

## 배양 간세포에서 녹차 Polyphenol의 세포보호기전

부산대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>부산대학교 신약개발연구소 약학과, <sup>2</sup>마산대학  
<sup>3</sup>도야마의약대 화한약 연구소

계인숙 · 전영수 · 성도유 · 이숙희 · 김 종<sup>2</sup>  
요코자와 타카코<sup>3</sup> · 정해영<sup>1</sup>·이경희<sup>1</sup>

### Cytoprotective Mechanisms of Green Tea Polyphenols in Cultured Liver Cells

In-Sook Kye, Young-Soo Jeon, Do-Yu Soung, Sook-Hee Rhee, Jong Kim<sup>2</sup>  
Takako Yokozawa<sup>3</sup>, Hae-Young Chung<sup>1</sup>, and Kyung-Hee Lee<sup>1</sup>

*Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea*

<sup>1</sup>*Department of Pharmacy, Research Institute of Drug Development, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea*

<sup>2</sup>*Masan College, Sewon-Ku, Masan, 630-480, Korea*

<sup>3</sup>*Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Sugitani, Toyama 930-0194, Japan*

Oxygen is essential for human life, yet it is dangerous to all aerobic organisms. This is because some oxygen is metabolized to oxygen-derived free radicals and other free radical species which, in excess, can cause the cell injury and be opposed by antioxidant defence systems. Nitric oxide (NO·) is known to the oxidant injury via production of the potent oxidant peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). In this study, 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), 2,2'-azobis[2,4-dimethylvaleronitrile] (AMVN), sodium nitroprusside (SNP), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) which can produce intracellular free radicals, the cause of tissue damage and lipid peroxidation, were used for elucidating cytoprotective mechanisms of (-)-epicatechin 3-O-gallate (ECG), (-)-gallocatechin 3-O-gallate (GCG), and (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) extracted from green tea against free radicals. The treatment with ECG, GCG and EGCG markedly reduced cell damage induced by SIN-1, AMVN, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and *t*-BHP in cultured AcF2 liver cells. On the other hand, in case of SNP, cell viability was not dependent on the concentration and kinds of green tea polyphenols. Therefore, we can postulate that green tea polyphenols inhibit peroxynitrite formation through their O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenging as well as direct peroxynitrite scavenging.

**Key Words:** (-)-Epicatechin 3-O-gallate (ECG), (-)-Gallocatechin 3-O-gallate (GCG), (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG), Green tea polyphenols, Cytoprotective mechanism

## 서 론

인체의 여러 기관들은 저산소증, 외상, 급격한 온도 변화, 기압변화, 방사선 등에 동반되는 물리적인 자극, 세포내 체액의 이상, 환경오염, 면역학적 반응, 유전자 장애와 영양 불균형 등의 원인에 의해 손상을 받아 여러 병리적인 증상을 발병하게 된다. 이와같이 다양한 원인에 의해 야기될 수 있는 세포상해의 기전은 허혈성 상해, 활성산소에 의한 세포상해, 사염화탄소 같은 화학물질에 의한 화학적 상해 및 세포용해성/세포병성 바이러스와 발암성 바이러스에 의한 바이러스 유발성 세포상해의 4가지 기전에 의해 주로 발생되는 것으로 알려져 있으며,<sup>1,2)</sup> 최근 이들 4가지 기전에 모두 활성산소가 관련되어 있다는 많은 연구가 진행되고 있다.

현재 세포손상과 노화연구 분야에서 가장 주목을 받고 있는 것은 free radical<sup>3)</sup>로 활성산소( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ )는 구조적으로 분자 또는 원자 최외각에 하나의 부대전자를 가지므로 반응성이 크고 매우 불안정한 화합물을 말하며, 다양한 산화효소에 의해 세포의 세포질, 미토콘드리아, 라이소좀, 원형질막 등에서 생성되며, 무기유기물질(특히 막과 핵산의 주요성분인 당질, 지질, 단백질)과 반응하여 자가촉매 반응을 개시하여 손상을 증폭시키기도 한다.<sup>2)</sup>

또한 Nitric oxide (NO)는 내피세포, 호중구 등에서 생성될 뿐만 아니라 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 citrulline으로 전환시에도 생성되며, 대부분의 기관에서 세포내 messenger로 작용하고 혈관의 항상성 유지 및 신경전달 물질로서 작용한다.<sup>4,5)</sup> 아울러 NO와  $O_2^-$ 에 의해 형성된 활성질소종인 peroxyntirite ( $ONOO^-$ )는 *in vivo* 및 *in vitro*에서 가장 강력한 산화제로 단백질, 아미노산, DNA 등과 반응하여 세포 및 조직 손상을 야기하며, 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부염 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다.<sup>6-9)</sup>

그러나 생체는 이들 활성산소 및 활성질소종을 조절할 수 있는 다양한 항산화계가 존재하여 효율적으로 제거함으로써 인체의 항상성을 유지하고 있으며, 이들 방어체제로서는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 등의 항산화효소와 toco-pherol, carotenoids, uric acid 등의 비효소성 항산화제가 있다.<sup>10,11)</sup>

본 연구는 녹차성분의  $ONOO^-$  제거 및 형성억제에 대한 작용기전 및  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  등의 활성산소에 대한 제거작용을 screening한 결과 녹차성분 중의 (-)-epicatechin 3-O-gallate (ECG), (-)-gallo-catechin-3-O-gallate (GCG), (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG)의 세 가지 성분이 탁월한 작용을 나타낸 결과를 토대로 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), 2,2'-azobis[2,4-dimethylvaleronitrile] (AMVN),  $H_2O_2$ , sodium nitro-prusside (SNP), *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) 등의 약물에 의한 간세포 독성에 대한 보호작용실험을 통해 녹차성분의 세포 보호작용 기전을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 실험재료

(-)-Epicatechin 3-O-gallate (ECG), (-)-gallo-catechin 3-O-gallate (GCG), (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) 등의 녹차성분들은 일본 Shizuoka현의 Haibara에서 생산된 녹차(*Thea sinensis* L.: *Theaceae*)의 tannin mixture를 JAI-LC-908 high-performance liquid chromatography (Japan Analytical Industry Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 분리정제한 후 GC mass spectrometer (JMS-DX 303, JEOL, Tokyo, Japan)와 NMR (GSX-400, JEOL, Tokyo, Japan)로 동정된 것을 Taiyo Kagaku Co. (Yokkaichi, Japan)로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

### 2) 세포주의 종류 및 시약

Donryu rat의 간에서 유래하는 정상 간세포주(Ac2F)는 일본 cell bank로부터 분주받아 사용하였다. 또한 hydrogen peroxide는 Junsei (Tokyo, Japan)사 제품, sodium nitroprusside (SNP)는 Wako (Tokyo, Japan)사 제품, 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), GSH, 2-thiobarbituric acid (TBA), *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (St. Louis, U.S.A.)사 제품을 사용하였다. 아울러 calf serum은 Gibco (Grand island, U.S.A.)사 제품, Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)는 Nissui (Tokyo, Japn)제약 제품을 사용하였으며, 그 외 시약

들은 특급시약을 사용하였다.

### 3) 세포배양

간세포주(Ac2F)를 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask (Corning Co., New York, U.S.A.)에 2×10<sup>6</sup> cells/ml의 밀도가 되게 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 glutamine (5.84 mg/ml), amphotericin B (0.25 µg/ml), penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100 U/ml)과 heat-inactivated (56°C, 30분) calf serum (20%)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (pH 7.4 ~ 7.6) (DMEM: Nissui, Tokyo, Japan)으로 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였으며, 1 ~ 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

### 4) Trypan blue assay와 cell counting

48-well plate에 간세포주를 24시간 complete medium에서 배양하여 각 농도의 녹차성분과 1 mM 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) 또는 0.1 mM 2,2'-azobis[2,4-dimethylvaleronitrile] (AMVN)을 넣고 6 ~ 10시간 배양후 calcium magnesium free phosphate buffered saline (CMF- PBS)로 1 ~ 2회 (0.5 ml) 세척하여 배지를 제거한다. 배지 제거 후 각 well에 0.3 ml의 trypsin을 가하고 10분간 배양하여 fetal calf serum 0.3 ml를 첨가하며, 0.4% trypan blue 0.1 ml를 가한 후 피펫으로 균일화한후 hemocytometer를 이용하여 세포를 세었다.

### 5) 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay<sup>12)</sup>

MTT stock solution은 CMF-PBS에 MTT (Sigma)를 녹여 암소에서 냉동 보관하였으며, 간세포주를 48-well plates에 배양하여 배지를 제거하고 CMF-PBS로 1회 세척한 후 각 농도의 시료와 1% calf serum (CS)로 처리하여 30분간 배양하였다.

그 후 각 well에 1 mM sodium nitroprusside (SNP), 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 1.55 µM *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)를 가하여 14 ~ 24시간 배양하여, MTT 50 µl를 가하고 CO<sub>2</sub> 배양기(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 3시간 배양하여 살아있는 세포의 active mitochondria dehydrogenases의 환원반응에 의하여 MTT를 formazan products로 변화시킨 후 용해액인 acidic-isopropanol Triton-X 100을 각 well에 가하고 생성된 보라색의 결정물질을 완전히 용해시켜 용출되도록 하여 560 nm (Packard Spectra Count, Camberra Company)에서 흡광도를 측정하였다.

### 6) 통계분석

대조군과 각 시료들로부터 얻은 실험 결과들은 Mean±SD치로 표시하였고, 각 실험 결과로부터 ANOVA (analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple test를 이용하여 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다.

**Table 1.** Effect of ECG, GCG and EGCG on cell viability of cultured Donryu rat Ac2F liver cells exposed to 1 mM 3-morpholinosydnonimine for 10hrs

Samples	Concentration of green tea polyphenols		
	2.5 µM	10 µM	40 µM
Control	100.0±4.8 <sup>ab</sup>		
SIN-1	25.0±4.2 <sup>e</sup>		
SIN-1+ECG	41.7±3.4 <sup>de</sup>	83.3±7.3 <sup>abc</sup>	104.2±11.0 <sup>a</sup>
SIN-1+GCG	34.7±2.8 <sup>de</sup>	58.3±4.2 <sup>cd</sup>	90.3± 2.8 <sup>ab</sup>
SIN-1+EGCG	26.4±6.1 <sup>e</sup>	75.0±4.8 <sup>bc</sup>	98.6± 5.6 <sup>ab</sup>

Values are means±SD of the relative % of cell viability by trypan blue assay.

SIN-1: 3-morpholinosydnonimine, ECG: (-)-epicatechin 3-O-gallate, GCG: (-)-galliccatechin 3-O-gallate, EGCG: (-)-epigallocatechin 3-O-gallate

<sup>a</sup> <sup>e</sup>Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

**Table 2.** Effect of ECG, GCG and EGCG on cell viability of cultured Donryu rat Ac2F liver cells exposed to 0.1 mM 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) for 6hrs

Samples	Concentration of green tea polyphenols		
	0.625 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	10 $\mu$ M
Control	100.5 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>		
AMVN	53.5 $\pm$ 9.7 <sup>d</sup>		
AMVN+ECG	74.7 $\pm$ 1.6 <sup>bcd</sup>	77.6 $\pm$ 9.0 <sup>abc</sup>	94.0 $\pm$ 6.6 <sup>ab</sup>
AMVN+GCG	87.9 $\pm$ 5.4 <sup>abc</sup>	88.9 $\pm$ 5.1 <sup>abc</sup>	99.8 $\pm$ 15.3 <sup>a</sup>
AMVN+EGCG	65.7 $\pm$ 7.6 <sup>cd</sup>	84.7 $\pm$ 6.1 <sup>abc</sup>	95.6 $\pm$ 13.3 <sup>ab</sup>

Values are means $\pm$ SD of the relative % of cell viability by trypan blue assay.

AMVN: 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile), ECG: (-)-epicatechin 3-O-gallate, GCG: (-)-galliccatechin 3-O-gallate, EGCG: (-)-epigallocatechin 3-O-gallate

<sup>a-d</sup>Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

## 결과 및 고찰

### 1) 3-Morpholinosydnonimine (SIN-1)에 의해 형성된 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)의 세포 독작용에 대한 녹차 polyphenol의 영향

Donryu rat의 간에서 유래하는 정상 간세포주(Ac2F)를 이용하여 세포의 보호작용을 검토한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 세포생존율이 1 mM SIN-1만을 투여한 군은 25.0%로 대조군에 비해 75.0% 감소되었으나, 녹차성분을 2.5 $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 40  $\mu$ M의 농도별로 전처리한 결과 SIN-1만을 처리한 군에 비해 농도의존적으로 세포생존율이 유의성있게 증가되었으며, ECG, GCG, EGCG를 각 농도별로 비교하였을 때 2.5  $\mu$ M, 40  $\mu$ M에서는 유의적인 차이가 없었으나, 10  $\mu$ M에서는 ECG, EGCG가 GCG에 비해 세포생존율이 증가되었다 ( $p < 0.05$ ).

Lin등<sup>8)</sup>은 human leukemia HL-60 cell에 ONOO<sup>-</sup>를 전처리한 후 활성산소 소거제로 알려진 15 mM의 N-acetyl-L-cysteine을 처리한 결과 세포사를 감소시켰다고 보고하였다. 한편 많은 양의 활성산소는 생체 내의 항산화효소의 고갈을 야기하는 산화적 스트레스를 초래하여 부가적인 산화를 행하므로 세포사를 악화시키지만 녹차성분 중의 ECG, GCG, EGCG는 SIN-1에 의해 형성되는 ONOO<sup>-</sup>의 형성을 저해함으로써 세포 보호작용을 나타내는 것으로 사료된다.

### 2) 2, 2'-Azobis [2, 4-dimethylvaleronitrile] (AMVN)의 세포 독작용에 대한 녹차 polyphenol의 영향

AMVN은 AAPH와 더불어 free radical initiator로 널리 사용되며, 세포와 조직에서 지질 과산화를 유발하여 세포손상을 야기하는 물질로 알려져 있으며, 최근에는 *in vitro* 실험시 수용성 및 지용성 양자에서 사용될 수 있는 2,2'-azobis [4-methoxy- 2,4-dimethylvaleronitrile (Meo-AMVN)]가 발견되어 AMVN에 비해 저농도로 쉽게 분산되는 장점이 있으므로 LDL, 세포막, micelle 등의 연구에 이용되고 있다.<sup>13)</sup>

한편 Table 2에서 보는 바와 같이 0.1 mM AMVN만을 투여한 군은 세포생존율이 53.5%로 대조군에 비해 46.5% 감소되었으나, 녹차성분을 0.625  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M의 농도별로 전처리한 결과 AMVN만을 처리한 군에 비해 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 유의성있게 증가되었으며, ECG, GCG, EGCG를 각 농도별로 비교하였을 때 0.625  $\mu$ M에서는 GCG에서 세포생존율이 증가되어 저농도에서도 강력한 세포 보호작용을 나타내었으며, 2.5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M에서는 각 농도간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다( $p < 0.05$ ). 따라서 녹차 성분 중의 ECG, GCG, EGCG는 AMVN에 의한 유리기를 저해함으로써 세포 보호작용을 나타내는 것으로 사료된다.

### 3) Sodium nitroprusside (SNP)의 세포 독작용에 대한 녹차 polyphenol의 영향

SNP는 NO를 생성하여 NMDA receptor에 의한 신경 독성을 억제하여 신경 보호작용을 행할 뿐만 아니라 강력한 NO<sup>+</sup> 성질을 나타내므로 NO를 발생하기 위해 thiol 등과 함께 환원성 활성화를 필요로 한다.<sup>14)</sup>

Table 3에서 보는 바와 같이 1 mM SNP만을 투여한 군은 세포생존율이 76.2%로 대조군에 비해 23.8% 감소되었으나, 녹차성분을 2.5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 40  $\mu$ M의 농도 별로 전처리한 결과 SNP만을 처리한 군에 비해 농도

증가에 따른 유의적인 세포 보호작용은 나타나지 않았다( $p < 0.05$ ). 따라서 녹차성분들은 ONOO<sup>-</sup>의 형성은 저해하나 이들의 전구체인 NO에 대한 저해작용은 나타나지 않았으므로 O<sub>2</sub>의 생성을 감소시켜 ONOO<sup>-</sup>의 형성을 저해하였으리라 사료된다.

한편 Valeri등<sup>15)</sup>은 S-nitroso-acetyl penicillamine (SNAP), SNP가 농도 의존적으로 토끼의 대동맥 평활근 세포에서 단백질 합성을 억제하나 Hb 투여로 NO 형성이 억제되었음을 보고하였으며, 정<sup>16)</sup>도 배양 간세포에서 Hb이 NO로 인한 세포 손상에 대한 세포 보호작용이 있음을 보고하였다.

**Table 3.** Effect of ECG, GCG and EGCG on cell viability of cultured Donryu rat Ac2F liver cells exposed to 1 mM sodium nitroprusside for 24hrs

Samples	Concentration of green tea polyphenols		
	2.5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	40 $\mu$ M
Control	100.0 $\pm$ 2.6a		
SNP	76.2 $\pm$ 0.4 <sup>bc</sup>		
SNP+ECG	76.7 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	72.6 $\pm$ 1.8 <sup>bcd</sup>	76.8 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>
SNP+GCG	73.0 $\pm$ 3.0 <sup>bcd</sup>	68.1 $\pm$ 3.1 <sup>d</sup>	68.2 $\pm$ 2.0 <sup>d</sup>
SNP+EGCG	73.0 $\pm$ 3.0 <sup>bcd</sup>	69.7 $\pm$ 2.9 <sup>cd</sup>	73.0 $\pm$ 7.2 <sup>bcd</sup>

Values are means $\pm$ SD of the relative % of cell viability by MTT assay.

SNP: sodium nitroprusside, ECG: (-)-epicatechin 3-O-gallate, GCG: (-)-gallocatechin 3-O-gallate, EGCG: (-)-epigallocatechin 3-O-gallate

<sup>a-d</sup>Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

**Table 4.** Effect of ECG, GCG and EGCG on cell viability of cultured Donryu rat Ac2F liver cells exposed to 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 14hrs

Samples	Concentration of green tea polyphenols		
	2.5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	40 $\mu$ M
Control	100.0 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	59.4 $\pm$ 6.8 <sup>d</sup>		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +ECG	60.7 $\pm$ 0.7 <sup>cd</sup>	68.2 $\pm$ 7.5 <sup>c</sup>	107.0 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +GCG	61.2 $\pm$ 2.8 <sup>cd</sup>	60.3 $\pm$ 1.6 <sup>cd</sup>	98.0 $\pm$ 5.8 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +EGCG	60.6 $\pm$ 5.7 <sup>cd</sup>	67.2 $\pm$ 2.4 <sup>cd</sup>	97.7 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>

Values are means $\pm$ SD of the relative % of cell viability by MTT assay.

ECG: (-)-epicatechin 3-O-gallate, GCG: (-)-gallocatechin 3-O-gallate, EGCG: (-)-epigallocatechin 3-O-gallate

<sup>a-d</sup>Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

4) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 세포 독작용에 대한 녹차 polyphenol의 영향

Table 4에서 보는 바와 같이 세포생존율이 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 투여한 군은 59.4%로 대조군에 비해 40.6% 감소되었으나, 녹차성분을 2.5 μM, 10 μM, 40 μM의 농도별로 전처리한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 처리한 군에 비해 농도의존적으로 세포생존율을 유의성있게 증가시켰으며, ECG, GCG, EGCG 모두 거의 비슷한 정도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 세포보호작용을 나타내었다. 따라서 녹차성분 중의 ECG, GCG, EGCG는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포 독성을 저해함으로써 세포 보호작용을 나타내는 것으로 사료된다. 또한 Leanderson<sup>17)</sup>은 배양된 human lung cell (A 549)에서 다량의 활성산소를 함유한 담배연기, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>에 의한 지질 과산화와 DNA 분해에 대한 녹차 polyphenol의 효과를 검토한 결과, 녹차 투여군이 대조군에 비해 지질 과산화와 DNA 분해를 저해하여 세포 독성을 감소시킴으로써 항암작용을 나타낼 것이라고 추정하였다.

5) *tert*-Butyl hydroperoxide (*t*-BHP)의 세포 독작용에 대한 녹차 polyphenol의 영향

Acute oxidative stress를 야기시켜 비가역적인 세포 손상의 기전을 연구하기 위해 자주 사용되는 organic hydroperoxide의 하나인 *t*-BHP를 이용하여 배양 간세포에서 녹차의 ECG, GCG, EGCG의 세포보호작용을 검

토한 결과 Table 5에서와 같이 세포생존율이 1.55 μM *t*-BHP만을 투여한 군은 62.1%로 대조군에 비해 37.9% 감소되었으나, 녹차성분을 2.5 μM, 10 μM, 40 μM의 농도별로 전처리한 결과 *t*-BHP만을 처리한 군에 비해 농도가 증가함에 따라 세포생존율을 유의성있게 증가시켰으며, ECG, GCG, EGCG를 각 농도별로 비교하였을 때 2.5 μM에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 10 μM에서는 ECG, EGCG에서 높은 세포생존율을 나타내었다(p<0.05).

*t*-BHP는 미토콘드리아의 cytochrome C 또는 cytochrome C<sub>1</sub>에 의해 대사되어 *t*-butoxyl, *t*-butyl peroxy 및 methyl radical 등의 유리기를 생성하여 지질 과산화, 단백질 산화 및 핵산의 손상을 초래한다고 보고되어 있으며,<sup>18)</sup> *t*-BHP에 의한 세포손상 기전은 칼슘의 증가에 의한 미토콘드리아 막의 탈분극<sup>19)</sup> 및 protein kinase C의 translocation과 activation이 oxygen-based radical에 노출된 세포의 막손상과 지질 과산화에 중요한 매개체로서 작용을 나타내는 것으로 보고되어져 있다.<sup>20)</sup> 그러나 녹차성분 중의 ECG, GCG, EGCG는 *t*-BHP에 의한 위와 같은 세포 독성을 저해함으로써 세포 보호작용을 나타내는 것으로 사료된다.

요 약

생체내에서 세포는 끊임없이 활성산소를 생산하며

**Table 5.** Effect of ECG, GCG and EGCG on cell viability of cultured Donryu rat Ac2F liver cells exposed to 1.55 μM *t*-butyl hydroperoxide for 14hrs

Samples	Concentration of green tea polyphenols		
	2.5 μM	10 μM	40 μM
Control	100.0±2.1 <sup>d</sup>		
<i>t</i> -BHP	62.1±1.2 <sup>f</sup>		
<i>t</i> -BHP+ECG	60.1±2.7 <sup>f</sup>	73.8±0.8 <sup>e</sup>	132.0±5.3 <sup>a</sup>
<i>t</i> -BHP+GCG	61.5±2.3 <sup>f</sup>	64.8±4.2 <sup>f</sup>	107.4±3.4 <sup>c</sup>
<i>t</i> -BHP+EGCG	61.7±1.0 <sup>f</sup>	73.6±1.9 <sup>e</sup>	122.0±4.2 <sup>b</sup>

Values show the relative % of cell viability by MTT assay. Values are mean±SD.

*t*-BHP: *t*-butyl hydroperoxide, ECG: (-)-epicatechin 3-O-gallate, GCG: (-)-gallicocatechin 3-O-gallate, EGCG: (-)-epigallocatechin 3-O-gallate

<sup>a-f</sup> Means with the different letters beside data are significantly different at the 0.05 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

이들은 매우 높은 반응성을 가지므로 생체내에서 다양한 분자들과 쉽게 반응하여 손상을 가져와 지질 과산화 및 산화적 상태를 초래하므로 염증, 노화, 발암 등 많은 질환의 병인으로 추측되고 있으며, 근래에는 NO와 O<sub>2</sub>의 반응에 의해 생성된 강력한 산화제인 peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>)가 지질 과산화, 세포내 -SH의 산화, DNA 손상과 세포 에너지 고갈 등 많은 만성 질환 병리학과 관련하여 활발히 연구되고 있다.

본 연구에서는 세포 배양계에서 ECG, GCG 및 EGCG의 세가지 성분에 대해 SIN-1, AMVN, SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 t-BHP의 세포 독작용에 대한 영향을 살펴본 결과 SNP를 제외한 약물에 있어서 ECG, GCG 및 EGCG는 농도의존적으로 유의한 세포 보호작용을 나타내었다. 즉 녹차성분 중에서 ECG, GCG 및 EGCG의 세가지 성분은 SNP에 의해 생성되는 NO의 저해효과는 나타나지 않았으나, SIN-1에 의해 형성되는 ONOO<sup>-</sup>, AMVN에 의한 유리기, t-BHP에 의한 LOOH 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포 손상에 대해서는 세포 보호작용을 나타내었다. 따라서 이들 세가지 성분들은 SIN-1에 의해 형성되는 NO보다는 O<sub>2</sub>의 제거를 통해서, 또한 t-BHP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup>의 peroxide들을 직접 제거함으로써 세포 보호작용을 나타내는 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

본 연구는 1999년도 부산대학교 학술연구조성비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참고 문헌

- Hole JW. Human anatomy and physiology. Wm.C. Brown Publishers, U.S.A., 1990, 535.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. W.B. Saunders, Philadelphia, 1989, 1.
- Harman D. A theory based on free radical chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298.
- Ameczua JL, Palmer RMJ, De Souza BM, Moncada S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 1119.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051.
- Althaus JS, Oien TT, Fici GJ, Scherch HM, Sethy VH, VonVoigtlander PF. Structure activity relationships of peroxynitrite scavengers an approach to nitric oxide neurotoxicity. *Res Commu Chem Patho Pharmacol* 1994; 83(3): 243.
- Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commu* 1997; 232: 164.
- Lin KT, Xue JY, Sun FF, Wong PYK. Reactive oxygen species participate in peroxynitrite induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commu* 1997; 230: 115.
- Halliwell B. Hypothesis: What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation *in vivo*? *FEBS Lett* 1997; 411: 157.
- Wiseman H. Dietary influences on membrane function; Importance in protection against oxidative damage and disease. *Nutri Biochem* 1996; 7: 2.
- Fukuzawa K, Takaishi Y. Antioxidants. *J Act Oxyg Free Rad* 1990; 1: 55.
- Tim M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Method* 1983; 65: 55.
- Noguchi N, Yamashita H, Gotoh N, Yamamoto Y, Numano R, Niki E. 2,2'-Azobis (4-methoxy-2,4,-dimethylvaleronitrile), a new lipid-soluble azo initiator; Application to oxidations of lipids and low density lipoprotein in solution and in aqueous dispersions. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(2): 259.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Sheung H, Chen V, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler J. A redox based mechanism for the neuroprotective effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature* 1993; 364(12): 626.
- Valeri K, Gordon D, Kulik TJ. Nitric oxide generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 476: 305.
- 정경미. 배양 간세포에서 nitric oxide와 superoxide의 상호 작용에 관한 연구. 부산대학교 석사학위논문 1997.
- Landerson P, Faresjo AO, Tagesson C. Green tea polyphenols inhibit oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells. *Free Rad Biol Med* 1997; 23(2): 235.
- Fraga CG, Tappel AL. Damage to DNA concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices. *Biochem J* 1988; 252: 893.
- Forman H, Dorio RJ, Skelton DC. Hydroperoxide-induced damage to alveolar macrophage function and membrane integrity. *Arch Biochem Biophys* 1987; 259: 457.
- Ruecker AA, Han-Jeon BG, Wild M, Bidlingmaier F. Protein kinase C involvement in lipid peroxidation and cell membrane damage induced by peroxidation and

16 대한암예방학회지 : 제 4 권 제 1 호 1999

cell membrane damage induced by oxygen-based radicals in hepatocytes. *Arch Biochem Biophys Res Com* 1989; 163: 836.