

Di(2-ethylhexyl) phthalate에 의해 유도된 DNA 손상과 소핵 형성

김종원¹ · 한의식¹ · 박미선¹ · 엄미옥¹ · 김인숙¹ · 전해승¹ · 정해관¹ · 심웅섭² · 오혜영^{1*}
¹식품의약품안전청 국립독성연구소 유전독성과, ²고려대학교 생물학과

DNA Damage and Micronuclei Induced by Di (2-ethylhexyl) phthalate in Human Breast Carcinoma MCF-7 cells

Jong Won Kim¹, Eui Sik Han¹, Hai Kwan Jung¹, Mi Sun Park¹, Mi Ok Eom¹,
In Sook Kim¹, Hye Seung Jun¹, Woong Seop Sim², and Hye Young Oh^{1*}

¹Genetic Toxicology Division, National Institute of Toxicological Research, Korea Food
and Drug Administration, 5 Nokbundong, Eunpyungku, Seoul, 122-704, Korea

²Molecular Biology Laboratory, Department of Biology, Korea University, 5 Anamdong Sungbukku, Seoul, 136-701, Korea

(Received, February 9, 2001 / Accepted, March 2, 2001)

ABSTRACT : Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) is the most commonly used phthalate ester in polyvinyl chloride formulations including food packing and storage of human blood. DEHP is a well known as non-genotoxic carcinogen and endocrine disrupting chemical (EDC). DEHP have shown all negative results in ICH-guideline recommended standard genotoxicity test battery. In this study, to assess the clastogenic and DNA damaging effect in human-derived tissue specific cells, DEHP was treated in human derived MCF-7 cells, HepG2 cells, LN-Cap cells, BeWo cells, MCF-10A cells, and female peripheral blood cells using micronucleus assay and in human breast carcinoma MCF-7 cells up to 1.28×10^{-2} M using Comet assay. The *in vitro* micronucleus assay is a mutagenicity test system for the detection of chemicals which induce the formation of small membrane bound DNA fragment i.e. micronuclei in the cytoplasm of interphase cells, originated from clastogenic and/or aneugenic mechanism. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay) is used to detect DNA strand-breaks and alkaline labile site. In our results, DEHP increased significantly and/or dose-dependently and time-dependently micronucleus frequency at the 6 and 24 hr without metabolic activation system only in MCF-7 cells. DEHP treated with 2 hrs in MCF-7 cells using Comet assay induced DNA damage dose-dependently.

Keywords : micronucleus assay, single cell gel electrophoresis assay (Comet assay), Di (2-ethylhexyl) phthalate, MCF-7 cells

서 론

DEHP는 퍼록시좀 증식물질(Peroxisome proliferator), 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemical; EDC)로서, 대표적인 비유전독성 발암물질로 알려져 있다. 퍼록시좀(peroxisome)은 세포내에 존재하는 구형 또는 난형의 단일소기관으로서 그 크기는 0.3-1 μ m(mitochondria의 $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{2}$ 크기)이며, 주로 간세포에 존재하며, 간세포 1개당 1000개의 퍼록시좀이 존재한다고 한다. 퍼록시좀의 기능은 H₂O₂, H₂O, sucrose등에 대하여 투과성을 보이며, oxidase, acyl transferas, dehydrogenase, catalase 등의 다양한 효소를 가지고 있으며, 호흡, 글루코스신생합성, 지질대사, 열발생, 아미노산 대사,

퓨린 대사 등에 관여한다. 퍼록시좀 증식물질의 종류는 ciprofibrate, clofibrate, methyl clofenapate(MCP) 등의 고지혈증 치료제, di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), diethylhexyladipate 등의 석유화학공업의 가소제, 2,4,6-trichlorophenol 등의 농약, perchloro acetic acid, dehydroepiandro steron 등으로 구분되어진다. 이 물질들은 세포분열을 촉진시키고 세포사멸(apoptosis)를 감소시켜 퍼록시좀 증식을 유도하므로써, hepatomegaly를 유도하며, 지질 산화경로에서 효소 유도과 P450A family의 효소를 유도하여 지질대사를 증가시킨다. 또한 RXR과 PPAR 수용체에 결합하여 heterodimer를 형성하여 세포내 신호전달에 관여하여 간독성 및 간암을 유발한다고 알려져 있다. 그런데, 최근 연구에 의하면 이러한 퍼록시좀 증식물질 등의 비유전독성 발암물질은 세포내에서 간접적으로 DNA, 염색체, 유전체(genome)에 영향을 미

*To whom correspondence should be addressed

쳐 발암성을 나타낸다고 보고되고 있다. clofibrate, cinnamyl anthranilate, DEHP, WY-14643, trichloroethylene 등은 세포 형질전환을 야기하였으며, WY-14643, Nafenopin, ciprofibrate은 간세포에서 소핵형성을 증가시켰으며, 자매염색체분체교환이 증가하여 염색체 손상을 유발함이 보고되었다(Ashby *et al.*, 1994; Lefevre *et al.*, 1994).

발암물질은 유전독성 발현여부에 따라 유전독성 발암물질(genotoxic carcinogen)과 비유전독성 발암물질(nongenotoxic carcinogen)로 나눌 수 있다(Ashby *et al.*, 1996, 1994, 1991; Yamasaki *et al.*, 1996). 유전독성 물질은 그 유해성을 유전독성시험법을 이용하여 쉽게 검색할 수 있어(ICH, 1995, 1997; OECD guideline; 유전독성과, 1999) 그 유해성을 예측하여, 사용을 규제하거나 독성을 경감시킬 수 있는 방법을 모색할 수 있다(Oh *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Han *et al.*, 1999). 그러나 비유전독성 발암물질은 유전독성시험법에서 발견이 되지 않아 그 위해성을 예측하기가 쉽지 않다. 유전독성 발암물질은 유전물질과 반응하거나 또는 직접 변화를 시키는 물질로서 유전독성 발암물질에 의해 유도되는 발암기전이 많이 밝혀져 있다. 그러나 비유전독성 발암물질은 유전물질과 반응하거나 또는 직접 변화시키지 않고 간접적으로 암을 유발할 수 있다(Roy *et al.*, 1999). 암은 유전적 변이의 축적으로 야기되며, 많은 비유전독성 발암물질이 간접적으로 유전독성(genotoxic event)을 나타내는 기작은 거의 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 ICH 가이드라인에서 제시하는 표준 유전독성 시험법인 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험, 염색체이상 시험, 마우스 림포마 tk⁺ 유전자 돌연변이시험, 생체내 소핵시험에서 검색이 안된 DEHP를 모델화합물로 선정하여 DNA 손상과 소핵형성을 지표로 하는 단세포전기영동시험법과 생체의 소핵시험을 이용하여 비유전독성 발암물질을 확인할 수 있는 방법을 연구하여, 암유발, 유전성 질환, 기형발생 등의 가능성을 사전에 예측하고자 하며, 비유전독성 발암물질의 세포내 작용기전 연구를 위한 기초자료로서 사용하고 자 한다.

재료 및 방법

실험재료

DEHP (di-ethylhexyl phthalate, CAS no. 117-81-7), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), cytochalasin-B는 Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA)에서, Eagle's minimal essential medium (EMEM), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), F12K modification Kaighn's medium, RPMI 1640 medium와

Fetal Bovine Serum (FBS), Donor Calf serum (DCS), 은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다.

세포주 및 세포배양

포유동물 세포는 Chinese hamster lung fibroblast (CHL) 세포로 일본 의약품식품위생연구소의 Sofuni 박사로부터 분양받아 사용하였다. Modal chromosome number는 25이며, 세포주기는 15시간이다(Ishidate *et al.*, 1977; Koyama *et al.*, 1970). 배양액은 10% FBS와 1%의 penicillin-streptomycin을 포함한 EMEM을 사용하였다. 배양된 세포는 2~3일 마다 0.25% trypsin-EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다.

사람 유래 세포로서 human breast carcinoma, estrogen receptor positive MCF-7 cells, hepatoblastoma HepG2, 전립선 암세포인 LNCap, 태반유래 세포인 BeWo세포를 이용하여 생명공학연구소 생물활성평가연구실로부터 분양받았다. MCF-7 cells과 HepG2 cells의 배양액은 10% FBS와 1%의 penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM을 사용하였으며, LNCap은 RPMI 1640 medium을, BeWo세포는 F12K modification Kaighn's medium 85%와 15% FBS를 사용하였다. MCF-10A 세포는 DMEM/F12, 10 µg/ml insulin (bovine), 100 ng/ml cholera toxin, 0.5 µg/ml hydrocortison, 20 ng/ml fungizone, 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml penicillin/streptomycin mixture, 5% horse serum이 함유된 배지를 사용하였다. 3~4일마다 계대배양하였으며 자연발생적인 돌연변이의 생성을 최소화하고자 구입후부터 10번 미만으로 계대배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 포화 습도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 Dual CO₂ incubator (Shel-lab 1845 TC, U.S.A)에서 배양하였다.

대사활성화계

In vitro 대사활성화를 위하여 체중 200 g 정도의 Sprague Dawley male rat에 Aroclor 1254를 복강내 투여하여 효소를 유도시킨 간으로부터 S9 분획을 제조하고 사용시까지 -70°C에 보관하였다(Maron and Ames, 1983).

S9 mix는 각 시험개시 직전에 조제하여 사용하였고, 그 조성은 다음과 같다.

	용량	최종농도
Distilled water	2.35 ml	
0.1M Phosphate buffer(pH7,4)	0.20 ml	4 mM
0.1M NADP	0.20 ml	4 mM
0.1M Glucose-6-phosphate	0.25 ml	5 mM
330mM MgCl ₂ /50mM KCl salt solution	0.50 ml	33/5 mM
S9	1.50 ml	30%
	5.00 ml	

시험물질의 처리

CHL 세포에서는 염색체이상시험 결과와의 비교를 위하여 직접법의 경우 6, 24시간 처리하였으며, 대사활성법의 경우에는 6시간 처리하였다. 사람 유래의 세포의 경우에는 직접법에서만 6, 24시간 처리하였다. 시험물질 처리후 24시간째에 표본 슬라이드를 제작하였다.

농도설정을 위한 세포독성시험

Mitochondrial dehydrogenase의 활성지수를 나타내는 MTT 비색환원분석법을 수행하였다. Mossman(Mossman, 1983)의 방법을 변형하여 96 well plate에 각 well(n=4)당 50,000개의 세포를 24시간동안 37°C, 5% CO₂ 조건하의 incubator에서 배양한 후 시험조건과 동일하게 처리하였다. 각 well당 10 µl의 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 4시간동안 노출시켰다. 상층액을 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO) 150 µl를 넣은 다음 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨후 microplate reader (E-max, Molecular Device, U.S.A.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 생존율로 변환하였다. 또한 hemocytometer를 이용한 trypan blue exclusion assay도 수행하였다.

생체의 소핵시험

최고용해도를 기준으로 하여 예비시험의 최고농도를 결정하였으며, 공비 10를 적용하였다. 또한, 용매대조군으로 DMSO 처리군과 기지의 양성대조군을 각각 처리하여 시험하였다. CHL 세포의 경우 직접법 및 대사활성법을, MCF-7, HepG2, LNCap, BeWo, MCF-10A 세포에서는 직접법만을 수행하였다. 직접법은 CHL 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 1×10⁵/ml 되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성대조물질 등을 함유하는 배양액으로 교환하여 24시간 배양하였다. 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 모은 후 4°C의 저장액(0.075 M KCl) 4 ml에 현탁 시킨 다음 바로 원심분리하였다. 고정액(methanol : glacial acetic acid = 3:1)으로 2회 고정시킨 후 50% 질산 전처리하여 냉장보관된 슬라이드에 세포침전액을 떨어뜨려 염색체 표본을 만들고, 공기 건조법으로 슬라이드를 제작하여, 5% Giemsa로 30분간 또는 Acridine orange를 이용하여 염색한 후 광학현미경 또는 형광현미경(×400~×1000)으로 관찰하였다. 대사활성 존재하의 시험은 CHL 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 1×10⁵/ml 되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 S-9 mix (배양액의 20% 비율)와 시험물질 또는 양성

대조물질이 포함된 배양액으로 6시간 배양한 후, 보통의 배양액으로 교환하여 18시간 더 배양하였다. 세포의 수거, 표본을 제작하였다. 양성대조군으로는 각 변이원 물질의 특성에 따라 직접법에서는 MMC 0.1 µg/ml을, 대사활성법에서는 B(a)P 20 µg/ml을 사용하였다.

한 시험 농도당 1000개의 세포를 광학현미경(Karl Zeiss, ×400~×1000) 또는 형광현미경(Nikon, ×400~×1000)하에서 판독하여 small MN, large MN, multi MN으로 구분하여 관찰하였다(Kim *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 1999). 소핵을 하나 가지는 세포는 소핵의 직경 < 1/3이면 small MN으로, 1/3 < MN의 직경 < 1/2이면 large MN으로 구분하였으며, 소핵을 두 개 이상 가지는 세포는 multi MN으로 구분하였다. 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.

세포질분열억제소핵시험

가. 혈액배양

젊고 건강한 여성 자원자(A:26세, B:26세, C:26세, D:25세; 4명)의 말초혈액 림프구를 이용하였다. 전완부 정맥에서 채혈한 혈액을 헤파린이 처리된 진공튜브에 담아 신속하게, 실험실로 옮겨, 세포배양액이 들어있는 원심분리관에 혈액 0.5 ml을 주입하여 잘 섞이도록 혼합한 후 37°C에서 배양하였다. 이때 사용된 세포배양액은 RPMI 1640 배지 10% 소태아혈청, 2% phytohemagglutinin, 1% penicillin-streptomycin(10,000 unit/ml, 10,000 µg)을 각각 첨가하여 전부 5 ml이 되도록 혼합 제조하였다.

나. 표본 슬라이드 제작

37°C 배양기에서 잘 현탁할 수 있도록 교반하면서 72시간 배양하였다. 혈액배양 시작시 시험물질을 0.5% 되도록 처리하였다. 배양종료 후 혈액세포들을 2000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 cold 0.075 M KCl 용액을 첨가한 후, 고정액(methanol : glacial acetic acid = 3:1) 1 ml로 예비고정한 후, 원심분리하고 고정, 원심분리과정을 3회 반복하였다. 적정 양의 세포 현탁액을 질산처리된 깨끗한 냉장 슬라이드 위에 2~3 방울 떨어뜨려 핵 표본을 제작하고, 공기 건조시켰다.

다. 세포질분열억제소핵시험

혈액배양 시작시 시험물질을 0.5% 되도록 처리하였다. 37°C 배양기에서 잘 현탁할 수 있도록 교반하면서 44시간 배양한 후 cytochalasin-B(final conc. 6 µg/ml)를 첨가하였다. 28시간 더 배양하여 72시간째 혈액세포들을 800 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상등액을 조심스레 적당량 제거하고 냉장보관된 0.075M KCl 용액을 첨가하고 800 rpm으로

5분간 원심분리한 후, 고정액(methanol:glacial acetic acid = 3:1)으로 3회 부드럽게 고정시키며, 600 rpm에서 5분간 원심분리시켰다. 처음 고정시에만 100 µl의 formaldehyde를 가해주었으며, 적정 양의 세포 현탁액을 질산처리된 깨끗한 냉장 슬라이드 위에 2~3 방울 떨어뜨려 소핵 표본 슬라이드 제작하였다. 슬라이드 건조 후 5% 김사용액에 20분간 염색하고 400배율에서 1,000개의 두핵을 가진 림프구 세포 중 소핵을 계수하였다(Tawn and Holdworth, 1992). 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.

단세포전기영동시험

가. 화학물질의 처리

Singh의 방법(Singh *et al.*, 1988)에 따랐다. Eppendorf tube에 MCF-7 세포를 포함한 배지를 넣고 2시간 처리한 후 일정시간 동안 5% CO₂를 공급하는 37°C의 Dual CO₂ incubator(Shel-lab 1845 TC, U.S.A)에서 배양하였다. 배양 후에는 DNA 회복을 차단하기 위해서 4°C를 유지하였다. 인산완충용액으로 화학물질이 처리된 세포를 3회 세척한 후 원심분리하여 상층액을 10 µl만 남기고 제거하고 이후 단세포 전기영동시험에 사용하였다.

나. 슬라이드 준비

Frosted slide에 0.6% agarose 130 µl를 처리 후 24×50 mm coverslip으로 덮고 4°C에서 10분 정도 방치하여 굳힌 다음 coverslip을 제거하였다. 화학물질이 처리된 세포를 0.5% low melting agarose 75 µl와 혼합하고 이를 슬라이드에 적정후 coverslip으로 덮어준 후 4°C에서 10분간 굳힌 다음 coverslip을 제거하였다. 이후 0.5% low melting agarose 110 µl를 이 위에 처리하여 굳힌 다음 차가운 lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA), 10mM Tis base,

1% N-laury sarcosinat, 1% Triton X-100, pH 10)에 담겨 4°C에서 1시간 용해시켰다.

다. 전기영동

Electrophoretic buffer(300mM NaOH, 0.1% 8-hydroxyquinoline, 2% dimethyl sulfoxide, 10 mM Na₂EDTA, pH12.3)을 이용하여 25분간 22 V, 300 mA에서 전기영동을 시행하였다. 이상 모든 과정은 추가적인 DNA 손상을 막기 위해 암실에서 수행하였다. 고알칼리 상태를 중화시키기 위해 Tris buffer(0.4M Tris, pH 7.4)로 5분간 3회 세척하고, DNA가 슬라이드에 침착될 수 있도록 에탄올을 적어도 1시간 이상 처리하였다.

라. 염색 및 관찰

슬라이드를 건조시킨 후 ethidium bromide(20 µl/ml)로 형광염색하였다. 형광현미경(NIKON Biophot II)을 이미지 분석 프로그램(Komet 3.1)을 통해 농도 당 50개의 세포를 선택하여 DNA 손상정도를 tail moment값으로 분석하였다.

마. 통계분석

통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나

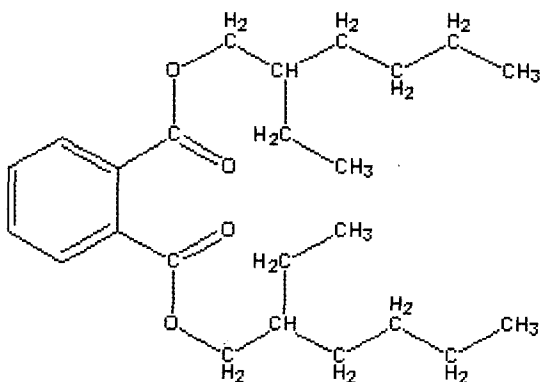


Fig. 1. Chemical structure of DEHP.

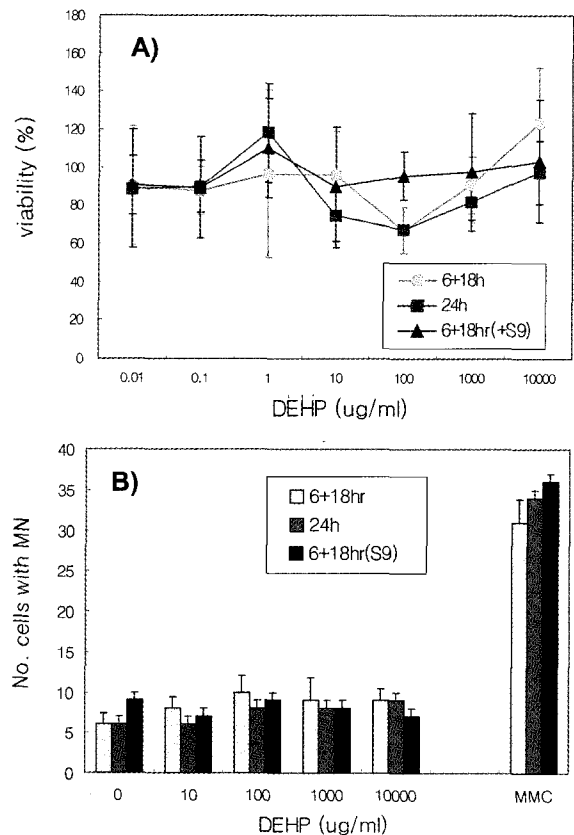


Fig. 2. Cytotoxicity (A) and micronucleus formation (B) of DEHP in Chinese hamster lung fibroblast (CHL) cells.

하나 이상의 용량단계에서 재현성 있게 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 하였다.

결 과

세포독성

DEHP는 DMSO를 용매로 하였으며, 10 mg/ml을 최고농도로 하여 공비 10으로 하여 세포독성시험을 실시하였다. CHL 세포에서의 DEHP의 세포독성시험 결과 0.01-10000 µg/ml까지의 전 농도에서 IC₅₀을 보이지 않아 본시험에서의 최고농도는 10000 µg/ml부터 공비 10으로 하여 소핵시험을 진행하였다(Fig. 2A). MCF-7 세포에서의 DEHP의 세포독성시험 결과 0.1-10000 µg/ml까지의 전 농도에서 보이지 않았다(Fig. 3A). HepG2, LN-Cap, BeWo 세포에서의 각각의 세포독성 시험의 결과도 0.01-10000 µg/ml까지의 전 농도에서 IC₅₀을 보이지 않아 본 시험에서의 최고농도는 10000 µg/ml부터 공비 10으로 하여 소핵시험을 진행하였다(각각 Fig. 4A, Fig. 5A, Fig. 6A).

생체의 소핵시험

DEHP는 CHL세포에서 직접법에서 6시간 및 24시간 처리

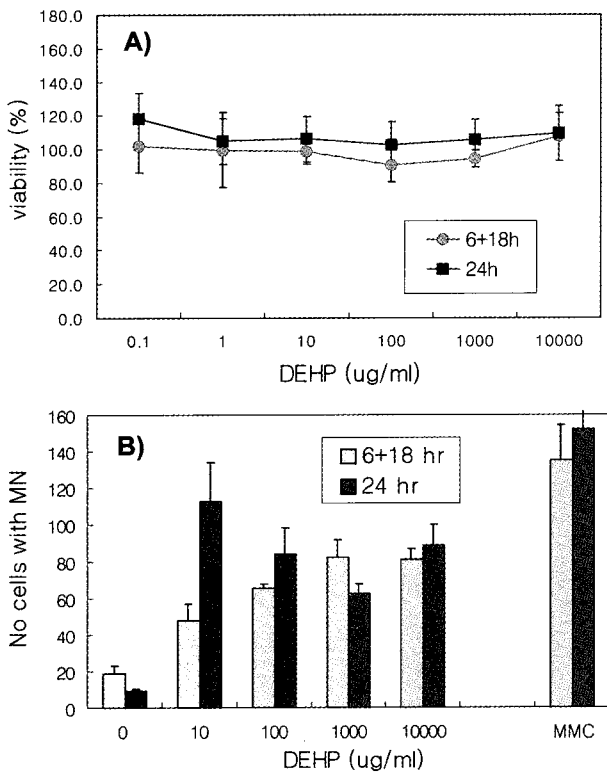


Fig. 3. Cytotoxicity (A) and micronucleus formation (B) of DEHP in human breast carcinoma MCF-7 cells.

모두에서, 그리고 대사활성법 6시간 처리조건에서 모두 음성의 결과를 보였으며(Fig. 2B)), MCF-7 세포에서의 생체의 소핵시험 결과, DEHP는 음성대조군에 비해, 10, 100, 1000, 10000 µg/ml의 모든 농도의 6시간 및 24시간 처리 조건에서 재현성있는 증가를 보였다(p<0.05) (Fig. 3B). HepG2, LN-Cap, BeWo 세포의 소핵형성은 음성대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타내지 않았다(각각 Fig. 4B, Fig. 5B, Fig. 6B). 또한 에스트로젠 수용체 음성인 MCF-10A 세포를 이용한 소핵시험에서 DEHP는 50 µg/ml 한 농도에서 유의성있고, 재현성있는 증가를 나타내었지만 (p<0.05), 에스트로젠 수용체 양성인 MCF-7 세포를 이용한 소핵시험에서의 증가에 비해서 낮은 소핵형성의 증가를 보였다(Fig. 8).

세포질분열억제소핵시험

Donor 1의 여성 말초혈액을 이용한 세포질분열억제 소핵 시험에서 DEHP는 5, 50 µg/ml에서 유의성있는 증가를, donor 2의 여성 말초혈액을 이용한 소핵시험에서 50 µg/ml

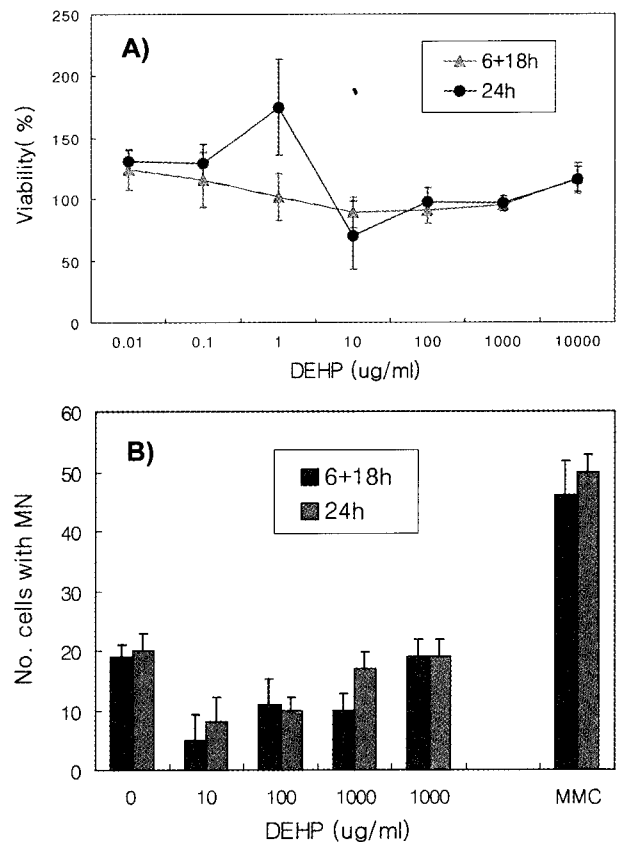


Fig. 4. Cytotoxicity (A) and micronucleus formation (B) of DEHP in human hepatoblastoma HepG2 cells.

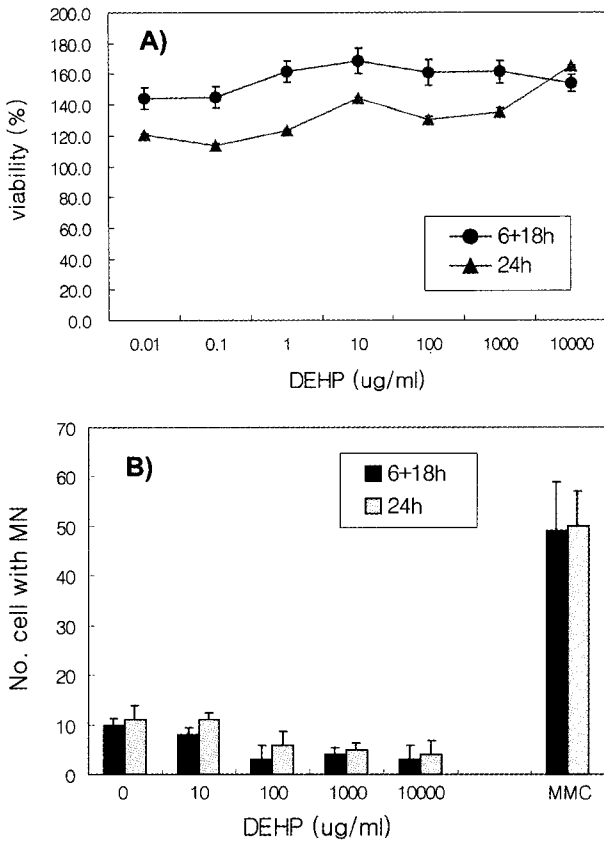


Fig. 5. Cytotoxicity (A) and micronucleus formation (B) of DEHP in human prostate cancer LN-Cap cells.

에서 유의성있는 증가를 나타내었다($p < 0.05$). 그러나, donor 3과 donor 4의 여성 말초혈액 림프구를 이용한 소핵시험에서는 유의성 있는 증가를 나타내지 않았다(Fig. 7).

단세포전기영동시험

DEHP는 MCF-7세포에 2시간 노출되었을 때, DMSO의 tail moment는 3.80 ± 3.11 , 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M을 각각 처리하였을 때 tail moment는 각각 16.32 ± 7.38 , 18.25 ± 5.46 , 12.00 ± 4.27 을 보였다. 양성대조물질로 사용한 H_2O_2 를 5×10^{-5} M로 처리하였을 때 19.83 ± 9.05 을 보여 실험이 적절히 수행되었음을 보여주었다. (Fig. 9)

고 찰

DHEP는 수혈세트나 일회용주사기 등 염화비닐수지(PVC)로 만든 일부 의료기기에서 녹아나오는 발암가능성이 있는 물질로서 세계보건기구 (WHO) 산하 국제암연구기관 (IARC) 워킹그룹은 1987년에 사람에게 발암가능성이 있는

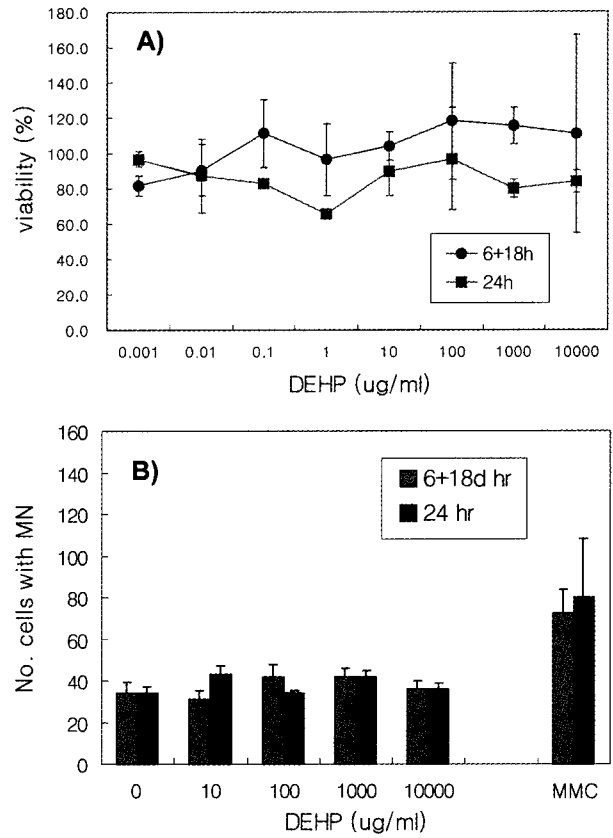


Fig. 6. Cytotoxicity (A) and micronucleus formation (B) of DEHP in human choriocarcinoma BeWo cells.

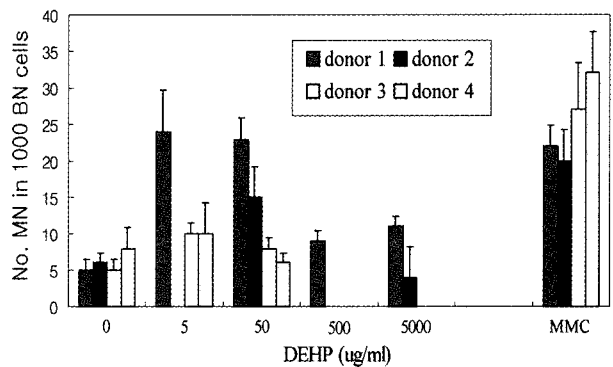


Fig. 7. In vitro CBMN in human peripheral blood lymphocytes (female, N=4).

물질인 2B group(동물에 대한 발암성 증거는 있으나, 인간에 대한 발암성 증거 없는 물질)으로 지정하였다. DEHP는 ICH 가이드라인에서 제시하는 표준 유전독성시험법인 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험(Yoshikawa et al., 1983; Kirby et al., 1983; Zeiger et al., 1985; Agarwal et al., 1985; DiVincenzo et al., 1985; Melnick et al., 1987;

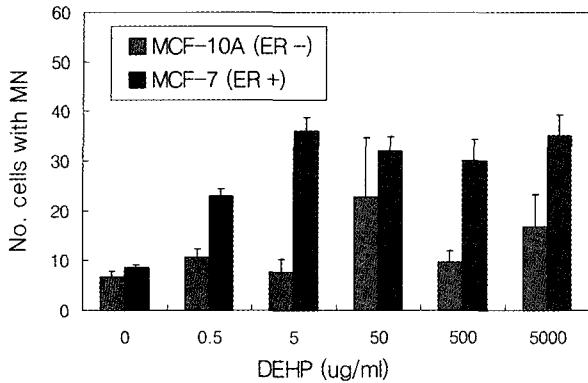


Fig. 8. Micronucleus assay of bisphenol A in human breast estrogen receptor negative MCF-10A and positive MCF-7 cells.

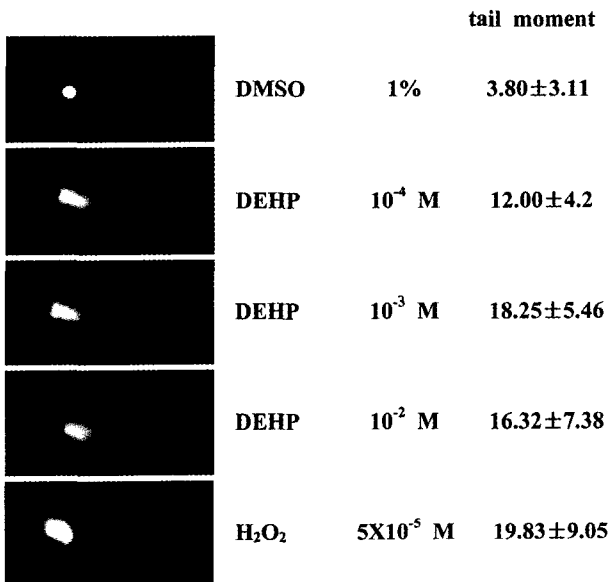


Fig. 9. Photograph and tail moment of DEHP-induced DNA damage for 2 hrs in human breast carcinoma MCF-7 cells.

Schmezer *et al.*, 1988), 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상시험(Kirby *et al.*, 1983; Douglas *et al.*, 1986), 마우스 리포마 tk⁺ 유전자 돌연변이시험(Kirby *et al.*, 1983; Myhr *et al.*, 1985; DiVincenzo *et al.*, 1985), 생체내 소핵시험(Douglas *et al.*, 1986)에서 모두 음성을 나타내었다. DEHP는 그 외에도 OECD 가이드라인에서 제시하는 시험법 및 새롭게 개발되어진 시험법들을 이용한 유전독성 연구가 진행되어졌는데, CHO, V79 세포를 이용한 유전자 돌연변이시험(Tomita *et al.*, 1982; Douglas *et al.*, 1986), CHO 세포를 이용한 자매염색분체교환시험(Douglas *et al.*, 1986; Melnick *et al.*, 1987), 초파리를 이용한 돌연변이시험(Kawai *et al.*, 1998), primary rat hepatocyte를 이용한 생

체외 소핵시험(Müller-Tegethoff *et al.*, 1995)에서 모두 음성의 결과를 나타내었다.

생체의 소핵시험은 염색체구조이상물질(clastogen)과 non-disjunction 등의 수적이상물질(aneugen)을 염색체 및 유전체(genome) 수준에서 검색할 수 있는 간단하면서도 경제적인 시험법이다(Fenech *et al.*, 1985; Matsushima *et al.*, 1999; Kirch-Volders *et al.*, 1997; Müller-Tegethoff *et al.*, 1995; Marzin, 1997). 생체의 소핵시험은 사람 말초혈액, 사람 유래 및 동물 유래 세포주 등 배양가능한 모든 세포에 적용할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 염색체 centromere probe를 이용하여 이수성 기전을 연구할 수 있는 장점을 가지고 있다(Migliore *et al.*, 1999). 생체의 소핵시험은 cytochalasin B에 의한 세포질 분열만 선택적으로 억제할 수 있는 세포질 분열억제소핵시험과 일반 생체의 소핵시험으로 구분할 수 있다. 세포질분열억제소핵시험은 세포질 분열은 억제되고 핵분열을 진행되어 한 세포질안에 두 핵이 존재, 1000개의 두 핵 세포중에서 소핵을 포함한 두 핵 세포수로 나타낸다. 이에 반하여 기존의 염색체이상시험은 증기상에서의 구조적 이상과 수적이상을 검색할 수 있는 시험법으로서, 염색체 증기상 형성을 못하게 하는 물질의 경우 정확한 염색체 손상성을 반영하지 못하는 단점을 지니고 있으며, 수적이상 중 배수성의 검색은 가능하나 확립된 세포주의 경우 일정한 형을 갖지 못하고, modal chromosome number를 갖는 자체적인 한계 때문에 이수성을 검출하지 못하는 단점을 내포하고 있다.

CHL 세포는 Chinese hamster lung fibroblast 세포로서 Modal chromosome number는 25이며, 세포주기는 15시간이다(Ishidate *et al.*, 1977). 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험에서 Chinese hamster ovary(CHO) cell, 사람 말초혈액 림프구와 더불어 전세계적으로 가장 많이 사용되어지고 있는 세포주이다. CHL 세포에서 염색체이상시험과 소핵시험의 다른 endpoints를 비교, 검색하고자 하였다. MCF-7 세포는 사람 유방 유래의 세포로서, estrogen receptor(ER)를 가지고 있는 것으로 알려져 있어서, 내분비계 장애물질을 검색할 수 있는 E-screen assay(Soto *et al.*, 1995), glucose-6-phosphate dehydrogenase assay 등에 적용되고 있다. MCF-10A 세포 또한 사람 유방 유래의 세포인데, estrogen receptor를 가지지 않는 것으로 알려져 있다. estrogen receptor와 소핵형성과의 관련성을 보기 위해 사용하였다. HepG2 cells은 48-54 염색체 범위를 가지며, modal chromosome number는 52인 이수성 핵형을 갖는다. 이 세포는 ER이 없는 것으로 알려져 있는데, 내분비계 장애물질 연구와 관련하여 human estrogen receptor를 transfection시켜 ER에 의한 기능 연구에 사용되어지고 있다.

HepG2세포를 이용한 유전독성시험으로서는, 단일 가닥 절단 발견, 부정기 DNA 합성, 자매염색분체교환, 생체의 소핵시험, 6-TGr 유전자 돌연변이시험 등이 수행되어지고 있으며, 한 세포주에서 다양한 지표를 적용하여 화학물질의 유해성을 정확히 평가하기에 적합하여 유전독성 다지표 평가(genotoxicity multi-endpoint assessment)에 사용되어지고 있다. 또한 HepG2 세포의 유용성은 다양한 유전독성 연구와 더불어 유전자 발현과 전사 등을 기전연구를 병행할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 사람 간 유래의 세포로서 대사활성능을 가지고 있기 때문에 설치류의 S9 등을 이용하는 대사활성법을 대체할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 많은 화학물질에서의 validation이 되어있어 신뢰성이 높고, 사람으로의 외삽이 보다 더 정확하다. 또한 비유전독성 발암물질은 조직특이성을 띄고 있어 간 특이적인 돌연변이물질 및 간 발암물질을 검색하기에 유용하다(Migliore *et al.*, 1997). 또한 사람 유래의 세포들 중 에서 조직특이성을 보기 위하여 위 두 세포와 전립선, 자궁 유래의 세포인 LNCap, BeWo 세포를 이용하였다.

본 연구에서는 비유전독성 발암물질의 공통적인 성질인 조직특이성, 종특이성, 성특이성을 살펴보기 위하여 첫째, ICH 추천 표준유전독성시험법 중 염색체이상시험에 사용되어지고 있는 세포주인 CHL 세포를 이용하여 설치류와 사람과의 종특이성을 살펴보고자 하였다. 둘째, 사람 유래 지방세포, 간세포, 전립선세포, 태반세포들을 이용하여 조직특이성을 살펴보고자 하였으며, 셋째, 여성 말초혈액을 이용한 세포질분열억제소핵시험을 통하여 성특이성을 살펴보고자 하였다. 넷째, 소핵형성과 에스트로젠 수용체와의 상관성을 밝히고자 하였으며, 다섯째, 특이적으로 소핵형성능을 보인 MCF-7 세포에서 DEHP의 DNA 손상성을 연구하기 위하여 단세포전기영동시험을 적용하였다.

본 연구결과에서 DEHP는 CHL, HepG2, LNCap, BeWo 세포에서는 음성을 보인 반면에 MCF-7세포에서는 시간, 농도의존적으로 소핵형성을 증가시켰다. 이 결과는 생체내 소핵시험(Douglas *et al.*, 1986) 뿐만 아니라 primary rat hepatocyte를 이용한 생체의 소핵시험(Müller-Tegethoff *et al.*, 1995)에서 모두 음성을 보였던 결과와 상반된 결과인데, 골수세포나 간세포에서는 소핵형성을 갖지 못하지만, 조직특이적으로 지방세포에서는 소핵형성능을 보였다.

4명의 여성 자원의 말초혈액 림프구를 이용한 세포질분열억제시험에서는 DEHP는 음성 또는 약한 양성을 보여 상반된 결과를 보여주고 있다. 이는 여성의 생리주기, 영양상태 등의 confounding factor가 고려되었던 후속 실험이 이루어져야 할 것으로 생각되어졌다.

또한 에스트로젠 수용체와 소핵형성능과의 관련성을 연구

하기 위하여 수용체 양성세포인 MCF-7세포와 음성세포인 MCF-10A에서의 소핵형성능을 비교하였는데, DEHP는 ER 양성인 MCF-7 세포에서 유의성있는 소핵형성을 증가시켰다. 이는 에스트로젠 수용체 발현여부 및 정도의 차이에 기인한 것으로 사료된다. 소핵형성기전과 내분비계 장애물질의 작용기전과의 상관성 규명을 위한 계속적인 연구가 진행되어야 한다고 사료된다.

DNA 손상성을 평가하기 위하여 MCF-7세포를 이용한 단세포전기영동시험을 진행하였는데, 본 연구결과에서 양성을 나타내었다. 이는 랫드와 사람 간세포에서의 alkaline elution 방법에서 음성의 결과를 보였던 보고(Butterworth *et al.*, 1984)와 상반되며, 사람 말초혈액을 이용한 단세포전기영동시험에서 양성의 결과를 보였다는 보고(Anderson *et al.*, 1999)와 일치하는 점이 있다.

EPA (미국 환경보호청)에서 제시하는 carcinogen risk assesment(1996)에 기초한 DEHP의 발암 위험도 평가(Doull *et al.*, 1999)에서, 이수성, 세포형질전환, 재조합, 생식세포 우성치사 등은 비유전독성 발암물질의 공통적인 성질로서 설명하고 있다. 비유전독성 발암물질의 작용특성을 이해하며, 작용양식에 기초하여 기전연구를 수행하기 위하여 이수성, 세포형질전환 등에 대한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

1. DEHP는 HepG2 세포, LNCap세포, Bewo세포, CHL 세포를 이용한 생체의 소핵시험에서 음성의 결과를 나타내었지만, MCF-7 세포에서는 소핵을 유발하였다.
2. DEHP는 사람 말초혈액 림프구를 이용한 세포질분열억제 소핵시험에서 유의성있는 재현성을 보이지 않았다.
3. DEHP는 단세포전기영동시험법에서 양성의 결과를 보였다.
4. DEHP는 에스트로젠 수용체 양성인 MCF-7 세포에서 유의성있게 소핵형성을 증가시켰다. 에스트로젠 수용체 음성인 MCF-10A에서 한 농도에서 재현성있는 양성의 결과를 나타내었다.

본 연구에서 DEHP는 에스트로젠 수용체 양성인 사람 유래 MCF-7 세포에서 특이적으로 DNA 손상과 소핵형성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구소 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Agarwal, D.K., Lawrence, W.H., Nunez, L.J. and Autian, J. (1985): Mutagenicity evaluation of phthalic acid esters and metabolites in *Salmonella typhimurium* cultures, *J. Toxicol. Environ. Health*, **16**: 61-9.
- Andersen, H.R., Andersson, A.M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E.B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Sumpter, J.P., Thorpe, S.M. and Grandjean, P. (1999): Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals, *Environ. Health Perspect.*, **107**(Suppl 1): 89-108.
- Anderson, D., Yu, T.W. and Hincal, F. (1999): Effect of some phthalate esters in human cells in the comet assay, *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **19**: 275-80.
- Ashby, J. and Morrod, R.S. (1991): Detection of human carcinogens, *Nature*, **352**: 185-6.
- Ashby, J., Brady, A., Elcombe, R., Elliott, B.M., Ishmael, J., Odum, J., Tugwood, J.D., Kettle, S. and Purchase, I.F.H. (1994): Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis, *Human & Experimental Toxicology*, **13**(sup.2): S1-S117.
- Ashby, J., Water, M.D., Preston, J., Adler, I.D., Gouglas, G.R., Fielder, R., Shelby, M.D., Anderson, D., Sofuni, T., Gopalan, H.N.B., Becking, G. and Sonich-Mullin, C. (1996): IPCS harmonization of methods for the prediction and quantification of human carcinogenic/mutagenic hazard, and for indicating the probable mechanism of action of carcinogens, *Mutat. Res.*, **352**: 153-157.
- Butterworth BE, Bermudez E, Smith-Oliver T, Earle L, Cattley R, Martin J, Popp JA, Strom S, Jirtle R, Michalopoulos G (1984): Lack of genotoxic activity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rat and human hepatocytes, *Carcinogenesis*, **5**: 1329-35.
- DiVincenzo, G.D., Hamilton, M.L., Mueller, K.R., Donish, W.H. and Barber, E.D. (1985): Bacterial mutagenicity testing of urine from rats dosed with 2-ethylhexanol derived plasticizers, *Toxicology*, **34**, 247-59.
- Douglas, G.R., Hugenholz, A.P. and Blakey, D.H. (1986): Genetic toxicology of phthalate esters: mutagenic and other genotoxic effects, *Environ. Health Perspect.*, **65**: 255-62.
- Doull, J., Cattley, R., Elcombe, C., Lake, B.G., Swenberg, J., Wilkinson, C. Williams, G. and van Gemert, M. (1999): A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl) phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **29**: 327-57.
- Fenech, M. and Morley, A.A. (1985): Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutat. Res.*, **147**: 29-36.
- Han, E.S., Kim, J.W., Park, C.H., Eom, M.O., Kang, I.H., Kang, H.J., Ha, K.W. and Oh, H.Y. (1999): Anti-genotoxicity Study of *Ecklonia stolonifera*, Edible Brown Algae, in *in vitro* Mouse Lymphoma tk⁺ Assay in L5178Y 3.7.2C cells and *in vivo* Micronucleus Assay in ddY Mice Bone Marrow Cells: Autumn meeting of Korean Association of Cancer Prevention, Seoul, Korea.
- ICH, Topic S2A, Genotoxicity: Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals, international conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, harmonised tripartite guideline CPMP /ICH/141/95, Approved September 1995 <http://www.ifpma.org>
- ICH, Topics S2B, Genotoxicity: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals, international conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Step 4 Document, July 1997, <http://www.ifpma.org>
- Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977): Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - a screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, **48**: 337-53.
- Kawai, K. (1998): Enhancement of the DNA damaging activity of N-nitrosodimethylamine by di(2-ethylhexyl) phthalate in somatic cells in *vivo* of *Drosophila melanogaster*, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**: 579-82.
- Kim, J.W., Han, E.S., Park, M.S., Eom, M.O., Kim, I.S., Jun, H.S., Jung, H.K., Sim, W.S. and Oh, H.Y. (2000): Bisphenol A-induced micronuclei formation in various cell lines with human origin, *Environmental Mutagen & Carcinogen*, **20**: 112-121.
- Kim, J.W., Park, C.H., Kim, I.S., Han, E.S., Sohn, S.J., Ha, K.W. and Oh, H.Y. (1999): Anti-clastogenicity Study of Ellagic Acid - *in vitro* chromosome aberration and micronucleus assay in Chinese Hamster Lung Fibroblast cells and *in vivo* micronucleus assay in Bone Marrow cells of ddY mice, Autumn meeting of Korean Association of Cancer Prevention, Seoul, Korea.
- Kirby, P.E., Pizzarello, R.F., Lawlor, T.E., Haworth, S.R. and Hodgson, J.R. (1983): Evaluation of di(2-ethylhexyl) phthalate and its major metabolites in the Ames test and L5178Y mouse lymphoma mutagenicity assay, *Environ. Mutagen.*, **5**: 657-63.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A. and Cundari, E. and Van Hummelen, P. (1997): The *in vitro* micronucleus test : a multipoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, *Mutat. Res.*, **392**: 19-30.
- Knasmiller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsh, G., Langer, T., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1998): Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens, *Mutat. Res.*, **402**: 185-202.
- Koyama, H., Utakoji, T., and Ono, T. (1970): A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue, *Gann*, **61**: 161-7.
- Lefevre, P.A., Tinwell, H., Galloway, S.M., Hill, R., Mackay, J.M., Elcombe, G.R., Foster, J., Randall, V., Callander, R.D. and Ashby, J. (1994): Evaluation of the genetic toxicity of the peroxisome proliferator and carcinogen methyl clofenapate, including assays using MutaTM Mouse and Big BlueTM trans-

- genic mice, *Human & Experimental Toxicology*, **13**: 764-775.
- Maron, D.M., and Ames, B.N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**: 173-215.
- Marzin, D. (1997): The position of the in vitro micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guideline, *Mutat. Res.*, **392**: 175-181.
- Matsuoka, A., Matsuura, K., Sakamoto, H., Hayashi, M. and Sofuni, T. (1999): A proposal for a simple way to distinguish aneugens from clastogens in the in vitro micronucleus test, *Mutagenesis*, **14**: 385-9.
- Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999): Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, **14**: 569-80.
- Melnick, R.L., Morrissey, R.E. and Tomaszewski, K.E. (1987): Studies by the National Toxicology Program on di(2-ethylhexyl) phthalate, *Toxicol. Ind. Health*, **3**: 99-118.
- Migliore, L., Botto, N., Scarpato, R., Petrozzi, L., Cipriani, G. and Bonuccelli, U. (1999): Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients, *Cytogenet. Cell Genet.*, **87**: 41-46.
- Migliore, L., Testa, A., Scarpato, R., Pavese, N., Petrozzi, L. and Bonuccelli, U. (1997): Spontaneous and induced aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease, *Hum. Genet.*, **101**: 299-305.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**: 55-63.
- Muller-Tegethoff, K., Kasper, P. and Muller, L. (1995): Evaluation studies on the in vitro rat hepatocyte micronucleus assay, *Mutat. Res.*, **335**: 293-307.
- Myhr, B., Bower, L., and Caspary, W. (1985): Assays for the induction of gene mutations at the thymine kinase locus in L1578Y mouse lymphoma cells in culture, *Prog. Mutat. Res.*, **5**: 555-568.
- Müller-Tegethoff, K., Kersten, B., Kasper, P. and Müller, M. (1997): Application of the in vitro rat hepatocyte micronucleus assay in genetic toxicology testing, *Mutat. Res.*, **392**: 125-138.
- OECD guideline, Genetic toxicology, TG no 471-478, <http://www.oecd.org/ehs/test/health.htm>.
- Oh, H.Y., Han, E.S., Kim, J.W., Eom, M.O., Lee, J.H., Choi, J.S. and Ha, K.W. (1999): Antimutagenic Effects of Ecklonia Stolonifera, an Edible Brown Algae Present in Korea against chemical mutagen: *Environ. Mol. Mutagen.*, **31**(S29): 58.
- Roy, D. and Liehr, J.G. (1999): Estrogen, DNA damage and mutations, *Mutat. Res.*, **424**: 107-15.
- Schmezer, P., Pool, B.L., Klein, R.G., Komitowski, D. and Schmahl, D. (1988): Various short-term assays and two long-term studies with the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate in the Syrian golden hamster, *Carcinogenesis*, **9**: 37-43.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res* **175**: 184-91.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N. and Serrano, F.O. (1995): The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants, *Environ. Health Perspect.*, **103**(Suppl 7): 113-22.
- Tawn, E.J and Holdworth, D. (1992): Mutagen-induced chromosome damage in human lymphocyte. In: *Human cytogenetics, A practical Approach*. Vol. 2. Rooney, D.E. and Szepulkowski (editors), Oxford: Oxford University Press, 189-208.
- Tomita, I., Nakamura, Y., Aoki, N., and Inui, N. (1982): Mutagenic/carcinogenic potential of DEHP and MEHP, *Environ Health Perspect.*, **45**: 119-25, 1982.
- Yamasaki, H., Ashby, J., Bignami, M., Jongen, W., Linnainmaa, K., Newbold, R.F., Nguyen-Ba, G., Parodi, S., Rivedal, E., Schiffmann, D., Simons, J.W., and Vasseur, P. (1996): Non-genotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project, *Mutat. Res.*, **353**: 47-63.
- Yoshikawa, K., Tanaka, A., Yamaha, T. and Kurata, H. (1983): Mutagenicity study of nine monoalkyl phthalates and a dialkyl phthalate using *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli.*, *Food Chem. Toxicol.*, **21**: 221-3.
- Zeiger, E., Haworth, S., Mortelmans, K. and Speck, W. (1985): Mutagenicity testing of di(2-ethylhexyl)phthalate and related chemicals in Salmonella., *Environ. Mutagen.*, **7**: 213-32.
- 식품의약품안전청 (1987): 내분비계 장애물질에 대한 연구계획과 대처방안, 행정간행물 등록번호 40200-65050-57-04.
- 유전독성과 (1999): 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청 고시 제 1999-61호, 42-45, 74-76, 1999. 12. 22.