

## Protective Effect of EGCG Against Reactive Oxygen Species-induced Stress

Jung Sun Ha and Jeong Hee Kim\*

Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Institute of Oral Biology, KyungHee University, Seoul, 130-701, Korea

(Received July 5, 2005 ; Accepted September 21, 2005)

EGCG [(-)-epigallocatechin gallate], is a major component of green tea has been considered as a major antioxidant constituent. It has been considered as potential chemopreventive and chemotherapeutic agents. However, very little is known about the cellular actions by which EGCG mediates its therapeutic effects. Various aspects of antioxidant activity of EGCG were evaluated in this study. EGCG itself did not show significant cytotoxicity. Significant 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was observed in all ranges of concentration (0.8-100 µg/ml) used in this study. Protective effect of EGCG against hydrogen peroxide induced cell death was observed. Relatively high lipid peroxidation inhibitory activity were detected (IC<sub>50</sub> was about 20 µg/ml). EGCG also dose-dependently enhanced the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) in V79-4 cells. In concentrations of 100 µg/ml of EGCG, activities of SOD, CAT and GPX were measured as 36.9 U/mg of protein, 22.9 U/mg of protein and 17.8 U/mg of protein, respectively. When these values were compared with those of the control groups (24.9 U/mg of protein, 14.9 U/mg of protein and 11.7 U/mg of protein), the relative increases were calculated as 48, 54 and 52%, respectively. Taken together, our findings suggest that EGCG can act as an antioxidant by scavenging radicals and enhancing antioxidant enzyme activities.

**Keywords:** EGCG, DPPH radical scavenging activity, Lipid peroxidation inhibitory activity, antioxidant enzymes.

\*Corresponding author: Jeong Hee Kim, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Institute of Oral Biology, KyungHee University, Seoul, 130-701, Korea. Tel.: +82-2-961-0915; Fax.: +82-2-960-1457, E-mail: jhkimh@khu.ac.kr

### 서 론

녹차는 아주 오래전부터 기호 식품 및 건강 증진의 목적으로 음용되어왔다. 녹차가 건강증진에 유익하다는 것이 널리 알려지고 건강에 대한 관심이 높아져 최근 녹차의 소비도 늘어가고 있으며, 또한 녹차의 성분 규명 및 이들 성분의 작용 메카니즘에 대한 연구도 활발해지고 있다. 녹차의 종류, 재배 기후 등 다양한 인자의 영향에 따라 녹차의 구성성분이 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 잎의 녹차에 함유되어있는 폴리페놀은 플라보노이드 또는 카테킨으로 많이 알려져 있으며, 건조한 녹차잎에 약 30-40% 포함되어 있다(Lin 등, 1996). 이 중에서 가장 중요한 카테킨인 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)는 건조된 녹차 잎의 약 5%를 차지하고 있다. EGCG의 생물학적 기능에 대한 많은 연구가 진행이 되어 항산화 활성(Saffari and Sadzadeh, 2004; Ahmed 등, 2002; Tobi 등, 2002; Shi 등, 2000) 항암 및 항돌연변이 활성(Huh 등, 2004; Naasani 등, 2003; Annabi 등, 2002; Yoo 등, 2002; Jung 등, 2001; Sachinidis 등, 2001; Hour 등, 1999; Hernaez 등, 1998) 등이 보고되었다.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산소의 대사과정 중 생성된 반응성이 높은 분자들의 총칭이다. 활성산소종은 반응성이 매우 커서 생체 내의 여러 물질과 쉽게 반응할 수 있다. 활성산소종이 생체 내에서 일으키는 반응은 자동 산화 반응의 개시 및 지질의 과산화 등을 초래하며, 이러한 반응으로 인해 DNA 가닥의 파손, DNA 염기의 변형, 돌연변이, 발암, 노화 및 관절염 등이 발생되기도 한다(Ward, 1994; Thomson, 1995). 특히 많은 양의 산소를 필요로 하고 있어서 항상 산화적 스트레스의 환경에 노출되어 있다고 할 수 있는 뇌조직의 경우 과잉의 활성산소종이 뇌조직의 지질 과산화를 유도

함으로써, 세포막이 손상되어 파킨슨병(Marttila 등, 1988), 알츠하이머병(Zelman 등, 1988) 등과 같은 각종 뇌신경계 장애가 발생한다는 사실이 보고되고 있다. 또한 활성산소종이 산화적 손상을 통한 세포 사멸을 유도한다는 보고가 있고(Kirkland and Franklin, 2001; Ratan 등, 1994), 세포의 산화적 손상에 의해 유도되는 것으로 알려진 노화, 암 등의 질환에서도 세포사멸이 관찰됨에 따라서, 이러한 질환의 발병과 세포사멸과의 연관관계를 밝히려는 연구가 많은 진전을 이루고 있다(Fahn and Cohen 등, 1992).

한편, 전신적 인자와 함께 치태침착과 세균들과 같은 국소적 인자가 치은과 치은열구액에 중성구의 이동을 유도하여, 이들의 대식작용중 폭발적인 호흡증가로 인해 생성되는, 다량의 활성산소종에 의해 치주 연조직에서의 지질 과산화가 일어나고, 규칙적인 과산화지질의 방출이 치주조직과 치주혈관의 형태적 및 기능적 변화를 일으켜서 collagen의 파괴와 골조직의 흡수를 가져온다(Voskresenskii 등, 1991). 또한 구강조직의 여러 염증들과 구강암 발생 과정에서 활성산소종이 중요한 작용을 하고 있음을 나타내는 연구 결과들이 속속 보고되고 있다(Stich 등, 1989; Marton 등, 1993; Jeng 등, 2001; Steikhi 등, 2001).

이러한 활성산소종의 양을 조절하거나 활성산소종에 의한 손상 방어를 위하여 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) 및 glutathione peroxidase (GPX) 등의 여러 가지 효소가 관련된 방어 메카니즘이 있다. SOD는 과산화산소 (superoxide)를 과산화수소와 산소로 분해한다. 이때 생성된 과산화수소는 CAT와 GPX에 의하여 분해되어 무해한 물과 산소로 전환된다. 이러한 중요 효소 작용과 더불어 생체 내의 항산화 물질이 항산화 방어 시스템에 관여한다는 것이 알려져 있다. 이러한 물질들은 식사를 통하여 섭취가 가능한 테 글루타치온, 토코페롤 및 카로틴 같은 비타민 등이 여기 속한다 (Halliwell and Gutteridge, 1998).

항산화 방어 메카니즘에 관련된 효소들의 활성을 증대시키는 물질 및 항산화 작용이 있는 물질을 이용하여 활성산소종에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호하고자 합성 화합물과 천연약용식물들에 대한 연구와 보고가 이어지고 있다. 최근에는 천연물에서 약효를 검색하여 신약 및 건강보조식품으로 개발하려는 노력이 활발하게 진행되고 있다. 천연물은 부작용이 적으며, 자연에서 손쉽게 얻을 수 있고, 음식물로도 섭취할 수 있는 등의 여러 가지 장점으로 인하여 각광을 받고 있다. 최근 녹차에 관심이 전세계적으로 높아지고 있으며, 녹차의 성분 및 이의 약리작용에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다. 인체의 구강 조직은 다양한 온도 변화, pH의 변화, 외부 미생물 침입 등의 다양한 환경에 노출되는 기관이다. 이러한 환경에 의해 구강 조직의 노화, 구강암의 발생, 치

주질환 등 다양한 구강질환이 발병되고 있다. 본 연구에서는 음용함으로써 직접 구강에 접촉 가능하고, 몸에 흡수되어서도 생리 활성 작용을 나타낼 수 있는, 녹차 함유 성분인 EGCG가 활성산소종에 의해 유도된 스트레스를 방어하는 효과의 여부와 나아가서 구강 내 염증의 예방 목적으로 사용가능 여부를 규명하고자 고안되었으며, 그 접근 방법으로 DPPH 자유기 소거활성, 과산화지질 생성억제 효과 및 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX)의 활성변화를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 세포배양

Epigallocatechin gallate (EGCG)는 시그마에서 구입하였다. DMSO에 100 µg/ml가 되도록 녹여 -70°C에 보관하였으며, 필요시 세포배양배지 또는 PBS에 여러 가지 농도로 희석하여 사용하였다. 본 연구에서 사용한 세포주는 V79-4 (Chinese hamster lung fibroblast, ATCC CCL-93)이며 배양액으로는 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지 (Gibco, BRL, USA)에 5% FBS (BioWhittaker, USA), streptomycin/penicillin (Gibco, BRL, USA)과 2 mM L-glutamine을 넣고 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>/95% 공기의 조건하에 배양하였다.

### 세포생존율 및 세포독성 측정

세포의 생존율은 MTT assay로 측정하였다 (Hansen 등, 1989; Lee 등, 2002). V79-4 cell을 EGCG와 함께 배양한 후 24 및 48 시간 후의 세포 생존율을 측정하였다. 과산화수소에 의한 세포상해의 방어활성 분석 시에는 세포배양액에 EGCG를 다양한 농도로 처리한 1시간 후 과산화수소를 1 mM 되게 섞어주었다. 세포를 계속하여 24 시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 MTT assay로 측정하였다.

### DPPH 자유기 소거 활성 측정

Blosi의 방법 (Blosi, 1958)에 따라  $1.5 \times 10^{-4}$  M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, USA) 600 µl에 각 시료의 농도가 100, 20, 4, 및 0.8 µg/ml가 되도록 각각 가한 후 methanol 용액을 가하여 최종 부피를 3 ml로 만들었다. 이를 vortex mixer (Scientific industries, USA)로 10초간 진탕하여 잘 섞은 후 520 nm에서 흡광도를 측정(Ultraspac 2000 UV/Visible spectrometer, Pharmacia Biotech)하여 다음 식에 의해 DPPH 자유기의 소거 활성을 산정하였다.

**Radical scavenging activity (%)**

$$= \{(OD_{control} - OD_{sample}) / OD_{control}\} \times 100$$

각 시료의 항산화 작용은 IC<sub>50</sub> (DPPH 자유기 형성을 50%로 억제하는데 필요한 시료의 농도)값으로 나타내었다.

**과산화지질 생성 억제 활성 측정**

EGCG의 과산화지질 생성을 억제하는 활성을 측정하기 위하여 배양한 V79-4 세포에 시료의 농도가 100, 20, 4 및 0.8 µg/ml가 되도록 가한 후 1시간 동안 배양하였다. 다음 산화적 스트레스를 일으키기 위하여 과산화수소의 농도가 1 mM 되도록 가한 후 다시 1시간 동안 배양하였다. 처리한 세포를 PBS로 잘 씻은 후 1.15% KCl 500 µl를 가하여 세포를 수확하고 microfuge tube로 옮긴 다음 4°C를 유지하면서 homogenization하여 사용하였다. 이 마쇄 균질액 100 µl에 Ohkawa 등의 방법(Ohkawa 등, 1979)에 준해 8.1% SDS 200 µl, pH를 3.5로 조절한 20% acetic acid 1.5 ml 및 0.8% TBA 1.5 ml를 각각 가하고 증류수로 최종 부피가 4 ml 되도록 채웠다. 이 용액을 잘 섞은 후 95°C에서 2시간 동안 가열하여 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 착색 물질을 n-butanol:pyridine (15:1, v/v) 혼합액으로 추출하여 1800 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 취해 532 nm에서 흡광도를 측정하고 과산화지질 생성 억제 활성을 구하였다.

**Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정**

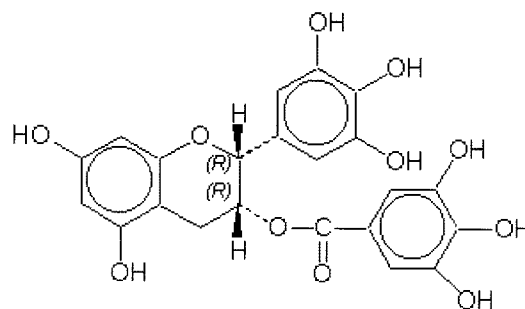
SOD 활성은 Beauchamp와 Fridovich (1971)의 NBT (nitroblue tetrazolium) 방법으로 측정하였다. 시료를 처리한 세포에 0.05 M 탄산 나트륨 완충용액 (pH 10.2)을 가하여 균질화하여 사용하였다. 이 마쇄 균질액 50 µl에 3 mM xanthine, 0.75 mM NBT, 3 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 1.5 mg/ml BSA (bovine serum albumin)을 가하여 진탕한 후 0.1 mg/ml의 xanthine oxidase 50 µl를 가하고 상온에서 30분 동안 방치하였다. 반응은 6 mM CuCl<sub>2</sub>를 가하여 멈춘 후 1500 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 취해 560 nm에서 흡광도를 측정하고 SOD 활성을 구하였다.

**Catalase (CAT) 활성 측정**

시료를 처리한 마쇄 균질액 100 µl에 3% 과산화수소 12 µl를 가하고 50 mM 인산 완충용액 (pH 7.0)으로 최종 부피가 1 ml 되도록 채웠다. 이 용액을 37°C에서 2분 동안 방치한 후 240 nm에서 5분 동안 과산화수소의 흡광도 변화를 측정하였다 (Carrillo 등, 1991).

**Glutathione peroxidase (GPX) 활성 측정**

Paglia와 Valentine (1967)의 방법에 따라 EGCG를 처



**Fig. 1.** Structure of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) used in this study.

리한 마쇄 균질액 100 µl에 1 mM EDTA, 10 mM GSH, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 1 unit의 glutathione reductase, 1.5 mM NADPH를 가한 후 37°C에서 10분 동안 방치하였다. 이 용액에 과산화수소를 1 mM 되도록 각각 가한 후 340 nm에서 NADPH의 흡광도 변화를 측정하였다.

**통계 처리**

본 논문에서 각 실험치는 실험을 3회 이상 반복하여 얻어졌으며, 얻어진 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 대조군 및 실험군의 통계학적인 유의성은 student t-test를 이용하여 판정하였으며, 그 값은 결과에 표시하였다.

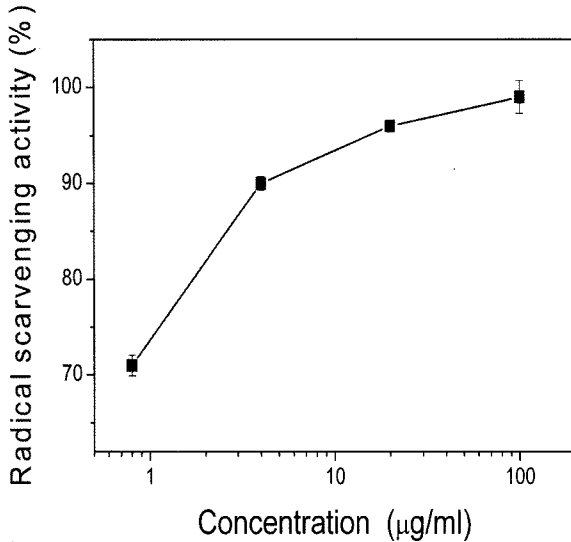
**결 과****DPPH 자유기 소거 활성**

본 연구에서는 EGCG의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH 자유기 소거 활성을 측정하였다. 세포주는 폐 세포주로서 산소 등에 의한 산화적 스트레스에 민감한 반응을 나타내어 산화적 스트레스 연구의 실험대상으로 사용되고 있는 V79-4 (Chinese hamster lung fibroblast, ATCC CCL-93)를 사용하였다(Gulston 등, 2002; Ju 등 2004). 시료의 농도를 0.8 µg/ml에서 100 µg/ml까지 변화시키면서 얻은 DPPH 자유기 소거 활성을 log-dose inhibition curve로 작성하여 Fig. 2에 도시하였다. 그 결과, EGCG는 100, 20, 4 및 0.8 µg/ml의 농도에서 각각 99, 96, 90 및 71%의 농도 의존적인 자유기 소거 활성을 나타내었다. 실험에 사용된 전 범위에서 50%이상의 자유기 소거 활성을 나타내었다.

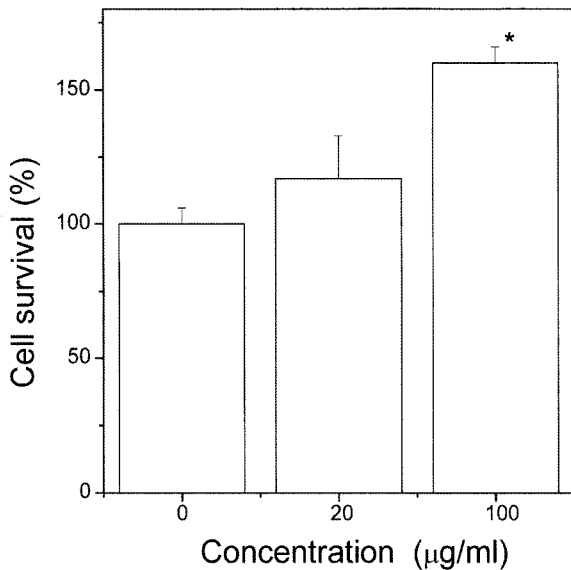
**과산화수소에 의한 세포 상해의 방어효과**

EGCG의 효과를 관찰하기에 앞서 먼저 산화적 손상을 일으키는 원인 물질인 과산화수소의 농도와 과산화수소를 가한 후의 세포 배양 시간을 변화시키면서 세포의 생존율을 관찰한 결과 최적의 조건은 1 mM의 과산화수소와 1시간의 배양 시간이었다. 따라서, EGCG의 과산화수소에 의한 세포상해의 방어효과를 측정하기 위하여, 세포

배양 배지에 EGCG를 0, 20 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 1시간 후에 과산화수소를 1 mM 되게 첨가하였다. 이어서 24시간 동안 계속하여 배양한 후 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과 EGCG를 미리 첨가하지 않은 경우에 비하여 EGCG를 첨가한 경우, 20  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 17%의 세포 생존율 증가가 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 60%의 세포의 생존율 증가가 관찰되었다(Fig. 3).



**Fig. 2.** DPPH radical scavenging effect of EGCG. EGCG was added to a methanolic solution of DPPH and radical scavenging activity was measured at 520 nm. Each experiment was performed 3 times and data were expressed as average percent changes from versus the control  $\pm$  S.D.



**Fig. 3.** Protective activity of EGCG against cell death caused by hydrogen peroxide treatment. V79-4 cells were treated with EGCG 1 hr prior to hydrogen peroxide treatment and cell survival was measured using MTT assay. Each experiment was performed 3 times and data were expressed as average percent changes from the control  $\pm$  S.D. (\*;  $p < 0.005$ )

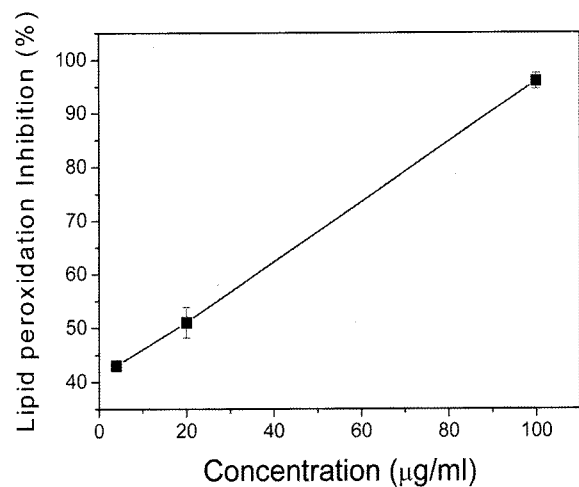
### 과산화지질 생성 억제 효과

세포막의 구성 성분인 인지질의 불포화 지방산은 자유기에 의해 과산화반응을 일으키며 이 때 생성된 과산화지질은 세포막 손상의 주요 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 지질 과산화반응의 억제는 항산화 활성 검정에 중요한 지표로 이용되고 있다. 본 연구에서는 EGCG를 각각 V79-4 세포에 가한 후 과산화수소에 의해 유도된 과산화지질 형성의 억제 활성을 측정하였다. 시료의 농도를 4  $\mu\text{g/ml}$ 에서 100  $\mu\text{g/ml}$ 으로 변화시키면서 세포에 가해준 후 얻은 과산화지질 억제 활성을 Fig. 4에 도시하였다. 그 결과, EGCG는 4, 20, 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 43, 51 및 96%의 농도 의존적인 과산화지질 생성 억제 활성을 나타내었다. DPPH 자유기 소거 활성에서와 같이 농도가 증가함에 따라 억제 활성도 증가하는 농도 의존성을 나타내었다.

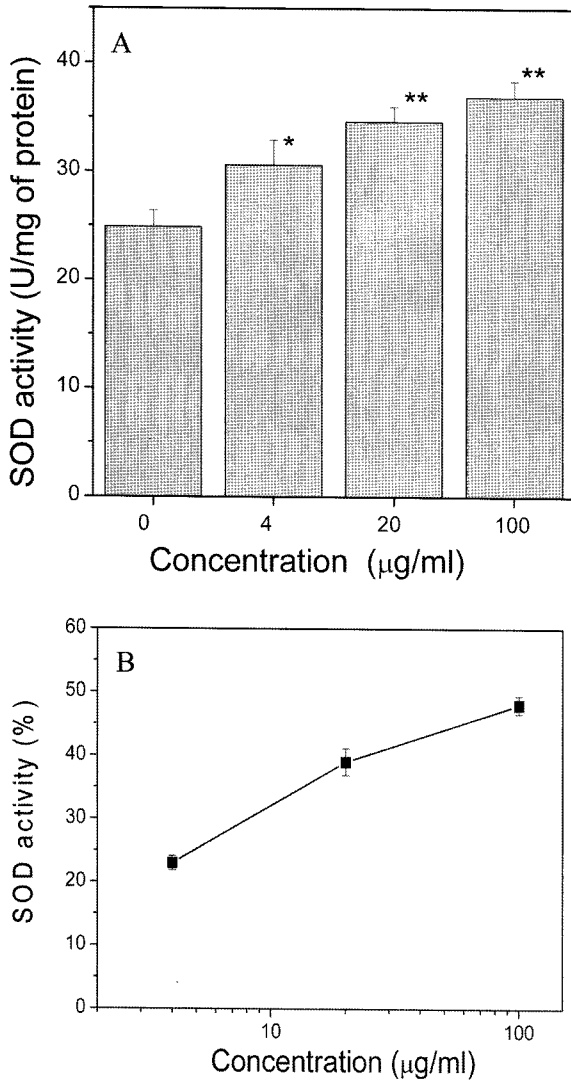
### Superoxide Dismutase 활성 증가효과

EGCG의 DPPH 자유기 소거 활성, 과산화수소에 의한 세포상해 저해 활성 및 과산화지질 생성 저해 활성 등의 항산화 효과의 기작을 규명하기 위하여 EGCG 처리 후의 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) 및 glutathione peroxidase (GPX) 등의 항산화 효소의 활성 변화를 관찰하였다.

SOD의 경우 4, 20 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 EGCG를 처리하였을 경우 각각 30.6, 34.6 및 36.6 U/mg of protein의 활성 증가를 나타내었다(Fig. 5A). EGCG를 처리하지 않은 대조군에서의 SOD 활성은 24.9 U/mg of protein이었다. 따라서 EGCG 농도증가에 따른 상대적인 SOD 활성의 증가는 각각 23, 39 및 48%이었다(Fig. 5B).



**Fig. 4.** Lipid peroxidation inhibitory effect of EGCG. Cells were incubated with 4, 20 and 100  $\mu\text{g/ml}$  of EGCG and was followed by 1 mM of hydrogen peroxide for 1 hr. The amounts of MDA were measured at 532 nm. Each experiment was performed 3 times and data were expressed as average percent changes from the control  $\pm$  S.D.



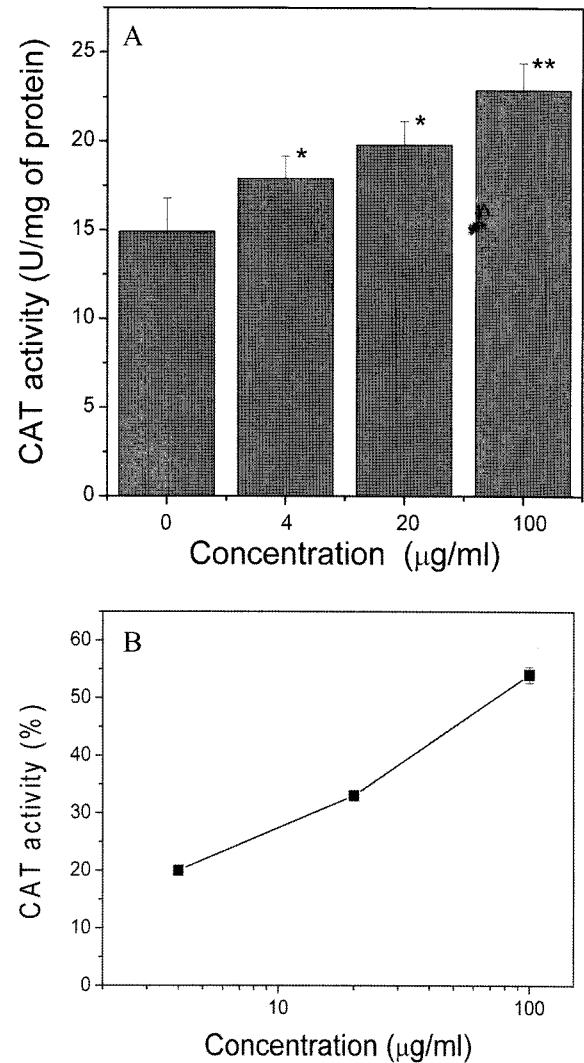
**Fig. 5.** Increase in superoxide dismutase (SOD) activity by EGCG treatment. Cells were treated with 4, 20 and 100 µg/ml of EGCG for 60 minutes and superoxide dismutase activity was measured at 560 nm as described in materials and methods. Each experiment was performed 3 times. The data were expressed as average enzyme units per mg of protein from the control  $\pm$  S.D. (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ ) (A) or the relative increase in enzyme activity (B).

#### Catalase 활성 증가효과

EGCG의 농도가 4, 20, 및 100 µg/ml로 증가됨에 따라 catalase의 활성은 17.9, 19.8 및 22.9 U/mg of protein의 증가를 나타내었다(Fig. 6A). EGCG를 처리하지 않은 대조군에서의 CAT의 활성은 14.9 U/mg of protein이었다. EGCG를 4, 20, 및 100 µg/ml의 농도로 세포 배양매체에 첨가하였을 때 얻어진 catalase의 상대적인 증가는 각각 20, 33 및 54 % 이었다(Fig. 6B).

#### Glutathione peroxidase 활성 증가효과

GPX의 경우에는 EGCG의 농도가 4, 20, 및 100 µg/ml로 증가됨에 따라 효소 활성이 14.2, 15.7 및 17.8 U/mg

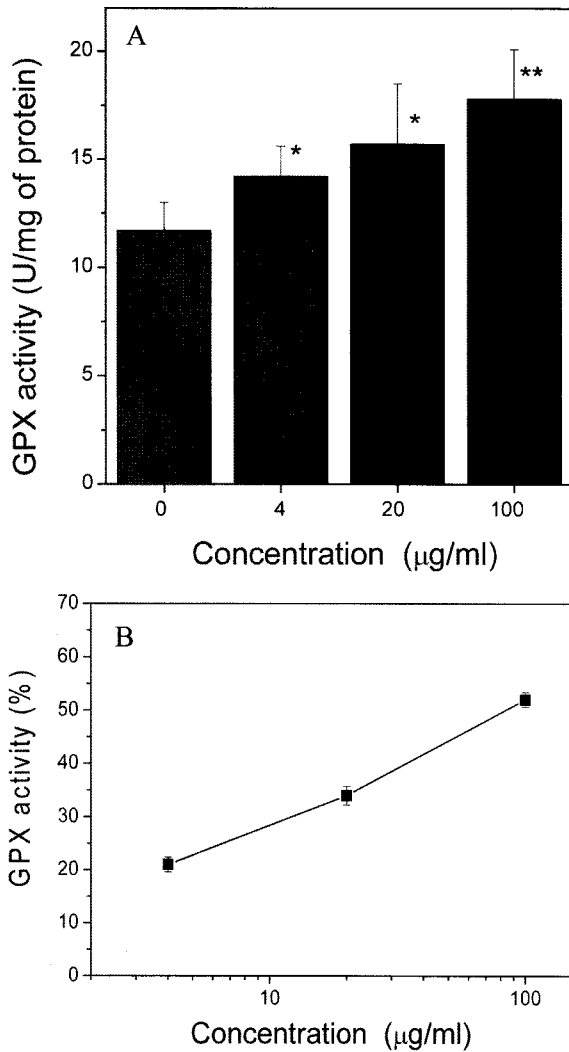


**Fig. 6.** Increase in catalase (CAT) activity by EGCG treatment. Cells were treated with 4, 20 and 100 µg/ml of EGCG for 60 minutes and catalase activity was measured at 560 nm as described in materials and methods. Each experiment was performed 3 times. The data were expressed as average enzyme units per mg of protein from the control  $\pm$  S.D. (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.005$ ) (A) or the relative increase in enzyme activity (B).

of protein으로 증가되었다(Fig. 7A). 대조군의 경우에는 11.7 U/mg of protein의 GPX 활성이 얻어졌다. 상대적인 효소활성의 증가를 살펴보면 EGCG의 농도가 4, 20, 및 100 µg/ml로 증가됨에 따라 21, 34 및 52%의 상대 활성 증가가 관찰되었다(Fig. 7B).

#### 고 찰

녹차는 오늘날 가장 많이 소비되는 음료 중의 하나로 녹차의 치료효과의 특성은 수 세기 동안 알려져 왔으며, 최근 들어 과학적인 접근법으로 연구되고 있다. (-)-Epiga-



**Fig. 7.** Increase in glutathione peroxidase (GPX) activity by EGCG treatment. Cells were treated with 4, 20 and 100 µg/ml of EGCG for 60 minutes and glutathione peroxidase activity was measured at 340 nm as described in materials and methods. Each experiment was performed 3 times. The data were expressed as average enzyme units per mg of protein from the control  $\pm$  S.D. (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ ) (A) or the relative increase in enzyme activity (B).

lloocatechin gallate (EGCG)는 녹차에 함유된 폴리페놀계 화합물로서 항산화 작용이 우수하며, 심혈관계 질환 및 암 등의 만성적 질환에 예방효과가 알려져 이러한 작용에 대하여 많은 관심을 받고 있으며, 이에 상응하여 다양한 연구가 진행되고 있다.

녹차 추출물 및 EGCG의 여러 가지 질환에 미치는 작용에 대한 많은 보고가 있다. EGCG는  $\beta$ -amyloid 독성에 대하여 뇌세포의 세포사멸을 저해하는 뇌세포 손상 방어효과를 나타내었으며(Reznichenko 등, 2003), 또한 적혈구막의 ATPase를 모델로 사용하여 t-butylhydroperoxide 유도 과산화지질 생성과 ATPase 활성에 미치는 EGCG의 영향을 평가한 연구에서도 우수한 항산화 활성을 나

타내었다(Saffari and Sadrzadeh, 2004). 또한 EGCG가 관절염을 가진 연골에서 유래한 인간 연골세포에서 interleukin-1 $\beta$ 에 의해 유도된 cyclooxygenase (COX-2)의 활성 및 nitric oxide synthase (iNOS)의 활성을 저해하여, 연골 흡수 및 관절염 치료에 사용 가능성이 제시된 바 있다(Ahmed 등, 2002). 뿐만 아니라 녹차의 성분들의 항산화 및 항암효과에 대한 많은 보고가 있다.

이러한 전신질환에서 뿐만 아니라 구강질환에도 EGCG가 광범위하게 관여하고 있다. EGCG는 치주염의 원인 균인 *Porphyromonas gingivalis*가 상피세포에 부착을 하는 것을 막을 뿐만 아니라, 균의 성장을 저해하였으며(Sakanaska S. 등, 1996). 또한 *Porphyromonas gingivalis*와 함께 치주 질환의 원인이 되는 *Prevotella intermedia*의 protein tyrosine phosphatase (PTPase)를 억제하였다(Okamoto 등, 2003). PTPase는 숙주 단백질의 인산화 정도를 저해함으로써 세균의 독성을 나타내는데 중요한 인자로 알려져 있다. 콜라겐 분해효소에 의한 콜라겐 섬유의 파괴는 치주 질환의 특성 중의 하나이다. 콜라겐 분해효소는 치주질환에 있어 중요한 인자이며 치주 질환의 진행 정도와 직접적인 상관관계가 있다. 녹차 추출액이 콜라겐 분해효소의 활성을 억제하였으며, 특히 EGCG의 효능이 가장 현저하였다(Annabi 등, 2002; Makimura 등, 1993).

또한 EGCG는 구강암의 전암병소로 알려져 있는 백반 증유래 세포주에서 세포주기를 조절하여 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려졌으며(Khafif 등, 1998), 또한 구강 편평상피세포암 세포주의 세포 성장을 억제한다고 알려졌다(Elattar and Virji, 2000). 최근에 EGCG는 구강암의 세포 사멸을 유도효과 뿐만 아니라, 암전이 억제 효과에 대한 보고가 있다(Hsu 등, 2000). 노화 및 암 치료에 수반 하여 타액선의 기능저하가 나타나는 경우가 있는데 녹차의 EGCG 성분이 이를 경감 시킨다는 보고가 있다. 녹차의 EGCG 성분을 투여한 경우 감마선 및 cis-platinum (II) diamine dichloride (CDDP) 화학요법으로 유도되는 정상 타액선 세포의 상해를 경감시켰다(Yamamoto 등, 2004).

본 연구에서는 녹차에 함유된 EGCG의 DPPH 자유기 소거 활성, 과산화지질 생성 억제활성 및 SOD, CAT 및 GPX 등과 같은 항산화 효소의 활성화 효능을 측정하여 분석하였다. 우선, 시험관에서 EGCG가 우수한 DPPH 자유기 소거 활성을 보였으며, 이로부터 EGCG가 직접 자유기를 소거할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 과산화수소에 의한 산화적 손상으로부터 세포 상해를 막아주는 방어효과를 관찰할 수 있었다. 둘째로, 과산화지질 생성 억제 활성을 측정한 결과, 농도 의존적으로 과산화지질의 생성이 억제됨을 알 수 있었다. 이 결과로부터 활성산소종에 의해 생성되어, 조직의 여러 가지 병변을 야기하는 과산화지질이 EGCG에 의해 소거됨으로써, 활성산소종으

로 인해 발생할 수 있는 여러 가지 질환들이 EGCG에 의해 예방·치유될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다. 마지막으로, 생체 내에서 자체적으로 활성산소종의 양을 조절하거나 활성산소종으로 인한 손상의 방어에 관련된, SOD, CAT 및 GPX 등의 항산화효소의 활성을 측정 한 결과, EGCG의 농도가 증가됨에 따라 이러한 효소들의 활성도 증가됨을 관찰하였다. 이 결과로부터 EGCG이 활성산소종의 양을 조절하는 데에도 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다.

인간의 노화 및 만성질환에 미치는 활성산소종의 영향에 관한 가설에 의하면, 활성산소종은 매우 위험한 화학종으로 인식되고 있다. 현재는 활성산소에 의한 세포손상과 이를 방어하는 세포의 항산화능 사이의 항상성이 깨져서 세포의 기능이 저하되고, 결국 개체가 노화 또는 만성질환에 이른다라는 가설 등이 제기되고 있다(Finkel and Holbrook, 2000). 여러 연구 보고들에 의하면, 활성산소종이 생체내의 여러 조직들의 병리적인 진행에 있어서 중요한 역할을 하고 있으며, 이는 활성산소종의 양이나 그 부산물들의 생성을 조절하는 것이 그러한 질환들의 치료와 예방에 있어서 하나의 방법이 될 수 있음을 시사한다. 본 연구 결과로부터 EGCG가 활성산소종에 의해 유발된 스트레스에 대한 방어효과가 있음을 확인할 수 있었으며, 나아가 전신 및 구강조직에서의 여러 병변들에 대해서도 예방 및 치료에 큰 도움이 될 수 있음을 알 수 있었다.

## 참고문헌

- Ahmed, S., Rahman, A., Hasnain A., Lalonde, M., Goldberg V.M. and Haqqi, T.M.: Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 $\beta$ -induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radical Biol. Med.* **33**:1097-1105, 2002.
- Annabi, B., Lachambre, M.P., Bousquet-Gagnon, N., Page, M., Gingras, D. and Beliveau, R.: Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1542**:209-220, 2002.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase : improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* **44**:276-287, 1971.
- Carrillo, M.C., Kanai, S., Nokubo, M. and Kitani, K.: Deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sci.* **48**:517-521, 1991.
- Elattar, T.M., and Virji A.S.: Effect of tea polyphenols on growth of oral squamous carcinoma cells in vitro. *Anticancer Res.* **20**:3459-3465, 2000.
- Fahn, S. and Cohen, G.: The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease : evidence supporting it. *Ann Neurol.* **32**: 804-12, 1992.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J.: Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature.* **408**:239-247, 2000.
- Gulston, M., Fulford, J., Jenner, T., de Lara, C., and O'Neil, P.: Clustered DNA damage induced by g-radiation in human fibroblast (HF19), hamster (V79-4) cells and plasmid DNA is revealed as Fpg and Nth sensitive sites. *Nucleic Acid. Res.* **30**:3463-3472, 2002.
- Gutteridge, J.M. and Halliwell, B.: Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* **899**:136-147, 2000.
- Hernaez, J.F., Xu, M. Dashwood, R.H.: Antimutagenic activity of tea toward 2-hydroxyamino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline : effect of tea concentration and brew time on electrophile scavenging. *Mutat Res.* **402**:299-306, 1998.
- Hour, T.C., Liang, Y.C., Chu, I.S. and Lin, J.K.: Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-)epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. *Food Chem. Toxicol.* **37**:569-579, 1999.
- Hsu, S.D., Singh B.B., Lewis J.B., Borke J.L., Dickinson, D.P., Drake L., Caughman G.B. and Schuster G.S.: Chemoprevention of oral cancer by green tea. *Gen Dent.* **50**: 140-146, 2000.
- Huh, S.W., Bae, S.M., Kim, Y.W., Lee, J.M., Namkoong, S.E., Lee, I.P., Kim, S.H., Kim, C.K. and Ahn, W.S.: Anticancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol. Oncol.* **94**:760-768, 2004.
- Jeng, J.H., Jang, M.C., and Hahn, L.J.: Role of areca nut in betelquid-associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. *Oral Oncol.* **37**:477-492, 2001.
- Ju, E.M., Lee, S. E., Hwang, H. J., and Kim, J.H.: Antioxidant and anticancer activity of extracts from *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Life Sci.* **74**: 1013-1026.
- Jung, Y.D., Kim, M.S., Shin, B.A., K.O, Chay., Ahn, B.W., Liu, W., Bucana C.D., Gallick, G.E. and Ellis, L.M.: 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, 2001.
- Khafif, A., Schantz, S.P. Al-Rawi, M., Edelstein, D. and Sacks, P.G.: Green tea regulates cell cycle progression on oral leukoplakia. *Head Neck.* **20**:528-534, 1998.
- Kirkland, R.A. and Franklin J.L.: Evidence for redox regulation of cytochrome c release during programmed neuronal death : Antioxidant effects of protein synthesis and caspase inhibition. *J. Neurosci.* **21**:1949-1963, 2001.
- Lin, Y.S., Tsai, Y.J., Tsay, J.S. and Lin, J.K.: Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J. Agric. Food Chem.* **51**:1864-1873, 2003.
- Mandel, S., Reznichenko, L., Amit, T. and Youdim, M.B.: Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate protects rat PC12 cells from apoptosis induced by serum withdrawal independent of P13-Akt pathway. *Neurotox Res.* **5**:419-424, 2003.
- Makimura, M., Hirasawa, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S., Taguchi, T. and Otake, S.: Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol.* **64**:630-636, 1993.
- Marton, I.J., balla, G., Hegedus, C., Redi, P., Szilgyi, Z.,

- Karmazsin, L. and Kiss, C.: The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 8:254-257, 1993.
- Marttila, R.J., Lorenz, H. and Rinne, U.K.: Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 88:321-325, 1988.
- Nassani, I., Oh-hashii, F., Oh-hara, T., Feng, W.Y., Johnston, J., Chan, K. and Tsuruo T.: Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 63:824-830, 2003.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 5: 351-358, 1979.
- Okamoto, M., Lwung, K.P., Ansai, T., Sugimoto, A. and Maeda, N.: Inhibitory effects of green tea catechins on protein tyrosine phosphatase in *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol. Immunol.* 18:192-195, 2003.
- Paglia, D.E. and Valentine, W.N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70:158-169, 1967.
- Ratan, R.R., Murphy, T.H. and Baraban, J.M.: Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J. Neurochem.* 62:376-379, 1994.
- Sachinidis, A., Seul, C., Seewald, S., Ahn, H.Y., Ko, Y. and Vetter, H.: Green tea compounds inhibit tyrosine phosphorylation of PDGF  $\beta$ -receptor and transformation of A172 human glioblastoma. *FEBS Letters.* 471:51-55, 2000.
- Saffari Y., and Sadrzadeh S.M.H.: Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sci.* 74: 1513-1518, 2004.
- Sakanaka, S., Aizawa, M., Kim, M. and Yamamoto, T.: Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 745-749, 1996.
- Shi, X., Ye, J., Leonard, S.S., Ding, M., Vallyathan, V., Castranova, V., Rojanasakul, Y. and Dong, Z.: Antioxidant properties of (-)-epicatechin-3-gallate and its inhibition of Cr(VI)-induced DNA damage and Cr(IV)- or TPA-stimulated NF-kappaB activation. *Mol Cell Biochem.* 206: 125-132, 2000.
- Stitch, H.F., and Anders, F.: The involvement of reactive oxygen species in oral cancers of betel nut/tobacco chewers. *Mutat. Res.* 214:47-61, 1989.
- Thomson, C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 267:1456-1462, 1995.
- Tobi S.E., Gilbert M., Paul N. and McMillan T.J.: The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, protects against the oxidative cellular and genotoxic damage of UVA radiation. *Int J Cancer.* 102:439-444, 2002.
- Voskresenskii, O.N. and Tkachenko, E.K.: The role of lipid peroxidation in the pathogenesis of periodontitis. *Stomatologia.* 4:5-10, 1993.
- Ward, J.F.: DNA damage as the cause of ionizing radiation-induced gene activation. *Radiat. Res.* 138: 85-88, 1994.
- Yamamoto, T., Staples, J., Wataha J., Lewis, J., Lockwood, P., Schoenlein, P., Rao, S., Osaki, T., Dickinson, D., Kamatani, T., Schuster, G., Hsu, S.: Protective effects of EGCG on salivary gland cells treated with gamma-radiation or cisplatinu(II)diammine dichloide. *Anticancer Res.* 24:3065-3073, 2004.
- Yoo, H.G., Shin B.A., Park, J.C., Kim, H.S., Kim W.J., Chay, K.O., Ahn, B.W., Park, R.K., Ellis, L.M. and Jung, Y.D.: Induction of apoptosis by the green tea flavonol (-)-epigallocatechin-3-gallate in human endothelial ECV 304 cells. *Anticancer Res.* 22: 3373-3378, 2002.
- Zelman, F.A., Thienhaus, O.J. and Bosmann, H.B.: Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease : possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res.* 476:160-165, 1988.