

In vivo에서 그래핀의 독성 연구 동향

성균관대학교 나노소재기반 휴먼인터페이스 융합
연구센터 선임 연구원
윤 옥자

1. 서론

- 다방면에 유용한 나노 물질들의 공통된 특징은 세포막이나 뇌혈막(**blood-brain barrier**)을 통과 할 수 있어 표적 지향형 약물 전달과 질병 치료에 응용될 수 있으나 의도하지 않는 인체 및 환경에 위해성을 초래하고 있어 미국 환경청(**EPA: Environmental Protection Agency**)은 나노 기술이 주는 환경 보호와 같은 긍정적인 이점을 확고히 하고 동시에 나노 물질의 환경 노출시 가져올 수 있는 잠재적 위험성을 인식하고자 나노 기술 백서에 환경 정책 결정을 위한 나노 기술에 관한 과학적 정보를 제공하고 있다 ¹.
- 최근 신소재로 각광받고 있는 2차원의 탄소 동소체인 그래핀은 특이한 물리적, 화학적 성질과로 인한 **electronics**², **biodevice**³, **solar-energy harvesting**⁴ 와 **light-weight displays**⁵의 기술발전을 기대하고 있다.
- 또한, 그래핀과 그래핀 산화물은 **bacterial inhibition**⁶, **drug delivery**⁷ 과 **anti-cancer therapy**⁸등 바이오 응용에도 주목을 받고 있다.
- 따라서, **in vitro**와 **in vivo**에서 그래핀과 그래핀 산화물의 세포독성과 **biological activity**에 대한 연구보고에 따른 다양한 바이오 응용 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 본 정보는 **in vivo**에서의 그래핀과 그래핀 산화물의 독성연구에 대한 최신 기술 동향에 대해 기술 하고자 한다.

2. 그래핀과 그래핀 산화물의 독성 연구

➤ **Wang et al.** 은 그래핀 산화물의 **biocompatibility**를 조사하기 위해 쥐의 꼬리에 있는 정맥 (**tail vein**)에 **0.1mg, 0.25mg** 정도를 투여했을 때, 독성이 관측되지 않았으나 **0.4mg** 이상을 투여했을 때 **9마리 중 4마리**가 죽고, 국소적으로 폐질환인 폐 육아종 (**lung granuloma**)이 형성되었으며 그래핀 산화물의 **flake-shapes** 때문에 신장 (**kidney**)의해서 배출되지 않았음 보이고 있음. 낮은 농도의 그래핀 산화물에 대해서는 폐 (**lung**), 간 (**liver**), 비장 (**spleen**), 신장 (**kidney**)에서 오랫동안 독성 없이 내성이 생겼으며 높은 농도에서는 기관의 손상과 죽음을 초래했다고 보고함⁹.

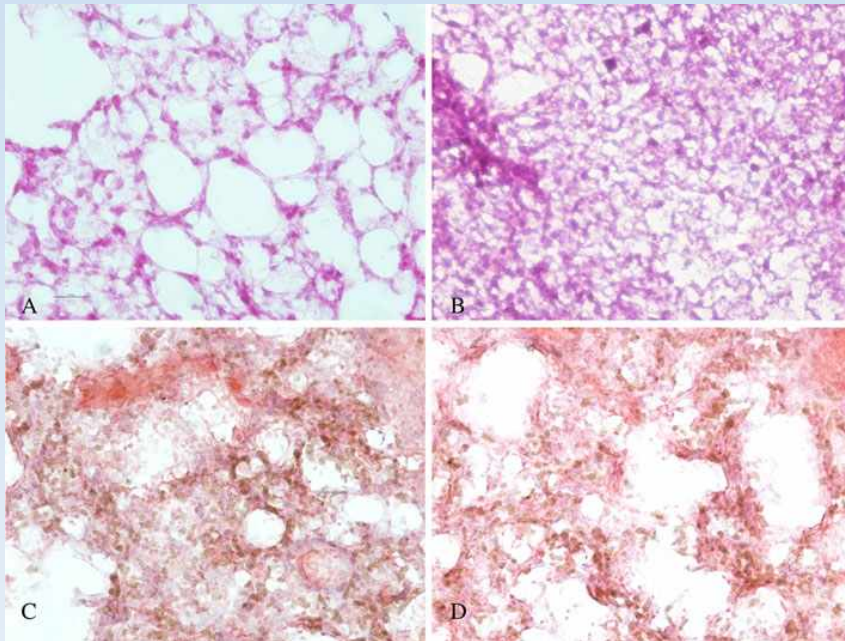


Figure 1. The light micrograph of lung tissues about rats exposed to different dose graphene sheets for 7 days: a control: 0 mg, b 0.1 mg, c 0.25 mg, d 0.4 mg (magnification = ×200).

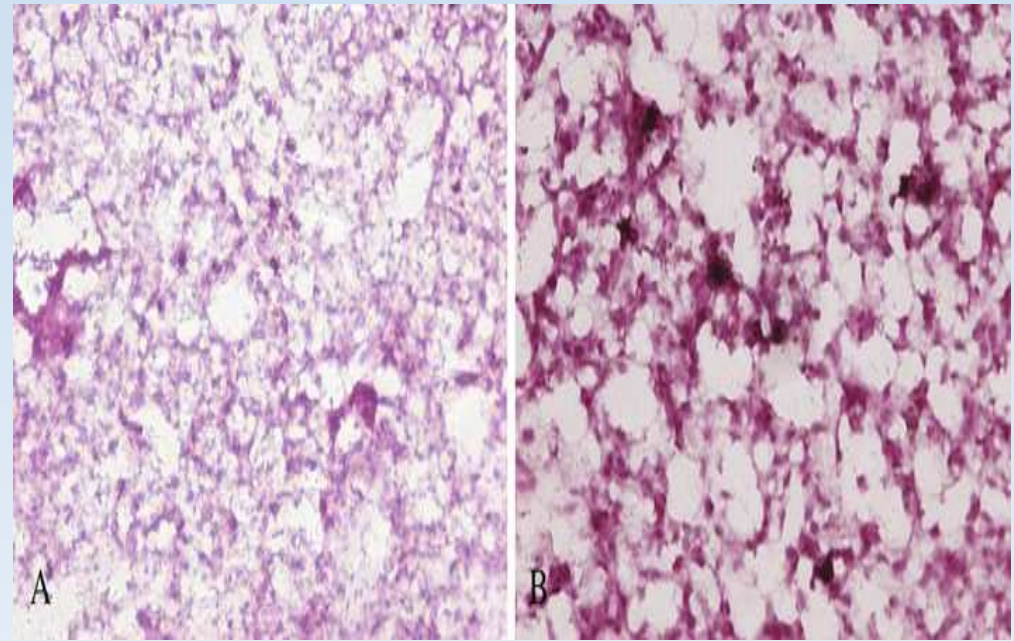


Figure 2. The light micrograph of lung tissues from mice exposed to GO of 0.1 mg at different exposure time: a 7 days, b 30 days (magnification = ×200).

3. 기능화된 그래핀과 그래핀 산화물의 독성연구

- 기능화된 그래핀의 **in vivo tumor uptake** 효과와 **photothermal therapy**에 관한 보고로(Yang *et al.*) 현광을 붙인 **polyethylene glycol (PEG)**를 그래핀에 코팅하여 (**NGF-PEG**) 이종이식 종양 모델(**xenograft tumor mouse model**)에 정맥 내 주사를 했을 때 **tumor uptake**의 현광 이미지를 얻었고 높은 **tumor passive targeting**과 세망내피계 (**reticuloendothelial systems**)에서 낮은 농도를 보이는 흥미로운 **in vivo behaviors**를 보고하고 있음. 또한 **NGF-PEG**를 투입하고 낮은 전력의 **NIR laser**를 투사하였을 때 성공적으로 **tumor**가 줄어드는 **in vivo photothermal therapy**를 입증함¹⁰.
- 더 나아가 이 연구자들은 쥐에 방사선 동위원소를 붙인 **NGF-PEG**(¹²⁵I-labeled **NGF-PEG**)를 정맥 주사하여 체내 약물 동력학(**in vivo pharmacokinetics**), 오랜 시간 동안 조직이나 **biological system**에서의 분포(**long-term biodistribution**) 그리고 독성에 대하여 보고하고 있는데 ¹²⁵I-labeled **NGF-PEG**는 간(**liver**)과 비장(**spleen**)을 포함한 세망내피계 (**reticuloendothelial systems**) 안에 축적되어 있다가 점차적으로 신장의 배뇨와 배설물로 배출됨을 확인함으로써 **in vivo pharmacokinetics**과 **long-term biodistribution**를 확인하였음. 또한 혈액의 생화학적 분석(**blood biochemistry**), 혈액학적 분석(**hematological analysis**) 그리고 조직학적 검사(**histological examinations**)를 통하여 20 mg/kg 정맥 주사한 후 3개월 까지 쥐에서 주목할만한 독성이 보여지지 않았음을 보고함. 그러나 그래핀의 크기에 따른 **in vivo behaviors**는 매우 중요하고 앞으로 연구 해야 할 과제를 제시하고 있음¹¹.

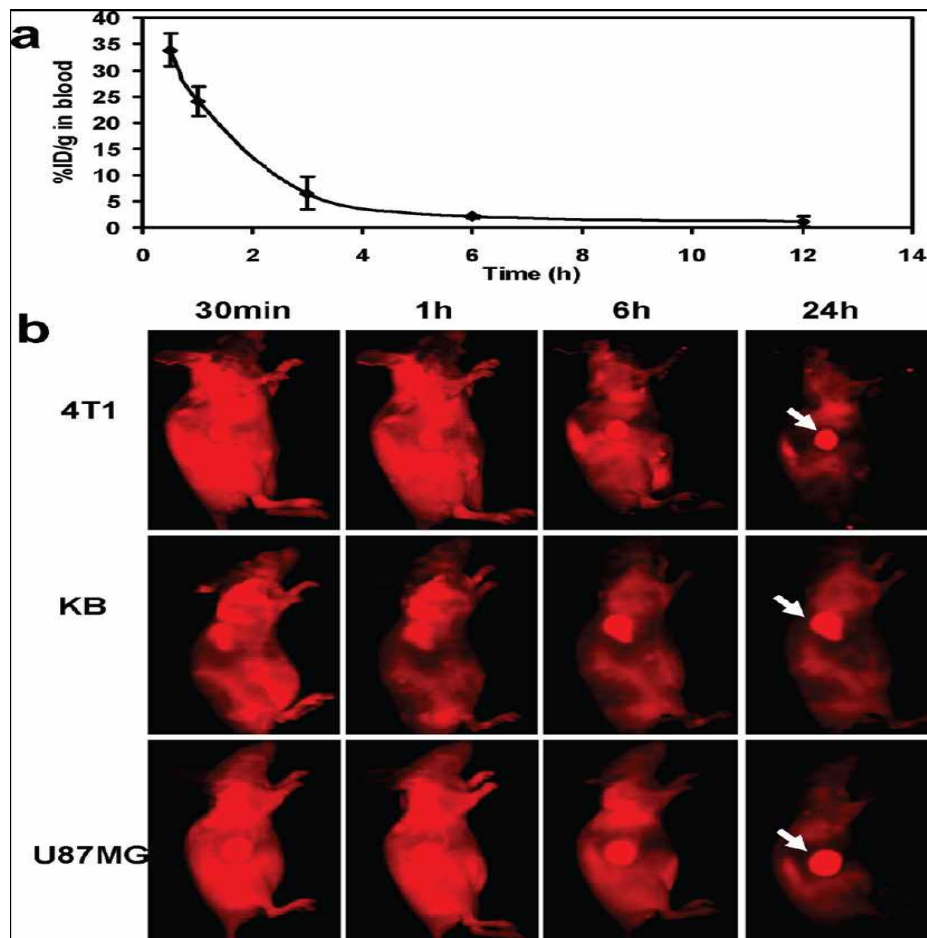


Figure 3. In vivo behaviors of NGS-PEG-Cy7. (a) The blood circulation curve of NGS-PEG-Cy7 determined by measuring Cy7 fluorescence in the blood at different time points post injection. The unit was a percentage of injected dose per gram tissue (% ID/g). Error bars were based on triplicated samples. **(b)** Spectrally unmixed in vivo fluorescence images of 4T1 tumor bearing Balb/c mice, KB, and U87MG tumor bearing nude mice at different time points post injection of NGS-PEG-Cy7. Mouse autofluorescence was removed by spectral unmixing in the above images. High tumor uptake of NGS-PEG-Cy7 was observed for all of the three tumor models. Hairs on Balb/c mice were removed before fluorescence imaging.

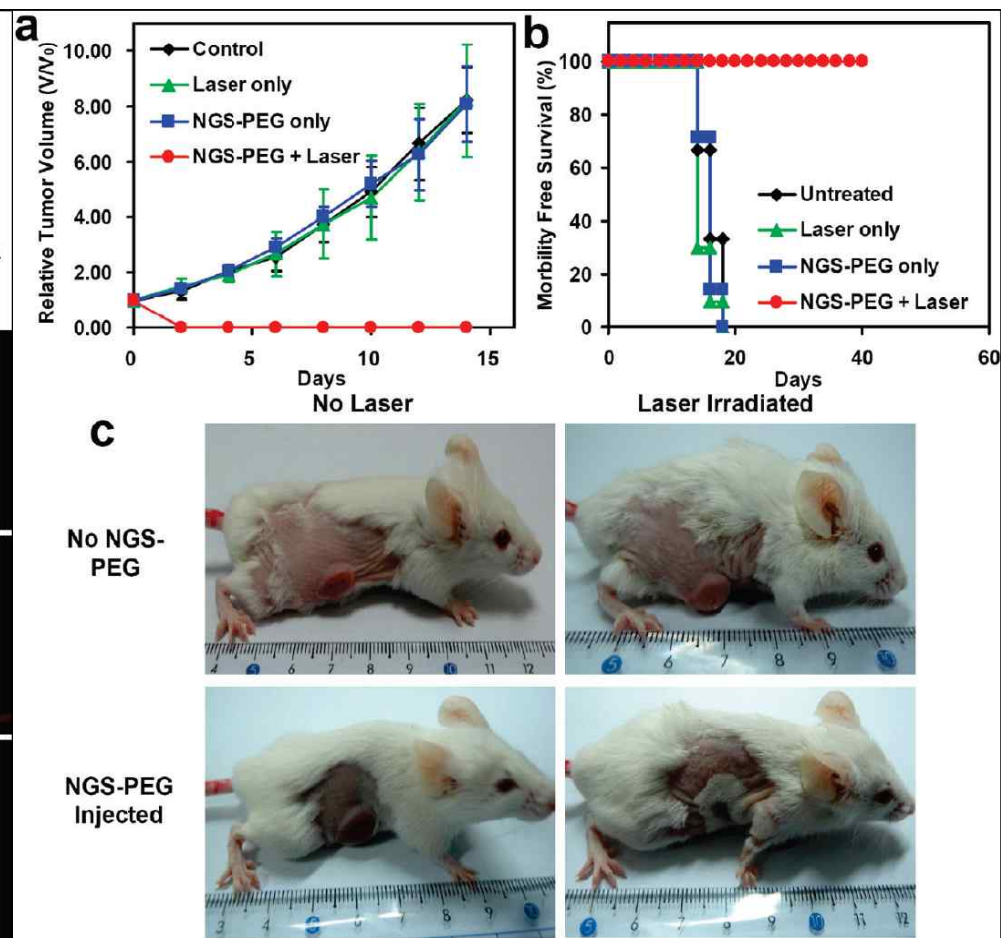


Figure 4. In vivo photothermal therapy study using intravenously injected NGS-PEG. (a) Tumor growth curves of different groups after treatment. The tumor volumes were normalized to their initial sizes. There were 6 mice in the untreated, 10 mice in the 'laser only', 7 mice in the 'NGS-PEG only', and 10 mice in the 'NGS-PEG + laser' groups. While injection of NGS-PEG by itself or laser irradiation on uninjected mice did not affect tumor growth, tumors in the treated group were completely eliminated after NGS-PEG injection and the followed NIR laser irradiation. **(b)** Survival curves of mice bearing 4T1 tumor after various treatments indicated. NGS-PEG injected mice after photothermal therapy survived over 40 days without any single death. **(c)** Representative photos of tumors on mice after various treatments indicated. The laser irradiated tumor on NGS injected mouse was completely destructed. Error bars in (a) were based on standard deviations.

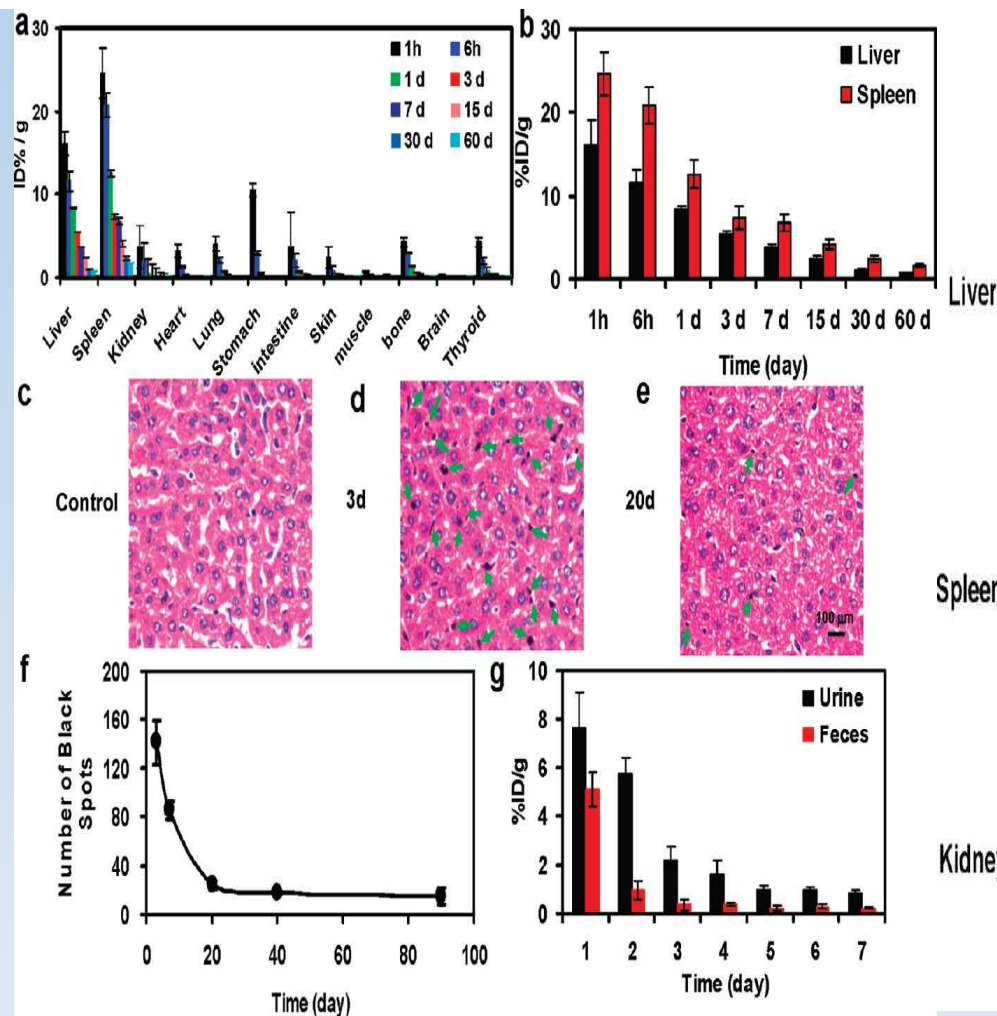


Figure 5. Biodistribution and clearance of NGS-PEG. (a) Time-dependent biodistribution of 125I-NGS-PEG in female Balb/c mice. (b) 125I-NGS-PEG levels in the liver and spleen over time. (c-e) H&E stained liver slices from the untreated control mice (c) and NGS-PEG injected mice at 3 d (d) and 20 d (e) p.i. Brown-black spots which could be clearly differentiated from the blue-stained cell nuclei were noted in the liver of mice 3 days after injection of graphene. Much less black spots in the liver were observed 20 days later. (f) Statistic of black spot numbers in liver slices at various time postinjection of NGS-PEG. Numbers of spots in full image fields under a 20 objective were averaged over 5 images at each data point. (g) 125I-NGS-PEG levels in urine and feces in the first week after injection. Mouse excretions were collected by metabolism cages. Error bars in the above data were based on standard deviations of 45 mice per group.

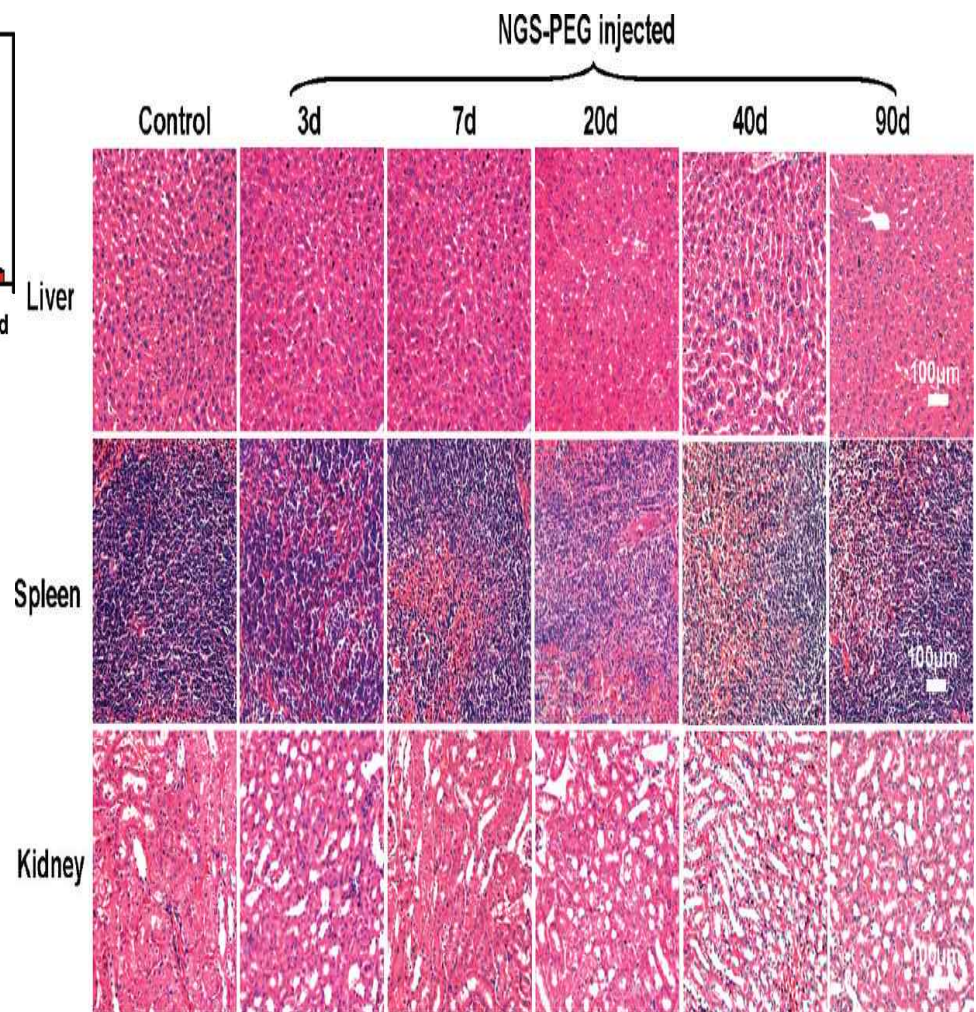


Figure 6. Representative H&E stained images of major organs including liver, spleen, and kidney collected from the control untreated mice and NGS-PEG injected mice at various time points postinjection. The dose of NGS-PEG was 20 mg/kg. No obvious organ damage or lesion was observed for NGS-PEG treated mice.

➤ **Biocompatible polymer인 dextran**을 그래핀 산화물에 공유결합으로 코팅하여 **GO-DEX**를 세포에 처리 했을때 **in vitro**에서 세포 독성이 감소 됨을 보이고 방사선 동위원소를 결합한 **¹²⁵I-GO-DEX**를 쥐에 정맥 주사 했을때 간(**liver**)과 비장(**spleen**)을 포함한 세망내피계 (**reticuloendothelial systems**) 안에 축적되어 있다가 두드러지는 독성 없이 일주일 안에 소멸됨을 보여주고 있음. 이러한 결과는 **in vivo pharmacokinetics**과 **biodistribution**을 입증하고 다양한 **biomedical applications**을 위하여 그래핀과 다양한 생체물질의 결합(**bioconjugates**)에 따른 기능화의 중요성을 제시하고 있음¹².

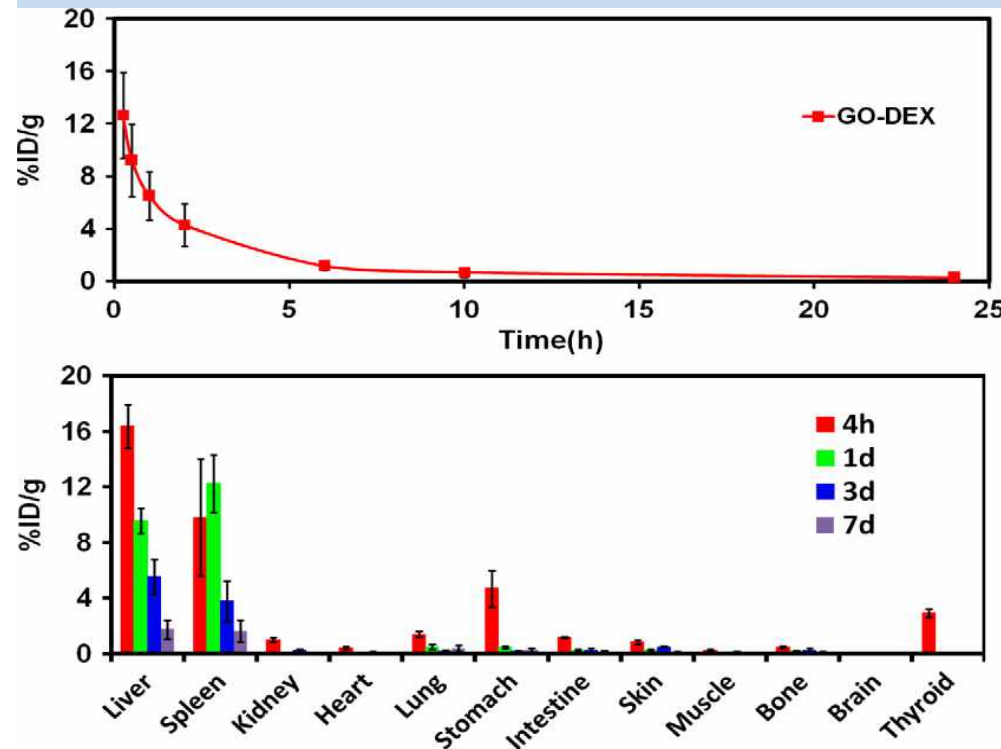


Fig. 7 – In vivo behaviors of GO-DEX. (a) The blood circulation curve of ¹²⁵I-GO-DEX. The pharmacokinetics of GO-DEX followed a two-compartment model. (b) Time-dependent biodistribution of ¹²⁵I-GO-DEX in female Balb/c mice. Error bars in both two graphs were based on three mice per group.

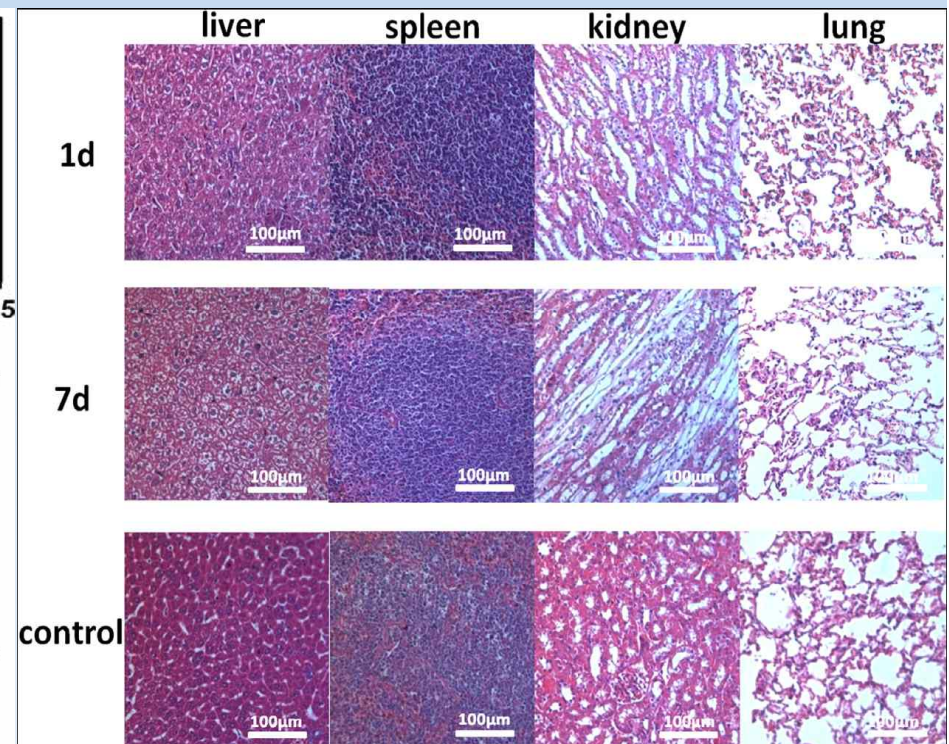


Fig. 8 – Microscopy images of H&E stained organ slices collected from mice sacrificed at 1 day and 7 days post-injection of GO-DEX at the dose of 20 mg/kg. No noticeable abnormality was observed in major organs including liver, spleen, kidney, and lung.

4. 결론

- **EPA**는 나노 입자와 나노 물질인 그래핀으로부터 유발되는 인체 및 환경에 미치는 위험성에 대하여 예측하고 관리·평가하기 위한 과학적 기반을 반드시 필요로 하며, 따라서 위해성에 관한 과학적 정보가 필수적이므로 그래핀이 바이오 환경에서의 독성연구는 매우 중요한 결과이다.
- 최근 2-3년간 보고되고 있는 **in vitro**에서 그래핀과 그래핀 산화물의 독성연구 결과로 비추어 볼 때, 그래핀 산화물 보다 그래핀이 세포 독성이나 세포사가 더 큼을 보고하고 있고 기능화한 그래핀이나 그래핀 산화물의 안전성과 **biocompatibility**를 보고하고 있다.
- **In vivo**에서도 그래핀이나 그래핀 산화물이 다양한 생체물질에 의한 표면 개질화에 따른 기능화를 한다면 독성도 줄고 체내에서 배뇨나 배설물로 배출됨을 그래핀의 다양한 기능화에 대하여 연구자들이 보고하고 있다.
- 이러한 결과는 **in vitro**나 **in vivo**에서 세포 독성이 그래핀이나 그래핀 산화물의 **physicochemical properties**에 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.

5. 참고문헌

1. 발행:U.S. EPA, “나노 기술 백서”, 환경부, (2007)
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”, *Adv. Eng. Mater.*, 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. Welsher, 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. K. Wang, J. Ruan, H. Song, J. Zhang, Y. Wo, S. Guo, D. Cui, “Biocompatibility of Graphene Oxide”, *Nanoscale Res. Lett.*, 6, 1 (2011)
10. K. Yang, S. Zhang, G. Zhang, X. Sun, S.-T. Lee, Z. Liu, “Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy”, *Nano Lett.*, 10, 3318 (2010)
11. K. Yang, J. Wan, S. Zhang, Y. Zhang, S.-T. Lee, Z. Liu, ”In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice”, *ASC NANO*, 1, 516 (2010)
12. 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)