

배양 레이디히 세포를 이용한 은나노 물질의 산화적 스트레스발생 연구

박 은 정, 박 광 식*

동덕여자대학교 약학대학

Induction of Oxidative Stress by Silver Nanoparticles in Cultured Leydig Cells

Eun-Jung Park and Kwangsik Park*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, #23-1, Wolgok-dong,
Seongbuk-gu, Seoul 136-714, Korea

ABSTRACT

Nanomaterials have been used to create unique devices at the nanoscale level. However, the toxicities of nanomaterials have not been fully tested and the risk of nanomaterials has been raised as an emerging issue in these days. In this study, the cytotoxicity of silver nanoparticles was tested using cultured mouse leydig cells. As results, silver nanoparticles showed cytotoxicity with the generation of reactive oxygen species (ROS). With the increased level of ROS, intracellular glutathione level was decreased. DNA fragmentation and caspase-3 activation suggested the apoptotic mechanism of cell death in leydig cells treated with silver nanoparticles.

Key words : silver particles, leydig cells, cytotoxicity, oxidative stress

서 론

일반적으로 나노입자는 입경 100 nm 이하의 초미세입자(Ultrafine particle)를 말한다. 어떤 물질이 그 크기가 분자 또는 원자 수준으로 작아지게 되면 원재료의 물리화학적 성질과는 전혀 다른 새로운 성질이 나타나는데 이를 이용하면 다양한 용도의 신소재를 개발할 수 있게 된다. 나노산업의 발전과 더불어 나노입자의 독성연구도 활발히 수행되고 있는데 나노물질의 독성발현과 관련하여서는

원료성분의 화학적 특성에 의한 것이라기 보다는 물리적 특성에 의해 발현된다는 가설이 지배적이다(Oberdorster *et al.*, 2005). 탄소 나노물질의 경우, 원료성분은 화학적으로 모두 탄소이지만 입자, 막대, 튜브, 구형 등 다양한 형태로 존재하며 존재형태에 따라 다양한 물리적 성질이 발현된다. 따라서 이들 물질이 생체에 노출될 경우에도 물리적 특성에 따라 서로 다른 생체반응이 나타날 것으로 추정된다(Oberdorster, 2004). 구리, 카드뮴, 은, 티타늄, 금, 알루미늄, 아연 등의 금속 성분도 그 크기가 나노수준으로 작아지게 되면 크기에 따라 서로 다른 파장의 형광을 방출하게 되는 등 다양한 물리적 특성을 갖게 된다. 동일한 화학성분의 금속성분이랄 할 지라도 입자크기에 따라 다르게 나타나는

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-940-4522, E-mail: kspark@dongduk.ac.kr

물리적 성질이 생체반응을 결정할 것이라는 의견이 지배적이다(Bhattacharya *et al.*, 2006; Danscher and Stoltenberg, 2006; Cho *et al.*, 2007; Pierrat *et al.*, 2007).

본질적으로 나노물질의 새롭고 다양한 특성은 지금까지 알려지지 않은 새로운 생체반응을 유도할 수 있으며, 이로 인해 최근에는 나노물질의 인체독성과 환경에 미치는 잠재적 위험성이 독성학 분야의 새로운 이슈로 등장하게 되었다(Park, 2005). 나노물질의 독성과 관련한 연구논문은 2005년 이후 급격히 빠른 속도로 발표되고 있다. 나노물질이 폐포를 통과하여 혈관계로 쉽게 유입되며, 여러 조직으로 분포될 뿐만 아니라 이들 조직에서 활성산소를 생성시키거나 염증반응을 유발하기도 한다는 연구결과가 발표된 바 있다. 또한 기관지에 침적시킨 탄소나노튜브가 폐포내 이물질 반응에 의한 염증성 결절(육아종, granuloma)을 생성하는 것이 알려지는 등 독성반응에 대한 연구결과가 다양하게 보고되고 있다(Braydich-Stolle *et al.*, 2005; Holsapple *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2005; Oberdorster *et al.*, 2005; Thomas and Sayre, 2005). 이와 함께 나노물질의 생체노출에 관한 연구결과도 보고되고 있는데 나노물질의 노출경로별 흡수, 대사, 분포 및 배설에 관한 연구는 내적용량 산정과 관련하여 인체위해성평가에 매우 중요한 정보를 제공하고 있다(Chen *et al.*, 2003; Al-Jamal *et al.*, 2006; Elder *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

최근 은나노 입자에 대한 산업적 응용이 증가하고 있는데 은은 예로부터 사진, 보석, 배터리, 전기제품 등에 사용되어 왔다. 특히, 이미 오래 전부터 항균력이 인정되어 의약품으로 사용되어 왔으며 현재에도 화상치료제 성분으로 광범위하게 사용되고 있다. 의약품으로서의 질산은(AgNO_3)에 대한 독성은 이미 오래 전부터 연구된 바 있으며 피부도포제로서의 은 제제는 상대적으로 독성이 높지 않은 것으로 평가되어 왔다. 그러나 최근 입자형태의 은나노 물질의 산업적 용도가 증가하면서 은나노 물질 물리적 특성에 따른 독성연구가 매우 심도있게 연구되고 있다(Hollinger, 1996; Drake and Hazelwood, 2005; Soto *et al.*, 2006). 은을 소재로한 나노물질의 제조 및 이의 특성을 이용한 산업적 응용이 증가하자 미국 등 환경선진국에서는 은의

살균소자를 사용하는 제조업체들은 자신이 생산한 나노물질이 환경 및 인체에 악영향을 주지 않는다는 과학적인 증거를 제공해야 한다는 분위기가 고조되고 있다. 이와 같은 결정은 은나노의 잠재적 위험성에 대한 결론이 아직까지 충분하지 않다는 것을 의미하며 이와 같은 분위기는 최종적으로 살균과 항균의 목적으로 은나노를 사용하는 세탁기나 공기청정기 등 산업계에 영향을 미치게 될 것이다. 이와 같이 나노입자에 의한 환경 및 인체 유해성에 대한 논란은 더 이상 과학자들의 관심사에만 머무르지 않고, 산업 경제적인 측면으로까지 떠오르고 있다는 사실은 그 시사하는 바가 크다.

본 연구에서는 최근 논란의 대상이 되고 있는 은나노 입자의 독성과 관련하여 우선 테스트스테론을 생산하는 레이디히세포(leydig cell)에 미치는 은나노 물질의 세포독성을 평가하였다. 아울러 세포독성과 산화적 스트레스와의 관련성을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 은나노입자 처리 및 세포독성시험

은나노입자(150 nm)는 (주)나노기술(대전, 한국)으로부터 구입하였다. 은나노입자 일정량을 배양배지에 넣은 후 사용직전에 초음파 처리한 후 세포에 투입하였다. 마우스의 leydig cell에서 유래한 TM3 cell line을 한국세포주은행에서 분양 받아 10%FBS(Fetal Bovine Serum)와 1% penicillin-streptomycin을 함유하는 RPMI 배지를 이용하여 CO_2 배양기에서 계대 배양하였다. 계대 배양한 TM3 cell을 트립신으로 처리하여 회수한 후 FBS-free media로 2회 세척하고 96 well plates에 분주하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 부착시켰다. 은나노 입자를 각 농도별로 처리하고 각각 24, 48, 72, 96시간씩 노출시킨 후 2 mg/mL의 MTT(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)용액을 well당 40 μL 씩 넣어 배양기내에서 4시간 정도 반응시켰다. platet상에 존재하는 상등액을 제거하고 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)를 well당 150 μL 씩 넣어 준 후 30분 정도 가볍게 흔들어 주고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도당 4 well씩 3회 이상 시험하였으며 각각의 O.D

값을 대조군의 O.D값과 비교하여 백분율로 표시하였다 (Hsiao *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2004).

2. ROS 측정

세포내의 ROS측정을 위해 세포를 12 well plate에 분주한 후 24시간 동안 부착시키고 은나노 입자를 각 농도별, 시간별로 처리하고 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척한 후 DCFH-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate)를 가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 세척한 후 1 M NaOH를 well당 400 µL씩 넣어 세포를 분해시키고 일정량을 96 well black plate으로 옮겨 480 nm (Ex.) 및 530 nm (Em.)에서 형광을 측정한 후 단백질 (µg) 당 흡광도를 대조군의 백분율로 나타내었다. ROS의 생성 세포에 대한 형광이미지 제작을 위해서는 8 chamber slide에 TM3 cell을 2×10^3 cells로 분주하고 은나노 입자를 처리하여 24시간 동안 부착시킨 후 DCFH-DA를 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후 형광현미경으로 관찰하였다 (Elbekai and El-kadi, 2005; Fotakis *et al.*, 2005; Park and Park, 2006).

3. GSH 측정

세포내의 환원형 글루타치온의 감소는 orthophthaldialdehyde를 기질로 이용하여 측정되었다. 간략히 설명하면, 먼저 세포를 6 well plate에 분주한 후 24시간 동안 부착시켰다. 은나노 입자를 각 농도별, 시간별로 처리한 후 트립신으로 처리하여 세포를 회수하였으며 PBS로 1회 세척하고, 1% perchloric acid로 세포를 용해시켰다. 얼음 위에서 10분간 방치한 후, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{EDTA}$ 로 희석한 1 mg/mL의 orthophthaldialdehyde를 넣고 30분간 실온에서 반응시켰다. 350 nm (Ex)과 420 nm (Em)에서 형광을 측정한 후 대조군에 대한 백분율로 나타내었다 (Elbekai and El-kadi, 2005; Fotakis *et al.*, 2005).

4. 유전자 발현

대조군과 은나노 처리군에서 추출한 RNA를 이용하여 RT-PCR과 PCR을 실행하여 개별 유전자의 발현을 확인하였다. RNA 1 µg에 oligo dT, reverse transcriptase 및 nucleotide가 혼합된 반응액 20 µL

를 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 얻은 후 Taq polymerase 및 nucleotide 등이 혼합된 (주)바이오니아(대전, 한국)의 PCR premix tube에 각각의 합성된 primer와 RT-PCR에서 얻은 반응생성물 1 µL를 넣고 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 25회 반응시켰다. 마지막 반응 이후에 72°C에서 15분간 더 증폭시켰다. 증폭을 통해 생성된 반응물을 ethidium bromide (10 mg/mL)를 함유하는 1.5% 아가로스 겔상에서 TAE완충용액을 사용하여 전기영동하였다 (Park and Park, 2006).

5. Caspase-3 활성 측정

Caspase-3 activity는 (주)웹트론에서 구입한 caspase-3 fluorescent assay kit을 이용하여 실행하였다. 프로토콜에 따라 세포를 24시간 동안 부착시킨 후 은나노 입자를 각 농도별, 시간별로 처리하고 트립신을 이용하여 세포를 회수한 후 용해완충액을 이용하여 용해산물을 만들었다. 세포용해물을 fluorogenic caspase-specific substrate (DEVD-AMC)와 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 360 nm (Ex)과 460 nm (Em)에서 형광을 측정한 후 대조군에 대한 백분율로 나타내었다 (Park and Park, 2006).

6. 통계

실험결과를 Students't-test로 통계 분석하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

은나노 입자를 5, 10, 20, 40 ppm 농도로 각 농도마다 24, 48, 72, 96시간씩 노출시키고 생존율을 평가하였다. 그 결과 은 나노입자는 레이디히세포의 생존율을 감소시키는 것이 확인되었으며 24시간 처리한 경우 세포의 생존율은 86.2~96.2%, 40 ppm을 96시간 동안 처리한 경우에는 약 70% 정도로 감소하였다 (Fig. 1). 그러나 예상과는 달리 최저농도인 5 ppm 농도와 최고농도인 40 ppm에서 생존율의 차이는 크지 않았다. 이는 본 실험에서 사용한 농도의 차이가 입자의 물리적 특성을 강화시키지는 못하기 때문이거나 이미 5 ppm농도에서 세포반응이 최고도에 달해 농도증가에 따른 생존율의 변

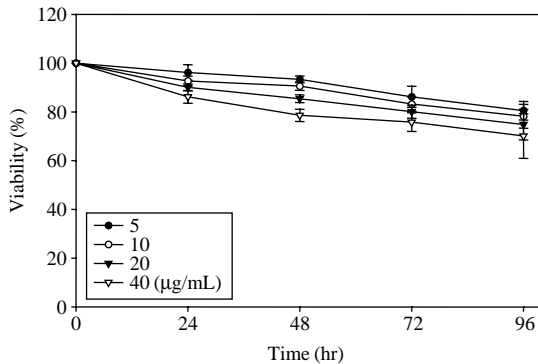


Fig. 1. Effect of Ag nanoparticles on the viability of cultured Leydig cells. Cells were treated with the indicated concentration of Ag nanoparticles for 24, 48, 72 and 96 hr. Cell viability was assessed by MTT assay. Data are presented as the percentage of the control group. Cell viability was greatly reduced in a concentration- and time-dependent manner by Ag nanoparticles. Results represent the mean of three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean.

화는 더 이상 심화되지 않기 때문에 판단된다.

최근 세포내 ROS의 농도증가를 나노입자의 세포독성기전으로 설명하고자 하는 연구결과들이 보고되고 있다(Kuhn *et al.*, 2003; Oberdorster, 2004). 본 연구에서도 은나노 입자의 세포독성기전이 ROS의 증가에 의해 야기되는지를 평가하기 위해 DCFH-DA를 사용한 형광분석법을 실시하였다. 은나노 입자를 5, 10, 20, 40 ppm으로 처리하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 세포에서 발생한 ROS를 측정된 결과 농도의존적으로 형광도가 증가하였으며, 최고농도인 40 ppm으로 24시간 처리한 경우 약 1.7배의 증가율을 나타내었다. 또한, 노출시간에 따른 변화를 관찰하고자 40 ppm의 은나노입자를 각각 3, 6, 12, 24시간으로 처리한 결과, 시간의존적으로 ROS의 생성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 ROS는 12시간까지는 완만히 증가하다가 24시간 노출의 경우 급격히 증가하였다(Fig. 2). ROS의 생성을 시각적으로 확인하기 위하여 10, 20, 40 ppm의 은나노 입자를 24시간 동안 처리한 후, DCFH-DA와 반응시키고 형광 현미경으로 관찰한 결과에서도 농도의존적으로 형광강도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

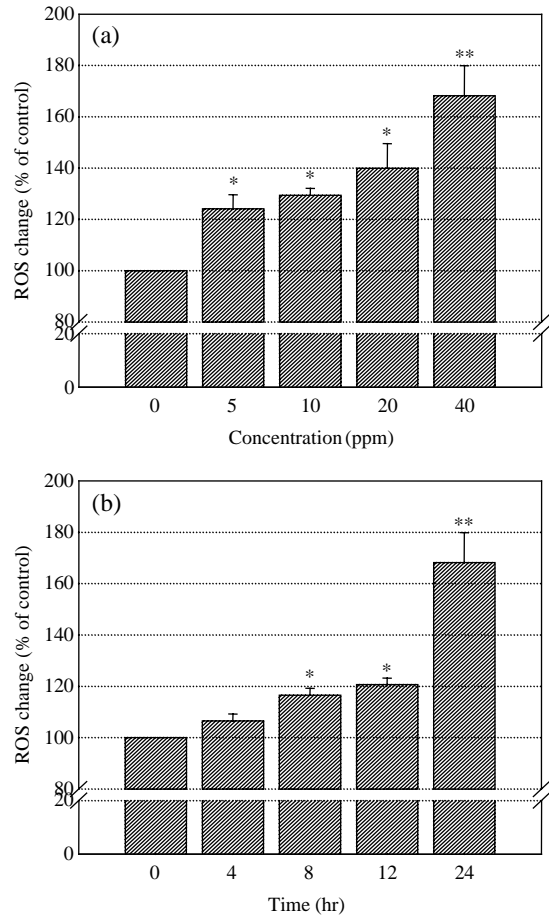


Fig. 2. Effect of Ag nanoparticle on ROS production in cultured Leydig cells. Cells grown in confluent were pretreated with Ag nanoparticles, washed with phosphate buffered saline, and then incubated with DCFH-DA 40 µM. At the end of DCFH-DA incubation, the cells were lysed with 1 M NaOH and fluorescence of aliquot was measured. Results represent means of three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean. (A) : concentration-dependent change, (B) : time-dependent change. Asterisks indicate a statistically significant difference (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$) from the control group.

40 ppm 농도로 24시간 은나노를 처리한 레이디히 세포의 세포질에서는 대조군에 비해 강한 형광이 발생되었으며 고배율로 관찰할 경우 세포질 형광은 세포질 부위에서 발생하는 것이 확인되었다. 향후 ROS의 생성이 미토콘드리아에서 기인하는

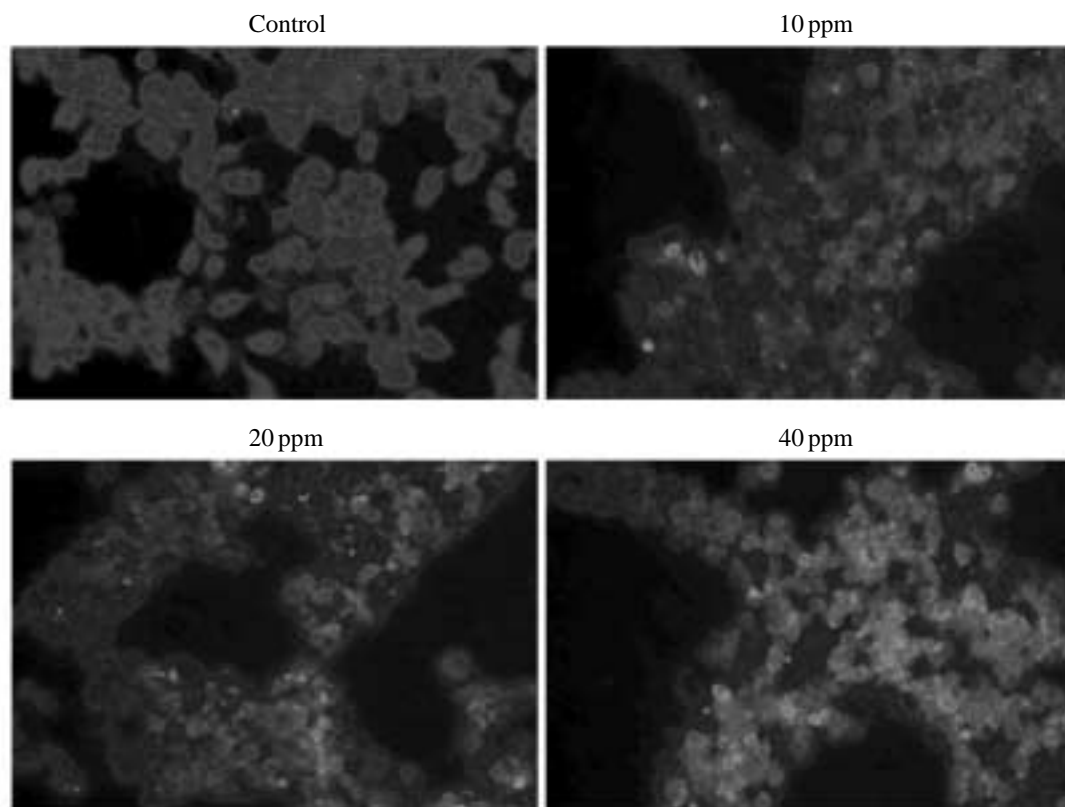


Fig. 3. Qualitative characterization of ROS generation by DCFH-DA staining using fluorescence microscopy. (A): Cells grown in confluent were pretreated with Ag nanoparticle, washed with PBS, and then loaded with $40 \mu\text{M}$ DCFH-DA. After washing with PBS, cells were visualized by fluorescent microscopy ($\times 100$). (B) : Images of phase contrast microscope ($\times 100$) are shown in lower panel.

지 등 보다 자세한 연구를 위해서는 미토콘드리아의 전자전달계 억제제 등을 전처리하여 ROS의 증가를 평가함으로써 가능할 것이다.

한편, 메탈로치오닌은 금속류에 의해 발현되는 대표적인 단백질이며 카드뮴, 납, 아연 등 중금속 노출에 의해 강하게 유도된다. 최근에는 중금속 노출의 생체지표로서 다양한 연구가 시도되었으며 아울러 생물학적 기능에 대한 연구도 광범위하게 수행되고 있다. 특히, 메탈로치오닌은 중금속과 결합하여 중금속의 독성을 경감시킬 뿐만 아니라 중금속에 의해 유도된 산화적 스트레스를 경감시키는 항산화 역할을 하는 것으로도 보고되었다(Vasak, 2005). 본 연구에서는 은나노 입자에 의한 메탈로치오닌의 mRNA 발현에 대해 평가하였는데 은나노입자를 10, 20, 40 ppm 농도로 24시간 처리한

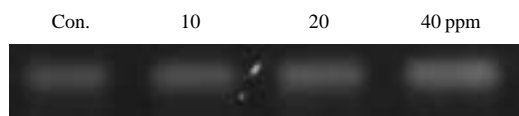


Fig. 4. Effect of Ag nanoparticles on the induction of metallothionein in cultured Leydig cells. Cells were treated with the indicated concentration of Ag nanoparticles for 24 hr. mRNA transcription was detected by RT-PCR analysis using respective primers is left: TCCTGAGTACCTTCTCTCA, right: AGGTGC-ACTTGCAGTTCTT.

결과 대조군에 비해 메탈로치오닌의 유전자 발현이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이는 금속류인 은나노입자가 카드뮴, 납, 수은

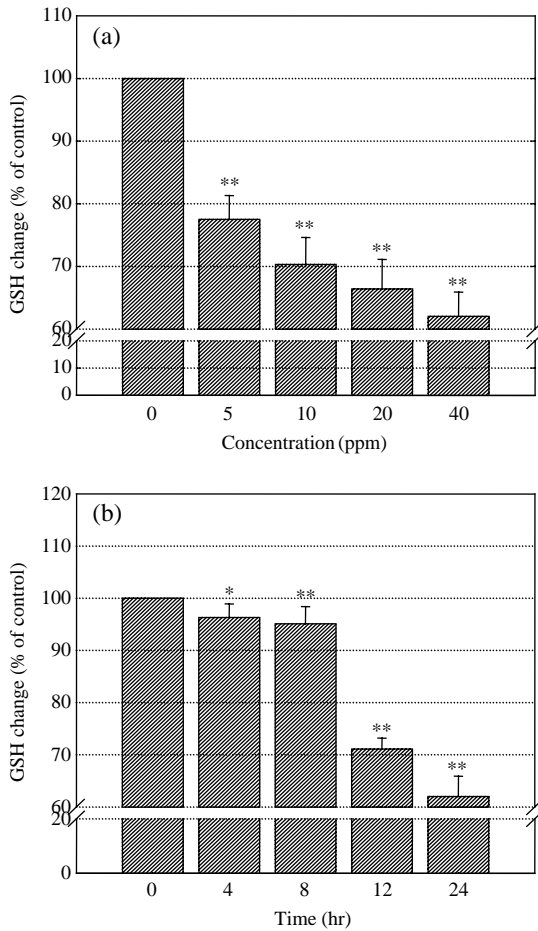


Fig. 5. Effect of Ag nanoparticles on the level of intracellular reduced glutathione. Fluorometric method using *o*-phthalaldehyde was used to measure the intracellular GSH. Results represent the average of three different analyses. GSH was calculated as nmol of glutathione per mg of protein and then was presented as the percentage of the control group. (A): concentration-dependent change, (B): time-dependent change. All treated group showed statistically significant difference by Student's *t*-test ($p < 0.01$) from the control group.

등 중금속과 마찬가지로 메탈로치오닌 유전자 전사를 증가시킨다는 것을 확인한 결과이며 아울러 은나노입자에 의해 생성된 산화적 스트레스도 자신이 유도한 메탈로치오닌에 의해 어느 정도는 경감될 수 있을 것으로 판단된다.

세포질내의 ROS의 증가는 세포내의 환원형 글

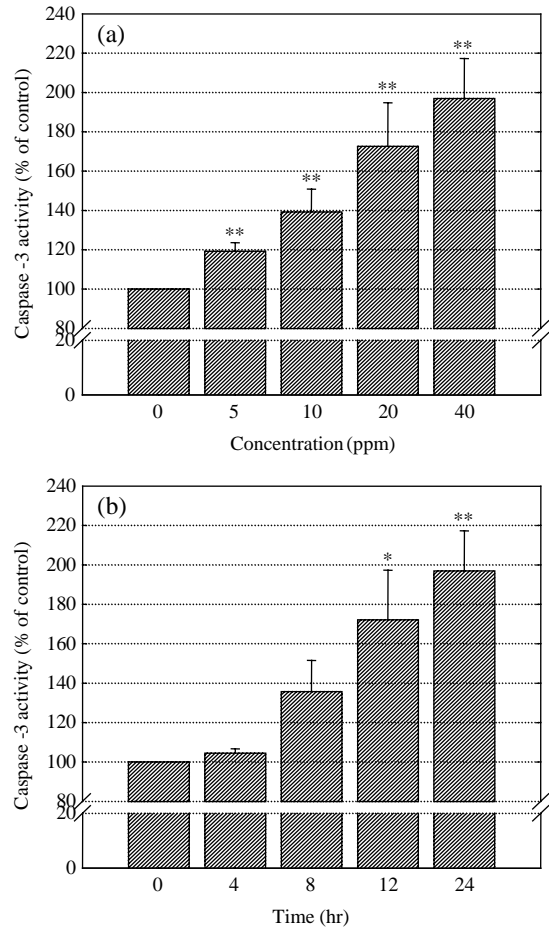


Fig. 6. Effect of Ag nanoparticles on the caspase-3 activity in cultured Leydig cells. The cell lysates were tested for the protease activity by the addition of a caspase specific substrate DEVD-AMC. The cleavage of the peptide by the caspase released the chromophore pNA, which could be quantified using fluorescent microplate reader at a wavelength of 360 (ex) and 460 (em). (A): concentration-dependent change, (B): time-dependent change. Asterisks indicate a statistically significant difference (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$) from the control group.

루타치온(reduced glutathione, GSH)의 감소와 매우 밀접하게 관련되어 있다. 은나노 입자를 5, 10, 20, 40 ppm으로 처리하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후, 회수한 lysate에 기질로서 *o*-phthalaldehyde를 반응시켜 세포내의 GSH농도의 변화를 관찰한 결과, 농도의존적으로 감소하는 것

을 확인할 수 있었으며, 40 ppm으로 24시간 처리한 경우 대조군에 비해 약 70% 정도로 감소하였다. 아울러 은나노 입자의 노출시간이 증가함에 따라 시간의존적으로 GSH의 농도가 점진적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A, 5B). 은나노 입자에 의해 세포내에 ROS가 증가함에 따라 ROS를 검출시키기 위한 생체방어기전으로서 항산화작용을 갖는 GSH가 소비된 결과로 판단된다. 이는 여러 중금속에 대해서도 동일한 결과들이 보고되어 있다.

ROS는 생체내 반응의 다양한 시그널로 작용하는데 그 대표적인 것 중의 하나가 caspase cascade를 자극시키는 것으로 알려져 있다. Caspase cascade는 잘 알려진 바 대로 세포사멸기전과 매우 밀접한 관련이 있다. 은나노 입자의 세포독성이 본질적으로 ROS생성과 이에 자극 받는 caspase 활성화에 의한 세포사멸기전(apoptosis)을 통해 나타나는지를 평가하기 위해 은나노 입자를 처리한 후 apoptosis 과정의 최종단계에 해당하는 caspase-3 활성을 측정하였다. 레이디히세포에 은나노 입자를 5, 10, 20, 40 ppm 농도로 24시간 처리한 결과 caspase-3의 활성이 농도의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 6A), 경시변화 관찰을 위해 40 ppm으로 24시간 처리한 경우의 caspase-3의 활성은 대조군에 비해 약 2배정도 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6B). caspase-3의 활성은 은나노 입자 노출 8시간부터 유의적으로 증가하였다. 이와 같은 결과는 은나노 입자의 세포독성이 세포사멸기전을 통해 발현된다는 것을 강하게 시사한다고 볼 수 있다.

결론적으로 은나노 입자는 배양 레이디히 세포에 독성을 나타내며 독성은 ROS생성에 의한 GSH 감소 및 caspase-3 활성을 통한 세포사멸기전을 통해 나타나는 것으로 판단된다. 아울러 다양한 크기의 나노 입자에 대한 독성연구와 세포반응 연구가 지속되어 산업적 응용이 증가하고 있는 은나노 입자에 대한 위해성평가가 시급히 이루어져야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 동덕여자대학교 학술연구지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Al-Jamal KT, Ruenaroengsak P, Hartell N and Florence AT. An intrinsically fluorescent dendrimer, as a nano-probe of cell transport, *J Drug Target* 2006; 14(6): 405-412.
- Bhattacharya J, Choudhuri U, Siwach O, Sen P and Dasgupta AK. Interaction of hemoglobin and copper nanoparticles: implications in hemoglobinopathy, *Nanomedicine* 2006; 2(3): 191-199.
- Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ and Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells, *Toxicol Sci* 2005; 88(2): 412-419.
- Chen Y, Xue Z, Zheng D, Xia K, Zhao Y, Liu T, Long Z and Xia J. Sodium chloride modified silica nanoparticles as a non-viral vector with a high efficiency of DNA transfer into cells, *Curr Gene Ther* 2003; 3(3): 273-279.
- Cho SJ, Maysinger D, Jain M, Roder B, Hackbarth S and Winnik FM. Long-Term Exposure to CdTe Quantum Dots Causes Functional Impairments in Live Cells, *Langmuir* 2007; 23(4): 1974-1980.
- Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH and Cho MH. Comparative study of PM2.5-and PM10-induced oxidative stress in rat lung epithelial cell, *J Vet Sci* 2004; 5: 11-18.
- Dansch G and Stoltenberg M. Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles, *Prog Histochem Cytochem* 2006; 41: 57-139.
- Drake PL and Hazelwood KJ. Exposure-related health effects of silver and silver compound: a review, *Ann Occup Hyg* 2005; 49(7): 575-585.
- Elbekai RH and El-Kadi AOS. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As3+, Cd2+, and Cr6+, *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1499-1511.
- Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J and Oberdörster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system, *Environ Health Perspect* 2006; 114(8): 1172-1178.
- Fotakis G, Cemeli E, Anderson D and Timbrell JA. Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line, *Toxicol in Vitro* 2005; 19: 481-489.
- Hsiao W, Mo ZY, Fang M, Shi XM and Wang F. Cytotoxicity

- city of PM_{2.5} and PM_{2.5-10} ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays, *Mutation Research/Genetic Toxicol Environ Mutagen*, 2000; 471: 45-55.
- Holsapple MP, Farland WH, Landry TL, Monteiro-Riviere NA, Carter JM, Walker NJ and Thomas KV. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs, *Toxicological Sci* 2005; 88(1): 12-17.
- Hollinger MA. Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals. *Crit Rev Toxicol* 1996; 26(3): 255-260.
- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT and Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, *Toxicol in Vitro* 2005; 19: 975-983.
- Kuhn KP, Chaberry IF, Masholder K, Stickler M, Benz VW, Sonntag HG and Erdinger L. Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UV A light, *Chemosphere* 2003; 5: 71-77.
- Lee D, Zhang W, Shirley SA, Kong X, Hellermann GR, Lockey RF and Mohapatra SS. Thiolated chitosan/DNA nanocomplexes exhibit enhanced and sustained gene delivery, *Pharm Res* 2007; 24(1): 157-167.
- Oberdoster E. Manufactured nanomaterials (Fullerene, C60), induce oxidative stress in the brain of juvenile large-mouth bass, *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1058-1062.
- Oberdorster G, Oberdorster E and Oberdorster J. Nanotoxicology. An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environ Health Perspect* 2005; 113: 823-829.
- Park KS. Toxicity of Nanomaterials and Strategy of Risk Assessment, *Kor. J. Environ. Toxicol* 2005; 20(4): 259-271.
- Park EJ and Park KS. Gene expression profiles of cultured rat cardiomyocytes (H9C2 cells) in response to arsenic trioxide at subcytotoxic level and oxidative stress, *J Health Sci* 2006; 52(5): 512-521.
- Pierrat S, Zins I, Breivogel A and Sonnichsen C. Self-assembly of small gold colloids with functionalized gold nanorods, *Nano Lett* 2007; 7(2):259-263.
- Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M and Reed W, Rothen-Rutishauser B, Schürch S and Schulz H. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update, *Part Fibre Toxicol* 2006; 3: 13.
- Soto KF, Carrasco A, Powell TG, Murr LE and Garza KM. Biological effects of nanoparticulate materials, *Mater Sci Eng C* 2006; 26: 1421-1427.
- Thomas K and Sayre P. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part II: *Toxicological Sci* 2005; 87(2): 316-321.
- Vasak M. Advances in metallothionein structure and functions, *J Trace Elem Med Biol* 2005; 19(1): 13-17.