

## ***Bacillus* spp. or *Bacillus* spp.-Derived Membrane Vesicles Induce the Intrinsic Pathways of Apoptosis of Human Colon Cancer Cell Lines**

Miso Yang, In-Taek Jang, Hwa-Jung Kim and Jeong-Kyu Park\*

Department of Microbiology, of Medical Science, Cancer Research Institute, School of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

The striking increase in colorectal cancer (CRC) has shown the great fatality in Korea for more than 15 years. The leading edge of this rising incidence rate is mainly due to the people's dietary changes in Korea. Some studies have reported that the dietary fiber does not have significant cytotoxic effects on CRC cells, which contrasts to the effects of probiotics. It gives a positive evaluation that the nonpathogenic spore-forming *Bacillus* species among the probiotics including fermented bacteria might have optimistic effects on CRC incidence rate. Recently, we isolated *Bacillus lentus* (BL) from Korean soybean fermented food. BL showed the cytotoxic effect on human colon carcinoma cell lines HCT116 and SW480. Interestingly, BL did not have effect on human dermal fibroblast cells and human hepatoma cell line HepG2. It suggested that BL has the target cell-specific cytotoxicity toward human colon carcinoma cells. To clarify the death signaling pathway underlying the BL-induced apoptosis in cancer cells, we analyzed the expression of caspases, Bax and Bcl-2 by western blotting. The apoptotic effects by cytotoxic elements were executed by direct BL contact or membrane-derived vesicles isolated from BL. Treatment of HCT116 with BL activated caspase-9, -3 and increased cleavage form of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). However, caspase-8 activity was not increased by BL. BL-activated intrinsic pathway increased the pro-apoptotic Bax, decreased the anti-apoptotic Bcl-2 proteins on mitochondria, disrupted the mitochondrial membrane potential, and then released the cytochrome c from mitochondria. The membrane-derived vesicles (MVs) from BL induced apoptosis of the HCT116. Here, we propose that BL as a strong candidate for the development of apoptosis-specific anti-tumor agent will give great contribution to the understandings of the tumor-microbe interdisciplinary areas.

**Key Words:** *Bacillus* spp., Membrane vesicles, Human colon cancer cell lines, Apoptosis

### INTRODUCTION

우리나라의 2013년 대장암 유병률이 남성에서는 위암 다음으로 2위이며 여성에서는 갑상선암, 유방암 다음으로 3위 이었다. 우리나라 호발암의 경우 위암 및 간암은 감

소 추세를 보이고 있으나 대장암은 증가하고 있다. 우리나라도 식생활 습관이 서구화되면서 대장암이 급격히 증가하여 최근에는 유병률이 미국보다 오히려 높아졌다 (1).

대장암의 경우 결장세포가 발암물질에 장기간 노출되면 악성세포로 전환될 수 있다. 그러므로 환경과 유전적 소인의 상호작용으로 암이 발생될 수 있다. 대장암의 환경

Received: April 27, 2016/ Revised: May 3, 2016/ Accepted: May 27, 2016

\*Corresponding author: Jeong-Kyu Park, M.D. & Ph.D. Department of Microbiology, School of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea.

Phone: +82-42-580-8244, Fax: +82-42-585-3686, e-mail: jekpark@cnu.ac.kr

\*\*This work was supported by research fund of Chungnam National University.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

적 요인 중에서는 식생활이 매우 중요한 위험인자이다. 대장암의 5%는 유전적 소인과 관계가 있지만 대부분은 흡연, 술, 붉은살고기(red meat)의 과다 섭취 및 장관 정상 균무리의 구성 변화 등 환경의 영향과 관계가 있다. 육식이 채식에 비하여 대장암 유병률이 높다. 붉은 고기의 섭취량에 따라 다르지만 고기의 섭취가 대장암 발생 위험을 10~30% 더 높인다 (2). 양고기를 많이 먹는 아랍인은 대장암의 발생빈도가 매우 낮고, 소고기 섭취가 많은 인도 무슬림은 다른 인도사람에 비하여 발생빈도가 높아 소고기 섭취가 대장암 발생과 관계가 있다. 한국과 일본은 1975년 이전은 대장암 발생빈도가 낮았다. 일본은 그 후 20년 동안 대장암 유병률이 2배로 증가하였으며 한국은 일본보다 20년 후인 1995년 이후부터 일본과 같이 2배로 증가하였다. 이와 같은 증가에는 소고기와 돼지고기의 수입증가가 선행되었다. 또한 소고기 섭취증가와 유방암, 난소암, 전립선암, 폐암 등과는 뚜렷한 관계가 없었다고 한다. 붉은고기의 조리과정에서 발생된 발암물질의 섭취에 의한 결장세포의 유전체 불안정 유도가 대장암과 관계가 있다 (3).

대장암 발생의 환경인자로 장관 미생물의 구성 변화가 관여된다. 아프리카인은 고기 섭취를 많이 하는 아프리카 미국인과 백인미국인에 비하여 대장암 발생빈도가 매우 낮으며 섬유소로부터 butyrate를 생산하는 장내세균이 훨씬 많다 (4). Butyrate는 대장점막의 건강유지와 항염증 및 항암능력이 있다. 대장의 butyrate는 음식 섭취로 얻어지는 것이 아니고 대장의 정상 균무리에 의하여 식이섬유로부터 생산된다 (5). 섬유소는 대변량을 증가시키고 장통과를 촉진하여 장관 내 발암물질에 대한 장 상피세포의 노출을 감소시키는 기능이 있다. 그러나 많은 관찰연구에서 식이섬유 또는 isoflavone이 함유된 콩식품의 섭취가 대장암 예방효과를 보이지 않았다 (6). 또한 브로콜리, 양배추, 꽃양배추 등 십자화과 식물의 섭취도 대장암 발생률과 상관관계가 없었다 (7). 그러므로 장관 정상 균무리의 변화가 대장암 발생과 더 밀접한 관계가 있다고 생각된다.

최근 우리나라의 대장암 발생증가는 경제적인 발달과 세계화에 따라 식생활이 김치, 된장 및 청국장 등의 발효식품의 섭취가 줄고 대신 소고기 및 돼지고기 등 육식의 증가로 대장 정상 균무리의 변화가 원인이 될 것으로 생각된다. 프로바이오틱스는 대장 균무리의 균형을 증진시켜 숙주에게 유익을 주는 살아있는 미생물을 지칭한다. 프로바이오틱스의 대부분을 유산균(lactic acid bacteria;

*Lactobacillus* species)이 차지한다. 유산균에 의한 암의 예방효과는 관찰할 수 없다 (8)고 한다. 식이섬유는 대장암 발생률을 낮추지 못하고 김치 유산균은 상반된 연구결과가 있으므로 1975년 이전 우리나라의 낮은 대장암 발생률은 발효식품에 존재하는 아포형성 *Bacillus* species의 역할로 판단되어 연구 대상으로 선정하게 되었다. 바닷물에서 분리 배양된 *Bacillus* SW31의 배양액에 두경부암세포를 세포자멸사시키는 물질이 있고 (9), 또 다른 보고에서는 바닷물에서 분리 배양된 *Bacillus vallismortis* 배양액에서 ethyl acetate로 추출한 추출물이 세포자멸사 특이 항종양 활성이 있다 (10)고 한다. *Bacillus polyfermenticus*의 배양액도 대장암세포주(HT-29, Caco-2 cells)의 성장을 억제시킬 수 있었다 (11)고 한다.

본 연구자들은 우리나라 전통발효식품인 청국장에서 BL을 순수분리 배양하였다. BL은 정상세포인 HDF (human dermal fibroblast)에는 세포독성을 보이지 않았다. 암세포 중에서는 HepG2 (human hepatoma)에는 세포독성이 없었으나 HCT116 (human colon cancer)과 SW480 (human colon adenocarcinoma) 등의 대장암세포주에 세포독성 효과가 있음을 발견하였다. 이에 본 연구에서는 우리나라 전통발효식품 발효균 중 하나인 BL을 대장암의 예방 및 치료에 적용하고자 BL에 의한 대장암세포주에 대한 세포자멸사 (apoptosis) 유도기전을 규명하고자 하였다.

## MATERIALS AND METHODS

### *Bacillus* spp. 및 균막소포의 준비

청국장에서 분리한 BL을 Luria-Bertani (LB) 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 새로운 배지에 1:100의 비율로 계대 배양하였다. 세균이 정지기에 도달하는 600 nm에서 Optical Density (OD)가 1이 될 때까지 배양한 후 4°C에서 3,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 세균을 수확하였다. 세균은 phosphate buffered saline (PBS)로  $1 \times 10^7$ /ml의 농도로 현탁한 후 얼려서 stock으로 보관하여 사용하였다. BL로부터 균막소포의 분리는 다음과 같이 실시하였다. BL 배양액을 4°C에서 10,000 g 속도로 20분간 원심분리하여 배양상청액을 분리한 후, 0.45  $\mu$ m 여과지로 1회 여과하고, QuixSand System (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, USA)을 사용하여 분자량 100 kDa 이하의 균막소포를 25배로 농축하였다. 농축여과액을 0.22  $\mu$ m 여과지로 1회 여과한 후 4°C에서 150,000 g 속도로 3시간 동안

초원심분리하고 그 침전물을 PBS에 부유하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

#### 세포주 및 세포의 배양

본 실험에 사용된 HDF, HCT116, HepG2, SW480E, SW-480R 등 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA)로부터 분양 받아 사용하였다. 세포 배양은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, HyClone, Pittsburgh, USA)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, HyClone, Pittsburgh, USA), penicillin (100 units/ml), 그리고 streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ )을 첨가한 배지를 사용하여 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에서 배양하였다. 세포 밀도가 높아지면 수분간의 trypsin 처리(0.05% trypsin, 0.02% EDTA)로 세포를 떼내어 계대 배양 하였으며, 모든 실험에는 계대 배양 15번 이내의 세포를 사용하였다.

#### 세포사멸의 측정

세포의 생존율은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, St. Louis, USA) assay로 측정하였다. 즉 96 well microtiter tissue culture plate (Falcon, Tewksbury, USA)에 HDF, HCT116, HepG2, SW480E, SW-480R 등 세포를  $1\sim 10 \times 10^3$  cell/well로 분주하고, 균을 처리한 후 일정시간 동안 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에서 배양하였다. 이들 세포를 PBS로 수회 세척하고 MTT (0.5 mg/ml) 용액으로  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 반응시켰다. 상청액을 제거

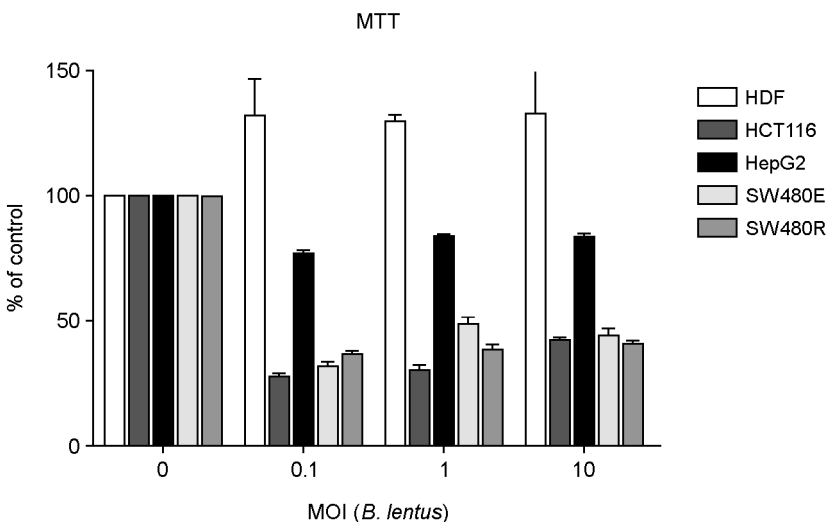
한 다음 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Pierce, USA)를 넣고 실온에서 formazan 결정을 녹인 후 ELISA reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 유세포 분석을 이용한 세포자멸사 및 세포괴사 분석

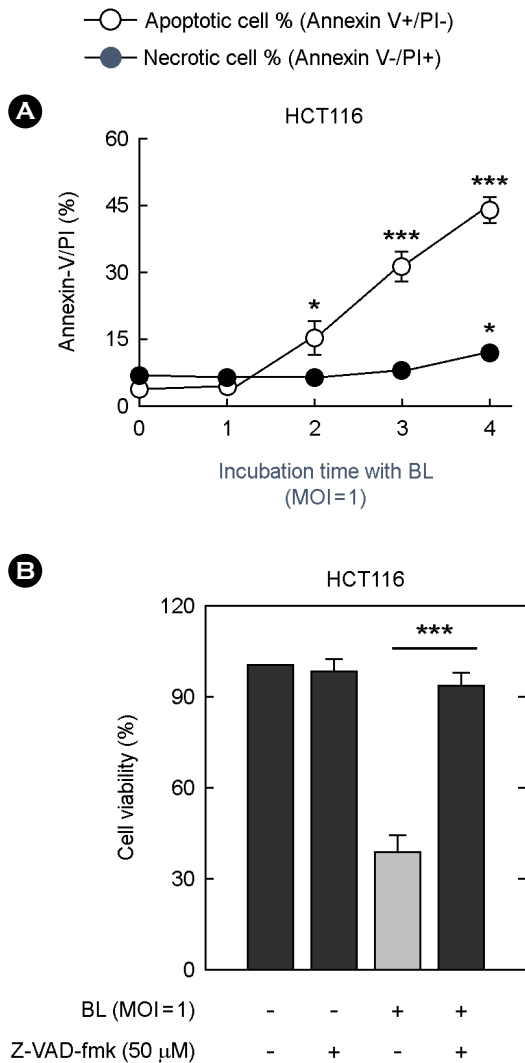
BL 감염에 의한 대장암세포의 세포자멸사 및 세포괴사는 Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, San Diego, USA)를 이용하여 분석하였다. 약술하면, 배양한 BL 균주를 대장암세포에 감염다중도별로 감염시키고 36시간 후에 trypsin/EDTA를 사용하여 세포를 모은 후 PBS로 2회 세척하였다. 세척한 대장암세포주는 Annexin V와 propidium iodide (PI)를 넣고  $4^{\circ}\text{C}$  암실에서 30분 동안 정치시킨 후 PBS로 3회 세척한 후에 유세포 분석기(FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### 세포자멸사 신호전달 기전 분석

세포를 모아 PBS로 2회 세척한 후 lysis buffer (125 mM NaCl, 20 mM NaF, 1 mM EDTA, 15 mM sodium pyrophosphate, 1 mM benzamidine, 2  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 0.1 mM PMSF, 50 mM Tris pH 7.5)로 처리한 후 15,000  $\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리하여 그 상청액을 본 실험의 단백질 시료로 사용하였으며 사용 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. Western blotting은 30~80  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 8~15% SDS-PAGE에 전기영동하여 분리한 다음 분리된 단백을 전기적 전사법으로 nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, USA)에 옮겼다.



**Figure 1.** *B. lentus* (BL)-induced cytotoxic effects on human dermal fibroblast (HDF) cells and human cancer cell lines HCT116, HepG2, SW480E, SW480R. Cells ( $5 \times 10^4$  cells per well in 96-well plate) were treated with a various MOI (0.1, 1, or 10) of BL for 72 hours. Cell survival was determined using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.



**Figure 2.** *B. lentus* (BL)-induced apoptosis in cancer cells. (A) After treatment with BL (MOI=1) for the indicated times, HCT116 cells were fixed, stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated annexin V and PI, and analyzed by Flow cytometry. Data are the mean  $\pm$  SD of five experiments. The result demonstrated the percentage of the ratio of cells in apoptosis and necrosis. (B) HCT116 cells were pretreated with 50  $\mu$ M z-VAD-fmk (a pan-caspase inhibitor) for 45 min and then treated with BL (MOI=1) for 3 days. Cell survival was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays. The mean levels of cell viability following medium were set to 100, and the relative loss of cell viability in presence of BL or inhibitor is shown.

전사된 membrane을 0.1% Tween 20, 5% skim milk가 포함된 Tris-buffered saline (TBS, pH 7.6)로 실온에서 1시간 동안 blocking한 다음, 일차항체를 가해 4°C에서 12시간 반응시

켰다. 그 다음 TBS/T (TBS containing 0.1% tween 20)로 3회 세척하고 Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 TBS/T로 5회 세척하고 Enhanced Chemiluminescence system (ECL, Millipore, Billerica, USA)을 이용하여 X-ray film에 감광하였다.

**RESULTS**

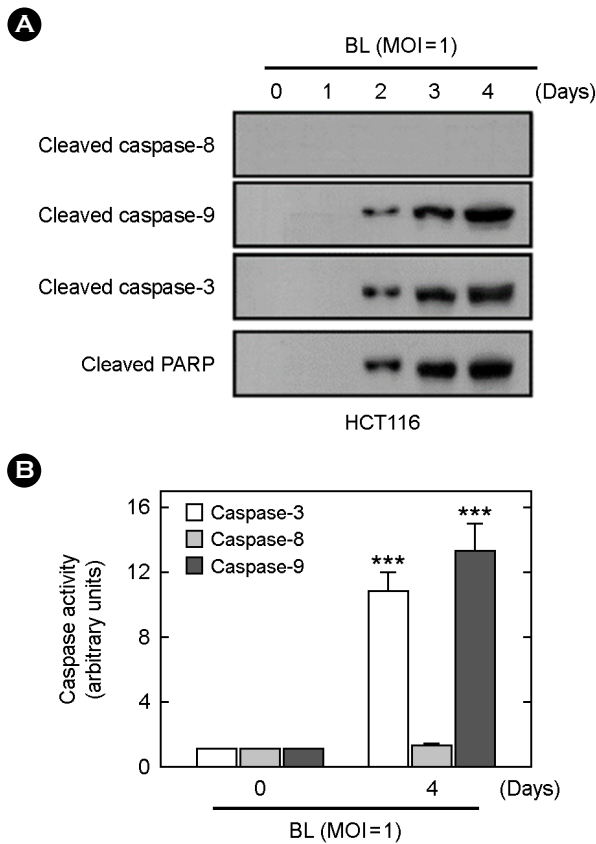
**BL에 의한 대장암세포의 선택적 독성능**

HCT116, HepG2, 그리고 SW480 E/R을 배양한 후 BL을 감염다중도(Multiplicity of Infection, MOI) 0.1, 1, 그리고 10의 농도로 처리하여 24시간 배양 후 MTT assay로 세포독성을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과 대장암세포주인 HCT116과 SW480E/R 세포에서는 최소감염농도인 MOI=0.1 감염조건에서부터 세포독성이 관찰되었으나 간암세포주인 HepG2는 MOI=10의 처리농도에서도 세포독성이 관찰되지 않았다. 따라서 BL은 대장암세포에 특이적인 세포독성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

상기 실험에서 BL 감염 시 대장암세포주에서 세포사가 유도되었으며, 특히 HCT116 세포주의 세포사가 현저히 증가됨이 관찰되었다. 따라서 BL 감염에 의해서 유도된 종양세포의 세포사가 세포자멸사 또는 세포괴사에 의해서 유도되는지를 확인할 필요가 요구되었다. HCT116 세포주에 BL을 MOI=1의 비율로 감염시키고, 각각 0, 24, 48, 그리고 72시간 후에 세포를 모아 Annexin V와 PI로 염색하여 유세포 분석기를 이용하여 세포사를 확인하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 BL 감염에 의한 종양세포의 세포사는 세포괴사 보다는 세포자멸사에 의해서 유도된다는 것을 알 수 있었다. 또한, 종양세포에 pan caspase inhibitor인 zVAD-fmk를 45분간 전처리 한 후에 BL 균주를 MOI=1의 비율로 감염시키고 72시간 후에 유세포 분석기를 이용하여 세포사가 회복되는지를 확인하였다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 BL 감염에 의한 종양세포의 세포사는 z-VAD-fmk 처리 시에 확연하게 억제된 것을 관찰할 수 있었다. 그러므로 BL 감염에 의한 종양세포의 사멸은 세포자멸사에 의한 것으로 확인되었다.

**BL에 의한 세포자멸사 유도 신호전달 기전**

BL에 의한 암세포의 세포자멸사 기전을 분석하기 위하여 caspase cascade의 활성화(Fig. 3)과 Bcl-2족 단백질의



**Figure 3.** *B. lentus* (BL)-induced mitochondria-dependent apoptosis in HCT116. (A) HCT116 cells were treated with BL (MOI=1) for the indicated times. The cells were harvested and subjected to Western blot analysis for cleaved caspase-8, -9, -3, and PARP. (B) Caspase-3, -8, and -9 activities were determined using the caspase-3, -8, or -9 fluorogenic peptide substrates DEVD-AFC, IETD-AFC, and LETD-AFC, respectively.

활성(Fig. 4)을 조사하였다. 배양된 HCT116 세포주를 MOI=1의 BL로 0, 1, 2, 3, 그리고 4일 동안 감염시킨 후 caspase-8, -9, -3, phosphorylated Bcl-2, Bcl-2, Bcl-XL, Bax 그리고 cytochrome c의 1차 항원과 각각 반응시켰다. 그리고 caspase-8, -9, -3과 PARP의 cleavage를 알아보았다. 감염시간의 증가에 따라 caspase-9과 caspase-3의 cleaved caspase의 양이 증가하여 BL 감염시간의 증가와 cleaved caspase의 양이 비례함을 관찰하였다(Fig. 3A). Caspase-3의 활성은 PARP cleavage를 통해 조사하였다. Caspase-3의 upstream 활성제는 BL 처리에 다르게 조절되었다. Caspase-8과 -9의 활성도 조사하였다. 4일 동안의 BL 처리 후 caspase-9은 13-fold 정도 증가되어 관찰되었다. 이러한 증

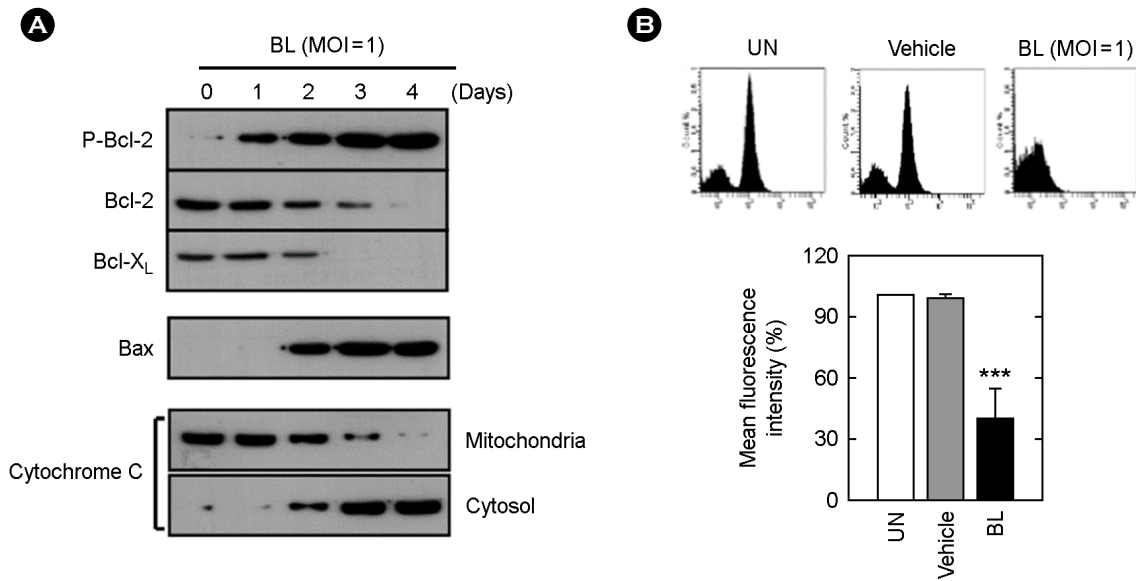
가된 caspase-9의 활동은 시간의 증가와 비례하였지만 caspase-8의 활동은 증가하지 않았다(Fig. 3B). Caspase-9을 통한 BL의 세포자멸능을 근거로 하여, mitochondria-mediated 세포자멸 기전을 분석하였다. Bcl-2족 단백질인 Bcl-2, Bcl-2, Bcl-XL, Bax 1차항원을 BL로 처리된 HCT116 세포주에 반응시켜 웨스턴 블롯으로 분석하였다. BL이 phosphorylation Bcl-2 (Ser70)을 유도하고 Bcl-2와 Bcl-XL 단백질을 down-regulation하며 감염시간과 비례하게 Bax 단백질을 up-regulation 하였다(Fig. 4A). Apoptogenic factor인 미토콘드리아에서 cytochrome c의 발현을 세포 부분분리 방법으로 조사하였다. 미토콘드리아에서의 cytochrome c의 발현은 BL 처리시간과 비례하여 관찰되었다. Bcl-2는 Bax의 활성을 억제시키고 미토콘드리아 막전위를 감소시키며 궁극적으로는 cytochrome c의 발현을 유도하였다. 미토콘드리아 막전위에 관여하며 미토콘드리아에 축적되어 있는 rhodamine123을 이용하여 HCT116 세포주의 형광강도를 유세포 분석하였다. BL 처리 후 HCT116 세포주의 형광강도는 급격하게 감소하였다(Fig. 4B). 이러한 결과들은 BL에 의한 HCT116 세포의 세포자멸사는 미토콘드리아 막전위의 붕괴와 그에 따른 cytochrome c에 의존하는 caspase-3, Bcl-2족 단백질의 활성과 연계되었다.

#### 세균 막소포에 의한 대장암세포주 독성능

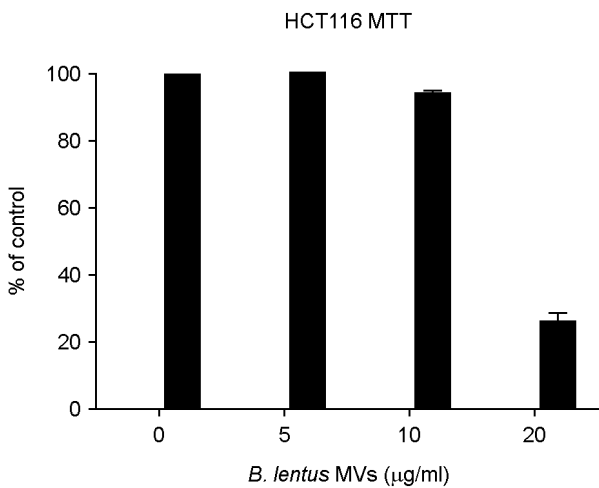
세균 막소포가 대장암세포의 세포독성에 미치는 영향을 MTT assay를 이용하여 평가하였다. 대장암세포주인 HCT116에 BL 균주에서 정제된 세균 막소포를 20 µg/ml의 농도로 48시간 처리하면 급격한 세포자멸사가 관찰됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

## DISCUSSION

대장암의 유병률이 1999년 10만 명당 남자가 27.0명, 여자는 17.1명이었으나 13년 후인 2012년 남자는 69.3명, 여자는 45.9명으로 2.5배 이상 급속히 증가하였다. 2011년 한국인과 일본인을 포함한 아시아계미국인 남자의 대장암 유병률이 38.3명이었고 여자의 경우 27.8명인 것에 비하면 최근 우리나라의 대장암 유병률은 매우 높다 (12~14). 이러한 변화는 김치, 된장 및 청국장 등의 발효식품의 섭취가 줄고 대신 소고기 및 돼지고기 등 육식의 증가로 대장 정상 균무리의 변화가 원인일 것으로 생각되었다 (15). 초기 대장암의 5년 생존률은 75~90%이지만 진행된 암



**Figure 4.** The effect of *B. lentus* (BL) on Bcl-2 family members and on cytochrome c release. (A) At the indicated time points after treatment with BL (MOI=1), the cells were harvested and subjected to Western blot analysis for phosphorylated Bcl-2, Bcl-2, BCL-XL, and Bax. Subcellular fractions were prepared as described in Materials and Methods. Cytochrome c release from mitochondria to cytosol was analyzed using anti-cytochrome c antibody. (B) The effect of BL on mitochondrial transmembrane potentials ( $\Delta\psi_m$ ) in HCT116 cells. The Cells were treated with and without BL (MOI=1). After 4 days, cells were incubated with 10  $\mu$ M rhodamine123 for 20 min and scored immediately by flow cytometry. Mean fluorescent intensity in HCT 116 cells was determined by flow cytometry (Bottom).



**Figure 5.** Cytotoxic effects of membrane vesicles (MV) from *B. lentus* (BL) on human colorectal cancer cell line HCT116. Cells were treated with various concentrations of BL OMV (5, 10, 20  $\mu$ g/ml) for 48 h. Cell survival was determined using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays were conducted on HCT116 cells as described in Materials and Methods.

은 15% 미만이다. 그러므로 조기진단이 매우 중요하다 (16). 그러나 대장암의 중앙형질전환 기간을 10~15년으로 생각하고 있음 (17)으로 대장암의 예방을 위하여 위험인자를 피하거나 막을 수 있는 연구가 현재 우리나라에서는 절실히 요구되고 있다.

대장암은 95% 이상이 뚜렷한 유전적 영향 없이 발생되며 대장암의 위험인자로는 식생활, 술, 흡연 및 약물 등이 지지를 받고 있다. 붉은 고기의 섭취는 1.13배 그리고 흡연은 1.26배로 유병률이 증가된다 (18)고 한다. 그러므로 식생활의 변화에 의한 대장 정상 균무리의 역할이 더욱 중요한 요인으로 생각되었다. 프로바이오틱스는 장관 균무리의 구성을 변화 시킬 수 있을 뿐만 아니라 대사산물을 생산한다. 장관 균무리의 대사산물은 장관장벽의 기능을 증진시키고 장관의 만성염증을 감소시킨다. 프로바이오틱스가 대장암 발생을 억제하는 기전으로는 붉은 고기에 의하여 유도되는 결장세포 DNA 손상에서 보호할 수 있으며 장관에서 생산되는 butyrate는 대장암 발생 위험을 감소시킬 수 있다고 한다. 그러나 일부 보고에서는 대장암 발생의 위험을 감소시키지 못하였다 (19)고 한다.

우리나라 김치에서 *Lactobacillus* species, *Leuconostoc* species, *Weissella* species 등의 유산균과 *B. licheniformis*, *B. pumilus* 등이 분리 배양되었다 (20, 21). 우리나라 된장에서는 *Leuconostoc mesenteroide*, *Tetragenococcus halophilus*, *Enterococcus faecium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* 등의 발효균과 *Mucor plumbeus*, *Aspergillus oryzae*, *Debaryomyces hansenii* 등의 진균이 분리 배양되었다 (22). 청국장에서는 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. polyfermenticus*, *B. thuringiensis* 등이 분리 배양되었다 (23). 식이섬유는 대장암 발생률을 낮추지 못하고 김치 유산균은 상반된 연구결과가 있으므로 1975년 이전 우리나라의 낮은 대장암 발생률은 전통발효식품 발효균 중 비병원성 아포형성 *Bacillus* species가 대장암 발생을 억제할 수 있었다고 생각되었다.

본 연구자들은 우리나라 전통발효식품인 청국장에서 BL을 순수분리 배양하였다. BL은 정상세포인 HDF에는 세포독성을 보이지 않았다. 암세포 중에서는 HepG2에는 세포독성이 없었으나 HCT116과 SW480에는 세포독성을 보여 선택적으로 대장암세포주에 세포독성 효과가 있음을 발견하였다. BL에 의한 세포독성 효과가 HCT116이 SW480 보다 더 많이 관찰되어 본 연구에서는 HCT116을 대상으로 하였다. HCT116의 세포독성을 유세포 분석기로 확인한 결과 세포자멸사에 의한 것이었다. BL에 의한 암세포 세포자멸사의 기전을 분석하기 위하여 caspase cascade의 활성을 웨스턴 블롯을 이용하여 평가하였다. 그 결과 BL에 의한 HCT116 세포의 세포자멸사는 미토콘드리아 막전위의 붕괴와 그에 따른 cytochrome c에 의존하는 caspase-3, Bcl-2족 단백질의 활성화와 연계되었다. 일반적으로 세균에 의한 암세포의 사멸은 세포자멸사에 의하여 유도된다 (24). *B. pumilus*에서 분리한 Bis phthalate는 K562 세포에서 세포자멸사를 유도하였다 (25). 세포자멸사는 세균의 여러 가지 인자에 의하여 anti-apoptotic Bcl-2가 억제되고, mitochondrial outer membrane에 있는 pro-apoptotic Bax와 Bak가 활성화되면 cytochrome C가 세포질로 유리되고 caspase-9과 caspase-3가 활성화되어 유도된다.

HCT116 암세포의 세포자멸사를 유도하는 BL의 인자로 세균막소포(membrane-derived vesicles; MVs)를 분리하여 확인하였다. SDS-PAGE에서 몇 가지 밴드를 확인할 수 있었고 주요 밴드는 약 26 kDa이었다. BL에서 정제된 세균막소포는 20 µg/ml에서 HCT116 대장암세포주의 급격한 사멸을 유도하였다. *B. subtilis*도 다른 그람양성균의 막

소포와 유사한 막소포를 생산하였다 (26)고 한다.

형질전환 과정에 있는 세포의 세포자멸사 이상이 대장암의 원인이 될 수 있다 (16). 우리 전통발효식품에 있는 아포형성 BL는 대장암의 발생을 억제할 수 있었다. 또한 대장암 환자에게 경구투여하여 암조직으로 전파(translocation)시켜 암을 치유하는 암의 미생물치료제로 활용할 수 있다고 생각된다. 세균을 암치료에 사용하는 것은 새로운 개념이 아니다. 1868년 독일인 의사 W. Bush가 암을 치료할 목적으로 세균을 감염시켜 환자를 치료하였으며, 30년 후 미국의 외과의사 William B. Coley는 *Streptococcus pyogenes*가 감염되어 치료된 암 환자를 경험한 후 세균으로 암 환자를 치료하기 시작하였다. 세균은 능동적이고 고도의 선택적인 방법으로 특정 숙주세포에 부착하고 증식하여 균무리를 이룬다. 이 특성을 이용하여 non-invasive diagnostic tests, 암의 치료 및 암 백신의 개발에 응용되고 있다. BCG는 표재성방광암의 확립된 치료법으로 임상에서 사용되고 있으며, *Clostridia*, *Bifidobacteria*와 *Salmonella*는 고형암에 집락(colonization)을 형성하여 종양세포를 사멸시킨다. 비병원성 *Clostridia*는 암치료에 광범위하여 사용되고 있다 (24).

본 연구에 사용된 BL은 한천구멍확산억제 시험과 초과리장관에서 *Salmonella* Typhimurium의 감염을 제어하는 능력이 있었다 (27). 이에 더하여 이 BL은 균 또는 균에서 유래된 세포막소포에 의하여 대장암세포주에 caspase-9과 caspase-3 경로를 통한 세포자멸사를 유도하였다. 그러므로 우리 전통발효식품에서 유래된 BL은 대장암의 예방과 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Jung KW, Won YJ, Oh CM, Kong HJ, Cho H, Lee JK, et al. Prediction of Cancer Incidence and Mortality in Korea, 2016. *Cancer Res Treat* 2016;48:451-7.
- 2) Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014;20:18151-64.
- 3) zur Hausen H. Red meat consumption and cancer: reasons to suspect involvement of bovine infectious factors in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2012;130:2475-83.
- 4) Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C, Young HA. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett* 2011; 309:119-27.

- 5) O'Keefe SJ, Ou J, Aufreiter S, O'Connor D, Sharma S, Sepulveda J, *et al.* Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J Nutr* 2009;139:2044-8.
- 6) Akhter M, Inoue M, Kurahashi N, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S. Japan Public Health Center-Based prospective Study Group. Dietary soy and isoflavone intake and risk of colorectal cancer in the Japan public health center-based prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2128-35.
- 7) Kim MK, Park JH. Conference on "Multidisciplinary approaches to nutritional problems". Symposium on "Nutrition and health". Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer: epidemiological evidence. *Proc Nutr Soc* 2009;68:103-10.
- 8) Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2008;14:6435-57.
- 9) Lim YC, Cho KW, Kwon HC, Kang SU, Pyun JH, Lee MH, *et al.* Growth Inhibition and Apoptosis with H31 Metabolites from Marine *Bacillus* SW31 in Head and Neck Cancer Cells. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2010;3:217-25.
- 10) Jeong SY, Park SY, Kim YH, Kim M, Lee SJ. Cytotoxicity and apoptosis induction of *Bacillus vallismortis* BIT-33 metabolites on colon cancer carcinoma cells. *J Appl Microbiol* 2008;104:796-807.
- 11) Ma EL, Choi YJ, Choi J, Pothoulakis C, Rhee SH, Im E. The anticancer effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition. *Int J Cancer* 2010;127:780-90.
- 12) Kim J, Park S, Nam BH. The risk of colorectal cancer is associated with the frequency of meat consumption in a population-based cohort in Korea. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:2371-6.
- 13) Choi JK, Kim DW, Shin SY, Park EC, Kang JG. Effect of Ulcerative Colitis on Incidence of Colorectal Cancer: Results from the Nationwide Population-Based Cohort Study (2003-2013). *J Cancer* 2016;7:681-6.
- 14) Jackson CS, Oman M, Patel AM, Vega KJ. Health disparities in colorectal cancer among racial and ethnic minorities in the United States. *J Gastrointest Oncol* 2016;7:S32-43.
- 15) Gagnière J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, *et al.* Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016;22:501-18.
- 16) Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol* 2016;8:57-84.
- 17) Rabeneck L, Horton S, Zauber AG, Earle C. Colorectal Cancer. In: Gelband H, Jha P, Sankaranarayanan R, Horton S, editors. *Cancer: Disease Control Priorities*. 3rd ed. Washington D.C.: The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; 2015. p101-19.
- 18) Oostindjer M, Alexander J, Amdam GV, Andersen G, Bryan NS, Chen D, *et al.* The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. *Meat Sci* 2014;97:583-96.
- 19) Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos BG, Zografos ED. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2008;14:6453-7.
- 20) Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae JW, Hahn Y, *et al.* Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:2264-74.
- 21) Song YR, Song NE, Kim JH, Nho YC, Baik SH. Exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* strains isolated from Kimchi. *J Gen Appl Microbiol* 2011;57:169-75.
- 22) Kim TW, Lee JH, Kim SE, Park MH, Chang HC, Kim HY. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 2009;131:265-71.
- 23) Kwon GH, Lee HA, Park JY, Kim JS, Lim J, Park CS, *et al.* Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *Int J Food Microbiol* 2009;129:282-7.
- 24) Lee CH. Engineering bacteria toward tumor targeting for cancer treatment: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;93:517-23.
- 25) Moushumi Priya A, Jayachandran S. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by Bis (2-ethylhexyl) phthalate produced by marine *Bacillus pumilus* MB 40. *Chem Biol Interact* 2012;195:133-43.
- 26) Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, Kim S, *et al.* Gram-positive bacteria produce membrane vesicles:



proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics* 2009;9:5425-36.

27) Lim YJ, Jo YH, Kim HJ, Park JK. The synergistic effects

of antimicrobial peptides on the growth inhibition of *Salmonella* Typhimurium through Imd pathway in *Drosophila* intestine. *J Bacteriol Virol* 2013;43:120-30.

---