creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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

dCollection

[UCI]I804:24011-200000236587

2008年 8月
博士學位論文

사람 폐암 세포주에서 시스플라틴과 독소루비신의 세포독성에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향

朝鮮大學校 大學院
醫 學 科
高 箕 浯

사람 폐암 세포주에서 시스플라틴과 독소루비신의 세포독성에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향

The effect of green tea polyphenol on cisplatin-or doxorubicin-induced cytotoxicity in human lung cancer cell line

2008 年 6 月 日

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

高 箕 浯

사람 폐암 세포주에서 시스플라틴과 독소루비신의 세포독성에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향

The effect of green tea polyphenol on cisplatin-or doxorubicin-induced cytotoxicity in human lung cancer cell line

指導敎授 李 炳 來

이 論文을 醫學博士學位申請 論文으로 提出함

2008 年 6 月

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

高 箕 浯

高箕浯의 博士學位 論文을 認准함

委員長	朝鮮大學校 教授	차 종 희
委 員	朝鮮大學校 教授	박 영 진
委 員	朝鮮大學校 教授	한 세 준
委 員	朝鮮大學校 教授	박 재 윤
委 員	朝鮮大學校 教授	이 병 래

2008 年 6 月

朝鮮大學校 大學院

목 차

Ⅰ. 서 론 1
Ⅱ. 방 법 3
1. 세포의 배양 3
2. A459 세포에서 시스플라틴, 독소루비신 및 폴리페놀이
세포활성에 미치는 영향 3
3. A549 세포에서 폴리페놀이 p53, caspase 3, noxa에
미치는 영향 4
4. Western blot 방법 4
5. 실험결과의 분석 5
Ⅲ. 결 과 6
1. 시스플라틴과 독소루비신이 A549 세포의 활성에 미치는 영향 6
2. 폴리페놀이 A549 세포의 활성에 미치는 영향 6
3. A549 세포에서 EGCG와 polyphenon이 시스플라틴의
세포활성에 미치는 영향 6
4. A549 세포에서 EGCG와 polyphenon이 독소루비신의
세포활성에 미치는 영향 7
5. A549 세포에서 EGCG와 polyphenon이 casapase 3
유전자 발현에 미치는 영향 8
6. A549 세포에서 EGCG와 polyphenon이 Noxa 유전자
발현에 미치는 영향 8
7. A549 세포에서 EGCG와 polyphenon이 casapase 8
유전자 발현에 미치는 영향 8
8. A459 세포에서 EGCG와 polyphenon이 p53 유전자
발현에 미치는 영향 9

Ⅳ. 고 찰 10
Ⅴ. 결 론 15
참 고 문 헌 16

도 목 차

Fig. 1. Effects of doxorubicin and cisplatin on MTT reduction of A549 cells 20
Fig. 2. Effects of polyphenon on MTT reduction of A549 cells 21
Fig. 3. Effects of tea polyphenol(EGCG and polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of A549 cells 22
Fig. 4. Effects of tea polyphenol(EGCG and polyphenon) on doxorubicin-induced cytotoxicity of A549 cells 23
Fig. 5. Effects of polyphenon and EGCG on caspase 3 expression in A549 cells 24
Fig. 6. Effects of polyphenon and EGCG on Noxa expression in A5 cells 25
Fig. 7. Effects of polyphenon and EGCG on caspase 8 expression in A549 cells 26
Fig. 8. Effects of polyphenon and EGCG on p53 expression in A549 cells 27

ABSTRACT

The effect of green tea polyphenol on cisplatin-or doxorubicin-induced cytotoxicity in human lungcancer cell line

Ko, Ki-Oh

Adviser : Prof. Lee, Byoung-Rai, M.D.,Ph.D

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

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

Methods: The human lung cancer cells of A549 line was used. A549 Cells(Korean Cell Culture Bank) were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics: 100 units/mL penicillin and 100 ㎍/mL streptomycin. Two types of TP, epigallocatechin galate(EGCG) and polyphenon were used for these experiment. Cells were seeded at 1×10^4 cells/well in RPMI1640 media in triplicate wells on a Nunc Lab ware 96 well flat bottom microculture plate, with or without TP(50㎍/mL) and at different concentrations of doxorubicin

(0-40㎍/mL) or cisplatin(0-100㎍/mL. 1 day after incubation at 37° C in 5% CO2, the cells viability were determined using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 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 A549 cell lines.

Results: A549 cells viability were decreased to 35% at a 12㎍/mL concentration of cisplatin, and to 14 % above 25 ㎍/mL as measured by the MTT assay. However, in the co-treatment with EGCG(50㎍/mL) or polyphenon(50 ㎍/mL), the cell viability decreased to 41% at 4㎍/mL of cisplatin and to 16 % at 6㎍/mL of cisplatin in A549 cells.

There is no apparent changes in cisplatin-induced cytotoxicity between EGCG and polyphenon administration.

A549 cells viability were decreased to 36% at a 6㎍/mL concentration of doxorubicin, but cell viability decreased to 32% at 4㎍/mL of doxorubicin cisplatin and to 16% at 6㎍/mL of cisplatin in EGCG(50㎍/mL) or polyphenon(50㎍/mL) co-treated A549 cells as measured by the MTT assay. There is no apparent changes in doxorubicin-induced cytotoxicity between EGCG and polyphenon administration.

The levels of p53, caspase-3, Noxa and caspase-8 in A549 cells were increased by EGCG or polyphenon treatment.

Conclusion: These experiments showed that TP has a potentiating effect on doxorubicin- or cisplatin-induced cytotoxicity of A549 cells. The synergistic activity of TP might be due to the induction of apoptosis.

Key words: Doxorubicin, cisplatin, polyphenol, apoptosis, A549 cell.

Ⅰ. 서 론

항암화학요법은 암의 종류나 시기에 관계없이 모두 시행할 수 있는 방법이지만 치료율이 수술요법보다 낮고, 생존율의 증가가 크지 않으며, 독성 부작용이 많기 때문에 논란이 되고 있으나, 전이된 경우나 말기암환자에서는 항암 화학요법제에 의한 보조요법(adjuvant therapy or neoadjuvant therapy) 등은 최근에 관심이 증가되고 있다.[1,2] 보조요법에 이용되는 화학요법제는 시스플라틴(cisplatin :cis-diammine dichloroplatinum)과 독소루비신(doxorubicin)과 같은 광범위 항암 화학요법제로 이들은 자궁경부암, 대장암, 폐암등 암에 대한 항암치료에 이용되고 있다.[3,4] 시스플라틴은 백금계 화학물질로서 항암작용 기전은 DNA 사슬사이에서 교차반응(interstrand cross linking)을 일으킴으로서, DNA 합성이나 RNA합성을 억제함으로서 세포자사(apoptosis)를 유도한다고 알려져 있다.[5,6] Anthracycline 계의 항암화학요법제인 독소루비신은 DNA에 결합하거나 topoisomeras II를 억제함으로서 DNA나 RNA의 합성을 억제하여 항암작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.[7] 광범위 화학요법제는 암치료에서 1차적인 치료제로 이용되고 있으나, 신장이나, 간장 및 골수세포 등에 대한 독성 부작용과 항암제에 대한 내성 암세포가 나타나므로서 항암화학요법의 장애로 대두되고 있다.[8-10] 따라서 최근에는 항암화학요법제 단독요법으로 항암효과가 충분치 않은 경우 항암효과를 상승시키기 위하여 여러가지 항암제를 병행하여 투여하는 병합요법이나 방사선요법과 병행하는 치료법이 시도되고 있다.[1-3] 또한 광범위화학요법제의 치료효과를 증진시키고, 부작용을 줄이기 위하여 투여량을 증가시키는 고용량요법을 시행하거나 리포좀등에 약물을 포장하여 투여하는등 약물투여 량이나 방법을 개선하는 연구에 관심이 모아지고 있다.[11,12] 그러나 아직까지 항암화학요법제의 항암작용을 증가시키면서 독성은 최소화하여 암치료가 효과적으로 이루어 질 수 있는 방법의 개발이 충분하지 않다. 따라서 화학요법제의 정상세포에 대한 독성작용을 최소화 하면서 암세포에 대한 독성을 증가시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하며, 이중에서도 항암제의 항

암력을 증가시키거나, 암세포의 내성을 변화시킬 수 있는 항암화학요법 보조제의 개발에 대한 연구가 매우 절실히 요구되고 있다. 최근 천연물을 이용한 약품개발에 관심이 집중되고 있는데, 특히 천연물에 함유된 항산화물질은 노화나 암등 여러 가지 질환의 예방및 치료에 이용하려는 연구가 진행되고 있다.[13] 녹차에 함유된 항산화 작용이 있는 폴리페놀 성분은 암의 발생과 치료에도 효과적인 작용을 한다는 많은 연구 논문이 발표되고 있다.[14] 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.[15] 녹차 카테킨은 발암물질에 직접 작용하거나 세포에 작용하여 암의 발생기전을 차단하여 암의 발생을 예방하고, 암세포 괴사를 유도하며, 암 침투와 혈관증식을 억제하여 암의 성장이나 진행을 억제시킬 수 있다고 한다.[16-18]

본 연구는 광범위 항암 화학요법제인 시스플라틴과 독소루비신의 항암작용 증강에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향을 관찰하기 위하여 사람 선형 폐암(adenocarcinoma) 세포주인 A549 세포를 배양하여 시스플라틴과 독소루비신 및 폴리페놀을 병합 투여 한 후 세포생존율을 측정하여 조사하였고, 세포자사에 관여하는 것으로 알려진 p53, caspase 3, caspase 8 및 Noxa 단백질의 량을 western blot법에 의해서 측정하여 폐암세포에서 광범위 화학요법제에 의한 암치료에 미치는 폴리페놀의 영향을 관찰하고자 하였다.

Ⅱ. 방 법

1. 세포의 배양 방법

본 실험에서 사용한 세포는 사람 폐암세포주인 A549 세포로, 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 상기 세포를 배양하였다.

2. A459 세포에서 시스플라틴, 독소루비신 및 폴리페놀이 세포활성에 미치는 측정방법

실험은 배양세포를 시스플라틴만 첨가한 대조군, 독소루비신(Sigma Chemical Co, USA), 시스플라틴(Sigma Chemical Co, USA)및 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 A459 세포 2 $\times 10^5$ 개씩을 넣어 1일간 배양한 후 실험을 실시하였다. 녹차 폴리페놀과 독소루비신은 PBS에 용해시켜 첨가하였고, 시스플라틴은 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해시킨 후 PBS(phosphate buffered saline)에 희석시켜 각 well에 순서대로 첨가한 후, CO_2 배양기에 24시간 동안 더 배양한 후, 세포활성(Cell viability)를 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide)법19)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 ㎕를 첨가하여 ELISA plate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

실험은 각 실험군마다 3 wells의 흡광도를 각각 측정하여 평균값을 계산하였고, 3회 반복 실험을 실시하여 유의성을 판정하였다.

3. A549 세포에서 폴리페놀이 p53, caspase 3, noxa 에 미치는 측정방법

A549 세포에서 폴리페놀이 p53, caspase 3, NOXA 유전자 발현에 미치는 영향을 알기 위하여 세포에 녹차 폴리페놀을 첨가하여 배양한 후 western blot 법으로 확인하였다. 실험은 배양세포를 배양한 후 대조군, 녹차 폴리페놀(polyphenon 60, Cat. No : P 1204, EGCG Cat. No : E 4143, Sigma Chemical Co, USA) 를 첨가한 군으로 나누어 세포배양 용기(4 well plate)의 각 well에 A459 세포 2 $\times 10^5$ 개씩을 넣어 1일간 배양한 후 녹차 폴리페놀을 PBS(phosphate buffered saline)에 희석시켜 각 well에 첨가하여 CO_2 배양기에 24시간 동안 더 배양한 후, p53, caspase 3, NOXA량을 western blot 법으로 확인하였다.

4. Western blot 방법

배양세포에서 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℃ 에서 5분 동안 방치한 후 냉각시켜서 전기영동을 시행하였다. 전기영동은 10% polyacrylamide gel에서 Tris 완충액(pH8.8, 0.025M Tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS)으로 80V로 2시간 동안 전개 시켰다. 전기영동 후 gel은 분리하여 nitrocellulose(NC) membrane을 얹어서 transfer buffer(25mM Tris, 192mM glycine, 20% methanol)에서 20V로 12시간동안 transfer하였다. NC membrane을 분리하여 5% nonfat milk를 함유한 TBS(0.1% Tween20 in pH7.4 Tris-based saline buffer)에서 1시간 동안 처리하고 TBS로 2회 세척하였다. 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/TBS 에 희석하여 4℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응후 TBS로 4회 세척하고 이차항체(horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG)는 2% nonfat milk/TBS 희석(1:2000 dilution)하여 1시간 동안 반응 시킨 후 TBS로 4회 세척하였다. NC membrane은 enhanced chemiluminescence 용액(Amersham, UK)에 넣은 후 1분 30초 동안 반응시키고 X-ray 필름을 이용하여 감광시킨 후 현상하여 나타난 밴드를 image analyzer (1D ver.2.1, pharmacia biotech, USA)로 그 밀도를 정량하였다.

5. 실험결과의 분석

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

Ⅲ. 결　　과

1. 시스플라틴과 독소루비신이 A549 세포의 활성에 미치는 영향

A549 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 0, 2, 4, 6, 12, 25, 50, 100㎍/mL 되게 첨가하여 배양한 후 MTT 환원량을 측정한 결과 시스플라틴의 농도가 12, 25, 50 및 100㎍/mL 일때 MTT 환원량은 대조군의 40, 11, 15 및 7%로 감소되었고, 독소루비신의 농도 6, 12, 25, 50 및 100㎍/mL 일때 MTT 환원량은 대조군의 35, 17, 11, 9 및 10%로 감소되었다(Fig. 1).

2. 폴리페놀이 A549 세포의 활성에 미치는 영향

A549 세포를 배양한 후 배양액에 EGCG나 polyphenon 을 0, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800 및 1000㎍/mL 되게 첨가하여 배양한 후 MTT 환원량을 측정한 결과 EGCG 농도 200, 400, 800 및 1000㎍/mL 일때 MTT 환원량은 대조군의 87, 41, 15 및 11%로 감소되었고, polyphenon 농도 200, 400, 800 및 1000㎍/mL 일때 MTT 환원량은 대조군의 91, 35, 12 및 12%로 감소되어 A549 세포에 대하여 EGCG와 polyphenon의 독성 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 2).

3. A549 세포에서 EGCG와 polyphenon이 시스플라틴의 세포활성에 미치는 영향

A549 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 2, 4, 6, 12, 25, 50 및 100㎍/mL되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 98, 95, 96, 35, 14, 11 및 7% 로 나타나 시스플라틴 12㎍/mL 첨가군부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있다.

A549 세포를 배양한 후 배양액에 EGCG나 polyphenon을 50㎍/mL 되게 첨가하고 2시간 배양 후, 시스플라틴을 0, 2, 4, 6, 12, 25, 50, 75 및 100㎍/mL 되게 첨가

하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량을 측정하였다.
EGCG를 첨가하여 배양한 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 90, 41, 16, 9, 8, 9 및 9%로 나타나 시스플라틴 4㎍/mL 군에서부터 세포활성이 급격히 감소되었는데, EGCG를 첨가하지 않은 군에서는 시스플라틴 12㎍/mL군에서부터 MTT 환원량이 감소되었던 것과 비교 하면 EGC에 의해서 시스플라틴에 의한 세포독성이 증가됨을 알 수 있다.
Polyphenon을 첨가하여 배양한 세포의 MTT 환원량은 시스플라틴의 투여량에 따라서 각각 100, 96, 43, 14, 11, 9, 9 및 8%로 나타나 시스플라틴 4㎍/mL 군에서부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있다(Fig. 3).

4. A549 세포에서 EGCG와 polyphenon이 독소루비신의 세포활성에 미치는 영향

A549 세포를 배양한 후 배양액에 독소루비신을 1, 2, 4, 6, 10, 20 및 40㎍/mL 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량은 독소루비신을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 98, 101, 98, 36, 11, 9 및 10% 로 나타나 독소루비신 6㎍/mL 첨가군부터 세포활성이 급격히 감소됨을 알 수 있다. A549 세포를 배양한 후 배양액에 EGCG나 polyphenon을 50㎍/mL 되게 첨가하고 2시간 배양 후, 독소루비신을 1, 2, 4, 6, 10, 20 및 40㎍/mL 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량을 측정하였다. EGCG를 첨가하여 배양한 세포의 MTT 환원량은 독소루비신 투여량에 따라서 각각 95, 91, 32, 15, 11, 10 및 12%로 나타나 독소루비신 4㎍/mL 군에서부터 세포활성이 급격히 감소되어 EGCG를 첨가하지 않은 군과 비교하면 EGCG에 의해서 독소루비신의 세포독성이 증가되었음을 알 수 있다. Polyphenon을 첨가하여 배양한 세포의 MTT 환원량은 독소루비신 투여량에 따라서 각각 94, 94, 41, 12, 10, 9 및 8%로 나타나 독소루비신 4㎍/mL 군에서부터 세포활성이 급격히 감소되어, polyphenon을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 세포 독성이 증가됨을 알 수 있다(Fig. 4).

5. A549 세포에서 EGCG와 polyphenon이 casapase 3 유전자 발현에 미치는 영향

A549 세포를 1일간 배양한 후 배양액에 EGCG와 polyphenon 을 50 과 100㎍/mL 되게 첨가하여 6시간 더 배양한 후 세포를 수집하여 caspase 3과 actin에 대한 western blot을 시행하여 나타난 밴드의 밀도를 측정하여 각각 caspase 3/actin 의 비율을 환산한 결과 polyphenon 0, 50 및 100㎍/mL 군에서 0.62, 1.24, 및 1.26를 나타냈고, EGCG 0, 50 및 100㎍/mL 군에서는 0.63, 1.31, 및 1.35 을 나타내서 polyphenon 과 EGCG 첨가군에서 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 5).

6. A549 세포에서 EGCG와 polyphenon이 Noxa 유전자 발현에 미치는 영향

A549 세포를 1일간 배양한 후 배양액에 EGCG와 polyphenon 을 50 과 100㎍/mL 되게 첨가하여 6시간 더 배양한 후 세포를 수집하여 Noxa 와 actin에 대한 western blot을 시행하여 나타난 밴드의 밀도를 측정하여 각각 Noxa/actin 비율을 환산한 결과 polyphenon 0, 50 및 100㎍/mL 군에서 0.58, 0.82 및 0.86 을 나타냈고, EGCG 0, 50 및 100㎍/mL 군에서는 0.58, 0.84 및 0.89를 나타내서 polyphenon 과 EGCG 첨가군에서 모두 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 6).

7. A549 세포에서 EGCG와 polyphenon이 casapase 8 유전자 발현에 미치는 영향

A549 세포를 1일간 배양한 후 배양액에 EGCG와 polyphenon 을 50 및 100㎍/mL 되게 첨가하여 6시간 더 배양한 후 세포를 수집하여 caspase 8 과 actin에 대한 western blot을 시행하여 나타난 밴드 밀도를 측정하여 각각 caspase 8/actin 비율로 환산한 결과 EGCG 0, 50 및 100㎍/mL 군에서 0.36, 0.83 및 0.86 을 나타냈고, polyphenon 0, 50 및 100㎍/mL 군에서는 0.35, 0.62 및 0.67 을 나타내서

EGCG와 polyphenon 첨가군에서 모두 대조군에 비하여 caspase 8 량이 증가됨을 나타냈다(Fig. 7).

8. A459 세포에서 EGCG와 polyphenon이 p53 유전자 발현에 미치는 영향

A549 세포를 1일간 배양한 후 배양액에 EGCG와 polyphenon 을 50 및 100㎍/mL 되게 첨가하여 6시간 더 배양한 후 세포를 수집하여 p53과 actin에 대한 western blot을 시행하여 나타난 밴드를 측정하여 각각 p53/actin 비율로 환산환 결과 EGCG 0, 50 및 100㎍/mL 군에서 0.8, 1.25, 및 1.21 를 나타냈고, polyphenon 0, 50 및 100㎍/mL 군에서는 0.8, 1.3 및 1.35 를 나타내서 EGCG와 polyphenon 첨가군에서 모두 대조군에 비하여 p53이 유의하게 증가됨을 나타냈다(Fig. 8).

IV. 고 찰

본 실험결과 사람의 폐암세포인 A549 세포에서 EGCG와 polyphenon은 시스플라틴과 독소루비신의 독성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 폴리페놀류는 식물에서 항산화작용을 나타내는 물질로서 녹차나 포도에 많이 함유되어 있으며, 식물에 함유된 flavanols, flavandiols, flavonoids 그리고 phenolic acids등이 폴리페놀류이다.[20] 녹차에는 폴리페놀류인 카테킨의 함량이 매우 높아 건조 녹차잎의 약 10% 내외를 차지하고 있다. 녹차에 함유되어 있는 카테킨에는 여러 가지 종류가 있는데, EC, ECG, EGC, EGCG등 이 많이 함유되어 있다.[15] 녹차 카테킨은 항산화 작용 및 항암작용 작용뿐 아니라 항균작용, 항비루스작용 등 여러 가지 생리활성이 있는 것으로 보고되고 있는데, 카테킨중에서 항암작용이나 항균작용은 EGCG가 가장 강한 것으로 알려져 있다.[15,16,21] 녹차 카테킨중 일반적으로 EGCG가 항암성이 가장 강한 것으로 보고되고 있으나[14,15], Babich 등23)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 실험에서는 EGCG와 녹차 카테킨 복합물인 polyphenon 의 암세포에 대한 독성작용을 비교하기 위하여 폐암 세포주인 A549 세포를 배양액에 EGCG와 polyphenon을 첨가하여 배양한 후 생존한 세포를 MTT법으로 측정한 결과 EGCG와 polyphenon 모두 400㎍/mL 이상의 농도에서 세포활성이 감소되어, EGCG와 polyphenon가 A549 세포에 대한 세포독성을 나타내는 농도가 유사하며, 항암작용이 가장 강한 것으로 알려진 EGCG와 녹차카테킨 복합물인 polyphenon 사이의 암세포에 대한 독성 민감도의 차이는 없는 것으로 생각된다.

본 실험에 사용한 polyphenon은 EGCG, ECG, EGC 및 EC 등이 혼합되어 있는 카테킨 복합물이다. 광범위 항암제 시스플라틴은 126㎍/mL, 독소루비신은 6㎍/mL 이상의 농도에서 세포활성이 감소된 것과 비교하면 EGCG와 polyphenon 은 400㎍

/mL 이상 농도에서 세포활성의 감소를 나타내므로 EGCG와 polyphenon 의 직접적인 세포독성작용은 크지 않은 것으로 생각된다.

항암제와 카테킨을 병행투여 한 경우 그 효과가 상승될 수 있다는 실험보고가 있는데, 난소육종암세포에서 독소루비신과 EGCG를 동시 투여하면 EGCG가 p-glycoprotein의 작용을 억제하여 독소루비신의 세포외 배출을 억제함으로서 항암 효과가 증대된다고 하였고[24], 독소루비신 내성세포에서 EGCG는 p-glycoprotein의 작용을 억제하여 감수성을 증가시킨다고 하였다.[25] 독소루비신은 anthracycline 계의 항암제로서 광범위 항암제로 폐암등 여러 가지 암치료에 이용되고 있다. 시스플라틴이나 독소루비신은 DNA에 결합함으로서 DNA 복제를 억제함으로서 항암작용을 하는 것으로 알려져 있다.[26]

본 실험에서 녹차 카테킨이 항암화학 요법에 미치는 영향을 알기 위하여 A549 세포를 배양한 후 시스플라틴과 독소루비신을 EGCG 나 polyphenon을 병행하여 배양액에 첨가한 후 세포활성을 측정하여 비교하였다. EGCG와 polyphenon 50㎍/mL을 각각 첨가하여 2시간 동안 배양한 후 시스플라틴을 2-100㎍/mL 투여하여 세포활성도를 측정한 결과 녹차폴리페놀을 투여하지 않은 대조군, EGCG 및 polyphenon 투여군의 세포활성도는 시스플라틴 4㎍/mL 투여시 95 %, 41% 및 43%를 각각 나타냈고, 6㎍/mL 투여시에는 96%, 16% 및 14%를 각각 나타내서 시스플라틴 4 및 6㎍/mL 투여군에서 모두 EGCG와 polyphenon의 첨가로 세포활성이 현저히 감소되었고, EGCG와 polyphenon의 세포활성 감소율 차이는 없는 것으로 나타났다. 이러한 실험 결과로서 EGCG와 polyphenon은 시스플라틴과 병합 투여시 A549 세포 활성이 현저히 감소되기 때문에 EGCG와 polyphenon는 시스플라틴의 항암 작용을 증가 시키는 효과가 있는 것으로 추측된다.

또한 EGCG와 polyphenon 50㎍/mL을 각각 첨가하여 2시간 동안 배양한 후 독소루비신을 1-40㎍/mL 투여하여 세포활성도를 측정한 결과 녹차폴리페놀을 투여하지 않은 대조군, EGCG 및 polyphenon 투여군의 세포활성도는 독소루비신 4㎍/mL 투여시 98%, 32% 및 41%를 각각 나타냈고, 6㎍/mL 투여시에는 36%, 15% 및 12%를 각각

나타내서 독소루비신 4㎍/mL 투여군에서 EGCG와 polyphenon의 첨가로 세포활성이 현저히 감소되었고, EGCG와 polyphenon의 세포활성 감소율 차이는 없는 것으로 나타났다.

EGCG와 polyphenon은 시스플라틴이나 독소루비신에 의한 세포활성 감소율을 증가 시켰고, 세포활성 감소율은 EGCG와 polyphenon이 비슷하게 나타나서 A549 세포에서 시스플라틴과 독소루비신의 감수성 증가에 미치는 EGCG와 polyphenon의 효율은 차이가 없는 것으로 생각된다.

Apoptosis는 세포의 사멸을 유도하는 기전으로서 여러 가지 항암물질이나 세포사멸의 중요한 기전으로 알려져 있는데, apoptosis의 유발은 p53, Noxa, bid 및 Bcl2 등이 관여하는 cascade 반응에 의해서 최종적으로 caspase가 활성화되어 일어난다.[27,28]

본 실험에서 폴리페놀이 p53 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 A549 세포에 EGCG와 polyphenon을 첨가하여 배양한 후 p53 단백질에 대한 western blot을 시행한 결과 EGCG와 polyphenon 첨가한 군에서 첨가하지 않은 대조군에 비하여 결과 EGCG 50, 100㎍/mL 투여군에서 56, 51%가 각각 증가 되었고, polyphenon 50 및 100㎍/mL 투여군에서는 60% 와 66% 가 각각 증가되어 A549 세포에서 EGCG와 polyphenon 투여로 p53이 증가됨을 알 수 있다. p53 단백질은 시스플라틴의 DNA 독성을 증가시키는 등의 시스플라틴의 항암작용과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있으므로,[29,30] 본 실험에서 EGCG와 polyphenon 의해서 A549 세포에서 p53 단백질량이 증가되는 것은 EGCG와 polyphenon에 의한 시스플라틴의 세포독성 증가에 요인이 될 수 있을 것으로 추측된다.

세포 자사(apoptosis)에 관여 하는 것으로 알려진 단백질인 caspase 3, caspase 8 및 NOXA 단백질[27,31] 에 대한 EGCG와 polyphenon 의 영향을 western blot에 의해서 관찰하였다.

Caspase 3는 세포자사에 직접 관여하는 단백질로서 A549 세포에 EGCG와 polyphenon 을 50 및 100㎍/mL 되게 첨가하여 배양하여 western blot을 시행한

결과 EGCG 투여군에서 101 및 110% 가 각각 증가 되었고, polyphenon 투여군에서는 100, 101% 가 각각 증가되어 EGCG와 polyphenon 첨가군에서 모두 caspase 3가 증가되었으며, 증가율은 polyphenon 과 EGCG 투여군이 유사하였다. 또한 EGCG 50 ㎍/mL 투여군에서 caspase 3 는 110%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 세포자사의 유발로 이어지는 것으로 알려져 있다.[28,31] 본 실험에서 Noxa 단백질의 량을 A549 세포에 EGCG와 polyphenon 을 50 및 100㎍/mL 되게 첨가하여 배양하여 측정한 결과 EGCG 투여군에서 45 및 53% 가 각각 증가 되었고, polyphenon 투여군에서는 41 및 48% 가 각각 증가되어 EGCG와 polyphenon 첨가군에서 모두 Noxa 량이 증가되었으며, 증가율은 polyphenon 투여군과 EGCG 투여군이 유사하였다.

또한 A549 세포에 EGCG와 polyphenon 을 50 및 100㎍/mL 되게 첨가하여 배양한 후 caspase-8 량을 측정한 결과 EGCG 투여군에서 130% 및 138% 가 각각 증가 되었고, polyphenon 투여군에서는 77, 91% 가 각각 증가되어 EGCG와 polyphenon 첨가군에서 모두 caspase-8 량이 증가되었다. 이상의 실험결과 A549 세포에서 EGCG나 polyphenon은 세포자사를 유발하는 caspase 를 활성화시키는 것으로 추측된다. 또한 EGCG 50㎍/mL 투여군에서 p53은 56%, caspase-3는 101%, Noxa는 45%, caspas-8은 130% 가 각각 증가되었고, polyphenon 50㎍/mL 투여군에서 p53은 60%, caspase-3는 100%, Noxa는 41%, caspas-8은 77% 가 각각 증가되어 EGCG나 polyphenon 사이에 농도차이 없이 세포자사에 관여하는 단백질의 변화가 비슷하게 나타나서 세포자사 유도력의 차이는 없는 것으로 추측된다.

최근 항암 화학 요법은 암 치료의 반응성을 높이기 위하여 고용량 요법이 시도되고 있는데,[3] 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.

EGCG와 polyphenon은 항암 화학 요법제의 주된 치료 약물로 이용되고 있는 광범위 항암제 시스플라틴이나 독소루비신과 병합 투여할 경우 항암 화학요법제 단독투여 때 보다 암세포의 독성이 증가되므로 암 치료에 있어서 폴리페놀을 병용 투여하면 항암화학요법제의 사용량을 늘리지 않고도 치료 효과를 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 폴리페놀이 항암화학요법 보조제로서 이용 될 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 효과를 증명하기위해서는 많은 연구과 임상실험이 필요 할 것으로 사료된다.

Ⅳ. 결 론

녹차 폴리페놀의 항암효과에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데, 본 실험에서는 EGCG와 폴리페논이 항암화학요법제의 항암작용 증강제로서 이용가능성을 추정하기 위하여 광범위 항암 화학요법제인 시스플라틴과 독소루비신의 항암작용에 미치는 영향을 사람 폐암 세포주를 이용하여 관찰하였다.

1. A549 세포를 배양하여 EGCG 또는 polyphenon을 투여하면 시스플라틴이나 독소루비신에 의한 세포독성이 증가되었다.
2. A549 세포를 배양하여 EGCG 및 polyphenon을 처리하면 400㎍/mL 이상의 높은 농도에서 세포독성이 나타났다
3. A549 세포에 EGCG 및 polyphenon 투여하면 p53이 증가되었다.
4. A549 세포에서 EGCG 및 polyphenon 투여하면 caspase 3 가 증가되었다.
5. A549 세포에 EGCG 및 polyphenon 투여하면 Noxa 가 증가되었다.
6. A549 세포에 EGCG 및 polyphenon 투여하면 caspase 8 이 증가되었다.

이상의 결과 EGCG와 polyphenon은 광범위 화학요법제인 시스플라틴이나 독소루비신과 병합 투여할 경우 화학요법제 단독투여시 보다 암세포의 활성도를 크게 감소시키므로 EGCG나 polyphenon를 화학요법제와 병행투여하면 높은 치료 효과가 나타날 것으로 생각된다. 따라서 녹차 폴리페놀은 항암 화학요법제에 의한 암치료시 치료 보조제로서 이용 될 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 효과를 입증하기 위한 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Sörenson S, Glimelius B, Nygren P : A systematic overview of chemotherapy effects in non-small cell lung cancer. Acta Oncol. 40: 327-339. 2001
2. Matsuyama R, Reddy S, Smith TJ. : Why do patients choose chemotherapy near the end of life? A review of the perspective of those facing death from cancer. J Clin Oncol. 24: 3490-3496. 2006
3. De Vita F, Giuliani F, Galizia G, Belli C, Aurilio G, Santabarbara G, Ciardiello F, Catalano G, Orditura M. Neo-adjuvant and adjuvant chemotherapy of gastric cancer. Ann Oncol. 18 : vi120-123. 2007
4. Högberg T, Glimelius B, Nygren P : A systematic overview of chemotherapy effects in ovarian cancer. Acta Oncol. 40: 340-360. 2001
5. Crown JP. The platinum agents: a role in breast cancer treatment? Senmin Oncol 28: 28-37. 2001
6. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. Cell Mol Life Sci 57: 1229-1235. 2000
7. Comella P, Abate G, Di Finizio G, Daponte A, Zarrilli D. : Treatment of resistant non-Hodgkin's lymphomas with cisplatin, etoposide, and bleomycin. Cancer Chemother Pharmacol. 26: 306-309. 1990
8. Cersosimo RJ. Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy. Ann Pharmacother 27: 438-441. 1993
9. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. Mutat Res 478: 23-43. 2001
10. Johnson E. : Cisplatin, vinblastine, and bleomycin versus vinblastine, cisplatin, and etoposide in the treatment of advanced germ cell tumors

of the testis. J Clin Oncol. 9: 1092-1094. 1991
11. Samad A, Sultana Y, Aqil M. : Liposomal drug delivery systems: an update review. Curr Drug Deliv. 4: 297-305. 2007
12. Di Stefano G, Fiume L, Baglioni M, Bolondi L, Busi C, Chieco P, Kratz F, Manaresi F, Pariali M. : A conjugate of doxorubicin with lactosaminated albumin enhances the drug concentrations in all the forms of rat hepatocellular carcinomas independently of their differentiation grade. Liver Int. 26: 726-733. 2006
13. 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
14. 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
15. Graham HN. Green tea composition. consumption, and polyphenol chemistry. Prevent Med 21: 334-350. 1992
16. Lin JK. Cancer Chemoprevention by tea polyphenols through modulating signal transduction pathways. Arch Pharm Res 25: 561-571. 2002
17. Gupta S, Hussain T, Mukhtar H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin -3-gallate-induced cells cycle arrest and apoptosis of humanprostate carcinoma cells. Arch Biochem Biophys. 410: 177-185. 2003
18. 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: 309-316. 2001
19. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. :An improved MTT assay. J Immunol Methods. 157: 203-207. 1993

20. 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
21. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochem Biophys Acta 1147: 132-136. 1993
22. 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
23. 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: 231-242. 2005
24. Sadzuka Y, Sugiyama T, Suzuki T, Sonobe T. Engancement of the activity of doxorubicin by inhibition of glutamate transporter. Toxicol Lett. 23: 159-167. 2001
25. 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: 64-69. 2005
26. Kasahara K, Fujiwara Y, Sugimoto Y, Nishio K, Tamura T, Matsuda T, Saijo N. :Determinants of response to the DNA topoisomerase II inhibitors doxorubicin and etoposide in human lung cancer cell lines. J Natl Cancer Inst. 84: 113-118. 1992
27. 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. 279: 28367-28374. 2004
28. 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. 11: 627-641. 2006

29. 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

30. Wetzel CC, Berberich SJ. : p53 binds to cisplatin-damaged DNA. Biochim Biophys Acta. 1517: 392-397. 2001

31. Gomez-Bougie P, Wuilleme-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. 67: 5418-5424. 2007

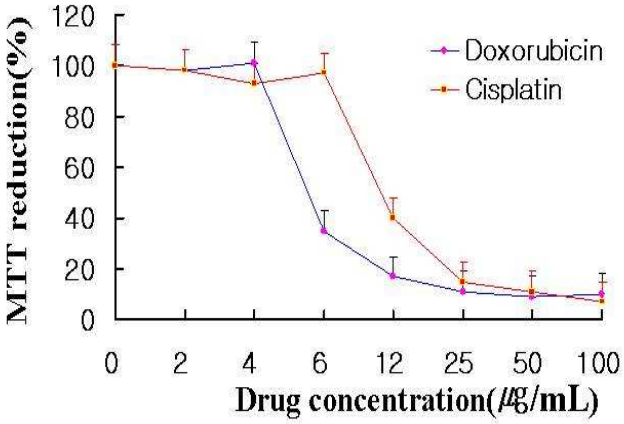

Fig.1.Effects of doxorubicin or cisplatin on MTT reduction of A549 cells.

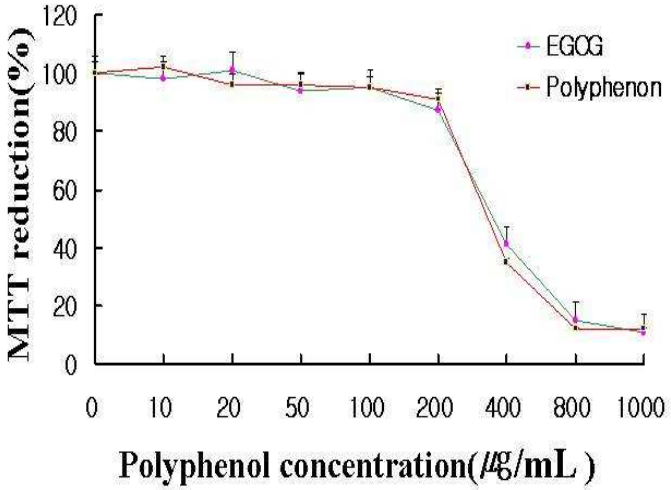

Fig.2. Effects of polyphenol on MTT reduction of A549 cells.

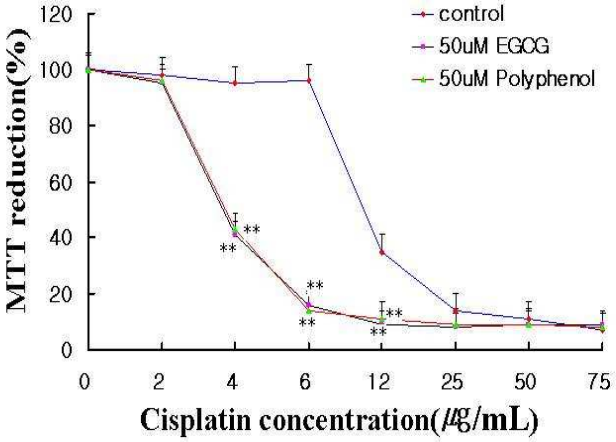

Fig.3. Effects of tea polyphenol(EGCG and polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of A549 cells. EGCG and polyphenon were added to culture media at 2 hrs before cisplatin treatment.
**:$p<0.01$ vs control

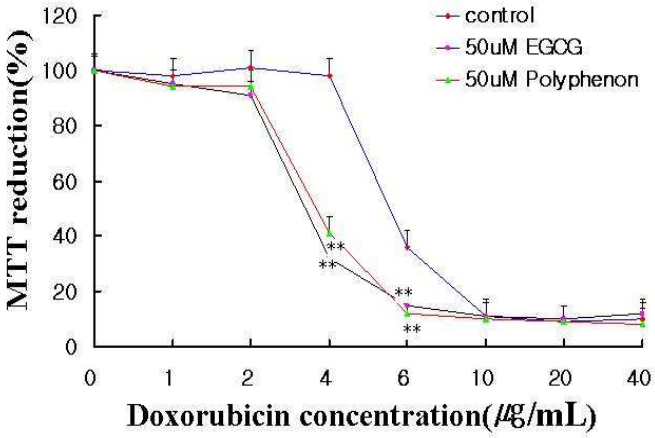

Fig.4. Effects of tea polyphenol(EGCG and polyphenon) on doxorubicin-induced cytotoxicity of A549 cells. EGCG and polyphenon were added to culture media at 2 hrs before doxorubicin treatment.
**:$p<0.01$ vs control

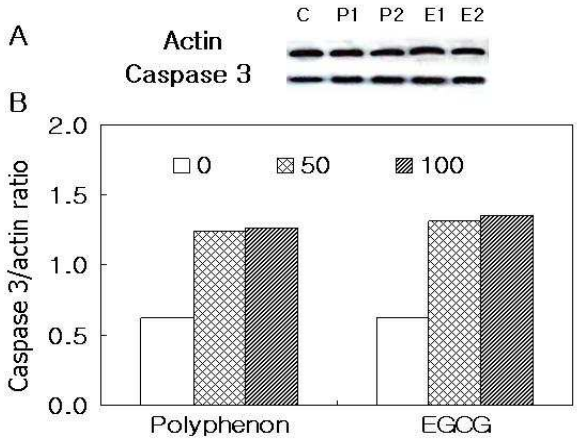

Fig.5. Effects of polyphenon and EGCG on caspase 3 expression in A549 cells. A) Caspase 3 expressions in A549 cells by western blot. B) The expression of caspase 3 relative to actin in vehicle, polyphenon, and EGCG. C, P and E are representative of control, polyphenon and EGCG, respectively. P1and P2 indicates concentration of polyphenon 50 and 100 ㎍/mL, respectively. E1and E2 indicates concentration of EGCG 50 and 100 ㎍/mL, respectively.

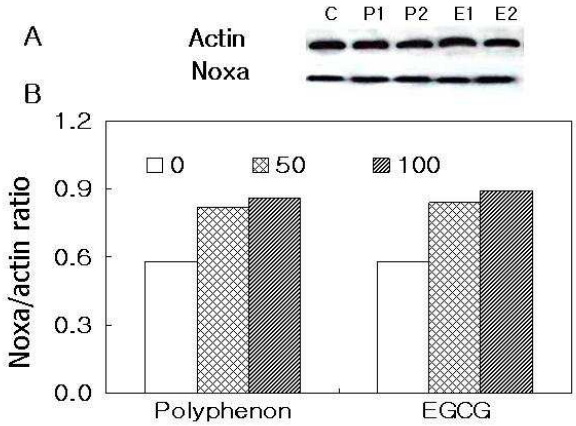

Fig.6. Effects of polyphenon and EGCG on Noxa expression in A549 cells. A) Noxa expressions in A549 cells by western blot. B) The expression of Noxa relative to actin in vehicle, polyphenon, and EGCG. C, P and E are representative of control, polyphenon and EGCG, respectively. P1and P2 indicates concentration of polyphenon, 50 and 100 ㎍/mL, respectively. E1 and E2 indicates concentration of EGCG, 50 and 100 ㎍/mL, respectively.

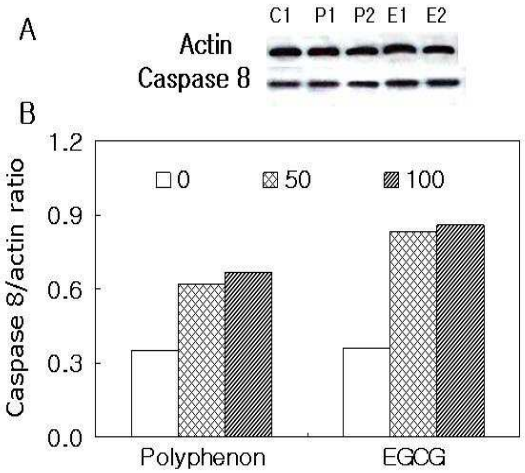

Fig.7. Effects of polyphenon and EGCG on caspase 8 expression in A549 cells. A) Caspase 8 expressions in A549 cells by western blot. B) The expression of caspase 8 relative to actin in vehicle, polyphenon, and EGCG. C, P and E are representative of control, polyphenon and EGCG, respectively. P1and P2 indicates concentration of polyphenon, 50 and 100 ㎍/mL, respectively. E1and E2 indicates concentration of EGCG, 50 and 100 ㎍/mL, respectively.

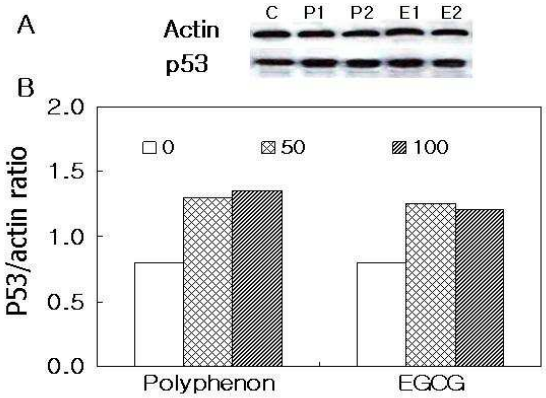

Fig.8. Effects of polyphenon and EGCG on p53 expression in A549 cells. A) Noxa expressions in A459 cells by western blot. B) The expression of p53 relative to actin in vehicle, polyphenon, and EGCG. C, P and E are representative of control, polyphenon and EGCG, respectively. P1and P2 indicates concentration of polyphenon, 50 and 100 ㎍/mL, respectively. E1and E2 indicates concentration of EGCG, 50 and 100 ㎍/mL, respectively.

저작물 이용 허락서

학 과	의	학 번	20067345	과 정	석사, 박사
성 명	한글 고기오 한문 高 箕 浯 영문 Ki-Oh Ko				
주 소	조선대학교 의과대학 생화학교실				
연락처	E-mail : koko7155@hanmail.net				
논문제목	한글: 사람 폐암 세포주에서 시스플라틴과 독소루비신의 세포독성에 미치는 녹차 폴리페놀의 영향				
	영문: The effect of green tea polyphenol on cisplatin-or doxorubicin-induced cytotoxicity in human lung 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(0) 반대( )

2008년 8 월 일

저작자: 고 기 오 (인)

조선대학교 총장 귀하