

PLHC-1세포주의 Comet assay를 이용한 하천 퇴적토의 생태독성평가

박정아* · 황인영¹ · 백승홍 · 김영숙

국립수산과학원 어장환경과, ¹인제대학교 환경학과

Studies on Toxicological Evaluation of Freshwater Sediment using a PLHC-1 Cell Comet Assay

Jeong-Ah Bak*, In-Young Hwang¹, Seung-Hong Baek and Young-Sug Kim

Marine Environment Research Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea

¹Environmental Science & Engineering, Inje University, Gyeongsangnam-do 621-749, Korea

Abstract – In this study, the Comet assay (evaluation of DNA damage) used the fish hepatocellular carcinoma cell, PLHC-1, was tried to the sediment extract obtained from freshwater to understand its applicability as a tool for monitoring sediment toxicity. In parallel, induced EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase) activity and DNA damage (TEM values) in PLHC-1 cells were measured for establishing the tandem endpoints of the PLHC-1 cell test to test the ecotoxicity of sediment. Among several study sites in a small river passed through downtown and industrial park area, one of them, site B, showed a higher level of EROD activity and DNA damage than other sites. It indicates that a tandem endpoints of PLHC-1 cells could be useful tools for assessing the toxicity of sediment. The sensitivity of Comet assay with PLHC-1 cells was a little higher than that with a blood cell of frog tadpoles to the solvent extract of sediment. According to the results, a PLHC-1 cell-Comet assay could be used as a useful tool for evaluating ecotoxicity of the freshwater sediment. In addition, more detailed studies are needed to the contaminated site.

Key words : PLHC-1 cell line, EROD, Comet assay, sediment

서 론

산업공단이 인접한 도시하천 퇴적토의 생태독성 수준이 높다는 연구결과 등과 함께 (문 등 2005, 환경부 2008) 하천 퇴적토의 경우 생물의 서식처가 되기 때문에 환경독성 평가 분야에서 중요한 연구과제로 인식되고

있다(조 등 2000; Kwok *et al.* 2005; Phillips *et al.* 2009).

오염된 환경을 진단 및 규명하는 방법으로 이화학적 분석기법 이외에 생물을 이용한 생태독성 평가기법이 선호되고 있는데, 이는 생물검정기법을 이용한 독성 평가기법이 적용하기에 간편하고, 재현성이 높기 때문이다 (Stephen and Henry 1969). 특히, 어류세포를 이용한 *in vitro* 시험기법 결과는 *in vivo* 시험의 치사율과도 상관성이 높으며 (Castaño *et al.* 1996; Jung *et al.* 2001), 신속하고 간편하며 경제성이 높아, *in vivo* 동물 실험의 보완 또는

* Corresponding author: Jeong-Ah Bak, Tel. 051-720-2545, Fax. 051-720-2515, E-mail. kero1000@nate.com

대체 시험 기법 및 생태독성평가 시 예비시험 기법으로써 활용되고 있다 (Babich *et al.* 1986; Saito and Shigeoka 1994; Chaparro *et al.* 2000; Repetto *et al.* 2001). 특히 어류 간암세포에서 유래된 PLHC-1 (Poeciliopsis lucida hepatocellular carcinoma) 세포주는 오염원에 대한 스크리닝 평가 시 활용도가 높아 널리 이용되는 세포이며 (Fent and Hunn 1996), 수환경 평가 시, 수층 시료뿐만 아니라 퇴적토에 대한 모니터링은 물론, 각 정점 간의 비교 자료로써 높은 활용성이 연구된 바 있다 (Huuskonen *et al.* 1998).

또한, 세포를 이용한 시험기법 가운데 유전독성 평가기법은 유해물질에 의한 염색체구조 변형 및 생체 내 잠재적인 독성의 영향을 관찰 할 수 있으며, 대표적인 시험기법으로 DNA 손상 평가기법인 Comet assay가 있다. Comet assay는 일반적으로 동물혈구세포에 적용되어 왔으며 (Gajski *et al.* 2008), 단일세포 수준에서 DNA 단일가닥 손상 (single strand break)과 alkali-labile Site, 그리고 DNA 손상 부위의 회복 중 불완전한 DNA 절편부위를 검출할 수 있는 방법으로서, 전기영동을 통해 손상된 핵막으로 인하여 DNA 파편이 핵 밖으로 흘러나와 그 파편 길이와 면적으로 DNA 손상 정도를 측정하는 방법이다 (Singh *et al.* 1988). Comet assay는 기존의 DNA 손상 측정법보다 민감하며 유용한 것으로 평가되어지고 있으며 (김과 배 2003; 박과 최 2006), 이와 같은 기법은 오염물질의 유전독성 유무와 환경모니터링을 위한 시험법으로 사용이 제안된 바 있다 (McCarthy 1990).

따라서, 본 연구에서는 기존에 동물혈구세포에 제한된 Comet assay가 어류간암세포에서 유래된 PLHC-1 계대 배양 세포의 새로운 시험기법으로의 가능성과 생태독성 평가의 적용여부를 확인하고자 하였으며, Neutral red (NR) assay, 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) induction 및 Comet assay를 병행하여 산업공단 관통 하천 퇴적토의 유기용매 추출시료를 대상으로 생태독성 평가를 실시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상 정점

본 연구에서는 도시 내 공업단지를 관통하는 경기도 북부지역의 임진강 유역 내 주요 지천인 하천을 선정하여 하천퇴적토에 Comet assay를 적용한 환경오염 진단을 실시 하고자 하였다. 또한, 해당도시의 환경사업소와 공단이 존재하고 있는 도시하천 (상류부터 정점 A~E)과 본류 (한탄강)의 합수 전 (정점 F), 후 (정점 G) 등 7개의

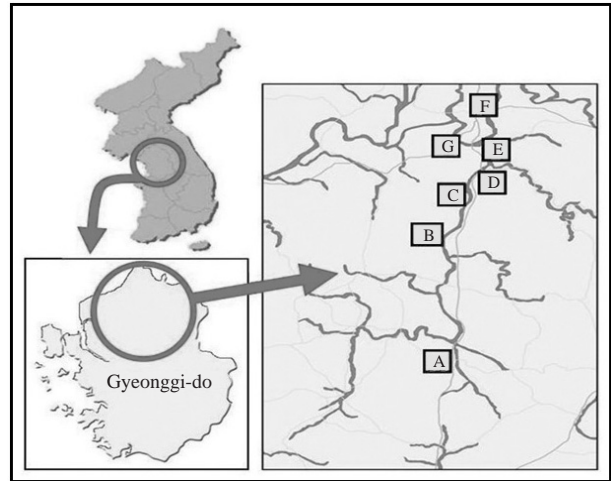


Fig. 1. Map for sampling sites of sediment in Gyeonggi-do.

Table 1. The location and characteristics of study sites.

Site	Location	Peculiarity
A	Environment industrial facility	Environment industrial facility
B	So-yo bridge	Up stream ↓ Down stream Discharge of wastewater: Approximately 100 points
C	Cho-seong bridge	
D	Sin-cheon bridge	
E	Dae-jeon bridge	Confluence
F	Go-tan bridge	Inflow river
G	Han-tan bridge	After confluence

정점을 선정하여 정점별 독성 특이성을 알아보하고자 하였으며, 각 정점의 특징과 위치는 Table 1, Fig. 1과 같았다.

2. 시약 및 기구

Fetal bovine serum은 Gibco™ (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, EROD의 기질인 7-ethoxyresorufin 등을 비롯하여 시험에 사용된 시약류는 Sigma Chem. Co. (ST. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포의 생존율과 EROD 역가 시험의 분석은 Fluorescence Multi-Detection Reader (Synergy HT, Biotek, USA)를 이용하여 정량하였으며, Comet assay의 측정을 위해 형광현미경 (Leica DM LB2, Germany)과 이미지 자동분석 소프트웨어 (Komet 5.x program software, Kinetic Imaging LTG, USA)를 이용해 분석하였다.

3. 하상 퇴적토의 채취 및 전처리

Grab sampler (EMTS, 한국) 및 Core sampler (경남기기, 한국)를 이용하여 하상퇴적토를 채취한 후, 1,500 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 공극수를 제거하였다. 공극수가 제거된 고형 퇴적물 50 g에 sodium sulfate 50 g을 첨가하여 잔존수분을 제거하였으며, 황독성을 배제하기 위하여 (Pardos *et al.* 1999) 25 mg 금속구리를 첨가하였다. 150 mL methylene chloride를 첨가한 후, 마개로 완전히 밀봉하여 200 rpm에서 4시간 동안 격렬하게 진탕하였다. 진탕 후 분리된 추출용매를 후드 내에서 완전히 증발시키고, Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 mL로 재용출하였으며, 이 용출 원액의 농도를 100%로 규정하여 적정농도로 희석하여 사용하였다.

4. PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma) 세포 배양

Poeciliopsis lucida hepatocellular carcinoma (PLHC-1) 세포주는 topminnow의 암컷 성체의 간암세포에서 분주한 것으로, ATCC® (#CRL-2406, USA)사에서 분양받은 후, 배양하여 본 시험에 이용하였다. 10% fetal bovine serum, L-glutamine, sodium pyruvate을 포함한 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)의 배지를 이용하여 5% CO₂와 습도가 조절되는 배양기에서 30°C를 유지하여 배양하였다. 10~20 passage의 세포를 시험재료로 이용하였으며, 배양된 세포는 0.05% Trypsin EDTA 용액을 처리하여 분리한 후, 만들어진 세포현탁액은 Hemocytometer를 이용하여 세포수가 2×10^5 cells mL⁻¹이 되도록 조절하여 배양 및 시험을 수행하였다.

5. PLHC-1 세포생존율 및 EROD 역가 측정

세포현탁액을 96-well plates의 각 well당 200 µL를 분주, 24시간 배양한 다음, 상등액 100 µL를 제거하고, 각 정점의 하상 퇴적토 유기용매 추출물 시료가 포함된 배지 100 µL를 첨가하였다. 이때 퇴적토 시료의 최종 농도가 0.005, 0.05, 0.125, 0.25 및 0.5%가 되도록 조절하였으며 배양기에서 48시간 동안 한 번 더 배양한 후 분석하였다. 또한, DMSO의 가장 높은 농도는 0.5%로 EROD 활성에 큰 영향이 없다는 연구를 참고하였으며 (Celander *et al.* 1997), 노출 시간이 끝난 후, 생존율과 효소 활성을 각각 측정하였다.

1) 세포의 생존율 측정

NR assay는 Neutral red (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride)가 생존 세포의 라이소좀

에 흡수 및 축적된 양을 정량하여 살아있는 세포의 수를 결정하는 기법이다. 본 연구에서는 Borenfreund and Purner (1985)의 시험법을 개선하여 이용하였으며, NR 정량을 위하여 상등액 20 µL를 제거한 후, NR (0.33%, v/v) 용액을 20 µL를 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 0.5% (v/v) formaldehyde/1% CaCl₂ 용액으로 행구어 준 후, 1% acetic acid/50% ethanol 용액을 이용하여 추출하였다. 10분의 반응 시간 후, 540 nm (measured wave length)와 690 nm (reference wave length)에서 흡광도를 측정하였다.

2) EROD 활성 측정

EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase) 활성은 cytochrome P4501A 효소 유도단계를 보는 방법으로 PCDD, PCDF, PCB 및 PAH 등이 Ah receptor와 결합함으로써 효소유도를 일으키는 특성을 이용한 시험법으로, 측정은 Bruke and Mayer (1974)의 시험법을 연구에 적합하도록 개선하여 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

100 µL의 상등액을 제거한 후, 2 µM 7-ethoxyresorufin의 반응 완충용액 100 µL를 첨가한 다음, 형광광도계의 kinetic mode를 이용하여 시간에 따른 변화량을 측정하였다. 이때, excitation/emission wavelength는 530/590 nm에서 측정하였으며, 단위는 pmol min⁻¹ mg⁻¹ protein으로 나타내었다. 또한, resorufin양의 정량에는 0~10 nM의 resorufin standard curve를 이용하였다.

6. 단백질 정량

단백질 정량은 형광광도계를 이용하여 측정하였다 (Kennedy *et al.* 1995; Fent *et al.* 2001). EROD 역가 측정 후, 상등액 100 µL를 제거하고, 50 mM의 sodium phosphate buffer를 이용하여 행구어 주었다. 150 µg mL⁻¹의 fluorescamine 용액을 100 µL를 첨가하고, 15분 동안 반응시킨 후, excitation/emission wavelength는 360/460 nm에서 측정하였다. 한편, standard curve를 이용하여 총단백질량을 정량하였으며, 이때, standard로 Bovine serum albumin을 이용하였다.

7. Comet assay

세포 DNA의 절편을 형광 측정하는 시험법으로, Comet program을 이용하여 손상된 핵의 DNA tail extent moment를 측정한다 (Singh *et al.* 1988; McCarthy 1990).

PLHC-1 세포수가 2×10^5 cells mL⁻¹이 되도록 조절한 세포 현탁액에 각 정점의 퇴적토 유기용매 추출물 시료를 희석하여 30분 동안 노출 시킨 후, 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 분리된 세포들을 0.65% low-melting agarose gel (LMAgarose gel) 25 µL로 재부유하여 미리 1%

normal-melting agarose gel (NMAgarose gel)로 코팅된 Slide glass 위에 응고시킨 후, 다시 0.65% NMAgarose gel로 코팅하여 응고시켰다. 완전히 응고된 slide glass를 lysis buffer solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 1시간 30분 동안 보관한 다음, 증류수에 slide glass를 3분 간격으로 2번 옮겨 세척한 후, DNA unwinding buffer solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, >pH 13)에 5분간 두었다. 그 후, slide glass를 동일한 DNA unwinding buffer solution로 채워진 전기영동 chamber에 넣고 10분간 35 V, 300 mA에서 전기영동을 실시하였으며, 전기영동된 slide glass를 중성화시키기 위하여 증류수와 0.4 M Tris 용액 (pH 7.5)에서 각각 3분 간격으로 2번 세척 후, 70%의 에탄올에 5분 동안 담가둔 후 실온에서 건조시켰다. 건조된 slide glass는 Ethidium Bromide 용액 ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$)으로 염색시켜 형광현미경 (Leica DM LB2)으로 200배 배율에서 관찰하였다 (Fig. 2). 염색된 DNA의 영상을 CCD카메라를 통해 컴퓨터로 불러들인 후, 이미지 자동분석 소프트웨어 (Komet 5.x program software, Kinetic Imaging LTG)로 DNA tail extent moment [Tail Extent Moment=(% DNA in Tail \times Tail Length)/100]를 계산하였으며, 각 slide glass 당 50개의 핵을 분석하여, 이로부터 평균과 표준편차를 구하여 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Arsenic (As)로 처리된 PLHC-1 세포의 DNA 손상도 (Comet assay)

1~10 μM 농도 범위의 As로 처리된 PLHC-1 세포의 DNA 손상도를 측정한 결과 (Fig. 3), 대조구의 경우 0.6 이하의 TEM 값을 나타내었으며, As의 노출 농도가 증가함에 따라 TEM의 값이 높게 측정되는 것을 확인할 수 있었다. 가장 높은 농도인 10 μM 의 경우 TEM 측정 결과 2.32로 대조구와 비교하여 4배 높은 값을 나타내며 As의 노출로 인하여 세포의 DNA의 손상에 영향을 주었다고 판단되었다. 또한 본 시험 결과는 타 연구와 유사한 결과를 나타내었으며 (Jeong 2007), 본 연구에서 사용된 PLHC-1 세포의 배양 및 DNA 손상도 측정기술이 향후 실험에 적용이 가능하다 사료된다.

2. 퇴적토 유기용매 추출물의 정점별 독성

연구대상 하천의 조사정점 7곳의 수시료의 이화학적 분석 결과, 온도와 pH의 정점별 특이성은 관측되지 않았

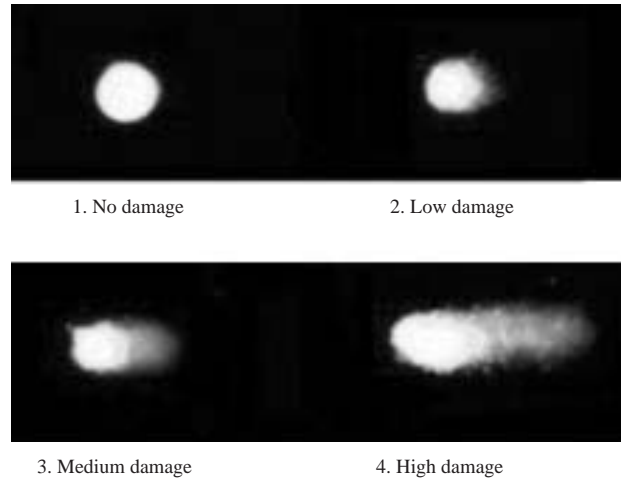


Fig. 2. Pictures of damaged DNA PLHC-1 cells for Comet assay.

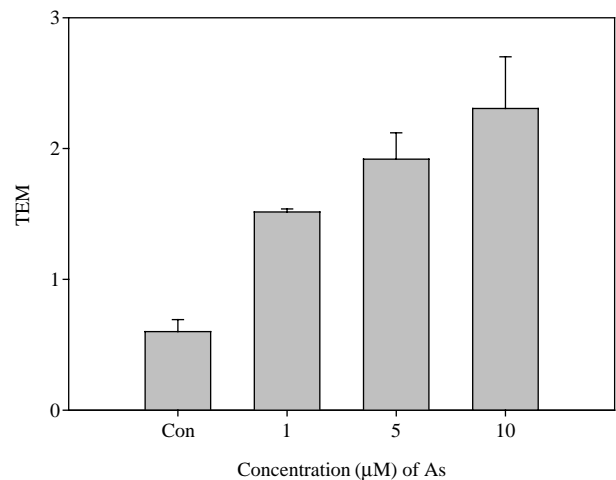


Fig. 3. The effect of Arsenic (As) on TEM values of PLHC-1 cells.

으나, 용존산소의 경우 정점 A에서 E까지의 구간에서 낮게 측정되었으며 그 중 정점 C가 가장 낮게 측정되었다 (Table 2). 이와 같은 이화학적 측정 결과로는 하천의 건강성을 판단하기 어려웠으며, 동일한 정점에서 각각 채취한 퇴적토로부터 시료를 추출 한 후, PLHC-1 세포에 노출시켜 48시간 후 생존율과 EROD 역가를 측정하였다. 대상정점 7곳의 퇴적토 추출시료에 의한 세포 생존율 측정결과, 생존율의 경우 대조구와 비교하여 88~127%의 범위 내에서 측정되었으며 (Fig. 4), 본 연구대상 하천의 정점별 특이성이나 노출 농도에 따른 영향은 관측되지 않았다 (Putnam *et al.* 2002).

EROD 역가의 경우, 대조구의 역가는 $6.322 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 으로 측정되었으며, 퇴적토 추출시료의 정점별, 노출농도별 특이성이 관측되었다 (Fig. 5). 연구대상 도

Table 2. The general quality of water samples obtained from each study sites (measured at 2009/04/18).

Parameter	Site						
	A	B	C	D	E	F	G
Temperature (°C)	13.5	16.2	13.8	14.1	13.0	13.5	12.2
pH	8.4	7.9	8.0	8.3	7.6	9.9	10.0
DO (mg L ⁻¹)	6.8	6.7	5.7	7.9	7.5	10.5	11.6

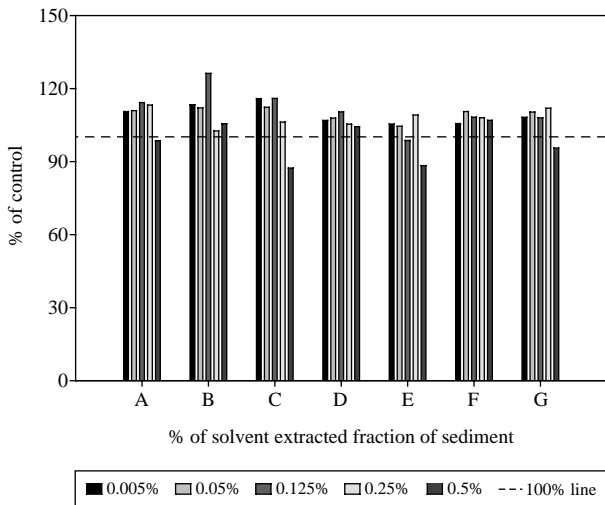


Fig. 4. The cytotoxicity of the solvent extracted fraction of sediment obtained from study sites to PLHC-1 cells (Cytotoxicity was measured by NR assay after 48 hr exposure).

시하천의 상류지점인 정점 A와 본류인 정점 G의 EROD 역가 값이 가장 낮게 나타났으며, 정점 B의 경우 낮은 농도의 처리구에서는 가장 높은 값을 보였으나 0.25%보다 높은 농도에서는 오히려 활성이 감소하였다. 이는 화학물질에 의하여 한계 이상의 농도에서는, EROD의 활성이 저해 또는 비활성 된다는 타 연구결과와 일치하였다 (Haasch *et al.* 1993; Celander *et al.* 1996; Hahn *et al.* 1996).

EROD 활성이 높게 측정된 정점들을 비교 하였을 때, 노출농도 0.25%의 활성기준으로 정점 B, 정점 D, 정점 F, 정점 E, 정점 C순으로 활성이 높게 나타났음을 알 수 있었다. 또한, PLHC-1 세포를 이용한 Comet assay의 정점별 퇴적토 추출물 0.25% 희석액의 30분 노출 시험결과 (Fig. 6), 대조구의 TEM값은 0.27로 측정되었으며, 정점 B, 정점 E, 정점 C, 정점 F, 정점 A, 정점 G의 순으로 높게 관찰되었다. 이러한 현상들은 공단이 존재하고 있는 연구대상 하천의 특성상 상류를 제외한 하천의 모든 구간이 공단 하·폐수로 인한 퇴적토 오염이 높다는 것을 시사해주고 있다. 또한, 이 결과들은 생활하수 및 공장폐수 등 복합적인 오염원에 따른 하천의 퇴적토 및 수

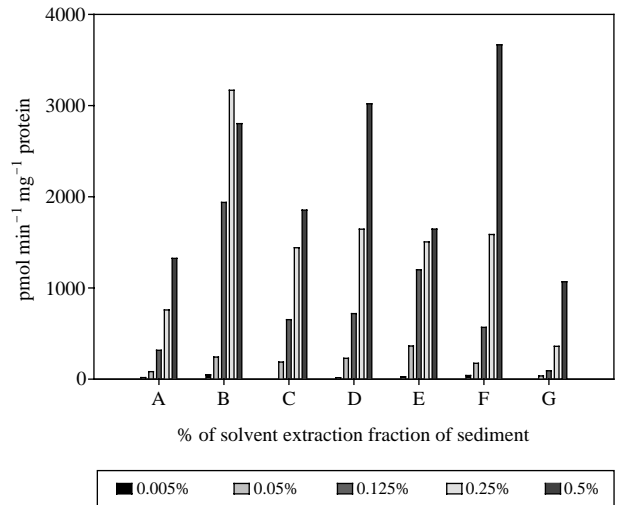


Fig. 5. The EROD activity in PLHC-1 cells exposed for 48 hr to the solvent extracted fraction of each sediment.

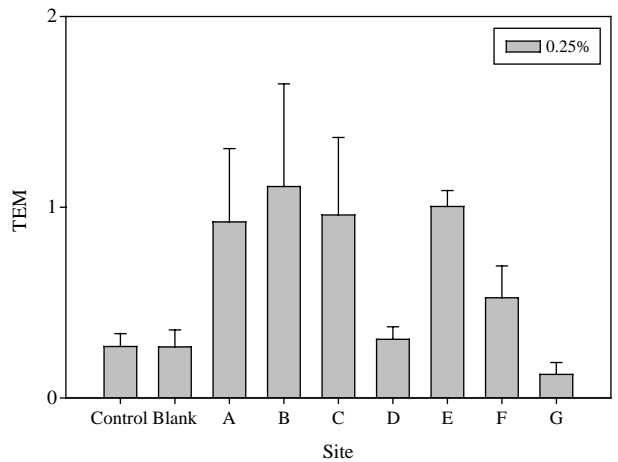


Fig. 6. The level of DNA damage (TEM) in PLHC-1 cells exposed to the solvent extracted sediment (exposed to 0.25% solvent extracted sediment to 30 min).

층의 오염도가 높아진다는 연구결과와 유사하게 나타났다고 보여진다(고와 정 2000).

3. PLHC-1 세포를 이용한 Comet assay의 감수성

PLHC-1 세포 Comet assay의 감수성을 평가하고자, 동일 시료에 대해 시험한 개구리 올챙이 혈구세포 Comet assay 결과와 비교하였다. 이때 올챙이 혈구세포 Comet assay 결과는 환경부 보고서(환경부 2009)의 내용을 차용하였다. 또한, 올챙이 혈구세포의 노출농도가 1%였기 때문에, PLHC-1 세포의 노출농도 0.25%를 고려하여 TEM값을 보정 ($0.25\% \times 4 = 1\%$)하여 나타내었다.

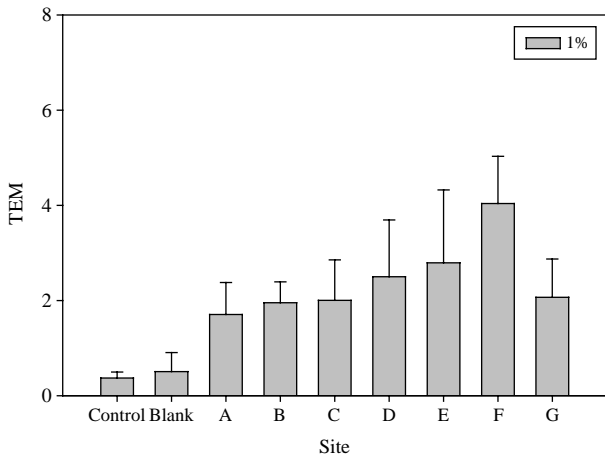


Fig. 7. The DNA damage in frog tadpole blood cells exposed for 30 min to the 1% solvent extract from sediment (cited from ME Report, 2009).

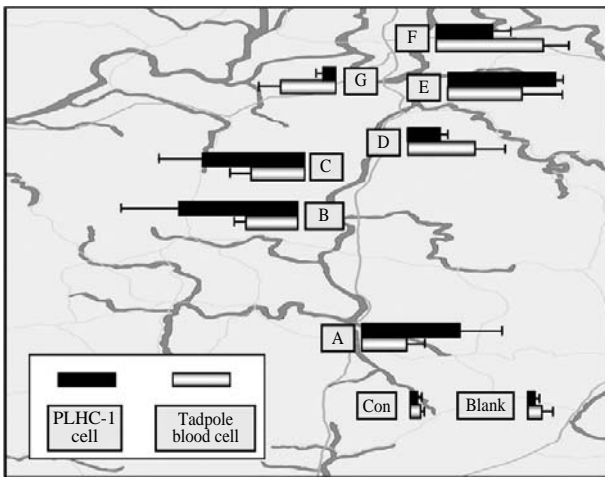


Fig. 8. Comparison for the sensitivity of PLHC-1 cell Comet assay to frog tadpole blood cell Comet assay.

PLHC-1 세포의 DNA 손상의 관찰 결과 정점 D와, G를 제외한 모든 정점에서 TEM의 값이 높게 측정되었으며, 그 중 정점 B의 TEM값이 가장 높게 나타났다.

반면, 올챙이 혈구세포의 TEM값의 경우 (Fig. 7), 정점 A에서 F까지 증가하는 추세를 나타내었으나 정점 G에서 감소하는 모습을 나타내었다. 이는 어류간암세포에서 유래된 배양세포와, 양서류의 혈구세포라는 시험 대상의 차이에서 나타나는 결과라고 사료된다. 또한, 정점 D와 G를 제외한 모든 정점에서 PLHC-1 세포의 TEM값이 혈구세포와 비교하여 월등하게 높은 값을 나타내는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 8). 이러한 결과들로부터 판단 하건데 혈구세포와 대비하여 PLHC-1 세포가 DNA 손상

물질에 대해 민감도가 높다고 사료되며, 따라서 PLHC-1 세포를 낮은 농도의 시료에서 독성 발현여부에 사용하는 것이 타당하다고 판단된다.

결 론

본 연구에서는 환경오염 진단을 목적으로 어류간암세포에서 유래된 PLHC-1 세포를 이용하여 하천 퇴적토를 대상으로 한 Comet assay (DNA 손상 평가기법)를 시도 하였으며, NR assay 및 EROD induction과 병행함으로써, 퇴적토의 생태독성 수준을 다양하게 평가 할 수 있는 PLHC-1 세포시험기법을 확립하고자 하였다.

도시하천으로부터 채취된 7개 정점 하상퇴적토의 독성을 평가하였으며 생존율에서는 모든 정점에서 영향이 관찰되지 않았다. 반면, EROD 역가와 Comet assay 평가에서는 공단이 인접한 정점들의 독성수준이 높게 나타났으며 정점별 특이성을 관측 할 수 있었다. 또한, PLHC-1 세포와 올챙이 혈구세포의 Comet assay를 시행한 결과, 퇴적토 유기용매 추출물 시료에 대하여 PLHC-1 세포의 민감도가 높게 나타났다.

이러한 결과들은 기존의 세포 생존율과 올챙이 혈구세포의 Comet assay에 비교하여 PLHC-1 세포의 Comet assay와 EROD 역가 측정이 하천퇴적토 생태독성평가를 비롯한 환경오염진단 과정에 평가종말점 (Endpoint)으로서 활용이 적합한 것으로 판단되며, 독성이 높게 나타난 문제 정점에 대하여 보다 집중적인 연구가 필요하다 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 수산환경모니터링 운영 (RP-2010-ME-052) 사업으로 일부 지원되었습니다.

참 고 문 헌

- 고성룡, 정규혁. 2000. EROD-microbioassay에 의한 원천천 상류지역 수질 조사. 한국환경위생학회지. 26:105-109.
- 김기범, 배세진. 2003. Pyrene과 Benzo(a)pyrene에 노출된 굴의 혈구 아가미 세포에서의 DNA 손상 측정을 위한 Comet assay의 이용. 한국양식학회지. 16(3):196-201.
- 문성환, 조재구, 정진애, 백승홍, 안지영, 박미선, 박재호, 황인영. 2005. 낙동강 하류 유입수 수질의 환경독성학적 평가 및 비교. 한국환경독성학회 학술대회자료. pp. 88-90.

- 박선영, 최진희. 2006. Comet assay를 이용한 지표 생물종에서의 환경유해물질로 인한 유전 모니터링. 대한환경공학회 춘계학술연구발표회 논문집. pp. 1805-1810.
- 조홍제, 이병호, 이근배. 2000. 도시하천 하상퇴적토의 특성에 관한 연구. 대한토목학회논문집. pp. 607-618.
- 환경부. 2008. 공단주변 공공수역 생태위해성 평가체계 구축을 위한 시범사업.
- 환경부. 2009. 공단주변 공공수역 생태위해성 평가체계구축 및 위해원인 규명을 위한 연구사업.
- Babich H, JA Puermer and E Borenfreund. 1986. In vitro cytotoxicity of metals to bluegill (BF-2) cells. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 15:31-37.
- Borenfreund E and JA Puermer. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Letters 24:119-124.
- Burke MD and RT Mayer. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. Drug Metabolism, Disposition 2:583-588.
- Castaño A, MJ Cantarino, P Castillo and JV Tarazona. 1996. Correlations between the RTG-2 cytotoxicity test EC₅₀ and in vivo LC₅₀ rainbow trout bioassay. Chemosphere 32: 2141-2157.
- Celander M, J Bremer and E Mark. 1997. Glucocorticoid-Xenobiotic interactions: Dexamethasone-Mediated potentiation of cytochrome P4501A induction by β -naphthoflavone in a fish hepatoma cell line (PLHC-1). Environmental Toxicology and Chemistry 16:900-907.
- Celander M, ME Hahn and JJ Stegeman. 1996. Cytochromes P450 (CYP) in the Poeciliopsis lucida hepatocellular carcinoma cell line (PLHC-1): dose- and time-dependent glucocorticoid potentiation of CYP1A induction without induction of CYP3A. Archives of Biochemistry and Biophysics 329: 113-122.
- Chaparro RJF, U Kammann, H Steinhartb and N Theobald. 2000. Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. Mutation Research 467:161-168.
- Fent K and J Hunn. 1996. Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1). Marine Environmental Research 42:377-382.
- Gajski G, V Garaj-Vrhovac and V Orescanin. 2008. Cytogenetic status and oxidative DNA-damage induced by atorvastatin in human peripheral blood lymphocytes: Standard and Fpg-modified comet assay. Toxicology and Applied Pharmacology 231:85-93.
- Haasch ML, EM Quardokus, LA Sutherland, MS Goodrich and JJ Lech. 1993. Hepatic CYP1A1 induction in rainbow trout by continuous flow thorough exposure to β -naphthoflavone. Fundamental Applied Toxicology 20:72-82.
- Hahn ME, BL Woodward, JJ Stegeman and SW Kennedy. 1996. Rapid assessment of induced cytochrome P4501A protein and catalytic in fish hepatoma cells grown in multiwell plates: response to TCDD, TCDF, and two planar PCBs. Environmental Toxicology and Chemistry 17:187-198.
- Huuskonen SE, TE Ristola, A Tuvikene, ME Hahn, JVK Kukkonen and P Lindstrom-Seppa. 1998. Comparison of two bioassays, a fish liver cell line (PLHC-1) and a midge (Chironomus riparius), in monitoring freshwater sediments. Aquatic Toxicology 44:47-67.
- Jeong YN. 2007. Arsenic toxicity in PLHC-1 cell line and the distribution of arsenic in central appalachian. Marshall University.
- Jung DK, T Klaus and K Fent. 2001. Cytochrome P450 induction by nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes, and binary mixtures in fish hepatoma cell line PLHC-1. Environmental Toxicology and Chemistry 20:149-159.
- Kennedy SW, SP Jones and LJ Bastien. 1995. Efficient analysis of cytochrome P4501A catalytic activity, porphyrins and total proteins in chicken embryo hepatocytes cultures with a fluorescence plate reader. Analytical Biochemistry 226: 362-370.
- Kwok YC, DPH Hsieh and PK Wong. 2005. Toxicity identification evaluation (TIE) of pore water of contaminated marine sediments collected from Hong Kong waters. Marine Pollution Bulletin 51:1085-1091.
- McCarthy JF and LR Shugart. 1990. Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publisher. pp. 205-216.
- Pardos M, C Benninghoff, RL Thomas and S Khim-Heang. 1999. Confirmation of elemental sulfur toxicity in the Microtox[®] assay during organic extracts assessment of freshwater sediments. Environmental Toxicology and Chemistry 18:188-193.
- Phillips BM, BS Anderson, JW Hunt, SL Clark, JP Voorhees, RS Tjeerdema, J Casteline and M Stewart. 2009. Evaluation of phase II toxicity identification evaluation methods for freshwater whole sediment and interstitial water. Ecotoxicology and Environmental Safety. pp. 1-8.
- Putnam KP, DW Bombick and DJ Doolittle. 2002. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. Toxicology in Vitro 16:599-607.
- Repetto G, A Jos, MJ Hazen, ML Molero, A del Peso, M Salguero, P del Castillo, MC Rodriguez-Vicente and M Repetto. 2001. A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. Toxicology in Vitro 15:503-509.
- Saito H and T Shigeoka. 1994. Comparative cytotoxicity of chlorophenols to cultured fish cells. Environmental Toxicology and Chemistry 13:1649-1650.
- Singh NP, MT McCoy, RR Tice and EL Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research pp.

184-191.

Stephen LW and LB Henry. 1969. The acute toxicity of some heavy metals to different species of aquatic insects. J. water. Poll. Ctrl. Fed. 41:280-284.

Manuscript Received: October 26, 2010

Revision Accepted: January 12, 2011

Responsible Editor: Hak Young Lee