

녹차 폴리페놀 성분과 일반 의약품의 상호작용에 의한 장관계 세포 독성 평가

최현아 · 김미리 · 홍정일*
서울여자대학교 자연과학대학 식품공학과

Evaluation of Cytotoxic Properties of Tea Polyphenols in Intestinal Cells Treated with Over-the-counter Drugs

Hyun-A Choi, Mi-Ri Kim, and Jungil Hong*

Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University

Abstract Polyphenols in green tea are biologically active and may interact with commonly-consumed over-the-counter (OTC) drugs in the body. In this study, modulation of cytotoxicity of polyphenon 60 (PPE, tea polyphenol mixture) with co-treatment of several OTC drugs, including ibuprofen (Ibu), acetaminophen (AAP), and aspirin was investigated in intestinal cells. PPE showed more potent cytotoxic effects on colon cancer HCT 116 cells than on normal intestinal INT 407 cells. Ibu had the strongest cytotoxic effects on both cell types. Cytotoxicity of PPE on HCT 116 and INT 407 cells was not markedly altered by co-treated OTC drugs. Cytotoxicity of the OTC drugs was not affected by PPE. When HCT 116 cells were incubated with AAP before or after PPE treatment, cytotoxicity was slightly enhanced more than their additive effect. The present study may provide basic information of possible toxicity due to interaction of the polyphenols and the OTC drugs.

Keywords: green tea, polyphenol, cytotoxicity, intestinal cell, over-the-counter drug

서 론

녹차의 폴리페놀 성분인 catechin의 항산화, 항동맥경화 및 항암 효과 등의 다양한 생리활성으로 인해(1-4), 소비자의 녹차 수요와 그에 따른 건강 증진에 대한 효과에 대한 기대가 증가하고 있다. 녹차의 생리 활성을 나타내는 주요 catechin으로는 (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG)가 있다(Fig. 1). 녹차 catechin의 주요 생리활성으로 유리라디칼 소거능에 기인한 항산화 활성이 널리 알려져 있고(2), lipoygenase 및 cyclooxygenase(COX)의 활성의 저해를 통해 염증억제 및 항암효과를 나타낸다고 보고되었으며(3), phase II 효소인 glutathione-S-transferase의 활성을 증가시켜 독성 물질의 제거를 통해 발암을 억제하는 활성도 보고되었다(4).

Paracetamol(acetaminophen, AAP), acetylsalicylic acid(aspirin, Asp), ibuprofen(Ibu)과 같은 해열 및 소염진통제는 처방전 없이 손쉽게 구입하여 복용할 수 있는 일반 의약품으로, 이로 인한 약물의 오남용과 그에 따른 부작용이 일어날 수 있을 것으로 예상된다. 특히 AAP에 의한 간 독성이 문제가 되는 것을 알려졌는데(5), AAP는 간에서 cytochrome P450 대사효소에 의하여 독성을 가진 중간 생성물로 대사될 수 있고 정상적인 상태에서는 이 중간 생성물이 glutathione과 결합하여 독성의 발현 없이 배설되나, 과량의

AAP는 glutathione의 고갈을 야기하며 간 독성을 일으킨다고 보고 되었다(6-8). 한편 Asp, Ibu와 같은 비스테로이드성 항염증 약물은 COX-1 활성의 저해를 통해 위점막 보호, 혈소판 응집 작용 등을 억제하여 위장관계의 손상을 일으킨다고 보고되었다(9,10).

최근 몇 가지 약물들이 같이 섭취된 식품 성분들과 상호작용을 통하여 체내의 항생제 약물 흡수를 방해하여 감염 부위에서의 활성을 저해하며, 장관계에서 cytochrome P450 3A4 대사효소의 발현을 증가시키는 등 약물의 생리/화학적 변화로 인하여 체내이용률 변화, 효소 발현의 변화를 야기한다고 보고되었다(11-13). 이에 반해 위에 언급한 다소비 일반 의약품과 대중적인 음료로 섭취가 증가되고 있는 차의 폴리페놀 성분과의 상호작용을 통한 활성상의 변화, 부작용 및 유해성에 대한 연구는 극히 제한되어 있으며, 특히 장관계 세포를 타깃으로 하는 연구는 거의 진행된 바가 없다. 장관계는 섭취한 식품 및 약물의 흡수가 이루어지기 전에도 고농도로 직접 접촉할 수 있는 부위로 광범위한 식품성분과 약물의 상호작용이 예상되는 기관으로 대중의 안전성 확보를 위한 관련 연구가 시급하다고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 녹차의 주요 생리활성 성분인 catechins이 빈번히 복용되는 일반 의약품 AAP, Ibu 및 Asp과 같이 섭취되었을 때 상호작용을 통하여 발생할 수 있는 변화를 장관계 세포모델에서 조사하였으며, 정상 세포와 암 세포에서의 독성 및 세포증식에 대한 효과를 비교하였다.

*Corresponding author: Jungil Hong, Department of Food Science & Technology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea
Tel: 82-2-970-5639
Fax: 82-2-970-5977
E-mail: hjil@swu.ac.kr
Received June 26, 2011; revised August 6, 2011;
accepted August 8, 2011

재료 및 방법

실험재료 및 세포주

실험에 사용된 녹차 폴리페놀 성분 polyphenon 60(PPE)는 Sigma-Aldrich chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였으

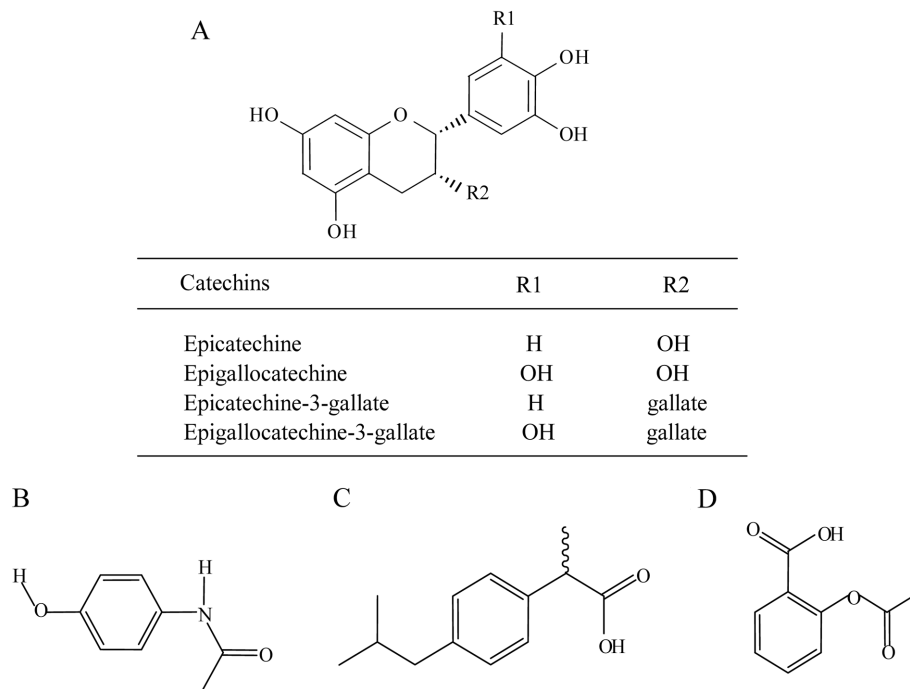


Fig. 1. Structures of green tea polyphenols (A), and commonly-consumed over-the-counter (OTC) drugs, acetaminophen (AAP, B), ibuprofen (Ibu, C), and aspirin (Asp, D) used in the present study.

며, PPE는 성분 조성은 EGCG 27.2, (-)-epigallocatechin 15.2, (-)-epicatechin gallate 7.7, (-)-epicatechin 6.8, 및 (-)-gallocatechin gallate 2.9% 등을 포함하여 60%이상(w/w)의 녹차 폴리페놀 성분들로 구성되어 있다. 일반 의약품 성분 Ibu, Asp과 superoxide dismutase(SOD, from bovine erythrocyte), 3,3'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]-o-cresolsulfonephthalein tetrasodium salt (xylenol orange), ammonium ferrous sulfate는 Sigma-Aldrich chemical Co.에서 구입하였고, AAP는 Fluka chemical Co.(Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. 본 실험에 사용된 PPE의 주요 폴리페놀 성분 및 일반 의약품의 구조를 Fig. 1에 나타내었다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide(MTT) 시약은 Amresco Inc.(Solon, OH, USA)에서 구입하여 사용하였고, 그 외에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich chemical Co.에서 구입하였다. PPE, Ibu, Asp, AAP는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해시키고 1회 분량씩 나누어 -80°C 초저온 냉동고(IlshinBioBase, Gyeonggi-do, Korea)에서 보관하여 사용하였다. 인간 형질전환 정상장관계 세포주 INT 407는 고려대학교 김태성 교수 실험실(Korea Univ., Seoul, Korea)에서 분양 받았으며, 인간 대장암 세포주 HCT 116와 rat 형질전환 정상장관계 세포주 IEC-6는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. HCT 116 세포, IEC-6 세포 및 INT 407 세포는 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)과 100 unit/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin이 포함된 RPMI 1640, DMEM 및 MEM 배지에서 각각 배양하였고, INT 407 세포를 위한 MEM 배지에는 추가로 1% non-essential amino acid를 첨가하였다. 모든 세포주는 약 80% confluency에 도달하였을 때 계대배양하였고, 습도 95%, 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

폴리페놀과 일반 의약품 성분의 단독 또는 복합처리에 의한 세포독성 평가

HCT 116, IEC-6 및 INT 407 세포는 trypsin-EDTA로 처리하여

단일 세포 현탁액으로 만든 후, 96 well plate에 각 well당 약 10⁴의 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 세포의 confluency가 약 80%에 도달하였을 때, 녹차 폴리페놀 성분 PPE와 일반 의약품 성분 Ibu, Asp, AAP를 serum free 배지에 처리 농도로 희석하여 well당 200 µL씩 단독 또는 복합 처리하였다. 처리 순서에 따른 독성변화를 평가하기 위하여, 일반 의약품 성분 또는 PPE를 먼저 단독 처리하고 24시간 후 PPE 또는 일반 의약품 성분이 포함된 배지로 각각 교체하여 24시간 더 배양하였다. 녹차 폴리페놀 성분과 일반 의약품 성분의 단독 또는 복합 투여 시 나타나는 세포 독성은 MTT assay를 사용하여 분석하였다. MTT 시약은 phosphate buffered saline(PBS)에 5 mg/mL의 농도로 용해시켜 0.2 µm filter로 제균한 후, 4°C에 보관하여 사용하였다. PPE 및 일반 의약품 성분을 일정 시간 처리 후, 기존 serum free 배지는 제거하고 MTT의 최종 농도가 0.5 mg/mL이 되도록 serum free 배지에 희석하여 각 well당 100 µL씩 첨가하였다. 37°C에서 약 1시간 반응시킨 후, 배지는 완전히 제거하고 생성된 보라색 MTT formazan을 DMSO로 용해하여 microplate reader(Triad LT, Dynex Technologies Inc, Chantilly, VA, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

H₂O₂ 생성량 측정

H₂O₂의 생성량은 ferrous 이온이 산성 조건에서 과산화수소에 의해 ferric 이온이 되어 xylenol orange와의 결합에 의해 생성되는 화합물을 microplate reader(Triad LT)를 사용하여 550 nm에서 파장을 측정하는 ferrous oxidation-xylenol orange(FOX) assay를 통해 측정하였다(14). PPE는 PBS로 희석하여 37°C에서 2시간 저장하였고 서로 다른 농도의 각 약물을 함께 저장하여 생성되는 H₂O₂량을 비교하였다. 각 시료 40 µL를 100 µM xylenol orange와 200 mM D-sorbitol 및 500 µM ammonium ferrous sulfate를 포함하는 FOX working solution 160 µL와 혼합하여 37°C, 암소에서 45분 반응시킨 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

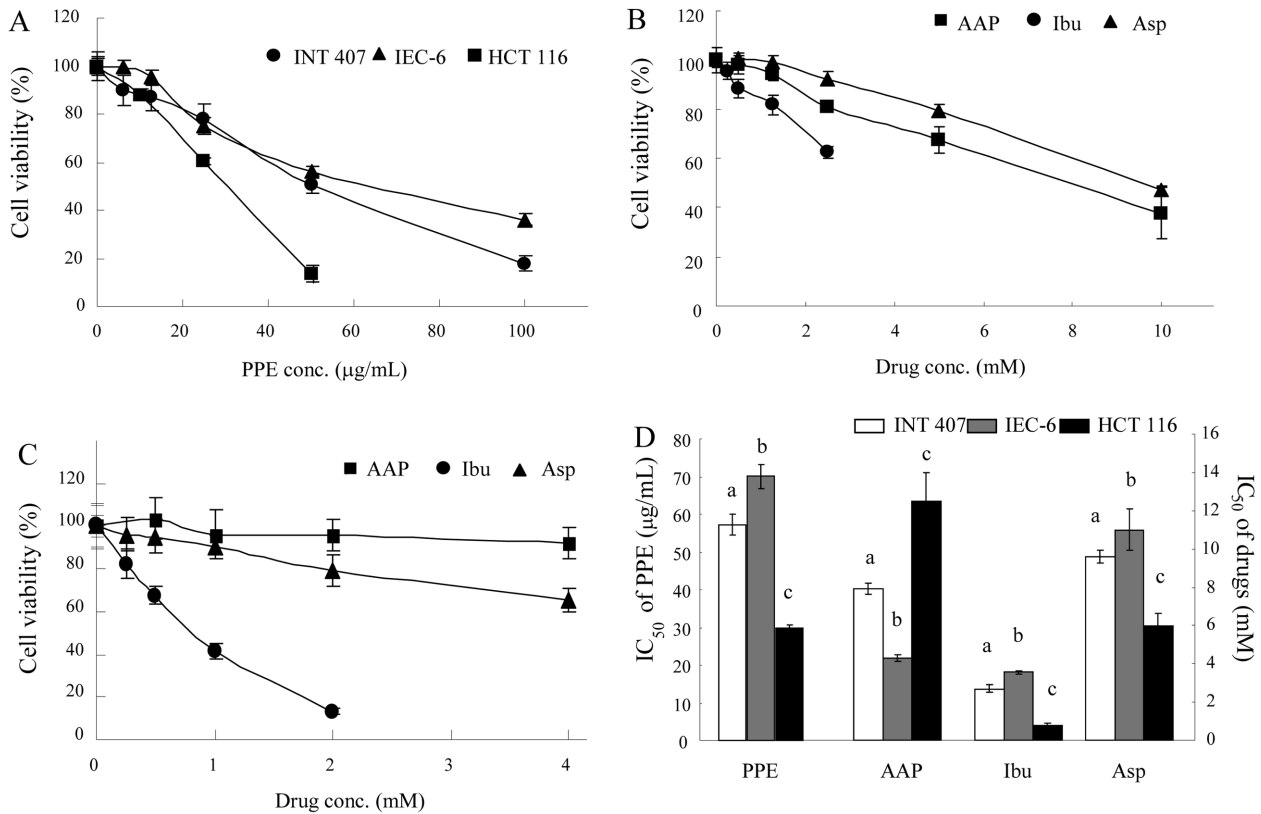


Fig. 2. Cytotoxic effects of PPE and the OTC drugs on the intestinal cells. (A) Concentration-dependent effects of PPE on INT 407, IEC-6, and HCT 116 cells. (B and C) Effects of the OTC drugs on INT 407 (B) and HCT 116 (C) cells. (D) IC₅₀ values of PPE and OTC drugs on each cell line. Cells were incubated with different concentrations of PPE or OTC drugs for 24 h. Viable cells were analyzed using the MTT assay. Each value represents the mean±SD (n=8). Different letters indicate a significant difference (*p*<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (D).

결과 분석 및 통계처리

모든 실험결과는 3회 이상 반복 분석하였으며 그 값을 평균 ±표준편차로 나타내었고, 각 실험구별 유의차 분석은 Student's t-test 또는 One-way ANOVA와 Tukey's HSD test를 실시하여 95 및 99%의 유의수준에서 검정하였다. IC₅₀ 값은 각 약물 및 PPE의 단독처리에 따른 농도별 세포사멸 결과로부터 직선부위에 대한 선형회귀식을 구하고 50% 사멸을 유도하는 농도를 계산하였다.

결과 및 고찰

PPE 및 약물에 의한 세포 독성

PPE 및 약물에 의한 세포독성은 사람 형질전환 정상장관계 세포인 INT 407, 사람 대장암세포인 HCT 116, rat 형질전환 정상장관계 세포 IEC-6에 대하여 처리한 후 생존세포에 의한 MTT 환원능을 비교하여 평가하였다. 본 실험모델로 선정된 장관계는 섭취한 식이성분 및 약물이 체내로 흡수되지 않은 상태에서도 고농도로 노출이 가능한 부위이며, 따라서 섭취 성분들간의 직접적이고 빈번한 상호작용이 발생할 수 있을 것으로 예상된다. 각 세포에 PPE 농도를 달리하여 24시간 처리한 후 세포독성을 평가한 결과, 각 세포에서 농도 의존적인 세포생존율의 감소현상이 나타났다(Fig. 2A). 흥미롭게도 PPE는 정상장관계 세포보다 HCT 116 대장암 세포에 대해 훨씬 강력한 세포독성을 발현하였으며, INT 407나 IEC-6에서보다 절반 가량의 낮은 IC₅₀값을 나타내었다(29.9 µg/mL vs. 57.4 and 70.1 µg/mL) (Fig. 2D). 이는 PPE가 암세포에 선택적인 독성효과를 발현할 수 있음을 암시하며, 녹차

의 주 폴리페놀 성분인 EGCG가 정상세포의 성장을 촉진하는 반면 암세포에 독성을 나타낸다는 기존 보고와도 유사한 결과이다 (15,16). 일반적으로 녹차 가용성분의 30% 이상이 폴리페놀 성분으로 알려져 있으나(1잔당 약 150 mg), 섭취 시 혈장농도나 systemic circulation을 통해 도달할 수 있는 조직에서의 농도는 훨씬 낮은 nM 수준으로 보고되고 있으며, 장관계에서의 함량도 조건에 따라 큰 차이를 나타내는 것으로 알려졌다(17,18).

일반 의약품 성분 Ibu, Asp, AAP 중 Ibu가 다른 약물에 비하여 비교적 강한 세포독성을 나타내었으며, mM 이내의 농도에서도 유의적으로 세포생존율을 감소시켰다(Fig. 2B, C). INT 407 세포에 2 mM의 Ibu를 처리 시 세포생존율이 약 40% 정도 감소하였고, 동일 농도의 Asp와 AAP는 각각 약 8, 20% 미만의 세포생장 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2B). Ibu는 암세포주인 HCT 116 세포에서도 유의적으로 높은 세포독성을 유발하였는데 2 mM 처리 시 약 90%의 세포가 사멸하였으며(Fig. 2C), IC₅₀ 값은 0.8 mM로서 정상세포주인 INT 407나 IEC-6에서의 2.7과 3.5 mM에 비해 현저히 낮았다(Fig. 2D). Asp도 HCT 116에 유의적으로 높은 독성을 나타내었는데, Ibu와 Asp은 AAP보다 COX에 강한 저해효과를 나타내는 바, 암세포인 HCT 116의 생존이 정상세포주보다 더욱 밀접하게 COX 및 그 대사산물에 의존하기 때문으로 사료된다(19). 가장 널리 사용되는 일반 의약품 해열진통제 성분인 AAP의 경우 정상세포주에 유의적으로 높은 독성을 나타내었고, 암세포주인 HCT 116에는 4 mM의 농도까지 거의 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2C, D).

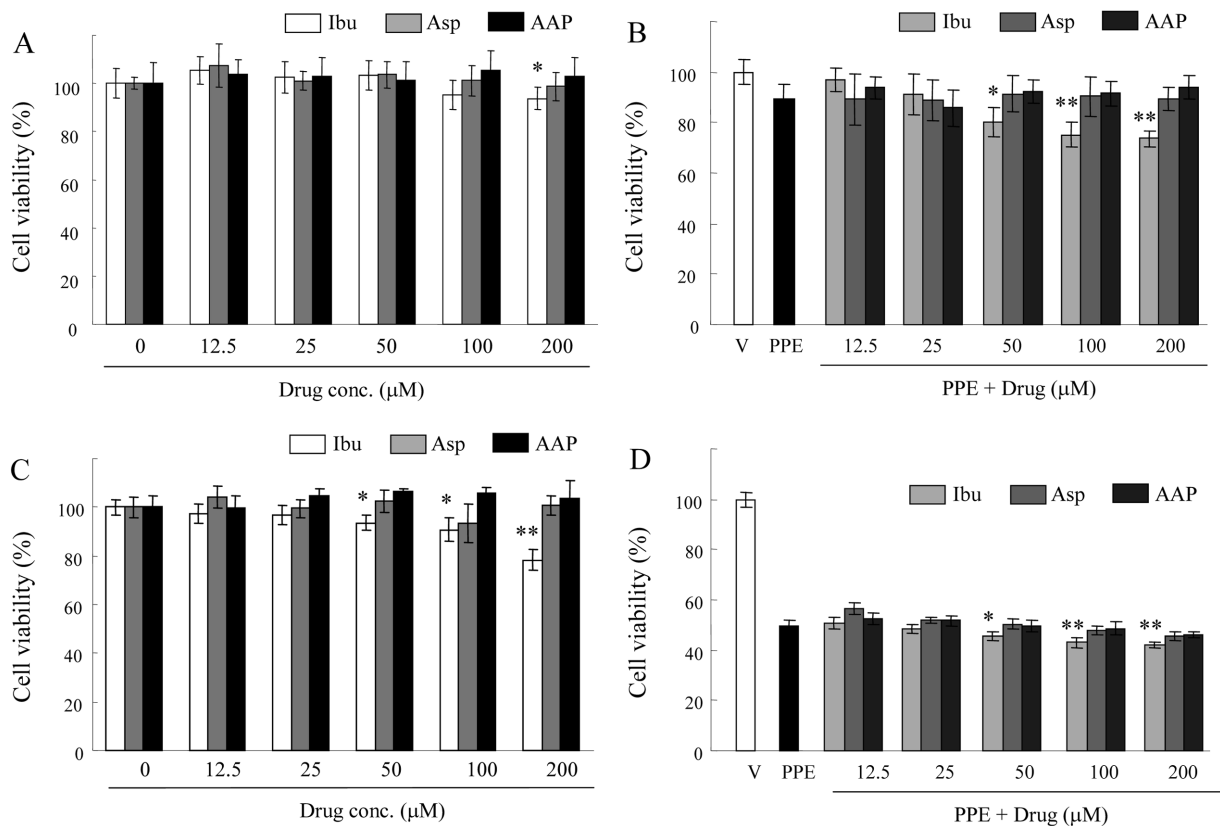


Fig. 3. Effects of PPE on viabilities of HCT 116 in the presence of the OTC drugs. (A and C) Effects of different concentrations of the OTC drugs on viability of HCT 116 cell during 24 h (A) and 48 h (C). (B and D) Effects of PPE on cell viability during 24 h (B) and 48 h (D) in the presence of the OTC drugs. HCT 116 cells was treated with PPE (10 μg/mL) in the absence or presence of the different concentrations of the OTC drugs. After 24 or 48h incubation, viable cells were analyzed using MTT assay. Each bar represents the mean±SD (n=8). * Significantly different from PPE only according to Student's *t*-test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

PPE와 약물의 복합처리 시 세포독성 변화

일반 의약품과 식품 중에 함유되어 있는 생리활성을 가진 성분들이 일상 중에 빈번히 혼용될 것을 예상하여 세포에 PPE와 약물을 동시에 처리하였을 때의 세포독성에 미치는 영향을 평가하였다. 우선 mM 수준 이하의 저농도 약물이 PPE의 독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 우선 각 약물을 최대 200 μM까지 HCT116 세포에 서로 다른 농도로 24와 48시간 처리하여 세포독성의 변화를 조사하였다. 그 결과 Asp과 AAP를 처리한 세포에서 48시간까지 세포독성의 변화가 관찰되지 않았으나, Ibu는 24시간 처리시 200 μM 농도에서 5.4%, 48시간 처리 시 100과 200 μM에서 각각 9.3과 21.6% 세포생존율이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3A, C). HCT 116 세포에 PPE(10 μg/mL)를 24시간 처리하였을 때 10% 이내의 세포독성이 나타났으나, 48시간 처리시 독성이 현저히 증가하여 50% 정도의 세포가 사멸하였다(Fig. 3B, D). 이들을 복합 처리한 결과, PPE와 Asp 또는 AAP 처리 세포에서 PPE 단독 처리 시와 비교하여 48시간까지 유의적인 세포독성의 변화는 나타나지 않았다(Fig. 3B, D). 하지만 PPE와 Ibu를 같이 처리한 경우, 세포독성이 약간 증가하는 현상을 보였는데 50 μM 이상의 Ibu 농도에서 PPE 단독처리 시와 비교하여 유의적으로 독성이 증가하였다(Fig. 3C, D). 특히 50-200 μM의 Ibu를 24시간 PPE와 처리 시, 20-26%의 세포독성을 나타내면서 Ibu와 PPE에 의한 각각의 독성의 산술적 합보다는 높은 독성을 발현하였으나 48시간 처리시에는 단지 부가적인 효과만이 나타났다. 따라서 암세포에서 PPE의 세포독성 효과는 AAP, Asp 및 Ibu

에 의해 급격한 변화를 나타내지 않는 것으로 보인다.

H₂O₂조절에 의한 세포독성 변화

다양한 폴리페놀성 물질들은 항산화 활성을 나타내는 동시에 활성산소종을 생성함으로써 산화 촉진작용을 하는 것으로 알려졌고(20), 생성된 활성산소종은 세포의 사멸과 성장억제 또는 성장촉진에 관여하는 등 다양한 역할을 하는 것으로 보고되었다(21,22). PPE로부터 생성되는 활성산소종이 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위해, 항산화 효소 SOD를 첨가하여 PPE의 세포독성을 비교하였다. EGCG 등의 폴리페놀류에서 superoxide anion이 우선적으로 생성되고 이어 H₂O₂로 전환되는 것으로 알려졌으며, SOD는 EGCG에 의해 이미 생성된 활성산소종을 제거할 뿐만 아니라 superoxide anion에 의한 EGCG의 연쇄적 산화반응을 억제하여 활성산소종의 생성도 억제하는 것으로 보고된 바 있다(23). 배지상에 SOD 첨가 시 INT 407 세포에서 PPE의 세포독성이 약간 감소한 반면, HCT 116 세포에서는 현저하게 PPE의 독성이 약화되었다(Fig. 4A). 따라서 활성산소종에 민감한 HCT 116 세포에서 SOD 유무에 따른 PPE와 약물의 복합독성을 비교하였다. HCT 116 세포에서 SOD 존재 시 25 μg/mL PPE의 독성이 20% 이상 감소하였으나, 이 조건에서 200 μM의 Asp 또는 AAP와 같이 처리하였을 때 PPE의 독성에 변화는 나타나지 않았다(Fig. 4B). 또한 200 μM의 Ibu와 함께 처리하였을 때 PPE의 독성이 약 10% 증가하여 원래 Ibu가 가지는 독성이 PPE에 대해 부가효과만을 나타낸 것으로 보인다(Fig. 4B). 본 결과는 같이 처리

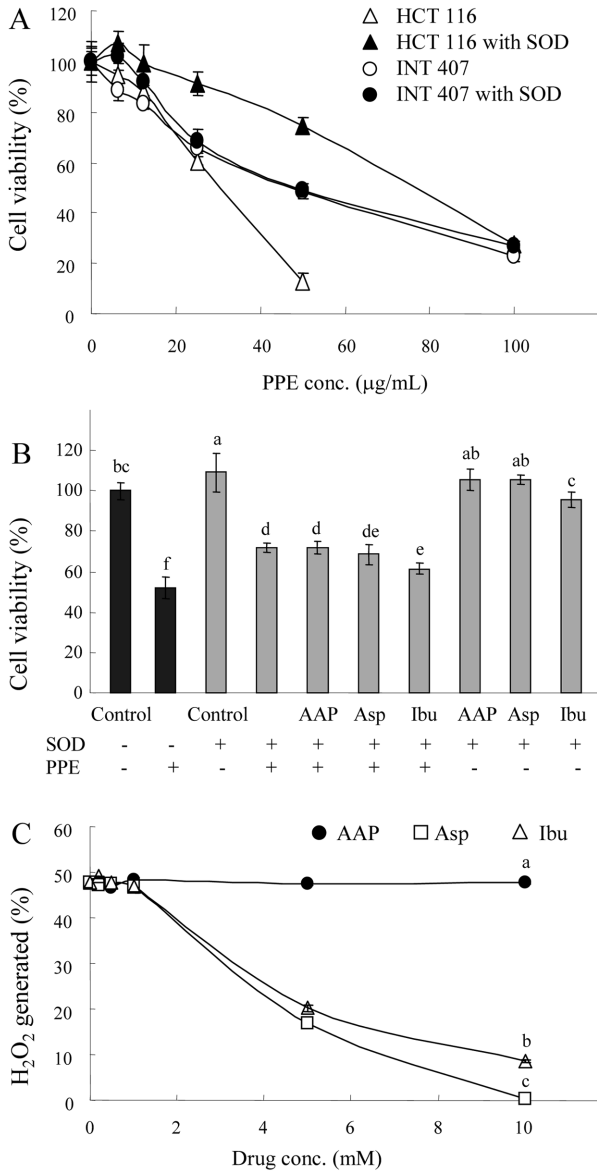


Fig. 4. Changes in PPE cytotoxicity by SOD, and generation of H₂O₂ from PPE. (A) Modulation of PPE cytotoxicity by SOD. (B) Evaluation of cytotoxic effects of PPE with the OTC drugs in the presence of SOD. (C) Generation of H₂O₂ from PPE. Cells were treated with different concentrations of PPE in the absence or presence of 15 U/mL SOD for 24 h (A). HCT 116 cells were also treated with PPE (25 µg/mL) and/or 200 µM each OTC drugs in the presence of SOD for 24 h (B). PPE (100 µg/mL) was incubated in PBS at 37°C in the presence of each OTC drug for 2h, and H₂O₂ level was analyzed using FOX assay. Each value represents the mean±SD (n=8 in the case of A and B, n=3-6 in the case of C). Different letters indicate a significant difference (*p*<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (B and C).

된 약물들이 PPE의 활성산소종 생성에 따른 세포독성 발현에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 하지만 Asp 등의 약물들은 항산화 효과를 가지고 있다고 보고된 바(24,25), PPE에 의한 실제 활성산소종 생성능과 이에 미치는 각 약물들의 소거활성을 PPE 또는 일반 의약품과 복합처리 하였을 때 생성되는 H₂O₂량으로 분석하였다. PPE 100 µg/mL을 2시간 동안 PBS에서 저장하였을 때 ~50 µM의 H₂O₂가 생성되었으며, AAP와 함께 저장 시

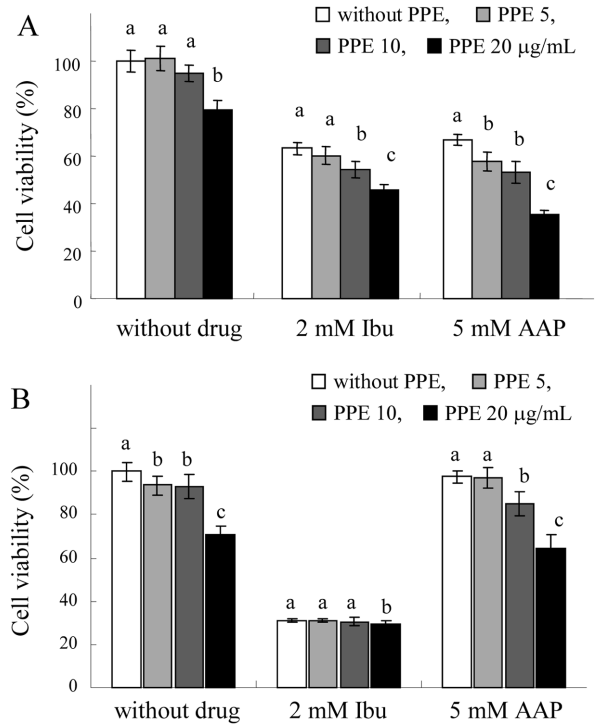


Fig. 5. Effects of PPE on viabilities of INT 407 (A) and HCT 116 (B) cells in the presence of OTC drugs. INT 407 or HCT 116 cells were incubated with different concentrations of PPE in the absence or presence of 2 mM Ibu or 5 mM AAP. After 24 h, viable cells were analyzed using MTT assay. Each value represents the mean±SD (n=8). Different letters indicate a significant difference (*p*<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

에는 10 mM 농도까지 PPE로부터의 H₂O₂ 생성에 영향을 주지 않았다(Fig. 4C). 하지만 5 mM 수준의 Asp 또는 Ibu의 존재 시 PPE로부터의 H₂O₂ 생성량이 50% 이상 감소하였으며, 10 mM Asp은 대부분의 H₂O₂를 소거하는 것으로 나타났다(Fig. 4C). 본 결과는 Asp과 Ibu와 같은 약물들이 PPE로부터 생성되는 H₂O₂를 감소시킬 수 있지만, mM 수준 이하에서는 H₂O₂의 생성에 거의 영향을 미치지 못하는 것으로 보아 Fig. 3과 Fig. 4B의 조건하에서 PPE에 의한 세포독성에도 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

고농도 약물독성에 대한 PPE의 영향

약물의 세포독성이 유발되는 mM 이상 농도의 Ibu 및 AAP와 PPE와 같이 처리하였을 때 세포독성의 변화를 INT 407 정상장관계 세포 및 HCT 116 대장암 세포 모델에서 비교 조사하였다. INT 407 세포에 대해 PPE는 10 µg/mL의 농도까지는 유의적인 세포독성을 나타내지 않았으며 20 µg/mL에서 20% 가량의 세포독성을 나타내었다(Fig. 5A). INT 407 세포에 2 mM Ibu를 24시간 처리하였을 때 63%의 세포생존율을 나타내었고, 여기에 5-20 µg/mL의 PPE를 처리한 결과 세포생존율은 45%까지 감소하였다(Fig. 5A). 한편 5 mM AAP를 24시간 처리시 66% 세포생존율을 보였으며, PPE를 10과 20 µg/mL 같이 처리하였을 때 세포생존율은 53 및 35%까지 감소하였다. 즉 INT 407 세포에 Ibu와 PPE의 혼합처리 시 각각의 단독 독성에 의한 추가적인 효과만 나타났으나 PPE는 AAP의 독성을 다소 강화시키는 것으로 나타났다(Fig. 5A). AAP의 독성에 비교적 민감하게 반응하는 정상장관계 INT 407 세포에서 PPE의 자극에 의해 독성이 강화되는 것으로

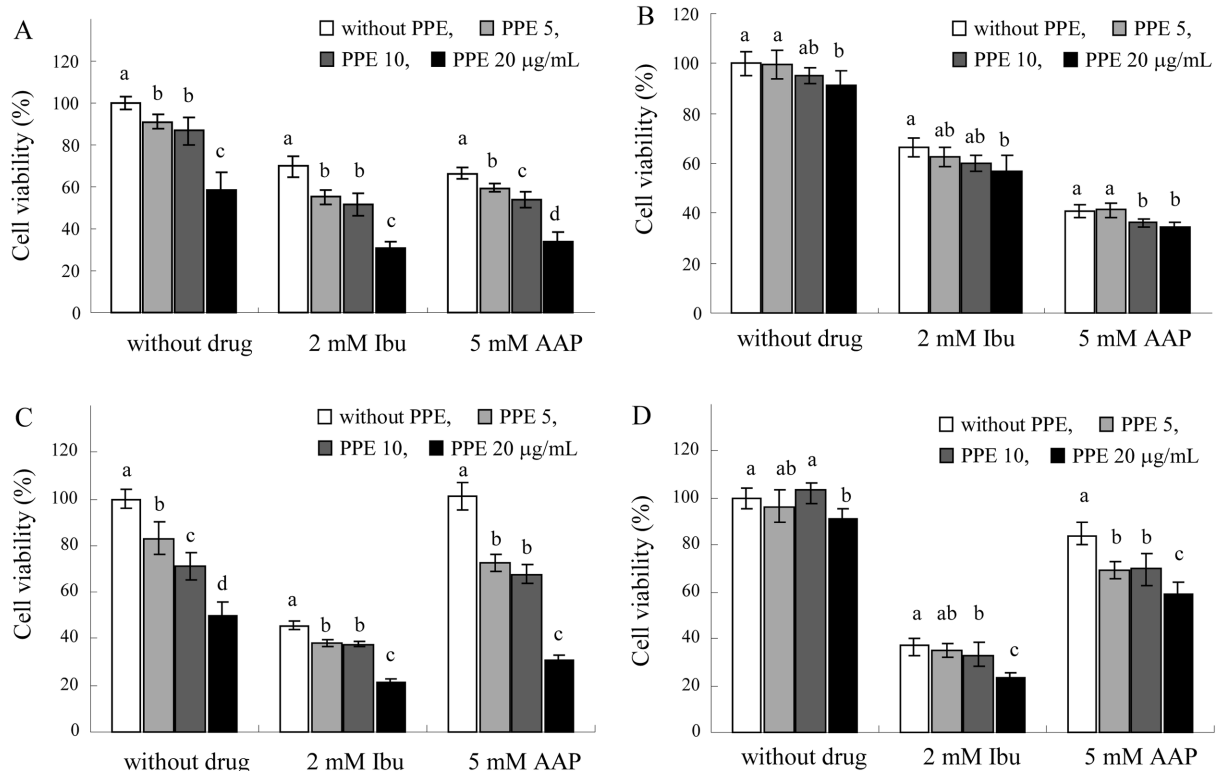


Fig. 6. Effects of PPE and the OTC drugs on cell viabilities by different sequence of treatment scheme. INT 407 (A) and HCT 116 (C) cells were incubated with vehicle (0.1% DMSO) or PPE (5, 10 or 20 µg/mL) for 24 h, the medium was then replaced by one containing vehicle, 2 mM of Ibu, or 5 mM of Ibu, and the cells were further incubated for 24 h. INT 407 (B) and HCT 116 (D) cells were also treated with Ibu or AAP first for 24 h, and the treatment was replaced with or without PPE for further 24 h. Each value represents the mean±SD (n=8). Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

보이며, 자세한 기작에 대한 추후 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

한편 PPE는 대장암 HCT 116 세포에 INT 407 세포보다 더 강한 독성을 나타내어 20 µg/mL 농도로 24시간 처리하였을 때 ~30%의 세포가 사멸하였으며, 2 mM Ibu에 의해서도 ~69%의 세포가 사멸하였다. PPE와 Ibu를 24시간 동안 복합 처리 시 PPE에 의해 Ibu의 독성이 거의 증가하지 않았으며(Fig. 4B), PPE와 5 mM AAP를 복합 처리 하였을 때 두 물질의 각각의 독성에 대한 부가적 효과 이상의 뚜렷한 활성의 감소나 증가현상이 나타나지 않았다. 기존 보고에 의하면 AAP는 대사를 통하여 독성 대사물인 *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine을 생성하고 이는 GSH와 결합하여 해독되지만, 고농도의 약물 투여 시에는 세포 내 GSH의 고갈을 초래할 수 있다(7,8). 한편, EGCG를 비롯한 폴리페놀류의 세포 내 GSH 영향에 대한 상반된 보고가 있는데(26), 이들에 의한 세포 내 GSH의 감소 또는 증가가 약물 독성의 변화에 영향을 미칠 수 있으며 이는 세포 내 redox status 등의 환경에 따라 다양하게 영향받을 수 있을 것으로 사료된다.

처리순서 변화에 의한 세포독성 변화

약물들과 폴리페놀성 물질들이 동시에 섭취되어 상호작용을 할 수도 있지만, 식이 중 함유된 페놀성 물질의 섭취 전후에 약물의 복용도 빈번하게 발생한다. 따라서 본 실험에서는 약물 처리 후 PPE에 대한 반응 및 PPE 처리 후 약물에 대한 반응을 세포에 처리순서를 달리하여 적용한 후, 세포독성 변화를 조사하였다. PPE 선처리 실험으로 INT 407과 HCT 116 세포에 각각 PPE를 24시간 동안 처리한 후, 2 mM Ibu 또는 5 mM AAP가 함유된 배

지로 교체하고 24시간 더 처리하였고, 약물 선처리의 경우 위와 동일농도의 약물을 24시간 처리 후 각 농도의 PPE 함유 배지로 교체하여 24시간 더 처리하였다(Fig. 6). 이 조건에서 역시 INT 407 세포보다 HCT 116 세포에서 PPE에 의한 독성이 현저히 두드러졌으며, 특히 PPE 선처리구에서 더 강한 독성이 발현되었다. INT 407 세포에서는 처리 순서에 따른 대부분 경우에서 약물 및 PPE에 의한 독성의 현저한 감소나 증가현상이 나타나지 않았으나(Fig. 6A, B), HCT 116 세포에 PPE를 선처리하고 이어 AAP를 처리한 경우 단독처리구에 비해 독성이 5-20%정도 증가하였다(Fig. 6C). 또한 HCT 116 세포에 AAP 선처리한 경우에서도 AAP의 단독처리구에 비해 이어 PPE를 처리한 세포에서 10-15% 세포독성 증가현상이 나타났다(Fig. 6D), 이러한 현상은 PPE와 약물이 서로 다른 세포 내 타겟에 순차적으로 작용하여 독성이 증대되었거나, 또는 전후 처리로 인해 실제 처리기간이 연장됨에 따라 24시간에 관찰되지 않은 현상이 현저하게 드러나는 등의 여러 원인이 작용하였을 것으로 사료된다. 이상의 결과는 녹차의 폴리페놀 성분과 일반 의약품 AAP, Asp 및 Ibu를 여러 조합에 의해 장관계 세포에 처리하였을 때 일부 독성의 강화현상이 관찰되었으나 최대 20%이내의 수준이었으며 그 이상의 두드러진 독성의 발현이나 감소는 나타나지 않았음을 보여준다. 본 연구는 식이 중에 보편적으로 포함되는 폴리페놀 성분과 빈번히 복용되는 일반 의약품 성분간의 상호작용에 대한 기초 자료를 제공하기 위한 목적으로 진행되었으며, 향후 세포독성 이상의 흡수 및 대사 등에 관련된 기작적 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 녹차의 주요 생리활성 성분인 PPE와 일반 의약품 성분 AAP, Asp 및 Ibu와의 혼용 시 일어날 수 있는 상호작용에 의한 세포독성 변화를 장관계 정상세포와 암세포 모델에서 비교하였다. PPE는 정상 장관계 세포 INT 407 및 대장암 세포 HCT 116에 농도의존적인 독성을 나타내었고, IC₅₀ 수치는 각각 29.9과 57.4 µg/mL로써 암세포에 더욱 강력한 독성을 보였다. PPE와 200 µM 이하의 저농도 약물을 HCT 116 세포에 24, 48시간 복합 투여한 결과 전체적으로 현저한 독성의 변화현상은 발생하지 않았다. HCT 116 세포에서 항산화효소 SOD 존재 시에 PPE 독성의 유의적인 감소가 관찰되었으나, 이 조건에서도 약물에 의한 유의적인 변화는 나타나지 않았다. PPE로부터 생성되는 H₂O₂의 양은 5 mM 이상의 Asp 또는 Ibu에 의하여 감소하였고, AAP에는 영향을 받지 않았다. INT 407 세포와 HCT 116 세포에서 mM 이상의 고농도 약물과 PPE를 복합 처리하여 세포독성 변화를 본 결과 현저한 독성의 변화가 관찰되지 않았으나, INT 407 세포에서 PPE 존재 시 AAP의 독성이 다소 증가하였다. 한편 PPE와 약물을 각각 순서를 달리하여 전후로 처리하였을 때 HCT 116 세포에서의 독성이 단독처리 시 각각의 합보다 20% 이내에서 증가하였다. PPE와 빈번히 복용되는 일반 의약품 AAP, Asp 및 Ibu를 여러 조합에 의해 장관계 세포에 처리하였을 때 이들의 상호작용에 의해 일부 독성의 강화현상이 나타났으나 전체적으로 두드러진 독성발현 및 활성변화는 발견되지 않았다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 기초연구사업 연구비 지원(과제번호: 2008-0059613)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Valcic S, Timmermann BN, Alberts DS, Wächter GA, Krutzsch M, Wymer J, Guillén JM. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. *Colloq. Inse.* 7: 461-468 (1996)
2. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. Food Sci.* 43: 89-143 (2003)
3. Hong J, Smith TJ, Ho CT, August DA, Yang CS. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase-and lipoxigenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochem. Pharmacol.* 62: 1175-1183 (2001)
4. Chow HHS, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Tome ME, Ranger-Moore J, Cordova CA, Mikhael DM, Briehl MM, Alberts DS. Modulation of human glutathione s-transferases by polyphenone intervention. *Cancer Epidem. Biomar.* 16: 1662-1666 (2007)
5. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, Schiodt FV, Ostapowicz G, Shakil AO. Acetaminophen-induced acute liver failure: Results of a united states multicenter, prospective study. *Hepatology* 42: 1364-1372 (2005)
6. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 31: 1499-1506 (2003)
7. Mitchell J, Jollow D, Potter W, Davis D, Gillette J, Brodie B.

- Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. role of drug metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187: 185-194 (1973)
8. Jollow D, Mitchell J, Potter W, Davis D, Gillette J, Brodie B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. role of covalent binding *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187: 195-202 (1973)
9. Vane DSc JR. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* 104: 2S-8S (1998)
10. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 252-266 (2002)
11. Genser D. Food and drug interaction: consequences for the nutrition/health Status. *Ann. Nutr. Metab.* 52: 29-32 (2008)
12. Whitcomb DC, Block GD. Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. *J. Am. Med. Assoc.* 272: 1845-1850 (1994)
13. Dai Y, Cederbaum AI. Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P4502E1-transfected HepG2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273: 1497-1505 (1995)
14. Waslidge NB, Hayes DJ. A colorimetric method for the determination of lipoxigenase activity suitable for use in a high throughput assay format. *Anal. Biochem.* 231: 354-358 (1995)
15. Chung JH, Han JH, Hwang EJ, Seo JY, Cho KH, Kim KH, Youn JI, Eun HC. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *FASEB. J.* 17: 1913-1915 (2003)
16. Uesato S, Kitagawa Y, Kamishimoto M, Kumagai A, Hori H, Nagasawa H. Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. *Cancer Lett.* 170: 41-44 (2001)
17. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: Formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidem. Biomar.* 11: 1025-1032 (2002)
18. Koo MWL, Cho CH. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *Eur. J. Pharmacol.* 500: 177-185 (2004)
19. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-716 (1998)
20. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177: 91-104 (2002)
21. Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307: 230-236 (2003)
22. Nemeikaitė-Ėėnienė A, Marozienė A, Vidpiūnaitė R, Ėėnas N. Prooxidant cytotoxicity, apoptosis induction, and protective effects of polyphenolic antioxidants. *Chem. Technol.* 3: 12-15 (2009)
23. Yamamoto T, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Ueta E, Osaki T, Athar M, Schuster G. Roles of catalase and hydrogen peroxide in green tea polyphenol-induced chemopreventive effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308: 317-323 (2004)
24. Maharaj D, Saravanan K, Maharaj H, Mohanakumar K, Daya S. Acetaminophen and aspirin inhibit superoxide anion generation and lipid peroxidation, and protect against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. *Neurochem. Int.* 44: 355-360 (2004)
25. Prasad K, Lee P. Suppression of oxidative stress as a mechanism of reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by aspirin. *J. Cardiovasc. Pharm.* 8: 61-69 (2003)
26. Ahmed I, John A, Vijayasathy C, Robin M, Raza H. Differential modulation of growth and glutathione metabolism in cultured rat astrocytes by 4-hydroxynonenal and green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Neurotoxicology* 23: 289-300 (2002)