

## Ricinus communis로부터 분리된 ricin과 RCA의 독성 비교연구

김재호 · 장혜영\*

경성대학교 생물학과, \*고신대학교 생물학과

### Toxic Activity of Ricin and RCA from *Ricinus communis* on Leukemia Cells and ICR Mice

Jae-Ho Kim and Hae-Young Jang\*

Department of Biology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

\*Department of Biology, Kosin University, Pusan 606-701, Korea

(Received October 21, 1995)

(Accepted November 11, 1995)

**ABSTRACT** : Antibody-toxin conjugates, termed immunotoxins, are currently being evaluated as potential new anticancer agents and one of the most extensively studied toxins for construction of immunotoxin is ricin which exists in the seeds of castor bean, *Ricinus communis*. Another toxic lectin from castor bean is RCA (*Ricinus communis* agglutinin). Both toxins are very homologous. We reported the purification procedure and biological properties of ricin from the Korean castor bean in another place and here we report those of RCA. The purified RCA shows three bands on denatured SDS PAGE while ricin shows two bands. On cultured K<sub>562</sub> cells ricin and RCA both inhibit the multiplication of cells extensively. 30 µg/ml of ricin shows 73% of inhibition rate at day 4 compared to 68% in same condition of RCA. The inhibition of multiplication of cells are directly proportional to the concentration of toxins and the incubation period. In every case ricin was more toxic than RCA. The LD<sub>50</sub> dose of ricin on ICR mice was 60 ng at day 3 but that of RCA was 10 µg.

**Key Words** : Ricin, RCA (*Ricinus communis* agglutinin), Immunotoxin, Toxic lectin, Castor bean, Cytotoxic activity

#### I. 서 론

당단백질인 lectin은 세포막 표면의 탄수화물 성분과 특이적인 결합을 함으로써 세포들을 응집시키는 agglutination activity와, 림프구의 분열을 촉진시키는 mitogenic activity, 단백질합성을 억제시키는 cytotoxicity 등 다양한 생리적 활성때문에 생물학적인 연구뿐만 아니라 의학적인 연구에서도 아주 유용한 재료로서 사용되고 있다(Sharon and Lis, 1989; Rudiger, 1981). 특히 lectin을 이용한 정상세포와 암세포의 구별 가능성이 알려진 이후 많은 연구가 진행 되었으며 monoclonal antibody의 생산은 immunotoxin의 개발가능성을 한층 높여 줌으로서 lectin 연구에 촉진제가 되었다(Pai and Pastan, 1993; Pastan *et al.*, 1986; Pirker, 1988; Uckun and Frankel, 1993; Vitetta *et al.*, 1983). Immunotoxin의 구성물질로서 가장 활발히 연구되고 있는 lectin은 피

마자(*Ricinus communis*)의 종자에 포함되어 있는 ricin이다(Kim, 1987). Ricin이 immunotoxin의 구성독소로서 적절한 이유는 concanavalin A와 같은 일반적인 lectin에 비하여 세포독성이 1000배 이상 강할 뿐만 아니라 독성이 강하기로 알려진 cobra의 독보다도 10배 이상 강한 것으로 밝혀진 때문이다(Sharon and Lis, 1989).

피마자의 종자에는 ricin과 유사한 또 하나의 lectin 으로서 RCA (*Ricinus communis* agglutinin)가 있다. RCA는 ricin에 비하여 세포독성은 약하나 응집력은 더 강한 것으로 알려져 있다(Cawley *et al.*, 1978; Lin and Li, 1980). RCA나 ricin에 대한 생화학적인 특징은 대체로 잘 밝혀져 있지만 이런 모든 내용들은 외국에서 발표된 것이며 국내에서 재배된 피마자를 이용한 연구는 활발히 이루어지지 않고 있다. 본 실험실에서는 한국산 피마자를 이용하여 ricin을 분리하여 보고한 바

있으며(Jang and Kim, 1993) 여기에서는 독성은 약하나 강한 세포응집력을 보이는 RCA의 분리과정에서의 ricin과의 차이점과 leukemia cell과 ICR mice에 대한 두 물질의 독성의 차이를 보고한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

부산 부전시장의 종묘상에서 구입한 피마자(*Ricinus communis*)를 실험재료로 사용하였다. DEAE-cellulose, Sepharose 4B, Sephadex G-100 등 액체 chromatography에 필요한 것은 Pharmacia Fine Chemicals 제품을 사용하였으며, Acrylamide, N,N'-methylene-bis acrylamide, Sodium dodecyl sulfate(SDS), Coomassie brilliant blue R-250 등 전기영동에 필요한 것은 Bio-rad 제품을 사용하였다. Sodium azide, Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), galactose를 비롯한 여러 당들은 Sigma 제품을 사용하였다. 그 밖에 시약이나 용매들도 특급 내지 일급품을 구입하여 사용하였으며 세포배양에 필요한 모든 배양액은 Gibco 제품을 사용하였다.

### 2. Ricin과 RCA의 분리

Ricin과 RCA(*Ricinus communis* agglutinin)는 이미 보고된 방법(Jang and Kim, 1993)에 따랐으며 여기에서는 CM-cellulose대신에 DEAE-cellulose를 1차 이온교환수지로 사용하여 Ricin과 RCA를 제외한 대부분의 단백질을 분리의 초기에 제거하였다. 자세한 분리절차는 결과에서 다시 설명하겠다.

### 3. 세포배양과 독성실험

사람의 만성 백혈구 암세포 K<sub>562</sub>(Klein *et al.*, 1976)를 10% fetal calf serum과 항생물질(streptomycin, 100 µg/ml; penicillin G, 100 IU/ml)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 연속배양하였다. 배양액은 일주일에 2회 정도 교환하였으며 독성실험을 할 때에는 반드시 하루전에 새 배양액으로 교환하였다. 세포독성은 Creppy 등(1980)의 방법대로 산세포의 수효를 헤아려 대조군과 비교하였다. 즉 4분획 세포배양접시의 각 분획에  $3.4 \times 10^8$ /ml 정도의 세포배양액 1 ml를 넣고 각각 다른 농도의 ricin이나 RCA가 포함된 1 ml의 배양액을 첨가하였다. 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 일정

시간 배양후 각 분획의 세포를 tryphan blue 선별염색법으로 염색하여 산세포와 죽은세포를 헤아렸다.

## 4. 실험동물 및 독성실험

ICR마우스는 polycarbonate 상자당(40×26×16 cm 10마리씩 사육하고 실험동물용 고형사료를 자유섭취시켰다. 독성실험은 독소농도별로 체중 25 g-30 g 짜리의 건강한 마우스 6마리씩을 사용하였다. 각각 다른 농도의 ricin이나 RCA를 포함한 0.2 ml의 생리적 식염수를 복강주사한 후 이상여부를 일주일간 매일 관찰하였다.

## III. 결 과

### 1. 순수분리

피마자씨 200 g의 껍질을 벗겨 잠길정도의 5% 초산 용액에 담구어 4°C에서 하룻밤을 지난후 3-4회 세척한 다음 가정용 mixer에 넣고 0.14 M NaCl, 10 mM sodium phosphate(pH 7.2) 완충용액을 적당히 넣어 10초 간격으로 30초씩 5분간 파쇄한 다음 tissue grinder로 다시 곱게 간 후 면형걸을 이용하여 거른다. 걸러진 용액은 9,800×g로서 20분간 원심분리하여 파쇄되지 않은 찌꺼기를 제거하며 불용성 지방성분은 여과지로 제거시킨다. 계속하여 30%-60% 포화 암모늄용액에서 12,100×g으로 20분간 원심분리하여 얻어진 분획침전물을 소량의 증류수에 녹여 0.01 M 인산완충액(pH 7.2)에서 투석하여 암모늄을 제거한다. 투석된 분획물은 동일한 완충액으로 평형된 DEAE-cellulose column(3×30 cm)을 통과시켰다. 이때 ricin과 RCA를 제외한 대부분의 단백질은 이온교환수지에 흡착되고 ricin과 RCA는 얼마간의 저분자량의 다른 단백질과 함께 유출액속에 포함되어 있었다. 모아진 유출액은 동결건조법으로 농축된 후 0.14 N의 NaCl을 포함한 인산완충액으로 평형된 Sepharose 4B affinity column에 주입되었다. 동일한 완충액으로 유출된 용액은 280 nm에서 높은 흡광도를 나타내는 첫번째의 peak와 이것보다 늦게 나타나며 약간 낮은 흡광도의 완만한 두번째 peak로 나누어졌다. 수지에 결합되지 않고 column을 그냥 통과하는 첫번째 peak의 단백질과는 달리 수지와와의 약간의 결합력으로 천천히 완만한 곡선을 이루며 유출되는 두번째 peak부분에 ricin이 포함되어 있었으며 여기에는 얼마간의 RCA도 함께 유출되었다. 수지에 흡착된 단백질은 10 mM의 galactose를 포함한 완충액으로 회

수되었으며 native PAGE상에서 하나의 band로서 순수한 RCA로 나타났다. Ricin을 포함하고 있는 peak부분은 다시 농축하여 Sephadex G-100 gel filtration column 이나 혹은 2차 Sepharose column을 거친 후에 Sephadex G-100 column을 통과 시킴으로써 함께 포함되어 있던 RCA를 완전히 제거하고 native PAGE상에서 역시 하나의 band로서 나타나는 순수한 ricin을 얻었다.

이들 분리된 ricin과 RCA를 SDS와  $\beta$ -mercaptoethanol을 처리하여 환원시킨 다음 denaturing PAGE상에서 확인하였을 때 그림 1에서 보는 것처럼 ricin은 두 개의 band를 보이는데 비하여 RCA는 세 개의 band를 각각 size marker와 비교하였을 때 예상되는 위치에서 나타냄으로써 Lin 등(1980)이나 Cawley 등(1978)의 결과와 일치하였다. 피마자로부터 분리되어 보고된 lectin의 수는 선택한 이온교환수지나 전기영동 조건의 차이와 구별기준의 엄정도에 따라 다양한 차이를 보인다. 각각의 명칭이 다르긴 하지만 생화학적 특징으로 비교해 볼 때 Cawley 등(1978)은 3종류의 ricin과 2종류의 RCA로 구별한데 비하여 Lin 등(1986) 등은 3종류의 ricin과 1종류의 RCA로 구별하였고 Lin 등(1980)은 2종류의 ricin과 2종류의 RCA로 구별하였으며 Mise 등(1977), Araki 등(1987), Wei 등(1978)과 Olsnes 등(1973,1974)은 2종류의 ricin과 1종류의 RCA로 구별하였다. 그러나 이러한 다양한 차이도 근본적인 생화학적 특징인 세포독성과 응집성에 근거할 때 세포독성이 강한 ricin과 독성은 약하지만 높은 응집성을 나타내는 RCA로서 크게 둘로만 구분될 수 있으며 이들은 SDS와  $\beta$ -mercaptoethanol을 처리한 전기영동에서 ricin은 2개의 band로 RCA는 3개의 band로 구별되어 나

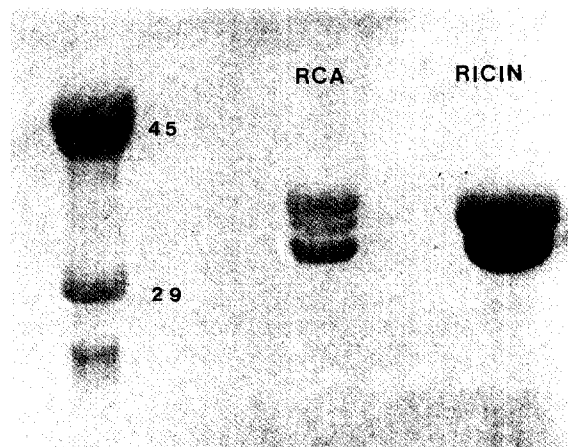


Fig. 1. Denaturing SDS polyacrylamide gel electrophoresis of the purified ricin and RCA. The very left lane shows standard size markers: carbonic anhydrase (19,000) and albumin (45,000).

타난다(Lin *et al.*, 1980; Cawley *et al.*, 1978).

## 2. 독성비교실험

Ricin과 RCA의 독성은  $K_{562}$  세포주를 이용한 *in vitro* 실험과 ICR 마우스를 이용한 *in vivo* 실험을 통하여 비교하였다.

### 1) $K_{562}$ 세포에 대한독성

$K_{562}$  세포에서의 독성 비교는 독소를 첨가하지 않은 정상세포군과 점차 증가하는 농도의 독소를 첨가한 실험세포군에서 세포수의 변화상태를 비교함으로써 독소의 영향을 확인하였다. 즉 4분획 세포배양접시의 각 분획에  $3-4 \times 10^8/ml$  정도의 세포배양액 1 ml씩을 넣고 각 분획마다 다른농도(0, 0.3, 3, 30  $\mu g$ )의 ricin이나 RCA를 첨가하였다. 실험때마다 세포 배양과정에서 있을 수 있는 미세한 배양 조건의 차이를 배제하여 실험 기술상의 오차를 최소화하기 위하여 독소를 첨가하지않은 정상세포 대조군을 매 확인시점마다 독소가 첨가된 실험 세포군과 함께 격막으로 나누어진 동일한 배양접시에서 동시 배양하였다. 첨가된 독소의 영향은 처음의 세포수를 기준으로하여 세포의 증식을 상대적으로 표시하였으며 ricin이나 RCA의 두 경우 모두 동일한 조건의 세포배양접시를 4개씩 준비하여 동시에 배양을 시작한 후 시일이 경과함에 따라 매일 하나씩 배양을 중지하고 회수하여 세포수를 측정하였다. 동일한 실험을 4회 시행하여 그 평균치를 구하였다. 그림 2와 표 1,2에서 보는것 처럼 ricin과 RCA는 모두 세포의 증식을 현저히 저해시켰다. 독소가 첨가되지 않은 대조군의 경우 첫날의 세포수를 100으로 했을때 시일이 경과 함에 따라 117, 152, 156, 176으로 증가하였으나 30  $\mu g$ 의 ricin이 첨가된 경우 각각 71, 60, 51, 48으로 감소함으로써 상대적증식율은 61,

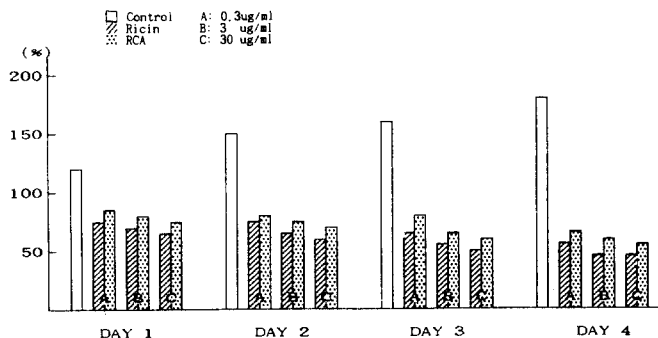


Fig. 2. Effect of toxins on the multiplication of  $K_{562}$  cells. 100% is the initial viable cell number at day 0.

**Table 1.** Toxic activity of ricin to the multiplication of K<sub>562</sub> cells

	Day 1			Day 2			Day 3			Day 4		
	Viable* cell (%)	B/A**	1- B/A***	Viable cell (%)	B/A	1-B/A	Viable cell (%)	B/A	1-B/A	Viable cell (%)	B/A	1-B/A
Control	(A) 117	100	0	152	100	0	156	100	0	176	100	0
Ricin (ug/ml)	(B)											
0.3	75	64	36	76	59	50	65	42	58	54	31	69
3.0	72	62	38	65	43	57	56	36	64	48	27	73
30	71	61	39	60	39	61	51	33	67	48	27	73

\*The number of viable cells are expressed as percentage based on the initial viable cell number.

\*\*Multiplication rate (%) compared with no toxin addition control.

\*\*\*Inhibition rate (%).

**Table 2.** Toxic activity of RCA to the multiplication of K<sub>562</sub> cells

	Day 1			Day 2			Day 3			Day 4		
	Viable* cell (%)	B/A**	1- B/A***	Viable cell (%)	B/A	1-B/A	Viable cell (%)	B/A	1-B/A	Viable cell (%)	B/A	1-B/A
Control	(A) 117	100	0	152	100	0	156	100	0	176	100	0
Ricin (ug/ml)	(B)											
0.3	83	71	29	81	53	47	80	51	49	62	35	65
3.0	77	66	34	75	49	51	65	42	58	60	34	66
30	76	65	35	67	44	56	58	37	63	57	32	68

\*The number of viable cells are expressed as percentage based on the initial viable cell number.

\*\*Multiplication rate (%) compared with no toxin addition control.

\*\*\*Inhibition rate (%).

39, 33, 27로 나타남으로써 저해율은 각각 39, 61, 67, 73%를 보였다. 한편 RCA의 경우는 30 µg이 첨가된 경우 76, 67, 58, 57로 감소함으로써 65, 44, 37, 32의 상대적증식율을 나타내었고 이것은 35, 56, 63, 68%의 저해율에 해당된다. 이와 같이 ricin, RCA 두 경우 모두 저해효과는 첨가되는 독소의 양이 많을수록, 혹은 배양시간이 경과할수록 더욱 심하게 나타남으로써 대조군과의 세포수효의 차이는 점차 현저하였다. 한편 ricin과 RCA 사이의 세포에 대한 독성을 비교해 볼 때 그림 2에서 보는 것처럼 모든 경우에서 ricin의 독성이 RCA보다 강하게 나타났다. 모든 대응되는 경우에서 RCA의 독성은 ricin독성의 약 90%를 나타내었다. 이것은 Cawley(1978)의 경우 cell free system을 이용한 단백질합성 저해실험에서 50%의 저해를 보이는 ricin의 농도가 RCA 농도의 1/25 밖에 되지 않는 것에 비한다면 많은 차이가 있으나 아마 이것은 배양세포를 직접 이용하는 것이 아니라 cell free system을 사용하는 측정방법의 차이 때문이라고 생각된다. Cell free system에서는 lectin이 세포의 원형질막이나 세포질을 통한 전달과정없이 직접 단백질 합성기구에 도달할 수 있다.

**Table 3.** Lethality of ricin to mice

Dose (ng)	Mortality at day (%)					
	1	2	3	4	5	6
15	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
60	0	25	38	50	50	63
120	0	20	20	50	75	
300	0	75	100			
600	25	100				

**Table 4.** Lethality of RCA to mice

Dose (ng)	Mortality at day (%)					
	1	2	3	4	5	6
0.3	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	25	25	25
10	0	0	50	50	100	
50	0	75	100			

## 2) ICR마우스에 대한 독성비교

Ricin은 ICR 마우스를 이용한 *in vivo* 독성실험에서 LD<sub>50</sub>값을 비교하였을때 표 3과 4에서 보는 것처럼 RCA에 비하여 현저히 높은 독성을 갖고 있었다. Ri-

cin의 경우 60 ng을 복강주사 하였을 때 3일 후에 반수가 죽었으며 120 ng의 경우도 유사한 결과를 보였으나 60 ng에 비하여 독성이 나타나는 시간이 단축되는 경향을 보였다. 0.3 µg 이상을 주입받은 경우는 전혀 살아남지 못하였다. 이것은 Wei와 Koh(1978)가 보고한 ricin D의 경우 LD<sub>50</sub>이 3일째 0.3 µg으로 나타난 경우와 Olsnes *et al*(1973)의 분획 D의 경우 0.2 µg으로 나타난 경우에 비교하여 조금 더 강한 독성을 보이는 경향은 있지만 엄밀히 비교하긴 힘들므로 대체로 동일한 수준의 독성을 갖는다고 볼 수 있으며 Lin and Liu (1986)의 2일째 LD<sub>50</sub>이 0.1 µg으로 나온 ricin A의 경우와 유사하다.

한편 RCA의 경우는 1 µg을 주입 받은 경우에 전혀 변화를 나타내지 않았으며 이 양은 ricin이라면 24시간 이내에 주입 받은 모든 개체가 죽는 양이다. 5 µg을 주입 받은 경우 3일후에 25%만 죽었으며 10 µg을 주입 받은 경우에 비로소 3일후에 반수가 죽었다. 이것은 같은 수준의 독성을 나타내기 위하여 ricin보다 약 170배나 많은 양의 RCA가 필요한 셈이다. 이것은 Lin and Liu(1986)의 경우 ricin A보다는 280배, ricin C보다는 80배 더 필요했던 경우의 중간값으로서 동일한 결과라고 볼 수 있다. 50 µg을 주입받은 경우는 이틀후에 모두 죽었다.

## 참고문헌

- Araki, T. and Funatsu, G. (1987): The complete amino acid sequence of the B-chain of ricin E isolated from small-grain castor bean seeds. Ricin E is a gene recombination product of ricin D and *Ricinus communis* agglutinin, *Biochimica et Biophysica Acta*, **911**, 191-200.
- Cawley, D.B., Hedblom, M.L. and Houston, L.L. (1978): Homology between ricin and *Ricinus communis* agglutinin: Amino terminal sequence analysis and protein synthesis inhibition studies, *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 744-755.
- Creppy, E.-E., Lugnier, A.-A.J., Beck, G. and Dirheimer, G. (1980): Action of ricin and its polypeptide chains on cultured hepatoma cells, *Arch. Toxicol.*, **44**, 175-179.
- Collier, R.J. and Kaplan, D. (1984): Immunotoxins, *Sci. Am.*, **251**, 56-64.
- Jang, Hae-Young and Kim, Jae-Ho (1993): Isolation and biochemical properties of ricin from *Ricinus communis*, *Korean Biochem J.*, **26**, 98-104.
- Kim, Jae-Ho (1987): 면역독소의 현주소, *유전공학*, **19**, 62-69.
- Klein, E., Ben-Bassat, H., Ralph, P., Zeuthen, J., Pollack, A. and Vanky, F. (1976): Properties of the K<sub>562</sub> cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia, *Int. J. Cancer*, **18**, 421-431.
- Lin, J.-Y. and Liu S.-Y. (1986): Studies on the antitumor lectins isolated from the seeds of *Ricinus communis* (castor bean), *Toxicol.*, **24**, 757-765.
- Lin, T. and Li, S (1980): Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis*, *Eur. J. Biochem.*, **105**, 453-459.
- Mise, T., Funatsu, G. Ishiguro, M. and Funatsu, M. (1977): Isolation and characterization of ricin E from castor beans, *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2041-2046.
- Olsnes, S. and Pihl, A. (1973): Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis, *Biochemistry*, **12**, 3121-3126.
- Olsnes, S., Saltvedt, E. and Pihl, A. (1974): Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*, *The Journal of Biological Chemistry*, **249**, 803-810.
- Rudiger, H. (1981): Lectins-An Introduction in *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*, (Bog-Hansen T.C., Ed.), (de Gruyter., Berlin), 3-10.
- Pai, L. and Pastan, I. (1993): Immunotoxin therapy for cancer, *JAMA*, **269**, 78-81
- Pastan, I., Willingham, M. and FitzGerald, D. (1986): Immunotoxins, *Cell*, **47**, 641-648.
- Pirker, R. (1988): Immunotoxins against solid tumors, *J Cancer Res Clin Oncol*, **114**, 385-393.
- Sharon, N. and Lis, H. (1989): Lectins (Chapman and Hall, New York), 26-36.
- Uckun, F. and Frankel, A. (1993): The current status of immunotoxins: an overview of experimental and clinical studies as presented at the third international symposium on immunotoxins, *LEUKEMIA*, **7**, 341-348
- Vitetta, E., Krolick, K., Miyama-Inaba, M., Cushley, W. and Uhr, J. (1983): Immunotoxins: A new approach to cancer therapy, *Science*, **219**, 644-650.
- Wei, C.H. and Koh, C. (1978): Crystalline ricin D, a toxic anti-tumor lectin from seeds of *Ricinus communis*, *The Journal of Biological Chemistry*, **253**, 2061-2066.