

## BrdU에 의한 DNA 표지법과 형태측정 방법을 이용한 랫트의 정소독성 연구

손우찬 · 김형진 · 이영순

서울대학교 수의과대학

## STUDIES ON TESTIS TOXICITY USING THE DNA LABELING METHOD BY BrdU AND THE MORPHOMETRIC METHOD IN RATS

Woo Chan Son, Hyung Jin Kim and Yong Soon Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University,  
103 Seodun-Dong, Suwon 440-744, Korea

(Received March 10, 1991)

(Revision Accepted April 17, 1991)

**ABSTRACT:** Complexities of testis structure and function are emphasized in morphometrical and genotoxic evaluation by statistical analysis. F-344 rats were treated with azinphos methyl, cyclophosphomide, and dichlorvos. And Brdu was injected with intraperitonally before sacrifice. The existence and degree of DNA damage were measured by Brdu labeling index which represented relative amount of Brdu incorporated in DNA, morphometric change was evaluated by the relative length of tubular diameter in circular seminiferous tubules and the number of spermatogonia per Sertoli cell in stage IX seminiferous tubules. The results obtained were as follows. First, Brdu labeling index of tubular sections was decreased in cyclophosphomide treated group (83.98%) but were no change in dichlorvos and azinphos methyl treated group (94.36%, 98.43%, respectively). Secondly, tubular diameter was significantly decreased in dichlorvos treated group ( $p < 0.01$ ), but there was no change in the number of spermatogonia per Sertoli cell in stage IX seminiferous tubules. Thirdly, there was no significant change in body weight, absolute and relative weight of testis, accessory sex gland, and adrenal gland. Therefore, quantitative expression of the testicular morphometry and spermatogonial immunocytochemistry by Brdu will give additional information about the effects of chemicals on testis.

**Key words:** testis toxicity, Brdu (5-Bromo-2'-deoxyuridine), morphometry, DSI (DNA Synthesis Inhibition) test

## 서 론

환경중의 화학물질이 생식세포 및 유전자에 미치는 독성작용은 이들 생식 기관의 해부 생리학적인 특이성, 생식과정 자체의 복잡성, 성성숙까지의 소요시간, 종간의 차이 등에 독성평가가 매우 까다롭고 어려운 것으로 알려져 있으며 또한 보다 예민하고 새로운 평가 방법이 요구되고 있는 실정이다.

웅성 생식독성 시험은 일반적으로 기능적, 형태적, 생화학적 변수들을 통해 독성을 평가하게 되나 이러한 사항만으로는 생식과정에 대한 충분한 검색이 될 수 없으므로 유전독성학적인 측면에 대한 고려를 해야한다.

유전독성학과 돌연변이에 관한 연구로 DNA 합성방해 (DNA Synthesis Inhibition DSI) 시험, Unscheduled DNA Synthesis (UDS), DNA 절단 (DNA breaks)의 판정, 정자세포 정조세포의 염색체분석, 자매세포교환 (Sister Chromatid Exchange, SCE) 등과 같은 단기 시험방법이 개발되어 유전독성 물질 평가에 이용되고 있다. 이중 DSI 시험은 생식세포의 DNA를 3H-thymidine으로 표지하여 DNA 합성과정시 3H-thymidine이 DNA로 도입 (incorporation)되는 것을 autoradiography나 Scintillation counting 등을 이용해 측정하는 것이다.

그런데 Gratzner 등은 3H-thymidine 대신 Brdu (5-Bromo-2'-deoxyuridine)의 monoclonal antibody를 생산하여 분열중인 DNA에 들어간 Brdu를 면역학적 방법으로 정량하였다. Brdu의 monoclonal antibody를 3H-thymidine과 동일한 기전으로 DNA를 검색하는 표지물질로써 이용할 수 있게 되었다. 이 방법은 3H-thymidine 보다 빠른 시간 내에서 정보를 얻을 수 있을 뿐 아니라 병리조직상에서도 평가할 수 있게 된다.

조직병리학적 방법으로 정소독성 평가시 적절한 조직조건은 저용량의 영향도 알수 있을 뿐만 아니라 독성의 발현부위, 작용기전 등에 대한 단서도 알 수 있다. 그러나 정소의 해부생리학적인 특이성 때문에 일반적인 병리학적 검색수법으로 평가하는 데에는 많은 한계가 있다. 그러므로 세정관 상피의 주기를 구분하여 구성요소를 측정하는 방법이 약물에 의한 미세한 영향을 평가하는데 효과적 이라는 보고가 있다.

따라서 본 시험은 정소 독성의 평가의 일환으로 일반적 독성 평가와 더불어 DSI 시험을 Brdu에 의한 DNA 표지법을 사용하여 표지된 DNA의 정량적 분석을 하였으며 형태 측정학 방법으로 정세관 상피의 병리학적 검색을 시도 하였다.

시험물질로써 cyclophosphomide, azinphos methyl 및 dichlorvos를 사용하였다. Cyclophosphomide는 alkylating agent로 변이원성 (Hales, 1982), 발암성 (Schmah과 Hab, 1979), 기형유발 (Halec, 1981) 물질로 알려져 있다. Dichlorvos (2,2-Dichlorvinyl dimethyl phosphate)는 유기인제 농약으로 랫드에서 세정관 상피의 변화가 보고 되었다 (Krause와 Homola, 1972). Azinphos methyl (0,0-Di-methyl-S-S-(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)) methyl ester; phosphorodithionic acid o,o-dimethyl ester, S-ester with 3-mercaptopmethyl 1,2,3-benzo-triazine-4(3H)-one)은 유기인제 농약이다.

Cyclophosphomide는 DNA에 영향을 주는 물질로 유전독성이 잘 알려져 있으므로 Brdu 염색법을 사용하였을 때와 비교하여 Brdu 표지법의 유용성 여부를 알아보기 위하여 시험물질로 선택 하였고, Dichlorvos는 정소에 대한 독성 기전이 cyclophosphomide와 비슷한 보고가 있어서 (Krause 등, 1976) 시험물질로 선택 하였다. 그리고 azinphos methyl은 dichlorvos와 같은 유기인제라는 점을 생각하여 시험물질로 선택 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 설계

3가지 시험물질에 대해서 각 대조군과 투여군을 두었으며 각 군당 15마리의 랫드를 사용하였다. 최종 부검시 각 군당 6마리는 일반병리조직 표본을 만들었다. 이들 각 개체에 대하여 한쪽 정소는 Bouin's 용액에 고정하고 나머지 한쪽 정소는 포르말린에 고정하였다. 그리고 나머지 7마리는 Brdu이 면역염색용으로 사용하였다.

Cyclophosphomide는 체중 kg당 40 mg을 증류수에 녹여 1회 경구투여 하였으며 azinphos methyl은

50 ppm의 농도로 분말사료에 혼합하여 4주간 투여하였다. Dichlorvos는 1% Olive oil에 섞어 40 mg/kg 용량으로 1회 투여하였으며 대조군은 Olive oil만 투여 하였다.

### Brdu에 의한 DNA의 표지

#### 1) Brdu의 투여

각군에서 7마리씩에 대하여 Brdu에 의한 표지 시험을 하였다. 투여 Brdu를 증류수에 용해하여 도살 1시간 전에 체중 kg당 40 mg의 농도로 복강내 주사하였다.

#### 2) ABC법에 의한 면역 조직 화학

ABC (Avidine Biotine Complex) 법을 이용하여 염색하였다. DNA를 단쇄화하기 위하여 4N 염산에 37°C에서 20분간 처리하고 (Sugihara 등, 1986) boric acid borate buffer로 중화시켰다. 그리고 항원성을 부활화 시키기 위해 0.04% actinase로 37°C에서 3분간 처리 하였다. Biotin labeled horse anti-mouse immunoglobulin IgG (2차 항체)와 avidine-biotine peroxidase complex는 vectastain ABC Elite kit, PK 4002 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)를 사용하였다. Moisture chamber내에서 5% 정상 horse serum에 20분간 처리후, monoclonal mouse anti Brdu (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.) (1:50), biotin labeled horse anti mouse IgG, avidine biotin peroxidase (ABC) 처리과정을 거쳐, hydrogen peroxidase 0.02%가 첨가된 0.1% diamin benzidine (DAB)에 incubation 시켜 정색 반응을 일으킨 후 hematoxylin으로 핵을 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

### 장기의 중량 측정 및 조직처리

최종부검시 체중, 정소, 정소상체, 저정낭, 전립선, 부신등에 대하여 무게를 측정하였다. 또한 체중에 대한 각각 장기의 상대 중량을 계산하였고 10% 중성 포르말린에 고정을 하였다. Brdu를 투여한 동물의 정소는 10%중성 포르말린에 고정을 하였다 (Sugihara 등, 1986). 정소는 Bouin's 용액에 고정시켰다. 처음 10분간 Bouin's 용액에 담가둔 다음 여러 조각으로 얇게 자른다음 다시 8시간 동안 Bouin's 용액에 고정 하였다. 이어 조직을 60% 에탄올서 부터 95% 에탄올까지 반복하여 담가서 탈수를 시켰다. 모든 조직은 paraffin에 포매한 후 5 $\mu$ m 두께의 절편을 만들었다. 정소는 Hematoxylin-Eosin 염색과 PAS 염색을 하였고, 나머지 조직은 Hematoxylin-Eosin 염색만 하였다.

### Brdu 표지 지수 측정

세정관중에서, Clermont 및 Leblond (1953)의 14주기 정자 발생구분법에 따라 IX 주기의 세정관만을 골라 전체 정조 세포중 표지된 정조 세포의 비율을 계산하였다. 그리고 이 표지율을 대조군에 대한 비율로 표시하였다.

### 세정관 형태 측정방법

#### 1) 세정관의 직경

200 배의 현미경으로 등갈게 잘린 세정관을 골라 현미경 (Nikon, Ophtophot)에 부착된 자로 세정관의 크기를 재었다.

#### 2) Sertoli 세포당 정조세포의 수

400 배의 광학현미경으로 IX주기의 세정관을 골라 Sertoli 세포와 정조세포를 세어 Sertoli 세포에 대한 비율을 계산하였다.

## 6. 자료의 통계처리

Student's t-test를 이용하여 실험 결과치를 대조군의 결과치와 비교, 분석하였다. 5% ( $P < 0.05$ ), 1% ( $P < 0.01$ ) 및 0.1% ( $P < 0.001$ )의 수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 일반 증상, 사료 섭취량 및 체중의 변화

Cyclophosphomide 투여군에서 투여후 2-5일 사이에 피모의 상태가 약간 거칠게 보였으나 그후 대조군과 별 차이없이 회복되었다. Dichlorvos 투여군에서는 투여직후 근육의 경련이 관찰되었으며 비강에 혈액성 분비물이 투여 직후 관찰 되었고, 불안한 행동을 보였으나 곧 회복 되었다. Azinphos methyl 투여군에서는 전 시험기간동안 별다른 이상이 관찰되지 않았다.

모든 투여군에서 대조군과 비교 하였을때 사료 섭취량에는 유의성 있는 변화가 없었다. Cyclophosphomide 투여군에서는 전 시험 기간동안 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중의 변화가 나타나지 않았다. Dichlorvos 투여군에서는 투여후 체중이 조금 감소하였으나 7일 후에는 대조군과 별 차이 없이 회복 되었다. Azinphos methyl 투여군에서도 전시험 기간동안 대조군과 비교하여 유의성있는 체중의 변화가 나타나지 않았다.

### 육안적 부검 소견 및 장기의 절대, 상대중량

Cyclophosphomide 투여군 1 예에서 정소가 심하게 위축되어 있었으나 다른 장기 및 조직의 이상은 관찰되지 않았다. 이외에 전 투여군에서 대조군과 비교하여 특이한 육안적 병변이 관찰 되지 않았다. 전 투여군 모두 장기의 절대 중량 및 체중에 대한 상대 중량에서 대조군에 비해 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다 (Table 1,2). Dichlorvos 대조군에서 부신의 무게가 약간 높게 나타 났으나 ( $24.73 \pm 23.97$ ), 통계적 유의성은 없었다 (Table 1).

**Table 1.** Absolute organ weights of rats treated with various chemicals

Groups	Final B.W (g)	Testis (g)	Adrenal gland (mg)	Seminal gland (g)	Epidi- dymis (g)	Prostate gland (g)
Cyclo. Treated	205.4 <sup>a</sup> 17.9 <sup>b</sup>	1.276 .073	21.02 5.78	0.338 0.068	0.581 .072	0.179 .035
Cyclo. Control	200.5 8.1	1.890 2.335	18.16 9.81	0.355 .057	0.569 .088	0.205 .030
DDVP Treated	209.0 16.3	1.155 .360	17.60 3.15	0.318 0.106	0.542 .057	0.218 .129
DDVP Control	208.8 11.4	1.194 .316	24.73 23.97	0.309 .085	0.574 .047	0.210 0.032
Azin Treated	260.8 22.0	1.303 .321	33.58 12.20	0.523 .085	0.629 .092	0.318 .067
Azin Control	251.6 11.9	1.350 .064	33.67 10.49	0.546 .158	0.669 .075	0.350 .050

<sup>a</sup> Mean, <sup>b</sup> Standard deviation

### Brdu에 의한 DNA의 표지

Cyclophosphomide 투여군에서 대조군에 비해 낮은 표지율을 나타냈다 ( $57.20 \pm 4.32$ ,  $48.04 \pm 8.77$ ) (Table 3). 또 이것을 대조군에 대한 백분율로 나타냈을때 83.98%로 낮게 나타났다 (Table 3). Dichlorvos와 azinphos methyl 투여군에서는 대조군에 비해 유의성 있는 차이가 없었다 (Table 3).

**Table 2.** Relative organ weights of rats treated with various chemicals

Groups	Final B.W (g)	Testis (g%)	Adrenal gland (mg%)	Seminal gland (g%)	Epidi- dymis (g%)	Prostate gland (g%)
Cyclo. Treated	205.4 <sup>a</sup> 17.9 <sup>b</sup>	0.624 .047	24.19 19.73	1.883 2.409	1.959 2.350	1.834 2.446
Cyclo. Control	200.5 8.1	0.927 1.094	26.67 21.48	2.927 2.478	2.973 2.423	2.895 2.516
DDVP Treated	209.0 16.3	0.550 .169	22.87 20.21	1.849 2.370	1.920 2.316	1.819 2.394
DDVP Control	208.8 11.4	0.575 .152	24.59 19.83	1.823 2.335	1.907 2.272	1.792 2.358
Azin Treated	260.8 22.0	0.501 .119	12.77 4.37	0.202 .035	0.241 .031	0.122 .024
Azin Control	251.6 11.9	0.537 .017	13.38 4.02	0.216 .056	0.266 .030	0.139 .022

<sup>a</sup> Mean, <sup>b</sup> Standard deviation

**Table 3.** Effects of various chemicals on the labeling of Brdu in Stage IX seminiferous tubules in rats treated with various chemicals

Chemicals	Labeling Inde <sup>1)</sup>		% of Controls (%)
	Control rats Mean±S.D.	Treated rats Mean±S.D.	
Cyclophosphomide	57.20±4.32	48.04±8.77	83.98
Dichlorvos	56.30±4.40	53.13±7.62	94.36
Azinphosmethyl	58.12±3.38	60.21±4.55	103.59

<sup>1)</sup> Total spermatogonia/labeled spermatogonia×100

### 병리조직 소견 및 세정관의 크기

전 시험군에서 대조군과 비교하여 뚜렷한 병변이 관찰되지 않았다. Dichlorvos 투여군에서는 세정관의 크기가 대조군에 비해 현저히 작게 측정 되었다 ( $p<0.01$ ) (Table 4). Cyclophosphomide 및 azinphos methyl 투여군에서는 대조군과 비교하였을때 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다 (Table 4).

**Table 4.** Diameters of the seminiferous tubules in rats treated with various chemicals<sup>1)</sup>

Chemicals	Control rats Mean±S.D. ( $\mu\text{m}$ )	Treated rats Mean±S.D. ( $\mu\text{m}$ )
Cyclophosphomide	289.25±25.60	268.35±25.20
Dichlorvos	278.25±21.08	260.70±23.64**
Azinphosmethyl	278.60±27.72	288.50±31.28

Values marked with asterisk differ significantly from the control: \*\*, 0.001< $p$ <0.01.

<sup>1)</sup> Outer marginal diameters in circular tubules

### Sertoli 세포당 정소 세포의 수

각 투여군에서 모두 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다 (Table 5). Sertoli 세포의 수와 정소세포의 수의 변이가 매우 심하게 나타났다.

**Table 5.** Mean ( $\pm$ S.D.) number of spermatogonia per sertoli cells in stage IX seminiferous tubular cross sections in rats treated with various chemicals

Chemicals	Control rats Mean $\pm$ S.D.	Treated rats Mean $\pm$ S.D.
Cyclophosphomide	4.32 $\pm$ 3.21	4.44 $\pm$ 2.20
Dichlorvos	5.01 $\pm$ 4.01	4.90 $\pm$ 3.93
Azinphosmethyl	4.24 $\pm$ 3.22	4.90 $\pm$ 4.30

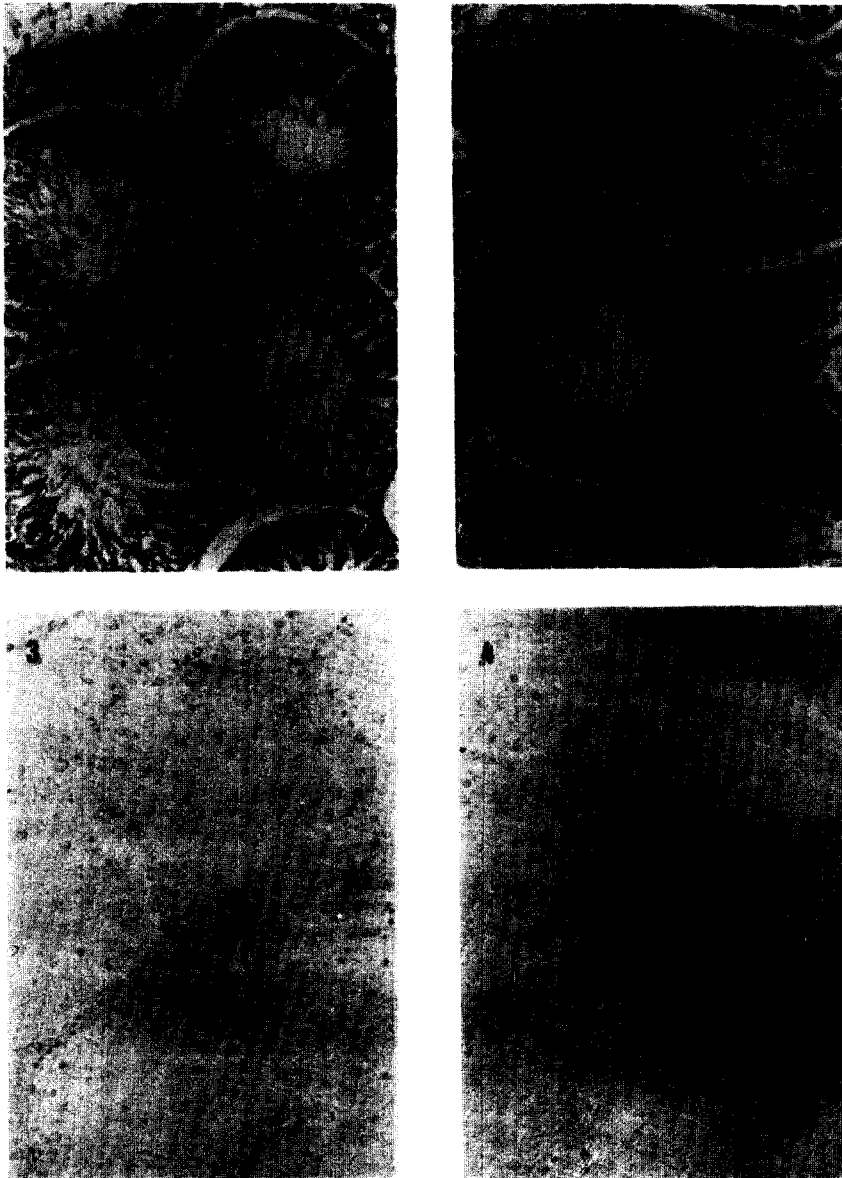
## 고 찰

본 시험은 웅성 생식독성 평가의 일환으로 다른 일반 독성시험과 병행하여 병리학적 수법으로 유전 독성을 평가하는 방법을 시도하였다. 시험체계의 특성이나 평가의 정확성을 높이기 보다는 생체내에서의 유전 독성 유무를 병리학적 수법의 검토와 함께 알아보고자 하였다. 평가방법으로 DSI 시험을 통해 DNA 합성의 방해가 일어나는 것으로 유전독성을 평가하고자 하였으며 3H-thymidine으로 DNA를 표지 하는것을 Brdu로 대체 하여 보았다.

일반적으로 웅성생식 독성 시험시 가장 간단한 독성검색 파라미터로 첫째 정소 및 생식선의 중량변화를 측정한다. 이는 정소의 중량 변화가 적기 때문에 (Blazak 등, 1985), 정소독성의 초기 징후가 될 수 있을 뿐 아니라 측정이 간편하고 동물이 살아 있는 상태에서도 측정이 가능하다는 장점이 있다. Foote 등 (1986) 은 만약 정소의 독성 현상이 중량 변화로 나타난다면 더 이상의 측정은 필요 없다고 하였다. 두번째로 조직학적 검색법이 사용 된다면 가장 간단한 형태가 세정관의 직경 측정일 것이다. 화학물질의 영향으로 억제 되었을때 측정되는 정도 (magnitude)가 다른 파라미터 보다는 적을지라도 정소 무게변화에서 감지되지 않았던 영향이 검출 될 수 있다. Foote 등 (1986)은 DBCP를 사용한 정소 독성 시험에서도 정소 중량비 보다는 세정관 크기 변화가 더 민감하게 영향을 받았다고 보고 하였다. 세번째로 Sertoli 세포당 생식세포의 비율을 측정하는데 본 시험에서는 유의성 있는 차가 나타나지 않았다. DBCP를 투여한 시험에서 most advanced cell 형태의 측정에서도 어떠한 변화도 나타나지 않았는데 그 이유를 각 세포형태의 구분이 어려웠기 때문이라고 하였다. 그리고 이런 이유로 이 방법은 추천되지 않는다고 하였다 (Foote 등, 1986). 그러나 cyclophosphomide와 vinblastin을 혼합하여 투여한 시험에서는 정소세포의 변화가 있었다 (Auroux 등, 1986). 이와같은 세포 형태측정 방법이 정자발생에 관한 독성의 검색에서 유용한 것으로 생각 되고 있다. 또한 어떤 한 주기만이 아닌 모든 주기를 각 주기별로 여러가지 형태의 세포를 측정한다면 독성의 기전을 밝히는데 의미있는 결과를 줄것으로 생각된다. 그러나 이런 형태분석 방법은 시간과 노력이 많이드는 일이므로 파라미터를 정하기 전에 대략적인 작용기전을 참고하여 측정하는 것이 바람직한 방법이라 생각된다. 형태측정방법을 사용하여 평가된 조직의 상해정도에 대해서는 아직까지 축적된 자료나 정보가 많지 않다. 또한 시험방법에 대한 기준도 미흡한 실정이다. 그러므로 합리적인 평가 방법이 요구되고 있다 (Zenick과 Clegg, 1988).

본 실험결과에 투여물질 각군에서 체중의 변화가 현격하게 나타나지 않았으며 정소의 상대 및 절대중량에 유의성 있는 차가 나타나지 않았으므로 (Table 1, 2), 체중과 정소무게에 영향을 미칠 정도의 독성 작용이 없었다고 평가된다.

조리병리학적 검색시 PAS 염색과 H. & E. 염색 결과 모든 투여군에서 현저한 병변이 발견 되지 않았으므로 (Fig. 1, 2) 보다 예민한 측정 방법의 일환으로 형태측정방법을 도입하였다. 우선 비교적 구분이 용이한 IX 주기의 세정관을 선택하여 외관 직경을 측정하였다. 측정결과 dichlorvos 투여군에서 세정관 직경의 유의성 있는 차이가 나타났다 ( $p < 0.01$ ). 이것은 일반적인 조직검사에서 발견 되지 않았던 약물의



**Fig. 1.** Section of tubules from a controls of dichlorvos dosing group.  $\times 200$  H.E.

**Fig. 2.** Section of tubules from a single treatment with dichlorvos (40 mg/kg). Showing no distinct change in comparison with control group but statistical results reveals decreased tubular size.  $\times 200$  H.E.

**Fig. 3.** Immunohistochemical demonstration of Brdu in spermatogonial DNA from a controls of cyclophosphomide dosing group. Arrows indicate labeled spermatogonia.  $\times 200$  ABC staining.

**Fig. 4.** Immunohistochemical demonstration of Brdu in spermatogonial DNA from a single treatment with cyclophosphomide (40 mg/kg). Labeled spermatogonia were decreased.  $\times 200$  ABC staining.

영향이 검출된것으로 생각된다. Krause (1974)는 dichlorvos의 투여후 세정관에 심한 병변이 나타나는 것을 관찰 하였다. 본 시험에서는 Krause의 보고에서와 같은 심한 병변은 관찰되지 않았으며 세정관의 직경이 위축된것만 관찰 되었다.

다음은 Sertoli 세포당 정소 세포수의 비율을 측정하였다. 모든 투여군에서 유의성 있는 차가 나타나지 않았다 (Table 5). 표준 편차가 크게 나타난 것은 조직표본이 잘 만들어 지지 않았기 때문이라 생각된다.

Friedman과 Staub (1976)는 발암물질을 정소의 DSI 시험으로 측정한 결과 간단하고 효과적인 *in vivo* 검색법 이라고 하였다. 이들에 따르면 정소 DSI 시험은 발암 물질에 대해 양성 반응을 나타냈고 유전적으로 비활성인 화합물은 독성을 나타내는 용량에서도 DNA 합성방해를 나타내지 않았다고 한다. 그후 Seiler 등 (1977)에 의해 이 방법의 검토가 이루어졌으며 Painter (1977)는 DNA 합성의 방해정도가 화학물질의 유전독성을 검색하는 신속한 방법임을 보였다.

본 실험결과 Brdu로 표지된 정소세포의 비율에서 cyclophosphomide 투여군에서만 표지율의 감소가 나타났으며 ( $57.20 \pm 4.32$ ,  $48.04 \pm 8.77$ ), 나머지 dichlorvos 및 azinphos methyl 투여군에서는 큰 차이가 나타나지 않았다 (Table 3, Fig. 3,4).

Lambert (1979) 등은 cyclophosphomide를 투여한후 정소로 도입된 3H-thymidine을 측정한 결과 cyclophosphomide 투여군에서 도입된 3H-thymidine이 낮게 측정되었다고 하였다. 또한 각 용량 단계별로 측정된 결과 투여 용량과 표지율간에 비례 관계가 나타났으며 회복 정도는 cyclophosphomide 투여 1일후에 가장 낮은 표지율을 보였고 3일 후에 회복되었다고 하였다. 그러나 hydroxyurea 같은 대사저해 작용제 (metabolic inhibitor)를 투여 하였을 때에는 3H-thymidine의 도입량에 큰 변화가 없었다. Lambert 등은 cyclophosphomide는 DNA를 알킬화 시켜 3H-thymidine의 도입을 저해 시켰을 것이라고 추측 하였다. 본 실험에서는 thymidine 대신 Brdu를 사용하여 표지시켰을때 이와 비슷한 결과가 나타났다.

Dichlorvos는 유기인제 살충제 중에서 변이원성에 대한 연구가 많이 되어 있다 (Ashwood-Smith 등, 1972; Vooged 등, 1972). Krause (1976)는 dichlorvos 가 cyclophosphomide와 비슷한 작용기전으로 정자발생과정에 영향을 준다고 하였다. 그러나 미생물 체계에서는 알킬화를 통한 돌연변이성이 확인되었으나 포유류 체계에서는 생체내의 빠른 대사로 인해 이런 작용이 없다는 보고도 있다(Wild, 1975). Nicholas (1978)와 Dean (1972)은 dichlorvos의 유전독성을 확인하지 못하였지만 Tezuka (1980)는 SCE 시험으로 유전독성을 보고 하면서 이런 이유를 시험계의 민감성 차이 때문이라 하였다.

본 시험의 dichlorvos 투여군에서는 Brdu 표지율의 유의성 있는 차이가 없었다. 이것은 위에서 언급한 것처럼 생체내 (*in vivo*) 실험이기 때문에 dichlorvos에 의한 세포 유전독성이 나타나지 않은 것으로 생각된다. Azinphos methyl도 dichlorvos와 비슷한 유기인제로 표지율의 차이가 없는 점으로 보아 세포유전 독성이 나타나지 않은 것으로 생각된다.

본 실험외에 Brdu를 이용한 여러 연구예가 있다. 암환자의 예후판단과 투약 계획 수립에 응용한 예가 있으며 (Riccardi 등, 1988), flow cytometry에서 Enzyme-Linked Immunoabsorbent assay (ELISA) 등에 응용한 방법 (Cheitlin 등, 1988) 등이 보고되고 있다. 이외에 Karube와 Watanabe (1988)는 G-banding 패턴과 염색체 상의 Brdu 패턴이 일치함을 보여 염색체 전위에 따른 DNA 분열시기의 변이를 검색하는데 유용하게 사용될 수 있음을 보고하기도 하였다. Brdu를 이용한 면역조직화학법이 유용하게 응용될 수 있는 또 하나의 분야는 세포증식의 해석이다. 세포 재생계 관찰은 표지세포의 경시적 관찰이 매우 유효한 검색 수단이다. 위의 발암과정에서 출현하는 Pepsinogen 1 (Pg1) 변이유문선 (PAPG)의 세포동태를 Brdu 및 Pg1의 면역조직화학 이중염색법으로 해석한 예 (立訟, 1987)와 랫드의 방광암 발암과정에 출현하는 가역성 및 비가역성 점막상피 증식반응에 Brdu로 연속 표지하여 표지세포의 분포이상을 지표로 해석을 한 보고가 있다 (Tatematsu, 1987). 이 외에도 *in vitro* 시험에서 다양하게 응용된 보고들이 있다.

이상에서 살펴본 바와 같이 Brdu에 의한 DNA 표지법을 이용한 DSI 시험은 첫째, 방법이 간단하다는 점. 둘째, *in vivo* 상태에서 짧은 시험기간에 할 수 있다는 점. 셋째, 병리조직상에서도 관찰이 가능하다는 점을 장점으로 생각 할 수 있다. 그러므로 Brdu를 이용한 DSI 시험은 다른 여러가지 유전독성 시험법과 함께 화학물질의 유전독성 예비검색의 차원에서 실시 될수 있는 유용한 방법이라고 판단되며, 이외에도 Brdu를 이용한 세포동태 관찰은 DSI 시험뿐만 아니라 여러 분야에서 다양하게 응용 될 수 있을 것으로 생각된다.



## 참고문헌

- Ashwood-Smith, M.J., Trevino, J. and Ring, R. (1972): Mutagenicity of dichlorvos, *Nature*, **240**, 418-420.
- Auroux, M.R., Dulioust, E.M., Nawar, N.Y. and Yacoub, S.G. (1986): Antimitotic drugs (cyclophosphomide and vinblastine) in the male rat death and behavioral abnormalities in the offspring, *J. Androl.*, **7**, 378-386.
- Blazak, W.F., Ernst, T.L. and Stewart, B.E. (1985): Potential indicators of reproductive toxicity: testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time, and motility in F-344 rats, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **5**, 1097-1103.
- Cheitlin, R.A. and Bodell, W.J. (1988): Application of ELISA procedure for the quantitation of bromodeoxyuridine incorporated into cellular DNA, *Anticancer Res.*, **8**, 471-474.
- Clermont, Y. and Leblond, C.P. (1953): Renewal of spermatogonia of rat, *Am. J. Anat.*, **93**, 475-502.
- Dean, B.J. (1972): The effects of Dichlorvos on cultured human lymphocytes, *Arch. Toxicol.*, **30**, 75-85.
- Foots, R.H., Berndston, W.E. and Rounsaville, T.R. (1986): Use of quantitative testicular histology to assess the effect of dibromochloropropane (DBCP) on reproduction in rabbits, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **6**, 638-647.
- Friedman, M.A. and Staub, J. (1976): Inhibition of mouse testicular DNA synthesis by mutagens and carcinogens as a potential simple mammalian assay for mutagenesis, *Mut. Res.*, **37**, 67-76.
- Gratzner, H.G. (1982): Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication, *Science*, **218**, 474-475.
- Hales, B.F. (1982): Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphomide and its active metabolites, 4-hydroxycyclophosphamide, phosphoramidate mustard, and acrolein, *Cancer Res.*, **42**, 3016-3021.
- Karube, T. and Watanabe, S. (1988): Analysis of the chromosomal DNA replication pattern using the bromodeoxyuridine labeling method, *Cancer Res.*, **48**, 219-222.
- Kruse, W.K. and Homola, S. (1974): Alterations of the seminiferous epithelium and the leyding cells of the rat testis after the application of dichlorvos (DDVP), *Bull. Environ. Toxicol.*, **11**, 429-433.
- Krause, W., Hamm, K. and Weissmuller, J. (1976): Damage to spermatogenesis in juvenile rat treated with DDVP and malathion, *Bull. Environ. Toxicol.*, **15**, 458-462.
- Nicholas, A.H., Vienne, M. and Berghe, H.V.D. (1979): Sister chromatid exchange frequencies in cultured human cells exposed to an organophosphorus insecticide, *Toxicol. Lett.*, **2**, 271-275.
- Painter, R.B. (1977): Rapid test to detect agents that damage human DNA, *Nature*, **265**, 650-651.
- Riccardi, A., Danova, M., Wilson, G., Ucci, G., Dormer, P., Mazzini, G. and Brugnattelli, S. (1988): Cell kinetics in human malignancies studies with *in vivo* administration of bromodeoxyuridine and flow cytometry, *Cancer Res.*, **48**,

6238-6245.

- Schmahl, D. and Habs, M. (1979): Carcinogenic action of low-dose cyclophosphamide given orally to Sprague-Dawley rats in a lifetime experiment, *Int. J. Cancer*, **23**, 706-712.
- Seiler, J.B. (1977): Inhibition of testicular DNA synthesis by chemical mutagens and carcinogens. Preliminary results in the validation of a novel short term test, *Mut. Res.*, **46** 305-310.
- Sugihara, H. Hattori, T. and Fukuda, M. (1986): Immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine in formalin-fixed tissues, *Histochem.*, **85**, 193-195.
- Tatematsu, M, Fukushima, Aoki, T., Mera, Y. Inouse, T. and Ito. N. (1987): Patterns of epithelial proliferation revealed by continuous administration of bromodeoxyuridine during urinary bladder carcinogenesis in rats, *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 177-191.
- Tezuk, H., Ando, N., Suzuki, R., Terahata, M., Moriya, M. and Shirasu, Y. (1980): Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in cultured chinese hamster cells treated with pesticides posticides positive in microbial reversion assays, *Mut. Res.*, **78**, 177-191.
- Vooged, C.E., Jacobs, J.J.J.A.A. and van der Stel. (1972): On the mutagenic action of Dichlorvos, *Mut. Res.*, **16**, 334-340.
- Wild, D. (1975): Mutagenicity studies of organophosphorus insecticides, *Mut. Res.*, **32**, 133.
- Zenick, H. and Clegg, E.D. (1989): Assessment of male reproductive toxicity.: A risk assessment approach *In Principles and methods of toxicology* (Hayes, A.W. (eds.), Raven, New York), p. 275-310.