

인체유암세포주 MCF-7의 형태변화와 증식에 영향을 주는 항암활성물질, MCS-202

이성우 · 김세은 · 김영호 · 김항섭
방희재 · 김환목 · 이정준*
KIST 유전공학연구소

Antitumoral Compound, MCS-202, an Effector on Proliferation and Morphology of Human Breast Tumor Cell Line, MCF-7

Lee, Sung-Woo, Se-Eun Kim, Young-Ho Kim, Hang-Sub Kim,
Hee-Jae Bang, Hwan-Mook Kim and Jung-Joon Lee*

Genetic Engineering Research Institute, KIST
P.O. Box 17, Taedok Science Town, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — In the course of screening for microbial metabolites employing human cancer cell line, we identified a mycelial extract of *Streptomyces* sp. 1365, which are effective on growth inhibition and morphological change of MCF-7, human breast cancer cell line. By repeated column chromatography and recrystallization process, yellow needle crystals were obtained as an active compound and identified as resistomycin by spectral analysis. Morphological change of the MCF-7 cell could be observed by treatment of resistomycin at concentration between 50 ng/ml and 50 µg/ml and showed cytotoxic effect at the concentration of more than 50 ng/ml. This compound also showed strong cytotoxic effect on proliferation of human tumor cell lines, UACC-62, NCI-H23, SNB-19, SF-539, PC-3, SW620, KM12, UO-31, and ACHN.

미생물 대사산물은 광범위한 생리활성을 나타내는 매우 다양한 구조를 갖는 화합물의 보고로서, 많은 난치병치료제 개발연구가 미생물 대사산물의 검색으로부터 시작된다. 이러한 검색은 항암제 분야에도 잘 적용되어 암세포에만 특이하게 작용하며 부작용이 적은 항암제를 찾기 위하여 다양한 생리활성물질 검색 system을 수립하고 미생물 대사산물로부터 항암제를 개발하려는 노력이 활발하게 전개되고 있다. 항암제 검색에 있어 대표적인 방법으로는 미국 국립 암연구소에서 대규모로 실시하고 있는 질병지향적 항암제 검색 system이다. 이 질병지향적 검색 system을 이용하여 혈액 및 피부암, 폐암, 대장암, 중추신경계암, 난소암, 신장암 등 각종 조직의 암세포주 60여종에

대한 조직특이적이고 선택적인 성장저해제나 세포독성물질을 대량으로 검색하고 있으며(1, 2), 일차검색에서 어느 특정조직에서 유래한 암세포 group에 선택독성을 보이는 물질을 선별하여 그 암세포주를 이식한 nude mice에 대한 효과를 실험하여 임상실험 진입여부를 판정한다.

최근 국내에서도 항암제 개발을 위하여 여러 암세포주를 이용한 항암활성물질의 screening이 행해지고 있는데 미국 NCI의 암세포주 panel에 포함되어 있지 않으면서, 국내에서 심각한 문제가 되는 암에서 유래한 세포주나, 축소된 암세포주 panel을 이용한 검색이 더 효과적일 것으로 생각된다.

본 실험에서는 전보에 이어(3) 인체유암세포주인 MCF-7 세포주를 이용하여 세포의 형태변화를 유도하며 세포성장을 저해하는 항암활성물질을 screening하는 계속적인 연구로서, 낮은 농도에서 인체유암세포주 MCF-7의 형태변화와 성장을 저해하는 St-

Key word: Human breast cancer cell line, MCF-7, morphological change, antitumor, resistomycin, *Streptomyces* sp. 1365

*Corresponding author

reptomycetes sp. 1365를 선별하고, 이 균주로부터 항암활성물질로서 MCS-202를 분리정제 하여 구조를 동정하였으며, 이 화합물에 대하여 9종의 인체암 세포주에 대한 항암활성을 측정하였다.

재료 및 방법

방선균의 분리와 활성검색

유전공학연구소 미생물 스크리닝 연구실에서 전국 각지의 산, 들, 밭에서 채취한 토양시료로부터 분리한 방선균을 배양하여 각 실험실에 분양하여 준 방선균 배양액 4 ml를 dichloromethane : methanol(1 : 1)의 혼합용매로 추출하고 농축한 후, 500 l DMSO에 녹여 시료로 하고, 이 시료에 대하여 MCF-7의 형태변화 유도활성과, 세포성장 저해활성을 측정하여 활성을 나타내는 방선균 분리주 *Streptomyces* sp. 1365를 분리하였다.

균주의 배양

방선균 분리주 *Streptomyces* sp. 1365의 배양을 위하여 사용한 배지는 oatmeal 20 g, malt extract 20 g, yeast extract 2 g, glucose 10 g, soybean meal 10 g, soluble starch 12 g, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g을 1 l의 증류수에 녹이고 pH를 7.0으로 조절한 MCLM-1 medium을 사용하였다. 본 배양을 위해서는 500 ml의 baffled flask 3개에 100 ml씩의 배지를 2 일동안 배양한 종배양액 240 ml를 8 l의 본배양 배지에 접종한후 28°C, 350 rpm, 10 LPM air의 조건으로 2일동안 배양하였다.

시약 및 사용기기

세포주의 배양을 위해 사용한 RPMI 1640은 GIBCO(MD, USA)사의 제품을 사용하였고, fetal calf serum(FCS)은 Hyclone(Utah, USA)에서 구입하였다. 방선균의 배양을 위해서 B. Braun의 15 l jar fermentor인 Biomate를 사용하였고, mycelium의 harvest를 위해서는 Beckman Model J2-21 High speed centrifuge를 사용하였다. 기기분석을 위해서 UV absorption는 Milton Roy Spectronic 3000 array Spectrophotometer를, IR은 Laser Precision Analytical RFX-65 FT-IR Spectrophotometer를, NMR은 Varian 500 NMR Spectrometer를, MS는 HP 5989A Spectrometer를 사용하였다.

MCF-7 세포의 형태변화와 성장저해활성

RPMI 1640 medium 100 μl (10% FCS 함유)에 96 well plate의 한 well당 log phase에 있는 MCF-7의 세포수가 5000 cells/well이 되도록 plating한 후 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 후, *Streptomyces* sp. 1365 배양액을 methylene chloride와 methanol 동량혼합용매로 추출하여 10배씩 희석한 시료를 넣어 최종 volume이 200 μl 가 되도록 하였다. 세포의 형태변화의 유무는 24시간 후에 현미경으로 관찰하였으며, MCF-7 세포의 성장저해활성은 48시간 배양한 후 SRB assay 법에 따라(4) microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

각종 인체 암세포주 들에 대한 항암활성

미국 국립암연구소(NCI)에서 수립한 9종의 인체암 세포주(5) UACC-62(skin), NCI-H23(lung), SNB-19(CNS), SF-539(CNS), PC-3(prostate), SW620(colon), KM12(colon), UO-31(renal), ACHN(renal) 를 사용하여 항암활성을 측정하였다. 암세포주는 사용할 때까지 액체질소하에서 보관하였으며, 가능한 한 초기단계의 세포를 10% FCS를 함유한 RPMI1640 배지를 이용하여 37°C CO_2 incubator(5% CO_2 , 95% air)에서 배양하였다. 각세포주의 초기세포농도는 Table 1과 같이 각각 달리하였으며, 배양후 24시간부터 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 시료를 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였고, 최종 DMSO의 농도는 0.1%로 보정하였다. 검체의 처리전에 time zero(Tz) plate를 만들었으며, 50%의 TCA용액으로 모든 부착 세포를 고정하였다. 검체를 처리한 후 세포는 48시간 동안 CO_2 incubator에서 배양하였다. 분석방법은 SRB

Table 1. Initial cell concentration of human cancer cell lines

Cell Line	Origin	Initial Cell Density (cells/well)
M14	Skin	15,000
NCI-H23	Lung	20,000
SNB-19	CNS	15,000
SF-539	CNS	15,000
PC-3	Prostate	10,000
SW620	Colon	10,000
KM12	Colon	15,000
UO-31	Renal	15,000
ACHN	Renal	15,000

assay 법에 따라 570 nm에서 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였고, 50% 성장억제 용량 (GI_{50})은 Probit 방법에 의거하여, 처리군의 흡광도에서 Tz plate의 흡광도를 뺀 후 대조군의 흡광도를 나누어 계산하였다(6).

결 과

활성물질의 분리 정제

Streptomyces sp. 1365를 OMYM medium에서 배양하여 얻은 배양액 5l를 8000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 supernatant와 mycelium을 분리하였다. Mycelium만을 증류수와 혼합하여 blending한 후에 동결건조하여 미황색의 powder를 얻었다. 이 powder를 ethylacetate 4l로 2회 추출하고 감압농축하여 ethylacetate extract를 얻고, 이를 silicagel column에 loading하여 $CH_2Cl_2 : MeOH : NH_4OH = 15 : 1 : 1$ 의 용매로 elution하였다. 활성분획을 모아서 다시 silica-gel column에 loading하여 hexane : ethylacetate = 2 : 1로 elution하고, 활성분획을 모아 감압농축한 후, 소량의 acetone에 녹여 4°C에서 재결정하여 순수한 화합물 MCS-202를 얻었다.

MCS-202의 물리 화학적 성질

MCS-202는 미황색 분말로서 MP 320~322°C를 나타내었다. 용해도는 dichloromethane, ethylacetate,

Table 2. Physicochemical properties of MCS-202

Nature	amorphous yellow powder
Solubility	soluble: dichloromethane, ethylacetate, acetonitrile, acetone, ethanol, methanol insoluble: water
MP	320-322 °C
UV λ_{max} (MeOH)	217, 269, 291, 319, 337, 369, 458, 515
IR ν_{max} (KBr)	3400, 2913, 1635, 1596, 1569, 1261,
EI-MS	376(M) ⁺ , 361(M-15) ⁺ , 333(M-43) ⁺ .
¹ H-NMR(300 MHz, DMSO-d ₆) δ :	1.69(6H, s, (CH ₃) ₂ -C), 3.05(s, 3H, CH ₃ -aromatic), 6.51(s, 1H, H-4), 7.23(s, 1H, H-8), 7.37(s, 1H, H-11), 14.27(s, 1H), 14.51(s, 1H), 14.75(s, 1H).
¹³ C-NMR*	
Rf values on TLC	0.34(hexane-ethylacetate, 2:1)

*See Table 3

acetonitrile, acetone, ethanol, methanol에는 가용이었으나 물에는 불용이었다. 이 화합물의 물리화학적 성질을 Table 2에 나타내었다.

MCS-202의 구조동정

MCS-202는 미황색의 결정으로서 MP 320~322°C를 나타내었고, UV 217, 269, 291 319, 337, 369, 458, 515 nm 등의 특징적인 UV 흡수 pattern을 나타내었다. IR spectrum의 3400 cm⁻¹에서 hydroxyl group을 추정할 수 있었고, intramolecular hydrogen bonding에 의한 ketone의 enol tautomer에 의한 흡수가 1635 cm⁻¹에서 관찰되었다. EI-MS spectrum을 측정한 결과 m/z 376에서 molecular ion peak가 관찰되었으며 m/z 365에서 [M-15]⁺, m/z 333에서 [M-43]⁺의 fragmentation peak가 관찰되었다. ¹H-NMR spectrum에서 C-1에 결합하고 있는 germinal dimethyl의 peak가 δ 1.69에서 6H의 singlet으로, C-9에 결합하고 있는 methyl group이 δ 3.05에서 3H의 singlet으로

Table 3. Comparison of ¹³C-NMR data of resitomyacin and MCS-202

Carbon	resitomyacin*	MCS-202*
C-1	45.9	46.3
C-2	204.6	205.1
C-2a	102.5	102.9
C-3	170.2	170.6
C-4	100.1	100.6
C-5	169.7	170.1
C-5a	105.7	106.2
C-6	184.5	184.9
C-6a	106.4	107.0
C-7	167.9	168.3
C-8	119.2	119.8
C-9	151.5	152.4
C-9a	114.1	114.7
C-10	162.3	163.4
C-11	109.5	110.3
C-11a	152.2	152.9
C-11b	107.4	107.5
C-11c	139.5	140.0
C-11d	128.5	129.0
C-12	28.4	30.6
C-13	28.4	28.8
C-14	25.4	25.9

*Chemical shift in ppm

나타났다. Aromatic ring에 결합하고 있는 H-4, H-8, H-11의 protone은 각각 δ 6.51, δ 7.23, δ 7.37에서 각각 1H의 singlet으로 나타났으며, intramolecular hydro-

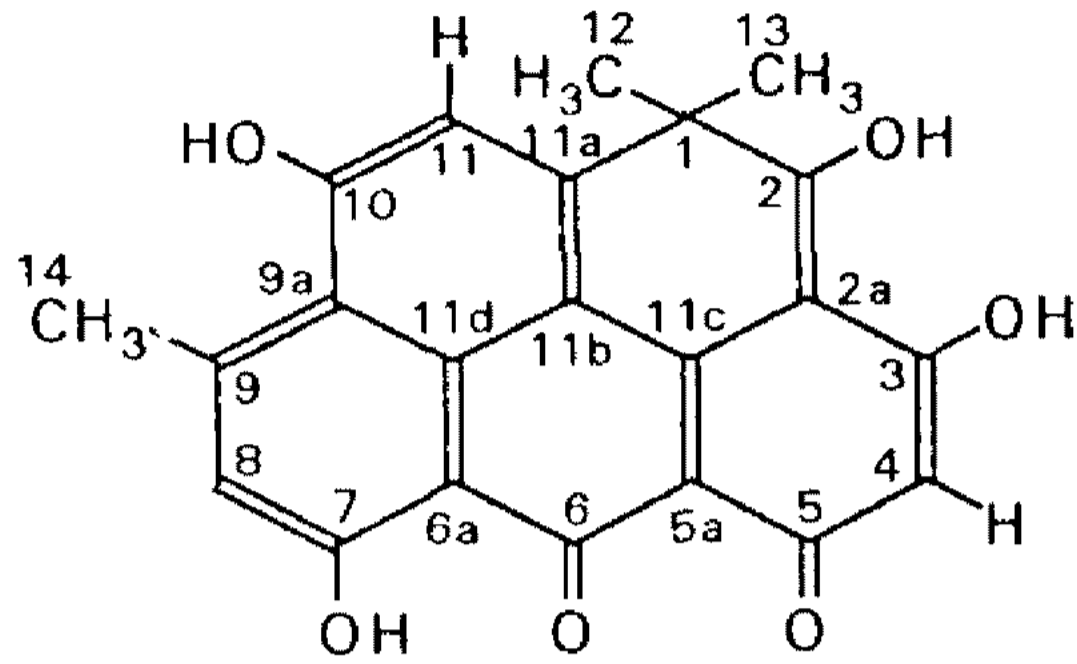


Fig. 1. Structure of resistomycin.

gen bonding을 하고 있는 C-2, C-5, C-7의 OH가 δ 14.27, δ 14.51, δ 14.75에서 나타났다. $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 각 탄소의 chemical shift는 Table 3에서와 같이 문헌에 보고된 resistomycin의 data와 비교하여 결정하였다. 이상의 물리화학적 성질과 spectral data를 통해서 MCS-202는 Fig. 1의 구조를 갖는 resistomycin으로 동정하였다(7, 8).

MCS-202의 생물학적 활성

MCS-202은 50 pg/ml부터 50 ng/ml의 농도에서 유암 세포주인 MCF-7의 형태변화를 유도하였고(Fig. 2), 50 ng/ml 이상의 농도에서는 cytotoxic한 활성을 나타내었다(Fig. 3). 또 이 화합물에 대하여 미국 NCI에서 항암제의 평가에 일반적으로 사용되는 종양 pa-

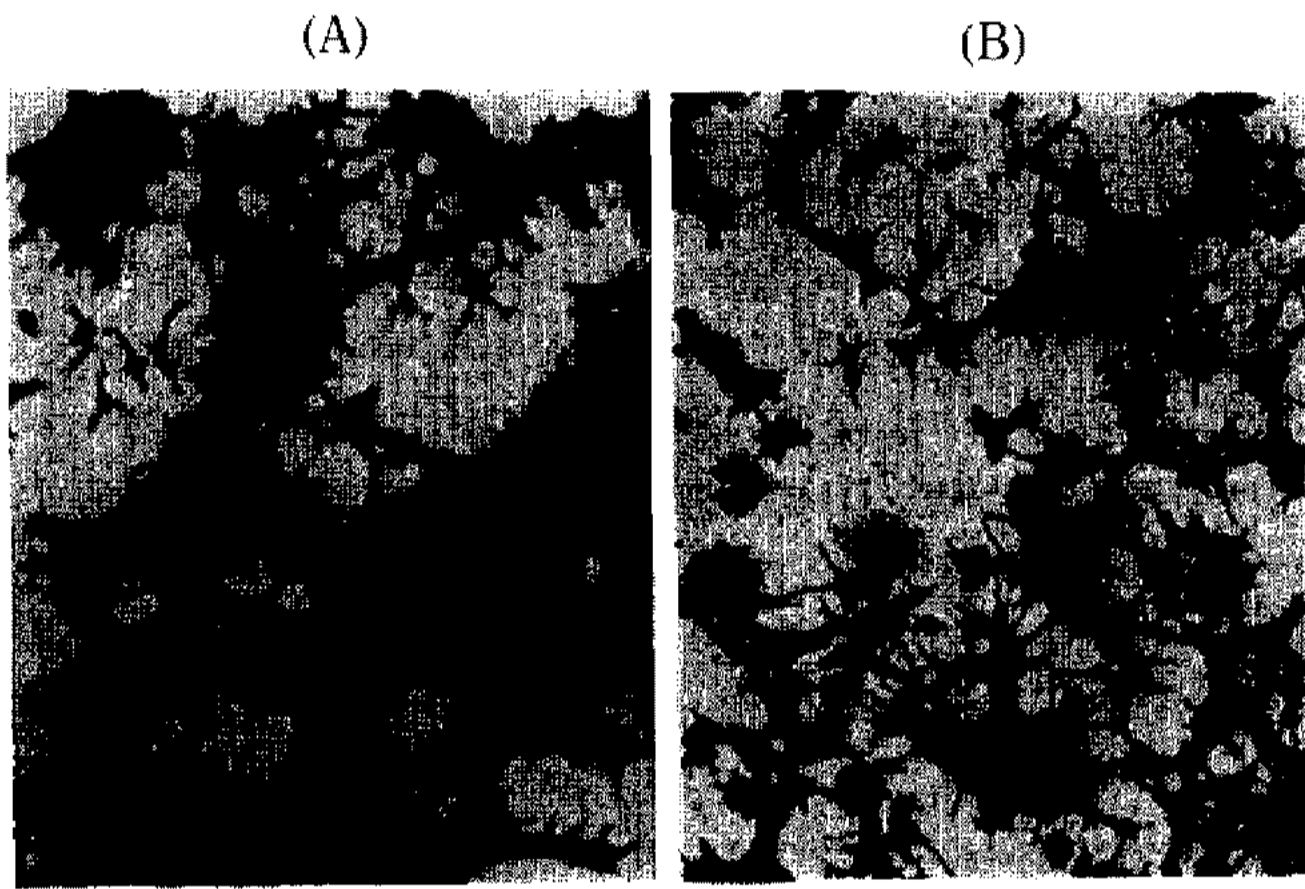


Fig. 2. Morphological change of MCF-7 cell (A) control (B) treated with 0.5 ng/ml MCS-202.

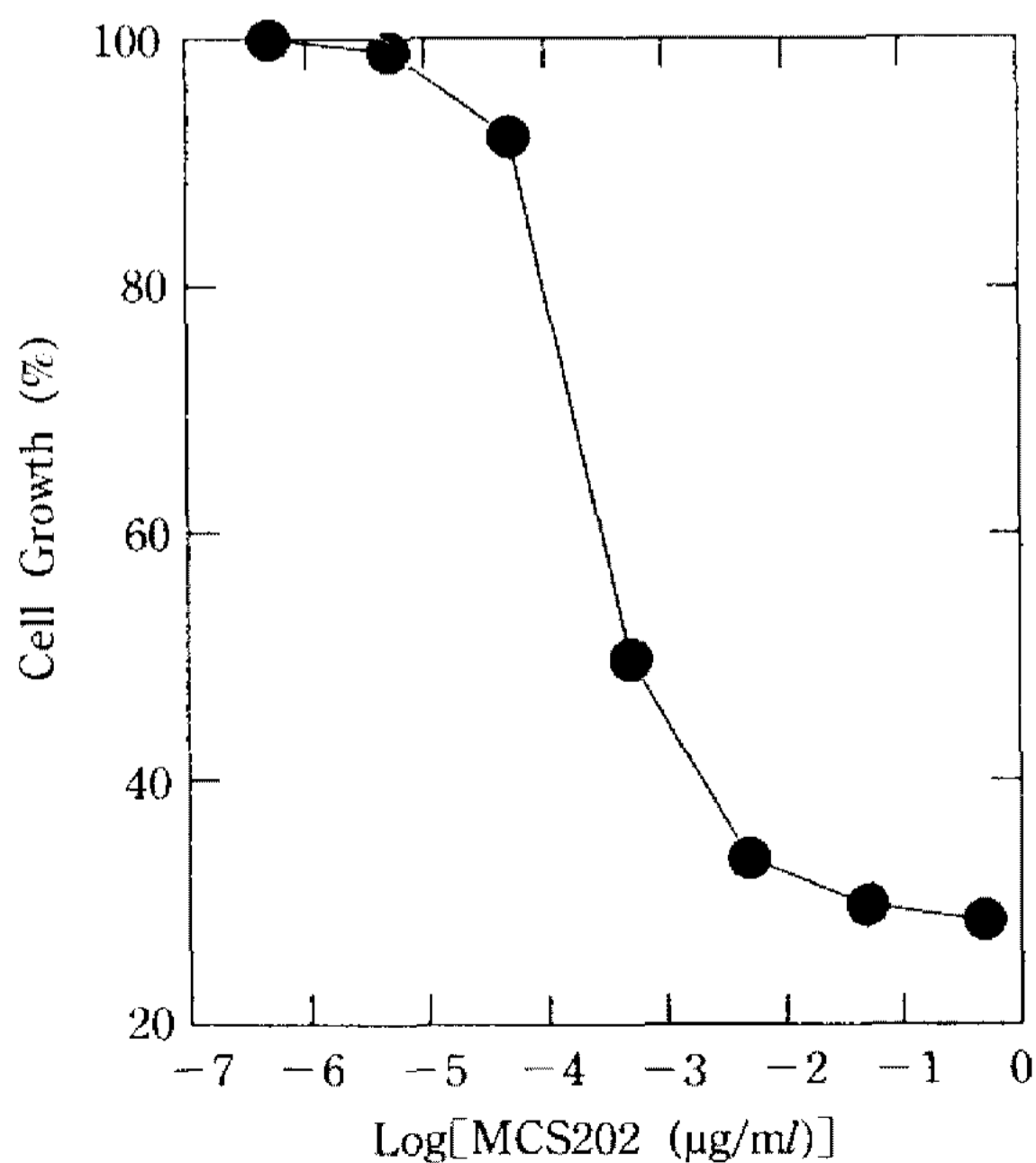


Fig. 3. Inhibition of MCS-202 on the growth of MCF-7 cells.

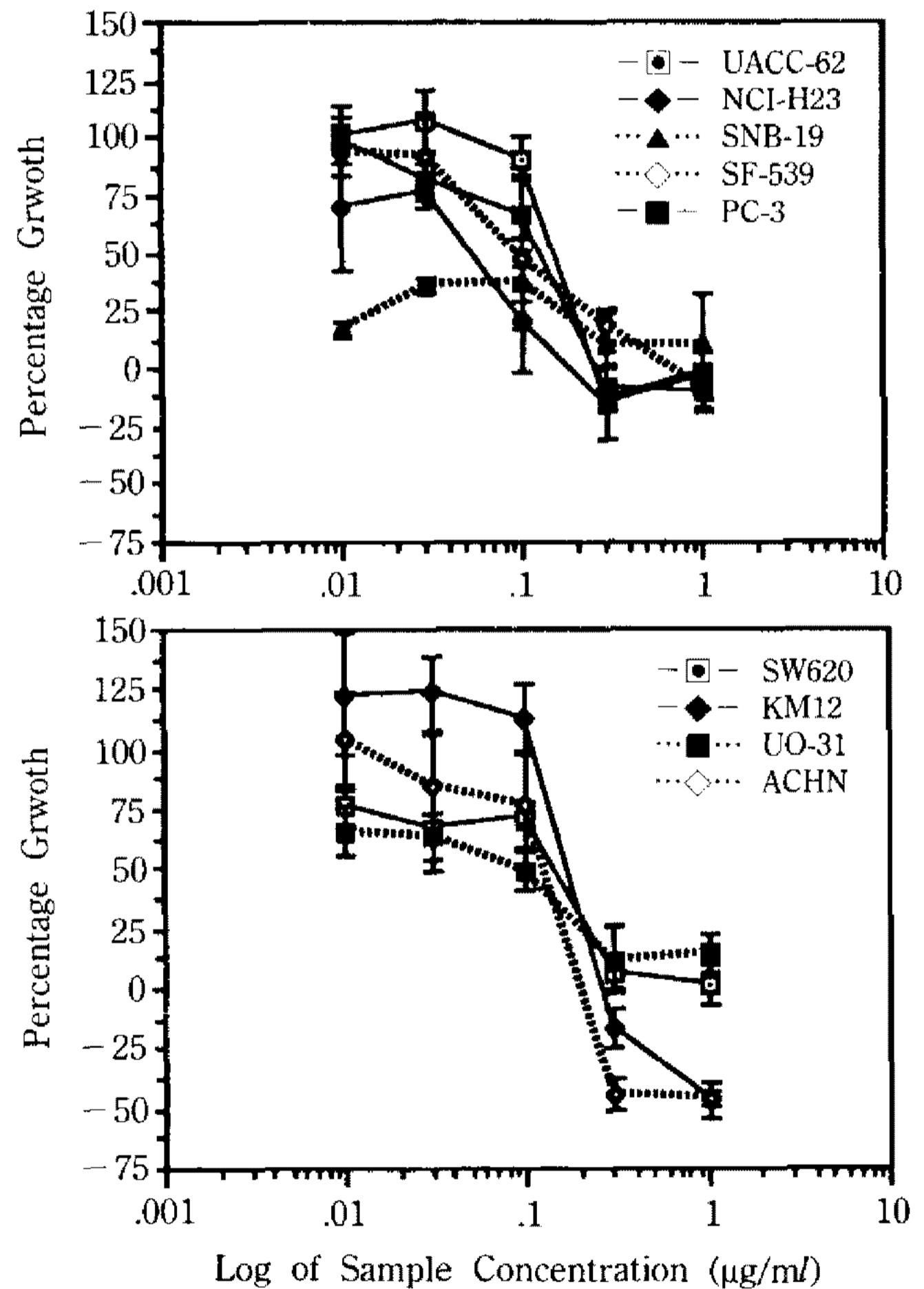


Fig. 4. Dose-response profile of *in vitro* growth inhibition induced by MCS-202.

All cell lines were inoculated at designated cell concentration and chemical treatment was done for 48 hours. Chemical concentrations were 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, and 1.0 µg/ml. Cell concentration was determined by SRB assay after TCA fixation. Data were expressed as mean \pm SD four determinations.

Table 4. Calculated GI₅₀ value of MCS-202 against human cancer cell lines

Cell line	Origin	GI ₅₀ (μg/ml)
UACC-62	Skin	0.137
NCI-H23	Lung	0.042
SNB-19	CNS	0.013
SF-539	CNS	0.118
PC-3	Prostate	0.124
SW620	Colon	0.055
KM12	Colon	0.279
UO-31	Renal	0.045
ACHN	Renal	0.285
Mena GI ₅₀		0.122

nel로서 6종류의 기관에서 유래한 9종의 인체 암세포주에 대한 항암활성을 조사하여, 각 세포주들에 대한 용량반응곡선을 Fig. 4에 나타내었고, 50% 성장저해농도(GI₅₀)를 Table 4에 나타내었다.

고 찰

Resistomycin은 1951년 Brockmann 등에 의해서 *S. resistomycificus*로부터 G(+) 세균에 항균활성을 나타내는 antibiotic으로 분리되어 구조동정되었으며(9), 10분자의 acetate와 2 분자의 methionine이 축합하여 생성된 benzo[cd]pyrene ring system을 가진 화합물이다. 1972년 Gause 등에 의하여 *S. valiabilisi*에서 생산된 항생물질 heliomycin은(10) UV, ¹H-NMR과 mass spectral data를 통해서 resistomycin과 동일한 화합물로 밝혀졌다(11). 1985년 Arora에 의해서 ¹H-NMR과 X-ray에 의해 이 화합물의 결정 구조가 밝혀졌으며(12), 분자내에 있는 gem dimethyl group을 제외하고는 intramolecular hydrogen bonding을 하고 있는 것으로 보고되었다. 이 화합물은 항균작용과 화상치료, 혈관수축작용 등의 작용이 알려져 있으며, 100 μg/ml의 농도에서 *Escherichia coli*의 성장과 DNA 합성에는 영향이 없었고, DNA dependant RNA polymerase의 활성을 저해함으로써 RNA의 합성을 저해한다고 보고되었으나(13), 그 외의 약리작용에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 실험에서는 세포의 증식이나 분화를 조절하는 화합물을 검색하는 지속적인 연구로 방선균 분리주 *Streptomyces* sp. 1365의 배양액이 인체유암 세포주 MCF-7의 형태변화를

강력하게 유도하는 것을 발견하였고, 각종 chromatography를 통하여 순수 화합물 MCS-202을 분리하였다. 이 화합물은 50 ng/ml 이하의 농도에서 인체유암세포주인 MCF-7의 세포형태를 부정형에서 가는 관 모양의 돌기가 있는 세포형태로 변화시켰다(Fig. 2). 이 화합물을 NCI의 tumor panel 중 9종의 인체암세포주에 대한 dose-response를 조사하여 본 결과, 세포주들은 거의 유사한 profile을 보여주었다. 즉 0.01~0.03 μg/ml의 농도에서는 미약한 성장저해를 보였으며, 0.1 μg/ml의 농도에서는 KM12의 경우 성장저해 활성이 나타나지 않았으나 UACC-62, PC-3, SW620, ACHN 세포주는 40% 이하의 성장저해를, NCI-H23, SNB-19, SF-539, UO-31은 50% 이상의 높은 성장저해활성을 나타내었다. 0.3~1.0 μg/ml에서는 모든 세포주가 강한 cytotoxicity를 나타내었고, 48시간 동안 세포농도의 증가도 관찰되지 않았다. Dose-response curve의 pattern에서 UACC-62, PC-3, SW620, KM12, ACHN은 0.1~0.3 μg/ml의 농도에서 급격한 감소를 보였다. Fig. 4의 종합적인 dose response curve에서 보는 바와 같이 모든 세포주의 *in vitro* 성장은 MCS-202의 0.01~1.0 μg/ml의 농도에서 저해되었다. 실험에 사용한 9종의 세포주들에 대한 평균 GI₅₀은 0.122 μg/ml이었으며, NCI-H23, SNB-19, SW620, UO-31은 평균보다 더 낮은 GI₅₀을, KM12, ACHN은 더 높은 GI₅₀을 나타내었다. GI₅₀의 최대차이는 5배에서 20배 정도이었고, 세포주의 차이에 따른 활성의 차이는 그다지 크지 않았다. MCS-202에 의한 MCF-7 세포의 형태변화와 각종 암세포주에 대한 활성을 근거로 하여 항암활성의 작용기전의 연구와 지속적인 활성연구가 기대된다.

요 약

미생물 대사산물로부터 인체유암세포주 MCF-7의 형태변화와 세포독성을 나타내는 화합물을 탐색하는 중에 *Streptomyces* sp. 1365 균주를 선별하였으며, 이 균주를 배양하여 활성물질 MCS-202를 분리하였다. 각종 spectroscopic data에 의한 구조분석의 결과 이 화합물은 resistomycin으로 동정하였다. 이 화합물은 50 pg/ml부터 50 ng/ml의 농도에서 MCF-7 세포의 형태변화를 유도하였으며, 50 ng/ml 이상의 농도에서는 세포독성을 나타내었다. 이 화합물에 대하여 NCI의 tumor panel 중 9종류의 인체암세포주에 대한 항암활성을 조사하여 본 결과 0.1~0.3 μg/ml의 농도

에서 거의 모든 세포에 대하여 강한 세포독성을 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구는 과기처 특정연구개발사업에 의해 수행되었으며, 연구비를 지원하여 주신 것에 감사드립니다.

참고문헌

1. Boyd, M.R. 1989. Status of the NCI Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen. Pp. 1-12. In V.T. Devita Jr., Hellman S. and Rosenberg S.A. (ed.), *Principles and Practice of Oncology Updates*, Vol. 3(10), Lippincott, Philadelphia.
2. Tischler, M., J.H. Cardellina II, M.R. Boyd, and G.M. Cragg. 1992. Cytotoxic quassinoids from *Cedronia granatensis*. *J. Nat. Prod.* **55**: 667-671.
3. Kim, H.S., S.E. Kim, Y.H. Kim, S.W. Lee, G.T. OH, H.M. Kim, and J.J. Lee. 1993. Antitumoral compound, MCH-201, an effector on proliferation and morphology of human tumor cell line, MCF-7. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 316-321.
4. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenny, and M.R. Boyd. 1990. New calorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. NCI.* **82**: 1107-1112.
5. Wu, L., A.M. Smythe, S.F. Stinson, L.A. Mullen-dore, A. Monks, D.A. Scudiero, K.D. Paull, A.D. Koutsoukos, L.V. Rubinstein, R. Boyd and R.H. Shoemaker. 1992. Multi-drug resistant phenotype of disease-oriented panel of human tumor cell lines used for anticancer drug screening. *Cancer Res.* **52**: 3029-3034.
6. Monks, A., D. Scudiero, P.Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, and M.R. Boyd. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. NCI.* **83**: 757-766.
7. Rosenbrook, W. 1967. The structure of resistomycin. *J. Org. Chem.* **32**: 2924-2925.
8. Hofle, G. and H. Wolf. 1983. Isolierung, ¹³C-NMR-spektren und biogenese von resistomycin und resistoflavin aus *Streptomyces griseoflavus* B71. *Liebigs Ann. Chem.* **5**: 835-843.
9. Brockmann, H., E. Meyer, K. Schrempp, F. Reiners, and T. Reschke. 1969. Die Konstitution des Resistomycins. *Chem. Ber.* **102**: 1224-1246.
10. Gause, G.F., T.P. Preobrahenskaya, T.S. Maksimova, R.S. Ukholina, N.P. Naecheva, and I.N. Koshoeva. 1972. Antibiotic Heliomycin. *German Patent* 2,212,854, Nov. 2.
11. Vinogradova, K.A., N.P. Kirillova, Z.G. Sokolova, I.V. Yatseva, B.V. Rozynov, and M.N. Preobrazhenskaya. 1991. On structure of heliomycin produced by *Streptomyces heliocini* and antibiotic 11-98 produced by *Streptomyces olivocinereus*. *Antibiot. Khimoter.* **36**: 28-29.
12. Arora, S.K. 1985. Molecular structure of heliomycin, an inhibitor of RNA synthesis. *J. Antibiotic.* **38**: 113-115.
13. Korolev, P.N., V.G. Bulgakova, A.N. Polin, E.I. Melikhova, and A.B. Silev. 1975. Effect of heliomycin on synthesis of protein and nucleic acids in *Escherichia coli*. *Mikrobiologiya* **44**: 400-403.

(Received October 23, 1993)