J Korean Soc Food Sci Nutr
40(6), 767~774(2011)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2011.40.6.767

HepG2 Cell에서 녹차씨박 에탄올 추출물의 암세포 증식 억제효과

노경희[1†] · 민관희[1] · 서보영[1] · 김혜옥[1] · 김소희[2] · 송영선[1]

[1]인제대학교 식품생명과학부, 기초과학연구소
[2]동주대학 외식조리 & 제과계열

Suppressive Effects of Defatted Green Tea Seed Ethanol Extract on Cancer Cell Proliferation in HepG2 Cells

Kyung-Hee Noh[1†], Kwan-Hee Min[1], Bo-Young Seo[1], Hye-Ok Kim[1], So-Hee Kim[2], and Young-Sun Song[1]

[1]*School of Foods and Life Science and Institute of Basic Sciences, Inje University, Gyeongnam 621-749, Korea*
[2]*School of Culinary Art & Baking Technology, Dong-Ju College, Busan 604-080, Korea*

Abstract

Defatted green tea seed was extracted with 100% ethanol for 4 hr and then fractionated with petroleum ether, ethyl acetate and butanol. The ethanol and butanol extracts showed greater increases in antiproliferation potential against liver cancer cells than petroleum ether, ethyl acetate, H_2O, and hot water extracts did. Thus, this study was carried out to investigate the anti-proliferative actions of defatted green tea seed ethanol extract (DGTSE) in HepG2 cancer cells. The DGTSE contained catechins including EGC (1039.1±15.26 μg/g), tannic acid (683.5 ±17.61 μg/g), EC (62.4±5.00 μg/g), ECG (24.4±7.81 μg/g), EGCG (20.9±0.96 μg/g) and gallic acid (2.4±0.68 μg/g), but caffeic acid was not detected when analyzed by HPLC. The anti-proliferation effect of DGTSE toward HepG2 cells was 83.13% when treated at 10 μg/mL, of DGTSE, offering an IC_{50} of 6.58 μg/mL. DGTSE decreased CYP1A1 and CYP1A2 protein expressions in a dose-dependent manner. Quinone reductase and antioxidant response element (ARE)-luciferase activities were increased about 2.6 and 1.94-fold at a concentration of 20 μg/mL compared to a control group, respectively. Enhancement of phase II enzyme activity by DGTSE was shown to be mediated via interaction with ARE sequences in genes encoding the phase enzymes. DGTSE significantly ($p<0.05$) suppressed prostaglandin E_2 level, tumor necrosis factor-α (TNF-α) protein expressions, and NFκB translocation, but did not affected nitric oxide production. From the above results, it is concluded that DGTSE may ameliorate tumor and inflammatory reactions through the elevation of phase II enzyme activities and suppression of NFκB translocation and TNF-α protein expressions, which support the cancer cell anti-proliferative effects of DGTSE in HepG2 cells.

Key words: defatted green tea seed ethanol extract, anti-proliferative effect, HepG2 cell, TNF-α, quinone reductase, CYP1A1, NFκB

서 론

생체에서 활성산소의 반응생성물이 증가됨으로써 동맥경화, 만성 염증성 질환, 암과 같은 성인병 및 노화가 일어나는 것으로 알려져 있으며 암세포의 증식은 산화적 손상이나 염증반응이 관련되어 있다. 식사와 대사과정에서 생성되는 활성 산소종은 산화적 스트레스를 유발하고 발암의 개시와 직접적으로 관련되는 돌연변이를 유발시킨다. 산화작용은 생체에서 끊임없이 일어나는데 호흡에 산소를 이용하는 생물체로서 산화적 스트레스에 대한 노출은 불가피하다(1). 암 예방물질(chemopreventive agent)은 최종 발암대사물질 활성을 줄이거나 형성을 차단하고 또한 표적조직에서 발암물질의 활성을 감소시킴으로써 암 발생을 억제할 수 있다(2,3). 체내에서 발암물질의 대사에 관여하는 효소계는 제1상효소계와 제2상효소계로 나누어지며 제1상효소계로는 aryl hydrocarbon hydroxylase와 cytochrome P450(CYP) family가 있으며 제2상효소계에는 NAD(P)H-quinone reductase (QR), heme oxygenase-1(HO-1), glutathione *S*-transferase (GST), UDP-glucuronyl transferase 등이 있다. CYP 효소들은 자연계 거의 모든 생물종에서 발견되며 기능적인 측면에서 외부로부터 유입된 물질의 해독작용을 하는 것으로 알려져 왔으나 최근의 연구에 의하면 CYP 효소들이 어떤 물질의 독성을 감소시키는 경우보다 오히려 증가시키는 것으로 밝혀져 CYP가 발암과정을 유도하거나 각종 질병의 발생 원

†Corresponding author. E-mail: khnoh1999@hanmail.net
Phone: 82-55-320-3235, Fax: 82-55-321-0691

인으로 생각되고 있다(4).

NFκB는 염증반응 및 면역 반응 등 다양한 유전자의 발현에 관여하는 전사인자로 종양형성, 자가 면역질환, 염증질환에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다(5,6). NFκB는 염증에 의한 암 발생에 있어서 필수적인 요인이라고 할 수 있으며(7), 외부자극원에 의해 NFκB 및 AP-1이 활성화되면, inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)가 발현되어 과량의 nitric oxide(NO)와 prostaglandin E_2(PGE_2)가 생성되어 염증을 일으킨다(8). 또한 활성화된 염증세포는 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β), IL-6, IL-12와 같은 pro-inflammatory cytokines을 생성하게 된다(9). 과량으로 생성된 염증매개물질은 과도한 면역반응을 야기하여 암 발생을 촉진시키는 원인이 되기 때문에 iNOS, COX-2의 발현억제를 통해 NO와 PGE_2의 생성을 억제하고, TNF-α, IL-1β와 같은 염증성 cytokine들의 생성을 억제하는 것은 발암을 억제하는 기전이 된다.

녹차씨에는 생리적 활성 물질인 사포닌, 플라보노이드류, 비타민과 기름을 풍부하게 함유하고 있어(10,11) 항암활성, 항염증활성, 항산화활성을 가질 것으로 기대되며(12,13), 5-α-reductase에 대한 잠재적 저해 활성을 가지는 kaempferol glycoside를 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다(11,14). 또한, 중국과 대만에서는 오래 전부터 녹차씨를 고급식용유의 원료로 사용되고 있으며 식용유지 자급율이 낮은 우리나라에서도 식용유지 자원으로서의 가능성이 매우 높은 자원이다(10). 녹차씨유를 추출한 후 부산물로 생산되는 녹차씨박의 유효한 생리활성 효과를 확인하면 기능성 소재로서의 그 이용 가치가 높을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 간암세포주인 HepG2 cell line에서 탈지한 녹차씨박 분획 추출물의 증식억제 효과를 비교하고 암세포 증식억제효과가 뛰어나고 수율이 높은 녹차씨박 에탄올 추출물의 암세포 증식 억제효과와 그 기전에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

녹차씨박 분획 추출물 조제

녹차씨(green tea seed, GTS)는 외껍질과 속껍질을 각각 제거하여 깨끗하게 세척한 후 50±5°C에서 3일간 열풍 건조하여 40 mesh로 분쇄한 후 사용하였다. 녹차씨 분말 100 g에 2 L의 n-hexane을 가하여 24시간 동안 탈지시킨 후 n-hexane으로 1회 더 세척하여 48시간 동안 자연 건조시켰다. 탈지 후 수율은 86.49%였다. 열수추출물은 녹차씨박(DGTS) 분말의 10배의 증류수를 가해 100±5°C에서 4시간 동안 환류 추출 후 원심분리(1,500 rpm, 15분)하여 동결 건조하였다. 에탄올 추출물은 DGTS 분말의 10배의 주정을 가해 80±5°C에서 4시간 동안 환류 추출하여 감압여과한 후 evaporator를 사용하여 건고하였다. 녹차씨박 에탄올 추출물과 열수추출물의 회수율은 각각 19.94%와 36.84%였다. 녹차씨박 분획추출물 조제는 건고시킨 에탄올 추출물 10 g을 증류수 500 mL을 가해 용해시킨 후 석유에테르(PE) 500 mL을 가하여 혼합한 후 PE층인 위층을 회수하였으며 같은 방법으로 2회 반복 추출하였다(PE층). 남은 물 층에 에틸아세테이트(EtOAC층), 부탄올(BuOH층)을 순차적으로 가하여 동일한 방법으로 각각 2회 반복 추출하였으며 남은 물 층은 H_2O층으로 사용하였다. H_2O층은 동결 건조하였으며 나머지 모든 층은 건고시켜 본 실험의 시료로 사용하였다. 각각의 회수율은 에탄올 추출물 10 g당 PE층 0.115 g, EtOAC층 0.144 g, BuOH층 4.059 g, H_2O층 4.952 g이었다.

세포 배양 및 시료처리

HepG2 cell line은 ATCC에서 구입하였으며 세포 배양은 α-MEM(10% FBS 첨가)배지를 사용하여 CO_2 incubator에서 37°C, 5% CO_2의 조건하에서 하였다. 세포 배양 시 세포분주 12~24시간 동안 preincubation한 후 α-MEM 배지를 제거하고 새로운 배지(10% FBS 무첨가)에 녹차씨박 추출물을 첨가하여 48시간 배양하였다. 녹차씨박 추출물의 시료처리 농도는 EtOH 추출물 0, 2.5, 5, 10, 20 μg/mL, PE층 0, 50, 100, 150 μg/mL, EtOAC층 0, 10, 20, 30 μg/mL, BuOH층 0, 1, 2.5, 5 μg/mL, H_2O층 0, 25, 50, 100 μg/mL, HW 추출물은 0, 10, 20, 30, 40 μg/mL로 하였다.

녹차씨박 추출물의 세포 증식 억제능 평가

96 well plate에 5×10^3 cell/well로 분주한 다음, 24시간 동안 preincubation하고 녹차씨박 추출물을 농도별로 투여하였다. 48시간 배양한 다음, 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 방법으로 세포생존율을 측정하였다. 즉, 1 mg/mL의 농도가 되도록 조정하여 4시간 동안 배양하여 여기에 dimethylsulfoxide(DMSO) 100 μL를 첨가하여 세포에서 formazan dye를 용해시켜낸 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 DMSO에 대한 흡광도 값을 나누어 백분율로 표시하였다.

녹차씨박 추출물의 간암세포 억제능과 IC_{50} 값은 Fig. 1과 Table 1에서 보듯이 BuOH층이 3.54 μg으로 가장 낮은 값을 보여 암세포 억제효과가 가장 높은 것으로 나타났으며 그 다음이 에탄올 추출물(6.58 μg), EtOAC층(18.29 μg), H_2O층(44.37 μg), PE층(120.77 μg)의 순으로 나타나 PE층에서 암

Table 1. IC_{50} values of cell viability of defatted green tea seed extracts in HepG2 cell (μg/mL)

	EtOH[1)]	PE[2)]	EtOAC[3)]	BuOH[4)]	H_2O	HW[5)]
IC_{50} value	6.58	120.77	18.29	3.54	44.37	25.02

[1)]Ethanol. [2)]Petroleum ether. [3)]Ethyl acetate. [4)]Butanol. [5)]Hot water.

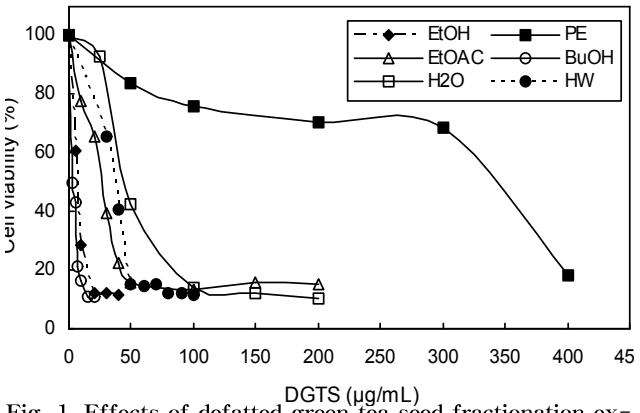

Fig. 1. Effects of defatted green tea seed fractionation extracts on antiproliferation of HepG2 cell. Cells (5×10^3/well) were preincubated with and without indicated concentrations of DGTS ethanol extract and its fractions for 24 hr, and then incubated for 48 hr. The data shown are representative of triplicate experiments. DGTS: defatted green tea seed extract, EtOH: ethanol, PE: petroleum ether, EtOAC: ethyl acetate, BuOH: butanol, HW: hot water.

세포 증식 억제능이 가장 낮은 것으로 나타났다.

따라서 본 연구에서는 간암세포 HepG2 세포에 대한 암세포 증식 억제능이 높고 기능성식품으로 활용 가능한 용매 추출물인 EtOH 추출물을 선정하여 다음 실험을 실시하였다.

HPLC에 의한 녹차씨박 에탄올 추출물의 polyphenol 분석

녹차씨박 에탄올 추출물(DGTSE)의 polyphenol의 함량은 에탄올에 녹여 syringe filter(0.45 μm, nylon membrane, Corning Inc., Acton, MA, USA)로 여과하여 이것을 HPLC용 시료로 이용하였다. Catechin류로는 (-)-epigallocatechingallate(EGCG), (-)-epigallo-catechin(EGC), (-)-epicatechingallate(ECG), (-)-epicatechin(EC), tannic acid, gallic acid, caffeic acid를 표준물질로 사용하였으며 HPLC의 분석조건은 Table 2와 같다.

녹차씨박 에탄올 추출물이 해독효소계 활성에 미치는 영향

NAD(P)H:quinone reductase activity: QR활성은 Benson 등의 방법(15)에 따라 수행하였다. 1×10^6개의 세포를 culture dish(ϕ 100 mm)에 분주하여 24시간 preincubation 후 α-MEM을 제거하고 새로운 배지에 각 시료를 첨가하여 48시간 배양하였다. 배지를 제거한 다음 차가운 10 mM phospate buffer saline(PBS, pH 7.0)로 2회 수세하고 0.25 M sucrose로 수집하였다. 수집한 세포를 ultrasonic cell disrupter(50W, Kontes, Vineland, NJ, USA)로 균질화한 다음, microcentrifuge(VS-15000CFN11, Vision, Seoul, Korea)로 원심분리(10,500×*g*, 15분)하여 상등액을 얻었다. 상등액 200 μL에 250 mM tris-HCl(pH 7.4), 70 mg bovine serum albumin, 0.1% Tween 20, 500 μM FAD, 2 mM NADH를 첨가한 다음, 기질인 2,6-dichlorophenolindophenol(DCPIP)이 단백질 mg당 1분 동안 산화되는 정도를 600 nm에서 측정하였다. 단백질 정량은 Bradford 법(16)으로 하였다.

Table 2. HPLC conditions for analysis of polyphenols contents in defatted green tea seed ethanol extract

Items	Conditions
Instrument	HPLC (JASCO 1580)
Column	Shiseido capcell Pak C18 (5 μm, 4.6×2250 mm, Phenomenex)
Detector	UV 280/210 nm
Mobile phase	Solvent A : Solvent B (9:1→4:6)
Flow rate	0.5 mL/min
Sample injection	20 μL

Solvent A: 0.5% H_3PO_4, Solvent B: 50% CH_3CN in 0.5% H_3PO_4.

ARE-Luciferase assay: Culture plate(ϕ 60 mm)당 1×10^5 cell로 분주하여, 24시간 preincubation한 다음, 각 추출물을 각각의 농도로 처리하여 48시간 배양한 후 세포를 수집하여 luciferase 활성을 Promega E4030방법(Madison, WI, USA)에 따라 측정하였다. 즉, 수집한 시료를 loMax 20/20 luminometer(Promega)를 통하여 분석하였다. 시료의 단백질 함량은 Bradford 법(16)에 따라 분석하였다.

녹차씨박 에탄올 추출물의 NO와 PGE2와 TNF-α 생성 억제능

NO 생성량은 Green 등의 방법(17)으로 NO 생성의 지표인 nitrite 양으로 확인하였다. 배지 상등액 100 μL에 1% sulphanilamide(in 5% phosphoric acid) 50 μL와 0.1% naphthylenediamine dihydrochloride 50 μL를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 $NaNO_2$를 농도별로 조제하여 사용하였다.

PGE_2와 TNF-α 생성 억제능은 각각 ELISA assay kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 분석하였다.

Western blot

HepG2 세포에서 녹차씨박 에탄올 추출물이 CYP 450과 TNF-α 단백질 발현에 미치는 효과를 western blot으로 확인하였다. PRO-PREP™ protein extraction solution(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)으로 추출한 30 μg의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리한 다음 polyvinylidene fluoride membrane(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)에 90분간 blotting하고 5% nonfat dry milk에 담궈 실온에서 1시간 동안 blocking하였다. 일차항체로 CYP 450 1A1 (CYP1A1)과 CYP 450 1A2(CYP1A2, rabbit polyclonal antibody, Abcam, Cambridge, England)를, polyclonal rabbit TNF-α antibody(Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA)를 1:1,000으로 blocking 용액에 희석하여 하룻밤 방치하여, TBS/T(Tris buffered saline-Tween; 200 mM Tris, 1.37 M NaCl, pH 7.6, 0.1% Tween 20)로 3번 헹군 후 alkaline phosphatase로 결합된 goat anti-mouse immuno-

globulin G 이차항체를 blocking 용액에 1:2,000으로 희석하여 1시간 동안 실온에 방치하였다. Blot은 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium color development substrate(Promega)로 발색시키거나 X-ray 필름(Amersham Hyperfilm^{TM} ECL)에 20X LumiGLO(R) 시약과 20X Peroxide(Cell Signaling Technology)로 발광시켜 현상하였다. 내부 표준물질로는 actin을 사용하여 quantity one software(Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 이용하여 정량하였다.

핵 내의 NFκB translocation 평가

PBS로 세포를 수집하여 원심분리(500×*g*, 5분) 후, 하층에 Nodiet P-40 lysis buffer(pH 8.0) 300 μL 첨가하고 4°C에서 10분간 반응시켜 500×*g*에서 5분간 원심분리한 후 남아있는 하층에 high salt buffer(20 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) 30 μL를 첨가한 다음 잘 혼합하고 원심분리(15,000×*g*, 30 분)한 후 상등액을 취해 핵 추출물로 사용하였다. 단백질의 발현은 phospho-p65 rabbit mAb(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 위의 방법과 동일한 방법으로 확인하였다.

통계처리

통계분석은 SPSS software(Version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석하였으며 모든 결과는 mean±SE로 표시하였고 one-way ANOVA와 Duncan's multiple range test로 각 군 간의 유의성을 $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

Polyphenol 함량

HPLC를 사용하여 분석한 녹차씨박 에탄올 추출물(DGTSE)의 polyphenol 함량은 Table 3에서 보는 바와 같이 EGC(1039.1±15.26 μg/g)> tannic acid(683.5±17.61 μg/g)> EC(62.4±5.00 μg/g)> ECG(24.4±7.81 μg/g)> EGCG(20.9±0.96 μg/g)> gallic acid(2.4±0.68 μg/g)의 순으로 검출되었으며 caffeic acid는 검출되지 않았다. Lim 등(18)은 녹차씨의 catechin류 함량을 HPLC로 분석한 결과 녹차씨 메탄올 추출물에서 ECG 821±95 μg/g, gallate 112±72 μg/g, caffeine 155±42 μg/g, EGC 116±72 μg/g, EGCG가 108±32 μg/g, EC 37±40 μg/g 순으로 함유되어 있다고 보고하였다. 이러한 차이는 Lim 등(18)의 연구에서는 녹차씨의 기름성분을 제거하지 않고 메탄올 추출물을 조제한 반면 본 연구에서는 녹차씨가 함유하고 있는 기름을 제거시킨 녹차씨박을 에탄올 추출물로 조제한 녹차씨 추출물 조제과정의 차이에 기인하는 것으로 보인다. 녹차의 주요한 polyphenols는 flavan-3-ols와 flavonols로 녹차의 polyphenolic compounds의 약 77%가 flavan-3-ols이며 구조적으로 flavonols보다 덜 안정하다. 녹차의 주요한 flavonol은 quercetin과 kaempferol의 glycosides이다(13,14). 녹차의 flavone-3-ol을 기본으로 하는 catechins로는 (+)-catechin, EGCG, EGC, ECG, EC가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(13).

본 연구에서는 DGTSE에는 모든 종류의 catechin들이 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 녹차씨 기름을 추출한 후의 부산물로써 얻어진 녹차씨박에서 얻어지는 점과 많은 양을 얻을 수 있는 점을 고려할 때 경제성이 있는 자원이라 할 수 있다.

암세포 증식 억제능

간암세포인 HepG2 세포에서 DGTSE이 암세포의 증식 억제능에 미치는 효과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. DGTSE의 농도가 2.5 μg/mL에서는 31.33%, 5 μg/mL에서는 67.6%, 10 μg/mL 이상에서는 84.13%의 세포 증식 억제능을 보여 DGTSE이 농도 의존적으로 간암세포 증식을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

Yoon 등(13)은 녹차나무 종자의 항종양 활성 검색 실험에서 녹차씨 과피 추출물은 항종양 효과가 전혀 없었으나 종자 추출물에서는 큰 활성을 보였으며 70% 에탄올 및 물과 같은

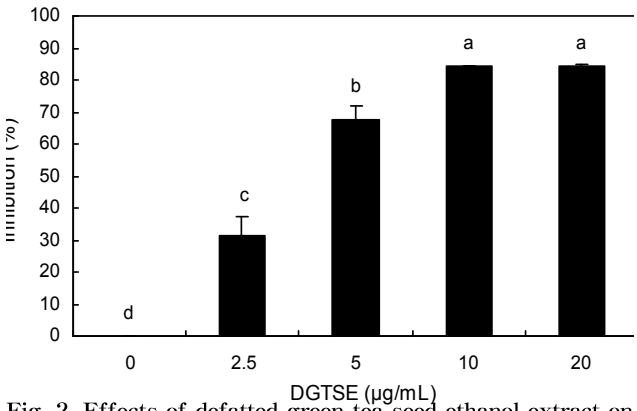

Fig. 2. Effects of defatted green tea seed ethanol extract on the antiproliferation of HepG2 cell. Cells (5×10^3/well) were preincubated with and without indicated concentrations of DGTS ethanol extract for 24 hr, and then incubated for 48 hr. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean±SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$. DGSTE: defatted green tea seed ethanol extract.

Table 3. Contents of catechins, caffeic acid, tannic acid, and gallic acid of defatted green tea seed ethanol extract by HPLC analysis (μg/g extracts)

EGCG	EGC	ECG	EC	Tannic acid	Caffeic acid	Gallic acid
20.9±0.96[1)]	1039.1±15.26	24.4±7.81	62.4±5.00	683.5±17.61	–[2)]	2.4±0.68

[1)]Mean±SE. [2)]Not detected.

극성 용매로 추출 시 종양세포 억제능이 높았다고 보고하였다. 즉, 종자 추출물 500 μg/mL을 처리 시 자궁암 세포인 human endomaterial adenocarcinoma(HEC-1B) 종양 세포주를 제외한 피부암세포(Farrow), 후두암세포(HEP-2), 난소암 세포(SK-OV-3)의 종양 세포주에서 약 90% 이상의 증식억제효과를 보였다. 종자의 물 추출물 처리 시에도 억제효과가 높았던 점을 고려할 때 용매가 극성일수록 증식억제 활성물질이 잘 추출되는 것으로 생각되며, 그리고 정상세포보다 종양세포에 대하여 보다 큰 선택 독성을 보였다고 하였다.

본 연구에서의 결과에서도 극성 용매 추출물인 에탄올과 부탄올 및 열수 추출물에서 HepG2 생육 억제능이 높아(Table 1에 제시함) 유사한 결과를 보였으며 DGTSE은 간암세포의 생육을 저해하여 항종양 활성을 가질 것으로 사료된다.

CYP1A1과 CYP1A2 발현

DGTSE이 제1상효소계인 CYP1A1과 CYP1A2의 발현에 미치는 영향은 Fig. 3에서 보는 바와 같다. DGTSE은 CYP1A1과 CYP1A2의 발현을 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다. CYP1A1 family는 구조적으로 관련된 이성체 CYP1A1와 CYP1A2로 구성되어 있으며 대사적으로 세포의 nucleophilies와 궁극적으로 발암물질과 상호작용할 수 있는 반응성이 큰 중간 매개물들을 형성하기 위해 많은 발암전구물질을 활성화시킨다. CYP1A1과 CYP1A2의 활성은 여러 가지 암과 관계가 있어 식이에 의한 CYP1A1의 활성 조절은 암 예방 또는 위험 평가를 포함한 발암원의 대사에 영향을 미칠 수 있으며 플라보노이드는 aryl hydrocarbon receptor (AhR)에 대하여 그들의 구조와 cell context에 따라서 agonist 또는 antagonists로 보고되기도 하였다(19-21). 사람의 CYP1A2는 간에 존재하는 주요한 CYPs의 하나로 간의 총 P450 단백질 함량의 약 15% 존재한다. Clozapine, tacrine, theophylline와 같은 임상적 약물 및 benzo[a]pyrene, 방향족 아민류의 발암물질과 스테로이드와 같은 여러 가지 중요한 내부 혼합물의 다수를 대사한다. CYP1A2는 1차적으로 AhR에 의해 조절되며 ligand binding과 nuclear translocation은 AhR-mediated transactivation을 통해 유도된다. 게다가, 이 효소는 역시 반응성이 강한 여러 가지 carcinogenic heterocyclic amine의 분해 작용과 여러 가지 암의 진행과 연관이 있다(21,22).

따라서 DGTSE은 간암 세포계에서 CYP1A1과 CYP1A2의 단백질 발현을 감소시켜 항종양 효과를 가지는 것으로 보인다.

해독효소계 활성

제2상 효소계인 QR은 electrophile을 함유한 대사 효소로 QR 활성은 어떤 물질의 제2상효소계의 지표효소로서 항종양효소계 활성인자의 탐색에 널리 사용되고 있다. QR은 간세포에서 주로 생성되어 세포질에 주로 분포하는 효소로 외부의 독성이 있는 물질과 돌연변이물질(mutagen), 발암물질(carcinogen)로부터 세포를 보호한다. 또한 생체 내에 유입되는 다양한 quinone과 그 대사산물인 quinoneimine을 환원시켜 신진대사 단계의 세포독성(cytotoxin)으로부터 세포를 보호하는 역할을 담당하고 있다. 제2상효소계의 유도반

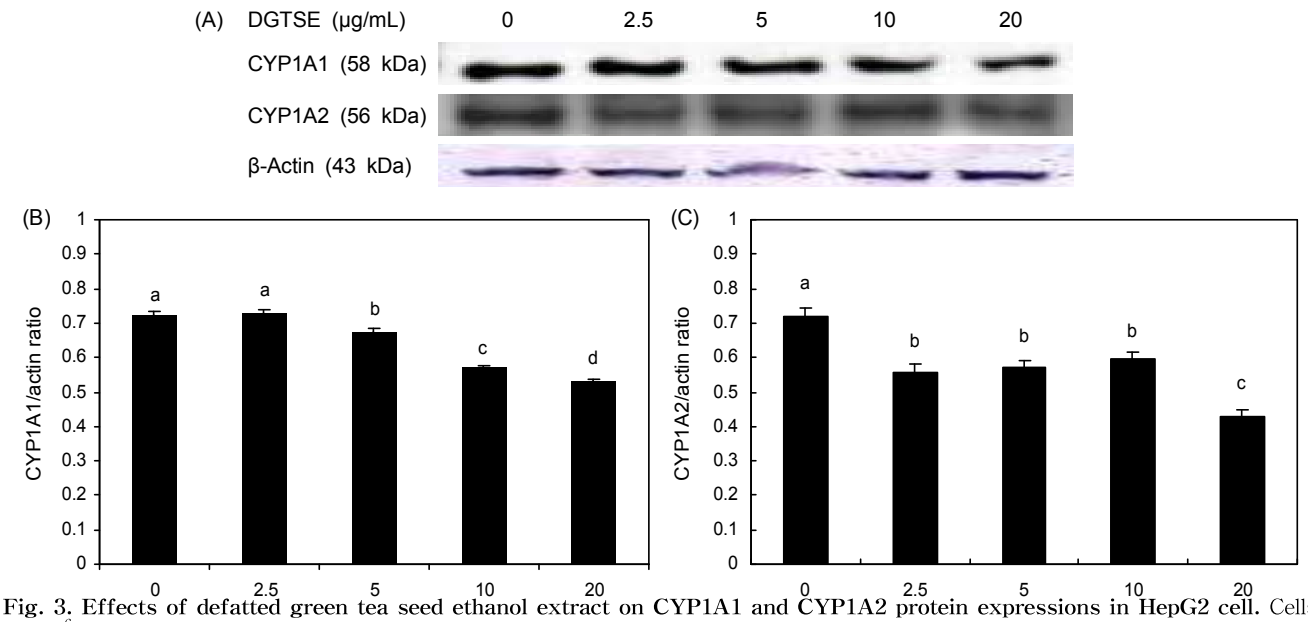

Fig. 3. Effects of defatted green tea seed ethanol extract on CYP1A1 and CYP1A2 protein expressions in HepG2 cell. Cells (1×10^6/dish) were preincubated with and without indicated concentrations of DGTS ethanol extract for 24 hr, and then incubated for 48 hr. (A) Levels of CYP1A1 and CYP1A2 proteins were measured by western blot analysis and actin was used as an internal control. (B and C) All signals were normalized to protein levels of the control protein, actin, and expressed as a ratio. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean±SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$. DGSTE: defatted green tea seed ethanol extract.

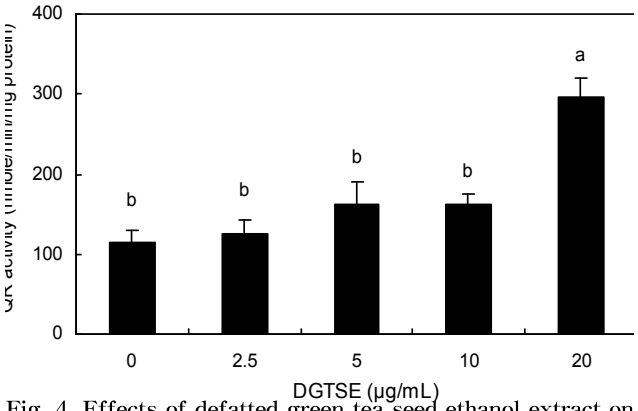

Fig. 4. Effects of defatted green tea seed ethanol extract on QR activity of HepG2 cell. Cells (1×10^6/dish) were preincubated with and without indicated concentrations of DGTS ethanol extract for 24 hr, and then incubated for 48 hr. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean±SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$. DGSTE: defatted green tea seed ethanol extract.

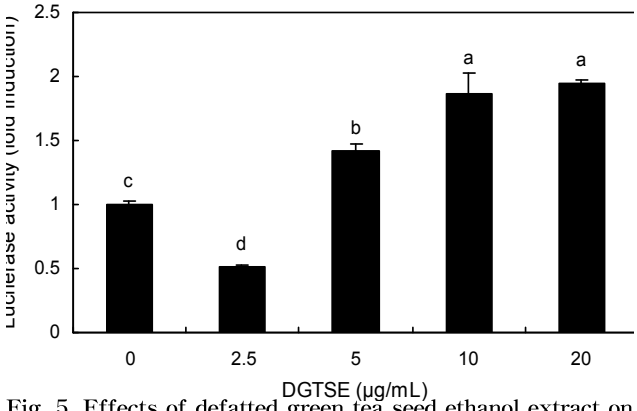

Fig. 5. Effects of defatted green tea seed ethanol extract on ARE activity of HepG2 cell. Cells (1×10^5/dish) were preincubated with and without indicated concentrations of DGTS ethanol extract for 24 hr, and then incubated for 48 hr. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean±SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$. DGSTE: defatted green tea seed ethanol extract.

응은 체외이물질을 무독화시킴으로써 생체에 중요한 방어기전으로 작용하며 그러므로 제2상 효소 생성의 유도는 항암활성으로 여겨진다(2).

QR 활성은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 HepG2 세포에서의 DGTSE을 20 μg/mL 농도로 처리 시 대조군에 비해 2.6배 정도 증가하는 것으로 나타났다. QR 유도는 제2상 효소계의 promotor region에서 antioxidant response element(ARE) sequence에 의해 조절되므로 DGTSE의 ARE-mediated gene expression에 대한 효과를 HepG2 cell의 세포질에 있는 luciferase reporter gene의 활성을 통해 확인하였다. Fig. 5에서 보듯이 2.5 μg/mL 농도로 처리 시 대조군에 비해 감소하였으나 5 μg, 10 μg, 20 μg/mL의 농도로 처리 시 1.42배, 1.87배, 1.94배로 각각 증가하였다.

Lim 등(18)은 녹차씨 80% 메탄올 추출물 100 μg/mL을 암세포인 hepa1c1c7과 BPRc1 세포에 처리하였을 때 대조군에 비해 QR 활성이 각각 1.9배와 2배 증가하였으며, 녹차잎 추출물에 비해 OR induction potential이 더 높았으며 HepG2-C8 cell에서 녹차씨 메탄올 추출물을 10~100 μg/mL 농도로 처리하였을 때 luciferase 활성을 농도 의존적으로 증가시켰다고 하였다. 이러한 보고는 본 연구의 결과와도 일치하는 것을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서 DGTSE은 제2상효소계를 활성화시켜 항종양 효과를 가지는 것으로 보인다.

NO, PGE_2 및 TNF-α 수준 및 TNF-α의 단백질 발현 정도

간암세포인 HepG2 세포에서 DGTSE이 염증지표에 미치는 효과는 Table 4에 제시하였다. DGTSE은 PGE_2 생성을 유발시키지 않았으며 NO와 TNF-α의 생성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 DGTSE은 TNF-α의 단백질 발현을 유의적으로 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 6). TNF-α의 분리에는 IL-6 등 여러 인자들이 관여하는 것으로 알려져 있으며(23) 본 연구에서 TNF-α의 분리와 단백질 발현이 다소 차이를 나타내는 것은 더 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다. TNF-α는 여러 가지 염증성 질환 및 숙주방어에서 가장 중요한 조절자로 알려져 있다. TNF-α는 단백질 분해효소인 TNF-α 전환효소에 의해 세포막에 결합된 TNF-α 전구체가 절단되어 막 밖으로 분비되어 활성화되며(24,25), TNF-α 전환효소는 iNOS와 arachidonic acid로부터 prostaglandin을 합성하여 면역조절 및 염증 유발에 관여하는 COX-2의 발현을 유도한다(26,27).

따라서 DGTSE은 HepG2 세포에서 TNF-α의 발현을 억제하여 PGE_2의 생성을 감소시켜 항종양 및 항염증 효과를 가질 것으로 보인다.

핵 내 NFκB의 translocation 평가

DGTSE이 핵으로의 NFκB translocation에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같다. DGTSE이 핵에서 p65의 농도를 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인

Table 4. Effects of defatted green tea seed ethanol extract on PGE_2, NO and TNF-α levels in HepG2 cell

	DGTSE[1)] (μg/mL)				
	0	2.5	5	10	20
PGE_2 (pg/mL)	38.9±0.0[2)]	–[3)]	–	–	–
Nitric oxide (μM)	0.224±0.006[NS]	0.225±0.009	0.225±0.014	0.235±0.005	0.224±0.008
TNF-α (pg/mL)	58.47±1.00[NS]	58.13±0.77	59.91±0.44	58.47±0.33	58.47±1.00

[1)]Defatted green tea seed ethanol extract. [2)]Mean±SE. [3)]Not detected. [NS]Not significant.

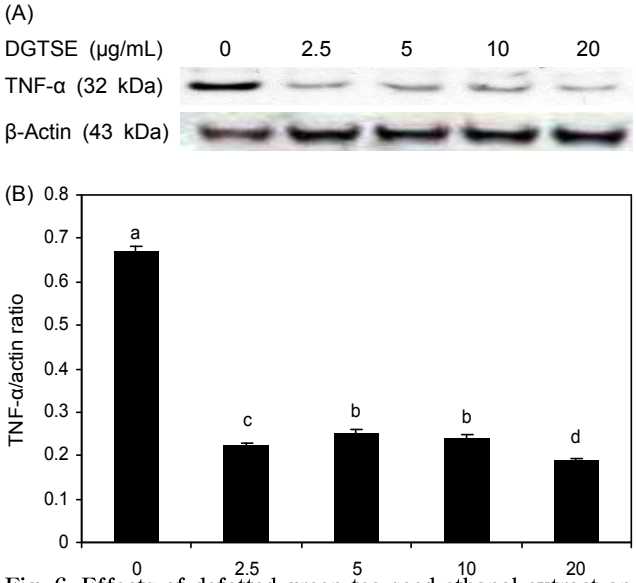

Fig. 6. Effects of defatted green tea seed ethanol extract on TNF-α protein expression in HepG2 cell. Cells (1×10^6/dish) were preincubated with and without indicated concentrations of DGTS ethanol extract for 24 hr, and then incubated for 48 hr. (A) Level of TNF-α was measured by western blot analysis and actin was used as an internal control. (B) All signals were normalized to protein levels of the control protein, actin, and expressed as a ratio. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean±SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$. DGSTE: defatted green tea seed ethanol extract.

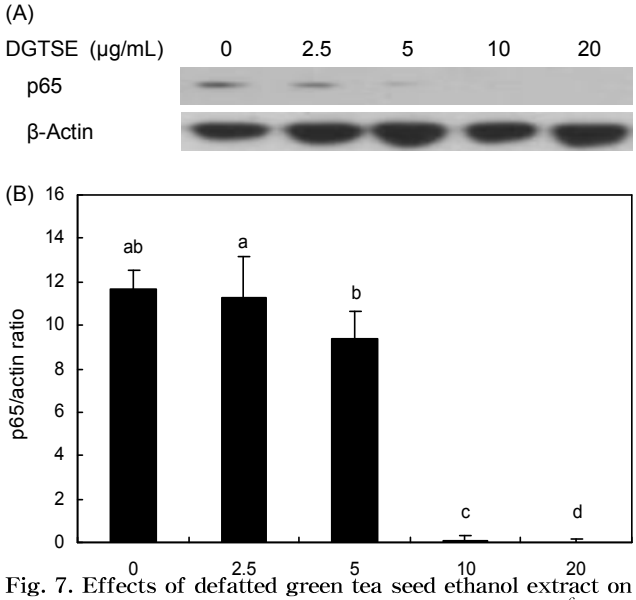

Fig. 7. Effects of defatted green tea seed ethanol extract on NFκB protein expressions in HepG2 cell. Cells (1×10^6/dish) were preincubated with and without indicated concentrations of DGTS ethanol extract for 24 hr, and then incubated for 48 hr. (A) Level of p65 was measured by western blot analysis and actin was used as an internal control. (B) All signals were normalized to protein levels of the control protein, actin, and expressed as a ratio. The data shown are representative of triplicate experiments. Bars represent the mean±SE and values with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$. DGSTE: defatted green tea seed ethanol extract.

할 수 있었다.

NFκB는 cytokine 반응, 염증, 세포성장조절과 같은 다양한 단계에 참여하는 전사인자이다. 많은 세포에서 NFκB는 세포질에서 핵으로의 다양한 신호 전달에 관여하는 redox-sensitive transcription factor로(28) 세포질 속에서 p50, p65, IκB subunit의 trimer로 발견되고, 산화적 스트레스에 의해 IκB가 분해되면 p50/p65 heterodimer가 핵 속으로 이동하여 연속적인 DNA 결합을 초래하는 것으로 알려져 있다(29). NFκB는 또한 세포의 산화환원전위 수준에서 변화하는 세포의 초기 반응 유전자의 가능한 생리적 중요성과 기작을 연구하는 특별한 인자로 최근의 연구에서 NFκB는 세포의 산화환원전위에 의해 조절된다(30). NFκB는 세포질 속에서 p50과 p65의 heterodimer와 방해 단백질인 IκB와 함께 불활성형으로 존재하다가 활성 산소종, LPS, cytokine 같은 염증성 자극에 의해 IκB kinase가 활성화되어 IκB가 분해되면 p50과 p65의 heterodimer 형태로 활성화되어 핵으로 이동하여 염증반응을 유도하는 cytokine, iNOS와 COX-2 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(31,32). 그러므로 NFκB 활성 억제를 통해 염증성 매개물을 감소시키면 암세포의 증식 억제효과를 통한 발암효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

따라서 DGTSE이 간암세포인 HepG2 세포에서 NFκB의 down-regulation에 의해 염증생성 전사자인 TNF-α의 유전자 발현과 PGE_2 생성을 저해하는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 간암세포주인 HepG2 cell line에서 녹차씨박 추출물을 에탄올, 석유 에테르, 에틸 아세테이트, 부탄올의 순으로 분획 및 열수 추출물을 조제하여 암세포 증식 억제능을 확인한 후 에탄올 추출물을 선정하여 항종양 및 항염증효과를 생화학적, 분자적 방법으로 분석하였다. 녹차씨박 에탄올 추출물(DGTSE)의 polyphenol 함량을 HPLC로 분석한 결과 EGC(1039.1±15.26 μg/g)> tannic acid(683.5±17.61 μg/g)> EC(62.4±5.00 μg/g)> ECG(24.4±7.81 μg/g)> EGCG (20.9±0.96 μg/g)> gallic acid(2.4±0.68 μg/g)의 순이었으나 caffeic acid는 검출되지 않았다. DGTSE의 농도가 10 μg/mL 이상에서는 84.13%의 세포 증식 억제능(IC_{50}: 6.58 μg/mL)을 보여 간암세포의 증식을 효과적으로 억제하였고 제1 상효소계인 CYP1A1와 CYP1A2의 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다. QR 활성은 DGTSE을 20 μg/mL 농도로 처리 시 대조군에 비해 2.6배 증가하였으며 reporter gene activity로 측정한 ARE 활성은 1.94배로 각각 증가하였다. DGTSE의 처리는 염증생성 인자인 PGE_2의 생성과 TNF-α의 단백질 발현은 유의적으로 저해하였으며 cytokine 반응, 염증, 세포성장조절과 같은 다양한 단계에 참여하는 전사인자인 NFκB의 핵으로의 translocation을 억제하였다. 이상의 결과에서 DGTSE은 간암세포인 HepG2

세포계에서 암세포 증식 억제능을 가지며 해독효소인 QR, ARE의 활성을 증진시키고 NFκB의 translocation을 방해하고 TNF-α의 단백질 발현과 PGE_2의 생성을 억제하여 암세포의 증식을 억제하였다. 따라서 녹차씨박 추출물에 함유된 암세포 증식효과를 나타내는 생리활성 물질들에 대한 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(2009-0067086) 결과이므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Seo HS, Chung BH, Cho YG. 2008. Antioxidant and anticancer effects of Agrimony (*Agrimonia pilosa* L.) and Chinese lizardtail (*Saururus chinesis* Baill). *Korean J Medicinal Crop Sci* 16: 139-143.
2. Shon YH, Cho HJ, Chang HW, Son KH, Nam KS. 2006. Chemopreventive potential of *Salvia miltiorrhiza* fraction extracts. *J Life Sci* 16: 369-374.
3. Kim SY, Son JH, Ha HC, Lee HW, Lee JS. 2002. Chemopreventive effects of the extracts from soybean fermented with bisidiomycetes. *Kor J Mycol* 30: 124-130.
4. Moon JY. 2004. Inhibitory effect of *Lentinus edodes* aqua-acupuncture solution on the cytochrome P450 1A1 and 1A2 activities. *Korean Journal of Meridian & Acupoint* 21: 139-145.
5. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR. 2001. Possible new role for NF-κB in the resolution of inflammation. *Nat Med* 7: 1291-1297.
6. Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. 1999. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an anti-rheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-κB. *FEBS Lett* 442: 89-94.
7. Karacay B, Sanlioglu S, Griffith TS, Sandler A, Bonthius DJ. 2004. Inhibition of the NF-κB pathway enhances TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Gene Ther* 11: 681-690.
8. Nathan CF. 1987. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79: 319-326.
9. Hirohashi N, Morrison D. 1996. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect Immun* 64: 1011-1015.
10. Park JS, Rho HS, Kim DH, Chang IS. 2006. Enzyme preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 54: 2951-2956.
11. Rah HH, Baik SO, Han SB, Bock JY. 1992. Chemical compositions of the seed of Korean green tea plant (*Camellia sinecis* L.). *J Korean Agric Chem Soc* 35: 272-275.
12. Yosioka I, Nishimura T, Matsuda A, Kitagawa I. 1970. Saponin and sapogenol. II. Seeds sapogenols of *Thea sinensis* L. Theasapogenol A. *Chem Pharm Bull* 18: 1621-1632.
13. Yoon WH, Choi JH, Lee KH, Kim CH. 2005. Antimicrobial and antitumor activities of seed extracts of *Camellia sinensis* L. *Korean J Food Sci Technol* 37: 108-112.
14. Lee HB, Kim EK, Park SJ, Bang SG, Kim TG, Chung DW. 2010. Isolation and characterization of nicotiflorin obtained by enzymatic hydrolysis of two precursors in tea seed extract. *J Agric Food Chem* 58: 4808-4813.
15. Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P. 1980. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidant; possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 5216-5220.
16. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 72: 248-254.
17. Green LC, Wagner DA, Glogowski J. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15^N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138.
18. Lim HA, Jang CH, Kim JH, Kim JR, Ha YR, Song YS, Kim YK, Kim JS. 2006. Antiproliferative and anticarcinogenic enzyme-inducing activities of green tea seed extract in hepatoma cells. *Food Sci Biotechnol* 15: 914-919.
19. Zhou SF, Wang B, Yang LP, Liu JP. 2010. Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metab Rev* 42: 268-354.
20. Chatuphonprasert W, Kondo S, Jarukamjorn K, Kawasaki Y, Sakuma T, Nemoto N. 2010. Potent modification of inducible CYP1A1 expression by flavonoids. *Biol Pharm Bull* 33: 1698-1703.
21. Badal S, Williams SA, Huang G, Francis S, Vendantam P, Dunbar O, Jacobs H, Tzeng TJ, Gangemi J, Delgoda R. 2010. Cytochrome P450 1 enzyme inhibition and anticancer potential of chromene amides from *Amyris plumieri*. *Fitoterapia* 82: 230-236.
22. Lim SLJ, Singh O, Ramasamy RD, Ramasamy S, Subramanian K, Lee JDE, Chowbay B. 2010. Pharmacogenetics of CYP1A2, novel polymorphisms and haplotypes in three distinct Asian populations. *Drug Metab Pharmacokinet* 25: 616-623.
23. LaDuca JR, Gaspari AA. 2001. Targeting tumour necrosis factor alpha: New drugs used to modulate inflammatory diseases. *Demratologic Clinics* 19: 617-635.
24. Kim EH, Rhee DK. 2009. Anti-oxidative properties of ginseng. *J Ginseng Res* 33: 1-7.
25. Seals DF, Courtneidge SA. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17: 7-30.
26. Funk CD. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875.
27. Bar-Shai M, Carmeli E, Ljubuncic P, Reznick AZ. 2008. Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF-kappaB activation. *Free Radic Biol Med* 44: 202-214.
28. Grimm S, Baeuerle PA. 1993. The inducible transcription factor NFκB: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 290: 297-308.
29. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I. 1993. Rapid proteolysis of IκB-α is necessary for activation of transcription factor NFκB. *Nature* 365: 182-185.
30. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. 1991. Dysregulation of *in vitro* cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88: 1747-1754.
31. Baeuerle P, Henkel T. 1994. Function and activation of NFκ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141-179.
32. Allenm R, Tresini M. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28: 463-499.

(2011년 2월 23일 접수; 2011년 3월 16일 채택)