

녹차카테킨과 에피갈로카테킨갈레이트의 산화적 스트레스에 대한 억제효과

윤여표 · 박종범* · 허문영**#

충북대학교 약학대학, *삼아약품(주), **강원대학교 약학대학
(Received November 24, 2000; Revised December 22, 2000)

Protective Effects of Green Tea Catechins and (-)-Epigallocatechin gallate on Reactive Oxygen Species-Induced Oxidative Stress

Yeo-Pyo Yun, Jong Bum Park* and Moon Young Heo**#

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763

*Sam-A Pharmaceutical Manufacturing Co., LTD, Seoul 135-101

**College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — Green tea catechins (GTC) and its major component, (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) were studied for their protective effects against reactive oxygen species (ROS)-induced oxidative stress. GTC and EGCG showed the strong antioxidative effects on the lipid peroxidation of ethyl linolate with Fenton's reagent and free radical scavenging effect to DPPH radical generation. They also protected H₂O₂- or KO₂-induced cytotoxicity in CHL cells or mouse splenocytes. These results indicate that GTC and EGCG are capable of protecting the lipid peroxidation, free radical generation and cytotoxicity induced by ROS. The mechanism of inhibition in ROS-induced cytotoxicity may be due to their antioxidative and free radical scavenging properties. Therefore, GTC and EGCG may be useful chemopreventive agents by protecting the free radical generation which are involved in cancer and aging.

Keywords □ Green tea catechins, EGCG reactive oxygen species, antioxidative effect, chemoprevention

녹차는 차나무(*Theae sinensis* L., *Theaceae*)의 잎을 말린 것으로서 최근 녹차 중의 카테킨류에 대하여 혈압강하작용,¹⁾ 항산화 작용,²⁾ 암 발생 예방작용,³⁻⁵⁾ 충치예방 작용,⁶⁾ 혈소판응집저해활성⁷⁻⁸⁾ 등 다양한 생리활성이 연구되고 있다. 그 동안 연구⁹⁻¹²⁾를 진행해온 녹차카테킨류(GTC)는 항혈전 및 심혈관작용이 우수함이 입증되어 현재 신약개발을 위한 전임상시험 중에 있다. 이러한 항혈전 및 심혈관효과와 함께 녹차 중의 카테킨성분은 폴리페놀화합물로서 항산화 작용과 free radical 소거작용이 큰 물질이다. 따라서 본 연구에서는 이미 밝혀진 항혈전효과와 함께 녹차카테킨류의 효

능 확보 차원에서 본 연구자들이 제조한 녹차카테킨과 주요 성분인 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)를 대상으로 하여 *in vitro*에서의 항산화작용과 free radical 소거작용을 비교 연구하는 한편, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)들에 의한 세포독성에 미치는 영향을 연구하여 산화적 스트레스에 의한 chemopreventive effect를 입증하고자 하였다.

이에, 녹차카테킨류(GTC)와 EGCG를 대상으로 하여 *in vitro*에서 항산화작용과 free radical 소거능을 비교 연구하고, 이들의 활성산소종들에 대한 효과를 규명하기 위해서 hydroxyl radical(\cdot OH) 생성물질로서 H₂O₂와 superoxide(O₂⁻ \cdot) 생성물질로서 KO₂ 유도 세포독성에 대한 억제효과에 미치는 영향을 검정하여 녹차카테킨류의 산화적 스트레스의 억제효과를 규명하였

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 033-250-6914 (팩스) 033-255-7865

기에 그 연구결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

녹차카테킨 (GTC)의 제조

녹차엽(*Camellia sinensis*, (주)태평양) 100 g을 취하여 70% Ethanol 1000 ml로 90~95°C에서 3시간 1차 추출하고 70% Ethanol 500 ml로 같은 조건에서 3시간 2차 추출 후 녹차의 고형성분을 압착하여 제거하고, 추출액을 합하여 vacuum rotary evaporator에서 45°C로 약 100 ml가 될 때까지 농축했다. 농축액을 H₂O로 2~3배 희석시킨 후 23,700×g에서 20분간 원심분리하여 고형성분을 완전히 제거한 후 모아진 상정액에 대하여 1.2배의 chloroform으로 2회 추출한 다음 chloroform 층을 버리고 수층에 대하여 1.2배의 ethylacetate로 4회 추출하여 얻은 액을 합한 후 ethylacetate가 완전히 없어질 때까지 감압 건조시켰다. 다시 소량의 물로 용해시킨 후 동결건조하여 녹차카테킨(GTC) 분말을 얻었다. 이 GTC는 건조엑스로서 1 g이 원생약 약 10 g에 상당하며, 건조물을 정량하면 총카테킨류를 75% 이상 함유하고, 그 중 epigallocatechin gallate(EGCG; C₂₂H₁₈O₁₁)가 25% 이상을 함유했다. 이 GTC는 황갈색의 흡습성이 있는 분말로 특유의 향을 지니며 맛이 쓰고 떫다.

실험동물 및 시약

본 실험에 사용된 C57BL mice는 (주)한국실험동물에서 공급받아 강원대 약대 동물사육실내에 있는 양압의 무균동물챔버에서 23±1°C 및 상대습도 55±7%의 조건으로 7~10일 적응시킨 후 사용했다. 사료는 삼양유지의 마우스용 pellet사료를 주었으며, 물은 자유롭게 먹게 하고, 12h/12h(L/D) cycle의 조건에서 실험하였다. 녹차카테킨(GTC)은 직접 조제하였고 EGCG를 비롯한 대부분의 시약은 Sigma사로부터 공급받아 사용하였다.

세포 및 배양방법

본 연구의 *in vitro* 실험에 사용된 cell line은 식품의약품안전청 국립독성연구소로부터 분양 받아 강원대 약대 액체질소탱크에 있는 Chinese Hamster Lung (CHL) cell을 사용하여 수시로 계대하여 실험목적에 맞게 배양하였다. 세포배양은 10% FBS(GIBCO), 1%

glutamine(GIBCO), 1% penicillin-streptomycin(GIBCO) 함유 MEM, DMEM(GIBCO) 배지를 사용하였다. 한편, primary cell culture를 위해서는 C57BL mice splenocyte를 분리하여 실험하였다. C57BL mice(male, 15~25 g)로 부터 무균적으로 비장을 적출하여 일회용 50 ml 무균 실린지의 plunger를 이용하여 세포를 분리시킨 후 cell count하여 20×10⁶ cell/ml로 만들었다. 이 세포현탁액 0.5 ml씩을 배지에 가하여 실험하였다. Complete medium은 15% heat inactivated fetal bovine serum(Gibco No. 200-6140), 1% sodium heparin(1,000 unit, Invenex No. 33-1), 1% penicillin-streptomycin(Gibco No. 600-5145), 2% concanavalin A(Con A, Sigma No. C-5275), 0.01% β-mercaptoethanol(0.05M, Sigma No. M-6250)이 되도록 RPMI 1640 culture medium으로 조제하여 사용하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 이루어졌다.

지질과산화 억제효과

지질과산화 억제효과를 측정하기 위하여 Fenton's reagent를 사용하여 관찰하였다. 증류수에 2% sodium dodecyl sulfate, 0.79 mM potassium chloride, 0.25 mM Trizma(pH 7.4), 1 μM FeCl₂, 0.025 mM H₂O₂가 되도록 첨가하여 반응액을 만들고, 이 용액 4.89 ml에 10 μl ethyl linoleate를 첨가한 후 미리 만들어 보관한 검체의 stock solution을 소정의 농도로 0.1 ml씩 분주하였다. 이 모든 양이 각 sample당 5 ml가 되도록 하였다. 만들어진 sample은 vortex mixer로 즉시 혼합하고 lipid peroxidation system에 빛을 차단시키기 위해 aluminum foil로 감싸서 16시간 동안 55°C에서 incubation시켰다. 그 후 각각의 sample에 50 μl 4% BHT ethanol solution을 분주하여 산화를 정지시킨 다음 항산화 정도를 535 nm에서 TBA법으로 측정하였다.^{13,14)}

Free radical 소거작용

DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazil)는 분자내 radical을 함유하고 있는데 이것이 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만든다. 이때 DPPH의 거동은 hydroxyl radical과 유사하여 free radical 소거실험에 활용된다. 본 실험에서는 60 μM의 DPPH 2 ml에 sample의 소정 농도용액 2 ml를 가하여 5분간 섞고 30분간 방치한 후 520 nm에서 측정하였다.¹⁵⁾

세포독성 보호작용

CHL cell과 마우스 splenocyte에 있어서의 H₂O₂ 및 KO₂의 세포독성에 대한 검체들의 효과를 MTT법¹⁶⁾에 따라 microplate reader로 측정하였다. 이때 CHL cell은 well 당 25,000개로 하고 배지 80 µl 중에서 24시간 배양한 후 H₂O₂ 또는 KO₂ 10 µl 및 검체 10 µl를 가하고 CO₂ incubator에서 20시간 더 배양한 후 MTT시약 15 µl를 가하고 4시간 배양 후 DMSO 200 µl를 가하고 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, lymphocyte는 well당 750,000개로 배양하고 이하 동일하게 시험하였으며, 다만 24시간 배양은 생략하였다.

한편, GTC와 EGCG의 자체 세포독성검정을 위해서 상기의 방법에 따라 시험하였으며, 다만 H₂O₂ 또는 KO₂처리를 생략하고 시험하여 GTC와 EGCG의 세포독성을 평가하였다.

통계처리

실험을 통하여 얻어진 data들은 Student's t-test를 사용하여 유의성 검정을 행하였다.

실험결과

지질과산화 억제효과

Table I에 나타난 것처럼 GTC와 EGCG 및 Vit-E 모두 투여농도에서 유의성 있는 지질과산화 억제작용을 나타내었으며, GTC와 EGCG는 Vit-E보다 훨씬 강한 지질과산화 억제를 나타내었다. IC₅₀를 비교해 보면 EGCG가 15.4 µg/ml, GTC가 29.3 µg/ml, Vit-E는 234.4 µg/ml로서 EGCG와 GTC가 Vit-E 보다 훨씬 높았으며 EGCG가 GTC보다 활성이 높았다. 본 실험은 ethyl linoleate를 사용하여 Fenton reaction에 의해 생성된 hydroxyl radical의 지질과산화작용에 대한 억제효과를 관찰하는 것으로서 나타난 결과로 보아, GTC와 EGCG는 강한 지질과산화억제작용이 있는 것으로 판단되었다.

Free radical 소거작용

Table II에 나타난 것처럼 GTC와 EGCG 및 Vit-E 모두 투여 농도에서 유의성이 있는 free radical소거작용을 나타내었으며, GTC와 EGCG는 Vit-E보다 강한 free radical소거작용을 나타내었다. SC₅₀를 비교해보면

Table I – The lipidperoxidation protective effect of green tea catechin and EGCG

Treatment (µg/ml)	OD _{535nm}	% Inhibition	IC ₅₀ (µg/ml)
GTC 0	0.361 ± 0.001	-	
10	0.274 ± 0.004**	33.73	
50	0.197 ± 0.019**	55.08	29.3
100	0.133 ± 0.001**	73.01	
500	0.075 ± 0.051**	87.25	
EGCG 0	0.399 ± 0.006	-	
10	0.270 ± 0.049*	42.61	
50	0.223 ± 0.013**	69.17	15.4
100	0.135 ± 0.014**	88.73	
Vit-E 0	0.361 ± 0.001	-	
10	0.326 ± 0.001**	20.61	
50	0.306 ± 0.002**	26.34	234.4
100	0.234 ± 0.007**	46.40	
500	0.197 ± 0.007**	57.67	

¹⁾n=3, Significantly different from the positive control group (Student's t-test)

*P<0.05, **P<0.01

²⁾% Inhibition = [OD positive - OD sample] / OD_{positive} × 100

Table II – The free radical scavenging effect of green tea catechin and EGCG

Treatment (µg/ml)	OD _{520nm}	%Inhibition	SC ₅₀ (µg/ml)
GTC 0	0.307 ± 0.004	-	
10	0.148 ± 0.006**	52.66	
50	0.057 ± 0.006**	82.63	4.0
100	0.027 ± 0.001**	92.73	
500	0.035 ± 0.005**	93.81	
EGCG 0	0.307 ± 0.004	-	
10	0.086 ± 0.004**	73.29	0.9
50	0.019 ± 0.002**	94.46	
100	0.015 ± 0.000**	95.44	
Vit-E 0	0.348 ± 0.017	-	
10	0.309 ± 0.000*	25.55	
50	0.290 ± 0.006**	28.80	185.4
100	0.211 ± 0.004**	51.29	
500	0.185 ± 0.000**	58.47	

¹⁾n=3, Significantly different from the positive control group (Student's t-test)

*p<0.05, **p<0.01

²⁾%Inhibition = [OD_{positive} - OD_{sample}] / OD_{positive} × 100

EGCG가 0.9 µg/ml, GTC가 4.0 µg/ml, Vit-E는 185.4 µg/ml로서 EGCG와 GTC가 Vit-E 보다 훨씬 높았으며 EGCG가 GTC보다 활성이 높았다. 본 실험은

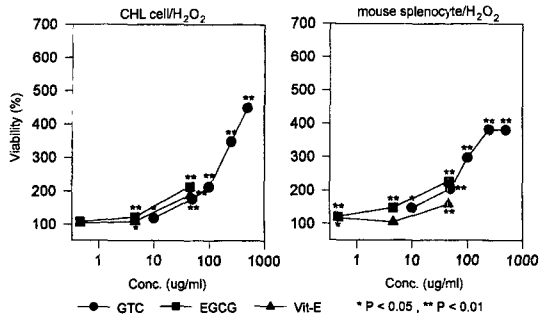


Fig. 1 - Cytoprotective effect of GTC and EGCG against H₂O₂ (10⁻⁴M)-induced cytotoxicity in CHL cells and mouse splenocytes.

DPPH free radical의 소거능에 관한 실험으로서 DPPH radical은 hydroxyl radical과 비슷한 거동을 하는 바, EGCG 및 EGCG를 다량 함유하고 있는 GTC는 강한 free radical 소거능이 있는 것으로 판단되었다.

세포독성 보호작용

Fig. 1에 나타난 것처럼 H₂O₂ 유도 세포독성에 대하여 CHL cell과 mouse splenocyte에 있어서 GTC와 EGCG 및 Vit-E는 세포독성 억제작용을 나타내었다. H₂O₂(10⁻⁴ M)을 단독으로 투여했을 때의 세포 생존율을 100%로 하고 검체 50 µg/ml의 처리 농도에서 비교해 보았을 때, EGCG>GTC≥Vit-E 순으로 활성이 강했다. H₂O₂는 hydroxyl radical을 생성하여 농도 의존적으로 세포독성을 나타내는데(Data not shown), EGCG 및 이를 다량으로 함유하고 있는 GTC가 항산화작용과 free radical 소거작용을 크게 나타낸 것처럼 H₂O₂유도 세포독성에 대하여 억제작용을 나타내었다.

한편, Fig. 2에 나타난 것처럼 CHL cell과 mouse splenocyte에 있어서 KO₂ 유도 세포독성에 대해서도 GTC와 EGCG 및 Vit-E는 농도의 증가에 따라 농도 의존적으로 세포독성 억제작용을 나타내었다. KO₂ (10⁻³ M)을 단독으로 투여했을 때의 세포생존율을 100%로 하고 검체 약 50 µg/ml의 처리농도에서 비교해 보았을 때, EGCG>GTC>Vit-E의 순으로 활성이 강했다. KO₂는 용액 중에서 superoxide anion을 생성하여 농도 의존적으로 세포독성을 나타내는데 (Data not shown), Table I과 Table II에서 EGCG와 GTC가 항산화작용과 free radical 소거작용을 크

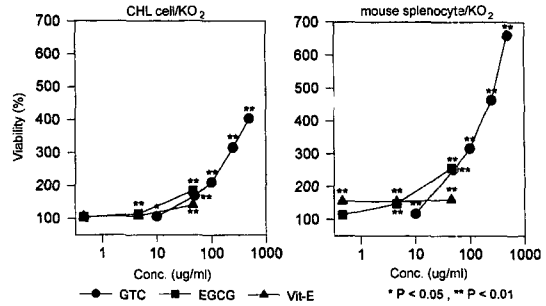


Fig. 2 - Cytoprotective effect of GTC and EGCG against KO₂ (10⁻³M)-induced cytotoxicity in CHL cells and mouse splenocytes.

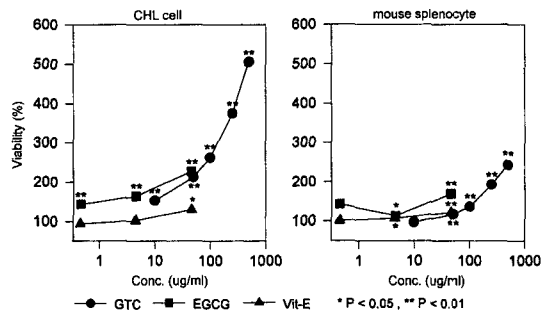


Fig. 3 - Cytotoxicity of GTC and EGCG in CHL cells and mouse splenocytes.

게 나타낸 것처럼 KO₂유도 세포독성에 대하여도 농도 의존적인 억제작용을 나타내었다.

그리고, Fig. 3에는 배양세포에 용매처리만 하였을 때의 세포생존율을 100%로 하여 소정농도의 검체용액을 처리했을 때의 세포생존율변화를 나타내었다. GTC와 EGCG는 Vit-E와 마찬가지로 CHL cell 및 mouse spleen lymphocyte에서 그 자체로서는 세포독성을 전혀 나타내지 않았으며, 오히려 처리 농도 증가에 따라 농도 의존적 세포증식효과를 나타냈다. 이같은 경향은 EGCG가 가장 컸으며 GTC도 크게 나타내었다. 이러한 세포 생존율의 증가는 GTC와 EGCG가 배양 중에 배지 중 발생하는 각종 산소라디칼등 세포증식을 저해하는 물질들을 소거하기 때문으로 판단된다.

고 찰

본 연구에서는 녹차카테킨(GTC)과 그 주성분인 EGCG의 항산화작용과 free radical 소거작용 및 이에 의한 산화적 세포독성 억제효과등을 검토하였다. EGCG와 GTC의 항산화효과는 Vit-E보다 강한 활성

을 나타내었다. Free radical 소거작용에 있어서도 EGCG와 GTC는 Vit-E보다 높게 나타났다. 또한 EGCG와 GTC는 H_2O_2 또는 KO_2 유도 세포독성에 대해서도 억제적으로 작용하였다. 그러나 EGCG와 GTC는 그 자체로는 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 녹차성분인 GTC와 EGCG는 항산화활성과 free radical 소거작용을 가지고 있으며 hydroxyl radical($\cdot OH$) 또는 superoxide($O_2^- \cdot$) 유도 세포독성과 DNA손상에 대해서도 억제적으로 작용하여 세포의 산화적 손상을 억제하여 산화적 스트레스에 의한 노화와 암에 대한 예방제로서의 응용가능성이 높은 물질로 보인다.

최근의 녹차추출물에 대한 항산화효과에 대한 연구는 주로 폴리페놀성분에 대하여 많이 이루어지고 있는데, 함유 카테킨들의 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)에 의한 azo free radical 유도 적혈구 유도 용혈에 대한 효과,¹⁷⁾ 다양한 중국산 차로부터 제조된 폴리페놀성분의 항산화효과,¹⁸⁾ 녹차 유래 항산화성물질들의 암 예방효과,¹⁹⁾ 녹차추출물의 hydroxyl radical과 superoxide anion scavenging activity,²⁰⁾ 녹차카테킨류의 lipid peroxidation에 대한 억제 효과,²¹⁾ hydroxyl radical에 의한 DNA break에 대한 억제효과,²²⁾ 1,2-dimethylhydrazine유도 산화적 DNA 손상에 대한 보호 효과²³⁾ 등이 알려지고 있다.

이같은 여러 연구를 종합해 볼 때, 녹차추출물과 함유 주성분인 카테킨류들이 항산화작용과 hydroxyl radical과 superoxide anion 등을 소거함으로써 산화적 스트레스에 대한 보호작용을 하고 있다고 볼 수 있다. 생체에서 생성된 hydroxyl radical은 대단히 반응성이 높다. 또한 생체는 superoxide도 생성하지만 이것은 비교적 반응성이 낮다. 이러한 superoxide는 Fe와 Cu 존재하에 hydroxyl radical을 만들며 nitric oxide와 결합하여($O_2^- \cdot + NO \cdot = ONOO^-$) peroxy nitrite가 되고, 이것이 분해하여 nitrogen dioxide gas ($NO_2 \cdot$), hydroxyl radical과 nitronium(NO_2^+)을 생성하기도 한다.²⁴⁾

이렇게 생성된 ROS들은 생체내에서 superoxide dismutase(SOD)가 superoxide를 hydrogen peroxide로 변화시키고, catalase는 hydrogen peroxide를 제거한다. 한편 glutathione transferase와 glutathione peroxidase 들은 친 전자성 이물을 포함하여 해독하며 SOD에 의해 생성된 peroxides를 제거한다. 그러나 생체 내에서 완화한 oxidative stress가 일어나면 세포들은 이러한

항산화기전을 가동하여 반응하지만 심한 oxidative stress는 세포의 injury와 death를 일으키며 이러한 cell death는 necrosis와 apoptosis로 발전된다.²⁵⁾

따라서, ROS에 의한 oxidative DNA damage는 암과 노화와 관련이 깊다. 이들은 point mutation이나 deletion을 포함하는 돌연변이를 nuclear DNA에서 일으키며 mitochondrial DNA에서의 oxidative damage는 노화세포에서의 에너지 결핍을 일으켜 나이에 따라 돌연변이의 축적이 일어난다. 따라서 DNA수복의 결핍은 세포사를 일으키고 이것은 인접세포들에 있어서 발암물질로의 촉진적 자극을 일으키게 한다.²⁶⁾

산화적 DNA손상을 통하여 발암의 전 단계에서 일어나는 돌연변이나 염색체 손상(chromosome aberration)등의 유전독성에 대한 억제물질들은 암의 initiation, promotion 및 progression 단계에서 항화 반응을 통한 세포내 대사의 modulation, DNA 반응성 물질들의 blocking, DNA replication이나 DNA repair modulation 작용과 같은 기전으로 돌연변이나 염색체 손상 및 암을 예방할 수 있는 것으로 기대되고 있다.²⁷⁾ 이와 같은 결과들을 종합해 볼 때, 녹차카테킨과 주성분인 EGCG는 항산화활성과 free radical 소거작용을 나타내었으며, H_2O_2 또는 KO_2 유도 세포독성에 대해서도 억제적으로 작용하여 cytoprotective effect를 나타내었다. 따라서 녹차카테킨류는 산소 free radical들에 의한 산화적 손상에 억제적으로 작용하는 기전을 활용하여 항산화성 스트레스를 통한 노화와 암의 예방제로서의 응용 가능성이 높은 물질로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 삼아약품(주)의 지원으로 수행되었음을 밝히며 이에 감사드리는 바이다.

문 헌

- 1) Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T.: Angiotensin converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **61**, 803 (1987).
- 2) Matsuzaki, T. and Hara, Y.: Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **59**, 129 (1985).
- 3) Xu, Y., Ho, C. T., Amin, S. G., Han, C. and Chung, F. L.: Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced

- lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res.* **52**, 3875 (1992).
- 4) Hayatsu, H., Inada, N., Kakutani, T., Arimoto, S., Negishi, T., Mori, K., Okuta, T. and Sakata, I. : Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. *Prev. Med.* **21**, 370 (1992).
 - 5) Sakagami, H., Asano, K., Hara, Y. and Shimamura, T. : Stimulation of human monocyte and polymorphonuclear cell iodination and interleukin-1 production by epigallocatechin gallate. *J. Leukoc. Biol.* **51**, 478 (1992).
 - 6) Otake, S., Makimura, M., Kuroki, T., Nishihara, Y. and Hirasawa, M. : Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res.* **25**, 438 (1991).
 - 7) Sagesaka-Mitane, Y., Miwa, M. and Okada, S. : Platelet aggregation inhibitors in hot water extract of green tea. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 790 (1990).
 - 8) Yayabe, F., Kinugasa, H. and Takeo, T. : A simple preparative chromatographic separation of green tea catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **63**, 845 (1989).
 - 9) Yun, Y. P., Kang, W. S. and Lee, M. Y. : The anti-thrombotic effects of green tea catechins. *J. Fd. Hyg. Safety* **11(2)**, 77 (1996).
 - 10) Ahn, H. Y., Lee, M. Y. and Yun, Y. P. : The effects of green tea catechins on vascular smooth muscle tension and Ca^{2+} uptake. *J. Fd. Hyg. Safety* **11(2)**, 83 (1996).
 - 11) Kang, W. S., Park, J. B. and Yun, Y. P. : Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. *Thromb. Res.*, **96**, 229 (1999).
 - 12) Ahn, H. Y., Hadizadeh, K. R., Seul, S., Yun, Y. P. and Sachinidis, A. : Epigallocatechin-3-gallate, selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Mol. Biol. Cell*, **10(4)**, 1093 (1999).
 - 13) Kitta, K., Hagiwara, Y. and Shibamoto, T. : Antioxidative activity of an isoflavonoid, 2-o-glycosylisovitexin isolated from green barlet leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1843 (1992).
 - 14) Ohtka, H., Ohishi, N. and Yaki, k. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).
 - 15) Fugita, Y., Uera, I., Morimoto, Y., Nakajima, M., Hatano, C. and Okuda, T. : Studies on inhibition mechanism of auto-oxidation by tannins and flavonoids. *Yakugaku Zasshi*, **108**, 129 (1988).
 - 16) Cole, S. P. C. : Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **17**, 259 (1986).
 - 17) Zhang, A., Zhu, Q. Y., Luk, Y. S., Fung, K. P. and Chen Z. Y. : Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sci.* **61**, 384 (1997).
 - 18) Ho, C. T., Chen, Q., Shi, H., Zhang, K. Q. and Rosen, R. T. : Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Prev. Med.* **21(4)**, 520 (1992).
 - 19) Katiyar, S. K. and Mukhtar, H. : Tea antioxidants in cancer chemoprevention. *J. Cell Biochem. Suppl.* **27**, 59 (1997).
 - 20) Noda, Y., Anzai, K., Mori, A., Kohno, M., Shinme, M. and Packer, L. : Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42(1)**, 35 (1997).
 - 21) Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S. and Xin, W. : Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochem. Biophys. Acta*, **1304**, 210 (1996).
 - 22) Hiramoto, K., Ojima, N., Sako, K. and Kikugawa, K. : Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 558 (1996).
 - 23) Inagake, M., Yamane, T., Kitao, Y., Oya, K., Matsumoto, H., Kikuoka, N., Nakatani, H., Takahashi, T., Nishimura, H. and Iwashima, A. : Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage by green tea extract in rat. *Jap. J. Cancer Res.* **86**, 1106 (1995).
 - 24) Chance, B., Siers, H. and Boveris, A. : Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Phys. Rev.* **59**, 527

- (1979).
- 25) Ames, B. N. : Endogeneous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutation Res.* **214**, 41 (1989).
- 26) Ames, B. N. : Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radical and degenerative diseases. *Science*, **221**, 1256 (1983).
- 27) Flora, S., Bronzetii, G. and Sovels, F. H. : Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. *Mutation Res.* **267**, 153 (1992).