

## 유방암 세포(EMT6) 이식 마우스에서 녹차폴리페놀 음용이 시스플라틴의 암 조직 성장 억제에 미치는 영향

이병래<sup>1</sup> · 조정일<sup>2</sup> · 박평심<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>조선대학교 의과대학 생화학교실

<sup>2</sup>조선이공대학교 식품영양조리학과

<sup>3</sup>조선대학교 의학연구원

### Effects of Dietary Tea Polyphenol on Tumor Growth Inhibition by Cisplatin in EMT6 Breast Tumor-bearing Mice

Byoung-Rai Lee<sup>1</sup>, Jung-Il Cho<sup>2</sup>, and Pyoung-Sim Park<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biochemistry, College of Medicine and <sup>3</sup>Institute of Medical Science,  
Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food Nutrient and Culinary, Chosun College of Science & Technology, Gwangju 501-744, Korea

**ABSTRACT** The aim of this study is to evaluate the effects of green tea polyphenol (GTP) on anticancer treatment with cisplatin (CP), using both an *in vitro* cell culture model and an *in vivo* mouse model of established breast tumor. Mouse breast cancer cells (EMT6) were treated with or without GTP and CP followed by determination of the cell viability using an MTT assay. The relative cell viability of CP treated EMT6 cells was 96% at a 20 µg/mL concentration of cisplatin; however, in combination with GTP (50 µg/mL), the cell viability decreased to 20% at the same concentration of CP (20 µg/mL). For the *in vivo* study, EMT6 cells were inoculated into Balb/c mice for the establishment of a tumor-bearing mice model. The tumor-bearing mice were treated with CP (5 mg/kg. i.p.) with or without dietary GTP (0.2% drinking water). Tumor growth was monitored by a measurement of tumor size using a digital caliper, and nephrotoxicity was determined by enzymatic and histological examinations. The levels of p53 and caspase-3 in tumor tissues were examined by a Western blot. In tumor-bearing mice treated with GTP plus CP, the increment of tumor volume showed a significant reduction, compared with CP or GTP alone. The levels of p53 and cleaved caspase-3 (caspase-3/p17) in tumor tissues of tumor-bearing mice were increased by CP and GTP compared to CP alone. In CP treated tumor-bearing mice, γ-glutamyltranspeptidase (GGT) and alkaline phosphatase (AP) activities were decreased, and marked tubular necrosis and dilatation were observed in the kidney. CP-induced enzymatic and histopathological changes in the kidney of tumor-bearing mice were reduced by combinations of GTP with CP. The results of these experiments demonstrated that dietary GTP has a potentiating effect on CP anti-tumor activity and a protective effect against CP-induced renal dysfunction. Therefore, GTP may be used as a modulator in anticancer treatment with CP.

**Key words:** green tea, cisplatin, EMT6 cells, breast cancer

## 서 론

항암화학요법은 암의 종류나 병기에 관계없이 시행할 수 있기 때문에 매우 유용한 암치료방법으로 이용되고 있으나 (1), 화학요법에 대한 내성 암세포의 출현과 독성 부작용은 화학요법 시행을 제한하는 큰 장애물로 알려졌다(2,3). 암세포에 대한 항암제 내성을 극복하기 위해 항암제의 용량을 증가시키는 고용량화학요법이나 항암제 몇 가지 종류를 병합하여 투여하는 방법 등이 시행되고 있으나(4,5), 고용량

화학요법은 항암효과는 증가되나 독성 부작용도 함께 증가 되기 때문에 일반적인 암 치료 방법으로 이용하기는 제한이 있다(6). 화학요법제의 항암작용을 증가시키거나 항암제의 독성 부작용을 감소시킬 수 있는 화학요법 보조제 개발은 항암화학요법제 개발 분야에서 대단히 중요한 과제로서 천연물을 이용하는 연구가 많이 이루어지고 있다(7).

녹차(*Camellia sinensis* L.)는 음료로서 널리 이용되고 있는데, 녹차에 함유된 기능성 물질이 건강증진에 도움을 주고 암 발생이나 치료에도 효과적이라는 연구결과가 발표되어 있다(8). 녹차에 함유된 폴리페놀류는 발암물질에 직접 작용하거나 세포에 작용하여 발암물질의 작용을 억제하여 암의 발생을 예방하며 암세포에 작용하여 세포사를 유도하

Received 4 September 2013; Accepted 25 November 2013

\*Corresponding author.

E-mail: halito@hanmail.net, Phone: +82-62-230-6292

는 기능이 있는 것으로 알려졌다(8,9). 녹차폴리페놀이 항암제의 작용을 증강시킨다는 연구 보고도 있는데, 사람 자궁암 세포에서 녹차폴리페놀이 시스플라틴(cisplatin: cis-diaminedichloroplatinum II)에 의한 세포 독성을 증가시키는 작용이 있으며(10), 마우스 유방암세포에서 녹차폴리페놀(-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)가 taxol의 세포 독성을 증강시키는 작용이 있는 것으로 보고되고 있다(11).

플라티늄(platinum)계 화학요법제인 시스플라틴은 1970년대에 항암화학요법제로 개발되어 암 치료분야에서 화학요법 시행의 중요한 역할을 한 제제로서(12), DNA 사슬사이에서 교차반응(interstrand cross linking)을 일으킴으로써 항암작용을 나타내며 광범위 항암화학요법제로서 여러 가지 고형암 치료에 이용되고 있다(13). 플라티늄계 제제인 시스플라틴은 치료효과가 높으며 경제적이기 때문에 암 치료를 위한 화학요법제로 우선적으로 이용되고 있으나 신장독성, 청신경독성 및 골수억제 등 여러 가지 독성 부작용은 이의 사용을 제한하는 요인으로 작용하고 있다(14). 유방암은 여성에서 호발하는 암으로 수술요법과 항암화학요법으로 치료하고 있는데, 플라티늄계 제제가 유방암의 항암화학요법제로 이용되고 있다(15). 유방암에 대한 역학적 조사 연구에서 녹차의 음용이 유방암의 발생을 억제하며, 유방암 환자에서 병의 예후를 호전시킨다고 하였다(16). 또한 사람 유방암 세포주를 이용한 연구에서 시스플라틴과 녹차폴리페놀을 병합하면 암세포 성장이 억제된다고 하여(17) 녹차가 유방암의 예방과 치료에 이용될 수 있을 것으로 기대되나 아직까지 *in vivo* 실험은 많지 않다.

본 연구는 항암화학요법제의 항암작용을 증강시키거나 독성 부작용을 감소시킬 수 있는 항암치료 보조제의 개발에 관한 실험의 일환으로 유방암 세포(EMT6)를 이용한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 시스플라틴 항암효과 및 신장독성에 미치는 녹차폴리페놀의 영향을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

본 실험에서 사용한 유방암 세포(EMT6 cell)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구매하여 실험에 사용하였다. 마우스 유방암 세포는 15% fetal bovine serum(FBS), 스트렙토마이신(100 U/mL) 및 페니실린(100 U/mL)을 함유한 Wymouth's 배지(Gibco BRL, Brooklyn, NY, USA)를 사용하였으며, 37°C로 유지되는 CO<sub>2</sub> 배양기에서 세포를 배양하였다.

### 세포생존율 측정

실험에 사용한 시스플라틴(cisplatin: CP)과 녹차폴리페놀(green tea polyphenol: GTP, polyphenon 60)은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였고, 녹차폴리페놀은 phosphate buffered saline(PBS)에 용

해시켜 주사기용 필터(syringe filter 0.22 μm, Millipore, Billerica, MA, USA)를 통과시킨 후 배양액에 첨가하였으며, 시스플라틴은 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해시킨 후 PBS에 희석시켜 배양액에 첨가하였다.

실험군은 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)과 시스플라틴군(CP)으로 나누어 실시하였다. 세포배양 용기(96 well plate)의 각 웰(well)에 유방암세포 2×10<sup>4</sup>개씩을 넣어 24시간 동안 배양한 후 시스플라틴(0, 10, 15, 20, 25, 30, 35 및 40 μg/mL)과 녹차폴리페놀(50 μg/mL)을 배양액에 첨가하고 24시간 후 세포생존율을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)법으로 측정하였다(18). 즉 세포 배양액에 MTT(최종농도: 1 mM)를 첨가하여 4시간 경과 후 배양액을 제거하고 Hank's balanced salt solution으로 3회 세척한 후 DMSO 200 μL를 첨가하여 ELISA plate reader(TECAN, Männedorf, Switzerland)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 각 실험군마다 3 wells의 흡광도를 각각 측정하여 평균값을 계산하였고 3회 반복 실험을 실시하였으며, 세포생존율은 측정된 흡광도를 다음 식에 의해서 계산하여 비교세포생존율로 표시하였다.

$$\text{비교세포생존율 (relative vitality)} = \frac{\text{실험군 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}} \times 100$$

### 실험동물 및 실험군

실험동물은 Balb/c 마우스(6주령)로 샘타코(Samtako, Daejeon, Korea)에서 구매하여 12시간 명암주기, 온도 20±2°C로 유지하고 상대습도 60±5%의 환경에서 사육하였다.

유방암의 유도는 마우스 등에 배양한 마우스 유방암 세포(EMT6: 2×10<sup>5</sup> cells)를 피하주사한 후 사육하여 육안으로 암 조직이 발생하는 것을 관찰하여 확인하였고 암 조직의 크기는 디지털 캘리퍼(digital calliper)를 이용해 측정하여 다음 식에 의해서 크기를 계산하였다.

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = (\text{width}^2 \times \text{length}) / 2$$

실험군은 암 조직의 크기가 250~400 mm<sup>3</sup> 된 마우스를 각각 5마리씩 대조군(CON), 녹차폴리페놀군(GTP), 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP) 및 시스플라틴군(CP)으로 나누었다(Table 1). 대조군(CON)과 녹차폴리페놀군(GTP)에는 인산염 용액 0.2 mL를 3일 간격으로 3회 복강주사 하였고, 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)과 시스플라틴군(CP)은 시스플라틴(5 mg/kg)을 3일 간격으로 3회 복강주사 하였다. 녹차폴리페놀군(GTP)과 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)에 실험 시작일부터 식수로 녹차폴리페놀(0.2%)을 공급하였고, 암 조직의 크기를 디지털 캘리퍼로 측정하였다.

**Table 1.** Experimental design

Groups <sup>1)</sup>	Treatment <sup>2)</sup>	
	IP injection (0.2 mL)	Drinking water
CON	PBS	Tap water
GTP	PBS	0.2% GTP
CP + GTP	CP (5 mg/kg)	0.2% GTP
CP	CP (5 mg/kg)	Tap water

<sup>1)</sup>CON, IP injection of PBS and tap water; GTP, IP injection of PBS and GTP in drinking water; GTP+CP, IP injection of CP and GTP in drinking water; CP, IP injection of CP and tap water.

<sup>2)</sup>GTP: green tea polyphenol, CP: cisplatin, IP injection: intra-peritoneal injection, PBS: phosphate buffered saline.

**Western blot assay**

실험동물은 시스플라틴 최종 투여 4일째에 에테르로 마취시켜 암 조직과 신장을 적출하였다. 암 조직은 완충액(RIPA buffer, Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하여 균질화 시키고 14,000×g로 3분 동안 원심분리 시킨 후 상층액을 취하여 SDS-loading buffer(50 mM Tris-HCl; pH 6.8, 2% SDS, 0.1% bromphenol blue, 10% glycerol)를 첨가하여 95°C에서 5분 동안 가열한 후 시료(단백질 60 mg)를 취해서 전기영동을 시행하였다. 전기영동은 10% SDS-PAGE를 시행하였고 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 electro-blot 법으로 이동시켰다. 일차 항체로서 anti-rabbit polyclonal anti-p53 Ab, anti-caspase-3 Ab 및 anti-β-actin Ab(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)를 사용하였고, 이차 항체로는 horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology)를 이용하였으며, enhanced chemiluminescence 용액(Amersham, London, UK)을 이용하여 반응시켜 X-ray 필름에 감광시킨 후 나타난 band를 image analyzer(1D version 2.1, Pharmacia biotech, London, UK)로 분석하였다.

**효소활성 측정**

실험동물은 시스플라틴 최종 투여 4일째에 에테르로 마취시켜 신장을 적출하였다. 적출된 신장의 일부는 효소활성 측정을 위한 시료로 이용하고 일부는 조직병리 검사를 위한 시료로 이용하였다. 신장조직 약 0.1 g에 10배(w/v)의 0.1 M 인산염 완충액(pH 7.4)을 첨가하여 균질화 시킨 후 alkaline phosphatase(AP)와 γ-glutamyl transpeptidase(GGT) 측정을 위한 시료로 이용하였다. AP는 Tenenhouse 등(19)의 방법에 따라 p-nitrophenyl phosphate로부터 생성되는 p-nitrophenol 양을 정량하는 방법으로 측정하였고, GGT는 Tate와 Meister(20)의 방법으로 γ-glutamyl-nitroanilide로부터 생성되는 p-nitroanilide 양을 정량하는 방법에 따라 측정하였으며, 단백질은 Sigma-Aldrich Co.의 단백질 정량 kit(total protein kit)를 이용하여 측정하였다. 효소의 활성은 μM/mg protein/hour로 표시하였다.

**조직병리 검사**

실험동물에서 적출한 신장조직 일부를 즉시 10% 포르말린 용액에 충분히 고정된 후 탈수과정을 거쳐서 파라핀 포매한 후 조직을 4 μm 절편을 만들어 hematoxylin과 eosin(H&E) 염색하여 광학현미경으로 200배 확대하여 관찰하였다. 신세뇨관 손상은 세뇨관 괴사(tubular necrosis)와 세뇨관 확장(tubular dilatation)을 다음과 같은 기준으로 평가하여 계산하였다. 0: 손상 없다, 1: 10% 이하 손상, 2: 10~25% 손상, 3: 25~50% 손상, 4: 50~75% 손상, 5: 75% 이상 손상.

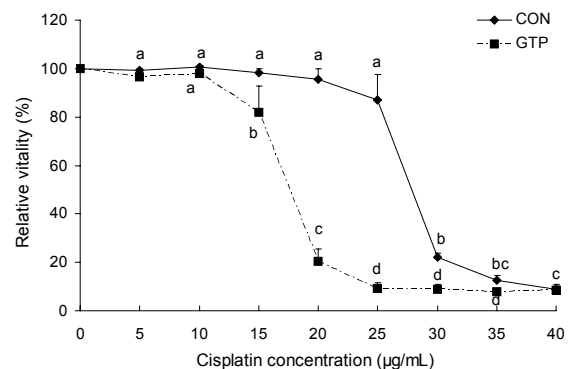
**통계처리**

본 연구의 실험 결과들은 평균±표준편차로 표시하였고, 실험 결과는 SPSS(statistical package for social sciences, version 12.0, Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 one-way ANOVA test로 분석하였고, 시료 간 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해서 P<0.05 수준에서 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**녹차폴리페놀과 시스플라틴이 EMT6 세포생존율에 미치는 영향**

마우스 유방암 세포(EMT6) 생존율에 미치는 녹차폴리페놀과 시스플라틴의 영향은 Fig. 1과 같다. EMT6 세포생존율은 시스플라틴 농도 30 μg/mL에서 대조군의 22%로 감소되었고, 시스플라틴 농도 35 μg/mL에서 대조군의 12%로 감소되어 EMT6 세포에 대한 시스플라틴의 세포 독성은 시스플라틴 30 μg/mL 이상의 농도에서 나타남을 알 수 있었다. 녹차폴리페놀 50 μg/mL를 첨가한 실험군에서는 시스플라틴 농도 15 μg/mL에서 흡광도가 감소되기 시작하였고



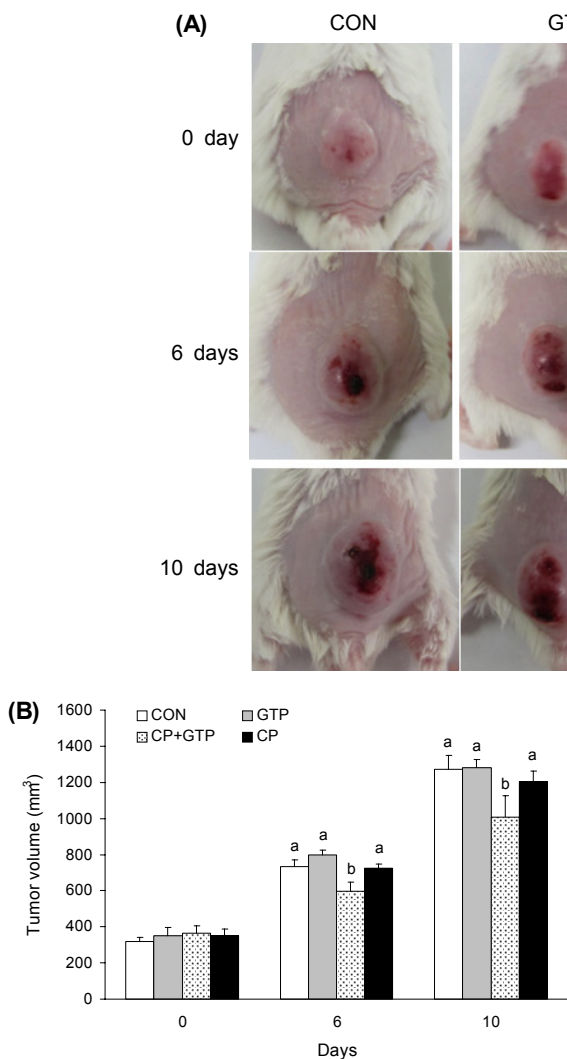
**Fig. 1.** Effects of GTP on cisplatin-induced cytotoxicity of mouse breast cancer cell (EMT6). EMT6 cells were treated cisplatin (0~40 μM) and GTP (50 μg/mL) for 24 hours and cell viability examined by MTT assay. Relative vitality (RV)=(ODExp/ODCon)×100%, which is an indication of EMT6 cell viability. Representative results are shown as the mean±SD of triplicates. Values with same superscripts are not significantly different (P<0.05).

시스플라틴 농도 20 µg/mL에서는 대조군의 20%로 급격히 감소되어, 녹차폴리페놀 첨가로 시스플라틴의 EMT6 세포에 대한 독성이 증가됨을 알 수 있었다. Nessa 등(21)은 사람 난소암 세포(A2780)에서 폴리페놀 종류인 resveratrol이 시스플라틴의 세포 독성을 증가시킨다고 하였고, Chan 등(22)은 난소암 세포를 이용한 실험에서 EGCG가 시스플라틴의 세포 독성을 증가시킨다고 하였으며, Periasamy와 Alshatwi(23)는 사람 유방암 세포(MCF-7)에서 녹차폴리페놀이 시스플라틴의 세포 독성을 증가시킨다고 하였다. 본 실험의 EMT6 세포배양 실험에서 녹차폴리페놀 첨가로 시스플라틴의 세포 독성이 증가되어 Chan 등(22)이나 Periasamy와 Alshatwi(23)의 실험 결과와 유사하였으며, 이는 녹차폴리페놀이 시스플라틴의 항암작용을 *in vitro*에서 증강시키는 작용이 있는 것으로 추측된다. 식물에 함유된 폴리페놀류는 flavonols, flavonoids, flavonols 및 phenolic acids 등이 있는데, 녹차에 함유되어 있는 카테킨은 flavanols류에 해당되며, (-)-epicatechin(EC), (-)-epicatechin-3-gallate(ECG), (-)-epigallocatechin(EGC),

(-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등 여러 가지 종류가 있는데(24), 본 실험에 사용한 polyphenon은 EGCG, ECG, EGC 및 EC 등이 혼합되어 있는 카테킨 복합물이다.

**시스플라틴 및 녹차폴리페놀이 마우스에 이식된 유방암 조직 성장에 미치는 영향**

녹차폴리페놀과 시스플라틴이 마우스에 이식된 유방암 조직의 성장에 미치는 실험 결과는 Fig. 2와 같다. 실험 시작 시점에 비교하여 종양크기는 대조군(CON)이 6일 2.2배, 10일 3.9배, 녹차폴리페놀군(GTP)은 6일, 10일에 각각 2.2배, 3.6배, 시스플라틴군(CP)은 6일, 10일에 각각 2.0배, 3.4배로 증가되어, 대조군(CON)과 녹차폴리페놀군(GTP) 및 시스플라틴군(CP) 사이에 시간 경과에 따른 종양크기의 유의한 차이가 나타나지 않았다. 반면에 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)의 종양크기 증가는 6일에 1.6배, 10일에 2.7배로 증가되어 10일 경과 시 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)의 종양크기는 대조군(CON)의 79%, 시스플라틴군(CP)의 83%로 대조군(CON)이나 시스플라틴군(CP)



**Fig. 2.** Effects of GTP and CP on tumor growth of tumor bearing mice. (A) Photography of GTP and CP treated tumor bearing mice. (B) Tumor volume of GTP and CP treated tumor bearing mice. Breast tumor bearing mice were treated CP (5 mg/kg) with intra-peritoneal injection at every 3 days for 3 times. 0.2% GTP solution were given as the only source of drinking water. Tumors size was measured by digital caliper and tumor volume calculated using the following formula; Tumor volume (mm<sup>3</sup>)=[(width)<sup>2</sup>×length]/2. Values are mean ±SD, n=5. Values with different superscripts in a same day are significantly different (P<0.05).

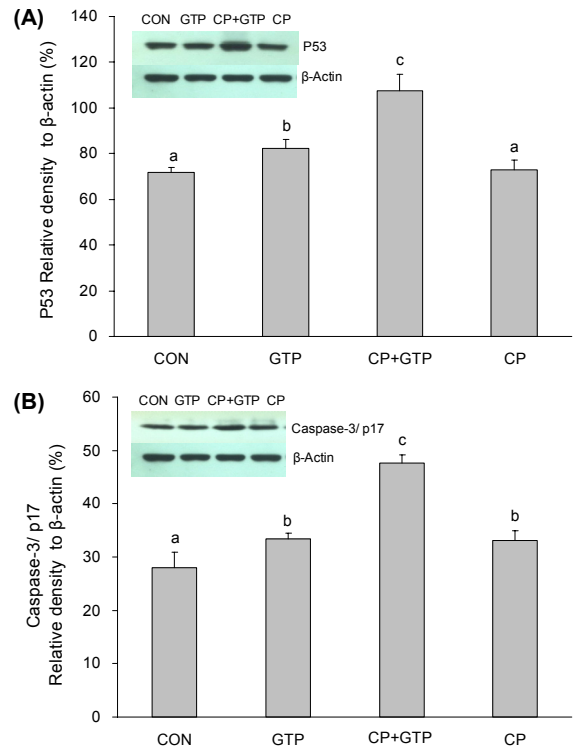
에 비하여 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)의 종양 크기가 유의하게 작았다. Thangapazham 등(17)은 유방암 세포주(MDA-MB231)를 nude mouse에 주사하여 실시한 실험에서 녹차폴리페놀이나 EGCG가 암 조직의 성장을 억제한다고 하였는데, 본 실험에서 녹차폴리페놀군(GTP)의 종양크기는 대조군(CON)과 차이를 나타내지 않아서 이들의 결과와 다르게 나타났는데, 이들의 실험에서 투여한 녹차폴리페놀의 농도는 본 실험의 녹차폴리페놀 농도 0.2%보다 5배 높은 1.0%를 투여하여 나타난 결과로서 폴리페놀 농도 차이 때문에 초래된 결과로 추측된다. 또한 시스플라틴과 녹차폴리페놀을 병합 투여할 경우 시스플라틴 단독 투여군보다 종양크기가 작아서 녹차폴리페놀 투여 농도 0.2%에서 시스플라틴의 항암작용을 증강시키는 효과가 있는 것으로 생각된다.

Luo 등(11)이 마우스 유방암 세포(4T1)를 이용한 *in vivo* 실험에서 EGCG와 paclitaxel을 병합 투여하면 암 조직의 성장을 억제하는 데 상승효과가 있다고 한 실험 결과와 본 실험 결과는 유사하였다. EMT6 세포는 Balb/c 마우스 유래의 유방암 세포주로서 피하에 주사하여 종양을 유도한 후 *in vivo* 실험에 이용되고 있는데(25), 이번 실험에서 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)의 종양크기가 시스플라틴군(CP)이나 녹차폴리페놀군(GTP)에 비하여 작은 것은 녹차폴리페놀이 시스플라틴의 항암작용을 상승시켜 나타난 결과로 추측된다.

녹차폴리페놀은 *in vitro* 실험에서 시스플라틴의 암세포 독성을 증가시켰고, 마우스에 고형암을 유발하여 실시한 *in vivo* 실험에서도 시스플라틴의 암 성장 억제작용을 상승시켜서, 녹차폴리페놀이 시스플라틴의 항암작용 증강을 유도하는 것으로 추측된다. 항암화학요법의 시행에서 항암작용 증강이나 부작용 감소는 매우 중요한 요소이기 때문에 녹차폴리페놀의 이러한 효과는 시스플라틴 항암요법의 유용한 치료보조제로서 이용 가능성을 보여주며 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

**시스플라틴 및 녹차폴리페놀이 마우스에 이식된 유방암 조직의 p53 및 caspase-3에 미치는 영향**

녹차폴리페놀과 시스플라틴이 마우스에 이식된 유방암 조직의 p53과 caspase-3에 미치는 실험 결과는 Fig. 3과 같다. 종양조직 내 p53과  $\beta$ -actin을 western blot 하여 band의 밀도를 측정하여 p53/ $\beta$ -actin 비율을 %로 환산한 결과 대조군(CON) 71%, 녹차폴리페놀군(GTP) 82%, 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP) 107%, 시스플라틴군(CP) 73%로 나타나서, 대조군(CON)과 시스플라틴군(CP) 사이에 유의한 차이가 나타나지 않았고 녹차폴리페놀군(GTP)과 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)은 종양조직 내 p53이 증가됨을 보여주고 있는데, 특히 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)은 대조군(CON)보다 150% 정도 증가되어 실험군 중에서 p53 증가가 가장 높았다.



**Fig. 3.** Effects of GTP and CP on p53 and caspase-3 levels in tumor tissue of tumor bearing mice. (A) p53, (B) Cleaved caspase-3 (caspase-3/p17). Breast tumor bearing mice were treated CP (5 mg/kg) with intra-peritoneal injection at every 3 days for 3 times. 0.2% GTP solution were given as the only source of drinking water. The levels of p53 and caspase-3/p17 in tumor tissue were determined by western blot and the intensity of the bands was quantified by densitometric analysis. The bar represents the standard error of the mean (n=5). Values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

종양조직 내 caspase-3과  $\beta$ -actin을 western blot 하여 band의 밀도를 측정하여 p53/ $\beta$ -actin/p17 비율을 %로 환산한 결과 대조군(CON) 28%, 녹차폴리페놀군(GTP) 33%, 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP) 47%, 시스플라틴군(CP) 33%로 나타나서 대조군(CON)과 녹차폴리페놀군(GTP) 및 시스플라틴군(CP) 사이에 유의한 차이가 나타나지 않았고, 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)은 종양조직 내 caspase-3/p17은 대조군(CON)보다 167%, 시스플라틴군(CP)보다 142% 정도 증가되었다.

Fraser 등(26)은 난소암 세포에서 p53이 증가되면 caspase가 활성화되고 apoptosis가 유발된다고 하였는데, 세포 내 비활성화 상태의 caspase-3은 분해되어 효소활성을 갖게 되므로 caspase-3의 활성화는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려졌다(26,27). Singh 등(28)은 사람의 자궁암 세포를 배양하여 실시한 *in vitro* 실험에서 시스플라틴과 녹차폴리페놀이 p53과 caspase-3의 활성화를 증가시켜서 apoptosis를 유발한다고 하였는데, 본 실험에서도 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)의 종양조직 내 p53과 caspase-3의 활성화 형태인 caspase-3/p17

**Table 2.** GGT and AP activities of kidney in cisplatin and GTP treated mice

Groups	GGT	AP
CON	43.16±2.56 <sup>a</sup>	15.42±1.13 <sup>a</sup>
GTP	44.40±4.86 <sup>a</sup>	14.84±1.93 <sup>a</sup>
CP+GTP	38.30±4.36 <sup>b</sup>	11.56±1.15 <sup>b</sup>
CP	32.12±4.13 <sup>c</sup>	9.85±1.05 <sup>c</sup>

Enzyme activities are expressed  $\mu\text{M}/\text{mg}$  protein/hour. Values are mean±SD (n=5).

Different superscripts within a same column are significantly different at the  $P<0.01$  by Duncan's multiple range test.

GGT:  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, AP: alkaline phosphatase.

이 증가된 것으로 나타나서 암 조직 내 세포의 apoptosis가 증가된 것으로 추측되며 이는 암 조직의 크기 증가 억제와 밀접한 연관이 있을 것으로 생각된다.

#### 시스플라틴 및 녹차폴리페놀 투여 마우스의 신장 독성 변화

유방암 세포(EMT6) 이식 마우스에 시스플라틴과 녹차폴리페놀을 투여하고 10일 경과 후 신장 GGT와 AP 활성을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 신장 GGT와 AP 활성은 정상 대조군(CON)과 녹차폴리페놀군(GTP) 간에 효소활성도 차이가 없었다. 반면에 시스플라틴군(CP)의 신장 GGT 활성도는 대조군(CON)에 비하여 25%, AP 활성은 36%가 낮게 나타나서 시스플라틴 투여로 신장의 효소활성도가 감소되어 신장 세포 손상이 있음을 보여주고 있다. 시스플라틴 + 녹차폴리페놀군(CP+GTP)의 신장 GGT와 AP 활성은 시스플라틴군(CP)보다 각각 19% 및 17%가 높았다. 신장에서 GGT와 AP는 세뇨관의 솔가장자리막(brush border membrane)에 많이 존재하는 효소로서, Khan 등(28)은 신장 GGT와 AP 활성이 시스플라틴 투여로 감소되었으나 시스플라틴과 녹차 추출물 병합 투여로 효소활성의 감소가 없었다고 하였고, Fatima 등(29)은 시스플라틴 주사로 감소된 신

**Table 3.** The score of tubular injury under microscopic findings of kidney in cisplatin and GTP treated mice

Groups	Tubular necrosis	Tubular dilatation
CON	0.11±0.33 <sup>a</sup>	0.11±0.33 <sup>a</sup>
GTP	0.11±0.33 <sup>a</sup>	0.11±0.33 <sup>a</sup>
CP+GTP	2.22±0.44 <sup>c</sup>	2.33±0.50 <sup>c</sup>
CP	3.11±0.60 <sup>b</sup>	3.44±0.52 <sup>b</sup>

The kidney sections were stained with haematoxylin and eosin. Sections were evaluated using microscope at an original magnification of  $200\times$ .

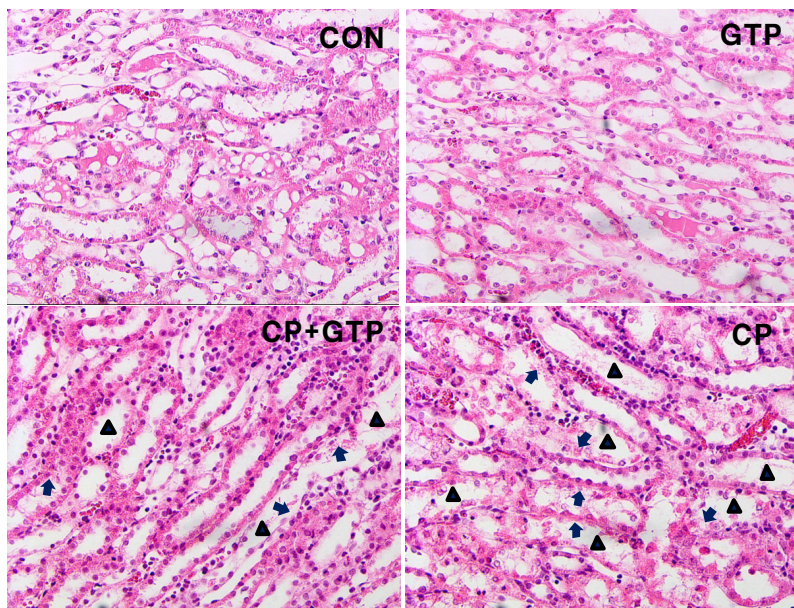
Tubular injury were evaluated by the following scoring system: 0=no tubular injury; 1= $\leq 10\%$  of tubules injured; 2= $10\sim 25\%$  of tubules injured; 3= $26\sim 50\%$  of tubules injured; 4= $51\sim 75\%$  of tubules injured; 5= $\geq 75\%$  of tubules injured.

Values are mean±SD (n=5).

Different superscripts within a same column are significantly different at the  $P<0.01$  by Duncan's multiple range test.

장 GGT와 AP 활성이 비타민 C 투여로 효소활성의 감소가 둔화되어 신장 세뇨관 손상에 대한 방지 효과가 있다고 하였다. 본 실험의 유방암 세포(EMT6) 이식 마우스에서 시스플라틴군(CP)에 비하여 시스플라틴 + 녹차폴리페놀군(CP+GTP)의 신장 GGT와 AP 활성이 높게 나타나서 Khan 등(28)의 녹차추출물 투여로 시스플라틴에 의한 신장 GGT와 AP 활성의 감소 방지 효과가 있었다는 실험 결과와 유사하였다. 그러나 Khan 등(28)의 실험에서는 3% 녹차추출물을 투여하여 효과가 있었으나, 본 실험은 0.2% 녹차폴리페놀 투여로도 신장효소의 활성 변화에 대한 방지 효과를 나타내서 그들이 실험에 사용한 녹차추출물보다 본 실험의 녹차폴리페놀이 더 효과적인 것으로 생각된다.

시스플라틴의 신장 독성에 미치는 녹차폴리페놀의 영향을 조직학적으로 관찰한 결과는 Table 3 및 Fig. 4와 같다. 신세뇨관 확장과 괴사는 시스플라틴군(CP)에서 25~50%로 나타나서 시스플라틴 투여로 인해 신장 손상이 일어나는 것



**Fig. 4.** Histopathological analysis of kidney in the groups of mice studied: control (CON), green tea polyphenol (GTP), cisplatin+green tea polyphenol (CP+GTP), and cisplatin (CP). Mice were studied 4 days after last cisplatin injection (haematoxylin and eosin staining, magnification  $\times 200$ ).  $\uparrow$ : Tubular necrosis,  $\blacktriangle$ : Tubular dilatation.

으로 나타났고, 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)에서 신세뇨관 확장과 괴사는 10~25%로 시스플라틴군(CP)에 비하여 손상이 적게 나타남을 보여주고 있다. 신세뇨관 확장이나 괴사는 세뇨관의 손상을 알 수 있는 조직학적 소견으로, Atessahin 등(30)은 시스플라틴 투여로 신세뇨관 확장과 괴사가 증가된다고 하였고, El-Mowafy 등(31)은 Ehrlich ascites carcinoma tumor를 가진 mice에서 EGCG를 복강으로 주사하면 항암작용이 증가되고 시스플라틴에 의한 신장 손상 예방효과가 있다고 하였는데, 본 실험의 유방암 세포(EMT6) 이식 마우스에서 0.2% 녹차폴리페놀 경구투여로 유사한 결과가 나타나서 낮은 농도의 녹차폴리페놀 경구투여로도 시스플라틴에 의한 신장 손상을 방지하는 효과가 있음을 알 수 있다. 따라서 녹차폴리페놀은 시스플라틴의 항암작용 상승과 신장 독성 부작용 억제 효과를 동시에 나타낼 수 있을 것으로 추측되어 시스플라틴 항암화학요법 보조제로서 이용 가능성이 클 것으로 생각되며, 이러한 효과를 규명하여 활용하기 위해서는 많은 부가적인 연구와 임상 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 녹차폴리페놀이 시스플라틴의 항암작용과 신장 독성에 미치는 영향을 유방암 세포(EMT6)와 암세포 이식 마우스를 이용하여 *in vitro*와 *in vivo* 실험으로 관찰하였다. 배양한 EMT6 세포에서 녹차폴리페놀은 시스플라틴에 의한 세포 독성을 증가시켰다. 마우스에 EMT6 세포를 주사하여 유발된 종양의 크기가 시스플라틴군(CP)보다 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)에서 유의하게 작았고, 종양조직 p53와 caspase-3 활성화가 시스플라틴군(CP)보다 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)에서 유의하게 높았으며, 신장 GGT와 AP 활성은 시스플라틴군(CP)보다 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)에서 유의하게 낮았고, 신장 조직학적 소견에서 신세뇨관 확장과 괴사가 시스플라틴군(CP)보다 시스플라틴+녹차폴리페놀군(CP+GTP)에서 유의하게 낮았다. 이상의 결과 녹차폴리페놀은 EMT6 유방암 세포를 이용한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 시스플라틴의 항암작용을 증강시키면서 신장에 대한 독성 부작용은 감소시키는 효과가 있는 것으로 추측된다. 녹차폴리페놀의 시스플라틴 항암작용 증강과 신장 독성 억제 및 감소 효과는 시스플라틴에 의한 암 치료 시 화학요법제의 보조제로서 이용 가치가 있는 것으로 생각되며, 항암화학요법제에 대한 보조제로의 개발을 위해서는 대규모 동물실험을 통한 효과 입증 및 부작용에 대한 실험과 임상연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 논문은 2012학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받

아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Matsuyama R, Reddy S, Smith TJ. 2006. Why do patients choose chemotherapy near the end of life? A review of the perspective of those facing death from cancer. *J Clin Oncol* 24: 3490-3496.
2. Lønning PE. 2010. Molecular basis for therapy resistance. *Mol Oncol* 4: 284-300.
3. Sancho-Martinez SM, Prieto-Garcia L, Prieto M, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. 2012. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacol Ther* 136: 35-55.
4. Bartelink H, Schellens JH, Verheij M. 2002. The combined use of radiotherapy and chemotherapy in the treatment of solid tumours. *Eur J Cancer* 38: 216-222.
5. Chuthapisith S, Eremin JM, El-Sheemy M, Eremin O. 2006. Neoadjuvant chemotherapy in women with large and locally advanced breast cancer: chemoresistance and prediction of response to drug therapy. *Surgeon* 4: 211-219.
6. Vogl DT, Stadtmauer EA. 2006. High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for metastatic breast cancer: a therapy whose time has passed. *Bone Marrow Transplant* 37: 985-987.
7. Mishra BB, Tiwari VK. 2011. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem* 46: 4769-4807.
8. Yang CS, Wang X. 2010. Green tea and cancer prevention. *Nutr Cancer* 62: 931-937.
9. Gupta S, Hussain T, Mukhtar H. 2003. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cells cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys* 410: 177-185.
10. Singh M, Bhui K, Singh R, Shukla Y. 2013. Tea polyphenols enhance cisplatin chemosensitivity in cervical cancer cells via induction of apoptosis. *Life Sci* 93: 7-16.
11. Luo T, Wang J, Yin Y, Hua H, Jing J, Sun X, Li M, Zhang Y, Jiang Y. 2010. (-)-Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma. *Breast Cancer Res* 12: R8. doi: 10.1186/bcr2473.
12. Hill JM, Loeb E, MacLellan A, Hill NO, Khan A, King JJ. 1975. Clinical studies of platinum coordination compounds in the treatment of various malignant diseases. *Cancer Chemother Rep* 59: 647-659.
13. Jordan P, Carmo-Fonseca M. 2000. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 57: 1229-1235.
14. Hartmann JT, Lipp HP. 2003. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother* 4: 889-901.
15. Shamseddine AI, Farhat FS. 2011. Platinum-based compounds for the treatment of metastatic breast cancer. *Chemotherapy* 57: 468-487.
16. Shrubsole MJ, Lu W, Chen Z, Shu XO, Zheng Y, Dai Q, Cai Q, Gu K, Ruan ZX, Gao YT, Zheng W. 2009. Drinking green tea modestly reduces breast cancer risk. *J Nutr* 139: 310-316.
17. Thangapazham RL, Singh AK, Sharma A, Warren J, Gaddipati JP, Maheshwari RK. 2007. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett* 245: 232-241.
18. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. 1993. An

- improved MTT assay. *J Immunol Methods* 157: 203-207.
19. Tenenhouse HS, Scriver CR, Vizel EJ. 1980. Alkaline phosphatase activity does not mediate phosphate transport in the renal-cortical brush-border membrane. *Biochem J* 190: 473-476.
  20. Tate SS, Meister A. 1985.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase from kidney. *Methods Enzymol* 113: 400-419.
  21. Nessa MU, Beale P, Chan C, Yu JQ, Huq F. 2012. Combinations of resveratrol, cisplatin and oxaliplatin applied to human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 32: 53-59.
  22. Chan MM, Soprano KJ, Weinstein K, Fong D. 2006. Epigallocatechin-3-gallate delivers hydrogen peroxide to induce death of ovarian cancer cells and enhances their cisplatin susceptibility. *J Cell Physiol* 207: 389-396.
  23. Periasamy VS, Alshatwi AA. 2013. Tea polyphenols modulate antioxidant redox system on cisplatin-induced reactive oxygen species generation in a human breast cancer cell. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 112: 374-384.
  24. Graham HN. 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21: 334-350.
  25. Yee MS, Blakley BW, Begleiter A, Leith M. 2008. Delayed sodium thiosulphate administration reduces cisplatin efficacy on mouse EMT6 tumour cells *in vitro*. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 37: 638-641.
  26. Fraser M, Chan SL, Chan SS, Fiscus RR, Tsang BK. 2006. Regulation of p53 and suppression of apoptosis by the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway in human ovarian cancer cells. *Oncogene* 25: 2203-2212.
  27. Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H. 2003. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene* 22: 4851-4859.
  28. Khan SA, Priyamvada S, Khan W, Khan S, Farooq N, Yusufi AN. 2009. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacol Res* 60: 382-391.
  29. Fatima S, Arivarasu NA, Mahmood R. 2007. Vitamin C attenuates cisplatin-induced alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport. *Hum Exp Toxicol* 26: 419-426.
  30. Ateşşahin A, Ceribaşı AO, Yuce A, Bulmus O, Cikim G. 2007. Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 100: 121-126.
  31. El-Mowafy AM, Al-Gayyar MM, Salem HA, El-Mesery ME, Darweish MM. 2010. Novel chemotherapeutic and renal protective effects for the green tea (EGCG): role of oxidative stress and inflammatory-cytokine signaling. *Phytomedicine* 17: 1067-1075.