

## 그래핀의 재생의학적 이용

윤정기, 김병수\*

# The Use of Graphene for Regenerative Medicine

Jeong-Kee Yoon and Byung-Soo Kim\*

접수: 2012년 10월 6일 / 게재승인: 2012년 10월 26일  
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Graphene is a one-atom-thick sheet composed of carbon atoms only. It has a two-dimensional honeycomb structure with  $sp^2$  orbital bonding, which presents some unique properties. Due to large Young's modulus, good electrical conductivity, ability to immobilize several kinds of small molecules and proteins, and biocompatibility of graphene, it has attracted interests in its ability to enhance cell growth and differentiation, followed by recent several studies. We reviewed about the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, and neurogenic differentiation of neuron stem cells, and the ectodermal and mesodermal differentiation of induced pluripotent stem cells using graphene. Graphene has not only enhanced the adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells, but also led to the faster differentiation even without any other exogenous signals. Nonetheless, graphene has some cytotoxicities in its amount-response manner, which is critical to regenerative medicine. The cytotoxicities of graphene were compared with those of grapheneoxide and carbon nanotubes.

**Keywords:** Graphene, Osteogenesis, Neurogenesis, Induced Pluripotent Stem Cells, Cytotoxicity

### 1. 서론

그래핀 (graphene)은 탄소원자 고리만으로 이루어진 육각형

서울대학교 공과대학 화학생물공학부  
School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Gwanak-gu, Seoul 151-744, Republic of Korea  
Tel: +82-2-880-1509, Fax: +82-2-888-1604  
e-mail: byungskim@snu.ac.kr

의 격자구조를 가지는 평면 나노 복합재료이다 (Fig. 1). 그래핀은 원자 1개의 두께로 이루어진 2차원 물질로서 0차원인 풀러렌 (fullerene), 1차원인 탄소나노튜브, 3차원인 흑연 (graphite), 더 나아가 그래핀 옥사이드 (graphene oxide)와 환원된 그래핀 옥사이드를 이루는 기본 물질이기도 하다. 최근 그래핀은 전기전자, 반도체, 디스플레이, 에너지, 고분자, 생명공학 등 여러 분야에서 응용되고 있다 [1]. 특히 생명공학 분야에서는 생체 적합성과 이식 가능한 특성을 이용해서 생체 기능화, 바이오센서, 조직공학 등의 분야에서 활발하게 도입되고 있다 [2]. 이 논문에서는 그래핀을 이용한 재생의학적 연구에 관련된 기술들을 정리하고자 한다. 우선 그래핀 고유의 특성과 제조법에 관하여 논의한다. 그리고 주변 환경에 따라서 분화방향이 달라질 수 있다는 줄기세포의 특징을 이용하여, 그래핀을 이용한 줄기세포의 골분화, 신경분화, 그리고 유도만능줄기세포의 분화에 관한 연구에 대하여 자세히 논의해 볼 것이다. 그리고 마지막으로 그래핀이 생체조직에 유해한 영향을 끼치지 않는지 그 독성에 관하여 논의해 볼 것이다.

### 2. 본론

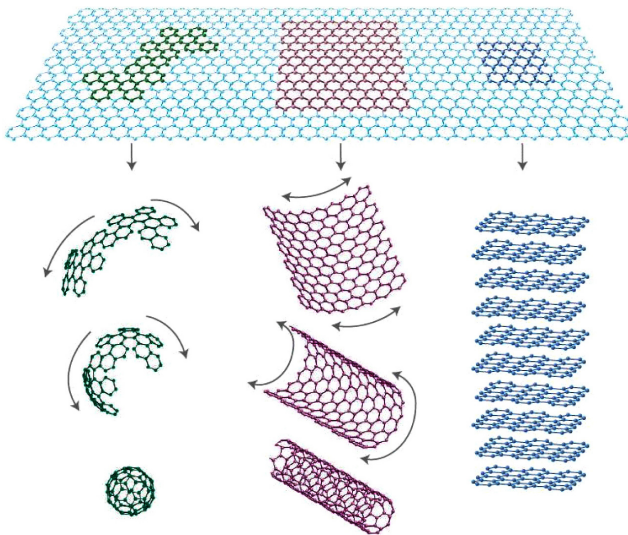
#### 2.1. 그래핀의 특성

그래핀이 탄소로만 이루어진 동소체라고는 하지만, 벤젠 등 다른 동소체들과는 차별되는 눈에 띄는 특성들 덕분에 조직공학 재료로서 자주 이용된다. 본 단락에서는 그러한 특성들 중 특히 줄기세포의 분화 방향을 결정할 가능성이 있어 주목할 만한 성질인 전기전도성, 탄성, 단백질 및 저분자 물질을 흡착시키는 성질에 대하여 다루어 볼 것이다.

##### 2.1.1. 전기전도성

그래핀의 뛰어난 전기전도성은 탄소원자간  $sp^2$  결합으로 설

명된다. 이 때, 탄소들의 최외각 전자 4개중 3개는 이웃한 3개의 다른 탄소와  $\sigma$ 결합을 하고, 남은 1개의 전자가  $\pi$ 결합을 이루게 된다. 파울리의 배타원리에 따라서  $\sigma$ 결합은 전자가 가득 차서 안정하고 단단한 결합을 이룬다. 하지만  $\pi$ 결합은 각각의 p오비탈이 1개의 여분의 전자만 가지고 있기 때문에 절반만 채워져 있다. 그래핀의 전기전도도는 바로 이 특수한  $\pi$ 결합 때문에 일어난다. 그래핀 내의 전자들은 서로간의 상호작용이 적은 편이고 평균자유행로가 매우 길어서 금속이나 반도체에서 나타나는 전기적 현상과는 다른 현상이 일어나게 된다. 이러한 다양한 전기적 성질들은 주변의 전기장과 자기장을 조절하거나, 그래핀을 여러 층으로 쌓거나, 기하구조를 바꾸거나, 화학처리를 해줌으로써 조절이 가능하다 [4]. 이렇게 그래핀은 상온에서  $\sim 200,000\text{cm}^2/\text{V}$ 의 전하이동도를 나타내고 [5], 이에 따라 전류밀도 및 전기전도도가 다른 물질에 비해 우수하다는 것을 알 수 있다. 한 예로 수소 아크방전 분리방법 (hydrogen arc discharge exfoliation)으로 얻어진 그래핀은 최대  $2 \times 10^3\text{S}/\text{cm}$ 의 전기전도도를 나타낸다 [6].



**Fig. 1.** Graphitic forms. Graphene is a 2D building material for carbon materials of all other dimensionalities. It can be wrapped up into 0D buckyballs (fullerene), rolled into 1D carbon nanotubes or stacked into 3D graphite [3].

### 2.1.2. 탄성

재생의학에서 중요하게 다뤄야 할 그래핀의 또다른 특성은 바로 탄성력이 우수하다는 것이다. 그래핀은 현재 알려져 있는 모든 물질 중에서 가장 높은 영률 (Young's Modulus)을 가지고 있고, 그 값은 0.1-1TPa에 해당한다 [7]. 그래핀은 높은 탄성력 덕분에 잘 끊어지지 않아서 안정하고, 물성의 변화 없이 어떤 모양으로도 휘어짐이 가능해서 불균일한 표면에도 용이하게 코팅할 수 있다 [8]. 또한 줄기세포의 분화 방향은 지지체의 탄성에 따라 달라진다고 잘 알려져 있다. 예로, 중간엽 줄기세포는 지지체가 부드러우면 신경으로 분화하고, 상대적으로 딱딱하면 뼈로 분화하며, 그 중간 정도의 물성의 지지체에서는 근육으로 분화한다는 것이 이미

밝혀졌다 [9]. 이러한 점을 잘 이용하면 그래핀을 이용해서 줄기세포의 분화방향을 조절해줄 수 있을 것이고, 그와 관련된 논문을 이후 소개해보도록 하겠다.

### 2.1.3. 단백질 및 저분자 물질의 흡착

그래핀이 조직공학적으로 이용될 수 있는 또 하나의 중요한 특성은 바로 그래핀에 단백질 및 저분자 물질이 달라붙을 수 있다는 점이다. 세포는 스스로의 성장을 위해서, 혹은 주변 세포들과 신호를 주고받기 위해서 각종 물질을 분비하는데, 그러한 물질들이 그래핀에 흡착되어 세포의 증식 및 분화 방향에 큰 영향을 끼칠 것이다. 단백질 및 저분자 물질들이 그래핀에 흡착되는 기본 원리로 이온결합, 소수성 인력 등 여러 가지가 있을 수 있겠지만  $\pi$ - $\pi$  스택킹 (stacking)으로 인한 반데르발스 힘이 대표적이다.  $\pi$ - $\pi$  스택킹은 주로 벤젠 고리끼리 잘 일어나는데, 그래핀의 수많은 연속된  $\text{sp}^2$  결합과 단백질의 아미노산에 있는 벤젠고리간에 작용하는 인력 등으로 인해 이루어진다 [10]. 대표적으로 골 형성 단백질 (bone morphogenic protein-2, BMP-2)이라는 골분화를 촉진시키는 단백질이 그래핀과 흑연에 잘 달라붙을 수 있다는 연구 결과가 발표되었다 [11,12]. 또한 트립신 [13]과 헤파린 [14], 그리고 라이소자임 [15] 등 여러 펩타이드 [16] 또한 그래핀과 유사한 구조를 갖는 그래핀 옥사이드와 흑연에 비슷한 원리로 비공유결합으로 흡착될 수 있다. 비슷한 소수성을 보이는 PDMS (polydimethylsiloxane)와 그래핀을 비교해보면, 그래핀의 파이 전자구름이 소수성을 띠는 단백질 중심과 상호작용을 한다고 추측된다 [2]. 골분화와 지방분화에 미치는 그래핀의 흡착성에 관하여 기술한 연구 결과에는 골분화에 영향을 미치는 저분자 물질인 dexamethasone과 단백질인  $\beta$ -glycerolphosphate가 각각 그래핀에 흡착되어 영향을 주고, 지방분화의 경우에는 지방분화에 도움을 주는 인슐린이 그래핀에 흡착되어 변성되기 때문에 지방분화가 억제된다는 연구가 보고되었다 [2]. 이처럼, 단백질이나 저분자 물질이 그래핀에 흡착될 수 있다는 사실은 줄기세포의 분화에 큰 영향을 끼칠 수 있다.

## 2.2. 그래핀의 제조

2004년 가임과 노보셀로프 교수에 의해서 발견된 그래핀의 초기 제조 방법은 접착성 스카치 테이프를 이용해서 흑연에 반복해서 붙였다 뗐다 하는 방법이었다. 이후 아세톤에 녹이는 등 몇 가지 공정을 더 해줌으로써 작은 크기의 그래핀 결정들을 얻을 수 있었다 [17]. 하지만 이러한 방법으로는 정말 작은 크기의 결정밖에 얻을 수 없다는 단점이 있었다. 그 뒤로도 SiC 단일결정 구조로부터 Si를 분리해내는 방법 [18,19], 전이금속을 이용해서 그래핀을 제조하고 크기를 키우는 방법 [20-24] 등 그래핀을 효율적으로 제조할 수 있는 방법이 많이 개발되었다. 하지만 그 중 요즘 가장 유용하게 쓰이고 있는 방법은 바로 구리 호일 (copper foil)을 이용한 화학 기상 성장법 (CVD, chemical vapor deposition)이다 [25]. 화학 기상 성장법이란 열 등의 외부 에너지를 이용해서 원료 가스를 분해시켜 기판 위에 박막을 형성하게끔 하는, 반도체 공정에서 많이 쓰이는 기술 중 하나이다. 구리 호일을 이용

해서 그래핀 필름의 크기를 키우는 과정에 대해서 간단히 설명을 해보면, 용융된 실리카 튜브를 구리 호일에 채우고 수소 가스를 40 mTorr, 1000°C에서 흘려준다. 이후 메탄가스를 500 mTorr에서 공급해주며 상온으로 온도를 내린다. 이후 구리를 Iron Nitrate로 에칭을 시켜주며 그래핀을 떼어낸다. SiO<sub>2</sub>/Si 접시에 코팅을 하고자 하면 그래핀 필름을 균일하게 만들어주기도 하는 물질인 PDMS (polydimethylsiloxane) 이나 PMMA (poly-methyl methacrylate)를 이용하면 된다. 이제 화학 기상 성장법으로 그래핀을 제조하였으면 배양접시 위에 코팅된 물질이 그래핀인지 확인을 할 차례다. 가장 대중적으로 이용되는 방법은 라만 분광법이다 [26,27]. 라만 분광법을 이용하면 그래핀 층의 개수를 유추해볼 수 있는데, 그래프를 보면 그래핀과 흑연은 약 1600 cm<sup>-1</sup>과 2700 cm<sup>-1</sup>에서 피크가 생긴다. 그리고 단일층 그래핀은 1600 cm<sup>-1</sup>과 2700 cm<sup>-1</sup> 피크 세기의 비가 약 1 : 7이지만, 흑연은 오히려 1600 cm<sup>-1</sup>의 피크가 높게 나온다. 또한 그래핀 층의 개수가 증가할수록 라만 이동 (Raman Shift)이 커져서 피크가 오른쪽으로 이동한다. 이를 이용하면 그래핀의 성공적인 제조여부와 만들어진 그래핀 층의 수를 확인할 수 있다.

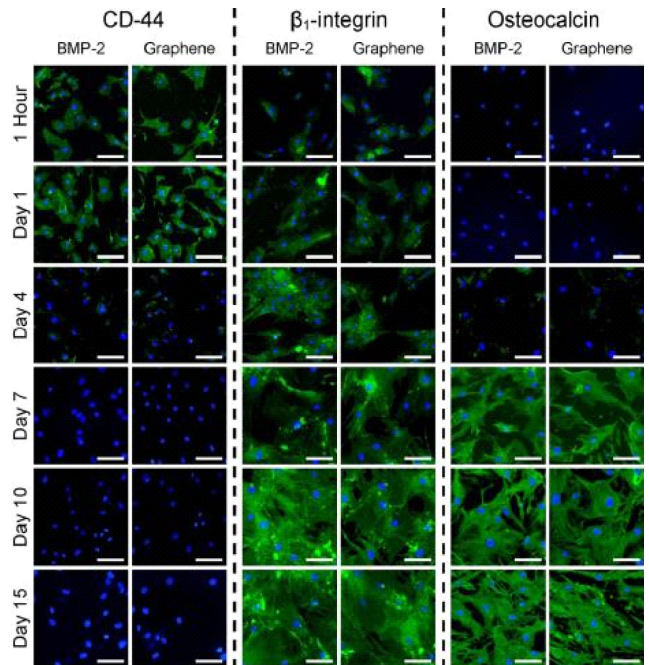
**2.3. 그래핀의 재생의학적 이용**

인간이 성장하면서 연골에 혈관이 생성되지 않고 허파에 근육이 생성되지 않는 것처럼, 줄기세포의 분화가 주변 환경, 즉 이웃한 세포, 세포 외 기질이나 성장인자, 물리적인 힘에 따라 달라진다는 것은 널리 알려진 사실이다 [28,29]. 이러한 논리대로 생각해서, 배양 접시 위에 그래핀을 코팅하고 세포를 키우면 일반 배양 접시 위에서 배양한 것과 다른 결과가 나올 것이라고 가설을 세워볼 수 있을 것이다. 이번 단락에서는 이러한 가설을 토대로 여러 줄기세포를 그래핀 위에서 배양한 실험 논문들에 대하여 소개해보고, 줄기세포를 배양하고 분화시키는데 유용하게 쓰일 수 있는 그래핀의 장점에 대해서 소개해보겠다.

**2.3.1. 골분화**

두개골 재생 실험으로 주로 대변되는 줄기세포의 골분화 역시 주변 지지체나 성장인자 등에 의해서 촉진되거나 억제된다. 특히 나노크리스탈 다이아몬드 위에서 뼈 생성에 중요한 역할을 하는 조골세포의 부착과 증식과 분화력이 좋아진다는 연구가 있었는데, 이로써 배양표면의 친수/소수성 [30]과 나노 스케일의 표면 거칠기 [31,32]가 세포를 키우고 분화시키는데 중요한 역할을 한다는 것이 증명되었다. 또한 그래핀은 다른 탄소나노물질들 (예: 탄소나노튜브)보다 상대적으로 순수하게 합성하는 것이 가능하므로 부착성 세포들, 이를테면 조골세포나 중간엽줄기세포를 이용한 실험에 적합한 모델이 된다. 그런 이유에서 그래핀을 이용한 줄기세포의 골분화는 현재 다른 조직보다 연구가 많이 진척되어있는 분야이기도 하다. 이와 관련된 연구 중 첫 번째로 주목할 만한 논문은 바로 그래핀이 일반 유리에 비해서 조골세포와 중간엽줄기세포의 부착을 증진시켜준다는 논문이다 [33]. 그 연구 결과에 따르면 그래핀은 인간 조골세포와 중간엽줄기세포에 독성을 띄지 않고 그들의 부착과 성장을 자극한다. 또한 세포의

양을 잘 조절해주면 [2] 중간엽줄기세포가 조골세포로 분화할 가능성이 있다고 말하고 있다. 그리고 그 이유로 그래핀의 전기전도성을 뚫으면서 성장인자를 넣은 것과 비슷한 효과를 가질 수 있는 가능성을 언급하였다. 이후에 나온 논문 중에는 그래핀을 이용하면 인간 중간엽줄기세포의 골분화를 촉진시킬 수 있다는 내용의 연구 결과가 있다 [34]. 그 논문에서는 두 가지 배지 조건에서 실험을 진행하였는데, 하나는 일반 줄기세포 배지에서, 다른 하나는 성장인자 (골 형성 단백질)를 첨가한 골분화 배지였다 [35]. 일반 줄기세포 배지에서는 그래핀의 유무가 세포의 생존성과 모양에 별로 영향을 끼치지 못하는 것을 알 수 있었다. 하지만 골분화 배지에서는 배양 및 분화 이후 면역염색 결과, 중간엽줄기세포를 염색하는 CD44의 발현은 적어지고 골세포를 염색하는 osteocalcin에 대한 신호가 점점 커지는 것이 관찰되었다 (Fig. 2). 이는 즉 중간엽줄기세포가 골세포로 분화하고 있다는 것을 의미하며, 결론적으로 골 형성 단백질을 포함하고 있는 골분화 배지에서는 그래핀이 중간엽줄기세포의 골분화에 영향을 줄 수 있다는 것을 뜻한다. 그래핀의 대조군으로 그래핀과 비슷한 무정형의 탄소필름의 일종인 흑연을 이용한 실험도 진행되었는데, 둘 간 확연한 차이가 보일 정도로 그래핀의 분화 효능이 우수하다는 결론이 도출되었다. 그래핀이 골분화에 유리하게 작용하는 이유에 대하여 생각해보면 우선 그래핀의 탄성은 골분화보다는 신경분화에 유리하게 작용한다고 알 수 있으므로 탄성은 골분화에 크게 영향을 미치지 않는

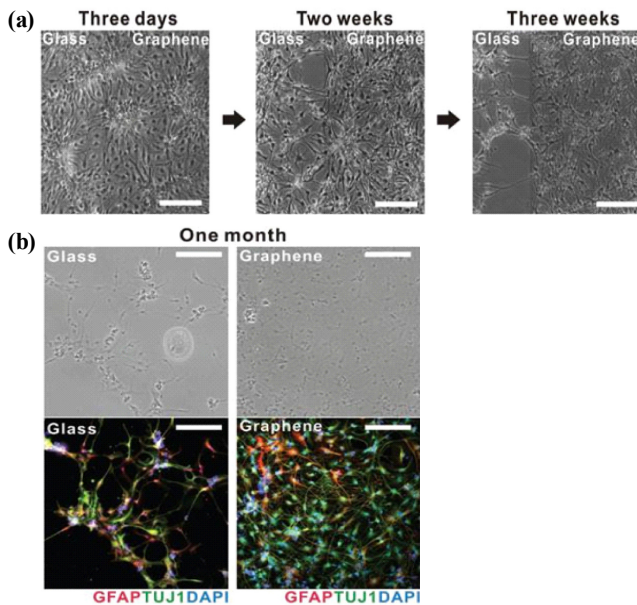


**Fig. 2.** Immunostaining of hMSCs on Si/SiO<sub>2</sub> substrates either treated with BMP-2 or coated with graphene. Observations were performed at different time points, from 1 h to 15 days. CD-44, a marker for stem cells, decreased over time and completely disappeared by day 7. (center) β<sub>1</sub>-integrin, a marker for cell-substrate adhesion, increased over time, reaching its peak by day 15. (right) OCN, a marker for bone cells, became visible at day 4 and very intense by day 7. Scale bars represent 100μm [34].

다고 사려된다 [9]. 하지만 2.1.3.에서 밝혔듯이 그래핀에는  $\pi$ - $\pi$  stacking으로 인해 각종 저분자 물질이나 단백질이 흡착될 수 있고, 특히 골분화에 영향을 끼칠 수 있는 저분자 물질인 dexamethasone과 단백질인  $\beta$ -glycerolphosphate, 그리고 골 형성 단백질이 흡착될 수 있어서 줄기세포의 골분화 속도를 촉진시킨다고 예상된다 [2].

### 2.3.2. 신경분화

뇌 및 신경관련 질환을 극복하기 위해서 요즘 대두되는 치료 방법이 바로 줄기세포를 이용한 방법이다. 이를 위해서는 인간 신경줄기세포 등의 신경세포로 분화할 수 있는 줄기세포가 필요하다. 한 연구결과에 따르면 신경줄기세포는 주변 지지체의 전기전도도에 따라서 생존성도 늘어나고 신경세포로 분화하는 정도도 증가할 수 있다고 한다 [36]. 앞서 언급했던 그래핀의 전기전도도가 매우 우수하다는 점과 같이 생각해본다면, 그래핀이 신경줄기세포의 분화를 도와줄 수 있다고 생각해볼 수 있다. 이러한 연구 결과들을 토대로 최근 그래핀을 이용해서 신경줄기세포를 신경세포인 뉴런과, 뉴런의 활동에 필요한 물질을 공급하는 신경교세포 (glial cell)로 분화시키는 연구가 진행되었다 [37]. 초반에는 basic fibroblast growth factor와 epidermal growth factor 등의 성장인자들을 주입해서 세포 양을 증식시킨 후, 이후 약 한 달간 성장인자를 넣어주지 않은 배지에서 증식 및 분화가 진행되는 것을 관찰하였다. 그 결과 배양 초기에는 별 차이



**Fig. 3.** Enhanced neural differentiation of hNSCs on graphene. (a) Bright-field images of the hNSCs differentiated for three days (left) to three weeks (right). Human neural stem cells on glass were gradually detached after two weeks, while those on graphene remained stable. (b) Bright-field (top row) and fluorescence (bottom row) images of hNSCs differentiated on glass (left) and graphene (right) after one month differentiation. Astroglial cells were immunostained with GFAP (red), neural cells with TUJ1 (green), and nuclei with DAPI (blue). Note that more hNSCs were adhered to graphene than to glass. Scale bars represent 200  $\mu$ m [37].

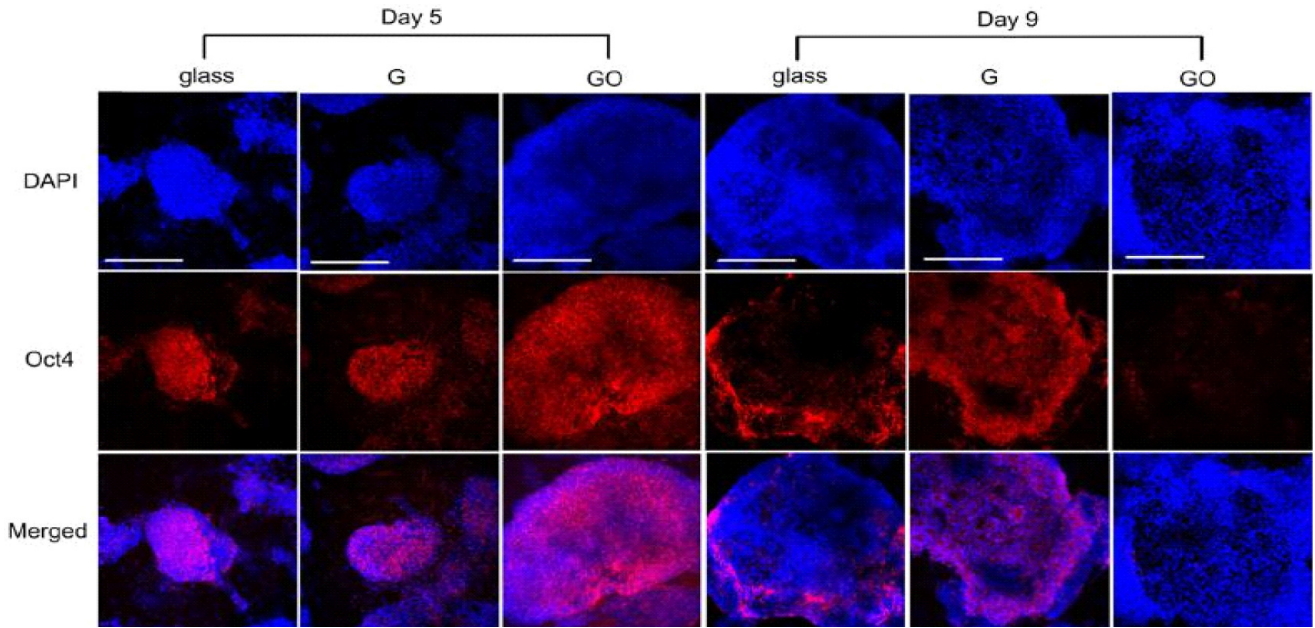
가 없었지만 2주 이상이 지나 안정하게 부착되어있는 세포의 수가 확연하게 차이가 남을 확인할 수 있었다 [37]. 뉴런과 신경교세포 중 질병을 치료하는데 중요한 것은 뉴런인데, 일반 유리 표면 ( $21.7 \pm 3.9\%$ ) 위에서 보다 그래핀 표면 위 ( $39.1 \pm 5.6\%$ )에서 뉴런으로 분화한 신경줄기세포의 비율이 더 높았다 (Fig. 3) [37]. 또한 신경교세포가 신경줄기세포를 뉴런으로 분화시키는데 큰 역할을 한다는 연구결과에 의하면 [38], 분화하지 않고 남은 신경줄기세포들도 이미 분화된 많은 신경교세포에 둘러 쌓여서 뉴런으로의 분화가 유도될 것이므로 더 높은 뉴런의 비율을 기대할 수 있다고 밝혔다 [37].

### 2.3.3. 유도만능 줄기세포의 분화

유도만능 줄기세포는 배아줄기세포와 비슷한 성질을 가지는 줄기세포이다. 대신 유도만능 줄기세포는 체세포에서 분리된 세포로, 배아를 이용하지 않아도 된다는 장점이 있다 [39,40]. 유도만능 줄기세포는 배아줄기세포와 마찬가지로 미분화상태로 유지하다가 분화를 시작하게 되면 내배엽, 중배엽, 외배엽의 3개의 층으로 분화하게 된다. 그리고 이 각각의 층은 더 분화하여 신체의 여러 기관을 이루게 된다. 이런 특성을 갖는 유도만능 줄기세포의 분화도 그래핀과 그래핀 옥사이드 위에서 달라질 수 있다는 연구 결과가 발표되었다 [41]. 연구결과에 따르면, 그래핀 옥사이드가 세포의 부착 및 증식을 촉진한 것에 비해서 그래핀은 이에 별 영향을 끼치지 못하였다 (Fig. 4). 하지만 qPCR로 알아본 세포 분화의 측면에서는 그래핀 옥사이드가 내배엽, 중배엽, 외배엽으로의 분화를 모두 촉진시킨 것에 비하여 그래핀은 외배엽과 중배엽으로의 분화만 촉진시키고 내배엽으로의 분화를 억제시키는 경향을 보였다 [41]. 내배엽이 간세포나  $\beta$ 세포로 분화한다는 면에서 그래핀을 잘 이용하면 이를 억제하고, 반대로 골분화, 연골분화 등을 집중적으로 할 수 있을 것이다.

### 2.4. 그래핀의 독성

세포와 관련된 바이오계열의 연구를 할 때 항상 강조되는 것이 바로 생물체내, 특히 인체 내에서 독성을 띄는지, 유해한 작용을 하는지 검사하는 것이다. 역사가 길지 않은 나노단위의 물질들에 대해서도 현재 독성에 관한 연구가 한창 진행중이다. 그 결과 나노물질이 세포사멸 (apoptosis)과 괴사 (necrosis)를 촉진시킨다는 연구 결과들이 나오기도 하였다 [42,43]. 그래핀 역시 다른 나노물질들에 비해서도 역사가 무척 짧지만 근래에 들어 독성 및 유해성에 대한 연구 결과가 하나 둘씩 보고 되고 있다. 특히 박테리아 [44]나 동물세포 [45,46]위주의 논문들이 몇 가지 발표가 되었다. 우선 나노물질이 독성을 띄는 몇 가지 이유에 관해서 언급해보겠다 [47]. 첫째, 나노분자의 표면적 대 부피 비율이 크기 때문이다. 이는 특히 다공성 물질의 경우 더 뚜렷하게 드러난다 [48]. 그래핀의 경우 다공성 물질로 볼 수 있기 때문에 이 영향은 무시할 수 없을 것이다. 둘째로, 나노분자는 체내 이식할 시 크기가 너무 작아서 체내에 잔여물이 남아있을 가능성이 높다 [49-52]. 특히 세포 내 [53,54] 혹은 간 등의 장기에 남아있을 확률이 높다 [55]. 본격적으로 그래핀에 관련된



**Fig. 4.** Immunohistochemical staining against Oct4, a pluripotency marker. iPSCs were cultured on 3 different substrates, and analyzed at day 5 and day 9. The expression of Oct4 is decreasing by time, indicating the differentiation of iPSCs, especially in GO [41].

연구로 넘어와서, 그래핀과 가장 쉽게 비교할 수 있는 물질은 바로 탄소나노튜브이다. 탄소나노튜브는 그 동안 세포독성을 띄고 있다는 연구결과가 많이 발표되었는데 [56-59], 1차원 물질인 탄소나노튜브와 2차원 물질인 그래핀의 세포독성의 차이점을 밝히려는 논문이 2010년에 발표되었다 [46]. 탄소나노튜브에 비해 그래핀은 세포막과 상호작용을 많이 하기 때문이라는 가설에서 시작된 논문이다. 우선 그래핀과 비교했을 때 나타나는 탄소나노튜브의 가장 큰 차이점은 바로 세포독성이 탄소나노튜브의 길이에 비례한다는 것이다. 하지만 탄소나노튜브의 길이가 길면 길수록 세포의 성장을 촉진시킨다는 모순이 존재해서 이를 사용하기엔 어려움이 따른다 [60]. 또한 탄소나노튜브에 비해서 그래핀은 순수도를 쉽게 높일 수 있으므로 정제과정에서 생길 수 있는 세포독성의 가능성을 최대한 줄일 수 있다는 장점도 존재한다 [33]. 생체 밖에서 나노물질의 독성여부를 검사하는 방법은 여러 가지가 있지만, 위 논문에서는 MTT assay와 LDH release, 그리고 탄소나노물질의 중요한 독성검사 방법인 활성산소를 검출함으로써 세포의 정상여부를 판별했다 [61]. 그 결과 미토콘드리아의 활성을 검사하는 MTT assay에서는 별 차이가 없었지만, LDH 분비량에선 기질의 농도가 높아질수록 그래핀보다 탄소나노튜브에서의 분비량이 높게 나왔다. 또한 활성산소 (ROS)수치를 측정함으로써 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 그래핀은 매우 독성을 띤다고 밝혔고, 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 낮은 농도의 그래핀은 생체 내에서도 유용하게 쓰일 수 있을 것이라는 결론을 냈다 [61]. 최대 농도 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 라는 그래핀의 수치는 7.5-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도만으로 DNA에 문제를 끼치는 탄소나노튜브 [62,63]에 비해서 훨씬 안정적인 수치이다. 즉 그래핀은 탄소나노튜브에 비해서 세포에 끼치는 독성이 적다고 할 수 있다. 다른 논문의 예를 보면, 인간 내의 세포는 크게 부착성 세포와 비부착성 세포 두 가지로 나뉘

는데, 이 둘에 미치는 그래핀과 그래핀 옥사이드의 독성의 영향에 대해서 실험한 결과를 찾아볼 수 있었다 [64]. 논문에서는 지지체 표면의 전하와, 물질의 뭉침정도가 세포독성에 영향을 끼칠 수 있다는 연구결과에 주목하고 [65,66], 그러한 측면에서 차이점을 보이는 그래핀과 그래핀 옥사이드의 세포독성에 대해서 관찰하였다. 그 실험에서는 부착성 세포로는 인간의 섬유아세포, 비부착성 세포로는 적혈구가 쓰였다 [64]. 먼저 적혈구의 경우에는, 독성을 적혈구의 용해와 세포모양의 변형을 광학현미경으로 관찰함으로써 확인하였다 [64]. 그 결과 그래핀에서는 그래핀 옥사이드에 비해서 양호한 수치의 용해된 적혈구 비율이 관찰되었고, 형태가 변형된 세포의 수도 적었다 [64]. 이는 그래핀이 그래핀 옥사이드보다 물질 표면에 전하가 적기 때문이라고 해석되었다 [64]. 부착성 세포인 섬유아세포의 경우에는 MTT assay, WST-8 assay가 각각 사용되었는데, MTT assay에서는 별 차이를 보지 못했지만 WST-8 assay에서는 그래핀 옥사이드에서 보다 그래핀에서의 세포 생존율이 훨씬 낮다는 결과가 나왔다 [64]. MTT assay 결과는 그래핀의 독성을 탄소나노튜브와 비교한 논문 [46]과 그래핀 옥사이드와 비교한 논문 [64] 모두 그래핀과 다른 물질과의 차이가 없게 나왔는데, 이 논문에서는 이를 MTT 시약이 탄소가 주성분인 물질에 의해 방해를 받아서 항상 세포 생존율이 높게 나오기 때문 [67,68] 이라고 결론을 내리고 WST-8 assay의 데이터만 가치 있게 보았다. 그리고 그 원인을 그래핀 옥사이드보다 그래핀이 더 쉽게 뭉치는 성질이 있기 때문에 그래핀에서는 세포에 양분 공급이 불충분할 수 있는 등의 문제가 생길 수 있다는 것으로 보았다 [64]. 또한 마찬가지로 활성산소 실험도 행하였는데 이 역시 그래핀이 아무 처리도 하지 않은 대조군보다 9배 높은 섬유아세포 내 활성산소 농도를 띄게 한다는 것을 확인할 수 있었다 [64]. 즉 그래핀과 그래핀옥사이드가 각각 부착

성 세포와 비부착성 세포에 미치는 영향이 조금씩 다르다는 결론이 나왔다.

### 3. 결론

그래핀은 현재 응용이 많이 진척된 디스플레이뿐 아니라 질병을 치료하는 목적으로서의 역할도 점점 커지고 있다. 아직 체내에 그래핀을 직접 이식하는 것은 어려울 수도 있겠지만, 몇몇 논문에서 행한 체외 실험에서 보여지듯이 줄기세포의 분화능을 향상시키고 분화방향을 조절할 수 있다는 사실 만으로도 재생의학 분야에서 커다란 파장을 몰고 온 것이 사실이다. 앞으로 그래핀이 세포와 세포 외 기질 등 주변 환경에 미치는 영향들을 잘 연구해서 세포독성을 억제하고 다양한 성장인자를 포함한 배지나 기타 조건을 개발하면 충분히 재생 의학적 응용이 가능해질 수 있는 물질이 될 것이다.

### 감사

본 연구는 보건복지부 연구비 (A100443) 지원을 받아 수행되었습니다.

### References

- Rao, C. N., A. K. Sood, K. S. Subrahmanyam, and A. Govindaraj (2009) Graphene: the new two-dimensional nanomaterial. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48: 7752-7777.
- Lee, W. C., C. H. Lim, H. Shi, L. A. Tang, Y. Wang, C. T. Lim, and K. P. Loh (2011) Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide. *ACS Nano* 5: 7334-7341.
- Geim, A. K. and K. S. Novoselov (2007) The rise of graphene. *Nat. Mater* 6: 183-191.
- Castro Neto, A. H., F. Guinea, N. M. R. Peres, K. S. Novoselov, and A. K. Geim (2009) The electronic properties of graphene. *Reviews of Modern Physics* 81: 109-162.
- Bolotin, K. I., K. J. Sikes, J. Hone, H. L. Stormer, and P. Kim (2008) Temperature-dependent transport in suspended graphene. *Phys. Rev. Lett.* 101: 096802.
- Wu, Z. S., W. Ren, L. Gao, J. Zhao, Z. Chen, B. Liu, D. Tang, B. Yu, C. Jiang, and H. M. Cheng (2009) Synthesis of graphene sheets with high electrical conductivity and good thermal stability by hydrogen arc discharge exfoliation. *ACS Nano* 3: 411-417.
- Lee, C., X. Wei, J. W. Kysar, and J. Hone (2008) Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science* 321: 385-388.
- Lee, Y., S. Bae, H. Jang, S. Jang, S. E. Zhu, S. H. Sim, Y. I. Song, B. H. Hong, and J. H. Ahn (2010) Wafer-scale synthesis and transfer of graphene films. *Nano Lett.* 10: 490-493.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126: 677-689.
- Wheeler, S. E. (2012) Understanding substituent effects in noncovalent interactions involving aromatic rings. *Acc. Chem. Res.* DOI: 10.1021/ar300109n
- Utesch, T., G. Daminelli, and M. A. Mroginski (2011) Molecular dynamics simulations of the adsorption of bone morphogenetic protein-2 on surfaces with medical relevance. *Langmuir* 27: 13144-13153.
- Mücksch, C. and H. M. Urbassek (2011) Adsorption of BMP-2 on a hydrophobic graphite surface: a molecular dynamics study. *Chemical Physics Letters* 510: 252-256.
- Xu, G., X. Chen, J. Hu, P. Yang, D. Yang, and L. Wei (2012) Immobilization of trypsin on graphene oxide for microwave-assisted on-plate proteolysis combined with MALDI-MS analysis. *Analyst* 137: 2757-2761.
- Lee da, Y., Z. Khatun, J. H. Lee, Y. K. Lee, and I. In (2011) Blood compatible graphene/heparin conjugate through noncovalent chemistry. *Biomacromolecules* 12: 336-341.
- Raffaini, G. and F. Ganazzoli (2010) Protein adsorption on a hydrophobic surface: a molecular dynamics study of lysozyme on graphite. *Langmuir* 26: 5679-5689.
- Sheng, Y., W. Wang, and P. Chen (2010) Interaction of an ionic complementary peptide with a hydrophobic graphite surface. *Protein Sci.* 19: 1639-1648.
- Novoselov, K. S., A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, and A. A. Firsov (2004) Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* 306: 666-669.
- Berger, C., Z. Song, X. Li, X. Wu, N. Brown, C. Naud, D. Mayou, T. Li, J. Hass, A. N. Marchenkov, E. H. Conrad, P. N. First, and W. A. de Heer (2006) Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene. *Science* 312: 1191-1196.
- Emtsev, K. V., A. Bostwick, K. Horn, J. Jobst, G. L. Kellogg, L. Ley, J. L. McChesney, T. Ohta, S. A. Reshanov, J. Rohrl, E. Rotenberg, A. K. Schmid, D. Waldmann, H. B. Weber, and T. Seyller (2009) Towards wafer-size graphene layers by atmospheric pressure graphitization of silicon carbide. *Nat Mater* 8: 203-207.
- Sutter, P. W., J. I. Flege, and E. A. Sutter (2008) Epitaxial graphene on ruthenium. *Nat Mater* 7: 406-411.
- Kim, K. S., Y. Zhao, H. Jang, S. Y. Lee, J. M. Kim, J. H. Ahn, P. Kim, J. Y. Choi, and B. H. Hong (2009) Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature* 457: 706-710.
- Reina, A., X. Jia, J. Ho, D. Nezich, H. Son, V. Bulovic, M. S. Dresselhaus, and J. Kong (2009) Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition. *Nano Lett.* 9: 30-35.
- Coraux, J., A. T. N'Diaye, C. Busse, and T. Michely (2008) Structural coherency of graphene on Ir (111). *Nano Lett.* 8: 565-570.
- Yu, Q., J. Lian, S. Siriponglert, H. Li, Y. P. Chen, and S.-S. Pei (2008) Graphene segregated on Ni surfaces and transferred to insulators. *Applied Physics Letters* 93: 113103.
- Li, X., W. Cai, J. An, S. Kim, J. Nah, D. Yang, R. Piner, A. Velamakanni, I. Jung, E. Tutuc, S. K. Banerjee, L. Colombo, and R. S. Ruoff (2009) Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils. *Science* 324: 1312-4.
- Ferrari, A. C., J. C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K. S. Novoselov, S. Roth, and A. K. Geim (2006) Raman spectrum of graphene and graphene layers. *Phys. Rev. Lett.* 97: 187401.
- Graf, D., F. Molitor, K. Ensslin, C. Stampfer, A. Jungen, C. Hierold, and L. Wirtz (2007) Spatially resolved Raman spectroscopy of

- single- and few-layer graphene. *Nano Lett.* 7: 238-242.
28. Discher, D. E., D. J. Mooney, and P. W. Zandstra (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324: 1673-1677.
  29. Haque, M. A., M. Nagaoka, B. Hexig, and T. Akaike (2010) Artificial extracellular matrix for embryonic stem cell cultures: a new frontier of nanobiomaterials. *Science and Technology of Advanced Materials* 11: 014106.
  30. Rezek, B., L. Michalikova, E. Ukraintsev, A. Kromka, and M. Kalbacova (2009) Micro-pattern guided adhesion of osteoblasts on diamond surfaces. *Sensors (Basel)* 9: 3549-3562.
  31. Kalbacova, M., B. Rezek, V. Baresova, C. Wolf-Brandstetter, and A. Kromka (2009) Nanoscale topography of nanocrystalline diamonds promotes differentiation of osteoblasts. *Acta Biomater.* 5: 3076-3085.
  32. Kalbacova, M., A. Broz, O. Babchenko, and A. Kromka (2009) Study on cellular adhesion of human osteoblasts on nano-structured diamond films. *Physica Status Solidi (b)* 246: 2774-2777.
  33. Kalbacova, M., A. Broz, J. Kong, and M. Kalbac (2010) Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. *Carbon* 48: 4323-4329.
  34. Nayak, T. R., H. Andersen, V. S. Makam, C. Khaw, S. Bae, X. Xu, P. L. Ee, J. H. Ahn, B. H. Hong, G. Pastorin, and B. Ozyilmaz (2011) Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS Nano* 5: 4670-4678.
  35. Fahmi, H., J. P. Pelletier, F. Mineau, and J. Martel-Pelletier (2002) 15d-PGJ2 is acting as a 'dual agent' on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 10: 845-848.
  36. Lundin, V., A. Herland, M. Berggren, E. W. Jager, and A. I. Teixeira (2011) Control of neural stem cell survival by electroactive polymer substrates. *PLoS One* 6: e18624.
  37. Park, S. Y., J. Park, S. H. Sim, M. G. Sung, K. S. Kim, B. H. Hong, and S. Hong (2011) Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene. *Adv. Mater* 23: H263-267.
  38. Song, H., C. F. Stevens, and F. H. Gage (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417: 39-44.
  39. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317.
  40. Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, S. Lukvin, II, and J. A. Thomson (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920.
  41. Chen, G. Y., D. W. Pang, S. M. Hwang, H. Y. Tuan, and Y. C. Hu (2012) A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation. *Biomaterials* 33: 418-427.
  42. Nel, A., T. Xia, L. Mädler, and N. Li (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311: 622-627.
  43. Shi, L., B. Hernandez, and M. Selke (2006) Singlet oxygen generation from water-soluble quantum dot-organic dye nanocomposites. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 6278-6279.
  44. Akhavan, O. and E. Ghaderi (2010) Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano* 4: 5731-5736.
  45. Ryoo, S. R., Y. K. Kim, M. H. Kim, and D. H. Min (2010) Behaviors of NIH-3T3 fibroblasts on graphene/carbon nanotubes: proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies. *ACS Nano* 4: 6587-6598.
  46. Zhang, Y., S. F. Ali, E. Dervishi, Y. Xu, Z. Li, D. Casciano, and A. S. Biris (2010) Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS Nano* 4: 3181-3186.
  47. Rivera Gil, P., G. Oberdorster, A. Elder, V. Puentes, and W. J. Parak (2010) Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future. *ACS Nano* 4: 5527-5531.
  48. Maurer-Jones, M. A., Y. S. Lin, and C. L. Haynes (2010) Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano* 4: 3363-3373.
  49. Nativo, P., I. A. Prior, and M. Brust (2008) Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *ACS Nano* 2: 1639-1644.
  50. Hess, H. and Y. Tseng (2007) Active intracellular transport of nanoparticles: opportunity or threat? *ACS Nano* 1: 390-392.
  51. Orr, G., D. J. Panther, J. L. Phillips, B. J. Tarasevich, A. Dohnalkova, D. Hu, J. G. Teeguarden, and J. G. Pounds (2007) Submicrometer and nanoscale inorganic particles exploit the actin machinery to be propelled along microvilli-like structures into alveolar cells. *ACS Nano* 1: 463-475.
  52. Porter, A. E., M. Gass, J. S. Bendall, K. Muller, A. Goode, J. N. Skepper, P. A. Midgley, and M. Welland (2009) Uptake of noncytotoxic acid-treated single-walled carbon nanotubes into the cytoplasm of human macrophage cells. *ACS Nano* 3: 1485-1492.
  53. Chang, E., N. Thekkekk, W. W. Yu, V. L. Colvin, and R. Drezek (2006) Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake. *Small* 2: 1412-1417.
  54. Thubagere, A. and B. M. Reinhard (2010) Nanoparticle-induced apoptosis propagates through hydrogen-peroxide-mediated bystander killing: insights from a human intestinal epithelium in vitro model. *ACS Nano* 4: 3611-3622.
  55. Casals, E., S. Vázquez-Campos, N. G. Bastús, and V. Puentes (2008) Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27: 672-683.
  56. Colvin, V. L. (2003) The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat. Biotechnol.* 21: 1166-1170.
  57. Tian, F., D. Cui, H. Schwarz, G. G. Estrada, and H. Kobayashi (2006) Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol In Vitro* 20: 1202-1212.
  58. Murr, L. E., K. M. Garza, K. F. Soto, A. Carrasco, T. G. Powell, D. A. Ramirez, P. A. Guerrero, D. A. Lopez, and J. Venzor, 3rd (2005) Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment. *Int. J. Environ Res. Public Health* 2: 31-42.
  59. Dong, L., K. L. Joseph, C. M. Witkowski, and M. M. Craig (2008) Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes suspended in various surfactants. *Nanotechnology* 19: 255702.
  60. Smart, S. K., A. I. Cassidy, G. Q. Lu, and D. J. Martin (2006) The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* 44: 1034-1047.
  61. Garza, K. M., K. F. Soto, and L. E. Murr (2008) Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *Int. J. Nanomedicine* 3: 83-94.
  62. Belyanskaya, L., S. Weigel, C. Hirsch, U. Tobler, H. F. Krug, and P. Wick (2009) Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells. *Neurotoxicology* 30: 702-711.

63. Sharma, H. S., S. F. Ali, Z. R. Tian, R. Patnaik, S. Patnaik, A. Sharma, A. Boman, P. Lek, E. Seifert, and T. Lundstedt (2010) Nanowired-drug delivery enhances neuroprotective efficacy of compounds and reduces spinal cord edema formation and improves functional outcome following spinal cord injury in the rat. *Acta Neurochir Suppl.* 106: 343-350.
64. Liao, K. H., Y. S. Lin, C. W. Macosko, and C. L. Haynes (2011) Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Appl. Mater Interfaces* 3: 2607-2615.
65. Arvizo, R. R., O. R. Miranda, M. A. Thompson, C. M. Pabelick, R. Bhattacharya, J. D. Robertson, V. M. Rotello, Y. S. Prakash, and P. Mukherjee (2010) Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. *Nano Lett.* 10: 2543-2548.
66. Liu, S., L. Wei, L. Hao, N. Fang, M. W. Chang, R. Xu, Y. Yang, and Y. Chen (2009) Sharper and faster "nano darts" kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube. *ACS Nano* 3: 3891-3902.
67. Monteiro-Riviere, N. A. and A. O. Inman (2006) Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. *Carbon* 44: 1070-1078.
68. Wörle-Knirsch, J. M., K. Pulskamp, and H. F. Krug (2006) Oops they did it again! carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 6: 1261-1268.