

## Lectin-conjugated Ellagitannin의 흑색종에 대한 항암활성

김형근 · 한기숙 · 이도익<sup>#</sup>

중앙대학교 약학대학

(Received October 2, 2000)

## Effects of Lectin-conjugated Ellagitannin on Antitumor Activity

Hyoung-Kun Kim, Ki-Sook Han and Do-Ik Lee<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Chungang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — Generally, antitumor drugs have strong toxicity and result in damage in normal cells. Previously, lectin has been reported as a tumor cell specific binding protein and tannin as an antitumor substance. In this study, we investigated antitumor activity of lectin-conjugated ellagitannin and used praecoxin A as an ellagitannin source. We injected mouse melanoma cell, B16-F10, on right the femoral region of C57BL/6 mouse. After 10 hours later, first treatment with praecoxin A, lectin-praecoxin A mixture and lectin-conjugated praecoxin A was carried and followed by injection i.m. every 48 hours. Praecoxin A extended the life of mice up to 14.8% in comparison with the negative control group at 5 mg/kg dose. The life extending ratio of Lectin-praecoxin A mixture was 26.1% at 5 mg/kg dose, and the life extending ratio of lectin-conjugated praecoxin A was 28.7% at 5 mg/kg dose. On the basis of these findings, we suggest that antitumor activities of lectin-praecoxin A mixture and lectin-conjugated praecoxin A on survival are better than that of praecoxin A.

**Keywords** □ Lectin-conjugated Ellagitannin, praecoxin A, antitumor activity.

최근 의약 전달 체계의 한 방법으로 환부에만 선택적으로 적용시켜 치료하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 항암제의 경우 일반적으로 독성이 강하여 정상세포에도 손상을 초래하는 경우가 많다. 따라서 암 세포만을 선택적으로 결합할 수 있는 물질의 선택이 매우 중요하다.

최근 세포생물학과 구조생화학의 연구 결과에 의하면 세포가 암화된 경우와 정상세포를 비교하였을 때 세포표면간의 당의 구조적 차이가 보고되고 있다.<sup>1,2)</sup> wheat germ agglutinin(*Triticum vulgare*에서 유래, WGA)은 N-acetyl-D-glucosamine 및 N-acetylneuraminic acid에 특이적으로 결합하는 성질이 잘 알려져 있으며, 바이러스와 화학발암제로 악성화된 세포를 정

상세포에 비해 강하게 응집하는 성질이 알려져 있다.<sup>3)</sup> 이와 같은 결합 성질을 이용하여 항암제와 conjugate시킨 경우 효과적인 targeting의 재료로 선택할 수 있다.

본 연구에서는 식물에서 정제된 ellagitannin의 일종인 praecoxin A(M.W.=952.08, Fig. 1)를 사용하였다. Tannin은 생체 내에서 다양한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있는데, angiotensin-converting enzyme (ACE) 저해효과,<sup>4,5)</sup> DNA topoisomerase II의 저해효과,<sup>6,7)</sup> DNA breakage 효과,<sup>8,9)</sup> 항정신성 효과,<sup>10)</sup> 신부전개선 효과,<sup>11,12)</sup> 항고혈압효과,<sup>13)</sup> 항allergy효과,<sup>14)</sup> blood urea nitrogen 감소효과,<sup>15,16)</sup> 항균효과,<sup>17)</sup> AIDS 및 herpes, hepatitis 등과 관련된 항 virus효과<sup>18-22)</sup> 등 그 밖의 여러 가지 활성<sup>23-25)</sup>이 보고되었다. 특히 최근 tannin의 항암효과에 대한 많은 보고가 잇따르고 있다. Tannin의 항암효과에 관한 보고로는 1992년 Gali 등이 ellagic acid와 gallic acid, 그리고 그 몇몇 관련 유도체

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-822-1469

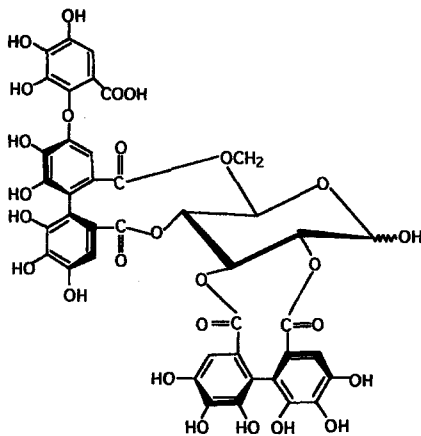


Fig. 1 - The structure of Praecoxin A ( $C_{41}H_{28}O_{27}$  M.W.= 952.08).

가 mouse의 피부암에 유효하다고 보고하였으며,<sup>26)</sup> 1993년 Miyamoto 등은 5개의 ellagitannin이 *in vivo*에서 항암효과가 있음을 보고하였고, interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ )의 유도를 증진시킨다고 보고하였다.<sup>27)</sup>

본 연구에서는 암세포에 특이적으로 결합하는 carbohydrate-binding protein(lectin) 특히, melanoma와 특이적으로 결합하는 wheat germ agglutinin (*Triticum vulgare*에서 유래)에 항암효과가 우수한 ellagitannin류인 praecoxin A를 conjugation시킨 lectin-conjugated ellagitannin을 사용하여 전이암인 흑색종(melanoma)에 대한 생명연장효과를 검색하였다.

### 실험재료 및 방법

**실험동물** - 본 연구의 실험동물로는 5주령된 C57BL/6 mouse(18~22 g  $\uparrow$ )를 사용하였다. C57BL/6 mouse는 대한동물에서 4주령된 것을 구입하여 1주의 적응기를 거친 후 사용하였다.

**실험약물** - Praecoxin A(M.W.=952.08)는 정제된 ellagitannin으로 중앙대학교 약학대학 생약학교실에서 제공받아 실험에 사용하였다. Lectin(Wheat Germ Agglutinin), Lectin-conjugated Praecoxin A, Lectin-Praecoxin A mixture는 중앙대학교 약학대학 약품물리학교실에서 제공받아 실험에 사용하였다. Negative control은 D-PBS buffer를 사용하였고, Positive control로는 cisplatin(cis-Platinum(II)-Diammine Dichloride: Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, F.W. 300.0) 10 mg/kg을 사용하

였다. 본 연구에서 투여한 약물들은 PBS(pH 7.2) 용액에 넣어 완전히 용해시킨 후 0.22  $\mu$ m filter로 여과 멸균하여 사용하였다.

**시약** - Cisplatin(cis-Platinum(II) diammine dichloride), DMSO, RPMI 1640, trypan blue는 Sigma Chem. Co.(U.S.A.)에서 구입하였으며, FBS, penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco BRL(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였고, 이 외 실험 중 사용한 buffer 및 시약들은 시판되는 1급 또는 특급 시약으로 직접 조제하여 사용하였다.

**기기 및 기구** - Centrifuge(Vision sci. co., Korea), clean bench(Vision sci. co., Korea), CO<sub>2</sub> incubator(Vision sci. co., Korea), deep freezer(Sanyo, Japan), microscope(Olympus, Japan), electronic balance(Mettler toledo, Switzerland), pH meter(Mettler toledo, Switzerland), autoclave(Vision sci. co., Korea), LN<sub>2</sub> tank(Minesota Valley Engineering, Inc., U.S.A.)를 사용하였고, 기타 모든 사용기기는 121°C, 1.1 kg/cm<sup>2</sup>, 20분간 고압증기 멸균하였다.

**세포주** - 본 실험에서 사용된 mouse melanoma cell B16-F10은 전남대학교 약학대학 면역학교실에서 분양 받아 실험에 사용하였다.

**세포배양** - 실험에 사용한 tumor cell line들은 10% FBS와 penicillin과 streptomycin이 각각 100 U/mL와 100  $\mu$ g/mL의 농도를 포함한 RPMI-1640 medium에서 1주일에 2~3회 계대배양 하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air로 조절된 CO<sub>2</sub>-incubator에서 배양하였다. 이렇게 배양된 tumor cell들은 모두 logarithmic phase에 도달한 것들을 실험 24시간 전에 새로운 배지에 넣어 원하는 농도로 희석하여 사용하였다. 이 때 사용된 FBS는 56°C에서 30분간 heating하여 inactivation시켰다.

**생명연장효과** C57BL/6 mouse(5 weeks,  $\uparrow$ )를 각 실험군 당 5마리씩을 준비하고 이식시킬 세포인 B16-F10 mouse melanoma cell을 log phase로 배양하여 이식하기 36~48시간 전에 세포 배양액을 새로운 배지와 1:1(volume: volume)로 만들어 세포의 성장을 최적화시켰다. 이식시킬 C57BL/6 mouse는 weight를 측정하여 기록하고 이식 24시간 전에 이식부위인 오른쪽 대퇴부를 면도한 다음, 최적화된 B16-F10을 PBS 용액으로 적당한 농도로 희석하여  $1 \times 10^4$  cells/mouse를 C57BL/6 mouse(5 weeks,  $\uparrow$ )의 미리 면

도된 이식부위에 *i.m. injection*으로 이식한다. 이 때 주사하는 양은 0.05 ml로 하였다. 암세포를 이식한 후 10시간 후에 처음으로 약물을 근육주사 하였으며, 약물은 negative control은 D-PBS buffer를 0.05 ml 투여하였고 positive control로는 cisplatin 10 mg/kg을 투여하였다. 실험군은 Lectin, Lectin-Praecoxin A Mixture, Lectin-conjugated Praecoxin A를 각각 0.1, 1, 5 mg/kg을 48시간 간격으로 투여하였다. 약물의 양은 0.05 mL가 되도록 조절하였다. 대조군과 실험군의 생존기간과 고형 종양의 크기와 무게를 비교하여 각 약물의 고형종양에 대한 생명연장효과를 측정하였다.

**통계처리** - 실험 결과는 평균치와 표준오차로 표시하였고, 대조군과의 차이를 Student t-test를 사용하여 효력을 검증하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

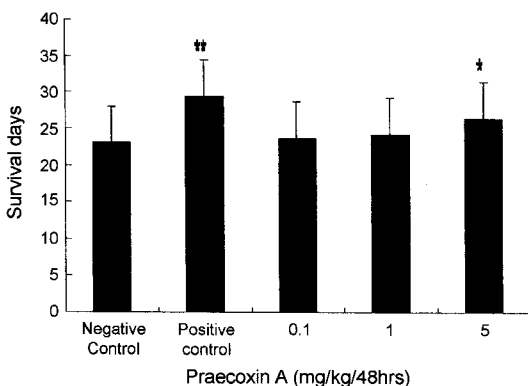
## 결과 및 고찰

**Praecoxin A** - Praecoxin A 0.1 mg/kg과 1 mg/kg을 투여하였을 때, negative control에 비해 각각 2.6%, 5.2%가 연장되었으나 유의성이 없었고, 5 mg/kg을 투여한 실험군은 negative control에 비해서 14.8%의 유의성이 있는 생명연장효과를 보였다. Positive control인 cisplatin의 생명연장률은 27.8%를

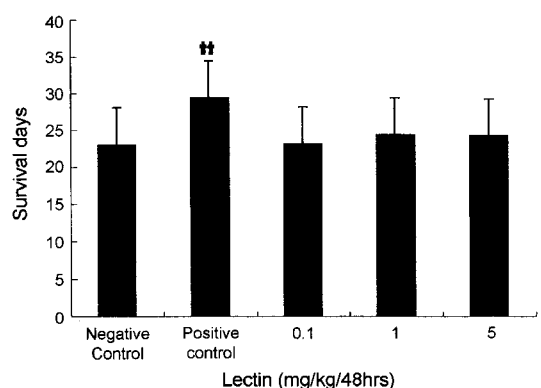
보였다(Fig. 2). 각 농도에 따라 용량의존적인 효과를 나타내어 약물의 농도를 증가하면 더욱더 많은 효과가 기대되지만 약물의 독성이 우려된다. Praecoxin A는 백금착체 항암제인 cisplatin보다 효과가 뛰어나지는 않았지만 약 15%의 생명연장효과를 보였다.

**Lectin(WGA)** - Lectin이 암세포만을 인식하므로 Lectin 단독투여만으로도 항암효과를 나타내는지를 확인하였다. 0.1 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg을 투여하여 생명연장효과를 검색하였을 때 각각의 농도에 따라 0.8%, 6.1%, 5.2%의 생명연장효과를 나타냈지만 유의성이 없었다(Fig. 3). Lectin 단독으로는 흑색종에 대한 항암효과를 기대할 수 없었고, 단지 암세포를 인식하는 물질로 생각된다.

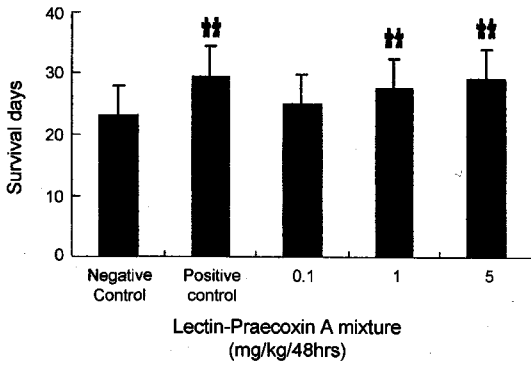
**Lectin-Praecoxin A mixture** - Lectin과 praecoxin A가 혼합된 물질을 투여하여 생명연장효과를 검색하였다. Lectin-praecoxin A mixture 0.1 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg를 mouse복강에 48시간 간격으로 투여하였을때 각각 7.8%, 19.1%, 26.1%의 생명연장효과를 나타내어 용량의존적인 효과를 나타내었다(Fig. 4). 또한 1, 5 mg/kg에서는 유의성이 있는 결과를 나타내었다. 5 mg/kg의 농도에서는 positive control인 cisplatin의 효과와 비교했을 때 비슷한 생명연장효과를 나타내어 두 약물을 병용투여했을 경우 그 효과가 증가한다는 의미있는 결과를 나타내었다.



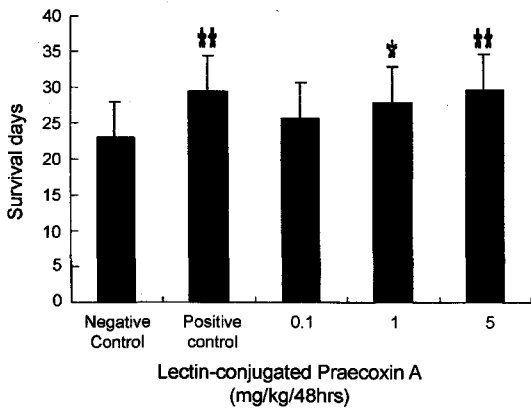
**Fig. 2** - Life-extending effect of praecoxin A on B16-F10 melanoma; 10 hrs later after inoculation of  $1 \times 10^4$  cells/mouse, C57BL/6 mice (5 weeks, ♂) were treated with indicated dose of praecoxin A with *i.m. injection* every 48 hrs. Negative control group was treated with D-PBS and positive control group was treated with cisplatin 10 mg/kg (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ).



**Fig. 3** - Life-extending effect of lectin (WGA) on B16-F10 melanoma; 10 hrs later after inoculation of  $1 \times 10^4$  cells/mouse, C57BL/6 mice (5 weeks, ♂) were treated with indicated dose of lectin with *i.m. injection* every 48 hrs. Negative control group was treated with D-PBS and positive control group was treated with cisplatin 10 mg/kg (\*\* $p < 0.01$ ).

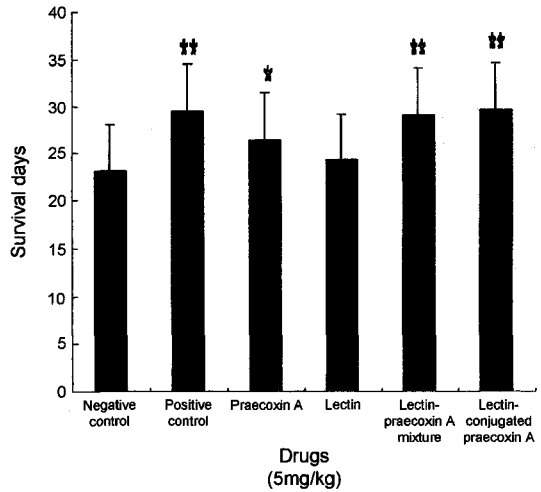


**Fig. 4** – Life-extending effect of lectin-praecoxin A mixture on B16-F10 melanoma; 10 hrs later after inoculation of  $1 \times 10^4$  cells/mouse, C57BL/6 mice (5 weeks, ♂) were treated with indicated dose of lectin-praecoxin A mixture with i.m. injection every 48 hrs. Negative control group was treated with D-PBS and positive control group was treated with cisplatin 10 mg/kg (\*\* $p < 0.01$ ).



**Fig. 5** – Life-extending effect of lectin-conjugated praecoxin A on B16-F10 melanoma; 10 hrs later after inoculation of  $1 \times 10^4$  cells/mouse, C57BL/6 mice (5 weeks, ♂) were treated with indicated dose of lectin-conjugated praecoxin A with i.m. injection every 48 hrs. Negative control group was treated with D-PBS and positive control group was treated with cisplatin 10 mg/kg (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ).

**Lectin-conjugated Praecoxin A** – Lectin-conjugated praecoxin A는 암세포를 인식하는 lectin과 이미 항암효과가 있다고 알려진 ellagitannin의 일종인 praecoxin A를 conjugation시켜 암세포에만 특이적으로 반응하도록 만든 물질이다. Lectin-conjugated praecoxin A 0.1 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg을 투여하여 그 생명연장효과를 검색하였을 때 각각 11.3%,



**Fig. 6** – Life-extending effect of praecoxin A, lectin, lectin-praecoxin A mixture, and lectin-conjugated praecoxin A on B16-F10 melanoma. Each dose is 5 mg/kg. Negative control group was treated with D-PBS and positive control group was treated with cisplatin 10 mg/kg (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ).

20.9%, 28.7%의 생명연장효과가 관찰되었다(Fig. 5). 용량의존적으로 유의성있게 수명이 연장되었으며, 특히 5 mg/kg의 농도에서는 positive control인 백금착체 항암제인 cisplatin과 비교하여 그 수치가 크게 높지는 않지만 더 높은 생명연장효과를 보였다. 이러한 결과로 볼 때 lectin과 conjugate된 praecoxin A가 lectin의 인도에 따라 암세포에 더 많이 작용하여 더 높은 항암작용을 나타낸 것으로 생각된다.

**결 론**

식물에서 정제된 ellagitannin의 일종인 praecoxin A를 melanoma에 특이적으로 결합하는 lectin인 Wheat Germ Agglutin(WGA)과 conjugation시킨 물질에 대한 생명연장효과를 *in vivo*에서 측정하였다.

각 약물에 따른 생명연장효과를 보면, Lectin 단독으로 투여한 군에서는 그 효과가 미약하였다. Praecoxin A 단독으로 투여한 군은 미약한 생명연장효과를 나타내었고, lectin-praecoxin A mixture와 lectin-conjugated praecoxin A의 경우 positive control과 대등한 생명연장효과를 나타내었다. 각 약물의 농도 5 mg/kg에서 서로 비교해 보면, praecoxin A 단독 14.8%, lectin 단독 5.2%, lectin-praecoxin A mix-

ture 26.1%, lectin-conjugated praecoxin A 28.7%의 생명연장효과를 보였다. cisplatin 10 mg/kg의 경우 27.8% 생명연장효과를 나타내었다(Fig. 6).

특히, lectin과 ellagitannin의 단순 혼합물의 경우에서도 생명연장효과가 나타나는 것은 매우 의미있는 결과이다. Lectin-praecoxin A mixture 및 lectin-conjugated praecoxin A는 lectin의 암세포에 대한 선택성 때문에 생명연장효과가 나타난 것으로 사료된다.

본 연구자료는 lectin의 targeting 효과에 대한 활성 기전을 규명하는데 기초자료로 이용되어 더 효과가 뛰어난 항암제 개발에 기여할 것으로 기대된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 보건과학기술연구개발사업(HMP-98-D-1-0016)에 의해서 수행된 연구 결과 중 일부를 정리한 것으로서 본 연구의 지원에 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) Dennis J, Donaghue, T, Florian, M., Kerbel Apparent, RS reversion of stable *in vitro* genetic markers detected in tumor cells from spontaneous metastasis. *Nature*, **292**, 242 (1981).
- 2) Dennis J. W, Laferte S, Waghorne C, Breitman M. L, Kerbel RS Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides in directly associated with metastasis. *Science*, **236**, 582 (1987).
- 3) Valdizan M. C, Julian J, Carson D. D, WGA-binding, mucin glycoproteins protect the apical cell surface of mouse uterine epithelial cell. *J. Cell Physiol.*, **151**(3), 451 (1992).
- 4) J. Inokuchi, H. Okabe, T. Yamauchi, A. Nagamatsu, G. Nonaka, and I. Nishioka. Inhibition of angiotensin-converting enzyme in crude drugs. II. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 264 (1985).
- 5) S. Uchida, N. Ikare, H. Ohta, M. Niwa, G. Nonaka, I. Nishioka, and M. Ozaki. Inhibitory effects of condensed tannins on angiotensin-converting enzyme. *Japan. J. Pharmacol.* **43**, 242 (1987).
- 6) Kuramamochi, M. A., H. Kuramamochi, F. Kobayashi, H. E-kimoto, K. Talahashi, S. Kadota, Y. Takamori, and T. Kikuchi. Woodfruticosin (woodfordin C), a new inhibitor of DNA topoisomerase II. Experimental antitumor activity. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 1961 (1992).
- 7) Kashima, Y., G. Nonaka, I. Nishioka, K. J. Lee, I. Bori, Y. Fukushima, K. F. Bastow, and K. H. Lee. Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*. *J. Pharm. Sci.* **82**, 487 (1993).
- 8) Shirahata, S., H. Murakami, K. Nishirama, I. Sugata, K. Shinogara, G. Nonaka, I. Nishioka, and H. Oura. DNA breakage by hydrolyzable Tannins in the presence of cupric ion. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1033 (1985).
- 9) Shirahata, S., H. Murakami, K. Nishiyama, K. Yamada, G. Nonaka, I. Nishioka, and H. Oura. DNA breakage by flavan-3-ols and procyanidins in the presence of cupric ion. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 299 (1989).
- 10) Ukei, S., I. Nishioka, M. FujiiWara, and G. Nanoka. Psychotropic effects of rhubarb. *Gendaitooyigaku*, **7**, 98 (1986).
- 11) Yokako, T., T. W. Lee, H. Oura, G. Nonaka, and I. Nishioka, Effect of magnesium lithospermate B in rats with sodium-induced hypertensin and renal failure. *Nephron* **60**, 460 (1992).
- 12) Yokozawa, T., N. Suzuki, H. Oura, G. Nonaka, and I. Nisgioka. Effect of extrarts obtained from rhubarb in rats with chronic renal failure. *Chem. pharm. Bull.* **34**, 4718 (1986).
- 13) Inokuchi, J. I., Antihypertensive substance in seeds of Areca catechu L. *Life Sciences* **38**, 1375 (1986)
- 14) Sertoli A., S. Francalanci, S. Giorgini, C. Brusi, M. C. Acciai. Prevention of allergic contact dermatitis with alternative products. *Contact Dermatitis* **31**(5), 322 (1994).
- 15) Shirahata, S., T. Nagasawa, H. Oura, G. Nonaka, and I. Nisgioka. Mechanism of the blood urea nitrogen decreasing activity of rhatannin from rhei rhizoma in rat. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2378 (1983).
- 16) Yokako, T., K. fujioka, H. Oura, G. Nonaka, and I. Nisgioka. Effect of rhubarb tannins on uremic toxins. *Nephron* **58**, 155 (1991).
- 17) Scalbert, A., Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**, 3875 (1991).
- 18) Fukuchi, K., H. Sakagami, M. Ikeda, Y. Kawazoe, H. T. Oh, K. Konno, S. Ichikawa, N. Hata, H. Kondo, and M. Nonoyama. Inhibition of herpes simplex

- virus infection by pine cone antitumor substances. *Anticancer Res.* **9**, 313 (1989).
- 19) Kashiwada, Y., H. P. Shi, G. Nonaka, I. Nishioka, J. E. Newbold, and K. H. Lee. Inhibitory effects of the phenolic constituents of rhubarb on cell cultures producing hepatitis B virus. *Int. J. Orient. Med.* **16**, 135 (1991).
- 20) Lee, K. H., Y. Kashiwada, G. Nonaka, I. Nishioka, M. Nishizawa, T. Yamagishi, A. J. Bodner, R. E. KilKuskie, and Y. C. Cueng, Natural products as antiviral agents, C. K. Chu and H. G. Cutler, H. G. Tannins and Related Compounds as Anti-HIV Agents. *Plenum Press*. New York **69** (1992).
- 21) Nonaka, G., I. Nishioka, M. Nishizawa, T. Yamagishi, Y. C. Kashiwada, and K. H. Lee. Anti-AIDS agents, 2 : Inhibitory effects of tannins on HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.* **53** (1990).
- 22) Takechi, M., Y. Tanaka, H. Takehara, G. Nonaka, and I. Nishioka. Structure and antihyperlipidemic activity among the tannins. *Phytochemistry* **24**, 2245 (1985).
- 23) 内田 眞嗣, 丹羽 正美, 尾崎 正岩, 森 昭亂, 野中源一郎, and 西岡 五夫. 縮合型タンニンの 脳卒中易発病 デット (SHRSP) に対する 延命効果と脂質過酸化抑制作用. *J. Med. Pharm. Soc. for WAKAN-YAKU.* **5**, 280 (1988).
- 24) Yokowawa, T., M. Iwano, K. Dohi, H. Oura, G. Nonaka, and M. Hattori. Magnesium lithospermate B suppressed the proliferation of mesangial cells. *J. Med. Pharm. Soc. for WAKANYAKU*, **9**, 165 (1992).
- 25) Nagasawa, T., H. Oura, G. Nonaka, and I. Nishioka. Effect of rhatannin on incorporation of precursors into proteins and ribonucleic acids of rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 4494 (1985).
- 26) Gali, H., E. Perchellet, D. Klis, J. Johnson, and J. Perchellet : Antitumor-promoting activities of hydrolyzable tannins in mouse skin. *Carcinogenesis* **13**, 715 (1992).
- 27) Miyamoto, K., T. Murayama, M. Nomura, T. Hatano, T. Yoshida, T. Furukawa, R. Oshiura, and T. Okuda. Antitumor activity and interleukin-1 induction by tannins. *Anticancer Res.* **13**, 37 (1993).