한국치위생교육학회지 : 제1권 제2호, 2001
J Korean Acad Dental Hygiene Education Vol.1, No.2, 2001.

구강암에 대해 항암효과를 나타내는 methanol 자화 방선균의 분리 및 동정

김 정 · 김선숙
수원여자대학 치위생과

색인 : 구강암, 동정, 메탄올 자화 방선균, 항암요법

1. 서 론

한국인의 사망자 5명 중 1명은 암으로 생명을 잃고 있으며, 이 중 구강암이 3~5%를 차지하고 있는 실정이어서 이제는 구강암을 더 이상 다른 사람의 일이라고 방치할 수만은 없다. 실제로 구강암은 조기 발견이 가장 쉬운 암으로 40대 이후에 많이 발생하며 혀, 잇몸, 구강저, 볼, 점막 순서로 잘 생기는 것으로 알려져 있다. 또한 발현빈도가 낮음에도 불구하고 5년 생존율은 50%미만이며, 80%이상이 편평상피세포암으로 보고되고 있다[1~2]. 발생되면 비교적 치명적이며 현저한 기능적 · 심미적 손상과 이에 따른 사회 · 심리학적인 장애를 유발하므로 수술, 방사선치료, 항암요법 등이 주된 치료법으로 이용되고 있다. 그러나 그리 현저하게 개선시키지 못하므로 좀더 활용도가 높고 경제적으로 부담이 적은 치료법이 절실하다.

치료방법 중 전신적인 화학요법제로 선택적으로 사용된 것은 1960년대에 이르러 bleomycin과 5-fluorouracil이 원발병소 후 재발된 환자에게서 선택적으로 사용되어 왔으며, 1980년대에는 면역억제제로 널리 사용되고 있는 cisplatin이 구강암을 포함한 두경부 암종에 효과적으로 작용한다는 보고가 있어 구강암에 대한 화학요법제의 중요성이 대두되고 있다. 그러나 골수기능저하, 소화기계 합병증, 신독성 및 면역력 저하 등의 부작용이 아직 해결해야 할 과제로 남아 있다[3~4].

또한, 최근에는 구강암이 국소적으로 진행된 원발부위를 성공적으로 치료한 것으로 생각된 환자에게서 국소적으로 재발한 환자가 30~50%, 원격 전이된 환자가 20~30%, 10~40%의 환자에서 새로운 이차 원발병소가 발생된다는 측면에서 암 발생의 기시단계, 증진단계, 진행단계를 막는 암화학예방(chemoprevention)

김 정 우 441-748 경기도 수원시 권선구 오목천동 산 1-6번지 수원여자대학 치위생과
전화 : 031-290-8119 전송 : 031-290-8120 E-mail : kimjung@mail.suwon-c.ac.kr
▶ 본 연구는 2001년도 수원여자대학 연구과제 지원에 의해 수행되었음.

이 retinoid, plant phenolics, 호르몬 길항제, polyamine 생합성 억제제, 항기생충제, 비스테로이드성 진통제 등에서 연구보고 되고 있다[5]. 실제로 암화학예방은 악성전환 전에 다단계의 발암단계를 중단시키는 목적으로 하고 있다.

그러나 치과영역에서의 구강암에 대한 연구는 미비하고 특이적으로 작용하는 항암제의 개발은 거의 없는 실정이므로, 본 연구에서는 토양으로부터 구강암에 특이적으로 작용하는 균주를 분리하여 분자생물학적인 방법으로 부작용이 없는 항암제를 개발하는데 기초적인 자료를 제공하고자 한다.

2. 연구재료 및 방법

2.1. 메탄올 자화 방선균의 분리 및 배양

2.1.1. 분리용 배지

토양으로부터 채취한 검체를 멸균 생리식염수로 10배씩 희석한 후, 0.05% 비타민 용액(Thiamine-HCl 0.5 mg, riboflavin 0.5 mg, niacin 0.5 mg, pyridoxine-HCl 0.5 mg, inositol 0.5 mg, Ca-pantothanate 0.5 mg, p-aminobenzate 0.5 mg, biotin 0.25 mg)을 함유한 HV agar medium[6](Humic acid 0.1%, Na_2HPO_4 0.05%, KCl 0.171%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, $CaCO_3$ 0.002%, 0.05%, *Cyclohexamide 0.005%, *Nalidixic acid 0.002%, Agar 1.75%, pH 7.0; *Compounds were added after autoclave), methanol medium[7](K_2HPO_4 0.3%, NH_4NO_3 0.3%, NaCl 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, Methanol 1.0%, Agar 1.5%, pH 7.0)와 AMP(NH_4NO_3 0.3%, K_2HPO_4 0.3%, NaCl 0.1%, $MgSO_4$ 0.02%, pH 7.0)에 토양 희석액 0.1 ml씩 도말하여 28°C에서 4~6일간 배양하였다. 생성된 colony 중 서로 상이하다고 생각되는 수백 종의 방선균 집락을 채취하고 보관용 배지인 GMY 배지(yeast extract 0.4%, malt extract 1.0%, glucose 0.4%, agar 1.75%, pH 7.0)에 1백금이 접종하여 28°C에서 4~6일간 사면배양하였다. 이들 분리균주 중 항암력이 가장 뛰어난 79번 균주를 실험균주로 사용하여 추출용 배지 TS(K_2HPO_4 0.3%, NaCl 0.1%, $MgSO_4$ 0.02%, yeast extract 0.1%, soytone 0.1%, pH 7.0)에 3%되게 접종 후, 28°C rotary shaking incubator에서 3일간 배양하였다.

2.1.2. 생육도 측정

건조균체량은 배양액 10 ml을 취하여 2,500 rpm(Toyo model, RS-206)에서 20분간 원심분리하여 침전된 균체를 0.1N HCl과 증류수로 세척한 뒤 Toyo filter paper로 여과한 후, 37°C에서 24시간 동안 건조시켜 무게를 측정하였다.

2.1.3. Stater의 조제와 미생물 보존

공시균주를 미생물 보존배지인 GYM 배지에 접종하여 포자가 충분히 형성될 때까지 배양하였다. 그 후, 0.1% Tween 80 용액으로 포자를 현탁시킨 후, 이를 전배양균으로 사용하였다. 그리고 미생물의 보존은 배양한 균체를 20% glycerol 용액에 현탁하여 deep freezer(-80 °C)에 넣어 보관하였다.

2.1.4. 분리균주의 동정

분리 방선균의 속을 동정하기 위하여 방선균의 동정 실험법[8] 및 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[9]에 따라 배양학적 특성, 형태학적 특성, 생리적 특성을 조사하였다.

2.2 시료의 조제

항암성 물질의 부분 정제를 위해 TS 배지에서 배양한 배양액 2*l*를 원심분리(12,000rpm, 30min)하여 균체를 완전히 제거하고 2배량의 ethylacetate를 넣어 배양액 중의 항암성 물질을 추출하여 Na_2SO_4로 건조한 다음, 진공·농축하였다. 농축액은 소량의 에탄올로 용해시킨 후, 10배량의 물을 첨가하여 overnight시켰다. Overnight시킨 추출액을 원심분리(12,000rpm, 30min)하여 침전물을 100% dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Co., USA) 용액에 녹인 후, 실험시에는 인산 buffer 용액(PBS)으로 여러 가지 농도로 희석하여 사용하였다.

2.3. 세포주 및 배양액

본 실험에 사용한 세포주는 사람의 구강내 협점막으로부터 분리된 편평세포암종인 KB cell을 사용하였다. 세포의 배양은 10% fetal calf serum(Hyclone Co.)이 함유된 RPMI1640 (Gibco BRL Co.)를 사용하였으며, 이들 배지에는 100units의 penicillin-streptomycin(Gibco BRL Co.)을 첨가하여 37°C, 5% CO_2, 100% relative humidity의 조건하에서 배양하였다.

2.4. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay

시료의 항암활성을 측정하기 위하여 1.0×10^5cell/ml로 세포농도를 맞춘 후, 세포 배양액을 96 well microtiter plate에 넣고 24시간 preincubation하였다. 그 후 RPMI1640 배지나 PBS로 여러 농도로 희석된 시료(DMSO의 배지내 농도: 0.5% 이내)를 well당 100 μl씩 넣고 48시간 동안 배양한 후, MTT 용액(5 mg MTT/ml PBS와 serum free media를 2:3의 비율로 혼합) 75 μl를 각 well에 첨가한 다음, 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후 2,000rpm에서 20분 동안 원심분리한 후, 상등액은 버리고 DMSO를 가하여 생성된 formazan을 용해시키고 540 nm에서 ELISA reader(Bio-Rad Co., Model 550)로 흡광도를 측정하였다. 저해율(%)는 [(대조구의 흡광도-시료의 흡광도)/대조구의 흡광도]×100으로 결정하였다. 이들 분석은 모두 최소 3회 이상을 측정하여 그 평균값을 얻었다.

2.5. 메탄올의 농도에 따른 항암성 물질의 생산 최적조건 검토

항암성 물질 생산능이 우수한 79번 균주를 대상으로 메탄올 농도에 따른 생산 최적조건을 검토하기 위해 methanol medium(K_2HPO_4 0.3%, NH_4NO_3 0.3%, NaCl 0.1%, $MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.02%, Methanol 1.0%, Agar 1.5%, pH 7.0)를 기본 배지로 사용하여 탄소 원인 메탄올의 농도를 각각 1%, 3%, 5% 첨가된 배지에 전배양균을 3% 접종하여 28°C, 120rpm에서 2~5일간 배양하여 활성을 측정하였다.

3. 연구성적

3.1. 메탄올 자화 방선균의 분리

항암물질 생산 방선균의 분리를 위한 분리원으로써 대구지역을 중심으로 한 설악산, 지리산, 한라산, 팔공산, 오대산, 주왕산 주위의 토양시료를 사용하여 다양한 분리용 배지를 사용한 결과, 구강암에 대해 비교적 뛰어난 항암효과를 나타내는 균주를 methanol 배지를 통해 34종, AMP를 통해 40종을 분리하였다(표 1). 그 중에서도 가장 뛰어난 항암효과를 나타내는 메탄올 배지에서 분리한 79번 균주를 공시균주로 사용하여 실험에 임하였다.

표 1. Number of anti-oral cancer activity producing microorganisms isolated from sampling districts.

Sampling districts	Seperation medium	
	Methanol	AMP
Taegu, Shindang Dong	0	4
Kümosan Province Park	2	5
Miryang Shi	1	1
Chuwangsan National Park	3	6
Kyongju National Park	4	3
Kimchon Shi	3	3
Sangju Gun	5	1
Ulchin Gun	5	7
Ponghwa Gun	1	0
Andong Shi	5	3
Hallasan National Park	5	7
Total	34	40

Table 2. Morphological characterization of strain No. 79.

Characteristics	No. 79
Spore chains on ISP 5	Rectiflexible(spiral)
Color of colony on ISP 5	
mycelium	Cream
pigment	Yellow
Colony morphology on ISP 2	
periphery	Localization
surface	Elevated
aerial mycelium	Abundant
spore mass color	Gray
Colony morphology on ISP 5	
periphery	Localization
surface	Wrinkle
aerial mycelium	Abundant
spore mass color	Gray

3.2. 분리균주의 동정

분리 방선균의 속을 동정하기 위하여 배양학적, 형태학적, 생리적 특성을 조사하였다.

3.2.1. 형태학적 특성

형태학적 특성을 알아보기 위하여 다양한 배지를 사용하였다. 먼저, yeast-malt extract agar medium에서 생육한 colony의 중심부는 융기된 형태를 보였고 inorganic salt-starch agar medium에서는 포자의 색은 노란색을 띄었고 중심부는 주름이 있는 융기된 형태를 나타내었다. 그리고 glycerol-asparagine agar medium에서 생육한 균사는 크림색을 띠었으며 노란색의 가용성 색소를 생성하였다(표 2).

주사현미경을 통해 기균사의 형태를 조사한 결과, 기균사의 형태는 잘 발달되어 길며 적절히 분지되어 있는 rectiflexible형을 나타내었다.

3.2.2. 배양학적 특성

생리적 특성을 조사하기 위하여 yeast-malt extract agar medium에 접종하여 생육온도를 조사한 결과, 27°C와 30°C에서는 비교적 포자형성과 생육이 양호하였으나, 10°C와 37°C에서는 생육은 하지 않았으며 포자생성은 나타내지 않았다. 그리고 45°C에서는 포자형성뿐만 아니라 생육도 하지 않았다.

3.2.3. 생리적 특성

생리적 특성을 조사한 결과, 우유 응고력과 젤라틴 액화력은 보였으나 전분 분해력과 셀룰로오스의 분해력은 나타내지 않았고 sodium chloride의 경우 7%까지 내성을 나타내었다(표 3).

탄소원의 이용성은 raffinose의 이용성이 다소 미약하지만, 그 밖에 fructose, glucose, inositol, mannitol, rhamnose, sucrose, xylose 등을 이용하여 생육하였다.

이상의 생리적, 형태학적, 배양학적 특성에 비

표 3. Physiological characteristics of strain No. 79.

Characteristics	No. 79
Liquefaction of gelatin	+
Coagulation of skim milk	±
Hydrolysis of starch	-
Hydrolysis of cellulose	-
Tolerance of NaCl	7%

추어 볼 때 *Amycolatopsis* sp.[10]로 추정되었으나, 종의 동정을 위해서는 좀더 계속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

3.3. 메탄올의 농도에 따른 항암성 물질의 생산

본 공시균주의 methanol 배지에서의 항암성 물질을 생산하는 점에서 메탄올의 농도에 따른 영향을 검토하였다. 메탄올의 최종 농도를 0.5%에서 5%까지의 농도로 조절하고 6일간 배양하여 일수별로 sampling하여 실험에 임하였다. 그 결과 항암성 물질의 생산은 메탄올의 농도에 크게 영향을 받지 않고 질소원에 영향을 받는 것이 아닌가 추정되었다. 또한 특징적인 것은 배양 5일째부터는 항암성 물질의 생산이 둔화되고 있다는 것이다.

4. 총괄 및 고안

국립 암센터의 연구에 따르면 1973년부터 1997년 사이에 두부암과 후부암의 발생빈도는 안정적인 것으로 조사되었으나 설암의 경우는 증가되는 것으로 분석되었다. 실제로 인체에 발생되는 암의 약 5%를 차지하는 두경부의 암은 암 치료법의 발전에도 불구하고 5년 생존율이 50%이하로 알려져 있다.

1986년 세계 최초로 구강점막의 전암병소인 백반증을 대상으로 암예방 임상실험이 보고되어 관심을 끌었고 이를 시작으로 현재는 간암, 유방암, 대장암 등에도 암예방실험이 진행되고 있다. 그러나 실제로 구강점막의 암 발생의 예방을 주도적으로 수행하는 연구는 아주 미비한 실정이다.

암화학 예방요법으로 구강암에 대한 연구는 Kelloff 등[11]이 retinoid, beta carotene, vitamin E 및 DHEA 등이 암세포의 증식을 억제하거나 발암억제효과를 얻었다는 연구결과를 보고하였다. 그 중에서도 레티노이드는 종류도 다양하고 (약 200종) 뛰어난 암예방효과를 나타낸다고 보고되고 있으나[12] 독성이 심하다는 것이 단점이며 레티노이드 치료법을 끝낸 후, 3~4개월 내에 50%의 재발률이 있다고 보고되고 있다[13]. 또한 국내에서는 아직 임상실험 단계까지 진행된 것은 없으나 동물실험을 이용하여 홍삼과 토코페롤[14], 비타민 A와 C[15] 등의 구강암 예방효과가 연구된 바 있다.

본 연구에서는 유전자 조작이 간단하고 대량생산이 쉬워 활용도가 매우 높은 미생물을 대상으로 실험에 임하였다. 미생물을 이용한 산업의 이용은 제 2 차 세계대전을 기점으로 많은 발전을 해 왔다. 1942년 Waksman이 항생물질인 streptomycin을 기점으로 항생물질의 진보와 함께 항바이러스, 효소저해 등 각종 생리활성(biological activity)을 나타내는 많은 물질이 연구되었다. 1960년대 이후 자연계로부터 새로운 물질을 개발하려는 연구가 체계적이고 광범위하게 이루어져 많은 신물질들이 발견되어 항세균제, 항암제, 항바이러스제, 항파아지제 등의 화학요법제로서의 가치를 가지는 다양한 항생물질에 대한 연구 및 효소저해제, 살충제, 식물성장 조절물질 등의 비임상적 목적으로 사용하는 항생물질에 대한 연구 그리고 항염증작용, 혈중지방 저하작용, 경련치료제 등의 비화학요

법적인 항생물질을 찾아내려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

그래서 본인은 미생물이 생산하는 새로운 항암화학요법제 중 구강암에 특이적으로 작용하는 미생물을 대량적으로 검색하여 그 중 매우 뛰어난 항암효과를 나타내는 균주를 선별하였다.

그러나 본 항암제의 면밀한 항암활성 메카니즘이 진행되어야 할 것이며 이를 실제 임상에 사용하기 위한 임상연구가 필요한 것으로 사료된다.

아울러 최근에 진행되고 있는 항암제와 면역증강제와의 병용투여에 의한 발암동물의 면역기능저하를 향상시키는 연구들도 병행되어야 할 것이다. 또한 항암제의 부작용을 경감시키기거나 항암활성 증강효과를 야기시키는 다른 약제와의 병용요법도 고안되어야 할 것으로 생각된다.

5. 결 론

다양한 생리활성 물질을 생산하는 희귀 방선균을 새로운 배지를 사용하여 분리하고 구강암 세포에 적용하여 항암활성 정도를 검사하였다. 본 연구에서는 특정 세포주에 대한 새로운 약제의 선별검사와 병용 화학요법에 대한 증강효과의 검사 등에 사용되는 MTT assay를 사용하여 KB 세포주에 대한 항암효과를 관찰하였다.

1. 새로운 분리용 배지인 HV agar 배지, methanol 배지와 AMP 배지를 통해 희귀 방선균을 분리하였다.
2. 토양에서 분리한 79번 균주는 배양학적, 형태학적, 생리적 특성 및 현미경 검경을 통해 *Amycolatopsis* sp.로 추정되었다.
3. 항암성 물질의 생산에는 메탄올의 농도에 따른 영향은 거의 없었다.
4. 사람의 구강내 협점막으로부터 분리된 편평세포암종인 KB-cell에 대해 대조군으로 사용한 5-fluorouracil에 비해 약 1,000배 이상의 항암효과를 나타내었다.

참고문헌

1. 이상철, 김여갑. 구강악안면종양학. 지성출판사, 서울, 1993.
2. Meyers, E.N. and Suen, J.Y. Cancer of the head and neck. 2nd ed., New York, Churchill Livingstone, 1989.
3. 이종한, 김명진. 구강편평세포암 세포주에서의 cisplatin과 5-fluorouracil 항암감수성의 측정. 대한구강악안면외과학회지 1998 : 24 : 165-171
4. Peterson L.J., Indresano, A.T., Marciani, R.D., Marciani, R.D. and Roser, S.M. Principles of oral and maxillofacial surgery. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1992
5. Boone, C.W., Kelloff, G.J. and Malone, W.E., Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials : a review. Cancer Res. 1990 : 50 : 2-9
6. Hayakawa, M. and Nonomura, H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil Actinomycetes. J. Fermet. technol. 1987 : 65 : 501-509.
7. Kim, H.S. Isolation and production of antifungal compound from methy-

lotrophic actinomycetes strain M-17. N. Inst. Nat. Sci. 1997 : 17 : 75-84

8. Hamada, M., and Manable, M.. Experimental methods of identification of Actinomycetes. The society for Actinomycetes Japan, Tokyo(in Japanese). 1988 : 35-57
9. Williams, S. T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. Bergey's manual of systematic Bacteriology, Vol. 4. Williams and Wilkins Co., Baltimore
10. De Boer, L., Dijkhuizen, L., Grobben, G., Goodfellow, M., Stackebrandt, E., Parlett, J.H., Whitechead, D. and Witt. D. Amycolatopsis methanolica sp. nov., a facultatively mehtylotrophic actinomycete. Int. J. Syst. Bacteriol. 1990 : 40 : 194-204
11. Kelloff, G.J., Boone, C.W., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.A., Doody, L.A., Malone, W.F., Hawk, E.T. and Sigman, C.C. New agents for cancer chemoprevention, J. Cell Biochem. Suppl. 1996 : 26 : 1-28
12. Lippman, S.M. and Hong, W.K. Retinoid chemoprevention of upper aerodigestive tract carcinogenesis. In : Important Advances in Oncology(De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds.), Philadelphia, JB Lippincott, 1992 : 93-109
13. Hong, W.K., Endicott, J. and Itri L.M. et al. 13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukeplakia. N. Engl. Med. 1986 : 315 : 1501-1505
14. 정세용, 이의웅. DMBA유도 햄스터 협낭암에서 홍삼 및 Tocopherol의 항암효과에 대한 면역조직학적 연구. 대한구강악안면외과학회지 1992 : 18 : 29-38
15. 김일규. 비타민 C 및 비타민 A가 햄스터 협점막의 9,10-dimethyl-1,2- benzanthracene(DMBA) 유도 구강암에 미치는 영향에 관한 실험적연구. 대한구강악안면외과학회지 1986 : 12 : 93-117

Abstract

Isolation and Identification of Methylotrophic Actinomycetes capable of Producing Anti-oral Cancer Activity

Jung Kim, Sun-Sook Kim

Dept. of Dental Hygiene, Suwon Women's College

Key words : Identification, methylotrophic actinomycetes, oral cancer

An appropriate amount of samples, collected from three each paddy forest, field and riverside soil near Taegu city, was suspended in sterile water and then diluted in order to isolation of antagonistic to oral cancer. The diluted samples were inoculated on separating medium in the routing spreading method. So, seven hundred and eighteen strains were isolated on HV agar and 220 strains were on methanol medium from soil samples. So, during the screening of anti-oral cancer activity from soil, we isolated microorganisms showing powerful antagonistic activity. Among them, No. 78 strain exhibited the most strongly anti-oral cancer activity.

Microbiological properties were investigated by the methods described in the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology and experimental methods of identification of actinomycetes by Hamada et al. As a result, a methylotrophic actinomycetes strain No. 79 was estimated as *Amycolatopsis* sp. based on taxonomic studies.