

## Caffeic acid, chlorogenic acid, EGCG가 유방암 세포 T-47D의 p16 유전자 DNA methylation에 미치는 영향

이 원 준\*

이화여자대학교 건강과학대학 체육과학과

Received January 31, 2007 / Accepted March 29, 2007

**Effects of caffeic acid, chlorogenic acid, and EGCG on the methylation status of p16 gene in T-47D breast cancer cells.** Won Jun Lee\*. *Department of Exercise Science College of Human Science, Ewha Womans University, Seoul, 120-750, Korea* – In the present investigation, we studied the modulating effects of caffeic acid, chlorogenic acid, and (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG) on the methylation status of promoter regions of cell cycle regulator, p16, in human breast cancer T-47D cells. We demonstrated that treatment of T-47D cells with caffeic acid, chlorogenic acid, or EGCG partially inhibited the methylation status of the promoter regions of p16 genes determined by methylation-specific PCR. In contrast, unmethylated p16 genes were increased with the treatment of T-47D cells with 20  $\mu$ M of caffeic acid or chlorogenic acid for 6 days. Treatment of T-47D cells with 5, 20 or 50  $\mu$ M of EGCG increased the unmethylation status of p16 gene up to 100%, and the methylation-specific bands of this gene were decreased up to 50 % in a concentration-dependent manner. The finding of present study demonstrated that coffee polyphenols and EGCG have strong inhibitory effects of the cellular DNA methylation process through increased formation of S-adenosyl-homocysteine(SAH) during the catechol-O-methyltransferase (COMT)- mediated O-methylation of these dietary chemicals or an direct inhibition of the DNA methyltransferases. In conclusion, various dietary polyphenols could reverse the methylation status of p16 gene in human breast T-47D cells.

**Key words** – polyphenols, DNA methylation, catechol-O-methyltransferase, methylation-specific PCR

### 서 론

DNA methylation은 DNA 염기서열 중 cytosine 다음에 guanosine이 위치할 때 cytosine 5번째 탄소에 methyl group (CH<sub>3</sub>)이 첨가되는 반응이다[1]. 이러한 현상은 DNA 염기서열에 변화가 없이 유전자의 발현을 조절하는 epigenetic mechanism으로서 유전자의 integrity를 유지하는데 있어 매우 중요한 기능을 한다. 최근 많은 선행 연구들이 거의 모든 암세포에서 유전자의 전반에 걸쳐서 global hypomethylation이 일어나는 반면, DNA 내에서 CpG dinucleotides의 밀도가 높은 소위 promoter 부근의 “CpG island” 지역에서는 유전자 특이적인 hypermethylation이 공통적으로 일어난다고 보고하였다[16,17].

DNA methylation은 우리 인체에서 DNA methyltransferase(DNMT)라는 효소에 의해 그 반응이 일어난다[18]. 인체에서 일어나는 다른 많은 효소적 methylation 반응과 마찬가지로 DNA methylation 반응 또한 methyl doner로서 S-adenosyl-methionine(SAM)을 이용하며, methylation 반응 후 부산물로서 S-adenosyl-homocysteine(SAH)을 만들어 낸다. 많은 선행연구들이 SAM이 methyl group을 기질(substrate)

에 제공한 후 생성된 SAH가 SAM-dependent methylation 반응에 있어서 feedback inhibitor로 작용하여 methylation 반응을 억제시킨다고 하였다[13,14].

Catechol-O-methyltransferase(COMT) 효소는 methyl doner인 SAM으로 부터 methyl group을 catechol 구조를 가지고 있는 기질로 전이시킨다. 이러한 COMT의 기질로서는 catecholamines, catechol estrogen과 같은 물질과 많은 종류의 catechol 구조를 포함하고 있는 내인성(endogenous)과 외인성(exogenous) 화학물질과 같이 다양한 물질들이 존재한다. 또한 catechol 구조를 포함하고 있는 많은 식이성 폴리페놀(polyphenol)은 COMT 효소에 의한 methylation 반응에 있어서 훌륭한 기질이 된다[23-26]. 이러한 식이성 폴리페놀은 우리 인체 내에서 흡수된 후 COMT 효소에 의해 methylation 반응이 일어나게 된다. 앞에서 언급한 DNA methylation 반응과 마찬가지로 COMT 효소에 의해 폴리페놀에 methyl group이 첨가되는 methylation 반응도 공통적으로 SAM을 methyl doner로 사용한다[23-26]. 이는 또한 COMT 나 DNMT 효소에 의한 두 methylation 반응 모두 부산물로서 SAH를 생성함을 의미한다. 이러한 선행연구를 바탕으로 식이성 폴리페놀의 COMT 효소에 의한 methylation 반응으로 인해 증가된 feedback inhibitor인 SAH가 DNMT에 의한 DNA methylation 반응 또한 억제시킬 것이라는 가정 아래 최근 여러 가지 catechol 구조를 함유하고 있는 폴리페놀 성

#### \*Corresponding author

Tel : +82-2-3277-2563, Fax : +82-2-3277-2846

E-mail : jun@ewha.ac.kr

분이 DNA methylation에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되었다[13,14]. 그 결과 여러 가지 식이성 폴리페놀들, 예를 들어 커피에 포함된 caffeic acid, chlorogenic acid, 과일 주스에 다량 함유되어있는 quercetin, fisetin, myricetin, 또한 차에 다량 함유된 catechin, epicatechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)등과 같이 많은 화학물들이 *in vitro* DNA methylation을 강력하게 억제하였을 뿐만 아니라, 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포와 MCF-7 세포와 esophageal squamous 암세포인 KYSE 150 세포, colon HT-29 암세포, prostate 암세포인 PC3 세포등과 같이 다양한 암세포에서 종양억제 유전자 중 하나인 retinoic acid receptor-β(RAR-β) 유전자의 methylation을 억제하였으며, 그 결과 unmethylation 상태의 RAR-β 유전자를 유의하게 증가시켰다고 보고하였다[7,13,14]. 하지만 수많은 암세포에서 특정한 유전자의 과메틸화 현상이 동일하게 일어나는 것이 아니라 암세포의 종류에 따라서 크게 상이하게 나타난다[20].

인체에 암이 발생하였을 때 암세포는 세포주기의 조절 기전을 상실하여, 계속 증식을 하게 된다[2]. 이렇듯 종양억제 유전자와 더불어 p14, p15, p16과 같은 세포주기 조절 유전자(cell cycle regulators)도 암세포의 증식을 억제하는데 매우 중요한 요소이다. 거의 모든 암에서 이러한 세포의 증식 억제에 관련된 여러 유전자들에서 hypermethylation이 일어난다[15]. 하지만 앞서 언급하였듯이 암세포의 종류에 따라 methylation 패턴이 매우 다양하게 나타난다. 공통점은 어떤 특정한 유전자에서 hypermethylation이 일어나는 곳은 주로 유전자 promoter 지역으로서, 이 부분의 hypermethylation은 그 특정 유전자의 발현을 억제시키는 역할을 한다. 암세포의 증식을 막기 위해서는 이러한 세포주기 조절 유전자의 정상적인 발현이 필수적이다. 하지만 식이성 폴리페놀이 세포주기 조절 유전자의 methylation에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 많이 부족한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 식이성 폴리페놀인 caffeic acid, chlorogenic acid, 그리고 EGCG(그림 1)가 유방암 세포인 T-47D 세포의 세포주기 조절 유전자인 p16의 methylation 상태에 미치는 영향을 살펴보는 데 있다.

### 재료 및 방법

#### 세포 배양

본 연구에 사용한 T-47D 유방암 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA)사로부터 구입하였다. T-47D 세포는 10% FBS, 100 U/ml의 페니실린 G, 100 µg/ml streptomycin sulfate를 함유하고 있는 Dulbecco's Modified Eagles' Medium(DMEM)을 이용하여 37°C(5% CO<sub>2</sub>)의 incubator에서 배양하였다. 세포는 6 wells plate에서 배양하였으며, 세포를 분주하고 난 뒤 24시간 후 caffeic acid,

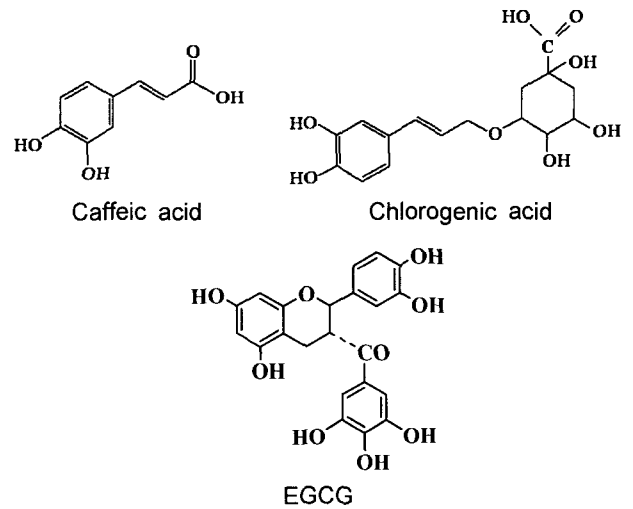


Fig. 1. The chemical structure of several catechol-containing dietary polyphenols used in this study

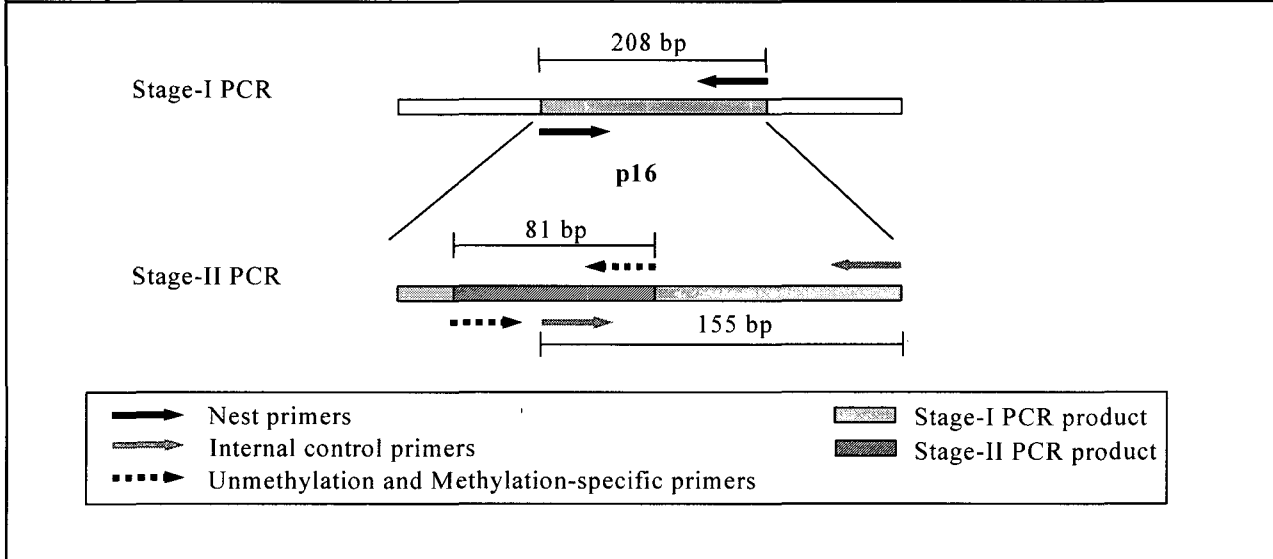
chlorogenic acid, EGCG를 처리하였다. 20 µM의 caffeic acid와 chlorogenic acid로 6일간 처리한 세포에서는 배지를 3일 후 교환해 주었으며, 배지 교환을 할 때 caffeic acid와 chlorogenic acid를 재처리하였다. EGCG는 세포를 분주하고 난 뒤 24시간 후 5, 20, 50 µM을 세포배양액에 혼합한 후 2일간 배양하여 처리하였다.

#### Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP)

T-47D 유방암 세포에서의 methylation 상태 변화를 알아보기 위하여 MSP를 실시하였다. DNA는 DNeasy tissue kit(Qiagen, Valencia, CA)로 추출하였다. p16 유전자의 methylation 상태는 2-stage nested PCR 방법으로 측정하였다[19]. 우선 1 µg의 추출한 DNA를 EZ DNA methylation kit(Zymo Research, Orange, CA)를 이용하여 변형시켰다. Methylation이 일어나지 않은 cytosine은 sodium bisulfite의 처리에 의해 urasil로 변형이 일어나는 반면, methylation이 일어나 있는 cytosine은 메틸 그룹(CH<sub>3</sub>)의 차단으로 인해 urasil로 변형되지 않고 그대로 cytosine으로 남아있게 된다. 이렇게 sodium bisulfite로 변형된 DNA의 sequence는 methylation이 일어난 DNA와 methylation이 일어나지 않은 DNA 간에 더 이상 동일하지 않은 염기서열을 가지게 된다. 따라서 본 연구에서는 각각의 DNA sequence에 맞는 primer를 제작하여 PCR을 실행하였다. Stage I PCR에서는 p16 유전자중 CpG가 풍부한 promoter 지역(size 208 bp)을 증폭시켰다. Stage I primer는 sodium bisulfite로 변형된 염기서열을 인식할 뿐 methylation 여부를 구분할 수는 없도록 되어있다. Stage I PCR에 의해 증폭된 product는 50-1000배로 dilution을 실시한 후 2.5 µl의 Stage I PCR product를 이용하여 Stage II PCR을 실시하였다. 이 단계에서 사용된 primer들은

Table 1. List of primers sequences, annealing temperatures, and expected product sizes for methylation-specific PCR

Gene		Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')	AT (°C)	PS (bp)
p16	N:	GGAGAGGGGGAGAGTAGGT	CTACAAACCCTCTACCCACCT	60	208
	IC:	GGGGAGTAGTATGGAGTTT	CTACAAACCCTCTACCCACCT	54	155
	U:	TGGGGAGTAGTATGGAGTTGGTGGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	62	81
	M:	CGGGGAGTAGTATGGAGTCGGCGGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	62	81



N: nest primers; IC: internal control primers, U: unmethylation-specific primers; M: methylation-specific primers; AT: annealing temperature; PS: product size

methylation과 unmethylation을 구분하여 증폭시키는 PCR이다. Primer의 sequence, annealing 온도, 그리고 product 크기는 표 1에 나타난 바와 같다. PCR 반응의 특이성을 높이기 위하여 HotStarTaq DNA polymerase(Qiagen, Valencia, CA)를 이용하였으며, PCR 반응 튜브의 최종 volume은 20 µl로 하였다. Stage I PCR의 조건은 denaturing 온도는 95°C에서 45초, anealing 온도는 60°C에서 1분, extension 온도는 72°C에서, 1분으로 구성되었으며, 이러한 세 단계를 40 cycles 반복하였다. 그 후 마지막 extension을 70°C에서 10분간 실시하였다. Stage II PCR 조건은 95°C에서 45초간 denaturing 시켰으며, 62°C(unmethylation-specific and methylation-specific)에서 45초간 실시하였으며, 마지막 extension 단계는 72°C에서 45초간 실시하였다. Stage II PCR 에서도 이러한 단계를 반복적으로 40 cycles 실행하였다. PCR cycle 수와 조건은 증폭된 신호가 증폭 curve에서 직선적으로 증가하는 부분에 해당되는지를 살펴본 후 최적의 cycle 수를 결정하였다. 또한 control은 DNA가 없는 상태에서 모든 효소나 첨가물을 포함한 채 PCR을 실시하였다. 모든 증폭된 PCR product는 2% agarose gel을 이용하여 15분간 전기영동을 한 후, ethidium bromide로서 5분간 염색을 하였다. 그

후 gel은 ultraviolet transillumination을 통해 사진으로 기록되었다. 이러한 gel 사진들은 densitometry를 이용하여 integrated optical density(IOD)를 측정하였다. 이렇게 측정된 methylation과 unmethylation PCR product의 IOD는 internal control로서 증폭된 PCR product(표 1)로서 보정하여 PCR 반응을 위해 쓰인 DNA의 copy수를 보정하였다. Internal control primer 역시 methylation과 unmethylation 상태를 구분하지 못하고 유전자를 증폭시킬 수 있도록 설계되었다. 모든 PCR 반응은 똑같은 조건의 세포를 3 set로 구성하여 각 set를 최소 2회이상 반복 측정하였으며, PTC-100 thermal cycler(MJ research, Waltham, MA)를 이용하여 증폭하였다.

### 결 과

#### Caffeic acid와 chlorogenic acid가 T-47D 세포의 p16 유전자 methylation 상태에 미치는 영향

본 연구에서 coffee에 다량으로 함유되어 있는 caffeic acid와 chlorogenic acid를 유방암 세포인 T-47D 세포에 6일간 처리하였다. 그림 2에서 보는 바와 같이 20 µM의 caffeic

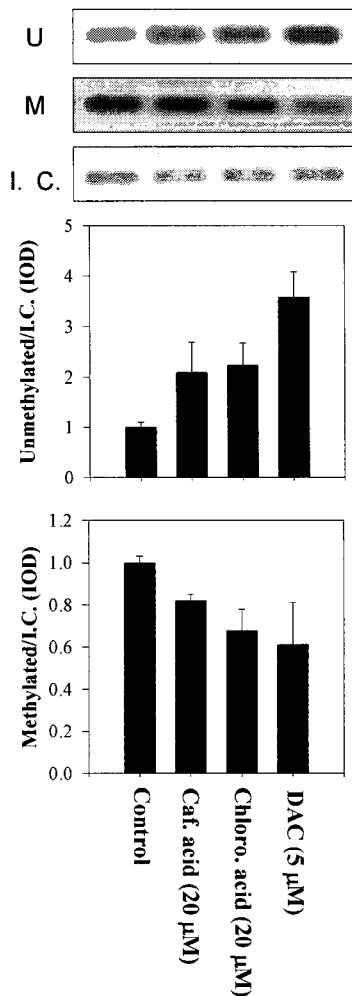


Fig. 2. Alterations of DNA methylation status of the promoter region of the p16 gene in T-47D cells following treatment with caffeic acid or chlorogenic acid. T-47D cells were treated with 20 μM of caffeic acid or chlorogenic acid for 6 days, or 5 μM of 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) for 6 days as a positive control. Each of chemicals was introduced through medium change on day 0 and 3. The integrated optical density (IOD) of each band was quantified by densitometry, and the values for the methylation-specific and unmethylation-specific bands were based on the ration between the IOD for the specific band and the IOD for the internal control band. In the graph, all the control values were arbitrarily set to 1 for ease of comparison. Each data point represents the mean ± S.E. of 3 parallel replica experiments. One representative set of the unmethylation-specific bands(U), methylation-specific bands(M), and internal control(I.C.) were shown.

acid는 T-47D 세포내의 세포주기 조절 인자인 p16 유전자 중 unmethylated p16을 약 100%정도 증가시켰다. 또한 20 μM의 chlorogenic acid를 T-47D 세포에 6일간 처리한 결과 unmethylation 상태의 p16 유전자가 caffeic acid로 처리하였을

때와 비슷한 수준으로 증가되었다. 이미 강력한 DNA methylation 억제제로 알려진 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) 5 μM을 positive control로서 T-47D 세포에 처리한 결과 caffeic acid와 chlorogenic acid로 처리했을 때보다 더 강력히 p16 유전자의 demethylaiton을 촉진하였다. 한편 methylation이 일어나 있는 상태의 p16 유전자는 caffeic acid와 chlorogenic acid의 처리에 의해 각각 20%, 40% 정도 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 이미 임상적으로 널리 암 치료에 사용되고 있는 DAC에는 비록 못 미치는 정도지만 coffee 폴리페놀이 DNA의 demethylation을 유도하는데 있어서 유의한 효과를 보였다.

### EGCG가 T-47D 세포의 p16 유전자 methylation 상태에 미치는 영향

녹차 추출물인 EGCG를 T-47D 유방암 세포에 2일간 처리한 후 p16 유전자의 methylation 상태를 살펴본 결과, 그림 3에서 보듯이 5 μM의 EGCG는 unmethylated p16 유전자를 약 29% 정도 증가시켰으며, 20 μM의 EGCG는 control에 비해 unmethylation된 p16을 약 100% 증가시켰다. 하지만 본 연구에서 사용한 가장 높은 농도인 50 μM의 EGCG는 20 μM의 EGCG를 처리하였을 때에 보다 더 부가적으로 unmethylated p16 유전자를 증가시키지는 못하였다. Methylated p16 유전자는 5, 20, 50 μM의 EGCG를 2일간 처리한 결과 control p16 유전자에 비해 각각 약 13, 22, 50% 정도 농도 의존적으로 감소되었다.

### 고 찰

최근 많은 연구들이 식이에 함유된 폴리페놀이 DNA methylation 패턴을 변화시킨다고 보고하고 있다[7,13,14,21]. 이처럼 여러 연구들이 DNA methylation에 관심을 가지는 가장 큰 이유는 거의 모든 암세포의 특정 유전자에서 DNA의 hypermethylation이 일어나기 때문이다. 이러한 hypermethylation이 일어나는 유전자 중 암세포의 증식을 억제시키는 데 중요한 역할을 하는 유전자들이 DNA methylation으로 인해 그 발현이 억제되는 경우가 많다. 이것은 여러 가지 기전에 의해 유전자의 발현이 억제되는 것인데, 그 주요 원인은 DNA 구조 변화에 있다. DNA methylation은 cytosine의 5번째 탄소에 methyl group이 첨가되는 반응으로서, 이러한 methyl-cytosine이 되면 2가닥으로 구성된 DNA의 구조 자체가 굉장히 compact한 구조로 바뀌며, 이러한 구조의 DNA를 가리켜 heterochromatin이라고 한다[21]. 이렇게 DNA methylation에 의해 remodeling된 heterochromatin은 유전자의 발현에 필수적인 전사인자(transcriptional factors)가 DNA와 결합하는 것을 방해하게 된다[11]. 또한 methyl-cytosine은 또 다른 epigenetic mechanism인 histone 단백

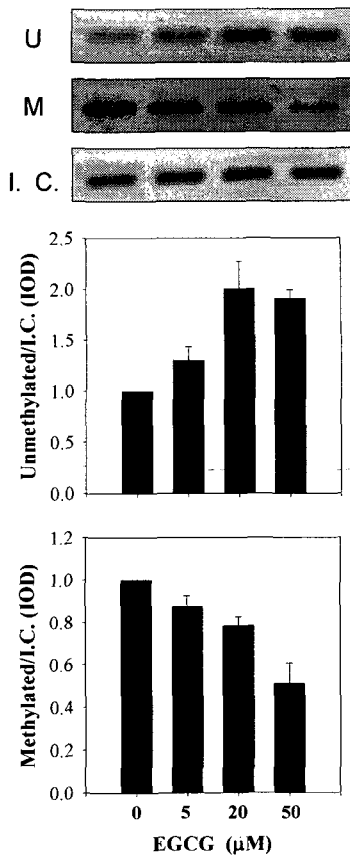


Fig. 3. Alterations of the methylation status of p16 genes after treatment with 5, 20, or 50 μM of EGCG for 48h in T-47D cells. The upper bar graph represents the unmethylation-specific bands and the bottom graph represents the methylation-specific bands. The integrated optical density (IOD) of each band was quantified by densitometry, and the values for the methylation-specific and unmethylation-specific bands were based on the ratio between the IOD for the specific band and the IOD for the internal control band. In the graph, all the control values were arbitrarily set to 1 for ease of comparison. Each data point represents the mean ± S.E. of 3 parallel replica experiments. One representative set of the unmethylation-specific bands(U), methylation-specific bands(M), and internal control(I.C.) were shown.

질의 deacetylation에 필요한 histone deacetylase 효소를 methyl-cytosine binding protein 2를 통해 활성화시킴에 따라 더욱 더 유전자의 발현을 억제시킨다[8]. 따라서 암세포의 증식과 발달을 조절하는 여러 유전자들의 발현에 중추적인 역할을 하는 DNA hypermethylation을 조절할 수 있다면 암을 예방하고 치료하는데 있어서 매우 의미 있는 일이라고 할 수 있다.

앞서 서론에서도 언급하였듯이, DNA methylation은 DNMT 효소에 의해 반응이 일어나며, SAM은 우리 인체에서 일어나는 다른 methylation 반응과 마찬가지로 DNA

methylation 반응에 있어서도 methyl group을 제공하는 donor역할을 한다. SAH는 SAM이 기질에 methyl group을 제공한 후 생성되는 부산물로서 이러한 SAH의 증가는 feedback 억제 기전에 의해 methylation 반응을 억제시키는 역할을 한다. 본 연구에서는 DNA methylation 억제제로서 식이성 폴리페놀을 이용하였는데, 구체적으로 coffee에 다량 함유되어 있는 caffeic acid, chlorogenic acid, 그리고 녹차에서 추출한 EGCG를 사용하였다. 이러한 폴리페놀이 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포와 MCF-7 세포에서 종양억제 유전자인 RAR-β의 methylation을 급격히 줄인 반면, unmethylation 상태의 유전자는 급격히 증가시켰다고 보고하였다[13, 14]. 하지만 중요한 것은 암세포마다 항상 여러 유전자들에게서 동일한 패턴의 methylation 상태를 보이는 것은 아니다. 세포마다 특이적인 패턴을 가지고 있으며, 또한 DNA methylation 억제제에 대한 반응도 동일하게 일어나지 않기 때문이다[3,4,5]. 따라서 본 연구에서는 선행연구에서 식이성 폴리페놀인 tea catechins과 bioflavonoids들이 MDA-MB-231 세포와 MCF-7 세포에서 종양억제 유전자의 발현을 억제시킨다고 보고하였지만, T-47D 세포에서의 p16 유전자의 변화에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 실행되지 않았기 때문에 식이성 폴리페놀이 T-47D 세포의 p16 유전자의 DNA methylation에 미치는 영향에 대해 고찰하였다.

암세포에 있어서 가장 두드러진 특징 중 하나는 암세포는 성장을 조절할 수 있는 능력을 상실하는 것인데, 이로 인해 세포가 끊임없이 증식을 함으로써 종양으로 발전하는 것이다. 이것은 세포주기를 조절하는 시스템에 문제가 발생하였기 때문에 세포주기를 조절하는 중요한 단백질의 발현이 억제되었기 때문이다. 본 연구에서 고찰한 p16 유전자는 이러한 세포의 증식을 조절하는 세포주기 조절인자 중 하나로서 이 유전자의 발현이 억제된다면 세포는 세포 주기의 check points를 거치지 않고 계속 증식을 하게 된다[10]. p16 유전자는 cyclin dependent kinases(CDK) 억제제로서 세포 주기의 G1 phase에서 세포가 분열을 일으키는 단계로 진행하는 것을 억제시킨다[12]. CDK4나 CDK6 같은 cyclin dependent kinases들은 retinoblastoma(Rb) 단백질을 인산화(phosphorylation)시킨다[15]. 이러한 Rb 단백질의 인산화는 E2F라고 불리는 전사인자를 방출하게 만들어, 세포가 증식할 수 있는 단계로 넘어갈 수 있도록 한다. 따라서 p16과 같은 CDK 억제제가 발현이 충분히 된다면, Rb 단백질의 인산화가 억제될 것이며, 이로 인해 세포의 증식 또한 억제 될 것이다.

많은 암세포에서 이러한 세포 증식에 있어서 중요한 기능을 담당하는 p16 유전자의 hypermethylation이 일어난다. 본 연구에서는 coffee 폴리페놀인 caffeic acid와 chlorogenic acid, 그리고 녹차 함유물인 EGCG가 T-47D 유방암 세포에서 p16 유전자의 methylation 패턴을 변화시켰음을 보고하

였다. 식이성 폴리페놀이 Methylation이 된 p16 유전자를 감소시키는 반면 unmethylation 상태의 p16 유전자를 증가시켰다. 이러한 유전자의 methylation 상태 변화는 그 유전자의 발현을 조절하는데 있어서 가장 중요한 기능중 하나이다 [6,9]. 본 연구에서 사용한 caffeic acid와 chlorogenic acid는 몸에 섭취가 된 후 인체에 존재하는 COMT 효소에 의해 매우 빠른 속도로 폴리페놀의 methylation이 일어난 것으로 사료된다. 왜냐하면, 이러한 폴리페놀 성분은 매우 높은 친화력 (affinity)로 COMT 효소와 반응이 일어나기 때문이다[22]. 또한, Lee 등[14]은 caffeic acid와 chlorogenic acid는 COMT-dependent하게 DNA methylation을 억제하였다고 보고하였다. 즉, COMT에 의해 methylation이 일어나지 않는다면, caffeic acid와 chlorogenic acid는 DNA methylation 억제작용이 아주 미약하다. 본 연구에서 SAM과 SAH의 농도를 직접적으로 측정하지는 않았다. COMT가 존재할 때만 DNA methylation을 강력히 억제한다는 것은 폴리페놀의 COMT에 의한 methylation으로 증가된 SAH가 빠른 속도로 세포내에 증가하여 feedback mechanism을 통해 DNA의 methylation 반응 또한 억제시킨 것으로 사료된다. 또한 Lee 등[13]의 연구에서 언급하였듯이, EGCG의 이러한 DNA methylation 억제작용은 앞에서 언급한 SAH의 증가에 따른 feedback mechanism이 아니라 EGCG가 다른 폴리페놀 성분과는 달리 독특하게 가지는 gallic acid moiety 구조(그림 1) 때문이며, EGCG의 gallic acid moiety가 DNMT의 catalytic core site에 높은 친화력으로 결합함으로써 DNA methylation 반응을 억제시킨다고 하였다. 하지만 본 연구에서는 비록 EGCG의 DNA methylation 억제 기전이 caffeic acid와 chlorogenic acid의 작용기전과는 다르지만 T-47D 유방암 세포내의 p16 유전자의 methylation 패턴을 변화시키는데 있어서는 크게 차이가 없었다. 본 연구에서는 여러 가지 세포주기 조절인자 중 p16 유전자에서의 methylation 변화만을 살펴보았다. 향후 연구에서는 p14, p21과 같은 세포주기 조절인자들에 대한 연구도 이루어 할 것이다. 또한, 많은 연구들이 암세포에서 식이성 폴리페놀들이 DNA methylation을 조절하는 기능을 가짐으로서 증식을 억제시키는데 필수적인 여러 유전자의 발현을 조절한다고 보고하고 있지만, 폴리페놀 성분이 암세포 증식에 중요한 여러 유전자의 methylation 상태를 변화시키는 것에 대한 좀 더 심도 있는 mechanistic한 연구뿐만 아니라 histone 단백질의 acetylation과 methylation 같은 다른 epigenetic mechanism과의 상호작용에 대한 연구도 향후 필요할 것이라고 사료된다.

## 요 약

본 연구에서 사용한 coffee에 다량 함유된 caffeic acid와 chlorogenic acid, 녹차에 함유된 EGCG 성분은 암세포의 증

식을 억제하는데 중요한 기능을 담당하는 세포주기 조절인자인 p16 유전자의 DNA methylation 패턴을 유방암 T-47D 세포에서 유의하게 변화시켰다. MSP를 이용하여 p16 유전자의 promoter 지역에서의 methylation 상태의 변화를 살펴본 결과 caffeic acid, chlorogenic acid, EGCG는 유전자의 hypermethylation을 감소시켰으며, 이로 인해 demethylation된 p16 유전자가 증가하는 경향을 보였다. 이러한 연구 결과는 coffee 폴리페놀인 caffeic acid, chlorogenic acid와 녹차 폴리페놀인 EGCG는 세포내의 DNA methylation을 억제하는 기능을 가지는데, 이는 coffee 폴리페놀과 같이 COMT 효소에 의한 methylation 부산물인 SAH의 증가에 의한 DNMT의 억제이거나, EGCG와 같이 DNMT와 직접적으로 결합하여 methylation 반응을 억제하는 mechanism에 의한 것으로 사료된다. 따라서 앞으로 이미 개발된 항암제뿐만 아니라, 부작용과 독성이 적은 식이성분에 대한 연구가 좀 더 심도 있게 이루어 져야 할 것이며, 이러한 연구들은 암이 발생되고 난 후 치료 요법으로 사용되는 물론, 암이 발생하기 전에 사전 예방법으로도 널리 적용하는데 있어 중요한 이론적 토대를 마련할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 신진교수연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

- Bestor, T. H. and V. M. Ingram. 1983. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5559-5563.
- Chim, C. S., R. Liang, C. Y. Tam and Y. L. Kwong. 2001. Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance. *J. Clin. Oncol.* **19**, 2033-2040.
- Costello, J. F., M. C. Fruhwald, D. J. Smiraglia, L. J. Rush, G. P. Robertson, X. Gao, F. A. Wright, J. D. Feramisoco, P. Peltomaki, J. C. Lang, D. E. Schuller, L. Yu, C. D. Bloomfield, M. A. Caligiuri, A. Yates, R. Nishikawa, H. Su Hwang, N. J. Petrelli, X. Zhang, M. S. O'Dorisio, W. A. Held, W. K. Cavenee and C. Plass. 2000. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genet.* **25**, 132-138.
- Esteller, M., P. G. Corn, S. B. Baylin and J. G. Herman. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* **61**, 3225-3229.
- Esteller, M. 2002. CpG island hypomethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a bright future. *Oncogene* **21**, 5427-5440.
- Esteller, M. and J. G. Herman. 2002. Cancer as an epigenetic

- disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.* **196**, 1-7.
7. Fang, M. Z., Y. Wang, N. Ai, Z. Hou, Y. Sun, H. Lu, W. Welsh and C. S. Yang. 2003. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* **63**, 7563-7570.
  8. Fraga, M. F., E. Ballestar, G. Montoya, P. Taysavang, P. A. Wade and M. Esteller. 2003. The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1765-1774.
  9. Herman J. G. and S. B. Baylin. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2042-2054.
  10. Hu, C. X., I. H. Wong and L. W. Chow. 2003. Tumor-derived aberrant methylation in plasma of invasive ductal breast cancer patients: clinical implications. *Oncol. Rep.* **10**, 1811-1815.
  11. Kass, S. U., D. Pruss and A. P. Wolffe. 1997. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet.* **13**, 444-449.
  12. Koh, J., G. H. Enders, B. D. Dynlacht and E. Harlow. 1995. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* **375**, 506-510.
  13. Lee, W. J. and B. T. Zhu. 2005. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1018-1030.
  14. Lee, W. J. and B. T. Zhu. 2006. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis* **27**, 269-277.
  15. Lukas, J., L. Aagaard, M. Strauss and J. Bartek. 1995. Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control. *Cancer Res.* **55**, 4818-4823.
  16. Mizuno, S. I., T. Chijiwa, T. Okamura, K. Akashi, Y. Fukumaki, Y. Niho and H. Sasaki. 2001. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* **97**, 1172-1179.
  17. Momparler, R. L. and V. Bovenzi. 2000. DNA methylation and cancer. *J. Cell. Physiol.* **183**, 145-154.
  18. Okano, M., D. W. Bell, D. A. Harber and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257.
  19. Palmisano, W. A., K. K. Divine, G. Saccomanno, F. D. Gilliland, S. B. Baylin, J. G. Herman and S. A. Belinsky. 2000. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* **60**, 5954-5986.
  20. Paz, M. F., M. F. Fraga, S. Avila, M. Guo, M. Pollan, J. G. Herman and M. A. Esteller. 2003. A systemic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **63**, 1114-1121.
  21. Tate, P. H. and A. P. Bird. 1993. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 226-231.
  22. Yang, C. S., P. Maliakal and X. Meng. 2002. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 25-54.
  23. Zhu, B. T., E. L. Ezell and J. G. Liehr. 1994. Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **269**, 292-299.
  24. Zhu, B. T. and J. G. Liehr. 1996. Inhibition of catechol-O-methyltransferase-catalyzed O-methylation of 2- and 4-hydroxyestradiol by quercetin. Possible role in estradiol-induced tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 1357-1363.
  25. Zhu, B. T., U. K. Patel, M. X. Cai and A. H. Conney. 2000. O-Methylation of tea polyphenols catalyzed by human placental cytosolic catechol-O-methyltransferase. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 1024-1030.
  26. Zhu, B. T., U. K. Patel, M. X. Cai, A. J. Lee and A. H. Conney. 2001. Rapid conversion of tea catechins to monomethylated products by rat liver cytosolic catechol-O-methyltransferase. *Xenobiotica* **31**, 879-890.