

Phenothiazines의 광독성에 대한 *in vitro* 실험법의 비교 연구

김 종 예, 김 현 진, 김 봉 희

충남대학교 약학대학

A Comparative Study of *in vitro* Methods on the Phototoxicity of Phenothiazines

Jong-Yea Kim, Hyunjin Kim and Bong-Hee Kim

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon, Korea

ABSTRACT

A few *in vitro* methods were developed to compare the result on the phototoxicity of phenothiazines. By the MTT assay, the *Candida* test, and the RBC photohemolysis, the phototoxicities of UVA and UVB irradiation were measured. This paper presents the comparisons of methods which are effective to measure the phototoxicities of the chemicals causing phototoxicity and photoallergy. The tested chemicals of phenothiazines include Chlorpromazine, Promethazine, Perphenazine, Chlorprothixene, Trifluoperazine, and Thioridazine. Each chemical represented variable results according to the test methods. MTT assay shows the most sensitive method.

서 론

식품, 의약품, 생활용품, 산업 생산물, 향장품 등의 화학물질 중에는 태양광 및 인공광에 의하여 피부에 이상 반응인 홍반, 화상, 부종, 각화증, 편평 및 기저세포암종 유발 등의 광과민 반응을 일으키는 경우가 있는데,¹⁾⁻³⁾ 이러한 물질을 광과민 물질(photosensitizer)이라고 부른다. 약물에 의해 야기되는 광과민 반응에는 광독성(phototoxicity)과 광알러지(photoallergy)가 있으며,⁴⁾ 이중 광독성은 시험물질에 자외선 혹은 가시광선을 1회 노출시킬 때 나타날 수 있는 급성 반응으로, 광독성물질의 활성화에 산소가 필요한 광동력학적 반응과 불필요한 비광동력학적 반응이 있고, 광동력학적 반응은 다시 빛의 조사에 의해 triplet state (3S)⁵⁾로 전환된 물질이 세포내의 인접한 기질로부터 제공

된 전자에 의해 환원되어 유리기를 생성하는 Type I 반응과 산소와 반응하여 직접적인 산화에 의해 세포구성물을 파괴할 수 있는 활성산소를 생성하는 Type II 반응으로 대별된다.⁶⁾⁻⁷⁾ 이와 관련성이 깊은 자외선은 파장에 따라 220~280 nm의 UVC, 280~320 nm의 UVB, 320~400 nm의 UVA로 세분되며,⁸⁾ 자외선 그 자체로도 피부에 여러 병변을 일으키는 것으로 알려져 있는데, 파장이 짧을수록 광에너지의 양은 증가되고, 이는 구성분자간의 결합을 파괴할 정도로 커서 인체에 많은 변화를 가져온다. 이중 가장 유해하다고 생각되는 UVC는 오존층에 의해 거의 흡수되고, UVA, UVB만이 지표에 도달되는데, 피부에 대한 자외선의 영향을 비교해보면, UVA는 진피의 유두층, 망상층까지 영향을 미치고, 탄력섬유와 콜라겐의 붕괴로 탄력감소, 조기노화를 초래한다. 또 모세혈관

의 확장 및 파괴로 피부의 근본조직을 와해시킨다. UVB는 살갓의 표피층에 작용하고 급속한 화상이나 홍반을 일으키며 더 진행되면 멜라닌 색소 형성, 색소침착으로 선전이 일어나고, 손상된 피부세포를 수복하여 각화이상을 일으키고, 각질층의 수분감소와 살갓이 거칠어지며 만성 노출시 피부주름이 생긴다.⁹⁾ 또한 DNA에 손상을 주며 glycosaminoglycan이 증가되어 collagen이 변하게 된다.¹⁰⁾

현재 의약품, 생활용품, 음료, 산업생산물, 향장품¹¹⁾ 등에서 화학물질의 광독성 및 광알러지의 유무를 평가하기 위한 시험이 행해지고 있는데,¹²⁾ 주로 기니픽, 토끼, 랫드 및 마우스 등의 동물을 이용한 *in vivo* 시험이 수행된다.¹³⁾⁻¹⁵⁾ 이러한 동물시험은 관리비용이나 인력, 시간 등의 소모가 많은 단점이 있는데, 최근 유럽을 중심으로 화장품의 안전성 평가시 동물실험을 금지하는 추세에 있고 인도적 차원에서 실험을 하는 동물대체시험, 동물사용감소, 시험방법증진의 3R운동이 확산되는 추세여서 동물을 이용하지 않는 시험법의 개발이 요구되고 있다.¹⁶⁾ *in vitro* 대체 시험법으로는 진균(*Candida albicans*)을 이용한 성장억제를 연구하는 법,¹⁷⁾⁻¹⁸⁾ 사람의 적혈구의 용혈 정도를 이용하는 법(hemolysis),¹⁹⁾ 림프구 분열 억제제를 이용한 방법,²⁰⁾ 세포 독성 측정법²¹⁾⁻²³⁾ 등이 이용되고 있고, 각 실험방법에 따라 서로 다른 장단점이 있다.

항정신성 의약품으로 사용되는 phenothiazine류의 신경안정제는 이 약물을 복용하는 환자에게서 광독성과 광알러지를 일으킨다고 보고되어 있으며, 이중 chlorpromazine에 대한 연구가 가장 많이 되고 있는데, 약물의 광독성이 측정법에 따라서 상이한 결과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 실험에서는 이 약물의 광독성 평가를 위하여 동물을 사용하지 않고 보다 효율적이고, 경제적이고 간편한 *in vitro* 시험법의 마련이 필요하리라 생각되어 광독성을 일으키는 phenothiazine류 중 Chlorpromazine, Perphenazine, Trifluoperazine, Promethazine, Thioridazine, Chlorprothixene을 선택하여 UVA 및 UVB를 조사하고 RBC photohemolysis, Candida test, MTT assay로 각 약물의 광독성 시험 결과를 비교 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시험약물

Chlorpromazine (CPZ) (U.S.P.), Perphenazine (PPZ) (U.S.P.), Trifluoperazine (TFZ) (U.S.P.), Thioridazine (TRZ) (U.S.P.), Promethazine (PMZ) (U.S.P.), Chlorprothixene (CPX) (U.S.P.).

2. 시약 및 기구

Candida albicans (계대배양한 균주), MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) 용액, L1210 cell (계대배양한 cell), UV irradiation (RMX-3W), Micro plate reader (Molecular Devices) 등을 사용하였으며, 기타 시약 및 용매는 특급 또는 1급을 사용했다.

1) RBC photohemolysis

Kahn 등의 방법²⁴⁾을 사용하였으며, physiological saline으로 CPZ, PPZ, TFZ, PMZ를 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 되게 만들고, 각 약물용액 5 ml과 적혈구 20 µl를 잘 혼합하여 UVA (350 nm)는 2.5 mW/cm², UVB (312 nm)는 1.5 J/cm²를 조사한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 그 상정액을 취해서 540 nm에서 흡광도를 측정, 100% hemolysis 용액에 대한 % hemolysis를 구하였다. 100% hemolysis 용액은 0.04% NH₄OH 5 ml과 적혈구 20 µl를 혼합하여 상기와 같은 방법으로 하여 측정된 값으로 하였다.

2) 진균 시험법 (*Candida albicans* test)

약물에 따른 *Candida albicans*의 MIC (Minimum Inhibition Concentration)를 측정하기 위해 액체배지를 이용하여 MIC를 구하였다.²⁵⁾ Phosphate buffer로 CPZ, PMZ, PPZ, CPX, TFZ, TRZ를 1 mg/ml씩 제조하여 석영관에 넣어 UVA 및 UVB를 각각 1.5 J/cm²씩 조사시켜 이를 27°C에서 24시간 배양한 *Candida albicans*액 100 µl과 함께 농도별로 100 µl씩 well-plate에 계열 희석하여 27°C에서 30시간 동안 배양하여 MIC값을 구하였으며, phototoxic activity를 보기 위해서는 CPZ를 기준 값으로 각 약물에 대한 비교 정도를 %로 나타내어 *Candida albicans*의 감수성을 비교하였다.

3) MTT assay

약물의 광독성 측정을 위해 cell culture를 2×10⁴개/ml의 농도로 만들어 96 well-plate에 100 μl씩 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 phosphate buffer로 CPZ, PMZ, PPZ, CPX, TFZ, TRZ을 5 μg/ml, 10 μg/ml, 20 μg/ml의 농도로 한 액을 100 μl씩 가해 1시간 배양 후 UVA 및 UVB를 각각 1.5 J/cm² 조사 후 37°C CO₂ 배양기에서 40시간 배양하여 MTT 시액 (5 mg/ml)을 20 μl을 넣은 후 4시간 배양 후 원심 분리하여 배지를 버리고 formazan 잔사를 DMSO에 녹인 후 Micro plate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정한다. 흡광도는 세포 생존율을 의미하며 인산완충액에 대한 흡광도를 100으로 하여 %로 나타낸다.

결과 및 고찰

1. RBC photohemolysis

약물 농도에 따른 photohemolysis에 의한 광독성 측정은 CPZ은 농도가 50 μg/ml일 때, PPZ, TFZ은 농도가 25 μg/ml일 때 급격한 photohemolysis를 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 큰

영향을 나타내지 않았다. PMZ은 모든 농도에서 매우 낮은 photohemolysis를 보였는데 이는 UVA에서 photohemolysis를 일으키지 않는 것에 비해 UVB에서는 소량의 증가를 보였으며 모든 경우에 UVA 조사에서와 같이 UVB 조사에서도 약물의 농도가 증가함에 따라 % hemolysis가 증가함을 알 수 있었다(Table 1, 2). UVB 조사시 약물의 광용혈 작용을 UVA 조사시와 비교해볼 때 % hemolysis가 낮게 나타났는데, 이는 UVA 조사시에는 인산완충 생리식염액을 사용하여 일정한 pH를 유지시켰기 때문이며 그 결과는 veronal 완충액을 사용했을 때에도 같은 것으로 보고되었다. UVB 실험에서는 생리 식염수만을 사용하였으므로 시험 물질이 용해시 pH 변화에 따른 그 자체로 용혈이 일어나 상대적으로 수치가 적어진 것으로 생각된다. RBC photohemolysis 방법은 시험 방법 검증 연구를 수행하고 있는 기전 평가 방법의 대표적인 방법으로, 조작이 간단하고, 광독성 예측력이 높으나, DNA와 반응하는 화학물질은 이 시험법에서 검출될 수 없으므로, 모든 광독성 기전을 검색할 수 있는 추가 시험이 수행되어야 할 것으로 생각된다.

2. 진균 시험법 (*Candida albicans* test)

약물에 따른 *Candida albicans*의 MIC (Minimum Inhibition Concentration)는 UVA 조사에 의해 PMZ, PPZ, TFZ, TRZ는 MIC 값이 거의 감소하지 않고, UVB 조사에 의해서는 CPZ, PMZ, PPZ, CPX는 MIC값이 감소함을 보였다(Fig. 1). CPZ를 기준으로 한 각 약물에 대한 MIC값의 비교치는 *Candida albicans*에 대한 감수성은 UVA, UVB 모두 CPZ와 PPZ가 높은 편이었고, 그에 반해 TRZ, TFZ, PMZ, CPX 순으로 작아지고 있음을 볼 수가

Table 1. Effect of the tested drugs in saline on red blood cell hemolysis by UVB irradiation (% hemolysis)

	Drug concentration (μg/ml)			
	12.5	25	50	100
CPZ	4.04±1.07	19.44±2.80	65.65±1.73	59.36±0.98
PPZ	4.17±0.49	75.70±3.47	63.16±2.21	70.38±1.06
TFZ	13.17±3.84	53.89±3.50	62.73±3.37	70.64±0.38
PMZ	0.92±0.09	1.56±0.19	2.54±0.04	6.47±1.12

* UVB-312 nm, 1.5 J/cm²
 * Values are the mean±S.D. of experiments (n=3-5)

Table 2. Effect of the tested drugs in phosphate buffered saline on red blood cell hemolysis by UVA irradiation

	Drug concentration (μg/ml)				
	1	10	25	50	100
CPZ	0.4±0.38	3.5±0.46	43.24±0.59	85.50±0.91	96.08±2.00
PPZ	1.48±0.38	6.52±0.42	80.70±1.55	85.28±1.05	96.38±1.37
TFZ	1.22±0.46	8.84±0.40	58.54±0.81	92.38±1.40	87.50±1.07
PMZ	0	0	0	0	0

* UVA-350 nm, 2.5 mW/cm²
 * Values are the mean±S.D. of experiments (n=5)

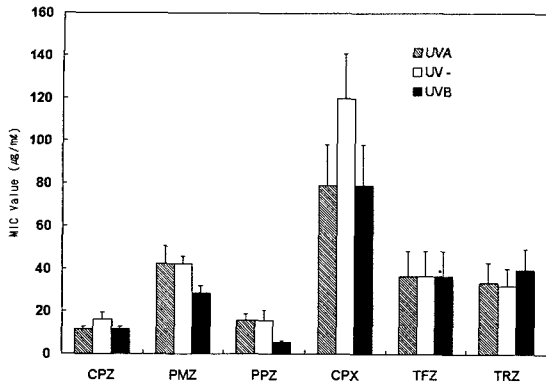


Fig. 1. Phototoxicity of phenothiazines using the *Candida albicans* test. MIC of *Candida albicans* by 1.5 J/cm² UVA, UVB irradiation on phenothiazines.
* Values are the mean ± S.D. of experiments (n = 6-10).

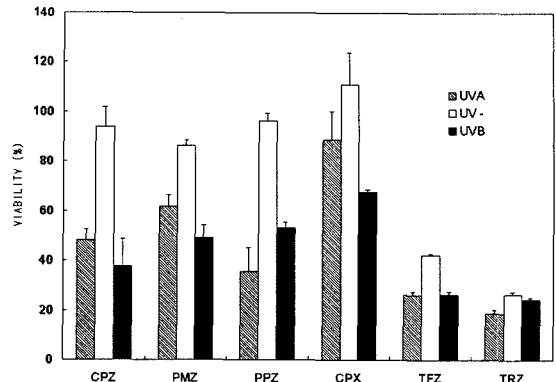


Fig. 2. Phototoxicity of phenothiazines in the MTT assay followed by L1210 cell cultures. L1210 cells were exposed to phenothiazines (5 mg/ml) for 1 hour and subsequently irradiated with 1.5 J/cm² UVA and UVB, and two-day incubation.
* Values are the mean ± S.D. of experiments (n = 3-6).

있다. CI기를 갖는 CPZ, PPZ과 같은 phenothiazine은 UV 조사 후 큰 광독성을 나타내지만, PMZ, TRZ, TFZ 같은 CI기를 갖지 않는 것은 활성을 나타내지 않는 것으로 보고되고 있는데, CPX를 제외한 CPZ, PPZ이 CI기가 없는 PMZ, TFZ, TRZ보다 높은 감수성을 보임으로써 확인할 수 있었다. 진균시험법은 주요 반응기전이 DNA나 cell organelles의 손상에 의한 것으로,²⁶⁾ 이는 *in vitro* 광독성 시험 중 가장 간단한 방법이나 민감성이 떨어져서 많은 광독성 물질을 검출할 수 없고, 효모의 실험실 오염 가능성을 내재하고 있는 단점이 있는데, 실험 결과 특히 UVA에 대한 감수성이 매우 낮음을 관찰할 수 있었으므로, 화학물질의 광독성 예측시 다른 실험 방법이 함께 수행되어야 할 것이다.

3. MTT assay

광독성을 측정해보니 UV 조사에 의해 대부분의 시험 약물에서 cell의 세포 생존율은 감소했다. UV를 조사하지 않았을 때의 세포 생존율을 1로 하여 나타낸 값을 광독성 민감도라고 하고, 값이 낮을수록 민감도가 민감하다고 정의하면, 특히 낮은 농도에서의 광독성 민감도는 높은 반면, 높은 농도에서는 낮은 민감도를 보였다. 5 µg/ml의 농도에서는 각각의 시험 약물에서 다양한 변화를 볼 수 있었으므로 이 농도에서의 민감도를 가지고 광독성 정도를 평가하였다. 시험약물이 UV 조사

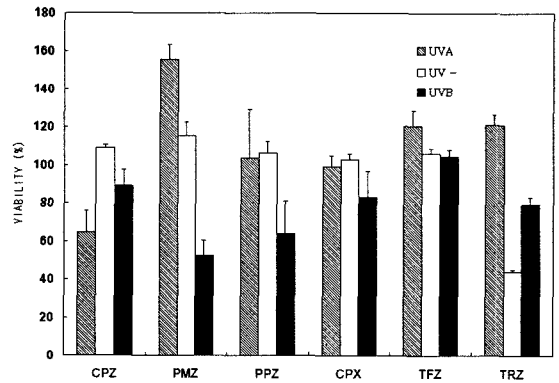


Fig. 3. Phototoxicity of phenothiazines in the MTT assay followed by L1210 cell cultures. L1210 cells were exposed to phenothiazines (5 µg/ml) irradiated with 1.5 J/cm² UVA and UVB, and three-day incubation.
* Values are the mean ± S.D. of experiments (n = 3-6).

에 의해 나타나는 광독성을 보면, UVA 조사에 의해서는 PPZ, CPZ, TFZ, TRZ, PMZ, CPX의 순서로 광독성이 작아지는 반면, UVB 조사에 의해서는 CPZ, PPZ, PMZ, CPX, TFZ의 순서로 반응성을 나타냈다. 이 중 TRZ은 UVB 조사에 의해 거의 광독성 반응을 나타내지 않았다 (Figs. 2, 3). MTT

assay는 MTT 시약의 환원분석을 이용해 미토콘드리아의 손상정도에 따른 세포 독성을 측정하는 것으로 화학물질의 대사에 의한 영향을 알 수 있는 방법인데, 실험에 사용한 L1210 cell 대신에 Jurkat human lymphoma cell을 사용하면, 신선한 사람임파구를 대용할 수 있는 유용한 광독성 검색이 될 것이다.²⁷⁾⁻²⁸⁾ 또한 사람의 피부 자극 대체 시험방법으로 사람유래의 섬유아세포를 사용하는 것이 *in vivo*와의 상관관계가 높다는 연구 결과가 있으므로, 광독성의 예측에 적합한 세포주를 검색해 보는 과정도 선행되어야 할 것으로 생각한다.

결 론

RBC photohemolysis에 의한 경우, UVA 조사에 의해 CPZ, PPZ, TFZ, TRZ에서 독성을 발현했으며, UVB 조사에 의해서는 CPZ, PPZ, TFZ에서 독성을 발현했다. 진균시험법에 의해서는 UVA 조사에 의해 CPZ, CPX가, UVB에 의해 CPZ, PMZ, CPX, PPZ가 *Candida albicans*에 대한 감수성이 증가하는 독성을 발현했으며, MIC를 상대 비교해보면, UVA, UVB 조사 모두에서 CPZ와 PPZ이 PMZ, CPX, TRZ, TFZ에 비해 큰 감수성을 나타냈다. MTT assay에 의한 경우, UVA 조사에 의해서는 PPZ, CPZ, TFZ, TRZ, PMZ, CPX의 순서로 광독성이 작아지는 반면, UVB 조사에 의해서는 CPZ, PPZ, PMZ, CPX, TFZ, TRZ의 순서로 반응성이 작아졌다.

각 시험약물은 시험법에 따라 약간씩 서로 다른 결과를 나타내었다. UVA와 UVB의 조사에 의해 발현된 광독성을 측정해 보았을 때, 가장 예민한 반응을 보인 시험법은 MTT assay이었으며, UVB 조사시보다는 UVA 조사시 더 많은 약물의 종류에서 광독성을 나타내었다. 이상의 결과에서 볼 수 있듯이 많은 약물들은 광독성을 측정하기 위해 가장 일반화되고 기준이 되는 시험법은 없는 실정이다. 그러므로, 여러 연구를 통한 시험법의 개발로 일반화된 광독성 측정법이 하루빨리 확립되는 것이 필요하다고 여겨진다.

감사의 말씀

본 연구는 1998년도 충남대학교 약학대학 의약

품 개발 연구소 연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Edward, S. and Rina, S. : Drug-induced photosensitivity. JAPA, 1973; 13(4): 200.
2. Furguson, H., Addo, A.A., MaGill, P.E., Wood-cock, K. R., Johnson, B.E. and Frain-Bell, W.W. : A study of benoxaprofen-induced photosensitivity. Br. J. Dermatol. 1982; 107: 429.
3. Klassen, C.C., Amdur, M.O., Doull, J. : Casarett and Doull's Toxicology. 3rd. Macmillan, 1986; 412.
4. Epstein, J.H., Wintroub, B.U. : Photosensitivity due to drugs. Drugs, 1985; 30: 42-57.
5. Harber, L.C., Baer, R.L. : Phthogenic mechanisms of drug-induced photosensitivity, J. Invest. Dermatol., 1972; 58: 327-342.
6. Johnson, B.E. : Light sensitivity associated with drugs and chemicals, The Physiology and Pathophysiology of the Skin (Jarret, A. ed), Academic Press, San diego, 1987; 2541-2606.
7. Cadenas, E. : Biochemistry of oxygen toxicity, Annu. Rev. Biochem., 1989; 58: 79-110.
8. Fitzpatric, T.B. : Trend in dermatology-ozone depletion and dematologist need we prepare for the consequences of a UVB "Holocaust" in next decades. Dermatology, Sober, A. J., Ritzpatric, T. B., 13, Mosby Year Books, St. Louis. 1990.
9. Woodcock, A. and Magnus, I. A. : The sunburn cell in mouse skin : preliminary quantitative studies on its production. Br. J. Dermatol., 1976; 95: 459-468.
10. Andrija, K., Wayne, W. and Albert, G.Jr. : Light-induced dermal toxicity : effects on the cellular and molecular level, Dermatotoxicology, 3rd edited by Frandic, N.M. and Howard, I.M., Hemisphere Publishing Co. New York., 1987; 377-412.
11. Harber, L.C. and Baer, R.L. : Pathogenic mechanism of drug-induced photosensitivity. J. Invest. Dermatol. 1972; 58(6): 327-342.
12. Emmett, E.A. : Phototoxicity from exogenous agents. Photochem. Photobiol., 1979; 30: 429-436.
13. Horio, T., M.H., A.Y. and H.M. : Phototoxicity and photoallergenicity of quinolones in quinea pigs. J. Permatological Science, 1994; 7: 130-135.
14. Kloss, M.W., Mcafree, J.L., Mandel, J., MacDonald, J.S. : An intrivo method for the assessment of drug-induced phototoxicity using the mouse ear. Toxicological

- Methods, 1992; 1(4): 252-262.
15. Ljuggren, B. and Moller, H. : Drug phototoxicity in mice. *Acta. Derm.*, 1987; 58: 125-130.
 16. Annette, J., Margot, D.O., Krysz, B., Barbara, G. and David, C.A. : Current status and future developments of databases on alternative methods. *ALTA*, 1997; 25: 411-422.
 17. Ljuggren, B. : Propionic acid derived non-steroidal antiinflammatory drugs are phototoxic *in vitro*. *Photodermatol.*, 1985; 2: 3-9.
 18. Kerr JB, Wardle DI, Ozone and UV-B Monitoring Program in Canada in Private Communication 1994.
 19. Gary, A. E. and Michele, T. S. : Photosensitized lysis of red blood cell by phototoxic antimalarial compounds. *Photochem. Photobiol.*, 1987; 46: 39-43.
 20. Hasan, T, Koohevar, I. E., McAuliffe D. J., Cooperman B.S. and Abolulah, D : Mechanism of teracycline phototoxicity. *J. Invest. Dermatol.*, 1984; 83: 179-183.
 21. Green, L.M., Reade, J.L. and Waro, O.F. : Rapid colorimetric assay for cell viability; Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods*, 1984; 70: 257-268.
 22. Lasarow, R.M., Isseroff, R.R. and Gomez, E.C. : Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity by a fibroblast-neutral red assay. *J. Invest. Dermatol.*, 1992; 98: 725-729.
 23. Edwards, S.M., Donnelly, T.A., Sayra, R.M. and Rheins, L.A. : Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity using a human skin model. *Skin, Photodermatol, Photoimmunol, Photomed.*, 1994; 10: 111-117.
 24. Kahn. G. and Fleischaker. B.: Red blood cell hemolysis by photosensitizing compounds. *J. Invest. Dermatol.* 1971; 56: 85-90.
 25. Giancarlo Lancini, Francesco Parenti, Gian Gualberto Gallo : *Antibiotics A Multidisciplinary Approach* : Plenum Press.: 1995; 16-18.
 26. Sugiyama, M., Itagaki, H. and Keto, S. : Assay to predict phototoxicity of chemicals : (II) yeast growth inhibitory assay and battery system with photohemolysis assay. *AATEX*, 1994; 2: 193-202.
 27. Sladowske, D., Steer, S., Clothier, R. and Balls, M. : Preliminary findings of an *in vitro* assay based on human complement activation for the detection of chemicals with phototoxicity potential, *ATLA*, 1993; 21: 509-512.
 28. Lee, J.K., Kim, D.B., Lee, E.H., Lee, H. and Kim, P.Y., Comparison of cultured fibroblast and HaCaT cells by Alamar Blue assay to predict skin irritation potential of surfactants. *J. Toxicol. Pub Health*, 1999; 15(2): 163-167.