

## Anti-cell Adhesion Effect of PLM-f74 with U937 Cell from Halophilic Enterobacteria and Identification of Strain

Jong-Kwon LIM, Hyo-Jin SEO, Jin-Hyuk SHIN, Se-Young LEE, Min-Yong KIM<sup>1</sup> and Jong-Deog Kim

Department of Biotechnology, <sup>1</sup>Dept. of Refrigeration Engineering, Yosu National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea  
TEL & FAX: +82-61-659-3305, pasteur@yosu.ac.kr

### Abstract

Fermented materials with enterobacteria isolated from fusiform fish, have strong anti-angiogenesis effect and anti-cell adhesion effect. PLM-f74 got from 74th fraction of size exclusion chromatography from fermented material, showed strong anti-cell adhesion effect between HUVECs and U937 monocytic cell.

Adhesion of U937 cell to HUVEC stimulated with IL-1b was clearly inhibited by PLM-f74 in a dose-dependent manner by 12.1, 21.2, 50.9, and 78.2%, when U937 cells treated with each of the PLM-f74 and stimulated with PMA (100 mg/L) was added onto untreated and unstimulated HUVECs, adhesion was observed by 15.8, 31.9, 70.8, and 102%, when both cell types were pretreated with PLM-f74, the adhesion was prominently decreased by 83.7, 99.2, 110, and 120.8%, with 0.74, 3.7, 7.4, and 18.5ug/mL of PLM-f74, respectively. PLM-f74, also, reduced IL-1-stimulated HUVEC expression of adhesion molecules, VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin dose-dependently by ELISA method.

### 1. 서 론

Cell adhesion(세포 부착)은 염증반응, 혈구의 이동에서 뿐만아니라 신생혈관의 형성, 압의 전이에도 중요한 매개역할을 한다. 현재의 항암제의 추세는 화학 물질이나 화학합성의 물질에서 부작용이 적은 혈관신생의 억제제 쪽으로 방향을 틀어가고 있다. 더구나 혈관신생은 기존의 혈관으로부터 새로운 모세혈관이 생성하는 과정으로 상처 치료, 조직 치유, 생식, 배아발육 등의 다양한 생리과정에 관여한다. 정상 상태에서 생체는 혈관신생

을 유도하는 인자들과 억제하는 인자들이 평형을 이루고 있으나, 질환이 유발되는 상황에서는 혈관성장을 촉진하는 인자들이 증가하거나, 억제인자가 제대로 작용하지 못하여 질병을 유발한다. 대표적으로 암을 들 수 있는데 혈관신생을 통해 종양 성장에 필요한 영양분과 산소를 제공하여 암세포 전이(metastasis)의 기회를 주게된다. 암 이외에도 각종 성인병인 만성질환이 혈관형성의 조절 이상으로 발생하는 것으로 알려져 있으며 여기에는 당뇨병성 망막염, 류마티스 관절염, 혈관종, 건선, 죽상 동맥경화증 등이 알려져 있다

이중에서도 cell adhesion은 다양한 방법으로 염증형성에 기인하며, 더구나 신생혈관의 형성에 중요한 역할을 함으로써 암의 발생과 전이를 돕는 역할을 한다. 따라서 본 연구에서는 신생혈관의 형성을 저해하고, 또한 암의 전이를 억제 할 수 있는 물질의 대량생산 방법에 대하여 연구하고자 하였으며, 실제로 신생혈관 생성억제제는 대부분이 식물의 추출물에서 유래되기 때문에 대량 생산하기에는 시간과 비용이 많이 들 수 있다. 연구자들은 등푸른 생선의 내장으로부터 장내세균을 분리하여 그 발효산물을 농축, 정제하여 신생혈관 저해 효과와 cell adhesion을 저해하는 물질을 개발하고 그 억제 내용을 보고하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### PLM-f74의 제조

이 실험에서 사용한 균주는 정어리의 내장에서 채취한 균을 순수 분리해서  $\lambda$  균으로 명명하고 총 5개의 균주를 선발하여 angiogenesis 실험을 거쳐  $\lambda$ -28균주를 선발하여 사용하였다. 균주의 대량 배양을 위해서 3L jar fermentor를 이용하여 25°C, 250rpm, 5vvm, 호기 조건으로 45시간 배양하였다. 균체를 분리하기 위해 5000rpm, 15분간 원심분리하고 상등액을 취하여 80% ammonium sulfate로 염석한 후 15000rpm, 15분간 원심분리하여 pellet만을 모아 MOPS buffer(pH 7.0)를 사용하여 투석 하였고, 2차로 sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 이용하여 투석하였다. 투석된 용액은 동결건조시켜 분말화 한 후 이를 phosphate buffer에 녹여 같은 조건으로 Size Exclusion Chromatography(SEC)를 실행하고, 분액을 취하여 신생혈관 저해 실험을 행하여 효과가 좋은 74번 fraction을 찾아 내었으며, PLM-f74로 명명하여 실험에 사용하였다.

### TLC for PLM-f74

PLM-f74를 6N-HCl을 사용하여 3시간 동안 환류시키고 NaOH로 중화시켰다.

원균주를 SEM으로 확대하여 보았을때 polysaccharide를 가지고 있는 것으로 보여 당 구성성분과 구성 아미노산을 확인하기 위하여 HPTLC plates Si 50000(Merk)를

사용하여 2 종류의 TLC를 실시하였다. 당의 구성성분을 위하여 silver nitrate-sodium hydroxide reagent를 사용하고, 분리용액은 1-propanol water(18:2)으로 하였고, 구성 아미노산을 위하여 ninhydrine reagent 용액과 n-butanol-acetic acid-water(4:1:2)의 분리상을 이용하였다.

### 균주의 동정

균주의 동정은 16S rDNA sequencing으로 하였고, 균주의 chromosomal DNA을 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용해 분리한 후 16S rRNA sequencing에 사용하는 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCAT GGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR 증폭하였다(1). 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석 하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하였으며, sequence의 상동성은 Clustal X 와 Mega 2 program을 이용하여 비교분석하였다(2).

### 세포배양

HUVECs은 2%FBS첨가 EBM-2배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 배양하였다. Anti-angiogenesis test는 96well-plate에 30µl의 matrigel을 넣어 고체화 시킨 후 각 well당 5×10<sup>3</sup>개의 세포를 넣어 총량이 200µl가 되게 한 후 세포 착상시 시료를 투여하고 3시간 후 tube가 형성되면 불규칙적으로 5면을 선택하여 촬영하고 NIH program을 이용하여 신생된 혈관의 길이를 측정하였다. U937 human monocytic cell line은 RPMI-1640 medium배지에 10% FBS, 2 mM L-glutamine와 1× 10<sup>5</sup> U penicillin/L, and 100 mg streptomycin/L의 조건에서 배양하였다.

### Cell adhesion

#### a) 세포배양

배양된 U937cell을 원심분리하여 10<sup>6</sup>cells/mL로 재분배하여 24well plate에서 PLM-f74를 넣거나 넣지 않은 상태로 배양하여 실험에 사용하였다.

#### b) U937 cell adhesion assay:

24-well plate에서 HUVECs를 confluency에 도달되게 배양한후 다른 농도의 PLM-f74를 3

7°C에서 20시간 배양하고 1%의 FBS가 함유된 PBS로 세척한 후 10 ng/mL의 recombinant human IL-1b로 6시간 유도시킨 후, U937 cells ( $2.5 \times 10^5$  cells/well)을 HUVEC의 monolayer에 접종하여 37°C에서 30분간 반응시키고 부착되지 않은 U937 cell을 PBS+1%FBS로 3번 세척한 후 cell의 부착 정도를 불규칙하게 5부분을 촬영하여 NIH Image analyzer program으로 분석하였다. 또한 U937 cell을 PLM-f74로 20시간 반응시킨 후 phorbol myristyl acetate (PMA: 100 mg/L)로 2시간 활성화시킨 후 활성화시키지 않은 HUVECs에 접종하여 그 부착 정도를 실험하였다. 그리고 U937, 그리고 HUVECs를 모두 PLM-f74로 전처리 후에 IL-1b로 활성화시킨 HUVECs에 접종하여 cepp의 부착 정도를 상기의 방법에 따라 분석하였다.

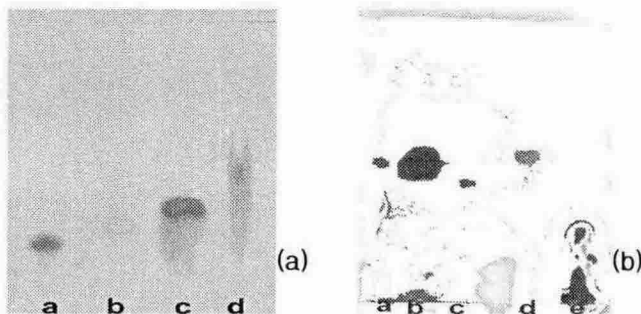
c) Determination of cell adhesion molecules by ELISA:

cell surface adhesion molecules의 측정은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)방법으로 행하였다. 96 plate에 HUVECs을 confluency에 도달되도록 배양한 후 PLM-f74를 37°C에서 20시간 반응시킨 후 5ng/ml의 IL-1b로 6시간 활성화시킨 후 CD106 (ICAM-1), CD54 (VCAM-1), 그리고 62E (E-selectin)의 1차항체, 2차항체를 반응시키고 O.D. 405 nm에서 plate reader로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

1) PLM-f74의 조성물

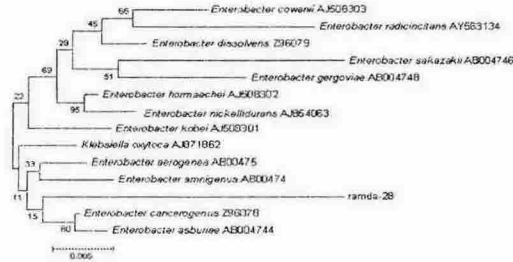
PLM-f74를 ^N-HCl로 가수분해하여 중화시키고 HPTLC plates Si 50000(Merk)로 TLC를 수행한 결과는 figure 1과 같이 나타났다.



따라서 PLM-f74는 더 깊은 실험을 해야 하겠지만 단백질과 당으로 결합된 당단백질로 생각되어 진다.

Fig. 1. TLC for PLM-f74 (a) plate for amino acid composition, a: asparagine, b: proline, c: cysteine, d: PLM-f74, (b) plate for saccharide composition, a: glucose, b: galactose, c: fructose, d: maltose, e: PLM-f74.

## 2) 균주의 동정



SEM으로부터 분석한결과 이 균주는 간균이며, Gram(+)이고, 길이는 1.5uM, 폭은 0.5um였고, PYG 배지, 25°C, 3% NaCl 농도에서 잘 자라는 것으로 나타났으며, 장내세균인 *Enterobacter cancerogenus* 으로 동정되었다.

Fig. 2. Identification of ramda-28 strain with 16S ribosomal DNA sequencing

## 3) Cell adhesion

### a. U937 cell adhesion to IL-1β stimulated HUVECs

U937 cell은 자극받지 않은 HUVECs에 대해서는 거의 부착이 일어나지 않았으나 IL-1β로 활성화 된 후 cell의 부착이 많이 일어난 것을 볼 수 있다.이렇게 부착된 cell은 PLM-f74의 저해 작용으로 농도에 따라 그 부착율이 줄어 드는 것을 볼 수 있다. PLM-f74의 농도가 0.74, 3.7, 7.4 및 18.5 ug/mL 일때 각각 U937의 부착 저해율은 12.1, 21.2, 50.9 및 78.2%으로 나타났다(Fig. 3).

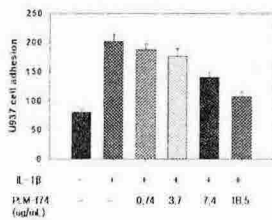


Fig. 3. U937 cell adhesion to IL-1β stimulated HUVECs

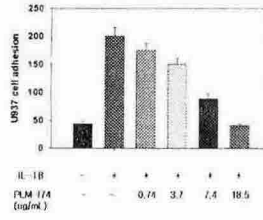


Fig. 4. PMA-stimulated U937 cell adhesion to HUVECs

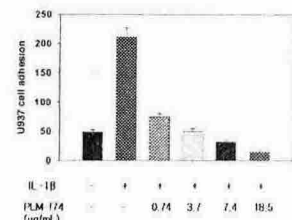


Fig. 5. U937 cell adhesion to HUVECs when both cells were treated with PLM-f74:

### b. PMA-stimulated U937 cell adhesion to HUVECs

PLM-f74로 U937 cell을 전처리한 후 PMA로 활성화시킨 두, 활성화 시키지 않은 HUVECs에 첨가하였을때 부착효과는 Fig. 4와 같이 나타났으며, 같은 농도에서 15.8, 31.9, 70.8 및 102%의 저해율을 보였다.

c. U937 cell adhesion to HUVECs when both cells were treated with PLM-f74:

U937 및 HUVECs를 모두 PLM-f74로 전처리 한 후 HUVECs만 IL-1 $\beta$ 로 활성화시켰을 때 동일 농도에서 83.7, 99.2, 110 및 120.8%의 저해율률 나타내어 완벽한 저해율을 나타내었다(Fig. 4).

### 감 사

본 연구는 학술진흥재단 기초과학 지원사업(KRF-2004-015-C00484) 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

1. **Yoon, J.H., Lee, S.T., and Park, Y.H.,(1996).** Inter-and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 187-194.
2. **Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.(1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting , position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.