

## 미생물 배양액으로부터 항암제의 예비선별을 위한 cccDNA Breakage 활성 검정과 Assay Sulforhodamine B 활성검정의 이용

이상한\* · 이동선 · 김종국 · 홍순덕†

경북대학교 미생물학과

## Use of cccDNA Breakage Assay and Sulforhodamine B Assay for the Prescreening of Antitumor Agents from Microbial Sources

Sang-Han Lee\*, Dong-Sun Lee, Jong-Guk Kim and Soon-Duck Hong†

Department of Microbiology, Kyung-pook National University, Teagu 702-701, Korea

### Abstract

In order to develop new antitumor agents from fermentation broths, we used cccDNA breakage assay and sulforhodamine B assay for prescreening. As a result, it was shown that positive sample reach 3.3% when using cccDNA breakage assay. In sulforhodamine B assay, we obtained 4 active fraction against A549 (a cell line of human lung carcinoma) and SK-OV-3 (a cell line of human adenocarcinoma). These results suggest that these assay would be a promising method for antitumor prescreening from microbial sources.

*Key words* : prescreen of antitumor agents, cccDNA breakage assay, sulforhodamine B assay

### 서 론

암화학요법의 경우, 기존에 개발된 물질의 거의 대부분이 매우 높은 독성을 가질 뿐만 아니라 환자에게 매우 심각한 부작용을 나타내어, 독성이 없는 항암제의 개발이 절실히 요구되고 있다<sup>1-2)</sup>. 항암제의 예비선별법은 *in vivo* 법과 *in vitro* 법으로 분류할 수 있다. *In vitro* 스크리닝법은 ras 발현 세포의 형태를 정상형으로 변화시키는 물질의 스크리닝법<sup>3)</sup>, Photobacterium induction assay<sup>4)</sup>, P388/ADM 내성세포 이용법<sup>5)</sup>, Hfr 균주 이용법<sup>6)</sup>, bleb forming assay<sup>7)</sup>, P388 agar diffusion assay<sup>8)</sup>, P-glycoprotein inhibitor<sup>9)</sup>, radical scavenger assay<sup>10)</sup>, MTT/XTT assay<sup>11)</sup>, Photodynamic

agents assay<sup>12)</sup>, anti-Gst-p agents assay<sup>13)</sup> 등이 알려져 있다. 또 *in vivo* 스크리닝법에는 mouse, rat의 이식종양을 이용하는 방법, nude mouse 등의 면역결손 동물에 사람의 암세포를 이식시켜 선별하는 방법, 암바이러스 발암제에 의한 자가종양을 이용하는 방법등이 있다<sup>2)</sup>. 그러나 이러한 방법등도 각각 문제를 지니고 있어서 1986년경부터 미국 NCI에서는 종래의 mouse에 종양을 일으켜 사용하던 방식을 전면적으로 개정하여 disease-oriented *in vitro/in vivo* 스크리닝법을 채용하였다.

그동안 동물세포를 이용한 *in vitro* 스크리닝방법으로는 MTT 및 XTT assay 가 널리 사용되어 왔으나, 최근에는 이들 방법의 단점을 보완한 SRB assay가 개발되어 이를

† Corresponding author

이용한 assay가 활발히 진행중이다. 항암제의 예비선별법으로서 ①다량의 시료를 ①빠르게 ③적은 비용으로 ④간단히 검색할수 있는 방법이 가장 이상적이라 할수 있겠다.

이에 본 연구에서는 여러 예비선별법중에서 cccDNA와 SRB를 사용하여 미생물발효여액에서 새로운 항암예비물질 을 찾고자 시도하였다.

## 재료 및 방법

### (1) 세균의 배양 및 Plasmid DNA 추출

*E.coli* HB101을 LB배지에서 배양한뒤, pBR 322를 Birnboim등의 alkaline SDS법을 사용하여 추출하였다<sup>14)</sup>.

### (2) 전기영동

pBR322와 발효액을 1 : 1로 30분간 반응시킨 반응액을 Meyers등의 방법으로 전기영동하였다(5). Gel은 Tris-borate buffer에 agarose를 0.7% 되게 한 것을 사용하였으며, parafilm 위에서 bromophenol blue 용액과 반응액을 1 : 5 비율로 섞어 5??를 sample well에 loading시켰다. 20 mA, 100V에서 3시간 전기영동하고 이 gel을 ethidium bromide용액 (0.4µg/ml)에 담구어 30분 정도 염색한후 transilluminator를 사용하여 cccDNA의 breakage정도를 관찰 하였다.

### (3) SRB assay

SK-OV-3를 24시간 배양시킨 24 well plate의 배지를 모두 aspiration하여 제거한후, 발효여액을 24 well의 plate에 2 ml씩 넣어 drug incubation time에 따른 효과를 측정하기 위해 각각 24, 48, 72시간 배양하였다. 발효여액을 넣어 배양을 시작하는 시점에서 T<sub>z</sub> (time zero) plate의 배지를 제거한 후, 10% TCA를 각 well에 1-2 ml 가하여 1시간동안 4℃에서 방치하였다. tap water로 5회 세척한 뒤 공기중에서 건조시킨 다음, 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB용액을 각 well마다 1 ml 넣어 5분정도 mixing시킨 다음, microplate reader (Dynatech, MR 700)로 520 nm에서의 OD값을 측정하였다. OD값이 1.8 이상인 경우에는 다시 희석하여 그 이하의 값이 되도록한 후 측정하였다<sup>17)</sup>.

$$\text{Vale}(\%) = 100 \times \frac{T - T_2}{C - T_2} \quad (T < T_2 \text{일 경우})$$

$$\text{또는 } 100 \times \frac{T - T_2}{T_2} \quad (T < T_2 \text{일 경우})$$

(T ; 배양이 끝난후 발효여액을 가한 well의 OD값

T<sub>2</sub> ; 배양을 시작하는 시간에 SRB의 값

C ; 배양이 끝난후 세포만의 well의 OD값)

### (4) 사용한 세포

Human lung carcinoma인 A549, human ovary adenocarcinoma인 SK-OV-3를 사용하였다.

### (5) 세포배양 및 시약

DMEM 배지 (Gibco)에 10% fetal bovine serum (Gibco)를 첨가하여 계대배양하였다. dish는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 증식시키고 3-4일 간격으로 재배양하였다. agarose (IBI), ethidium bromide (Sigma), ethanol (Merck), lysozyme (Sigma), SRB (Sulforhodamine B ; Sigma) 및 기타 시약은 시판품을 구입하여 사용하였다.

## 결 과

60여개의 미생물 발효여액에 대하여 pBR322의 breakage 정도를 검토하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 전기영동상에서 대조구는 ccc form과 LC 및 OC form이 선명하나 lane 1-46까지의 미생물배양액을 첨가한 경우, lane 4 (B-380)와 14 (AFA-4)에서 ccc form이 절단되어 특이한 형태의 band가 형성된 것을 알 수 있었다.

SRB assay의 dose-response 곡선에서, partial net growth inhibition의 범위에서는 tumor cell의 증식이 일어남을 알 수 있다. tumor zero value에서는 tumor cell은 살아 있으나 net growth는 되지 않는 상태이며 partial net cell killing의 범위에서는 부분적으로 tumor의 volume이 감소 되는 상태이다. 따라서 total cell killing이 일어나야만 tumor cell에 효과가 있는 것으로 판단할 수 있다. 각각의 발효액을 이용한 SRB assay결과는 Table 1에 나타난 바와 같이 발효여액을 10, 20배 희석한 후에도 AFA-3, AFA-4, AFA-6, AFA-7, AFA-11 등의 발효액은 SK-OV-3에 활성을 나타내었으며, B-380, AFA-3, AFA-4, AFA-6, AFA-7, AFA-11 등의 발효액은 A-549에 비교적 높은 활성을 나타내었다. 이들중 특히 AFA-4, AFA-6는 두 종류의 암세포

미생물 배양액으로부터 항암제의 예비선별을 위한 cccDNA Breakage 활성검정과 Assay Sulforhodamine B 활성검정의 이용

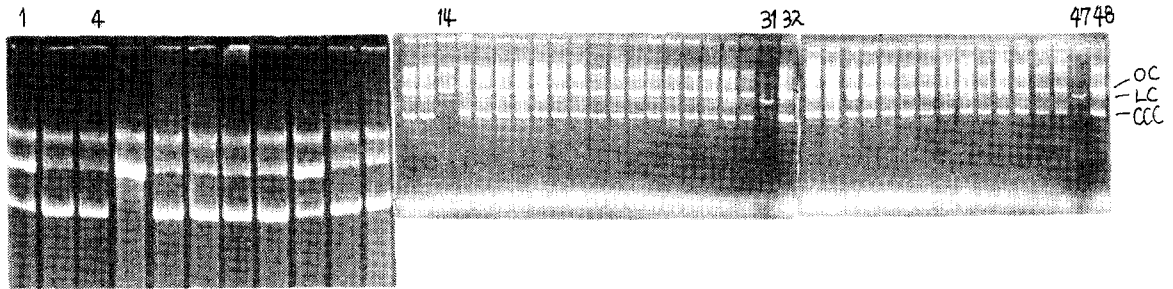


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns of cccDNA after treatment with various fermentation broths.  
 Lane 32 and 48 : cccDNA of pBR322 as control, Lane 31 and 47 : EcoR1 digest of pBR322.  
 Lane 4 : fermentation broth of B-380, Lane 14 : fermentation broth of AFA-4.  
 Abbreviations : OC ; single-strand broken, relaxed form.  
 LC ; double-strand broken, linear form, CCC ; intact covalently closed circular DNA.

Table 1. Comparison of antitumor activity of various fermentation broths against A549 and SK-OV-3 by SRB assay

Sample	Dilution	Value		Sample	Dilution	Value	
		A549	SK-OV-3			A549	SK-OV-3
B-26	1/10	59.07	54.95	B-227	1/10	5.32	-6.68
	1/20	79.29	71.91		1/20	16.80	10.83
B-260	1/10	79.61	97.87	B-291	1/10	46.87	70.10
	1/20	92.98	103.09		1/20	52.38	90.64
B-301	1/10	-81.41	13.47	B-306	1/10	40.22	96.84
	1/20	13.80	76.99		1/20	68.26	96.44
B-326	1/10	-0.29	-2.69	B-332	1/10	69.37	108.03
	1/20	13.77	2.56		1/20	91.35	104.94
B-355	1/10	20.16	11.40	B-364	1/10	-1.05	-2.89
	1/20	32.71	31.37		1/20	14.08	11.48
B-374	1/10	39.22	36.87	B-378	1/10	33.60	70.07
	1/20	70.60	74.89		1/20	54.28	99.72
B-380	1/10	-99.74	-53.40	B-2270	1/10	18.40	5.95
	1/20	-81.92	41.24		1/20	25.83	16.45
B-2910	1/10	51.47	88.46	B-3010	1/10	62.98	90.47
	1/20	58.12	101.95		1/20	66.66	102.22
B-3060	1/10	77.75	99.19	B-3260	1/10	16.47	17.19
	1/20	87.57	98.45		1/20	37.25	35.10
B-3320	1/10	90.80	107.05	B-3550	1/10	44.64	47.51
	1/20	97.74	106.13		1/20	62.23	73.39
B-3640	1/10	21.28	13.89	B-3740	1/10	66.21	81.39
	1/20	36.20	34.70		1/20	79.73	91.79
B-3780	1/10	72.59	96.59	B-3800	1/10	81.78	94.29
	1/20	96.53	105.04		1/20	82.74	98.00
AFA-3	1/10	-68.64	-72.01	AFA-4	1/10	-77.21	-93.28
	1/20	-44.26	-14.85		1/20	-55.52	-85.17
AFA-5	1/10	3.21	-53.27	AFA-6	1/10	-51.99	-91.95
	1/20	9.83	2.23		1/20	-47.45	-46.89
AFA07	1/10	-48.54	-86.24	AFA-11	1/10	-44.26	-69.09
	1/20	-47.62	-26.02		1/20	-37.36	-14.72

See Reference 17 or Materials and Methods for details.

에서 비교적 높은 활성을 나타내었다.

## 고 찰

항암제의 예비선별의 전략은 ①rapid, ②simple, ③inexpensive, ④sensitive ⑤capacious, ⑥special technique이 요구되고 있으나 현재까지의 스크리닝방법으로는 아직까지 독성이 적은 유효한 약물은 개발되지 않고 있는 실정이다.<sup>9)</sup> 한편, cccDNA 이용법은 발효액중에서 *E. coli* HB101의 pBR322의 superhelicity의 single break를 일으키는 물질을 찾아내는 방법으로서, DNA의 구조적 변화를 전기영동법으로 찾아내는 것이다. 즉 전기영동상에서 supercoiled DNA 형태가 발효액내의 어떤 물질에 의해 relaxed circle 또는 linear DNA 형태로 변화되는 band를 전기 영동으로 판별하는 것이다 (19). Fig. 1에서 이미 cccDNA가 절단되어 특이한 형태의 band가 형성되는 것을 보았는데 이러한 사실은 방선균에 의해 생산된 활성물질의 영향으로 band가 절단된 것이라 생각된다. nuclease의 작용가능성 또한 전혀 배제할수 없으나, exo 또는 endonuclease일 경우 65°C에서 15분열처리시에는 실행되는 것으로 알려져 있고, 이러한 효소들이 작용한다고 하더라도 OC form이나 LC form 에 더 선택적으로 작용하기 때문에 이들 band가 더 많이 부서질 것으로 생각된다. 이 방법을 이용하여 60여종의 시료를 처리한 결과 positive반응을 나타낸 균주는 약 3.3%이었다. Fig.1에서의 각각의 시료가 nuclease에 의한 영향인지의 유무를 검토하기 위하여 각각의 시료들을 65°C에서 15분간 처리한 것과 98°C에서 5분간 열처리한 것으로 나누어서 각각 살피본 결과 한개의 발효액에서 nuclease의 활성이 관찰되었다(data not shown). cccDNA breakage법은 Mong등(19)의 보고에서 알려진 바와 같이 bleomycin, tallysomyin, neocarzinostatin계통의 항암 물질이 발견될 가능성도 있으나, 특이하게 band가 형성되는 시료들은 새로운 항암후보물질일 가능성이 높다고 생각된다.

한편, SRB는 aminokanthene dye이며, 2개의 하전된 SO<sub>3</sub>기가 있어서 약산성인 조건에서 물질의 positive charge에 결합한다. Trichloroacetic acid로써 고정시킨 세포에서의 결합부위는 단백질의 아미노기이므로 SRB assay는 protein stain으로 널리 쓰이는 bromophenol blue, naphthol yellow S 및 coomassie blue 등과 조직화학적 성격이 유사하

다(20). SRB assay는 세포농도에 비례하며, 세포수에 따른 상관성이 우수하여 microplate를 사용하여 접착세포와 부유세포 모두에서 drug-induced cytotoxicity를 신속하고 정확하게 측정할수 있다. SRB assay의 dose-response 곡선에서, partial net growth inhibition의 범위에서는 tumor cell의 증식이 일어남을 알수 있다. time zero에서는 tumor cell은 살아 있으나 net growth는 되지 않는 상태이며, partial net cell killing의 범위에서는 부분적으로 tumor cell의 감소를 나타내는 상태이다. 따라서 total cell killing이 일어나야만 tumor cell에 효과가 있는 것으로 판단할수 있다. 각각의 발효액을 이용한 SRB assay 결과를 Table 1에 나타내었다. 이 결과에서 알수 있듯이 발효액은 10, 20배 희석한 후에도 AFA-3, AFA-4, AFA-6, AFA-7, AFA-11등의 발효액은 SK-OV-3 암세포에 활성을 나타내었으며, B-380, AFA-3, AFA-4, AFA-6, AFA-7, AFA-11등의 발효액은 A-549 암세포에 비교적 높은 활성을 나타내었다. 이들중 특히 AFA-4, AFA-6는 두 종류의 암세포에서 비교적 높은 활성을 나타내었다.

이에 앞으로의 연구에서는 먼저 cccDNA법으로 positive strain을 식별하고 이를 SRB assay에 적용함으로써 새로운 항암후보물질로서의 가능성을 검토할 예정이다. 또한 DNA fragmentation assay를 실시함으로써 apoptosis 유도물질은 효과적으로 스크리닝 할 예정이다.

## 요 약

다량의 시료를 빠르게, 적은 경비로, 간단히 검색할수 있는 예비선별법을 찾던중, cccDNA와 sulforhodamine B를 각각 사용한 미생물배양액내의 신규항암후보물질의 탐색을 시도하였다.

cccDNA법으로는 3.3%가 positive 반응을 나타내었으며, SRB assay에서는 A549와 SK-OV-3에 활성을 나타내는 4개의 발효여액을 확인할수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Schwartzmann, G., Winograd, B. and Pinedo, H. M. : The main steps in the development of anticancer agents. *Radiother. Oncol.*, 12, 301-313(1988).
2. Zee-Cheng, R. K. and Gheng, C. C. : Screening and

- evaluation of anticancer agents. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **10**, 67-101(1988).
3. Suzukake-Tsuchiya, K., Moriya, Y., Yamazaki, K., Hosokawa, N., Iinuma, H., Imada, C. and Hamada, M. : Screening of antibiotics preferentially active against ras oncogene-expressed cells. *J. Antibiot.*, **43**, 1489-1496(1990).
  4. Steinberg, D. A., Peterson, G. A., White, R. J., and Maiese, W. M. : The stimulation of bioluminescence in *Photobacterium leiognathi* as a potential prescreen for antitumor agents. *J. Antibiot.*, **38**, 1401-1407(1985).
  5. Edanami, K., Komiyama, K., Kuroda, T. and Umezawa, I. : Antitumor activity of a nitrosourea derivative, CNUA, on murine tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **13**, 22-26(1984).
  6. Tanida, S., Hasegawa, T., Muroi, M. and Higashide, E. : Dnacins, new antibiotics. I. Producing organism, fermentation, and antimicrobial activities. *J. Antibiot.*, **39**, 1443-1448(1980).
  7. Osada, H., Magae, J., Watanabe, C. and Isono, K. : Rapid screening method for inhibitors of protein kinase C. *J. Antibiot.*, **39**, 925-931(1988).
  8. Elespuru, R. K. and White, R. J. : Biochemical prophase induction assay : a rapid test for antitumor agents that interact with DNA. *Cancer Res.*, **43**, 2819-2830(1983).
  9. Shin-ya, K., Shimazu, A., Hayakawa, Y. and Seto, H. : 7-Demethylnaphterpin, a new free radical scavenger from *Streptomyces prunicolor*. *J. Antibiot.*, **45**, 124-125(1992).
  10. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358(1979).
  11. Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M. and Glasebrook, A. L. : An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods*, **142**, 257-265(1991).
  12. Diwu, Z. : Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins. *Photochem. Photobiol.*, **61**, 529-539(1995).
  13. Yusa, K., Hamada, H. and Tsuruo, T. : Comparison of glutathione S-transferase activity between drug-resistant and -sensitive human tumor cells : is glutathione S-transferase associated with multidrug resistance? *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **22**, 17-20(1988).
  14. Birnboim, H. C. and Doly, J. : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513-1523(1979).
  15. Meyers, J. A., Sanchez, D., Elwell, L. P. and Falkow, S. : Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, **127**, 1529-1537(1976).
  16. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular Cloning : A laboratory Manual, 1st Ed., Cold Spring Harbor, p.440, p.448, pp.454-455(1982).
  17. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, R., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1107-1112(1990).
  18. Skehan, P. : Nonchelational cell growth inhibition by EDTA. *Life Sci.*, **39**, 1787-1793(1986).
  19. Mong, S., Strong, J. E., Bush, J. A. and Crooke, S. T. : Use of covalently closed circular deoxyribonucleic acid for prescreening for antitumor compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **16**, 398-405(1979).
  20. Skehan, P., Thomas, J. and Friedman, S. J. : Postconfluency MDCK monolayers as an *in vitro* model of solid tumor chemosensitivity. *Cell Biol. Toxicol.*, **2**, 357-368(1986).