

## 산화네오디뮴 기도투여에 따른 폐내 활성산소종 발생 및 DNA의 산화적 손상

김종규<sup>1</sup> · 김수진 · 강민구<sup>2</sup> · 송세욱\*

<sup>1</sup>한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원

<sup>2</sup>한국산업안전보건공단 전남동부지도원

## The Effect of Neodymium Oxide on the Generation of Reactive Oxygen Species and DNA Oxidative Damage by Intratracheal Instillation

Jong-Kyu Kim<sup>1</sup> · Soo-Jin Kim · Min-Gu Kang<sup>2</sup> · Se-Wook Song\*

<sup>1</sup>Occupational Safety and Health Research Institute, KOSHA

<sup>2</sup>Jeonnam Dongbu Area Office, KOSHA

### ABSTRACT

**Objectives:** This study was performed to assay the effect of neodymium oxide on the generation of reactive oxygen species and DNA oxidative damage by intratracheal instillation.

**Methods:** Two groups of rats were exposed to neodymium oxide( $\text{Nd}_2\text{O}_3$ ) via intratracheal instillation with doses of 0.5 mg and 2.0 mg, respectively. At two days and at 12 weeks after exposure, the contents of neodymium oxide in the lung, liver, kidney, heart and brain, leukocyte, olive tail moment, ROS, RNS, lactate dehydrogenase, albumin, cytokine and MDA from BALF were measured.

**Results:** Neodymium oxide contents in the liver, kidney, heart, and brain were detected at less than 1  $\mu\text{g/g}$  tissue concentration. However, in the lungs at four weeks the highest amount were detected and then found to be drastically reduced at 12 weeks.

ROS and RNS in bronchoalveolar lavage increased in concentration dependently at two days, four weeks and 12 weeks after neodymium oxide instillation. However, ROS and RNS decreased with the passage of time.

At two days the total number of WBC in BALF in the high concentration group was significantly increased, and at four weeks the total number of WBC were significantly increased in the low and high concentration groups( $p<0.01$ ).

At two days after exposure, the LDH of the low and high concentration groups was significantly increased. At 12 weeks, only the LDH of the high concentration group was significantly increased compared to in the control group( $p<0.01$ ).

As a result of Comet assay, after two days, damage to the DNA of the low and high concentration groups was observed.

**Conclusions:** Intratracheal instillation of neodymium oxide induces the generation of ROS and DNA damage in rats.

**Key words:** bronchoalveolar lavage, Comet assay, Neodymium oxide, ROS

### I. 서 론

희토류 금속원소는 첨단산업의 비타민이라고 한다. 이는 현대 첨단산업에서 꼭 필요하다는 측면에서 인체의 비타민에 비유되고 있으며 국가 전방 주력산업

에서 반드시 필요한 필수 금속으로 그 사용 및 중요성이 강조되고 있으며, 특히 17가지의 희토류 금속원소 중 특성이 탁월하고, 생산량이 많은 원소 중 하나인 네오디뮴은(Park, 2012), CAS number가 1313-97-9이며, 분자식은  $\text{Nd}_2\text{O}_3$ 이다. 분자량은 336.48 g/mol 이

\*Corresponding author: Se-Wook Song, Tel: 052-703-0900, E-mail: s88093@kosha.net  
Occupational Safety and Health Research Institut. KOSHA. 400 Jongga-ro, Jung-gu, Ulsan  
Received: July 11, 2014, Revised: September 3, 2014, Accepted: September 5, 2014

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

며, 밝은 푸른 회색을 띤 육방정계 결정구조이다. 밀도는  $7.24 \text{ g/cm}^3$  이며, 녹는점은  $2,233^\circ\text{C}$ 이고, 끓는점은  $3,760^\circ\text{C}$ 이다

이다(Wikimedia Foundation Inc., 2013). 우리나라에서는 네오디뮴이 생산되고 있지는 않으나, 수입량은 6 톤이며, 사용량은 3 톤이다(Kim & Park, 2013). 향후 소재산업의 발달로 사용량 및 노출근로자가 증가할 것으로 전망된다. 탄소아크램프에서 나오는 희토류 함유 흙과 분진에 노출된 근로자가 호흡곤란, 청백증(Cyanosis), 비빔거품소리(Crepitant rale) 증상을 보였으며, 진폐판정을 받은 사례가 보고되었다(Vocaturro et al., 1983). 세포독성시험결과 폐포 대식세포에 독성을 유발하고(Ronal et al., 1987), 동물실험에서 세포면역 및 체액면역에 영향을 주고 간 기능을 교란시키며(Jie et al., 2011b) 세포괴사, 간의 호염기성적혈구증, 신세뇨관 구조의 이상, 혈과 및 신장 모세혈관의 막힘 심장출혈을 유발시키는 등(Jie et al., 2011a) 네오디뮴의 독성이 보고되었다. 그러나 네오디뮴의 흡입독성이 많이 밝혀지지 않아 기도투입에 따른 흡입독성 연구를 수행하였다.

산화네오디뮴을 시험동물의 기도 내 주입 후 폐에서 흡수되어 간, 신장, 심장, 뇌 등 다른 장기로의 이동 축적이 얼마나 잘 일어나는지를 파악하기 위하여 각 장기 내 산화네오디뮴 분포량을 측정하였으며, 폐에서 흡수되어 산화적 손상일으키는 지 여부를 확인하기 위하여 활성산소종(ROS, RNS)을 측정하였다. 또한 폐포 세포에 염증반응이 유발되는 지를 확인하기 위하여 폐포세척액 내 백혈구를 측정하였으며, 폐조직손상 여부를 확인하기 위하여 Lactate dehydrogenase, Albumin을 측정하였다. 그리고 산화네오디뮴이 폐 면역체계에 미치는 영향을 확인하기 위하여 폐포세척액내 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10을 측정한다. 그리고 세포막의 지질 과산화가 발생하여 세포와 DNA를 손상시키는 지 여부를 확인하기 위하여 Malondialdehyde를 측정하였다. 폐세포 DNA의 산화적 손상여부를 확인하기 위하여 폐세포 Comet Assay를 실시하였다.

따라서, 본 연구에서는 산화네오디뮴을 시험동물의 기도 내 주입에 따른 독성연구를 통하여 근로자의 건강보호를 위한 기초자료 및 유해성평가 기초자료를 생산하고자 본 연구를 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 실험재료

본 연구에서는 산화네오디뮴( $< 100 \text{ nm}$ , Sigma-Aldrich, [Nd $2\text{O}_3$ ; 1313-97-9], Product No. 634611, Lot No. MKBC4929V, USA)을 구입하여 시험물질로 사용하였다.

### 2. 용량 설정 및 투여방법

시험동물 당 멸균한 시험물질을 생리식염수에 저농도군, 고농도군에 각각  $1.7 \text{ mg/ml}$ ,  $6.7 \text{ mg/ml}$  농도로  $0.3 \text{ ml}$ (각각  $0.5 \text{ mg}$ ,  $2.0 \text{ mg}$ )를 시험동물의 기도 내(Intratracheal instillation)로 1회 투여하였다(Bellmann et al., 1997).

### 3. 시험동물 및 사육환경

시험동물은 특정병원체 부재동물(Specific pathogen free, SPF) Sprague-Dawley 수컷 7주령 랫드를 중앙실험동물(주)에서 분양받아 동물실에서 2주 순화시킨 후 9주령 켜부터 노출시켰다. 대조군 24마리, 저농도 24마리, 고농도 24마리로 군을 구성하였으며, 각 군의 시험동물은 기도 투여 후 2일째, 4주째, 12주째 시험동물을 희생시켰다. 동물사육실은 온도  $22\pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 20\%$ , 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간(오전 9시~오후 9시) 및 조도 150~300 Lux로 설정하였으며, 사료는 방사선 멸균된 실험동물용 고형사료(Labdiet 5053, PMI Nutrition, St. Louis, MO, USA)를 자유롭게 섭취시켰다. 물은 자유로이 섭취토록 하였다.

### 4. 폐, 간, 신장, 심장, 뇌 장기내 산화네오디뮴 정량

장기에 누적된 산화네오디뮴은 2일째, 4주째, 12주째 폐, 간, 신장, 심장, 뇌를 건조기에서 1일 건조 후 65% 질산(Merck, USA)으로 녹인 후 ICP-MS(7500CE, Agilent Technologies, USA)로 정량하였다.

### 5. 기관지폐포 세척 및 생화학 검사

기관지폐포 세척(BAL, Bronchoalveolar lavage)은 에어레인(Isoflurane, Ilsung Pharm, Korea)으로 마취한 시험동물의 기관지를 절개한 후 PBS (calcium-and magnesium-free phosphate buffer solution, pH 7.4)  $3 \text{ ml}$ 를 사용하여 시험동물의 폐를 총 10회 세척하였다.

기관지폐포 세척액내 활성산소종(ROS, RNS)은

OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit(CELL BIOLABS, INC., STA-347, 96 assays)을 이용하여 측정하였다.

또한 자동혈액분석기(Hemavet 850, Drew Scientific, USA)를 이용하여 BAL내 WBC(White blood cell), NE (Neutrophile), LY(Lymphocyte), MO(Monocyte), EO (Eosinophile), BA(Basophile)을 측정하였으며, 혈액생화학 분석기(TBA 20FR, Toshiba Co, Japan)를 이용하여 LDH (Lactate dehydrogenase), ALB(Albumin)을 측정하였다.

IFN- $\gamma$ (BD OptEIA™ Set Rat IFN- $\gamma$ ), IL-6(BD OptEIA™ Set Rat IL-6), IL-10(BD OptEIA™ Set Rat IL-10), TNF- $\alpha$ (BD OptEIA™ Set Rat TNF- $\alpha$ )를 이용하여 기관지폐포 세척액을 1,500 g에서 10분간 원심 분리하여 수집한 상층액의 IFN- $\gamma$ (Interferon gamma), IL-6(interleukin-6), IL-10(interleukin-10), TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )를 측정하였다.

#### 6. Comet assay

각 군의 시험동물은 기도 투여 후 2일째, 4주째 폐세포의 DNA 손상정도 측정하기 위하여 형광물질 (ethidium bromide, 10× stock solution : 20  $\mu$ g/ml)로 염색

한 DNA를 20~40배율의 형광현미경으로 관찰하였다. 또한 SCGE 자료를 정량화하기 위해서는 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.

#### 7. 자료의 통계처리

시험결과는 평균과 표준편차로 표시하였으며, SPSS 18을 이용하여 일원배치분산분석(One-way ANOVA)을 검정하였으며 유의성이 인정된 자료의 사후검증은 Dunnett's test와 Duncan multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

### III. 연구결과

#### 1. 폐, 간, 신장, 심장, 뇌 장기의 산화네오디뮴 분포량

산화네오디뮴을 기도 주입 시 폐에서 흡수되어 각 장기로 이동 축적되고, 농도가 증가할수록 각 장기에 축적된 산화네오디뮴이 증가할 것이며, 주입 후 시간

**Table 1.** The contents of neodymium oxide in lung, liver, kidney, heart and brain of SD male rats after neodymium oxide intratracheal instillation

(n=4, unit : $\mu$ g/g tissue)				
Organ	Exposure Period	Control	Low	High
Lung	2 days	0.00±0.00	165.17±69.76	6450.53±3014.83*
	4 weeks	0.67±1.25	1276.95±553.24	7955.22±3833.78*
	12 weeks	0.08±0.16	181.06±150.80	756.27±466.69*
Liver	2 days	5.18±8.29	0.51±0.69	0.23±0.14
	4 weeks	0.14±0.18	0.23±0.08	0.53±0.28
	12 weeks	0.29±0.56	0.04±0.04	0.11±0.07
Kidney,	2 days	0.08±0.13	0.02±0.01	0.02±0.01
	4 weeks	0.01±0.01	0.18±0.11	0.76±1.07
	12 weeks	0.00±0.00	0.03±0.03	0.04±0.02
Heart	2 days	0.04±0.05	0.00±0.01	0.02±0.03
	4 weeks	0.13±0.12	0.06±0.02	0.04±0.06
	12 weeks	0.00±0.01	0.00±0.00	0.00±0.01
Brain	2 days	0.14±0.19	0.02±0.05	0.15±0.13
	4 weeks	0.00±0.00	0.02±0.04	0.02±0.05
	12 weeks	0.00±0.00	0.00±0.01	0.01±0.01

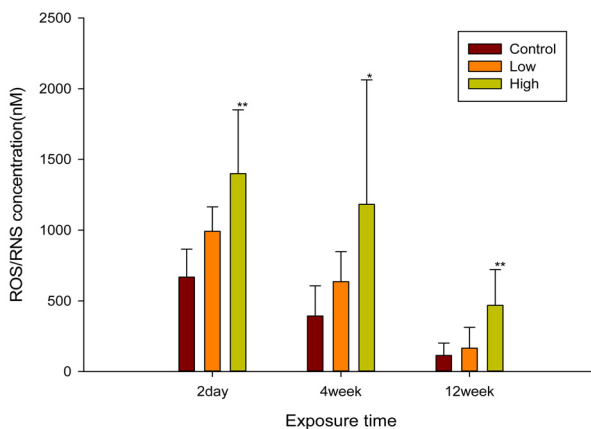
All values are expressed as mean±S.D.

\*: different as compared with control group,  $P < 0.01$

이 경과함에 따라 제거(Clearance) 기전에 의하여 축적된 농도가 감소할 것이라는 가설 하에 폐, 간, 신장, 심장 및 뇌에 축적된 산화네오디뮴을 측정된 결과 폐에서는 주입된 농도가 증가할수록 산화네오디뮴이 높게 검출되었다. 주입 후 2일째는 저농도군에서 평균 165  $\mu\text{g/g tissue}$ 의 농도로 검출되었으며, 고농도군에서는 평균 6450  $\mu\text{g/g tissue}$ 의 농도로 검출되었다. 4주째는 저농도군에서 평균 1276  $\mu\text{g/g tissue}$ 의 농도로 검출되었으며, 고농도군에서는 7955  $\mu\text{g/g tissue}$ 의 농도로 검출되었다. 또한 12주째는 저농도군에서 평균 181  $\mu\text{g/g tissue}$ 의 농도로 검출되었으며, 고농도군에서는 756  $\mu\text{g/g tissue}$ 의 농도로 검출되었으며, 시간이 지남에 따라 저농도 4주째군에서는 2일째군 보다 7.7배 높게 검출되었으나, 12주째는 1.1배로 낮게 검출되었다. 고농도 4주째군에서는 2일째군 보다 1.2배 높게 검출되었으나, 12주째군은 0.1배로 낮게 검출되었다. 그러나 간, 신장, 심장, 뇌에서 축적된 산화네오디뮴은 1  $\mu\text{g/g tissue}$  미만이었다(Table 1).

## 2. BALF 내 ROS, RNS 측정결과

산화네오디뮴을 기도 주입 시 폐에서 흡수되어 ROS, RNS가 발생하여 산화적 손상이 발생할 것이라고 예측되어 폐내 ROS, RNS를 측정된 결과 2일째, 4주째, 12주째 모두 농도 의존적으로 ROS, RNS의 발생



**Figure 1.** ROS and RNS generation of SD male rats after neodymium oxide instillation (n=4).

n: the number of animals

All values are expressed as mean $\pm$ S.D.

\*: different as compared with control group,  $P < 0.05$

\*\* : different as compared with control group,  $P < 0.01$

이 증가하였으며, 2일째 ROS, RNS의 발생이 가장 많았으며, 4주째, 12주째 시간이 지남에 따라 ROS, RNS의 발생량은 감소하였다(Figure 1).

## 3. 산화네오디뮴 주입 후 폐포세척액(BAL)내 백혈구 측정결과

산화네오디뮴을 기도 주입 시 폐포에서 발생된 활성산소종 발생으로 인한 산화적 스트레스가 발생하며 염증반응을 유발할 것이라는 가설 하에 폐포세척액내 염증반응이 유발되었는지 여부를 파악한 결과 WBC는 산화네오디뮴 기도 투여 후 2일째 고농도군에서 유의한 증가를 보였으며( $p < 0.01$ ), 4주째에는 저농도 고농도군에서 모두 유의한 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). 12주째는 WBC가 농도 의존적으로 증가하는 경향이 관찰되었으나, 통계적으로는 유의한 증가가 관찰되지 않았다(Table 2).

## 4. BALF 내 Lactate dehydrogenase, Albumin 측정결과

산화네오디뮴을 기도 주입 시 폐조직손상을 파악하기 위하여 LDH(Lactate dehydrogenase), ALB(Albumin)를 측정된 결과 노출 후 2일째 저농도군과 고농도군에서 LDH가 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였으며( $p < 0.01$ ), 4주째 저농도군( $p < 0.05$ ), 12주째 고농도군에서 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 또한 ALB도 2일째 유의하게 증가하였으며, 12주째 고농도에서 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ ) (Figure 2, 3).

## 5. BALF 내 Cytokine 측정결과

산화네오디뮴이 폐 면역계에 미치는 영향을 확인하기 위하여 폐포세척액내 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10을 측정된 결과 TNF- $\alpha$ 는 2일째 농도의존적으로 증가하였으며, IFN- $\gamma$ 는 고농도군에서 감소하였으며, IL-6는 12주째 고농도군에서 감소하였다. 그리고 IL-10는 12주째 저농도, 고농도군에서 감소하였다(Figure 4).

## 6. BALF 내 MDA 측정결과

산화네오디뮴을 기도 주입 시 폐에서 흡수되어 ROS가 발생하여 세포막의 지질과산화 발생하여 세포와 DNA를 손상시킬 것으로 예측되어 BALF 내 MDA를

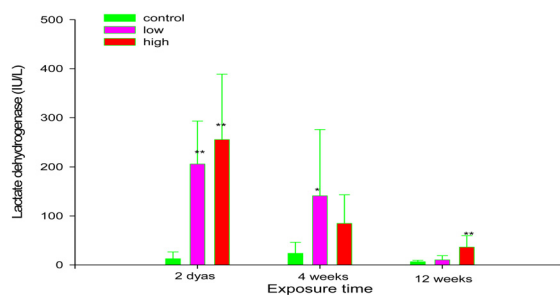
**Table 2.** Leukocyte counts from broncho alveolar lavage fluid(BALF) of SD male rats after neodymium oxide instillation (n=8)

BAL Cells	Exposure Period	Control	Low	High
WBC (K/ $\mu$ L)	2 days	0.43 $\pm$ 0.16	1.17 $\pm$ 0.62	1.87 $\pm$ 1.02*
	4 weeks	0.35 $\pm$ 0.09	1.02 $\pm$ 0.4*	1.16 $\pm$ 0.34*
	12 weeks	0.68 $\pm$ 0.19	0.81 $\pm$ 0.33	1.14 $\pm$ 0.57
Neutrophils (K/ $\mu$ L)	2 days	0.15 $\pm$ 0.07	0.19 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.32
	4 weeks	0.11 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.06	0.3 $\pm$ 0.09
	12 weeks	0.23 $\pm$ 0.09	0.23 $\pm$ 0.09	0.35 $\pm$ 0.27
Lymphocyte (K/ $\mu$ L)	2 days	0.1 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.47	1.21 $\pm$ 0.57
	4 weeks	0.13 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.33	0.63 $\pm$ 0.25
	12 weeks	0.12 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.2	0.48 $\pm$ 0.22
Monocytes (K/ $\mu$ L)	2 days	0.03 $\pm$ 0.06	0.04 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.11
	4 weeks	0.02 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.04
	12 weeks	0.01 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.03
Eosinophyls (K/ $\mu$ L)	2 days	0.09 $\pm$ 0.06	0.05 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.06
	4 weeks	0.05 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.04
	12 weeks	0.15 $\pm$ 0.07	0.15 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.05
Basophyls (K/ $\mu$ L)	2 days	0.06 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.03
	4 weeks	0.05 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.02
	12 weeks	0.15 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.05
Neutrophyls (%)	2 days	37.05 $\pm$ 8.97	16.24 $\pm$ 6.19	16.11 $\pm$ 4.57
	4 weeks	31.42 $\pm$ 7.56	27.98 $\pm$ 8.19	26.67 $\pm$ 5.71
	12 weeks	34.02 $\pm$ 6.98	30.01 $\pm$ 8.15	28.55 $\pm$ 7.64
Lymphocytes(%)	2 days	23.2 $\pm$ 9.23	70.56 $\pm$ 7.1	67.08 $\pm$ 8.31
	4 weeks	36.73 $\pm$ 8.78	51.02 $\pm$ 13.79	53.11 $\pm$ 7.93
	12 weeks	19.33 $\pm$ 9.36	28.85 $\pm$ 11.81	42.62 $\pm$ 8.89
Monocytes (%)	2 days	2.64 $\pm$ 1.95	4.3 $\pm$ 1.43	6.96 $\pm$ 2.49
	4 weeks	3.12 $\pm$ 1.56	5.49 $\pm$ 2.75	6.75 $\pm$ 3.03
	12 weeks	1.91 $\pm$ 2.16	4.01 $\pm$ 1.83	5.05 $\pm$ 2.23
Eosinophyl (%)	2 days	21.33 $\pm$ 6.69	4.85 $\pm$ 1.97	4.68 $\pm$ 1.77
	4 weeks	14.47 $\pm$ 3.77	8.88 $\pm$ 5	8.48 $\pm$ 4.12
	12 weeks	22.22 $\pm$ 6	21.74 $\pm$ 6.7	13.54 $\pm$ 5.25
Basophylsl (%)	2 days	15.76 $\pm$ 3.26	2.83 $\pm$ 1.05	2.64 $\pm$ 1.31
	4 weeks	14.24 $\pm$ 5.43	6.62 $\pm$ 3.05	4.98 $\pm$ 2.11
	12 weeks	22.47 $\pm$ 6.43	15.37 $\pm$ 6.16	10.22 $\pm$ 3.35

n: the number of animals

All values are expressed as mean $\pm$ S.D.

\*: different as compared with control group, P&lt;0.01

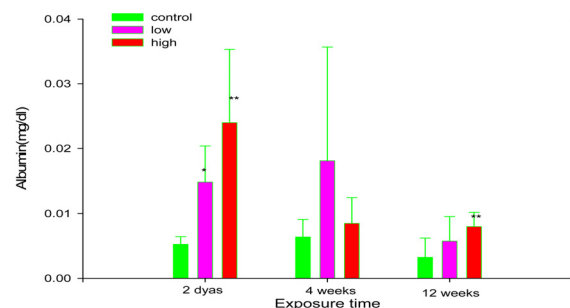
**Figure 2.** The lactate dehydrogenase in BALF after neodymium oxide intratracheal instillation (n=8).

n: the number of animals

All values are expressed as mean $\pm$ S.D.

\*: different as compared with control group, P&lt;0.05

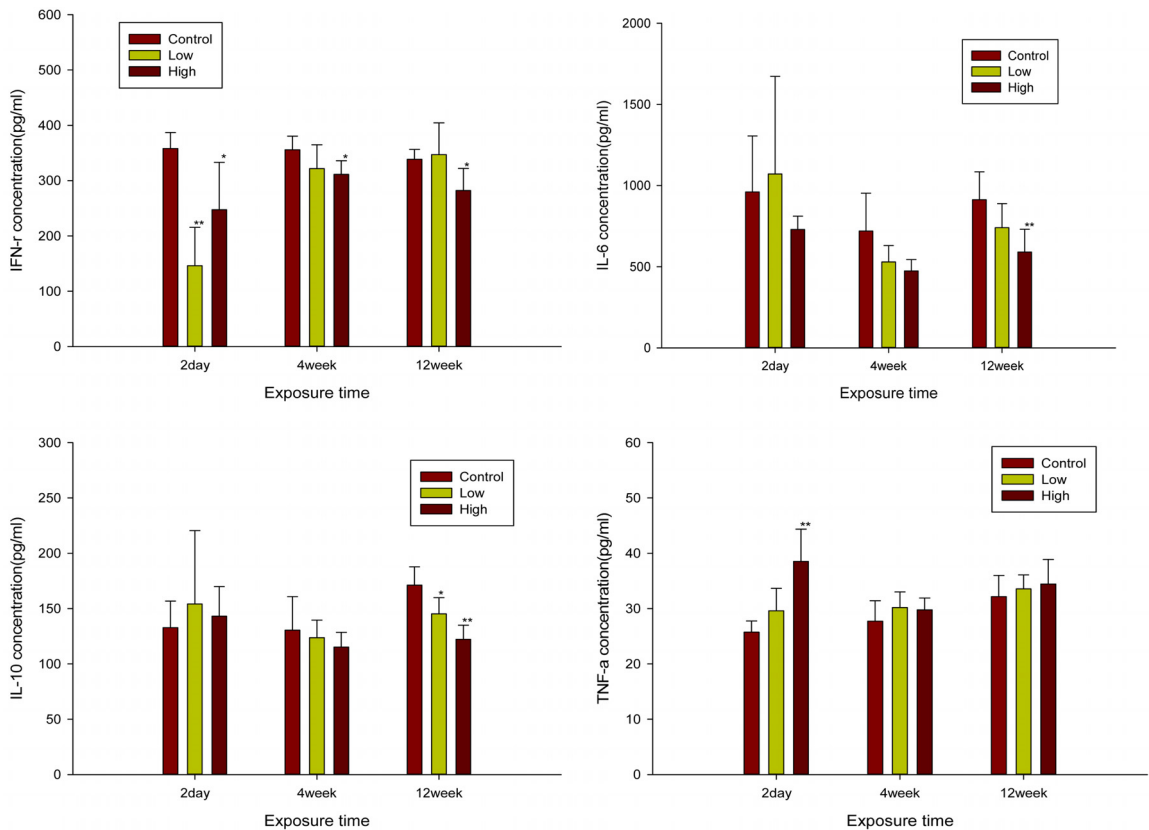
\*\*: different as compared with control group, P&lt;0.01

**Figure 3.** The albumin in BALF after neodymium oxide intratracheal instillation (n=8).

n: the number of animals

\*: different as compared with control group, P&lt;0.05

\*\*: different as compared with control group, P&lt;0.01

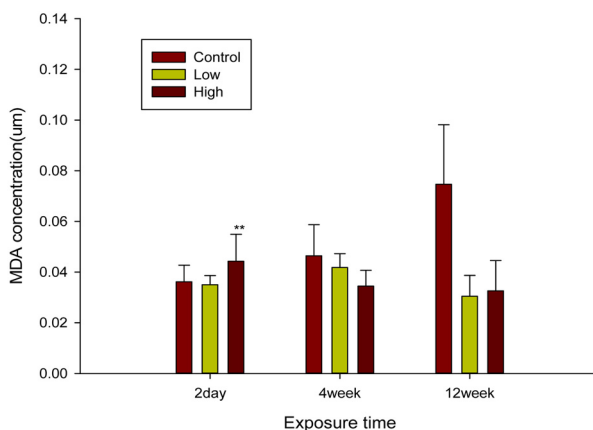


**Figure 4.** Cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid (n=8).

n: the number of animals

\*: different as compared with control group,  $P < 0.05$

\*\*: different as compared with control group,  $P < 0.01$



**Figure 5.** MDA levels in bronchoalveolar lavage fluid (n=8).

n: the number of animals

\*: different as compared with control group,  $P < 0.05$

\*\*: different as compared with control group,  $P < 0.01$

측정한 결과 2일째 고농도군의 MDA가 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 그러나 4주, 12주째는 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Figure 5).

## 7. Comet Assay 측정결과

산화네오디뮴을 기도 주입 후 폐세포 DNA의 산화적 손상여부를 확인하기 위하여 폐세포 Comet Assay를 실시한 결과 산화네오디뮴을 기도 주입 후 2일째 저농도군은 대조군에 비하여 Olive tail moment 값이 4.3배 높았고, 고농도군은 6.6배 높았으며 통계적으로도 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 그러나 4주째에는 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 또한 tail length도 기도 주입 후 2일째 저농도군은 3.4배 높았으며, 고농도군은 4.2배 높았으며 통계적으로도 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 그러나 4주째에는

**Table 3.** Olive tail moment values of FLARE assay after neodymium oxide intratracheal instillation (n=4)

Exposure Period	Control	Low	High
2 days	3.97±3.61	17.26±4.88*	26.43±3.15*
4 weeks	13.26±3.05	14.15±4.15	7.27±2.92

Unit: a.u.(arbitrary unit)

All values are expressed as mean±S.D.

\*: different as compared with control group,  $P < 0.01$ 

유의한 변화는 관찰되지 않았다(Table 3).

#### IV. 고 찰

희소금속은 소재산업의 발달로 향후 활용이 증가하고 사용 생산량이 증가할 것으로 예상된다. 특히 자석, 유리를 만들 때 첨가물 등 다양한 용도로 사용되는 네오디뮴은 독성이 많이 밝혀지지 않았으며, 노출기준도 설정되어 있지 않다. 이에 산화네오디뮴을 시험동물의 기도 내 주입하여 폐내 활성산소종 발생 및 폐세포 DNA의 산화적 손상연구를 통하여 근로자의 건강보호를 위한 기초자료 및 유해성평가 기초자료를 생산하고자 본 연구를 수행하였다.

Jie et al.(2011a)는 희토류가 세포속으로 쉽게 이동되어 단백질, 아미노산, 인지질 등과 결합하여 독성을 일으킬 것으로 설명하고 있으며, Haiquan et al.(2010)은 희토류가 뇌로 이동하며, 특히 나노입자는 세포를 통과하기 때문에 산화네오디뮴을 기도 주입 시 폐에서 흡수되어 폐, 간, 신장, 심장 및 뇌로 이동하여 축적될 것으로 예상되어 장기내 산화네오디뮴의 분포량을 측정하였다. 기도내 주입된 산화네오디뮴의 농도가 증가할수록 폐에서 높게 검출되었다. 산화네오디뮴 주입 후 2일째 고농도군에서는 저농도군보다 39배 높게 검출되었다. 이는 저농도군에서는 폐의 방어 기전인 제거기전이 어느 정도 작동되나, 고농도군에서는 용량이 과다하여 폐의 제거기전이 작동되지 않았기 때문인 것으로 사료된다.

4주째 고농도군에서는 저농도군보다 6배 높게 검출되었다. 또한 12주째 고농도군은 저농도군보다 4배 높게 검출되어 투여용량비와 같았다. 이는 4주째 이후 고농도군의 제거기능이 활발히 이루어져 12주째 투여용량비와 같은 비율로 산화네오디뮴이 검출

된 것으로 사료된다. 또한 시간이 지남에 따라 저농도군에서는 4주째에서 2일째보다 7.7배 높게 검출된 것으로 보아 기도내 투여된 산화네오디뮴이 폐내로 지속적으로 이동하고 있음을 알 수 있었다. 4주째 폐내 산화네오디뮴이 12주째 감소하는 것으로 보아 산화네오디뮴이 하루 당 제거되는 양은 저농도군에서는 19  $\mu\text{g/g tissue day}$ , 고농도군에서는 130  $\mu\text{g/g tissue day}$  인 것으로 추정된다.

Jie et al.(2011a)은  $\text{NdCl}_3$ 을 마우스에 60일 경구 투여한 결과 간, 신장, 심장에서 네오디뮴이 15 ~ 25  $\mu\text{g/g tissue}$  농도로 검출되었으며, 간에서 가장 많이 검출되고 신장 심장 순이었다. 또한 Haiquan et al.(2010)은  $\text{NdCl}_3$ 을 마우스에 14일 복강투여한 결과 뇌에서 네오디뮴이 검출되었다. 그러나 본 연구에서는 간, 신장, 심장, 뇌에서 산화네오디뮴은 1  $\mu\text{g/g tissue}$  미만 검출되었다. 이는 흡입된 산화네오디뮴이 폐에서 혈액을 통하여 전신으로 잘 이동하지 않거나, 노출경로, 투여 용량, 장기 반복 노출의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

산화네오디뮴을 기도 주입 시 폐포에서 발생된 활성산소종이 발생하고 산화적 스트레스가 발생하여 염증반응을 유발할 것으로 예측되어 폐포세척액내 총세포수를 측정한 결과 산화네오디뮴 기도 투여 후 2일째 고농도군에서 유의한 증가를 보였으며 ( $p < 0.01$ ), 4주째에는 저농도 고농도군에서 모두 유의한 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). 12 주째는 농도 의존적으로 증가하는 경향이 관찰되었으나, 통계적으로는 유의한 증가가 관찰되지 않았다.

염증유발 사이토카인  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 중  $\text{TNF-}\alpha$ 는 증가하는 경향을 보이나,  $\text{IFN-}\gamma$ 와 IL-6는 감소하는 경향을 보였다. 이는 Carter 등은 카본블랙을 노출 시 염증유발 사이토카인이 농도 의존적으로 증가(Carter et al., 2006)하였으나, 본 연구결과와는 일치하지 않았다. 또한 항염증 사이토카인 IL-10은 4주, 12주째는 감소하는 경향을 보였다. Carter의 연구에서 IL-10증가하였으나 본 연구결과와 일치하지 않았다. 이는 산화네오디뮴이 마크로파지에 손상을 직접 일으켜 항염증유발 사이토카인 IL-10생성이 감소한 것으로 사료된다.

활성산소종이 고도불포화지질(Polyunsaturated lipids)을 분해하면 malondialdehyde가 생성되어 산화적 스트레

스의 생물학적표지로 이용된다(Pryor & Stanley, 1975). 또한 malondialdehyde는 반응성이 큰 aldehyde(-CHO)를 함유하는 유기 화합물 군으로서 친전자성을 지니고 있어 독성 스트레스를 일으키고 공유결합을 하여 지질산화 최종산물, 무효소당화 최종산물을 생성시키며(Farmer et al., 2007), malondialdehyde는 deoxyadenosine과 deoxyguanosine과 반응을 하여 MIG와 같은 발암물질을 생성시킨다(Marnett, 1999). 본 연구에서 2일째 고농도군의 MDA가 대조군에 비하여 유의하게 증가( $p<0.01$ )한 것으로 보아 산화네오디뮴은 급성으로 기관지 및 폐 세포막의 지질과산화를 일으킨 것으로 판단된다.

LDH는 심장, 간, 폐 그리고 많은 조직에 분포하고 있으며, 조직이 손상을 받으면 LDH가 조직에서 빠져나와 LDH의 활성도가 증가하는 것으로 알려져 있다(Na et al., 2009). 본 연구에서는 산화네오디뮴을 기도 주입 시 폐 염증발생여부를 파악하기 위하여 LDH(Lactate dehydrogenase), ALB(Albumin)를 측정하고 결과 노출 후 2일째 저농도군과 고농도군에서 LDH가 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 4주째 저농도군, 12주째 고농도군에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 또한 ALB도 2일째 유의하게 증가하였으며, 12주째 고농도에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 이는 산화네오디뮴 기도 주입에 의하여 폐 염증 반응이 발생하였으며, 종말세기관지 및 폐포관의 손상이 발생하였음을 확인할 수 있었다. Edilberto 등이  $TiO_2$ 의 아만성흡입시험 연구에서 세포세척액의 LDH를 측정한 결과와 유사하게 노출 시 LDH, 단백질이 증가하고, 노출이 끝난 후 시간이 지남에 따라 감소하였다(Edilberto et al., 2004). 또한 Fei et al.(2011)은  $NdCl_3$ 를 14일 복강투여 후 혈청에서 LDH를 측정한 결과 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다.

산화네오디뮴을 기도 주입 후 폐세포 DNA의 산화적 손상여부를 확인하기 위하여 폐세포 Comet Assay 분석 결과 기도 주입 후 2일째 저농도군은 대조군에 비하여 Olive tail moment 값이 4.3배 높았으며, 고농도군은 6.6배 높았으며 통계적으로도 유의하게 증가하였다. 그러나 4주째에는 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 또한 tail length도 기도 주입 후 2일째 저농도군은 3.4배 높았으며, 고농도군은 4.2배 높았으며 통계적으로도 유의하게 증가하였다. 그러나 4주째에는 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 산화네오

디뮴을 기도에 주입 시 2일째는 DNA의 산화적 손상을 일으키나, 4주째에는 폐포세포가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다.

Anand & Akhilesh(1995)은 neodymium( $Nd_2O_3$ )을 생쥐의 복강에 주사 후 골수세포의 염색체이상(Chromosome aberration)을 실험한 결과 농도 의존적으로 염색체 이상이 발생하였으며, 12시간 노출 후 염색체 이상이 통계적으로 유의하게 증가하였다고 보고하였다. 이는 산화네오디뮴이 골수세포의 염색체에 영향을 미치고 있으며, 폐세포 DNA에 손상을 일으키는 것으로 사료된다.

Fei et al.(2011)은  $NdCl_3$ 를 14일 복강투여 후 간독성을 연구한 결과 염증 사이토카인을 활성화하여 간조직에 손상을 주어 간세포에 손상을 주고 자멸사(Apoptosis)를 유발시킨 것과 같이 산화네오디뮴이 폐세포에 손상을 주고 자멸사를 유발시켜 Olive tail moment가 증가한 것으로 사료된다.

따라서 산화네오디뮴 나노입자를 기도내 투여시 폐내 활성산소종 발생, 기관지세척액내 백혈구 증가, LDH 증가, 폐세포 DNA 산화적손상 발생을 관찰할 수 있었다.

현재 노출기준이 설정은 되어 있지 않으나 향후 사용 취급량이 증가할 것으로 예상되므로 산화네오디뮴 분진발생사업장에서는 국소배기장치 설치 및 개인보호구 착용 등 산업위생학적 관리가 필요한 것으로 판단된다.

## V. 결 론

랫드에 산화네오디뮴을 0.5 mg, 2.0 mg을 기도내 투여결과 폐내 활성산소종 발생, 기관지세척액내 백혈구 증가, LDH 증가, 폐세포 DNA 산화적손상 발생을 관찰할 수 있었다.

## 감사의 글

본 논문은 한국산업안전보건공단 산업안전보건연구원의 연구비 지원을 받아 수행된 것임.

## References

Anand MJ and Akhilesh CS. Clastogenicity of lanthanides:



- induction of chromosomal aberration in bone marrow cells of mice in vivo. *Mutat Res.* 1995 Jan;341(3): 193-7
- Bellmann B, Muhle H, Kamstrup O, Graeger UF. Investigation of the biodurability of man made vitreous fibers ion rat lungs. *Environ Health perspect.* 1997;102(suppl 5):185-189.
- Carter JM, Corson N, Driscoll KE, Elder A, Finkelstein JN et al. A comparative dose-related response of several key pro- and antiinflammatory mediators in the lungs of rats, mice, and hamsters after subchronic inhalation of carbon black. *J Occup Environ Med.* 2006 Dec;48(12):1265-78
- Edilberto B, James B, Mangum, BA, Wong, Bahman A, et al. Pulmonary Responses of Mice, Rats, and Hamsters to Subchronic Inhalation of Ultrafine Titanium Dioxide Particles *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 77, 347-357 (2004)
- Farmer EE, Davoine C (2007). "Reactive electrophile species". *Curr. Opin. Plant Biol.* 10 (4): 380-6
- Fei M, Li N, Ze Y, Liu J, Wang S, et al. The mechanism of liver injury in Mice caused by lanthanoids *Biol Trace Elem Res.* 2011 Jun;140(3):317-29
- Haiquan Z, Zhe C, Renping H, Jie C, Mengmeng H, et al. Oxidative Injury in the Brain of mice Caused by Lanthanid. *Biol Trace Elem Res.* 2010 Jul 8
- Jie C, Na L, Jingwei C, Zhe C, Renping H, et al. Organ Histopathological Changes and its Function Damage in Mice Following Long-term Exposure to Lanthanides Chloride. *Biol Trace Elem Res.* 2011a Sep 8
- Jie C, Zhe C, Renping H, Yaling C, et al. Immune dysfunction and liver damage of mice following exposure to lanthanoids. *Environ Toxicol.* 2011b Sep 16
- Kim GU, Park MC (2013). "Studies on the priority of rare metals for the risk assessment" Occupational safety and health research institute
- Marnett LJ (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde". *Mutat. Res.* 424 (1-2): 83-95.
- Na L, Yanmei D, Min Z, Chao L. The effects of Lanthanoid on the Structure-Function of Lactate Dehydrogenase from Mice Heart. *Biol Trace Elem Res* (2009) 132:164-175
- Olive PL and Banath JP. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. *INT. J. RADIAT. BIOL.*, 1993, VOL., 64, NO. 4, 349~358
- Park JU Neodymium(Nd) 2012 [cited 2013 Jun 11]. Available from: [http://navercast.naver.com/contents.nhn?rid=44&contents\\_id=15443](http://navercast.naver.com/contents.nhn?rid=44&contents_id=15443)
- Pryor WA, Stanley JP (1975). "Letter: A suggested mechanism for the production of malondialdehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation". *J. Org. Chem.* 40 (24): 3615-7
- Ronald JP, John LB, Jeffrey BS. Cytotoxicity of the Rare Earth Metals Cerium, Lanthanum, and Neodymium in Vitro: Comparisons with Cadmium in a Pulmonary Macrophage Primary Culture System. *Environmental Research* 43, 142-156(1987)
- Vocaturro G, Colombo F, Zanoni M, Rodi F, et al. Human exposure to heavy metals. Rare earth pneumoconiosis in occupational workers. *Chest.* 1983 May;83(5): 780-3.
- Wikimedia Foundation, Inc. Neodymium(III) oxide. 2013 [cited 2013 Jun 10]. Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Neodymium\(III\)\\_oxide](http://en.wikipedia.org/wiki/Neodymium(III)_oxide)