韓國營養學會誌 35(1) : 53~59, 2002

녹차의 (−)EGCG에 의한 사람 폐암 세포주 A549의 c-Jun N-terminal Kinase 1과 Activating Protein-1활성화를 통한 세포고사*

박지선 · 신미경[1] · 손희숙 · 박래길[2] · 김명선[2] · 정원훈[3]§

전북대학교 식품영양학과, 원광대학교 식품영양학과[1]
의과대학 미생물학교실[2], 원광보건대학[3]

Green Tea (−)EGCG Induces the Apoptotic Death of Lung Cancer Cells via Activation of c-Jun N-terminal Kinase 1 and Activating Protein-1*

Park, Ji-Sun · Shin, Mi-Kyoung[1] · Sohn, Hee-Suk
Park, Raekil[2] · Kim, Myung-Sunny[2] · Jeong, Won-Hun[3]§

Department of Food and Nutrition, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea
Department of Food and Nutrition,[1] Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea
Department of Microbiology,[2] Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea
Wonkwang Health Science College,[3] Iksan 570-750, Korea

ABSTRACT

Green tea has been recognized as a favorite beverage for centuries in Eastern and Western cultures. Recently, anti-tumor effects of green tea constituents have received increasing attention. However, the mechanism of catechin-mediated cytotoxicity against tumor cells remains to be elusive. To elucidate the mechanical insights of anti-tumor effects, (−)epigallocatechin-gallate(EGCG) of catechin was applied to human lung cancer A549 cells. (−)EGCG induced the death of A549 cells, which was revealed as apoptosis in DNA fragmentation assay. (−)EGCG induced the activation of caspase family cysteine proteases including caspase-3, -8 and -9 proteases in A549 cells. Furthermore, (−)EGCG increased the phosphotransferase activity of c-Jun N-terminal kinase1(JNK 1), which further induced the transcriptional activation of activating protein-1(AP-1) in A549 cells. We suggest that (−)EGCG-induced apoptosis of A549 cells is mediated by signaling pathway involving caspase family cysteine protease, JNK1 and transcription factor, AP-1. (*Korean J Nutrition* 35(1) : 53~59, 2002)

KEY WORDS: (−)EGCG, catechin, apoptosis, lung cancer, caspase, JNK1, AP-1.

서 론

암치료의 가장 좋은 방법은 주위 환경으로부터 발암원을 제거하는 예방이지만 현대 사회에서의 발암원에 대한 노출 기회는 더 많아져 화학적 암예방(chemoprevention)에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다. 최근 암의 발생을 예방할 수 있는 자연생성 화합물(natural occurring organosulfur compounds)에 대한 역학조사 및 실험들이 많이 진행되고 있다.

1991년 뉴욕에서 미국건강재단 주최로 열린 국제 차 심포지움에서 녹차를 매일 마시는 사람에게서 심장병과 암발생율이 감소했다는 보고가 있었으며, 추가적인 관련 연구에서도 유사한 연구결과가 보고되었다.[1] 현재까지 알려진 녹차의 주성분인 catechin류는 (+)catechin(C), (−)epicatechin(EC), (−)epicatechin gallate(ECG), (−)epigallocatechin(EGC), (−)epigallocatechin gallate(EGCG) 등이 있다. 그 밖에 녹차에는 theanine, carotenoid, caffeine 및 mineral 등이 미량 포함되어 있다. 녹차 catechin은 혈중 콜레스테롤 저하작용,[2] 신생 혈관형성 억제작용,[3] 항균작용,[4] 혈소판응집 억제작용,[5] 혈압상승 억제작용,[5] 혈당 저하작용[7] 등의 다양한 약리작용이 보고되었으며, catechin에 의한 암세포 손상과 세포고사(apoptosis)가 보고된 바 있다.[8,9] 녹차의 polyphenol 성분 중 가장 풍부한 (−)EGCG의 생물학적인 활성은 *in vitro*에서 암세포

접수일 : 2001년 10월 19일
채택일 : 2001년 12월 4일
*This research was supported by 2001 grant from Wonkwang Health Science College.
§To whom correspondence should be addressed.

© 2002 The Korean Nutrition Society

의 성장(proliferation)을 억제하거나[10] 전립선암 및 위암 세포를 세포고사로[11,12] 유도한다고 보고되었다. 또한 urokinase,[13] mitogen-activated protein kinases(MAPKs),[13-15] lipoxygenase, cyclooxygenase,[16] and vascular endothelial growth factor(VEGF)[17] 등에 작용하여 암의 발생을 예방한다. 최근, polyphenol EGCG는 G_0/G_1-phase cell cycle arrest와 epidermoid carcinoma(A431) 세포의 세포고사를 유도한다고 알려져 있다.[15,18,19] 이상의 연구결과에서 녹차 catechin의 항암효과는 녹차성분을 이용한 암예방 물질 개발의 높은 가능성을 시사하고 있다. 그래서 본 연구에서는 역학조사에서 제시되고 있는 녹차 catechin의 암세포에 대한 세포독성의 작용기전을 세포고사 신호전달계를 통하여 규명하고자 한다.

세포고사(apoptosis)는 1980년대 후반에 세포생물학의 중요 연구분야로 관심이 집중되어 많은 발전이 이루어졌으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 등에 중요한 역할이 밝혀졌다.[20,21] 세포고사 기전의 장애는 암발생, 암치료에 대한 내성발현, 자가면역 질환의 발생, 퇴행성 질환 및 HIV 감염에 의한 병리현상에 중요한 원인이 된다고 보고되었다.[22,23] 최근 연구에 의하면 현대 임상에서 흔히 사용되는 많은 항암제들, 특히 adriamycin, ara-c, taxol, cis-platinum, cyclophosphamide, etoposide, teniposide, vincristine, mitoxantrone, hydoxyurea, 및 bleomycin 등이 작용기전에 무관하게 다양한 암세포에서 세포고사 기전의 활성화를 통하여 암세포의 사멸을 유도하며, 그 작용기전으로는 TNF receptor system, sphingomyelin/ceramide 경로, 조기발현 유전자(early immediate gene)의 전사적 활성, 단백분해 효소인 caspase-family cysteine protease, DNA 분절을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다.[24] 암치료제의 효능은 세포고사 유도능력과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, 성공률 높은 암 치료법 개발을 위하여 세포고사 현상의 정확한 생화학적 및 분자생물학적 기전에 대한 연구가 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 암에 예방적 효과가 있다고 알려진 녹차의 암세포 사멸효과를 사람의 폐암 세포주를 이용하여 조사하고 이에 관련된 세포고사 신호전달 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 세포배양

(-)EGCG는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 0.1M의 농도로 dimethyl sulfoxide에 용해하여 -70℃에 보관하였고, 배지에 희석하여 사용하였다. RPMI 1640, 우태아혈청(FBS), 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. JNK 1에 대한 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. 그 외의 시약은 Sigma사를 통해 구입하였다.

사람 폐암 세포주인 A549세포(KCLB 10185)는 한국 세포주은행에서 분양 받아 37℃, 5% CO_2 배양기에서 10% 우태아혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였으며, 세포 생존율은 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10^5 cells/ml)를 1ml씩 분주하여 12시간 이상 CO_2 세포 배양기에서 안정시킨 후 다양한 농도의 EGCG를 100㎕씩 중복으로 분주하였다.

2. 세포 생존율 측정

다양한 실험 조건의 세포는 37℃, 5% CO_2 세포 배양기에서 배양 후 crystal violet 염색액(0.5% crystal violet (w/v), 30% ethanol(v/v), 3% formaldehyde) 200㎕와 상온에서 5분 반응시켰다.[25,26] 세포 배양판에 부착능력을 상실한 사멸 세포들은 흐르는 물로 세척하여 제거한 후, 염색된 생존 세포만을 얻어서 1ml의 0.1M sodium citrate/50% ethanol로 용해시켰다. 생존율은 세포 용해액의 흡광도를 ELISA 분석기(540nm 파장)로 측정한 후 대조군에 비교한 백분율(%)로 표시하였다.

3. DNA 분절 관찰

DNA 분절현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit(Promega Co., Madison, USA)를 이용하여 추출하였다.[27,28] 먼저 A549 세포를 원심분리하여 배양액을 제거한 후 phosphate-buffered saline(PBS)를 이용하여 세척하였다. 침전 세포에 nuclear lysis buffer(100mM NaCl, 10mM Tris/HCl, pH 7.4, 10mM EDTA, 0.5% SDS)를 부가하여 세포를 파쇄한 후, RNase를 37℃에서 5분 처리하였다. 세포 파쇄액은 단백질 침전 완충용액으로 단백질을 제거하고 NaCl과 isopropanol 침전에 의하여 얻어진 genomic DNA를 70% 에탄올로 세척하여 진공건조시켰다. 여기에 TE buffer(10mM Tris/HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)를 부가하여 DNA pellet을 용해한 후 UV 분광광도계(Ultraspec 3000, Pharmacia biotech, England)를 이용하여 260nm와 280nm 파장에서 DNA 농도 및 순도를 측정하였다. 분석된 DNA 5㎍을 1.5% agarose gel에서 50V, 2시간 전기영동을 실시

한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선등(trans illuminator)을 이용하여 DNA 분절을 관찰하였다.

4. Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

A549 세포는 4℃에서 lysis buffer(1% Triton X-100, 10mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT))를 처리하여 15분 파쇄한 후 13,000 rpm으로 15분 원심 분리시켰다. 원심분리 후 얻은 상층액은 bicinchoninic acid(BCA; Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 방법으로 단백질을 정량하고 100μg의 단백질을 분석 완충용액(100mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin, 2mM DTT)에 희석된 형광기질과 37℃에서 30분 반응시킨 후 fluorometer(Molecular Devices Co., USA)를 이용하여 형광세기를 측정하였다. Caspase-3 protease의 효소적 활성은 형광기질인 50μM DEVD-7-amino-4-coumarin(AMC) (Calbiochem Co., CA, USA)을 사용하였으며, proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성도를 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(380nm)와 emission wavelength(460nm)를 사용하였다. Caspase-8 protease 활성은 기질로서 50μM Z-IETD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin(AFC)(Calbiochem Co., CA, USA), caspase-9 protease 활성은 50μM Ac-LEHD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin(AFC)를 사용하였으며 이들의 proteolytic cleavage를 405nm/510nm의 파장에서 측정하였다.

5. *In vitro* kinase assay

A549 세포를 Hank's balanced salt solution(HBSS, 4℃)으로 2회 세척한 후 1ml 세포 파쇄용액(1% Triton X-100, 10mM Tris-HCl, pH 7.6, 50mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin, 1% aprotinin, 5mM EDTA, 50mM NaF, 5μM phenylarsine oxide 100μM sodium vanadate)을 부가하여 4℃에서 30분 반응시켰다. 세포 파쇄액은 12,000rpm으로 30분 원심분리하여 상층액의 단백질을 정량하고 동량의 세포 파쇄액에 1μg anti-JNK 1 항체를 부가하여 4℃에서 1시간 30분 반응시켰다. 이때 20~30분 간격으로 잘 흔들어 주었다. JNK 1 면역복합체의 침전은 미리 세포 파쇄용액으로 세척한 10%(v/v)의 100μl Pansorbin (Calbiochem Co., CA, USA)을 부가하여 20분 간격으로 흔들어 주면서 1시간 반응시켰다. 반응액은 4,000rpm에서 5분 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 세포 파쇄용액으로 다시 한번 세척하였다. Anti-JNK 1 면역침전제는 PAN용액(10mM Pipes, pH 7.4, 0.1% aprotinin, 0.1M NaCl)으로 2회 더 세척하였다. 이 반응액에 1μg GST-c-Jun_{1-79} 단백질과 2μCi의 [γ-^{32}P] ATP를 최종 20μl의 kinase reaction buffer(2mM Tris/HCl, pH7.5, 20mM $MgCl_2$, 2mM DTT, 20mM ATP)를 부가, 진탕하여 재현탁시킨 후 30℃에서 30분 반응시켰다. 여기에 20μl의 SDS-PAGE sample buffer를 부가하여 100℃에서 5분 가열하여 단백질 변성을 유도하였으며 12.5%의 SDS-PAGE로 단백질을 전개, 분리하였다. JNK 1의 활성은 gel을 건조한 후 X-ray 필름에 노출시키거나 image plate에 노출시켜서 PhosphorImage analyzer(Fuji, Japan)를 이용하여 정량적 측정을 시행하였다. JNK 1의 면역침전 정도는 JNK 1항체를 이용하여 표준 Western blotting방법에 의거하여 확인하였다.

6. 핵단백질 분리 및 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

A549 세포는 (-)EGCG를 처리하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 반응시킨 후, 세포를 원심분리 방법으로 채취하여 1ml PBS에 현탁한 후 원심분리하여 4℃에서 세척하였다. 세포 침전체에 80μl buffer A(10mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 10μg/ml aprotinin)를 부가한 후 4℃에서 10분 세포를 팽창시킨 다음 Nonidet P-40을 0.1%되게 부가하여 4℃에서 5분 반응시켜 세포질을 파괴하였다. 원심분리 방법으로 세포질 액을 제거하고 남은 침전물에 buffer A와 high salt를 동량 혼합한 용액 20μl를 부가하여 4℃에서 10분 반응시킨 다음 원심분리하여 핵 추출물인 상층액을 취하였다. 전사인자 activating protein-1(AP-1)의 binding consensus에 해당하는 oligonucleotide probe인 AP-1(5′-CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3′)을 10mM Tris/HCl 용액(pH 8.0, 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$ 및 1mM DTT)에 희석해서 85℃에서 5분 denaturation한 다음 100ng[α-^{32}P] CTP(1μCi)을 Rediprime kit(Amersham, England)를 이용하여 표지시켰다. 5μg의 핵단백질과 [α-^{32}P]CTP가 부착된 AP-1 probe와의 결합은 실온에서 30분 반응하였으며, 4% polyacrylamide gel(4℃)에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 polyacrylamide gel은 건조 후 X-ray 필름에 노출된 정도에 의해서 AP-1의 활성화를 판정하였다.

7. 통계분석

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였으며 통계적 유의성이 $p < 0.01$과 $p < 0.001$내에서 검증된 결과를 표시하였다.

결과 및 고찰

1. (-)EGCG가 폐암 세포주 A549에 대한 독성효과 및 세포고사 기전

폐암 세포주에 대한 catechin의 세포독성을 알아보고자 catechin 유도체인 (-)EGCG를 사용하여 폐암 세포주 A549에서 세포 생존율을 관찰하였다. (+)C를 포함한 (-)EC, (-)ECG, (-)EGC 등과 비교하여 (-)EGCG의 A549에 대한 세포독성은 처리 후 24시간부터 세포생존율이 감소하기 시작하였으며 최고 60시간까지 시간 의존적으로 세포 독성이 증가하여 현저한 생존율 감소를 관찰할 수 있었다(결과생략). 농도 의존적인 (-)EGCG의 세포독성을 조사하기 위하여 다양한 농도로 60시간 처리시 62μM에서 20%, 125μM에서 45%, 250μM에서 70%, 그리고 500μM에서 90% 이상의 생존율 감소를 나타냈다(Fig. 1A). 이상의 결과는 녹차 catechin 성분 중에서 (-)EGCG의 암세포에 대한 세포독성이 현저하여 화학적 암예방에 응용할 수 있는 가능성을 시사하였다. 또한, (-)EGCG에 의한 A549 세포의 세포독성이 세포고사(apoptosis) 기전에 의하여 매개되는지를 확인하고자 세포고사 현상의 특징인 DNA 분절현상을 확인하였다. (-)EGCG 200μM을 48시간 처리한 A549 세포에서 사다리 모양의 DNA 분절 현상이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 1B).

Caspase family cysteine protease는 염증반응이나 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 단백질로서, 세포질에서 불활성화 효소형태로 존재하다가 세포고사를 유도하는 자극에 의하여 활성화된다.[29] 그래서 본 연구에서도 (-)EGCG에 의한 A549 세포고사 신호전달 과정에서 caspase의 활성변화를 조사하였다. A549 세포에 (-)EGCG 200μM을 다양한 시간 처리한 후 caspase-3, -8, -9 protease의 효소적 활성을 측정하였다. Caspase-3 protease의 활성은 (-)EGCG 처리 10시간 후부터 서서히 증가하기 시작하여 50시간에 최고치(정상세포의 2.5배)를 나타냈으며, 그 후 세포사멸 때문에 급격히 감소하였다(Fig. 2A). Caspase-8 protease의 효소적 활성은 (-)EGCG 처리 후부터 서서히 증가하기 시작하여 30시간에 최고치(정상세포의 1.7배)를 나타낸 후 서서히 감소하였다(Fig. 2B). 또한 caspase-9 protease의 효소적 활성은 (-)EGCG 처리 10시간 후부터 증가하기 시작하여 40시간에 최고치(정상세

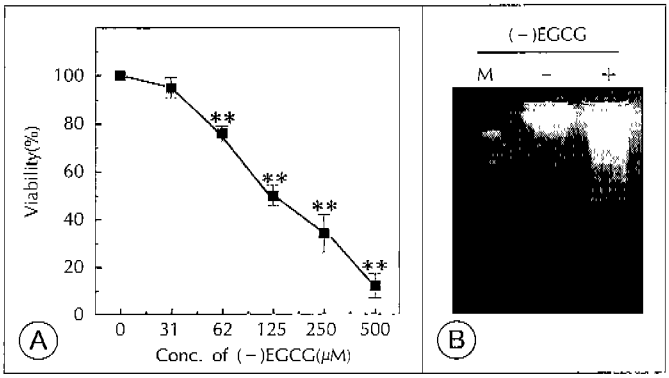

Fig. 1. (-)EGCG significantly induced the apoptosis of A549 cells in a dose-dependent manner. A549 cells(1×10^6 cells/well) were treated with various concentrations of (-)EGCG in the presence of 5% FBS for 60hr (A). Then, cell viability was measured by crystal violet staining(upper panel) and represented as the mean(%) ± SD of triplicates (lower panel). *: $p < 0.01$; **: $p < 0.001$ by Student's t-test, compared to media. Genomic DNA from (-)EGCG-treated cells was isolated and separated on 1.5% agarose-gel electrophoresis (B). DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

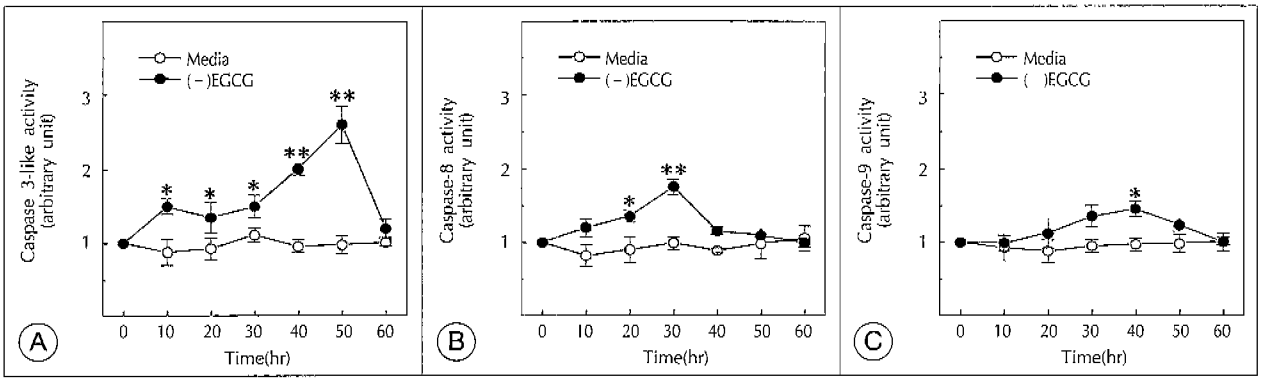

Fig. 2. (-)EGCG induced the activation of caspases family cysteine protease by A549 cells. A549 cells were treated with 200μM (-)EGCG for the indicated time points. Cell lysates were used to measure the catalytic activity of caspases by using fluorogenic peptide; Ac-DEVD-AMC for caspase-3 protease (A), Z-IETD-AFC for caspase-8 protease (B), Ac-LEHD-AFC for caspase-9 protease (C) as substrates. Data represent the mean ± SD of quadruplicates. *: $p < 0.01$; **: $p < 0.001$ by Student's *t*-test, compared to media.

포의 1.5배)를 나타낸 후 서서히 감소하였다(Fig. 2C). 즉, (-)EGCG는 시간 의존적으로 현저한 caspase-3, -8, -9 protease 활성 증가를 유도하였다. 지금까지 (-)EGCG에 의한 세포고사는 다양한 암세포에서 보고되었으나, (-)EGCG에 의한 세포고사 기전에서 caspase의 활성 증가는 아직까지 보고된 바가 없다. 이는 녹차의 성분 중 (-)EGCG에 의한 세포고사의 새로운 기전에 대한 가능성을 제시한다.

2. (-)EGCG가 JNK/SAPK와 AP-1의 활성에 미치는 영향

JNK 효소의 활성화는 일산화질소(NO), 종양괴사인자(TNF)와 interleukin-1(IL-1)과 같은 염증반응 매개물(inflammatory cytokines), 단백질 합성 저해제 또는 삼투압 스트레스와 같은 생리적 및 환경적 스트레스 등에 의해서 유도되어 세포의 사멸, 분화, 그리고 활성에 관여한다.[30] 그래서 (-)EGCG에 의한 폐암 세포주 A549의 세포고사 과정에 JNK가 관여하는지를 확인하기 위하여 JNK의 isoform인 JNK 1의 활성화를 측정하였다. A549 세포에서 JNK 1의 활성은 (-)EGCG 처리 10-15시간 후에 현저하였으며, 이후 감소하였다(Fig. 3). 이 결과는 (-)EGCG에 의한 폐암 세포주 A549의 세포고사 신호전달 과정에 JNK 1이 관여하고 있음을 의미하였다. 일부 보고에 의하면 JNK의 활성이 초기 스트레스 신호전달을 유도하며 세포고사의 초기에 필수적으로 작용하였으며 이 세포고사현상은 caspase의 활성에 의해 매개되어짐을 보인 바 있다.[31,32] 본 연구에서는 EGCG에 의한 JNK1의 활성이 caspase의 활성이전이나 또는 활성이 증가하기 시작하는 시점에서 작용하였음을 짐작할 수 있다.

유핵세포 신호전달경로의 가장 주된 형태는 MAPK라 불리는 인산화 단백질 신호전달계로서, 기질 특이성이나 세포 외부의 자극에 대한 다양한 반응성을 보여주지만 기본적인 구조와 활성화 기전 등은 매우 유사한 것으로 밝혀지고 있다. 현재까지 밝혀진 포유동물에서의 MAPK kinase계 신호전달계는 extracellular-regulated kinases(ERK), c-Jun-N-terminal kinases(JNK)/stress-activated protein kinases(SAPK), 그리고 p38 kinase계로 구분되는 3개의 아군이 확인되었다. 이들 중에서 JNK/SAPK는 유전자 전사인자인 c-Jun을 인산화시키는 단백질로서 처음 발견되었다.[30] Verheij 등[33]은 스트레스에 의해 유도되는 세포고사에 있어 JNK 활성이 필요하다고 제시하였고, Wilson 등[34]은 인간 T세포의 Fas 매개에 의한 세포고사에도 JNK 활성이 선행된다고 보고하였다. 현재까지 알려진 JNK 활성화는 그 상위단계 인산화 효소인 SEK1/MKK4에 의해 촉진된다. 그러나 최근 이러한 SEK1/MKK4에 의한 JNK 활성화 외에도, Moriguichi 등[35]은 TNF-α 자극에 의하여 SEK1/MKK4와는 별개의 새로운 인산화 효소인 MKK7이 JNK/SAPK를 활성화시킬 수 있음을 보고하였다. JNK는 자외선, IL-1, TNF-α, 그리고 CD28의 자극에 의해서 활성화된다. 특히 MAPK/ERK kinase kinase(MEKK),

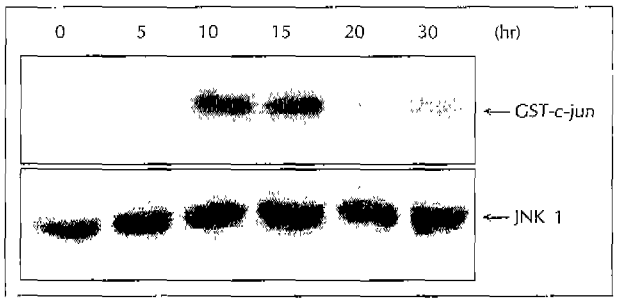

Fig. 3. (-)EGCG increased the phosphotransferase activity of JNK 1 in A549 cells. A549 cells were treated with 200μM of (-)EGCG for various periods and the lysates were used to immunoprecipitate with anti-JNK 1 antibodies. Anti-JNK 1 immunoprecipitate was reacted with GST-c-Jun N-terminal protein1-79 as a substrate and 2μCi [γ-32P] ATP. After the separation of reaction mixture on SDS-PAGE, gel was transferred onto nitrocellulose membrane, dried and then exposed onto X-ray film or image plate. The signals of autoradiogram were quantitated by PhosphorImage analyzer(Fuji, Japan) (upper panel). Immunoprecipitation of JNK 1 was confirmed by immunoblot for JNK 1(lower panel).

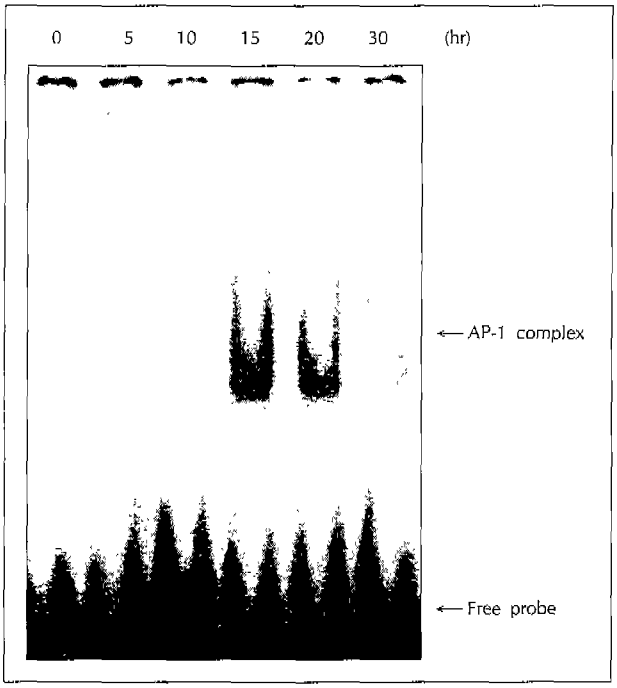

Fig. 4. (-)EGCG induced the transcriptional activation of AP-1 in A549 cells in a time-dependent manner. A549 cells were treated with 200μM of (-)EGCG for the indicated time periods. Nuclear extract was isolated and incubated with oligonucleotide probe of AP-1 binding consensus. Transcriptional activation of AP-1 was assessed by using EMSA and visualized by PhosphorImage analyzer(Fuji Co, Japan).

JNK-activating kinase를 과발현한 섬유아세포에서 세포사멸이 보고되었으므로 본 연구에서도 JNK 활성화가 (-)EGCG에 의해 유도되는 세포고사에 관여하는지를 확인하였다. 그 결과로서, (-)EGCG에 의하여 시간 의존적인 JNK 1의 활성화가 유도되었으며 이러한 JNK 1 활성은 (-)EGCG에 의한 세포고사 현상의 한 작용기전이라 사료된다.

전사 활성인자 AP-1은 세포의 여러 기능과 관련되어 있으며, 이 AP-1의 활성은 AP-1 구성 단백질 즉, c-Jun family 단백질의 homodimer 혹은 c-Jun 및 c-Fos 단백질의 heterodimer에 의해서 구성된다. 본 연구에서는 A549 세포에 (-)EGCG를 다양한 시간 처리한 후 핵 추출물을 분리하여 AP-1의 활성여부를 측정하였다. A549 세포는 (-)EGCG 처리 15시간 후에 핵 추출물과 AP-1 binding consensus sequence oligonucleotide의 결합이 최고치를 나타냈으며, 이후 서서히 감소하였다(Fig. 4). 이상의 결과는 (-)EGCG에 의한 A549 세포고사 과정에서 JNK 1이 활성화되어 전사 활성인자 AP-1의 활성을 유도하였으리라 추정된다. JNK 1과 AP-1의 활성은 (-)EGCG를 처리하고 상당시간이 경과한 후 나타났는데 이것은 이들의 활성화 과정에서 새로운 신호전달분자의 생성 혹은 (-)EGCG에 의해 생성된 세포내 reactive oxygen species(ROS)에 의해서 매개될 가능성을 내포한다. 또한 (-)EGCG에 의한 세포고사 과정에서 미토콘드리아의 외막에 존재하는 Bcl_2와 Bax의 발현여부를 조사한 결과 세포고사를 억제할 수 있는 Bcl_2의 단백질 발현은 감소하는 반면 세포고사를 촉진시키는 Bax의 단백질 발현은 감소함을 확인할 수 있었다(결과 생략). 이는 (-)EGCG에 의한 세포고사 현상에 Bcl_2 family의 참여와 대부분의 Bcl_2 family가 존재하는 미토콘드리아의 참여를 짐작할 수 있게 한다.

세포고사는 생리적 및 화학적인 손상에 의한 세포사멸인 세포괴사(necrosis)와는 달리 개체의 정상적인 발달과 분화에 관여하며, 태아의 손발 형성, 난자세포의 배란, 그리고 뇌 신경세포의 시냅스 형성에 중요한 역할을 하고, 개체의 생존에 위협이 될 수 있는 비정상 세포를 제거하는 세포의 항상성(homeostasis) 유지 기전이다.[36,38] 이러한 세포사멸에서 caspase family cysteine protease의 중요성이 보고되었으며,[39] JNK/SAPK 또한 세포고사 과정의 중요한 신호전달분자이다.

JNK는 아미노산 타이로신을 인산화시키는 효소로써 MAP kinase family에 속하며, 아미노산 서열상에서 protein kinase subdomain Ⅴ Ⅲ내의 쓰레오닌-프롤린-타이로신의 아미노산 서열을 가지고 있으며,[40] 자외선, 사이토카인 및 항암제 등에 의해서 활성화된다.[41,42] 또한 JNK는 조기발현 유전자(early immediate gene)인 c-Jun의 아미노기 말단에 위치한 두 개의 세린(63번째, 73번째 위치)을 인산화시켜 유전자 전사인자인 tetradecanoylporbolacetate-responsive element(TRE)의 c-Jun 유전자 발현을 증가시킨다.[43] c-Jun 발현 증가는 또 다른 조기발현 유전자인 AP-1의 활성화를 유도하며, 암세포 사멸현상의 조절에 관여한다.[44] 그러므로 이러한 세포고사 기전을 통하여 녹차 성분의 항암효과에 대한 연구는 녹차가 기호식품으로서만이 아니라 암에 대한 화학적 예방 및 치료에 응용되는 약리작용의 기전을 제시할 수 있을 것이다.

결 론

녹차 catechin 유도체 (-)EGCG에 의한 항종양 효과를 규명하기 위해서 A549 폐암 세포주의 세포고사 신호전달기전을 조사하였다. (-)EGCG는 농도 의존적으로 A549 세포의 생존율을 현저하게 감소시켰으며, 이 세포사멸은 DNA 분절 현상으로 확인된 세포고사 신호전달기전에 의해서 매개됨을 확인할 수 있었다. (-)EGCG 처리에 의한 A549 세포의 사멸은 caspase-3, -8 및 -9 protease의 효소적 활성을 동반하였다. (-)EGCG는 A549 세포에서 JNK 1의 phosphotransferase 활성 및 AP-1의 활성을 유도하였다. 이상의 결과에서 ( )EGCG에 의한 A549 세포의 사멸은 세포고사 신호전달분자인 caspases protease의 단계적인 활성화, JNK/SAPK의 활성화 및 JNK의 활성에 기인한 전사 활성인자 AP-1의 활성화에 의하여 매개되었음을 확인하였다. 본 연구는 녹차의 항암효능에 대한 작용기전, 그리고 암의 화학적 예방제 개발에도 응용 가능한 기술적 방법론을 제시할 수 있으리라 사료된다.

Literature cited

1) Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo)* 32(6): 613-622, 1986
2) Cao Y, Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 398(6726): 381, 1999
3) Fukai K, Ishigami T, Hara Y. Antibacterial activity of tea polyphenols against phytopathogenic bacteria. *Agric Biol Chem* 55 (7): 1895-1897, 1991
4) Namiki K, Yamanaka M, Tateyama C, Igarashi M, Namiki M. Platelet aggregation inhibitory activity of tea extracts. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 38(3): 189-195, 1991
5) Hara Y, Tono-Oka F. Hypotensive effect of tea catechins on blood pressure of rats. *日本營養·食糧學會誌* 43(5): 345-348, 1990
6) Matsumoto N, Ishigaki F, Ishigaki A, Iwashina H, Hara Y. Reduction of blood glucose levels by tea catechin. *Biosci Biotech*

Biochem 57(4): 525-527, 1993
7) Tanaka H, Hirose M, Kawabe M, Sano M, Takesada Y, Hagiwara A, Shirai T. Post-initiation inhibitory effects of green tea catechins on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary gland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 116(1): 47-52, 1997
8) Hibasami H, Achiwa Y, Fujikawa T, Komiya T. Induction of programmed cell death(apoptosis) in human leukemia cells by catechins compounds. *Anticancer Res* 16: 1943-1946, 1996
9) Imai K, Suga K, Nakachi K. Cancer-preventive effects of drinking tea among a japanese population. *Prev Med* 26: 769-775, 1997
10) Asano Y, Okamura S, Ogo T, Eto T, Otsuka T, Niho Y. Effect of (−)-epigallocatechin gallate on leukemic blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia. *Life Sci* 60(2): 135-142, 1997
11) Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, Ohnishi K, Kojima T, Nakanishi K, Akashi K, Hara Y. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol Rep* 5(2): 527-529, 1998
12) Paschka AG, Butler R, Young CY. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (−)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett* 130(1-2): 1-7, 1998
13) Jankun J, Selman SH, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387(6633): 561, 1997
14) Ahn HY, Hadizadeh KR, Seul C, Yun YP, Vetter H, Sachinidis A. Epigallocathechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Mol Biol Cell* 10(4): 1093-1104, 1999
15) Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Sueoka E, Kozu T, Tada Y, Suga K, Imai K, Nakachi K. Cancer inhibition by green tea. *Mutat Res* 402(1-2): 307-310, 1998
16) Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem Suppl* 22: 169-180, 1995
17) Jung YD, Kim MS, Shin BA, Chay KO, Ahn BW, Liu W, Bucana CD, Gallick GE, Ellis LM. EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br J Cancer* 84(6): 844-850, 2001
18) Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89(24): 1881-1886, 1997
19) Ahmad N, Cheng P, Mukhtar H. Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Biophys Res Commun* 275(2): 328-334, 2000
20) Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival. *Science* 262: 695-700, 1993
21) Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J Patho* 173: 1-4, 1994
22) Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65: 1097-1098, 1991
23) Thomson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462, 1995
24) Mesner PW Jr, Budihardjo II, Kaufmann SH. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol* 41: 461-499, 1997
25) Weldon CB, Burow ME, Rolfe KW, Clayton JL, Jaffe BM, Beckman BS. NF-kappa B-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Surgery* 130(2): 143-150, 2001
26) Huh WK, Gomez-Navarro J, Arafat WO, Xiang J, Mahasreshti PJ, Alvarez RD, Barnes MN, Curiel DT. Bax-induced apoptosis as a novel gene therapy approach for carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 83(2): 370-377, 2001
27) Kim MS, So HS, Lee KM, Park JS, Lee JH, Moon SK, Ryu DG, Chung SY, Jung BH, Kim YK, Moon G, Park R. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe(*Viscum album var. coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Gen Pharmacol* 34(5): 349-355, 2000
28) Kim MS, Cheong YP, So HS, Lee KM, Kim TY, Oh J, Chung YT, Son Y, Kim BR, Park R. Protective effects of morphine in peroxynitrite-induced apoptosis of primary rat neonatal astrocytes: potential involvement of G protein and phosphatidylinositol 3-kinase(PI 3-kinase). *Biochemical Pharmacol* 61(7): 779-786, 2001
29) Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur J Biochem* 254: 439-459, 1998
30) Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R, Roth GS. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathways. *J Biol Chem* 273: 3756-3764, 1998
31) Singhal P, Kapasi A, Reddy K, Franki N. Opiates promote T cell apoptosis through JNK and caspase pathway. *Adv Exp Med Biol* 493: 127-135, 2001
32) Hama-Inaba H, Choi KH, Wang B, Haginoya K, Yamada T, Hayata I, Ohyama H. Fas-independent apoptosis induced by UVC in p53-mutated human epithelial tumor A431 cells through activation of caspase-8 and JNK/SAPK. *J Radiat Res(Tokyo)* 42(2): 201-215, 2001
33) Verheij M, Bose R, Lin, Yao B, Jarvis W, Grant S, Birrer M, Szabo E, Zon L, Kyriakis J, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolensnick R. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380: 75-79, 1996
34) Wilson DJ, Fortner KA, Lynch DH, Mattingly RR, Macara IG, Posada JA, Budd RC. *Eur J Immunol* 26: 989-994, 1996
35) Moriguchi T, Toyoshima F, Masuyama N, Hanafusa H, Gotoh Y, Nishida E. A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNF-α and cellular stresses. *EMBO* 16: 7045-7053, 1997
36) Cohen JJ. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract(Off Ed)* 28(12): 35-43, 1993
37) Pospisil R, Young-Cooper GO, Mage RG. Preferential expansion and survival of B lymphocytes based on VH framework 1 and framework 3 expression: "positive" selection in appendix of normal and VH-mutant rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (15): 6961-6965, 1995
38) Raff MC. Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell* 86(2): 173-175, 1996
39) Del Peso L, Gonzalez VM, Nunez G. Caenorhabditis elegans EGL-1 disrupts the interaction of CED-9 with CED-4 and promotes CED-3 activation. *J Biol Chem* 273(50): 33495-33500, 1998
40) Davis RJ. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* 16: 152-161, 1994
41) Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369(6476): 156-160, 1994
42) Osborn MT, Chambers TC. Role of the stress-activated/c-Jun NH2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs. *J Biol Chem* 271(48): 30950-30955, 1996
43) Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein-and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7: 2135-2148, 1993
44) Davis RJ. Signaling transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp* 64: 1-12, 1999