

## Benzimidazole계 살균제의 세포독성 평가

이제봉\* · 성필남<sup>1</sup> · 정미혜 · 신진섭 · 강규영<sup>2</sup>

농업과학기술원 농약안전성과, <sup>1</sup> 제주농업시험장 축산과, <sup>2</sup> 경상대학교 농업생명과학대학 환경생명화학과

**요 약** : Benzimidazole계 살균제의 세포독성을 평가하기 위하여 CHL(chinese hamster lung) 세포를 이용한 Giemsa stain assay, Lactic dehydrogenase(LDH) activity, MTT assay, DNA synthesis inhibition test 및 Sulforhodamin B(SRB) assay를 수행하여 benzimidazole계 살균제에 대한 약제별 세포독성을 평가하고 위해도 평가를 위한 자료로 사용하고자 하였다. 시험결과 LDH활성은 carbendazim 4.0, 16.0 및 32.0  $\mu\text{g/mL}$ 을 24시간 처리하였을 때 음성대조군에 비해 농도별로 세포독성이 각각 2.16, 2.94 및 2.64배 강하게 나타났다. DNA 합성시험에서는 carbendazim 2.0  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 약 45% DNA 합성을 저해하였으며, Giemsa assay와 MTT assay에서도 세포와 mitochondria에 독성을 일으키는 것으로 나타났다. Giemsa assay의  $\text{IC}_{50}$ 은 thiophanate-methyl, benomyl, carbendazim 및 양성대조 약제인 captafol에서 각각 >125, 1.2, 30.0 및 0.3  $\mu\text{g/mL}$  이었고, MTT assay의  $\text{IC}_{50}$ 은 thiophanate-methyl, benomyl, carbendazim 및 captafol에서 각각 >125, 18.7, 20.4 및 2.6  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 그리고 세포 증식에 대한 영향을 조사하기 위하여 수행된 SRB assay의  $\text{IP}_{50}$ (반수세포증식억제농도)에서도 thiophanate-methyl, carbendazim, benomyl 및 captafol이 각각 17.4, 5.3, 1.5, 및 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 으로 관찰되었다. 이상의 결과는 급성독성이 낮은 benzimidazole계 살균제가 유전독성 등 특수독성이 강하게 나타나는 원인일 것으로 판단되었다.(2003년 8월 12일 접수, 2003년 9월 22일 수리)

**Key word** : Benzimidazole Fungicides, Cytotoxicity, Chinese Hamster Lung Fibroblast Cell.

### 서 론

농약은 현대농업에 없어서는 안될 농업용 필수자재이나, 농약을 포함한 모든 합성화학물질들은 물질 고유의 독성을 가지고 있으며, 인축 및 환경에 유해한 영향을 미치기도 한다. 지난 수십년 동안 화학물질의 사용에 따른 많은 위해성이 제기 되어 왔으며, 선진국을 비롯한 세계 각국들은 화학물질의 독성을 확인하고 안전성을 확보하기 위한 수많은 연구를 수행하여 왔다(농과원, 2002; 농촌진흥청, 2001).

최근에는 환경보호에 대한 인식이 고조되면서 안전성여부에 대한 평가가 절대적으로 필요하게 되었으며, 또한 사회적인 관심이 급속도로 고조되고 있다(James, 1999; 한국과학기술원, 2000). 합성화학물질은 암, 유전병, 내분비계장애 등의 원인으로 추정되면서, 위해성을 줄이기 위한 수단으로 안전성평가가 수행되어 왔다(Kamrin, 1997; US/EPA, 1996, 1999, 2000,

2001). 그러나 기존의 실험동물을 이용한 안전성평가에는 수백억원에 달하는 시험경비와 막대한 시간이 문제점으로 지적되고 있다. 이와 같은 배경에서 학자들은 동물을 이용한 독성시험보다 시간 및 경비면에서 경제적이고, 또한 동물을 보호할 수 있는 대체시험법으로 *in vitro* 시험 또는 단기독성시험을 수행하여 장기간 노출에 의한 대규모시험을 대체할 수 있는 방법을 모색하여 왔다(Ames 등, 1975; Ashby, 1986; Eisenbrand, 등 2002).

Benzimidazole계 살균제는 미국 DuPont사에 의해 1969년에 등록되었으며(Tomlin, 1997), 국내에서는 1975년 benomyl 50% 수화제가 처음 등록되면서 현재 총 31품목이 등록되어 있고, benzimidazole계 살균제 성분함유 농약(benomyl, carbendazim, thiophanate-methyl 및 thiabendazole 등 4종)의 사용량은 연간 1,000 M/T(1999)정도로 국내 살균제 사용량의 12.4%에 해당한다.

등록된 품목의 제품독성은 30품목이  $\text{LD}_{50}$  500~5,000 mg/kg 이상으로 저독성이며, thiophanate-methyl

\*연락처자

40% SC만이 LD<sub>50</sub> 416 mg/kg으로 보통독성이었다(농약공업협회, 2000). 지금까지 알려진 benzimidazole계 살균제의 원재독성은 급성독성이 약하며, 만성, 발암성, 기형독성 등의 NOEL이 각각 8.0~12.5 mg/kg/day, 8.8 mg/kg/day, 10~30 mg/kg/day이었고, 유전독성은 염색체이상시험에서 수적이상을 유발하며, 발암성도 일부 실험동물에서 유발하는 것으로 알려져 있다(Heyes, 1982).

따라서 본 연구에서는 CHL 세포에 대한 benzimidazole계 살균제의 세포독성을 평가하기 위하여 Giemsa stain assay, Lactic dehydrogenase activity, MTT assay, DNA synthesis inhibition test 및 Sulforhodamin B assay를 수행하여 benzimidazole계 살균제에 대한 약제별 세포독성을 평가하고 위해성평가를 위한 자료로의 사용가능성을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험농약 및 시약

시험물질인 benzimidazole계 농약원제는 국내 농약제조회사(경농 등 3개사)로부터 공급받아 사용하였으며, 이들 성분의 순도는 benomyl 95%, carbendazim 90% 및 thiophanate-methyl 93%이었다. 대조 농약인 captafol은 농업과학기술원에 보관중인 분석용 표준품을 사용하였으며, 순도는 99.0%이었다. 세포배양 배지는 Eagle's minimal essential medium(EMEM, Gibco)을 사용하였으며, 그 밖의 시약은 시중에서 구입하여 사용하였다.

### 시험세포 및 배양조건

세포독성시험에 사용된 세포는 Chinese hamster lung(CHL) fibroblast cell로서, 염색체 수는 25개이며, 세포분열 주기는 15시간이었다. 배양액은 5% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)과 1%의 antibiotic-antimycotic용액(100X 용액, Gibco)을 포함한 EMEM(Gibco)를 사용하여 포화 습도하에서 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C의 배양기(Vision, Korea)에서 배양하였다. 배양된 세포는 3~5일 마다 0.05% trypsin-EDTA(Gibco) 용액을 이용하여 계대 배양하여 유지하였다.

### Lactic dehydrogenase(LDH) 활성측정

LDH활성은 CHL세포 1×10<sup>3</sup> cell/mL을 24 well

culture plate에 접종하여 3일간 배양한 후 carbendazim 4.0, 8.0, 16.0 및 32.0 µg/mL을 24시간 처리하여 배양액 50 µL를 LDH reagent(Gilford Diagnostics Reagent, USA) 1.0 mL에 혼합하여 automatic analyzer(Gilford System 103, Ciba Coming, USA)로 활성을 측정하였다.

### DNA 합성저해 시험

1×10<sup>3</sup> cell/mL의 CHL세포를 24 well culture plate에 접종하고, 24시간 배양한 후 carbendazim 2.0, 4.0, 8.0, 및 16.0 µg/mL과 <sup>3</sup>H-thymidine 5 µCi/mL(Sigma, USA) 포함되게 하여 2시간 labelling 하였다. 100 µg/mL의 sodium azide로 DNA합성을 중지시키고, Ca<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>가 없는 phosphate buffer(pH 7.1)로 3회 세척한 다음, 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시키고, 부유액 1.0 mL을 liquid scintillation cocktail(Beckman, USA) 5mL에 용해시켜 방사선량을 liquid scintillation counter(Tri-Carb TR 1600, Hwellel Packard, USA)로 측정하였다.

### Giemsa stain assay

CHL세포 1×10<sup>3</sup> cell/mL을 24 well culture plate에 접종하여 3일간 배양한 후 benzimidazole계 살균제 3종 및 양성대조 약제인 captafol을 8.0, 16.0, 32.0, 64.0 및 128.0 µg/mL을 24시간 처리하여 배양하고, phosphate buffer(pH 6.8)로 2회 세척한 후 well 당 0.5mL의 methanol로 5분간 고정시킨 다음 5% Giemsa로 15분간 염색하였다. 염색 후 세포생존율(%)을 산출하였다.

### MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

CHL세포 1×10<sup>3</sup> cell/mL을 24 well culture plate에 접종하여 3일간 배양한 후 thiophanate-methyl 및 benomyl 8.0, 16.0, 32.0, 64.0 및 128.0 µg/mL, carbendazim 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 및 32.0 µg/mL, captafol 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 µg/mL을 24시간 처리하여 배양하고, 분석당일에 50 µg/mL의 MTT(Sigma, USA)가 포함되게 조제한 배지로 교체하여 37°C에서 4시간 배양하고, 배지를 제거한 후 1.0 mL의 DMSO를 첨가하여 형성된 formazon을 용해하여 비색계(Shimadzu UV-2201, Japan)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

### 세포증식억제 시험(SRB assay)

CHL세포  $1 \times 10^3$  cell/mL을 24 well culture plate에 접종하여 24시간 배양하고 thiophanate-methyl 8.0, 16.0, 32.0, 64.0 및 128.0  $\mu\text{g/mL}$ , carbendazim 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 및 32.0  $\mu\text{g/mL}$ , benomyl 및 captafol 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0  $\mu\text{g/mL}$ 을 처리하여 4일간 배양하고, 50% trichloroacetic acid를 well 당 500  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하여, 1시간 동안 4°C에서 항온한 다음 5회 수돗물로 세척하고, 하룻밤 풍건하여 10 mmol Tris(pH 10.0) 2.0 mL 첨가하여 용해시킨 다음 비색계(Shimadzu UV-2201, Japan)로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### Lactic dehydrogenase 활성

Carbendazim의 CHL배양세포에 대한 세포독성을 조사하기 위해 LDH 활성을 측정하였다. LDH활성은 음성대조군, 용매대조군(DMSO : dimethyl sulfoxide)과 carbendazim 처리군으로 나누어 시험하였으며, 용매대조군은 DMSO함량을 배지량의 0.5%를 초과하지 않도록 4.0  $\mu\text{L/mL}$ 을 처리하였고, carbendazim은 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 및 32.0  $\mu\text{g/mL}$ 을 배지에 처리하여 LDH활성을 조사한 결과 표 1에서와 같이 각각 대조군의 175, 216, 229, 294 및 264%로 투여농도에서 세포독성이

관찰되었다. 세포막이 손상되거나 피사가 일어나면 원형질 및 핵내에 LDH활성이 증가되고, 세포밖으로 유출되어 배양배지 내의 LDH활성이 증가되는 것으로 알려져있다(Shell, 1973). Alachlor, chlorpyrifos 및 fenitrothion을 PC-12 세포에 100 nmol로 처리하였을 때 LDH 활성이 각각 2.8, 3.1 및 3.4배 증가시켰다고 보고하였고(Baguchi 등, 1995), Fisher 344 랫드 신장세포를 이용한 chloronitrobenzen의 세포독성시험에서도 LDH의 활성이 증가되었으며(Hong 등, 2002), 또한 유기염소계 농약을 이용한 랫드 간세포독성시험에서도 chlorothalonil, captan 등의 농약이 LDH활성을 강하게 증가시켰다고 보고하였다(Suzuki 등, 1997). 랫드 섬유모세포를 이용한 카드뮴 10  $\mu\text{mol}$ 과 50  $\mu\text{mol}$ 을 처리한 농도에서 대조군에 비해 각각 139와 282%의 증가를 보여(정 등, 1993) 본 연구의 결과와 유사하였다. Suwalsky 등(2000)은 benomyl을 개구리 신경상피세포에 노출시켰을 때 0.01~1.0 mmol의 농도에서 영향이 있었다고 보고하여 세포막을 손상시킬 수 있음을 알 수 있다. LDH 활성측정법은 환경생물에 대한 세포독성시험법으로도 최근에 많이 이용되고 있으며, 수질오염을 측정하기위해 수생생물의 혈액 LDH 활성을 측정하여 오염정도를 측정하기도 한다(Asztalos, 1986). Benzimidazole계 살균제의 세포독성은 설치류를 이용한 독성시험과는 달리 CHL 배양세포에서는 독성이 강하게 나타났으며, Borenfreund 등(1988)이 제시한 세

Table 1. Effects of different concentrations of carbendazim on lactic dehydrogenase (LDH) activity in culture fluid of complete cultured CHL cell

Treated concentration( $\mu\text{g/mL}$ )	LDH activity <sup>a)</sup> (Mean $\pm$ SD)	% control
DMSO	31.53 $\pm$ 0.87	138
0.0	22.81 $\pm$ 3.74	100
2.0	38.91 $\pm$ 4.08	175
4.0	49.31 $\pm$ 6.35	216
8.0	52.29 $\pm$ 2.46	229
16.0	66.95 $\pm$ 3.84	294
32.0	60.28 $\pm$ 3.11	264

<sup>a)</sup>The cells were cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 3 days and incubated after treated with carbendazim for 24 hours. LDH activity was measured by automatic analyzer(Gilford system 103, Ciba Corning, USA). Each value represents mean  $\pm$  SE.

$$\text{LDH activity(U/L)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{TV} \times 1000}{6.22 \times \text{SV} \times \text{LP}}$$

$\Delta A/\text{min}$  = Change in absorbance per minute at 340 nm, TV = Total reaction mixture volume, SV = Sample volume, LP = lightpath, 1,000 = converts units per mL to units per liter.

Table 2. Effects of different concentrations of carbendazim on DNA synthesis in cultured CHL cells

Treated concentration( $\mu$ g/ml)	$^3\text{H-DPM}(\times 10^6)^{\text{a)}}$	% to control
0.0	3.34	100
2.0	1.85	55
4.0	1.36	41
8.0	1.47	44
16.0	0.95	28

<sup>a)</sup>CHL cell were cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 24 hours and DNA synthesis inhibition was measured by liquid scintillation counter(Tri-carb TR 1600, Hewlett Packard, USA) after 24 hours treated with carbendazim and after 2 hours treated with 5  $\mu$ Ci/mL  $^3\text{H-thymidine}$ .

포독성구분에 의하면 독성이 강한 물질(IC<sub>50</sub><100  $\mu$ mol)에 해당하였다.

### DNA 합성저해 시험

단백질, RNA, 및 DNA 등 거대분자에  $^{35}\text{S-methionine}$ ,  $^3\text{H-uracil}$  및  $^3\text{H-thymidine}$ 과 같은 전구체에 방사성동위원소를 labelling 하여 거대분자 합성저해를 이용하여 세포독성을 측정할 수 있다고 알려져 있다(Mayer, 2000). Benzimidazole계 살균제의 DNA 합성에 미치는 영향을 검색하기 위해  $^3\text{H-thymidine}$ 에 labelling된 방사선 동위원소를 이용하여 시험한 결과 표 2에서 보는 바와 같이 음성대조군의 방사선량  $3.34 \times 10^6$  DPM을 100%로 하였을 때 carbendazim 2.0  $\mu\text{g/mL}$ 에서는  $1.85 \times 10^6$ 으로 대조군의 55%에 해당하였으며, 4.0  $\mu\text{g/mL}$ 에서는  $1.36 \times 10^6$ 으로 대조군의 41%, 8.0  $\mu\text{g/mL}$ 에서는  $1.47 \times 10^6$ 으로 대조군의 44% 그리고 16.0  $\mu\text{g/mL}$ 에서는  $0.95 \times 10^6$ 으로 대조군의 28%에 해당하여 DNA 합성저해가 2.0  $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 50% 내외여서 LDH에 의

한 세포독성 보다 2배 이상 강한 것으로 나타나 DNA 수준의 세포독성이 민감하게 일어남을 알 수 있었다.

중금속 카드뮴을 랫드 섬유세포에 7.0  $\mu\text{M}$ 과 60.0  $\mu\text{M}$ 을 처리하였을 때 대조군에 비하여 각각 90 및 50%의 합성율을 보였으며, 랫드 섬유세포에서 남은 10  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 각각 86 및 75%, 2.0 mM에서 45%의 합성율을 보여(정 등, 1993; 정 등, 1995), 본 연구에서 나타난 결과와 유사한 경향이었으며, carbendazim이 카드뮴이나 납보다 6.0~20배로 DNA 합성을 저해하는 것으로 나타났다.

### Giemsa stain assay

Giemsa stain assay는 살아있는 세포의 핵을 염색하여, 세포의 활성을 측정하므로 물질의 세포독성을 평가하는 일반적인 시험법이다. Benzimidazole계 살균제 및 양성대조 약제인 captafol에 대한 세포독성시험을 수행한 결과 표 3에서 보는 바와 같이 thiophanate-methyl, benomyl, carbendazim 및 captafol을 각각 8.0,

Table 3. Cytotoxicity results measured by giemsa stain assay in cultured CHL cell treated with different concentrations of benzimidazole fungicides for 24 hours

Treated concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cell viability(%) <sup>a)</sup>			
	Thiophanate-methyl	Benomyl	Carbendazim	Captafol <sup>b)</sup>
0.0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
8.0	80 $\pm$ 7	36 $\pm$ 5	98 $\pm$ 5	30 $\pm$ 14
16.0	86 $\pm$ 14	15 $\pm$ 4	65 $\pm$ 6	25 $\pm$ 8
32.0	86 $\pm$ 14	10 $\pm$ 0	30 $\pm$ 0	30 $\pm$ 12
64.0	76 $\pm$ 9	9 $\pm$ 3	14 $\pm$ 3	28 $\pm$ 3
128.0	60 $\pm$ 14	9 $\pm$ 3	10 $\pm$ 0	23 $\pm$ 5

<sup>a)</sup>CHL cells were cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 3 days and thiophanate-methyl, benomyl, carbendazim and captafol were treated to the cultured CHL cells at concentration of 8.0, 16.0, 32.0, 64.0 or 128.0  $\mu\text{g/mL}$ . Cytotoxicity were measured by Giemsa stain(5%) assay to investigate cell viability

<sup>b)</sup>Captafol was used as positive reference.

16.0, 32.0, 64.0 및 128.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 배양배지에 24시간 처리하였을 때 thiophanate-methyl 처리에 의한 세포생존율은 대조군(100%)에 비해 처리농도별로 80, 86, 86, 76, 및 60%로 50% 세포생존농도가 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상이었으며, benomyl은 36, 15, 10, 9 및 9%로 50% 세포생존농도가 1.24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. Carbendazim은 98, 65, 30, 14 및 10%로 50% 세포생존농도가 28.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 대조약제인 captafol은 30, 25, 30, 28 및 23%로 50% 세포생존농도가 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. Giemsa stain assay에 의한 benzimidazole계 살균제 및 captafol에 대한 세포독성 비교시험에서 세포독성은 captafol > benomyl > carbendazim > thiophanate-methyl 순으로 강하게 나타나, 발암성(Tamano 등, 1990; Kim 등, 1997; Perocco 등, 1995; Tsuda 등, 1993), 유전독성(Rahden-Staaron 등, 1994), 해독효소 활성저해(Ilio 등, 1996), DNA, RNA 합성저해(Rodrigues와 D'Angelo, 1994) 등 복합적으로 세포에 독성을 일으키는 것으로 알려진 양성대조 약제인 captafol의 세포독성이 가장 강했으며, 또한 benomyl의 독성이 강하게 나타난 것은 benomyl은 빠른 시간내에 carbendazim과 butylisocyanate로 분해되는데, 이때 생성된 butylisocyanate에 의해 기인되는 것으로 여겨지며, butylisocyanate는 carbendazim보다 cytochrome P450의 활성을 더 많이 저해하는 것으로 알려져 있다(Radice 등, 1997). Thiophanate-methyl은 활성 형태인 carbendazim으로 전환되는 기간이 benomyl보다 길어(김, 1998) 독성이 상대적으로 낮은 것으로 판단되었다.

### MTT assay

MTT assay에 의한 benzimidazole계 살균제 및 captafol이 CHL 배양세포에 미치는 독성을 조사하기 위하여 mitochondrial dehydrogenase 활성을 측정하였다. Colorimetric assay인 MTT assay는 각종 독성물질을 일차적으로 검정하는데 이용되는 편리한 방법으로 미국 국립암연구소(National cancer institute)에서도 항암제 등의 검색을 위한 방법으로 제안하였다(Camicheal 등, 1987). Mitochondrial dehydrogenase가 ATP : ADP 비율 등에 의해 MTT를 formazon으로 변화시키는 원리를 이용한 세포생존율을 측정하는(Meyer, 2000) 시험으로 세포증식율(Greenman 등, 1997), 세포독성(정 등, 1993; 정 등, 1995; Ponsoda 등, 1995) 등을 연구하는 시험법으로 많이 사용되고 있다. MTT

assay 결과를 대조군과 비교하여 50% 저해농도를 설정하고,  $\text{IC}_{50}$ 에 따른 독성을 구분하여 독성정도를 판정하기도 한다(Borenfreund 등, 1988). Benzimidazole계 살균제 및 양성대조 약제인 captafol을 대상으로 MTT assay에 의한 세포독성시험을 수행한 결과 그림 1에서 보는 바와 같이 thiophanate-methyl을 8.0, 16.0, 32.0, 64.0 및 128.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 배양배지에 24시간 처리하였을 때 mitochondrial dehydrogenase에 의한 formazon 생성율이 각각 대조군(100%)에 비해 147, 157, 136, 153 및 120%로 probit 분석이 곤란하였으며, 50% 세포생존 농도가 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상으로 그래프에 표기하지 못하였다.

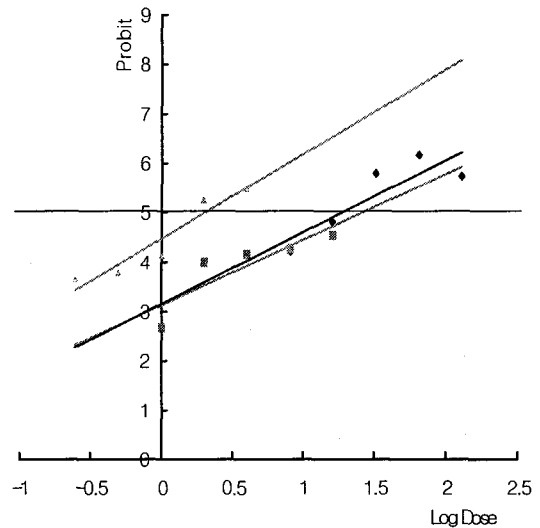


Fig. 1. Probit analysis of the MTT assay results obtained in CHL cell treated with different concentrations of benomyl, carbendazim and captafol. CHL cells were cultured in  $\text{CO}_2$  incubator for 3 days and different concentrations of benomyl, carbendazim and captafol were treated to the cultured CHL cells. Mitochondrial dehydrogenase activity was measured by MTT assay using spectrophotometer(Shimaduz UV-2201, Japan) by monitoring the change in absorbance at 570 nm. ◆ Benomyl, ■ Carbendazim, ▲ Captafol.

Benomyl을 동일농도로 처리하였을 때는 각각 77, 58, 21, 11 및 23%로 probit 분석결과 절편 3.11, 기울기 1.48로서 50% 세포생존농도는 18.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. Carbendazim을 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 및 16.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 mitochondrial dehydrogenase에 의한 formazon 생성율이 각각 100, 84, 80, 73 및 68%로

probit 분석결과 절편 3.41, 기울기 1.00으로서, 50%세포 생존농도가 20.4  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 한편 양성대조약제인 captafol을 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때는 mitochondrial dehydrogenase에 의한 formazon 생성율이 각각 81, 89, 81, 60 및 31%로 probit 분석결과 절편 4.52, 기울기 1.17이며, 50%세포 생존농도가 2.6  $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

Staub 등(1998)은 benomyl이 mitochondria dehydrogenase 활성을 저해하므로 세포독성을 일으킨다고 보고하여 본시험의 결과와 동일하였다. MTT assay에서도 giemsa stain assay와 유사한 결과를 얻었으며, 세포독성은 captafol( $\text{IC}_{50}$  2.6  $\mu\text{g/mL}$ , 7.4  $\mu\text{M}$ ) > benomyl( $\text{IC}_{50}$  18.7  $\mu\text{g/mL}$ , 64.4  $\mu\text{M}$ ) > carbendazim( $\text{IC}_{50}$  20.4  $\mu\text{g/mL}$ , 107.0  $\mu\text{M}$ ) > thiophanate-methyl ( $\text{IC}_{50}$  >125.0  $\mu\text{g/mL}$ , >365.0  $\mu\text{M}$ )순으로 강하게 나타났다. Thiophanate-methyl의 경우 세포독성이 약했지만, benomyl, carbendazim 및 captafol은 세포독성이 강하게 나타났다.

#### 세포증식억제시험(SRB assay)

Benzimidazole계 살균제와 양성대조 약제인 captafol에 대해 SRB assay법에 의한 세포증식억제시험을 수행한 결과 그림 2에서 보는 바와 같이 thiophanate-methyl 8.0, 16.0, 32.0, 64.0 및 128.0  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 배양배지에 4일간 처리하였을 때 세포생존율이 각각 대조군(100%)에 비해 86.6, 33.7, 23.5, 19.5, 및 8.1%로 probit 분석결과 절편 2.76, 기울기 1.82로서, 50% 세포생존농도는 17.4  $\mu\text{g/mL}$  이었으며, benomyl을 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 4일간 처리하였을 때 세포생존율이 각각 101.0, 97.5, 84.5, 14.2 및 9.4%로 probit 분석결과 절편 4.24, 기울기 4.31로서, 50% 세포 생존농도가 1.5  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. Carbendazim 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 및 16.0  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 4일간 처리하였을 때 세포생존율이 각각 99.0, 80.8, 36.2, 24.8 및 16.5%로 probit 분석결과 절편 3.56, 기울기 2.21이었으며, 50% 세포생존농도가 5.3  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 한편 대조약제인 captafol을 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 4일간 처리하였을 때 세포생존율이 각각 78.8, 48.0, 15.7, 13.0 및 8.2%로 probit 분석결과 절편 5.59, 기울기 1.95로, 50%세포생존농도가 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 시험 결과 독성의 강도를 나타내는 기울기와 절편을 살펴보면, 기울기는 benomyl > carbendazim >

captafol > thiophanate-methyl 순 이었으며, 절편은 captafol > benomyl > carbendazim > thiophanate-methyl 순으로 높았다. Captafol의 경우 기울기는 benomyl에 비해 낮으나 절편이 크기 때문에 독성이 가장 강하게 나타남을 알수 있었으나, 농도의 증가에 따른 독성의 강도는 benomyl이 강하였다.

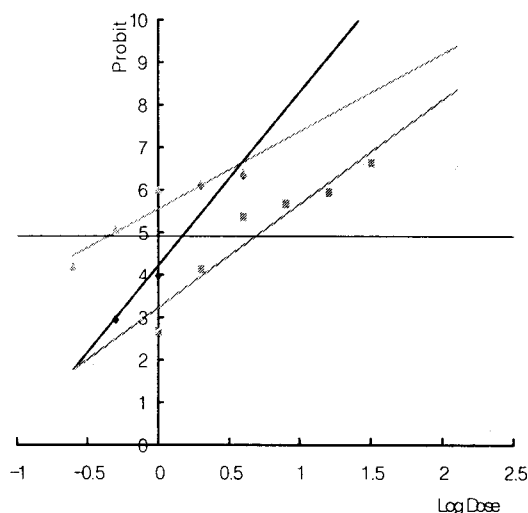


Fig. 2. Probit analysis of the SRB assay results obtained in CHL cell treated with different concentrations thiophanate-methyl, benomyl, carbendazim and captafol. CHL cells were cultured in  $\text{CO}_2$  incubator for 24 hours and different concentrations of thiophanate-methyl, benomyl, carbendazim and captafol were treated to the cultured CHL cells for 4days. Cell proliferation was measured by SRB assay using spectrophotometer(Shimduz UV-2201, Japan) by monitoring the change in absorbance at 550 nm. ● Thiophanate-methyl, ◆ Benomyl, ■ Carbendazim, ▲ Captafol.

세포증식억제정도를 측정하는 대표적인 시험법인 SRB assay법으로 시험을 수행한 결과 배양세포에 복합적으로 독성을 유발하는 captafol이 가장 강한 독성을 보였으며(Ilio 등, 1996; Rodrigues와 D'Angelo, 1994), benomyl은 carbendazim보다 세포독성이 더 강하게 나타났는데, 이러한 결과는 benomyl의 대사 산물인 butylisocynate가 carbendazim보다 cytochrome P450의 활성을 더 많이 저해하였다는 Radice 등(1997)의 연구결과와 일치하였다. 반면 Thiophanate-methyl은 활성 형태인 carbendazim으로 전환되는 시간이 benomyl보다 길어(김, 1998) 상대적으로 독성이 약한 것으로

판단되었다.

이상의 연구결과 benzimidazole계 살균제는 일반적으로 급성독성이 약한 물질로 알려져 있으나, 이들 중 benomyl과 carbendazim은 세포독성이 비교적 강한 것으로 나타났다. 4일간 benzimidazole계 살균제가 처리된 세포증식억제시험에서 NOEC(no observed effect concentration)는 benomyl 0.4  $\mu\text{g/mL}$ , carbendazim 1.0  $\mu\text{g/mL}$ , thiophanate-methyl 4.0  $\mu\text{g/mL}$  및 captafol 0.1  $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 이와 같은 연구결과는 benzimidazole계 살균제의 통합노출에 따른 *in vitro* 식이섭취위해도 평가에 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

### 인용문헌

- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) Method for detecting carcinogens and mutagens with *salmonella/mammalian-microsomal* mutagenicity test. *Mutation Research* 31:347~364.
- Ashby, J. (1986) The prospects for a simplified and internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens. *Mutagenesis* 1:3~16
- Asztalos, B. (1986) LDH enzymes as a tool on monitoring tissue necrosis in fishes caused by pesticides. *Acta Biologica Hungarica* 37(1):59~65.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E. A. and Stohs, S. J. (1995) *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 104:129~140.
- Borenfreund, E., Babichi, H. and Matin-Alcuacil, N. (1988) Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assay-The neutral red and tetrazolium MTT tests. *Tocol. In Vitro* 2:1~6.
- Borenfreund, E., Borrero. (1984) *In vitro* cytotoxicity assays : potential alternatives to the Draize ocular irritancy test. *Cell Biology and Toxicology* 1:55~60.
- Camichael, J. W., Degraff, W. G., Gaadar, A. F., Minna, J. D. and Michell, J. B. (1987) Evaluation of the tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47:936~942.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J. Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J. C., Pieters R. and Kleiner, J. (2002) Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology* 40:193~236
- Greenman, S. B., M. J. Rutten, W. M. Fowler, L. Scheffler, L. A. Shorridge, B. Brown, B. C. Sheppard, K. E. Deveney, C. W. Deveney, and D. D. Trunkey. (1997) Herbicide/ Pesticide Effects on Intestinal Epithelial Growth. *Environmental Research* 75:85~93.
- Hayes, W. J. (1982) Pesticides studied in man. Williams & Wilkins, Baltimore/London, 610~615.
- Hong, S. K., Anestis, D. K., Ball, J. G., Valentovic, M. A. and Rankin, G. O. (2002) *In vitro* nephrotoxicity induced by chloronitrobenzenes in renal cortical slices from Fischer 344 rats. *Toxicology Letters* 129(1~2):133~141.
- Ilio, C. D., Sacchetta, P., Angelucci, S., Bucciarelli, T., Pennelli, A., Mazzetti, A. P., Lo Bello, M. and Aceto, A. (1996) Interaction of Glutathione Transferase P1-1 with Captan and Captafol. *Biochemical Pharmacology* 52:43~48.
- James V. Bruckner. 1999. Differences in Sensitivity of Children and Adults to Chemical Toxicity : The NAS Panel Report. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31:280~285.
- Kamrin, M. A. (1997) Environmental risk harmonization: Federal/State Approachs to Risk Assessment and Management. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25:158~165.
- Kim, H. C., Cha, S. W., Song, S. H., Ha, C. S., Han, S. S., Roh, J. K., Lee, Y. S., Furukawa, F., Nishikawa, A. and Takahashi M. (1997) Enhancing effects of captafol on the development of GST-P-positive liver cell foci in a medium-term bioassay, and protection by -cysteine of the enhancement in rats. *Cancer Letters* 111:15~20.
- Meyer, A. S. (2000) Overview of cellular techniques in toxicology. in introduction to biochemical toxicology (Hodgson, E. and Levi, P. E., editors). Wiley Interscience, New York, 3:51~64.

- Perocco, P., Colacci, A., Del Ciello, C. and Grilli, S. (1995) Transformation of BALB/c 3T3 cells *in vitro* by the fungicides captan, captafol and folpet. *Jpn. J. Cancer Research* 86(10):941~947.
- Ponsoda, X., Jover, R., Nunez, C., Royo, M., Castell J. V. and Gomez-Lechon M. J. (1995) Evaluation of the Cytotoxicity of 10 Chemicals in Human and Rat Hepatocytes and in Cell Lines: Correlation Between *In Vitro* Data and Human Lethal Concentration. *Toxic. in vitro* 9(6):959~966.
- Radice, S., Marabini, L., Gervasoni, M., Ferraris, M., Chiesara, E. (1997) Carbendazim and n-butylisocyanate: metabolites responsible for benomyl double action on cytochrome P450 in HepG2 cells. *Toxicology* 123(1~2):135~142.
- Rahden-Staaron, I., Szumilo, M. and Ziemkiewicz, P. (1994) The effects of captan and captafol on different bacterial strains and c-mitosis in V79 chinese hamster fibroblasts. *Acta Biochim Pol* 41(1):45~55.
- Rodrigues M. A. and D'Angelo M. (1994) Cytotoxicity of captafol in mammalian cells. *Biomed Environ Sci* 7(3):278~283.
- Shell, W. E. (1973) Early estimation of myocardial damage in conscious dogs and patients with evolving acute myocardial infraction. *Clin. Invest.* 52:2579~2584.
- Staub, R. E., Quistad, G. B. and Casida, J. E. (1998) Mechanism for benomyl action as a mitochondrial aldehyde dehydrogenase inhibitor in mice. *Chemical Research in Toxicology* 11(5):535~543.
- Suwalsky, M., M. Benites, B. Norris, P. Sotomayor. (2000) Toxic effects of the fungicide benomyl on cell membranes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 125:111~119.
- Suzuki, T., Komatsu, M. and Isono, H. (1997) Cytotoxicity of organochlorine pesticides and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Biological and pharmaceutical Bulletin* 20(3):271~274.
- Tamano, S., Kurata, Y., Kawabe, M., Yamamoto, A., Hagiwara, A., Cabral, R. and Ito, N. (1990) Carcinogenicity of captafol in F344/DuCrj rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 81(12):1222~1231.
- Tomlin, C. D. S. (1997) The pesticide manual, eleventh edition. British crop protection council.
- Tsuda, H., Matsumoto, K., Ogino, H., Ito, M., Hirono, I., Nagao, M., Sato, K., Cabral, R. and Bartsch, H. (1993) Demonstration of inhibition potential of carcinogens by induction of preneoplastic glutathione S-transferase P-form-positive liver cell foci : possible *in vivo* assay system for environmental carcinogens. *Jpn. J. Cancer Res.* 84(3):230~236.
- US / EPA (1996) Office of pesticide programs list of chemical evaluated for carcinogenic potential
- US / EPA (1999) Benomyl-report of the FQPA safety factor committee.
- US / EPA (2000) RED of Thiabendazole.
- US / EPA (2000) RED of Thiophanate-methyl.
- US / EPA (2001) Benomyl and carbendazim-endpoint selection for incidental oral ingestion for carbendazim.
- 김정환 (1998) 건조 Hop 중 10종 농약의 잔류 분석법 개발.
- 농약공업협회 (2000) 농약연보.
- 농약공업협회 (2001) Pesticide Handbook.
- 농업과학기술원 (2002) 농약의 안전성과 작물보호
- 농촌진흥청 (2001) 농약관매인 교육교재
- 정연태, 박승택, 최민규, 김정중, 문연자, 우원홍, 한두석, 최봉규, 소진탁 (1993) 중금속 카드뮴(Cd)의 세포독성에 관한 연구. *Korean J. Toxicol.* 9(1):45~60.
- 정연태, 최민규, 김정중, 문연자, 김재민, 백순기 (1995) 납(pb)이 배양 섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구. *Environmental Mutagens & Carcinogens* 15(2):122~130.
- 한국과학기술원, 한국산업기술진흥협회 (2000) 진보된 안전성평가와 환경호르몬 검출기법



---

**Risk assessment on cytotoxicity for benzimidazole fungicides**

Je Bong Lee\*, Pil Nam Sung<sup>1</sup>, Mi-Hye Jeong, Jin Sup Shin, Kyu Young Kang<sup>2</sup>(Pesticide Safety Division, NIAST, Suwon 441-707, Korea, <sup>1</sup>Livestock division, National Jeju Agricultural Experimental Station, Jeju 690-150, Korea, <sup>2</sup>Dept. of Enviro-Biotechnology, Gyeong Sang National University, Jinju 660-701, Korea)

**Abstract :** To assess potential risk of the benzimidazole fungicides, their cytotoxicities were evaluated. Activities of LDH(Lactic dehydrogenase) in the culture fluid of CHL(chinese hamster lung) fibroblast cell treated with 4.0, 16.0 or 32.0  $\mu\text{g/mL}$  of carbendazim for 24 hours were elevated 2.16, 2.94 and 2.64 folds compared to the control, respectively. DNA synthesis was inhibited by 45% at 2.0  $\mu\text{g/mL}$  of carbendazim. Benzimidazole fungicides showed high toxicity to cell and mitochondria of CHL cell by Giemsa and MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.  $\text{IC}_{50}$  by the Giemsa assay of thiophanate-methyl, benomyl, carbendazim and captafol were over 125, 1.2, 30.0 and 0.3  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.  $\text{IC}_{50}$  by the MTT assay of thiophanate-methyl, benomyl, carbendazim and captafol were over 125, 18.7, 20.4 and 2.6  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Inhibitory concentration of cell median proliferation by SRB (sulforhodamin B) assay for thiophanate-methyl, carbendazim, benomyl, and captafol were 17.4, 5.3, 1.5 and 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Accordingly, benzimidazole fungicides inhibited DNA synthesis, mitochondrial function, cell proliferation and induced cell necrosis.

---

\*Corresponding author (Fax : +82-31-290-0521, E-mail : jblee@rda.go.kr)