creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

[UCI]I804:24011-200000256770

2012年 2月
博士學位 論文

생쥐 乳房癌에서 폴리페놀이 독소루비신의 抗癌作用에 미치는 影響

朝鮮大學校 大學院
醫 學 科
安 鐘 培

생쥐 乳房癌에서 폴리페놀이 독소루비신의 抗癌作用에 미치는 影響

Effects of polyphenol on doxorubicin-induced anticancer activity in mouse breast cancer

2012 年 2月 24日

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

安 鐘 培

생쥐 乳房癌에서 폴리페놀이 독소루비신의 抗癌作用에 미치는 影響

Effects of polyphenol on doxorubicin-induced anticancer activity in mouse breast cancer

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

2011 年 10月

朝鮮大學校 大學院

醫 學 科

安 鐘 培

安鐘培의 博士學位 論文을 認准함

委員長	朝鮮大學校 教授	朴 榮 珍
委　員	朝鮮大學校 教授	韓 世 俊
委　員	朝鮮大學校 教授	裵 鶴 淵
委　員	朝鮮大學校 教授	朴 在 允
委　員	朝鮮大學校 教授	李 炳 來

2011 年　12 月

朝鮮大學校 大學院

목 차

Ⅰ. 서 론 1
Ⅱ. 방 법 4
1. 세포의 배양 4
2. EMT-6 세포활성 측정 4
3. EMT-6 세포의 p53 과 caspase 8 량 측정.....5
4. Western blot 방법.....5
5. EMT-6 세포에 의해 유발된 생쥐 암조직의 성장에 미치는 독소루비신과 폴리페놀의 영향측정 6
6. 실험결과의 분석.....6
Ⅲ. 결 과 8
1. EMT6 세포의 활성에 미치는 폴리페놀의 영향 8
2. EMT6 세포의 활성에 미치는 독소루비신의 영향 8
3. EMT6 세포에서 폴리페놀과 독소루비신이 세포활성에 미치는 영향 8
4. EMT6 세포에서 폴리페논과 퀘르세틴이 p53 및 casapase 8 에 미치는 영향 ..9
5. 독소루비신과 폴리페논이 Balb/C 생쥐에 이식된 유방암조직 성장에 미치는 영향 10
6. 독소루비신과 퀘르세틴이 Balb/C 생쥐에 이식된 유방암조직 성장에 미치는 영향 11
Ⅳ. 고 찰 12
Ⅴ. 결 론 17
참 고 문 헌 18

도 목 차

Fig.1. Structure of quercetin and epicatechin.....21
Fig.2. Effects of some polyphenols on the viability of mouse breast cancer cells(EMT6 cells).....22
Fig.3. Effects of doxorubicin on the viability of mice breast cancer cells(EMT6 cells).....23
Fig.4. Microscopy of doxorubicin-treated EMT6 cells 24
Fig.5. Effects of polyphenon on doxorobicin-induced cytotoxicity of EMT6 cells.....25
Fig.6. Microscopy of doxorubicin and polyphenon-treated EMT6 cells.....26
Fig.7. Microscopy of doxorubicin and quercetin-treated EMT6 cells.....27
Fig.8. Effects of polyphenon and quercetine on the level of P53 in EMT6 cells.....28
Fig.9. Effects of polyphenon and quercetine on caspase 8 levels in EMT6 cells.....29
Fig.10. Effects of polyphenon and doxorubicin on growth of breast cancer of mice.....30
Fig.11. Effects of doxorubicin and/or polyphenon on tumor volume of mice.....31
Fig.12. Effects of quercetin and doxorubicin on growth of breast cancer of mice 32
Fig.13. Effects of doxorubicin and/or quercetin on tumor volume of mice.....33

ABSTRACT

Effects of polyphenols on doxorubicin-induced anticancer activity in mouse breast cancer

Ahn, Jong-Bae

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

Department of Medicin,

Graduate School of Chosun University

Objective: Doxorubicin(DOX), as monotherapy or in combination, is widely used in the treatments of tumor, but clinical use of this agent limited to it's toxicity and drug-resistance. In this study, I evaluated some polyphenols as a modulator of doxorubicin in breast cancer cells.

Methods: The mouse breast cancer(EMT6) cell line was used. EMT-6 cells were grown in Wymouth's medium supplemented with 15% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics: 100 units/mL penicillin

and 100 μg/mL streptomycin. Polyphenols, polyphenon(POL:mixture of catechin) and quercetin(QUE), were used for these experiment. EMT6 cells were seeded in microculture plate(Nunc Lab ware, flat bottom), with polyphenols(50ug/mL) and at different concentrations of DOX(0-60ug/mL). The cells viability were determined using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay. To establish breast tumor bearing mice, EMT6 cells(1x 10^5 cells/mouse in 200uL PBS) were injected into subcutaneousely on flank of Balb/c mice. When tumor grew to 200mm^3 in volume, the mice were randomly assigned to one of the following 6 groups(5 per group): control group, DOX group, POL group, QUE group, DOX+POL group and DOX+QUE group. Breast tumor(EMT6 cells) bearing mice were treat DOX(5mg/kg), POL(50mg/kg) and QUE(50mg/kg) with intra-peritoneal injection at every 3 days for 3 times. Tumor volumes were measured by a digital caliper and calculated as follows: tumor volume(mm^3) = ($width^2$ x length)/2.

Results: EMT6 cells viability was decreased to 21 % at 40 ug/mL concentration of DOX as measured by the MTT assay. However, in the co-treatment of polyphenol(50ug/mL) and DOX the cell viability decreased to 21% by DOX+POL and to 14 % by DOX+QUE at 20 ug/mL concentration of DOX in EMT6 cells. Intra-peritoneal injection of polyphenol or DOX alone suppressed tumor growth slightly in breast tumor bearing-mice. However, combinations of DOX+POL or DOX+QUE tumor volumes were decreased to under 50% at 6 days. There is no apparent changes in doxorubicin-induced cytotoxicity between POL and QUE treatment.

Conclusion: These experiments showed that some polyphenol potentiate the DOX-induced cytotoxicity of breast cancer cells. Therefore, the polyphenol may be candidate for modulator of tumor chemotherapy with DOX.

Key words: Polyphenol, Polyphenon, Quercetin, EMT6 cell, Doxorubicin.

Ⅰ. 서 론

유방암은 여성에서 호발하는 암으로서 수술적인 요법과 화학요법으로 치료하고 있으나, 우리나라 보건복지부 중앙암등록본부의 2010년 발표자료에 따르면 유방암의 발생율은 천체 암의 7위이고, 여성에서는 2위를 차지하는 암으로서 조발생율은 인구 10만명당 51.1건 이다.[1] 암치료분야에서 화학요법은 암의 종류, 병기(stage)에 관계없이 시행할 수 있고, 전이되었거나 말기암환자에서도 시행할 수 있어서 매우 중요하다.[2]

독소루비신(doxorubicin)은 anthracyclines 계의 항생제로서 DNA에 결합하여 DNA 합성을 억제하여 세포분열을 막거나, RNA합성과 단백질합성을 억제함으로서 항암작용을 나타낸다[3]. 독소루비신은 여러 가지 고형암의 항암치료제로 이용되고 있으며, 유방암의 치료에도 일차적으로 단독 또는 복합요법 제제로 이용되고 있다.[4] 독소루비신은 심장, 신장, 간장 및 골수세포 등에 대한 독성 부작용이 크고, 독소루비신 내성암세포가 나타나서 항암제로서 사용의 제한이 있다.[5] 따라서 독소루비신의 항암효과를 증진시키고 부작용을 줄이기 위하여, 투여량을 증가시키는 고용량요법이나 리포좀등에 약물을 포장하여 투여하는 방법등에 대한 연구가 진행되고 있다.[6,7] 그러나 아직까지 화학요법제의 항암작용은 증가시키면서 독성작용은 최소화하여 암치료 효과를 높일 수 있는 방법의 개발은 미흡하다. 따라서 화학요법제의 독성작용을 감소시키고 암치료 효과를 증가시키는 보조제 개발에 대한 연구가 필요하다.

암에 대한 역학적 연구에서 음식물이 암의 발생과 관련 있다는 보고가 있으며 특히 채소류의 섭취를 증가시키면 암 발생이 감소된다는 보고가 많다.[8] 따라서 채소류나 식물에 함유된 생리활성물질이나, 천연물에서 유래한 물질을 이용하여 노화나 암등 여러 가지 질환의 예방 및 치료에 이용하려는 연구가 많은 관심을 받고 있다.[9] 식물에 함유된 플라보노이드(flavonoid), 폴리페놀(polyphenol) 또는 이들이 많이 함유된 식품을 섭취하면 암발생이 감소된다는 보고가 있다.[9,10]

폴리페놀(polyphenol)은 페놀링(phenol ring) 구조가 2개 이상인 물질로서 항산화 작용, 염증억제 작용 및 항암작용 등 여러 가지 생리활성을 나타내는 식물유래 화학물질로서 카테킨(catechin), 퀘르세틴(quercetin), 피토스테롤(phytosterol), 쿠르쿠민(curcumin), 프로안토시아니딘(proanthocyanidin) 등 여러 가지 종류가 알려져 있다.[10] 카테킨은 녹차에 다량으로 함유된 폴리페놀류로서 암의 발생과 치료에 효과적인 작용을 한다는 연구 논문이 다수 발표되어 있다.[11] 녹차 카테킨은 암을 유발하는 발암물질에 직접 작용하여 발암물질을 제거하거나 세포에 작용하여 발암물질에 의한 암의 발생과정을 차단하여 암의 발생을 예방하고, 암세포 괴사를 유도하며, 암 침투와 혈관증식을 억제하여 암의 성장이나 병의 진행을 억제시킬 수 있다고 한다.[12,13]

퀘르세틴(Qurcetin)은 양파, 딸기, 사과, 차등 식물에 들어있는 폴리페놀로서 항산화작용과 항암작용이 있는 것으로 알려져 있다.[14] 역학적 조사에서 퀘르세틴은 암의 발생을 억제하며, 항암제 내성을 나타내는 P-glycoprotein의 기능을 억제하여 항암작용을 증강시키는 것으로 알려져 있다.[15]

본 연구는 광범위 항암 화학요법제인 독소루비신의 항암작용 증강에 미치는 폴리페놀의 영향을 관찰하기 위하여 생쥐 유방암 세포(EMT6 cell)를 배양하여 독소루비신 및 폴리페놀을 병합 투여 한 후 세포생존율을 측정하였다. 본 연구에서 폴리페놀은 녹차에 추출한 카테킨 복합물인 폴리페논과 양파에서 추출한 퀘르세틴을 사용하였는데, 퀘르세틴은 카테킨의 한 종류인 epicatechin(EC) 과 구조적으로 매우 유사한 구조를 가진 폴리페놀 종류이다. 또한 고형암의 성장에 미치는 카테킨의 항암작용에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 생쥐 유방암세포를 이용하여 Balb/C 생쥐에서 고형암을 유발시킨 후 암조직의 성장에 미치는 독소루비신과 폴리페놀의 영향을 관찰하였다.

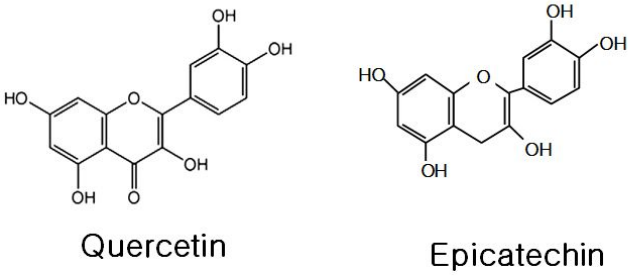

Fig.1. Structure of quercetin and epicatechin.

Ⅱ. 방 법

1. 세포의 배양

본 실험에서 사용한 생쥐 유방암세포(EMT6 cells)는 미국표준균주 배양수록 보존소(ATCC)에서 구매하여 실험에 사용하였다. EMT6 세포는 10% 태우혈청, 스트렙토마이신(100U/mL) 및 페니실린(100U/mL)을 함유한 Wymouths 배지(Gibco BRL)를 사용하였으며, 5% CO_2, 37℃ 조건에서 세포를 배양하였다.

2. EMT-6 세포활성 측정

실험은 배양세포를 대조군, 독소루비신(Sigma Chemical Co, USA)군, 폴리페놀군 폴리페놀+독소루비신군 으로 나누어 실험하였다. 실험에 사용한 폴리페놀은 카테킨복합물인 폴리페논(polyphenon 60, Sigma Chemical Co, USA)과 퀘르세틴(quercetin hydrate, Sigma Chemical Co, USA)이었다.

세포활성 실험은 배양세포를 세포배양 용기(96 well plate: 2 × 10^5/cells/well)에 넣어 24시간 배양한 후 실험을 실시하였다. 폴리페논과 독소루비신은 PBS(phosphate buffered saline)에 용해시켜 배양액에 첨가하였고, 퀘르세틴은 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해시킨 후 PBS에 희석시켜 배양액에 첨가한 후, CO_2 배양기에 24시간 동안 더 배양한 후 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)법[16]으로 세포활성을 측정하였다. MTT법은 각 웰에 MTT 최종농도가 1 mM이 되게 첨가하여 4 시간동안 배양시킨 후 배양액을 제거하고 PBS로 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 측정하였다. 실험은 각 실험군마다 3 웰의 흡광도를 각각 측정하여 평균값을 계산하였고, 3회 반복 실험을 실시하여 유의성을 판정하였다.

3. EMT-6 세포의 p53 과 caspase 8 량 측정

EMT6 세포를 배양액에 폴리페놀을 첨가하여 배양한 후 p53 과 caspase 8 량을 Western blot 법으로 측정하였다. 실험군을 대조군, 폴리페논군 및 퀘르세틴군 으로 나누어 세포배양 용기(4 well plate)의 각 웰에 EMT-6 세포 2 × 10^5 개씩을 넣어 24시간 배양한 후 폴리페논은 PBS에 용해시켜 각 웰에 첨가하고, 퀘르세틴은 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해시킨 후 PBS에 희석시켜 배양액에 첨가한 후, CO_2 배양기에 24시간 동안 더 배양한 후, 세포내 p53 와 caspase 8 량을 Western blot 법으로 확인하였다.

4. Western blot 방법

배양세포에서 배지를 제거 한 후 Dulbecco's PBS로 2회 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 냉각시켜서 상층액을 모아 전기영동시료로 사용하였다. 전기영동은 10% polyacrylamide gel에서 Tris 완충액(pH8.8, 0.025M Tris, 0.192M glycine, 0.1% SDS)으로 80V로 2시간 동안 전개 시켰다. 전개된 gel은 분리하여 nitrocellulose(NC) membrane을 얹어서 transfer buffer(25mM Tris, 192mM glycine, 20% methanol)에서 20V로 12시간동안 transfer 하였다. 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 와 anti-caspase 8 Ab(Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)를 사용하였으며, 각각의 일차 항체는 2% nonfat milk/TBS 에 희석하여 4℃에서 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 반응 시킨 후 TBS로 4

회 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. EMT-6 세포에 의해 유발된 생쥐 암조직의 성장에 미치는 독소루비신과 폴리페놀의 영향측정

Balb/C 생쥐는 한국 실험동물센터(대전)에서 구매하여 사용하였다. 실험동물은 12시간 명암주기, 온도 20± 2℃ 상대습도 60± 5% 의 환경에서 사육하였다.
Balb/C 생쥐 등쪽 피하에 EMT6 세포를 주사하여 고형암을 유발하였다. 배양한 EMT-6 세포 2×10^5 개를 생쥐 등쪽에 피하주사한 후 7일간 사육하여 육안으로 암조직이 발생한 것을 확인하였다. 암조직을 caliper로 측정하여 크기가 200-400 mm^3 된 생쥐를 각각 5마리씩 대조군, 독소루비신 투여군, 폴리페논 투여군, 퀘르세틴 투여군, 독소루비신+폴리페논 투여군 및 독소루비신+퀘르세틴 투여군으로 나누었다. 대조군에는 증류수 0.3 mL, 시스플라틴 투여군은 독소루비신(5 mg/kg), 폴리페논 투여군은 폴리페논(50 mg/kg), 퀘르세틴 투여군은 궤르세틴(50 mg/kg), 독소루비신+폴리페논 투여군은 독소루비신(5 mg/kg)과 폴리페논(50 mg/kg), 독소루비신+퀘르세틴 투여군은 독소루비신(5 mg/kg)과 퀘르세틴(50 mg/kg)을 복강내로 주사하고 3일 간격으로 4회 더 주사하였으며, 암조직의 크기는 1주일 간격으로 측정하였다. 암조직의 크기는 측정값을 다음 식에 의해서 계산하였다.

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

6. 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. EMT6 세포의 활성에 미치는 폴리페놀의 영향

EMT6 세포를 배양한 후 배양액에 폴리페놀과 퀘르세틴을 각각 0, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 및 500 ㎍/mL 되게 첨가하여 배양한 후 세포활성을 측정한 결과 폴리페놀 농도 50, 100, 200 및 300 ㎍/mL 일때 MTT 환원량은 대조군의 95, 96, 81 및 34 %로 감소되었다. 퀘르세틴 농도 50, 100, 200 및 300 ㎍/mL 일때 MTT 환원량은 대조군의 97, 81, 31 및 12 %로 감소되어 EMT6 세포에 대하여 폴리페놀은 300 ㎍/mL 이상의 농도, 퀘르세틴은 200 ㎍/mL 이상의 농도에서 세포활성이 현저히 감소되어 독성이 나타남을 알 수 있다(Fig. 2).

2. EMT6 세포의 활성에 미치는 독소루비신의 영향

EMT6 세포를 배양한 후 배양액에 독소루비신을 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 및 60 μM 되게 첨가하여 배양한 후 세포활성을 측정한 결과 독소루비신 농도 15, 20, 25, 30, 40 및 50 μM 일때 MTT 환원량은 대조군의 97, 93, 81, 61, 15 및 8 %로 감소되어 EMT6 세포에 대하여 독소루비신은 25 μM 이상의 농도에서 세포활성이 현저히 감소되어 독성이 나타남을 알 수 있다(Fig. 3). 또한 독소루비신을 20, 30 및 50μM 첨가하여 24시간 배양한 EMT6 세포를 현미경으로 관찰 결과 독소루비신 30μM 과 50μM 첨가하여 배양한 세포의 형태가 변화되고 세포수가 감소되어 세포가 사멸되는 것으로 나타났다(Fig. 4).

3. EMT6 세포에서 폴리페놀과 독소루비신이 세포활성에 미치는 영향

EMT6 세포를 배양한 후 배양액에 독소루비신을 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 및 60 μM 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 법으로 세포활성을 측정한 결

과 독소루비신 10, 15, 20, 25, 30, 40 및 50 μM 첨가군의 세포활성은 독소루비신을 첨가하지 않은 대조군의 99, 97, 93, 75, 67, 11 및 9% 로 나타나 독소루비신 25 μM 이상 첨가군에서 세포활성이 감소되었다(Fig. 5).

EMT6 세포를 배양한 후 배양액에 폴리페논을 50 ㎍/mL 되게 첨가하고 2시간 배양 후, 독소루비신을 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 및 60 μM 되게 첨가하여 24 시간 배양한 후 MTT 법으로 세포활성을 측정한 결과 독소루비신 10, 15, 20, 25, 30, 40 및 50 μM 첨가군의 세포활성은 독소루비신을 첨가하지 않은 대조군의 97, 78, 21, 11, 8, 9 및 8% 로 나타나 독소루비신 15 μM 이상 첨가군에서 세포활성이 감소되었다(Fig. 5).

EMT6 세포를 배양한 후 배양액에 퀘르세틴을 50 ㎍/mL 되게 첨가하고 2시간 배양 후, 독소루비신을 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 및 60 μM 되게 첨가하여 24 시간 배양한 후 MTT 법으로 세포활성을 측정한 결과 독소루비신 10, 15, 20, 25, 30, 40 및 50 μM 첨가군의 세포활성은 독소루비신을 첨가하지 않은 대조군의 98, 74, 14, 9, 9, 8 및 9% 로 나타나 독소루비신 15 μM 이상 첨가군에서 세포활성이 감소되었다(Fig. 5).

광학현미경 사진에서도 독소루비신 20 μM 첨가군과 폴리페논 50 ㎍/mL 첨가군 의 세포형태는 대조군과 차이가 없었으나, 독소루비신 20 μM + 폴리페논 50 ㎍/mL 첨가군의 세포형태는 변형되고 세포수가 감소되어 세포독성이 나타남을 알 수 있다.(Fig. 6). 또한 퀘르세틴을 첨가한 군에서도 독소루비신 20 μM 첨가군과 퀘르세틴 50 ㎍/mL 첨가군 의 세포형태는 대조군과 차이가 없었으나, 독소루비신 20 μM + 퀘르세틴 50 ㎍/mL 첨가군의 세포형태는 변형되고 세포수가 감소되어 세포독성이 나타남을 알수 있다.(Fig. 7).

4. EMT6 세포에서 폴리페논과 퀘르세틴이 p53 및 casapase 8 에 미치는 영향

EMT6 세포를 1일간 배양한 후 배양액에 폴리페논 50㎍/mL 과 퀘르세틴 50㎍/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 0.15, 폴리페논군 0.17, 퀘르세틴군 0.18로 대조군과 폴리페논군 및 퀘르세틴군 사이에 유의한 차이가 없었고(Fig.8), caspase 8/actin 비율을 환산한 결과 대조군 0.21, EGCG 투여군 0. 19, 시스플라틴 투여군 0.22로 대조군과 폴리페논군 및 퀘르세틴군 사이에 유의한 차이가 없었다(Fig.9).

5. 독소루비신과 폴리페논이 Balb/C 생쥐에 이식된 유방암조직 성장에 미치는 영향

유방암세포(EMT6 cell)를 Balb/c 생쥐의 등에 피하주사하여 종양크기가 200-400 mm^3 일때 독소루비신(5mg/kg)과 폴리페논(50mg/kg)을 3일 간격으로 주사하면서 종양크기를 측정하였다. 증류수를 주사한 대조군의 종양크기는 주사시, 6일 후 및 12 일 후에 각각 214, 802 및 1627 mm^3를, 폴리페논 투여군은 주사시, 6일 후 및 12일 후 각각 257, 812 및 1497 mm^3를, 독소루비신 투여군은 주사시, 6일 후 및 12 일 후 각각 238, 724 및 1375 mm^3를 나타내서 종양크기가 대조군은 주사당시보다 주사 6일 후 3.7배. 12일 후 7.6배로 증가되었다. 폴리페논 투여군은 주사당시보다 주사 6일 후 3.1배. 12일 후 5.8배로 증가되었고, 독소루비신 투여군은 주사당시보다 주사 6일 후 3.0배. 12일 후 5.7배로 증가되어 주사후 6일째까지는 대조군, 폴리페논 투여군및 독소루비신 투여군사이에 유의한 차이가 없었다. 주사 12일 경과시 대조군에 비하여 폴리페논 투여군과 독소루비신 투여군에서 유의하게 종양의 크기가 감소되었다. 또한 독소루비신과 폴리페논 복합 투여군의 종양크기는 주사시, 6일 후 및 12일 후 각각 281, 634 및 897 mm^3를 나타내서 주사당시보다 주사 6일 후 2.2배. 12일 후 3.2배로 증가되어 대조군, 폴리페논 투여군 및 독소루비신 투여군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다. (Fig.10,11).

6. 독소루비신과 퀘르세틴이 Balb/C 생쥐에 이식된 유방암조직 성장에 미치는 영향

유방암세포(EMT6 cell)를 Balb/c 생쥐의 등에 피하주사하여 종양크기가 200-400 mm^3 일때 독소루비신(5mg/kg)과 퀘르세틴(50mg/kg)을 3일 간격으로 주사하면서 종양크기를 측정하였다. 증류수를 주사한 대조군의 종양크기는 주사시, 6일 후 및 12 일 후에 각각 214, 802 및 1627 mm^3를, 퀘르세틴 투여군은 주사시, 6일 후 및 12일 후 각각 255, 756 및 1512 mm^3를, 독소루비신 투여군은 주사시, 6일 후 및 12 일 후 각각 238, 724 및 1375 mm^3를 나타내서 종양크기가 대조군은 주사당시보다 주사 6일 후 3.7배. 12일 후 7.6배로 증가되었다. 퀘르세틴 투여군은 주사당시보다 주사 6일 후 3.0배. 12일 후 5.9배로 증가되었고, 독소루비신 투여군은 주사당시보다 주사 6일 후 3.0배. 12일 후 5.7배로 증가되어 주사후 6일째까지는 대조군, 폴리페논 투여군및 독소루비신 투여군사이에 유의한 차이가 없었으나, 주사 12일 경과시 대조군에 비하여 폴리페논 투여군과 독소루비신 투여군에서 유의하게 종양의 크기가 감소되었다. 또한 독소루비신과 퀘르세틴 복합 투여군의 종양크기는 주사시, 6일 후 및 12일 후 각각 254, 654 및 876 mm^3를 나타내서 주사당시보다 주사 6일 후 2.5배. 12일 후 3.4배로 증가되어 독소루비신과 퀘르세틴 복합 투여군의 종양크기는 대조군, 퀘르세틴 투여군 및 독소루비신 투여군에 비하여 유의한 감소를 나타냈다. (Fig. 12,13).

Ⅳ. 고 찰

본 실험은 광범위 항암제 독소루비신의 항암작용을 증가시킬 수 있는 제제 개발 실험의 일환으로 생쥐 유방암세포에서 녹차에서 추출한 폴리페놀인 카테킨 혼합물인 폴리페논과 양파에서 추출한 폴리페놀인 퀘르세틴이 독소루비신의 항암성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 녹차잎에 함유된 카테킨은 폴리페놀의 종류로서 epicatechin(EC), epicatechin-3-gallate(ECG), epigallocatechin(EGC) 및 epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등이 함유되어 있는데,[12] 본 실험에 사용한 폴리페논은 EGCG, ECG, EGC 및 EC 등이 혼합되어 있는 카테킨 복합물이다. 카테킨이 여러 가지 암세포에 대한 항암작용이 있는 것으로 알려져 있어서[11-13] 본 실험에서 배양한 유방암세포에 미치는 폴리페놀의 영향을 관찰하기위해 폴리페논과 퀘르세틴을 생쥐유방암세포인 EMT6 세포를 배양하여 배양액에 폴리페논을 첨가하여 생존한 세포를 MTT법으로 측정한 결과 폴리페논 200 ㎍/mL 이상의 농도에서 세포활성이 감소되었고, 퀘르세틴은 100 ㎍/mL 이상의 농도에서 세포활성이 감소되어 EMT6 세포에 대한 독성은 퀘르세틴이 더 강한 것으로 생각된다. 광범위 항암제 독소루비신은 유방암, 임프종, 폐암, 방광암, 위암 및 난소암등 여러 가지 암의 치료에 이용되고 있는데, 본 실험에서 유방암세포인 EMT6 세포를 배양하여 배양액에 독소루비신을 첨가하여 생존한 세포를 MTT법으로 측정한 결과 독소루비신 25 μM 이상의 농도에서 세포활성이 감소되어 독소루비신 독성이 나타나는 것으로 생각된다.

항암제와 카테킨을 병행하면 항암작용이 상승된다는 실험보고가 있는데, EGCG는 암세포의 항암제 내성에 관여하는 p-glycoprotein의 작용을 억제하여 항암 효과를 증가시킨다고 하였다.[17] 또한 카테킨은 암세포의 성장을 억제하고, 혈관신생을 억제하며, 세포자자살을 유발하여 항암작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다.[18,19] 퀘르세틴은 세포의 성장 억제, 세포주기 정지, 세포성장에 필요한 신호전달 억제 및 세포자살유도 등에 의해서 항암작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.[20]

본 실험에서 폴리페놀인 카테킨과 퀘르세틴이 독소루비신에 의한 유방암 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 EMT6 세포를 배양한 후 독소루비신과 폴리페놀을 배양액에 첨가한 후 세포활성을 측정하였다. 폴리페논과 퀘르세틴을 각각 50 ㎍/mL 을 첨가하여 2시간 동안 배양한 후 독소루비신 0-60 ㎍/mL 되게 첨가하여 24시간 배양한 후 세포활성도를 측정한 결과 독소루비신 10 ㎍/mL 첨가군 99 %, 15 ㎍/mL 첨가군 97 %, 20 ㎍/mL 첨가군 93 %, 25 ㎍/mL 투여군에서 75%를 나타내서 독소루비신에 의한 세포독성은 독소루비신 단독첨가의 경우 독소루비신 25 ㎍/mL 첨가군부터 세포활성이 감소되었다. 폴리페논 50 ㎍/mL 첨가군의 세포활성도는 독소루비신 10 ㎍/mL 첨가군 97 %, 15 ㎍/mL 첨가군 78 %, 20 ㎍/mL 첨가군 21 %, 25 ㎍/mL 투여군에서 11%를 나타냈고, 퀘르세틴 50 ㎍/mL 첨가군의 세포활성도는 독소루비신 10 ㎍/mL 첨가군 98 %, 15 ㎍/mL 첨가군 74 %, 20 ㎍/mL 첨가군 14 %, 25 ㎍/mL 투여군에서 9%를 나타내서 폴리페논이나 퀘르세틴 첨가군에서는 모두 독소루비신 15 ㎍/mL 첨가군부터 세포활성이 감소되어 폴리페논이나 퀘르세틴 첨가로 독소루비신을 단독으로 첨가한 군보다 세포활성도가 감소되어 세포독성이 증가되는 것으로 나타났다. 본 실험에서 첨가한 폴리페놀의 농도 50 ㎍/mL 는 EMT6 세포에 대한 독성이 나타나는 폴리페논 농도의 1/4, 퀘르세틴 농도의 1/2 이기 때문에 이들 폴리페놀에 의한 독소루비신 세포독성의 증가는 폴리페놀이 독소루비신의 세포독성작용을 증가시켜서 나타난 결과로 생각된다.

Thangapazham 등[21]은 녹차 카테킨이 유방암세포의 증식을 억제한다고 하였고, Rao 등[18]은 EGCG가 난소암세포나 유방암세포 등에서 세포자살을 유발하는 작용이 있어서, 세포자살 유도는 EGCG의 항암작용에 중요한 역할을 한다고 하였다. 본 실험에서 폴리페놀이 세포자살에 관여하는 p53 과 caspase 8 에 미치는 영향을 관찰하기 위해 EMT6 세포에 폴리페놀을 첨가하여 배양한 후 p53과 caspase 8 단백질량을 Western blot법으로 측정한 결과 대조군, 폴리페논 첨가군 및 퀘르세틴 첨가군 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다. Lahiry 등[19]은 EGCG 가 p53이나 caspase-8 를 유도하여 암세포 자살을 유도한다고 하였는데, 본 실험결과는 폴리

페논이나 퀘르세틴이 모두 p53이나 caspase-8 량에 미치는 영향이 적은 것으로 나타나서 암세포의 종류에 따라서 폴리페놀에 대한 감수성의 차이가 있는 것으로 추측된다.

이상의 세포배양 실험에서 폴리페논과 퀘르세틴은 독소루비신에 의한 세포독성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났는데, 퀘르세틴은 카테킨의 한 종류인 EC 와 구조적으로 매우 유사한 구조를 가진 폴리페놀 종류이다.

독소루비신의 암세포에 대한 폴리페놀의 항암작용 증강효과가 암 조직에서도 나타나는지는 확인하기 위하여 암조직을 유도하여 고형암에 대한 실험을 실시하였다. Balb/c 생쥐에서 유래한 유방암세포인 EMT6 세포를 배양하여 Balb/C 생쥐의 피하에 주사하여 종양을 유도하고 폴리페놀과 독소루비신의 영향을 종양 크기를 측정하여 비교 관찰하였다. EMT6 세포를 주사하고 종양의 크기를 측정하여 종양의 크기가 200-400 mm^3 되었을 때 실험을 시작하였다. 독소루비신(5mg/kg)과 폴리페논(50mg/kg)을 3일 간격으로 복강에 주사하여 종양크기를 측정한 결과, 폴리페논 투여군이나 독소루비신투여군은 6일째에 종양 크기가 증류수를 주사한 대조군 유의한 차이를 나타내지 않았다. 주사 12일째에 폴리페논 투여군이나 독소루비신투여군 모두 증류수를 주사한 대조군에 비하여 종양의 크기가 유의하게 작았으며, 폴리페논 투여군과 독소루비신투여군사이의 유의한 차이를 나타내지는 않아서 독소루비신이나 폴리페논 단독투여로 인한 EMT6 종양조직의 성장억제작용은 크지 않은 것으로 생각된다. 세포를 배양하여 독소루비신 투여한 경우 세포독성이 나타났으나, 본 실험에서 EMT6 세포로 유도한 종양조직의 성장에 대한 억제효과는 크지 않은 것으로 나타났다. 그러나 폴리페논과 독소루비신 병합투여군은 증류수를 주사한 대조군, 독소루비신 및 폴리페논 단독 투여 군에 비하여 6일 및 12일 후 종양 크기가 현저히 작아서 독소루비신과 폴리페논 병합투여는 종양조직의 성장을 억제하는 작용이 큰 것으로 나타났다. 또한 독소루비신(5mg/kg)과 퀘르세틴(50mg/kg)을 3일 간격으로 복강에 주사하여 종양크기를 측정한 결과, 퀘르세틴 투여군이나 독소루비신투여군은 6일후에 종양 크기가 증류수를 주사한 대조군 유의

한 차이를 나타내지 않았고, 12일째에는 퀘르세틴 투여군이나 독소루비신투여군 모두 증류수를 주사한 대조군에 비하여 유의하게 감소되었으며, 퀘르세틴 투여군과 독소루비신투여군사이의 유의한 차이를 나타내지는 않아서 독소루비신이나 퀘르세틴 단독투여로 인한 EMT6 종양조직의 성장억제작용은 크지 않은 것으로 생각된다. 세포를 배양하여 독소루비신 투여한 경우 세포독성이 나타났으나, 본 실험에서 EMT6 세포로 유도한 종양조직의 성장에 대한 억제효과는 크지 않은 것으로 나타났다. 그러나 퀘르세틴과 독소루비신 병합투여군은 증류수를 주사한 대조군, 독소루비신 및 퀘르세틴 단독 투여군에 비하여 6일 및 12일 후 종양 크기가 현저히 작아서 독소루비신과 퀘르세틴 병합투여는 종양조직의 성장을 억제하는 작용이 큰 것으로 나타났다. 이러한 실험결과로 폴리페논, 퀘르세틴 및 독소루비신을 단독으로 투여한 경우에는 종양조직의 성장억제작용이 작지만, 독소루비신과 폴리페논 또는 퀘르세틴을 병행 투여하면 종양의 성장억제 효과가 현저히 상승되므로, 폴리페논이나 퀘르세틴이 독소루비신의 암조직 성장 억제에 대한 상승효과가 있는 것으로 생각된다.

항암 화학요법제에 의한 암치료효과를 증가시키기 위하여 항암제의 투여량을 증가시키거나, 여러 가지 화학요법제를 병합시키는 요법 등이 시도되고 있는데,[5,6] 이러한 방법은 항암제의 절대적인 사용량이 증가되어 그에 따른 부작용도 증가된다. 따라서 항암 화학요법제의 양을 증가시키지 않고, 부작용을 최소화 하면서 항암작용은 지속 시킬 수 있는 항암치료제나 치료 보조제(modulator)에 대한 개발이 필요하다. 본 실험 결과로서 항암 화학 요법제의 주된 약물로 이용되고 있는 광범위 항암제인 독소루비신과 폴리페놀을 병합 투여할 경우 항암제 단독투여 때 보다 암세포의 독성이 증가됨을 알 수 있고, 또한 실험동물에서 유발된 고형암 실험에서도 암조직의 성장을 억제하는 유사한 결과를 나타내어 향후 유방암 치료에서 독소루비신 화학요법제로 선택할 경우 폴리페놀을 병용하면 화학요법제의 사용량을 늘리지 않고도 치료 효과를 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다. 폴리페놀의 이러한 항암 화학요법제에 대한 항암작용 상승효과는 항암화학요법 보조제로서 이용

될 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 효과를 증명하기위해서는 연구과 임상실험이 필요 할 것으로 사료된다.

V. 결　　론

본 실험은 폴리페논과 퀘르세틴이 항암화학요법제의 항암작용 증강제로서의 이용가능성을 추정하기 위하여 항암 화학요법제인 독소루비신의 항암작용에 미치는 영향을 생쥐 유방암세포와 이를 이용하여 유발된 암조직을 이용하여 관찰하였다.

1. 생쥐유방암 세포(EMT6 cells)를 배양하여 독소루비신과 폴리페논을 투여하면 독소루비신의 세포독성이 증가되었다.
2. 생쥐유방암 세포(EMT6 cells)를 배양하여 독소루비신과 퀘르세틴을 투여하면 독소루비신의 세포독성이 증가되었다.
3. 생쥐유방암 세포(EMT6 cells)에 폴리페논이나 퀘르세틴 첨가로 인한 p53이나 caspase-8 량 변화는 없었다.
4. Balb/c 생쥐에 EMT6 세포를 주사하여 유발된 종양조직의 성장이 독소루비신과 폴리페논 병합 투여로 현저히 감소되었다.
5. Balb/c 생쥐에 EMT6 세포를 주사하여 유발된 종양조직의 성장이 독소루비신과 퀘르세틴 병합 투여로 현저히 감소되었다.

이상의 결과 폴리페논과 퀘르세틴은 화학요법제인 독소루비신과 병합 투여할 경우 독소루비신 단독투여시보다 유방암 세포에 대한 활성도 감소가 더 크고, 생쥐 유방암조직의 크기를 감소시키므로 폴리페논과 퀘르세틴은 화학요법제와 병행투여하면 항암치료 효과가 증가될 것으로 생각된다. 따라서 폴리페놀은 항암 화학요법제에 의한 암의 치료효과를 증강시킬 수 있는 보조제로서 이용 될 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 효과를 입증하기 위한 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

VI. 참 고 문 헌

1. 2008년 국가암 등록통계(보건복지부 중앙암등록본부 2010년 12월 28일 발표자료) 보건복지부 중앙암등록본부
2. Anderson BO, Jakesz R.: Breast cancer issues in developing countries: an overview of the Breast Health Global Initiative. World J Surg. 32:2578-85. 2008
3. Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A, Rossi C, Goso C, Maggi CA, Capranico G, Animati F. : Anthracyclines: selected new developments. Curr Med Chem Anticancer Agents. 1:113-30. 2001
4. Gennari A, Pronzato P. : New understanding of the role of anthracyclines in early-stage breast cancer: patient selection considerations. Clin Breast Cancer. 8:S179-83. 2008
5. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI. : Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. Curr Med Chem. 16:3267-85. 2009.
6. 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
7. Leonard RC, Williams S, Tulpule A, Levine AM, Oliveros S.: Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: focus on liposomal doxorubicin (Myocet). Breast. 18:218-24. 2009.
8. Vainio H, Weiderpass E. : Fruit and vegetables in cancer prevention. Nutr Cancer. 54:111-42. 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. Wahle KW, Brown I, Rotondo D, Heys SD.: Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. Adv Exp Med Biol. 698:36-51. 2010
11. Yang CS, Wang X. : Green tea and cancer prevention. Nutr Cancer. 62:931-937. 2010.
12. Lambert JD, Elias RJ. : The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. Arch Biochem Biophys. 501:65-72. 2010.
13. 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
14. Erlund, 2004 I. Erlund, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology. Nutrition Research, 24 :851-874. 2004
15. Borska S, Sopel M, Chmielewska M, Zabel M, Dziegiel P. : Quercetin as a potential modulator of P-glycoprotein expression and function in cells of human pancreatic carcinoma line resistant to daunorubicin. Molecules. 15:857-70. 2010.
16. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. : An improved MTT assay. J Immunol Methods. 157:203-207. 1993
17. 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
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.

20. Araújo JR, Gonçalves P, Martel F. : Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. Nutr Res. 31:77-87. 2011.

21. 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.

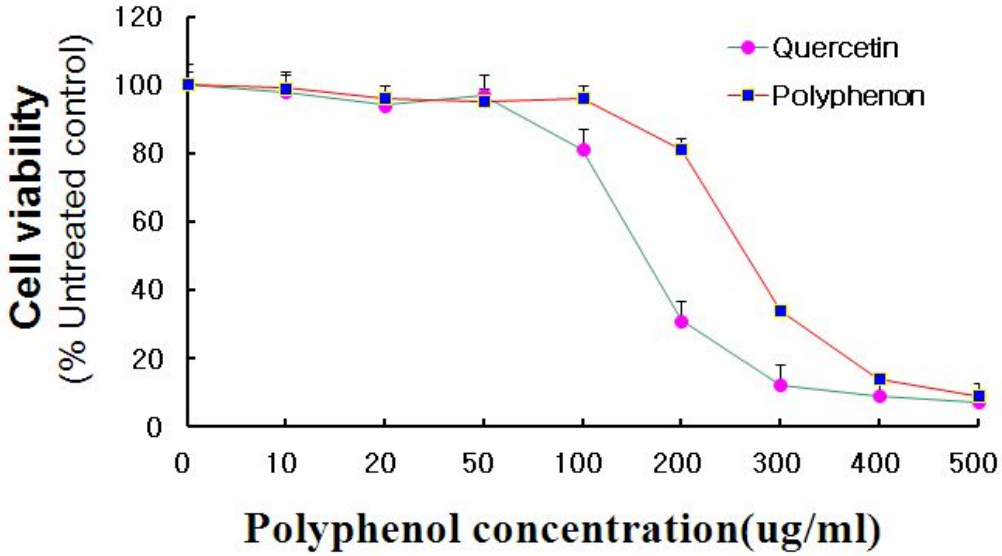

Fig.2. Effects of some polyphenols on the viability of mouse breast cancer cells(EMT6 cells). EMT6 cells were treated with polyphenon(0-500 μg/mL) and quercetine(0-500 μg/mL) for 24hours and cell viability examined by MTT assay.

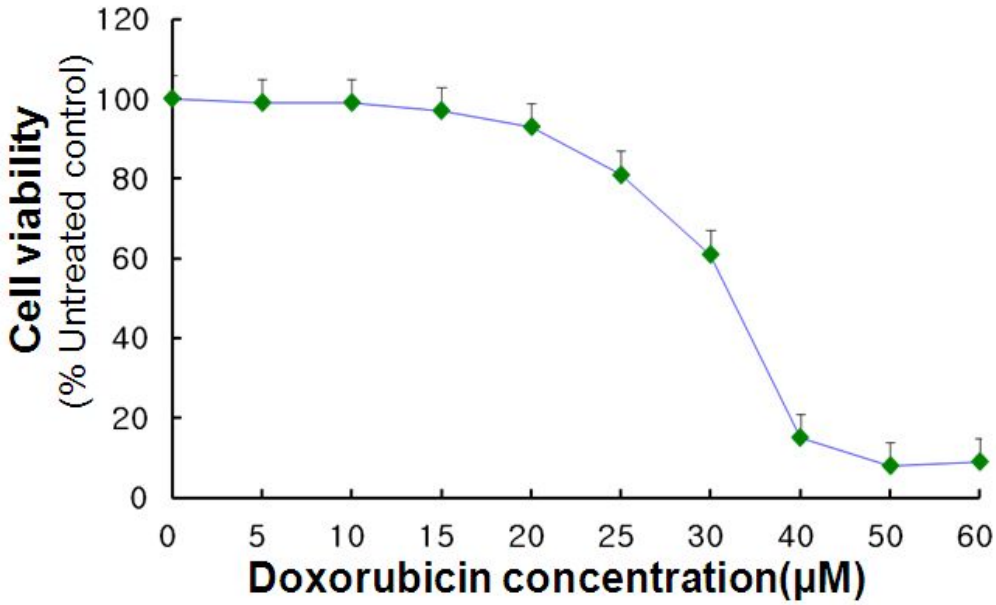

Fig.3. Effects of doxorubicin on the viability of mice breast cancer cells(EMT6 cells). Doxorubicin (0-60 μM) added to culture medium for 24 hours and cell viability examined by MTT assay.

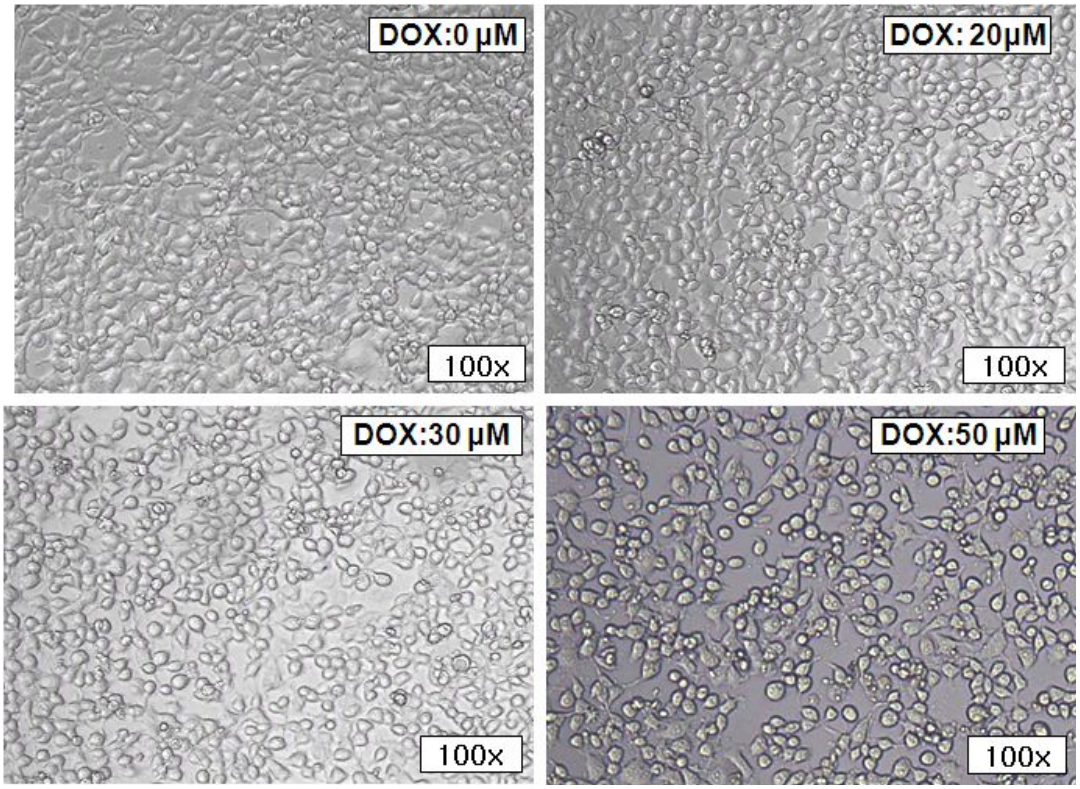

Fig.4. Microscopy of doxorubicin-treated EMT6 cells. Doxorubicin (DOX: 0-50 μM) added to culture medium for 24 hours and examined under inverted microscope.

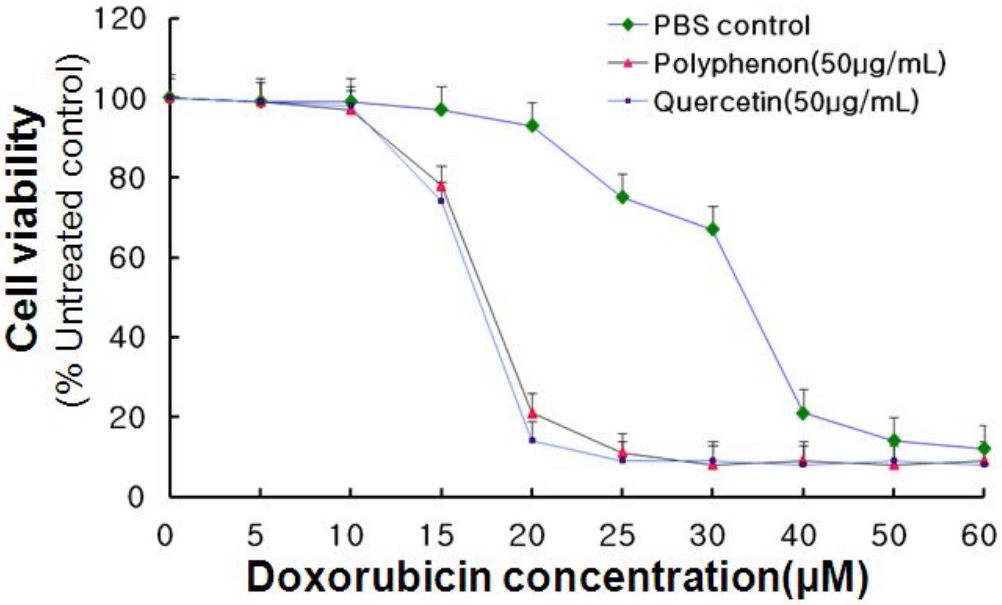

Fig.5. Effects of polyphenon on doxorobicin-induced cytotoxicity of mice breast cancer cells(EMT6). The cells were treated with doxorubicin(0-60 μM) and polyphenon (50 μg/mL) or quercetin(50 μg/mL) for 24hours and cell viability examined by MTT assay.

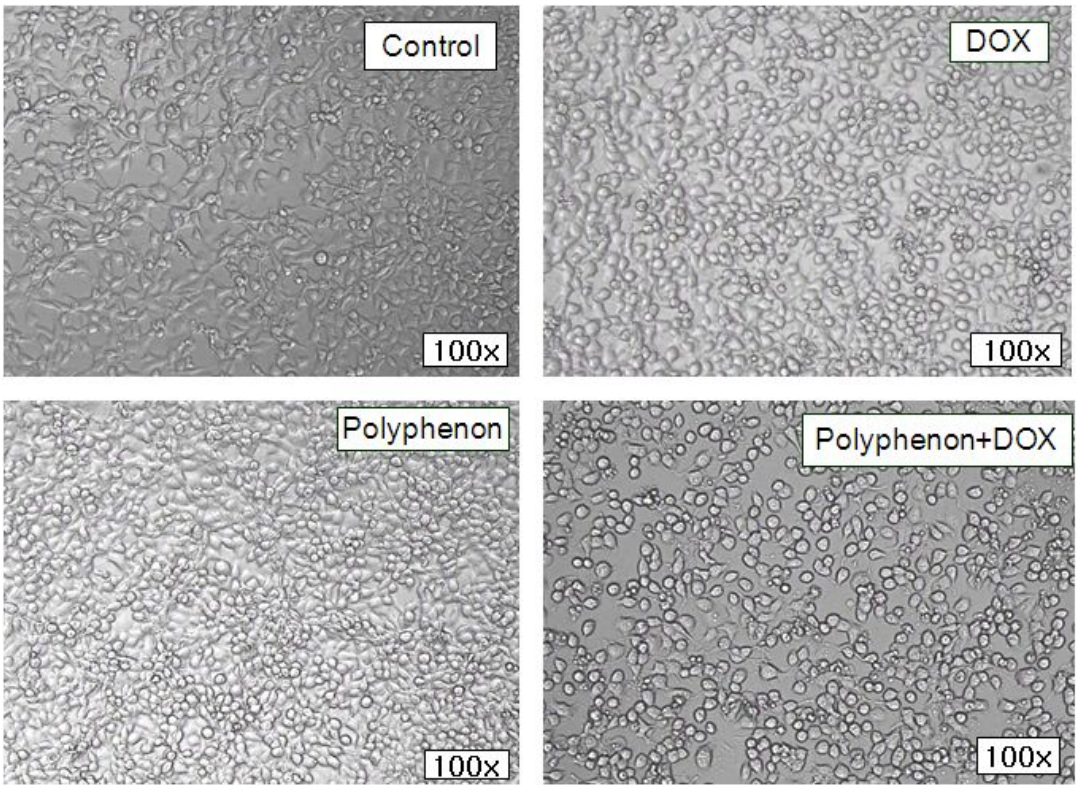

Fig.6. Microscopy of doxorubicin and polyphenon-treated EMT6 cells. Doxorubicin(DOX: 20 μM) and polyphenon(50 μg/mL) added to culture medium for 24 hours and examined under inverted microscope.

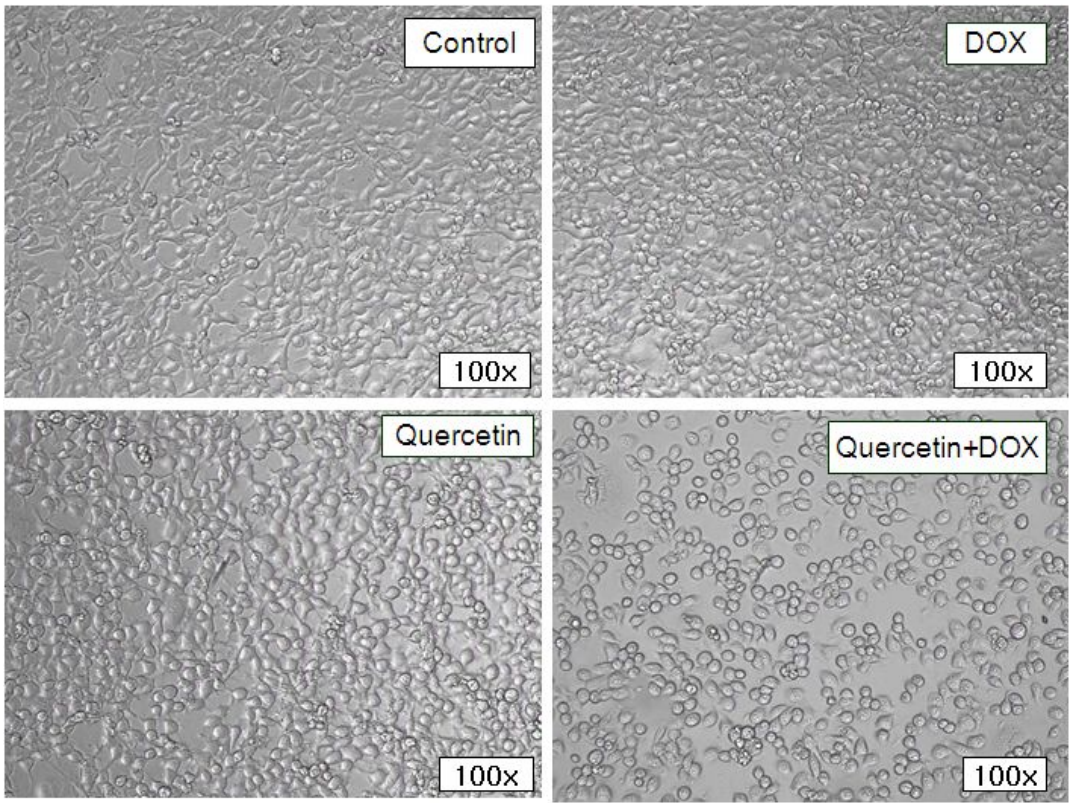

Fig.7. Microscopy of doxorubicin and quercetin-treated EMT6 cells. Doxorubicin (DOX: 20 μM) and quercetin(50 μg/mL) added to culture medium for 24 hours and examined under inverted microscope.

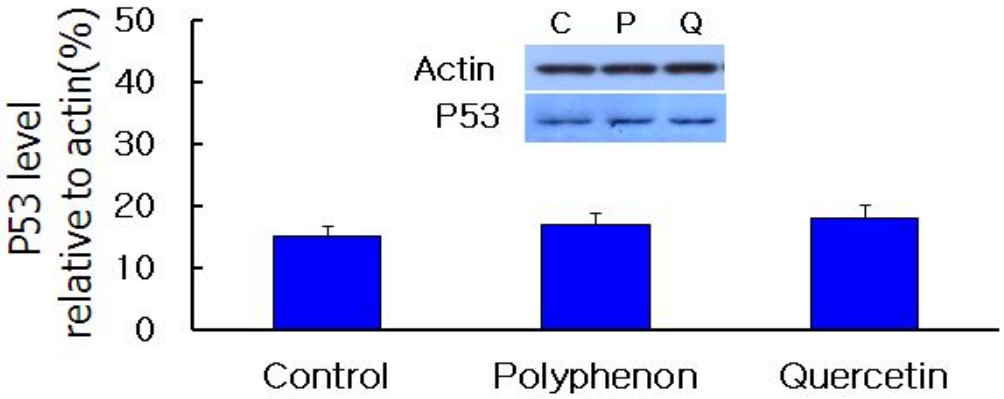

Fig.8. Effects of polyphenon and quercetin on the level of P53 in EMT6 cells. Polyphenon(50 μg/mL) and quercetin(50 μg/mL) added to culture medium for 24 hours and p53 levels were examined by western blot. The level of p53 relative to actin in vehicle, polyphenon and quercetin are representative of polyphenon and quercetin, respectively. C: control, P:polyphenon, Q:quercetin.

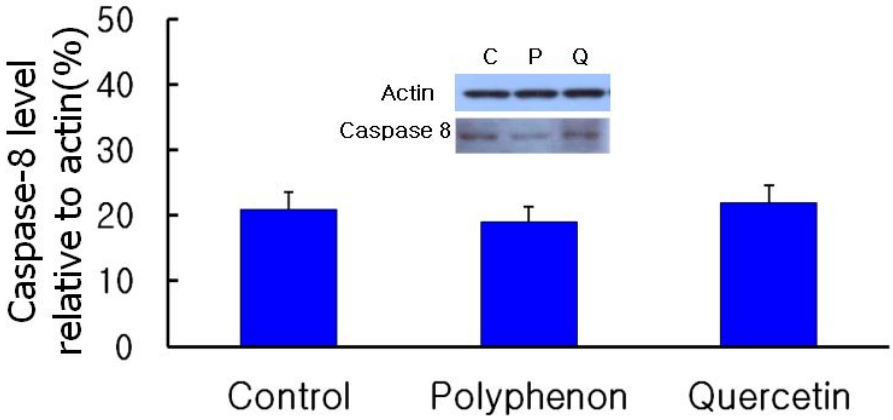

Fig. 9. Effects of polyphenon and quercetin on caspase 8 levels in EMT6 cells. Polyphenon(50 μg/mL) or quercetin (50 μg/mL) added to culture medium for 24 hours and p53 levels were examined by western blot. C: control, P:polyphenon, Q:quercetin.

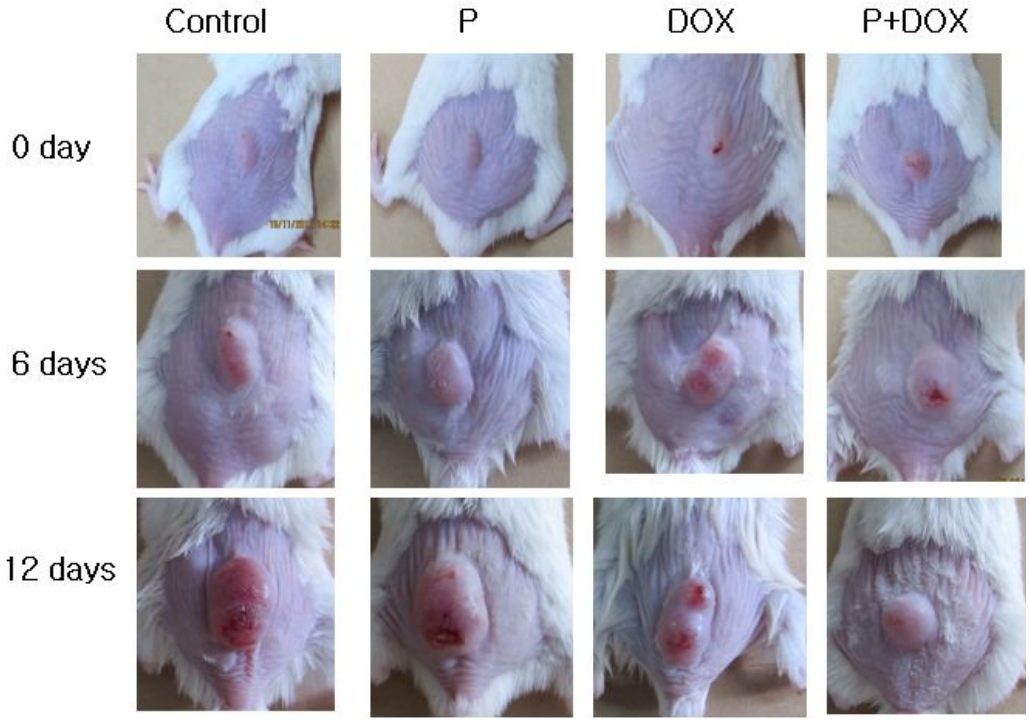

Fig.10. Effects of polyphenon and doxorubicin on growth of breast cancer of mice. Breast tumor(EMT6 cells) bearing mice were treated with doxorubicin(DOX: 5mg/kg) and/or polyphenon(P: 50mg/kg) by intra-peritoneal injection at every 3 days for 3 times.

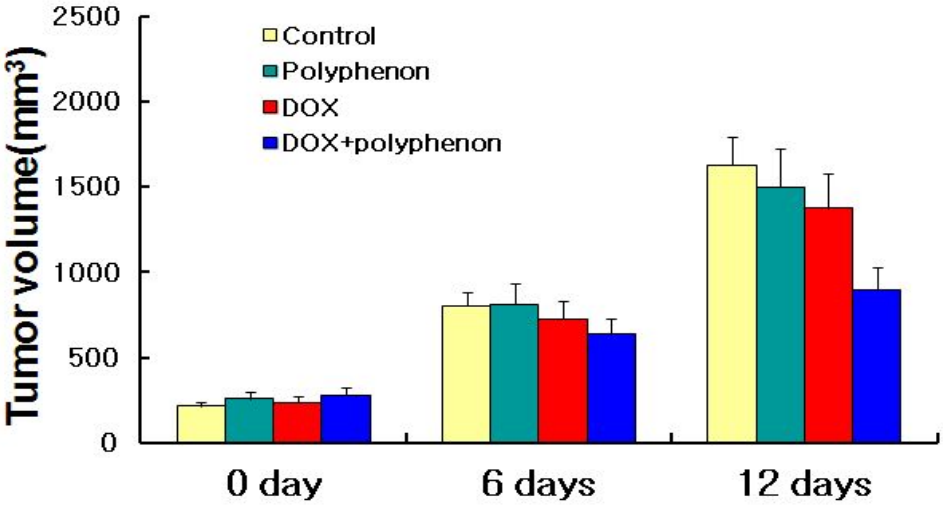

Fig.11. Effects of doxorubicin and/or polyphenon on tumor volume of mice. Breast tumor(EMT6 cells) bearing mice were treated with doxorubicin(DOX: 5mg/kg) and/or polyphenon(50 mg/kg) by intra-peritoneal injection at every 3 days for 3 times. Tumors were measured by caliper weekly and tumor volume calculated using the following formula ;
Tumor volume(mm^3) = [(width) ^{2} x length]/2.

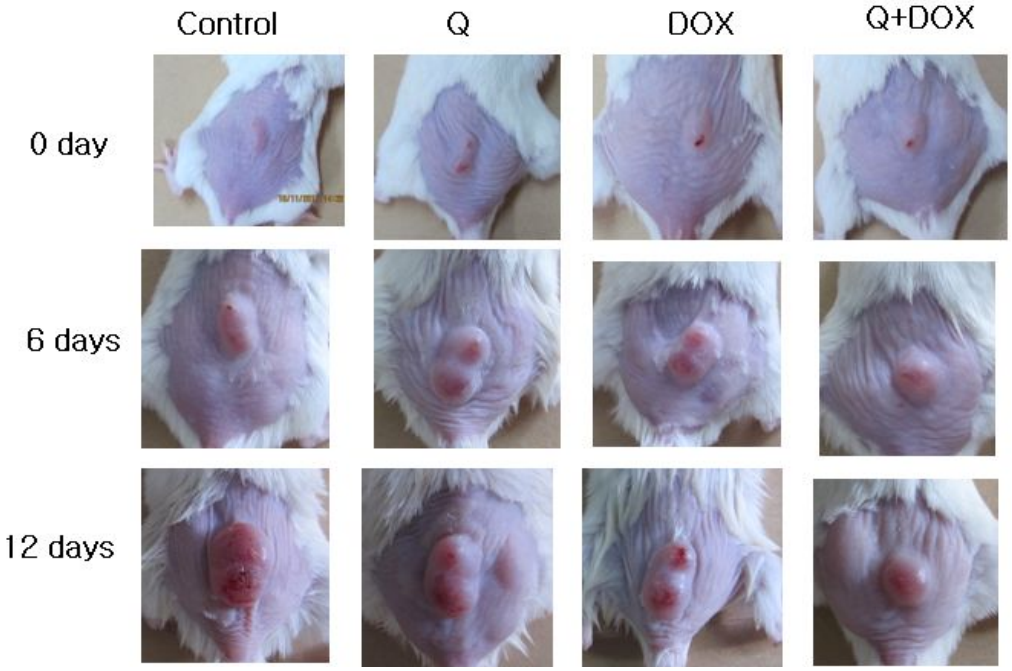

Fig.12. Effects of quercetin and doxorubicin on growth of breast cancer of mice. Breast tumor(EMT6 cells) bearing mice were treated with doxorubicin(DOX: 5mg/kg) and/or quercetin(Q: 50mg/kg) by intra-peritoneal injection at every 3 days for 3 times.

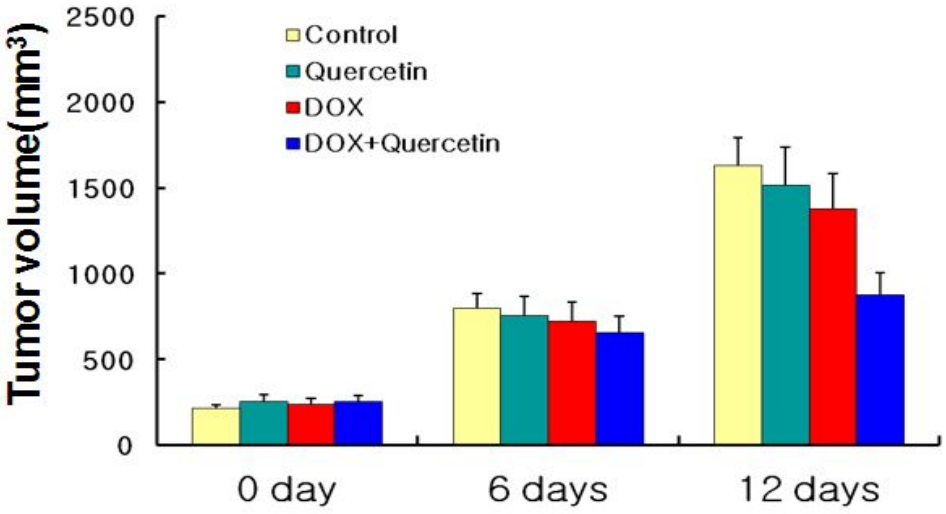

Fig.13. Effects of doxorubicin and/or quercetin on tumor volume of mice. Breast tumor(EMT6 cells) bearing mice were treated with doxorubicin(DOX: 5mg/kg) and/or quercetin(50mg/kg) by intra-peritoneal injection at every 3 days for 3 times.