

오존노출이 천식모형 쥐에서 항산화제반응에 미치는 영향

순천향대학교 의과대학 내과학교실¹, 전남대학교 의과대학 내과학교실², 생화학교실³
장안수¹ · 최인선² · 양성렬³ · 이준혁¹ · 박성우¹ · 어수택¹ · 김용훈¹ · 박춘식¹

The effect of ozone exposure on antioxidant responses in murine model of asthma

An-Soo Jang¹, Inseon-S Choi², Sung-Yeul Yang³, June-Hyuk Lee¹, Sung-Woo Park¹,
Soo-Taek Uh¹, Yong-Hoon Kim¹, Choon-Sik Park¹

Department of Internal Medicine¹, Soonchunhyang University Hospital, Bucheon, Department of
Internal Medicine², Biochemistry³, Chonnam National University Medical School, Gwangju,
Republic of Korea

Background and Objective : Ozone exposure has been shown to modify the protective antioxidant defense network in the respiratory tract. The aim of the present study was to evaluate the effects of ozone exposure on antioxidant status in murine model of asthma.

Methods : Enhanced pause of breathing (Penh) as marker of airway obstruction was measured to determine whether bronchoconstriction occurred in BALB/c mice using barometric whole-body plethysmography after ozone and ovalbumin (OVA) exposure. Antioxidant levels were determined using high performance liquid chromatography with electrochemical detection in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and lung tissue homogenates.

Results : Uric acid and γ -tocopherol concentrations were significantly increased in BAL fluid following ozone and OVA exposure ($p<0.01$). Malondialdehyde concentrations in lung tissue homogenates were significantly increased in ozone and OVA exposed group than in the saline exposed group ($p<0.05$). Uric acid concentrations were increased in ozone and OVA exposed group than in the saline exposed group. Increases in Penh were significantly higher in ozone and OVA exposed group than in saline exposed group. The proportion of neutrophils in BAL fluid was significantly higher in ozone exposed group than in saline exposed group ($p<0.01$). The level of ascorbate was correlated with the level of γ -tocopherol ($r=0.65$, $p<0.05$). Penh was not related with antioxidant responses.

Conclusion : The data indicate that antioxidant responses may serve as protective mechanism to minimize the effects of ozone exposure in murine model of asthma. (**J Asthma Allergy Clin Immunol 23: 749-58, 2003**)

Key Word : Ozone; Antioxidants; Airway responsiveness

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-000-0155-0) 지원으로 수행되었음

통신저자 : 순천향의대 내과 장안수

경기도 부천시 원미구 중동 1174 (☎ 420-767)

e-mail : jas877@schbc.ac.kr

접수 : 2003년 5월 21일, 통과 : 2003년 8월 25일

서 론

대기오염 물질중 하나인 오존은 최근 자동차 수가 증가하면서 자동차 배기가스에서 나오는 질소산화물과 탄화수소가 태양광선에 반응하는 광화학 산화반응으로 생성되어 건강에 위협한 영향을 미치고 있어 우리나라를 포함한 전세계적으로 오존 등 대기오염을 적절히 대처함으로써 환경을 보호해야한다는 관심이 높아지고 있다.¹⁾ 특히 오존 노출이 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환 등 호흡기질환이 있는 사람에서 폐기능저하, 기도과민성증가, 기도염증을 유발하고,^{2,3)} 대기오염이 증가될 때 천식환자가 응급실 내원, 병원입원, 약물사용 등이 증가되는 것으로 보고되고 있다.⁴⁻⁶⁾

저자 등은 동물모형모델에서 오존 노출 후 기도폐쇄가 오존 농도증가에 따라 증가하며 오존 노출 후 72시간까지 지속되며, 오존 노출 후 폐상피세포가 증식함을 보고하였다.^{7,8)}

반응성 산소종(O₂⁻, H₂O₂, OH·, hypohalous)의 생성은 인체의 중요한 방어기전이며 반응성 산소종의 과생성은 기관지 수축, 기도과민성의 증가, 점액의 증가, 섬모운동의 감소, 점액제거의 감소 등을 초래하여 기도의 기능장애를 일으키는 것으로 알려져 있다.^{9,10)} 이러한 반응성 산소종의 증가와 함께 항산화제의 증가가 기도과민성과 기도염증의 방어기전의 하나로 알려져 있으며, 천식환자에서 산화 및 항산화제의 변화는 혈액, 객담, 기관지폐포세척액에서 관찰되었다.^{11,12)} 따라서 이 연구에서는

BALB/c mouse에 난알부민을 감작하여 천식 모형모델을 만들고 이 모델에 오존을 노출하여 메타콜린 기관지 유발시험, 기관지폐포세척액, 폐조직을 얻어 기도과민성과 기도염증을 확인하고, 기관지폐포세척액 및 폐조직에서 산화 및 항산화효소를 측정하여 천식에서 항산화제의 역할을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 동물모델 프로토콜

실험동물은 5내지 6주의 BALB/c mouse (대물싸이언스, 대전)를 사용하고, 공급처로부터 쥐를 받은 후 3일 이내에 실험을 실시하고 실험하기까지는 전남대학교 의과대학 동물 사육사에서 사육하였다. BALB/c mouse의 좌측 둔부에 난알부민(OVA)(grade III, Sigma) 10μg을 1일과 14일에 생리식염수에 섞어 피하 주사하고, 동시에 Al(OH)₃ 1mg을 피하 주사하여 감작시킨다. 21, 22, 23일째에 pariboy 연무기(출력=0.42g/min, mass median aerodynamic diameter=4.8μm, 압력=0.75 bar)를 사용하여 노출상자 40×40×30cm 안에서 OVA나 오존을 노출시키며 OVA는 1%(wt/vol)으로 20분 동안 흡입하였으며 오존은 2ppm농도로 3시간동안 노출하였다. OVA와 오존 노출군은 OVA노출 후 바로 오존을 노출하였다. 실험군은 세군(각군: 6마리)으로 나누었으며 24일째 폐기능검사와 메타콜린 유발시험을 실시하였으며 25일째 기관

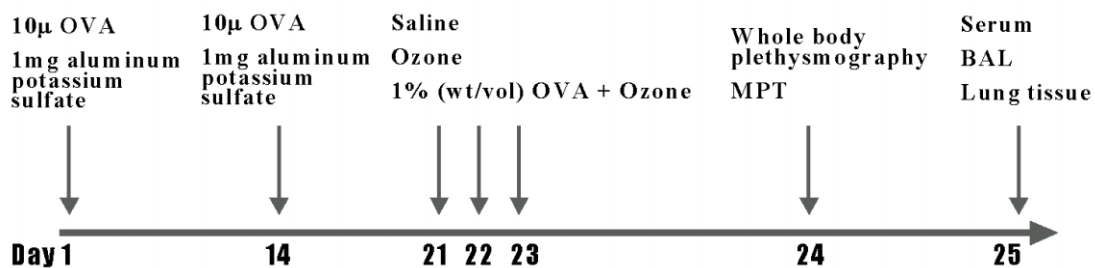


Fig. 1. Schematic drawing of the sensitization protocol. Animals were exposed either to 1%(wt/vol) ovalbumin three times for 20 min or ozone(2ppm) three times for 3hr or to both agents.

지폐포세척액과 폐조직검사를 실시하였다(Fig. 1).

2. 오존노출

오존은 Sander사의 오존 발생기(Model 25; Sander, Eltze, Germany)를 사용하여 발생시켰다. 이때 10초마다 오존분석기(Model 49C; Thermo Environmental Instruments Inc., Franklin, Mass)로 오존 농도를 측정하여 일정한 농도를 유지하도록 하며, 오존 분석기의 눈금교정을 위해서는 Model 165 오존 발생기(Thermo Environmental Instruments Inc., Franklin, Mass)를 사용하였다. 노출상자는 40×40×30cm 크기의 유리로 제작하였으며, 노출상자와 오존 발생기 그리고 오존 분석기와의 상호 연결(tubings and fittings)은 테플론관을 사용하였다. 오존을 3시간 동안 노출시킨 상태에서 오존 분석기를 사용하여 실제 측정한 오존 농도를 측정하였다.

3. 메타콜린 기관지 유발검사

동물이 자유롭게 움직일 수 있는 수분 섭취가 가능하고 장시간 폐기능검사가 가능한 one chamber 체용적변동 기록기를 이용하여 기도 폐쇄의 지표인 enhanced pause(Penh) 등을 포함하여 다양한 호흡지표들의 변화를 측정하였다. 메타콜린 기관지 유발검사는 2분 동안 pari boy 연무기를 통해 메타콜린을 3.12mg, 6.25mg, 12.5mg, 25mg, 50mg을 노출상자에 노출한 후 폐용적변동기록기에 3분 동안 기록된 Penh를 평균하여 측정하였다.

4. 기관지폐포세척술

오존 및 OVA 노출 후 폐기능검사와 메타콜린기관지유발검사 측정 후 하루 뒤 thiopental sodium 50mg/kg을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 곧바로 흉곽을 절개하여 폐와 기관을

노출 시켰다. 기관 상단부를 통해 PE-20 폴리에틸렌 도관을 삽입하여 고정시키고, 4℃의 생리식염수 5ml(1ml씩 5회)로 기관지폐포세척술을 시행하였다. 회수된 세척액 양을 기록하고, 바로 4℃, 1500rpm으로 10분간 원심분리(VS-6000 CF, Vision, Korea)하여 상층액은 버리고 남아 있는 세포 압착결정을 인산완충액 0.5ml(pH 7.4)로 녹인 다음, 이중 50μl를 3% acetic acid용액 950μl와 섞어서 Hemocytometer(Naubauer chamber)를 사용하여 현미경(×100)아래서 총세포수를 세었다. 표본 튜브내에 남아 있는 세포수가 ml당 10⁶개가 되도록 인산완충액으로 희석한 후 400μl를 따서 4℃, 700rpm으로 5분간 cytopspin(CF-120, SAKURA, Japan)하여 슬라이드를 만들었다. 이것을 Diff-Quick 염색하여 400배 현미경하에서 각 슬라이드의 백혈구 수를 500개씩 세어 세포분획을 계산하였다.

5. 단백측정

단백측정은 bovine 혈청 알부민 등과 BCA 시약을 이용한 Smith 등의 방법¹³⁾을 이용하여 측정하였다.

6. TNF-α, IL-1β, IL-2 측정

각 사이토카인은 기관지폐포세척액 200 μL를 효소면역검사로(QuantikineTM; R&D Systems, Inc., MN)¹⁴⁾ 측정하였다.

7. 조직처리

폐조직을 얻어 포르말린 고정 후 3μm 두께로 절단하여 Probe On Plus 슬라이드(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)에 포매하였다.

8. 항산화효소 및 산화능측정

항산화제 측정 - 고성능 액체 크로마토그래프

(High Performance Liquid Chromatograph, HPLC)를 이용하여 수용성 항산화제인 아스코르빈산(ascorbic acid, vitamin C), 요산(uric acid)과 지용성 항산화제에 속하는 레티놀(retinol, vitamin A), 알파 및 감마 토코페롤(α and γ -tocopherol, vitamin E) 등을 측정하였다. HPLC는 2150 HPLC pump(LKB Biotechnology, Sweden), 2152 HPLC controller(LKB, Sweden)와 CoulArray[®] detector(ESA, USA)를 사용하였다. 기관지 폐포 세척액은 HPLC 측정전에 불순물을 제거하기 위해 전처리 하고 수용성 항산화제의 측정을 위해서는 200 μ L의 시료(혈청 상층액)에 0.6M PCA와 1mM EDTA가 섞어진 동량의 용액과 혼합하여 4°C에서 12,000g의 속도로 30분간 원심분리한 뒤 얻은 상층액을 측정하여 사용하였다. 지용성 산화제의 측정을 위해서는 200 μ L의 시료에 BHA(butylated hydroxyanisole)가 혼합된 0.2mL의 용액을 혼합하여 1분간 vortex에서 섞은 후 1mL의 핵산을 첨가하여 다시 10분간 4,000rpm의 속도로 원심분리한 뒤 0.8mL의 상층액을 얻어내어 N₂가스를 이용하여 핵산 성분을 증발 시켰다. 증발 후 남은 시료에 BHA 0.2mL의 희석액을 첨가한 후 다시 5분간 섞은 다음 측정하였다. HPLC는 수용성 항산화제의 경우 PhaseSep[®] ODS2, 3 μ m, 150 $\times$ 4.6mm 칼럼을 사용하며, Honegger 등¹⁵⁾의 방법을 약간 변형시켜 측정하였다. 이동상으로는 0.1M monophasic sodium phosphate에 5% 메탄올과 0.1mM EDTA를 섞은 후 σ -phosphoric acid를 이용하여 pH 2.5로 적정한 용액을 사용하였다. 유속은 0.8 mL/min로 하고 검출을 위한 각 채널의 전압은 채널 1부터 4까지 각각 200, 400, 600, 800mV로 설정하였다. 반응온도는 30°C로 하고 측정에 쓰인 시료는 20 μ L로 하였다.

지용성 산화제의 측정은 수용성의 경우와 동

일한 칼럼을 사용하고 Bieri 등¹⁶⁾을 참고하였다. 이동상으로는 A와 B의 두 가지를 사용하여 미리 프로그램화 된 시간에 따른 농도구배를 주었다. 이동상 A는 메탄올과 0.2M ammonium acetate를 9:1의 용적비로 혼합한 뒤 약 염산을 이용하여 pH 4.4로 적정하고, 이동상 B는 메탄올과 1-propanol, 1M ammonium acetate를 각각 78:20:2의 용적비로 혼합하여 pH 4.4로 적정한 뒤 사용하였다. 유속, 검출기, 각 채널의 전압, 온도, 시료량 등은 수용성의 경우와 같은 조건으로 하였으며 모든 이동상에 쓰이는 용액들은 진공여과 시킨 후 사용하였다.

지질과산화(lipid peroxidation)억제능 측정 - 금속 촉매 산화계(metal-catalyzed oxidation system)로 리포솜(liposome)을 산화시키는 과정에서 혈청의 지질과산화 억제능을 구하여 혈청의 항산화능을 알아보았다. 50mM potassium phosphate 완충액(pH 7.4), 100nmol Pi/mL의 리포솜, 0.2mM 아스코르빈산 및 50 μ M FeSO₄를 포함하는 반응액에 1mg의 단백질을 포함한 혈청을 가한후 37°C 진동수조에서 1시간 동안 반응시키고, 이때 반응액의 총 부피는 1.0mL로 하였다. 1시간 후 2mM EDTA를 첨가하여 반응을 정지시키고 여기에 TBA(thiobarbituric acid, 0.375% (w/v) TBA-15% (w/v) TCA-0.25 N HCl)시약을 가한 후 잘 섞는다. 이를 100°C에서 15분간 가열한 뒤 수돗물에 담궈서 식히고 원심분리하여 그 상층액을 얻어, 이를 535nm의 파장에서 분광광도계(Spectronic 601, Milton-Roy, USA)로 측정하였다. 지질과산화물의 양은 MDA(malondialdehyde)의 분자흡광계수($E_{M}^{cm}=1.53\times 10^6$)를 이용하여 계산하였다.¹⁷⁾

결 과

1. BALB/c mouse에서 오존과 난알부민

감작에 따른 폐기능과 기관지 반응성의 차이

1, 14일에 $10\mu\text{gOVA}$ 와 $1\text{mg aluminum potassium sulfate}$ 로 감작 후 21, 22, 23일에 생리식염수, 오존, 1%(wt/vol) OVA과 오존으로 첼린지 후 24일째에 폐기능검사와 메타콜린 기관지 유발검사를 시행하였으며 25일째에 기관지폐포세척액을 얻었다. 메타콜린 기관지 유발검사에서 OVA과 오존을 같이 노출시켰을 때 생리식염수, 오존군에 비해 메타콜린 3.12mg, 6.25mg, 12.5mg, 25mg에서 유의하게 기도과민성이 높았다(Saline vs Ozone vs OVA+Ozone; Penh 0; 0.79 ± 0.02 vs 0.86 ± 0.04 vs 0.88 ± 0.03 , Penh 3.12; 1.13 ± 0.13 vs 1.14 ± 0.10 vs 1.23 ± 0.02 , Penh 6.25; 1.16 ± 0.03 vs 1.23 ± 0.12 vs 1.53 ± 0.10 , Penh 12.5; 1.29 ± 0.04 vs 1.71 ± 0.27 vs 1.88 ± 0.16 , Penh 25; 1.53 ± 0.10 vs 1.97 ± 0.34 vs 2.10 ± 0.14 , Penh 50; 1.93 ± 0.11 vs 2.26 ± 0.40 vs 2.59 ± 0.14 , $p<0.01$, Fig. 2).

2. 난알부민 감작과 오존노출에 의한 기관지 폐포세척액 세포분획

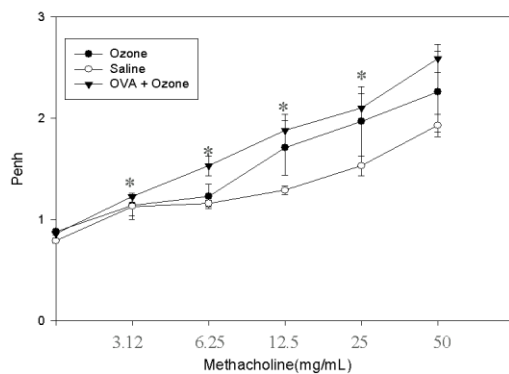


Fig. 2. Methacholine-induced airway responses measured by whole body plethysmography in BALB/c mice. Means $\pm$ SEM; n=6 mice per group. Significant difference between the OVA/ozone and the saline and, ozone group indicated as * $p<0.01$.

기관지폐포세척액에서 OVA과 오존 노출군에서 생리식염수 또는 오존군에 비해 총세포수가 많았다(Saline vs Ozone vs OVA+Ozone; $1.1\pm 0.04\times 10^4$ vs $1.2\pm 0.03\times 10^4$ vs $1.7\pm 0.12\times 10^4$, $p<0.05$). 대식세포분획은 OVA과 오존 노출군에서 생리식염수 또는 오존군에 비해 유의하게 낮았다(Saline vs Ozone vs OVA+Ozone; 95.4 ± 2.34 vs 91.3 ± 5.45 vs 84.3 ± 6.09 , $p<0.05$). 호산구림프구 분획은 OVA과 오존 노출군에서 생리식염수 또는 오존군에 비해 유의하게 높았다(호산구; Saline vs Ozone vs OVA+Ozone; 1.4 ± 0.28 vs 1.2 ± 0.03 vs 8.2 ± 1.21 , $p<0.05$, 림프구; Saline vs Ozone vs OVA+Ozone; 0.8 ± 0.02 vs 0.7 ± 0.03 vs 1.5 ± 0.06 , $p<0.05$). 호중구분획은 OVA과 오존 노출군에서 생리식염수군에 비해 유의하게 높았으며, 오존군에서 생리식염수군에 비해 유의하게 높았다(Saline vs Ozone vs OVA+Ozone; 2.4 ± 1.32 vs 6.8 ± 1.34 vs 5.9 ± 2.01 , $p<0.05$).

3. 오존 노출 후 기관지, 폐의 형태학적 변화

OVA와 오존노출 세기관지에서 점액분비의 증가가 관찰되었으며 OVA와 오존노출 세기관지 폐세엽과 폐포에 호산구, 호중구, 림프구의 침윤이 관찰되었다(Fig. 3).

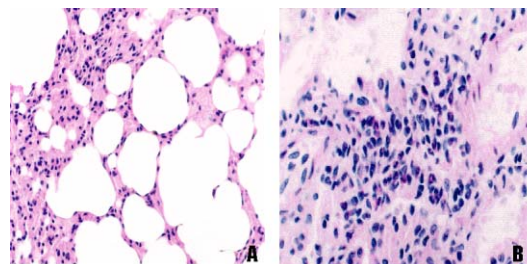


Fig. 3. Bronchioles exposed to OVA and Ozone. Figure A shows interstitial thickening. Figure B shows eosinophils, neutrophils, and lymphocytes infiltration in interstitium and alveoli. Original magnification, $\times 100$.

4. 기관지폐포세척액내 cytokine변화

IL-1 β 는 OVA과 오존 노출군에서 오존, 생리식염수군에 비해 유의하게 높았다(Table 1). IL-2는 생리식염수군에서 OVA과 오존 노출군 및 오존군에 비해 유의하게 높았으며, 오존군에 비해 OVA와 오존 노출군에서 유의하게 높았다. 기관지폐포세척액에서 단백질량은 OVA와 오존 노출군에서 생리식염수나 오존군에 비해 유의하게 높았다(Saline vs Ozone vs OVA+Ozone; $11.06 \pm 0.67 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ vs $13.47 \pm 0.92 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ vs $16.35 \pm 0.84 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $p < 0.01$).

5. 알레르겐 감작과 오존 노출에 의한 항산화제 반응

기관지폐포세척액에서 수용성 항산화제 아스코르빈산과 요산, 지용성 항산화제인 레티놀과 γ 토코페롤이 OVA와 오존노출군에서 유의하게 높았다(Table 2). 폐조직에서 지질과산화 억제능 측정지표인 malonyldialdehyde(MDA)는 오존과 난알부민 노출군에서 유의하게 높았다(폐포; Saline = 2.975 ± 0.054 ; Ozone =

3.2790 ± 0.012 ; OVA + Ozone = 3.6907 ± 0.125 , Fig. 4).

고 찰

천식을 비롯한 알레르기 질환들이 점차 증가되는 추세에 있고, 천식에 의한 사망률도 증가되고 있는 추세이다. 미국의 보고에 의하면 천식에 의한 사망률이 1982년에 10만명당 1.34

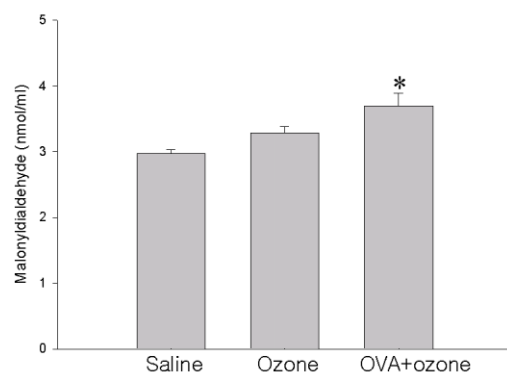


Fig. 4. MDA levels in lung homogenate(nmol/ml).
* Significant differences between the OVA/Ozone group and the saline group($p < 0.05$).

Table 1. Cytokine profiles in bronchoalveolar lavage

	IL-2 (pg/ml)	IL-1 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
Saline	$76.24 \pm 3.89^*$	43.1 ± 1.19	9.2 ± 0.54
Ozone	34.3 ± 0.80	46.9 ± 1.77	10.26 ± 1.45
OVA + Ozone	$46.88 \pm 2.09^\dagger$	$61.5 \pm 7.06^\ddagger$	9.7 ± 0.06

* Significant differences between the OVA/Ozone or Ozone group and Saline group($p < 0.01$).

† Significant differences between the Ozone group and OVA/Ozone group($p < 0.01$).

‡ Significant differences between the OVA/Ozone group and Ozone group($p < 0.05$).

Table 2. Antioxidant levels in bronchoalveolar lavage fluid(nmol/ml; Mean $\pm$ SEM)

	Ascorbic acid	Uric acid	Retinol	γ -tocopherol	α -tocopherol
Saline	17543.5 ± 3478.7	5287.8 ± 957.3	957.2 ± 169.4	1632.5 ± 321.0	755.2 ± 365.3
Ozone	18937.4 ± 2765.1	$11345.6 \pm 879.1^*$	1532.2 ± 657.3	$3125.3 \pm 539.3^*$	827.4 ± 145.7
OVA + Ozone	$21674.3 \pm 2392.3^\ddagger$	$13509.2 \pm 1257.4^\dagger$	$2180.3 \pm 856.0^\dagger$	$3773.2 \pm 767.5^\dagger$	1027.5 ± 432.6

* Significant differences between the Ozone group and Saline group($p < 0.05$).

† Significant differences between the OVA group and OVA/Ozone group($p < 0.05$).

‡ Significant differences between the OVA/Ozone group and Saline group($p < 0.05$).

명이었던 것이 1991년 1.88명으로 40%나 증가하였다.¹⁸⁾ 같은 기간 동안에 천식 유병률이 42% 증가되었는데, 이러한 증가 원인으로는 알레르기를 일으키는 원인물질들이 더 많아지고, 주거 및 식생활 형태의 변화 등이 생각되어지고 있으며 특히 흡연, 자동차 배기가스에 의한 대기오염 등도 중요한 원인으로 알려져 있다. 우리나라도 학동기 아동의 경우 천식은 1980년대 초반 5.7%에서 1990년에는 10.1%로 1995년에는 15.5%로 증가되고 있는 추세이다.^{19,20)}

대기오염물질 중 하나인 오존은 자동차 배기가스 등 배출된 오염물질과 광화학 산화반응에 의해서 생성되어 오존노출이 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환 등 호흡기질환이 있는 사람에서 폐기능저하, 기도과민성증가, 기도염증을 유발^{2,3)}하며 대기오염이 증가될 때 천식환자가 응급실 내원, 병원입원, 약물사용 등 증가되는 것으로 보고되고 있다.⁴⁻⁶⁾ 저자 등은 오존노출에 의한 기도폐쇄가 오존농도에 따라 증가됨을 보고하였으며⁷⁾ 본 연구에서 저자 등^{7,8)}의 연구를 기초로 오존 농도를 2ppm 노출한 동물모형을 이용하였으며 오존과 난알부민을 동시에 노출 후 대조군보다 유의하게 기도과민성이 증가되어 오존이 천식동물모델에서 기도과민증의 상승작용에 관여함을 시사하는 소견으로 여겨진다. 또한 데이터를 기술하지 않았지만 난알부민 군에 비해서도 난알부민과 오존군이 기도과민성이 증가되어 오존이 천식모형 쥐에서 기도과민성에 상승작용에 관여함을 알 수 있었다.

오존 노출에 의해 알레르기성 염증은 호중구, 림프구, 호산구, 비만세포 등 여러 염증세포가 관여하고, 오존 노출후 기관지 폐포세척액에서 호중구, IL-8, IL-6 등이 증가되며,²¹⁾ 천식발작과 연관됨이 알려져 있다.³⁾ 0.4 ppm 오존 노출 18시간에 기관지 폐포세척액 호중구가 증가되며, 이것은 기도상피세포 투과성과 연관되는데 이 투과성은 혈관으로부터 단백질투과와

가, 세포손상증가 등이 원인이 된다. 877명의 소아를 대상으로 한 역학조사에서 오존 노출 후 소변에서 호산구 단백 X가 증가됨을 보고하여 오존이 호산구성염증에 관여함을 보고하였다.²²⁾ 본 연구에서도 기관지 폐포세척액에서 중성구, 호산구, 임프구가 유의하게 증가됨을 확인하였고 폐조직소견에서도 비슷한 조직소견을 보여 오존노출 후 기도염증에 호중구, 호산구, 임프구 등이 관여함을 확인할 수 있었다. 또한 기관지폐포세척액에서 오존과 난알부민 흡입 후 단백질량의 증가되어 혈관투과성의 증가가 이러한 세포의 침착에 관여할 수 있음을 시사하는 소견으로 생각된다. 저자 등⁸⁾의 연구에서 오존 노출 후 기도상피세포증식을 나타내는 지표인 증식세포핵항원이 오존농도에 따라 증가하여 기도상피세포가 관여함을 확인하였다. 따라서 호중구, 호산구, 임파구, 상피세포 등 다양한 세포가 오존노출 기도염증에 관여함을 알 수 있으며 각 세포의 역할에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

TNF- α 와 IL-1 β ²³⁾은 염증반응 초기에 호중구, 호산구에 직접 작용하거나 세포간 접착분자(ICAM), 내피세포접착분자(E-selectin) 등을 통하여 혈관 내피에 과립구의 접착에 작용한다. Arsalane 등²⁴⁾은 in vitro에서 오존 노출 후 TNF, IL-1, IL-6, 및 IL-8 등이 증가되어 오존유발 기도 염증에 사이토카인이 관여함을 보고하였다. 오존 노출 후 기도염증에 호중구의 증가와 활성화가 관여하며, selectins 등이 호중구 접착의 초기에 중요한 역할²⁵⁾을 하며 그 후에 면역글로불린 계열의 접착분자의 증가에 의해 혈관내피세포에 과립구의 접착을 강하게 하고, 혈관내피세포로의 이동을 하게 된다. 본 연구에서 기관지폐포세척액에서 IL-1 β 가 오존과 난알부민 노출 쥐에서 증가되어 오존 노출 초기에 관여하는 싸이토카인임을 알 수 있었다. 또한 TNF- α 는 오존 노출군에서 약간 상승하였으며, IL-2는 오존군에 비해 오존과

난알부민 군에서 증가하였으나 생리식염수군에서도 증가하여 더 많은 대상으로 하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

오존은 폐에 노출되어 반응성 산소종을 생성하고 연이어 기도의 염증을 유발하는 것으로 알려져 있으며 급성오존 노출 후 항산화제인 아스코르빈산, 요산, reduced glutathione 등의 증가를 보여 반응성 산소종이 기도에 미치는 영향에 대한 방어기전으로 작용함을 간접적으로 알려주는 지표로 알려져 있다.²⁶⁾ 최근에 산화스트레스와 항산화제가 기도폐쇄와 기도염증에 미치는 효과에 대한 연구가 진행되고 있으며 오존, 질산성산소, 흡연에 노출후 기도내 상피세포상층액에서 항산화제가 방어적 역할이 있음이 알려져 있다.²⁷⁾ 본 연구에서 아스코르빈산과 요산, γ 토코페롤이 증가되어 오존에 의한 산화스트레스에 항산화제가 증가하여 기도염증의 방어기전으로 작용될 수 있음을 시사하였다.

항산화제와 폐기능과의 연관성은 연구되어지고 있는데 아직은 연관성에 대해 논란이 있다.²⁸⁾ 본 연구에서도 항산화제와 폐기능과는 유의한 관계는 관찰되지 않았다.

천식환자에서 백혈구에서 superoxide 증가, 혈액에서 산화질소산물증가, 지질과산화증가 등이 관찰되어 항산화제의 역제가 치료에 이용될 수 있음을 시사하였다.²⁹⁾ 산화스트레스후 비타민 C, E 등이 강력한 항산화제로 알려져 있다. 이러한 비타민의 섭취가 오존 등 산화스트레스에 오존이 상피세포에 접촉하는 것을 억제할 가능성을 시사하는 보고가 있으며³⁰⁾ 또한 4000명의 젊은 성인을 대상으로 한 연구에서 비타민 C의 섭취가 천식의 유병률의 증가, 흡연과 연관된 폐증상의 감소를 가져와 항산화제역할이 있음을 보고하였다.³¹⁾ 산화스트레스지표인 MDA는 천식환자 호기농축액에서 대조군에 비해 유의하게 높았으며(30.2 ± 2.4 nM vs 19.4 ± 1.9 nM) 치료 후 유의하게 감소하였다.³²⁾ 본 연구에서도 폐조직에서 산화스트레스의 지표인

MDA가 증가되어 오존 노출에 의한 산소라디칼로 인해 폐조직에 지질과산화가 일어남을 반영하는 것으로 생각된다. 항산화제의 투여에 대한 오존노출동물모형에서의 산화 및 항산화제의 변화에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 오존노출 후 산화 및 항산화효소의 변화가 일어나며 이러한 변화가 어떻게 일어나는지, 세포단위에서의 세포신호전달체계에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

결론

천식모형모델에서 오존노출 후 기관지폐포세척액에서 항산화제 아스코르빈산, 요산, 레티놀, 토코페롤, 폐조직에서 MDA 등이 증가하여 오존 노출 후 산화 및 항산화효소의 변화가 일어남을 알 수 있었다. 따라서 오존노출과 같은 산화 스트레스후 항산화제가 증가되어 기도염증에 방어기전으로 작용할 수 있음을 시사하고 오존과 같은 대기오염이 인체에 미치는 영향에 대한 연구가 더 필요하다.

참고문헌

- 1) Lippmann M. Effects of ozone on respiratory function and structure. Annu Rev Public Health 1989;10:49-67
- 2) McDonnell WF, Horstman DH, Abdul-Salaam S, House DE. Reproducibility of individual responses to ozone exposure. Am Rev Respir Dis 1985;131:36-40
- 3) Koren HS, Devlin RB, Graham DE, Mann R, McGee MP, Horstman DH et al. Ozone induced inflammation in the lower airways of human subjects. Am Rev Respir Dis 1989;139:407-15
- 4) Weiss KB, Wagener DK. Changing patterns of asthma mortality. Identifying target populations at high risk. JAMA 1990;264:1683-7
- 5) Cody RP, Weisel CP, Birnbaum G, Liou PJ. The effect of ozone associated with summertime photochemical smog on the frequency of asthma

- visits to hospital emergency departments. *Environ Res* 1992;58:184-94
- 6) Koenig JQ. Air pollution and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:717-22
- 7) Jang AS, Choi IS. Airway obstruction after ozone exposure in BALB/c mice using barometric plethysmography. *Korean J Int Med* 2003;18:1-5
- 8) Jang AS, Choi IS, Koh YI, Park CS, Lee JS. The relationship between alveolar epithelial proliferation and airway obstruction after ozone exposure. *Allergy* 2002;57:737-40
- 9) Lansing MW, Ahmed A, Cortes A, Sielczak MW, Wanner A, Abraham WM. Oxygen radicals contribute to antigen induced airway hyperresponsiveness in conscious sheep. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:321-6
- 10) Ikuta N, Sugiyama S, Takagi K, Satake T, Ozawa T. Implication of oxygen radicals on airway hyperresponsiveness after ovalbumin challenge in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:561-5
- 11) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9
- 12) Nadeem A, Chhabra SK, Masood A, Raj HG. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:72-8
- 13) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85
- 14) Dickason RR, Huston MM, Huston DP. Enhanced detection of IL-5 in biological fluids utilizing murine monoclonal antibodies which delineate distinct neutralizing epitopes. *Cytokine* 1994;6:647-56
- 15) Honegger CG, Langemann H, Krenger W, Kempf A. Lipid chromatographic determination of common water-soluble antioxidants in biologic samples. *J Chromatogr* 1989;487:463-8
- 16) Bieri JG, Poukka RKH, Prival EL. Determination of alpha-tocopherol in erythrocytes by gas-liquid chromatography. *J Lipid Res* 1970;11:118-23
- 17) Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad Biol Med* 1990;9:515-40
- 18) From the Center for Disease Control. Asthma-United States, 1982-1992. *JAMA* 1995;273:451-2
- 19) 신태순, 이금자, 윤혜선. 국민학교 아동에서의 알레르기 질환에 관한 조사 알레르기 1990;10:201-12
- 20) 이상일. 우리나라 어린이 청소년의 천식 유병률의 변천과 ISAAC 활동. 알레르기 1996;16:172
- 21) Basha MA, Gross KB, Gwizdala CJ, Haidar AH, Popovich J. Bronchoalveolar lavage neutrophilia in asthmatic and healthy volunteers after controlled exposure to ozone and filtered purified air. *Chest* 1994;106:1757-65
- 22) Frischer T, Studnicka M, Halmerbauer G, Horak F Jr, Gartner C, Tauber E, et al. Ambient ozone exposure is associated with eosinophil activation in healthy children. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1213-9.
- 23) Sayers TJ, Wiltrout TA, Bull CA, Denn AC 3rd, Pilaro AM, Lokesh B. Effects of cytokines on polymorphonuclear neutrophil infiltration in the mouse. Prostaglandin- and leukotriene-independent induction of infiltration by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1988;141:1670-7
- 24) Arsalane K, Gosset P, Vanhee D, Voisin C, Hamid Q, Tonnel AB, et al. Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:60-8
- 25) Krishna MT, Blomberg A, Biscione GL, Kelly F, Sandstrom T, Frew A, Holgate S. Short-term ozone exposure upregulates P-selectin in normal

- human airways. Am J Respir Crit Care Med 1997;155:1798-803
- 26) Kelly FJ, Blomberg A, Frew A, Holgate ST, Sandstrom T. Antioxidant kinetics in lung lavage fluid following exposure of humans to nitrogen dioxide. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154:1700-5
- 27) MacNee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:S58-S65
- 28) Schunemann HJ, Grant BJ, Freudenheim JL, Muti P, Browne RW, Drake JA, et al. The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:1246-55
- 29) Nadeem A, Chhabra SK, Masood A, Raj HG. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. J Allergy Clin Immunol 2003;111:72-8
- 30) Romieu I, Meneses F, Ramirez M, Ruiz S, Perez Padilla R, Sienra JJ, et al. Antioxidant supplementation and respiratory functions among workers exposed to high levels of ozone. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:226-32
- 31) Omenaas E, Fluge O, Buist AS, Vollmer WM, Gulsvik A. Dietary vitamin C intake is inversely related to cough and wheeze in young smokers. Respir Med 2003;97:134-42
- 32) Corradi M, Folesani G, Andreoli R, Manini P, Bodini A, Piacentini G, et al. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:395-9