J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 16, No. 2, pp. 173-178, 2000

몇 가지 제초제가 NIH 3T3 섬유모세포에 끼치는 세포독성

임요섭* · 박영민 · 정연규 · 한두석[1] · 한성수[1]

*순천대학교 농업생명과학대학 환경농업과학부
[1]원광대학교 치과대학 구강해부학교실, 생명자원과학대학 농화학과

Cytotoxicity on Fibroblast Cells of Several Herbicides

Yo Sup Rim*, Young Min Park, Yeun Kyu Jung, Du Seok Han[1] and Seong Soo Han[1]

**Division of Environment and Agricultural Science, College of Agriculture and Life Sciences, Sunchon National University, Chonnam 540-742, Korea*
[1]Department of Oral anatomy, School of Dentistry and Department of Agricultural Chemistry, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
(Received May 10, 2000)
(Accepted June 28, 2000)

***ABSTRACT** : This study was carried out to investigate cytotoxicity of several herbicides (Bentazone, Butachlor, Paraquat and Ethalfluralin) in cultured mouse NIH 3T3 fibroblasts. Tetrazolium (MTT), neutral red (NR) and sulforhodamine protein B (SRB) of the colorimetric assays were performed to evaluate the cytotoxicity on cell organelles. 2×10^4 cell/ ml of NIH 3T3 fibroblast in each well of 24 multidish were cultured. After 24 hours, the cells were treated with solution (1, 25, 50 or 100 μM) of each herbicide. After the NIH 3T3 fibroblasts of all groups were cultured in the same condition for 48 hours, MTT, NR and SRB assays were performed to evaluate the cytotoxicity. The light microscopic study was carried out to examine morphological changes of cultured NIH 3T3 fibroblasts. The MTT_{50} of Bentazone, Butachlor, Paraquat and Ethalfluralin were 1560.97 μM, 56.15 μM, 3138.81 μM and 1301.82 μM, respectively. The NR_{50} of Bentazone, Butachlor, Paraquat and Ethalfluralin were 1763.93 μM, 45.98 μM, 1030.85 μM and 1808.29 μM, respectively. The SRB_{50} of Bentazone, Butachlor, Paraquat and Ethalfluralin were 1913.38 μM, 65.30 μM, 1860.73 μM and 1086.93 μM, respectively. The morphological changes of NIH 3T3 fibroblasts showed severe degeneration in Butachlor 50 μM and 100 μM concentrations. These results indicate that Butachlor has high cytotoxicity, Bentazone, Paraquat and Ethalfluralin very weak cytotoxicity against NIH 3T3 fibroblasts.*

***Key Words** : Bentazone, Butachlor, Paraquat dichloride, ethalfluralin, NIH 3T3 fibroblast*

I. 서 론

농약을 사용하는 궁극적인 목적은 병충해와 잡초를 제거하는 것인데 살포된 농약이 목적을 달성한 후 즉시 분해되거나 소실되지 않고 환경에 잔류되는 것 이외에도 인축에 직접 접촉 또는 흡입되어 중독되거나 치사시키는(권, 1974; 정, 1978; 임, 1982) 등 급성적 위해(危害) 유발가능성이 높기 때문에 국내에서도 농약의 인축에 대한 안전성 평가의 기초자료를 확립하기 위하여 오래 전부터 많은 연구들이 행하여져 왔으며 이러한 노력들은 앞으로도 계속되어야 할 것이다. 그러나 농약에 대한 대부분의 연구들이 농약의 급성독성(이 등, 1984; 양 등, 1986; 임 등, 1995)이나 효소활성(류 등, 1990; 양 등, 1992; 임 등, 1995) 및 대사(김 등, 1995; 경 등, 1999)에 관한 것으로 이루어져 있으므로 인축의 조직이나 세포독성 등에 미치는 영향에 대한 연구뿐만 아니라 이를 이용한 해독제의 기초자료 개발에 대한 연구(한 등, 1996; 임 등, 1997; 한 등, 1997a; 한 등, 1997b; 한 등, 1997; 한 등, 1998; 임 등, 1999)등 다양한 관점에서 연구되어야 할 시점이라고 생각된다. 특히 농촌인구의 고령화로 인한 제초제 사용량의 증가로 제초제에 대한 중독사고가 빈번히 일어나고 있어 이에 따른 사회적 문제점과 빈약한 농촌의 경쟁력제고를 위해서도

*To whom correspondence should be addressed

농약에 관한 연구는 필요한 실정이다. 이에 저자는 제초제의 독성경감에 대한 기초 연구를 위해 몇 가지 서로 다른 제초제가 세포독성에 미치는 영향을 분석하고자 본 연구는 수행되었다.. 따라서 본 연구는 우리나라에서 수도 및 원예용 등의 제초제로 많이 사용되고 있는 bipyridylium계 Paraquat(그라목손®), chloroacetanilide계 Butachlor(마세트®), pH 조절제 Bentazone(밧사그란®), dinitroaniline계 Ethalfluralin(쏘나란®)을 NIH 3T3 섬유모세포에 적용한 후 세포독성을 검정하기 위하여 세포독성 검정방법으로 다양하게 사용되고 있는 MTT, NR, 및 SRB 정량법을 이용 각각에 대한 제초제들의 IC_{50}(MTT_{50}, NR_{50}, 및 SRB_{50})을 구하고 각 제초제에 대한 세포의 광학현미경적 소견을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

시험 농약인 제초제 Bentazone(3-isopropyl-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one 2,2-dioxide, 순도: 99%), Butachlor(N-butoxymethyl-2-chloro-2',6'-diethylacetanilide, 순도: 98%), Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'bipyridinium dichloride, 순도: 99%) 및 Ethalfluralin(N-ethyl-α,α,α-trifluoro-N-(2-methylallyl)-2,6-dinitro-p-toluidine, 순도: 99%)의 표준품을 Kanto Chemical Co.(Japan)에서, 그리고 MTT, NR, SRB 정량에 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. 기기는 CO_2 incubator와 Turk형 혈구계산기는 Shellab Co.(USA) 제품을, well multidish와 microplate reader(Molecular devices)는 Nunclon Co.(USA) 제품을, 도립현미경은 Olympus Co.(inverted microscope, Japan) 제품을 사용하였고 MTT, NR, SRB 정량은 ELISA reader (ETY-96, Japan)를 사용하였다.

2. 세포배양

각 제초제의 세포독성을 시험하기 위하여 원광대학교 의과대학 해부학 교실에서 분양 받은 NIH 3T3 세포 (mouse skin fibroblast)를 배양용기(25 cm^2 flask, Nurc)에서 stock culture한 후 3~4회 계대배양하여 사용하였다. 세포배양액은 EMEM에 10% FBS와 penicillin G(25 unit/m*l*), streptomycin(25 μg/m*l*) 및 fungizone(25 μg/m*l*)을 넣어 조제하였고, 세포는 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%로 조절한 항온기(CO_2 incubator)내에서 배양하였으며 배양액은 3일마다 교환하였다. 실험을 위한 세포부유액은 1차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여 Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2.0×10^4 cell/m*l*가 되도록 만들었고, 이 세포부유액을 세포배양용 well multidish에 well당 2 m*l*씩 분주하여 배양하였다.

3. IC_{50} 결정

각 제초제(Bentazone, Butachlor, Paraquat 및 Ethalfluralin)의 IC_{50} 결정은 배양중인 NIH3T3 섬유모세포의 각 well당 1, 25, 50, 100 μM의 제초제들을 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT, NR 및 SRB 정량을 하여 제초제가 이들 각각에 대한 50% 억제농도인 IC_{50}(MTT_{50}, NR_{50} 및 SRB_{50})을 회귀직선식(채 등, 1991)에 의해 구하였다.

4. MTT 정량

MTT 정량(Tetrazolium MTT)은 Mosmann(1983)의 방법에 따라 세포를 배양용기당 4.0×10^4 cell/ m*l*이 되도록 24 well multidish에 분주하여 24시간 배양 후 0 μM, 1 μM, 25 μM, 50 μM 및 100 μM 농도의 각종 제초제를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양 후 분석당일 조제한 MTT 50 μg/m*l*가 포함된 배양액을 well당 1 m*l*씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 2 m*l*/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 용해된 MTT formazan의 흡광도는 well multidish에 microplate reader를 부착한 ELISA reader(540 nm)로 측정하여 대조군과 비교 · 검토하였다.

5. NR 정량

Borenfreund 등(1984)의 방법에 의하여 세포를 배양용기당 4.0×10^4 cell/m*l*이 되도록 24 well multidish에 분주하여 24시간 배양 후 0 μM, 1 μM, 25 μM, 50 μM 및 100 μM 농도의 각종 제초제를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양 후 당일 조제한 NR 50 μg/m*l*가 포함된 배양액을 well당 1 m*l*씩 넣은 후 37°C 어두운 곳에서 overnight 시킨 다음, well 당 1 m*l*씩 다시 첨가하여 3시간 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척하고 1% formaldehyde - 1% $CaCl_2$ 0.5 m*l*/well을 넣어 세포를 고정시킨 후 1% glacial acetic acid - 50% ethanol을 well당 2 m*l*씩 넣어 15분간 실온에 방치하여 3시간동안 용해소체에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 흡광도는 Elisa reader(550 nm)로 측정하여 무처리 대조군과 비교 조사하였다.

6. SRB 정량

Skehan 등(1988)의 방법에 따라 세포를 4.0×10^4 cell/well이 되도록 조절하여 24 well plate에 분주하고 각종 제초제를 농도별(0, 1, 25, 50, 100 μM)로 처리한 다음 48시간 동안 배양 후 여기에 50% trichloroacetic acid를 well당 1 ml씩 분주하여 4°C에서 1시간동안 배양하였다. 배양 완료후 배양액을 버리고 5회 세척한 다음 0.4% sulforhodamine B(SRB)를 200 μl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 후 1% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조시켰다. 10 mM Tris base[tris (hydroxymethyl) aminomethane]로 bound protein stain을 녹인 후 ELISA reader로 520 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

7. 세포의 광학현미경적 관찰

광학현미경적 관찰을 위하여 NIH 3T3 섬유모세포를 well에 분주하여 24시간 배양한 후 제초제를 처리하고 48시간 배양하여 MTT, NR, SRB를 처리하기 전에 도립현미경으로 관찰하였다.

8. 통계처리

실험결과의 통계처리는 Student's t-test로 하였고, P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. MTT 분석법에 의한 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 세포독성

NIH 3T3 섬유모세포에서 4가지(Bentazone, Butachlor, Paraquat 및 Ethalfluralin) 종류의 제초제를 여러 농도(1 μM, 25 μM, 50 μM 및 100 μM)로 적용한 후 MTT 흡광도를 측정하고 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 비례적으로 산출한 결과, 흡광도는 제초제의 농도에 비례하여 감소하였는데 Butachlor의 경우 50 μM과 100 μM 농도에서 심하게 감소하였다. 4종의 제초제에 대한 MTT_{50}은 Bentazone 1560.97 μM, Butachlor 56.15 μM, Paraquat 3138.81 μM, Ethalfluralin 1301.82 μM이였다 (Table 1).

2. NR 분석법에 의한 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 세포독성

NIH 3T3 섬유모세포에서 4가지(Bentazone, Butachlor, Paraquat 및 Ethalfluralin) 종류의 제초제를 여러 농도 (1 μM, 25 μM, 50 μM 및 100 μM)로 적용한 후 NR 흡광도를 측정하고 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 비례적으로 산출한 결과, Bentazone과 Ethalfluralin은 농도에 비례하여 감소하지 않았다. Butachlor는

Table 1. The Cytotoxicity of Bentazone, Butachlor, Paraquat and Ethalfluralin by MTT assay in NIH 3T3 Cells

Group	Bentazone	Butachlor	Paraquat	Ethalfluralin
Concentration μM	Mean±S.D. (% of control)	Mean±S.D. (% of control)	Mean±S.D. (% of control)	Mean±S.D. (% of control)
Control	4.16±0.00 (100)	4.15±0.00 (100)	4.15±0.00 (100)	3.73±0.23 (100)
1	4.16±0.00 (100)	4.15±0.00 (100)	4.15±0.00 (100)	3.77±0.09 (101.3)
25	4.13±0.05 (99.4)	4.15±0.00 (100)	4.15±0.00 (100)	3.80±0.29 (101.8)
50	4.06±0.13 (97.7)	2.09±0.02 (50.4)***	4.15±0.00 (100)	3.35±0.33 (89.9)
100	4.03±0.16 (97.0)	0.18±0.01 (4.4)***	4.08±0.11 (98.3)	3.33±0.12 (89.4)
IC_{50}	1560.97 μM	56.15 μM	3138.81 μM	1301.82 μM

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: ***P<0.001 (Student's t-test).

Table 2. The Cytotoxicity of Bentazone, Butachlor, Paraquat and Ethalfluralin by NR assay in NIH 3T3 Cells

Group	Bentazone	Butachlor	Paraquat	Ethalfluralin
Concentration μM	Mean±S.D. (% of control)	Mean±S.D. (% of control)	Mean±S.D. (% of control)	Mean±S.D. (% of control)
Control	3.60±0.05 (100)	3.57±0.11 (100)	3.87±0.06 (100)	3.52±0.08 (100)
1	3.55±0.07 (98.6)	3.26±0.15 (91.4)	3.85±0.00 (99.6)	3.50±0.12 (99.5)
25	3.62±0.06 (100.5)	2.82±0.44 (79.0)*	3.78±0.02 (97.8)	3.65±0.06 (103.9)
50	3.62±0.06 (100.6)	0.78±0.43 (21.7)***	3.73±0.03 (96.3)	3.58±0.08 (101.8)
100	3.68±0.04 (102.2)	0.31±0.05 (8.8)	3.68±0.02 (95.1)	3.62±0.08 (102.9)
IC_{50}	1763.93 μM	45.98 μM	1030.85 μM	1808.29 μM

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *P<0.05, ***P<0.001 (Student's t-test).

Table 3. The Cytotoxicity of Bentazone, Butachlor, Paraquat and Ethalfluralin by SRB assay in NIH 3T3 Cells

Group	Bentazone	Butachlor	Paraquat	Ethalfluralin
Concentration μM	Mean±S.D. (% of control)	Mean±S.D. (% of control)	Mean±S.D. (% of control)	Mean±S.D. (% of control)
Control	3.02±0.01 (100	3.00±0.02 (100)	3.16±0.02 (100)	3.17 ± 0.01 (100)
1	3.01±0.01 (99.8	2.99±0.00 (99.8)	3.08±0.01(97.4)	3.11±0.01 (98.2)
25	2.9 ±0.02 (99.2)	2.95±0.03 (98.3)	3.08±0.02 (97.3)	3.10 ± 0.01 (97.9)
50	2.95±0.00 (97.7)	2.58±0.13 (86.0)**	3.05±0.01 (96.3)	3.03 ± 0.02 (95.6)
100	2.94±0.01 (97.5)	0.13±0.03 (4.4)***	3.05±0.03 (96.2)	3.01 ± 0.02 (94.9)
IC_{50}	1913.38 μM	65.30 μM	1860.73 μM	1086.93 μM

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: **P<0.01, ***P<0.001 (Student's t-test).

농도에 따라 심하게 감소하였으며 50 μM과 100 μM 농도에서 더욱 심하였다. 4종의 제초제에 대한 NR_{50}은 Bentazone 1763.93 μM, Butachlor 45.98 μM, Paraquat 1030.85 μM, Ethalfluralin 1808.29 μM이였다(Table 2).

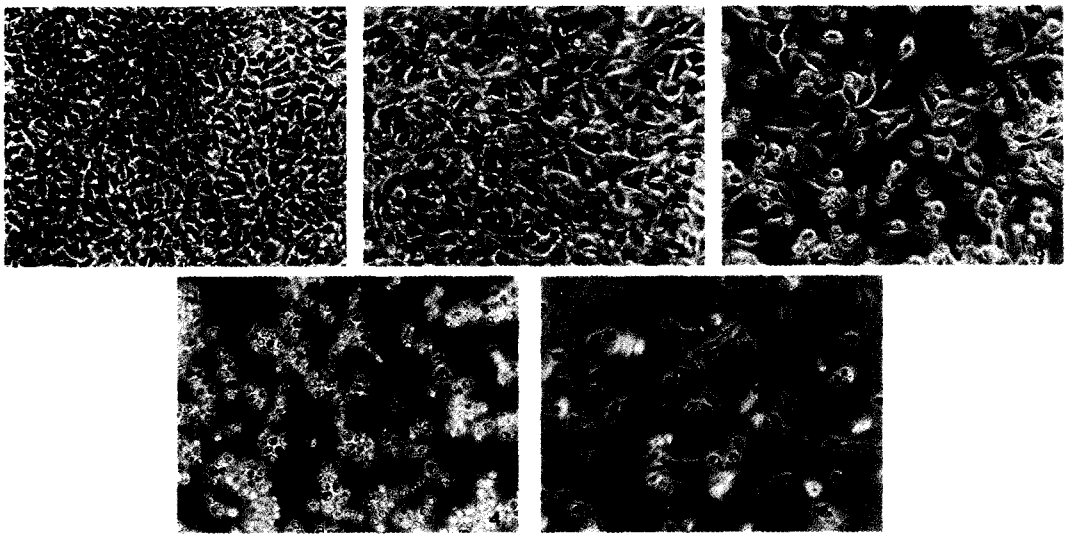
3. SRB 분석법에 의한 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 세포독성

NIH 3T3 섬유모세포에서 4가지(Bentazone, Butachlor, Paraquat 및 Ethalfluralin) 종류의 제초제를 여러 농도(1 μM, 25 μM, 50 μM 및 100 μM)로 적용한 후 SRB 흡광도를 측정하고 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 비례적으로 산출한 결과, 흡광도는 제초제의 농도에 비례하여 감소하였는데 Butachlor의 경우 50 μM과 100 μM 농도에서 심하게 감소하였다. 4종의 제초제에 대한 SRB_{50}은 Bentazone 1913.38 μM, Butachlor 65.30 μM, Paraquat 1860.73 μM, Ethalfluralin 1086.93 μM이였다(Tabel 3).

4. 세포의 광학현미경적 관찰소견

대조군에 있어서는 배양용기의 바닥에 다수의 방추형의 세포들이 부착되어 있었으며(Photo 1). Butachlor 1 μM로 처리한 소견에서는 세포에 미치는 영향이 작았으나(Photo 2), 25 μM로 처리한 소견에서는 세포수의 감소가 관찰되었고 세포형태가 위축된 양상을 보였으며(Photo 3), 50 μM에서 뚜렷한 세포수의 감소 및 원형의 세포형태가 다수 관찰되었으며(Photo 4), 100 μM에서는 세포형태변화가 관찰되었다(Photo 5). 그러나 Bentazone, Paraquat 및 Ethalfluralin을 처리한 세포에서는 처리한 모든 농도에서 세포수와 형태에서 심한 변화를 관찰할 수 없었다.

본 실험에서 사용한 검정방법은 독성기준 설정을 위해 미국 암협회(National Cancer Institute)에서 이용하고 있는 방법들로써 Tetrazolium MTT(MTT) 분석법과 Sulforhodamine B protein(SRB) 분석법(Mosmann, 1983)은 세포반응에 의한 효소작용을 측정하는 방법이고 Neutral red(NR) 분석법(Borenfreund 등, 1984)은 세포질 반응 중 용해소체



Photos. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in **1**. unmodified medium (control), **2**. 1 μM Butachlor containing medium, **3**. 25 μM Butachlor containing medium, **4**. 50 μM Butachlor containing medium, **5**. 100 μM Butachlor containing medium for 2 days. ×200.

의 변화를 측정하는 방법으로 MTT분석법의 경우 세포의 활성과 증식정도를 측정할 수 있는 예민한 방법으로 정량적 측정이 가능하다. MTT 분석방법은 세포의 미토콘드리아의 호박산 탈수 효소(succinyl dehydrogenase)에 의하여 노란색의 용해성 MTT가 청색의 불용성 MTT formazan으로 환원되는 기전에 기초하고 있으며 형성되는 formazan의 양은 생존 세포의 수에 비례한다. 따라서 MTT 분석은 formazan을 많이 형성하여 흡광도가 클수록 세포의 활성도가 우수하다고 할 수 있다. SRB 정량분석법은 핵내 단백질인 sulforhodamine B 단백질을 측정하는 방법으로 세포 내에 생성되는 단백질의 양이 많으면 세포의 활성과 증식이 증가한다고 할 수 있으며, 1차 검색방법으로 이용되는 타 분석법에 비하여 단층 및 다층배양시 모두에서 효과적이고 SRB 염색이 안정하다는 장점을 갖고 있다(Skehan 등, 1988). NR 정량법은 염색제를 이용하여 세포의 용해소체내의 효소를 측정하는 것으로서 다양한 화학제재의 세포독성을 평가하는데에 사용되며 빠르고, 값이 싸며, 정확하고, 반복성이 있는 장점이 있다. 세포 단백질은 0.1 M sodium hydroxide 용액에 의하여 용해되며, 단백질의 양을 결정할 수 있다. 세포수나 활성과 연관된 전체 단백질 양을 측정하는데는 이 방법이 간단하며, 단층배양(Monolayer culture)시 특히 유리하고 세포표본을 냉동 보관할 수 있는 장점이 있으나 매 계대 배양시 마다 단위 단백질양이 변하므로 여러번의 확인 실험이 필요하며, 한번의 실험시 오랜 기간의 배양기간이 필요한 단점이 있기는 하다(Borenfreund 등, 1985; Borenfreund 등, 1998). 따라서 다양한 세포독성 검정방법 중 가장 민감하고 안정적인 방법인 MTT 정량분석법, NR 정량분석법, SRB 정량분석법을 이용하여 4가지 종류의 제초제에 대한 IC_{50} (MTT_{50}, NR_{50}, SRB_{50}) 값을 측정한 결과 MTT 정량분석법에서는 Bentazone 1560.97 μM, Butachlor 56.15 μM, Paraquat 3138.81 μM, Ethalfluralin 1301.82 μM이었고, NR 정량분석법에서는 Bentazone 1763.93 μM, Butachlor 45.98 μM, Paraquat 1030.85 μM, Ethalfluralin 1808.29 μM이었으며, SRB 정량분석법에서는 1913.38 μM, Butachlor 65.30 μM, Paraquat 1860.73 μM, Ethalfluralin 1086.93 μM이었다. Borenfreund 등(1988)은 MTT의 흡광도를 대조군과 비교하여 세포가 독성을 받기 시작하는 농도를 MTT90으로 하고, 심한 독성을 받는 농도를 MTT_{50}으로 결정한 후 MTT_{50}이 100 μM 미만일 때를 고독성, 100 μM과 1.000 μM 사이일 때를 중간독성, 1.000 μM과 2.000 μM 사이일 때를 저독성, 2.500 μM 이상일 때를 무독성으로 독성물질의 판정기준을 제시하였다. 이 기준에 의하면 4가지 제초제 중 Butachlor는 MTT_{50} 56.15 μM, NR_{50} 45.98 μM, SRB_{50} 65.30 μM으로 NIH 3T3 섬유모세포에 대하여 고독성으로 판정할 수 있고, Bentazone, Paraquat 및 Ethalfluralin은 IC_{50} 값이 모두 1000 μM과 2000 μM 사이에 있거나 2500 μM 이상이어서 저독성이거나 무독성으로 판정할 수 있다. 세포의 광학현미경적 관찰소견에서도 Butachlor과는 농도가 증가함에 따라 세포수와 형태의 변화가 심하였으나 Bentazone, Paraquat 및 Ethalfluralin은 농도에 따른 변화가 거의 없었다. 본 실험의 결과는 4가지 제초제를 100 μM 농도범위 내에서 수행된 실험이어서 고농도의 제초제를 사용할 경우 나타날 수 있는 변화에 대하여는 계속적인 연구가 필요할 것이다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 순천대학교 공모과제 학술연구비의 지원에 의하여 수행된 연구결과이며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1984): A simple quantiative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/Nr-90), *J. Tissue Cultute Meth.*, **9**, 7-9.

Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985): Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Lett.*, **24**, 119-124.

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.

Borenfreund, E. Babich, H. and Martin-Alcuad, N. (1998): Comparison of two *in vitro* cytotoxicity assay: The nertral red (NR) and terazolium MTT tests. Toxic., **2**, 1-4.

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55-63.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Visteca, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. (1988): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Nat. Cancer Inst.*, **82**(13), 1107-1112.

경기성, 김진화, 이병무, 오병렬, 정영호, 이재구 (1999): 제초제 metolachlor의 잉어 체내 행적, 한국농약과학회지, **3**(2), 54-59.

권숙표 (1974): 농약과 공해. 대한의학협회지, **17**(11), 45-51.

김인선, 이강봉, 심재한, 서용택 (1995): 생쥐에서 Cytochrome P-450 효소계에 의한 α-Endosulfan의 시험관내 대사시험, 한국농화학회지, **38**(5), 463-467.

류종국, 이규승 (1990): 돼지 간 중의 Monooxygenase가 Diazinone의 분해에 미치는 영향, 한국환경농학회지, **9**(2), 153-159.

양광록, 심재한, 서용택 (1992): 농약 상호간의 협력작용에 의한 잉어의 독성과 해독효소 활성의 비교, 한국농화학회지, **35**(5), 367-374.

양재설, 신진섭, 이해근(1986): 수중농약성분이 어류독성에 미치는 영향, 시험연구보고서, 농촌진흥청 농약연구소, 213-221.

이성규, 박철원, 노정구 (1984): 농약의 급성 어독성과 처리방법에 따른 독성의 변화, 한국환경농학회지, **3**(1), 45-51.

임금춘, 허장현, 한대성 (1995): Phosalone의 활성화과정을 통한 Acetylcholinesterase와 Butyrylcholinesterase에 대한 활성 저해, 한국농화학회지, **38**(2), 174-178.

임요섭, 한성수 (1995): 농약에 의한 참잉어 및 이스라엘잉어의 급성독성 비교, 한국환경농학회지, **14**(2), 163-170.

임요섭, 한성수 (1997): Carbofuran이 쥐의 조직에 미치는 형태적 변화와 Phenobarbital Sodium 및 3-Methylcholanthrene에 의한 억제효과, 한국환경농학회지, **16**(1), 61-66.

임요섭, 한성수 (1999): 살충제 Carbofuran과 Phenobarbital Sodium 및 3-Methylcholanthrene이 쥐의 효소 활성에 미치는 영향, 한국농약과학회지, **3**(3), 27-36.

임현술 (1982): 일부 농촌지역에서의 농약에 의한 인체의 피해 현황에 관한 조사 연구, 예방의학회지, **15**, 205-211.

정종학 (1978): 유기인제 농약으로 인한 피해, 대한의학협회지, **21**(5), 359-364.

채영암, 구자옥, 서학수, 이영만 (1991): 기초생물통계학 제9장 직선회귀, 향문사, 176-198.

한두석, 한성수, 임요섭 (1997a) Carbofuran이 NH3T3 섬유모세포와 흰쥐의 신장에 미치는 영향과 Phenobarbital Sodium의 보상효과에 관한 연구, 한국독성학회지, **13**(1), 87-94.

한두석, 이영욱, 정규호, 임요섭 (1997b): Carbofuran이 흰쥐의 간조직과 P-450 효소계에 미치는 영향과 3-Methylcholanthrene의 보상효과에 관한 연구, 한국환경성 돌연변이·발암원학회지, **17**(2), 125-131.

한성수, 정재훈, 임요섭 (1996): 살충제 Carbofuran과 Phenobarbital Sodium 및 3-Methylcholanthrene이 이스라엘잉어의 효소 활성에 미치는 영향, 한국농화학회지, **39**(1), 77-83.

한성수, 임요섭 (1997): 살충제 Carbofuran의 쥐 NIH3T3 섬유모세포에 끼치는 독성 및 Phenobarbital Sodium과 3-Methylcholanthrene에 의한 보상효과, 한국환경농학회지, **16**(2), 149-155.

한성수, 임요섭 (1998): 쥐에서 phenobarbital sodium 및 3-methylcholanthrene이 ^{14}C-carbofuran의 독성과 *in vitro* 대사에 미치는 영향, 한국농약과학회지, 2(2), 29-38.