

## 혈관내피세포의 세포사멸작용에 대한 (-)Epigallocatechin Gallate의 억제효과

최연정 · 최정숙 · 이세희 · 이용진 · 강정숙\* · 강영희<sup>†</sup>

한림대학교 생명과학부 식품영양학 전공

\*제주대학교 식품영양학과

### Inhibitory Effects of Epigallocatechin Gallate on Apoptosis in Human Vascular Endothelial Cells

Yean-Jung Choi, Jung-Suk Choi, Se-Hee Lee, Yong-Jin Lee,  
Jung-Sook Kang\* and Young-Hee Kang<sup>†</sup>

Division of Life Sciences, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Cheju National University, Cheju 690-750, Korea

#### Abstract

Oxidative stress contributes to cellular injury following clinical and experimental ischemia/reperfusion scenarios. Oxidative injury can induce cellular and nuclear damages that result in apoptotic cell death. We tested the hypothesis that the catechin flavonoid of (-)epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, inhibits hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. The effect of apigenin, a flavone found in citrus fruits, on apoptosis parameters was also examined. A 30 min pulse treatment with 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased endothelial cell viability within 24 hrs by >30%; this was associated with nuclear condensation and biochemical DNA damage consistent with programmed cell death. In the 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apoptosis model, 50 μM (-)epigallocatechin gallate markedly increased cell viability with a reduction in the nuclear condensation and DNA fragmentation. In contrast, equimicromolar apigenin increased cell loss with intense DNA laddering, positive nick-end labeling and Hoechst 33258 staining. Thus, polyphenolic (-)epigallocatechin gallate, but not apigenin flavone, qualify as an antioxidant in apoptosis models caused by oxidative stress. Further work is necessary for elucidating the anti-apoptotic mechanisms of polyphenolic catechins.

**Key words:** (-)epigallocatechin gallate, catechin, apigenin, flavone, antioxidant, apoptosis, hydrogen peroxide, endothelial cells

#### 서 론

세포사멸작용(apoptosis)은 개체에 따라 불필요해진 세포를 교체하기 위하여 일어나는 적극적인 현상인 세포죽음을 일컫으며, 정상적인 생물학적 시스템에서 나타나는 중요한 과정이다. 그러나 세포사멸작용은 노화현상과 관련되어 나타나는 퇴행성 질환의 원인이 되고 면역작용과 신경전달체계의 혼란 등의 치명적인 질환들을 일으키게 된다(1). 이러한 질환에서의 세포사멸은 산화적 독성에 의하여 초래된다고 하는데(2,3), 세포소기관에 변화를 초래하고 세포 내 칼슘부하를 가중시키며 세포막의 이온교환을 증가시켜 세포죽음을 일으키며 세포막의 신호전달체와 관련된 효소 활성도를 변화시킨다고 한다(3,4). 이러한 다양한 병리적인 과정은 활성산소종(reactive oxygen species)의 산화적인 연쇄반응에 의하여 증폭된다고 할 수 있

다. 따라서, 산화적인 스트레스에 의하여 유발되는 여러 일련의 세포시스템의 손상을 방지하기 위한 노력들이 시도되고 있으며 항세포사멸작용을 지닌 식이성 항산화제 개발에 대한 관심이 모아지고 있다.

Flavonoids는 그리스어로 황색을 의미하는 flavus에서 유래된 단어로서 현재까지 4,000여가지 형태로 녹차, 콩류, 포도, 마늘 및 양파류 등의 채소나 과일의 식물체에 존재하는 수용성 색소물질로 존재한다고 확인되고 있다. Flavonoids의 생리활성작용은 프랑스인의 포도주 효과인 French Paradox에서 유래되었지만, 모든 flavonoids가 다 생리활성을 갖는다고 볼 수 없다. 다양한 생리활성작용에서 flavonoids는 세포나 조직에서 활성산소종을 제거하는 자연적인 항산화제의 역할을 지니고 있다고 보고되고 있다(5-7). 이와 같은 flavonoids의 항산화작용에 의하여 순환기질환의 예방이나 치료에 그 활용성이 제시되

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: yhkang@hallym.ac.kr  
Tel: 82-33-240-1475. Fax: 82-33-254-1475

고 있다(8,9).

녹차에 함유되어 있는 polyphenols은 조직이나 체액에서 radicals을 제거하여 암을 억제한다고 보고되고 있다(10). 암을 유발시킬 수 있을 정도로 자외선을 쬐인 한 생쥐 연구실험에서, 잎차는 중량의 크기와 수를 현저하게 억제시키는데 녹차보다는 홍차가 더 효력이 있다고 하였다(11). 최근에 녹차의 polyphenol 성분인 (-)epigallocatechin gallate을 이용하여 다양한 세포들의 세포사멸작용에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. (-)Epigallocatechin gallate는 배양된 뉴런세포에서 베타 아밀로이드에 의한 신경독성을 완화시키고, arsenite에 의하여 유발된 JB6 세포의 세포사멸작용을 억제시킨다고 한다(12,13). 또한 epicatechin과 이것의 체내 대사산물인 3'-O-methyl epicatechin은 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 세포죽음으로부터 섬유아세포를 보호한다고 한다(14). 세포죽음을 억제시키는 (-)epigallocatechin gallate의 이러한 작용은 (-)epigallocatechin gallate의 항산화적인 역할에 비중을 두고 있다. 그러나 암세포를 이용한 경우에 녹차의 polyphenols은 과산화수소의 생성과 전사인자의 활성화 등으로 인하여 세포사멸작용을 유도하여 암치료제로서 그 기능을 발휘한다고도 한다(15,16).

본 연구에서는 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의한 혈관내피세포의 세포사멸작용에 대한 (-)epigallocatechin gallate의 항산화적인 억제효과를 규명하고자 하였다. 산화적인 혈관손상을 유도하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 혈관내피세포와 함께 배양하였고, 허혈성 심혈관질환의 산화적인 스트레스 상태와 유사한 조건을 유도하였다. 혈관내피세포의 세포사멸작용에 대한 (-)epigallocatechin gallate의 억제효과를 flavones 중의 하나인 apigenin과 비교분석하였다.

## 재료 및 방법

### 혈관내피세포의 준비

혈관내피세포(human umbilical vein endothelial cells)는 아기 태줄 정맥혈관에서 collagenase 효소(collagenase type II, Worthington Biochemicals Co., Lakewood, NJ)를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 일차배양되었다(17). 혈관내피세포는 DiI 형광물질(Molecular Probes Co., Eugene, OR)로 라벨된 아세틸화된 LDL의 uptake 실험을 통하여 진위를 확인하였다(18).

### 혈관내피세포 배양실험

분리된 혈관내피세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.9 mg/mL bovine brain extract, 0.75 mg/mL human epidermal growth factor, 그리고 0.075 mg/mL hydrocortisone이 첨가되어 있는 25 mM HEPES-M199 배지(Sigma Co., St. Louis, MO)에서 배양되었다. 배양된 내피세포들이 충분히 증식하면 40% FBS와 10% dimethylsulfoxide(DMSO)가 첨가된 배지에 분획하여 -70°C에서 냉동 보관하였다. 건강한 혈관내피세포를 배양실험에 이용하기 위하여 일차배양의 passage

4 내지 5 이내에서 사용하였다.

### 세포사멸 유도실험

분주하여 배양시킨 혈관내피세포를 다양한 농도에서 (-)epigallocatechin gallate와 apigenin으로 30분간 전처리한 후에 다시 30분간 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 배양시켰다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와의 배양 마지막 시점에서 catalase(100 U/mL, Worthington Biochemicals Co.)를 첨가하여 더 이상의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 산화독성이 유발되지 않도록 제거하였다. 혈관내피세포는 배지로 세척하고 같은 농도의 (-)epigallocatechin gallate와 apigenin이 첨가된 새 배지를 가하여 24시간 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양시켰다. 24시간의 배양 후에 형태학적인 관찰 및 생화학적인 분석 등의 다양한 실험분석이 시도되었다.

### Radical 소거활성 조사

(-)Epigallocatechin gallate와 apigenin의 항산화작용은 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) free radical을 이용하여 시료의 radical 소거활성 효과를 측정하였다(6,19). DPPH radical을 메탄올에 0.2 mM로 용해시키고, 0.2 mM 메탄올 용액 0.5 mL에 (-)epigallocatechin gallate와 apigenin의 메탄올 용액 1 mL을 첨가한 후에 517 nm 파장에서 흡광도의 감소를 측정하였다. (-)Epigallocatechin gallate와 apigenin의 항산화력은 radical 소거활성으로 표시하였고 SC<sub>50</sub>은 DPPH radical에 대한 흡광도가 50%로 감소하는데 필요한 (-)epigallocatechin gallate와 apigenin 농도로 나타내었다.

### 세포생존률 조사

혈관내피세포를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와의 세포배양실험을 거친 후에, 세포생존률을 측정하기 위하여 자동 microplate reader spectrophotometer를 이용한 MTT 분석이 이루어졌다. 이 분석법은 tetrazolium MTT salt(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 미토콘드리아 효소인 succinate dehydrogenase에 의하여 불용성의 formazan으로 변하는 과정을 이용하여 측정하였다(20). 내피세포의 (-)epigallocatechin gallate와 apigenin, 그리고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와의 배양실험을 거친 후 세척한 다음, MTT(5 mg/mL stock solution)가 첨가된 phenol red가 들어있지 않는 배지에서 3시간 배양시켰다. 그런 후에, iso-propyl alcohol을 가하여 조심스럽게 흔들어 주면서 형성된 formazan을 용해시키고 λ = 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### DNA 추출과 전기영동

세포사멸현상의 생화학적인 특징인 DNA fragmentation은 세포사멸 말기에 나타나는 비가역적인 현상으로 내재성 endonuclease의 활성화에 의하여 약 180 bp의 다양한 oligomers로 잘려 젤상에서 독특한 DNA ladder 형태를 나타낸다(21,22).

혈관내피세포를 (-)epigallocatechin gallate와 apigenin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 배양시킨 후에, 1 mL lysis 용액인 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% sodium N-lauroyl sarcosinate, 100 µg/mL proteinase K(Sigma Co.)를 세포단층에 가하여 5시간 50

°C에서 용해시켰다. 세포 lysates는 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25/24/1) 유기용매로 교반시키면서 추출하고 2,000×g, 10분간 4°C에서 원심분리시켰다. DNA를 함유하는 상층액에 0.3 M sodium acetate가 첨가된 2배 부피의 차가운 100% ethanol을 가하여 -20°C에 하룻밤 보관하였다. 2,000 ×g, 10분간 4°C에서 원심분리하고 나온 DNA 침전물을 70% ethanol로 두 번 세척하였다. DNA는 Tris-EDTA 용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 용해시키고 1 µg/mL RNase A(Sigma Co.)를 가하여 3시간 37°C에서 배양하였다. DNA의 optical density를  $\lambda = 260$  nm에서 측정하였고 추출된 DNA를 0.5 µg/mL ethidium bromide가 함유된 1.8% agarose 겔상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 DNA 띠는 UV(302 nm) trans-illuminator(Hoefer Scientific Instrument, CA)로 가시화하여 DNA ladder 형태를 확인하였다. 겔상의 photographs는 Polaroid Type 667 positive/negative 필름으로 현상화하였다.

#### *in situ* 세포사멸 검출

세포사멸의 생화학적 현상인 DNA fragmentation을 *in situ* 상태에서 특이적으로 검출하기 위하여 TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) 분석을 시도하였다(23). TUNEL 분석은 *in situ* Cell Death Detection kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 제품의 사용법에 따라 이루어졌다. 내피세포를 차가운 4% formaldehyde로 고정시키고, NBT(50 mg/mL nitro blue tetrazolium in 70% dimethylformamide)와 BCIP(50 mg/mL bromochloroindolyl phosphate toluidine in 70% dimethylformamide)가 함유된 alkaline phosphatase 기질용액(100 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)을 가하여 15분간 배양 발색시켰다. Eosin Y로 대조염색시킨 다음 마지막으로 마운팅 용액을 가하고 커버 glass로 덮어 발색의 정도를 Olympus CH2 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 세포핵의 형태학적 분석

세포배양실험에서 나온 혈관내피세포를 차가운 PBS로 잘 세척하고 여기에 차가운 4% formaldehyde 용액을 가하여 실온에서 1시간 고정시켰다. 그런 후에 PBS로 세척하고 Hoechst 33258(Molecular Probes Co.) 형광용액을 0.01 µg/µL 농도로 첨가하여 15분간 배양하였다. 조심스럽게 다시 세척한 후에 형광용 마운팅 용액을 가하고 세포핵의 염색형태를 UV 필터

가 정착된 형광현미경으로 관찰하였다.

#### 통계처리 방법

실험 data는 means±SEM으로 표시하였으며, SAS PC program(SAS Institute Inc., Cary, NC)을 이용하여 그룹 간의 차이(p<0.05)를 비교하였다. 그룹간의 차이에 대해서는 two-way ANOVA로 검증하였고, 유의적인 차이를 보이는 그룹에 대해서는 Tukey correction test가 수반되었다.

## 결과 및 고찰

### Radical 소거작용에 대한 (-)epigallocatechin gallate의 효과

본 연구에서는 free radicals의 산화적인 손상에 의한 세포사멸에 있어서 녹차성분의 하나인 (-)epigallocatechin gallate의 억제효과를 규명하였다. 우선 radicals의 소거작용에 있어서 (-)epigallocatechin gallate의 항산화작용을 조사하였다. Table 1에서 (-)epigallocatechin gallate의 SC<sub>50</sub>은 3.0 µM로 탁월한 환원력을 지닌 것으로 조사되었으며, 녹차의 다른 (+)catechin도 radical DPPH를 50% 소거하는데 6.4 µM이 필요하였다. 이러한 catechins의 radical 소거능도는 자연적인 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid의 14.0 µM보다 월등한 환원력을 나타내었다. 반면에 flavones의 하나인 apigenin은 molar 농도의 SC<sub>50</sub>을 나타내어 radical 소거능력을 거의 지니지 않은 것으로 조사되었다. 이로서 다양한 flavonoids에는 서로 다른 radical 소거능력을 지닌다는 것을 알 수 있고, 녹차성분은 탁월한 항산화력을 지닌다는 것을 보여주었다(8,9,12).

### 산화독성에 대한 (-)epigallocatechin gallate의 억제 효과

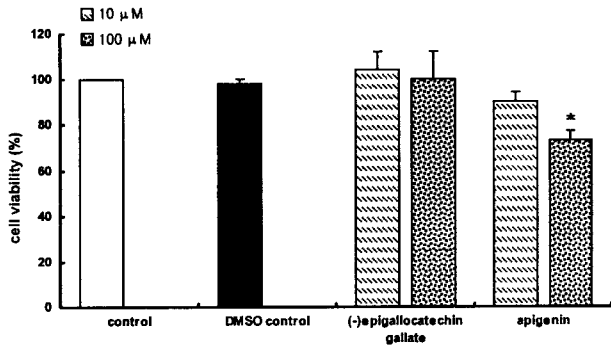
혈관내피세포는 혈관벽의 해부학적인 특수구조로 인하여 활성산소종에 의한 산화적 독성으로 수반되는 혈관성 세포사멸현상인 혈관손상을 초래하여 생리적인 기능장애뿐만 아니라 치명적인 심혈관질환을 유발시킨다고 알려져 있다(2,3,24). 따라서 본 연구에서는 혈관성 노화현상과 허혈성 심혈관질환 등의 병리적인 상태와 유사한 상황을 유도하는 hydroxyl radical의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 혈관내피세포에 도입하였다. 혈관손상과 직결되는 혈관내피세포를 이용하여 산화적인 손상에 대한 생존율을 조사하여 (-)epigallocatechin gallate의 항산화적인 대처능력을 조사하였다.

Fig. 1은 (-)epigallocatechin gallate의 세포독성효과를 조사한 결과를 보여주고 있다. (-)Epigallocatechin gallate를 녹인 DMSO의 배양농도는 0.05% 이하였으며 이 농도에서의 DMSO는 세포에 독성을 보이지 않았다. (-)Epigallocatechin gallate는 24시간의 배양실험에서 100 µM 농도에서도 독성을 나타내지 않았다. 그러나 apigenin은 10 µM에서 독성이 없었지만 100 µM의 고농도에서는 세포독성을 가진다는 것을 보여주었다. Apigenin의 세포독성에 대한 dose response에서 apigenin ≤50

**Table 1. Radical scavenging activity of (-)epigallocatechin gallate**

Flavonoids	SC <sub>50</sub>
(-)Epigallocatechin gallate	3.0 µM
Catechin	6.4 µM
Apigenin	>10 mM

Each flavonoid was diluted in methanol to make a flavonoid working solution. The values of SC<sub>50</sub> represent flavonoid concentrations at which a decrease in absorbance at  $\lambda = 517$  nm by 50% occur against 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical in methanol (1:2, v/v) 10 min after an addition of flavonoid in methanol. The SC<sub>50</sub> value of L-ascorbic acid was 14.0 µM.

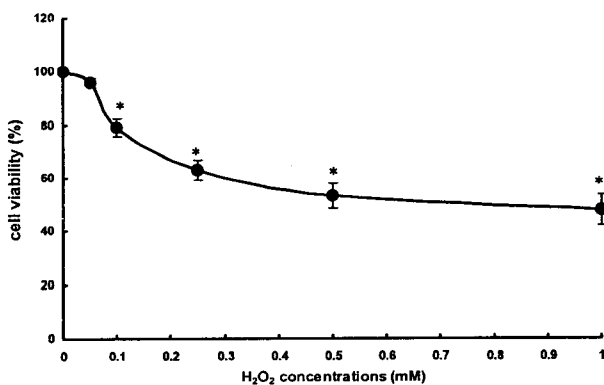


**Fig. 1.** Cytotoxicity of (-)epigallocatechin gallate added to M199 culture media.

Human umbilical vein endothelial cell viability for 24 hrs was assessed by MTT. Data (means ± SEM, 5 separate experiments) are expressed as percent cell survival relative to controls (viability = 100%). \*p < 0.05, relative to controls.

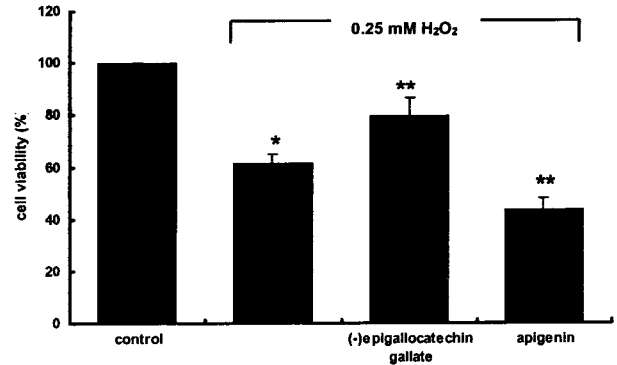
μM에서 유의적인 세포독성의 효과는 나타나지 않았다(data not shown). 이 결과를 토대로 세포독성을 나타내지 않는 50 μM을 flavonoids의 전처리 농도로 하여 세포배양실험에 이용하였다.

Fig. 2는 혈관내피세포에 0.05~1.0 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 30분 처리하여 산화적 독성을 유발시키고 24시간 이내에 혈관내피세포의 생존율을 조사한 결과이다. 그 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 세포생존율에 대한 dose-response 양상을 보여주었고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1~0.25 mM 농도에서 급격한 세포생존율의 감소를 나타내었으며(Fig. 2), 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 24시간 이내에 세포생존율이 30~40% 이상 감소하였다(Fig. 3). 한편 30분간 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출된 혈관내피세포를 50 μM (-)epigallocatechin gallate로 전처리하였을 때 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포독성을 완화시켜 세포생존율을 20% 정도 유의적으로 증가시켰다(Fig. 3). 그러나 50 μM apigenin을 처리한 경우에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포독성은 더 심화되어 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 세포손실이 현저히 증가하였고 18% 이상 세



**Fig. 2.** Dose dependence of endothelial viability by 30 min treatment of 0.05~1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Human umbilical vein endothelial cell viability during 24 hrs was assessed by MTT. Data (means ± SEM, 7 separate experiments) are expressed as percent cell survival relative to the viability measured at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-free incubation (viability = 100%). \*p < 0.05, relative to controls (no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Fig. 3.** Bar graphs showing effects of a 30 min H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pulse treatment on dose-response relationships between 50 μM (-)epigallocatechin gallate added to M199 culture media, and human umbilical vein endothelial cell viability after 24 hrs as assessed by MTT.

Data (means ± SEM, 4 separate experiments) are expressed as percent cell survival relative to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and (-)epigallocatechin gallate-free controls (viability = 100%). \*p < 0.05, relative to controls, \*\*p < 0.05, relative to respective H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone.

포생존율이 감소하였다. 이와 같이 apigenin과는 달리 (-)epigallocatechin gallate는 hydroxyl radical에 의한 세포독성을 경감시키는 항산화제로서의 활성을 강하게 나타낸다는 것을 알 수 있다. 이러한 (-)epigallocatechin gallate의 항산화적인 작용은 그것의 radical 소거작용에 의하여 발휘되었다고 볼 수 있지만(Table 1)(9), pentose phosphate pathway와 연결된 NADPH/glutathione 시스템과 lactate dehydrogenase에 의하여 조절되는 세포질내의 NADH/NAD<sup>+</sup> 시스템 등의 세포내 radical 방어기전을 활성화시키는 경로를 통하여 (-)epigallocatechin gallate의 항산화적인 작용이 발휘된다는 가능성도 배제할 수 없을 것이다.

**산화독성에 의한 세포사멸에 있어서 (-)epigallocatechin gallate의 억제효과**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출된 혈관내피세포는 세포사멸에 의하여 세포죽음으로 연결되는 지를 규명하고, 다양한 세포사멸 검출법을 이용하여 (-)epigallocatechin gallate가 항산화적 작용에 의하여 이러한 세포사멸현상을 억제시킬 수 있는 지를 조사하였다. Fig. 4는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출된 혈관내피세포를 (-)epigallocatechin gallate(panel C)와 apigenin(panel D)과 배양한 후에 세포핵을 염색시키는 Hoechst 33258로 염색하여 촬영한 microphotographs이다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 배양 후 24시간 이내에 응축된 세포핵을 가진 내피세포들이 많이 생성되었다(panel B). 또한 panel B에 있는 화살 표시 부분의 비핵성 세포 fragments인 세포사멸체(apoptotic bodies)도 출현하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 정상세포에서는 DNA 손상이나 chromatin 응축, 또는 세포사멸체의 출현 등의 형태학적인 변화의 조짐은 찾을 수가 없었다(panel A). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출된 혈관내피세포를 50 μM (-)epigallocatechin gallate를 처리하였을 때, 세포핵의 형태는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출되지 않은 정상세포와 비교하여 뚜렷한 차이를 발견하지

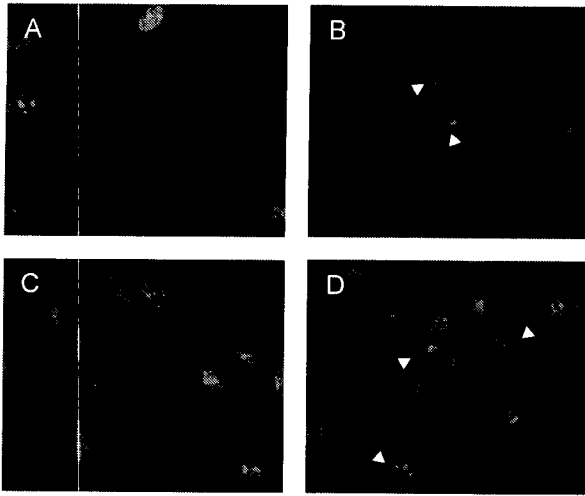


Fig. 4. Typical effects of  $H_2O_2$  in the absence and presence of  $50 \mu M$  (-)epigallocatechin gallate on nuclear morphology of human umbilical vein endothelial cells stained with Hoechst 33258.

Panel A, untreated time controls; panel B, cells exposed to  $0.25 \text{ mM } H_2O_2$  for 30 min; panels C, cells treated with  $0.25 \text{ mM } H_2O_2$  in presence of  $50 \mu M$  (-)epigallocatechin gallate; panels D, cells exposed to  $0.25 \text{ mM } H_2O_2$  in presence of apigenin, respectively.  $H_2O_2$  caused nuclear condensation and the appearance of apoptosis-like bodies (arrows). (-)Epigallocatechin gallate near-completely prevented these  $H_2O_2$ -induced nuclear morphological changes; apigenin were ineffective. Observations in five other slide sets were essentially identical. Magnification: 400-fold.

못하였다(panel C). 그 반면에  $50 \mu M$  apigenin을 처리하였을 때는  $H_2O_2$ 에 노출된 혈관내피세포의 핵손상을 가중시켜 응축된 세포핵과 세포사멸체와 같은 형상의 출현이 증가되었다(panel D). 현미경 상에서 응축되고 fragment된 세포핵을 가진 세포는 세포사멸을 겪고 있는 세포로 간주하고, 불규칙적이고 흐릿한 핵을 포함하는 세포들은 세포괴사를 겪고 있다고 한다(25,26). 따라서 본 연구의  $0.25 \text{ mM } H_2O_2$ 에 노출된 혈관내피세포는 세포사멸작용에 의하여 죽음을 맞게 되었고 여기에  $50 \mu M$  (-)epigallocatechin gallate는  $H_2O_2$ 에 의한 내피세포의 세포사멸을 억제시키는 항산화제로서 작용한다는 것을 알 수 있다. 반면에 Table 1에서 보여준 바와 같이, radical 소거활성이 미약한 apigenin은 세포사멸 억제효과를 전혀 보여주지 못하였고, 오히려 세포사멸을 유도시키는 것으로 나타났다.

세포사멸은 활성화된 핵산분해효소에 의하여 조직적으로 DNA가 nucleosomes 또는 oligosomes 크기로 절단되어 agarose 겔상에 "DNA laddering" 형태로 검출된다(22,27). Fig. 5는  $H_2O_2$ 에 의하여 초래된 세포사멸현상의 생화학적인 사례로 알려진 DNA fragmentation 현상에 대한 (-)epigallocatechin gallate와 apigenin의 효과를 기술한 것이다.  $H_2O_2$ 에 노출된 혈관내피세포로부터 추출된 DNA는 정상세포의 DNA와는 다른 독특한 fragments를 이루고 있으며(lane 3), 이것은 세포괴사에서 볼 수 있는 임의적인 DNA의 절단현상과는 다른 형상인 DNA laddering을 보여주었다.  $H_2O_2$ 에 노출된 내피세포에  $50$

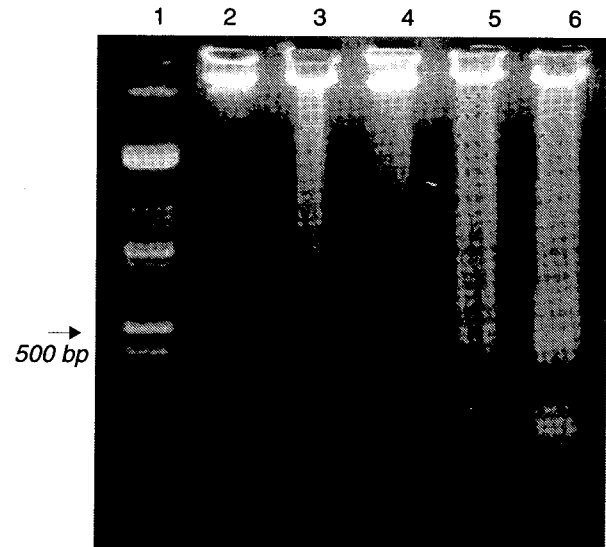
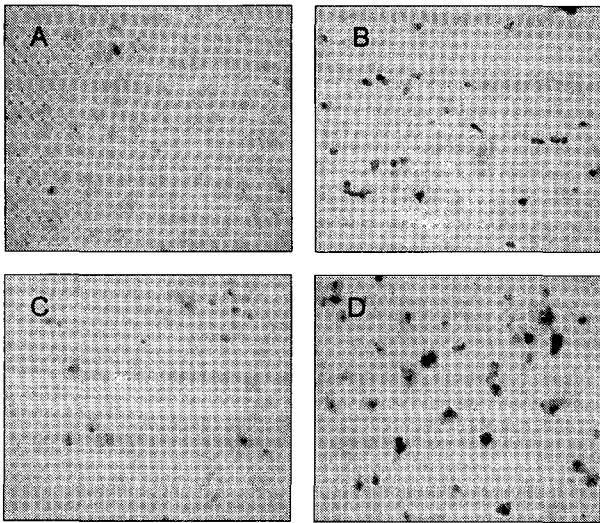


Fig. 5. Genomic DNA gel electrophoresis of human umbilical vein endothelial cells treated with  $H_2O_2$  in the absence and presence of  $50 \mu M$  (-)epigallocatechin gallate.

Endothelial cells ( $7 \times 10^5$  cells) plated on 100 mm culture dishes for 2 days were incubated for 30 min without (lane 2) and with (lanes 3 to 6)  $0.25 \text{ mM } H_2O_2$ . Endothelial cells were incubated as time controls or in presence of  $50 \mu M$  (-)epigallocatechin gallate (lane 4), luteolin (lane 5) or apigenin (lane 6). Nuclear DNA was extracted and electrophoresed. Lane 1 shows standard DNA markers. Five different experimental sets showed similar DNA run patterns.

$\mu M$  (-)epigallocatechin gallate를 처리하였을 때 DNA fragments는 사라졌다(lane 4). 그와 반대로 flavone인 apigenin (lane 6)을 처리한 경우에는 DNA fragmentation을 억제시키지 못하였다. 같은 flavone인 luteolin(lane 5)을 처리한 경우에도, apigenin과 마찬가지로 DNA fragmentation을 억제시키지 못하였다. 이로서 flavone 종류의 flavonoids는 혈관내피세포의 사멸억제작용을 갖지 않는다는 것을 유추할 수 있다.

(-)Epigallocatechin gallate의 DNA laddering 억제작용은 (-)epigallocatechin gallate가 산화적인 스트레스에 의하여 초래되는 혈관내피조직에서의 세포사멸현상을 억제시킬 수 있다는 것을 다시 한번 제시하고 있다. 산화적인 DNA 손상에 있어서 TUNEL 기법을 이용하여 나온 결과도 이러한 주장을 뒷받침하고 있다(Fig. 6). 예상한 바와 같이  $H_2O_2$ 에 노출된 내피세포에서는 DNA의 손상으로 염색된 세포핵이 많이 검출되었다(panel B). 그러나 여기에 (-)epigallocatechin gallate를 처리하였을 때(panel C), 염색된 세포핵이 대부분 사라지는 것으로 미루어 (-)epigallocatechin gallate는 현저하게 DNA fragmentation을 경감시킨다고 볼 수 있다. 반대로 apigenin(panel D)은 거의 모든 내피세포에서 TUNEL 염색이 강하게 나타났다. 이러한 결과는 flavones은  $H_2O_2$ 와 같은 활성산소종 및 radicals에 의한 세포사멸현상을 가중시키는 것으로 판명되었다. 본 연구에서는 (-)epigallocatechin gallate가 어떠한 작용기작을 통하여 세포사멸 억제작용을 유도하는지를 규명하지



**Fig. 6. Representative microphotographs of TUNEL-stained human umbilical vein endothelial cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and treated with 50 μM (-)epigallocatechin gallate.** Cells were exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min and then treated with 50 μM (-)epigallocatechin gallate (panel C), or 50 μM apigenin (panel D), respectively. Panel A, untreated time controls; panel B, cells exposed to 0.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min. Similar results were obtained in five other slide sets. Magnification: 200-fold.

않았다. 또한 (-)epigallocatechin gallate와 apigenin의 flavone이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 초래된 세포사멸에 어떻게 서로 반응을 나타내는지를 규명하여야 할 필요성이 여전히 남아있다.

결과적으로 catechin 형태의 flavonoids는 세포사멸을 억제시키지만 flavone 형태의 flavonoids는 세포사멸을 촉진시키는 바, 다양한 종류의 flavonoids는 혈관내피세포의 산화적 스트레스에 의한 세포사멸작용을 억제시키는 데 있어서 그 세포생리적인 역할이 본질적으로 다르다는 것을 알 수 있었다. 따라서 산화적 독성으로부터 혈관내피조직을 보호하기 위하여 (-)epigallocatechin gallate의 catechin flavonoids의 임상적인 활용이 가능하다고 본다.

**요 약**

본 연구에서는 free radicals의 산화적인 손상에 의한 세포사멸에 있어서 녹차성분의 하나인 (-)epigallocatechin gallate의 억제효과를 규명하였다. 우선 radicals 소거작용에 있어서 (-)epigallocatechin gallate는 탁월한 항산화력을 발휘하였다. 혈관손상과 직결되는 혈관내피세포를 이용하여 hydroxyl radical의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화적인 손상을 유발시켜 세포생존율을 조사하였는데, (-)epigallocatechin gallate는 100 μM 이하의 농도에서는 그 자체 독성이 없었고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 산화적 독성효과를 경감시키는 것으로 나타났다. 그러나 flavone인 apigenin은 고농도에서 독성을 가지며 radical 소거활성이 미약하고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 산화독성은 경감시키지 못하였다. 다양한 세포사멸 검출법을 이용하여 세포 및 세포핵의 형태학적 양상을 조사한 결과, 0.25

mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 24시간 이내의 세포죽음은 세포사멸현상에 의하여 초래되었다. 그러나 이러한 세포사멸과정을 겪고 있는 혈관내피세포에 50 μM (-)epigallocatechin gallate를 처리한 경우에 세포핵의 응축이나 DNA fragmentation은 사라지고 세포사멸작용을 억제시키는 효과를 보여주었다. 예상한 바와 같이 apigenin의 flavone은 세포사멸 억제효과를 나타내지 못하였다. (-)Epigallocatechin gallate는 녹차에 함유된 catechins의 하나로서 free radicals의 산화적 손상에 의한 세포사멸에 있어서 탁월한 방어적인 세포생리학적 기능을 지니고 있으며, 혈관노화 및 혈관손상과 함께 유발되는 세포사멸성 심혈관 질환의 예방과 치료에 기능성 식품 신소재로서 활용될 수 있으리라 본다.

**감사의 글**

본 연구는 2000년 한국과학재단에서 시행한 지역대학우수 과학자 연구비 지원(과제번호 R05-2000-000-00205-0)과 2001년도 한국과학재단 지역협력연구센터사업 한림대 실버생물산업기술연구센터(과제번호 R12-2001-007202-0)의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

**문 헌**

1. Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.
2. Buttke TM, Sandstrom PA. 1993. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15: 7-13.
3. Sarafian TA, Bredesen DE. 1994. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? *Free Radic Res* 21: 1-8.
4. Hockenbery DM, Olivai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.
5. Cotelle N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 1: 569-590.
6. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K. 2001. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47: 357-362.
7. Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J. 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J Ethnopharmacol* 79: 379-381.
8. Kris-Etherton PM, Keen CL. 2002. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 13: 41-49.
9. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74: 418-425.
10. Yang CS, Maliakal P, Meng X. 2002. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 25-54.
11. Wang ZY, Huang MT, Lou YR, Xie JG, Reuhl KR, Newmark HL, Ho CT, Yang CS, Conney AH. 1994. Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer Res* 54: 3428-3435.

12. Choi YT, Jung CH, Lee SR, Bae JH, Baek WK, Suh MH, Park J, Park CW, Suh SI. 2001. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sci* 70: 603-614.
13. Chen NY, Ma WY, Yang CS, Dong Z. 2000. Inhibition of arsenite-induced apoptosis and AP-1 activity by epigallocatechin-3-gallate and theaflavins. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19: 287-295.
14. Spencer JP, Schroeter H, Kuhnle G, Srai SK, Tyrrell RM, Hahn U, Rice-Evans C. 2001. Epicatechin and its *in vivo* metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochem J* 354: 493-500.
15. Yang GY, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, Yang CS. 2000. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis* 21: 2035-2039.
16. Sakagami H, Arakawa H, Maeda M, Satoh K, Kadofuku T, Fukuchi K, Gomi K. 2001. Production of hydrogen peroxide and methionine sulfoxide by epigallocatechin gallate and antioxidants. *Anticancer Res* 21: 2633-2641.
17. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756.
18. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetyl-low density lipoprotein. *J Cell Biol* 99: 2034-2040.
19. Miller MJ, Angeles FM, Reuter BK, Bobrowski P, Sandoval M. 2001. Dietary antioxidants protect gut epithelial cells from oxidant-induced apoptosis. *BMC Complement Altern Med* 1: 1-11.
20. Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89: 271-277.
21. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. 1982. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Ann* 17: 229-259.
22. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142: 67-77.
23. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501.
24. Carson DA, Ribeiro JM. 1993. Apoptosis and disease. *Lancet* 341: 1251-1254.
25. Lizard G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignote B. 1995. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 9: 1277-1287.
26. Gardner AM, Xu FH, Fady C, Jacoby FJ, Duffey DC, Tu Y, Lichtenstein A. 1997. Apoptotic vs nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Rad Biol Med* 22: 73-83.
27. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. 1990. Apoptosis: role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136: 593-608.

(2002년 5월 3일 접수; 2002년 8월 9일 채택)