

녹차 (-)Epigallocatechin-gallate에 의한 전립선암 세포주 DU145 세포고사 기전

이지현¹ · 정원훈^{3*} · 박지선² · 신미경⁴ · 손희숙² · 박래길¹

¹원광대학교 의과대학 미생물학교실 및 ⁴식품영양학과,
²전북대학교 식품영양학과, ³원광보건대학,

Green Tea (-)Epigallocatechin-gallate Induces the Apoptotic Death of Prostate Cancer Cells

Jienny Lee¹, Won-Hun Jeong^{3*}, Ji-Sun Park², Mi-kyoung Shin⁴, Hee-Suk Sohn² and Raekil Park¹

¹Department of Microbiology, Wonkwang University School of Medicine & ⁴Department of Food and Nutrition, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea

²Department of Food and Nutrition, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

³Wonkwang Health Science College, Iksan 570-750, Korea

(Received February 4, 2002)

(Accepted May 27, 2002)

ABSTRACT : The mechanism by which catechin-mediated cytotoxicity against tumor cells remains to be elusive. To elucidate the mechanical insights of anti-tumor effects, (-)epigallocatechin-gallate (EGCG) of catechin was applied to human prostate cancer DU145 cells. Cell viability was measured by crystal violet staining. Cell lysates were used to measure the catalytic activity of caspases by using fluorogenic peptide; Ac-DEVD-AMC for caspase-3 protease, Z-IETD-AFC for caspase-8 protease, Ac-LEHD-AFC for caspase-9 protease as substrates. The equal amounts of protein from cell lysate was separated on SDS-PAGE and analyzed by western blotting with anti-Fas antibody, anti-FasL antibody, anti-BCL2 antibody and anti-Bax antibody. (-)EGCG induced the death of DU145 cells, which was revealed as apoptosis shown by DNA fragmentation. (-)EGCG induced the activation of caspase family cysteine proteases including caspase-3, -8 and -9 proteases in DU145 cells. Also, (-)EGCG increased the expression of Fas and Fas ligand (FasL) protein in DU145 cells. The expression level of BCL2 was decreased in (-)EGCG treated DU145 cells, whereas Bax protein was increased in a time-dependent manner. We suggest that (-)EGCG-induced apoptosis of DU145 cells is mediated by signaling pathway involving caspase family cysteine protease, mitochondrial BCL2-family proteins and Fas/FasL.

Key Words : Prostate cancer, Apoptosis, Fas/FasL, BCL2/Bax

I. 서 론

암은 유전적 요인, 그리고 비유전적 요인의 복합적인 상호작용으로 발생한다(Nowell, 1976). 유전적 변형은 유전될 수 있지만, 대부분이 후천적으로 획득된다(Fearon과 Vogelstein, 1990). 우리나라 국민의 사망원인 중 각종 암으로 인한 사망은 1999년도에 55,005명으로 1990년도 38,490명에 비하여 10년 사이에 16,515명(42.9%)이 증가

하였다(보건복지부, 2000). 전립선암에 있어 가족력이 있는 경우를 연구한 결과 9% 미만에서만 유전적인 형태로 발견되었으므로(Carter 등, 1992), 나머지는 유전적 요인, 그리고 환경적 요인에 의한 상호작용의 결과로 추정된다. 암세포는 정상조직과는 달리 독자적으로 성장할 수 있고 주변 조직으로 침윤되거나 다른 장기로 전이하여 거의 무제한적으로 증식하는 성질을 가지고 있지만 정확한 발암 기전은 밝혀지지 않았다. 발암요인으로 인체 유해물질이나 방사선, 일부 바이러스 등이 알려져 있으며, 그 치료법으로 외과적 수술, 방사선 요법, 면역요법 및 각종 항암 화학제 등이 이용되고 있지만 그 치료의 우수성에도 불구하고 다양한 암의 종류에 대한 감수성 차이, 부작용, 재발 및 합병증 등의 문제점 때문에 인체에 무해하면서도 효과

*To whom correspondence should be addressed

Abbreviations : (-)EGCG, (-)epigallocatechin gallate; PBS, phosphate-buffered saline; HBSS, Hank's balanced salt solution; BCA, bicinchoninic acid; ECL kit, enhanced chemiluminescence kit; SDS-PAGE, dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

적으로 암을 치료할 수 있는 새로운 약제개발이 절실하다. 그래서 천연물의 항암효과가 크게 부각되고 있으며, 또한 암의 예방과 치료에 있어 식품 화합물의 약제로서의 역할이 폭 넓게 논의되고 있다.

1991년 미국건강재단 주최로 열린 뉴욕 국제 차심포지움에서 녹차를 매일 마시는 사람에게서 심장병과 암 발생율이 감소함을 보고하였으며, 콜레스테롤을 먹여 사육한 랫트에서 콜레스테롤 수준을 감소시킨 녹차의 효과를 보고하였다(Muramatsu 등, 1986). 현재까지 알려진 녹차의 주성분인 catechin류는 (+)catechin (+C), (-)epicatechin (-EC), (-)epicatechin gallate (-ECG), (-)epigallocatechin (-EGC), (-)epigallocatechin gallate (-EGCG) 등이 있다. 그 밖에 theanine, carotenoid, caffeine 및 mineral 등이 미량 포함되어 있다. 녹차 catechin은 새로운 혈관형성 억제작용(Cao와 Cao, 1999), 항균작용(Fukai 등, 1991), 혈소판응집 억제작용(Namiki 등, 1991), 혈압상승 억제작용(Hara와 Tono, 1990), 혈당 저하작용(Matsumoto 등, 1993), 항암작용(Tanaka 등, 1997) 등의 다양한 약리작용이 보고되었으며, catechin에 의한 암세포 손상이 세포고사 기전을 유도한다는 보고도 있다(Hibasami 등, 1996; Imai 등, 1997). 또한 녹차의 polyphenol 성분 중 가장 풍부한 (-)EGCG의 생물학적인 활성은 in vitro에서 암세포의 성장을 억제하거나(Asano 등, 1997), 전립선암 및 위암 세포를 세포고사(apoptosis)로 유도하며(Hibasami 등, 1998; Paschka 등, 1998), urokinase(Jankun 등, 1997), mitogen-activated protein kinases(MAPKs)(Ahn 등, 1999; Fujiki 등, 1998; Jankun 등, 1997), lipoxigenase, cyclooxygenase(Stoner와 Mukhtar, 1995), 그리고 vascular endothelial growth factor(VEGF)(Jung 등, 2001) 등에 작용하여 암의 발생을 예방한다. 최근, polyphenol (-)EGCG는 G0/G1-phase cell cycle arrest와 epidermoid carcinoma(A431) 세포의 세포고사를 유도한다고 알려졌다(Ahmad 등, 1997; Ahmad 등, 2000; Fujiki 등, 1998).

세포사멸은 유도기전에 의해서 세포괴사(necrosis)와 세포고사로 구분되며, 이는 세포의 형태적 및 생화학적 특성에 의하여 명백하게 구분된다. 생리적 및 화학적인 외상에 의한 세포사멸인 세포괴사와는 달리 세포고사는 개체의 정상적인 발달과 분화에 관여하며, 태아의 손발형성, 난자 세포의 배란, 그리고 뇌 신경세포의 시냅스 형성, 개체의 항상성(homeostasis) 유지에 관여하여 개체의 생존에 위협이 될 수 있는 비정상 세포를 제거하는 세포사멸 기전이다(Cohen, 1993; Pospisil 등, 1995; Raff, 1996).

이러한 세포고사에서 caspase family cysteine protease의 역할이 중요하게 보고되었고(Del 등, 1998), 이 중 caspase-8 protease의 전구부위에는 60개의 아미노산으로

구성된 죽음특이부위(DED : death effector domain)라 불리는 부분이 있는데, 이 부분은 caspase protease와 다른 단백질과의 결합에 중요하다(Fernandes 등, 1996; Muzio 등, 1996). 세포에 죽음신호가 전달되면 procaspase-8 protease는 단백질-단백질 결합을 이용하여 Fas(CD95) 또는 tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR-1)의 세포질 부위에 결합하여 세포사멸유도 신호복합체(death-inducing signaling complex)를 형성하며, 이때 procaspase-8 protease는 전구부위가 절단되면서 효소적 활성을 가진다(Hofmann, 1999). Caspase-8 protease는 Fas와 TNFR-1의 세포질 부위에 결합하기 때문에 여러 caspase 중에서 가장 가까이 세포막에 위치하며, 또한 Fas는 TNF가 관여하는 세포사멸의 주된 신호전달경로가 된다(Bang 등, 2000). 또한 세포고사 현상을 매개하는 미토콘드리아 BCL2 family 단백질 중에서 세포고사 기전을 억제하는 BCL2 단백질 및 세포고사 기전을 촉진하는 Bax 단백질 발현의 중요성도 세포사멸을 연구하는 과정에서 중요하게 보고되었다(Jurgensmeier 등, 1998; Knudson 등, 1995).

이 연구에서는 이상의 보고들과 관련하여 녹차 catechin의 항암효과와 기전을 제시하고자 하였다. 최근의 많은 역학적 조사연구에서 제시되고 있는 녹차 catechin의 암 세포주에 대한 세포독성 기전을 사람의 전립선암 세포주를 이용하여 조사하고, 이와 관련한 세포고사 신호전달 기전을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 세포 배양

(-)EGCG는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 0.1M의 농도로 dimethyl sulfoxide에 용해하여 -70°C에 보관하였고, 배지에 희석하여 사용하였다(DMSO 2 μ l/1 ml 기준). RPMI 1640, 우태아혈청, 항생제 및 trypsin 등의 세포 배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Fas, Fas ligand, Bax 그리고 BCL2에 대한 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. 그 외의 시약은 Sigma사를 통해 구입하였다.

사람 전립선암 세포주인 DU145 세포(KCLB 30081)는 한국 세포주은행에서 분양 받아 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10% 우태아혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였으며, 세포 생존율은 배양판(24-well plate)에 세포(1×10^5)를 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기에서 안정시킨 후 다양한 농도의 (-)EGCG를 분주하였다.

2. 세포 생존율 측정

다양한 실험 조건의 세포는 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양 후 crystal violet 염색액(0.5% crystal violet(w/v), 30% ethanol(v/v), 3% formaldehyde) 200 µl와 상온에서 5분 반응시켰다(Huh 등, 2001; Weldon 등, 2001). 배양판에 부착능력을 상실한 죽은 세포는 흐르는 물로 세척하여 제거한 후 부착되어 염색된 세포만을 얻어서 1 ml의 0.1 M sodium citrate/50% ethanol로 용해시켰다. 생존율은 세포 용해액의 흡광도를 ELISA 분석기(540 nm 파장)로 측정 후 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

3. DNA 분절

DNA 분절 현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit(Promega Co., Madison, USA)를 이용하여 추출하였다(Kim 등, 2000; Kim 등, 2001). 먼저 DU145 세포를 원심분리하여 배양액을 제거한 후 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)를 이용하여 세척하였다. 침전 세포에 nuclear lysis buffer(100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 0.5% SDS)를 추가하여 세포를 파쇄한 후, NaCl과 isopropanol을 처리하고 RNase를 37°C에서 5분 처리하였다. 세포 파쇄액은 단백질 침전 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 얻어진 genomic DNA를 70% 에탄올로 세척하여 진공건조시켰다. 여기에 TE buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 추가하여 DNA pellet을 용해한 후 UV 분광광도계(Ultaspec 3000, Pharmacia biotech, England)를 이용하여 260 nm와 280 nm 파장에서 DNA 농도 및 순도를 측정하였다. DNA 5 µg을 1.5% agarose gel에서 50 V, 2시간 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선등(UV light)을 이용하여 DNA 분절을 관찰하였다.

4. Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

DU145 세포는 4°C에서 lysis buffer(1% Triton X-100, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol(DTT))로 15분 파쇄한 후 13,000 rpm으로 15분 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 상층액은 bicinehonic acid(BCA; Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 방법으로 단백질을 정량하고 100 µg의 단백질을 분석 완충용액(100 mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM

DTT)에 희석된 형광기질과 37°C에서 30분 반응시킨 후 fluorometer(Molecular Devices Co., USA)를 이용하여 형광세기를 측정하였다. Caspase-3 protease의 효소 활성은 형광기질인 50 µM DEVD-7-amino-4-coumarin(AMC) (Calbiochem Co., CA, USA)을 이용하였고, proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성도를 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength (380nm)와 emission wavelength(460 nm)를 사용하였다. Caspase-8 protease 활성은 기질로서 Z-IETD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin(AFC), caspase-9 protease 활성은 Ac-LEHD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin(AFC)를 이용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 405 nm/510 nm의 파장에서 측정하였다.

5. Western blotting

DU145 세포를 원심분리하여 Hank's balanced salt solution(HBSS, 4°C)으로 2회 세척한 후 4°C에서 세포 파쇄용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)을 30분 처리하였다. BCA 방법을 이용하여 세포 파쇄액의 단백질을 정량하였다. 세포 파쇄액(단백질 : 200 µg)은 sample buffer와 혼합하여 100°C에서 5분 가열한 후에 12.5% sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동으로 분리, 전개된 gel의 단백질은 semidry 방법으로 실온에서 단위 면적 당 0.8 mA 전하로 2시간 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체와의 결합을 예방하였다. BCL2, Bax, Fas, 그리고 Fas ligand에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/Tris-buffered solution Triton X-100 (TBS-T)에 1 : 1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 3시간 반응 후 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase(Amersham Co., England)와 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBS-T로 3번 세척 후 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit: Amersham Co., England)를 이용하여 발색시킨 후에 ECL 필름에 현상하였다.

6. 통계분석

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이고 실험 결과에 대한 분석은 Student's t-test를 이용하였으며, 이들의 평균과 표준편차를 산출하여 통계적 유의성이 $p < 0.01$ 과 $p < 0.001$ 내에서 검증된 결과를 표시하였다.

III. 결 과

1. (-)EGCG가 전립선암 세포주 DU145에 미치는 독성 효과 및 세포고사 기전

전립선암 세포주에 대한 catechin의 세포독성을 알아보기 위하여 catechin 유도체인 (-)EGCG를 사용하여 전립선암 세포주 DU145에서 세포 생존율을 관찰하였다. (+)C를 포함한 (-)EC, (-)ECG, (-)EGC 등과 비교하여 (-)EGCG의 DU145에 대한 세포독성은 처리 후 12시간부터 세포 생존율이 감소하기 시작하였으며 시간 의존적으로 세포 독성이 증가하여 현저한 세포 생존율 감소를 관찰할 수 있었다(결과생략). 농도 의존적인 (-)EGCG의 세포독성을 조사하기 위하여 다양한 농도로 60시간 처리 시 31 μM 에서 4%, 62 μM 에서 20%, 125 μM 에서 50%, 250 μM 에서 70%,

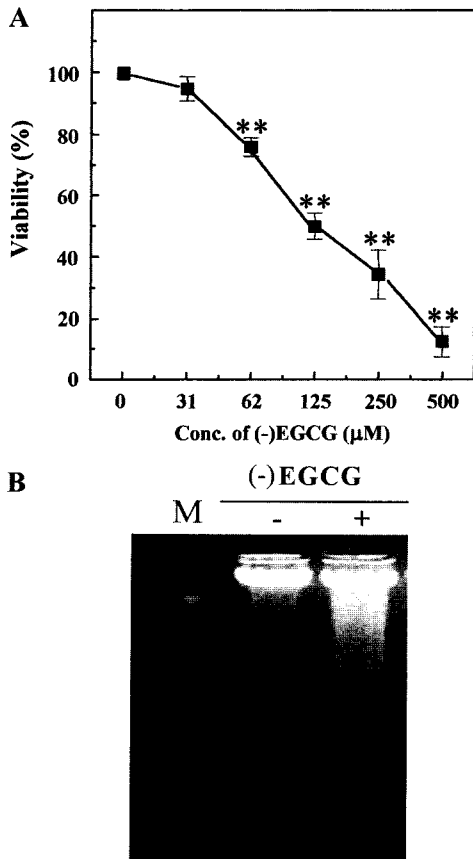


Fig. 1. (-)EGCG significantly induced the apoptosis of DU145 cells in a dose-dependent manner. DU145 cells (1×10^6 cells/well) were treated with various concentrations of (-)EGCG in the presence of 5% FBS for 60 hr (A). Then, cell viability was measured by crystal violet staining and represented as the mean (%) \pm SD of triplicates. *, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$ by Student's t-test, compared to media. Genomic DNA from (-)EGCG-treated cells was isolated and separated on 1.5% agarose-gel electrophoresis (B). DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

500 μM 에서 90% 이상의 생존율 감소를 나타냈다(Fig. 1A). 이상의 결과는 녹차 catechin 성분 중에서 (-)EGCG의 암세포에 대한 세포독성이 현저하여 화학적 암예방에 응용할 수 있는 가능성을 시사하였다. 또한, (-)EGCG에 의한 DU145 세포의 세포독성이 세포고사 기전에 의하여 매개되는지를 확인하고자 세포고사 현상의 특징인 DNA 분절현상을 확인하였다. (-)EGCG 200 μM 을 30시간 처리한 DU145 세포에서 사다리 모양의 DNA 분절현상이 관찰되었다(Fig. 1B).

2. (-)EGCG가 caspase 활성화에 미치는 영향

Caspase-family cysteine protease는 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 단백질로 세포질에서 불활성화 효소형태로 존재하다가 세포고사를 유도하는 자극에 의하여 활성화된다(Klaus와 Davide, 1998). 본 연구에서도 (-)EGCG에 의한 전립선암 세포주 DU145 세포고사 신호 전달 과정에서 caspase family의 활성변화를 조사하였다. DU145 세포에 (-)EGCG 200 μM 을 다양한 시간 처리한 후 caspase-3, -8, 및 -9 protease의 효소적 활성을 측정하였다. Caspase-3 protease의 활성은 (-)EGCG 처리 16시간 후부터 서서히 증가하기 시작하여 40시간째에 최고치(정상세포의 3.2배)를 나타냈으며, 그 후 세포사멸 때문에 급격히 감소하였다(Fig. 2A). Caspase-8 protease의 효소적 활성은 (-)EGCG 처리 직후부터 급격하게 증가하기 시작하여 8시간째에 최고치(정상세포의 2.2배)를 나타낸 후 서서히 감소하였다(Fig. 2B). 이 결과로 (-)EGCG에 의한 DU145 세포의 사멸과정은 Fas 단백질 발현증가에 의한 Fas/FADD의 결합, 그리고 FADD에 의한 caspase-8 protease 활성화의 매개를 시사하였다. 또한 caspase cascades 신호전달계에서 caspase-3 protease의 상방에 존재하는 caspase-9 protease의 효소적 활성을 측정하였다. Caspase-9 protease의 효소적 활성은 (-)EGCG 처리 직후부터 증가하기 시작하여 16시간째에 최고치(정상세포의 2.5배)를 나타낸 후 서서히 감소하였다(Fig. 2C). 즉, (-)EGCG는 현저한 caspase-3, -8, 및 -9 protease 활성 증가를 유도하였다. 현재까지 (-)EGCG에 의한 세포고사는 다양한 암세포에서 보고되었으나, (-)EGCG에 의한 세포고사 기전에서 caspase의 활성 증가는 아직까지 보고된 바가 없다. 이는 녹차의 성분 중 (-)EGCG에 의한 세포고사의 새로운 기전에 대한 가능성을 제시한다.

3. (-)EGCG가 Fas/FasL 활성화에 미치는 영향

Fas 항원은 TNF 수용체속(Tumor necrosis factor receptor family)에 속하며, 세포막 외부에 cysteine이 풍부한 3

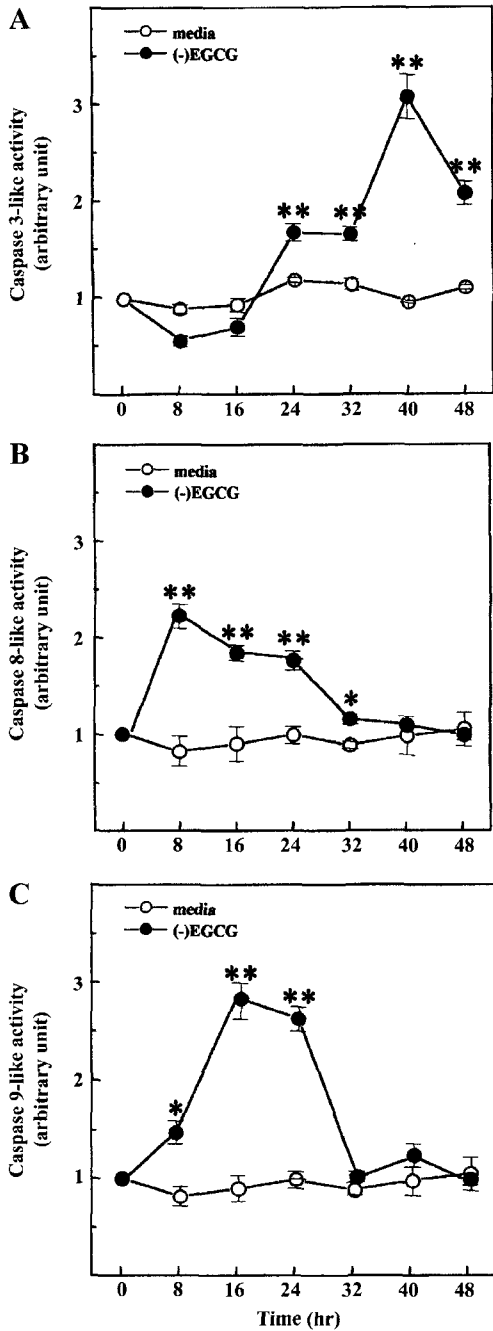


Fig. 2. (-)EGCG induced the activation of caspases family cysteine protease by DU145 cells. DU145 cells were treated with 200 μ M (-)EGCG for the indicated time points. Cell lysates were used to measure the catalytic activity of caspases by using fluorogenic peptide; Ac-DEVD-AMC for caspase-3 protease (A), Z-IETD-AFC for caspase-8 protease (B), Ac-LEHD-AFC for caspase-9 protease (C) as substrates. Data represent the mean \pm SD of quadruplicates. *, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$ by Student's t-test, compared to media.

개의 영역(cysteine rich domain)이 존재하는 단백질로서 Fas ligand(FasL)에 특이적으로 결합하여 세포고사 신호를 전달한다(Cosman, 1994). 본 연구에서도 caspase-8 활성

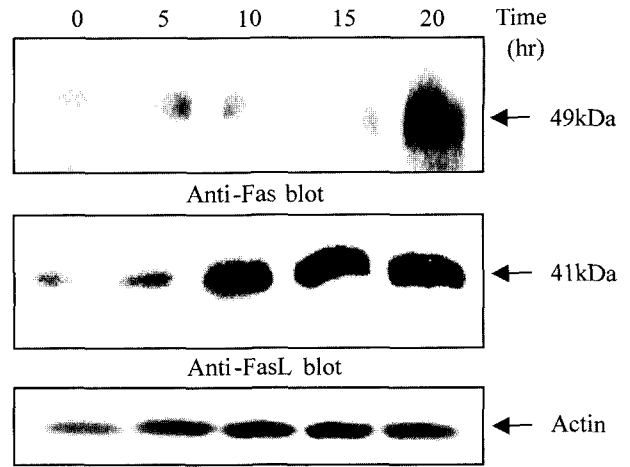


Fig. 3. (-)EGCG increased the expression of Fas and FasL protein in DU145 cells. Cells were treated with 200 μ M (-)EGCG for the indicated periods. The equal amount of protein from cell lysate was separated on 12.5% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-Fas antibody and anti-FasL antibody.

에 의한 Fas 단백질 활성의 매개를 추측하였으므로(Fig. 2B), (-)EGCG에 의한 DU145 세포사멸 과정에 Fas/FasL 단백질 발현의 연관성을 확인하고자 하였다. DU145 세포에서 (-)EGCG 200 μ M을 처리하고 5시간 후부터 FasL 단백질 발현이 증가하기 시작하여 10시간 이후에는 현저한 증가를 보였다(Fig. 3A). Fas 단백질의 발현은 15시간까지 거의 변화가 없다가 20시간에는 현저한 증가를 보였으며 (Fig. 3B), Fas, FasL 단백질의 정량분석을 확인하였다.

4. (-)EGCG가 BCL2와 Bax 단백질 발현에 미치는 영향

세포고사 현상을 매개하는 미토콘드리아 BCL2 family 단백질 중에서 세포고사 기전을 억제하는 BCL2 및 세포고사 기전을 촉진하는 Bax 단백질의 발현양상은 밀접한 연관성을 가지고 있다(Jurgensmeier 등, 1998; Knudson 등, 1995). 본 연구에서는 (-)EGCG에 의한 세포고사 과정에서 미토콘드리아의 역할을 확인하고자 DU145 세포에 (-)EGCG 200 μ M를 다양한 시간 처리한 후 세포 파쇄액으로부터 BCL2와 Bax 단백질의 발현을 조사하였다. (-)EGCG 200 μ M을 처리한 DU145 세포에서 BCL2 단백질의 발현이 감소하였다(Fig. 4A). 또한 세포고사를 촉진하는 Bax 단백질의 발현은 (-)EGCG 200 μ M 처리 10시간 이후부터 증가하기 시작하였으며(Fig. 4B), BCL2, Bax 단백질의 정량분석을 확인하였다.

IV. 고 찰

개체를 구성하는 생명의 기본단위인 세포는 지속적인

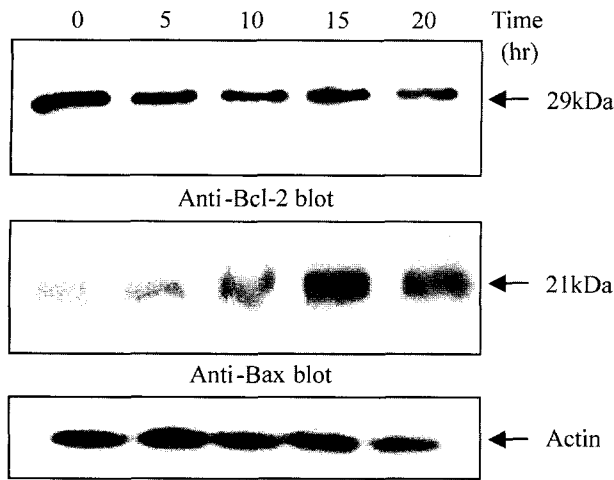


Fig. 4. Expression of BCL2 family proteins including BCL2 and Bax in (-)EGCG-treated DU145 cells. Cells were treated with 200 μ M of (-)EGCG for the indicated periods. The equal amounts of protein from cell lysates were separated on 14% SDS-PAGE and analyzed by western blotting with anti-BCL2 antibody and anti-Bax antibody.

증식과 사멸의 과정을 거치게 된다. 즉 개체는 자신을 구성하는 세포의 생성과 사멸의 정교한 균형을 통하여 건강한 상태를 유지하게 되는데, 이와 같은 균형이 여러 가지 원인에 의해 붕괴되거나 한쪽으로 치우치게 될 경우에 개체는 질병의 상태로 전이가 된다. 암, 자가면역질환 등은 제거되어야 할 세포들이 살아남아 발생하는 질병의 예이며, 암은 여러 단계의 과정을 거쳐 발생하는데, 개시, 촉진, 진행, 그리고 전이의 단계를 거쳐 정상세포가 암세포로 변화한다. 개시 단계는 자외선, 방사선, benzopyrene 등의 발암물질이 세포에 직접 작용함으로써 이루어지며, 이때 세포의 염색체 내에 있는 암 관련 유전자의 일부가 손상을 입는다. 촉진 단계는 담배, estrogen 및 사카린 등 발암을 촉진시키는 물질에 의해 이루어지는데, 개시된 세포들이 암세포로 본격적인 형태변화가 나타나는 단계이다. 진행 단계는 암세포 자신에게 산소와 영양분을 보급할 새로운 혈관을 만들고, 다른 장기를 침범할 전이능력을 보유하는 단계이다. 이러한 여러 과정은 세포의 DNA 안에서 이루어지며, 조절이 불가능한 세포분열과 악성종양을 발생시키는 변이 유전자를 만들어 낸다. 전이 단계는 원래 발생했던 장기를 거쳐 폐, 간, 뇌 및 뼈 등으로 병소가 확산되는 단계이다.

이와 같은 생명현상의 중요한 기점을 점유하고 있는 능동적인 세포의 사멸을 세포고사라 하고, 세포고사는 암세포 사멸에 중요한 역할을 하는데 이러한 세포고사 과정을 거쳐 개체는 필요가 없거나 노화되었거나 병든 세포를 제거해 나가게 된다. 세포고사가 일어나 세포는 주변의 세포들이나 대식세포 등의 식세포 작용에 의해 제거되므로, 생명체에게 세포의 죽음으로 인한 피해를 전혀 입지 않는

다. 이러한 세포고사의 형태학적, 생리학적 특징으로는 세포막 박리, 세포의 수축, 핵의 응축, DNA의 분절, 세포막을 이루는 지질인 phosphatidyl serine의 세포 외부로의 노출 등이 보고되고 있다. 본 연구에서는 녹차 catechin 유도체인 (-)EGCG가 전립선암 세포주 DU145에 미치는 영향을 조사하였다. 전립선암 세포주 DU145에 (-)EGCG 200 μ M을 60시간 처리한 결과 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며(Fig. 1A), 세포고사의 전형적인 특징인 DNA 분절현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 또한, 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소인 caspase-family cysteine protease는 세포질에서 불활성화 효소형태로 존재하다가 세포고사를 유도하는 자극에 의하여 활성화되며, 세포고사 신호전달기전에서 caspase protease의 중요성은 널리 알려져 있다(Klaus와 Davide, 1998). Caspase는 cysteine protease로써 세포막 수용체에 의하여 전달되는 “extrinsic stimuli” 혹은 세포막 수용체와 관계없는 “intrinsic stimuli”에 의하여 불활성화 상태에서 활성화 형태로 변환되면서 연속적으로 활성화신호를 전달하며(Allen 등, 1998; Widmann과 Gibson, 1998), 이들은 세포고사에서 중요한 역할을 한다(Tewari와 Dixit, 1995; Thornberry와 Lazebnik, 1998). 본 연구에서도 (-)EGCG에 의하여 caspase-3, -8, -9 proteases의 시간 의존적인 활성을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 그러나 본 연구결과와 (-)EGCG에 의한 caspase-3, -8 및 -9 proteases의 효소적 활성 증가는 아직까지 보고된 바 없다. Fas 단백질은 Fas ligand(FasL)와 결합하면 급격한 세포자살의 신호를 전달하지만, 세포의 종류에 따라 Fas/FasL의 상호작용은 차이가 있다고 알려져 있다(Singer와 Abbas, 1994). 활성화신호를 전달받은 Fas는 cytoplasmic tail에 존재하는 “death domain(DD)”이 세포질의 FADD와 결합하며 이들의 결합은 caspase-8 protease를 불활성화 상태에서 prodomain이 절단되면서 효소적 활성을 가지는 활성화형 caspase-8 protease가 되어 연속적으로 caspase 3-like protease의 활성화를 초래한다(Budihardjo 등, 1999). 본 연구결과에서도 (-)EGCG에 의하여 Fas와 FasL 단백질 발현이 증가하고(Fig. 3), 발현된 Fas에 의한 FADD의 결합증가가 caspase-8 protease의 활성화를 유도하였으리라 추정된다(Fig. 2). 또한, 세포고사 현상을 매개하는 미토콘드리아 BCL2 family 단백질 중에서 BCL2 단백질 및 Bax 단백질 발현의 중요성도 세포사멸을 연구하는 과정에서 중요하게 보고되었다(Jurgensmeier 등, 1998; Knudson 등, 1995). BCL2는 사람의 B세포 림프종(human follicular lymphoma)에서 분리된 암 유전자로서 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 신호전달기전을 억제한다. 이러한 세포고사를 억제하는 BCL2의 작용기전은 산화-환원반응의 조절, 세포 내 이온의 분포조절, caspase protease의 효소적 활성

조절, 미토콘드리아 막 전위, DNA 분절, 스트레스 연관 MAP kinase인 JNK 및 p38 kinase의 효소적 활성의 조절 등에 관여한다고 알려져 있으며, Bax 단백질은 BCL2와는 반대로 세포사멸을 촉진시키는 기능을 수행한다고 알려져 있다(Kroemer 등, 1998). 본 연구결과에서도 (-)EGCG에 의한 BCL2와 Bax 단백질 발현의 상관관계를 관찰한 결과 세포고사를 억제하는 BCL2 단백질의 발현 감소와 세포고사 촉진하는 Bax 단백질의 발현 증가를 확인할 수 있었으며, 이는 (-)EGCG에 의한 DU145 세포고사의 작용기전으로 추정된다. 이러한 세포고사 기전을 통하여 녹차 성분의 항암효과에 대한 연구는 녹차가 기호식품으로서만이 아니라, 암에 대한 화학적 예방 및 치료에 응용되는 약리 작용의 기전을 제시할 수 있으리라 본다.

감사의 글

이 논문은 원광보건대학 교내 연구비(2002)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Ahmad, N., Cheng, P and Mukhtar, H. (2000): Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 328-334.
- Ahmad, N., Feyes, D.K., Nieminen, A.L., Agarwal, R. and Mukhtar, H. (1997): Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **89**, 1881-1886.
- Ahn, H.Y., Hadizadeh, K.R., Seul, C., Yun, Y.P., Vetter, H. and Sachinidis, A. (1999): Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of cis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Mol. Biol. Cell.*, **10**, 1093-1104.
- Allen, R.T., Cluc.k M.W. and Agrawal, D.K. (1998): Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *CMLS*, **54**, 427-445.
- Asano, Y., Okamura, S., Ogo, T., Eto, T., Otsuka, T. and Niho, Y. (1997): Effect of (-)-epigallocatechin gallate on leukemic blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia. *Life Sci.*, **60**, 135-142.
- Bang, S., Jeong, E.J., Kim, I.K., Jung, Y.K. and Kim, K.S. (2000): Fas and Tumor Necrosis Factor-mediated apoptosis uses the same binding surface of FADD to trigger signal transduction, a typical model for convergent signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **275**, 36217-36222.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X. (1999): Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **15**, 269-290.
- Cao, Y. and Cao, R. (1999): Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature*, **398**, 381.
- Carter, B.S., Beaty, T.H., Steinberg, G.D., Childs, B. and Walsh, P.C. (1992): Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 3367-3371.
- Cohen, J.J. (1993): Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp. Pract. (Off Ed.)*, **28**, 35-43.
- Cosman, D. (1994): A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells*, **12**, 440-455.
- Del, P.L., Gonzalez, V.M. and Nunez, G. (1998): Caenorhabditis elegans EGL-1 disrupts the interaction of CED-9 with CED-4 and promotes CED-3 activation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33495-33500.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-767.
- Fernandes, A.T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G. and Alnemri, E.S. (1996): In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 7464-7469.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Komori, A., Sueoka, E., Kozu, T., Tada, Y., Suga, K., Imai, K. and Nakachi, K. (1998): Cancer inhibition by green tea. *Mutat Res.*, **402**, 307-310.
- Fukai, K., Ishigami, T. and Hara, Y. (1991): Antibacterial activity of tea polyphenols against phytopathogenic bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1895-1897.
- Hara, Y. and Tono, O.F. (1990): Hypotensive effect of tea catechins on blood pressure of rats. *日本營養・食糧學會誌*, **43**, 345-348.
- Hibasami, H., Achiwa, Y., Fujikawa, T. and Komiya, T. (1996): Induction of programmed cell death (apoptosis) in human leukemia cells by catechins compounds. *Anticancer Res.*, **16**, 1943-1946.
- Hibasami, H., Komiya, T., Achiwa, Y., Ohnishi, K., Kojima, T., Nakanishi, K., Akashi, K. and Hara, Y. (1998): Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol Rep.*, **5**, 527-529.
- Hofmann, K. (1999): The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol. Life Sci.*, **55**, 1113-1128.
- Huh, W.K., Gomez, N.J., Arafat, W.O., Xiang, J., Mahareshti, P.J., Alvarez, R.D., Barnes, M.N. and Curiel, D.T. (2001): Bax-induced apoptosis as a novel gene therapy approach for carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.*, **83**, 370-377.
- Imai, K., Suga, K. and Nakachi, K. (1997): Cancer-

- preventive effects of drinking tea among a Japanese population. *Prev. Med.*, **26**, 769-775.
- Jankun, J., Selman, S.H., Swiercz, R. and Skrzypczak, J.E. (1997): Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*, **387**, 561.
- Jung, Y.D., Kim, M.S., Shin, B.A., Chay, K.O., Ahn, B.W., Liu, W., Bucana, C.D., Gallick, G.E. and Ellis, L.M. (2001): EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br. J. Cancer.*, **84**, 844-850.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, G., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J.C. (1998): Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **95**, 4997-5002.
- Kim, M.S., Cheong, Y.P., So, H.S., Lee, K.M., Kim, T.Y., Oh, J., Chung, Y.T., Son, Y., Kim, B.R. and Park, R. (2001): Protective effects of morphine in peroxynitrite-induced apoptosis of primary rat neonatal astrocytes: potential involvement of G protein and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase). *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 779-786.
- Kim, M.S., So, H.S., Lee, K.M., Park, J.S., Lee, J.H., Moon, S.K., Ryu, D.G., Chung, S.Y., Jung, B.H., Kim, Y.K., Moon, G. and Park, R. (2000): Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Gen. Pharmacol.*, **34**, 349-355.
- Klaus, S.O. and Davide, F. (1998): Apoptosis signal by death receptors. *Eur. J. Biochem.*, **254**, 439-459.
- Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A. and Korsmeyer, S.J. (1995): Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, **270**, 96-99.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. and Resche, R.M. (1998): The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Nature Med.*, **6**, 614-620.
- Matsumoto, N., Ishigaki, F., Ishigaki, A., Iwashina, H. and Hara, Y. (1993): Reduction of blood glucose levels by tea catechin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 525-527.
- Muramatsu, K., Fukuyo, M. and Hara, Y. (1986): Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **32**, 613-622.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. and Dixit, V.M. (1996): FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, **85**, 817-827.
- Namiki, K., Yamanaka, M., Tateyama, C., Igarashi, M. and Namiki, M. (1991): Platelet aggregation inhibitory activity of tea extracts. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.*, **38**, 189-195.
- Nowell, P.C. (1976): The clonal evolution of tumor cell population. *Science*, **194**, 23-28.
- Paschka, A.G., Butler, R. and Young, C.Y. (1998): Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett.*, **130**, 1-7.
- Pospisil, R., Young-Cooper, G.O. and Mage, R.G. (1995): Preferential expansion and survival of B lymphocytes based on VH framework 1 and framework 3 expression: "positive" selection in appendix of normal and VH-mutant rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 6961-6965.
- Raff, M.C. (1996): Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell*, **86**, 173-175.
- Stoner, G.D. and Mukhtar, H. (1995): Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell Biochem. Suppl.*, **22**, 169-180.
- Singer, G.G. and Abbas, A.K. (1994): The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity*, **5**, 365-371.
- Tanaka, H., Hirose, M., Kawabe, M., Sano, M., Takesada, Y., Hagiwara, A. and Shirai, T. (1997): Post-initiation inhibitory effects of green tea catechins on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary gland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.*, **116**, 47-52.
- Tewari, M. and Dixit, V.M. (1995): Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3255-3260.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998): Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.
- Weldon, C.B., Burow, M.E., Rolfe, K.W., Clayton, J.L., Jaffe, B.M. and Beckman, B.S. (2001): NF-kappa B-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Surgery*, **130**, 143-150.
- Widmann, C. and Gibson, S. (1998): Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7141-7147.
- 보건복지부 한국중앙암등록본부, 한국중앙암등록사업 연례보고서: 2000.