Epigallocatechin-3-gallate의 화학안정성 및 세포독성에 미치는 각종 항산화제의 영향

김미리 · 강스미 · 홍정일*
서울여자대학교 자연과학대학 식품공학과

Modulation of Chemical Stability and Cytotoxic Effects of Epigallocatechin-3-gallate by Different Types of Antioxidants

Mi-Ri Kim, Sme Kang, and Jungil Hong*

Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University

Abstract Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a polyphenolic compound frequently found in green tea, and its physiological actions have been extensively investigated. In the present study, changes in chemical stability and cytotoxic properties of EGCG in the presence of different types of antioxidants were investigated. The antioxidants used modulated the chemical stability of EGCG. Superoxide dismutase (SOD) significantly increased EGCG stability; EGCG was less stable in the presence of catalase. Ascorbic acid, *N*-acetylcysteine (NAC), and glutathione (GSH) stabilized EGCG concentration dependently. The H_2O_2 level generated from EGCG was decreased by catalase, SOD, and NAC but not by GSH. The cytotoxic effects of EGCG also decreased in the presence of NAC, catalase, and SOD. GSH, however, showed a complicated modulatory pattern according to the EGCG and GSH concentrations, and ascorbic acid rather enhanced EGCG toxicity. The results suggest that certain antioxidants could modulate the cytotoxic properties of EGCG in a cell culture system not only by removing reactive oxygen species but by modulating chemical stability and other factors, which should be considered carefully when studying reactive oxygen species-dependent mechanisms of EGCG.

Keywords: epigallocatechin-3-gallate, reactive oxygen species, antioxidant, cytotoxicity, H_2O_2

서 론

경제적 풍요와 함께 고령화 사회의 도래로 인하여 대중들의 건강에 대한 관심이 급증하고 있는 가운데, 천연식품에서 유래한 기능성 성분을 통한 질병 예방 또는 건강 유지에 대한 관심 또한 증가하는 추세이다. 그 중에서도 식물체가 외부 환경 또는 스트레스 등에 대한 방어기작으로 생성하는 파이토키미컬의 일종인 폴리페놀류들이 질병 예방 및 건강 유지에 긍정적으로 작용할 수 있다는 다수의 증거들이 제시되면서, 관련 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1-3).

녹차(*Camellia sinensis*)는 전세계적으로 음용되는 기호음료이며, 뉴욕 타임지가 선정한 10대 건강식품 중 하나로(4), 일반적인 차 한 잔에서 용출되는 성분 중 폴리페놀류인 카테킨 성분이 30-40%를 차지하고 있다(5). 녹차의 주요 카테킨으로는 (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)가 있으며, 항산화 활성, 지질산패 억제 효과, 항노화 효과, 혈압 강하작용 및 항염증 효과 등과 같은 다양한 생리

작용을 나타낸다고 보고 되었다(6-13). 녹차 카테킨 중에 EGCG가 40% 이상을 차지하고 있고(14), 가장 우수한 생리활성을 나타낸다고 알려져 있다(15). 이 밖에도 EGCG는 세포분열을 위한 신호전달 경로를 차단하거나, 세포 주기 조절인자 또는 redox state를 변화시켜 다양한 암세포주에서의 세포 성장 억제 효과를 나타내고 세포 자멸사를 유도한다고 보고되었다(16-19).

EGCG를 비롯한 폴리페놀 화합물들은 전자의 공여를 통하여 직접적으로 라디칼을 소거하거나(8-10) 산화 촉진제로 작용하는 metal에 대해 chelator로 작용하기도 하며(11), 생체 내에서 superoxide dismutase, catalase, hemeoxygenase-1, glutathione *S*-transferase 등과 같은 항산화 효소들의 발현을 유도하여 항산화 활성을 나타낸다(20,21). 또한, pro-oxidant로 작용하는 nitric oxide를 생성하는 induced nitric oxide synthase의 유도 억제를 통하여 항산화 작용을 나타내기도 한다(22). 이처럼 다양한 기작을 통해 항산화 활성을 나타내는 반면, EGCG의 pro-oxidant로서의 활성도 알려졌는데, 특히 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하여 세포성장 저해 및 세포 자멸사를 유도하는 현상이 보고된 바 있다(23,24). 그리고 EGCG의 세포독성기작을 비롯한 ROS 의존성 기작은 주로 각종 항산화제들과 같이 처리하여 ROS를 소거하였을 때 나타난 결과를 토대로 설명하고 있다(23,24). EGCG는 세포 배양액 및 중성 이상의 pH에서 매우 불안정하므로 쉽게 산화되며 그 과정에서 ROS를 생성하나(25), 이 때 생성된 ROS가 직접적으로 세포독성을 유도한다는 결정적인 증거는 아직 미흡한 것으로 보인다. 한편, ROS 의존성 기작 규명을 목적으로 빈번하게 사용되는 항산화제들에 의해 과연 ROS의 제거효과만 나

*Corresponding author: Jungil Hong, Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea
Tel: 82-2-970-5639
Fax: 82-2-970-5977
E-mail: hjil@swu.ac.kr
Received March 25, 2011; revised May 19, 2011;
accepted May 21, 2011

타날 것인지 아니면, 이 외에 실험계상의 환경요인이나 EGCG 등의 시료물질과 직접적으로 작용하여 나타날 수 있는 여타 작용에 대한 의문점은 해결해야 할 과제로 남아있다. 따라서 본 연구에서는 항산화 효소 및 thiol성 황산화제 등을 비롯한 서로 다른 유형의 항산화제들에 의한 EGCG의 화학안정성, EGCG에 의해 생성되는 ROS수준 및 EGCG의 세포독성 변화를 분석하였고, 각종 항산화제들이 ROS제거 외에 EGCG와의 상호작용을 통해 나타낼 수 있는 작용을 조사하여 ROS 관련 기작 규명에 사용되는 각종 항산화제들의 타당성 여부를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

녹차 폴리페놀 성분 EGCG(순도 >99%)는 Rutgers university (Piscataway, NJ, USA)의 Dr. Chung S. Yang으로부터 제공받았다. 다양한 항산화제 *N*-acetylcystein(NAC), glutathione(GSH), ascorbic acid, superoxide dismutase(SOD, from bovine erythrocyte), catalase(from bovine liver)와 3,3-bis[*N,N*-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-*o*-cresolsulfonaphthalein tetrasodium salt(xylenol orange)는 Sigma-Aldrich chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltertrazolium bromide(MTT) 시약은 Alfa Aesar Inc.(Ward Hill, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. EGCG와 NAC는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에, ascorbic acid와 GSH는 증류수에, SOD와 catalase는 phosphate buffered-saline(PBS)에 각각 용해시키고 1회 분량씩 나누어 -80°C 초저온 냉동고(IlshinBioBase, Gyeonggi-do, Korea)에서 보관하여 사용하였다. 세포에 처리 시, DMSO 등의 vehicle은 배지 내에 0.1% 이하가 되도록 조절하여 세포 생장에 영향이 없도록 하였다.

세포주 및 세포배양

사람의 자궁암 세포 HeLa와 대장암 세포 HT-29는 각각 한국 원자력의학원(Seoul, Korea) 배상우 박사 및 ATCC(Manassas, VA, USA)로부터 분양 받아 배양하였다. HeLa와 HT-29 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)과 항생제(100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin)가 첨가된 DMEM 또는 McCoy's 5A 배지에서 각각 배양하였다. 세포는 약 70-80% confluency에 도달하였을 때 계대 배양하였고, 습도 95%, 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

다양한 항산화제들의 EGCG 화학안정성에 미치는 영향 평가

EGCG의 저장시간에 따른 흡수 스펙트럼의 변화는 EGCG(400 μM)를 PBS에 용해하여, 37°C에서 저장하면서 분광광도계(UV-2450; Shimadzu, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 저장시간별 190 nm에서 750 nm에 이르는 파장에서의 스펙트럼을 분석하여, 405 nm 부근의 파장에서 시간에 따른 EGCG 산화생성물에 의한 흡광도의 비례적 증가를 확인하고(Fig. 1), 이를 근거로 EGCG 화학안정성의 변화를 측정하였다. 즉, EGCG와 농도를 달리한 각종 항산화제를 1 M의 인산완충용액(pH 7.4)에 용해시키고 37°C에서 저장하면서 저장시간별 생성된 EGCG 산화생성물의 흡광도를 microplate reader(Triad LT; Dynex Technologies Inc, Chantilly, VA, USA)를 사용하여 405 nm 파장에서 측정하였다.

Hydrogen peroxide(H₂O₂) 생성량 측정

다양한 항산화제들 존재 시의 EGCG에 의한 H₂O₂ 생성량은 ferrous oxidation-xylenol orange(FOX) methods를 일부 변형하여 측정하였다(26). EGCG(100 μM)를 1 M 인산완충용액에 단독 또는 각 항산화제들과 함께 용해시키고, 24시간 동안 37°C에서 반응시킨 후, 증류수로 10배 희석한 반응액 40 μL와 100 μM xylenol orange, 200 mM D-sorbitol, 그리고 500 μM ammonium ferrous sulfate를 함유한 FOX working solution 160 μL와 혼합하여 37°C 암소에서 45분간 반응시켰다. H₂O₂ 생성량은 550 nm의 파장에서의 흡광도 변화를 microplate reader(Triad LT)를 사용하여 측정하였으며, H₂O₂ 표준물질로 검량곡선을 작성하여 정량하였다.

각종 항산화제들의 EGCG 세포독성에 대한 영향 평가

녹차 폴리페놀 성분 EGCG와 다양한 항산화제들과의 단독 또는 복합 처리 시 나타나는 세포독성은 MTT colorimetric method로 분석하였다. MTT 시약은 PBS에 용해하여 5 mg/mL의 stock solution을 제조하고 0.2 μm syringe filter로 여과하여 사용하였다. 계대 배양한 세포는 trypsin-EDTA로 처리하여 단일세포 현탁액으로 만든 후, 96 well plate에 각 well당 10⁴세포씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 세포배양배지는 제거하고 EGCG 및 항산화제를 각각의 처리 농도로 serum free 배지에 희석하여 well 당 200 μL씩 단독 또는 복합 처리하여 24시간 더 배양하였다. 이후 처리 물질을 포함한 serum free 배지는 제거하고, 최종농도가 0.5 mg/mL이 되도록 serum free 배지로 희석한 MTT solution을 각 well당 100 μL씩 첨가하였다. 37°C CO₂ 배양기에서 약 1시간 반응시킨 후, 배지는 완전히 제거하고 DMSO를 각 well당 100 μL씩 첨가하여 세포 내 보라색의 MTT formazan을 용해시키고 이를 550 nm에서 측정하였다(Triad LT).

통계분석

모든 실험결과는 3회 이상 반복 분석하였으며, 그 값을 평균±표준편차로 나타내었다. 각 실험구별 유의차 분석은 Student's *t*-test 또는 일원분산분석(One-way ANOVA)을 실시하였으며, 일원분산분석의 사후검정은 Tukey's test를 사용하여 95 또는 99% 유의수준에서 검정하였다. IC₅₀ 값은 EGCG와 각 항산화제의 단독 또는 복합처리에 따른 농도별 세포사멸 결과로부터 직선부위에 대한 선형회귀식을 구하고 50% 사멸을 유도하는 농도를 계산하였다.

결과 및 고찰

다양한 항산화제들 존재 시의 EGCG 화학안정성 및 H₂O₂ 생성량의 변화

EGCG는 pH 7.4의 완충용액 시스템에서 불안정하여 자동산화와 에피머화 되면서 옅은 분홍색에서 어두운 갈색의 화합물로 산화된다(25). EGCG 산화에 따른 변색의 정량화를 위하여 광범위한 파장(190-750 nm)에서 흡수 스펙트럼 변화를 분석한 결과, EGCG가 산화되어 생성되는 갈변화합물로 인해 405 nm 부근의 파장에서의 흡광도가 저장시간에 따라 증가하였으며(Fig. 1B), 특히 8시간 이내에서 직선적으로 비례하는 것을 확인하였다(Fig. 1C). 이를 근거로 각종 항산화제들이 EGCG 화학안정성에 미치는 영향 여부를 405 nm에서의 흡광도 변화를 통하여 분석하였다. EGCG는 pH의 감소에 따라 화학적으로 안정화되는 것으로

Fig. 1. Structure of EGCG (A), time-dependent changes in absorbance spectrum (B), and absorbance at 405 nm (C) of EGCG at different incubation periods. EGCG (400 μ M) was incubated in PBS at 37°C and absorbance spectrum (190-750 nm) was analyzed at indicated time points. Changes in absorbance at 405 nm were plotted according to incubation time (C).

알려졌는데(27), 같이 처리되는 ascorbic acid, NAC 등의 산성 항산화제에 의한 pH 저하가 EGCG의 화학안정성에 영향을 미칠 것을 고려하여 완충능을 높인 1 M의 인산완충용액(pH 7.4)을 사용하였다. 이 조건에서 mM수준의 각종 항산화제에 의한 pH 변화는 0.01 이하로 미미하였고, pH 저하에 의한 EGCG 안정화 효과는 배제할 수 있을 것으로 사료된다. EGCG를 1 M 인산완충용액에 용해하여 37°C에 저장하면서 시간에 따른 405 nm에서의 흡광도 변화를 측정한 결과, 저장시간의 경과에 따라 EGCG 산화물 생성량은 4시간 이내에서는 linear하게 증가하였으며, 8시간 이후에 증가속도는 현저하게 감소하였다(Fig. 2). EGCG를 각종 항산화제들과 복합처리 하였을 때, 대부분의 항산화제 존재 시에 EGCG의 갈색산화물 생성량이 감소하는 것으로 나타났다. 항산화 효소인 SOD 존재 시, 8시간 이내에서 EGCG의 화학안정성이 증가하는 것으로 나타났으며, 15보다 30 U/mL의 농도에서 더 효과적이었다. 반면, catalase 첨가 시에는 EGCG 단독 처리구에 비하여 갈색산화물 생성이 증가되었는데, 이는 EGCG산화에 의해

발생하는 H_2O_2 가 catalase에 의해 제거되면서 반응의 평형이 우측으로 이동하며 EGCG의 불안정화를 가속화시킨 것으로 보인다(28) (Fig. 2A). 화학항산화제인 ascorbic acid, NAC, GSH는 첨가 농도에 비례하여 EGCG의 갈색산화물 생성을 억제하였고, 특히 ascorbic acid의 활성이 가장 강하게 나타났으며, 4와 8 mM ascorbic acid는 24시간 까지 EGCG의 산화물 생성을 거의 완벽하게 저해하였다(Fig. 2B). Thiol성 항산화제인 NAC와 GSH는 8시간 이내의 저장기간 중 뚜렷한 농도의존적인 EGCG에 대한 화학적 안정화 효과를 나타내었으나, 24시간 저장 시 농도별 유의차가 대부분 소멸되는 것으로 나타났다(Fig. 2C and D).

각종 항산화제의 EGCG에 대한 화학안정화 효과와 EGCG 산화과정 중에 생성되는 ROS량과의 관계를 알아보기 위하여, 항산화제와 EGCG를 같이 처리 후 생성되는 H_2O_2 량을 조사하였다. EGCG를 pH 7.4 인산완충용액(1 M)에서 24시간 동안 저장 후 생성된 H_2O_2 량을 분석한 결과, 100 μ M EGCG로부터 426.03 ± 34.72 μ M의 H_2O_2 가 생성되었으며, 같이 처리된 catalase는 EGCG에 의해 생성된 H_2O_2 를 검출한계 이하로 완전히 제거하였다(Fig. 3). EGCG의 안정화 효과를 가진 SOD에 의해서는 H_2O_2 량이 유의적으로 감소하였으나 약 13% 저하의 미미한 효과를 보였다. 이외에도 0.5와 2 mM의 ascorbic acid와 NAC가 EGCG에 의해 생성된 H_2O_2 를 유의적으로 제거하였으나, 40-50% 이상의 H_2O_2 는 여전히 잔류하는 것으로 나타났다. 흥미롭게도 GSH와 8 mM의 ascorbic acid에 의해서는 H_2O_2 의 양이 오히려 증가하였는데, 실험계상에서 이들의 환원성질이 직접적으로 또는 EGCG와 상호작용을 통하여 분자상 산소를 H_2O_2 와 같은 ROS로 전환시키기 때문으로 사료된다.

이상의 결과는 대부분의 항산화제 처리에 의해 EGCG로부터의 ROS 제거가 효과적으로 일어나지 않으며, 항산화제의 양과 종류에 따라라도 잔류하는 ROS량에 크게 차이가 있다는 것을 보여준다. 한편, 항산화제는 ROS 조절 이외에 EGCG와 같은 페놀성 물질의 화학안정성에도 영향을 미치는 것으로 보아, 각종 항산화제를 이용한 폴리페놀성 물질과 ROS 관련 실험에 주의를 기울일 필요가 있을 것으로 판단된다.

다양한 항산화제 존재 하에 EGCG의 세포독성 변화

EGCG를 비롯한 폴리페놀성 화합물의 ROS 관련 기작 분석을 위해 다양한 항산화제들이 이용되고 있으며, 각종 실험계상에 같이 처리된 항산화제들에 의해 세포독성을 비롯한 EGCG의 다양한 활성이 조절되는 것으로 보고되었다(23,24). 하지만 본 연구에서 나타난 결과에 의하면 catalase를 제외한 각종 항산화제 존재 시 EGCG로부터의 ROS 생성이 효과적으로 제어되지 않으며 일부는 ROS 발생량을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 3). 따라서 EGCG의 대표적인 ROS 의존성 활성으로 보고된 세포독성에 대하여(23,24), 관련 실험에 빈번히 사용되는 thiol성 항산화제인 NAC와 GSH를 함께 처리하여 세포 독성의 변화를 평가하였다. 그 결과, 같이 처리된 NAC 농도증가에 따라 EGCG의 세포독성은 현저히 약화되었으며, 8 mM NAC 존재 시 HeLa 세포에 대한 EGCG의 IC_{50} 는 7배 이상 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4A and D). 하지만 GSH 존재 하에 EGCG에 의한 세포 독성은 다소 복잡한 양상을 나타내었는데, 2와 8 mM 농도의 GSH는 20 μ M 이하 농도 EGCG의 세포 독성을 감소시켰으나 40 μ M 이상의 고농도 EGCG의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 한편, 20 μ M 이하의 EGCG에 의한 세포 독성은 0.5 mM 농도의 GSH에 의해 오히려 증대되었는데, 이 농도 범위 내에서 10 μ M로 EGCG 농도를 고정하고 GSH 농도를 변화시켰을 때 1 mM 이하

Fig. 2. Time- and concentration-dependent effects of different antioxidants on stability of EGCG. Effects of catalase and SOD (A), ascorbic acid (B), NAC (C), and GSH (D) on EGCG stability were analyzed by measuring absorbance at 405 nm at different time points. EGCG (200 μ M) was incubated at 37°C in 1 M phosphate buffer (pH 7.4) containing different types of antioxidants. At each time point indicated, formation of EGCG oxidation products were analyzed by measuring absorbance at 405 nm using a microplate reader. Each value represents the mean $\pm$ SD (n=8).

Fig. 3. Changes in H_2O_2 level generated from EGCG by different types of antioxidants. EGCG (100 μ M) was incubated in the absence or presence of different antioxidants including 30 U/mL catalase, 30 U/mL SOD, ascorbic acid, GSH, and NAC at 37°C in 1 M phosphate buffer (pH 7.4). After 24 h-incubation, the amounts of H_2O_2 were analyzed using a FOX method described in materials and methods. Each value represents the mean $\pm$ SD (n=4). ** significantly lower from the control according to Student's *t*-test ($p < 0.01$).

¹N.D., Not detected

의 GSH는 EGCG의 세포독성이 증가한 반면, 그 이상에서는 활성을 감소시키는 biphasic한 현상을 보였다(Fig. 4C). 전체적으로

GSH에 의한 EGCG의 HeLa 세포에 대한 IC_{50} 는 크게 변화하지 않았으며, 8 mM GSH 처리시에만 유의적인 증가를 보였다(Fig. 4D). GSH에 대한 EGCG의 세포독성 변화 현상은 또 다른 폴리페놀 화합물인 curcumin의 세포독성이 1 mM 이하의 저농도 NAC에 의해 증가하나, 2 mM 이상의 고농도의 NAC 존재 하에 활성이 감소한 결과(29)와 유사한 경향이였다. 하지만 curcumin의 경우 NAC와 GSH 등의 thiol성 항산화제에 대해 유사한 활성 변화 패턴을 나타낸 반면, EGCG는 항산화제의 종류 및 농도에 따라 다른 반응성을 나타내었다.

한편, catalase를 처리한 세포에서 EGCG의 HeLa 세포에 대한 독성은 현저히 감소되었으나, SOD나 ascorbic acid와 같은 항산화제에 의한 세포독성 변화는 미비하였다(Fig. 5A). Ascorbic acid는 오히려 EGCG의 세포독성을 증가시켰으며 ascorbic acid에 의한 효과는 24시간 보다 48시간에서 더 현저하게 나타났다(Fig. 5C). HT-29 대장암 세포에 대한 실험 결과, catalase와 SOD 존재 시 EGCG의 세포독성이 현저하게 약화되었으며(Fig. 5B), catalase 처리에 의한 EGCG 독성 감소현상이 더 두드러져서 IC_{50} 기준으로 3배 가량 증가하였다(Fig. 5C). SOD와 catalase를 동시에 처리하였을 경우, catalase만 존재 시와 유사한 활성을 나타내었다(Fig. 5B and C). 따라서 HT-29 세포는 HeLa 보다 EGCG에 대하여 더 큰 내성을 가지고 있지만, ROS에 더 민감하게 반응하여 catalase나 SOD 존재 시에 EGCG에 의한 보다 뚜렷한 세포독성의 감소를 초래하는 것으로 보인다(Fig. 5C). ROS 중에서 비라디칼성 물질인 H_2O_2 는 상대적으로 독성이 강하지 않은 반면, H_2O_2 가 Fe^{2+}

Fig. 4. Changes in cytotoxic effects of EGCG by thiol antioxidants. HeLa cells were incubated with EGCG in the absence or presence of NAC (A) or GSH (B) for 24 h. Viable cells were analyzed using the MTT assay. Effects of different concentrations of GSH on 10 μM EGCG-induced cytotoxicity (C), and changes in IC₅₀ values of EGCG for HeLa cell growth by different concentrations of NAC and GSH (D) were also analyzed. Each value represents the mean±SD (n=7 or 8). Different letters indicate a significant difference (*p*<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey HSD test.

등의 금속이온 존재 시 Fenton 반응에 의해 전환될 수 있는 hydroxyl radical(HO·)이 가장 강력한 독성을 발휘하는 것으로 알려져 있다(30,31). 따라서 EGCG의 ROS에 의한 세포독성이 전적으로 H₂O₂에 의한 것인지, 세포배양계상에 존재하는 미량의 금속 등에 의해 전환된 hydroxyl radical 등이 세포독성에 기여할 것인지를 조사하기 위해 금속이온의 chelator인 EDTA 존재 하에 EGCG의 세포독성 변화를 조사하였다(Fig. 5D). EDTA(1 mM) 첨가에 의해 HT-29 세포생존율은 약 20%정도 감소하였으나, EDTA 존재 시 25와 50 μM EGCG에 의한 세포독성은 대조구에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이 결과는 EGCG에 의한 세포독성은 H₂O₂뿐만 아니라, hydroxyl radical을 비롯한 각종 ROS가 관여할 수 있다는 것을 암시한다.

기존의 다양한 보고에서 각종 항산화제의 처리에 의해 감소되거나 소멸된 세포독성 결과로부터, H₂O₂ 등의 ROS가 EGCG 세포독성 발현의 주요 기작으로 설명된 바 있다(23,24). 본 연구결과에서도 EGCG에 의해 생성되는 H₂O₂가 catalase에 의해 완전히 제거되었고(Fig. 3), HeLa나 HT-29 세포 모두 catalase 존재 시 EGCG의 세포독성이 감소되는 것으로 보아, EGCG의 세포독성은 부분적으로 ROS에 의한 기작임을 예측할 수 있다. 하지만 ascorbic acid에 의해 H₂O₂가 감소된 상황에서 EGCG의 세포독성이 증가하는 경우나, GSH에 의해 ROS가 증가된 환경에서도 세포독성이 감소되는 다양한 결과로 미루어볼 때, EGCG의 세포독성이 단순히 ROS에 의한 것으로 단정지을 수 없을 것으로 보이

며, EGCG 구조에 근거한 자체 활성화, EGCG 산화물의 작용, EGCG와 항산화제의 반응에 의해 생성된 물질, 세포의 특성, 배양환경 및 배양액 조성 등도 함께 고려해야 할 것으로 사료된다.

결론적으로 폴리페놀 화합물들의 ROS 의존성 기작 규명을 위해 사용되는 각종 항산화제들이 실제 실험계상의 다양한 환경에 따라 ROS에 대한 소거 여부가 불확실하며, ROS 소거활성 외에도 폴리페놀 화합물들의 화학안정성 등 다양한 부분에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 향후 관련연구에서 이들 항산화제의 존재 하에 변형된 폴리페놀 화합물의 활성을 단순히 ROS 의존 기작으로 해석하기에는 무리가 있으며, 다양한 요인들에 대한 고려가 함께 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 다양한 생리활성이 보고된 폴리페놀 화합물인 EGCG의 화학안정성, H₂O₂ 생성능 및 세포독성에 대하여 다양한 항산화제와의 조합에 의한 변화를 분석하였다. EGCG는 생리적 조건에서 갈색화합물로 산화되면서 불안정화되는데, catalase를 제외한 각종 항산화제 SOD, ascorbic acid, NAC 및 GSH는 EGCG 갈색산화물의 생성을 유의적으로 저해하였다. EGCG에 의해 생성되는 H₂O₂는 catalase에 의해 거의 완벽하게 제거되었으며, SOD와 NAC에 의해서도 유의적으로 감소하였다. 하지만 GSH 및 고용도의 ascorbic acid의 존재 시 오히려 H₂O₂ 수준이 증가

Fig. 5. Modulation of cytotoxic effects of EGCG by different types of antioxidants and EDTA. HeLa (A) or HT-29 (B) cells were incubated with EGCG in the absence or presence of 15 U/mL SOD, 30 U/mL catalase, catalase/SOD together, or 2 mM ascorbic acid for 24 h. Viable cells were analyzed using the MTT assay. Changes in IC_{50} values of EGCG during 24 or 48 h for HeLa or HT-29 cells by different antioxidants were calculated (C). Effects of EGCG on HT-29 cell viability for 24 h were also analyzed in the presence of 1 mM EDTA (D). Each value represents the mean $\pm$ SD (n=7 or 8). Different letters indicate a significant difference ($p<0.05$) based on one-way ANOVA and the Tukey HSD test (in C). ** significantly different from its corresponding control according to Student's t -test ($p<0.01$ in D).

하는 현상을 나타내었다. EGCG의 HeLa 및 HT-29 세포에 대한 독성은 catalase, SOD 및 NAC 등과 같은 항산화제 존재 하에 유의적으로 감소하였고 NAC에 의한 EGCG 세포독성의 감소는 첨가된 NAC의 농도 증가에 따라 더욱 두드러졌다. 그러나 GSH 존재하에 EGCG의 독성은 GSH와 EGCG농도에 따라 다른 조절 양상을 나타내었으며, ascorbic acid에 의해서 EGCG의 세포독성이 약간 증가하는 현상을 나타내었다. 본 결과는 EGCG와 함께 처리된 다양한 항산화제들이 ROS의 소거 뿐만 아니라 EGCG 화학안정성 등 다른 요인에 영향을 미칠 수 있으며, 항산화제의 존재 하에 변형된 EGCG활성에 대해 ROS관련 기작 외에 다양한 요인들에 대한 고려가 함께 이루어져야 함을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. KRF-2008-F00157)의 일부로 이에 감사드립니다.

문헌

1. Hasler CM. Functional Foods: Their role in disease prevention

- and health promotion. Food Technol. -Chicago 52: 63-147 (1998)
- Visioli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease: The potential role of phytochemicals. Cardiovasc. Res. 47: 419-425 (2000)
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkowski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am. J. Med. 113: 71-88 (2002)
- Janic MH. 10 Food that pack a wallop. Available from: <http://www.time.com/time/covers/1101020121/food.html>. Accessed Mar. 18, 2011.
- Lambert JD, Yang CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. J. Nutr. 133: 3262-3267 (2003)
- Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. Biochem. Pharmacol. 37: 837-841 (1998)
- Rafat Husain S, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. Phytochemistry 26: 2489-2491 (1987)
- Zhao B, Li X, He R, Cheng S, Wenjuan X. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. Cell Biochem. Biophys. 14: 175-185 (1989)
- Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S, Xin W. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. BBA-Lipid Lipid Met. 1304: 210-222 (1996)
- Hayatsu H, Inada N, Kakutani T, Arimoto S, Negishi T, Mori K, Okuda T, Sakata I. Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. Prev. Med. 21: 370-376 (1992)
- Chung JH, Han JH, Hwang EJ, Seo JY, Cho KH, Kim KH, Youn

- JI, Eun HC. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *FASEB J.* 17: 1913-1915 (2003)
12. Kapoor M, Howard R, Hall I, Appleton I. Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. *Am. J. Pathol.* 165: 299-307 (2004)
13. Varilek GW, Yang F, Lee EY, deVilliers WJS, Zhong J, Oz HS, Westberry KF, McClain CJ. Green tea polyphenol extract attenuates inflammation in interleukin-2-deficient mice, a model of autoimmunity. *J. Nutr.* 131: 2034-2039 (2001)
14. Hara Y. Influence of tea catechins on the digestive tract. *J. Cell. Biochem.* 67: 52-58 (1997)
15. Bagchi D. Green Tea: Antioxidant Power to Fight Disease. Keats Publishing, New Canaan, CT, USA. p. 48 (1999)
16. Lea MA, Xiao Q, Sadhukhan AK, Cottle S, Wang ZY, Yang CS. Inhibitory effects of tea extracts and (-)-epigallocatechin gallate on DNA synthesis and proliferation of hepatoma and erythroleukemia cells. *Cancer Lett.* 68: 231-236 (1993)
17. Yang G, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis* 19: 611-616 (1998)
18. Chung L, Cheung T, Kong S, Fung K, Choy Y, Chan Z, Kwok T. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci.* 68: 1207-1214 (2001)
19. Uesato S, Kitagawa Y, Kamishimoto M, Kumagai A, Hori H, Nagasawa H. Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. *Cancer Lett.* 170: 41-44 (2001)
20. Chow HHS, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Tome ME, Ranger-Moore J, Cordova CA, Mikhael DM, Briehl MM, Alberts DS. Modulation of human glutathione *S*-transferases by polyphenon E intervention. *Cancer Epidem. Biomar.* 16: 1662-1666 (2007)
21. Lin YL, Cheng CY, Lin YP, Lau YW, Juan IM, Lin JK. Hypolipidemic effect of green tea leaves through induction of antioxidant and phase II enzymes including superoxide dismutase, catalase, and glutathione *S*-transferase in rats. *J. Agr. Food Chem.* 46: 1893-1899 (1998)
22. Chan MMY, Fong D, Ho CT, Huang HI. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem. Pharmacol.* 54: 1281-1286 (1997)
23. Yang GY, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, Yang CS. Effect of black and green tea polyphenols on c-Jun phosphorylation and H₂O₂ production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: Possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. *Carcinogenesis* 21: 2035-2039 (2000)
24. Hwang JT, Ha J, Park IJ, Lee SK, Baik HW, Kim YM, Park OJ. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett.* 247: 115-121 (2007)
25. Sang S, Lee MJ, Hou Z, Ho CT, Yang CS. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *J. Agr. Food Chem.* 53: 9478-9484 (2005)
26. Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26: 853-856 (1991)
27. Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang CS. Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 62: 7241-7246 (2002)
28. Hou Z, Sang S, You H, Lee MJ, Hong J, Chin KV, Yang CS. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: Auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res.* 65: 8049-8056 (2005)
29. Hong J. Curcumin-induced growth inhibitory effects on HeLa cells altered by antioxidant modulators. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 1029-1034 (2007)
30. Halliwell B, Gutteridge J. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation an update. *FEBS Lett.* 307: 108-112 (1992)
31. Neyens E, Baeyens J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J. Hazard. Mater.* 98: 33-50 (2003)