



구리로 만든 나노입자의 기관지상피세포에 미치는 독성

박은정 · 박광식
동덕여자대학교 약학대학

Cytotoxicity of Copper Nanoparticles in Cultured Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B)

Eun-Jung Park and Kwangsik Park

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Received November 25, 2005; Accepted December 15, 2005

ABSTRACT. Nanomaterials, which ranges in size from 1 to 100 nm, have been used to create unique devices at the nanoscale level possessing novel physical and chemical functional properties. However, the toxicities of nanomaterials have not been fully tested and the risk of nanomaterials is emerging issues in these days. In this study, the cytotoxicity of copper nanoparticles was tested in cultured human bronchial epithelial cells. As a results, copper nanoparticles showed cytotoxicity similar with cupric ion and the apoptotic mechanisms of DNA fragmentation and caspase-3 activation were involved. Induction of heme oxygenase-1 and thioredoxin reductase by copper nanoparticles indicated that cytotoxicity of copper nanoparticles is likely to be mediated through oxidative stress.

Keywords: Copper nanoparticles, Cytotoxicity, Apoptosis, Heme oxygenase

서 론

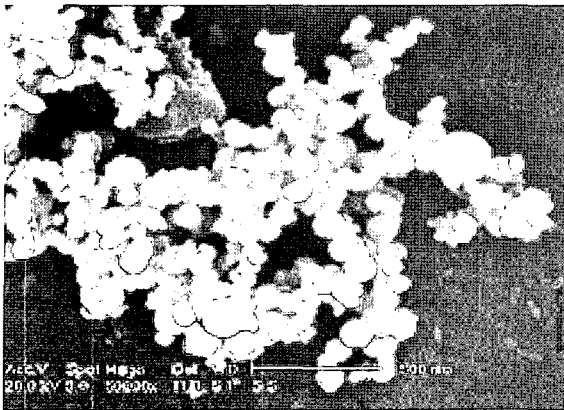
일반적으로 나노입자는 입경 100 nm 이하의 초미세입자(Ultrafine particle)를 말한다. 어떤 물질이 그 크기가 분자 또는 원자 수준으로 작아지게 되면 원재료의 물리화학적 성질과는 전혀 다른 새로운 성질을 나타내며 이를 이용하면 다양한 용도의 소재로 발전시킬 수 있다. 탄소 나노물질의 경우, 입자, 튜브, 평판, 구형 등 다양한 형태를 갖는 물질로 변형될 수 있으며 구리, 카드뮴, 은, 티타늄, 금, 알루미늄, 아연 등의 금속 성분도 그 크기가 나노 수준으로 작아지게 되면 크기에 따라 서로 다른 파장의 형광을 방출하게 되는 등 다양한 나노물질의 특성을 갖게 된다. 이러한 성질을 이용하여 반도체, 에너지, 환경, 금속공학 등 다양한 분야에서 나노물질의 응용성 연구가 수행되었으며 나노기술은 향후 인류의 미래생활을 변화시킬 새로운 기술동력으로 여겨지고 있다(Feynman, 1991;

Cui and Gao, 2003; Mazzola, 2003; Salata, 2004).

그러나 나노물질의 새롭고 다양한 특성은 본질적으로 지금까지 알려지지 않은 새로운 생체반응을 유발할 수도 있다는 것을 의미하며, 이로 인해 나노물질의 인체독성과 환경에 미치는 잠재적 위해성이 최근 독성학 분야의 새로운 이슈로 등장하게 되었다. 나노물질의 독성과 관련한 최근의 연구결과는 나노물질이 폐포를 통과하여 혈관계로 쉽게 유입되며, 여러 조직으로 분포될 뿐만 아니라 이들 조직에서 활성산소를 생성시키거나 염증반응을 유발하기도 한다는 것을 암시하고 있다. 또한 기관지에 침적시킨 탄소나노튜브가 폐내 이물질 반응에 의한 염증성 결절(육아종, granuloma)을 생성하는 것이 알려지는 등 독성반응에 대한 연구결과가 다양하게 보고되고 있다(Thomas and Sayer, 2005; Holsapple *et al.*, 2005; Oberdorster *et al.*, 2005).

본 연구에서는 금속성 나노입자들이 사람의 정상기관지 상피세포에 흡입되었을 때 일으킬 수 있는 세포독성을 평가하고자 우선 구리 나노입자(copper nanoparticle)에 대한 독성시험을 수행하였으며 아울러 구리이온(cupric ion)과의 세포독성을 비교하였다.

Correspondence to: Kwangsik Park, College of Pharmacy, Dongduk Women's University, #23-1, Wolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-714, Korea
E-mail kspark@dongduk.ac.kr



100nm, 5~9m²/g

Fig. 1. The image of copper nanoparticles. The size of particles is about 100 nm and the surface area is about 5~9 m²/g. This photo was provided by Nanotechnology Inc.

재료 및 방법

세포배양 및 구리나노입자 노출

사람의 정상 폐세포에서 유래한 BEAS-2B cell line을 ATCC로부터 분양받아 FBS(Fetal Bovine Serum) 10%를 함유하는 DMEM/F12 배지를 이용하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 계대배양하였다. 구리나노입자는 (주)나노기술(대전, 한국)로부터 구입하였다(Fig. 1). 탈이온수를 이용하여 stock solution을 만든 후, 왓트만 필터(Wattman, pore size 0.22 μm)를 이용하여 제균여과하고 FBS-free 배지로 희석한 후 나노입자의 분산을 위해 37°C에서 30분간 sonication시켰다. 나노입자노출은 완전배지로 희석하여 각 시험농도 별로 처리하였다. 나노입자와 구리이온의 세포독성 비교시험에는 구리화합물로서는 CuCl₂를 사용하였다.

세포독성측정 및 DNA laddering

배양한 BEAS-2B cell을 트립신처리하여 회수한 후 PBS(Phosphate Buffered Saline, pH 7.2, KCl 2.68 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM)로 2회 세척하고, 96 well plates에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 부착시켰다. 구리 나노입자와 구리화합물을 각각 농도별로 24, 48, 72, 96시간씩 노출시킨 후, 2 mg/ml의 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)용액을 well당 40 μl씩 넣어 배양기내에서 4시간 정도 반응시켰다. plate에 있는 상등액을 제거하고, DMSO(Dimethyl Sulfoxide)를 well당 150 μl씩 넣어 준 후, 30분 정도 가볍게 흔들어 주고, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도 당

4 well씩 처리하였으며, 각각의 O.D값을 대조군의 O.D값과 비교하여, 백분율로 표시하였다(Choi *et al.*, 2004; Hsiao *et al.*, 2000). DNA fragmentation을 확인하기 위해 Promega Corporation(WI, Madison, USA)의 Genomic DNA purification kit을 이용하여 추출한 DNA를 ethidium bromide(10 mg/ml) 0.02% 함유하는 1.5% 아가로스겔에 전기영동하고, UV light로 확인하였다.

Caspase-3 활성측정

Caspase-3의 활성측정은 R&D systems, Inc(MN, Minneapolis, USA)의 Caspase-3 colorimetric assay kit를 사용하였으며 제조사의 프로토콜에 따라 시행하였다. 간략히 설명하면 아래와 같다. 배양된 세포에 구리 나노입자를 1, 2, 4, 8 ppm으로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 incubation하였다. 배양배지를 제거하고 부착된 세포만을 회수한 후 PBS로 2회 세척하고 상등액을 제거하고, 1×10⁶당 25 μl의 분해원충액을 넣어 세포를 분해시켰다. BCA protein assay로 단백질 양을 계산한 후, 150 μg의 protein을 함유하는 세포분해물을 well당 50 μl씩 넣어 주었다. 반응액과 기질로서 DEVD-pNA를 넣어 준 후 37°C에서 2시간 방치하였다. 405 nm에서 흡광도를 측정한 후 control대비 증가율로 환산하였다(Pattie and Christiaan, 2002).

Heme oxygenase-1 및 thioredoxin reductase 발현

Promega Corporation(WI, Madison, USA)의 Total RNA isolation system을 이용하여 추출한 RNA의 RT-PCR과 PCR 과정을 통해 Heme oxygenase 및 thioredoxin reductase의 유전자 발현을 확인하였다. RT-PCR 반응은 RNA 주형 1 μg에 oligo dT, reverse transcriptase 및 nucleotide가 혼합된 반응액 20 μl를 42°C에서 60분간 반응시킨 후, 94°C에서 5분간 가열하였으며, PCR 반응은 Taq polymerase 및 nucleotide 등이 혼합된 (주)바이오니아(대전, 한국)의 PCR premix tube에 합성된 primer쌍 2 ul와 RT-PCR에서 얻은 반응생성물 1 μl를 넣고 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 25~32회 반응시켰다. 마지막 반응 이후에 72°C에서 15분간 더 증폭시켰다. 증폭을 통해 생성된 반응물을 ethidium bromide(10 mg/ml) 0.02% 함유하는 1.5% agarose gel상에서 TAE 완충용액을 사용하여 전기영동하고, UV light로 확인하였다(Lee *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2004). Heme oxygenase-1의 primers는 left: 5'-AGTTGCTGTAGGGCTTTATG-3', right: 5'-CTCTGAAGTTAGGCCATTG-3' 이었으며 Thioredoxin reductase의 primer는 left: 5'-CTATGAGAATGCTTATGGGC-3', right:

5'-AAACCAATACCAGCAAGA AA-3'이었다(Angeline *et al.*, 2003).

결과 및 고찰

구리는 cytochrome c oxidase, tyrosinase, p-hydroxyphenyl pyruvate hydrolase, dopamine beta hydroxylase, lysyl oxidase 및 CuZn-SOD의 cofactor로 작용하며 따라서 생체내 구리가 결핍될 경우 여러 형태의 병리적 소견을 나타내게 된다. 구리는 산화형(cupric Cu^{2+}) 또는 환원형(cuprous Cu^+) 양쪽으로 존재하며 다양한 산화환원반응에 관여한다. 구리의 세포독성 기전으로는 구리 이온(free Cu ion)에 의한 활성산소의 생성이 가장 주요한 반응으로 인정되고 있다(Lisa and Ching, 2003; Janet and Carl, 2005).

본 연구에서는 입자상태인 구리나노물질의 경우에도 구리이온과 마찬가지로 산화적 스트레스에 의한 세포독성을 발현하는지 알아보려고 하였으며 아울러 이들 두 물질간의 독성도 비교해 보고자 하였다. 5, 10, 20, 40 ppm의 구리나노 입자를 BEAS-2B 세포에 처리한 결과 처리한 모든 농도군에서 24시간 이내에 강한 세포독성이 나타났다(Fig. 2). 구리나노입자의 독성은 같은 농도의 구리이온의 독성과 유사한 정도의 독성을 발현하는 것으로 보인다(Fig. 3a, 3b). 구리나노입자의 세포독성 메커니즘이 세포사멸기전을 통해 일어나는지 확인하기 위해 우선 DNA fragmentation을 확인하였는데 Fig. 4에서 보는 바와 같

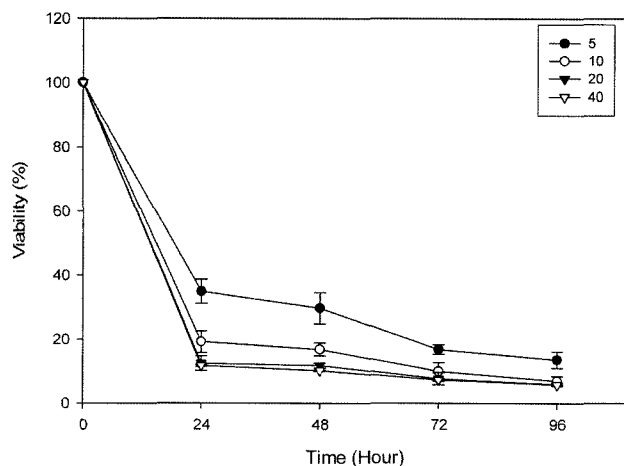


Fig. 2. Cytotoxicity of copper nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. Cells were treated with different concentration of nanoparticles (5, 10, 20, 40 ppm as of copper particles) for 24, 48, 72, and 96 hours. At the end of incubation period, cytotoxicity was measured by MTT assay. The data are expressed as mean \pm SD of three independent experiments.

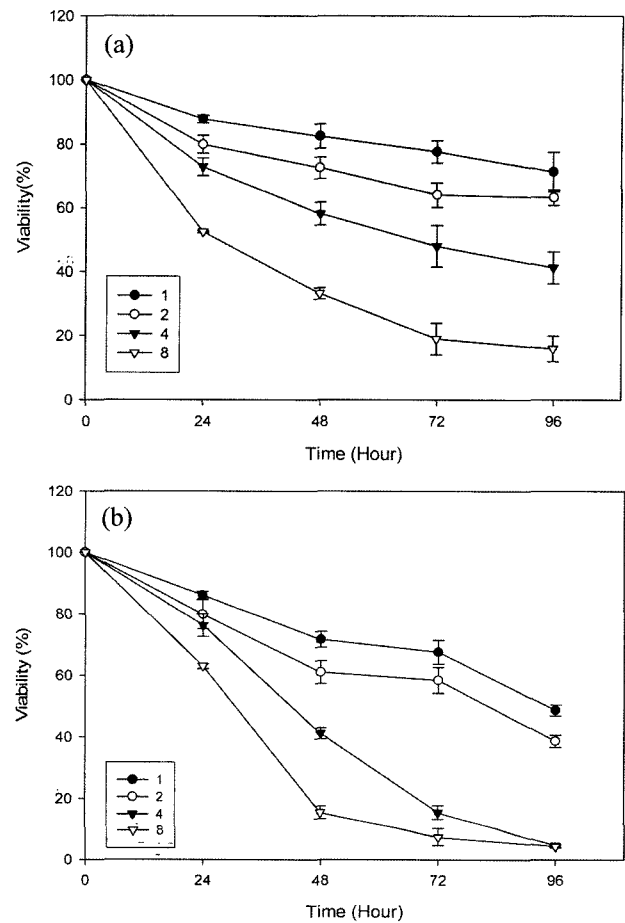


Fig. 3. Cytotoxicity of copper nanoparticles and cupric ion in cultured BEAS-2B cells. (a) Cells were treated with different concentration of nanoparticles (1, 2, 4, 8 ppm as of copper particles) for 24, 48, 72, and 96 hours. (b) Cells were treated with different concentration of cupric chloride (1, 2, 4, 8 ppm as of copper ion) for 24, 48, 72, 96 hours. At the end of incubation period, cytotoxicity was measured by MTT assay. The data are expressed as mean \pm SD of three independent experiments.

이 구리 나노입자를 4 ppm, 8 ppm 농도로 24시간 처리할 경우 DNA 손상이 심각하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. DNA 손상과 더불어 Caspase-3의 활성도 증가하였는데(Fig. 5) 이러한 사실은 구리 나노입자가 세포사멸기전을 통해 세포독성을 나타낸다는 것을 암시한다. 한편, heme oxygenase는 heme를 분해시켜 biliverdin을 생성하며 biliverdin은 biliverdin reductase의 작용을 받아 담즙성분인 bilirubin을 생성하게 된다. bilirubin은 생체 내에서 강력한 항산화작용을 갖는 물질이며 bilirubin의 생성 초기단계에 작용하는 heme oxygenase의 상승은 체내 산화적 스트레스에 대한 지표가 될 수 있다(Mahin and Peter, 2005). PCR증폭을 통해 확인한 결과 구리나노

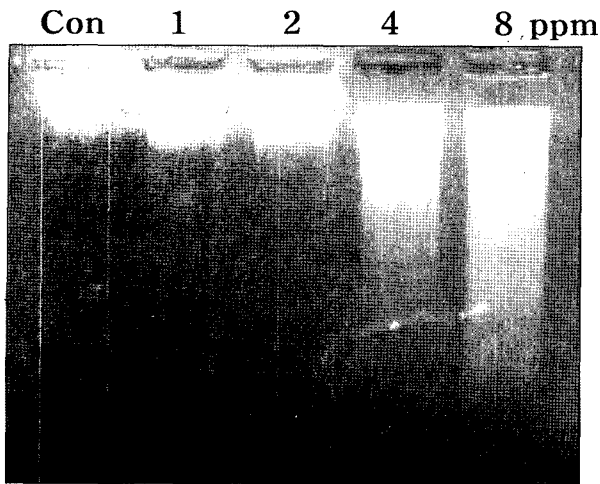


Fig. 4. DNA electrophoresis of cells cultured with copper nanoparticles for 24 hours. Copper nanoparticles (4 ppm, 8 ppm) induced DNA fragmentation in cultured BEAS-2B cells.

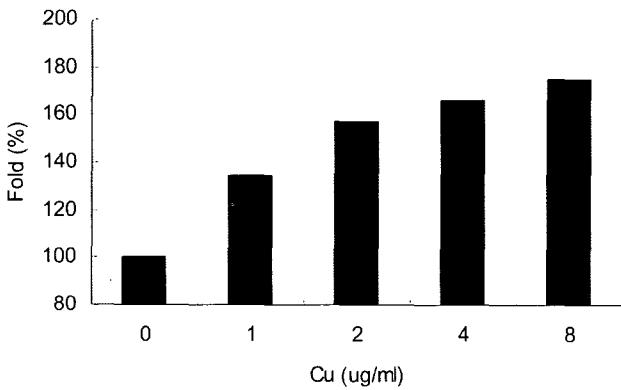
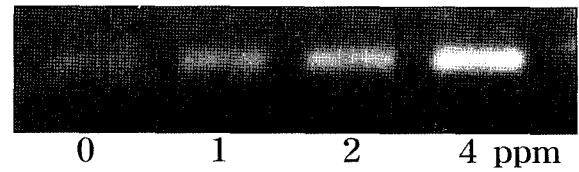


Fig. 5. Effect of copper nanoparticles on the caspase-3 activity. The cell lysate was tested for protease activity by the addition of a caspase specific substrate DEVD-pNA. The cleavage of the peptide by the caspase releases the chromophore pNA, which can be quantitated spectrophotometrically at a wavelength of 405 nm.

입자는 Heme oxygenase-1의 발현을 용량 의존적으로 증가시키는 것을 알 수 있었으며 또한 산화적 스트레스와 관련된 thioredoxin의 환원에 관여하는 thioredoxin reductase의 발현도 증가시키는 것으로 확인되었다(Fig. 6)(Anne *et al.*, 2005).

결론적으로, 구리나노입자에 의해 산화적 스트레스가 증가한다는 결과는 아직 충분하지 않으나 본 연구에서 얻은 결과를 종합해 볼 때 구리 나노입자는 산화적 스트레스에 의해 BEAS-2B 세포의 세포사멸을 유도하는 것으로 판단되었으며 그 독성 정도는 구리이온과 유사한 정도일 것으로 생각된다. 산화적 스트레스에 미치는 구리 나노입자의 영향을 보다 세밀히 평가하기 위해서는 향후 세포내

Heme oxygenase -1



Thioredoxin reductase

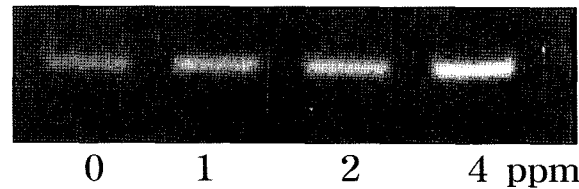


Fig. 6. Expression of heme oxygenase-1 gene and thioredoxin reductase gene. BEAS-2B cells were treated with copper nanoparticles, 1, 2, and 4 ppm for 24 hrs. After total RNA extraction, reverse transcription-polymerase chain reaction was done and amplified again with the primers of heme oxygenase 1 and thioredoxin reductase, respectively. mRNA of the heme oxygenase and thioredoxin reductase were shown to be greatly increased by the copper nanoparticles.

에서의 항산화 생체반응 물질 및 ROS 측정 등 oxidative stress와 관련된 여러 시험이 추가적으로 필요할 것으로 판단된다.

참고문헌

Angeline, S.A., Amy, J.W., Aaron, B., Kaili, A.T., Linda, K., Nicole, V.S., Kimberley, A.O. and Joshua, W.H. (2003): Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in human lung cells. *Toxicogenomics*, **3**, 825-838.

Anne, B.G., Matthew, E.J. and Hajine, N. (2005): Thioredoxin: friend or foe in human disease? *TRENDS in Pharmaceutical Sciences*, **26**, 398-404.

Choi, J.H., Kim, J.S., Kim, Y.C., Kim, Y.S., Chung, N.H. and Cho, M.H. (2004): Comparative study of PM_{2.5}- and PM₁₀-induced oxidative stress in rat lung epithelial cell. *Journal of Veterinary Science*, **5**, 11-18.

Cui, D. and Gao, H. (2003): Advance and prospect of bionanomaterials. *Biotechnol. Prog.*, **19**, 683-692.

Feynman, R. (1991): There is plenty of room at the bottom. *Science*, **254**, 1300-1301.

Holsapple, M.P., Farland, W.H., Landry, T.L., Monteiro-Riviere, N.A., Carter, J.M., Walker, N.J. and Thomas, K.V. (2005): Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part II: Toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. *Toxicological Sci.*, **88**, 12-17.

Hsiao, W., Mo, Z.Y., Fang, M., Shi, X.M. and Wang, F. (2000): Cytotoxicity of PM_{2.5} and PM_{2.5-10} ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmen-*

- tal Mutagenesis*, **471**, 45-55.
- Janet, Y.U. and Carl, L.K. (2005): Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, **26**, 268-298.
- Lee, C., Na, J.G., Lee, K.C. and Park, K. (2002): Choriogonin mRNA induction in male medaka *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption. *Aquatic Toxicology*, **61**, 233-242.
- Lisa, M.G. and Ching, K.C. (2003): Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, **189**, 147-163.
- Mahin, D.M. and Peter, E.M. (2005): 30 som years of heme oxygenase: From a "molecular wecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events, Biochemical and Biophysical Research Communications.
- Mazzola, L. (2003): Commercializing nanotechnology. *Nature Biotechnology*, **21**, 1137-1143.
- Oberdorster, G., Overdorster, E. and Oberdorster, J. (2005): Nanotoxicology, An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect*, **113**, 823-839.
- Paolo, S., Silvano, G., Paola, A., Patrizia, F., Valeria, M., Sabina, N., Pierfranco, R., Giorgio, G., Alberto, B., Franco, P., Antonio, B. and Claudio, B. (2004): Carvedilol prevents doxorubicin- induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes *in vitro*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **37**, 837-846.
- Pattie, S.G. and Christiaan, L. (2002): Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1588**, 94-101.
- Ryu, J., Lee, M.S., Na, J.G., Chung, K., Song, B.J. and Park, K. (2004): Molecular cloning of CYP1A cDNA of medaka (*Oryzias latipes*) and regulation by environmental pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**, 1004-1011.
- Salata, O.V. (2004): Applications of nanopaticles in biology and medicine. *J. Nanobitotech.*, **2**, 3-9.
- Thomas, K. and Sayre, P. (2005): Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. *Art II: Toxicological Sci.*, **87**, 316-321.