Environmental Mutagens & Carcinogens 22-1 : 106-111 (2002)

Acriflavine과 Guanosine 복합체(AG60)의 유전독성시험

정영신[1]* · 홍은경[1] · 김상건[2] · 안의태[3] · 이경영[4] · 강종구[5]
*[1]메드빌 중앙 연구소, [2]서울대학교 약학대학, [3]순천향대학교 의과대학 해부학교실
[4]건국대학교 의과대학 일반외과, [5]충북대학교 수의과대학 실험동물의학연구실

Genotoxicity Studies of the Complex of Acriflavine and Guanosine

Young-Shin Chung[1]*, Eun-Kyung Hong[1], Sang Geon Kim[2], E-Tay Ahn[3], Kyung-Yung Lee[4] and Jong-Koo Kang[5]
*[1]*Medvill Research Laboratory, Pyungchang-dong, Jongro-gu, 110-102, Korea*
[2]*College of Pharmacy, Seoul National University, Sillim-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea*
[3]*Department of Anatomy, College of medicine, Soonchunhang University, Chunan, Korea*
[4]*Department of Surgery, College of Medicine, Kon-Kuk University, Seoul, Korea*
[5]*Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine Chung-Buk National University, Cheongju, Korea*

(Received May 27, 2002 / Accepted June 28, 2002)

ABSTRACT **: AG60, the complex of acriflavine and guanosine, has been shown to possess the synergistic anti-tumorigenic activity in the previous paper (J. Pharm. Pharmacol. 1997, 49:216). In this study, we have investigated the genotoxic properties of AG60 using *in vitro* and *in vivo* system such as Ames bacterial reversion test, chromosomal aberration assay and micronucleus assay. In Ames reverse mutation test, AG60 treatment at the dose range up to 250 μg/plate caused the dose-independent random induction of the mutagenic colony formation in *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1537, and *E. coli* WP2uvrA, while any mutagenic effect of AG60 wasn't observed in *S. typhimurium* TA1535. Any significant chromosomal aberration wasn't observed in chinese hamster lung (CHL) fibroblast cells incubated with PBS or AG60 at the concentrations of 2.5, 5, 10 μg/ml for 24 hours without but even with S9 metabolic activation system for 6 hours. In vivo ICR mice, the intramuscular injection of AG60 at the doses of 7.15, 14.3, and 28.6 mg/kg did not induce the frequency of micronucleus formation. However, mitomycin C, as one of the positive controls at the dose of 2 mg/kg caused the 8.4% induction in the frequency of micronucleus and 24% increase in the chromosomal aberration.**

Keywords : Acriflavine, guanosine, anti-tumorigenic agent, reverse mutation test, chromosome aberration test, micronucleus test

서 론

암의 치료를 위하여 많이 사용되고 있는 세포독성(cytotoxic)이 강한 항암제들은 암세포의 분열을 억제하는 것을 주목적으로 하여 개발된 것들로, 탁월한 살세포작용을 나타내나 부작용으로 인해 오히려 생명을 위협하거나 삶의 질을 떨어뜨리는 단점이 있다. 따라서 최근의 항암제 개발 동향은 암조직의 성장을 억제하여 더 이상 자라지 않게 하면서 만성적인 질병처럼 다루어 환자의 삶의 질을 유지하는 쪽으로 바뀌고 있다. 이를 위하여 세포독성작용은 탁월하지 않더라도 부작용이 적은 항암제, 곧 암세포에만 선택적으로 세포독성을 나타내는 항암제나 치료방법을 개발하거나, 신생혈관 억제를 통하여 암세포의 성장을 억제(cytostatic)하는 물질의 개발에 주력하고 있다.

본 연구팀이 항암제로 개발하고 있는 AG60은 acriflavine과 guanosine의 복합체이며 암세포 성장 억제 효능은 탁월하면서도 부작용은 미약하다. Acriflavine은 acridine 유도체로서 1912년 Ehrlich에 의해 합성되어 트리파노조마에 대한

*To whom correspondence should be addressed

항균작용이 처음 보고되었으며(Macadam *et al.*, 1974), 최근에는 어류 양식장에서 강력한 항균제로 사용되었고(Richards, 1977), 또 Friend virus에도 항균작용을 보이므로 AIDS 치료를 위한 임상시험에도 사용된 바 있다(Mathe *et al.*, 1994; Mathe *et al.*, 1996). Acriflavine은 마이크로 수준의 저농도에서도 미생물의 발육을 억제하므로, 화농성 질환에 외용으로 또는 정맥주사로서도 이용되었다(Bose *et al.*, 1966; Canellakis *et al.*, 1979). Acridine 계통의 화합물들은 항종양효과를 갖는 물질로써, DNA topoisomerase II의 작용 억제, RNA 합성 저해 및 인과 세포질에서의 단백질 합성 저해 등의 작용을 나타내는 것으로 보고되었고(Macadam *et al.*, 1974), protein kinase C의 억제 작용도 확인되었다(Hannun *et al.*, 1988). 특히 acridine 계통의 protein kinase C 억제 작용은 세포막의 성분 변화나 ion transfer의 변화를 야기하는 등의 세포막 작용기전을 시사해 준다고 하겠다. 또 세포막에 작용하여 세포 표면 항원을 변화시킴으로 암세포에 대한 면역성을 증가시킨다(Chakraborty *et al.*, 1984; Chakraborty *et al.*, 1987).

본 연구팀은 이미 항균제로 사용되었던 acriflavine에 핵산의 구성성분인 guanosine을 첨가하여 복합체로서 투여했을 때, 항암효과가 증가함을 보고하였다(Kim *et al.*, 1997). AG60은 다양한 인간 암세포주에 강한 세포 독성(IC50: 0.09~1.94 μg/ml)을 나타내며(Hong *et al.*, 1997), Erhlich carcinoma와 Sarcoma 180 세포주 이식 고형암유발 동물실험에서 80%까지 암세포 성장을 억제하였다(Hong *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997). Human carcinoma xenograft 모델에서도 폐암, 전립선암, 대장암을 이식한 동물에서 탁월한 암세포 성장억제 효과를 나타내었으며(Chung *et al.*, 2002), 그 작용은 암세포의 증식을 억제하고, 반면 암세포의 사멸을 촉진하는 것으로 관찰되었다. Protein kinase C를 매개로 하는 epoxide hydrolase와 glutathione S-transferase (Kim *et al.*, 1998), 신호전달 체계와 연계된 transcriptional factor complex의 AP-1과 NF-κB, 그리고 TNF-α(Choi *et al.*, 2000)의 활성 및 발현을 억제하는 것 등이 본 연구자들에 의해 확인되었다. 또, AG60을 처리한 암조직에서 apoptotic body 형성이 촉진되는 것을 관찰하여 보고하였고(Kim *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1999), AG60이 암세포에 대한 선택성, 즉 암세포에 대한 세포독성은 강하나 가슴샘, 위 점막세포 및 십이지장 점막세포에 대한 독성은 미약함을 확인하였다(Park *et al.*, 1999).

따라서, 본 연구는 항암제로 개발하고 있는 AG60의 유전독성 시험 즉 복귀돌연변이 시험, 마우스 소핵 시험 및 염색체 이상 시험을 식품의약품안전청고시 제1999-61호 "의약품 등의 독성시험기준"에 따라 수행함으로서 항암제로서의 임상시험을 위한 안전성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시험물질 및 시약

AG60은 황색을 띠는 고형분말로서 갈색 기밀용기에 넣어 4°C에서 냉장보관하였고, 시험시 주사용 생리식염수에 용해하여 사용하였다. 양성대조물질로 사용한 sodium azide (NaN_3), 2-aminoanthracene(2-AA), 2-aminofluorene(AF-2), 9-aminoacridine(9-AA) 및 mitomycin C는 Sigma Co.에서, benzo[a]pyrene은 Aldrich Co.에서 구입하였다.

*Salmonella typhimurium*을 이용한 복귀돌연변이시험

균주 및 배양조건

사용한 균주로는 *Salmonella typhimurium* LT2주 유래의 histidine 요구성 변이주인 TA1535, TA1537, TA98, TA100와 트립토판 요구주인 *Escherichia coli* WP2uvrA의 5균주를 한국화학연구소에서 분양받아 사용하였다. 0.8% oxoid nutrient broth No.2 배양액(pH 7.0-7.5)에 접종한 다음 37°C에 15시간 동안 180회/분의 속도로 선회 배양하였다. 각 균주는 본 시험에 앞서 histidine 요구성, crystal violet 감수성, UV 감수성, ampicillin 또는 tetracyclin 내성 및 자발 복귀변이 빈도 등의 유전적인 특성을 확인하였다.

시험물질 및 대조물질

AG60은 시험당일 생리식염수에 농도별로 희석하여 plate에 분주하되 시험물질의 액량이 0.1 ml/plate가 되도록 조정하였다. 용량을 결정하기 위한 예비시험 결과에 따라 균 생육이 저해되지 않는 농도인 250 μg/plate를 최고 농도로 설정하였고 다음 농도는 100, 50, 10, 5 μg/plate로 정하였다. 양성대조물질 sodium azide(NaN_3)는 생리식염수에, 2-aminoanthracene(2-AA), 2-aminofluorene(AF-2) 및 9-aminoacridine(9-AA)는 DMSO에 용해하였고 음성대조물질은 생리식염수에 용해하였다.

복귀 돌연변이 시험

Ames 방법(Ames *et al.*, 1975; Maron *et al.*, 1983)을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 균현탁액(약 2×10^9 cells/ml) 0.1 ml에, 여러 농도의 AG60 및 인산완충액 (0.2 M phosphate buffer, pH 7.4) 0.5 ml을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 이때 S9에 의한 대사를 위하여는 인산완충액 대신 S-9 혼합액(10% v/v, S9 함유) 0.5 ml를 첨가하였다. 배양 종료 후 45°C에서 용해한 top agar(연한천 용액) 2 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후, 변이원성 검색용 배지(Vogel-Bonner minimal medium E) 위에 중층

하여 37°C에서 2일간 배양한 후 복귀변이 콜로니 수를 계측하였다. 균의 생육저해 및 시험물질의 침전, 분출의 관찰은 육안 및 실체 현미경으로 실시하였다. 독성여부의 판정을 위하여 각 용량당 2장의 plate를 이용하였고 plate 당 복귀변이성 콜로니 수의 평균치를 판정에 사용하였다. 시험물질을 처리 한 모든 군에서 복귀변이 성 콜로니수가 음성대조군의 2배 이상이고 용량-반응관계가 인정될 때, 복귀변이 유발능 양성으로 판정하였다.

포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험

세포 및 배양조건

포유동물 세포인 Chinese hamster lung fibroblast(CHL)을 화학연구소로부터 분양받아 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)과 1% antibiotic-antimycotic 용액을 포함한 Eagle's minimal essential medium(EMEM, Gibco)을 사용하여 5% CO_2 공급하에 37°C에서 배양하였다.

시험물질 및 대조물질

시험물질은 PBS에 희석하였고 시험물질의 용량을 결정하기 위하여 예비독성시험을 실시하였다. 2회에 걸친 세포독성 시험을 통하여 세포증식을 50% 억제하는 농도를 구하여 최고 농도로 하고, 공비 2로 3단계의 농도를 시험농도로 정하였다. 양성대조물질인 mitomycin C는 멸균증류수에 benzo[a]pyrene은 DMSO에 용해하여 각각 0.05와 20 μg/ml의 농도로 사용하였다.

직접법을 통한 염색체 이상 시험

대사활성부재하의 시험은 CHL 세포를 60 mm의 petri dish에 1×10^5 cells/5 ml이 되도록 분주하여 3일간 배양한 후, 단층세포를 만든 다음, 각각 시험물질과 양성대조물질 (Beno[a]pyrene 20 μg/ml) 등을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간 동안 배양하였다. 각 petri dish에 colcemid (Gibco)를 0.25 μg/ml이 되도록 처리한 후 2시간 동안 더 배양하여 총검체 처리기간이 24시간이 되도록 하고 원심분리관에 세포를 모은 후, 37°C수조에 15~20분간 방치하고, 고정액(methanol:acetic acid=3:1)으로 3회 고정시킨 후 slide를 제작 및 Giemsa 염색 후 현미경으로 관찰하였다(Ishidate *et al*., 1977; Ivett *et al*., 1989).

간접법에 의한 염색체 이상 시험

대사활성 존재하의 시험은 CHL 세포를 petri dish에서 3일간 배양후 시험물질 및 양성대조물질(mitomycin C 0.05 μg/ml) 함유배양액에 S9(배양액의 20%비율)을 첨가하여 6시간 배양하고 보통 배양액으로 교환하여 18시간 더 배양하였다. 결과 해석을 위해 구조이상과 숫적이상으로 나누어 계수하였는데, 구조이상은 염색체(chromosome) 이상과 염색분체 (chromatid) 이상에 대해 각각을 결손형(deletion), 교환형 (exchange type)으로 분류계수하였고 gap은 이상에 포함시키지 않았다. 숫적 이상은 4배수체 이상만을 기록하였고, 구조이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 종류를 각각 기록하였다. 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.

마우스를 이용한 소핵시험

ICR 마우스 및 사육환경

웅성 ICR 마우스(5~6 주령, 22-28 g, 80마리)를 (주)대한실험동물센타(한국, 충북)에서 구입하여 사용하였다. 1주일의 순화기간을 통하여 체중 감소가 없는 건강한 동물만을 사용하였다. 군당 6마리씩 사용하였다. 사육실에 일정 온도(23±2°C) 및 습도(50±5%)를 유지하였고 7:00am-19:00pm의 명암 cycle을 유지하였다.

시험 물질 및 대조물질

AG60은 PBS(-)에 희석하였고, 본 시험의 투여량을 결정하기 위하여 마우스를 사용한 급성예비독성시험을 실시하여 LD_{50}를 산출하였다. LD_{50}의 1/2값인 28.6 mg/kg를 최고용량(28.6 mg/kg)으로 하고 공비2로 3단계의 농도를 시험농도로 하여, 체중 kg 당 20 ml의 용량이 되도록 복강투여하였다. 양성대조물질인 mitomycin C는 2 mg/kg 용량으로 복강내 단회 투여하였다.

골수세포를 이용한 소핵시험

예비시험에서 AG60 최고용량(28.6 mg/kg)을 1회 투여한 후 16시간, 24시간 및 48시간에 골수세포를 채취하여 다염성적혈구가 최대로 관찰되는 시간을 본 시험의 골수세포 수거시간으로 정하려고 하였으나, 뚜렷한 증가 시간이 관찰되지 않아 24시간으로 확정하여 채취하였다. 동물 당 양호한 상태의 골수도말 표본을 2매씩 작성하였고 각 개체 당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구(Polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고, 다시 1,000개의 PCE 중에서 소핵 다염성적혈구(Micronucleated Polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도를 계수하였다. 관찰은 광학현미경(AX70, Olympus, Japan)으로 1,000배에서 하였고 소핵 이상의 판정은 용량의존적으로 소핵 다염성적혈구수가 증가하였을 때를 소핵 유발성이 있다고 하고 총 적혈구 중 다염성 적혈구비가 30% 이하로 되었을 때를 조혈기능 억제 등의 세포독성이 있다고 판정하였다(Altman, 1993; Kondo 1993; Salamone 1980; Schmi 1975; Hayashi *et al*., 1989).

결과 및 고찰

AG60의 복귀돌연변이 유발 효과

*Salmonella tryphimurium*을 이용한 복귀돌연변이 시험은 Ames 등에 의하여 개발된 것으로 그 신속성, 간편성으로 인하여 *in vitro*에서 돌연변이 물질 검색법으로 현재 가장 널리 사용되고 있는 시험법이다. 항암제로 개발중인 AG60의 Ames test 결과를 Table 1에 제시하였다. 예비실험 결과로부터 균 생육을 저해하지 않는 AG60의 5개 농도, 5, 10, 50, 100 및 250 µg/plate에서, 염기치환형인 TA100과 WP2uvrA 균주에서 대사활성화 시켰을 때 복귀변이성 콜로니 수가 증가하여 양성으로 나타났다. 또한 frameshift 형인 TA98과 TA1537에서도 대사활성화 시켰을 때도 양성으로 관찰되었으나 용량 의존적인 반응을 보이지 않았다. 한편 TA1535의 모든 균주에 있어서 복귀돌연변이 콜로니수가 AG60 투여 5개 농도 5, 10, 50, 100 및 250 ug/plate의 모든 농도에 관계없이 음성 대조군과 비교하여 상승되지 않았으며, 용량-반응관계가 인정되지 않아 음성으로 판정되었다. 한편, 양성 대조물질로 사용된 sodium azide, 9-aminoacridine(9-AA), 2-aminoanthracene(2-AA) 및 2-aminofluorene(AF-2)을 투여한 각 대응하는 균주는 AG60 처리군 및 음성 대조군에 비하여 복귀돌연변이 콜로니수가 2배 이상 증가하여 뚜렷한 양성치를 나타냈으며 AG60보다 적은 농도에서도 콜로니수가 많이 증가하였다.

염색체이상시험 결과

용량 결정을 위한 1차 예비독성시험에서 AG60, 5,000~4.9 µg/ml(공비 2) 농도로 시험한 결과, 19.5~4.8 µg/ml에서 현미경상 50%의 세포독성을 나타내었고, 다시 20, 15, 10 및 5 µg/ml 농도로 2차 예비독성시험을 수행한 결과 10 µg/ml의 농도에서 50%의 세포독성을 나타내었다. 따라서, 염색체 이상시험의 본 시험을 위하여 AG60의 농도를 10, 5, 2.5 µg/ml로 결정하였고 염색체이상시험 결과를 Table 2에 나타내었다. 직접법에 의한 염색체이상시험 결과, 음성 대조군(PBS) 및 AG60 10, 5, 2.5 µg/ml군에서 100개의 중기상당(metaphase) 염색체에서 염색체 이상의 빈도가 용량 의존적으로 유의성 있게(Student *t*-test) 증가하지 않았으나 양성 대조군에서는 mitomycin C에 의한 염색체이상의 빈도가 현저하게 나타났다. 대사 활성화법에 의한 시험에서도 음성 대조군(PBS) 및 AG60 10, 5, 2.5 µg/ml 농도 군에서 100개의 중기상당 염색체중 이상의 빈도는 1.0개 이하로 시험물질에 의한 염색체이상 유발작용은 없는 것으로 사료된다.

AG60의 소핵 발생에 미치는 영향

Schmid(1975)에 의해 개발된 소핵발생 시험법을 활용하여 ICR 마우스에서 *in vivo* 유전독성 시험을 수행하였고 그 결과, 시험 전 기간을 통하여 AG60 투여 후 모든 마우스에서, 본 시험물질에 의한 특이한 임상증상은 전혀 관찰되지

Table 1. Reverse mutation test of AG60 using *S. typhimurum* and *E. coli* with or without metabolic activation

With (+) or without (−) S9 mixture	AG60 concentration (µg/plate)	Number or revertant colonies per plate				
		base replacement type			frame shift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9 Mix (−)	Saline	151	10	42	47	27
	5	118	8	122	57	23
	10	79	7	29	22	10
	50	65	9	26	12	14
	100	62	4	19	9	15
	250	30	3	6	2	8
S9 Mix (+)	Saline	173	10	35	34	18
	5	358	14	65	302	50
	10	493	18	93	619	72
	50	163	11	139	2280	240
	100	83	9	50	551	130
	250	84	5	9	175	30
Positive Control without S9 Mix (−)	compounds	AF-2	NaN3	AF-2	AF-2	9-AA
	concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	No. of colonies/plate	663	404	263	395	175
Positive Control with S9 Mix (+)	compounds	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	concentration (µg/plate)	1.0	2.0	10	0.5	2.0
	No. of colonies/plate	643	101	269	203	122

Results are mean from 2 plates; NaN3: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene, AF-2: 2-aminofluorene.

Table 2. Chromosome aberration test of AG60 in CHL cells

	Compound[a] (μg/ml)		No. of cell observed	Time[b]	No. of aberration type[c]								No. of aberrant cells[d]	
					ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	pol	end	TA(+g)	TA(-g)
S9 mix (−)	PBS (vehicle)		100	24-0	1	0	0	1	0	0	0	0	2	1
					1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	AG60	10	100	24-0	2	0	0	1	0	0	0	0	3	1
					0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
		5	100	24-0	0	1	1	0	0	0	0	0	2	1
					0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
		2.5	100	24-0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
					0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
	MMC	0.05	100	24-0	5	2	8	2	16	4	0	0	34	27
					3	1	6	1	13	3	0	0	25	21
S9 mix (+)	PBS (vehicle)		100	6-18	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
					0	1	0	1	0	0	0	0	2	1
	AG60	10	100	6-18	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0
					0	1	0	1	0	0	0	0	2	1
		5	100	6-18	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
					0	0	0	1	1	0	0	0	2	2
		2.5	100	6-18	1	0	0	1	0	0	0	0	2	1
					0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
	B[a]P	20	100	6-18	3	2	6	5	10	2	0	0	25	20
					2	1	4	3	11	3	0	0	20	17

[a]PBS(−): Phosphate buffered saline, MMC: Mitomycin C, B[a]P: benzo[a]pyrene;
[b]Time: Treatment time-Expression time;
[c]Ctg: Chromatid gap, Csg: Chromosome gap, Ctb: Chromatid break; Csb: Chromosome break, Ctg: Chromatid exchange, Cse: Chromosome exchange, Pol: Polyploid, End: Endoreduplicate;
[d]TA(+g): total structural aberration including gap, TA(-g): total structural aberration excluding gap.

Table 3. Micronucleus test of AG60 in ICR male mice

Compound	Dose (mg/kg)	Route	Sampling time (hr)	Animal Number	PCE/PCE+NCE (%, Mean±S.D.)	MNPCE (%, Mean±S.D.)
Vehicle(PBS)	0	i.p.	24	6	49.4±6.5	0.133±0.103
AG60	28.6	i.p.	24	6	44.3±4.5	0.200±0.110
	14.3	i.p.	24	6	43.7±8.0	0.167±0.082
	7.15	i.p.	24	6	54.4±7.7	0.183±0.075
Mitomycin C	2	i.p.	24	6	39.5±4.7	8.367±1.528**

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte, PCE: Polychromatic erythrocyte NCE: Normochromatic erythrocyte; **$p<0.01$, compared with control by Chi-square test.

않았으며, 사망한 동물 또한 관찰되지 않았다. 또한 각 군간에 유의한 체중차이도 관찰되지 않았다. 소핵 발생 빈도에 관한 결과는 Table 3에서 나타난 바와 같이, 음성대조군의 마우스에서 다염성적혈구(PCE) 1,000개 당 소핵 다염성적혈구(MNPCE) 유발빈도는 1.33개였으나 AG60의 28.6, 14.3 및 7.15 mg/kg 투여군에서는 각각 2.00, 1.67, 1.83개로 음성대조군에 비해 유의한 증가는 인정되지 않았다. 그러나 양성대조군인 mitomycin C 투여군에서 1,000개 당 소핵유발 빈도는 83.67개로 음성 대조군에 비하여 유의성 있는 증가가 인정되었다($p<0.01$, Chi-square test). 또한 PCE/(PCE+NCE) 비율(%)은 음성대조군에서는 49.4±6.5이었으며, AG60 28.6, 14.3 및 7.15 mg/kg 투여군에서는 각각 44.3±4.5, 43.7±8.0, 54.4±7.7로 음성대조군에 비해 유의성 있는 증가는 인정되지 않았다. 한편 양성대조군인 mitomycin C 투여군에서도 PCE/(PCE+NCE) 비율은 39.5±4.7로 Hayashi *et al.*(1989)의 참고 data 상, 하한의 범위 내에 들어가며 음성대조군에 비해 유의성 있는 변화가 인정되지 않았다.

이상의 실험에서 AG60은 일부 균주에서 용량 비의존적으로 돌연변이를 일으켰으나, CHL세포에서 염색체에 이상

을 유발하지 않았으며, 마우스 골수에서도 소핵 유발을 촉진시키지 않았으므로 사용 용량 범위에서 유전자에 변화를 야기하지 않는 다소 안전한 물질로 인정된다. AG60이 유전독성 시험에서 강한 독성을 나타내지 않는 것은 DNA에도 다소 작용하지만 AG60의 세포막에 강한 친화력으로 인하여 외부로부터의 신호들을 차단하는 기전 때문인 것으로 사료된다.

참고문헌

Ahn, E.T., Park, K.H., Ko, J.S., Cheong, K.S., Han, Y.B., Hong, E.K., Chung, Y.S., Yoo, B.I., Kim, S.G., Kang, J.K. and Lee, K.Y. (1997): Ultrastructure of mice thymic cortex following treatment with acriflavine in combination with guanosine, *Korean J. Anat.*, **30**, 595-608.

Ahn, E.T., Ko, J.S., Kim, H.J., Kim, S.G., Lee, K.Y., Kang, J.K., Yoo, B.I., Chung, Y.S., Hong, E.K. and Han, Y.B. (1999): Anticancer effect of AG60 (acriflavine-guanosine compound) on the Ehrlich cancer cells. Light microscopic, autoradiographic and electron microscopic study, *Korean J. Anat.*, **32**, 117-134.

Altman, D.G. (1993): Comparing groups-categorical data: Practical statistics for Medical Research, Chapman & Hall, London, pp. 229-276.

Ames, B.M., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammlian-microsome mutagenecity test, *Mutat. Res.*, **31**, 347-364.

Bose, S., Gothoskar, B.P. and Ranadive, K.J. (1966): Studies of biological macromolecules: II. Effect of acriflavine exposure on the synthesis of macromolecules in liver cells *in vitro*, *Exp. Cell Res.*, **42**, 89-98.

Canellakis, E.S. and Chen, T-K. (1979): Relationship of biochemical drug effects to their antitumor activity-I, Biochem. *Pharmacol.*, **28**, 1971-1976.

Chakraborty, N.G. and Bose, S.R. (1984): Joy Chowdhury JR. Acriflavine-induced surface changes in three tumor cell types and differential sensitity to lectins, *Tumori.*, **70**, 127-130.

Chakraborty, N.G. and Bose, S.R. (1987): Protective immunity by chemically modified tumor cell antigens extracted by 3M KCl, *Neoplasma*, **34**, 427-430.

Choi, S.H., Cho, J.Y., Chung, Y.S., Hong, E.K., Han, Y.B. and Kim, S.G. (2000): Inhibition of lipopolysaccharide-induced I-κB degradation and tumor necrosis factor-α expression by acriflavine, an antimicrobial agent, *Int. J. Immunopharm.*, **22**, 775-787.

Chung, Y.S., Kim, H.M., Kim, S.G., Lee, K.Y., Ahn, E.T., Chung, S.I., Park, K.C. and Hong, E.K. (2002): Characterization of AG60 anti-tumor property in human colon, prostate, and lung carcinoma-xenografted nude mice, *AACR proceedings*, **43**, 78-79.

Hannun, Y.A. and Bell, R.M. (1988): Aminoacridines, potent inhibitors of protein kinase C, *J. Biol. Chem.*, **263**, 5124-5131.

Hayashi, M., Yoshimura, I., Sofuni T. and Ishidate, Jr. M. (1989): A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control, *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**, 347-356.

Hong, E.K., Kim, H.M., Lee, K.Y., Chung, Y.S., Yoo, B.I., Kim, S.G., Ahn, E.T. and Han, Y.B. (1997): Anti-tumor effect of the complex of actiflavite and guanosine (AG60), *J. Korean Canter Assoc.*, **29**, 29-37.

Ishidate, Jr. M. and Odashima, S. (1977): Chromosome tests with 134 compounds on chinese hamster cells in vitro-a screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, **48**, 337-354.

Ivett, J.L., Brown, B.M., Rodgers, C., Anderson, B.E., Resnick, M.A. and Zeiger, E. (1989): Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. IV. Results with 15 chemicals, *Environ Mol. Mutagen.*, **14**(3), 165-187.

Kim, S.G., Kim, C.W., Ahn, E.T., Lee, K.Y., Hong, E.K., Yoo, B.I. and Han, Y.B. (1997): Enhanced anti-tumor effects of acriflavine in combination with guanosine in Mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 216-222.

Kim, S.G., Cho, J.Y., Chung, Y.S., Ahn, E.T., Lee, K.Y. and Han, Y.B. (1998): Suppression of xenobiotic-metabolizing enzyme expression in rats by acriflavine, a protein kinase C inhibitor: effects on epoxide hydrolase, glutathione S-transferases, and cytochromes P450, *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 66-72.

Kondo, K. (1993): Mutagenecity studies of S-1108, a new estertupe oral cephem antibiotic (IV): Microncleus test in mouse bone-marrow cells, *Iyakuhin Kenkyu*, **24**(1), 18-20.

Macadam, R.F. and Williamson, J. (1974): Drug effects on the fine structure of Trypanosom a rhodesienes: acriflavine, ethidium and antrycide, *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **68**, 291-299.

Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-275.

Mathe, G., Pontiggia, P., Bourut, C., Chenu, E. and Orbach-Arbouys, S. (1994): *In vivo* eradication of Friend virus as an experimental HIV-model, by combination of zidovudine, acriflavine and an ellipticine analogue: possible application to the treatment of human pre-AIDS?, *Biomed. Pharmacother.*, **48**, 51-53.

Mathe, G., Pontiggia, P., Orbach-Arbouys, S., Triana, K. and Ambetima, N. (1996): AIDS therapy with two, three or four agent combinations, applied in short sequences, differing from each other by drug rotation. Part 1: First of two parts: a phase I trial equivalent, concerning five virostatics: AZT, ddI, ddC, acriflavine and an ellipticine analogue, *Biomed. Pharmacother.*, **50**, 220-227.

Park, K.H., Ahn, E.T., Ko, J.S., Ha, S.S., Chung, Y.S., Hong, E.K., Yoo, B.I., Kim, S.G., Lee, K.Y., Kang, J.K. and Han, Y.B. (1999): Autoradiographic study on the effect of AG60 to the DNA synthesis of gastric epithelium of mouse inoculated with Ehrlich carcinoma, *Korean J. Anat.*, **32**, 95-104.

Richards, R. (1977): Diseases of aquarium fish-4: treatment, *Vet. Rec.*, **101**, 166-167.

Salamone, M. (1980): Towards an improved micronucleus test: Studies on 3 model agents, Mitomycin C, Cyclophosphamide and Dimethylbenzanthracene, *Mutat. Res.*, **74**, 347-356.

Schmid, W. (1975): The micronucleus test, *Mutat. Res.*, **31**, 9-15.