

인체 혈액암세포주(HL-60)에서 (-)-epigallocatechin-3-gallate에 의한 Apoptosis 유도

이해미 · 김연정 · 박태선[§]

연세대학교 식품영양학과

Induction of Apoptosis by (-)-epigallocatechin-3-gallate in HL-60 Cells

Lee, Hae Mi · Kim, Yun Jung · Park, Tae Sun[§]

Department of Food and Nutrition, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT

(-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a polyphenolic compound found in green tea leaves, and has been known to be one of the most potent catechin species which inhibits cell growth most possibly through an apoptotic cell death. We investigated the apoptotic activity of (-)-EGCG on the human myeloid leukemia cell line, HL-60. Our results of MTT test indicated that (-)-EGCG had a significant antiproliferation effect in HL-60 cells with IC₅₀ (50% inhibition concentration) value of 65 μ M. Giemsa staining of HL-60 cells treated with (-)-EGCG (100 μ M) for 6hrs showed a typical apoptosis-specific morphological change including shrinkage of the cytoplasm, membrane blebbing and compaction of the nuclear chromatin. The DNA fragmentation was observed from the agarose gel electrophoresis of cells treated with (-)-EGCG for 3hrs or longer, and was progressed to a greater degree as treatment time increases. Treatment of the cells with (-)-EGCG (100 μ M) resulted in a rapid release of mitochondrial cytochrome c into the cytosol, and a subsequent cleavage of caspase-3 to an active form in a treatment-time dependent manner. (-)-EGCG (100 μ M) also stimulated proteolytic cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) to an active form in HL-60 cells. Taken together, (-)-EGCG appears to induce the apoptosis in human myeloid leukemia cells via a caspase-dependent pathway. These results suggest the possible application of (-)-EGCG, the major active compound in green tea, as an antiproliferative agent for cancer prevention. (*Korean J Nutrition* 36(4) : 382~388, 2003)

KEY WORDS : HL-60 cells, apoptosis, (-)-epigallocatechin-3-gallate, caspase-3, poly-(ADP-ribose)-polymerase.

서 론

역학조사 결과에 의하면 장기간 녹차 또는 녹차 추출물을 섭취한 동양인의 경우 서양인 보다 암 발생율이 낮은 것으로 보고되고 있다.^{1,2)} 아울러 녹차 추출물의 항돌연변이, 항암, 항산화 및 항염증 효과 등이 실험동물을 대상으로 연구된 바 있는데, 이러한 녹차의 주요 생리활성 물질로 카테킨을 들 수 있다.³⁾ 카테킨은 녹차에 풍부하게 함유되어 있는 flavonol 화합물로서 (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epicatechin (EC)

및 (+)-catechin 등의 형태로 존재하며,⁴⁾ 이들 카테킨 화합물 중에서도 gallate가 치환된 ECG 및 EGCG가 강한 항암활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾

Apoptosis (세포사멸)는 수동적 세포사망 현상인 necrosis (세포괴사)와는 달리 정상조직에서 부적절하게 분열되는 세포 또는 유전적 손상을 입은 세포들을 제거하는 자발적 사망기전이며, 세포수의 항상성 유지에 중요한 기능을 담당한다.⁸⁾ 최근 화학적 암예방 물질에 관한 연구는 전암 상태에서 악성 종양으로 발전하는 것을 차단하는 암세포의 분열 및 전이 억제에 역점을 두어 진행되고 있으며,⁹⁾ 세포의 암화과정에서 나타나는 주요 지표로 apoptosis의 감소가 제기되면서¹⁰⁾ 지난 10여년 간 이에 관한 활발한 연구가 집중되어 졌다.^{11,12)} Apoptosis의 형태학적 및 생리적 특징으로는 세포질의 위축 (shrinkage of the cytoplasm), 세포막 융기 (membrane blebbing), 염색사의 응

접수일 : 2003년 1월 21일

채택일 : 2003년 5월 12일

[§]To whom correspondence should be addressed.

축 (compaction of the nuclear chromatin), DNA 분절 (fragmentation), 그리고 세포막을 구성하는 인지질의 일종인 phosphatidylserine이 세포막 외부로 노출되는 현상 등이 보고되고 있다.¹³⁾ Apoptosis 과정에는 세포 신호전달 체계, 암유전자들과 관련된 다양한 세포증식 물질들, 세포 주기 제어물질 및 분화 유도물질들이 관여하는 것으로 알려져 있으나, 아직까지 명확한 작용 기전은 밝혀지지 않고 있다.¹⁴⁾ 가장 널리 알려진 apoptosis의 작용기전으로는 caspase-dependent 경로를 들 수 있다. 현재까지 14종의 caspase가 분류되었고, 이 중에서 8종이 apoptosis 과정에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 이들 apoptosis 관련 caspase는 크게 initiator caspase (caspase -2, -8, -9, -10)와 effector caspase (caspase -3, -6, -7)로 구분되며, 전자가 활성화되면 후자를 자극함으로 신호가 전달되는 일련의 cascade 체계를 이룬다.¹⁶⁾ 예를 들어 외부 자극에 의해 미토콘드리아 외막의 투과성이 증가하면 미토콘드리아내의 cytochrome c가 세포질로 방출되어 caspase-9를 활성화시키며, 활성화된 caspase-9은 다시 caspase-3를 활성화시키고, 후자는 poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP)를 활성화시킴으로서 chromosome DNA 분절을 유도한다.¹⁷⁾

인체 혈액암세포주인 HL-60 세포주는 DMSO 또는 retinoic acid와 같은 물질에 의해 정상 호중구 (neutrophil)로 분화되며, 이와같은 분화과정동안에는 apoptosis 현상에 의해 세포분열이 억제되는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 다양한 물질들의 apoptosis 유도 효과를 측정하는 실험에서 HL-60 세포주가 유용한 모델로 이용된 바 있으며,^{19,20)} 최근에는 (-)-EGCG가 HL-60세포의 DNA 분절을 유도하였음이 관찰된 바 있다.²¹⁾ 본 연구는 HL-60 세포를 대상으로 녹차 카테킨의 주요성분인 (-)-EGCG가 caspase-3와 관련한 apoptosis 작용기전을 경유하여 apoptosis를 유도하는지의 여부를 평가하고자 시도되었다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 시약

Human premyelocytic leukemia cell line (HL-60)은 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 함유된 RPMI 1640 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지를 사용하여 175 cm² 플라스크에서 배양시켰다. 세포배양은 95% O₂와 5% CO₂ 가스가 존재하는

37°C 배양기에서 진행되었다.

(-)-EGCG는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 3차 증류수를 이용하여 5 mg/ml의 농도로 조제하여 사용하였다. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (St. Louis, MO, USA) 시약은 phosphate buffered saline (PBS)에 5 mg/ml의 농도로 녹인 후 멸균 여과하여 사용하였고, Giemsa 염색시약은 메탄올에 녹여 40% 농도로 사용하였다. Western blot에 사용한 모든 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology사 (San Diego, CA)에서, 그리고 2차 항체는 Pharmingen사 (San Diego, CA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포생존을 분석

MTT 테스트는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 함유된 일련의 탈수소효소(dehydrogenase)에 의해 MTT가 formazan으로 전환되는 양을 분광학적으로 측정하는 방법이다.²²⁾ 본 연구에서는 (-)-EGCG에 의한 HL-60 세포주의 증식억제 정도를 측정하기 위해 MTT 테스트를 실시하였다. 약 1 × 10⁵ cells/ml의 세포가 분주된 24-well plate에 농도를 달리하여 (-)-EGCG를 첨가하고 12시간 동안 배양하였다. 각 well에 MTT 용액 (5 mg/ml)을 100 µl씩 첨가하고 2시간 동안 더 배양하였다. 처리한 각 well을 1000 × g에서 3분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 생성된 자주색의 formazan 결정을 100 µl의 DMSO에 용해시켰다. Formazan 용해액을 24-well plate에 재분주한 후, ELISA reader (Perkin Elmer사, Wallac 1420, Turkin, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 측정된 흡광도는 생존하는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 MTT가 formazan으로 전환된 양을 나타내며, 생존하는 세포수와 비례한다.

아래의 공식에 준해 HL-60 세포의 생존율을 산출하였으며,²³⁾ 생존 세포율은 중복 측정된 3회 반복실험의 평균값으로 제시하였다.

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(-)\text{-EGCG로 처리된 세포의 흡광도}}{\text{대조세포의 흡광도}} \times 100$$

MTT 테스트 결과로부터 (-)-EGCG의 IC₅₀ (50% inhibition concentration) 농도를 산출하였다. IC₅₀는 MTT 테스트 결과에서 (-)-EGCG로 처리한 세포의 흡광도가 대조세포에 비하여 50% 감소하는 값을 의미하며, (-)-EGCG의 농도를 x축으로, 그리고 각 well에서 얻어진 흡

광도로부터 계산된 생존율을 y축으로 설정하여 얻어진 방정식으로부터 산출되었다.

3. 세포모양의 확인

(-)-EGCG (100 μ M)로 10시간 동안 전처리한 HL-60 세포를 PBS로 세척한 후, 멸균된 슬라이드글라스에 에탄올로 고정시키고 Giemsa 시약으로 염색하였다. 세포의 모양은 inverted microscope (Axiovert 135, Carl Zeiss, Swiss)에 부착된 자동카메라를 이용하여 확인하였다.

4. DNA ladder 패턴

(-)-EGCG로 전처리한 세포의 DNA 분절 여부를 agarose gel 전기영동법으로 측정하였다.²⁴⁾ (-)-EGCG (0~100 μ M)로 일정기간 전처리한 HL-60 세포를 0.25% trypsin + EDTA 용액을 이용하여 분산시킨 후 1000 \times g에서 3분간 원심분리하였다. 세포 침전물에 lysis 용액 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% sodium N-lauryl sarcosinate, 100 μ g/ml proteinase K] 1 ml 씩을 가한 후 50 $^{\circ}$ C에서 5시간동안 흔들며 주면서 배양하였다. 동량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 용액을 가하여 잘 섞고 1700 \times g에서 10분간 원심분리하여 수용성 층을 회수한 후, 다시 phenol : chloroform : iso-amyl alcohol (25 : 24 : 1) 용액으로 반복처리하여 원심분리하였다. 회수한 수용성 층에 0.5 ml의 0.3 mM sodium acetate와 2배 부피의 냉각된 100% 에탄올 용액을 첨가하여 잘 섞은 후, 1700 \times g에서 2분간 원심분리하였다. 얻어진 DNA 침전물을 공기 중에 건조시키고, 다시 65 $^{\circ}$ C의 30 μ l TE 완충용액 [10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA]에 녹인 후, 1 μ g/ml RNase를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간동안 반응시켰다. 260 nm에서 흡광도를 측정하므로써 추출된 DNA 용액의 농도를 산출한 후, ethidium bromide (0.4 μ g/ml)가 함유된 1.8% agarose gel 상에서 전기영동시켰다. Agarose gel 상에서 분리된 DNA를 302 nm에서 transilluminator로 가시화하여, DNA ladder 패턴을 확인하였다.

5. Western blot

(-)-EGCG로 처리한 HL-60 세포를 수거하여 1000 \times g에서 3분간 원심분리하였다. 세포 침전물에 lysis 용액 [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholic acid, 100 μ M PMSF, 20 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 1 μ g/ml aprotinin, 100 mM NaF] 300 μ l를 가하고, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치한 후, 12,000 \times g

에서 30분간 원심분리하였다. 침전물을 다시 lysis buffer에 혼탁시키고, sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 시행하였다. Nitrocellulose membrane (Amersham, Arlington Heights, IL)에 단백질을 이동시키기 위해 25 mM Tris-HCl (pH 8.9), 192 mM glycine, 20% 메탄올이 함유된 transfer buffer와 semidry transfer 장치 (Trans Blot SD, Bio-Rad, San Diego, CA)를 이용하여 20 volt에서 50분동안 blotting을 시행하였다. 세포용해액의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하였으며, Bradford 법²⁵⁾을 응용한 상업용 kit (#500-0002, Bio-Rad, San Diego, CA)를 사용하여 측정하였다. 단백질이 옮겨 붙은 nitrocellulose membrane을 blocking buffer [0.05% Tween 20이 함유된 tris-buffered saline (TBS) + 5% 탈지분유]에서 1시간 동안 흔들어 준 후, caspase-3, PARP, cytochrome C 또는 Bcl-2에 대한 rabbit monoclonal antibody가 1 : 1000의 비율로 첨가된 buffer에서 1시간 동안 immunoblotting시켰다. Membrane을 0.05% Tween 20가 함유한 TBS buffer로 5분씩 3번 세척한 후 1 : 1000의 비율로 희석된 2차 항체 (peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin)와 1시간동안 반응시켰다. Membrane을 잘 세척한 뒤 단백질 band를 확인하기 위하여 enhanced chemiluminescence system (ECL, Amersham Arlington Heights, IL)으로 1분간 동안 반응시킨 후 Kodak X-Omat film에 노출시켰다.

Cytochrome c에 대한 Western blot은 미토콘드리아와 세포질 분획에서 각기 실시되었다. 세포를 ice-cold buffer A [250 mM sucrose, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 17 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 8 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin (pH 7.4)]로 용해시키고, 주사바늘 (1 ml ; 0.45 ; 3 mm ; 26G \times 1/2)을 이용하여 10회 통과시킨 후 750 \times g에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 10,000 \times g에서 15분간 원심분리하여 생성된 침전물을 buffer A로 분산시켜 미토콘드리아 분획으로 사용하였고, 다시 100,000 \times g에서 1시간동안 원심분리하여 회수한 상층액을 세포질 분획으로 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 암세포 증식도

HL-60 세포주를 0~100 μ M의 (-)-EGCG로 처리한 후 MTT 테스트를 실시한 결과 (-)-EGCG 농도 의

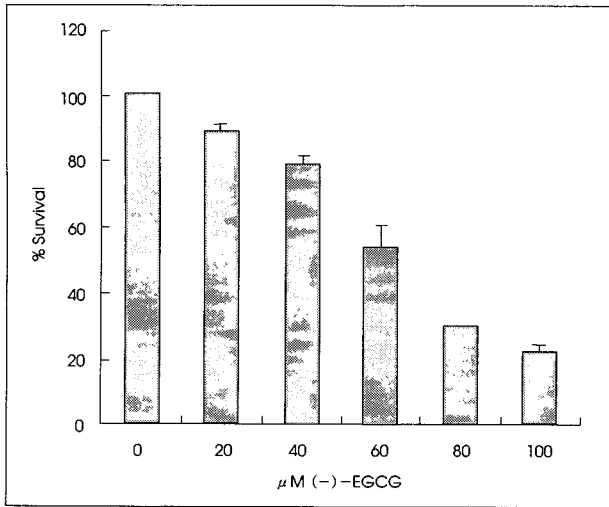


Fig. 1. Antiproliferation effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with 0-100 μM (-)-EGCG as described under Materials and Methods. Values are mean ± SD from three independent experiments performed in duplicate. Percentage of viable cells observed in cells treated with (-)-EGCG was normalized to the value for untreated control cells as a 100%.

존적으로 생존 세포수의 비율에 유의적인 감소가 나타나 (Fig. 1), 녹차 카테킨의 (-)-EGCG 성분이 혈액암세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다. IC₅₀는 세포의 성장을 50% 억제하는 물질의 농도값을 나타내며, 세포에 처리된 물질의 독성을 평가하기 위해 흔히 이용되는 지표이다. 본 실험에서 HL-60 세포를 (-)-EGCG로 12시간 동안 처리한 결과, (-)-EGCG의 IC₅₀값은 65 μM로 나타났다.

2. Apoptosis의 확인

Apoptosis의 형태적 특성을 평가하기 위하여 HL-60 세포주를 100 μM (-)-EGCG로 6시간 동안 처리한 후 Giemsa 시약으로 염색한 결과, 세포질의 위축, 세포막 융기, 염색사의 응축 및 핵 변형 등을 포함하는 전형적인 apoptosis 특이 형태가 관찰되었다 (Fig. 2).

Apoptosis 신호가 세포내에 전달되면 endonuclease가 활성화되고, 그 결과 chromosome DNA가 약 180~200 bp의 크기로 분절되는 현상이 나타난다.²⁶⁾ 다양한 농도 (0~100 μM)의 (-)-EGCG로 처리한 세포로부터 chromosome DNA를 추출한 후 agarose-gel 상에서 전기영동을 실시한 결과, (-)-EGCG 농도 의존적으로 DNA 분절현상이 관찰되었다 (Fig. 3A). 한편, HL-60 세포에 100 μM (-)-EGCG를 1~12시간동안 전처리한 결과, 3시간 이후부터 DNA 분절현상이 관찰되었고, 전처리시간이 길어질수록 DNA 분절정도가 심화되어 apoptosis가 진행됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 이와 같은 결과는 다양

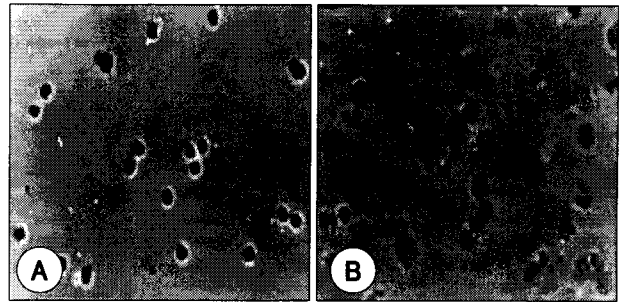


Fig. 2. Morphology of HL-60 cells treated with (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) under a light microscope after Giemsa staining. Cells (3×10^4) were seeded into a well of 24-well plates, and exposed to (-)-EGCG (100 μM) for 6 hrs. A : Control cells. B : (-)-EGCG treated cells.

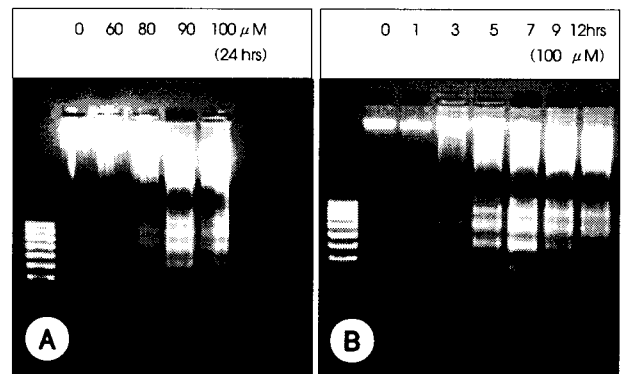


Fig. 3. DNA-fragmentation in HL-60 cells treated with (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). A : Cells treated with 0-100 μM (-)-EGCG for 24 hr. B : Cells treated with 100 μM (-)-EGCG for 0-12 hrs.

한 혈액암세포주에 (-)-EGCG를 처리한 결과 100 μM 농도에서 DNA 분절이 유도되었음을 관찰한 Takeshi 등²⁷⁾의 보고를 지지하는 것이다. 한편, apoptosis를 유도하는 (-)-EGCG 농도는 세포주에 따라, 그리고 처리시간에 따라 차이가 있음을 알 수 있다.^{28,29)}

이상의 결과로부터 녹차 카테킨의 주요성분인 (-)-EGCG는 인체혈액암 세포주에서 매우 효과적으로 apoptosis를 유도하였음을 확인할 수 있었고, 이는 다른 종류의 인체 암세포주를 대상으로 한 선행 연구에서 보고된 녹차 카테킨의 항암활성과 일치하는 내용이라 할 수 있다.^{30,31)}

3. Apoptosis 관련 유전자의 발현 변화

HL-60 세포에서 (-)-EGCG에 의한 apoptosis 활성의 작용기전을 규명하기 위해 Western blot을 실시하였다. 본 연구에서는 apoptosis가 유도되는 다양한 경로 중 caspase-dependent 경로에 초점을 맞추어, (-)-EGCG가 미토콘드리아내에 존재하는 cytochrome c를 세포질로 방출시키고, 후자는 caspase-3와 PARP를 차례로 활성화 시키므로써 핵 내부로 apoptosis 신호를 전달하게 된다

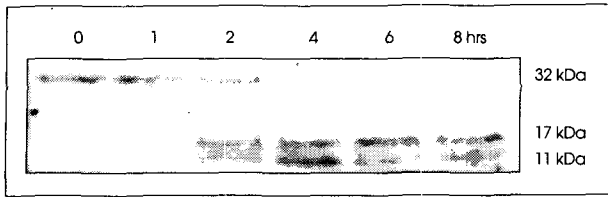


Fig. 4. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the cleavage of caspase-3 protein in HL-60 cells. Exponentially growing HL-60 cells were treated with 100 μ M (-)-EGCG for indicated time periods. Cells were washed with PBS, lysed, and subjected to Western blot analysis as described in Materials and Methods. Protein bands were visualized by the electrochemiluminescence detection reagent.

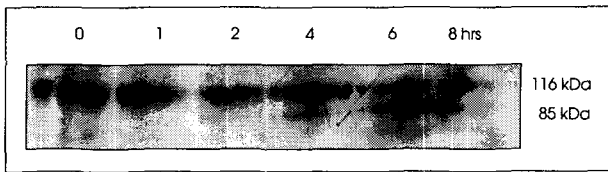


Fig. 5. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in cells undergoing (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) - induced apoptosis. HL-60 cells were treated with 100 μ M (-)-EGCG for indicated time periods, and subjected to Western blot.

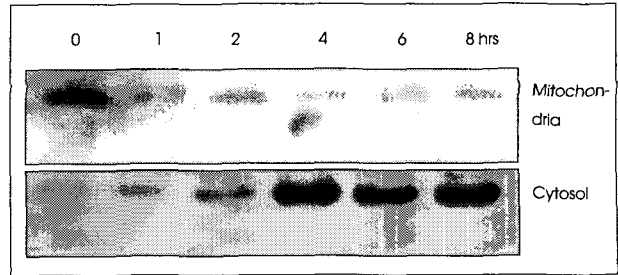


Fig. 6. Western blot analysis of cytochrome C in (-)-EGCG treated HL-60 cells. HL-60 cells were treated with 100 μ M (-)-EGCG for indicated time periods. Cytochrome c protein level was detected by Western blot in both mitochondria and cytosol fractions of HL-60 cells.

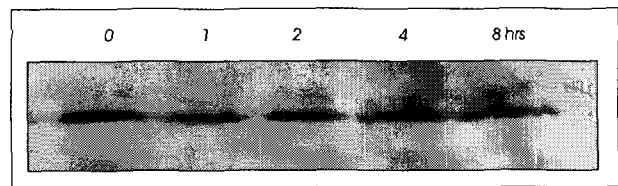


Fig. 7. Western blot analysis of Bcl-2 in (-)-EGCG treated HL-60 cells. Cells were treated with 100 μ M (-)-EGCG for the indicated time periods, and subjected to Western blot.

는 가정 하에 caspase-3, PARP, cytochrome C 및 Bcl-2 단백질 함량의 변화를 측정하였다.

정상 세포내에서 caspase-3는 32 kDa의 procaspase 상태로 존재하다가 apoptosis 신호가 전달되면, 17 kDa과 11 kDa으로 분해되어 활성화되는 것으로 알려져 있다.³²⁾ HL-60 세포주를 (-)-EGCG (100 μ M)로 0~8시간 동안 처리한 후 Western blot을 실시한 결과, 2시간 이후부터 caspase-3가 분해되어 활성화됨이 관찰되었다 (Fig. 4). PARP 단백질은 정상 세포내에서 116 kDa 크기의 불활성 상태로 존재하다가 외부 자극에 의해 apoptosis가 유도된 경우 85 kDa와 46 kDa로 분해되어 활성화된다.³³⁾ 본 실험에서 HL-60 세포주를 (-)-EGCG (100 μ M)로 0~8시간동안 처리한 결과, 4시간 이후부터 PARP가 두개의 단백질로 분해되는 것이 관찰되었다 (Fig. 5). Apoptosis가 진행되면 세포내에서 미토콘드리아 막이 손상되고, 그 결과 cytochrome C가 미토콘드리아로부터 세포질로 방출되는 현상이 나타난다.³⁴⁾ 본 연구에서 HL-60 세포의 미토콘드리아와 세포질로부터 각기 cytochrome C 단백질 함량을 측정한 결과, (-)-EGCG (100 μ M)로 전처리 한 시간이 증가함에 따라 세포질로 방출되는 cytochrome C 함량이 증가됨이 확인되었다 (Fig. 6).

일반적으로 Bcl-2 단백질은 정상세포보다 암세포에서 발현이 증가하며, 반대로 apoptosis가 진행되는 동안에는 발현이 감소되는 것으로 알려져 있다.³⁵⁾ 한편, 본 연구에서 HL-60 세포주를 (-)-EGCG (100 μ M)로 처리한 결

과, Bcl-2 발현에 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 7). Bcl-2 단백질계에는 Bcl-2, Bcl-X_L, 및 Bax 등이 포함되며, 이들의 apoptosis 관련 작용은 서로 다르게 나타나고 있다. 즉, Bcl-2 및 Bcl-X_L는 cytochrome C의 방출을 억제하여 apoptosis를 억제시키는 반면, Bax는 cytochrome C의 방출을 촉진시켜 apoptosis를 유도한다.³⁶⁾ 따라서 후속 연구에서는 Bcl-2뿐만 아니라, Bcl-2/Bax 발현 비율을 함께 관찰하여야 할 것으로 생각된다.³¹⁾ Chung 등³⁷⁾의 연구에서도 인체 전립선암세포주인 DU145 세포에 (-)-EGCG를 처리한 결과 Bcl-2 단백질 함량의 변화와 무관하게 apoptosis가 유도되었음이 보고된 바 있어, 본 연구의 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

(-)-EGCG가 apoptosis를 일으키는 기전에 관하여 Gupta 등³⁸⁾은 인체 전립선암세포가 G₀/G₁기에서 S기로 진행되는 과정을 저해하였음을 제시한 바 있고, 이외에도 (-)-EGCG가 MAP-kinase, AP-1 또는 NF- κ B 등 세포분열과 관련된 단백질의 활성을 저해하므로써,^{39,40)} apoptosis를 유도하는 것으로 설명하고 있다. Apoptosis 현상의 초기 단계에서는 주로 세포내 미토콘드리아막이 탈분극되어 cytochrome C가 세포질로 방출되고, 다양한 caspase 효소들의 활성 변화가 나타나는 한편,⁴¹⁾ apoptosis가 상당히 진행된 상태에서는 세포모양의 변형, DNA 분절현상, 그리고 세포표면에 phosphatidylserine 기가 노출되면서 세포내 redox potential의 변화가 초래되는 현상 등이 수반된다.⁴²⁾ 인체 전립선암세포주 (DU145)에서 녹차

의 카테킨류는 reactive oxygen species의 생성을 촉진하고, 미토콘드리아막의 손상을 초래함이 보고된 바 있고,³⁷⁾ Tada-Oikawa 등⁷⁾은 (-)-EGCG가 항산화 역할을 하는 동시에 pro-oxidant로 작용하여 다양한 암세포주들에서 H₂O₂ 생성을 촉진하므로서 미토콘드리아막을 탈분극시키고 apoptosis 과정을 유도하였음을 제시하였다. 아울러 문헌에 보고된 바에 의하면 (-)-EGCG가 apoptosis를 유도하는 지의 여부는 정상세포와 암세포에서 다르게 나타남을 알 수 있다. 예를 들어 Hsu 등⁴³⁾은 구강암세포주(OS-C2)를 (-)-EGCG로 처리한 결과, apoptosis가 유도되었음을 관찰한 반면, 정상 인체각질세포주(normal human keratinocytes) (SCC2)에서는 이와 같은 현상이 나타나지 않았다. 이와 유사하게 (-)-EGCG는 인체 유표피암세포주(human epidermoid carcinoma cells) (A431)에서 NF- κ B의 발현을 억제하고 apoptosis를 유도하였으나, 정상 인체표피각질세포주(normal human epidermal keratinocyte) (NHEK)에서는 (-)-EGCG에 의한 apoptosis 현상이 나타나지 않았다.⁴⁰⁾

본 연구에서는 녹차 카테킨 성분인 (-)-EGCG가 인체 혈액암세포주에서 미토콘드리아내 cytochrome C를 세포질로 방출시키고, caspase-3를 활성화하므로서 apoptosis를 유도하는 효과가 있음을 밝혔으나, 이와같은 미토콘드리아의 탈분극 현상이 (-)-EGCG의 산화촉진 효과에 의한 것인지, 아니면 세포막을 통한 신호전달체계에 의한 것인지의 여부는 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

요약 및 결론

HL-60 세포주를 대상으로 녹차 카테킨의 주성분인 (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)가 apoptosis를 유도하는 작용기전을 평가한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다. (-)-EGCG는 인체 혈액암세포의 증식을 억제하는 효과가 있었으며, (-)-EGCG의 IC₅₀ 값은 65 μ M로 나타났다. 세포를 100 μ M (-)-EGCG으로 6시간동안 처리한 결과 세포질의 위축, 세포막 융기, 염색사의 응축 등을 포함하는 전형적인 apoptosis 특이 형태가 관찰되었다. HL-60 세포주를 (-)-EGCG으로 24시간 동안 처리한 결과, 농도 의존적으로 DNA 분절현상이 관찰되었다. 아울러 세포를 100 μ M (-)-EGCG로 시간을 달리하여 처리한 결과 3시간 이후부터 DNA 분절현상이 나타났으며, 처리시간이 증가할수록 DNA 분절 정도가 심화되었다. (-)-EGCG에 의한 apoptosis 유도기전을 평가하기 위해 Western blot을 통해 관련 단백질들의 발현을 평가한 결과,

(-)-EGCG 처리 시 미토콘드리아내에 존재하던 cytochrome c가 세포질로 방출되고 불활성 형태의 caspase-3 및 poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP)가 활성화 되었음이 관찰되었으나, Bcl-2 단백질의 발현에는 변화가 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 녹차에 다량 함유된 (-)-EGCG 성분이 caspase-dependent 경로에 의해 인체 혈액암세포의 apoptosis를 유도하였음을 제시하는 것이며, antiproliferative agent로서 녹차의 이용 가능성을 지지해 주는 것이다.

Literature cited

- 1) Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem* 22: 169-180, 1995
- 2) Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Komori A, Sueoka E, Sueoka N, Kozu T, Sakai Y. Japanese green tea as a cancer preventive agent in humans. *Nutr Rev* 54: S67-S70, 1996
- 3) Valcic S, Timmermann BN, Alberts DS, Wachter GA, Krutsh M, Wymer J. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. *Anticancer Drugs* 7: 461-468, 1996
- 4) Graham HN. Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21: 334-350, 1992
- 5) Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol* 42: 25-54, 2002
- 6) Yang GU, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, Yang CS. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis* 21: 2035-2039, 2000
- 7) Tada-Oikawa S, Oikawa S, Kawanishi M, Yamada M, Kawanishi S. Generation of hydrogen peroxide precedes loss of mitochondrial membrane potential during DNA alkylation-induced apoptosis. *FEBS Lett* 442: 65-69, 1999
- 8) Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354, 1997
- 9) Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Steele VE, Fay JR, Sigman CC. Inhibition of chemical carcinogenesis. In: *Chemical Induction of Cancer*, pp.73-122, 1995
- 10) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000
- 11) Kim YS, Jin SH, Lee YH, Kim SI, Park JD. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis in dependently of Bcl-2, Bcl-XL, or Bax in C6Bu-1 cells. *Arch Pharm Res* 22: 448-453, 1999
- 12) Los M, Burek CJ, Stroth C, Benedyk K, Hug H, Mackiewicz A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. *Drug Discov Today* 208 (2): 67-77, 2003
- 13) Kerr C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DA. Cleavage of actin by interleukin 1 β -converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci* 93: 2234-2238, 1991
- 14) Chen J. The antimutagenic and anticarcinogenic effects of tea,

- garlic and other natural foods in China. *Biomed Environ Sci* 15: 1-17, 1992
- 15) Budhardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-290, 1999
 - 16) Kohler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* 265 (1): 97-110, 2002
 - 17) Du C, Fang M, Li Y, Li, Wang X. A mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42, 2000
 - 18) Covacci V, Bruzzese N, Sgambato A, et al. Magnesium restriction induces granulocytic differentiation and expression of P27 KIP1 in human leukemic HL-60 cells. *J Cell Biochem* 70: 313-322, 1998
 - 19) Cipak L, Rauko P, Midokova E, Cipakova L, Novotny L. Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L1210 leukemia cells. *Leuk Res* 27 (1): 65-72, 2003
 - 20) Kanno T, Kobuchi H, Kajitani N, Utsumi T, Yano H, Horton AA, Yasuda T, Utsumi K. Mevastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, induces apoptosis, differentiation and Rap1 expression in HL-60 cells. *Physiol Chem Phys Med NMR* 34(1): 1-15, 2002
 - 21) Zhang W, Hashimoto K, Yu GY, Sakagami H. Decline of superoxide dismutase activity during antioxidant-induced apoptosis in HL-60 cells. *Anticancer Res* 22 (1A): 219-24, 2002
 - 22) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 65: 55-63, 1992
 - 23) McGahon AJ, Martin SJ, Bissonete RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Green DR. The end of cell line: methods for the study of apoptosis in vitro. In: Schwartz LM, Osborne BA ed., *Methods in Cell Biology*, vol. 46, Academic Press, New York, 1995
 - 24) Yabuki M, Inai Y, Yoshikoka T, Hamazaki K, Yasud T, Inoue M, Utsumi K. Oxygen-dependent fragmentation of cellular DNA by nitric oxide. *Free Radic Res* 26: 245-255, 1997
 - 25) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
 - 26) Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis - its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 74: 2013-2026, 1994
 - 27) Takeshi O, Tomonori O, Tetsuya E, Yoshinobu A, Masami S, Yoshiyuki N. Growth inhibition of leukemic cells by (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea. *Life Sci* 63 (16): 1397-1403, 1998
 - 28) Paschka AG, Butler R, Young CY. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett* 14:130(1-2): 1-7, 1998
 - 29) Yoo HG, Shin BA, Park JC, Kim HS, Kim WJ, Chay KO, Ahn BW, Park RK, Ellis LM, Jung YD. Induction of apoptosis by the green tea flavonol (-)-epigallocatechin-3-gallate in human endothelial ECV 304 cells. *Anticancer Res* 22 (6A): 3373-8, 2002
 - 30) Mukhtar H, Ahmad N. Mechanism of cancer chemopreventive activity of green tea, *Proc Soc Exp Biol Med* 220: 234-238, 1999
 - 31) Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis* 19: 611-616, 1998
 - 32) Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37-43, 1995
 - 33) Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347, 1994
 - 34) Suzuki N, Urano J, Tamano F. Farnesyltransferase inhibitors induce cytochrome C release and caspase 3 activation preferentially in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15356-15361, 1998
 - 35) Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 6: 495-496, 1999
 - 36) Baliga BC, Kumar S. Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematol Oncol* 20 (2): 63-74, 2002
 - 37) Chung LY, Cheung TC, Kong SK, Fung KP, Choy YM, Chan ZY, Kwok TT. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci* 68: 1207-1214, 2001
 - 38) Gupta S, Hussain T, Mukhtar H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys* 410 (1): 177-185, 2003
 - 39) Chen W, Dong Z, Valcic S, Timmermann BN, Gowden GT. 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: 79-84, 1999
 - 40) Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells. *Arch Biochem Biophys* 376: 338-346, 2000
 - 41) Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeflner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G. Mitochondrial permeability is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 184: 1155-1160, 1996
 - 42) Kroemer G, Martinez AC, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18: 44-51, 1997
 - 43) Hsu SD, Singh BB, Lewis JB, Borke JL, Dickinson DP, Drake L, Caughman GB, Schuster GS. Chemoprevention of oral cancer by green tea. *Gen Dent* 50 (2): 140-6, 2002