

Somite stage에 노출된 은나노 입자가 zebrafish 발생에 미치는 영향

홍석호, 송형귀, 정경준, 고광일, 여민경^{1,*}

한국과학영재학교, ¹경희대학교 환경학 및 환경공학과

Effects of Silver Nanoparticles Exposed in Somite Stage on Zebrafish Development

Suk ho Hong, Hyung Gwi Song, Kyeong-jun Jeong, Kwang Il Ko and Min-Kyeong Yeo^{1,*}

Korea Science Academy, Busan 614-103, Korea

¹*Department of Environmental Science and Engineering, Kyung Hee University,
Yongin, Gyeonggi 449-701, Korea*

ABSTRACT

Nanotechnology, one of the technologies that forms the core of the recent scientific innovation, is used much in our real lives. Especially products that use nano silver are being sold, with its positive characteristics resulting from the antibacterial effects of both nano materials and silver. But critiques have pointed out that nano silver diffused into everyday life too quickly as we do not have done any comprehensive research about the material, and worry that nano silver will affect the ecology adversely. Therefore, this research focuses on investigating the toxicity of silver nanoparticles first. To compare the effects of exposure to silver nanoparticles at pre-somite stage and somite stage (10 hours after fertilization), we exposed zebrafish embryos to silver nanoparticles (15, 30 ppt) during embryogenesis, and then checked the details of catalase enzyme activity. The hatch rate decreased in the silver nanoparticles exposed groups (15 and 30 ppt); furthermore, the hatched fishes had an abnormal notochord, damaged eyes and curved tail. The catalase activities of the 15 ppt exposed group at somite stage increased relative to those in the control group. Therefore, the silver nanoparticles could seriously damage the development of zebrafish embryos. Especially, exposure to silver nanoparticles at somite stage did severer damage than exposure since pre-somite stage did.

Key words : nanoparticles, silver nano, somite stage, zebrafish, development

서 론

은나노 물질은 높은 항균성 특성으로 인해 다양

한 생활용품에 사용된다. 그러나 금속 은이 나노물질화 되면서 생길 수 있는 생물 위해성에 대한 우려도 있다. 주로 나노 입자 크기로 인한 생체 내 침투성과 물질특성 변화에 의해 생길 수 있는 영향이 주된 쟁점이라고 할 수 있다(Park, 2005). 특히 나노 물질의 특성에 따라 투과성이 달라지는 것으로 알려져 있는데, 덴드리머 형태의 나노물질

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-31-201-2413, Fax: +82-31-203-4589
E-mail: bioclass@khu.ac.kr

은 생체막 투과가 용이하기 때문에 약물 및 유전자를 선택적으로 운반 할 수 있는 장점이 있는 반면, 높은 침투성으로 인해 인체 내부에서 이동이 용이하다. 이처럼 이동이 쉽고 반응성이 높은 나노물질은 생체 면역 기능을 변화 시킬 수도 있어 잠재적인 위해성도 더 크다고 할 수 있다. 또한 같은 농도에서 극 미세한 입자들이 생체에 더 큰 손상을 입힐 수 있으며(Asharani *et al.*, 2008), 이러한 미세입자를 사용하는 상업적 나노 물질의 위해성이 보고되기도 하였다(Reijnders, 2006). 특히, 수중 생태계에 나노 입자의 영향에 대한 연구(Moore, 2006)에서처럼 나노 물질은 생태계에 잠재적으로 위해한 영향을 미칠 것으로 의심되고 있다.

금속 나노 입자 중에서도 가장 상업적인 응용도가 높은 물질 중 하나인 은 나노 입자는 다른 금속 나노 입자에 비해서 시험관 실험에서 더 큰 세포 독성을 나타내는 것으로 보고되었고(Asharani *et al.*, 2008), 이전 연구에서 상업적으로 사용되는 은 나노 물질을 zebrafish 발생초기에 노출했을 시에 부화율 이상 및 기형 발생이 나타났으며, catalase 활성도와 Selenoprotein N의 발현에도 영향을 주는 것으로 나타났다(Yeo and Kang, 2008). 그러나 이러한 결과는 어류의 발생과정이 외부 자극에 극히 민감한 시기라는 것을 감안할 때 발생과정의 주기를 나누어 위해성을 검토할 필요가 있다. 특히 어류는 체질의 발생 전과 후는 온도를 포함한 외부 영향에 그 외에도 평가에 다른 결과를 가져올 수 있기 때문에(Hall and Johnston, 2003), 체질이 발생하는 전후의 시점에 대한 비교연구가 필요하다고 하겠다.

아직까지 은나노 물질의 연구에서 수정 후 2~4 시간을 초과하지 않은 시기에만 노출 시험이 이루어졌을 뿐, 체질이 생성되기 전과 수정 후 10시간이 경과된 후인 체질 형성이 이루어지는 시기의 비교연구는 이루어 지지 않았다. Somite stage 전후의 은나노 물질 노출 시험은 위해성 평가의 표준 시기를 결정하는데 필요한 시험이라고 할 수 있다.

은나노 물질은 금속 은을 나노 사이즈화한 것으로 금속 성분으로 인해 생체 내 지질의 과산화 촉진된다는 보고가 있다(Stoys and Bagchi, 1995). 과산화 지질은 산화적 스트레스의 척도 물질로 이를 제거하는 catalase의 활성도에 영향을 줄 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 somite stage에서 zebrafish (*Danio rerio*, Wild type)의 수정란에 은나노 물질(15 ppt, 30 ppt)을 노출하여 배발생이 시작된 시점에 은나노 물질에 노출된 군과 비교 연구하였다. 또한 금속은이 나노화 되면서 반응효율이 상승하고 이로 인해 금속 은으로 인한 산화적 스트레스의 영향이 증대하여 생체에 영향을 주는지를 알아보고자 하였다. 이를 위해 catalase 활성이 체질 형성 이후 은나노 물질 노출로 인한 영향이 있는지 비교 연구 하였다.

재료 및 방법

1. 은나노 물질

본 연구에 사용된 은나노 물질은 주로 코팅용으로 사용되는 N사(한국)의 상업용 은나노 물질로 최초의 농도는 은나노 물질을 증류수로 희석한 500 ppm 농도였다. 이를 HRTEM (High Resolution Transmission electron Microscope, JEOL, Japan)으로 300 kV의 조건에서 분석 한 결과 10~20 nm 크기의 나노 크기 입자인 것으로 확인하였다(Fig. 1). 또한 X-RD(X-ray diffractometer, Cu Target, 40.0kV, 30.0 mA, Shimadzu, Japan)를 사용하여 성분 분석하여 그 주된 성분이 은성분인 것을 확인하였다(Fig. 2). 은나노 물질이 이온성분인지를 확인하기 위한 방법은 이전 연구와 같은 방법으로(Yeo and

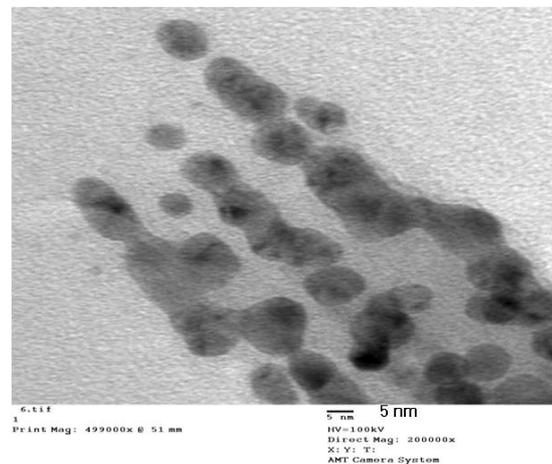


Fig. 1. TEM analysis of silver nanoparticles.

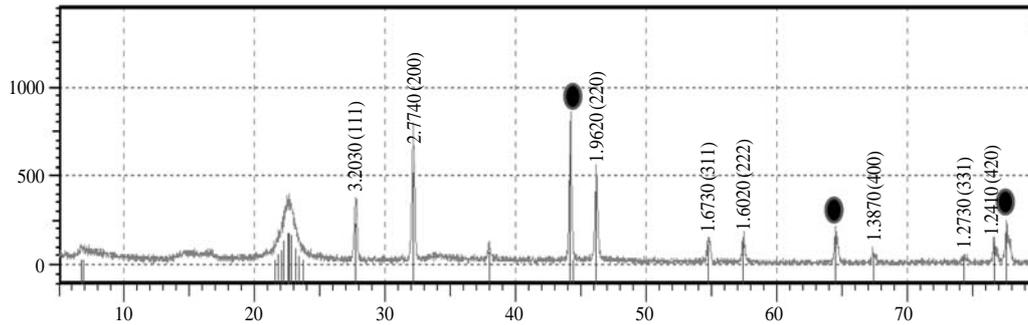


Fig. 2. X-RD pattern of silver nanoparticles.

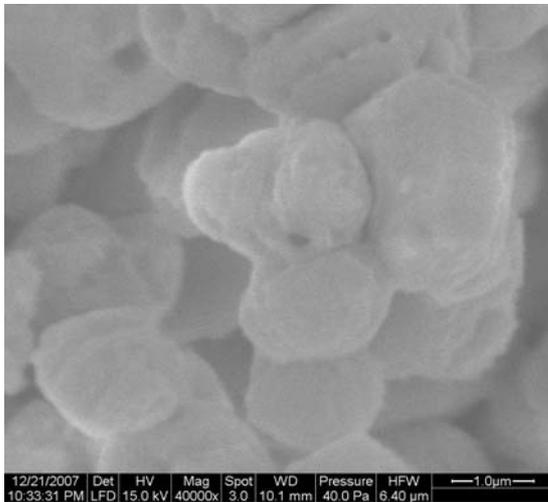


Fig. 3. SEM analysis of AgCl sediment.

Kang, 2008) AgCl이 형성되어 침전물이 생기는 방법으로 은이온이 포함되었음을 확인하였다(Fig. 3). 이를 시험 동물에 노출하기 위해 15, 30 ppt의 농도로 증류수로 희석하여 사용하였다.

2. 시험동물 및 노출조건

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(Yeo and Kang, 2008). 60 L의 유리 수조에 탄소여과장치를 거친 물의 환경에서 사육하였으며, 수온은 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였고 광주기는 14시간으

로 하였다.

Zebrafish의 알의 채취는 채취 전날 특수망을 설치한 알 채취용 수조에 암컷과 수컷 성어를 1:2로 비율로 넣고 다음날 광주기 시작 1~2시간 경과 후 알을 채취하였다. 채취 후에 20.5°C 의 환경으로 배발생을 지연시킨 후 Westerfield(1995)의 방법에 따라 제조한 zebrafish용 embryo medium으로 수회 세척하였다. 배 발생을 위한 물 환경은 zebrafish embryo medium을 조제하여 사용하였으며 pH는 7.0이었고, 각 군당 300개의 배를 300 mL의 embryo medium에서 28.5°C 로 온도 보정하여 배 발생시켰다.

각 배는 대조군과 시험군으로 나누었으며, 시험군의 은나노 물질의 노출은 배발생 초기 단계로 이를 1) 체절 발생이 이루어지기 전(pre-somite)과 2) 체절 발생이 이루어진 시기인 somite stage(수정 후 10시간 이후)로 나누어 각기 노출 시점을 정하였다. 각 노출 시점에서 15, 30 ppt의 두 가지 농도로 은나노 물질을 노출하였다.

각 배 발생 단계의 관찰간격은 노출 후 2시간 간격으로 수정 후 50시간이 경과된 시점까지로 하였다. 배 발생 단계의 관찰을 위한 기준은 Kimmel 등(1995)의 방법에 따랐다.

3. Catalase의 활성도 측정

Catalase의 활성도측정은 Goth(1991)의 방법에 따랐다. 각 군별로 수정 후 52시간이 경과된 치어를 phosphate buffer (0.1 M, pH 7.3)와 함께 균질화시킨 후 4°C 에서 9,000 g로 5분간 원심분리하여 상층액을 효소원으로 사용하였다. 각 시료의 효소원

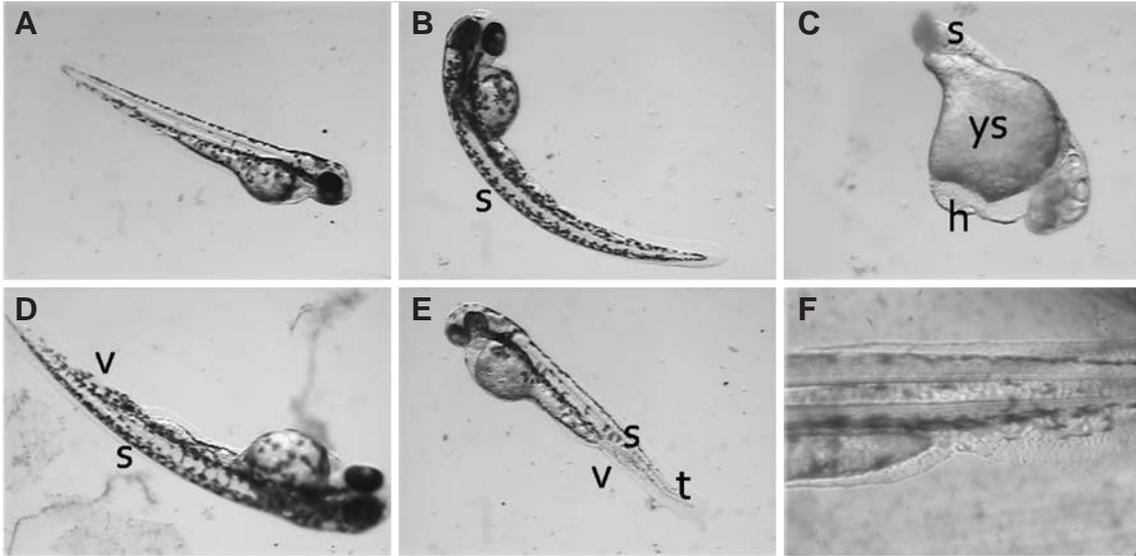


Fig. 4. The effects of nanometer sized silver on the development of zebrafish. A : Control, B : exposed at pre-somite stage, silver-nanoparticles 15ppt, C : exposed at somite stage, silver-nanoparticles 15 ppt, D : exposed at pre-somite stage, silver-nanoparticles 30ppt, E : exposed at somite stage, silver-nanoparticles 30 ppt, F : abnormal blood vessel (ys : yolk sac, t : tail, h : heart, s : somite, v : vessel).

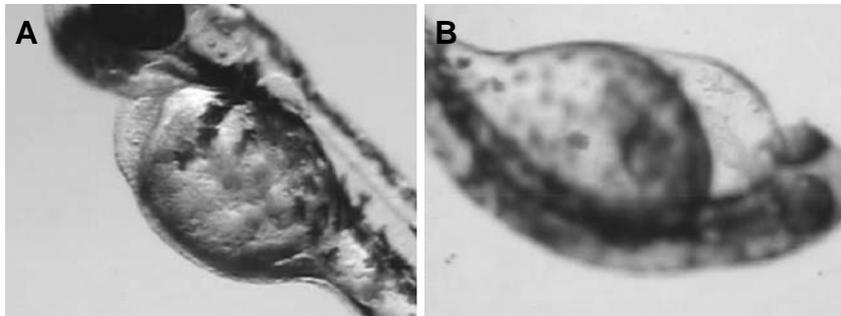


Fig. 5. The morphology of heart in (A) control (B) silver nanoparticles exposed group.

은 H_2O_2 기질과 $37^\circ C$ 에서 1분간 반응시켰다. 이를 32.4 mmol/L의 ammonium molybdate를 첨가하여 반응을 정지시킨 후에 UV-Vis분광광도계 (UV-1601PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 405 nm에서 catalase의 활성도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Pre-somite stage와 somite stage에서 은나노 물질

30 ppt에 노출된 경우 모두 척추가 휘고, 척추와 꼬리로 이어지는 혈관에 굴곡이 생기는 현상이 관찰되었다(Fig. 4). 특히 체절이 형성된 후인 somite stage에 은나노 물질에 노출되어 발생된 치어는 pre-somite stage부터 은나노 물질에 노출된 경우보다 꼬리의 분화에 특징적인 이상이 나타났다.

Somite stage에서 15 ppt농도의 은나노 물질에 노출된 상태에서 부화한 치어의 경우 꼬리가 접히고, 색소가 형성되지 않았으며, 심장이 확장되는 등 심각한 이상이 나타나는 것으로 관찰되었다. 같은 농

도에서 pre-somite stage 시기에 노출된 치어는 혈관형성의 이상과 척수 이상은 있었지만 색소 생성이나, 꼬리 분화는 정상적으로 진행되었다(Fig. 4-c). 특히 은나노 물질에 노출된 각 군에서 심장이 다른 치어에 비해 비대해진 치어가 관찰되었는데(Fig. 5), 혈관 막이 손상되는 특성을 함께 나타내었다. 혈관 막의 손상으로 보아 혈액순환이 잘 되지 않아 심장이 과다하게 박동되면서 심장 근육이 커진 것으로 추측된다. 이는 은나노 물질이 염증 관련 유전자의 발현에 영향을 준다는 보고(Yeo and Pak, 2008)로 보아 은나노 물질이 혈관막의 염증을 유발하여 생긴 현상과 관련이 있는 것으로 생각된다. 또한 대부분 척추의 이상과 부종도 함께 나타나는 경향이 관찰되었다. 은나노 입자에 노출시켰을 때 발생중인 치어의 뇌에 나노입자가 축적되었다는 보고(Asharani *et al.*, 2008)로 보아 은나노 입자가 뇌-혈관 장벽을 넘어 생체내로 침투하여 중추신경계의 기능에 영향을 줄 수 있을 것으로 추측된다. 그러나 아직까지 관련 중추신경계인 척추 이상과 은나노 입자와의 관련성을 직접적으로 입증할 수 있는 연구는 없다. 치어에서 나타난 부종의 경우는 나노 입자의 노출로 인해 혈류가 몸의 특정 부분에 쌓일 경우 부종을 초래할 수 있다

는 연구결과와 유사한 것으로 보인다.

부화율의 측정은 수정 후 약 52시간 경과 후, 모든 군에 대해서 부화한 치어를 대상으로 부화율과 이상율을 측정하였다(Table 1). 은나노 노출된 실험군의 부화율은 25.6~43.6%로 대조군보다 낮은 부화율을 나타냈다. 또한 30 ppt 은나노 노출군의 부화율이 15 ppt 은나노 노출군보다 낮고, 이상율은 높았다. 특히, 체절이 발생된 후인 somite stage에서 은나노에 노출된 경우에도 15, 30 ppt 두 농도에서 대조군에 비해 낮은 부화율은 보였다. 이는 체절이 생기고 나서 은나노 물질에 노출 되었지만, 은나노가 난막에 영향을 주기 때문인 것으로 사료된다. 이 두 군에서는 발생이 완료되지 않은 상태에서 난막이 탈리되고 부화한 치어가 많이 나타났다. 이를 통해 은나노가 난막에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. Somite stage에 은나노 물질에 노출된 30 ppt-2군의 이상율이 15 ppt-2군보다 낮은 이유는 생존한 치어의 마리수에 대한 이상율의 산출 결과 때문이다. 즉, 치어가 되기 전에 대부분 사멸하는 경향을 보였다. Pre-somite stage 노출군과 somite stage 노출군을 비교해 보면, 15 ppt농도에서는 체절 형성 후의 은나노 노출이 난막에 대한 위해영향이 큰 것으로 나타났다. 즉, 체절 형성 후 노출군에서 부화율은 낮고 이상율은 높은 것으로 나타났다. 기형 발생율을 보면 대부분의 이상은 척추 이상율이 가장 높았으며, 부종, 색소 이상, 심장박동이상 순으로 나타났다(Table 2).

Catalase 효소활성도 측정은 Fig. 6과 같다. 효소 활성도 측정 결과, 실험군의 경우, 체절 발생 후 15 ppt 노출군이 가장 효소 활성도가 높았고, 30 ppt 노

Table 1. The effects of nanometer sized silver on the hatching rate

	Hatched rate (%)				
Control	15 ppt	15 ppt-2	30 ppt	30 ppt-2	
154/250	109/250	85/250	64/250	92/250	
61.6	43.6	34.0	25.6	36.8	

Table 2. The effects of nanometer sized silver on the abnormal rate

Abnormal rate (%)	Control	15 ppt	15 ppt-2	30 ppt	30 ppt-2
Total abnormal (%)	21/154 13.6	18/109 16.5	20/85 23.5	15/64 23.4	16/92 17.4
Abnormal somite (%)	21/154 13.6	12/109 11.0	14/85 16.5	9/64 14.1	11/92 12.0
Edema (%)	1/154 0.6	11/109 10.1	7/85 8.2	5/64 7.8	6/92 6.5
Abnormal heart (%)	0/154 0.0	1/109 0.9	1/85 1.2	1/64 1.6	1/92 1.1
Abnormal pigment (%)	0/154 0.0	0/109 0.0	2/85 2.4	2/64 3.1	2/92 2.2

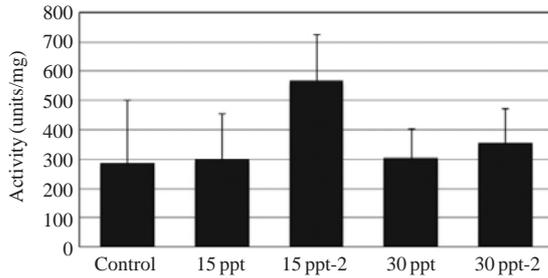


Fig. 6. The effects of nanometer sized silver on catalase activity. There wasn't significant difference between control and nanometer sized silver exposed groups. The frequency of each group was 30.

출근들은 오히려 이 군보다 효소활성도가 낮았다. 그러나 대조군에 비해 통계적 유의성은 없었다. 체절 발생 후 15 ppt에 노출되었을 때 효소활성도가 높은 것은, 체절 발생 직후의 시기가 항산화 체계가 잘 갖춰진 후여서 초기부터 15 ppt에 노출시킨 군보다 항산화 체계의 활동이 강했을 가능성이 있다. 또한, 30 ppt 노출군의 효소활성도가 낮은 것은 독성 자체가 더 낮기보다는, 독성의 정도가 zebrafish의 항산화 방어 체계가 수용하지 못할 정도로 강하기 때문에 항산화 체계가 제대로 발현되지 못하였기 때문이라 사료된다. 이는 은 나노물질이 나노사이즈 뿐만 아니라 금속 성분이며, 금속이 일으키는 이러한 화학 반응들의 생성물로서 초과산화이온, 과산화수소, 하이드록실 라디칼과 같은 반응성이 높은 물질들이 만들어지며, 이러한 물질들이 지질의 과산화를 초래한다는 보고(Stohs and Bagchi, 1995; Atli *et al.*, 2006)와 같이 은나노 입자도 같은 영향인 것으로 생각된다. 또한 은 이온이 생성되게 한 다음 2차적으로 과산화 라디칼을 생성해 내고, 이들이 산화-환원반응을 함과 동시에, 은나노 입자가 세포막을 파괴하는 효과가 중첩되어 세포 독성 작용을 하게 된다는 연구(Hwang *et al.*, 2008)와도 같은 결론이라고 할 수 있다.

결 론

본 연구에서는 은나노 입자가 체절이 생성되기 전과 후에 생물체에 노출되었을 때에 나타나는 영향을 알아보았다. 먼저 TEM과 X-RD 분석을 통해

은나노 입자의 물질 특성을 확인하였다. 또한 은나노의 농도와 노출 시기에 따른 독성을 zebrafish를 대상으로 관찰하였고, 실험 결과를 통해 은나노 입자의 농도에 비례하여 발생 과정에 독성을 가지며 시기에 따른 은나노 노출은 zebrafish의 난막에 영향을 주어 발생을 중단시킴을 확인할 수 있었다. 시기에 따른 은나노 노출에서 농도가 높아지면 난막의 파괴 보다는 은나노 자체에 의한 독성의 영향이 커지는 것을 관찰할 수 있다. 특히 척색이 형성된 이후인 somite stage에 노출된 은나노 입자의 영향은 pre-somite stage에 노출된 군보다 위해성이 큰 것으로 나타났다. 은나노 입자의 노출에 따른 이상 증상에는 척추이상으로 인한 혈액순환의 문제로 혈관과 심장에도 영향을 주는 것을 확인할 수 있다. 또한 은나노의 농도가 높아 독성이 강해지면 항산화 체계가 제대로 발현되지 못하여 카탈라아제의 활성도가 오히려 낮아지는 결과를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 한국과학영재학교 R&E 프로그램의 지원에 의해 이루어졌습니다.

참 고 문 헌

- Asharani PV, Wu YL, Gong Z and Valiyaveetil S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models, *Nanotechnology* 2008; 19(25): 255102.
- Atli G, Alptekin Ö, Tükel S and Canli M. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*, *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 2006; 143: 218-224.
- Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clin Chim Acta* 1991; 196: 143-152.
- Hall TE and Johnston IA. Temperature and developmental plasticity during embryogenesis in the Atlantic cod *Gadus morhua*, *L Mar Biol* 2003; 142: 833-840.
- Hwang ET, Lee JH, Chae YJ, Kim YS, Kim BC, Sang BI and Gu MB. Analysis of the Toxic Mode of Action of Silver Nanoparticles Using Stress-Specific Bioluminescent

- Bacteria, *Small* 2008; 4(6): 746-750.
- Kimme W, Ballard S, Ullman BK and Schilling T. Stages of embryonic development in zebrafish, *Developmental Dynamics* 1995; 203: 253-310.
- Moore MN. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?, *Environment International* 2006; 32: 967-976.
- Park K. Toxicity of nanomaterials and strategy of risk assessment, *J Environ Toxicol* 2005; 20(4): 259-271.
- Reijnders L. Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles, *Journal of Cleaner Production* 2006; 14: 124-133.
- Stohs SJ and Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radical Biology & Medicine* 1995; 18(2): 321-336.
- Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish*, University of Oregon Press, Eugene, Oregon. 1995.
- Yeo MK and Kang M. Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis, *Bull Korean Chem Soc* 2008; 29(6): 1179-1184.
- Yeo MK and Pak SW. Exposing zebrafish to silver nanoparticles during caudal fin regeneration disrupts caudal fin growth and p53 signaling, *Mol & Cell Toxicol* 2008; 4(4): 311-317.