가되었으나 B와 C 차량에 대해서는 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 D와 E 차량에 대해서는 차이 ($p < 0.05$)가 있었다. 한편 A, B, C 차량의 DEP에서 참조물질인 SRM 2975에 비해 유의적으로 높게 측정된 것으로 나타났다 (Fig. 2).

4. DEP가 세포의 TNF-α와 IL-1β의 mRNA 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 세포의 차종에 따른 각각의 DEP 100 µg/mL과 양성대조군인 SRM 2975, TiO₂, ZnO를 노출한 후 TNF-α의 mRNA 발현 정도를 관찰하였다. TNF-α의 발현 정도를 비교했을 때 A, B,

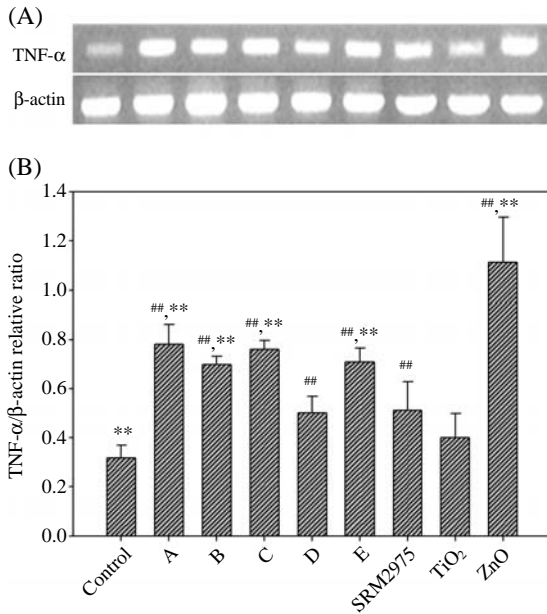


Fig. 3. Effect of various DEPs on the expression of TNF- α in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 100 μ g/mL of DEPs (A-E) from vehicles as shown in Table 1, SRM 2975, TiO₂, and ZnO for 18 hr. (A) The expression of TNF- α measured by RT-PCR. (B) Quantities represented by gel band are expressed as intensities relative to β -actin. The data are represented as mean \pm S.D. of three independent experiments. Statistical significance from control is shown with # ($p < 0.05$) and ## ($p < 0.01$), and from SRM2975 with * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

C, D, E 차종에서 DEP를 처리하지 않은 대조군에 비해 각각 순서대로 2.5, 2.2, 2.4, 1.6, 2.2배 높게 발현된 것으로 나타났으며, 양성대조군인 SRM 2975, TiO₂, ZnO는 각각 1.6, 1.3, 3.5배로 높게 나온 것을 확인하였다. 특히 A 차량의 DEP에서 평균적으로 TNF- α 의 발현이 제일 높게 평가되었으며, D 차량을 제외한 전 차종의 DEP에서 참조물질인 SRM 2975에 비해 유의적으로 높게 측정되었다 (Fig. 3). 마찬가지로 방식으로 RAW 264.7 세포에 DEP를 처리했을 때 IL-1 β 의 발현을 평가하였다. 대조군에 비해서 A, B, C, D, E 차종에서 각각 순서대로 24.1, 8.1, 2.0, 14.9, 13.8배의 높은 발현 양을 보였으며, 자가세포사멸 정도와 MTT법을 이용한 세포독성 평가의 정도와 상당히 다른 경향을 보여 주었다 (Fig. 4).

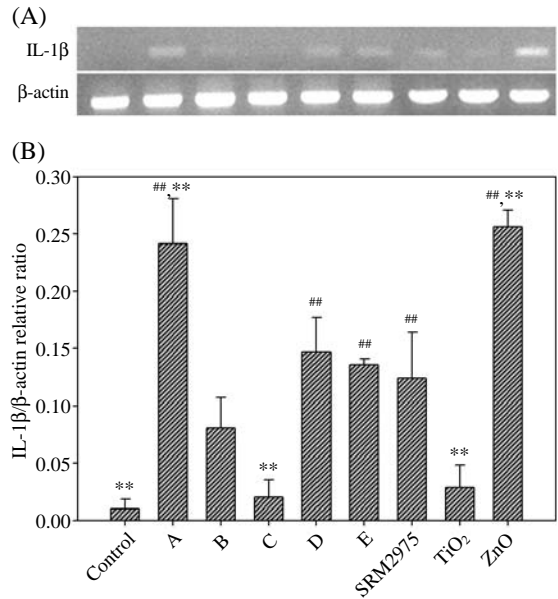


Fig. 4. Effect of various DEPs on the expression of IL-1 β in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 100 μ g/mL of DEPs (A-E) from vehicles as shown in Table 1 for 18 hr. (A) The expression of IL-1 β measured by RT-PCR. (B) Quantities represented by gel band are expressed as intensities relative to β -actin. The data are represented as mean \pm S.D. of three independent experiments. Statistical significance from control is shown with # ($p < 0.05$) and ## ($p < 0.01$), and from SRM2975 with * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$).

고 찰

DEP는 대기오염의 주요 고체상 미세입자의 원 인이며, 세포의 기능과 염증에 관련되어 다양한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 특히 노출되었을 시 만성 천식 등의 질병에 걸릴 위험이 높다는 보고가 있다 (Hiura *et al.*, 1999; Boland *et al.*, 2001). DEP는 대기 중에 혼재해 있다가 일반적으로 호흡을 통해서 사람에게 노출되며, 이렇게 노출된 미립자로 인해 위와 같은 증세가 나타나며 실제로 *in vitro*뿐만 아니라 *in vivo*에서도 많은 연구결과가 보고되고 있다 (Li *et al.*, 2002; Dybdahl *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008).

우리는 이번 실험에서 각각의 디젤차량 유래의

DEP (Table 1)를 마우스 유래 대식세포인 RAW 264.7 세포에 노출시켰을 때 50% 전후의 높은 세포독성이 나타난 것을 확인하였다 (Fig. 1). 비록 통계적으로 차이가 나지 않았으나 B 차량의 세포독성 평균이 다소 높은 현상에 대한 원인을 살펴보면 B 차량 유래 DEP의 탄소와 총 PAHs 함량이 다른 차량의 DEP보다 더 높은 것에 원인이 있을 것으로 추정 되었으나 다른 화학적 조성과의 관련성은 관찰되지 않았다 (Table 2). 나머지 차량 유래의 DEP에서 독성의 정도가 B 차량 유래 DEP보다 평균값이 약간 낮았으나 대조군이나 SRM 2975에 비해 월등히 높았다.

상기한 MTT법은 세포대사 나아가서 미토콘드리아의 활성도에 미치는 독성물질의 영향을 측정하는 가장 일반적인 방법이나 한편으로 자가세포사멸 측정은 독성물질이 세포에 미치는 영향을 측정하는 또 다른 보편적인 방법이다 (Mosmann, 1983). 자가세포사멸에 의한 세포독성 측정결과를 보면 MTT법에 의한 세포독성 측정결과와 달리 A 차량에서 TiO₂에 이르기까지 독성 정도가 점진적으로 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 2). 그 중에 독성의 정도가 가장 높은 것은 A 차량과 B 차량 유래 DEP이었으며, 이 두 종류의 디젤 차량은 생산연도와 상관없이 22만km 이상의 긴 주행거리를 가지고 있었다. 한편 A 차량은 다른 차량에 비해 상대적으로 낮은 PAH 함량을 가지고 있음에도 불구하고 높은 자가세포사멸 정도를 보여 준 점에서 특이성을 보였다.

상기한 두 가지 독성 측정법과의 관련성을 조사하기 위해 RAW 264.7 세포에 DEP를 노출시켰을 때 TNF- α 와 IL-1 β 발현 정도를 알아보았다 (Figs. 3, 4). 두 가지 독성 측정법의 독성 정도는 IL-1 β 발현 정도와는 상관관계가 아주 낮아 보인 반면 TNF- α 발현 정도와는 높은 상관관계가 예상되었다. 따라서 이들 두 가지 독성 측정법과 TNF- α 발현 정도 상관관계를 조사하였다. TNF- α 발현 정도와 세포독성평가 (Fig. 5A) 그리고 자가세포사멸 정도와 세포독성평가 (Fig. 5B) 사이의 상관관계 계수 (r)는 각각 0.93과 0.95이었으나 TNF- α 발현 정도와 자가세포사멸 정도 (Fig. 5C)는 r=0.96으로 가장 높음을 확인할 수 있었다. 이러한 관계를 생각하면, DEP의 존재 시 대식세포에 의해 분비되는 TNF- α 와 같은 사이토카인은 대식세포뿐만 아니라 호흡기 기관에 있는 여러 세포, 특히 폐 상피세포에 영

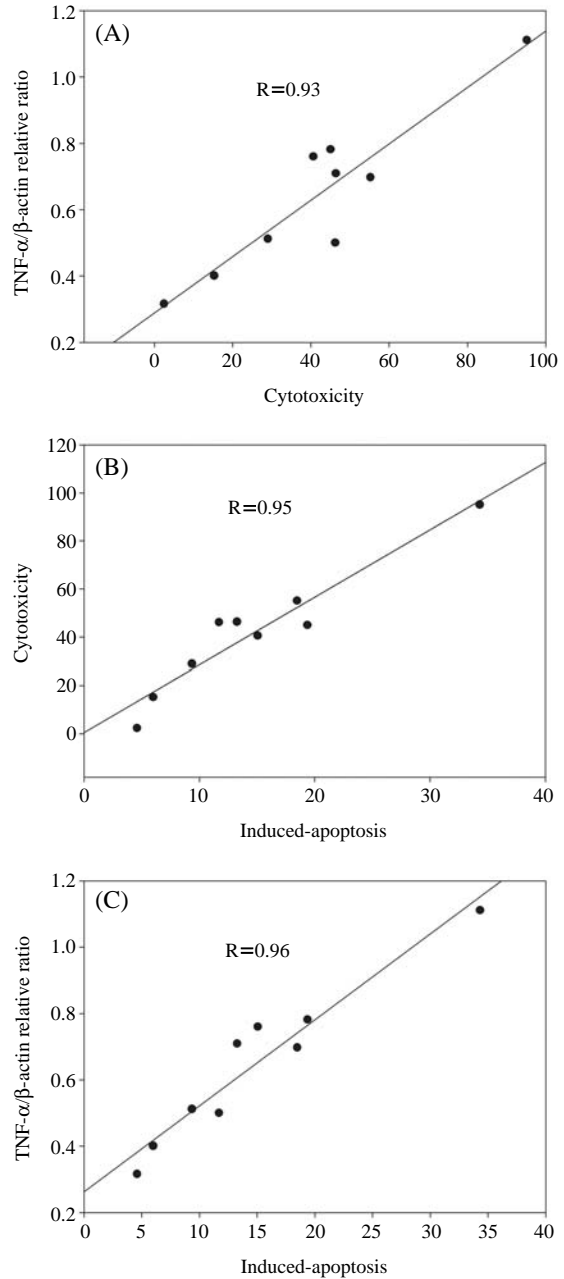


Fig. 5. Correlation between TNF- α / β -actin relative ratio and cytotoxicity (A), between cytotoxicity and induced-apoptosis (B), between TNF- α / β -actin relative ratio and induced apoptosis (C).

향을 가장 많이 미칠 것으로 생각된다. 더욱이 이러한 영향으로 인해 TNF- α 가 폐 상피세포에 염증을

일으키거나 세포사멸에까지 이르게 할 수 있다는 것을 과거와 현재의 연구결과(Yang *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2002; Matsuo *et al.*, 2003)로부터 추정할 수 있다.

일반적으로 DEP에 의한 독성을 추정하기 위한 방법으로 DEP의 화학적 조성을 조사하고 이를 *in vitro* 또는 *in vivo* 독성연구 결과와 관련을 지으려고 노력해 왔다(Diaz-Sanchez, 1997; Park *et al.*, 2006). 예를 들면, DEP의 PAHs 함량과 염증인자 발현의 관련성을 말할 수 있으며, 다른 예로 DEP의 전이금속 함량과 산화적 스트레스의 상관관계 등을 들 수 있다. DEP의 화학적 조성을 조사하는 것은 독성을 측정하기 위해 필요하지만 많은 노력과 고가의 장비가 필요하다. 따라서 일반적인 독성 실험실에서 측정이 가능한 자가세포사멸과 TNF- α 발현 정도 그리고 나아가 MTT assay 같은 독성 측정법으로 DEP의 독성을 추정하고 이들의 상관관계를 연구하면, 더욱 더 실용적으로 DEP나 관련 물질의 독성을 평가하는 것이 가능할 것이다. 한편 상기한 연구결과를 더 명확히 하기 위해, 추가적으로 실제 폐와 가장 비슷한 환경을 만들어주거나 *in vivo* 실험을 통해서 직접적으로 폐 상피세포와 대식세포간의 염증반응 그리고 자가세포사멸과 관련된 신호전달에 대해 연구해야 할 것이다.

감사의 글

이 연구는 환경부 Eco-STAR project(무·저공해 자동차사업단)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

김종순, 노민희. 저출력레이저와 전기자극에 의한 골격근 손상 흰쥐의 IL-1 β , IGF-1, IGF-2 활성. 한국콘텐츠학회논문지 2008; 8(11): 251-262.
 김 현. 분자생물학적 기법을 활용한 대기오염 관련 연구. 대한산업의학회 제28차 춘계학술대회 2002; 11-22.
 Ahn EK, Yoon HK, Jee BK, Ko HJ, Lee KH, Kim HJ and Lim Y. COX-2 expression and inflammatory effects by diesel exhaust particles *in vitro* and *in vivo*, Toxicol Lett 2008; 176(3): 178-187.
 Bao L, Chen S, Wu L, Hei TK, Wu Y, Yu Z and Xu A. Mu-

tagenicity of diesel exhaust particles mediated by cell-particle interaction in mammalian cells, Toxicology 2007; 229: 91-100.
 Boland S, Baeza-Squiban A, Bonvallot V, Houcine O, Pain C, Meyer M and Marano F. Similar cellular effects induced by diesel exhaust particles from a representative diesel vehicle recovered from filters and Standard Reference Material 1650, Toxicol In Vitro 2001; 15(4-5): 379-385.
 Chow JC, Watson JG, Ashbaugh LL and Magliano KL. Similarities and differences in PM₁₀ chemical source profiles for geological dust from the San Joaquin Valley, California, Atmos Environ 2003; 37(9-10): 1317-1340.
 Diaz-Sanchez D. The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease, Allergy 1997; 52(suppl 38): 52-56.
 Dinarello CA and Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*, Immunol Today 1991; 12(11): 404-410.
 Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W and Stone V. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure, Part Fibre Toxicol 2005; 2(1): 10.
 Dybdahl M, Risom L, Bornholdt J, Autrup H, Loft S and Wallin H. Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles *in vitro* and *in vivo*, Mutat Res 2004; 562(1-2): 119-131.
 Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Vincent R and Van Eeden SF. Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells, Am J Respir Cell Mol Biol 2001; 25(3): 265-271.
 Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N and Nel AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages, J Immunol 1999; 163(10): 5582-5591.
 Keogh DU, Ferreira L and Morawska L. Development of a particle number and particle mass vehicle emissions inventory for an urban fleet, Environ Modelling & Software 2009; 24(11): 1323-1331.
 Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM and Nel AE. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages, J Immunol 2002; 169(8): 4531-4541.
 Li YJ, Kawada T, Takizawa H, Azuma A, Kudoh S, Sugawara I, Yamauchi Y and Kohyama T. Airway inflammatory responses to oxidative stress induced by prolonged low-dose diesel exhaust particle exposure from birth

- differ between mouse BALB/c and C57BL/6 strains, *Exp Lung Res* 2008; 34(3): 125-139.
- Matsuo M, Shimada T, Uenishi R, Sasaki N and Sagai M. Diesel exhaust particle-induced cell death of cultured normal human bronchial epithelial cells, *Biol Pharm Bull* 2003; 26(4): 438-447.
- Montazeri-Gh M, Poursamad A and Ghalichi B. Application of genetic algorithm for optimization of control strategy in parallel hybrid electric vehicles, *J Franklin Inst* 2006; 343(4-5): 420-435.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
- Na K, Sawant AA, Song C and Cocker III DR. Primary and secondary carbonaceous species in the atmosphere of Western Riverside County, California, *Atmos Environ* 2004; 38: 1345-1355.
- Nam HY, Ahn EK, Kim HJ, Lim Y, Lee CB, Lee KY and Vallyathan V. Diesel exhaust particles increase IL-1 β -induced human β -defensin expression via NF- κ B-mediated pathway in human lung epithelial cells, *Part Fibre Toxicol* 2006; 3: 9.
- Nitta H, Sato T, Nakai S, Maeda K, Aoki S and Ono M. Respiratory health associated with exposure to automobile exhaust. I. Results of cross-sectional studies in 1979, 1982, and 1983, *Arch Environ Health* 1993; 48(1): 53-58.
- Park S, Nam H, Chung N, Park JD and Lim Y. The role of iron in reactive oxygen species generation from diesel exhaust particles, *Toxicol in Vitro* 2006; 20(6): 851-857.
- Ravindra K, Mittal AK and Van Grieken R. Health risk assessment of urban suspended particulate matter with special reference to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review, *Rev Environ Health* 2001; 16(3): 169-189.
- Saito Y, Azuma A, Kudo S, Takizawa H and Sugawara I. Long-term inhalation of diesel exhaust affects cytokine expression in murine lung tissues: comparison between low-and high-dose diesel exhaust exposure, *Exp Lung Res* 2002; 28(6): 493-506.
- Seaton A, MacNee W, Donaldson K and Godden D. Particulate air pollution and acute health effects, *Lancet* 1995; 345(8943): 176-178.
- Sheu HL, Lee WJ, Lin SJ, Fang GC, Chang HC and You WC. Particle-bound PAH content in ambient air, *Environ Pollut* 1997; 96(3): 369-382.
- Spengler JD and Sexton K. Indoor air pollution: a public health perspective, *Science* 1983; 221(4605): 9-17.
- Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B and Pryor WA. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter, *Free Radic Biol Med* 2001; 31(9): 1132-1138.
- Steenenberg PA, Zonnenberg JA, Dormans JA, Joon PN, Wouters IM, van Bree L, Scheepers PT and van Loveren H. Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) in vitro, *Exp Lung Res* 1998; 24(1): 85-100.
- Vinitketkumnue U, Kalayanamitra K, Chewonarin T and R Kamens. Particulate matter, PM10 & PM2.5 levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand, *Mutat Res* 2002; 519(1-2): 121-131.
- Yang HM, Ma JY, Castranova V and Ma JK. Effects of diesel exhaust particles on the release of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha from rat alveolar macrophages, *Exp Lung Res* 1997; 23(3): 269-284.