

별불가사리 렉틴의 복수암에 대한 항암효과

손윤희 · 전경희* · 최수정 · 정시련*

영남대학교 이과대학, *영남대학교 약학대학

(Received March 30, 1998)

Antitumor Effect of *Asterina pectinifera* Lectin on Ascitic Tumor

Yun Hee Shon, Kyung Hee Jeune[#], Soo Jeong Choi and See Ryun Chung^{*}

College of Science and

^{*}College of Pharmacy, Yeungnam University Kyongsan 712-749, Korea

Abstract—The lectin from starfish, *Asterina pectinifera*, was purified and tested for its potential antitumor activity. It was shown to possess considerable toxicity toward various tumor cell lines. Concentration of *Asterina pectinifera* lectin (APL) at 4 mg/5×10⁵ cells resulted in 28% death of Ehrlich ascites tumor cell, 40% of L929, 60% of A549, and 52% of HeLa cells after 48 hours incubation. Toxicity of APL to L929, Ehrlich ascites, A549, and HeLa cells revealed a reduction in cell viability of approximately 70% at APL concentration of 8 mg/5×10⁵ cells after 48 hours incubation. Administration of APL (100 µg/day or 300 µg/day) inhibited the growth of Ehrlich ascites cells *in vivo*. Mice given only Ehrlich cells survived an average of 15±1 (S.E.) days. Mice given Ehrlich cells and 100 µg or 300 µg APL had 58% and 67% survival, respectively, after 20 days. These results suggest that APL has antitumor activity.

Keywords □ Antitumor activity, *Asterina pectinifera*, cell toxicity, lectin.

렉틴은 구조적으로 다양성을 지니며 특이적인 당쇄구조를 인식해서 결합하는 단백질 또는 당단백질로 식물계뿐만 아니라 미생물, 무척추동물, 하등척추동물에서도 발견되어지고 있다.^{1,2)} 여러 가지 렉틴들은 생물학적, 화학적, 면역학적 성질이 매우 다양하게 나타나며,^{3,4)} 주요 생리작용은 적혈구 및 각종세포를 응집하고, 정상세포보다 암세포를 더 쉽게 응집시키며, 임파구의 분열을 촉진하고, 세포에 대한 독성을 나타내는 현상등이다.⁵⁾

식물종자 렉틴과 암세포와의 응집반응은 잘 알려진 현상으로 피마자(*Ricinus communis*)와 강낭콩(*Phaseolus vulgaris*)의 렉틴은 암세포를 강하게 응집시키고, 맥아(*Triticum vulgare*), 렌즈콩(*Lens culinaris*), 완두(*Pisum sativum*), 대두(*Glycine max*)와 감자(*Solanum tuberosum*)의 렉틴은 암세포와 약한 반응을 한다.^{6,7)} 특히

독성이 높은 abrin과 ricin은 쥐와 사람의 암세포(L 1210 leukemia, Ehrlich ascites tumor, Lewis lung carcinoma, B16 melanoma, fibrosarcoma humeri, ovarian carcinoma, Ewing's sarcoma) 성장저해 효과가 증명되었으며,⁸⁾ *Griffonia(Bandeiraea) simplicifolia* I(GS I), concanavalin A, 맥아 응집소와 버섯류인 *Agaricus bisporus* 렉틴도 암세포의 증식을 억제하는 효과가 있었다.⁹⁻¹¹⁾ 또한 Ehrlich tumor cell과 *Phaseolus vulgaris* 렉틴을 37°C에서 1 시간 동안 처리한 후 쥐에게 주사했을 때 종양이 유발되지 않았으나 렉틴 처리 없이 암세포를 쥐에게 주사했을 때 종양이 유발되었다.¹²⁾ 균류에서 얻은 렉틴을 예로 들면 Roland등은 담자균류 *Calvatia gigantea*로부터 항암성분을 분리했으며,¹³⁾ Gregory 등도 많은 종류의 담자균에서의 추출물이 항종양 작용이 있는 것을 확인하였다.¹⁴⁾

본 논문에서는 해양동물 별불가사리(*Asterina pectinifera*)에서 렉틴 APL을 추출하여 이미 이 렉틴의 특

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-810-2375 (팩스) 053-815-3061

성을 밝히고 암세포 성장저해효과를 검색한 바 있는 전보¹⁵⁾에 이어 항암효과를 더욱 구명하고자, 쥐의 Ehrlich ascites tumor cell(EATC, ascites carcinoma), L929 세포(fibrosarcoma) 및 사람의 A549(lung carcinoma)와 HeLa 세포(epithelioid carcinoma, cervix)에 대한 성장 억제 효과를 *in vitro* 세포독성 실험으로 확인한 후, Ehrlich cells로 쥐에 복수암을 유발시켜 APL의 항암효과를 *in vivo*에서 살펴 보았다.

실험방법

렉틴(APL)의 분리 및 정제 - 별불가사리(*Asterina pectinifera*)는 우리나라 동해안에서 수집하여 조직을 파쇄하고 ammonium sulfate로 crude 렉틴을 추출한 후, Jeune 등의 방법¹⁵⁾에 따라 25 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.4)으로 미리 평형시켜 둔 DEAE Cellulose A-52(Whatman) column을 통과시켜 정제하였다. 단백질 성분은 0.05 M, 0.2 M, 0.3 M NaCl step-wise salt gradient 방법으로 분리했으며 각 분획은 280 nm에서 흡광도를 측정하고 사람의 적혈구 응집반응으로 렉틴 활성을 측정하였다. 0.3 M NaCl 분획이 가장 강한 활성을 나타내며 수거율도 높았으므로 이 분획을 증류수에 투석시켜 염(salt)을 제거한 후 이를 APL로 취했다. Lowry Assay¹⁶⁾를 이용해 렉틴의 단백질 농도를 결정한 후 Freezer Dryer(Labconco)를 이용하여 동결건조시켜 농축하였다.

세포배양 - Ehrlich ascites tumor cell(EATC, ATCC CCL-77)은 미국의 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 1×10^6 cells을 ICR 마우스의 복강내에 매주 이식하여 계대보존 중인 것을 사용하였다. *In vitro* 세포독성 실험을 위해 EATC를 쥐의 복강에서 추출하여 10% fetal calf serum(Gibco)이 포함된 NCTC 135(Sigma)를 배양액으로 CO₂ 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 배양하였고, 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 쥐의 L929와 사람의 A549, HeLa 세포는 영남대학교 의과대학 해부학 교실에서 분주 받아 horse serum이 첨가된 NCTC 135 배양액으로 배양하였다. 세포독성실험에 사용한 세포들은 액체질소의 기체상태(-150°C)에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 사용하였다.

응집 시험 - 렉틴 시료를 1 mg/ml 되게 조제하여

24 well plate(Nunc)에서 실시하였다. Phosphate-buffered saline(PBS, Sigma)에 준비된 암세포(1×10^5 cells/ml)를 0.5 ml 취한 뒤 0~800 µg의 렉틴을 첨가하고 30분 간격으로 현미경(Zeiss, Telaval 31)으로 관찰하였다.

In vitro 세포독성 실험 - 세포독성 실험은 EATC, L929, A549와 HeLa 세포를 사용하여 실시하였다. 활발히 성장하고 있는 Ehrlich cells을 1×10^5 cells/ml이 되도록 신선한 배지로 희석한 후, 세포배양 플라스크(25 cm²)에 5 ml씩 넣었다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후, APL의 최종 농도를 0 mg, 2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg이 되도록 배양액에 용해한 렉틴을 0.22 µm 여과막(Millipore)을 통해 여과 멸균한 후 각 세포에 처리하였다. APL의 처리농도는 암세포 응집실험 결과를 참고로 결정하였다. 렉틴이 처리된 세포는 배양기에서 24, 48, 72시간 배양한 후 trypan blue exclusion 법으로 푸른색으로 염색된 죽은 세포와 염색이 되지 않은 살아 있는 세포수를 계수하였다.¹⁷⁾ L929, A549, HeLa 세포들도 활발히 성장하고 있는 세포주를 1×10^5 cells/ml이 되도록 신선한 배양액으로 희석한 후, 5 ml의 세포액을 세포 배양 플라스크(25 cm²)에 넣고 10% horse serum이 첨가된 NCTC 135 배지로 37°C 5% 대기하에서 24 시간 배양하였다. EATC에 사용한 농도와 같은 양의 렉틴을 세포에 처리하고 24, 48, 72시간 배양 후 trypan blue exclusion법으로 살아 있는 세포 수와 죽은 세포수를 계수하였다. 본 실험은 3중으로 시행하였다.

실험동물 - 대한실험동물센터에서 구입한 34~42 g의 6주령 수컷 ICR 마우스를 사용하였다. 7~10일간 안정화 시킨 후 6마리를 1개 실험군으로 편성하여 3번의 실험을 반복하였으며, 실험기간 중 사료와 물은 자유로 먹게 하였다.

항암실험을 위한 시료 및 암세포 - 냉동건조한 시료 APL은 PBS에 용해시켜 0.22 µm 여과막(Millipore)을 통해 여과 멸균하여, 살균된 1 ml 주사기로 시료를 복강내에 주사하였다. Ehrlich 복수암 세포는 쥐의 복강에 5×10^7 세포를 이식한 후 8~10일 후 복강에서 추출하였다. 세포의 이식 및 추출은 멸균상태에서 실시하였으며, 추출한 세포는 trypan blue exclusion법으로 99% 이상이 살아 있는 세포임을 확인하였다.

EATC 복수암에 대한 항암실험 - EATC 복수암에 대한 APL의 항암 효과 측정을 위하여, 마우스를 여섯

실험군으로 나누어 복강내 암세포 이식 및 APL의 복강내 주사를 다음과 같이 실시하였다. 제 1 실험군은 0.3 ml의 PBS만 매일 1회 총 10회 주사하였고, 제 2 실험군은 100 µg APL을, 제 3 실험군은 300 µg APL만을 10일간 매일 쥐의 복강에 주사하였다. 제 4 실험군은 1×10^7 의 Ehrlich cells을 실험동물의 복강내에 이식하였으며, 제 5 실험군은 1×10^7 의 암세포를 이식하고 24시간 후부터 100 µg APL을 10일간 매일 1회 복강내 주사하였다. 제 6 실험군은 암세포를 이식하고 24시간 후부터 10일간 매일 1회 300 µg의 APL을 주사하였다. 암세포 성장은 매일의 체중변화로 측정하였으며, 항암효과는 각 실험군 마우스의 수명을 측정하여 Student's t-test를 시행하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정하였다.

실험결과 및 고찰

응집 및 *in vitro* 세포독성 실험 - 응집 시험에서 2.5시간 후부터 200 µg, 400 µg, 600 µg, 800 µg 렉틴을 첨가한 세포들에서 응집현상이 관찰되었으므로, 세포독성 실험은 응집효과를 나타낸 렉틴의 농도를 암세포 (EATC, L929, A549, HeLa)에 처리하여 암세포의 성장 억제 효과를 살펴보았다. EATC에 대한 실험에서 APL은 8 mg/ 5×10^5 cells 농도에서 24시간 처리시 64%, 48시간 처리시 68% 및 72시간 처리시 76%의 세포 성장 억제율이 나타났다. 각 처리 시간에서 APL의 농도가 낮아질수록 억제효과가 낮아져, APL 2 mg 농도

에서 24시간 배양 후에 12%의 성장억제율로 APL을 처리하지 않은 세포(조절군)의 억제율(11%)과 거의 같았다(Fig. 1). EATC에 사용한 농도와 같은 APL 농도로 L929 세포에 실시한 독성분석에서는, 8 mg 농도로 24시간, 48시간, 76시간 배양 후 각각 57%, 73%, 81%의 세포성장 억제효과가 나타났으며, APL 2 mg에서 24시간 후의 세포 생명력은 APL을 처리하지 않은 조절군 세포의 생명력과 비슷하였다. APL의 농도가 높을수록 처리시간이 길수록 세포독성 효과가 증가하였다(Fig. 2).

쥐의 암세포에 실시한 것과 같은 방법으로 사람의 A549, HeLa 세포주에 대한 APL의 세포독성을 실시한

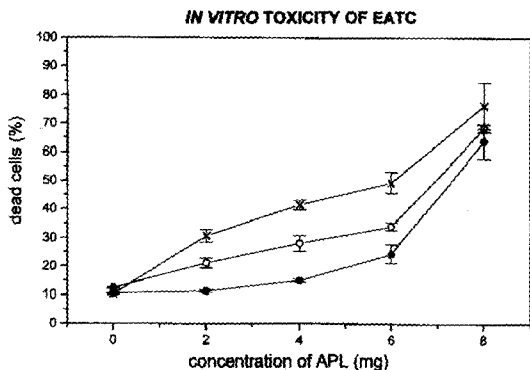


Fig. 1 — *In vitro* toxicity assay of APL to Ehrlich ascites tumor cells. The cells were incubated for 24 hours (—●—), 48 hours (—○—), and 72 hours (—×—) with APL at the concentrations indicated. Data shown are mean values with error bars indicating the standard error of the mean (n=3).

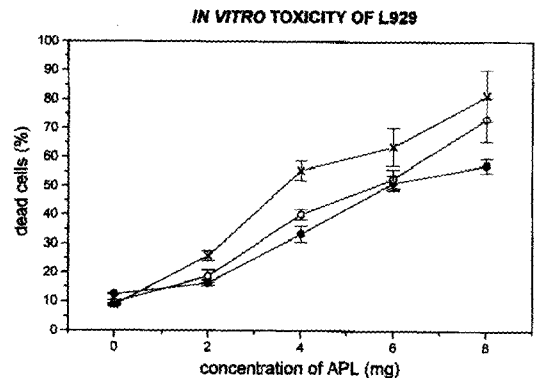


Fig. 2 — *In vitro* toxicity assay of APL to L929 cells. The cells were incubated for 24 hours (—●—), 48 hours (—○—), and 72 hours (—×—) with APL at the concentrations indicated. Metabolic viability was assessed by trypan blue exclusion.

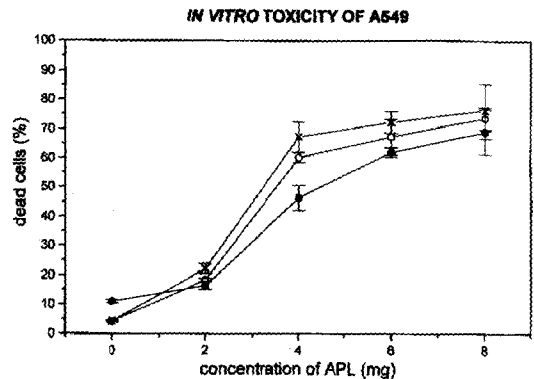


Fig. 3 — *In vitro* toxicity assay of APL to A549 cells. The cells were incubated for 24 hours (—●—), 48 hours (—○—), and 72 hours (—×—) with APL at the concentrations indicated. Data shown are mean values with error bars indicating the standard error of the mean (n=3).

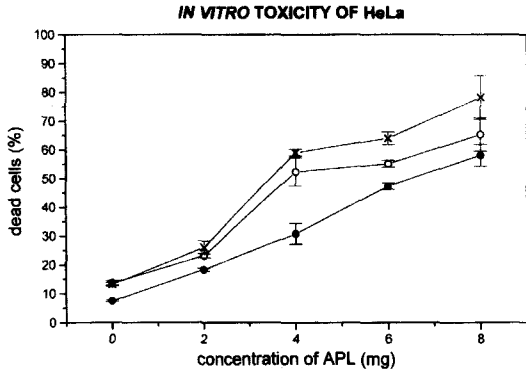


Fig. 4—*In vitro* toxicity assay of APL to HeLa cells. The cells were incubated for 24 hours (●), 48 hours (○), and 72 hours (×) with APL at the concentrations indicated. Metabolic viability was assessed by trypan blue exclusion.

결과, A549 세포에 8 mg APL 처리 후 24시간, 48시간, 72시간 배양에서 69%, 74%, 76%의 세포성장 억제효과를 나타내었다(Fig. 3). 8 mg APL을 HeLa 5×10^5 cells에 처리했을 때 24시간 후에는 58%의 세포성장억제, 48시간 후에는 65%, 72시간 후에는 78%의 억제효과를 나타내었다. 그리고 다른 세포들과 같이 농도가 높을수록 처리 시간이 길수록 독성효과가 증가하였다(Fig. 4). 이와같은 렉틴의 시간 및 농도 의존적 암세포 성장저해작용의 측정 결과를 토대로, 향후 실험에서는 각 농도별에서 48시간 이후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay로 세포독성효과를 측정하는 것이 적절할 것으로 사료되었다. 한편 APL은 쥐 암세포나 사람 암세포 모두에 강한 세포성장 억제효과가 있었기 때문에, EATC를 사용하여 쥐를 대상으로 복수암을 유발시킨 후 생체에서의 APL 항암효과를 측정하였다.

EATC 복수암에 대한 항암효과 - *In vivo*에서 Ehrlich cells에 대한 APL의 효과를 살펴보기 위하여, 각 실험군에서 마우스의 평균 체중변화로 Ehrlich cell의 성장을 측정하였다(Fig. 5). 마우스에 Ehrlich cells만 복강내에 이식했을때, 종양세포 이식 후 16일에 복수와 암세포의 축적으로 마우스의 몸무게가 27.9g이 증가하였으며, 이는 PBS만을 주사한 마우스에서는 2.5g만이 증가한 것과 크게 대조가 되었다. 매일 10일간 100 μ g이나 300 μ g APL만을 주사했을 때, 16일 후 각각 마우스당 3.5g과 0.8g의 체중이 증가하였으므로, 적어도 이 농도의 APL은 마우스 생체에 독성 효과는 없었다. Ehrlich

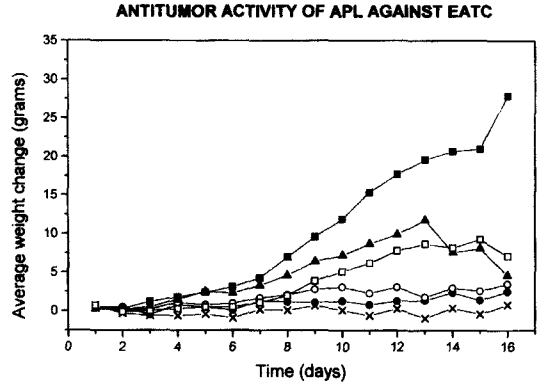


Fig. 5—Effect of intraperitoneal inoculation of APL on the growth of Ehrlich cells *in vivo*. Points indicate average weight change per mouse in each group of mice. ●—PBS only, ○—100 μ g lectin only, ×—300 μ g lectin only, ■—Ehrlich cells only, ▲—Ehrlich cells and 100 μ g lectin, □—Ehrlich cells and 300 μ g lectin.

cell 이식 후 매일 10회의 100 μ g APL과 300 μ g APL을 복강내 주사한 마우스는 16일 후 각각 4.6g과 7.1g의 체중이 증가하였으므로, APL은 마우스 생체내의 복수암 성장을 억제하는 효과가 있었다.

Ehrlich cells 이식 후 APL 처리에 의한 쥐의 수명율은 Table I과 같았다. EATC만을 이식한 쥐들은 20일 후 0%의 수명율로 이 실험군의 쥐는 모두 죽은 반면, Ehrlich 복수암 이식 후 매일 10회의 100 μ g APL 또는 300 μ g APL을 주사했을 때 20일 후 각각 58%와 67%의 수명연장 효과가 있었다. 100 μ g이나 300 μ g APL만을 매일 10일간 주사했을 때, 20일 후 100% 수명율을 나타내었다. 이와같이 APL은 쥐 복강내 Ehrlich ascites tumor cells의 증식을 억제하여 수명연장 효과가 있었다. 이는 Lin 등¹⁸⁾이 abrin과 ricin이 Ehrlich cell의 성장을 강하게 억제함을 보고한 것과, Ikegawa 등¹⁹⁾의 *P. linteus* 자실체 추출물이 Ehrl-

Table I—Antitumor activity of APL against Ehrlich ascites tumor cells in ICR male mice

Group	APL injections	Ehrlich cell challenge	Survival rate (% after 20 days)
1	-	10^7 cells	0
2	PBS buffer	-	100
3	100 μ g/day	-	100
4	300 μ g/day	-	100
5	100 μ g/day	10^7 cells	58*
6	300 μ g/day	10^7 cells	67*

*Survival rate of APL injected groups was significantly increased ($p < 0.05$).

ich carcinoma에 항암효과가 있음을 확인한 바와 같은 뜻으로 이해할 수 있다. 식물류, 균류, 지의류, 세균에서 분리한 여러 렉틴이 Ehrlich carcinoma, Sarcoma 180, L1210 등의 종양세포에 항암 효과가 있음이 주목되고 있으며,²⁰⁾ 그 중에서도 구름버섯, 운지(*Coriolus versicolor*), 배양균사체로부터 추출한 PS-K는 Kres-tin이라는 이름으로 시판되고 있고²¹⁾ 표고버섯(*Lentinus edodes*)유래의 다당체 lentinan 또한 각종 임상 실험에서 항암력을 확인하였다.²²⁾ 지금까지 많은 식물류 및 균류에서 추출한 렉틴의 항암효과에 대한 연구가 많았으나, 보다 우수한 항암 성분의 개발을 위한 연구가 계속되고 있으므로, 본 연구에서는 이러한 연구의 일환으로 이미 전보¹⁵⁾에서 암세포 성장저해효과를 검색한 바 있는 별불가사리에서 추출한 렉틴이, 생체에서의 복수암에 대한 항암효과가 있음을 증명하였다. 이 결과를 기초로 더 오랜 기간(5~10개월)동안의 수명연장 효과를 분석하면 더욱 의미있는 렉틴의 항암작용 연구가 될 것으로 사료된다.

렉틴의 암세포에 대한 독성 효과의 세부 작용기전은 잘 알려지지 않았지만, 암세포 표면의 특성변화로 렉틴과 암세포의 결합이 정상세포보다 쉽게 이루어지는 것이 한 원인으로 알려져 있다. Abrin, ricin은 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성되어 있으며^{23,24)} B-사슬은 말단에 galactose 잔기를 가지는 세포표면 수용기에 결합하고, A 사슬은 세포질로 투과해 60S ribosomal 소단위를 불활성화시켜 단백질 합성을 방해하므로써 암세포에 독성 효과를 가지는 것으로 알려져 있다.^{25,26)} 암세포에 대한 GS I 렉틴의 독성효과도 GS I과 암세포 표면 galactose기와의 결합에 의해서 나타나는 것으로 알려져 있다.⁹⁾

렉틴은 또한 숙주 면역계를 자극하여 항암효과를 나타낼 수 있다. 대식세포가 암세포의 자극을 받으면 그들의 세포표면에 렉틴과 반응할 수 있는 당단백질을 표현하는 것이 확인되었으며,⁹⁾ 렉틴에 의한 당쇄구조의 인식에 의해 암세포와 대식세포가 근접되어, 활성화된 대식세포는 암세포 용해작용을 할 수 있다. 이때의 렉틴은 항체의존성 종양세포 분해작용(antibody-dependent tumor lysis by macrophages)에서의 항종양성 항체와 유사한 기능으로 대식세포 매개성 종양세포 용해를 유도하며, 대식세포의 렉틴 의존성 종양세포 용해작용은 항체 의존성작용과는 달리 많은 종류의 종양세포들을 용해할 수 있는 장점이 있다.²⁷⁻²⁹⁾ 렉틴 또한 polymorphonuclear leukocytes(PMNs)를 자극하여 종양세포를 붕괴(PM-

Ns-mediated cytotoxicity)할 수 있으며, 이때의 PMNs는 렉틴의 자극에 의한 대식세포의 암세포 용해 작용에서의 대식세포와 같이 종양세포를 인식하여 제거하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.^{30,31)}

본 연구 결과에 의하면 *in vitro* 세포독성효과를 위한 APL의 농도(4~8 mg/5×10⁵ cells)는 *in vivo* 항암효과 실험의 APL 양(100 µg, 300 µg/1×10⁷ cells)에 비해 고농도이므로, APL의 항암효과는 숙주의 면역기능을 자극하여 항종양 효과를 나타내었을 가능성이 있으며, 앞으로 그 작용기전을 살펴보는 연구는 흥미가 있을 것이다. 또한 본 연구 결과를 기초로 독성은 나타나지 않거나 최소화하여 항암효과와 mitogenic activity가 있는 '적정 농도'의 측정으로 임상 실험으로의 접근의 시도나 solid tumor를 유발하여 렉틴을 tumor 부위에만 처리한 후의 종양 억제 작용의 관찰 등의 연구는 매우 흥미 있을 것으로 기대된다.

결 론

별불가사리(*Asterina pectinifera*)에서 추출한 렉틴 APL은 200~800 µg 농도에서 암세포(5×10⁴ cells)에 대한 용집현상이 나타났다. 용집효과를 나타낸 렉틴의 농도를 이용한 암세포 독성실험 결과에 의하면, APL은 쥐의 EATC, L929 및 사람의 A549, HeLa 세포주에 독성효과가 있었다. Ehrlich ascites tumor cells을 마우스의 복강내에 이식한 후 APL의 주사에 의해, 복수암 세포의 성장이 억제되고 수명연장 효과가 있었으므로 항암효과가 증명되었다. *In vivo*에서 항암효과를 나타낸 렉틴의 농도는 *in vitro* 독성실험에서 암세포주 성장 억제효과를 나타낸 렉틴의 농도보다 낮았으므로, APL의 항암작용은 숙주 의존성 항종양 작용에 의해 나타났을 가능성이 있다.

감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단의 박사후연수과정(Post-doc., 손윤희) 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Elgavish, S. and Shaanan, B. : Lectin-carbohydrate

- drate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 462 (1997).
- 2) Chung, S. R., Kim, J. H., Suh, Y. A. and Jeune, K. H. : Lectins from marine shells, III. *Arch. Pharm. Res.* **9**, 201 (1986).
 - 3) Jeune, K. H., Kim, J. H. and Chung, S. R. : Lymphocytes mitogenic and immunochemical characteristics of the immunomodulating lectins, MLA, from marine natural products. *Yakhak hoeji* **39**, 252 (1995).
 - 4) Lis, H. and Sharon, N. : Biological properties of lectins, in *The Lectins*, Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein, I. J.(eds.), Academic Press, New York, p. 266 (1986).
 - 5) Sharon, N. : Lectins. *Sci. Am.* **6**, 108 (1977).
 - 6) Tomita, M., Osawa, T., Sakurai, Y. and Ukita, T. : On the surface structure of murine ascites tumors. I. Interactions with various phytoagglutinins. *Int. J. Cancer* **6**, 283 (1970).
 - 7) Nachbar, M. S., Oppenheim, J. D. and Aull, F. : Interaction of lectins with plasma membrane glycoproteins of the Ehrlich ascites carcinoma cell. *Biochim. Biophys. Acta*, **419**, 512 (1976).
 - 8) Fodstad, O., Olsnes, S. and Pihl, A. : Inhibitory effect of abrin and ricin on the growth of transplantable murine tumors and of abrin on human cancers in nude mice. *Cancer Res.* **37**, 4559 (1977).
 - 9) Maddox, D. E., Goldstein, I. J. and Lobuglio, A. F. : *Griffonia simplicifolia* I lectin mediated macrophage-induced cytotoxicity against Ehrlich ascites tumor. *Cell Immunol.* **71**, 202 (1982).
 - 10) Kiss, R., Camby, I., Duckworth, C., Decker, R. De., Salmon, I., Pasteels, J-L., Danguy, A. and Yeaton, P. : *In vitro* influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, concanavalin A, wheat germ, and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo, and SW837 human colorectal cancer cell growth. *Gut* **40**, 253 (1997).
 - 11) Yu, L., Fernig, D. G., Smith, J. A., Milton, J. D. and Rhodes, J. M. : Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Res.* **53**, 2912 (1993).
 - 12) Robinson, E. and Mekori, T. : Studies on the effect of phytohemagglutinin on ascites tumor in mice. *Isr. J. Med. Sci.* **7**, 83 (1971).
 - 13) Roland, J. F., Chmielwewicz, Z. F., Weiner, B. A., Gross, A. M., Boening, O. P., Luck, J. V., Bardos, T. J., Really, H. C. and Sugiura, K. : Calvacine, a new antitumor agent. *Science* **132**, 1987 (1960).
 - 14) Gregory, F. J., Healy, E. M., Agerbory, H. P. K. Jr. and Warren, G. H. : Studies on antitumor substances produced by Basidiomycetes. *Mycologia* **58**, 80 (1966).
 - 15) Jeune, K. H., Park, C. S., Park, W. H., Choi, S. J., So, M. S. and Chung, S. R. : Characteristics and cancerostatic activity of the starfish lectin. *Yakhak Hoeji* **41**, 4 (1997).
 - 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
 - 17) Hudson, L. and Hay, F. : The lymphocytes : its role and function. In *Practical Immunology* 3rd ed., Blackwell Scientific Pub., Oxford, p 86 (1989).
 - 18) Lin, J.-Y., Tserng, K.-Y., Chen, C.-C., Lee, L.-T. and Tung, Y.-C. : Abrin and ricin: new antitumor substances. *Nature (Lond.)* **229**, 292 (1970).
 - 19) Ikegawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M. and Fukioka, F. : Antitumor activity of aqueous extract of some edible mushrooms. *Cancer Res.* **29**, 734 (1969).
 - 20) Komatsu, N., Okuba, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakaki, S. : Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *schizophyllum commune*. *Gann* **60**, 137 (1967).
 - 21) Tsugagoshi, S. and Ohashi, F. : Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* **65**, 557 (1974).
 - 22) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fractionation of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.* **30**,

- 2776 (1970).
- 23) Olsnes, S. and Pihl, A. : Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. evidence for different biological functions of its two constituent peptide chains. *European J. Biochem.* **35**, 179 (1973).
- 24) Olsnes, S., Refsnes, K. and Pihl, A. : Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature* **249**, 627 (1974).
- 25) Benson, S., Olsnes, S., Pihl, A., Skorue, J. and Abraham, A. K. : On the mechanism of protein synthesis inhibition by abrin and ricin. Inhibition of the GTP hydrolysis site on the 60S ribosomal subunit. *European J. Biochem.* **59**, 573 (1975).
- 26) Sperti, S., Montanaro, L., Mattiolo, A. and Stirpe, F. : Inhibition by ricin and protein synthesis *in vitro*. 60S ribosomal subunits as target of the toxins. *Biochem. J.* **136**, 813 (1973).
- 27) Yamazaki, M., Esumi-kurusu, M., Mizuno, O., Ogata, K. and Kamiya, H. : Marine animal lectin-dependent tumor recognition by macrophages. *Gann* **74**, 405 (1983).
- 28) Kurisu, M., Yamazaki, M. and Mizuno, D. : Induction of macrophage-mediated tumor lysis by the lectin wheat germ agglutinin. *Cancer Res.* **40**, 3798 (1980).
- 29) Yamazaki, M., Shinoda, H. and Mizuno, D. : Antibody-dependent macrophage-mediated cytotoxicity in a murine syngeneic tumor system. *Gann* **67**, 651 (1976).
- 30) Tsunawaki, S., Oshima, H., Mizuno, D. and Yamazaki, M. : Induction of polymorphonuclear leukocyte-mediated cytotoxicity by wheat germ agglutinin and antitumor antibody. *Gann* **74**, 258 (1983).
- 31) Yamazaki, M., Ikenami, M., Komano, H., Tsunawaki, S., Kamiya, H., Natori, S. and Mizuno, D. : Polymorphonuclear leukocyte-mediated cytotoxicity induced by animal lectin. *Gann* **74**, 576 (1983).