



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2015년도 2월
석사학위 논문

대기 미세먼지로 인한 심장 부정맥 발생 기전 규명

조선대학교 대학원

의 과 학 과

주 수 진

대기 미세먼지로 인한 심장 부정맥 발생 기전 규명

Identification of mechanism underlying cardiac arrhythmia
induced by ambient particulate matter

2014 년 2 월 25 일

조선대학교 대학원

의 과 학 과

주 수 진

대기 미세먼지로 인한 심장 부정맥 발생 기전 규명

지도교수 송 희 상

이 논문을 이학석사학위 신청 논문으로 제출함

2014 년 10월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

주 수 진

주수진의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 부교수 방일수



위 원 조선대학교 조교수 이준식



위 원 조선대학교 조교수 송희상



2014년 11월

조선대학교 대학원

목 차

List of Tables.....	1
List of Figures.....	2
Abstract	3
I . Introduction	4
1. 연구 배경	4
1.1 대기 중 미세먼지의 특성	4
1.2 대기 중 미세먼지의 건강영향.....	7
2. 연구 목적	12
II . Material and Method.....	13
1. 실험재료 및 시료 준비	13
2. 심근세포 분리 및 배양	14
3. 심근세포내 활성산소 측정	14
4. 심근세포내 칼슘 측정.....	15
5. Patch clamp techniques.....	16
6. Immunoblot assay	16
7. Real-time quantitative PCR (qPCR)	17
8. 통계분석.....	17

III. Result	19
1. 대기 중 미세먼지의 성분 분석	19
2. 대기 미세먼지가 심장부정맥 발생에 미치는 영향	23
3. 대기 미세먼지가 심근세포내 칼슘 항상성 조절에 미치는 영향	27
3.1 심근세포내 칼슘 변화.....	27
3.2 칼슘 항상성 관련 유전자의 발현 및 인산화 활성 변화	27
4. 대기 미세먼지가 심근세포내 활성산소 생성에 미치는 영향	33
4.1 심근세포내 Reactive oxygen species 변화.....	33
4.2 ERK 및 Akt 인산화 활성 변화.....	36
5. 미세먼지로 인한 활성산소가 심장부정맥 발생에 미치는 영향	39
IV. Discussion	47
V. Reference	51
VI. 감사의 글.....	61

List of Table

Table 1. Primer sequences for quantitative RT- PCR analysis..... 18

Table 2. Concentrations of various organic compounds present in seasonal
ambient particulate matter found in Seoul metropolitan area. Korea
..... 21

List of Figures

Figure 1. Analysis of arrhythmogenic effects on cardiomyocytes by ambient particulate matter	24
Figure 2. Effects of ambient particulate matter on intracellular calcium handling in cardiomyocytes	29
Figure 3. Altered expression levels of calcium homeostasis-related proteins by ambient particulate matter	31
Figure 4. Intracellular ROS generation by ambient particulate matter in cardiomyocytes	33
Figure 5. Altered phosphorylation levels of Akt and ERK by H ₂ O ₂	37
Figure 6. Altered phosphorylation levels of Akt and ERK by ambient particulate matter	38
Figure 7. Scavenging effects of NAC on intracellular ROS induced by ambient particulate matter	41
Figure 8. Scavenging effects of NAC on intracellular calcium handling induced by ambient particulate matters	42
Figure 9. Scavenging effects of NAC on calcium homeostasis-related proteins alteration induced by ambient particulate matter.....	43
Figure 10. Scavenging effects of NAC on ambient particulate matter induced	

arrhythmogenic effect..... 44

Abstract

Identification of mechanism underlying cardiac arrhythmia induced by ambient particulate matter

Sujin Ju

Advisor : Assistant Prof. Heesang Song, Ph.D.

Department of medical science

Graduate school of Chosun University

Ambient particulate matter (PM) is a mixture of many different chemicals to which inorganic compounds including heavy metals and other organic compounds are attached. The chemical components of PM vary by their origin or source, and may cause the adverse effects on human health as well as environment. Recently, epidemiological studies have suggested that increased levels of PM is positively associated with cardiovascular morbidity and mortality such as arrhythmia, atherosclerosis, myocardial infarction, and myocardial hypertrophy. However, despite the concrete evidence of the cardiac development of PM, the underlying mechanism is still poorly understood.

The main aim of this study was investigate to the arrhythmogenic effect of PM and to explore the possible mechanism of arrhythmogenic effect induced by PM in cardiomyocytes (CMCs). Ambient PM were collected in summer season (SS1) and winter season (SW1) in Seoul metropolitan area. For the

arrhythmogenic effect of SS1 and SW1, primary CMCs were isolated from neonatal rat and exposed to SS1 and SW1 in different concentrations. Then, The resting membrane potential (RMP), heart rate and action potential amplitude (APA) in CMCs were recorded by single-cell patch-clamp techniques. Results showed that contraction and relaxation of CMCs were markedly altered by SS1 and SW1.

For the possible mechanism of arrhythmogenic effect induced by SS1 and SW1, we measured intracellular calcium and reactive oxygen species (ROS) in CMCs using the indicators fluo-4am and H₂DCF-DA, respectively. The mRNA , protein expression and phosphorylation status of key calcium homeostasis-related proteins such as RyR2 (ryanodine receptor2), SERCA2a (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase), NCX (sodium-calcium exchanger), CaMKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II); and phosphorylation activation of Akt and ERK1/2 were evaluated by qPCR and western blot assay.

Results showed that the fluorescence of intracellular calcium and ROS increased in a concentration-dependent manner as compared to the control. Calcium homeostasis-related proteins, p-Akt and p-ERK1/2 also indicated the change in concentration-dependent manner by SS1 and SW1. However these effects were prevented by pretreatment of CMCs with ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC, 1mmol/L).

In conclusion, our findings confirmed that PM has arrhythmogenic effect on

CMCs *via* increased ROS and perturbed calcium handling. moreover, oxidative stress could be one of the major mechanisms of these arrhythmogenic effect.

I. 서론

1. 연구배경

대기 중 미세먼지 및 미세먼지에 함유된 유해성분들은 호흡을 통해 유입되면 다양한 기전을 통해 호흡기 질환과 염증성 질환 및 심혈관계 질환의 발생을 증가시킬 뿐만 아니라 사망률의 증가와도 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다 [1-5].

특히, 이러한 미세먼지 노출로 인한 위해성은 많은 역학조사 연구 결과를 통해서 장기간의 노출뿐만 아니라 노출 후 수 시간 혹은 단기간에도 질병 및 사망의 위험이 증가되는 것을 확인하였다 [4, 6].

1.1 대기 중 미세먼지의 특성

미세먼지는 매우 복합적인 성분들이 함유되어 있고 대기 중에서 가장 많이 부유하고 있는 물질로 모래먼지, 화산재, 산불 등으로 인한 자연적인 발생과 자동차 배기가스, 도로의 먼지, 연료 소비 등 인간의 산업 활동으로 인한 인위적인 활동의 결과로 발생된다 [7].

이러한 대기 중의 먼지는 주로 입자의 크기 별 또는 화학적 조성에 따라 분류될 수 있는데, 특히 먼지입자의 크기는 발생원 특성을 파악하는 것과 함께 인체건강위해를 예측하는데 있어서 중요한 요인으로 알려져 있다 [8].

먼지의 크기 별 분류는 직경(aerodynamic diameter, AD)의 크기에 따라 먼지의 직경이 10 μm 이하인 조대분진 ($AD < 10 \mu\text{m}$, coarse particle; PM₁₀)과 직경이 2.5 μm 이하인 미세먼지 ($AD < 2.5 \mu\text{m}$, fine particle; PM_{2.5}) 그리고 직경이 0.1 μm 이하인 극미세먼지 ($AD < 0.1 \mu\text{m}$, ultrafine particles; UFPs)로 분류되며 이를 포함하는 직경이 100 μm 이하를 총부유분진 (total suspended particle, TSP)라 한다 [9]. 일반적으로 직경이 작은 먼지일수록 호흡기 깊숙이 침투하여 폐 조직에 높은 침착률과 바람, 기온, 대기안정도 등 기상 조건의 영향을 받아 대기 중에 장기간 부유할 가능성이 높기 때문에 건강에 미치는 위해성이 더 큰 것으로 알려져 있다 [10]. 또한 호흡기 깊숙이 침투할 수 있는 먼지인 PM₁₀과 PM_{2.5}는 자연발생적인 성분보다는 주로 인위적인 활동에 의해 발생된 성분을 함유하고 있는 것으로 확인되었다 [10].

화학적 특징에 따른 분류로는, 미세먼지는 유기화합물 (Organic compounds)와 무기화합물 (inorganic compounds)로 이루어진 복합물질로 화학적으로 금속성분 (납, 카드뮴, 구리, 철, 망간)과 이온성분 (황산염, 질산염, 암모늄염, 클로라이드) 및 탄소성분 (유기탄소 [organic carbon, OC], 무기탄소[Elemental carbon, EO])으로 분류할 수 있다. 그 외에도 소량의 박테리아와 포자, 화분과 같은 생물학적 성분과 오존(O₃), 황(sulfur), 질소 산화물 (nitric oxides), 일산화탄소 (carbon monoxide [CO])와 같은 대기가스가 포함된다 [9].

미세먼지에는 인체에 영향을 미치는 많은 유해성분들이 함유되어 있는데, 그 중 대표적인 유해성분은 benzo[α]pyrene 과 같은 다환방향족탄화수소 (poly aromatic hydrocarbon, PAH)를 포함한 유기성분과 [11] 철(Fe), 니켈(Ni), 크롬(Cr)과 같은 전이 금속이 있다 [12]. 이와 관련된 연구에는 세포의 단백질, 지질, 세포막, DAN 를 손상시키는 산화적 스트레스의 증가 및 인간의 암 발생과 관련하여 독성 효과의 연구가 진행되고 있다 [11-14].

1.2 대기 중 미세먼지의 건강영향

미세먼지 노출이 인체에 미치는 영향은 미국 6 대 도시에서 8111 의 성인을 대상으로 미세먼지와 폐암과 심폐질환으로 인한 사망률 증가와의 관련성에 관한 연구 결과를 통해서 그 중요성이 대두되었다.[15] 이후 다양한 약학 연구결과가 발표되어 미세먼지가 천식, 폐기종, 만성폐쇄성폐질환, 만성 기관지염을 비롯한 심혈관계 질환 및 뇌졸중으로 인한 유병률 및 사망률의 증가와 밀접한 관계가 있다는 것이 보고되고 있다 [1-4, 16].

대기 중 미세먼지는 단기간의 노출에도 사망률의 증가와 직접적으로 연결되어있는데, 예를 들어 $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 수준의 PM10 에 단기간 노출 시 심장질환, 만성폐쇄성폐질환, 폐렴으로 인한 병원 입원율을 각각 1.27%, 1.45%, 2.00%로 증가시켰으며 (data for chicago area hospitals for years 1988-1993), 일일 총 사망률의 평균 0.89%를 증가시키는 결과를 야기시킨다 (U.S city) [17],[18].

또한 인체영향은 입자의 크기가 작고 농도가 높고 미세먼지에 노출되는 기간이 길어질수록 인체에 미치는 영향이 커지는데 PM_{2.5}에 장기간 노출 시에는 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 당 16%의 사망률을 증가시킨다는 역학연구 결과가 있다 [1].

이는 역학조사 외 사람의 폐상피세포주(lung type II epithelial cell)인 A529 cell line에 직경이 서로 다른 미세입자인 PM₁₀, PM_{2.5}, PM_{0.1} 에 각각 노출 시킨 결과 직경이 작은 미세입자 즉 PM_{0.1} 에 노출된 분획 일수록 IL-6(interleukin-6), IL-8(interleukin-8)과 같은 염증성 사이토카인을 더 많이 분비하고 DNA 손상정도 또한 더 강하게 나타나는 연구 결과를 통해서도 확인되었다 [9, 19].

이러한 미세먼지에 의한 인체영향은 앞서 언급한 바와 같이 물리적, 먼지의 질량과 직경 및 조성의 화학적 특성에 따라 독성을 나타나게 되는데, 앞서 언급한 바와 같이 대표적인 유해성분인 전이금속물질은 폐상피세포주에서 유래한 BEAS-2B cell line 에 대기 미세먼지에 포함되어 있는 비소, 수은, 카드뮴을 분리하여 노출시킨 결과 세포 내 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)을 증가시키는 동시에 산화적 스트레스와 관련 있는 것으로 알려진 heme oxygenase-1, glutathione-S-transferase, metallothionein, thioredoxin reductase, hypoxia inducible 등의 유전자 발현을 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 [20].

미세먼지의 심혈관 질환 발생 영향은, 대기 중 미세먼지는 심장 혈관의 손상을 야기하는 심장 스트레스를 촉진시키는 요인으로 작용하여 최근에 다양한 역학 및 임상 연구들을 통해서 미세먼지의 노출 및 농도의 증가는 부정맥 (arrhythmia), 죽상동맥경화증 (atherosclerosis), 심근경색 (myocardial infarction) 및 심장비대 (myocardial hypertrophy)를 발생시킨다고 보고 되었다. [5, 21]

죽상동맥경화증은 혈관내피세포(endothelial cell)의 기능 이상 및 지방산, 콜레스테롤, 칼슘 등이 동맥 안쪽에 축적되어 동맥경화반(atherosclerotic plaque)을 형성함으로써 발생하는 질환을 말한다 [22].

미세먼지가 죽상동맥경화증 발생에 미치는 영향은 역학 및 in vivo 연구를 통해 확인되었다. PM_{2.5}에 장기간 노출은 고지방을 섭취한 아포지단백 E가 결핍된 마우스 마우스 (apolipoprotein E ^{-/-}mice)에서 동맥경화반 크기가 증가된 것을 확인하였고, 미세먼지에 노출된 4 주 후 관상동맥경화증의 진행 정도는 고지혈증의 토끼와 비슷한 진행 정도를 확인하였다. [23, 24]

또한 사회과학 조사방법론인 cross sectional 연구 결과 PM_{2.5} 이하 미세먼지 노출의 증가는 경동맥 내막 중간층 (carotid-intima media) 두께의 증가를 야기한다는 것이 확인되면서 대기 미세먼지의 노출과 동맥경화증의 발생이 연관되어 있다는 사실을 입증할 수 있다. 그러나 이를 발생시키는 명확한 발생 기전은 밝혀지지 않았다. [25]

혈압 상승은 심장비대를 일으키는 주요 원인 중 하나인데, 고농도의 미세먼지의 노출은 노출 후 수시간에서 수기간 내에 혈압을 증가시킨다. [26-28] 이는 심장비대를 야기하는 안지오텐신 II (angiotensin-II)를 매개하는 경로를 활성화시킴으로써 발생하는 것으로 알려져 있는데, 최근 연구결과에서 미세먼지는 근절(sarcomere)을 재구성을 일으켜 심장 리모델링을 야기하는 경로인 RhoA/Rho-kinase pathway 가 안지오텐신 II 자극을 통해서 활성화되는 것을 확인하였다. [29]

본 연구는 미세먼지에 의한 심혈관계질환의 발생 영향 중 미세먼지와 심장 부정맥 발생에 초점을 맞추어 이루어졌다.

부정맥은 심장의 심근세포에 가해지는 전기적인 자극이 제대로 가해지지 못하거나 자극의 전달이 원활하지 못하는 비정상적인 전기적 활성으로 인하여 심장박동이 느리거나 빨라지거나 혹은 불규칙적으로 변하는 질환을 말한다. 이는 심장의 선천적인 이상이나 다른 심장질환 (허혈/재관류 손상, 심근경색, 고혈압) 등의 원인으로 작용하기도 한다 [30, 31].

대기 미세먼지에 의한 심장 부정맥의 영향은 주로 역학적인 차원의 연구 결과를 통해서 그 관련성이 입증되었다. 높은 농도의 배출가스와 PM₁₀이 7 일 동안 노출되었을 때, 생명을 위협할 정도의 부정맥을 발생시키는데 다른 연구결과에서는 단 2 시간의 노출에도 빠르게 부정맥을 발생시킬 수 있다는 보고가 있다. [32, 33]

그 외에도 환자의 지속적인 모니터링을 통한 제세동기 (Implantable Cardioverter Defibrillator, ICD)로부터 얻은 데이터에 기초하여 대기 오염과 심장 빈맥과 심방세동을 포함한 부정맥간의 연관성을 관찰하였을 때, 미세먼지의 노출은 임상적으로 심장 전기생리학에서 의미 있는 변화를 일으킨다는 결과를 도출하였다. [34]

심장의 수축과 이완은 심장 조직에서 세포의 반복적인 재분극 (repolarization)을 통해 일어나는데, 이 때 칼슘(Ca^{2+})의 순환은 이러한 수축과 이완 과정에서 주요 조절자로 심장 부정맥의 발생에 있어서 칼슘 항상성 유지는 밀접하게 관련이 되어 있는 것으로 알려져 있다. [35, 36]

여기서, SERCA2a (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase), RyR (ryanodine receptor), NCX (sodium-calcium exchanger), L-type Ca²⁺ channel (LTCC), CaMK II (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II) 등 다양한 이온 채널들이 세포 내 칼슘 조절 메커니즘에 연관되어 심근세포 내 칼슘의 항상성을 일정하게 유지할 수 있게 된다. [37-39]

심근세포의 수축, 이완에 있어서 칼슘조절 메커니즘을 살펴보면, 먼저 수축 시에는 압력 민감 칼슘통로인 L-type Ca²⁺ channel을 통해서 세포 내로 칼슘이 유입되고, 이는 근육세포질세망 (sarcoplasmic reticulum, SR)의 칼슘유리 통로인 RyR을 통해 SR의 칼슘을 세포질로 유리 시킨다.[40] 반대로 이완은 증가된 세포 내 칼슘을 감소시키기 위해 칼슘 유입 통로인 SERCA2a와 세포 외로 칼슘을 유출시키는 NCX을 통하여 빠르게 제거됨으로써 일어나게 된다 [41].

따라서, 심부전 심근에서 칼슘조절 이상 중 가장 전형적인 것은 SR의 기능장애이므로 이러한 칼슘조절단백질들의 이상은 부정맥 발생에 있어서 중요한 조절인자라고 할 수 있다 [35].

칼슘조절단백질 외 부정맥 발생에 영향을 미치는 인자로는 활성산소가 있다 [42-44]. 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)는 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)와 슈퍼옥사이드 (O²⁻)와 같은 반응성이 강한 산소유도체로 정의되어 세포분화, 유전자의 발현, 사이토카인 등 다양한 생물학적 과정에 연관되어 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [45, 46].

심장에서 ROS의 증가는 심근기면 (myocardial stunning), 괴사 (necrosis), 혈관의 기능저하 (vascular dysfunction), 세포사멸 (apoptosis)과 밀접하게 관련이

있으며, 이러한 효과는 ROS 저해제에 의해서 효과적으로 방어됨을 확인되었다 [47, 48].

몇몇 연구들을 통하여 증가된 대기 미세먼지의 노출이 산화스트레스를 증가시킨다는 연구결과가 보고 되었는데 [49, 50], 여기서 높은 농도의 활성산소는 세포사멸 및 심근의 칼슘 순환을 방해시킨다는 연구결과가 있다. [51, 52]

그러나 미세먼지와 관련하여 부정맥에 관한 연구는 유병율이나 사망률 조사와 같은 역학적인 차원에서의 연구가 많이 진행되어 있는 상태로 정확한 발생기전에 관한 연구는 아직 미미한 시점에 있다. 특히 부정맥은 매우 복잡적이고 다양한 인자들이 연관되어 있기 때문에 미세먼지로부터 어떤 경로를 통하여 발현이나 활성이 비정상적인 변화가 발생하는지 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않고 있다.

2. 연구목적

본 연구에서는 유해화학물질이 함유된 미세먼지가 심장 부정맥 발생에 미치는 영향과 그 발생 기전을 활성산소의 증가 및 칼슘항상성의 붕괴를 중심으로 하여 구체적인 신호전달 경로 기전을 확인하고자 한다. 이를 위해 본 연구에서는 우리나라의 서울지역의 각각 하절기와 동절기에 수집한 PM₁₀의 미세먼지 분획을 배양한 심근세포에 노출시킴으로써 발생하는 ROS의 발생 정도와 칼슘의 증가를 부정맥을 발생시키는 주요 기전으로 알려진 칼슘항상성 관련 단백질(SERCA2a, RyR2, CAMK II, NCX)와 같은 단백질들의 발현 정도를 확인하였다. 그리고 더 나아가 활성산소 저해제인 NAC을 처리함으로써 이러한 심장부정맥 발생에 활성산소가 미치는 영향을 동시에 확인하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시료준비

심근세포 배양에 사용한 α -MEM (alpha Dulbecco's modified Eagle's medium) 와 FBS (Fetal bovine serum), penicillin streptomycin 및 trypsin-EDTA는 Welgene사로부터 구입하였고, collagenase type II는 Gibco사에서 구입하였다. ROS와 칼슘측정을 위한 형광지표인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA), Fluo-4am 및 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 는 Invitrogen사로부터 구입하였다. qPCR을 위해 사용한 TRIzol lysis reagent은 QIAGEN사에서 western blot을 위한 Bradford protein Assay kit 와 polyvinylidene difluoride membrane 은 Bio-Rad laboratories에서 구입하였다. 실험에 사용된 antibody인 Akt, p-ERK 1/2, ERK, p-RyR2 는 Cell Signaling사이며, p-CaMKII, CaMKII는 AbFrontier사, SERCA2a 는 Abcam사, RyR2 는 Proteintech Group사, β -actin은 sigma에서 구입하였다.

본 연구를 위해 사용된 서울지역의 하절기와 동절기 기간에 포집한 미세먼지 (지름이 $10 \mu m$ 이하의 분진, $10 \mu m$ -particulate matter, PM_{10}) 시료는 조선대학교 공과대학 환경공학과 교수님으로부터 제공받았으며, 각각 SS1, SW1 으로 명명하였다. SS1 과 SW1 은 원액($4,032m^3/ml$)을 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시킨 후 2 배, 4 배, 10 배로 용해하여 실험에 적용하였다.

2. 심근세포의 분리 및 배양

2-3 일 된 신생 백서의 심장을 분리하여 PBS (phosphated buffer saline, PH7.2)에 넣어 좌심실만 분리한 다음, micro dissecting scissor를 사용해 심근 세포가 1 mm³ 정도 될 때까지 절단한다. 5 ml의 collagenase type II (0.8 mg/ml, 262 units/mg)를 넣고 나서 37°C, 5% CO₂ 에 7 분간 배양한 후, collagenase II 부유액을 제거한다. 5 ml의 새로운 collagenase II를 첨가하고 5 분간 더 배양한 다음, 새 튜브에 상등액을 옮기고 세포 배양 배지 (10 % FBS α-MEM)을 첨가한 후, 4 분간 1200 rpm에서 원심 분리한다. 5 ml의 배양 배지에 세포 침전물을 다시 부양한 다음, 심근 세포가 거의 남지 않을 때까지 여러 번 반복 실험하여, cell suspension을 하나의 튜브에 모은다. 100 mm tissue culture plate에 심근 세포를 1-3 시간 동안 배양하여 fibroblast만 plate에 부착하게 한 다음, plate에 붙지 않은 심근 세포들만을 모아 실험에 사용하는 조건에 따라 농도를 달리하여 새로운 plate에서 배양한다. 이 때 0.1mM의 Bromodeoxyuridine (BrdU)를 첨가하여 fibroblast의 성장을 억제시키면서 이렇게 분리된 심근세포는 37°C, 5% CO₂ 에서 배양한 후 실험에 사용하였다.

3. 심근세포 내 활성산소 측정

세포 내 reactive oxygen species(ROS) 함량은 DCF-DA assay로 측정하였다. fluorescence probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)는 세포 내 활성산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 것으로 DCF-DA를 세포에 처리하여 발생하는 형광을 측정 함으로써 세포내의 활성 산소 농도를 측정할 수 있다. 먼저 24well plate에 5×10⁴ cells/ml의 수로 배양된 심근세포 (Cardiomyocyte, CMC)에

H₂O₂ 100μM 와 시료를 각 well에 농도 별로 처리하여 1 시간 처리 한 후, 칼슘과 마그네슘이 함유된 PBSc로 1 번 씻어준다. 그 다음 PBSc에 희석한 10μM의 H₂DCF-DA와 세포핵을 염색시키는 50μg/ml의 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)용액을 처리하여 30 분 동안 37°Cincubator에서 빛을 차단한 상태에서 incubation 한 후 PBSc로 3 번 씻어준다. 세포 내 ROS 생성 정도는 confocal microscope (Fluoview FV1000 confocal system, Olympus) 를 이용하여 λexcitation 485 nm, λemission 530 nm에서 DCF fluorescence intensity를 측정하였다. 측정된 형광이미지는 Image J software program을 통해 분석하였다.

4. 심근세포 내 칼슘 측정

심근세포내 칼슘농도의 변화 측정은 ca²⁺과 결합할 수 있는 막 투과성 형광 표지자인 Fluo-4am을 사용하였다. 먼저 배양된 심근세포에 시료를 농도 별로 1 시간 동안 처리 한 후 serum free media로 한번 씻어준다. 그 다음 serum free media에 희석된 2 μM의 Fluo-4am과 50μg/ml의 DAPI용액을 처리하여 20 분동안 37°Cincubator에서 빛을 차단한 상태에서 incubation 한 후 PBS로 3 번 씻어준다. 칼슘 측정은 confocal microscope (Fluoview FV1000 confocal system, Olympus) 를 이용하여 λexcitation 485 nm, λemission 530 nm에서 측정되었다. 측정된 형광이미지는 Image J software program을 통해 분석하였다.

5. Patch-clamp techniques

심근세포 내 heart rate와 막전압은 gigaohm-seal clamp 방법 중 cell-attached membrane patch 방법을 사용하여 기록하였다. Patch clamp 증폭기를 통하여 측정된 전기적인 신호는 디지털 신호기록기를 거쳐 비디오에 기록하였다. 막전압 및 전체 이온전류 측정을 위한 전극 내 용액 (pipette solution)의 조성 (mM)은 Mg-ATP 3, CaCl₂ 140, HEPES 10, EGTA 10 (PH 7.2)로 하였고 세포외액 (external solution)은 NaCl 135, KCl 5.4, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 1.8, NaH₂PO₄ 0.33, glucose 5 HEPES 10 (pH7.4)으로 하였으며 모든 실험은 30°C에서 진행되었다. 또한 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5~2.5 MΩ이 되도록 하였으며 결과 분석은 Clampfit program (Axon Instruments)과 GraphPad Prism software (version 2.01, GraphPad software Inc., Sandiego, CA, USA)을 사용하여 분석하였다.

6. Immunoblot assay

전술한 바와 같이 시료를 처리한 심근세포를 일정시간 배양한 후 PBS 로 세척한 뒤 1x lysis buffer (1 mM PMSF)로 suspension 시키고 4°C에서 10 분간 lysis 시킨다. Cell lysate 를 12000 rpm, 4°C에서 15 분간 원심분리를 하여 얻은 상등액을 분리하여 Bradford protein Assay 로 정량하여 동량의 protein 을 크기에 맞게 6~15% SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)에 loading 후 전기영동 한다. 원하는 크기의 gel 을 자른 후 polyvinylidifluoride (PVDF) transfer membrane 과 transfer buffer (20 mM Trizma® base, 190 mM Glycine, 20% Methanol)를 사용하여 전기적으로 단백질을 이동, 고정시킨다. 전기 이동된 membrane 은 5% skim milk 와 TBS-t (1x TBS, 0.1% tween-20)를 혼합한

blocking buffer 에서 1 시간 blocking 한 뒤, P-AKT, P-ERK, SERCA2a, P-RyR2, P-CAMKII 등의 1 차 항체를 넣어 1 시간 30 분~overnight 반응시킨다. 그 다음 TBS-t 로 5 분 간격으로 5 번 세척하고 2 차 항체를 넣어 1 시간 30 분간 반응시킨다. 반응이 끝나면 TBS-t 로 5 분 간격으로 5 번 세척하고 Enhanced chemiluminescence plus western blotting system (ECL)을 이용하여 발광시킨 후 암실에서 band intensity 를 확인하였다. 밴드 정량은 Image J software program 을 통해 분석하였다.

7. Real-time quantitative PCR (qPCR)

Total RNA 는 TRizol lysis reagent 방법에 의하여 분리한 후 spectrophotometer 을 이용하여 260nm 에서 RNA 양을 측정하였다. 그 후 total RNA 1 μ g 을 취하여 first strand cDNA 를 합성하였다. PCR 반응은 SYBR Green method 을 사용하여 95 $^{\circ}$ C에서 15 분, 95 $^{\circ}$ C30sec, 62 $^{\circ}$ C 20sec, 70 $^{\circ}$ C 20sec 로 40cycle 수행하였다. qPCR 에 사용한 primer 서열은 table 1 에 나타내었다.

8. 자료분석

모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었고, 통계적 유의성은 Student' t-test 로 검증하였다. 모든 경우 $P < 0.05$ 일 때 유의적인 차이가 이는 것으로 판정하였다.

Table 1. Primer sequences for quantitative RT-PCR analysis

Gene	Primer sequence
GAPDH	Sence: 5'-CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT-3'
	Antisense: 5'-TGGTAACCAGGCGTCCGATA-3'
SERCA2a	Sence: 5'-CGAGTTGAACCTTCCCACAA-3'
	Antisense: 5'-AGGAGATGAGGTAGCCGATGAA-3'
CAMK II	Sence: 5'-CATCCTGAACCCTCACATCCA-3'
	Antisense: 5'-CCGCATCCAGGTACTGAGAGTGAT-3'
RyR2	Sence: 5'-CAAACAGGGCAGAAGACACC-3'
	Antisense: 5'-CTCTGAGGGTGCTCCACCT-3'
NCX 1	Sence: 5'-AGCAAGGCGGCTTCTCTTTT-3'
	Antisense: 5'-GCTGGTCTGTCTCCTTCATGT-3'
NCX 2	Sence: 5'-CACTACGAGGATGCTTGTGG-3'
	Antisense: 5'-CCTTCTTCTCATACTCTTCGT-3'
NCX 3	Sence: 5'-CCTGTGGCTCCTCTACGTACTCTT-3'
	Antisense: 5'-GAGGTCTTGTTCTGGTGGTTCA-3'

III. 연구 결과

1. 대기 중 미세먼지의 성분 분석

대기 중 미세먼지의 심장 부정맥 발생 효과를 관찰하기 위하여 조선대학교 공과대학 환경공학부 (Department of Environmental Engineering, Chosun University) 교수님으로부터 모니터링 된 샘플 및 그 화학적 유해성분에 대한 분석자료를 제공받아 연구를 진행하였다.

대기 미세먼지의 포집은 우리나라의 수도이자 인구밀도가 가장 높은 서울에서 실시되었으며, 계절에 따른 인체 유해성을 평가하기 위하여 각각 2007년 7월 5일 (하절기)와 2007년 2월 28일 (동절기)의 대기 미세먼지를 모니터링 하였다. 모니터링이 실시한 날은 황사 및 스모그와 같은 기상상의 특이적인 사항이 발생하지 않았던 일상적인 대기상태에서 진행되었다.

포집된 미세먼지에 대한 주요 구성성분 분석 및 그에 대한 농도를 table1에 나타내었다. 분석된 화학물질의 종류는 유기화합물 (organic compounds)에 해당하는 성분으로 미세먼지에 함유된 중금속 분석은 실시되지 않았다.

미세먼지의 유해물질 성분을 살펴보면 표에서 볼 수 있듯이, 21종의 다환방향족탄화수소류 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)와 7종의 산화된 다환방향족탄화수소류 (Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, Oxy-PAH), 19종의 디카르복시산류 (Dicarboxylic acid) 및 유기, 무기, 수용성탄소를 포함한 탄소유기물 (Carboneous)이 함유되어 있었다.

또한 구성성분의 농도를 살펴보면 디카르복시산류를 제외하고 SS1 보다 SW1 에서 상대적으로 더 높은 농도의 유해유기오염물질을 함유하고 있다. PAH류의 경우, SW1 는 $20.43\text{ng}/\text{m}^3$ 농도로 $2.76\text{ng}/\text{m}^3$ 인 SS1 에 비해 7.4 배 높은 농도를 함유하고 있으며, Oxy-PAH류와 탄소유기물도 마찬가지로 각각 SW1 은 $6.80\text{ng}/\text{m}^3$, $13.36\text{ng}/\text{m}^3$ 의 농도로 SW1 의 $1.57\text{ng}/\text{m}^3$, $9.23\text{ng}/\text{m}^3$ 보다 각각 4.3 배, 1.5 배 높은 농도를 함유하고 있다. 그러나 디카르복시산류의 경우 다른 유해성분보다 훨씬 더 높은 농도를 함유하고 그 농도함유 정도가 SS1 에서 SW1 보다 1.7 배 높은 농도를 함유하고 있다는 점을 감안하였을 때 (SS1; $245.94\text{ng}/\text{m}^3$, SW1; $141.68\text{ng}/\text{m}^3$), SW1 가 SS1 보다 심근부정맥 발생에 영향을 더 미칠 것이라고 앞서 생각할 수는 없을 것으로 여겨진다.

따라서 앞으로의 실험을 통해 SS1 과 SW1 을 각각 처리하여 심장 부정맥에 미치는 영향을 비교함으로써 미세먼지로 인한 부정맥 발생 원인 성분을 간접적으로 유추해 볼 수 있을 것이라 예상된다.

Table 2. Concentrations of various organic compounds present in seasonal ambient particulate matter found in Seoul metropolitan area. Korea

Organic compounds	SS1		SW1	
	ng/m ³	ng/ml	ng/m ³	ng/ml
PAHs				
Phenanthrene	0.09	0.36	2.44	9.84
Anthracene	–	–	0.23	0.93
3–mp	0.02	0.08	0.23	0.93
2–mp	0.03	0.12	0.29	1.17
9–mp	0.03	0.12	0.20	0.81
1–mp	0.02	0.08	0.28	1.13
Fluoranthene	0.23	0.93	2.78	11.21
Pyrene	0.23	0.93	2.03	8.18
Retene	–	–	1.31	5.28
Benz[a]anthracene	0.24	0.97	0.98	3.95
Chrysene	0.17	0.69	0.90	3.63
Benzo[b]fluoranthene	0.41	1.65	1.41	5.69
Benzo[k]fluoranthene	0.25	1.01	1.16	4.68
Benzo[e]pyrene	0.20	0.81	0.93	3.75
Benzo[a]pyrene	0.21	0.85	1.00	4.03
Indeno[1,2,3–cd]fluoranthene	0.04	0.16	0.39	1.57
Dibenz[a,h]anthracene	0.05	0.20	0.47	1.90
Indeno[1,2,3–cd]pyrene	0.17	0.69	1.43	5.77
Benzo[perylene]	0.16	0.65	1.07	4.31
135 tpbz	0.13	0.52	0.11	0.44
Coronene	0.07	0.28	0.80	3.23
total	2.76	11.13	20.43	82.37
Oxy-PAHs				
1,4-Naphthalenedione	–	–	1.12	4.52
9,10-Anthracenedione	0.47	1.90	1.37	5.52
9-Fluorenone	0.37	1.49	0.67	2.70
Perinaphthenone	0.73	2.94	2.38	9.60
Xanthone	–	–	0.47	1.90
5,12-Naphthacenedione	–	–	–	–
Benz[a]anthracene-1,12-dione	–	–	0.79	3.19
total	1.57	6.33	6.80	27.42

Continue

Organic compounds	SS1		SW1	
	ng/m ³	ng/ml	ng/m ³	ng/ml
Dicarboxylic acids				
Oxalic acid	108.59	437.83	55.99	225.75
Malonic acid	49.73	200.51	20.54	82.82
Succinic acid	68.68	276.92	40.22	162.17
Glutaric acid	8.55	34.47	11.70	47.17
Adipic acid	4.01	16.17	6.87	27.70
Pimelic acid	2.54	10.24	4.79	19.31
Suberic acid	3.84	15.48	1.56	6.29
Azelaic acid	13.34	53.79	21.88	88.22
Sebacic acid	2.42	9.76	4.05	16.33
Undecanedioic acid	2.52	10.16	3.43	13.83
Maleic acid	1.77	7.14	4.57	18.43
Fumaric acid	1.69	6.81	1.96	7.90
Methylmaleic acid	2.49	10.04	4.17	16.81
Phthalic acid	17.39	70.12	34.21	137.93
Iso-phthalic acid	2.25	9.07	4.68	18.87
Methylmalonic acid	1.52	6.13	1.67	6.73
Methylsuccinic acid	4.40	17.76	7.84	31.61
2-Methylglutaric acid	2.05	8.27	2.50	10.08
D-malic acid	16.05	64.71	16.55	66.73
Total	245.94	991.63	141.68	571.25
Carboneous				
OC ^a	5.20	20.97	7.83	31.57
EC ^b	1.82	7.34	1.96	7.90
WSOC ^c	2.20	8.87	3.56	14.35
Total	9.23	37.22	13.36	53.87

OC^a: Concentrations corresponding to the total organic carbon, EC^b:
 Concentrations corresponding to the total element carbon, WSOC^c:
 Concentrations corresponding to the total water solubility element carbon.

2. 대기 미세먼지가 심장부정맥 발생에 미치는 영향

먼저 대기 중 미세먼지 시료인 SS1 와 SW1 가 심장 부정맥 발생에 미치는 영향을 확인하기 위해 배양한 심근세포의 이온채널로부터 유입 또는 유출되는 이온의 이동 변화를 기록할 수 있는 patch-clamp 기법을 이용하여 그 효과를 확인하였다.

단일심근세포에서 1 분 동안 DMSO 가 함유되어 있는 세포외액을 관류시킨 것을 control 로 하였으며, 이후 SS1 과 SW1 이 들어가 있는 세포외액으로 교체한 후 1 분 동안의 미세먼지 처리로 인한 심근세포의 전기적 활성, 즉 안정막전위 (Resting Membrane Potential, RMP)와 분당 심박수 (heart rate), 탈분극 (depolarization)과 재분극 (repolarization) 사이의 활동전위(action potential)의 진폭 (Amplitude of Action Potential, APA) 변화를 기록하여 비교 분석하였다 (Figure 1A).

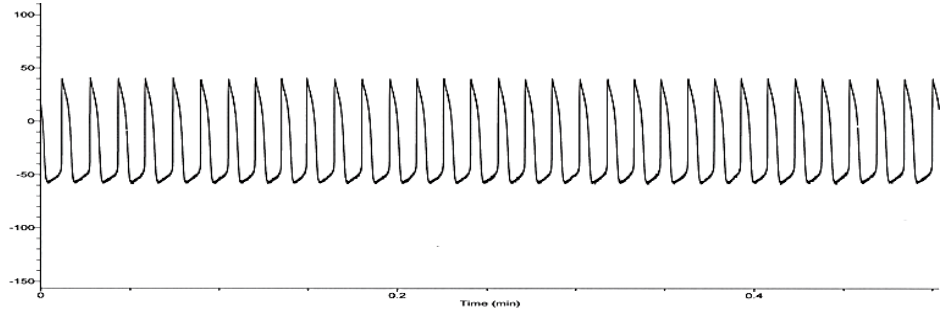
그 결과 SS1 과 SW1 는 RMP 를 각각 6.7mV, 5.4mV 감소시켰으며 (Figure 1B,D-a), Heart rate 또한 대조군과 비교하여 각각 분당 1.5 배, 1.28 배 증가시키는 효과를 확인하였다 (Figure 1B,D-b). APA 도 SS1 과 SW1 을 처리 시 각각 4.3mV, 3.3mV 감소효과를 보였으나 큰 변화는 확인하지 못하였다 (Figure 1B,D-c).

따라서 Figure 1 에서는 미세먼지인 SS1, SW1 은 심근세포의 전기적 활성에 변화를 유도함으로써 심장 부정맥을 발생시키는 효과가 있음을 확인하였다.

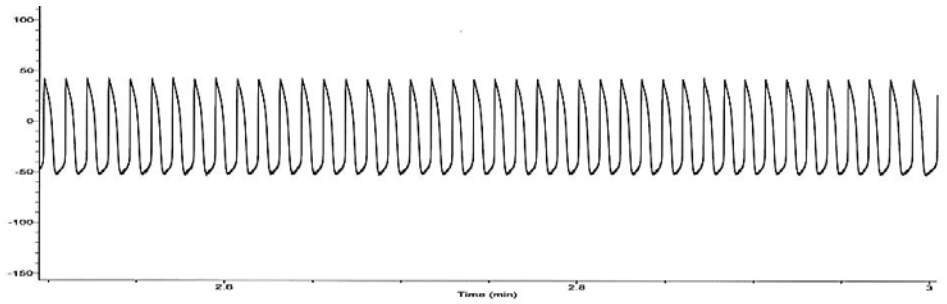
이 결과를 토대로 미세먼지가 심장 부정맥을 발생시키는 구체적인 신호전달 경로 기전을 확인하기 위해 미세먼지에 의한 활성산소와 칼슘항상성의 변화를 확인하였다.

A

a.

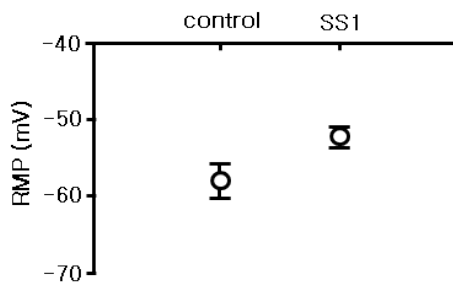


b.

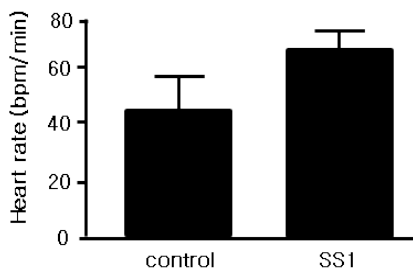


B

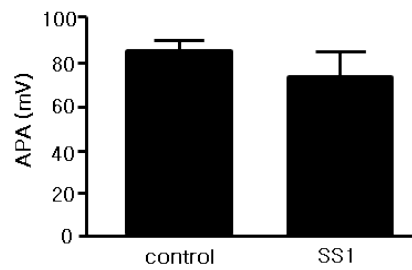
a.



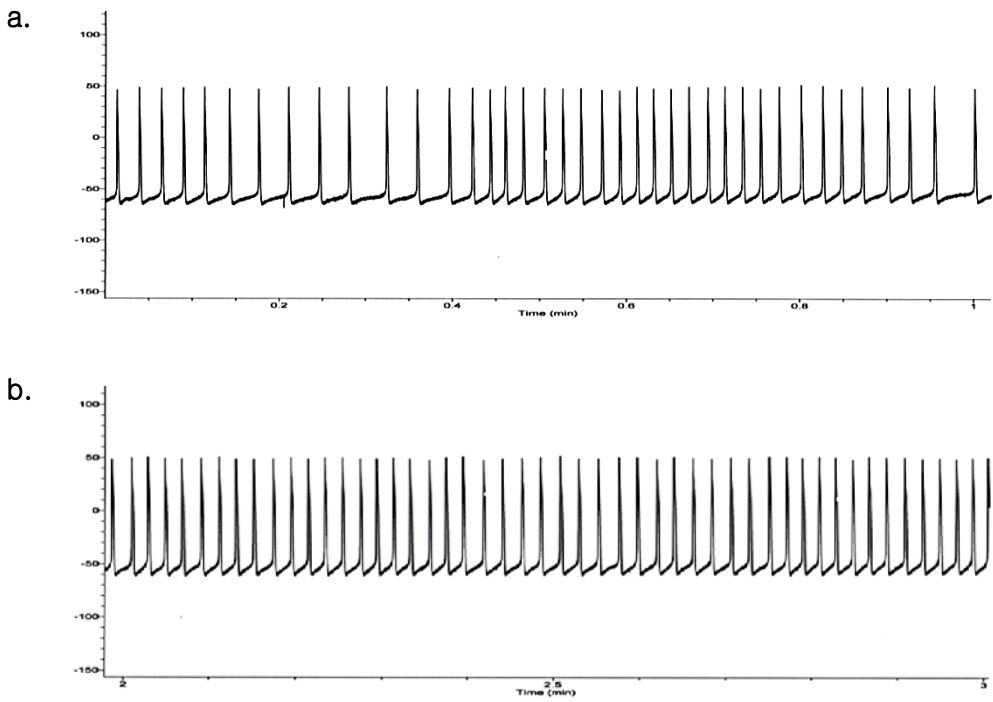
b.



c.



C



D

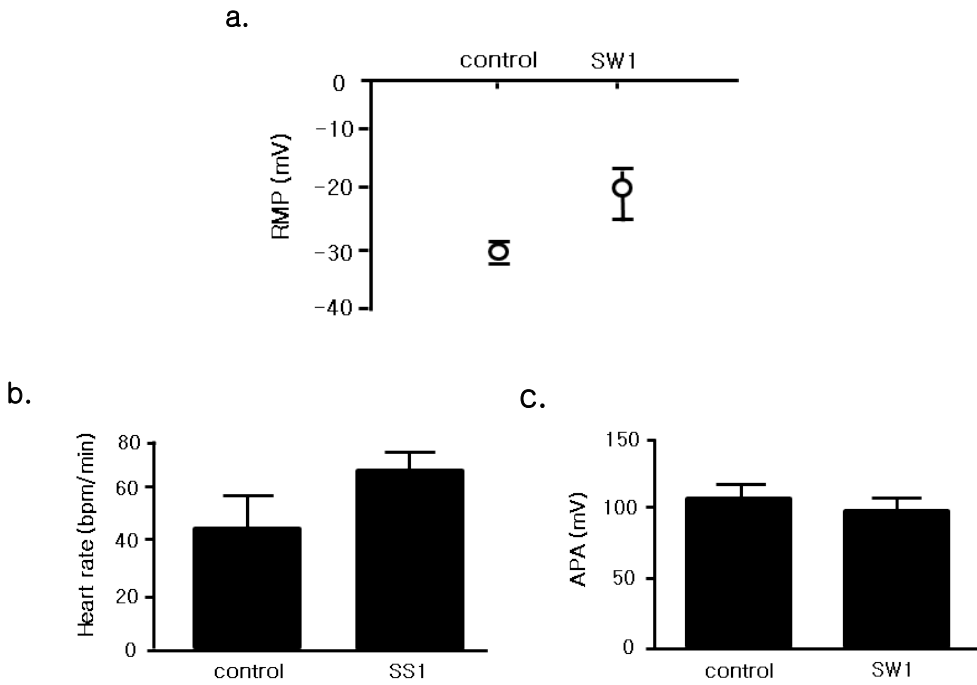


Figure 1. Analysis of arrhythmogenic effects on cardiomyocytes by ambient particulate matter .

Representative recordings of (A) a. DMSO (control), b. SS1 (x 4), (C) a. DMSO (control), SW1 (x 4). The arrhythmogenic effects by SS1 and SW1 were summarized in (B),(D). cells were recorded to basal conditions and after injection of SS1 and SW1 for 1min, respectively. Current were elicited by 300-ms voltage steps from -60 to +40 mV from a holding potential of -70mV at an inter-pulse interval of 10s.

3. 대기 미세먼지가 심근세포내 칼슘 항상성 조절에 미치는 영향

3.1 심근세포내 칼슘 변화

앞서 설명한 바와 같이 칼슘은 심근의 수축과 이완에 중요한 역할을 담당하는데 심부전 심근에서의 칼슘조절은 RyR2 의 과인산화, NCX의 활성 증가, SERCA2a의 발현과 활성도 감소 등의 원인으로 인하여 세포 내 칼슘이 축적을 유도하게 된다 [35, 36]. 따라서 미세먼지가 부정맥 발생에 미치는 영향을 확인하기 위하여 먼저 배양한 심근세포에서 세포 내 칼슘 축적 정도를 Fluo-4am을 통하여 확인하였다.

심근세포에 각 농도 별로 SS1 과 SW1 시료를 1 시간 동안 처리한 후 세포 내 칼슘 변화를 형광발광 정도를 측정함으로써 확인하였다. 그 결과, SS1 과 SW1 은 DMSO 만 처리한 negative control 과 비교하여 심근세포 내 농도 의존적인 칼슘 증가를 유발하는 것이 확인되었다 (Figure 2).

3.2 칼슘 항상성 관련 유전자의 발현 및 인산화 활성 변화

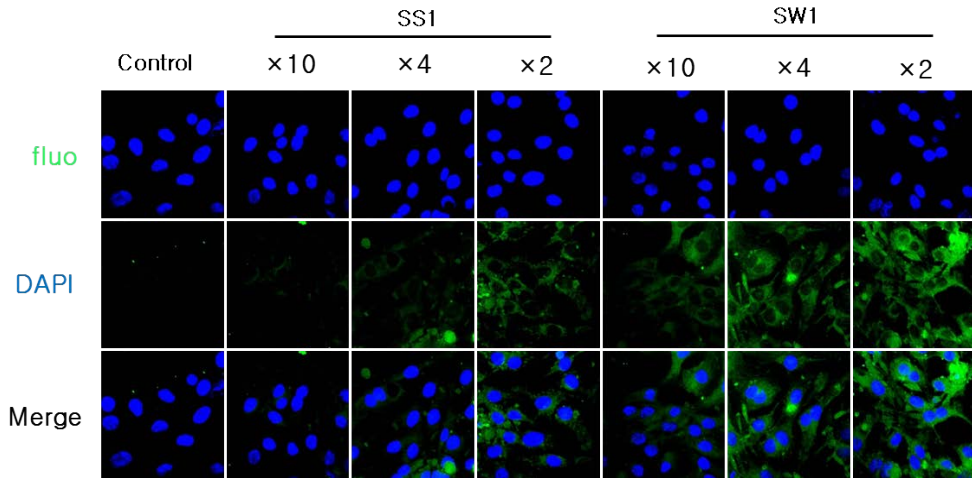
Figure 2 의 결과에서, 세포 내 칼슘의 증가는 칼슘항상성을 유지시켜주는 이온채널 단백질들의 변화를 통해서 유도되었을 것이라고 생각되었다. 따라서, 미세먼지가 칼슘항상성 유지 관련 조절단백질인 SERCA2a, RyR2, NCX, CAMKII 의 mRNA 와 단백질 발현 및 인산화 활성 변화에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. mRNA 발현 수준은 각각 SS1 과 SW1 시료를 8 시간 동안 처리 후 확인하였고,

단백질 발현 수준은 24 시간, 인산화 활성 정도는 30 분동안 처리 후 세포를 걷어내어 qPCR 및 western blot assay 를 통해 확인하였다.

그 결과, 칼슘항상성 조절 단백질이 SS1 과 SW1 을 처리함으로써 농도 의존적인 발현 및 인산화 활성이 변하여 심근세포내 칼슘 항상성이 붕괴됐음을 확인하였다. (Figure 3) 이러한 발현 정도 또한 SS1 대비 SW1 에서 칼슘 조절 단백질의 기능저하에 영향을 주는 것으로 나타났다.

SERCA2a 의 경우, mRNA 와 단백질 발현 모두 유의적으로 감소하는 효과를 확인하였는데 가장 높은 농도에서의 단백질 발현 정도를 control 과 비교하였을 때 SNU-115 는 26.77%, SNU-62 는 62.6%의 감소효과를 확인하였다 (Figure 3 B,C). 이러한 SERCA2a 의 발현감소는 sarcoplasmic reticulum(SR)의 칼슘유리를 촉진하는 결과를 초래하게 된다. CaMKII 는 mRNA level 에서는 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었으나 (Figure 3B), CaMKII 의 인산화 활성 정도는 SS1 에서는 control 과 비교하여 발현 변화를 크게 확인하지 못하였고, SW1 에서 뚜렷한 농도 의존적인 감소 효과를 보였다 (Figure 3D). RyR2 의 인산화 활성 정도는 control 과 비교하여 SS1 에는 30.4%, SW1 에는 64% 증가하였으나 (Figure 3E) mRNA 발현 정도는 약간의 증가하는 경향을 보였으나 그 발현의 폭이 크게 나타나지 않았다 (Figure 3B). 이 결과를 통해서, 대기 미세먼지에 의한 RyR2 의 영향은, RyR2 자체의 발현은 변하지 않으면서 다른 인산화 효소 (kinase)에 의해 인산화 되어 작용함으로써 SR 의 칼슘 유출을 증가시키는 것을 알 수 있었다.

A



B

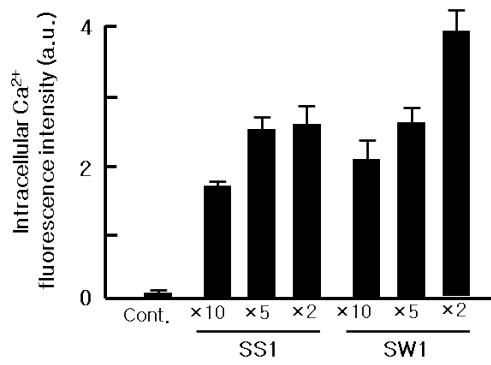
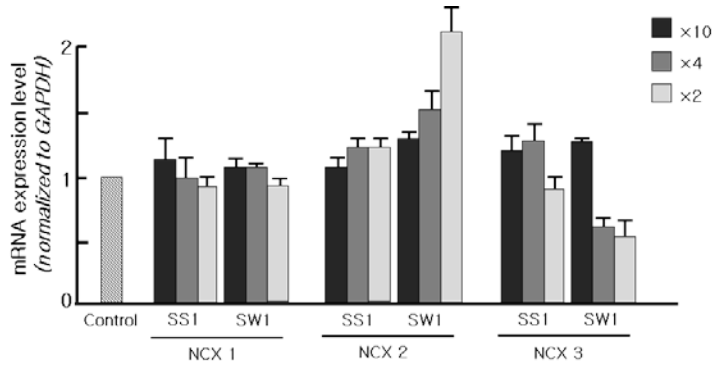


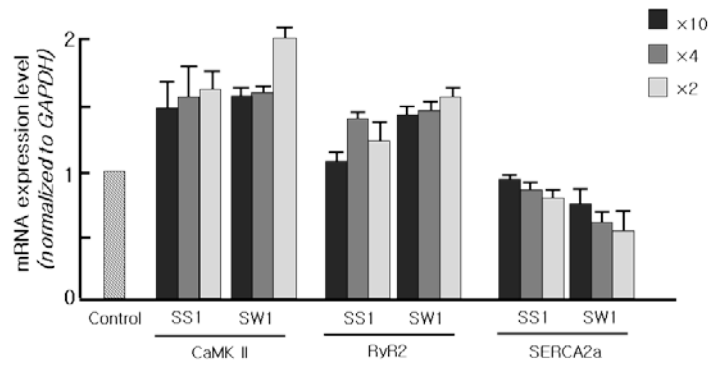
Figure 2. Effects of ambient particulate matter on intracellular calcium handling in cardiomyocytes.

(A) Cardiomyocytes were exposed to control (DMSO), SS1 and SW1 in different concentrations. Intracellular calcium fluorescence was measured Fluo-4am. intracellular Fluo-4am images were taken by confocal laser microscope (Olympus, Japan) using excitation and emission wavelengths of 488 nm and 520 nm respectively (fluorescent images were magnified $\times 40$). (B) The fluorescence intensity of an equivalent field size (2.5×2.5 mm) was measured using the Image J quantification software.

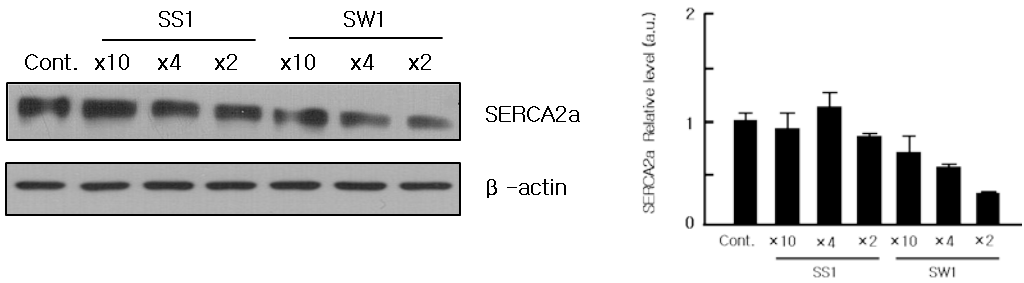
A



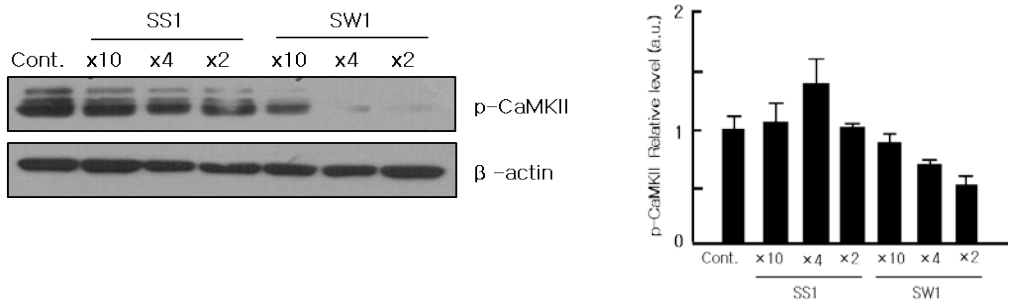
B



C



D



E

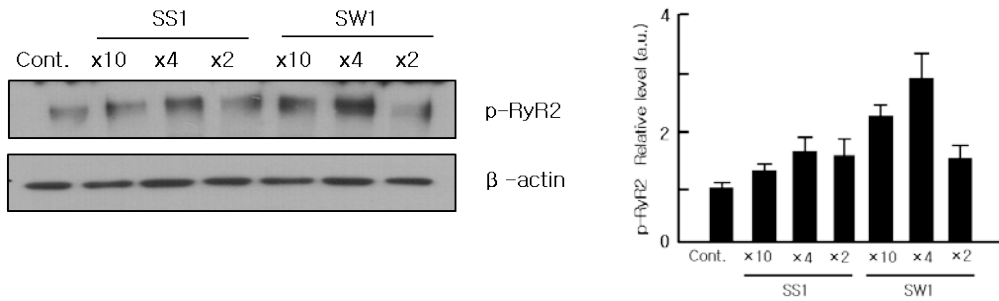


Figure 3. Altered expression levels of calcium homeostasis-related proteins by ambient particulate matter

(A) NCX 1, NCX 2, NCX 3, (B) CAMKII, RyR2, SERCA2a mRNA levels were measured by quantitative real time PCR. Rat cardiomyocytes were treated for 12 hours with SS1 and SW1. The mRNA levels were normalized to GAPDH.

(C) SERCA2a, (D) p-CaMKII, (E) p-RyR2 expression were measured by western blot. Rat cardiomyocytes were treated for 24 hours with SS1 and SW1, phosphorylation level were treated for 30min. protein-band intensities normalized to β -actin, relative to control.

4. 대기 미세먼지가 심근세포내 활성산소 생성에 미치는 영향

4.1 심근세포내 활성산소 변화

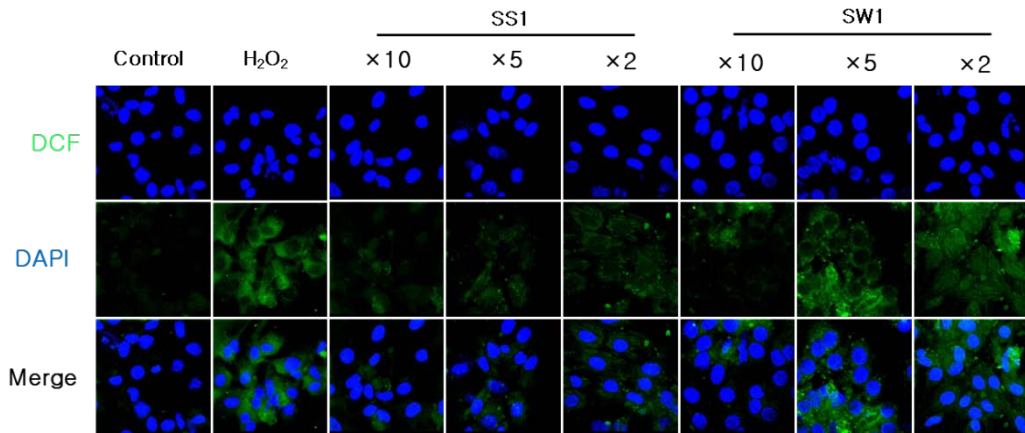
심근세포에서 계절별 미세먼지 시료의 처리 농도에 따른 세포 내 활성산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS)의 변화는 형광염료인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)가 세포 내 생성된 활성산소와 반응하여 형광물질인 DCF로 산화하는 원리를 이용하여 측정하였다.

심근세포에 각 농도 별로 SS1 과 SW1 시료를 처리하였고, negative control은 DMSO를 사용하였으며 positive control은 H₂O₂를 처리함으로써 세포 내 ROS 생성을 유도한 후 1 시간 후의 형광강도 변화를 측정하여 비교하였다.

그 결과 Figure 4 에서 보는 바와 같이 DMSO만 처리한 negative control의 경우 DCF fluorescence 값의 변화가 거의 없었고 반대로 H₂O₂를 처리한 positive control인 경우 negative control 대비 72.5%의 형광강도 증가를 보였다. 또한 SS1 과 SW1 을 처리한 심근세포에서는 모두 농도의존적으로 ROS가 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며, 특히 SW1 이 SS1 과 비교하여 농도 별로 각각 15.5%, 15%, 12.5% 더 많은 ROS가 생성되는 것을 확인하였다.

따라서 미세먼지는 빠른 시간 안에 심근세포 내 활성산소를 증가시킴으로써 세포의 산화적 손상을 야기하며 그 발생 정도는 SW1 에서 더 높게 나타났음을 확인하였다.

A



B

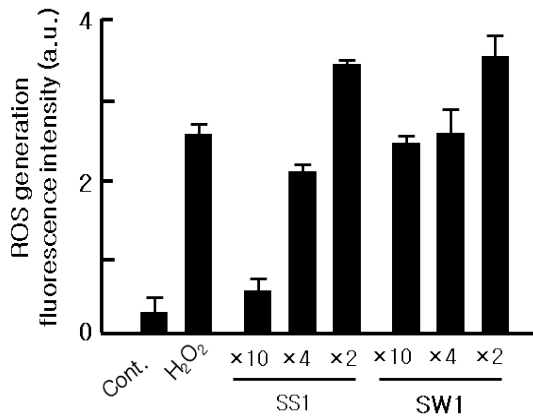


Figure 4. Intracellular ROS generation by ambient particulate matter in cardiomyocytes.

Evaluation of intracellular peroxide generation was based on the dye 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) the fluorescence.

(A) DMSO (negative control), H₂O₂ 100μM (positive control), intracellular H₂DCF-DA images were taken by confocal laser microscope (Olympus, Japan) using excitation and emission wavelengths of 488 nm and 520 nm respectively (fluorescent images were magnified ×400). (B) The fluorescence intensity of an equivalent field size (2.5 × 2.5 mm) was measured using the Image J quantification software.

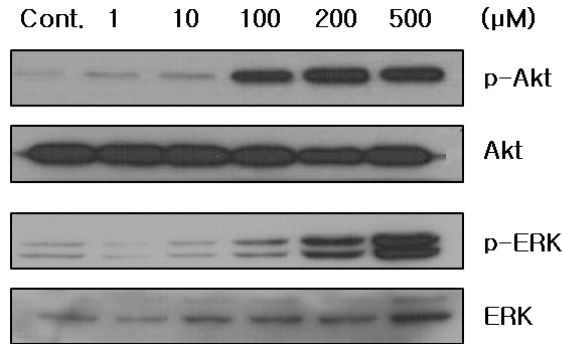
.

3.2 ERK 및 Akt 인산화 활성 변화

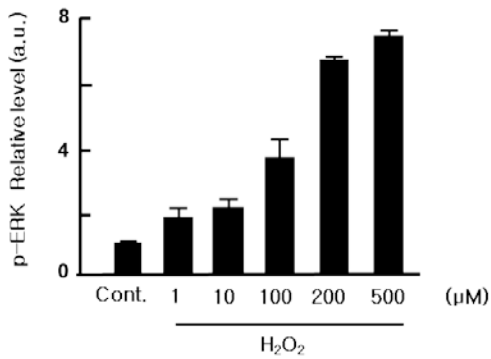
ERK 와 AKT 는 세포의 증식, 생존, 분화, 사멸 등의 다양한 세포생리 조절에 관여하는 대표적인 신호전달 분자로 세포의 산화적 손상 시 외부세포 신호전달 조절 효소인 ERK 와 AKT 관련 신호전달 시스템이 관여하여 활성화 되는 것으로 알려져 있다 [53].

따라서 미세먼지에 의한 세포 내 신호 전달계에 미치는 영향을 확인하기 위해 먼저 활성산소가 Akt와 ERK 경로에 미치는 영향을 확인하였다. 배양된 심근세포에 H₂O₂ 농도를 1, 10, 100, 200 및 500 μM로 달리하여 처리한 다음 30 분 후 심근세포에서 해당 단백질 발현 수준을 각각 확인하였다. 그 결과 p-ERK와 p-Akt 수준 모두 H₂O₂ 100μM 에서부터 농도에 비례하게 아무것도 처리하지 않는 심근세포에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였다 (Figure 5). 이는 ROS가 Akt와 ERK를 활성화시킴으로써 세포의 사멸을 유도한다고 볼 수 있다. 이를 바탕으로 미세먼지에 의한 Akt, ERK 의 활성화 변화 양상을 확인하기 위해서 SS1 과 SW1 을 농도 별로 각각 30 분 동안 처리하여 마찬가지로 심근세포에서 해당 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과 DMSO를 처리한 control로 비교하였을 때 미세먼지 처리 시 Akt와 ERK 모두 농도 의존적으로 활성화 양상을 보였다 (Figure 6). 그러나 AKT의 활성화는 ERK의 활성화에 비교하였을 때 비교적 낮은 수준으로 발현되는 것으로 확인되었다.

A



B



C

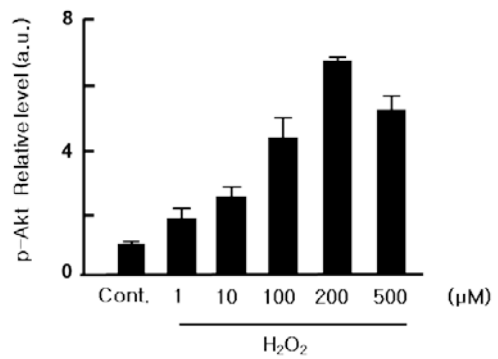
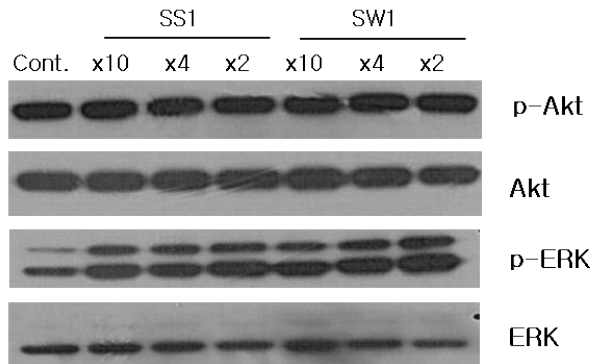


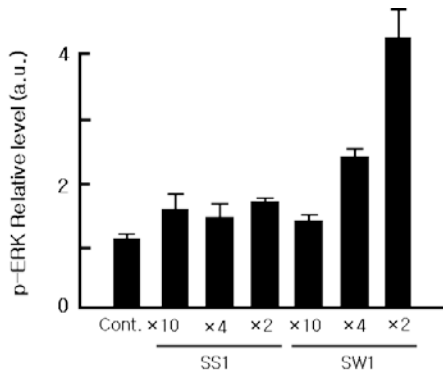
Figure 5. Altered phosphorylation levels of Akt and ERK by H₂O₂

(A) The expression of P-Akt and ERK were measured by western blot. Rat cardiomyocytes were treated for 30 min with H₂O₂ (1–500μM) (B) protein-band intensities were normalized to Akt and ERK, relative to control.

A



B



C

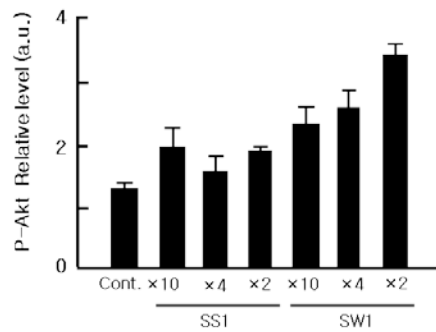


Figure 6. Altered phosphorylation levels of Akt and ERK by ambient particulate matter.

(A) The expression of p-Akt and ERK were measured by western blot. Rat cardiomyocytes were treated for 30 min with SS1 and SW1. (B),(C) protein-band intensities normalized to Akt and ERK, relative to control.

4. 활성산소가 미세먼지로 인한 심장부정맥 발생에 미치는 영향

부정맥의 발생기전은 칼슘 항상성의 붕괴 외에도 매우 복잡적이며 다양한 인자들이 연관되어 현재 그 기전이 명확히 규명되지 않는 것으로 보고되어 왔다. 그 중 산화적 스트레스가 허혈/재관류 손상과 협심증, 심비대 등 여러 질환의 발생에 있어서 중요한 원인을 제공하는 것으로 보고 되었다 [46, 54]. 따라서, 활성산소가 미세먼지로 유도된 arrhythmogenic 효과, 즉 세포 내 칼슘축적과 칼슘조절단백질의 기능이상에 어떤 상관관계가 있는지 알아보기 위해 free radical scavenger 인 N-acetylcysteine (NAC)을 전처리를 통해서 확인하였다.

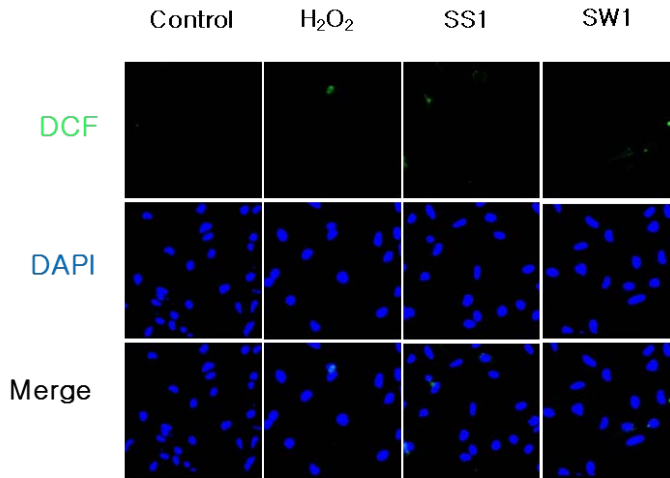
먼저, 미세먼지로 유도된 활성산소에서 NAC의 효과를 확인하기 위하여, 배양한 심근세포에 NAC (1mmol/L)를 1 시간 동안 전처리 한 후, SS1 과 SW1(x4)를 각각 처리하여 1 시간 동안 배양하여 심근세포내 활성산소 정도를 확인하였다. 그 결과, H₂O₂와 미세먼지에 의한 활성산소 증가는 전 처리된NAC에 대하여 증가된 활성산소를 상당히 감소시키는 억제효과를 보였다. (Figure 7)

위와 같은 조건으로 NAC 에 의한 심근세포 내 칼슘 변화를 확인하기 하였다. 그 결과 미세먼지에 의해 증가된 세포 내 칼슘은 NAC 1mM 을 전처리 하였을 경우 통계학적으로 유의하게 칼슘농도의 증가가 억제되는 것을 확인하였다 (Figure 8). 그 다음으로 칼슘 항상성 관련 유전자의 발현 변화를 확인하였다. mRNA 발현 수준은 DMSO 를 처리한 대조군과 비슷한 수준의 발현양상을 보였으며, 이는 단백질 발현에서도 같은 경향을 나타내었다 (Figure 9).

이러한 결과를 바탕으로 NAC 이 세포 내 미세먼지에 의한 활성산소와 칼슘의 증가를 억제시켜 심장 부정맥 발생을 억제할 것이라 생각되었고, 이는 최종적으로, 심근세포의 전기학적 신호 변화를 확인함으로써 미세먼지로 유도된 심장 부정맥 발생에 있어서 NAC 의 효과를 확인 하였다. NAC 을 처리한 세포외액을 1 분동안 흘러 보낸 후, 각각 DMSO 와 SS1, SW1 을 용해시킨 세포외액으로 교체하여 전기활성을 기록하였다. 그 결과, SS1 과 SW1 모두 NAC 에 의한 RMP, APA 는 큰 회복 효과가 없었으나, SS1 의 Heart rate 를 크게 감소 시켰다. 그러나 SW1 에는 그 효과를 확인하지 못하였다.

이러한 결과는 미세먼지에 의해 유발된 arrhythmogenic 효과에 있어서 활성산소가 중요한 역할을 하는 것으로 보여진다. (Figure 10)

A



B

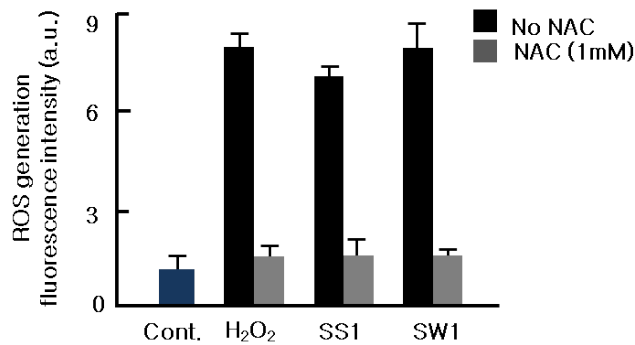
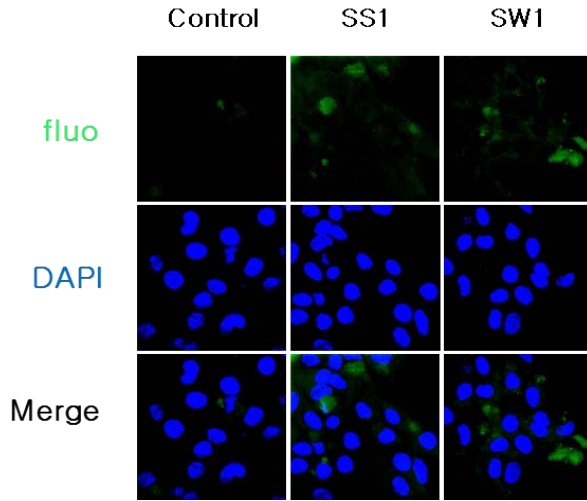


Figure 7. Scavenging effects of NAC on intracellular ROS induced by ambient particulate matters in cardiomyocytes.

(A),(B) Rat cardiomyocytes were pretreatment with ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC, 1mmol/L) for 30min. Then, cells were treated with SS1 (x 4), SW1 (x 4) for 1h. Evaluation of intracellular peroxide generation was based on the dye 2,7-dichlorodihydroflurescein diacetate (H₂DCF-DA) the fluorescence.

A



B

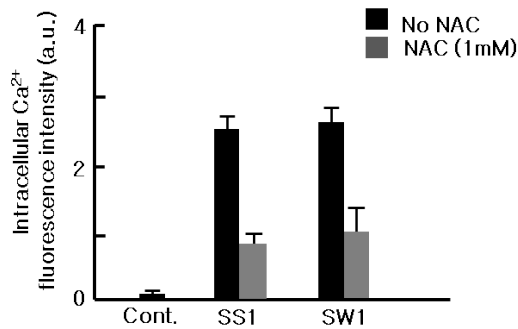


Figure 8. Scavenging effects of NAC on intracellular calcium handling induced by ambient particulate matters in cardiomyocytes.

(A),(B) Rat cardiomyocytes were pretreatment with ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC, 1mmol/L) for 30min. Then, cells treated with SS1 (x 4), SW1 (x 4) for 1h. Evaluation of intracellular calcium fluorescence was based on the dye Fluo-4am.

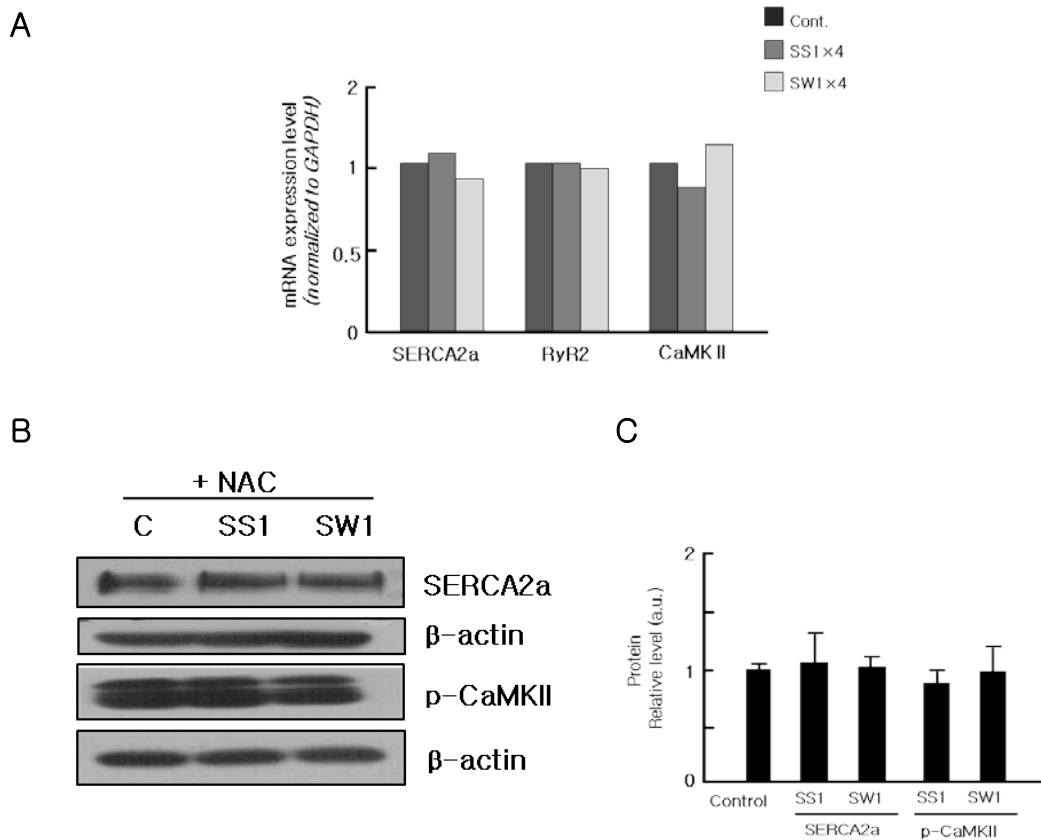


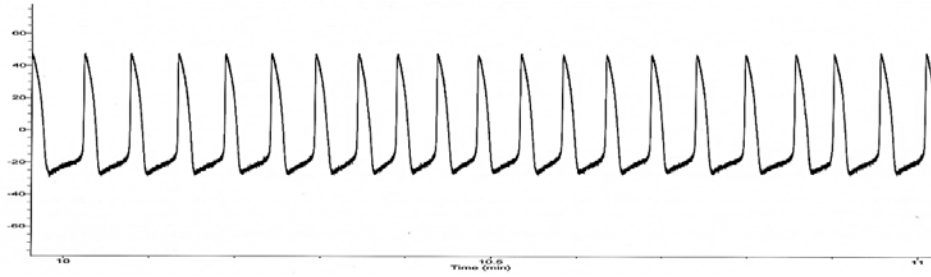
Figure 9. Scavenging effects of NAC on calcium homeostasis-related proteins alteration induced by ambient particulate matter.

(A) SERCA2a, RyR2 and CaMKII mRNA levels were measured by quantitative real time PCR. Rat cardiomyocytes were pretreatment with N-acetylcysteine (NAC, 1mmol/L) for 30min. Then, cells were treated with SS1 (x4), SW1 (x4) for 12h. mRNA levels normalized to GAPDH.

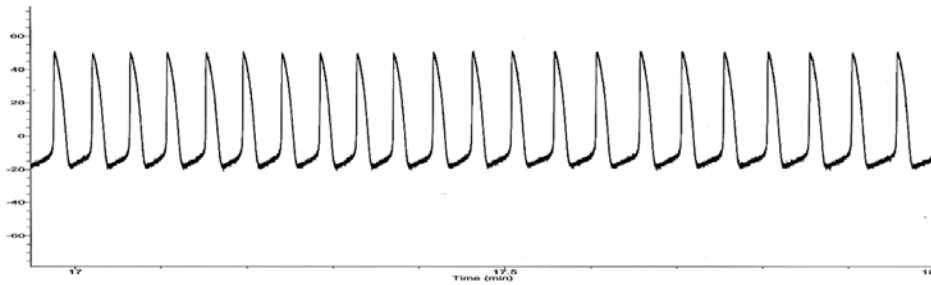
(B) SERCA2a, p-CaMKII were measured by western blot. protein-band intensities normalized to β -actin, relative to control.

A

a.

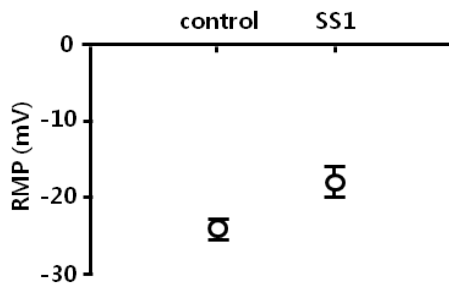


b.

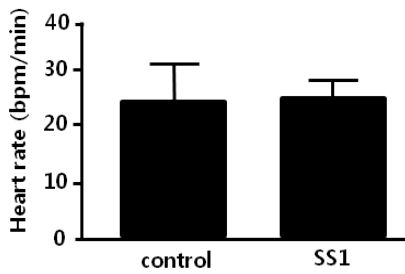


B

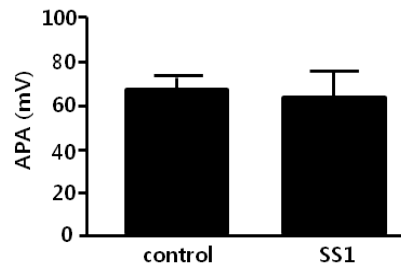
a.



b.

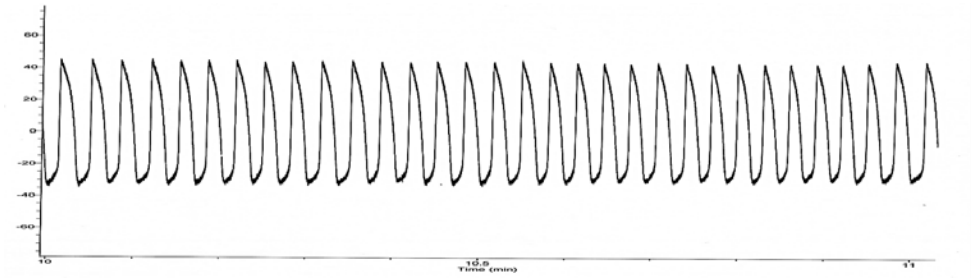


c.

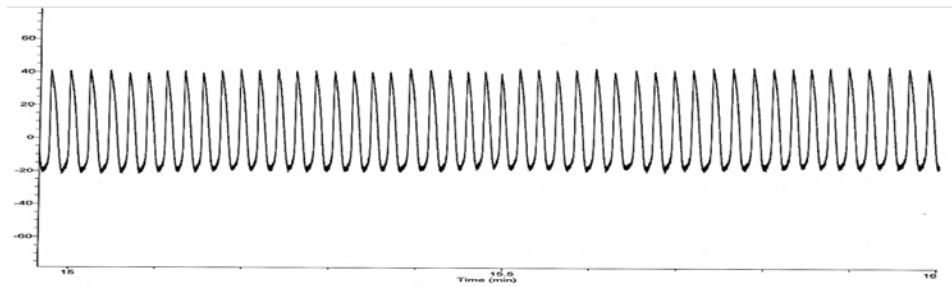


C

a.

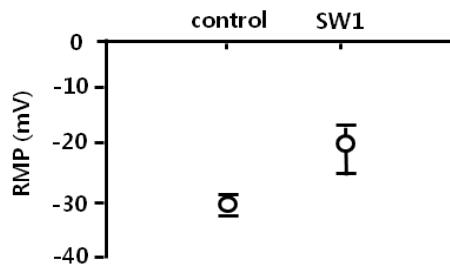


b.

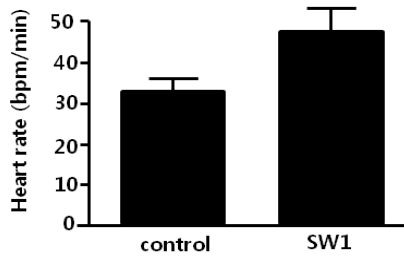


D

a.



b.



c.

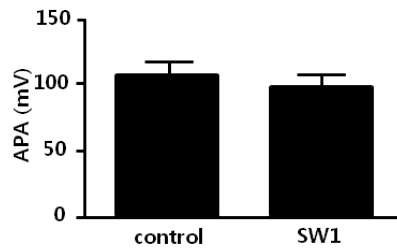


Figure 10. Scavenging effects of NAC on ambient particulate matter induced arrhythmogenic effect.

Representative recordings of (A) a. DMSO (control), b. SS1 (x 4) with NAC, (C) a. DMSO (control), SW1 (x 4) with NAC. The arrhythmogenic effects by SS1 and SW1 with NAC were summarized in (B),(D).

IV. 결론 및 고찰

산업화, 도시화의 영향으로 사람들은 오염된 대기 환경 속에 노출되어 살아가고 있다. 이로 인해 다양한 역학 및 임상 결과에서 미세먼지 농도의 증가는 호흡기 질환 및 염증성 질환의 증가뿐만 아니라 심혈관계 질환을 발생시키는 것으로 나타났다 [1-5]. 그러나 이러한 대기 미세먼지의 인체 영향에 관여하는 인자들이나 관련 메커니즘에 관한 기전을 규명하기 위한 연구는 상대적으로 많지 않다.

이에 본 연구에서는 우리나라 중심지인 서울에서 수집한 대기 미세먼지 (SS1, SW1)와 그 함유된 성분과 농도를 분석한 자료를 제공받아 본 연구를 진행하였으며, 수축과 이완 능력을 가진 심근세포를 분리 및 배양 후 미세먼지에 노출시킴으로써 미세먼지가 심장 부정맥 발생에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 이와 동시에 관련 메커니즘을 확인하기 위해 미세먼지에 의해 유도되는 심근세포에서의 칼슘 항상성 관련 유전자 발현 패턴 및 그 변화에 있어서 활성산소의 역할을 확인하였다

그 결과, 심근세포의 전기적 활성을 측정하는 patch-clamp 를 통하여 SS1 과 SW1 는 Figure1 과 같이 심근세포의 세포막전위와 심장 수축 정도를 변화시킴으로써 심장부정맥을 일으킬 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다. 그러나 분당 심장 박동수를 기록한 결과를 보면, control 자체도 일반적인 박동수 보다 훨씬 느린 상태에서 진행되었기 때문에, 이 결과는 control 과 미세먼지를 처리했을 때의 변화를 상대적인 유의성으로만 확인을 할 수 있다.

이러한 미세먼지에 의한 부정맥 발생 영향은 대기 가스상 오염물질인 일산화탄소를 건강한 rat 에 비교적 적은 농도로 4 주 동안 노출시킨 것 (CO<1ppm)과 고동도로 24 시간 노출시킨 후 excitation-contraction coupling (ECC)를 분석하였을 때, Heart rate, sarcomere length, action potential 을 감소시켜 심장 부정맥을 발생시킨다는 연구결과에서도 확인 할 수 있다. 이때, 일산화탄소는 칼슘의 이동을 느리게 하여 세포 내 칼슘을 축적을 유도하게 되고 SERCA2a 발현을 감소시킴으로써 부정맥을 발생시킨다는 결론을 도출하였다 [55].

다음으로 SS1 과 SW1 에 의한 심근세포내 칼슘과 활성산소 변화를 확인하였는데, 각각 농도 의존적으로 먼지시료를 처리하였을 때 Figure 2, 4 에서 볼 수 있듯이, 유의적으로 칼슘축적과 ROS 를 증가시키는 것을 확인 할 수 있었다. 세포질 내 칼슘의 축적의 증가는 칼슘을 저장하는 SR 의 기능장애를 의미한다고 볼 수 있으며, SR 의 기능장애는 수축 시 증가된 칼슘을 SR 에 재유입 시키지 못하기 때문에 심장의 규칙적인 수축과 이완을 방해하여 정상적인 혈액 방출의 어려움으로 심장 부정맥을 발생시킬 수 있을 것으로 생각된다. 또한 미세먼지에 의한 ROS 의 증가는 세포의 단백질, 지질, 세포막, DNA 을 손상시키게 되는데, 연구결과를 통해 UCPs, diesel exhaust particles (DEPs), ambient particulate matter (APM), cigarette smoke 는 심장과 폐에서 ROS 를 증가시키고,[56] 이러한 산화 스트레스의 증가는 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 와 activator protein-1 과 같은 전사인자들을 활성화시켜

케모카인 및 염증성 사이토카인을 발현하는 유전자를 발현 시킨다고 알려져 있다 [57].

본 연구에 사용된 먼지시료는 organic carbon, PAH, Oxy-PAH, Dicarboxyl acid 등 복합적인 물질로 이루어져 있기 때문에 어떠한 물질이 ROS 생산에 관여하는지는 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만, 몇몇 연구들에서 PAH 와 퀴논, 크롬, 니켈 철 등의 중금속이 ROS 증가에 관련이 있는 것으로 보고하고 있다 [58, 59]. 특히, 본 연구에서 칼슘과 ROS 의 변화는 먼지시료 처리 후 1 시간 후에 측정된 결과로, 대기 미세먼지에 의한 인체 영향은 장기간뿐만 아니라 단시간의 노출에도 인체 영향을 야기 시킨다고 할 수 있다.

심근세포에서 다양한 이온채널들이 세포 내 칼슘 조절 메커니즘에 연관되어 작용한다. 이러한 이온 채널들의 기능저하는 심부전과 부정맥의 발생에 있어서 중요한 역할을 하게 되는데, 이를 근거로 SS1 과 SW1 을 처리하였을 때 칼슘 이온 채널들의 변화를 mRNA 와 단백질 발현 수준에서 확인하였다. 그 결과 SERCA2a 는 농도 의존적으로 mRNA 와 단백질 발현이 감소되는 것을 확인하였으며, RyR2 는 빠른 시간 내에 미세먼지에 의해 인산화 정도가 증가됨을 확인하였으나, 농도 의존적인 변화는 확인하지 못하였다. 또한 CaMKII 는 phospholamban (PLB)와 RyR2 을 타겟으로 하여 phosphorylation 이 되어 SR 의 칼슘 방출을 유도하고 SR 의 칼슘 정도를 줄여 부정맥을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있는데 [60, 61], 본 연구의 결과에서는 P-RyR2 는 증가되는 것을 확인하였으나 이를 조절하는 CaMKII 의 phosphorylation 은 농도 의존적으로 크게 감소되는 것을 확인하였으며, 이와 반대로 mRNA 수준은 농도 의존적으로 증가되는

것을 확인하였다. 이러한 결과는 미세먼지에 의한 인산화 정도의 변화만으로도 칼슘 항상성에 관련된 이온채널들의 변화를 유도할 수 있다는 사실을 확인 할 수 있었다.

최근에 산화스트레스는 CaMKII 을 활성화시킴으로써, action potential duration (APD)를 연장 시키고 후탈분극 (afterdepolarization)을 촉진한다는 보고가 있었다 [62]. 따라서, 활성산소가 미세먼지에 의한 부정맥 발생에 미치는 영향을 확인하기 위해 ROS 의 억제제로 알려진 NAC 을 심근세포에 처리하였더니 세포질 내 칼슘의 감소와 동시에 칼슘 항상성 관련 이온채널들의 발현이 정상적인 수준으로 회복됨을 확인하였고, 이는 patch-clamp 를 통해서 부정맥 발생 효과가 감소됨을 다시 한번 확인하고자 하였으나, heart rate 의 회복을 제외하고는 RMP 와 APD 의 회복효과는 확인하지 못하였다.

본 연구를 통하여, 미세먼지로 인한 심근세포내 칼슘과 활성산소의 증가는 심장 부정맥 발생에 있어서 주요 기전으로 작용할 수 있음을 확인하였으며, 특히 활성산소 저해제는 세포 내 칼슘증가로 인한 칼슘채널의 과인산화와 기능저하에 뚜렷한 보호효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 더 나아가 활성산소의 저해제는 미세먼지로 인한 부정맥 발생에 있어서 잠재적인 치료 가능성을 제시할 것 이라 예상되며, 미세먼지에 의해 발생하는 부정맥의 기전을 밝히는데 있어 중요한 단서 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

V. References

1. Laden F, Schwartz J, Speizer FE, Dockery DW: **Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006, **173**(6):667–672.
2. Kaplan GG, Hubbard J, Korzenik J, Sands BE, Panaccione R, Ghosh S, Wheeler AJ, Villeneuve PJ: **The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association.** *The American journal of gastroenterology* 2010, **105**(11):2412–2419.
3. Mar TF, Norris GA, Koenig JQ, Larson TV: **Associations between air pollution and mortality in Phoenix, 1995–1997.** *Environmental health perspectives* 2000, **108**(4):347–353.
4. Sun Q, Hong X, Wold LE: **Cardiovascular effects of ambient particulate air pollution exposure.** *Circulation* 2010, **121**(25):2755–2765.
5. Brook RD: **Cardiovascular effects of air pollution.** *Clinical science (London, England : 1979)* 2008, **115**(6):175–187.
6. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ: **Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease.** *Circulation* 2004, **109**(1):71–77.
7. Katsouyanni K, Touloumi G, Spix C, Schwartz J, Balducci F, Medina S, Rossi G, Wojtyniak B, Sunyer J, Bacharova L *et al*: **Short-term effects of ambient**

- sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: results from time series data from the APHEA project. *Air Pollution and Health: a European Approach. BMJ (Clinical research ed)* 1997, **314**(7095):1658–1663.
8. Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devlin RB: **Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent.** *Toxicology and applied pharmacology* 1997, **146**(2):180–188.
 9. Harrison RM, Yin J: **Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health?** *The Science of the total environment* 2000, **249**(1–3):85–101.
 10. Hsiao WL, Mo ZY, Fang M, Shi XM, Wang F: **Cytotoxicity of PM(2.5) and PM(2.5–10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays.** *Mutation research* 2000, **471**(1–2):45–55.
 11. Chin BY, Choi ME, Burdick MD, Strieter RM, Risby TH, Choi AM: **Induction of apoptosis by particulate matter: role of TNF-alpha and MAPK.** *The American journal of physiology* 1998, **275**(5 Pt 1):L942–949.
 12. Klein CB, Conway K, Wang XW, Bhamra RK, Lin XH, Cohen MD, Annab L, Barrett JC, Costa M: **Senescence of nickel-transformed cells by an X chromosome: possible epigenetic control.** *Science (New York, NY)* 1991, **251**(4995):796–799.
 13. Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, MacNee W: **Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals.** *Environmental health perspectives* 1997, **105 Suppl 5**:1285–1289.

14. Prahalad AK, Inmon J, Ghio AJ, Gallagher JE: **Enhancement of 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage by coal and oil fly ash in relation to particulate metal content and availability.** *Chemical research in toxicology* 2000, **13**(10):1011–1019.
15. Dockery DW, Pope CA, 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Jr., Speizer FE: **An association between air pollution and mortality in six U.S. cities.** *The New England journal of medicine* 1993, **329**(24):1753–1759.
16. !!! INVALID CITATION !!!
17. Schwartz J: **Is there harvesting in the association of airborne particles with daily deaths and hospital admissions?** *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 2001, **12**(1):55–61.
18. Schwartz J: **Assessing confounding, effect modification, and thresholds in the association between ambient particles and daily deaths.** *Environmental health perspectives* 2000, **108**(6):563–568.
19. Hetland RB, Cassee FR, Refsnes M, Schwarze PE, Lag M, Boere AJ, Dybing E: **Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions.** *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2004, **18**(2):203–212.
20. Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH, Cho MH: **Comparative study of PM2.5 – and PM10 – induced oxidative stress in rat lung epithelial cells.** *Journal of veterinary science* 2004, **5**(1):11–18.

21. Simkhovich BZ, Kleinman MT, Kloner RA: **Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms.** *Journal of the American College of Cardiology* 2008, **52**(9):719–726.
22. Matsuzawa Y, Guddeti RR, Kwon TG, Lerman LO, Lerman A: **Treating Coronary Disease and the Impact of Endothelial Dysfunction.** *Progress in cardiovascular diseases* 2014.
23. Sun Q, Wang A, Jin X, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD, Aguinaldo JG, Fayad ZA, Fuster V, Lippmann M *et al.*: **Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model.** *Jama* 2005, **294**(23):3003–3010.
24. Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Ohgami A, Vincent R, van Eeden SF: **Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis.** *Journal of the American College of Cardiology* 2002, **39**(6):935–942.
25. Kunzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, Thomas D, Peters J, Hodis HN: **Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles.** *Environmental health perspectives* 2005, **113**(2):201–206.
26. Harrabi I, Rondeau V, Dartigues JF, Tessier JF, Filleul L: **Effects of particulate air pollution on systolic blood pressure: A population-based approach.** *Environmental research* 2006, **101**(1):89–93.
27. Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, Katus HA, Kranzhofer R: **Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor- κ B**

- and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *Journal of vascular research* 2005, **42**(5):415-423.
28. Ibald-Mulli A, Stieber J, Wichmann HE, Koenig W, Peters A: **Effects of air pollution on blood pressure: a population-based approach.** *American journal of public health* 2001, **91**(4):571-577.
29. Ying Z, Yue P, Xu X, Zhong M, Sun Q, Mikolaj M, Wang A, Brook RD, Chen LC, Rajagopalan S: **Air pollution and cardiac remodeling: a role for RhoA/Rho-kinase.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2009, **296**(5):H1540-1550.
30. Zaza A, Rocchetti M: **Calcium Store Stability as an Antiarrhythmic Endpoint.** *Current pharmaceutical design* 2014.
31. Sedmera D, Kockova R, Vostarek F, Raddatz E: **Arrhythmias in the developing heart.** *Acta physiologica (Oxford, England)* 2014.
32. Ljungman PL, Berglind N, Holmgren C, Gadler F, Edvardsson N, Pershagen G, Rosenqvist M, Sjogren B, Bellander T: **Rapid effects of air pollution on ventricular arrhythmias.** *European heart journal* 2008, **29**(23):2894-2901.
33. Dockery DW, Luttmann-Gibson H, Rich DQ, Link MS, Mittleman MA, Gold DR, Koutrakis P, Schwartz JD, Verrier RL: **Association of air pollution with increased incidence of ventricular tachyarrhythmias recorded by implanted cardioverter defibrillators.** *Environmental health perspectives* 2005, **113**(6):670-674.
34. Peters A, Liu E, Verrier RL, Schwartz J, Gold DR, Mittleman M, Baliff J, Oh JA,

- Allen G, Monahan K *et al.*: Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 2000, **11**(1):11–17.
35. Huser J, Wang YG, Sheehan KA, Cifuentes F, Lipsius SL, Blatter LA: Functional coupling between glycolysis and excitation–contraction coupling underlies alternans in cat heart cells. *The Journal of physiology* 2000, **524** Pt **3**:795–806.
36. Weiss JN, Karma A, Shiferaw Y, Chen PS, Garfinkel A, Qu Z: From pulsus to pulseless: the saga of cardiac alternans. *Circulation research* 2006, **98**(10):1244–1253.
37. Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM: Upregulation of Na(+)/Ca(2+) exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circulation research* 1999, **85**(11):1009–1019.
38. Shannon TR, Pogwizd SM, Bers DM: Elevated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circulation research* 2003, **93**(7):592–594.
39. Hobai IA, O'Rourke B: Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation–contraction coupling in canine heart failure. *Circulation* 2001, **103**(11):1577–1584.
40. Fabiato A: Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *The Journal of general physiology* 1985, **85**(2):291–320.
41. Bers DM, Bassani JW, Bassani RA: Na–Ca exchange and Ca fluxes during

- contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996, **779**:430–442.
42. Ferrari R, Alfieri O, Curello S, Ceconi C, Cargnoni A, Marzollo P, Pardini A, Caradonna E, Visioli O: **Occurrence of oxidative stress during reperfusion of the human heart.** *Circulation* 1990, **81**(1):201–211.
43. Volk T, Schmutzler M, Engelhardt L, Pantke U, Laule M, Stangl K, Grune T, Wernecke KD, Konertz W, Kox WJ: **Effects of different steroid treatment on reperfusion-associated production of reactive oxygen species and arrhythmias during coronary surgery.** *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 2003, **47**(6):667–674.
44. McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ: **Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans.** *European heart journal* 1993, **14**(11):1493–1498.
45. Cozzi E, Hazarika S, Stallings HW, 3rd, Cascio WE, Devlin RB, Lust RM, Wingard CJ, Van Scott MR: **Ultrafine particulate matter exposure augments ischemia-reperfusion injury in mice.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2006, **291**(2):H894–903.
46. Gold DR, Litonjua A, Schwartz J, Lovett E, Larson A, Nearing B, Allen G, Verrier M, Cherry R, Verrier R: **Ambient pollution and heart rate variability.** *Circulation* 2000, **101**(11):1267–1273.
47. Przyklenk K, Kloner RA: **"Reperfusion injury" by oxygen-derived free radicals? Effect of superoxide dismutase plus catalase, given at the time of reperfusion,**

- on myocardial infarct size, contractile function, coronary microvasculature, and regional myocardial blood flow. *Circulation research* 1989, **64**(1):86–96.
48. Bolli R, Zughalb M, Li XY, Tang XL, Sun JZ, Triana JF, McCay PB: **Recurrent ischemia in the canine heart causes recurrent bursts of free radical production that have a cumulative effect on contractile function. A pathophysiological basis for chronic myocardial "stunning"**. *The Journal of clinical investigation* 1995, **96**(2):1066–1084.
49. Steinberg D: **Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime**. *Nature medicine* 2002, **8**(11):1211–1217.
50. Ghio AJ, Kim C, Devlin RB: **Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers**. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000, **162**(3 Pt 1):981–988.
51. Zima AV, Blatter LA: **Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters**. *Cardiovascular research* 2006, **71**(2):310–321.
52. Seddon M, Looi YH, Shah AM: **Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure**. *Heart (British Cardiac Society)* 2007, **93**(8):903–907.
53. Hayashi H, Tsuchiya Y, Nakayama K, Satoh T, Nishida E: **Down-regulation of the PI3-kinase/Akt pathway by ERK MAP kinase in growth factor signaling**. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2008, **13**(9):941–947.
54. Cerbai E, Ambrosio G, Porciatti F, Chiariello M, Giotti A, Mugelli A: **Cellular**

- electrophysiological basis for oxygen radical-induced arrhythmias. A patch-clamp study in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation* 1991, **84**(4):1773–1782.
55. Andre L, Boissiere J, Reboul C, Perrier R, Zalvidea S, Meyer G, Thireau J, Tanguy S, Bideaux P, Hayot M *et al*: **Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010, **181**(6):587–595.
56. Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, Gonzalez-Flecha B: **Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation.** *Environmental health perspectives* 2002, **110**(8):749–755.
57. Shukla A, Timblin C, BeruBe K, Gordon T, McKinney W, Driscoll K, Vacek P, Mossman BT: **Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000, **23**(2):182–187.
58. Silbajoris R, Ghio AJ, Samet JM, Jaskot R, Dreher KL, Brighton LE: **In vivo and in vitro correlation of pulmonary MAP kinase activation following metallic exposure.** *Inhalation toxicology* 2000, **12**(6):453–468.
59. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A: **Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage.** *Environmental health perspectives* 2003, **111**(4):455–

- 460.
60. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, Brown JH: **The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure.** *Circulation research* 2003, **92**(8):912–919.
61. Ji Y, Li B, Reed TD, Lorenz JN, Kaetzel MA, Dedman JR: **Targeted inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac longitudinal sarcoplasmic reticulum results in decreased phospholamban phosphorylation at threonine 17.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(27):25063–25071.
62. Xie LH, Chen F, Karagueuzian HS, Weiss JN: **Oxidative-stress-induced afterdepolarizations and calmodulin kinase II signaling.** *Circulation research* 2009, **104**(1):79–86.

VI. 감사의 글

걱정과 기대, 설레임 속에 시작한 대학원 생활이 어느덧 2 년이라는 시간이 훌쩍 지나 졸업을 앞두고 있습니다. 2 년이라는 시간 동안 힘든 시간도 있었지만, 무엇보다도 바꿀 수 없는 새로운 지식들을 배우고 시행착오를 거치면서 만들어낸 결과를 통해서 연구에 대한 즐거움과 앞으로 더 나아갈 길이 많다는 것을 더욱 느끼게 해주는 시간이 된 것 같습니다. 무엇보다도 저를 믿어주시고 걱려를 아끼지 않으셨던 분들의 관심 덕분에 더욱 큰 도움이 되었습니다.

많이 부족했던 저를 믿고 기다려주시고 연구에 대한 많은 지도뿐 만 아니라 삶에 대해 늘 긍정적인 희망을 심어주셨던 지도 교수님 송희상 교수님께 정말 감사드립니다. 교수님의 조언과 걱려가 있었기에 아직도 많이 부족하지만 오늘의 제가 있는 것 같습니다. 대학교 졸업 후에도 안부를 물으며 관심을 가져주신 유영범 교수님, 최필선 교수님, 이재혁 교수님, 공성래 교수님 그리고 항상 다 잘될 거라며 걱정하지 말라고 따뜻한 말씀을 해주신 이영진 교수님 모두 감사드립니다.

힘들 때나 기쁠 때나 늘 함께였던 심혈관질환연구실 식구들. 실험실의 중심역할을 하며 함께 있어 늘 든든했던 리진 언니, 많은 시간을 함께하며 의지했던 슬기, 주영이, 대학원에서 만난 친구 진아, 그리고 내 소중한 친구들 연진이, 선미, 미경이, 도희, 민형이, 곁이 이렇게 소중한 사람들이 곁에 있어 감사하고 또 감사합니다.

마지막으로 2 년동안 묵묵히 저를 믿어주시고 항상 격려해 주셨던 가족들에게 감사드립니다. 엄마, 아빠 사랑해요. 저를 믿어주신 것보다 제가 더 큰 사람이 되어 효도할게요. 조금만 기다려 주세요.

이 논문이 새로운 시작을 위한 밑거름이 되어, 항상 노력하고 겸손한 자세를 잊지 않고 긍정과 열정을 가지면서 이 길을 계속 이어나가겠습니다. 지나온 시간보다 앞으로의 펼쳐질 밝은 미래가 있기에 앞으로의 저의 미래가 더욱 기대가 됩니다.