

마우스세포주 Balb/c 3T3 A31-1-1에서 Epigallocatechin gallate(EGCG)의 세포암화 억제효과에 대한 유전자발현 해석

정기경 · 서수경 · 김태균 · 박문숙 · 이우선 · 박순희 · 김승희 · 정해관*
식품의약품안전청 국립독성연구원

Genome-based Gene Expression Analysis of EGCG-mediated Cell Transformation Suppression Effect in Mouse Cell line Balb/c 3T3 A31-1-1

Ki kyung Jung, Soo Kyung Suh, Tae Gyun Kim, Moon Suk Park, Woo Sun Lee,
Sue Nie Park, Seung Hee Kim and Hai Kwan Jung*

National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration
Nokbundong 5, Eunpyungku, Seoul 122-704, Korea

(Received November 20, 2006 / Accepted December 20, 2006)

ABSTRACT : Previous studies showed that epigallocatechin gallate (EGCG) have substantial effects of suppressing the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-initiated cell transformation process on the bases of foci formation frequency and loss of anchorage dependency. In this study we tried to clarify the molecular mechanism of suppressing the cell transformation process. Mouse cell line balb/c 3T3 A31-1-1 was exposed 2 days to MNNG followed by 15 days 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) treatment for our transformation process. EGCG was added after the time point of 24 hours exposure to TPA and incubated for 19 days. 2029 genes were selected in our transformation process that showed fold change value of 1.5 or more in the microarray gene expression analysis covering the mouse full genome. These genes were found to be involved mainly in the cell cycle pathway, focal adhesion, adherens junction, TGF- β signaling, apoptosis, lysine degradation, insulin signaling, ECM-receptor interaction. Among the genes, we focused on the 631 genes (FC > 0.5) reciprocally affected by EGCG treatment. Our study suggest that EGCG down-regulate the gene expressions of up stream signaling factors such as nemo like kinase with MAPK activity and PI3-Kinase, Ras GTPase and down stream factors such as cyclin D1, D2, H, T2, cdk6.

Key words : Cell transformation, MNNG, carcinogenesis, microarray, EGCG

서 론

세포의 암화는 세포증식 및 생존시그널의 활성화와 사멸시

*To whom correspondence should be addressed

Abbreviations : **MNNG**: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, **TPA**: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, **MAPK**: mitogen activated protein kinase, **PI3K**: phosphatidylinositol 3 kinase, **CREB**: cAMP responsive element binding protein, **TGF**: transforming growth factor, **FGF**: fibroblast growth, **IGF**: insulin-like growth factor, **ATM**: ataxia-telangiectasia mutated, **CDK**: cyclin dependent kinase, **JNK**: c-jun N-terminal kinase, **mTOR**: mammalian target of rapamycin, **ECM** endothelial cell multimerin

그널의 불활성화에 기인하는 것으로 설명할 수 있다. 저자들은 세포의 생존 및 사멸의 신호전달 경로상의 세포내인자를 표적으로 하는 암억제물질 검색법을 확립하고 이를 이용하여 식품유래인자 및 생약성분 등을 대상으로하여 암억제물질을 검색하고 그 작용기구를 해석하므로써 암예방 및 치료수단의 개발을 위한 단서를 제공하고자 한다.

우리들은 마우스 정상세포주인 Balb/c 3T3 A31-1-1를 이용하여 MNNG와 TPA의 병행처리에 의하여 유도된 세포의 암화가 녹차추출물의 주된 성분의 하나인 EGCG에 의하여 현저히 억제됨을 포커스 형성과 앵커리지 비의존성의 획득을 지표로 하여 밝힌 바 있다 (Park et al., 2005). 이 연구는 EGCG의 세포암화 억제효과가 세포암화의 신호전달경로 상 어떠한 인자를 표적으로 하여 나타나는지를 마이크로어레이

기법을 이용하여 마우스 토템 제놈을 대상으로 밝히고자 한 것이다.

세포암화의 시그널 전달경로는 아직 충분히 밝혀진 것은 아니나 RAS/MAPK 경로와 PI3K/AKT 경로가 주된 경로로 제시되고 있으며 (Vivanco *et al.*, 2002), Tyrosine kinase를 표적으로 하는 Herceptin, Gleevec, mTOR를 표적으로 하는 Rapamycin, PI3K를 표적으로 하는 Wartmannin 등 이들 경로상의 인자를 표적으로 하는 항암화학요법제 또는 세포주기저해제도 속속 개발되고 있다 (Senderowicz *et al.*, 2004). 이들 경로에서 생성된 시그널은 세포핵에 전달되어 종국적으로 Jun, Fos 등 전사인자들을 활성화시켜 세포증식에 필요한 유전자군을 발현시키고, p21등 cdk inhibitor 등에 작용하여 세포주기진행을 촉진하거나 bcl 2, bax 등에 작용하여 아포토시스를 유발하게 된다. 식품유래인자 또는 생약유래성분 중에는 세포암화의 상류 또는 하류의 경로에 작용하여 세포암화를 억제하는 활성을 가진 물질이 다수 존재할 것으로 생각되고 있으며 EGCG는 우리의 연구의 대상이 된 첫 번째 물질이다.

EGCG는 녹차에 함유되어 있는 주성분 중의 하나 (Fujiki *et al.*, 1988)이며 이 물질의 암억제 효과에 대하여는 많은 연구가 이루어져 있으나 (Fujiki *et al.*, 1992; Hirose *et al.*, 1997; Liao *et al.*, 1995; Mukhtar, 1999; Chen *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998), 그 분자 메커니즘은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 최근의 연구에 의하면, 동 물질의 암 예방 작용이 세포주기진행저해와 아포토시스의 유도에 기인 할 가능성이 제시된 바 있으며 (Gupta *et al.*, 2000; Ahmad, 2000; Gupta *et al.*, 2003), telomerase를 저해하는 것이 암억제 효과의 주요기전 중 하나일 수 있다고 보고되었다 (Nasasni *et al.*, 1998; Nasasni, 2003).

Balb/c 3T3 A31-1-1 세포주를 이용한 *in vitro* 암화 검색법은 높은 세포암화 감수성과 판독성이 높은 포거스의 형성 등 암화 검색법으로서 우수한 특성을 갖추고 있으며 (LeBoeuf *et al.*, 1996; IARC, 1985), 빌암개시인자와 발암촉진인자의 검색에 적합하다고 알려져 있고 동종의 타 시험법에 비하여 시험기간도 크게 단축되었다 (Tsuchiya and Umeda, 1995; Kajiwara *et al.*, 1997). 동 세포주에 빌암개시인자로서 MNNG를, 발암촉진인자로서 TPA를 각각 처리한 다음 EGCG를 추가적으로 처리하여 세포암화과정에서 특이적으로 과발현되거나 과소발현된 유전자는 EGCG에 의하여 어떻게 발현 패턴을 변화시키는가에 주목하였다. 세포암화과정에서 발현이 증가하거나 감소한 유전자는 모두 2029개였으며 이들 유전자 중 EGCG처리에 의하여 발현이 증가한 것이 유의하게 발현이 억제되거나 발현이 감소된 것이 발현이 촉진된 유전자는 631개로 밝혀졌다. EGCG의 세

포암화 억제작용의 분자기구에 대하여는 타 연구자의 연구에 의하여 일부 밝혀진 바 있으나, cyclin D1, D2, H등과 같은 세포주기관련 유전자, 세포간 접착 경로에 속하는 유전자인 transcription factor 3, nemo like kinase, snail homolog 2, IGF-1 수용체 등을 우리의 연구에 의하여 EGCG의 분자표적으로 새로이 밝혀진 것이다. *In vitro* 암화억제물질 검색법을 이용한 유전자발현 레벨에서의 암화억제물질의 작용 기구의 해석은 세계적으로 전례가 희소함에 비추어 이 연구에서 설정한 실험설계 및 접근방법은 향후 본격적인 암화억제물질 검색 작업에 있어 좋은 가이드를 제공할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

시약 및 사용기기

MEM Medium, DMEM Medium, FBS (Fetal Bovine Serum), penicillin-streptomycin은 Gibco BRL (USA)에서 구입하였으며 Sodium bicarbonate, DMSO 등은 Sigma사의 것을 사용하였다. MNNG, TPA, EGCG는 Sigma (USA)에서 구입하였으며, 용매로 사용한 DMSO는 세포 성장과 형질 전환을 유도하지 않는 0.5% 이내의 농도에서 사용하였다. Total RNA는 RNesay Mini kit (Quiagen, USA)을 사용하여 추출하였다. Mouse의 전체 유전자가 모두 실린 Genechip 4302.0 Array (Affymetrix, USA)를 이용하였으며 cDNA onecycle kit를 이용하여 cDNA합성, cRNA 합성, cRNA 단편화와 hybridization을 수행하였다. 그 외에 ethanol (MERCK사), Streptavidin Phycoerythrin (SAPE, Molecular probe, USA), Bovine Serum Albumin (BSA, Invitrogen) 등 기타 시약은 모두 특급을 사용하였다. RNA 정량 및 순도측정은 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA)을 사용하였다.

세포암화 및 암화억제 처리과정

마우스 세포주 Balb/c 3T3 A31-1-1 (배아유래 섬유아세포)를 일본 보건과학 연구자원은행으로부터 분양받았다. 이 세포주의 배양액에 빌암개시인자로서 MNNG를 종농도 500 ng/ml로 2일간 처리 한 후 새로운 배지로 교환해주었으며 4일간 추가 배양한 다음 빌암촉진을 위하여 TPA 존재하에서 (종농도 100 ng/ml) 추가로 15일간 더 배양하였다. EGCG는 TPA 처리 24시간 경과시점에 종농도 20 ug/ml로 처리하였으며 TPA처리 종료후 5일간 더 배양하였다. 이 과정을 도시하면 아래 그림과 같다 (Fig. 1). MNNG와 TPA의 농도는 CHEMICON사 (미국)가 제시한 세포암화시험 프로토콜에 따랐으며 EGCG의 농도는

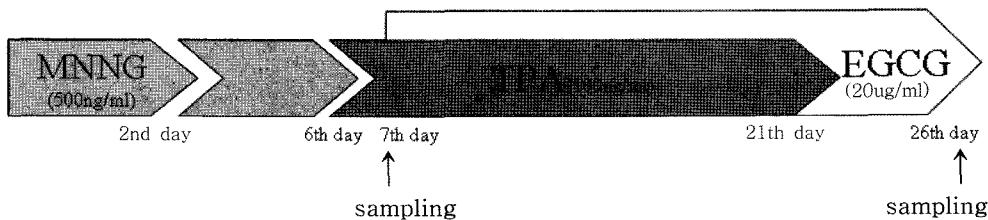


Fig. 1. Time scale of MNNG and TPA induced cell transformation process and its suppression by EGCG.

예비 세포독성 실험을 통하여 세포증식을 저해하지 않는 최고농도로 하였다. 사용한 배지는 MEM 배지이며 10% FBS와 2.2 g/L sodium bicarbonate, 1% Pen/strep를 첨가하였다.

DNA microarray 해석용 세포표품의 조제 및 RNA의 추출

상기 세포암화 및 암화억제 처리과정 중 TPA처리 24시간 경과 시점 및 EGCG처리후 19일 경과 시점에서 각각 세포를 수확하여 이를 DNA microarray 해석용 세포표품으로 하였다 (Fig. 1 참조). 이들 표품을 PBS 완충액으로 세정한 후 RNeasy Mini Kit (Qiagen사, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다.

DNA microarray를 이용한 유전자발현 해석

본 실험에 사용한 DNA microarray-용 DNA칩 (Murine Genome 430 2.0 Array, Affymetrix사 USA)에는 34,000개 이상의 유전자에 대응하는 45,000개 이상의 DNA probe로 구성 되어있다. 본 실험의 모든 과정은 Affymetrix사에서 제공된 표준 프로토콜 (Affymetrix Inc., 2004)에 따랐다.

(1) 역전사에 의한 cDNA의 합성

One cycle cDNA synthesis Kit (Affymetrix)을 사용하였으며 5 ug의 total RNA 표품을 사용하였다. 먼저, RNA/T7-Oligo (dT) 혼합물을 PCR 기기를 사용하여 70°C, 10분간 안정화 시킨 후, 제1쇄 혼합물을 제작하였다. 이 혼합물에 SuperScript II 효소를 첨가하여, 42°C, 1시간 반응시켰다. 이후 제2쇄 혼합물을 제작하여 16°C에서 2시간 반응시켰다. 생성된 cDNA 표품은 cDNA Cleanup Module (Affymetrix)을 사용하여 정제하였다.

(2) Biotin 표지 cRNA의 합성과 단편화

in vitro 전사 표지 키트 (Affymetrix)를 사용하였다. 먼저, *in vitro* 전사반응 혼합물을 제작한 후, 준비된 cDNA 표품과 대조 cRNA 표품은 cRNA Cleanup Module (Affymetrix)을 사용하여 정제하였으며, Agilent 2100 Bioanalyzer

를 사용하여 정량하였다. 이 표품을 단편화 완충액에 혼합한 후 94°C에서 35분간 반응시켰다.

(4) Eukaryotic Target Hybridization

in vitro 전사 표지 키트 (Affymetrix)를 사용하여 hybridization cocktail (20X Eukaryotic hybridization control (bioB, bioC, bioD, Cre), BSA, oligo B2, herring sperm DNA, target fragmented cRNA 혼합액을 만들고 단편화한 cRNA를 혼합하여, Probe Array에 200 uL씩 넣어준 다음 Hybridization Oven (Affymetrix)에서 45°C, 60 rpm, 16시간 반응시켰다.

(5) Probe Array의 세정, 염색, 주사

GeneChip Operation Software (GCOS)를 이용하여, Fluidics Station 450 (Affymetrix)에서 GeneChip 조작용 소프트웨어의 프로토콜에 따라 실험을 진행하였다. 먼저, priming과정에 이어 세정과정을 거친 다음 streptavidin phycoerythrin을 이용하여 staining과정을 완료하였다.

이상의 조작이 완료된 Probe Array는 GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix)으로 스캐닝하여 유전자발현 프로파일을 얻었다. 데이터의 분석은 Avadis와 R 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

RNA의 정량 및 microarray 실험과정의 확인

실험에 사용한 total RNA는 모두 rRNA ratio (28s/18s)가 1.9-2.1 사이의 값을 나타내어 DNA microarray에 적합한 순도임을 확인하였다.

DNA microarray 실험 과정 중 *in vitro* 전사과정을 확인하기 위하여 대조 cDNA를 실험용 표품의 cDNA와 같은 조건하에서 함께 실험하여 *in vitro* 전사과정이 잘 수행되었음을 생성된 cRNA로 확인하였으며, cRNA의 경우 hybridization 효율을 높이고 2차 구조를 줄이기 위하여 마그네슘이온 존재하에서 가열하여 35-200 bp로 단편화하였으며, 실험에서 사용한 표품 모두에서 프로토콜에서 제시하는 기준을 충족하였다.

데이터의 품질관리

(1) Probe array 이미지 확인

positive hybridization control로 넣어준 B2 oligo의 intensity 및 발현 여부를 지표로하여 hybridization의 적정성을 확인하였다.

(2) 평균 background와 noise(RawQ)값

평균 background 값은 보통 20-100 사이가 전형적이며, 본 실험에서는 100 이상의 값을 나타내었으나 QC에 필요한 다른 factor들을 충분히 고려해 볼 때 모두 정상임을 확인하였다. Noise (RawQ)는 probe의 pixel-to-pixel variation 수치로서, scanner의 electrical noise와 sample quality에 의해 영향을 받는데 특히 전자적 노이즈는 비중이 크며 같은 scanner로부터 얻은 array data는 5 이하로 유지해야 한다. 본 실험에서 1-5로 유사한 값을 나타내었다.

(3) 대조용 유전자의 발현 확인

RNA sample과 assay quality를 확인하기 위하여 β -actin과 GAPDH의 3·5·probe set의 3·5·ratio가 각 array 모두 1~3사이의 값을 나타내어 3·5·ratio가 3이하인 조건을 충족시켰다.

(4) Hybridization control (bio B, bio C, bio D, cre) 확인

BioB, bioC, bioD는 E.coli의 biotin 합성경로에 관련된 유전자이며, cre는 P1 bacteriophage에서 얻은 재조합 유전자이다. GeneChip Eukaryotic Hybridization control kit에는 이들 유전자의 biotin-labeled cRNA transcripts의 혼합물로 이루어진 20X Eukaryotic Hybridization Control (bioB 1.5 pM, bioC 5 pM, bioD 25 pM, cre 100 pM)이 들어있어 hybridization 여부를 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 모든 array에서 이들 유전자가 모두 양성반응을 나타내었으며 signal 값도 이들 유전자 각각의 상대적인 농도를 잘 반영하였다.

(5) Poly-A controls (lys, phe, thr, dap) 확인

Poly-A RNA control은 전체 target labeling 과정을 모니터 하는데 사용되었다. GeneChip Poly-A RNA control Kit은 미리 합성된 lys, phe, thr, dap의 혼합물로 이루어져 있으며, 본 실험에 사용한 array의 각 signal를 확인한 결과, 모두 양성으로 확인 되었고, 각 회석배율 (1 : 100,000), 1 : 5,000, 1 : 25,000, 1 : 7,500로 넣어준 대조실험에 대하여 직선성을 나타내었다. 또한 그 기울기가 0.9-1.0에 가까운 수치를 보여 hybridization 과정과 전사과정이 성공적으로

수행되었음을 확인 하였다.

(6) Scaling factor

Scaling factor 값은 같은 실험군내에서 항상 일정한 값을 나타내는 것이 바람직하며 그 차이가 클 경우 샘플간의 차이가 많다는 것을 의미한다. 본 실험에서는 모든 샘플이 유사한 값을 가진다.

(7) Scatter correlation graph

본 연구에서는 각 실험군에 대하여 각각 독립적인 3개의 반복실험을 수행하였으며 이들 반복군에 있어서 array간의 variation 여부를 살펴보기 위하여 scatter correlation graph를 검토한 바 분석에 사용할 present 값의 signal 대부분이 2배 이내에 속하였고 그레프 모양도 유사하게 나타났다.

유전자 발현 프로파일링 및 데이터 분석

위에서 만들어진 데이터로부터 실험과정에서 생길 수 있는 오차를 줄이기 위해 house keeping gene이나 발현 변화가 없는 유전자들의 발현정도를 기준으로 삼아 표준화(normalization)를 실시하여 유전자발현 데이터를 보정하였다.

세포암화과정에서의 유전자발현 변화

세포암화처리 (MNNG + TPA)에 의해 유전자발현의 증감을 보인 유전자들이 어떠한 양상으로 EGCG에 의해 영향을 받는지 조사하기 위해 먼저 무처리 대조군에서의 유전자 발현량을 기준으로 하여 세포암화 처리군의 발현량 변화배수 (fold change, FC) 값을 구하였다. Fig. 2에 이들 유전자의

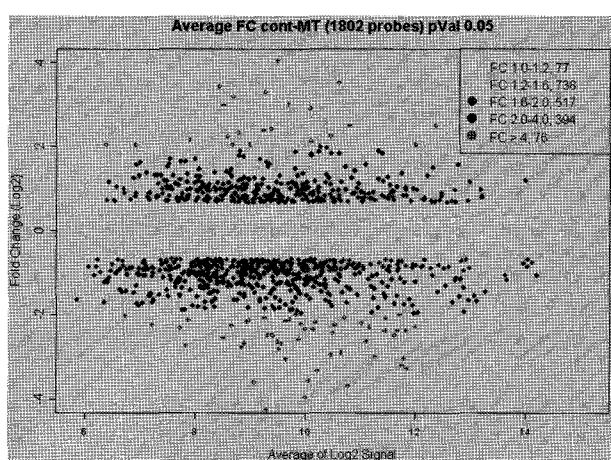


Fig. 2. Distribution of total genes by their fold change value of gene expression in MNNG and TPA induced cell transformation process.

Table 1. Functionally categorized lists of genes up or down regulated in the MNNG and TPA induced cell transomation process

CELL CYCLE
minichromosome maintenance deficient 2,3,4 homolog / ATM homolog / v-abl 1 / polo-like kinase 1 histone deacetylase 6 / mad2-like 1 / budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog 3-monoxygenase/triptophan 5-monoxygenase activation protein γ polypeptide / checkpoint kinase 1 homolog / CREB binding protein / RB1 / GADD45 β / p27 / TGF β 2 / cdc 7 / cdc 25 homolog cyclin A2, B1, H, E2, D2
FOCAL ADHESION
integrin α V / myosin light polypeptide kinase / protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A, catalytic subunit β isoform, catalytic subunit γ isoform / rho-associated coiled-coil forming kinase 2 parvin α / vinculin / PI3K polypeptide 2 / PTK2 / rho GTPase activating protein 5 ras homolog gene family member A / procollagen, type I α 1,2 / type V α 1 / type V α 2 c-fos induced growth factor / PDGF-derived growth factor C polypeptide / RIKEN cDNA 6230417E10 gene jun oncogene / laminin α 4, β 2, γ 1 / thrombospondin 1,2,3 / caveolin 2 / baculoviral IAP repeat-containing 4
ADHERENS JUNCTION
transcription factor 3 / transcription factor 7-like 2(T-cell specific) / nemo like kinase / CREB binding protein fer protein kinase testis specific 2 / snail homolog 2 / MAPK 1 / TGF β receptor II / FGF receptor 1 IGF I receptor / ras homolog gene family member A / WAS protein family member 2 / acid phosphatase 1 vinculin / sorbin and SH3 domain containing 1 / actinin α 2 / IQ motif containing GTPase activating protein 1 par-3 homolog
TGF-β SIGNALING
ring-box 1 / activin receptor IIA / mad homolog 7 / CREB binding protein / inhibitor of DNA binding 2,3,4 activin A receptor type 1 / inhibin β A / rho-associated colied-coil forming kinase 2 ras homolog gene family member A / TFG β receptor II / TGF β 2
APOPTOSIS
protein phosphatase 3 catalytic subunit, α isoform / ATM homolog / caspase 3,7,12 baculoviral IAP repeat-containing 4 / DNA fragmentation factor β subunit / nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100) / protein kinase type II α , β nuclear factor of κ light chain gene enhancer in B-cells inhibitor α / calpain 6,10 / I κ B kinase β PI3K (C2 domain containing) α polypeptide / PI3K (regulatory subunit) polypeptide 2 (p85 β) interleukin-1 receptor-associated kinase 1
LYSINE DEGRADATION
OTU domain ubiquitin aldehyde binding 1 / RIKEN cDNA 1810004F21 gene / HLA-B associated transcript 8 suppressor of variegation 3-9 homolog 2 / procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1,3 glutaryl-coenzyme A dehydrogenase / hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase 12 / serine hydroxymethyl transferase 2 aldehyde dehydrogenase family 3 subfamily A2
INSULIN SIGNALING
MAPK 1,8 / suppressor of cytokine signaling 3 / protein phosphatase 1 catalytic subunit β , γ isoform calmodulin 3 / phosphorylase kinase α 1 / protein kinase type II α , β / acetyl-coenzyme A carboxylase PI3K polypeptide 2 (p85 β) / hexokinase 1 / Casitas B-lineage lymphoma b
ECM-RECEPTOR INTERACTION
laminin α 4, β 2, γ 1 / procollagen type 1 α 1, 2 / type IV α 2 / type V α 1 / dystroglycan 1 thrombospondin 1, 2, 3 / integrin α V / syndecan 4 / cd47 antigen / cd44 antigen

발현량 변화배수에 따른 전체 유전자의 분포를 나타내었다. 발현량 변화배수는 4배수 발현량 증가에서 4배수 감소에 이르기까지 다양한 분포를 나타내었다. 본 실험에서는 발현량 변화배수의 기준은 1.5로 하였으며 세포암화 처리에 의해 발현의 증감을 보인 유전자는 모두 2029개가 검출되었다. 세포암화 처리에 의하여 발현의 증감을 나타낸 총 2029개의 유전자들을 KEGG pathway 데이터 베이스에 따라 기능별로 분류한 바 세포주기 관련인자, 세포-기질간 접착성 관련인자, 세포간 접착성 관련인자, TGF- β 신호전달경로 관련인자, 아포토시스 관련인자, Lysine 분해 관련인자, 인슐린 신호전달경로 관련인자, ECM-수용체 상호작용 관련인자 등 8개의 카테고리로 나뉘어졌다 (Table 1). 세포주기 관련 유전

자들로는 cyclin B1, A2, D1, D2와 같은 cyclin 부류와 CDK inhibitor 1B (p27), CDC7, CDC25, RB1과 같은 많은 유전자들이 여기에 속하였다. 세포기질간 접착성 관련 유전자들은 대개 세포의 생존과 증식, 세포의 모빌리티에 관여하는 것으로 보인다. 대표적인 것으로는 PI3K, protein phosphatase 1, Rho GTPase activating protein 5 등과 integrin α V, laminin, procollagen과 같은 세포외기질 단백질 등이 여기에 속하였다. 세포간 접착 관련 유전자들은 주로 세포의 성장과 구조, 세포간 상호작용에 관련된 유전자들이었으며 대표적으로는 transcription factor 3, nemo like kinase, CREB binding protein, MAPK 1, TGF- β receptor II, FGF receptor 1, IGF-1 receptor 등이 있다. Caspase

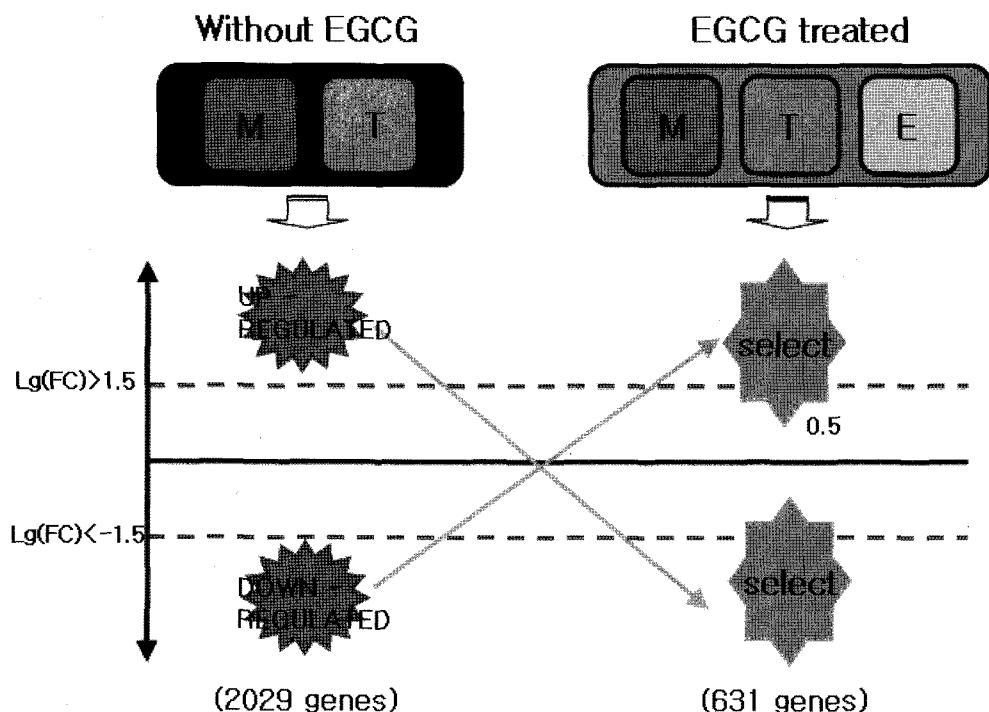


Fig. 3. Strategy for identification of genes differentially expressed by EGCG treatment in MNNG and TPA induced cell transformation process. M indicates MNNG, T for TPA, E EGCG.

부류, NF-B, Bcl-2 등 아포토시스 관련 유전자 등이 MNNG와 TPA 처리에 의한 세포암화과정에서 발현이 촉진되거나 억제되는 것으로 나타났다. 또한 ATM과 같은 DNA 수복 관련 유전자들이 세포암화과정에서 발현의 증감을 나타내었다. 일반적으로 암화된 세포는 무한 증식능의 획득, Anchorage 의존성의 상실, 세포-기질간 및 세포간 접착성의 상실 등의 공통적인 특성을 가지고 있는데 (Lanfrancone *et al.*, 1994), 우리가 세포암화과정에서 찾아 낸 2029개의 유전자들은 암화된 세포의 공통적인 특성을 부여하는 데 관여하는 유전자 또는 세포증식 및 생존의 신호전달경로와 아포토시스의 신호전달 경로 상에 존재하는 유전자가 주류를 이루고 있는 것으로 나타났다.

세포암화억제과정에서의 유전자발현 변화

세포암화억제 처리군(MNNG + TPA + EGCG)을 대상으로 같은 방법으로 발현량의 값을 구한 다음 세포암화처리군 간의 유전자 발현 변화의 차이를 조사한 결과, 세포암화과정에서 발현이 증가하거나 감소된 총 2029개의 유전자 중 세포암화 억제 처리에 의하여 역으로 유의하게 발현이 억제되거나 발현이 촉진된 유전자는 631 ($FC > 0.5$)개로 밝혀졌다 (Fig. 3).

이들을 유전자의 기능에 따라 분류해 본 바 주로 세포주기 관련인자, 세포간접착 관련인자, 알츠하이머 치매 관련인

자, Huntington's disease 관련인자, 아포토시스 관련인자 등에 속하는 유전자들이었다. 세포주기 관련인자에는 cyclin D1, D2, T2, H 및 CDK6, histone deacetylase 6 등이었고 세포간접착 관련인자에는 transcription factor 3, nemo like kinase, snail homolog 2, IGF-1 receptor 등이 검출되었다. 세포 생존에 관여하는 유전자로는 Son cell proliferation protein, fibrosin 1, bone morphogenetic protein 1 (BMP 1), PI3-kinase, nemo kinase 등이 검출되었다. 이밖에도 Ras GTPase를 활성화시키는 것으로 알려진 RAB GTPase activating protein 1, IQ motif containing GTPase activating protein 1 등과 산화적 스트레스 관련인자인 peroxiredoxin 1, thioredoxin-like 1 등이 검출되었다. Caspase-3, 7, 인슐린 분해효소, 저밀도 당단백수용체, calmodulin 3, Huntington's disease gene homolog 등 알츠하이머 치매, Huntington's disease와 같은 신경퇴행성질환 관련인자가 EGCG에 의하여 발현이 유도되거나 저해되는 분자표적으로서 검출된 것이 특이 하다 할 수 있으나 이들 질환이 아포토시스에 의한 뇌신경세포의 사멸에 기인할 가능성은 제기되고 있음에 비추어 (Bredesen *et al.*, 2006) 충분히 이해할 수 있는 일이다. EGCG가 산화적 손상에 의하여 유도된 세포사를 예방할 수 있다는 보고 (Koh *et al.*, 2004)도 이러한 가능성성을 뒷받침하는 일례이다. 신경퇴행성

Table 2. List of representative genes differentially expressed by EGCG treatment in MNNG and TPA induced cell transformation process

Gene name	Known Function	Fold change value		
		C: MT	C: MET	Up/Down
cyclin T2	MyoD-dependent transcription, regulatory subunit of cdk 9	1.6	-1.5	↓
cyclin D2	Hypertrophic growth in cardiac myocytes, regulatory subunit of cdk 4, 6	2.9	2.2	↓
cyclin D1	G1-S cell cycle progression, regulatory subunit of cdk4, 6	2.8	2.3	↓
cyclin H	Meiotic expression of the cyclin H/Cdk7 complex in male germ cells	2.1	1.3	↓
cdk 6	associates with the androgen receptor and enhances its transcriptional activity	-1.8	-1.1	↑
Neighbor of brca 1	unknown	-1.9	-1.3	↑
Son cell proliferation protein	Fyn-associated molecule	2.0	1.1	↓
nemo like kinase	MAPK kinase activity	1.5	-1.2	↓
serum/glucocorticoid regulated kinase 3	serine/threonine kinase	1.5	-1.1	↓
phosphatidylinositol 3-kinase	Ras-mediated signaling, anti-apoptosis	2.2	1.5	↓
RAB GTPase activation protein 1	GTPase activator activity	2.2	1.2	↓
IQ motif containing GTPase activating protein 1	Ras GTPase activator activity	2.1	1.4	↓

C indicates no treatment control

질환 발생과 세포암화의 분자 메커니즘 간에는 서로 공통되는 인자가 다수 관여할 가능성이 있으며 이러한 공통인자를 표적으로 하여 그 기능을 활성화시키거나 억제하는 물질을 찾아내는 작업은 이를 질병을 예방함에 있어 매우 유효한 의미가 있을 것으로 생각한다.

EGCG의 암예방 또는 암화억제효과의 분자기구에 대하여는 이미 상당한 연구의 축적이 있다. EGCG는 아포토시스를 유발하고 cdk inhibitor인 WAF-1/p21을 유도하여 세포주기진행을 G1기에 멈추게 한다는 것이 알려져 있으며 G-protein 신호 네트워크에 속하는 유전자, telomerase, MAPK, AP-1, NF-κB 등에 대하여는 억제적으로 작용한다는 보고가 있다. EGCG가 EGF와 그 수용체와의 결합을 저해하며 혈관신생작용을 저해한다는 보고도 있다. 이미 알려진 이상과 같은 EGCG의 작용은 우리의 마이크로아레이 유전자발현 해석에서도 상당부분 확인할 수 있었으나 cyclin D1, D2, H 등과 같은 세포주기 관련 유전자, 세포간 접착 경로에 속하는 유전자인 transcription factor 3, nemo like kinase, snail homolog 2, IGF-1 receptor 등은 우리의 연구에 의하여 EGCG의 분자표적으로 새로이 밝혀진 것이다 (Table 2).

세포암화의 시그널 전달경로는 아직 충분히 밝혀진 것은 아니나 Ras/MAPK 경로와 PI3K/AKT 경로가 주된 경로로

제시되고 있다 (Igor et al., 2002). EGF, PDGF 등 세포성장인자가 세포막을 관통하여 존재하는 세포성장인자 수용체와 결합하면 수용체의 tyrosine kinase 활성을 부여하게 되고 이 신호를 PI3K, Ras, JAK 등 세포질에 존재하는 인자들에 전달하게되고 이 신호는 다시 MAPK 등 신호전달 경로의 하류의 인산화 캐스케이드를 통하여 세포핵에 전달되어 최종적으로 Jun, Fos 등 전사인자들을 활성화시켜 세포증식에 필요한 유전자군을 발현시키거나 p21등 cdk inhibitor 등에 작용하여 세포주기 진행을 촉진하게 된다. bcl 2, bax 등에 작용하여 아포토시스를 유발하기도 한다. 이러한 신호전달경로의 인자들은 잠재적으로 암화억제물질의 분자표적이 될 수 있을 것으로 생각하며 이미 Tyrosine kinase를 표적으로 하는 Herceptin, Gleevec, mTOR를 표적으로 하는 Rapamycin, PI3K를 표적으로 하는 Wartmannin 등 이를 경로상의 인자를 표적으로 하는 항암화학요법제 또는 세포주기저해제가 속속 개발되고 있다. *in vitro* 실험에서 세포사멸의 주된 경로인 JNK 경로를 특이적으로 저해하고 세포생존경로를 활성화하는 작용이 알려져 알츠하이머 치매 예방물질로 개발되고 있는 CEP-1347의 연구 (Zhang et al., 2005, Bozyczko-Coyne et al., 2001)는 향후 우리의 연구를 발전시킴에 있어 방법론적으로 중요한 단서를 제공할 것으로 보인다.

참고문헌

- Ahmad, N., Cheng, P., and Mukhtar, H. (2000) Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 328-334.
- Bozyczko-Coyne, D. (2001) CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of SAPK/JNK pathway activation, promotes survival and blocks multiple events associated with Abeta-induced cortical neuron apoptosis. *J. Neurochem.*, **77**(3), 849-863.
- Bredesen, D.E., Rao, R.V., and Mehlen, P. (2006) Cell death in the nervous system. *Nature*, **19**;443(7113), 796-802.
- Chen, Z.P., Schell, J.B., Ho, C-T., and Chen, K.Y. (1998) Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett.*, **129**, 173-179.
- Fujiki, H., Yoshizawa, S., Horiuchi, T., Suganuma, M., Yatsunami, J., and Nishiwaki-Matsuhashima, R. (1992) Anticarcinogenic effects of (-)-epigallocatechin gallate. *Prev. Med.*, **4**, 503-509.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Komori, A., Sueoka, E., and Sueoka, N. (1998) Japanese green tea as a cancer preventive in humans. *Nutr. Rev.*, **54**, S67-70.
- Gupta, S., Ahmad, N., Nieminen, A-L., and Mukhtar, H. (2000) Growth inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by green tea constituent (-)-epigallocatechin 3-gallate in androgen-sensitive and androgen-insensitive human prostate carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **164**, 91-96.
- Gupta, S., Hussain, T., and Mukhtar, H. (2003) Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cell. *Arch. biochem. biophys.*, **410**, 177-183.
- Hirose, M., Mizoguchi, Y., Yaono, M., Tanaka, H., Yamaguchi, T., and Shirai, T. (1997) Effects of green tea catechins on the progression or late promotion stage of mammary gland carcinogenesis in female sprague-Dawley rats pretreated with 7, 12 dimethylbenz (a) anthracene. *Cancer Lett.*, **112**, 141-147.
- IARC (1985) IARC/NCI/EPA Working Group Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols. *Cancer Research*, **45**, 2395-2399.
- Kajiwara, Y., Ajimi, S., Hosokawa, A., Ajimi, S., Hosokawa, A., and Maekawa, K. (1997) Improvement of carcinogen detection in the BALB/3T3 cell transformation assay by using a rich basal medium supplemented with low concentration of serum and some growth factors. *Mutation Research*, **393**, 81-90.
- Koh, S.H., Kwon, H., Kim, K.S., Kim, J., Kim, M.H., Yu, H.J., Kim, M., Lee, K.W., Do, B.R., Jung, H.K., Yang, K.W., and Appel, S.H., Kim, S.H. (2004) Epigallocatechin gallate prevents oxidative stress induced death of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase (G93A) motoneuron cells by alteration of cell survival and death signals. *Toxicology*, **202**(3), 213-225.
- Lanfrancone, L., Pelicci, G., and Pelicci, P.G. (1994) Cancer genetics. *Curr. Opin.. Genet. Dev.*, Feb; **4**(1), 109-119.
- LeBoeuf, R.A., Kerckaert, G.A., Aardema, M.J., Gibson, D.P., Brauninger, R., and Isfort, R.J. (1996) The pH 6.7 Syrian hamster embryo cell transformation assay for assessing the carcinogenic potential of chemicals. *Mutation Research*, **356**, 85-127.
- Liao, S., Umekita, Y., Guo, J., Kokontis, J.M., and Hiipakka, R.A. (1995) Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. *Cancer Lett.*, **96**, 239-243.
- Mukhtar, H. and Ahmad, N. (1999) Green tea in chemoprevention of cancer. *Toxicol. Sci. [suppl]*, **52**, 111-117.
- Nasasni, I., Oh-hashi, F., Oh-hara, T., Feng, W.Y., Johnston, J., and Chan, K. (2003) Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, **63**, 824-830.
- Park, J.Y., Kwon, H.S., Yoon, C.Y., Park, M.S., Kim, B.H., Kim, J.S., Kang, H.I., and Jung, H.K. (2005) Screening of anticarcinogenic agents and their mode of action. *The Annual Report of KFDA*, **8**(1), 238-245, 2004
- Senderowicz, A.M. (2004) Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**(6), 670-678.
- Tsuchiya, T. and Umeda, M., (1995) Improvement in the efficiency of the *in vitro* transformation assay method using BALB/3t3 A 31-1-1 cells. *Carcinogenesis*, **16**, 1887-1894.
- Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer., *Nat Rev Cancer*. **2**(7), 489-501.
- Yang, G-Y., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E.J., and Yang, C.S. (1998) Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenol. *Carcinogenesis*, **19**, 611-616.
- Zhang, G.Y. (2005) Agents targeting c-Jun N-terminal kinase pathway as potential neuroprotectants. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **14**(11), 1373-1383.