

Rhanella aquatilis 유래 당단백질과 항암제 혼합물에 의한 인체 대장암 HT29세포에 대한 항암상승효과

박혜지, 김광현*
동의대학교 자연대 생명응용학과

Received : May 9, 2013 / Revised : June 3, 2013 / Accepted : June 4, 2013

Synergistic Anticancer Activity of a Mixture of Anticancer Agent with Proteoglycan from *Rhanella aquatilis* against Human Colon Cancer Cell HT29. Park, Hae-Ji and Kwang-Hyeon Kim. Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

In order to investigate the anticancer activity of an anti-yeast substance (AYS), a proteoglycan produced by *Rhanella aquatilis* AY2000, the cytotoxicity of the AYS against cancer cells was determined *in vitro*. The AYS was not cytotoxic to the human Jurkat T cell or the mouse sarcoma 180 cell, but was cytotoxic to the human colon cancer TH20 cell. The AYS was increasingly cytotoxic against human colon cancer cells in a dose-dependent manner at range from 62.5 to 500 µg/ml. Anticancer activity by combination of the AYS and an anticancer agent was also determined. The anticancer agent combined with the AYS was shown to possess greater synergistic anticancer activity against human colon cancer cells, as compared with the anticancer agent alone.

Keywords: *Rhanella aquatilis*, proteoglycan, human colon cancer, synergistic anticancer activity

오늘날 다양한 항암제의 개발이 이루어져 왔으나, 대부분의 항암제는 독성이 강하여, 이에 따른 부작용으로 피로, 통증, 메스꺼움, 구토, 골수기능장애, 혈구감소, 머리털 감소와 신경독소 등 환자에 따라 다양하게 보고되고 있다[9, 11, 14]. 또한 장기적으로 사용되는 단일 항암제는 다재내성세포를 출현[1, 16]시킬 가능성 때문에 작용이 다른 2종 이상의 약제를 사용한 복합처방을 행하는 경우도 있다[7, 8]. 그러나 복합처방 역시 세포독성이 강한 항암제로 구성된 경우 그에 따른 부작용을 감수할 수밖에 없는 실정이다. 다행히 최근에는 항암제에 의한 부작용을 최소화하고 항암효과를 증진시키는 물질을 혼합하는 항암보조제[2, 6, 10, 17]의 효과가 인정되어 임상에 적용되고 있다.

항진균제들 중에는 항암활성을 가지는 물질들이 다수 알려져 있으며[3, 13, 19], *Rhanella aquatilis* AY2000이 생산하는 당단백질성 물질인 anti-yeast substance (AYS)도

*Candida albicans*에 항진균 작용을 가진다[15]. 따라서 AYS의 암세포에 대한 세포독성 유무와 AYS를 항암보조제로 활용할 가능성을 타진코자 기존 시판 항암제와 AYS를 혼용하여 이 혼합약제가 암 세포에 대해 항암효과를 증진시킬 수 있는지를 조사하였다. 먼저 AYS의 암세포에 대한 세포독성은 인체의 Jurkat T세포, 마우스의 sarcoma 180세포 및 인체 대장암 HT20세포를 대상으로 하였다. 이들 암세포는 10% FBS가 함유된 RPMI1640배지를 96-well microplate에 1×10^5 cells/ml가 되도록 넣고, CO₂ incubator (37°C)에서 24시간 동안 배양시켰다. 배양된 각각의 암세포에서 상층액을 제거시킨 후 일정한 농도로 희석된 각 항암물질 (AYS나 시판 항암약제)을 첨가하여 CO₂ incubator (37°C)에서 일정한 기간(1~3일) 동안 배양시킨 후 생육된 세포의 수는 MTT 법[5]으로 측정하였다. 또한 항암활성은 항암제가 함유되지 않은 대조군의 암세포 생육과 비교하였으며 암세포의 생육 억제율(%)은 Cell growth inhibition (%) = 100 - (Sample A₅₅₀ / Control A₅₅₀) × 100로 나타내었다. 그 결과 인체 Jurkat T 세포와 마우스의 sarcoma 세포는 각각 AYS (500 µg/ml) 처리에서 20% 이하의 세포생육억제로 거의 항암작용이 나타

*Corresponding author

Tel: +82-51-890-1533, Fax: +82-51-890-1532
E-mail: kimkh@deu.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

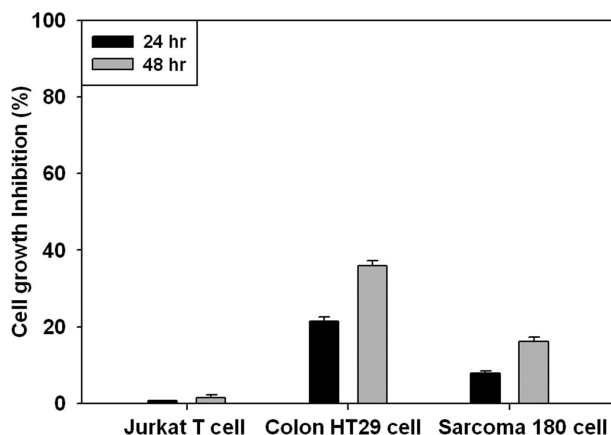


Fig. 1. Cytotoxicity of AYS against cancer cells. Cytotoxicity of AYS against cancer cell was determined by MTT method. Cancer cell (1.0×10^5 cells/ml) was incubated in a 96-well microplate. AYS (250 $\mu\text{g/ml}$) was used to determine cytotoxicity against human colon HT29 cell. For cytotoxicity against human Jurkat T cell and mouse sarcoma 180 cell, AYS (500 $\mu\text{g/ml}$) was applied respectively. Each results represent the mean \pm standard deviations.

나지 않았으나, 인체 대장암 HT29세포는 AYS (250 $\mu\text{g/ml}$) 처리에서 24시간 후에는 22.2%, 48시간 후에는 약 38%의 세포생육이 억제되었다(Fig. 1). 따라서 AYS가 인체 대장암 세포에 생육억제 작용을 나타내었으므로 AYS의 농도를 증가시키고, 대장암 세포의 배양 시간을 더 늘려서 AYS농도에 의존적으로 대장암 세포의 생육을 억제시키는지 검토하였다. 그 결과 62.5-500 $\mu\text{g/ml}$ 의 AYS로 처리된 대장암 세포들은 배양시간(48과 72 hr)에 따라 농도 의존적으로 그 생육을 억제시켰다(Fig. 2). 또한 AYS와 기존 항암제의 혼합처리에 따른 대장암 세포에 대한 병용효과를 측정하기 위해 Canfield

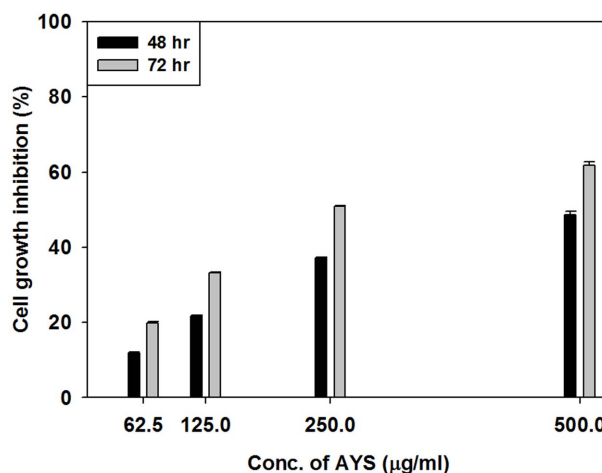


Fig. 2. Growth inhibition of human colon HT29 cell by AYS. Human colon HT29 cell (2×10^5 cells/ml) was incubated with different concentrations of AYS in a 96-well microplate for 3 days. Growth inhibition of the HT29 cells were determined by MTT method. Each results represent the mean \pm standard deviations.

등이 기술한 방법[4]으로 행하였다. 즉, AYS와 기존 항암제가 함유된 96-well microplate에 인체 대장암 HT29 세포 (1×10^5 cells/ml)를 접종한 후 CO_2 incubator (5% CO_2 , 37°C)에서 3일간 배양시킨 후 MTT 법으로 세포 수를 측정하고, AYS와 기존 항암제에 대한 fractional inhibitory concentrations (FIC)과 ΣFIC (sum FIC; fractional inhibitory concentrations)를 산출하여 이들 2종의 약제에 대한 상호작용을 검토하였다. 이때 사용된 약제의 농도는 AYS는 500 $\mu\text{g/ml}$, etoposide는 50 $\mu\text{g/ml}$, 그 외 paclitaxel, 5-fluorouracil 과 doxorubicin은 각각 20 $\mu\text{g/ml}$ 이 사용되었다. 그 결과 AYS와 기존 항암제의 혼합물들이 각각의 기존 항암제 보다 더욱 강하게 대장암 HT29 세포의 생육을 억제시켰다(Table 1).

Table 1. Synergistic anticancer activity of anticancer agent mixed with AYS against human colon HT29 cell.

Anticancer agent	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)				ΣFIC^a
	Alone (A or B)	Combination (A+B)	FIC		
Group 1	Etoposide (A)	11.3	6.3	0.0628	0.6203
	AYS (B)	250.0	15.7	0.5575	
Group 2	Fluorouracil (A)	3.2	0.4	0.0628	0.1878
	AYS (B)	250.0	15.7	0.1250	
Group 3	Paclitaxel (A)	0.06	0.008	0.0628	0.1961
	AYS (B)	250.0	15.7	0.1333	
Group 4	Doxorubicin (A)	0.6	0.1	0.0628	0.2295
	AYS (B)	250.0	15.7	0.1667	

^a ΣFIC was calculated for each well as $\text{FIC}_A + \text{FIC}_B$ where A and B are the two drugs in the well. The FIC of each drug was calculated as $(\text{IC}_{50} \text{ of the drug in combination}) / (\text{IC}_{50} \text{ of the drug alone})$. ΣFIC was calculated for each IC_{50} . $\Sigma\text{FIC} < 1$: synergistic, $\Sigma\text{FIC} > 1$: antagonistic, $\Sigma\text{FIC} = 1$: indifferent.

따라서 이들 약제를 처리한 대장암 HT29 세포를 3일간 배양시킨 후 측정된 IC_{50} 값을 활용하여 두 가지 혼합약제에 대한 ΣFIC 를 산출하면 [AYS + Etoposide] 혼합물은 0.6203, [AYS + 5-Fluorouracil] 혼합물은 0.1878, [AYS + Paclitaxel] 혼합물은 0.1961, [AYS + Doxorubicin] 혼합물은 0.2295였다. Canfield [4]에 의하면 ΣFIC 값이 <1이면 서로 상승작용 (synergistic)을 나타내고, ΣFIC 값이 >1이면 서로 저해작용 (antagonistic)을 나타내며, ΣFIC 가 1과 동일하면 서로 무관하게 작용한다고 기술하였다. 따라서 *in vitro*에서 AYS는 4종의 기존 항암제와 혼합하여 사용한 모든 경우에 ΣFIC 의 값이 1 보다 작았으므로 이들 약제를 단독으로 사용했을 때 보다 AYS와 혼합하여 사용하였을 때 인체 대장암 HT29세포에 대한 항암작용이 상승되었다(Table 1). 특히 이들 항암제들은 암세포에 대한 작용 메커니즘에 차이는 있지만 AYS와 이들 항암제를 혼합하면 항암효과가 크게 증진되었으므로 AYS는 일종의 항암 보조제로 개발할 가치가 있다고 생각된다. 따라서 AYS와 4종의 항암제를 혼합물로 투여시킬 경우 기존 항암제의 량을 감소시킬 수 있어 항암제에 의한 부작용도 줄일 수 있으므로 AYS는 항암보조제로서 대장암 치료에 화학요법제(chemotherapy)의 새로운 소재로서 가능성을 나타내었다. 또한 일반적으로 항암제의 독성은 생체 면역세포의 기능에도 영향을 주어 면역세포들에 의한 항암기능은 물론 항암제 투여기간 동안에 감염균에 대한 저항력이 떨어져 최악의 조건으로 전락할 가능성도 있다. 이런 점을 고려하여 최근에는 면역요법(immunotherapy)을 행하기 위한 시도도 이루어지고 있다[12, 18]. 본 AYS는 *in vitro*에서 hPBMC (human peripheral blood mononuclear cell)를 배양시키면 cytokine인 IL-6, TNF- α 와 IFN- γ 분비가 유도되었다[Data 미제출]. 특히 척추동물에서 면역기능은 암세포 증식을 억제하는데도 중요한 역할을 하므로 AYS는 *in vivo*에서 면역세포를 활성화시켜 적어도 항암제 투여기간 동안에 감염균에 대한 저항력이 떨어지는 부작용도 다소 줄일 수 있을 것이라고 생각된다.

결론적으로 AYS는 *in vitro*에서 농도 의존적으로 인체 대장암 HT29 세포의 생육을 억제시켰으며, 기존의 항암제들과 병용하였을 경우 HT29 세포에 대한 항암작용이 상승되었다.

요 약

Rhanella aquatilis AY2000 균주가 생산하는 일종의 당단백질인 항효모성 물질 (AYS)에 대한 항암활성을 조사하기 위해 *in vitro*에서 암세포에 대한 AYS의 세포독성을 조사하였다. 그 결과 AYS는 인체의 Jurkat T 세포와 마우스의 sarcoma 180 세포에 대해서는 세포독성을 나타내지 않았으나, 인체 대장암세포인 colon cancer TH20 세포에는 세포독

성을 나타내었다. 또한 이 AYS는 62.5에서 500 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도의존적으로 인체대장암세포에 대해 세포독성을 증가시켰다. 뿐만 아니라 이 AYS와 시판 항암제를 혼합하여 처리한 결과 시판 항암제를 단독으로 처리한 것 보다 인체대장암세포에 대한 항암효과가 더욱 상승되었다.

Acknowledgments

This work was supported by Dong-eui University Grant (2012AA098).

References

1. Abe T, Hasegawa S, Taniguchi K, Yokomizo A, Kuwano T, Ono M, *et al.* 1994. Possible involvement of multi-drug-resistance-associated protein (MRP) gene expression in spontaneous drug resistance to vincristine, etoposide and adriamycin in human glioma cells. *Int. J. Cancer.* **58**: 860-864.
2. Ahn JB, Shim KY, Jeung HC, Rha SY, Yoo NC, Kim NK, *et al.* 2001. Monthly 5-days 5-Fluorouracil and low-dose leucovorin for adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Cancer Lett.* **167**: 215-224.
3. Beggs WH. 1993. Anti-Candida activity of the anti-cancer drug tamoxifen. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **80**: 125-128.
4. Canfield CJ, Pudney M, Gutteridge WE. 1995. Interaction of Atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Exp. Parasitol.* **80**: 373-381.
5. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. 1993. In vitro valuation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials.* **14**: 359-364.
6. Irving T. 2008. Current perspective adjuvant chemotherapy after resection of liver metastases from colorectal cancer. *Eur. J. Cancer.* **44**: 1198-1201.
7. Jekunen AP, Christen RD, Shalinsky DR. 1994. Synergistic interaction between cisplatin and taxol in human ovarian carcinoma cells in vitro. *Br. J. Cancer.* **69**: 299-306.
8. Langer CJ, Leighton JC, Comis RL. 1995. Paclitaxel and carboplatin in combination in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a phase II toxicity, response, and survival analysis. *J. Clin. Oncol.* **13**: 1860-1870.
9. Lee M, Yea SS, Jeon YJ. 2000. Paclitaxel causes mouse splenic lymphocytes to a state hyporesponsive to lipopolysaccharide stimulation. *Int. J. Immunopharmacol.* **22**: 615-621.
10. Longhi A, Mariani E, Kuehn JJ. 2009. A randomized study with adjuvant mistletoe versus oral Etoposide on post relapse disease-free survival in osteosarcoma patients. *Eur. J. Integrative Med.* **1**: 27-33.
11. McClendon AK, Osheroff N. 2007. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat. Res.* **623**: 83-97.
12. Mihich E, Ehrke MJ. 2000. Anticancer drugs plus cytokines: immunomodulation based therapies of mouse tumors. *Int. J.*

- Immunopharmacol.* **22**: 1077-1081.
13. Park BT, Na KH, Jung EC, Park JW, Kim HH. 2009. Antifungal and anticancer activities of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **13**: 49-54.
 14. Papoian T, Lewis W. 1990. Adriamycin cardiotoxicity in vivo, Selective alterations in rat cardiac mRNAs. *Am. J. Pathol.* **130**: 1201-1207.
 15. Park HJ, Kang MJ, Lee JH, Kim KH. 2011. Action pattern of anti- yeast substance originated from *Rahnella aquatilis* strain AY2000. *Korean J. Microbiol.* **47**: 163-166.
 16. Shinoda C, Fujishita MM, Dohkan J, Oda H, Shinoda K, Yamada T, *et al.* 2005. Doxorubicin induces expression of multidrug resistance-associated protein 1 in human small cell lung lines by the c-jun N-terminal kinase pathway. *Int. J. Cancer.* **117**: 21-31.
 17. Suehisa H, Toyooka S. 2009. Adjuvant chemotherapy for completely resected non-small-cell lung cancer. *Acta Med. Okayama.* **63**: 223-230.
 18. Wang ZH, Wu BJ, Zhang XH, Xu M, Chang HM, Lu XY, *et al.* 2012. Purification of a polysaccharide from *Boschniakia rossica* and its synergistic antitumor effect combined with 5-fluorouracil. *Carbohydr. Polym.* **89**: 31-35.
 19. Zhou H, Shen T, Luo Y, Liu L, Chen W, Xu B, *et al.* 2010. The antitumor activity of the fungicide ciclopirox. *Int. J. Cancer.* **127**: 2467-2477.