

## 비소세포폐암주에서 저산소상태에 의해 유발된 HIF-1 $\alpha$ 와 VEGF의 발현증가에 미치는 Epigallocatechin-3-gallate의 억제 효과

중앙대학교 의과대학 <sup>1</sup>내과학교실, <sup>2</sup>미생물학교실

송주한<sup>1</sup>, 전은주<sup>1</sup>, 광희원<sup>1</sup>, 이해민<sup>1</sup>, 조성근<sup>1</sup>, 강형구<sup>1</sup>, 박성운<sup>1</sup>, 이재희<sup>1</sup>, 이병욱<sup>1</sup>, 정재우<sup>1</sup>, 최재철<sup>1</sup>, 신종욱<sup>1</sup>, 김기정<sup>2</sup>, 김재열<sup>1</sup>, 박인원<sup>1</sup>, 최병휘<sup>1</sup>

## The Effect of Epigallocatechin-3-gallate on HIF-1 $\alpha$ and VEGF in Human Lung Cancer Cell Line

Joo Han Song, M.D.<sup>1</sup>, Eun Joo Jeon, M.D.<sup>1</sup>, Hee Won Kwak, M.D.<sup>1</sup>, Hye Min Lee, M.D.<sup>1</sup>, Sung Gun Cho, M.D.<sup>1</sup>, Hyung Koo Kang, M.D.<sup>1</sup>, Sung Woon Park, M.D.<sup>1</sup>, Jae Hee Lee, M.D.<sup>1</sup>, Byung Ook Lee, M.D.<sup>1</sup>, Jae Woo Jung, M.D.<sup>1</sup>, Jae Cheol Choi, M.D.<sup>1</sup>, Jong Wook Shin, M.D.<sup>1</sup>, Ki Jeong Kim, M.D.<sup>2</sup>, Jae-Yeol Kim, M.D.<sup>1</sup>, In Won Park, M.D.<sup>1</sup>, Byoung Whui Choi, M.D.<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Internal Medicine, <sup>2</sup>Microbiology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is the major catechin in green tea, and has shown antiproliferative, antiangiogenic, antimetastatic and cell cycle perturbation activity in various tumor models. Hypoxia can be induced because angiogenesis is insufficient for highly proliferating cancer. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and its downstream target, vascular endothelial growth factor (VEGF), are important for angiogenesis, tumor growth and metastasis. The aim of this study was to determine how hypoxia could cause changes in the cellular phenomena and microenvironment in a non-small cell culture system and to examine the effects of EGCG on a HIF-1  $\alpha$  and VEGF in A549 cell line.

**Methods:** A549 cells, a non-small cell lung cancer cell line, were cultured with DMEM and 10% fetal bovine serum. A decrease in oxygen tension was induced using a hypoxia microchamber and a CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> gas mixture. Gas analysis and a MTT assay were performed. The A549 cells were treated with EGCG (0, 12.5, 25, 50  $\mu$ mol/L), and then examined by real-time-PCR analysis of HIF-1  $\alpha$ , VEGF, and  $\beta$ -actin mRNA.

**Results:** Hypoxia reduced the proliferation of A549 cells from normoxic conditions. EGCG inhibited HIF-1  $\alpha$  transcription in A549 cells in a dose-dependent manner. Compared to HIF-1  $\alpha$ , VEGF was not inhibited by EGCG.

**Conclusion:** HIF-1  $\alpha$  can be inhibited by EGCG. This suggests that targeting HIF-1  $\alpha$  with a EGCG treatment may have therapeutic potential in non-small cell lung cancers.

**Key Words:** HIF-1  $\alpha$ , VEGF, EGCG, Lung cancer, Hypoxia

## 서 론

비소세포폐암은 기관지폐포암의 70%를 차지하며 진단 당시 이미 진행해 있는 경우가 대부분이다. 또한 항암화학요법이나 방사선 치료에 대한 성적이 다른 장기의 고형암이나 혈액암보다 낮아서 치명률이 매우 높은 암이다. 시간이나 암 조직형별로 암세포의 증식 속도나 대사 상태는 다양하며 같은 종괴라고 하더라도 종괴 중심에서의 위치에 따라 암세포는 증식 속도가 다양하며, 종양혈관 형성

Address for correspondence: In Won Park, M.D.

Division of Allergy, Respiratory and Critical Care Medicine,  
Department of Internal Medicine, Chung-Ang University  
Hospital, 224-1, Huksuck-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-755,  
Korea

Phone: 82-2-6299-1401, Fax: 82-2-6263-2184

E-mail: iwpark@cau.ac.kr

Received: Nov. 6, 2008

Accepted: Mar. 6, 2009

의 효율성에 따라 서로 다른 상대적인 산소 분압이나 영양 공급을 받아 같은 종괴 내에서도 각 암세포는 병태생물학적 현상을 달리한다<sup>1</sup>. 즉 같은 종괴 내 비소세포폐암이라 할지라도 종괴의 크기, 중앙 혈관 형성의 효율성 등은 암세포의 유전적 발현을 현저하게 변화시킨다. 이에 따라 항암 화학 요법이나 방사선 치료에 대한 반응이 다르고 원격 전이나 치료 후 재발 등에도 치료자가 예상하지 못하는 결과가 나타날 수 있다<sup>24</sup>. 이러한 종양 내 세포의 생물학적 현상이 달라지는 기전 중에는 저산소증이 중요한 기여를 하는 것으로 보인다. 저산소증과 암과의 관계는 다른 암세포에서도 비교적 잘 밝혀져 있다<sup>5,6</sup>. 저산소증은 항암 화학 요법에 높은 저항을 보이는 비소세포폐암에서도 중요한 역할을 한다<sup>7,8</sup>. 반면 최근 분자 표적 치료로 각광받는 Epithelial cell growth receptor (EGFR)의 경우, 저산소증은 EGFR이나 EGFR의 리간드를 발현시키며, 또한 EGFR는 저산소에 대한 암세포의 Hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ )의 발현을 증가시켰다<sup>9,10</sup>. HIF-1  $\alpha$ 는 저산소 상태에서 활성화되는 중심 유전자로 산소화가 충분히 되는 경우 von Hippel-Lindau와 결합하여 유비퀴틴 E3 결합효소(ligase)에 의한 유비퀴틴-프로테아솜계로 전달되어 계속 단백질 분해되어 세포 내에서는 낮은 농도로 존재하게 된다. 저산소 상태에서는 여러 가지 경로를 거쳐서 이러한 유비퀴틴화는 억제되며 HIF-1  $\alpha$ 는 축적되고 핵 내로 이동하면서 HIF-1  $\beta$ 와 결합하여 복합체를 형성하고 DNA의 Hypoxia-response element (HRE)에 결합함으로써 Vascular endothelial growth factor (VEGF) 등의 유전자 발현을 유발한다. 체외실험에서는 폐선암 세포주인 A549에 저산소증을 가할 경우 세포의 이동성이 증가되기도 하였다<sup>11</sup>. VEGF 또한 저산소에 노출된 암세포에서 자살 유전자를 유도할 수도 있다<sup>12</sup>. VEGF는 혈관생성의 중요한 인자의 하나로 이전의 연구들에 의하면 Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)는 VEGF의 생성을 줄이고 비혈관생성의 작용을 보인다. 그리고, 다양한 수준의 저산소증에 노출된 폐암세포를 SPECT를 이용하여 영상화하여 방사선 치료에 응용하려는 시도도 최근에 이뤄지고 있다<sup>13</sup>.

녹차에는 100~150 mg의 catechin 성분이 있으며 50% 이상의 EGCG가 포함되어 있다. EGCG에 대해 많은 연구가 진행되고 있으며, 비증식성, 비혈관생성, 비전이성 효과에 대해 체내, 체외실험으로 증명되고 있다. EGCG는 Epidermal growth factor (EGF, erbB1), HER-2/neu (erb B2), HER-3 등을 비활성화시키고, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt, Extracellular signal-regulated kinase1/2

(ERK1/2)를 저해함으로써 치료에 효과 있음이 증명되었다.

그러나 현재까지 정확한 기전에 대해서는 확립되어 있지 않아 본 연구에서는 A549 세포주에서 저산소증과 EGCG가 암세포의 생존과 HIF-1  $\alpha$  및 VEGF의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 세포주와 저산소화

실험에 사용한 세포주는 비소세포폐암 세포주인 A549 세포주(CCL-185<sup>TM</sup>; American Type Culture Collection, Rockville, USA)를 이용하여 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 또는 RPMI-1640 배지(GIBCO-BRL-Invitrogen Co., Grand Island, USA)에서 10% 우태아 혈청(Hyclone, Logan, USA)과 함께 배양하였으며, 세포의 밀도가 80~90%에 도달하였을 때 실험을 수행하였다. 세포가 저산소 상태에 노출되는 실험은 이전의 논문에서 제시하였다<sup>14</sup>. 이를 요약하면, 5% CO<sub>2</sub>와 95% 대기 가스가 공급되는 37°C 세포배양기에서 자라는 세포주를 대조군으로 하였다. 산소의 농도를 줄이기 위하여 세포배양기 내에 다시 작은 세포 배양기인 MIC-101 (Modular Incubator; Billups-Rothenberg Inc., Del Mar, CA, USA)을 넣는 방법을 적용하였다. MIC-101 내에 세포배양접시를 넣어 두고 5분 동안 5% CO<sub>2</sub>와 95% N<sub>2</sub>가 혼합되어 있는 가스를 투여하여 배양액 내 MIC-101 내 산소의 분압을 감소시켰다. 세포의 증식능은 MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]법을 이용하여 72시간 동안 측정하였다. 대조군과 실험군 간의 차이를 통계학적으로 검정하기 위해 SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 10.0을 이용하였으며, 평균의 비교를 위하여 T 검정을 이용하였고, p값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

### 2. HIF-1 $\alpha$ 및 VEGF에 대한 EGCG의 처리 및 Real time PCR

EGCG (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)로 0, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ mol/L으로 농도 변화를 주어 실험을 시행하였으며 16시간 동안 A549세포를 저산소 상태로 만든 후, HIF-1  $\alpha$ , VEGF,  $\beta$ -actin mRNA에 대해 Real time PCR을 시행하였다. PCR Primer로는 HIF-1  $\alpha$ 에 대해 전방향: 5'-TCA CCA CAG GAC AGT ACA GGA TGC-3', 후방향: 5'-CCA GCA AAG TTA AAG CAT CAG GTT CC-3',

VEGF에 대해 전방향: 5'-AGG AGG GCA GAA TCA TCA CG-3', 후방향: 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3',  $\beta$ -actin에 대해 전방향: 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3', 후방향: 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3'를 사용하였다. Real time PCR은 ABI 7000 series를 사용하였고 변성 (denaturation)은 95°C, 15초, 결합(annealing)은 60°C, 30초, 신장(extension)은 72°C, 30초로 40 사이클을 시행하였으며 통계학적 수치는 Pair-wise Fixed Reallocation Randomization Test (REST)를 이용하였다.

## 결 과

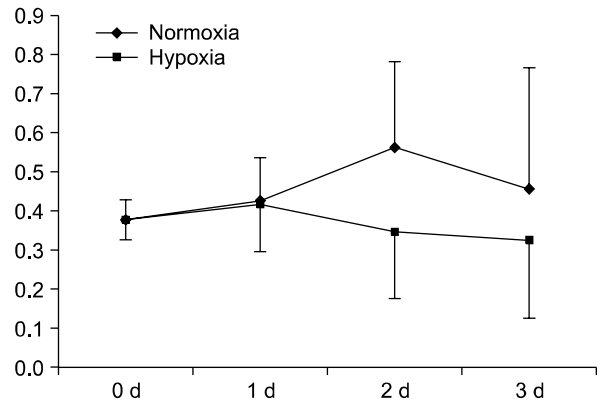
### 1. 산소 농도 감소 시의 세포 증식능의 변화

저산소화 시행 후 세포의 증식능은 24시간까지는 의미 있는 차이가 없었으나 48시간부터 72시간까지 정상 산소 대조군에 비하여 저산소증에 노출된 A549세포의 세포증식속도는 유의하게 감소하는 것을 볼 수 있었다(Figure 1)

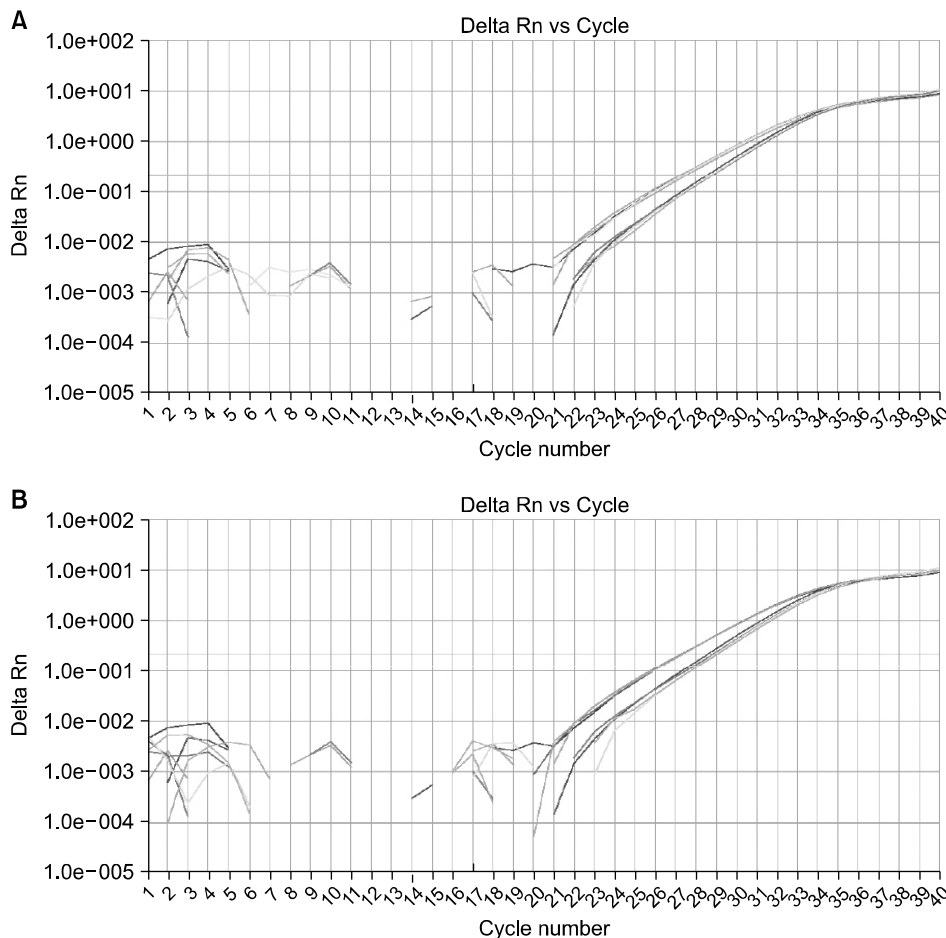
( $p < 0.05$ ).

### 2. EGCG 처리 농도에 따른 HIF-1 $\alpha$ mRNA level의 변화

EGCG 처리 농도에 따른 저산소 상태에서의 HIF-1 $\alpha$



**Figure 1.** Cell viability under normoxia and hypoxia; Under hypoxic conditions, the proliferation of A549 cells was decreased than under normoxic conditions (\* $p$  value  $< 0.05$ ).



**Figure 2.** Changes of hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  messenger RNA transcription. (A) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 12.5  $\mu$ mol/L (B) EGCG 25.0  $\mu$ mol/L (C) EGCG 50.0  $\mu$ mol/L (D) EGCG 100.0  $\mu$ mol/L; Under EGCG 50.0 and 100.0  $\mu$ mol/L, expression of hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  in A549 cells was decreased by EGCG.

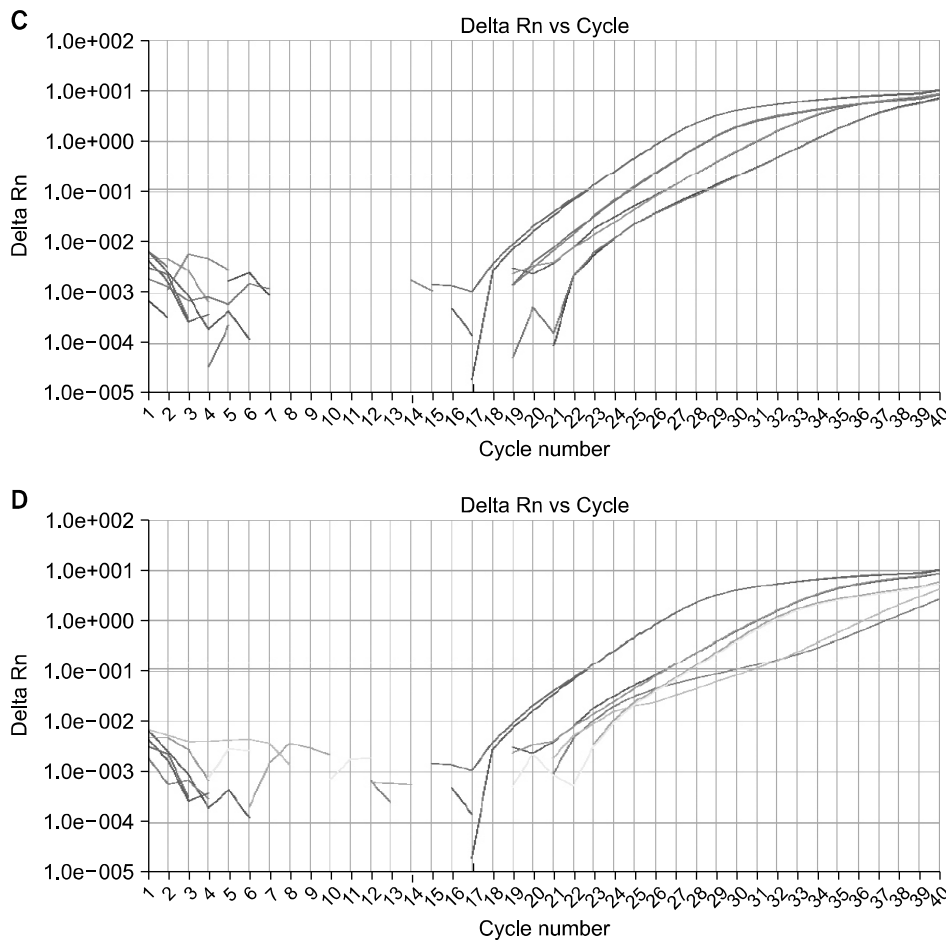


Figure 2. Continued.

mRNA level은 12.5  $\mu\text{mol/L}$  (Figure 2A)과 25.0  $\mu\text{mol/L}$  (Figure 2B)에서는 의미있는 차이가 없었으며 50.0  $\mu\text{mol/L}$  (Figure 2C)와 100.0  $\mu\text{mol/L}$  (Figure 2D)에서는 의미있게 차이를 보였으며( $p < 0.05$ ),  $\beta$ -actin에 대한 HIF-1 $\alpha$ 의 상대적 발현 비율도 50.0  $\mu\text{mol/L}$ 과 100.0  $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 처리하였을 때 의미있게 발현이 억제되었다(Figure 3, 4A).

### 3. EGCG 처리 농도에 따른 VEGF mRNA level의 변화

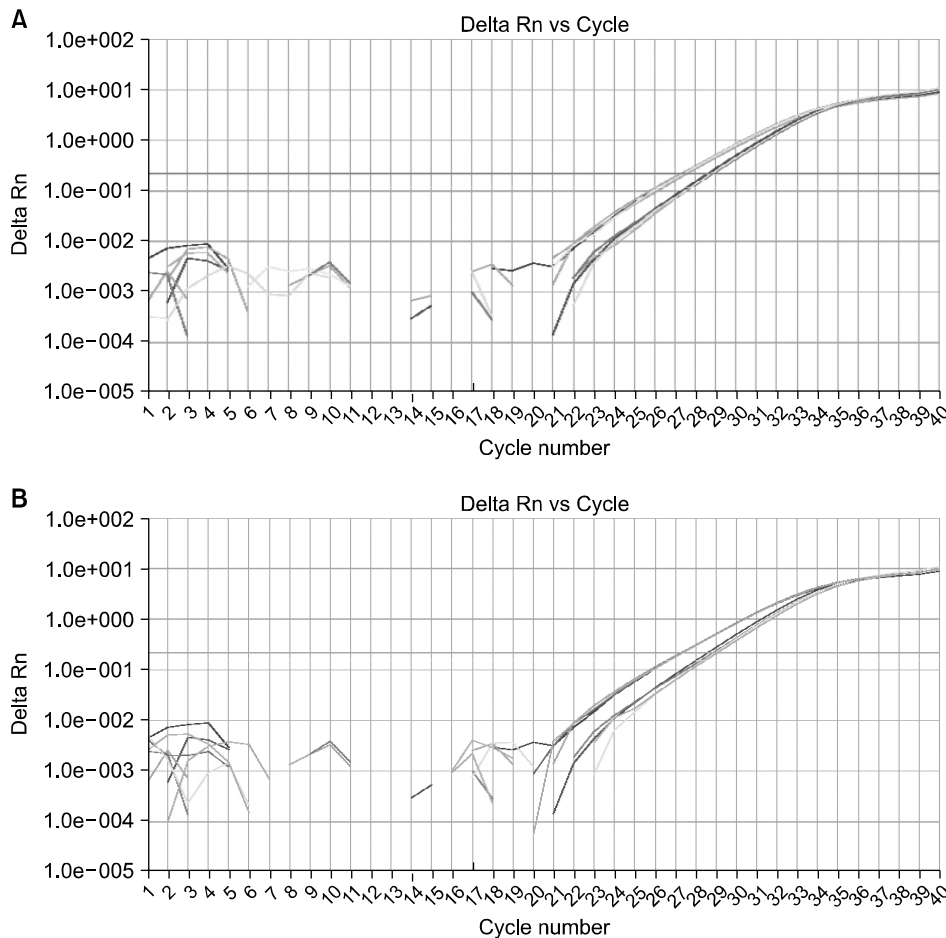
EGCG를 12.5, 25.0, 50.0, 100.0  $\mu\text{mol/L}$ 로 처리 시에 각각의 경우에서 발현은 의미있게 억제되지 않았다(Figure 3, 4B).

## 고 찰

폐암 세포의 증식은 시간에 따라서 증식의 속도가 다르므로 시기에 따라 유전자의 발현이 다양하게 나타날 수 있다. 세포의 수가 늘어나고 종괴의 크기가 증가할 때 종괴는 종양 혈관을 형성하여 생존과 증식을 이어간다. 그

렇지만 종양 혈관은 정상적인 혈관 형성과는 다른 형태와 기능을 가지고 있고 종양의 중심부에 가까이 있는 세포는 외부 세포와는 다른 상대적인 저산소 상태에 있을 수 있다. 그 결과 종양 내부는 괴사나 세포 자멸사 현상을 보일 수 있고 항암 화학 약물이나 치료 방사선에 대해 감수성이 떨어진 상태에 있을 수 있다. 그래서 종양 내부 세포는 종양의 재발이나 치료에 내성을 보이는 세포들로 남을 수 있다. 저산소증에 의하여 세포에 비가역적인 세포 손상을 일으키는 기전으로는 세포의 에너지의 고갈, 세포의 산성화, 독성 대사 산물의 증가, 세포막 인지질의 파괴, 산소 유리기의 증가, 아데닌 뉴클레오타이드의 세포 내 소실 등을 들 수 있다<sup>15</sup>. 에너지의 고갈이 있을 경우, 이를 극복하기 위해서 세포는 해당 과정이나, 크레아티닌 키나아제 반응, 아데닐레이트 키나아제 반응의 활성화나 아데닌 뉴클레오타이드의 동화 과정이 작동되어 극복된다. 그리고 세포 내의 락트산은 세포 외로 배출이 촉진되는 기전도 활성화된다.

본 연구에서는 MIC-101이라는 작은 크기의 세포 배양



**Figure 3.** Changes of hypoxia-induced VEGF messenger RNA transcription, (A) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 12,5  $\mu$ mol/L (B) EGCG 25,0  $\mu$ mol/L (C) EGCG 50,0  $\mu$ mol/L (D) EGCG 100,0  $\mu$ mol/L; Under any concentration of EGCG, expression of hypoxia-induced VEGF was not affected by EGCG in A549 cells ( $p>0.05$ ).

기를 이용하였는데 이 기구로는 10 cm 지름의 세포 배양 접시를 6개 정도 넣을 수 있으며 세포 배양 접시의 종류에 따라 다양하게 세포를 키울 수 있다. 본 연구에서는 5분 정도의 무산소 혼합 가스를 MIC-101에 투여함으로써 150 mmHg의 산소 분압으로부터 90 또는 70 mmHg까지 산소 분압을 낮출 수 있었는데 무산소 혼합 가스를 초기 투여로부터 30분이 지난 뒤 다시 5분 정도 투여해 줌으로써 세포 배양액 내에 녹아 있던 산소가 MIC-101 내부로 확산되어 나오는 것을 다시 배출해 낸 효과로 생각이 되며, 무산소 혼합 가스로 정화(purging)하는 횟수에 따라서 세포 배양액 내 산소의 농도를 더 낮출 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 본 연구에서는 MIC-101으로 저산소-재산소(hypoxia-reoxygenation)의 모델에도 적용해 볼 수 있을 것으로 생각되며 MIC-101에 무산소 혼합가스 대신 산소가 든 가스를 교환 투여하면 되는 편리성을 확인할 수 있었다. 결국 산소의 분압을 달리 할 수 있고 재산소화를 시킬 수 있는데 유용한 실험법이 될 수 있을 것으로 기대해 본다.

세포 모델뿐만 아니라 실험 동물에서도 종양과 관련한

저산소증에 대한 실험이 몇몇 있는데 최근 기법으로 주목할 만한 것은 phosphorescence quenching 방법을 쥐 등 실험 동물에 적용하여 조직 또는 종양의 저산소 상태를 실시간으로 측정하는 방법이 있다<sup>16</sup>.

저산소증은 ATP의 생성을 줄이고 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 펌프의 작용을 감소시켜 세포 내로의 칼륨 이온의 이동을 줄이고 세포 외로의 나트륨 이온을 축적시킬 수 있다. 기타 칼륨 통로, 전압 의존 칼슘 이온 통로나 ATP 의존 세포막 칼슘 펌프, 칼슘-나트륨 교환 통로 등도 저산소증과 관련이 있다<sup>17,18</sup>. 본 연구에서는 전해질의 세포막 이동이나 이온 통로에 대한 구체적인 연구를 시행하지 않아서 전해질의 이동에 대한 결정적인 연구는 되지 못하는 한계가 있었다. 산소의 분압이 저하된 상태에서는 당연하게도 비소세포폐암 세포주의 증식은 억제 되는 것을 본 실험에서 관찰할 수 있었으며, 저산소에 의한 직접적, 간접적 효과에 의한 것으로 생각되며 본 논문에서는 제시되지 않았지만 재산소화 이후 세포의 증식능의 회복 등을 확인한다면 세포 생물학적 분자 생물학적으로 비소세포 폐암세포의 성질이나 변

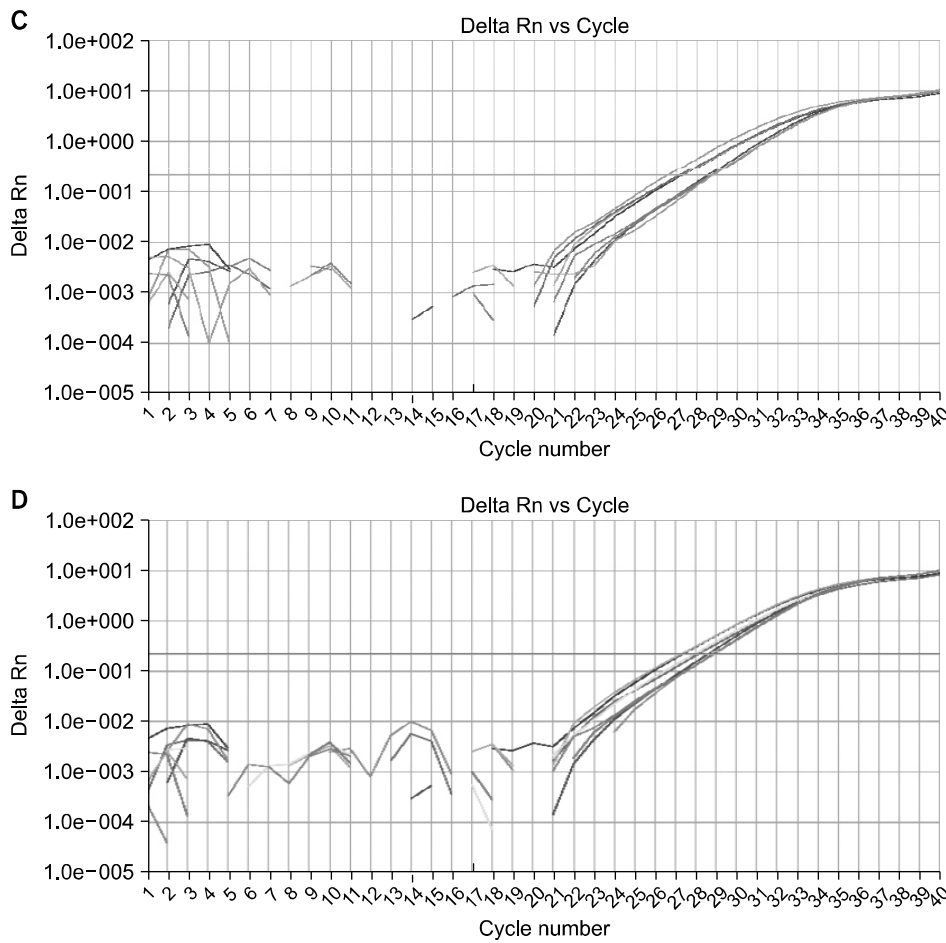
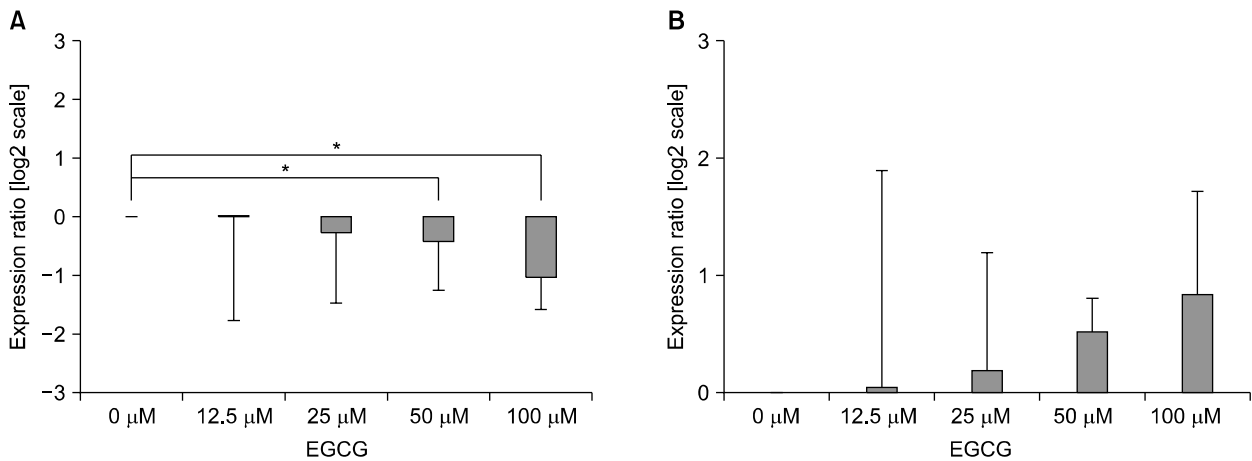


Figure 3. Continued.



**Figure 4.** Bar graphs for relative transcriptional levels of hypoxia-induced HIF-1  $\alpha$  (A) and VEGF (B) in contrast to house-keeping  $\beta$ -actin mRNA level under various concentrations of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG). These graphs summarized results of Figure 3(A) to (D) (\* $p < 0.05$  compared to control).

화를 규명하는데 쉬운 길이 될 것으로 믿는다. 단, 증식의 억제제는 생존능이나 주변 조직 침입 능력이나 원격 전이 등과 같은 현상들과의 상관관계에 대해서는 앞으로의 연

구가 더 필요할 것으로 보인다. HIF-1  $\alpha$ 와 VEGF는 세포 암주의 혈관 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. HIF-1  $\alpha$  단백질의 합성과 안정화는 저산소화로 프

롤린기의 수산화(prolyl hydroxylation) 억제 시에 생성되며 종양억제유전자를 억제하고 Src 유전자를 활성화시킨다. 또한 여러 싸이토키인이나 호르몬 및 성장인자 등의 자극을 받는 것으로 되어 있다. EGCG는 간세포암주에서의 HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있으며 소화기계세포암주 및 혈관 내세포에서의 VEGF를 감소시킬 수 있다. 최근 비소세포 폐암주에서 EGCG의 효과에 대해 연구가 진행되는 경우는 드물어 폐암 세포주에서 EGCG의 사용에 대해 HIF-1 $\alpha$ 와 VEGF의 발현 비율을 중심으로 검사를 진행하였다. 결과 HIF-1 $\alpha$ 의  $\beta$ -actin mRNA 수준을 중심으로 EGCG 처리 후 반응의 변화를 관찰하였고 농도에 따라 HIF-1 $\alpha$ 의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다. 반면 VEGF의 경우 EGCG의 농도 변화 시에도 변화가 없었던 것으로 보아 VEGF에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이러한 선별적인 EGCG의 작용은 여러 가지 기전으로 설명할 수 있을 것이다. 첫째, 저산소증은 HIF-1 $\alpha$ , VEGF만 활성화시키는 것이 아니며 활성화된 다양한 분자들 중에는 VEGF의 발현을 조절하는 역할이 있을 것으로 추정할 수 있다. 둘째, EGCG에 의한 HIF-1 $\alpha$  활성화의 억제의 기전이 VEGF의 활성화 억제 기전과는 다를 수 있다. 전술한 바와 같이 HIF-1 $\alpha$ 는 전사인자로서 유비퀴틴에 의해 억제되어 있다. 저산소증이 유발되면 유비퀴틴-프로테아솜계로부터 자유로워져서 활성화되는 것이므로 EGCG가 이러한 유비퀴틴-프로테아솜계에 영향을 미칠 수 있을 것을 추정할 수 있고, VEGF의 경우는 전사인자의 유비퀴틴화와는 다른 방식으로 조절받는 하부 분자이므로 HIF-1 $\alpha$ 의 조절 방식과는 다를 수 있으므로 EGCG에 대한 반응이 HIF-1 $\alpha$ 와는 다를 것으로 추정할 수 있다. 셋째, EGCG 자체는 세포 내 다양한 분자들에게 여러 가지 효과를 가질 수 있으므로 이렇게 달라진 분자들이 HIF-1 $\alpha$ 와 VEGF에 상이한 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대해 볼 수 있다. 이와 같이 제시된 여러 가지 기전들에 대한 검증은 앞으로 연구에 중요하게 보여진다. 요약하면, 저산소증으로 VEGF의 발현이 강력하게 유도되는 것은 여러 가지 경로가 있을 수 있으므로 HIF-1 $\alpha$ 는 억제되어도 VEGF의 발현은 억제되지 않을 수 있을 것이다. HIF-1 $\alpha$  이외에 저산소증에 반응하는 대표적인 전사인자로 CREB (cyclic AMP response element-binding protein)가 최근 알려지고 있다<sup>19</sup>. VEGF를 암호화하고 있는 DNA 염기 서열의 상부 promoter 부위에는 HIF-1 $\alpha$ 가 결합하는 HRE와 CREB가 결합하는 CRE (CREB-response element)가 포함되어 있다. 따

라서, 이러한 사실은 저산소증에 의해 유도되는 HIF-1 $\alpha$ 와 VEGF의 발현에 EGCG가 서로 다른 영향을 미칠 수 있음을 보여주는 간접적인 증거라고 하겠다. 그렇지만 이에 대한 증명은 실험을 통하여 밝혀져야 하는 것으로 남겠다.

본 연구에서는 저산소 유도 후 EGCG를 처리함으로써 HIF-1 $\alpha$ 의 발현 억제시킬 수 있음을 확인하였고 항암치료를 하는 데 효과를 볼 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

**연구배경:** 암세포는 빠른 증식 속도로 인하여 상대적인 저산소증에 노출되면서 비정상적인 종양 혈관을 형성하여 치명적인 병인을 형성한다. EGCG는 녹차의 추출물로 간세포암주 및 전립선암주에서 HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러나 EGCG의 비혈관 증식성 효과에 대해서는 아직 정확히 규명되어 있지 않다. 본 연구에서는 EGCG가 비소세포폐암주에서 HIF-1 $\alpha$  및 VEGF의 발현에 대한 억제 가능성을 확인하여 보고자 하였다.

**방 법:** 비소세포폐암주인 A549를 RPMI배지에서 계대 배양하였다. 저산소 유사 상태는 Modular Incubator Chamber (MIC-101)을 이용하였고 5% 이산화탄소와 95% 질소 혼합 가스를 5분 동안 공급하여 저산소 상태를 만들었으며 세포 배양액을 채취하여 혈액가스분석기(Blood Gas Analyzer ABL725)로 세포 배양 상태를 측정하였다. 세포의 증식 상태는 MIT 방법을 실시하였다. EGCG는 0, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ mol/L로 농도 변화를 주어 실험을 시행하였으며 16시간 동안 저산소 상태를 만든 뒤 HIF-1 $\alpha$ , VEGF,  $\beta$ -actin mRNA에 대해 Real time PCR을 시행하였다.

**결 과:** 48시간과 72시간에서 저산소 상태에 놓인 A549 세포의 증식능력은 대조군에 비하여 억제되었다. EGCG는 저산소화에 의해 유도된 HIF-1 $\alpha$ 의 mRNA의 전사를 유의하게 억제하였다. 그러나 이러한 억제 효과는 VEGF mRNA 발현에는 미치지 못하였다.

**결 론:** EGCG는 HIF-1 $\alpha$ 의 발현을 억제함으로써 비소세포암주에서의 예방적 항암요법이나 항암 치료요법 시의 주요 작용 목표로 사용될 수 있을 것으로 보인다.

## 참 고 문 헌

1. O'Byrne KJ, Dalglish AG, Browning MJ, Steward WP, Harris AL. The relationship between angiogenesis and

- the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Cancer* 2000;36:151-69.
2. Brown JM. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1999;59:5863-70.
  3. Rofstad EK, Danielsen T. Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Br J Cancer* 1999;80:1697-707.
  4. Rofstad EK, Mathiesen B, Henriksen K, Kindem K, Gallapathi K. The tumor bed effect: increased metastatic dissemination from hypoxia-induced up-regulation of metastasis-promoting gene products. *Cancer Res* 2005;65:2387-96.
  5. Büchler P, Reber HA, Lavey RS, Tomlinson J, Büchler MW, Friess H, et al. Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model. *J Surg Res* 2004;120:295-303.
  6. Cangul H. Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. *BMC Genet* 2004;5:27.
  7. Song X, Liu X, Chi W, Liu Y, Wei L, Wang X, et al. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 $\alpha$  gene. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58:776-84.
  8. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Fezoulidis I. Cancer vascularization: implications in radiotherapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:545-53.
  9. Swinson DE, O'Byrne KJ. Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2006;7:250-6.
  10. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;88:1474-80.
  11. Wang T, Niki T, Goto A, Ota S, Morikawa T, Nakamura Y, et al. Hypoxia increases the motility of lung adenocarcinoma cell line A549 via activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Cancer Sci* 2007;98:506-11.
  12. Koshikawa N, Takenaga K, Tagawa M, Sakiyama S. Therapeutic efficacy of the suicide gene driven by the promoter of vascular endothelial growth factor gene against hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:2936-41.
  13. Li L, Yu J, Xing L, Ma K, Zhu H, Guo H, et al. Serial hypoxia imaging with <sup>99m</sup>Tc-HL91 SPECT to predict radiotherapy response in nonsmall cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 2006;29:628-33.
  14. Shin JW, Jeon EJ, Kwak HW, Song JH, Lee YW, Jeong JW, et al. Microenvironments and cellular proliferation affected by oxygen concentration in non-small cell lung cancer cell line. *Tuberc Respir Dis* 2007;63:242-50.
  15. Kobayashi S, Conforti L, Pun RY, Millhorn DE. Adenosine modulates hypoxia-induced responses in rat PC12 cells via the A2A receptor. *J Physiol* 1998;508:95-107.
  16. Ziemer LS, Lee WM, Vinogradov SA, Sehgal C, Wilson DF. Oxygen distribution in murine tumors: characterization using oxygen-dependent quenching of phosphorescence. *J Appl Physiol* 2005;98:1503-10.
  17. Mairbäurl H, Wodopia R, Eckes S, Schulz S, Bärtsch P. Impairment of cation transport in A549 cells and rat alveolar epithelial cells by hypoxia. *Am J Physiol* 1997;273:L797-806.
  18. O'Kelly I, Peers C, Kemp PJ. O<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> channels in neuroepithelial body-derived small cell carcinoma cells of the human lung. *Am J Physiol* 1998;275:L709-16.