

## 저산소 조건에서 제네티신이 유방암세포의 생존에 미치는 영향

대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>생화학교실

이태순 · 박성환 · 이종원<sup>1</sup> · 임선하<sup>1</sup>

### The Effect of Geneticin on the Survival of a Human Breast Cancer Cells under Hypoxic Condition

Tae Soon Lee, M.D., Sung Hwan Park, M.D., Jong Won Lee, Ph.D.<sup>1</sup> and Sun Ha Lim, M.S.<sup>1</sup>

Departments of Surgery and <sup>1</sup>Biochemistry, Catholic University of Daegu, Daegu, Korea

**Purpose:** In solid tumor, there is a region where oxygen supply is insufficient. Under this hypoxic condition, cancer cells became more resistant than normal cells. In this study, we found that one of the aminoglycoside antibiotics, geneticin, made a human breast cancer cell, MCF-7, even more resistant to hypoxia.

**Methods:** On normoxic (21% O<sub>2</sub>) condition, MCF-7 cells (1.5 × 10<sup>6</sup> cells/60 mm culture dish) were grown in low glucose (1 g/l) MEM (with 10% FBS) supplemented with 0, 1, 10, 100, and 1000 µg/dl geneticin, respectively, for one day. Then, the cells were transferred to hypoxic (1% O<sub>2</sub>) incubator and grown for 3 days. We examined the viability of cells, the concentration of glucose and lactate and DNA fragmentation assay in each groups.

**Results:** When the cells were grown in low glucose medium under hypoxia (1% O<sub>2</sub>), all the cells became dead after 2 days of culture in the absence of geneticin whereas the cells still survived even after 3 days of culture in the presence of geneticin (10 µg/ml). In the presence of geneticin, the cells survived despite of consumption of all glucose in the medium, whereas the cells became dead once all glucose was consumed in the absence of geneticin. In this case,

geneticin made cells survive by suppressing apoptosis, which was proved by DNA fragmentation assay.

**Conclusion:** The results might have some implications in treating solid tumor; if cancer patients should be treated for infection with antibiotics, aminoglycoside antibiotics can aggravate the patient's condition by making cancer cells more resistant to hypoxia. Therefore, the results strongly suggest that we should be careful in choosing antibiotics when they are used for cancer patients. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2002;5:279-283)

**Key Words:** Geneticin, Hypoxia, Cell survival, Breast cancer cell

**중심 단어:** 제네티신, 저산소조건, 세포생존, 유방암

### 서론

세포는 포도당 등 여러 가지 영양분과 산소가 공급되면 효율적으로 에너지를 얻어 살아 갈 수 있다. 이 때 산소공급이 줄어들거나 끊어지게 되면 세포들은 혐기성 해당작용(anaerobic glycolysis)에 의해 포도당의 소모가 증가하게 되어 영양분인 포도당이 고갈되거나 또는 젖산이 너무 많이 생성되어 죽게된다. 이러한 저산소 조건에서 세포의 생존을 개선시키는 새로운 방법으로 대장균의 ribosome 중 30S subunit의 억제제로 작용하여 단백질의 합성을 억제함으로써 그 항균작용을 나타내는 aminoglycoside 계열의 항생제인 제네티신(geneticin)(1-3)이 발견되었다.(4,5)

유방암 등의 고형암에서도 종양이 일정한 크기에 도달하면 종양의 중앙 부위에 저산소 조건이 발생하며, 그 부위의 세포에서는 혐기성 해당과정을 통해 결국 괴사가 일어난다.(6) 저자들은 저산소 조건에서 세포의 사멸을 억제한다고 알려진 제네티신이 유방암 세포인 MCF-7의 생존을 개선시키는 지를 조사하고 이것이 일어나는 기전을 밝히는 연구를 하였다. 즉 항생제 사용이 유방암 치료에 영향을 미칠 수 있는 지 여부에 유의하며 이를 확인하기 위한 기초 조사로서 이 실험을 하였다.

책임저자 : 박성환, 대구시 남구 대명 4동 3056-6

☎ 705-716, 대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

Tel: 053-650-4055, Fax: 053-624-7185

E-mail: shwpark@cataegu.ac.kr

접수일 : 2001년 11월 5일, 게재승인일 : 2001년 12월 20일

본 논문은 2002년 춘계대한유방암학회에서 구연 발표된 내용임.

## 방 법

### 1) 실험재료

동물세포 배양에 사용한 Minimum Essential Medium (MEM), fetal bovine serum (FBS), geneticin (G418) 및 penicillin/streptomycin은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구매하였다.

### 2) 세포주 및 세포배양

사람의 유방암 세포인 MCF-7은 10% FBS, 100 Units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 들어있는 저농도 포도당 (1.0 g/l) MEM 배양배지에 geneticin 각각 0 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml 및 1,000 µg/ml 를 넣고 5% CO<sub>2</sub> incubator, 37°C에서 배양하였다.

### 3) 저산소 조건에서의 실험

세포들을  $1.5 \times 10^6$  개/60 mm culture dish로 계산하여 정상 산소 조건(normoxia)에서 1일 배양한 후 새 배지로 교체하여 질소를 불어 넣어 산소농도를 조절할 수 있는 hypoxia incubator (Vision Scientific Co., LTD, Korea) (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에 넣어 배양기 내에서의 산소 분압을 1~21% (대기에서의 산소분압은 21%)로 유지하여 실험하였다.

### 4) 살아있는 세포수의 결정

Cell viability는 trypan blue exclusion 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 0.4% trypan blue와 cell suspension을 1 : 1로 섞어 10~15분이 지난 후 hemocytometer로 푸르게 염색되지 않는 세포들을 살아있는 세포수로 집계하였다.

### 5) 포도당(glucose)과 젖산(lactic acid) 측정

세포의 대사 과정을 확인하기 위하여 대표적인 에너지 원인 포도당의 소비와 대사 산물인 젖산의 농도를 측정하였다. 저산소 상태나 정상산소 상태에서 세포를 배양하고 일정 시간마다 샘플을 채취해서 각각의 경우에 포도당과 젖산의 농도를 측정하였다. 각 샘플들은 일정한 상태가 유지되는 전체 기간에 -70°C에서 냉동보관(Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA)되었다가 전체 샘플이 다 모여지면 분석(assay)을 실시하였다. 포도당은 아산테크 GLU II 자동 분석기용(Hitachi 747; Japan) 시약을 사용하여 농도를 측정하였고, 젖산의 농도는 LAC Slides (VITROS) (Ortho-Clinical Diagnostics Inc., USA)를 사용하여 Ektachem 750 (Rochester, NY, USA)로 측정하였다.

### 6) DNA fragmentation assay

Culture dish에 배양된 세포들로부터 배양액을 제거한 후 lysis buffer [0.5% Triton buffer, 5 mM Tris buffer (pH 7.4),

20 mM EDTA]를 넣은 다음 생긴 lysate를 eppendorf tube에 모았다. 이것을 원심분리하여 얻은 상등액을 protease K로 처리한 후 phenol-chloroform-isoamylalcohol 용액을 이용하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 들어있는 DNA를 ethanol 침전법을 이용하여 얻은 후 1.5% agarose gel에 전기영동을 실시하였다.

## 결 과

### 1) 산소농도가 세포의 생존에 미치는 영향

사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포가 세포배양기 내의 산소농도에 따라 그 생존이 변화되는 과정을 알아보기 위해 여러 다른 산소농도에서 실험을 하였다(Fig. 1). 정상 산소상태에서의 세포 수는 평균적으로 하루에 2배씩 증가하였으나, 산소농도가 낮아질수록 증가하는 세포의 수가 감소하였다. 특히 1% 산소 농도에서는 일시 증가하다가 배양 2일만에 세포들이 모두 죽었다. 이를 근거로 하여 저산소 조건에서의 실험은 1% 산소 농도에서 시행되었다.

### 2) 저산소 조건에서 제네티신이 세포의 생존에 미치는 영향

저산소 조건에서 제네티신이 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 저산소 조건(1% 산소농도)에서 제네티신의 농도에 따른 세포의 생존율을 조사하였다(Fig. 2). 제

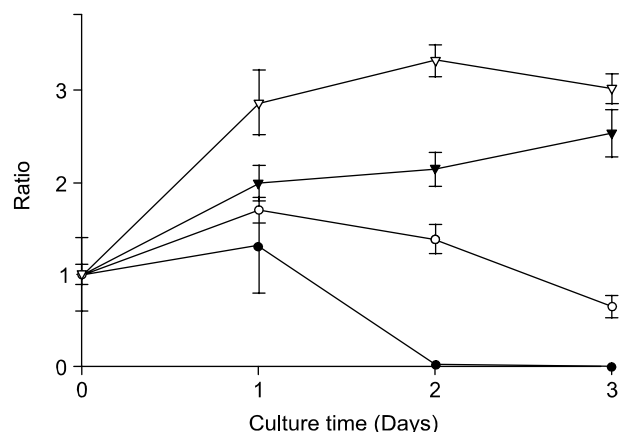
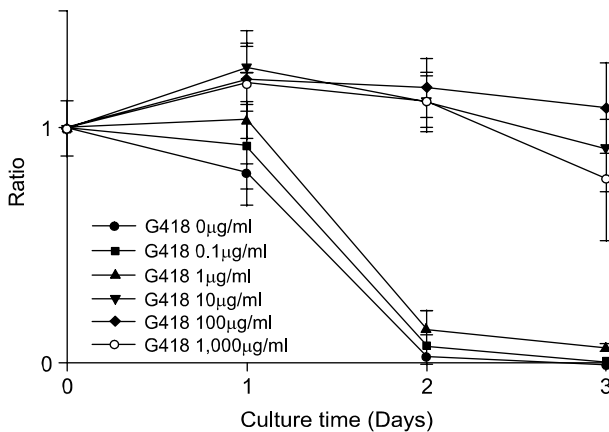
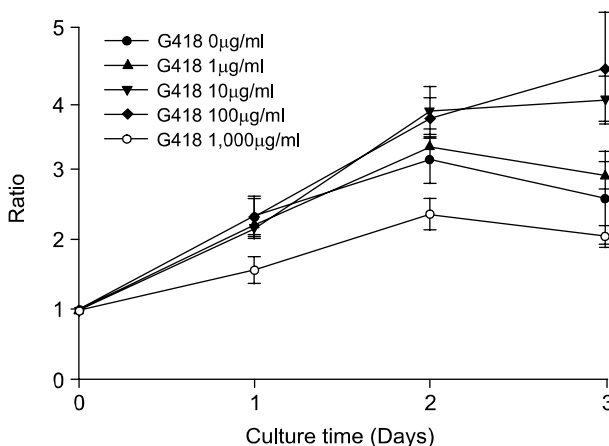


Fig. 1. Effect of oxygen concentrations on the cell viability. Human breast cancer cells (MCF-7) were grown under normoxic condition (21% oxygen concentration) before transferred to 21 (▽), 10 (▼), 5 (○), and 1% (●) oxygen concentrations. The Y axis, Ratio, indicates the number of viable cells at a specific culture day divided by the number of viable cells at day zero. Error bars represent the standard deviation of at least three samples taken from a single run.

네티신을 투여하지 않은 대조군에서는 Fig. 1에서와 같이 세포들이 배양 2일만에 모두 죽었으며, 제네티신의 농도가 1 $\mu$ g/ml까지는 약효가 없어 대조군과 유사한 형태로 세포들이 죽었다. 하지만 제네티신을 10 $\mu$ g/ml 이상을 투여한 경우에는 저산소 조건에서 배양 3일까지도 세포들이 살아 있었다. 이러한 결과는 제네티신이 저산소 조건에서 세포의 생존을 개선시킬 수 있다는 것을 나타낸다.



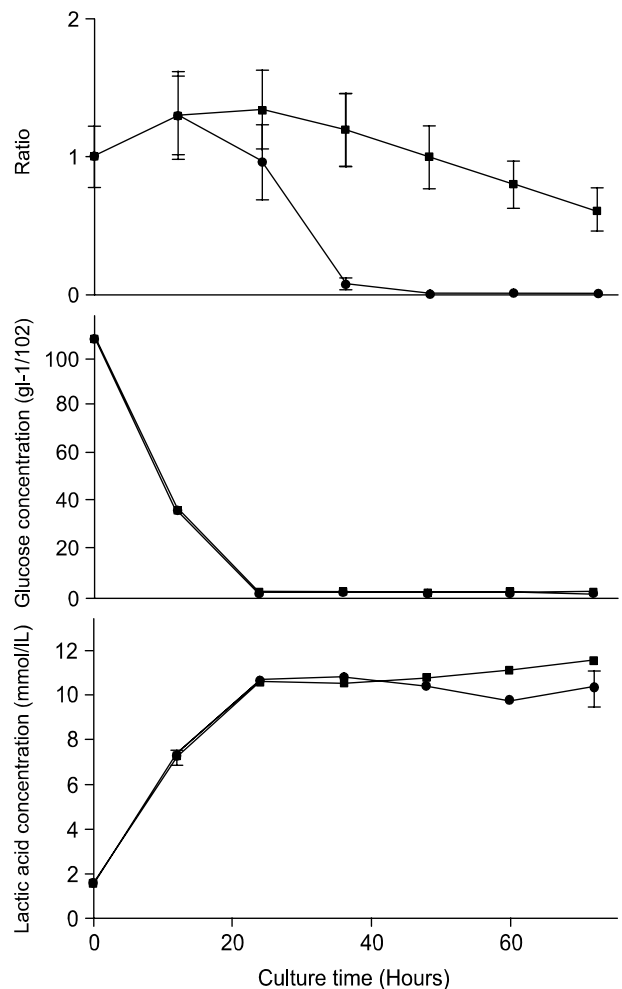
**Fig. 2.** Effect of geneticin concentrations on the cell viability under hypoxic condition. Human breast cancer cells (MCF-7) were grown under normoxic condition (21% oxygen concentration) before transferred to 1% oxygen concentration with 0 (●), 0.1 (■), 1 (▲), 10 (▼), 100 (◆) and 1,000 (○)  $\mu$ g/ml geneticin in the medium. Error bars represent the standard deviation of at least three samples taken from a single run.



**Fig. 3.** Effect of geneticin concentrations on the cell viability under normoxic condition. Human breast cancer cells (MCF-7) were grown under normoxic condition (21% oxygen concentration) with 0 (●), 1 (▲), 10 (▼), 100 (◆) and 1,000 (○)  $\mu$ g/ml geneticin in the medium. Error bars represent the standard deviation of at least three samples taken from a single run.

### 3) 정상산소 조건에서 제네티신이 세포의 생존에 미치는 영향

저산소 조건에서 제네티신이 세포의 생존을 개선시키는 것이 세포의 성장을 억제시킴으로써 에너지의 소모가 줄어들어 생긴 현상인지를 알아보기 위해 정상산소 조건에서 제네티신이 세포의 성장에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 3). 투여된 제네티신의 농도가 1,000 $\mu$ g/ml 이상일 때는 약의 독성에 의해 세포의 성장을 억제하였다. 뿐만 아니라 제네티신의 농도가 10~100 $\mu$ g/ml인 경우에는 제네티



**Fig. 4.** Cell viability, glucose consumption and lactic acid production under hypoxic condition. Human breast cancer cells (MCF-7) were grown under normoxic condition (21% oxygen concentration) before transferred to 1% oxygen concentration with 0 (■) and 10 $\mu$ g/ml (●) geneticin in the medium. Cell viability (top), glucose concentrations in the medium (middle) and lactic acid concentrations in the medium (bottom) were measured during culture. Error bars represent the standard deviation of at least three samples taken from a single run.

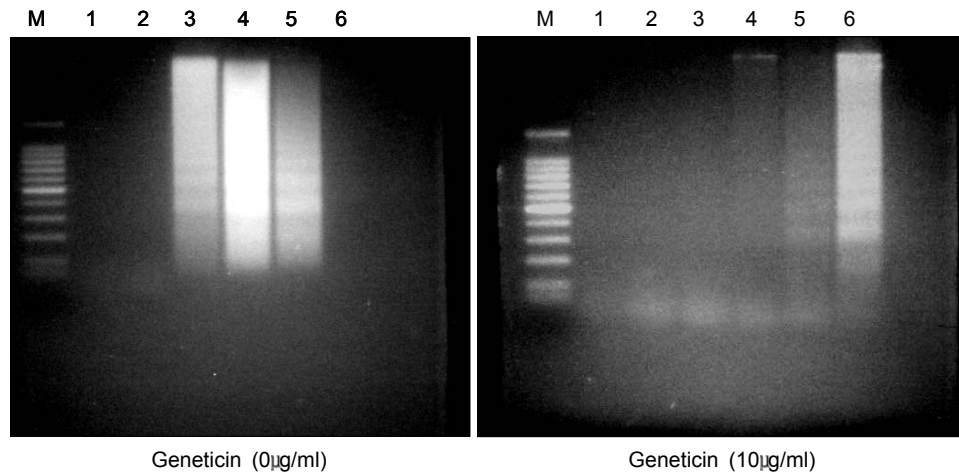


Fig. 5. DNA fragmentation assay. Human breast cancer cells (MCF-7) were grown under normoxic condition (21% oxygen concentration) before transferred to 1% oxygen concentration with 0 (left) and 10 $\mu$ g/ml (right) geneticin in the medium. At the indicated times, all the cells in the 60 mm dishes were lysed and chromosomal DNA was taken and loaded to 1.5% agarose gel. Lane M (100 bp DNA marker), Lane 1 (0), Lane 2 (24), Lane 3 (30), Lane 4 (36), Lane 5 (48), Lane 6 (72 hours of culture under hypoxia).

신을 투여하지 않은 경우에 비해 배양 후반부에는 오히려 세포의 생존율을 증가시켰다. 따라서 저산소 조건에서 제네티신의 농도가 10~100 $\mu$ g/ml 농도범위 내에서 세포의 생존을 개선시키는 것은 세포의 성장을 억제시켜 일어나는 것이 아니라 세포의 생존에 직접 영향을 미쳐 일어난 현상임을 알 수 있다.

#### 4) 제네티신이 저산소 조건에서 세포의 생존을 개선시키는 기전 연구

제네티신이 저산소 조건에서 세포의 생존을 개선시키는 기전을 알아보기 위해 우선 에너지원으로 쓰이는 배지 내 포도당 농도와 배지 내에 생성된 젖산의 농도를 측정하였다(Fig. 4). 이미 Fig. 2에서 보여 준 바와 같이 제네티신을 투여하지 않은 대조군에서는 세포들이 배양 1일 후에 모두 죽었으나 제네티신을 10 $\mu$ g/ml를 첨가한 실험군에서는 세포의 생존이 개선되었다(Fig. 4-top). 제네티신을 투여하지 않은 대조군에서 세포가 죽는 것은 에너지원인 포도당이 모두 고갈되어 일어났다(Fig. 4-middle). 하지만 제네티신이 투여된 경우에는 포도당이 모두 고갈되었음에도 불구하고 세포가 살아있었다. 한편, 생성된 젖산은 제네티신의 투여와는 상관없이 동일하였다(Fig. 4-bottom).

이러한 결과로부터 제네티신이 세포의 생존을 개선시키는 것은 포도당 소모 속도, 젖산 생성 속도와 상관없이 일어나는 현상임을 알 수 있다. 에너지원인 포도당이 고갈되면 보통의 경우에는 세포들이 죽는데도 불구하고 제네티신이 세포를 살아있게 하는 원인을 찾기 위해 세포자살(apoptosis)의 발생유무를 나타내는 DNA fragmentation assay

를 Fig. 4와 동일한 실험조건에서 실시하였다(Fig. 5). 제네티신을 투여하지 않은 경우에는 저산소 조건에서 30시간 이후부터 세포자살을 나타내는 DNA laddering이 뚜렷하게 나타나는 반면(Fig. 5-left) 제네티신을 첨가한 경우에는 36시간 후부터 서서히 나타나다가 72시간 후에 가장 뚜렷하게 나타났다(Fig. 5-right). 이는 저산소 조건에서 포도당이 떨어질 때 세포가 죽는 것은 세포자살이라고 보아야 하며, 제네티신에 의해 세포의 생존이 개선되는 것은 세포자살을 억제하여 일어나는 현상임을 알 수 있다.

## 고 찰

본 연구에서는 항생제로 개발된 aminoglycoside 계열인 제네티신이 저산소 조건에서 세포생존에 미치는 영향에 대하여 사람의 유방암 세포를 이용하여 조사하였다. 본 실험에서 제네티신을 10 $\mu$ g/ml 농도로 배양배지에 첨가하면 정상 산소농도에서 세포의 생존에는 영향을 미치지 않으면서도 저산소 조건에서 세포의 생존을 개선시키는 것이 확인되었다. 이렇게 세포의 생존을 개선시키는 기전은 에너지원인 포도당이 고갈되었는데도 불구하고 세포자살을 억제하여 일어났다.

이러한 결과는 임상적으로 여러 가지 의미를 가지게 된다. 첫 번째로 유방암과 같은 고형암인 경우에 고형암 내부에는 산소와 포도당의 공급이 줄어들어 산소와 포도당이 부족한 부분이 조직 내에 존재한다.(6) 이 때 암을 치료하기 위한 화학요법을 시행 중이거나 또는 감염을 방지하기 위해 항생제를 사용하는 경우에 제네티신을 포함한

aminoglycoside 계열의 항생제를 사용하면 암의 특정한 부위에서는 오히려 암세포를 살릴 가능성이 존재하므로 가능하면 이러한 항생제의 사용은 억제하는 것이 좋으리라 생각한다. 실제로 항생제로 직접 사용되고 있는 aminoglycoside 계열의 항생제들 중에서 겐타마이신(gentamicin)도 비록 고농도(100~1,000 $\mu$ g/ml)에서이긴 하지만 저산소 조건에서 세포의 생존을 개선시키는 효과가 있었다.(4) 두 번째로 제네티신이 저산소 조건에서 포도당이 고갈된 상태에서도 세포의 생존을 개선시키는 것은, 혈관이 막혔을 때 일어나는 허혈성 질병이 발생하는 조건과 동일한 조건에서 세포의 생존을 개선시키는 것을 나타낸다. 따라서, 비록 사용된 세포가 유방암 세포를 이용하였다하더라도 이러한 결과는 제네티신이 허혈성 질병의 치료에 사용될 수 있다는 것을 시사한다.(8)

제네티신이 항균작용을 나타내는 것은 세균(bacteria)의 30S subunit와 결합하여 translation에서의 elongation을 방해함으로써 그 효과를 나타낸다. 제네티신이 항균작용 이외에 세포의 대사에 영향을 미친다는 것은 최근에 Valera(9) 등에 의해서도 보고되었다. 즉 제네티신(G418)에 저항성을 가지는 neomycin resistance gene (*neo*<sup>r</sup>)을 세포로부터 발현시킨 후 이것을 G418로 처리한 경우 이 세포가 젖산을 적게 분비한다는 것이 관찰되었다. 이 때 이러한 대사에 영향을 미치는 것은 *neo*<sup>r</sup> gene으로부터 발현되는 3'-glycosyl phosphotransferase 효소가 아니라 투여된 G418 자체라는 것은 본 연구실에서의 또 다른 실험으로부터 밝혀졌다.(4) 뿐만 아니라 세포배양 시 투여된 제네티신이 glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored alkaline phosphatase (AP)의 유전자 발현에도 영향을 미친다는 것이 밝혀졌다.(10) 이는 제네티신이 항생제 효과 이외에 에너지대사 뿐만 아니라 유전자의 발현에도 영향을 미치는 등 세포의 생리에도 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 항생제들이 미생물을 죽이는 항생제 원래의 역할 이외에도 다양한 효과를 나타낸다는 것을 보여주며 이것들을 의학에 이용하고자 하는 연구가 보다 활성화되어야 할 것으로 생각한다.

## 결 론

항생제의 일종인 제네티신은 저산소 및 저포도당 농도에서 유방암 세포 MCF-7의 생존율을 포도당이 고갈된 상태에서도 증가시켰으며, 이러한 효과는 제네티신이 세포자살을 억제하였기 때문이었다.

이 결과는 생체 내에서 저산소 및 저포도당 농도가 일어나는 고형암에서 항생제가 그 영향을 미치리라는 것을 암시한다. 즉 저산소 및 저포도당 조건이 나타나는 고형암 환자에서의 항생제 사용이 고형암 세포의 생존을 향상시키는 부작용으로 작용할 가능성이 있음을 나타낸다. 반면에 혈관이 막혀 혈액 공급이 되지 않음으로써 생기는 허혈성 질병에 대해서는 세포의 생존을 증가시킴으로써 치료제로 사용될 가능성이 있다. 따라서, 질병에 대해서 여러 가지 영향을 미칠 것으로 예상되는 제네티신을 포함한 항생제들에 대해 보다 심도 깊은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각한다.

## REFERENCES

- 1) Madigan MT, Martinko JM, Park J. Brock Biology of Microorganisms. 8th ed. New Jersey. Prentice Hall International, Inc. 1997. p.414-20.
- 2) Sande MA, Mandall GL. Antimicrobial Agents: the Aminoglycosides, In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds.). Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th ed. New York. Pergamon Press. Inc. 1991. p. 1098-116.
- 3) Marquez JA, Wagman GH, Testa RT, Waitz JA, Weinstein MJ. A new broad spectrum aminoglycoside antibiotic, G-52, produced by Micromonospora zionensis. J Antibiot (Tokyo) 1976; 29(5):483-7.
- 4) 한미정. 1999. 유전자 조작을 통한 동물세포의 생존능 개선연구. 석사학위 논문.
- 5) 김명섭. 2000. 저산소 조건에서 항생제인 geneticin (G418)에 의한 쥐 신경교종세포(C6)의 생존 개선연구. 석사학위 논문.
- 6) Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. Mol Med Today 1999;6:157-62.
- 7) Mueller-Klieser W. Tumor biology and experimental therapeutics. Crit Rev Oncol Hematol 2000;36:123-39.
- 8) Golding EM, Vink R. Inhibition of phospholipase C with neomycin improves metabolic and neurologic outcome following traumatic brain injury. Brain Res 1994;668(1-2):46-53.
- 9) Valera A, Perales JC, Hatzoglou MF, Bosch. Expression of neomycin-resistance (*neo*) gene induces alterations in gene expression and metabolism. Hum Gene Ther 1994;5:449-56.
- 10) Küng M, Stadelman B, Brodbeck U, Büttikofer P. Addition of G418 and other aminoglycoside antibiotics to mammalian cells results in the release of GPI-anchored proteins. FEBS Lett 1997;409:333-8.