

# In vitro에서 그래핀의 독성 연구 동향

성균관대학교 나노소재기반 휴먼인터페이스 융합  
연구센터 선임 연구원  
윤 옥자

# 1. 서론

- Carbon nanomaterials의 독성 연구는 지난 수년간 CNTs(carbon nanotubes), fullerene, CB(carbon black), AC(activated carbon)에 대하여 보고되었으며, 이러한 Carbon nanomaterials의 안전성 연구와 관련된 국제표준화는 국제표준화 기구인 ISO의 나노기술위원회(TC229)에서 적극적인 참여로 이루어지고 있다<sup>1</sup>.
- 최근 신소재로 각광받고 있는 2차원의 탄소 동소체인 그래핀은 특이한 물리적, 화학적 성질과로 인한 electronics<sup>2</sup>, biodevice<sup>3</sup>, solar-energy harvesting<sup>4</sup> 와 light-weight displays<sup>5</sup>의 기술발전을 기대하고 있다.
- 또한, 그래핀과 그래핀 산화물은 bacterial inhibition<sup>6</sup>, drug delivery<sup>7</sup> 과 anti-cancer therapy<sup>8</sup>등 바이오 응용에도 주목을 받고 있다.
- 따라서, in vitro와 in vivo에서 그래핀과 그래핀 산화물의 세포독성과 biological activity에 대한 연구보고에 따른 다양한 바이오 응용 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 본 정보는 in vitro에서의 그래핀과 그래핀 산화물의 독성연구에 대한 최신 기술 동향에 대해 기술 하고자 한다.

## 2. 그래핀과 그래핀 산화물의 독성 연구

➤ Zhang *et al.*은 동일한 탄소구조체이지만 모양이 다른 그래핀과 SWCNTs를 neural pheochromocytoma-derived PC12 cells에 농도를 증가시켜 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리했을 때 mitochondrial toxicity는 낮은 농도에서 SWCNTs가 그래핀 보다 독성이 강했으며 높은 농도에서는 그래핀이 독성이 강했다.

lactate dehydrogenase release는 그래핀은 변화가 없었으나 SWCNTs를 처리했을 때 일어났다. 또한, caspase 3 activity (apoptosis marker)와 ROS generation은 그래핀의 농도와 시간에 따라 증가됨을 보고하고있다. 결과적으로 CNTs보다 그래핀이 낮은 독성을 보였고, 세포독성이 그래핀이나 CNTs의 농도, 모양 그리고 노출 시간에 관계한다고 보고하고 있다<sup>9</sup>.

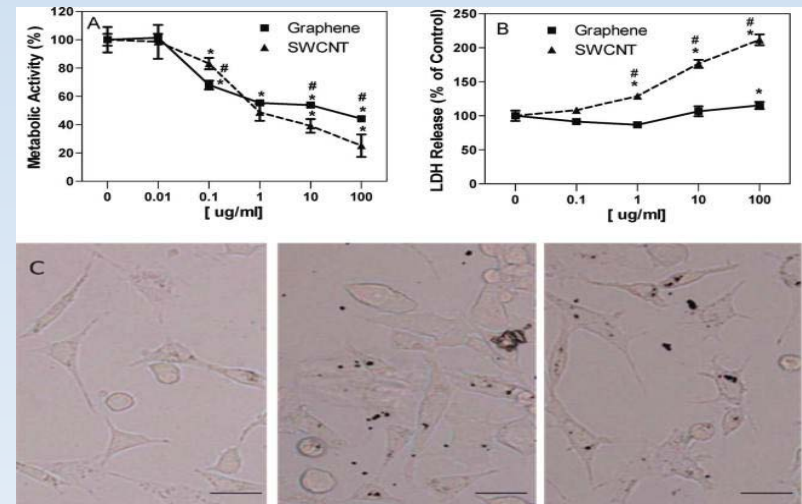
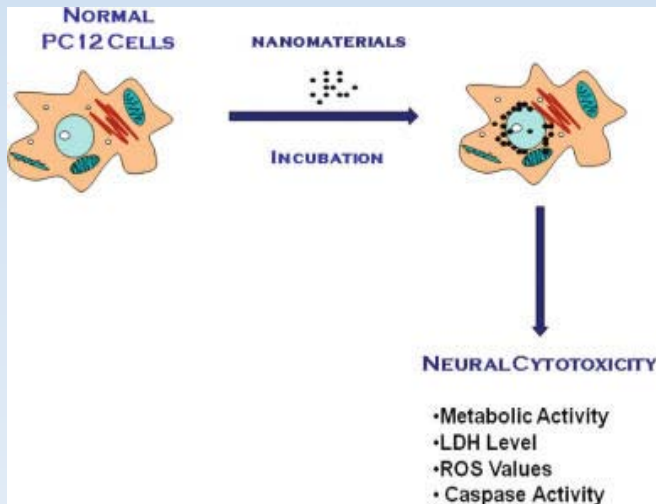


Fig. 1. Schematic diagram showing the experimental conditions under which the shape of the raphitic nanomaterials (G and SWCNT) was investigated for the corresponding induced cytotoxic effects.

Fig. 2. Effect of G or SWCNT on (A) mitochondrial toxicity and (B) LDH release (cell membrane damage marker). (C) Morphology change of PC12 cells: left, control; middle, G; right, SWCNT. Bar = 10 $\mu\text{m}$ .

Wang *et al.* 는 그래핀 산화물이 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 이상에서 human fibroblast cells의 세포 독성, cell floating, apoptosis를 일으켜 세포 부착력이 감소하였고 cytoplasm과 nucleus 안에 들어가는 것을 확인하였다. 결과적으로 그래핀 산화물을 *in vivo*에 적용하기에는 이러한 문제를 제어하는 것이 중요하다고 보고하고 있다<sup>10</sup>.

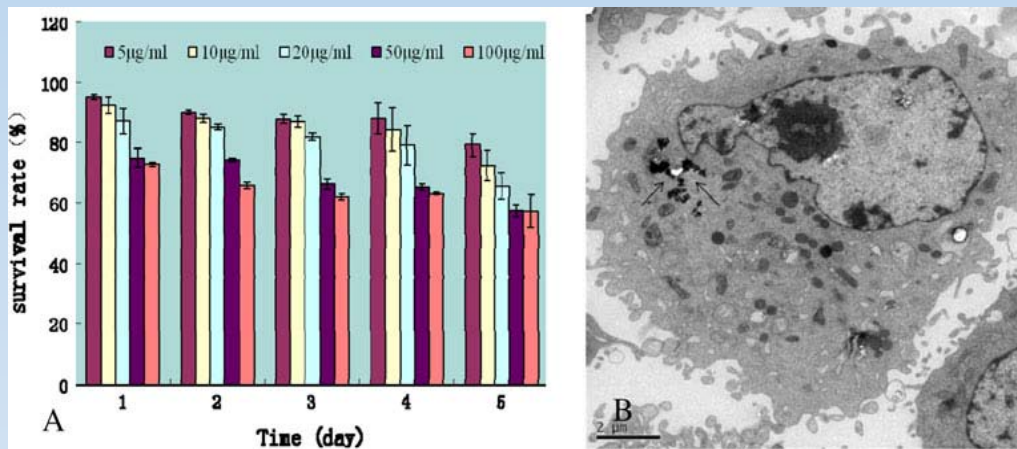


Fig. 1. Effects of GO on human fibroblast cells:

(a) the HDF survival rate at different concentrations of GO and different culture time,

(b) TEM picture of location of GO inside HDF cells as shown by the arrows.

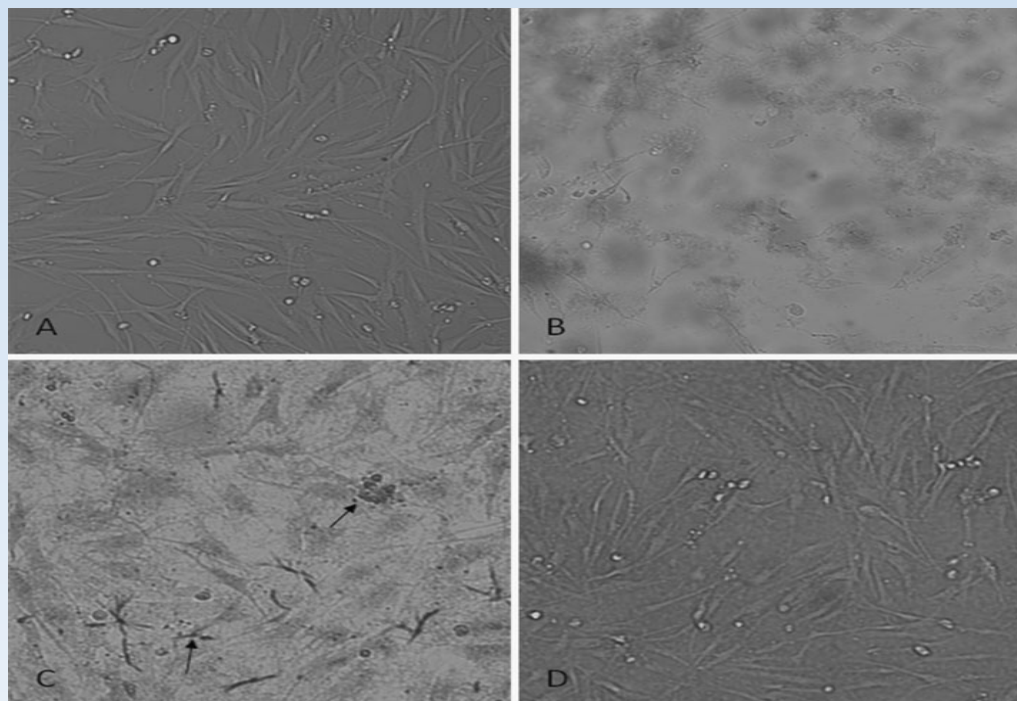
Fig. 2. Apoptosis of HDF cells induced by GO:

(a) normal HDF cells, showing normal morphological cells,

(b) morphological changes of HDF cells cultured with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GO for 1 day, cells appear inner vacuole and apoptotic bodies showing apoptotic characteristics,

(c) morphology of HDF cells cultured with 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GO for 3 days, showing cell have unclear boundary, membrane vesicles and fragmentation, the arrow showing apoptotic cells formed nodular structure encapsulating GO,

(d) morphology of HDF cells cultured with 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GO for 5 days, showing normal cell morphology.



- Hu *et al.* 은 A549 cells에 그래핀 산화물을 처리했을 때 그래핀 산화물의 농도가 85 $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상에서 약간 세포 증식이 감소하고 oxidative stress가 생기기는 했으나 apoptosis나 cell death가 일어나지 않았고 reduced 그래핀 산화물 (RGO)은 같은 조건에서 세포독성이 두드러지게 나타났음을 보고했다.  
또한, 그래핀이나 그래핀 산화물은 E. coli bacteria의 성장을 억제했음을 보고했다<sup>11</sup>.

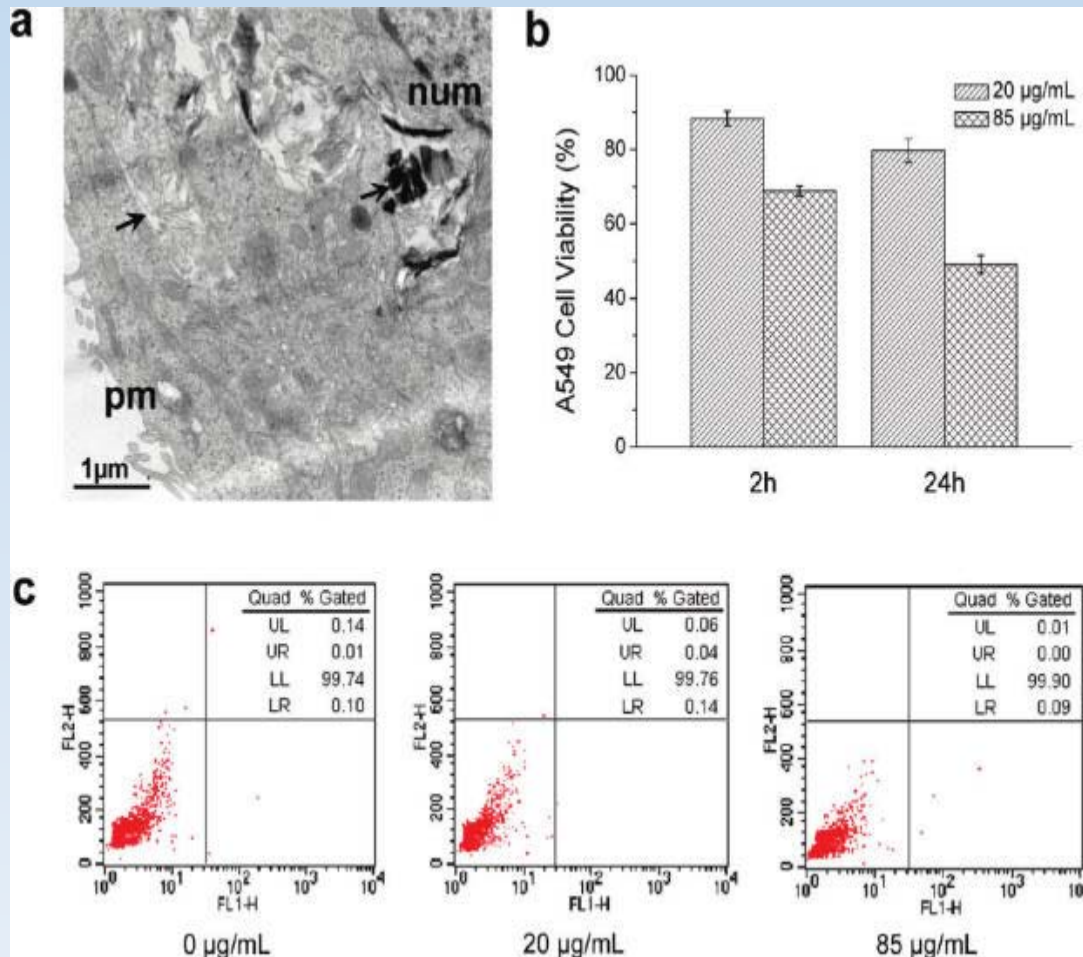


Fig. 1. Cellular uptake and cytotoxicity of GO nanosheets.

- (a) TEM images of A549 cells incubated with 85  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GO nanosheets for 6 h. GO nanosheets were internalized in A549 cells (indicated by arrows). "pm" and "num" stand for plasma membrane and nuclear membrane. The light-colored parts marked with an arrow were ascribed to single- or few-layer GO sheets, while the black parts were GO aggregates.
- (b) Viability of cells incubated with 20 and 85  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GO nanosheets for 2 h and 24 h.
- (c) Distribution of A549 cells without GO nanosheet treatment (left) and treated with 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (middle) and 85  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (right) GO for 24 h.

➤ Changa *et al.* 은 A549 cells에 그래핀 산화물을 처리했을 때 그래핀 산화물의 높은 농도 (200 $\mu\text{g}/\text{ML}$ )에서 세포 증식이 감소하고 oxidative stress 가 생기기는 했으나 세포 안으로 그래핀 산화물이 들어가지 않았으며 apoptosis나 cell death 일어나지 않았고 세포 독성은 높은 농도에서 그래핀 산화물의 크기에 따라 나타났는데 크기가 큰 그래핀 산화물이 biocompatibility가 좋아졌다고 보고하고 있다<sup>12</sup>.

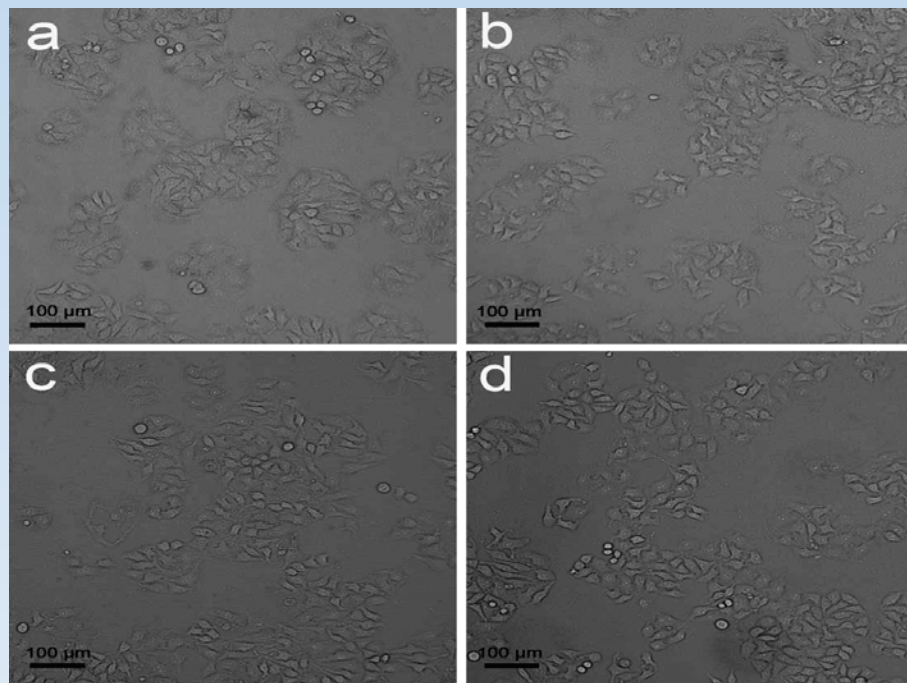


Fig. 1. Optical microscopy images of GO-treated A549 cells.

(a) I-GO; (b) s-GO; (c) m-GO; the control

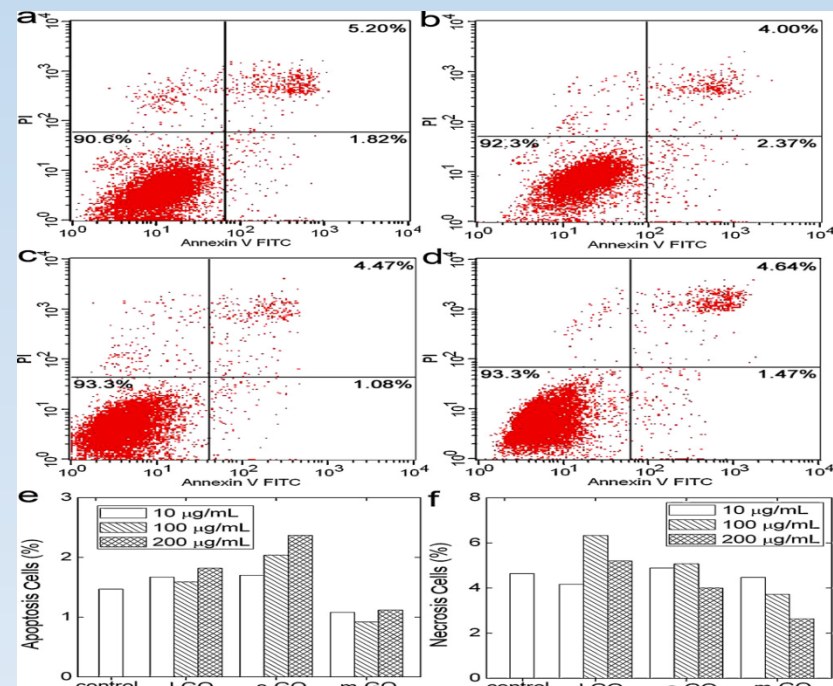


Fig. 2. FACS results of the Annexin V-FITC and PI assay.

(a-d) Scatter diagrams of cells exposed to 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$  of I-GO (a), s-GO (b), m-GO (c) and the negative control (d).

(e and f) The summary of the apoptosis rate (e) and necrosis rate (f) of A549 cells after exposed to GO for 24 h.

# 4. 기능화된 그래핀과 그래핀 산화물의 독성연구

- Sasidharan *et al.*은 표면에 소수성 성질을 가진 그래핀과 친수성 성질을 가진 그래핀의 biological systems에서 상호작용관계를 입증하였는데 소수성 성질을 가진 그래핀 (pristine graphene)이 cell membrane 위에 large accumulation이 생기면서 apoptosis 를 일으키는 intracellular ROS의 원인이 됨을 보였고, 반면에 carboxyl functionalization(f-G) 한 소수성 그래핀 산화물은 어떤 독성도 유발되지 않았음을 보고했다<sup>13</sup>.

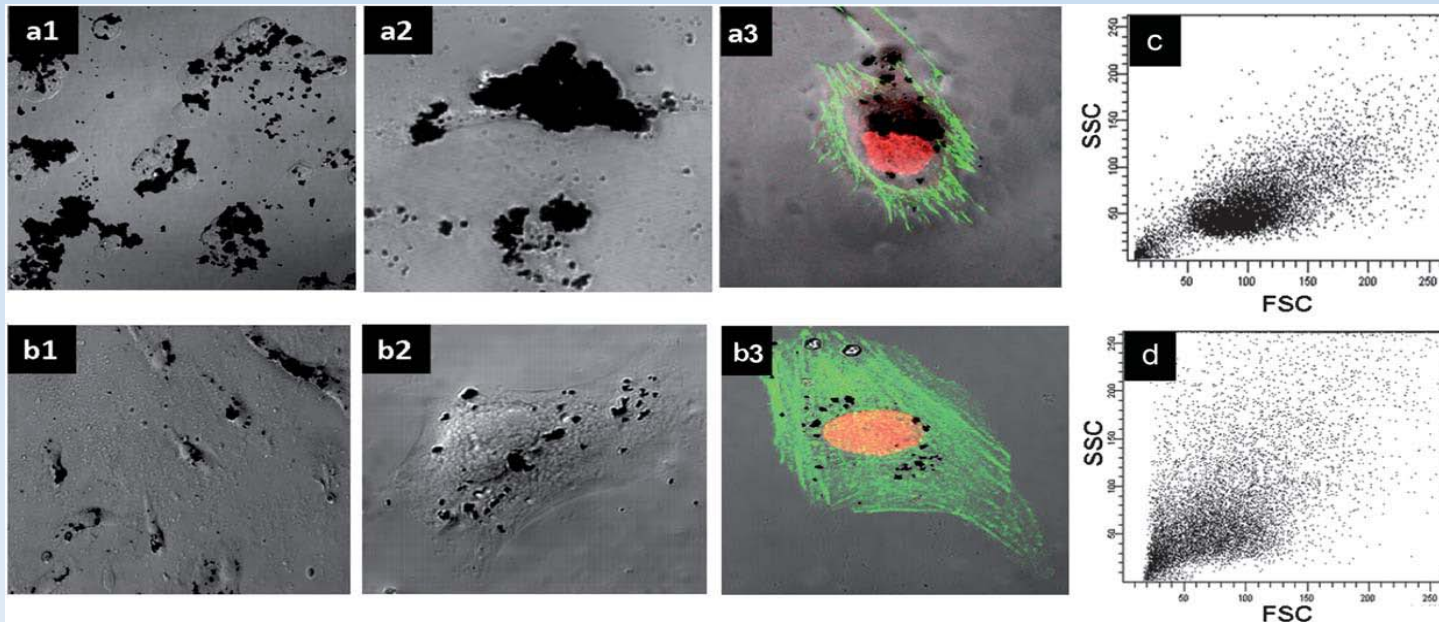


Fig. 1. Confocal and flow cytometry data depicting differential uptake of p-G and f-G in Vero cells. (a1 and a2) Differential interference contrast (DIC) images showing the accumulation of p-G on plasma membrane of Vero cells. (b1) and (b2) showing the intracellular uptake of COOH-functionalized graphene (f-G). Fluorescence confocal microscopy of cytoskeletal F-actin arrangement of cells treated with p-G (a3) and f-G (b3). Flow cytometry data showing an increase in forward scattering in (c) p-G treated cells and increase in side scattering in (d) f-G treated cells. [Forward scatter (FSC) correlates to the size of the cells and side scatter (SSC) depends on the inner complexity of the cells.]

➤ Zhang *et al.*은 biocompatible polymer인 dextran (DEX)를 그래핀 산화물 표면에 공유결합으로 기능화하였으며 그래핀 산화물과 비교하여 세포 독성 실험에서 독성이 감소되었음을 입증하였고 *in vivo* 실험을 통하여 GO-DEX가 안전함을 보고하였다<sup>14</sup>.

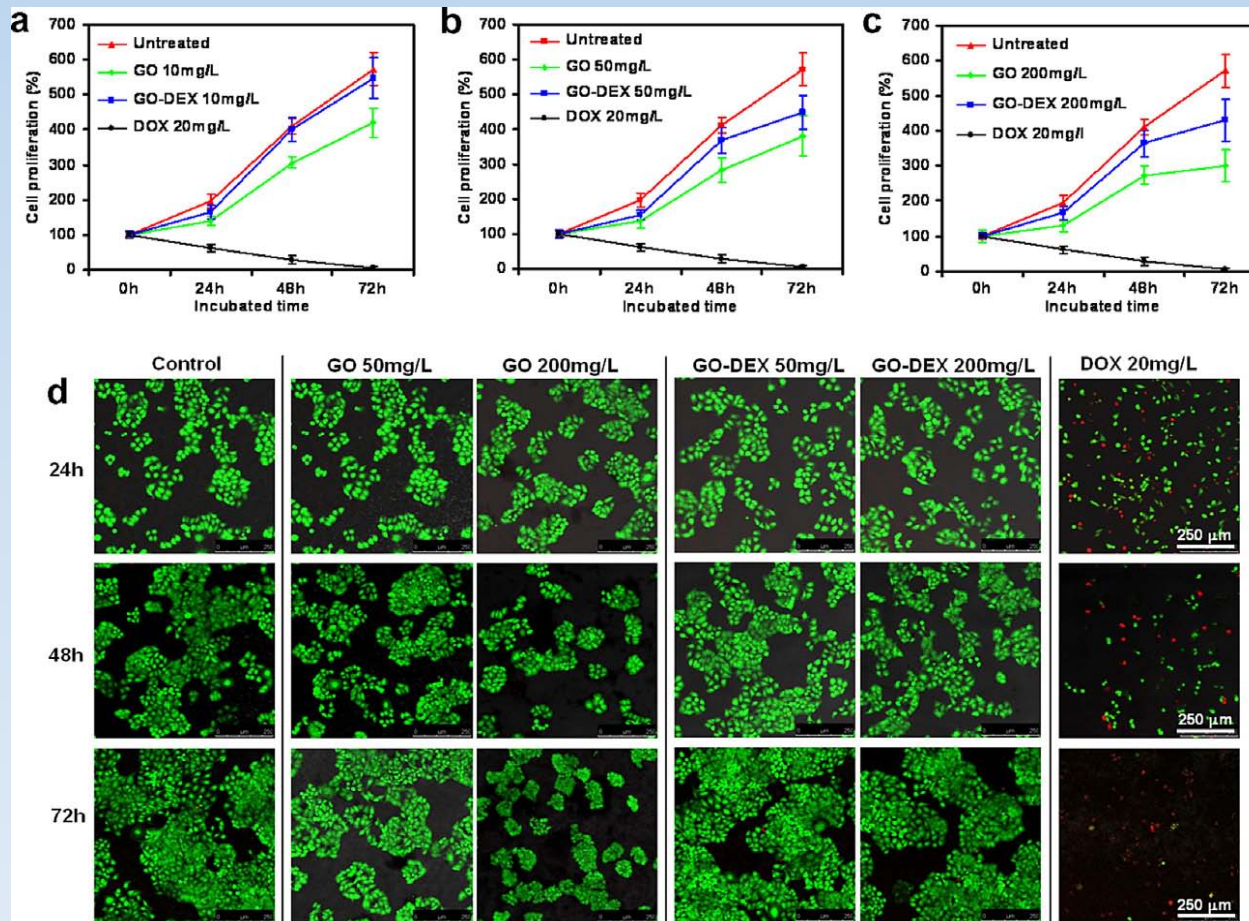


Fig. 1. In vitro cell proliferation and toxicity assays. (a-c) The proliferation of HeLa cells in the presence of 10 mg/L (a), 50 mg/L (b) and 200 mg/L (c) of GO or GO-DEX. DOX at 20mg/L was used as the positive control. The relative cell proliferation was determined by cell counting. Standard deviations were based on five parallel samples. (d) Confocal fluorescence images of Calcein M/PI stained HeLa cells 24, 48 and 72 h after various treatments indicated. Live and dead cells were stained by Calcein AM (green fluorescence) and PI (red fluorescence), respectively.



## 5. 결론

- 나노 물질인 그래핀은 NT, IT, BT와 함께 미래를 주도할 핵심소재기술이지만, 바이오에 응용하기 위해서는 인체 및 환경에 미치는 위험성에 대한 예측 및 예방연구가 필수적이며, 따라서 안전성 확보를 위하여 그래핀이 바이오 환경에서의 독성연구는 매우 중요한 결과이다.
- 최근 2-3년간 보고되고 있는 그래핀과 그래핀 산화물의 독성연구 결과로 비추어 볼 때, 그래핀 산화물 보다 그래핀이 세포 독성이나 세포사가 더 큼을 보고하고 있고 기능화한 그래핀이나 그래핀 산화물의 안전성과 biocompatibility를 보고하고 있다.
- 또한 그래핀과 그래핀 산화물은 bacterial membrane에 손상을 주고 증식이 억제된다고 보고하고 있다.
- 이러한 결과는 세포 독성이 그래핀이나 그래핀 산화물의 physicochemical properties에 의한 size, surface charge, particulate state, surface functional groups, 그리고 residual precursors 등에 영향을 받고 있으므로 적절한 제어와 기능화를 한다면 다양한 biomedical 응용에 도움이 될 것이다.

## 6. 참고문헌

1. M. UO, T. AKASAKA, F. WATARI, Y. SATO and K. TOHJI, "Toxicity evaluations of various carbon nanomaterials", *Dental Materials Journal*, 30, 245 (2011)
2. C. N. R. Rao, A. K. Sood, K. S. Subrahmanyam, A. Govindaraj, "Graphene: The New Two-Dimensional Nanomaterial", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 7752 (2009)
3. N. Mohanty, V. Berry, "Graphene-based Single-bacterium Resolution Biodevice and DNA Transistor: Interfacing Graphene Derivatives with Nanoscale and Microscale Biocomponents", *Nano Lett.*, 8, 4469 (2008)
4. C. X. Guo, G. H. Guai, C. Ming, "Graphene Based Materials: Enhancing Solar Energy Harvesting", 1, 448 (2011)
5. A. K. Geim. "Graphene: Status and Prospects", *Science*, 324, 1530 (2009).
6. O. Akhavan and E. Ghaderi, "Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria", *ACS NANO*, 4, 5731 (2010)
7. X. M. Sun, z. Liu, K. Welscher, K *et al.* "Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery", *Nano Res.* 1, 203 (2008)
8. L. M. Zhang, J. G. Xia, Q. H. Zhao, L. W. Liu, Z. J. Zhang, "Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs", *Small*, 6, 537 (2010)
9. Y. Zhang, S. F. Ali, E. Dervishi, Y. Xu, Z. Li, D. Casciano, and A. S. Biris, "Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells", *ASC NANO*, 4, 3181 (2010)
10. K. Wang, J. Ruan, H. Song, J. Zhang, Y. Wo, S. Guo, D. Cui, "Biocompatibility of Graphene Oxide", *Nanoscale. Res. Lett.*, 6, 8 (2011)
11. W. Hu, C. Peng, W. Luo, M. Lv, X. Li, D. Li, Q. Huang and C. Fan, "Graphene-Based Antibacterial Paper" *ASC NANO*, 4, 4317 (2010)
12. Y. Chang, S.-T. Yang, J.-H. Liu, E. Dong, Y. Wang, A. Cao, Y. Liu, H. Wang, "In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells", *Toxicology Letters*, 200, 201 (2011).
13. A. Sasidharan, L. S. Panchakarla, P. Chandran, D. Menon, S. Nair, C. N. R. Rao and M. Koyakutty, "Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene", *Nanoscale*, 3, 2461 (2011)
14. S. Zhang, K. Yang, L. Feng, Z. Liu, " In vitro and in vivo behaviors of dextran functionalized Graphene", *C A R B O N*, 4 9, 4040 ( 2 0 1 1 )