

## Lectin-conjugated Ellagitannin의 흑색종에 대한 전이억제효과

김형근 · 한기숙 · 이도익<sup>#</sup>

중앙대학교 약학대학

(Received October 2, 2000)

### Effects of Lectin-conjugated Ellagitannin on Inhibition of Melanoma Metastasis

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

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

**Abstract** — Recently, studies on missile antitumor drugs, which selectively act on tumor cell and display drug effects, have been performed. These missile antitumor drugs which can increase drug effects and decrease side effects, are ideal medication method. Lectin has been reported as tumor cell specific binding protein and tannin as antitumor substance. In this study, we studied inhibition of melanoma metastasis by lectin-conjugated ellagitannin and used praecoxin A as ellagitannin source. Mouse melanoma cell, B16-F10, was injected into the sole of forefoot of C57BL/6 mouse, and after administration with drug, the number of pulmonary tumor colony was counted. The administration of praecoxin A, lectin-praecoxin A mixture, and lectin-conjugated praecoxin A was started after amputation of established tumor foci at right forefoot of mice and continued for 3 weeks with i.p. injection of one of those drugs A every 24 hours. Lectin-praecoxin A mixture, and lectin-conjugated praecoxin A significantly reduced the number of spontaneous pulmonary metastasis. Exposure to 5 mg/kg of lectin-praecoxin A mixture and lectin-conjugated praecoxin A produced a statistically significant 38.3%, 41.8% reduction in the number of remaining pulmonary metastasis. These results suggest that metastasis inhibition by lectin-praecoxin A mixture and lectin-conjugated praecoxin A are better than that of praecoxin A.

**Keywords** □ Lectin-conjugated Ellagitannin, praecoxin A, melanoma metastasis.

최근 암세포에만 선택적으로 작용하여 약효를 발휘하게 하는 미사일형 항암제 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 미사일형 항암제는 약효를 증가시키고 부작용을 감소시키는 이상적인 형태의 투여방법이므로 암세포와 선택적으로 결합할 수 있는 물질의 선택이 대단히 중요한 부분이라 사료된다.

최근 세포가 암화가 된 경우와 정상세포를 비교하였을 때 세포표면간의 당의 구조적 차이가 보고<sup>1,2)</sup>되었고, 이와 같은 당의 구조적인 차이를 특이적으로 인식하여 결합하는 물질로는 monoclonal antibody와 car-

bohydrate-binding protein(lectin)이 있다. 이들 물질을 이용하여 암의 진단과 치료에 응용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>3,4)</sup> 특히, 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 정상세포에 비해 강하게 응집하는 성질이 알려져 있다.<sup>5)</sup> 또한, WGA가 인간유래의 melanoma 세포와 결합하므로<sup>6-8)</sup> 항암제와 conjugate시킨 경우 효과적인 targeting이 가능할 수 있다.

본 연구에서는 식물에서 정제된 ellagitannin의 일종인 praecoxin A(M.W.=952.08, Fig. 1)를 사용하였다. 이 compound는 오리나무(*Alnus hirsuta* var. *micro-*

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

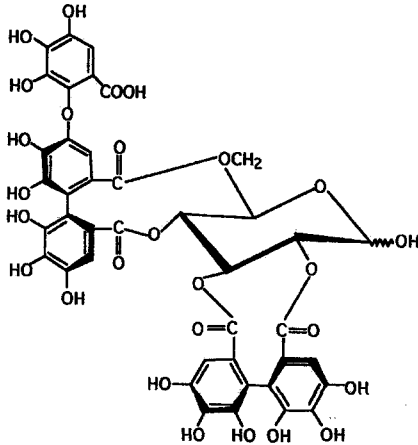


Fig. 1 - The structure of Praecoxin A ( $C_{41}H_{28}O_{27}$ , M.W.=952.08).

hylla, Betulaceae)에서 정제<sup>9)</sup>된 ellagitannin으로서 수년전부터 항암 및 면역부활작용에 관한 연구가 진행되어왔다.<sup>10,11)</sup>

Tannin은 생체 내에서 다양한 활성<sup>12-14)</sup>이 보고되고 있고, 특히 1993년 Miyamoto 등은 ellagitannin의 일종인 oenothien B의 antitumor activity를 보고하였고,<sup>15)</sup> 1991년 Yoshida 등은 trimeric hydrolyzable tannin인 woodfordin D와 oenothien A가 antitumor activity를 갖는다고 보고하였으며,<sup>16)</sup> 1989년 Okuda 등도 ellagitannin의 항암효과를 보고하는<sup>17)</sup> 등 최근 tannin의 항암효과에 대한 많은 보고가 잇따르고 있고, 이외에도 tannin의 항암효과에 관한 보고로는 1992년 Gali 등이 ellagic acid와 gallic acid, 그리고 그 몇몇 관련 유도체가 mouse의 피부암에 유효하다고 보고하였으며,<sup>18)</sup> 1993년 Miyamoto 등은 5개의 ellagitannin이 *in vivo*에서 항암효과가 있음을 보고하였고, interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )의 유도를 증진시킨다고 보고하였다.<sup>19)</sup> 또 sarcoma-180으로 복수암을 유발시킨 mouse에 45개의 ellagitannin을 처리한 결과 21개의 ellagitannin이 유효하였다고 보고하였다.<sup>20)</sup> 또한 1992년 Kashiwada 등은 129종의 tannin과 관련 화합물의 tumor cell에 대한 cytotoxicity를 연구하여 보고하였으며, 그중 몇몇 tannin은 뛰어난 항암효과가 있다고 보고하였다.<sup>21)</sup>

본 연구에서는 암세포에 특이적으로 결합하는 carbohydrate-binding protein(lectin) 특히, melanoma에 특이적으로 결합하는 wheat germ agglutinin (*Triticum vulgare*에서 유래)에 항암효과가 우수한

ellagitannin류인 praecoxin A를 conjugation시킨 lectin-conjugated ellagitannin으로 종양의 전이에 대한 연구를 수행하여 전이율이 높은 흑색종에 대한 전이억제효과를 알아보았다.

## 실험재료 및 방법

**실험동물** - 본 연구의 실험동물로는 5주령된 C57BL/6 mouse(18~22 g ♂)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 사용하였다. 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(Minnesota 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 실험에 사용된 mouse melanoma cell B16-F10은 전남대학교 약학대학 면역학교실에서 분양받아 실험에 사용하였다.

**세포배양** - 실험에 사용한 tumor cell line들은 10% FBS와 penicillin과 streptomycin이 각각 100 U/mL와 100 µg/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.

**전이억제효과** - C57BL/6 mouse(5 weeks, ♂)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 최적화 시켰다. 이식시킬 C57BL/6 mouse는 weight를 측정하여 기록하고 최적화 된 B16-F10을 PBS 용액으로 적당한 농도로 희석하여 5×10<sup>5</sup> cells/mouse를 C57BL/6 mouse(5 weeks, ♂)의 이식부위인 오른쪽 앞발바닥에 injection하여 이식하였다. 이식하는 세포의 총 부피는 0.02 mL가 되도록 조절하였다. 암세포를 이식한 후 발바닥에 종양의 크기가 7~8 mm(보통 18~20일 후)가 되었을 때 발목을 절단하고 70% EtOH 솜으로 세계 눌러 지혈을 시켰다.

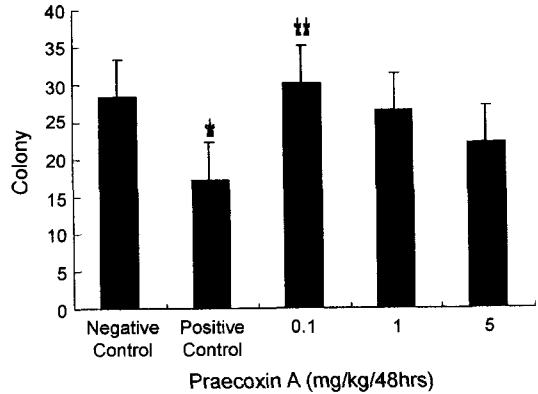
이 후 약물은 복강주사로 하였으며, negative control로는 D-PBS buffer를 0.1 mL 투여하였고 positive control로는 cisplatin 10 mg/kg을 투여하였다. 실험군은 lectin, lectin-*praecoxin A* mixture, lectin-conjugated *praecoxin A*를 각각 0.1, 1, 5 mg/kg을 48시간 간격으로 3주간 투여하였다. 약물의 양은 0.1 mL이 되도록 조정하였다.

마지막 약물 투여 3일 후 mouse의 무게를 측정 후 흉부를 절개하여 폐를 적출하여 폐에 전이되어 나타나는 종양 colony의 수를 측정하였다.

**통계처리** - 실험 결과는 평균치와 실험에 대한 standard error율을 계산하였고, 대조군과의 차이를 Student t-test를 사용하여 효력을 검증하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

**Praecoxin A** - Praecoxin A의 암전이억제력을 검

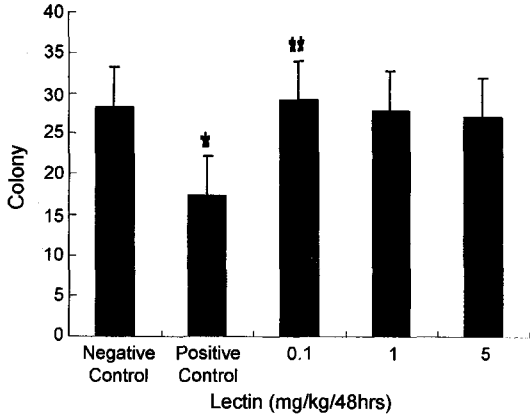


**Fig. 2** - The effect of praecoxin A on the inhibition of melanoma metastasis; 10 hrs later after inoculation of 5 × 10<sup>5</sup> cells/mouse, C57BL/6 mice (5 weeks, ♂) were treated with indicated dose of praecoxin A with i.m. injection every 48 hrs. Negative control group was treated with D-PBS and positive control group was treated with cisplatin 10 mg/kg (\*\*p<0.01, \*p<0.05).

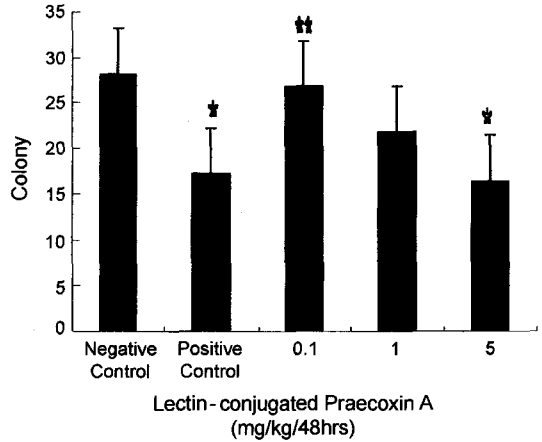
색한 결과 0.1 mg/kg의 농도에서는 전이억제효과가 없었으나 1, 5 mg/kg의 농도에서는 6.4%, 21.9%의 전이억제력을 보였다. Positive control인 cisplatin은 39.0%의 전이억제력을 나타내어(Fig. 2) Praecoxin A가 cisplatin보다 효과는 우수하지 않았지만, 단독투여로도 상당한 전이억제력을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

**Lectin(WGA)** - Lectin이 암세포만을 인식하는 물질이므로 그 자체의 항암효과를 나타낼 수 있는 가능성이 있는 것으로 생각되어 lectin단독으로서의 전이억제력을 검색하였다. 그 결과, 0.1, 1, 5 mg/kg의 농도에서 각각 -2.8%, 1.4%, 4.3%의 억제효과를 나타내었는데 그 효과가 미약하고 대체로 유의성이 없었다. Lectin 단독으로는 그 효과를 기대하기는 부족한 것으로 생각된다(Fig. 3).

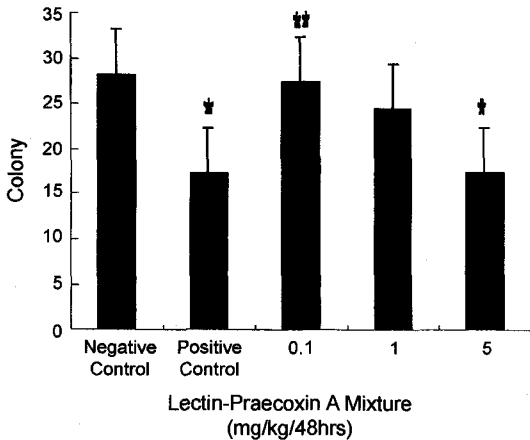
**Lectin-Praecoxin A mixture** - Lectin과 praecoxin A의 혼합된 물질의 전이억제효과에서는 각 농도에 따라 용량의존적인 효과를 나타내었다. 0.1 mg/kg의 농도에서 2.8%, 1 mg/kg의 농도에서는 13.5%, 그리고 5 mg/kg의 농도에서 38.3%의 전이억제효과를 나타내었다(Fig. 4). Positive control과의 비교에서도 5 mg/kg의 농도에서 거의 대등한 효과를 나타내었다. Lectin과 Praecoxin A 단독투여와 비교해보면, 두 약물의 병용투여로 전이억제력의 상승효과가 나타난 것



**Fig. 3** – The effect of lectin (WGA) on the inhibition of melanoma metastasis; 10 hrs later after inoculation of  $5 \times 10^5$  cells/mouse, C57BL/6 mice (5 weeks, ♂) were treated with indicated dose of lectin (WGA) 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. 5** – The effect of lectin-conjugated praecoxin A on the inhibition of melanoma metastasis; 10 hrs later after inoculation of  $5 \times 10^5$  cells/mouse, C57BL/6 mice (5 weeks, ♂) were treated with indicated dose of lectin-conjugated praecoxin A with i.m. injection every 48hrs. 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. 4** – The effect of lectin-praecoxin A mixture on the inhibition of melanoma metastasis; 10 hrs later after inoculation of  $5 \times 10^5$  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, \*p<0.05).

으로 생각된다.

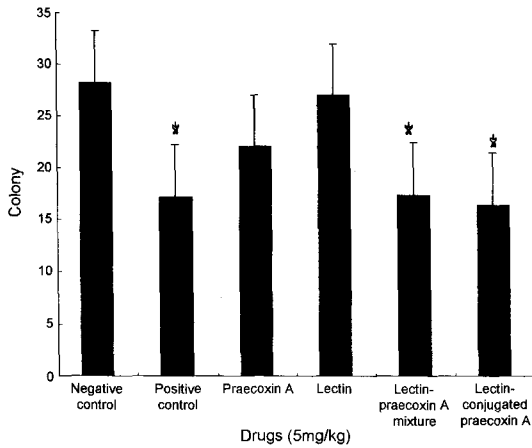
**Lectin-conjugated Praecoxin A** – Lectin-conjugated praecoxin A 0.1 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg을 투여하여 그 전이억제효과를 검색하였을 때 용량의존

적으로 각각 5.0%, 22.7%, 41.8%의 전이억제효과가 나타났으며(Fig. 5) 억제력도 탁월하였다. 특히, 5 mg/kg의 농도에서 positive control보다 더 뛰어난 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 lectin이 암세포에 대해 선택성을 발휘하여 주약물인 praecoxin A의 효과를 극대화한 것으로 생각되며, lectin-conjugated praecoxin A의 항암제로서의 개발가능성이 매우 높음을 시사하고 있다.

**결 론**

식물에서 정제된 ellagitannin의 일종인 praecoxin A를 melanoma에 특이적으로 결합하는 lectin인 Wheat Germ Agglutinin(WGA)과 conjugation시킨 물질에 대한 전이억제효과를 in vivo에서 측정하였다.

Lectin 단독 투여군은 암전이억제 효과가 거의 없었으나 lectin-praecoxin A mixture 또는 lectin-conjugated praecoxin A를 투여한 군에서 각각 38.3%, 41.8%의 높은 전이억제능력을 나타내었으며 cisplatin 10 mg/kg 투여한 대조군의 39%와 비슷하거나 더 좋은 효과를 나타내었다(Fig. 6). Praecoxin A를 단독 투여한 군에서는 21.9%의 억제효과를 보였다. 이러한



**Fig. 6** – The effect of praecoxin A, lectin, lectin-praecoxin A mixture, and lectin-conjugated praecoxin A on the inhibition of melanoma metastasis. 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 (\* $p < 0.05$ ).

결과로 볼 때, 전이억제실험에서는 lectin의 혼합이나 conjugation이 주약물인 praecoxin A의 효과를 증가시키므로서 lectin의 암세포에 대한 선택성을 발휘한 것으로 생각된다. 따라서, 본 연구에서 의도한 lectin의 성질에 따른 암세포의 targeting이 가능한 것으로 확인되었으며, lectin의 미사일형 항암제로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

IFN- $\gamma$  production 등의 cytokine 분비와의 연관성에 대한 면역학적인 기전연구가 더 진행되어야 할 것이다.

### 감사의 말씀

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

### 문헌

- 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).
- Dennis J, W, Laferte S, Waghorne C, Breitman M. L, Kerbel R. S Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides in directly associated with metastasis. *Science*, **236**, 582 (1987).
- Moody, R., Joshi, S., and Chaney W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharm. Toxicol.*, **33**, 1 (1995).
- Wright C. S, Crystal structure of a Wheat Germ Agglutinin/glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex. *J. Biol. Chem.*, **267**, 14345 (1992)
- 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).
- Aubery M, Reynier M, Lopez M, Ogier-Denis E, Font J, Bardin F WGA binding to the surface of two autologous human melanoma cell lines: different expression of sialyl and N-acetylglucosaminyl residues. *Cell Biol. Int. Rep.*, **14**(3), 275 (1990).
- Lorea P, Goldschmidt D, Darro E, Salmon I, Bovin N., Gabius H. J, Kiss R., Danguy A. *In vitro* characterization of lectin-induced alterations on the proliferative activity of three human melanoma cell lines. *Melanoma Res.*, **7**(5), 353 (1997).
- Alonso-Varona A., Calle Y., Palomares T., Castro B., Barbera-Guillem E. A simple cell labeling technique by means of lectin linked to fluorochromes for the detection of cells on tissue sections. *Biol. cell* **83**(1), 87 (1995).
- Lee, M. W, Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. Hirsunin, An ellagitannin with a diarylheptanoid moiety, from *Alnus hirsuta* var. *microphylla*. *Phytochemistry*, **31**, 967 (1992).
- 장지훈, 조장현, 김하형, 이민원, 이광표, 이도익. Condensed Tannin인 (+)-Catechin의 배양암세포주에 대한 항암효과. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* **8**, 85 (1994).
- Chang, J. H., J. H. Cho, H. H. Kim, M. W. Lee, S. S. Han, D. I. Lee. Antitumor Astivity of Pedunculagin, One of the Ellagitannin. *Arch. Pharm. Res.* **18**, 396 (1995).
- 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 脳卒中易發病 デット (SHRSP)타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 (1988).
- 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).
- 14) 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).
- 15) Miyamoto, K., M. Nomura, M. Sasakura, E. Matsui, R. Koshiura, T. Murayama, T. Furukawa, T. Hatano, T. Yoshida, and T. Okuda. Antitumor activity of oenothien B, a unique macrocyclic ellagitannin. *Jpn. J. Cancer. Res.* **84**, 99 (1993).
- 16) Yoshida, T., T. Chou, M. Matsuda, T. Yasuhara, K. Yazaki, T. Hatano, A. Nitta, and T. Okuda. Woodfordin D and oenothien A, trimeric hydrolyzable tannins of macroring struture with antitumor activity. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1157 (1991).
- 17) Okuda, T., T. Yoshida, and T. Hatano. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Medica* **55**, 117 (1989).
- 18) Gali, H., E. Perchellet, D. Klis, J. Johnson, and J. Perchellet. Antitumor-promoting activites of hydrolyzable tannins in mouse skin. *Cacinogenesis* **13**, 715 (1992).
- 19) 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).
- 20) Miyamoto, K., T. Murayama, M. Nomura, T. Hatano, T. Furukawa, T. Hatano, T. Yoshida, R. Koshiura, and T. Okuda, Antitumor activities of ellagitannins against sarcoma-180 in mice. *Bio. Pharm. Bull.* **16**, 379 (1993).
- 21) Yoshiki, K., G. Nonaka, I. Nishioka, J. J. Chang, and K. H. Lee. Antitumor agents, 129 tannins and related compoounds as selective cytotoxicagents. *J. Nat. Prod.* **55**, 1033 (1992).