

방사선 조사와 병행 처리한 녹차 Polyphenol의 혈구암세포 사멸 촉진 효과

ABSTRACT

Synergistic effect of green tea polyphenol co-treated along with gamma radiation in leukemia cell necrosis

Dept. of Radiology, Mokpo Medical Center

Lee, Hong Su

The Green tea, one of the most popular and favorite drinks in eastern societies, has been reported to have various therapeutic properties. These includes anti-cancer, anti-oxident, anti-endocrine disrupter effects. Its anti-cancer effect was said to be achieved through prevention of tumorigenesis, inhibition of tumor cell division and growth, acceleration of cancer cell necrosis, ect. In this study, we investigated the effect of green tea polyphenol(GTPP), treated to the leukemia cells, on the cell growth rate and cell necrosis. We also investigated GTPP effect on tumor cell necrosis, especially when treated along with gamma radiation. A leukemia cell line, HL-60, was used to determine the effect of GTPP treatment. Gamma radiation was applied at three degree dosages(3, 5, 7Gy) and cells were harvested after 48 and 72 hours for cell proliferation(MIT based) assay.

The GTPP inhibited the leukemia cell growth at the proper concentration. More significantly, it enhanced leukemia cell necrosis when treated together with gamma radiation. Simultaneous treatment of GTPP and gamma radiation increased cell necrosis ratio up to 40% higher than separated treatment. These results suggest that drinking of green tea or co-treatment of GTPP during gamma radiation therapy may result in better therapeutic achievement through enhancement of tumor cell necrosis.

I 서 론

동양에서는 오래 전부터 기호식품으로 사용되어 온 녹차의 효능에 대하여 최근 여러 가지 연구 결과가 보고되고 있는데 이 중에는 항암, 항산화, 항내분비 교란의 효능 등이 포함되어 있다. 항암 효과로는 암 발생 억제, 암세포 성장 및 분열 저해, 암세포 사멸 등의 효능을 들 수 있는데 본 연구에서는 녹차 추출물인 GTPP (Green Tea Polyphenol)를 이용하여 혈액암세포의 세포사멸 촉진 효능을 검증하고자 한다.

악성종양의 치료에 사용되는 화학요법제가 수백여 종이 개발되어 임상에 사용되고 있다. 임상에서 광범위하게 사용되고 있는 항암제는 암환자의 완전 치유까지 좋은 결과도 있었으나 한편으로는 문제점도 많았다. 암세포의 항암제에 대한 내성과 다약제 내성 그리고 암세포 뿐만 아니라 정상세포의 손상과 면역기능에 영향을 미치는 등 심각한 부작용과 후유증을 초래하는 경우도 많았다. 이러한 문제점에 있어서 암환자 치료시 정상세포와 암세포를 구별하여 선별적으로 암을 치료하는 것이 중요한 과제라고 생각한다. 또한 방사선이 원자력산업과 의료용 등에 광범위하게 사용되어짐에 따라 인체에 대한 방사선의 직·간접적인 위험이 증가되고 있다. 방사능이 인체에 치명적인 것은 방사선을 조사하면 방사선의 강한 전리작용에 의해 세포핵 속의 유전 물질이나 유전자가 돌연변이를 일으키거나 파괴하기 때문이다. 이로 인해 암이나 기형아 출산 등의 유전병이 유발되거나 심한 경우 사망에 이르기 때문이다(서, 1997). 방사선을 생체에 조사했을 때는 방사선의 에너지가 생체에 흡수되고 이에 수반하여 화학변화가 일어나며, 이어서 변화된 물질을 포함한 여러 가지 생화학적 작용이 발생하여 최종적으로 생물학적 단계인 생체에 변화가 나타나게 된다(이, 1987).

포유동물의 방사선 장애는 병적 상태 또는 개체 사망 등인데, 피폭된 생체의 방사선장애는 시기에 따라 조기효과(早期效果)와 만발효과(晩發效果)로 구별되어 진다. 조기효과는 다량의 방사선을 비교적 짧은 시간에 조사하였을 경우 피폭 후 바로 나타나며 급성치사는 간세포(幹細胞)의 생성의 정지에 의한 세포수의 감소에 원인이 있는데, 중추신경장애를 제외하고는 거의 회복이 이루어진다. 만발효과는 피폭 후 오랜 시간이 지나서 발생하는 것으로 백혈병을 포함하는 암의 발생, 백내장, 불임 등과 같은 국소적 영향, 수명 단축 등으로 회복이

어려운 상해로 남게 된다(이, 1987; Brode, 1968; Upton, 1968). 방사선의 피폭을 완전히 피하는 데는 기술적으로나 경제적으로 한계가 있다.

따라서 방사선을 잘 관리함으로써 피폭의 최소화를 유지하는게 가장 중요하다. 하지만, 핵사고나 부주의에 의한 방사선원예의 노출 등과 같은 상황에 직면하였을 경우 먼저 대처해야 할 것은 생체에 방사선 장애를 예방하기 위하여 차폐 물질을 이용하는 것이다. 하지만, 위기 사항시 차폐물질을 활용하지 못하고 피폭을 당하였을 경우는 이를 대처할 만한 화학적 약품 제재가 필요로 하게 된다. 방사선 사고에 대비해서 연구가 진행된 것은 cysteine, mercaptoethylamine 등의 SH 화합물, 5-hydroxytryptamine(serotonin), histamine, cyanides, P.A.P(para-amino propiophenone), EDTA, Vit E 등의 방어제를 통한 방사선보호 등과 산소효과, 온도효과 등에 관한 것이다(이, 1987). 하지만, 이들 방어물질 등은 모두 독성이 강한 제재로써 생체에 적용하는 데에는 어려움이 있기 때문에 무독성 방호제재가 절실히 필요하다고 하겠다.

차는 작물학상으로는 특용작물의 기호품에 속하고 식물학상으로는 종자식물에 속한다. 차는 山茶科이고 茶屬이며 種은 차이다. 학명은 *Camellia sinensis*이다(정, 1997). 차의 종류에는 춘차, 하차, 녹차, 오롱차, 홍차, 자스민차 등이 있는데, 그 중 녹차(Green tea)는 중국에서 음용 하기 시작하여 한국, 일본을 포함한 전 세계적으로 전파되어 건강 증진, 신체 기능 조절에 있어서 유효한 기호식품으로 산화효소의 작용을 억제하여 건조시켜 제조한 것으로 다도(茶道)등의 사회적 기능 뿐만 아니라 특수한 영양 성분을 다량 함유하면서 약리적 효능 및 유효성분들이 과학적으로 밝혀져 학계에 비상한 관심을 유발시키고 있다(윤, 1994). 녹차(Green tea)는 물 다음으로 인기가 많고 소비가 많은 음료수 중의 하나로 무독성이면서 널리 분포하기 때문에 전 세계적으로 사람을 대상으로 한 암 예방 억제제로서 관심 있는 연구 분야로 주목받고 있다(Yoshizawa et al., 1987). 녹차에 대한 연구가 본격적으로 진행된 것은 녹차 성분 중 카페인을 발견하면서부터 75~80%의 수분과 20~25%의 고형물질로 이루어졌음이 알려진 뒤이다. 초창기에는 녹차의 생리 활성물질인 catechin의 분리와 정제에 곤란함이 있어 성분과 생체내 기전에 관한 연구가 거의 진행되지 못했으나, 차잎에서 몇몇의 학자들에 의해 catechin 성분 중 (-)epicatechin((-) EC), (-)catechingallate(CG), (-)epicatechin gallate (ECG),

(-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechingallate(EGCG)가 분리되면서 활발한 연구가 진행되기 시작되었다. 녹차의 카테킨(Catechin) 성분은 항암 효과가 있음이 알려져 있다. 녹차의 카테킨 성분은 설치류 등에서 피부, 전위, 식도, 십이지장, 결장암 등을 억제시키고 생쥐에서는 TPA-유도 피부암 축진을 억제시키는 것으로 알려져 왔다(Fujiki H et al., 1998). 그중 (-)-epigallocatechin gallate(EGCG)는 폴리페놀의 중요한 구성 성분이다(Zong et al., 1998). 녹차에는 다량의 항산화 폴리페놀 물질인 caffein, theophylline을 함유하는 alkaloid와 theaflavin, flavonoid, tannin등을 함유하고 있는데, 이들은 녹차의 정미성분으로 중요할 뿐만 아니라 항균작용, 갑상선 기능 항진 억제, 항산화작용, 암발생 억제, cholesterol 재흡수 억제, 충치예방, 혈소판 응집 억제, 각성, 간장, 이뇨작용, 심근 및 신경 증추를 자극하고 근육 이완, 위산분비, 배뇨 촉진 및 약리대사 활성화와 산소 소비 증가로 신진대사율을 증가시킨다고 보고되었다(Chung and Wang 1993; 정, 1997; 이, 1989; 신, 1986; 여 등, 1995). Tannin은 phenol기를 다량 함유하는 중합체로 녹차 생엽에 약 10~20% 정도 함유되어 있는데, tannin은 단백질과 결합하는 특성을 가지고 있는 폴리페놀을 총칭한다(조 등 1993). Tannin의 화학성분 중에서 중요한 것은 차의 색깔, 滋味 및 향기 등과 관련된 catechin 유도체이다.

Yamane등(1996)은 green tea 추출물을 지원자를 대상으로 하여 1g/day 선량을 임상적으로 사용하였는데, 지원자에서 특별한 독성 및 병리조직학적 병폐가 없음을 관찰하였다. Chen 등(1997)도 GTPP의 체내 대사 기전을 관찰하기 위하여 decaffeinated green tea(DGT, 25 mg/kg)를 쥐의 체내에 구강 흡수시켜 plasma와 tissue에서의 분포를 HPLC을 통해 분석하였는데, kidney보다 liver, lung에서 적은 양이 분포하며, 녹차의 polyphenol은 주로 bile과 urine을 통해 배설된다고 보고하였다.

본 실험은 항산화, 항암작용 등 여러 작용 가능성을 가지고 있는 것으로 알려진 녹차 추출 성분 물질인 GTPP를 이용하여 1) 종양세포주에 대하여 GTPP의 처리가 세포 성장에 어떤 영향을 미치는지 관찰하였으며 2) 방사선 감수성을 관찰하고자 종양세포주를 방사선에 선량별로 노출시켜 치사율로 관찰하였고 3) 방사선 조사와 병행 처리한 GTPP의 작용을 조사하기 위하여 세포주를 GTPP로 처리한 후 일정기간 배양하고 배양된 세포에 방사선을 조사하여 다시 일정기간 배양하여

MTT assay를 통해 세포의 성장 억제율을 관찰하여 GTPP가 방사선에 조사된 종양세포주의 손상 또는 방어 작용에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

II 재료 및 방법

1. 실험재료 및 사용기기

1.1. 실험재료

실험에 사용한 녹차 추출물인 GTPP는 Sigma(USA), 회사로부터 구입하였다. 인체 기원 암세포주 HL-60 (Human leukemia, acute promyelocyte)은 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank)으로부터 구입하여 사용하였다. 세포주 세포배양액인 RPMI 1640(GibcoBRL, U. S.A), 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco BRL, U.S.A) penicillin-streptomycin(GibcoBRL, U.S.A)과 Fungizone(GibcoBRL, U.S.A) 및 sodium bicarbonate등은 Gibco 사(Grand Island, NY)제품을 사용하였다. 증식된 세포주의 동결보관을 위하여 동결용액인 10% DMSO(dimethylsulfoxide, Sigma, U.S.A)와 20% FBS, RPMI 1640을 사용했다. 세포 생존율 측정에 사용되는 MTT assay kit는(Boehringer Mannheim, Germany)제품을 사용하였다.

1.2. 사용기기

세포 계대배양에 사용되는 CO₂ incubator는(Queue model Qwj-300T, U.S.A)을 사용하였고, 세포독성 측정을 위한 생존율 검사시 사용되는 위상차 현미경(Olympus IMT-2-21) 및 MTT측정을 위한 microplat reader (ELISA reader)는 (EMAX, Molecular Device, U.S.A) 사용하였으며, 세포 방사선 선량별 조사에 사용한 blood irradiator는 전남대학교병원 임상연구소에 있는 Nodion사의 Gammacell 3000 Elan system(Canada, 선원: ⁶⁰Co gamma ray)을 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. 암세포주 계대배양

실험에 사용된 암세포주는 인체 기원 암세포주로 전골수성 백혈병 세포주 HL-60(Human leukemia, acute promyelocyte)를 이용하였다. 세포주를 20 ml 원심

분리관에 넣고 penicillin-streptomycin과 Fungizone 및 10% FBS가 포함된 RPMI 1640에 넣어서 800 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 2회 정도 반복하여 세포주에 있는 DMSO를 세척하여 제거시킨 후 10% FBS가 포함된 RPMI 1640배양액에 세포 수를 2×10^4 ml 정도로 조정된 후 culture flask에 넣어서 섭씨 37°C, 5% 이산화탄소를 포함한 배양기 내에서 배양하였다. 3~4일에 한 번씩 계대를 유지하였다. 본 실험에서는 8~10대 사이의 계대배양 중인 대수기의 증식력이 왕성한 세포를 이용하였다.

2.2 각 농도별 녹차 추출물(GTPP) 준비

실험에 사용한 정제된 Green Tea 추출물(GTPP) 0.01 mg을 100 ml의 RPMI 1640 배양액에 넣어 녹인 후 Syringe filter(0.22 μ m NALGENE)로 여과하여 저장용액(stock solution)을 만들어 알루미늄 호일로 감아서 냉장소(4°C의 냉장고)에 보관하였다. 실험 직전에 저장용액을 RPMI 배양액으로 희석하여 10%, 20%, 30%, 40%, 50%.....100% 용액을 만들었다(Table 1). GTPP 농도는 실험시 96 well plat에 포함되는 배양액 100 μ l에 대한 최종희석 농도이다.

2.3 암세포독성 실험

계대배양된 HL-60세포를 15 ml 원심분리관에 넣고 penicillin-streptomycin과 Fungizone 및 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배양액에 넣어 800 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 2회 정도 반복하여 세척한 후 상층액을 버리고 침전세포에 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배양액을 넣어 세포수를 5×10^4 /well(50 μ l) 정도로 조정된 후 96 well plat에 50 μ l씩 각각 분주한 다음 GTPP를 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 30 μ g/ml, 40 μ g/ml, 50 μ g/ml, 60 μ g/ml, 70 μ g/ml, 80 μ l, 90 μ g/ml, 100 μ g/ml을 각 well에 농도별로 50 μ l씩 분주하여 최종 용량은 100 μ l/well이 된다. 가볍게 혼합한 다음 37°C에서 5% CO₂ 배양기 및 100% 습도의 조건에서 48시간 배양 그리고 72시간 배양하였다. 배양된 세포는 MTT kit를 이용하여 각각의 생존율을 측정하였다.

2.4 암세포 방사선 감수성 실험

HL-60세포의 방사선 조사에 관한 방사선 감수성 실험을 하기 위하여 계대 배양된 HL-60세포를 15 ml 원심분리관에 넣고 penicillin-streptomycin과 Fungi-

zone 및 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배양액에 넣어 800 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 2회 정도 반복하여 세척한 후 상층액을 버리고 침전세포에 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배양액을 넣어 세포수를 5×10^4 /well(100 μ l) 정도로 세포수를 조절하였다. 15 ml 원심분리관에 4개 조절된 세포를 5 ml씩 각각 넣고 대조세포(control cell)를 제외한 다른 3개의 세포에 혈액 조사 장치인 Gammacell로 각각 3 Gy(300 rad), 5 Gy(500 rad), 7 Gy(700 rad) 조사하였다. 조사된 세포를 96 well plat의 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 37°C에서 5% CO₂ 배양기 및 100% 습도의 조건에서 48시간 배양 그리고 72시간 배양하였다. 배양된 혈구암세포를 MTT kit를 이용하여 생존율을 측정하였다.

2.5 GTPP 처리 전, 후 방사선 선량별 암세포성장예 관한 실험

계대배양된 HL-60세포를 각 15 ml 원심분리관에 넣고 penicillin-streptomycin과 Fungizone 및 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 1640에 넣어 800 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. RPMI 1640 배양액으로 세포수를 5×10^4 /well로 조정된 후 조정된 세포를 15 ml 원심분리관 4개에 각각 3 ml씩 분주하고 여기에 GTPP 희석액(40 μ g/ml, 50 μ g/ml, 60 μ g/ml 농도별로 희석한 GTPP용액)을 각 농도별로 3 ml씩 분주하여 가볍게 흔들어 잘 혼합한 후에 37°C, 100%습도를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함한 배양기 내에서 6시간 배양하였다. 배양된 세포주를 비교 세포(control cell)를 제외한 다른 3개의 세포에 혈액조사 장치인 Gammacell로 각각 3 Gy(300 rad), 5 Gy(500 rad), 7 Gy(700 rad) 조사하였다. 조사된 세포를 96 well plat의 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 37°C에서 5% CO₂ 배양기 및 100% 습도의 조건에서 48시간 배양 그리고 72시간 배양하였다. 혈액 조사장치에서의 암세포 조사는 아래 수식에 의하여 각각 6 sec/1 Gy씩 조사하였다. 즉 3 Gy는 18초, 5 Gy는 30초이고 7 Gy는 42초를 조사하였다. 배양된 세포는 MTT kit를 이용하여 각각의 생존율을 측정하였다.

$$\begin{aligned}
 \text{TS (min)} &= \frac{\text{Desired Central Dose (rad)} \times 60 \text{ min/h}}{\text{CDR (rad/h)} \times \text{Decay Factor}} \\
 &= \frac{1000 \text{ rad} \times 60 \text{ min/h}}{6.8 \times 10^4 \text{ rad/h} \times 0.9828}
 \end{aligned}$$

2.6 MTT Assay

혈구암세포인 HL-60세포를 생존율을 Cell Proliferation kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 세포의 Proliferation과 viability를 측정하는 것으로 배양하던 세포를 hemocytometer를 이용하여 96 well plat로 100 μ l 배양액 안에 5×10^4 /well이 되게 분주한 다음 CO₂ incubator안에 넣고 48시간, 72시간 각각 배양된 96 well에 MTT assay kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하였다. 각각 배양된 96 well에 MTT 반응액 50 μ l을 넣어 섭씨 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 4시간 동안 배양시킨 후 490 nm 파장에서 ELISA 판독기(EMAX, Molecular Device, U.S.A)로 흡광도를 측정하였다.

2.7 Synergistic Effect의 계산

방사선조사와 병행 처리한 녹차 GTPP의 사멸 유도 효과에 대한 예상값은 GTPP의 농도별 암세포독성검사 값을 방사선량 control값에 곱하여 예상치(calculated value)를 얻은 다음 실제값(determined value)을 아래 공식에 대입하여 계산하였다.

$$\% \text{ synergism} = \frac{\text{calculated value} - \text{determined value}}{\text{determined value}} \times 100$$

III 결 과

1. 녹차 GTPP에 의한 혈액암세포 사멸 유도 효과

1) 혈구암세포에 대한 농도별 GTPP 처리 효과

혈구암 세포주에 GTPP 처리하여 농도별로 세포 생존율을 비교하였다. HL-60 세포주의 GTPP처리 후 48 시간 배양에서는 대조군에 비해 농도가 높아질수록 점차적으로 완만하게 세포사멸을 증가시키는 경향을 보였다.

GTPP를 30 μ g/ml까지는 90%의 생존율을 유지하다가, 40 μ g/ml에서는 80%, 80 μ g/ml에서는 약 70%까지 생존율이 감소하였다. 72시간째 배양하였을 때 GTPP는 30 μ g/ml 농도에서는 세포분열을 완전 억제하였다(Table 1, Fig 1).

GTPP를 처리하지 않은 대조군에서는 세포수가 약

Table 1. Effect of GTPP treatment on cell growth of HL-60

Concentration of GTPP(μ g/ml)	Hours	
	48 hr	72 hr
control	1.00 \pm 0.01	1.52 \pm 0.02
10	0.95 \pm 0.02	1.44 \pm 0.04
20	0.93 \pm 0.05	1.21 \pm 0.00
30	0.88 \pm 0.08	1.00 \pm 0.05
40	0.81 \pm 0.03	0.87 \pm 0.01
50	0.76 \pm 0.02	0.81 \pm 0.03
60	0.73 \pm 0.06	0.77 \pm 0.04
70	0.75 \pm 0.04	0.69 \pm 0.04
80	0.68 \pm 0.03	0.58 \pm 0.05
90	0.64 \pm 0.03	0.57 \pm 0.03
100	0.58 \pm 0.02	0.51 \pm 0.01

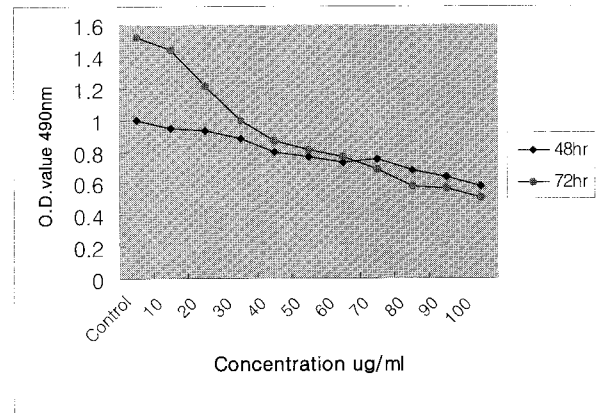


Fig. 1. GTPP inhibited the leukemia cell growth at the appropriate concentration

50% 증가하였으나(1.52 \pm 0.02) 30% 이상 처리군에서는 세포수 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 1).

HL-60세포주는 GTPP의 농도가 높을수록 뚜렷한 세포독성이 관찰되었다.

2) 혈구암세포에 대한 방사선 조사효과

혈구암 세포인 HL-60 세포는 방사선 조사량에 비례하여 사멸률이 증가하는 경향을 보였다 방사선이 조사된 세포에서 3 Gy 방사선 조사에서는 48시간 배양과 72시간 배양에서 각각 0.98 \pm 0.00 과 0.92 \pm 0.01로 약 1%정도의 세포수 감소를 보였다. 5 Gy에서는 0.84 \pm 0.03와 0.82 \pm 0.03으로 약 4%의 감소를 보였

Table 2. Comparison of dose and times after irradiation in control

Doses (Gy)	48 hr	72 hr
0	1.00 ± 0.01	1.52 ± 0.02
3	0.98 ± 0.00	0.92 ± 0.01
5	0.84 ± 0.03	0.82 ± 0.03
7	0.64 ± 0.02	0.54 ± 0.02

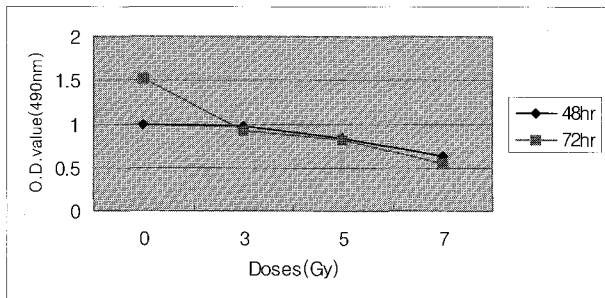


Fig. 2. Gamma Irradiation Enhanced Leukemia Cell Necrosis in a Dosage Dependent Manner

고, 7Gy에서는 0.64 ± 0.00와 0.54 ± 0.03로 16%의 감소를 보였다(Table 2). 그리고 72시간 배양에서 대조군과 비교하여 볼 때 3 Gy에서는 약 40%의 세포 감소를 보였으며 5 Gy에서는 46%, 7 Gy에서는 약 75%의 세포 감소를 보임으로서 방사선 선량이 높을수록 그리고 배양시간이 경과할수록 세포수의 감소가 관찰되었다(Fig. 2). 시간이 경과하여도 세포수가 증가가 관찰되지 않는 것은 방사선 조사가 세포분열을 억제하는 결과를 유도하였음을 의미하며, 이 실험에서 볼 때 HL-60 세포주는 방사선에 대한 감수성이 있는 세포로 확인할 수 있다.

2. GTPP 처리한 혈구암세포의 방사선 조사 효과

방사선 조사와 녹차 GTPP 처리는 개별적으로 혈구암세포의 사멸을 유도하였다(Fig. 1, 2). 따라서 두가지 처리를 병행하였을 때 그 효과가 더 크게 나타난 것으로 예상되어 혈구암세포에 GTPP를 처리한 뒤 방사선을 선량별로 조사하였다. 녹차 GTPP 투여후 48hr 대조군(1.00±0.01)과, 40 µg/ml(0.81±0.03), 50 µg/ml(0.76±0.02), 60 µg/ml(0.73±0.06)의 결과를 관찰하였고 GTPP처리 후 3 Gy 방사선조사시, 처리전(0.98±0.00)

Table 3. Relative cell proliferation at 48hrs after co-treatment of GTPP & γ-irradiation

Gy	GTPP(µg/ml)			
	0	40	50	60
3	0.98 ± 0.01	0.77 ± 0.00	0.59 ± 0.06	0.58 ± 0.00
5	0.84 ± 0.03	0.69 ± 0.07	0.58 ± 0.01	0.57 ± 0.01
7	0.64 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.41 ± 0.02

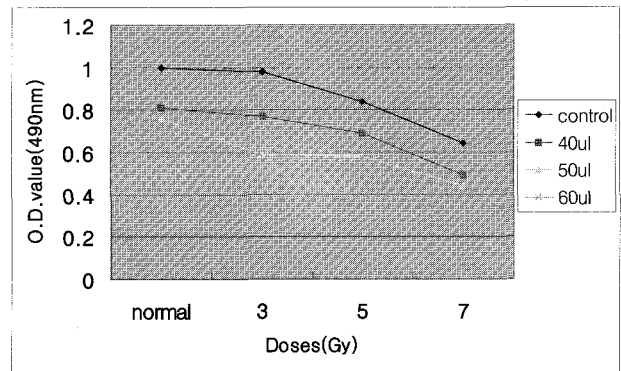


Fig. 3. Comparison of concentration and doses after irradiation at 48 hr

에 비해 처리 후 40 µg/ml(0.77±0.00), 50 µg/ml(0.59 ± 0.06), 60 µg/ml(0.58±0.00)에서 세포수의 감소를 나타내었고, 5 Gy 방사선 조사시, 처리전(0.84±0.03)에 비해 처리 후 40 µg/ml(0.69±0.07), 50 µg/ml(0.58 ± 0.01) 60 µg/ml(0.57±0.01)를 보여 세포 성장률이 감소함을 알 수 있었다, 7 Gy 방사선 조사시, 처리전(0.64 ± 0.00)에 비해 처리 후 40 µg/ml(0.49±0.01), 50 µg/ml(0.44±0.01), 60 µg/ml(0.41±0.02)를 보여 방사선 조사 선량과 녹차 GTPP 농도가 높을수록 세포수의 성장률이 감소함을 보이고 있다(Table 3, Fig. 3).

상승효과를 보면 3 Gy 방사선 조사시 40 µg/ml에서는 0.09%, 50 µg/ml 26.23%, 60 µg/ml 23.34%, 5Gy 방사선 조사시, 40 µg/ml에서는 -1.39%, 50 µg/ml 10.06%, 60 µg/ml 7.57%, 7 Gy 방사선 조사시, 40 µg/ml에서는 5.79%, 50 µg/ml 10.54% 60 µg/ml 13.95%의 상승률을 나타내었다(Fig. 4).

녹차 GTPP 투여후 72 hr 대조군(1.52±0.02)과, 40µg/ml에서는 (0.87±0.01), 50 µg/ml(0.81±0.01), 60 µg/ml(0.77±0.04)의 결과를 관찰하였고 GTPP처리 후 3Gy 방사선조사시, 처리전(0.92±0.01)에 비해 처리 후

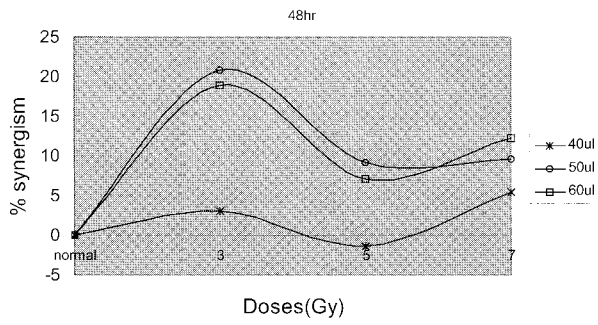


Fig 4. Synergistic effect on leukemia cell necrosis at 48 hr

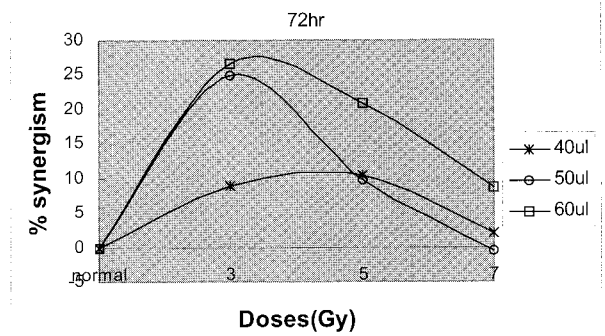


Fig. 6. Synergistic effect on leukemia cell necrosis at 72 hr

Table 4. Relative cell proliferation at 72hrs after co-treatment of GTPP & γ -irradiation

Gy	GTPP(μ g/ml)			
	0	40	50	60
3	0.92 \pm 0.01	0.72 \pm 0.04	0.56 \pm 0.03	0.52 \pm 0.01
5	0.81 \pm 0.02	0.64 \pm 0.02	0.60 \pm 0.01	0.50 \pm 0.01
7	0.54 \pm 0.03	0.49 \pm 0.03	0.43 \pm 0.08	0.37 \pm 0.08

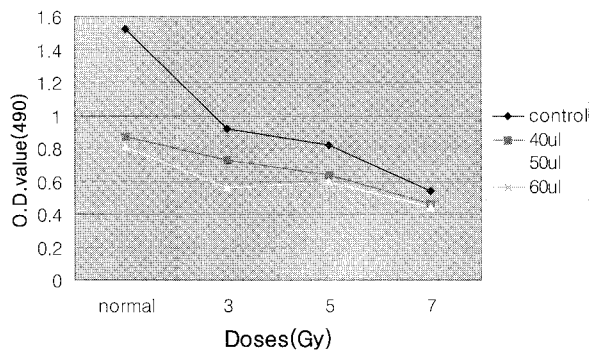


Fig 5. Comparison of concentration and doses after irradiation at 72 hr

40 μ g/ml(0.72 \pm 0.04), 50 μ g/ml(0.56 \pm 0.03) 60 μ g/ml (0.52 \pm 0.01)에서 세포수의 감소를 나타내었고 5 Gy 방사선조사시, 처리전(0.81 \pm 0.02)에 비해 처리 후 40 μ g/ml (0.64 \pm 0.02), 50 μ g/ml(0.60 \pm 0.01), 60 μ g/ml(0.50 \pm 0.01)를 보여 세포 성장률이 감소함을 알 수 있었다. 7 Gy 방사선조사시, 처리전(0.54 \pm 0.03)에 비해 처리 후 40 μ g/ml(0.49 \pm 0.03), 50 μ g/ml(0.43 \pm 0.08), 60 μ g/ml (0.37 \pm 0.08)를 보여 방사선조사 선량과 녹차 GTPP 농도가

높을수록 세포수의 성장률이 감소함을 보이고 있다 (Table 4, Fig. 5).

상승효과를 보면 3 Gy 방사선 조사시 40 μ g/ml에서는 11.16%, 50 μ g/ml 33.07%, 60 μ g/ml 34.46%를 나타내어 가장 높은 사멸 유도효과를 5 Gy 방사선 조사시, 40 μ g/ml에서는 10.10%, 50 μ g/ml 9.35% 60 μ g/ml 23.12%, 7 Gy 방사선 조사시, 40 μ g/ml에서는 4.40%, 50 μ g/ml 1.724% 60 μ g/ml 10.91% 상승률을 나타내었다(Fig. 6). 이 실험에서 EGCG 처리 전과 후 비교에서 암세포주에 60 μ g/ml의 EGCG 처리 후 3 Gy 방사선 조사에서는 무려 34.46%의 암세포 사멸 유도 효과를 보였다.

IV 고찰

녹차의 GTPP는 단독처리 했을 때 혈구암세포 사멸 유도효과를 나타내며 방사선 조사와 병행 처리하였을 때는 방사선의 사멸효과를 증진시키는 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 기존의 연구와 일치한다.

Valcic 등(1996)은 (+)-gallocatechin(GC), (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocate catechin(EGC), (-)-epicatechin gallate(EGCG)와 caffeine 등을 이용하여 MCF-7(breast carcinoma)세포주, HT-29(colon carcinoma)세포주, A-427(lung carcinoma)세포주, UA CC-375(melanoma)세포주 등의 암세포주의 성장 억제를 관찰하였는데, EGCG, GC, EGC 등이 다른 화합물에 비해 암세포주 성장 억제 효과를 관찰하였고, 그 중 EGCG 효과가 가장 월등함을 밝혔다. 특히, 폴리페놀 성분 중 EGCG(epigallocatechin gallate)에 관한 여러 분야에

대한 연구가 진행되어지고 있다. Guo 등(1996)은 green tea polyphenol(GTPP) 성분인 EGCG, ECG, EGC(-) epigallocatechin, EC(epicatechin) 등이 synaptosome에서 iron-induced lipid peroxidation 억제 효과를 관찰하였는데, EGCG > ECG > EGC > EC 등 순으로 lipid peroxidation 생성을 억제시키고, hydroxyl radical(HO) 배기 능력은 ECG > EC > EGCG > EGC순으로 감소시킴을 관찰하였다. Otsuka 등(1998)은 Human과 mouse leukemic cell line인 K562, KG1, THP-1, U397, NFS60 세포주를 이용하여 0 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 10000 μ M 등 각각의 EGCG 농도에 따른 세포주의 성장률을 36시간 경과 후 MTT를 통해서 관찰하였고, Colony 형성은 14일 경과 후 관찰하였다. MTT, Colony 형성의 경우 모두 100 μ M농도 이상의 경우에서만 암세포주 성장 억제 및 colony 형성을 억제시킴을 관찰할 수 있었는데, 특히, mouse 세포주인 NFS 60 세포주의 경우는 human과는 달리 20 μ M에서 암세포 성장률을 억제시킴이 관찰되었다.

Katiyar 등(1994)은 최근 몇 가지 항암 생체 분석 시스템(antitumor bioassay system)을 통해 therein이 존재 시 epicatechin(EGC)이 항산화(antioxidant) 효과를 나타내 녹차가 chemical 또는 photo-carcinogenesis에 보호 기능이 있음을 보고하였다. Uchida 등(1992)은 생쥐에 GTPP를 음용수를 통해 자유롭게 공급했더니, 간(liver)에서 방사선 유도에 의해 발생한 lipid peroxidase 증가를 억제시키고, 전신 X-선 조사 후 사망이 지연됨을 관찰하여 매우 낮은 독성을 지닌 방사선 보호제로서의 가능성을 제시하였다. Kuroda (1996)는 chinese hamster V79 cell line을 이용하여 4-nitroquinolin 1-oxide(4NQO)에서 유도되는 6-thioguanine(6TG)-저항성 돌연변이 유도 억제에 관한 연구를 통해 catechins, EGCG, (-)-epicatechin gallate(ECG)등이 세포독성이 관찰되지 않으면서 돌연변이 억제에 효과가 있음을 보고하였다. Hasegawa 등(1997)은 CCC DNA(covalently closed circular DNA)에 X-선, γ -선, β -선 등을 조사한 후 DNA 손상 억제 효과를 관찰하였는데, GTPP 농도가 증가할수록($1 \times 10^{-3} \sim 3 \times 10^{-3}$) CCC DNA 생존율이 증가함을 관찰하였고 이는 GTPP가 OH radical를 제거하는 능력이 있기 때문이라고 보고하였다. 또한, Ishino 등(1999)도 GTPP의 항암작용, 항산화작용, 세포독성의 효과에 미치는 항암물질, 중금속이온 및 항산화제의 역할에 관한 연구

를 통해 tamoxifen, sulindac, doxorubicin 등과 같은 항암제와 병행해도 GTPP의 효과에 영향을 미치지 않으나, CoCl_2 의 경우는 GTPP에 의해 유도되는 세포상해(cell injury)를 억제시킨다고 보고하였다. Gensker 등(1996)은 GTPP를 음용수에 0, 100, 500 mg(0, 0.56, 2.8 mg/day)을 첨가하여 구강 흡수시켰을 때, 특별한 가시적인 독성을 관찰하지 못했으며, UV-유도 피부암 증가를 억제시킴을 관찰하였다. 또한, GTPP의 작용 기전을 밝히려는 여러 시도가 진행되기도 하였다. Nakagawa 등(1997)은 쥐에 GTPP(500 mg/g body weight)를 경구 투여하고 60분 후에 chemiluminescence-detection high-performance 액체 크로마토그래피(CL-HPLC)를 이용하여 뇌와 소화기계통을 측정된 결과 혈장에서 12.3 nmol/g, brain 0.5 nmol/g, liver 48.4 nmol/g, 소장점막에서 565 nmol/g, 대장점막 68.6 nmol/g의 EGCG가 흡수되었다는 연구 결과를 보고하였다. Komatsu 등(1997)은 C3H1-T1/2 cell을 이용하여 방사선 유도 형질전환에 관한 GTPP 효과를 관찰한 바, EGCG 5 μ M은 세포독성이 약간 관찰되었지만, 방사선유도 형질전환 억제에 효과가 있음을 관찰하였다. GTPP는 또한, 화학방어(chemoprevention) 작용이 있는 것으로 알려져 왔다. Chen 등(1999)은 human keratinocyte cell line (HaCaT)을 이용하여 GTPP의 UVB c-fos 유전자 발현 효과를 관찰하였는데, HaCaT에서 tumor 촉진에 주요하게 관여하는 AP-1 활동 요소 중의 하나인 c-fos의 경우 GTPP가 선량의존 c-fos 유전자의 전사 활동을 억제시키고, 동일 선량내에서는 c-fos 단백질의 UVB-유도 축적을 억제시킨다고 보고하였다. 그리고, 실험실 내에서 배양한 human keratinocytes 세포에 자외선 B 방사선(UVB)를 조사하였을 경우 AP-1 발현에 관한 연구에서 GTPP 농도가 5.45 nM에서 54.5 μ M사이의 농도에서 AP-1 활동을 억제시킴을 관찰하였다(Barthelman et al., 1998). GTPP는 세포막 자가 수용체가 종양 촉진자(tumor promoter)와 상호 작용하면서 암세포의 작용을 억제하는 기능이 있어 "sealing effect"라고 불리며, ^3H -EGCG를 이용한 생쥐 실험에서 전 장기에 걸쳐 고른 분포를 나타내며 48시간째 인간 폐암 세포주(PC-9 cell)에 EC(100 μ M)을 첨가하였을 경우 세포고사(apoptosis) 반응이 EGCG(75 μ M) > ECG(50 μ M) > EGC(200 μ M) 순으로 촉진시키면서 TNF- α 방출을 억제시키는 효과가 있다. 또한, Stage I, II, III breast cancer (유방암)환자에게 각각 녹차를 ≤ 2 cups/day와 ≥ 8

cups/day를 복용시켰을 경우, 하루에 2컵을 복용한 환자들 보다 8 컵 이상을 복용한 환자들에서 stage I, II에서 훨씬 낮은 재발률을 보이면서 완치되는 기간도 단축됨이 알려져 왔다(24.3 % vs 16.7%)(Suganuma et al., 1999). 또한, Melissa등(2000)은 방사선에 민감한 Jurkat T-lymphocyte(림프구)를 사용하여 H₂O₂-유도 DNA 손상 효과가 25 μM H₂O₂ 단독으로 처리한 군에 비해 EGCG를 10 μM를 배양시 함께 첨가한 군에서 H₂O₂ 단독 처리군에 비해 DNA 손상을 억제시키는 작용이 있으나, 고농도(100 μM)에서는 오히려 DNA 손상이 발생하는데 이는 EGCG 구조 중 페놀기(phenol group)가 금속이온에 대해 착화능을 가지고 있어 H₂O₂에서 발생한 hydroxyl radical에 대해 쉽게 hydroxyl group (기)이 결합을 형성할 수 있기 때문이다 라고 보고하였다. 본 연구에서 녹차 처리와 방사선조사를 병행하였을 때 세포 사멸은 상승적으로 증가하는데 특히 그 효과는 저선량 조사에서 뚜렷하게 관찰된다 7 Gy와 5 Gy에서 10% 미만의 상승효과를 보이던 GTPP 처리효과는 3 Gy에서 35%까지 증가한다. 방사선조사는 일반적으로 많은 정상세포의 손실을 초래하는데 저선량 방사선과 녹차처리로써 암세포를 효과적으로 제거할 수 있을 것이라는 가능성을 보여준다. 본 연구에서는 40~60 μM의 미량의 GTPP를 처리하여 암세포에 대한 사멸촉진 상승효과를 확인할 수 있었다. 또한, 방사선 조사 전, 후 GTPP 첨가 유무에 따른 혈구암세포주 성장률을 비교한 결과 방사선 단독 처리 세포에서보다 현저한 암세포 억제 효과가 있는 것을 확인하였으며, 고선량보다 저선량에서 상승효과가 높게 나타난 사실을 관찰할 수 있었다 특히, 녹차 GTPP처리에 의해 암세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있을 것이라는 점을 시사한다. 이상의 결과로 미루어 혈액암의 방사선 치료시 녹차 GTPP를 병행 처리하면 저선량의 방사선 조사로도 정상세포의 손상을 최소화하면서 효과적으로 암세포를 사멸을 유도할 수 있을 것으로 기대된다. 방사선 조사와 녹차 GTPP의 병행 처리효과가 다른 암세포에 대해서도 *In vivo* 처리에서도 동일한 효과를 나타내는지에 대해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

참고문헌

1. Brode H.L., 1968. Review of nuclear weapons effects. Ann. Rev. Nucl. Sci. 18:153
2. Barthelman, M., Stickland, B.K., Chen, W., Timmermann, B.N., Dong, Z., and Bowden, G.T. 1998. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity. Carcinogenesis. 19(12): 2201-4.
3. Chen L., Lee, M.J., Li, H., and Chung, S.Y., 1997. Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenol in rats. Am. Soc. Pharm. Exp. Therap. 25: 1045-1050.
4. Chen, W., Dong, Z., Valcic, S., Timmermann, B.N., and Bowden, G.T., 1999. Inhibition of ultraviolet B-induced c-fos gene expression and p38 mitogen-activated protein kinase activation by (-)-epigallocatechin gallate in a human keratinocyte cell line. Mol. Carcinog. 24(2):79-84.
5. Chung, S.Y and Wang, Z.Y., 1993. Tea and cancer. J. Nat. Cancer. Inst. 85:1038-1049.
6. Fujiki H, Yoshizawa S, Horiuchi T, Suganuma M, Yatsunami J, Nishiwaki S, Nishiwaki.
7. Gensker, H.L., Timmermann, B.N., Wachter, G.A., Dorr, R., Dvorakova, K., and Alberts, D.S., 1996. Prevention of photocarcinogenesis by topical administration of pure epigallocatechin gallate isolated from green tea. Nutr. Cancer. 26(3): 325-35.
8. Guo, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S., and Xin, W., 1996. Studies on protective mechanisms of four compounds of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. Biochem. Biophys. Acta. 1304(3):210-222.
9. Hasegawa, K., and Yoshioka, H., 1997. DNA damage by various radiation. Radiat. Phys. Chem. 49(1): 81-84.
10. Ishino, A., Mita, S., Watanabe, S., and Sakagami, H. 1999. Effect of anticancer drugs, metal and antioxidants on cytotoxic activity of epigallocatechin gallate. J. Anticancer Res. 19(5B):4343-48
11. Katiyar, S.K., Agarwal, R., and Mukhtar, H., 1994. Inhibition of spontaneous and photo-enhanced lipid peroxidase in mouse epidermal microsomes by epicatechin derivatives from green tea. Cancer Lett. 79(1):61-6.
12. Komatsu, K., Tauchi, H., Yano, N., Endo, S., Matsuura, S., and Shoji, S., 1997. Inhibition action of (-)-epigallocatechin gallate on radiation-induced mouse oncogenic transformation. Cancer Lett. 112(2):135-9
13. Kuroda, Y., 1996. Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells. Mutat. Res. 361(2-3):179-186.

14. Melissa, K., Loo, J. G., 2000. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutation Research*. 459:211-218.
15. Otsuka, T., Ogo, T., Eto, T., Asano, Y., Suganuma, M., and Niho, Y., 1998. Growth inhibition of leukemic cells by (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea. *Life Science*. 63(16):1397-1403.
16. Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Seoka, E., Matsuyama, S., Imai, K., Nakachi, K., and Fujiki, H., 1999. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutation Research*. 428:339-344.
17. Uchida, S., Ozaki, M., Suzuki, K., and Shikida, M., 1992. Radioprotective effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate(green-tea tannin) in mice. *Life. Sci*. 50(2): 147-52.
18. Yamane, T., Nakatani, H., Kikuoka, N., Natsumoto, H., Iwata, Y., Kiato, Y., Oya, T., and Takahashi, T., 1996. Inhibitory effects and toxicity of green tea polyphenols for gastrointestinal carcinogenesis. *Cancer*. 77(8):1662-1667.
19. Yoshizawa, S., Horiuchi, T., Fujiki, H., Yoshida, T., Okuda, T., and Sugimura, T., 1987. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of 'tannin' in green tea. *Phytither. Res*. 1:44-47.
20. Upton, A.C., 1968. Effects of radiation on man. *Ann. Rev. Nucl. Sci*. 18:495
21. Valcic, S., Timmermann, B. N., Alberts, D. S., Wachter, G. A., Krutzsch, M., Wymer, J., and Guillen, J. M. 1996. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. *Anticancer. Drugs*. 7(4):461-468.
22. Zong P.C., John B.S., Chi-Tang H., and Kuang Y.C., 1998. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer letter*. 129:173-179.
23. 서왕진 : 환경단체의 입장에서 본 방사능 문제. 대한방사선방어학회 춘계심포지움 보문집. 110-117, 1997.
24. 신정옥 : 녹차가 가축과 자발성 백서의 혈압의 심박수 및 혈청 지질 농도에 미치는 영향. 이학박사 학위논문, 한양대학교, 1986.
25. 이미경 : 녹차생엽의 조리과학적 특성에 관한 연구. 이학 석사 학위 논문, 한양대학교, 1989.
26. 이상석 : 의료방사선생물학. 고문사, 1987.
27. 여생규, 안철우, 이용우, 이대기, 박영호, 김선봉 : 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 항산화작용. *한국영양식량학회지*. 24:299~304, 1995.
28. 윤기식 : 우리차와 건강. 성림출판사, 1994.
29. 조영제, 천성숙, 최청 : 한국산 옥차로부터 분리한 출혈형 탄닌의 Xanthine oxidase 자해 효과. *한국영양식량학회지*. 22:418~422, 1993.