

녹차성분 EGCG의 CSK 단백질 조절을 통한 암예방 효과

김대용 · 최부영*

서원대학교 바이오융합학부 제약공학과

Cancer Prevention Effect of Epigallocatechin-3-gallate through Regulate in C-terminal Src Kinase (CSK) Signaling Pathway

Dae Yong Kim and Bu Young Choi*

Department of Pharmaceutical Science & Engineering, Seowon University, Cheongju, Chungbuk 361-742, Korea

Abstract – A great interest is emerging about green tea as a tool against human cancer proliferation or inflammation, as pointed out by recent reports describing the inhibitory action of epigallocatechin gallate (EGCG) on angiogenesis, urokinase, metalloproteinases, and induction of inducible nitric oxide synthase. We proposed that EGCG may regulate a multi target signaling having wider spectra of action than those actions of single enzymes. CSK (c-terminal Src kinase) protein is a non-receptor tyrosine kinase involved in the cross-talk and mediation of many signaling pathways that promote cell proliferation, adhesion, invasion, migration, and tumorigenesis. Based on the knowledge that CSK activation is important for cancer proliferation we hypothesized that CSK could be a target of EGCG. Here we showed that EGCG effectively suppressed the growth of CSK MEF cell when compare with CSK knockout MEF cell growth. These results indicate that EGCG could be used as a chemoprevention to modulate CSK signal pathway in inflammatory processes and tumor formation.

Key words – EGCG, c-Terminal Src kinase, CSK knockout MEF, Inflammation, tumor

녹차는 *Camilla sinensis*의 잎에서 생성되며 중국의 전통 의학에서는 질병의 예방을 위해 녹차를 마시는 것을 권장하고 있으며, 아시아에서는 아직도 건강한 습관으로 여겨지고 있다. 녹차에는 카테킨(catechin)을 포함한 폴리페놀 플라보노이드(polyphenol flavonoid)가 많이 함유되어 있고 소량의 카페인(caffeine), 테아닌(theanine), 테오브로민(theobromine), 테오필린(theophylline) 및 페놀산(phenolic acid) 이 포함되어 있다.

폴리페놀은 암, 퇴행성 신경 질환, 당뇨병, 심혈관 질환 등의 다양한 만성 질환 치료 효과가 있을 것으로 생각되며 최근, 다양한 폴리페놀에 대한 특정 분자 표적이 발견되었다. 따라서, 치료제로써 폴리페놀에 대한 과학적 관심이 빠르게 증가하고 있다. 그러나 많은 연구들이 폴리페놀의 효과를 세포학적, 분자적, 생리학적 메커니즘을 해명하지 않은 채 보고되는 경우가 많다. 그래서 특정 메커니즘을 정의하는 어려움에도 불구하고, 최근의 연구는 폴리페놀의 생리 활성에 대한 자세한 분자 메커니즘을 밝히는데 노력하고 있다.

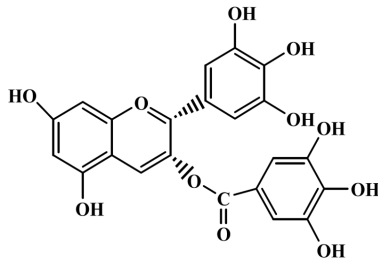
많은 폴리페놀은 암, 염증, 당뇨, 심혈관 질환 등의 병리의 넓은 범위에 대한 효과를 가지고 있다. 그러나, 각각의 폴리페놀은 다른 효능과 생체 이용률과 다양한 조직에서 서로 다른 특정 분자 표적을 가지고 있다.¹⁾

폴리페놀은 pro-oxidant와 antioxidant의 두 가지 기능을 가지는데, 이 두 기능을 활용하여 산화 스트레스(oxidative stress)를 조절하는 것으로 보고되고 있다.²⁾ 폴리페놀은 활성산소를 제거하고 지질과산화에 의한 생체의 순환기능 장애와 노화 등을 억제하는 항산화 기능을 가지고 있으므로 각종 질환의 예방과 치료에 이용된다.³⁾ 또한 산화적 DNA 손상, 비정상적 세포증식, 세포의 돌연변이, 세포간 정보전달 등을 억제하므로 인해 발암과 관련된 과정에 항암효과를 가지며 단백질과 결합하여 신체대사에 관여하는 효소활성을 변화시키거나 화학물질의 독성 제거를 위한 유전자 발현을 촉진하는 작용을 한다.^{4,6)} 특히 폴리페놀의 많은 수산기(hydroxyl group)와 병원균의 단백질 내에 존재할 수 있는 sulfhydryl group(-SH)과의 반응 또는 다른 단백질 부분과의 비결합성 상호작용에 의한 항균작용을 보인다.⁷⁾

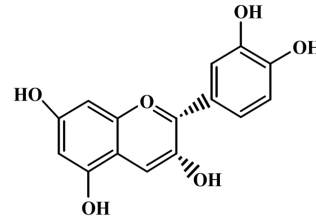
이미 알려진 폴리페놀의 강력한 항산화 및 항염증 효능

*교신저자(E-mail): bychoi@seowon.ac.kr
(Tel): +82-43-299-8411

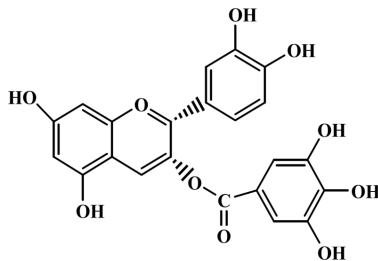
(-)- Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)



(-)- Epicatechin (EC)



(-)- Epicatechin-3-gallate (ECG)



(-)- Epigallocatechin (EGC)

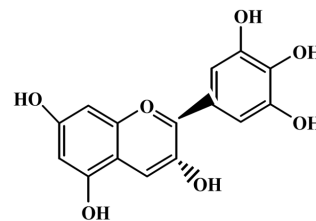


Fig. 1. The chemical structures of EGCG analogues, EGCG, EC, ECG, and EGC.

때문에 폴리페놀이 항암에 대해 효능이 있을 것으로 생각되었다. 간세포 암(hepatocellular carcinoma; HCC) 으로 알려진 간암 등의 여러 가지 치명적인 암들은 산화 스트레스와 염증의 이유로 발병된 것들인데 폴리페놀과 같은 식물성 화학 물질은 간세포 암의 예방 및 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다.⁸⁾

이들 폴리페놀 중에 Epigallocatechin 3-gallate, epigallocatechin(EGC), epicatechin gallate(ECG), epicatechin(EC) (Fig. 1) 등은 플라보 노이드계 화합물인 catechin을 다량 포함하고 있다. Epigallocatechin 3-gallate(EGCG)는 녹차의 카테킨 중에서 가장 풍부하고 효능을 지닌 성분이다. EGCG는 기능성 식품 분야에서 중요한 요소로 많은 연구가 진행되었다. EGCG는 종종 구조적인 이유 때문에 항산화제로 분류되지만 Fe(III)이 존재할 때에 EGCG를 세포에 처리하면 hydrogen peroxide와 hydroxyl radical이 생성된다는 보고가 있다. 또한 최근 연구에 의하면 EGCG가 항산화 기작과는 별도로 직접적인 역할을 한다고 알려졌다. EGCG는 plasma membrane의 단백질과 phospholipid와 직접적으로 반응하여 세포 내 신호전달을 매개하는데, EGCG는 생물학적 활성을 매개하는 세포질, 미토콘드리아, lysosome, 핵과 같은 세포 내 소기관으로 이동하여 전사인자, DNA methylation, 미토콘드리아 기능 등을 조절한다. 이런 다양한 기능은 세포의 유형, 스트레스 상황, EGCG의 농도에 따라 달라진다.¹⁾ 또한 EGCG는 가장 효율적인 항암 성분으로

알려져 있으며, 많은 연구에 이용되고 있다. EGCG 이외에도 EGC와 aflavins 등도 암 억제 활성이 보고 되고 있으며, Komori 등은 사람 폐암과 유방암 세포에서 EGCG 또는 녹차추출물 비교한 결과 폐암세포의 경우 EGCG 성분이 세포 성장억제에 더 효율적으로 유도됨을 보고하였다.⁹⁾ 그리고 EGCG가 비임상, 임상 연구에서 심혈관 질병과 관절염 치료에 효과가 있다는 연구가 보고되고 있는데 이는 류머티즘 관절염(rheumatoid arthritis)에서 혈관 염증의 치료와 예방에 EGCG가 탁월한 효과가 있음을 증명했다.¹⁰⁾

Protein tyrosine kinase는 표적단백질의 tyrosine 잔기를 인산화하는 효소로서 다양한 종류의 성장인자, peptide 호르몬, cytokine 수용체 하위의 세포 내 신호전달에 관여한다. Tyrosine kinase인 Src, Fyn, Yes는 상피 세포를 포함한 많은 세포에서 세포의 성장, 분화, 이동을 조절하는 중요한 인자들이다. Non-receptor tyrosine kinase의 일종인 c-Src는 세포막에서 발생한 ligand-receptor 상호작용 하위의 신호전달에서 중요한 역할을 하는데 이런 src family kinase는 다양한 외부신호에 의해 인산화됨으로써 활성화되고, 활성화된 src family kinase는 MAP kinase를 포함한 다양한 종류의 신호전달기구를 활성화한다. 지금까지의 보고에 의하면 src kinase는 세포생존, 세포사멸, 혈관신생뿐만 아니라 뇌 질환에 의한 vascular permeability 조절 등의 다양한 세포의 조절기능에 관여한다고 알려져 있다.¹¹⁾

C-terminal Src kinase(CSK)는 Src 또는 관련 kinase의 c-

terminal의 특정 잔기를 인산화 시킴으로써 Src kinase의 기능을 조절하는 분자이다. 이러한 Src-CSK loop를 통한 세포 내 신호전달과정은 세포의 증식과 분화, 사멸 조절에 중요한 기능을 담당한다¹¹⁾. CSK는 배아 발생 시 혈관 형성에 중요한 역할을 수행 함으로써 embryonic development에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹²⁾ 다른 연구에 의하면 CSK가 lipopolysaccharide(LPS)에 반응하여 tyrosine 잔기에 인산화를 일으킨다고 알려졌다. 특히 granulocyte에서 CSK가 LPS에 의해 유도되는 급성 염증 반응과 과민 반응에 관여한다고 밝혔다. Macrophage와 같은 세포에서도 LPS에 의해 유도되는 신호전달과 염증성 사이토카인의 분비에 CSK가 관여한다고 한다.¹³⁾

여러 선행 연구에 의하면 EGCG는 항암 효과를 가지면 CSK는 세포의 증식에 연관이 있다는 것이 확인되었다. 그러나 EGCG와 CSK의 연관 관계에 대한 연구는 드물어 보다 면밀한 연구가 앞으로 더 진행되어야 할 것으로 사료된다. 따라서 본 실험은 다양한 농도의 EGCG를 적용하여 세포의 성장 및 CSK활성에 미치는 영향을 분석 평가하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 시료 – 모든 배지는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)의 권장 배지를 사용하였고, fetal bovine serum(FBS) 시약은 Gemini Bio-Products (Calabasas, CA, USA)로 부터 구입하였다.

CNBr-Sepharose 4B, glutathione-Sepharose 4B, [γ -³²P]ATP는 Amersham Biosciences에서 구입하여사용하였다.

[³H]EGCG(13Ci/mmol in ethanol containing 8 mg/ml ascorbic acid)는 Dr. Yukihiko Hara(Food Research Laboratory, Mitsui Norin Co. Ltd., Fujieda, Shizuoka, Japan)로 부터 제공받아 사용하였다. 재조합 CSK와 poly-(Glu4-Tyr) peptide는 Upstate Biotechnology, Inc.(Charlottesville, VA)로 부터 구입하였다. ATP immobilized agarose 4B는 Fluka(St. Louis)에서 구입하여 사용하였다. EGCG, EC, ECG, EGC는 Dr. Chi-Tang Ho(Rutgers University, Piscataway, NJ)로부터 제공받아 사용하였다.

세포배양 – Jurkat(clone E6-1) human T cell leukemia 세포와 CSK+/+와 CSK-/- MEF 세포는 Dr. Zigang Dong (Cellular & molecular biology, Hormel institute, Austin, MN, USA)로 부터 제공받아 사용하였다. Jurkat와 CSK knockout MEF 세포는 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.

결합력 및 K_d 측정 – GST-CSK의 결합력을 측정하기 위하여 GST fusion 단백질을 glutathione-Sepharose 4B beads와 한 시간 동안 상온에서 반응시켜 immobilization 하였다. 결

합력 측정은 4°C에서 reaction buffer가 포함된 500- μ l reaction mixture와 1 μ g의 GST-CSK-Sepharose 4B 또는 GST-Sepharose 4B와 0.5 μ Ci의 [³H]EGCG를 반응시켰다. 농도 의존적 분석을 위해서 EGCG 농도를 3 pM에서 50 μ M 까지 사용하였다. K_d 측정은 Prism 4.0 program(Graphpad Inc., San Diego, CA)을 사용하여 nonlinear regression 분석을 이용하였다.

EGCG-Sepharose 4B와 L-[³⁵S] Methionine-labeled CSK단백질 Pulldown Assays – Full-length CSK유전자(pcDNA4/HIS/Max-CSK)를 TNT Quick Coupled Transcription/Translation System(Promega) 이용하여 L-[³⁵S] methionine과 함께 *in vitro* translation 시켜서 라벨을 만들었다. ³⁵S-label CSK 단백질을 reaction buffer(50 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.01% Nonidet P-40, 2 μ g/ml bovine serum albumin, 0.02 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 \times protease inhibitor)에서 EGCG-Sepharose 4B beads와 반응시켰다. Bead는 완충용액(50 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.01% Nonidet P-40, 0.02 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)으로 5번 세척한 후 bead와 결합한 단백질을 autoradiography 또는 immunoblotting으로 분석하였다.

Kinase Assay – CSK kinase assay는 30°C에서 2시간 동안 25 μ l reaction mixture(50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM MnCl₂, 1 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 0.01% Brij), 0.2 μ g의 재조합 CSK, 1 μ g의 kinase substrate(poly(Glu4-Tyr) peptide, biotin conjugate) Upstate Biotechnology, Inc.(Charlottesville, VA)와 1 μ g의 unactive LCK 단백질 (millipore, MA, USA) 그리고 EGCG(0.5-20 μ M), 100 μ M ATP, 1 μ Ci의 [γ -³²P]ATP를 반응시켰다. ECG, EGC, EC는 10 μ M로 처리하였다. 반응 종결 후 scintillation counter를 이용하여 결과를 분석하였다. LCK 단백질의 인산화를 확인하기 위해 anti-phospho-LCK(Tyr505) 항체(millipore, MA, USA)를 이용하였다.

세포 성장 측정 – 세포(6 \times 10⁵)를 96-well plate에 24시간 동안 배양한 후 각각의 EGCG 농도(0, 0.5, 1, 5, 10, or 20 μ M)에서 72시간 동안 배양하였다. EGCG의 세포 성장 억제 효과를 측정하기 위하여 the Cell-Titer 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay kit(MTS)(Promega, Madison, WI)를 이용하였다. 시약을 각 well에 첨가하여 흡광도를 492 nm 파장에서 96-well plate reader(Labsystem Multiskan MS, Labsystem, Finland)로 결과를 측정하였다. CSK+/+와 CSK-/-세포에서의 20 μ M EGCG 처리후 성장률을 3주간 관찰하였다. 본 실험은 focus-forming 방법에 의해 수행하였으며 약 3주후 세포 콜로니를 methanol에 고정 후 0.4% crystal violet으로 염색 후 관찰 하였다

결 과

EGCG와 CSK 결합 능력 - CSK는 Src-family kinase의 활성을 촉진하며 다양한 암세포에서 활성화 되었다.¹⁴⁾ Kinase screening 실험을 통하여 EGCG 5 μM에 의해서 CSK가 억제됨을 확인하였다. 그래서 우리는 EGCG와 CSK가 서로 상호작용을 할 것으로 예상하고 실험을 진행하였다. 우선 EGCG와 CSK의 결합 능력을(binding affinity; K_d) GST pull-down assay와 ³H-labeled EGCG를 이용하여 확인하였다. EGCG와 CSK의 결합 K_d 값은 0.05 ± 0.04 으로 측정되었다(Fig. 2A). 그 다음으로 EGCG와 CSK의 결합을 EGCG-Sepharose 4B affinity chromatography 실험을 통하여 확인

하였다. 그 결과 EGCG와 CSK는 complex를 이루는 것이 확인되었다(Fig. 2B).

또한 EGCG와 CSK 사이의 결합에 대한 구조적 관계를 좀 더 확실하게 파악하고자 우리는 CSK의 x-ray co-crystal 구조를 활용하여 EGCG의 결합 부위를 확인하였다(Fig. 2C).

CSK Kinase 활성에 대한 EGCG의 효과 - 다음으로 우리는 EGCG가 CSK의 인산화 또는 kinase 활성을 억제 할 수 있는지 확인하였다. Kinase 활성은 활성 CSK와 기질인 poly(Glu⁴-Tyr)펩타이드를 이용한 *in vitro* kinase assay를 통하여 측정하였다. 그 결과, EGCG는 농도의존적으로 CSK kinase 활성을 억제하였으며, 4 μM의 농도에서 50% 활성억제(IC₅₀)를 보였다(Fig. 3A).

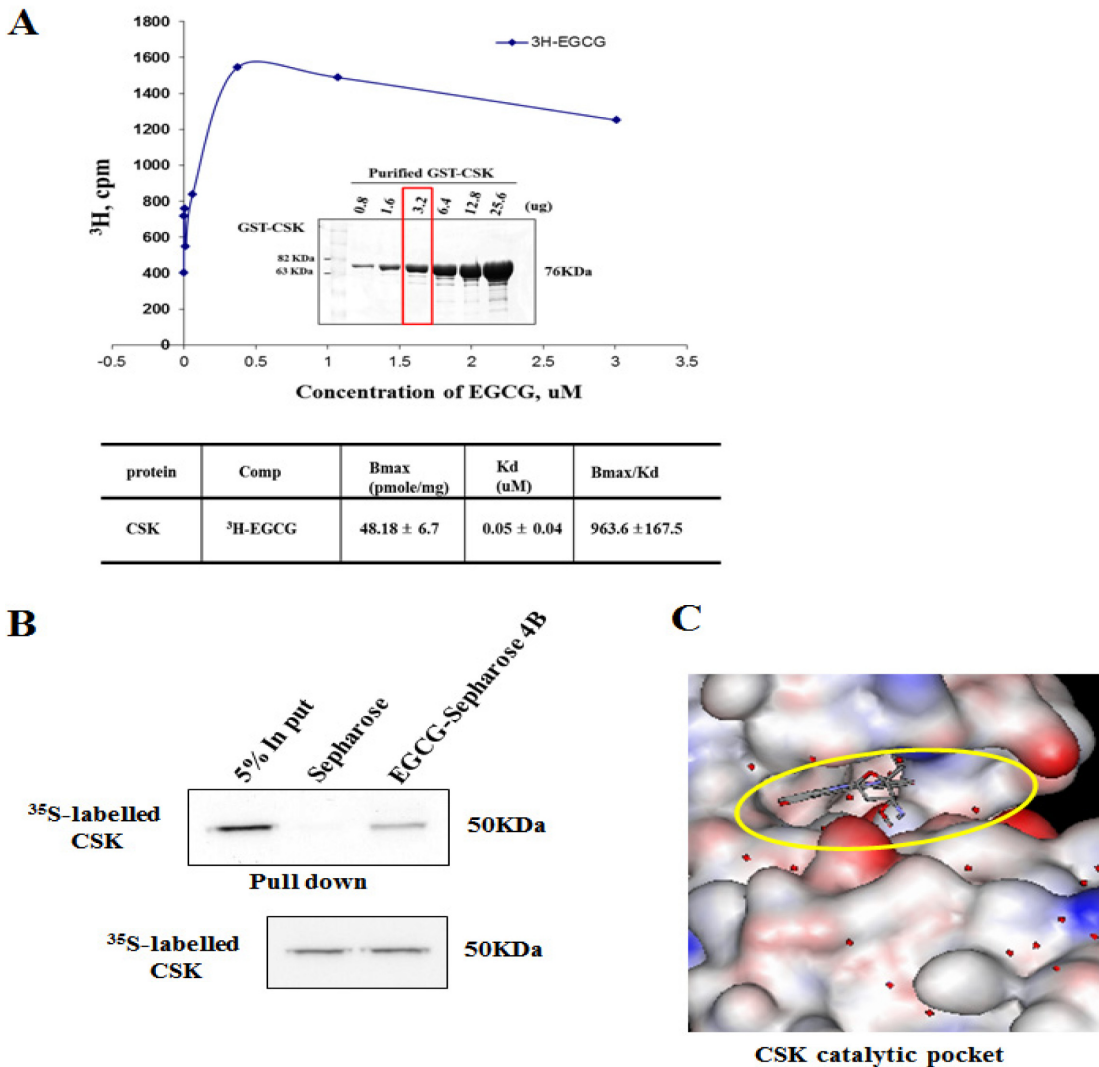


Fig. 2. *in vitro* interaction of CSK with ³H-EGCG. A. specific binding assay for CSK and EGCG. The K_d (dissociation kinetic) value of the EGCG-CSK interaction ($K_d=0.05 \mu M$) was obtained by using a GST-CSK affinity-binding assay as described under “Experimental Procedures.” B, *in vitro* identification of the EGCG-binding site of CSK. The full-length CSK were translated with L-[³⁵S]methionine using TNT and subjected to the EGCG-Sepharose 4B pulldown assay. C, modeling of EGCG binding with the CSK catalytic pocket protein.

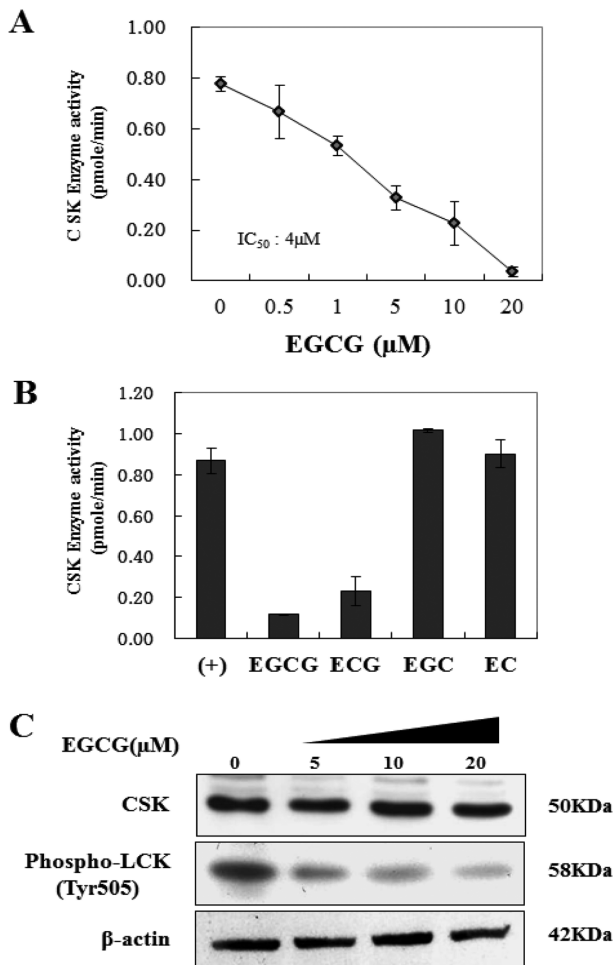


Fig. 3. Effect of EGCG or analogue on CSK kinase activity and phosphorylation of LCK. A-B, EGCG inhibits CSK kinase activity in vitro. Kinase activity of CSK was assayed under the conditions described under “Experimental Procedures.” C, phosphorylation of LCK on regulate CSK by treatment EGCG (20 μM). (+): Positive control-recombinant CSK, and kinase substrate (poly(Glu4-Tyr) peptide, biotin conjugate. Data are represented as means±S.D. of triplicate samples from three independent experiments.

다른 폴리페놀들(EGC, EGC, EC)과 EGCG의 CSK kinase 활성을 비교 실험하였다. EGCG는 다른 폴리페놀들에 비해 가장 강력하게 kinase 활성을 억제하였다(Fig. 3B).

그 다음으로 CSK의 기질로 알려진 lymphocyte-specific protein tyrosine kinase(LCK)를 이용하여 EGCG가 CSK의 활성에 미치는 영향을 확인하였다. EGCG를 농도 별로 처리하였을 때 LCK의 인산화가 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3C).

세포 성장에 대한 EGCG의 효과 – 최근 연구에 의하면 EGCG는 암세포 증식을 억제하므로 암 예방의 효과가 있음을 보고하였다.¹⁵⁾ 본 실험에서도 EGCG의 세포 증식에 관한 효과를 살펴보고자 하였다. 세포증식 조절에서 CSK와의

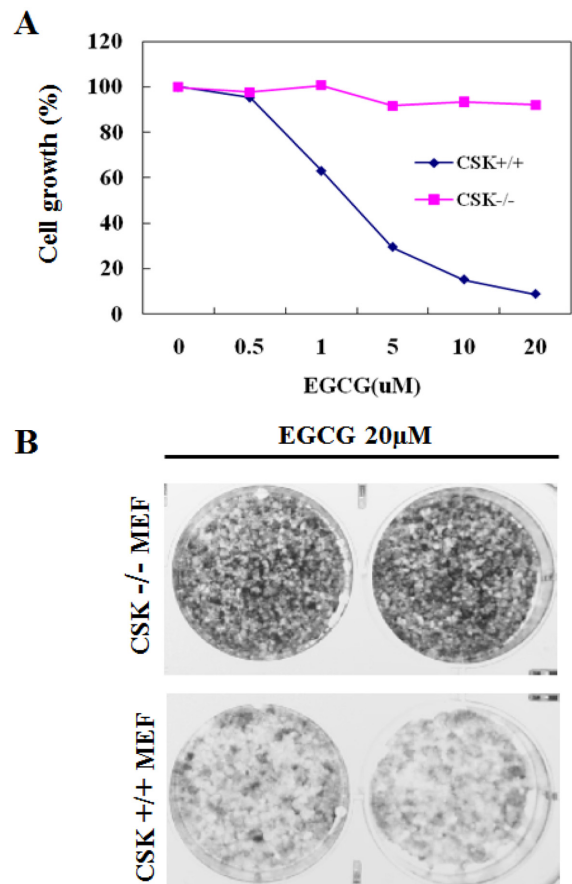


Fig. 4. EGCG inhibition of Cell growth and focus formation mediated by CSK knockout MEF cell lines. A-B, CSK knockout MEF cell growth was assessed by Cell-Titer 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (MTS) and focus forming assay in the presence of increasing amounts of EGCG.

관계를 증명하기 위하여 CSK+/+와 CSK-/- MEF 세포를 제작하였다. 두 세포에서 세포 성장에 미치는 EGCG의 영향을 조사하기 위해 MTS assay와 anchorage independent cell growth assay(Soft agar assay)를 실시한 결과 CSK knockout된 MEF 세포(CSK-/-)에서는 EGCG 처리와는 관계없이 세포 증식이 이루어졌으며, CSK+/+ MEF 세포에서는 EGCG 처리 농도 의존적으로 증식이 억제 되었다(Fig. 4A, B). EGCG는 CSK pathway를 통하여 세포 증식을 조절함을 알 수 있다.

고 찰

본 실험의 결과로 EGCG가 CSK의 kinase 활성을 조절할 수 있음을 확인하였다. 아직까지 암에서 CSK의 명확한 기능이 밝혀져 있지 않은 상태에서 이런 EGCG의 조절은 암의 메커니즘에서 CSK의 역할을 설명할 수 있는 증거를 제시할 수 있다.

현재까지 진행된 CSK에 대한 연구를 살펴보면, embryonic carcinoma cell line인 P19에서 CSK의 발현이 높은 것이 확인되었다. 이 세포주에서 CSK는 세포 부착 분자에 의해 매개되는 cell-to-cell interaction에서 중요한 역할을 하는 Src family kinase들을 조절함으로써 neural differentiation에 관여한다고 알려져 있다.¹⁶⁾ 다른 연구 그룹에서는 2개의 정상 대장 세포주와 18개의 대장암 세포주에서 CSK의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과, 대장암 세포주에서 정상 세포주보다 CSK의 발현이 현저히 증가되어 있는 것을 확인하였다.¹⁷⁾ 유방암에 관한 CSK의 연구를 살펴보면, 정상 breast 조직과 breast tumor에서 CSK의 kinase 활성을 조사하였다. CSK는 정상 breast 조직과 breast carcinomas, 유방암 세포주에서 높은 발현과 kinase 활성을 나타내었다.¹⁸⁾

EGCG의 암 억제 기전에 대해서는 많은 연구가 이루어져 있다. 암 환자에서 암 전이는 주된 사망 원인이다. 전이의 복잡한 여러 단계의 과정을 거치며 암세포의 기저막 침윤은 초기의 중요한 단계이다. EGCG의 항암작용이 암세포 기저막 침윤에 중요한 urokinase plasminogen activator (uPA), matrix metalloproteinase(MMP), 활성산소 등의 억제를 통해 작용됨이 보고 되었다.

암세포의 침윤에서 중요한 hydrolase인 uPA는 기저막과 세포 외 기질의 분해를 촉진한다. uPA는 유방, 난소, 전립선, 위장관계 암 등 대부분의 침윤성 암에서 과발현되고 전이에 필수적인 역할을 하며, 예후를 예측하는데 중요한 지표가 된다. 동물모델실험에서 uPA 억제는 종양의 크기를 줄이거나 암 생성을 억제하였다. EGCG가 인간 섬유육종 세포주(human fibrosarcoma cell line)인 HT-1080 세포를 이용한 실험에서 uPA의 발현을 억제한다는 보고가 있다.¹⁹⁾ 이 연구에서 EGCG는 uPA의 promoter 활성을 억제하고 uPA의 mRNA의 안정화에 영향을 주었다. 다른 보고에서는 인간 구강암 세포주(human oral cancer cell line)인 OC2 세포를 이용하여 실험한 결과, OC2 세포의 이동과 침윤활동이 EGCG에 의해서 억제되었고, 그 과정에서 MMP-2/9, uPA의 발현이 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다.²⁰⁾ 하인두암 세포(hypopharyngeal carcinoma cell)에서는 HGF (hepatocyte growth factor)에 의해서 유도되는 종양의 성장, 이동, 침윤과정에서 발현이 증가되는 MMP-9과 uPA가 EGCG에 의해서 억제되는 것을 확인하였다.²¹⁾

MMP-2와 MMP-9는 암 및 주위조직에서 발현이 증가되어 기저막의 분해를 통해 세포침윤을 돕는다. 최근 몇몇의 MMP 억제제가 항암제로서 개발되고 임상시험 중에 있지만 근골격통 등의 부작용이 나타나 사용이 제한되고 있다.²²⁾ EGCG의 MMP 억제 작용에 대해 많은 연구들이 보고 되고 있으며,²³⁾ 일정량의 EGCG를 처치한 경우 MMP를 억제하여 종양세포의 침윤을 50% 정도 감소시킴이 보고 되었다.²⁴⁾ 최근 연구에 의하면, 신경교종(glioma) 세포주인 U251 세포

에 EGCG를 처리하면 세포의 침윤과 성장이 억제되는데 이때 MMP2/9의 mRNA 발현이 낮아진다고 보고되었다.²⁵⁾ 다른 연구에서는 유방암 세포주인 MCF-7과 MDA-MB-231 세포에서 EGCG가 MMP2/9의 활성을 억제시켜 TIMP-3 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3)의 발현을 증가시킴으로써 세포 침윤을 억제한다는 것을 밝혔다.²⁶⁾

EGCG는 활성산소를 소거하는 항산화 활성을 갖는 것으로 알려지고 있다. 종양세포는 암세포의 침윤과 전이와 관련된 reactive oxygen species(ROS)를 다량 생성한다. ROS는 세포 내 중요한 신호전달자이며, 결국 MMP 등 침윤과 관련된 유전자 발현을 촉진한다. 보고된 연구에 의하면 hypoxanthine-xanthine oxidase system으로 생성된 ROS가 암세포의 침윤을 증가시킨다고 하였다.²⁷⁾ Ascorbic acid에서 유래한 지용성 asc-2-O-phosphate-6-O-palmitate(Asc2P6Plm) 혹은 carotenoid는 항산화작용을 통해 암세포의 침윤을 억제하였다.²⁸⁾ 뿐만 아니라, superoxide를 제거하는 효소인 Cu-Zn superoxide dismutase의 처치가 생쥐연구에서 암의 폐 전이를 억제하였다. 이상의 결과들은 EGCG와 같은 항산화제가 잠재적으로 항전이 약물로의 개발가능성이 있음을 시사한다.

녹차의 EGCG가 혈관신생을 억제함을 증명하기 위해 용모 요막(chorioallantoic membrane) 측정법을 사용한 연구에서, EGCG는 FGF(fibroblast growth factor)로 성장이 촉진되는 모세 혈관 내피 세포의 증식을 억제하였으며, 특히 EGCG의 세포성장 억제는 내피세포에만 국한되었고, 암세포, 섬유모세포, 혈관 편평 세포 등에서는 별다른 효과를 나타내지 않았다.²⁹⁾ 최근 연구에서 SD rats에 thioacetamide를 처리하여 유도된 MMP-9과 FGF-2의 발현이 EGCG에 의해 억제됨을 확인하였다.³⁰⁾

사람 대장암세포에서, EGCG는 extracellular-regulated kinase(ERK)-1과 ERK-2의 활성과 vascular endothelial growth factor(VEGF) 발현을 차단함으로써 혈관신생을 억제하였다. EGCG가 ERK-1과 ERK-2의 활성을 억제하는 분자적 기전은 아직 정확하지 않다. 앞서 언급한 바와 같이, EGCG가 강력한 금속이온 결합제로 알려져 있으며, 많은 수용체 kinase는 2가 양이온이 필요하기 때문에, EGCG는 이러한 양이온을 결합함으로써 수용체 인산화를 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 연구에 의하면 EGCG가 전사인자인 activator protein-1(AP-1)를 억제하여 유전자발현을 조절함을 보고하였다.³¹⁾ VEGF 유전자 promoter는 여러 AP-1 결합부위를 가지기 때문에 EGCG는 전사인자인 AP-1의 활성을 감소시킴으로써 VEGF의 발현을 억제할 수 있다. 이상 종합해 볼 때, EGCG는 ERK-1과 ERK-2의 활성을 억제하거나, VEGF promoter에 전사인자 AP-1의 결합을 억제하여 VEGF 발현을 조절할 수 있다.

Epidermal growth factor(EGF) 신호 전달계는 신생혈관조

질 유전자인 VEGF와 IL-8의 발현을 조절하는 상위 조절인자로 알려지고 있다. EGFR 항체를 이용한 연구에서 췌장암 유발생쥐에서 VEGF, IL-8 발현 및 혈관신생 억제를 보여주었다.³²⁾ 또한 EGCG는 EGF가 EGFR에 결합하는 것을 차단하여 EGFR 인산화 활성을 억제하였다.³³⁾ EGCG가 EGFR 신호 전달계를 억제하는 정확한 기전은 잘 알려지지 않고 있지만, EGF 신호전달 억제는 EGCG의 항암효과가 암세포 성장억제와 함께 혈관신생 조절에 의해 일부 부분 매개될 수 있음을 제시한다.

다른 연구에서는 EGCG가 p53 비의존적인 경로로 VEGF 및 MMP-9의 활성을 조절할 수 있는 것으로 나타났으며, p53 비의존적인 경로에서는 EGCG가 AMPK의 활성을 통해 암세포의 전이를 억제하는 것을 확인하였다.³⁴⁾

EGCG는 구강 암의 화학적 예방요법(chemoprevention) 측면에서 많은 연구가 되어 왔다. 최근의 연구에 의하면 구강암종 세포주(oral squamous cell carcinoma; OSCC)와 동물 모델에서 EGCG가 세포독성을 가짐을 확인하였고 이때의 분자적 작용 기작에 대해서도 밝혀졌다. *In vitro* 실험을 통하여 밝혀진 바에 따르면 EGCG는 세가지 조절 기작을 가지는 것으로 알려졌다. 첫 번째는 세포 주기 정지나 apoptosis를 통한 세포성장 억제이다. 두 번째는 NF- κ B(nuclear factor- κ B)나 AP-1(activator protein-1) 같은 전사인자를 조절하는 것이다. 마지막으로 matrix metalloproteinase의 생성을 억제하여 세포의 이동이나 침윤을 억제시키는 것이다. 다른 동물모델에서는 폴리페놀이 oxidative stress를 줄이고 phase II enzyme 활성이 유도되는 동안 phase I enzyme의 활성을 억제시키는 것으로 나타났다.³⁵⁾

또한 최근 연구에 의하면 EGCG가 유방암, 피부암, 대장암을 포함하는 암의 성장을 억제한다는 사실이 밝혀졌다.³⁶⁾ 또한 중앙 생성 과정에도 관여한다고 보고하였다. 이런 모든 기능들은 암 발생 과정(개시, 촉진, 발달)의 예방 및 억제에 유용할 것으로 생각된다. 즉, EGCG를 조절하면 암의 발생 및 성장을 조절할 수 있음을 의미한다고 할 수 있다.

본 연구에서는 EGCG가 CSK 활성을 조절한다는 사실을 확인하였으며 EGCG는 암종 중에서 C-Src family kinase 발현이 높은 암종의 경우 암 예방에 있어서 효과적으로 작용할 수 있음을 제시한 결과이다.

사 사

본 논문은 한국산업단지공단 바이오테마클러스터 사업(과제번호:2013055-1)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

1. Kim, H. S., Quon M. J. and Kim, J. A. (2014) New insights

- into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox. Biol.* **2**: 187-195.
2. Yiannakopoulou ECh. (2013) Targeting oxidative stress response by green tea polyphenols: clinical implications. *Free Radic. Res.* **47**: 667-671.
3. Ren, W., Qiao, Z., Wang, H. and Zhang, L. (2003) Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med. Res. Rev.* **23**: 519-534.
4. Jankun, J., Selman, S. H., Swiercz, R. and Skrzypek-Jan-kun, E. (1997) Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* **387**: 561.
5. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A. and Capasso, F. (1999) Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* **65**: 337-353.
6. Samuelson, B. (2000) The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J. Ethnopharmacol.* **71**: 1-21.
7. Cowan, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 564-582.
8. Darvesh, A. S. and Bishayee, A. (2013) Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer. *Nutr. Cancer.* **65**: 329-344.
9. Komori, A., Yatsunami, J., Okabe, S., Abe, S., Hara, K., Suganuma, M., Kim, S. J. and Fujiki, H. (1993) Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **23**: 186-190.
10. Riegsecker, S., Wiczynski, D., Kaplan M. J. and Ahmed, S. (2013) Potential benefits of green tea polyphenol EGCG in the prevention and treatment of vascular inflammation in rheumatoid arthritis. *Life Sci.* **93**: 307-312.
11. Gye, M. C., Choi, J. K., Ahn, H. S. and Kim, Y. S. (2004) Expression of p50 C-terminal Src kinase (Csk) in mouse testis. *Arch. Androl.* **50**: 287-93.
12. Duan, L. J., Imamoto, A. and Fong, G. H. (2004) Dual roles of the C-terminal Src kinase (Csk) during developmental vascularization. *Blood* **103**: 1370-1372.
13. Aki, D., Mashima, R., Saeki, K., Minoda, Y., Yamauchi, M. and Yoshimura, A. (2005) Modulation of TLR signalling by the C-terminal Src kinase (Csk) in macrophages. *Genes Cells* **10**: 357-368.
14. Sen B., Johnson F. M. (2011) Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. *J. Signal Transduct.*, **2011**: 865819.
15. Du GJ1, Zhang Z, Wen XD, Yu C, Calway T, Yuan CS, Wang CZ. (2012) Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients* **8**: 1679-1691.
16. Takayama, Y., Nada, S., Nagai, K. and Okada, M. (1997) Role of Csk in neural differentiation of the embryonic carcinoma cell line P19. *FEBS Lett.* **406**: 11-6.
17. Watanabe, N., Matsuda, S., Kuramochi, S., Tsuzuku, J.,

- Yamamoto, T. and Endo, K. (1995) Expression of C-terminal src Kinase in Human Colorectal Cancer Cell Lines. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **25**: 5-9.
18. Bougert, C., Jiang, S., Keydar, I. and Avraham, H. (2001) Functional analysis of Csk and CHK kinases in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 33711-33720.
 19. Kim, M. H., Jung, M. A., Hwang, Y. S., Jeong, M., Kim, S. M., Ahn, S. J., Shin, B. A., Ahn, B. W. and Jung, Y. D. (2004) Regulation of urokinase plasminogen activator by epigallocatechin-3-gallate in human fibrosarcoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **487**: 1-6.
 20. Ho, Y. C., Yang, S. F., Peng, C. Y., Chou, M. Y. and Chang, Y. C. (2007) Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. *J. Oral. Pathol. Med.* **36**: 588-593.
 21. Lim, Y. C., Park, H. Y., Hwang, H. S., Kang, S. U., Pyun, J. H., Lee, M. H., Choi, E. C. and Kim, C. H. (2008) (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits HGF-induced invasion and metastasis in hypopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett.* **271**: 140-152.
 22. Li, H., Lindenmeyer, F., Grenet, C., Opolon, P., Menashi, S., Soria, C., Yeh, P., Perricaudet, M. and Lu, H. (2001) AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice. *Hum. Gene Ther.* **12**: 515-526.
 23. Maeda-Yamamoto, M., Kawahara, H., Tahara, N., Tsuji, K., Hara, Y. and Isemura, M. (1999) Effects of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 2350-2354.
 24. Garbisa, S., Sartor, L., Biggin, S., Salvato, B., Benelli, R. and Albini, A. (2001) Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer* **91**: 822-832.
 25. Li, H., Li, Z., Xu, Y. M., Wu, Y., Yu, K. K., Zhang, C., Ji, Y. H., Ding, G. and Chen, F. X. (2014) Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis, inhibits proliferation and decreases invasion of glioma cell. *Neurosci. Bull.* **30**: 67-73.
 26. Deb, G., Thakur, V. S., Limaye, A. M. and Gupta, S. (2014) Epigenetic induction of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 by green tea polyphenols in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* doi: 10.1002/mc.22121.
 27. Zhang, G., Miura, Y. and Yagasaki, K. (2000) Suppression of adhesion and invasion of hepatoma cells in culture by tea compounds through antioxidative activity. *Cancer Lett.* **159**: 169-173.
 28. Liu, J. W., Nagao, N., Kageyama, K. and Miwa, N. (1999) Antimetastatic and antiinvasive ability of phospho-ascorbyl palmitate through intracellular ascorbate enrichment and the resultant antioxidant action. *Oncol. Res.* **11**: 479-487.
 29. Cao, Y. and Cao, R. (1999) Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature.* **398**: 381.
 30. Darweish, M. M., Abbas, A., Ebrahim, M. A. and Al-Gayyar, M. M. (2014) Chemopreventive and hepatoprotective effects of Epigallocatechin-gallate against hepatocellular carcinoma: role of heparan sulfate proteoglycans pathway. *J. Pharm. Pharmacol.* doi: 10.1111/jphp.12229.
 31. Dong, Z., Ma, W., Huang, C. and Yang, C. S. (1997) Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate, and theaflavins. *Cancer Res.* **57**: 4414-4419.
 32. Bruns, C. J., Harbison, M. T., Davis, D. W., Portera, C. A., Tsan, R., McConkey, D. J., Evans, D. B., Abbruzzese, J. L., Hicklin, D. J. and Radinsky, R. (2000) Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin. Cancer Res.* **6**: 1936-1948.
 33. Liang, Y. C., Lin-shiau, S. Y., Chen, C. F. and Lin, J. K. (1997) Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* **67**: 55-65.
 34. Park, S. Y., Jung, C. H., Song, B., Park, O. J. and Kim, Y. M. (2013) Pro-apoptotic and migration-suppressing potential of EGCG, and the involvement of AMPK in the p53-mediated modulation of VEGF and MMP-9 expression. *Oncol Lett.* **6**: 1346-1350.
 35. Iriti, M. and Varoni, E. M. (2013) Chemopreventive potential of flavonoids in oral squamous cell carcinoma in human studies. *Nutrients* **5**: 2564-2576.
 36. Donejko, M., Niczyporuk, M., Galicka, E. and Przyłipiak, A. (2013) Anti-cancer properties epigallocatechin-gallate contained in green tea. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* **67**: 26-34.

(2014. 5. 14 접수; 2014. 6. 11 심사; 2014. 6. 12 게재확정)