

Effect of asbestos and man made mineral fibers (MMMF) on FcR mediated phagocytosis in RAW macrophages

Il Je Yu, Department of Industrial Toxicology, Industrial Health Research Institute, Korea Industrial Safety Corporation, 34-6, Kusan-dong, Bupyeong-gu, Incheon, 403-120, Korea

Abstract:

Receptor mediated phagocytosis in fiber and particle ingested macrophages is very important to remove foreign materials and to confront infectious microorganisms in lung environment. To study the effect of fibers and particles on the receptor mediated phagocytosis, we developed in vitro culture system to test the effect of mineral fibers and particles on Fc receptor (FcR) mediated phagocytosis in RAW macrophages. RAW macrophages were exposed to respective fibers and particles for overnight, then the cells were tested for their FcR mediated phagocytosis using IgG coated sheep erythrocytes. Numbers of associated erythrocyte per RAW cell were counted and expressed as binding index (BI). RAW macrophages treated with amosite and crocidolite showed more than 50% decreases of BI. RAW macrophages treated with Chrysotile and SiO₂ showed less than 30% decreases of BI. Interestingly, TiO₂, previously known as less toxic, showed more than 50% decrease of BI. Roles of interferon gamma in fiber ingested macrophages were investigated. Although high concentration of interferon treatment was resulted in somewhat toxic effect to control cells, FcR mediated phagocytosis in crocidolite ingested RAW macrophages was recovered by treating with interferon gamma even in high concentrations. Our results indicate that the decreased phagocytosis by exposing mineral fibers and particles may be recovered by proper treatment using lymphokines such as interferon gamma.

석면과 대체물질이 거식세포의 Fc 리셉터를 이용한 탐식작용에 대한 영향

유 일재

한국산업안전공단 산업보건연구원 산업독성연구실
인천광역시 부평구 구산동 34-6, 403-120

I. 서론

석면이나 대체물질의 독성학적인 평가에 있어서 in vitro 평가방법의 개발은 막대한 비용이 드는 in vivo 방법에 대한 경제적인 측면과 석면에서 유발되는 여러가지 독성의 기전을 하나하나 체계적으로 밝혀내기 위해서는 효과적인 in vitro 독성평가방법이 개발되어야 할 것이다. 지금까지의 in vitro 방법은 주로 대상세포가 석면에 의해 손상을 입어 세포가 분열을 못하거나 또는 세포막의 파괴 등에 의한 세포의 생사에 따라 독성을 규명하였으나 이는 거의 형태학적인 방법에 의한 독성학적인 방법이라고 할 수 있을 것이다. 즉 동물을 이용한 독성시험의 LD₅₀이나 LC₅₀과 같은 치사량을 구하는 방법과 거의 비슷한 방법이라고 볼 수 있다. 그러나 석면을 탐식한 세포가 세포의 기능적으로 어떠한 영향을 받는지에 대한 연구는 아직

미비한 상태라고 할 수 있다.

Monocytes/macrophages는 여러가지 receptor를 세포막에 표현하고 있는데 그 중에 어떤 receptor들은 전염적인 물질 (infectious materials)이나 비전염적인 물질 (non-infectious material)을 체내에서 제거하기 위해 탐식작용 (phagocytosis)을 하는 receptor하게 한다. 이들의 분류는 이미 알고 있는 구조나 이들의 ligand 와 receptor의 기능에 따라 분류하고 있는데 (Gordon et al., 1988) 크게 3가지로 분류할 수 있다. 항체와 항원의 면역복합체를 탐식하기 위한 Fc receptor (FcR) mediated phagocytosis에 관계하는 FcR은 크게 다시 크게 3종류로 나눌수 있는데 monocytes/macrophages에서 나타나고, 높은 친화성 (high affinity)을 receptor로 antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)반응에 관계하는 FcR I과 (Grazino & Fanger), monocytes, platelets, neutrophils, B cells등에 존재하고 저친화성을 가진 receptor로 neutrophil에서 oxidative burst로 lysosomal 효소들의 분비에 관계하는 FcR II (Willis et al., 1988)과, neutrophils, NK cells, 적은 수의 T cells, eosinophils, Tissue macrophages에는 존재하나 monocyte에는 나타나지 않고 면역복합체 (immune complex)의 제거에 관여한다고 알려진 FcR III (Clarkson et al., 1986)이 있다.

보체 (complement)에 의한 opsonization된 미생물들을 탐식하기위한 complement receptor (CR) (Wright et al., 1987)는 크게 3종류로 나눌수 있는데 CR1은 C3b를 ligand로 하고 있고 neutrophils, macrophages, B cells, follicular dendritic cells 등에 존재하고 있고 이의 주기능은 C3를 포함하는 복합체들의 제거작용에 관여한다. CR2는 C3d, C3dg, iC3b등을 ligand로 하고 있으며, B cells, follicular dendritic cell에 존재하고 있으며 B cell activation에 관여하며 Epstein Barr virus가 이 receptor를 이용하여 B cell에 침입하는 경로로 이용하고 있다. CR3 는 C3bi를 ligand로 하고 있으며, granulocytes, macrophages, natural killer cells (NK)에 존재하고 있으며, integrin family에 속하며 LFA-1과 관계가 있다.

당으로 구성된 세포막이나 세포벽을 가진 미생물들을 탐식하기 위한 mannose-fucose receptor (MFR) mediated phagocytosis에 관여하는 MFR은 혈액에 순화하는 monocyte에는 존재하지 않으며, 이 monocyte를 며칠간 배양하면 유도할수 있고, 또 폐의 macrophages에 높은 수준의 MFR이 존재한다 (Stahl & Gordon, 1982; Ezekowitz et al., 1981). MFR은 glycopeptides에서 terminal mannose나 fucose기를 ligand로 하고 있다. 그리고 이 receptor이 활성화되기 위해서는 Ca^{+2} 가 필요하다 (Lenartz, 1987).

석면폭로에 의해 유발되는 석면폐나 중피종의 기전은 면역학과 분자생물학의 발달로 서서히 밝혀지고 있다. 특히 석면을 탐식한 거식세포는 여러가지 성장 호르몬을 분비하여 fibrosis 형성에 관여하고 또 여러가지 아직 밝혀져 있지 않은 면역학적인 조절작용을 한다고 한다. Fiber glass의 일종인 JM code 100의 매우가는 섬유를 Alveolar Macrophage에 폭로한후 serum-opsonized zymosan 입자를 더하여 탐식작용을 조사하였더니 식균작용의 변화가 있었다고 보고하였다 (Tilkes & Beck, 1983). 그러나 이런 방법은 어떤 receptor의 경로에 변화가 왔는지를 제시하지 못하고 있다. 그리고 Gallagher 등 (1987)은 (+) 전기를 띤 입자는 (-)전기를 띤 거식세포막의 sialic acid에 잘 결합할 수 있다고 가정하였다. 이 가설은 Hesterberg et al. (1987)등에 의해 강한 (+)를 가진 chrysotile이 (+)전기가 거의 없는 crocidolite보다 쉽게 탐식된다고 보고하였다. 그러나 이의 전기적인 가설은 아직 완전히 증명되지 못하고 있다. 석면이 폭로된 동물 거식세포의 탐식세포의 기능은 Warheit에 의해서도 연구되었는데 (1983, 1984), 이들은 석면에 폭로된 동물의 폐에서 거식세포를 분리하여 carbonyl iron particle을 rat 혈청과 섞어 시험을 하였다, 그들은 석면 (crocidolite)에 폭로된

동물의 폐 거식세포는 대조군에 비해 40% 가량의 탐식작용의 감소가 있었지만, Kevlar섬유나 wollastonite에 폭로된 동물의 폐 거식세포는 전혀 영향을 받지 않았다고 한다.

위에서 언급한 방법들은 석면이나 광물섬유를 탐식한 거식세포의 세포기능을 측정하기 위해 여러가지 입자들을 (serum opsonized zymosan, carbony iron particles) 사용하였으나 이들은 거식세포의 식균작용이 어떤 receptor 경로를 통해 억제되고 있는지 어떤 receptor가 억제되는지에 대해서는 완전한 정보를 주고 있지 못하고 있다. 그래서 본연구에서는 석면의 독성을 기능적으로 측정하기 위하여 석면을 탐식한 거식세포에서 두개의 중요한 receptor (FcR, CR)의 기능을 in vitro 배양한 Raw macrophage 세포에서 시험하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

RAW 세포는 100 mm 배양접시에 RPMI-FBS HI (56 C, 30' heat inactivated serum) 의 배양액으로 37^d C의 배양기에서 배양하였다. Fiber toxicity 시험은 24 well 배양접시에 12 mm glass coverslip에 세포를 부착시켜 한 well에 세포가 10000 개 정도가 들어가게 하여 배양하였고, 시험대상 세포는 일정한 양의 fiber를 첫배양 다음날에 더하여서 여러가지 독성시험을 행하였다.

2. Fibers and particles

Chrysotile과, crocidolite, amosite는 UICC standard reference sample을 사용하였고, 이런 석면류와 그리고 SiO₂, TiO₂는 Sigma에서 구입하였고, glass wool과 glass fiber는 사업장에서 얻어온 시료를 pestle에 잘게 부순후 1 시간 동안 sonication 하였다.

3. Preparation of SRBC particles

Sheep erythcytes (SRBC)는 Komed(서울 양재동)에서 구입하였다. 그리고 Rabbit anti-SRBC IgG fraction과 IgM fraction은 Accurate Chemical (NY, USA)구입하였다. SRBC coated with IgG를 만들기 위하여서는 Yu (1989)의 방법을 사용하였다.

1) 5% SRBC Preparation: 먼저 SRBC 4cc를 50 ml cetrifuge tube에 넣고 ice cold한 phosphate bufferd saline (PBS, without Ca⁺², Mg⁺²)을 50 ml 채운후 1500 rpm, 4 C에서 10분간 원심분리한후 상등액을 버리고 다시 PBS로 두번더 원심분리한다. 그런후 상등액을 버리고 0.5 ml의 SRBC를 15ml tube에 넣고 9.5 ml의 PBS를 더하면 5% SRBC가 된다.

2) SRBC coated with IgG (EG): 1 ml의 SRBC와 1 ml의 PBS를 15 ml conical tube에 더한후 10 ul (1 mg/ml IgG)의 Rabbit anti-SRBC IgG antibody를 더한후 15 분동안 37 C waterbath에 배양한후, 1500 rpm, 4 C에서 10분간 원심분리한후 상등액을 버리고 ice cold PBS with Ca⁺², Mg⁺²로 다시 두번 1500 rpm, 4 C에서 10분간 원심분리한후, FCS가 없는 DMEM을 더하여 10 ml이 되게 한다. 이것을 0.5% EIgG라 한다. EIgG는 2 주일 동안 4 C에서 보관하여 사용할 수 있다.

3) SRBC coated with complement (EC): 1 ml의 SRBC와 1 ml의 PBS를 15 ml conical tube

에 더한후 10 ul (1 mg/ml IgG)의 Rabbit anti-SRBC IgM antibody를 더한후 15 분동안 37 C waterbath에 배양한후, 1500 rpm, 4 C에서 10분간 원심분리한후 상등액을 버리고 ice cold PBS로 다시 두번 1500 rpm, 4 C에서 10분간 원심분리한후, 1 ml이 되게 한다. 이것을 0.5% EIGM이라고 한다. 1 ml의 EIGM에 다시 1 ml의 PBS를 더한후 freshly prepared 50 ul의 human serum을 더하여 37 C에 10분간 배양한다. 배양이 끝나자 말자 바로 ice cold PBS with Ca²⁺, Mg²⁺로 두번 1500 rpm, 4 C에서 10분간 원심분리한후, FCS가 없는 DMEM을 더하여 10 ml이 되게 한다. 이것을 0.5% EC이라 한다. EC는 2 주일 동안 4 C 에서 보관하여 사용할 수 있다.

4. Particle Binding Assay

RAW 세포를 12 mm glass coverslip이 들어있는 24 well 배양용기에 하룻밤 배양하여 glass coverslip에 RAW 세포가 부착되게 한후 일정한 양의 (50 ug) 석면이나 입자, 대체섬유 등을 더하여 하룻밤더 배양한후 각각의 glass coverslip을 PBS로 씻어내어 glass coverslip에 부착된 석면이나 입자 대체섬유등을 없앤후 100 ul의 EIGG (for FcR function test), EIGM (for CR function test), SRBC (for control)을 더하여 15 분간 37 C에 배양한 후, RAW가 부착된 coverslip을 다시 PBS로 다시 9번 씻은 후 4% formaldehyde in PBS로 고정하여, 카메라가 장착된 Nikon phase contrast microscope에서 400 배로 관찰하였다. Coated SRBC를 탐식했거나 SRBC가 결합 (binding)된 RAW 세포를 무작위하게 (random counting in continuous fields) 100개이상 세어 BI (binding index)= number of RBC/cell로 나타내었다. 즉 BI는 세포한개당 몇개의 coated SRBC가 부착되었는가를 말하는 것이다.

5. Interferon gamma mediated particle binding assay

Interferon gamma (murine recombinant, 100000 u/ml)은 GIBCO에서 구입하였다. Interferon gamma mediated particle binding assay는 RAW 세포를 12 mm glass coverslip이 들어있는 24 well 배양용기에 하룻밤 배양하여 glass coverslip에 RAW 세포가 부착되게 한후 일정한 양 (20 ug)의 crocidolite를 더하고, 1, 10, 50, 100, 200 unit/ml 의 interferon gamma를 더한후 하룻밤을 배양하고 각각의 glass coverslip을 PBS로 씻어 내어 glass coverslip에 부착된 crocidolite 없앤후 100 ul의 EIGG (for FcR function test) 더하여 15 분간 37 C에 배양한 후, RAW가 부착된 coverslip을 다시 PBS로 다시 9번 씻은 후 4% formaldehyde in PBS로 고정하여, 카메라가 장착된 Nikon phase contrast microscope에서 400 배로 관찰하였다. 결과는 위에서와 동일하게 BI로 표시하였다.

III. 결과

1. Particle binding assay to RAW cell

먼저 EIGG, EC, E (SRBC)를 RAW세포와 15분간 배양하여 RAW세포가 이들을 탐식할 수 있는지를 조사하였다.

Table I. Binding of EIGG, EC, E to RAW cells.

	BI*
E	0
EIgG	3.0
EC	0.03

* indicates binding index

Table I. 보는바와 같이 RAW cell은 E (SRBC)와는 전혀 결합하지 않고 있다. 이는 15분동안 control particle인 SRBC가 전혀 RAW cell에 의해 탐식되고 있지 않다는 것을 알수 있거 또 탐식되기 위해서는 어떤 특정한 receptor mediated phagocytosis 경로를 거쳐야 한다는 것을 알수 있다. RAW 세포는 EIgG와는 3이라는 BI를 보여주고 EC와는 0.03이라는 BI를 보여주고 있다. 이는 곧, RAW세포는 Fc recptor는 활발하게 존재하고 있으나 대부분의 mouse의 거식세포에서 나타나는 특성인 낮은 수준의 complement receptor (CR) 수준을 보여주고 있다.

2. Particle binding assay to fiber exposed RAW cells.

RAW cell을 5, 10, 20 50 ug의 SiO₂, TiO₂, Chrysotile, crocidolite, amosite, glass wool, glass fiber로 하룻밤 폭로 시킨후 EIgG particle을 이용하여 이들의 Fc receptor mediated phagocytosis 기능을 측정하였다.

Table II. Particle binding assay to fiber exposed RAW cells.

	5 ug	10 ug	20 ug	50 ug
control	1	1	1	1
SiO ₂	0.86	0.72	0.76	1
TiO ₂	0.43	0.47	0.39	0.07
Crocidolite	0.45	0.36	0.33	0.23
Amosite	0.38	0.40	0.31	0.14
Chrysotile	0.86	0.62	0.84	0.68
Glass wool	0.61	0.68	0.48	0.97
Glass fiber	0.48	0.79	0.58	1

* Values are indicated as BI of fiber/BI of control.

Tabel II에서 보는바와 같이 SiO₂와 chrysotile은 가장 적은 BI의 감소를 보여주고 있고, 다음으로 glass wool, glass fiber가 BI의 감소를 보여주고 있다. Figure 1에서 보는바와 같이 glass fiber(Fig 1. G)나 glass wool (Fig 1. H)은 워낙 섬유 크기가 커기 때문에 거식세포

에 의해 탐식되기가 힘든점이 있기 거식세포에게 영향을 크게 미치지 못한 것 같다. 좀더 작은 크기의 glass wool이나 glass fiber의 생산이 필요한 것 같다. 이와 반대로 SiO₂는 Figure 1B에서 보는바와 같이 SiO₂를 탐식한 세포는 활발한 Fc receptor mediated phagocytosis를 보여주고 있다. 50 ug으로 처리하여 SiO₂에 폭로된 RAW 세포에서는 더욱더 증가된 것을 볼 수가 있는데 왜 SiO₂가 이를 활성화 시키는 지는 좀더 연구가 필요한 것 같다. 그리고 MTT assay나 tryphan blue exclusion 방법에 의해 아주 낮은 독성을 보여주었던 TiO₂는 RAW세포의 50 ug 농도에서 Fc receptor mediated phagocytosis 를 완전히 억제하고 있다. Figure 1E에서 보이는 바와 같이, SiO₂와는 달리 아주 작은 수의 EIgG가 세포에 결합된것을 볼 수 있다. 그리고 chrysotile은 crocidolite나 amosite의 inhibition 보다 훨씬 적게 Fc receptor에 영향을 끼치고 있다. Figure 1F 에서도 chrysotile을 탐식한 세포는 그런데로 EIgG와 결합하고 있으나 amosite (Figure 1D)나 crocidolite (Figure 1C)를 탐식한 세포에서는 감소한 EIgG와 결합을 보여주고 있다. 이 결과는 지난해의 우리의 in vitro toxicity test의 결과와 거의 일치하고 있고 일반적으로 알려진 것같이 백석면(chrysotile) 황색면 (amosite)이나 청색면 (crocidolite)보다 독성이 낮은 것을 알 수 있다.

Figure 1. Fc receptor mediated phagocytosis in fiber and particle ingested RAW macrophages.

RAW cells were incubated with respective fibers and particles for overnight and allowed to bind with IgG coated erythrocytes (EIgG) for 15 min at 37 C as described in materials and methods. The cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS and observed in a phase contrast microscope.

A, control; B, SiO₂; C, crocidolite; D, amosite; E, TiO₂; F, chrysotile; G, Glass wool; H, Glass fiber. Small round cells are EIgG.

3. Effect of interferon gamma on FcR mediated phagocytosis in Crocidolite exposed RAW cells.

FcR mediated phagocytosis를 억제하는 20 ug의 crocidolite에 폭로된 RAW macrophages에서의 FcR mediated phagocytosis를 회복하기 위하여 interferon gamma의 처리가 이를 회복할 수 있는지를 조사하였다. 먼저 RAW 세포를 10000개 정도를 glass coverslip이 들어 있는 24 well 배양용기에 하룻밤 키운후, 20 ug의 crocidolite와 여러농도의 interferon을 처리하여 하룻밤 더 배양하였다. 그리고 coverslip을 PBS로 씻은 후 100 ul의 EIG를 coverslip에 더한 후 15분간 37 C 에서 배양하였다. coverslip은 다시 PBS로 많이 씻어 세포에 결합되지 않은 EIG를 없애고, 4% formaldehyde in PBS로 고정하여 현미경에서 관찰하였다.

Table III. Effect of IFN-gamma on crocidolite exposed RAW cells.

Units of IFN	IFN-gamma	IFN-gamma + crocidolite*
0	4.6+0.6#	2.0+0.6
1	19 +7.0	11.1+2.9
50	17.2+0	15.3+2.7
100	11.1+1.4	19.0+5.0
200	8.3+1.0	7.2+0.2

* 20 ug of crocidolite were used.

Values are indicated as BI.

Table III에서 보이는 바와 같이 crocidolite는 56% 이상의 FcR mediated phagocytosis를 억제하고 있지만, interferon gamma 처리와 함께 FcR mediated binding을 100 unit까지 증가시키고 있다. Interferon gamma만을 처리한 군에서는 interferon gamma의 농도가 50 unit 까지는 증가 양상을 보이다가 100 unit을 넘어면서 감소를 보여주고 있다. 이는 고농도의 interferon이 nitric oxide를 형성을 유도하여 세포에 유해한 영향을 끼치기 때문이라고 본다. 다른 실험에서는 고농도의 interferon gamma (100, 200 unit)의 처리가 세포독성을 나타내어 대부분의 세포가 죽은 것을 관찰할 수 있었고, 고농도의 interferon gamma처리가 crocidolite에 폭로된 세포에서는 아무런 독성을 나타내지 않고 FcR mediated phagocytosis를 증가시키는 것을 보여주었다 (Figure 2C and D). 이 실험에서도 100unit 이상의 interferon이 FcR mediated phagocytosis를 감소시키며, crocidolite폭로된 RAW cell에서는 interferon gamma 의 처리로 100 unit까지는 증가를 보여주며 200 unit에서는 감소를 보여주었다.

Interferon gamma가 석면에 의한 독성을 줄일수 있다는 것은 잘 알려져 있지 않다. 그러나 이 실험이 제시하는 것은 interferon gamma는 적어도 FcR을 활성화시키는 역할을 하고, 이의 활성화 작용은 crocidolite와 같은 독성이 높은 석면에서도 interferon gamma 의 처리로 FcR의 활성을 회복시킬수 있다는 점이다. 이는 다른 여러가지 석면독성에 의해 일어나

는 장애도 interferon gamma의 처리로 회복할 수 있다는 것을 예시한다고 생각된다.

Figure 2. The effect of interferon gamma on crocidolite ingested RAW macrophages.

RAW cells were incubated with 20 ug of crocidolite and several concentrations of interferon gamma for overnight and allowed to bind with IgG coated erythrocytes (EIgG) for 15 min at 37 C as described in materials and methods. The cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS and observed in a phase contrast microscope.

A, control; B, cells treated with crocidolite only; C, cells treated with crocidolite and 100 units of interferon gamma; D, cells treated with crocidolite and 200 units of interferon gamma. Small round cells are EIgG.

IV. 고찰

본 연구에서는 석면과 대체물질의 *in vitro* 독성시험 실시함에 있어 지금까지는 주로 세포의 생사나 분열능력등의 방법과 형태학적인 방법을 지양하고 세포의 실제적 기능에 의거한 방법을 사용하였다. 특히 석면이나 석면 대체물질을 흡입하였을때 가장 먼저 관계하는 macrophages의 석면, 석면대체물질 폭로후의 macrophage에서 이들의 기능 중에서 가장 중요한 phagocytosis의 작용을 이들의 각각 관여하는 receptor의 ligand를 이용하여 연구되었다. 이런 연구의 중요성은 실제 생리학적인 상황에서 석면을 탐식한 phagocytes가 어떤 기능을 가지고 있고 또 폐에서 이들의 기능을 제대로 수행하고 있는지를 아는데 중요하고, 또 만약 석면과다폭로된 상황에서 다른 염증이 생긴다면 이런 염증에 대해 phagocytes가 어떤 역할을 수행하고 있는지에 대한 여러가지 세포의 기능을 알 수 있기 때문이다.

먼저 RAW macrophage는 complement receptors의 발현이 아주 낮은것을 볼 수가 있었다. 대부분의 murine macrophages가 이런 현상을 보여주어서 앞으로 석면에 폭로된 macrophages에서 complement receptor의 영향을 측정하기 위해서는 다른 cell system을 적용해야 할 것이다. 이의 후보로서는 사람의 monocyte나 monocyte를 배양하여 tissue macrophage와 유사한 기능을 가지고 있는 monocyte derived macrophages를 이용해야 할 것이다. 아니면 단기시험으로는 사람의 granulocytes등을 이용할 수 있다. 그러나 granulocyte의 수명은 세포배양시 아주 짧기 때문에 (12 시간) 이 실험 모델과는 달리 실험디자인을 짜야 할 것이다.

이번 실험에서는 석면을 탐식한 세포에서의 MFR에 의한 phagocytosis에 대한 실험을 하지 않았으나, 앞으로 상당부분이 연구가 되어야 할 것이다. 특히 석면폐나 중피종 환자가 만약 bacterial infection 이나 fungal infection이 생기게 된다면 이들의 제거를 위해서는 FcR, CR, 또 MFR이 제대로 작용해야 할 것이다.

FcR은 우리 몸에서 이물질이 들어오면 이물질에 대한 항체가 결합한 immune complex의 제거에 가장 중요한 역할을 한다. 본연구에서 보이는 바와 같이, amosite 와 crocidolite는 FcR mediated phagocytosis를 억제하고 있다. 이들의 억제 mechanism은 아직 밝혀져 있지 않지만 interferon gamma 의해 회복될 수 있는 점으로 보아 interferon gamma가 FcR의 합성을 촉진하는 역할을 하거나, 세포막의 integrity를 증가하는 역할, 또는 세포의 분화를 촉진하는 역할을 한다고 볼 수 있다. 항 바이러스성과 항 세포분해성 특성을 가진 Interferon은 lymphocytes나, NK cells, macrophages의 세포독성적인 활성을 자극하고 major histocompatibility complex (MHC)를 조절한다고 한다 (Stewart, 1979; Baron & Dianzani, 1977). 그중에서도 interferon gamma는 T cells 에서 생성된다고 알려져 있고 peripheral mononuclear cells, spleen cells, NK cells에 의해 생성되는 IL-2에 의해 생산이 유도될 수 있다 (Kasahara et al, 1983). 그리고 interferon gamma는 암세포의 분열 억제작용이 있으며 이는 TNF beta와 같이 사용하게되면 B cell의 분화를 촉진하고, NK cell 활성화와 ADCC를 증가시킨다고 한다 (Catanola et al., 1981; Ratliff, et al, 1981). 그러나 고농도의 interferon gamma의 독성을 crocidolite의 폭로에 의해 억제 될수가 있다는 것도 아직 해결되어야 할 과제인 것 같다. 그리고 SiO₂는 FcR receptor mediated phagocytosis에게 많은 영향을 끼치지 않는 것으로 보이고 또 현미경상에서의 형태도 SiO₂를 탐식한 세포에서는 macrophage가 아주 많이 활성화된 모습을 보여주고 있다. Chrysotile은 어느정도 FcR receptor mediated

phagocytosis에게 영향을 주지만 amosite나 crocidolite등과 같은 영향을 주지 않는 것 같이 보이며 따라서 이의 독성도 상대적으로 amosite나 crocidolite 보다는 낮으리라 생각된다. 특기할 사항은, 독성이 아주 낮으리라고 생각되었던 TiO_2 가 아주 심하게

FcR receptor mediated phagocytosis에 영향을 끼치고 있다. TiO_2 는 지난해의 MTT assay나 tryphan blue exclusion에 의한 독성시험에서도 아주 낮은 독성을 보여주었지만 금번의 FcR receptor mediated phagocytosis에서는 50% 이상의 억제를 보여주고 있다. 이는 한가지 독성 시험으로 충분치 않고 독성을 알기 위해서는 세포의 기능도 살펴보아야 한다는 관점에서 아주 특기할 사항이라고 할 수 있다.

그리고 우리가 생산한 Glass wool이나 glass fiber는 크기가 크기 때문에 세포에 의해 탐식되기가 어렵다고 생각되며, 이들이 inhalable particle이 되어 폐에 흡수되기는 아주 어렵다고 생각된다. 왜냐하면 inhalable particle이 되기 위해서는 적어도 길이가 10 μm 이하여야 하나, 우리가 생산한 glass wool이나 glass fiber는 길이가 평균 50 μm 이상이기 때문에 폐에 흡수되기가 어렵다고 생각되며, macrophage에 의해 탐식도기도 어렵다고 생각된다. 다만 사진에서 볼 수 있지만 여러 세포들이 함께 붙어 있는 모습은 볼 수가 있었다, 앞으로 좀더 미세한 fiber 생산을 위해 새로운 방법이 개발 되어야 할 것이다.

IV. 결론 및 요약

광물섬유나 광물입자를 탐식한 거식세포의 세포기능 변화를 배양된 세포와 탐식작용(phagocytosis)에 관계하는 receptor등에 부합하는 ligand coated particles 을 만들어 이에 관계되는 영향을 조사하였다. RAW macrophages에서는 complement receptor mediated phagocytosis (Complement coated sheep erythrocyte binding assay)는 아주 낮은 수준을 보여주었으며, Fc receptor mediated phagocytosis (IgG coated sheep erythrocyte binding assay) 정상 수준을 보여주었다. Amosite, crocidolite에 폭로된 RAW macrophages는 60% 이상의 binding index (BI)의 감소를 보여주어 Fc receptor mediated phagocytosis에 많은 영향을 끼치는 것을 알 수 있었고, SiO_2 , chrysotile은 30% 이하의 BI 감소를 보여주어서 Fc receptor mediated phagocytosis에 적은 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다. 그러나 독성이 아주 낮다고 보고된 TiO_2 는 이에 폭로된 RAW macrophages 에서 50% 이상의 BI의 감소를 볼 수 있었다.

Interferon gamma가 석면에 폭로된 세포에서의 영향을 조사하기 위해 crocidolite에 폭로된 RAW macrophage에서 Fc mediated phagocytosis 기능을 조사하였다. Interferon gamma는 대조군 세포에서 고농도(100-200 unit) 처리는 세포독성을 보였지만, 저농도에서는 Fc receptor mediated phagocytosis를 증가시키는 역할을 하였고, crocidolite에 폭로된 RAW macrophage에서 interferon gamma의 처리는 crocidolite에 의한 Fc receptor mediated phagocytosis를 회복하여 증가시키는 역할을 하였다.

광물섬유나 광물입자에 의하여 거식세포의 phagocytosis는 영향을 받게되는데 특히 Fc receptor mediated phagocytosis는 crocidolite, amosite와, TiO_2 에 의해 영향을 심하게 받게되고, SiO_2 나 chrysotile은 적은 영향을 끼친다. Crocidolite에 의한 Fc receptor mediated phagocytosis 기능의 감소는 interferon gamma에 의해 회복될 수 있다.

VI. 참고문헌

Baron, S. and Dianzani, F. eds 1977. *Tex. Rep. Med.* 35:1

Catalona, W. J. Ratliff, T. L., and McCool, R. E., 1981. *Nature*, 291: 77.

Clarkson, S. G., R. P. Kimberly, J. E., Valinsky, M. D. Witmer, J. B. Bussel, R. L. Nachman, and H. C. Unkeless, 1986, Blockade of clearance of immune complexes by an anti-Fc-gamma-receptor monoclonal antibody, *J. Exp. Med.*, 164: 474-489.

Ezekowitz, R. A. B., J. Austyn, P. Stahl, and S. Gordon, 1981. Surface properties of activated mouse macrophages-BCG infection reduces expression of antigen F4/80 and Fc and mannose specific receptors for endocytosis whilst enhancing IA antigens, *J. Exp. Med.* 154:60-76.

Gallagher, J.E., George, G., and Brody, A. R., 1987. Sialic acid mediates the initial binding of positively charged inorganic particles to alveolar macrophage membranes, *A. Rev. Respir. Dis.* 135: 1343-1352.

Gordon, S., Perry, V. H., Rabinowitz, S., Chung, L., and Rosen, H., 1988. plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system, *J. Cell Sci. Suppl.* 9: 1-26.

Grazino, R. F., and M. W. Fanger, 1987. Fc gamma RI and Fc gamma RII on monocytes and granulocytes are cytotoxic trigger molecules for tumor cells, *J. Immunol.* 139: 3536-3541.

Hesterberg, T. W., Ririe, D. G., Barrett, J. C., and Nettesheim, P. (1987). Mechanisms of cytotoxicity of asbestos fibers in rat tracheal epithelial cells in culture. *Toxicol. Vitro* 1: 59-65.

Kasahara, T., Hooks, J. J. Dougherty, S. F., and Oppenheim, J. J., 1983. *J. Im.* 130: 1784.

Lenartz, M. R., Wileman, T. E., and P. D. Stahl, 1987, isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from rabbit alveolar macrophages, *Biochem. J.* 245:705-711

Ratliff, T. L. McCool, R. E., and Catalona, W. J. 1981. *Cell Immunol* 138: 3824

Stahl, P., and S. Gordon, 1982, Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids, *J. Cell Biol*, 93:49

Stewart, W. E. 1979. *The interferon system*, Springer, Berlin

Tilkes, F., and Beck, E. g. 1983. Macrophage functions after exposure to mineral fibers. *Environ Health Perspect.* 51: 275-279.

Warehit, D. B., Hill, L. H., and Brody, A. R., 1983. Pulmonary macrophage phagocytosis: quantification by secondary and backscattered electron imaging. *Scanning Electron Microsc.* 1:431-437.

Warheit, D. B., Hill, L. H., and Brody, A. R., 1984. In vitro effects of crocidolite asbestos and wollastonite on pulmonary macrophages and serum complement. *Scanning Electron Microsc.* 2: 929-926.

Willis, H. E., G. Browder, A. J. Feister, T. Mohanakumar and S. Ruddy, 1988. Monoclonal antibody to human IgG Fc receptors, *J. Immunol.* 136:4681.

Wright, S. D., P. A. Detmers, M. T. C. Jong, and B. W. Erikson, 1987, C3bi-receptor recognizes a region of complement protein C3 containing the sequence R-G-D, *PNAS (USA)* 84:1965-1968.

Yu, I. J. 1989. *Leishmania major* parasite interaction with monocyte-derived human macrophages, a thesis, SUNY Health Science Center at Brooklyn.