

산화란타넘, 산화네오디뮴이 세포독성 및 DNA손상에 미치는 영향

김종규 · 김수진 · 강민구 · 정용현*

산업안전보건연구원 화학물질센터 독성연구팀

Cytotoxicity and DNA Damage in Human Lung Cells Treated with Lanthanum Oxide and Neodymium Oxide

Jong Kyu Kim · Soo Jin Kim · Min Gu Kang · Young Hyun Chung*

Toxicity Research Team, Center for Chemicals Safety and Health, Occupational Safety & Health Research Institute

ABSTRACT

Objectives: The present study investigated cytotoxicity and DNA damage in human lung cells *in vitro*.

Methods: Neodymium oxide and lanthanum oxide were dispersed by ultrasonic treatments. The assay was performed with MRC-5 (Human male fetus lung cell). Cytotoxicity and comet assay of lanthanum oxide and neodymium oxide were measured after 24 and 48 hours incubation.

Results: After 24 hours of exposure to rare earth metals, the cytotoxicities of lanthanum oxide in more than 1 μ M concentration groups were significantly increased when compared to the control group, but the cytotoxicities of neodymium oxide in more than 100 μ M concentration groups were statistically increased. After 48 hours exposure, cytotoxicities of both materials were statistically increased in 100,000 μ M concentration groups. Olive tail moments of the lanthanum oxide treated group were significantly increased when compared to the control group.

Conclusions: The cytotoxicity of lanthanum oxide was higher than that of neodymium oxide. The DNA of MRC-5 cells treated with lanthanum oxide for 48 hours were significantly damaged.

Key words : rare earth metals(REM), cell toxicity, Comet assay, MRC-5

I. 서 론

희토류원소는 각 금속이 지닌 독자적인 물성과 기능을 지니고 있어 다양한 소재와 제품에 사용되고 있어 산업의 비타민이라고 불리고 있다(KISTI, 2010). 현재 희토류 금속 소비량은 석유나 석탄 등 다른 천연자원과 비교해 보면 극히 적은 편에 속하지만 경제적으로는 이미 중요한 위치를 차지하고 있어, 그 수요는 해마다 폭발적인 증가 추세를 보이고 있다.

전 세계 희토류의 확인매장량은 8,800만 톤, 추정매장량은 1억5,000만 톤이며(KIIT, 2012), 2010년을 기준으로 전 세계적으로 희토류의 소비는 15만톤에 달하고 2012년에는 Ce, La, Nd 순으로 190,000톤의 수요가

조사되었다. 우리나라 2010년 희토류의 수입현황은 약 7,000톤에 이른다(Lee, 2011).

희토류는 최외곽에 있는 원자가 전자의 배열이 거의 같고, 이온반지름도 거의 같지만 란탄족 수축 현상에 의하여 원자와 이온의 크기가 약간 감소하며, 란탄족 수축 때문에 희토류 이온들은 거의 비슷한 크기를 가지고 있고 원자가가 모두 3으로 화학적 성질이 매우 비슷한 특성이 있다(Yang, 2000).

희토류는 화학적으로 안정적이어서 열과 전류의 전도율이 높으며, 금속으로 가공된 후 합금이 용이할 뿐만 아니라 산화물은 안정적이고 유리화(琉璃化)되기 쉬워 금속공업과 유리공업에 사용된다. 독특한 화학적, 전기적 특성과 자성(磁性), 발광(發光), 방사성 차폐

*Corresponding author: Young Hyun Chung, Tel: 042-869-0344, E-mail: ch935@kosha.net

Center for Chemicals Safety and Health, Occupational Safety & Health Research Institute, #339-30, Expo Yuseong-Gu, Daejeon, 305-380, Received: May 29, 2013, Revised: June 18, 2013, Accepted: June 19, 2013

(遮蔽)라는 특성을 지니고 있으며, 다른 물질과 혼합하면 물리적, 구조적인 특징의 유지 및 변경이 가능하며 기능이나 성능을 향상시키는 특성을 갖고 있다. 또한 희토류를 첨가함으로써 인성(靱性)이 강화된다. 희토류는 단독으로 제품화되기보다는 대부분 첨가물의 용도로 광범위하게 사용되고 있다. 고온초전도체, 하이브리드 자동차 등과 같은 첨단기술이 필요한 산업 분야뿐만 아니라 미래 산업에 필수적인 자원으로 희토류 활용의 중요성을 더욱 부각되고 있다. 특히 산화란타늄은 고굴절-저분산 유리렌즈 제조에 사용되고 있으며, 디지털 카메라에 사용되고 있다. 또한 세라믹 컨덴서 제조에 많이 사용될 것으로 예상되고 있다. 그리고 산화네오디뮴은 IT산업에 중요한 역할을 하는 재료로서 네오디뮴 자석이 많이 사용되고 있다. 향후에는 플라스틱 네오디뮴도 함께 많이 사용될 것으로 예상된다. 또한 자동차용으로 첨가량이 증가하고 있고, 의료용 기기의 MRI, 휴대전화 진동 모터나 스피커 용도도 증대되고 있다. 그리고 온도 보상용 세라믹 컨덴서, 필터로도 사용되고 있고 각종 기기의 기판에 사용되고 있다.

한편 란타늄, 네오디뮴의 건강영향 선행연구에서, Sabboni et al.(1982)은 유심탄소아크램프의 연기에 노출 시 간질성 진폐가 발생하였다고 보고하였고, 희토류 함유 흡과 분진에 수년 간 노출된 남성 근로자가 희토류 진폐 판정을 받았으며, 호흡기 및 임파절에서 희토류가 높게 검출되었다고 보고되었다(Vocatur et al., 1983; Pietra et al., 1984). 또한 사진제판사 근로자의 기관지 폐포 세척액(Broncho Alveolar Lavage; BAL)과 손톱에서 희토류가 검출되었으며(Sulotto et al., 1986, Maier et al., 1986), 중국의 희토류 광산 주민에서 희토류 원소 혈중량이 높게 검출되었다고 보고되었다(Yu et al., 2004). 그리고 희토류금속 흡은 폐 조직에 세포독성이 있으며, 섬유화의 잠재적 가능성이 있으며(Ronald et al., 1987), 세포면역 및 체액면역에 영향을 주고, 간 기능을 교란시킨다고 보고되었다(Jie et al., 2011).

이와 같이 첨단 전자산업의 발달로 희토류 금속화합물의 활용이 증가할 것으로 예측되며 이에 따라 근로자의 희토류 금속화합물 노출이 증가할 것으로 예상된다. 본 연구에서는 희토류 금속화합물 중 산업계에서 많이 사용되는 산화란타늄, 산화네오디뮴을 시험물질로 선택하였다. 또한 사업장 근로자의 노출 주요경로가 호흡기임을 감안하여 폐세포를 선택하여, 희토류 금속화합물이 세포독성 및 DNA 손상에 미치

는 영향 연구를 통하여 유해성평가 기초자료를 생산하고자 본 연구를 수행하게 되었다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질 및 세포주

본 연구에 사용한 희토류는 산화란타늄[La₂O₃; CAS No. 1312-81-8] nanopowder (< 100 nm particle size), Sigma-Aldrich (Product No. 634271, Lot No. MKBH 6827V) 및 산화네오디뮴[Nd₂O₃; 1313-97-9] nanopowder (< 100 nm particle size), Sigma-Aldrich, Product No. 634611, Lot No. MKBC4929V)를 구입하여 사용하였다.

시험에 사용한 사람 폐태아세포 (Human-male fetus, 14 weeks old, Caucasian, lung cell)는 MRC-5 세포주로서 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea, No. 10171)에서 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

MRC-5 세포주의 배양을 위해 5% CO₂를 공급하며 10% heat-inactivated fetal bovine serum을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, GIBCO, New York, USA)을 이용 37℃로 배양하여 시험에 사용하였다.

3. 투과전자현미경(Transmission electron microscope)을 이용한 나노입자 검경

La₂O₃, Nd₂O₃ 나노입자의 형태와 크기의 확인을 위해 투과전자현미경(TEM, H-7100FA, ×50~×600,000 magnification, 100 kV acceleration voltage, Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 검경하였다.

4. 나노입자의 분산 및 크기분포

세포주에 처리되는 La₂O₃, Nd₂O₃, 나노입자의 형태와 크기의 확인을 위해 100 mM 농도에서 나노입자가 100 nm 이하가 되는지 확인하였으며, 희토류 금속화합물을 증류수에 넣어 probe type Sonicator(SONICS Vibra Cell™ (VC 750), Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)로 초음파 처리하여 시간에 따른 각 시료의 크기를 Zetasizer nano zs90(Malvern instruments Ltd., Worcestershire, UK)으로 측정하였다.

5. 세포독성(Cytotoxicity)의 확인

MRC-5 세포의 세포독성을 측정하기 위해 Cell Coun-

ting Kit-8(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 이용하였으며, 세포배양액에 시험물질을 처리하고 5% CO₂를 공급하면서 온도 37℃에서 24시간, 48시간 incubation 후 650 nm를 reference로 하여 450 nm에서 시험 배지용액의 흡광도를 측정하였다. 결과는 평균과 표준편차로 제시하였고 각 처리시간별 처리군들간의 차이를 비교하기 위해 one way ANOVA를 실시하였으며, 사후검정법으로 Dunnett's method를 유의수준 $\alpha < 0.05$ 로 검정하였다.

6. In vitro Comet assay

세포에서 DNA 손상을 선별하기 위해 DNA 손상 회복 효소인 E. coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) 및 endonuclease III(Thymine Glycol-DNA glycosylase)를 이용하여 Comet assay를 실시하였다. Comet assay는 희토류를 각 농도군별로 처리한 MRC-5 세포 시료를 LMA(Low melting agarose)와 잘 섞어 슬라이드글라스 위에 떨어뜨리고 4℃ 냉장고에 10분간 넣어 두었다가, 4℃ lysing solution에 1시간동안 넣어 두었다. 그리고 완충용액으로 5분간씩 3회 세척한 다음 DNA 손상회복 효소인 Fpg 혹은 Endonuclease III를 37℃에서 30분간 처리한 후 pH 13의 alkaline 전기영동용 완충용액에 20분간 담갔다가 전기영동(25 V, 100 mA)하였다. 전기영동이 끝난 슬라이드 표본들을 증류수로 10분간씩 2회 세척하고, 70% ethanol에 5분간 넣은 후 꺼내 37℃에서 30분간 건조시켜 두었다.

그리고 DNA 손상정도를 가시화하기 위하여 형광물질(Ethidium bromide, 10× stock solution : 20 µg/ml)로 염색한 DNA를 20~40배율의 형광현미경으로 관찰하였다. 또한 DNA 손상정도를 정량화하기 위하여 Komet analysis system 5.0(Kinetic Imaging, Ltd., Liverpool, UK)을 CCD camera에 연결하여 migrated된 DNA의 %와 migration length를 측정하였다. 이 소프트웨어 프로그램으로 Olive tail moment(Olive & Banath, 1993) 값을 계산함으로써 DNA 손상정도를 나타내었다.

통계적 분석을 위해서 대조군과 각 노출군의 DNA 손상정도에 대한 측정값의 평균과 표준편차를 표시하였고, 측정값에 대한 통계분석은 SPSS 18.0 프로그램을 이용, 노출농도별 Olive tail moment와 Tail length 측정값을 One Way ANOVA를 실시하였으며, 사후검정법으로 Dunnett's method를 유의수준 $\alpha < 0.05$ 로 검정하였다.

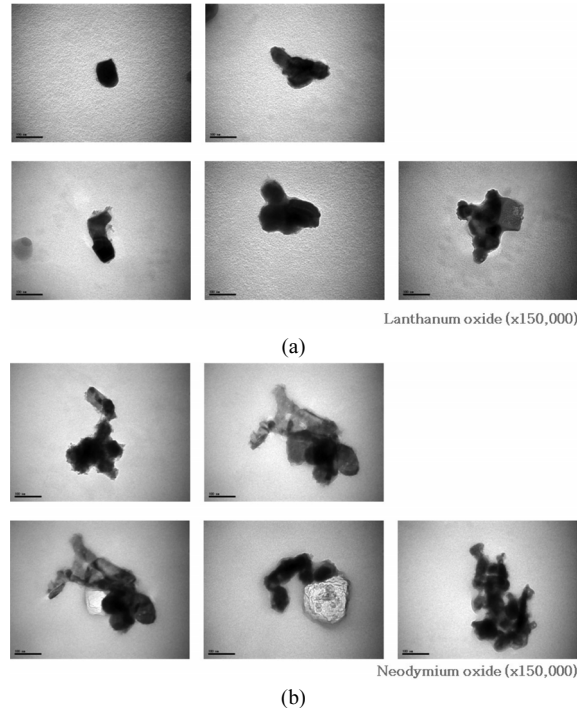


Figure 1. Transmission electron microscope images of neodymium oxide and lanthanum oxide particles:(a)La₂O₃, Scale bar 100 nm, (b) Nd₂O₃, Scale bar 100 nm

III. 연구결과

1. 산화란타넘, 산화네오디뮴 나노입자의 투과전자현미경(TEM) 검정

본 연구에서 사용한 산화란타넘, 산화네오디뮴 나노입자의 형태와 크기를 투과전자현미경을 이용하여 확인한 결과 아래 Figure 1과 같다. 입자의 크기는 두 물질 모두 100 nm 미만의 나노크기였으며, 입자들간의 응집(Aggregation)형태가 관찰되었다.

2. 초음파 처리 시간에 따른 나노입자의 크기 변화

산화란타넘, 산화네오디뮴 나노입자의 초음파 처리 시간에 따른 입자 크기의 변화를 확인하기 위하여, 희토류 금속화합물을 증류수에 넣어 초음파 분산 후 각 시료의 크기분포를 측정된 결과는 Table 1과 같다. 산화란타넘의 입자크기는 초음파 처리 전 373.0 nm이었으며, 초음파 처리 10초 후 100 nm로 이하 나노입자로 분산되었으며 420 초 분산 후 10 nm이하의 입자로 분산되었다. 또한 산화네오디뮴의 입자크기는 초음파 처리 전 245.0 입자가 초음파처리 10초 분산 시

Table 1. Particle size of lanthanum oxide, neodymium oxide and by sonicated dispersion at each concentration

| Material | Sonication time(sec) | z-average(nm) | PDI* |
|---|----------------------|---------------|-------|
| Lanthanum oxide (La ₂ O ₃) | 0 | 373.0 | 0.244 |
| | 10 | 34.91 | 0.222 |
| | 30 | 23.97 | 0.214 |
| | 60 | 22.82 | 0.213 |
| | 120 | 17.73 | 0.201 |
| | 300 | 13.73 | 0.208 |
| Neodymium oxide (Nd ₂ O ₃) | 0 | 245.0 | 0.512 |
| | 10 | 57.35 | 0.413 |
| | 30 | 6.147 | 0.208 |
| | 60 | 7.067 | 0.216 |
| | 120 | 6.978 | 0.229 |
| | 300 | 5.964 | 0.219 |
| | 420 | 6.775 | 0.201 |

* PDI; polydispersity index

100 nm이하 나노입자로 쉽게 분산되었으며, 30초 분산 시 10 nm이하의 나노입자로 분산되어, 산화네오디뮴이 산화란타넘보다 분산이 잘 되었다.

3. 세포독성시험(Cytotoxicity)

Table 2는 산화란타넘, 산화네오디뮴 나노입자를 MRC-5 세포에 각 농도별 24시간 노출 후 MRC-5 세포의 cell viability(%)를 측정한 결과이다. 1 μ M부터 100,000 μ M까지의 농도에서 산화란타넘의 세포독성은 1 μ M 이상의 모든 처리 농도군에서 대조군 보다 통계적으로 유의한 세포독성을 나타냈으며, 1~1,000 μ M 농도군에서는 농도의존적으로 세포독성을 나타냈다. 또한 100,000 μ M 농도에서 약 42%의 cell viability를 나타냈다. 산화네오디뮴 나노입자의 세포독성은 10 μ M이하 농도군에서는 세포생존율이 감소하였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았으나, 100 μ M이상의 농도군에서는 대조군 보다 통계적으로 유의한 세포독성을 나타냈다. 또한 100,000 μ M 농도에서 약 54%의 cell via-

bility를 나타냈다. 산화란타넘, 산화네오디뮴 모두 10,000 μ M 이하 농도군에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였으며, 100,000 μ M 농도에서는 55% 이하로 세포 생존율이 급격히 감소하였으며, 산화란타넘의 세포 생존율이 산화네오디뮴의 세포 생존율보다 낮았다.

한편, 48시간 노출 후 시험물질인 산화란타넘, 산화네오디뮴 나노입자의 각 농도별 MRC-5 세포의 cell viability를 측정한 결과 산화란타넘의 경우 세포생존율이 1,000 μ M 이하 농도군에서는 대조군보다 통계적으로 유의한 감소가 관찰되지 않았다. 그러나 10,000 μ M, 100,000 μ M 농도군에서는 세포생존율이 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 100,000 μ M 농도군에서는 20.3%로서 생존율이 급격히 감소하였다. 산화네오디뮴 나노입자 노출 시 세포생존율은 1,000 μ M 이하 농도군에서는 대조군보다 통계적으로 유의한 감소가 관찰되지 않았으나, 10,000 μ M, 100,000 μ M 농도군에서는 세포생존율이 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 100,000 μ M 농도군에서는 34.4%로서 생존율이 급격히 감소하였다.

산화란타넘, 산화네오디뮴 나노입자 모두 10,000 μ M 이상 농도에서 통계적으로 유의하게 세포생존율이 감소하였다.

산화란타넘, 산화네오디뮴 나노입자 노출 시간에 따른 세포생존율 결과, 산화란타넘은 1 μ M 농도군을 제외한 1,000 μ M 이하 농도군에서 노출시간이 증가함에 따라 세포생존율은 증가하였으며, 산화네오디뮴의 경우는 1,000 μ M 이하 모든 농도군에서 노출시간이 증가함에 따라 세포생존율은 증가하였다. 그러나 산화란타넘, 산화네오디뮴 모두 100, 000 μ M 농도군에서는 노출시간이 증가함에 따라 세포생존율은 감소하였다.

5. In vitro Comet assay를 통한 폐세포의 DNA손상 확인결과

핵내 DNA의 손상지표인 단일사슬 절단(Single strand breakage)의 확인을 위해 Comet assay를 실시한 결과

Table 2. Viability of MRC-5 exposed to rare earth elements for 24/48 hrs

| Material | | Viability (%) | | | | | | |
|-----------------|-----|---------------|--------------|-------------|--------------|---------------|----------------|-----------------|
| | | 0 μ M | 1 μ M | 10 μ M | 100 μ M | 1,000 μ M | 10,000 μ M | 100,000 μ M |
| Lanthanum oxide | 24h | 100.00±0.829 | 92.84±4.768* | 87.1±0.974* | 87.88±0.644* | 81.65±3.275* | 82.77±1.845* | 42.98±3.696* |
| | 48h | 100.00±6.956 | 83.42±9.626 | 89.87±1.718 | 91.31±7.906 | 92.31±9.309 | 83.81±3.627* | 20.36±3.658* |
| Neodymium oxide | 24h | 100.00±7.881 | 91.89±3.098 | 88.25±5.046 | 88.51±2.318* | 83.22±2.41* | 84.12±6.195* | 54.22±3.479* |
| | 48h | 100.00±5.584 | 98.34±2.767 | 90.61±4.669 | 95.3±5.232 | 94.51±7.007 | 85.85±6.808* | 34.46±5.06* |

Table 3. Olive tail moment values of in vitro FLARE assay after rare earth elements treatment for 24/48 hrs

| Material | concentration | Exposure time(h) | |
|-----------------|---------------|------------------|------------------|
| | | 24 | 48 |
| Lanthanum oxide | 0 μ M | 2.69 \pm 0.24 | 3.37 \pm 0.32 |
| | 10 μ M | 4.36 \pm 1.40 | 6.55 \pm 1.40* |
| | 50 μ M | 3.11 \pm 0.51 | 7.00 \pm 1.34* |
| | 100 μ M | 4.44 \pm 0.02 | 6.24 \pm 1.88* |
| | 500 μ M | 4.88 \pm 0.23 | 8.19 \pm 1.33* |
| | 1000 μ M | 4.21 \pm 0.05 | 6.93 \pm 0.71* |
| Neodymium oxide | 0 μ M | 2.69 \pm 0.24 | 3.93 \pm 0.51 |
| | 10 μ M | 2.80 \pm 0.24 | 5.70 \pm 0.60 |
| | 50 μ M | 3.88 \pm 0.05 | 6.53 \pm 0.18 |
| | 100 μ M | 3.24 \pm 0.19 | 6.83 \pm 0.03 |
| | 500 μ M | 3.78 \pm 0.33 | 5.81 \pm 0.78 |
| | 1000 μ M | 4.60 \pm 0.87 | 6.15 \pm 0.26 |

Unit: a.u.(arbitrary unit); All values are expressed as Mean \pm S.D.
 *: compare with control group, $P < 0.05$

24시간, 48시간 각 처리시간에 따른 Olive tail moment변화는 Table 3과 같았다.

24시간 산화란타넘 처리군의 Olive tail moment는 대조군 보다 증가하였으나 농도 의존적 변화는 관찰되지 않았으며, 통계적으로 유의한 증가도 관찰되지 않았다. 그러나 48시간 노출군의 Olive tail moment는 대조군 보다 통계적으로 유의하게 증가하였다.

산화네오디뮴 처리군의 경우, 24시간 노출군의 Olive tail moment가 농도 의존적으로 증가하는 경향이 관찰되었으며, 1000 μ M 노출군은 대조군에 비하여 1.7배 증가하였으나, 통계적으로 유의한 증가는 관찰되지 않았다. 48시간 노출군의 경우 100 μ M 이하 노출군에서는 농도 의존적으로 Olive tail moment가 증가하였으나 통계적으로 유의한 증가는 관찰되지 않았다.

산화란타넘, 산화네오디뮴 24시간, 48시간 각 처리시간에 따른 tail length변화는 Table 4와 같았다.

산화란타넘 처리군의 경우, 24시간 노출군에서는 산화란타넘 농도에 따른 tail length의 감소는 관찰되지 하였으나 48시간 노출군은 100 μ M 이하 농도군에서 대조군 보다 tail length가 증가하였다. 그러나 통계적으로 유의한 증가는 관찰되지 않았다.

산화네오디뮴 처리군의 경우, 24시간 48시간 노출군에서는 대조군보다 tail length가 증가하였으나 농도 의존적 변화는 관찰되지 않았으며, 통계적으로 유의한 증가도 관찰되지 않았다.

Table 4. Tail length of in vitro FLARE assay after rare earth elements treatment for 24/48 hrs

| Material | concentration | Exposure time(h) | |
|-----------------|---------------|--------------------|--------------------|
| | | 24 | 48 |
| Lanthanum oxide | 0 μ M | 102.38 \pm 11.15 | 65.18 \pm 0.51 |
| | 10 μ M | 66.13 \pm 1.94 | 96.67 \pm 6.90 |
| | 50 μ M | 56.01 \pm 7.32 | 116.25 \pm 19.11 |
| | 100 μ M | 73.63 \pm 0.25 | 123.69 \pm 30.98 |
| | 500 μ M | 67.80 \pm 7.83 | 117.50 \pm 27.27 |
| | 1000 μ M | 71.07 \pm 4.88 | 95.59 \pm 8.76 |
| Neodymium oxide | 0 μ M | 58.15 \pm 4.97 | 77.97 \pm 25.25 |
| | 10 μ M | 56.96 \pm 1.93 | 90.18 \pm 17.26 |
| | 50 μ M | 68.93 \pm 10.10 | 117.38 \pm 9.43 |
| | 100 μ M | 60.65 \pm 5.81 | 100.47 \pm 7.24 |
| | 500 μ M | 71.67 \pm 0.17 | 108.03 \pm 14.39 |
| | 1000 μ M | 64.23 \pm 3.96 | 91.72 \pm 12.04 |

Unit: a.u.(arbitrary unit); All values are expressed as Mean \pm S.D.
 *: compare with control group, $P < 0.05$

산화란타넘 24시간/48시간 500 μ M 처리군에서 Olive tail moment가 가장 높았으며, 산화네오디뮴은 24시간 1000 μ M 처리군, 48시간 100 μ M 처리군에서 Olive tail moment가 가장 높았다.

IV. 고 찰

첨단 전자산업의 발달로 희토류 금속화합물의 활용이 증가하고 있다. 또한 근로자가 희토류 금속화합물을 취급 사용에 따라 노출이 증가 할 것으로 예상된다. 그리고 희토류 금속화합물에 대한 유해성평가가 요구되고 있다. 그러나 희토류에 대한 독성이 많이 밝혀지지 않아, 산업계에서 희토류 금속화합물 중 많이 사용되는 산화란타넘, 산화네오디뮴을 이용하여 폐세포에 미치는 세포독성 및 DNA 손상에 미치는 영향 연구를 통하여 유해성평가 기초자료를 생산하고자 본 연구를 수행하게 되었다.

나노입자독성은 활성산소종(ROS: reactive oxygen species)발생에 기인하는 것으로 생각되고 있다(Donaldson et al., 2005; Oberdörster et al., 2005). 또한 산소분자는 Fenton-like reaction을 통해 직접 금속함유입자의 표면이나 철 등 오염 입자에 의해 활성산소 종으로 변환될 수 있다. 또한 활성산소 종은 NADPH 산화 효소에 의해 카탈라이즈 되거나, mitochondrial respiratory

chain에 의하여 전자전달 부가 반응으로 생성될 수 있다. 산소는 과산화물($O_2^{\cdot-}$)과 반응을 하여 과산화수소(H_2O_2)가 생성되게 된다(Unfried et al., 2007). 생성된 활성산소 종은 세포의 주요 구성 성분인 지질, 단백질, 핵산 등을 손상시킴으로서 산화 스트레스를 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 금속 분자이며 나노입자인 산화란타넘, 산화네오디뮴 나노입자의 물리화학적 특성으로 인하여 활성산소종이 많이 발생하고, 핵산에 많은 손상을 일으킬 것이라는 가정 하에 폐세포독성 및 DNA 손상에 미치는 영향을 연구하였다.

초음파 처리 시간에 따른 나노입자의 크기 변화를 측정한 결과 산화네오디뮴이 산화란타넘보다 작은 입자로 분산이 잘 되었다. 그래서 입자의 크기만을 고려할 때, 산화네오디뮴 입자가 세포를 더 잘 통과하여 세포독성과 핵산에 많은 손상을 일으킬 것으로 예상하였다. 그러나 산화란타넘, 산화네오디뮴에 24시간, 48시간 노출 결과 세포독성은 산화란타넘이 산화네오디뮴보다 강하였다. 이 결과는 Ronald et al.(1987)이 랫드 호흡기 폐포 대식세포를 이용하여 세륨, 란타넘, 네오디뮴의 세포독성시험결과 100 μ M 농도에서 세포독성은 산화네오디뮴 > 산화란타넘 > 산화세륨 순으로 본 연구의 세포독성과 다른 경향을 보였다. 그러나 본 연구에서 24시간 노출 후 100 μ M 농도에서 세포생존율은 산화란타넘(87.9%), 산화네오디뮴(88.5%)으로, 산화란타넘과 산화네오디뮴의 세포독성은 비슷하게 나타났다. 또한 Ronald et al.(1987)은 산화란타넘, 염화란타넘, 산화세륨, 염화세륨, 산화네오디뮴, 염화네오디뮴 물질에 대한 세포독성을 실험한 결과 염화란타넘, 염화세륨은 산화란타넘, 산화세륨보다 독성이 더 강하나, 산화네오디뮴은 염화네오디뮴보다 더 강한 세포독성을 나타냈다. 또한 반치사 농도는 염화세륨 ($LC_{50} = 29 \mu$ M) > 염화란타넘 ($LC_{50} = 52 \mu$ M) > 산화네오디뮴 ($LC_{50} = 101 \mu$ M) 순이었다.

Feyerabend et al.(1995)이 골육종 세포주 MG63인 사람 배꼽혈관주위 (HUCPV) 세포 및 마우스 대식세포 (RAW 264.7)를 이용하여 yttrium, neodymium, dysprosium, parasedymium, gadolinium, lanthanum, cerium, europium, lithium, zirconium 염화물에 대한 세포독성시험결과 La와 Ce희토류 금속이 높은 세포독성을 나타냈으며, 이는 본 연구결과와 같은 경향을 보였다.

그리고 Jie et al.(2001)은 마우스에 $LaCl_3$, $CeCl_3$

및 $NdCl_3$ 를 2, 10 및 20 mg/kg 용량으로 30일간 각각 경구투여 후, 임파구 계수, 혈청 IgM 수준, 혈액 지표, 간 기능의 생화학적 지표 및 조직병리학적 변화를 연구한 결과 $Ce(3+) > Nd(3+) > La(3+)$ 순의 독성을 나타내어 본 연구 결과와 상이한 결과를 나타냈다(Jie et al., 2011).

또한 Haiquan et al.(2010)등은 ICR 마우스에 1회 20 mg/kg body weight 용량의 $LaCl_3$, $CeCl_3$, $NdCl_3$ 를 14일간 복강투여한 결과 $Ce(3+)$ 와 $Nd(3+)$ 는 $La(3+)$ 보다 높은 산화적 스트레스 및 뇌의 독성을 나타내고, $Ce(3+)$ 는 $Nd(3+)$ 보다 더욱 심각한 뇌 장해 및 산화적 스트레스를 유발하여 본 연구 결과와 일치하지 않았다. 이는 본 연구에서 사용한 산화희토류의 독성과 염화희토류의 독성이 다르기 때문인 것으로 판단된다.

Comet assay를 실시한 결과 24시간 산화란타넘 처리군의 Olive tail moment는 대조군 보다 증가하였으나 농도의존적 변화는 관찰되지 않았으며, 통계적으로 유의한 증가도 관찰되지 않았다. 그러나 48시간 노출군의 Olive tail moment는 대조군 보다 통계적으로 유의하게 증가하였다. 세포독성이 크게 나타나지 않는 1000 μ M 이하의 농도군에서 Olive tail moment가 증가한 것은 산화란타넘에 의한 DNA 손상 영향으로 판단된다.

그리고 산화네오디뮴 48시간 노출군의 Olive tail moment는 대조군 보다 통계적으로 유의하게 증가는 없었으나 대조군에 비하여 증가한 것은 산화네오디뮴에 의한 영향이라 판단된다.

또한 산화란타넘, 산화네오디뮴 48시간 처리군의 tail length가 증가한 것으로 보아 산화란타넘, 산화네오디뮴이 DNA 손상에 영향을 미친 것으로 판단된다.

Jha et al.(1995)은 산화네오디뮴(Nd_2O_3)을 생쥐의 복강에 주사 후 골수세포의 염색체이상(chromosome aberration)을 실험한 결과 농도 의존적으로 염색체 이상이 발생하였으며, 12h 노출 후 염색체 이상이 통계적으로 유의하게 증가하였다고 보고하였다. 이는 염색체 이상 발생과 본 연구의 Comet assay결과 폐세포 DNA손상 발생의 관련성이 있다고 판단된다.

본 연구에서 산화란타넘의 Comet assay결과 DNA의 손상이 발생하였으므로 더 많은 유전독성 연구가 필요할 것으로 판단되며 향후 희토류 금속화합물의 독성을 파악하기 위하여 실험동물을 이용한 희토류 금속화합물 흡입독성 등 더 많은 연구와 근로자 노출 실태 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

산업계에서 사용되는 희토류 금속화합물 중 많이 사용되는 산화란타넘, 산화네오디뮴이 폐세포의 세포독성 및 DNA 손상에 미치는 영향 연구결과 24시간, 48시간 노출 시 세포독성은 산화란타넘이 산화네오디뮴보다 높았으며, 산화란타넘 48시간 처리군에서 Olive tail moment가 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다.

또한 세포독성이 크게 나타나지 않는 산화란타넘, 산화네오디뮴 48시간 처리군에서 Olive tail moment, tail length가 증가한 것으로 보아 산화란타넘, 산화네오디뮴이 DNA 손상에 영향을 미친 것으로 판단된다.

참고문헌

- Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, MacNee W, Stone V. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* 2005;2:10
- Feyerabend F, Fischer J, Holtz J, Witte F, Willumeit R, Drücker H, Vogt C, Hort N. Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. *Acta Biomater* 2010 May;6(5):1834-42. Epub 2009 Oct 1.
- Haiquan Zhao, Zhe Cheng, Renping Hu, Jie Chen, Mengmeng Hong, Min Zhou, Xiaolan Gong, Ling Wang, Fashui Hong. Oxidative Injury in the Brain of mice Caused by Lanthanid. *Biol Trace Elem Res*. 2010 Jul 8
- Jha AM, Singh AC. Clastogenicity of lanthanides: induction of chromosomal aberration in bone marrow cells of mice in vivo. *Mutat Res* 1995 Jan;341(3):193-7
- Jie Cheng, Na Li, Jingwei Cai, Zhe Cheng, Renping Hu, Qian Zhang, Fangfang Wan, Qingqing Sun, Suxing Gui, Xuezi Sang, Ling Wang, Fashui Hong. Organ Histopathological Changes and its Function Damage in Mice Following Long-term Exposure to Lanthanides Chloride. *Biol Trace Elem Res*. 2011 Sep 8
- Jie Cheng, Zhe Cheng, Renping Hu, Yaling Cui, Jingwei Cai, Na Li, Suxing Gui, Xuezi Sang, Qingqing Sun, Ling Wang, Fashui Hong. Immune dysfunction and liver damage of mice following exposure to lanthanoids. *Environ Toxicol*. 2011 Sep 16
- Korea Institute of Industrial Technology(KIIT). Resources Wars[Internet]. [Accessed 2012Feb1]. Available from: <http://www.kiram.re.kr>
- Korea Institute of Science and Technology Information (KISTI). Rare metal resources and trends in China. 2010 [Accessed 2012Feb1]. Available from: <http://www.ndsl.kr>
- Lee WS. The status and recycling technology of rare-earth element. Korea Institute of Science and Technology Information. 2011;65(11):87-94
- Maier EA, Dietemann-Molard A, Rastegar F, Heimbürger R, Ruch C, Maier A, Roegel E, Leroy MJ. Simultaneous determination of trace elements in lavage fluids from human bronchial alveoli by energy-dispersive x-ray fluorescence. 2: Determination of abnormal lavage contents and verification of the results. *Clin Chem* 1986 Apr;32(4):664-8.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005;113(7):823-39
- Pietra R, Sabbioni E, Orvini E, Vocaturo G, Colombo F, Zanoni M, Rodi F, Occupational risk to rare earths. *Inorganica Chimica Acta* Volume 94, Issues 1-3, February 1984, p. 143-144
- Ronald J. Palmer, John L. Butenhoff and Jeffrey B. Stevens. Cytotoxicity of the Rare Earth Metals Cerium, Lanthanum, and Neodymium in Vitro: Comparisons with Cadmium in a Pulmonary Macrophage Primary Culture System. *Environmental Research* 1987;43:142-156
- Sabbioni E, Pietra R, Gaglione P, Vocaturo G, Colombo F, Zanoni M, Rodi F. Long-term occupational risk of rare-earth pneumoconiosis. A case report as investigated by neutron activation analysis. *Sci Total Environ* 1982 Dec;26(1):19-32.
- Sulotto F, Romano C, Berra A, Botta GC, Rubino GF, Sabbioni E, Pietra R. Rare-earth pneumoconiosis: a new case. *Am J Ind Med* 1986;9(6):567-75.
- Unfried K, Albrecht C, Klotz LO, von Mikecz A, Grether-Beck S, Schins RPF. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicol* 2007;1:52-71
- Vocaturo G, Colombo F, Zanoni M, Rodi F, Sabbioni E, Pietra R. Human exposure to heavy metals. Rare earth pneumoconiosis in occupational workers. *Chest* 1983 May;83(5):780-3.
- Yang HG. The Status and Prospect of rare-earth element industry. News & information on for chemical engineers 2000;18(1):41-43
- Yu L, Dai YC, Yuan ZK, Li J. Effects of rare earth compounds on human peripheral mononuclear cell telomerase and apoptosis. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2004 Jul;38(4):248-51.