

Amylocolatosis sp.가 생산하는 항암물질의 정제 및 구강암 모델에 미치는 항암 효과

김 정[†] · 박영민¹ · 임도선²

수원여자대학 치위생과

¹여주대학 치위생과

²서울보건대학 치위생과

Purification of Materials Produced by *Amylocolatosis* sp. and Anticancer Effect in Oral Cancer Model

Jung Kim[†], Young-Min Park¹ and Do-Seon Lim²

Department of Dental Hygiene, Suwon Women's College, Suwon City, Kyunggi-do 441-748, Korea

¹Department of Dental Hygiene, Yeojoo Institute of Technology(YIT) Kyo-ri 454-5, Yeojoo-up, Yeojoo-gun, Kyunggi-do 880-705, Korea

²Department of Dental Hygiene, Seoul Health College, Sungnam City, Kyunggi-do 461-713, Korea

ABSTRACT A methylotrophic Actinomycetes strain, which produce the anti-oral cancer activity compound, was isolated from soil and estimated as *Amylocolatosis* sp. based on taxonomic studies. A methanol didn't have influence on the production of the anticancer compounds. These compound were isolated by ethylacetate extract, silica gel column chromatography, sephadex LH-20 column and reverse phase HPLC. The compounds were very stable under heat (121°C), acid(pH 2.0) and alkali(pH 11.0) treatment. The cytotoxic effect of isolated anticancer compounds on various cancer cell lines such as A549, SNU-1, KB, L1210, and Sarcoma 180 was investigated by MTT assay method. And these produced compounds also showed the broad antimicrobial spectrum to test strains such as bacteria and yeast.

Key words *Amylocolatosis* sp., Oral cancer, Purification

서 론

암의 치료에 유효한 항생물질의 연구는 오늘날까지도 중요한 사회적 요청의 하나로 되어 있다. 이와 같은 항암제의 연구는 1950년대부터 시작된 항암활성물질의 체계적인 탐색으로 인하여 세계적으로 600여종 이상의 항암활성물질이 발견되었으며, 이를 이용한 암의 화학요법은 암의 치료 뿐만 아니라, 암세포의 생물학적 연구에도 많은 기여를 하였다. 그러나, 1990년 후반인 현재까지도 암은 여전히 사망원인 1위를 기록하고 있으며 최근 5년간 암환자의 생존율 또한 백인의 경우 52%, 흑인인 경우 38%에 불과하다. 특히 가장 흔한 5가지 암종인 폐암, 결장직장암, 유방암, 전립선암, 췌장암의 치료율은 매우 낮아 거의 난치병이라 할 수 있을 정도이다.

암의 병인은 암의 종류와 발생부위에 따라서 각각 복잡하게 다르지만, 그 병인론을 크게 두가지로 대별하여 설명하고 있다.

첫째는 정상조직에서 과각화, 증식 그리고 이형성이 점진적으로 증가하여 상피내암, 침윤성 악성종양으로 진행되는 단단계 발암과정이고¹⁾, 둘째는 담배나 술 등의 발암물질에 노출된 부위에 유전적인 손상이 일어나고 이러한 변화가 지속적이고 광범위하게 축적되어 정상조직에서 암조직으로 전환된다²⁾는 것이다.

이중 구강암은 인체에 발생하는 암의 약 3-5%를 차지하며, 그 중 90% 이상이 편평세포암종이다³⁾. 현재 위암이나 간암 등 다른 암종과 비교해 보았을 때 많은 비율을 차지하고 있지 않으나 전암병소인 백반증이나 홍반증이 동반되는 즉, 다른 장기와는 달리 진행과정을 관찰하기 용이하므로 전형적인 단단계의 발암모델로 연구되고 있다.

오늘날 사용되고 있는 항암제는 숙주에 대해서도, 암세포에 대해서도 선택독성이 좁은 화합물이 많고, 부작용이 강한 것이 중요한 결함이다. 그러나 방사선이라든지 외과수술 등의 치료법의 진보와 더불어서, 항암제의 연구는 오늘날 매우 활발하며 보다 부작용이 적은 물질의 검색이 전세계적인 규모로 진행되고 있다. 특히 actinomycin D, daunorubicin, doxorubicin 및 bleomycin 등의 항암물질은 토양에서 분리된 방선균으로부터

[†]Corresponding author
Tel: 031-290-8119
Fax: 031-290-8143
E-mail: kimjung@suwon-c.ac.kr

생산된다고 보고되어지고 있다⁴⁾. 따라서 미생물 자원이 풍부한 국내 토양을 중심으로 분리한 방선균을 대상으로 항암물질을 탐색하는 것은 새로운 항암물질을 개발하기 위하여 필요한 과정이라 하겠다.

본 연구와 관련된 **methanol**을 자화(methylotrophs)하는 생리적 특성을 가진 미생물은 세균 및 효모에서 분리되어 왔으며 이들로부터 SCP(single-cell protein)생산, L-serine, cytochrome C 생산 등의 연구가 이루어져 왔고 많은 연구자에 의해 methanol 자화 기구의 연구가 수행되었다. 그러나 분리된 methanol 자화 방선균의 종류 및 기능에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서 기존의 방선균 분리용 배지를 사용하지 않고 신기능성 물질의 탐색을 위하여 희귀방선균의 분리용 배지인 methanol이 함유된 M 배지와 AMP 배지를 사용하여 방선균을 분리하고 항암시험을 실시하였다.

본 연구에서는 토양으로부터 새로운 항암제의 분리 및 현재 이용되고 있는 항암제의 가장 큰 단점인 side effect가 적은 항암제의 탐색을 목적으로 하였다. 따라서 방선균 중 특히, 특수한 생리적 특성을 가지고 있는 희귀 토양 방선균을 대상으로 하여 새로운 구강암 세포주를 포함한 여러 암세포주에 대한 항암물질의 분리 및 정제에 관한 연구를 수행하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 항암물질 생산균주의 분리 및 배양

항암물질 생산 방선균의 분리를 위한 분리원으로써 설악산, 지리산, 한라산, 팔공산, 오대산, 주왕산 주위의 토양시료를 사용하였다. 각종 토양시료 1g을 멸균수 10 ml에 현탁시켜 10⁴, 10⁵, 10⁶ 되게 희석한 후, HV agar 배지⁵⁾와 methanol 배지⁶⁾에 0.1 ml 씩 도말하여 28°C에서 5~7일간 배양하여 구강암에 대해 가장 뛰어난 항암효과를 나타내는 생성된 colony는 AMP 배지에 순수분리하였으며, 활성 유지를 위해 2주마다 계대배양 No. 221와 No. 301을 분리하였다. 항암물질 생산은 전배양배지인 GMY(yeast extract 0.4%, malt extract 1.0%, glucose 0.4%, pH7.0) 25 ml(100 ml Erlenmeyer flask 사용)에 분리한 slant 배지의 균을 2백금이 접종하여 18~48시간 배양한 후, 추출용배지 TS[potassium phosphate, dibasic 0.3%, sodium chloride 0.1%, magnesium sulfate 0.02%, yeast extract 0.1%, soytone 0.1%, pH7.0]에 3% 되게 접종 후 28°C rotary shaking incubator에서 3일간 배양하였다.

2. 항암물질 탐색을 위한 세포배양

항암물질 탐색에는 A549(lung carcinoma, human), SNU-1(stomach, adenocarcinoma, human), KB(mouth, carcinoma, human), L1210(lymphocyte, leukemia, mouse), Sarcoma 180(sarcoma, mouse) 등의 세포주를 이용하였다. 세포의 배양은 RPMI1640(GibcoBRL Co.)에 10% fetal calf serum(Hyclone Co.)을 첨가한 배지에 100 units의 penicillin-streptomycin(Gibco BRL Co.)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂, 100% relative humidity의 조건하에서 배양하였다. 각 세포주에 따라 2~6일마다 계대배양하였고, monolayer 형성 세포주는 0.05% trypsin-EDTA 용액으로 cell dissociation하였다.

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

시료의 항암활성을 측정하기 위하여 1.0×10⁵ cell/ml로 세포 농도를 맞춘 후, 세포 배양액을 96 well microtiter plate에 넣고 24시간 preincubation 하였다. 그 후 RPMI 1640 배지나 PBS로 여러 농도로 희석된 시료(DMSO의 배지내 농도: 0.5% 이내)를 well 당 100 μl 씩 넣고 48시간동안 배양한 후, MTT 용액(5 mg MTT/ml PBS와 serum free media를 2:3의 비율로 혼합) 75 μl를 각 well에 첨가한 다음, 4시간동안 반응시켰다. 반응 후 2000 rpm에서 20분동안 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.

4. 항암물질의 분리 및 정제

항암물질의 분리 정제는 Fig. 1에서 보인 바와 같이, TS 배지에서 3일간 배양한 배양액 2 liter를 원심분리(12,000 rpm, 30분)에 의해 균체를 완전히 제거하고 동량의 ethylacetate를 처리하여 배양액중의 항암성분을 추출하였다. 추출액은 무수 magnesium sulfate로 건조 후 농축하였다. 농축액은 소량의 ethanol로 용해시킨 후 10배량의 water을 첨가하여 4°C에서 overnight 시켰다. Overnight 시킨 추출액을 원심분리(12,000 rpm, 30분)하여 침전물을 methylene chloride로 용해시켜 silica gel 60 column(φ35×600 mm, Merck Co.)에 흡착시킨 후, methylene chloride-ethanol(96:4) 용매로 용출시켜 농축하였다. 농축된 활성획분은 sephadex LH-20 column(φ15×300 mm, Pharmacia LKB)에서 100% methanol로 용출시켜 그 중 활성획분만을 농축하여 HPLC(Waters, ODS column)로서 최종적으로 정제하였으며, 항암성 물질의 확인은 MTT assay로 확인하였다.

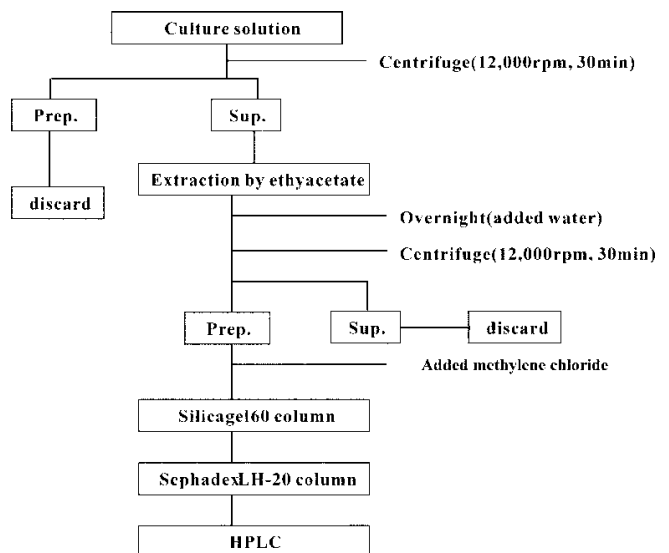


Fig. 1. Procedure for purification method of anti-oral cancer activity materials by *Amylocolatosis* sp..

5. 항암성 물질의 항균 효과

항균스펙트럼의 시험은 agar diffusion 법을 사용하였다. 즉, 시험균이 함유된 평판배지위에 paper disc(φ6 mm, Advantec Co.)를 얹고 정제물질을 20 μl를 첨가한 후, 효모와 곰팡이는 28°C, 세균은 37°C에서 1-2일간 배양하여 생성된 clear zone의 유무 및 크기로서 판단하였다.

6. 항암성 물질의 안정성 조사

항암성 물질의 안정성을 조사하기 위하여 정제된 compound를 대상으로 산(pH 3.0, 1N HCl로 조정) 및 알칼리(pH 11.0, 1N NaOH로 조정)처리 하에서 24시간 방치 후 중성으로 조정하여 항암활성능을 검토하였으며, 열처리(121°C, 1기압)에서 30분간 가열처리한 다음, 항암활성능을 조사하였다. 처리시료의 항암활성능은 A549(lung carcinoma, human), SNU-1(stomach, adenocarcinoma, human), KB(mouth, carcinoma, human), L1210(lymphocyte, leukemia, mouse), Sarcoma 180(sarcoma, mouse) 세포주를 대상으로 하여 MTT assay 법, HPLC를 사용하여 확인하였다.

결 과

1. 항암물질 생산균주의 분리 및 배양

방선균은 다양한 2차 대사산물을 생산하므로 산업적으로 이용성이 높은 미생물이다. 따라서 본 연구를 수행하기 위해, 특수한 생리적 기능을 가지는 희귀 방선균을 분리 대상으로 하였다. 각종 토양시료로부터 M 배지와 AMP 배지에서 생육하는 500여종의 방선균을 분리하였으며 그 중 전배양배지(GMY 배지)에서 항암활성능을 소유한 2균주(No. 211, 301)를 3~7일간 배양한 결과, 배양 3일째가 항암활성능이 가장 우수하였으며, 그 중 No. 211은 L1210, SNU-1, Sarcoma 180에 대해 항암활성능을 보인 반면, No. 301 균주는 L1210, A549, SNU-1, KB, Sarcoma 180에 대해 항암활성능을 보여 No. 301 균주를 항암물질 생산균으로 선별하여 본 실험에 사용하였다.

분리균주를 배양학적, 형태학적, 생리적 특징 및 현미경적 동정을 통해 *Amycolaptosis* sp.로 추정되었다^{6,9)}.

2. 항암물질의 분리 및 정제

항암물질의 분리 정제는 TS 배지에서 3일간 배양한 배양액 2 liter를 원심분리(12,000 rpm, 30분)에 의해 균체를 완전히 제거하고 동량의 ethylacetate를 처리하여 배양액중의 항암성분을 추출하였다. 추출액은 무수 magnesium sulfate로 건조 후 농축하였다. 농축액은 소량의 ethanol로 용해시킨 후 10배량의 water을 첨가하여 4°C에서 overnight 시켰다. Overnight 시킨 추출액을 원심분리(12,000 rpm, 30분)하여 침전물을 methylene chloride로 용해시켜 silica gel 60 column(φ35×600 mm, Merck Co.)에 흡착시킨 후 methylene chloride-ethanol(96:4) 용매로 용출시켜 농축하였다. 농축된 활성획분을 sephadex LH-20 column(φ15×300 mm, Pharmacia LKB)에서 100% methanol로 용출하여 HPLC(Waters, ODS)를 이용하여 최종적으로 정제하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 1개의 peak를 나타내어 완전 정제되었음을 나타내었다.

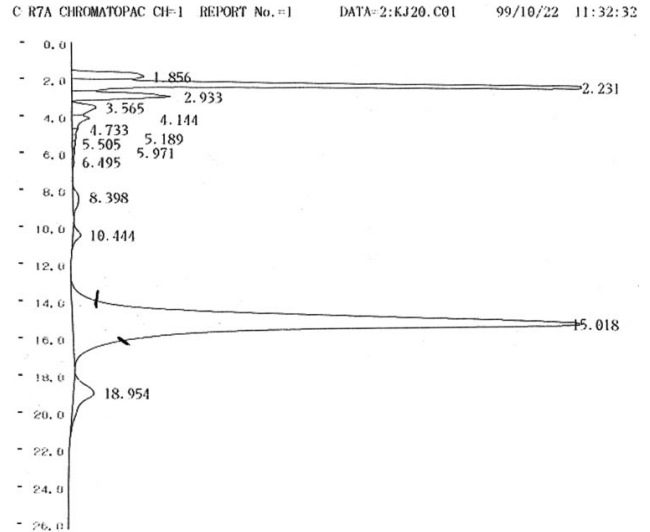


Fig. 2. HPLC elution pattern of the anticancer compounds.

3. 항암활성능 측정

정제된 화합물을 A549, SNU-1, KB, L1210, Sarcoma 180 세포주를 대상으로 하여 MTT assay법 항암활성능을 조사하였다. 그 결과 Table 1에서 보인 바와 같이 완전 정제된 compound는 모든 암세포에 대해 세포독성을 나타내었다.

그 중 구강유상피암세포에 대한 실험결과를 살펴보면 모든 암세포에서와 마찬가지로 시료의 농도가 높아질수록 세포독성이 증가되었고, 특히 20 μg/ml에서는 거의 모든 암세포를 소멸시키는 것으로 관찰되었다.

Table 1. Cytotoxicity of antitumor compounds against various cells by MTT assay method

Conc. (μg/ml)	Sarcoma 180	L 1210	KB	SNU-1	A549
Control	0	0	0	0	0
0.1	-	-	77	-	-
0.5	11	9	18	6	-
1	22	15	23	14	10
5	46	39	41	33	29
10	79	66	62	58	43
15	97	87	92	82	78
20	98	99	99	95	92

4. 항암물질의 안정성

산처리(pH 2.0), 알칼리 처리(pH 11.0), 열처리(121°C, 1기압, 30 min) 한 다음, 잔존활성을 통해 안정성을 실험하였다. 그 결과 산, 알칼리 및 열에 대해서도 매우 안정하여 단백질성의 물질은 아님을 추정할 수 있었다.

5. 메탄올의 농도에 따른 항암 물질의 생산

메탄올 자화 방선균의 메탄올 산화기구는 Gram(+) 세균에 비해 복잡하다는 점에서 *Amycolaptosis methanolica*를 중심으로 MDH와 ALDH를 대상으로 연구되어 왔다. 본 연구에서는 실험결과 뚜렷한 활성도에 차이가 없으므로 이에 대한 자세한 내용의 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 탄소원인

메탄올의 농도에 따른 영향을 검토한 결과 항암 물질의 생산은 메탄올의 농도에 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

고 찰

구강암은 두경부에서 가장 흔히 발생하는 암으로서 성공적인 치료가 매우 어려운 질환으로 field cancerization과 multistep process가 잘 설명되는 부위로서^{10,11)} 백반증¹²⁾, 상피이형성¹³⁾ 등의 전암병소 발견이 용이하여 전암병소에서 암으로의 진행을 미리 발견하여 예방할 수 있다는 이유 때문에 전암병소의 발견의 중요성이 강조되어 왔다.

이러한 구강암의 치료방법중 전신적요법으로서의 화학요법은 원발병소부의 치료 후 재발된 환자에서 선택적으로 사용되어 왔다. 1960년대에 이르러 bleomycin과 5-fluorouracil를 이용한 항암화학요법이 시행되었고, 1980년대부터 cisplatin 등의 약제가 구강암을 포함한 두경부 암종에 효과적으로 작용한다는 보고가 알려지면서 구강암에 대한 항암화학요법은 그 역할이 증가되는 추세이다. 항암화학요법은 일반적으로 DNA와 직접 작용하여 DNA의 복제, 전사, 번역과정을 차단하거나 핵산전구체의 합성을 방해하여 활성을 저해시키거나 또는 세포분열을 저해함으로써 암세포에 대한 세포독성을 나타낸다. 그러나 이러한 항암화학요법제의 많은 개선과 발전에도 불구하고 효능과 함께 나타날 수 있는 골수기능저하, 소화기계합병증, 신독성 및 면역력 저하 등의 부작용이 아직 해결해야 할 과제로 남아 있다. 또한 두경부 영역에서의 항암요법은 환자의 생존율 향상에 대한 결과는 아직까지 명확하지 않은 실정이며 외과적인 처치 전후의 수술범위의 감소 및 그 결과로서 수술 후 기능장애를 최소화하여 환자의 삶의 질을 향상시키는데 목적을 두고 있는 실정이다.

한편 항암활성요법으로서 MTT 검사법을 택한 이유는 단시간내에 비교적 객관적으로 데이터를 얻을 수 있고, 최근에 알려진 병용요법효과에 따른 증강효과에 대해서도 다음 실험을 모색할 수 있으므로 적용하였다. 이제 항암효과의 추가적으로 병용요법에 따른 증강효과에 대한 검사, 항암활성의 자세한 메카니즘에 대한 면밀한 실험연구, 나아가 추출물에 대한 정상세포에 대한 독성정도를 검색하고 물질의 구조분석 등 실제 임상에 사용하기 위한 임상연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

각종 토양시료로부터 M배지와 AMP 배지에서 생육하는 500여종의 방선균을 분리하였으며, 그 중 전배양배지(GMY 배지)에서 가장 뛰어난 항암활성능을 소유한 균주를 분리하고 배양하여 세포의 항암성물질을 분리하여 이 물질을 완전정제하고 MTT 정량분석을 실시하여 암세포에 대한 세포독성검사를 실시하였다.

1. 정제는 배양한 균체를 완전히 제거하고 동량의 ethy-

lacetate를 처리하여 배양액중의 항암성분을 추출하고 무수 magnesium sulfate로 건조 후 농축, ethanol로 용해, 10배량의 water을 첨가하여 4°C에서 overnight 시킨 후 추출액을 원심분리(12,000 rpm, 30분)하여 methylene chloride로 용해시켜 silica gel 60 column(φ35×600 mm, Merck Co.), methylene chloride-ethanol(96:4) 용매로 용출하고 sephadex LH-20 column(φ15×300 mm, Pharmacia LKB)에서 100% methanol로 용출하여 HPLC (Waters, ODS)를 이용하여 최종적으로 완전 정제하였다.

- Compound는 Gram(+) 세균(6균주), Gram(-) 세균(11균주), 효모(2균주), 곰팡이(1균주)에 대하여 항균 효과를 나타내었다.
- 완전 정제된 물질에 대한 항암효과를 측정된 결과, 모든 실험 암세포에 대해서 뛰어난 항암효과를 나타내었으며 protein성 물질은 아닌 것으로 추정되었다.

참고문헌

- Faber E: The multistep nature of cancer development. *Cancer Res* 44: 4217-4225, 1984.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. Clinical implication of multicentric origin. *Cancer* 6: 963-968, 1953.
- Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada NF: Oral leukoplakia and malignant transformation, *Cancer* 53: 563-568, 1984.
- Masayuki H, Nomomura H: A new method for intensive isolation of Actinomycetes from soil. *Actinomycetol* 3: 95-104, 1989.
- Hayakawa M, Nonomura H: Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil Actinomycetes. *J Ferment Technol* 65: 501-509, 1987.
- Kim HS: Isolation and production of antifungal compound from methylotrophic actinomycetes strain M-17. *N Inst Nat Sci* 17: 75-84, 1977.
- Miyazak SS, Toki I, Izumi Y, Yamada H: Purification and characterization of methanol dehydrogenase of a serine producing methylotroph, *Hyphomicrobium methylvorum*. *J Ferment Technol* 65: 371-377, 1987.
- Yoon BD, Ueno M, Tami Y: Improvement of cytochrome c production by Glycin and Glycine Analog resistant mutants of *Methyllumonas* sp. *J Ferment Technol* 52: 917-920, 1987.
- Kato N, Tsuji K, Tani Y, Ogata K: A Methanol-utilizing Actinomycetes. *J Ferment Technol* 52: 917-920, 1974.
- Shibuya H, Amagasa T, Seto K, Ishibashi K, Horiuchi J, Suzuki S: Leukoplakia-associated multiple carcinomas in patients with tongue carcinoma. *Cancer* 57: 843, 1986.
- Robinson E, Neugut AI, Murray T, Rennert G: A comparison of the clinical characterization of first and second primary head and neck cancers. A population based study. *Cancer* 68: 189, 1991.
- Pinborg JJ, Renstrup G, Jolst O, Roed-Petersen B: Studies in oral leukoplakia: a preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patient, *J Am Dent Assoc* 76: 767-771, 1968.
- Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F: Oral leukoplakia and malignant transformation. *Cancer* 53: 563-568, 1984.

(Received May 21, 2003; Accepted June 16, 2003)

