

세포주에 따른 담배연기응축물의 소핵생성 비교

신한재 · 손형옥 · 이영구 · 이동욱 · 현학철*

KT&G 중앙연구원
(2003년 11월 18일 접수)

Comparison of Micronucleus Induction of Cigarette Smoke Condensate in Various Cell Lines

Han-Jae Shin, Hyung-Ok Sohn, Young-Gu Lee, Dong-Wook Lee and Hak-Chul Hyun*

KT&G Central Research Institute, Daejeon, Korea

(Received November 18, 2003)

ABSTRACT : Although tobacco smoke has been known to have genotoxicity as well as cytotoxicity, the sensitivity of the cell lines used against cigarette smoke is poorly understood. The objective of this study was to evaluate and compare the genotoxicity of several cell lines, which are routinely used in the *in vitro* assays, with cigarette smoke condensate(CSC) of Kentucky Reference Cigarette 1R4F. In the micronucleus(MN) induction assays, murine(CHO-K1, V79, BALB/c 3T3) cell lines and human(MCF-7, A549) ones were used. As a result, the CSC exhibited cytotoxicity with a concentration-dependent response in all cell lines. EC_{50} of CSC in CHO-K1, V79, BALB/c 3T3, MCF-7 and A549 were 140, 125, 100, 116 and 109 $\mu\text{g/mL}$, respectively. On the other hand, the spontaneous micronucleated cell(MNC) frequency was stable and reproducible in every cell lines tested in this study. The dose-response of various cell lines to the induction of MN by CSC was estimated using linear regression analysis. CSC(0 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$) caused a dose-dependent MN induction in CHO-K1, V79, BALB/c 3T3 and MCF-7 cell lines. Putting together all the data obtained and linear regression analysis of the data, we concluded that V79 cells are more susceptible to the accurate assessment of CSC-induced MN than the others.

Key words : cigarette smoke condensate, cell lines, genotoxicity assay, micronucleus

약물의 안전성 평가에 널리 사용되고 있는 *in vitro* 방법은 미생물 또는 동물 세포를 이용하여 세포의 괴사, 돌연변이성 및 염색체 이상 유·무를 확인하는 시험 등으로 수행된다(Buckton and Evans, 1973; Ames *et al.*, 1975; Fenech and

Morley, 1985; Balls and Clothier, 1992). 세포독성은 약물이 세포에 미치는 기전을 이해하는데 중요할 뿐만 아니라, 염증 반응과 같은 생리학적 과정을 이해하는데 매우 중요하다(Belinsky *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1990). 세포의 생존능력이나 성

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302번지, KT&G중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea (phone: Tel : 82-42-866-5596 Fax : 82-42-866-5426; E-mail : hchyun@ktrg.com)

장속도의 감소는 세포독성의 증거이며, 세포의 능동수송, 미토콘드리아의 효소활성, 세포막에 존재하는 효소들의 활성변화 등은 *in vitro* 세포독성을 평가하는 생물학적 지표(endpoint)로서 사용되고 있다(Shirhatti and Krishna, 1990; Sanders *et al.*, 1991). 미토콘드리아의 탈수소효소 활성을 측정하여 세포독성을 평가하는 MTS 방법은, 전세계적으로 널리 사용되고 있으며(Riss and Moravec, 1992), 농도반응곡선을 조사함으로써 세포성장을 50% 억제하는 농도인 EC₅₀를 설정할 수 있다.

In vitro 소핵시험은 염색체의 구조이상과 수적이상 등 염색체 및 유전체 수준에서 유전독성을 검색할 수 있는 간단하면서도 경제적인 시험법으로(Kirsch-Volders *et al.*, 1997; Fenech, 2000) 염색체이상 시험법과 함께 널리 사용되고 있다(Miller *et al.*, 1998). 소핵 시험은 화학물질이 DNA 수복 및 세포분열시 작용하는 단백질 등에 영향을 주거나 또는 유전체 직접 작용하여 생성된 소핵을 가진 세포를 측정하여 유전독성을 평가하는 방법이며, 유전독성 발암물질과 비유전독성발암물질 모두를 검색할 수 있다(Ashby *et al.*, 1994; Yamasaki *et al.*, 1994).

담배연기 응축물(Kosak, 1954; Johnstone and Plimmer, 1959; Stedman, 1968)에 대한 안전성 연구는 세균을 이용한 돌연변이성 평가와 포유류 유래세포를 사용하는 세포독성 및 유전독성 연구 등이 이루어지고 있다(DeMarini, 1983; Doolittle *et al.*, 1990; Veltel and Hoheneder, 1996; Bombick *et al.*, 1998; Putnam *et al.*, 2002). 또한 CORESTA 중심으로 담배연기의 안전성을 평가할 수 있는 표준방법이 제정되고 있고, 특히 세균을 이용하는 돌연변이성 및 BALB/c 3T3 세포를 이용하는 세포독성 등의 평가는 표준방법까지 제정되었다(Andreoli *et al.*, 2003). 그러나 담배연기 시료에 대한 유전독성 연구는 세포종류 및 시험방법에 따라 평가가 상이하여 표준방법을 정립하기 위해서는 많은 연구가 필요하다(Erexson *et al.*, 2001). 본 연구에서는 Kentucky Reference 1R4F의 연기 응축물(CSC)에 대하여 5가지 세포주(human: MCF-7, A549, Murine: CHO-K1, V79, BALB/c 3T3)를 이용해서 세포독성 및 소핵시험

을 수행하여 담배시료에 대한 susceptibility등을 비교 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료

RPMI 1640 medium(RPMI), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), L-glutamine, penicillin/streptomycin solution, PBS 등은 GIBCO(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO), mitomycin C(MMC), Gimsa 등은 Sigma(St. Louis, USA) 제품을 사용하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS)는 Promega(St, WI, USA) 제품을 사용하였다.

세포주 및 세포배양

In vitro 실험을 위해 사용할 chinese hamster ovary cells(CHO-K1)을 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 사용하였으며 세포주기는 14 ± 2시간이다. Chinese hamster lung fibroblast V79(V79)와 mouse embryo BALB/c 3T3(BALB/c 3T3)은 American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 분양받아 사용하였으며 세포주기는 각각 14 ± 2와 20 ± 3 시간이다. CHO-K1 세포의 배양액은 10% FBS와 100 U penicillin/mL, 100 µg streptomycin/mL을 포함한 RPMI를 사용하였다. V79와 BALB/c 3T3 세포는 10% FBS, 100 U penicillin/mL, 100 µg streptomycin/mL와 2 mM L-glutamine이 포함된 DMEM을 사용하였다. 배양된 세포는 2 ~ 3일마다 0.25% trypsin - 0.03% EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다.

사람유래세포로서 human breast carcinoma MCF-7(MCF-7)과 human lung carcinoma A549(A549) 세포는 KCLB로부터 분양 받았으며 세포주기는 30 ± 3 시간이다. MCF-7 cells과 A549 cells의 배양액은 10% FBS, penicillin-streptomycin이 포함된 RPMI 배지를 사용하였다. 배양된 세포는 3~4일마다 0.25% trypsin- 0.03% EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다. 모든 세

포주의 자연발생적 돌연변이의 생성을 최소화하고자 구입 후부터 10번 미만으로 계대배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 배양은 CO₂ 배양기 (VISION사, Korea)를 이용하여 포화습도 하에서 37℃, 5% CO₂ 상태로 배양하였다.

담배연기응축물의 제조

담배연기응축물(CSC)은 표준담배 (Kentucky reference cigarette 1R4F) 20개피를 RM20/CS 흡연장치(Heinr Borgwaldt, Germany)를 이용하여 CORESTA 표준흡연조건(puff volume: 35 mL, puff frequency: 60 sec, puff duration: 2 sec)하에서 연소시키고, 92 mm cambridge filter pad를 이용하여 포집 하였다. 적당량의 DMSO를 이용해서 filter pad로부터 CSC를 추출해서 농도가 10 mg/mL이 되도록 한 후 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

시험물질의 처리

모든실험에서 사용되는 대조군은 최고농도의 CSC에 첨가된 DMSO농도(1.0 또는 1.2%)로 하였다. 시료의 처리시간은 설치류유래세포(CHO-K1, V79, BALB/c 3T3)의 경우 24 시간동안 시료를 처리하였으며, 사람유래세포(MCF-7, A549)의 경우 24 시간 시료 처리 후 보통 배양액으로 24 시간 더 배양(24 + 24 h) 하였다.

세포독성 시험

시험물질의 세포독성 농도를 구하고자 미토콘드리아 탈수소효소의 활성 지수를 나타내는 MTS 비색환원방법을 사용하였다. 설치류유래세포(5×10^3 cells) 또는 사람유래세포 (2.0×10^3 cells)을 96 well plate(n=3)에 이식해서 24 시간동안 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 시험물질 처리 후 24 시간(설치류유래세포) 또는 48 시간(사람유래세포)에 세포의 각 well 당 MTS 용액 20 μ L를 첨가하여 37℃에서 4 시간동안 배양한 후 microplate reader (BIO-TEK, USA)를 사용해서 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험 결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질이 처리되지 않은

대조군과 비교하여 생존율로 환산하였다. 세포독성은 50%의 세포를 사멸시키는 시험물질의 농도 (EC₅₀)로 표시하였다.

소핵시험

세포독성 시험에서 결정된 세포독성 농도(EC₅₀)를 참고하여 4 단계의 농도를 세포에 처리해서 소핵시험을 수행하였다. 또한 대조군은 DMSO(1 또는 1.2%)를 처리하였다. 설치류유래세포(1.2×10^4 cells) 또는 사람유래세포(1.0×10^4 cells)를 chamber slide plate(Nunc, Denmark)에 이식해서 1 일간 배양 후, 시험물질을 처리하여 24 시간(설치류유래세포) 또는 48 시간(사람유래세포) 배양하였다. 그 후 PBS로 세척하고, 0.75 M KCl 용액을 넣어 4℃에서 5 분간 배양 하였다. 상등액 제거 후 고정액(methanol : acetic acid=3:1)으로 세포들을 고정시킨 다음 공기건조법으로 슬라이드를 제작하여 5% Gimsa 용액으로 30 분간 염색하였다. 한 시험 농도당 1000개의 세포를 광학현미경 (Nikon microphot FXA, Japan)을 이용하여 $\times 1000$ 배율로 판독하여 소핵 세포를 판독하였다. 정상핵의 1/3 크기의 핵을 소핵으로 판정했으며, 하나이상의 소핵을 가지고 있는 세포를 소핵세포로 계수하였다.

통계학적인 방법

모든 측정값은 평균값 \pm 표준편차로 표시하였으며 SPSS(version 10.0) 통계프로그램을 이용하여 one way ANOVA test를 실시하였고, 유의한 차이가 인정되는 경우 Dunnet's multiple-range test를 통해서 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 의 수준에서 처리군과의 유의성을 검정하였다. 시료의 농도별 소핵세포 생성율에 관한 용량상관성은 선형회귀분석을 통해서 측정하였다.

결 과

설치류유래세포인 CHO-K1, V79와 BALB/c 3T3 세포에 대한 담배연기응축물(CSC) 농도에 따른 세포독성을 조사하였다. CSC 150 μ g/mL을 최고 농도로 해서 단계적으로 희석하여 세포독성

Table 1. EC₅₀ values (μg/mL) of CSC in various cells

| Cell lines | Exposure time | |
|------------|--------------------|-------------------------|
| | 24 h ¹⁾ | 24 + 24 h ²⁾ |
| CHO-K1 | 140.0 | NT ³⁾ |
| V79 | 125.0 | NT |
| BALB/c 3T3 | 100.4 | NT |
| MCF-7 | NT | 116.2 |
| A549 | NT | 109.6 |

- ¹⁾ Cells were treated with various dose of CSC for 24 h
- ²⁾ Cells were treated with CSC for 24 h and then, cells were washed with media and replaced with fresh media. Cells were cultured for a further 24 h.
- ³⁾ NT = not tested

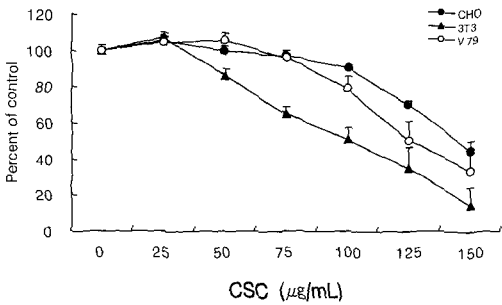


Fig. 1. Cytotoxicity of CSC to murine cells after 24 h exposure. Cells were treated with various dose of CSC for 24 h. Parallel cytotoxicity were determined by MTS conversion assay and calculated as a percentage of the control. Data were expressed as mean ± S.D.

시험을 실시한 결과, 모든 세포주에서 농도 의존적으로 세포독성이 증가 되었고(Fig. 1), CHO-K1, V79와 BALB/c 3T3 세포주별 CSC의 EC₅₀는 각각 140, 125와 100 μg/mL 이었다(Table 1). 사람

유래세포인 MCF-7과 A549 세포의 경우에서도 농도 의존적으로 세포독성이 증가 되었고(Fig. 2), CSC의 EC₅₀는 각각 116.2와 109.6 μg/mL으로 측정되었다(Table 1).

MTS 세포독성 측정방법에 의한 결과를 근거로, 1R4F 표준담배의 CSC 농도별에 따른 각 세포주별 소핵생성을 조사하였다. CHO-K1, V79, BALB/c 3T3, MCF-7과 A549 등 5개 세포주에서의 자발적 소핵생성율은 각각 2.4, 1.8, 2.3, 1.3과 3.0%로서 설치류유래세포주에서는 V79 세포주가 가장 낮았으며, 전체적으로는 MCF-7 세포가 1.3%로 가장 낮았다(Table 2, Table 3). CSC의 농도별 처리시 CHO-K1, V79와 BALB/c 3T3에서 농도 의존적으로 소핵생성 세포수가 증가하였고(Table 2), 회귀분석을 이용하여 세포주별 소핵생성 빈도수(회귀식의 기울기)를 계산한 결과, 각각 0.507, 0.904와 0.523으로 V79 세포주가 가장 높았으며, 각 세포주별 CSC의 용량 상관관계를 조사한 결과, 상관계수(R)가 0.8이상이었다(Table 4). 사람 유래 세포인 MCF-7과 A549 세포에 대해서 CSC 농도별로 각각 처리해서 48 시간 후 소핵 세포수를 측정한 결과, MCF-7 세포에서 농도 의존적으로 소

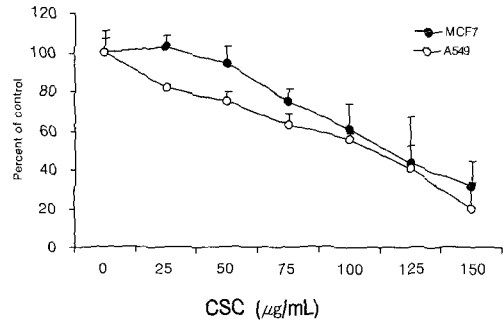


Fig. 2. Cytotoxicity of CSC to human cells after 24 h exposure. Cells were treated with CSC for 24 h and then, Cells were washed with media and replaced with fresh media. Cells were cultured for a further 24 h prior to MTS assay. Data were calculated as a percentage of the control.

Table 2. Effect of CSC on the induction of micronucleus in murine cells after 24 h exposure

| CSC ($\mu\text{g/mL}$) | Micronucleated cells / 1000 cells scored | | |
|-----------------------------|--|--------------------|------------------|
| | CHO-K1 | V79 | BALB/c 3T3 |
| 0 ¹⁾ | 24.3 \pm 5.1 | 18.0 \pm 2.0 | 23.3 \pm 5.5 |
| 25 | 22.0 \pm 5.3 | 28.3 \pm 4.2 | 22.0 \pm 5.3 |
| 50 | 46.7 \pm 8.3** | 40.0 \pm 8.7** | 49.7 \pm 6.0** |
| 75 | 49.3 \pm 6.1** | 59.7 \pm 9.0** | 59.3 \pm 9.1** |
| 100 | 74.0 \pm 14.0** | 110.3 \pm 14.0** | 70.0 \pm 6.1** |

Cells were treated with various dose of CSC for 24 h. Cells were washed with PBS and fixed with a solution(methanol : acetic acid, 3 : 1). Cells were dried in the air and then 5% Giemsa solution was applied to stain cells. Data are mean \pm S.D.

** $P < 0.01$ compared with the control.

¹⁾ Dimethyl sulfoxide (1%) was used for solvent control.

Table 3. Effect of CSC on the induction of micronucleus in human cells after 24 h exposure

| CSC ($\mu\text{g/mL}$) | Micronucleated cells / 1000 cells scored | |
|-----------------------------|---|------------------|
| | MCF-7 | A549 |
| 0 ¹⁾ | 13.0 \pm 1.0 | 30.0 \pm 3.0 |
| 40 | 24.0 \pm 3.0** | 54.2 \pm 13.5* |
| 80 | 41.0 \pm 4.0** | 34.6 \pm 13.1 |
| 120 | 85.1 \pm 7.2** | 10.3 \pm 20.0 |

Cells were treated with CSC for 24 h and then, Cells were washed with media and replaced with fresh media. Cells were cultured for a further 24 h prior to fixation and staining. Data are mean \pm SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the control.

¹⁾ Dimethyl sulfoxide(1.2%) was used for solvent control.

핵 세포수가 증가하였고(Table 3), CSC 농도별 소핵세포 생성에 관한 용량상관성도 높았다(Table 4). A549 세포의 경우 CSC 40 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 소핵세포가 대조군에 비해 증가되었으나 80 $\mu\text{g/mL}$

이상의 농도에서는 오히려 소핵세포 생성율이 감소하였다.

고 찰

최근 들어 덜 해로운 담배개발이 중요시되고 있다. 따라서 제품담배의 품질을 평가함에 있어서도 성분중심의 감소방안과 더불어, 실제적으로 생체에 영향을 측정할 수 있는 생물학적 안전성 평가의 필요성이 증대되고 있다. 본 연구에서는 CORESTA가 추진중인 3가지 *in vitro* 안전성 평가방법중의 하나이며, 아직 guideline이 설정되지 않은 소핵시험법에 초점을 맞추어, 이 방법에 사용가능한 5종의 세포주를 대상으로 표준담배(K1R4F)의 CSC에 대한 세포독성 및 소핵시험을 수행하여 세포주별 소핵생성 빈도수를 비교 평가함으로써, 소핵시험에 적용할 수 있는 적정세포주를 선택하고자 하였다.

유전독성 평가에 이용되는 *in vitro* 소핵시험은 염색체 수준에서 유전독성을 검색할 수 있는 간단하면서도 경제적인 시험법이며(Fenech and Morley, 1985; Kirsch-Volders *et al.*, 1997), 세포질 분열만 선택적으로 억제할 수 있는 cytochalasin B의 처리 유·무에 따라 세포질분열 억제 소핵시험과 일

Table 4. The dose-response relationship in induction of micronucleus in various cell lines by the CSC

| Cell lines (exposure time) | Linear regression equation | Correlation coefficient <i>R</i> |
|-------------------------------|--|-------------------------------------|
| CHO-K1 (24 h) | $Y = 17.9 + 0.507 X (\mu\text{g}/\text{mL})$ | 0.886 |
| V79 (24 h) | $Y = 7.1 + 0.904 X (\mu\text{g}/\text{mL})$ | 0.911 |
| BALB/c 3T3 (24 h) | $Y = 18.7 + 0.523 X (\mu\text{g}/\text{mL})$ | 0.926 |
| MCF-7 (24+24 h) | $Y = 6.5 + 0.575 X (\mu\text{g}/\text{mL})$ | 0.941 |
| A549 (24+24 h) | $Y = 43.2 - 0.178 X (\mu\text{g}/\text{mL})$ | 0.482 |

Y : Predictive frequency of micronucleated cells per 1000 cells scored at selected dose of CSC

반 소핵시험으로 구분되어지며(Fenech, 1993), 본 실험에서는 일반 소핵시험을 이용하였다. 최근에는 다양한 probe를 사용하는 형광면역염색법(FISH)을 이용하여 clastogen과 aneugen을 정확하게 분석해 낼 수 있게 되었다(Zijno *et al.*, 1994).

In vitro 평가 방법에는 CHO, HepG2, V79, A549, L5178Y와 같은 다양한 세포주와 peripheral blood lymphocyte, hephatocyte 등과 같은 일차배양세포들을 사용되고 있으나(Fenech, 1993), 이들 각 세포는 특징 및 세포주기가 다르기 때문에 화학물질에 대한 독성 정도가 일치하지 않고(Zhang *et al.*, 1995; Erexson *et al.*, 2001), sensitivity도 물질에 따라 차이를 보인다고 알려져 있다(Gu *et al.*, 1992).

현재까지 담배연기성분의 독성 평가를 위한 최적 조건을 설정하기 위한 여러 연구들이 보고되고 있다(Bombick and Doolittle, 1992; Putnam *et al.*, 2002). 담배연기성분을 소핵시험에 적용할 농도를 결정하기 위해서는 세포독성 측정이 필요하며, 이를 근거로 소핵시험에 사용될 대상물질의 농도범위를 결정한다. 일반적으로 소핵시험은 EC₅₀을 최고농도로 하여 수행한다. CSC의 세포독성(EC₅₀)을 측정할 결과, 설치류유래세포(CHO-K1, V79와 BALB/c 3T3)는 각각 140, 125와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, 사람유래 세포주(MCF-7과 A549)의 경우는 각각 116.2와 109.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. CSC의 독성은 대사활성제(이물질 대사효소)의 유·무에 따라 차이를 나타내므로(Doolittle *et al.*, 1990; Roemer *et al.*, 2002), 세포주별 EC₅₀이 다른 것은 세포주별

대사활성(세포내 이물질 대사 효소의 활성) 능력이 다르기 때문인 것으로 사료된다(Tsao *et al.*, 1984).

CHO-K1, V79, BALB/c 3T3, MCF-7과 A549 등 5종의 세포주에 대한 CSC 농도별 소핵시험을 실시한 결과, A549 세포주를 제외한 모든 세포주에서 농도 의존적으로 소핵 세포수가 유의적으로 증가하였다. A549 세포주의 경우는 CSC에 대한 세포독성(EC₅₀)이 109.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인데도 불구하고, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 소핵세포가 오히려 감소했다. 소핵세포주별 소핵생성율을 비교하고자 선형회귀분석을 실시하였다. Table 4.의 회귀식에서 볼 수 있는 것처럼, 단위 CSC($\mu\text{g}/\text{mL}$)당 소핵생성 빈도수가 V79 세포주의 경우 0.904로 다른 세포주에 비해 높았다. 이 결과의 의미는 단위 CSC 처리시 V79 세포의 소핵생성 빈도수가 다른 세포주에 비해 많다는 것을 의미한다. 각 세포주별로 소핵생성 빈도수가 다른 것은 세포주기, DNA 수복능력, 유전자 돌연변이, 세포분열시 작용하는 단백질의 기능 등과 같은 다양한 요인에 의해 소핵생성이 영향을 받기 때문일 것이라 사료된다(Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

향 후 덜 해로운 담배개발에 적용하기 위해서는 담배별, 잎담배별, 사용재료별 유전독성의 정도를 비교 평가하는 것이 중요하기 때문에, 담배시료에 대해서 소핵생성 빈도가 큰 세포주를 이용하는 것이 바람직하다. 또한 담배시료의 유전독성 유·무 판별이 아니라, 담배시료별 유전독성의 정도를 비교평가하기 위해서는 담배시료에 민감성

(susceptibility)이 높은 세포주 선택이 중요하기 때문에, V79 세포를 이용하여 담배시료의 소핵생성 시험을 수행하는 것이 효율적이라 사료된다.

결 론

본 연구에서는 표준담배(K1R4F)의 연기 응축물(CSC)에 대하여 5가지 세포주(human: MCF-7, A549, Murine: CHO-K1, V79, BALB/c 3T3)를 이용해서 세포독성과 유전독성을 비교 조사하였다. 독성평가를 위해 본 실험에서는 MTS법(세포독성)과 소핵 시험법(유전독성)을 사용하였다. CSC 처리시(0 ~ 150 µg/mL) 모든 세포주에서 농도 의존적으로 세포독성이 증가되었다. CSC에 대한 EC₅₀은 CHO-K1, V79, BALB/c 3T3, MCF-7과 A549 세포에서 각각 140, 125, 100, 116과 109 µg/mL로 나타났다. 한편 각각의 세포주에서의 자발적인 소핵 생성율은 일정했으며, CSC를 각각의 세포주에 처리시(0 ~ 100 µg/mL) CHO-K1, V79, BALB/c 3T3와 MCF-7 세포에서 농도 의존적으로 소핵생성이 증가되었다. 회귀분석을 이용하여 세포주별 CSC의 용량 상관관계를 조사한 결과, 상관계수(R)가 0.8이상이었으며, 소핵생성 빈도수(회귀식의 기울기)는 V79 세포가 0.904로서 가장 높았다. 이상의 결과로부터, 담배시료의 소핵생성 평가에는 민감성(susceptibility)이 높은 V79 세포를 이용하는 것이 효율적일 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Andreoli, C., Gigante, D. and Nunziata, A. (2003) A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicol. in Vitro* 17: 587-594.

Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364.

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 & Exp. Toxicol.* 13: S1-S117.

Balls, M. and Clothier, R. H. (1992) Cytotoxicity assays for intrinsic toxicity and irritancy. In: Watson, R.R. (Ed), *In Vitro methods of Toxicology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 37-52.

Belinsky, S. A., Walker, V. E., Maronpot, R. R., Swenberg, J. A. and Anderson M. W. (1987) Molecular dosimetry of DNA adduct formation and cell toxicity in nasal mucosa following exposure to a specific carcinogen: Relationship to induction of neoplasia. *Cancer Res.* 47: 6058-6065.

Bombick, D. W. and Doolittle, D. J. (1992) The effect of cell type on chemical toxicity in the neutral red cytotoxicity assay. *Toxicologist* 12: 373-376.

Bombick, D. W., Ayres, P. H., Putnam, K., Bombick, B. R. and Doolittle, D. J. (1998) Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 3. In vitro toxicity of whole smoke. *Food Chemical Toxicol.* 36: 191-197.

Buckton, K. E. and Evans, H. J. (1973) Method for the analysis of human chromosome aberration. World Health Organization, Geneva, Switzerland pp.18.

Chen, Q., Jones, T. W., Brown, P. C. and Steven, J. L. (1990) The mechanism of cysteine conjugate cytotoxicity in renal epithelial cells: Covalent binding leads to thiol depletion and lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 265: 21603-21611.

DeMarini, D. M. (1983) Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate. *Mutat. Res.* 114: 59-89.

- Doolittle, D. J., Lee, C. K., Ivett, J. L., Mirsalis, J. C., Riccio, E., Rudd, C. J., Burger, G. T. and Hayes A. W. (1990) Comparative studies on the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn or only heat tobacco. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 15: 93-105.
- Erexson, G. L., Periago, M. V. and Spicer, C. S. (2001) Differential sensitivity of chinese hamster V79 and chinese hamster ovary (CHO) cells in the in vitro micronucleus screening assay. *Mutat. Res.* 495: 75-80.
- Fenech, M. and Morley, A. A. (1985) Measurement of micronucleic in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147: 29-36.
- Fenech, M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285: 35-44.
- Fenech, M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.
- Gu, Z. W., Whong, W. Z., Wallace, W. E. and Ong, T. M. (1992) Induction of micronuclei in BALB/c 3T3 cells by selected chemicals and complex mixtures. *Mutat. Res.* 279: 217-222.
- Johnstone, R. A. W. and Plimmer, J. R. (1959) The chemical constituents of tobacco and tobacco smoke. *Chemical Review* 59: 885-936.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and VanHummelen, 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.
- Kirsch-Volders, M., Vamhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U. and Decordier, I. (2003) Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol. Letters* 140-141: 63-74.
- Kosak, A. I. (1954) The composition of tobacco smoke. *Experientia* 10: 69-71.
- Miller, S., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998) Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test. *Mutat. Res.* 410: 81-116.
- Putnam, K. P., Bombick, D. W. and Doolittle D. J. (2002) Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. in Vitro* 16: 599-607.
- Riss, T. L. and Moravec, R. A. (1992) Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assay. *Mol. Biol. Cell* (Suppl.) 3: 184-191.
- Roemer, E., Tewes, F. J., Meisgen, T. J., Veltel, D. J. and Carmines, E. L. (2002) Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 3: In vitro genotoxicity and cytotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 40: 105-111.
- Sanders, C., Swedlund, T. D., Stephens, T. J. and Silber, P. M. (1991) Evaluation of six in vitro toxicity studies: Comparison with in vivo ocular and dermal irritation potential of prototype cosmetic formulations. *Toxicologist* 11: 282-289.
- Shirhatti, V. and Krishna, G. (1990) A simple and sensitive method for monitoring drug induced cell injury in cultured cells. *Analytical Biochemistry* 147: 410-418.
- Stedman, R. L. (1968) The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chemical Review* 68: 153-207.
- Tsao, M. S., Smith, J. D., Nelson, K. G. and Grisham, J. W. (1984) Adiploid epithelial cell line from normal rat liver with

- phenotypic properties of "oval" cells. *Exp. Cell Res.* 154: 38-52.
- Vetel, D. and Hoheneder, A. (1996) Characterization of cigarette smoke-induced micronucleic in vitro. *Exp. Toxic. Pathol.* 48: 548-550.
- Yamasaki, H., Ashby, J., Bignami, M., Jongen, W., Linnainmaa, K., Newbold, R. F., Nguyen-Ba, G., Parooi, 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.
- Zhang, L. S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995) A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test. *Mutat. Res.* 347: 105-115.
- Zijno, A., Marcon, F., Leopardi, P. and Crebelli, R. (1994) Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by in situ hybridization with a centromeric DNA probe; implications for the human lymphocyte in vitro micronucleus assay using cytochalasin B. *Mutagenesis* 9: 225-232.