

고추 부위별추출물에 의한 종양세포의 세포사유도 - Hepatoma 세포와 MCF-7 세포 -

정 용 자

경성대학교 약학과

(Received March 19, 2003; Revised April 14, 2003)

Induction of Cancer Cell Apoptosis by the Extract of *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill* Sorted According to the Parts in Hepatoma Cells and MCF-7 Cells

Yong-Za Chung

College of Pharmacy, Kyungshung University, 110-1 Daeyon-dong, Nam-gu, Pusan 608-736, Korea

Abstract — Under the active search for biologically active novel agents for cancer prevention and treatment, some agents have been found from plants which are easily available. Our previous research on them revealed that *C. annuum L. var. angulosum Mill* have high antiproliferating effect on cancer cells. However, it has not been known whether the anticancer efficacy is different according to each part of *C. annuum L. var. angulosum Mill* or whether it can be changed by timing of harvest or solvent for extraction. Thus we compared the efficacy of each part of *C. annuum L. var. angulosum Mill* and assessed how much difference in the efficacy can be made according to the time of harvest or solvents for extraction. We observed the morphologic change and apoptosis 48 hr after treatment with the extract of each part of *C. annuum L. var. angulosum Mill* in MCF-7 mammary gland adenocarcinoma cells and human hepatoma cells. We also counted cancer cells by trypan blue method and MTT method to check the cytotoxicity. The leaf extract showed the highest anticancer effect among all the parts of *C. annuum L. var. angulosum Mill*; 50% and 70% reduction in the number of cancer cells was observed at 25 µg/ml and 50 µg/ml, respectively. It was more than 2 times as potent as 5-fluorouracil (5-FU). We found chromosomal fragmentation, clumping, and destruction by PI staining, and DNA fragmentation by electrophoresis. In conclusion, this study suggests that leaf extraction using water as solvent has the highest antiproliferative and apoptotic activity in cancer cells compared with other parts of extraction.

Keywords □ *Capsicum annuum*, morphology, apoptosis

천연물에는 항종양효과 등 여러 생리활성물질이 포함되어있다.^{1,4} 이에 우리들 식품 중 식탁에 흔히 오르는 수종의 식물을 대상으로 항종양효과를 관찰해 본 결과,¹⁾ 특히 고추의 항종양효과가 뚜렷하였으므로 고추의 부위별로 항종양효과를 관찰해 보았다. 고추를 추출용매, 계절과, 부위 별; 잎, 청고추(열매), 홍고추(열매), 청고추씨, 홍고추씨로 나누고, 그 부위, 계절과 용매에 따른 간암세포와 유방암세포에서의 항종양효과를 관찰하기 위하여 그 증식억제효과를 중심으로 항암효과를 관찰하였다.

서로는 세포독성유발물질이나 여러 인자들의 외부자극에의하

여 세포사멸이 유도되며, 세포사과정에서 세포의 형태변화 및 축소 또는 파괴가 유도되고, 핵의 농축과 변화, 그리고 파괴 등이 관찰된다. 이에 실험방법으로 세포성장을 관찰하는데는 역상현미경을 이용한 세포착상 및 증식형태관찰, MTT법과 trypan blue 염색에 의한 세포수 측정, colcemid를 이용한 염색체의 banded 모형과 전기영동법에 의한 DNA 분절관찰, 그리고 형광현미경하에서 핵 변화를 propidium iodide(PI) 염색 등으로 관찰하였다. 고추의 부위별 추출물이 간암세포와 유방암세포의 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과 모든 부위에서 증식억제효과가 분명히 나타났다. 그중 간암세포에서는 청고추추출물에서 증식억제 작용이 낮게 나타났고, 유방암세포에서는 홍고추추출물이 비교적 억제작용이 낮게 나타났다. 그들 시료 중 고추잎의 수추출물이 가장 큰 증식억제작용을 보여주었다.

#본 도문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 051-620-4887 (팩스) 051-628-6540
(E-mail) yjjung@star.kyungshung.ac.kr

실험방법

시료추출 및 선택

시료는 계절별로 봄과 가을에 채취한 것을 선택하고, 에칠알콜과 물로 추출하여 용매에 따른 결과를 얻었으며, 고추의 가식부위를 부위별로 분류하여 실험에 사용했다. 가식부위는 잎, 청고추, 홍고추, 청고추씨, 홍고추씨, 별로 나누어 사용하였고, 5FU와 씌바귀를 비교하여 실험하였다. 각 시료는 먼저 1차 증류수로 수회세척하고, clean bench내에서 멸균한 3차 증류수로 2회 세척하여, 추출용매로는 알콜과 증류수를 각각 사용하여 추출했다. 추출액은 0.45 μm cellulose acetate membrane filter로 여과시켜 시료로 사용하였다. 시료 1 g당 수 추출물은 15 mg이었다. 실험에 사용된 부위의 명칭은 다음과 같다.

No.	Used sample (Scientific name)	Part of use
①	<i>Capsicum annuum L. var. angulosum Mill</i>	Leaf
②	<i>Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino</i>	Aerial Part
③	<i>Capsicum annuum L.var. angulosum Mill</i>	Fruit, unripen
④	<i>Capsicum annuum L.var. angulosum Mill</i>	Seed, unripen
⑤	<i>Capsicum annuum L.var. angulosum Mill</i>	Fruit, ripen
⑥	<i>Capsicum annuum L.var. angulosum Mill</i>	Seed, ripen

세포배양

Human hepatoma 세포와 유방암세포인 MCF-7 세포를 실험 대상세포로 사용하였으며, 배양조건은 RPMI 1640 배지에 10% FBS(Gibco사)를 첨가하고 100 I.U.penicillin G - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ strep- tomycin과 0.075% NaHCO_3 를 첨가하였다.⁵⁾

생존세포 수 측정

배양한 Hepatoma세포와 MCF-7 세포를 0.4% trypan blue를 섞은 다음 2분 후 hematocytometer로 광학현미경하에서 세포 수를 측정하였다. 다음의 세포성장 및 억제를 관찰하기 위해 사용된 세포 수는 이 방법으로 셈하였다. 이 trypan blue에 염색되지 않은 세포 수는 살아있는 세포 수이다.⁶⁾

MTT법에 의한 세포성장억제도 측정

각 시료를 용량별로 MCF-7 세포와 hepatoma 세포(4×10^3 개)에 첨가하여 37°C 5% CO_2 배양기 내에서 48시간 배양한 뒤, MTT 정량법으로 생존세포에 따른 흡광도를 측정했다. 흡광도의 감소는 살아있는 세포수의 감소, 즉 암세포의 성장억제 효과를 나타낸다.⁷⁾ 96 well plate를 사용하여, well당 배지총량을 200 μl 로 하여 배양했다.

측정값은 표준편차 범위 밖의 최소 최대 값은 제외하고, 6회 이상 측정값을 평균하여 얻었으며, 대조군과 비교하여 표시하였다.

형태학적 관찰

MCF-7 세포와 hepatoma 세포를 각well 당 4×10^3 개씩 접종하여, 24시간 배양으로 세포를 안정화시킨 후 각 시료추출물을 농도별로 첨가하여 대조군과 실험군의 형태적 변화를 100배율의 역상현미경에서 관찰하였다.

DNA 분절확인 실험

MCF-7 세포를 2×10^5 개/ml씩 되게 배양병(culture bottle)에서 배양 24시간 후에 배지를 조심스럽게 제거하고, 준비된 각각의 시료를 flask에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 넣었다.⁸⁾ 9일 후까지 여기에 신선한 배지를 48시간마다 교환해주면서, 그 상등액(세포 파쇄분)은 260 nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.⁹⁾

또한 DNA 분절분석을 위해, 상기 암세포를 배양병에 이식하여 24시간 배양하고 안정화한 후 신선배지와 각 추출시료 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 첨가하여 24시간, 36시간, 또는 48시간 배양 후 배지를 제거하고, 그 각각을 0.05% trypsin-EDTA로 처리한 후 부유상태의 세포를 취하여 lysis buffer를 첨가하고 1시간 배양기에 방치한다. 이것을 DNA 분리침전법¹⁰⁾에 따라 분리하여 침전물을 약 10분 정도 감압 건조하여 잔여 에탄올을 제거하고, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A로 처리하여 1시간 배양한다. 이렇게 만든 시료에 bromphenol blue tracking dye를 첨가하고, 이것을 TBE buffer속 1.2% agarose gel에서 전기영동한다. agarose gel에는 ethidium bromide를 첨가하여 apoptosis에 의한 DNA fragmentation를 비교 관찰하였다.¹¹⁾

염색체의 banded 모형을변화

Hepatoma 세포와 MCF-7 세포를 24시간 배양하여 배지를 조심스럽게 제거하고, 준비된 각 시료를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 넣었다.¹²⁾ 여기에 신선한 배지를 첨가하고, 24시간, 40시간, 또는 48시간 뒤에 colcemid를 추가한 후 5시간 배양하고 배지를 제거하였다. 여기에 0.25% trypsin을 첨가하고 10분간 배양 후 원심분리하여 상등액을 제거하고, 저장액(0.04 M KCl, 0.025 M sodium citrate)에 세포를 재현탁시켜, 36.5°C에서 15분간 방치시켰다. 그 뒤 신선한 ice-cold 초산·메탄올로 세포를 고정시키고, ice에 10분간 방치한 뒤 원심분리하여 초산·메탄올을 제거하고, 신선한 초산·메탄올에 세포를 재현탁하여, 세포 현탁액을 한 방울 떨어내어 cold slide에 놓고 고정시켰다.⁶⁾ 그리고 Giemsa로 염색하여 1000 \times 에서 염색체변화양상을 관찰하였다.

PI 염색 후의 관찰

상기와 동일방법으로 배양된 세포를 trypsin 처리하여 세포를 취하고 70% ethanol을 첨가하여, 4°C에서 60분 고정한다. PBS로 재현탁하여, RNase(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하고, PI, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 염색하여 25°C에서 15분간 반응시켜 형광현미경하에서 관찰하

실험결과 및 고찰

시료의 에타놀 추출물과 시료채취계절에 따른 항암효과관찰

MCF-7세포와 hepatoma 세포(4×10^3 개)에 각 시료를 용량별로 첨가하여 37°C 5% CO₂ 배양기 내에서 48시간 배양한 뒤 MTT 정량법으로 그 흡광도를 측정했다. MTT 정량법은 MTT가 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의하여 환원되어 청색 침전물을 형성하는 원리를 이용한 분석방법으로 생존세포수에 비례하여 540 nm에서의 흡광도가 상승된다.¹⁴⁾ 각 시

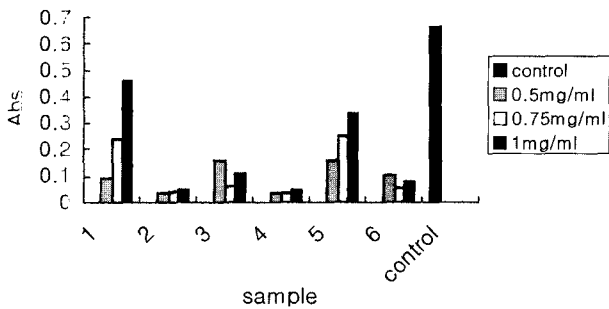


Fig. 1 - Antiproliferative effects of *C. annuum* extract of each part using alcohol as solvent on hepatoma cells. The cells were cultured at several different concentrations of the extracts for 48 hr. The absorbance was measured by MTT assay. 1. Extract on 99% alcohol of *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, Leaf; 2. Extract on 75% alcohol of *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, Leaf; 3. Extract on 99% alcohol of *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit unripen; 4. Extract on 75% alcohol of *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit unripen; 5. Extract on 99% alcohol of *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit ripen; 6. Extract on 75% alcohol of *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit ripen.

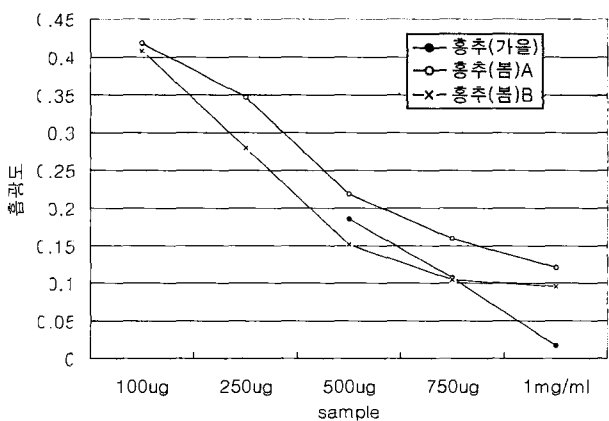


Fig. 2 - Antiproliferative effects of ripen fruit extract of *C. annuum* using water as solvent on hepatoma cells. The samples were harvested on spring and autumn, respectively. The cells were cultured at several different concentrations of the extracts. The absorbance was measured by MTT assay.

료에 따른 암세포성장억제정도를 비교하여 상대적 항암효과를 관찰하였다. 시료에 대한 추출용매인 에타놀 농도와 수확기에 따른 계절별 항암효과는 Fig. 1과 2와 같다. 봄과 가을에 취한 시료에서의 실험결과, 가을에 채취한 시료에서 증식억제작용이 약간 높게 관찰되었으나, 채취시기에 따른 작용정도차이를 결론지을 수는 없었다. 왜냐하면 동시기의 다른 시료에서 얻은 결과 차이가 더 크게 관찰되었다. 따라서 계절에 따른 항암효과차이

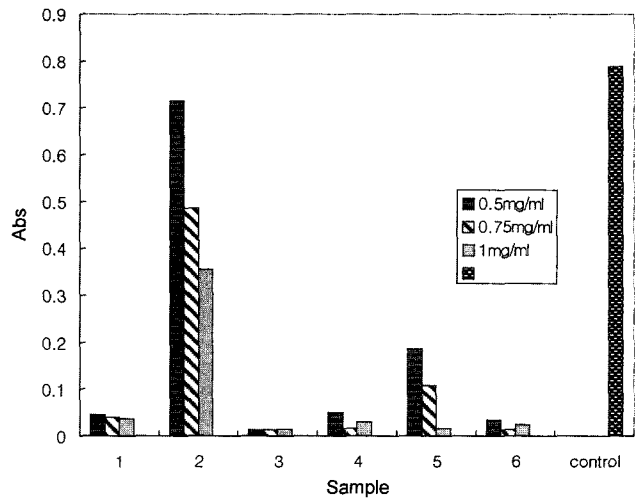


Fig. 3a - Antiproliferative effects of *C. annuum* extract of each part using water as solvent on MCF-7 cells. The cells were cultured at several different concentrations of the extracts for 48 hr. The absorbance was measured by MTT assay. 1. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, Leaf; 2. *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino; 3. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit unripen; 4. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, seed unripen; 5. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit ripen; 6. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, seed ripen.

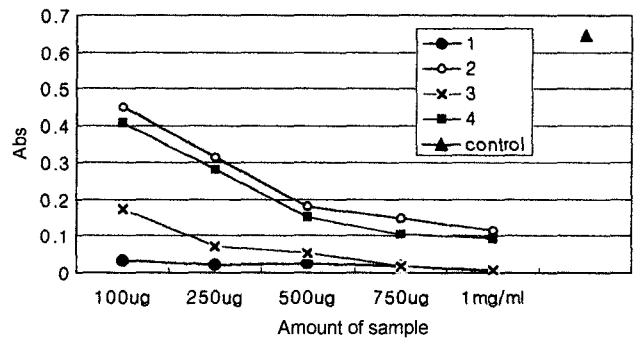


Fig. 3b - Antiproliferative effects of *C. annuum* extract of each part using water as solvent on MCF-7 cells. The cells were cultured at the various concentrations of the extracts for 48 hr. The absorbance was measured by MTT assay. 1. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, Leaf; 2. *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino; 3. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit unripen; 4. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit ripen.

로 단정하기보다는 시료의 종류에 따른 차이로 간주되었다. 그래서 다음의 실험상의 결과는 동일시료추출물에 대한 비교 실험으로 결과를 얻었다. 추출용매는 99% 에탄올로 추출한 경우에는 항암효과가 절반이하로 감소되고 불안정한결과를 보였으며, 75% 에탄올 추출물에서는 수 추출물에 거의 비슷한 항암효과를 관찰할 수 있었으나, 수 추출물에서보다 비교적 낮은 억제작용을 보였으므로 다음의 실험결과는 수 추출물에 대하여 행하였다.

수 추출물의 암세포증식억제효과

시료의 에탄올 추출물을 첨가한 경우에는 수 추출물의 경우보

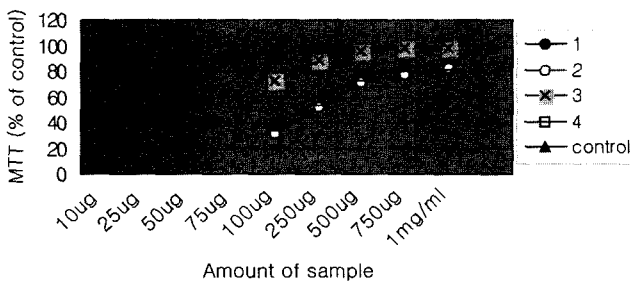


Fig. 3c - Antiproliferative effects of *C. annuum* extract of each part using water as solvent on MCF-7 cells. The cells were cultured at the various concentrations of the extracts for 48 hr. The absorbance was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control.
 1. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, Leaf; 2. *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino; 3. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit unripen; 4. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit ripen.

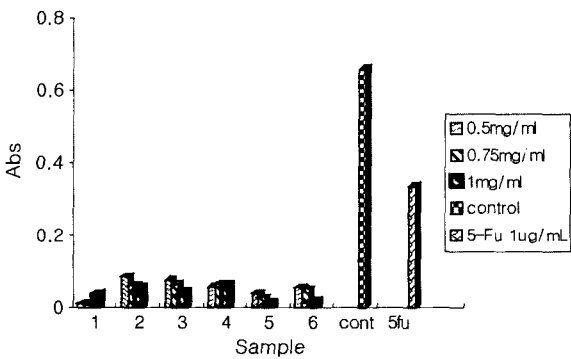


Fig. 4a - Antiproliferative effects of *C. annuum* extract of each part using water as solvent on hepatoma cells. The cells were cultured at several different concentration of the extracts for 48 hr. The absorbance was measured by MTT assay.
 1. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, Leaf; 2. *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino; 3. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit unripen; 4. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, seed unripen; 5. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit ripen; 6. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, seed ripen.

다 암세포증식효과가 낮고 불안정하여, 수 추출물을 대상시료로 선택하여 실험하였다. 실험에 사용한 시료는 1 mg/ml에서 10 µg/ml까지의 농도로 세포배양배지에 처리하고, 48시간 배양하여 MTT법으로 측정된 결과를 얻었다. Trypan blue 검사법에서도 유의성있는 결과를 얻었다. Fig. 3a, 4a와 같이 고추의 모든 부위별 추출물을 시료로 각각 첨가했을 때, 살아있는 세포수의 현저한 감소를 보였다. 고추잎 추출물을 첨가한 경우 유방암세포와 간암 세포주 모두에서 강한 성장억제작용을 보였다. 홍고추는 유방암세포에서 성장억제작용이 비교적 낮게 나타났다. 암세포증식억제작용의 한도를 측정하기 위해 용량별 1 mg/ml에서 10 µg/ml까지 세분하여 행한 실험결과는 Fig. 3b, 3c와 같으며, 실험 결과 고추잎 추출물은 10 µg/ml에서 35.3%의 증식억제 효과를 보였고(Fig. 3c), 25 µg/ml에서는 42.9%의 증식억제 효과를 보였으

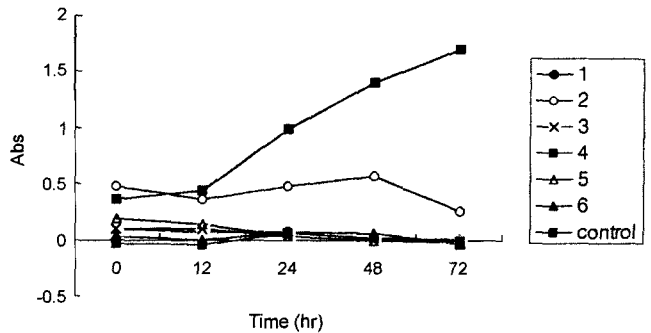


Fig. 4b - Antiproliferative effects of *C. annuum* extract of each part using water as solvent on hepatoma cells. The cells were cultured at the concentration of 0.5 mg/ml of the extracts. By various time intervals the cell culture was done, then the absorbance measured by MTT assay.
 1. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, Leaf; 2. *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino; 3. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit unripen; 4. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, seed unripen; 5. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit ripen; 6. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, seed ripen.

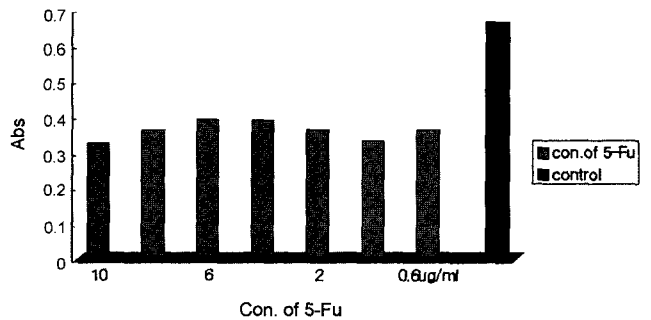


Fig. 4c - Antiproliferative effects of 5-FU on hepatoma cells. The cells were cultured at the various concentrations of 5-FU for comparing to the samples. After the cells were cultured for 48 hr, the absorbances were measured by MTT assay.

며, 75 µg/ml에서는 94.8%의 감소를 보여주었다. Fig. 4c는 5-FU의 농도별 암세포 성장억제효과 보여주는 실험결과이다. 10 µg/ml에서 0.6 µg/ml 농도까지에서 40~50%의 억제율을 나타내었다. 이에 비해 고추의 모든 부위의 추출물은 암세포성장 저해효과가 더 크게 나타났다. 간암세포에 대한작용은 청고추보다 홍고추가 증식억제작용이 높게 관찰되었고, 홍고추씨의 추출물은 간암세포에 대한 증식억제작용이 30% 정도 감소하는 것이 관찰되었다. 고추의 모든 부분 시료에서 강한 암세포성장억제작용을 보였으며, 5-FU 보다도 2~3배 이상의 강한 증식억제효과가 관찰되었다(Fig. 4c). 고추잎 수추출물을 시료로 사용한 결과에서는

살아있는 세포가 거의 관찰되지 않았다. Fig. 4b는 시간에 따른 세포성장억제효과를 나타낸 그래프이다.

세포형태변화

각 시료를 50 µg/ml 농도로 첨가한 연속 배양에서, 암세포의 증식 및 형태변화를 역상광학현미경으로 관찰하였다. 성장하는 세포를 trypsin digestion으로, 각 배양병에 이식을 행하고 배양하면 이식 2일에 배양병 바닥에 붙어 자라기 시작한다. MCF-7 세포는 Fig. 5a에서 보이는 바와 같이 선명한 형태를 갖추고, 계속해서 성장을 유지한다. Fig. 5b는 고추잎의 추출물 50 µg/ml을 첨가하여 배양한 것으로 이식후 첫날부터 착상이 어렵고, 배양

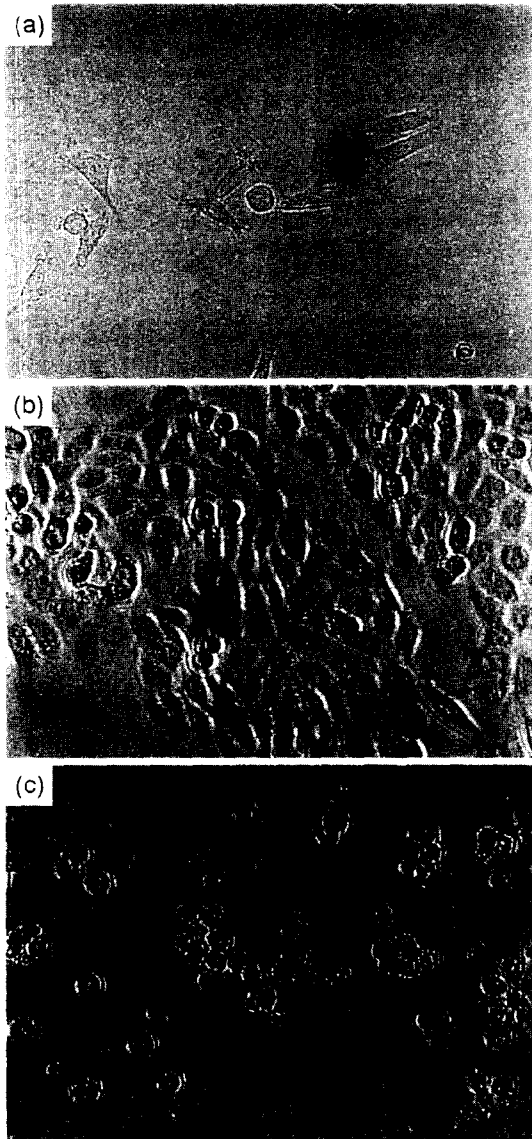


Fig. 5a – The pictures above show morphology of MCF-7 cells. The description of its morphology is as follows: (a) 2nd day, starting to grow on the bottom of cultural bottle. (b) 6th day, continuing to grow with clear form. (c) 10th day, continuing to grow with clear form.

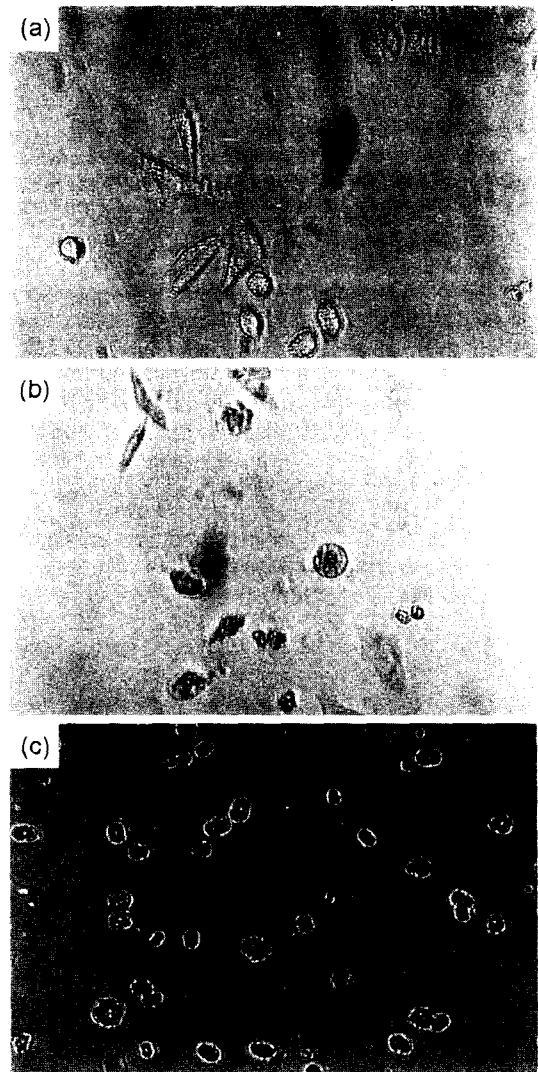


Fig. 5b – The pictures above show morphologic changes of MCF-7 cells that occurred at the concentration of 50 µg/ml of *C. annuum* extract of leaf. The description of its morphological changes is as follows: (a) 1st day, cannot grow. (b) 3th day, started to be destroyed. (c) 6th day, almost cells destroyed.

3일에서 세포탈락과 세포파괴가 시작되어, 6일째에 거의 모든 세포의 형태변화와 파괴 현상을 보였다. 그리고 청고추 추출액을 첨가한 것으로서, 4일째에 세포변형이 관찰되고, 7일째에 세포가 탈락되고 파괴되기 시작했으며, 14일째엔 거의 모든 세포가 파괴되었다. 홍고추 추출액을 첨가한 경우에는 4일째에 세포변형이 보이고, 11일째에 세포가 파괴되기 시작하여 16일째엔 거의 모든 세포가 파괴되었다. 홍고추씨와 청고추씨 추출물에서도 거의 비슷한 결과를 보였으나 세포변형은 약간 늦게 일어났다.

청고추, 홍고추, 씬바귀 추출액은 시료에 따라 약간의 차이는 있으나 약 4일 정도에서 일부 세포를 제외하고는 탈락을 보이며 세포형태변화를 보이기 시작했다. 그리고 14~19일 정도에서 거의

의 모든 세포가 파괴되었으며, 그 주변에 파괴된 세포 파편들이 관찰되었다(Table I).

이 형태관찰 결과는 MTT법에서 얻은 결과와 조금은 상이한 결과로서, 현미경관찰에서는 홍고추추출물의 첨가시료에서 MTT법의 결과보다 세포의 성장과 착상저해작용이 상대적으로 낮게 관찰되었다. 이점은 미토콘드리아탈수소효소의 활성화에 의해 측정된 MTT법, 즉 관련 효소활성과 형태변화와의 차이 일 가능성이 시사되는 점이다(실험방법에 따른 결과차이). 비교시료로 사용된 씬바귀 추출액을 첨가한 경우 4일째에 세포가 잘 자라지 못하고, 8일째에 파괴되기 시작하여 19일엔 거의 모든 세포가 파

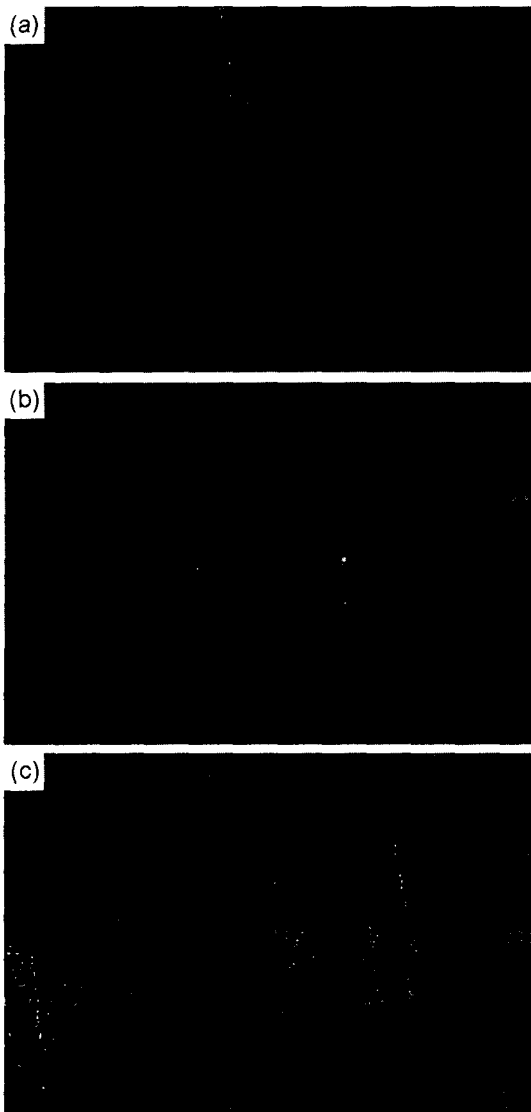


Fig. 5c - The pictures above show morphology of hepatoma cells. The description of its morphology is as follows: (a) 3rd day, starting to grow on the bottom of culture bottle. (b) 4th day. (c) 7th day, continuing to grow with clear form.

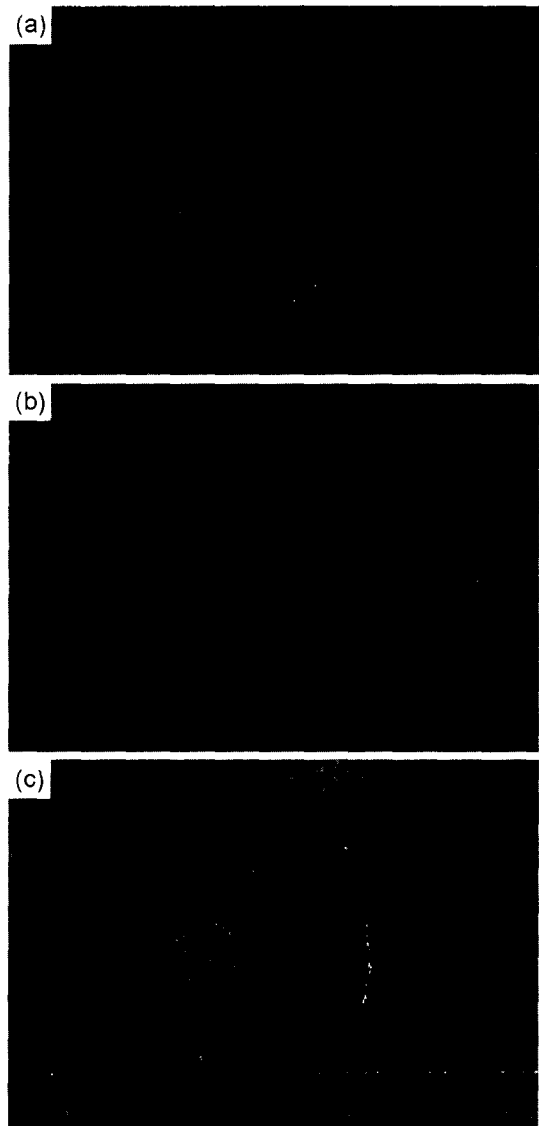


Fig. 5d - The pictures above show morphologic changes of hepatoma cells that occurred at the concentration of 50 µg/ml of *C. annuum* extract of leaf. The description of its morphological changes is as follows: (a) 2nd day, started to be fragmented. (b) 10th day, almost all cells were destroyed. (c) 18th day, there were a lot of cell debris.

Table I – Morphological changes of MCF-7 cell and hepatoma cell by the microscope

Morphological change of water extract-treated MCF-7 cell ¹³⁾				
sample treated	1*(see Fig. 5)	2*	3*	
culture times				
2nd day	cannot grow			
3th day	start to be destroyed			
4th day		morphological change	morphological a little change	
6th day	almost cells destroyed	started to be destroyed		
10th day			started to be destroyed	
Morphological change of water extract-treated hepatoma cell ¹¹⁾				
sample treated	1*(see Fig. 5)	2*	3*	
culture times				
2nd day	morphological change and started to be fragmented			
3th day		mophological change	mophological change	
4th day				
6th day				
10th day	almost cells destroyed	a little destroyed	a little destroyed	

*: 1 *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill.*, leaf; 2. *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill.*, fruit unripen; 3. *Capsicum annuum L. var. angulosum Mill.*, fruit unripen.

피도었다(썩바귀를 대조시료로 사용한 이유는 향암 및 청혈 식품으로 널리 알려져 있고 본 실험실의 관련실험결과^{1,13)}에서도 다른 시료들에 비해 좋은 결과를 보였으므로 계속 비교하여 실험하였다.).

간장세포에 대한결과에서도 고추의 모든 부위에서 억제작용이 높게 관찰되었으나, 고추잎의 수추출물의 첨가에서는 더욱 높게 나타나서 배양 2일째에 세포의 형태변화와 파괴가 관찰되었고, 세포증식이 거의 없는 상태로 지속되어 배양 10일에 거의 모든 세포가 파괴되었다. 청고추보다 홍고추가 증식억제작용이 높

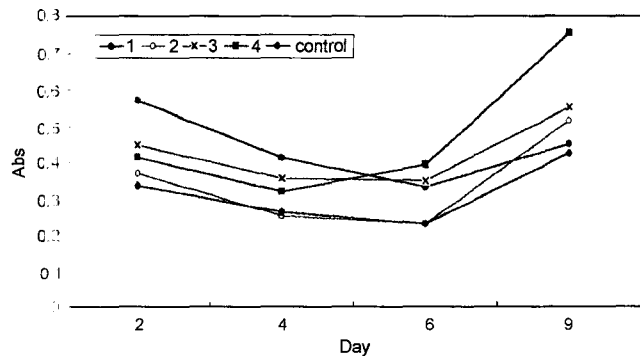


Fig. 6 – Absorbance on the supernatant of medium.. The cell's treated with 50 µg/ml of each sample. When the culture medium was changed with new one, the old one was calculated the absorbance by 260 nm spectrophotometer. They were counted during 9 days.

1. *C. annuum L. var. angulosum Mill.*, Leaf;
2. *Lactuca dentata Makino. var. flaviflora Makino.*;
3. *C. annuum L. var. angulosum Mill.*, fruit unripen;
4. *C. annuum L. var. angulosum Mill.*, fruit ripen.



Fig. 7 – Electrophoresis of cells' DNA fragmentation treated with each sample. They were cultured for 24 hr. 1. Marker (DNA 100 base); 2. Marker (DNA 100 base); 3. control; 4. *C. annuum L. var. angulosum Mill.*, Leaf; 5. *C. annuum L. var. angulosum Mill.*, fruit unripen; 6. *C. annuum L. var. angulosum Mill.*, fruit ripen.

Table II - The ratio of the absorbances of DNA in upper layer medium by spectrophotometer 260 nm. MCF-7 cells were cultured with water extract of each sample (50 µg/ml) for 2, 4, 6, 9 days

cultured days	sample	1*	2*	3*	4*	control
	2		1.71	1.10	1.33	1.24
4		1.57	0.96	1.36	1.21	1
6		1.45	1.01	1.52	1.71	1
9		1.05	1.21	1.30	1.77	1

*: 1. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, leaf; 2. *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino; 3. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit unripen; 4. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit ripen.

관찰되었고, 배양 4일째에 형태변화가 관찰되고 배양 10일에 세포의 파괴가 관찰되었다. 홍고추씨의 추출물은 간암세포에 대한 증식억제 작용이 감소하는 것이 관찰되었다.

염색체의 변화와 DNA 분질에 대한 관찰

PI 염색법에 의한 관찰 - Table III는 MCF-7 cell에 각 시료를 100 µg/ml 농도로 첨가하여 얻은 PI 염색법에 의해 관찰된 결과이다. 그리고 Fig. 9b는 고추잎추출물을 시료로 첨가하여 PI 염색 결과를 현광현미경으로 관찰한 것이며, 6시간 배양에서 세포핵이 일부 파괴되기 시작했으며 24시간에는 거의 대부분이 파괴되었다. 청고추 추출물을 첨가한 경우로서, 6시간과 24시간에서는 세포핵의 누출이 관찰되지 않았으나 48시간 후에는 많은 세포

핵파괴가 있었다. 홍고추 추출물을 첨가한 것이며, 역시 6시간과 24시간에서는 파괴가 관찰되지 않았으며 48시간 후에 파괴되기 시작하여 72시간 후에는 많은 파괴가 관찰되었다(Fig. 제시생략).

Hepatoma cell에 고추잎추출물을 시료로 첨가한 경우, 3시간 경과에서 핵의 일부누출이 일어나기 시작하였고, 6시간 후에는 세포에서 핵의 누출이 현상을 보였고 48시간에 핵의 파괴가 관찰되었다(Fig. 9d). 청고추 추출물과 홍고추 추출물을 첨가한 경우로서, 거의 비슷한 6시간과 24시간에서 세포핵의 누출이 관찰되지 않았으나 48시간에는 세포핵파괴가 관찰되었다. 썸바귀 추출물을 첨가한 경우이며, 6시간과 24시간에서는 세포핵 변형이 없었고 48시간 후부터 약간 파괴하기 시작하여 72시간 후에는 다소 파괴되었다.

이 실험 결과에서도 고추의 모든 부분의 수 추출시료가 실험 암세포에 대해 증식 억제효과를 보여주었다. 특히 고추잎의 추출물이 다른 부위추출물에 비해 hepatoma 세포와 MCF-7 mammary gland adenocarcinoma 세포의 세포사를 더욱 유도한다는 것이 확인 관찰되었다.

염색체의 banded 모형변화 - 유방암세포의 염색체는 37시간 경과한 후나 40시간 뒤가 별로 차이가 없었다. 그러나 시료로 고추잎 추출물을 100 µg/ml 농도로 첨가한 경우는, 배양 24시간에 염색체의 풀어짐이 관찰되고(Fig. 8b(a)), 배양 27시간에 많은 파괴가 관찰되고, 48시간에는 응축과 파괴현상이 함께 관찰되었다(Fig. 8b(c)). 청고추의 추출물 첨가군에서는 배양 24시간에 약간의 모형변화와 분산이 관찰되었고, 40시간에 염색체의 많은 풀

Table III - Morphological changes of chromosomes in MCF-7 and hepatoma cells

a. MCF-7 cell ⁽³⁾									
sample	banded appearance of chromosome				sample	observation of nuclear by PI staining			
	1* (Fig. 8)	2*	3*	4*		cultured time	1* (Fig. 9)	2*	3*
24 (27)	scattered (destroyed)	a little changed	a little dispersion	normal form	6	some destroyed	normal	normal	
						much more destroyed	nearly normal	almost normal	
40		concentrated	loosed form	aggregated	48		a little destroyed	destroyed	nearly normal
48		much more concentrated	scattered	aggregated	72		destroyed		almost destroyed

b. Hepatoma cell ⁽²⁾									
sample	banded appearance of chromosome				sample	observation of nuclear by PI staining			
	1* (Fig. 8)	2*	3*	4*		cultured time	1* (Fig. 9)	2*	3*
37	concentrated				24				
	ted								
40	despersion	a little concentrated			48	some destroyed			
		ted							
48		concentrated	loosed form	aggregated	72		a little destroyed	a little destroyed	a little destroyed
		ted							

*: 1. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, leaf; 2. *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino; 3. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit unripen; 4. *C. annuum* L. var. *angulosum* Mill, fruit ripen.

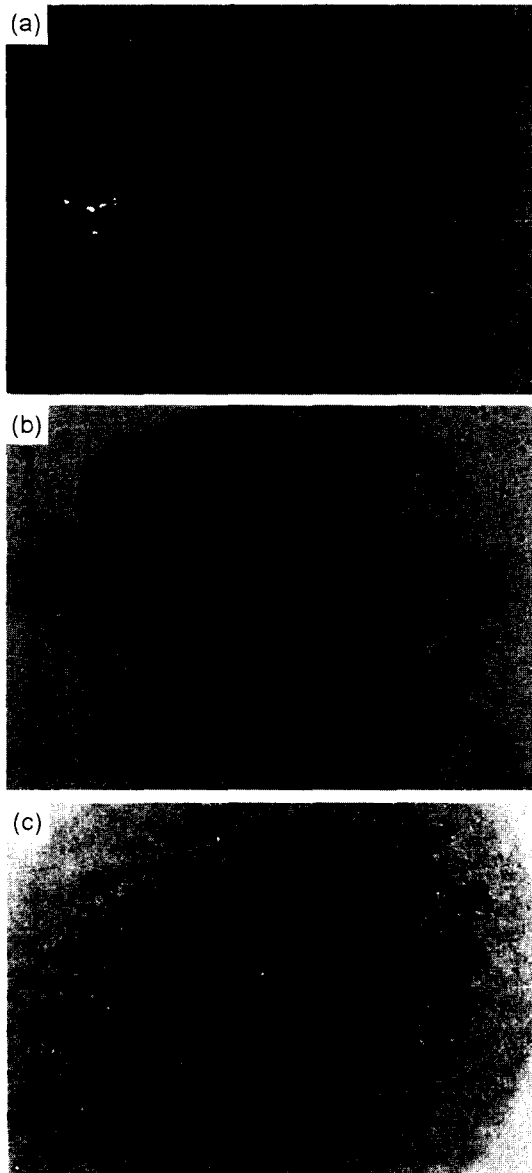


Fig. 3a - The chromosomal states in normal MCF-7cell. The $4 \times 10^3/ml$ cells were cultured for (a) 24 hr (b) 40 hr (c) 48 hr.

어짐이 관찰되었으며, 배양 48시간에는 풀어짐과 흩어짐이 관찰되었다. 홍고추 추출물에 대한 결과는 염색체의 농축현상이 배양 4(시간)과 48시간에 관찰되었다. 간암세포에 대한 결과는 고추추출물을 $100 \mu g/ml$ 농도로 첨가하여, 배양 37시간에 염색체의 농축이 관찰되다가(Fig. 8d). 배양 40시간이 경과하면서 염색체의 길이가 늘어나 느슨하게 보였다. 청고추와 홍고추는 배양 48시간에 풀어짐과 응축이 각각 관찰되었다.

DNA 분절 관찰 - 각 시료를 $50 \mu g/ml$ 농도로 첨가하여 배양한 세포의 DNA를 분리하여¹⁰⁾ 전기영동한 결과, 첨가시료에 따라 세포사의 특징인 DNA의 저분자로의 분절현상이 나타났다. 24시간 배양한 세포에서 분리한 DNA를 전기영동법으로 관찰한

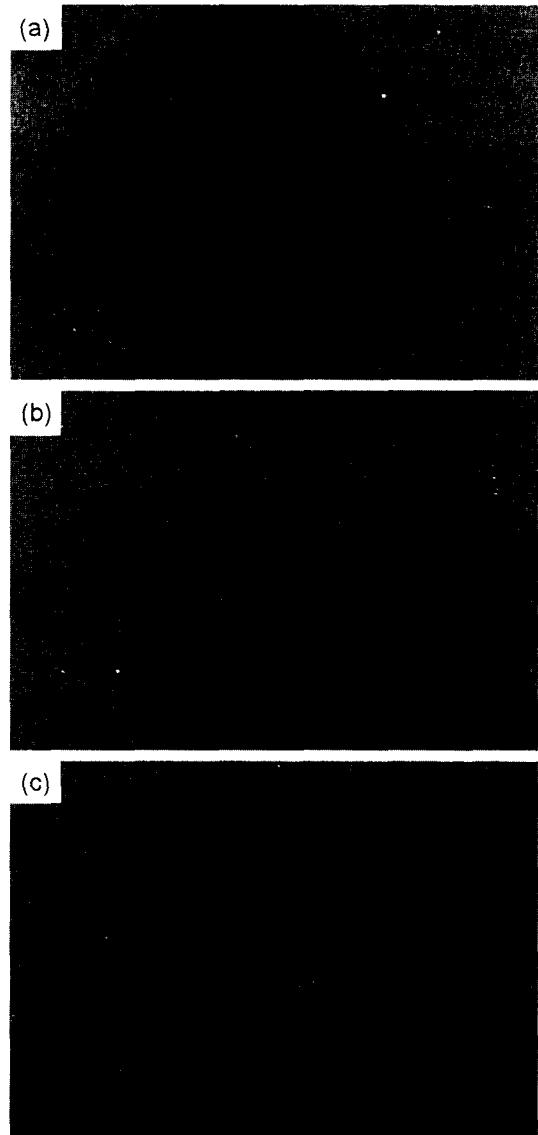


Fig. 8b - The chromosomal states when the extracts of *C. annuum L. vax angulosum Mill.*, leaf $100 \mu g/ml$ were added to the medium in the MCF-7 cells. Hours from seeding and the morphology's as follows: (a) 24 hr, it seems to be scattered. (b) 27 hr, destroyed. (c) 48 hr, destroyed and aggregated.

결과는 Fig. 7과 같으며, 36시간과 48시간 배양에서는 더 많은 분산과 끌림현상이 관찰되었다. Fig. 7에서 관찰된 결과에서 보면 각 고추잎과 청고추추출물을 시료로 첨가한 군에서는 DNA의 전기영동 band는 흐리고 약하게 관찰되었다(대조군에 비해 10% 미만의 약한 band로 관찰된 배양 12시간이나 그 이하의 배양 후의 결과를 관찰하지 않았으므로 확실한 결론을 지을 수는 없으나, 일부는 분산되어 끌림을 보이고 일부는 제거된 것으로 추정함). 그러나 홍고추 첨가군에서는 대조군과 비슷한 수준의 고분자의 band가 관찰되었다.

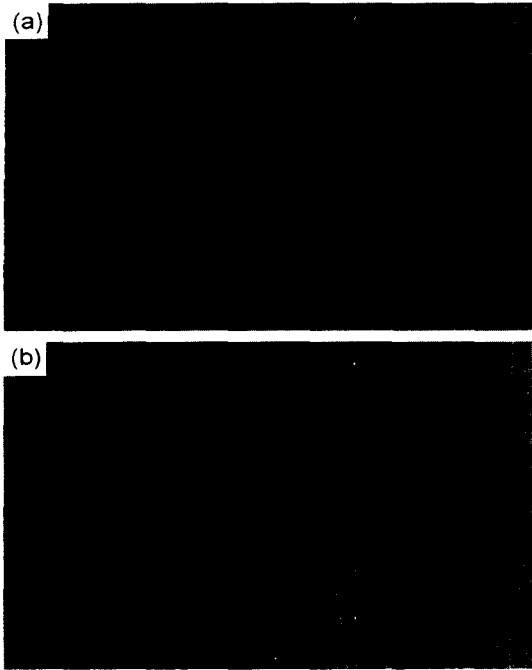


Fig. 8c - The chromosomal states in normal hepatoma cells. The $4 \times 10^3/ml$ cells were cultured for (a) 37 hr, (b) 40 hr.

그리고 배양액의 부유층을 260 nm 흡광도법으로 관찰한 결과에서도 고추잎추출물을 시료로 첨가한 세포에서는 배양초기부터 부유층의 흡광도가 높게 나타났다(Fig. 6). 썸바귀는 24시간 배양한 결과에서는 부유층의 흡광도는 대조군과 비슷한 비교적 낮은 값을 보여주었으며, 배양후기인 9일에 그 부유층의 흡광도는



Fig. 9a - PI staining in normal MCF-7 cells. Hours from seeding and cell morphology's as follows and above. The MCF-7 cells were added to the medium in 25 cm^2 canted neck flask, and then examined by PI staining.

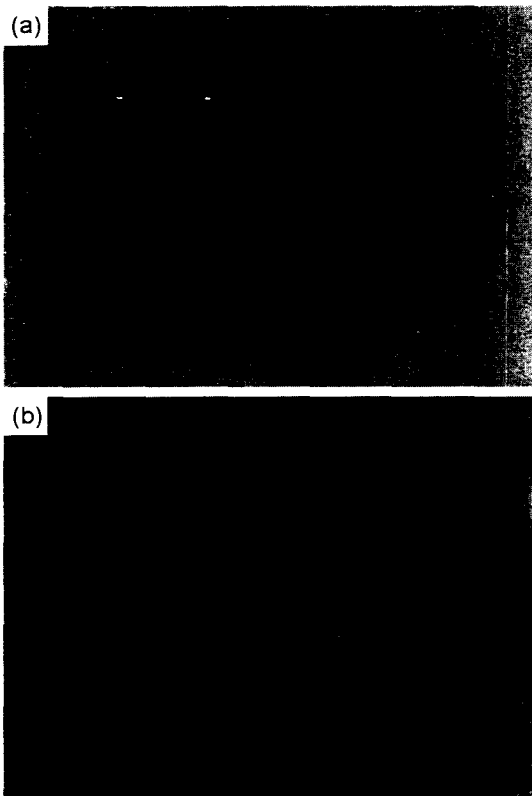


Fig. 8d - The chromosomal states when the extracts of *C. annuum L. var. angulosum* Mill, Leaf $100\ \mu\text{g/ml}$ were added to the medium in the hepatoma cells. Hours from seeding and cell morphology's as follows and above. (a) 37 hr, concentrated, (b) 40 hr, dispersion.

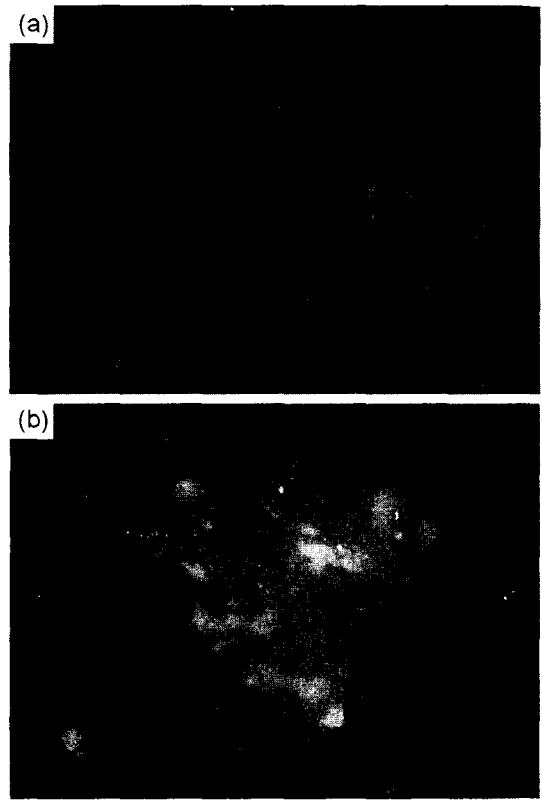


Fig. 9b - PI staining in the MCF-7 cells when the extracts of *C. annuum L. var. angulosum* Mill, Leaf $100\ \mu\text{g/ml}$ were added to the culture medium. Hours from seeding and cell morphology's as follows and above. (a) 6 hr, some destroyed. (b) 24 hr, they were cell debris.

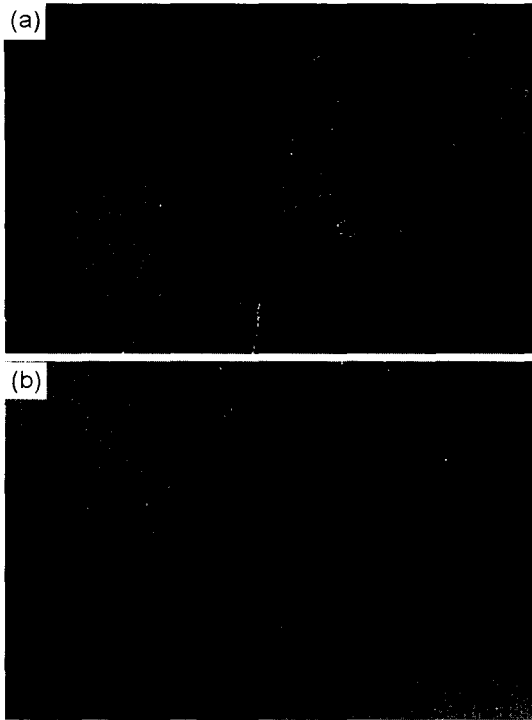


Fig. 9c - PI staining in the normal hepatoma cells. Hours from seeding and cell morphology's as follows and above. (a) 3 hr (b) 48 hr.

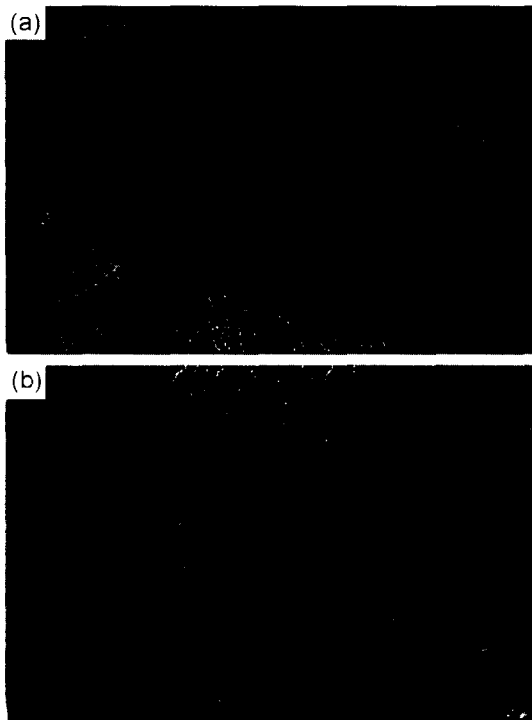


Fig. 9d - PI staining in the hepatoma cells when the extracts of *C. annuum L. var. angulosum Mill.*, leaf 100 µg/ml were added to the culture medium. Hours from seeding and cell morphology's as follows and above. (a) 3 hr, almost normal. (b) 48 hr, almost destroyed.

높았다. 그리고 전기영동의 결과에서도 DNA 분절이 대조군과 비슷한 band의 결과를 보여준다(Table II).

결 론

*C. annuum L. var. angulosum Mill*의 전 가식부 모두에서 MCF-7 세포와 hepatoma세포에 대한 증식억제 작용이 현저하였다. 특히 고추잎의 수 추출 시료를 첨가한 경우에는 확실하고 강한 억제효과가 관찰되었다. 뿐만 아니라 사용된 실험방법 모두에서(MTT법, 형태적관찰, 세포의 종류(유방암세포와 간암세포) 전기영동과 염색체변화와 PI 염색 등) 공히 빠르고 분명한 세포파괴와 사멸을 관찰할 수 있었다.

유방암세포에 대한 고추잎의 추출시료를 첨가한 경우 추출시료 10 µg/ml에서 35.3%의 증식억제 효과를 보였고(Fig. 3c), 25 µg/ml에서는 42.9%의 증식억제 효과를 보였으며, 75 µg/ml에서는 94.8%의 감소를 보여주었다. 또한, 형태적 변화에 대한 관찰에서도 50 µg/ml 고추잎의 추출시료를 첨가한 경우 유방암세포에서는 착상이 제대로 일어나지 않고, 2~3일 후부터 세포변형과 세포사가 일부 관찰되었고, 첨가 배양 6일에는 모든 세포가 세포사로 인한 세포파괴가 관찰되었다. 염색체의 banded 모형관찰에서도 배양 24시간에 염색체의 분산현상이 나타나고, 시료첨가 27시간에 파괴와 농축 현상이 관찰되었다. PI염색법으로 염색된 핵의 관찰에서 시료첨가 3시간에 핵내 황색반점의 누출 현상이 관찰되고 6시간에 파괴되어 24시간에 파편의 부스러기가 관찰되었다. 전기영동에서도 세포사의 DNA 분절이 관찰되었고, 배양상등액의 분광광도계 측정 260 nm에서의 흡광도 검사결과에서도 시료 첨가시 대조군에 비해 상등액내의 흡광도가 높게 나타났다.

간암세포에서 고추잎의 추출물을 첨가한 경우 추출시료 100 µg/ml농도에서 MTT 실험결과 95%의 증식억제율이 관찰되었고 또한, 형태적 변화에 대한 관찰에서도 50 µg/ml 고추잎의 추출시료를 첨가한 경우 착상과 증식이 지연되어 2~3일 후부터 세포변형이 관찰되었고, 배양 6일에는 세포의 파괴가 관찰되었다. chromosome의 형태관찰에서도 배양 24시간에 염색체의 농축현상이 나타나고, 시료첨가 37시간에 농축되다가 40시간에 염색체 형태의 많은 변화는 없이 분산되기 시작했다. PI염색법으로 염색된 핵의 관찰결과, 시료첨가 3시간에 핵내의 황색점이 일부 관찰되고 배양시간에 따라 침투현상이 증가하여 48시간에 파괴현상을 보였다. 청고추(열매)의 수추출물은 간암세포에서, 그리고 홍고추의 수추출물은 MCF-7 세포에 대해 상대적으로 증식억제 작용이 약하게 관찰되었다. 청고추씨의 수추출물은 비슷한 억제 작용을 보였으나, 홍고추씨의 추출물은 간암세포에 대해 저해작용이 낮게 관찰되었다. 또한 청고추추출물의 MCF-7 세포에 대한 억제작용이 MTT 시험결과와 현미경상의 관찰결과와 상이한

면을 보여주었다. 그 결과는 MTT법에서는 억제작용이 큰 것으로 관찰되었으나 현미경관찰에서 세포형태변화와 파괴현상은 상대적으로 낮게 나타남을 감지할 수 있었다.

이상의 실험결과에서 고추잎의 수 추출물은 MCF-7 세포와 hepatoma 세포의 증식을 강하게 억제한다는 결과를 얻었으며, 세포사의 특징인 염색체의 분절과 파괴가 관찰되었다. PI 염색법에서 핵의 누출현상이 분명하고 배양 48시간에서 핵 파편을 관찰할 수 있었다. 전기영동과 흡광도법을 이용한 결과에서도 세포사의 특징인 DNA 분절이 관찰되어, 따라서 고추잎의 수추출물은 MCF-7 세포와 hepatoma 세포의 세포사를 유도하여 강한 항암효과를 나타내는 것으로 결론지을 수 있었다. 그러나 MTT법에서는 유방암세포와 간암세포에 대하여 비슷한 세포증식억제 작용을 보여주었지만 세포와 핵관찰에서는 유방암세포에 대하여는 2일 정도에서 빠른 세포사를 관찰할 수 있었으나, 간암세포에 대하여는 세포의 변형은 관찰되었으나 세포와 핵의 파괴현상은 10여일 후에 늦은 세포사가 관찰되었다.

고추잎 이외의 고추 모든 부분에서의 수추출물에서도 hepatoma 세포와 MCF-7 세포에 대한 강한 항암효과를 관찰할 수 있었다. 이상의 방법들에서 정도의 차이는 있으나 모두 염색체 분해에 의한 세포사의 과정에 따라 암세포의 성장이 저해되고 있음이 확인되었으며 이후에도 성분에 대한 분리와 세포사과정의 기전을 밝힐만한 가치가 있다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 경성대학교 특별연구비와 한국암연구소 지원으로 수행하였으며, 이에 감사 드립니다.

문 헌

- 1) Chung, Y. Z. and Lee, U. J. : Anti-proliferating effects of some plants on Hepatoma cells. *Kor. J. Clin. Pharm.* **9** (2), 103 (1999).
- 2) Sugimura, T. : Mutagen, carcinogens and tumor promoters in our dairy food. *Cancer* **49**, 1970 (1982)
- 3) Ames, B. N. : Dietary carcinogens and anticarcinogens : Oxygen radicals and degenerative disease. *Science* **221**, 1256 (1983).
- 4) Sugimura, T. and Sato, S. : Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res.* **43**, 2415 (1983)
- 5) Freshney, R. I. : *Culture of animal cell culture - a practical approach*. IRL press, oxford, 16 (1986).
- 6) Freshney, R. I. : *Culture of animal cells.- A manual of basic Technique*. Alan R. Liss Inc., New York, 177 (1987).
- 7) Denizot, F. and Lang. R. : Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.* **89**, 271 (1986).
- 8) Gey, G. O., Coffman, W. D. and Kubicek, M. T. : Tissue culture studies of the proliferative capacity of Cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**, 364 (1952).
- 9) Choinski, J. S. : *Exp. Cell and Molecular biology*. WBC, 41 (1992).
- 10) Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. O., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. : *Current protocols in molecular biology*, Harvard Med. School, Wiley Interscience, 2.2.1 (1987)
- 11) Cohen, J. and Duke, R. C. : Glucocorticoid activation of a calcium- dependent endonuclease in thymocyte nuclei lead to cell death. *J. Immunol.* **132**, 38 (1984)
- 12) Watson, R. W., McEleny, K. R., Coffey, R. N. O'Neill, A. J. and Fitzpatrick, J. M. : Inhibitors of apoptosis prostate cancer cell lines. *Prostate.* **51**, 133 (2002).
- 13) Kwak, S. Y. and Chung, Y. Z. : Effects of some edible plants on changing chromosomal morphology, and apoptosis of MCF-7 cell. *Kor. J. Life Science* **12**(3), 340 (2002).
- 14) Chung, Y. Z., Hong, G. T. and Jung, H. O. : Antitumor and Immunological effects of bovine thymic extract. *Kor. J. Clin. Pharm.* **2**(1), 11 (1992).