

수열합성법으로 제조된 Zn-TiO₂ 나노입자와 TiO₂ 나노입자가 zebrafish 배발생에 미치는 영향

여민경*, 김효은

경희대학교 공과대학 환경학과 환경연구센터

The Effect of Nano-scale Zn-TiO₂ and Pure TiO₂ Particles were Prepared using a Hydrothermal Method on Zebrafish Embryogenesis

Min-Kyeong Yeo* and Hyo-Eun Kim

Department of Environmental Science and Environmental Research Center,
College of Engineering, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 446-701, Korea

ABSTRACT

In this study, we investigated the biological toxicity of nano-scale Zn (0.1, 0.5, and 1 mol%)-doped TiO₂ and pure TiO₂ nanoparticles using zebrafish embryogenesis as our model organism. Zn-doped TiO₂ nanoparticles were prepared using a conventional hydrothermal method for the insertion of zinc into the TiO₂ framework. The characters of Zn-doped TiO₂ (0.1%, 0.5%, 1%Zn) and pure TiO₂ were about 7~8 nm. These sizes were smaller than 100~200 nm of TiO₂ was prepared using the sol-gel method. Particularly, in this study, we found no significant biological toxicity in the hatching rate and abnormal rate under expose pure TiO₂ and Zn-doped TiO₂ nanoparticles were prepared using a conventional hydrothermal method of zebrafish. It was different from the biological damage under TiO₂ nanoparticles were prepared using sol-gel method. We assessed that the damage was not linked to the particle's nanometer size, but rather due to the prepare method. Moreover, TiO₂ nanoparticles were prepared using a hydrothermal method were not shown to cause cytotoxic effects, like apoptosis and necrosis, that are the major markers of toxicity in organisms exposed to nanomaterials. Therefore, there is some relationship with biological toxicity of nanoparticles and the prepare method of nanometer size particles.

Key words : Zn-doped TiO₂, Nano scale, hydrothermal method, sol-gel method

서 론

광촉매로 널리 알려진 TiO₂는 광 조건하에서 환

경호르몬인 비스페놀 A를 저감하고 (Ohko *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2003), 휘발성 유기화합물 (VOCs: Volatile Organic Compounds)을 제거할 뿐 아니라 악취 제거 효능이 있는 등 다양하게 사용되고 있다.

또한 썬크림과 같은 화장품과 의약품과 같은 일상 생활용품으로도 널리 사용되고 있는 물질이

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-31-201-2413, Fax: +82-31-202-8854
E-mail: bioclass@khu.ac.kr

다 (Schulz *et al.*, 2002).

한편으로 물질의 반응 효율을 높이기 위한 나노과학의 발달로 TiO₂ 입자의 나노화가 가속화되어 다양한 나노입자 TiO₂가 개발되어 사용되고 있다 (Ohko *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2004; Jing *et al.*, 2005; Yeo and Kang, 2006). 그러나 나노물질화 되면서 나타날 수 있는 나노물질 독성에 대한 우려가 탄소나노튜브 등에서 보고된 바 있어 나노 TiO₂에 대한 생물위해성 평가도 관심의 대상이다 (Schulz, *et al.*, 2002; Gamer *et al.*, 2006; Cross *et al.*, 2007).

일부 연구에서 나노 TiO₂의 생물 독성영향이 보고된 바가 있지만, 이와 다르게 그 독성이 미비함을 지적한 연구도 함께 있어 나노 TiO₂의 생물독성 연구는 아직까지 충분하지 않다고 하겠다 (Ohko *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2003; Jing *et al.*, 2005; Yeo and Kang, 2006).

그 동안 나노물질의 독성연구는 주로 입자의 크기에 대한 것으로 나노입자화 되면서 원래 존재하던 물질보다 극히 작아지면서 세포내 침투와 뇌-혈관 장벽의 무력화 등이 지적되어 왔다 (Schulz *et al.*, 2002; Gamer *et al.*, 2006; Cross *et al.*, 2007).

그러나 나노물질은 그 제조과정에 다양한 물질반응이 일어날 수 있어 최종적으로 생산된 나노물질의 위해성은 그 입자 크기 이외에 나노 입자 제조 과정의 잔류 물질에 대한 영향도 연구해 볼 필요가 있다고 하겠다. 또한 생물체의 면역계의 작동으로 인해 노화된 세포나 암세포를 세포자살을 통해 제거하는 것에 착안하여 나노물질과 같은 외부 영향에 의한 개체의 이상이 세포자살현상을 유도하는지 여부를 알아보는 것은 나노물질의 생물체 영향을 이해하는데 필요한 연구방법으로 고려되고 있다. 특히 사전 연구에서 은나노물질이 zebrafish의 세포자살을 유도하는 유전자에 영향을 주는 것을 확인한 바 있다 (Yeo and Park, 2008; Yeo and Yoon, 2009).

이에 본 연구에서는 서로 다른 두 가지 제조법인 sol-gel 법과 수열합성법 (hydrothermal method)으로 각각 제조된 나노 TiO₂와 TiO₂의 광촉매효과를 상승시키기 위해 수열합성법으로 제조된 아연 도핑 (doping)된 Zn-TiO₂의 생물영향을 OECD 시험어종인 zebrafish (*Danio rerio*, wild-type)을 이용하여 시험 평가하였다. 이를 위해 X-선 회절분석법으로 나

노물질을 분석하고, HR-TEM 분석을 통해 입자의 크기와 형태를 확인하였다. 나노물질의 생물 영향은 zebrafish 배발생 과정 중 나노물질에 폭로된 배의 부화율과 이상율을 관찰하고, 이상개체를 confocal laser microscope를 이용하여 세포단계에 세포자살 (apoptosis)과 세포괴사 (necrosis)가 나타나는지 분석하였다.

재료 및 방법

1. Zn-TiO₂와 TiO₂ 나노입자의 특성분석

수열합성법 (hydrothermal method)에 의해 제조된 Zn-TiO₂ 나노입자, 순수 TiO₂ 나노입자 (Sreethawong and Yoshikawa, 2005) 및 sol-gel법 (Yeo and Kang, 2006)에 의해 제조된 순수 TiO₂ 나노입자는 영남대학교 화학과 강미숙 교수로부터 기증받은 시료를 사용하였다.

수열합성법에 의해 제조된 TiO₂ 나노입자와 0.1, 0.5 및 1.0 mol% Zn-TiO₂ 나노입자를 X선 회절분석기 (model PW 1830; Philips, Amsterdam, The Netherlands; nickel-filtered CuK α radiation, 30 kV, 30 mA)를 이용하여 2 θ angles로 5~70°까지 분석하였다.

또한 고감도 투과현미경 (High-resolution transmission electron microscopy; TEM, JEOL 2000 EX, 200 kV)으로 수열합성법에 의해 제조된 TiO₂ 나노입자와 0.1, 0.5, 1.0 mol% Zn-TiO₂ 나노입자 및 sol-gel법으로 제조된 TiO₂ 나노입자의 형태 및 크기를 분석하였다.

2. 시험동물

시험동물은 본 실험실에서 사육되어진 7~8월령의 zebrafish (*Danio rerio*, wild-type)를 사용하였다. Zebrafish의 사육 조건과 발생단계의 형태적 관찰과 부화율 측정은 선행연구에서 제시한 방법에 따랐다 (여민경, 2003). 60 L의 유리수조에 탄소여과장치를 거친 물의 환경에서 사육하였으며, 수온은 28 ± 1°C를 유지하였고 광주기는 14시간으로 하였다. Zebrafish의 알의 채취는 채취 전날 특수망을 설치한 알 채취용 수조에 암컷과 수컷 성어를 1:2의 비율로 넣고 다음날 광주기 시작 1~2시간 경과 후

알을 채취하였다. 채취 후에 20.5°C의 환경으로 배 발생을 지연시킨 후 zebrafish 용 embryo medium 으로 수회 세척하였다. 배발생을 위한 물 환경은 zebrafish embryo medium을 조제하여 사용하였으며 pH는 7.0이었고, 130~150개의 배를 300 mL의 embryo medium에서 28.5°C로 온도 보정하여 배발 생시켰다.

3. 실험군별 조건

실험군별 처리를 위한 배의 발달 단계는 2-세포 기(2-cell stage)인 0.75 hpf (hour post fertilized) 경 과 시부터 2시간 간격으로 2일간 Leica Letiz Bio-med 현미경으로 관찰하였다. 발생도중 죽은 배는 제거하였으며 48시간 경과 후 배 발달의 부화기 (hatching period of embryogenesis)인 long-pec stage 에 이른 배를 조사하여 부화율을 측정하였으며 부 화율 측정시의 폭로 조건은 다음과 같다.

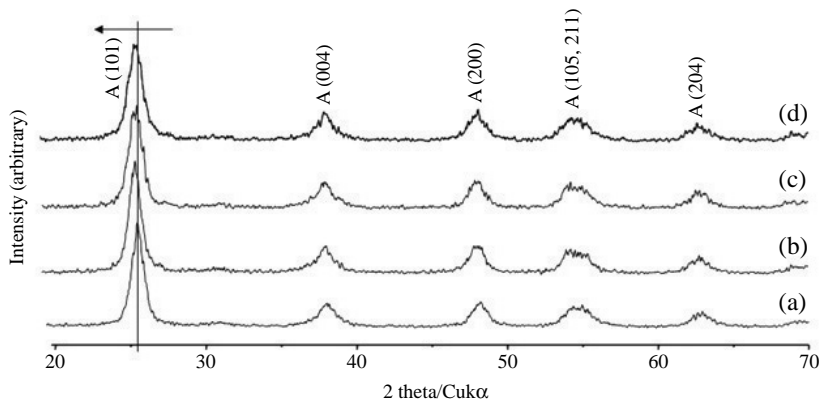
대조군, 수열처리법으로 제조된 TiO₂ 나노입자와

0.1, 0.5 및 1.0 mol% Zn-TiO₂ 나노입자군 및 sol-gel 법으로 제조된 TiO₂ 나노입자 처리군을 실험군으 로 실험 조건을 달리하였다. 이때 노출시킨 농도는 10 ppt와 20 ppt였으며 3회에 걸쳐 반복 시험하였 다.

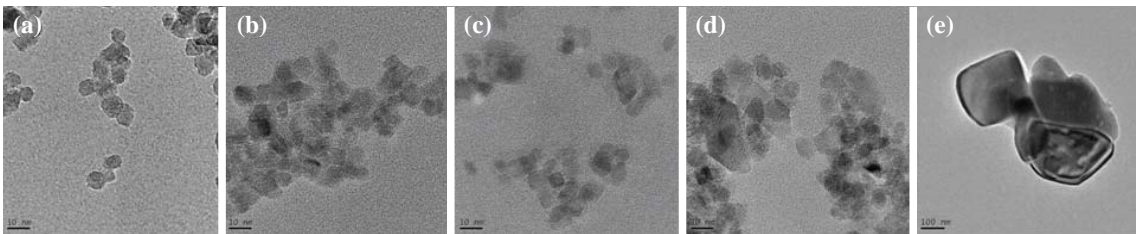
각 배 발생 단계의 관찰간격은 노출 후 4시간 간 격으로 수정 후 52시간이 경과된 시점까지에서 부 화율 및 이상율을 측정하였다. 배 발생 단계의 관 찰을 위한 기준은 Kimmel *et al.* (1995)의 방법에 따랐다.

4. Confocal laser microscopy를 이용한 세포자살 (apoptosis)과 세포괴사 (necrosis)의 확인

시료의 준비와 처리법은 Yoo *et al.* (2006)의 방법 을 바탕으로 일부 변경한 처리법을 사용하였다. 각 군별 치어 50마리를 임의적으로 선택한 후에 pro-teanase K로 처리하여 난막을 제거하였다. 조직의



(A) XRD patterns of TiO₂ and Zn-TiO₂ nanoparticles were prepared using hydrothermal methods.



(B) TEM images of TiO₂ and Zn-TiO₂ nanoparticles

Fig. 1. The XRD patterns and TEM images of TiO₂ and Zn-TiO₂: (A) XRD patterns and (B) HR-TEM images; (a) TiO₂, (b) 0.1 mol% Zn-TiO₂, (c) 0.5 mol% Zn-TiO₂, (d) 1.0 mol% Zn-TiO₂ and (e) TiO (sol-gel method).

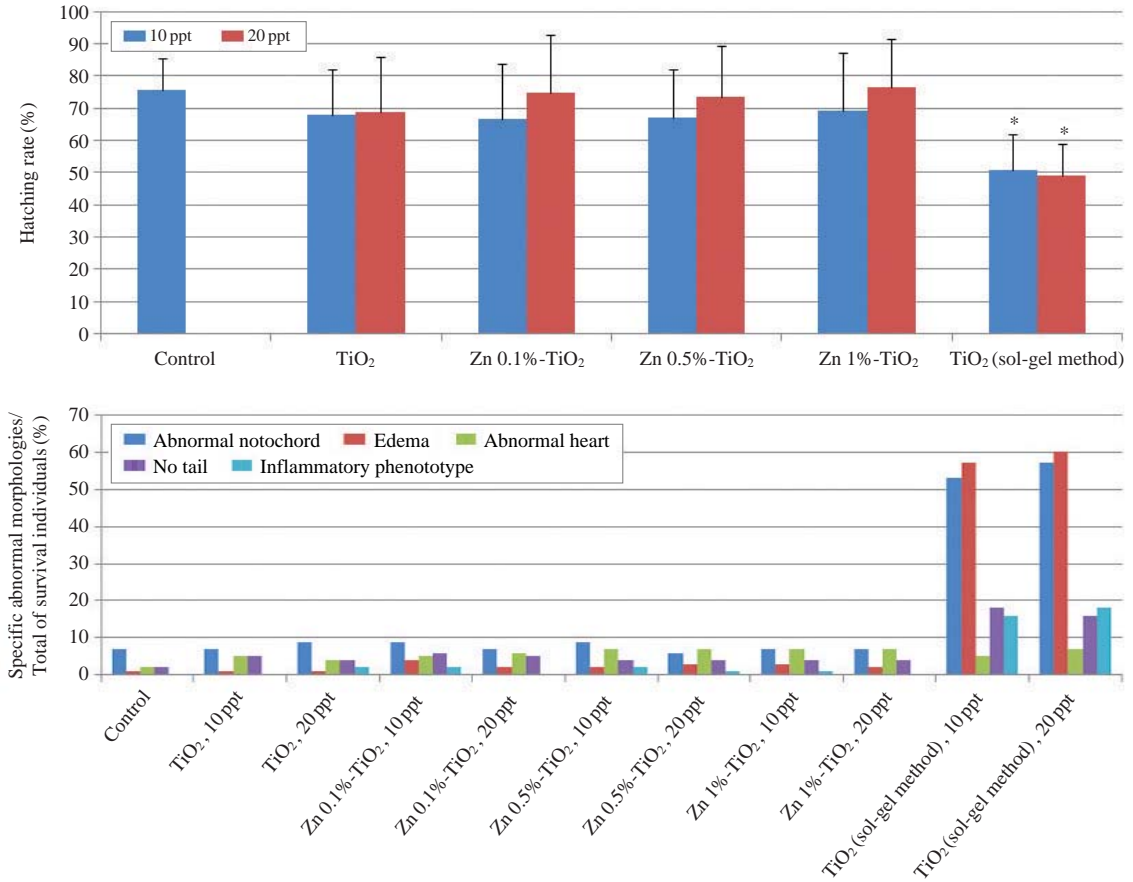


Fig. 2. The effects of nano-scale Zn-TiO₂ and pure TiO₂ particles were prepared using hydrothermal or sol-gel methods on the hatching rate and rates of specific abnormal morphologies among surviving embryos are shown. The properties of abnormal morphologies are abnormal notochord, edema, abnormal heart, no tail, and inflammatory phenotype.

분쇄와 여과과정은 zebrafish용 embryo medium을 이용하였으며 이후 처리과정은 문헌의 방법과 같다(Yoo *et al.*, 2006). 최종 단계의 시료량은 20 μ L로 세포자살의 marker로는 20 μ M YO-PRO-1 (YO-PRO-1 iodide, Molecular Probes Co.)를 사용하였다. 세포괴사(necrosis)의 marker로는 propidium iodide (PI) 염색을 이용하였다. Zebrafish 최종 시료를 2 μ M PI 1 μ L와 1 μ M YO-PRO-1 1 μ L로 처리한 후 암조건 얼음상에서 5분간 유지 보정하였다. 염색된 세포의 형광은 488nm Aragon laser, 543-nm HeNe laser 및 633-nm HeNe laser를 사용하여 confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 510, Zeiss Co.)로 분석하였다.

5. 통계분석

그래프와 통계는 Excel 2007 (Microsoft, USA)를 사용하였다. 각각의 데이터는 각 군당 300개의 배를 이용하였다. 안정된 실험 데이터를 얻기 위해 3번의 실험을 수행하였으며 Student's *t*-test를 이용하여 유의성 검정하였다(*, $P \leq 0.05$).

결과 및 고찰

수열합성법으로 제조된 TiO₂ 나노입자와 0.1, 0.5 및 1.0 mol% Zn-TiO₂ 나노입자의 X-선 회절분석법(X-RD) 분석에서 TiO₂ anatase 결정형인 것으로 확인되었다(Fig. 1A). HR-TEM분석을 통한 나노입

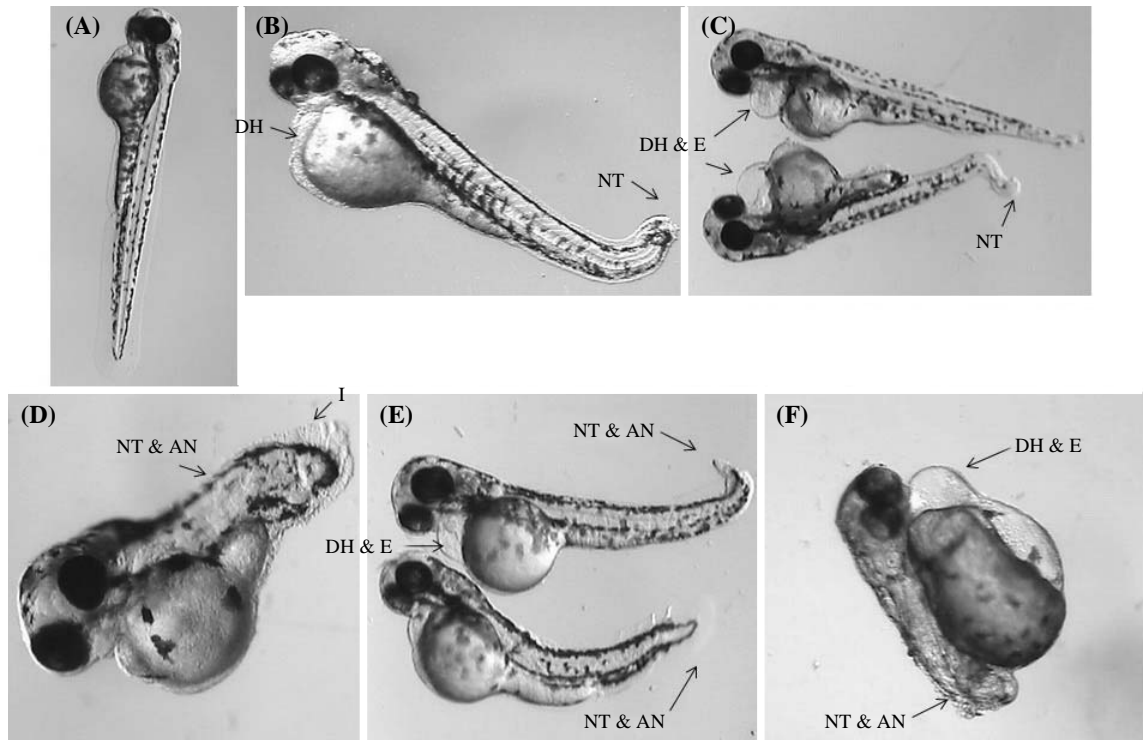


Fig. 3. The effects of nano-scale Zn-TiO₂ and pure TiO₂ particles on the development of zebrafish. (A) Control, (B) TiO₂, (C) Zn-doped TiO₂ (0.1%Zn), (D) Zn-doped TiO₂ (0.5%Zn), (E) Zn-doped TiO₂ (1%Zn), (F) TiO₂ (sol-gel method), B~E: nanoparticles were prepared using hydrothermal methods; F: TiO₂ nanoparticle was prepared using sol-gel methods. Abbreviation: DH, Damaged heart; AN, Abnormal notochord; NT, No tail and Damaged tail; E, edema; I, Inflammatory.

자의 크기는 수열합성법으로 제조된 TiO₂ 나노입자와 0.1, 0.5 및 1.0 mol% Zn-TiO₂ 나노입자의 경우 약 7~8 nm 정도인 반면 sol-gel법에 의해 제조된 TiO₂ 나노입자는 100~200 nm의 상대적으로 입자 크기가 큰 것으로 분석되었다(Fig. 1B). 결정형의 특성은 sol-gel법에 의해 제조된 TiO₂ 나노입자가 사각결정형을 나타낸 반면 수열합성법으로 제조된 나머지 입자들은 등근형의 특성을 나타내는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해 나노입자의 제조법에 따라 입자의 크기에 차이가 있을 것을 확인할 수 있었다. 특히 아연이 포함된 경우에도 입자의 크기는 크게 증가하지 않은 것을 알 수 있었다.

나노입자가 생물에 미치는 영향은 발생과정에 나노입자에 노출된 배의 부화율을 통해 관찰하였다. 수열합성법으로 제조된 TiO₂ 나노입자와 0.1,

0.5 및 1.0 mol% Zn-TiO₂ 나노입자는 10 ppt와 20 ppt 농도에서 폭로된 군 모두에서 대조군의 부화율에 비해 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 그러나 sol-gel법으로 제조된 TiO₂ 나노입자에 폭로된 군의 부화율은 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보여 생물 독성의 영향이 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과는 일반적으로 나노물질의 생물독성이 입자 크기의 감소로 인해 세포내 침투의 영향으로 알려진 것과는 다른 것으로 상대적으로 입자의 크기가 큰 sol-gel법으로 제조된 나노 TiO₂ 입자에서 유의성 있는 부화율 감소가 나타난 것이다(Fig. 2). 이러한 결과는 수열합성제조법의 경우 titanium tetra isopropoxide와 zinc chloride 혼합액을 200°C로 8시간 동안 고압고온처리하여 1차적으로 휘발성 화합물을 처리하고, pH 7.0이 될 때까지 증류수로 반복 세척한다(Sreethawong and Yoshikawa,

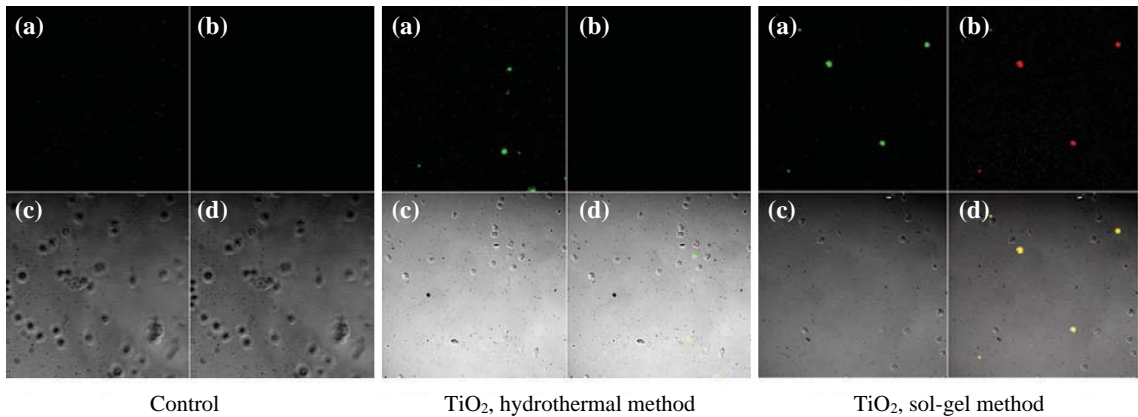


Fig. 4. Confocal microscopic data of Control, TiO_2 (hydrothermal methods), and TiO_2 (sol-gel methods). Markers for necrosis (propidium iodide staining, PI) and apoptosis (YO-PRO-1) used to stain control cells and treated zebrafish cells: (a) YO-PRO-1, (b) PI, (c) Differential Interference Contrast (DIC), (d) Merge.

2005). 이는 sol-gel법 (Ohko *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2003; Yeo and Kang, 2006)의 경우와는 다른 것으로 수열처리법에 의한 나노물질의 제조가 제조과정의 잔여 화합물로 인한 영향을 최소화 할 수 있기 때문인 것으로 추측된다. 최종 부화시점에서 생존한 개체 중 이상율의 확인에서도 sol-gel법에 의해 제조된 상대적으로 큰 사이즈의 나노 TiO_2 에서 이상개체가 다수 나타난 것도 이러한 분석 원인과 같다고 추정된다 (Fig. 2).

그러나 이상개체가 sol-gel법에 의해 제조된 TiO_2 나노입자에 비해 상대적으로 많이 나타나는 않았지만 수열합성법으로 제조된 TiO_2 나노입자와 0.1, 0.5 및 1.0 mol% Zn- TiO_2 나노입자에 폭로된 개체 중 이상개체에서 나타난 비정상 개체의 특징은 심장 이상과 부종의 동반 특성형, 척색의 이상과 꼬리가 짧거나 꼬리가 없는 경우 및 염증형으로 거의 동일한 형태를 보였다 (Fig. 3). 이러한 비정상 개체의 특성은 나노물질에 폭로된 전체 군에서 나타나 대조군의 정상개체와는 다른 것이었다. 은나노물질에 노출된 zebrafish의 배의 경우에도 거의 같은 특성이 나타난 바 있고 (Yeo and Kang, 2008), 구리가 포함된 TiO_2 의 경우에는 특히 심각한 이상형을 보이는 개체가 다수 발견된 보고 (Yeo and Kang, 2009)에서 볼 수 있듯이 본 연구의 결과는 나노물질 노출로 인한 배발생과정에 나타날 수 있는 일반적인 생물체 이상의 결과와 같은 것이다. 그러나 아연의 경우 다른 금속과는 달리 상대적으로

독성이 적은 것으로 알려져 있는데 (Sreethawong and Yoshikawa, 2005; Zou *et al.*, 2008; Yeo and Kang, 2009) 이번 연구에서도 아연이 포함된 나노 TiO_2 입자의 경우 아연의 포함 농도와 상관없이 특징적인 생물독성이 나타나지 않았다.

은나노물질의 유전자 연구에서 세포자살 관련 유전자의 발현에 영향을 나타내는 것으로 보고된 바 있어 나노물질과 세포면역 반응과의 연관성에 대한 관심이 증가하고 있다 (Yeo and Park, 2008; Yeo and Kang, 2009; Yeo and Yoon, 2009). 본 연구에서 서로 다른 제조법에 의해 제조된 TiO_2 나노물질에 폭로된 개체의 세포자살 또는 세포괴사의 징후는 뚜렷하게 나타난 것은 아니었다 (Fig. 4). 그러나 수열합성법에 의해 제조된 나노입자의 경우는 대조군에 비해 세포자살이 나타난 일부 세포가 관찰되는데 반해 세포 괴사가 나타난 세포는 관찰되지 않았다. 이에 반해 sol-gel법에 의해 제조된 TiO_2 나노입자는 세포자살과 세포괴사가 나타난 세포가 관찰되었다. 특히 동일한 세포에서 두 가지 세포손상의 징후가 함께 관찰되어 sol-gel법에 의해 제조된 TiO_2 나노입자가 입자 크기가 100 nm 이상이었지만 증류수 세척과정을 통해 pH를 7.0으로 중화과정을 거친 수열합성법으로 제조된 10 nm 이하의 TiO_2 나노입자에 비해 생물체에 독성이 큰 것으로 나타났다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 나노물질의 생물 위해성 평가에 있어 나노물질의 입자 크기 뿐 아니라 나노물질의 제조과정 중에 나타날 수

있는 잔류물질의 영향에 관한 연구로 확대될 필요성이 있다고 사료된다.

결 론

서로 다른 두 가지 제조법인 sol-gel 법과 수열합성법으로 각각 제조된 나노 TiO₂와 TiO₂의 광촉매 효과를 상승시키기 위해 수열합성법으로 제조된 아연 도핑(doping)된 Zn-TiO₂의 생물영향을 zebrafish (*Danio rerio*, wild-type)의 배발생과정을 통해 시험 평가하였다. 이를 위해 나노물질의 특성을 X-RD법과 HR-TEM 분석을 통해 확인하였다. Zebrafish 배발생과정에 나노물질에 폭로된 배의 부화율과 생존한 개체 중 이상율을 관찰하여 나노물질의 생물 영향 확인하였다. 특히 이상개체에 공통적으로 나타난 이상이 자체면역 방어계에 의한 세포자살에 의한 것인지 여부를 confocal laser microscope를 이용하여 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 수열합성법에 의해 제조된 나노 TiO₂와 나노 Zn-TiO₂는 입자 크기가 10 nm 이하로 작지만, 생물체에 독성은 거의 없었다.
2. 이에 비해 sol-gel법에 의해 제조된 나노 TiO₂는 부화율이 떨어지고, 이상개체가 다수 나타나는 생물독성이 나타났다.
3. 수열합성법에 의해 제조된 나노 TiO₂에 폭로된 zebrafish 배의 경우 세포자살 특성이 일부 나타났지만 다수 관찰된 것은 아니었다. 그러나 sol-gel법에 의해 제조된 나노 TiO₂에 폭로된 경우에는 세포자살과 세포괴사의 징후가 동일한 세포에서 관찰되어 차이를 보였다.

참 고 문 헌

여민경. Bisphenol-A와 nonylphenol이 zebrafish 배발생에 미치는 영향, 한국환경위생학회지 2003; 29(5): 1-9.
 Cross S, Innes B, Roberts M, Tsuzukib T, Robertson C T and McCormick P. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation, Skin Pharmacol Physiol 2007; 20(3): 148-154.
 Gamer A, Leibold E and Ravenzwaay B. The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through

porcine skin, Toxicol in Vitro 2006; 20(3): 301-307.
 Jing D, Zhang Y and Guo L. Study on the synthesis of Ni doped mesoporous TiO₂ and its photocatalytic activity for hydrogen evolution in aqueous methanol solution, Chem Phys Letters 2005; 415: 74-78.
 Kimmel W, Ballard S, Ullman B and Schilling T. Stages of embryonic development in zebrafish, Developmental Dynamics 1995; 203: 253-310.
 Ohko Y, Ando I, Niwa C, Tatsuma T, Yamamura T, Nakashima T, Kubota Y and Fujishima A. Degradation of bisphenol A in water by TiO₂ photocatalyst, Environ Sci Technol 2001; 35(11): 2365-2368.
 Schulz J, Hohenberg H, Pflücker F, Gärtner E, Willa T, Pfeiffer S, Wepf R and Wittern K. Distribution of sunscreens on skin, Adv Drug Deliv Rev 2002; 54(1): 157-163.
 Sreethawong T and Yoshikawa S. Comparative investigation on photocatalytic hydrogen evolution over Cu-, Pd-, and Au-loaded mesoporous TiO₂ photocatalysts, Catal Comm 2005; 6(10): 661-668.
 Watanabe N, Horikoshia S, Kawabe H, Sugiea Y, Zhaob J, and Hidaka H. Photodegradation mechanism for bisphenol A at the TiO₂/H₂O interfaces, Chemosphere 2003; 52(5): 851-859.
 Yeo MK and Kang MS. Photodecomposition of bisphenol A on nanometer-sized TiO₂ thin film and the associated biological toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) during and after photocatalysis, Water research 2006; 40(9): 1906-1914.
 Yeo MK and Kang MS. Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis, Bull Korean Chem Soc 2008; 29(6): 1179-1184.
 Yeo MK and Kang MS. Effects of Cu_xTiO_y nanometer particles on biological toxicity during zebrafish embryogenesis, Korean J Chem Eng 2009; 26(3): 711-718.
 Yeo MK and Park SH. Exposing zebrafish to silver nanoparticles during caudal fin regeneration disrupts caudal fin growth and p53 Signaling, Mol Cell Toxicol 2008; 4(4): 311-317.
 Yeo MK and Yoon JW. Comparison of the effects of nano-silver antibacterial coatings and silver ions on zebrafish embryogenesis, Mol Cell Toxicol 2009; 5(1): 23-31.
 Yoo K, Lee J, Hwangbo J and Chung I. 2β, 3α, 23-trihydroxyxryrus-12-ene-28-oic acid induces the apoptosis of human hepatoma HepG2 cells, Korean Soc Appl Biol Chem 2006; 49(4): 270-275.
 Zou J, Liu C, Yu K, Cheng D, Zhang Y, He F and Cui L. Highly efficient Pt/TiO₂ photocatalyst prepared by plasma-enhanced impregnation method, Chem Phys Letters 2004; 400: 520-523.