

李 名 淑 教 授 指 導

碩 士 學 位 請 求 論 文

혈관내피세포(ECV304 cell)에서
녹차가 식이성 지질 과산화물에 의한
진행성 동맥경화에 미치는 영향

2006

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

金 梅 河

혈관내피세포(ECV304 cell)에서
녹차가 식이성 지질 과산화물에 의한
진행성 동맥경화에 미치는 영향

李名琚 教授指導

이 論文을 碩士學位 論文으로 提出함

2005年 11月

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

金梅河

감사의 글

어느덧 2년이라는 대학원 시간이 지나 새로운 삶을 향해 있는 지금 오늘의 저를 있게 해주신 분들에게 이 감사의 마음을 조금이나마 전하려고 합니다.

본 논문이 완성되기까지 학문의 길과 배움에 대해 아낌없는 가르침을 주시고 사랑과 격려로 이끌어 주신 이명숙 교수님께 먼저 진심으로 감사드립니다. 아울러 세심하고 자상하게 논문 심사를 해 주신 안명수 교수님, 안홍석 교수님께 진심으로 감사드리며 학부와 석사과정 동안 늘 따뜻한 관심으로 지켜봐 주시고 많은 가르침으로 학문의 자세를 깨우쳐 주신 김혜영 교수님, 조은자 교수님, 한영숙 교수님께 깊은 감사의 마음을 드립니다.

논문이 완성될 수 있도록 많은 도움을 주신 오현희 선생님과 미영언니, 영연언니께 감사드리며 항상 격려의 말로 위로해 주신 대학원 선배언니들께도 감사의 마음을 전합니다. 또한 고마운 마음을 말로 다 표현할 수 없을 만큼 친언니처럼 자상하게 대해준 효숙언니와 항상 곁에서 묵묵히 실험을 일을 도와주고 따뜻한 위로의 말을 해주었던 인수언니에게 감사드리며 열심히 실험실 일을 배우고 있는 수정이와 유호 선생님, 그리고 옆에서 항상 힘이 되어준 선용이 오빠와 후배 진숙이, 은아에게도 고마운 마음을 전합니다. 항상 따뜻한 격려의 말로 큰 힘이 되어 주신 유정아 선생님과 김경식 선생님께도 감사드리며 힘들 때 마다 마음의 휴식처가 되어 주었던 친구 윤미, 의한, 지수에게도 고마운 마음을 전하며 이 작은 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

마지막으로 항상 든든한 오빠와 착한 동생 성용이에게 고마움을 전하며 부족한 딸에게 누구보다도 격려를 아끼지 않으시고 한없는 사랑으로 감싸주신 아빠, 엄마께 고개 숙여 감사드리며 이 작은 결실을 바칩니다.

논문개요

최근 우리의 식생활이 서구화 되어감에 따라 식이 지방의 섭취가 증가하였으며, 이로 인해 심장 및 뇌혈관 질환의 발병률이 증가하고 있다. 식이 지방의 섭취량뿐만 아니라 체내에서 생성되는 지질 과산화물을 심혈관 질환의 원인물질로 제시하는 연구가 보고되고 있다. 생체 내에서 최종적으로 생성되는 지질 과산화물의 한 형태인 4-HNE(4-hydroxynonenal)는 ω -3계열과 ω -6계열 지방산이 함유된 지질의 과산화 과정에서 생성된다. 이렇게 형성된 지질 과산화물들은 혈관벽의 산화적 손상을 유발하여 혈관성 세포사멸을 초래하고, 이는 생리적인 기능장애뿐만 아니라 동맥경화와 같은 심혈관 질환을 유발시킨다고 보고되고 있다.

세포사멸(apoptosis)이란 개체를 구성하고 있는 세포가 조직의 항상성을 유지하기 위하여 능동적으로 죽는 적극적인 현상으로, 프로그램화된 세포사멸(programmed cell death)이라고도 한다. 그러나 세포사멸은 퇴행성 질환의 원인이 되고 면역질환 등을 유발한다고 알려져 있으며, 이러한 질환은 산화적 스트레스와 연관되어 있다고 보고되고 있다. 산화적 스트레스는 미토콘드리아 관련성 세포사멸 경로를 통해 세포사멸을 유발한다. 미토콘드리아 관련성 세포사멸 경로에 관여하는 단백질에는 cytochrome c, bcl-2, caspase-9, caspase-3 등이 있다. 최종적으로 활성화된 caspase-3는 PARP[poly(ADP-ribose)polymerase]를 활성화시켜 DNA 분절화 현상과 핵의 응축을 유도하면서 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 세포사멸을 억제하는 물질로는 녹차, 콩

류, 포도, 마늘 및 양파류 등의 채소나 과일에 존재하는 폴리페놀 성분들이 제시되고 있다.

특히 녹차에 함유된 폴리페놀 성분들은 지질의 과산화 현상을 억제하여 심혈관계 질환의 발병률을 감소시킨다고 보고되고 있으며, 과산화물과 지질 라디칼을 효율적으로 제거하여 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 항산화 기전에 관여하는 효소의 활성을 증가시킴으로써 과산화 물질을 제거하고, 산화적 스트레스에 의한 세포사멸 기전을 억제한다고 보고되고 있다.

따라서 본 연구는 인체 혈관 내피 세포(ECV304 cell)를 이용하여 4-HNE가 혈관 내피 세포의 사멸에 미치는 영향과 이에 따른 녹차의 생리활성 효과를 살펴보기 위하여 4-HNE는 50, 100, 200, 400 μM 의 농도로 처치하였고, 녹차 에탄올 추출물(green tea ethanol extracts, GTE)은 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처치하여 세포 생존율을 측정하였다. 위의 실험 결과를 바탕으로 4-HNE 50 μM 과 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치하여 세포의 형태학적 변화, 지질 과산화물(lipid peroxides, LPO)의 함량, caspase-3 단백질의 활성화도, 미토콘드리아 관련성 세포사멸 경로에 관여하는 단백질의 발현정도를 측정하였으며, 실험 결과는 다음과 같다.

1. 세포의 형태학적 변화를 살펴보면, 4-HNE 50 μM 처치군은 배양시간이 지남에 따라 세포사멸 현상이 뚜렷하게 나타났다. 반면, GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치한 군에서는 1, 6시간 배양 시 4-HNE 50 μM 처치군에 비해 세포사멸

현상이 감소하는 것으로 관찰되었다. 그러나 12, 24시간 배양 시에는 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치한 군에서 세포사멸 억제효과가 나타나지 않는 것으로 관찰되었다.

2. 4-HNE를 50-400 μM 의 농도로 처치하여 12, 24, 48시간 배양 후 세포생존율을 관찰한 결과 농도 의존적이며 배양시간 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 4-HNE를 50 μM 의 농도로 처치한 후 1, 3, 6, 12, 24시간 배양하였을 경우에도 같은 경향을 나타내었다. 반면, GTE 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 4-HNE 50 μM 과 함께 처치하여 1, 3, 6, 12, 24시간 배양하였을 경우에는 4-HNE 50 μM 처치군에 비해 세포 생존율이 증가하는 것으로 관찰되었다. 특히 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처치하였을 경우에는 GTE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처치한 것에 비해 세포 생존율이 더 높은 것으로 나타났다.

3. 지질 과산화물 함량에 있어서는 4-HNE 50 μM 을 처치하였을 경우 대조군에 비해 지질 과산화물 함량이 시간 의존적으로 증가하였다. 반면, GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치한 군에서는 1, 6시간 배양 시 지질 과산화물의 함량이 유의적으로 감소하였다($p=0.009$, $p=0.024$). 그러나 12, 24시간 배양 시에는 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 첨가가 지질 과산화물 함량에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

4. caspase-3 활성도를 살펴보면 4-HNE 50 μM 처치군에서는 배양시간이 증가할수록 caspase-3의 활성이 유의적으로 증가하였다($p<0.001$). 반면,

GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치한 군에서는 4-HNE 50 μM 처치군에 비해 1, 6시간 배양 시 caspase-3의 활성도가 유의적으로 감소하였다($p=0.001$, $p=0.002$). 12시간 배양 시에도 caspase-3의 활성도가 감소하였으나 유의적이지 않았으며, 24시간 배양 시에는 caspase-3의 활성도가 4-HNE 50 μM 처치군에 비해 다소 증가하였으나 유의적이지 않았다.

5. cytochrome c 단백질의 발현정도는 4-HNE 50 μM 처치군의 경우 모든 배양시간에서 cytochrome c 단백질의 발현이 증가한 것으로 나타났다. 반면, GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치한 군에서는 1, 6시간 배양 시 4-HNE 50 μM 처치군에 비해 cytochrome c 단백질의 발현이 억제되었다. 그러나 12, 24시간 배양 시에는 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치한 군에서 cytochrome c 단백질 발현에 대한 억제효과가 관찰되지 않았다.

6. 항세포사멸 인자인 bcl-2 단백질의 발현정도를 살펴보면, 4-HNE 50 μM 처치군은 대조군과 비교하였을 경우 bcl-2 단백질의 발현정도가 유사한 것으로 관찰되었다. 반면, GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치한 군에서는 1, 6시간 배양하였을 경우 bcl-2 단백질의 발현이 4-HNE 50 μM 처치군에 비해 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 12, 24시간 배양하였을 경우에는 bcl-2 단백질의 발현정도가 4-HNE 50 μM 처치군과 유사한 것으로 나타났다.

7. caspase-3 단백질의 발현정도는 4-HNE 50 μM 처치군의 경우 모든 배양시간에서 활성화된 caspase-3 단백질의 발현이 증가한 것으로 나타났다.

GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치한 군에서는 1, 6시간 배양하였을 경우 4-HNE 50 μM 처치군에 비해 활성화된 caspase-3 단백질 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 12, 24시간 배양 시에는 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치한 군에서 활성화된 caspase-3 단백질 발현에 대한 억제효과가 관찰되지 않았다. 이는 GTE가 초기 배양시간에서 세포사멸을 억제하는 역할을 한 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 지질의 과산화 생성물질인 4-HNE는 인체 혈관 내피 세포(ECV 304 cell)에서 미토콘드리아 관련성 세포사멸 경로를 통해 세포사멸을 유발하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 녹차 에탄올 추출물은 6시간 이내의 초기 배양시간에서 4-HNE에 의하여 유도되는 세포사멸을 억제하였다. 이와 같은 혈관 내피 세포에서 녹차의 세포사멸 억제효과는 동맥경화의 예방에 도움을 줄 것으로 기대된다.

향후 연구로서 세포 신호 전달 체계의 초기과정에 있어서 녹차와 관련된 기전적 연구가 요구되어지며, 이를 바탕으로 녹차에 함유된 폴리페놀 성분들의 임상적인 활용 가능성을 타진할 필요가 있겠다.

목 차

논문개요

I . 서론	1
II . 재료 및 방법	9
1. 실험재료	10
2. Human vascular endothelial cell (ECV 304 cell)의 배양	10
(1) 세포배양	10
(2) 녹차 에탄올 추출물(GTE)	11
(3) 시료처리	11
3. 세포 형태학적 관찰	12
4. 생화학적 검사	12
(1) Cell extracts	12
(2) 세포 생존율	13
(3) 지질 과산화물(Lipid peroxides , 4-HNE+MDA) 함량	14
(4) caspase-3 활성화도	14
(5) Western blot 분석	15
(6) 단백질 정량	16
5. 통계처리	16

III. 연구 결과 및 고찰	17
1. 세포 형태학적 변화	17
2. 세포 생존율	20
3. 지질 과산화물(Lipid peroxidation, 4-HNE+MDA) 함량	32
4. caspase-3 활성화도	36
5. Western blot 분석	41
IV. 요약 및 결론	50

참고문헌

ABSTRACT

Lists of Tables

Table 1. Effects of increasing concentration of 4-HNE on the cell proliferation of ECV304 cells according to the different incubation times	23
Table 2. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the cell viability of ECV304 cells according to the different incubation times	29
Table 3. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the LPO production of ECV304 cells according to the different incubation times	34
Table 4. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the caspase-3 activation of ECV304 cells according to the different incubation times	39

List of Figures

Fig. 1. Lipid peroxidation of autocatalytic chain process	6
Fig. 2. Mitochondrial Pathway of Apoptosis Signaling	7
Fig. 3. Molecular structures of green tea polyphenols	8
Fig. 4. The experimental design	9
Fig. 5. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the cell morphology of ECV304 cells according to the different incubation times	19
Fig. 6. Effects of increasing concentration of 4-HNE on the cell viability of ECV304 cells according to the different incubation times compared with control	24
Fig. 7. Cytotoxicity of ethanol extracts of green tea on the cell viability of ECV304 cells according to the different incubation times compared with control	30
Fig. 8. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the cell viability of ECV304 cells according to the different incubation times compared with control	31
Fig. 9. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the LPO production of ECV304 cells according to the	

	different incubation times	35
Fig. 10.	Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the caspase-3 activation of ECV304 cells according to the different incubation times	40
Fig. 11.	Cytochrome c protein expression levels in human vascular endothelial cells (ECV304 cells) exposed to 4-HNE 50 μ M and incubated with GTE 20 μ g/ml	43
Fig. 12.	Bcl-2 protein expression levels in human vascular endothelial cells (ECV304 cells) exposed to 4-HNE 50 μ M and incubated with GTE 20 μ g/ml	46
Fig. 13.	Caspase-3 protein expression levels in human vascular endothelial cells (ECV304 cells) exposed to 4-HNE 50 μ M and incubated with GTE 20 μ g/ml	49

I. 서론

2003년 통계청의 사망원인 통계결과에 의하면 뇌혈관 질환이 10만 명당 75.5명, 심장질환이 10만 명당 35.6명으로 남녀 모두에서 암 다음으로 한국인 사망률의 직접적인 원인이 되고 있다(1). 또한 우리의 식생활이 서구화 되어감에 따라 지방 섭취량이 매년 증가하여 1992년에는 총열량에 대한 지방 섭취율이 16.6%에 불과하였으나, 2001년에는 19.5%로 증가하였다(2). 따라서 우리나라의 식생활 패턴이 여전히 뇌혈관 및 심혈관 질환의 사망률에 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 뇌혈관 질환과 심장질환은 동맥경화가 주된 원인인 것으로 알려져 있으며(3), 동맥경화의 위험인자로는 비만, 음주, 흡연, 가족력, 남성, 폐경, 나이, 혈중 지질농도, 혈장 호모시스테인 농도 증가, 유전자 다형성 및 식이인자 등이 제안되고 있다(4,5). 특히 여러 역학조사 결과 식이 지방이 고혈압, 동맥경화, 심장질환 등의 심혈관계 질환과 밀접한 관계가 있다고 밝혀지면서, 이들 질병과 관련된 콜레스테롤, 불포화지방산과 같은 식이 지방에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(6,7).

식이 지방 중 고도 불포화 지방산 특히 식이 내 ω -3 지방산은 다른 지방산에 비해 지방산 자체의 불포화도가 높고 cis형의 불안정한 이중결합을 지니고 있으므로 체내 외에서 산화되어 자유기와 과산화물을 생성할 가능성이 높다(8). 이렇게 생성된 과산화물은 세포막 파괴, 지단백질의 산화, 체조직의 노화, 암 및 여러 종류의 퇴행성 질환을 일으켜 생체에 치명적인 영향을 줄 수 있다고 보고되고 있다(9-11). 또한 자유기 중에서도 활성산소들은 반응성

이 대단히 높아 세포의 주요 구성물질인 지질, 단백질 및 핵산을 파괴하여 조직에 산화적 손상을 초래하게 되고 만성적인 산화적 손상은 세포의 기능 저하뿐만 아니라 노화나 암 및 동맥경화와 같은 각종 만성질환을 유발하는 원인이 된다고 알려져 있다(12,13). 이러한 활성산소들은 정상 에너지 대사 과정에서는 물론 그 외 여러 기전에 의해 끊임없이 생성되며 동시에 각종 효소 및 비효소적 항산화 물질에 의해 제거되어 정상 생체에서는 이들의 생성과 소거가 균형을 이루고 있다. 그러나 이러한 대사가 불균형을 이루게 되면 세포내에서 산화적 스트레스가 발생하게 되며, 특히 지질의 산화적 손상을 유발하여 초기에 지질 라디칼을 생성한 후 자동 연쇄 반응으로 과산화물을 생성하게 된다고 알려져 있다(14).(Fig. 1)

지질 과산화물의 한 형태인 4-hydroxynonenal(4-HNE)은 ω -3계열과 ω -6계열 지방산의 산화과정에 의해 생성되는 α,β -unsaturated aldehydes 중 하나이며 동맥경화, 파킨스씨 질병, 당뇨, 만성신부전 등과 같은 다양한 질병의 원인물질로 작용한다고 보고되고 있다(15-18). 4-HNE는 아미노산 잔기의 변형을 일으켜 단백질의 산화적 손상을 유발하고, DNA adduct 물질로서 작용하여 유전자 발현에 변화를 초래한다고 알려져 있다(19,20). 4-HNE가 식이성 요인의 지질 과산화물 표지자로서 혹은 DNA adduct 물질로서 작용한다는 사실이 최근에 밝혀졌으나, 동맥경화와 관련된 연구는 아직 미흡한 실정이다(21). 4-HNE는 농도 의존적으로 세포신호기전에 영향을 미친다. 즉 몇몇 세포에서는 저농도의 4-HNE가 세포증식을 촉진한다고 보고되고 있는 반면, 고농도의 4-HNE는 세포사멸(apoptosis)을 유도한다고 보고되고 있다(14). 특히 혈관내벽에서 일어나는 과도한 세포사멸은 동맥경화의 발생과 관

런이 있다고 알려져 있다. 혈관내벽에서의 세포사멸은 죽상반 파열(plaque rupture)을 동반하여 죽상반의 혈전을 증가시키고, 이로 인해 혈관 내강이 협착하게 되어 동맥경화를 유발하게 된다(22). 또한 혈관 내벽에 콜레스테롤이 축적될 때 형성되는 섬유성 막을 지속적으로 약화시키고, 갑작스런 파열을 유발하여 결과적으로 동맥경화를 유발하게 된다고 보고되고 있다(23).

세포사멸이란 신체를 구성하고 있는 기본단위인 세포가 조직의 항상성을 유지하기 위하여 세포분열과 죽음을 조절하는 과정에서 능동적으로 죽는 것을 의미하며 프로그램화된 세포사멸(programmed cell death)이라고도 한다(24,25). 그러나 세포사멸은 퇴행성 질환의 원인이 되고, 면역 질환 등의 치명적인 질환을 유발한다고 알려져 있으며(26), 이러한 질환은 산화적 스트레스와 연관되어 있다고 보고되고 있다. 산화적 스트레스는 미토콘드리아 관련성 세포사멸 경로를 통해 세포사멸을 유발하게 된다(27). 이러한 세포사멸은 형태학적으로는 세포막의 파괴, 염색체의 응축 및 사멸체(apoptotic body) 형성과 함께 식세포 작용을 거치는 것을 의미하며, 생화학적으로는 염색체 DNA가 큰 조각에서 작은 조각으로 갈라지는 DNA 단편화 현상을 의미한다(28,29). 일반적으로 세포사멸 기전은 caspase라 불리는 단백질 분해효소에 의해 세포 내 단백질이 분해되면서 신호가 전달되는 일련의 과정으로 여러 종류의 caspase들이 세포사멸에 관여하는 것으로 보고되고 있다(30). 세포사멸 경로는 외인성인 수용체 매개성 경로와 내인성인 미토콘드리아 관련성 경로가 있다. 수용체 매개성 세포사멸 경로는 세포사멸 수용체인 FasR, TNF-R1, CAR1, DR3 또는 DR4에 리간드가 결합하여 활성화가 일어나는 것에 의해 시작된다.(Fig. 2) 이로 인해 세포질 내 도메인이

FADD(Fas associated death domain) 단백질과 결합하게 되고, 다음으로 caspase-8과 연결되어 세포사유도신호복합체(death inducing signaling complex, DISC)를 형성한다고 알려져 있다(31). 미토콘드리아 관련성 세포사멸 경로는 주로 산화성 스트레스에 의한 비특이적 막투과성의 증가와 미토콘드리아 막전위가 감소되는 것에 의해 시작된다(32). 이때 미토콘드리아의 막간격에 존재하는 cytochrome c가 미토콘드리아 막의 통로(channel)를 통해 방출되며, 이는 막의 통로를 구성하고 있는 bcl-2계 단백질들에 의해 조절된다(33,34). 방출된 cytochrome c는 Apaf-1, caspase-9, dATP와 결합하여 caspase-9을 활성화시키고, 이렇게 활성화된 caspase-9은 caspase-3를 활성화시켜 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되고 있다(35). 최종적으로 활성화된 caspase-3는 PARP[poly(ADP-ribose)polymerase]를 활성화시켜 DNA 분절화 현상과 핵의 응축을 유도하면서 세포사멸을 일으키는 것으로 알려지고 있다(36). 이러한 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 세포사멸 억제 물질로는 녹차, 콩류, 포도, 마늘 및 양파류 등의 채소나 과일에 존재하는 폴리페놀 성분들이 제시되고 있다(37).

최근에는 녹차에 대한 관심이 높아지면서 녹차의 성분과 그 약리 효과에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 녹차는 여러 가지 다양한 화합물질의 복합체로 구성되어 있으며, 그 중에서도 여러 종류의 폴리페놀류가 다량 함유되어 있다(38,39). 녹차의 기능성분인 폴리페놀은 flavan-3-ol 구조를 기본으로 하고 있으며, 녹차에 함유된 폴리페놀을 살펴보면 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)가 26.9%, epicatechin gallate(ECG)가 11.6%, epicatechin(EC)은 7.7%, epigallocatechin(EGC)은 7.2% 정도 함유되어 있다. 그 외

gallocatechin과 catechin이 각 3-5% 정도 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(40,41).(Fig. 3) 녹차에 함유된 폴리페놀류는 지질의 과산화 현상을 억제하고 노화를 지연시키며, 혈중 콜레스테롤과 중성지질의 생성을 억제하여 비만을 방지하고, 자유 라디칼을 효율적으로 제거하여 항산화 작용을 하는 것으로 보고되고 있다(42,43). 그 외에도 항암 작용(44,45), 해독 작용(46), 항균 작용(47) 및 모세혈관의 저항력 증진 작용(48) 등이 보고되고 있다.

특히 산화적 스트레스에 의한 세포사멸 기전에 있어서 녹차 폴리페놀 성분이 미치는 영향에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 녹차 폴리페놀 성분인 EGCG는 과산화수소에 의해 유발된 인체 혈관 내피 세포(HUVEC)의 사멸을 억제시킨다고 보고되며(49), EC는 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 세포사멸로부터 섬유아세포를 보호한다고 보고되고 있다(50). 그러나 이러한 생리적인 효과가 생체 내에서도 유효한지 확실하지 않으며, 생리활성 효과에 대한 구체적인 작용기전에 대해서도 여전히 많은 연구가 필요하다고 본다.

따라서 본 연구에서는 인체 혈관 내피 세포(ECV304 cell)를 이용하여 4-HNE를 농도에 따라 처치한 후 세포 생존율과 혈관 내피 세포의 사멸에 미치는 영향을 살펴보고, 4-HNE에 의해 유도된 동맥경화 발생기전에 있어서 녹차 에탄올 추출물(green tea ethanol extracts, GTE)의 생리활성 효과를 살펴보고자 한다. 이에 따른 이 연구의 세부 목적은 1) 4-HNE와 GTE의 농도에 따른 세포 생존율 변화, 2) 지질 과산화물 생성에 대한 GTE의 항산화적 역할 규명, 3) 4-HNE에 의해 유발되는 미토콘드리아 관련성 세포사멸 경로에 대한 GTE의 억제효과 및 기전을 살펴보고자 하는 것이다.

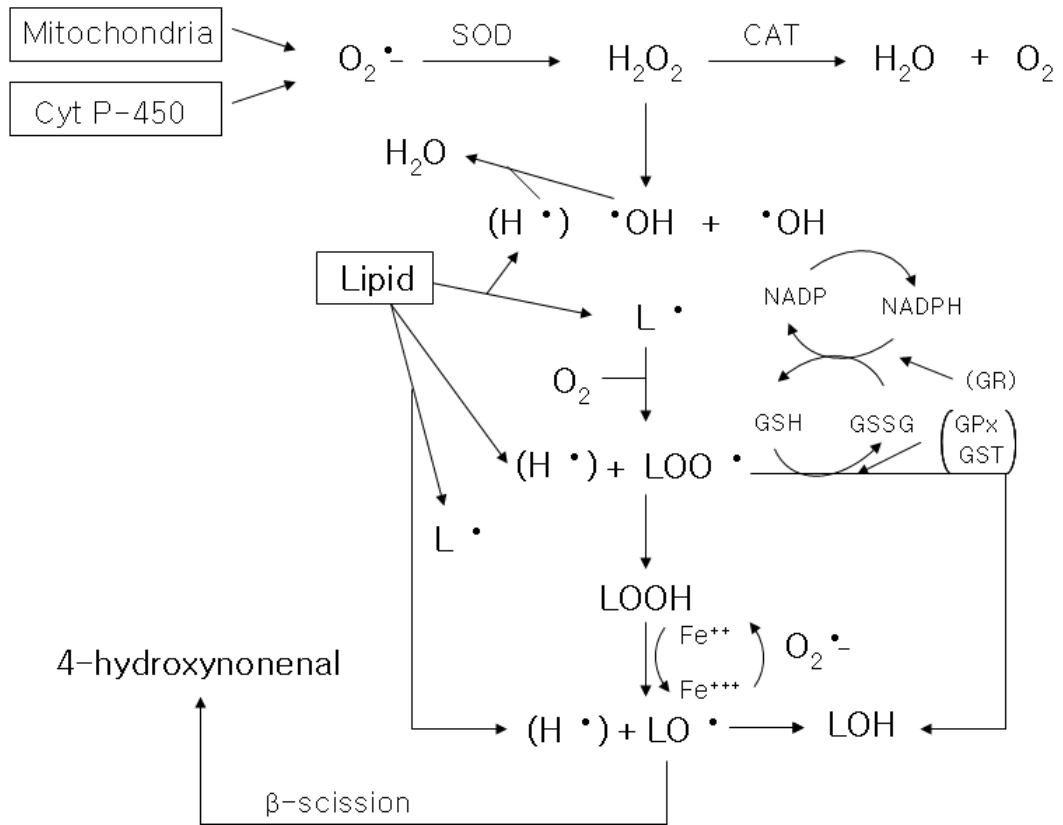


Fig. 1. Lipid peroxidation of autocatalytic chain process

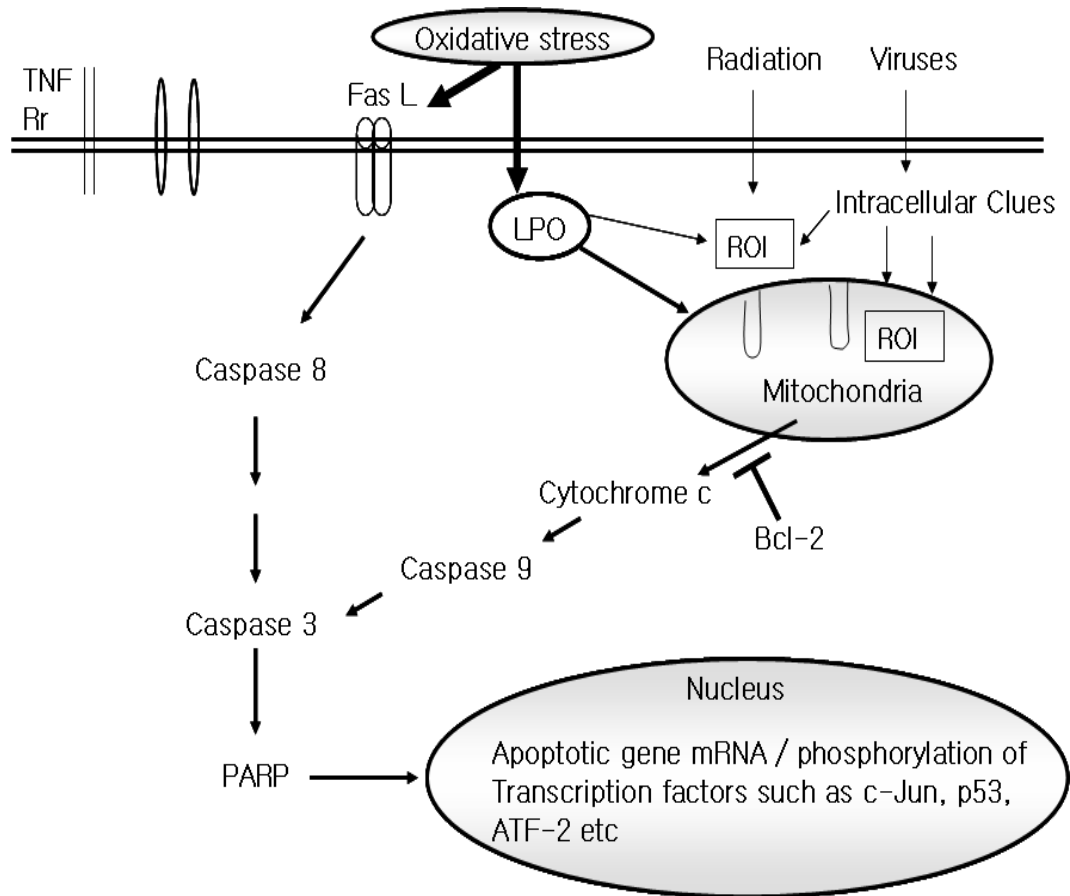


Fig. 2. Mitochondrial Pathway of Apoptosis Signaling

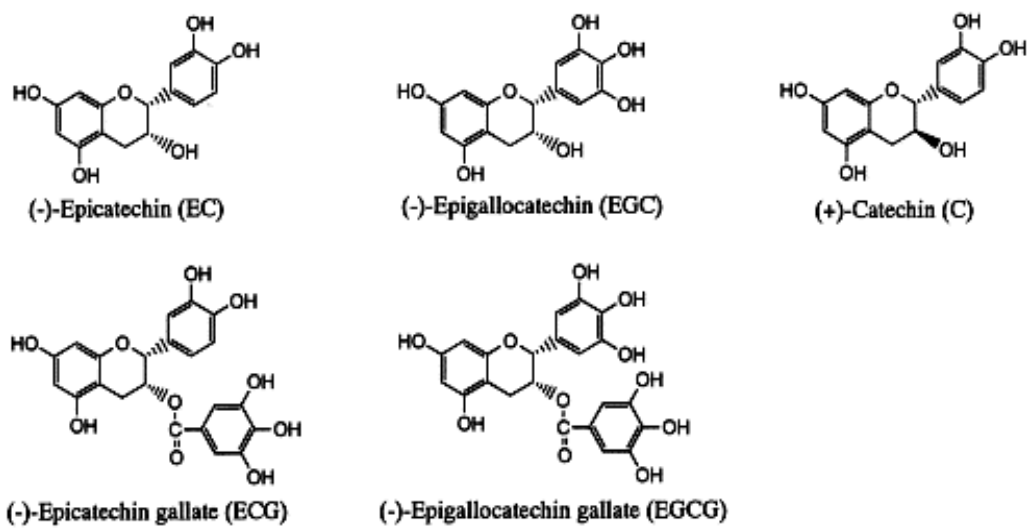


Fig. 3. Molecular structures of green tea polyphenols

II. 재료 및 방법

본 연구는 인체 혈관 내피 세포(ECV304 cell)에 지질 과산화물인 4-HNE와 녹차 에탄올 추출물(GTE)을 처리한 후 세포형태학적 변화, 세포증식률, 지질 과산화물의 함량, 세포사멸에 관여하는 단백질의 활성도를 측정하여 혈관 내피 세포의 세포사멸 정도를 측정하였다.

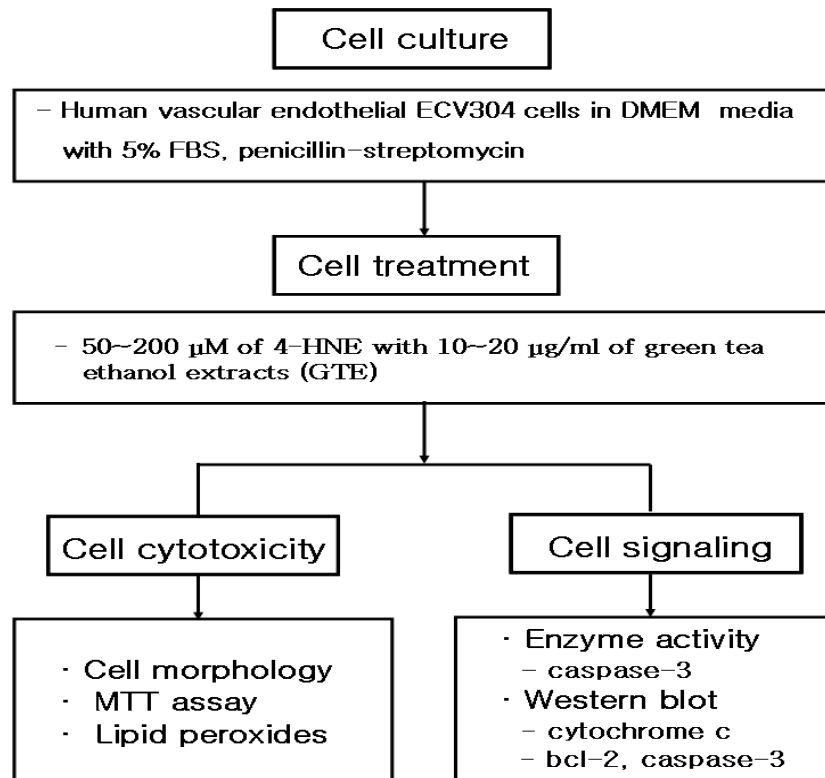


Fig. 4. The experimental design

1. 실험재료

본 연구에 사용되는 DMEM(Dubelcco's Modified Eagle Medium), antibiotics(penicillin-streptomycin), FBS(fetal bovine serum), trypsin-EDTA는 GIBCO BRL(Ithersburg, MD U.S.A)에서 구입하였다. 배지에 첨가되는 sodium bicarbonate 및 dimethyl sulfoxide(DMSO), PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4), trypan blue(0.4%)는 sigma사로부터 구입하였고, 세포증식률 측정을 위한 MTT(3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-dienyl trazolium bromide)도 sigma사로부터 구입하였다. 지질 과산화물 처치를 위한 4-HNE는 Calbiochem으로부터 구입하였다. 단백질 정량을 위한 시약으로 bovine serum albumin (BSA), Protein Assay 용액은 Bio-Rad 제품을 이용하였다. Western blot 분석에 사용되는 일차항체(cytochrome c, Bcl-2, caspase-3)는 Santa Cruz Biotechnology사와 Zymed Laboratories사로부터 구입하였고, 이차항체 (goat anti-mouse, rabbit anti-goat)는 Zymed Laboratories사 제품을 이용하였다.

2. Human vascular endothelial cell (ECV304 cell)의 배양

(1) 세포배양

Human vascular endothelial cell(ECV304 cell)은 JCRB(Japanese Collection of Research Bioresources)에서 분양받아 사용하였다. ECV304 세

포는 5% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS)을 함유하는 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 배지의 pH는 sodium bicarbonate(3.7 g/l)를 사용하여 7.2~7.4로 조정하였으며 항생제로는 penicillin-streptomycin(10 ml/l)을 사용하였다. 세포 배양 접시에 80% 정도의 세포가 자라면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하여 세포주를 유지시켰으며, 실험 시에는 일정수의 세포를 배양하여 사용하였다. 계대배양은 6회 이상하지 않았다.

(2) 녹차 에탄올 추출물(GTE)

본 실험에 사용된 녹차시료는 태평양 녹차사업부로부터 공급받아 사용하였다. 녹차의 추출은 수직으로 환류 냉각관을 부착시킨 플라스크에 시료 10배에 해당하는 70%의 에탄올을 사용하여 45°C의 수욕상에서 12시간 동안 추출한 후 여과하였다.(3x) 추출액은 진공회전증발농축기(rotatory vacuum evaporator)로 감압 농축한 다음 농축물을 동결 건조기를 사용하여 건조한 후 4°C 냉장에 보존하면서 실험에 사용하였다.

(3) 시료처리

각 군별로 50 mm 세포 배양 접시에 세포를 1×10^6 씩 일정하게 분주하고 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 시료를 처리하기 12시간 전에 serum free DMEM 배지를 넣어 배양한 뒤 4-HNE와

GTE를 용해시켜 첨가하였다. GTE는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여서 사용하였고(51), 세포배양에 사용된 DMSO의 최종농도는 0.05%이하가 되도록 하였다. 4-HNE의 처리 농도는 50, 100, 200, 400 μM 이었으며 GTE는 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 이들 각 처리군의 농도로 예비실험을 한 결과 세포 배양을 위한 4-HNE의 적정농도는 50 μM 이었으며, GTE의 적정 농도는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.

3. 세포 형태학적 관찰

지질 과산화물과 녹차 에탄올 추출물이 처리된 세포의 형태는 AXIOVERT 25 광학현미경으로 관찰하였다.($\times 200$, ZEISS)

각 군별로 50 mm 세포 배양 접시에 세포를 1×10^6 씩 일정하게 분주하고 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 시료를 처리하기 12시간 전에 serum free DMEM 배지를 넣어 배양한 뒤 4-HNE와 GTE 처리 1, 6, 12, 24시간 후 광학현미경으로 세포형태를 관찰하였고, 현미경에 부착된 카메라(CONTAX olympus)로 촬영하였다.

4. 생화학적 검사

(1) Cell extracts

배양 1, 6, 12, 24시간 후 배지를 제거하고 PBS(pH 7.2~7.4)로 2회 세척

한 후 0.25% trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 모은 뒤 원심 분리하여(2000 rpm, 3 min) cell pellet을 얻었다. caspase-3 활성은 cell pellet에서 바로 cell extracts를 얻어서 측정하였으며 지질 과산화물 함량, Western blot, 단백질 정량 등은 -80℃에서 냉동 보관하며 실험에 이용하였다.

(2) 세포 생존율

지질 과산화물과 녹차 에탄올 추출물 처치에 의한 세포 생존율은 MTT 법으로 확인하였다.(52) MTT법의 측정 원리는 mitochondria dehydrogenase가 3-(4,5)-dimethylthiazol-2yl-2,5-dienyl trazolium bromide(MTT., Sigma Chemicals, USA)를 환원시켜 보라색 물질인 formazan을 생성하는 성질을 이용한 것이다. Formazan 생성량은 대사적으로 활성을 가진 살아있는 세포의 수와 비례하므로 그 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정할 수 있다.

96 well plate에 ECV304 cell을 1×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 12시간 동안 안정화시킨 후 4-HNE와 녹차 에탄올 추출물을 용해시켜 각 well에 처치하였다. 1, 3, 6, 12, 24, 48시간에 걸쳐 세포를 배양한 후 10 μ l의 MTT 용액(5 mg/ml)을 각 well에 첨가한 후 37℃에서 3시간 동안 배양하였다. 세포내의 formazan 결정체를 녹이기 위하여 남아 있는 배지를 모두 제거한 후 isopropanol(0.04 M) 100 μ l를 넣고 증류수 100 μ l를 넣어 혼합한 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 지질 과산화물(lipid peroxides, LPO : 4-HNE + MDA)함량 측정

지질 과산화 정도는 lipid peroxidation assay kit(Calbiochem, Germany)를 이용하여 측정하였다. 이는 불포화지방산으로부터 생성되는 최종과산화물 malondialdehyde(MDA)와 2-hydroxy-2(E)-nonenal(4-HNE) 같은 4-hydroxy-alkenal을 동시에 측정하는 방법이다. 전통적인 thiobarbituric acid(TBA) 방법에 의한 MDA의 측정법은 많은 상호물질에 의해 영향을 받고 재현성이 떨어지므로 MDA와 4-HNE를 동시에 측정하였다.

N-methyl-2-phenylindole이 45°C에서 MDA와 4-hydroxy-alkenal들과 반응하여 발색하는 원리를 이용하여 spectrophotometer(Pharmacia)로 586nm에서 흡광도를 측정하여 1 mg protein의 양을 기준으로 처리군 간에 비교하였다.

(4) Caspase-3 활성화도 측정

이 분석법은 예정된 세포사멸을 유발하는 cysteine protease의 활성을 지니는 caspase-3의 활성을 조사하는 방법(30)으로 세포 내에서 세포사멸이 유도되면 단백 분해효소가 활성화되고, 이와 같이 활성화되면 caspase-3 효소는 세포내의 p-nitroanilide와의 기질결합체인 DEVD-pNA를 분해하여 푸른 빛의 pNA와 DEVD를 만든다. 이 효소의 분석은 Apo-One™ Homogeneous caspase 3/7 assay kit(Promega)를 이용하였다. cell pellet에 cell lysis buffer를 첨가하여 lysis 시킨 후 얼음에 15분 동안 두었다가 4°C, 15000g에서 20분

간 원심분리하여 cell extracts를 준비하였다. 이 cell extracts를 96 well plate에 넣고 caspase assay buffer, DMSO, DTT 그리고 DEVE-pNA substrate를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader로 405nm에서 흡광도를 측정하여 1 μ g protein의 양을 기준으로 처리군 간에 비교하였다.

(5) Western blot 분석

Western blot 분석을 위하여 우선 cell pellet에 lysis buffer(1 M Tris, 0.1 M EDTA, 5 M NaCl, NP-40, pH 7.4) 50 μ l를 첨가하여 cell extracts를 준비하였다. 준비된 cell extracts의 단백질을 12% SDS-PAGE 겔 상에서 전기영동을 실시하였다. 겔 상에 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell Grr, Germany)로 120V에서 1시간 20분 동안 전이시킨 다음, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% skim milk로 1시간 동안 blocking시킨 후 TBST(20 mM Tris-HCl, 0.8% NaCl, 0.05% Tween-20)으로 nitrocellulose membrane을 10분씩 3차례 씻어준 다음 일차항체(cytochrome c, Bcl-2, caspase-3)를 5% skim milk로 500 ~ 1,000배 희석하여 4°C에서 12시간 반응시켰다. nitrocellulose membrane을 10분 동안 TBST로 3차례 씻어준 다음 이차항체(goat anti-mouse, rabbit anti-goat)를 5% non-fat dried milk로 1,000배 희석하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 10분 동안 TBST로 3차례 씻어준 다음 확인하고자 하는 단백질은 chemiluminescence reaction(ECLTM kit, Amersham, USA)을 이용하여 확인

하였다.

(6) 단백질 정량

단백질의 분석은 Bradford법(53)에 근거한 Bio-Rad Protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하였다. cell extract를 일부 취하여 96 cell plate에 넣고 염색시약을 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후 ELISA reader로 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 통계분석

본 연구에서 얻은 모든 결과는 MINITAB(Ver. 14)을 이용하여 통계분석을 하였으며 각 실험군마다 평균과 표준편차(mean \pm SD)를 구하였다. 실험군 간의 차이는 ANOVA test와 t-test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 연구결과 및 고찰

1. 세포형태학적(Cell morphology)변화

인체 혈관 내피 세포인 ECV304 cell에 지질 과산화물인 4-HNE 50 μM 과 녹차 에탄올 추출물(GTE) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하여 시간에 따른 세포의 형태학적인 변화를 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다.

배양시간이 지남에 따라 4-HNE 50 μM 처리군은 대조군과 비교했을 때 세포막이 붕괴되어 세포사멸 현상이 뚜렷하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 4-HNE 50 μM 과 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처리한 군은 4-HNE 50 μM 처리군에 비해 세포사멸 현상이 감소하는 경향을 보였으며 이는 1, 6시간 배양에서 뚜렷하게 나타났다. 그러나 12, 24시간 배양 시에는 4-HNE 50 μM 만 처리한 군과 4-HNE 50 μM 과 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처리한 군 사이에서 세포사멸 현상이 유사하게 나타나 세포형태학적으로 볼 때 12, 24시간 배양 시에는 녹차의 세포사멸 억제효과가 나타나지 않는 것으로 관찰되었다. 이 실험 결과는 녹차의 폴리페놀 성분이 과산화수소나 xanthine oxidase에 의한 세포사멸 현상을 감소시킨다는 Park 등(54)의 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

결과적으로 녹차에 함유된 폴리페놀 성분들이 독성에 의한 산화적 손상에 대해 항산화적인 역할을 수행한 것으로 사료되며, 녹차 폴리페놀 성분들의 양친매성과도 연관이 있는 것으로 보인다. 즉, 녹차 폴리페놀의 양친매적인

성질이 세포막을 빠르게 통과할 수 있게 하여 폴리페놀 성분들의 세포내 유입률이 높아져 세포내에서 항산화제로서의 높은 생리활성효과를 나타낸 것으로 사료된다.(54)

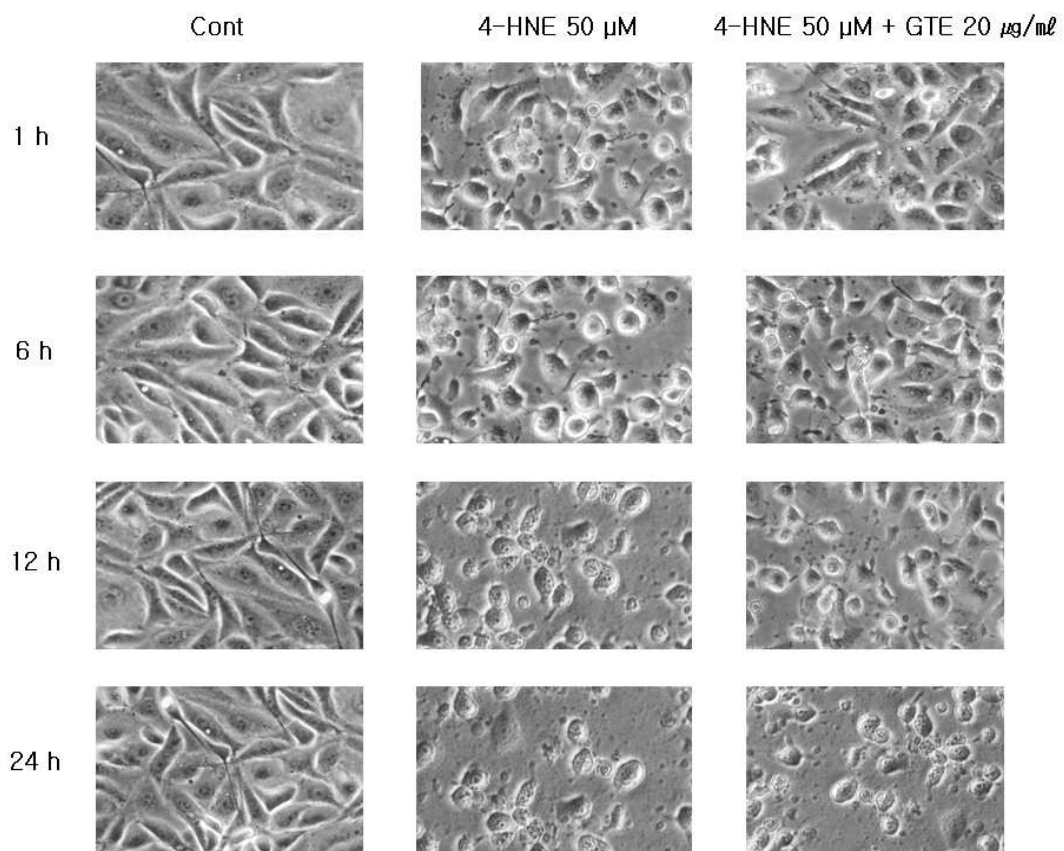


Fig. 5. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the cell morphology of ECV304 cells according to the different incubation times

2. 세포 생존율

본 연구에서는 동맥경화와 같은 허혈성 심혈관 질환의 병리적인 상태와 유사한 상황을 유도하는 지질 과산화물인 4-HNE를 혈관 내피 세포에 처리하였다. 혈관손상과 직접적으로 관련이 있는 혈관 내피 세포를 이용하여 산화적인 손상에 대한 세포의 생존율을 측정하였고, 녹차 에탄올 추출물의 세포 독성억제 효과를 조사하였다.

(1) 4-HNE에 의한 세포독성

인체 혈관 내피 세포인 ECV304 cell의 세포 생존율은 MTT법을 이용하여 측정하였으며, 지질 과산화물인 4-HNE를 농도별로 처리한 다음 12, 24, 48 시간 후에 MTT 용액을 첨가하여 3시간 배양한 후에 ELISA reader로 측정하였다. 4-HNE의 농도와 배양 시간에 따른 생존율은 Table 1과 Fig. 6에 나타내었다.

농도에 따른 세포 생존율을 살펴보면, 12시간 배양 시 4-HNE 50 μ M 처리군의 세포 생존율이 대조군에 비해 40% 정도로 나타나 세포독성 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. 또한 4-HNE의 처리 농도가 증가할수록 대조군에 비해 세포 생존율이 유의적으로 감소하였으며($p < 0.001$), 농도 의존적(dose-dependent)적인 경향을 나타내었다. 24시간 배양 시에는 4-HNE 50 μ M 처리군의 세포 생존율이 대조군에 비해 32% 정도인 것으로 나타나 높은 세포독성 효과를 나타내었으며, 12시간 배양 시와 유사하게 4-HNE의 처리

농도가 증가할수록 세포 생존율이 유의적으로 감소하였다($p < 0.001$). 48시간 배양 시에는 4-HNE 50 μM 처치군의 세포 생존율이 대조군에 비해 현저하게 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 200~400 μM 농도에서 급격한 세포 생존율의 감소를 나타내었다. 또한 12, 24시간 배양하였을 경우와 마찬가지로 농도 의존적인 세포독성 효과를 나타내었다.

배양시간에 따른 세포 생존율의 변화를 살펴보면, 4-HNE 50 μM 을 처치하였을 경우 시간이 지날수록 세포 생존율이 유의적으로 감소하여($p < 0.001$) 시간 의존적(time-dependent)인 세포독성 효과를 나타내었다. 4-HNE 100 μM , 200 μM , 400 μM 을 각각 처치하였을 경우에도 50 μM 처치하였을 경우와 유사하게 시간이 지날수록 세포 생존율이 유의적으로 감소하여($p = 0.009$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) 시간 의존적인 세포독성 효과를 나타내었다.

Lawrence 등(56)의 연구에서는 결장암세포(RKO cells)에 4-HNE를 30-75 μM 로 처치하였을 경우 세포사멸이 일어나는 세포의 수가 농도 의존적으로 증가한다고 보고하였으며, 이는 4-HNE가 혈관 내피 세포에서 독성효과를 나타낸다는 본 연구의 결과와 일치한다. 또한 Liu 등(57)의 연구에서도 림프종 세포(Jurkat cells)에 4-HNE를 1-100 μM 로 처치하였을 경우 세포 생존율이 농도 의존적으로 감소한다고 보고하였다. 그러나 4-HNE 50 μM 을 처치하였을 경우 대조군에 비해 세포 생존율이 20%밖에 되지 않아 본 연구의 결과보다 세포독성 효과가 더 강한 것으로 나타났다. 이것은 세포의 종류에 따라 4-HNE의 독성효과가 다르기 때문인 것으로 사료된다. Park 등(54)의 연구에서는 산화적 혈관손상을 유도한다고 알려져 있는 과산화수소를 미세 혈관 내피 세포(HUMVEC cells)에 0.1-10 mM로 처치한 결과 농도 의존

적으로 세포 생존율이 감소하는 경향을 나타내었다. 그 외에도 Jeong 등 (58)의 연구에서는 신경퇴행성 질환에서 높게 발현되는 것으로 알려진 3-Hydroxykynerenine(3-HK)를 신경세포종 세포(SH-SY5Y cells)에 처리하여 세포독성을 관찰한 결과 3-HK는 농도 의존적으로 세포 생존율을 감소시키는 것으로 나타났다고 보고하였다. 특히 3-HK를 250 μ M로 처리하였을 경우 시간 의존적으로 세포 생존율이 감소되었으며, 이는 본 연구 결과와 일치하였다.

결론적으로 지질 과산화물인 4-HNE는 농도 의존적이며 배양 시간 의존적으로 세포독성 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 4-HNE가 세포 내로 쉽게 확산되어 항산화 기전을 차단시키는 것과 연관이 있는 것으로 보인다. 즉, 4-HNE가 항산화 작용에 관여하는 GSH의 수치를 감소시키는 등 항산화 기전을 차단시킴으로써 산화-환원 상태(redox state)를 변화시키게 되고, 이러한 변화가 산화적 스트레스로서 세포내 신호 전달 기전에 영향을 미쳐 세포 사멸 현상을 유발한 것으로 사료된다.(57,58) 이러한 산화적 손상으로 인한 세포사멸은 혈관내벽에서 죽상혈전증 등을 유도하여 결국 동맥경화를 유발하게 되는 것으로 사료된다.(23)

Table 1. Effects of increasing concentration of 4-HNE on the cell proliferation of ECV304 cells according to the different incubation times

	12h	24h	48h	p-value ²⁾
Control	^v 0.674±0.00 ^{1)b}	^v 0.682±0.01 ^a	^v 0.695±0.01 ^a	0.021
4-HNE 50 µM	^w 0.284±0.00 ^a	^w 0.216±0.01 ^b	^w 0.181±0.01 ^c	<0.001
4-HNE 100 µM	^x 0.205±0.00 ^a	^x 0.189±0.01 ^a	^x 0.151±0.02 ^c	0.009
4-HNE 200 µM	^y 0.170±0.01 ^a	^y 0.146±0.01 ^b	^y 0.086±0.00 ^c	<0.001
4-HNE 400 µM	^z 0.121±0.01 ^a	^z 0.084±0.00 ^b	^z 0.069±0.01 ^c	<0.001
p-value ³⁾	<0.001	<0.001	<0.001	

¹⁾ Value are expressed mean ± S.D.

²⁾ P-values for the significance among the incubation time according to the various concentration of 4-HNE

³⁾ P-values for the significance among the various concentration of 4-HNE according to the incubation time

- a, b, c values within the incubation time of 4-HNE groups with different superscripts are significant at p<0.05
- x, y, z values within the treated concentration of 4-HNE with different superscripts are significant at p<0.05

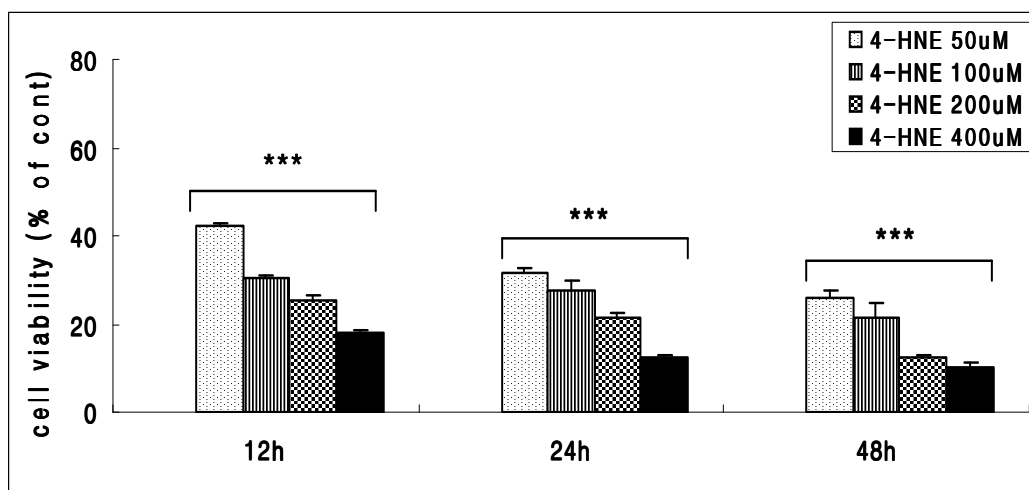


Fig. 6. Effects of increasing concentration of 4-HNE on the cell viability of ECV304 cells according to the different incubation times compared with control

*** : Significantly the difference among the 4-HNE groups , $p < 0.001$

(2) 4-HNE의 세포독성에 대한 GTE의 억제효과

지질 과산화물인 4-HNE의 배양시간에 따른 세포독성에 대한 GTE의 억제 효과는 Table 2와 Fig. 8에 나타내었으며, Fig. 7에는 GTE의 세포독성 효과를 조사하여 나타내었다.

GTE를 녹인 DMSO의 배양농도는 0.01%이하였으며, 이 농도에서의 DMSO는 세포독성을 나타내지 않았다. 또한 GTE 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하여 1, 3, 6, 12, 24시간 배양하였을 경우에도 세포독성을 나타내지 않았다. 이 결과를 바탕으로 하여 GTE 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 4-HNE 50 μM 과 함께 처리하여 세포 생존율을 관찰하였다.

배양시간에 따른 4-HNE 50 μM 의 세포독성에 대한 GTE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 억제 효과를 살펴보면, 1시간 배양 시 4-HNE 50 μM 과 GTE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처리한 군은 4-HNE 50 μM 에 의한 세포독성을 완화시켜 세포 생존율을 7% 정도 유의적으로 증가시켰다($p=0.034$). 또한 3시간 배양 시와 6시간 배양 시에도 4-HNE 50 μM 과 GTE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처리한 군은 4-HNE 50 μM 처리군에 비해 세포 생존율이 6%정도 증가하는 경향을 나타내었다. 12시간과 24시간 배양 시 4-HNE 50 μM 과 GTE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처리한 군은 4-HNE 50 μM 처리군에 비해 세포 생존율이 2%정도 증가하였으나 유의적이지는 않았다. 즉, GTE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 12시간 이후에는 4-HNE에 의한 세포독성을 억제하지 못하는 것으로 나타났다.

배양시간에 따른 4-HNE 50 μM 의 세포독성에 대한 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 억제 효과를 살펴보면, 1시간 배양 시 4-HNE 50 μM 과 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처

치한 군은 4-HNE 50 μ M 처치군에 비해 세포 생존율이 8.3% 정도 유의적으로 증가하였으며($p=0.029$), GTE 10 μ g/ml를 처치하여 동일한 시간 배양한 것에 비해 세포 생존율이 다소 증가한다는 것을 알 수 있다. 3시간 배양 시에는 GTE 20 μ g/ml를 함께 처치하였을 경우 세포 생존율이 11%정도 증가한 것으로 나타나 GTE 10 μ g/ml를 처치한 것에 비해 세포독성 억제효과가 높은 것으로 나타났다. 또한 6시간 배양하였을 경우 4-HNE 50 μ M과 GTE 20 μ g/ml를 함께 처치한 군은 4-HNE 50 μ M 처치군에 비해 세포 생존율이 14%정도 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었으며($p=0.002$), GTE 10 μ g/ml를 처치하여 동일한 시간동안 배양한 것에 비해 세포 생존율이 8%정도 증가한다는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 GTE 20 μ g/ml를 처치하였을 경우 6시간 배양 시에 녹차의 보호효과가 가장 높다는 것을 의미한다. 12시간 배양 시에는 GTE 20 μ g/ml를 함께 처치한 군이 4-HNE 50 μ M 처치군에 비해 세포 생존율이 5%정도 유의적으로 증가한 것으로 나타났으며($p=0.039$), GTE 10 μ g/ml를 처치한 것에 비해 세포 생존율이 3%정도 증가한 것으로 관찰되었다. 또한 24시간 배양하였을 경우 GTE 20 μ g/ml를 함께 처치한 군이 4-HNE 50 μ M 처치군에 비해 세포 생존율이 3.5%정도 유의적으로 증가한 것으로 나타났으며($p=0.042$), 다른 배양 시간대와 마찬가지로 GTE 10 μ g/ml를 처치한 것에 비해 세포 생존율이 다소 증가하는 경향을 나타내었다. 즉, GTE 20 μ g/ml를 4-HNE 50 μ M과 함께 처치하였을 경우 GTE 10 μ g/ml를 함께 처치한 것에 비해 4-HNE 50 μ M에 의한 세포독성 억제효과가 높은 것으로 나타났다. 또한 GTE 20 μ g/ml는 1시간과 6시간 배양 시에 시간 의존적인 세포독성 억제효과를 나타내었으나, 12시간 이후에는 GTE의 세포독

성 억제효과가 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 GTE 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처치하였을 경우와 마찬가지로 12시간 이후에는 GTE의 세포독성 억제효과가 감소한다는 것을 의미한다.

Kaneko 등(59)의 연구에서는 혈관내피세포(HUVEC)에 linoleic acid hydroperoxide(LOOH)를 폴리페놀류와 함께 처치하여 LOOH에 의한 세포독성억제효과를 관찰한 결과 폴리페놀류 중에서도 특히 EGCG monoglucoside와 EGCG diglucoside, catechin을 처치하였을 경우 유의적인 세포독성 억제효과를 나타내었다고 보고하였다. 이는 폴리페놀 성분이 세포막 인지질의 친수성 부분에 위치하여 자유 라디칼들을 소거하는 기능을 하거나 이미 생성된 과산화물들을 제거하여 항산화제로서 역할을 하는 것을 의미하며 본 연구결과와 일치한다. 또한 이러한 결과는 인체 미세 혈관 내피 세포(HUMVEC)에서 녹차의 폴리페놀 성분들이 과산화수소에 의한 세포독성을 억제한다고 보고한 Rah 등(54)의 연구결과와 일치한다. Choi 등(51)의 연구에서는 인체 혈관 내피 세포(HUVEC)에 과산화수소를 폴리페놀 성분들과 함께 처치하여 폴리페놀 성분들의 세포독성 억제효과를 관찰하였으며, EGCG와 quercetin 등의 폴리페놀 성분들이 세포생존율을 유의적으로 증가시켜 과산화수소에 의한 세포독성을 억제한다고 보고하였다. 이는 폴리페놀 성분들이 라디칼을 소거하는 등 항산화 역할을 한 것으로 사료되며 본 연구결과와 유사한 경향을 나타낸다. 동맥경화를 유발할 수 있는 산화된 LDL과 여러 종류의 플라보노이드들을 함께 처치한 후 이들의 보호효과를 혈관 내피 세포에서 관찰한 Kang등(60)의 연구에서도 EGCG와 같은 플라보노이드들이 산화된 LDL에 의해 유도된 세포독성을 유의적으로 억제시킨다고 보고

하였다. Jeong 등(61)의 연구에 따르면 3-Hydroxykynerenine(3-HK)와 녹차의 주된 성분인 EGCG를 신경세포종 세포(SH-SY5Y cells)에 함께 처치하였을 경우 3-HK에 의한 세포사멸을 EGCG가 유의적으로 억제시키는 것으로 나타났다.

결론적으로 GTE는 농도 의존적으로 4-HNE에 의한 세포독성을 억제시키는 것으로 관찰되었다. 이는 GTE가 생체 내에서 효소반응이 수반되는 2차적인 항산화 기전에 관여하는 것과 연관이 있는 것으로 사료된다. 즉, GTE는 4-HNE를 제거하거나 4-HNE에 의한 산화적 손상을 수선하는 역할을 하는 것으로 생각된다. 또한 녹차의 주된 성분인 폴리페놀들은 4-HNE에 의해 감소될 수 있는 GSH의 수치를 증가시켜 항산화 기전을 활성화 시키는 것으로 사료된다(62,63). EGCG와 같은 폴리페놀 성분들은 GPx 등의 효소 활성을 증가시켜 항산화 기전을 활성화시킴으로써 4-HNE에 의한 세포사멸을 감소시킨다고 보고되고 있다(58,63). 이러한 폴리페놀성분의 항산화 작용은 4-HNE의 소거작용에 의한 것으로 볼 수 있지만, 5탄당 회로(pentose phosphate pathway)와 연결된 NADPH/glutathione 시스템 등의 세포내 항산화 방어기전을 활성화시키는 경로를 통하여 폴리페놀들의 항산화적인 작용이 발휘된다는 가능성도 배제할 수는 없을 것이다. 따라서 녹차의 폴리페놀 성분들은 4-HNE에 의한 세포사멸을 감소시켜 혈관내벽을 보호하고, 결국 동맥경화 유발을 억제시키는 역할을 하는 것으로 사료된다.

Table 2. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the cell viability of ECV304 cells according to the different incubation times

	1h	3h	6h	12h	24h	p-value ²⁾
Control	^x 0.664 \pm 0.02 ^{1)a}	^x 0.615 \pm 0.00 ^b	^x 0.600 \pm 0.01 ^c	^x 0.616 \pm 0.00 ^b	^y 0.589 \pm 0.01 ^c	<0.001
4-HNE 50 μ M	^z 0.524 \pm 0.00 ^a	^z 0.419 \pm 0.01 ^b	^z 0.329 \pm 0.02 ^c	^z 0.266 \pm 0.02 ^d	^z 0.215 \pm 0.01 ^e	<0.001
4-HNE 50 μ M + GTE 10 μ g/ml	^y 0.568 \pm 0.01 ^a	^y 0.455 \pm 0.01 ^b	^y 0.365 \pm 0.00 ^c	^y 0.278 \pm 0.02 ^d	^z 0.229 \pm 0.00 ^e	<0.001
p-value ³⁾	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Control	^x 0.664 \pm 0.02 ^{a1)}	^x 0.615 \pm 0.00 ^b	^x 0.600 \pm 0.01 ^c	^x 0.616 \pm 0.00 ^b	^x 0.589 \pm 0.01 ^c	<0.001
4-HNE 50 μ M	^z 0.524 \pm 0.00 ^a	^z 0.419 \pm 0.01 ^b	^z 0.329 \pm 0.02 ^c	^z 0.266 \pm 0.02 ^d	^z 0.215 \pm 0.01 ^e	<0.001
4-HNE 50 μ M + GTE 20 μ g/ml	^y 0.579 \pm 0.01 ^a	^y 0.484 \pm 0.00 ^b	^y 0.412 \pm 0.01 ^c	^y 0.296 \pm 0.01 ^d	^y 0.236 \pm 0.01 ^e	<0.001
p-value ³⁾	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

¹⁾ Value are expressed mean \pm S.D.

²⁾ P-values for the significance among the incubation time according to the treatment groups

³⁾ P-values for the significance among the treatment groups according to the incubation time

· a, b, c values within the incubation time of treatment groups with different superscripts are significant at $p < 0.05$

· x, y, z values within the treatment groups with different superscripts are significant at $p < 0.05$

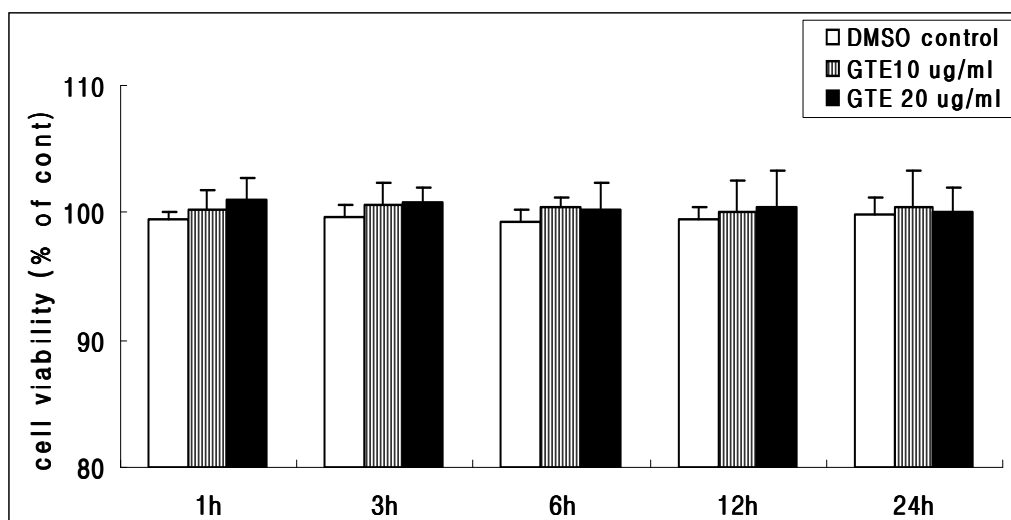


Fig. 7. Cytotoxicity of ethanol extracts of green tea on the cell viability of ECV304 cells according to the different incubation times compared with control

· Data was not significant difference among the groups

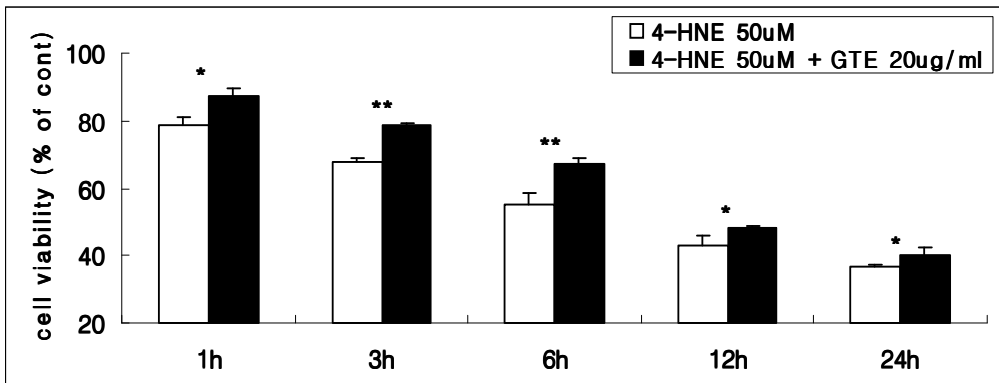
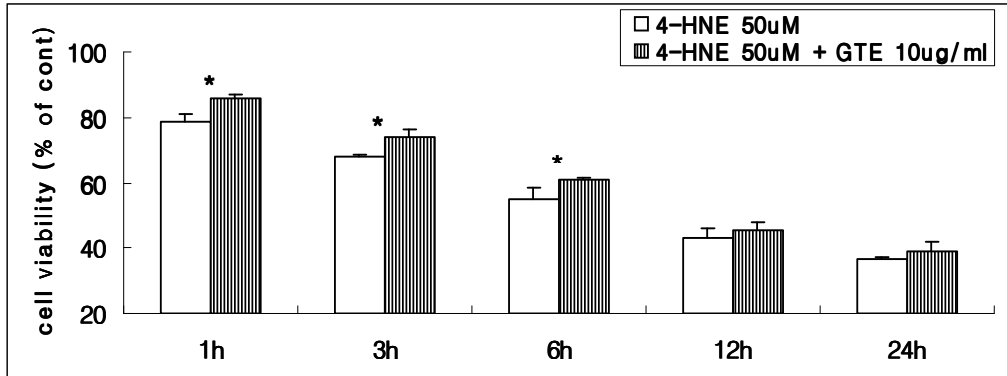


Fig. 8. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the cell viability of ECV304 cells according to the different incubation times compared with control

*, ** : Significantly the difference between 4-HNE and 4-HNE + GTE groups, respectively at $p < 0.05$, $p < 0.01$

3. 지질 과산화물 함량

ECV 304 세포에 4-HNE 50 μM 과 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처치한 후 4-HNE와 MDA가 N-methyl-2-phenylindole과 반응하는 것으로서 지질 과산화 정도를 측정하였으며, 그 결과는 Table 3와 Fig. 9에 나타내었다.

4-HNE 처치군에서 시간에 따른 LPO(4-HNE + MDA)의 함량을 살펴보면, 1시간 배양 시 대조군과 비교하였을 때 LPO 함량은 137% 증가하였으며, 6시간 배양 시에는 136%가 증가하였다. 12시간 배양 시 LPO 함량은 대조군에 비해 147%가 증가하여 가장 높은 증가율을 나타내었다. 반면, 24시간 배양 시에는 대조군에 비해 137%가 증가하여 1시간과 6시간 배양 시와 비슷한 경향을 나타내었다.

4-HNE 50 μM 과 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치한 군에서 시간에 따른 LPO의 함량을 살펴보면, 1시간 배양 시에는 4-HNE 50 μM 처치군에 비해 LPO 함량이 70%까지 감소되는 높은 효과를 나타내었으며, 6시간 배양 시에는 30%의 감소 효과를 나타내었다. 반면, 12, 24시간 배양 시에는 4-HNE 50 μM 처치군과 비교하였을 때 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 즉, 4-HNE 50 μM 과 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치하였을 경우 초기 배양시간에서는 GTE가 LPO의 세포내 유입에 관여하여 세포를 보호하는 경향을 보인 반면, 시간이 경과 할수록 세포 내 지질 과산화물 함량에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

Eliezer 등(65)의 연구에서는 *in vitro*상에서 green tea polyphenols를 처치하였을 경우 과산화수소에 의해 생성된 LPO(MDA)의 함량이 유의적으로

감소하였다고 보고하였으며, 이는 본 실험의 연구결과와 일치함을 알 수 있다. 또한 혈관 내피 세포(HUVEC)에서 LDL의 산화를 유도하여 실험한 Koo 등(66)의 연구에서는 녹차를 처치하였을 경우 대조군에 비해 지질 과산화물의 함량이 유의적으로 감소하였으며, 특히 에탄올로 추출한 녹차를 처치하였을 경우 그 효과가 가장 높은 것으로 나타났다. Arthur 등(67)의 연구에 따르면 간암세포(HepG2 cell)에 arachidonic acid와 철분을 함께 처치하였을 경우 세포내 지질 과산화물의 함량이 증가되는 반면, 녹차의 주된 성분인 epigallocatechin-3-gallate를 첨가하여 처치하였을 경우 지질 과산화물의 함량이 유의적으로 감소한다고 보고하였다. 그 외에도 Elzbieta 등(63)은 쥐에게 에탄올과 녹차를 식이로 섭취시킨 결과 에탄올 처치군에 비해 녹차를 첨가한 군이 간과 뇌 등의 장기에서 LPO의 함량이 감소할 뿐만 아니라 GPx의 활성이 증가한다고 보고하였다.

결론적으로 GTE의 주된 성분인 폴리페놀은 지질 이중층으로 자유 라디칼이 이동하는 것을 억제시키고 4-HNE의 유입에 관여하며, 2차 항산화 기전에 관여하는 효소들의 활성을 증가시키는 것으로 보인다. 즉 GTE는 동맥경화를 유발할 가능성이 있는 지질 과산화물을 제거하거나 지질 과산화물에 의해 손상된 세포를 수선(repair)하는 역할을 하여 항동맥경화성 효과를 나타내는 것으로 사료된다(64-71).

Table 3. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the LPO production of ECV304 cells according to the different incubation times

(μ M/mg protein)				
	Control	4-HNE 50 μ M	4-HNE 50 μ M + GTE 20 μ g/ml	p-value ²⁾
1h	^z 23.49 \pm 1.66 ^{1)c}	^z 55.70 \pm 0.26 ^a	^z 39.46 \pm 4.34 ^b	0.003
6h	^z 26.64 \pm 0.26 ^c	^y 62.92 \pm 0.26 ^a	^y 55.08 \pm 2.93 ^b	<0.001
12h	^y 27.19 \pm 1.28 ^b	^x 67.26 \pm 1.79 ^a	^x 66.35 \pm 0.26 ^a	<0.001
24h	^y 28.72 \pm 0.38 ^b	^x 69.24 \pm 0.26 ^a	^x 68.61 \pm 1.26 ^a	<0.001
p-value ³⁾	0.034	0.001	0.002	

¹⁾ Value are expressed mean \pm S.D.

²⁾ P-values for the significance among the treatment groups according to the incubation time

³⁾ P-values for the significance among the incubation time according to the treatment groups

• a, b, c values within the treatment groups with different superscripts are significant at p<0.05.

• x, y, z values within the incubation time of treatment groups with different superscripts are significant at p<0.05.

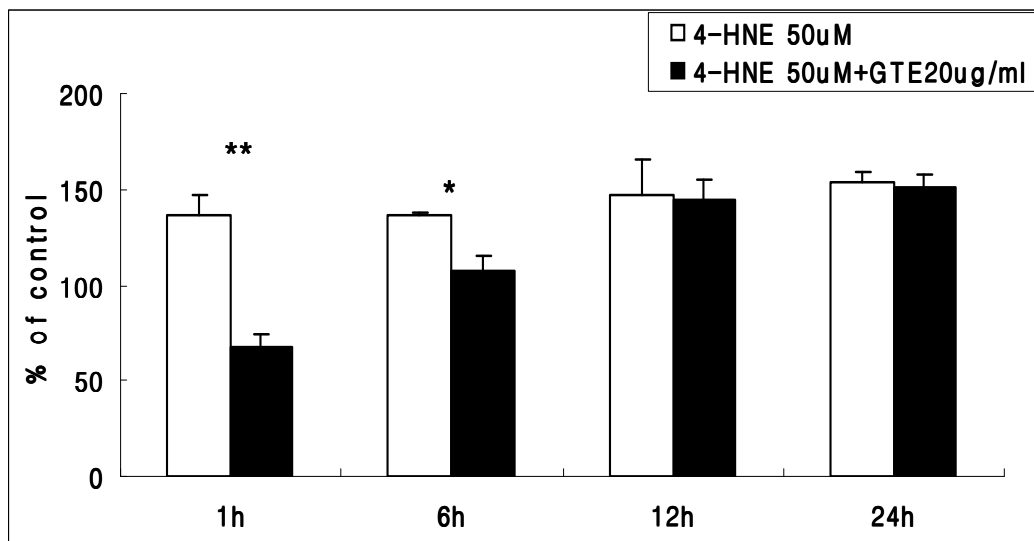


Fig. 9. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μM on the LPO production of ECV304 cells according to the different incubation times

*, ** : Significantly the difference between 4-HNE and 4-HNE + GTE groups, respectively at $p < 0.05$, $p < 0.01$

4. caspase-3 활성화 측정

지질 과산화물인 4-HNE가 ECV 304 세포의 프로그램화된 세포사멸에 미치는 영향과 세포사멸에 대한 GTE의 억제효과를 확인하기 위해 cysteine protease의 활성을 가지고 있는 caspase-3의 활성도를 측정하였다. 4-HNE 50 μM 과 GTE 20 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 후 caspase-3의 활성도를 측정하였으며 그 결과는 Table 4와 Fig. 10에 나타내었다.

배양시간에 따른 4-HNE 50 μM 처리군의 caspase-3 활성도를 살펴보면 배양시간이 증가할수록 caspase-3의 활성도가 유의적으로 증가하는 경향을 보였으며($p < 0.001$), 특히 12시간 배양 시 6시간 배양에 비해 그 활성도가 76% 정도 급격히 증가하였다. 이것은 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하고 있던 caspase-3가 4-HNE의 자극으로 인하여 활성화된 caspase-9 등의 단백질 분해효소에 의해 분해되면서 활성화되어 세포사멸을 유도한 것으로 사료된다.

Lawrence 등(56)의 연구에서는 결장암 세포(RKO cell)에 4-HNE 45 μM 을 처리하였을 경우 대조군에 비해 caspase-3의 활성도가 5배정도 증가하였고 보고하였으며 이는 본 실험의 연구결과와 일치한다. 또한 Liu 등(57)의 연구에서도 Jurkat T 림프종 세포에 4-HNE를 처리하였을 경우 caspase-3의 활성도가 대조군에 비해 증가한다고 보고하였다. 이러한 결과는 세포내 항산화 기전에 관여하는 GSH의 수치와 연관이 있는 것으로 사료된다. 즉, 세포내로 함입된 4-HNE는 산화적 손상을 받은 세포를 수선하거나 과산화물질을 제거하는 역할을 하는 GSH의 수치를 감소시켜 세포내 항산화 기전

을 억제하여 생체 내 산화-환원 상태의 불균형을 초래하게 되는 것으로 보인다. 이러한 생체내 불균형은 산화적 스트레스로 작용하여 미토콘드리아의 손상을 일으키게 되며, 이로 인해 cytochrome c가 세포질로 방출되고, 하위 기전인 caspase-3를 활성화시켜 세포사멸을 일으키는 것으로 사료된다 (56-58).

4-HNE 50 μ M과 GTE 20 μ g/ml를 함께 처치한 군에서는 1, 6시간 배양 시 4-HNE 50 μ M 처치군에 비해 caspase-3의 활성도가 유의적으로 감소하여 보호효과를 나타내었으며($p=0.001$, $p=0.002$), 12시간 배양 시에도 감소하는 경향을 보였으나 유의적이지는 않았다. 반면 24시간 배양했을 경우에는 4-HNE 50 μ M 처치군에 비해 오히려 caspase-3의 활성도가 약간 증가하는 경향을 나타내었지만 유의적이지 않았다.

Kang 등(60)의 연구에서는 염증반응을 유도하여 동맥경화를 유발할 수 있는 산화된 LDL과 여러 종류의 플라보노이드들을 함께 처치한 후 이들의 보호효과를 혈관 내피 세포에서 관찰하였는데, 산화된 LDL에 의해 증가된 caspase-3의 활성을 플라보노이드들이 억제하는 것으로 나타났다. Choi 등(62)의 연구에서도 녹차의 주된 성분들인 epigallocatechin gallate와 quercetin을 첨가하였을 경우 과산화수소만 처치한 것에 비해 caspase-3의 활성이 유의적으로 감소한다고 보고하였으며, 이는 본 연구의 결과와 일치한다.

결론적으로 지질 과산화물의 한 형태인 4-HNE는 미토콘드리아 관련성 세포사멸 경로에 관여하는 단백질 중 하나인 caspase-3를 활성화시킴으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 나타났다. 이에 반해 GTE는 4-HNE에 의해

유도된 caspase-3의 활성을 억제시킴으로써 caspase-3 다음에 일어나는 일련의 신호전달과정을 차단시켜 세포사멸을 억제하는 역할을 수행하는 것으로 사료된다.(60,62)

Table 4. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the caspase-3 activation of ECV304 cells according to the different incubation times

(pmol/hour/ μ g protein)

	1h	6h	12h	24h	p-value ²⁾
4-HNE 50 μ M	^x 2.07 \pm 0.09 ^{c1)}	^x 2.85 \pm 0.07 ^b	5.01 \pm 0.04 ^a	5.11 \pm 0.10 ^a	<0.001
4-HNE 50 μ M + GTE 20 μ g/ml	^y 0.32 \pm 0.00 ^b	^y 0.42 \pm 0.14 ^b	4.25 \pm 0.50 ^a	5.40 \pm 2.12 ^a	0.020
p-value ³⁾	0.001	0.002	N.S	N.S	

¹⁾ Value are expressed mean \pm S.D.

²⁾ P-values for the significance among the incubation time according to the treatment groups

³⁾ P-values for the significance between the treatment groups according to the incubation time

- N.S : Values are not significantly different between groups
- a, b, c values within the incubation time of treatment groups with different superscripts are significant at $p < 0.05$
- x, y, z values within the treatment groups with different superscripts are significant at $p < 0.05$

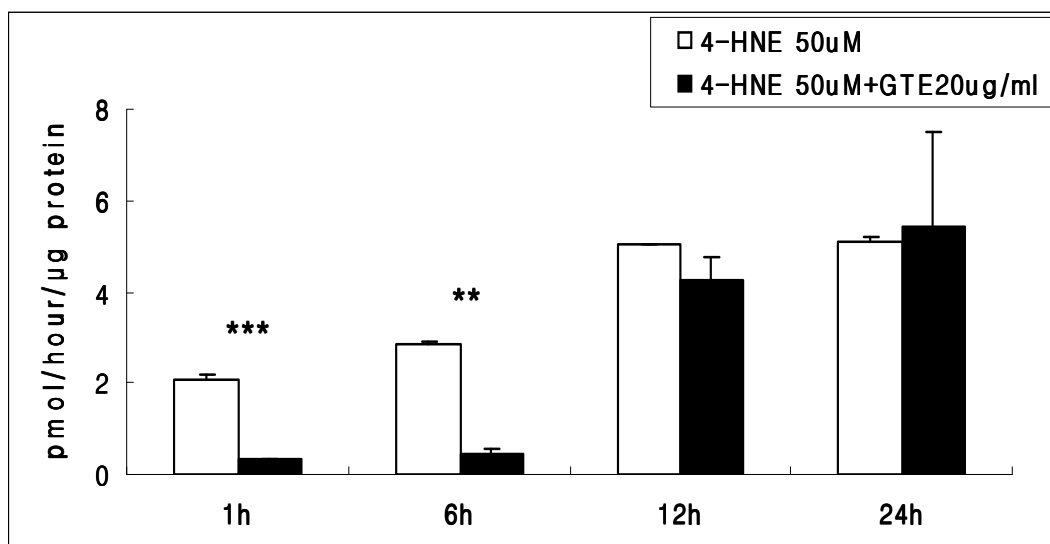


Fig. 10. Effects of ethanol extracts of green tea treated with 4-HNE 50 μ M on the caspase-3 activation of ECV304 cells according to the different incubation times

, * : Significantly the difference between 4-HNE and 4-HNE + GTE groups, respectively at $p < 0.01$, $p < 0.001$

5. Western blot 분석

4-HNE가 미토콘드리아 관련성 세포사멸에 미치는 영향과 세포사멸에 대한 GTE의 억제효과를 살펴보기 위하여 미토콘드리아 관련성 세포사멸에 관여하는 단백질인 cytochrome c, bcl-2, caspase-3의 발현정도를 western blot 분석을 통하여 살펴보았다.

(1) 4-HNE에 의해 증가된 cytochrome c 발현에 대한 GTE의 억제 효과

4-HNE에 의해 유도된 cytochrome c 단백질의 발현에 대한 GTE의 억제효과를 살펴보기 위하여 western blot 분석을 시행하였으며 그 결과는 Fig. 11에 나타내었다.

배양시간에 따른 4-HNE 50 μ M 처치군의 cytochrome c 단백질의 발현정도를 살펴보면, 모든 배양시간에서 cytochrome c 단백질의 발현이 증가한 것으로 나타났다. 이 결과는 결장암세포(RKO cells)에 4-HNE를 처치하였을 경우 cytochrome c 단백질의 발현이 증가한다고 보고한 Lawrence 등(56)의 연구결과와 일치한다. 이는 bcl-2 단백질 발현과 연관이 있는 것으로 사료된다. 즉, 4-HNE와 같은 산화적 스트레스는 세포사멸을 유도하는 자극물로서 작용하게 되어 bcl-2 단백질과 같은 항세포사멸인자의 발현을 감소시키게 되고(74,75), 결국 cytochrome c 단백질의 방출이 증가되어 세포사멸을 유발하는 것으로 사료된다.

4-HNE 50 μ M과 GTE 20 μ g/ml를 함께 처치한 군은 1, 6시간 배양 시 4-HNE 50 μ M 처치군에 비해 cytochrome c 단백질의 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있다. 그러나 12, 24시간 배양 시에는 GTE 20 μ g/ml를 함께 처치한 군에서 cytochrome c 단백질 발현에 대한 억제효과가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 cytochrome c 단백질이 세포질로 방출되는 것을 억제하는 항세포사멸인자인 bcl-2 단백질의 발현증가와 연관이 있는 것으로 보인다. 녹차의 폴리페놀 성분인 EGCG와 quercetin을 처치하였을 경우 bcl-2 단백질의 발현이 증가된다고 보고한 Choi 등(51)의 연구에서와 같이 폴리페놀은 bcl-2 단백질의 발현을 증가시켜 cytochrome c 단백질이 미토콘드리아에서 세포질로 방출되는 것을 억제시키고, cytochrome c 단백질의 하위기전을 차단시킴으로써 세포사멸을 억제하는 것으로 사료된다.

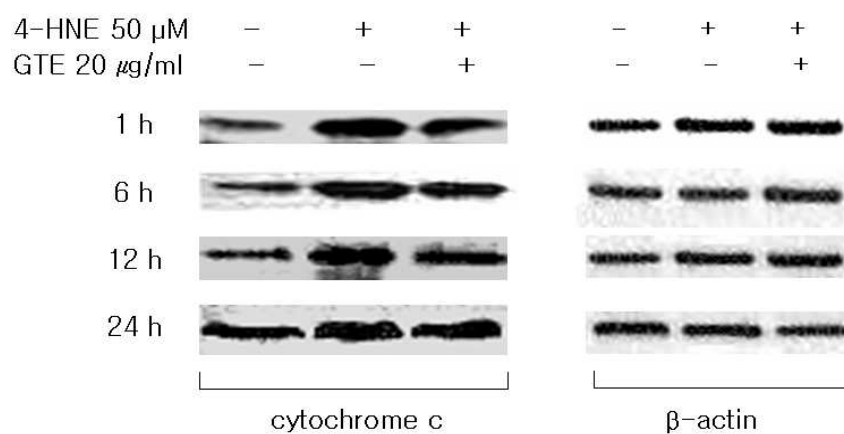


Fig. 11. Cytochrome c protein expression levels in human vascular endothelial cells (ECV304 cells) exposed to 4-HNE 50 μ M with or without GTE 20 μ g/ml

(2) 항세포사멸인자인 bcl-2 단백질의 발현 정도

4-HNE에 유도된 혈관 내피 세포의 세포사멸에 대한 GTE의 억제효과가 항세포사멸인자인 bcl-2 단백질의 발현에 의한 것인지를 규명하기 위하여 western blot 분석을 실시하였으며 그 결과는 Fig. 12.에 나타내었다.

배양시간에 따른 4-HNE 50 μ M 처치군의 bcl-2 단백질의 발현정도를 살펴보면, 대조군과 비교하였을 경우 bcl-2 단백질의 발현정도가 유사하다는 것을 관찰할 수 있다. 이에 반해 4-HNE 50 μ M과 GTE 20 μ g/ml를 함께 처치한 군에서는 1, 6시간 배양하였을 경우 bcl-2 단백질의 발현이 4-HNE 50 μ M 처치군에 비해 증가하는 것을 관찰할 수 있다. 그러나 12, 24시간 배양하였을 경우에는 4-HNE 50 μ M 처치군과 비교하였을 때 bcl-2 단백질의 발현정도가 유사한 것으로 관찰되었다.

Choi 등(51)의 연구에서는 인체 혈관 내피 세포(HUVEC)에 과산화수소와 폴리페놀 성분들을 함께 처치하여 bcl-2 단백질의 발현정도를 살펴 본 결과 폴리페놀 성분 중에서 EGCG와 quercetin을 함께 처치하였을 경우 과산화수소만 처치한 군에 비해 bcl-2 단백질의 발현이 증가한 것으로 나타났으며, 이는 본 연구에서 4-HNE와 GTE를 함께 처치한 군에서 bcl-2 단백질의 발현이 증가한 결과와 일치한다. 또한 Kang 등(60)의 연구에서도 산화된 LDL과 여러 종류의 플라보노이드를 함께 처치하였을 경우 플라보노이드 중에서도 특히 EGCG, quercetin, hesperetin을 함께 처치한 군에서 bcl-2 단백질의 발현이 증가한다고 보고하였다.

결과적으로 GTE는 cytochrome c 단백질이 세포질로 방출되는 것을 억제

하는 항세포사멸인자인 bcl-2 단백질의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. GTE에 의해 증가된 bcl-2 단백질은 cytochrome c 단백질의 방출을 억제시켜 cytochrome c 단백질의 하위기전인 caspase-3 단백질의 발현을 억제시키고, 세포사멸 연쇄반응(apoptosis cascade)을 차단시켜 결국 세포사멸을 억제시키는 작용을 하는 것으로 사료된다(60,76).

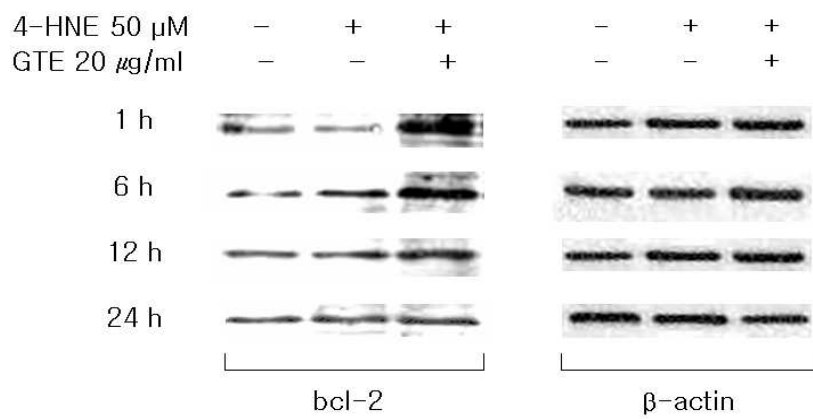


Fig. 12. Bcl-2 protein expression levels in human vascular endothelial cells (ECV304 cells) exposed to 4-HNE 50 μ M with or without GTE 20 μ g/ml

(3) 4-HNE에 의해 증가된 caspase-3 단백질 활성화에 대한 GTE의 억제 효과

4-HNE에 의해 유도된 caspase-3 단백질의 발현에 대한 GTE의 억제효과를 살펴보기 위하여 western blot 분석을 시행하였으며 그 결과는 Fig. 13에 나타내었다.

배양시간에 따른 4-HNE 50 μ M 처치군의 활성화된 caspase-3 단백질의 발현정도를 살펴보면, cytochrome c 단백질의 발현과 유사하게 모든 배양시간에서 활성화된 caspase-3 단백질의 발현이 증가한 것으로 나타났으며 6, 12, 24시간 배양 시에는 1시간 배양했을 경우에 비해 활성화된 caspase-3 단백질 발현이 증가한 것으로 관찰되었다. Lawrence 등(56)의 연구에서는 결장암세포(RKO cells)에 4-HNE를 처치하였을 경우 시간 의존적으로 활성화된 caspase-3 단백질의 발현이 증가한다고 보고하였으며, 이는 본 연구의 결과와 일치한다. Liu 등(57)의 연구에서도 림프종세포(Jurkat cells)에 4-HNE를 처치하였을 경우 활성화된 caspase-3 단백질의 발현이 증가한다고 보고하였다.

4-HNE 50 μ M과 GTE 20 μ g/ml를 함께 처치한 군에서는 1, 6시간 배양하였을 경우 4-HNE 50 μ M 처치군에 비해 활성화된 caspase-3 단백질의 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있다. 그러나 12, 24시간 배양 시에는 GTE 20 μ g/ml를 함께 처치한 군에서 활성화된 caspase-3 단백질의 발현에 대한 억제효과가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 EGCG 등의 폴리페놀이 산화된 LDL에 의해 활성화된 caspase-3 단백질의 발현을 감소시킨다고 보고한

Kang 등(60)의 연구결과와 일치한다. 또한 Choi 등(62)의 연구에서도 EGCG가 과산화수소에 의해 활성화된 caspase-3 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시킨다고 보고하였다. 그러나 GTE는 cytochrome c, bcl-2, caspase-3 단백질의 발현에 있어서 1, 6시간 배양 시에는 단백질 발현을 억제시키는 반면, 12, 24시간 배양했을 경우에는 단백질 발현을 억제시키지 않는 것으로 나타났다. 이는 세포 신호전달의 초기과정에 관여하는 즉각 초기 유전자(Immediate Early Genes, IEG)와 연관이 있는 것으로 사료된다(77). c-jun, c-fos 등의 즉각 초기 유전자는 세포의 성장과 분열(78-79), 분화와 발달에 관여하고(80-81), 신경 세포사멸 시 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(77). 산화적 스트레스가 작용하게 되면 c-jun의 인산화가 증가된다고 보고되고 있으며, 녹차의 폴리페놀 성분들은 초기 배양시간에서 c-jun의 인산화를 억제시키는 작용을 한다고 보고하고 있다(62). 또한 c-jun을 인산화시키는 JNK(c-jun N-terminal kinase) 단백질도 산화적 스트레스에 의해 인산화 된다고 보고되고 있으며, 초기 배양시간에서 녹차의 폴리페놀 성분들이 JNK 단백질의 인산화를 억제시킨다고 보고되고 있다(41,62). 따라서 GTE가 초기 배양시간에서 세포사멸을 억제하는 효과를 나타내는 것은 c-jun, JNK 단백질이 관여하는 MAPK(mitogen activated protein kinase) 경로와 연관이 있는 것으로 사료된다.

결과적으로 GTE는 4-HNE에 의해 활성화된 caspase-3 단백질의 발현을 억제하여 caspase-3 단백질의 하위기전인 PARP 또는 JNK 등의 단백질의 발현을 차단시키고, 세포사멸을 억제시킴으로써 항동맥경화성 인자로서의 역할을 하는 것으로 사료된다.

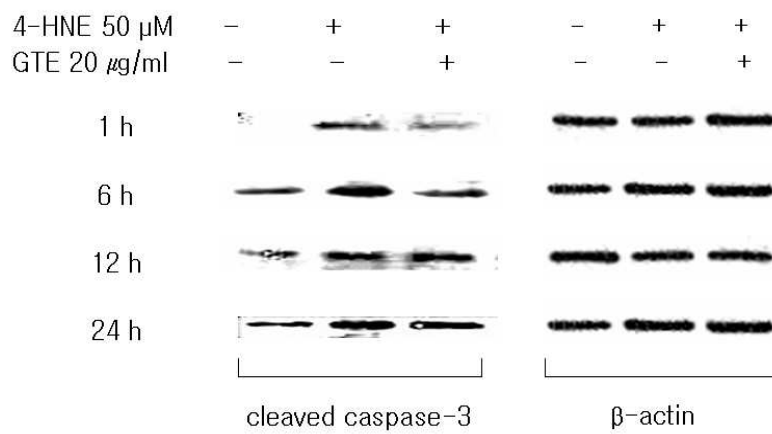


Fig. 13. Caspase-3 protein expression levels in human vascular endothelial cells (ECV304 cells) exposed to 4-HNE 50 μ M with or without GTE 20 μ g/ml

IV. 요약 및 결론

본 연구는 지질 과산화물의 한 형태인 4-HNE(4-hydroxynonenal)가 혈관 내피 세포(ECV 304 cell)의 세포사멸에 미치는 영향과 이에 대한 녹차 에탄올 추출물(GTE)의 생리활성 효과를 알아보기 위하여 4-HNE를 50, 100, 200, 400 μM 의 농도로 처리하고, 녹차 에탄올 추출물(GTE)은 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 세포 생존율은 1, 3, 6, 12, 24시간 동안 배양하여 관찰하였으며, 세포 형태학적 변화, 지질 과산화물의 함량, caspase-3의 활성화, 미토콘드리아 관련성 세포사멸 기전에 관여하는 단백질의 발현정도는 4-HNE 50 μM 과 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하여 1, 6, 12, 24시간 후에 조사하였으며, 그 결과는 다음과 같았다.

1. 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과 4-HNE 50 μM 처리군에서 세포사멸 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 4-HNE 50 μM 과 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처리한 군은 6시간 이내의 초기 배양시간에서 4-HNE 50 μM 에 의한 세포사멸을 억제하여 세포사멸 현상이 감소하는 것으로 관찰되었다. 그러나 12, 24시간 배양 시에는 GTE의 세포사멸 억제효과가 관찰되지 않았다.

2. 4-HNE를 농도에 따라 처리하여 세포 생존율을 살펴본 결과 농도 의존적이면서 배양시간 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 4-HNE 50 μM 과 GTE 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처리했을 경우에는 4-HNE

50 μM 처치군에 비해 세포 생존율이 증가한 것으로 나타났으며, 특히 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 모든 배양시간에서 세포 생존율을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났다($p=0.029$, $p=0.009$, $p=0.002$, $p=0.039$, $p=0.042$). 또한 GTE를 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 군은 모두 초기 배양시간에서 유의적인 세포독성 억제효과가 관찰되었다.

3. 지질 과산화물 함량을 살펴보면 4-HNE 50 μM 처치군은 배양 시간이 증가할수록 대조군에 비해 지질 과산화물 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처리하였을 경우에는 초기 배양시간에서 지질 과산화물 함량이 유의적으로 감소하였다($p=0.009$, $p=0.024$). 이는 GTE가 4-HNE의 세포막 유입에 관여하였거나 4-HNE를 제거하는 역할을 수행한 것으로 사료된다.

4. 미토콘드리아 관련성 세포사멸 기전에 관여하는 단백질인 caspase-3의 활성도를 측정한 결과 4-HNE 50 μM 처치군은 시간이 지날수록 caspase-3의 활성이 증가하였으나, GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처리하였을 경우에는 초기 배양시간에서 4-HNE 50 μM 에 의한 caspase-3의 활성이 유의적으로 감소되었다($p=0.001$, $p=0.002$).

5. cytochrome c 단백질의 발현정도를 살펴보면 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 초기 배양시간에서 4-HNE 50 μM 에 의해 증가된 cytochrome c 단백질 발현을 억제시키는 것으로 나타났다. 이는 GTE가 bcl-2 단백질의 발현을 증가시켜

cytochrome c가 세포질로 방출되는 것을 억제시키는 역할을 한 것으로 생각된다.

6. bcl-2 단백질의 발현정도를 살펴보면 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치하였을 경우 4-HNE 50 μM 처치군에 비해 초기 배양시간에서 bcl-2 단백질 발현이 증가하는 것으로 나타났다. GTE에 의한 bcl-2 단백질의 발현 증가는 cytochrome c 단백질이 세포질로 방출되는 것을 억제하고, cytochrome c 단백질의 하위기전을 차단시킴으로써 세포사멸을 억제하는 것으로 사료된다.

7. caspase-3 단백질의 발현은 4-HNE 50 μM 을 처치하였을 경우 증가하는 것으로 나타났으며, 반면 GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 함께 처치하였을 경우에는 초기 배양시간에서 caspase-3의 발현이 감소되었다. 이는 GTE가 4-HNE에 의해 활성화된 caspase-3 단백질의 발현을 억제하여 caspase-3 단백질의 하위기전인 PARP 또는 JNK 등의 단백질 발현을 차단시키고, 세포사멸을 억제시킴으로써 동맥경화 유발을 억제하는 것으로 사료된다.

결과적으로 지질 과산화물의 한 형태인 4-HNE는 인체 혈관 내피 세포에서 시간 의존적이면서 농도 의존적으로 세포사멸을 일으키는 것으로 나타났으며, 이에 대해 녹차 에탄올 추출물은 6시간 이내의 초기 배양시간에서 세포 생존율을 증가시키고, 4-HNE의 세포내 유입을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 미토콘드리아 관련성 세포사멸 경로에 관여하는 단백질인 cytochrome c, caspase-3 단백질의 발현을 감소시키고, 항세포사멸 인자인 bcl-2 단백질의

발현을 증가시켜 세포사멸을 억제하였다. 따라서 녹차는 4-HNE와 같은 산화적 손상에 의한 동맥경화 발생기전을 억제하여 동맥경화 유발을 감소시키는 것으로 생각된다.

본 연구의 결과는 첫째, 대사성 질환의 식이요법에서 혈중 콜레스테롤 감소를 위해 권장되는 고도 불포화 지방산의 섭취 기준 자료로 이용될 수 있다. 둘째, DHA 등의 지방산을 이용한 기능성 식품의 허가에 있어서 다가 불포화 지방산의 독성효과 및 동맥경화성 인자에 관한 기준 자료로 이용될 수 있으리라 사료된다. 셋째, 식이 불포화 지방산의 과산화 현상으로 인해 생성되는 4-HNE에 의한 동맥경화 발생 기전에 있어서, 녹차의 항동맥경화 효과를 연구함으로써 심혈관 질환의 식이요법에 관한 과학적인 기초 자료로 제공될 수 있을 것이라 사료된다.

앞으로 녹차가 초기 세포 신호 전달 기전에 미치는 영향에 관한 깊이 있는 연구가 요구되며, 임상적인 측면에서 녹차에 함유된 폴리페놀 성분들의 활용 가능성에 관한 연구가 시행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 통계청. 2003
2. 국민건강·영양조사. 보건복지부. 2001
3. 권정숙, 박경희, 윤수홍, 장현숙. 여성 뇌혈관질환자의 혈청지질과 항산화 비타민 상태에 관한 연구. 한국영양학회지 32(1): 24-29, 1999
4. 장양수, 김오연, 권석주, 이종호, 정남식, 이현철, 허갑범. 남성에서 음주와 흡연이 동맥경화증 위험요소와 항산화체계에 미치는 영향. 대한내과학회지 56: 437-449, 1999
5. 김우식, 김영설. 동맥경화증의 새로운 유전자 지표로서의 Paraoxonase 유전자 다형성. 한국지질학회지 6: 81-86, 1996
6. 김수연, 정은정, 이양자. ω 3 및 ω 6계 지방산 함량과 비타민 E 수준이 흰쥐의 심장 미토콘드리아 효소 활성화에 미치는 영향. 한국지질동맥경화학회지 4: 1-10, 1994
7. Hetzel BS, Charnock T. Fall in coronary heart disease mortality in USA and Australia due to sudden death : Evidence for the role of polyunsaturated fat. J Clin Epidemiol 42: 855-893, 1989
8. Hu ML, Frankel EN, Leibovitz BE, Tappel AL. Effect of dietary lipids and vitamin E on *in vitro* lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenates. J Nutr 119: 1574-1582, 1989

9. Buckingham KW. Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and dietary vitamin E on lipid peroxidation in the rat. *J Nutr* 115: 1425-1435, 1985
10. Naito C, Kawamura M, Yamamoto Y. Lipid peroxides as the initiating factor of atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 676: 27-45, 1993
11. Ferrari R, Ceconi C, Curello A, Cargnoni A, Pasini E, Ed Giuli F, Albertini A. Role of oxygen free radical in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* 53: 215S-222S, 1991
12. Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP. Free radicals in toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 120: 168-178. 1993
13. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease : Free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; Journal of Technical Methods and Pathology* 47: 412-426, 1982
14. Yusong Y, Rajendra S, Abha S, Sanjay A, Yogesh C. Lipid peroxidation and cell cycle signaling : 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim Pol* 50: 319-336, 2003
15. Hennig B, Chow CK. Lipid peroxidation and endothelial cell injury : implications in atherosclerosis. *Free Radic Biol. Med.* 4: 99-106, 1988
16. Jurgens G, Chen Q, Esterbauer H, Mair S, Ledinski G, Dinges

- HP. Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies apolipoprotein B an apoprotein(a). *Arterioscler Thromb* 13: 1689-1699, 1993
17. Taccone-Gallucci M, Nucci G, Meloni C, Valeri M, Piazza A, Elia L, Torromeo C, Mandelli F, Casciani CU. Risk of ironoverload and 'hemochromatosis allele(s)' in patients on maintenance hemodialysis. *Am. J. Nephrol* 7: 28-32, 1987
 18. Traverso N, Menini S, Cosso L, Odetti P, Albano E, Pronzato M. A, Marinari UM. Immunological evidence for increased oxidative stress in diabetic rats. *Diabetologia* 41: 265-270
 19. Brambilla G, Sciaba L, Faggini P, Maura A, Marinari UM, Ferro M, Esterbauer H. Cytotoxicity, DNA fragmentation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes. *Mutat. Res* 171: 169-176
 20. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radic. Biol. Med* 11: 81-128
 21. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide, *Science* 267: 1445-1449, 1995
 22. Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, Haider N, Farb A, Hui-Liang Y, Smialek J. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am. J. Pathol* 157:

1259-1268, 2000

23. Filomena de Nigris, Lerman A, Ignarro LJ, Williams-Ignarro S, Sica V, Baker AH, Lerman LO, Geng YJ, Napoli C. Oxidation-sensitive mechanisms, vascular apoptosis and atherosclerosis. *TRENDS in Molecular Medicine* 9: 351-359, 2003
24. Chung KS, Kim BK. Studies on antitumor constituents of *Pluteus cervinus*. *Seoul Univ J Pharm Sci* 10: 1-18, 1985
25. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449, 1995
26. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462, 1995
27. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15: 7-13, 1993
28. Lee Ch, Chung MC, Lee HJ, Kho YH. An apoptosis regulator isolated from *Petasites japonicum*. *Korean J Food Sci Technol* 32: 448-453, 2000
29. Jaruga E, Sokal A, Chrul S, Bartosz Z. Apoptosis-independent alteration in membrane dynamics induced by curcumin. *Exp Cell Res* 245: 303-312, 1998
30. Alnemri ES. Mammalian cell death proteases : a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 64: 33-42, 1997

31. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85: 817-827, 1996
32. Zamazmi N, Marchetti P, Castedo M. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182: 367-377, 1995
33. Muchmore SW, Asttler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL. an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381: 335-341, 1996
34. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385: 353-357, 1997
35. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-89, 1997
36. Soldani C, Sconassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis : an update. *Apoptosis* 7: 321-328, 2002
37. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of

- action and potential applications. *AM. J Clin Nutr* 74: 418-425, 2001
38. Wickremasinghe RL. Tea. *Adv. Food Res.* 24: 229-234, 1978
 39. Tsujimura M, Osawa N. Amino acid in green tea. *Jissin Joshi Daigaku Kigo, Chem. Abstr* 41: 5294-5297, 1957
 40. Roberts E, Wood DA. Study of the polyphenols in tea leaf by paper chromatography. *Biochem. J* 49: 414-419, 1951
 41. Katsunari M, Noritaka I, Takashi Y, Mingyao L, Hiromi W. Green tea polyphenol blocks H₂O₂-induced interleukin-8 production from human alveolar epithelial cells. *Cytokine* 18: 266-273, 2002
 42. Chung HY, Yokozawa T. Studies on antioxidative and antimutagenic mechanism of epicatechin 3-O-gallate isolated from green tea. The 3rd International Symposium of Green tea, Seoul, Korea, 1995
 43. Liuji C, Xianqiang Y, Park J, Shengrong S, Yuefei W. Mechanism of Scavenging Reactive Oxygen Species of Tea catechins. The 6th International Symposium on Green tea, Seoul, Korea, 2001
 44. Nakachi K, Suga K, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cardiovascular disease and cancer. The 3rd International Symposium on Green tea, Seoul, Korea, 1995
 45. Hara Y, Maysuzaki S, Nakamura K. Antitumor activity of tea catechins. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi* 42: 39-45, 1989
 46. Lee SJ, Kim MJ, Yoon YH. Effect of Korean green tea, Oolong tea and black tea beverage on the removal of cadmium and

- antioxidative detoxification in cadmium administered rats. The 3rd International symposium on Green tea, Seoul, Korea, 1995
47. Hara Y, Ishigami Y. Antibacterial activities of tea polyphenols against foodborn pathogenic bacteria. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 36: 996-999, 1989
 48. Park GY, Lee SJ, Im JG. Effect of green tea catechin on cytochrome xanthne oxidase activities in liver and liver damage in streptozotochin induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Nutr* 26: 901-907, 1997
 49. Choi YJ, Kang JS, Park HY, Yong-Jin Lee, Choi JS Kang YH. Polyphenolic Flavonoids Differ in Their Antiapoptotic Efficacy in Hydrogen Peroxide-Treated Human Vascular Endothelial Cells. *J. Nutr.* 133: 985-991, 2003
 50. Spencer JP, Schroeter H, Kuhnle G, Srai SK, Tyrrell RM, Hahn U, Rice-Evans C. Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *Biochem J* 354: 493-500, 2001
 51. Anderson JJ, Gamer SC. Phytoestrogens and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12: 543-557, 1998
 52. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetic assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving

- improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89: 271-277, 1986
53. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
 54. Park JC, Rah DK, Han DW, Baek HS, Hyon SH. Prevention of reactive oxygen species-induced oxidative stress in human microvascular endothelial cells by green tea polyphenol. *Toxicology Letters* 155: 269-275, 2005
 55. Sarafian TA, Bredesen DE. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? *Free Radic Res* 21: 1-8, 1994
 56. Lawrence J, Chuan J, Ventkataraman A, Jennifer AP. 4-Hydroxynone nal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release. *Chem. Res. Toxicol* 14: 1090-1096, 2001
 57. Wei L, Isumi N, Masashi K, Anwaral A, Akemi H, Hjaruhiko S. 4-Hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J. Cell. Sci* 113: 635-641, 2000
 58. Izumi N, Wei L, Anwarul A, Kozue T, Yoshiyuki K, Masashi K, Haruhiko S. 4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction caascades for suppression of cellular functions. *Molecular Aspects of Medicine* 24: 231-238, 2003

59. Takao K, Mitsuyoshi M, Naomichi B. Inhibition of linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity in cultured human umbilical vein endothelial cells by catechins. *Chem Biol* 114: 109-119, 1998
60. Kang YH, Jeong YJ, Choi YJ, Kwon HM, Kang SW, Park HS, Lee MS. Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids. *Br. J. Nutr* 93: 581-591, 2005
61. Jeong JH, Kim HJ, Lee TJ, Kim MK, Park ES, Choi BS. Epigallocatechin 3-gallate attenuates neuronal damage induced by 3-hydroxykynurenine. *Toxicology* 195: 53-60, 2004
62. Choi YJ, Kang YH, Jeong YJ, Lee YJ, Kwon HM. (-)Epigallocatechin Gallate and Quercetin Engage Survival Signaling in Response to Oxidant-Induced Human Endothelial Apoptosis. *J. Nutr* 135: 707-713, 2005
63. Elzbieta S, Justyna O, Wojciech L, Irena K, Andrzej R. Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. *Alcohol* 32: 25-32, 2004
64. Slater TF, Brock G. Editors. Antioxidant vitamins and beta-carotene in disease prevention. *Am J Clin Nutr* 53: 189S-396S, 1991
65. Eliezer R, Leonid N, Harold N, Nahum K, Ezra R. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biochemical Pharmacology* 54: 973-978, 1997

66. Koo MWL, Yang TTC. Inhibitory effect of chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. *Atherosclerosis* 148: 67-73, 2000
67. Jose M, Arthur I. Cederbaum. Green tea polyphenol epigallocatechin-3 gallate protects HepG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity. *Free Radical Biology & Medicine* 36: 359-370, 2004
68. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology* 37: 837-841, 1998
69. Husain SR, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26: 2489-2491, 1987
70. Arora A, Byrem TM, Nair MG, Strasburg GM. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch Biochem Biophys* 373: 102-109, 2000
71. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med* 19: 481-486, 1995
72. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157, 1996
73. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:

481-490, 1998

74. Esterbauer H, Scahur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol. Med* 11: 81-128, 1991
75. Cheng JZ, Singhal SS, Saini M, Sngnal J, Piper JT, Van Kuijk FJ, Zimniak P, Awasthi YC, Awasthi S. Effects of mGST A4 transfection on 4-hydroxynonenal mediated apoptosis and differentiation of k562 human erythroleukemia cells. *Arch. Biochem Biophys* 372: 29-36, 1999
76. Voehriger DW, Meyn RE. Redox aspects of bcl-2 function. *Antioxid Redox Signal* 2: 537-550, 2000
77. Dragunow M, Young D, Hughes P, Macgibbon G, Lawlor P, Singleton K. Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischaemic brain injury? *Mol Brain Res* 18: 347-352, 1993
78. Kovary K, Bravo R. The Jun and Fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11: 4466-4472, 1991
79. Nishikura K, Murray JM. Antisense DNA of proto-onco-gene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 7: 639-649, 1987
80. Caubet JF. c-fos Proto-oncogene expression in the nervous system

during mouse development. *Mol Cell Biol* 9: 2269-2272, 1989

81. Wilkinson G, Bhatt S, Ryseck R, Bravo R. Tissue-specific expression of c-jun and jun-B during mouse development. *Development* 106: 464-473, 1989

ABSTRACT

Bioregulation of green tea ethanol extracts (GTE) on the 4-HNE induced apoptosis in human vascular endothelial ECV304 cells

Kim Mae-Ha

Department of Food & Nutrition

The Graduated School

Sungshin Women's University

It has been reported that lesions on endothelial cells are proposed to be the initial event in the development of atherosclerosis. Reactive oxygen species or metabolic oxides is believed to be one of contributing factors in the several diseases including the vascular disease and aging process. 4-hydroxynonenal (4-HNE), one of dietary lipid peroxides, can be produced by oxidative stimuli and has been suggested to mediate a number of oxidative stress-linked pathological incidences, including cellular growth inhibition and apoptosis.

There is growing evidence that natural polyphenols could prove useful in the prevention of pro-oxidative states mediated by formation of free radicals species in different pathological situations. Flavonoids, commonly known as catechins, are major polyphenolic components of green tea, black tea, red wines and fruits. Green tea contains relative large amounts of antioxidant polyphenols such as (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) and epigallocatechin (EGC). These compounds have much attention because of their antimutagenic and anticarcinogenic effects. Therefore, the purpose of this study is to investigate that bioregulation of green tea ethanol extracts (GTE) containing polyphenols on the 4-HNE induced apoptosis in ECV304 cells.

ECV304 cells were cultured in DMEM media treated with 50–200 μM 4-HNE and 10–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GTE. After cells were incubated for 1–24 hours, cell viability and morphology were measured. Also the levels of lipid peroxides (LPO), caspase-3 activity were measured and analyzed by western blot of cytochrome c, bcl-2, and caspase-3 proteins.

The results of this study were as following;

1. 4-HNE was time- and dose-dependent apoptotic effects on the endothelial cell death. On the other hand, GTE (10–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was

dose-dependent anti-apoptotic effects as evidenced by changes in cell morphology and cell viability in 4-HNE induced apoptosis of ECV304 cells.

2. 4-HNE 50 μM time-dependently increased the LPO production in ECV304 cell, whereas GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ significantly reduced the 4-HNE induced LPO production within 6 hour incubation. But GTE was no effect after 6 hour incubation on the content of LPO.

3. To confirm that GTE has anti-apoptotic effect, ECV304 cells were treated with either 4-HNE 50 μM or 4-HNE 50 μM together with GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. GTE 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibited caspase-3 activity until 6 hour compared to 4-HNE 50 μM .

4. Western blot analysis showed that treatment of 4-HNE-exposed cells with GTE inhibited the releasing of cytochrome c from the mitochondria to cytosol until 6 hour incubation. The caspase-3 expression also, was blocked by a treatment with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of GTE until 6 hour incubation. Treatment of 4-HNE-exposed cells with GTE enhanced the bcl-2 expression within 6 hour incubation. It is considered that GTE may switch off the apoptotic death cascade by increasing the activation of bcl-2 and likely by boosting the intrinsic cellular tolerance against apoptotic triggers.

In conclusion, green tea ethanol extracts (GTE) has function as an anti-apoptotic agent in 4-HNE induced apoptosis of ECV304 cells. Since the polyphenols in GTE were effective in preventing endothelial apoptosis by oxidative stress such as 4-HNE, this study suggests that natural polyphenols might be anti-atherosclerotic chemicals in future.