

Tetrazolium salt, MTT Colorimetric Assay를 이용한 Mouse  
Fibroblast에 대한 화장품원료 물질의 세포독성 평가

조 재 훈

(태평양기술연구소)

Cytotoxicity Evaluation of Cosmetic Materials to Mouse  
Fibroblast : by Tetrazolium salt, MTT Colorimetric Assay

Jo Jae-Hoon

(Pacific R&D Center)

ABSTRACT

The in Vitro chemosensitivity of fibroblast cell strains was determined using a semiautomated tetrazolium-based colorimetric assay(MTT assay) to 16 cosmetic materials.

This assay is useful method to evaluate toxic effects of the chemicals. From assay results, we determined that the preservatives are more toxic than moisturizers. The chemicals in the same group have a different toxicity. That is, in preservatives, Germall-115 is more toxic than Danisol -M, -P, and in surfactant, sodium lauryl sulfate than Myrj 52, and in moisturizers, 1, 3-butylene glycol is more safe than the others.

When the results from this assay for preservatives were compared with patch test results, good correlation was observed.

Forthemore, this assay method can be used together with patch test for the evaluation of the chemical toxicity, particularly in cosmetic field.

## I. 서론

동물 세포를 배양하여 여러 화학 물질과 bio-products의 안전성을 평가하는 방법으로는 작용 원리에 따라 크게 다음과 같이 나눌 수 있다. 1) Doubling time : exponential growth의 상실은 cell death와 관계되므로, 2) Labeling index : chemical이나 protein으로 labeling하여, 이때 intact cell만 labeling된다. 3) Dye exclusion : cell membrane성분의 indicator로써 dye를 이용, 4)  $^{51}\text{Cr}$  release : cellular protein에 대해 결합된 radioactive chromate가 세포막 손상으로 인해 방출되는 양을 측정하는 방법이다 (Finlay, 1986).

이상의 방법들은 모두 나름대로의 장점을 지니고 있으나 본 연구에서는 colorimetric assay의 일종으로 tetrazolium salt인 MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 사용하여 실험을 수행하였다. MTT를 사용한 chemosensitivity assay는 현재 널리 보고되고 있으며, 최근에는 한국에서도 많이 사용되고 있는 방법이다.

이 방법의 원리는 tetrazolium salt인 MTT가 mitochondrial succinate dehydrogenase에 의해 purple colored product (formazan)을 형성하는 특성을 이용한 것이며, 이때 이러한 전환은 살아있는 세포에서만 발생하므로 생성된 formazan의 양은 존재하는 세포수에 비례하게 된다. 그리고 serum내에도 이 enzyme은 존재하지 않으므로 세포의 survival과 proliferation assay에 사용될 수 있다. 이러한 특성을 이용하여 Mosmann(1983)은 T-cell growth factor와 lymphotoxin을 detection하는데 있어서 빠르고 간편한 assay방법을 개발할 수 있었다.

그러나 이 방법은 상대적으로 sensitivity에 있어서  $^3\text{H}$ -thymidine uptake방법보다 떨어졌으나, 최근에 Denizot(1986) 등에 의해 단점들이 어느정도 개선되어 sensitivity를 증가시키고, reliability를 더욱 증가시킬 수 있었다.

본 연구에서는 MTT assay를 이용하여 화장품에 널리 사용되고 있는 원료 물질의 일부를 선택하여 세포 독성 (cytotoxicity)를 조사하였으며, 이때 target cell로는 피부 조직의 대부분을 차지하는 fibroblast를 분리, 배양하여 사용하였다.

## II. 재 료 및 방 법

### 1. Cell Strains

Cell은 피부 조직에 많이 존재하는 fibroblast를 이용하였으며, 이 fibroblast는 이미 잘 알려진 trypsinization method ( Freshney, 1983 )에 의해 피부 조직으로부터 분리되었다. 이때 사용된 cell strain은 adult mouse skin과 adult human foreskin에서 얻어졌으며, 실험에 사용된 세포는 culture 대수에서 10-15대에 이르는 세포를 이용하였다.

cell strain은 모두 10% horse serum, penicillin, streptomycin을 포함한 Eagle's Minimum essential Medium ( EMEM, Gibco )에서 배양하였다. 이때 exponentially growing cultures는 5% CO<sub>2</sub>, 37°C humidified incubator에서 배양하였다.

### 2. 96-well plate microculture

T-75 tissue culture flask ( Falcon )에서 배양된 cells은 0.05% trypsin-EDTA ( Gibco )로 처리하여 flask로부터 떼어낸후 HBSS에서 원심분리를 통하여 washing하고 모은후 10% FBS-DMEM으로  $2 \times 10^4$ /ml 농도로 조정되어 well당 200ul씩 seeding하였다.

### 3. MTT solution

MTT ( 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide )는 Sigma ( cat.no.M2128 )에서 구입하였다. Solution은 phosphate-buffered saline에서 5mg/ml stock으로 제조 되었으며, 이 stock은 4°C, dark에서 2주 이상 보관되지 않는다.

사용전에 0.22um membrane filter로 filtration하여 이미 형성되어 있는 blue formazan product를 제거하고 media로 1mg/ml로 희석하여 사용한다.

#### 4. MTT assay

5 X 농도의 chemical solution이나 PBS를 각 well에 50ul씩 첨가하고 5X serial dilution으로 4개 농도를 처리한다. 이때 chemical solution 농도는 예비적인 assay에 의해 결정된  $CI_{50}$  (50% inhibition concentration) span을 3-5log 농도로 cover할 수 있도록 chemical을 각 농도별로 8개의 well에 처리한다. 그리고 나서 72hrs 배양을 한 후 준비된 MTT solution을 50ul씩(MTT 0.05mg) 각 well에 더하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4hrs 정도 incubation을 수행한다. 다음에 plate는 plate holder에서 10min 동안 450g에서 원심분리하고 media는 각 well에 30ul 정도 남기고 aspiration된다. 이때 well의 바닥에서 formazan crystal이 흐트러지지 않도록 주의한다.

Media가 aspiration된 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO, Shinyo Pure chem.Co.)를 150ul씩 각 well에 첨가하고 formazan crystal이 solubilize되도록 plate를 손 끝으로 툭툭 쳐준다. 그리고 나서 즉시 나타난 적자색을 scanning multiwell spectrometer (Microplate reader, Bio-tek EL-310)에서 reading한다. 이때 얻어진 모든 data는 각 column의 well들의 평균으로 나타내며, positive control로는 media에 chemical의 처리없이 배양한것을 이용하고, negative control은 세포없이 media만 있는 것을 사용하였다.

#### 5. 세포 독성의 상호 비교

$CI_{50}$  Value는 농도별로 얻어진 absorbance graph에서 high absorbance를 50%로 감소시키는 농도로 정의되며, 이때 이 값은 toxic effect가 보이는 농도 범위의 중간 값에 해당하는 농도이다. 그러므로  $A_H$ (high absorbance value)와  $A_L$ (low absorbance value)의 평균에 해당하는 absorbance 값( $A_M$ )이 그 chemical의 curve와 만나는 농도값에 해당한다.

#### 6. Chemical solution의 preparation

사용되는 chemical은 원칙적으로 멸균이 되어야 하고, 희석 배수의 stock solution으로 만들어 졌다. 계면 활성제의 경우는 9%를 3X stock으로 사용하여 200ul의 media에 100ul의 chemical solution을 첨가 한후, sequential di-

lution을 하여 실험하였다. 그리고 보습제의 경우는 100%를 5X stock으로 사용하여 200ul의 media에 50ul의 solution을 첨가 한후 serial dilution을 하여 독성을 조사하였다. Dye의 경우는 본래 1,000배 희석된 용액을 화장품에 사용하므로, 이것을 100%라 가정하고 5X serial dilution을 하여 실험하였다. 방부제는 1%를 2X stock으로 사용하여 2X serial dilution하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 세포의 수와 absorbance 사이의 관계

$2 \times 10^4$ /well의 cell을 2X serial dilution하여 96 well plate에 seeding한후, 4hrs incubation하고 나서 MTT를 처리하여 각 well의 absorbance를 측정하였다(그림 1). 결과는 세포수와 absorbance는 상당히 높은 correlation을 보여준다( $r = 0.998$ ).

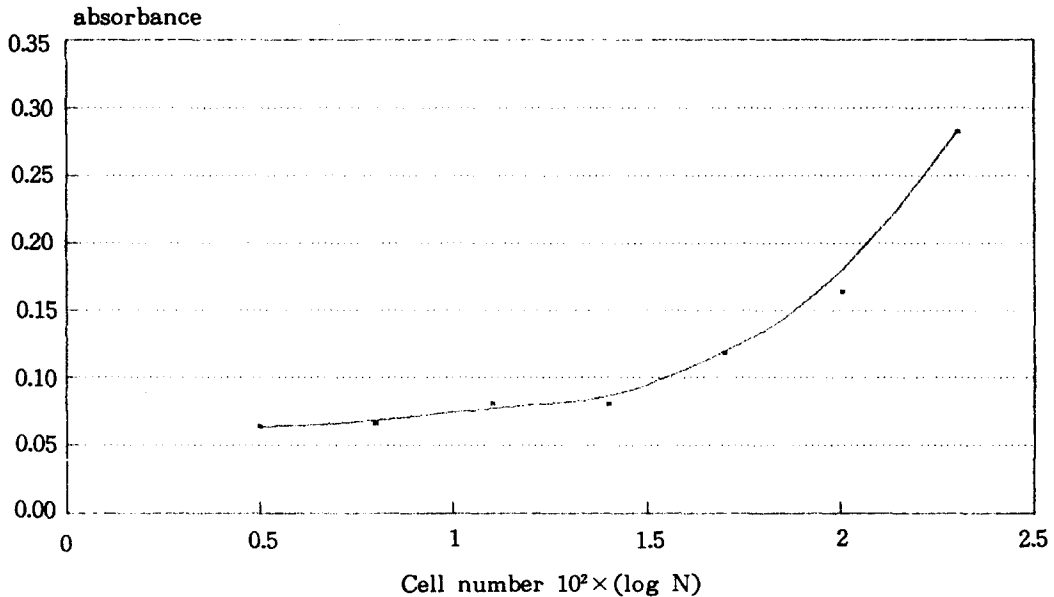


그림 1. 세포수의 증가에 따른 absorbance의 증가

## 2. 계면 활성제의 세포 독성 효과

Myrj 52 (Polyoxyethylene 40 stearate), Arlachel 83 (Sorbitan Sescquioleate), Tween 60 (Polysorbate 60) 과 강력한 detergent로 알려진 Sodium lauryl sulfate (SLS) 를 조사하였다.

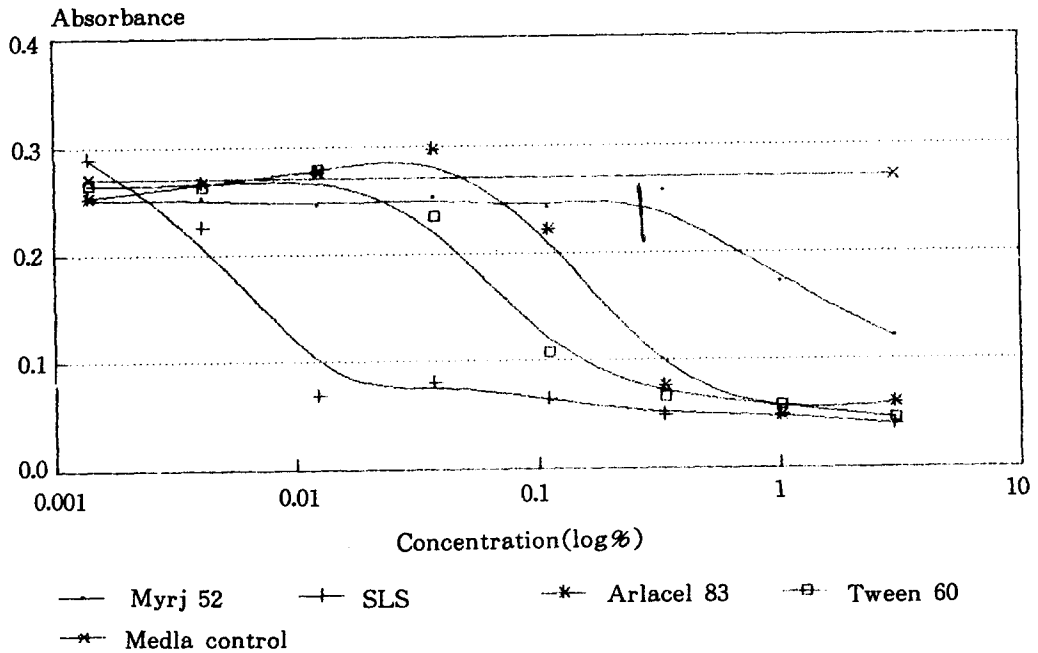


그림 2. Mouse fibroblast에 대한 계면 활성제의 세포 독성 효과

결과는 그림 2에서 보는 바와 같이 SLS가 0.004% 정도의 낮은 농도에서부터 독성효과를 보이기 시작하여 0.015%에서 full toxic effect를 보인다. 반면에 Myrj 52의 경우는 0.33%에서부터 독성효과를 보이고 있다. 이상의 결과를 기준으로 판단하면 toxicity가 강한 순서는 SLS > Tween 60 > Arlachel 83 > Myrj 52 라고 말할 수 있으나, 현재 SLS를 제외하고 나머지 계면 활성제가 기초화장품에 사용되는 농도가 대체적으로 0.5-1.5%로 화장품에 첨가되어 사용되므로 피부에 도포되었을 때 base의 영향으로 각각의 독성효과는 없다고 말할 수 있으나, 서로 혼합되어 사용했을 때의 상승효과는 별도로 고려되어야 할 것이다.

### 3. 보습제의 세포 독성 효과

조사된 물질은 Polyethylene glycol-1500, 1,2-propylene glycol, 1,3-butylene glycol, Maltitol, Glycerine으로 이들의 독성 효과는 거의 유사하게 나타났다.(그림 3). 이들중 Maltitol과 glycerine은 거의 같은 독성 효과를 가졌으며, PEG가 약간 더 독성이 있는 것으로 나왔다.

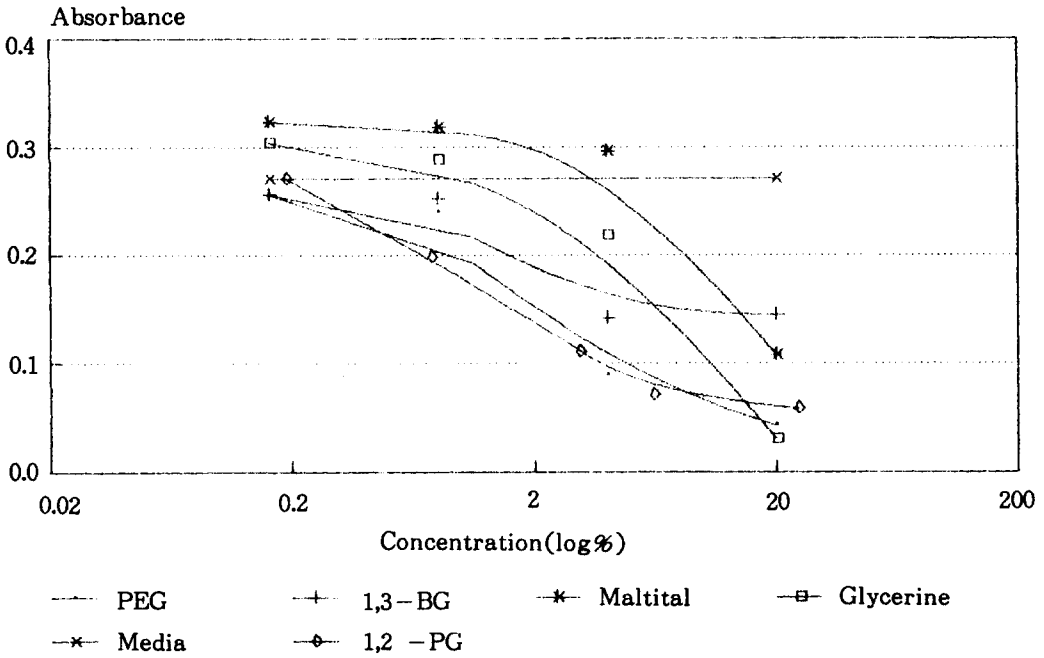


그림 3. Mouse fibroblast에 대한 보습제의 세포 독성 효과

### 4. Dye의 세포 독성 효과

Dye의 종류는 여러가지가 있으나 본 연구에서는 화장품에서 주로 사용되고 있는 Brilliant blue FCF (Blue #1/CTAF), Fast acid magenta (Red #33/CTAF), Tetrazine (Yellow #4/CTAF), Sunset yellow FCF (Yellow #5/CTAF)를 조사하였다(그림 4).

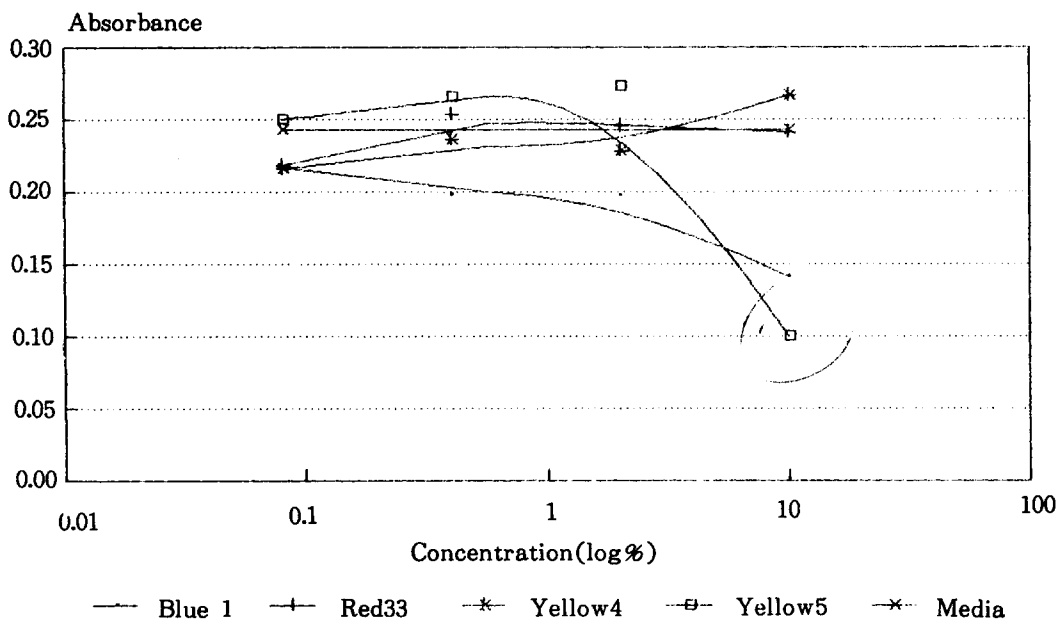


그림 4. Mouse fibroblast에 대한 dye의 세포 독성 효과

이들 dye는 아주 적은 농도로 사용되고 있기 때문에 처리 농도도 적게 조정 되었으며 이 농도에서의 독성 효과는 모두 보이지 않고 있다. 그러나 Yellow #5의 10%에서 약간의 독성 효과를 보이고 있다.

#### 4. 방부제의 세포 독성 효과

조사된 방부제는 3종류로 hydroxy benzoic acid 계통인 Danisol-M과 Danisol-P를 비롯하여 imidazolidinyl urea 계통의 Germall-115를 택하였다. 그 결과는(그림 5) Germall의 독성이 다른 두 종류에 비하여 훨씬 강하게 나타났다. 더불어 지금까지의 실험은 mouse의 fibroblast를 대상으로 하여 실험하였지만, 방부제의 경우는 준비된 human fibroblast에 대해서도 조사하여 보았다.



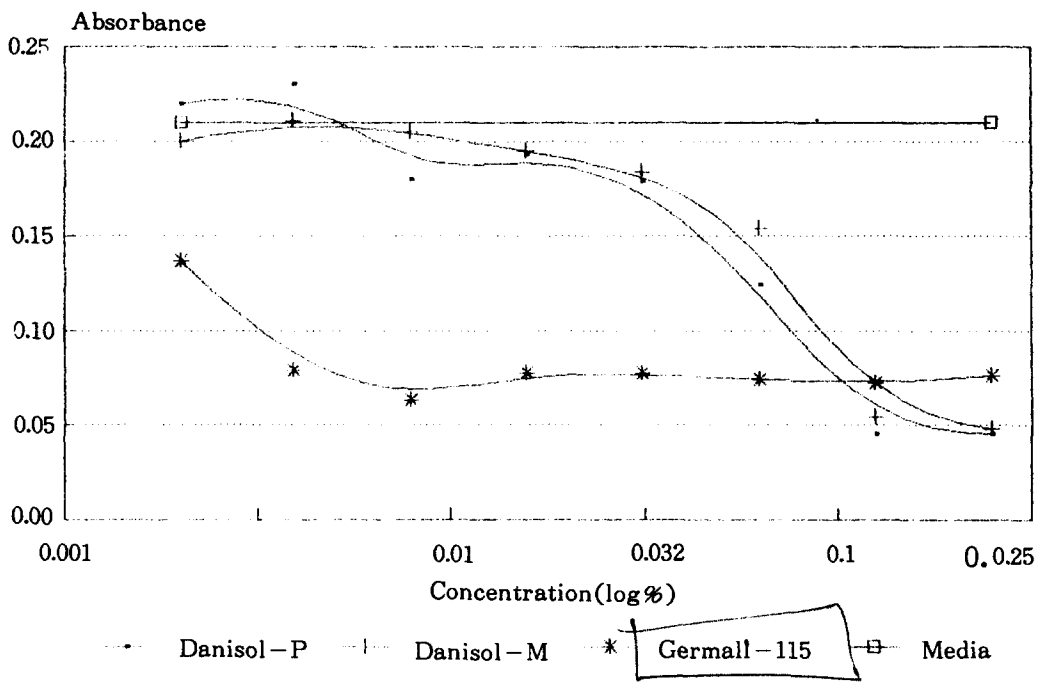


그림 5. Mouse fibroblast에 대한 방부제의 세포 독성 효과

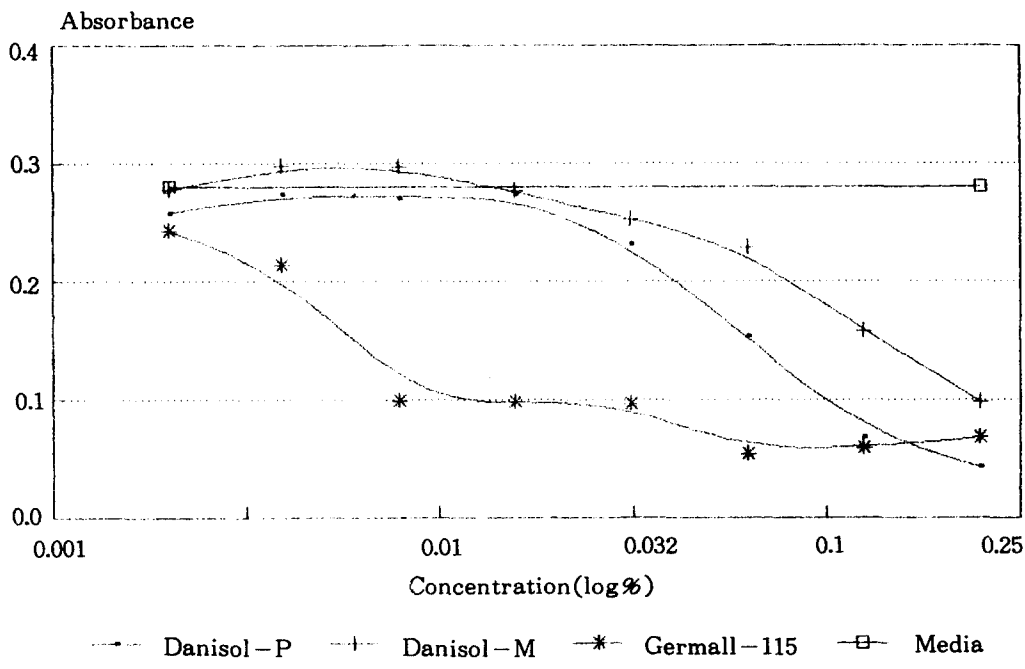


그림 6. Human fibroblast에 대한 방부제의 세포 독성 효과

결과는(그림 6) mouse fibroblast의 경우와 별 차이가 없었다. 그러므로, mouse fibroblast에 대해서 수행된 지금까지의 결과는 human fibroblast에도 그대로 적용되어 판단할 수 있을 것이다.

### 5. $CI_{50}$ Value 비교

조사된 chemical의  $CI_{50}$  값은 다음의 그림 7,8에 나타내었다. 우선은 비교가 용이하도록  $CI_{50}$  값이 큰 lower toxic group과  $CI_{50}$  값이 작은 higher toxic group으로 구분하여 나타내었다.

Germall-115가 독성이 제일 강하고 1,3-butylene glycol이 독성이 가장 약하게 나타났다.

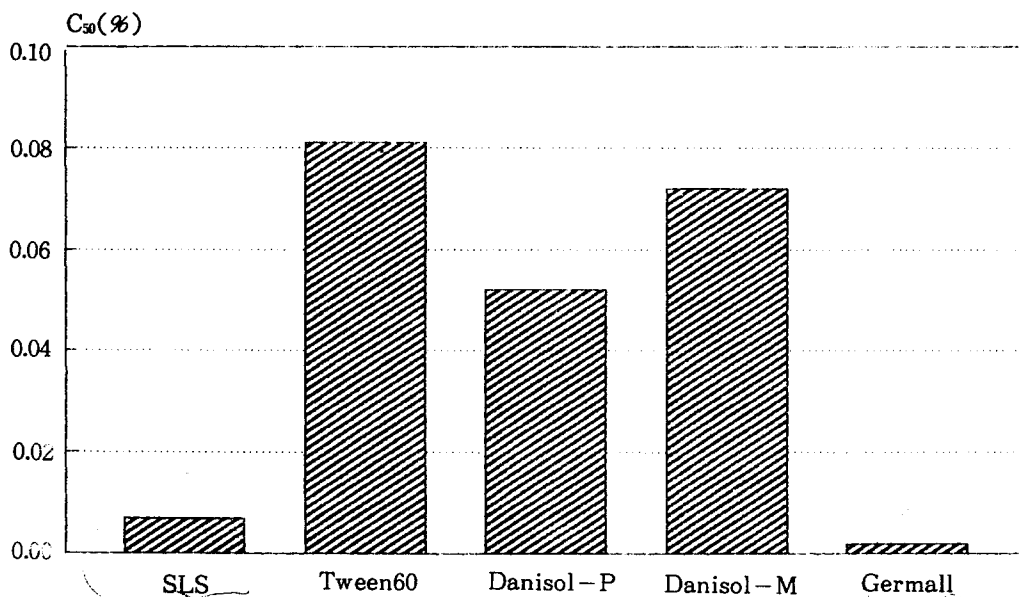


그림 7. 지금까지 조사된 chemicals의  $CI_{50}$  value.(High toxic group)

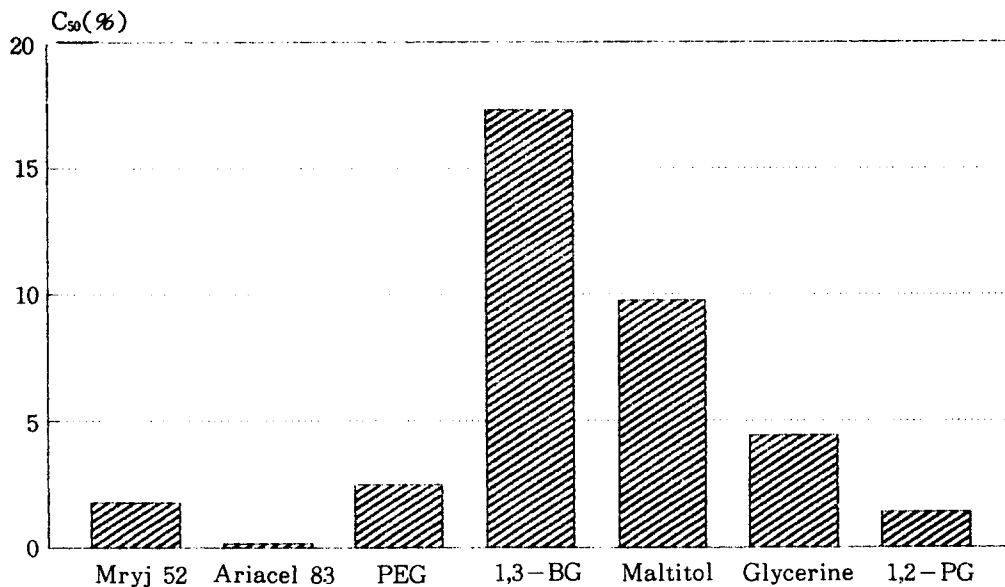


그림 8. 지금까지 조사된 chemicals의 CI<sub>50</sub> value(Low toxic group)

#### IV. 토 론

위의 결과로부터 MTT chemical을 이용한 독성의 조사 방법은 실제 알려진 결과와 상당한 일치성을 보이고 있다. 계면 활성제의 세포독성을 살펴보면 SLS가 독성이 강하고 Myrj 52가 약한것으로 나타나는데 이것은 SLS는 이온성 계면 활성제이고 Myrj 52는 비이온성 계면 활성제이기 때문인 것으로 판단된다. 또한 SLS를 제외한 나머지 계면 활성제의 독성이 상당히 낮은 농도인 0.015%에서 0.33% 범위 사이에서 모두 독성 효과를 보이기 시작하나, 이들이 사용될 때는 emulsion을 만들어 사용하기 때문에 대체적인 사용 농도인 0.5-1.5%에서의 독성효과는 무시될 수 있다. 더우기, 독성 효과가 cell culture에 처리되어 chemical이 직접 세포와 접촉되는 경우와 피부에 도포되어 피부를 통하여 흡수되어 나타나는 경우에 있어서 독성 효과를 보이는 농도는 큰 차이를 보인다. 그러므로 본 연구의 결과는 처리된 각 chemical의 상대적인 독성 효과를 나타내며, 이 결과가 In Vivo에 적용되기 위해서는 그 chemical의 특성과 이에 따른 침투율, 처리되는 base의 상태 등이 고려되어 In Vivo의 결과를 예상하여야 할

것이다.

Dye의 경우는 처리된 농도에서 거의 독성이 없었으며, microplate reader 에서 측정시 잔유 dye에 의해 빛의 흡수가 일어나 결과에 상당한 variation이 있었다. 이것은 well에 있는 media의 양을 최소로 감소시키므로 어느정도 극복이 가능하다.

방부제의 세포 독성 비교에서는 Danisol-P와 Danisol-M의 독성이 거의 비슷하였으며 Germall-115가 상당한 독성 효과를 보여주었다. 그리고 human fibroblast를 target cell로 하여 세포 독성을 보았을 때, 결과는 mouse fibroblast의 것과 일치하나, 독성효과가 시작되는 농도는 약간 다르게 나타났다. 또한 In Vivo에서 patch test를 한 결과와 비교하여 보았을때 0.5%에서는 모두 독성효과가 나타나지 않으나 1~2%에서는 Germall만 독성 효과가 이었다. 이때 Danisol-M과 -P의 경우 2%부터는 용해되지 않으므로 squalane에서 용해시켜 피부에 도포한 결과이다 (그림 9).

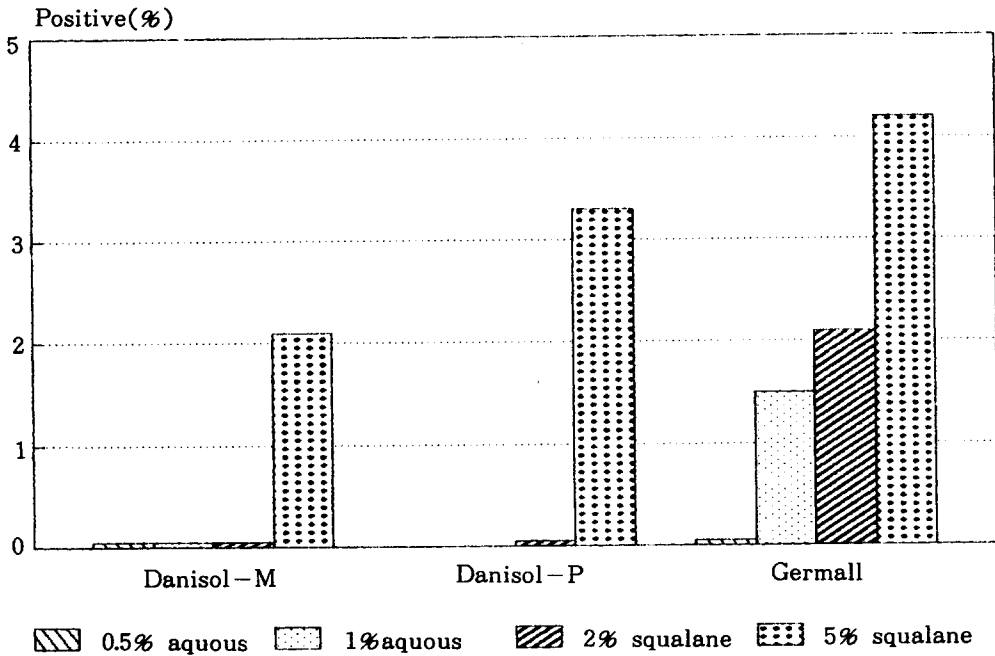


그림 9. 방부제의 In Vivo human patch test 결과 비교

이상의 결과는 In Vitro와 In Vivo의 결과가 낮은 농도에서는 일치하지 않음을 보여준다. 이것은 두가지 이유로 생각할 수 있는데 첫째는 Germall의 세포 독성 효과의 작용 기작의 차이점에 기인한다고 생각된다. 즉, Germall은 수용액 상태에서 분해되어 formalin을 형성하는데, 이때 cell culture에 처리된 낮은 농도에서는 모든 Germall이 formalin으로 변화되었다고 볼 수 있으나 squalane이나 다른 oil base 상태에서와 높은 농도에서의 formalin으로의 변화가 일부만 이루어져서 독성 효과가 농도에 정확히 비례하지 않았다. 두번째로는 patch test 방법이 낮은 농도에서의 독성 차이를 구분하는 능력이 cell culture의 세포 독성 효과 구분 능력보다 떨어지기 때문이라고 생각할 수 있다. 실제로는 두가지 이유 모두 적용될 수 있을 것이다.

이상의 결과들을  $CI_{50}$  value로 비교한 것을 보면 다른 group에 비해 방부제의 세포 독성 효과가 강하고 계면 활성제는 SLS가 강하게 보이며 보습제들은 상대적으로 낮은 독성 효과를 보인다.

## REFERENCES

- 1) W. J. Bettger et al.,(1981) Rapid clonal growth and Serial passage of Human diploid Fibroblasts in a Lipid-enriched synthetic medium supplement with Epidermal growth factor, Insulin, and Dexamethasone. P. N. A. S. 78, 5588-5592
- 2) J. Carmichael et al. (1987) Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assesment of Chemosensitivity Testing. Can. Res. 47, 963-942
- 3) F. Denizot and R. Lang. (1986) Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Suvival : Modification to Tetrazolium dye Procedure Giving improved Sensitivity and Reiability. J. Immunol. Meth. 89, 271-277
- 4) P. A. Duffy and O. P. Flint. (1987) In Vitro Dermal Irritancy Tests in "In Vitro Methods In Toxicology" New York Cambrige. pp279-297
- 5) G. J. Finlay et al (1984) A Semiautomated Microculture Method for Investigating Growth Inhibitory Effects of Cytotoxic Compounds on Exponentially Growing Carcinoma Cells. Anal. Biochem. 139, 272-277
- 6) G. J. Finlay et al. (1986) Comparision of In Vitro Activity of Cytotoxic Drugs Toward Human Carcinoma and Leukaemia Cell Lines: Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 22, 655-662
- 7) R. I. Freshney(1983) Primary Culture in "Culture of Animal Cells" : A Manual of

Basic Technique. New York ARL pp 104–110

- 8) T. Mosmann. (1983) Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application To Proliferation and Cytotoxic Assay. *J. Immunol. Meth.* 65, 55–63
- 9) C. R. Parish and A. Mullbacher. (1983) Automated Colorimetric Assay for T Cell Cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* 58, 225–227
- 10) J. G. Park et al. (1987) Chemosensitivity Testing of Human Colorectal Carcinoma Cell Lines Using a Tetrazolium–based Colorimetric Assay. *Can. Res.* 47, 5875–5879
- 11) P. Roper and B. Drewinko. (1976) Comparison of In Vitro Methods To Determine Drug–induced Cell Lethality. *Can. Res.* 36, 2182–2188
- 12) R. Weinstein et al., (1982) Growth of Human Foreskin fibroblast in a Serum free, Defined medium without Platelet derived Growth Factor. *J. Cell. Physiol.* 11