

2015년 2월
석사학위 논문

대기 미세먼지로 인한
혈관평활근세포 이동 기전 규명

조선대학교 대학원

의 과 학 과

조 주 영

대기 미세먼지로 인한 혈관평활근세포 이동 기전 규명

Identification of mechanism underlying
vascular smooth muscle cell migration induced
by ambient particulate matter

2015년 2월 25일

조선대학교 대학원

의 과 학 과

조 주 영

대기 미세먼지로 인한 혈관평활근세포 이동 기전 규명

지도교수 송 희 상

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2014년 11월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

조 주 영

조주영의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 부교수 방일수



위 원 조선대학교 조교수 이준식



위 원 조선대학교 조교수 송희상



2014년 11월

조선대학교 대학원

CONTENTS

List of Table	1
List of Figures	2
Abstract	3
I. Introduction	5
II. Materials and Methods	9
II-1. 재료	9
II-2. 혈관평활근세포의 분리 및 배양	9
II-3. 세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성 측정	10
II-4. transwell migration assay	11
II-5. Immunoblot assay	12
II-6. Gelatin zymography	13
II-7. 통계분석	14
III. Results	15
III-1. 계절별 미세먼지 시료 분석	15
III-2. 대기 미세먼지가 혈관평활근세포 이동에 미치는 영향	18
III-3. 혈관평활근세포 내 reactive oxygen species (ROS)의 변화	20
III-4. 대기 미세먼지가 MMP의 발현에 미치는 영향	22
III-5. 대기 미세먼지가 Akt 및 ERK 활성화에 미치는 영향	28
III-6. 대기 미세먼지에 의한 MMP의 발현에 NF- κ B의 활성화가 미치는 영향	30
IV. Discussion	32
V. References	38
VI. 감사의 글	43

List of Table

Table 1. Components of Ambient particulate matter

List of Figures

Figure 1. Effect of ambient particulate matter on VSMCs migration

Figure 2. Effect of ambient particulate matter on ROS generation in VSMCs

Figure 3. Effect of ambient particulate matter on the expression of MMP2 in VSMCs

Figure 4. Effect of ambient particulate matter on the expression of MMP9 in VSMCs

Figure 5. Effect of ambient particulate matter on the activity of MMP2 in VSMCs

Figure 6. Effect of ambient particulate matter with NAC on the expression of MMP2
in VSMCs

Figure 7. Effect of ambient particulate matter with NAC on the activity of MMP2 in
VSMCs

Figure 8. Effect of ambient particulate matter with NAC on the activation of
Akt/ERK in VSMCs

Figure 9. Effect of ambient particulate matter with NAC on the activation of NF- κ B in
VSMCs

Abstract

Identification of mechanism underlying vascular smooth muscle cell migration induced by ambient particulate matter

Juyeong Jo

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

Department of medical science,

Graduate school of Chosun University

Vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferate and migrate in response to various forms of stress such as mechanical trauma, inflammation, growth factors, oxidative stress and alterations in blood pressure or flow. Clinical disorders that are characterized by VSMCs proliferation, migration, and the consequent neointima formation include atherosclerosis, posttransplant vasculopathy, and restenosis after balloon angioplasty. Ambient particulate matter (PM) is nowadays recognized as having major impacts on the cardiovascular system. Growing evidence suggests that long-term exposure to fine particulate matter (PM_{2.5}) air pollution contributes to the risk of cardiovascular disease (CVD) morbidity and mortality. We examined the effects of PM on the VSMCs migration in an urban area of Seoul, Korea, and investigated the molecular mechanisms that are involved.

The VSMCs were isolated from rat aorta and exposed to SS1 (summer

season PM) and SW1 (winter season PM) in different concentration. Cell migration was assessed by boyden chamber assay and ROS generation was detected by confocal microscopy using the indicator H₂DCF-DA. Expression of MMP (Matrix metalloproteinase) and activation of Akt, ERK1/2 and p-65 (NF-κB) were evaluated by Western blot analysis.

SS1 and SW1 significantly increased cell migration and ROS generation. Protein levels of MMP2 and MMP9 were increased in a concentration-dependent manner as compared to the control. The activation of p-65 (NF-κB) was increased but not the activation of Akt and ERK1/2. The involvement of MMP2 and MMP9 expression, and Akt, ERK1/2 and NF-κB activation in the responses was determined by western blot assay for their corresponding proteins using ROS scavenger *N*-acetylcysteine (NAC). NAC (2mM) decreased only the SS1 and SW1-induced intracellular ROS generation but not MMP2 and MMP9 expressions, and Akt and ERK activation. However, NF-κB activation was increased.

In conclusion, the present data demonstrated that nontoxic-dose SS1 and SW1 induces cell migration and ROS generation in VSMCs. This result suggests the possibility that the refined study would be needed for each component of the SS1 and SW1 for the identification of specific signaling pathways.

I. Introduction

심혈관질환의 기저병리상태인 죽상동맥경화증 (Atherosclerosis)은 과거에는 혈관벽에 단순히 지질이 침착되어 발생하는 병으로 인식되었으나, 최근에는 혈관의 내피세포, 면역세포, 혈관평활근세포 (Vascular smooth muscle cell, VSMC)들의 복잡한 염증작용에 따른 혈관 내부의 조직학적 변화로 알려지고 있다[1]. 당뇨병, 고혈압, 이상지혈증에서 최근에 위해성이 확인된 여러 화학적 요인에 이르기까지 다양한 위험인자에 노출된 혈관 내피세포는 화학적, 기계적, 그리고 면역학적 반응을 통해 손상을 받게 되고, 콜레스테롤 및 여러 부착분자가 복합적으로 작용하여 최종적으로 대식세포, T 림프구, 혈관평활근세포 (VSMC)등의 지속적인 만성 염증반응을 야기함으로써 죽상동맥경화를 일으키게 된다[2]. 이렇게 진행되는 죽상동맥경화증에 관련된 다양한 인자들이 죽상동맥경화증의 정도 및 활성도를 나타낼 수 있는 표지가 될 뿐 아니라 질병의 발생기전에 중요하게 작용하므로 이에 대한 충분한 이해가 필요할 것으로 사료된다. 또한 질병의 발생 원인에 해당하는 여러 위험인자에 따른 질병발생기전을 규명하기 위한 보다 구체적인 연구는 죽상동맥경화증을 포함한 여러 심혈관질환의 예방과 치료에 있어서 그 기반을 구축할 수 있을 것이다.

죽상동맥경화증의 병리학적 변화에 있어 면역반응에 의한 염증반응으로 형성된 단순한 지방덩어리인 지방선조가 더욱 심한 병변인 지방반, 즉 plaque로 진행하게 되는데, 이 때 가장 특징적인 소견은 혈관 중막에 위치하고 있던 VSMC가 형질 변화에 따라 증식하게 되고 혈관 내막 쪽으로 이주한다는 점이다[1]. 이러한 VSMC의 형질 변화에는 성장인자 (growth factor), 사이토카인 (cytokine), 지질 (lipid), 활성산소종 (reactive oxygen species) 을 포함한 여러 인자가 작용하게 되는데[1, 3], 그 중 Matrix metalloproteinase (MMP)는 여러 성장인자의 능력과 세포-기질, 세포-세포 간의 연락을 조절함으로써 VSMC의 이동, 증식 및 생존에 관

여하는 효소로 알려져 있다[4, 5].

MMP에 속하는 효소군은 고도로 유사한 아미노산 서열을 가진 단백질 분해효소로[6], VSMC의 이동과 증식과정에서 세포 외막의 분해 작용을 하고 그 결과 방출된 세포외기질의 remodeling으로 VSMC의 성장 환경을 형성한다. 또한 atherosclerotic lesion에서 세포외기질을 분해시키는데 작용함으로써 불안정한 plaque형성에 기여하게 된다[7]. 특히 MMP2 (72kDa)와 MMP9 (92kDa)은 세포외기질의 구성성분에 포함되는 lamin, fibronectin, heparin sulphate, proteoglycan 및 collagen 등을 분해시키는데 필수적인 것으로[8], 대부분의 연구에서 다루어져 왔으며 VSMC의 이동과 증식에 있어서 서로 다른 Mechanism을 통하여 유도 매개체로 작용함이 밝혀졌다[9, 10].

대기오염 (air pollution)은 고체 또는 작은 방울의 액체 형태로 대기의 공기와 미세먼지 (particulate matter, PM)내에 존재하는 것으로 건강에 유해한 영향을 유도하는 주요 물질로 간주된다[11]. 특히 대기 미세먼지에 의한 심폐질환의 유병률과 사망률이 지속적으로 높아지고 있는데 기반하여[12, 13], 죽상동맥경화증 발생의 위험 인자로 주목되고 있다. 최근에는 PM에 장기간 노출되었을 때의 심혈관계 질환에 대한 위험성이 단기간 노출되었을 때보다 10배 이상 증가함이 보고되었다[14]. PM_{2.5} (particulate matter size ≤ 2.5)에 대한 노출은 죽상동맥경화증의 진행·염증반응·고혈압을 포함한 질병에 대한 민감성을 증가시킨다는 사실이 혈압·심박수·심근세포 소포체에서의 Ca^{2+} 전달 등과 같은 심근세포의 기능을 *in vitro* 수준에서 확인함으로써 보고되었으며[15-20], PM₁₀ (particulate matter size ≤ 10)에 의존적인 죽상동맥경화증의 진행과 발달에 대한 위험성 또한 혈압의 변화·동맥경화반의 형성 증가·혈관내막에의 지질 및 대식세포의 축적을 통하여 확인 및 보고되었다[21].

ROS (Reactive oxygen species, ROS)는 산소원자를 포함한 반응성이 매우 높은 분자로 호기성 대사과정 동안 세포의 다양한 부위에서 생성되며, 세포 내 신호 전달 및 항상성 등에 매우 중요한 역할을 한다[22]. ROS의 농도는 자외선이나 높은 온도와 같은 여러 환경적 스트레스로 인해 극적으로 증가하게 되는데, 최근에는 대기 미세먼지와 그 구성성분인 여러 화학 물질에 의해 생성되는 ROS가 세포에 미치는 영향이 활발히 연구되고 있다[23-26]. 대기 미세먼지에 노출된 세포에서 발생하는 ROS에 의한 산화 스트레스는 세포괴사, 세포자살, 자가 소화작용 등을 통한 세포의 염증반응 형성에 관여하는데[27, 28], 특히 혈관에서 낮은 농도의 ROS는 VSMC의 signaling과 mitogenesis를 유도하는 주요 자극체로 작용하는 반면 높은 농도의 ROS는 lipid peroxidation, DNA damage, mitochondrial dysfunction을 유도하여 곧 VSMC의 proliferation, hypertrophy, migration의 signaling event의 전달과 연합에 있어 주요 stimuli로 작용한다[29-31]. 또한 손상된 혈관에서의 VSMC에서는 H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} 와 같은 ROS의 생성이 증가하며[32, 33], 이는 고혈압에서 죽상동맥경화증 및 재협착증에 이르는 모든 심혈관계 질환의 주요 원인이자 현상으로 보고되고 있다[34].

죽상동맥경화증의 병리학적 현상은 VSMC의 이동 및 증식에 관여하는 여러 단백질들의 발현유무에 따라 조절되며 이는 다양한 신호전달 경로를 통하여 이루어진다. 그 중 VSMC의 이동에 필수적인 효소인 MMPs와 관련한 신호전달경로는 여러 연구를 통하여 보고 되었으며, 그 경로가 ROS를 통한다는 것 또한 확인된 바 있다. Akt와 ERK 경로는 세포의 성장, 생존 및 분화에 중요한 역할을 담당하는 신호전달인자로서 VSMC에서의 MMPs의 전사 수준을 조절하는 경로로 알려져 있다[24, 35-37]. VSMC에서 MMP9의 발현이 ROS로 인한 산화 스트레스에 의존적인 ERK-NF- κ B pathway를 통한 다는 사실이 밝혀졌으며[38],

MMP 발현의 전사 및 전사 후 조절 메커니즘을 ROS가 조절한다는 사실이 MMP2와 관련하여 보고되었다[39]. MMP9의 경우도 마찬가지로 그 활성을 조절하는데 ROS의 종류 중 하나인 H_2O_2 가 직접적인 자극으로 작용한다[40]. 다시 말해 VSMC에서의 MMP2와 MMP9 모두 ROS에 의해 활성화 된다[41, 42].

대기 미세먼지가 중요한 요인으로 작용하여 발생하는 심혈관계 질환, 그 중 죽상동맥경화는 미세먼지로 인해 발생하는 ROS와 산화 스트레스로 인한 혈관 내피세포의 기능 장애 및 염증반응 야기와 관련하여 진행된다는 사실은 여러 연구를 통해 밝혀져 왔다. 그러나 VSMC의 migration과 그 기전에 미치는 대기 미세먼지의 영향에 대해서는 명확히 알려진 바가 없다. 이에 본 연구는 미세먼지가 VSMC의 이동에 미치는 영향과 그 기전에 있어서의 ROS의 발생과 MMP의 발현을 확인하고, 그 구체적인 신호전달 경로 메커니즘을 단백질 및 분자적인 수준에서 확인하기 위해 시행되었다. 이를 위하여 우리나라 중심지인 서울에서 수집한 PM10 (particulate matter size $\leq 10\mu m$)으로 분류되는 미세먼지 샘플을 유해유기오염물질의 농도가 서로 다른 여름(SS1)과 겨울(SW1)로 분류하여 VSMC의 migration, ROS의 발생 정도, MMP의 발현 정도, 그리고 죽상동맥경화 진행의 주요 메커니즘으로 관여하는 신호전달경로로 밝혀진 Akt/ERK 경로 및 NF- κ B 경로의 활성화에 미치는 영향을 확인, 비교하였다.

II. Materials and Methods

II-1. 재료

본 연구에 사용된 대기 미세먼지 시료는 우리나라 수도권 지역인 서울의 여름철 (2007년 2월), 및 겨울철 (2007년 2월)의 대기 미세먼지를 수집하여 정제한 것으로 조선대학교 공과대학 환경공학과로부터 제공받았으며, 여름철 및 겨울철의 대기 미세먼지 시료를 각각 SS1, SW1으로 명명하였다. 각 시료는 정제된 상태 그대로를 원액 (4,032m³/ml)으로 하여 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 2, 4, 10배로 실험에 사용하였고, 모든 실험의 음성대조군으로 DMSO를 사용하였다.

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS (Fetal bovine serum), penicillin streptomycin 및 trypsin/0.53mM EDTA는 Welgene사로부터 구입하였다.

Dimethyl sulfoxide (DMSO)와 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)는 각각 BioShop와 Invitrogen사로부터 구입하였으며 transwell chamber는 Corning사로부터 구입하였다.

Anti-MMP2와 anti-MMP9은 Abcam사, 그리고 anti-phospho-Akt, anti-phospho-ERK, anti-phospho-p-65 및 anti-Akt는 Cell signaling Technology사로부터 구입하였으며, anti-ERK는 Santa Cruz Biotechnology사로부터 각각 구입하였다. Anti-β-actin은 Sigma-Aldrich사로부터 구입하였다.

II-2. 혈관평활근세포의 분리 및 배양

생후 6주령의 수컷 Sprague-Dawley rats (Charles River Japan, Hino,

Japan)에서 흉부대동맥을 적출하여 0.1% penicillin streptomycin을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에서 주위의 결합조직 및 지방조직과 혈액을 제거하고, 1mg/ml의 collagenase type I 과 0.5mg/ml의 elastase가 혼합된 DMEM에 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 세포 외막을 분리해낸 뒤 조각을 내어 새로운 collagenase와 elastase 혼합액에서 2시간 동안 반응시켰다(37°C). 효소소화법으로 분리되어 나온 혈관평활근세포 (vascular smooth muscle cell, VSMC)를 1,600 rpm으로 원심분리하여 침전시키고 얻어진 세포를 0.1% penicillin streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)를 함유한 DMEM에서 분산시킨 뒤 재원심분리(1,600 rpm)하여 얻어진 세포를 10% FBS DMEM에 충분히 분산시켜 CO₂배양기(37°C, 95% 공기, 5%CO₂)에서 배양하였다. 계대배양은 0.05% trypsin/0.53mM EDTA용액으로 처리하여 시행하였다. 획득하여 배양한 세포는 10계대 전후까지 실험에 이용하였다.

모든 실험에 사용된 세포는 시료를 처리하기에 앞서 0.1% FBS이 포함된 DMEM에서 24시간 동안 배양한 것으로(37°C), 동일한 조건에서 각 실험이 수행되었다.

II-3. 세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성 측정

VSMC 내에서 생성되는 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)를 표지하였다. H₂DCF-DA는 세포막을 통과할 수 있는 oxidation-sensitive probe로서 세포 내로 들어가서 세포 내 esterase에 의해 H₂DCF-DA의 acetate group이 해리되면서 비 형광성 nonfluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) 부분이 세포 내부에 포획되고, 이어서 ROS에 의한 산화반응으로 세포막을 통과 할 수 없는 형광산물인 2',7'-

dichlorofluorescein (DCF)로 전환된다. 이에 따라서 산화된 형태인 DCF가 나타내는 형광강도로 VSMC 내에서 생성된 ROS를 간접적으로 측정하였다.

5×10^4 cells/ml의 VSMC를 cover slip이 들어있는 24 well plate에 각 well 당 500 μ l씩 분주한 후 24시간 배양하여 세포를 cover slip에 부착시킨 후 음성대조군으로 DMSO, 양성대조군으로 H₂O₂ 200nM, 그리고 대기 미세먼지의 계절별 시료인 SS1와 SW1를 각각 농도 의존적으로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 1시간 배양하였다.

배양한 세포는 따뜻한 calcium free PBS (PBSc)로 두 번 씻어낸 후 10 μ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)와 50 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 함유한 PBSc를 가하고 빛을 차단한 곳에서 20분간 배양하였다. 10 μ M H₂DCF-DA 에 들어있는 각 well의 cover slip을 따뜻한 PBSc로 부드럽게 3번 씻어낸 후 조심스럽게 들어올려 잘 말린 뒤 세포가 부착된 면의 slip을 slide glass위에 mounting하여 confocal-laser scanning microscope (Fluoview FV1000 confocal system, Olympus)로 관찰하였다. 이때 형광을 나타내는 DCF는 480nm에서부터 535nm의 파장까지 발광 광도계로 측정되는데, 산화된 경우에는 515nm에서 빛을 발생하게 된다. Confocal-laser scanning microscope로 측정한 slip(3X3 mm)의 형광 강도는 Image J로 분석, 정량화 하여 나타내었다.

II-4. 혈관평활근세포의 이동성 분석 (transwell migration assay)

VSMC의 이동능은 3차원의 Boyden chamber assay를 사용하여 측정하였다. 실험에 사용된 Boyden chamber는 24-well plate에 사용되는 8.0 μ m pore, 6.5mm 직경의 transwell chamber이다.

먼저 VSMC를 0.1% FBS를 함유한 DMEM에서 24시간 동안 사전 배양하여 휴면상태로 만들고, trypsin 처리, 동일한 조건의 DMEM내에서 수량측정을 한 뒤 upper chamber의 insert 내부에 5×10^4 cells/100 μ l의 세포 부유액을 첨가하였다. upper chamber의 polycarbon filter는 10% FBS를 포함한 DMEM으로 24시간 동안 coating 하였다. low chamber에는 VSMC의 이동을 유도하는 conditioned medium 으로 사용된 upper chamber의 세포 부유액과 10배의 serum 농도 차이를 갖는 10% FBS를 함유한 DMEM을 각 well당 600 μ l씩 넣은 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, filter의 아랫면을 고정, 염색시키고 insert의 내면을 면봉으로 닦아 이동하지 않은 세포를 제거한 뒤 광학현미경을 이용하여 200배율로 관찰하였으며 well당 5개의 현미경 시야에 관찰된 세포 수를 정량화 하였다.

II-5. Western 법에 의한 세포내의 단백질 분석 (Immunoblot assay)

각 군의 VSMC를 차가운 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 세포를 수집하고 1mM PMSF를 함유한 RIPA buffer (1mM PMSF, protease inhibitor 함유)을 이용하여 용해시킨 후 세포 용해액을 14,000rpm 에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 모아 Bradford protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 단백질의 농도를 측정하고 총 단백질정량을 계산하였다. 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane(Bio-Rad laboratories. Inc.)에 transfer 하였다. 그리고 이 membrane을 5% skim milk를 포함한 Tris-buffered saline-Tween 20 (TBS-T, 0.1% Tween 20) 에서 1시간 동안 반응시켜 항체의 비특이적인 결합을 blocking 한 뒤, 검증의 대상이 되는 단백질의 항체 - MMP2(1:2000), MMP9(1:500), phosphor Akt(1:500), Akt(1:1000),

phosphor-ERK(1:1000), ERK(1:1000), phosphor-p65(1:1000), β -actin(1:10000) 로 24시간 동안 반응시켰다. 이어서 TBS-T용액으로 5분 간격으로 5회 세척한 다음 2차 항체로 1시간 30분 동안 반응시킨 뒤, Enhanced chemiluminescence reagent (ECL, BIONOTE, Animal genetics Ins.) 을 반응시켜 X-ray film상에 나타난 밴드의 크기를 통하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 밴드의 크기는 Image J를 사용하여 분석, 정량화 하여 나타내었다.

II-6. Gelatin zymography

Gelatin zymography는 Conditioned cultured medium안의 MMP2 (gelatinase A)와 MMP9 (gelatinase B)의 gelatin 분해 활성을 알아보기 위한 실험으로, 세포 내 포함된 단백질분해효소 MMP가 gel 내의 gelatin을 분해하여 gel을 염색하였을 때 나타나는 밴드로 효소의 활성 정도를 정량화 할 수 있다. MMP2의 활성 여부는 gel상에서 72kD(pro MMP2)와 62kD(active MMP2)에서 확인할 수 있으며, MMP9의 활성 여부는 92kD(pro MMP9)와 82kD(active MMP9)에서 확인할 수 있다.

먼저, VSMC에 각 실험군을 처리하여 48시간 배양한 배양액을 수집한 뒤 supernatant를 취해 0.8%의 gelatin을 첨가한 10% SDS-polyacrylamide gel에 준비된 시료를 전개하여 120V 로 4℃에서 5시간 동안 전기영동 하였다. 영동이 끝난 뒤 gel을 2.5% triton X-100으로 실온에서 30분간 2회 세척시킴으로써 SDS를 제거하고, 3차 증류수로 1시간 동안 세척하였다. 세척된 gel은 MMP를 활성화시키기 위해 developing buffer (50mM Tris-HCL, pH 7.5, 5mM CaCl₂, 1 μ M ZnCl₂, 0.02% sodium azide, 1% Triton X-100)로 37℃에서 24시간 동안 반응시킨 후, 1% Coomassie blue로 염색한 뒤 destaining buffer로 분해된 gelatin band가 보일 때까지 탈색하여 gel을 확인하였다. band의 크기는 laser densitometry를

통하여 분석 및 정량화 하였다.

II-7. 통계분석

모든 실험결과와 측정치는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며 각 자료군 간의 통계학적인 비교는 분산분석과 Student 't-test' 를 시행하여 p 값이 0.05 미만인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. Results

III-1. 계절별 미세먼지 시료 분석

대기 미세먼지 샘플의 주요 구성성분 및 조성 농도를 분석한 결과 (table. 1), 우리나라 수도권인 서울의 대기 중 미세먼지를 획득한 시료의 주성분에는 16종의 다환방향족탄화수소류 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH), 7종의 산화된 다환방향족탄화수소류 (oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons, oxy-PAH), 19종의 디카르복시산류 (dicarboxylic acid) 및 탄소유기물 (Carboneous)이 포함되어 있었다. 또한 디카르복시산류를 제외하고 대부분의 유해유기오염물질이 SS1보다 SW1에 상대적으로 더 높은 농도를 포함하고 있었다. PAH류의 경우 SW1는 $20.43\text{ng}/\text{m}^3$ 농도로 $2.76\text{ng}/\text{m}^3$ 인 SS1에 비해 7.4배 높은 농도를 함유하고 있으며, Oxy-PAH류와 탄소유기물도 마찬가지로 SW1은 $6.80\text{ng}/\text{m}^3$, $13.36\text{ng}/\text{m}^3$ 의 농도로 SW1의 $1.57\text{ng}/\text{m}^3$, $9.23\text{ng}/\text{m}^3$ 보다 각각 4.3배, 1.5배 높은 농도를 함유하고 있음을 확인하였다.

Table 1. Components of Ambient particulate matter (SS1, SW1)

	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[g,h,i]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-7,12-dione	–	–	0.79	3.19
Total	1.57	6.33	6.80	27.42

Table 1.continue

	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	5.20	20.97	7.83	31.57
EC	1.82	7.34	1.96	7.90
WSOC	2.20	8.87	3.56	14.35
Total	9.23	37.22	13.36	53.87

- OC : Organic carbon
- EC : Elemental carbon
- WSOC : Water-soluble organic carbon

III-2. 대기 미세먼지가 혈관평활근세포 이동에 미치는 영향

대기 미세먼지의 노출이 혈관평활근세포 (Vascular smooth muscle cell, VSMC)의 이동성에 미치는 영향을 알아보기 위해 DMSO를 처리한 대조군과 DMSO에 각각 4배로 희석한 SS1, SW1를 처리하고 24시간 후의 세포 이동정도를 확인 및 비교하였다. 또한 SS1와 SW1가 세포의 이동에 미치는 영향을 보다 유의하게 비교하기 위하여 PDGF를 2.5ng 처리한 세포의 이동 정도를 동일하게 확인하였다.

그 결과, DMSO만 처리한 세포군에 비하여 PDGF를 처리한 세포군에서 3배 이상의 세포 이동 수준을 보였고, SS1와 SW1를 처리한 실험군에서는 통계학적으로 유의하게 세포 이동이 증가하였다. 이는 PDGF로 인해 유도된 세포 이동 정도와 비교하여도 유의한 수치이다 (Fig. 1).

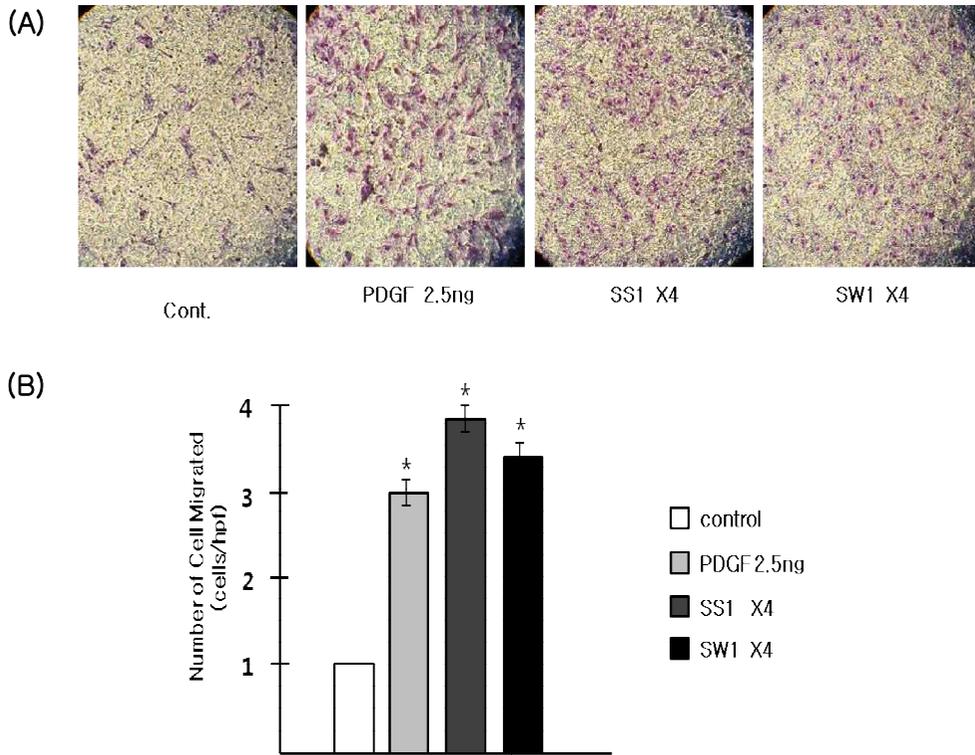


Fig 1. Effect of ambient particulate matter on VSMCs migration

(A) Transwell migration of VSMCs induced by SS1(X4) and SW1(X4). Control group was treated with DMSO. Positive control group was treated with DMSO and PDGF 2.5ng. The migration assay was performed 24 hours later in a chemotaxis chamber for 24 hours with a polycarbonate membrane coated with DMEM (containing 10% FBS) and designated concentrations of conditioned medium in the lower well. The cells migrating to the lower surface of the membrane were examined original magnification X200. (B) Five different areas of migrated cells were counted for each data point (n = 5). The asterisk indicates a significant difference (*p<0.05)

III-3. 대기 미세먼지에 의한 혈관평활근세포 내 reactive oxygen species (ROS)의 변화

대기오염이 세포 내 활성산소를 생성하고 산화적 스트레스를 일으킨다는 사실은 이미 보고되어 있다[43, 44]. 이를 토대로 대기 미세먼지가 VSMC 내 ROS 생성에 미치는 영향을 확인하고자 H₂DCF-DA assay를 실시하였다. H₂DCF-DA는 세포에 전처리 하면 세포 안으로 쉽게 들어가고, H₂O₂와 만나면 형광을 띠는 DCF를 생성하게 되므로 DCF의 형광강도를 측정하면 세포 내의 ROS 생성량을 알 수 있다. 또한 H₂O₂는 세포 내의 ROS를 효과적으로 유발시키는 물질로 알려져 있다. 이를 바탕으로 대기 미세먼지의 계절별 샘플을 각각 처리한 세포와 처리하지 않은 세포, 그리고 H₂O₂를 처리한 세포군을 확인 및 비교하였다.

본 실험 결과, DMSO를 단독으로 처리한 음성대조군에 비해 DMSO에 4배 희석된 SS1, SW1를 각각 처리한 군에서의 세포 내 ROS 생성수준이 약 10~20배로 증가함을 관찰하였다. 특히 H₂O₂ 100μM을 처리한 양성대조군과 유사한 수준으로 ROS 생성이 증가한 것을 통하여 *in vitro* 상에서의 대기 미세먼지에 의한 항산화 활성이 유효함을 확인할 수 있었다.

이러한 효과는 ROS 억제제로 사용되는 free radical scavenger인 *N*-acetylcysteine (NAC)을 2mM의 농도로 1시간 전에 전처리 한 뒤 ROS 생성 수준을 측정하였을 때 음성대조군과 비슷한 수준으로 소거되었다 (Fig. 2).

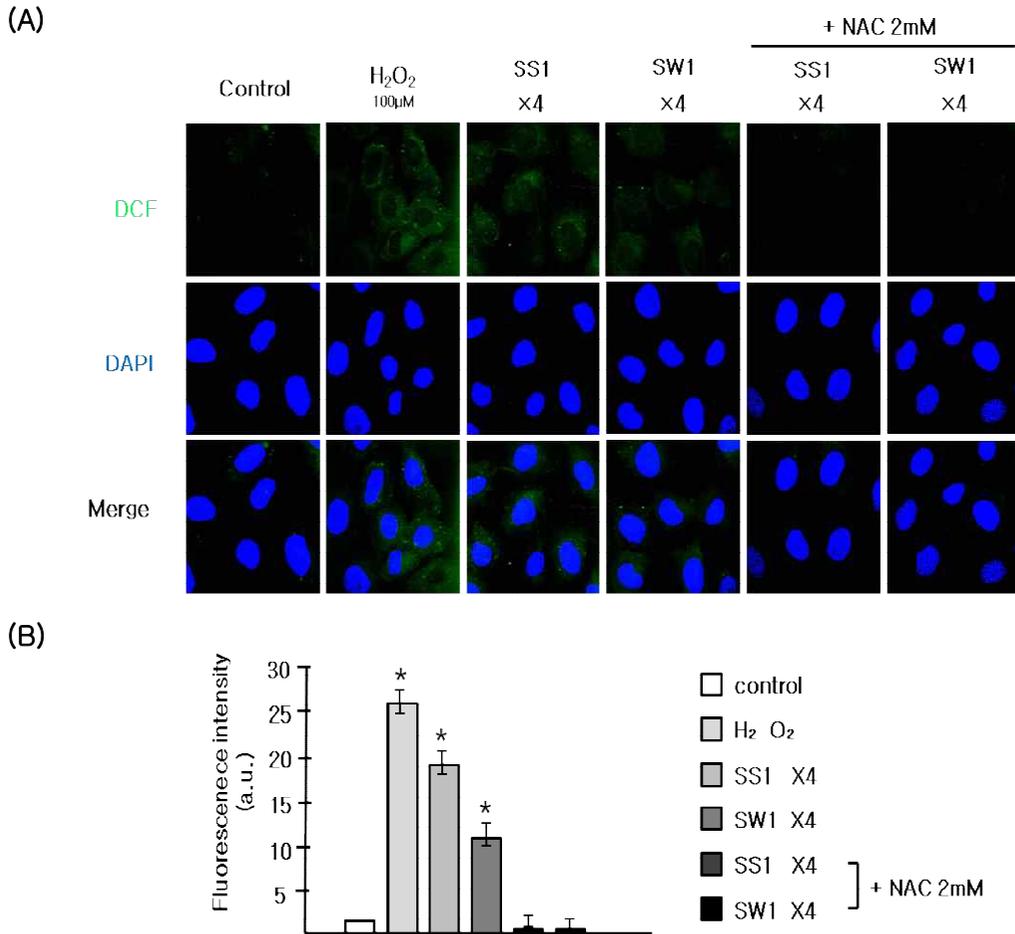


Fig 2. Effect of ambient particulate matter on ROS generation in VSMCs

(A) Intracellular ROS generation of VSMCs induced by SS1(X4) and SW1(X4). The effect was removed by NAC(ROS scavenger 2mM). Generation of ROS in VSMCs following 1hr exposure to vehicle control vs SS1, SW1(X4) using H₂DCF-DA as ROS probe. (Control group was treated with DMSO. Positive control group was treated with DMSO and 100μM H₂O₂.) ROS production was observed at the X60 magnification. (B) These experiments were performed at least two times with similar result (n = 2), *p<0.05 versus the control.

III-4. 대기 미세먼지가 MMP의 발현에 미치는 영향

MMP는 VSMC의 이동과 침윤을 촉진시키는 단백질로 보고되었다[7, 9, 10]. 또한 MMP는 활성산소종 (ROS)에 의해 유도된다는 보고[38-43]를 바탕으로 대기 미세먼지의 노출에 의한 VSMC의 전이 효과를 MMP의 단백질 수준과 활성화 수준을 통하여 간접적으로 확인하고자 western blot assay와 gelatin zymography를 시행하였으며, 이에 대한 ROS의 영향을 확인하기 위하여 ROS 억제제인 NAC의 효과도 조사하였다. 이때 SS1, SW1를 각각 X10, X4, X2로 처리한 후 48시간에서의 그 수준을 확인하였다.

Immunoblot을 이용한 실험 결과 SS1, SW1를 처리한 세포에서의 MMP2과 MMP9의 단백질 수준이 농도 의존적으로 통계적으로 유의하게 증가하였다 (Fig. 3, Fig. 4). Gelatin zymography를 통하여 확인한 MMP2의 활성화 수준에서도 통계적으로 유의한 증가를 보였다 (Fig. 5). 이러한 효과가 NAC을 2mM 전처리 하였을 때 SS1의 경우 30%가, SW1의 경우 미미한 수준으로 감소되었다 (Fig. 6). 또한 gelatin zymography를 이용한 실험 결과 VSMC의 세포외기질 분해효소인 MMP2의 gelatin 분해 능력이 SS1와 SW1의 처리로 인해 증가함에 따라 통계적인 차이를 확인하였다 (Fig. 7). 이에 대한 NAC의 효과는 SW1의 경우에서만 유의적으로 나타났다.

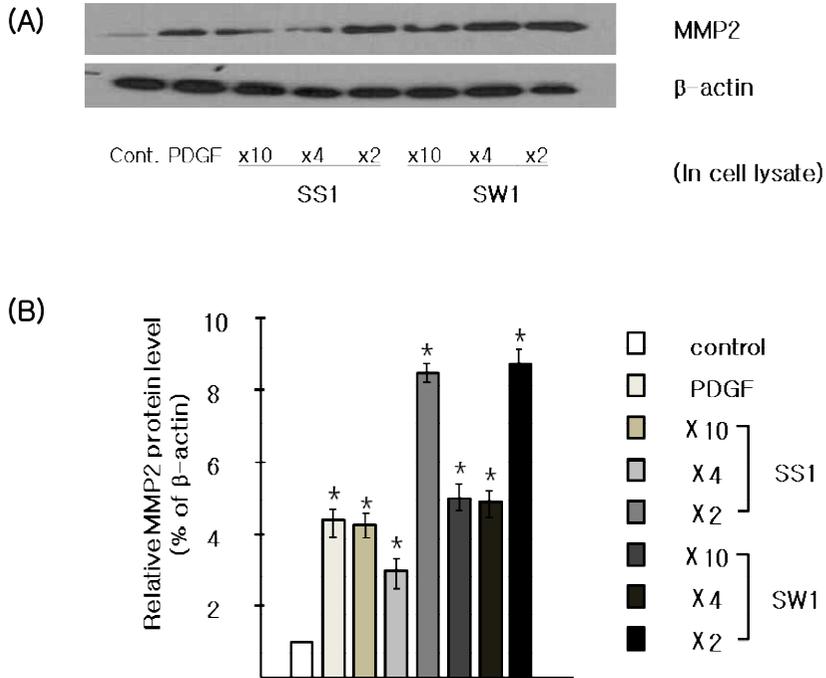


Fig 3. Effect of ambient particulate matter on the expression of MMP2 in VSMCs

(A) The expressions of MMP2 proteins were measured by western blot. The band density was normalized with β-actin (internal controls). The total protein loaded per lane was 70μg; detection of MMP2 and loaded per lane was 15μg; detection of β-actin. (B) Histogram showing average data for MMP2 protein in the control, positive control and the treated each sample (SS1, SW1) in dose-dependent. Densitometry analysis of three independent western blots shows quantitation of MMP2 levels (n = 3). *p<0.05 versus the control.

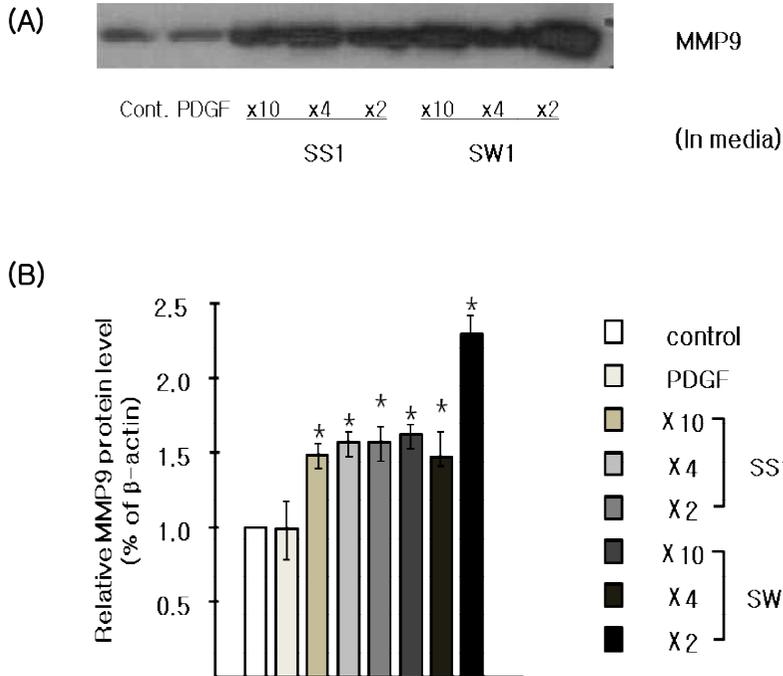


Fig 4. Effect of ambient particulate matter on the expression of MMP9 in VSMCs

(A) The expressions of MMP9 proteins were measured by western blot. The band density was normalized with β -actin (internal controls). The total protein loaded per lane was $70\mu\text{g}$; detection of MMP9 and loaded per lane was $15\mu\text{g}$; detection of β -actin. (B) Histogram showing average data for MMP9 protein in the control, positive control and the treated each sample (SS1, SW1) in dose-dependent. Densitometry analysis of three independent western blots shows quantitation of MMP9 levels ($n = 3$). $*p < 0.05$ versus the control.

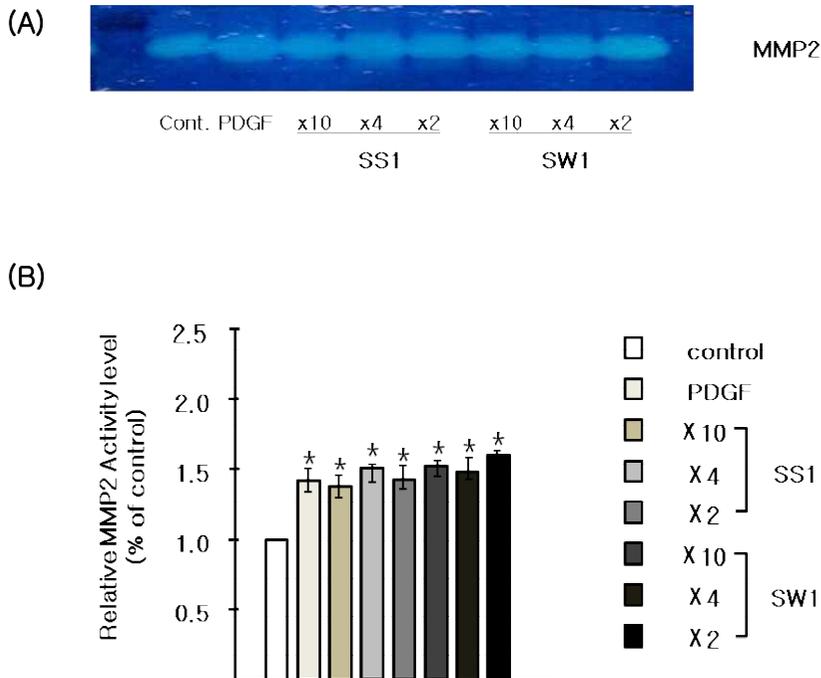


Fig 5. Effect of ambient particulate matter on the activity of MMP2 in VSMCs

(A) The activity of MMP2 proteins were measured by gelatin zymography. Representative zymograms showing the effects of SS1 and SW1 (dose-dependent) on inducible MMP2 activity after 48 hours. (B) Histogram showing average data for MMP2 activity in the control, positive control and the treated each sample (SS1, SW1) in dose-dependent. Densitometry analysis of three independent zymograms shows quantitation of MMP2 activity levels (n = 3). *p<0.05 versus the control.

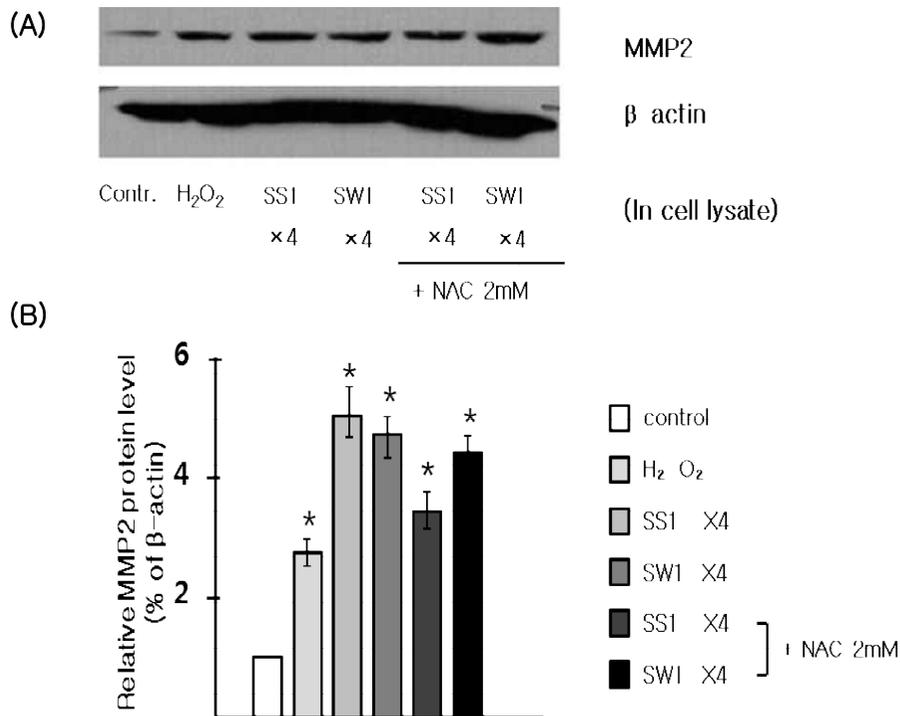


Fig 6. Effect of ambient particulate matter with NAC on the expression of MMP2 in VSMCs

(A) The expressions of MMP2 proteins were measured by western blot. VSMCs were treated only DMSO (control), $10\mu M H_2O_2$, each samples (SS1 and SW1, $\times 4$) and each samples with 2mM NAC, respectively. The band density was normalized with β -actin (internal controls). The total protein loaded per lane was $70\mu g$; detection of MMP2 and loaded per lane was $15\mu g$; detection of β -actin.

(B) Histogram showing average data for MMP2 protein level of the each lane. Densitometry analysis of three independent western blots shows quantitation of MMP2 levels ($n = 3$). $*p < 0.05$ versus the control.

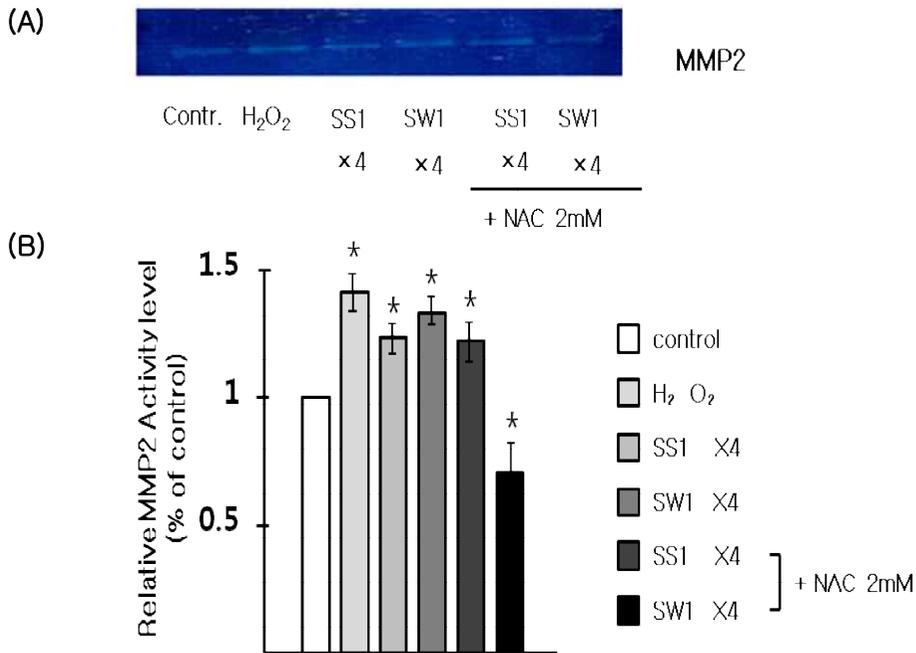


Fig 7. Effect of ambient particulate matter with NAC on the activity of MMP2 in VSMCs

(A) The activity of MMP2 was measured by gelatin zymography. VSMCs were treated only DMSO (control), 10 μ M H₂O₂, each samples (SS1 and SW1, X4) and each samples with 2mM NAC, respectively. Representative zymograms showing the effects of SS1 and SW1 (dose-dependent) on inducible MMP2 activity after 48 hours. (B) Histogram showing average data for MMP2 activity level of the each lane. Densitometry analysis of three independent zymograms shows quantitation of MMP2 activity levels (n = 3). *p<0.05 versus the control.

III-5. 대기 미세먼지가 Akt 및 ERK 활성화에 미치는 영향

Akt 와 ERK 경로는 VSMC의 이동을 유도하는 효소인 MMP의 전사 수준을 조절하는 경로로 알려져 있으며[24, 35-37], 이와 같은 작용은 ROS에 의존적으로 일어난다고 보고되었다[38, 42]. 따라서 대기 미세먼지에 의한 세포이동 유도 시 Akt와 ERK의 변화는 매우 중요한 의미를 갖는다.

본 실험에서는 VSMC에서 대기 미세먼지에 대한 Akt 및 ERK의 활성화 유무를 평가하기 위하여, VSMC에 SS1, SW1를 X4로 처리한 후 30분 시점에서 인산화 된 Akt와 ERK의 단백질 수준을 western blotting assay를 통하여 측정하였다.

또한 Akt와 ERK에 나타난 변화가 대기 미세먼지로 인해 생성된 ROS에 의존적인지 확인하기 위하여 NAC을 전처리 한 뒤의 인산화 Akt와 ERK의 단백질 수준을 위와 동일하게 측정하였다.

그 결과 SS1, SW1을 처리한 각각의 세포에서 처리하지 않은 대조군과 비교하여 p-Akt와 p-ERK 수준이 모두 유의한 변화를 보이지 않았고, ROS 억제제인 NAC을 사전 처리한 세포에 SS1, SW1를 각각 처리하였을 때, p-Akt의 경우 그 수준이 SS1과 SW1를 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 오히려 증가하였다. p-ERK는 SS1을 처리하였을 경우의 수준이 ROS의 억제로 인해 감소 하였으나, ROS를 억제하지 않았을 때와 마찬가지로 변화의 수준이 미미하여 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다 (Fig. 8).

즉, 대기 미세먼지에 의한 Akt 및 ERK의 활성화 효과를 확인하지 못하였고, Akt는 NAC에 의하여 그 효과가 오히려 증가하였다.

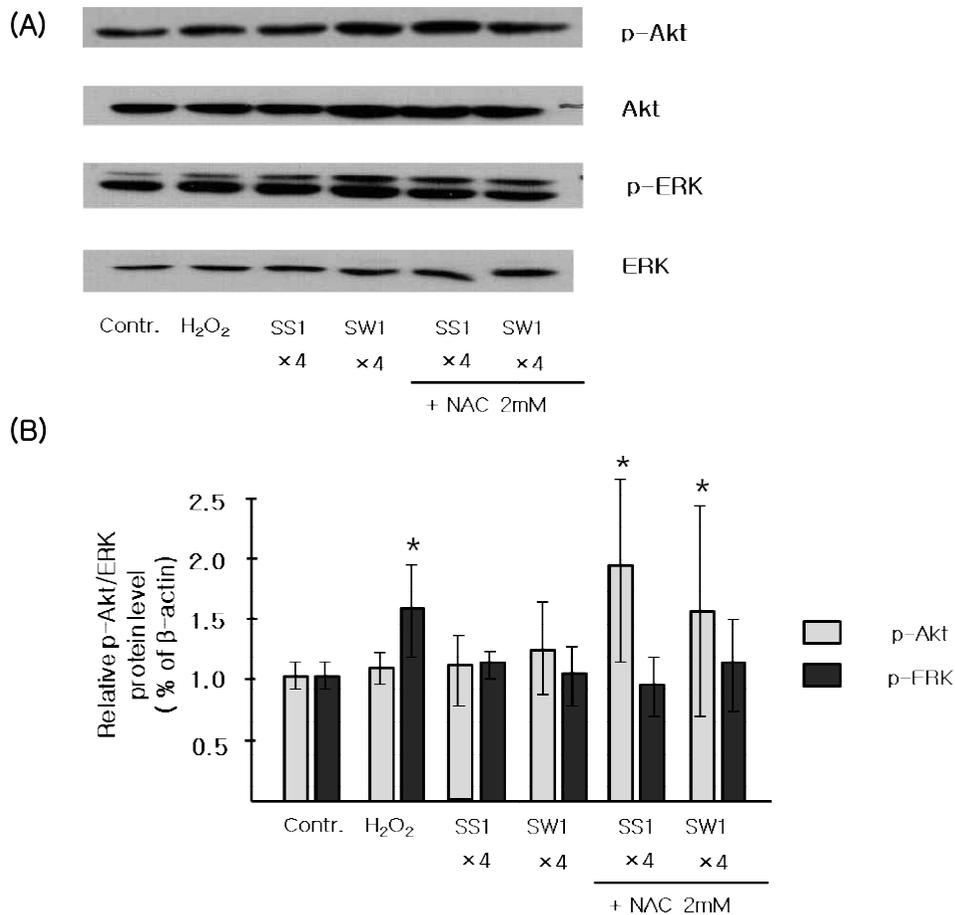


Fig 8. Effect of ambient particulate matter with NAC on the activation of Akt/ERK in VSMCs

(A) The effect of SS1 and SW1 on the Akt and ERK phosphorylation with 2mM NAC. The total protein loaded per lane was 50μg; detection of p-Akt, p-ERK and detection of Akt, ERK on equal membranes. (B) Histogram showing average data for p-Akt and p-ERK level of the each lane. Densitometry analysis of three independent western blots shows quantitation of MMP9 levels (n = 3). *p<0.05 versus the control.

III-6. 대기 미세먼지에 의한 MMP의 발현에 NF- κ B의 활성화가 미치는 영향

NF- κ B는 MMP 발현의 주요 구성성분으로 작용하는 산화-환원 감응 전사인자로 보고된 바 있다[38, 45-47]. 이와 함께 대기 미세먼지로 인한 ROS 생성과 MMP의 발현 수준이 유의하게 증가한 결과를 바탕으로 대기 미세먼지에 의해 유도되었던 MMP의 발현에 관련 전사인자인 NF- κ B의 활성화가 VSMC에 미치는 영향을 확인하기 위해 SS1와 SW1에 30분 동안 노출된 VSMC에서의 NF- κ B의 소단위체 중 하나인 p-65의 활성화 형태, p-p-65의 단백질 수준을 확인하였다. 또한 NF- κ B의 활성화에 있어서 대기 미세먼지에 의해 유도된 ROS의 영향을 확인하기 위하여 NAC을 사전 처리한 후 SS1 및 SW1을 처리한 세포군에서의 단백질 수준을 확인, 비교하였다.

결과는 Fig. 9 에서 보는 바와 같이 SS1를 처리한 경우 처리하지 않은 대조군에 비하여 p-p-65의 수준이 증가하였으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았으며, SW1를 처리한 경우 대조군에 비하여 50% 정도 증가한 것을 확인하였다. 각 실험군은 특히 H₂O₂를 처리한 것과 대비 유의하게 증가하였으나 그 효과가 NAC에 의하여 소거되지 않고 오히려 증가하는 것을 확인하였으며 그 정도는 유의한 통계치를 나타냈다 (Fig. 9).

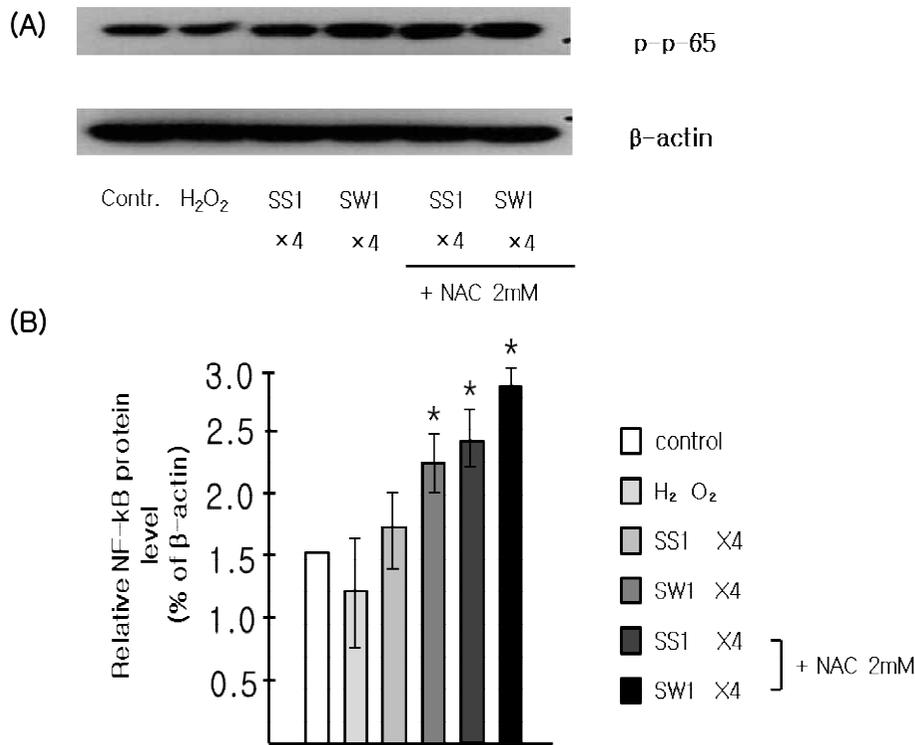


Fig 9. Effect of ambient particulate matter with NAC on the activation of NF-κB in VSMCs

(A) The expressions of NF-κB (p-p-65) and β-actin (as an internal control) proteins were measured by western blot. The effect of SS1 and SW1 on the NF-κB (p-65) phosphorylation with 2mM NAC. The total protein loaded per lane was 50μg; detection of p-p-65. (B) Histogram showing average data for p-p-65 level of the each lane. Densitometry analysis of three independent western blots shows quantitation of NF-κB (p-65) phosphorylation levels (n = 3). *p<0.05 versus the control.

IV. Discussion

혈관평활근세포 (VSMC)의 이동은 완전한 혈관으로 혈관이 형성·발달하는 동안 꼭 필요한 현상 중 하나이며, 이는 혈관의 항상성과 그 기능을 유지하는데 핵심적인 작용을 한다[4]. 그러나 혈압에 의한 물리적 외압, 화학물질, 활성산소종 등의 다양한 요인으로 인해 혈관에 스트레스가 가해짐에 따라 항상성이 무너져 VSMC의 증식과 이동에 의한 세포의 비정상적인 성장이 일어나게 되고, 혈관 내막 세포 및 림프구, 단핵구/대식세포를 포함한 다른 세포들에 대한 복합적인 작용이 함께 이루어지면서 그 결과 죽상동맥경화증을 야기한다[48]. Atherosclerotic lesion 이 형성될 때 VSMC에서는 세포자살 (apoptosis)과 단백질가수분해효소 (proteolytic enzyme)인 Matrix metalloproteinase (MMP)을 방출하게 된다[49, 50]. 관련된 인자인 PDGF (Platelet-derived growth factor)는 VSMC의 proliferation을 유도하는 물질로 잘 알려져 있다[51].

이러한 혈관질환의 발생에 대기오염원, 특히 대기 미세먼지는 대기중의 아황산가스와 복합적으로 작용하여 기침, 천식 등의 각종 호흡기 질환을 유발하고 죽상동맥경화, 심근경색, 뇌졸중, 심박동수 이상 등과 같은 심혈관 질환의 중요한 요인으로 작용함이 활발하게 보고되고 있다[52, 53]. 그 실제적 예로 *Suwa et al.*는 미세먼지 오염원이 심혈관계에 있어 해로운 영향을 미친다는 가설을 역학적 조사를 통한 경험적 증거를 바탕으로 증명·보고 하였으며[54], 2011년 발행된 *Kunzli, N*의 연구에서는 대기 미세먼지 노출에 따른 죽상동맥경화증의 유발을 장기간의 역학적 조사를 통하여 보고함으로써 그 연계성을 제시하였다[55]. 또한 *Robert D*의 연구에서는 대기 미세먼지의 입자크기 및 노출기간, 그리고 입자의 구성성분을 Nitrogen oxides, Carbon monoxide, Sulfur dioxide, Ozon, Secondhand smoke로

분류하여 각 성분이 심혈관질환에 미치는 영향을 여러 연구결과를 통하여 확인함으로써 심혈관계, 곧 심혈관질환에서의 대기 미세먼지의 위해성을 보다 분명히 입증하였다[56].

대기 미세먼지가 혈관계에 노출된 후 VSMC에서는 활성산소종 (ROS)이 발생하고, 이 때 증가하는 산화 스트레스가 세포괴사, 세포자살, 자가소화작용 등을 통한 세포의 염증반응 형성에 관여하게 된다[14]. VSMC의 분화에 있어 활성산소에 의한 스트레스가 영향을 미친다는 사실은 여러 연구들에 의해 보고되었다[57-60]. 이러한 사실은 곧 활성산소에 의해 유도된 VSMC의 성질 변화에 따라 세포는 이동 및 증식능을 갖게 되고, 그 결과 혈관질환을 야기할 수 있다는 것을 의미한다.

위에서 확인한 바와 같이 대기 미세먼지가 중요한 요인으로 작용하여 발생하는 심혈관계 질환, 그 중 죽상동맥경화는 미세먼지로 인해 유도된 활성산소종 (ROS)와 산화 스트레스로 인한 혈관 내피세포의 기능 장애 및 염증반응 야기와 관련하여 진행된다는 사실은 여러 연구를 통해 꾸준히 밝혀져 왔다. 그러나 대기 미세먼지로 유도된 ROS에 대한 VSMC의 이동과 그 기전에 대한 구체적인 연구는 미미한 실정으로 본 연구에서 이를 규명하고자 하였다.

연구에 앞서 계절별 미세먼지 샘플에 대한 주요 구성성분 및 조성농도 분석을 시행하였다. 각 샘플의 구성성분은 PAH와 oxy-PAH, Dicarboxylic acid, Carboneous로 분류하였으며 그 농도는 대체적으로 SS1 (여름철)에 비해 SW1 (겨울철) 샘플에서 높게 나타났다 (Table. 1). 미세먼지에 포함된 유해한 화학성분의 농도차이는 곧 여름철에 비해 겨울철 미세먼지의 위해성이 더 높다고 해석된다. 또한 PAH 및 oxy-PAH를 포함한 여러 구성성분이 VSMC의 기능에 미치는 영향을 각각 확인함으로써 세포에서의 대기 미세먼지의 작용기전을 보다 구체적으로 분석할 수 있는 향후 연구 방향에 대한 가능성을 제시할 수 있다. PAH와 oxy-PAH는

이에 해당하는 benzo[a]pyrene, phenanthrene 등과 관련하여 심혈관계 질환 및 VSMC의 기능에 대한 연구가 보고된 바 있다[23-26].

본 연구 결과, 대기 미세먼지의 노출에 따라 VSMC의 이동과 ROS의 생성이 활성화 되었으며 VSMC의 전이효과를 간접적으로 확인할 수 있는 biomarker인 MMP의 단백질 수준 및 활성화 수준 또한 증가함을 확인하였다.

우리나라 서울에서 수집한 계절별 미세먼지 샘플인 SS1, SW1를 각각 4배로 희석하여 24시간 동안 VSMC에 노출시킨 후의 세포의 이동능력을 확인한 결과, VSMC의 이동이 세포독성 없이 증가하였다 (Fig. 1). 이는 VSMC 이동의 유도물질로 잘 알려진 PDGF에 의한 이동 정도와 비교하여도 유의한 효과로써, 지금까지 보고된 여러 연구들이 제시하고 있는 VSMC의 기능장애와 대기 미세먼지의 관련성을 뒷받침하는 결과라고 할 수 있다.

대기 미세먼지가 세포 내에서 ROS를 생성하고 그로 인한 산화적 스트레스가 곧 VSMC 내 기능장애를 일으킨다는 사실은 앞서 확인하였다. 이를 토대로 SS1, SW1가 VSMC 내 ROS 생성을 유도하는지를 확인하였다. 그 결과 VSMC가 SS1, SW1에 노출된 후 30분 만에 ROS 생성 효과를 보였으며, ROS 억제제인 NAC에 의해 그 효과는 모두 소거되었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 본 연구를 통하여 확인한 SS1, SW1에 대한 VSMC의 이동이 곧 유해물질 노출에 따라 세포 내에서 생성된 ROS로 유도된 결과임을 유추할 수 있다.

VSMC는 이동과 증식작용을 통하여 lipid, extracellular matrix 등과 함께 혈관의 내막에 축적되는 과정을 통하여 죽상동맥경화증을 포함한 여러 혈관질환을 일으킨다[4]. 이 때 extracellular matrix를 분해시키는 효소로 MMP가 작용한다[5, 7, 61]. 따라서 대기 미세먼지에 의한 VSMC의 이동·증식 작용의 활성화를 확인할 수 있는 하나의 지표가 곧 MMP의 활성화 정도라고 할 수 있다. 또한 MMP의 발현이

ROS에 의존적인 경로를 통해 유도되며, ROS의 억제로 그 수준이 감소됨을 확인한 *Haozhang*의 연구[38]를 바탕으로 본 연구에서는 서로 다른 농도의 SS1, SW1를 VSMC에 노출시킨 후 48시간에서 MMP2와 MMP9의 단백질 수준과 활성화 수준을 확인하였을 때 그 수준이 모두 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 3, Fig. 4). 이러한 효과는 ROS의 억제로 인해 모두 감소 하였으나, 경우에 따라 약간의 차이를 보였다. 단백질 수준은 SS1이 SW1에 비하여 유의하게 감소 하였고, 활성화 수준의 경우 SW1에서 보다 유의한 감소를 보였다. 이는 SS1과 SW1에 의해 MMP의 활성화가 유도됨은 확증할 수 있으나, NAC에 의한 효과가 두 경우 (SS1, SW1)에서 유사하게 나타나지 않는 점과 NAC에 대한 MMP의 단백질 수준과 활성화 수준이 서로 유사한 경향을 보이지 않는 점을 미루어 볼 때, 그 과정상에 ROS와 완전한 관련성을 갖지는 않을 것으로 해석된다. 다시 말해, 앞서 확인하였던 SS1, SW1에 의해 생성된 VSMC 내의 ROS가 세포의 이동을 유도하는 경로로 작용할 것이라는 하나의 가정과 다른, SS1과 SW1에 의한 VSMC의 이동 곧 MMP의 활성화가 ROS를 통한 경로를 포함한 하나 이상의 경로를 통하여 작용할 것이라는 또 다른 가정을 설정할 수 있다. 또한 MMP의 발현의 ROS에 따른 경로는 SW1 보다 SS1에 의해 더 크게 작용하며, MMP 활성화의 ROS에 따른 경로는 SW1가 더 크게 작용한다는 해석도 가능하게 한다. 이러한 해석에 대하여서는 향후 MMP의 발현과 활성화를 야기할 수 있는 ROS 의존적인 경로에 있어 ROS 생성의 활성화 정도에 상한선이 있는지에 대한 것과, 또 다른 활성화 경로의 확인을 위한 객관적인 자료를 얻을 수 있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

MMP의 활성화에 대한 구체적인 신호전달경로는 여러 연구를 통하여 확인되었다. Akt와 ERK 경로는 주로 mitogen과 growth factor에 의해서 조절되며 세포의 성장, 생존 및 분화에 중요한 역할을 담당할 뿐 아니라, VSMC의 이동을 유도하는 효소

인 MMPs의 전사 수준을 조절하는 경로로 알려져 있다[24, 35-37]. 이와 관련하여 MMP2는 PDGFR- β /Akt signaling pathway를 통하여 활성화되고[36], MMP9의 발현은 NF- κ B와 AP-1 및 ERK1/2를 통하여 이루어진다는 연구가 보고되었으며 [42], ROS에 의존적인 ERK-NF- κ B의 경로 또한 MMP의 활성화를 유도한다는 최근의 연구결과는 MMP 발현의 신호전달경로와 ROS의 관련성을 제시하고 있다 [38].

본 연구에서는 SS1과 SW1의 노출로 유도된 VSMC의 이동 증가에 대한 구체적인 신호전달경로를 추적하기 위하여 Akt, ERK, NF- κ B의 활성화 정도를 확인하였다. 그 결과를 각각 살펴보면 SS1, SW1 노출 후 30분에서 p-Akt와, p-ERK 모두 그 변화 수준이 미미하여 통계학적 유의성을 보이지 않았고, ROS의 억제에 대한 p-Akt의 수준은 오히려 증가하였다. p-ERK의 경우 SS1에 대하여서는 ROS의 억제로 통계적 유의성이 없는 감소 수준을 보였다 (Fig. 8). NF- κ B의 활성화 형태인 p-p-65의 수준은 SS1과 SW1에 대한 노출에 따라 증가하였고, 그 수준은 SW1에서 보다 의미 있는 통계치를 보였으며 각 효과는 ROS의 억제로 오히려 증가하였다 (Fig. 9). 즉, SS1과 SW1에 의해 유도된 VSMC의 이동, MMP의 활성화에 대한 구체적인 신호전달 경로에 있어서 Akt와 ERK는 의미 있게 작용하지 않으며 NF- κ B의 활성화에 따른 경로가 보다 의미 있게 작용한다는 결론을 얻을 수 있다. 또한 ROS의 노출에 대한 NF- κ B의 활성화보다 ROS를 억제하였을 때의 활성화 수준이 더 증가함은, NF- κ B가 VSMC의 이동에 관여하는 직접적인 신호전달 인자로서 작용하는 것 보다 SS1과 SW1의 노출에 따른 VSMC의 이동에 관여하는 여러 인자들 중 ROS에 의해 억제되는 인자의 활성화에서 보다 강한 전사인자로 작용하며, 그 효과는 SS1 보다 SW1에서 더 크게 나타난다고 해석할 수 있다.

본 연구에서 사용된 대기 미세먼지 샘플인 SS1과 SW1는 여러 탄소화합물을

구성성분으로 하는 복합 물질로, 세포 내에 작용하게 될 때 각각의 구성성분은 서로 다른 경로를 통하여 VSMC의 이동을 유도한다고 가정할 수 있다. 연구를 통하여 확인한 Akt, ERK 경로와의 무관성과 NF- κ B의 경로에 대한 특이적인 관련성은 이 외의 다양한 경로와의 관련성이 존재한다는 것을 시사하는 바이며, 이는 향후 SS1과 SW1의 각 구성성분에 대한 다양한 경로의 활성화를 확인할 수 있는 연구를 통하여 VSMC의 이동에 관여하는 보다 명확한 신호전달 경로를 정립할 수 있는 가능성을 의미한다.

본 연구를 통하여 우리나라 대기 미세먼지 SS1, SW1가 VSMC의 이동과 세포 내 ROS 생성을 활성화하는데 작용한다는 것과, 이 때의 VSMC의 이동은 활성화된 ROS에 의해 유도되는 경로를 포함한 여러 경로를 통하여 일어나며 그 신호전달체계에 NF- κ B가 관여함을 확인 할 수 있었다. 또한 그 구체적인 신호전달체계는 대기 미세먼지의 다양한 구성성분에 따라서 세분화 된 연구를 통하여 보다 명확하게 규명할 수 있을 것이다.

V. References

1. Weissberg PL, Bennett MR: **Atherosclerosis—an inflammatory disease.** *The New England journal of medicine* 1999, **340**(24):1928–1929.
2. Glass CK, Witztum JL: **Atherosclerosis. the road ahead.** *Cell* 2001, **104**(4):503–516.
3. Lusis AJ: **Atherosclerosis.** *Nature* 2000, **407**(6801):233–241.
4. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR: **Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease.** *Physiological reviews* 2004, **84**(3):767–801.
5. Newby AC: **Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates.** *Cardiovascular research* 2006, **69**(3):614–624.
6. Nagase H, Visse R, Murphy G: **Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.** *Cardiovascular research* 2006, **69**(3):562–573.
7. Johnson JL: **Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis.** *Cardiovascular research* 2014, **103**(4):452–460.
8. Bauvois B: **New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression.** *Biochimica et biophysica acta* 2012, **1825**(1):29–36.
9. Dilme JF, Bellmunt S, Camacho M, Sola-Villa D, Romero JM, Escudero JR, Vila L: **Influence of cardiovascular risk factors on levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human abdominal aortic aneurysms.** *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2014, **48**(4):374–381.
10. Guo L, Ning W, Tan Z, Gong Z, Li X: **Mechanism of matrix metalloproteinase axis-induced neointimal growth.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 2014, **66**:116–125.
11. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J: **Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.** *Environmental health perspectives* 2005, **113**(7):823–839.
12. Lewtas J: **Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects.** *Mutation research* 2007, **636**(1–3):95–133.
13. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD: **Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution.** *Jama* 2002, **287**(9):1132–1141.
14. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA *et al*: **Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association.** *Circulation* 2010, **121**(21):2331–2378.
15. Wold LE, Ying Z, Hutchinson KR, Velten M, Gorr MW, Velten C, Youtz DJ,

- Wang A, Lucchesi PA, Sun Q *et al*: **Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution.** *Circulation Heart failure* 2012, **5**(4):452–461.
16. 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.
 17. Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett BJ, Gong KW, Navab M, Harkema J, Sioutas C, Lulis AJ *et al*: **Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress.** *Circulation research* 2008, **102**(5):589–596.
 18. Kunzli N, Jerrett M, Garcia-Esteban R, Basagana X, Beckermann B, Gilliland F, Medina M, Peters J, Hodis HN, Mack WJ: **Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adults.** *PloS one* 2010, **5**(2):e9096.
 19. Sun Q, Yue P, Ying Z, Cardounel AJ, Brook RD, Devlin R, Hwang JS, Zweier JL, Chen LC, Rajagopalan S: **Air pollution exposure potentiates hypertension through reactive oxygen species-mediated activation of Rho/ROCK.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008, **28**(10):1760–1766.
 20. Sun Q, Yue P, DeIulii JA, Lumeng CN, Kampfrath T, Mikolaj MB, Cai Y, Ostrowski MC, Lu B, Parthasarathy S *et al*: **Ambient air pollution exaggerates adipose inflammation and insulin resistance in a mouse model of diet-induced obesity.** *Circulation* 2009, **119**(4):538–546.
 21. Miyata R, Hiraiwa K, Cheng JC, Bai N, Vincent R, Francis GA, Sin DD, Van Eeden SF: **Statins attenuate the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction induced by exposure to urban particulate matter (PM10).** *Toxicology and applied pharmacology* 2013, **272**(1):1–11.
 22. Stadtman ER: **Protein oxidation and aging.** *Free radical research* 2006, **40**(12):1250–1258.
 23. Henkler F, Stolpmann K, Luch A: **Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses.** *Exs* 2012, **101**:107–131.
 24. Ji K, Xing C, Jiang F, Wang X, Guo H, Nan J, Qian L, Yang P, Lin J, Li M *et al*: **Benzo[a]pyrene induces oxidative stress and endothelial progenitor cell dysfunction via the activation of the NF- κ B pathway.** *International journal of molecular medicine* 2013, **31**(4):922–930.
 25. Shrimali D, Shanmugam MK, Kumar AP, Zhang J, Tan BK, Ahn KS, Sethi G: **Targeted abrogation of diverse signal transduction cascades by emodin for the treatment of inflammatory disorders and cancer.** *Cancer letters* 2013, **341**(2):139–149.
 26. Uno S, Sakurai K, Nebert DW, Makishima M: **Protective role of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) against benzo[a]pyrene-induced toxicity in mouse aorta.** *Toxicology* 2014, **316**:34–42.
 27. Jour'd'heil D: **Redox control of vascular smooth muscle function.** *Antioxidants & redox signaling* 2010, **12**(5):579–581.

28. Griendling KK, Ushio-Fukai M: **Redox control of vascular smooth muscle proliferation.** *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1998, **132**(1):9–15.
29. McCord JM: **Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance.** *Clinical biochemistry* 1993, **26**(5):351–357.
30. Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA *et al.*: **Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells.** *Circulation research* 2000, **86**(9):960–966.
31. Moon SK, Thompson LJ, Madamanchi N, Ballinger S, Papaconstantinou J, Horaist C, Runge MS, Patterson C: **Aging, oxidative responses, and proliferative capacity in cultured mouse aortic smooth muscle cells.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2001, **280**(6):H2779–2788.
32. Nunes GL, Robinson K, Kalynych A, King SB, 3rd, Sgoutas DS, Berk BC: **Vitamins C and E inhibit O₂- production in the pig coronary artery.** *Circulation* 1997, **96**(10):3593–3601.
33. Erl W, Weber C, Hansson GK: **Pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptosis depends on cell type, density, and the presence of Cu(2+) and Zn(2+).** *American journal of physiology Cell physiology* 2000, **278**(6):C1116–1125.
34. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: **NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.** *Circulation research* 2000, **86**(5):494–501.
35. Liao AC, Kuo CC, Huang YC, Yeh CW, Hseu YC, Liu JY, Hsu LS: **Naringenin inhibits migration of bladder cancer cells through downregulation of AKT and MMP2.** *Molecular medicine reports* 2014, **10**(3):1531–1536.
36. Seo KW, Lee SJ, Kim YH, Bae JU, Park SY, Bae SS, Kim CD: **Mechanical stretch increases MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via activation of PDGFR-beta/Akt signaling pathway.** *PloS one* 2013, **8**(8):e70437.
37. Gan J, Li P, Wang Z, Chen J, Liang X, Liu M, Xie W, Yin R, Huang F: **Rosuvastatin suppresses platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration via the MAPK signaling pathway.** *Experimental and therapeutic medicine* 2013, **6**(4):899–903.
38. Zhang H, Wang ZW, Wu HB, Li Z, Li LC, Hu XP, Ren ZL, Li BJ, Hu ZP: **Transforming growth factor-beta1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat vascular smooth muscle cells via ROS-dependent ERK-NF-kappaB pathways.** *Molecular and cellular biochemistry* 2013, **375**(1–2):11–21.
39. Elliot S, Catanuto P, Stetler-Stevenson W, Cousins SW: **Retinal pigment epithelium protection from oxidant-mediated loss of MMP-2 activation requires both MMP-14 and TIMP-2.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2006, **47**(4):1696–1702.
40. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS: **Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for**

- atherosclerotic plaque stability. *The Journal of clinical investigation* 1996, **98**(11):2572–2579.
41. Hu T, Luan R, Zhang H, Lau WB, Wang Q, Zhang Y, Wang HC, Tao L: **Hydrogen peroxide enhances osteopontin expression and matrix metalloproteinase activity in aortic vascular smooth muscle cells.** *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2009, **36**(7):626–630.
 42. Moon SK, Kang SK, Kim CH: **Reactive oxygen species mediates disialoganglioside GD3-induced inhibition of ERK1/2 and matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006, **20**(9):1387–1395.
 43. Stone V, Johnston H, Clift MJ: **Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions.** *IEEE transactions on nanobioscience* 2007, **6**(4):331–340.
 44. Mazzoli-Rocha F, Fernandes S, Einicker-Lamas M, Zin WA: **Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter.** *Cell biology and toxicology* 2010, **26**(5):481–498.
 45. Zhang W, Wang F, Xu P, Miao C, Zeng X, Cui X, Lu C, Xie H, Yin H, Chen F *et al.* **Perfluorooctanoic acid stimulates breast cancer cells invasion and up-regulates matrix metalloproteinase-2/-9 expression mediated by activating NF- κ B.** *Toxicology letters* 2014, **229**(1):118–125.
 46. Kim HR, Kim JM, Kim MS, Hwang JK, Park YJ, Yang SH, Kim HJ, Ryu DG, Lee DS, Oh H *et al.* **Saussurea lappa extract suppresses TPA-induced cell invasion via inhibition of NF- κ B-dependent MMP-9 expression in MCF-7 breast cancer cells.** *BMC complementary and alternative medicine* 2014, **14**:170.
 47. Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, Hayashi M: **Smooth muscle-selective inhibition of nuclear factor- κ B attenuates smooth muscle phenotypic switching and neointima formation following vascular injury.** *Journal of the American Heart Association* 2013, **2**(3):e000230.
 48. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ: **Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity.** *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* 2007, **15**(3):100–108.
 49. Hayashi JN, Ito H, Kanayasu T, Asuwa N, Morita I, Ishii T, Murota S: **Effects of glucose on migration, proliferation and tube formation by vascular endothelial cells.** *Virchows Archiv B, Cell pathology including molecular pathology* 1991, **60**(4):245–252.
 50. Perrins CJ, Bobryshev YV: **Current advances in understanding of immunopathology of atherosclerosis.** *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2011, **458**(2):117–123.
 51. Ahn HY, Hadizadeh KR, Seul C, Yun YP, Vetter H, Sachinidis A: **Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human**

- glioblastoma cells (A172). *Molecular biology of the cell* 1999, 10(4):1093–1104.
52. Peters A: **Ambient particulate matter and the risk for cardiovascular disease.** *Progress in cardiovascular diseases* 2011, 53(5):327–333.
 53. Tonne C, Yanosky JD, Beevers S, Wilkinson P, Kelly FJ: **PM mass concentration and PM oxidative potential in relation to carotid intima-media thickness.** *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 2012, 23(3):486–494.
 54. 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.
 55. Kunzli N, Perez L, von Klot S, Baldassarre D, Bauer M, Basagana X, Breton C, Dratva J, Elosua R, de Faire U *et al*: **Investigating air pollution and atherosclerosis in humans: concepts and outlook.** *Progress in cardiovascular diseases* 2011, 53(5):334–343.
 56. Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Jr. *et al*: **Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association.** *Circulation* 2004, 109(21):2655–2671.
 57. Vendrov AE, Madamanchi NR, Hakim ZS, Rojas M, Runge MS: **Thrombin and NAD(P)H oxidase-mediated regulation of CD44 and BMP4-Id pathway in VSMC, restenosis, and atherosclerosis.** *Circulation research* 2006, 98(10):1254–1263.
 58. Su B, Mitra S, Gregg H, Flavahan S, Chotani MA, Clark KR, Goldschmidt-Clermont PJ, Flavahan NA: **Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation.** *Circulation research* 2001, 89(1):39–46.
 59. Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Schmidt HH, Lassegue B, Griendling KK: **Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2007, 27(1):42–48.
 60. Lee MY, San Martin A, Mehta PK, Dikalova AE, Garrido AM, Datla SR, Lyons E, Krause KH, Banfi B, Lambeth JD *et al*: **Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009, 29(4):480–487.
 61. Visse R, Nagase H: **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.** *Circulation research* 2003, 92(8):827–839.