

오존 노출이 바이러스 감염에 의한 기도과민증에 미치는 영향

전북대학교 치과대학 약리학교실

이 혜 경

Effects of ozone on influenza virus-induced airway hyperreactivity in rats

Hye Kyung Lee

Department of Pharmacology, Chonbuk National University Dental School Chonju, Korea

Background : Ozone is one of the most ubiquitous oxidant in urban air and may exacerbate respiratory diseases such as asthma.

Objective : We examined whether ozone can influence airway hyperresponsiveness induced by influenza virus-infection.

Subject and Method : Rats were exposed to ozone, acutely to 1.0ppm and 0.25ppm for 23.5hrs. At 2hrs post cessation of ozone exposure, animals were infected with rat-adapted influenza virus intra-nasally. On day 3 post-virus inoculation, pulmonary mechanics were measured during an intravenous challenge with acetylcholine (<(ACh), 100-140mg/ml in saline>. Cumulative dose-response functions were obtained by doubling the rate of the intravenous infusion every 2min.

Results : ACh increased airway resistance in a dose-dependent manner. Neither of the concentrations of ozone altered the airway responses to ACh. Animals infected with virus developed hyperresponsiveness to ACh as was expected. Pre-exposure to 1.0ppm ozone for 23.5hrs augmented the virus-induced airway hyperresponsiveness, while 0.25ppm did not.

Conclusion : Acute exposure to ozone can synergistically act on virus-induced airway hyperreactivity. (**J Asthma Allergy Clin Immunol 20: 749-754, 2000**)

Key words : Ozone, influenza virus, airway hyperreactivity, acetylcholine, air pollutant

서 론

오존은 햇빛이 강하고 맑은 여름철 자동차의 배기 가스나 공장의 매연 등 질소산화물이나 탄화수소류 등의 중간물질들이 태양광선에 의한 '광화학' 반응에 의해 많이 발생되며, 강한 산화력을 가지고 있기 때문에 인체에 직접적으로 노출되는 경우 심하면 폐기능이 저하되기도 한다.

우리나라에서는 대기중 오존 농도가 0.12ppm 이상 올라가면 오존 주의보를, 0.3ppm 이상이면 경보, 0.5ppm 이상인 경우 중대경보를 발령하는데 그 동안 지속적으로 발령 횟수와 농도가 증가하고 있어 우려를 낳고 있다. 그 외에도, 직물 표백, 하수 처리, 공기 정화, 용접 등 오존이 방출될 수 있는 과정에 직업적으로 노출될 수 있음

통신저자 : 전북대학교 치과대학 약리학교실 이혜경
전북 전주시 덕진구 덕진동 664-14 (우 561-756)
e-mail : kyung@moak.chonbuk.ac.kr
접수 : 2000년 6월 21일, 통과 : 2000년 8월 7일

을 간과해서는 안되겠다.

고농도 오존은 단 한번의 짧은 시간동안 노출 만으로도 사람¹⁾ 및 실험 동물²⁻⁴⁾ 에서 기관지와 민증을 유발시킬 수 있다고 보고된 바 있다. 또한 오존은 이미 유발된 기관지천식 같은 호흡기 질환의 증상을 악화시킬 수도 있다⁵⁾.

본 연구에서는 오존이 인플루엔자 바이러스 감염이 일으키는 기관지과민증에 어떤 영향을 미칠 수 있는지 알아보고자, 백서를 0.25ppm 또는 1.0ppm 오존에 노출시킨 후 바이러스에 감염시켜 아세틸콜린(ACh)에 대한 기관지의 과민성의 변화를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 재 료

1) 실험동물

생후 90일 된 수컷 백서 (Fischer-344, 몸무게 250-300 g)는 구입시 혈청을 채취하여 바이러스들 (type 3 retrovirus, mouse pneumonia virus, encephalomyelitis, Sendai, mouse adenovirus, sialodacryo adenitis, Toolan H-1, Kilham rat virus, lymphocytic choriomeningitis, rat coronavirus)에 대한 항체가 없음을 확인하였다. 또한 호흡기와 소화기의 감염이 없음을 조직 해부화적인 방법을 사용하여 확인하였다. 백서들은 구입 후 4일간 안정을 취하게 한 후 오존 또는 정화된 공기에 노출되었다.

2. 방 법

1) 오존 노출

실험군 백서들은 두 군으로 나뉘어 0.25 또는 1.0ppm 오존에 23.5시간씩 각각 노출시켰고 대조군은 정화된 공기에 같은 시간동안 노출시켰다. 오존 노출완료 2시간 후, 이들 실험군과 대조군을 다시 각각 두군씩 나누어 백서에 순응시킨 인플루엔자 바이러스 또는 무감염 균질액을 주입시켰다.

2) 바이러스 감염

먼저, Influenza A/Port Chalmers/1/73 (H3N2) 바이러스를 10세대에 걸쳐 백서에 통과시켰다. 간단히 요약하면, 바이러스를 Eagle's minimum essential medium (E-MEM, Gibco)으로 희석하여 ether로 마취된 백서의 비강에 0.2ml (2.0×10^4 pfu (plaque-forming units)/0.2ml)씩 주입한 후 그 감염된 백서의 폐 균질액 (homogenate)을 채취하였다. 그 균질액을 다시 E-MEM으로 희석하여 0.2ml 씩 새로운 (naïve) 백서에 주입하여 그 폐 균질액을 다시 채취하는 방식으로 10세대에 걸쳐 바이러스를 백서에 통과시켰다.

이처럼 순응된 바이러스를 E-MEM으로 희석하여 오존 또는 정화된 공기에 노출시킨 백서들의 비강에 0.2 ml 주입시켰고, 상대되는 대조군 백서에는 무감염 백서의 폐 균질액 0.2 ml을 주입시켰다. 이 백서모델에서 기도과민증 유발이 가장 높은 감염 3 일 후에 각 백서들의 ACh에 대한 기도과민성을 측정하였다.

3) 기도과민성 측정

Urethane (1gm/Kg, 복강주사)으로 마취시킨 백서의 외경점막에 ACh 주입을 위한 cannula와, 기도에 polyethylene tube (14 gauge)을 각각 삽관한 후, constant volume body plethysmograph에 넣고 0.2ml succinyl choline을 정맥 주사하여 근마비를 시키고 0.6 ml/min/100gm으로 인공호흡시켰다. 기도의 압력 (airway pressure)은 기관과 실험동물용 인공호흡기 (Harvard 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA) 사이에 장착된 압력계 (pressure transducer) (Narco Biosystems, Houston, TX)로 측정하였고 폐강의 확장은 또 다른 transducer (Validyne, MP-45, Northridge, CA)를 사용하여 측정하였다. 기도의 기류는 시간에 대한 volume signal을 측정하여 계산하였다.

먼저 기본 폐기능을 측정한 후, 생리적 식염수로 희석 (100-140 mg/ml)한 ACh을 외경점막으로 연속 주입 시키는 동안 백서의 기도 저항

(airway resistance)를 측정하였다. ACh 주입율은 0.04 ml/min부터 시작하여 2분마다 거의 2배씩 증가시켰고 최고 주입율은 0.58 ml/min였다. 매 주입율이 지속되는 2분 동안의 기도 저항 최고치를 측정하여 ACh 양에 대한 cumulative dose-response 관계를 확립하였다. 각 백서의 dose-response curve에서 기본 기도저항을 두 배로 증가시키는 ACh 양 (effective dose doubling baseline airway resistance, ED₂₀₀ ACh, mg/kg/min)을 계산하여 실험군과 대조군에서 비교하였다.

매 실험은 반드시 다음과 같은 4 군으로 구성되어 실행되었다. 1) 실험군: 0.25 또는 1.0 ppm 오존+바이러스 (n=7/군), 2) 상대대조군I: 정화된 공기+바이러스 (n=6/군), 3) 상대대조군II: 오존+무감염 폐균질액 (n=5~6/군), 4) 절대대조군: 정화된 공기+무감염 폐균질액 (n=5~6/군). 동반된 절대대조군 백서들의 평균 ED₂₀₀ 값보다 40% (arbitrary standard)가 감소된 ED₂₀₀ 값을 보이는 백서의 기관지를 기도와민증으로 판별하였다. 선행된 실험에서 바이러스 감염 3일 후 기도 과민증 발생률이 가장 높은 것으로 나타나 본 실험에서 사용된 백서들은 모두 감염 3일 후 기도 과민성이 측정되었다.

4) 통계처리

실험결과는 student's *t*-test를 사용하여 통계 처리하였고, *p* 값이 0.05 미만이면 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

오존의 백서 기관지 기능에 대한 영향은 오존 노출 완료 2시간 후 또는 3일 후 측정되었다. 오존에 노출되었던 백서들(상대대조군II)의 기도 저항은 0.25 또는 1.0ppm에서 절대대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). 따라서 이들 농도에 대한 오존노출은 기관지 과민증을 유발시키지 않는 것 같다. 정화된 공기와 바이러스에 노출되었던 백서들(상대대조군I)

은 80% 이상에서 기관지과민증이 유발되었다. 0.25ppm 오존에 노출되었던 백서들은 바이러스 감염 후 37% (n=4/7)에서 기관지과민증이 나타나, 바이러스에만 감염되었던 백서들(상대 대조군II_(0.25)) 86% (n=6/7)에 비해 발생률이 오히려 감소하는 경향을 보였다. 1.0ppm 오존에 노출되었던 백서들은 모두 (n= 7/7) 바이러스 감염 후 기관지과민증을 보였고, 바이러스에만 감염되었던 백서들(상대대조군II_(1.0))은 83% (n=5/6)에서 기관지과민증이 나타났다.

대조군과 실험군 백서들의 기관지 기능을 ACh에 대한 기도저항을 측정 비교하여 관찰하였다 (Fig. 1, 2). 감염 3일 후 백서들의 기본 폐 기능 (ACh 주입 전)은 대조군과 실험군에서 통계적으로 다르지 않았다. 기도저항은 ACh 용량에 비례해서 증가하였다. 0.25ppm 오존에 노출되었던 백서들은 바이러스 감염 후, 바이러스에만 감염되었던 백서들(상대 대조군II_(0.25))에 비해 ACh에 대한 기도저항이 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). 그러나 1.0ppm 오존에 노출되었던 백서들은 바이러스 감염 후, 바이

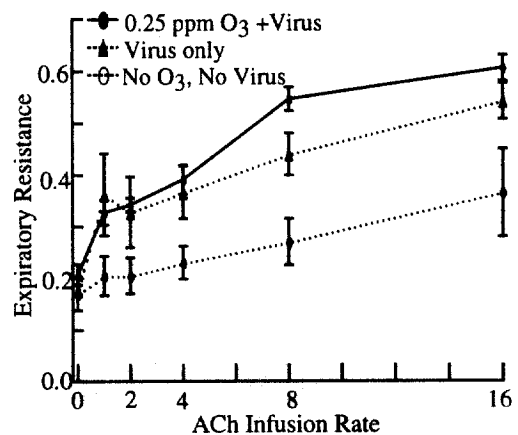


Fig. 1. Airway resistance (Cm H₂O/ml/min) to intravenous Acetylcholine was measured 3 days postvirus inoculation. Pre-exposure to 0.25 ppm O₃ for 23.5 hrs did not significantly affect airway responsiveness to ACh in virus-infected animals. The initial ACh infusion rate was 0.04ml/min (setting 1) and almost doubled every 2 min to the maximum rate of 0.58ml/min (setting 16).

러스에만 감염되었던 백서들(상대 대조군 II_{1.0})에 비해 ACh에 대한 기도저항이 증폭되었고 ($p < 0.05$) 특히 낮은 ACh dose에서 그러한 경향을

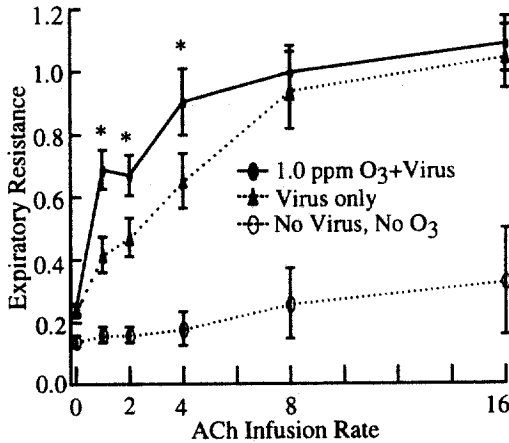


Fig. 2. Airway resistance (Cm H₂O/ml/min) to intravenous Acetylcholine was measured 3 days postvirus inoculation. Pre-exposure to 1.0 ppm O₃ for 23.5 hrs potentiated airway responsiveness to ACh in virus-infected animals. The initial ACh infusion rate was 0.04ml/min (setting 1) and almost doubled every 2 min to the maximum rate of 0.58ml/min (setting 16). * $p < 0.05$ vs virus only

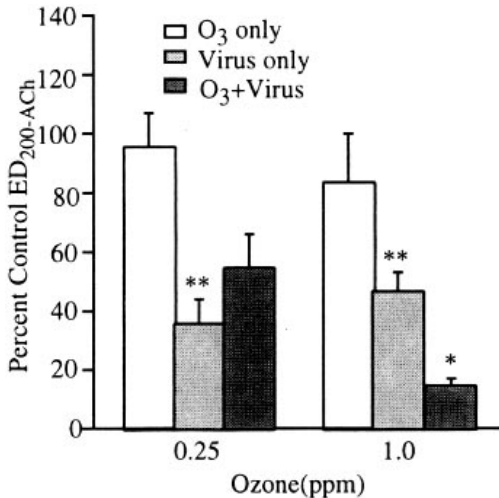


Fig. 3. Comparison in ED_{200-ACh} values between animals with or without O₃ and animals infected with virus. Pre-exposure to 1.0ppm for 23.5hrs decreased DE_{200-ACh} in virus-infected animals, indicating a left shift of airway responsiveness to ACh. * $p < 0.05$ vs Virus only. ** $p < 0.05$ vs controls (No O₃, No Virus)

보였다(Fig. 2).

기관지과민성에 대한 영향을 살펴보면 (Fig. 3), 0.25ppm 오존과 바이러스에 노출되었던 백서들의 ED₂₀₀ 값은 55±11 mg/kg/min (n=7)였고, 정화된 공기와 바이러스에만 노출되었던 백서들의 36±8 mg/kg/min (n=7)였으며 통계적으로는 유의하지 않았다. 한편, 1.0ppm 오존과 바이러스에 노출되었던 백서들은 기관지과민성이 악화되는 경향을 보였는데, 그 ED₂₀₀ 값은 14±1 mg/kg/min (n=7)로서, 정화된 공기와 바이러스에 노출되었던 백서들의 41±6 (n=6) 보다 통계적으로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 즉, 1.0ppm 오존 노출이 바이러스 감염에 의한 기관지과민증을 더욱 과민하게 악화시켰음을 알 수 있다.

고 찰

도시 공기 중 오존 농도가 인체에 해를 줄 수 있을 만큼 증가하여 이에 대한 사회적 관심이 커지고 있다. 사람이 오존에 노출되었을 때 기침, 폐기능 저하 등 호흡기 반응이 나타나는데, 0.12ppm 오존에의 노출이 아토피성 기관지천식 환자의 항원에 대한 예민성을 증가시킨다고 보고된 바⁶⁾ 있다. 실험 동물에서는, 3.0ppm, 15 분 동안의 오존 노출이 기니피에서 기관지 과민증상을 초래하였고³⁾, 생쥐에서는 1.0 또는 0.5ppm 오존에 3시간 노출시 바이러스 감염에 의한 조직병태학적 염증반응이 심화 되었다⁷⁾. 이러한 문헌 보고들을 바탕으로 오존이 기관지과민증을 악화시킬 것이라는 가정하에, 본 연구에서는 바이러스 감염에 의해 유발되는 기관지과민증을 증폭시킬 수 있는 오존의 양을 알아보고자 하였다. 그 결과, 1.0ppm 오존 농도에 23.5시간의 노출이 바이러스 감염에 의한 콜린성 기관지 과민성을 악화시키는 것을 발견하였다. 그러나, 이 오존 농도는 그 자체로서는 기관지 기능에 어떤 뚜렷한 영향은 미치지 않는 것으로 보인다. 1.0 ppm 오존이 기관지과민증 발생을 (결과 제 1문

단 참조)에 영향을 주는지는 본 실험 방법으로는 아직 확실히 규명하기 어려운데, 그 이유는 역치 이하 수준 (subthreshold dose)의 감염을 균일하게 얻기 어려워 오존과의 상승작용 (synergism)의 관찰이 불가능하였기 때문이다. 이를 위해 앞으로 바이러스 감염 정도를 조절할 수 있는 모델이 개발되어져야 할 것이다.

오존이 바이러스 감염에 의한 기관지과민증을 악화시키는 기전에 대해서 구체적으로 보고된 바는 없으나 여러 문헌자료를 토대로 예측할 수 있는 것은 세포 손상 가중과 염증도의 심화이다. 백서에서 0.5ppm 오존은 기관지 상피세포의 손상과 염증세포인 호중구의 침윤을 야기하는데¹⁾, 호중구의 침윤은 기관지천식 기전의 한 전단계로서 인식 되어 왔었다^{2,4)}. 인플루엔자 바이러스 감염 또한 백서 기관지 상피세포의 손상과 염증을 초래하므로¹⁰⁾ 오존과 바이러스 감염은 결국 세포손상과 염증을 가중시키고, 이들에 의한 체내 항산화능력의¹¹⁾ 감소는 손상된 세포의 회복을 지연시키게 된다. 또한 염증 세포의 축적은 유해산소(oxygen-radical)의 유리¹²⁾를 유도하여 기관지에 과량의 유해산소를 축적 시키는데, 유해산소에 의한 세포손상은 기관지과민증 유발과 관련된다는 보고들^{13,14)}이 있다.

그 외에도 오존에의 노출이 면역체계에 변화를 일으킬 수 있다. 오존에 자주 노출되는 어린이들은 그렇지 않은 어린이들에 비해 다른 분포의 T-cell을 갖는 경향이 있는데¹⁵⁾, 예를 들면 helper 세포와 natural killer 세포가 감소되고 suppressor 세포 등이 증가된다고 한다. 본 백서 모델에서 바이러스 감염은 기관지과민증 유발과 함께 면역체계에 여러 변화를 일으킨다^{16,17)}. 본 백서모델에서 오존 노출이 바이러스 감염과 중첩됨으로써 백서의 면역체계에 어떤 변화를 초래하는지 앞으로 연구가 필요하다고 사료된다.

한편 오존과¹⁸⁾ 바이러스 감염¹⁹⁾이 M₂-muscarinic 수용체 기능을 억제한다는 보고가 있었다. M₂-muscarinic 수용체의 활성화는 신경말

단에서 ACh 유리의 억제에 관여하므로, 오존 노출과 바이러스 감염은 ACh 유리를 증가시켜 결국 기관지 근 수축의 증폭을 가져올 수 있다. 본 실험에서 사용한 ACh의 정맥내 주입방법으로는 이 기전의 개입 여부를 확인할 수 없으나, 본 백서모델에서 유발된 postsynaptic 과민반응에 더해진다면 그 기관지과민성이 한층 더 증폭될 것이라고 사료된다.

결 론

본 실험 결과는 오존 노출이 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 기관지과민증과 상승작용이 있음을 암시해준다.

참 고 문 헌

- 1) Golden JA, Nadel JA, Boushey HA: Bronchial hyperreactivity in healthy subjects after exposure to ozone. *Am Rev Respir Dis* 118: 287-94, 1978
- 2) Fabbri LM, Aizawa H, Alpert SE, Walters EH, O'Byrne PM, Gold BD et al: Airway hyperresponsiveness and changes in cell counts in bronchiolar lavage after ozone exposure in dogs. *Am Rev Respir Dis* 129: 288-91, 1984
- 3) Lee HK, Murlas C: Ozone-induced bronchial hyperreactivity in the guinea pig is abolished by BW755C or FPL55712 but not by indomethacin. *Am Rev Respir Dis* 132: 1005-9, 1985
- 4) Tepper JS, Costa DL, Lehman JR, Weber MF, Hatch GE: Unattenuated structural and biochemical alterations in the rat lung during functional adaptation to ozone. *Am Rev Respir Dis* 140: 493-501, 1989
- 5) Kreit JW, Gross KB, Moore TB, Lorenzen TJ, D'Arcy J, Eschenbacher WL: Ozone-induced changes in pulmonary function and bronchial responsiveness in asthmatics. *J Appl Physiol* 66: 217-22, 1989

- 6) Molfino NA, Wright SC, Katz I, Tarlo S, Siverman F, McClean PA: Effect of low concentrations of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects. *Lancet* 338: 199-203, 1991
- 7) Selgrade MK, Illing JW, Starnes DM, Stead AG, Menache MG, Stevens MA: Evaluation of effects of ozone exposure on influenza infection in mice using several indicators of susceptibility. *Fundam Appl Toxicol* 11: 169-80, 1988
- 8) Holtzman MJ, Fabbri LM, O'Byrne PM, Gold BD, Aizawa H, Walters EH et al: Importance of airway inflammation from hyperresponsiveness induced by ozone. *Am Rev Respir Dis* 127: 686-90, 1983
- 9) Nadel JA: Inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 73: 651-3, 1984
- 10) Ibanes JD, Morgan KT, Burleson GR: Histopathological changes in the upper respiratory tract of F344 rats following infection with a rat-adapted influenza virus. *Vet Pathol* 33: 412-8, 1996
- 11) Hennet T, Peterhans E, Stocker R: Alterations in antioxidant defenses in lung and liver of mice infected with influenza A virus. *J Gen Virol* 73: 39-46, 1992
- 12) Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-26, 1982
- 13) Takahash T, Miura M, Katsumata U, Ichinose M, Kimura K, Inoue H et al: Involvement of superoxide in ozone-induced airway hyperresponsiveness in anesthetized cats. *Am Rev Respir Dis* 148: 103-6, 1993
- 14) Harlan JM, Callahan KS: Role of hydrogen peroxide in the neutrophil mediated release of prostacyclin from cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 74: 442-8, 1984
- 15) Zwick H, Popp W, Wagner C, Reiser K, Schomoger J, Bock A et al: Effects of ozone on the respiratory health, allergic sensitization, and cellular immune system in children. *Am Rev Respir Dis* 144: 1075-9, 1991
- 16) Burleson GR: Alteration of cellular interactions in the immune system: Natural killer activity and N lymphocytes. In Milman HA, Elmore E (ed.): *Biochemical mechanisms and regulation of intracellular communication*, p.51-96, Princeton Scientific Publishing, Princeton, New Jersey, 1987
- 17) Lebrech H, Burleson GR: Influenza virus host resistance models in mice and rats: utilization for immune function assessment and immunotoxicology. *Toxicology* 91: 179-88, 1994
- 18) Schultheis AH, Bassett DJP, Fryer AD: Changes in neuronal control of airway smooth muscle after exposure to ozone. *Br J Pharmacol* p104: 291, 1991
- 19) Fryer AD, Adamko DJ, Yost BL, Jacoby DB: Effects of inflammatory cells on neuronal M2 muscarinic receptor function in the lung. *Life Sci* 64: 449-55, 1999