

별불가사리 렉틴의 특성 및 암 세포 성장저해 효과

전경희[#] · 박채수 · 박원학 · 최수정 · 소명숙* · 정시련**

영남대학교 이과대학, *대구보건전문대학, **영남대학교 약학대학

(Received May 8, 1997)

Characteristics and Cancerostatic Activity of the Starfish Lectin

Kyung Hee Jeune[#], Chae Soo Park, Won Hark Park,
Soo Jeong Choi, Myung Suk So* and See Ryun Chung**

[#]Taegu Health College, Taegu 702-260, Korea,

College of Science and **College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Abstract—A new lectin was partially purified from starfish, *Asterina pectinifera* by means of physiological saline extraction, salt fractionation, ion exchange chromatography and hydroxyapatite chromatography, and it was named APL. The biochemical properties of the APL were characterized. In addition, its effects on lymphocyte mitogenicity and cancer cell agglutinability were tested. The APL agglutinated nonspecifically human erythrocytes and rabbit blood cells. Agglutinability was decreased to 30% of control activity below pH 5 and above pH 9 and was relatively unstable at increasing temperatures above 60°C. The activity was reduced by addition of two kinds of metal ions, Ba²⁺, Mn²⁺ and chelating agent, EDTA. APL was proved to be glycoproteins containing 9% sugars. For carbohydrate specificity, it was found that the activity of APL was inhibited by D(+)-glucosamine, D(+)-galactosamine, stachyose, N-acetyl-galactosamine and methyl- α -D-galactopyranoside among 35 sugars tested. In amino acid composition, the contents of acidic amino acids such as aspartic acid and glutamic acid were relatively high. This result suggest that the isoelectric point would be in a lower range. APL was found that it promotes the division of human lymphocytes. APL was proved to be a potent agglutinin for cancer cells such as HeLa, L929 and LI210 cells. Significant changes on the HeLa cell surfaces affected by APL were observed under the electron microscope.

Keywords □ *Asterina pectinifera*, lectin, mitogenicity, cancer cell agglutination.

현대의 여러가지 질병에 대응하는 하나의 방편으로 림프구를 자극분열 시키는 면역조정제나 항종양물질을 천연물 자원으로부터 개발하려는 노력은 대단히 중요한 과제라고 할 수 있는 바 이 목적으로 렉틴의 연구가 주목된다.

렉틴(lectins)은 면역계를 거쳐 생성되는 물질이 아니며 당과 결합하여 세포를 응집시키고, 당화합물을 침전시키며 적어도 당과의 결합 부위를 2개 이상 가지는 단백질 혹은 당단백질로서¹⁻⁴⁾ 식물, 동물, 미생물 등 자

연계에 널리 분포되어 있다.⁵⁾ 이는 oligomeric 단백질로서 보통 한 subunit 마다 한 개 씩, 따라서 한 분자에 몇 개의 당 결합 부위를 갖고 있는 거대분자이다. 렉틴을 면역계에 응용한 첫 시도는 P. Ehrlich가 1890년대에 ab-rin과 ricin을 이용한 것으로, 렉틴을 이용한 항원 항체를 연구함으로써 면역학의 기초를 수립하였으며⁶⁻⁸⁾ 1960년, Nowell⁹⁾은 PHA(*Phaseolus vulgaris* agglutinin) 렉틴이 림프구를 자극 분열시킬 수 있음을 보고 하였다. 1963년 Aub 등은¹⁰⁾ WGA(wheat germ agglutinin)가 정상 세포보다 종양 세포를 더 잘 응집시킬 수 있음을 관찰하여 렉틴 연구에 획기적인 전환점을 가져왔으며, 실제로 Concanavalin A (Con A), PHA,

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 053-810-2375 (팩스) 053-741-8798

ricin과 abrin 등은 암 연구 및 면역학적 연구에 현재까지 지속적으로 이용되고 있다.^{9, 11, 12)}

이 렉틴성분들은 생물화학적 및 면역학적 성질이 매우 다양하여 질병의 치료, 진단 및 생명과학 연구도구 등으로 많이 사용되고 있는 물질인바, 렉틴이 갖는 다양한 생리활성 중 림프구에 대한 마이트젠(mitogen)으로서의 역할을 살펴보면 렉틴은 그 종류에 따라 T 또는 B 세포를 자극 분열시키며 그 기전은 T 세포의 경우 렉틴이 대식세포를 자극함으로써 분비되는 IL-1(interleukin-1)이 보조 T 세포를 활성화시키고 이에 따라 IL-2가 작용하여 T 세포가 증식되며, B 세포의 경우 렉틴이 직접 작용하여 증식되거나 혹은 보조 T 세포에 의해 유리되는 IFN γ (γ -interferon), IL-4, IL-5, IL-6 등의 영향으로 증식되어지는 것으로 알려져 있다.^{8, 13-15)}

다음으로 항 종양 작용은 종양 세포 항원으로 조제한 단세포항체를 렉틴을 적용하였을 때 종양 세포의 단백질 합성이 저해되어 성장이 저해되는 직접적인 작용에 대한 보고와¹⁶⁻¹⁸⁾ 이외에 대식세포나 대형핵 백혈구가 어떤 종류의 렉틴 존재하에서 종양 세포를 용해시켜 항 종양 효과를 나타내는 등의 보고가 있다.¹⁹⁻²¹⁾ 국내에서 렉틴에 관한 연구는 1976년 부터 본 연구진이 각종 천연물(식물, 동물, 해양동물 및 고등균류)로부터 이 독특한 생리활성 성분의 검색, 분리 정제 및 생물물리화학적 특성을 구명한 바 있다.²²⁻²⁷⁾

본 연구에서는 해양 자원으로부터 새로운 렉틴을 개발할 목적으로 한 검색시험 결과 렉틴 활성이 비교적 강하게 나타난 별불가사리(*Asterina pectinifera*)를 대상으로 렉틴 성분을 분리 정제하였고, 이로부터 몇가지 생물화학적 특성 및 면역화학적 연구를 수행하였으며, 림프구를 대상으로 한 마이트젠으로서의 기능과 암 세포에 대한 렉틴성분의 응집 효과 등 몇가지 생물물리화학적 특성에 대해서 보고하고자 한다.

실험 방법

실험 재료 - 실험 재료로 사용한 유극목 (*Spinulosa*)에 속하는 별불가사리(*Asterina pectinifera*)는 동해안에서 채취하였으며, 암 세포는 영남대학교 의과대학 해부학 및 생화학 교실로부터 HeLa cell, L929 및 L1210 등의 cell line을 분양 받아 실험재료로 사용하였다.

시약 - DEAE-cellulose 52는 Whatman Inc.

(USA)에서, hydroxyapatite는 Japan Biochemicals Co. (Japan)에서, tris(Tris-hydroxymethyl-aminoethane), [6-³H]thymidine (specific activity 1.8 Ci/mmol), Con A, HEPES, acrylamide, N, N'-methylene-bisacrylamide 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서, EMEM, fetal bovine serum, bovine calf serum은 Gibco Lab. (USA)에서 구입하였으며, 기타 일반시약은 특급품을 사용하였다.

기기 - 실험에 사용한 주요 기기는, high speed centrifuge : Hitachi, (Japan); fraction collector : LKB2070 ULTRORAC II (Sweden); spectrophotometer : ULTROSPEC III, Pharmacia LKB (Sweden); electrophoresis apparatus : LKB 2001 (Sweden); scintillation spectrometer : MINAXI Tri-Carb 4000, Packard (USA); CO₂-air incubator : Shel-Lab. (USA); amino acid analyzer : LKB 4150 ALPHA (Sweden); electron microscope : Hitachi H-600, H-7000B (Japan); 등이었다.

조렉틴의 분리 및 COLUMN CHROMATOGRAPHY에 의한 정제 - 별불가사리와 생리식염수를 1:2로 하여 조직을 파쇄하고, 이를 10,000×g 에서 30분 동안 원심분리한 뒤 상층액을 crude 추출물로 하였다. Crude 추출물을 ammonium sulfate로 0~40% 까지 포화, 침전, 분리시킨후 10,000×g 에서 30분간 원심분리하였고, 25 mM tris-HCl 완충액(pH 7.4)으로 투석시켜 이를 다시 한번 10,000×g 에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 crude 렉틴으로 하여 다음과 같이 분리 및 정제를 행하였다. Crude 렉틴을 Chung 등의 방법²⁷⁾에 따라 25 mM tris-HCl 완충액(pH 7.4)으로 미리 평형시켜둔 DEAE-cellulose 52 column(1.3×19 cm)으로 정제하였다.

단백질 성분은 NaCl 농도를 50 mM에서 400 mM까지 step-wise gradient으로 증가시키면서 유출시켰고 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 확인하였으며, 분리된 분획의 렉틴 활성은 토끼 적혈구로 확인하였다.

렉틴활성이 나타난 0.3M NaCl 분획을 Diaflo ultra membrane PM 10(cutoff : 10,000 daltons, Amicon Co., USA)과 동결 건조 및 Aquacide III등을 이용하여 농축하였다. 렉틴활성이 확인된 DEAE cellulose 0.3M 분획을 5 mM 인산 완충액(pH 6.8)에 투

석시키고, 같은 완충액으로 미리 평형시켜 둔 hydroxyapatite column(0.8×19 cm)에 주입한 후 완충액 농도를 50 mM에서 300 mM까지 step-wise gradient로 증가시키면서 단백질 성분을 분리하였으며, 동일한 방법으로 확인하고 농축시켰다.

POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS에 의한 순도 확인 - Discontinuous 완충액을 이용한 PAGE(poly-acrylamide gel electrophoresis)는 Davis의 방법²⁶⁾으로 pH 8.3에서 10% polyacrylamide gel(0.8:30)로 4°C에서 실시하였다. 전기영동(PAGE)은 stacking gel 상에서 40 mA/slab의 전류로 시작하여 resolving gel에 도달할 시 70 mA/slab로 5시간 실시하였으며, tracking dye는 0.001% bromophenol blue를 이용하였다. 단백질 부위는 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 용액(99% 초산 : 95% 에탄올 : 증류수=2:5:5)으로 고정, 염색시켰다. 탈색은 5% 초산과 95% 에탄올(6:4, 7:3, 7:3, 8:2)로 2시간 씩 탈색시켰다.

적혈구 및 림프구 응집력 시험 - 렉틴의 적혈구 및 림프구 응집력 시험은 U-모양 홈으로 된 microtiter plate 위에 시료를 연속 2배수 희석한 후, 0.15M NaCl 용액으로 세척하여 조제한 3% 적혈구 용액을 가하여 실시하였으며²⁹⁾ 트립신(trypsin) 처리는 Lis 와 Sharon의 방법³⁰⁾에 따라 처리하였다.

림프구 용액은 Chung 등의 방법²⁵⁾을 응용하여 조제하였다. 암수 구별없이 정상 성장한 생쥐로부터 비장을 분리하여 20 mM HEPES을 함유한 EMEM(pH 7.2) 속에서 scalpel로 잘게 부순 뒤, 솜에 여과시켜 비장 조직을 제거하였다. 150 mM NH₄Cl 용액을 가하여 적혈구를 파괴한 다음 EMEM으로 3~4회 세척하여 5×10⁷ cells/ml로 조제하여 사용하였다. 적혈구 및 림프구 응집력(HU : Hemagglutinating Unit)은 세포 응집력을 나타내는 렉틴의 최대 희석배수의 역수로 나타내었다.

렉틴 활성에 미치는 pH, 온도 및 금속이온의 영향 - Crude 렉틴을 pH 2~11 사이의 여러가지 완충액으로 4시간 4°C에서 투석시킨 후, 남아있는 렉틴활성을 조사하였다. 이때 사용한 buffer는 25 mM KCl-HCl buffer(pH 2.18), 25 mM glycine-HCl buffer(pH 3.18), 25 mM citrate buffer(pH 4.16, 5.35), 25 mM acetate buffer(pH 4.20, 5.20), 25 mM phosphate buffer(pH 6.25), 25 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4,

8.71)과 25 mM carbonate buffer(pH 9.62, 10.8) 등이었다.

또한, crude 렉틴을 10~90°C 범위의 온도에서 30분간 배양한 후, 즉시 얼음으로 식힌 다음, 남아있는 렉틴 활성을 조사하였으며, 금속이온의 영향을 확인하기 위해 Ba(OH)₂, CaCl₂, FeCl₂, HgCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂ 등과 착물 형성제인 EDTA를 20 mM로 조제하여 각각 50 μl씩 취하고 연속 2배수 희석법으로 희석한 뒤, 각 well에 렉틴 용액 50 μl를 가하고, 그 위에 3% 적혈구 용액 50 μl를 가하여 30분 뒤에 세포 응집력을 조사하였다.

렉틴의 적혈구 응집 저해 시험 - 적혈구 응집력 저해 효과는 Iglesias 등의 방법³¹⁾에 따라 35종의 당류를 사용하여 실시하였다. 당 용액(100 mM or 200 mM)을 연속 2배수 희석한 뒤, 각 well에 4HU의 응집력을 나타내는 렉틴 용액을 50 μl 가하고, 그위에 3% 사람 및 토끼 적혈구 용액을 50 μl씩 가하였다. 이때 당에 의한 적혈구 응집력 저해 효과는 적혈구 응집력을 완전히 저해할 수 있는 최저 당 농도로 표시하였다.

아미노산 분석 - Crude 렉틴, DE 0.3M 분획과 hydroxyapatite 0.2M 분획에서 얻은 동결건조한 렉틴 2 mg씩을 시험관에 취하고 질소 가스를 채운 다음 6N-HCl 1.5 ml를 가한 후, 완전히 밀봉하여 115°C에서 24시간 가수분해하였다.

가수분해산물은 3N-NaOH 1 ml로 중화한 다음, 증류수로 세척하여 진공 증발기로 건조시켰다. 이를 loading buffer(0.2M sodium citrate buffer, pH 2.2) 1 ml에 녹여 millipore(0.22 μm)로 여과시킨 후, 아미노산 분석기로 아미노산 조성 및 함량을 측정하였다.

단백질 및 당 함량 분석 - 단백질 함량은 Lowry 등의 방법³²⁾에 따라 소 혈청 알부민(BSA)을 표준품으로 하여 측정하였으며, 당 함량은 만노오스를 표준품으로 하여 anthron방법으로 실시하였다.

쥐 림프구 분리 - 림프구 분리는 Wysocki와 Sato의 방법³³⁾에 따라 암수구별없이 ICR 생쥐와 흰쥐의 비장과 흉선을 각각 분리하여 EMEM 용액 상에서 잘게 분쇄하고 솜으로 여과한 후, 1500×g에서 10분간 원심분리하였다. 이 침전물에 tris-buffered ammonium chloride 용액(0.168M NH₄Cl : 0.17M Tris-HCl, pH 7.65=9:1)을 가하여 잔류한 적혈구를 용혈시킨 후 원심분리하고, EMEM 용액을 가하여 솜으로 여과한 후 비장과 흉선의 림프구를 분리 사용하였다.

사람 림프구 분리 - 사람의 림프구는 Callard³⁴⁾, Ly와 Mishell 등³⁵⁾의 방법으로 분리하였다. 즉 건강한 20대 초 사람 말초혈액을 주사기로 채취하여 항응고제 (heparin 10 IU/ml)를 함유한 RPMI 1640 배양액과 1:1로 희석하고 희석한 혈액 7 ml를 3 ml의 Histopaque-1077 배양액에 조심스럽게 취한 후 400×g에서 30분간 원심분리하였다. 이때 분리된 림프구를 조심스럽게 취하여 10 ml RPMI 1640 배양액을 가한 뒤 1,000×g에서 10분간 원심분리하는 반복 세척을 거쳐서 5% FBS를 함유한 RPMI 1640 배양액으로 다시 한번 원심분리하여 얻은 림프구를 이용하였다.

림프구 자극분열 효과 측정 - 렉틴의 림프구 자극 분열 효과는 Pandolfino 등의 방법³⁶⁾을 응용하여 측정하였다. 실험에 사용한 Con A는 1.6 mg/ml로 EMEM 배양액에 녹여 사용하였다. 전 항과 같이 분리한 림프구는 0.4% trypan blue로 생존율을 시험한 후 흰쥐는 2×10^6 cells/ml, 사람 림프구는 1.2×10^6 cells/ml 조제하였고 배양액은 25 mM HEPES, 100 µg/ml 스트렙토마이신과 100 IU/ml 페니실린을 함유한 EMEM 배양액으로 준비하였다.

림프구 배양은 편평한 바닥의 microtiter plate (Nunc Co.)에서 실시하였다. 렉틴 용액 100 µl를 넣고 동량의 배양액으로 2배수 희석한 후 동량의 림프구 및 20% FBS를 각 well에 넣었다. 이를 CO₂-배양기 (5% CO₂/95% air/100% 습도)에서 37°C로 48시간 배양시킨 후 0.5 µCi의 [³H] thymidine을 각 well에 넣고 24시간 더 배양시켰다. 배양이 끝난 림프구는 polypropylene filter funnel (d=25 mm, Gelman)로 glass micro fibre filter (GF/C, Whatman)상에 여과 수집하고 냉각시킨 PBS 완충액 (pH 7.2), 5% TCA, 무수 메탄올 순으로 10 ml씩 가하여 세척, 건조시켰다. 건조된 여과지를 5 ml scintillation cocktail 용액에 넣어 scintillation counter로 방사능량을 측정하였다.

암 세포 응집 시험 - 암 세포는 HeLa, L929 및 L

1210 등의 cell line을 대상으로 하여 실험하였다. 세포 분리는 액화 질소통에서 세포가 들어있는 ampule을 꺼낸 후 항온 수조에서 37°C로 가온하여 가능한 빠르게 녹인 다음 가온한 배양액 (10% bovine calf serum/α-MEM) 10 ml를 첨가하였다. 그 후 원심분리(1,000 rpm, 3 min.)하여 세포를 취한 다음 Falcon 플라스크에 세포와 배양액 5 ml를 넣고 CO₂ 배양기(5% CO₂/100% 습도/37°C)에서 24시간 배양한 후 도립 현미경으로 세포의 상태를 관찰한 다음 배양액을 교환해 주고 세포 상태와 수가 가장 적절한 시기까지 배양하였다.

배양액 제거를 위해 PBS(pH 7.2)로 두번 세척한 후 Falcon 플라스크 바닥에 부착된 세포를 분리하기 위해서 트립신-EDTA(0.05%) 5 ml를 10분간 37°C에서 처리하였다. 트립신-EDTA 제거를 위해서는 배양액 2 ml를 가해 원심분리(1,000 rpm, 3 min.)한 다음 침전된 세포를 PBS 1 ml에 혼합한 뒤 1×10^6 cells/ml로 조제하여 사용하였다.

활성도는 시료를 100 µg/ml되게 조제하여 U-모양 microtiter plate에서 실시하였다. 먼저 PBS 50 µl를 취하고 동량의 렉틴 용액을 2배수 희석법으로 희석한 다음 미리 준비된 세포(1×10^6 cells/ml)를 50 µl 취한 뒤 30분 후부터 수 회 현미경으로 관찰하였다.

실험결과 및 고찰

렉틴의 분리 및 정제 - 별불가사리의 추출물은 ammonium sulfate로 0~40% 포화 침전시켰을 때 가장 강한 활성을 나타내었으므로 이를 crude 렉틴으로 하였으며, crude 렉틴은 추출물에 비해 1.88배 정제되었고 80% 회수되었다(Table I).

Crude 렉틴을 DEAE cellulose 52 column으로 chromatography하였을 때, 0.05M, 0.2M 및 0.3M NaCl 분획에서 렉틴 활성이 나타났으나, 0.3M NaCl 분획이 수율과 활성이 가장 컸다. 이 분획은 3.02배 정

Table I— Purification of lectins from starfish *Asterina pectinifera*

| Purification step | Total Protein (mg) | Total Activity (units×10 ⁻³) | Specific Activity (units/mg) | Purification (fold) | Recovery (%) |
|------------------------------------|--------------------|--|------------------------------|---------------------|--------------|
| Extraction | 12,055.8 | 48,768.0 | 4,045.2 | 1.00 | 100.0 |
| Salt fractionation | 5,123.7 | 39,014.4 | 7,614.5 | 1.88 | 80.0 |
| 0.3M fraction of DEAE cellulose 52 | 757.7 | 9,246.7 | 12,203.6 | 3.02 | 19.0 |
| 0.2M fraction of hydroxyapatite | 10.9 | 327.4 | 30,036.7 | 7.43 | 0.7 |

* The protein content was estimated by Lowry assay.

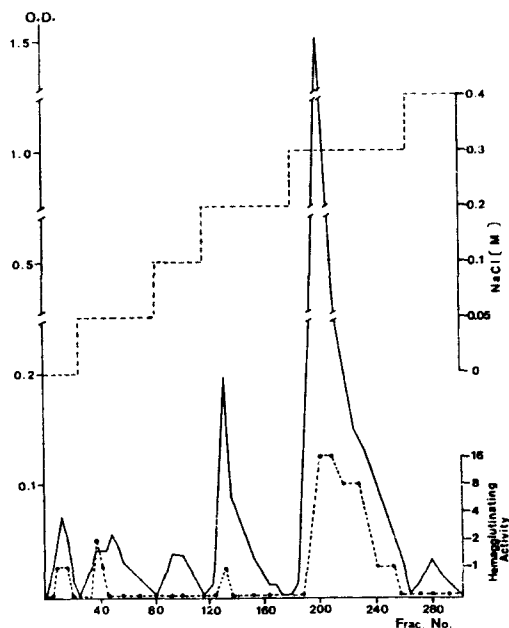


Fig. 1 — Elution profile of *Asterina pectinifera* crude lectins on DEAE cellulose 52 column (1.3×19 cm) chromatography. Dotted line (···) represents hemagglutinating activity. O. D., absorbance at 280 nm; flow rate, 24 ml/h.

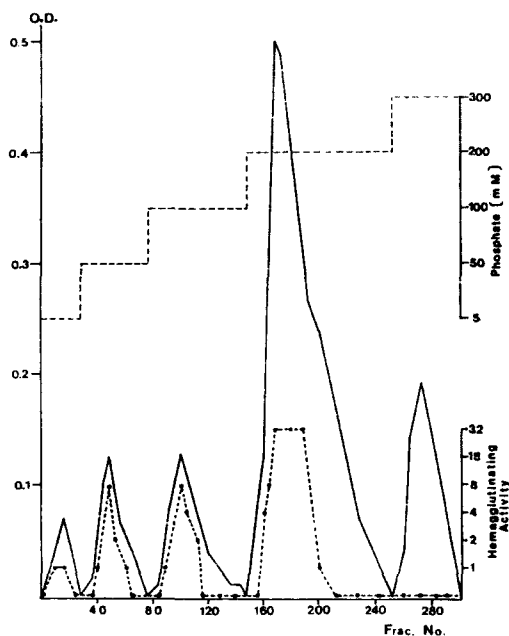


Fig. 2 — Elution profile of 0.3M NaCl fraction from DEAE cellulose 52 column on hydroxyapatite column (0.8×19 cm) chromatography. Dotted line (···) represents hemagglutinating activity. O.D., absorbance at 280 nm; flow rate, 15 ml/h.

제되었고 19% 회수되었다(Table I, Fig. 1).

DEAE-cellulose 52 column의 0.3M NaCl 분획을 hydroxyapatite column으로 더욱 정제한 결과 Fig. 2와 같이 0.05M, 0.1M 및 0.2M phosphate 분획에서 렉틴활성이 나타났으며, 그중 가장 강한 활성을 나타내는 0.2M 분획으로 이 렉틴을 APL 이라하며 이는 7.43배 정제되었고 0.7% 회수되었다 (Table I). 이와같이 얻은 각 분획의 렉틴은 정제단계에 따라 점 띠(band)가 줄어 들어서 hydroxyapatite column을 통과한 0.2M 분획에서는 1개의 주된 띠와 4개의 흔적의 띠가 확인되었고, 이로써 부분정제되었음을 알 수 있었다.³⁷⁾

적혈구 및 림프구 응집력 - DEAE cellulose 0.3M NaCl 분획 렉틴에 대한 사람 및 각종 동물의 적혈구와 림프구에 대한 렉틴 활성은 Table II에 나타난 것처럼 실험에 이용한 모든 적혈구 및 림프구에 대하여 활성을 나타냈으며, 토끼 혈액에 대해서 가장 강한 활성을 나타냈다. 한편, 트립신으로 처리하였을 때, 사람의 혈액에서는 렉틴 활성이 다소 증가되었으나 토끼 혈액에서는 변화가 없었다.

pH, 온도 및 금속이온의 영향 - 렉틴의 적혈구 응집력은 pH 5~9범위에서는 안정하였으나, 그 이하 혹은 그 이상에서는 렉틴의 활성이 급격히 감소하였다. 따라서, 이 렉틴은 약산성 및 중성과 약염기에서 안정함을 알 수 있었다(Table III). 온도변화에 따른 안정성은 Fig. 3과 같았다. 40°C에서 활성이 감소하기 시작하여 60°C에서 완전히 소실되는 APL 렉틴은 실온에서 어느

Table II — Specificity of 0.3M fraction lectin from DEAE cellulose on agglutination of erythrocytes from various animals and murine splenic lymphocytes

| Species | Cell Agglutinating Activity* (HU) | |
|----------------------------|-----------------------------------|-------------|
| | untreated | trypsinized |
| Human A type | 128 | 256 |
| B | 128 | 256 |
| O | 128 | 1024 |
| AB | 128 | 512 |
| Rabbit | 4096 | 4096 |
| Murine splenic lymphocytes | 8 | |

* (HU) : Hemagglutination Unit

Table III—Effect of pH on hemagglutinating activity of 0.3M fraction from DEAE cellulose 52 with trypsinized human and rabbit erythrocytes

| Buffer | pH | Hemagglutinating Activity (HU) | |
|--------------------------|-------|--------------------------------|--------|
| | | Human AB | Rabbit |
| 25 mM KCl-HCl buffer | 2.18 | 2 | 16 |
| 25 mM Glycine-HCl buffer | 3.18 | 4 | 32 |
| 25 mM Acetate buffer | 4.20 | 16 | 32 |
| 25 mM Acetate buffer | 5.20 | 16 | 32 |
| 25 mM Phosphate buffer | 6.54 | 16 | 64 |
| 25 mM Tris-HCl buffer | 7.40 | 16 | 64 |
| 25 mM Tris-HCl buffer | 8.71 | 16 | 128 |
| 25 mM Carbonate buffer | 9.62 | 8 | 64 |
| 25 mM Carbonate buffer | 10.80 | 1 | 32 |

정도 안정하였으나 40°C 이상의 고온에서는 다소 불안정하였다. 한편 -20°C에서 6개월까지는 렉틴 활성에 변화가 없었으며 실온에서 (20°C) 3시간 후 부터는 렉틴 활성이 다소 감소하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 AP 렉틴의 온도와 pH에 대한 안정성은 비교적 양호하였지만, 40°C 이상의 온도와 강산 및 강염기 범위에서는 불안정하게 나타났다. 이러한 결과는 *Meretrix lusoria*²⁴⁾에서 분리된 렉틴의 결과와 유사하였다.

금속이온의 영향을 시험한 결과는 Table IV와 같았다. 착물 형성제인 EDTA의 존재하에서 렉틴 활성이 상당히 감소되었는데 이는 이 렉틴 분자 내에 금속 이온

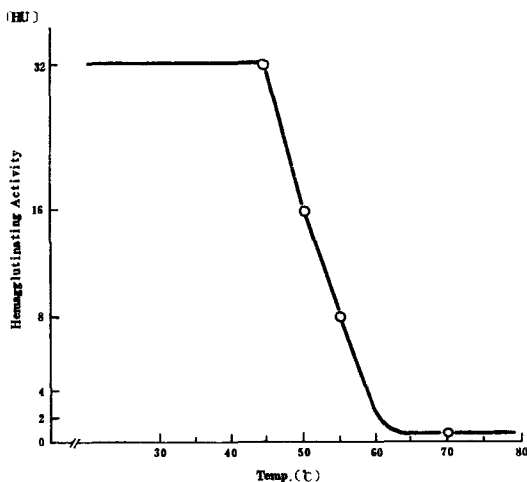


Fig. 3—Effect of temperature on hemagglutinating activity of 0.2M phosphate fraction from hydroxyapatite (APL).

Table IV—Effect of metal ions and chelating agent on hemagglutinating activity of 0.3M fraction from DEAE cellulose 52 column

| Metal ions & chelating agent | Hemagglutinating Activity* |
|------------------------------|----------------------------|
| Ba ²⁺ | 1.25 mM |
| Ca ²⁺ | No effect |
| Fe ²⁺ | No effect |
| Hg ²⁺ | No effect |
| Mg ²⁺ | No effect |
| Mn ²⁺ | 10 mM |
| Zn ²⁺ | No effect |
| EDTA | 0.08 mM |

* Minimal concentrations inhibiting hemagglutinating activity.

The test was performed with chelating agent and metal ions of various concentrations (from 0.02 mM to 10 mM).

이 존재한다는 것을 시사하며 또한 이 렉틴 활성 부위에 금속 이온이 관여한다고 사료된다. 2가 금속 이온인 Mn²⁺와 Ba²⁺ 등이 존재할 때 응집이 감소되는 현상은 이들 금속 이온이 이 렉틴의 활성 부위에 경쟁적으로 작용하거나 렉틴의 conformation을 변형시켜 불활성화시키는 것으로 추정되었고, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺ 등이 존재할 때는 응집 현상에 아무런 변화가 없는 것으로 보아 이들 금속 이온은 렉틴 단백질 변성과는 전혀 무관하며 또한 결합 부위에 존재하지도 않는 것으로 간주되었다. 이는 대부분의 무척추동물, 즉 *Limulus polyphemus*, *Anthocidaris crassispina* 등이나 해양패류 *Megabalanus volcano*, *Megabalanus rosa*, *Meretrix lusoria* 등에서 분리된 렉틴들이 Ca²⁺-의존성인 사실과 비교할 때 약간의 차이를 보였다.²⁴⁾

당 특이성—이 렉틴은 D(+)-glucosamine, D(+)-galactosamine, stachyose, methyl- α -D-galactopyranoside, N-acetyl-D-galactosamine 등의 당에 의해 저해 현상이 확인되었으며, 특히 stachyose와 N-acetyl-D-galactosamine의 경우 비교적 낮은 농도인 25 mM에서 렉틴 활성 저해 현상이 일어났다 (Table V). 불가사리렉틴의 이러한 특성은 대부분의 해양 무척추동물이 -COCH₃ group을 가진 N-acetyl-D-galactosamine과 N-acetyl-D-glucosamine에 의해 강하게 저해 현상이 일어나는 결과와 유사하였고, 이런 해양 무척추동물 렉틴들의 특성에서 공통적으로 발견할 수 있었던 점은 이들 렉틴이 생체 내에서 여러 종류로 존재하고 또한 다양한 당 특이성을 나타낸다는 사실이며, 그 이유는 무척추동물의 경우 한 종류

Table V—Inhibition of hemagglutination by sugars for 0.3 M fraction from DEAE cellulose 52 column

| Sugar | Minimum concentration(mM) for completely inhibiting 4 hemagglutinating doses |
|--------------------------------------|--|
| Stachyose | 25 |
| N-acetyl galactosamine | 25 |
| D(+)-glucosamine | 50 |
| D(+)-galactosamine | 100 |
| Methyl α -D-galactopyranoside | 100 |

Other 30 sugars are not mentioned

의 렉틴만으로는 자기와 중복된 비자기(multiplicity nonself)를 효과적으로 구별할 수 없기 때문이 아닐까 라고 추정한 Parish³⁸⁾의 보고가 설득력있는 가설로 받아들여지고 있다.

아미노산 조성 - 각각의 정제 단계에서 얻은 각 분획을 아미노산 분석한 결과 Table VI과 같았다. 정제 단계별 분획들의 아미노산 함량을 비교해 보면 산성 아미노산인 아스파르트산과 글루탐산 함량이 높게 나타났으며 이는 가수분해시 아스파라긴과 글루타민이 각각 아스파르트산과 글루탐산으로 전환되어 포함되었기 때문이라 사료되었다. 또한 당과 O-결합을 할 수 있는 트레오

닌과 세린 함량이 높은 것으로 보아 별불가사리 렉틴이 당단백질을 시사함과 동시에 이들의 역할이 있음을 시사하였다.

한편, 조각매물고둥²³⁾과 백합조개²⁴⁾ 렉틴도 아미노산 중에서 산성 아미노산인 아스파르트산과 글루탐산 함량이 높았으며, 이들의 pI가 산성이었음을 감안할 때 별불가사리 렉틴의 pI값도 낮은 값으로 추정할 수 있었고, 또한 이들 렉틴이 황을 함유한 시스테인과 메티오닌이 소량 존재하는 점이 별불가사리 렉틴과 유사한 결과를 보임에 따라 이 렉틴은 전형적인 해양 동물 렉틴의 범주에 속하는 것으로 간주되었다.

당 함량 - 렉틴의 당 함량을 알아본 결과 DEAE cellulose column의 0.3M 분획은 19.35%, hydroxyapatite column의 0.2M 분획은 8.96%의 당(neutral sugar)을 함유한 당단백질로 밝혀졌다.

림프구 자극 분열 효과 - 렉틴의 생리활성으로 림프구 자극분열 효과를 알아보기 위해hydroxyapatite의 0.2M 분획을 대상으로 전형적인 mitogen인 Con A와 비교 조사한 결과, 생쥐 림프구를 대상으로 한 경우는 비록 0.3 μ g/ml에서 활성도를 보였지만³⁷⁾ 림프구 증식 정도가 너무 낮아서 마이토젠으로서의 효과가 없는 것으로 간주되었으며, 흰쥐 림프구는 세포분열 효과를 나타내지

Table VI—Amino acid composition of *Asterina pectinifera* lectins

| | Crude Lectin | | DEAE 0.3 M* | | HA 0.2 M**(APL) | |
|-------------------------------|---------------|------|---------------|------|-----------------|------|
| | Amount (nmol) | % | Amount (nmol) | % | Amount (nmol) | % |
| 1. Aspartic acid ^a | 127.3 | 11.8 | 10.9 | 13.1 | 19.8 | 12.6 |
| 2. Threonine | 98.2 | 9.1 | 5.1 | 6.1 | 10.5 | 6.7 |
| 3. Serine | 98.2 | 9.1 | 5.5 | 6.6 | 10.4 | 6.6 |
| 4. Glutamic acid ^a | 140.1 | 12.9 | 11.1 | 13.3 | 19.5 | 12.4 |
| 5. Proline | 29.6 | 2.7 | 3.9 | 4.7 | 7.7 | 4.9 |
| 6. Glycine | 107.7 | 9.9 | 7.9 | 9.5 | 14.2 | 9.0 |
| 7. Alanine | 98.0 | 9.1 | 6.8 | 8.2 | 13.7 | 8.7 |
| 8. Cystine | 25.4 | 2.3 | 1.3 | 1.6 | 2.1 | 1.3 |
| 9. Valine | 45.6 | 4.2 | 3.9 | 4.7 | 8.2 | 5.2 |
| 10. Methionine | 23.8 | 2.2 | 1.6 | 1.9 | 2.5 | 1.6 |
| 11. Isoleucine | 23.4 | 2.2 | 2.5 | 3.0 | 4.9 | 3.1 |
| 12. Leucine | 49.2 | 4.5 | 6.8 | 8.2 | 13.5 | 8.6 |
| 13. Tyrosine | 46.8 | 4.3 | 2.7 | 3.3 | 5.4 | 3.5 |
| 14. Phenylalanine | 31.4 | 2.9 | 4.1 | 4.9 | 8.1 | 5.2 |
| 15. Histidine | 27.4 | 2.5 | 1.5 | 1.8 | 3.0 | 1.9 |
| 16. Lysine | 55.5 | 5.1 | 4.0 | 4.8 | 7.2 | 4.6 |
| 17. Arginine | 56.2 | 5.2 | 3.6 | 4.3 | 6.5 | 4.1 |
| Total amino acid(nmol) | 1083.8 | | 83.2 | | 157.2 | |

O.D. = 2(2 mg/ml, sample volume = 40 μ l)

^a Asp + Asn. Glu + Gln

* 0.3 M fraction of DEAE cellulose 52, ** 0.2 M fraction of hydroxyapatite

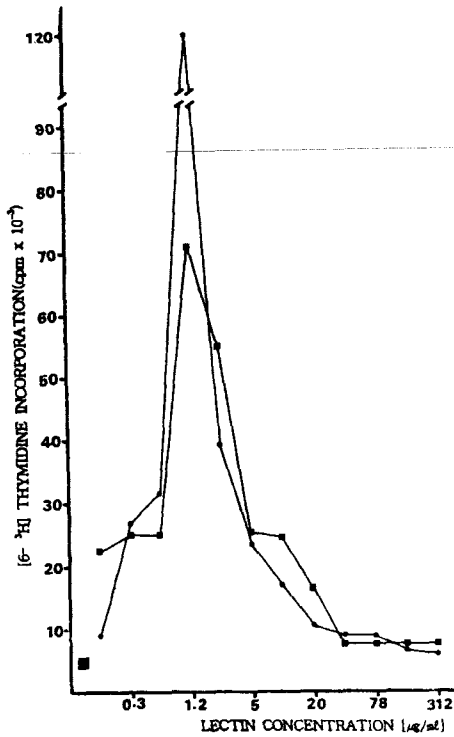


Fig. 4—Effect of APL on mitogenic response of human peripheral lymphocytes.
 APL : -■-■-■-■-■-■-
 Con A : -●-●-●-●-●-●-
 Control : ■

않았다. 그러나 사람 림프구에서는 1.2 µg/ml에서 효과가 나타났으며, 이때 비교 시료로 사용된 Con A 경우에도 1.2 µg/ml에서 활성을 나타냄으로써 APL 렉틴의 림프구 자극분열 효과를 입증시켰다(Fig. 4).

같은 해양 동물인 조각매물고등²³⁾ 렉틴은 6.4 µg/ml (생쥐), 백합조개¹¹⁾ 렉틴은 62.25 µg/ml(생쥐)와 1.95 µg/ml(사람), 눈알고등²⁵⁾ 렉틴은 3.91~31.25 µg/ml(생쥐)와 15.63~31.25 µg/ml(사람)농도에서 최대 활성을 나타냈으며, 버섯류인 표고²⁶⁾ 렉틴은 2.5 µg/ml(흰쥐)와 1.2 µg/ml(사람), 콩과에서 얻은 PHA는 5 µg/ml농도에서, lentil 렉틴은 30 µg/ml농도에서 세포분열 효과가 있었음³⁹⁾과 비교해 볼 때 APL 렉틴은 비슷한 농도이거나 더 낮은 농도에서 세포분열 효과가 나타나 이는 매우 흥미있는 사실이라 하겠다.

암 세포 응집 효과 - 응집 효과 측정 대상인 cell line은 HeLa cell, L929 및 L1210 등이었으며, 이들에게 APL 렉틴을 첨가하였더니 HeLa cell, L929 및 L1210 모두에서 응집 효과를 나타내었다(Fig. 5, 6, 7).

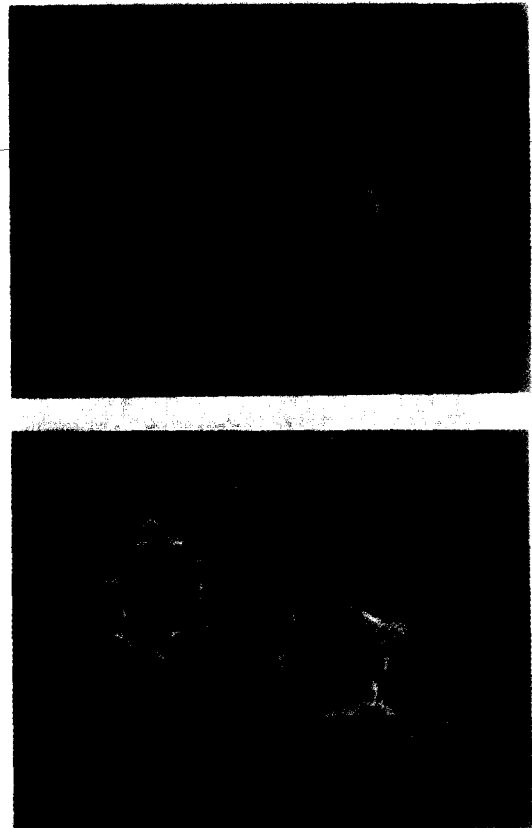


Fig. 5—A : Phase-contrast microphotograph of HeLa cells of control group. Magnification, ×1,000.
 B : Phase-contrast microphotograph of HeLa cells at 2 hours after APL administration. Agglutination of cells are evident (arrows). Magnification, ×1,000.

HeLa cell과 L929의 경우 Falcon 플라스크 바닥에 부착된 형태로 배양된 세포를 트립신-EDTA로 처리한 후 저배율 광학 현미경으로 관찰한 결과, 렉틴을 처리하지 않은 세포들의 분포 모습과 APL 렉틴에 의한 세포들의 응집 현상을 비교 하였을 때, APL 렉틴을 첨가한 경우에 눈에 띄이는 응집 현상이 관찰되었다. 한편 HeLa cell에 APL 렉틴을 첨가하였을 때 광학 현미경 상에서 응집 현상을 관찰하고 난 후, HeLa cell의 세포막 변화를 자세히 관찰하기 위하여 전자 현미경을 이용한 결과 Fig. 8과 같은 결과를 관찰할 수 있었다. 이때 응집한 세포 군에서 대조 군과 비교시 세포막에 다수의 돌기 모양을 발견할 수 있었으며, 응집할 때 세포막 모양은 막 전체가 융합된 것이 아니라 막과 막사이에 군데 군데 다리 모양이 형성되면서 응집되어 있는 것으로 보

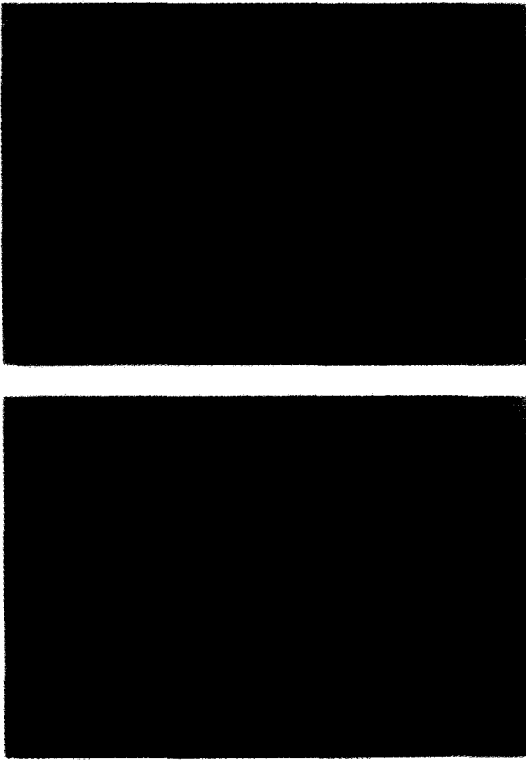


Fig. 6— A : Phase-contrast microphotograph of L929 cells of control group. Magnification, $\times 1,000$.
B : Phase-contrast microphotograph of L929 cells at 2 hours after APL administration. Agglutination of cells are evident (arrows). Magnification, $\times 1,000$.

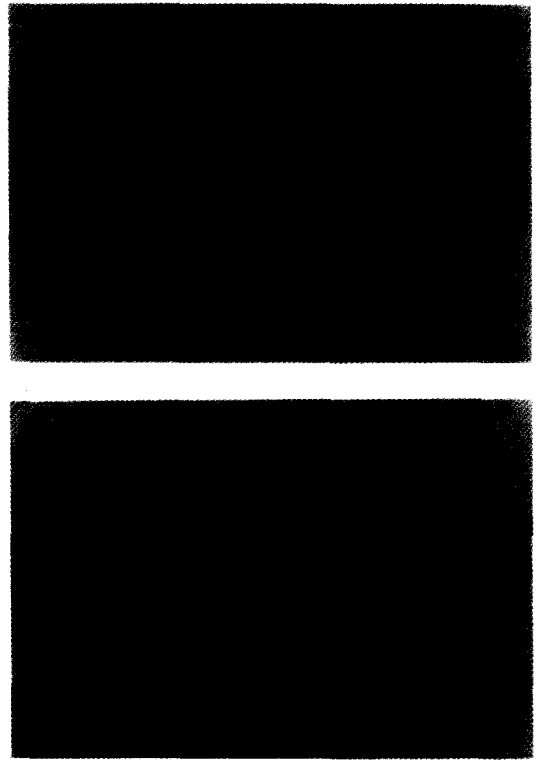


Fig. 7— A : Phase-contrast microphotograph of L1210 cells of control group. Magnification, $\times 1,000$.
B : Phase-contrast microphotograph of L1210 cells at 2 hours after APL administration. Agglutination of cells are evident (arrows). Magnification, $\times 1,000$.

아, 세포막 상에서 서로 해당되는 glycoconjugate와 이웃 세포의 glycoconjugate와의 사이에서 렉틴이 특이적으로 결합하여 야기된 것이라고 사료되었다.

이상으로서 본 연구에서는 지금까지 쓸모없는 해로운 동물로 간주되어 버려져 왔던 해양 동물 불가사리류의 한종인 별불가사리(*Asterina pectinifera*)로부터 부분정제된 APL 렉틴이 사람 림프구에 대해 훌륭한 mitogen으로 작용한다는 흥미로운 사실을 발견하였고, 한편 HeLa cell, L929 및 L1210 등의 암 세포에 대해서 세포 응집 효과를 확인함과 동시에 이는 암세포의 성장저해를 의미하는 것으로 사료되어 앞으로 이 결과를 이용하여 암 세포 연구에 APL 렉틴을 이용할 수 있는 가능성을 발견하였다.

본 연구에서 얻은 실험 결과를 토대로 앞으로 계속 수행하여야 할 과제는 더 순도높은 APL 렉틴의 정제와 생화학적 특성 규명, 그리고 쥐의 암 세포와 사람 암 세

포를 이용하여 렉틴 성분의 암 세포 응집 및 성장저해 효과를 *in vivo*에서 관찰하는 연구가 될 것이며 나아가 렉틴의 임상학적 응용을 모색하는 일일 것이다.

결 론

별불가사리(*Asterina pectinifera*) 렉틴은 최종 정제단계인 hydroxyapatite column chromatography를 거친후에 7.43배 정제되었고 0.7% 회수되었다. APL 렉틴은 사람과 토끼의 적혈구에서 응집작용을 일으켰다. 림프구 자극분열 시험 결과 쥐과 동물(murine) 림프구에 대해서는 자극분열 효과가 없었고 사람 림프구에 대해서는 분열 효과가 있었다. 사람 림프구에서는 대표적 mitogen인 Con A와 비슷한 농도에서 활성이 나타났으나, 세포 증식 정도는 낮게 나타났다. 3종류의 암 세포 즉 HeLa, L929 및 L1210 cell 등과 APL 렉틴의

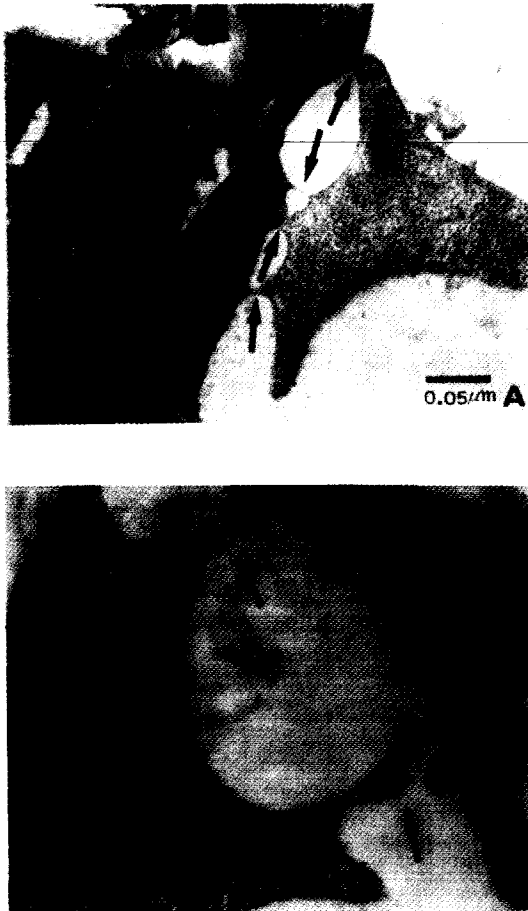


Fig. 8—A : Electron microphotograph of HeLa cells at 2 hours after APL administration. The sites of multiple conjugated processes on the membrane are shown (arrows). Magnification, $\times 20,000$.
B : Electron microphotograph of HeLa cells at 2 hours after APL administration. The sites of multiple conjugated processes on the membrane are shown (arrows). Magnification, $\times 40,000$.

응집현상을 시험한 결과 강한 응집현상을 나타냄으로써 암세포 성장저해 효과를 확인할 수 있었다.

감사의 말씀

이 연구는 1996년도 영남대학교 학술연구조성비의 지원으로 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

문헌

1) Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M.,

Osawa, T. and Sharon, N. : What should be called a lectin ? *Nature* **285**, 66 (1980).

2) Kocourek, J. and Horejisi, V. : Defining a lectin. *Nature* **290**, 188 (1981).

3) Dixon, H. B. F. : Defining a lectin. *Nature* **292**, 192 (1981).

4) NCIUB-IUPAC (nomenclature committee of international union of biochemistry-international union of pure and applied chemistry) joint commission. : What is a lectin? *J. Biol. Chem.* **256**, 12 (1981).

5) Chung, S. R., Kim, J. H., Suh, Y. A. and Jeune-Chung, K. H. : Studies on lectins from marine shells(III) : Screening of lectin-like agglutinins from marine shells. *Arch. Pharm. Res.*, **9**, 201 (1986, a).

6) Sharon, N. and Lis, H. : Lectins. Cell-agglutinating and sugar-specific proteins, *Sci.*, **177**, 949 (1972).

7) Olsnes, S. and Pihl, A. : Toxin lectins and related proteins. in *Molecular Action of Toxins and Viruses.*, Cohen and Van Heyningen ed., Elsevier Biomedical Press., Amsterdam 51 (1982).

8) Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein, I. J. : Properties, function and application in biology and medicine. in *The Lectins*, Academic Press, New York, pp. 1-600 (1986).

9) Nowell, P. C. : Phytohemagglutinin : An initiator of mitosis in culture of normal human leukocytes. *Cancer Res.*, **20**, 462 (1960).

10) Aub, T. C., Tieslau, C. and Lankester, A. : Reaction of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 613 (1963).

11) Chung, S. R., Kim, J. H. and Jeune, K. H. : Immunostimulating lectins from marine natural products: Characteristics of the MLA-I, MLAII and MLA-III. *Yakhak Hoeji* **39**, 243 (1995).

12) Chung, S. R., Lee, Y. C. and Jeune, K. H. : Immunomodulating lectins from marine natural products. Proceedings of International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Commemorating the 80th Anniversary of Modern Pharmaceutical Education in Korea. The Phar-

- maceutical Society of Korea, 403 (1995).
- 13) Robb, R. J. : Interleukin 2 : The molecule and its function. *Immunol. Today* **5**, 203 (1984).
 - 14) Chung, S. R., Jeune, K. H. and Suh, Y. A. : Lectins from the ocean. Proceedings of the 2nd Symposium on the Biochemical Society of Korea, 349 (1991).
 - 15) Chung, S. R., So, M. S. and Jeune, K. H. : Studies on bioactive marine natural substance, Lectins. Marine animal lectins(XII) : Invited Lectures of International Congress of New Drug Development, The Pharm. Soc. Kor., 345 (1991).
 - 16) Blakey, D. C., Wawrzynezak, E. J., Wallace, P. M. and Trope, P. E. : Antibody toxin conjugates : A perspective. in *Monoclonal Antibody Therapy, Progress in Allergy*. Waldmann, H.(eds), Basal Publications, **45**, 50 (1988).
 - 17) Vitetta, E. S., Krolick, K. A., Miyama-Inaha, M., Cushley, W. and Uhr, J. W. : Immunotoxin : A new approach to cancer therapy. *Science* **219**, 644 (1983).
 - 18) Olsnes, S., Refsnes, K. and Pihl, A. : Mechanism of action of the toxic lectin abrin and ricin. *Nature* **249**, 627 (1974).
 - 19) 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).
 - 20) Nakajima, H., Kamano, H., Esumi-Kurisu, M., Abe, S., Yamazaki, M., Natori, S. and Mizuno, D. : Induction of macrophage-mediated tumor lysis by an animal lectin, *Sacophaga peregrina agglutinin*. *Gann* **73**, 627 (1982).
 - 21) Ohkuma, Y., Komano, H. and Natori, S. : Comparison of binding proteins on the surface of murine tumor cells for two lectins active in the lectin-dependent macrophage-mediated cytotoxic reaction. *Cancer Res.* **45**, 4397 (1985).
 - 22) Chung, S. R., Hong, S. S. and Jeune-Chung, K. H. : Isolation, purification of lectin from *Phaseolus radiatus*. *Yakhak Hoeji*, **27**, 221 (1983).
 - 23) Chung, S. R., Suh, Y. A. and Jeune-Chung, K. H. : Studies on lectins from marine shells, IV : Characterization of several biophysicochemical properties of *Neptunea intersculpta lectin*, in *Proceeding of the 4th Federation of Asian and Oceanian Biochemists Congress*, Cambridge Univ. Press, 288 (1986, b).
 - 24) Kim, J. H., Chung, S. R. and Jeune, K. H. : Lectins from marine shells (IX) : Purification and carbohydrates specificities of a lectin, MLA-1, from the hemolymph of *Meretrix lusoria*. *Kor. Biochem. J.* **23**, 328 (1990).
 - 25) So, M. S., Jeune, K. H. and Chung, S. R. Lymphocytes mitogenic and immunochemical properties of the lectins from marine animal *Lunella coronata coreensis*. *Yakhak Hoeji* **37**, 254 (1993).
 - 26) Moon, I. J., Chung, S. R. and Jeune, K. H. : Mitotic stimulation and cancer cell agglutination of the lectin from *Lentinus edodes*. *Yakhak Hoeji* **39**, 260 (1995).
 - 27) Chung, S. R., Kim, J. H. and Jeune-Chung, K. H. : Studies on lectins from marine shell(II) : Isolation, purification and characterization of lectin from shellfish, *Neptunea intersculpta*. *Kor. Biochem. J.* **18**, 429 (1985).
 - 28) Davis, B. J. *Disc electrophoresis* II, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404, (1964).
 - 29) Chung, S. R., Jeune-Chung, K. H. and Kim, K. A. : Isolation, purification and characterization of phytohemagglutinating proteins from Korean natural products. *Arch. Pharm. Res.* **3**, 31 (1980).
 - 30) Lis, H. and Sharon, N. : Soy bean(*Glycine max*) agglutinin, in *Method in Enzymology*, Academic Press, New York, **28**, 360 (1972).
 - 31) Iglesias, J. L., Lis, H. and Sharon, N. : Purification and properties of a D-galactose/N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Erythrina cristagalli*. *Eur. J. Biochem.* **123**, 247 (1982).
 - 32) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, J. : Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
 - 33) Wysocki, L. J. and Sato, V. L. "panning" for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2844 (1978).
 - 34) Callard, R. E., Shields, J. S. and Smith, S. H. : Assay for human B cell growth and differen-

- tiation factors. in *Lymphokines and Interferons*, Clemens, Morris and Gearing(eds), IRL Press, Oxford, 345 (1987).
- 35) Ly, I. A. and Mishell, R. I. : Separation of mouse spleen cells by passage through columns of Sephadex G-10. *J. Immunol. Methods* **5**, 239 (1974).
- 36) Pandolfino, E. R., Namen, A. E., Munske, G. R. and Magnuson, J. A. : A comparison of the cell-binding characteristics of the mitogenic and nonmitogenic lectins from lima beans. *J. Biol. Chem.* **258**, 9203 (1983).
- 37) Park, C. S. Cancer cell agglutinability and biochemical properties of the lectins from starfish, *Asterina pectinifera*. *Ph. D. Thesis, Yeungnam University*, 1, (1994).
- 38) Parish, C. R. : Simple model for self-nonsel discrimination invertebrates. *Nature* **267**, 711 (1977).
- 39) Monsigny, M., Kieda, C. and Roch, A. C. Membrane lectins. *Biol. Cellulaire* **36**, 289 (1979).