

한국환경농학회지 제16권 제2호(1997)
Korean Journal of Environmental Agriculture
Vol. 16, No. 2, pp. 149~155

살충제 Carbofuran이 쥐의 NIH3T3 섬유모세포에 끼치는 독성 및 Phenobarbital Sodium과 3-Methylcholanthrene에 의한 보상효과†

한성수 · 임요섭

원광대학교 농화학과

Carbofuran Cytotoxicity on Rat Fibroblast Cells and Compensation Effects of Phenobarbital Sodium and 3-Methylcholanthrene on Its Toxicity

Seong-Soo Han and Yo-Sup Rim(Dept. of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iksan, Korea 570-749)

Abstract : This study was carried out to investigate the effects of phenobarbital sodium(PB) and 3-methylcholanthrene(3-MC) on carbofuran cytotoxicity and to develop antitoxic agents based on the effectiveness. Experimental groups for carbofuran cytotoxicity were divided into five groups ; medium alone and four treatments of carbofuran (1, 25, 50 and 100 μ M), and those for compensation effects were divided into six groups ; medium alone, IC₅₀ carbofuran and four combinations of carbofuran and PB or 3-MC(IC₅₀ carbofuran plus 1, 25, 50, 100 μ M of PB and 3-MC, respectively). After incubation for 48 hrs under the same conditions, MTT(Tetrazolium MTT), NR(Neutral red) and SRB(Sulforhodamine B protein) assay were performed. Fifty percentage inhibition of MTT, NR, and SRB against carbofuran in rat fibroblast cell were 60.7, 82.5 and 87.0 μ M, respectively. At the combination treatments of IC₅₀ of carbofuran and 100 μ M of PB, the significant compensation effects were observed from the results of MTT and NR but not from that of SRB absorbance. And at the combination treatments of IC₅₀ of carbofuran and 3-MC, the relatively significant compensation effects were found at 50 μ M 3-MC from the results of MTT and at 100 μ M 3-MC from that of NR and SRB absorbances, respectively. From the results of light microscopy, combination treatments of carbofuran(IC₅₀) and PB or 3-MC showed good regeneration in carbofuran toxicity of rat fibroblast cells. These results suggest that PB or 3-MC can compensate the cytotoxicity of carbofuran insecticide in rat NIH3T3 fibroblast cells.

서 론

사용된 농약이 환경에 잔류되는 것 이외에도 인축에 직접 접촉되거나 흡입되어 중독되거나 치사시키는 등^{1,2)} 급성적 위해(危害) 유발가능성이 높기 때문에 현재 국내에서도 농약의 인축에 대한 안전성 평가의 기초자료의 확립을 위해 오래전부터 많은 연구들이^{3,4)} 행하여져 왔으며 이러한 노력들은 앞으로도 계속되어야 할 것이다. 중금속의 경우 중금속이 세포독성에 미치는 영향⁵⁾, 중금속에 대한 해독물질 개발⁶⁾ 등의 연구가 지속적으로 이루어지고 있으나 농약의 경우 대부분의 연구들이 농약 자체의 독성에 대한 것으로 이루어져 있어서^{2~4)} 농약 해독제의 개발에 대한 기초자료가 부족한 실정으로 이에 대한 연구가 시급한 실정이다. 본 실험에서 사용한 검정방법은 독성기준 설정을 위해 미국 암협회(NCI)에서 이용하고 있는 방법들로서 Tetrazolium MTT (MTT)분석법과 Sulforhodamine B protein(SRB)분석법⁷⁾은 세포반응에 의한 효소작용을 측정하는 방법이고 Neutral red(NR)분석법⁸⁾은 세포질 반응중 용해 소체 변화를 측정하는 방법이다. 이중 MTT분석법의 경우 세포의 활성화

중식정도를 측정할 수 있는 예민한 방법으로 세포의 미토콘드리아의 호박산 탈수 효소(succinyl dehydrogenase)에 의하여 노란색의 용해성 MTT가 청색의 불용성 MTT formazan으로 환원되는 기전에 기초하고 있으며 SRB분석법은 sulforhodamine B 단백질을 이용하는 방법으로 세포내에 생성되는 단백질의 양에 의해 분석할 수 있는 방법으로 SRB염색이 안정하다는 장점을 갖고 있다. NR정량법은 염색제를 이용하여 세포의 용해소체내의 효소를 측정하는 것으로서 다양한 화학제제의 세포독성을 평가하는데 사용되고 있다. 따라서 본 연구는 농약의 독성 경감물질개발의 기초자료를 제시하고자 잉어에서의 급성경구독성(LC₅₀)이 0.52ppm⁴⁾이고 쥐에 대한 급성경구독성(LD₅₀)이 6.9mg/kg⁹⁾으로, 독성이 비교적 강한 것으로 알려진 carbamate계 살충제 carbofuran이 쥐의 NIH3T3 섬유모세포에 끼치는 독성을 검정하고 carbofuran에 의해 나타난 섬유모세포의 독성에 대한 효소유도체 phenobarbital sodium(PB) 및 3-methylcholanthrene(3-MC)의 보상효과를 검토하기 위하여 독성물질의 영향을 많이 받는 기관으로 알려진^{5,6)} 섬유모세포를 배양한 것에 여러 농도의 carbofuran을 처리하여 MTT, NR, 및 SRB 정량법을

이용 각각에 대한 carbofuran의 IC_{50} (MTT_{50} , NR_{50} , 및 SRB_{50})을 구한 후, IC_{50} 과 PB 또는 3-MC를 조합처리하여 섬유모세포의 보상효과를 비교·분석하였던 바 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

본 연구는 1996년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 사의를 표한다.

재료 및 방법

공시약제 및 시약

Carbamate계 살충제 carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol methyl carbamate, 순도: 99.9%)은 국립보건원에서 분양받아 사용하였으며 phenobarbital sodium [5-ethyl-5-phenyl-2,4,6(1H,3H,5H)-pyrimidinetrione monosodium salt, 순도: 97.5%], 3-methylcholanthrene(2-dihydro-3-methyl-ben[j]aceanthrylene, 순도: 99%) 그리고 MTT, NR, SRB정량에 사용한 시약은 Sigma Chemical Co. (U.S.A)에서, 세포배양액에 사용한 Eagle's minimum essential medium(EMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin G, streptomycin, 및 fungizone은 Gibco Chemical Co.(USA) 제품의 GR급을, 기타 시약은 특급시약을 구입하여 실험을 수행하였다.

실험기기

CO_2 incubator와 Turk형 혈구계산기는 Shellab Co.(USA) 제품을, well multidish와 microplate reader(Molecular devices)는 Nunclon Co.(USA)제품을, 도립현미경은 Olympus Co.(Japan)제품을 사용하였고 MTT, NR, SRB정량에 사용된 UV-Spectrophotometer는 Pye-Unicam Co.(Model SP-8-400, USA)제품을 사용하였다.

세포배양

Carbofuran과 PB 및 3-MC의 세포독성실험을 위하여 원광대학교 의과대학 해부학 교실에서 분양받은 NIH3T3세포(mouse skin fibroblast)를 배양용기(25cm² flask, Nurc)에서 stock culture한 후 3~4회 계대배양하여 사용하였다. 세포 배양액은 EMEM에 10% FBS와 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25µg/ml) 및 fungizone(25µg/ml)을 넣어 조절하였고, 세포는 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%로 조절된 항온기(CO_2 incubator)내에서 배양하였으며 배양액은 3일마다 교환하였다. 실험을 위한 세포부유액은 1차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여 Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10^4 cell/ml가 되도록 만들었고, 이 세포부유액을 세포배양용 well multidish에 well당 2ml씩 분주하여 배양하였다.

IC_{50} 결정과 보상효과 측정

Carbofuran의 IC_{50} 결정은 배양중인 NIH3T3 섬유모세포

의 각 well당 1, 25, 50, 100µM의 carbofuran을 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT, NR 및 SRB 정량을 하여 carbofuran이 이들 각각에 대한 50% 억제농도인 IC_{50} (MTT_{50} , NR_{50} 및 SRB_{50})을 회귀직선식에 의해 구하였다¹⁰⁾. 보상효과 측정은 여기에서 구한 carbofuran의 IC_{50} 농도와 여러 농도의 phenobarbital sodium(PB) 또는 3-methylcholanthrene(3-MC)을 배양액에 각각 조합으로 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT, NR 및 SRB 정량을 실시하여 이것을 토대로 보상효과를 대조군과 비교·검토하였다.

MTT정량(Tetrazolium MTT)은 Mosmann의 방법¹¹⁾에 따라 수행하였으며, 실험은 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합처리군으로 구분하여 각각 6군으로 나누었는데, 배양액을 넣어 배양한 군을 대조군, MTT_{50} 량의 carbofuran을 첨가한 배양액으로 배양한 군을 MTT_{50} 군, $MTT_{50}(IC_{50})$ 량의 carbofuran과 여러 농도의 PB 및 3-MC를 각각 배양액에 넣어 배양한 군을 실험군으로 하여 24 well multidish에서 48시간 배양하였다. 배양후 분석당일 조제한 MTT 50µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1ml씩 넣어 3시간 배양하였다.

배양 완료후 배양액을 버리고 dimethyl sulfoxide를 2ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 용해된 MTT formazan의 흡광도는 well multidish에 microplate reader를 부착한 다음 UV-Spectrophotometer(550nm)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

NR(Neutral red) 정량은 Borenfreund와 Puerner 방법¹²⁾에 따라 세포를 배양용기당 5×10^4 cell/ml이 되도록 well당 1ml씩 24 well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. MTT 정량 방법과 동일하게 대조군, NR_{50} 군, 실험군으로 하여 24시간 배양한 섬유모세포에 시료를 처리한 후 48시간 배양하였다. 배양후 당일 조제한 NR 50µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1ml씩 넣은 후 37°C 어두운 곳에서 overnight시킨 다음, well당 1ml씩 다시 첨가하여 3시간 배양하였다. 배양 완료후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline으로 3회 세척하고, 1% formaldehyde - 1% $CaCl_2$ 0.5ml/well을 넣어 세포를 고정시킨 후 1% glacial acetic acid - 50% ethanol을 well당 2ml씩 넣어 15분간 실온에 방치하여 3시간동안 용해소체에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 흡광도는 well multidish에 microplate reader를 부착한 다음 UV-Spectrophotometer(540nm)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

SRB(Sulforhodamine B protein)정량은 Skehan 등¹³⁾의 방법에 따라 세포를 5.0×10^4 cell/well이 되도록 조절하여 1ml씩 24 well plate에 분주하고 48시간 동안 배양후 대조군, SRB_{50} 군, 실험군으로하여 시료를 처리한 후 여기에 50% trichloroacetic acid를 well당 1ml씩 분주하여 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 완료후 배양액을 버리고 5회 세척한 다음 0.4% sulforhodamine B(SRB)를 200µl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 후 1% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조시켰다. 10mM Tris base [tris(hydroxymethyl)aminomethane]로 bound protein stain을 녹였다. SRB 흡

광도는 well multidish에 microplate reader를 부착한 다음 UV-Spectrophotometer(510nm)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

세포의 형태학적 관찰

전술한 각 처리군들의 광학 현미경적 관찰을 위하여 NIH3T3 섬유모세포를 MTT 정량법의 절차대로 수행한 다음 MTT량을 측정하기 직전에 도립현미경(Inverted microscope)으로 관찰하였다.

통계처리

실험결과와 통계처리는 Student's paired t-test로 하였고, p-value가 0.05미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

Carbofuran의 세포독성

MTT(Tetrazolium MTT)정량

NIH3T3 섬유모세포에 여러 농도의 carbofuran을 처리한 후 MTT분석법을 행하여 측정한 MTT흡광도는 표 1에서 보는 바와 같이 25 μ M까지는 영향을 받지 않았으나 50 μ M에서는 대조군에 비해 3배, 100 μ M에서는 6배 정도 급격히 감소하였다. 대조군의 흡광도를 100%로 하였을 때 carbofuran 처리군의 흡광도를 백분율로 환산한 후 이 값을 토대로 하여 회귀직선식으로 산정한 결과 carbofuran이 MTT량의 50%를 감소시키는 농도(IC₅₀)인 MTT₅₀은 60.7 μ M이었다(표 1). Borenfreund 등⁷⁾은 MTT의 흡광도를 대조군과 비교하여 세포가 독성을 받기 시작하는 농도를 MTT₉₀(IC₁₀)으로 하고 심한 독성을 받는 농도를 MTT₅₀(IC₅₀)으로 결정한 후 MTT₅₀ 100 μ M 미만의 경우 고독성, 100~1000 μ M 범위는 중간독성, 1000~2000 μ M 범위는 저독성, 2000 μ M 이상은 무독성으로 독성 판정 기준을 제시하였다. 따라서 본 실험에 사용한 carbamate계 살충제인 carbofuran은 MTT₅₀이 60.7 μ M로 독성이 비교적 높게 나타났다. 현재까지 농약을 실험관 실험(in vitro)에 적용하여 세포독성을 측정한 보고가 없어 비교할 수는 없으나 중금속인 카드뮴에 관한 세포독성을 실시한 몇몇의 보고를 참고로 하면 박 등⁸⁾은 NIH3T3 섬유모세포에 대한 카드뮴의 MTT₅₀이 27.99 μ M, 정 등⁹⁾은 흰쥐에서 분리하여 배양한 섬유모세포에 대한 카드뮴의 MTT₅₀이 60.0 μ M로 보고하고 있다.

NR(Neutral red)정량

NR흡광도는 표 1에서 보는 바와 같이 carbofuran 50 μ M까지는 NR량에 영향을 미치지 않았으나 100 μ M농도에서 급격히 감소하였으며, MTT정량에서와 같이 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 처리군의 백분율을 구한 다음 직선회귀식으로 산정한 결과 carbofuran이 NR량의 50%를 감소시키는 농도(IC₅₀)인 NR₅₀은 82.5 μ M이었다(표 1).

Borenfreund 등⁷⁾은 MTT의 흡광도와 같은 방법으로 NR흡광도에 의한 독성을 평가하였으며, 카드뮴의 세포독성을 측정한 박 등⁸⁾과 정 등⁹⁾이 카드뮴의 양이 증가함에 따라 비례적으로 MTT량과 NR량이 동시에 감소하는 경향이 있었다고 보고한 바와 같이 본 분석법에 의한 실험에서도 carbofuran의 양이 증가함에 따라 NR량이 감소되는 것으로 보아 carbofuran의 독성이 비교적 크다는 것을 알 수 있었다. 그러나 MTT정량에서는 NR정량보다 carbofuran의 독성이 높게 나타난 결과로 보아 carbofuran은 세포소기관인 mitochondria 대한 영향이 용해소체보다 더 클 것으로 추정된다.

Table 1. Cytotoxicity of carbofuran on NIH3T3 fibroblast.

Concentration of carbofuran	Absorbance		
	MTT	NR	SRB
Untreated control	1.731±0.04 ^{a)} (100) ^{b)}	1.922±0.059 (100)	1.913±0.03 (100)
1 μ M	1.778±0.05(102.7)	1.942±0.046 (101)	1.878±0.04 (98.2)
25 μ M	1.772±0.06(102.4)	1.879×0.107 (97.8)	1.799×0.02 (94.0)
50 μ M	0.481±0.07(28.8)**	1.985±0.025 (103.3)	1.139×0.19 (59.5)**
100 μ M	0.268×0.05(15.5)**	0.407±0.175 (21.2)**	0.233×0.04 (12.2)**

a) Data are mean±S.D.(%)

b) Values in parenthesis are percentage to untreated control. Asterisks of * and ** are significantly different from the control at P<0.01 and P<0.001, respectively.

SRB(Sulforhodamine B Protein)정량

SRB흡광도는 표 1에서 보는 바와 같이 carbofuran 25 μ M까지는 SRB량에 영향을 미치지 않았으나 100 μ M농도에서 급격히 감소하였으며, MTT정량에서와 같이 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 처리군의 백분율을 구한 다음 직선회귀식으로 산정한 결과 carbofuran이 SRB량의 50%를 감소시키는 농도(IC₅₀)인 SRB₅₀은 87.0 μ M이었다(표 1).

단백질 정량은 Lowry 등¹⁴⁾의 방법이 많이 이용되어 왔으나 측정값이 불안정하고 검정방법이 복잡하여 실험결과와 오차범위가 컸으나 Skehan 등¹³⁾이 개발한 SRB분석방법은 분석속도가 빠르고 민감하며 실험경비가 적게드는 장점이 있어서 1990년대 이후에 세포독성 검정방법으로 많이 이용되고 있어 이 방법으로 검정한 결과 SRB₅₀인 87.0 μ M은 섬유모세포에 다양한 연구보고가 없어 비교할 수는 없으나 MTT₅₀, NR₅₀값에 비해 다소 높게 나타나 독성은 상대적으로 낮게 나타났고, 고독성 기준치인 100 μ M 이하인 것이 증명되었으므로 carbofuran은 독성이 다소 높은 것으로 판단된다. 따라서 상기의 결과인 carbofuran이 MTT, NR, SRB정량에 미치는 결과를 분석해 보면 carbofuran은 섬유모세포의 세포소기관중 미토콘드리아(MTT)>핵(SRB)>용해소체(NR)의 순서로 독성이 나타나 carbofuran은 주로 미토콘드리아에 작용하는 것으로 추정 할 수 있었다.

보상효과 시험

MTT(Tetrazolium MTT)정량

NIH3T3 섬유모세포에 MTT₅₀(IC₅₀)인 60.7μM의 carbofuran을 처리하여 나타난 MTT₅₀군의 흡광도는 48.7%와 69.9% 범위였다(표 2, 3). NIH3T3 섬유모세포에 60.7μM의 carbofuran(IC₅₀)과 여러 농도의 3-MC와 PB를 조합처리하여 MTT흡광도를 측정된 결과를 t-test 하였는 바 3-MC는 50 μM처리군에서부터 유의성있는 보상효과가 나타났으며(표 2), PB는 100μM처리군에서 유의성 있는 보상효과가 나타났(표 3).

Table 2. Compensation effect of 3-Methylcholanthrene(3-MC) on cultured NIH3T3 fibroblast.

Treatment of carbofuran(IC ₅₀)+3-MC	Absorbance		
	MTT	NR	SRB
Untreated control	1.346±0.01 (100)	1.870×0.064 (100)	1.754±0.06 (100)
IC ₅₀	0.656±0.001 (48.7)	0.886×0.077(47.4)	1.190±0.01 (67.8)
IC ₅₀ +1μM	0.680±0.006 (50.5)	0.840±0.069 (44.9)	1.255±0.02 (75.6)
IC ₅₀ +25μM	0.673±0.018 (50.0)	0.813±0.049 (43.5)	1.295±0.08 (73.8)
IC ₅₀ +50μM	0.740±0.025 (55.0)*	0.933±0.035 (49.9)	1.344±0.09 (76.6)
IC ₅₀ +100μM	0.886×0.12 (65.8)*	1.034±0.044 (55.6)*	1.385±0.04 (79.0)*

a) Data are mean±S.D(%)

b) Values in parenthesis are percentage to untreated control. Asterisk *) is significantly different from the control at P<0.05.

NR(Neutral red)정량

NIH3T3 섬유모세포에 NR₅₀(IC₅₀)인 82.5μM의 carbofuran을 처리하여 나타난 NR₅₀군의 흡광도는 47.4%와 53.9% 범위였다(표 2, 3). NIH3T3 섬유모세포에 82.5μM의 carbofuran(IC₅₀)과 여러 농도의 3-MC와 PB를 조합처리하여 NR흡광도를 측정된 결과를 t-test 하였는 바 3-MC와 PB 모두 100μM처리군에서 유의성있는 보상효과가 나타났(표 2, 3).

SRB(Sulforhodamine B Protein)정량

NIH3T3 섬유모세포에 SRB₅₀(IC₅₀)인 87.0μM의 carbofuran을 처리하여 나타난 SRB₅₀군의 흡광도는 67.8%와 53.7% 범위였다(표 2, 3). NIH3T3 섬유모세포에 87.0μM의 carbofuran(IC₅₀)과 여러 농도의 3-MC와 PB를 조합처리하여 SRB흡광도를 측정된 결과를 t-test 하였는 바 3-MC는 100 μM처리군에서부터 유의성있는 보상효과가 나타난 반면 PB는 보상효과가 나타나지 않았다. 여러 가지 독성물질의 세포독성을 검색한 보고^{5,6)}에 의하면 SRB정량방법은 MTT 정량방법보다 민감하지 않은 경향이 있다고 하였으나 본 실험에서와 같이 carbofuran세포독성에 대한 PB의 보상효과가 전혀 나타나지 않은 보고는 없다. 따라서 PB가 NIH3T3 섬유모세포의 핵내에 미치는 영향에 관하여는 추후 계속 연구되어야 할 것이다. 이상의 보상효과 시험중 SRB정량에서는 PB의 보상효과가 나타나지 않았지만 3-MC는 100μM

농도처리군에서 유의성 있는 보상효과를 나타냄을 알 수 있었다.

Table 3. Compensation effect of phenobarbital sodium(PB) on cultured NIH3T3 fibroblast.

Treatment of carbofuran(IC ₅₀)+PB	Absorbance		
	MTT	NR	SRB
Untreated control	1.70±0.066 (100)	1.96±0.069 (100)	1.964±0.034 (100)
IC ₅₀	1.19±0.003 (69.9)	1.06±0.073 (53.9)	1.054±0.039 (53.7)
IC ₅₀ +1μM	1.16±0.005 (68.2)	0.97±0.123 (49.6)	1.029±0.05 (52.4)
IC ₅₀ +25μM	1.08±0.003 (63.5)	0.93±0.11 (47.3)	1.040±0.033 (53.0)
IC ₅₀ +50μM	1.06±0.003 (62.3)	1.28±0.312 (65.1)	1.031±0.024 (52.5)
IC ₅₀ μM	1.41±0.034 (82.9)**	1.52±0.365 (77.5)**	1.045±0.036 (53.2)

a) Data are mean±S.D(%)

b) Values in parenthesis are percentage to untreated control. Asterisk *) is significantly different from the control at P<0.01.

세포의 광학현미경적 관찰소견

대조군에 있어서는 배양 24시간째부터 well바닥에 다수의 방추형의 NIH3T3 섬유모세포가 부착되어 있었으며, 48시간째에는 monolayer의 세포들이 바닥을 덮고 있었으나(Fig. 1) carbofuran만을 처리한 실험군에서는 carbofuran의 농도가 증가할수록 세포수가 감소하였고 방추형의 세포가 원형으로 변형되었다(Fig. 2). Carbofuran의 MTT, NR 및 SRB에 대한 IC₅₀을 처리한 군에서는 세포수가 감소하였고, 세포의 형태가 원형으로 변형되는 양상을 보였다(Fig. 3). IC₅₀농도의 carbofuran과 3-MC를 혼합처리하였을 때의 세포들은 carbofuran IC₅₀농도+3-MC 1μM 처리군부터 세포가 회복되기 시작하였고(Fig. 4), carbofuran IC₅₀농도+3-MC 100μM의 처리군의 경우 대부분의 세포가 정상인 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 또한 carbofuran과 PB를 혼합처리한 실험군에서도 carbofuran IC₅₀농도+3-MC를 혼합처리한 실험군에서와 유사하게 세포가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6~7). 따라서 이상의 결과로 보아 정도의 차이는 있으나 PB와 3-MC 모두 carbofuran의 세포독성을 감소시킬 수 있는 물질임을 알 수 있었다.

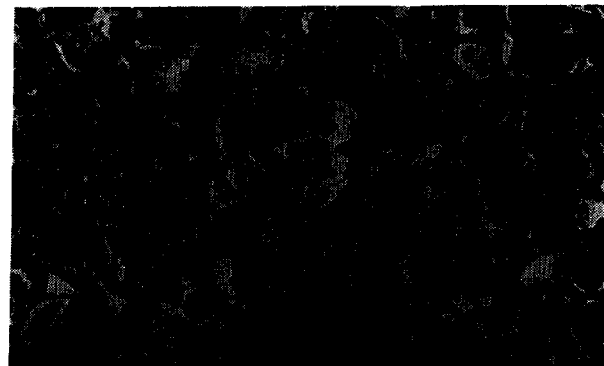


Fig. 1. An inverted photomicrograph of NIH3T3 fibroblasts cultured in control media. All cells had normal spindle shape and cytoplasmic process. ×100.

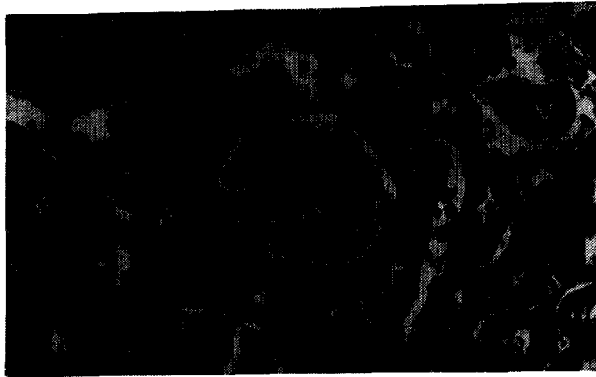


Fig. 2. An inverted photomicrograph of NIH3T3 fibroblast cultured in media containing 100µM carbofuran. All cells were severely damaged and necrosis was observed. ×100.

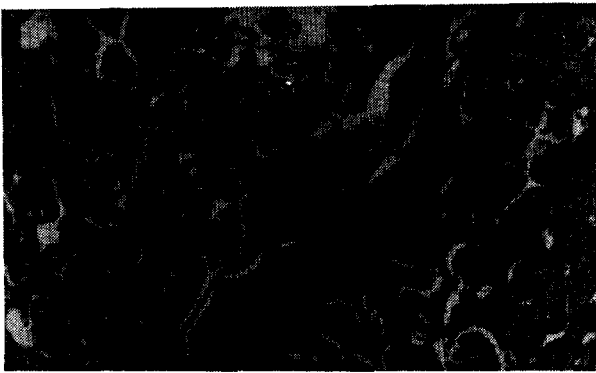


Fig. 3. An inverted photomicrograph of NIH3T3 fibroblast cultured in media containing 60.7µM carbofuran. Most cells were severely damaged and necrosis was observed. ×100.



Fig. 4. An inverted photomicrograph of NIH3T3 fibroblast cultured in media containing 60.7µM carbofuran and 25µM 3-MC. Many cells were similar to control. ×100.

고 찰

본 연구는 신경계에 작용하여 유해 해충을 치사케 하는 카바메이트계 살충제 carbofuran의 독성과 carbofuran의 독성에 PB 및 3-MC를 처리하여 나타난 독성경감효과를 시험관내 시험(in vitro)을 통하여 관찰해보기 위한 실험으로써 그 중 MT(Metallothionenin)는 말의 신장피질에서



Fig. 5. An inverted photomicrograph of NIH3T3 fibroblast cultured in media containing 60.7µM carbofuran and 100 µM 3-MC. All cells were normal. ×100.



Fig. 6. An inverted photomicrograph of neuroglial cell cultured in media containing 60.7µM carbofuran and 25µM PB. Many cells were regenerated. ×100.

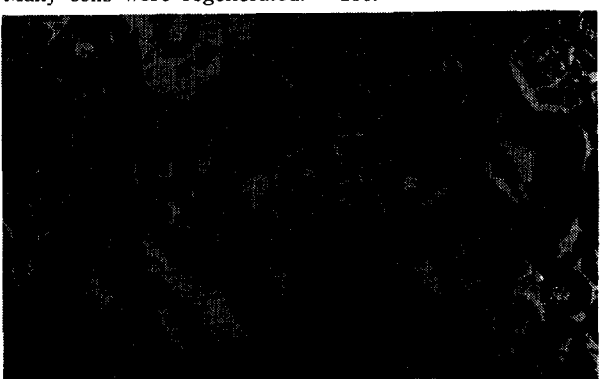


Fig. 7. An inverted photomicrograph of neuroglial cell cultured in media containing 60.7µM carbofuran and 100µM PB. Most cells were normal. ×100.

Margoshes 등¹⁵⁾에 의해 발견된 저분자 단백질로써 중금속 등의 독성물질 및 스트레스시 세포적응기전(Cellular adaptation mechanism)에 관여하여 독성물질과 MT의 thionein과 결합시켜 대사시킨다는 Kagi 등¹⁶⁾의 보고와 독성물질이 독성작용을 유발시키는 세포핵이나 사립체보다 MT와의 친화성이 크기 때문에 독성물질이 생체내에 유입되면 MT가 독성물질을 수용체로 전환시켜 독성작용을 완화시킨다는 이론¹⁷⁾ 등이 있으나 어떠한 기전에 의하여 이들 독성을 완화

시키는가에 대한 정확한 기전은 아직 알려져 있지 않고 있지만, MT의 독성물질에 대한 방어 작용은 MT가 독성물질과 밀접하게 결합하므로써 생물학적 반응에 참여하는 여러 효소 및 단백질이 독성물질과 결합하는 것을 지연시킨다는 의견이 지배적이다¹⁰⁾. 따라서 이러한 연구결과들과 본 연구결과를 비교해 보면 carbofuran 단독처리군의 경우 carbofuran의 독성을 경감시키고자 하는 MT가 carbofuran의 독성에 의해 중식되지 못하면서 독성물질과의 결합이 약화되어 carbofuran의 독성이 세포에 나타나게 하는 것으로 추정된다. 그러나 carbofuran과 PB 및 3-MC의 조합처리군의 경우 PB 및 3-MC가 carbofuran의 독성 경감에 관여하여 다량의 MT가 생성되도록 보조역할을 하여 체내에 투입된 carbofuran의 독성을 낮추는 것으로 생각된다. 특히 3-MC의 경우 임 등¹⁹⁾의 세포조직 실험에서 자체독성 문제가 있음에도 불구하고 본 실험의 결과인 보상효과 실험의 MTT정량에서 PB의 유의성 있는 보상효과 농도인 100 μ M 보다 2배 정도 낮은 농도인 50 μ M에서 유의성 있는 보상효과를 나타낸 것으로 보아 3-MC가 세포독성을 크게 낮출 수 있는 물질임이 판명되었으므로 3-MC 자체가 끼치는 조직독성을 낮출 수 있는 연구를 지속해야 할 것으로 생각된다. 또한 PB 및 3-MC가 미토콘드리아의 succinic dehydrogenase (MTT 정량)와 용해소체내의 효소(NR 정량)의 효소활성도를 높여 세포의 보상효과를 나타낸 것으로 보아 임 등⁹⁾에 의한 쥐에서의 효소활성과 연관지어 볼 때 carbofuran의 독성은 뇌의 acetylcholinesterase(AChE) 등 각 조직에 있는 ChE를 저해시켜 신경마비를 일으키게 하므로써 치사에 이르게 하지만 PB와 3-MC의 경우 간의 cytochrome P-450 dependent monooxygenase, UDP-glucuronosyltransferase, 또는 glutathione S-transferase 등의 활성을 유도시켜 이들 효소들에 의해 carbofuran을 산화시키거나 산화된 독성물질을 빠르게 분해시킴으로써 생존이 가능하게 하는 것으로 추정되는데, 세포에 직접 흡수된 carbofuran은 미토콘드리아의 succinic dehydrogenase와 용해소체내의 효소 등의 활성에도 영향을 미치어 세포독성을 감소시킨 것으로 생각된다.

요 약

Carbofuran에 의하여 손상된 NIH3T3 섬유모세포(mouse skin fibroblast)를 보상시킬 수 있는 물질을 개발하기 위한 기초자료를 제시하고자 carbofuran이 NIH3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성을 검정하고, carbofuran의 독성에 대한 phenobarbital sodium(PB) 및 3-methylcholanthrene(3-MC)의 보상효과를 비교·분석 하였다. Carbofuran의 IC₅₀ 결정은 배양중인 NIH3T3 섬유모세포의 각 well당 1, 25, 50, 100 μ M의 carbofuran을 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT(Tetrazolium MTT), NR(Neutral red) 및 SBR(Sulforhodamine B protein)정량을 실시하여 이들에 대한 각각의 IC₅₀을 구하였으며, 여기에서 구한 carbofuran의 IC₅₀농도와 여러 농

도의 PB 또는 3-MC를 배양액에 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT, NR 및 SRB 정량을 실시하여 보상효과를 측정하고 광학현미경적 관찰을 실시하였다. Carbofuran의 세포독성 실험결과를 보면 MTT흡광도는 carbofuran의 농도증가에 따라 감소하였으며 MTT₅₀은 60.7 μ M이었고, NR흡광도는 100 μ M농도에서 급격히 감소하였으며, NR₅₀은 82.5 μ M이었고, SRB흡광도는 50 μ M농도에서 급격히 감소하였으며 SRB₅₀은 87.0 μ M으로써 50%의 세포독성을 나타냈다. 보상효과 실험에서는 carbofuran IC₅₀과 PB의 조합처리의 경우 MTT정량과 NR정량에서는 유사하게 PB 100 μ M처리군에서부터 유의성 있는 보상효과가 나타났으나, SRB정량에서는 보상효과가 인정되지 않았다.

Carbofuran IC₅₀과 3-MC의 조합처리의 경우 MTT정량은 3-MC 50 μ M처리군에서부터, NR정량과 SRB정량의 경우는 동일하게 3-MC 100 μ M처리군에서부터 유의성 있는 보상효과가 나타났다. 세포의 광학현미경적 관찰조건인 경우에서도 carbofuran과 PB 또는 3-MC 조합처리 실험군 모두에서 세포가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과에서 PB와 3-MC 모두 carbofuran의 세포독성을 감소시킬 수 있는 물질임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 권숙표(1974). 농약과 공해, 대한의학협회지, 17(11) : 45~51.
2. 정종학(1978). 유기인제 농약으로 인한 피해, 대한의학협회지, 21(5) : 359~364.
3. 이성규, 박철원, 노정구(1984). 농약의 급성 어독성과 처리방법에 따른 독성의 변화, 한국환경농학회지, 3(1) : 45~51.
4. 임요섭, 한성수(1995). 농약에 의한 참잉어 및 이스라엘 잉어의 급성독성 비교, 한국환경농학회지, 14(2) : 163~170.
5. 정연태, 박승택, 최민규, 김정중, 문연자, 우원홍, 한두석, 최봉규, 소진탁(1993). 중금속 카드뮴(cd)의 세포독성에 관한 연구, 한국독성학회지, 9(1) : 45~49.
6. 박인성, 유현경, 김영옥, 곽정숙, 백승화, 한두석(1995). 한국산 생약으로부터 해독물질개발(제7호) 금은화 메탄올 분획의 카드뮴 세포독성에 대한 해독효과, 대한구강해부학회지, 19(1) : 167~171.
7. Borenfreund, E, Babichi, H and Matin-Alcuacil, N(1988). Comparisons of two in vitro cytotoxicity assay, The neutral red(NR) and Tetrazolium MTT tests, Toxicol, In Vitro, 2 : 1~5.
8. Dudley R.E., Svovoda D.J., Klaassen C.D.(1982). Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats, Toxicol, Appl, Pharmacol, 65 : 302~313.
9. 임요섭(1996). 살충제 Carbofuran에 의한 쥐의 효소활

- 성저해와 Phenobarbital Sodium 및 3-Methylcholanthrene의 해독기작 구명, 원광대학교 박사학위 논문, p. 29~51.
10. 채영암, 구자옥, 서학수, 이영만(1991). 기초생물통계학 ; 제9장 직선회귀, 향문사, p. 176~198.
 11. Mosmann, T(1983). Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol, Methods*, **65** : 55~63.
 12. Borenfreund, E and Puerner, J.A(1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays(HTD/Nr-90). *J. Tissue Culture Meth*, **9** : 7~11.
 13. Skehan, P., Storeng, S., Studiero, D., Monke, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bodesh, H., Kenny, S. and Boyd, M.R.(1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *National cancer institute*, **82(13)** : 1107~1112.
 14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall R.J.(1955). Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol, Chem*, **193** : 265~275.
 15. Margoshes, M. and Valle, B.L.(1957). A cadmium protein from equine kidney cortex, *J. Am, Chem, Soc*, **79** : 4813~4817.
 16. Kagi, J.H.R. and Vallee, B.L.(1960). Methllothionein, a cadmium and zinc containing protein from equine renar cortex, *J. Biol, Chem*, **235** : 3460~3466.
 17. Cherian, M.G. and Nordberg, M.(1983). Cellualr adaptation in metal toxicology and methllothionein, *Toxicology*, **28** : 1~15.
 18. Yamane, Y.(1981). Toxicology aspects of environmental pollutants, faculty of pharmaceutical sciences, Chiba University, p. 1~7.
 19. 임요섭, 한성수(1997). 살충제 Carbofuran이 쥐의 조직에 미치는 형태적 변화와 Phenobarbital Sodium 및 3-Methylcholanthrene에 의한 억제효과, *한국환경농학회지*, **16(1)** : 61~66.