



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2007年 6月
博士學位論文

The Effect of Green Tea Polyphenol on
Cisplatin-induced Cytotoxicity in Human
Uterine Cervix Cancer Cell Lines

朝鮮大學校 大學院

醫學科

金 東 春

사람 자궁경부암 세포주에서
Cisplatin의 세포독성에 미치는
녹차 폴리페놀의 영향

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

2007 年 6 月 日

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

金 東 春

사람 자궁경부암 세포주에서
Cisplatin의 세포독성에 미치는
녹차 폴리페놀의 영향

指導教授 李 炳 來

이 論文을 博士學位申請 論文으로 제출함

2007 년 6 월 일

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

金 東 春

金東春의 博士學位 論文을 認准함

委 員 長	朝鮮大學校 教授	<u>차 종 희</u>
委 員	朝鮮大學校 教授	<u>박 영 진</u>
委 員	朝鮮大學校 教授	<u>한 세 준</u>
委 員	朝鮮大學校 教授	<u>박 재 윤</u>
委 員	朝鮮大學校 教授	<u>이 병 래</u>

2007 년 6 월

朝鮮大學校 大學院

Contents

I. 緒論	1
II. 方法	3
1. 세포의 배양	3
2. 자궁 경부암세포에서 시스플라틴과 폴리페놀이 세포활성에 미치는 영향 측정	3
3. Western blot	4
4. 실험결과의 분석	5
III. 結果	6
1. 시스플라틴이 HeLa 세포의 활성화에 미치는 영향	6
2. 폴리페놀이 HeLa 세포의 활성화에 미치는 영향	6
3. HeLa 세포에서 시스플라틴에 의한 세포활성에 미치는 EGCG와 polyphenon® 의 영향	6
4. HeLa 세포에서 p53 유전자 발현에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향	7
5. HeLa 세포에서 Casapase-3 유전자 발현에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향	7
6. HeLa 세포에서 Noxa 유전자 발현에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향	8
7. HeLa 세포에서 Casapase-8 유전자 발현에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향	8
IV. 考察	10
IV. 結論	15
V. 參考文獻	17

List of Figures

Fig. 1. Effects of cisplatin on MTT reduction of HeLa cells	22
Fig. 2. Effects of polyphenol on MTT reduction of HeLa cells	23
Fig. 3. Effects of tea polyphenol(EGCG and polyphenon [®]) on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cellsSiHa cells and HeLa cells.	24
Fig. 4. Effects of polyphenon [®] and EGCG on p53 expression in HeLa cells	25
Fig. 5. Effects of polyphenon [®] and EGCG on caspase-3 expression in HeLa cells	26
Fig. 6. Effects of polyphenon [®] and EGCG on Noxa expression in HeLa cells	27
Fig. 7. Effects of polyphenon [®] and EGCG on caspase-8 expression in HeLa cells	28

ABSTRACT

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

Dong Chun Jin

Advisor : Prof. **Ryoung-Rai Lee**, Ph.D.

Dept of Biochemistry and Medicine

College of Medicine, Chosun University

Objective: Green Tea polyphenol(GTP) has been shown to have anti-tumor properties in a wide variety of experimental systems. In this study, we evaluated GTP as a biochemical modulator on the cytotoxic effects of cisplatin in treatment of cancer.

Methods: HeLa (Korean Cell Culture Bank) human uterine cervical cancer cell line was used. HeLa Cell was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics: 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Two types of GTP, epigallocatechin gallate(EGCG) and polyphenon[®] were used for these experiment. Cells were seeded at 1.0×10^4

cells/well in RPMI1640 media in triplicate wells on a Nunc Labware 96 well flat bottom microculture plate, with or without GTP(50µg/mL) and at different concentrations of cisplatin (0–100µg/mL). After incubating the plates at 37°C in 5% CO₂ for 1 days, cell viability was determined using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue] assay. Western blot method were employed to detect the influence of EGCG and polyphenon[®] on the expressions of p53, capsae-3, caspase-8, and Noxa genes in HeLa cell lines.

Results: The viability of the HeLa cells was decreased to 31% at a 12 ug/ml concentration of cisplatin, and to 12 % above 25 ug/ml as measured by the MTT assay. However, in the co-treatment with EGCG(50µg/mL), the cell viability decreased to 47% at 4 ug/ml of cisplatin and to 15 % at 6 µg/mL of cisplatin in HeLa cells.

There are no apparent changes in cisplatin-induced cytotoxicity between EGCG and polyphenon[®] administration. The levels of p53, caspase-3, Noxa and caspase-8 in HeLa cells were increased by EGCG or polyphenon[®] treatment.

Conclusion: These experiments showed that GTP has a potentiating effect on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cells. The synergistic activity of GTP might be due to the

increased caspase-3 by means of its influence on anti-neoplastic activity of cisplatin.

Key words: Cisplatin, Green Tea polyphenol, HeLa cell, caspase-3

I. 서 론

항암화학요법은 수술요법 및 방사선 치료법과 함께 3대 암치료법 중 하나로 이용되고 있는데, 최근에는 항암 화학 요법에 대한 관심이 증대되고 있다.^{1,2)} 부인암치료에서 항암 화학요법은 1976년 Wiltshaw 등이³⁾ 시스플라틴 (cisplatin :cis-diammine dichloroplatinum)을 난소암환자의 치료에 이용한 이후로 본격적으로 시작되었다고 할 수 있다. 시스플라틴은 백금계 화학물질로서 항암작용 기전은 DNA 사슬사이에서 교차반응(interstrand cross linking)을 일으킴으로서, DNA 합성이나 RNA합성을 억제함으로써 세포자멸사 (apoptosis)를 유도한다고 알려져 있다.^{4,5)} 현재 platinum 계 화학 요법제는 자궁경부암, 대장암, 폐암등 여러가지 고형암에 대한 주된 항암 화학요법제로 이용되고 있다.⁴⁻⁶⁾

백금계 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 있다.⁵⁻⁶⁾ 또한 시스플라틴 단독요법으로 항암효과가 충분치 않은 경우 항암효과를 상승시키기 위하여 여러 가지 항암제를 병행하여 투여하는 병합요법이나 방사선요법과 병행하는 치료법이 최근에 시도되고 있다.^{2,3)} 그러나 시스플라틴의 독성은 감소시키고 항암작용은 증가시킬 수 있는 방법의 개발은 아직까지 충분히 이루어져 있지 않다. 항암 화학요법제의 정상장기에 대한 독성작용을 최소화 하면서 암세포에 대한 독성을 증가시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하며, 이중에서도 항암제의 항암력을 증가시키거나, 암세포의 내성을 변화시킬 수 있는 항암화학요법 보조제의 개발에 대한 연구가 매우 절실히 요구되고 있다. 따라서 식물, 버섯,

균류 및 해조류등 천연물에 함유되어 있는 부작용이 적은 항암물질의 개발에 대한 관심이 증가되고 있다.⁹⁾ 천연물에 함유된 물질 중에서 항산화작용을 가진 물질이 암치료에 보조제로 이용될 수 있는 것으로 알려지고 있는데, 녹차에는 항산화 작용이 있는 폴리페놀 성분이 대량으로 함유되어있다. 녹차의 polyphenol 성분인 카테킨은 암의 발생과 치료에 효과가 있다는 많은 연구 논문이 발표되고 있다.^{10,11)} 녹차잎에 함유된 카테킨은 여러 가지 종류가 있는데, 그중 epicatechin(EG), epicatechin-3-gallate(ECG), epigallocatechin (EGC) 및 epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등 4가지 종류가 특히 많고, 이중에서도 EGCG가 녹차잎에 함유된 폴리페놀 중 가장 함량이 높다.¹⁰⁻¹³⁾ 녹차 카테킨은 발암물질을 소거하거나 암의 발생기전을 차단하여 암의 발생을 예방하는 작용 있고, 암세포 괴사를 유도하거나 암 침투와 혈관증식을 억제하여 암의 성장이나 진행을 억제시킬 수 있다고 한다.¹⁴⁻¹⁶⁾

녹차의 항암효과에 대한 연구는 대부분이 항암작용기전에 대한 연구가 이루어지고 있는데, 항암제의 병합투여 효과에 대한 연구도 진행되고 있으나, 자궁경부암 세포에 대한 연구 결과는 아직까지 많지 않고, 대부분의 연구가 EGCG에 집중되어 있다.¹¹⁻¹⁶⁾

본 연구는 광범위 항암 화학요법제인 시스플라틴의 항암작용에 증강에 미치는 녹차 폴리페놀의 종류에 따른 영향을 관찰하기 위하여 자궁경부암 세포주를 배양하여 시스플라틴과 폴리페놀을 병합 투여 한 후 세포생존율을 측정하여 조사하였고, 세포자멸사에 관여하는 것으로 알려진 p53, caspase-3, caspase-8 및 Noxa 단백질의 양을 western blot법에 의해서 측정하여 폴리페놀의 종류에 의한 차이와 작용 기전을 규명하고자 하였다.

II. 방 법

1. 세포의 배양

본 실험에서 사용한 세포는 편평상피세포암(squamous cell cancer)인 자궁경부암세포주(HeLa cell)로, 한국 세포주 은행에서 분양받아 실험에 사용하였다. 10% 혈청, 스트렙토마이신(100U/mL) 및 페니실린(100U/mL)을 함유한 RPMI 1640 배지(Gibco BRL)를 사용하였으며, 37°C로 유지되는 CO₂ 배양기에서 상기 세포를 배양하였다.

2. 자궁경부암세포에서 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, Sigma Chemical Co, USA)를 첨가한 군으로 나누어 실시하였다. 즉 세포배양 용기(96 well plate)의 각 well에 HeLa 세포 2.0 × 10⁵ 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 well에 순서대로 첨가하여, CO₂ 배양기에서 24시간 동안 더 배양한 후, 세포활성(Cell viability)를 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 4 시간동안 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 μ l를 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. Western blot

배양세포는 배지를 제거 한 후 Dulbecco's PBS로 1회 세척하고 100 μ l SDS-loading buffer(50mM Tris-HCl;pH6.8, 2% SDS, 0.1% Bromphenol blue, 10% glycerol)를 첨가하여 95 $^{\circ}$ C에서 5 분 동안 방치한 후 전기영동을 시행하였다. 전기영동은 10% polyacrylamide gel을 이용하여 Tris 완충액(pH 8.8, 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 분리하여 5% nonfat milk를 함유한 TBS(0.1% Tween20 in pH7.4 Tris-based saline buffer)에 1시간 동안 blocking하고 TBS로 2회 washing한다. 일차 항체로서 Antirabbit polyclonal Anti-p53 Ab, anti-caspase-3 Ab, anti-caspase-8 AB, anti-Noxa Ab(Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)를 사용하였다.

각각의 일차 항체는 2% non fat milk/TBS에서 4 $^{\circ}$ C에서 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.

4. 실험결과의 분석

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

Ⅲ. 결 과

1. 시스플라틴이 HeLa 세포의 활성에 미치는 영향

HeLa 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 0, 2, 4, 6, 12, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되게 첨가하여 배양한 후 MTT 환원량을 측정한 결과 시스플라틴의 농도가 12, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일때 MTT 환원량은 대조군의 34, 11, 5 및 5 %로 감소되었다.(Fig. 1)

2. 폴리페놀이 HeLa 세포의 활성에 미치는 영향

HeLa 세포를 배양한 후 배양액에 EGCG나 polyphenon[®] 을 0, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800 및 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되게 첨가하여 배양한 후 MTT 환원량을 측정한 결과 EGCG 농도 200, 400, 800 및 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일때 MTT 환원량은 대조군의 86, 31, 11 및 8 %로 감소되었고, polyphenon[®] 농도 200, 400, 800 및 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일때 MTT 환원량은 대조군의 90, 23, 8 및 7 %로 감소되어 HeLa 세포에 대한 EGCG나 polyphenon[®] 의 독성 차이가 없는 것으로 나타났다.(Fig. 2)

3. HeLa 세포에서 시스플라틴에 의한 세포활성에 미치는 EGCG와 polyphenon[®] 의 영향

HeLa 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 2, 4, 6, 12, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 98, 95, 89, 34, 15, 6 및 7% 로 나타나 시스플

라틴 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가군부터 세포독성이 급격히 감소됨을 알 수 있다.

HeLa 세포를 배양한 후 배양액에 EGCG나 polyphenon[®] 을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되게 첨가하고 2시간 배양 후, 시스플라틴을 0, 2, 4, 6, 12, 25, 50, 75 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량을 측정하였다.

EGCG를 첨가하여 배양한 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 90, 45, 16, 12, 9, 7 및 8 %로 나타나 시스플라틴 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군에서부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있다.

polyphenon[®] 을 첨가하여 배양한 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 94, 55, 12, 8, 10, 7 및 7 %로 나타나 시스플라틴 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군에서부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있다.(Fig.3)

4. HeLa 세포에서 p53 유전자 발현에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향

HeLa 세포를 1일간 배양한 후 배양액에 EGCG와 polyphenon[®] 을 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되게 첨가하여 6시간 더 배양한 후 세포의 p53과 actin을 western blot을 시행하여 나타난 밴드의 밀도를 각각 측정하여 p53/actin 의 비율을 관찰한 결과 EGCG 0, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군에서 0.85, 1.31, 1.29 및 1.30 를 나타냈고, polyphenon[®] 0, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 군에서는 0.85, 1.29, 1.31 및 0.95 를 나타내서 EGCG와 polyphenon[®] 첨가군에서 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다.(Fig 4)

5. HeLa 세포에서 Casapase 3 유전자 발현에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향

HeLa 세포를 1일간 배양한 후 배양액에 EGCG와 polyphenon[®] 을 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되게 첨가하여 6시간 더 배양한 후 세포의 Caspase-3과 actin을 western blot을 시행하여 나타난 밴드의 밀도를 각각 측정하여 Caspase-3/actin

의 비율을 관찰한 결과 EGCG 0, 25, 50 및 100 μ g/mL군에서 0.83, 0.91, 1.11 및 1.12 를 나타냈고, polyphenon[®] 0, 25, 50 및 100 μ g/mL 군에서는 0.83, 1.11, 1.23 및 1.31 을 나타내서 EGCG와 polyphenon[®] 첨가군에서 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다.(Fig 5)

6. HeLa 세포에서 Noxa 유전자 발현에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향

HeLa 세포를 1일간 배양한 후 배양액에 EGCG와 polyphenon[®] 을 25, 50 및 100 μ g/mL 되게 첨가하여 6시간 더 배양한 후 세포의 Noxa 과 actin을 western blot을 시행하여 나타난 밴드의 밀도를 각각 측정하여 Noxa/actin 의 비율을 관찰한 결과 EGCG 0, 25, 50 및 100 μ g/mL 군에서 0.58, 0.62, 1.11 및 1.12 를 나타냈고, polyphenon[®] 0, 25, 50 및 100 μ g/mL 군에서는 0.58, 1.01, 0.98 및 2.35 를 나타내서 EGCG와 polyphenon[®] 첨가군에서 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다.(Fig 6)

7. HeLa 세포에서 Casapase 8 유전자 발현에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향

HeLa 세포를 1일간 배양한 후 배양액에 EGCG와 polyphenon[®] 을 25, 50 및 100 μ g/mL 되게 첨가하여 6시간 더 배양한 후 세포의 Caspase-8 과 actin을 western blot을 시행하여 나타난 밴드의 밀도를 각각 측정하여 Caspase-8/actin 의 비율을 관찰한 결과 EGCG 0, 25, 50 및 100 μ g/mL 군에서 0.66, 1.24, 1.20 및 1.21 를 나타냈고, polyphenon[®] 0, 25, 50 및 100 μ g/mL 군에서는 0.66, 0.96, 1.25 및 1.31 을 나타내서 EGCG와 polyphenon[®] 첨가군에서 모두 대조군

에 비하여 유의한 증가를 나타냈다.(Fig 7)

IV. 고 찰

본 실험결과 사람의 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에서 녹차 폴리페놀 EGCG와 polyphenon[®] 은 시스플라틴의 독성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 폴리페놀류는 식물에서 항산화작용을 나타내는 물질로서 녹차나 양파, 포도등에 많이 함유되어 있으며, flavanols, flavandiols, flavonoids 그리고 phenolic acids등이 이에 속한다.¹⁸⁾ 녹차에는 카테킨, 카페인, 아미노산등 이 함유되어 있는데, 특히 폴리페놀류인 카테킨의 함량이 매우 높다. 녹차에 함유되어 있는 카테킨은 flavanols 류에 해당되며, EC, (ECG), EGC, EGCG 등 여러 가지 종류가 있는데,^{12,13)} 본 실험에 사용한 polyphenon[®] 은 EGCG, ECG, EGC 및 EC 등이 혼합되어 있는 카테킨 복합물이다. 녹차 카테킨은 항산화 작용 및 immune modulator 작용뿐 아니라 항균작용, 항비루스작용 등 여러 가지 생리활성이 있는 것으로 보고되고 있는데, 항암작용이나 항균작용은 EGCG가 가장 강한 것으로 알려져 있다.¹⁹⁻²¹⁾ 본 실험에서는 EGCG와 녹차 카테킨 복합물인 polyphenon[®] 의 암세포에 대한 독성작용을 비교 측정하기 위하여 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포를 배양액에 EGCG와 polyphenon[®] 을 각각 첨가하여 배양한 후 생존한 세포를 MTT법으로 측정한 결과 EGCG와 polyphenon[®] 모두 400 µg/mL 이상의 농도에서 세포활성이 감소되어, EGCG와 polyphenon[®] 의 세포독성을 나타내는 농도가 유사한 것으로 생각된다. 카테킨 혼합물인 polyphenon[®] 의 세포 독성을 나타내는 농도와 카테킨 종류 중에서 가장 항암 작용이 큰 것으로 알려져 있는 EGCG가 HeLa 세포에 대한 독성작용을 나타내는 농도가 비슷한 것으로 나타나서, polyphenon[®] 과 EGCG는 HeLa 세포에 대한 직접적인 세포독성 작용을 나타내는 농도는 차이가 없는 것으로 생각된다. 또한 항암제 시스플라틴이 12 µg/mL 이상의 농도에서 세포활성이 감소된 것과 비교하면 EGCG와 polyphenon[®] 은 400 µg/mL 이상의 농도에서 세포활성의 감소를 나타내므로 EGCG와 polyphenon[®] 의 직

접적인 세포독성작용은 크지 않은 것으로 생각된다.

항암제와 카테킨을 병행투여한 경우 그 효과가 증대될 수 있다는 실험보고가 있는데, Ovarian sarcoma cell에서 doxorubicin과 EGCG를 동시 투여하면 EGCG가 p-glycoprotein의 작용을 억제하여 doxorubicin의 세포외 배출을 억제함으로써 항암 효과가 증대 된다고 하였다.²²⁾

녹차 카테킨 중 일반적으로 EGCG가 항암성이 가장 강한 것으로 보고되고 있으나,¹⁰⁻¹⁵⁾ Babich 등²⁴⁾은 정상세포(HGF-2) 와 암세포(HSC-2)를 배양한 실험에서 HSC-2에 대한 세포독성의 크기는 ECG,EGCG > EGC > EC, C 였으나, HGF-2 세포에 대한 세포독성은 ECG > EGCG > EGC 순서로 나타난다고 하여 세포의 종류에 따라서 폴리페놀의 종류에 대한 감수성이 다르다고 하였다.

본 실험에서 녹차 카테킨이 자궁경부암 항암화학 요법에 미치는 영향을 알기 위하여 HeLa 세포를 배양한 후 시스플라틴과 EGCG 나 polyphenon[®] 을 병행하여 배양액에 첨가한 후 세포활성을 측정하여 비교하였다. EGCG와 polyphenon[®] 50 µg/mL 을 첨가하여 2시간 동안 배양한 후 시스플라틴을 투여하여 세포활성도를 측정한 결과 녹차폴리페놀을 투여하지 않은 대조군, EGCG 및 polyphenon[®] 투여군의 세포활성도는 시스플라틴 4 µg/mL 투여시 93 %, 47 % 및 51 %를 각각 나타냈고, 6 µg/mL 투여시에는 86 %, 15 % 및 11%를 각각 나타내서 EGCG와 polyphenon[®] 의 첨가로 세포활성이 현저히 감소되었으며, 세포활성도 감소율은 EGCG와 polyphenon[®] 이 서로 비슷한 것으로 나타났다.

이러한 실험 결과로서 EGCG와 polyphenon[®] 은 시스플라틴과 복합 투여시 HeLa 세포의 활성이 현저히 감소되기 때문에 EGCG와 polyphenon[®] 는 시스플라틴의 항암 작용을 증가 시키는 효과가 있는 것으로 추측된다.

또한 EGCG와 polyphenon[®] 의 시스플라틴에 의한 세포활성 감소율이 비슷하게 나타나서 EGCG와 polyphenon[®] 은 시스플라틴 감수성 증가효율은 비슷할

것으로 생각된다.

자궁경부암의 확실한 발병기전은 밝혀지지 않으나, 고위험군 인유두종 비루스(HPV)감염과 자궁경부암 발병은 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.²⁶⁻²⁷⁾ 지금까지 알려진 인유두종 비루스의 발암 기전은 비루스 DNA가 인간의 DNA에 끼워들어 합쳐져서 인유두종 비루스의 E6와 E7 단백질이 숙주세포의 p53과 pRB와 같은 종양억제 단백질과 결합하여 이를 비활성화시킴으로써 암을 유발하는 것으로 알려져 있다.^{28,29)} p53 단백질은 유전자가 17번 염색체에 있고 반감기가 수분정도로 매우 짧으며 세포성장을 억제하는 작용이 있다.³⁰⁾ 사람의 종양세포에서 p53의 돌연변이가 있는 경우가 많은데, 변형된 p53은 세포 순환주기 억제력이 감소된다.³²⁾

본 실험에서 녹차 폴리페놀이 p53 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 HeLa 세포에 EGCG와 polyphenon[®] 을 첨가하여 배양한 후 p53 단백질에 대한 western blot을 시행한 결과 EGCG와 polyphenon[®] 첨가한 군에서 첨가하지 않은 대조군에 비하여 결과 EGCG 25, 50 및 100 μ g/mL 투여군에서 54, 51 및 52%가 각각 증가 되었고, polyphenon[®] 25 와 50 μ g/mL 투여군에서는 51% 와 54% 증가되었으나, 100 μ g/mL 투여군에서는 거의 변화가 없어서 HeLa 세포에서 EGCG와 polyphenon[®] 투여로 p53이 증가됨을 알 수 있으며, 25와 50 μ g/mL 사이의 차이는 없는 것으로 나타났고, EGCG와 polyphenon[®] 의 p53 증가에 대한 차이도 없는 것으로 나타났다. p53 단백질은 시스플라틴의 DNA 독성을 증가시키는 등의 시스플라틴의 항암작용과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있으므로^{33,34)}, 본 실험에서 EGCG와 polyphenon[®] 의해서 HeLa 세포에서 p53 단백질량이 증가되는 것은 EGCG와 polyphenon[®] 에 의한 시스플라틴의 세포독성 증가에 요인이 될 수 있을 것으로 추측된다.

p53 단백질은 세포의 자사(apoptosis)에 관여 하는 것으로 알려져 있어, 본 실험에서 세포의 자사에 관여하는 것으로 알려진 단백질인 caspase-3, caspase-8 및 NOXA 단백질³⁵⁻³⁷⁾을 western blot에 의해서 측정하여 관찰하였

다.

Caspase-3는 세포자사에 직접 관여하는 단백질로서 HeLa 세포에 EGCG와 polyphenon[®] 을 25, 50 및 100 μ g/mL 되게 첨가하여 배양한 결과 EGCG 투여군에서 10, 33 및 35% 가 각각 증가 되었고, polyphenon[®] 투여군에서는 33, 48, 57% 가 각각 증가되어 EGCG와 polyphenon[®] 첨가군에서 모두 caspase-3가 증가되었으며, 증가율은 polyphenon[®] 투여군에서 EGCG 투여군보다 더 컸다. 또한 EGCG 25 μ g/mL 투여군에서 caspase-3 는 10%가 증가 되었으나, p53은 54% 가 증가되어 p53의 증가와 caspase-3 의 증가비율이 다른 것으로 나타났다. p53에 의한 세포자사는 p53 은 핵에서 Puma, Noxa 단백질의 활성화 그리고 이들에 의한 Bax나 Bak 단백질활성화 에 따른 caspase-3, -7, -12 등 effector caspase 의 활성화에 따른 세포자멸사의 유발로 이어지는 것으로 알려져 있다.^{40,41)} 본 실험에서 Noxa 단백질의 양을 HeLa 세포에 EGCG와 polyphenon[®] 을 25, 50 및 100 μ g/mL 되게 첨가하여 배양하여 측정 한 결과 EGCG 투여군에서 7, 91 및 93% 가 각각 증가 되었고, polyphenon[®] 투여군에서는 74, 68, 305% 가 각각 증가되어 EGCG와 polyphenon[®] 첨가군에서 모두 Noxa 량 이 증가되었으며, 증가율은 polyphenon[®] 투여군에서 EGCG 투여군보다 더 컸다. 또한 EGCG 25 μ g/mL 투여군에서 p53은 54%, caspase-3는 10%, Noxa는 7% 가 각각 증가되었고, EGCG 50 μ g/mL 투여군에서 p53은 51%, caspase-3는 33%, Noxa는 91% 가 각각 증가되어 세포자사를 직접유발하는 caspase-3 량의 변화와 Noxa 량의 변화는 비례적으로 증가되어 연관성이 큰 것으로 생각되나, p53 단백질량의 변화와 caspase-3 량의 변화에 비례관계는 성립되지 않아서 연관성이 더 적은 것으로 추측된다. 따라서 녹차 폴리페놀에 의한 Noxa 의 증가에 또 다른 요인이 작용 될것으로 생각되어 caspase-8 을 측정하였다. HeLa 세포에 EGCG와 polyphenon[®] 을 25, 50 및 100 μ g/mL 되게 첨가하여 배양한 후 caspase-8 량을 측정 한 결과 EGCG 투여군에서 87, 81 및 81% 가 각각 증가 되었고, polyphenon[®] 투여군에서는 45, 89, 98% 가 각각 증가되어 EGCG

와 polyphenon[®] 첨가군에서 모두 caspase-8 량이 증가되었다. EGCG 25 μ g/mL 투여군에서 p53은 54%, caspase-3는 10%, Noxa는 7%, caspas-8은 87% 가 각각 증가되어 세포자사를 직접유발하는 caspase-3 량의 변화와 Noxa 량의 변화는 비례적으로 증가되어 연관성이 큰 것으로 생각되나, p53 단백질량이나 caspase-8 의 변화와 caspase-3 량의 변화에 비례관계는 성립되지 않아서 연관성이 더 적은 것으로 추측된다.

최근 항암 화학 요법은 암 치료의 반응성을 높이기 위하여 고용량 요법이 시도되고 있는데²⁾, 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 polyphenon[®] 은 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 항암효과 연구는 아직까지 많지 않다. 본 실험에서는 항암 화학요법제의 항암작용 증강제로서 녹차 폴리페놀의 이용가능성을 추정하기 위하여 광범위 항암 화학요법제인 시스플라틴의 항암작용에 증강에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향을 자궁경부암 세포주를 배양하여 시스플라틴독성작용에 미치는 폴리페놀영향을 관찰하고 세포자멸사에 관여하는 단백질량의 변화를 관찰하였다.

1. HeLa cells 을 배양하여 EGCG 또는 polyphenon[®] 을 투여하면 cisplatin 에 의한 세포활성이 감소되었다.

2. HeLa cells을 배양하여 EGCG 및 polyphenon[®] 을 처리하면 높은 농도에서 세포활성이 감소되었다.

3. HeLa cells 에서 P53 을 western blot 한 결과 EGCG 및 polyphenon[®] 투여군에서 증가되었다.

4. HeLa cells 에서 caspase-3 를 western blot 한 결과 EGCG 및 polyphenon[®] 투여군에서 증가되었다.

5. HeLa cells 에서 Noxa 를 western blot 한 결과 EGCG 및 polyphenon[®] 투여군에서 증가되었다.

6. HeLa cells 에서 Caspase-8 을 western blot 한 결과 EGCG 및 polyphenon[®] 투여군에서 증가되었다.

이상의 결과로서 녹차의 주요 성분인 EGCG와 polyphenon[®] 은 항암 화학요법제의 주된 치료 약물로 이용되고 있는 시스플라틴과 병합 투여할 경우 시스플라틴의 단독투여 보다 암세포의 활성도를 크게 감소시키므로 암 치료

에 있어서 시스플라틴과 폴리페놀을 병용 투여하면 시스플라틴 사용량을 늘리지 않고도 높은 치료 효과가 나타날 것으로 생각된다. 녹차 폴리페놀의 이러한 작용은 항암치료 보조제로서 이용 가능성을 제시하는 작용으로 이러한 효과를 증명하기 위한 지속적인 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

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 North 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? *Semin 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 cancer: 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 gallate (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. 1996년 발표(1994.1-1994.12)
 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.
 35. Yakovlev AG, Di Giovanni S, Wang G, Liu W, Stoica B, Faden AI. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem*. 2004 279:28367-74.
 36. Jüllig M, Zhang WV, Ferreira A, Stott NS. MG132 induced apoptosis

is associated with p53-independent induction of pro-apoptotic Noxa and transcriptional activity of beta-catenin. *Apoptosis*. 2006 11 : 627-41.

37. Gomez-Bougie P, Wuillemé-Toumi S, Menoret E, Trichet V, Robillard N, Philippe M, Bataille R, Amiot M. Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer Res*. 2007 67:5418-24.

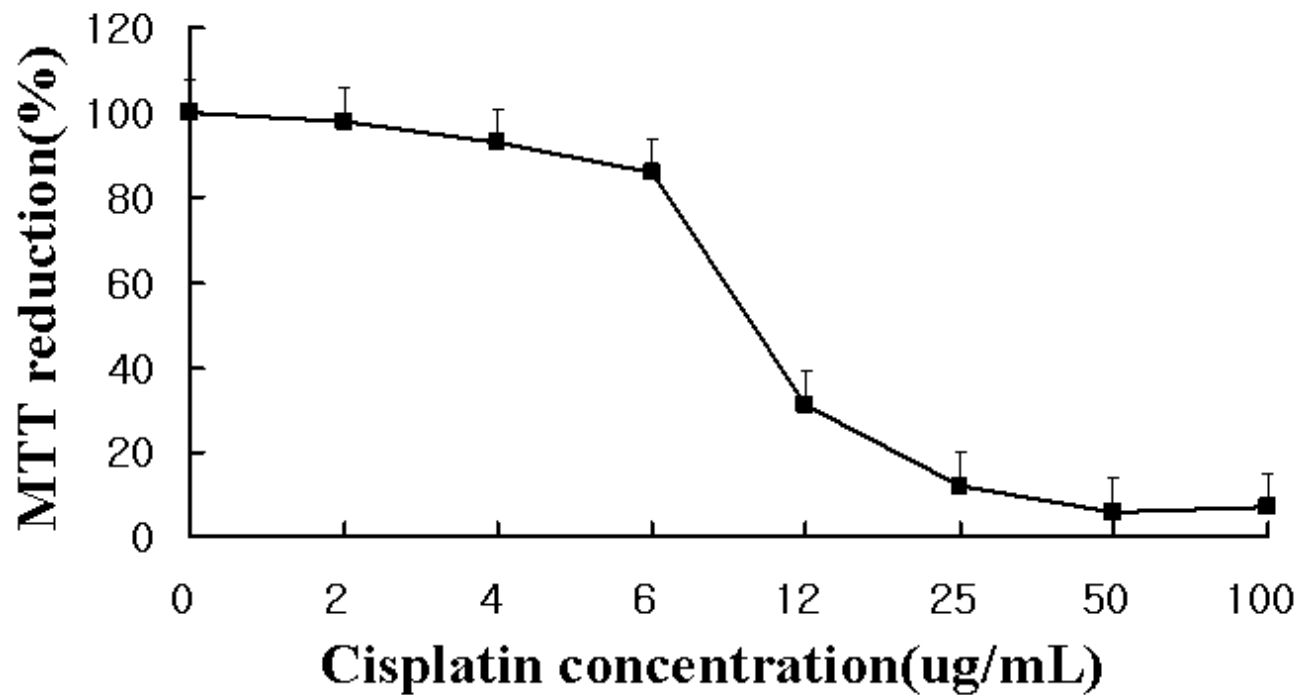


Fig.1.Effects of cisplatin on MTT reduction of HeLa cells.

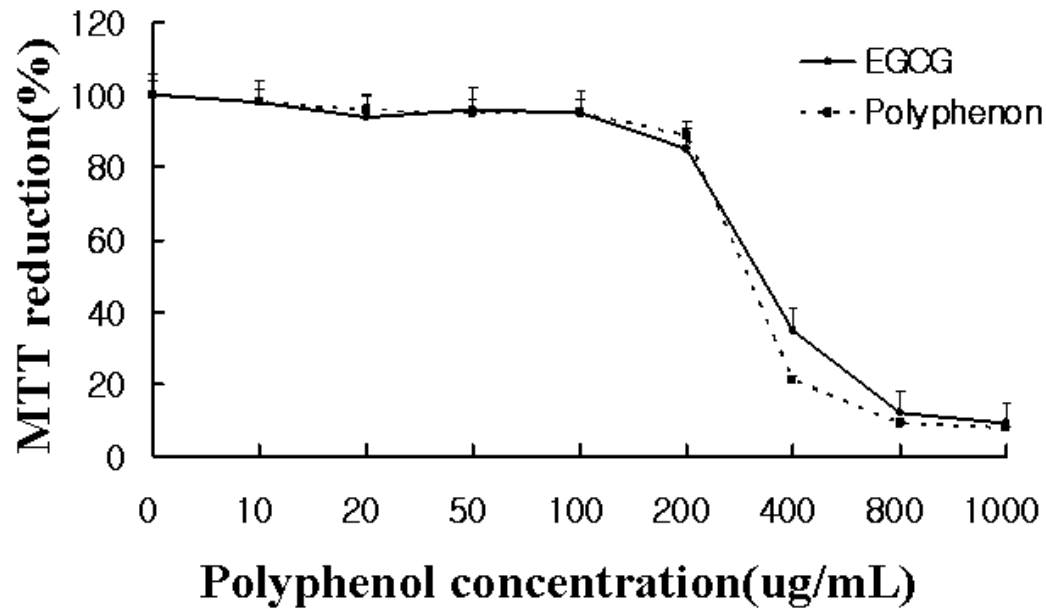


Fig.2.Effects of polyphenol on MTT reduction of HeLa cells.

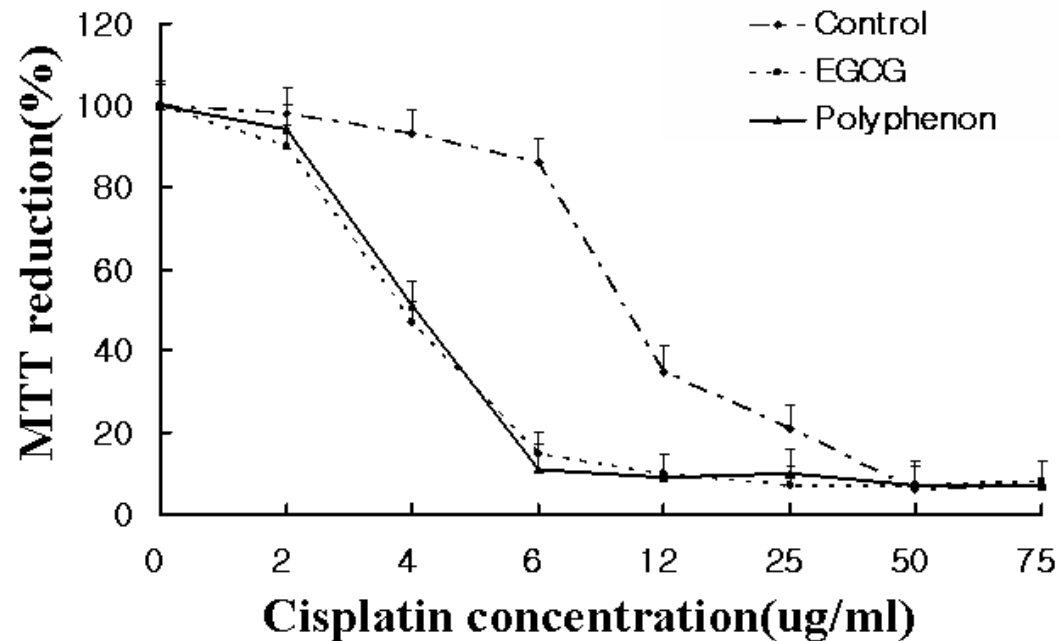


Fig.3. Effects of tea polyphenol(EGCG and polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of HeLa cells. EGCG and polyphenon(50ug/mL) were added to culture media at 2 hrs before cisplatin treatment

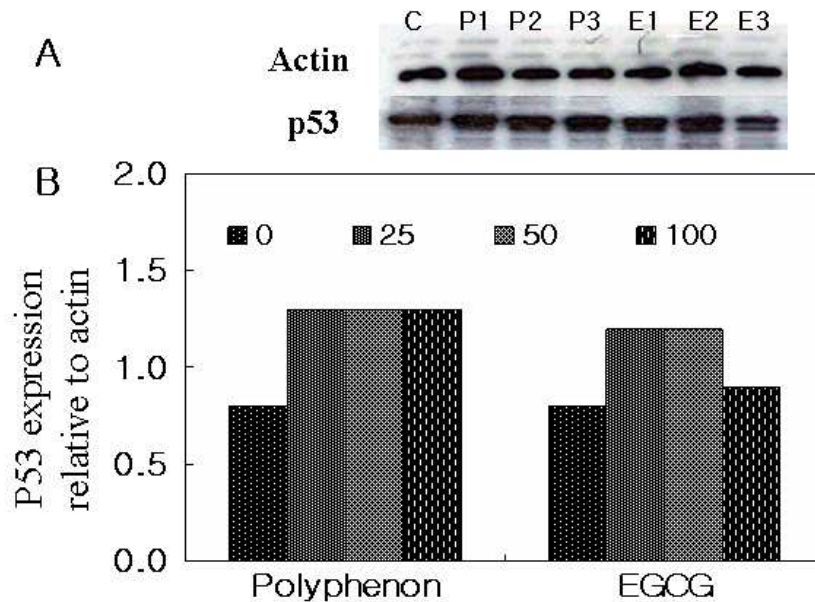


Fig.4. Effects of polyphenon and EGCG on p53 expression in HeLa cells. A) Noxa expressions in HeLa cells by western blot. B) The expression of p53 relative to actin in vehicle, polyphenon, and EGCG. C, P and E are representative of control, polyphenon and EGCG, respectively. P1-P3 indicates concentration of polyphenon, 25, 50 and 100ug/mL, respectively. E1-E3 indicates concentration of EGCG, 25, 50 and 100ug/mL, respectively.

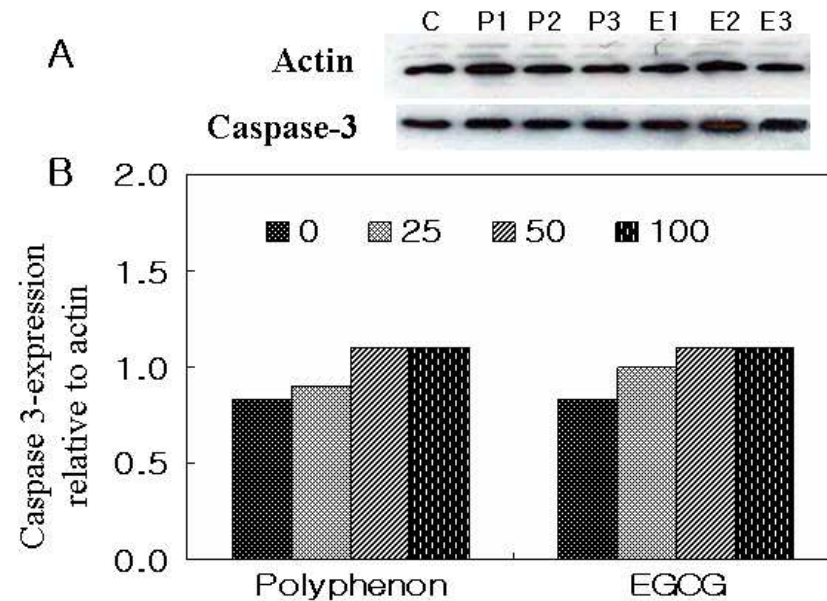


Fig.4. Effects of polyphenon and EGCG on caspase-3 expression in HeLa cells. A) Caspase-3 expressions in HeLa cells by western blot. B) The expression of caspase-3 relative to actin in vehicle, polyphenon, and EGCG. C, P and E are representative of control, polyphenon and EGCG, respectively. P1-P3 indicates concentration of polyphenon, 25, 50 and 100ug/ml, respectively. E1-E3 indicates concentration of EGCG, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

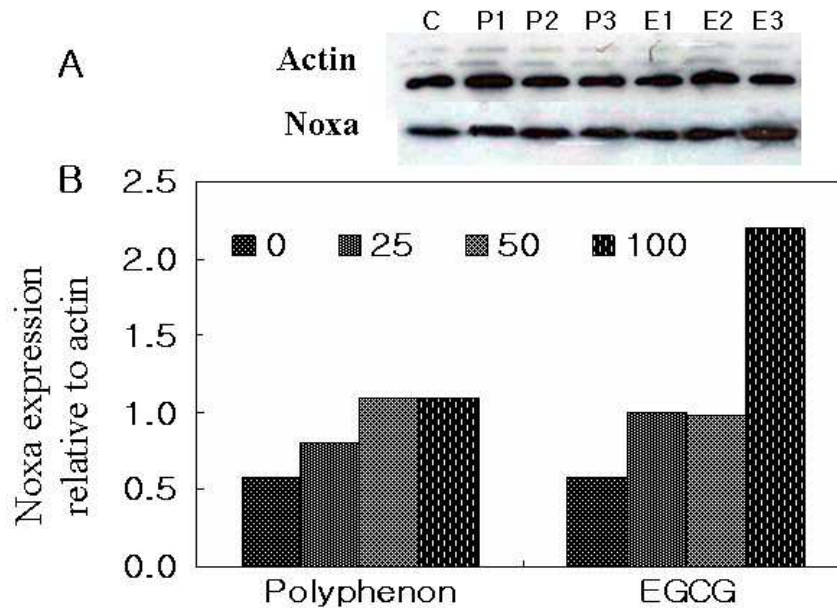


Fig.6. Effects of polyphenon and EGCG on Noxa expression in HeLa cells. A) Noxa expressions in HeLa cells by western blot. B) The expression of Noxa relative to actin in vehicle, polyphenon, and EGCG. C, P and E are representative of control, polyphenon and EGCG, respectively. P1-P3 indicates concentration of polyphenon, 25, 50 and 100ug/mL, respectively. E1-E3 indicates concentration of EGCG, 25, 50 and 100ug/mL, respectively.

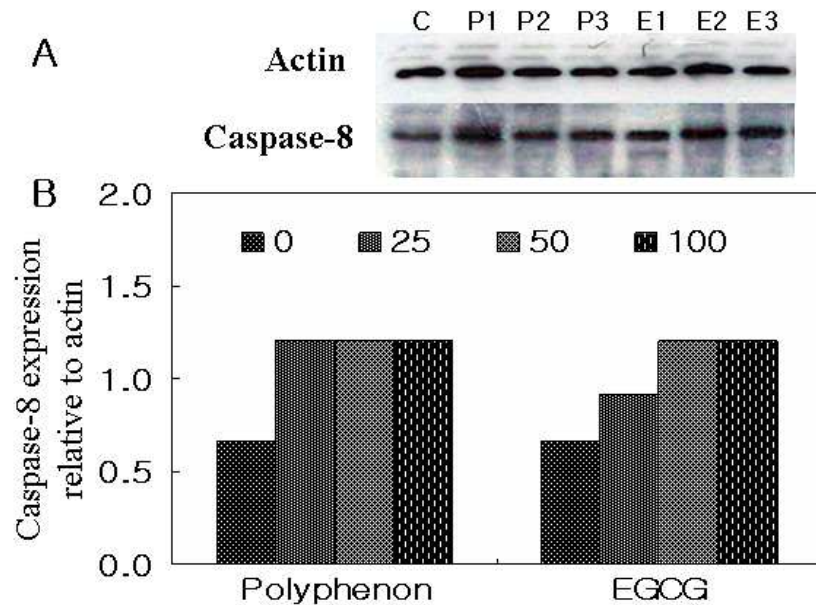


Fig.5. Effects of polyphenon and EGCG on caspase-8 expression in HeLa cells. A) Caspase-8 expressions in HeLa cells by western blot. B) The expression of caspase-8 relative to actin in vehicle, polyphenon, and EGCG. C, P and E are representative of control, polyphenon and EGCG, respectively. P1-P3 indicates concentration of polyphenon, 25, 50 and 100ug/mL, respectively. E1-E3 indicates concentration of EGCG, 25, 50 and 100ug/mL, respectively.

저작물 이용 허락서

학 과	의 학 과	학 번	20057921	과 정	박 사
성 명	한 글 : 김 동 춘 한 문 : 金 東 春 영 문 : Dong Chun Jin				
주 소	조선대학교 의과대학 생화학교실				
연락처	E-mail : ybyyyy@yahoo.co.kr				
논문제목	한글: 사람 자궁 경부암 세포주에서 Cisplatin의 세포독성에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향				
	영문: The effect of green tea polyphenol on cisplatin-induced cytotoxicity in human uterine cervix cancer cell lines				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의() 반대()

2007 년 월 일
저 작 자: 김 동 춘 (인)

조선대학교 총장 귀하