

EGCG induces Apoptosis under Hypoxic State in B16F10 Melanoma Cancer Cells

Yoon-Yi Kim¹, In Seop Kim¹, Ock-Jin Park² and Young-Min Kim^{1*}¹Department of Biological Sciences, Hannam University Daedeok Valley Campus, Daejeon 305-811, Korea²Department of Food and Nutrition, Hannam University Daedeok Valley Campus, Daejeon 305-811, Korea

Received November 4, 2010 / Accepted December 3, 2010

EGCG, catechins in green tea, is a kind of phytochemical. Through the regulation of signal pathways, EGCG has been known to show anti-oxidant and anti-tumor effects in cells. In this study, we investigated the apoptotic effects of EGCG through AMP-activated protein kinase (AMPK) signal pathways, including hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α). The experiments were performed in B16F10 melanoma cells in a hypoxic state. AMPK is activated by ATP consumption such as nutrient deficiency, exercise, heat shock, etc. The activated AMPK that plays an important role as an energy sensor inhibits proliferation of cancer cells, as well as inducing apoptosis. HIF-1 α , the primary transcriptional regulator of the response to oxygen deprivation, plays a critical role in modulating tumor growth and angiogenesis in a hypoxic state. The apoptotic effects of EGCG were studied in B16F10 cells in a hypoxic state. The results show that EGCG inhibits the transcriptional activity of HIF-1 α and induces apoptosis. These observations suggest that EGCG may exert inhibitory effects of angiogenesis and control tumor cell growth in hypoxic melanoma cells.

Key words : EGCG, AMP-activated protein kinase (AMPK), hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α), apoptosis, B16F10 melanoma cells

서 론

피부암은 피부의 색소를 형성하는 세포인 멜라닌 세포의 악성 종양으로, 특히 서구 사회에서 피부암 발생이 증가하고 있으며 미국의 경우에는 20년 전과 비교했을 때 발생률이 2배나 증가 하였다. 피부암의 종류에는 기저 세포암(basal cell carcinoma), 편평 세포암(squamous cell carcinoma), 악성 흑색종(malignant melanoma)이 있는데, 이 중에서 악성 흑색종은 전체 피부암의 4% 정도이지만 전체 피부암 사망자의 79%를 차지하고 있다[17]. 이와 같은 악성 흑색종은 피부암 중에서도 독성이 가장 강하며, 전 세계적으로 발생률이 급속히 늘어나고 있는 실정이다. 발병 시에는 임파절로 전이되어 폐, 간, 뼈에 가는 것은 물론 보통 암세포가 전이되지 않는 뇌, 심장 세포에까지 영향을 미칠 만큼 높은 전이율을 나타낸다[14].

저산소증(hypoxia)은 산소 농도가 낮아진 상태를 말하며 암과 관련이 있는 것으로 알려져 있는데, 일반적으로 종양세포의 증식 속도가 빠르기 때문에 고형암(solid tumor)에서 나타나게 되는 현상이다[6]. 암 조직의 내부가 hypoxia 상태에 이르면, 이에 저항성을 획득하지 못한 암세포는 괴사(necrosis) 또는 세포사멸(apoptosis)로 소멸 된다[11]. 이러한 과정에서 암 조직과 같이 세포증식이 왕성한 경우에는 hypoxia 상태에서 산소를 전달하기 위한 새로운 혈관이 형성되어 암세포들이

전이되기 위한 통로 구실을 한다[18]. 암세포는 혈관형성 의태(vasculogenic mimicry)라는 혈관과 유사한, 체액을 전달하는 그물망을 형성할 수 있는데, hypoxic한 미세환경에서 흑색종 세포는 혈관형성 의태를 유도하고, hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)의 발현을 증가시킨다[5]. HIF-1은 HIF-1 α 와 HIF-1 β subunits으로 구성된 이형 이량체 단백질로, HIF-1 α 는 세포 내 산소 농도에 의해 조절되어 발현되고 활성화 된다[15]. HIF-1 α 는 암의 성장과 증식에 중요한 요인으로서, hypoxia 상태에서 HIF-1 α 가 증가되어 신생혈관형성(angiogenesis)에 관련된 유전자의 발현을 유도하는 것으로 밝혀져 있다[5].

Hypoxia 상태가 되어 세포 기능이 원활하지 못하게 되면, 충분한 ATP를 필요로 하므로 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성이 유도된다[7]. AMPK는 hypoxia, 영양분 결핍, 운동, heat shock와 같이 세포 내에서 ATP가 결핍되면 활성화된다. 세포에서 에너지가 고갈되면 에너지를 소비하는 경로는 억제되고 에너지를 생성하는 경로가 활성화됨으로써 에너지를 조절하는 에너지 센서로서의 역할을 한다[3,4]. 세포가 강한 스트레스를 받았을 때 세포 내의 ATP 소비량이 증가하게 되고 AMPK가 활성화 되어 apoptosis가 유도되는 것으로 알려져 있다[8].

파이토케미컬(phytochemical)의 일종인 Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)는 녹차 잎의 성분으로 항산화 효과가 있으며, 폐암, 유방암 등에서 암 예방 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다[9]. 최근에는 식품에서 추출한 플라보노이드(flavonoid)와 폴리페놀(polyphenol)과 같은 파이토케미컬이 세포 내 신호전달

***Corresponding author**

Tel : +82-42-629-8753, Fax : +82-42-629-8751

E-mail : kym@hnu.kr

분자들을 조절함으로써 암세포의 증식 및 전이를 저해한다는 연구가 발표되고 있다. 본 연구에서는 hypoxia 상태에서 B16F10 피부암 세포에 EGCG를 처리하였을 때, EGCG가 HIF-1 α 를 포함한 AMPK 신호경로를 경유하여 B16F10 세포의 증식을 억제하고, apoptosis를 유도하는 것을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 염화코발트(cobalt chloride, CoCl₂)는 Sigma (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)에서 구입하여 증류수에 녹인 뒤 100 mM stock으로 만들어 10 mM로 희석한 뒤, -20°C에 보관하여 사용하였다. EGCG는 Sigma에서 구입하여 사용하기 전에 증류수에 녹여서 10 mM stock으로 만들어 사용하였다. AMPK 저해제인 Compound C는 CALBIOCHEM (San Diego, CA), HIF-1 α 저해제인 cycloheximide는 Sigma에서 구입하여 각각 10 mM로 희석한 뒤 사용하였다.

세포 배양

American Type Culture Collection (ATCC, Gaithersburg, MD)로 부터 B16F10 세포주를 구입하였으며, 배양배지는 10%의 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, Gibco BRL, NY, USA), 1% streptomycin 및 penicillin (Biofluids, Rockville, MD, USA)을 RPMI 1640에 혼합하여, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 confluence 70~80% 정도로 배양되었을 때 실험에 사용하였다.

B16F10 세포, EGCG, CoCl₂의 농도별 처리

B16F10 세포를 6-well culture plate에서 배양한 후, hypoxic chamber를 사용하지 않고 hypoxic한 상태를 주기 위하여 CoCl₂를 처리한 선행 연구를 바탕으로[1], CoCl₂ 100 μ M를 농도별(Control, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M)로 처리하였으며, EGCG 10 mM를 농도별(Control, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M)로 각각 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 CoCl₂ 100 μ M를 30분 전처리 한 후, EGCG를 농도별(10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M)로 병행 처리하여 6시간 동안 배양하였다. Inhibitor 실험을 하기 위해 배양된 세포에 Compound C 10 μ M과 cycloheximide 10 μ M를 각각 30분 전 처리한 후, CoCl₂ 100 μ M를 처리하고 나서, 30분 후에 다시 EGCG 80 μ M를 처리하여 6시간 동안 배양하였다.

MTT assay에 의한 암세포의 생존율 측정

B16F10 세포를 배양시킨 후, 12-well culture plate의 각 well에 MTT 용액(5 mg/ml)을 30 μ l씩 첨가하여 1시간 반응시킨 다음, phosphate buffered saline (PBS)로 세척하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 150 μ l를 12-well culture plate에 첨가하여 세포를 떨어뜨린 다음, 각 plate에서 100 μ l씩을 취해 ELISA-reader용 96-well plate에 분주하고 microplate reader

(BIO-RAD Laboratories, Inc. USA)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번 하였으며, 그에 따르는 평균값과 표준오차는 Microsoft Excel program을 이용하여 분석하였다.

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)에 의한 apoptosis 관찰

Apoptosis는 FITC-Annexin V apoptosis detection kit (BD PharmingenTM, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. AnnexinV/PI staining을 하기 위해, 먼저 세포에 EGCG를 고농도(Control, 40 μ M, 80 μ M)로 처리하였다. 또한 CoCl₂와 EGCG를 병행 처리하기 위해, media 8 ml에 CoCl₂ 100 μ M를 희석하여 전 처리한 후, 30분 뒤에 CoCl₂ 100 μ M과 EGCG를 농도별(Control, 80 μ M)로 media에 희석하여 처리한 후 24시간 배양하였다. 처리된 세포는 차가운 PBS로 세척하고 나서 trypsin-EDTA로 모은 다음, 1 \times 10⁶ cells/ml의 농도에서 binding buffer로 suspension하였다. 그 다음에 1 \times 10⁵ 개의 세포를 Annexin V-FITC와 propidium iodide (PI)로 15분간 염색한 후, 2시간 정도 flow cytometry (Becton-Dickinson Biosciences, Drive Frankline Lages, NJ, USA)로 분석하였다.

Western blotting에 의한 단백질 발현의 분석

단백질을 추출하기 위하여 RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP 40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl]를 각 well에 150 μ l씩 첨가하여 반응시킨 후, 14,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리 하였다. 그런 다음, ELISA-reader 595 nm에서 흡광도를 측정하여 각 표본의 단백질 농도를 결정하였다. 5 \times Laemmi sample buffer (loading dye; 250 mM Tris-cl (pH 6.8), 40% glycerol, 4% β -mercaptoethanol, 0.08% bromophenol blue, 8% SDS)와 B16F10 세포에서 추출한 단백질을 혼합하여 표본을 제작한 후, AMPK, HIF-1 α , β -actin의 1차 항체를 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)로 부터 구입하여 각각 희석한 후, 반응시켰다. 2차 항체(Cell Signaling Technology)를 희석하여 1시간 반응시킨 다음, Blue X-ray film에 나타나는 밴드로 단백질의 활성을 관찰하였다.

통계처리

통계 프로그램인 SPSS 17.0을 사용하였고 실험설계에 대한 분산분석은 ANOVA를 실시하여 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과로 검정하였고 $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

Hypoxia 상태에서 HIF-1 α , AMPK의 활성

EGCG를 처리하지 않은 오직 hypoxia 상태에서 흑색종 피

부암의 생존율을 알아보기 위하여 MTT 실험을 실시하였다. Fig. 1A 에서와 같이 CoCl₂의 농도를 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M로 증가시켰지만, B16F10 세포의 증식은 억제되지 않았다. 마찬가지로 동일한 조건하에서 HIF-1 α , AMPK의 활성을 알아보기 위하여 Western blotting 실험을 실시한 결과, Fig. 1B에서 나타난 바와 같이 HIF-1 α , p-AMPK의 발현이 모두 증가한 것을 확인하였다. 즉 hypoxia 상태에서 HIF-1 α , p-AMPK의 발현이 증가한 것은, 암세포가 지속적인 성장과 증식을 하기 위해서, 낮은 산소 상태나 불균형 에너지 상태에 반응하여 자신의 적응반응을 시작한 것으로 보인다.

EGCG에 의한 B16F10 세포의 증식 억제 및 apoptosis 유도 효과

EGCG가 B16F10 세포의 증식을 억제하는지를 관찰하기 위해 MTT assay 실험을 수행하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이, EGCG를 농도별(None, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M)로 처리했을 때, 농도가 증가할수록 B16F10 세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였다. 이와 같은 암세포의 증식 억제 효과가 apoptosis 유도에 의해 일어난 것인지를 알아보기 위해 FACS를 통하여 관찰한 결과, Fig. 2B에서와 같이 EGCG의 고농도(40 μ M, 80 μ M)에서 apoptosis가 일어나는 것을 확인하였다.

이러한 apoptosis 유도 효과가 HIF-1 α 를 포함한 AMPK 신

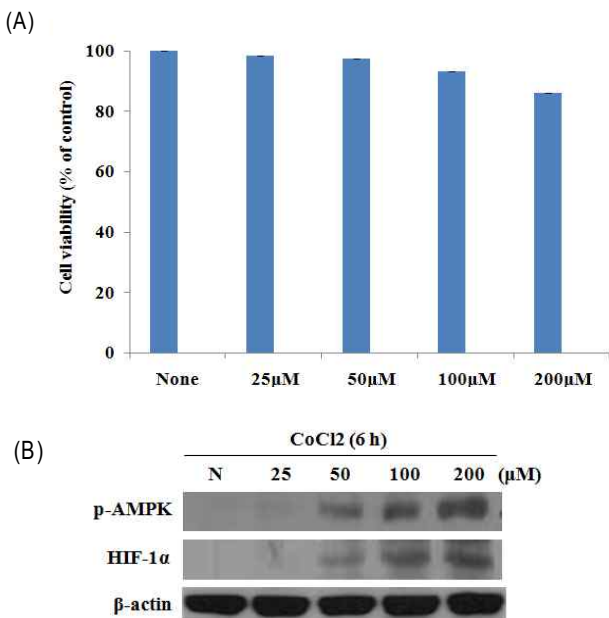


Fig. 1. Hypoxic state did not affect cell viability and increased AMPK, HIF-1 α in B16F10 cells. B16F10 cells were treated with CoCl₂ (control, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) for 12 hr (A), followed by assessment of viability using the MTT assay. Cells were treated with CoCl₂ (control, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) for 6 hr (B).

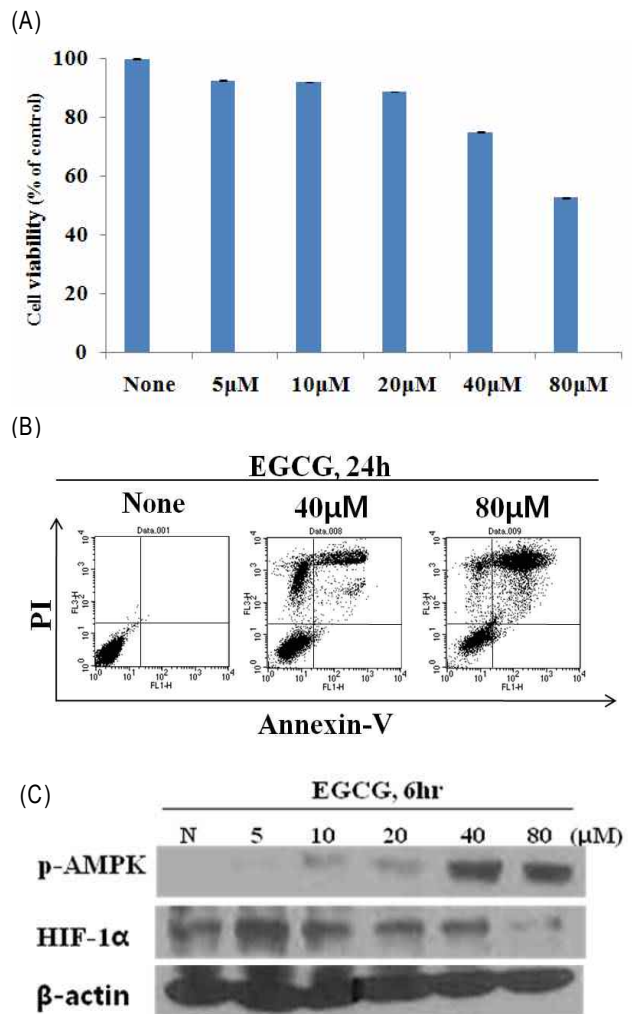


Fig. 2. EGCG exerts apoptotic effect through AMPK activation and inhibits expression of HIF-1 α in B16F10 cells. Cells were treated with EGCG (control, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M) for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay (A). Apoptotic effects were measured by fluorescence-activated cell-sorting analysis. Cells were treated with EGCG (Control, 40 μ M, 80 μ M) for 6 hr (B). B16F10 cells were treated with EGCG (5-80 μ M) for 6 hr and total proteins were subjected to Western blot analysis using phospho-AMPK, HIF-1 α , β -actin (loading control) antibodies (C).

호경로에 의한 것인지를 규명하기 위해 Western blotting 실험을 실시하였다. 실험 결과, Fig. 2C에 나타난 바와 같이 AMPK의 활성은 증가한 반면, HIF-1 α 의 활성은 감소한 것으로 관찰되었다. 이처럼 EGCG에 농도 의존적으로 AMPK의 활성이 증가된 것은 AMPK의 활성화로 인해 B16F10 세포에서 apoptosis가 유도되었다는 것을 의미한다. 그러나 EGCG의 농도가 높아질수록 hypoxia 상태에서 신생혈관형성에 관련된 유전자의 발현을 유도하는 HIF-1 α 의 발현이 감소된 것은, B16F10 세포에서 신생혈관형성이 감소된 것으로 보인다[7].

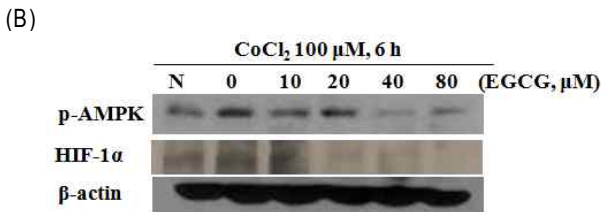
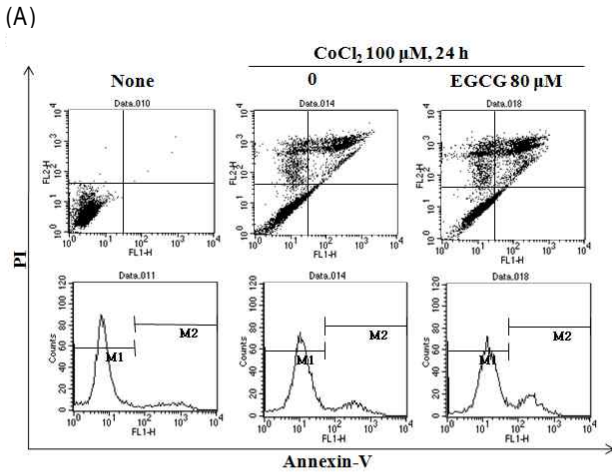


Fig. 3. EGCG induced apoptosis through inhibiting AMPK and HIF-1α activity. Cells were pretreated with 100 μM of CoCl₂ for 30 min and then treated with EGCG (10-80 μM) for 6 hr. Total proteins were subjected to Western blot analysis using phosphor-AMPK, HIF-1α, β-actin (loading control) antibodies (A). Cells were pretreated with 100 μM of CoCl₂ for 30 min and then treated with EGCG 80 μM for 24 hr and stained with 10 μg/ml propidium iodide (B). Then apoptotic effect was evaluated by fluorescence-activated cell-sorting analysis.

Hypoxia 상태에서 EGCG에 의한 apoptosis 유도 효과

CoCl₂와 EGCG를 병행 처리하였을 때 apoptosis가 유도되는지를 확인하기 위하여 FACS 실험을 실시하였다. Fig. 3A에서 보는 바와 같이, CoCl₂ 100 μM을 단독 처리했을 때와, CoCl₂ 100 μM에 EGCG 80 μM를 병행 처리한 것을 비교했을 때, 병행처리 시에 apoptosis가 더 많이 발생한 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 hypoxia 상태에서도 EGCG 처리에 의해 apoptosis가 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 이 같은 apoptosis 유도 효과가 HIF-1α를 포함한 AMPK 신호경로에 의한 것인지를 규명하기 위해 Western blotting 실험을 실시한 결과, Fig. 3B에 나타난 바와 같이 AMPK, HIF-1α의 활성 모두가 감소하였다.

Hypoxia 상태에서 AMPK, HIF-1α 사이에서의 cross-talk

AMPK 저해제(inhibitor) Compound C를 10 μM, HIF-1α 저해제 cycloheximide를 10 μM를 각각 CoCl₂ 100 μM, EGCG 80 μM와 병행 처리하여 실험을 실시하였다. 그 결과 Fig. 4에

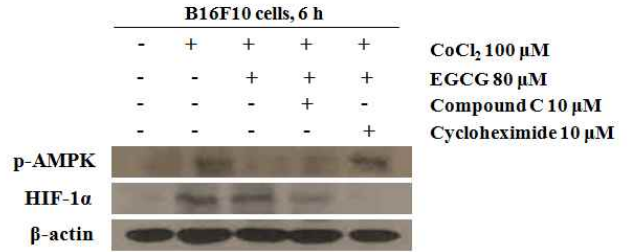


Fig. 4. EGCG suppresses activation of AMPK and inhibit expression of HIF-1α under hypoxic condition in B16F10 cells. Cells were pre-treatment with compound 10 μM and cycloheximide 10 μM for 30 min, respectively. After treatment, cells were pre-treatment with CoCl₂ 100 μM for 30 min and then treated with EGCG 80 μM for 6 hr. Total proteins were subjected to Western blot analysis using phosphor-AMPK, HIF-1α, β-actin (loading control) antibodies.

서 보는 바와 같이, CoCl₂ 100 μM에서 p-AMPK, HIF-1α의 발현은 모두 증가하였으나, CoCl₂ 100 μM과 EGCG 80 μM를 병행처리 하였을 때에는 감소하는 것을 관찰하였다. 또한 Compound C를 병행처리 한 결과, AMPK, HIF-1α의 발현이 감소하였다. Cycloheximide를 처리한 결과, HIF-1α의 발현은 감소되었지만, 반면에 p-AMPK의 발현 정도에는 변화가 없음을 확인하였다.

고 찰

암 세포는 hypoxic한 미세환경에서 생존하기 위해 충분한 혈액 공급을 얻고 인접한 조직까지 성장하기 위해 무산소 대사(anaerobic metabolism), 전이(metastasis), 침윤(invasion)에 관련된 유전자들을 더욱 활성화 시킨다[14]. 그 중에서 HIF-1α는 hypoxia 상태에서 활성화되는 유전자로서 중요한 전사인자이다. 최근에 발표된 연구에 따르면, HIF-1α는 종양의 성장, 혈관신생, apoptosis에 있어서 중요한 역할을 수행하며, HIF-1α가 과발현 되면 공격적인 종양으로 나타나는 것으로 발표되었다[12,16].

EGCG를 처리하지 않은 hypoxia 상태에서는 Fig. 1A에서와 같이 B16F10 세포의 증식이 거의 억제되지 않았다. 그러나 Fig. 1B에서 보이는 바와 같이 Hypoxia 상태가 되었을 때, AMPK, HIF-1α의 활성이 증가하는 것을 관찰하였다. 그와 같은 이유는 hypoxia 상태가 되면 ATP결핍 등에 의해 세포 내에서 AMPK가 활성화가 되고, 암세포는 살아남기 위해 HIF-1α의 활성을 증가시키는 것으로 보인다[8]. 조직의 산소 농도가 낮아짐에 따라 종양의 변환과 관련된 중요한 경로 중의 하나는 포도당 대사이다. Hypoxia 상태에 있는 고형암은 높은 glycolytic 비율을 보이며, 이 때 AMPK는 해당효소를 활성화시키기 위하여 증가하는 것으로 알려져 있다[2]. 이와 관련하여

선행 연구에서 siRNA를 통하여 hypoxia 상태에서 활성화된 AMPK가 knock-down 되는 것을 확인함으로써 AMPK가 핵심 신호로서 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며[13], 본 연구에서도 AMPK의 같은 효과를 나타낼 것으로 보인다.

EGCG는 파이토케미컬의 일종으로서 항산화, 항염증 효과를 나타내고, 피부암의 성장을 억제한다고 보고되었다[10]. B16F10 세포에 EGCG를 처리했을 때, EGCG가 B16F10 세포에서 apoptosis를 유도하는지를 실험한 결과, Fig. 2A에서와 같이, EGCG 농도가 증가함에 따라 암세포의 증식이 감소하는 것을 관찰하였다. 특히 EGCG를 40 μ M로 처리했을 때에는 암세포의 증식이 약 25% 감소되었고, 80 μ M로 처리했을 때에는 거의 절반인 약 50%까지 암세포의 증식이 감소되었다. 이러한 암세포의 증식 억제 효과가 apoptosis의 유도에 의한 것인지를 확인하기 위하여 FACS 실험을 통하여 관찰한 결과, Fig. 2B에서 보이는 바와 같이 EGCG를 고농도(40 μ M, 80 μ M)로 처리했을 때 apoptosis가 강하게 발생하는 것을 확인하였다. 이 같은 apoptosis 효과가 HIF-1 α 를 포함한 AMPK 신호경로에 의한 것인지를 확인하기 위해 Western blotting 실험을 실시한 결과, Fig. 2C에서와 같이, AMPK의 활성은 증가되었으나, hypoxia 상태에서 발현이 증가하는 HIF-1 α 의 발현은 감소되었다. 이러한 실험 결과는 EGCG에 의해 HIF-1 α 의 발현이 억제된 것으로 보인다. 결과적으로 hypoxia 상태가 아닌 암세포에서 EGCG가 apoptosis 효과를 나타낸다는 것을 확인하였고, 그런 다음에는 hypoxia 상태에서 EGCG의 apoptosis 효과를 알아보기 위하여 Western blotting 실험을 실시하였다.

Hypoxia 상태인 암세포에서 EGCG의 apoptosis 유도 여부를 실험을 통하여 관찰한 결과, Fig. 3A에서와 같이 hypoxia 상태에서도 EGCG가 apoptosis를 유도할 수 있다는 것을 확인하였다. 그런데 여기서 흥미로운 점은 Fig. 3B에서 보이는 바와 같이, 활성화된 AMPK와 HIF-1 α 의 발현 이 EGCG의 농도가 증가함에도 불구하고 오히려 감소되었다는 것이다. Hypoxia 상태의 암세포에서 EGCG는 apoptosis를 유도하고 AMPK의 활성화와 HIF-1 α 의 발현을 억제하는데, 이는 hypoxia 상태에서 EGCG가 혈관신생에 관련된 HIF-1 α 의 발현을 억제하기 위해 AMPK의 활성을 감소시킴으로써 AMPK와 HIF-1 α 의 신호조절이 가능하다고 여겨진다.

Hypoxia 상태인 B16F10 세포에 EGCG를 처리했을 때, AMPK와 HIF-1 α 의 활성이 감소되는 신호경로에 대해 알아보기 위한 저해제(inhibitor) 실험을 실시하였다. AMPK의 저해제인 Compound C와 HIF-1 α 단백질 합성 저해제인 cycloheximide를 hypoxia 상태에서 EGCG와 병행 처리하여 관찰하였다. 그 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이, Compound C 처리에 따라 AMPK와 HIF-1 α 의 발현이 감소된 것을 확인하였다. 또한 cycloheximide를 처리한 결과 HIF-1 α 의 발현이 감소된 반면에 AMPK의 활성은 감소되지 않음을 확인할 수 있었다. 이미 선행연구에서 AMPK는 HIF-1 α 의 표적 유전자인 vas-

cular endothelial growth factor (VEGF)나 Glucose transporter 1 (Glut1)을 자극하는 데 있어서 HIF-1 α 전사활성의 조절을 위한 핵심 신호로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[7]. 결과적으로 AMPK는 hypoxia 상태에서 HIF-1 α 의 upstream으로 작용하여 HIF-1 α 의 전사 활성을 조절하는 신호 분자이며, hypoxia 상태에서 EGCG는 AMPK의 활성을 억제하여 HIF-1 α 의 전사 활성을 억제하는데 관여함을 확인할 수 있었다. 또한 hypoxia 상태에서 EGCG는 암세포의 증식을 억제하고 직접적으로 apoptosis를 유도하는데 관여함으로써, 향후 파이토케미컬을 이용한 암 예방 연구에서 있어서 크게 기여할 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부와 한국산업기술재단의 전략기술양성사업과 2010년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2010-0021402).

References

1. Ardyanto, T. D., M. Osaki, N. Tokuyasu, Y. Nagahama, and H. Ito. 2006. CoCl₂-induced HIF-1 α expression correlates with proliferation and apoptosis in MKN-1 cells: a possible role for the PI3K/Akt pathway. *Int. J. Oncol.* **29**, 549-555.
2. Bedogni, B. and M. B. Powell. 2009. Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 166-174.
3. Borger, D. R., L. C. Gavrilescu, M. C. Bucur, M. Ivan, and J. A. Decaprio. 2008. AMP-activated protein kinase is essential for survival in chronic hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**, 230-234.
4. Koh, H. and J. Chung. 2007. AMPK links energy status to cell structure and mitosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 789-792.
5. Kuphal, S., A. Winklmeier, C. Warnecke, and A. K. Bosserhoff. 2010. Constitutive HIF-1 activity in malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* **46**, 1159-1169.
6. Lee, D. H. and Y. J. Lee. 2008. Quercetin suppresses hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) through inhibiting protein synthesis. *J. Cell Biochem.* **105**, 546-553.
7. Lee, M., J. T. Hwang, H. J. Lee, S. N. Jung, I. Kang, S. G. Chi, S. S. Kim, and J. Ha. 2003. AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 39653-39661.
8. Lee, Y. K., S. Y. Park, Y. M. Kim, W. S. Lee, and O. J. Park. 2009. AMP kinase/cyclooxygenase-2 pathway regulates proliferation and apoptosis of cancer cells treated with

- quercetin. *Exp. Mol. Med* **41**, 201-207.
9. Liu, J. D., S. H. Chen, C. L. Lin, S. H. Tsai, and Y. C. Liang. 2001. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *J. Cell Biochem* **83**, 631-642.
 10. Nihal, M., N. Ahmad, H. Mukhtar, and G. S. Wood. 2005. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int. J. Cancer* **114**, 513-521.
 11. McClintock, D. S., M. T. Santore, V. Y. Lee, J. Brunelle, G. R. Budinger, W. X. Zong, C. B. Thompson, N. Hay, and N. S. Chandel. 2002. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. *Mol. Cell Biol.* **22**, 94-104.
 12. Pouyssegur, J., F. Dayan, and N. M. Mazure. 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**, 437-743.
 13. Schneider, A., R. H. Younis, and J. S. Gutkind. 2008. Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* **10**, 1295-1302.
 14. Sun, B., D. Zhang, S. Zhang, W. Zhang, H. Guo, and X. Zhao. 2007. Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma. *Cancer Lett.* **249**, 188-197.
 15. Thomas, R. and M. H. Kim. 2005. Epigallocatechin gallate inhibits HIF-1alpha degradation in prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 543-548.
 16. Zhang, Q., X. Tang, Q. Lu, Z. Zhang, J. Rao, and A. D. Le. 2006. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1alpha protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1227-1238.
 17. Zhang, S., M. Li, D. Zhang, S. Xu, X. Wang, Z. Liu, X. Zhao, and B. Sun. 2009. Hypoxia influences linearly patterned programmed cell necrosis and tumor blood supply patterns formation in melanoma. *Lab. Invest.* **89**, 575-586.
 18. Zhou, Y. D., Y. P. Kim, X. C. Li, S. R. Baerson, A. K. Agarwal, T. W. Hodges, D. Ferreira, and D. G. Nagle. 2004. Hypoxia-inducible factor-1 activation by (-)-epicatechin gallate: potential adverse effects of cancer chemoprevention with high-dose green tea extracts. *J. Nat. Prod* **67**, 2063-2069.

초록 : 저산소증 상태에서 B16F10 피부암 세포에 EGCG를 처리하였을 때의 apoptosis 효과

김윤이¹ · 김인섭¹ · 박옥진² · 김영민^{1*}

(¹한남대학교 생명나노과학대학 생명과학과, ²한남대학교 생명나노과학대학 식품영양학과)

파이토케미컬의 일종인 EGCG는 녹차의 카테킨 성분으로, 세포 내 신호 경로 조절을 통하여 항산화, 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 hypoxia 상태인 B16F10 피부암 세포에서 HIF-1α를 포함한 AMPK의 신호경로를 통하여 EGCG의 apoptosis 유도 효과를 규명하였다. AMPK는 hypoxia, 영양분 결핍, 운동, heat shock 등, 세포 내 ATP의 결핍에 의해서 활성화되며 암세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유도한다. 세포에서 중요한 에너지 센서로서 작용하는 AMPK가 hypoxia 상태의 암세포 내에서는 HIF-1α의 전사 활성을 유도하는데, HIF-1α는 hypoxia 상태에서 산소 결핍에 반응하는 첫 번째 전사 조절인자로서 암세포의 생존을 위한 세포 내 산소공급과 혈관신생형성을 조절한다. Hypoxia 상태가 아닌 B16F10 세포에서와 hypoxia 상태에서의 B16F10 세포에서 EGCG에 의한 apoptosis 효과를 관찰하였다. 실험 결과, hypoxia 상태에서 EGCG는 더 강한 apoptosis를 유도하며, 혈관신생형성을 조절할 수 있는 HIF-1α의 전사 활성을 억제시킨다. 이러한 관찰을 통해 EGCG가 hypoxia 상태의 피부암 세포에서 암의 성장과 신생혈관형성을 저해하는 것으로 보인다. 이와 같은 연구는 향후 식품에 첨가된 파이토케미컬을 이용하여 암을 예방하는 연구에서 있어서, 도움이 될 것으로 여겨진다.