

하인두 편평세포암주의 증식과 침습을 유도하는 간세포성장인자에 대한 녹차추출물 억제효과

아주대학교 의과대학 이비인후과학교실,¹ 가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실²
김철호¹ · 임혜진¹ · 강성운¹ · 이하늘¹ · 황혜숙¹ · 윤용로¹ · 김동현²

Green Tea Extracts Inhibits HGF-Induced HNSCC Progression in vitro

Chul-Ho Kim, MD, PhD¹, Hae Jin Lim, MS¹, Sung Un Kang¹, Ha Neul Lee¹,
Hye Sook Hwang, MS¹, Yong Ro Yoon, MD¹ and Dong Hyun Kim, MD²

¹Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon; and

²Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Aberrant activation of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor, c-Met, has been known to be involved in many human cancer development and progression. During the search for an effective molecule inhibitor of HGF/c-Met signaling, we have found that Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in green tea might inhibit HGF/c-Met signaling. Studies were performed to address whether EGCG inhibited HGF-dependent tumor proliferation and invasion in HNSCC. **Materials and Method** : For EGCG inhibition of HGF/c-Met signaling, Western blot was performed. The proliferation of FaDu cells was assayed by counting the number of the cells after treatment by HGF 0, 10 ng/ml, EGCG 1 μ M, EGCG 10 μ M, HGF 10+EGCG 1 μ M, HGF 10+EGCG 10 μ M. The dispersion of cells was observed by measuring the separation and morphologic changes of the cells after treatment with HGF 0, 10 ng/ml HGF 10+EGCG 1 μ M, HGF 10+EGCG 10 μ M for 24 hours. Tumor cell migration was assessed by wound healing assay and tumor cell invasiveness was assessed by the membrane invasion assay. **Results** : HGF treatment induced rapid activation of c-Met and EGCG inhibited HGF-induced c-Met signaling in FaDu cells. HGF significantly enhanced the growth of HNSCC cells and this phenomenon was inhibited by EGCG in a dose-dependant manner ($p < 0.05$). EGCG inhibited HGF-induced scattering, migration, and invasion of HNSCC cells in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). **Conclusion** : Inhibition of HGF/Met by EGCG leads to decreased proliferation, scattering, migration and invasion in vitro, suggesting the possible use of EGCG in HNSCC associated with down-regulation of HGF/Met signaling. (Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2008;51:163-70)

KEY WORDS : Hepatocyte growth factor · c-Met · Hypopharyngeal cancer · Epigallocatechin-3-gallate (EGCG).

서 론

구강, 구인두, 하인두 및 후두를 포함하는 두경부암은 선진국에서 남자에서는 6번째로 흔한 암이다.¹⁾ 최근 수십 년간 많은 진단과 치료기술의 발달로 기능적인 치료와 제한적으로나마 치료율의 향상은 있었지만 두경부 편평세포암의 5년 생존율은 50%를 맴돌고 있다. 특히 하인두암은 공격적인 침습,

경부전이, 원격전이와 이차암이 특징이라 할 수 있는데 두경부암 중 가장 예후가 나빠 5년 생존율이 30% 전후에 이르며 다양한 연구와 치료에도 불구하고 지난 20년간 생존율이 크게 변하지 못한 상태이다. 최근에는 이러한 두경부암을 분자생물학적인 접근을 통해 치료율을 높이려는 시도가 많아지고, 암의 증식, 전이와 세포사멸과 관련된 표적치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 암을 억제할 수 있는 물질로 식물, 해양 등에서 유래한 천연추출물 혹은 항산화제를 등을 이용한 항암연구가 활발하게 진행되고 있다. 암의 증식과 전이 등 암의 진행에 관여하는 중요한 인자로 최근 다양한 암종에서 연구가 되는 것 중 하나가 간세포성장인자(hepatocyte growth factor, HGF)이다. 기질의 섬유아세포에서 분

논문접수일 : 2007년 6월 3일 / 심사완료일 : 2007년 9월 5일
교신저자 : 김철호, 442-721 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5
아주대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (031) 219-5269 · 전송 : (031) 219-5264
E-mail : ostium@ajou.ac.kr

비되어 종양세포의 성장과 이동을 촉진하고 혈관형성에 관여하는 인자로 알려진 HGF는 최초 발견 시에는 간세포의 증식을 촉진하는 인자로 알려졌으나,²⁾ 이후에는 간세포뿐만 아니라 위장관 상피세포, 각질세포 등을 위시한 여러 상피세포의 증식을 촉진하는 능력이 있음이 알려졌으며, 일부 암세포에 있어서는 protease의 분비를 통해 종양의 활동(motility)과 침습(invasiveness)을 일으키고 형질생성(morphogenesis)과 신생혈관의 생성(angiogenesis)에 관여한다고 알려지게 되었다.^{3,4)} HGF에 대한 수용체인 c-Met는 c-met protooncogene의 산물이며 190 kDa의 receptor tyrosine kinase로서 170 kDa의 전구물질이 glycosylation 과정을 거쳐 완성된 단백질로 세포외(extracellular)의 50 kDa α -subunit과 경세포막(transmembrane) 형태로 존재하여 tyrosine phosphorylation이 일어나는 145 kDa의 β -subunit로 구성되어 있다.³⁾ 이 protooncogene은 위장관암, 폐암, 췌장암, 백혈병, 유방암 등 다양한 암종에서 과표현됨이 알려져 있다.³⁾ 본 저자는 기존의 연구에서 하인두암에서의 HGF와 c-Met의 높은 발현을 확인하였고 이러한 발현은 하인두암의 전이와 병기가 증가됨에 따라 통계적으로 유의하게 증가됨을 보고한 바 있다. 또한 HGF가 하인두암 세포주(FaDu)의 증식, 분산과 이동을 증가시키고 FaDu에서 분비되는 HGF 분비유도물질에 의해 섬유아세포에서의 HGF 분비가 유의하게 증가됨을 보고한 바 있다.

한편 천연추출물로 강한 항산화효과를 보이는 녹차의 polyphenol은 다양한 연구에서 암예방효과와 항암효과가 있다고 보고되고 있다.^{4,5)} 녹차에서 확인되는 catechin은 크게 네 가지로 (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG), (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin(EGC)와 (-)-epicatechin-3-gallate(ECG)로 구성되어 있다. 이 중 EGCG가 가장 큰 비중(60%)을 차지하고 가장 강력하고 주된 polyphenol로 알려져 있다. 많은 연구에서 EGCG가 다양한 암세포주에서 세포사멸을 유도하고 종양의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ EGCG는 JNK, AP-1, p44/p42 MAPK, Erk1/2, EGF-R, PDGF-R과 FGF-R 등의 다양한 세포전달기전과 kinase를 억제하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 또한 DNA methyltransferase, topoisomerase I, matrix metalloproteinase 등의 암과 관련된 단백질을 억제하는 것으로 알려져 있다.⁶⁻⁸⁾

본 연구는 두경부 암에서의 녹차추출물의 HGF 억제에 관한 연구가 없는 바 녹차추출물인 EGCG가 하인두암 세포주(FaDu)에서 HGF에 의해 유도되는 c-Met 활성을 억제하는지와 HGF에 의해 유도되는 증식, 분산, 이동과 침습에 어떠한 영향을 주는지를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양

American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 구입한 하인두암 세포주 FaDu(HTB-43, ATCC)를 EMEM(10% FBS) 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

실험에 사용한 항체

HGF에 대한 일차항체는 human 항 HGF affinity purified polyclonal goat antibody(R & D systems, Inc, MN, USA)를 사용하였고 c-Met에 대한 일차 항체는 human 항 HGF receptor(c-Met) polyclonal goat antibody(R & D system)를 사용하였다.

RT-PCR에 의한 HGF와 c-Met의 mRNA 측정

하인두암 세포주 1 ml의 TRIzol®(GIBCOBRL, Grand Island, NY, USA) 시약에 균질화시킨 후, 총 RNA를 추출하였다. 하인두암 세포주에서 추출된 총 RNA 2 μ g을 각각 Omniscript Reverse Transcriptase kit(20511, Qiagen Germany)의 반응혼합물(10 \times Buffer RT 2.0 μ l, dNTP Mix(5 mM each dNTP) 2.0 μ l, Oligo-dT primer(10 μ M) 2.0 μ l, RNase inhibitor(10 units/ μ l) 1.0 μ l, Omniscript Reverse Transcriptase 2 units, RNase-free water) 20 μ l에 넣고 37°C에서 60분, 94°C에서 5분간 역전사하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 Minicycler™(MJ research, USA)를 사용하였고 합성된 cDNA를 Taq DNA polymerase 1 unit(Roche Diagnostics Co, Indianapolis, USA)과 각각의 primer를 넣어 증폭시켰다. 이 실험에서 사용된 human HGF primer와 human c-Met primer의 염기배열 순서는 다음과 같다.

Human HGF ;

Sense : 5'-ACA TCG TCA CTT CTG GC-3'
Antisense : 5'-ATC CAT CCT ATG TTT GTT CG-3'

Human c-Met ;

Sense : 5'-AGT AGC CTG ATT GTG CAT TT-3'
Antisense : 5'-TCT TTC ATG ATG CCC TC-3'

β -Actin ;

Sense : 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC TT-3'
Antisense : 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3'

PCR 과정은 초기 변성을 96°C에서 3분간 실시한 후, 96°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간 총 30 cycles을 실시하고 신전(extension)은 72°C에서 5분간 시행하였다.

Western blotting을 이용한 c-Met의 발현 검색

하인두암 세포주를 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 다음 단백질을 분해 억제제(100 $\mu\text{g/ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin)가 첨가된 RIPA(RadioImmunoPrecipitation) buffer 1 ml(150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris(pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5% Deoxycholate)에 넣고 균질화하였다. 이 균질액을 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 Western blot analysis에 이용하였는데 단백질의 양은 Bio-Rad protein assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. Well당 20 μg 의 단백질을 분리하기 위해 sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 사용하여 분리한 후 nitrocellulose filter(Amersham, Arlington Heights, IL, USA)에 옮긴 다음 4°C에서 하룻밤 동안 항 c-Met항체를 반응시켰다. 다음 날 filter를 0.1% Tween-20이 함유된 Tris buffered saline(TBS) 용액으로 세척한 후 peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody(Amersham)와 donkey anti-mouse antibody(Amersham)로 각각 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence detection system(ECL, Amersham)을 이용하여 X-ray film으로 확인하였다. HGF에 의해 FaDu cell에서 phosphor-c-Met의 발현이 time sequential하게 증가되는 것과 EGCG의 양이 증가함에 따라 HGF에 의해 activation된 form인 phosphor-c-Met의 발현이 억제되는 것을 Western blot으로 확인하였다.

MTT assay

96 well plate에 FaDu를 well당 2×10^3 cells로 seeding을 한 뒤 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2일간 배양한다. EGCG를 0, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 150, 200 μM 로 각 sample당 5번의 실험이 되도록 한 뒤 incubator에서 16시간 배양한다. Well당 1 mg/ml의 MTT solution으로 처리한 뒤 4시간 incubator에서 배양한 뒤 well당 100 μl DMSO로 formazan을 용해시킨 뒤, 540 nm에서 용해된 formazan의 optical density를 측정한다.

종양세포의 증식 분석(Proliferative assay)

EGCG의 HGF 억제 효과를 평가하기 위해 HGF 0, 10 ng/ml로 처리한 FaDu 세포(1×10^5 /well)에 EGCG(1, 10 μM)

로 처리한 뒤 5일까지 배양하고 1, 3, 5일의 증식상태를 haemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였고 이때에 배지를 갈아주었다. 이를 5회 반복하여 HGF의 양에 따른 차이를 통계적으로 분석하였다.

종양세포의 분산성(Colony dispersion) 분석

EGCG의 효과를 평가하기 위해 HGF 0, 10 ng/ml로 처리한 FaDu 세포에 EGCG(1, 10 μM)로 처리한 뒤 12 well plate에 well당 3×10^5 의 세포를 넣었다. 성장 인자와 혈청이 없는 배지에서 48시간 배양한 뒤 16세포 이상의 군락(colony)이 형성되었을 때 실험을 시행하였다. Mitomycin C(8 $\mu\text{g/ml}$)를 30분간 전처리한 뒤 HGF 0, 10 ng/ml로 처리한 FaDu 세포에 EGCG(1, 10 μM)로 처리한 뒤 시간대별(6시간, 12시간, 18시간, 24시간)로 세포의 분산성을 현미경을 통해 관찰하였다.

Wound healing assay을 통한 종양세포의 이동성 분석

FaDu 세포를 24 well plate에 1×10^6 개씩 접종한 후 성장 인자와 혈청이 없는 배지에서 48시간 동안 배양하여 세포가 plate에 포화된(90% 이상) 상태가 되도록 하였다. Blue tip을 이용하여 dish 바닥을 십자로 그어 균일한 너비로 injury line을 만들었다. PBS로 세포가 바닥에서 떨어지지 않도록 하면서 세척한 뒤 PBS를 제거한 후에 배지를 천천히 넣고 HGF 0, 10 ng/ml로 처리한 FaDu 세포에 EGCG(1, 10 μM)로 처리하였다. Wound healing assay는 현미경 배율 $\times 100$ 으로 시간대별(4, 8, 12, 24, 36, 48시간)로 사진을 찍어 비교하였고 현미경내에 내장된 컴퓨터 프로그램에 의해 측정된 두 양단 간의 거리를 통계적으로 처리하였다.

종양세포의 침습성 분석

종양세포의 침습성을 분석하기 위해 Transwell chamber(Costar)를 사용하였다. 먼저 polyethylene filter(8 μm pore-sized)의 윗면에 EMEM 100 μl 에 녹인 type I collagen(6 $\mu\text{g/filter}$)을 부은 후 하룻밤 동안 laminar flow hood에서 coating시켰다. 하부 well에 0.5% FBS medium 500 μl 를 넣은 후 EGCG의 효과를 평가하기 위해 HGF 0, 10 ng/ml로 처리한 FaDu 세포에 EGCG(1, 10 μM)로 처리한 well을 각각 만들었다. Mitomycin C(8 $\mu\text{g/ml}$)를 30분간 전처리한 뒤 상부 well의 filter 위에 10^5 cells(in 100 μl of growth medium)를 부착하였다(Fig. 1). 이 chamber를 37°C, 5% CO₂에서 48시간 배양한 다음 상부 well의 filter를 제거하고 pore를 통과하여 아랫면에 부착된 세포를 hematoxylin으로 염색한 후 광학 현미경을 통하여 그 숫자를 세었다.

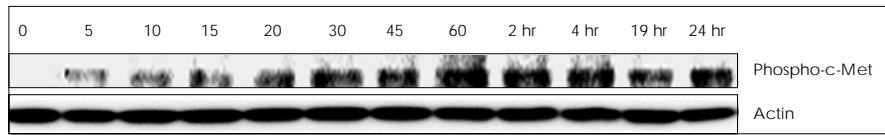


Fig. 1. FaDu cells are responsive to HGF induced Met activation. 3×10^4 FaDu cells were serum starved for 4–5 h and treated with or without (–) 10 ng/ml HGF for the indicated times in serum-free media. Protein lysates were taken with boiling laemmli buffer. Protein (10 μ l) was loaded per well for Western blot analysis and probed with phospho-c-Met antibody. HGF treatment induced rapid activation of the HGF receptor, c-Met which is sustained up to approximately 24 hour. The experiment was performed three times and a representative experiment is shown.

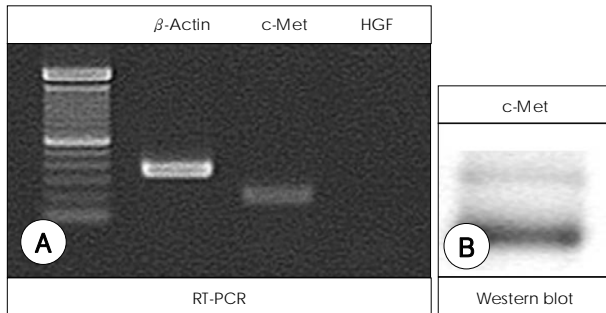


Fig. 2. Analysis of expression of c-Met and HGF in the FaDu cell line. A : The expression of c-Met mRNA was measured by RT-PCR in the hypopharyngeal cancer line FaDu. B : Detection of the c-Met protein in FaDu cells by Western blotting. HGF was not detected by either RT-PCR or Western blot analysis.

통계적 분석

증식분석, wound healing assay와 침습분석은 SPSS(version 12)을 이용하여 t-test를 시행하였고, 통계는 *p* 값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의있는 것으로 판정하였다.

결 과

하인두암 세포주에서의 RT-PCR과 Western blotting

하인두암 세포주를 이용한 RT-PCR의 결과 HGF의 발현은 없었으나 c-Met의 발현은 강하게 나타났고 Western blotting상 c-Met의 강한 발현이 확인되었다(Fig. 2). EGCG에 의한 HGF 억제효과를 보기 위해 시행한 Western blotting에서, HGF에 의해 FaDu cell에서 phosphor-c-Met의 발현이 time sequential하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

EGCG의 양이 증가함에 따라 HGF에 의해 activation된 form인 phosphor-c-Met의 발현이 억제되는 것을 Western blot으로 확인할 수 있었는데, EGCG의 양이 0.625 μ M 이상에서는 활성화된 c-Met이 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

MTT assay

하인두암 세포주에서 EGCG를 농도에 따라 처리하였을

때, EGCG의 5 μ M의 초기용량부터 세포의 증식이 확연하게 억제되어 40 μ M에서 200 μ M까지 plateau를 이루는 양상으로 나타났으며 40 μ M에서 대조군에 비해 세포의 증식이 약 70% 억제되는 양상을 보였다(Fig. 4).

EGCG에 의한 간세포성장인자의 증식유도 억제

Haemocytometer를 이용하여 증식도를 평가하여 본 결과 10 ng/ml 농도의 HGF로 자극을 준 경우 대조군에 비해 5 일째 40.54%의 상승을 보였고 통계적으로 유의한 세포증식을 보였다(*p*<0.05). EGCG를 처리한 군에서는 대조군과 HGF 처리군과 통계적으로 유의하게 FaDu가 억제되는 것을 확인할 수 있었으며 EGCG의 농도에 따라서 EGCG 1 μ M를 처리한 군보다 10 μ M을 처리한 군에서 FaDu의 증식이 억제됨을 확인할 수 있었는데 이는 통계적으로 유의하였다(*p*<0.05) (Fig. 5).

EGCG에 의한 간세포성장인자의 분산유도 억제

HGF에 의한 하인두암의 군락의 분산성 실험에서 24시간대에서 10 ng/ml의 HGF 자극에서 분산되었던 FaDu가 EGCG에 의해 확연하게 분산이 억제되고 있음을 알 수 있었으며, EGCG 1 μ M를 처리한 군보다 10 μ M을 처리한 군에서 FaDu의 분산이 확연히 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6). Fig. 4에서 보여주듯이 EGCG를 처리하였을 때 세포사멸이 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

EGCG에 의한 간세포성장인자의 Wound healing 유도 억제

Wound healing test를 통해 확인한 세포의 이동과 증식에 관한 검사에서는 HGF 10 ng/ml로 처리한 군에서 가장 왕성한 이동과 증식이 확인되어 wound 양단 간의 간격이 가장 좁았으며 아무런 처리를 하지 않은 대조군이 EGCG를 사용한 군보다 wound 양단 간의 간격이 좁았다. 이러한 현상을 통계적으로 처리했을 때 48시간대에는 대조군에 비해 HGF 10 ng/ml를 처리한 군에서 통계적 유의성이 있게 양단 간의 간격이 좁아진 양상을 보였으며 EGCG를 처리한 군이 대조군에 비해 양단 간의 간격이 통계적으로 유의하게 넓게 나타났다(*p*<0.05) (Fig. 7). 또한 EGCG 1 μ M를 처리한 군보

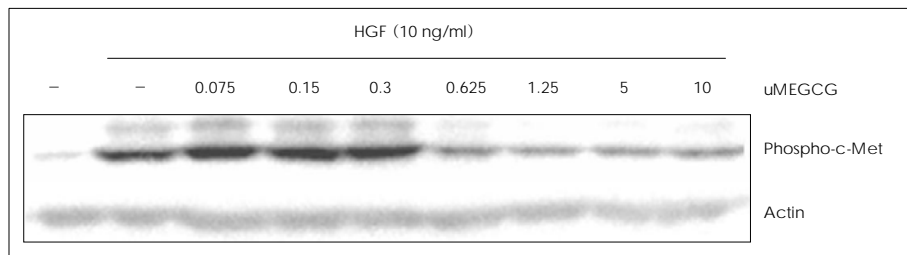


Fig. 3. EGCG inhibits HGF-induced c-Met signaling in FaDu cells. 3×10^4 FaDu cells were serum starved for 4–5 h and pretreated with the indicated concentrations of EGCG alone for 0.5 hour. The media was removed and the cells were treated with (+) or without 10 ng/ml HGF (-), with and without the presence of the indicated concentrations of EGCG for 15 min. Protein lysates were taken with boiling laemmli buffer. Protein (10 μ l) was loaded per well for Western blot analysis and probed with c-Met. Treatment with 0.625 μ M EGCG inhibits HGF-induced c-Met phosphorylation.

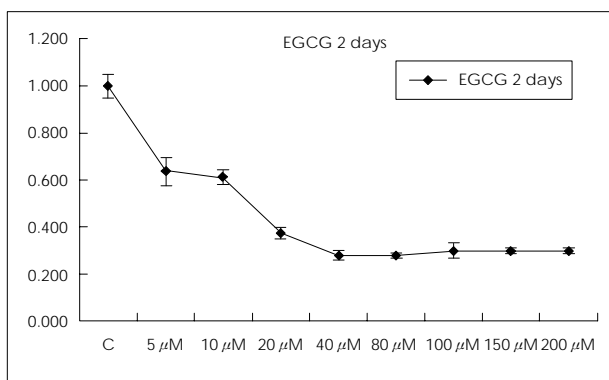


Fig. 4. MTT assay. 2-day cytotoxicity of EGCG towards proliferation of FaDu cells. Cell viability assays were done using the MTT assay system.

다 10 μ M을 처리한 군에서 FaDu의 이동이 확연히 억제됨을 확인할 수 있었다.

EGCG에 의한 간세포성자인의 종양세포의 침습유도 억제

Transwell chamber에 type I collagen을 coating하고 시행한 침습 검사에서 대조군이 평균 51.4개인데 반해 HGF 10 ng/ml인 경우 평균 157.2개였고 HGF 10 ng/ml+ EGCG 1 μ M인 경우 58.6개이고, HGF 10 ng/ml+ EGCG 10 μ M로 처리한 경우 25.4개였다. HGF만 처리한 군이 대조군에 비해 Transwell chamber를 통과한 수가 통계적으로 유의하게 많았고($p < 0.05$), HGF 10 ng/ml+ EGCG 1 μ M인 경우가 대조군에 비해 약간 증가되었으나 통계적 유의성은 없었다($p = 0.425$). HGF 10 ng/ml+ EGCG 10 μ M인 경우에는 대조군과 HGF 10 ng/ml+ EGCG 1 μ M 처리군보다 종양의 침습이 억제되었으며, 통계적 유의성이 있는 차이를 보였다($p = 0.005$) (Fig. 8).

고 찰

항암물질로서 식물의 polyphenol에 대한 연구는 최근에 꾸준히 증가되고 있다. 이를 통해 이미 다양한 실험조건에서

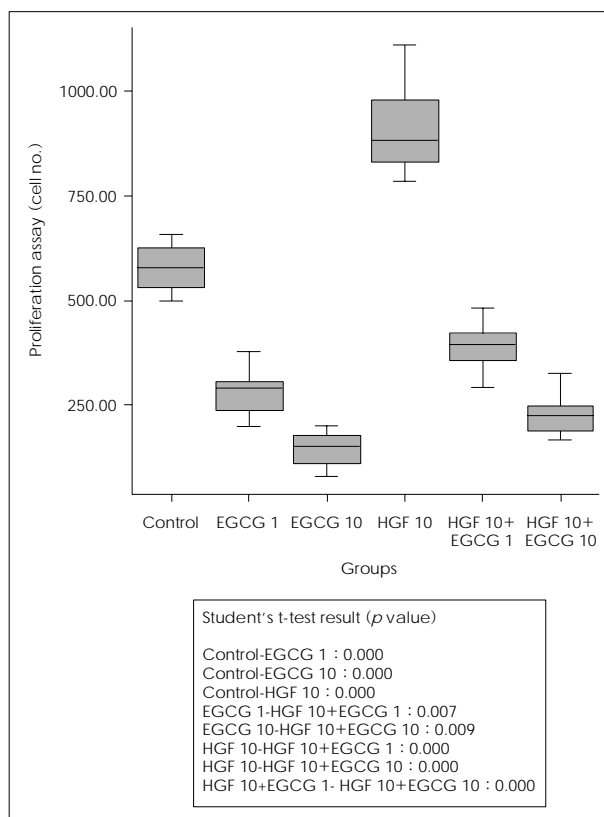


Fig. 5. Proliferation assay. Proliferative assay of FaDu cells after treatment with HGF for 5 days. Exogenous HGF significantly enhanced the growth of FaDu and EGCG inhibited HGF-induced proliferation of hypopharyngeal cancer cells in dose-dependent. * : $p < 0.05$ calculated by t-test.

in vitro와 in vivo 모두 강력한 항암효과가 있고 다양한 신호전달경로를 통해 암의 성장과 세포사멸을 조절하고 있음이 밝혀지고 있다.

더욱이 흥미로운 것은 여러가지 역학연구를 통해 이러한 polyphenol이 암의 치료적인 역할뿐 아니라 예방적인 측면에서도 효과가 좋다는 것이다. 이러한 연구 중에는 소변에서 차의 polyphenol 수치가 위암발병과 반비례한다거나, 차 소비가 많은 사람에서 대장암의 빈도가 적다는지, 하루에 녹차를

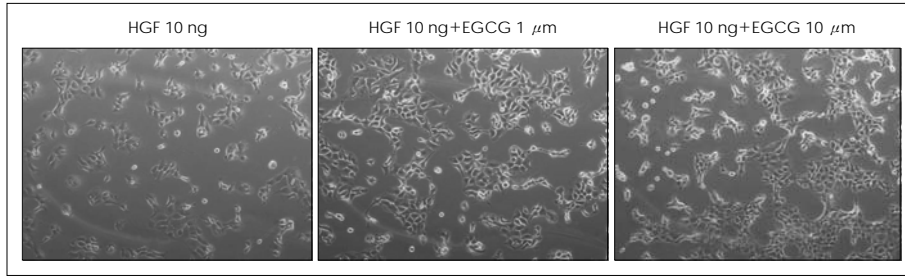


Fig. 6. Scattering assay. Colony dispersion assay of FaDu cells after treatment of HGF 10 ng, HGF 10 ng+EGCG 1 μM, and HGF 10 ng+ EGCG 10 μM. HGF stimulated dispersion of cancer cells but EGCG inhibited HGF-induced scattering of hypopharyngeal cancer cells in dose-dependant. FaDu cells were maintained in serum-free medium containing 0.1% BSA for 48 hours prior to the treatment with HGF (10 ng/ml) for 24 hours.

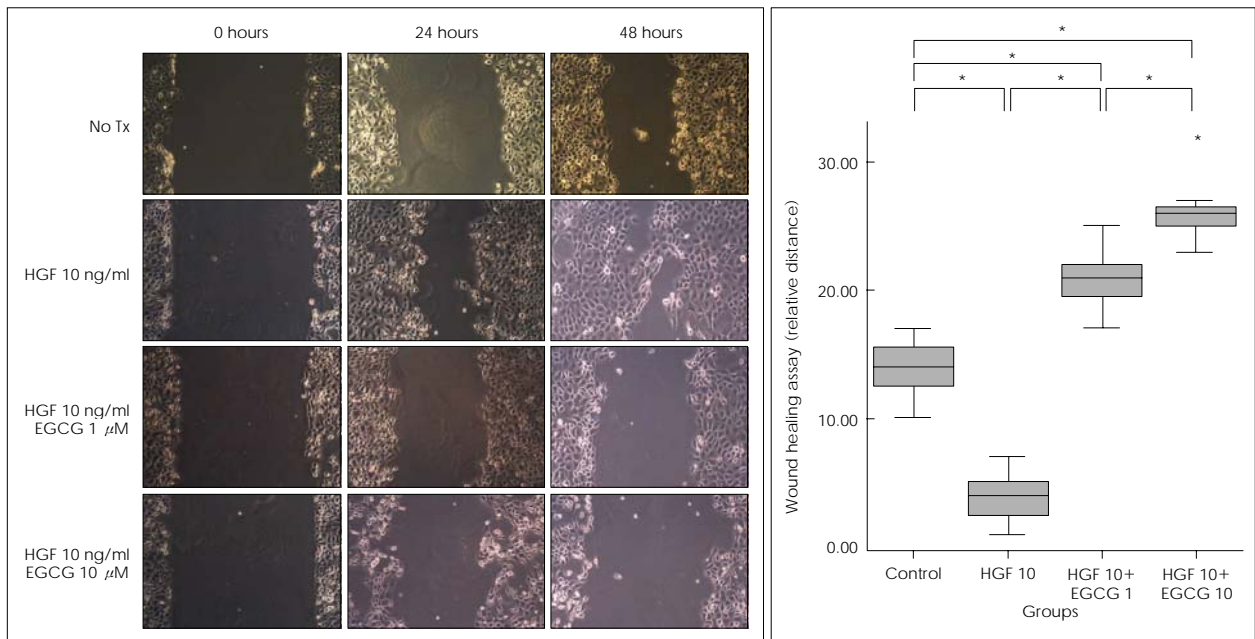


Fig. 7. Wound healing assay. Wound healing assay of FaDu cells after treatment of HGF 10 ng, HGF 10 ng+EGCG 1 μM, and HGF 10 ng+EGCG 10 μM. For assessing the contributions of HGF to both migratory and proliferative activities, we performed the in vitro wound healing assay without mitomycin. Exogenous HGF enhanced the migration and proliferation of FaDu but EGCG inhibited HGF-induced migration of hypopharyngeal cancer cells in dose-dependant. $p < 0.05$ calculated by t-test.

5잔 이상 마시는 경우 1, 2병기의 유방암의 예후가 좋아진다는 보고들이 있다.⁹⁾

앞서 기술한대로 EGCG는 녹차의 주된 catechin으로 많은 암세포주에서 암의 성장을 억제하고 세포사멸을 유도한다고 알려져 왔다. Crespy 등⁵⁾은 EGCG가 in vivo 마우스실험에서 UV에 의해 유도되는 암화과정(carcinogenesis)을 억제하는 강한 예방 화학약물이라고 보고한 바 있다. 또한 Kavanagh 등¹⁰⁾은 DMBA로 처리된 백서에서 녹차추출물이 종양의 발현시기를 억제하고 발병된 종양의 무게와 전이를 감소시키는 것으로 알려졌다. 이러한 EGCG의 종양억제효과에 대한 기전으로 인정된 것 중 하나가 EGCG가 성장인자의 신호전달체계를 in vivo에서 억제한다는 것이다.⁴⁾ 유사한 연구로서 전립선암 마우스 모델에서 녹차추출물을 내복한 경우

IGF signaling을 억제하고 PI3K와 MAPK 경로의 활성을 억제한다고 보고하였다.¹¹⁾ EGCG의 성장인자 억제와 관련한 연구가 최근 몇몇 논문에서 보고되었는데 Liang 등¹²⁾은 A431 cell에서 녹차 catechin인 EGCG, EGC와 ECG는 EGF 신호경로를 억제한다고 발표하였으나 EC는 억제효과가 없었다고 보고하였고 몇몇 연구자들도 EGCG, ECG와 ECG에서는 암세포주의 증식을 억제하고 세포사멸을 유도하나 EC는 이러한 효과가 없다고 보고하였다.

HGF/c-Met 신호전달경로는 많은 암에서 비정상적으로 조절되고 있고 HGF 관련 신호전달경로의 과도한 활성이 암의 예후를 나쁘게 한다는 보고가 있다.¹³⁾ PI3-kinase/AKT와 Ras/ERK 경로의 하부경로의 활성화는 HGF에 유도되는 세포의 이동과 유착(adhesion)에 필수적인 것으로 알려져 있다.

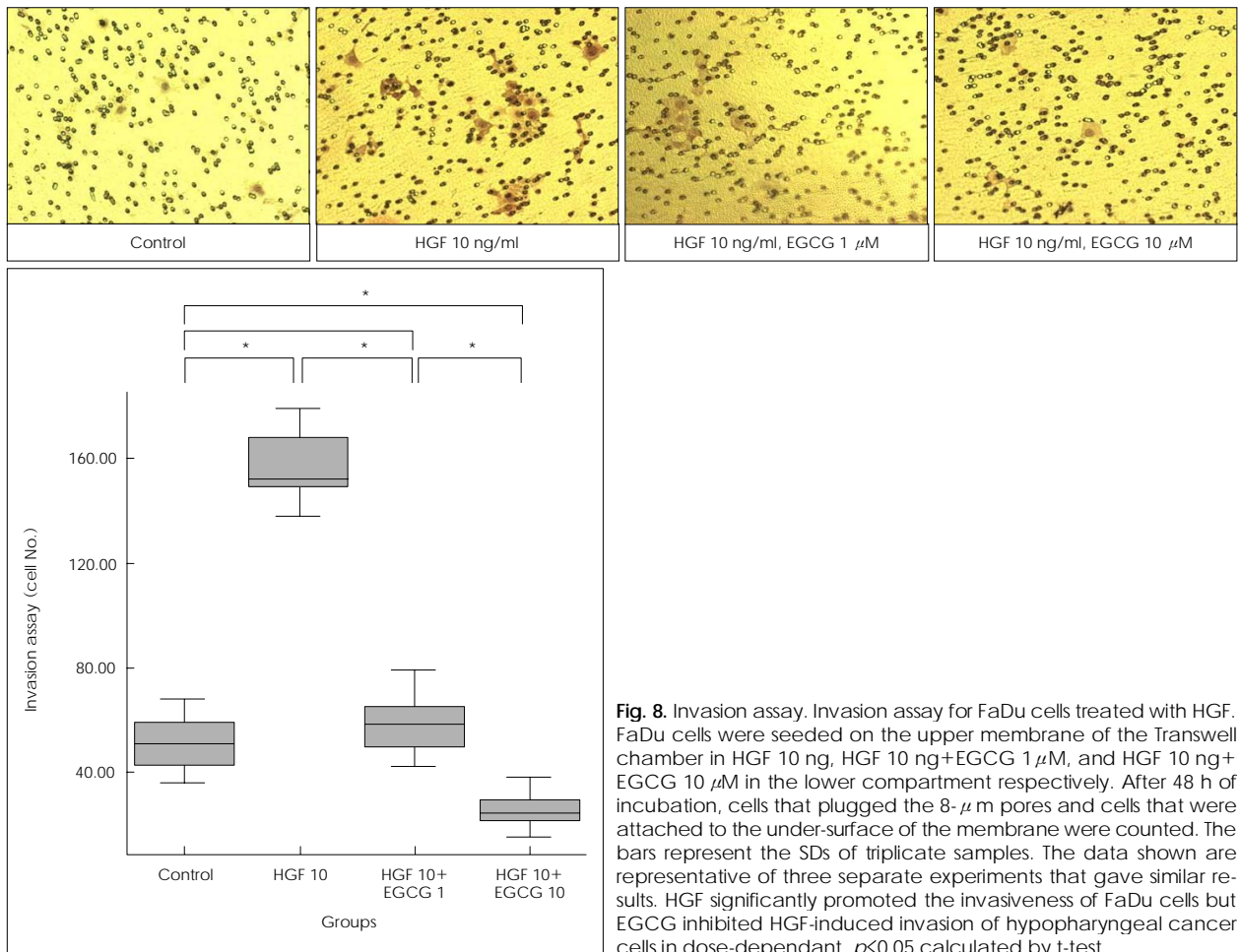


Fig. 8. Invasion assay. Invasion assay for FaDu cells treated with HGF. FaDu cells were seeded on the upper membrane of the Transwell chamber in HGF 10 ng, HGF 10 ng+EGCG 1 μ M, and HGF 10 ng+EGCG 10 μ M in the lower compartment respectively. After 48 h of incubation, cells that plugged the 8- μ m pores and cells that were attached to the under-surface of the membrane were counted. The bars represent the SDs of triplicate samples. The data shown are representative of three separate experiments that gave similar results. HGF significantly promoted the invasiveness of FaDu cells but EGCG inhibited HGF-induced invasion of hypopharyngeal cancer cells in dose-dependant. $p < 0.05$ calculated by t-test.

이는 HGF가 종양의 전이와 침습에 중요한 역할을 함을 보여준다고 할 수 있다.¹⁴⁾ 본 연구는 기존에 저자들이 발표한 HGF와 c-Met이 하인두암의 예후와 중요하다는 임상분석¹⁵⁾과 HGF에 의해 in vitro에서 하인두암 세포주가 증식, 분산과 이동을 증가시키고,¹⁶⁾ matrix metalloproteinase-2(MMP-2)와 urokinase type plasminogen activator(u-PA)의 활성을 통해 세포의 침습을 증가시킨다는¹⁷⁾ 연구결과를 토대로 녹차추출물이 HGF에 의해 유도되는 하인두암 세포의 증식, 분산, 이동과 침습을 억제하는지를 보고자 하였다. 본 연구를 시행하면서 녹차추출물의 대표적인 4가지 catechin(EGCG, EGC, ECG, EC)에 대한 MTT assay를 시행한 결과 EGCG의 항암효과가 가장 좋게 나왔고 EC는 하인두암세포를 오히려 증가시키는 결과를 보여 EGCG로 본 연구를 진행하였다.

Uchida 등의 연구에서는 외인성 HGF는 구강암세포주의 성장을 자극하지는 않았고 오히려 50 ng/ml의 고농도 HGF는 세포성장을 억제하는 효과가 있었다고 보고하였으나¹⁸⁾ FaDu의 단층배양에서는 외인성 HGF가 저자들이 사용한 HGF 10 ng/ml과 30 ng/ml 모두에서 증식에 통계적으로 유의하게

영향을 주었으므로 HGF 10 ng/ml을 임의로 선택하여 본 연구에서 시행하였다. 결과에서 기술한대로 HGF 10 ng/ml을 처리한 후 EGCG를 처리한 결과 대조군에 비해 FaDu가 통계적으로 유의하게 감소되고 EGCG의 용량에 비례하여 EGCG 10 μ M을 사용한 경우가 EGCG 1 μ M을 사용한 경우보다 증식이 강하게 억제되는 것을 볼 수 있었다. 또한 본 연구에서 분석하지는 않았으나 EGCG를 처리한 경우 세포의 증식 억제뿐 아니라 세포의 모양이 변형되고 응축되는 세포사멸 시 나타나는 소견을 보였다. 기존 연구에서 보고한 바와 같이 HGF처리 후 FaDu 세포의 분산이 증가되는 것을 확인할 수 있었는데 EGCG를 처리한 결과 Fig. 4에서와 같이 분산효과가 억제되는 것을 볼 수 있었다. FaDu의 경우 HGF를 처리한 뒤 초기 6시간의 관찰에서 보면 HGF를 처리하지 않은 세포에 비해 lamellipodia나 filopodia가 잘 관찰되었고 세포의 모양도 섬유아세포의 모양처럼 길쭉하게 변형된 세포가 관찰되는데 EGCG를 HGF와 함께 넣은 경우 이러한 lamellipodia나 filopodia가 잘 발견되지 않고 발현 시간이 지연되는 것으로 관찰되었다. 이러한 세포의 형태학

적인 차이는 wound healing assay를 이용한 migration assay에서도 유사하게 관찰되었다. 또한 앞서 증식분석에서도 기술했듯이 EGCG을 처리한 군에서는 세포사멸 시 보이는 세포모양이 많이 관찰되었다. 일반적으로 암세포가 주변 조직으로 침윤하기 위해서는 우선 세포 간의 결합이 소실되어야 하고 암세포가 이동하기 위해서는 주변조직의 분해가 필요한데, EGCG에 의해 세포 간의 해리와 분산이 억제되고 이동능이 감소되므로서 wound healing assay와 침습성 분석에서도 EGCG를 처리한 군에서 EGCG용량에 비례하여 암세포의 이동과 침습이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 생체내에서 암세포가 주위조직으로 침윤 혹은 전이가 억제될 수 있는 소견이라 해석할 수 있다.

EGCG는 선택적으로 어느 한 단백질만을 억제하지는 않는다. 앞서 기술한대로 DNA methyltransferase, JNK, AP-1, MMP와 FGF-R 등 다양한 단백질을 억제한다.^{4,14} Bigelow의 최신 연구에서 EGCG가 EGF의 하부 다양한 경로(AKT, ERK 등)를 억제했듯이¹⁹ HGF에 유도되는 Met의 인산화와 AKT, ERK의 경로를 억제한다고 보고하였다. 그러나 EGCG에 대해 많은 연구가 진행되고 있지만 EGCG의 다양한 기전에 대해서는 아직도 확립된 상태가 아니며 일부 연구결과들은 상충되는 부분이 있어 해석에 혼란을 주기도 한다. 본 연구를 통해 저자들은 HGF에 유도되는 하인두암 세포주(FaDu)의 증식, 분산, 이동과 침습에 있어 녹차추출물인 EGCG가 효과적으로 억제함을 보여주었다. 일부 녹차추출물의 항암효과에 관한 많은 연구가 사람에게서 도달될 수 없는 고용량의 녹차추출물을 사용하여 결론을 낸 경우가 있어 실질적인 임상 이용에는 어려움이 있다는 보고도 있다. 하지만 Lambert 등⁴에 의하면 EGCG인 경우 사람에게서 최대 1 μM까지 올릴 수 있다는 결과에 비추어 볼 때 본 연구에는 사용한 EGCG를 1 μM는 비교적 생리적 혈중량에 근접한 실험이라고 할 수 있으며 향후 다양한 방법으로 임상적인 응용이 가능하리라 판단된다.

결 론

본 연구를 통해 저자들은 HGF에 의해 유도되는 c-Met의 활성이 녹차추출물인 EGCG에 용량에 비례하여 억제되고, HGF에 유도되는 하인두암 세포주(FaDu)의 증식, 분산, 이동과 침습에 있어서도 EGCG가 용량에 비례하여 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.

중심 단어 : 간세포성장인자 · c-Met · 하인두암 · EGCG.

이 논문은 2005 정부(교육 인적 자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-003-E00126).

REFERENCES

- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. *Cancer statistics, 2001. CA Cancer J Clin* 2001;51 (1):15-36.
- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. *Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. Biochem Biophys Res Commun* 1984;122 (3):1450-9.
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, et al. *Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. Science* 1991;251 (4995):802-4.
- Lambert JD, Yang CS. *Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. J Nutr* 2003;133 (10):3262S-7S.
- Crespy V, Williamson G. *A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. J Nutr* 2004;134 (12 Suppl):3431S-40S.
- Berger SJ, Gupta S, Belfi CA, Gosky DM, Mukhtar H. *Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits topoisomerase I activity in human colon carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun* 2001;288 (1):101-5.
- Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, et al. *Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. Cancer Res* 2003;63 (22):7563-70.
- Nam S, Smith DM, Dou QP. *Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. J Biol Chem* 2001;276 (16):13322-30.
- Nakachi K, Suemasu K, Suga K, Takeo T, Imai K, Higashi Y. *Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. Jpn J Cancer Res* 1998;89 (3):254-61.
- Kavanagh KT, Hafer LJ, Kim DW, Mann KK, Sherr DH, Rogers AE, et al. *Green tea extracts decrease carcinogen-induced mammary tumor burden in rats and rate of breast cancer cell proliferation in culture. J Cell Biochem* 2001;82 (3):387-98.
- Adhami VM, Siddiqui IA, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. *Oral consumption of green tea polyphenols inhibits insulin-like growth factor-I-induced signaling in an autochthonous mouse model of prostate cancer. Cancer Res* 2004;64 (23):8715-22.
- Liang YC, Lin-shiau SY, Chen CF, Lin JK. *Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. J Cell Biochem* 1997;67 (1):55-65.
- Ghoussoub RA, Dillon DA, D'Aquila T, Rimm EB, Fearon ER, Rimm DL. *Expression of c-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. Cancer* 1998;82 (8):1513-20.
- Royal I, Park M. *Hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells requires phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem* 1995;270(46):27780-7.
- Kim CH, Moon SK, Bae JH, Lee JH, Han JH, Kim K, et al. *Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Acta Otolaryngol* 2006;126 (1):88-94.
- Kim CH, Moon SK, Bae JH, Lee JH, Choi EC. *Effect of HGF in Proliferation, dispersion and migration of hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2005;48 (2):208-15.
- Kim CH, Moon SK, Bae JH, Lee JH, Choi EC. *Effect of HGF in invasion of hypopharyngeal squamous cell carcinoma cell line. Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2005;48 (6):788-95.
- Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro Ki, Kimura-Yanagawa T, Hino S, et al. *Role of HGF/c-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. Int J Cancer* 2001;93 (4):489-96.
- Sah JF, Balasubramanian S, Eckert RL, Rorke EA. *Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. J Biol Chem* 2004;279 (13):12755-62.