

## 腹水細胞의 Succinate Dehydrogenase 阻害物質의 檢索

宋 邦 鎬

慶北大學校 師範大學 生物學科  
(1976년 6월 20일 수리)

### Isolation of Inhibitor against Mouse Carcinoma Cells from *Streptomyces* sp.

Bang Ho Song

Department Biology, Teachers' college, Kyung-pook National University, Daegu  
(Received June 20, 1979)

#### Abstract

An actinomycete, AS-568, which produced an inhibitory substance against succinate dehydrogenase of Ehrlich ascites carcinoma and Sarcoma-180 cells of mouse, was isolated. The inhibitory activity was determined by SDI (Succinate Dehydrogenase Inhibition) method. The active substance was specific against carcinoma cells compared to normal cells in mouse; liver, kidney and brain. The inhibitory ratio was about 50% after one hr treatment at 37°C *in vitro*. Maximal productivity of active substance was recognized by 5 days culture in glucose-asparagine. The active component in cultural liquid was stable in neutral pH range and heat treatment reasonably, and it was recovered from precipitate by ammonium sulfate or non-dialyzable fraction in cellophane membrane as showing the behavior of high molecular substance.

#### 緒 論

現在 癌의 治療劑로써 化學療法劑 및 抗癌性 抗生物質은 수많이 開發되고 있으나 制癌劑에 依해 完全히 治癒되는 경우는 드문 實情이며, 다만 延命效果를 나타냄에 不過하다. 한편 有効藥劑도 있어 手術併用療法 間歇投與法 動脈內注入法 局所灌流法等으로서 널리 使用되고 있다<sup>(1)</sup>.

有効性 藥劑로서의 制癌劑의 選擇 즉 多種多樣한 癌疾患에 對한 그 適應性의 判定은 극히 어려운 實情이다. 뿐만 아니라 우선 抗癌性 物質自體의 檢索에도 *in vitro* test 로써 antiviral antibiotics 라든가 組織培養된 癌細胞에 對한 antitumor antibiotics를 檢索하여 生體實驗에 導入할때 藥劑自體의 感受性 및 正常組織에는 無關하고 癌細胞에만 選擇

的으로 作用하여야 된다는 藥理作用의 特異性等이 要求되었기 때문에 한 가지의 새로운 藥劑가 一定한 癌種에 對해 最終段階의 臨床實驗에까지 有効한 藥劑로써 判定되기까지는 극히 어려운 實情이었다<sup>(2-4)</sup>.

이와 같은 어려운 問題點을 內包하고 있는 制癌性物質의 感受性 測定法으로서 細胞內 succinate dehydrogenase inhibition test(以下 S. D. I法으로 表記)가 그 inhibition index 와 腫瘍에 對한 臨床實驗結果와 類似한 一致性을 나타내고 있음이 近藤<sup>(5-6)</sup>에 依해 發表되었으며 특히 本方法에 依해 endomycin, mitomycin, toyomycin, nitromin 등의 人體癌에 對한 藥劑 感受性의 效果에 對한 關聯性이 상세히 報告되고 있다. 이 S. D. I法은 癌細胞를 그대로 succinate dehydrogenase 酵素源으로 使用하였으며 이 酵素阻害劑의 活性을 判定할

에 있어서 Tetrazolium 系 酸化環元色素를 導入한 研究가 Kun, (7) Black (8) 등에 依해서 發表된바 있다.

本 實驗에서는 이 S. D. I 法을 導入하여 微生物 界에서 腹水癌細胞의 succinate dehydrogenase 阻 害活性物質을 檢索한 結果土壤에서 分離한 *Strepto-* *myces* 屬 菌株에서 이것을 强하게 生成하는 菌의 1 株를 選別하였기에 報告코져 한다.

## 材料 및 方法

### 菌源試料의 採取

土壤微生物中 放線菌을 採取할 目的으로 八公山 一帶, 秋風嶺, 俗離山, 一帶에서 約 70 餘種의 土壤을 菌源試料로 採取하였다.

### 菌의 分離

放線菌 分離培地로써 glucose-asparagine agar 를 使用하여 三段稀釋法으로 總 120 餘의 放線菌叢을 分離하였다. 이때 使用한 培地 組成은 L-Asparagine 0.1%, Glucose 1.0%,  $K_2HPO_4$  0.05%, NaCl 0.05%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%, Agar 1.5% (pH 7.2)였으며 水道물에 溶解하여 調製된 培地를 121°C (15 lbs)에서 15 分間 殺菌한 後 여기에 菌源試料를 생리식염수에 懸濁시켜 接種後 30°C에서 2 日間 培養하여 異種으로 判定되는 colony 를 斜面培地에 分離培養하였다.

### 菌의 選別

阻害活性物質 生成培地로써 yeast-malt broth 를 使用하여 菌 接種後 30°C에서 4~5 日間 靜置培養한 後 그 濾液을 試料로 使用하였으며 總 120 菌株中 16 株를 一次選別하여 다시 4 株를 2 次 選別하였으며 最終적으로 succinate dehydrogenase 阻害物質을 强하게 生成하는 菌 1 株 (As-568)을 選別하였다. 이때 使用한 培地組成은 다음과 같다. 즉 1% nutrient broth 0.5%, yeast extract 0.4% malt extract 1.0% glucose 0.4% (pH 7.2).

### Succinate dehydrogenase 阻害能 測定法

S. D. I test (9) 즉 Thunberg 管을 使用하여 主室에는 酵素源인 mouse 의 腹水癌細胞 懸濁液 1 ml 와 阻害劑로서 放線菌 培養濾液 1 ml 를 넣어 混合하여 37°C에서 1 時間 前處理시킨後 0.01M T. T. C (Triphenyl Tetrazolium Chloride) 液 1 ml 를 加한 副室을 附着시켜 vacuum-pump 로써 2 分間 減壓한

後 副室의 液을 主室에 기울여 넣어 全液을 混合하여 37°C에서 1 時間 處理시켰다. 그 後 Acetone 10 ml 를 加하여 反應을 完了시킨 後 還元된 T. T. C-H<sub>2</sub> 의 formazan 赤色色素를 Acetone 에 轉溶시켜 470 m $\mu$ 에서 吸光度를 測定하여 菌을 培養하지 않는 培地 添加區와의 比로써 그 阻害能을 算出하여 inhibition index 로 나타내었다.

즉 Inhibition Index

$$= \frac{\text{無處理區의 吸光度} - \text{處理區의 吸光度}}{\text{無處理區의 吸光度} (-\log T)} \times 100$$

이 때 癌細胞를 添加하지 않는 對照區의 吸光度는 거의 認定되지 않았기 때문에 以下 選別實驗에서는 無視하였으며 使用한 완충액은 1/15 M-McIlvaine Buffer (pH 7.2)로써 癌細胞 懸濁液 및 Sodium succinate 의 溶媒로 使用하였다.

### 癌細胞 懸濁液 調製

癌細胞는 Ehrlich ascites carcinoma, Sarcoma-180 等 2 種의 腹水癌細胞로서 使用直前に mouse 의 腹腔에서 採取하여 2 回遠心—洗滌後 McIlvaine buffer 로써 懸濁하여 (10) 使用하였으며 癌細胞는 마우스(系統未詳)에 每 10 日間마다 繼代 移植하면서 使用하였다.

### 動物正常組織에 대한 作用性

正常 마우스의 肝, 腎臟, 腦, 筋肉을 摘出하여 마쇄한 後 McIlvaine buffer (pH 7.2, 4°C)로써 懸濁하여 二重 가제 천으로 濾過한 細胞 浮遊液을 1 ml 使用하였으며 懸濁液은 組織濕重量의 5 倍 程度 稀釋하였다. 이들 各 組織에 菌 培養液을 1 ml 加하여 癌細胞에서의 測定方法에 準하여 그 阻害活性를 測定하였으며 對照區로서 培養하지 않는 培地를 使用하였다.

### 培地 種類別 阻害活性物質의 生成

Glucose-asparagine 培地外 5 種의 放線菌培養用 培地 (11)를 水道물에 溶解하여 常法에 따라 殺菌接種後 30°C에서 4 日間 培養한 濾液을 試料로 使用하였으며 各 培地別 組成은 Table 1 같다.

### 培養 期間에 따른 活性物質의 生成

glucose-asparagine 培地와 yeast-malt extract 培地에서 菌을 接種한 後 7 日間 培養하면서 培養後 2 日제부터 每日 培養液 一定量을 取하여 凍結하면서 最終日까지 取한 後 各 段階에서 取한 培

**Table 1.** Various Kinds of Culture Medium for Actinomycetaceae,

Medium	Component (%)			
Glucose-asparagine	L-asparagine	0.1	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02
	NaCl	0.05	glucose	0.1
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05		
Starch-salts	soluble starch	1.0	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
	NaCl	0.1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2		
Nutrient glucose	yeast extract	0.2	nutrient	2.8
	NaCl	0.5	beef extract	0.1
	peptone	0.5	glucose	0.1
Yeast malt	yeast extract	0.4	malt extract	1.0
	glucose	0.4		
Nutrient yeast malt	nutrient broth	0.5	yeast extract	0.4
	glucose	0.4	malt extract	1.0
Nutrient broth	nutrient broth	0.8	yeast extract	0.001
	glucose	0.2	peptone	0.2
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	NaCl	0.1

All components in each medium was dissolved in distilled water, and adjusted the pH to 7.2

養液을 同一條件에서 pH 및 阻害 活性도를 測定 하였으며 또 各 段階別 菌體를 吸引濾過後 Acetone 으로 脫水하여 105°C에서 2時間 乾燥하고 乾燥菌 體量을 評量하였다.

## 結 果

### 菌株의 選別

As-568 菌株는 他의 菌株에 比해 強하게 succinate dehydrogenase 活性을 阻害하였으며 그 阻害率은 두 가지의 癌種 즉 *Ehrlich ascites carcinoma* 와 *Sarcoma-180*에 對해 約 50%의 阻害率을 나타 내었다. 그 以外의 菌도 阻害率은 낮지만 兩種의 腹水癌에 對해 그 阻害率이 거의 같았음을 볼 때 succinate dehydrogenase 阻害物質에 對한 感受性이 거의 同一한 것으로 推定된다. 本 實驗에서는 土壤에서 分離한 供試菌株 *Actinomyces* 120 株로부터 succinate dehydrogenase를 強하게 分泌하는 菌株 As-568을 最終 選別하였으며 그 阻害率은 測定 條件의 改善 및 活性物質에 精製로써 상승될 것으로 생각된다. 또 두 가지 癌種에서 그 阻害率이

거의 同一比率로 나타났기 때문에 두 가지의 癌種을 임의로 擇一하여 以下 實驗에 使用하였다.

(Table 2)

**Table 2.** Inhibition of Succinate Dehydrogenase on Cancer Cell by Cultural Liquid of Actinomycete.

Strain	Inhibition index	
	Ehrlich ascites carcinoma	Sarcoma-180
AS-616	25	22
AS-568	49	41
AS-502	27	22
10-2-2	18	21

Two kinds of cancer cell on mouse was treated with cultured liquid of actinomycete for 1 hr at 37°C and the inhibition ratio was evaluated by SDI method.

### 正常組織에 對한 作用性

여러가지 臟器에서 succinate dehydrogenase의 阻害活性을 測定한 結果 癌細胞에 對해서는 50% 以上임에 比해 肝, 腦, 腎臟等에서는 阻害作用이 20% 以下였으며 脾臟, 筋肉等에서는 對照區에서 succinate dehydrogenase의 活性이 極히 微弱하게 나타났으므로 阻害率을 判定하기가 極히 어려웠다. 이 結果 本物質은 어느 程度 癌組織에 對해 特異하게 作用하는 物質로 推定되며 生體內에 直接 注射로써 腹腔에 투여하는 경우 선택적으로 癌細胞에 使用하여 抗癌效果가 나타날 것으로 推測된다. 對照區로써의 癌細胞는 *Ehrlich ascites carcinoma*였다 (Table 3).

### 異種培地에서의 阻害物質의 生成

glucose-asparagine 培地外 5種의 培地에서 阻害物質의 生成能을 調査코져 各 培地에 菌을 接種後 30°C에서 5日間 培養後, 그 培養液으로 阻害活性을 調査한 結果 glucose-asparagine, yeast-malt, nutrient-yeast-malt, nutrient broth는 比較的 좋은 結果를 나타내어 40% 以上의 阻害率을 나타내었으나 starch-salts, nutrient-glucose는 不適한 培地임을 알 수 있었다.

특히 合成培地인 glucose-asparagine 培地에서는 菌의 生育度는 別로 좋지 않으나 阻害活性은 높으므로 yeast-malt 培地和 같이 以下 實驗에 使用하

**Table 3.** Inhibition of Succinate Dehydrogenase on Normal Cell by Cultured Liquid

Organ	OD (-log T)		Inhibiton index
	Treated	Control	
Cancer	0.21	0.44	53
Liver	0.95	1.15	18
Kidney	0.31	0.38	19
Pancreas	0.05	0.10	—*
Muscle	0.10	0.15	—
Brain	0.14	0.17	18

Fresh cell from mouse was suspended with McIlvaine buffer (pH 7.2, 5°C) in five volumes to cell mass. The cell suspension after filtering with gauze was incubated with cultured liquid of AS-568 (pH 7.2) for 1 hr at 37°C, then determined the inhibitory activity by SDI method.

\*Succinate dehydrogenase activity in control was not noted.

**Table 4.** Production of Inhibitory Substance against Succinate Dehydrogenase from Various Kinds of Cultured Medium.

Medium	Color <sup>1</sup>	Growth <sup>2</sup>	pH	Inhibition index
Glucose-asparagine	white-gray	++	7.4	55
Starch salts	"	+	6.8	9
Nutrient-glucose	"	+++	7.6	5
Yeast-malt	yellow-brown	++++	6.6	48
Nutrient-yeast-malt	"	++++	7.2	40
Nutrient broth	yellow	+++	7.8	49

1. color of cultured liquid.

2. growth rate in each medium.

+ ; poor    ++ ; fair    +++ ; good  
++++ ; excellent

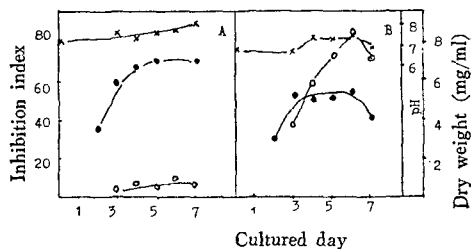
As-568 strain was cultured in each medium and filtrate was tested for the inhibitory activity against succinate dehydrogenase of Ehrlich ascites carcinoma.

였으며 특히 glucose-asparagine 培地에서 本菌을 接種하면 活性物質의 精製가 쉬울 것으로 推測된다. 使用한 癌細胞는 *Ehrlich ascites carcinoma* 였으며 培養液의 pH가 다소 差異가 있었으나 反應條件에 添加된 McIlvaine buffer에 依해 反應은

同一條件에서 이루어졌을 것으로 推測된다 (Table 4).

### 培養期間에 따른 阻害物質의 生成

glucose-asparagine 및 yeast-malt extract에서는 培養後 3日째부터 多量의 阻害物質이 生成되어 培養後 4~5日경에 最高度에 達하였다가 그後 時間이 경과함에 따라 6日 以後부터 서서히 活性物質이 파괴됨을 알 수 있었다. 특히 培養後 3日째는 菌體는 別로 많지 않으나 阻害活性은 높음을 볼때 菌의 對數增殖期 初期부터 阻害物質이 培地 中에 蓄積됨을 알 수 있었으며 培地에서 生育된 菌體量의 yeast-malt extract 培地에 비해 glucose-asparagine 培地에서는 約 10分の 1밖에 안되나 阻害活性은 더 높은 것은 흥미로운 事實이었다. 또한 培養時間이 경과함에 따라 培地는 점차 알카리성으로 pH가 變하였다. 以上の 實驗에서 本菌은 glucose-asparagine 培地를 使用하여 4~5日間 培養하는 경우가 가장 높은 力價의 活性物質을 生成할 수 있을 것으로 생각되며 이때 供試한 癌種은 *Ehrlich ascites carcinoma* 였다 (Fig 1).



**Fig. 1.** Productivity of Inhibitory Substance according to Cultured Period.

Inhibitory activity (●—●), cell mass (○—○) and pH (×—×) was checked out for determining productivity of inhibitory substance according to cultured period in the media of glucose-asparagine (A) and of yeast-malt (B).

Inhibition ratio was determined in Ehrlich ascites carcinoma cells by SDI method. Cell mass was determined by weighing acetone dried cells after filtration.

### pH에 對한 安定性

活性物質을 37°C에서 3時間 pH 2에서 8까지의 各段階에서 處理한 後 conc-HCl 및 conc-NaOH

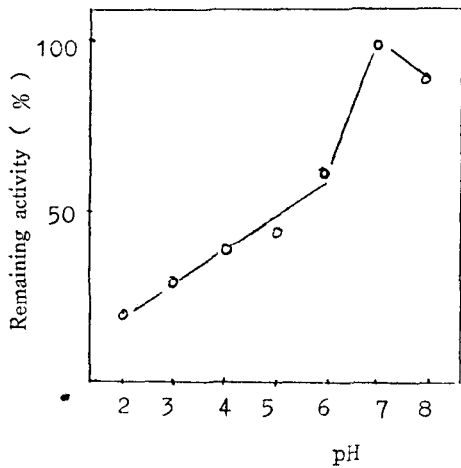


Fig. 2. pH Stability of Inhibitory Substance of Cultured Liquid.

Cultured liquid was treated for 3 hours at 37°C after mixing with each pH solution of buffer (McIlvaine's) and adjusted to neutral pH range (pH 6.5~7.5) with conc-HCl or conc-NaOH. Reaction mixture was prepared from cell suspension of Ehrlich ascites carcinoma and above treated liquid.

로써 pH를 6.5~7.5로調整한 後 殘存活性을 測定함으로써 각 pH에서의 安定性을 檢討한 結果 pH 7 및 pH 8 즉 中性 또는 弱 鹼基性에서는 安定하나 pH 6 以下의 酸性에는 極히 예민하게 失活되는 物質으로써 酸에 不安定한 物質임을 알았다. 이때 使用한 癌種은 *Ehrlich ascites carcinoma* 였다(Fig 2).

#### 溫度에 對한 安定性

40°C, 50°C, 60°C에서 3時間 溫度處理하면서 經時的으로 殘存活性을 測定한 結果 60°C의 高溫에서 3時間 處理했을 경우에도 처음 活性의 約 75%가 殘存함을 볼 때 本 物質은 溫度에 對해 比較的으로 安定한 物質로 생각되었으며 常溫에서 長時間 放置하면서 活性物質을 精製하여도 失活되지 않을 것으로 생각되었다. 供試한 癌種은 *Sarcoma-180*이었다(Fig. 3).

#### 硫酸 飽和 劃分의 阻害活性<sup>(12)</sup>

培養液에  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 飽和시켜 5°C에서 12時間 放置한 後 生成되는 沈澱을 遠心分離하여 모은 後 少量의 McIlvaine buffer (pH 7.2)에 溶解하

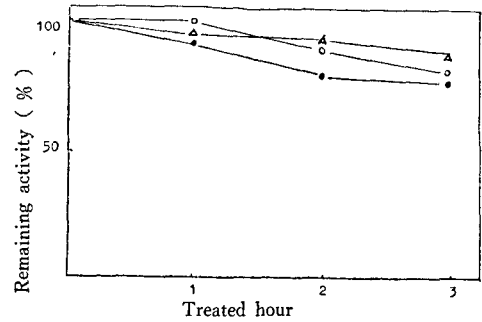


Fig. 3. Temperature Stability of Inhibitory Substance in Cultured Liquid.

Remaining activity of inhibitor in the cultured liquid was determined after heat treatment for 3 hrs at 40°C, 50°C and 60°C respectively. Assay method described precisely in Materials and Methods. (△—△): 40°C, (○—○): 50°C, (●—●): 60°C treated.

여 5°C, 5時間 同一 완충액에서 2回 透折하였으며 遠心上澄液도 同一條件에서 透折하여 殘存活性을 比較 測定하였다. 對照區로서 培養液을 그대로 投折하였을 때의 活性도 檢討하였다. 그 結果 硫酸 沈澱 劃分에서 阻害活性이 強하게 나타났으며 培養原液을 그대로 透折하였을 경우에도 亦是 阻害되었음을 볼 때 本 活性物質은 飽和 硫

Table 5. Inhibitory Activity of Precipitate by Saturated Ammonium Sulfate from Cultured Liquid.

Case	Inhibition index
1. Original cultured liquid	40
2. Interior by dialysis	50
3. Precipitate by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50
4. Precipitate by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2X)	75
5. None precipitate by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15

Cultured liquid was fractionated with ammonium sulfate precipitation for purifying the active components. The active fraction was isolated as a precipitate by ammonium sulfate saturation (3) and supernatant was not detected the activity (5). The active precipitate was diluted two times (4). Non-dialyzable fraction in cellophane tube (2) was tested for comparing with original cultured medium (1).

安溶液에서 沈澱되는 非透析性物質로 推定되었다 (Table 5).

## 考 察

制癌劑로서의 適合性 여부는 여러가지 感受性 測定法에 依해 試圖되어 왔으나 近勝에 依해 臨床學的으로 그 有効성이 發表된 S. D. I法은 *in vitro* test로서 비교적 손쉽게 抗癌性的 有効성을 判定할 수 있음이 報告되었다.

本 實驗에서는 이 S. D. I法에 依해 마우스의 腹水癌細胞中 *Ehrlich ascites carcinoma* 및 *Sarcoma-180*에 對한 抗癌性物質을 檢索코져 土壤에서 分離한 120餘株의 放線菌을 對象으로 檢索한 結果 正常 肝, 腎臟 組織 等에서는 inhibition index가 20 以下였으나 癌組織에서는 50 以上の 阻害率을 나타내는 物質을 強하게 分泌하는 *Streptomyces* 屬 菌 1株(As-568)을 選別하였다.

이 結果 近勝의 報文에서 人體癌의 境遇 正常 肝에 對해서는 그 inhibition index가 50 以上이면 서 癌細胞의 경우 75 以上일 때 臨床實驗에서 副作用이 없는 有効한 藥劑로 判定한 事實에 비추어 볼때 實地 生體實驗에 本 物質을 投與함으로써 癌細胞에 比較的 選擇的으로 作用하며 좋은 效果를 나타낼 것으로 推測된다.

高收率의 培養條件을 檢討한 結果 合成 培地인 glucose-asparagine 培地에서 約 4~5日間 培養하는 경우가 가장 좋았으며 複合培地인 yeast-malt extract에서도 活性物質이 多量 蓄積됨을 알 수 있었다.

本 活性物質은 glucose-asparagine 培地에서의 約 5日間 培養後 培養液에 硫安으로 飽和시켰을 때 生成되는 沈澱劃分을 얻음으로써 粗精製될 것으로 推測되며 精製過程中 酸性에서는 쉽게 失活되므로 中性領域에서의 處理가 要求되며 溫度에 對해선 比較的 安定한 高分子의 非透析性 物質로 생각된다.

—本 實驗을 指導해 주시고 또 腹水癌細胞를 分離해 주신 慶北大學校 農科大學 農化學科 徐正墳 教授任에게 깊이 感謝를 드립니다. 아울러 實驗을 直接 도와준 本研究室의 金珠淵, 尹明姬에게도 感謝를 드립니다. —

## 要 約

土壤源으로 부터 分離된 *Actinomycetes* 120餘株를 對象으로 S. D. I法에 依해 마우스의 腹水癌인 *Ehrlich ascith carcinoma* 및 *Sarcoma 180* 細胞의 succinate dehydrogenase 活性을 阻害하는 物質을 強하게 生成하는 菌 1株(As-568)를 選別하였으며 이 活性物質은 正常組織인 肝, 腎臟, 腦等에는 아주 弱한 inhibition index를 나타내었으나 (20% 以下) 癌組織에서는 50% 程度의 選擇的 阻害作用을 나타내었다. glucose-asparagine 培地에서 4~5日間 培養하였을 때 가장 높은 力價의 活性物質을 生成하였으며 本 物質은 中性領域의 pH 및 熱에 對해서는 比較的 安定한 高分子의 非透析性 物質로 推定된다.

## : 參考文獻

- 1) 近藤達平; 癌의 臨床 別冊 癌化學療法 177 (1966).
- 2) C. Yoshikumi, K. Nomoto, K. Matsunaga, T. Fuji, K. Takay: GANN 66, 649 (1975).
- 3) W. Nakahara: Cancer Research 34, 1767 (1974).
- 4) T. Sugimura: Bulletin U. I. C. C 12, 1, (1974).
- 5) T. Kondo, T. Imamura, H. Ichihashi: GANN 57, 113, (1966).
- 6) T. Kondo: Cancer Clinical Investigation Review Committee Symposium Report, Casbades Conference Cente, Williamsbury, Va, February 19 (1970).
- 7) E. Kun, L. G. Abood: Science, 109, 144, (1949).
- 8) M. M. Black, I. S. Kleiner: Science, 110, 660, (1949).
- 9) 赤堀四郎: 酵素研究法 I. 朝創書店 606 (1962).
- 10) 吉田富三: 生命と制御: 共立出版 207 (1970).
- 11) J. R. Norris, D. W. Ribbons: Methods in Microbiology (3A) Apr. 93 (1970).
- 12) 日本生化学会編: 酵素研究法上 3 (1975).