

Hatomarubigin의 다제내성극복 활성

하상철*

한국과학기술연구원 생명공학연구소

Reversal Activity of Multidrug-Resistance by Hatomarubigins. Sang-Chul Ha*. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. BOX 115, Yusung 305-600, Korea - Hatomarubigins inhibited the growth of various cancer cell lines including multidrug-resistance cells. Hatomarubigins were found to potentiate the colchicine- and vinblastine-induced cytotoxicity against KB-C2 cell, but not the adriamycin-induced cytotoxicity against KB-C2 cells. Hatomarubigins didn't affect the sensitive KB cells. These results suggest that hatomarubigins are specific potentiators of colchicine. Among four hatomarubigins, hatomarubigin A showed the highest synergistic effect on colchicine-induced cytotoxicity. Similar effect of hatomarubigin A was found against V79/ADM cells.

암의 치료는 외과 요법과 방사선 요법과 화학 요법으로 크게 3가지로 나눌 수 있다. 그중 화학요법은 제2차 세계대전 이후 50년의 역사를 가지고 있다. 암의 정체가 급속히 해명되는 것과 동시에 화학요법은 크게 발전되고 있다. 지난 50년동안 여러 가지의 광범위한 항암제들이 개발되었다. 현재까지 개발되고 임상에 사용되고 있는 항암제의 대부분이 DNA를 손상하거나 그 합성을 저해하거나 유사분열기에 작용해서 세포분열을 저해하는 약제이다. 여기서 문제가 되는 것은 항암제에 대한 내성 종양의 존재이다. 종양중에는 어떤 종류의 항암제에도 반응하지 않는 것이 있고 이를 내성 종양을 치료하는 데에 있어서, 어떤 방법으로 항암제에 감수성이 되게 하는 가를 밝히는 것이 중요하다.

항암제 내성은 크게 두가지로 나눌 수 있다. 첫번째로 화학요법시 치료 저항성을 나타내는 "자연내성"과 첫 번째 치료시에는 항암제에 감수성이지만 화학요법의 과정중 항암제 내성을 획득한 암세포가 출현하는 "획득내성"이다.

현재 광범위한 항암제에 동시에 내성을 나타내는 암세포에서는 P 당단백질이라고 불리우는 막단백질이 증가하고 있고, 세포내에 들어간 항암제를 세포밖으로 방출하는 pump의 역할을 담당하고 있는 것이 알려져 있다. 많은 항암제에 동시에 내성을 획득한 세포를 "다제내성세포"(1, 2)라고 부른다. 다제내성세포에서 축적이 감소하는 항암제의 대부분은 지용성이기 때문에, 확산으로 지질 이중막을 통해 세포에 들어간다. 세포외로 나올 때는 들어갈 때와는 다른 경로로 방출되고 그 때문에 에너지를 필요로 하는 것이 알려졌다. 다제내성세포에는 세포내로 들어온 항암제를 ATP 에너지를 이용해서 세포외로 방출하는 기능이 항진되고 있다.

어떤 다제내성세포에도 공통적으로 발견되는 변화는 세포막에 분자량 17만의 당단백질이 증가하는 것이다. 이 다제내성세포의 세포막에 존재하는 분자량 17만의 당단백질은 P 당단백질(3, 4)이라 불리우고 있다. P 당단백질이 막의 수송 단백질에 유사하다는 것, 2개의 ATP 결합 부위를 가지고 있다는 것(5), 막을 통한 channel을 형성하고 있을 가능성이 크다는 것 등이 알려져 있고, P 당단백질은 ATP의 energy를 이용해서 항암제를 세포외로 방출하는 pump로써의 기능을 가지고 있다고 생각되어진다. 다제내성에 대해서 분자 level에서 내성 기구가 잘 연구되어 있다(6-15).

본 연구는 colchicine 내성 KB 세포주(KB-C2)를 이용한 다제내성을 극복할 수 있는 물질 hatomarubigin(16)을 이용하여 여러 가지의 다제내성세포에 대한 생물활성을 조사하였다.

재료 및 방법

Hatomarubigins(16)

Streptomyces plicatosporus 균주가 생산하는 4종류의 항암증강물질.

세포주와 세포배양

인체구강암세포주인 KB 세포와 Colchicine 내성세포주인 KB-C2세포, Chinese hamster ovary 세포주인 V79 세포와 adriamycin 내성세포주인 V79/ADM 세포는 2 mM L-glutamine과 10% fetal calf serum(FCS)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's Medium(D-MEM)에서, 인체백혈병세포인 K562 세포와 adriamycin 내성세포인 K562/ADM세포는 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 실험에 사용하였다. KB-C2 세포는 내성을 유지하기 위하여 1 μM Colchicine을 함유한 D-MEM 배지에서 배양하였

*Corresponding author.

Key words: Hatomarubigins, multidrug-resistance cells, KB-C2 cell, colchicine

다.

항암증강활성

항암증강활성은 단계별로 희석한 시료에 대하여 colchicine을 처리한군과 처리하지 않은 군의 cytotoxicity를 비교하여 시료자체의 세포독성이 없으면서 colchicine의 항암활성을 유의성있게 증가시키는 활성을 측정하였다. 분리한 화합물의 각 세포주에서의 항암제 활성에 대한 영향을 측정하기 위하여 IC₅₀ 이하 농도의 화합물과 단계별로 희석한 각 항암제를 함께 처리하였다. 화합물의 내성세포주에 대한 항암제의 항암증강정도는 Potentiation index(P.I)로 나타내었다(17).

$$\text{활성 증강도(P.I)} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ value of anticancer drugs per se}}{\text{IC}_{50} \text{ value of anticancer drugs with hatomarubigins}}$$

결 과

Hatomarubigin의 암세포 증식저해활성

hatomarubigin은 다제내성세포를 포함하는 각종 암세포에 대해서 증식억제 활성을 나타내었다. 그 결과를 Table 1에 나타내었다. Hatomarubigin A와 B는 KB-C2 세포를 제외한 각종 암세포에 대해서 50 μg/ml 이하에서는 증식저해활성을 나타내지 않았거나 혹은 약한 활성을 나타내었다. 한편, hatomarubigin C와 D는 KB-C2 세포를 제외한 각종 암세포에 대해서 IC₅₀ 치 3.5~42 μg/ml의 범위에서 증식저해활성을 나타내었으며, KB-C2 세포에 대해서는 50 μg/ml에서도 활성이 없었다. KB-C2 세포는 colchicine 내성세포주로써 선택된 다제내성세포주이며, hatomarubigin C 및 D에 대해서는 교차내성을 획득하였고, A 및 B에 대해서는 역으로 교차 감수성을 나타내는 것이 명백히 되었다.

Hatomarubigin의 colchicine 내성 KB-C2 세포에 대한 항암제 활성 증강 효과

Colchicine은 중기분열정지(metaphase arrest)를 일으키는 것에 의해 세포의 증식을 억제하는 작용을 나타낸다. Colchicine에 내성이 된 암세포는 adriamycin과 vinblastine 등의 임상적으로 중요한 항암제에도 내성이

되는 소위 다제내성을 획득한다. 그래서 colchicine 내성 세포에 대한 colchicine의 저해 농도를 낮추는 작용을 나타내는 물질은 암세포의 다제 내성의 문제를 극복하는데 유효할 것이라고 생각된다. 여기서 colchicine 내성 KB-C2 세포를 이용하여 hatomarubigin에 이와같은 작용이 있는 가를 검토하였다.

Table 2에 나타내는 바와 같이 세포독성을 나타내지 않는 농도의 colchicine 혹은 vinblastine의 존재하에서 hatomarubigin의 증식저해 농도의 저하가 발견되었으므로 hatomarubigin에 의한 colchicine 혹은 vinblastine 항암 활성증강 효과를 조사하였다. 그 결과를 Table 3과

Table 2. Hatomarubigin의 KB-C2 세포에 대한 colchicine 혹은 vinblastine의 존재, 비존재하의 증식저해활성 (IC₅₀, μg/ml)

compound	none	+ colchicine (1.5 μg/ml)	+ vinblastine (0.2 μg/ml)
hatomarubigin A	8.5	0.9	2.2
hatomarubigin B	16.0	10.1	37.0
hatomarubigin C	>50	10.0	1.6
hatomarubigin D	>50	10.1	40.5

Table 3. Hatomarubigin에 의한 KB-C2 세포에 대한 colchicine의 활성증강효과

Compounds	Conc. (μg/ml)	IC ₅₀ of colchicine (μg/ml)	P.I.*
Vehicle	—	4.5	
hatomarubigin A	1	0.23	19.6
	3	0.09	50.0
hatomarubigin B	10	0.60	7.5
	30	0.60	7.5
hatomarubigin C	10	0.29	15.5
	30	0.20	22.5
hatomarubigin D	10	0.25	18.0
	30	0.21	21.4

*P.I.=potentiation index: IC₅₀ of colchicine alone/IC₅₀ of colchicine and test sample

Table 1. Hatomarubigin의 각종 암세포에 대한 증식저해활성 (IC₅₀, μg/ml)

compound	KB/S	KB-C2	K562/S	K562/ADM	V79/S	V79/ADM
hatomarubigin A	>50	8.5	>50	>50	34	>50
hatomarubigin B	46.6	16.0	>50	>50	>50	>50
hatomarubigin C	12.5	>50	7.6	9.0	3.5	12.2
hatomarubigin D	17.0	>50	42.0	17.5	9.4	24.0

/ADpM: adriamycin 내성, /S: 감수성

Table 4. Hatomarubigin에 의한 KB-C2 세포에 대한 vinblastine의 활성증강효과

Compound	Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC_{50} of vinblastine ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	P.I.*
Vehicle	—	1.12	
Hatomarubigin A	1	0.36	3.1
	3	0.26	4.3
Hatomarubigin B	1	0.74	1.5
	3	0.28	4.1
Hatomarubigin C	1	0.22	5.2
	3	0.05	21.5
Hatomarubigin D	10	0.54	2.1
	30	0.31	3.6

*P.I.=potentiation index: IC_{50} of vinblastine alone/ IC_{50} of vinblastine and test sample

Table 5. Hatomarubigin에 의한 KB/S 세포에 대한 colchicine의 활성증강효과

Compound	Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC_{50} of colchicine (ng/mL)	P.I.*
Vehicle	—	6.6	
Hatomarubigin A	10	12.5	0.53
	30	8.5	0.78
Hatomarubigin B	10	9.6	0.69
	30	11.2	0.59
Hatomarubigin C	1	77.0	0.086
	3	49.0	0.135
Hatomarubigin D	10	46.0	0.14
	30	24.5	0.27

*P.I.=potentiation index: IC_{50} of colchicine alone/ IC_{50} of colchicine and test sample

4에 나타내었다.

Hatomarubigin은 Table 3에 나타난 바와 같이 다제내성 KB-C2 세포에 대한 colchicine의 활성을 증강시켰다. 증강 활성을 hatomarubigin A $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 경우가 가장 강하였고 colchicine의 IC_{50} 치를 1/50로 저하시켰다. 가장 약한 hatomarubigin B는 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 및 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 활성증강율이 7.5배 정도였지만 hatomarubigin들 사이의 현저한 차이는 발견되지 않았으며 그리고 농도 의존성도 그정도 강하지 못하였다.

Table 4에 나타낸 바와 같이 hatomarubigin은 같은

Table 6. Hatomarubigin의 K562/ADM에 대한 adriamycin 존재하, 비존재하에 있어서 증식저해활성 (IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)

	-ADM	+ADM ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)
hatomarubigin A	>50	>50
hatomarubigin B	>50	>50
hatomarubigin C	9.0	5.0
hatomarubigin D	17.5	16.0

Table 7. Hatomarubigin의 V79/ADM에 대한 adriamycin 혹은 colchicine 존재하, 비존재하에 있어서 증식저해활성 (IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)

	none	+ADM ($1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$)	+COL ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)
hatomarubigin A	>50	>50	1.6
hatomarubigin B	>50	>50	>50
hatomarubigin C	12.2	2.7	1.5
hatomarubigin D	24.0	21.5	30.0

KB-C2 세포에 대해서 vinblastine의 활성증강효과도 나타내었지만, 그 활성은 전반적으로 약하였으며, hatomarubigin C 만이 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 21.5배라는 명백한 증강 효과를 나타내는 것에 지나지 않았다.

다음에 이 항암제 활성증강 효과가 다제내성세포에만 특이적인지를 검토하기 위해 친주의 감수성 세포인 KB/S 세포에 대한 활성을 검토하였다. 그 결과, Table 5에 나타난 바와 같이 hatomarubigin은 KB/S 세포에 대한 colchicine의 활성을 증강시키지 않았으며, 역으로 저하시키는 작용이 있는 것이 판명되었다. 이 사실에서 hatomarubigin은 colchicine 내성 세포에 특이적으로 작용한다는 흥미 있는 성질을 가지고 있는 것이 판명되었다.

Hatomarubigin의 다른 다제내성세포에 대한 항암제 활성증강효과

Hatomarubigin이 KB-C2 세포 이외의 다제 내성 세포에 대해서도 항암제 활성증강효과를 나타내는지를 조사하였다. 사람 백혈병 세포 K562의 adriamycin 내성주(K562/ADM)는 다제내성 model로써 널리 이용되고 있다. K562/ADM에 대해서 adriamycin의 활성을 증강하는지를 조사하였다.

Table 6에 나타난 바와 같이 hatomarubigin은 K562/ADM에 대해서 adriamycin의 활성을 증강하는 작용이 없었다.

다음에 역시 adriamycin으로 선택된 chinese hamster 유래 다제내성세포인 V79/ADM에 대한 hatomarubigin에 의한 adriamycin 및 colchicine의 활성증강효과를 조사하였다. 그 결과를 Table 7, 8에 나타내고 있다.

Table 8. Hatomarubigin에 의한 V79/ADM 세포에 대한 colchicine의 활성증강효과

Compound	Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC_{50} of colchicine ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	P.I.
Vehicle	-	2.5	
hatomarubigin A	10	0.39	6.4
	30	0.38	6.7
hatomarubigin B	10	1.19	2.1
	30	0.99	2.5
hatomarubigin C	1	0.42	6.0
	3	0.37	6.8
hatomarubigin D	5	2.00	1.8
	10	1.60	1.6

*P.I.=potentiation index: IC_{50} of colchicine alone/ IC_{50} of colchicine and test sample

Table 8에 나타낸 바와 같이 hatomarubigin A 및 C가 V79/ADM 세포에 대해서 약한 colchicine 활성증강효과를 나타내었고 다른 화합물에는 활성이 거의 나타나지 않았고, adriamycin에 대한 활성증강 효과는 거의 약한 것이었다.

고 찰

Hatomarubigin은 사람 상피암 다제내성세포 KB-C2에 대해서 colchicine과 vinblastine의 항암활성을 증강시켰고, adriamycin에는 증강활성을 나타내지 않았다. 한편, 친수인 감수성 KB 세포에 대해서는 항암활성증강효과를 나타내지 못하였다는 사실에서 hatomarubigin은 다제내성을 부분적으로 극복하는 활성이 있는 것으로 생각되어진다. 이들 활성은 특히 hatomarubigin A, C, D에서 현저히 나타났다. 그리고, 이 화합물은 다른 다제내성세포인 V79/ADM에 대해서도 colchicine의 활성을 증강시켰지만 adriamycin에 대해서는 증강활성을 나타내지 못하였다. 이와같이 hatomarubigin이 일부의 항암제, 특히 colchicine에 대한 내성을 선택적으로 극복했다는 것은 calcium 길항물질등 종래의 내성극복제에서는 알려지지 않았는 현상이고 흥미있는 발견이라 생각되어진다.

이와같은 실험결과에서 hatomarubigin의 작용기작은 P-당단백질의 colchicine 결합부위의 부근에 선택적으로 결합하여 항암제의 배출을 저해하는 것으로 예상된다. hatomarubigin A, B, C, D는 어느 것이나 약한 세포독성을 나타내며 다제내성세포 KB-C2가 친수와 비교해서 hatomarubigin C와 D에 대해서 내성이 되었다는

것은 이들 화합물도 P 당단백질에 결합하여 세포외로 배출되었다는 것을 시사한다. 화학적으로는 hatomarubigin과 colchicine은 어느 것이나 분자량 350 정도의 약산성의 방향족 화합물이며, 동일부위에 결합하는 것은 충분히 추정가능하다.

그리고, hatomarubigin은 특히 KB-C2 세포에 특이적으로 높은 증강활성을 나타내었다. colchicine으로 선택된 다제내성세포에 발현되고 있는 P 당단백질은, 185번째의 아미노산이 glycine에서 valine으로 변이되어 있고(18), 이것에 의해 선택적으로 colchicine에 대한 내성이 상승하는 것이 알려져 있다. 그러나, 이 아미노산의 변이는 colchicine의 P 당단백질에의 결합을 저하시키기 때문에 결합능의 증대에 의한 배출촉진이 아니고, 수송된 약제의 해리과정에 관여한다고 추측된다. 그래서, hatomarubigin은 이 과정을 저해한다고 생각하는 것이 타당하다. 더욱이, hatomarubigin A와 B에 관해서는 KB-C2 세포에서 교차 감수성이 발견되었다. 이것은 같은 골격을 가지는 hatomarubigin C에서는 내성이 되었다는 것이 반대의 현상이고, 다른 다제내성세포에서는 발견되지 않았다. 교차 감수성은 내성세포에 있어서 자주 관찰되는 현상이고 그 mechanism은 잘 알려져 있지 않다. 같은 골격을 가지는 일련의 화합물이 한편으로는 내성이 되고 다른 한편으로는 감수성이 되는 보고는 지금까지 없고, 그 mechanism을 해석하기 위해 유용한 도구가 될 뿐 아니라, 내성극복의 새로운 가능성을 개척하는 것으로 주목된다.

요 약

Hatomarubigin은 다제내성세포를 포함하는 각종 암세포에 대하여 증식억제활성을 나타내었다. 그리고 Hatomarubigin은 사람 상피암 다제내성세포 KB-C2에 대해서 colchicine과 vinblastine의 항암활성을 증강시켰고, adriamycin에는 증강활성을 나타내지 못하였다.

한편 친수인 감수성 KB 세포에 대해서는 항암활성증강효과를 나타내지 못하였다는 사실에서 hatomarubigin은 다제내성을 부분적으로 극복하는 활성이 있는 것으로 생각되어진다. 이들 활성은 hatomarubigin A에서 현저히 나타났다. 그리고, 이 화합물들은 다른 다제내성세포인 V79/ADM에 대해서도 colchicine의 항암활성을 증강시켰지만 adriamycin에 대해서는 증강활성을 나타내지 못하였다.

참고문헌

- Kartner, N., et al. 1983. Cell Surface P-Glycoprotein Associated with Multidrug Resistance in Mammalian Cell Lines. *Science* 221: 1285-1288.
- Tsuruo, T. 1988. Mechanism of Multidrug Resistance

- and Implications for Therapy. *Jpn. J. Cancer. Res.* **79**: 285-296.
3. Hamada, H. and T. Tsuruo. 1986. Functional role for the 170- to 180-KDa Glycoprotein Specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 7785-7789.
 4. Hamada, H. and T. Tsuruo. 1988. Purification of the 170-to 180- Kilodalton Membrane Glycoprotein Associated with Multidrug Resistance. *J. Biol. Chem.* **263**: 1454-1458.
 5. Naito, M., H. Hamada and T. Tsuruo. 1988. ATP/ Mg^{2+} -dependent Binding of Vincristine to the Plasma Membrane of Multidrug-resistant K562 Cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 11887-11891.
 6. Bellamy, W.T., W.S. Dalton, M.C. Gleason, T.M. Grogan and T.M. Trent. 1991. Development and Characterization of a Melphalan-resistant Human Multiple Myeloma Cell Line. *Cancer Res.* **51**: 995-1002..
 7. Samuels, B.L., J.L. Murray, M.B. Cohen, A.R. Safa, B.K. Sinha, A.J. Townsend, M.A. Beckett and R.R. Weichselbaum. 1991. Increased Glutathione Peroxidase Activity in a Human Sarcoma Cell Line. *Cancer Res.* **51**: 521-527.
 8. Frankfurt, O.S., D. Seckinger and E.V. Sugarbaker. 1991. Intercellular Transfer of Drug Resistance. *Cancer Res.* **51**: 1190-1195.
 9. Schwartz, G.K., H. Arkin, J.F. Holland and T. Ohnuma. 1991. Protein Kinase C Activity and Multidrug Resistance in MOLT-3 Human Lymphoblastic Leukemia Cells Resistant to Trimetrexate. *Cancer Res.* **51**: 55-61.
 10. Lankelma, J., E.C. Spoelstra, H. Dekker and H.J. Broxterman. 1990. Evidence for daunomycin efflux from multidrug-resistant 2780^{Ad} human ovarian carcinoma cells against a concentration gradient. *Biochim. Biophys. Acta.* **1055**: 217-222.
 11. Shibata, H., R. Kanamura, T. Sato, C. Ishioka, Y. Konishi, A. Ishikawa, A. wakui and T. Tsuruo. 1990. Increase in the Level of P-Glycoprotein mRNA Expression in Multidrug-resistant K562 Cell Lines Treated with Sodium Butyrate Is Not Accompanied with Erythroid Differentiation. *Jpn. J. Cancer. Res.* **81**: 1214-1217.
 12. Schechter, R.L., A. Woo, M. Duong and G. Batist. 1991. *In Vivo* and *in Vitro* Mechanism of Drug Resistance in a Rat Mammary Carcinoma Model. *Cancer Res.* **51**: 1434-1442.
 13. Shen, D.W., Y.G. Lu, K.U. Chin, I. Pastan and M.M. Goltesman. 1991. Human hepatocellular carcinoma cell lines exhibit multidrug resistance unrelated to MDRI gene expression. *J. Cell. Sci.* **98**: 317-322.
 14. Yang, L.Y. and J.M. Trujillo. 1990. Biological Characterization of Multidrug Resistance Human Colon Carcinoma Sublines Induced/Selected by Two Methods. *Cancer Res.* **50**: 3218-3225.
 15. Marguardt, D., S. McCrone and M.S. Center. 1990. Mechanism of Multidrug Resistance in HL60 Cells: Detection of Resistance-associated Protein with Antibodies against Synthetic Peptide That Correspond to the Deduced Sequence of P-Glycoprotein. *Cancer Res.* **50**: 1426-1430.
 16. Hayakawa, Y., S.C. Ha, Y.J. Kim, K. Furihata and H. Seto. 1991. Studies on the isotetracenone antibiotics IV. hatomarubigins A, B, C and D, new isotetracenone antibiotics effective against multidrug-resistant tumor cells. *J. Antibiotics* **44**: 1179-1186.
 17. Kawada, M., S. Sumi and K. Umezawa. 1992. Circumvention of Multidrug Resistance in Human Carcinoma KB Cells by Polyether Antibiotics. *J. Antibiotics* **45**: 556-562.
 18. Choi, K., C.J. Chen, M. Krieglerx and I.B. Roninson. 1988. An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the mdr 1 (P-glycoprotein) gene. *Cell.* **53**: 519-529.

(Received 2 October 1995)