

방사선조사와 병행 처리한 녹차 EGCG의 혈구암세포 사멸촉진 효과

— Synergistic Effect of Green Tea EGCG Treatment with Gamma Radiation in leukemia Cell Necrosis —

목포대학교 생물학과

이홍수·김재만

— 국문초록 —

암을 치료하는 과정에서 사용하는 방사선조사와 화학요법제 처리는 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 심각한 손상을 일으킨다. 이 연구에서는 정상세포의 손상을 최소화하고 암세포를 효과적으로 죽일 수 있는 방법을 찾기 위하여 항암과 항산화 효능이 알려진 녹차 추출물, Epigallocatechin-gallate(Green Tea EGCG)의 혈액암 세포 성장억제 및 사멸촉진 효능을 조사하였다. 혈액암 세포주인 HL-60 세포와 정상면역세포주인 NC-37세포에 녹차의 EGCG를 농도별 처리하고, 방사선을 조사하여 세포사멸에 미치는 영향을 조사하였다. 녹차 EGCG는 정상세포의 성장에는 영향을 미치지 않는 반면 적정농도에서 종양 세포주의 성장을 억제하였다. 녹차 EGCG를 처리한 뒤 방사선조사를 병행하면 종양 세포주는 방사선만 단독 조사한 군에 비해 녹차 EGCG를 첨가한 군에서 세포사멸 효과가 상승적으로 증가하였다. 그 효과는 저선량 방사선조사 시에 EGCG를 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도로 처리할 때 가장 크게 나타났다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 혈액암을 포함한 각종 암의 방사선 치료시, 녹차의 음용 또는 녹차 EGCG를 병행 처리를 통해서 암세포(Leukemia cell)의 사멸을 촉진하고 정상세포를 보호하여 더 나은 치료효과를 기대할 수 있을 것으로 추정된다.

중심 단어: 혈액암 세포, HL-60, 녹차 EGCG, 상승효과

I. 서 론

악성종양의 치료에는 대개 화학요법과 방사선조사법을 병행하여 사용한다. 생체에 방사선을 조사하면 방사선의 에너지가 생체에 흡수되고 이에 수반하여 화학변화가 일어나며, 이어서 변화된 물질을 포함한 여러 가지 생화학적 작용이 발생하여 최종적으로 생물학적 단계인 생체에 변화

가 나타나게 된다¹⁾. 방사선치료와 함께 화학요법제로 사용되는 항암제들은 암세포를 완전히 제거하는 좋은 결과도 보이기도 하지만 한편으로는 여러가지 부작용도 많이 나타난다. 항암제는 암세포뿐만 아니라 정상세포까지 손상시키며 면역기능에 영향을 미치는 등 심각한 부작용과 후유증을 초래하는 경우도 많았다. 따라서 암세포를 선별적으로 사멸시키고 정상세포를 보호하는 새로운 항암제 개발, 또는 치료법 개발이 매우 중요한 과제라고 생각된다.

최근 들어 정상세포를 보호하고 암세포를 선별적으로 사멸시킬 수 있는 물질로 녹차의 항암 성분이 주목을 받고 있다^{2,3)}. 동양에서 오래 전부터 기호식품으로 사용되어 온 녹차는 항암, 항산화, 항내분비 교란의 효능 등을

* 이 논문은 2006년 11월 13일 접수되어 2006년 12월 6일 채택 됨.

책임저자: 김재만, (534-729) 전남 무안군 청계면 도림리 61
목포대학교 생물학과
TEL: 061-450-2348, FAX: 061-454-0267
E-mail: jkim@mokpo.ac.kr

가지는 것으로 보고되고 있는데, 특히 항암 효과로는 암 발생 억제, 암세포 성장 및 분열저해, 암세포 사멸 등의 효능을 들 수 있다^{4,5)}.

녹차의 카테킨 성분은 설치류 등에서 피부, 전위, 식도, 십이지장, 결장암 등을 억제하고 생쥐에서는 TPA-유도 피부암 축진을 억제시키는 것으로 알려져 왔다⁶⁾. 그 중 (-)-epigallocatechin gallate(EGCG)는 폴리페놀의 중요한 구성 성분이며 생엽 kg당 8.7g 또는 건조물질의 약 10% 정도를 차지한다⁴⁾. Yamane 등⁷⁾은 green tea 추출물을 지원자를 대상으로 하여 하루 1g을 임상적으로 사용하였는데, 지원자에서 특별한 독성 및 병리조직학적 병변이 없음을 관찰하였다. Chen 등⁸⁾도 EGCG, EGC, EC 등의 체내 대사기전을 관찰하기 위하여 decaffeinated green tea(DGT, 25 mg/kg)를 쥐의 체내에 구강 흡수시켜 혈장과 조직에서 분포를 HPLC를 통해 분석하였는데, EGCG, EC, EGC는 소장, 신장보다 간, 허파에서 적은 양이 분포하며, EGCG는 주로 쓸개즙을 통해서 EGC와 EC는 쓸개즙과 소변을 통해 배설된다고 보고하였다.

본 실험은 항산화, 항암작용 등 여러 작용 가능성을 가지고 있는 것으로 알려진 녹차 추출성분 중 특히 주요 활성물질인 EGCG를 이용하여 정상 면역세포와 종양세포주에 대하여 EGCG의 처리가 세포 성장에 어떤 영향을 미치는지 관찰하고 방사선조사와 병행하여 EGCG를 처리하였을 때 암세포 사멸효과가 어떻게 나타나는지를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 녹차 추출 성분

실험에 사용한 녹차 추출물인 EGCG는 (95~98% polyphenols(> 80% catechin(EGCG > 45%), < 3% caffeine) Sigma(USA)에서 구입하였다. 정제된 녹차 추출물인 EGCG 0.01 mg을 100 ml의 RPMI 1640 배양액에 넣어 녹인 후 Syringe filter(0.22 μ m, Nalgene)로 여과하여 저장용액을 만들어 알루미늄 호일로 감싸서 4°C에 보관하였다. 실험 직전에 저장용액을 RPMI 배양액(Gibco)으로 희석하여 10 μ g/ml에서 100 μ g/ml까지 용액을 만들었다. EGCG 농도는 실험시 96 well plate에 포함되는 배양액 100 μ l에 대한 최종 희석농도이다.

2. 혈액암 세포주와 정상 면역세포주 배양

실험에 사용된 암세포주는 인체기원 암세포주로 전골

수성 백혈병 세포주, HL-60(Human leukemia, acute promyelocyte)과 정상면역세포주, NC-37(Human B cell : B lymphoblast)를 이용하였다. 세포주를 15 ml 원심분리관에 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 1640 배양액에 세포 수를 2×10^4 ml 정도로 조정된 후 culture flask에 넣어서 섭씨 37°C, 5% 이산화탄소를 포함한 배양기 내에서 배양하였다. 세포수가 지나치게 많아지면 세포를 원심분리하여 배양액을 교환하고 3~4일에 한 번씩 숫자를 줄여서 계대 배양하였다. 본 실험에서는 8~10대 사이의 계대배양 중인 대수기의 증식력이 왕성한 세포를 이용하였다.

3. 암세포와 정상면역세포 독성 실험

계대배양된 HL-60세포와 NC-37세포를 2회 정도 반복하여 세척한 후 상층액을 버리고 침전세포에 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배양액을 넣어 세포수를 5×10^4 / 50 μ l 정도로 조정된 후 96 well plate에 50 μ l씩 각각 분주한 다음 EGCG를 10 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 또는 72시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 XTT kit(Roche, Swiss)를 이용하여 각각의 생존율을 측정하였다. 대조군에는 약물대신 50 μ l의 배양액을 넣었다. 동일 실험군은 5개의 well로 설정하였으며, 같은 조건의 실험을 5회 이상 반복하였다.

4. 암세포 방사선 감수성 실험

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

HL-60세포의 방사선조사에 관한 방사선 감수성 실험을 하기 위하여 계대배양된 HL-60세포를 15 ml 원심분리관에 넣고 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 $5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ 정도로 세포수를 조절하였다. 15 ml 원심분리관에 4개 조절된 세포를 5 ml씩 각각 넣고 대조세포(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 plate의 각 well에 100 μl 씩 분주한 다음 37°C에서 5% CO₂ 배양기 및 100% 습도의 조건에서 48시간 배양 그리고 72시간 배양하였다. 배양된 혈구암세포를 XTT kit를 이용하여 생존율을 측정하였다.

5. EGCG 처리 전, 후 방사선 선량별 암세포 성장에 관한 실험

계대배양된 HL-60세포를 각 15 ml 원심분리관에 넣고 10% FBS가 포함된 RPMI 1640에 넣어 800 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 2회 정도 세척을 반복한 후 상층액을 버리고 침전세포에 20% FBS가 포함된 RPMI 1640 배양액으로 세포수를 $5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ 로 조정된 후 조정된 세포를 15 ml 원심분리관 4개에 각각 3 ml씩 분주하고 여기에 EGCG 희석액(40 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 농도별로 희석한 EGCG 용액)을 각 농도별로 3 ml씩 분주하여 가볍게 흔들어 잘 혼합한 후에 37°C, 100% 습도를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함한 배양기 내에서 6시간 배양하였다. 6시간 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 plate의 각 well에 100 μl 씩 분주한 다음 37°C에서 5% CO₂ 배양기 및 100% 습도의 조건에서 48시간 배양 그리고 72시간 배양하였다.

혈액 조사장치에서의 암세포 조사는 아래 수식에 의하여 각각 1 Gy/6 sec씩 조사하였다. 즉 3 Gy는 18초, 5 Gy는 30초이고 7 Gy는 42초를 조사하였다. 배양된 세포는 XTT kit를 이용하여 각각의 생존율을 측정하였다.

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

6. XTT Assay

혈구암세포인 HL-60세포의 생존율을 측정하기 위하여

cell proliferation kit(Boehringer-Mannheim, Germany)는 정량 kit인 XTT kit를 사용하였다. 배양하던 세포를 hemocytometer를 이용하여 96 well plate로 100 μl 배양액 안에 $5 \times 10^4/\text{well}$ 이 되게 분주한 다음 CO₂ incubator 안에 넣고 48시간, 72시간 각각 배양된 96 well에 XTT assay kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하였다. 각각 배양된 96 well에 XTT 반응액 50 μl 을 넣어 섭씨 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양시킨 후 490 nm 파장에서 ELISA 판독기(EMAX, Molecular Device, U.S.A)로 흡광도를 측정하였다. 방사선조사와 병행 처리한 녹차 EGCG의 사멸 유도 효과에 대한 예상값(calculated value)은 EGCG의 농도별 암세포독성검사 값을 방사선량별 control 값에 곱하여 예상치를 얻은 다음 측정값(estimated value)을 아래 공식에 대입하여 계산하였다.

$$\% \text{ Synergism} = \frac{\text{Calculated value} - \text{Estimated value}}{\text{Estimated value}} \times 100$$

III. 결 과

1. 혈액암세포와 정상세포에 녹차 EGCG 처리 효과

혈액암세포인 HL-60 세포주에 EGCG를 처리하여 농도별로 세포생존율을 비교하였다. HL-60 세포주의 EGCG처리 후 48시간 배양에서는 대조군에 비해 농도가 높아질수록 점차적으로 완만하게 세포사멸이 증가시키는 경향을 보였다 EGCG는 30 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 90%의 생존율을 유지하다가, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 80%, 80 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 70%까지 생존율이 감소하였다. 72시간째 배양하였을 때 EGCG는 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 세포 분열을 완전 억제 하였다(Table 1, Fig. 1). 무 처리군에서는 세포수가 약 50% 증가하였으나 30% 이상 처리군에서는 세포수 증가가 관찰되지 않았다(Table 1). 40 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 약 90~50% 정도의 생존율을 나타내었다. 이와같은 생존율 감소는 정상 혈구 세포인 NC-37에서는 관찰되지 않았다(Table 1). NC-37 세포는 분열 속도가 느릴 뿐만 아니라 EGCG에 의해서 세포 사멸이유도 되지 않았다. 반대로 낮은 농도의 EGCG처리(10 $\mu\text{g/ml}$)시에 오히려 세포분열이 10% 정도 증가하는 결과를 나타내었다.

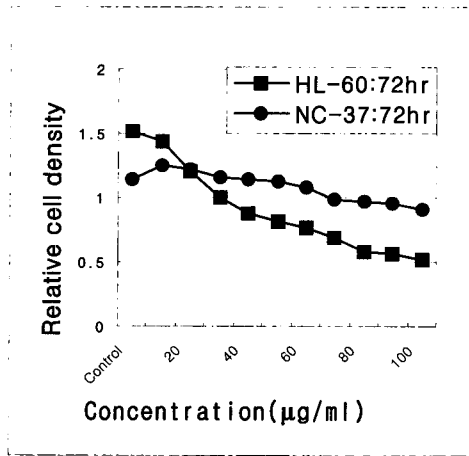


Fig. 1. EGCG effect on leukemia cell growth

Table 1. Effect of EGCG treatment on cell growth of HL-60 and NC-37. The data represent relative cell densities

Concentration of GTPP(µg/ml)	HL-60		NC-37	
	48 hr	72 hr	48 hr	72 hr
control	1.00	1.52	1.00	1.13
10	0.95	1.44	1.04	1.25
20	0.93	1.21	1.11	1.21
30	0.88	1.00	1.12	1.16
40	0.81	0.87	1.15	1.13
50	0.76	0.81	1.12	1.12
60	0.73	0.77	1.11	1.08
70	0.75	0.69	1.15	0.99
80	0.68	0.58	1.13	0.97
90	0.64	0.57	1.11	0.95
100	0.58	0.51	1.05	0.91

2. 혈구암세포에 대한 방사선조사효과

혈구암 세포인 HL-60 세포는 방사선 조사량에 비례하여 사멸율이 증가하는 경향을 보였다. 방사선이 조사된 세포에서 3 Gy 방사선조사에서는 48시간 배양세포군에서는 배양에서 각각 0.98 ± 0.00 과 0.92 ± 0.01 로 약 2~8% 정도의 세포수 감소를 보였다. 5 Gy 조사시에는 0.84 ± 0.03 와 0.82 ± 0.03 로 약 16~18%의 감소를 보였고, 7 Gy에서는 0.64 ± 0.00 와 0.54 ± 0.03 로 36~46%의 감소를 보였다(Fig. 2). 그리고 72시간 배양에서 대조군과 비교하여 볼 때 3 Gy에서는 약 40%의 세포 감소율을 보였으며 5 Gy에서는 46%, 7 Gy에서는 약 75%의 세포 감소율을 보임으로서 방사선 선량이 높을수록 그리고 배양시간

이 경과할수록 세포수의 감소가 더 크게 관찰되었다. 시간이 경과하여도 세포수 증가가 관찰되지 않는 것은 방사선조사가 세포분열을 억제하는 결과를 유도하였음을 의미한다.

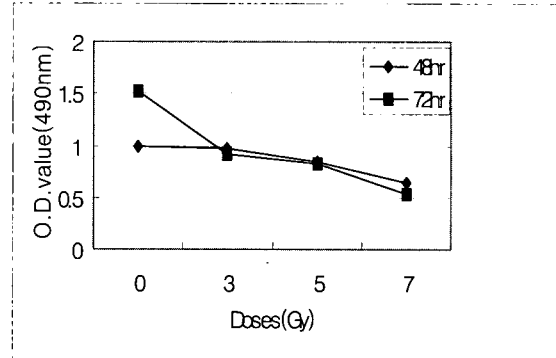


Fig. 2. Gamma irradiation induced leukemia(HL-60) cell necrosis in a dosage dependent manner

3. EGCG 처리한 혈구암세포의 방사선조사 효과

방사선조사와 녹차 EGCG 처리는 개별적으로 혈구암세포의 사멸을 유도하였다(Fig. 1, 2). 따라서 두가지 처리를 병행하면 상승효과가 나타날 것으로 예상되어 혈구암세포에 EGCG를 처리한 뒤 방사선을 선량별로 조사하였다. 서로 다른 농도의 녹차 EGCG를 투여 후 48시간째에 3 Gy의 방사선을 조사한 집단의 세포 생존율은 EGCG 무처리군이 0.98로 세포사멸이 거의 나타나지 않았다(Table 2, Fig. 3). EGCG 만을 40, 50, 60 µg/ml 농도로 처리한 세포에서는 생존율이 0.81, 0.76, 0.73으로 3 Gy의 방사선을 조사한 집단보다 약간 더 사멸하였다. 그런데 EGCG를 각각 40, 50, 60 µg/ml 농도로 처리한 세포에 동일한 선량으로 방사선조사를 하면 EGCG만 단독처리한 세포군에 비교하여 예상값보다 각각 3.1%, 26.2%, 23.3% 더 사멸하는 상승효과가 나타났다(Table 2, Fig. 3). 방사선 조사량을 5 Gy, 7 Gy로 각각 늘리면 세포사멸 상승효과는 감소하였으나 약 10% 정도의 상승작용을 유지하였다. 암세포사멸 상승효과는 EGCG 농도가 50 µg/ml일 때 가장 높게 나타났다(Fig. 3). 녹차 EGCG의 처리시간을 72시간으로 늘렸을 때도 암세포사멸 상승효과는 48시간 처리군과 유사한 형태를 나타내었다(Table 3). 가장 큰 사멸 상승효과는 EGCG 농도가 50 µg/ml일 때 3 Gy의 방사선을 처리하여 얻을 수 있었으며 이때 처리 상승효과는 약 35%까지 증가하였다.

Table 2. Relative cell proliferation at 48hrs after co-treatment of EGCG and γ -irradiation, Percent(%) values are degrees of synergistic effect and numbers in the round bracket are expected values for each condition

γ -ray (Gy)	EGCG($\mu\text{g/ml}$)			
	0	40	50	60
0	1.00 \pm 0.01	0.81 \pm 0.03	0.76 \pm 0.02	0.73 \pm 0.06
3	0.98 \pm 0.00	0.77 \pm 0.00 3.14% (0.79)	0.59 \pm 0.06 26.2% (0.74)	0.58 \pm 0.00 23.3% (0.71)
5	0.84 \pm 0.03	0.69 \pm 0.07 -1.4% (0.68)	0.58 \pm 0.01 10.6% (0.63)	0.57 \pm 0.01 7.6% (0.61)
7	0.64 \pm 0.01	0.49 \pm 0.01 5.8% (0.51)	0.44 \pm 0.01 10.5% (0.48)	0.41 \pm 0.02 14.0% (0.46)

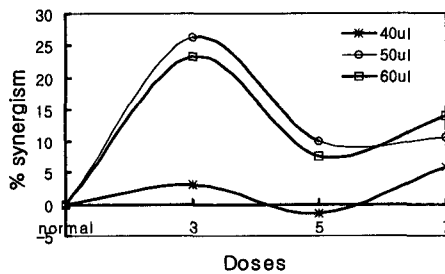


Fig. 3. Synergistic effect of EGCG treatment in leukemia cell necrosis induced by γ -irradiation after 48 hours treatment

Table 3. Relative cell proliferation at 72 hrs after co-treatment of EGCG and γ -irradiation

Gy	EGCG($\mu\text{g/ml}$)			
	0	40	50	60
0	1.52 \pm 0.02	0.87 \pm 0.01	0.81 \pm 0.01	0.77 \pm 0.04
3	0.92 \pm 0.01	0.72 \pm 0.04 11.2%	0.56 \pm 0.03 33.1%	0.52 \pm 0.01 34.5%
5	0.81 \pm 0.02	0.64 \pm 0.02 10.1%	0.60 \pm 0.01 9.4%	0.50 \pm 0.01 23.1%
7	0.54 \pm 0.03	0.49 \pm 0.03 -6.12%	0.43 \pm 0.08 1.7%	0.37 \pm 0.08 10.9%

IV. 고찰

녹차의 EGCG는 단독처리 했을 때 혈구암세포 사멸유도 효과를 나타내며 방사선조사와 병행처리 하였을 때는 방사선의 사멸효과를 증진시키는 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 기존의 연구와 일치한다.

Valic 등⁹⁾은 (+)-gallocatechin (GC), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocate catechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG), (-)-epigallocatechin 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 등¹⁰⁾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 등의 순으로 lipid peroxidation 생성을 억제시키고, hydroxy radical (HO) 배기 능력은 ECG > EC > EGCG > EGC 순으로 감소시킴을 관찰하였다. Otsuka 등¹¹⁾은 사람과 생쥐 leukemic cell line인 K562, KG1, THP-1, U397, NFS60 세포주를 이용하여 0 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 10000 μM 등 각각의 EGCG 농도에 따른 세포주의 성장률을 36시간 경과 후 MTT 분석을 통해서 관찰하였고, colony 형성은 14일 경과 후 관찰하였다. colony 형성의 경우 모두 100 μM 농도 이상의 경우에서만 암세포주 성장억제 및 colony 형성을 억제시킴을 관찰할 수 있었는데, 특히, 생쥐 세포주인 NFS60 세포주의 경우는 사람과는 달리 20 μM 에서 암세포 성장률을 억제함이 관찰되었다.

한편 EGCG는 암세포를 사멸을 유도할 뿐만 아니라 동시에 정상 세포를 보호하는 기능을 나타낸다. 본 실험 결과를 보면(Table 1, Fig. 1) EGCG가 암세포에 대해서는 강력한 사멸유도 효과를 보이지만(100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50% 정도사멸), 동일한 농도에서 정상세포는 거의 사멸되지 않는다. 이런 결과는 안정된 분열조절체계를 지닌 정상세포가, 불안정한 분열 조절체계를 지닌 암세포에 비해서 독성작용을 덜 받기 때문인 것 같다. EGCG의 세포 보호 작용은 기존의 여러 논문에서도 자주 보고 되었다. Katiyar 등¹²⁾은 최근 몇 가지 항암 생체분석 시스템(antitumor

bioassay system)을 통해 therein이 존재시 epicatechin (EGC)이 항산화(antioxidant) 효과를 나타내 녹차가 chemical 또는 photo-carcinogenesis에 보호 기능이 있음을 보고하였다. Uchida 등¹³⁾은 생쥐에 EGCG를 음용수를 통해 자유롭게 공급했더니, 간에서 방사선 유도에 의해 발생한 lipid peroxidase 증가를 억제시키고, 전신 X-선 조사 후 사망이 지연됨을 관찰하여 매우 낮은 독성을 지닌 방사선 보호제로써의 가능성을 제시하였다. Kuroda¹⁴⁾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 등¹⁵⁾은 CCC DNA (covalently closed circular DNA)에 X-선, γ -선, β -선 등을 조사한 후 DNA 손상 억제효과를 관찰하였는데, EGCG 농도가 증가할수록 CCC DNA 생존율이 증가함을 관찰하였고 이는 EGCG가 OH radical를 제거하는 능력이 있기 때문이라고 보고하였다.

본 연구에서 녹차 처리와 방사선조사를 병행하였을 때 세포사멸은 상승적으로 증가하는데 특히 그 효과는 저선량 조사에서 뚜렷하게 관찰된다. 7 Gy와 5 Gy에서 10% 미만의 상승효과를 보이던 EGCG 처리효과는 3 Gy에서 35%까지 증가한다. 방사선조사는 일반적으로 많은 정상 세포의 손실을 초래하는데 저선량 방사선과 녹차처리로써 암세포를 효과적으로 제거할 수 있을 것이라는 가능성을 보여준다. 본 연구에서는 40~60 μ M의 미량의 EGCG를 처리하여 암세포에 대한 사멸촉진 상승효과를 확인할 수 있었다. 또한, 방사선조사 전, 후 EGCG 첨가 유무에 따른 혈구암 세포주 성장률을 비교한 결과 방사선 단독처리 세포에서보다 현저한 암세포 억제가 있는 것을 확인하였으며, 고선량보다 저선량에서 상승효과가 높게 나타난 사실을 관찰할 수 있었다. 특히, 녹차 EGCG의 처리가 정상 세포에는 거의 영향을 미치지 않았는데 이 사실은 녹차 EGCG처리에 의해 암세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있을 것이라는 점을 시사한다. 이상의 결과로 미루어 혈액 암의 방사선 치료시 녹차 EGCG를 병행 처리하면 저선량의 방사선조사로도 정상세포의 손상을 최소화하면서 효과적으로 암세포를 사멸을 유도할 수 있을 것으로 기대된다. 방사선과 녹차 EGCG의 병행 처리효과가 다른 암세포에 대해서도 In vivo 처리에서도 동일한 효과를 나타내는데 대해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

참고 문헌

1. 이상석, 박영선, 김홍태, 고성진: 의료방사선생물학, 정문각, 35, 1999
2. 여생규, 안철우, 이용우, 이대기, 박영호, 김선봉: 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 항산화작용, 한국영양식량학회지, 24, 299-304, 1995
3. Chung SY and Wang, ZY: Tea and cancer, J. Nat. Cancer. Inst., 85, 1038-1049, 1993
4. Zong PC, John BS, Chi-Tang H, Kuang YC: Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts, Cancer letter, 129, 173-179, 1998
5. Yoshizawa S, Horiuchi T, Fujiki H, Yoshida T, Okuda T, Sugimura T: Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of 'tannin' in green tea, Phytother. Res., 1, 44-47, 1987
6. Fujiki H, Suganuma M, Okabe S *et al.*: Cancer inhibition by green tea, Mutat-Res., 18, 402(1-2), 307-10, 1998
7. Yamane T, Nakatani H, Kikuoka N *et al.*: Inhibitory effects and toxicity of green tea EGCGs for gastrointestinal carcinogenesis, Cancer, 77(8), 1662-1667, 1996
8. Chen W, Dong Z, Valcic S, Timmermann BN, Bowden 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(2), 79-84, 1999
9. Valcic S, Timmermann BN, Alberts DS *et al.*: 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, 1996
10. Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S, Xin W: Studies on protective mechanisms of four compounds of green tea EGCGs against lipid peroxidation in synaptosomes, Biochem. Biophys. Acta, 1304(3), 210-222, 1996
11. Otsuka T, Ogo T, Eto T, Asano Y, Suganuma M,

- Niho Y: Growth inhibition of leukemic cells by (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea, *Life Science*, 63(16), 1397-1403, 1998
12. Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H: Inhibition of spontaneous and photo-enhanced lipid peroxidase in mouse epidermal microsomes by epicatechin derivatives from green tea, *Cancer Lett.*, 79(1), 61-6, 1994
13. Uchida S, Ozak, M, Suzuki K, Shikida M: Radioprotective effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (green-tea tannin) in mice, *Life. Sci.*, 50(2), 147-152, 1992
14. Kuroda Y: Bio-antimutagenic activity of green tea cathchins in cultured Chinese hamster V79 cells, *Mutat. Res.*, 361(2-3), 179-186, 1996
15. Hasegawa K, Yoshioka H: DNA damage by various radiation, *Radiat. Phys. Chem.*, 49(1), 81-84, 1997

• Abstract

Synergistic Effect of Green Tea EGCG Treatment with Gamma Radiation in leukemia Cell Necrosis

Hong-Soo Lee · Jae-Man Kim

Department of Biology, Graduate School, Mokpo National University

During cancer therapy, gamma-ray irradiation and treatment of anti-cancer chemicals destroy the normal cells as well as cancer cells. In this study, we investigated the effect of epigallocatechin-gallate(EGCG) extracted from green tea, which is known to have anti-cancer and anti-oxident activities, in order to find out the feasible method to protect the normal cells and to kill the cancer cells efficiently.

We investigated the effect of EGCG on the leukemia cell growth and cell necrosis, especially when treated along with gamma radiation. The EGCG inhibited the leukemia cell, HL-60, growth at the appropriate concentration while it exhibited no influence on the normal cell growth. More significantly, it enhanced leukemia cell necrosis when its treatment was combined with gamma irradiation. Simultaneous treatment of EGCG and gamma radiation increased leukemia cell necrosis up to 35% compared with separate treatments.

These results suggest that drinking of green tea or co-treatment of EGCG during gamma irradiation therapy may result in better prognosis through enhancement of the tumor cell necrosis and protection of the normal cells.

Key Words: leukemia cell, HL-60, EGCG in green tea, synergistic effect