

교육학 석사학위논문

UVB에 의해 손상된 각질세포에
대한 epigallocatechin-3-gallate
의 세포 보호 효과



2009년 2월

부경대학교 교육대학원

영양교육전공

금혜미

교육학석사학위논문

UVB에 의해 손상된 각질세포에
대한 epigallocatechin-3-gallate
의 세포 보호 효과

지도교수 김형락

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함.



2009년 2월

부경대학교 교육대학원

영양교육전공

금혜미

금혜미의 교육학석사 학위논문을
인준함.

2009 년 2 월 25 일



주 심 의학박사 변 대 석 (인)

위 원 이학박사 김 형 락 (인)

위 원 약학박사 최 재 수 (인)

**Protective effects of epigallocatechin-3-gallate on
UVB-induced damage in human keratinocytes.**

Hye Mee Kum

Graduate School of Education

Pukyong National University

Abstract

Ultraviolet B (UVB) irradiation is an important inducer of several biological changes in skin, including sunburn, premature skin aging, and skin cancer, which are mainly mediated by direct DNA damage or production of reactive oxygen species (ROS). The increased generation of ROS by oxidative stress can cause the disruption of natural defense mechanisms. Green tea is a rich source of polyphenols, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a major constituent of green tea polyphenols. Beneficial effects of green tea on anticancer and antioxidant properties have been mediated by EGCG. In this study, effects of EGCG on cell proliferation and UVB-induced apoptosis of human keratinocytes (HaCaT) were determined with UVB-induced keratinocytes. We demonstrated that EGCG can stimulate the proliferation of the UVB-induced HaCaT cells with dose-dependent manner. EGCG increased the phosphorylation of ERK and Akt proteins. Furthermore, EGCG increased Bcl-2 protein expression but decreased Bax protein expression after UVB irradiation. EGCG increased translocation of Nrf-2 from cytosol into nuclear. UVB-induced apoptosis is suppressed via decrease of cleaved-caspase-3

followed by reduced cleaved-PARP by EGCG treatment. Moreover, EGCG decreased phosphorylation of JNK and p38 proteins. In conclusion, high antioxidant activity EGCG promotes the survival of HaCaT cells through the activation of protective cell signaling mechanisms and inhibits UVB-induced apoptosis via suppression of cell death signaling mechanisms.



목 차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 재료	7
2. 실험방법	8
III. 결과 및 고찰	12
1. UVB 및 EGCG의 HaCaT 세포에 대한 독성	12
2. EGCG의 활성산소종(ROS) 생성 억제효과	16
3. EGCG의 DPPH radical 소거능	18
4. UVB 처리된 세포에 대한 EGCG의 효과	20
4-1. UVB 조사 후 EGCG에 의한 HaCaT 세포 증식효과	23
4-2. UVB 조사 후 EGCG에 의한 HaCaT 세포 사멸효과	26
5. UVB 조사 후 EGCG에 의한 전사인자의 변화	32
IV. 참고문헌	34

I. 서론

최근 산업사회의 발달은 물질적, 문화적으로 풍요로운 혜택을 주는 반면, 환경오염의 가장 큰 원인이 되고 있다. 환경오염의 증가는 지구의 성층권 내 오존층의 파괴를 가져왔고 이로 인해 지표에 도달하는 자외선 량이 증가하고 있다 (McKenzie et al., 1999). 자외선 (ultraviolet; UV)은 태양광선 중 피부에 생물학적인 영향을 가장 많이 주는 광선으로 일반적으로 크게 UVA (320~400 nm), UVB (280~320 nm), UVC (200~280 nm)의 세 개의 영역으로 나누어진다. 파장이 짧을수록 광 에너지의 양은 증가하고, 이는 구성 분자 간 결합을 파괴할 정도로 커서 인체에 많은 변화를 가져 온다 (Lee et al., 2001).

UVC는 오존층에 의해 거의 대부분이 흡수되고, UVA와 UVB만이 지표에 도달된다. 피부에 대한 자외선의 영향을 살펴보면 UVA는 진피의 유두층, 망상층 까지 영향을 미치고 탄력섬유 (elastin)와 콜라겐 (collagen)의 붕괴로 탄력감소, 조기노화, 모세혈관 확장 및 파괴로 피부의 기저층을 와해시키며, 피부암을 일으킬 가능성이 있다. 또한 UVB는 진피 상부층까지 도달하고, 급속한 화상이나 홍반을 일으킨다. 화상반응의 경우 피부가 붉어지고 (홍반), 부종이 관찰되며, 조직학적으로는 화상세포 (sunburn cell)가 형성된다.

화상세포는 각질형성세포가 apoptosis 과정을 거쳐 사망하는 세포이다. 더 진행되면 멜라닌 색소 형성, 색소침착으로 선텐 (sun tan)이 일어나고 손상된 피부세포를 수복하여 각화이상을 일으키게 되는데 각질층 중의 수분감소와 살갓이 거칠어짐으로서 만성 노출 시 광노화 및 피부암을 유발한

다 (Donald et al., 1987; Brenner and Gschnait, 1979). UVB는 UV의 약 4~5%에 해당되지만 UVA에 비하여 1000배 이상의 일광화상을 일으키는 가장 강력한 요소이며 유전독성이 강해 (Sovobodova et al., 2003) 지구상 생물체 피부암의 주요원인의 약 90%를 차지한다 (Koh, 1995).

많은 연구결과 자외선에 의한 화상반응, sunburn cell 형성, 광발암, 광노화 현상을 일으키는 기전에는 자외선 조사 후 형성된 반응성 산소 라디칼 (reaction oxygen radical)을 들고 있다 (Stewart et al., 1996; Frenkel, 1992; Kensler and Taffe, 1986). 반응성 산소 라디칼은 단백질의 변성이나 생체막 지질의 산화, DNA의 파괴 등을 일으켜 일시적이거나 영구적인 유전자 손상을 가져오며, 성장과 분화에 영향을 주거나 세포의 기질 단백질 형성에 관여하는 신호전달체계의 변화를 초래한다 (Seo et al., 2001). 자외선 조사 후 반응성 산소 라디칼의 발생을 억제하거나 반응성 산소 라디칼을 제거하는 항산화제인 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, 비타민 C, 비타민 E를 투여하면 sunburn cell의 형성, 피부노화, 피부암 발생 등이 억제된다고 알려져 있다 (Petkau et al., 1975; Miyachi et al., 1983; Danno et al., 1984).

녹차는 한국을 비롯한 아시아지역에서 오래전부터 널리 음용되어온 차로 대표적인 항산화제이다. 녹차는 차나무과 (Theaceae)의 상록관목인 차나무 (*Thea sinensis* L.)의 어린잎을 시기별로 채취해 가공한 것을 부르는 말이다. 전통적으로 녹차는 차나무의 순이나 어린잎을 봄철 (곡우(4/20) ~입하(5/6)사이)에 채취하여 산화효소를 파괴하여 발효를 방지시킨 것으로 완전히 발효시킨 홍차와 반쯤 발효시킨 반 발효차와 구분하여 부르고 있다 (김외, 2003).

녹차의 항산화능은 녹차에 함유된 polyphenol에 의하며 flavanols,

flavandiols, flavonoids 그리고 phenolic acids 등을 포함한다 (Kim, 2004). 특히 polyphenol 함량의 약 70% 이상을 차지하고 있는 catechin류는 flavan 3-ol 구조의 화합물로서, 무색, 수용성이며 강한 항산화 능력을 가지고 있다. 또한 녹차 특유의 수렴성 쓴맛을 제공하며 (Khokhar and Magnusdottir, 2002; Oh et al., 2004) 녹차 한잔에는 100 mg 내외의 catechin이 함유되어 있다 (Graham, 1992). Catechin은 지질 과산화를 억제하고 과산화물 (superoxide)의 형성을 억제하는 강한 항산화능 (Hyon and Kim, 2001; Crespy and Williamson, 2004; Giugliano et al., 1996) 이외에도 혈압강화작용 (Hara et al., 1987) 및 혈소판 응집저해활성 (Yayabe et al., 1989)등 심순환기계 질환의 예방에 탁월한 효과와 함께 혈당강화 효과 (Hodgson et al., 1999; Van et al., 1999; Kuttan, 2002)가 있는 것으로 보고되었다. 또한 혈중 콜레스테롤을 저하시키고 (Hyon and Kim, 2001), 동맥경화의 억제 효과가 알려져 있으며 혈청 중의 지질농도를 저하시키고, 중성지질의 생성을 억제하여 비만을 방지하며, 모세혈관의 저항력도 증진시킨다 (Pack et al., 1997). 그밖에 항박테리아, 항바이러스, 항발암작용, 위액분비 촉진, 이뇨작용, 항염증 효과 등 다양한 생물학적 활성과 약리학적 효과를 가지는 것으로 보고되었다 (Katiyal and Mukhtar, 1997; Santosh et al., 1993). 녹차 중의 주요 카테킨은 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin 3-O-gallate(EGC), (-)-epicatechin (EC), (+)-gallocatechin (GC), (+)-catechin(C)등이 있으며 (Lin, 1995) 그 중에서 EGCG는 항산화기능이 가장 강력한 것으로 평가되고 있다 (Fig. 1). 항산화제로 널리 이용되는 비타민 E보다 25배, 비타민 C보다 100배 더 효능이 있다 (Kang et al., 1999). 동시에 고농도에서는 특정 암세포에서 apoptosis를 오히려 유도하는 항암효과도 보고되어 다양한 기능을 갖고 있는 물질로 현재 인체에 있어서 그 유용성 및 그 기전에 많

은 연구가 활발히 진행 중에 있다 (Wei et al., 1999; Mukhtar and Ahmad, 2000).

특히 신체와 외부의 경계인 epidermal keratinocyte은 정기적, 연속적으로 자외선 뿐 만아니라 chemical을 포함한 다양한 환경적 및 생리적 스트레스에 노출되어 있다. Human keratinocyte (각질형성세포)는 때때로 이러한 유해한 자극에 apoptosis가 일어나거나, 그렇지 않으면 생존할 수 있는 신호전달을 개시한다 (Dicker-Cohen et al., 2003). Human keratinocyte는 표피를 구성하는 가장 주된 세포로 각질을 형성하여 피부를 보호하는 기능 이외에도 여러 사이토카인 (cytokines)을 생산하여 다양한 염증반응과 면역반응에 관여할 뿐만 아니라 주위 세포의 성장에도 관여한다 (Lee et al., 2005; Sesto et al., 2002; Lemaitre et al., 2004).

세포는 세포외부에서 자극을 받으면 자극의 종류에 따라 증식, 분화, 세포사멸 (apoptosis)등의 적응반응을 나타낸다. 세포는 세포막의 수용체로 외부의 자극을 감지하고, 수용체의 세포질 내에 존재하는 효소활성을 변화시킴으로써 세포 내 신호를 생성한다. 수용체의 정보는 세포질 내의 신호전달체계에 따라 증폭되고, 궁극적으로는 유전자 조절의 장(場)인 세포핵으로 전달된다. 환경의 스트레스에 대해 다양한 적응반응 중 특히 현저한 것은 MAPK (mitogen-activated protein kinase)의 활성화를 매개로한 대처이다 (오 외, 2006). MAP Kinase는 세포 외부에서 세포 내부의 핵으로의 정보전달을 담당하는 중요한 세포내 신호전달 시스템의 하나로 ERK (extracellular signal regulated protein kinase), p38, JNK (c-Jun N-terminal kinase)의 세 가지 경로로 구성되어 있다 (Verheij et al., 1998).

염증성 사이토카인이나 스트레스, DNA 손상 등의 외부 스트레스에 의해 MAPK가 활성화되며 3단계의 kinase 연쇄반응을 가진다. 이 경로의 중요한 기능은 스트레스의 양과 질에 따라 생존을 유도 할 것인지 혹은 세포사멸을 유도하여 손상된 세포를 제거할 것인지를 결정하는 것이다 (오 외, 2006). ERK는 세포의 증식과 분화과정에 관여하는 중요한 MAPK이며, 또한 p38는 외부 스트레스에 의해 활성화 되어 각질형성세포의 분화와 apoptosis를 조절하고 (Eckert et al., 2002), JNK는 신호전달 경로와 함께 염증 반응과 관련된 activator protein-1 (AP-1), COX-2 등의 발현을 증가 시키는 것으로 보고되고 있다 (Bachelor and Bowden, 2004). Caspase family 또한 연쇄신호전달을 통해 세포사멸을 실행하는 것으로 알려져 있다 (Cemeli et al., 2002). 한편 또 다른 세포생존기전중의 하나는 PI3K(phosphatidyl-inositol 3-kinase) pathway이다. 이 kinase cascade는 일련의 중요한 중간 매개체들을 활성화시키며 Akt (serine /threonine protein kinase)경로의 활성화를 통해 세포사멸을 저해한다고 보고되어진다 (오 외, 2006).

또한 UVB 자극을 받으면 외인성 항산화제가 없어도 체내 항산화 시스템이 가동이 된다. 그 기전의 하나로 내인성 항산화제인 SOD, catalase 등의 항산화 효소의 발현이 증가하게 되는데 이것을 조절하는 단백질이 Nrf-2 이다. 외부의 자극으로부터 세포질의 Nrf-2가 활성화되고 결합되어 있던 keap 1 단백질과 분리되면서 Nrf-2가 핵 안으로 이동하게 되고 antioxidant response element (ARE)와 결합하여 SOD, catalase, hemeoxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione S-transferase A2 (GSTA2) 등의 단백질들을 생성한다. 이 단백질들은 UVB로부터 생성된 ROS를 제거하여 세포를 보호한다 (Hirota A et al, 2005).

이러한 세포 신호 전달 경로에 대한 EGCG의 효과에 관하여 여러 연구들이 보고되고 있다 (Chung et al., 2003; Santosh et al., 2001; Hisayoshi Kondo et al., 2004). 따라서 본 연구에서는 위의 연구 결과들을 바탕으로 하여 human keratinocyte인 HaCaT cell에 UVB를 조사하여 인위적으로 스트레스를 부여하여 ROS의 생성을 유도한 후, EGCG의 투여로 HaCaT 세포에서 일어나는 세포생존 및 세포사멸 과정의 항산화 신호전달 체계와 관련된 녹차 EGCG의 세포 보호 효과 대해 규명하고자 한다.



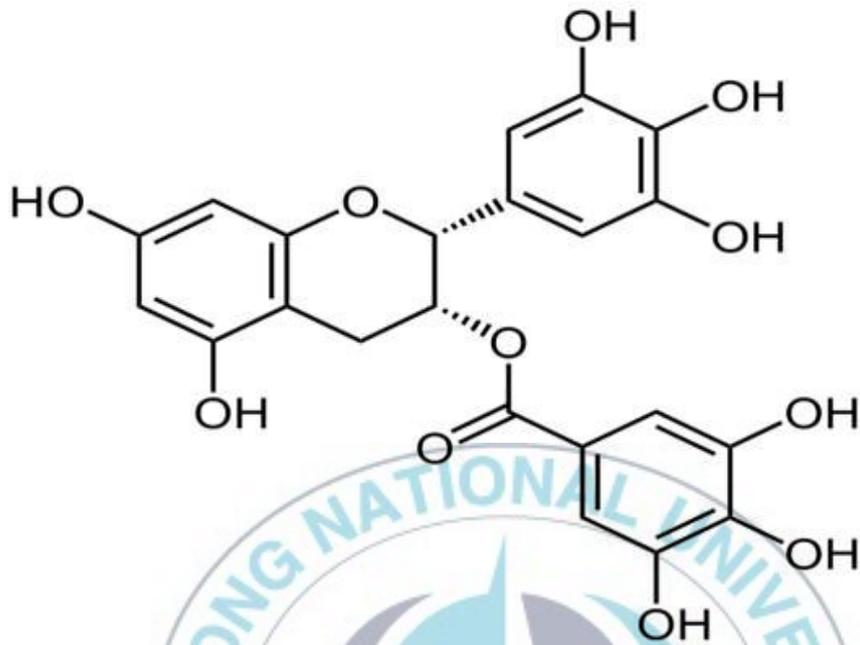


Figure 1. Chemical structure of (-)epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

II. 재 료 및 방 법

1. 재 료

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin 용액, 0.25% trypsin-EDTA, fetal bovine serum (FBS)는 HyClone Laboratory Inc. (Logan, UT)로부터 구매하였다. MTT (methylthiazole tetrazolium), DMSO (dimethyl sulfoxide), HBSS (Hanks' balanced salt buffer)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)로부터 구매하였다. Protein standard marker는 BIO-RAD Laboratories (Hercules, CA)의 것을 사용하였으며, enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit는 Perkin Elmer Life science (Wellesley, MA)로부터 구매하였다. pAKT, Akt, ERK, pJNK, pp38, PARP, caspase-3, Nrf-2, p-p38, Bcl-2, tubulin 및 actin의 1차 항체와 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)로부터 구매하였다. Cleaved caspase-3와 pERK는 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA)의 것을 사용하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 는 Signaling Chemical Co. (St. Louis, MO)의 것을 사용하였고 L-ascorbic acid는 Shinyo pure Chemicals 사 (Osaka, Japan) 제품을 사용하였다.

2. 실험방법

1) Human keratinocyte (HaCaT cell) 세포 배양

HaCaT 세포는 10% FBS와 penicillin/streptomycin (10 μ l/ml)을 첨가한 DMEM 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2) 세포 독성 실험 (MTT assay)

96-well plate에 HaCaT를 2.5×10^4 cells/well로 접종하여 24시간 배양하였다. 시료를 처리하기 전 FBS가 없는 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. DMSO와 PBS를 처리한 대조군과 UVB만 처리한 실험군, EGCG만 처리한 실험군으로 나누어 실험하였다. MTT 시약은 DMSO에 5 mg/ml의 농도로 녹여 보관하였으며 FBS가 없는 DMEM 배지 95 μ l에 MTT 시약 5 μ l를 혼합하여 사용하였다. MTT 시약 처리 후 세포는 37°C에서 1시간 동안 배양하였으며 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 비교하였다.

3) ROS 측정

12-well plate에서 배양한 HaCaT 세포에 시료를 처리한 다음 PBS로 두 번 세척하고 HBSS에 20 μ M DCFH-DA를 처리하였다. 세포를 37°C에서 30 분 동안 배양한 다음 상층액을 spectrofluometry로 측정하였다. 여기 파장은 485 nm, 방사 파장은 523 nm에서 측정하였다.

4) DPPH assay

EGCG의 항산화 효능은 DPPH assay를 이용하여 free radical 소거능력을 측정하였다 (Yoshida et al., 1989). 각 농도별 시료 (10~480 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 메탄올에 녹인 뒤 4 ml씩 취하고, 1.5×10^{-4} M 농도로 메탄올에 용해시킨 DPPH 용액 1 ml와 잘 혼합하였다. 실온에서 30분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군에는 시료를 첨가하지 않고 용매인 메탄올로 측정하여 유리 라디칼의 소거 활성을 백분율로 나타내었다.

5) 배양한 세포에 자외선(UVB) 조사 및 EGCG 처리

자외선 조사는 UVB lamp를 사용하였으며, 조사 시에는 세포 배양 용기에서 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척한 후 배양 용기의 크기에 따라 적당량의 PBS로 세포를 덮은 후 UVB (280~320nm) 50 mJ/cm^2 을 조사하였다. Dr. Hönle UV meter를 사용하여 광원을 측정 한 후 거리에 해당하는 시간을 조절하여 조사하고자 하는 광량을 선택하여 조사하였다. UVB 조사 후 PBS로 1회 세척한 후 0 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM 의 농도의 EGCG를 배지와 1:1000로 희석하여 EGCG를 처리하였다. 이후 발현되는 단백질에 따라서 시간을 달리하여 배양하였다.

6) Western immunoblot

6-well plate에서 배양한 HaCaT 세포를 phosphatase 저해제가 첨가된 ice-cold PBS로 두 번 세척하였다. 그 다음 각 well에 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% SDS, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 nM aprotinin, 20 μM leupetin, 50 μM phenanthroline, 280 μM benzamidine-HCl)과 10 \times protease inhibitor cocktail을 9:1 비율로 만든 lysis buffer를 넣고 얼음 위에서 30분

간 lysis한 후 cell scrapper로 cell을 모은 뒤 12,000 rpm 4°C에서 20분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 상층액에 SDS-PAGE용 sample buffer를 3:1의 비율로 첨가하여 100°C에서 5분간 가열하여 전기영동용 sample을 만들었다. 40 µg의 단백질을 SDS-PAGE를 통하여 분리하였으며 nitrocellulose membrane으로 분리된 단백질을 이동시켰다. Membrane은 5% skim-milk가 포함된 plain buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 136 mM NaCl)로 1시간 동안 blocking 하였으며 그 후 1차 항체를 적당한 비율로 희석하여 4°C에서 16시간 반응시켰다. washing buffer로 20분씩 3회 세척하고 난 후 2차 항체를 1: 5000으로 희석하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 washing buffer로 20분씩 3회 세척하였다. ECL detection kit를 사용하여 발광시켜 사진으로 현상하였다.

7) 핵 획분 추출

Nrf-2의 발현량을 측정하기 위해 Nuclear extract 방법을 사용하였다 (Kang et al., 2008). 세포 배양 후 약 80% 정도 세포가 자라면 UVB를 조사한 후 EGCG를 투여하여 6시간 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 PBS를 이용하여 cell을 회수 하였다. 그 다음 1200 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. Cell lysate에 1×Hypotonic Buffer를 첨가해 4°C에서 15분 동안 방치한 후 detergent를 넣고 13000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고, 흡광도를 측정한 후 cytosol fraction으로 사용하였다.

침전물에 Complete Lysis Buffer를 넣어 150rpm에서 30분 동안 반응시킨 후, 13000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액의 흡광도를 측정한 후 nuclear fraction으로 사용하였다.

8) 통계

본 실험에 대한 모든 실험 결과는 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ 로 나타내었고, 실험군 간의 유의성은 SPSS ver. 10.0 프로그램을 사용하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. UVB 및 EGCG의 HaCaT 세포에 대한 독성

UVB 조사량에 대한 세포의 안정성을 측정하기 위하여 HaCaT 세포를 96-well plate에 배양하여 무혈청 배지에서 24시간 배양한 다음 0, 25, 50, 100 mJ/cm²의 UVB를 조사한 후 24시간 동안 배양한 후 세포독성을 MTT로 측정하였다. Fig. 2에 나타난바와 같이 25 mJ/cm²의 UVB 처리에 의하여 26% 정도의 세포사멸이 일어났으며, 50 mJ/cm²의 UVB 처리에 의하여 50% 정도의 세포사멸이 일어났다. 그리고 100 mJ/cm²의 UVB 처리에 의하여 70% 정도의 세포사멸이 일어났다. 따라서 UVB에 의한 세포처리는 세포의 50% 가량이 생존 가능한 상태인 50 mJ/cm²에서 세포를 처리하여 EGCG에 의한 효과실험을 진행하였다.

Fig. 3은 EGCG에 의한 세포 독성을 나타낸 것으로 0, 0.5, 1, 5, 10, 50 μM의 EGCG를 UVB를 조사하지 않은 HaCaT 세포에 처리 하였다. 그 결과 0~10 μM의 농도로 처리한 결과 HaCaT 세포의 증식에 영향을 미치지 않는 것으로 나타난 반면, 50 μM로 처리한 구에서는 세포생존율이 50% 이하로 감소하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 50 μM의 EGCG가 세포의 항산화능을 증가하기 보다는 오히려 세포 독성을 유발하는 것으로 나타났다. 이러한 결과의 원인은 항산화제인 EGCG가 산화촉진제(prooxidant)로서의 성질을 가지고 있어서 오히려 고농도에서 세포 독성을 일으킬 수 있다는 주장과 일치하고 있다 (Yang et al., 1998). 이상의 결과

는 UVB는 조사량에 비례하여 세포사멸을 유도하며 높은 농도의 EGCG는 오히려 항산화효과보다는 산화촉진제로써 작용하여 세포사멸을 유도한다는 보고와 일치하고 있다 (Van Leatham et al., 2005). 위의 결과에 따라 UVB로 처리된 HaCaT 세포에 대한 EGCG의 세포보호효과를 분석하기 위한 실험은 50 mJ/cm²의 UVB 처리조건과 10 μM 이하의 EGCG 농도 범위 내에서 실시하였다.



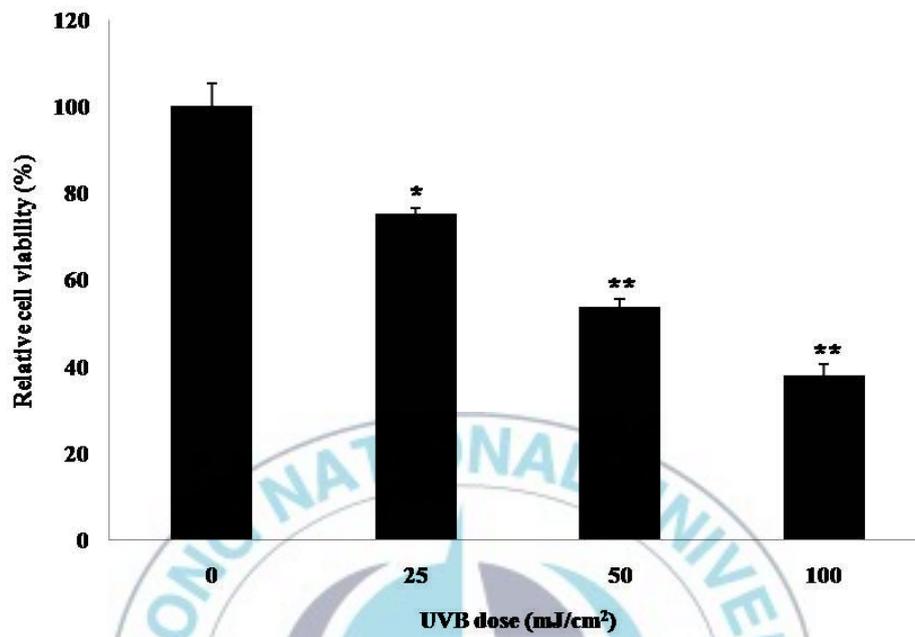


Figure 2. Dose-dependent effect of EGCG in the viability of HaCaT cells.

HaCaT cells were preincubated without FBS for 24hr at 37°C and then irradiated with UVB at various radiation of 25 or 50 or 100 mJ/cm². Values that share the different symbols are statistically different (*p<0.05, **p<0.01). Data represent the mean ± SEM of 3 experiments.

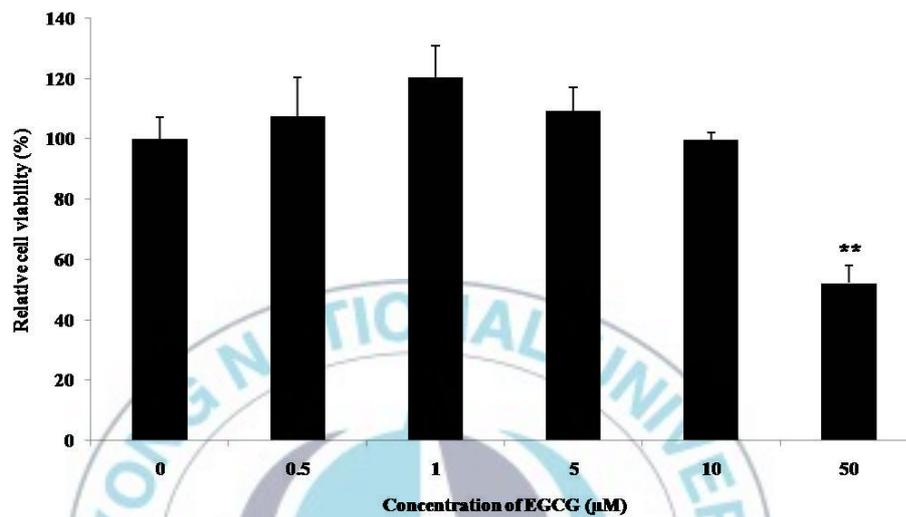


Figure 3. Cytotoxicity of EGCG on HaCaT cells.

HaCaT cells preincubated without FBS for 24 hr at 37°C were cultured with different concentration of EGCG for 24 hr 37°C. Cell viability was measured by MTT assay. Values that share the different symbols are statistically different (**p<0.01). Data represent the mean \pm SEM of 3 experiments.

2. EGCG의 활성산소종(ROS) 생성 억제효과

UVB 처리에 의한 HaCaT 세포내 ROS의 변화를 측정하기 위하여, UVB로 처리된 HaCaT 세포에 0-10 μM 의 EGCG를 처리한 후에 세포내 활성산소 농도를 DCFH-DA 형광 probe를 사용하여 측정하였다. 무혈청 배지에서 24시간 동안 배양한 세포를 50 mJ/cm^2 으로 처리한 결과, 50 mJ/cm^2 의 UVB 조사에 의해 HaCaT 세포내에서의 ROS 농도가 35% 가량 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 그리고 UVB로 처리된 세포에 0-10 μM 의 EGCG를 처리한 결과 ROS 생성이 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었다.

세포내 활성산소종은 일정 농도 이상 생성 시에 세포사멸에 관여하는 단백질을 활성화시켜 대부분 생명체의 기관에서 세포 사멸을 일으키며, 특히 자외선에 의한 염증 반응, 일광화상세포 형성, 광발암, 광노화 현상 등의 원인으로도 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다 (Kensler, 1986; Frenkel, 1992; Stewart et al., 1996). ROS의 세포사멸에 대한 효과와 같이 본 실험에서도 UVB 조사에 의해 ROS 생성이 증가되어 HaCaT 세포의 사멸을 유도하는 것으로 판단되며, 세포독성 분석결과와 일치함을 알 수 있었다.

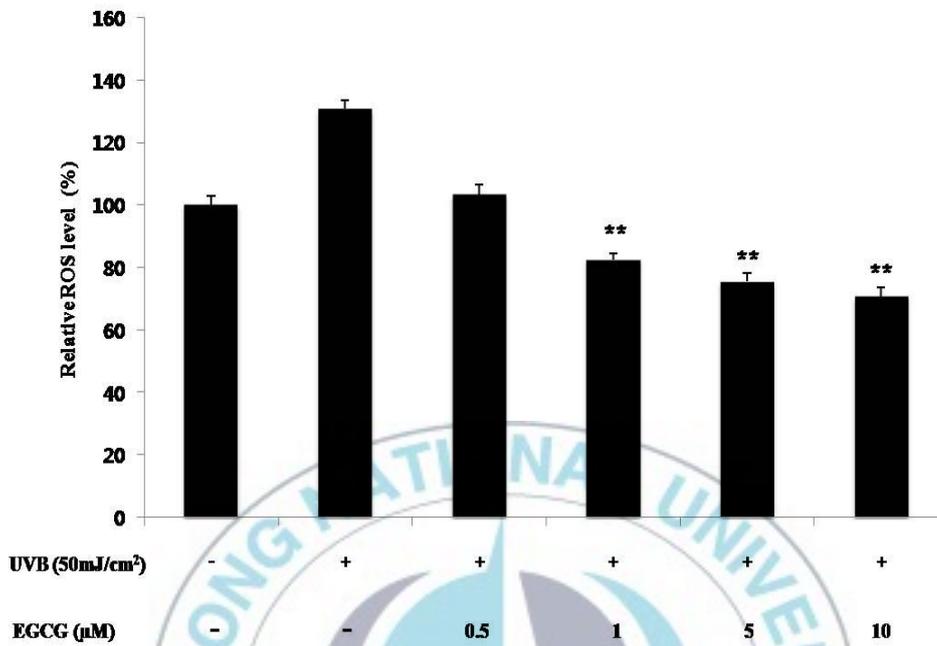


Figure 4. Effect of EGCG on intracellular ROS level in UVB-induced HaCaT cells.

HaCaT cells grown to near confluency were exposed to 50 mJ/cm² of UVB alone or post-treated with the indicated concentration of EGCG and harvested after 24 hr. Intracellular reactive oxygen species were measured by DCFH-DA with fluoroscencemetry. Values that share the different symbols are statistically different (**p<0.01). Data represent the mean ± SEM of 3 experiments.

3. EGCG의 DPPH radical 소거능

이상의 실험에서 EGCG는 강력한 항산화제로 UVB 자극으로 인해 세포 내 생성되는 활성 산소 종 (ROS)을 소거하여 직접적으로는 ROS를 소거하여 항산화효과를 발휘할 뿐만 아니라, 간접적으로는 세포내 구성성분인 DNA, 단백질, 지방 등의 손상을 방지함으로써 세포보호효과를 나타낼 수 있는 것으로 평가되었다. 이러한 EGCG의 항산화능은 vitamin A, C, E 등과 같은 항산화 비타민보다 더 탁월한 것으로 알려져 있다 (Surh, 2004). 따라서 항산화 비타민 중 비타민 C (L-ascorbic acid)와 EGCG의 항산화제로서의 항산화 활성을 측정, 비교하였다.

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 520 nm에서 강한 흡수 band를 보이나, 전자나 hydrogen radical을 하나 받으면 phenoxy radical을 생성하여 흡수 band도 사라지고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하여, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔은 점점 옅어지게 되고, optical density (O.D)도 감소하게 된다 (Blois, 1958; Yoshida et al., 1989)는 원리에 따라 실험을 하였다.

실험 결과, 유리 라디칼의 생성을 50% 제거 할 수 있는 농도를 나타내는 EC₅₀ (Effective concentration 50)값이 EGCG는 1.1 µg/ml을 나타내었고, 양성대조군으로 같이 측정한 L-ascorbic acid의 EC₅₀은 4.2 µg/ml로 L-ascorbic acid에 비해 EGCG가 약 4배 정도의 높은 유리 라디칼의 소거능을 보여 주었다 (Fig. 5).

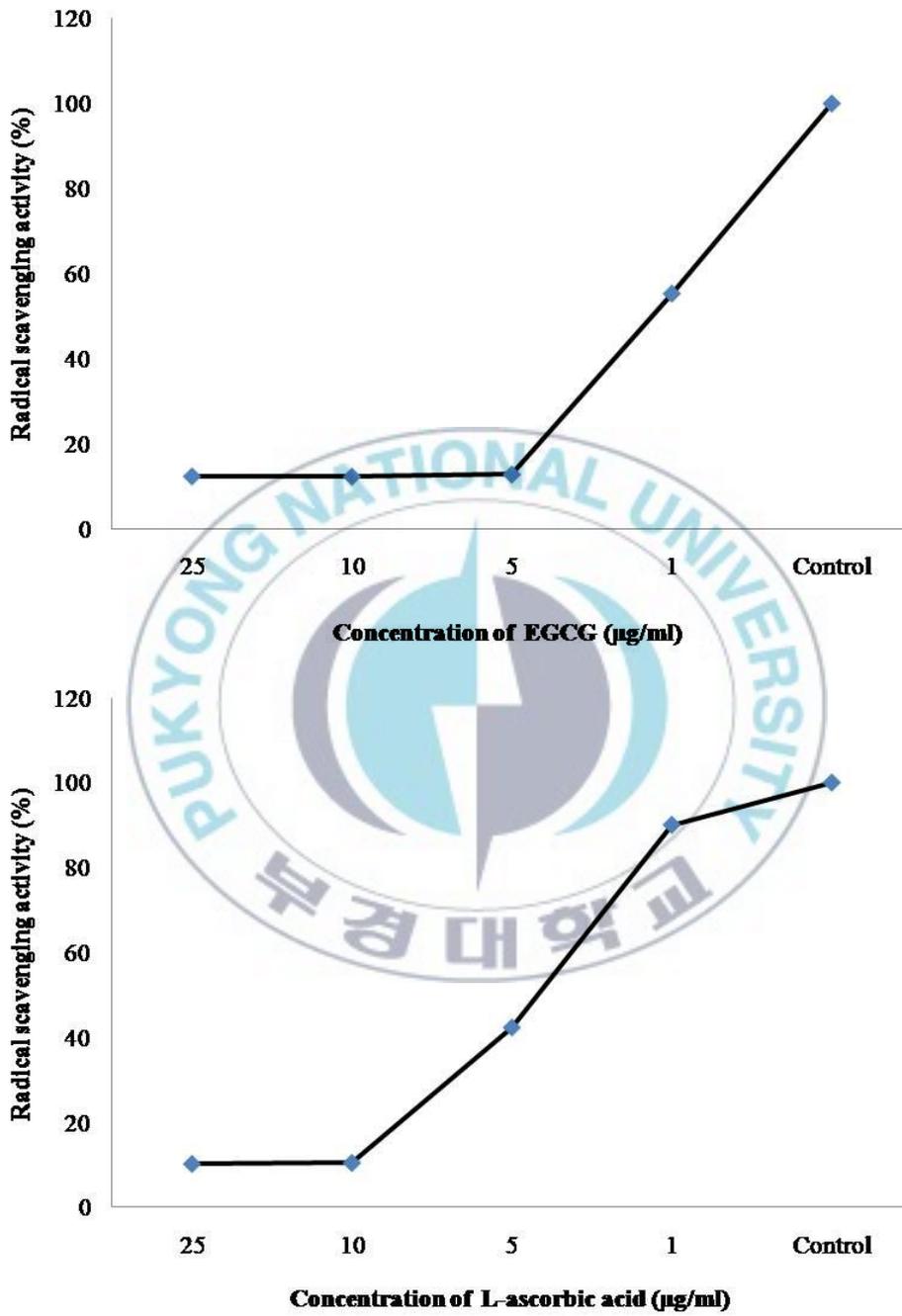


Figure 5. Measurement of DPPH radical scavenging activity.

4. UVB 처리된 세포에 대한 EGCG의 효과

세포는 자외선과 같은 외부 스트레스를 받을 경우 스스로 회복 가능한 경우 세포내 생존기전을 통하여 손상된 세포내 소기관이나 거대분자를 복구시킴으로써 생존을 위해 적응하거나, 또는 스스로 치유할 수 없을 정도로 결정적인 손상을 받게 되는 경우에 변이세포로 전환되는 것을 방지하기 위하여, 세포사멸 (apoptosis)에 관련된 단백질들을 활성화하여 세포자살을 일으킨다 (최, 2004). 세포 사망 (cell death)에는 두 가지 기전이 있는데 외부적 환경의 변화에 의해 급격히 일어나는 수동적 죽음인 괴사 (necrosis)와 세포내부에 존재하는 자살 프로그램의 신호에 의해 개시된 세포내 여러 유전자들이 발현되거나, 단백질들이 활성화됨으로써 일어나는 능동적인 죽음인 세포사멸 (apoptosis)이 있다 (조 외, 1998). 자외선에 의한 세포사망은 한꺼번에 많은 양의 자외선 조사 시 세포괴사 (necrosis)가 일어나기도 하지만 대부분은 apoptosis 기전에 의해 이루어진다.

세포 증식 (proliferation)과 세포사멸 (apoptosis)은 여러 가지 단백질이 관여하는 복잡한 생물학적 현상으로 유전적으로 조절되고 있다. Apoptosis는 직·간접적으로 caspase family, MAP kinase 중 JNK 및 p38의 활성화에 의해 유도되며 Bcl-2 family의 활성화에 의해 억제된다. HaCaT 세포에서 UVB에 의한 ROS의 증가로 Fas와 FasL 복합체가 형성되어 caspase-8이 활성화된다. Caspase-8은 2종류의 경로를 통해 apoptosis를 유도하는데 하나는 caspase-8가 직접 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis를 유도하는 경로이며, 또 다른 하나는 Bid를 절단하여 활성화하고 cytochrome c가 미토콘드리아에서 세포질로 유리되어 caspase-9가 활성화되어 caspase-3를 활성화시킴으로써 apoptosis를 유도하는 경로이다. cytochrome c가

caspase-9을 활성화시키는 후자의 과정에서 Bcl-2의 제어를 받는다 (오 외, 2006).

Bcl-2 family는 Bcl-2, Bcl-xL과 같은 apoptosis을 억제하는 단백질과 Bax, Bid와 같이 apoptosis을 촉진하는 단백질이 있다 (오 외, 2006). 즉, 세포성장 인자나 외부자극 등이 수용체에 결합하나 자극하게 되면 PI3K등이 활성화되고, 이것은 Akt 등과 같은 하부구조 인산화 효소 (down stream kinase)를 인산화시켜 활성화시킨다. 이들에 의해 Bad가 인산화되면, 인산화 된 Bad가 Bcl-2나 Bcl-xL 단백질로부터 분리되어 최종적으로 Bcl-2나 Bcl-xL은 세포사멸 억제 단백질의 기능을 수행하게 된다. 또는, Bcl-xL이 Bax에 대한 세포사멸작용을 억제하여 세포의 생존을 유도하기도 한다 (조 외, 1998). Chung et al., (2003)의 연구에서는 UVB 조사 후 EGCG를 농도별로 처리한 군에서 Bax의 발현량이 감소하는 반면, Bcl-2의 발현량은 증가하는 경향을 보였는데 그 결과 apoptosis가 저해된 것으로 나타났다.

JNK, p38은 자외선을 포함한 외부의 여러 스트레스성 자극에 의해 활성화된다. JNK (c-Jun N-terminal kinase)는 자외선 조사에 의해 전사인자인 c-Jun의 말단에 있는 63번째와 73번째의 Ser 잔기를 인산화 하는 단백질 kinase이다. JNK경로가 활성화되면 인산화된 JNK는 핵에 축적되고 apoptosis 유도한다. p38 또한 자극에 의해 인산화되어 apoptosis를 유도한다 (오 외, 2006). 이와 같은 신호전달 경로에 대한 EGCG의 보호 효과에 대한 연구 중, Santosh et al., (2001)의 실험은 UVB 조사 후 EGCG를 투여 한 다음 배양시간을 달리하여 측정한 결과 JNK와 p38의 인산화가 감소하는 경향을 보였다. 즉 EGCG가 이 두 단백질의 활성화를 억제함으로써 apoptosis를 저해한다고 보고하고 있다.

또한 외부 스트레스에 대한 Akt와 ERK의 활성화는 세포 생존 및 증식

에 필수적인 역할을 담당하는 신호 전달 경로이다. MAP kinase 종류 중 하나인 ERK 경로는 세포 성장 인자, 사이토카인 등을 인지하여 활성화된 후 세포 내로 증식 및 생존에 관련한 신호를 전달하는 것으로 알려져 있다 (Pearson et al., 2001). 또 다른 세포 생존 관련 신호전달경로인 Akt는 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)에 의해 매개되며 Akt 경로의 활성화는 cytochrom C의 방출과 procaspase-3, procaspase-9의 활성화를 억제하여 apoptosis를 저해한다고 보고되고 있다 (Kulms and Schwarz, 2002). 이를 증명하는 실험으로 Chung et al. (2003)의 연구에서 UVB 조사 후 EGCG를 농도별로 처리한 군에서 Akt과 ERK의 인산화가 증가되는 것이 증명되었다. 반면, Hisayoshi Kondo et al. (2004)의 실험에서 자외선 처리된 각질세포에 EGCG를 처리함으로써 caspase-3의 활성화를 억제하고 그 결과 그 down-stream 단백질인 PARP의 단편화를 억제하는 EGCG의 세포보호 효과를 증명함으로써 EGCG가 자외선 처리된 각질세포에 대하여 antiapoptosis 효과가 있다는 것을 입증하였다.

따라서 본 실험에서는 위의 이론과 보고들을 바탕으로 EGCG의 효과를 측정하기 위해 50 mJ/cm²의 광량으로 UVB를 HaCaT 세포에 조사하여 apoptosis를 유도한 상태에서 EGCG를 투여한 후 신호전달체계에서 발현되는 여러 단백질들의 변화를 관찰하여 그 기전을 증명하고자 하였다. 즉 EGCG가 UVB에 의해 유도되는 caspase-3, PARP, JNK, p38 등의 활성화 저해를 통해 세포사멸 (apoptosis)을 저해할 수 있는지와 ERK와 PI3K/Akt, Bcl-2 등의 활성화를 통해 세포증식 및 생존에 관여하는지 확인하기 위하여 실험을 실시하였다. 또한 Nrf2의 세포질에서 핵으로의 translocation 정도를 측정함으로써 EGCG에 의한 항산화효소의 전사 유도를 측정하였다.

4-1. UVB 조사 후 EGCG에 의한 HaCaT 세포 증식효과

ERK와 Akt이 인산화되면 apoptosis가 저해되고 세포성장이 촉진된다고 알려져 있다 (Chung et al., 2003). 따라서 UVB 조사에 의해 손상을 받은 HaCaT 세포에 EGCG 처리 농도와 시간에 따른 세포 증식의 정도를 확인하기 위하여 western blot을 통해 ERK와 Akt의 인산화정도를 측정하였다.

Fig. 6에서와 같이 대조군과 비교했을 때 UVB만 조사한 군에서는 UVB 자극으로 인해 ERK의 인산화가 감소하였으나, 1 μ M, 5 μ M 및 10 μ M의 EGCG를 처리함으로써 ERK 단백질의 인산화 (phosphorylated ERK)가 농도의존적으로 증가하여, 10 μ M의 EGCG 처리에 의하여 정상으로 회복되는 것으로 나타났다. 반면에, total ERK 발현량은 모든 농도에서 동일하였다. 따라서 EGCG가 UVB의 자극으로 인해 감소된 ERK의 인산화를 증가시킴으로써 세포를 보호하는 것으로 보여 진다.

현재까지 알려진 바에 의하면, PI3K은 phosphatidylinositol-3-phosphate를 인산화시켜, 다음으로 인산화된 Akt은 세포막으로 이동한 후 활성을 갖게 된다. 활성화된 Akt는 다시 Bcl-2 family나 Bad, caspase-9와 같은 세포의 생존에 관여하는 target 단백질들을 인산화시켜 세포사멸을 저해하고 세포 생존을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Datta et al., 1997; Cardone et al., 1998).

본 실험 결과에서도 대조군과 비교했을 때, EGCG 농도 의존적으로 PI3K와 이것의 직접적인 downstream target인 Akt 인산화 (phosphorylated Akt)가 증가되었고, total Akt의 발현량 또한 대조군과 비교시 변화를 보이지 않았다. 이것은 EGCG가 PI3K 및 Akt경로의 활성화를 통해 apoptosis를 저해하고 세포 생존에 기여함을 증명하는 결과이다

(Fig. 6).

또한 Akt 인산화의 증가는 Bcl-2, Bad, caspase-9 등의 신호전달에 영향을 주어 apoptosis를 억제하는 것으로 보인다 (Fig. 9).

본 실험결과, UVB에 의한 자극을 받은 HaCaT 세포에서 EGCG는 농도 의존적으로 ERK와 PI3K와 Akt 의 활성화를 통해 세포의 생존 및 성장을 촉진함으로써 녹차 추출물인 EGCG가 항산화 효과를 가지는 것으로 나타났다.



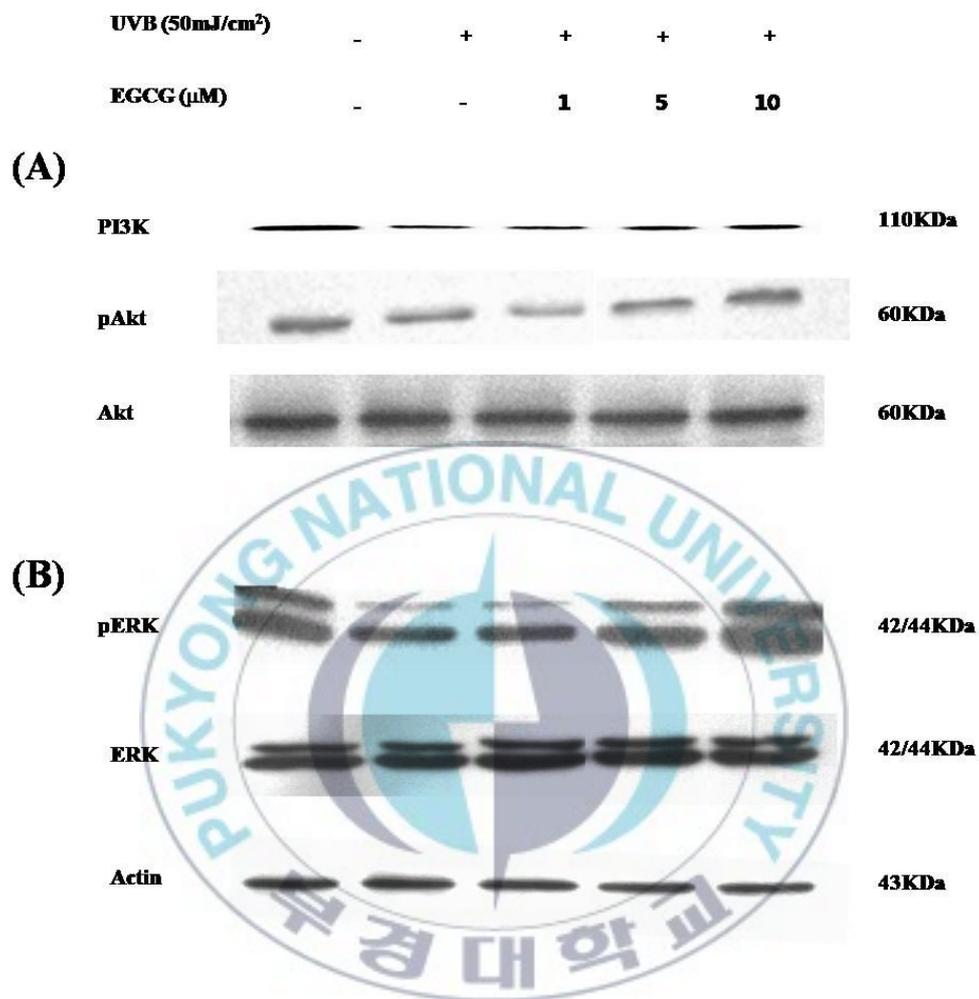


Figure 6. The effect of EGCG on the phosphorylation of PI3K/Akt and ERK 1/2 in UVB-induced HaCaT cells.

Cultured keratinocytes were incubated with EGCG (0–10 μM). After 24 hr, the cells were irradiated with UVB (50 mJ/cm²) and cultured for 1 hr. Bands shown are representative of triplicate experiments. A) EGCG augmented UVB-induced PI3K/Akt. B) EGCG increased the UVB-induced phosphorylation ERK.

4-2. UVB 조사 후 EGCG에 의한 HaCaT 세포 사멸효과

EGCG에 의한 UVB로 손상된 HaCaT 세포의 apoptosis 저해 작용을 확인하기 위하여 UVB 조사 후 EGCG를 처리한 HaCaT 세포에서 apoptosis에 관여하는 caspase family 중 cleaved caspase-3, MAP kinase 중 JNK 및 p38, Bad 단백질의 발현 변화를 western blot으로 확인하였으며, 이와는 반대로 apoptosis를 억제하는 단백질인 Bcl-2 family의 발현 변화를 분석하였다. 일반적으로 세포사멸이 유도되면 caspase-3가 활성화되어, 그 기질인 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)가 절단되어 85 KDa의 단편이 생성된다. PARP는 손상된 DNA single strand의 회복을 매개하는 효소로 절단이 된 경우에는 그 역할을 수행할 수 없게 된다 (Hengartner, 2000). Hisayoshi Kondo et al. (2004)의 실험결과에서 EGCG를 처리하였을 경우 농도 의존적으로 caspase-3의 활성이 저하되고 이에 따라 PARP의 절단이 감소하는 것을 확인하였다. 본 연구결과에서도 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

Fig. 7에 나타난바와 같이 EGCG를 처리한 군에서 UVB에 의해 유도되는 caspase-3의 활성화와 그 down-stream인 PARP의 절단이 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 EGCG가 UVB 자극으로부터 진행된 caspase family의 연쇄 반응에서 caspase-3의 활성화를 억제시켜 활성화된 caspase-3에 의한 PARP의 분해가 억제되어 그 결과 생성되는 85 KDa의 PARP 단편의 생성이 감소된 결과이다. 따라서 EGCG 처리는 UVB에 의하여 활성화된 caspase-3의 활성을 억제함으로써 PARP 단편화를 감소시켜 세포 사멸을 억제하는 것으로 추측된다.



Figure 7. Suppression of UVB-induced apoptosis of HaCaT cells by EGCG treatment.

Cells were exposed to 50 mJ/cm² of UVB alone or post-treated with EGCG (0–10 μM) after UVB exposure and harvested after 24 hr. Cell lysates were prepared and western blotting was carried out using anti-cleaved PARP and anti-cleaved caspase-3.

MAP kinase 중 JNK 및 p38은 외부 스트레스에 민감하게 반응하는 신호전달 단백질이다. Western blot 결과, 대조군에서는 낮은 인산화 정도를 보였던 JNK 및 p38 단백질이 UVB 자극에 의해 현저하게 증가하였으며, 이는 UVB 자극으로 인해 활성화된 pJNK 및 pp38 단백질의 증가로 apoptosis의 신호전달 활성화를 의미한다. 하지만 EGCG의 처리에 의하여 UVB에 의하여 인산화된 pJNK 및 pp38 단백질의 농도가 EGCG 농도가 증가함에 따라 유의성 있게 감소되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 8). 본 실험의 결과는 UVB에 의해 매개된 MAPK 신호전달 경로에 대해 EGCG의 효과를 보고한 Santosh et al., (2001)의 실험에서와 마찬가지로의 결과를 나타내었다. 그리고 이와 유사한 실험으로 과일의 씨 또는 껍질에 함유되어 있는 catechin의 항산화 효능을 알아 본 Wu et al., (2006)의 실험에서도 UVB 자극 후 catechin을 처리한 군에서 JNK의 뚜렷한 인산화 감소를 확인할 수 있었지만 p38에서는 JNK와 같이 확연한 차이를 보이지 않았다. 따라서 본 실험의 결과와 앞선 연구들의 결과들을 통합하여 결론을 추론한 결과, EGCG는 JNK, p38의 활성을 저해시켜 HaCaT 세포의 apoptosis가 일어나는 것을 막아 세포 생존에 기여하는 것을 알 수 있었다.

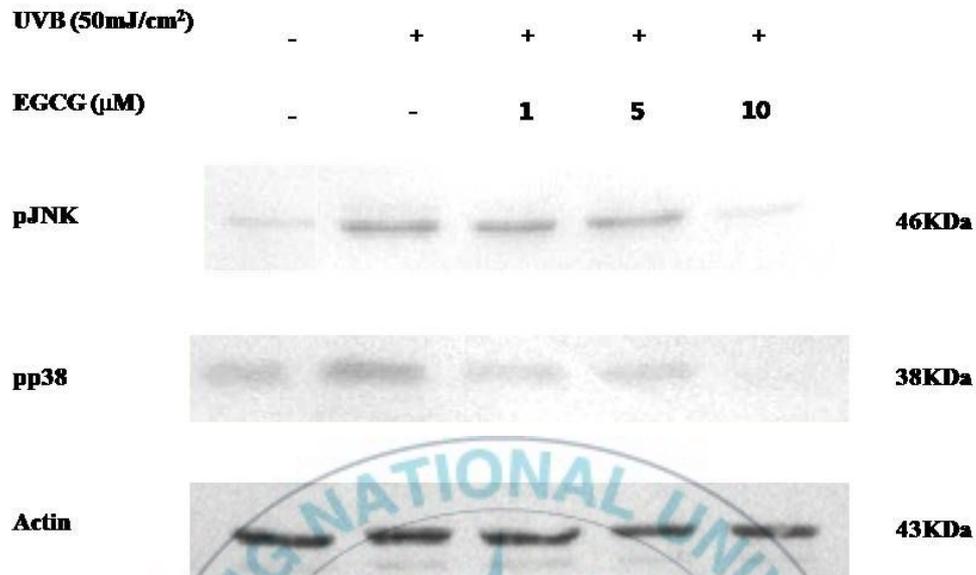


Figure 8. The inhibitory effect of EGCG on UVB-induced pJNK and pp38 expression in HaCaT cells.

Cultured keratinocytes were incubated with EGCG (0–10 μM). After 24 hr, the cells were irradiated with UVB (50 mJ/cm²) and cultured for 1 hr. Bands shown are representative of triplicate experiments.

한편, Bcl-2 family는 단백질 자극에 의해 유발된 apoptosis를 조절하는 또 다른 주요 단백질로 알려져 있다 (Hockenbery et al., 1990). Bcl-2 family 단백질 중 Bcl-2와 Bcl-xL는 가장 중요한 anti-apoptotic 단백질이다. 즉, 이들 단백질의 발현이 증가되면 세포는 계속 성장하며 apoptosis를 억제하여 세포의 생존에 관여하는 것으로 보고되고 있다 (Hockenbery et al., 1993). Chung et al., (2003)의 연구에서는 0.01, 0.1, 0.5 μM 농도의 EGCG를 사용하여 녹차의 항산화 효과를 분석한 결과, EGCG 농도가 증가할수록 Bax 단백질의 발현은 감소하고 Bcl-2 단백질의 발현량은 증가한다고 보고하였다.

앞선 연구결과들을 바탕으로 본 실험에서는 UVB 조사 후 EGCG를 처리한 HaCaT 세포에 대해 Bcl-2 단백질의 발현을 분석하였다. UVB 조사 후 EGCG의 1, 5, 10 μM 으로 농도를 달리하여 처리한 결과, Bcl-2 단백질의 발현은 EGCG 농도 의존적으로 증가 추세를 보였으나 Bax 단백질은 점차 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 9). 이는 EGCG가 Bcl-2 단백질의 발현을 증가시키고, apoptosis를 유도하는 Bax 단백질의 발현을 감소시킴으로써 결론적으로 UVB에 의해 유발된 HaCaT 세포의 apoptosis를 억제하는 것으로 해석된다.

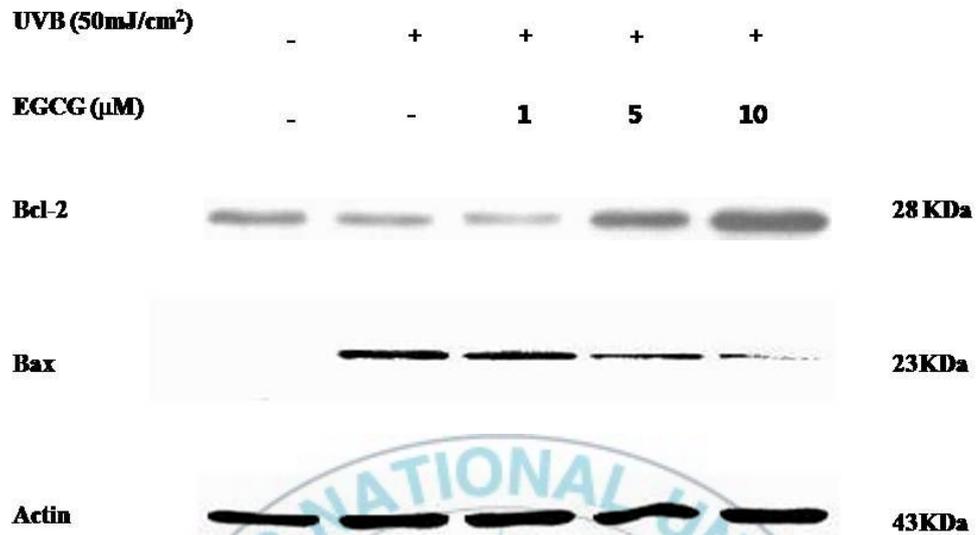


Figure 9. Effect of EGCG on Bcl-2 and Bax protein expressions in UVB-induced HaCaT cells.

Cultured keratinocytes were irradiated with UVB (50 mJ/cm²). After incubated with EGCG (0-10 μM) for 24 hr. Bands shown are representative of triplicate experiments.

5. UVB 조사 후 EGCG에 의한 전사인자의 변화

세포질 내 액틴에 결합된 단백질인 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)은 전사인자인 nuclear factor-erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor2 (Nrf2)와 Keap1-Nrf2 복합체를 형성하여 Nrf2를 세포질 내에 가두어 핵 내로의 이동을 방해함으로써 전사 활성을 억제하지만, 산화적 스트레스나 외인성 독성화학물질들에 의해 세포가 손상을 입게 되면 Keap1-Nrf2 복합체가 분리되어 Nrf2는 핵 안으로 이동하여 ARE sequence에 결합하여 전사인자로 작용함으로써 생체방어를 위한 여러 가지 단백질들의 유전자들의 발현을 개시한다 (Surh, 2004). 즉, 내인성 항산화제의 역할을 하는 SOD, catalase, HO-1, NQO1, GSTA2 등의 단백질이 생성되어 UVB로부터 생성된 ROS를 제거한다. Lim et al., (2007)의 연구에서는 대나무에서 추출한 플라보노이드 배당체인 Isoorientin의 항산화 효능을 알아보기 위해 cytosol과 nuclear의 Nrf2의 발현량을 western blot으로 분석하였다. 실험결과 항산화물질에 노출된 시간이 증가할수록 cytosol에서의 Nrf2의 양은 감소하고 nuclear에서의 Nrf2의 양은 증가함을 볼 수 있었다. 이 연구 결과는 같은 항산화 효능을 지닌 EGCG를 처리한 세포에서도 유사한 결과를 보일 것이라는 추측 하에 실험을 진행하였다.

본 실험에서 EGCG 처리 후 HaCaT 세포의 세포질과 핵 내의 Nrf2의 발현량을 western blot으로 분석하였다. Fig. 10 에서와 같이 세포질에서의 Nrf2는 EGCG 농도 의존적으로 감소하였으며 핵 내에서의 Nrf2는 EGCG 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 EGCG의 농도가 증가할수록 Nrf2의 세포질에서 핵 내로의 translocation을 도와 더 많은 항산화 효소의 생성을 증가시키는데 도움을 주는 것으로 보여 진다.

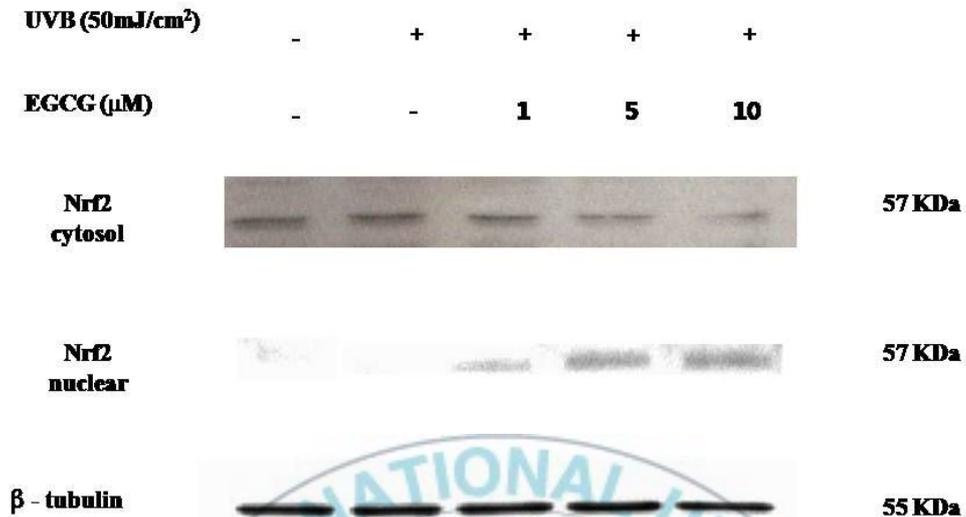


Figure 10. Effect of EGCG on the translocation of Nrf2 in UVB-induced HaCat cells.

Cultured keratinocytes were irradiated with UVB (50 mJ/cm²). After incubated with EGCG (0-10 μM) for 24 hr. Bands shown are representative of triplicate experiments.

IV. 참고 문헌

- Bachelor M.A., Bowden G.T.** UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin Cancer Biol.* 2004; 14: 131-138
- Blois MS.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958; 26: 1199-1200
- Brenner, W., Gschnait, F.** Decreased DNA repair activity in sunburn cell. A possible pathogenetic factor of the epidermal sunburn reaction. *Arch. Dermatol.* 1979; 266: 11
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Friscj S, Reed JC.** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998; 282: 1318-1321
- Cemeli E, Schmid TE, Aderson D.** Modulation by flavonoids of DNA damage induced by estrogen-like compounds. *Environ. Mol Mutagen.* 2004; 44: 420-426
- Crespy V, Williamson G.** A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J Nutr.* 2004; 134: 3431S-40S
- Chung JH, Han JH, Hwang EJ, Seo JY, Cho KH, Kim KH, Youn JI, Eun HC.** Dual mechanisms of green tea extract-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *The FASEB J* 2003; 10: 1096
- Danno, K., Horio, T., Takigawa, M., et al.** Role of oxygen intermediates in UV-induced epidermal cell injury. *J invest Dermatol.* 1984; 83:166
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME.** Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell in trinsic death machinery. *Cell.* 1987; 91: 231-241
- Dicker-Cohen T, Koren R, Liberman UA, and Ravid A.** Vitamin D process keratinocytes from apoptosis induced by osmotic shock, oxidative stress, and tumor necrosis factor. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1010: 350-353
- Donald, L.B., Daniel, P.H., Thomas, V.O.** An animal model of solar-aged skin : histological, phygical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *J/Photochem Photobiol.* 1987; 46(3).
- Eckert R.L., Efimova T., Dashti S.R., Balasubranian S., Deucher A., Crish J.F., Sturniolo M. and Bone F.** Keratinocyte survival, differentiation,

and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2002; 7: 36-40

Frenkel, K. Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol Ther.* 1992; 53:127-166

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzl. *Cell.* 2002; 109: S81-S96

Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA, White DW. Rel/NF- κ B/I κ B proteins and cancer. *Oncogene.* 1996; 13: 1367-1378

Giugliano D, Ceriello A, and Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 1996; 19: 257-67

Graham HN. Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Prev Med.* 1992; 21: 334-350

Hara Y, Matsuzaki T, and Suzuki T. Angiotensin converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* 1987; 61: 803

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; 407: 770-776

Hirota A, Kawachi Y, Itoh K, Nakamura Y, Xu X, Banno T, Takahashi T, Yamamoto M, Otsuka F. Ultraviolet a irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: Protective role in UVA-induced apoptosis. *J Invest Dermatol.* 2005; 124: 825-832.

Hisayoshi Kondo, Pack Hang See et al. polyphenol (-)-epigallocatechin gallate inhibits apoptosis induced by irradiation in human HaCaT keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 59-64

Hockenbery, D.M., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., S.J. Korsmeyer. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 1990; 348: 334-336

Hockenbery, D.M., Oltvai Z.M., et al. Bcl-2 functions in an anti-oxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993; 75: 241-251

Hodgson JM, Puddey IB, Burke V, Jordan N. Effects on blood pressure of drinking green and black tea. *J Hypertens.* 1999; 17: 457-463

Hyon S.H., Kim D.H. Long-term preservation of rat pancreatic islets under physiological conditions. *J Biotechnol.* 2001; 85: 241-6

Kang B.Y., Kim S.J., et al. Transcriptional profiling in human HaCaT keratinocytes in response to kaempferol and identification of potential transcription factors for regulating differential gene expression. *Exp Mol Med.* 2008; 40(2): 208-219

- Kang J.H., Pack Y.K., Chung S.T., Row K.H.** Extraction and purification of EGCG from green tea. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 1999; 14(5): 517-522
- Katiyal SK, Mukhtar H.** Tea antioxidants in cancer chemoprevention. *J Cell Biochem. Suppl.* 1997; 27: 59
- Kensler TW, Taffe BG.** Free radicals in tumor promotion. *Advances in Free Radical Biology and Medicine.* 1986; 2: 347-87
- Khokhar S, Magnusdottir SGM.** Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumption and polyphenol chemistry. *Prev Med.* 2002; 21: 334-350.
- Kim S.Y.** Effect of Far-Infrared Irradiation on the antioxidant activity and catechin of green tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2004; 33(4): 753-756
- Koh H.K.** Preventative strategies and research for ultraviolet associated cancer. *Health Perspect.* 1995; 103(suppl):255-257
- Kulms, D., Schwarz, T.** Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2002; 16: 196-201
- Kuprash DV, Udalova IA, Turetskaya RL, Rice NR, Nedospasov SA.** Conserved kappa B element located downstream of the tumor necrosis factor alpha geneL distinct NF-kappa B binding pattern and enhancer activity in LPS activated murine macrophages. *Oncogene.* 1995; 11: 97-106
- Kuttan R.** Antidiabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2002; 83: 109-116
- Lee E.H., Lee J.K., Hong J.T., Jung K.M., Kim Y.K., Lee S.H., Chung S.Y., Lee Y.W.** Protective Effect of Green Tea Extract , Catechin on UVB - Induced Skin Damage. *J. Fd Hyg. Safety.* 2001; 16(2): 117-124
- Lee K.M., Lee J.G., Seo E.Y. et al.** Analysis of genes responding to ultraviolet B irradiation of HaCaT keratinocytes using a cDNA microarray. *Br J Dermatol.* 2005; 152: 52-59
- Lemaitre G, Lamartine J, Pitaval A, et al.** Expression profiling of genes and proteins in HaCaT keratinocytes: proliferating versus differentiated state. *J Cell Biochem.* 2004; 93: 1048-1062
- Lim J.H., Park H.S., et al.** Isoorientin induces Nrf-2 pathway-driven antioxidant response through phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Arch Pharm Res* 2007; 30(12): 1590-1598
- Lin J.K.** Biochemical studies on the anticarcinogenesis of tea polyphenols. *Proceedings of the 3rd International Symposium on green tea, Seoul.* 1995; 1-11

- McKenzie, R., Connor, B., Bodeker, G.** Increased summertime UV radiation in New Zealand in response to ozone loss. *Science*(Washington DC). 1999; 285: 1709-1711
- Miyachi Y, Horio T, Imamura S.** Sunburn cell formation is prevented by scavenging oxygen intermediates. *Clin Exp Dermatol.* 1983; 8: 305-10
- Mukhtar H, Ahmad N.** Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 1698-1702
- Oh J.H., Kim E.H., et al.** Study on Antioxidant Potency of Green Tea by DPPH Method. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2004; 33(7): 1079-1084
- Orlowski RZ, Baldwin AS Jr.** Immunomodulation and anti-cancer activity of trends. *Mol. Med.* 2002; 8: 385-389
- Pack G.Y., Lee S.J., Im J.G.** Effect of green tea catechin on cytochrome xanthine oxidase activities in liver and liver damage in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc. Food Nutr.* 1997; 26: 901-907
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B.E., Karandikar M, Berman K, Cobb M.H.** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; 22: 153-183
- Petkau A, Chelack WS, Pleskach SD, et al.** Radioprotection of mice by superoxide dismutase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975; 65:886-93
- Santosh, K.K, Rajesh, A, Susan, E. Gray, S.W. and Hasan M.** Protection against 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-caused inflammation in SENCAR mouse ear skin by polyphenolic fraction isolated from green tea. *Carcinogenesis.* 1993; 14: 361
- Santosh, K.K, Farrukh A, Kashif A, Hassan M.** Inhibition of UVB-induced oxidative stress-Mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 176: 110-117
- Santosh K.K, Farrukh A, Anaibelith P, Hasan M.** Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* 2001; 22(2); 287-294
- Seo J.Y., Cho K.H., Eun H.C., Chung J.H.** Skin aging from phenotype to mechanism. *Ko J Invest Dermatol.* 2001; 8(4): 187-194
- Sesto A, Navarro M, Burslem F, and Jorcano JL.** Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 2965-2970

Simon E. Tobi, Mileka Gilbert, et al. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, protects against the oxidative cellular and genotoxic damage of UVA radiation. *Int. J. Cancer* 2002; 102: 439-444

Sovobodova A, Psotova J, Walterova D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2003; 147: 137-145

Stewart MS, Cameron GS, Pence BC. Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocyte in culture. *J Invest Dermatol.* 1996; 106(5): 1086-9

Surh YJ. Cancer chemopreventive effects of dietary phytochemicals. *J Korean Assoc Cancer Prev.* 2004; 9(2): 68-83

Van het Hof KH, Wiseman SA, Yang CS, Tijburg LB. Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 220: 203-209

Van Leathem, A., Claerhout, S., Garmyn, M., Agostinins, P. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 1547-1553.

Verheij M, Ruiter GA, Bouillon R, et al. The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis. *Radiother Oncol.* 1998; 47:225-32

Wei H, Zhang X, Zhoro JF, Wang ZY, Bickers D, and Ledwohl M. Scavenging of hydrogen peroxide and inhibition of ultraviolet light-induced oxidative DNA damage by aqueous extracts from green and black teas. *Free Radical Biol Med.* 1999; 26: 1427-1435

Yang GY, Liao J, et al. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis.* 1998; 19: 611-616.

Yayabe F, Kinugasa H, Takeo T. A simple preparative chromatographic separation of green tea catechins. *Nippon Nogenikagaku Kaishi.* 1989; 63: 845

Yoshida T, Mori K.H, Okumura T, Uehara I, Komagoe K, Fujita T, Okuda T. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenol on DPPH radical. *Chem. Pharm. Bull.* 1989; 37: 1919-1921.

김종태, 정동효 (2003). 차의 과학. 서울: 대광서림

오세관, 오역수 역 (2006). 세포신호 전달 일러스트맵. 서울: 월드사이언스.

최인장 역 (2004). 정보전달. 서울: 월드사이언스.

한국유전학회 (1998). 유전2. 서울: 월드사이언스.

< 감사 의 글 >

가장 먼저, 부족한 저에게 많은 가르침과 조언을 아끼지 않으신 김형락 교수님께 깊은 감사 드립니다. 교수님이 최고예요!!^^ 그리고 바쁘신 와중에도 여러모로 신경 써 주신 변대석 교수님, 최재수 교수님! 머리 숙여 감사인사 드립니다. 학부 때부터 지금까지 깊이 있는 가르침과 사랑을 베풀어 주신 류홍수 교수님, 남택정 교수님, 류은순 교수님께도 너무 감사드립니다.

그리고 너무 고생한 박경은쌤, 아름 킴, 박지영쌤 정말정말 고마워요. 너무 많이 도와주고 힘이 되어줘서 말로 다 못할 정도로 고맙습니다. 그래도 실험실에 있는 동안 좋은 추억 만들어 줘서 또 고마워요. 솔직히 공부와 실험을 병행하면서 많이 힘들었는데 많이 도와주고 배려해 줘서 너무 고맙기도 하고 미안했어요. 또 민섭선배, 오령이를 비롯한 우리 실험실 식구들도 너무 고맙습니다. 다들 복 받으실 꺼예요^^

그리고 나의 정신적 지주인 오랜 친구들 미지, 유미, 승하, 민정, 미정아~! 내 드디어 졸업한다~!! 그리고 논문 쓰는 동안 맛있는 거 많이 사주고 스트레스 다 받아주고 열심히 응원해 준 곰돌씨에게도 감사의 마음을 전합니다. 마지막으로, 내가 세상에서 제일 사랑하는 우리 아버지, 어머니, 언니들, 동생, 새로 태어난 조카 진욱이~^^ 사랑합니다~~ ♡