

(+)-Catechin에 의한 백혈병 세포 HL-60의 분화 유도효과

이수진⁴ · 염윤기² · 안형수³ · 안령미⁴ · 이세윤¹
원자력병원 면역학연구실¹, 순천향대학교 자연과학대학²,
동덕여자대학교 약학과³, 보건관리학과⁴

Differentiation Inducing Effects of (+)-Catechin in Human Leukemia HL60 Cells

Su-Jin Lee⁴, Yoon Ki Yom², Hyung-Soo Ahn³, Ryoung-Me Ann⁴ and Seh-Yoon Yi¹

¹Lab. of Immunology, Korea Cancer Center Hospital, KAERI Seoul 139-240 Korea

²College of Natural Science, Soon Chun Hyang University,
Choongnam 337-745, Korea

³Department of Pharmacy, Dongduk Women's University,
Seoul 136-714, Korea

⁴Department of Health Science, Dongduk Women's University,
Seoul 136-714, Korea

(Received October 7, 1998)

(Accepted December 21, 1998)

ABSTRACT : (+)-Catechin inhibited the growth and induced the differentiation of HL-60 human leukemia cells. The degree of a differentiation by (+)-catechin was proved by NBT reduction assay. To understand the molecular mechanism of (+)-catechin during the differentiation, the expresstion level of oncogenes was detected by Northern blot analysis. *c-Myc* mRNA level was reduced after treatment with (+)-catechin (10^{-4} M), however, the expression of *c-jun* was increased with a concentration dependent manner in HL-60 cells. These results showed that the differentiation and antiproliferation of HL-60 cells against (+)-catechin was related to the redution of *c-myc* and the induction of *c-jun* expression.

Key Words : (+) Catechin, Differentiation, HL-60 cell, *c-myc*, *c-jun*

I. 서 론

(+)-Catechin은 식물과 녹차의 성분으로 자연계에 광범위하게 존재하는 flavonoids이며 특히 식물들의 나무 껍질 또는 잎이나 뿌리에 광범위하게 존재하는 phenolic compound로서 코코아, 차, 와인 그리고 사과껍질과 같은 다양한 음식원료 속에 있으며 주목할 만한 독성은 없다(Perrissoud, 1986; Pierpoint *et al.*, 1986). 지금까지 알려진 녹차의 추출물은 세균과 비루스를 억제하는 작용이 있고, 항균, 항용혈소, 항산화, 항암효과를 가지고 있으며 flavonoids의 효과로는 항암효과와 돌연변이를 억제하는 효과가 있다(Toda *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996).

Wang 등(1989)은 녹차의 polyphenols이 6-thioguanine (6-TG) 저항변이와 aflatoxin B 또는 benzo[α]pyrene에 의해 유도된 sister-chromatin-exchanges와 chromosome abberation을 줄인다고 보고하고있다. 특히 (+)-cate-

chin은 DNA복제와 회복을 조절하고 암의 촉진과 진행, 분자간 반응을 억제하는 차단제와 억제제로서 작용한다(De Flora *et al.*, 1988). (+)-Catechin은-acetylaminofluorene, N-hydroxy-4-aminobiphenyl, benzo[α]pyrene 등 몇몇 변이원성물질을 억제하는 효과를 가지고 있다고 보고하고 있으며, 또한 (+)-catechin은 담배의 발암성분인 4-metylnitrosamino 3-pyridyl-1-butan(NNK)이 유발하는 호소 활성화와 DNA가 손상된 중간생성물의 형성을 억제하여 DNA single-strand breaks(SSBs)와 DNA methylation을 감소시켜 간암을 유발하는 NNK를 효과적으로 방어하는 물질이라고 보고하고 있다.

Polyphenol류인 epigallocatechin gallate(EGCG)는 mouse의 skin에서 암의 촉진(promotion)의 억제 효과를 가지고 있으며(Oguni *et al.*, 1989) 음료 중 EGCG은 rat glanular stomach, mouse duodenum, rat colon, hamster pancreas 그리고 mouse의 간에서 발암을 억제한다(Yoshizawa *et al.*, 1987). 음료 중 EGCG는 B16 mela-

noma cell이 쥐의 폐로 전이되는 것을 막아 EGCG는 암의 예방물질로 널리 알려져 있다(Yoshizawa *et al.*, 1987). 이러한 기전으로 carcinogenesis의 억제효과로서 유전자 변이의 억제는 원암유전자의 변이를 억제하여 결론적으로 carcinogenesis의 방어를 한다고 알려져 있다.

HL-60는 급성전골수성백혈병(acute promyelocytic leukemia)유래의 암세포 주로서 여러 분화 유도 인자에 의해 granulocyte나 macrophage로 분화될 수 있는 bi-potent한 세포이다(日本生化学會, 1987, Raymond and Ruddon, 1987). 분화는 여러 성장인자와 세포들 사이의 자극과 상호작용, 산소와 영양분의 양 그리고 주위 환경 등에 영향을 받는다. HL-60세포에 알려진 분화 유도 물질은 granulocyte로 분화하는 retinol(vitamin A), retinoic acid(RA), vitamin D₃, dimethyl sulfoxide(DMSO)와 monocyte로 분화를 유도하는 cAMP, TPA 등이 보고되고 있다. 이러한 분화 유도 물질이 암세포에 특이적으로 작용하는 항암제 연구와 기전에 주목받고 있는 분야이다. 세포의 원암유전자인 c-fos와 c-myc은 growth factor나 다른 phorbol esters와 같은 유사분열물질에 의해 신호 전달의 초기 목표(target)가 되어 유사분열과정과, cell cycle 조절 기전에 중요한 영향을 미친다(Langgut and Kerster, 1990). c-Myc은 세포의 형질전환이 일어나는 과정에 관여하며 간장에서의 발현증가가 재생간과 간암의 발생 과정에서 관찰된 바 있고 폐암이나 직장암에서도 발현의 증폭을 보였다(Thompson *et al.*, 1984; Hayashi *et al.*, 1984). HL-60세포에서 c-myc은 세포의 분화와 증식의 과정에 관여하며 HL-60세포에서 c-myc의 발현은 정상 세포에 비하여 20배 이상 증가되어 있음이 확인되었으며 c-myc의 발현은 이 세포의 암세포로의 변형에 중요한 요인이 되는 것으로 추정된다(Nobuyuki *et al.*, 1994). c-fos와 c-jun은 초기에 발현하는 유전자로 유사분열물질, growth factor 또는 화학물질과 같은 외부 자극에 의해 빠르고 순간적인 전사 활성을 한다고 보고되어졌다(Greenberg and Ziff, 1984).

분화는 기존의 세포독성을 나타내는 농도보다 저 농도에서 세포의 분화유도작용이 있는 것들이 알려지고 있어 저 농도 사용에 따라 심각한 항암제의 부작용을 줄일 수 있다는 점에서도 상당히 고무적인 것으로 받아들여진다. 따라서 본 연구에서는 녹차의 주성분이고 세포독성이 적은 (+)-catechin에 의한 암세포의 성장억제 효과와 분화유도 작용을 알아보고자 하였다. 또한 이들 현상과 연관성이 있음이 알려진 protooncogene인 c-myc과 c-jun유전자의 발현의 변화를 관찰하여 (+)-

catechin의 세포내 기작을 이해하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 세포 및 배양액

본 실험에는 human promyelocytic leukemia세포인 HL-60를 사용하였고, 한국 KCLB(Korea Cell Line Bank)에서 분양 받아 heat inactivation시킨 10%의 fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Life Technologies, Inc. USA) 및 100 I.U./mL의 penicillin과 100 µg/mL의 streptomycin(Sigma Chemical Co., USA)을 포함한 RPMI medium 1640(Gibco Life technologies. Inc. USA) 배지에서 5% CO₂가 공급되는 37°C의 배양기(Vision Scientific Co.)에서 mL당 3×10⁵의 세포를 넣어 배양하였다.

2) 시약 및 조제

본 연구에서 사용한 (+)-catechin(C₁₅H₁₄O₆, MW=290.3)은 Sigma사에서 구매하여 사용하였다. 투여 용액은 10⁻¹ M 농도로 50% ethanol에 녹여 단계별 희석하였으며 용시조제하였다. Trypan blue(0.4%(w/v) trypan blue, 0.8% sodium chloride, 0.06%(w/v) potassium phosphate, 0.05%(w/v) Methyl-p-hydroxybenzoate, pH 7.2), nitro blue tetrazolium, guanidin thiocyanate, sodium citrate, formamide, formaldehyde, MOPS(3-[N-Morpholino]propane-sulfonic acid), EDTA, Triton-X, isoamyl alcohol 등은 Sigma사에서, 제한 효소와 RNase는 Promega사에서 구입하였고, Hyper-film-MP와 Hybond N⁺는 Amersham사에서 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약은 특급시약을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포의 성장을 검사

HL-60세포를 10⁴개/mL로 24 well에 심어서 37°C, 5%의 CO₂ 배양기에서 24시간 전 배양하였다. 전 배양 후 (+)-catechin(C₁₅H₁₄O₆, FW=290.3, Sigma)을 증류수로 희석하여 10⁻¹ M로 만든 후 배지에 희석하여 10⁻² M에서 10⁻⁶ M로 세포에 처리하여 24시간 48시간 72시간 후에 세포의 성장율을 관찰하였다. 각 농도별로 처리한 세포를 300 rpm으로 15분간 원심분리한 후 Trypan blue(0.4%(w/v) trypan blue, 0.8% sodium chloride, 0.06%(w/v) potassium phosphate, 0.05%(w/v) Methyl-p-hydroxybenzoate, pH 7.2)를 사용하여 hemacytometer에

서 수를 세었다. 결과의 통계학적인 분석은 ANOVA 분석을 사용하여 실시하였다.

2) NBT assay

HL-60 세포를 기른 배양액으로부터 세포배양액을 취한 다음 1% NBT(sigma)와 TPA 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 가한 후 30분 동안 37°C에서 배양하여 현미경으로 염색된 세포를 counting한다(Yen *et al.*, 1987).

3) Plasmid DNA분리

Colony를 ampicillin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 있는 LB(Luria-Bertani media)에서 흔들면서 배양하여 원심분리한 후 침전물을 차가운 GTE(50 mM glucose, 25 mM tris, 10 mM EDTA) 용액으로 씻고 다시 같은 조건으로 원심분리한다(4°C). 침전물은 차가운 GTE로 씻은 후 250 ml 플라스크에 옮기고 흔들면서 lysozyme 용액(20 mg/ml in cold GTE)을 가한다. 충분히 섞고 실온에서 잠시 방치한 후 lysis 용액(2.2 ml 10 N sodium hydroxide, 5.5 ml 20% sodium dodecylsulfate, 102.3 ml H₂O)을 가하고 충분히 섞어 얼음물에 방치한다. 3 M potassium acetate buffer(pH 4.8)를 가하고 계속 흔들면서 얼음속에 방치한다. 총량을 50 ml polycarbonate tube에 나누어 넣고 원심분리한다(4°C). 거르기로 상층액을 거르고 부피를 측정 후 250 ml 원심분리 용기에 옮겨 isopropanol을 가한다. 실온에서 잠시 방치하고 원심분리(4°C)한 후 상층액은 버리고 침전물을 건조시킨 다음 TE(10 mM Tris, 1 mM EDTA) 용액에 녹이고 50 ml conical tube로 옮긴다. cesium chloride를 가하여 녹인 후 부피를 측정하고 ethidium bromide를 가한 다음 50 K rpm에서 원심분리한다(20°C). 파스퇴르 파이펫으로 supercoil DNA를 뽑아내고 동량의 isoamylalcohol로 4~5번 씻어 ethidium bromide를 추출하여 제거한다. 50 ml 원심분리 용기에 옮기고 3 M sodium acetate와 95% ethanol를 가하여 잘 섞는다. 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 부어내어 70% ethanol로 씻고 침전물을 건조시킨 후 TE buffer에 녹인 다음 UV spectrophotometer로 260 nm에서 OD를 측정하여 plasmid DNA 농도를 계산한다.

4) Northern hybridization analysis

RNA의 정제는 Chomczynski 및 Sacchi의 acid guanidium thiocytate-phenol-chloroform 추출법을(Chomczynski, 1987) 이용하였고 48시간 전에 (+)-catechin으로 처리한 세포를 수집하여 변성용액(4 M guanidine thiocyanate, 0.75 M sodium-citrate(pH 7.0),

10% sarcosyl, 0.1 M 2-mercapto ethanol) 5 ml을 넣은 후 2 M sodium acetate(pH 4.0) 0.5 ml, saturate phenol 5 ml, chloroform-isoamyl alcohol mixture(49:1) 1 ml을 가하고 30분간 얼음속에 방치한 후 4°C의 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 상층액을 조심스럽게 DEPC(Diethyl pyrocarbonate)를 처리한 다른 tube에 옮기고 2배의 ethanol과 섞은 다음 -20°C에서 1시간 이상 방치한 후 4°C에서 13,000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액은 버리고 pellet에 변성용액을 400 μl 넣어 녹인 후 1.5 ml 미세원심분리관으로 옮긴 후 800 μl 의 ethanol을 넣어 -20°C에서 1시간 이상 방치하여 RNA를 침전시켰다. RNA를 침전시킨 후 4°C에서 13,000 rpm으로 30분간 원심분리한 다음 상층액을 버리고 DEPC 처리된 70% ethanol로 세척한 후 건조시킨 다음 DEPC 처리된 증류수로 녹여 -70°C에서 보관하였다.

Northern blot은 RNA 30 μg 을 사용하여 formamide와 formaldehyde 용액으로 변성시켜 시료에 3 μl 의 loading buffer(50% glycerol, 0.4% bromphenol blue, 0.1% xylene cyanole)을 넣어 6.2% formaldehyde-agarose gel에 1×MOP buffer(0.02 M MOPS, 0.0005 M sodium acetate, 0.001 M EDTA)에서 80 eV, 3시간 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 50 mM sodium hydroxyde 1×SSC에서 30분간, 10×SSC 용액으로 capillary transfer법을 이용하여 nylon membrane(Hybond N⁺)에 옮겼다. RNA가 옮겨진 membrane을 UV로 crosslink시켜 고정하고 hybridization을 실시하였다.

probe는 random primer labeling방법으로 하였다. Plasmid를 제한효소로 절단한 후 low melting agarose gel에서 DNA조각을 분리하여 [α -³²P]-dCTP와 Klenow fragment를 사용하여 labeling하여 hybridization을 실시하였다.

UV-crosslink한 membrane을 0.25 M disodium phosphate(pH 7.2)로 적시고 hybridization buffer(1 mM EDTA, 7% SDS, 0.25 M disodium phosphate pH 7.2)에 65°C에서 60분간 prehybridization 시킨 다음 밤동안 hybridization시켰다. hybridization시킨 막을 2×SSC, 1% SDS 용액에서 씻고, 0.1×SSC, 1% SDS 용액에서 15분간 2번 세척한 후 1×SSC 용액에서 다시 세척하였다. 세척한 후 chemiluminescent substrate solution을 가하고 plastic bag에 넣어 암실에서 X-ray 필름에 감광시켜 관찰하였다.

III. 결 과

1. (+)-Catechin에 의한 세포 성장억제 효과

Table 1. Dose-dependent growth inhibition effects of (+)-catechin on HL-60 cells

Concentration of (+)-catechin	Time of post-incubation (hr)		
	0 hr	24 hr	48 hr
normal	1×10^4	2.7×10^4	5.36×10^4
10^6 M	1×10^4	1.8×10^4 *	3.44×10^4 **
10^5 M	1×10^4	1.5×10^4 *	2.48×10^4 **
10^4 M	1×10^4	1.05×10^4 *	1.84×10^4 **
10^3 M	1×10^4	ND	ND
10^2 M	1×10^4	ND	ND

* $p < 0.05$; significantly different from normal.

** $p < 0.01$; significantly different from normal.

ND; non detectable.

(+)-Catechin이 배양세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 (+)-catechin의 농도를 10^6 M, 10^5 M, 10^4 M, 10^3 M, 10^2 M로 세포에 처리하여 세포 성장을 본 결과는 다음과 같다(Table 1).

배양세포에 물질을 처리한 다음 24시간 배양 후에 (+)-catechin의 농도가 10^6 M일 때는 세포의 성장이 33%가 감소되었고, 10^5 M일 때 44%, 10^4 M일 때 61%의 감소를 보였다. 또한 48시간 배양후에는 (+)-catechin의 농도가 10^4 M일 때는 세포의 성장이 36%가 감소되었고, 10^5 M일 때 54%, 10^3 M일 때 66%의 감소를 보여 (+)-catechin의 농도가 증가할수록 세포의 성장이 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$)(Table 1, Fig. 1).

2. (+)-Catechin에 의한 분화촉진 효과

(+)-Catechin에 의해 분화된 백혈구세포가 superoxide anion을 생성할 수 있음을 이용하여 분화의 여부를 보고자 하였다. 성장에 억제효과가 있었던 (+)-ca-

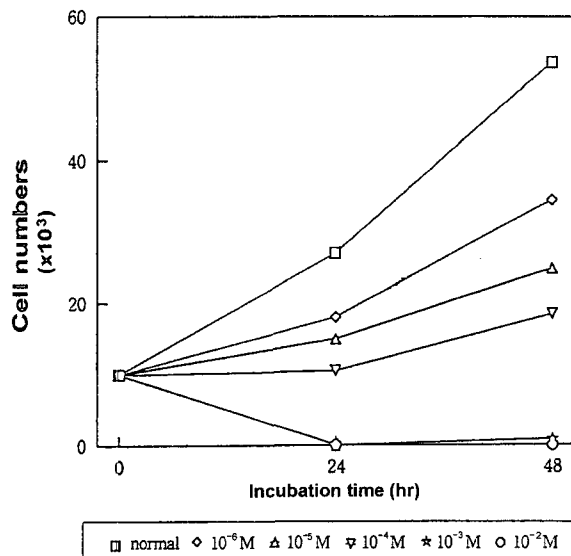


Fig. 1. Time course of growth behavior in HL-60 with various concentrations of (+)-catechin.

Table 2. Differentiation of HL-60 with (+)-catechin and retinoic acid

normal	(+)-catechin		retinoic acid 10^6 M
	10^4 M	10^5 M	
3%	36%*	15%**	72%**

* $p < 0.05$; significantly different from normal.

** $p < 0.01$; significantly different from normal.

techin의 10^4 M과 10^5 M을 처리하고, HL-60 세포에 높은 분화물질로 알려진 retinoic acid를 처리하여 분화정도를 비교하고자 하였다. NBT의 환원능을 보인 positive cell이 control의 경우 3%인데 비해(+)-catechin을 10^5 M로 처리한 세포는 15%, 10^4 M로 처리했을 때는 36%로 나타났으며, retinoic acid를 10^6 M로 처리하여 72%의 분화를 보였다. 따라서 (+)-catechin은 10^4 M과 10^5 M 농도에서 HL-60의 분화를 유도함을 알 수 있었으며 10^4 M에서 더 높은 분화효과를 보였다(Table 2).

3. (+)-catechin에 의한 c-jun과 c-myc의 발현시험

배양세포에 (+)-catechin을 10^4 M로 처리하여 24시간 후 원암유전자인 c-myc과 c-jun의 발현을 northern blotting을 실시하여 관찰하였다. c-myc 유전자는 (+)-catechin을 10^4 M로 처리하여 (+)-catechin을 처리하지 않은 세포에 비해 발현이 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig 2).

또한 세포에 (+)-catechin을 10^4 M과 10^5 M로 처리하여 24시간 후 원암유전자인 c-jun의 발현은 (+)-catechin을 10^5 M과 10^4 M로 처리하여 처리하지 않은 세

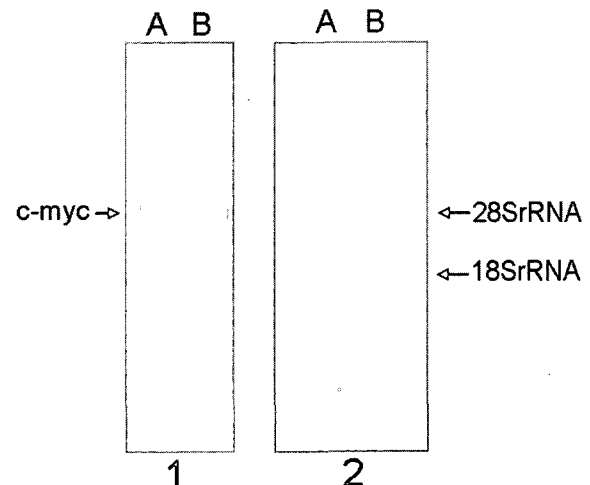


Fig. 2. Northern hybridization analysis of c-myc expression in HL-60 cells with (+)-catechin. A; untreated, B; treated with 10^4 M (+)-catechin.

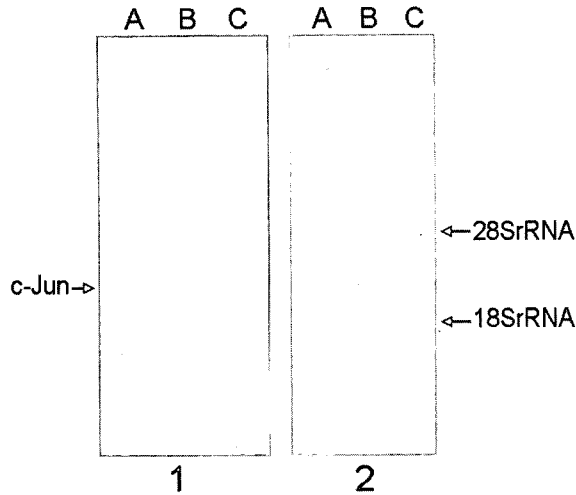


Fig. 3. Northern hybridization analysis of c-jun expression in HL-60 cells with (+)-catechin. A; untreated, B; treated with 10⁻⁵ M (+)-catechin, C; treated with 10⁻⁴ M (+)-catechin.

포에 비해 발현이 증가한 것을 볼 수 있으며 농도가 증가함에 따라 발현도 증가함이 관찰되었다(Fig 3).

IV. 고 찰

기존에 우리가 사용하던 항암요법제들은 주로 그 작용기전이 DNA의 복제를 억제하거나 세포내 대사와 생합성을 감소하거나 free radical을 생성시키는 등 세포독성을 주로 하는 것들로서 증식이 빠른 암세포에 작용해 세포를 죽이는 것을 목적으로 하고 있다. 그러므로 상당히 고용량의 화학합성약물이 필요하게 되므로 치료 목적 외의 심각한 부작용에 의해 항암제의 투여가 많은 제약을 받고 있다. 따라서 세포독성이외의 독성이 적은 새로운 기전의 항암제 개발이 요구되어지고 있는데 최근에 세포독성이 나타나는 농도 보다 훨씬 저 농도 세포분화를 유도함으로써 항암작용을 연구하고 있다.

녹차의 주성분인 (+)-catechin은 항암효과를 갖는 식물성 원료이며 주의할 만한 독성은 보고되지 않아 천연 항암제로서 많은 연구에서 증명되고 있다. 따라서 본 연구는 (+)-catechin이 인간 백혈병세포인 HL-60에 작용하여 분화 유도를 알아보고자 하였다.

(+)-catechin을 HL-60 세포에 10⁻⁶ M에서 10⁻³ M 농도로 3일간 배양하여 관찰한 결과 농도 의존적으로 성장을 억제시켰으며 10⁻⁵ M에서 50%의 감소를 나타내었다. Jang 등(1994)은 (+)-catechin이 human chronic myelogenous leukemia세포주인 K-536과 mouse lymphocytic leukemia세포주인 L1210에서 독성을 갖는다고 보고하고 있어 본 실험과 일치하는 결과를 보여

(+)-catechin은 leukemia세포 증식을 억제하는 효과를 보였다.

일반적인 우리 신체의 정상조직의 모든 세포는 어느 정도 증식을 이룬 뒤에는 반드시 분화라는 과정을 거쳐 정상적인 기능을 갖는 세포로 존재하게 되며 이런 증식과 분화는 이미 세포 내에서 program되어 있는 유전자 level에서의 조절에 의한 것으로 알려져 있다. 그러나 암조직은 이러한 신체의 정상조직에서 유래하기는 하였으나 정상세포와는 달리 정상적인 분화를 하지 못한 채 무제한적으로 증식만 계속하는 미성숙한 세포들로 이루어진 것이다. 따라서, 암세포는 그 대사나 효소의 patterns, 유전자 수준의 조절, 세포표면의 구조들이 정상세포와 다르게 나타난다.

암세포와 같은 미분화된 세포의 출현기전에 대해서는 아직 확실히 알려진 바는 없으나 그 주된 쟁점은 분화가 완료되었던 성숙한 세포가 dedifferentiation된 것인지 또는 undifferentiation 상태에 있던 세포들이 분화의 능력을 잃어버린 것인지 하는 점에 있다 (Raymond and Rudden, 1987). 지금까지 보고된 바에 의하면 암세포로의 변역(transformation)은 증식능력을 가지고 있는 세포에서만 일어난다고 하며 어떤 경로로의 단기의 운명이 결정되었던 세포의 분화는 비가역적인 반면 terminal differentiation 과정만은 가역적인 것으로 알려져 있다(Yaffe, 1969). Pierce는(1970) renewal capacity를 가지고 있는 normal tissue stem cell이 malignant tumor의 orgin이라는 주장을 하였는데 이는 지속적인 증식능을 가진 미분화 세포의 생성되는 점에서는 암과 일치한다. 그러나 최근에 암세포에서 보여지는 abnormality가 완전히 비가역적인 것은 아니라는 것이 밝혀졌다. 그 대표적이 예가 분화유도제를 사용하여 암세포를 정상세포로 또는 그와 유사하게 분화유도를 시키는 방법으로서 leukemia나 hepatocyte, fibroblast 등에서 많이 시도되어지고있다(Krystosek and Sachs, 1976; Maruo *et al.*, 1983).

본 실험에서 (+)-catechin이 분화유도제로서의 작용을 알아보기 위해, HL-60 세포에 대한 강한 분화물질인 retinoic acid를 양성대조물질로 사용하여 비교하였다. (+)-catechin을 10⁻⁴ M과 10⁻⁵ M로 처리한 후 24시간 배양하여 NBT reduction test를 실시하여 positive cell이 control에서 3%인데 비해 (+)-catechin을 10⁻⁵ M로 처리한 세포는 15%, 10⁻⁴ M로 처리했을 때는 36%로 나타났으며, 10⁻⁶ M의 retinoic acid를 처리하여 72%의 분화를 보였다. 따라서 (+)-catechin은 백혈병 세포인 HL-60에 자극을 주어 superoxide anion을 생성하여 NBT의 환원능을 보임으로써 leukemia세포를 다른 형

질로 분화를 유도함을 알 수 있었다.

세포의 분화와 증식의 과정에서 여러 종류의 protooncogene이 관여하는데 c-myc 유전자는 미분화세포와 증식이 계속되는 세포에서 c-myc 발현이 증가되고, 세포가 분화되고 증식이 억제됨에 따라 발현이 억제된다고 보고하고 있다(Nobuyki *et al.*, 1994). 또한 c-myc과 c-jun 등은 초기에 발현하는 원암유전자(immediate early response gene)이므로 본 실험에서 배양세포에 (+)-catechin을 10^{-4} M로 처리하여 24시간 후 원암유전자인 c-myc의 발현을 northern blotting을 실시하여 그 발현이 감소함을 관찰할 수 있었고 c-jun 유전자는 (+)-catechin을 10^{-5} M과 10^{-4} M로 처리하여 처리하지 않은 세포에 비해 발현이 증가한 것을 볼 수 있으며 농도에 의존적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. Obeid 등(1993)은 세포투과성 N-acetyl sphingosine이 HL-60 세포와 U-937 세포에서 세포분화와 세포증식 억제작용을 나타내며 이는 c-myc protooncogene의 발현과 관계가 있다고 보고 N-acetyl sphingosine를 처리하여 c-myc이 감소하였고 세포분화와 세포증식의 억제작용을 보고하고 있다. 따라서 (+)-catechin은 HL-60 세포에서 분화의 유도과 세포증식 억제작용을 나타내며 c-myc 유전자의 발현을 억제하는 결과를 보여 c-myc protooncogene의 발현과 밀접한 관계가 있다고 생각되어진다.

c-myc 유전자의 발현이 화학적 발암 물질에 의해 유발된 쥐 간암에서 발견되었으며(Huber and Thorgeirsson., 1987), 또 c-myc 암유전자의 발현 증가가 화학 물질 혹은 x-ray에 의해 형질 전환된 C3H/10T1/2(c18) 마우스 태아 섬유아세포에서 관찰된 바 있다(Billings *et al.*, 1987). 형질 전환 세포가 정상세포와 다른 점은 c-myc의 발현이 증가하던가 deregulation되어 있는 점이다. 따라서 본 실험에서 HL-60 세포에서 (+)-catechin에 의한 c-myc과 c-jun의 발현의 변화는 carcinogen의 변화에 영향을 미친다는 생각되어지며 (+)-catechin은 분화를 유도하여 HL-60 세포에서 항암효과가 있다고 생각된다.

c-Fos나 c-jun은 신호전달초기 단계에서 발현되는 유전자들이며 세포 내 신호전달경로와 밀접한 관계가 있다. c-Fos와 c-jun 단백질은 heterodimer형태로 DNA에 결합하여 세포주기를 조절한다. 그러므로 protooncogene의 발현변화는 HL-60 세포의 성장억제와 분화촉진을 분자수준에서 이해하는데 기여하고 있으며 앞으로 신호전달과정에 관여하는 protein kinase의 활성화도 및 발현변화를 검색하여 세포 내 기작을 연구하고자 한다.

참고문헌

- Billings, P.C., Shuin, T., Lillehang, J., *et al.* (1987): Enhanced expression and state of the c-myc oncogene in chemically and x-ray transduced C3H/10T1/2Cl 8 mouse embryo fibroblasts. *Cancer Res.* **47**, 3643-3650.
- Campisi, J., Gray, H.E., Pardee, A.B., Dean, M. and Soensheim, G.E. (1984): Cell-cycle-control c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. *Cell.* **36**, 241-245.
- Chang, J.H., Cho, J.H., Kim, H.H., Lee, M.W., Lee, K. P. and Lee, D.I. (1994): Cytotoxicity of (+)-catechin, one of the condensed tannin, on tumor cell lines. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* **8**, 85-91.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 152-155.
- De Flora, S. and Ramel, C. (1988): Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.* **202**, 285-306.
- Dyson, P.J. and Rabbits, T.H. (1985): Chromatin structure around the c-myc gene Burkitt lymphomas with upstream and downstream translocation points, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 1984-1990.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Yoshizawa, S., Horiuchi, T. *et al.* (1992): Sarcophytol A and (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), nontoxic inhibitors of cancer development. *Cancer chemoprevention.* 393-405.
- Green, R. *et al.* (1994): Inhibition of multiplication of influenza virus by extracts of tea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **71**, 84-85.
- Greenberg, M.E. and Ziff, E.B. (1984): Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos protooncogene. *Nature.* **331**, 433-438.
- Hayashi, K., Makino, R. and Sugimura, T. (1984): Amplification and overexpression of the c-myc gene in morris hepatomas. *Gene.* **75**, 475-481.
- Huber, B.E. and Thorgeirsson, S.S. (1987): Analysis of c-myc expression in a human hepatoma cell line. *Cancer Res.* **47**, 3414-3419.
- Klein, G. (1981): The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis, *Nature.* **294**, 313-318.
- Krystosek, A. and Sachs, L. (1976): Control of lysozyme induction in the differentiation of myeloid leukemia cells. *Cell.* **9**, 675-684.
- Langgut, W. and Kerster, H. (1990): The deazaguanine-derivative, queuine, effects cell proliferation, protein phosphorylation and the expression of the proto oncogene c-fos and c-myc in HeLa cells.

- FEBS*. **265**, 33-36.
- Lee, M.K., Yi, S.Y., Ahn, H.S. and Ahn, R.M. (1996): Lipid peroxidation and antioxidant activities on hairless mouse induced by UVB irradiation and effects of Tannic acid. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **22**, 102-108.
- Maruo, S.I., Gemmell, M.A., Callahan, M.F., Anderson, N.L. and Huberman, E. (1983): Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxy vitamin D₃ and phorbol-12 myristate-13-acetate. *Cancer Res.* **43**, 4989-4996.
- Nobuyuki, T., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Lamphier, M.C., Aizawa, S., Mak, T.W. and Taniguchi, T. (1994): Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell.* **77**, 829-839.
- Oguni, I., Nasu, K., Kanaya, S., Ota, Y., Yamamoto, S. and Nomura T. (1989): Epidemiological and experimental studies on the antitumor activity by green tea extracts. *Jpn. J. Nutr.* **47**, 93-102.
- Perrissoud. (1986): The development of cyanidanol and 3-palmitoyl-(+)-catechin as drug for the treatment of liver disease. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*. 559-569.
- Pierpoint, W.S. et al. (1986): Flavonoids in the human diet. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*. 125-140.
- Potter, M. (1972): Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol Rev.* **52**, 631-636.
- Price, G.B. (1970): Differentiation of normal and malignant cells. *Fed. Proc.* **29**, 1248-1252.
- Raymond, W., Ruddon (1987): Disease of abnormal differentiation. *Cancer Biology*. **2nd**, 172-176.
- Raymond W. Ruddon (1987): Regulation of cellular differentiation. *Cancer Biology*. **2nd** edition 69.
- Thompson, N.L., Mead, J.E., Braun, L., Goyette M., Shank, P.R. and Fausto, N. (1984): Sequential protooncogene expression during rat liver regeneration. *Cancer Res.* **46**, 3111-3118.
- Toda, M., Okubo, S., Ikigai, H., Suzuki, T., Suzuki Y. and Shimamura, T. (1991): The protective activity of tea against infection by *Vibrio Colerae*. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 109-112.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Manikumar, G., Abraham, P., Taylor, H., Hughes, T., Warner, J. and McGiveney, R. (1988): Plant antimutagenic agents Flavonoids. *J. Nat. Prod.* **6**, 1084-1091.
- Wang, Z.T., Cheng, S.J., Zhou, M., Athar, W.A., Khan, D., Bickers, R. and Mukhtar, H. (1989): Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutation Res.* **223**, 173-183.
- Yaffe, D. (1969): Cellular aspects of muscle differentiation in vitro. *In vitro current Topics in developmental biology*. **4**, 39-42.
- Yoshizawa., S., Horiuchi, T., Fujiki, H., Yoshida, T., Okuda, T. and Sugimura, T. (1987): Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of "tannin" in green tea. *Phytother Res.* **1**, 44-47.
- 암세포 생물학 (1992): 서울대학교 의과대학 암연구센터.
- 日本生化学会 (1987): 白血病細胞の分化と分化誘導, 續生化学実験講座. **8**, 121-129.