

## 비색분석법에 의한 Epigallocatechin Gallate의 항암효과평가

白順玉<sup>1</sup> · 金日光 · 白承和\* · 韓斗錫<sup>11</sup>

원광대학교 자연과학대학 화학과

<sup>1</sup>한국인삼연초연구소 분석센터

<sup>11</sup>원광대학교 치과대학 구강해부학교실

(1998. 1. 24 접수)

## Antitumor Evaluation of Epigallocatechin Gallate by Colorimetric Methods

Soon Ok Baek<sup>1</sup>, Il Kwang Kim, Seung Hwa Baek\*, and Du Seok Han<sup>11</sup>

Department of Chemistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

<sup>1</sup>Chemical Analysis Center, Korean Ginseng & Tobacco Research Institute Daejeon 305-345, Korea

<sup>11</sup>Department of Oral Anatomy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

(Received January 24, 1998)

**요 약.** 인체 피부흑색종 세포에 대한 epigallocatechin gallate의 세포독성작용을 평가하고, 광학현미경적 관찰을 실시하여 인체 피부흑색종 세포의 형태학적인 변화를 볼 수 있었다. 세포독성은 비색정량분석법, NR정량분석법과 SRB정량분석법으로 측정하였다. 이런 결과는 epigallocatechin gallate에 항암활성을 보여 준다.

**ABSTRACT.** In the present study, we were evaluated cytotoxic effects of epigallocatechin gallate in human skin melanoma cells such as HTB-69. The light microscopic study showed morphological changes of the treated cells. Disruptions in cell organelles were determined by colorimetric methods; 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay, neutral red (NR) assay and sulforhodamine B protein (SRB) assay. These results suggest that epigallocatechin gallate retains a potential antitumor activity.

### 서 론

녹차의 성분<sup>1,2,3</sup>과 항암활성에 관한 연구<sup>4,5,6</sup>는 국제적으로 다양하게 이루어지고 있으며, Liao 등<sup>4</sup>은 암세포주를 피하에 주사하여 유발시킨 nude mouse의 전립선암세포와 유방암세포의 성장(-)epigallocatechin gallate (EGCG)를 복강내에 주사하면 억제된다고 보고하였다. 녹차의 성분이 표적기관에서 androgen작용을 조절하므로서 전립선암이나 어떤 피부질환을 억제할 수 있고, 임상적으로 인체에 해가 없이 낮은 가격으로 사용할 수 있다고 보고하였다.<sup>7</sup> Yamane 등<sup>5</sup>은 녹차의 주성분인 EGCG가 흰쥐의 샘위(glandular stomach)에서 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)에 의하여 유발된 위상피암발생(gastric carcinogenesis)을 억제하는데, 그 이유는 위

점막의 세포활성을 억제하는 데에 기인한다고 보고하였다. 한편 Stoner와 Mukhtar<sup>6</sup>는 시험관내 시험(*in vitro*)에서 GTPs(green tea polyphenol)가 carcinogen에 의하여 유발된 피부암, 폐암, 위암, 식도암, 십이지장암, 직장암 등의 항돌연변이활성(antimutagenic activity)을 갖는다고 보고하였다. 우리 나라도 최근에는 녹차의 선호현상이 두드러져 그 소비가 폭발적으로 증가함에 따라서 다윈이 점차 늘어나므로 종자의 생산량도 크게 증가할 것으로 예상된다.

이에 본 연구는 EGCG를 인체 피부흑색종세포(HTB-69)에 적용하여 일정한 조건에서 배양하면서 항암활성을 측정하기 위하여 일반적으로 검색에 많이 이용되는 MTT정량분석법, NR정량분석법 및 SRB정량분석법을 실시하여 유의한 결과를 얻었기

에 보고하는 바이다.

## 실험

**시 약.** EGCG는 일본의 Mitsuli Nordin사에서 제조한 상품을 사용하였다(Fig. 1). 세포배양에 사용한 RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin 및 fungizone 시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT정량분석법, NR정량분석법 및 SRB정량분석법에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였고, 종류수는 3차 증류하여 사용하였다.

**실험기기.** 세포의 배양은 CO<sub>2</sub> incubator(Shellab Co., USA)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경(inverted microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT정량분석법, NR정량분석법 및 SRB정량분석법은 ELISA reader(Spectra Max 250, Molecular Devices Co., USA)를 사용하였다.

**시료의 처리.** 사용직전에 EGCG(Mitsui Nordin Co, USA)를  $\mu\text{M}$ 농도로 조절하여 사용하였다.

**세포배양.** 인체 피부흑색종세포(HTB-69)는 항암 활성을 측정하기 위하여 RPMI 1640(Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)과 항생물질을 첨가하여 배양하였다. 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기(CO<sub>2</sub> incubator, Shellab, USA)를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하고, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가  $2 \times 10^4$  cells/mL가 되도록 세포부유액을 만들었다. 세포배양용 24 well multidish(Nunclon, USA)에 상기 세포부유액을 well당 2 mL 씩 분주하고, 24시간 배양한 후, 추출액과(추출액에 대한 실험 data는 없었음) EGCG를 1 mL씩 첨가하여 배양하였다.

**MTT 정량분석법.** Mosmann의 방법<sup>8</sup>에 의하여 세포를 EGCG가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한

후, 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50  $\mu\text{g/mL}$ 가 포함된 배양액을 well당 1 mL씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양 후, 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 mL/well씩 넣어 5분간 실온방치하여 MTT formazan을 용해한 후, ELISA reader(540 nm)로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

**NR 정량분석법.** Borenfreund와 Puerner의 방법<sup>9</sup>에 의하여 인체 피부흑색종세포를 배양용기당  $2.0 \times 10^4$  cells/mL 되도록 24 well multidish에 분주하여 24시간 배양 후, EGCG가 첨가된 배양액으로 교환하고, 48시간 동안 배양한 다음, 50  $\mu\text{g/mL}$  neutral red(Sigma)가 포함된 배양액을 37°C 어두운 곳에서 overnight 시킨 후, well당 1 mL 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후, 배양액을 버리고, phosphate buffered saline(PBS)으로 2-3회 세척한 다음, 1% formaldehyde - 1% CaCl<sub>2</sub>를 넣어 실온에 방치하여 3시간동안 용해소체에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 흡광도를 ELISA reader(550 nm)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

**SRB 정량분석법.** Skehan *et al.*(1990)의 방법<sup>10</sup>에 따라 세포를 EGCG가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고, 5회 세척한 후, 0.4% sulforhodamine B(SRB)를 200  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음, 1% acetic acid로 5회 세척하고, 완전히 건조하였다. 10 mM tris base [tris(hydroxymethyl)aminomethane]에 결합된 protein stain을 녹인 후, ELISA reader(540 or 510 nm)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

**세포의 형태학적 관찰.** 광학현미경적으로 세포를 관찰하기 위하여 인체 피부흑색종세포는 MTT정량 방법으로 처리한 후, MTT흡수능을 측정하기 전에 도립현미경(Inverted microscope, Olympus)으로 관찰하였다.

**통계처리.** 실험결과의 통계처리는 Student's t-test에 준하였고, P-value가 0.05이하일 경우, 유의한 것으로 판정하였다.

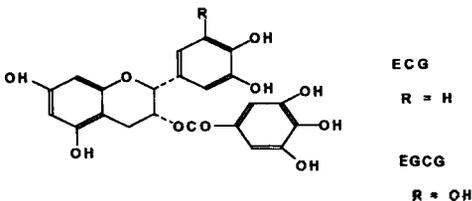


Fig. 1. The chemical structures of ECG and EGCG.

## 결과 및 고찰

녹차잎의 성분 중 tea catechin의 일종인 EGCG가 발암초기(initiation stage)와 증식기(promotion stage)에 억제효과가 있는 것으로 밝혀지고 있으나, 본 연구에서는 인체 피부흑색종세포에 EGCG를 적용한

후, 암연구에 검색방법으로 많이 이용되고 있는 MTT정량분석법, NR정량분석법 및 SRB정량분석법을 이용하여 각각의 흡광도를 측정하고, 세포의 광학현미경적 관찰을 실시한 결과, MTT흡광도와 NR 흡광도를 Borenfreund 등<sup>9</sup>의 판정기준에 의하면 고독성 또는 중간독성으로 판정할 수 있었고, SRB흡광도에서는 인체 피부흑색종세포에 대하여 무독성으로 판정할 수 있었으며, EGCG의  $\mu\text{M}$ 농도를 양적으로 증가하면서 처리한 후, 48시간이 지난 다음, MTT정량분석법, NR정량분석법 및 SRB정량분석법으로 흡광도를 측정하고, 광학현미경적으로 관찰한 결과는 Table 1-3과 사진 1, 2와 같다.

MTT정량분석에 의한 실험결과는 Table 1에서 보는 바와 같이, EGCG는 인체 피부흑색종세포에 대하여 EGCG 1  $\mu\text{M}$ 과 25  $\mu\text{M}$ 에서는 MTT농도가 대조군(control)의 8.19%와 85.2%로 감소하여 유의적인 항암 활성을 보이지 않았으나, 50  $\mu\text{M}$ 농도에서는 MTT량이 통계적으로 유의성있게 감소하였으며, 100  $\mu\text{M}$ 농도( $P < 0.001$ )에서는 오히려 50  $\mu\text{M}$ 농도에서보다 MTT량이 더욱더 감소하였다. 즉 MTT 정량분석법에서는 EGCG농도가 증가함에 인체 피부흑색종세포에 대한 항암활성이 증가하였으며, EGCG의 농도가 감소함에 따라 MTT량이 증가하였다. 따라서  $\text{MTT}_{50}$ 는 166.10  $\mu\text{M}$ 이었다.

NR정량분석법에 있어서도 MTT정량분석법에서와 유사한 결과가 나타났다. EGCG는 인체 피부흑색종세포에 대하여 50  $\mu\text{M}$ 농도에서 NR량을 통계적으로 유의하게 감소시켰으며, 100  $\mu\text{M}$ 농도( $P < 0.01$ )에서는 50  $\mu\text{M}$ 농도에서 보다 NR량의 감소현상이 더욱

Table 2. The NR uptake ability of EGCG on human skin melanoma cells

EGCG Concentration ( $\mu\text{M}$ )	NR quantity	
	Mean $\pm$ S. D. <sup>a</sup>	% of control
Control	1.34 $\pm$ 0.28	100
1	1.06 $\pm$ 0.09	79.0
25	0.98 $\pm$ 0.16	72.8
50	0.88 $\pm$ 0.18*	65.6
100	0.49 $\pm$ 0.12**	36.5
$\text{NR}_{50}$	123.72	

cells were incubated for 48 hrs. the cells were harvested with Trypsin-EDTA. aThe values represent the mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control values: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Table 3. The SRB absorbance of EGCG on human skin melanoma cells

EGCG Concentration ( $\mu\text{M}$ )	SRB quantity	
	Mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>	% of control
Control	2.72 $\pm$ 0.03	100.0
1	2.70 $\pm$ 0.02	99.1
25	2.65 $\pm$ 0.12	97.3
50	2.03 $\pm$ 0.15***	74.7
100	1.52 $\pm$ 0.32***	55.8
$\text{SRB}_{50}$	3572.30	

cells were incubated for 48 hrs. the cells were harvested with Trypsin-EDTA. aThe values represent the Mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \*\*\* $P < 0.001$

증가하였고,  $\text{NR}_{50}$ 는 123.72  $\mu\text{M}$ 이었다. MTT 정량분석법에서와 같이 EGCG의 농도가 증가함에 따라 NR량이 감소하였으며, 1  $\mu\text{M}$ 와 25  $\mu\text{M}$ 에서는 유의한 억제효과를 볼 수 없었다.

핵내의 단백질인 sulforhodamine B protein량을 측정하는 SRB정량분석법에 있어서도 MTT정량에서와 같이 50  $\mu\text{M}$ 와 100  $\mu\text{M}$  EGCG에서 인체 피부흑색종세포의 SRB량이 통계적으로 유의( $P < 0.001$ )하게 감소하였으며, 다른 정량분석법에 비하여 높은 유의성( $P < 0.001$ )을 볼 수 있었다. 마찬가지로, 1  $\mu\text{M}$ 과 25  $\mu\text{M}$  EGCG에서 항암활성에 대한 유의성이 나타나지 않았으며, EGCG농도가 증가함에 따라서 SRB량이 감소하였다.  $\text{SRB}_{50}$ 는 3572.30  $\mu\text{M}$ 이었다.

위의 세 가지(MTT, NR, SRB) 정량 분석법에 의한 결과로부터 EGCG의 농도 50  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$ 에서 인체 피부 흑색종 세포에 대하여 통계적으로 유의적인

Table 1. The MTT absorbance of EGCG on human skin melanoma cells

EGCG Concentration ( $\mu\text{M}$ )	MTT quantity	
	Mean $\pm$ S. D. <sup>a</sup>	% of control
Control	3.25 $\pm$ 0.13	100.0
1	2.64 $\pm$ 0.11	89.1
25	2.77 $\pm$ 0.11	85.2
50	2.56 $\pm$ 0.03*	78.8
100	1.20 $\pm$ 0.05***	36.8
$\text{MTT}_{50}$	166.10	

cells were incubated for 48 hrs. the cells were harvested with Trypsin-EDTA. aThe values represent the mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control values: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$

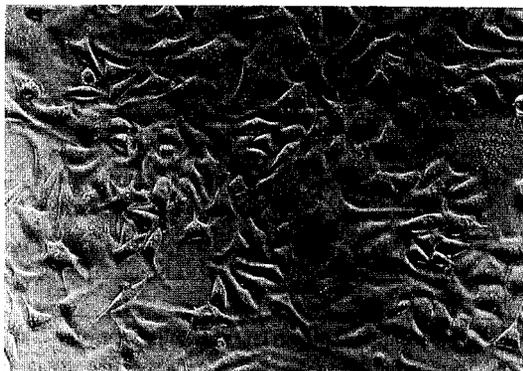


Photo. 1. An inverted photomicrograph of human skin melanoma cells treated with unmodified medium(control) for 48 hrs( $\times 400$ ). Most cells had abundant cytoplasm and cytoplasmic process.

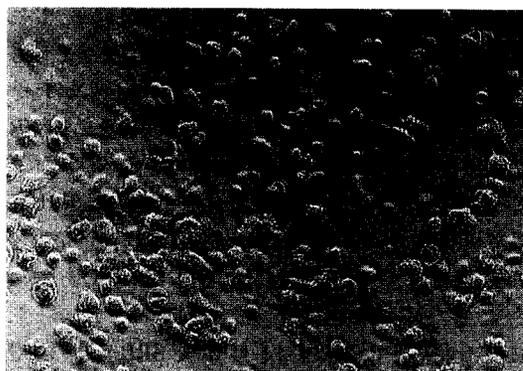


Photo. 2. An inverted photomicrograph of human skin melanoma cells treated with 50  $\mu\text{M}$  EGCG containing medium for 48 hrs( $\times 400$ ). Most cells were observed morphological changes.

항암 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 한편, 각 정량 분석들 간의 P값을 비교해 볼 때, SRB정량 분석법에서 가장 유의성이 높은( $p < 0.001$ ) 결과를 보였으므로, EGCG가 인체의 피부흑색종 세포에 미치는 항암효과를 평가하는 데에 SRB 정량분석법이 MTT나 NR정량분석법보다도 예민함을 알 수 있었다.<sup>10</sup> 인체 피부흑색종세포를 24시간 배양하면, well바닥에 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 빈틈없이 부착하고 있었으며, 72시간 후에는 여러 형태의 세포들이 층을 이루고 있었다. EGCG 25  $\mu\text{M}$  농도를 인체 피부흑색종세포에 처리한 well에서는 세포의 형태가 원형으로 위축된 상태로 관찰되었으나, EGCG 100  $\mu\text{M}$  농도를 처리한 well에서는 세포의 형태가 대조군의 형태로 회복되는 경향이였다. 광학현미경적 관찰에서도 인체 피부흑색종세포는 50  $\mu\text{M}$  농도에서 퇴행성 변화가 심하게 나타났으나(photo 2), 100  $\mu\text{M}$  농도에서는 오히려 세포의 형태가 대조군과 유사하게 변화하는 경향이였다(photo 3), 이 결과에서 EGCG 100  $\mu\text{M}$  농도를 인체 피부흑색종세포에 처리하였을 때, 오히려 흡광도가 증가하고, 세포의 형태가 대조군과 유사하였는데, 그 이유에 대하여는 앞으로 계속 연구하여야 할 부분이며 같은 성분을 동일한 조건에서 암세포에 처리하여도 암세포의 종류에 따라서 항암작용이 다르게 나타남을 본 연구에서도 실감할 수 있었다. 이와 같은 결과에서 모든 항암제는 암세포에 대한 억제효과를 연구함과 동시에 암세포에 대한 작용메카니즘에 관한 연구가 필수적임을

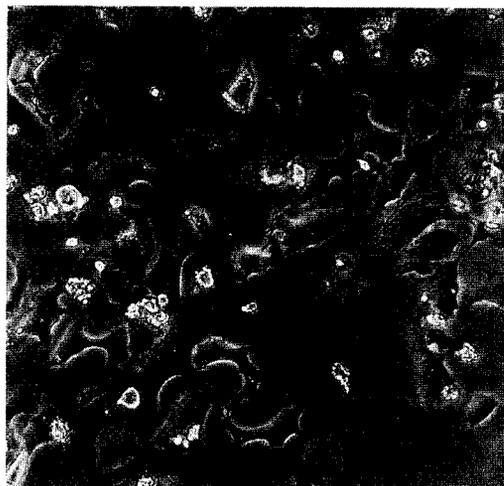


Photo. 3. An inverted photomicrograph of human skin melanoma cells treated with 100  $\mu\text{M}$  EGCG containing medium for 48 hrs( $\times 400$ ). Most cells were observed morphological changes.

알 수 있으므로 앞으로 작용메카니즘에 관한 연구를 병행할 계획이다.

## 결 론

독성에 의한 부작용이 적고 항암활성이 강한 항암 물질을 개발하기 위하여 전장세포에 대한 세포독성이 약하고 유방암, 백혈병 및 생쥐 피부암 등의 발암 과정 초기 또는 증식기에 억제 효과가 있는 것으로 알려진 EGCG를 인체 피부흑색종세포에 처리한 후,

48시간 배양하여 일반적으로 암검색에 이용되는 MTT분석법, NR분석법 및 SRB분석법으로 항암활성을 측정하였으며, 동시에 광학현미경적으로 암세포를 관찰하였다.

1. MTT정량 분석시, 50  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$  EGCG에서 통계학적으로 유의한 항암활성을 나타내었으며, 100  $\mu\text{M}$  EGCG에서 가장 유의성( $P < 0.001$ )이 측정되었다. 다른 농도에서 유의성이 없었다.

2. NR 정량 분석시, 50  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$  EGCG에서 통계적으로 유의한 항암활성을 나타냈으며, 다른 농도에서 유의성이 없었다. 100  $\mu\text{M}$  EGCG에서 높은 유의성( $P < 0.01$ )이 측정되었다.

3. SRB 정량분석에서 50  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$  EGCG에서 통계적으로 가장 유의( $P < 0.001$ )한 항암활성이 나타났고, 다른 농도에서는 유의성이 없었다.

4. 세포를 광학현미경으로 관찰한 결과, 인체 피부 흑색종세포에 대하여 50  $\mu\text{M}$  EGCG에서 퇴행성변화가 심하게 나타났으나, 100  $\mu\text{M}$  EGCG에서는 대조군의 세포형태와 유사하였다.

## 인 용 문 헌

1. Yosioka, L.; Nishimura, T.; Matsud, A.; Kitagawa, L.; *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, *18*, 1610.
2. Yosioka, L.; Nishimura, T.; Matsude, A.; Kitagawa, L.; *Chem. Pharm. Bull.* **1971**, *19*, 1186.
3. 나효환, 백순옥, 한상빈, 복진영; *Korean Agri. Chem. Soc.* **1992**, *35*, 276.
4. Liao, S.; Umekita, Y.; Guo, J.; Kokontis, J. M.; Hiipakka, R. A.; *Cancer Lett.* **1995**, *96*, 239.
5. Yamane, T.; Takahashi, T.; Kuwata, K.; Oya, K.; Inagake, M.; Kitao, Y.; Suganuma, M.; Fujiki, H.; *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2018.
6. Stoner, G. D.; Mukhtar, H.; *J. Cell. Biochem. Suppl.* **1995**, *22*, 169.
7. Liao, S.; Hiipakka, R. A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *214*, 833.
8. Mosmann, T.; *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55.
9. Borenfreund, E.; Puemer, J. A.; *J. Tissue Culture Meth.* **1984**, *9*, 7.
10. Skehan, P.; Storeng, S.; Studiero, D.; Monke, A.; McMahon, T.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bodesh, H.; Kenny, S.; Boyd, M. R.; *Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107.