

인체유암세포주 MCF-7의 형태변화와 증식에 영향을 주는 항암활성물질, MCH-201

김항섭 · 김세은 · 김영호 · 이성우 · 오구택 · 김환목 · 이정준*
KIST 유전공학연구소

Antitumoral Compound, MCH-201, an Effector on Proliferation and Morphology of Human Breast Tumor Cell Line, MCF-7

Kim, Hang-Sub, Se-Eun Kim, Young-Ho Kim, Sung-Woo Lee,
Goo-Taeg Oh, Hwan-Mook Kim and Jung-Joon Lee*

Genetic Engineering Research Institute,
KIST P.O. Box 17, Taedok Science Town, Taejon, 305-606, Korea

Abstract — MCH-201 was isolated from the mycelium of *Streptomyces* sp. Ba16 as a potent effector on proliferation and morphology of human breast tumor cell line, MCF-7. Morphological change could be observed at concentration between 2.5 µg/ml and 250 pg/ml and showed cytotoxic effect at the concentration of more than 5 µg/ml. This compound also showed inhibitory effect on DNA synthesis of hepatoma cells, Hepa 1c1c7, and strong cytotoxic effect on proliferation of human tumor cell lines, A549 and XF498.

천연물로부터 항암제를 개발하기 위한 미국국립암 연구소 중심의 지난 40년간의 탐색 및 개발연구는 혈액성암인 백혈병 림프종 등의 치료제 개발에는 상당한 성공을 거두었으나, 암의 대부분을 차지하는 고형암 치료에는 만족할 만한 성과를 거두지 못하였다. 이러한 원인은 지금까지 prescreen에서 p388을 복강에 이식한 쥐에 대한 수명연장효과를 지표로 하여 항암성 화합물을 검색하고 효과를 판단하는 방법을 주로 이용하였기 때문이다. 따라서 이러한 screening 방법은 동물 model과 임상에서의 상관성이 낮다고 결론지어, 1985년 이후 미국국립암연구소에서는 사람의 조직특이적 암세포주를 대상으로 소위 disease-oriented 항암제 검색계를 수립하여 *in vitro*에서의 대량검색을 실시하고 있다. 이 질병지향적 검색계에는 혈액 및 피부암, 폐암, 대장암, 중추신경계암, 난소암, 신장암 등 각종 조직의 암세포주 60여종에 대한 조직특이적이고 선택적인 성장저해제나 세포독성물질을

대량으로 검색하고 있다(1, 2). 최근 국내에서도 항암제 개발을 위하여 여러 암세포주를 이용한 항암활성물질의 screening이 행해지고 있다(3). 그러나 국내에서 미국 NCI와 유사한 검색계를 운영하는 것은 비용이나 인력면에서 불가능하다고 생각되어, 미국 NCI에서는 포함되어 있지 않는 조직의 암세포주 등을 대상으로 축소된 암세포주 panel을 이용한 검색이 더 효과적일 것으로 기대된다. 본 실험에서는 인체 유암세포주인 MCF-7 세포주를 이용하여 세포의 형태변화를 유도하며 세포성장을 저해하는 화합물을 생산하는 방선균을 선별하고, 선별된 균주로부터 항암활성물질로서 MCH-201을 분리하여 구조를 동정하였으며, 5종의 인체암 세포주에 대한 항암활성을 측정하였다.

재료 및 방법

균주의 배양

방선균 분리주 Ba16의 배양을 위하여 사용한 배지는 oatmeal 20 g, malt extract 20 g, yeast extract

Key word: MCF-7, morphological change, antitumor, concanamycin B, *Streptomyces*
*Corresponding author

2 g, glucose 10 g, soybean meal 10 g, soluble starch 12 g, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g을 1 l의 증류수에 녹이고 pH를 7.0으로 조절한 MCLM-1 medium을 사용하였다. 본 배양을 위해서는 500 ml의 baffled flask 3개에 100 ml씩의 배지를 3일 동안 배양한 종배양액 240 ml를 8 l의 본 배양 배지에 집종한 후 28°C, 350 rpm, 10 LPM air의 조건으로 3일 동안 배양하였다.

시약 및 사용기기

세포주의 배양을 위해 사용한 RPMI 1640과 α -MEM 배지는 GIBCO(MD, USA)사의 제품을 사용하였고, fetal calf serum은 Hyclone(Utah, USA)에서 구입하였다. 방선균의 배양을 위해서 B. Braun의 15 l jar fermentor인 Biomate를 사용하였고, mycelium의 harvest를 위해서는 Beckman Model J2-21 High speed centrifuge를, 화합물의 분리를 위한 HPLC는 Waters system(501 pump, 745B Data Module, Automated Gradient Controller)를 사용하였다. 기기분석을 위해서 UV absorption는 Milton Roy Spectronic 3000 array Spectrophotometer를, IR은 Laser Precision Analytical RFX-65 FT-IR Spectrophotometer를, NMR은 Varian 500 NMR Spectrometer를, MS는 HP 5989A Spectrometer를 사용하였다.

세포의 형태변화와 항암활성의 측정

RPMI 1640 medium 100 μ l(10% FCS 함유)에 96 well plate의 한 well당 log phase에 있는 MCF-7의 세포수가 5000 cells/well이 되도록 plating한 후 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하고 미생물 배양액 추출물을 10배씩 희석한 시료를 넣어 최종 volume이 200 μ l가 되도록 하였다. 세포의 형태변화의 유무는 24시간 후에 현미경으로 관찰하였으며, MCF-7 세포의 성장저해 활성은 48시간 배양한 후 SRB assay법에 따라(4) microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HCT15 등에 대한 활성은 화학연구소 screening실에서 행하였다.

DNA 합성에 대한 영향

Hepa 1c1c7 세포주는 10% FCS가 함유된 α -MEM 배지를 사용하여 6 well plate에 배양하였으며, 배양 조건은 5% CO_2 /95% air 상태를 유지하면서, 37°C

서 배양하였다. 세포의 농도는 6×10^4 cells/ml로 각 well당 2 ml씩 분주하여 배양하였다. 배양 24시간 후 배지를 교환하고 시료를 처리하여, 24시간 동안 배양한 후에 [^3H]-thymidine(1 $\mu\text{Ci/ml}$)이 함유된 배지로 교환하여 2시간 동안 pulse labelling시켰다(5,6). Labelling을 시킨 세포를 0.2 N NaOH 용액으로 수거하여, 10% trichloroacetic acid(TCA)로 세포내 고분자 물질을 침전시킨 후 5% TCA로 2회 세척하고 다시 0.2 N NaOH로 용해시켜서 DNA 합성능과 단백질을 정량하는 시료로 사용하였다. Radioactivity는 liquid scintillation counter를 사용하여 측정하였으며, DNA 합성은 [^3H]-thymidine이 세포 DNA에 incorporation되는 양을 DPM으로 표시하였고, 단백질 정량은 Bradford의 방법(7)을 따라 실시하였다.

결 과

방선균 분리주 Ba16의 분리

우리나라 전국 각지에서 채취한 토양시료를 실온에서 건조시키고, 80°C에서 40분간 가열한 후에 멸균 생리식염수 10 ml에 충분히 교반시킨 후 $10^1 \sim 10^2$ 배로 희석하여 그 200 μ l를 augmentin 200 $\mu\text{g/ml}$, nystatin 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 포함하는 OMYM plate(oatmeal 20 g, malt extract 2 g, yeast extract 2 g, glucose 2 g, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30 mg, agar 15 g, distilled H_2O 1000 ml)에 도말하고, 28~30°C에서 5일간 배양하여 augmentin 및 nystatin에 저항성을 나타내는 방선균을 선별하였다. 분리된 방선균은 OMYM medium 10 ml에서 7일간 배양한 후, 배양액을 dichloromethane : methanol(1 : 1)의 혼합용매로 추출하고 농축한 후, 500 μ l DMSO에 녹여 시료로 하고, 이 시료에 대하여 MCF-7의 형태변화 유도활성과, 세포 성장 저해활성을 측정하여 활성을 나타내는 방선균 분리주 Ba16을 분리하였다.

활성물질의 분리 정제

방선균 Ba16을 OMYM medium에서 배양하여 얻은 배양액 5 l를 8000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 supernatant와 mycelium을 분리하였다. Mycelium만을 MeOH 4 l로 2회 추출하고 여과한 후, MeOH 추출액을 합하여 감압농축하였다. 이 MeOH extract를 다시 dichloromethane으로 녹여서 soluble한 분획만을 얻고 이를 농축한 후, MeOH을 용매로 하여 Se-

Table 1. Physicochemical properties of MCH-201

Nature	amorphous white powder
Solubility	
soluble	dichloromethane, ethylacetate, acetonitrile, acetone, ethanol, methanol
insoluble	water
HPLC	RT 8.28 (column: μ -Bondapak C-18 (ϕ 3.9 \times 300 mm), solvent: 80% methanol, UV: 280 nm, flow rate: 1 ml/min)
MP	172 $^{\circ}$ C
UV λ_{\max} (MeOH)	244, 285
IR ν_{\max} (KBr)	3509, 3428, 2973, 1708, 1690, 1450, 1376, 1249
MS(m/z)	874 (FAB, M+Na $^{+}$)

phadex LH20(ϕ 26 \times 460 mm) column chromatography를 실시하였다. 각 분획에 대하여 MCF-7 세포주 의 형태변화를 유도하는 활성을 측정하고 활성이 나타나는 분획만을 모아서 농축한 후 80% MeOH을 용매로 하여 preparative HPLC(Delta Pak ϕ 19 \times 300 mm)를 실시하여 major 화합물로서 MCH-201 17 mg을 얻었다.

MCH-201의 물리 화학적 성질

MCH-201은 무정형의 백색분말로서 MP 172 $^{\circ}$ C 를 나타내었다. 용해도는 dichloromethane, ethylacetate, acetonitrile, acetone, ethanol, methanol에는 가용이었으나 물에는 불용이었다. 이 화합물의 물리화학적 성질을 Table 1에 나타내었다.

MCH-201의 구조동정

MCH-201은 UV 285 nm의 흡수와 ^1H NMR의 δ 6.35(3-H)와 δ 5.58(5-H)의 두 olefinic methine proton의 peak에서 α , β , γ , δ -unsaturated ester의 존재와 UV 245 nm와 ^1H NMR δ 5.19(15-H), δ 5.80(13-H), δ 6.50(14-H)에서 conjugated diene의 존재를 추정할 수 있었고, FAB MS spectrum에서 m/z 874의 M+Na $^{+}$ 의 peak로부터 분자량 851임을 추정할 수 있었다(8). 이 화합물은 실온에서 NMR spectrum을 측정할 경우 macrolide ring의 conformational flexibility 때문에 일부 peak들은 broad하게 나타나거나 또는 관찰되지 않았으므로 NMR 측정온도를 -20 $^{\circ}$ C로 하여 측정하였다. ^1H NMR spectrum에서 8-H의 methine

Table 2. ^1H -NMR assignments of MCH-201

C2-OCH3	3.48 s	C18-CH3	0.76 d (6.0)
H3	6.35 s	H19	3.91 m
C4-CH3	1.96 s	H20	1.60 m
H5	5.58 d (9.5)	C20-CH3	1.00 d (5.5)
H6	2.53 m	C22-H2	2.25 m
C6-CH3	0.88 d (6.0)	H23	3.71 m
H7	3.95 br d	H24	1.20 m
H8	2.81 m	C24-CH3	0.80 d (6.0)
C8-CH3	1.05 d (6.0)	H25	3.90 br t
H9	3.02 br d	H26	5.19 m
H10	2.33 m	H27	5.48 m
C10-CH3	0.94 d (6.5)	C28-H3	1.50 d (5.5)
C11-H2	1.90 m		
C12-CH3	1.81 s	H1'	4.48 d (9.5)
H13	5.80 d (11.0)	H2'ax	1.60 m
H14	6.50 m	H2'eq	2.11 m
H15	5.19 m	H3'	3.63 m
H16	3.79 br t (9.5)	H4	4.23 t (9.0)
16-OCH3	3.20 s	H5'	3.28 m
H17	5.02 br d (9.5)	C6'-H3	1.16 d (6.0)
H18	2.11 m	OCO-NH2	4.96 s

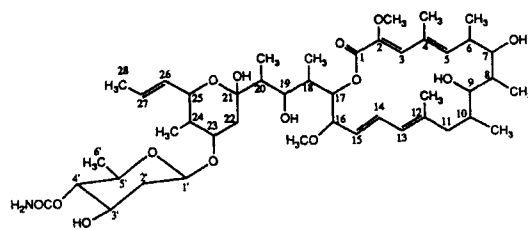


Fig. 1. Structure of concanamycin B.

signal이 δ 2.81로 downfield shift한 것으로 보아 이 화합물은 C-8의 위치에 ethyl group 대신 methyl group이 결합하고 있는 것을 알 수 있었다(9). 또 δ 4.48의 methine signal은 β -pyranoside의 anomeric proton을 나타내었고, δ 4.96의 singlet으로부터 carbamoyl group의 존재를 알 수 있었다. 이상의 기기 분석 data를 문헌치와 비교하여 볼 때 MCH-201은 *Streptomyces diastatochromogenes* S-45에서 분리 보고된 concanamycin B(Fig. 1)로 동정할 수 있었고(10), 표준품 concanamycin B와 HPLC의 retention time을 비교하여 본 결과 동일한 화합물임을 알 수 있었다.

MCH-201의 생물학적 활성

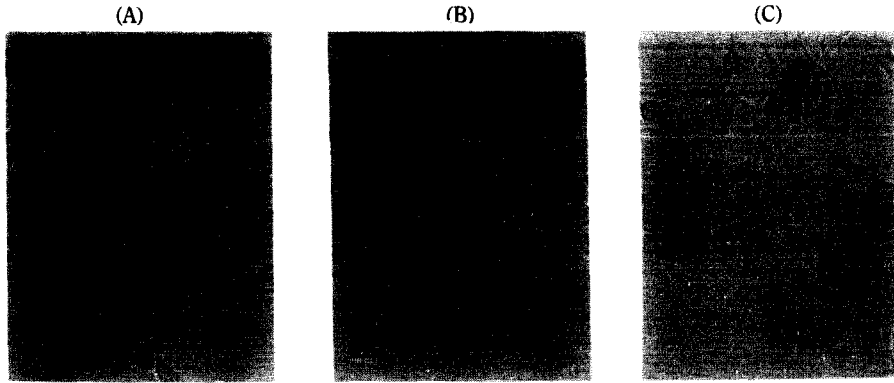


Fig. 2. Morphological change of MCF-7 cell (A) control (B) treated with 2.5 µg/ml MCH-201 and (C) 0.05 µg/ml MCH-201.

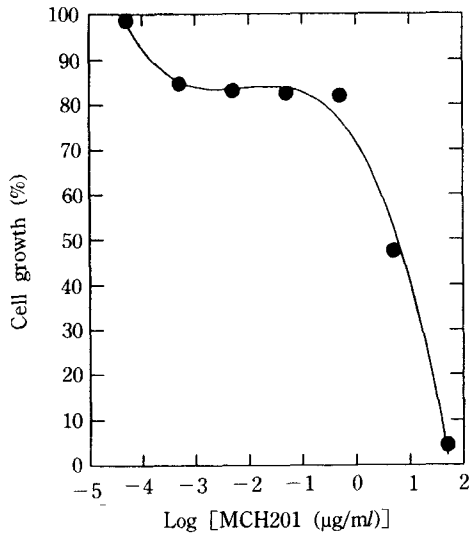


Fig. 3. Inhibition of MCH-201 on the growth of MCF-7 cells.

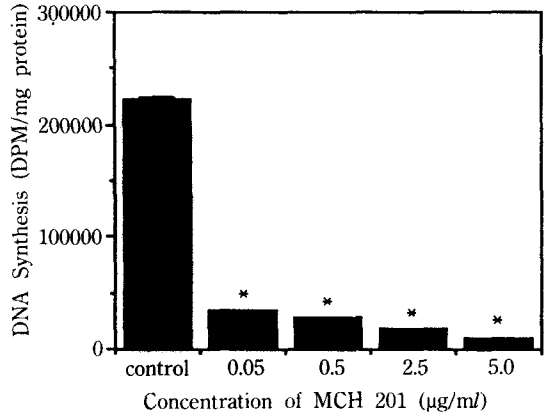


Fig. 4. Effect of MCH-201 on DNA synthesis of hepa-toma cells (Hepa 1c1c7).

Cells were maintained in culture for 48 hrs. Medium was replenished daily and [³H]-thymidine was included for 2 hrs in culture to determine DNA synthesis. Values represent the mean ± S.D. of triplicate cultures. * indicates p ≤ 0.01 when compared to the control value.

MCH-201은 250 pg/ml부터 2.5 µg/ml의 농도에서 유암 세포주인 MCF-7의 형태변화를 유도하였고(Fig. 2), 5 µg/ml 이상의 농도에서는 cytotoxic한 활성을 나타내었다(Fig. 3). 간암 세포주인 Hepa 1c1c7 세포를 이용한 incorporation 실험결과, DNA 합성은 용량의 존적으로 저해되었으나(Fig. 4), protein의 합성에는 영향이 없었다. 또 이 화합물에 대하여 NCI의 종양 panel인 5종의 인체 암세포주에 대한 항암활성을 조사한 결과 폐암세포주인 A549와 중추신경계암 세포주인 XF498에 대하여는 각각 4.8 ng/ml, 0.33 ng/ml의 ED₅₀을 보였고, 난소암 세포주인 SK-OV-3 세포주와 결장암 세포주 HCT15, 흑색종암 세포주인 SK-MEL-

2에 대해서는 각각 2.84 µg/ml, 4.21 µg/ml, 0.19 µg/ml의 ED₅₀을 나타내었다.

고 찰

Concanamycins은 *Streptomyces diastatochromogenes* S-45에서 처음으로 분리된 18-membered macrocyclic lactone 화합물로 long side chain에 2-deoxy-β-D-rhamnosyl group을 가진 six-membered hemiketal ring이 결합하고 있는 화합물이다. Kinashi 등에 의하면 concanamycins은 bacteria에는 항균활성이

없고 fungi와 yeast에는 항균활성을 나타내었으며, concanavaline A로 자극한 mouse splenic lymphocyte의 증식을 저해하였다(8). 또 Woo 등에 의하면 concanamycin B는 macrophage J774에서 oxidized LDL에 의해 유도된 cholesteryl ester의 합성과 lysosomal acidification을 강력하게 저해하였다고 보고하였다(10). 본 실험에서는 암세포의 증식이나 분화를 조절하는 화합물을 검색하는 중에 방선균 분리주 *Streptomyces* sp. Ba16이 강력하게 인체유암 세포주 MCF-7의 형태변화를 유도하는 것을 발견하였고, 각종 chromatography를 통하여 순수 화합물 MCH-201을 분리하였다. 이 화합물은 2.5 µg/ml 이하의 농도에서 인체유암세포주인 MCF-7의 세포형태를 둥근모양으로, 더욱 낮은 농도에서는 가는 관 모양의 돌기가 있는 세포형태로 변화시켰다. 또 Hepa 1c1c7 세포에 대한 thymidine-uptake 실험에서 MCH-201은 DNA 합성을 강력하게 저해하였으나 protein 합성에는 큰 영향이 없었다. 특히 이 화합물을 NCI의 tumor panel 중 5종의 인체암세포주에 대한 작용을 조사하여 본 결과 난소암 세포주 SK-OV-3, 결장암 세포주 HCT15, 흑색종암 세포주 SK-MEL-2에서 보다 폐암 세포주 A 549와, 중추신경계암 세포주 XF498에는 높은 세포독성을 나타내었다. MCH-201에 의한 MCF-7 세포의 이러한 형태변화가 어떠한 작용기전에 의해서인지는 분명하지 않으며, 앞으로 MCF-7 세포의 분화 marker인 β-casein과 α-lactalbumin의 발현을 조사하여 보면 진정한 세포분화효과인지 아니면 단순한 세포의 골격변화에 의한 것인지 알 수 있을 것이다. 최근 tumor promotor의 일종인 okadaic acid가 MCF-7 세포의 분화를 유도하며, 그러한 작용은 okadaic acid의 phosphatase 1과 phosphatase 2A의 저해작용과 상관성이 있음이 제시되었다(11). 따라서 MCH-201이 세포증식 및 분화과정의 신호전달계에 작용할 가능성이 시사되어 분화 marker의 확인과 함께 분리정제 과정에서 확인된 3종의 유도체의 활성도 관련해서 연구되어질 필요가 있다.

요 약

미생물 대사산물로부터 인체유암세포주 MCF-7의 형태변화와 세포독성을 나타내는 화합물을 탐색하는 중에 *Streptomyces* sp. Ba16 균주를 선별하였으며, 이 균주를 배양하여 활성물질 MCH-201을 분리 정제하였다. 각종 spectroscopic data에 의한 구조분석의

결과 이 화합물은 concanamycin B로 동정하였으며 표준품과 비교하여 확인하였다. 이 화합물은 250 µg/ml부터 2.5 µg/ml의 농도에서 MCF-7 세포의 형태변화를 유도하였으며, 5 µg/ml 이상의 농도에서는 세포독성을 나타내었다. 간암세포주인 Hepa 1c1c7 cell을 이용하여 DNA 합성과 protein 합성에 대한 영향을 조사하여 본 결과 용량의존적으로 DNA 합성을 저해하였으나 단백질 합성에는 영향을 나타내지 않았고, 또 폐암 세포주인 A 549와, 중추신경계암 세포주인 XF 498에는 강한 세포독성을 보였다.

감사의 말씀

본 연구는 과기처 특정연구개발사업에 의해 수행되었으며, 5종의 tumor panel에 대하여 항암 활성을 측정하여 주신 화학연구소 이정옥 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Boyd, M.R. 1989. Status of the NCI Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen. Pp. 1-12. In V.T. Devita Jr., Hellman S. and Rosenberg S.A. (ed.), *Principles and Practice of Oncology Updates*, Vol. 3(10), Lippincott, Philadelphia.
2. Tischler, M., J.H. Cardellina II, M.R. Boyd and G.M. Cragg. 1992. Cytotoxic quassinoids from *Cedronia granatensis*. *J. Nat. Prod.* **55**: 667-671.
3. Ryu, S.Y., S.U. Choi, C.O. Lee and O.P. Zee. 1992. Antitumor activity of *Psoralea corylifolia*. *Arch. Pharm. Res.* **15**: 356-359.
4. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenny, and M.R. Boyd. 1990. New calorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. NCI.* **82**: 1107-1112.
5. Nakamura T., K. Nawa, and A. Ichihara. 1984. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatomized rats. *Biophys. Res. Comm.* **122**: 1450-1459.
6. Miyazaki, M., S. Wahid, L. Bai and M. Namba. 1992. Effects of intercellular cyclic AMP and cyclic GMP levels on DNA synthesis of young-adult rat hepatocytes in primary culture. *Exp. Cell Res.* **200**: 404-409.
7. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

8. Kinash, H., K. Someno and K. Sakaguchi. 1984. Isolation and characterization of concanamycin A, B and C. *J. Antibiotics*. **37**: 1333-1343.
9. Kinash, H., K. Sakaguchi, T. Higashijima and T. Miyazawa. 1982. Structure of concanamycin B and C. *J. Antibiotics*. **35**: 1618-1620.
10. Woo, J.-T., C. Shinohara, K. Sakai, K. Hasumi and A. Endo. 1992. Isolation, characterization and biological activities of concanamycins as inhibitors of lysosomal acidification. *J. Antibiotics*. **45**: 1108-1116.
11. Kiguchi, K., C. Giometti, C.H. Chubb, H. Fujiki and E. Huberman. 1992. Differentiation induction in human breast tumor cells by okadaic acid and related inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **189**: 1261-1267.

(Received June 18, 1993)