

초산균체 추출물의 *In Vitro*계 암세포 증식 억제 효과

이병우 · 유익제 · 유무영 · 황우익* · 최춘언
오투기중앙연구소, *고려대학교 의과대학

Cytotoxic Effect of the Extract from *Acetobacter aceti* OLS-001

Byung-Woo Lee, Yik-Je Yoo, Moo-Yung Yoo, Woo-Ik Hwang* and Chun-Un Choi
Ottogi Research Center, *College of Medicine, Korea University

Abstract

This study was performed to observe cytotoxic effect of *Acetobacter aceti* OLS-001 extract against cancer cell lines, including mouse leukemic lymphocyte(P388, L1210) and human rectal(HRT-18) cell. The anticancer substance was prepared by ethanol precipitation of the glass bead extraction combined with hot water of *Acetobacter aceti* OLS-001. The growth rates of the cancer cells in medium containing *Acetobacter aceti* extract were inhibited gradually to a significant degree in proportion to the increase of the extract concentration. Morphology of HRT-18 cells in medium containing *Acetobacter aceti* extract were seen to be shrunked and fragmented.

Key words: *Acetobacter aceti* extract, cytotoxic effect

서 론

초산발효는 초산균의 작용으로 alcohol이 산화되어 acetic acid를 생성하는 호기적 발효로서 대표적인 초산균인 세균으로 *Acetobacter aceti*, *A. xylinum*, *A. pasteurianus*, *A. suboxydans*, *A. orleans* 등이 있다⁽¹⁾. 이러한 초산균은 heteropolysaccharide로 구성되어져 있으며 생리활성이 높고 독성이 없는 것이 특징이다⁽²⁾. 류 등^(2, 3)은 *A. pasteurianus* IFO 13751의 다당류 생성과 IFO 13751-5 변이주가 생성하는 다당류의 함양효과를 검토하였으며 Valla⁽⁴⁾ 등은 *A. xylinum*을 돌연변이에 의해 생성된 세포의 다당류에 대한 조사를 하였다. 또 Tayama 등⁽⁵⁾은 *Acetobacter* sp. NBI 1022에 의해 생성된 acidic polysaccharide의 조성에 대하여 보고하였지만 초산발효후 생성된 초산균체는 발효부산물로 이용성이 거의 없는 실정이다.

본 연구는 초산발효후 생성되는 발효 부산물의 산업적 응용에 대한 연구의 일환으로, *Acetobacter aceti* OLS-001 균체 추출물에 대하여 암세포 3종에 대한 생육 억제 효과를 조사하여 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

사용균주 및 암세포

실험에 사용한 균주는 *Acetobacter aceti* OLS-001균주

를 사용하였으며, 항암실험을 위해 사용한 암세포는 항암제 screening에 응용하는 cell lines(고려대학교 의과대학)중 mouse leukemic cell인 P388과 L1210, 그리고 인체의 장암세포인 HRT-18을 *in vitro*에서 배양하면서 사용하였다.

추출물의 제조

발효가 완료된 후 회수된 초산균체는 이⁽⁶⁾ 등의 방법으로 추출하였다. 즉, 증류수로 2회 세척한 다음 0.25 mm의 크기인 glass bead로 5,000 rpm에서 30분간 분쇄(Type KDL, Switzerland)한 다음 열수추출(100°C, 30 min)하였다. 열수추출후 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 여액은 감압농축기로 10배 농축한 후 3배의 에탄올을 가하여 4°C에서 하루밤을 방치하였다. 방치후 생성된 침전물을 원심분리한 다음 동결건조하여 사용하였다.

암세포의 배양

Mouse leukemic cell인 P388과 L1210은 Fisher와 Sartorelli법⁽⁷⁾에 의하여 배양하였으며 인체의 장암세포인 HRT-18은 fetal bovine serum(Gibco)이 5%, penicillin(Sigma) 100 units/ml, streptomycin(Sigma) 10 µg/ml이 함유된 DMEM배지로 T-75 플라스크에 이식시킨 후 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온기에서 monolayer로 배양하였으며, 플라스크에 암세포가 4×10⁵ cells/ml 정도로 증식되면 phosphate buffered saline로 세척하고 0.05% trypsin-EDTA로 분리시켜 계대 배양하였다.

Corresponding author: Byung-Woo Lee, Ottogi Research Center, 430-070, Korea

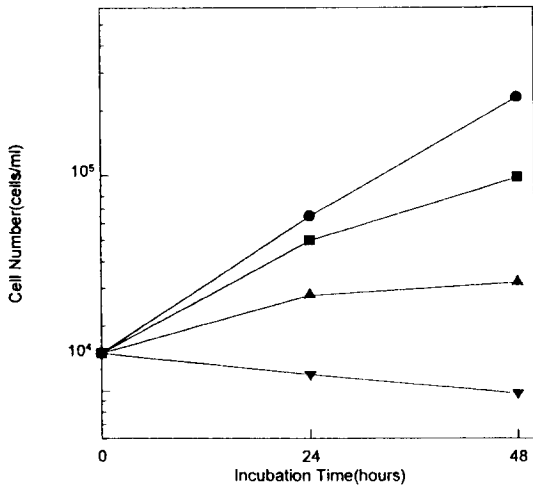


Fig. 1. Growth curves of P388 cell in the culture medium with or without *Acetobacter acetii* extracts
 ●—●, control; ■—■, 2 mg/ml; ▲—▲, 4 mg/ml; ▼—▼, 6 mg/ml

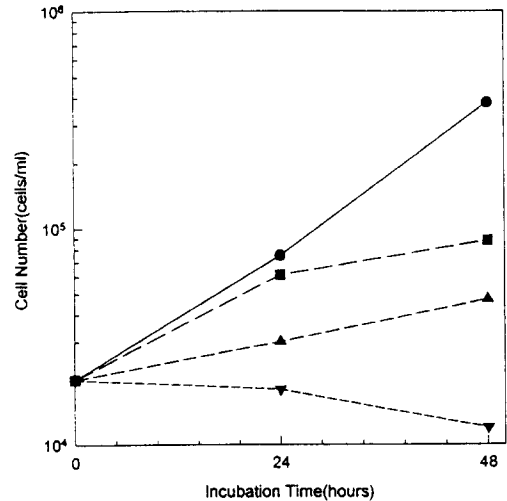


Fig. 2. Growth curves of L1210 cells in the culture medium with or without *Acetobacter acetii* extracts

초산균체 추출물의 암세포 증식 억제 효과 측정

Mouse leukemic cell인 경우 추출물이 농도별 함유된 Fisher's medium에 일정량의 세포를 첨가한 후, 37°C에서 배양하면서 시간별, 농도별 각각 세포수를 coulter counter(ZBI, USA)로 측정하여 대조군과 비교하였으며, 인체의 장암세포인 HRT-18의 경우 35 mm petri dish에 이식하고 24시간 배양하고 세포수가 일정농도로 되었을 때 초산균체 추출물이 농도별로 함유된 새로운 DMEM 배양액으로 교체한후, 다시 CO₂ 항온기 에서 배양하면서 시간별, 농도별 각각 세포수를 coulter counter로 측정하여 대조군과 비교하였다⁽⁸⁾.

암세포 형태의 관찰

HRT-18 암세포에 초산균체 추출물을 첨가하여 배양하면서 24시간 경과후부터 암세포의 모양을 inverted microscope로 관찰하였다⁽⁹⁾.

결과 및 고찰

Mouse leukemic cell인 P388 증식 억제 효과

초산균체 추출물을 농도별로 첨가한 배양액에서 배양한 P388세포의 증식억제 효과는 Fig. 1과 같다. 즉, 출발 세포수 1.5 × 10⁴ cells/ml에서 24시간 및 48시간 배양시, 대조군은 6.5 × 10⁴ 및 2.3 × 10⁵ cells/ml로 증식되었고, 추출물 2 mg/ml 첨가한 배양액은 24시간, 48시간 배양시 5.0 × 10⁴과 9.8 × 10⁴ cells/ml로 증식되어 23%와 57%가 각각 억제되었는데 비하여, 4 mg 첨가한 배양액은 대조군의 24시간 및 48시간 배양에 비해 세포수가 74%, 92% 억제되었고, 6 mg 첨가한 배양액의 경우 초기농도보다

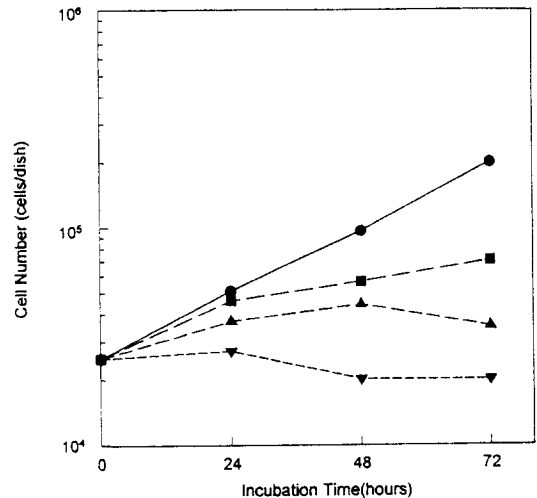


Fig. 3. Growth curves of HRT-18 cells in the culture medium with or without *Acetobacter acetii* extracts

감소하는 경향을 보였다.

Mouse leukemic cell인 L1210 증식 억제 효과

초산균체 추출물을 농도별로 첨가한 배양액에서 배양한 L1210 세포의 증식억제 효과는 Fig. 2와 같다. 즉, 출발 세포수 2.0 × 10⁴ cells/ml에서 24시간 및 48시간 배양시, 대조군은 7.5 × 10⁴ 및 3.8 × 10⁵ cells/ml로 증식되었으나, 추출물 2 mg/ml 첨가한 배양액의 경우 대조군의 해당 시간에 비하여 각각 18%, 81%씩 감소되었고, 4 mg 첨가한 배양액은 대조군의 24시간 및 48시간 배양에 비해

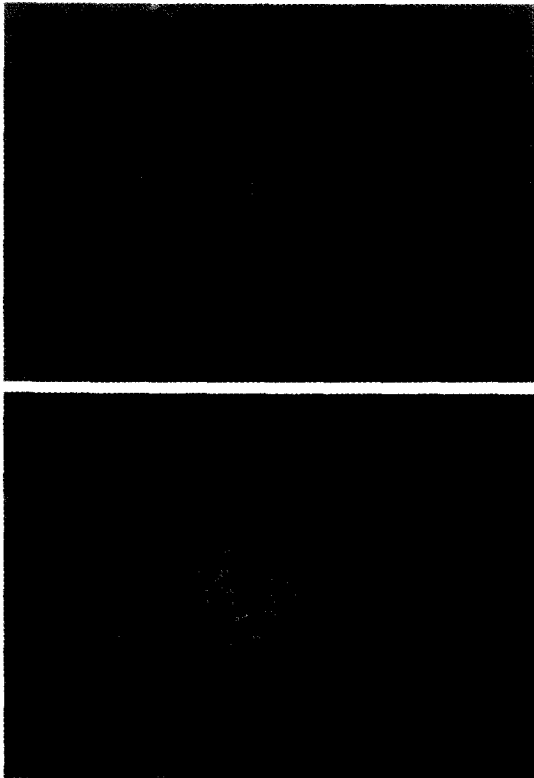


Fig. 4. Morphology of HRT-18 cells in grown normal medium

p-1; HRT-18 cell not treated. (24 hours, ×200)
p-2; HRT-18 cell not treated. (48 hours, ×200)

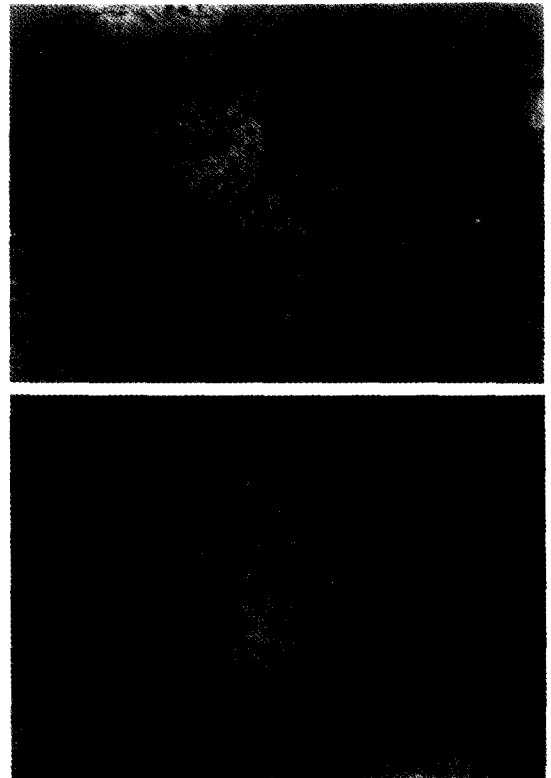


Fig. 5. Morphology of HRT-18 cells grown in medium containing *Acetobacter aceti* extract

p-3; HRT-18 cell treated with *Acetobacter aceti* extract, 9 mg/ml (24 hours, ×200)
p-4; HRT-18 cell treated with *Acetobacter aceti* extract, 9 mg/ml (48 hours, ×200)

세포수가 80%, 93% 억제되었고, 6 mg 첨가한 배양액의 경우 초기농도보다 현저히 감소하였다.

장암세포 HRT-18 증식 억제 효과

Fig. 3은 HRT-18암세포 배양액에 초산균체 추출물을 ml당 3 mg, 6 mg, 9 mg씩 첨가하여 배양했을 때의 성장곡선이다. 출발세포수가 2.5×10^4 cells/dish에서 24, 48 및 72시간 배양시 대조군은 5.1×10^4 cells/dish, 9.6×10^4 cells/dish 및 2.0×10^5 cells/dish로 각각 증식하였다. 그러나 추출물 3 mg/ml 첨가군은 72시간 배양시 71% 증식이 억제되었고, 6 mg/ml 첨가군은 94% 증식이 억제되었다. 9 mg/ml 첨가군은 증식이 억제되었을 뿐만 아니라 초기세포수보다 오히려 감소하는 경향을 보였다.

암세포 형태의 관찰

HRT-18 cell에 초산균체 추출물 9 mg/ml를 첨가하여 배양하면서 24시간 부터 48시간 까지 암세포의 형태를 관찰한 결과 Fig. 4, 5와 같다. 대조군의 HRT-18 cell의 경우(Fig. 4) p-1, p-2에 나타낸 바와 같이 배양시간 경과에 따라 정상적으로 증식하고 있으나, 초산균체 추출

물을 첨가한 군은(Fig. 5) 대조군에 비해 세포의 형태가 기형적으로 변형되었으며, 죽은 세포의 잔유물이 떠 있어 암세포의 증식억제 효과가 있음을 나타낸다. 류 등²⁾은 *Acetobacter pasteurianus* IFO. 13751-5 변이주에서 생성된 다당류가 *in vivo*에서는 50 mg/kg의 투여 농도에서 고형암 성장 저지율이 약 65%의 효과를 나타냈으나, *in vitro*에서는 효과가 보이지 않는다고 보고하였으나 *Acetobacter aceti* OLS-001에서는 암세포 증식 억제효과를 있음을 알 수 있다.

요 약

Acetobacter aceti OLS-001 균체에서 추출한 추출물의 농도가 높을수록, 배양시간이 길수록 암세포의 증식 억제 효과가 높게 나타났으며, 현미경 관찰에서 본래의 암세포 형태가 변형되고 세포막사이의 경계막이 흐트러지면서 사멸하는 현상을 나타냈다.

문 헌

1. 김찬조 : 발효화학. 수학사, 서울 p210 (1988)
2. 김동석, 류병호 : *Acetobacter pasteurianus* IFO. 13751-5 변이주가 생성하는 다당류의 항암효과. 한국식품과학회지, 23, 405 (1991)
3. 김동석, 류병호 : *Acetobacter pasteurianus* IFO. 13751 돌연변이주에 의한 다당류 생산성. 한국식품과학회지, 23, 291 (1991)
4. Valla, S. and Kjosbakken, J.: Isolation and characterization of a new extracellular polysaccharide from a cellulose-negative strain *Acetobacter xylinum*. *Can. J. Microbiol.*, 27, 599 (1981)
5. Tayama, K., Minakami, H., Entani, E., Fujiyama, S. and Masai, H.: Structure of an acidic polysaccharide from *Acetobacter* sp. NBI 1022. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 959 (1985)
6. 이병우 : 대한민국특허, 공개번호 94-11011
7. Fisher, G.A. and Sartorelli, A.G.: Development maintenance and assay of drug resistance. *Meth. in Med. Res.*, 10, 247 (1964)
8. 황우익, 이성동, 손홍수, 백나경, 지유환 : 마늘성분에 의한 면역증강 및 항암효과. 한국영양식량학회지, 19, 494 (1990)
9. Clark, G.: *Staining procedures*, 4th ed. Williams & Wilkins (1981)

(1995년 1월 6일 접수)