



### 저작자표시-비영리-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.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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](#)

2011年 2月  
博士學位 論文

大腸癌 細胞에서 시스플라틴의  
細胞毒性에 미치는 카테킨의 影響

朝鮮大學校 大學院

醫學科

鄭 勝 旭

大腸癌 細胞에서 시스플라틴의  
細胞毒性에 미치는 카테킨의 影響

The effect of catechin on cisplatin-induced  
cytotoxicity in colon cancer cells

2011 年 2月 25日

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

鄭 勝 旭

大腸癌 細胞에서 시스플라틴의  
細胞毒性에 미치는 카테킨의 影響

The effect of catechin on cisplatin-induced  
cytotoxicity in colon cancer cells

指導教授 李 炳 來

이 論文을 醫學博士學位申請 論文으로 提出함

2010 年 10月

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

鄭 勝 旭

# 鄭勝旭의 博士學位 論文을 認准함

委員長 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 차 종 희

委 員 朝鮮大學校 教授 이 병 래

2010 年 12 月

朝鮮大學校 大學院

# 목 차

I. 서 론 .....	1
II. 방 법 .....	3
1. 세포의 배양 .....	3
2. 시스플라틴과 카테킨 첨가 HCT116 세포 및 CT26.WT 세포활성 측정 .....	3
3. HCT116 세포에서 p53 과 caspase 8 발현량 측정 .....	4
4. Western blot 방법 .....	4
5. 생쥐에 동종이식된 대장암 성장에 미치는 시스플라틴과 카테킨 영향측정 .....	5
6. 실험결과와 분석 .....	6
III. 결 과 .....	7
1. 카테킨이 HCT116 세포의 활성화에 미치는 영향 .....	7
2. HCT116 세포에서 EGCG가 시스플라틴의 세포활성에 미치는 영향 .....	7
3. HCT116 세포에서 EGCG가 p53 및 casapase 8 유전자 발현에 미치는 영향 ....	8
4. CT26.WT 세포에서 EGCG 및 폴리페논이 시스플라틴의 세포활성에 미치는 영향 .....	8
5. 시스플라틴 및 폴리페논이 Balb/C 생쥐에 이식된 대장암조직 성장에 미치는 영향 .....	9
IV. 고 찰 .....	10
V. 결 론 .....	14
참 고 문 헌 .....	15

# 도 목 차

Fig.1. Effects of catechin on viability of human colon cancer cell line (HCT116) .....	18
Fig.2. Effects of EGCG on cisplatin-induced cytotoxicity of human colon cancer cell line(HCT116).....	19
Fig.3. Microscopy of cisplatin-treated HCT116 cells .....	20
Fig.4. Microscopy of cisplatin and EGCG-treated HCT116 cells .....	21
Fig.5. Effects of EGCG and cisplatin on P53 expression in HCT116 cells.....	22
Fig.6. Effects of EGCG and cisplatin on caspase 8 expression in HCT116 cells .....	23
Fig.7. Effects of catechin(EGCG,polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of mouse colon cancer cells(CT26.WT).....	24
Fig.8. Effects of polyphenon and cisplatin on mouse colon cancer .....	25
Fig.9. Effects of cisplatin and/or polyphenon on tumor volume of mouse .....	26

## ABSTRACT

The effect of catechin on cisplatin-induced cytotoxicity in colon cancer cells

Jeong Seung-Wook

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

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

**Objective:** Cisplatin used as a effective chemotherapeutic agents for treatment solid tumor, but clinical use of this agent limited to it's toxicity. In this study, I evaluated catechin as a biochemical modulator on the tumor suppressive effects of cisplatin in treatment of colon cancer.

**Methods:** The human colon cancer cell(HCT116) and mouse colon cancer cell(CT26.WT) lines were used. HCT116 and CT26.WT cells(ATCC) were grown 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 catechin, epigallocatechin galate(EGCG) and polyphenon(mixture of catechin) were used for these experiment. Cells were seeded at  $1 \times 10^4$



cells/well in RPMI1640 media in triplicate wells on a Nunc Lab ware 96 well flat bottom microculture plate, with or without catechin(50ug/mL) and at different concentrations of cisplatin(0–100ug/mL). The 1 day after incubation at 37° C in 5% CO<sup>2</sup>, the cells viability were determined using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay. Western blot method were employed to detect the influence of EGCG and polyphenon on the expressions of p53, and caspase 8 genes in CT26.WT cells. Influence of catechin on therapeutic efficacy of cisplatin was evaluated in Balb/c mice with CT26.WT cell inoculation. The cisplatin(5mg/kg) and polyphenon(50mg/kg) were injected intraperitoneally to CT26.WT cell-inoculated mice and tumor size measured by caliper.

**Results:** HCT116 cells viability were decreased to 62% at a 4 ug/mL concentration of cisplatin, and to 25 % above 6 ug/mL as measured by the MTT assay. However, in the co-treatment with EGCG(50ug/mL) or polyphenon(50ug/mL) the cell viability decreased to 31% at 2 ug/mL of cisplatin and to 11 % at 4 ug/mL of cisplatin in HCT116 cells.

CT26.WT cells viability were decreased to 73% at a 4 ug/mL concentration of cisplatin, but cell viability decreased to 20% and 21% at 4 ug/mL of cisplatin in EGCG(50ug/mL) or polyphenon(50ug/mL) co-treated CT26.WT cells as measured by the MTT assay. There is no apparent changes in cisplatin-induced cytotoxicity in between EGCG and polyphenon administration. The levels of p53 and caspase-8 in HCT116 cells were not changed by EGCG treatment. Tumor size of Balb/C mice was significantly decreased in cisplatin+polyphenon treatment compared with cisplatin or polyphenon treatment groups.

**Conclusion:** These experiments showed that catechin has a potentiating effect on cisplatin-induced cytotoxicity of colon cancer cells. Therefore, the catechin may be candidate for modulator for anticancer treatments with cisplatin.

**Key words:** Catechin, cisplatin, CT26.WT cell, HCT116 cell.

## 1. 서 론

항암화학요법은 수술요법과 함께 중요한 암치료 방법으로 이용되고 있으나, 수술요법보다 치료율이 낮고, 환자의 수명연장 효과가 크지 않으며, 독성 부작용이 많기 때문에 치료의 효용성에 논란이 되고 있다<sup>1)</sup>. 그러나 항암화학요법은 암의 종류나 암의 병기에 관계없이 모두 시행할 수 있고, 전이된 암이나 말기암환자에서도 광범위 화학요법제에 의한 보조요법(adjutant therapy or neoadjuvant therapy) 등으로 이용될 수 있어서 암 치료 방법으로 많이 이용되고 있다.<sup>1,2)</sup>

시스플라틴(cisplatin :cis-diammine dichloroplatinum)은 광범위 항암화학요법제로서 여러 가지 고형암의 항암치료제로 이용되고 있는데<sup>3,4)</sup>, 신장이나, 간장 및 골수세포 등에 대한 독성 부작용과 항암제에 대한 내성 암세포 출현은 항암화학요법의 장애로 대두되고 있다.<sup>5,6)</sup> 따라서 항암화학요법제의 항암효과가 충분치 않은 경우 항암효과를 상승시키기 위하여 여러 가지 항암제를 병행하여 투여하는 병합요법이나 방사선요법과 병행하는 치료법이 시도되고 있다.<sup>1,2)</sup> 또한 화학요법제의 치료효과를 증진시키고 부작용을 줄이기 위하여, 투여량을 증가시키는 고용량요법이나 리포솜 등에 약물을 포장하여 투여하는 방법 등에 대한 연구가 진행되고 있다.<sup>7,8)</sup> 그러나 화학요법제의 항암작용은 증가시키면서 독성은 최소화하여 암 치료효과가 증대될 수 있는 방법의 개발은 아직까지 미흡하다. 따라서 화학요법제의 독성작용을 최소화 하면서 암치료효과를 증가시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하며, 항암제의 항암력을 증가시키거나, 암세포의 내성을 감소시킬 수 있는 화학요법제에 대한 보조제 개발에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다. 이런 이유로 천연물에서 유래한 물질을 이용하여 노화나 암 등 여러 가지 질환의 예방 및 치료에 이용하려는 연구가 많은 관심을 받고 있다.<sup>9)</sup> 이에 녹차에 함유된 카테킨이 암의 발생과 치료에도 효과적인 작용을 한다는 많은 연구 논문이 발표되고 있다.<sup>10)</sup> 녹차 외에 함유된 카테킨은 여러 가지 종류가 있는데, 그중 epicatechin(EC),

epicatechin-3-gallate(EGC), epigallocatechin(EGC) 및 epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등 4가지 종류가 특히 많으며, 이들 중에서도 EGCG가 녹차 잎에 함유된 카테킨 중 가장 함량이 높다.<sup>11)</sup> 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.<sup>12-14)</sup>

본 연구는 광범위 항암 화학요법제인 시스플라틴의 항암작용 증강에 미치는 녹차 카테킨의 영향을 관찰하기 위하여 사람 대장암 세포(HCT116)를 배양하여 시스플라틴 및 카테킨을 병합 투여 한 후 세포생존율을 측정하여 조사하였으며, 세포자살에 관여하는 것으로 알려진 p53과 caspase 8 단백질의 양을 Western blot법에 의해서 측정하여 대장암세포에서 광범위 화학요법에 의한 암 치료에 미치는 카테킨의 영향을 측정하였다. 또한 고형암의 성장에 미치는 카테킨의 항암작용에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 생쥐 대장암세포(CT26.WT)를 이용하여 Balb/C 생쥐에서 고형암을 유발시켜 cisplatin의 항암작용에 미치는 카테킨의 영향을 관찰하였다.

## II. 방 법

### 1. 세포의 배양

본 실험에서 사용한 사람 대장암세포주인 HCT116 세포 와 생쥐 대장암세포주 CT26.WT 세포는 미국표준균주 배양수록 보존소(ATCC)에서 구매하여 실험에 사용하였다. HCT116 세포는 10% 태우혈청, 스트렙토마이신(100U/mL) 및 페니실린(100U/mL)을 함유한 RPMI 1640 배지(Gibco BRL), CT26.WT 세포는 10% 태우혈청, 스트렙토마이신(100U/mL) 및 페니실린(100U/mL)을 함유한 McCoy's 5A 배지(Gibco BRL)를 사용하였으며, 37°C로 유지되는 CO<sub>2</sub> 배양기에서 세포를 배양하였다.

### 2. 시스플라틴과 카테킨 첨가 HCT116 세포 및 CT26.WT 세포활성 측정

실험은 배양세포를 시스플라틴만 첨가한 대조군, 시스플라틴(Sigma Chemical Co, USA)과 카테킨(polyphenon 60, Cat. No : P 1204, EGCG Cat. No : E 4143, Sigma Chemical Co, USA)을 병행첨가한 군으로 나누어 실시하였다. 즉 세포배양 용기(96 well plate)의 각 웰(well)에 배양세포 2 × 10<sup>5</sup> 개씩을 넣어 1일간 배양한 후 실험을 실시하였다. 카테킨은 PBS(phosphate buffered saline)에 용해시켜 배양액에 첨가하였고, 시스플라틴은 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해시킨 후 PBS에 희석시켜 배양액에 첨가한 후, CO<sub>2</sub> 배양기에 24시간 동안 더 배양한 후, 세포활성(Cell viability)을 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)법<sup>15)</sup>으로 측정하였다. MTT법의 시행은 각 웰에 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 $\mu$ l를 첨가하여 ELISA plate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

### 3. HCT116 세포에서 p53 과 caspase 8 발현량 측정

HCT116 세포를 배양액에 카테킨을 첨가하여 배양한 후 p53 와 caspase 3 유전자 발현을 Western blot 법으로 확인하였다. 실험은 실험군을 대조군, 카테킨 및 시스플라틴 첨가군(폴리페논, EGCG, 시스플라틴) 으로 나누어 세포배양 용기(4 well plate)의 각 웰에 HCT116 세포  $2 \times 10^5$  개씩을 넣어 1일간 배양한 후 녹차 카테킨을 PBS에 희석시켜 각 웰에 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에 24시간 동안 더 배양한 후, p53 와 caspase 8 량을 Western blot 법으로 확인하였다.

### 4. Western blot 방법

배양세포에서 배지를 제거 한 후 Dulbecco's PBS로 1회 세척하고 100 $\mu$ l 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 냉각시켜서 전기영동을 시행하였다. 전기영동은 10% polyacrylamide gel에서 Tris 완충액(pH8.8, 0.025M Tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS)으로 80V로 2시간 동안 전개시켰다. 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 anti-rabbit polyclonal anti-p53 Ab, anti-caspase 3 Ab 와 anti-caspase 8 Ab(Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)를 사용하였으며, 각각의 일차 항체는 2% nonfat milk/TBS 에 희석하여 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다.

반응 후 TBS로 4회 세척하고 이차항체(horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG)는 2% nonfat milk/TBS 희석(1:2000 dilution)하여 1시간 동안 반응시킨 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. 생쥐에 동종이식된 대장암 성장에 미치는 시스플라틴과 카테킨 영향 측정

Balb/C 생쥐는 한국 실험동물센터(대전)에서 구매하여 사용하였다. 실험동물은 12시간 명암주기, 온도  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  상대습도  $60 \pm 5\%$  의 환경에서 사육하였다.

Balb/C 생쥐 등 쪽 피하에 CT26.WT 세포를 주사하여 고형암을 유발하였다. 배양한 CT26.WT 세포  $2 \times 10^5$  개를 생쥐 등 쪽에 피하주사한 후 7일간 사육하여 육안으로 암 조직이 발생한 것을 확인하였다. 암 조직의 크기가  $200\text{--}400 \text{ mm}^3$  된 생쥐를 각각 5마리씩 대조군, 시스플라틴 투여군, 카테킨 투여군 및 시스플라틴 + 카테킨 투여군으로 나누었다. 대조군에는 증류수 0.4mL, 시스플라틴 투여군은 시스플라틴 (5mg/kg), 카테킨 투여군은 폴리페논(50mg/kg), 시스플라틴 + 카테킨 투여군은 시스플라틴(5mg/kg)과 폴리페논(50mg/kg)을 복강 내로 주사하고 2일 간격으로 5회 더 주사하였으며, 암조직의 크기를 caliper로 측정하여 다음 식에 의해서 계산하였다.

$$\text{Tumor volume}(\text{mm}^3) = (\text{width}^2 \times \text{length})/2$$

## 6. 실험결과와 분석

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



### III. 결 과

#### 1. 카테킨이 HCT116 세포의 활성에 미치는 영향

HCT116 세포를 배양한 후 배양액에 EGCG나 폴리페논을 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 85, 39, 18 및 7 %로 감소되었고, 폴리페논 농도 200, 400, 800 및 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  일때 MTT 환원량은 대조군의 81, 34, 14 및 9 %로 감소되어 HCT116 세포에 대하여 EGCG와 폴리페논은 모두 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 농도에서 독성을 나타냈고, 독성의 정도도 EGCG와 폴리페논이 유사하였다(Fig. 1).

#### 2. HCT116 세포에서 EGCG가 시스플라틴의 세포활성에 미치는 영향

HCT116 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 1, 2, 4, 6, 8, 10 및 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 99, 95, 62, 25, 14, 12 및 8% 로 나타나 시스플라틴 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  첨가군 부터 세포활성이 급격히 감소되었다(Fig. 2).

HCT116 세포를 배양한 후 배양액에 EGCG를 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  되게 첨가하고 2시간 배양 후, 시스플라틴을 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 및 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량을 측정한 결과, MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 85, 31, 11, 9, 7, 8 및 9% 로 나타나 시스플라틴 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  첨가군 부터 세포활성이 급격히 감소되었다(Fig. 2). 광학현미경 사진에서도 시스플라틴 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  첨가군의 세포형태는 변형이 없었고, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  첨가군 에서 세포 형태가 변형되었으나(Fig. 3), EGCG를 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  첨가한 군에서는 시스플라틴 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  첨가군에서도 세포형태 변형이 나타났다(Fig. 4).

### 3. HCT116 세포에서 EGCG가 p53 및 casapase 8 유전자 발현에 미치는 영향

HCT116 세포를 1일간 배양한 후 배양액에 EGCG 50 $\mu$ g/mL 과 시스플라틴 2 $\mu$ g/mL 되게 첨가하여 6시간 더 배양한 후 세포를 수집하여 p53, caspase 8과 actin에 대한 Western blot을 시행하여 나타난 밴드의 밀도를 각각 p53/actin 비율로 환산한 결과 대조군 0.45, EGCG 투여군 0.47, 시스플라틴 투여군 0.51을 보여 대조군과 EGCG 및 시스플라틴 투여군 사이에 유의한 차이는 없었으며(Fig 5), caspase 8/actin 비율을 환산한 결과 역시 대조군 0.21, EGCG 투여군 0.22, 시스플라틴 투여군 0.21을 보여 대조군과 EGCG 및 시스플라틴 투여군 사이에 유의한 차이가 없었다(Fig 6).

### 4. CT26.WT 세포에서 EGCG 및 폴리페논이 시스플라틴의 세포활성에 미치는 영향

CT26.WT 세포를 배양한 후 배양액에 시스플라틴이 1, 2, 4, 6, 8, 10 및 12  $\mu$ g/mL 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 101, 98, 73, 31, 14, 14 및 9% 로 나타나 시스플라틴 4  $\mu$ g/mL 첨가군 부터 세포활성이 감소되었다(Fig. 7).

CT26.WT 세포를 배양한 후 배양액에 EGCG를 50  $\mu$ g/mL 되게 첨가하고 2시간 배양 후, 시스플라틴을 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 및 12  $\mu$ g/mL 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 환원량을 측정 한 결과 MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 93, 41, 20, 12, 8, 7 및 7% 로 나타나 시스플라틴 2  $\mu$ g/mL 첨가군 부터 세포활성이 급격히 감소되었다(Fig. 7).

CT26.WT 세포를 배양한 후 배양액에 폴리페논(50  $\mu$ g/mL)을 첨가하고 2시간 배양 후, 시스플라틴을 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 및 12  $\mu$ g/mL 되게 첨가하여 24시간 배양

한 후 MTT 환원량을 측정한 결과 MTT 환원량은 시스플라틴을 첨가하지 않은 대조군에 비하여 94, 52, 21, 12, 10, 8 및 8% 로 나타나 시스플라틴 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  첨가군부터 세포활성이 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 7).

## 5. 시스플라틴 및 폴리페논이 Balb/C 생쥐에 이식된 대장암조직 성장에 미치는 영향

CT26.WT 세포를 생쥐의 피하에 주사하여 종양크기가 200-400  $\text{mm}^3$  일때 시스플라틴과 폴리페논을 2일 간격으로 주사하면서 종양크기를 측정한 결과, 증류수를 주사한 대조군은 주사시, 1주일 후 및 2주일 후에 각각 263, 1471 및 2581  $\text{mm}^3$ 을, 폴리페논 투여군은 주사시, 1주일 후 및 2주일 후 각각 319, 1283 및 2194  $\text{mm}^3$ 을 나타내어 종양크기가 대조군은 주사당시보다 주사 1주 후 5.6배, 2주 후 9.8배로 증가되고, 폴리페논 투여군은 주사당시보다 주사 1주 후 4.0배, 2주 후 6.8배로 증가되어 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또한 시스플라틴 투여군의 종양크기도 주사시, 1주일 후 및 2주일 후 각각 263, 1180 및 1926  $\text{mm}^3$ 을 나타내어 주사당시보다 주사 1주 후 4.4배, 2주 후 7.3배로 증가되어 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 이에 반해 시스플라틴과 폴리페논 병합투여군에서는 주사시, 1주일 후 및 2주일 후에 각각 275, 657 및 782  $\text{mm}^3$ 을 나타내어 주사당시보다 주사 1주 후 2.4배, 2주 후 2.8배로 증가되어 대조군이나 시스플라틴 투여 군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. (Fig. 8,9).

## IV. 고 찰

본 실험결과 대장암세포에서 카테킨이 시스플라틴의 항암성을 증가시키는데 효과가 있는 것으로 나타났다. 플라티늄(platinum)계 제제는 항암화학요법의 도입에 중요한 역할을 한 제제로서, 자궁경부암, 대장암, 폐암 등 고형암에 대한 항암 화학요법제로 이용되고 있으나,<sup>3-5)</sup> 부작용이 많고 치료효과가 높지 않기 때문에 이를 개선할 수 있는 보완제의 개발이 필요하다. 플라티늄계 제제인 시스플라틴은 DNA 사슬사이에서 교차반응(interstrand cross linking)을 일으킴으로서 DNA 합성이나 유전자발현을 억제하여 항암작용을 한다고 알려져 있다.<sup>4)</sup>

본 실험은 광범위 항암제인 시스플라틴의 항암작용을 증가시킬 수 있는 제제개발 실험의 일환으로 카테킨을 이용하여 대장암세포에서 실험을 실시하였다. 본 실험에 사용한 폴리페논은 EGCG, ECG, EGC 및 EC 등이 혼합되어 있는 카테킨 복합물이다. 카테킨이 대장암세포에 미치는 영향을 관찰하기 위해 EGCG와 녹차 카테킨 복합물인 폴리페논을 사람 대장암세포인 HCT116 세포를 배양액에 EGCG와 폴리페논을 첨가하여 배양한 후 생존한 세포를 MTT법으로 측정된 결과 EGCG와 폴리페논 모두 200 µg/mL 이상의 농도에서 세포활성이 감소되어, EGCG와 폴리페논이 HCT116 세포에 대한 독성을 나타내는 농도가 유사하여, 항암작용이 가장 강한 것으로 알려진 EGCG와 녹차카테킨 복합물인 폴리페논 사이의 대장암세포에 대한 독성 민감도의 차이는 없는 것으로 생각된다. 광범위 항암제인 시스플라틴이 4 µg/mL 이상의 농도에서 세포활성이 감소된 것과 비교하면 EGCG와 폴리페논은 200 µg/mL 이상 농도에서 세포활성의 감소를 나타내므로 EGCG와 폴리페논의 HCT116세포에 대한 직접적인 세포독성작용은 시스플라틴에 비하면 매우 적은 것으로 생각된다.

항암제와 카테킨을 병행하여 투여한 경우 상승효과가 나타난다는 실험보고가 있는데, EGCG가 p-glycoprotein의 작용을 억제하여 항암 효과를 증가시킨다고 하였다.<sup>16)</sup> 본 실험에서 녹차 카테킨이 시스플라틴에 의한 대장암 세포독성에 미치는

영향을 알기 위하여 HCT116 세포를 배양한 후 시스플라틴과 EGCG를 배양액에 첨가한 후 세포활성을 측정하였다. EGCG 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  을 첨가하여 2시간 동안 배양한 후 시스플라틴을 0-12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  되게 첨가하여 24시간 배양한 후 세포활성도를 측정한 결과 카테킨을 투여하지 않은 대조군은 시스플라틴 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  투여시 95 %, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  투여시 62 %, 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  투여 군에서 25%를 나타냈으나, EGCG 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  첨가군의 세포활성도는 시스플라틴 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  투여시 31 %, 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  투여시 11 %, 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  투여 군에 9%를 나타내서 EGCG 첨가로 세포활성이 현저히 감소된 것을 알 수 있었다. EGCG 는 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상 투여할 경우 세포독성이 나타나기 때문에 본 실험에서 첨가한 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도는 HCT116 세포에 대한 독성을 나타낼 수 있는 농도의 1/4 이기 때문에 이는 EGCG가 시스플라틴의 작용을 증가시켜서 나타난 결과로 사료된다. Thangapazham 등<sup>17)</sup>은 녹차 카테킨이 유방암세포의 증식을 억제한다고 하였으며, Rao 등<sup>18)</sup>은 EGCG가 난소암세포나 유방암세포 등에서 세포자살을 유발하는 작용이 있고, 세포자살 유도는 EGCG의 항암작용에 중요한 역할을 한다고 하였다. 또한 Lahiry 등<sup>19)</sup>은 유방암세포를 이용한 실험에서 흉차로부터 유래한 플라빈이 p53과 caspase-8 을 증가시켜서 세포자살을 유도한다고 하였다.

본 실험에서 EGCG가 HCT116 세포 p53 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 HCT116 세포에 EGCG 첨가하여 배양한 후 p53 단백질량을 Western blot법으로 측정한 결과 대조군, EGCG 첨가군 및 시스플라틴 첨가군 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또한 EGCG를 첨가하여 배양한 HCT116 세포의 caspase-8 량은 대조군이나 시스플라틴 첨가군과 유의한 차이를 나타내지 않아서, Lahiry 등<sup>19)</sup>의 유방암세포 실험과는 다른 소견을 나타냈다. 이러한 결과로서 EGCG 가 p53이나 caspase-8등 세포 자살에 관여하는 단백질의 유도에 미치는 영향은 암세포의 종류에 따라서 감수성의 차이가 있는 것으로 추측된다.

사람 대장암세포를 배양하여 실시한 실험에서 카테킨이 시스플라틴에 의한 세포독성 작용을 증가시키는 것으로 나타났는데, 암 조직에서도 카테킨이 시스플라틴

에 의한 항암작용 증강효과가 나타나는지 알기 위해서 생쥐대장암세포인 CT26.WT 세포를 이용하여 실험을 실시하였다. CT26.WT 세포에 시스플라틴과 EGCG 또는 폴리페논을 배양액에 첨가하여 배양한 후 세포활성을 측정하였다. CT26.WT 세포의 활성도는 시스플라틴을 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  투여군 98 %, 시스플라틴 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + EGCG 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  첨가군 41 %, 시스플라틴 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 폴리페논 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  첨가군 52 %를 나타내서 EGCG나 폴리페논 첨가로 시스플라틴에 의한 세포활성이 크게 감소되어 시스플라틴의 세포독성을 증가시키는 것으로 나타났다.

CT26.WT 세포로 유도된 암 조직을 이용한 항암치료제의 효과나 독성에 관한 실험이 이루어지고 있는데, 본 실험에서 CT26.WT 세포를 같은 종(species)인 Balb/C 생쥐의 피하에 주사하여 종양을 유도하여 카테킨과 시스플라틴이 종양의 크기에 미치는 영향을 관찰하였다. 세포를 주사하고 7일 후 종양의 크기를 caliper로 측정하여 종양의 크기가 200-400  $\text{mm}^3$  되었을 때 실험을 시작하였다.

시스플라틴과 폴리페논을 2일 간격으로 복강으로 주사하면서 종양 크기를 측정한 결과, 폴리페논 투여군이나 시스플라틴 투여군은 1주 및 2주에 종양 크기가 증류수를 주사한 대조군에 비해 유의한 차이를 나타내지 않아 시스플라틴이나 폴리페논 단독 투여로 인한 종양의 성장억제작용은 크지 않은 것으로 생각된다. 세포를 배양하여 시스플라틴을 투여한 경우 세포독성이 나타났고, 시스플라틴이 여러 가지 고형암에 대한 항암작용이 있는 것으로 알려져 있으나, 본 실험에서 CT26.WT 세포를 주사하여 유도한 종양의 성장억제에 대한 효과는 크지 않은 것으로 나타났다. 그러나 폴리페논과 시스플라틴 병행투여군은 증류수를 주사한 대조군, 시스플라틴 및 폴리페논 단독 투여군에 비하여 1주 및 2주 후 종양 크기가 현저히 작아서 종양의 성장 억제작용이 큰 것으로 나타났다. 이러한 실험결과로 볼 때, 폴리페논과 시스플라틴을 단독으로 투여한 경우에는 종양의 성장억제작용은 작지만 시스플라틴과 폴리페논을 병행 투여하면 종양의 성장억제 효과가 현저히 상승되므로, 시스플라틴과 폴리페논 병행 투여시 나타나는 암 성장억제 상승효과는 폴리페

논에 의한 작용으로 생각된다.

항암화학요법에 의한 암 치료효과를 증가시키기 위하여 항암요법제의 투여량을 증가시키는 고용량 요법, 여러 가지 화학요법제를 병합시키는 병합요법 등이 시도되고 있는데,<sup>1,2)</sup> 이러한 요법의 시행은 항암제의 사용량이 증가되기 때문에 독성 부작용도 증가된다. 따라서 항암 화학요법제의 양을 증가시키지 않고 항암작용을 증가시키거나, 항암화학요법제의 부작용을 감소시키면서 항암작용은 지속 시킬 수 있는 항암치료 보조제(modulator)에 대한 개발이 요구되고 있다.

본 실험 결과로서 항암 화학요법제의 주된 치료 약물로 이용되고 있는 광범위 항암제인 시스플라틴과 폴리페논을 병합 투여할 경우 시스플라틴 단독투여 때 보다 암세포의 독성이 증가됨을 알 수 있었고, 또한 실험동물에서 고형암을 유발하여 실시한 실험에서도 유사한 결과를 나타내어 향후 대장암의 치료에 있어서 시스플라틴을 투여할 때 폴리페논을 병용 투여하면 화학요법제의 사용량을 늘리지 않고도 치료 효과를 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 폴리페논의 이러한 항암 화학요법제에 대한 항암효과 상승작용은 항암화학요법 보조제로서 이용 될 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 효과를 증명하기 위해서는 많은 연구과 임상실험이 필요 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 실험에서는 EGCG와 폴리페논이 항암화학요법제의 항암작용 증강제로서의 이용 가능성을 추정하기 위하여 광범위 항암 화학요법제인 시스플라틴의 항암작용에 미치는 영향을 사람 대장암 세포와 생쥐 대장암세포를 이용하여 관찰하였다.

1. 사람 대장암 세포인 HCT116 세포를 배양하여 EGCG 또는 폴리페논을 투여하면 시스플라틴에 의한 세포독성이 증가되었다.
2. HCT116 세포에 EGCG의 투여로 인한 p53이나 caspase-8 량 변화는 없었다.
3. 생쥐 대장암세포인 CT26.WT 세포를 배양하여 EGCG 또는 폴리페논을 투여하면 시스플라틴에 의한 세포독성이 증가되었다.
4. 생쥐에 CT26.WT 세포를 주사하여 유발된 종양의 성장이 시스플라틴과 폴리페논 병합 투여로 현저히 감소되었다.

이상의 결과로서 EGCG와 폴리페논은 화학요법제인 시스플라틴과 병합 투여할 경우 화학요법제 단독 투여시 보다 대장암 세포의 활성화 감소가 더 크고, 생쥐대장암의 크기를 감소시키므로 카테킨을 화학요법제와 병행투여하면 항암치료 효과가 증가될 것으로 생각된다. 따라서 카테킨은 항암 화학요법제에 의한 암 치료시 치료 효과를 증강시킬 수 있는 보조제로서 이용될 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 효과를 입증하기 위한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.



## VI. 참고 문헌

1. 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
2. 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
3. Crown JP. : The platinum agents: a role in breast cancer treatment? *Senmin Oncol.* 28:28-37. 2001
4. Jordan P, Carmo-Fonseca M. : Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 57: 1229-1235. 2000
5. Cersosimo RJ. : Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy. *Ann Pharmacother* 27:438-441. 1993
6. Kartalou M, Essigmann JM. : Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 478:23-43. 2001
7. Samad A, Sultana Y, Aqil M. : Liposomal drug delivery systems: an update review. *Curr Drug Deliv.* 4:297-305. 2007
8. 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
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. : Potential

- molecular targets of tea polyphenols in human tumor cells: significance in cancer prevention. *In Vivo* 16: 397–403. 2002
11. Graham HN. : Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prevent Med* 21: 334–350. 1992
  12. Lin JK. : Cancer Chemoprevention by tea polyphenols through modulating signal transduction pathways. *Arch Pharm Res* 25: 561–571. 2002
  13. 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: 177–185. 2003
  14. 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: 309–316. 2001
  15. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. : An improved MTT assay. *J Immunol Methods*. 157:203–207. 1993
  16. 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
  17. Thangapazham RL, Singh AK, Sharma A, Warren J, Gaddipati JP, Maheshwari RK. : Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 245:232–41. 2007.
  18. Rao SD, Pagidas K. : Epigallocatechin-3-gallate, a natural polyphenol, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res*. 30:2519–23. 2010

19. Lahiry L, Saha B, Chakraborty J, Adhikary A, Mohanty S, Hossain DM, Banerjee S, Das K, Sa G, Das T. : Theaflavins target Fas/caspase-8 and Akt/pBad pathways to induce apoptosis in p53-mutated human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 31:259-68. 2010.

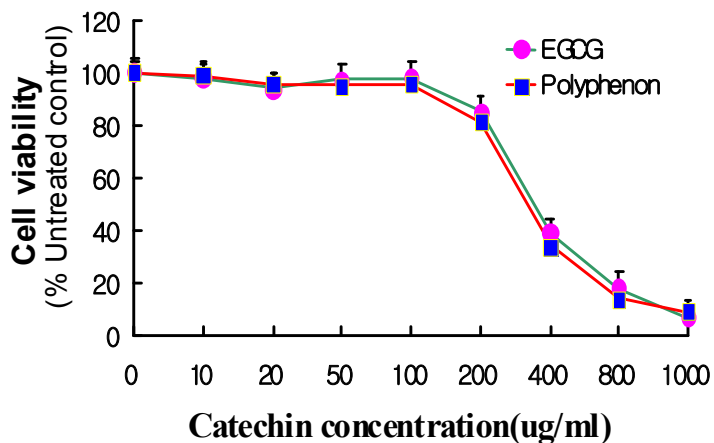


Fig.1. Effects of catechin on viability of human colon cancer cell line(HCT116). HCT116 cells were treated catechin(0–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24hours and cell viability examined by MTT assay. Values are expressed as mean $\pm$ S.D.(n=5).

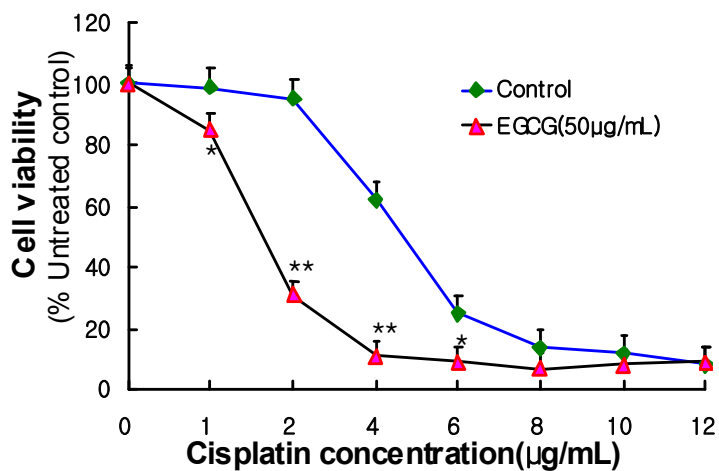


Fig.2. Effects of EGCG on cisplatin-induced cytotoxicity of human colon cancer cell line(HCT116). The cells were treated cisplatin(0–12 µg/mL) and EGCG (50 µg/mL) for 24hours and cell viability examined by MTT assay. Values are expressed as mean±S.D.(n=5). \* p<0.05, \*\* p<0.01, significantly different from the EGCG untreated controls.

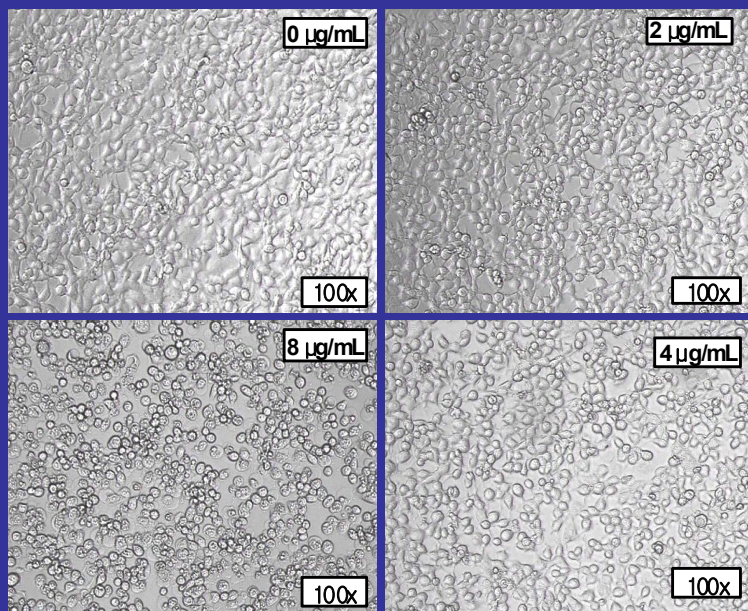


Fig.3. Microscopy of cisplatin-treated HCT116 cells. Cisplatin (0–8 µg/mL) added to culture medium for 24 hours and examined under inverted microscope.

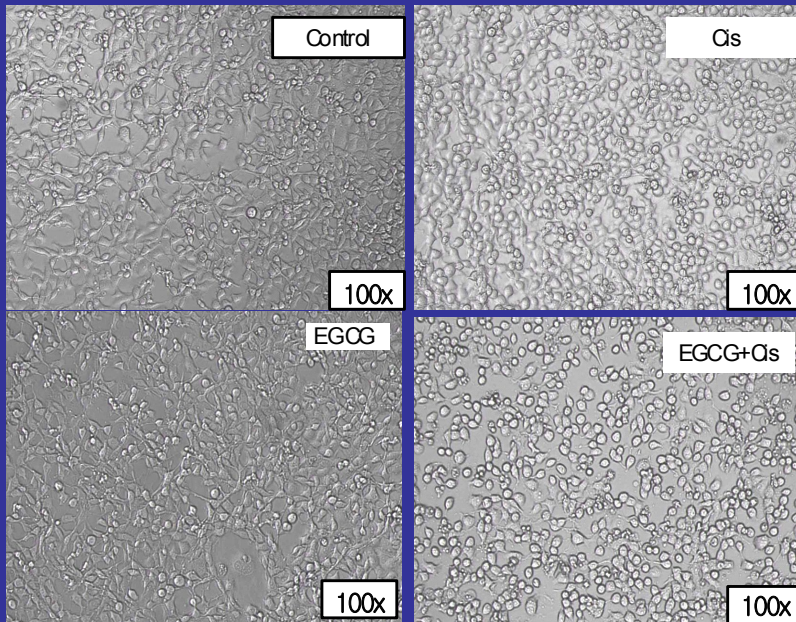


Fig.4. Microscopy of cisplatin and EGCG-treated HCT116 cells. Cisplatin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and EGCG(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) added to culture medium for 24 hours and examined under inverted microscope.

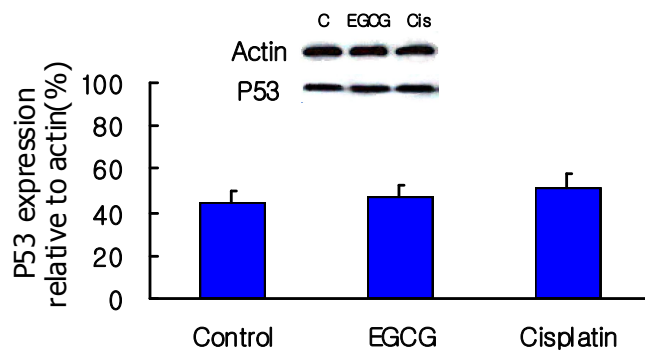


Fig.5. Effects of EGCG and cisplatin on P53 expression in HCT116 cells. Cisplatin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and EGCG(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) added to culture medium for 24 hours and p53 expression examined by western blot. The expression of p53 relative to actin in vehicle, EGCG and cisplatin are representative of EGCG and cisplatin, respectively. Values are expressed as mean $\pm$ S.D. (n=3).



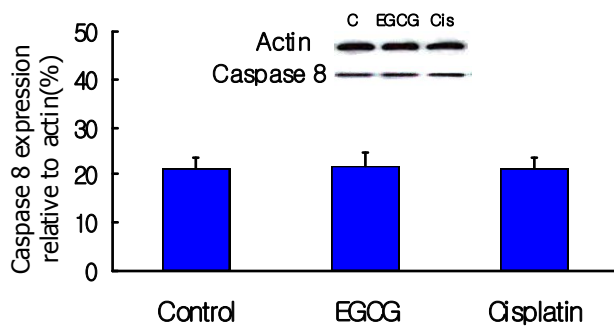


Fig.6. Effects of EGCG and cisplatin on caspase 8 expression in HCT116 cells. Cisplatin (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or EGCG(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) added to culture medium for 24 hours and p53 expression examined by western blot. The expression of caspase 8 relative to actin in vehicle, EGCG and cisplatin are representative of EGCG and cisplatin, respectively. Values are expressed as mean $\pm$ S.D.(n=3).

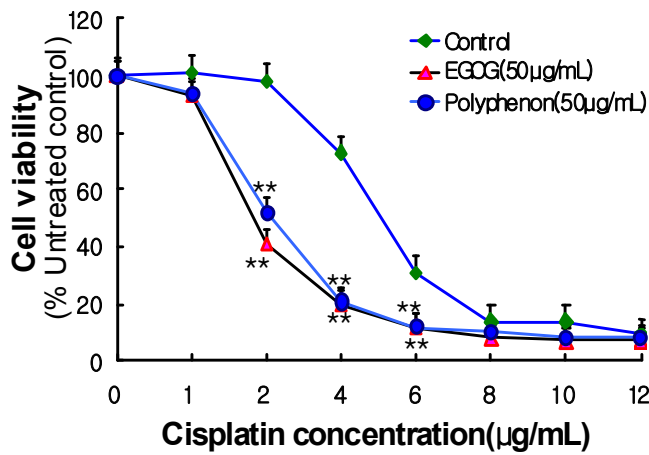


Fig.7. Effects of catechin(EGCG, polyphenon) on cisplatin-induced cytotoxicity of mouse colon cancer cells(CT26.WT). The cells were treated cisplatin (0–12 µg/mL) with EGCG (50 µg/mL) or polyphenon (50 µg/mL) for 24hours and cell viability examined by MTT assay. Values are expressed as mean±S.D.(n=5). \*\* p<0.01, significantly different from the catechin untreated controls.

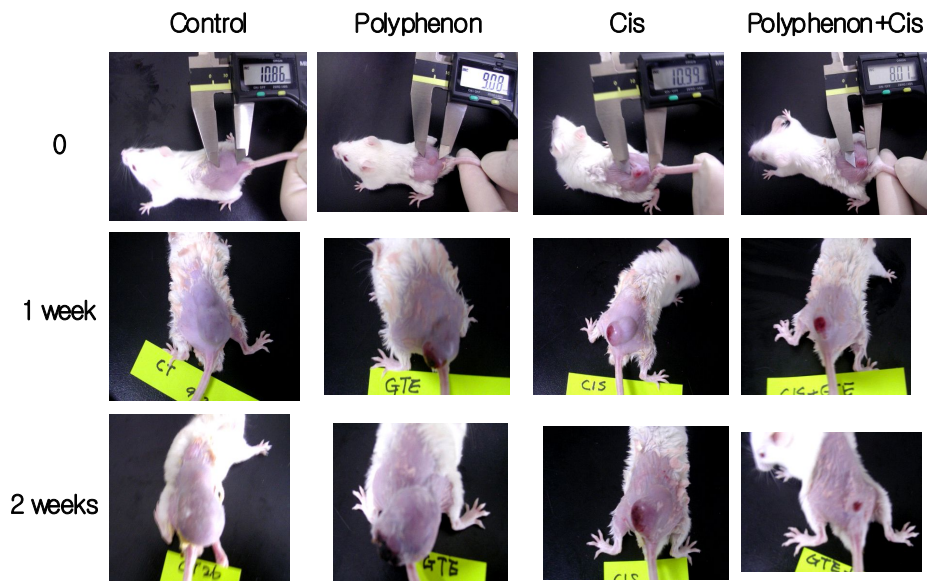


Fig.8. Effects of polyphenon and cisplatin on mouse colon cancer. CT26.WT-allografted mice were treated cisplatin(5mg/kg) and/or polyphenon(50mg/kg) with intra-peritoneal injection at every 2 days for 5 times.

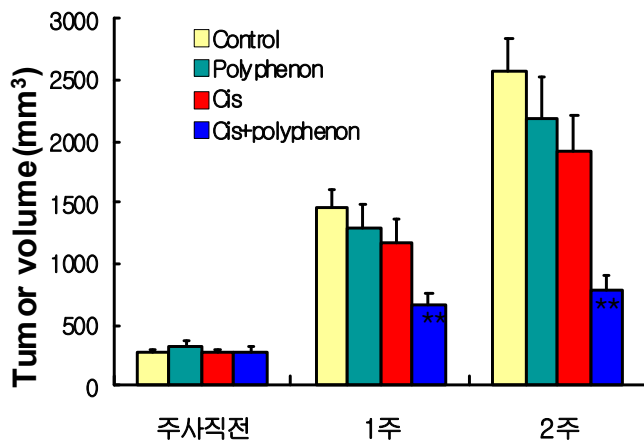


Fig.9. Effects of cisplatin and/or polyphenon on tumor volume of mouse. CT26.WT-allografted mice were treated cisplatin(5mg/kg) and/or polyphenon(50mg/kg) with intra-peritoneal injection at every 2 days for 5 times. Tumors were measured by caliper weekly and tumor volume calculated using the following formula ; Tumor volume(mm<sup>3</sup>) = [(width)<sup>2</sup> x length]/2. Values are expressed as mean±S.D.(n=5). \*\* p<0.01, significantly different from the catechin untreated controls.

