

천연물에서 단리한 식물정제 탄닌의 항암효과 및 생물학적 반응 조절 물질로서의 기능 검색

이도익* · 조장현 · 이민원

중앙대학교 약학대학

(Received April 30, 1998)

Antitumor Effect of Natural Products, Purified Tannin from Plants and Screening of BRM function

Do-ik Lee*, Jang-Hyun Cho and Min-Won Lee

College of Pharmacy, Chungang University

Abstract—Pracoxin A, an ellagitannin, purified from *Alnus hirsuta* var. *microphilla* was evaluated on the antitumor activity. Pracoxin A had the significant cytotoxicity to six tumor cell lines: human chronic myelogenous leukemia K-562, human promyelocytic leukemia HL-60, mouse leukemia P388, mouse lymphocytic leukemia L-1210, sarcoma-180, mouse lymphoma L5178Y except L-1210. And the most sensitive cell line was K-562 ($ED_{50}=2.43 \mu\text{g/ml}$). The ED_{50} of pracoxin A against HL-60, P388, L-1210, sarcoma-180 and L5178Y were 6.28, 8.66, 10.00, 7.01, 9.32 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Pracoxin A showed the increasing effect in life span by 36.8% on the 1st day after treatment of 10 mg/kg in mice bearing sarcoma-180 tumor cells (ascitic form) via NCI (National Cancer Institute, U.S.A.) protocol in vivo assay. As a result, pracoxin A is considered to show the antitumor activity.

Keywords □ Pracoxin A, Ellagitannin, Antitumor activity.

암을 치료하는 요법으로서 수술요법, 방사선요법, 면역요법, 약물요법 등이 있다. 암은 전이를 일으키는 특성 때문에 암발생 부위에 대한 국소적 치료만으로는 암의 퇴치가 불가능한 경우가 많으므로 전신요법인 약물요법이 기본적으로 병행되고 있다.^{1,2)} 그러나 기존의 약물요법에 쓰이는 치료제들은 대부분 부작용이 커서 암치료에 많은 어려움을 겪고 있다.^{3,4)} 현대 약물요법에서 이런 문제를 줄이는 것이 중요한 연구과제라 하겠다. 이런 문제를 줄이는 노력으로 최근에는 천연물, 특히 식물정제 물질에 대한 관심이 점차 높아지고 있다.

그 중 생체 내에서 다양한 활성을 지닌 Tannin은 angiotensin-converting enzyme(ACE) 저해효과,^{5,6)} protein kinase C의 억제효과,⁷⁾ DNA topoisomerase

II의 저해효과,^{8,9)} DNA breakage 효과,^{10,11)} 항정신성효과,¹²⁾ 항신부전효과,^{13,14)} 항고혈압효과,¹⁵⁾ 항allergy 효과,¹⁶⁾ blood urea nitrogen 감소효과,^{17,18)} 항균효과,¹⁹⁾ 항virus 효과²⁰⁻²⁴⁾ 등 그 밖에 여러가지 활성²⁵⁻²⁷⁾이 보고되었다. 특히 최근의 연구에서 항암효과가 있다고 보고되어지고 있다.²⁸⁻³⁰⁾

1992년 Gail 등은 tannin의 가수분해물인 ellagic acid, 그리고 그 몇몇 관련 유도체가 mouse의 피부암에 유효하다고 보고하였으며,³¹⁾ 1993년 Miyamoto 등은 5개의 ellagitannin이 *in vivo*에서 항암효과가 있었고, interleukin-1 β (IL-1 β)의 유도를 증진시킨다고 보고하였다.³²⁾ 또 sarcoma-180으로 복수암을 유발시킨 mouse에 45개의 ellagitannin을 처치한 결과, 21개의 ellagitannin이 유효하였다고 보고하였다.³³⁾ 1992년 Kashiwada 등은 129 종의 tannin과 관련 화합물의 tumor cell에 대한 cytotoxicity를 연구보고 하

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-822-1469

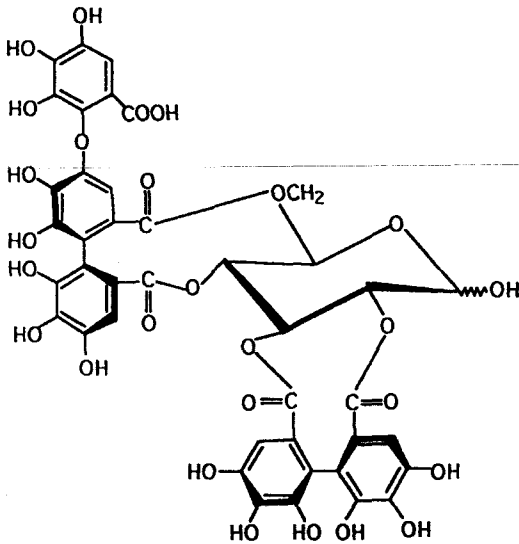


Fig. 1 -- The structure of praecoxin A.
($C_{41}H_{28}O_{27}$ M.W. = 952.08)

였으며, 그 중 몇몇 tannin은 뛰어난 항암효과가 있다고 보고하였다.³⁴⁾

이 연구보고에서 오리나무(*Alunus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*)에서 정제한³⁵⁾ ellagitannin, praecoxin A(M.W. = 952.08, Fig. 1)의 *in vitro*, *in vivo*에서의 항암효과를 검색하였다.

실험방법

재료 및 시약 - 식물정제 tannin, praecoxin A는 자체 분리하여 실험에 사용하였다. Dimethylsulfoxide (Sigma. Chem. Co., U.S.A.), Trypan blue(Sigma. Chem. Co., U.S.A.), RPMI1640 medium powder (Gibco., U.S.A), Fetal bovine serum(Gibco., U.S.A.)을 구입하여 사용하였다.

실험기기 - Clean bench(Dae Il Engineering., Korea), Auto Clave(Kukje Cien Co. Ltd., Korea), CO_2 -Incubator(Model VS-9180MS, Vision Scientific Co. Ltd., Korea), Centrifuge(Hanil Industry Co., Korea), pH-meter(Model SP-701, Suntex Co., Taiwan), Microscope(Model Telaval 31, Zeiss Co., Germany), LN_2 Tank(Model MVE SC 20/20, Minnesota Valley Engineering, Inc., U.S.A.), Hot Plate stirrer(Model PC 351, Corning Co., U.S.A.), Pipet-aid(Drummond Scientific Co., U.S.A.), Vor-

tex mixer(Scientific Industries, Inc., U.S.A.), 12-well multiplate (Costar Co., U.S.A.), 75 cm^2 screw-capped culture flask(Corning Co., U.S.A.), 0.02 μm membrane filter(Gelman Co., Germany)를 사용하였고 기타 사용기기는 $-121^\circ C$, $1.1 kg/cm^2$, 15분간 고압증기 멸균하여 사용하였다.

세포주 - Human chronic myelogenous leukemia인 K-562, human promyelocytic leukemia인 HL-60, mouse leukemia인 P388과 mouse lymphocytic leukemia인 L-1210, sarcoma-180, mouse lymphoma인 L5178Y 등, 총 6개의 tumor cell line을 실험에 사용하였다.

세포배양 - 위 모든 세포주는 Fetal Bovin Serum (FBS) 10%가 보완된 RPMI 1640 medium에서 1주일에 2회 계대배양 하였으며, $37^\circ C$, 5% CO_2 , 95% air로 맞춘 CO_2 -incubator에서 배양하였다. FBS는 사용 전 $56^\circ C$ 에서 30분간 heat-inactivation시켰다.

세포현탁액 조제 - 실험에 사용되는 logarithmic phase에 도달한 tumor cells의 배양은 실험하기 24시간 전에 75 cm^2 screw-capped culture flask에 $2 \sim 3 \times 10^5$ cells/ml의 농도로 tumor cell을 넣어 배양시켰다(Spinner culture). 이렇게 배양한 배양액의 세포수는 24시간 후에 보통 $0.8 \sim 1.0^6$ cells/ml이 된다. 이 세포현탁액을 신선한 medium으로 희석하여 최종농도 $1 \sim 5 \times 10^5$ cells/ml이 되도록하였다(Run bottle).

약물조제 - Praecoxin A 적당량을 phosphate buffered saline(pH7.2, PBS)에 용해시켜, 각각 1, 5, 10, 20 $\mu g/ml$ 의 농도로 조제하여, 수용성 membrane filter로 여과멸균하여 $4^\circ C$ 냉장보관하였다.

In vitro 약물투여 - 암세포에 대한 직접적인 작용은 약물투여 후 세포수를 계측하여 측정하였다. 세포현탁액 1 ml를 12-well multiplate에 각각 well당 1 ml씩 분주한 후 각각의 약물 1, 5, 10, 20 $\mu g/ml$ 의 농도로 가하여 최종 부피가 2 ml가 되도록 하였다. $37^\circ C$, 5% CO_2 , 95% air로 맞춘 CO_2 -incubator에서 각각 24, 48시간 배양 후, 0.4% trypan blue in PBS 용액으로 염색하여(Trypan blue dye exclusion method) 배양된 세포 중의 생존 세포수를 hemacytometer로 2회 측정 하였다. 각 약물의 농도마다 2개의 well씩 배양하여 4회 평균을 계산하였으며, 대조군도 2개의 well씩으로 하였다.

In vitro 결과처리 - 본실험에서 각 농도에 대한 성장

율은 다음과 같이 계산하였다.

$$Y(\%) = \frac{T_{48} - C_0}{C_{48} - C_0} \times 100$$

Y : growth rate for each dose of testing substance.

T₄₈ : mean cell count for each dose of testing substance after 48 hr incubation.

C₄₈ : mean cell count for control after 48 hr incubation.

C₀ : mean cell count at the start of incubation.

위에서 계산한 성장률로서 다음과 같은 식에 의하여 ED₅₀치를 구하였다.⁴⁾

$$B = \frac{N \cdot \sum(X_i \cdot Y_i) - (\sum X_i) \cdot (\sum Y_i)}{N \sum(X_i)^2 - (\sum X_i)^2}$$

$$A = \frac{\sum Y_i}{N} - B \sum \frac{N_i}{N}$$

B : slope

A : intercept

N : number of points selected

(≤ number of dose level & ≥ 2)

X_i : log₁₀ of dose

Y_i : growth rate calculated for dose

$$Y = A + BX$$

$$50 = A + B(\log ED_{50})$$

$$\log ED_{50} = (50 - A) / B$$

$$ED_{50} = 10^{\log ED_{50}}$$

각각의 농도에서 계산한 성장율치가 모두 55%보다 크거나, 45%보다 작으면 재실험을 실시하였고 그 값이 모두 85%보다 크거나, 15%보다 작을 경우에는 유의성이 없는 것으로 판정하였다.

실험동물 - 4~5주령의 수컷, ICR mouse(body weight : 22±1.7 g)를 최소 일주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사료는 고형사료를 사용하였고, 그 조성은 조단백 21%, 조지방 3.5%, 조cellulose 5.5%, 무기질 8.0%등 이었다. 물은 수돗물을 사용하였으며, 사료와 물은 제한하지 않았다.

In vivo 암세포 이식 및 약물투여 - ICR mouse의 복강내에서 7일 간격으로 계대배양한 sarcoma-180

tumor cell을 복수와 함께 취하여 氷冷 PBS (pH 7.2) 용액으로 세척한 후 약 2×10⁶ cells/ml이 되도록 부유시켜 0.1 ml씩(2×10⁵ cells/ml)을 건강하고 정상인 ICR mouse의 복강에 이식하여 복수암을 유발시켰다. 암세포를 이식한 후 NCI protocol³⁶⁾에 따라 24시간 후 PBS(pH 7.2)에 용해시킨 약물을 1, 5, 10 mg/kg을 0.1 ml씩 1회 복강내 투여하였다. 대조군에는 동량의 PBS(pH 7.2)을 투여하였다.

In vivo 결과처리 - 암세포를 이식한 후 대조군과 약물 투여군의 생존여부를 30일까지 관찰하여 평균 생존일(mean survival time, MST)을 구하여 생명연장(increase in life-span, ILS) 백분율을 구하였다. 암세포 이식이 실패한 개체(No-takes)와 10일 이전에 처사한 개체는 계산에서 제외시켰다.³⁷⁾

$$ILS(\%) = \frac{\text{실험군의 평균 생존일수}}{\text{대조군의 평균 생존일수}} \times 100$$

통계처리 - 실험 결과는 mean±standard error (Mean±S.E.)로 표시하였으며, 실험에 사용한 각 실험군간의 유의성 검정은 computer program을 사용하여 Student's t-test를 실시하였으며, p가 0.05%이하 일 때 유의성이 있는 것으로 검정하였다.

결 과 및 고 찰

In vitro에서의 항암효과

식물정제 tannin, praecoxin A를 2종의 human leukemia tumor cell line, 2종의 mouse leukemia cell line, sarcoma, mouse lymphoma 등, 총 6종의 tumor cell line에 대해 각각 약물 1, 5, 10, 20 µg/ml의 농도로 처치한 후 Trypan blue dye exclusion 법으로 항암효과를 검색하였다.

Praecoxin A는 L-1210 tumor cell line을 제외하고 모두 10 µg/ml 이하의 ED₅₀치를 나타내었다(Table I).

먼저 leukemia cell line 중 human cell line인 K-562 tumor cell line을 가장 크게 성장을 억제하였다(Fig. 2). 5 µg/ml 농도부터 50% 이하의 성장율을 보였으며, 20 µg/ml의 농도인 경우 92%까지 억제하였다(Table I).

또 하나의 human leukemia cell line, HL-60에서도 역시 농도 의존적으로 성장을 억제하였으며(Fig. 3), 위 두 cell lines의 ED₅₀치는 각각 2.43 µg/ml, 6.28 µg/

Table I—The effects of praecoxin A on tumor cells *in vitro*

Group	Dose (μg/ml)	Growth Rate ^a (%)	ED ₅₀ ^b (μg/ml)	M ^c
Control	0 ^d	100		
K-562	1	63.4	2.43	2.5 × 10 ⁻⁶
	5	43.7		
	10	26.5		
	20	8.2		
HL-60	1	72.6	6.28	6.6 × 10 ⁻⁶
	5	52.0		
	10	45.2		
	20	35.6		
L-1210	1	88.3	>10	
	5	78.8		
	10	79.5		
	20	70.7		
P388	1	70.8	8.66	9.1 × 10 ⁻⁶
	5	63.5		
	10	53.8		
	20	32.2		
L5178Y	1	67.6	9.32	9.8 × 10 ⁻⁶
	5	48.5		
	10	49.9		
	20	47.7		
S-180	1	69.8	7.01	7.4 × 10 ⁻⁶
	5	57.9		
	10	46.4		
	20	35.8		

^{a)} Growth rate at 48hr after testing agent treatment
^{b)} Indicates dose level which effects tumor cell growth to 50% of the control
^{c)} Molarity of ED₅₀
^{d)} Control group is similarly treated with phosphate buffered saline

mI로 관찰되었다.

반면에 mouse leukemia cell line 중 lymphocytic leukemia, L-1210에서는 본 실험 중 가장 둔한 성장억제효과를 보였으며(Fig. 4), 10 μg/ml을 훨씬 상회하는 ED₅₀치를 나타내었으며(Table I), 또 어떤 농도에서도 50% 이하의 성장 억제를 보여주지 못했다.

하지만 같은 mouse leukemia cell line인 P388인 경우에는 10 μg/ml의 농도까지 농도 의존적으로는 성장을 억제하지 않았지만(Fig. 5), ED₅₀가 8.66 μg/ml로 세포에 대한 직접적인 효과를 관찰할 수 있었다.

Leukemia cell line에서의 Praecoxin A는 human leukemia cell line보다 mouse leukemia cell에서 더 유효한 항암효과가 있다는 보고³⁴⁾와는 달리, 본실험에서는 PraecoxinA가 human leukemia cell line에 더 높은 암세포에 대한 직접적인 효과를 보였다. 이와같이

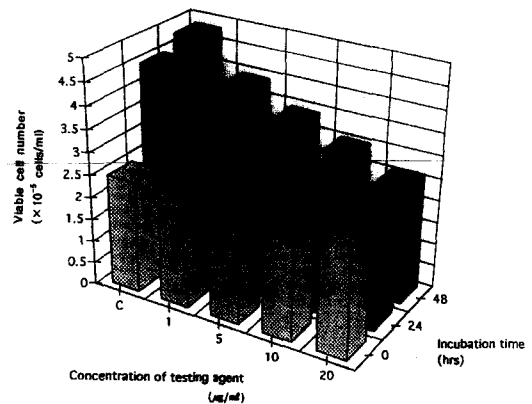


Fig. 2—The effect of praecoxin A on the viability of K-562 tumor cells *in vitro*.

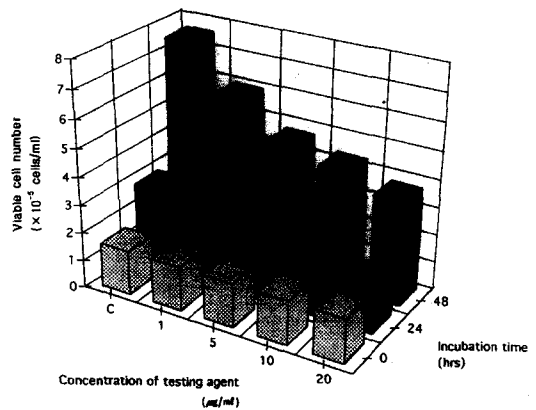


Fig. 3—The effect of praecoxin A on the viability of HL-60 tumor cells *in vitro*.

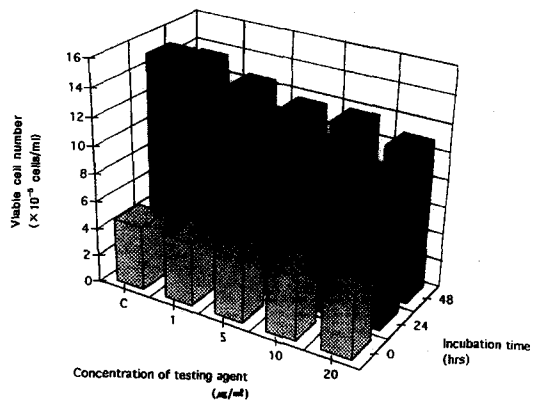


Fig. 4—The effect of praecoxin A on the viability of L-1210 tumor cells *in vitro*.

human leukemia cell line에 보다 높은 특이성을 지닌다는 것은 근래에 antitumor agent가 human cell line에 더욱 감수성을 보이고, 그 각 기관에 미치는 영향

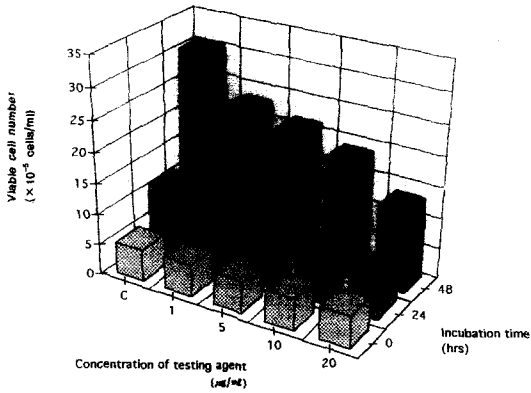


Fig. 5—The effect of praecoxin A on the viability of P388 tumor cells *in vitro*.

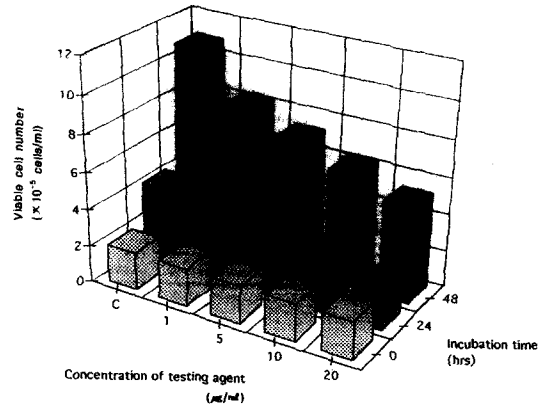


Fig. 7—The effect of praecoxin A on the viability of S-180 tumor cells *in vitro*.

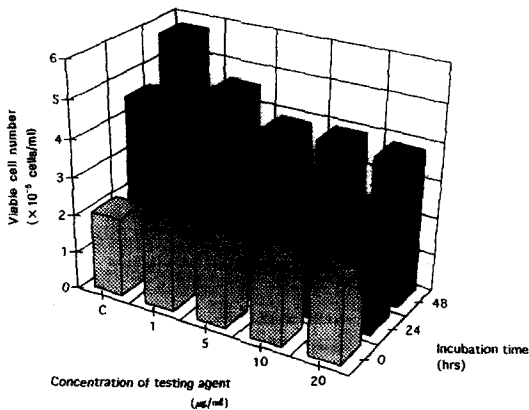


Fig. 6—The effect of praecoxin A on the viability of L-5178Y tumor cells *in vitro*.

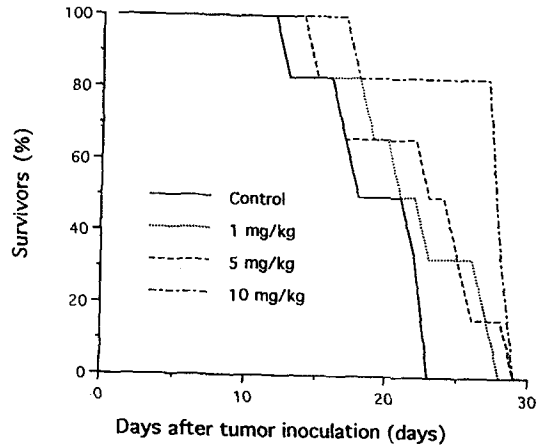


Fig. 8—The effect of praecoxin A on life span against the ascitic form of sarcoma-180 in ICR mice.

에 대한 연구보고³⁸⁾를 주시할 때, 위 사실은 앞으로의 연구대상으로 충분한 의미가 있다고 사료된다.

Lymphoma인 L5178Y인 경우 ED₅₀은 9.32 µg/ml로 나타내었으며, 5 µg/ml이상의 농도에서의 세포 성장에 있어서는 차이를 보이지 않았다(Fig. 6).

Sarcoma-180에 대해서는 농도 의존적으로 성장을 억제하였고(Fig. 7), ED₅₀치도 7.01 µg/ml로, 암세포에 대한 직접적인 효과를 관찰할 수 있었다.

Praecoxin A는 K-562 tumor cell line에 대해 본 실험에 사용한 tumor cell line 중 모든 농도에서 성장을 억제효과가 가장 높았고, L-1210에서 가장 둔한 성장억제효과를 보였다(Table I).

In vivo에서의 항암효과

Sarcoma-180을 mouse의 복강에 암세포를 이식한 후, 24시간 후 *in vitro*에서 6종의 tumor cell line에 대

해 cytotoxicity를 나타낸 약물, 식물 정제 tannin, praecoxin A를 1, 5, 10 mg/kg을 0.1 ml씩 1회 복강내 투여하여 생명연장효과를 검색하였다(Fig. 8).

식물정제 tannin, praecoxin A는 1, 5 mg/kg의 농도에서는 각각 10, 19.2%의 생명연장효과를 나타냈다(Fig. 8). 그러나 10 mg/kg의 농도에서는 36.8%의 유의성있는 생명연장효과를 보여 주었다. 이는 천연물에서 30%이상 생명연장효과를 보일 경우, 유의성있는 항암효과가 있다고 판정³⁸⁾한다는 점을 주시할 때 매우 의미있는 일이라 하겠다.

결 론

*In vitro*에서 식물정제 tannin, praecoxin A을 2종의 human leukemia tumor cell line, 2종의 mouse

leukemia cell line, sarcoma, mouse lymphoma 등, 총 6종의 tumor cell line에 항암효과를 검색하였다.

Praecoxin A는 L-1210 tumor cell line을 제외한 나머지 tumor cell line에서 모두 10 µg/ml 이하의 ED₅₀치를 나타내었다.

K-562는 본 실험에 사용한 tumor cell line중 모든 농도에서 성장억제효과가 가장 높았으며, L-1210에서는 가장 둔한 성장억제효과를 보였다.

본 실험에서 praecoxin A는 실험에 사용한 tumor cell lines 중에서 mouse leukemia cell line보다 human leukemia cell line에서 더 높은 성장억제효과를 보였다. Sarcoma-180 mouse의 복강에 암세포를 이식한 후, 24시간 후에 *in vitro*에서 암세포에 대해 직접적인 효과를 나타낸 약물, 식물정제 tannin, praecoxin A을 1, 5, 10 mg/kg을 0.1 ml씩 1회 복강내 투여하여 생명연장효과를 검색하였다.

먼저 식물정제 tannin, praecoxin A인 경우 1, 5 mg/kg을 농도에서 유의성있는 생명연장효과를 관찰할 수 없었다. 그러나 10 mg/kg의 농도에서는 36.8%의 생명연장효과를 보여 유의성있는 항암효과를 나타냈다.

이상의 관찰사실로 미루어 보아 식물 정제 tannin, praecoxin A은 *in vitro*, *in vivo*에서 암세포에 대한 직접적인 독작용과 생명연장효과를 관찰할 수 있었으며, 항암 치료제 개발의 가능성은 충분하다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단의 학술연구 조성비지원으로 이루어졌으며 이에 심심한 감사를 드리는 바이다.

문헌

- Gilman, A. D., Gooman, L. S., Rall, T. W. and Murad, F. : *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th Ed., Macmillan Publishing Co., New York, p. 1268 (1988).
- Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Hayes, P. E., Yee, G. C. and Posey, L. M. : *Pharmacotherapy a Pathophysiologic Approach*, Elsevier, Amstesdam, p. 1343 (1989).
- Lee, J. H., Kim, Y. C., Choi, Y. W., Noh, Y. S. and Jung, J. C. : Studies on the synthesis, the antitumor activity and the toxicity of Pt(II) complexes containing 1,2-cyclohexanediamine isomers, *Bull. K. H. Pharma. Sci.*, **21**, 17 (1993).
- Shin, H. S. : *Synthesis of 5-FU-Lipid or Amino Conjugates and Screening of Their Antitumor Activity* [Dissertation]. Seoul: Duk Sung Woman's University, 1992.
- Inokuchi, J., Okabe, H., Yamauchi, T., Nagamatsu, A., Nonaka, G. and Ozaki, M. : Inhibition of angiotensin-converting enzyme in crude drugs II, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 264 (1985)
- Uchida, S., Ikare, N., Ohta, H., Niwa, M., Nonaka, G., Nishioka, I., and Ozaki, M., Inhibitory effects of condensed tannins on angiotensin converting enzyme, *Japan. J. Pharmacol.*, **43**, 242 (1987).
- Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Ballas, L. M., Jiang, J. B., Janzen, W. P. and Lee, K. H. : Tannins as selective inhibitors of protein kinase C, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2**, 239 (1992).
- Kuramamochi, M. A., Kuramamochi, H., Kobayashi, F., Ekimoto, H., Talahashi, K., Kadota, S., Takamori, Y. and Kikuchi, T. : Woodfruticodin (woodfordin C), a new inhibitor of DNA topoisomerase II. Experimental antitumor activity, *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 1961 (1992).
- Kashima, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Lee, K. J., Bori, I., Fukushima, Y., Bastow, K. F. and Lee K. H. : Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 487 (1993).
- Shirahata, S., Murakami, H., Nishirama, K., Sugata, I., Shinogara, K., Nonaka, G., Nishioka, I. and Oura, H. : DNA breakage by hydrolyzable Tannins in the presence of cupric ion, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1033 (1985).
- Shirahata, S., Murakami, H., Nishiyama, K., Yamada, K., Nonaka, G., Nishioka, I. and Oura, H. : DNA breakage by flavan-3-ol and procyanidins in the presence of cupric ion, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 299 (1989).
- Ukei, S., Nishioka, I., Fujiwara, M. and Nonaka, G. : Psychotropic effects of rhubarb, *Gen-daitoyoigaku*, **7**, 98 (1986).
- Yokako, T., Lee, T. W., Oura, H., Nonaka, G.

- and Nishioka, I. : Effect of magnesium lithospermate B in rats with sodium-induced hypertension and renal failure. *Nephron*, **60**, 460 (1992).
- 14) Yokozawa, T., Suzuki, N., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Effect of extracts obtained from rhubarb in rats with chronic renal failure. *Chem. pharm. Bull.*, **34**, 4718 (1986).
- 15) Inokuchi, J. I. : Antihypertensive substance in seeds of *Arecacatechu L.*, *Life Sciences*, **38**, 1375 (1986).
- 16) Kakegawa, H., Matsumoto, H., Endo, K., Satoh, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Inhibition effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesenteric mast cells. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5079 (1985).
- 17) Shirahata, S., Nagasawa, T., Oura, H., Nonaka, G., and Nishioka, I. : Mechanism of the blood urea nitrogen decreasing activity of rhatannin from rhei rhizoma in rat. *I, Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2378 (1983).
- 18) Yokako, T., Fujioka, K., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Effect of rhubarb tannins on uremic toxins. *Nephron*, **58**, 155 (1991).
- 19) Scalbert, A. : Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**, 3875 (1991).
- 20) Fukuchi, K., Sakagami, H., Ikeda, M., Kawazoe, Y., Oh, H. T., Konno, K., Ichikawa, S., Hata, N., Kondo, H. and Nonoyama, M. : Inhibition of herpes simplex virus infection by pine cone antitumor substances. *Anticancer Res.*, **9**, 313 (1989).
- 21) Kashiwada, Y., Shi, H. P., Nonaka, G., Nishioka, I., Newbold, J. E. and Lee, K. H. : Inhibitory effects of the phenolic constituents of rhubarb on cell cultures producing hepatitis B virus. *Int. J. Orient. Med.*, **16**, 135 (1991).
- 22) Lee, K. H., Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E. and Cueng, Y. C. : Natural products as antiviral agents. Chu, C. K. and Cutler, H. G. (Eds.). *Tannins and Related Compounds as Anti-HIV Agents*, Plenum Press, New York, pp.69 (1992).
- 23) Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y. C. and Lee, K. H. : Anti-AIDS agents. 2: Inhibitory effects of tannins on HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.*, **53**, 587 (1990).
- 24) Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, H., Nonaka, G., and Nishioka, I. : Structure and antitherpetic activity among the tannins. *Phytochemistry*, **24**, 2245 (1985).
- 25) 内田 眞嗣, 丹羽 正美, 尾崎 正岩, 森 昭亂, 野中源一郎, 西岡 五夫, 縮合刑 タンニンの腦卒 中易發病 テット (SHRSP)に對する 延命效果と脂質過酸化抑制作用. *J. Med. Pharm. Soc. for WAKAN-YAKU*, **5**, 280-281 (1988).
- 26) Yokowawa, T., Iwano, M., Dohi, K., Oura, H., Nonaka, G. and Hattori, M. : Magnesium lithospermate B suppressed the proliferation of mesangial cells. *J. Med. Pharm. Soc. for WAKAN-YAKU*, **9**, 165 (1992).
- 27) Nagasawa, T., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Effect of rhatannin on incorporation of precursors into proteins and ribonucleic acids of rat liver. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4494 (1985).
- 28) Miyamoto, K., Nomura, M., Sasakura, M., Matsui, E., Koshiura, R., Murayama, T., Furukawa, T., Hatano, T., Yoshida, T. and Okuda, T. : Antitumor activity of oenothetin B, a unique macrocyclic ellagitannin. *Jpn. J. Cancer. Res.*, **84**, 99 (1993c).
- 29) Yoshida, T., Chou, T., Matsuda, M., Yasuhara, T., Yazaki, K., Hatano, T., Nitta, A. and Okuda, T. : Woodfordin D and oenothetin A, trimeric hydrolyzable tannins of macroring structure with antitumor activity. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1157 (1991).
- 30) Okuda, T., Yoshida, T. and Hatano, T. : Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Medica*, **55**, 117 (1989).
- 31) Gali, H., Perchellet, E., Klis, D., Johnson, J. and Perchellet, J. : Antitumor-promoting activities of hydrolyzable tannins in mouse skin. *Carcinogenesis*, **13**, 715 (1992).
- 32) Miyamoto, K., Murayama, T., Nomura, M., Hatano, T., Yoshida, T., Furukawa, T., Koshiura, R. and Okuda, T. : Antitumor activity and interleukin-1 induction by tannins. *Anticancer Res.*, **13**, 37 (1993a).

- 33) Miyamoto, K., Murayama, T., Nomura, M., Hatano, T., Furukawa, T., Hatano, T., Yoshida, T., Koshiura, R. and Okuda, T. : Antitumor activities of ellagitannins against sarcoma-180 in mice, *Bio. Pharm. Bull.*, **16**, 379 (1993b).
- 34) Yoshiki, K., Nonaka, G., Nishioka, I., Chang, J. J. and Lee, K. H., Antitumor agents, 129 tannins and related compounds as selective cytotoxic agents, *J. Nat. Prod.*, **55**, 1033 (1992).
- 35) Lee, M. W., Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Hirsunin, An ellagitannin with a diaryl-heptanoid moiety, from *Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Phytochemistry*, **31**, 967 (1992).
- 36) Cancer Chemotherapy National Service Center, Protocols for selected in vivo models., *Cancer Chemotherapy Reports*, **25**, 1 (1982).
- 37) Cancer Chemotherapy National Service Center, Protocols for screening chemical agents and natural protocols against animal tumors and other biological systems., *Cancer Chemotherapy Reports*, **3**(2), 33 (1972).
- 38) Kim, H. M., Oh, G. T., Hong, D. H., Hwang, B. Y., Kim, Y. H. and Lee, J. J. : Comparative studies of adramycin and human cell lines, *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 100 (1994).