

SP-ICP-MS 및 ICP-MS를 이용한 HepG2 세포 내 금 나노물질 축적 평가

김은정 · 성화경 · 유선경 · 조은혜 · 김현미[†] · 김필제 · 유승도

국립환경과학원

Assessment of Gold Nanomaterial Uptake in HepG2 Cells by Single Particle ICP-MS and ICP-MS

Eunjeong Kim, Hwa Kyung Sung, Sun Kyoung Yoo, Eunhye Jo,
Hyun-Mi Kim[†], Pilje Kim, and Seung Do Yu

National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea

Received April 6, 2018/Revised May 1, 2018/Accepted June 20, 2018

The cellular uptake of gold nanomaterials (AuNPs) was investigated in human liver HepG2 cells exposed to 0.5 or 1 $\mu\text{g/mL}$ of AuNPs for 24 hours. After the exposure period, the total gold concentration in the medium and cells was observed to have increased significantly in a dose-dependent manner; gold nanomaterials were mainly present in the medium, while some were present in the cells. SP-ICP-MS showed that the AuNPs concentration increased in the medium and cells, but the results were lower in comparison to the total gold concentration measured by ICP-MS. This difference was presumably due to the fact that AuNPs were ionized and aggregated, and only a part of them retained a shape that is detectable by SP-ICP-MS. The median size of AuNPs remained similar after 24 hours to that at initial exposure. In conclusion, this study confirmed the applicability of SP-ICP-MS for the analysis of the concentration and size of AuNPs and the distribution pattern of AuNPs in HepG2 cells.

Key words: Gold nanomaterials, Uptake, HepG2 cells, SP-ICP-MS, ICP-MS

1. 서 론

환경부 나노물질 유통현황에 따르면 국내 유통되는 나노물질은 2012년 15,005톤, 2013년 318,031톤 및 2015년 587,843톤으로 점차 증가하는 추세이며¹⁾, 미국의 Woodrow Wilson 센터는 나노물질을 함유한 제품의 수가 2005년 54종에서 2013년 1,628종 및 2014년 1,814종으로 계속 늘어나고 있다고 발표한 바 있다.²⁾ 따라서 나노물질 및 나노물질을 함유한 제품의 사용이 증가함에 따라 나노물질이 인체에 노출되거나 환경 중으로 배출되어 유해한 영향을 미칠 가능성이 커지고 있다. 나노물질은 물리·화학적 특성 및 노출되는 세포의 종

류에 따라 식세포작용(phagocytosis), 대음세포작용(macropinocytosis) 및 수용체 매개 세포 내 섭취작용(receptor-mediated endocytosis) 등의 다양한 경로를 통해 세포 내로 흡수되며³⁾, 동일한 성분의 일반 화학물질보다 높은 부피 대 표면적 비율로 인해 세포 내 다양한 성분들과 화학적으로 반응하여 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 증가시킨다고 알려져 있다.⁴⁾ 나노물질이 세포 내로 축적되어 생성된 ROS는 산화적 손상, 염증 반응 및 DNA 손상 등의 세포 독성을 유발하며, Wang 등의 연구에 따르면 이산화티타늄 나노물질에 노출된 인체 기관지 폐선암세포주인 A549 세포에서 세포 생존율 감소, DNA 손상 및 세포 주기 억제 등의 세

[†]To whom correspondence should be addressed.

포 독성이 유발되었고⁵⁾, Xue 등의 연구에서 인체 간암 세포주인 HepG2 세포에 은 나노물질을 노출한 결과 활성산소종 증가 및 미토콘드리아 손상 등이 관찰되었다.⁶⁾

현재까지 세포 내 축적된 나노물질의 농도를 측정하기 위한 분석법으로는 유도결합플라즈마 질량분석법(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)⁷⁾ 및 원자흡수분광법(atomic absorption spectroscopy, AAS)⁸⁾ 등이 사용되고 있다. 그러나 이들 분석법은 이온과 입자의 농도가 더해진 총 농도가 결과 값으로 산출되기 때문에 나노입자 또는 이온만의 농도를 측정하기 위해서는 추가적인 분리 과정이 필요한 단점이 있다. 또한 나노물질의 크기분포를 분석하기 위한 기존의 분석법으로는 투과전자현미경(transmission electronic microscopy, TEM)⁹⁾이 주로 사용되고 있으나, 낮은 농도로 노출할 경우 세포 내로 흡수된 나노입자가 매우 적기 때문에 분석 결과를 신뢰할 수 있는 개수의 입자를 찾는 것이 어려워 유의적인 데이터를 산출할 수 없다.

그러나 최근 급속계 나노물질의 농도 및 크기분포 분석이 동시에 가능한 단일입자 유도결합플라즈마 질량분석법(single particle ICP-MS, SP-ICP-MS)의 식물^{10,11)} 및 동물 조직^{12,13)} 등 다양한 생물체 내 나노물질 분석 가능성에 대한 연구들이 보고되고 있다. 나노물질의 세포 내 축적성은 입자 크기, 모양, 표면전하 등 나노물질의 물리·화학적 특성에 따라 달라지기 때문에 배양 세포에서도 일부 나노물질에 대한 SP-ICP-MS 분석 연구가 시도되고 있다. Hsiao 등은 마우스 신경모세포종 세포주인 Neuro-2a 세포에 이산화티타늄 및 은 나노물질을 노출한 후 SP-ICP-MS를 이용하여 세포 내 나노입자 수 및 크기분포를 분석하였으며¹⁴⁾, Klingberg 등은 인체 혈관내피세포(hu-

man umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 내 금 나노물질의 입자 수 및 크기분포를 분석한 바 있다.¹⁵⁾

나노물질은 노출 시 체내의 여러 기관 중 간에 가장 많이 축적된다고 알려져 있는데¹⁶⁾, 현재까지 나노물질의 주요표적 기관인 간세포 내 입자 크기, 크기분포, 농도 등을 SP-ICP-MS 분석한 사례는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 간에서 기원한 세포주인 HepG2 세포에 금 나노물질을 0.5 및 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 노출 후 SP-ICP-MS 분석을 통하여 농도 변화에 따른 배지와 세포 내 나노입자의 이동, 분포특성 등을 비교하였다. 추가적으로 ICP-MS 및 TEM 분석을 수행하여 SP-ICP-MS 분석 결과를 검증하고 향후 세포 내 나노물질 분석법으로의 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시험물질

본 시험에 사용한 나노물질은 polyvinylpyrrolidone (PVP)로 표면처리된 공시직경 40 nm의 금 나노물질(CAS No. 7440-57-5, nanoComposix, USA)이며, 노출 시험 전에 나노물질을 증류수에 분산시킨 후 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL, Japan)을 통해 나노물질이 응집이나 집적 없이 고르게 분산되어 있는 것을 확인하였고(Fig. 1A), ImageJTM 프로그램을 이용하여 크기분포를 측정하였다(Fig. 1B).

2.2. 세포배양 및 노출 농도 선정

HepG2 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 5 mL MEM NEAA

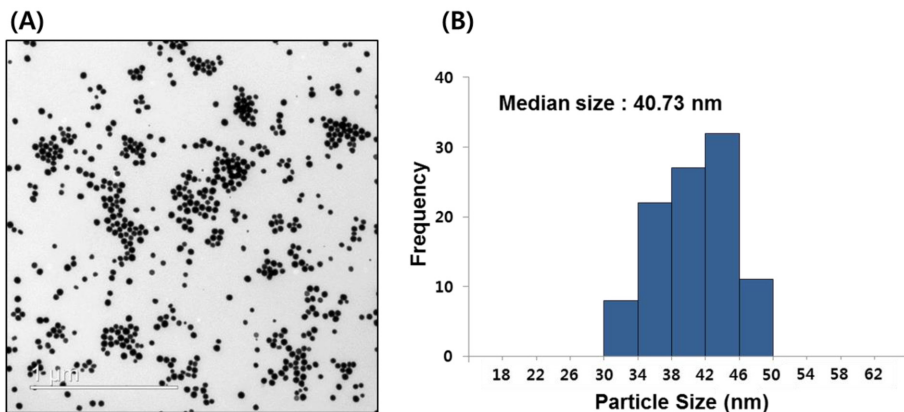


Fig. 1. (A) Transmission electronic microscopy (TEM) image and (B) size distribution of 40 nm AuNPs.

(100X, Gibco, USA) 및 1% penicillin-streptomycin (Gibco, USA)을 포함하는 DMEM high glucose 배지에서 계대배양하여 나노물질 노출 시험에 사용하였다.

세포 내 축적을 확인하기 위한 나노물질의 노출 농도를 선정하기 위해 96 well plate (Thermo Scientific, USA)에서 1×10^4 cells/well로 24시간 동안 배양한 HepG2 세포에 배스형 초음파분산기(250W)로 5분간 분산시킨 금 나노물질을 0.0625~1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24시간 동안 노출한 후, MTT assay로 세포 생존율을 확인하였다. MTT assay를 위해 나노물질이 포함된 배지를 제거하고 새로운 배지 100 μL 와 12 mM MTT 용액 (Thermo Fisher Scientific inc., USA) 10 μL 을 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 MTT가 환원되어 생성된 비수용성 MTT formazan 결정을 DMSO (Sigma, USA)로 녹여낸 다음 마이크로 플레이트 리더기 (Tecan, USA)를 이용해서 540nm에서의 흡광도를 측정하였다.

2.3. 나노물질 노출 및 시료 전처리

세포 생존율 시험을 통해 선정한 농도로 노출시험을 진행하였다. 6 well plate에 HepG2 세포를 2×10^5 cells/well로 24시간 배양한 후, 배스형 초음파분산기(250 W)에서 5분간 분산시킨 금 나노물질을 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24시간 동안 노출하였다. 나노물질 노출 후 배지를 회수하여 0.45 μm cellulose acetate 필터(CHMLAB GROUP, Spain)로 여과하였고, 세포는 0.25% trypsin-EDTA로 떼어낸 후 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포만을 분리한 다음 PBS로 재부유시켜서 계수하였다. 배지 및 세포 시료는 전함량 분석(ICP-MS)과 입자농도 및 크기분포 분석(SP-ICP-MS)에 각각 절반씩 사용하였다.

ICP-MS로 총 금 농도를 분석하기 위해 각 시료 내에 존재하는 입자 형태의 나노물질을 염산과 질산의 혼합액(3:1, vol. ratio)인 왕수를 처리하여 이온화시켰다. 배지는 시료와 동량, 세포의 경우 0.5 mL의 왕수를 처리한 다음 상온에서 15분간 방치시킨 후 증류수로 희석하여 분석하였다.

SP-ICP-MS로 금 나노입자의 농도 및 크기분포를 분석하기 위해 배지는 필터로 여과한 시료를 증류수로 희석 후 바로 사용하였고, 세포의 경우 세포 내로 흡수된 나노입자를 분리해내기 위해 0.1% triton X-100 1 mL을 처리한 후 상온에서 1시간 동안 반응시키면서 세포를 용해한 다음 0.45 μm cellulose acetate 필터로 여과 후 증류수로 희석하여 분석하였다.

Table 1. Analysis conditions for SP-ICP-MS and ICP-MS

Subject	Analysis conditions
RF generator power	1570 W
Carrier gas	0.83 L/min
Nebulizer pump	0.1 rps
Nebulization pump rate	0.346 mL/min
Mass monitored	^{197}Au
Sample depth	8.2 mm
Integration time (SP-ICP-MS)	0.1 ms
Acquisition time (SP-ICP-MS)	60 s

2.4. 배지 및 세포 내 나노물질 분석

배지 및 세포 내 총 금 농도(ICP-MS)와 입자 농도 및 크기분포(SP-ICP-MS)를 Agilent 7900 quadrupole ICP-MS 모델(Agilent, USA)을 Time-resolved analysis (TRA) mode로 분석하였다. 본 연구와 동일한 분석장비 및 방법을 사용한 선행연구 결과, 금 나노물질의 크기는 20~100 nm, 질량농도는 40~100 nm의 크기를 갖는 입자 범위에서 오차범위 $\pm 20\%$ 내로 분석 가능하였으며, 80 nm 크기 금 나노물질의 질량농도 분석에 대한 정확도(Accuracy) 및 정밀도(Precision)는 각각 99.66 및 1.60%로 확인되었다.

본 시험에서 분석 데이터는 Mass hunter 7.0 소프트웨어로 처리하였으며, 총 농도 분석 시에는 기존의 질량농도 분석 방식대로 일정한 시간에 따른 신호의 평균값이 산출되도록 소프트웨어를 설정하였고, 입자 농도 및 크기 분포 분석 시에는 짧은 쪼갠시간으로 인해 나타나는 불연속 펄스 신호가 단일입자의 직경으로 산출되도록 설정하였다. 기타 기기의 분석 조건은 Table 1과 같다.

2.5. 배지 및 세포 내 나노입자 관찰

금 나노물질 노출 후, 배지 및 세포 내에 존재하는 나노입자를 투과전자현미경(transmission electronic microscopy, TEM)으로 관찰하였다. 노출 24시간 후, 배지를 파라필름 위에 2~3방울 떨어뜨린 다음 그리드(300 mesh)를 배지와 맞닿게 얹고 1분간 방치시켜 배지 내 나노입자를 그리드에 부착시킨 후, 배지 내 염을 제거하기 위해 배지와 같은 방법으로 증류수에 1분간 방치시켰다. 나노입자를 그리드에 부착시키고 염을 제거하는 과정을 4번 반복한 다음 상온에서 자연건조 후 사용하였다. 세포의 경우, 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 떼어낸 다음 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 분리한 후, 2.5% 글루타알데하이드로 24시간 동안 전고정 및 1% 오스뮴 산으로 압조건에서 2시간 동안 후고

정하였다. 고정된 시료는 50~100% 에탄올로 20분씩 탈수 및 프로필렌 옥사이드로 30분씩 2회 치환한 후 프로필렌 옥사이드와 포매제(epon mixture) 혼합물(1:1, vol. ratio)과 포매제로 각각 90분씩 포매한 다음 60°C 오븐에서 36시간 동안 중합하였다. 중합한 시료를 초미세박절기(EM-UC 7, Leica, Japan)를 이용해 70 nm 두께로 절편한 후, 우라닐 아세테이트-구연산 납으로 이중염색하여 배지 및 세포 시료 내 나노입자를 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL, Japan)을 이용해 관찰하였다.

2.6. 통계처리

통계분석은 SPSS 18.0(SPSS Inc., USA)을 이용하여 수행하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였고 분석은 정규성을 가정하고 모수적인 일원분산분석(One-way ANOVA)을 적용하였으며, LSD로 사후검정을 실시하여 대조군과 유의한 차이를 보이는 노출군을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 생존율 확인을 통한 나노물질 노출농도 선정

Connor 등의 연구 결과 인체 만성 골수성 백혈병 세포주인 K562 세포에 노출된 금 나노물질은 독성을 유발하지 않은 반면¹⁷⁾, Yen 등의 연구에서 마우스 대식세포주인 J774. A1 세포에 금 나노물질을 노출한 결과 세포 생존율 감소 및 염증관련 유전자 발현이 증가한 바 있

다.⁹⁾ 이처럼 노출 조건에 따라 금 나노물질이 세포에 미치는 영향이 다를 수 있기 때문에 본시험에 앞서 연구 목적에 부합하는 노출 농도 선정 시험을 수행하였다.

본 연구의 목적은 HepG2 세포 내로 축적되거나 배지에 존재하는 금 나노물질의 농도 및 크기분포를 확인하는 것이기 때문에 세포에 독성을 유발하지 않는 노출 농도를 선정해야 하며, 이를 위해 HepG2 세포에 금 나노물질을 24시간 노출한 후, 세포의 형태학적 변화 및 생존율을 확인하였다.

나노물질 노출 24시간 후, 위상차현미경을 통해 HepG2 세포의 형태를 관찰한 결과 모든 노출농도(0.0625~1 $\mu\text{g/mL}$)에서 금 나노물질로 인한 세포의 형태학적 변화는 관찰할 수 없었으며(Fig. 2A), 세포 생존율 확인을 위한 MTT assay 결과 역시 모든 노출 농도(0.0625~1 $\mu\text{g/mL}$)에서 대조군 대비 통계적으로 유의한 세포 생존율 감소를 확인할 수 없었다(Fig. 2B).

따라서 나노입자 분석을 위한 노출농도를 세포 생존율에 변화가 없는 최대 농도인 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 으로 선정하였다.

3.2. 배지 및 세포 내 총 금 농도 확인

HepG2 세포에 금 나노물질을 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 24시간 동안 노출한 후, 배지 및 세포 내에 존재하는 총 금 농도를 ICP-MS를 이용하여 측정하였다.

배지 내 총 금 농도는 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 노출군에서

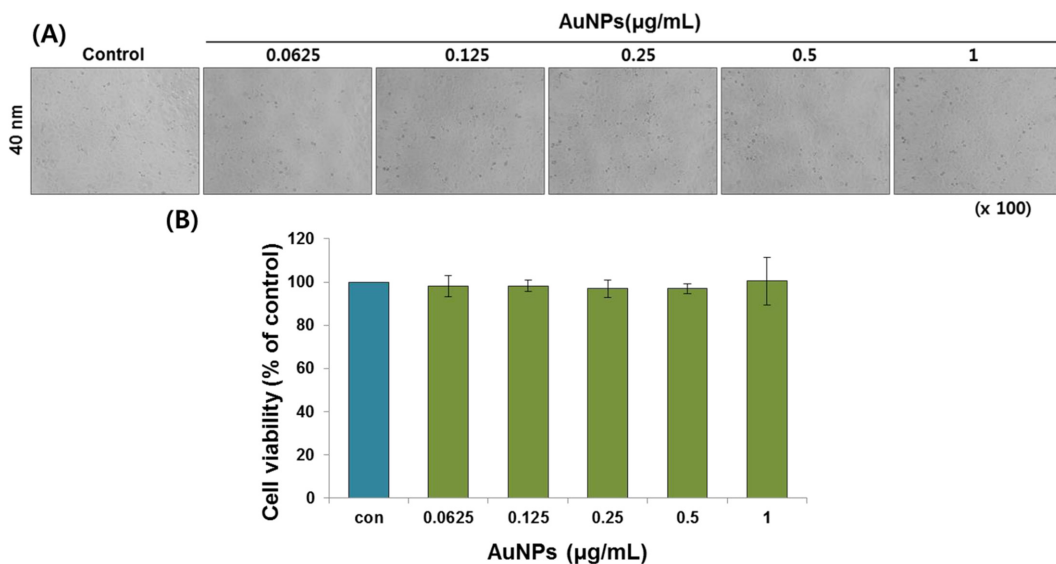


Fig. 2. (A) Morphological changes and (B) viability of HepG2 cells exposed to AuNPs.

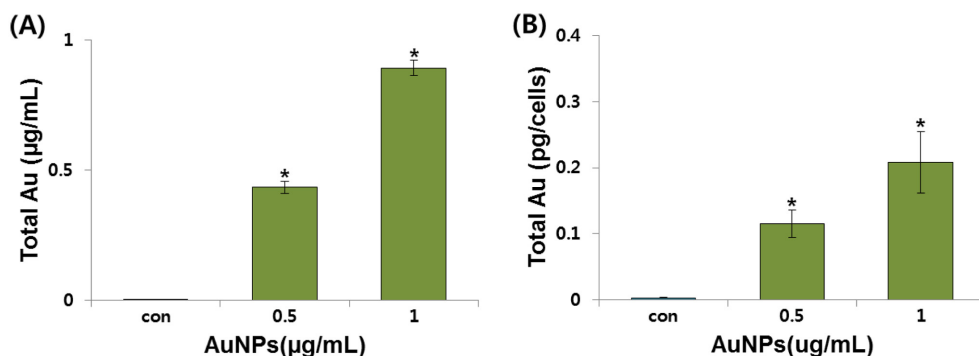


Fig. 3. Total gold concentration in (A) medium and (B) HepG2 cells exposed to AuNPs for 24 hours (* $p < 0.05$).

각각 0.43 ± 0.022 및 0.89 ± 0.029 $\mu\text{g/mL}$ 로 모든 노출군에서 대조군 대비 유의적으로 나노물질의 노출 농도에 비례하여 증가(약 2.1배)하였다(Fig. 3A). 또한 노출한 금 나노물질의 총 함량과 배지에서 측정된 금의 총 함량을 비교했을 때, 노출한 금 나노물질의 약 87%(0.5 $\mu\text{g/mL}$ 노출군) 및 89%(1 $\mu\text{g/mL}$ 노출군)가 배지 내에 존재하고 있는 것으로 확인되었다.

세포의 경우 총 금 농도는 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 노출군에서 각각 0.12 ± 0.020 및 0.21 ± 0.047 pg/cells 로 배지와 마찬가지로 모든 노출군에서 대조군 대비 유의적으로 노출한 나노물질의 농도에 비례하여 증가(약 1.8배)하는 경향을 보였으며(Fig. 3B), 노출 농도 의존적인 나노물질의 세포 내 축적은 돼지 신장세포주인 PK15 세포에 은 나노물질을 노출한 Milic 등의 연구에서도 확인된 바 있다.⁷⁾ 또한 노출한 금 나노물질 중 약 3.8%(0.5 $\mu\text{g/mL}$ 노출군) 및 3.4%(1 $\mu\text{g/mL}$ 노출군)가 세포 내로 축적된 것으로 확인되었는데, 이러한 수치는 배지에서 확인된 것보다 20배 이상 낮은 값으로, 본 결과를 통해 세포에 금 나노물질 노출 시 노출한 나노물질은 대부분(약 88%) 배지 내에 존재하며 세포 내로는 일부(약 3.6%)만 축적된다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 Hsiao 등의 연구에서 마우스 신경모세포종 세포주인 Neuro-2a 세포에 은 나노물질을 2 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 24시간 노출했을 때, 노출한 나노물질 중 일부만이 세포 내로 흡수되어 세포 내 총 은 농도가 약 1 pg/cells 로 확인된 결과와 유사하다.¹⁴⁾

3.3. 배지 및 세포 내 금 나노입자 농도 및 크기분포 확인

금 나노물질을 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 24시간 동안 노출한 후 SP-ICP-MS를 이용하여 배지 및 세포 내 금

나노입자의 농도 및 크기분포를 확인하였다.

배지 내 금 나노입자 농도는 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 노출군에서 각각 0.35 ± 0.005 및 0.75 ± 0.031 $\mu\text{g/mL}$ 로 금 나노물질의 노출 농도에 비례하여 증가(약 2.1배)하는 경향을 보였으며(Fig. 4A), ICP-MS를 이용하여 측정된 총 금 농도와 비교했을 때 약 18% 감소하여 배지 내 금 함량 중 약 82%가 SP-ICP-MS로 검출 가능한 입자의 형태를 유지하고 있는 것으로 확인되었다.

세포의 경우 금 나노입자의 농도는 0.5 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 노출군에서 각각 0.05 ± 0.013 및 0.11 ± 0.014 pg/cells 로 배지와 마찬가지로 노출한 나노물질의 농도에 비례하여 증가(약 2.0배)하는 경향을 보였으며(Fig. 4D), ICP-MS 결과와 비교했을 때 약 51% 감소하여 세포 내로 흡수된 금 함량 중 약 48%가 SP-ICP-MS로 검출 가능한 입자의 형태를 유지하고 있는 것으로 확인되었다.

따라서 본 연구 결과를 통해 ICP-MS로 확인된 배지 및 세포 내 금 함량 중 일부(배지: 82%, 세포: 48%)만이 SP-ICP-MS로 검출 가능한 입자의 형태를 유지하고 있는 것으로 확인되었으며, 이러한 결과는 배지 및 세포 내에서 일부 금 나노물질이 응집 또는 이온화되어 SP-ICP-MS로 검출 불가능하였기 때문으로 추정된다. Barreto 등의 연구에 따르면 본 연구에서 사용한 것과 같은 PVP로 표면처리된 금 나노물질은 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 12시간 동안 안정성이 유지된 후 응집된 것으로 확인되었으며¹⁸⁾, Cui 등의 연구에서 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포에 금 나노물질을 노출한 후 세포 내에서 응집된 나노물질을 관찰한 바 있는데¹⁹⁾, 응집되어 크기가 증가한 나노입자는 SP-ICP-MS 분석 시 분무기(nebulizer)를 통해 분무되어 플라즈마로 도입되지 못하고 배출(drain)되었을 가능성이 높다. 또한 나노 크

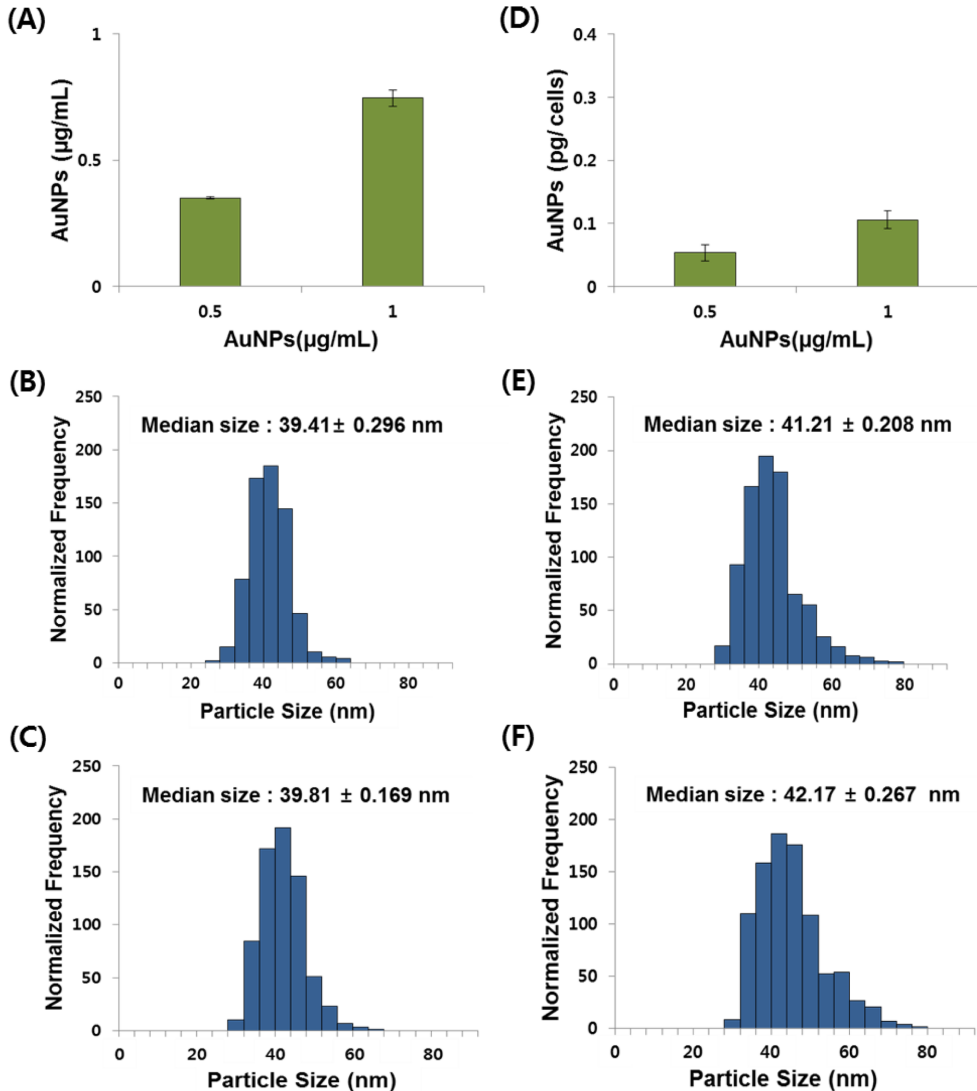


Fig. 4. (A) AuNPs concentration in medium, size distribution in media exposed to (B) 0.5 and (C) 1 µg/mL AuNPs. (D) AuNPs concentration in HepG2 cells, size distribution in HepG2 cells exposed to (E) 0.5 and (F) 1 µg/mL AuNPs.

기의 물질은 세포 표면에서 흡수되어 세포내 섭취 과정의 마지막 단계인 리소좀에 도달하기까지 약 30분이 소요되며²⁰⁾, Sabella 등의 연구에서 리소좀 내부와 같은 pH 4.5 조건에서 금 나노물질이 일부 이온화된 결과로 보아 본 연구의 노출 조건에서도 세포 내로 흡수된 금 나노물질 중 일부가 리소좀으로 이동하여 이온화되었을 것으로 추정된다.²¹⁾

배지 내 금 나노입자의 크기는 0.5 및 1 µg/mL 노출군에서 각각 39.41 ± 0.296 nm 및 39.81 ± 0.169 nm (Fig. 4B, C), 세포의 경우 0.5 및 1 µg/mL 노출군에서

각각 41.21 ± 0.208 nm 및 42.17 ± 0.267 nm (Fig. 4E, F)로 측정되어 노출 24시간이 경과한 후까지 처음 노출한 크기와 유사하게 유지되는 것을 확인하였다.

3.4. 배지 및 세포 내 나노물질 관찰

HepG2 세포에 금 나노물질을 24시간 노출한 후 TEM을 사용하여 배지 및 세포 내 나노입자를 관찰하였다. 배지 내 나노입자는 0.5 µg/mL 노출군보다 1 µg/mL 노출군에서 더 높은 빈도로 관찰되었으며 (Fig. 5A), 세포 또한 높은 농도의 금 나노물질을 처리한 노출군에

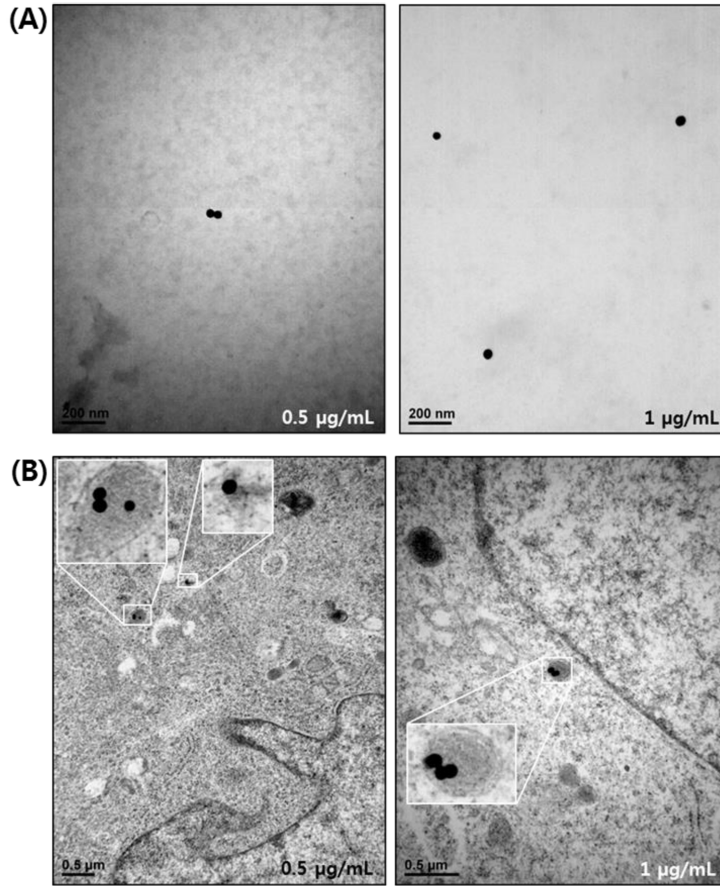


Fig. 5. TEM images of particles in (A) medium and (B) HepG2 cells exposed to AuNPs for 24 hours.

서 더 많은 나노입자가 관찰되었다(Fig. 5B). 세포내 나노입자는 주로 세포질 및 미토콘드리아 내에서 관찰되었는데, 미토콘드리아 내 금 나노입자의 축적은 Van Winkle 등의 연구에서 랫드 1형 폐포상피세포주인 R3/1 세포에 금 나노물질을 노출한 연구 결과에서도 확인된 바 있다.²²⁾ 반면 Freese 등의 연구에서는 인체 미세혈관 내피세포에 금 나노물질을 24시간 동안 노출한 결과 나노입자는 핵이나 미토콘드리아가 아닌 핵 근처의 소낭에서 관찰되었으며 금 나노입자는 내피세포보다 상피세포에 더 많이 축적되는 것으로 확인되었다.²³⁾ 따라서 추후 세포의 종류에 따른 나노입자의 축적에 관한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

4. 결 론

금 나노물질의 HepG2 세포 내 축적을 ICP-MS 및

SP-ICP-MS를 통해 분석한 결과, 금 나노물질은 배지 및 세포 내에서 노출 농도에 비례하여 증가하였으며 노출한 나노물질은 일부(약 3.6%) 세포 내로 축적되며 대부분(약 88%)은 배지 내에 존재하는 것으로 확인되었다. 또한 배지 및 세포 내 총 금 함량 중 각각 약 82% 및 약 48%만이 SP-ICP-MS로 검출 가능한 입자의 형태를 유지하는 것으로 확인되었으며, 이는 배지 및 세포 내 나노입자의 응집 및 이온화 때문으로 추정된다. 본 연구는 SP-ICP-MS를 이용하여 배지 및 세포 내 금 나노입자의 농도 및 크기분포 분석이 가능함을 확인하였고 ICP-MS를 이용한 총 농도 분석 결과와 비교하여 체내에 노출되어 주요 표적장기인 간에 축적된 나노물질의 간세포 내 분포 경향을 파악하였다는 것에 의의가 있으며, 추후 본 분석법을 나노물질의 특성 및 세포의 종류가 상이한 노출 조건에서 나노물질의 축적 평가에 적용 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 국립환경과학원 연구사업(NIER 2017-01-01-013) 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 환경부, “나노물질 유통량 조사(IV) 및 산업계 안전관리 지원 시범사업”, **2015**, 29-50.
2. M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, D. Rejeski, M. S. Hull, “Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory”, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **2015**, 21, 1769-1780.
3. K. Kettler, K. Veltman, D. van de Meent, A. van Wezel and A. J. Hendriks, “Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2014**, 33, 481-492.
4. J.K. Fard, S. Jafari and M.A. Eghl, “A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles”, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **2015**, 5, 447-454.
5. Y. Wang, H. Cui, J. Zhou, F. Li, J. Wang, M. Chen and Q. Liu, “Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells”, *Environmental Science and Pollution Research*, **2015**, 22, 5519-5530.
6. Y. Xue, T. Zhang, B. Zhang, F. Gong, Y. Huang and M. Tang, “Cytotoxicity and apoptosis induced by silver nanoparticles in human liver HepG2 cells in different dispersion media”, *Journal of Applied Toxicology*, **2016**, 36, 352-360.
7. M. Milić, G. Leitinger, I. Pavičić, M. Zebić A. Z. Avdičević, S. Dobrović, W. Goessler and I. V. Vrček, “Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells”, *Journal of Applied Toxicology*, **2015**, 35, 581-592.
8. A. R. Gliga, S. Skoglund, I. O. Wallineder, B. Fadeel and H. L. Karlsson, “Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release”, *Particle and Fibre Toxicology*, **2014**.
9. H. J. Yen, S. H. Hsu and C. L. Tsai, “Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes”, *Small*, **2009**, 5, 1553-1561.
10. D. Bao, Z. G. Oh and Z. Ghen, “Characterization of silver nanoparticles internalized by *Arabidopsis* plants using single particle ICP-MS analysis”, *Frontiers in Plant Science*, **2016**.
11. J. Jiménez-Lamana, J. Wojcieszek, M. Jakubiak, M. Asztemborska and J. Szpunar, “Single particle ICP-MS characterization of platinum nanoparticles uptake and bioaccumulation by *Lepidium sativum* and *Sinapis alba* plants”, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2016**, 31, 2321-2329.
12. K. Loeschner, M. S. J. Brabrand, J. J. Sloth and E. H. Larsen, “Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2014**, 406, 3845-3851.
13. K. Loeschner, J. Navratilova, C. Kjøbler, K. Mølhav, S. Wagner, F. von der Kammer and E. H. Larsen, “Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, 405, 8185-8195.
14. I. L. Hsiao, F. S. Bierkandt, P. Reichardt, A. Luch, Y. J. Huang, N. Jakubowski, J. Tentschert and A. Haase, “Quantification and visualization of cellular uptake of TiO₂ and Ag nanoparticles: comparison of different ICP-MS techniques”, *Journal of Nanobiotechnology*, **2016**, 14, 1-13.
15. H. Klingberg, L. B. Oddershede, K. Loeschner, E. H. Larsen, S. Loft and P. Møller, “Uptake of gold nanoparticles in primary human endothelial cells”, *Toxicology Research*, **2015**, 4, 655-666.
16. L. Yang, H. Kuang, W. Zhang, Z. P. Aguilar, H. Wei and H. Xu, “Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice”, *Scientific Reports*, **2017**, 7, 3303.
17. E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy and M. D. Wyatt, “Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity”, *Small*, **2005**, 1, 325-327.
18. Â. Barreto, L. G. Luis, A. V. Girão, T. Trindade, A. M. W. M. Soares and M. Oliveira, “Behavior of colloidal gold nanoparticles in different ionic strength media”, *Journal of Nanoparticle Research*, **2015**, 17, 1-13.
19. W. Cui, J. Li, Y. Zhang, H. Rong, W. Lu and L. Jiang, “Effect of aggregation and the surface properties of gold nanoparticles on cytotoxicity and cell growth”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2012**, 8, 46-53.
20. I. Canton and G. Battaglia, “Endocytosis at the nanoscale”, *Chemical Society Reviews*, **2012**, 41, 2718-2739.
21. S. Sabella, R. P. Carney, V. Brunetti, M. A. Malvindi, N.

- Al-Juffali, G. Vecchio, S. M. Janes, O. M. Bakr, R. Cingolani, F. Stellacci and P. P. Pompa, "A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles", *Nanoscale*, **2014**, 6, 7052-7061.
22. V. A. VanWinkle, K. L. de Mesy Bentley, J. M. Malecki, K. K. Gunter, I. M. Evans, A. Elder, J. N. Finkelstein, G. Oberdörster and T. E. Gunter, "Nanoparticle (NP) uptake by type-alveolar epithelial cells and their oxidant stress response", *Nanotoxicology*, **2009**, 3, 307-318.
23. C. Freese, C. Uboldi, M. I. Gibson, R. E. Unger, B. B. Weksler, I. A. Romero, P. O. Couraud and C. J. Kirkpatrick, "Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells", *Particle and Fibre Toxicology*, **2012**, 9, 23.