

세포독성 평가를 통한 γ -Fe₂O₃ 나노입자의 생체안정성 및 약물전달효율

이권재 · 안정희*[†] · 신재수** · 김동희*** · 유화승**** · 조종관*****

승실대학교 물리학과, *서강대학교 화공생명공학과,
대전대학교 신소재공학과, *대전대학교 한의학과, ****대전대학교 한의학과 동서암센터

Biostability and Drug Delivery Efficiency of γ -Fe₂O₃ Nano-particles by Cytotoxicity Evaluation

Kwon-Jai Lee, Jeung-Hee An*[†], Jae-Soo Shin**, Dong-Hee Kim***,
Hwa-seung Yoo**** and Chong-kwan Cho*****

Department of Physics, Soongsil University, Seoul 156-743, Korea

*Department of Chemical & Biomolecular Engineering, Sogang University, Seoul, 123-742, Korea

**Department of Advanced Materials Engineering, Daejeon University, Daejeon 300-71, Korea

***Department of Pathology Lab, Collage of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

****East-West Cancer Center, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

(2010년 2월 2일 접수 : 2010년 3월 3일 최종수정 : 2010년 3월 3일 채택)

Abstract This study examined the biostability and drug delivery efficiency of γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles (GMNs) by cytotoxicity tests using various tumor cell lines and normal cell lines. The GMNs, approximately 20 nm in diameter, were prepared using a chemical coprecipitation technique, and coated with two surfactants to obtain a water-based product. The particle size of the GMNs loaded on hangamdan drugs (HGMNs) measured 20-50 nm in diameter. The characteristics of the particles were examined by X-ray diffraction (XRD), field emission scanning electron microscopy (FE-TEM) and Raman spectrometer. The Raman spectrum of the GMNs showed three broad bands at 274, 612 and 771 cm⁻¹. A 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay showed that the GMNs were non-toxic against human brain cancer cells (SH-SY5Y, T98), human cervical cancer cells (Hela, Siha), human liver cancer cells (HepG2), breast cancer cells (MCF-7), colon cancer cells (CaCO2), human neural stem cells (F3), adult mescenchymal stem cells (B10), human kidney stem cells (HEK293 cell), human prostate cancer (Du 145, PC3) and normal human fibroblasts (HS 68) tested. However, HGMNs were cytotoxic at 69.99% against the DU145 prostate cancer cell, and at 34.37% in the Hela cell. These results indicate that the GMNs were biostable and the HGMNs served as effective drug delivery vehicles.

Key words γ -Fe₂O₃, magnetic nanoparticles, tumor cells, cytotoxicity, drug delivery.

1. 서 론

나노 기술은 마이크로입자에서는 얻기 어려운 고유의 광학적, 전기적, 화학적, 기계적 한계를 극복할 수 있는 새로운 기술이라고 널리 알려져 있다.¹⁾ 최근 나노기술은 세포독성,²⁾ 환경,³⁾ 약물 전달,⁴⁾ biosensors,⁵⁾ 자기 공명영상,⁶⁾ catalyst supporters⁷⁾ 등 생물의학 분야와 생물의 식별 및 분리를 위한 자성운송체,⁸⁾ 효소 및 단백질고정,⁹⁾ 생물 의학적 응용분야에서 많은 관심을 모으며 연구되

고 있다.

특히 자성 나노입자는 수백 나노미터 크기의 약물전달체로서 상당히 큰 가능성을 가지고 있다. 자성 나노입자는 약물을 운반함과 동시에 혈액 내에서 자성에 따라 암세포가 있는 해당 장기에 도착하게 되고 세포에 도착하면 가지고 있던 약물이 퍼지면서 치료 작용을 하게 되는 기전이 보고되고 있다.²⁾ 이러한 약물학적 효과 이외에도 나노입자의 물리적인 효과도 기대해 볼 수 있다. 즉, 전자기장이 형성되면서 나노입자들이 암 조직 위에 쌓이게 되면 암 조직을 물리적으로 파괴시킬 수 있을 것이라고 기대하고 있다.⁴⁾ 자성 나노입자는 이러한 두 가지 기대 효과로 인하여 건강한 세포에 영향을 주지 않

[†]Corresponding author
E-Mail : anjhee@hanmail.net (J. -H. An)

고도 암을 치료할 수 있다는 것이 장점으로 보고되고 있다. Kuckelhaus 등은 코발트 기반의 자성유체를 이용하여 어떤 조직 손상이나 염증 세포 침윤이 관찰되지 않았음을 보고하였고,¹⁰⁾ Macaroff 등은 약물과 단백질 사이에 발생하는 상호 작용을 확인하기 위해 BMFs (biocompatible magnetic fluids)의 독성 실험을 수행하였다.¹¹⁾ 박 등은 hematoporphyrin을 코팅한 자성유체가 체온이 변화함에도 어떤 상의 변화도 보이지 않고 안정했음을 보고 하였다.¹²⁾ Johannse 등은 자성유체 고열치료(magnetic fluid hyperthermia : MFH)를 이용하여 70°C 이상의 온도에서 orthotopic Dunning R3327 생쥐 모델에서 전립선암의 성장을 감소시켰음을 발표하였다.¹³⁾ 자성 나노 물질은 그 제조 방법이 환원에 의한 방법, 공침에 의한 방법, 졸-겔방법, 수열합성, 분무열 분해법 등 수 없이 다양하다. 예를 들면 자성 나노 입자를 제조하는 데는 FeCl₂·4H₂O, FeCl₃·6H₂O, Fe(NO₃)₃·9H₂O, FeSO₄·7H₂O, Fe₂(SO₄)₃·xH₂O 등의 수 많은 원료가 사용될 수 있다.⁶⁾ 이를 조합하여 제조하는 방법만 7가지 종류가 있으며 공침제를 변화시키면 14가지 이상의 제조 유형이 존재하게 된다.⁷⁾ 그러나 아직 다양한 자성 나노입자의 제조 방법에 따른 화학적 조성의 차이와 나노입자의 크기에 대한 독성연구는 매우 제한적이다. 또한 세포를 다루는 연구그룹이 연구에 필요한 나노입자에 약물을 정량적으로 코팅할 수 있는 환경이 구축되어 있지 못하고 상용되는 세포에 대한 다양성도 결여되어 있어 연구에 제약이 많다.

본 연구는 종양 세포를 이용하여 자성 나노입자 (GMNs)의 생체안정성 대한 연구와 GMNs에 특정약물을 코팅하여 약물을 암세포에 전달하게 함으로써 GMNs의 약물전달 능력을 확인하는데 있다. GMNs의 세포 안정성을 실험하기 위해 종양 세포 DU145, PC3, LN3, C6, Siha, T98와 정상적인 인간의 fibroblast 세포에 대해 실험하였다. 약물전달 능력을 실험하기 위해 미국국립암센터(NCI)에서 그 효과가 확인된 한약 “항암단”¹⁴⁾을 γ -Fe₂O₃ 나노입자에 코팅한 후 DU145 전립선암 세포에 투입하여 세포사멸 여부를 관찰하였다.

2. 실험 방법

2.1 자성 나노 입자 제조 방법 및 약물 코팅

GMNs는 NH₄OH를 공침제로 하여 FeCl₂·4H₂O (Junsei, extra pure)와 FeCl₃·6H₂O (Junsei, extra pure)를 Fe²⁺/Fe³⁺의 비율이 1:1이 되도록 제조하였다. 용액은 30분 동안 잘 교반 한 후 80°C에서 pH가 7까지 도달 할 때까지 NH₄OH를 넣어 주며 격렬하게 교반하였다. 이때 나노입자끼리의 뭉침현상을 방지하기 위하여 올레인산을 첨가

하였다. NH₄OH를 넣은 후 2 시간동안 교반하여 갈색의 나노입자를 얻었다. 용액에 남아있는 전해질은 아세트과 메탄올을 1:1의 비율로 혼합하여 세척한 후 증류수로 반복 세척하여 제거하였다. 에틸렌 글리콜을 계면 활성제로 사용하여 항암단을 γ -Fe₂O₃ 자성 나노입자 (HGMNs)에 코팅하였다.

자성 나노입자 5 g을 증류수 50 ml에 넣은 후 10 분 동안 교반 한 후 항암단 2.34 g과 10 ml의 에틸렌 글리콜 (11.0472 g)을 넣고 84°C에서 1 시간동안 교반하여 HGMNs를 제조하였다. 제조된 HGMNs는 자석 침강법을 사용하여 분리 세척하였다. 만들어진 시료의 물리적 특성은 X-선 회절 (XRD, Rigaku, D/mAX-200) 및 전계방사주사 전자 현미경 (FE - SEM, Hitachi)을 사용하여 측정하였다.

2.2 세포배양 및 세포독성

실험에 사용된 종양세포는 한국 세포주 은행에서 분양 받았다. 인간 전립선암 세포주 (PC3, DU145)는 10% fetal bovine serum (FBS), penicilline (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml) 등을 함유한 RPMI-1640M 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 CO₂ 배양기로 배양하였고, 인간 뇌종양 세포(SH-SY5Y cell, T98 cell), 인간 자궁 경부암 세포 (Hela, Siha), 인간 간암 세포 (HepG2), 유방암 세포 (MCF-7), 대장암 세포 (CaCO2), 인간 신경 줄기 세포 (F3)와 성체 줄기 세포 (B10, 중앙대, 김승업 교수 기증), 정상적인 인간 섬유아 세포 (HS 68 세포)는 10% FBS와 1% 항생제가 함유된 Dulbecco의 minimum essential medium에서 배양하였다. 종양 세포와 정상 세포들 모두 3일마다 배양액을 교환해주었으며 trypsin-EDTA를 이용하여 계대 배양을 하였고 배양실험에 사용한 혈청과 배지는 Gibco사 제품을 구입하여 사용하였다.

세포 생존율 측정법은 GMNs와 HGMNs입자의 농도 의존적 세포생육의 저해효과는 3-(4, 5 - dimethylthiazol-2 - YL)-2, 5 - diphenyltetrazolium bromide (MTT) 방법을 통해 분석하였다.¹⁵⁾ 종양 세포를 1 × 10⁴ cells/ml의 농도가 되도록 조절한 후 96 well microplate에 180 μl/well씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 24 시간 배양하여 세포를 부착시킨 각기 다른 농도로 제조된 시료를 10 μl씩 첨가하였다. 이와 같이 시료가 첨가된 well plate를 24 시간 동안 배양시킨 후, MTT 용액을 각 well 당 10 μl씩 넣고 세포 배양기에서 4 시간 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하고 DMSO 180 μl를 첨가하여 각 세포를 용해시켜 microplate reader (Bio-Rad, USA를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포의 시료 무첨가군의 생존율을 100%로 하여 첨가된 시료의 상대적인 세포생존율을 측정 하였다.

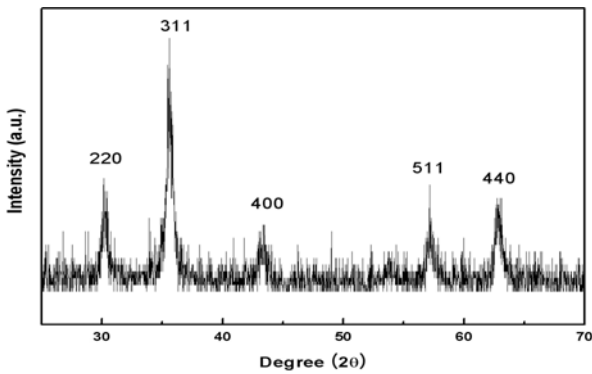


Fig. 1. XRD pattern of the γ -Fe₂O₃ nanoparticles prepared at a Fe²⁺/Fe³⁺ ratio of 1:1.

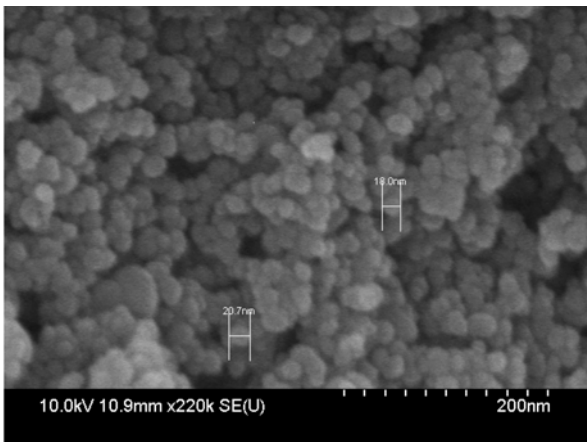


Fig. 2. FE-SEM image of the γ -Fe₂O₃ nanoparticles.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 Fe²⁺/Fe³⁺의 비가 1:1인 나노입자의 XRD 결과이다. 모든 피크는 1997년 JCPDS에 보고된 입방 γ -Fe₂O₃ 상의 회절 데이터와 일치하였다. 나노입자 크기는 20 nm로 Debye-Scherrer 방정식을 이용하여 구하였다. FE-SEM을 사용하여 합성된 나노입자의 크기, 모양을 측정하였다. Fig. 2는 GMNs를 FE-SEM으로 측정된 그림이다. 나노입자가 구형이고 그 평균 크기가 20 nm로 XRD를 이용하여 구한 크기와 잘 일치함을 보여준다.

Fig. 3은 Fe²⁺/Fe³⁺의 비가 1:1인 나노입자를 액체상 상태에서 측정한 Raman 분광 분석 결과이다. 일반적으로 γ -Fe₂O₃는 역 스피넬 구조이며 350, 500와 700 cm⁻¹에서 Raman 신호가 나타난다고 알려져 있다¹⁶⁾. 그런데 Fig. 3에서는 274, 612과 771 cm⁻¹로 Raman 신호가 이동되어 있음을 볼 수 있다. 이러한 현상에 대하여 Morais 등은 자성유체가 코팅되지 않았을때 3250 cm⁻¹의 Raman 신호가 코팅 후에 3700 cm⁻¹로 이동하며 둔덕(shoulder)이 나타난다고 보고하였다.¹⁷⁾ 이와 같이 Fig. 3에서 보

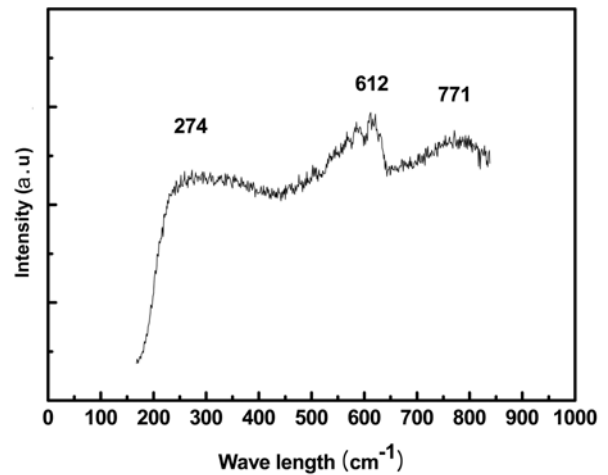


Fig. 3. Raman spectrum of γ -Fe₂O₃ nanoparticles (band was shifted by affect of ethylene glycol).

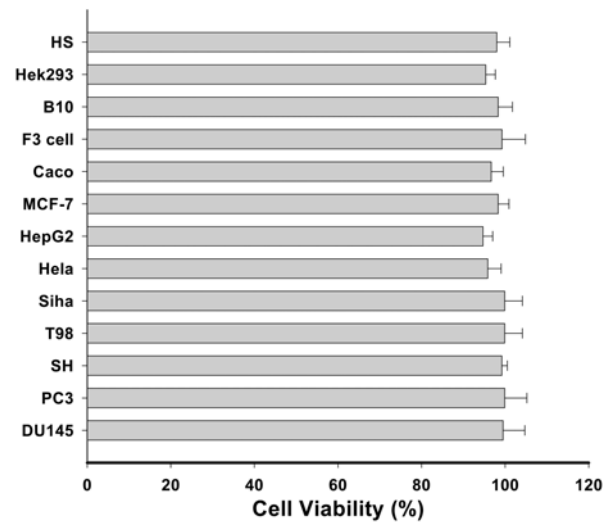


Fig. 4. The cytotoxic effects of magnetic fluids against the tumor cell lines (Caco, MCF-7, HepG2, Hela, Shha, T98, SH, PC3 and DU145) and normal cell (HS 68, HEK 293, B10 and F3 cell).

여지는 Raman 신호의 이동은 표면에 올레인산으로 코팅된 것에 기인한 것이라 해석된다.

Fig. 4는 GMNs의 농도를 100 ug/ml의 농도에 대한 종양 세포 생존을 실험 결과로서 인간 전립선 암 세포주 (PC3, DU145), 인간 뇌종양 세포 (SH-SY5Y cell, T98 cell), 인간 자궁 경부암 세포 (Hela, Siha), 인간 간암 세포 (HepG2), 유방암 세포 (MCF-7), 대장암 세포 (CaCO2) 등에서 세포 독성이 보이지 않았다. 또한 정상 세포주인 인간 신경 줄기 세포 (F3)와 성체 줄기 세포 (B10), 인간 섬유아 세포 (HS 68 세포)에서도 세포 독성은 나타나지 않았다. 줄기 세포에서 자성 나노입자의 생체 생존율이 안정된다는 것은 본 연구에서 처음 발표되는 것으로서, 이 결과로 줄기 세포에서 형질 전환 시 자성 나노입자의 활용이 기대되며 γ -Fe₂O₃는 생체 안정성이 있

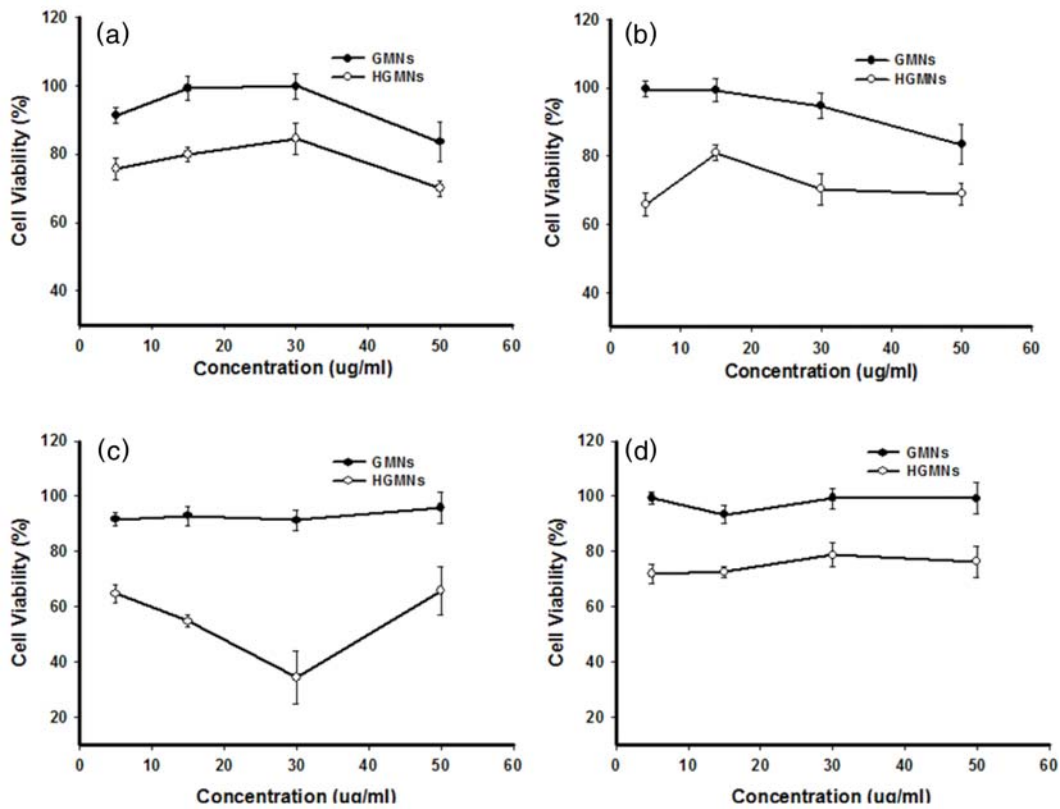


Fig. 5. Cell viabilities after addition of magnetic nano particles (GMNs) and HGMNs. (a) DU145, (b) HepG2, (c) HeLa and (d) SH-SY5Y.

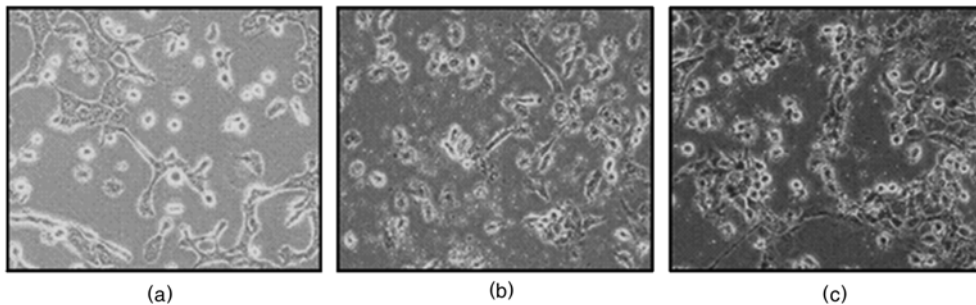


Fig. 6. Phase contrast microscopic image of DU145 cells in control culture cell (a), DU145 cells treated with magnetic nanoparticles (b) and with GMNs loaded on hangamdan drug (HGMNs) (c). Magnification ($\times 100$).

는 나노입자임을 알 수 있다.

Fig. 5는 GMNs의 약물전달 효과를 실험하기 위해 항암단을 GMNs에 코팅한 HGMNs와 코팅하지 않은 GMNs를 전립선암 세포인 DU145(A), 간암 세포 (HepG2, B), 자궁 경부암 (HeLa, C)와 뇌종양 세포 (SH-SY5Y cell, D) 등에 투여한 후의 MTT결과이다. GMNs는 농도에 따른 세포독성효과가 거의 보이지 않았다. 그러나 HGMNs의 50 $\mu\text{g/ml}$ 에 대한 DU145의 세포 생존율은 69.99%로 GMNs 대비하여 생존율이 30.01% 정도 감소하였고 HepG2tpbh 생존율은 68.98%, SH-SY5Y 세포에서는 HGMNs이 76.33% 생존율을 보였다. 특히 HeLa 세포는 HGMNs의 농도 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 34.37%의 낮은 세포 생존

율을 보였으며, HGMNs의 농도 13.6 $\mu\text{g/ml}$ 에서 IC_{50} 값을 보여 주었다. Fig. 5의 결과로부터 세포독성이 없는 GMNs에 약을 코팅하였을때 약물의 적은 농도에서도 약물의 항암효과를 확인하였으며, 약물 전달체로서의 역할을 훌륭히 수행하였음을 알 수 있다.

Fig. 6은 37°C에서 24 시간동안 세포를 배양하였을 때의 DU145 세포의 형태변화를 나타낸 것으로써 (a)는 대조군으로써의 DU145, (b)는 GMNs를 넣은 후, (c)는 HGMNs를 넣은 후의 사진이다(DU145 전립선암 세포는 미국에서 가장 빈번하게 진단되는 암으로 종양으로는 사망률 2위에 해당하는 암이다).

대조군으로 사용된 DU145 (a)와 DU145에 GMNs를

투입한 세포군 (b)의 사진에서 세포의 모양이 잘 퍼져나가고, 세포벽이 잘 형성되는 것을 관찰 할 수 있다. 반면에 HGMNs가 투입된 세포군에서는 세포가 잘 뻗어나지 못하며 세포벽 주위에 HGMNs가 응집되는 것을 볼 수 있다. 또한 검은 점들이 세포질에서 관찰되는데 이것은 HGMNs가 세포 내로 침윤되어진 것으로 판단 할 수 있다. 종양세포에 HGMNs에 투입된 후 세포 모양의 변화는 항암단이 세포 내에 효과적으로 전달되어 세포가 약리작용에 의해 성장이 억제되거나 사멸되기 때문이다. 또한 이러한 연구 결과는 자성 나노입자가 세포 내에 독성을 없음을 확인해주며 약물전달체로써 세포 내 약물 효과를 증진시키는 것으로 보여 진다. 자성 나노입자의 세포 내 투입경로는 세포 내 포집과정을 통해 세포막을 통과하여 세포질 내로 이동하는 것으로 사료된다.

4. 결 론

공침법으로 평균직경 20 nm크기의 자성 나노입자(GMNs)를 제조하였고, 항암단을 코팅하여 20-50 nm크기의 약물 전달 나노입자(HGMNs)를 제조하였다. 자성 나노입자 γ -Fe₂O₃는 역 스피넬 구조로 274, 612 그리고 771 cm⁻¹에서 Raman 신호가 관찰되었다. 자성 나노입자인 GMNs은 인간 전립선암 세포주 (PC3, DU145), 인간 뇌종양 세포 (SH-SY5Y cell, T98 cell), 인간 자궁 경부암 세포 (Hela, Siha), 인간 간암 세포 (HepG2)와, 유방암 세포 (MCF-7), 대장암 세포 (CaCO2) 등에 대해 세포 독성을 보이지 않았다. 또한 정상 세포주인 인간 신경 줄기 세포 (F3)와 성체 줄기 세포 (B10), 인간 섬유아 세포 (HS 68 세포)에서도 세포독성효과가 나타나지 않았다. 그러나 항암단이 코팅된 자성 나노입자인 HGMNs에서는 전립선암에서 69.99%, 자궁경부암에서는 34.375% 세포생존율은 보여 주었다. 이러 결과로 자성 나노입자는 독성이 없는 약물 전달체로써 세포 내 약물 전달에 효과적으로 이용될 수 있다. 또한 다성분이 함유된 한약을 자성 나노입자에 코팅함으로써 약의 다 유효성분을 효과적으로 검출하는 방법과 분석 방법에 대한 것으로 한약의 다 성분에 대한 유효성분 판단과 유효성분에 의한 치료 mechanism을 이해 할 수 있는 의학적 재료로 사용될 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2007-314-E00217).

참 고 문 헌

1. K. Furumura, H. Sugi, Y. Murakami and H. Asai, US patent, **4598914** (1986).
2. V. Angeles, C. Magdalena, G. R. Alejandro, C. Macarena, V. V. Sabino, J. S. Carlos, P. M. María and M. Rodolfo, *Nanotechnology*, **20**, 115103 (2009).
3. J. -K. Han, H. -C. Kim, W. -S. Hong and S. -C. Choi, *Kor. J. Mater. Res.*, **18**(7), 389 (2008) (in Korean).
4. P. C. Morais, V. K. Garg, A. C. Oliveira, L. B. Silveira, J. G. Santos, M. M. A. Rodrigues and A. C. Tedesco, *Hyperfine Interact.*, **190**, 87 (2009).
5. M. Varshney and Y. Li, *Biosensors Bioelectron.*, **22**, 2408 (2007).
6. J. M. Perez, L. Josephson, T. O. Loughlin, D. H. Lgemann and R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 816 (2002).
7. H. K. Kim and R. Y. Lee, *Kor. J. Mater. Res.*, **19**(4), 192 (2009) (in Korean).
8. P. S. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud and J. Viovy, *Science*, **295**, 2237 (2002).
9. D. Cao, P. He and N. Hu, *Analyst*, **128**, 1268 (2003).
10. S. Kückelhaus, S. C. Reis, M. F. Carneiro, A. C. Tedesco, D. M. Oliveira, E. C. D. Lima, P. C. Morais, R. B. Azevedo and Z. G. M. Lacava, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2402**, 272 (2004).
11. P. P. Macaroff, D. M. Oliveira, K. F. Ribeiro, Z. M. Lacava, E. C. D. Lima, P. C. Morais and A. C. Tedesco, *J. Magn. Magn. Mater.*, **293**, 293 (2005).
12. S. I. Park, J. Kim and C. O. Kim, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2340**, 272 (2004).
13. M. Johannsen, B. Thiesen, A. Jordan, K. Taymoorian, U. Gneveckow, N. Waldofner, R. Scholz, M. Koch, M. Lein, K. Jung, and S. A. Loening, *The prostate*, **283**, 1 (2005).
14. H. S. Yoo, C. K. Cho and M. S. Hong, *Integrative Cancer Therapies*, **7**, 182 (2008).
15. K. J. Lee, J. H. An, J. S. Shin, D. H. Kim, C. Kim, H. Ozaki and J. G. Koh, *Nanotechnology*, **18**, 465201 (2007).
16. G. V. M. Jacintho, P. Corio and J. C. Rubim, *J. Electroanal. Chem.*, **603**, 27 (2007).
17. P. C. Morais, S. W. da Silva, M. Aparecida, M. A. G. Soler and N. Buske, *J. Phys. Chem. A*, **104**, 2894 (2000).