

A STUDY ON THE CYTOTOXICITY OF CYTOSINE ARABINOSIDE AND VINBLASTINE ON CULTURED MOUSE FIBROBLASTS

Jae-Min Kim, Ki-Won Kim* and Yeun-Tai Chung**

Department of Ocular Optics, Dongshin Junior College, Kwang Ju, 500-100, Korea

*Department of Biology, College of Natural Science, Chonnam National University, Kwang Ju, 500-757, Korea

**Department of Anatomy, School of Medicine, Wonkwang University, Iri, 570-749, Korea

(Received June 2, 1990)

(Accepted June 30, 1990)

섬유모세포에 미치는 세포 독성에 관한 연구

김재민 · 김기원* · 정연태**

동신전문대학 안경광학과, *전남대학교 자연과학대학 생물학과

**원광대학교 의과대학 해부학교실

ABSTRACT: Cytotoxic effects of cytosine arabinoside and vinblastine on cultured fibroblasts were determined by colorimetric assays of neutral red (NR) and tetrazolium MTT, and by mutagenicity tests < micronuclei test, cytogenetic study and sister chromatid exchange (SCE) >. Cytosine arabinoside and vinblastine were highly toxic by showing that concentrations of NR-50 and MTT-50 of two drugs were lower than 100 μ M. At mid-point cytotoxicity value of two drugs, frequencies of micronuclei and SCEs were very high and chromosome showed structural abnormalities. The sizes of micronuclei formed by vinblastine were larger than those induced by cytosine arabinoside.

These results suggest that cytosine arabinoside and vinblastine have highly mutagenic and severe cytotoxic effects on the cultured mouse fibroblasts.

Keywords: Mutagenicity test, Cytokinesis-blocked cell, Neutral red, MTT, Micronuclei.

서 론

최근 급속한 경제성장과 과학기술의 발달로 각종 질환을 치료하기 위하여 많은 약제가 개발되어 왔으나 이 약제들의 잘못된 사용으로 오히려 많은 부작용을 일으키는 원인이 되어왔다. 그중에서도 각종 암을

치료하기 위해 개발된 항암제들은 암세포 뿐만 아니라 정상세포에까지 작용하여 각종 부작용을 일으키는 것은 잘 알려진 사실이다. 항암제의 암세포에 대한 작용은 주로 DNA, RNA 및 단백질합성을 억제하거나, 세포주기를 저해함으로써 나타난다. 이들 항암제 중 cytosine arabinoside는 DNA polymerase 활성을 저해하여 DNA 합성을 억제하며 염색체 이상을 야기시키는데 S-phase에서 가장 세포독성이 강하게 나타나는 약제로 백혈병 치료에 많이 이용되고 있다(Bhuyan 등, 1971 ; Maier와 Schmid, 1976 ; Rainaldi 등, 1984 ; Moore와 Randall, 1987). 그리고 vinblastine은 mitotic spindle의 중요한 microtubular protein인 tubulin과 결합하여 세포분열의 중기에 microtubule의 형성을 저해하는 약제로 주로 lymphoma의 치료에 이용되고 있다(Lanthan 등, 1985 ; Hashizume 등, 1988 ; Russo와 Paccierotti, 1988).

근래에 이르러 세포배양 기법이 발달함에 따라 *in vitro*에서 많은 연구가 행하여지고 있는데, 특히 생쥐 섬유모세포는 분열이 왕성하고 종식이 활발하므로 세포독성 연구에 많이 이용되고 있다(김 등, 1985 ; 정 등, 1987 ; Russo와 Pacchierotti, 1988). 이러한 세포배양 기법을 이용한 독성실험에서 세포독성을 검정하는 방법으로 colorimetric assay를 이용한 neutral red<NR>와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide<MTT> 분석법이 개발되어 세포독성 정도를 비교 평가하는데 많이 이용되고 있다.

NR 분석법은 세포질 내의 용해소체에 축적된 NR을 추출하여 흡광도를 측정하는 것으로써 용해소체에 대한 독성을 규명할 수 있는 방법이다(Nemes 등, 1979 ; Borenfreund와 Puerner, 1984 ; Babich와 Borenfreund, 1987 ; Borenfreund와 Babichi, 1987 ; Borenfreund 등, 1988).

MTT 분석법은 노란색의 용해성 MTT tetrazolium salt가 사립체의 succinic dehydrogenase에 의해 환원되어 파란색의 불용성 MTT formazan을 생성하는데 이 MTT formazan을 용매로 용해하여 흡광도를 측정하는 것으로서 사립체에 대한 독성을 규명하는 방법이다(Mosmann, 1983 ; Denizot와 Lang, 1986 ; Gerlier와 Thomasset, 1986 ; Carmichael 등, 1987a, 1987b). NR과 MTT 분석법은 대조군에 비해 실험군의 흡광계수가 90%를 나타내는 농도를 NR-90, MTT-90 그리고 50%를 나타내는 농도를 NR-50, MTT-50으로 하여 대조군과 상대 평가하는데 많이 이용되는 분석법인데 *in vitro*에서 독성물질의 농도결정에도 중요한 방법이다.

한편 핵내의 염색체에 미치는 손상은 큰 손상(macrolesion)과 적은 손상(microlesion)으로 나눌 수 있고 이들 손상을 검정하는데 mutagenicity test가 많이 이용된다.

이와 같은 mutagenicity test 중 micronuclei test는 근래에 cytochalasin B를 이용한 cytokinesis-block method가 개발되어 핵형분석보다 간단하고 정확하게 염색체의 손상정도를 측정할 수 있게 되었다(Fenech와 Morley, 1985 ; Erexon 등, 1987 ; Migliore 등, 1987 ; Wakata와 Sasaki, 1987).

따라서 본 연구는 항암제인 cytosine arabinoside와 vinblastine을 생쥐 섬유모세포에 24시간 노출시킨 후 NR과 MTT 분석법으로 세포독성을 조사하여 이들 항암제의 NR-90과 MTT-90 중 낮은 농도를 initial-point cytotoxicity value(ICV)로 하였고 NR-50, MTT-50의 농도 중 낮은 농도를 mid-point cytotoxicity value[MCV]로 하여 mutagenicity를 측정하기 위한 micronuclei test, 염색체의 구조적 이상 및 자매 염색분체 교환을 조사하였다.

재료 및 방법

세포 배양

본 연구에 사용된 세포는 생쥐 미부에서 분리한 섬유모세포로서 30-40세대의 세포를 조직배양용 flask(25 cm², NUNC)에 stock culture하여 사용하였다. 배양액은 Eagle's minimum essential medium(MEM,

Gibco)에 15% fetal bovine serum(FBS, Gibco), Penicillin G(25 unit/ml), Streptomycin(25 µg/ml) 및 Fungizon(0.25 µg/ml)을 넣어서 사용하였다. 세포배양은 37°C로 조정된 5% CO₂ 항온기(Forma Scientific Co.)에서 시행하였으며 배양액은 3일마다 교환하였다. 본 실험을 위하여 stock culture한 flask의 세포를 0.125% trypsin으로 처리하여 세포를 부유시켜 0.2% trypan blue로 염색한 후 혈구계산기로 세포수를 산정하였다. NR과 MTT 분석을 위하여 직경 16 mm의 24 well plate(Bellco)에 5×10⁴ cells/well이 되도록 세포 부유액을 1 ml씩 분주하여 배양하였다. Micronuclei test와 염색체 구조적 이상 및 자매 염색체 교환빈도를 조사하기 위하여 25 cm² flask에 5×10² cells/flask이 되도록 세포 부유액을 4 ml씩 분주하여 배양하였다.

이상과 같이 세포 부유액을 분주한 24시간 후에 배양액을 항암제가 포함된 배양액으로 교환하여 24시간 동안 배양한 뒤 다음 과정을 진행하였으며 항암제가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다.

항암제 처리

본 실험에서 사용한 cytosine arabinoside(1-β-D-arabinofuranosylcytosine, Sigma)와 vinblastine (Vincleukoblastine sulfate, Sigma)은 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma)에 녹여 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 희석하여 stock solution으로 사용하였다. Stock solution으로 cytosine arabinoside는 100 µg/ml, vinblastine은 10 µg/ml가 되게 만들어 냉동보관하였으며 사용당일 NR-90, MTT-90, NR-50, MTT-50의 농도가 되도록 희석하여 사용하였다.

비색분석(Colorimetric Assay)

1) Neutral Red(NR) 정량

NR의 정량은 생쥐 섬유모세포를 24 well plate에 각각 5×10⁴ cells/well를 분주하여 24시간 배양한 후 cytosine arabinoside와 vinblastine이 여러 농도로 포함된 배양액으로 교환하여 24시간 동안 배양한 후 배양액을 버리고 하루 전에 조제한 50 µg/ml의 NR이 포함된 배양액을 넣어 3시간 동안 항온기에 배양하였다. 그 후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)로 세척하여 4% formaldehyde-1% CaCl₂ 혼합액으로 고정한 후 1% glacial acetic acid-50% ethanol로 15분 동안 실온에서 추출하여 분광 광도계(Beckman)로 540 nm에서 흡광도를 측정, 대조군과 비교하였다(Borenfreund와 Puerner, 1984).

2) MTT 정량

MTT 정량은 Mosmann의 방법(1983)에 따랐다. 섬유모세포를 항암제가 함유된 배양액에 24시간 노출시킨 후 사용 당일 제조한 500 µg/ml MTT를 포함한 배양액으로 교환한 후 3시간 동안 배양하였다. MTT를 포함한 배양액은 1% FBS만 포함하고 phenol red가 없는 배양액을 이용하였다. 배양완료 후 배양액을 버리고 formazan MTT를 용해하기 위해 DMSO를 넣어 5분간 실온에 방치한 후 분광 광도계를 503 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

3) 농도결정

NR과 MTT 정량에서 대조군과 비교하여 90%의 흡광계수를 나타내는 농도를 NR-90과 MTT-90으로 정하고 50%의 흡광계수를 나타내는 농도를 NR-50, MTT-50으로 정하였다.

NR-90과 MTT-90의 농도 중에서 낮은 농도를 initial-point cytotoxicity value((ICV)로, NR-50과 MTT-50의 농도 중에서 낮은 농도를 mid-point cytotoxicity value(MCV)로 하여 이 두 농도에서 세포독성을 조사하였다.

변이원성 검색(Mutagenicity Test)

1) 소핵세포 검색(Micronuclei test)

Micronuclei test는 Fenech와 Morley(1985)의 cytokinesis-block method를 변형하여 사용하였다. 먼저 cytokinesis-blocked(CB) cell을 얻기 위하여 사용된 cytochalasin B(Sigma)의 농도를 결정하기 위하여 섬유모세포를 25 cm^2 에 5×10^5 cells/flask에 넣어 24시간 배양한 후 cytochalasin B를 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 여러 농도를 24시간 노출시켜 가장 많은 이해세포를 생성하는 농도를 선택하여 이용하였다. Micronuclei test는 세포를 24시간 배양한 후 ICV와 MCV 농도의 항암제가 함유된 배양액에 24시간 배양하고 HBSS로 3회 세척한 다음 일정농도의 cytochalasin B가 포함된 배양액에 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.125% trypsin으로 세포를 부유시켜 약한 저장액인 0.72% NaCl로 10분간 처리한 후 methanol/glacial acetic acid(3 : 1)의 Carnoy 고정액으로 고정하여 현미경 슬라이드 위에 떨어뜨려 공기건조 후 2% Giemsa로 염색하여 400배 시야에서 1000개의 CB cell을 관찰하여 micronuclei의 수를 산정하였다. 그리고 이해세포당 micronuclei 수의 출현빈도를 백분율로 환산하여 조사하였으며 micronuclei의 크기를 main nucleus와 비교하기 위해 100개의 micronuclei를 1000배에서 사진촬영하여 직경의 상대적인 비율을 측정하였다.

2) 염색체 구조적 이상 조사

세포를 24시간 배양한 후 항암제가 포함된 배양액으로 교환하여 24시간 배양한 후 염색체 표본을 만들어 4% Giemsa로 염색하고 염색체의 구조적 이상을 조사하였다.

3) 자매 염색분체 교환조사

세포를 배양액에 24시간 동안 배양한 후 항암제와 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 5-bromodeoxyuridine(BrDU, Sigma)이 포함된 배양액에서 24시간 배양한 다음 항암제가 없고 BrDU만을 첨가한 배양액으로 교환한 후 24시간 배양하여 염색체 표본을 만들었다. 염색체 표본을 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Hoechst 33258(Sigma)로 15분 동안 반응시켜 자외선을 30분간 조사한 후 60°C , $2 \times \text{SSC}$ 용액에 15분간 처리한 다음 4% Giemsa로 염색하여 50개의 중기 염색체를 얻어 염색체당 자매 염색분체 교환의 빈도를 조사하였다.

결 과

비색분석(Colorimetric Assay)

1) Cytosine arabinoside의 NR과 MTT 정량

Cytosine arabinoside가 여러 농도로 포함된 배양액에서 생쥐의 섬유모세포를 24시간 배양한 후 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

NR 정량의 경우 $0.25\text{ }\mu\text{M}$ 에서 90%, $1.64\text{ }\mu\text{M}$ 에서 50%를 나타냈으며, MTT 정량의 경우 $0.33\text{ }\mu\text{M}$ 에서 90%, $2.06\text{ }\mu\text{M}$ 에서 50%를 나타내어 각각의 값을 NR-90, NR-50과 MTT-90, MTT-50으로 정하였으며 NR-90과 MTT-90 중 낮은 농도 즉 $0.25\text{ }\mu\text{M}$ 을 ICV로 하였고 NR-50과 MTT-50 농도 중 낮은 농도 즉 $1.64\text{ }\mu\text{M}$ 을 MCV로 하였다(Table 1).

2) Vinblastine의 NR과 MTT 정량

Vinblastine이 여러 농도로 포함된 배양액에서 세포를 24시간 배양한 후 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사한 결과, NR 정량은 $0.009\text{ }\mu\text{M}$ 에서 90%, $0.06\text{ }\mu\text{M}$ 에서 50%를 나타냈으며 MTT 정량은 $0.006\text{ }\mu\text{M}$ 에서 90%, $0.03\text{ }\mu\text{M}$ 에서 50%를 나타내어 각각의 값을 NR-90, NR-50과 MTT-90, MTT-50으로 정하여 NR-90과 MTT-90 중 낮은 농도 즉 $0.006\text{ }\mu\text{M}$ 을 ICV로 하였으며 NR-50과 MTT-50 중 낮은 농도 즉 $0.03\text{ }\mu\text{M}$ 을 MCV로 하였다(Table 1).

Table 1. Cytotoxicities of cytosine arabinoside and vinblastine as determined by the neutral red and tetrazolium MTT assay

Drug	NR assay		MTT assay	
	NR ₉₀	NR ₅₀	MTT ₉₀	MTT ₅₀
Cytosine arabinoside	0.25	1.64	0.33	2.06
Vinblastine	0.009	0.06	0.006	0.03

Concentration (μM) required to reduce absorbance by 10% (NR₉₀ and MTT₉₀) and by 50% (NR₅₀ and MTT₅₀).

Table 2. Frequency of micronuclei in mouse fibroblasts treated with cytosine arabinoside or vinblastine

Drug	Dose (μM)	No. of micronuclei / 1000 binucleated cells	
		Count	Mean \pm SD
Control	0	4	
		4	3.36 \pm 0.57
		3	
		34	
Cytosine arabinoside	0.25	43	35.33 \pm 7.09
		29	
		138	
		127	151.33 \pm 33.08
Vinblastine	1.63	180	
		9	
		11	11.67 \pm 3.06
		15	
	0.006	99	
		158	129.67 \pm 29.57
		132	

변이원성 검색(Mutagenicity Test)

1) Micronuclei test

Micronuclei test는 CB cells을 얻기 위하여 cytochalsin B를 처리하였는데 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 가장 많은 CB cell인 이핵세포를 얻을 수 있었다. 이를 세포 중 세포질이 잘 보존된 1000개의 이핵세포를 관찰하여 micronuclei 수를 산정하였다. 대조군의 경우 1000개의 세포당 micronuclei의 수는 3.36 ± 0.57 이었고 cytosine arabinoside를 처리한 경우 $0.25 \mu\text{M}$ 에서 35.33 ± 7.09 였으며 $1.64 \mu\text{M}$ 에서는 151.33 ± 33.08 로 매우 높은 빈도를 나타내고 있었다(Table 2).

Vinblastine의 경우 $0.006 \mu\text{M}$ 에서는 11.67 ± 3.05 였고 $0.03 \mu\text{M}$ 에서는 129.67 ± 29.57 로 높은 빈도를 나타냈다(Table 2). 또한 이핵세포당 micronuclei의 수는 cytosine arabinoside의 $1.64 \mu\text{M}$ 농도에서 한 개인 경우가 18.9%이고 두 개가 3%, 세 개가 0.9%, 네 개 이상이 0.8%이었고 vinblastine $0.03 \mu\text{M}$ 농도에서는 한 개가 12.4%, 두 개가 1.65%, 세 개가 0.45%, 네 개 이상이 0.15%이었다(Fig.1 & 3).

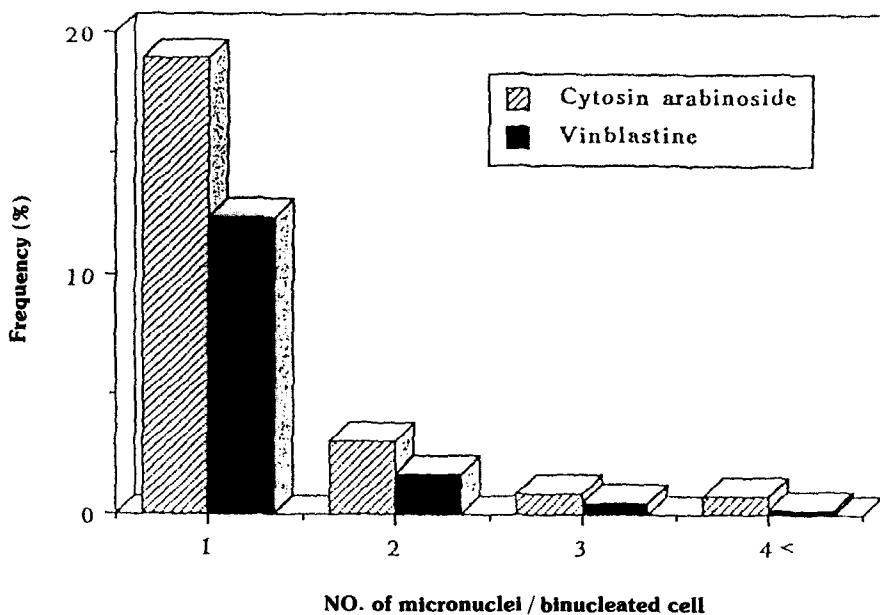


Fig. 1. Frequency of binucleated cells with various micronuclei induced by cytosine arabinoside (1.64 μ M) or vinblastine (0.03 μ M) in mouse fibroblasts.

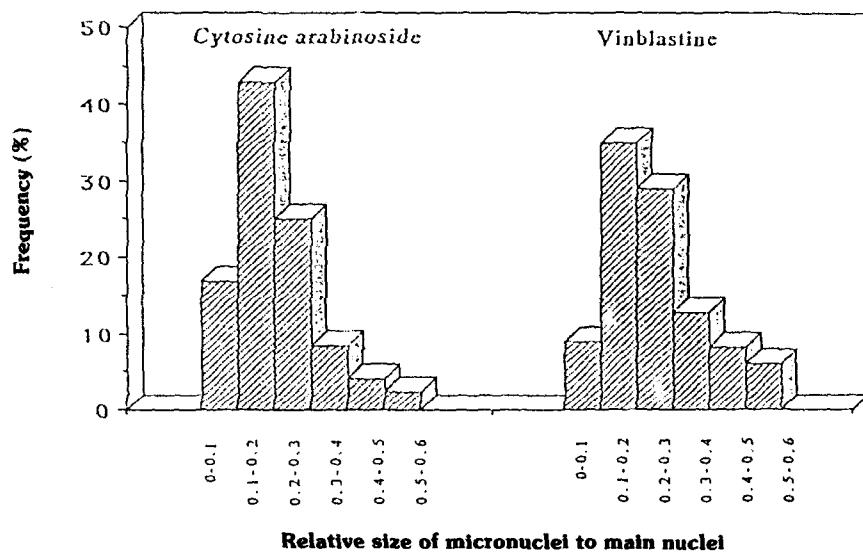


Fig. 2. Size distribution of micronuclei induced by cytosine arabinoside (1.64 μ M) or vinblastine (0.03 μ M). The micronucleus size is expressed as a relationship between the diameters of the micronucleus and the main nucleus (100 binucleated cells).

Table 3. Frequency of chromosome aberration in mouse fibroblasts treated with cytosine arabinoside or vinblastine

Drug	Dose (μM)	Number of cells	Frequency of aberrations
Control	0	40	0
Cytosine arabinoside	1.64	40	7
Vinblastine	0.03	40	6

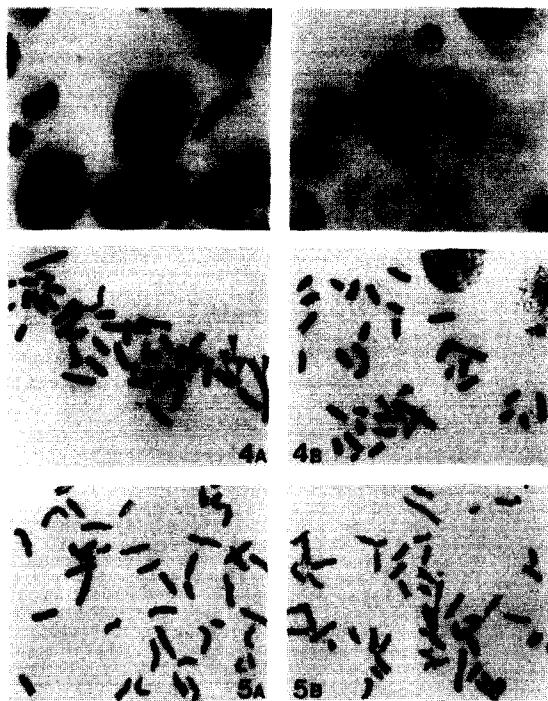


Fig. 3. Photomicrograph of a cytokinesis-blocked (CB) cell, containing a micronucleus (A) and multimicronuclei (B). $\times 100$.

Fig. 4. Photomicrograph of chromosome aberrations of mouse fibroblasts treated with cytosine arabinoside (1.64 μM) and vinblastine (0.03 μM) for 24 hours. Arrows indicate giant chromosome, chromosome and chromatid gaps and acentric fragments. $\times 100$.

Fig. 5. Sister chromatid exchange of mouse fibroblasts treated with cytosine arabinoside (A) and vinblastine (B) at the concentration of MCV. $\times 100$.

Table 4. Frequency of sister chromatid exchange in mouse fibroblasts induced by cytosine arabinoside or vinblastine

Drug	Dose (μM)	Number of cells	Total number of chromosome scored	SCE / chromosome
Control	0	50	2016	0.085
Cytosine arabinoside	0.25	50	2117	0.101
	1.64	50	2124	0.553
Vinblastine	0.006	50	2243	0.112
	0.03	50	2359	0.511

그리고 micronuclei의 크기가 다양하였는데 main nucleus에 대한 micronucleus의 직경이 상대적인 비는 cytosine arabinoside의 $1.64 \mu\text{M}$ 에서 0.1 이하가 17%, 0.1-0.2가 43%, 0.2-0.3이 25% 그리고 0.3 이상이 15%이었고 vinblastine의 경우 $0.03 \mu\text{M}$ 에서 0.1 이하가 9%, 0.1-0.2가 35%, 0.2-0.3이 29% 그리고 0.3 이상이 27%로 나타나 vinblastine에서 micronuclei의 크기가 큰 것으로 나타났다(Fig. 2).

2) 염색체의 구조적 이상 조사

염색체의 구조적 이상은 염색체나 염색분체의 gap이 대부분이었고 거대염색체(giant chromosome)와 염색체가 서로 융합되어 있는 interchange 형태도 볼 수 있었는데 cytosine arabinoside의 경우 $1.64 \mu\text{M}$ 농도에서 40개의 중기 염색체 중 7개의 중기 염색체에서 이상이 나타났고 vinblastine의 경우 $0.03 \mu\text{M}$ 에서 6개의 중기염색체에서 이상이 나타났다(Table 3, Fig. 4).

3) 자매 염색분체 교환 조사

자매 염색분체 교환은 50개의 중기 염색체를 관찰하여 염색체의 총 수와 자매 염색분체 교환빈도를 측정하여 염색체당 자매 염색분체 교환 수로 나타내었다.

대조군의 경우 염색체당 0.085의 빈도로 자매 염색분체 교환이 일어났고 cytosine arabinoside $0.25 \mu\text{M}$ 에서 0.101, $1.64 \mu\text{M}$ 에서 0.553의 빈도로 나타나 대단히 높은 빈도를 보여주었다. Vinblastine $0.006 \mu\text{M}$ 에서 0.112, $0.03 \mu\text{M}$ 에서 0.511로 역시 매우 높은 빈도를 나타냈다(Table 4, Fig. 5).

고 찰

항암제는 암세포에 효과적으로 작용하여 세포의 성장을 억제함으로써 각종 암치료에 널리 사용되고 있으나 대부분 돌연변이 유발원으로 Maier와 Schmid(1976)는 이들을 크게 alkylating agents, spindle poisons, 항생제 및 해산 합성의 anti-metabolites 등으로 분류하였다. 항암제에 의한 세포의 사멸은 크게 2가지 형으로 나눌 수 있는데 하나는 대부분의 세포에서 볼 수 있는 세포분열 직후 사멸하는 delayed form이고 다른 하나는 세포분열과 관계없이 interphase에서 바로 사멸하는 rapid form이며 대부분의 항암제 특히 cytosine arabinoside를 포함한 DNA 합성 저해제는 delayed form에 해당된다(Crowther 등, 1985).

본 연구는 각종 약물이 세포에 미치는 독성을 조사하기 위한 일환으로 항암제인 cytosine arabinoside와 vinblastine을 생쥐 섬유모세포에 처리하여 colorimetric assay인 NR과 MTT 분석법으로 세포독성을 조사하고 농도를 결정하였다.

Colorimetric assay는 많은 시료의 세포독성을 일차적으로 검정하는데 주로 이용되는 방법으로 형태적인 변화를 도립현미경으로 관찰할 수 있고 분광 광도계를 이용하여 정량적으로 세포독성을 비교할 수 있는 편리한 방법인데 최근 미국 국립 암연구소(National Cancer Institute)의 항암제 검정 프로그램에서 제안한

바에 의하면 항암제의 검정은 MTT assay 같은 colorimetric assay를 이용하도록 제안하고 있다(Carmichael 등, 1987a).

NR assay의 경우 하나의 시료를 이용하여 세포의 형태관찰과 분광 광도계를 이용한 정량적 분석이 가능하며 형태 관찰과 정량분석이 끝난 세포를 이용하여 총 단백질 정량을 할 수 있기 때문에 대단히 간편하고 민감한 분석방법이다. 또한 MTT assay의 경우도 formazan을 용해하는 용매의 종류에 따른 차이는 있지만 세포의 chemosensitivity를 빠르고 정확하게 측정할 수 있는 방법이다.

본 실험에서 나타난 colorimetric assay의 결과는 cytosine arabinoside의 경우 NR-50과 MTT-50의 농도가 $1.64 \mu\text{M}$ 과 $2.06 \mu\text{M}$ 로 Borenfreund 등(1988)이 BALB/C3TC 섬유모세포를 이용한 NR, MTT assay의 결과인 NR-50의 $8.0 \mu\text{M}$ 과 MTT-50의 $12.0 \mu\text{M}$ 에 비해 낮은 농도를 나타냈으나 NR-50이 MTT-50보다 낮게 나타난 결과는 일치하였다. 이와 같은 농도의 차이는 세포의 종류와 배양용기의 크기에 따른 세포밀도의 차이에 의한 것으로 사료된다. 한편 vinblastine의 경우 Carmichael 등(1987a)이 chinese hamster의 섬유 모세포 V79를 이용한 연구에서 MTT assay의 결과는 4일간 노출시킨 경우 MTT-50이 $2 \mu\text{M}$ 이었고 1시간 노출시킨 경우 $5 \mu\text{M}$ 이었는데 본 연구에서는 24시간 노출시켰을 때 MTT-50이 $0.03 \mu\text{M}$ 로 나타나 노출시간에 따라 많은 차이가 있는 것으로 사료된다. 본 실험의 colorimetric assay 결과 cytosine arabinoside와 vinblastine은 NR-50과 MTT-50이 $100 \mu\text{M}$ 이하로 나타나 Borenfreund 등(1988)이 제시한 독성판정 기준에 따르면 본 연구의 결과는 이들 약제들이 매우 독성이 강한 것으로 나타났다.

한편 mutagenicity를 측정하기 위하여 micronuclei test와 염색체의 구조적 이상 및 자매 염색분체 교환의 빈도를 조사하였다.

Micronuclei test는 Lebedur와 Schmid(1973)가 생쥐 골수의 polychromatic erythrocyte에서 처음 시도하였는데 근래에는 cytokinesis-block method를 이용하여 보다 간편하고 정확하게 염색체 이상을 조사할 수 있게 되었다. 이러한 cytokinesis를 저해하는 약제인 cytochalasin B의 농도가 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 가장 많은 이해세포를 형성하였는데 이는 Nito 등(1988)의 결과와 일치하였다.

본 실험에 나타난 micronuclei test 결과는 1000개의 이해세포당 cytosine arabinoside의 농도 $1.64 \mu\text{M}$ 에서 151.33과 vinblastine의 $0.03 \mu\text{M}$ 에서 129.67의 빈도로 출현하였는데 이 빈도는 Migliore 등(1987)이 사람의 말초혈액을 이용한 연구에서 vincristine $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 1000개의 이해세포당 56의 빈도를 나타냈다는 보고와 Schmuck 등(1988)이 syrian hamster fibroblast를 이용한 연구에서 colchicine을 $1 \mu\text{M}$ 로 처리하였을 때 1000개의 단핵세포당 140의 빈도를 보인 결과와 차이가 있었는데 이는 세포 종류, 농도 처리시간 등의 차이에서 비롯된 것으로 사료된다.

그런데 이들 두 약제는 Schmuck(1988)이 제시한 유전독성 판정기준에 따르면 2000개의 세포에서 50개 이상의 micronuclei가 관찰되었으므로 강한 mutagenicity가 있는 것으로 사료된다. 그리고 이해세포당 micronuclei의 수는 cytosine arabinoside보다 vinblastine의 MCV 농도에서 3개 이상의 multimicronuclei가 적게 나타났으며 micronuclei의 크기는 Wakata와 Sasaki(1987)의 보고에 의하면 chinese hamster fibroblast를 이용한 연구에서 적경의 상대적인 비가 $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ colcemid를 처리한 경우 0.4 이상이 40%였으나 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ mitomycin C를 처리한 경우는 0.4 이상이 5% 정도에 불과하였다고 보고하였는데 본 연구에서도 cytosine arabinoside는 0.3 이상이 15%였으나 vinblastine은 27%를 차지하여 micronuclei의 크기가 큰 것이 vinblastine을 처리하였을 경우 많이 출현하는 것을 볼 수 있었다. 이 결과는 mitomycin C나 cytosine arabinoside가 DNA 합성에 손상을 주는 약제인 반면 colcemid와 vinblastine은 방추사에 손상을 미치는 약제이기 때문에 이해세포당 micronuclei의 수와 크기의 차이가 있는 것으로 사료된다.

한편, 염색체의 구조적 이상은 Mair와 Schmid(1976)에 의하면 chinese hamster fibroblast를 이용한 연구에서 vincristine을 $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하면 염색체 이상을 나타내는 빈도가 2%였고 cytosine arabinoside의 농도 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 2%를 나타냈다고 보고하였으며 Moore와 Randall(1987)에 의하면

JU56 섬유모세포를 이용하여 cytosine arabinoside를 $15 \mu\text{M}$ 로 24시간 처리하였을 때 cell cycle이 지연되고 염색체 이상이 나타났으며 그에 따른 세포 사멸이 초래된다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 연구의 $1.64 \mu\text{M}$ cytosine arabinoside에서 40개의 metaphase 중 7개의 metaphase와 $0.03 \mu\text{M}$ vinblastine에서 6개의 metaphase가 이상을 나타낸 결과와 비교하였을 때 본 연구의 결과에서 훨씬 많은 염색체 이상을 보였다.

또한 자매 염색분체 교환빈도는 Ishii와 Bender(1980)의 chinese hamster V79B-1 세포를 이용한 연구에서 cytosine arabinoside를 $0.25 \mu\text{M}$ 로 38시간 동안 처리하였을 경우 세포당 27.6의 빈도로 일어났다고 하였고 Rainaldi 등(1984)에 의하면 V79/Ap4 chinese hamster 섬유모세포를 이용한 연구에서 cytosine arabinoside를 $1 \mu\text{M}$ 로 24시간 동안 처리하면 세포당 25의 빈도로 교환이 일어난다고 보고하였다. 본 연구에서는 cytosine arabinoside 농도 $1.64 \mu\text{M}$ 에서 염색체당 0.553의 빈도로 나타나 Ishii와 Bender(1980)의 보고나 Rainaldi 등(1984)의 결과보다 낮게 나타났는데 이는 세포 종류와 처리시간 및 배양용기의 차이에 의한 것으로 사료된다.

본 연구에서는 항암제인 cytosine arabinoside와 vinblastine의 세포독성을 조사하였는데 cytosine arabinoside는 DNA 합성 저해제로 작용하고 vinblastine은 microtubule 용해제로 작용하여 세포소기관의 독성을 규명하는 NR과 MTT 정량 결과 두 약제 모두 강한 세포독성을 나타냈다. 또한 염색체에 미치는 손상을 조사한 결과 micronuclei가 높은 빈도로 출현하였고 염색체의 구조적 이상과 자매 염색분체 교환빈도도 매우 높은 것으로 보아 두 약제 모두 강한 mutagenicity를 나타내는 것으로 사료된다.

참고문헌

- 김재민, 김정중, 정연태(1985) : Polyethylene glycol에 의하여 유발되는 사람과 생쥐의 잡종세포에 대한 세포유전학적 연구, 원광의과대학, 1, 221-236.
- 정종훈, 김재민, 최민규, 정연태(1987) : 3가 및 6가 크롬이 배양 생쥐 섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구, 원광의과학, 3, 1-12.
- Babich, H. and Borenfreund, E. (1987) : Structure-activity relationship (SAR) models established in vitro with the Neutral Red cytotoxicity assay, *Toxicol. In Vitro.*, **1**, 3-9.
- Bhuyan, B.K., Scheidt, L.G. and Fraster, T.J. (1971) : Cell cycle phase specificity of antitumor agents, *Cancer Res.*, **32**, 398-407.
- Borenfreund, E. and Babichi, H. (1987) : *In vitro* cytotoxicity of heavy metals, acrylamide and organotin salts to neutral cells and fibroblasts, *Cell Biol. Toxicol.*, **3**, 63-73.
- Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1984) : A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90), *J. Tiss. Cult. Meth.*, **9**, 7-9.
- Borenfreund, E., Babichi, H. and Martin-Alguacil, N.M. (1988) : Comparison of two *in vitro* cytotoxicity assays-The Neutral Red (NR) and Tetrazolium MTT tests, *Toxicol. In Vitro.*, **2**, 1-6.
- Carmichael, J., Degriff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Michell, J.B. (1987a) : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.*, **47**, 936-942.

- Carmichael, J., Degriff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Michell, J.B. (1987b) : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of radiosensitivity, *Cancer Res.*, **47**, 943-946.
- Crowther, P.J., Cooper, I.A. and Woodcock, D.M. (1985) : Biology of cell killing by 1-B-D-Arabinofuranosylcytosine and its relevance to molecular mechanisms of cytotoxicity, *Cancer Res.*, **45**, 4291-4300.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986) : Rapid colorimetric assay for growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Meth.*, **89**, 271-277.
- Erexon, G.L., Kligerman, A.D. and Allen, J.W. (1987) : Diaziquone induced micronuclei in cytochalasin B-blocked mouse peripheral blood lymphocytes, *Mut. Res.*, **178**, 177-122.
- Fenech, M. and Morley, A.A. (1985) : Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mut. Res.*, **147**, 29-36.
- Gerlier, D. and Thomasset, N. (1986) : Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *J. Immunol. Meth.*, **94**, 57-63.
- Hashizume, T., Akiba, S., Sato, T., Fujii, T., Watanabe, S. and Sasaki, J. (1988) : Vinblastine inhibits platelet aggregation by a microtubule-independent mechanism, probably by its pertubing action on the plasma membrane, *Thrombosis Res.*, **50**, 181-190.
- Ishii, Y. and Bender, M.A. (1980) : Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells, *Mut. Res.*, **79**, 19-32.
- Lanthan, B., Clark, G.M. and Von Hoff, D.D. (1985) : In vitro comparison of vinzolidine and vinblastine: A model for methods of evaluation of analogues in a human tumor cloning system, *Cancer Res.*, **45**, 6286-6289.
- Leidebur, M.V. and Schmid, W. (1973) : The micronucleus test methodological aspects, *Mut. Res.*, **19**, 109-117.
- Maier, P. and Schmid, W. (1976) : The model mutagens evaluated by the micronucleus test, *Mut. Res.*, **40**, 325-338.
- Migliore, L., Bararale, R., Belluomini, D., Cognetti, A.G. and Loprieno, N. (1987) : Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by adriamycin and vinblastine: A comparison between micronucleus and chromosomal aberration assays, *Toxic. in vitro.*, **1**, 247-254.
- Moore, R.C. and Randall, C. (1987) : Different effects of 1-m-arabinofuranosylcytosine and aphidicolin in S-phase cells chromosome aberrations, cell-cycle delay and cytotoxicity, *Mut. Res.*, **178**, 73-80.
- Mosmann, T. (1983) : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55-63.
- Nemes, Z., Diets, R., Luth, J.B., Gomba, S., Hakenthal, E. and Gross, F. (1979) : The pharmacological relevance of vital staining with neutral red, *Experiential.*, **35**, 1475-1476.
- Nito, S., Ariyuki, F. and Okaniwa, A. (1988) : Spontaneous expulsion of micronuclei by enucleation in the micronucleus assay, *Mut. Res.*, **207**, 185-192.

- Rainaldi, G., Sessa, M.R. and Mariani, T. (1984) : Inhibitors of DNA synthesis induce sister chromatid exchanges at the early S phase of the cycle. *Chromosoma, (Berl.)*, **90**, 46-49.
- Russo, A. and Pacchierotti, F. (1988) : Meiotic arrest and aneuploidy induced by vinblastine in mouse oocytes, *Mut. Res.*, **202**, 215-221.
- Schmuck, G., Lieb, G., Wild, D., Schffmann, D. and Henchler, D. (1988) : Characterization of an *in vitro* micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts, *Mut. Res.*, **203**, 397-404.
- Wakata, A. and Sasaki, M.S. (1987) : Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: Comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mut. Res.*, **190**, 51-57.