



사람 MCF-7 세포에서 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)에 의한 소핵형성과 타목시펜에 의한 TCDD유도 소핵형성 억제효과

식품의약품안전청 국립독성연구소 유전독성과, ¹고려대학교 생물학과

김종원 · 한의식 · 전해승 · 엄미옥
박미선 · 정해관 · 심웅섭¹ · 오혜영

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Induced Micronuclei Formation and Inhibition Effect of Tamoxifen Against TCDD-induced Micronuclei Formation in Human Breast Estrogen Receptor Positive MCF-7 Cells

Jong Won Kim, Eui Sik Han, Hye Seung Jun, Mi Ok Eom,
Mi Sun Park, Hai Kwan Jung, Woong Seop Sim¹,
and Hye Young Oh

*Genetic Toxicology Division, National Institute of Toxicological Research,
Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea,
¹Molecular Biology Laboratory, Department of Biology,
Korea University, Seoul 136-701, Korea*

To identify mutagenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) which are not identified by ICH (International Harmonization of Technological Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) guideline-recommended standard genotoxicity test battery; Ames test, chromosome aberration assay, mouse lymphoma *tk*⁺ assay, *in vivo* micronucleus assay. the *in vitro* micronucleus assay (MN) was chosen. The *in vitro* MN using MCF-7 cells was useful to identify mutagenicity of bisphenol A and di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). In this study, we found that TCDD induced MN formation significantly. Further to investigate the relationship between MN formation and estrogen receptor (ER), we comparatively assessed MN formation of TCDD in different human breast cells; MCF-7 cells (ER positive) and in MCF-10A cells (ER negative), MDA-MB-231 cells (ER negative). TCDD induced MN formation in MCF-7 cells (ER positive) but not or little induced MN formation in MCF-10A cells (ER negative) and MDA-MB-231 (ER negative). We also have examined the effect of estrogen inhibitor, tamoxifen, against TCDD induced MN formation. Tamoxifen inhibited TCDD-induced MN formation up to 47.3% in MCF-7 cells. We concluded the *in vitro* MN using MCF-7 cells is a good test method for detecting nongenotoxic carcinogen and

identifying the genotoxicity of endocrine disruptors which are not identified by standard genetic toxicology test battery and additive endpoints should be included.

Key Words: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), *in vitro* micronucleus assay, Estrogen receptor, MCF-7 cells

서 론

발암물질은 유전독성 발현여부에 따라 유전독성 발암물질(genotoxic carcinogen)과 비유전독성 발암물질(nongenotoxic carcinogen)로 나눌 수 있다.^{1~4)} 유전독성 물질은 그 위해성을 유전독성시험법을 이용하여 쉽게 검색할 수 있으며^{5~8)} 그 위해성을 예측하여, 사용을 규제하거나 독성을 경감시킬 수 있는 방법을 모색할 수 있다.^{9~11)} 그러나 비유전독성 발암물질은 의약품등록의 국제적 합의를 위한 협의체(ICH: International Conference on Harmonization of Technological Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) 등에서 제시하는 표준 유전독성시험법에서는 발견이 되지 않아 그 위해성을 예측하기 위한 새로운 시험법이 요구되고 있다.

본 연구에서는 기존에 비유전독성 발암물질로 알려진 물질이며, 내분비계 장애물질들 중에서 ICH가 권유하는 표준 유전독성 시험법 즉 미생물을 이용한 복귀돌연변이,^{12~14)} 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험,¹⁵⁾ 마우스 림포마 유전자 돌연변이시험,^{16,17)} 생체내 소핵시험¹⁸⁾에서 모두 음성을 나타낸 2,3,7,8-tetrachlorobenzo-p-dioxin (TCDD)을 선정하였으며, 사람 유래 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor; ER) 양성인 MCF-7세포를 이용한 생체의 소핵시험은 사용되는 세포의 조직특이성에 따라 비유전독성물질을 검색할 수 있는 방법으로 나타났기 때문에,^{19,20)} MCF-7 세포를 이용한 생체의 소핵형성능을 연구하였다. 또한 사람 유방 유래의 ER 존재여부에 따른 소핵형성능과의 관련성을 연구하기 위하여 사람 유방 유래의 ER negative MCF-10A세포, MDA-MB-231세포를 이용하여 ER 유무와 세포의 status에 따른 소핵형성능

의 차이를 살펴보았다.

Tamoxifen은 ER 억제제로 알려져 있으며, 유방암 치료제로 임상 적용되고 있다. ER 관련성을 confirm하기 위하여 ER inhibitor인 tamoxifen을 처리하여 억제효과를 연구하였다.

재료 및 방법

1) 재료

TCDD (Cas. no. 1746-01-6), MTT (Sigma, M-2128)를 Sigma Aldrich에서, 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 미국의 Gibco BRL사에서 구입하였다.

2) 세포주 및 세포배양

사람 유방 유래 세포로서 human breast carcinoma, estrogen receptor positive MCF-7 cells, human breast carcinoma estrogen receptor negative MDA-MB-231 cells, human breast normal, immortal MCF-7A cells를 사용하였다. MCF-7 cells 및 MDA-MB-231 cells의 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1%의 penicillin-streptomycin을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였으며, MCF-10A는 DMEM/F12, 10 μ g/ml insulin (bovine), 100 ng/ml cholera toxin, 0.5 μ g/ml hydrocortison, 20 ng/ml fungizone, 2 mM L-glutamine, 100 μ g/ml penicillin/sterptomycin mixture, 5% horse serum이 함유된 배지를 사용하였다. 매 3~4일마다 계대배양하였으며 자연발생적인 돌연변이의 생성을 최소화하고자 구입 후부터 10번 미만으로 계

대배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 포화 습도 하에서 5% CO₂를 공급하는 37°C의 Dual CO₂ incubator (Shel-lab 1845 TC, USA)에서 배양하였다.

3) 시험물질의 처리

시험물질을 24시간 처리하였으며, 시험물질 처리 후 24시간째에 표본 슬라이드를 제작하였다.

4) 농도설정을 위한 세포독성시험

Mitochondrial dehydrogenase의 활성지수를 나타내는 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 비색환원분석법을 수행하였다. Mossman²¹⁾의 방법을 변형하여 96 well plate에 각 well (n=4)당 50,000개의 세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하의 incubator에서 배양한 후 시험조건과 동일하게 24시간 처리하였다. 처리시간이 지나면 PBS로 충분히 씻어주고 배지를 교환하여 각 well당 10 μ l의 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 4시간 동안 노출시켰다. 상층액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO) 150 μ l를 넣은 다음 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 540 nm 및 570 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.

5) 생체의 소핵시험

최고용해도를 기준으로 하여 예비시험의 최고 농도를 결정하였으며, 공비 10을 적용하였다. 또한, 용매대조군으로 DMSO 처리군과 기지의 양성 대조군으로 염색체 구조이상 유발물질인 mitomycin C (0.1 μ g/ml)와 염색체 수적이상 유발물질인 DES (2.1 μ g/ml)를 각각 처리하여 시험하였다. 세포를 직경 60 mm의 petri dish에 1 \times 10⁵/ml 되도록 파종하여 1일간 배양한 후, 각각 시험물질과 양성 대조물질 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 : acetic acid=3 : 1)으로 2회 고정시킨 후 50% 질산 전처리하여 냉장보관된 슬라이드에 세포침전액을 떨어뜨려 염색체 표본을 만들고, 공기 건조 방법으로 슬라이드를 제작하여, 5% Giemsa 염색액으로 30분간 또는 Acridine orange 염색액을 이용하여 염색한 후 광학현미경 또는 형광현미경 (\times 400~ \times 1,000)으로 관찰하였다.

한 시험 농도당 1,000개의 세포를 광학현미경 (Karl Zeiss, \times 400~ \times 1,000) 또는 형광현미경(Nikon, \times 400~ \times 1,000) 하에서 판독하여 small MN, large MN, multi MN으로 구분하여 관찰하였다.²²⁾ 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.

결 과

1) TCDD의 세포독성

(1) MCF-7 세포에서의 세포독성: MCF-7 세포에서의 TCDD의 세포독성시험 결과, 0.01 pM~10 nM까지의 전 농도에서 유의성있는 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1). 반면 대조군에 비해 TCDD

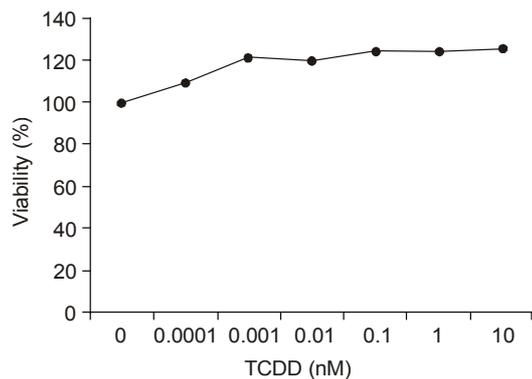


Fig. 1. Cytotoxicity of TCDD for 24 hrs in human breast estrogen receptor positive MCF-7 cells.

로 처리한 각 군에서 세포증식이 10~20% 증가된

양상을 보였다.

(2) **MCF-10A 세포에서의 세포독성:** MCF-10A 세포에서의 TCDD의 세포독성시험 결과, 0.1 pM~10 nM까지의 농도에서 세포독성을 유의적으로 나타내지 않았다(Fig. 3).

(3) **MDA-MB-231 세포에서의 세포독성:** MDA-MB-231 세포에서의 TCDD의 세포독성시험 결과, TCDD는 0.1 pM~10 nM까지의 농도에서 유의성 있는 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 5).

2) TCDD의 생체외 소핵시험

(1) **MCF-7 세포에서의 소핵시험:** MCF-7 세포에서의 생체외 소핵시험 결과, TCDD는 음성대조군에 비해, 0.01 pM, 1 pM, 0.01 nM 농도에서 유의

적인 차이를 보였다($p < 0.01$)(Fig. 2).

(2) **MCF-10A 세포에서의 소핵시험:** 에스트로젠 수용체 유무에 따른 영향을 보기 위하여 MCF-10A 세포에서의 생체외 소핵시험에서 TCDD는 0.1 pM~10 pM까지의 농도에서 약한 소핵형성을 유발하였다. 1 pM농도에서는 음성대조군에 비해 유의적으로 높은 소핵형성을 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 4).

(3) **MDA-MB-231 세포에서의 소핵시험:** MDA-MB-231 세포에서의 생체외 소핵시험에서 소핵형성을 유발하지 못하였다(Fig. 6). 각 세포들과의 비교는 다음과 같다(Fig. 7).

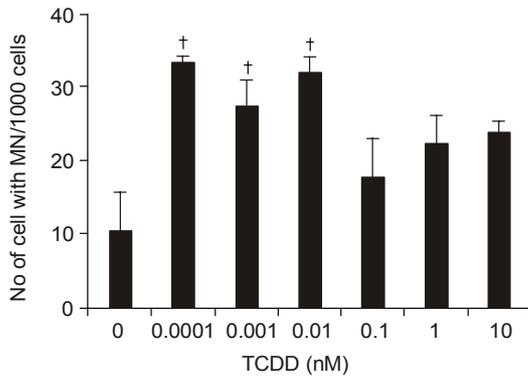


Fig. 2. Micronuclei formation of TCDD for 24 hrs in human breast estrogen receptor positive MCF-7 cells. [†] $p < 0.01$

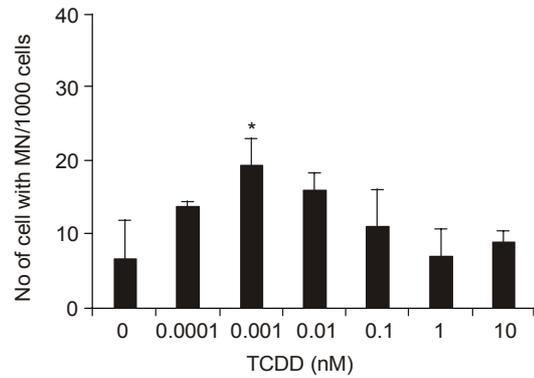


Fig. 4. Micronuclei formation of TCDD for 24 hrs in human breast estrogen receptor negative MCF-10A cells. * $p < 0.05$

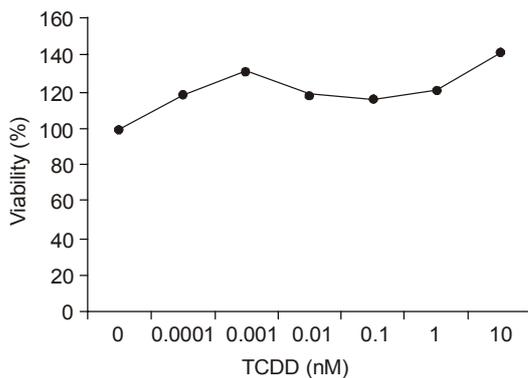


Fig. 3. Cytotoxicity of TCDD for 24 hrs in human breast estrogen receptor negative MCF-10A cells.

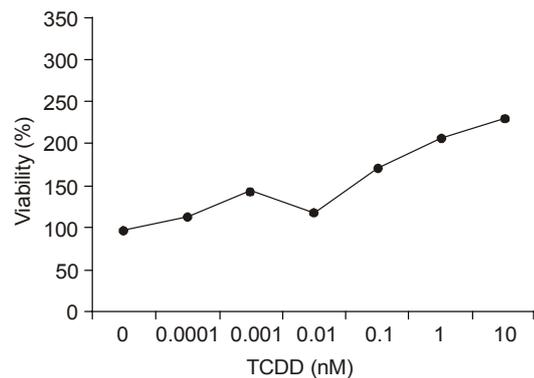


Fig. 5. Cytotoxicity of TCDD for 24 hrs in human breast estrogen receptor negative MDA-MB-231 cells.

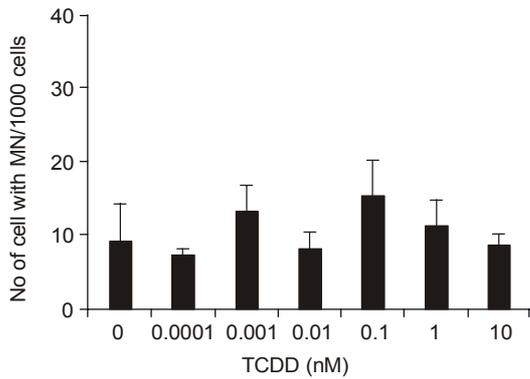


Fig. 6. Micronuclei formation of TCDD for 24 hrs in human breast estrogen receptor negative MDA-MB-231 cells.

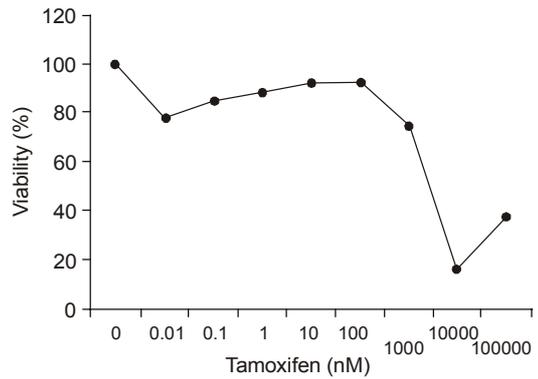


Fig. 8. Cytotoxicity of tamoxifen in human breast MCF-7 cells.

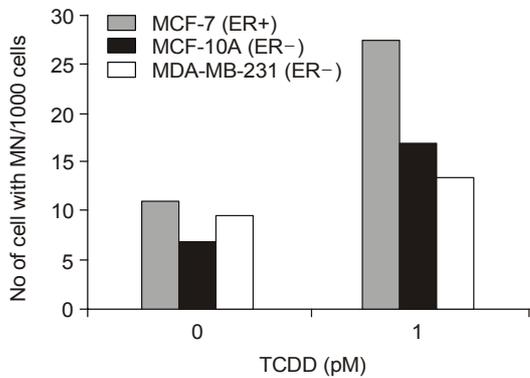


Fig. 7. Comparative evaluation of micronuclei formation of TCDD (0.1 pM) for 24 hrs in MCF-7, MCF-10A, and MDA-MB-231 cells.

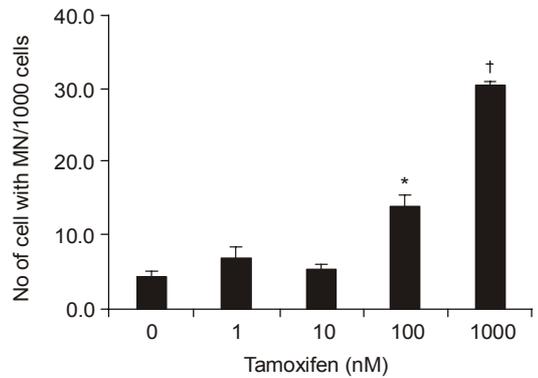


Fig. 9. Micronuclei formation of tamoxifen in human breast MCF-7 cells. *p<0.05, †p<0.01

3) Tamoxifen의 생체의 소핵시험 및 TCDD유도 소핵형성 억제효과

(1) MCF-7 세포에서의 tamoxifen의 세포독성: Tamoxifen의 억제효과를 보기 위하여 우선 tamoxifen 자체의 세포독성과 소핵형성능을 수행하였다. MCF-7 세포에서의 tamoxifen의 세포독성시험 결과, 0.01 nM~100 nM 농도에서는 음성대조군에 비해 80% 이상의 생존율을 보였으나, 1,000 nM, 1,000 nM에서는 40% 이하의 생존율을 나타냈다(Fig. 8).

(2) MCF-7 세포에서의 tamoxifen의 소핵시험: MCF-7 세포에서의 생체의 소핵시험에서 tamoxi-

fen은 음성대조군에 비해 100 nM, 1,000 nM 농도에서 유의적으로 소핵형성을 증가시켰으며(p<0.05, p<0.01), 10 nM 이하에서는 음성대조군과 비슷하여 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 병용처리 시험에서의 최고농도는 10 nM로 결정하였다(Fig. 9).

(3) MCF-7 세포에서의 TCDD와 병용처리된 zctamoxifen의 세포독성: MCF-7 세포에서의 TCDD 1 pM과 병용처리된 tamoxifen의 세포독성시험 결과, 음성대조군과 비교하여 전 농도에서 유의성 있는 세포독성을 나타나지 않았다(Fig. 10).

(4) MCF-7 세포에서의 TCDD와 병용처리된 tamoxifen의 소핵시험: 소핵형성을 유발하지 않는 10 nM을 최고 농도로 3단계의 농도를 결정하여

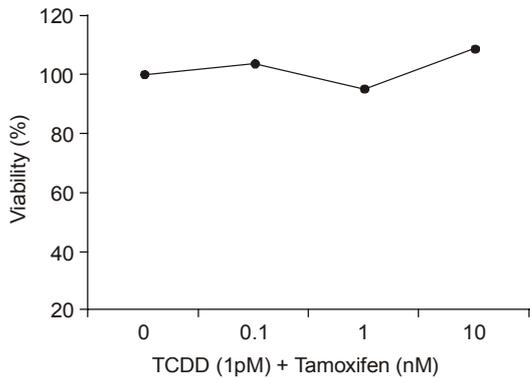


Fig. 10. Cytotoxicity of tamoxifen with TCDD (1 pM) in human breast MCF-7 cells.

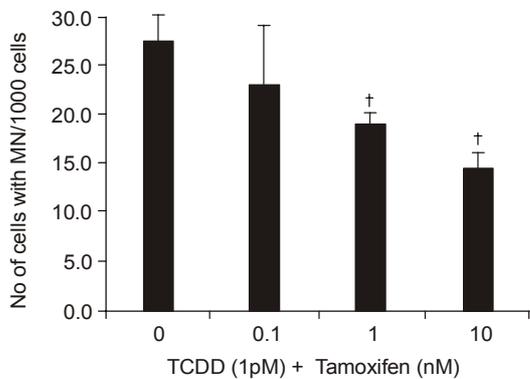


Fig. 11. Inhibitory effect of tamoxifen on TCDD (1 pM)-induced micronuclei formation in human breast MCF-7 cells. † p < 0.01

tamoxifen을 병용처리하였다. MCF-7 세포를 이용한 생체외 소핵시험에서 tamoxifen은 1 nM, 10 nM 농도 병용처리시 TCDD 유도 소핵형성을 각각 30.9%, 47.3% 유의적으로 억제하였다(p < 0.01) (Fig. 11).

고찰

TCDD는 소각로 등에서 배출되는 다이옥신의 일종으로서 가장 강력한 발암물질로 알려져 있다 (IARC carcinogen Group 1).²³⁾ 그러나 ICH 가이드라인에서 제시하는 미생물을 이용한 복귀연변이 시험(OECD471),^{12~14)} 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험(OECD473),¹⁵⁾ 마우스 림포마 유전

자 돌연변이시험(OECD476),^{16,17)} 소핵시험¹⁸⁾ 등의 결과에서 음성의 결과를 나타내었다(자세히 정리할 것). 또한 OECD 가이드라인 등에서 제시하는 많은 유전독성 시험 즉, 생체내 염색체이상시험 (OECD475),^{24~26)} 자매염색분체교환시험(OECD 479),^{21,27,28)} 초파리를 이용한 열성치사시험(OECD 477),²⁹⁾ mouse spot test (OECD484),³⁰⁾ 우성치사시험(OECD478)³¹⁾ 등의 연구에서도 음성의 결과를 나타내었다. TCDD와 같은 대표적인 비유전독성 발암물질은 ICH 가이드라인에서 제시하는 표준 유전독성시험법에서는 발견이 되지 않아 그 위해성을 예측하기 위한 새로운 시험법이 요구되고 있다.

본 연구에서는 사람 유래 ER 양성인 MCF-7 세포를 이용한 생체외 소핵시험은 사용되는 세포의 조직특이성에 따라 비유전독성물질을 검색할 수 있는 방법으로 나타났기 때문에,²¹⁾ MCF-7 세포를 이용한 TCDD의 생체외 소핵형성능을 연구하였다. 본 연구결과 TCDD의 MCF-7세포(ER positive)에서 소핵형성을 유발하였으나, MCF-10A 및 MDA-MB-231세포에서는 음성의 결과를 나타내었다. TCDD가 ER과의 관련성을 확인하기 위하여 ER 억제제로 잘 알려져 있는 tamoxifen을 이용하여 소핵형성이 억제되는지를 관찰하였다. tamoxifen (10 nM)은 TCDD에 의해 형성된 소핵을 최고 47.3%까지 억제하였다. TCDD에 의하여 생성된 소핵은 ER과의 관련성이 있는 것으로 생각되어진다. TCDD는 Hepa1C1C7 (AhR positive) cell를 이용한 생체외 소핵시험에서 자체로는 소핵형성을 유발하지 못하였지만, B[a]P 또는 담배연기 농축물(cigarette smoke condensate)에 의한 AhR-의존성 소핵형성을 증진시킨다고 보고되었다.³²⁾ 또한 Wistar rat skin fibroblasts에서 two stage로 적용하였을 경우 소핵형성능을 증진시켰다고 보고되었다.³³⁾ 지금까지 TCDD는 AhR을 통한 발암기전이 많이 알려져 있는데, 주요 기전 외에도 소핵을 형성하는 기전은 ER을 통한 crosstalk이 이루어지는 것으로 생각되어지며, 추후 지속적인 연구가 진행되어져야 할 것으로 사료된다.

TCDD에 대한 연구는 현재까지 많은 연구가 진행되어져 왔으며, 아직도 많은 연구가 진행되어지고 있다. TCDD를 검색하였던 시험법을 살펴보면,

DNA adduct를 형성하였고,^{34,35)} yeast 및 mouse에서 intra-chromosomal recombination을 유발하였으며,³⁶⁾ *Saccharomyces cerevisiae*에서 유전자돌연변이를 유발하였으며,³⁷⁾ immortalized human keratinocyte RHEK-1 cell에서 세포형질전환을 유발하였으며,³⁸⁾ mouse embryo fibroblast C3H10T1/2 cells, rat tracheal epithelial cells 등에서 일단계 세포형질전환시험법에서는 세포형질전환을 유발하지 못하였지만,³⁹⁾ MNNG 등으로 전처리된 두 단계 세포형질전환시험법에서 세포형질전환을 유발하였으며,³⁹⁻⁴¹⁾ 또한 Syrian hamster embryo (SHE) 일차배양 세포에서 세포형질전환을 유발하였다.⁴²⁾ 비유전독성 발암물질을 검출한다고 알려진 일차배양간세포 및 초기 패시지의 WB F344간세포에서 생체의 gap junction을 통한 세포간 대화 억제(inhibition of gap junctional intercellular communication, iGJIC)를 유발하였다.⁴³⁾

이상과 같은 ICH guideline에서 제시하는 표준 유전독성시험법으로서는 검색이 안되는 대표적인 비유전독성 발암물질인 TCDD의 변이원성 및 그 억제효과를 확인하였다. 이수성을 검출을 위한 *in vivo* 상태를 simulation 할 수 있는 사람유래의 세포를 이용한 생체의 소핵시험, 세포형질전환을 검색할 수 있는 SHE 세포를 이용한 세포형질전환시험, 생체의 gap junction을 이용한 세포간 대화 억제를 연구할 수 있는 iGJIC 등을 포함한다면 표준유전독성시험법에서 검색이 되지 않는 TCDD의 보다 더 정확한 위해성을 파악할 수 있으며, 예방할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 여러 적용하는 시험계의 상이함으로 인해 상반된 결과에 대한 해석이 쉽지 않았는데, 위에서 제시된 다양한 지표를 포함하는 유전독성 다지표 평가법(genotoxicity multi-endpoint assessment)을 개발하여 DNA damage, DNA repair, apoptosis, cell cycle arrest를 포함하는 기전연구가 동시에 진행되어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

- 1) TCDD는 MCF-7 세포(ER positive)를 이용한 생체의 소핵시험에서 양성을 나타내었다.
- 2) TCDD는 MCF-10A 세포(ER negative), MDA-

MB-231 세포(ER negative)를 이용한 생체의 소핵시험에서 소핵형성이 미미하거나 전혀 증가하지 않았다.

3) Tamoxifen 자체도 100 nM 이상에서는 소핵형성능을 나타내었으나, 10 nM 이하에서는 소핵형성을 유발하지 못하였다.

4) TCDD에 의한 소핵형성은 에스트로젠 길항제인 tamoxifen에 의해 최고 47.3%까지 억제되었다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구센터 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) Ashby J, Brady A, Elcombe R, Elliott BM, Ishmael J, Odum J, Tugwood JD, Kettle S, Purchase IFH. Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Human & Experimental Toxicology* 1994; 13(sup.2): S1-S117.
- 2) Ashby J, Water MD, Preston J, Adler ID, Gouglass GR, Fielder R, Shelby MD, Anderson D, Sofuni T, Gopalan HNB, Becking G, Sonich-Mullin C. 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* 1996; 352: 153-157.
- 3) Yamasaki H, Ashby J, Bignami M, Jongen W, Linnainmaa K, Newbold RF, Nguyen-Ba G, Parodi S, Rivedal E, Schiffmann D, Simons JW, Vasseur P. Nongenotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project. *Mutat Res* 1996; 353: 47-63.
- 4) Ashby J, Morrod RS. Detection of human carcinogens. *Nature* 1991; 352: 185-6.
- 5) 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>
- 6) 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>
- 7) OECD guideline, Genetic toxicology, TG no 471-478, <http://www.oecd.org//ehs/test/health.htm>
 - 8) 유전독성과. 의약품 등의 독성시험기준, 식품의약품안전청고시 제1999-61호, 42-45, 74-76, 1999. 12. 22
 - 9) Kim JW, Park CH, Han ES, Sohn SJ, Kang IH, Kim IS, Ha KW, Oh HY. 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, 1999.
 - 10) Han ES, Kim JW, Eom MO, Kang IH, Kang HJ, Choi JS, Ha KW, Oh HY. Inhibitory effects of *Ecklonia Stolonifera* on gene mutation on mouse lymphoma tk⁺/- locus in L5178Y-3.7.2C cell and bone marrow micronuclei formation in ddY mice. *Environmental Mutagen & Carcinogen* 2000; 20: 104-111.
 - 11) Park CW, Oh HY, Heo OS, Sohn SJ, Han ES, Kim JW, Kim SH, Kang IH, Ha KW. Inhibition of isophorone induced mutagenicity by ellagic acid in three short term mutagenicity tests using mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Toxicological Sciences* 1998; 23(SupII): 304.
 - 12) Gilbert P, Saint-Ruf G, Poncelet F, Mercier M. Genetic effects of chlorinated anilines and azobenzenes on *Salmonella typhimurium*. *Arch Environ Contam Toxicol* 1980; 9: 533-541.
 - 13) Geiger LE, Neal RA. Mutagenicity testing of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in histidine auxotrophs of *Salmonella typhimurium*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981; 59: 125-9.
 - 14) Mortelmans K, Haworth S, Speck W, Zeiger E. Mutagenicity testing of agent orange components and related chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 75: 137-46.
 - 15) Galloway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C, Bloom AD, Nakamura F, Ahmed M, Duk S. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ Mol Mutagen* 1987; 10(Suppl 10): 1-175.
 - 16) Meyne J, Allison DC, Bose K, Jordan SW, Ridolpho PF, Smith J. Hepatotoxic doses of dioxin do not damage mouse bone marrow chromosomes. *Mutat Res* 1985; 157: 63-9.
 - 17) Rogers AM, Andersen ME. Mutagenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and perfluoro-n-decanoic acid in L5178Y mouse-lymphoma cells. *Mutat Res* 1982; 105: 445-9.
 - 18) McGregor DB, Brown AG, Howgate S, McBride D, Riach C, Caspary WJ. Responses of the L5178Y mouse Lymphoma cell forward mutation assay. V: 27 coded chemicals. *Environ Mol Mutagen* 1991; 17: 196-219.
 - 19) Kim JW, Han ES, Park MS, Eom MO, Kim IS, Jun HS, Jung HK, Sim WS, Oh HY. Bisphenol A-induced micronuclei formation in various cell lines with human origin. *Environmental Mutagen & Carcinogen* 2000; 20: 112-121.
 - 20) Kim JW, Han ES, Park MS, Eom MO, Kim IS, Jun HS, Jung HK, Som WS, Oh HY. DNA damage and micronuclei Induced by di(2-ethylhexyl) phthalate in human breast MCF-7 cells. *Environmental Mutagen & Carcinogen* 2001; 21: in press.
 - 21) Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
 - 22) Matsuoka A, Matsuura K, Sakamoto H, Hayashi M, Sofuni T. A proposal for a simple way to distinguish aneugens from clastogens in the *in vitro* micronucleus test. *Mutagenesis* 1999; 14: 385-9.
 - 23) IARC 참고문헌 명기
 - 24) Green S, Moreland FS. Cytogenetic evaluation of several dioxins in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 33: 161.
 - 25) Loprieno N, Sbrana I, Rusciano D, Lascialfari D, Lari T. In vivo cytogenetic studies on mice and rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. In: Hutzinger O, Frei RW, Merian E, Oocchiari P, *Chlorinated dioxins and related compounds. impact on the environment*. Oxford, New York, Pergamon Press, 1982; 419-428.
 - 26) Green S, Moreland F, Sheu C. Cytogenetic evaluation of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on rat bone marrow cells. *FDA By-lines* 1977; 6: 292-294.
 - 27) Lamb JC 4th, Marks TA, Gladen BC, Allen JW, Moore JA. Male fertility, sister chromatid exchange, and germ cell toxicity following exposure to mixtures of chlorinated phenoxy acids containing 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Toxicol Environ Health* 1981; 8: 825-34.
 - 28) Lim M, Jacobson-Kram D, Bowman RE, Williams JR. Effect of chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on sister chromatid exchange levels in

- peripheral lymphocytes of the rhesus monkey. *Cell Biol Toxicol* 1987; 3: 279-84.
- 29) Zimmering S, Mason JM, Valencia R, Woodruff RC. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. II. Results of 20 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environ Mutagen* 1985; 7: 87-10.
 - 30) Troxel CM, Buhler DR, Hendricks JD, Bailey GS. CYP1A induction by beta-naphthoflavone, Aroclor 1254, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its influence on aflatoxin B1 metabolism and DNA adduction in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146: 69-78.
 - 31) Shertzer HG, Nebert DW, Puga A, Ary M, Sonntag D, Dixon K, Robinson LJ, Cianciolo E, Dalton TP. Dioxin causes a sustained oxidative stress response in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 44-8.
 - 32) Bronzetti G, Bauer C, Corsi C, Del Carratore R, Nieri R, Paolini M. Mutagenicity study of TCDD and ashes from urban incinerator "in vitro" and "in vivo" using yeast D7 strain. *Chemosphere* 1983; 12: 549-553.
 - 33) Schiestl RH, Aubrecht J, Yap WY, Kandikonda S, Sidhom S. Polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induce intrachromosomal recombination in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997; 57: 4378-83.
 - 34) Fahrig R. Genetic effects of dioxins in the spot test with mice. *Environ Health Perspect* 1993; 101(Suppl 3): 257-61.
 - 35) Khera KS, Ruddick JA. Polychlorodibenzo-p-dioxin: perinatal effects and the dominant lethal test in Wistar rats. *Adv Chem Ser* 1973; 120: 70-84.
 - 36) Abernethy DJ, Greenlee WF, Huband JC, Boreiko CJ. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) promotes the transformation of C3H/10T1/2 cells. *Carcinogenesis* 1985; 6: 651-3.
 - 37) Tanaka N, Nettesheim P, Gray T, Nelson K, Barrett JC. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin enhancement of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced transformation of rat tracheal epithelial cells in culture. *Cancer Res* 1989; 49: 2703-8.
 - 38) Wolfle D, Marquardt H. Antioxidants inhibit the enhancement of malignant cell transformation induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1273-8.
 - 39) Yang JH, Thraves P, Dritschilo A, Rhim JS. Neoplastic transformation of immortalized human keratinocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res* 1992; 52: 3478-82.
 - 40) Gibson P, Aardema MN, Custer L, Isfort RJ, Le-Boeuf RA. Update on the Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay: Results for the prediction on NTP carcinogens and from the ILSI/HESI program on alternative carcinogenesis models. 2000; 35(S31): 25.
 - 41) Dertinger SD, Silverstone AE, Gasiewicz TA. Influence of aromatic hydrocarbon receptor-mediated events on the genotoxicity of cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis* 1998; 19: 2037-42.
 - 42) Kim PM, DeBoni U, Wells PG. Peroxidase-dependent bioactivation and oxidation of DNA and protein in benzo[a]pyrene-initiated micronucleus formation. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 579-96.
 - 43) Baker TK, Kwiatkowski AP, Madhukar BV, Klaunig JE. Inhibition of gap junctional intercellular communication by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2321-6.
-