

## 한국산 갈조류에서 추출한 Fucoidan의 황산기에 따른 항암작용

朴璋洙\* · 金안드레 · 金銀希 · 徐弘錫 · 崔原哲<sup>†</sup>

부산대학교 자연과학대학 화학과

<sup>†</sup>부산대학교 자연과학대학 생물학과

(2002. 1. 31 접수)

### Increased Anticancer Activity by the Sulfated Fucoidan from Korean Brown Seaweeds

Jang-Su Park\*, Andre Kim, Eun-Hee Kim, Hong-Suk Suh, and WonChul Choi<sup>†</sup>

Department of Chemistry Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Department of Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received January 31, 2002)

**요 약.** Fucoidan은 갈조류에 다량 함유되어있는 다당류로서 항암작용, 항혈응고작용, 항혈전작용, 항염증작용, 항virus작용과 같은 생리활성작용력을 가지고 있어 최근 많은 연구가 수행되어지고 있다. 본 논문은 갈조류에서 fucoidan을 추출 하여 그 항암활성을 SV40 DNA replication assay, RPA-ssDNA binding assay, 그리고 MCF7 cell growth inhibition assay를 이용하여 알아보았으며 이 항암활성은 fucoidan의 황산기가 중요한 역할을 하고 있음을 알아내었다. 화학적으로 황산기의 함유량을 증가시킨 fucoidan이 황산기의 함유량을 제거시킨 fucoidan보다 항암활성이 뛰어났고, 이는 RPA의 ssDNA 결합력을 떨어 뜨리기 때문이라 예측되어 진다. 본 연구는 한국산 갈조류에서 추출한 황산기를 함유한 fucoidan의 항암활성능력을 보여주었다.

**주제어:** 황산화 fucoidan, 항암효과, replication protein A(RPA), SV40 DNA 복제

**ABSTRACT.** Fucoidan is a kind of polysaccharides in brown seaweeds. For the past years have been extensively studied due to their numerous biological activities : anticancer, anticoagulant, antithrombotic, anti-inflammatory and antiviral. In this study, we have extracted fucoidan from the Korean brown seaweeds and examined it's anticancer activities for employed SV40 DNA replication assay, RPA-ssDNA binding assay of replication protein A(RPA: known as human single-stranded DNA-binding protein essential for DNA replication) and MCF7 cell growth inhibition assay. In addition to, we found that chemically sulfated fucoidan's anticancer activity is more higher than natural and desulfated fucoidan. It seem that fucoidan's sulfate group affect on DNA replication, cause of decrease RPA's DNA binding activity. These results suggests that sulfated fucoidan from Korean brown seaweeds have anticancer activity.

**Key words:** Sulfated fucoidan, anticancer, replication protein A(RPA), SV40 DNA replication

### 서 론

바다는 육상생물과는 조금 다른 생리활성물질을 함유한 해조류가 대단히 많기 때문에 새로운 생리활성분

질의 보고라고 할 수 있다. 이러한 이유로 많은 연구자들이 새로운 생리활성 물질들을 연고자 해조류 연구에 박차를 가하고 있다. 특히 해조류중 황산기를 함유한 다당류들은 항암성, 항종양성, 항virus성, 항혈액응고성,

면역력증강 등의 생리활성기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>17</sup> 다당류 중에서 fucoidan은 다시마를 비롯한 갈조류에 많이 함유되어있는데 다시마의 경우 건조중량의 4% 전후 함유 되어 있다. Fucoidan은 분자량이 200,000을 넘는 큰 다당류로서 L-Fucose의 에스테르화 황산을 주성분으로 하여 소량의 galactose, xylose, glucuronic acid 등을 함유하는 복잡한 황산화 다당이다. 황산화성을 갖고 있는 fucoidan은 앞에서 언급한 생리활성을 가지고 있어서 많은 국내의 학사들에 의해 활발한 연구가 수행되어 지고 있다. 이러한 fucoidan의 생리활성을 나타내는 주요 성분은 황산기인데 그 조성비율과 구조에 의하여 세포성장과 유전자 발현에 관한 생리학적 기능을 갖는 것으로 알려지고 있다.<sup>8</sup>

본 연구는 이렇게 다양한 fucoidan의 생리활성기능 중에서 항암작용을 in vitro에서 SV40(Simian Virus 40) DNA replication assay, 및 DNA 복제에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 RPA(replication protein A)의 ssDNA binding assay, 그리고 cancer cell growth inhibition assay, 등을 이용하여 연구하였다. 9-14 또한 이 항암작용이 fucoidan에 함유되어있는 황산기에 의한 것임을 알아보기 위하여 화학적으로 황산기의 함유량을 증가시킨 fucoidan(over sulfated fucoidan)과 황산기의 함유량을 제거시킨 fucoidan(desulfated fucoidan)을 각각 합성하여 다시마에서 추출한 native fucoidan과 그 항암성의 차이를 비교해 보았다.

## 재료 및 방법

### 일반시약

Fucoidan의 추출 및 황산화와 황산기의 제거 및 황산화도의 측정에 사용된 ethanol, cetylpyridinium chloride, sodium chloride, ethyl ether, sodium hydroxide, sulphuric acid, phosphorus pentoxide, sulphur dioxide, BaCl<sub>2</sub>, DMSO, pyridine, formamide 등은 SIGMA(St Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였고, 분석막은 Spectrum Co. (Gardena, CA, USA)사의 제품을 사용하였다.

### Fucoidan의 추출 및 황산기 함량을 늘린 fucoidan과 황산기를 제거한 fucoidan의 제조

Fucoidan 추출을 위해 갈조류인 *Laminaria japonica* (다시마), *Ecklonia stolonifera*(곰피), *Undaria pinnatifida* (미역), *Sargassum fulvellum*(모자반)은 자갈치 시장에서 판매하는 것으로 구입하여 사용하였다. Fucoidan의

추출은 Maeda와 Nisizawa방법을<sup>15</sup> 이용하여 추출하였는데, 먼저 500 g의 갈조류를 잘 씻어 소금기를 제거한 후, 잘게 잘아서 원심분리(12000 rpm, 4 °C, 20 min)한 후 상층을 6차례 진공농축하고 침전물의 3배에 해당하는 양의 95% ethanol을 넣고 하룻밤 지어 주었다. 이 용액을 다시 원심분리(6000 rpm, 4 °C, 20 min)하여 침전물을 분리하였고, 이를 다시 증류수로 녹인 후 다시 3차례 3배에 해당하는 양의 95% ethanol을 넣어 다시 침전 시켰다. 이를 다시 증류수에 녹인 후 부서하여 징제하고 이를 동결건조하여 crude fucoidan으로 추출하였다. Crude fucoidan을 다시 증류수에 녹이고 여기에 1.6 ml의 10% cetylpyridinium chloride 용액을 넣어 침전시켰다. 상온에서 24시간 방치한후 원심분리(3000 rpm, 상온, 15 min)한후 15 ml의 2 M NaCl: ethanol (100:15, v/v)용액으로 녹인 후 4 °C에서 24시간 방치하고 다시 원심분리(3000 rpm, 상온, 15 min)하여 얻은 침전물을 95% ethanol로 두 차례 씻어주고 이것을 증류수에 다시 녹여 투석하여 정제한 후 동결건조 시켜 부분적으로 정제된 fucoidan(CF-F)을 얻었다. 이 부분적으로 정제된 fucoidan(CF-F) 200 mg을 DEAE-cellulose column(9 2 cm)을 이용하여 분리하였다. Column을 증류수로 세척한 후 50 mM sodium acetate 완충용매(pH 5.0)에 녹인 CF-F를 흡착시켰다. 50 mM sodium acetate 완충용매(pH 5.0)로 세척한 후 1.0 M NaCl 용액 50 mM을 이용하여 농도차이 의해 단계별로 용출 시켰다.

황산기 함량을 늘린 fucoidan(over sulfated fucoidan)의 제조는<sup>16</sup> 먼저 동결건조시킨 fucoidan 5 g을 50 mM pyridine과 20 ml의 formamide로 녹이고 난 후 이 용액을 -5 °C로 온도를 낮추고 phosphorus pentoxide를 이용해 완전히 정제시킨 pyridine과 정제시킨 chlorosulfonic acid 6.0 ml을 30분 동안 한 방울씩 첨가하고 3시간 가량 저어준 다음 -5 °C에서 하룻밤 방치하였다. 그 후 ethyl ether로 추출하고 sodium hydroxide로 중화시키고 부서하여 정제하고 0.1 g NaCl과 ethanol로 침전시킨 후 용매를 제거하여 over sulfated fucoidan을 얻었다.

황산기를 제거한 fucoidan<sup>17</sup>(desulfated fucoidan)은 3 mg fucoidan을 DMSO, MeOH, pyridine(89:10:1, v/v) 용액에 녹인 후 100 °C에서 2시간 가열한 후 시커서 증류수 9 ml를 첨가하여 중화 시킨다. 이것을 부서 후 동결건조하여 얻었다.

### 황산화도의 측정

황산화도는 gravimetric method를<sup>18</sup> 이용하여 측정하

였다. 200-400 mg의 황산기가 함유된 fucoidan을 부피가 20 ml 정도 되게 증류수에 녹이고 여기에 3.5 N 염산을 넣어 20시간 정도 reflux를 시켜 가수분해하였다. 이 가수분해물을 sintered-glass Gooch filter로 탄소화합물들은 제거하고 증류수로 씻어 그 부피가 100 ml가 되게 하였다. 이 용액의 25 ml 정도를 barium sulphate를 이용하여 황산화정도를 측정하였다.

#### Replication protein A(RPA)의 정제

RPA 정제는<sup>12</sup> insect cells(Sf-9)로부터 lysates를 만들고 이를 0.5 M NaCl이 들어간 buffer A(25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% glycerol, 0.02% Nonidet P-40, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mg/ml leupeptin, and 0.2 mg/ml antipain)를 용매로 하여 ssDNA cellulose column에 흡착시키고, column 용량의 20배에 해당하는 0.5 M NaCl이 들어간 buffer A와 0.8 M NaCl이 들어있는 buffer A로 씻어주고난 후 2.0 M NaCl과 40% ethylene glycol이 들어간 buffer A로 용출하여 단백질을 분획별로 얻어내고 용출된 분획들은 그 양을 buffer A로 5배 묽히고 이를 0.5 M NaCl이 들어간 buffer A로 Affi-Gel Blue(Bio-Rad, Hercules, CA)를 column에 흡착시켰다. 이것을 다시 0.5 M NaCl이 들어간 buffer A와 0.8 M NaCl이 들어있는 buffer A로 씻어준 후 2.0 M NaCl과 40% ethylene glycol이 들어있는 buffer A로 단백질을 추출하였다. RPA가 들어 있는 분획을 50 mM NaCl이 들어간 buffer A로 투석한 후 Q-Sepharose column에 흡착시키고 NaCl의 농도를 50 mM에서 0.4 M까지 비중을 걸어 정제하였다. 이 모든 과정은 4°C에서 이루어졌으며 RPA의 확인은 RPA의 subunit인 p34와 p70의 항체를 이용한 immunoblotting으로 확인하였다. 분획은 90% 이상 순수하였고 coomassie staining으로 확인 하였으며 정제후에는 이를 -80°C에 보관 하여 사용하였다.

#### Simian Virus 40(SV40) DNA replication assay system

Simian Virus DNA의 복제에 필요한 물질들인 0.23 mg의 SV40 origin-containing circular duplex DNA (pUC-ori), 0.6 mg의 SV40 T-Ag, topo I, human DNA pol  $\alpha$ -primase, RPA, HeLa, 40 mM creatine Phosphate-di-Tris salt(pH 7.7), 1 mg의 creatine kinase, 7 mM의 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM의 DTT, 4 mM의 ATP, UTP, GTP, CTP 각각 200 mM, dATP, dGTP, 그리고 dCTP 각각 100 mM, 25 mM의 [<sup>3</sup>H]dTTP(300 epm pmol), HeLa extracts, 그리고 fucoidan을 혼합하여 반응혼합물(40  $\mu$ l)

로 만들고 이것을 37°C에서 2시간가량 방치한 후 Liquid Scintillation Counter(LS 6500; Beckman Instruments Inc. Fullerton, CA, USA)를 이용하여 DNA 복제정도를 측정하였으며 3번 반복실험하여 그 평균을 구하여 incorporation 값으로 사용하였다.

#### RPA-단일가닥 DNA binding assay

RPA의 단일가닥 DNA 결합력 측정은 50 mM Hepes-KOH(pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mg의 poly(dI · dC), 0.2 mg/ml의 bovine serum albumin 그리고 fucoidan, 혹은 over sulfated fucoidan, desulfated fucoidan을 함유한 반응혼합물(20  $\mu$ l)을 5-<sup>32</sup>P-labeled(dT)<sub>30</sub> (1,200 cpm/fmol)과 RPA를 섞어서 50분 동안 25°C에서 방치하였다. 반응이 끝나면 5% polyacrylamide gel을 이용한 전기영동법(0.5×TBE 완충용액, 12V/cm)으로 분리하여 측정하였다.

#### MCF-7 cell의 배양 및 cancer cell growth inhibition assay

MCF-7 human mammary gland adenocarcinoma cell은 10% fetal calf serum과 antibiotic-antimycotic agent(10 ml/ml)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 사용해 배양하였다. Medium, serum, 그리고 antibiotic-antimycotic agent는 Life Technologies, Inc., (Gaithersburg, MD, USA)사 제품을 사용하였다. 배양은 37°C를 유지하면서 5% CO<sub>2</sub> 주세하의 incubator에서 이루어졌다.

Growth inhibition assay는 six-well tissue culture plate에 cell을 밀도가 1 × 10<sup>5</sup> cells/well 정도가 되게 하여 24시간 방치하여 굵기고 10% fetal calf serum을 함유한 배지(control)와 fucoidan, over sulfated fucoidan, desulfated fucoidan을 각각 1 mg/ml 씩 첨가한 배지를 넣어주고 40시간 배양하여 성장저해효과를 알아보았다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서 fucoidan의 항암작용을 알아보기 위하여 수행한 SV 40 DNA replication assay system은 *in vitro*에서 DNA의 복제정도를 측정하는 유일한 실험법으로 현재 DNA복제 메커니즘 규명에 많이 이용되고 있다.<sup>9-12</sup> DNA가 복제되기 위해서는 복제 초기 단계에서 이중가닥의 DNA가 단일가닥으로 풀어지게 되고, 이때 Replication protein A(RPA)라는 단백질이 단일가닥 DNA(ssDNA)에 결합하게 된다. 그 후에 DNA 복제에

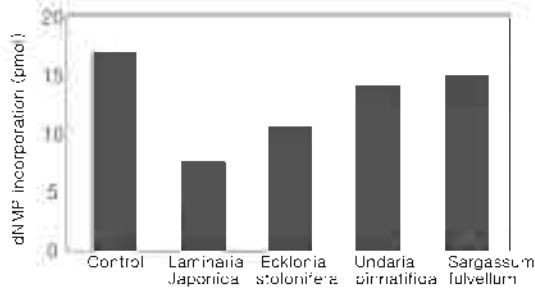


Fig. 1. The effect of fucoidan from *Laminaria japonica*, *Ecklonia stolonifera*, *Undaria pinnatifida*, and *Sargassum fulvellum* on SV40 DNA replication *in vitro*. Replication reaction comprised SV40 origin-containing DNA(pUC-ori+), SV40 T-Ag, HeLa cytosolic extract(100 µg), [<sup>3</sup>H]dTTP, and the indicated amounts of fucoidan(25 mM). Reaction mixtures were incubated for 2 h at 37 °C, and the reaction products examined for acid-insoluble radioactivity.

관여하는 여러 가지 DNA복제 단백질들이 관여하여 DNA복제가 시작 된다. 따라서 본 연구에서는 먼저 이 system을 이용하여 *Laminaria japonica*(다시마), *Ecklonia stolonifera*(곰피) *Undaria pinnatifida*(미역), *Sargassum fulvellum*(모자반)에서 각각 추출한 fucoidan이 DNA 복제에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. Fig. 1에서 보는바와 같이 fucoidan을 넣지 않은 control(1번 lane)의 DNA 복제 정도가 17 pmol 정도인데 비하여 *Laminaria japonica*(다시마), *Ecklonia stolonifera*(곰피) *Undaria pinnatifida*(미역), *Sargassum fulvellum*(모자반)에서 추출한 fucoidan(다시마: M.W. 200,000, 곰피: M.W. 23,000, 미역: M.W. 42,000, 모자반: M.W. 42,000)을 첨가하였을 때는 각각 DNA 복제 정도가 7.5, 10, 13.5, 15.0 pmol 정도로 저해되는 것을 관찰 할 수 있었다. 특히 다시마에서 추출한 fucoidan은 fucoidan을 넣지 않은 control에 비하여 DNA 복제 저해력이 두 배 이상 증가하였다. 또한 *Laminaria japonica*(다시마), *Ecklonia stolonifera*(곰피) *Undaria pinnatifida*(미역), *Sargassum fulvellum*(모자반)에서 추출한 fucoidan의 황산기(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 함유도를 알아 본 결과 각각 23.5%, 20%, 17%, 16%로 다른 연구자에 의해 보고된 사실과 같이 다시마에서 추출한 fucoidan의 황산기 함유량이 가장 높음을 알 수 있었다.<sup>19-22</sup> 이들 결과로 미루어 보면 fucoidan은 DNA 복제의 저해를 통하여 항암활성을 나타내는 것으로 추정되며, 이 활성은 fucoidan과 같은 나당류에 포함되어 있는 황산기가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 예견되

Table 1. Analysis of sulfate contents of fucoidan by Gravimetric method

	Sulfated	Native	Desulfated
Sulfate contents of Fucoidan(% of SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	55.3%	23.5%	0.2%

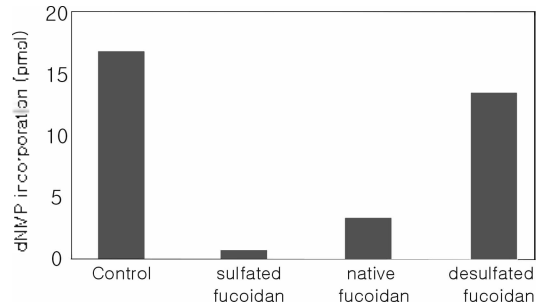


Fig. 2. The effect of sulfated fucoidan, native fucoidan and desulfated fucoidan on SV40 DNA replication *in vitro*. Replication reaction comprised SV40 origin-containing DNA (pUC-ori+), SV40 T-Ag, HeLa cytosolic extract(100 µg), [<sup>3</sup>H]dTTP, and the indicated amounts of fucoidan(25 µM). Reaction mixtures were incubated for 2 h at 37 °C, and the reaction products examined for acid-insoluble radioactivity.

어 진다.

따라서 본 연구에서는 이러한 항암효과를 나타내는 황산기에 중점을 두어 다시마에서 추출한 fucoidan과 이불 화학적으로 황산기의 함유량을 더 늘린 over sulfated fucoidan, 그리고 화학적으로 황산기의 함유량을 제거한 desulfated fucoidan을 각각 합성하여 이들의 항암활성 차이를 비교해 보았다(Table 1에 나타나있듯이 그 함유비는 fucoidan, over sulfated fucoidan, desulfated fucoidan이 각각 23.5%, 55.3%, 0.2%이다). Fig. 2에서 보여주듯이 over sulfated fucoidan의 DNA 복제 저해 정도가 1 pmol 정도로 가장 뛰어난 DNA replication 저해력을 보였으며, desulfated fucoidan은 14 pmol 정도로 저해력이 native fucoidan 보다 현저히 떨어짐을 알 수 있었다. 이 처럼 fucoidan이 *in vitro* DNA replication의 구체적인 저해 메커니즘을 알아보기 위하여 본 연구에서는 DNA복제 초기단계에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진(복제초기단계에서 RPA가 ssDNA 결합을 하여야만 복제가 시작됨) RPA의 ssDNA 결합에 미치는 fucoidan의 영향을 알아 보았다. Fig. 3의 RPA-ssDNA binding assay의 polyacrylamide gel 사진에 나타나 있

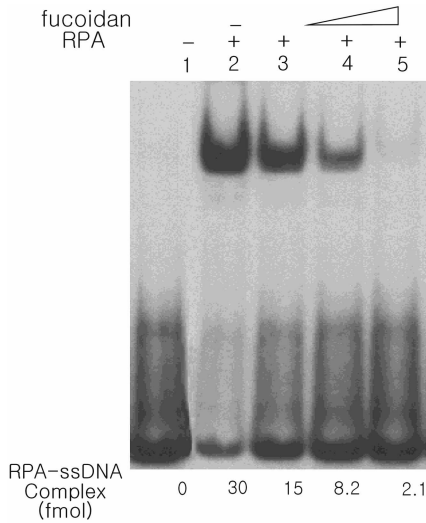


Fig. 3. The effect of amounts of fucoidan on RPA's ssDNA binding activity(lane 2: fucoidan 0 μM, lane 3: fucoidan 10 μM, lane 4: fucoidan 25 μM, lane 5: fucoidan 50 μM). Indicated amounts of either human RPA or a mixture of both RPA and fucoidan were combined with <sup>32</sup>P-labeled(dT)<sub>30</sub> and incubated for 15 min at 25 °C. The protein-DNA complexes were then separated from unbound DNA by 5% polyacrylamide(acrylamide:bisacrylamide, 29:1) gel electrophoresis.

듯이(각 lane의 위, 아래 두가지 band중 위쪽의 band는 oligo(dT)<sub>30</sub>과 RPA복합체이며 아래 band는 RPA와 결합하지 못한 oligo(dT)<sub>30</sub>의 band이다) fucoidan이 존재하지 않을 때는 Fig. 3의 lane 2에서 보여 주듯이 RPA와 단일가닥 DNA가 안정한 복합체를 형성한다는 것을 알 수 있는데 그 양이 증가할수록 결합력이 감소해 복합체 형성이 저해 됨을 알 수 있었다(Fig. 3의 lane 3-5). 또한 Fig. 4의 결과에서 보여주듯이 over sulfated fucoidan (lane 2) native fucoidan(lane 3)이나 desulfated fucoidan (lane 4) 보다 RPA-단일가닥DNA 결합력을 현저히 저해하고 있다. 따라서 fucoidan, 특히 sulfated fucoidan 은 단일가닥 DNA에 대한 RPA의 결합력을 떨어뜨리는 생물학적인 특성을 가짐으로써 SV40 DNA replication system에서 복제를 저해하는 것으로 추정된다.

이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 또한 유방암 세포인 MCF-7 cell의 growth inhibition assay를 수행하여 그 성장 억제 정도를 측정해 보았다. Fig. 5에서 보여준 결과처럼 fucoidan을 첨가하지 않은 배지의 cell 들은 시간이 경과할수록 수가 증가되어 40시간 정도 후

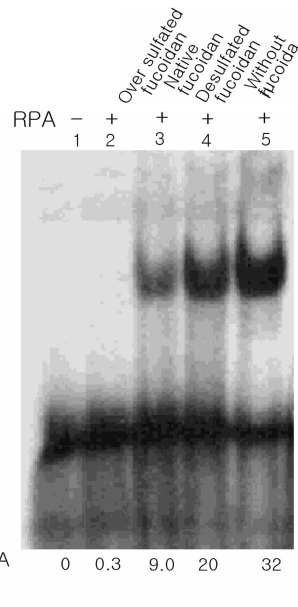


Fig. 4. The effect of oversulfated fucoidan(lane 2: 25 μM), native fucoidan(lane 3: 25 μM) and desulfated fucoidan(lane 4: 25 μM) on RPA's ssDNA binding activity(lane 5 no fucoidan). Indicated amounts of either human RPA or a mixture of both RPA and fucoidan were combined with <sup>32</sup>P-labeled(dT)<sub>30</sub> and incubated for 15 min at 25 °C. The protein-DNA complexes were then separated from unbound DNA by 5% polyacrylamide(acrylamide:bisacrylamide, 29:1) gel electrophoresis.

에는 약 3배정도 그 수가 증가한 반면에 fucoidan을 첨가하여 배양한 cell들은 시간이 경과할수록 그 수가 감소됨을 알 수 있다. 특히, 황산기의 함유량을 증가시킨 over sulfated fucoidan을 첨가한 배지의 암세포들은 15시간을 고비로 그 수가 급격히 줄어들어 40시간이 지난 후에는 황산기의 함유량을 감소시킨 fucoidan과 fucoidan을 넣지 않고 배양한 암세포에 비해 생존율이 거의 없음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 fucoidan의 항암활성은 fucoidan 내에 포함되어있는 황산기(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 사료되어지며, 특히 이들 항암활성은 RPA의 ssDNA 결합활성을 저해함으로써 나타나는 것으로 추측된다. Fucoidan에 함유되어있는 황산기(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)가 어떻게 RPA의 ssDNA 결합력을 저해하는 지에 대한 구체적인 메커니즘에 대해서는 쉐너 연구가 진행되어야 하겠지만 음전하량의 증가에 의해 RPA와 DNA의 결합력에 영향을 주는 것으로 추측된다.

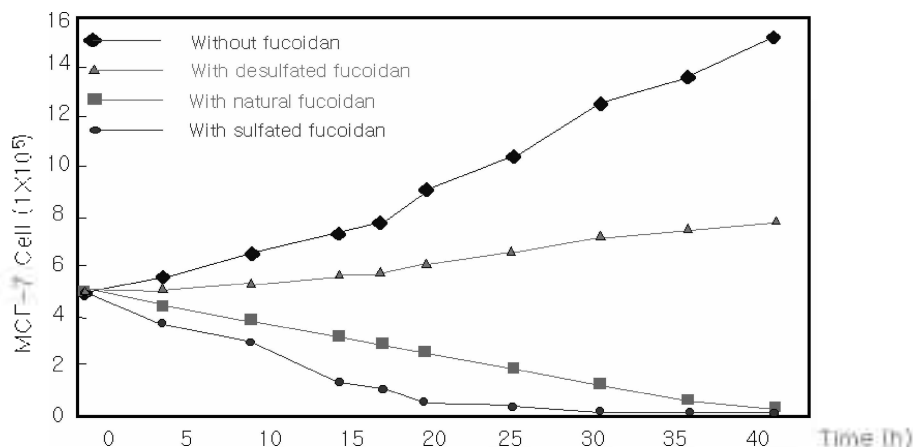


Fig. 5. MCF-7 cells were incubated in culture medium with sulfated fucoidan, native fucoidan and desulfated fucoidan. The untreated cells (without fucoidan) and treated cells with 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M and 200  $\mu$ M for 48 h were harvested.

본 연구는 해양수산 연구개발과제의 연구비로 수행되어졌으며 이에 감사드립니다.

### 인용 문헌

- Springer, G. F.; Wurzel, H. A.; McNeal, G. M.; Ansell, N. J.; Doughty, M. F. *Proc. Soc. Exp. Med.* **1957**, *94*, 404.
- Boisson-Vidal, C.; Collic-Jouault, S.; Fischer, A. M.; Tapon-Breaudiere, J.; Sternberg, C.; Durand, P.; Jozefonvicz, J. *Drugs of the Future* **1991**, *16*(6), 539.
- Boisson-Vidal, Haroun F.; Ellouali, M.; Blondin, C.; Fischer, A. M.; de Agostini, A.; Jozefonvicz, J. *Drugs of the Future* **1995**, *20*(12), 1237.
- Itoh, H.; Noda, H.; Amano, H.; Zhuang, C.; Mizuno, T.; Ito, H. *Anticancer research* **1993**, *13*, 2045.
- Beress, A.; Wassermann, O.; Tahhan, S.; Bruhn, T.; Beress, I.; Kraiselburd, E. N.; Gonzalez, I. V.; de Motta, G. E.; Chavez, P. I. *J Nat Prod.* **1993**, *56*(4), 478.
- Brunner, G.; Reimbold, K.; Mcissauer, A.; Schirrmacher, V.; Erkel, L. J. *Exp. Cell Res.* **1998**, *239*, 301.
- Durig, J.; Bruhn, T.; Zurborn, K.; Gutensohn, K.; Bruhn, H. D.; Beress, I. *Thrombosis Research* **1997**, *85*(60), 479.
- Lee, H.-S.; Jin, S.-H.; Kim, H.-S.; Ryu, B.-H. *Korean J. Food Sci. Technol.* **1995**, *27*(5), 716.
- Richard, A.; Pfuertner, Alexey, B.; Lori, E.; Aled, M.; Edwards *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*(1), 430.
- Erdile, L. E.; Heyer, W. D.; Kolodner, R.; Kelly, T. J. *J Biol Chem.* **1991**, *266*(18), 12090.
- Elena, B.; Sergey, K.; Alexey, B. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*(35), 27332.
- Park, J.-S.; Wang, M.; Park, S.-J.; Lee, S.-H. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*(41), 29075.
- Stigge, E.; Dean, F. B.; Hurwitz, J.; Lee, S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*(2), 579.
- Kar, S.; Carr, B. I. *J. Cellular Phys.* **2000**, *185*, 386.
- Maeda, M.; Nisizawa, K. *J. Biochem.* **1968**, *63*, 199.
- O'Neill, A. N. *Canadian J. Chem.* **1955**, *33*, 1097.
- Nagasawa, K.; Inoue, Y.; Kamata, T. *Carbohydrate Research* **1977**, *58*, 47.
- Dodgson, K. S.; Price, R. G. *Biochem. J.* **1962**, *84*, 106.
- Nishino, T.; Nagumo, T. *Carbohydr Res.* **1991**, *14*(1), 193.
- Zvyagintseva, T. N.; Shevchenko, N. M.; Nazarova, I. V.; Scobun, A. S.; Luk'yanov, P. A.; Elyakova, L. A. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **2000**, *126*(3), 209.
- Dace, R.; McBride, E.; Brooks, K.; Gander, J.; Buszko, M.; Doctor, V. M. *Thrombosis Research* **1997**, *87*, 113.
- Zvyagintseva, T. N.; Shevchenko, N. M.; Nazarova, I. V.; Scobun, A. S.; Luk'yanov, P. A.; and Elyakova, L. A. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **2000**, *126*(3), 209.