

## Macrophage의 IL-1 $\beta$ Gene Expression 대한 Lectin-conjugated Ellagitannin의 효과

김한준 · 김민수 · 이민원 · 최영욱 · 김하형 · 이도익<sup>#</sup>

중앙대학교 약학대학

(Received April 9, 2002; Revised May 1, 2002)

### Effects of Lectin-conjugated Ellagitannin on the IL-1 $\beta$ , Gene Expression of Macrophage

Han Jun Kim, Min Soo Kim, Min Won Lee, Yong Wook Choi, Ha Hyung Kim and Do Ik Lee<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Chung-ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — Lectin-conjugated praecoxin A, which has developed as a missile antitumor drug, is the one that has conjugated with wheat germ agglutinin (WGA), a kind of carbohydrate-binding protein (lectin) especially bound to melanoma. Praecoxin A is a kind of tannin extracted and purified from plants. Beside this direct antitumor effect as tannins, we have examined an activation of macrophage by lectin-conjugated praecoxin A. We also confirmed the gene expression of IL-1  $\beta$ , both *in vitro* and *in vivo*. We added 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$  of lectin-conjugated praecoxin A, 10  $\mu\text{g/ml}$  of lectin, 10  $\mu\text{g/ml}$  of praecoxin A to normal murine macrophage and analyzed the extracted total RNAs by RT-PCR after 4, 8, 12, 24 hours. Our data demonstrated that lectin-conjugated praecoxin A increased IL-1  $\beta$ , mRNA expression in a dose dependent manner. However, the effectiveness of lectin-conjugated praecoxin A was not superior to lectin and praecoxin A.

**Keywords** □ Lectin-conjugated praecoxin A, IL-1 $\beta$ , anti-tumor

인체는 외부로부터의 감염이 일어났을 때 스스로를 보호하는 면역력을 가지고 있다. 이 중에서 B cell이나 T cell에 의한 면역반응은 일단 체내로 침입한 항원에 대하여 반응하되 반드시 같은 종류의 항원이 계속 존재하거나 반복 침입해 왔을 경우에 작용하는 면역체계이다. 그래서 T cell이나 B cell 같은 면역반응은 특정 항원에 대한 특이적인 반응이라 한다.<sup>1,2)</sup> 그러나, 항원에 노출된 경험이 없는 경우라도 직접적으로 반응하여 대상 세포를 파괴하는 일종의 자연 면역반응도 있다. 이러한 면역반응에 관계하는 세포 중에서 macrophage는 면역 반응에서 여러 가지 역할을 하는데, 특이적 면역 반응을 일으키는 과정에서 림프구에 항원을 노출시킬 때 항원 제시 세포(antigen presenting cell, APC)로서 중요한 역할을 하며 부분적으로는 cytokine을 비롯한 여러 가지 물질을 분비함으로써 림프구에 의한 면역 반응에 대하여 보조 역할을 하고 있다.<sup>3,4)</sup> 본 연구는 macrophage의 효력 증강을 이용한 면역 활성화에 중점을 두어 항암 효과가 있는 물질

의 직접적인 항암 효과 이외에 면역 반응에 의한 효과를 검증하기 위한 연구를 하였다.

Murine의 경우, macrophage에서 IL-1 $\beta$ , IL-6 등 여러 cytokine을 분비한다. 그 중 IL-1 $\beta$ 는 collagenase와 같은 분해효소와 PG을 생성함으로써 T cell과 B cell을 활성화시키고, 염증 반응을 유발하며, 내발열성물질(endogenous pyrogen), 림프구 활성화 인자(lymphocyte activating factor, LAF), 분해산물(catabolin) 등으로 알려져 있다.<sup>5-15)</sup>

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

Praecoxin A는 오리나무(*Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*)에서 정제된 ellagitannin으로서 몇 년 전부터 항암 및 면역부활작용에 관한 연구가 진행되어왔다.<sup>16-17)</sup> 본 연구에서는 암세포에 특이적으로 결합하는 wheat germ agglutinin(WGA)에, 식물에서 추출한 tanin의 일종인, praecoxin A(C<sub>41</sub>H<sub>28</sub>O<sub>27</sub> M.W.=952.08 Fig. 1)를 conjugation시킨 약물인 lectin-conjugated

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-822-1469  
(E-mail) leedi@cau.ac.kr

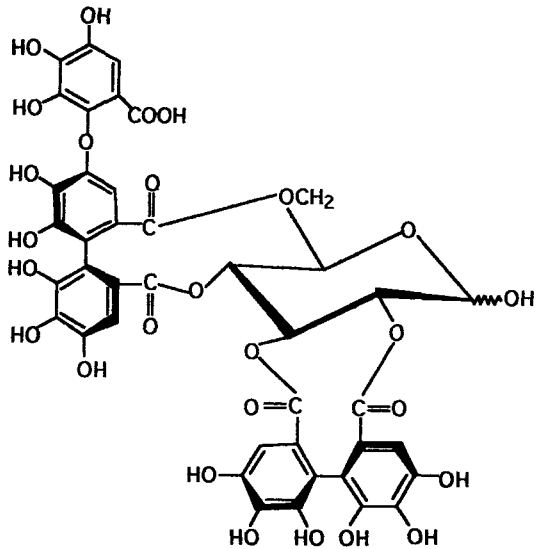


Fig. 1 - The structure of Praecoxin A ( $C_{41}H_{28}O_{27}$  M.W.=952.08).

praecoxin A를 사용하였다. 원래, 이 lectin-conjugated praecoxin A는 암세포에만 선택적으로 작용하여 약효를 발휘하는 미사일형 항암제 개발목적으로 만든 약물이다. 그러나, lectin-conjugated praecoxin A는 암세포에 대한 직접적인 작용 이외에 주 약물인 tannin성분에 의한 다양한 활성도 기대된다.

이 약물에 의한 직접적인 항암 작용 이외의 면역 활성효과를 macrophage에 의한 IL- $\beta$  활성으로 확인해 보았다.

### 실험방법

**실험동물** - 본 연구에 사용된 실험 동물은 5주령의 ICR(20~25 g)계 mouse로 중앙동물에서 구입하여 1주의 적응기를 거친 후 사용하였다.

**실험약물** - Praecoxin A(M.W.=952.08)는 정제된 ellagitannin 으로 중앙대학교 약학대학 생약학교실에서 제공받아 실험에 사용하였다. Lectin(Wheat Germ Agglutinin)과 Lectin-conjugated Praecoxin A는 중앙대학교 약학대학 약품물리학교실에서 제공받아 실험에 사용하였다. 본 연구에서 투여한 약물들은 RPMI 용액, PBS(pH 7.2)용액에 넣어 완전히 용해시킨 후 0.22  $\mu$ m filter 로 여과 멸균하여 사용하였다.

**Peritoneal macrophage separation** - Murine macrophage 의 분리는 standard protocols에 따라 실시하였다.<sup>18-20)</sup> 6주령 된 수컷 ICR mouse를 경부 탈취로 급살 시킨 후 복부의 skin을 벗 기고 serum free RPMI 1640 medium 6 ml와 air 3 ml를 복강 에 주사하고 2~3분간 마사지 후 다시 주사기를 이용하여 회수한다. 3회 반복하여 복강내의 세포를 거의 취하도록 한다. 이것을 적당량의 배지로 희석한 다음 100 g에서 10분간 원심분리한다. 침전된 세포를 RPMI 1640 medium에 부유시키고 37°C, 5%

CO<sub>2</sub>, 95% air로 맞춘 CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 배양하여 plate 에 부착된 macrophage만을 취했다

**Macrophage culture** - 배양법은 standard protocols에 따라 배양하였다.<sup>18-20)</sup> macrophage를  $5 \times 10^6$  cells 개수로 75 cm<sup>2</sup> flask에 분주하였다. Macrophage는 RPMI 1640 medium에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air로 맞춘 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포는 3~4일 방치하여 배양한 후에 *in vitro* 실험을 수행하였다.

**In vitro 실험** - 6주령 ICR계 mouse에서 macrophage를 취하여 75 cm<sup>2</sup> flask에  $5 \times 10^6$  cells씩 분주하고 3~4일 배양하였다. Lectin-conjugated praecoxin A, lectin, praecoxin A, LPS는 배 지에 녹여 사용하였다. Macrophage에 대한 각 약물의 효과를 알아 보기 위하여 standard protocols에 따라 실험하였다.

75 cm<sup>2</sup> flask의 배지를 교체하고 나서 lectin-conjugated praecoxin A 1, 10, 100  $\mu$ g/ml(1.27, 12.7, 127  $\mu$ M), lectin 10  $\mu$ g/ml(12.7  $\mu$ M), praecoxin A 10  $\mu$ g/ml(12.7  $\mu$ M)을 각각 처리 한 후 4, 8, 12, 24시간 배양하였다. Trypsin을 처리하고 배지로 세척 후에 모았다. RNA extraction할 때까지 -70°C에 보관하였 다. Negative control로서 배지에서 배양하였고, positive control 로서 LPS 1  $\mu$ g/ml(12.7  $\mu$ M)을 투여한 후 배양하였으며 위와 동 일한 방법으로 실험하였다

**In vivo 실험** - 6주령 ICR계 mouse 4마리를 한 개의 군으로 하여 standard protocols에 따라 실험하였다. Lectin-conjugated praecoxin A, lectin, praecoxin A, LPS는 PBS(pH 7.2)에 녹여 사용하였다.

실험군은 lectin-conjugated praecoxin A 1, 5, 10 mg/kg, lectin 5 mg/kg, praecoxin A 5 mg/kg을 복강주사 한 후 4, 8, 12, 24시간 후에 macrophage를 취하였고, negative control로서 PBS buffer를 0.1 ml 투여하였고, positive control로서 LPS 1 mg/kg을 투여하여 위와 동일한 방법으로 실험하였다. 각 약물의 양은 0.1 ml가 되도록 조정하였다. RNA extraction할 때까지 -70°C에 보관하였다.

**RNA extraction** -  $5 \times 10^6$  cells 개수의 macrophage를 4, 8, 12, 24시간 후에 취하여 RNA extraction을 하였다. Pharmacia biotech의 instruction에 따라 total RNA를 extraction하였다. -70°C에 보관된 세포를 녹인 후 LiCl 용액 350  $\mu$ l,  $\beta$ -mercaptoethanol 3  $\mu$ l, extraction buffer 150  $\mu$ l, CsTFA 500  $\mu$ l를 가 하여 vortex하여 세포를 lysis시켰다. 15,000 rpm에서 15분간 원 심분리하여 total RNA를 얻었다. 얻은 total RNA를 세척하기 위 하여 extraction buffer 75  $\mu$ l, LiCl 용액 175  $\mu$ l, CsTFA 250  $\mu$ l 를 가하여 세척한 후에 70% ethanol를 가하여 vortex한 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 ethanol을 제거한 후 실온 에서 15분간 건조시켰다. Total RNA에 DEPC-treated water 50  $\mu$ l를 가하여 얼음에 15~30분간 방치한 후 vortex하고 65°C에서 10분간 가열하였다. vortex한 후 -20°C에 보관하였다.

**RNA 확인** - 위에서 얻은 RNA를 확인하기 위하여 Total RNA 2  $\mu$ l를 취하여 RNA loading buffer 3  $\mu$ l, DEPC water 7  $\mu$ l를 혼합한 후 ethidium bromide를 함유하는 1% agarose gel 위에 loading하였다. Bromphenol blue가 gel 길이의 2/3정도 이동할 때까지 70~80A로 전류를 20~30분간 유지시킨 후 UV에서 260 nm에서 band를 확인하였다.

**RNA 정량(OD측정)** - 얻은 RNA의 농도는 spectrophotometer를 통하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래 계산방법으로 total RNA 농도를 계산한 후에 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)에 사용할 total RNA 1  $\mu$ g을 정량하였다.

$$[RNA] = OD_{260 \text{ nm}} \times D \times 40 \mu\text{g/ml} \quad (D = \text{final dilution factor})$$

**Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)** -- 1  $\mu$ g의 total RNA reverse transcription에 사용하였다. 20 U의 Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 10 U의 RNasin, 1 U의 thermostable DNA polymerase, dNTP

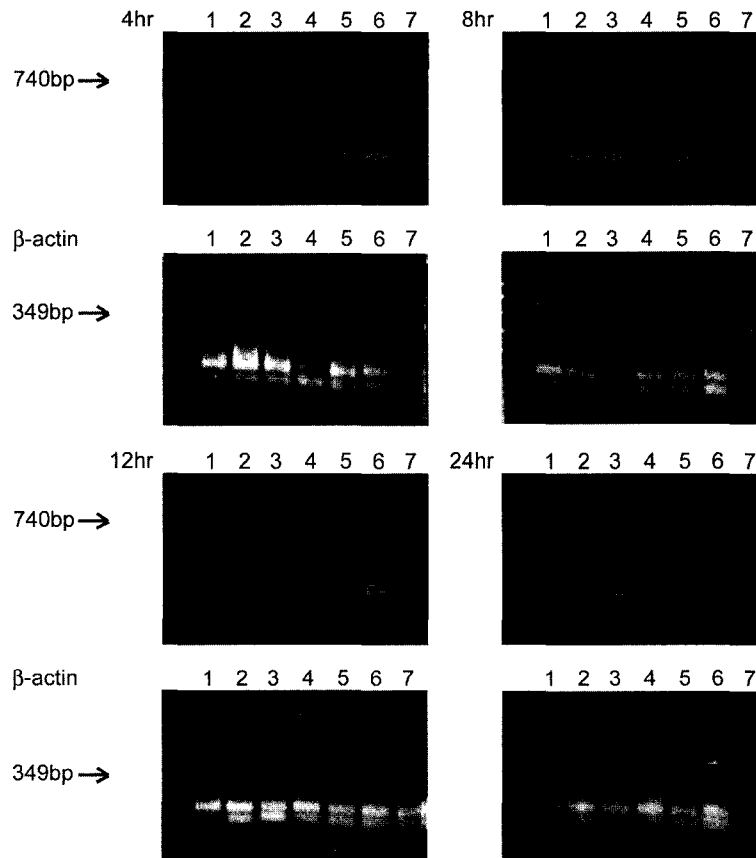
를 함유하는 20  $\mu$ l용 RT-PCR kit를 사용하였다. RT-PCR을 Bioneer社의 protocols에 따라 수행하였다. RNA 1  $\mu$ g, oligo(dT)<sub>18</sub> 25 pmole, primer 50 pmol, RNase-free water로 20  $\mu$ l까지 채우고 reverse transcription반응이 수행되었다. 57°C에서 10분 동안 가열하여 RNA denaturation되었고, 42°C에서 60분 동안 incubation하여 cDNA 합성이 되었으며, 94°C에서 5분 동안 가열하여 reverse transcriptase inactivation한 후 4°C에서 incubation되었다. PCR 증폭은 94°C 0.5분, 55°C 1.5분, 68°C 1분, 34 cycles로 반응시켰다. 3  $\mu$ l의 PCR product를 1.8% agarose gel에서 loading하였다. PCR 반응에 사용된 IL-1 $\beta$  primer들은 다음과 같다.

5' primer CTGAAGCAGCTATGGCAACT

3' primer TAGCCTGGGAGCAAGGCAGT

## 실험결과

**In vitro 실험** - *in vitro* 실험 결과 IL-1 $\beta$  mRNA는 아무 것도



**Fig. 2** - The effect of lectin-conjugated praecoxin A on the induction of IL-1 $\beta$  mRNA in murine macrophage *in vitro*. Total RNA extracted from murine macrophage 4, 8, 12, 24hr after applications of 1, 10, 100  $\mu$ g/ml of lectin-conjugated praecoxin A, 10  $\mu$ g/ml of lectin, 10  $\mu$ g/ml of praecoxin A, was analyzed by RT-PCR for the identification and the induction of IL-1 $\beta$  mRNA and  $\beta$ -actin mRNA. 1  $\mu$ g/ml of LPS was used as a positive control. 1=Baseline signal, 2=Lectin-conjugated praecoxin A 1  $\mu$ g/ml, 3=Lectin-conjugated praecoxin A 10  $\mu$ g/ml, 4=Lectin-conjugated praecoxin A 100  $\mu$ g/ml, 5=Lectin 10  $\mu$ g/ml, 6=Præcoxin A 10  $\mu$ g/ml, 7=LPS 1  $\mu$ g/ml.

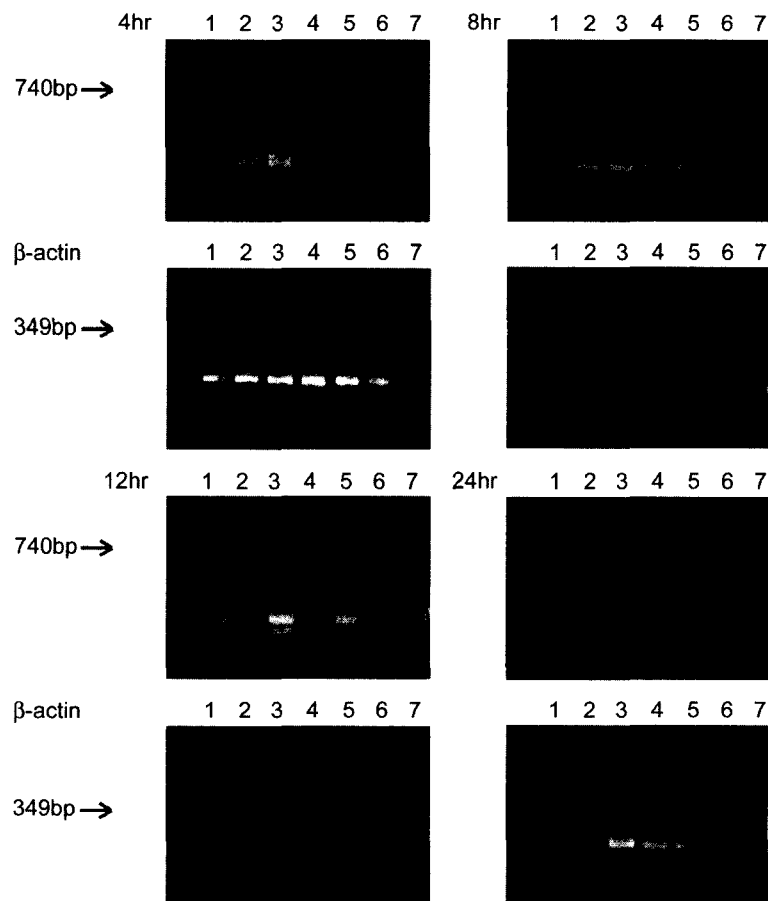
처리하지 않은 baseline에서도 소량씩 분비하고 있음을 알 수 있었다. Positive control로서 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 투여했을 때 baseline signal과 비교하면 4시간부터 24시간까지 IL-1 $\beta$  mRNA는 증가되었다.

Lectin-conjugated praecoxin A를 투여했을 때 baseline signal과 비교하면 lectin-conjugated praecoxin A 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 4시간부터 24시간까지 변화가 없었다. Lectin-conjugated praecoxin A 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 8, 12, 24시간 때 IL-1 $\beta$  mRNA가 약간 증가되었고, 8, 12, 24시간 때 LPS와 비교하면 LPS보다 약하게 증가되었다. Lectin-conjugated praecoxin A 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 4시간부터 24시간까지 IL-1 $\beta$  mRNA가 증가되었고, 4시간부터 24시간까지 LPS와 비교하면 LPS와 거의 비슷하게 증가되었다. Lectin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 투여했을 때 baseline과 비교하면 4시간부터 24시간까지 IL-1 $\beta$  mRNA가 약간 증가되었고, 4시간부터 24시간까지 LPS와 비교하면 LPS보다 약하게 증가되었다. Praecoxin A 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 투여했을 때 baseline과 비교하면 4시간부터 24시간까지 IL-1 $\beta$

mRNA가 약간 증가되었고, 4시간부터 24시간까지 LPS와 비교하면 LPS보다 약하게 증가되었다. Lectin-conjugated praecoxin A 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lectin 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , praecoxin A 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 서로 비교하면, IL-1 $\beta$  mRNA expression에 큰 차이가 없었다(Fig. 2).

**In vivo 실험** - *in vivo* 실험 결과 IL-1 $\beta$  mRNA는 아무 것도 처리하지 않은 baseline에서도 소량씩 분비하고 있음을 알 수 있었다. Positive control로서 LPS 1 mg/kg을 투여했을 때 baseline signal과 비교하면 4시간부터 24시간까지 IL-1 $\beta$  mRNA는 증가되었다.

Lectin-conjugated praecoxin A를 투여했을 때 baseline signal과 비교하면 lectin-conjugated praecoxin A 1 mg/kg은 4시간부터 24시간까지 IL-1 $\beta$  mRNA가 약간 증가되었고, 4시간부터 24시간까지 LPS와 비교하면 LPS보다 약하게 증가되었다. Lectin-conjugated praecoxin A 5 mg/kg 4시간부터 24시간까지 IL-1 $\beta$  mRNA가 약간 증가되었고, 4시간부터 24시간까지 LPS와 비교하면 LPS보다 약하게 증가되었다. Lectin-conjugated praecoxin



**Fig. 3** – The effect of lectin-conjugated praecoxin A on the induction of IL-1 $\beta$  mRNA in murine macrophage *in vivo*. Total RNA extracted from murine macrophage 4, 8, 12, 24hr after injections of 1, 5, 10 mg/kg of lectin-conjugated praecoxin A, 5 mg/kg of lectin, 5 mg/kg of praecoxin A, was analyzed by RT-PCR for the identification and the induction of IL-1 $\beta$  mRNA and  $\beta$ -actin mRNA. 1 mg/kg of LPS was used as a positive control. 1=Baseline signal, 2=Lectin-conjugated praecoxin A 1 mg/kg, 3=Lectin-conjugated praecoxin A 5 mg/kg, 4=Lectin-conjugated praecoxin A 10 mg/kg, 5=Lectin 5 mg/kg, 6=Praecoxin A 5 mg/kg, 7=LPS 1 mg/kg.

A 10 mg/kg은 4시간부터 24시간까지 IL-1 $\beta$  mRNA가 증가되었고, 4시간부터 24시간까지 LPS와 비교하면 LPS와 거의 비슷하게 증가되었다. Lectin 5 mg/kg을 투여했을 때 baseline과 비교하면 4시간부터 24시간까지 IL-1 $\beta$  mRNA가 약간 증가되었고, 4시간부터 24시간까지 LPS와 비교하면 LPS보다 약하게 증가되었다. Praecoxin A 5 mg/kg을 투여했을 때 baseline과 비교하면 4시간부터 24시간까지 IL-1 $\beta$  mRNA가 약간 증가되었고, 4시간부터 24시간까지 LPS와 비교하면 LPS보다 약하게 증가되었다. Lectin-conjugated praecoxin A 5 mg/kg, lectin 5 mg/kg, praecoxin A 5 mg/kg을 서로 비교하면, IL-1 $\beta$  mRNA expression에 큰 차이가 없었다(Fig. 3).

## 고 찰

*In vitro*에서 IL-1 $\beta$  mRNA는 lectin-conjugated praecoxin A 10  $\mu$ g/ml에서 8, 12, 24시간 때, lectin 10  $\mu$ g/ml, praecoxin A 10  $\mu$ g/ml에서 24시간동안 baseline signal과 비교하여 약간 증가되었으나, positive control인 LPS보다는 약하게 증가되었다. Lectin-conjugated praecoxin A 100  $\mu$ g/ml에서는 24시간동안 baseline signal과 비교하여 증가되었고, LPS와 비교해도 거의 비슷하게 증가되었다. 또한, *in vivo*에서 IL-1 $\beta$  mRNA는 lectin-conjugated praecoxin A 1 mg/kg, lectin-conjugated praecoxin A 5 mg/kg, lectin 5 mg/kg, praecoxin A 5 mg/kg 모두에서 24시간동안 baseline signal과 비교하여 약간 증가되었으나, positive control인 LPS보다는 약하게 증가되었다. Lectin-conjugated praecoxin A 10 mg/kg 24시간동안 baseline signal과 비교하여 증가되었고, LPS와 비교해도 거의 비슷하게 증가되었다.

*In vitro, in vivo* 모두 lectin-conjugated praecoxin A, lectin, praecoxin A를 같은 용량에서 비교하면, IL-1 $\beta$  mRNA 발현에 큰 차이는 없었다.

이제까지의 결과를 종합하면, *in vitro, in vivo*에서 normal murine macrophage에 lectin-conjugated praecoxin A를 투여하면 Proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ 가 증가된 것으로 보아 염증반응 쪽으로 면역작용이 일어날 것이다. 구체적으로 lymphocytes가 활성화되고, B cell의 증식과 분화가 촉진되며, prostaglandin E2가 유리되고, NK cell활성을 촉진되는 등 여러 가지 면역반응이 일어날 것으로 생각되어진다. 또한, lectin과 praecoxin A 단독투여로도 IL-1 $\beta$  분비를 약간 증가시켰다. 그러나, lectin과 praecoxin A를 conjugation시킨 lectin-conjugated praecoxin A는 IL-1 $\beta$  mRNA expression에 있어 동일한 농도의 lectin이나 praecoxin A보다 더 뛰어난 증가효과는 없는 것으로 생각된다.

이상의 결과는 lectin-conjugated praecoxin A의 macrophage 활성화물질로서의 가능성을 제시한다. 이미 lectin-conjugated

praecoxin A가 암세포에 대한 선택적인 항암작용이 있다고 알려졌다<sup>21-22)</sup> 이번의 연구에서 항암작용 이외에 면역증강작용이 있음을 증명한 것이다. 또한, lectin과 praecoxin A도 면역증강물질로서의 가능성이 있을 것으로 생각되고, 면역 증강 작용에 대한 더 깊은 연구가 필요하리라 생각된다.

## 감사의 말씀

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

## 문 헌

- 1) Kuby, J : Cell-Mediated Immunity. *J. Kuby. Immunology 4th edited.* 347 (2000).
- 2) Stites, D. P and Terr, A. I. : *Basic and Clinical Immunology.* 7th ed. 870 (1991).
- 3) Adams, D. O. and Hamilton, T. A. : The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 283 (1984).
- 4) Roitt, I., Brostoff, J. and Male D. *Immunology.* 2nd ed. 13, 25 (1989).
- 5) Banchereau, J. et al. : The CD40 antigen and its ligand. *Ann. Rev. Immunol.* 12, 881 (1994).
- 6) Brodsky, F. M. and Guagliardi, L. : The cell biology of antigen processing and presentation. *Ann. Rev. Immunol.* 9, 707 (1994).
- 7) Chantry, D. and Feldmann, M. : The role of cytokines in autoimmunity. *Biotechnol. Ther.* 1, 361 (1991).
- 8) Clark, E. A. and Ledbetter, J. A. : How B and T cells talk to each other. *Nature.* 367, 425 (1994).
- 9) Parker, D. C. : T cell-dependent B cell activation. *Ann. Rev. Immunol.* 11, 331 (1993).
- 10) Romagnani, S. : Cytokine production by human T cells in disease states. *Ann. Rev. Immunol.* 12, 227 (1994).
- 11) Ullman, K., Northrop, J. P., Veirweij, C. L. and Crabtree, G. R. : Transmission of signals from T lymphocyte antigen receptor to the gene responsible for cell proliferation and immune function. *Ann. Rev. Immunol.* 8, 421 (1989).
- 12) Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. *Cellular and Molecular Immunology.* 1st ed. (1991).
- 13) Dinarello, C. A. : Role of interleukin-1 in infectious diseases. *Immunol. Rev.* 127, 119 (1992).
- 14) Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Arai, N. and Yokoda T. : Cytokines; coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 783 (1990).
- 15) Balkwill, F. R., Burke, F. : The cytokine network. *Immunol. Today.* 10, 299 (1989).

- 16) Lee, M. W., Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Hirsunin, an ellagitannin with diarylheptanoid moiety, from *Alnus hirsuta* var. *microphylla*. *Phytochemistry*. **31**, 967 (1992).
- 17) Chang, J. H., Cho, J. H., Kim, H. H., Lee, M. W., Han, S. S. and Lee, D. I. : Anti-tumor Activity of Pedunculagin, One of the Ellagitannin. *Arch. Pharm. Res.* **18**, 396 (1995).
- 18) 赤木忠厚, 乾直道 외 20. 組織培養の技術. 19 (1982).
- 19) 瀬野得二, 小山秀機, 黒木登志夫. Manual of Selected Culture Cell lines for Bioscience and Biotechnology. 132 (1993).
- 20) Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W. *Current Protocols in Immunology*. wiley Interscience. **4**, 2. 1 (1996).
- 21) Kim, H. K., Han, K. S. and Lee, D. I. : Effects of Lectin-conjugated Ellagitannin on Antitumor Activity. *Yakhak Hoeji*. **44**, 6, 607 (2000).
- 22) Kim, H. K., Han, K. S. and Lee, D. I. : Effects of Lectin-conjugated Ellagitannin on Inhibitor of Melanoma Metastasis. *Yakhak Hoeji*. **44**, 6, 601 (2000).