

A Research on Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles' Toxicity to U373MG Cell and its Effect on the Radiation Survival Curve

Seonghee Kang*, Jeonghwan Kim**, Dokyung Kim***, Bosun Kang*

*Department of Radiological Science, College of Medical Science, Konyang University**,

*Department of Anatomy, College of Medicine, Konyang University**,*

*Industry Cooperation Foundation, Konyang University****

산화철 나노입자의 U373MG 세포 독성평가 및 방사선 세포생존 곡선에 미치는 영향에 대한 연구

강성희*, 김정환**, 김도경***, 강보선*

건양대학교 방사선학과*, 건양대학교 의학과**, 건양대학교 산학협력단***

Abstract

This research was performed to evaluate the superparamagnetic iron oxide nanoparticles'(SPIONs) cell toxicity and to measure the radiation cell survival curve changes of SPIONs-uptake glioblastoma multiforme cells. The results could be practically used as the fundamental data to ameliorate proton beam cancer therapy, for example, providing necessary GBM treatment dose in the proton beam therapy when the therapy takes advantage of SPIONs. The assessment of the toxicological evaluation of synthesized SPIONs was accomplished by MTT assay as an in vitro experiment. The results showed no meaningful differences in the cell survival rate at the 1-100µg/ml SPIONs concentrations, but the cell toxicity was shown as the cell survival rate decreased up to 74.2% at the 200µg/ml SPIONs concentration. Then, we measured each radiation cell survival curve for U373MG cells and SPIONs-uptake U373MG cells with 0~5 Gy of proton beam irradiations. It is learned from the analysis of the experimental results that the SPION-uptake cells' radiation survival rate was more rapidly decreased as the irradiation dose increased. In conclusion we confirmed that SPIONs-uptake in U373MG cells induces cell death at the much less dose than the lethal dose of SPION-non-uptake cell. This research shows that the therapeutic efficacy of glioblastoma multiforme treatment in proton beam therapy can be improved by SPIONs targeting to the GBM cells.

Key Words : Proton beam, GBM, Cell toxicological evaluation, MTT assay, Cell survival curve, U373MG cell, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, SPIONs

요약

본 연구는 초상자성 산화철 나노입자 (SPIONs)의 세포독성평가 및 SPIONs를 uptake한 뇌신경교종 (glioblastoma multiforme, GBM) 세포의 방사선 세포생존곡선을 구하기 위해 수행되었으며, 본 연구의 결과는 양성자선과 SPIONs

이용한 GBM의 양성자선 치료선량 정보 등 양성자선 치료효과를 개선하기 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다. SPIONs의 세포독성을 평가는 in vitro 실험 후 MTT 분석법을 이용하여 수행하였다. 독성평가 결과 1~100µg/ml의 농도에서는 세포생존율의 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만 200µg/ml의 농도에서는 세포생존율이 74.2%로 감소하며 세포독성을 나타냈다. SPIONs가 uptake 된 U373MG세포와 uptake 되지 않은 U373MG세포에 0~5 Gy의 양성자선을 조사하여 각각에 대한 세포생존곡선을 측정된 결과를 분석하여 SPIONs가 uptake된 U373MG세포의 세포생존율이 더 급격히 감소함을 알 수 있었다. 결론적으로 SPIONs가 uptake 된 세포에서는 보다 적은 선량으로도 세포사멸을 유도할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 GBM에 SPIONs를 타겟팅하면 양성자선을 이용한 뇌신경교종 치료효과를 개선할 수 있음을 보였다.

중심단어: 양성자선, GBM, 세포독성평가, MTT분석법, 세포생존곡선, U373MG세포, 초상자성 산화철 나노입자, SPIONs

I. 서론

방사선치료기기의 발전과 선량평가 및 제어의 정확성에 대한 신뢰도가 높아지고, 방사선 생물학적 영향에 대한 실험적/경험적 연구결과들의 축적에 따라 비침습적 암 치료방법인 방사선치료의 빈도가 급격히 증가하고 있다. 양성자치료란 방사선치료의 하나로써 수소원자핵을 가속하여 얻은 고에너지 양성자선을 이용하여 암을 치료하는 비 침습적 방법이다. 양성자치료는 양성자 빔의 특성상 X선 치료 보다 정상조직의 방사선 손상 정도와 빈도를 경감시켜서 암 치료효과가 우수하다^[1]. 현재 방사선치료에 가장 많이 사용되고 있는 X선은 상당량의 에너지가 종양이 아닌 종양 전후에 위치한 정상조직에 전달되고 있다. 반면, 양성자선의 경우 양성자의 에너지는 인체 내부의 특정 깊이에서 최대 에너지를 전달하게 된다(Bragg peak)^[2]. 다시 말해서, 양성자선은 암 표적 부위에 도달하기 전까지 일반 정상조직에는 거의 방사선에너지를 전달하지 않기 때문에 정상 조직에서 나타나는 방사선부작용을 줄일 수 있다^[3].

나노기술(Nano Technology;NT)은 원자나 분자단위 정도의 작은 크기에서 물질을 합성하고, 특성을 제어하며 그 성질을 규정/규명하는 기술을 말한다. 특히 최근의 나노기술은 의료분야에서 진단학과 치료학의 혁명을 가능케 하는 theragnostics의 새로운 분야에 중요한 역할을 하고 있다^[4].

U373MG 세포는 human glioblastoma cell로서 glioblastoma multiforme (GBM)는 예후가 매우 나빠

서 평균생존기간이 12~14개월이며 거의 대부분 사망한다^[5]. 뿐만 아니라, U373MG 세포는 방사선감수성이 낮아서 다른 암세포에 비해 상당히 높은 치료선량이 필요하므로 X선을 이용한 방사선치료 시 주변 정상 뇌세포에 대한 손상이 불가피하다. 따라서 본 연구에서는 GBM에 대한 방사선치료 시 치료선량을 줄이고 치료효과를 개선하기 위한 방법으로 초상자성 산화철 나노입자와 양성자선을 이용하여 치료효과 개선에 대한 가능성연구를 수행하였다.

초상자성 산화철 나노입자에 양성자선이 조사되면 세포 내에서 추가적으로 Delta-ray, Characteristic X-ray, Auger electron 등 2차 방사선이 발생하여 세포 내 활성 산소의 증가, DNA의 손상 등이 발생하여 암세포의 생존율이 감소할 것이라 기대하였다^{[6],[7]}.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

본 연구에 사용된 U373MG 세포(신경교모세포종)는 한국세포주은행으로부터 분양받은 세포를 YUJIN Science&Medical사의 Cell Incubator에서 배양하여 사용하였다. 배양 시 incubator 내의 CO₂의 농도는 5 %, 온도는 37 °C를 유지하였다. 세포배양배지는 EMEM medium과 10 % Fetal Bovine Serum(FBS), 1 % penicillin/Strep Amphotericin b로 구성된 세포배양배지를 사용하였으며, 3일마다 새로운 배지로 교체하였다. 초상자성 나노입자를 U373MG 세포에 uptake 시키기 위하여 cell culture 과정 중 세포배양배지와 초상자성

나노입자를 혼합한 배지에 U373MG 세포를 풀어서 25T Flask에 배양하였다.

2. Colony formation assay

T25 Flask에 배양된 U373MG 샘플세포에 양성자선을 계획된 선량대로 조사한 후 colony formation assay를 이용하여 control 세포와 초상자성 산화철 나노입자가 uptake된 세포의 생존율을 비교하고 각 샘플의 치사선량을 측정하였다.

각 샘플에 심은 세포의 개수는 양성자선의 선량이 증가할수록 세포생존율이 감소함을 고려하여 0~2 Gy 선량에서는 100 개/Flask, 3~5 Gy 선량에서는 400개/Flask 등 고선량 샘플에 대해서는 더 많은 세포를 배양하였다. 각 샘플에 심은 세포의 수를 확인하기 위해 100Φ disk에 배양중인 U373MG 세포의 배지를 제거하고, PBS(Phosphate Buffered Saline)로 washing 후 1 ml trypsin(1X) 처리 후 37 °C, 5 % CO₂ Incubator에 2분간 보관하였다. Incubation 후 1ml의 세포배양배지를 혼합하여 3000RPM으로 3분간 원심분리한 후 cell counting chip을 사용하여 counting하였다.

계획된 선량에 대한 세포생존율 측정을 위해 각각의 샘플에 0~5 Gy 양성자선 조사 후 37 °C, 5 % CO₂ Incubator에서 일주일간 배양하여 colony가 형성될 수 있도록 하였다. Colony의 counting은 [그림 1]과 같이 microscopy로 확인하여 적어도 50개 이상의 cell을 포함하고 있는 colony만 측정하였다. Colony counting을 위해 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 3회washing 처리 후 Methyl alcohol을 각 25TFlask에 2 ml씩 15분간 처리하여 U373MG 세포 고정 후, wright stain으로 염색하였다.

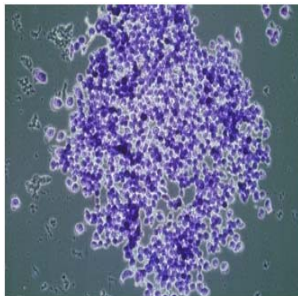


Figure 1. Optical microscopic image of proton beam irradiated U373MG colony after 1 week incubating (wright stained)

3. 초상자성 산화철 나노입자(SPIONs)

실험에 사용된 초상자성 산화철 나노입자의 농도는 OPERON사의 원심진공농축기 SVQ-120을 이용하여 용액을 증발시킨 후 Mettler Toledo 분석용 전자저울을 이용하여 측정하였으며, 제작된 조건에서의 stock solution의 농도는 9.387 µg/ml였다. 초상자성 산화철 나노입자의 크기와 모양은 Transmission Electron Microscopy(TEM)을 이용해 확인하였으며, [그림 2]에 보인 바와 같이 구형으로 직경이 대략 10 nm로 매우 균일 하였다. 실험에 사용하기 전까지 working solution은 4 °C에 냉장 보관하였다.

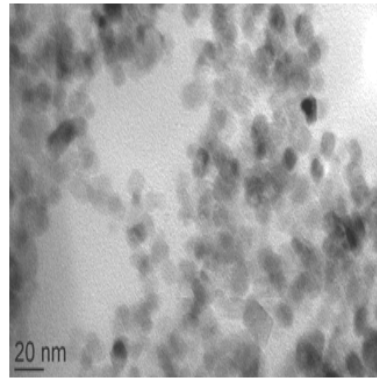


Figure 2. TEM image of synthesized SPIONs

4. MTT 세포독성검사

세포 uptake에 따른 초상자성 산화철 나노입자의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay에 의한 세포독성 검사를 실시하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 비수용성 기질인 MTT formazan3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다^[8]. MTT formazan의 흡광도는540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. U373MG 세포는 각각 농도가 다른 초상자성 산화철 나노입자가 혼합된 배지(10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml)에 배양되었다. U373MG 세포를 37 °C, 5 % CO₂ Cell Incubator에 6시간 동안 배양하고,

MTT formazan powder을 PBS(Phosphate Buffered Saline)에 1 mg/ml로 용해시켜 10 μ l/well에 넣어주었다. 2~3 시간동안 Incubation 후 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)로 U373MG세포를 녹여 ELISA reader를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. 양성자선 조사

양성자선 조사는 한국원자력의학원의 MC50 사이클로트론 장치를 이용하였다^[9]. 40 MeV 양성자선을 U373MG 세포만 배양된 샘플과 U373MG세포에 초상자성 산화철 나노입자가 uptake된 샘플에 조사하였다. 각각의 조사마다 조사야는 10 cm X10 cm로 일정하게 유지하였으며, 0~5 Gy선량을 1 Gy간격으로 각 선량마다 3개의 샘플을 조사하였다. U373MG세포는 다른 암세포에 비해 방사선감수성이 매우 낮으므로 정확한 세포생존곡선을 구하기 위해서는 10 Gy 이상까지의 조사선량에 대한 데이터가 필요하나 본 실험에서는 가용세포 및 배지 등의 부족으로 인하여 5 Gy까지만 측정하였다.

III. 결과

1. MTT assay를 통한 SPIONs의 독성검사

초상자성 산화철 나노입자의 농도를 다르게 설정하여 control group을 포함하여 6 group을 선정하였다. U373MG세포는96well Flate에 각각 1X104개씩 배양하였고, ELISA reader을 통해 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 측정하였으며 그 결과를 [표 1]에 나타내었다.

Table 1. MTT assay results at different SPIONs concentrations

농도 μ g/ml Group	Con	10	25	50	100	200
1	1.225	1.103	0.925	1.154	1.027	0.999
2	1.238	1.053	1.192	1.043	1.187	0.715
3	1.266	1.198	1.284	1.225	0.826	0.918
4	1.417	0.944	1.066	1.086	1.23	0.95
5	1.191	1.074	1.271	1.215	1.133	0.963
6	1.175	1.16	1.022	1.097	1.12	0.615
avg	1.252	1.089	1.127	1.137	1.087	0.860

초상자성 산화철 나노입자를 각각의 다른 농도로 U373MG세포에 Uptake시킨 후 MTT assay를 통해 독성검사를 실시한 결과, [그림 3] 및 [그림 4]에 나타낸 바와 같이 초상자성 산화철 나노입자의 농도가 증가할수록 세포의 생존율이 감소함을 확인하였다.

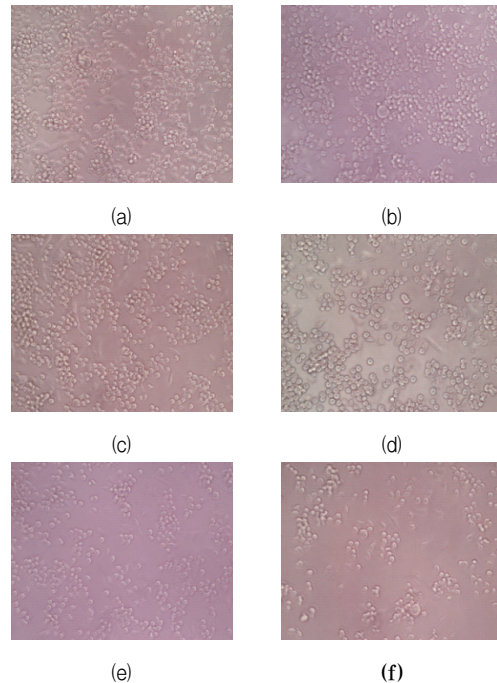


Figure 3. U374MG cell plating morphology with different SPIONs concentrations (a)Control (b)10 μ g/ml (c)25 μ g/ml (d)50 μ g/ml (e)100 μ g/ml (f)200 μ g/ml

초상자성 산화철 나노입자의 농도가 10 μ g/ml부터 100 μ g/ml까지는 세포생존율의 유의한 차이가 없었다. 하지만, 200 μ g/ml의 농도에서는 세포 생존율이 74.2%로 감소하며 세포독성을 나타냄을 확인하였다

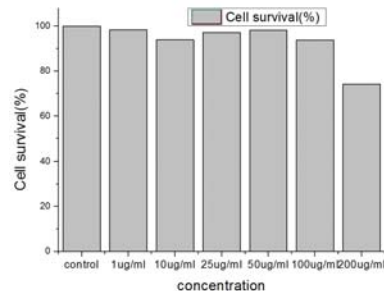


Figure 4. The probability of U373MG cell survival at different SPIONs concentration

2. 양성자선 조사 후 U373MG controlgroup과 SPIONs를 uptake한 U373MG group의 세포생존율 비교

방사선세포생존곡선 측정을 위한 샘플의 배양세포 수 및 plating efficiency에 대하여 [표 2]에 나타내었다. Control group인 U373MG세포만 배양한 샘플의 plating efficiency는 100 개/Flask에서 23.8 %, 400 개/Flask에서 21.4 %로 평균 plating efficiency가 22.6 %로 측정되었고, SPIONs가 uptake된 U373MG세포 샘플의 Plating efficiency는 100 개/Flask에서 29.1 %, 400 개/Flask에서 26.8 %로 평균 plating efficiency가 27.9 %로 측정되었다.

Table 2. The probabilities of U373MG cell at different irradiation doses

구분 선량(Gy)	U373MG (개/well)		U373MG+SPIONs (개/well)	
Control	100	400	100	400
PE(Plating efficiency)	23.8	21.4	29.1	26.8
1	100		100	
2	100		100	
3	400		400	
4	400		400	
5	400		400	

모든 샘플을 37 °C, 5 % CO₂ Cell Incubator에 24시간 배양하고, MC50 사이클로트론을 이용하여 0~5 Gy의 양성자선을 1 Gy씩 증가시켜 조사한 후 37 °C, 5 % CO₂ Cell Incubator에 일주일간 세포배양배지 교체없이 배양하였다. 일주일 후 배지를 모두 제거하고, colony 수를 측정하였다. 측정결과는 [표 3] 및 [그림 5]에 보인 바와 같이 대조군에 비해 양성자 선량이 증가할수록 생존확률이 감소됨을 알 수 있었다. 특히, SPIONs가 uptake된 U373MG세포의 경우 대조군에 비해 생존률이 더 급격하게 감소됨을 볼 수 있었다. U373MG control group과 SPIONs를 uptake한 U373MG group 모두 5 Gy에서 세포생존율이 0.25±0.01, 0.16±0.02로 급격하게 감소하는 것을 관찰하였다.

Table 3. The probabilities of SPIONs-uptaken cell survival as the irradiation dose increased.

SF 선량(Gy)	U373MG (개/well)	U373MG+SPIONs (개/well)
Control	1	1
1	0.86 ± 0.04	0.72 ± 0.01
2	0.78 ± 0.02	0.60 ± 0.01
3	0.67 ± 0.02	0.44 ± 0.02
4	0.49 ± 0.02	0.37 ± 0.02
5	0.25 ± 0.01	0.16 ± 0.02

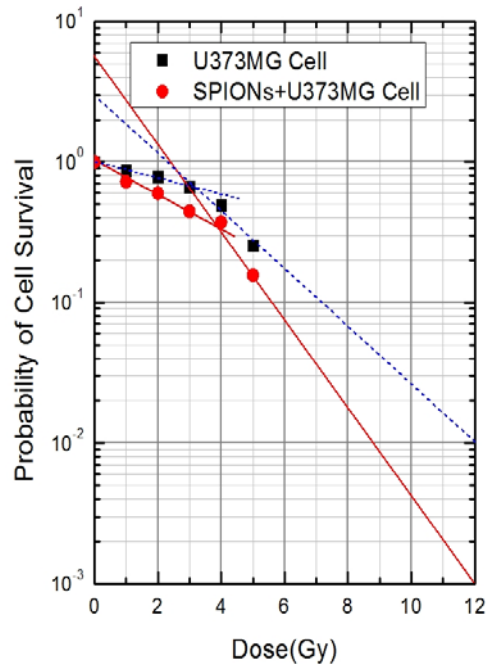


Figure 5. Cell survival curves of normal U373MG cell and SPIONs-uptaken U373MG cell

IV. 고찰

본 연구의 목표는 기존 양성자선 암 치료효과를 개선하기 위해 최근 BT, NT의 학제간 융합연구 분야로 주목받고 있는 나노메디신 (Nanomedicine)의 한 분야인 초상자성 나노입자를 이용하여 양성자의 방사선생물학적 효과를 극대화하고, 양성자선을 이용하여 초상자성 나노입자의 치료효과 개선도 확인 및 치료기작 규명에 있다.

초상자성 산화철 나노입자의 독성평가를 위하여 MTT assay를 실시한 결과, 특정 농도(200 µg/ml) 이상

의 농도에서 독성이 있음을 확인하였다. 나노입자는 모양, 크기, 형태에 따라 생물학적 독성이 생길 수 있기 때문에 독성실험을 통해 In vitro 실험에 적정한 농도를 100 µg/ml로 설정하였다^[10].

암조직이나 배양세포는 방사선에 의해 세포핵과 세포질이 직접적으로 손상을 받게 된다. 특히 지방산이 분해되어 MDA(malonic Dealdehyde)를 생성하게 되는데, MDA는 DNA에 가교를 형성한다. 뿐만 아니라 방사선에 의하여 DNA-핵막 복합체의 해리 및 형성의 저해가 관찰되고 있으며, 이것은 DNA 합성능력의 저하로 나타나게 된다^[11].

양성자가 물질 내에 조사되면, 양성자는 대부분의 에너지를 물질을 구성하고 있는 원자의 궤도전자와 충돌하여 잃어버리게 된다. 양성자는 물질과 상호작용 후 Delta-ray, Characteristic X-ray (Particle induced X-ray emission), Auger electron과 같은 2차 방사선을 발생하게 된다. 따라서 U373MG 세포 내에 uptake 되어 있는 초상자성 산화철 나노입자가 양성자선과 상호작용하여 발생된 2차 방사선이 세포의 사멸을 증가시키는 것으로 판단된다.

0~5 Gy 양성자선을 초상자성 산화철 나노입자를 uptake 시킨 U373MG 세포와 U373MG 세포만 배양되어 있는 Flask에 조사 후 측정된 결과를 그림 1에서 보인 바와 같이 고선량에 대해 외삽해서 그 결과를 추정하면, 12 Gy에서는 초상자성 산화철 나노입자를 uptake 시킨 Flask의 세포생존율이 약 10 배 더 감소될 것을 예상할 수 있으며, 생존율 0.01에 필요한 선량을 약 3/4로 낮출 수 있을 것으로 예상된다.

초상자성 산화철 나노입자를 uptake 시킨 암세포에 의 세포생존율이 더 감소한 이유는 양성자선에 의해 직접적인 세포의 사멸이 발생할 뿐만 아니라, 양성자선과 초상자성 산화철 나노입자의 상호작용에 의해 발생된 Delta-ray, Characteristic X-ray (Particle induced X-ray emission), Auger electron과 같은 2차 방사선에 의해 추가적으로 DNA 손상, 세포 내 활성산소가 증가하기 때문으로 추정되며 이에 대한 규명을 위해 더 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

V. 결론

개발된 초상자성 산화철 나노입자는 특정 농도(200 µg/ml) 이하에서는 세포독성이 없음을 MTT assay를 실시한 결과로 확인하였고, 초상자성 산화철 나노입자가 uptake 된 U373MG 세포에 양성자선을 조사하였을 때, U373MG 세포만 배양된 세포에 비해 세포사멸이 증가하여 세포생존율이 더 감소된다는 것을 확인하였다. 따라서 양성자선을 이용한 뇌암 치료 시 초상자성 나노입자를 이용하는 것이 치료효과개선을 위해 효과적임을 확인하였다.

이 실험의 결과를 임상에 적용하기 위해서는 초상자성 산화철 나노입자의 크기에 따른 세포의 독성검사와 고선량 조사 시 세포생존율의 변화에 대한 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것이며, 종양표적화를 위한 초상자성 나노입자와 종양발현물질항체(antibody)의 conjugation 등 생화학적 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것이다.

참고문헌

- [1] Barbara Alicja jereczek-Fossa MD, PhD Marco Krengli MD, Roberto Orecchia MD, "Particle beam radiotherapy for head and neck tumors: Radiobiological basis and clinical experience", HEAD&NECK, Vol. 28, pp.750-760, 2006
- [2] Paola Scampoli, "Biological effects of accelerated protons", Heavy Charged Particles in Biology and Medicine, Vol. 73, pp.S130-S133, 2004.
- [3] 김대용, 박성용, Proton Beam Therapy, 대한의사협회지, Vol. 51, No. 7, pp.638-642, 2008.
- [4] Xuan Phuc Nguyen, "Iron oxide-based conjugates for cancer theragnostics", IOP Science, Vol. 3, pp.13, 2012.
- [5] Van Meir, E. G.; Hadjipanayis, C. G.; Norden, A. D.; Shu, H. K.; Wen, P. Y.; Olson, J. J. "Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma". CA: A Cancer Journal for Clinicians Vol. 60, No. 3, pp. 166-193, 2010
- [6] W.Rueter, A.Lurio, E.Cardone and J.F.Ziegler, J. of Applied Physics, Vol. 46, pp.3194, 1975.
- [7] Jong-Ki Kim, Seung-Jin Seo, Ki-Hong Kim, Tae-Jeong Kim, Myung-Hwan Chung, Kye-Ryung Kim, and Tae-Keun Yang, "Therapeutic application of metallic nanoparticles combined with

-
- particle-induced x-ray emission effect", *Nanotechnology* Vol. 21 pp.425102~425112, 2010
- [8] Berridge MV, Tan As, "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 303, pp.474-482, 1993.
- [9] <http://mc50.kirams.re.kr>
- [10] JM Hillegass, "Assessing nanotoxicity in cells in vitro", *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, Vol. 2, pp.219-231, 2010.
- [11] KM Prise, G Schettino, M Folkard, KD Held, "New insights on cell death from radiation exposure", *The Lancet Oncology*, Vol. 6, pp.520-528, 2005