Journal of Food Hygiene and Safety 9(1), 15-21(1994)

UV-A 조사에 의한 Phenothiazines의 돌연변이원성 비교 연구

김봉희 · 박영아
충남대학교 약학대학

Comparative Study on the Mutagenic Activity of Phenothiazines by UV-A Irradiations

Bong-Hee Kim and Young-A Park
College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

ABSTRACT–The mutagenic activity of four phenothiazine derivatives such as chlorpromazine, perphenazine, trifluoperazine and thioridazine in conjunction with UV-A irradiation or not based on the Ames plate incorporation test in the presence and absence of liver microsomal enzyme(S9 fraction). None of these compounds and their photo-excited were detected as mutagen in the Salmonella microsome assay with TA 98 and TA 100.

Keyword □ Chlorpromazine, Perphenazine, Trifluoperazine. Thioridazine. Ames test, UV-A irradiation.

많은 약물들이 섭취후 일광에 노출되는 광독성 내지 광알러지를 나타내며 그 증상으로 홍반, 부종, 각화증과 더욱 심하게는 편평 및 기저세포암종을 일으킨다.[1-3]

화학물질의 광독성, 광알러지성의 실험에 사용되는 방법은 여러가지 방법이 보고되고 있으며,[4] 그중 일반적으로 행해지는 예비 실험으로는 candida test,[5] photohemolysis,[6] mouse tail oedema[7] 등이 있다.

광독성 약물반응은 주로 phenothiazine tranquilizers와 demethylchlortetracycliene에서 많이 연구되어 졌으며 특히 chlorpromazine, benoxaprofen은 그 구조와 독성 관계,[8] metabolite의 독성,[9] toxic photoproduct의 형성,[10,11] free radical 생성,[9,12] 생세포와 광결합[13,14]등에 대한 연구가 보고되어 있으나 이에 대한 확실한 기전이 규명되어 있지 않고 가설만이 있을 뿐이다.

따라서 저자등은 광독성 및 광알러지를 일으키는 제반 약물이나 화학물질의 안정성과 생체 이용율을 높이고 현재까지 확실하게 규명되어 있지 않은 약물 및 화학 물질에 의한 광독성 광알러지성의 기전을 이해하고 설명할 수 있는 학문적 기초를 확립하고저 phenothiazines중 몇가지 약물을 택하여 적혈구를 이용한 광용혈 현상을 Kahn등의 방법[15]으로 측정한 결과 UV-A조사 시간과 약물 농도에 따라 용혈현상이 증가되었으며,[16] 이 용혈현상은 항산화제인 ascorbic acid에 의해 유의성 있게 감소되었다.[17]

광 예민성 물질은 물질이 UV에 의해 excited state가 된 뒤 ground state로 되면서 방출되는 에너지가 세포막을 peroxidation시켜 생성된 free radicals, peroxides등이다. UV에 의해 물질이 toxic photoproduct[11,12]를 형성하여 이들에 의한 독성을 나타낸다. 실제 phenothiazines와 같은 화학물질은 빛에 의해 활성화 된 후 독성물질이나 발암물질이 될 수 있다고 보고되었다. 특히 chlorpromazine은 1977년 Molnar등에 의해 non-mutagenic이라 보고되었으나[18] 1988년 E. E. Obaseiki-Ebor등에 의해 그 mutagenicity가 보

Received for publication February 5, 1994
Reprint request:Dr. B.H. Kim at the above address.

고되었다.[19] 1974년 photo-excited chlorpromazine이 mutagenecity가 있음이 D. G. Macphee와 F. Paula Imrey에 의해 보고되었다.[20] 그래서 UV-A에 의해 광용혈현상을 나타낸 phenothiazine약물들의 UV-A조사 전 후 각각의 돌연변이원성 여부를 비교하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 chlorpromazine(CPZ), perphenazine(PPZ), trifluoperazine(TFZ), thioridazine (TRZ)은 U.S.P시약을 사용하였고, 기타 시약 및 용매는 특급 또는 1급을 사용하였다. UV-A는 black-light fluorescent tube 40W F40 T10 BL-B, FL40S BL-B, Sanyo Denki(output는 10 m에서 2.5 mW/cm, emission peak는 350 nm)를 사용하였다.

*사용균주 : *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA 100은 Dr. Bruce N. Ames로부터 제공받아 화학연구소에서 계대배양한 균주를 실험하였다.

*균주 동정 : Nutrient broth에서 18시간 배양한 균현탁액을 사용하여 다음 각 항을 조사하였다.

(1) Histidine과 Biotin요구성
(2) Deep rough(rfa)시험
(3) R factor
(4) UVR B
(5) 자연적 변환률

이상 동정된 균은 nutrient broth에 접종하여 37℃에서 18시간 배양하여 배양액 0.8 ml에 dimethyl sulfoxide 0.07 ml넣어 2 ml용량의 멸균된 vial에 넣어 dry ice상에서 냉동시켜 액체질소 탱크에 냉동보관하였다.

사용 배지

(1) Vogel-Bonner minimal agar plate

• Agar	15 g
• Distilled water	930 ml
• 50x VB salt	20 ml
• 40% glucose	50 ml

각각을 따로 고압증기멸균(15l b/in^2, 15min)하여 45℃로 식혀 잘 섞은 다음 plate를 만들었다.

상기 50x VB salt 조제는 다음과 같이 하였다.

• Warm distilled water(about 45℃)	670 ml
• $MgSO_2$ $7H_2O$	10 g
• Citric acid H_2O	100 g
• K_2HPO_4	500 g
• $NaHNH_4PO_4$ $4H_2O$	175 g

각 성분을 순서대로 넣어가며 한가지가 다 녹은 뒤에 다음 것을 넣어 녹인 다음 실온으로 식힌 뒤 실온에서 보관하였다.

(2) Top agar

• Agar	6 g
• NaCl	5 g
• Distilled water	1 ℓ

잘 녹인 후 고압증기멸균(15 lb/in^2, 15min)하였다.

(3) Nutrient broth

• Oxoid nutrient broth No.2	2.5 g
• Distilled water	100 ml

잘 녹인 후 25 ml씩 삼각플라스크에 넣은 뒤 고압증기멸균(15 lb/in^2, 15min)한 nutrient broth 25 ml에 냉동보관한 균주(TA 98, TA 100)을 각각 0.1 ml를 접종하여 37℃에서 배양하여 16시간안에 사용하였다.

S-9 mixture제조

Aroclor 1254를 corn oil에 200 mg/ml로 희석하여 rat에 500 mg/kg를 1회 복강내 주사하고 5일 후 희생시켜, rat의 간을 꺼내 동량의 0.15 M KCl로 씻어 3배의 0.15 M KCl(3 mg/g wet liver)을 넣고 멸균된 가위로 자른 다음 teflon 유봉으로 된 Potter-Elvehjem homogenizer로 분쇄하여 균질화하고 9000 g로 10분간 원심분리한 상등액을 용량 2 ml의 plastic tube에 옮겨 dry ice에서 급냉동하여 액체질소에 냉동보관하였다(S-9 fraction). 본 실험에서는 S-9 mix 1 ml당 8 μmole $MgCl_2$, 33 μmole KCl, 5 μmole glucose-6-phosphate, 4 μmole NADPH, 100 μmole phosphate buffer와 S-9 fraction 0.1 ml의 조성으로 제조하여 사용하였다.

CPZ, PPZ, TFZ, TRZ의 mutagenicity test.

멸균되어 있는 test tube(Falcon 2207)를 45℃ 항온

조에서 예열한 후 멸균된 top agar에 100 ml당 0.5 mM histidine-biotin용액을 10 ml 혼합하여 2 ml씩 test tube에 나누어 담고 여기에서 CPZ, PPZ, TFZ, TRZ을 각각 농도를 달리하여 0.1 ml 넣어 섞고 배양된 균현탁액(TA 98, TA100) 0.1 m(약 10^8 cells/plate)를 가하여 vortex mixer로 약 3초간 잘 혼합하여 준비된 Vogel-Bonner agar plate에 부어 굳기 전에 여러 방향으로 기울여 배지상에 고루 퍼지게 한 다음 top agar가 굳으면 뒤집어 37℃에서 48시간 배양 후 colony수를 세었다.

S-9 mixture를 사용하는 경우에는 균현탁액을 가한 후에 넣어 상기와 같은 방법으로 하였다.

공시험은 시료 대신 시료를 녹인 용매를 가하여 같은 방법으로 하였다.

양성대조물질에 대한 관찰은 TA 98에서는 2-aminofluorene을 2.5 μg/plate의 농도로 DMSO에 녹여 사용하였고, TA 100은 sodium azide를 1.5 μg/plate 농도로 증류수에 녹여 사용한 결과 유의성 있게 나타

Table 1. Results of CPZ, PPZ, TFZ, TRZ reversion tests using the Ames plate incorporation test with *Salmonella typhimurium* TA98.

Agent	concentration (μg/plate)	revertant colony without S-9*	Agent	concentration (μg/plate)	revertant colony with S-9*
CPZ	0	27	CPZ	0	39
	6.5	35		25	50
	12.5	41		50	41
	25	41		100	45
	50	38		200	32
	100	K		400	K
PPZ	0	30	PPZ	0	33
	12.5	26		25	40
	25	22		50	40
	50	23		100	43
	100	13		200	23
	200	10		400	K
TFZ	0	27	TFZ	0	39
	12.5	31		25	50
	25	24		50	60
	50	36		100	56
	100	25		200	33
	200	16		400	K
TRZ	0	25	TRZ	0	37
	6.5	31		12.5	44
	12.5	23		25	37
	25	14		50	36
	50	15		100	31
	100	13		200	20
			2-AF	2.5	1299

*Mean of duplicate experiments.
K means killing of the test strain.

Table 2. Results of CPZ, PPZ, TFZ, TRZ reversion tests using the Ames plate incorporation test with *Salmonella typhimurium* TA100.

Agent	concentration (μg/plate)	revertant colony without S-9*	Agent	concentration (μg/plate)	revertant colony with S-9*
CPZ	0	134	CPZ	0	139
	6.5	169		25	134
	12.5	154		50	109
	25	161		100	67
	50	135		200	57
	100	39		400	K
PPZ	0	113	PPZ	0	183
	12.5	140		25	163
	25	155		50	184
	50	143		100	171
	100	147		200	K
	200	22		400	K
TFZ	0	134	TFZ	0	130
	6.5	145		25	118
	12.5	137		50	105
	25	126		100	99
	50	153		200	48
	100	50		400	K
TRZ	0	169	TRZ	0	162
	3.125	162		3.125	173
	6.25	189		6.25	176
	12.5	196		12.5	167
	25	168		25	154
	50	129		50	141
			Sod. azide	1.5	1299

*Mean of duplicate experiments.
K means killing of the test strain.

났다.

CPZ, PPZ, TFZ, TRZ을 UV-A 조사한 후 생성된 물질의 mutagenicity test.

각 약물 CPZ, PPZ, TFZ, TRZ 농도 2000 μg/ml 용액을 UV-A조사(30분, 10 cm)한 후 농도별로 하여 상기 방법으로 mutagenicity test를 하였다.

결과 및 고찰

일반적으로 광독성에 관련되는 태양 스펙트럼은 290-700 nm이며, 이보다 더 짧은 파장은 대기중에서 흡수되고, 긴 파장은 단지 조직에 열을 가할 뿐이다. 파장을 물리적, 독성학적 측면에서 분류하면, 220-280 nm를 UV-C로, 280-320 nm를 UV-B로, 320-400 nm를 UV-A로, 400-760 nm를 가시부라 하며, UV-C는 지구표면에서 받는 햇빛 중에는 존재하

Table 3. Results of photo-excited CPZ, PPZ, TFZ, TRZ reversion tests using the Ames plate incorporation test with *Salmonella typhimurium* TA98.

Agent	concentration (μg/plate)	revertant colony without S-9*	Agent	concentration (μg/plate)	revertant colony with S-9*
CPZ	0	22	CPZ	0	46
	0.32	21		0.32	31
	1.6	27		1.6	38
	8	22		8	36
	40	25		40	40
	200	K		200	K
PPZ	0	19	PPZ	0	38
	1.6	18		1.6	48
	8	17		8	44
	40	20		40	37
	200	11		200	35
	1000	K		1000	K
TFZ	0	22	TFZ	0	46
	0.32	18		0.32	43
	1.6	23		1.6	37
	8	23		8	43
	40	25		40	41
	200	21		200	50
TRZ	0	22	TRZ	0	49
	0.32	20		12.5	31
	1.6	23		25	22
	8	16		50	34
	40	20		100	37
	200	12		200	28
			2-AF	2.5	974

*Mean of duplicate experiments.
K means killing of the test strain.

Table 4. Results of photo-excited CPZ, PPZ, TFZ, TRZ reversion tests using the Ames plate incorporation test with *Salmonella typhimurium* TA100.

Agent	concentration (μg/plate)	revertant colony without S-9*	Agent	concentration (μg/plate)	revertant colony with S-9*
CPZ	0	152	CPZ	0	185
	0.32	169		0.32	169
	1.6	188		1.6	202
	8	186		8	146
	40	112		40	140
	200	K		200	K
PPZ	0	162	PPZ	0	178
	1.6	190		1.6	210
	8	182		8	208
	40	189		40	199
	200	70		200	125
	1000	K		1000	K
TFZ	0	152	TFZ	0	185
	0.32	151		0.32	215
	1.6	171		1.6	219
	8	163		8	224
	40	132		40	209
	200	44		200	128
TRZ	0	152	TRZ	0	178
	0.32	151		12.5	207
	1.6	145		25	190
	8	143		50	154
	40	103		100	154
	200	K		200	78
			Sod. azide	1.5	899

*Mean of duplicate experiments.
K means killing of the test strain.

지 않지만, DNA와 단백질에 심한 광화학적 장애를 일으킬 수 있다. UV-B는 피부의 병리변화에 관여하는 주영역이며, UV-A는 광감작 반응에 관여한다. 가시광선은 대부분의 단백질과 DNA에 광화학적 반응을 일으키는데 필요한 에너지는 부족하지만, 색깔이 있는 물질이나 rhodopsin 또는 chlorophyll같은 분자에 의해 잘 흡수된다.[21]

Phenothiazines류 약물의 광독성에는 free radical이 중요한 역할을 하고 있으며 또한 매우 반응성이 큰 물질들이 관여되고 있음이 간접적으로 알려져 있다. 색소로서 화장품, 식품 및 약물에 첨가되는 tartrazine은 조사 전에는 his^+ revertants에 영향을 주지 않았으나 20분 조사시킨 후에는 TA97, TA100에서 높은 활성을 나타냈다.[22] 또한 psoralens와 같은 furocoumarins은 어두운 곳에서는 DNA용액과 non-damaging화합물을 형성하였으나, 365 nm에 노출시 핵산과 반응하여 DNA의 pyrimidine base 5, 6 이중결합과 C_4-cyclo 부가 화합물을 형성하였다.[23] Chlorpromazine은 조사 후 toxic photoproducts를 생성한다.[10,11] 따라서 UV 조사후 생성된 free radical이나 toxic photoproducts에 의해 변이원성이 유발되어 광예민성 화합물의 섭취 후 일광에 노출될 때 피부암 등을 일으키는가를 조사하기 위해 본 실험을 실행하였다.

본 실험에서는 UV-A조사시 광용혈 현상을 나타낸 CPZ, PPZ, TFZ, TRZ에 대한 mutagenicity를 알아보고자 ***Salmonella typhimurium*** TA98, TA100을 사용하여 Dorothy M. Maron과 Bruce N. Ames의 mutagnicity test 중 plate incorporation test방법[24]으로 실시하였다. 먼저 각각의 약물 농도 별로 본 복귀돌연변이 실험은 Table 1, 2에서 보여 주는 것처럼 돌연변이 원성을 나타내지 않았다. 이때 TA 98에서는 2-aminofluorene을, TA100에서는 sodium azide를 사용한 양성대조군의 결과는 모두 적절하게 나타났다. 다음 각각의 약물을 농도 별로 제조 후 30분간 UV-A(350 nm) 조사 후 실험한 경우도 돌연변이원성을 나타내지 않았다(Table 3, 4).

본 실험 결과 UV-A에 의해 광용혈현상을 나타낸 CPZ, PPZ, TFZ및 TRZ은 ***Salmonella typhimurium*** TA98, TA100을 사용한 직접법 또는 대사활성법에서 음성으로 나타났으며 또한 UVA에 의해 photo-excited된 각 약물도 본 실험방법에 의해 음성으로 나타났다. 그러나 1977년 Molnar등에 의해 CPZ이 non-mutagenic이라 보고하였으나, 1988년 E.E. Obaseiki-Ebor and J. O. Akerele에 의해 ***Salmonella typhimurium*** TA102, ***Eschelichia coli*** EE102 strain에서 microsomal activation시 mutagenicity를 나타낸다고 보고하였다. 이와같이 CPZ가 다른 strain에서 변이원성을 나타내는 것으로 보아 photo-excited된 물질의 돌연변이원성 여부를 검토하고저 할 때는 여러 균주를 사용하여야 하며, 이에 본 연구는 화학 물질의 섭취 후 일광에 의한 광독성 반응 중 nuclear phototoxic damage을 규명하고자 하는 기초연구의 자료로 제공하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 1992년도 신약개발 연구지원사업(보건사회부)의 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 깊은 감사를 드립니다. 또한 변이원성 실험에 여러가지로 도움을 주신 화학연구소 안정성센터의 노정구 박사님과 김용화박사님께 감사드립니다.

국문 요약

Phenothiazine류의 약물 중 UV-A(350 nm, 2.5 mW/cm)의 조사에 의해 광용혈 현상을 나타낸 chlorpromazine, perphenazine, trifluoperazine 및 thioridazine의 UV-A조사 전후의 돌연변이원성 여부를 비교 조사하였다. *Salmonella typhimurium* TA98, TA100을 사용하여 Dorothy M. Maron과 Bruce N. Ames의 mutagenicity test중 plate incorporation test 방법으로 실시한 결과 각 약물과 UV-A에 의해 photo-excited된 물질 모두 직접법 또는 대사활성법에서 음성으로 나타났다.

참고 문헌

1. Edward, S. and Rina, S. : Drug-induced photosensitivity. *JAPA*. **13**, 200 (1973)
2. Ferguson, H., Addo, A.A., MaGill, P.E., Woodcock, K. R., Johson, B.E. and Frain-Bell, W. W. : A study of benoxaprofen-induced photosensitivity. *Br. J. Dermatol.* **107**, 429 (1982).
3. Klassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J. : *Casarett and Doull's Toxicology*. 3rd. Macmillan, 412 (1986).
4. Emmett, E.A. : Phototoxicity from exogenous agents, *Photochem. Photobiol.* **30**. 429 (1979).
5. Ljunggren. B. : Propionic acid derived non-steroidal antiinflammatory drugs are phototoxic in *vitro*. *Photodermatol.* **2**, 3 (1985).
6. Gary, A.E. and Michele, T.S. : Photosensitized lysis of red blood cell by Phototoxic antimalarial compounds. *Photochem. Photobiol.* **46**. 39 (1987).
7. Ljuggren, B. and Moller, H. : Drug phototoxicity in mice. *Acta. Derm.* **58**, 125 (1987).
8. Ljunggern, B. and Moller, H. : Phototoxic reaction to chlorpromazine as studied with the quantitative mouse tail technique. *Acta. Derm.* **56**, 373 (1976).
9. Ljunggern, B. and Moller, H. : Phenothiazine phototoxicity : An experimental study on chlorpromazine and its metabolites. *J. Invest. Dermatol.* **68**. 313 (1977).
10. Saucin, M. : Mechanisms of photosensitization by phenothiazine derivatives. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **87**, 1051 (1979).
11. Guy, F.W., Kays, H.K. and Alver, M.K. : Phototoxicity from benoxaprofen : *In vivo* and *in vitro studies*. *Photochem Photobiol.* **36**, 59 (1982).
12. Moore, D.E. and Tamat, S.R. : Photosensitization by drugs : Photolysis of some chlorine-containing drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* **32**, 172 (1989).
13. Marko, J., Vermeersch, G., Febvay-Garot, N. and Lablache-Combier. A. : Photo-CIDNP in nucleic acid bases and their nucleotides induced by chlorpromazine and analogs. *Photochem. Photobiol.* **42**, 213 (1985).
14. Tomas, A.C., Gary, A.E. and Irene, E.K. : Photoaddition of chlorpromazine to guanosine-5-monophosphate. *Photochem. Photobiol.* **43**. 607 (1986).
15. Kahn, G. and Fleischaker, B. M.T.(ASCP) : Red blood cell hemolysis by photosensitizing compounds. *J. Invest. Dermatol.* **56**, 85 (1971).
16. Kim,B.H. and Back, K.H. : Comparative study on red blood cell hemolysis and yeast test by photosensitizing compounds. *Kor. J. Environ. Toxicol.*, **5**, 45 (1990).
17. Kim, B.H. and Park, Y.A. : Effects of ascorbic acid on the phototoxicity of phenothiazines. *Kor. J. Food Hygiene*, **7**, 143 (1992).
18. Molnar, J., Holl, I.B. and Mandi, Y. : Selection of iron mutants in *Escherichia coli* by treatment with phenothiazines. *Genet. Res.* **30**, 13 (1977).
19. Obaseiki-Ebor, E.E. and Akerele, J.O. : The mutagenic activity of chlorpromazine, *Mutation Re-*

search, **208**, 33 (1988).

20. McPhee, D.G. and Imrey, F.P. : Mutagenesis by photoactivation of chlorpromazine, a tranquilizer of the phenothiazine group. *Aust. J. Biol. Sci.*, **27**, 231 (1974).
21. Wilkinson, J.B. and Moore, R.J. : *Sunscreen, suntan and anti-sunburn products, Harry's cosmeticology*. Chemical Publishing Company, Inc., New York (1982).
22. Merville, M.P., Decuyper, J., Lopez, M., Piette, J. and Vorst, V.D. : Phototoxic potentialities of tartrazine : screening tests. *Photochem. Photobiol.* **40**. 221 (1984).
23. harber, L.C. and Baer, R.L. : Pathogenic mechanism of drug-induced photosensitivity. *J. Invest. Dermatol.* **58**, 327 (1972).
24. Maron, D.M. and Ames, B.N. : Revised methods for the Salmonell a mutagenicity test. *Mutation Research*. **113**, 173 (1983).