[UCI]I804:24011-200000231741

2006년 2월
박사학위논문

사람 자궁경부암 세포주에서 Cisplatin의 세포독성에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 동 원

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY
100355549 2006-09-13

사람 자궁경부암 세포주에서 Cisplatin의 세포독성에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향

The effect of green tea polyphenol on cisplatin-induced cytotoxicity in human uterine cervical cancer cell lines

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 동 원

사람 자궁경부암 세포주에서 Cisplatin의 세포독성에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향

지도교수 한 세 준

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함

2005년 10월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 동 원

김동원의 박사학위 논문을 인준함

위원장 울산대학교 교수 남 주 현

위원 동국대학교 교수 심 재 철

위원 조선대학교 교수 박 영 진

위원 조선대학교 교수 이 병 래

위원 조선대학교 교수 한 세 준

2005년 12월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

목차

표목차 ———— II

도목차 ———— III

영문초록 ———— 1

서론 ———— 3

연구대상 및 방법 ———— 3

결과 ———— 6

고찰 ———— 10

결론 ———— 14

참고문헌 ———— 16

표목차

Table 1. Table 1. The Nucleotide sequences of primer for PCR ——— 20

도목차

Fig.1. Effects of cisplatin on MTT reduction of SiHa cells and HeLa cells.

Fig.2. Effects of EGCG on MTT reduction of SiHa cells and HeLa cells.

Fig.3. Effects of polyphenon on MTT reduction of SiHa cells and HeLa cells

Fig.4. Effects of EGCG(50㎍/㎖) on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cells

Fig.5. Effects of EGCG(50㎍/㎖) on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cells.

Fig.6. Effects of EGCG (50㎍/㎖) on cisplatin-induced cytotoxicity of SiHa cells

Fig.7. Effects of tea polyphenols (catechin, EGCG and polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cells

Fig.8. Effects of tea polyphenol (catechin, EGCG and polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cells

Fig.9. Effects of tea polyphenol(catechin, EGCG and polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of SiHa cells

Fig.10. Effects of tea polyphenols on p53 gene expression in HeLa and SiHa cells

Abstract

The effect of green tea polyphenol on cisplatin-induced cytotoxicity in human uterine cervical cancer cell lines

by Dong Won Kim
Directed by Sei Jun Han, M.D., Ph.D.
Department of Medicine
Graduate School, Chosun University

tive: The aim of this study was to evaluate tea polyphenol(TP) as a biochemical lator on the cytotoxic effects of cisplatin in uterine cervical cancer cell lines.

Meth ds: HeLa cell and SiHa cells from Korean Cell Culture Bank were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with a 10% fetal bovine serum, antibiotics strept mycin and penicillin. Three types of TP-catechin, epigalocatechin galate(EGCG) and p lyphenon were used for this study.
Cells were seeded at 1×10^4 cells/well in RPMI1640 media in triplicate wells on a Nunc Labware 96 well flat bottom microculture plate, with or without TP(50㎍/㎖) and at differen concentrations of cisplatin (0-100㎍/㎖). After incubating the plates at 37°C in 5% CO_2 for 1 days, cell viability was determined using the MTT [3-(4,5- limethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue] assay. RT-PCR and western blot method were employed to detect the influence of EGCG and polyphenon on the expressions of p53 gene in HeLa and SiHa cell lines.

Resu e viability of HeLa cells was decreased to 31% at 12 ㎍/㎖ concentration of

cisplatin, and to 12% above 25μg/mℓ by the MTT assay. However, in the co-treatment with EGCG(50μg/mℓ), the viability of HeLa cells was decreased to 47% at 4μg/mℓ of cisplatin and to 15% at 6μg/mℓ of cisplatin.
The viability of SiHa cells was decreased to 81% at 12μg/mℓ cisplatin, and to 25% above 25μg/mℓ of cisplatin. However, in EGCG(50μg/mℓ) treated groups, the viability of SiHa cells were decreased to 47% at 6μg/mℓ of cisplatin and to 15% at 12μg/mℓ of cisplatin. There is no apparent changes in cisplatin-induced cytotoxicity between EGCG and polyphenon administration. The viability of SiHa cells and HeLa cells were significantly decreased at 6μg/mℓ of cisplatin when EGCG was administered 2 hours before or after cisplatin treatment. But there was no beneficial effect when it was administered with cisplatin simultaneously. After administration of EGCG and polyphenon, p53 protein level was increased in western blot. But p53 expression was unchanged by RT-PCR.

Conclusion: This study showed that TP has potentiating effect on cisplatin-induced cytotoxicity in HeLa and SiHa cell lines especially when it was administered before or after cisplatin treatment. This synergistic activity of TP might be associated with the increased levels of p53 gene.

Key words: **Cisplatin, Tea polyphenol, HeLa cell, SiHa cell**

I. 서 론

항암화학요법은 수술요법 및 방사선 치료법과 함께 3대 암치료법 중 하나로 이용되고 있는데, 최근 들어 항암 화학 요법에 대한 관심이 더욱 증대되고 있는 실정이다.1,2) 부인암치료에서 항암 화학요법은 1976년 Wiltshaw 등이3) 시스플라틴(cisplatin :cis-diammine dichloroplatinum)을 난소암환자의 치료에 이용한 이후로 본격적으로 시작되었다고 할 수 있다. **시스플라틴**은 백금계 화학물질로서 항암작용 기전은 DNA 사슬사이에서 교차반응(interstrand cross-linking)을 일으킴으로서, DNA 합성이나 RNA합성을 억제함으로서 세포자사(apoptosis)를 유도한다고 알려져 있다.4,5) 현재 platinum 계 화학 요법제는 자궁경부암, 대장암, 폐암 등 여러 가지 고형암에 대한 주된 항암 화학요법제로 이용되고 있다. 4-6)

platinum계 항암 화학요법제는 암 환자에게 효과적인 치료제로 이용되고 있으나, 신장이나, 간장 및 골수세포 등에 대한 독성으로 나타나는 부작용과 항암제에 대한 내성세포 증가는 항암화학요법의 커다란 장애로 대두되고 있다. 5-8)

따라서 시스플라틴의 부작용을 줄이기 위하여 oxiplatin, carboplatin 등 여러 가지 유도체들이 개발되고 있다5-6). 또한 시스플라틴 단독요법으로 항암효과가 충분치 않은 경우 항암효과를 상승시키기 위하여 여러 가지 항암제를 병행하여 투여하는 병합요법이나 방사선요법과 병행하는 치료법이 최근에 시도되고 있다2,3). 그러나 아직까지도 시스플라틴의 독성을 줄이면서 항암작용은 증가 시킬 수 있는 방법의 개발은 충분하지 않다. 그러므로 항암 화학요법제의 장기에 미치는 독성작용을 최소화 하면서 치료 효과를 높일 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하며, 이중에서도 항암제의 항암력을 증가시키거나, 암세포의 내성을 변화시킬 수 있는 항암화학요법 보조제의 개발에 대한 연구가 매우 절실히 요구되고 있다. 최근 부작용이 적은 항암제로서 식물, 버섯, 균류 및 해조류 등 천연물에 대한 관심이 증가되고 있다9). 특히 천연물에 함유된 항산화작용을 가진 여러 가지 물질이 암치료에 보조제로 이용될 수 있는 것으로 알려지고 있는데, 녹차의 항암작용, 특히 녹차의 polyphenol 성분인 카테킨이 암의 발생과 치료에 효과가 있다는 연구 논문이 발표되고 있다

10-11). 녹차잎에 함유된 여러 종류의 카테킨 중 epicatechin(EG), epicatechin-3-gallate(ECG), epigallocatechin(EGC) 및 epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등 4가지가 대부분을 차지하며, 녹차잎에는 폴리페놀중 EGCG가 가장 많이 함유되어 있다10-13). 녹차 카테킨은 발암물질을 소거하거나 암의 발생기전을 차단하여 암의 발생을 예방하는 작용이 있고, 암세포 괴사를 유도하거나 암 침투와 혈관증식을 억제하여 암의 성장이나 진행을 억제시키는 효과가 있다고 알려져 있다.14-16) 녹차의 항암효과에 대한 연구의 대부분은 항암작용기전에 대한 것인데, 항암제의 병합투여 효과에 대한 연구는 많이 진행되고 있으나 자궁경부암 세포에 대한 연구 결과는 아직까지 많지 않고, 대부분의 연구가 여러 종류의 카테킨 중 EGCG에 집중되어 있다. 11-16)

본 연구는 각기 다른 종류의 녹차 폴리페놀을 광범위 항암화학요법제 중 시스플라틴과 병합 투여할 경우, 이미 밝혀져 있는 시스플라틴이 가지는 항암작용에 폴리페놀이 어떤 부가적 영향을 주는지 관찰하기 위하여 자궁경부암 세포주를 배양하여 시스플라틴과 폴리페놀을 여러 방법으로 병합 투여 한 후 세포생존율을 측정하여 조사하여,. 투여방법과 폴리페놀의 종류에 따른 세포활성도 감소 정도의 차이를 관찰하였다.

Ⅱ. 방 법

1. 세포의 배양

본 실험에서 사용한 세포는 편평상피세포암(squamous cell cancer)인 자궁암세포주(HeLa cell, SiHa cell)로, 한국 세포주 은행에서 분양받아 실험에 사용하였다. 10% 태우혈청, 스트렙토마이신(100U/ml) 및 페니실린(100U/ml)을 함유한 RPMI 1640 배지(Gibco BRL)를 사용하였으며, 37℃로 유지되는 CO_2 배양기에서 세포배양을 실시하였다.

2. 자궁 경부암세포에서 시스플라틴과 폴리페놀이 세포활성에 미치는 영향 측정

실험은 배양세포를 시스플라틴만 첨가한 대조군, 시스플라틴(Sigma Chemical Co, USA)과 녹차 폴리페놀(polyphenon 60, Cat. No : P 1204, EGCG Cat. No : E 4143, Catechin Cat. No : C 1251 Sigma Chemical Co, USA)을 첨가한 군으로 나누어 실시하였다. 즉 세포배양 용기(96 well plate)의 각 웰에 HeLa와 SiHa 세포 2×10^5 개씩을 넣어 1일간 배양한 후 실험을 실시하였다. 녹차 폴리페놀을 PBS에 용해시켜 첨가하였고, 시스플라틴은 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해시킨 후 PBS(phosphate buffered saline)에 희석시켜서 각 웰에 순서대로 첨가하여, CO_2 배양기에서 24시간 동안 더 배양한 후, 세포활성(Cell viability)을 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)법17)으로 측정하였다. MTT법의 시행은 배양된 세포에 MTT를 최종농도가 1 mM이 되게 첨가하여 4시간동안 배양시킨 후 배양액을 제거하고, HBSS로 3회 세척한 후 MTT 용해액[50% N,N-dimethylformamide(v/v); 20% sodium dodecyl sulfate(W/v), pH4.7] 200㎕를 첨가하여

ELISA plate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 실험은 각 실험군마다 3 wells의 흡광도를 각각 측정하여 평균값을 계산하였고, 3회 반복 실험을 실시하여 유의성을 판정하였다.

3. 자궁 경부암세포에서 폴리페놀이 p53 mRNA에 미치는 영향 측정

자궁암세포(HeLa cell, SiHa cell)에서 폴리페놀이 p53 유전자 발현에 미치는 영향을 알기 위하여 세포에 녹차 폴리페놀을 첨가 하여 배양한 후 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR 법으로 p53 mRNA를 확인하였다.

4. RNA 분리

배양세포의 RNA 분리는 배양액을 제거한 후 TRI Regant(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 첨가하여 세포를 수집하여 균질화하고, 0.2㎖ chloroform을 첨가하여 잘 혼합한 후, 실온에서 15분간 방치한 후 4℃에서 12,000×g로 15분간 원심분리하여 상층액을 수집한다. 수집액에 0.5㎖ isopropanol을 첨가하여 혼합한 후, 실온에서 5-10분간 방치하고, 4℃에서 12,000×g로 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한다. 침전물에 1㎖ 75% ethanol을 첨가하여 잘 혼합한 후 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 건조시켜서 50㎕의 0.1% DEPC 용액을 첨가하여 55-60℃에서 용해시켜 RNA 시료로 사용하였다.

5. cDNA 합성 및 중합효소연쇄반응

역전사 반응은 random hexamer를 primer로 하여 역전사 효소 RAV-2(TaKaRa Code No. 2610)를 이용하여 실시하였다. 즉 추출된 RNA 10㎕에 primer 2㎕를 넣어 95℃에서 5분 동안 방치한 후 5분 동안 얼음에 보관하고 10,000rpm에서 5초 동안 원심 분리하여 반응액을 침전시켰다. 여기에 DEPC로 처리된 증류수 20㎕,

5×PCR buffer 10㎕, 0.1M dTT 5㎕, 10mM dNTP 2㎕, RNAsin 1㎕, reverse transcriptase 1㎕를 넣고 37℃에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성한 다음 이것을 4℃에 보관하였다.

PCR은 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수 30.5㎕, 10×PCR buffer 5㎕, 25mM MgCl2 6㎕, 10mM dNTPs 1㎕, forward primer 1㎕, reverse primer 1㎕, cDNA template 5㎕, Taq polymerase (5U/㎕) 0.5㎕를 혼합하였다. PCR 조건은 denaturation과정으로 95℃에서 45초, annealing 과정으로 50℃에서 45초, 그리고 polymerization 과정으로 72℃에서 1분을 설정하여 30 cycle을 거친 다음 마지막으로 72℃에서 10분 동안 반응시킨 다음 -4℃에 보관하였다. PCR로 증폭된 산물을 확인하기 위하여 10㎕의 PCR 산물을 2㎕의 gel loading buffer (0.25% bromophenol blue tracking dye in 25% Ficoll)와 혼합하여 1.5% agarose gel에 loading한 후 100V에서 30분간 TAE buffer (0.04M tris-acetate, 0.001M EDTA)에서 mini-gel electrophoresis unit (MUPID-2)을 사용하여 전개하였다. 이상의 실험단계에서 얻어진 PCR 산물은 3% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidiume bromide 용액으로 염색하고 UV-transilluminator에서 나타난 DNA band를 사진촬영하여 대조군과 실험군의 band의 밀도를 image analyzer (1D ver.2.1, pharmacia biotech, USA)로 측정하여 비교하였다.

4. Western blot

배양세포는 배지를 제거 한 후 Dulbecco's PBS로 1회 세척하고 100㎕ SDS-loading buffer(50mM Tris-HCl;pH6.8, 2% SDS, 0.1% Bromphenol blue, 10% glycerol)를 첨가하여 95°C에서 5 분 동안 방치한 후 전기영동을 시행하였다. 전기영동은 10% polyacrylamide gel을 이용하여 Tris 완충액(pH8.8, 0.025M Tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS)에서 80V로 2시간 동안 전개시켰다. 전기영동 후 gel은 분리하여 nitrocellulose membrane을 얹어서 transfer buffer(25mM Tris, 192mM glycine, 20% methanol)에서 20V에서 12시간동안 transfer하였다. Membrane을 분

리하여 5% nonfat milk를 함유한 TBS(0.1% Tween20 in pH7.4 Tris-based saline buffer)에 1시간 동안 blocking하고 TBS로 2회 washing한다. Antirabbit polyclonal Anti-p53 Ab(1:1200 dilution)(Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA), 2% non fat milk/TBS에서 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. TBS로 4회 washing후 horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG(1:2000 dilution), 2% nonfat milk/TBS에서 1시간 동안 반응 시킨 후 TBS로 4회 washing한다. Membrane은 enhanced chemiluminescence 용액(Amersham, UK)에 넣은 후 1분 30초 동안 반응시키고 X-ray 필름을 이용하여 감광시킨 후 현상하여 나타난 band를 image analyzer (1D ver.2.1, pharmacia biotech, USA)로 그 intensity를 정량하였다.

5. 실험결과의 분석

모든 측정결과는 평균±표준편차로 표시하였고, 실험결과는 SPSS 컴퓨터 통계 프로그램을 이용하여 Duncan's multiple range test에 의해서 유의성을 검정하여 $p<0.05$를 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결　　과

시스플라틴이 HeLa 세포와 SiHa 세포의 활성에 미치는 영향

HeLa 세포와 SiHa 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 0, 2, 4, 6, 12, 25, 50, 100 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 배양한 후 MTT 환원량을 측정한 결과 HeLa 세포는 시스플라틴의 농도가 6, 12, 25 및 50 ㎍/㎖ 일때 MTT 환원량은 대조군의 86, 31, 12 및 6 %로 감소되었고, SiHa 세포는 시스플라틴의 농도가 6, 12, 25 및 50 ㎍/㎖ 일때 MTT 환원량이 대조군의 95, 81, 25 및 11%로 감소되었다.**(Fig. 1).**

폴리페놀이 HeLa 세포와 SiHa 세포의 활성에 미치는 영향

HeLa 세포와 SiHa 세포를 배양한 후 배양액에 EGCG을 0, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800 및 1000㎍/㎖ 되게 첨가하여 배양한 후 MTT 환원량을 측정한 결과 HeLa 세포는 EGCG 농도 200, 400, 800 및 1000㎍/㎖ 일때 MTT 환원량은 대조군의 89, 21, 9 및 8 %로 감소되었고, SiHa 세포는 EGCG 농도 200, 400, 800 및 1000㎍/㎖ 일때 MTT 환원량은 대조군의 93, 71, 11 및 8 %로 감소되었다.**(Fig. 2).**

HeLa 세포와 SiHa 세포를 배양한 후 배양액에 polyphenon을 0, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800 및 1000㎍/㎖ 되게 첨가하여 배양한 후 MTT 환원량을 측정한 결과 HeLa 세포는 polyphenon 농도 200, 400, 800 및 1000㎍/㎖ 일때 MTT 환원량은 대조군의 85, 35, 12 및 9 %로 감소되었고, SiHa 세포는 polyphenon 농도 200, 400, 800 및 1000 ㎍/㎖ 일때 MTT 환원량은 대조군의 96, 84, 23 및 12 %로 감소되었다.**(Fig. 3).**

HeLa 세포에서 시스플라틴에 의한 세포활성에 미치는 EGCG의 영향

HeLa 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 2, 4, 6, 12, 25, 50, 75, 100 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대

조군에 비하여 98, 93, 86, 35, 21, 6, 7 및 8 % 로 나타나 시스플라틴 12 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

HeLa 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 0, 2, 4, 6, 12, 25, 50, 75, 100 ㎍/㎖ 되게, EGCG을 50 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량을 측정하였다.

EGCG를 첨가하고 2시간 배양 후 시스플라틴 투여하여 24시간 배양한 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 90, 81, 24, 15, 10, 7, 8 및 7 %로 나타나 시스플라틴 6㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

EGCG와 시스플라틴을 혼합하여 투여하고 24시간 배양한 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 98, 97, 98, 85, 61, 12, 9 및 8 %로 나타나 시스플라틴 25 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다.

시스플라틴 투여하고 2시간 배양한 후 EGCG를 첨가하여 24시간 배양한 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 94, 89, 45, 18, 8, 7, 7 및 8 %로 나타나 시스플라틴 6 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다. **(Fig. 4,5).**

SiHa 세포에서 시스플라틴에 의한 세포활성에 미치는 EGCG의 영향

SiHa 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 2, 4, 6, 12, 25, 50, 75, 100 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 99, 97, 95, 81, 25, 11, 8 및 7% 로 나타나 시스플라틴 25 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

SiHa 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 0, 2, 4, 6, 12, 25, 50, 75, 100 ㎍/㎖ 되게, EGCG을 50 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량을 측정하였다.

EGCG를 첨가하고 2시간 배양 후 시스플라틴 투여하여 24시간 배양한 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 90, 78, 24, 15, 10, 7, 8

및 7 %로 나타나 시스플라틴 6㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

EGCG와 시스플라틴을 혼합하여 투여하고 24시간 배양한 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 98, 97, 98, 85, 71, 14, 9 및 9%로 나타나 시스플라틴 50 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다.

시스플라틴 투여하고 2시간 배양한 후 EGCG를 첨가하여 24시간 배양한 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 94, 95, 71, 25, 12, 7, 7 및 8 %로 나타나 시스플라틴 6㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다. **(Fig. 6).**

HeLa 세포에서 시스플라틴에 의한 세포활성에 미치는 폴리페놀의 영향

HeLa 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 2, 4, 6, 12, 25, 50, 75 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 24 시간 배양한 후 MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 98, 93, 86, 35, 21, 6 및 7% 로 나타나 시스플라틴 12 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

HeLa 세포를 배양한 후 폴리페놀(EGCG, Catechin, Polyphenon)을 각각 50 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 2 시간 배양한 후 시스플라틴이 0, 2, 4, 6, 12, 25, 50, 75 ㎍/㎖ 되게 투여하여 24 시간 배양한 후 MTT 환원량을 측정하였다.

EGCG 50 ㎍/㎖를 첨가한 군에서 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 90, 47, 15, 10, 7, 7 및 8%로 나타나 시스플라틴 4 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다.

Catechin 50 ㎍/㎖를 첨가한 군에서 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 98, 91, 56, 15, 10, 7 및 9%로 나타나 시스플라틴 6 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다.

Polyphenon 50 ㎍/㎖를 첨가한 군에서 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 94, 51, 11, 9, 10, 7 및 7 %로 나타나 시스플라틴 4 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다.**(Fig. 7,8).**

SiHa 세포에서 시스플라틴에 의한 세포활성에 미치는 폴리페놀의 영향

SiHa 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 2, 4, 6, 12, 25, 50, 75 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 24 시간 배양한 후 MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 97, 95, 81, 25, 11 및 8 % 로 나타나 시스플라틴 12 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있었다.

SiHa 세포를 배양한 후 폴리페놀(EGCG, Catechin, Polyphenon)을 각각 50 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 2 시간 배양한 후 시스플라틴이 0, 2, 4, 6, 12, 25, 50, 75 ㎍/㎖ 되게 투여하여 24 시간 배양한 후 MTT 환원량을 측정하였다.

EGCG 50 ㎍/㎖를 첨가한 군에서 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 97, 95, 47, 15, 10, 7 및 8 %로 나타나 시스플라틴 6 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다.

Catechin 50 ㎍/㎖를 첨가한 군에서 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 98, 96, 95, 51, 10, 7 및 9 %로 나타나 시스플라틴 12 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다.

Polyphenon 50 ㎍/㎖를 첨가한 군에서 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 98, 94, 45, 9, 11, 7 및 7 %로 나타나 시스플라틴 6 ㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다.**(Fig. 9)**.

HeLa 및 SiHa 세포에서 p53 유전자 발현에 미치는 폴리페놀의 영향

세포를 배양한 후 배양액에 폴리페놀을 50 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 6 시간 배양한 후 세포의 p53 유전자와 GAPDH mRNA에 대한 RT-PCR을 시행하여 agarose gel에서 나타난 band의 density를 측정하여 p53/GAPDH 비율로 관찰한 결과 HeLa 와 SiHa 세포에서 EGCG와 polyphenon 첨가군에서 모두 대조군과 유의한 차이가 없었다.

세포를 배양한 후 배양액에 폴리페놀을 50 ㎍/㎖ 되게 첨가하여 6 시간 배양한 후 세포의 p53 단백질에 대한 western blot을 시행하여 나타난 band의 density를 측정하여 관찰한 결과 HeLa 와 SiHa 세포에서 EGCG와 polyphenon 첨가군에서 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다.(Fig 10)

IV. 고 찰

본 실험에서 녹차 폴리페놀 즉 EGCG와 polyphenon은 HeLa 와 SiHa 세포에 대한 시스플라틴의 독성을 증가 시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 폴리페놀류는 식물에서 항산화작용을 나타내는 물질로서 녹차나 양파, 포도 등에 많이 함유되어 있으며, flavanols, flavandiols, flavonoids 그리고 phnolic acids등이 이에 속하며, 카테킨은 flavanols에 해당된다.18) 녹차에는 카테킨, 카페인, 아미노산등 이 함유되어 있는데, 특히 폴리페놀류인 카테킨의 함량이 다른 식물에 비하여 매우 높다. 녹차에 많이 함유되어있는 카테킨은 (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 등 여러 가지 종류가 있다12,13). 카테킨은 항산화 작용 및 immunomodulatory 작용뿐 아니라 항균작용, 항비루스작용 이 있다는 보고가 있는데 그 중에서 항암작용이나 항균작용은 EGCG가 강하다고 알려져 있다.19-21).

본 실험에서 EGCG 와 polyphenon 의 암세포에 대한 독성을 비교측정하기 위하여 자궁경부암 세포주인 HeLa 와 SiHa 세포를 배양하여 배양액에 이들 폴리페놀을 첨가하여 세포활성을 MTT법으로 측정한 결과 EGCG와 polyphenon 모두 400㎍/㎖ 이상에서 세포활성이 감소되어, EGCG와 차 catechin 혼합물인 polyphenon의 세포독성작용이 비슷한 것으로 나타났다. 또한 항암제 시스플라틴은 12㎍/㎖ 이상의 농도에서 세포활성이 감소된 것과 비교하면 EGCG와 polyphenon 는 400㎍/㎖ 이상의 농도에서 세포활성이 감소되므로 세포독성이 강하지는 않은 것으로 생각된다.

항암제와 동시 투여한 경우 그 효과가 증대될 수 있다는 보고도 있는데, Ovarian sarcoma cell에서 doxorubicin과 녹차의 성분인 데아닌(theanine)과 EGCG를 동시 투여한 결과, 항암작용이 증가되었다고 한다.22) 데아닌의 항암효과 증강작용은 글루타민의 세포내 유입을 억제하여 항암제의 해독작용(conjugation)을 감소시켜 나타난 결과로, EGCG는 p-glycoprotein의 작용을 억제함과 동시에 conjugated doxorubicin의 세포외 배출을 억제하여 항암 효과가 증대 된다고 하였다.22,23).

본 실험에서 녹차 폴리페놀이 자궁경부암 항암화학 요법에 미치는 영향을 알기 위하여 HeLa 와 SiHa 세포를 배양한 후 시스플라틴과 EGCG, catechin 및 polyphenon을 동시에 배양액에 첨가한 후 세포활성을 측정하여 비교하였다.

폴리페놀의 투여 시간에 따른 영향을 알아보기 위하여 HeLa 세포를 배양한 후 EGCG를 시스플라틴을 투여하기 2시간 전 투여군, 동시 투여군, 2시간 후 투여군 및 EGCG를 첨가하지 않은 대조군으로 나누어 실험을 실시한 결과, 세포활성도가 대조군은 시스플라틴 12㎍/㎖ 군에서부터 세포활성이 급격히 감소되었고, 2시간 전 투여군은 시스플라틴 6㎍/㎖ 군부터, 동시투여군은 시스플라틴 25㎍/㎖ 군부터, 2시간 후 투여군은 시스플라틴 6㎍/㎖ 군부터 세포활성이 급격히 감소되었다. 이는 EGCG를 투여하지 않은 군의 세포활성도와 비교할 때 EGCG 2시간 전투여군과 2시간 후 투여군은 시스플라틴에 의한 세포독성이 증가되었고, 동시 투여군은 세포독성이 감소되는 것으로 나타났다. SiHa 세포를 배양한 후 EGCG를 시스플라틴을 투여하기 2시간 전 투여군, 동시투여군, 2시간 후 투여군 및 EGCG를 첨가하지 않은 대조군으로 나누어 실험을 실시한 결과 EGCG를 투여하지 않은 군의 세포활성도와 비교할 때 EGCG 2시간 전투여군과 2시간 후 투여군은 시스플라틴의 세포독성이 증가되었고, 동시 투여군은 세포독성이 감소되는 것으로 나타나서, HeLa와 SiHa 세포에서 유사한 결과가 나타났다. HeLa 나 SiHa 세포에 EGCG를 단독으로 투여하였을 경우 EGCG 농도 400㎍/㎖ 이상에서 세포활성도가 감소되었으나, 시스플라틴과 동시에 투여한 경우 EGCG 농도 50㎍/㎖ 에서도 시스플라틴에 의한 세포활성 감소 작용을 증가시키는 효과가 나타나서 이는 매우 흥미로운 현상으로 생각된다. 그러나 EGCG를 시스플라틴과 동시 혼합하여 첨가하면 세포활성은 오히려 증가되는 것으로 나타났는데, 이는 시스플라틴과 EGCG 상호간에 직접적인 약물반응이 나타난 결과로 생각된다.

녹차 폴리페놀 중 EGCG가 항암성이 가장 강한 것으로 보고 되고 있다10-15). 그러나 Babich 등24)은 정상세포(HGF-2) 와 암세포(HSC-2)를 배양한 실험에서 HSC-2는 ECG와 EGCG가 독성이 크고 EGC는 중간정도 이었으며 카테킨과 EC은 독성이 적었으나, HGF-2 세포는 ECG가 독성이 크고 EGCG는 중간정도 이었으며

EGC는 독성이 적은 것으로 나타난다고 보고하여, 세포의 종류에 따라서 폴리페놀의 종류에 대한 감수성이 서로 다를 수 있음을 추정할 수 있다.

본 실험에서 녹차 폴리페놀의 종류에 따라서 시스플라틴의 항암효과 상승작용에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 EGCG, 카테킨, polyphenon을 첨가하여 2시간 동안 배양한 후 시스플라틴을 투여하여 세포활성도를 측정한 결과 녹차폴리페놀을 투여하지 않은 대조군, EGCG 투여군, 카테킨 투여군, polyphenon 투여군의 세포활성도는 시스플라틴 4 ㎍/㎖ 투여시 93%, 47 %, 91% 및 51%를 각각 나타냈고, 6 ㎍/㎖ 투여 시에는 86%, 15%, 56% 및 11%를 각각 나타내서 EGCG와 polyphenon은 세포활성도 감소율이 비슷하였고, 카테킨은 세포활성도 감소가 더 적었다. 이러한 실험 결과로서 녹차 폴리페놀은 세포의 종류에는 차이가 없이 SiHa와 HeLa 세포 모두에서 시스플라틴에 대한 감수성을 증가시키는 작용이 있는 것으로 생각된다. 또한 EGCG와 polyphenon의 시스플라틴에 의한 세포활성 감소율이 비슷하게 나타나서 EGCG와 polyphenon은 시스플라틴 감수성 증가효율은 비슷할 것으로 추측되고, 카테킨의 감수성 증가 효율은 EGCG와 polyphenon 보다는 낮을 것으로 생각된다.

자궁경부암은 우리나라 여성에서 흔한 암으로, 확실한 발병기전은 밝혀지지 않으나, 고위험군 인유두종 비루스(HPV)감염과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.25-27) 지금까지 알려진 HPV의 발암 기전은 HPV DNA가 인간의 DNA에 끼어든 후 서로 합쳐져서 HPV의 E6와 E7 단백질이 숙주세포의 p53과 pRB와 같은 종양억제 단백질과 결합하여 이를 비활성화시킴으로서 암을 유발하는 것으로 알려져 있다.28,29)

p53 종양억제유전자는 17번 염색체의 단완에 존재하며, 375개의 아미노산으로 구성되어 있으며 반감기는 수분 정도로 매우 짧다.30) 정상적인 p53은 세포의 성장을 억제하는 능력이 있는데, 특히 세포주기의 G1이나 S 단계에서 가역적인 순환주기 억제를 유발한다.30) 이러한 세포주기의 순환 정지는 비가역적인 세포자사를 일으킬 수 있다.31) p53의 돌연변이는 인간의 여러 종양에서 나타나는데, 돌연변이에 의해 변형된 p53은 세포순환주기 억제력이 감소되거나 없어진다.32)

본 실험에서 녹차 폴리페놀이 p53 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 SiHa 세포와 HeLa 세포에 EGCG와 polyphenon을 50㎍/㎖을 첨가하여 6시간 배양한 후 p53에 대한 RT-PCR을 시행하여 전기영동하여 나타난 DNA band의 density를 측정한 결과 녹차 폴리페놀을 첨가하지 않은 대조군과 EGCG와 polyphenon을 50 ㎍/㎖을 첨가한 군 사이에 band의 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과로서 녹차 폴리페놀이 p53 유전자의 발현에 미치는 영향을 적은 것으로 생각되나 이에 대하여는 세부적인 실험이 더 필요할 것으로 생각된다. 그러나 p53 단백질에 대한 western blot 결과 EGCG와 polyphenon을 50 ㎍/㎖을 첨가한 군에서 첨가하지 않은 대조군에 비하여 4배정도 증가되어 녹차 폴리페놀에 의해서 p53 단백질량이 증가되는 것으로 추측된다. p53 단백질은 시스플라틴의 DNA 독성을 증가시키는 등의 시스플라틴의 항암작용과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있으므로[33,34], 본 실험에서 녹차 폴리페놀에 의해서 SiHa 와 HeLa 세포에서 p53 단백질량이 증가되는 것은 폴리페놀에 의한 시스플라틴의 세포독성 증가에 영향을 줄 수 있을 것으로 추측된다.

최근 항암 화학 요법은 암 치료의 반응성을 높이기 위하여 고용량 요법이 시도되고 있는데[2], 고용량요법은 항암제의 부작용 증가에 따르는 문제점이 있다. 따라서 항암 화학요법제의 항암작용을 증가시키거나, 부작용을 감소시켜 항암 치료를 효과적으로 할 수 있는 항암치료 보조제(modulator)에 대한 개발이 요구되고 있다. 녹차의 주요 성분인 EGCG와 polyphenon은 항암 화학 요법제의 주된 치료 약물로 이용되고 있는 시스플라틴과 병합 투여할 경우 시스플라틴의 단독투여 보다 암세포의 활성도를 크게 감소시키므로 암 치료에 있어서 시스플라틴과 폴리페놀을 병용 투여 하면 시스플라틴 사용량을 늘리지 않고도 높은 치료 효과를 기대 할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 녹차 폴리페놀이 항암치료 보조제로서 이용 될 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 효과를 증명하기위한 더 많은 연구과 임상실험이 필요 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

녹차 폴리페놀의 항암효과에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데, 자궁경부암 세포에 대한 연구 결과는 아직까지 많지 않고, 대부분의 연구가 EGCG에 집중되어 있다. 본 연구는 각기 다른 종류의 녹차 폴리페놀을 광범위 항암화학요법제 중 시스플라틴과 병합 투여할 경우, 이미 밝혀져 있는 시스플라틴이 가지는 항암작용에 폴리페놀이 어떤 부가적 영향을 주는지 관찰하기 위하여 자궁경부암 세포주를 배양하여 시스플라틴과 폴리페놀을 여러 방법으로 병합 투여 한 후 세포생존율을 측정하여 조사하여, 투여방법과 폴리페놀의 종류에 따른 세포활성도 감소 정도의 차이를 관찰하였다.

1. SiHa와 HeLa cells을 배양하여 catechin, EGCG 및 polyphenon을 시스플라틴과 동시에 처리하면 세포활성이 오히려 증가되었다.
2. SiHa와 HeLa cells을 배양하여 catechin, EGCG 및 polyphenon을 처리하고 2시간 후 시스플라틴을 처리하면 세포활성이 감소되었다.
3. SiHa와 HeLa cells을 배양하여 시스플라틴을 처리하고 2시간 후 Catechin, EGCG 및 polyphenon을 처리하면 세포활성이 감소되었다.
4. SiHa cells과 HeLa cells에 각각 catechin, EGCG 및 polyphenon을 처리하고 2시간 후 시스플라틴을 처리했을 때 EGCG 와 polyphenon 투여군의 세포활성 감소율은 서로 비슷하였고, catechin 투여군에서는 세포활성 감소율이 더 높게 나타났다.
5.SiHa cells에서 catechin, EGCG 및 polyphenon을 처리한 후 p53 mRNA를 RT-PCR한 결과 DAN band에는 서로 차이가 없었다.
6. SiHa cells 에서 catechin, EGCG 및 polyphenon을 처리 후 p53 단백질을 western blot 한 결과 EGCG 및 polyphenon 투여군에서 p53 단백질 band가 증가되었다.

이상의 결과로 볼 때 항암화학제인 시스플라틴을 이용하여 자궁경부암의 항암치료를 시행할 때 tea polyphenol을 병합 투여할 경우, 시스플라틴 단독 요법에 비해 보다 소량의 항암요법제 만으로도 효과적으로 암세포 자사(Apoptosis)를 유도할 수 있을 것으로 사료되며, 이로 인해 항암화학요법제의 여러 가지 부작용의 발현 역시 감소될 것으로 기대된다. 특히 이러한 효과는 자궁경부암 세포주에 시스플라틴을 처리하기 2시간 전, 후에 tea polyphenol을 투여한 경우 더 좋게 나타났다. 이러한 효과는 분자생물학적으로 p53유전자의 발현이나 단백질 양의 증가 등이 관여될 것으로 추정되나 보다 많은 연구를 통해 그 정확한 기전을 밝히려는 노력이 필요할 것으로 생각된다.

VI. 참 고 문 헌

1. Greven K, Petereit D, Vermorken JB, Lanciano R. Current developments in the treatment of newly diagnosed cervical cancer. Hematol Oncol Clin North Am 13: 275-303. 1999
2. Sardi JE. Neoadjuvant chemotherapy in gynecologic oncology. Surg Clin Noth Am 81: 965-85. 2001
3. Wiltshaw E, Kroner. Phase two study of cis-dichlorodimmine-platinum (Ⅱ) in advanced adenocarcinoma of the ovary. Cancer Treat Rep 60: 55-60. 1976
4. Crown JP. The platinum agents: a role in breast cancer treatment? Senmin Oncol 28: 28-37. 2001
5. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. Cell Mol Life Sci 57: 1229-35. 2000
6. Del Mastro L, Gennari A, Donati S. Chemotherapy of non-small-cell lung caner: role of erythropoietin in the management of anemia. Ann Oncol 10:91-4. 1999
7. Cersosimo RJ. Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy. Ann Pharmacother 27: 438-41. 1993
8. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. Mutat Res 478: 23-43. 2001
9. Kanadaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT. : The antitumor activities of flavonoids. In Vivo. 19:895-909. 2005
10. Kazi A, Smith DM, Daniel K, Zhong S, Gupta P, Bosley ME, et al. Potential molecular targets of tea polyphenols in human tumor cells: significance in cancer prevention. In Vivo 16: 397-403. 2002
11. Lin JK. Cancer Chemoprevention by tea polyphenols through modulating

signal transduction pathways. Arch Pharm Res 25: 561-71. 2002

12. Graham HN. Green tea composition. consumption, and polyphenol chemistry. Prevent Med 21: 334-50. 1992
13. Ho CT, Chen Q, Shi H, Zhang KQ, Rosen RT. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. Prev Med 21: 520-525. 1992
14. Gupta S, Hussain T, Mukhtar H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cells cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. Arch Biochem Biophys. 410: 177-85. 2003
15. Jun YD, Ellis LM. Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin galltae (EGCG), a major component of green tea. Int J Exp Pathol. 82: 309-16. 2001
16. Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agrawal ML, Mukhtar H, Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCap cells. Oncogene 22: 4851-9. 2003
17. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. :An improved MTT assay. J Immunol Methods. 157:203-7. 1993
18. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. :Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit Rev Food Sci Nutr. 45:287-306. 2005
19. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochem Biophys Acta 1147: 132-136. 1993
20. Katiyar SK, Challa A, McCormick TS, Cooper KD, Mukhtar H. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polygenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. Carcinogenesis 20: 2117-2124. 1999
21. Sakagami H, Takeda M, Sugaya K, Omata T, Takagashi H, Yamamura M

et al Stimulation by epigallocatechin gallate of interleukin-1 production by human peripheral blood mono-nuclear cells. Anticancer Res 15: 971-974. 1995

22. Sadzuka Y, Sugiyama T, Suzuki T, Sonobe T. Engancement of the activity of doxorubicin by inhibition of glutamate transporter. Toxicol Lett. 23: 159-67. 2001

23. Qian F, Wei D, Zhang Q, Yang S. Modulation of P-glycoprotein function and reversal of multidrug resistance by (-)-epigallocatechin gallate in human cancer cells. Biomed Pharmacother. 59:64-9. 2005

24. Babich H, Krupka ME, Nissim HA, Zuckerbraun HL. Differential in vitro cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. Toxicol In Vitro. 19:231-42. 2005

25. 보건복지부. 한국인 암등록 조사자료 보고서. 2005년 발표(2002.1-2002.12)

26. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. J Clin Virol, 19:1-5, 2000

27.Matsukura T, Sugase M. Relationships between 80 human papillomavirus genotypes and different grades of cervical intraepithelial neoplasia: association and causality. Virology, 283:139-47, 2001

28. Havre PA, Yuan J, Hedrick L, Cho KR, Glazer PM. p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. Cancer Res, 55:4420-4, 1995

29. Wells SI, Francis DA, Karpova AY, Dowhanick JJ, Benson JD, Howley PM. Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways. EMBO J 19:5762-71, 2000

30. Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Keller G, *et al.* p53 Mutations in nasal natural killer/T-cell lymphoma from Mexico: association with large cell morphology and advanced disease. Am J Pathol. 159:2095-105. 2001

30. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53.

oncogene. 20:1803-15. 2001.

31. Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, Kidd VJ, Mak TW, Ingram AJ. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. J Biol Chem. 277:12710-7. 2002.
32. Hussain SP, Harris CC. p53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. Mutat Res. 428:23-32. 1999.
33. Weinberg RL, Freund SM, Veprintsev DB, Bycroft M, Fersht AR. Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. J Mol Biol. 342:801-11. 2004
34. Wetzel CC, Berberich SJ. p53 binds to cisplatin-damaged DNA. Biochim Biophys Acta. 1517:392-7. 2001

Table 1. The Nucleotide sequences of primer for PCR

Primer		Sequence	Product size
GA3PDH	For	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG	584
	Rev	CGT CCA AGA GGA TAC TGA TC	
P53	For	TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT	310
	Rev	AGC AAT CAG TGA GGA ATC AG	

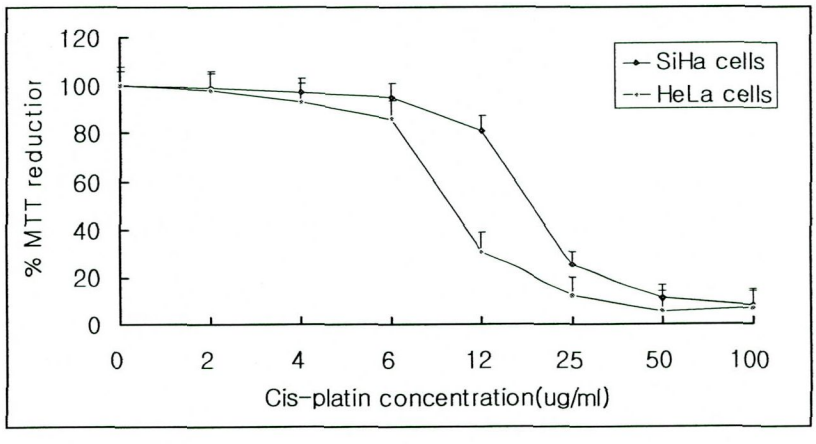

Fig.1.Effects of cisplatin on MTT reduction of SiHa cells and HeLa cells.

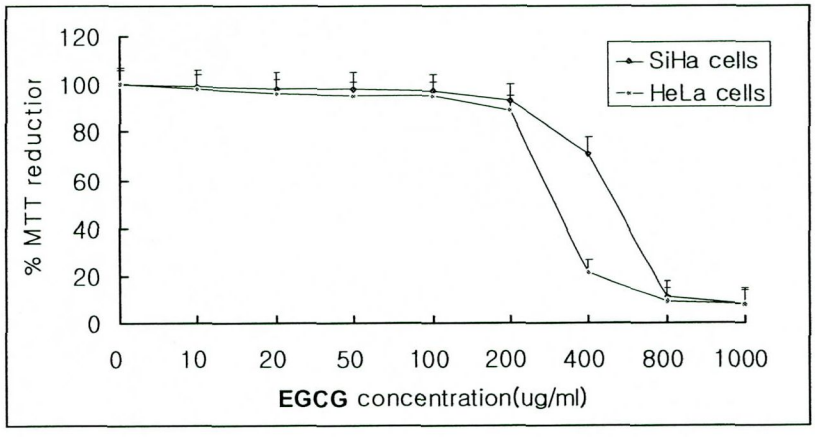

Fig.2.Effects of EGCG on MTT reduction of SiHa cells and HeLa cells.

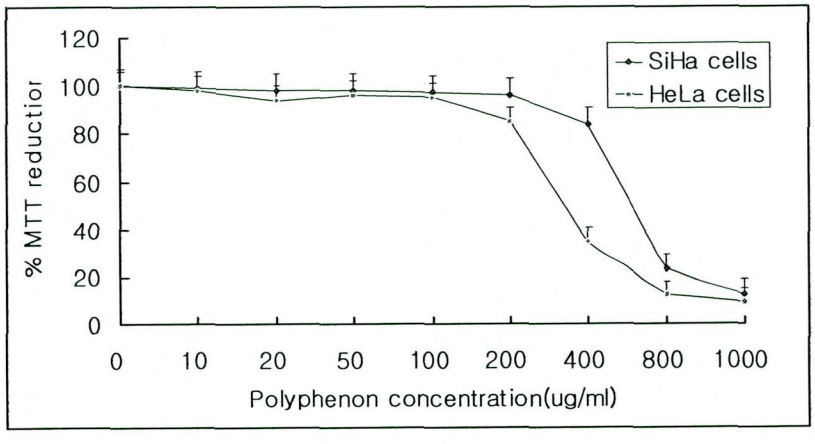

Fig.3.Effects of polyphenon on MTT reduction of SiHa cells and HeLa cells.

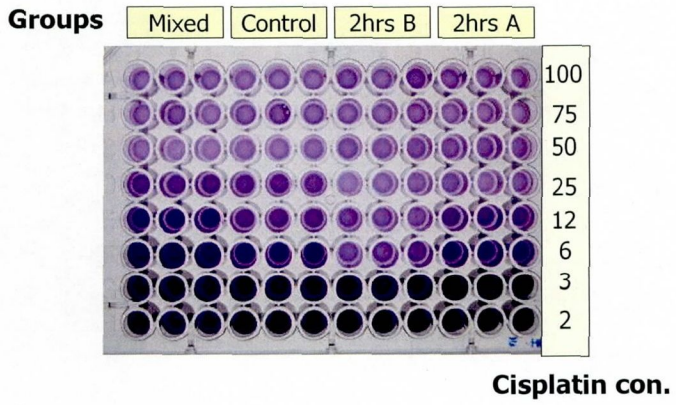

Fig.4. Effects of EGCG(50ug/ml) on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cells. Mixed: Added EGCG mixed with cisplatin, Control: no EGCG, 2hrs B: EGCG added at 2hrs before cisplatin treatment, 2hrs A: EGCG added at 2hrs after cisplatin treatment.

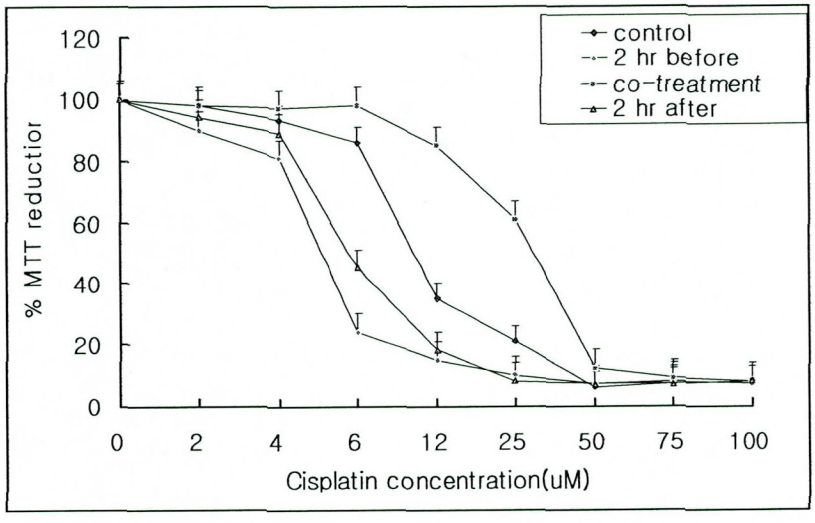

Fig.5. Effects of EGCG(50ug/ml) on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cells.

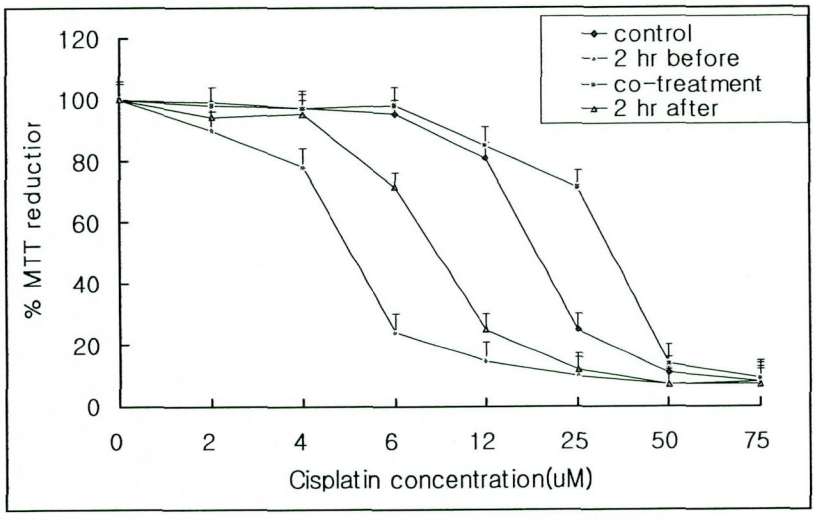

Fig.6. Effects of EGCG (50ug/ml) on cisplatin-induced cytotoxicity of SiHa cells.

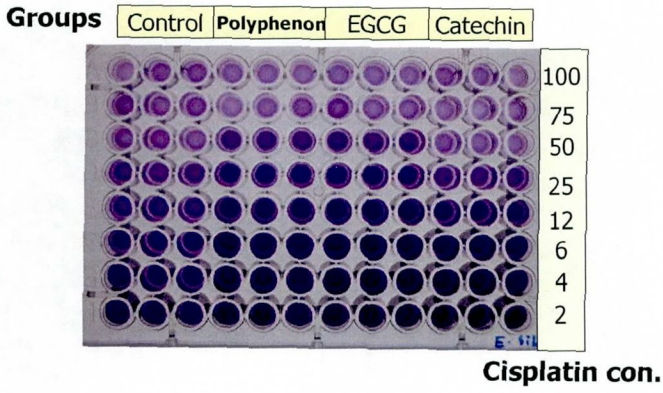

Fig.7. Effects of tea polyphenols(catechin, EGCG and polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cells. TP(final concentration: 50ug/ml) mixed with cisplatin and added to culture media, and 24 hrs after, the cell viability assayed by MTT method.

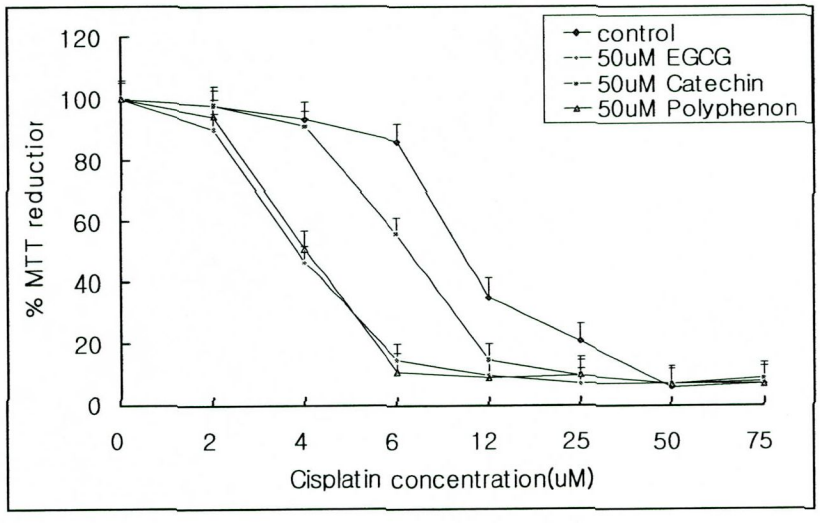

Fig.8. Effects of tea polyphenol(catechin, EGCG and polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cells. Catechin, EGCG and polyphenon were added to culture media at 2 hrs before cisplatin treatment

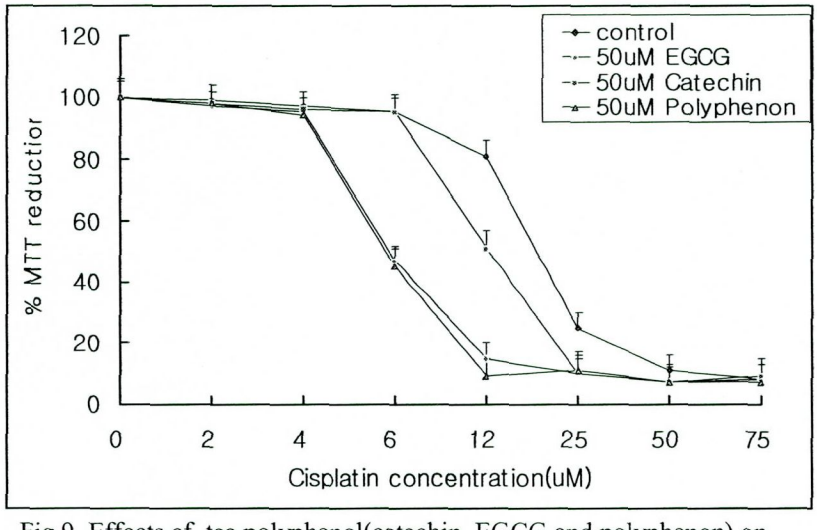

Fig.9. Effects of tea polyphenol(catechin, EGCG and polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of SiHa cells. Catechin, EGCG and polyphenon were added to culture media at 2 hrs before cisplatin treatment

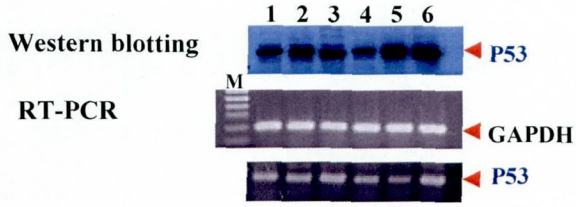

Fig.10. Effects of tea polyphenols on p53 gene expression in HeLa and SiHa cells. The cells were incubated with TP for 6 hrs in culture medium. P53 protein concentrations and p53 mRNA levels in cells were determined by western blot and RT-PCR methods respectively.

1, 2, 3 : HeLa cells, 4, 5, 6: SiHa cells , M; molecular weight control.1,4 : control, 2,5: EGCG 50ug/ml, 3,6: Polyphenon 50ug/ml