

## 종양세포에서의 capsaicin에 의한 apoptosis 유도 항암제의 항암효과의 증가

전북대학교 의과대학 소아과학교실, 임상의학연구소\*, 치과대학 생화학교실†

김선영\* · 이유진\* · 박은혜\* · 이호근† · 조대선 · 김정수 · 황평한

= Abstract =

### Capsaicin induced apoptosis and the enhanced anticancer effect of anticancer drugs in cancer cells

Sun Young Kim, Ph.D.\*, You Jin Lee\*, Eun Hye Park\*, Ho Keun Yi, Ph.D.†,  
Dae Sun Jo, M.D., Jung Soo Kim, M.D. and Pyoung Han Hwang, M.D.

Department of Pediatrics, School of Medicine, Research Institute of Clinical Medicine\*,  
Department of Biochemistry†, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

**Purpose :** Capsaicin, the major pungent ingredient in red pepper, has long been used in spices and food additives. It has been recently shown to induce apoptosis in several cell lines through a not well known mechanism. The aim of this study was to investigate the apoptosis-inducing effect of capsaicin on gastric cancer cells, and to provide valuable information concerning the application of capsaicin for therapeutic purposes.

**Methods :** Cultured SNU-668 cells were treated with capsaicin. We analyzed cell survival by trypan blue and crystal violet analysis, cell cytotoxicity by MTT assay, apoptosis by nuclear condensation and DNA fragmentation, bcl-2 and bax mRNA expression by RT-PCR, and the expression of apoptosis related proteins by Western immunoblot analysis. In order to assess whether the growth inhibitory effect of anticancer drugs is enhanced by capsaicin, we investigated the effects of cell cytotoxicity and the expression of apoptosis related proteins of etoposide and adriamycin treated with capsaicin in cells.

**Results :** Capsaicin inhibited growth of SNU-668 cells in a dose-dependent manner. This inhibitory effect of capsaicin on cell growth was mainly due to the induction of apoptosis as evidenced by DNA fragmentation, nuclear condensation and the expression of apoptosis related proteins. Furthermore, capsaicin prominently reduced the ratio of anti-apoptotic Bcl-2 to pro-apoptotic Bax and consequently increased caspase-3 activity. The cells treated with capsaicin were more sensitive to death induced by etoposide and adriamycin than the cells without capsaicin.

**Conclusion :** These results demonstrate that capsaicin efficiently induced apoptosis in SNU-668 cells through a caspase-3-dependent mechanism and sensitizes cancer cells to anticancer drugs toward apoptotic cell death, which may contribute to its anticancer effect and chemosensitizer function against gastric cancer. (*Korean J Pediatr* 2008;51:307-314)

**Key Words :** Capsaicin, Apoptosis, Chemosensitivity, Gastric cancer

## 서 론

우리나라에서 암 사망률의 1위를 차지하는 위암은 가장 흔한 악성종양으로 현재 증가하는 추세에 있고 많은 의료비의 손실과

함께 사망률이 가장 높으므로 반드시 해결해야 할 암 중의 하나이다<sup>1)</sup>. 그동안 수술적 처치가 주로 사용되고 있으나 최근에는 수술 외에도 항암 요법에 관심이 모아지고 있다. 즉 수술이 가장 기본적인 근치 방법이지만, 눈에 보이지 않는 미세 전이의 치료와 재발의 방지를 위해 항암 요법 및 면역 요법을 병행해 환자의 생존율을 높이고자 많은 노력이 행해지고 있다. 또한 수술이 불가능한 원격 전이 환자에게도 생존율을 높이기 위해 항암 요법을 시행하기도 한다. 그러나 항암 요법을 시행 시 선택적으로 암세포만 파괴할 수 없기 때문에 많은 부작용이 발생하고, 내성이 발생한 경우 원하는 치료 효과를 얻을 수 없기도 한다. 그러므로 최근 항암 요법과 더불어 세포자멸사(apoptosis) 유도 및 관련

Received : 16 September 2007, Accepted : 10 November 2007

Address for correspondence : Pyoung Han Hwang, M.D.

Department of Pediatrics, School of Medicine, Chonbuk National University,  
634-18 Keumam-dong, Dukjin-gu, Jeongju-si, Jeonbuk 561-712, Korea

Tel : +82.63-250-1472, Fax : +82.63-250-1464

E-mail : hwaph@chonbuk.ac.kr

이 논문은 2006년도 전북대학교 지원 연구비(연구기반조성 2006-18)와 전북대학교병원 특수목적연구비에 의해 연구되었음.

유전자들 이용한 치료 방법을 시도하여 궁극적으로는 선택적이고 효과적인 암세포의 사멸을 통해 위암 치료율을 높이는 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>2)</sup>.

세포자멸사는 계획되어진 세포사멸(programmed cell death)의 한 형태로 세포질의 농축, DNA의 분절을 특징으로 하며 정상 발달, 기관 형성, 면역 기능, 조직의 성장 등에서 세포를 제거하는 기능을 한다<sup>3)</sup>. 세포자멸사가 발생하면 세포 내의 genomic DNA가 endonuclease에 의하여 180-200 bp 크기의 oligonucleosome 으로 잘려지는 것이 사멸의 특징적인 소견이다. 사멸 과정 중의 세포는 괴사 세포에 반하여 크기가 작고, 염색질과 세포질 내의 소기관이 농축되어 막에 둘러싸인 사멸체(apoptotic body)를 형성하며, 이어 주위 세포에 의하여 신속하게 제거된다. 이 과정에서 원형질막은 파열되지 않으므로 세포 내 물질이 세포 주위에 유출되지 않아 염증반응을 일으키지 않는다.<sup>4)</sup>

세포자멸사는 ATP 형태의 에너지를 필요로 하는 능동적인 과정으로서 자외선, 열, 세포 성장 인자의 결핍, 수용체에 대한 배위자(ligand)의 결합, 반응기 산소대사물, DNA 손상 등 세포에 대한 여러 자극에 의하여 유발된다. 사멸에 관여하는 세포 내의 신호전달경로는 확실히 규명되지 않았으나 자극 및 세포의 종류에 따라 다양하리라고 추측되고 있다<sup>5, 6)</sup>.

암에 대한 역학조사와 실험적 연구를 통해 사람이 섭취하고 있는 식이 중의 특정 성분이 암의 원인이나 예방 및 치료에 중요한 역할을 한다는 사실이 알려졌다<sup>7)</sup>. 최근에 capsaicin이 작용하는 수용체로 알려진 vanilloid receptor subtype 1 (VR1)은 신경세포뿐만 아니라 위점막 상피세포에도 발현되며, 세포 보호에 중요한 역할을 할 것으로 보고되었다<sup>8)</sup>. 특히 한국인 음식에 널리 이용되고 있는 중요한 향신료인 고추에 많이 들어있는 capsaicin이 최근 많은 연구를 통해 암을 예방하고 더 나아가 치료할 수 있는 성분으로 밝혀지고 있다<sup>9)</sup>. 따라서 본 저자들은 이번 연구에서 한국인이 많이 섭취하고 있는 식이성분인 capsaicin이 위암세포의 세포자멸사의 유도물질로 가능성을 알아보고 이를 항암치료의 일부분으로 시도하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 위암 세포 SNU-668의 배양

Capsaicin의 항암기능의 실험에 사용된 세포주는 위암환자로부터 유래되어 잘 분화된 편평 상피세포암 세포주 SNU-668을 한국 세포주 은행(Korean Cell Line bank, 서울대학교 암 연구소, 서울, 대한민국)에서 분양 받아 실험하였다. 세포 배양액은 RPMI1640 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)배지에 56°C에서 30분간 가열하여 비활성화시킨 10% 우태아 혈청(FBS, Hyclone, Logan, Utah, USA), penicillin (100 unit/mL)과 streptomycin (100 µg/mL), glutamine (300 µg/mL)을 첨가하여 조제하였다. 세포주는 위의 배양액을 사용하여 37°C, 95%

습도, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였고, 통상적으로 세포가 서로 융합되기 직전인 3-4일 간격으로 계대 배양을 하였으며, 실험에는 총 35계대 이하인 세포만을 사용하였다.

### 2. 세포성장 측정

Capsaicin의 세포 성장에 관한 효과를 알아보기 위하여 위암 세포주를 24 well plate의 각 well에 약 2×10<sup>4</sup>개씩 분주하고 capsaicin을 여러 농도로 처리하여 하루 동안 배양 후 1, 2일에 살아있는 세포를 trypan-blue 염색하여 세포의 성장을 측정하였다. 더불어 capsaicin 처리 2일 후 배양용기를 50% 메탄올로 고정시키고 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척하여 생존 세포만을 용기에 부착시켰다. 부착된 세포는 crystal violet으로 염색하여 관찰하였다.

### 3. 세포 독성 실험

Capsaicin의 항암제의 세포 독성에 관한 효과를 알아보기 위하여 위암세포주 SNU-668를 1×10<sup>5</sup> cell/mL 농도의 세포 부유액을 만들어 이중 80 µL를 96 well microplate에 각각 분주한 후 세포를 안정하기 위하여 24시간 동안 배양시켰다. 안정된 세포에 200 µM 농도의 capsaicin 10 µL를 각 well에 첨가한 후 항암제를 여러 농도로 PBS 용액에 희석하여 각 well에 10 µL씩 첨가하고 또 대조군으로 약물이 없는 PBS만을 10 µL를 첨가하였다. 이를 3일간 배양한 후 MTT 시약을 10 µL씩 각 well에 다시 첨가하여 4시간 배양한 후 microplate를 원심 분리하여 세포가 없는 상층액 중 50 µL를 덜어내고 DMSO 150 µL씩 각 well에 첨가하여 세포를 분석한 후 microplate reader를 이용해 형성된 formazan crystal의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하였다.

### 4. DNA 단편화

DNA 단편화 실험은 Kondo 등<sup>10)</sup>의 방법을 변형하여 실시하였다. Capsaicin을 여러 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양 후 1×10<sup>6</sup> 세포를 2회 차가운 PBS 용액으로 세척 후 1 mL의 lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS)를 첨가하여 얼음에서 15분간 용해시킨 후, 세포 찌꺼기를 13,000 rpm에서 원심 제거하였다. 상층의 용해질을 phenol/chloroform으로 2회 추출 후 에탄올로 DNA를 침전시켰고, 2 µg의 RNase A가 함유된 TE 용액에 녹인 후 2% 환천 겔에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

### 5. 핵응축(nuclear condensation)

세포핵의 염색은 capsaicin을 여러 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양 후 먼저 세포를 회수하여 찬 PBS 용액으로 세척하여 슬라이드 글라스에 옮긴 후 실온에서 약 5분간 Carnoy 용액(메탄올:초산=3:1)으로 고정시켰다. 이 위에 Hoechst 용액(0.1 mg/mL in PBS)을 떨어뜨려 10분간 염색시키고 PBS 용액으로 2회 세척하였다. 염색 후 형광현미경을 이용하여 365 nm에서 관찰하

였다.

## 6. SNU-668 세포에서 RNA분리

실험 세포주로부터 RNA를 분리하였다. 세포주는 Tri reagent<sup>®</sup> (MRC, molecular researcher center, Cincinnati, USA)를 사용하여 분리하였다. 세포에 capsaicin 처리 후 100 mm 배양용기에 1 mL Tri reagent<sup>®</sup>를 첨가 후 강하게 교반시킨 실온에서 5분간 세포를 용해시켜 RNA를 노출시켰다. 220  $\mu$ L의 클로로포름을 첨가하여 강하게 섞고 15분간 상온에서 방치시킨 후 4°C, 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리시켜, 새로운 튜브에 상층액만 취하였다. 분리한 상층액과 동량인 500  $\mu$ L 아이소프로판올을 첨가하고, 실온에서 10분간 방치시킨 후, 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전된 RNA pellet을 획득하였고, 75% 에탄올로 세척하였다. 침전 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 3차 증류수에 녹여서 정량 후 -80°C에 보관하였다.

## 7. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

### 1) cDNA 합성

분리한 RNA에 대한 cDNA합성은 Promega (Madison, WI, USA)사의 cDNA합성 kit를 사용하였다. Total RNA(2  $\mu$ g)를 DEPC 처리된 3차 증류수로 4  $\mu$ L를 만든 후 65°C에 10분간 방치시키고, 반응 혼합물(50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 M MgCl<sub>2</sub>) 2  $\mu$ L, 0.1 M DTT 1  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP 1  $\mu$ L, 100  $\mu$ M random primer 1  $\mu$ L, Recombinant RNase inhibitor (50 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L 역전사 중합효소(200 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L를 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후, 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA합성하였다.

### 2) 중합효소 연쇄 반응

bcl-2의 발현 분석에 사용된 시발체(primer)는 사람의 bcl-2와 bax 유전자 cDNA의 염기서열에 근거하여 bcl-2 (sense: 5'-cgc aga ggg gct acg agt-3', antisense: 5'-cgg ttg acg ctc tcc aca-3'), Bax (sense: 5'-aag cgc att gga gat gaa ct-3', antisense: 5'-cga tct cga agg aag tcc ag-3')로 제작하여 실험에 사용하였다. 증폭시킬 cDNA 2  $\mu$ L에 reaction buffer 5  $\mu$ L, 500  $\mu$ M dNTP 혼합물 5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L, 시발체 10 pmol 1  $\mu$ L, Taq-polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L 및 증류수를 가하여 총 50  $\mu$ L 만들었다. 중합효소 연쇄반응 조건은 95°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분간 변성반응(denaturation), 57°C annealing 온도에서 1분간 결합반응(annealing), 72°C에서 1분간 연장반응(extension)을 30회 반복하였다. 증폭된 DNA중 10  $\mu$ L를 취해서 2% agarose gel에서 전기영동 하였다. 정량 분석 기준은  $\beta$ -actin (661bp)에 대한 중합효소반응을 동시에 실시하여 이를 기준으로 비교 분석하였다.

## 8. Western immunoblot assay

SNU-668 세포에 capsaicin을 200, 300  $\mu$ M/L 농도로 처리하여 24시간 동안 배양 후 전체세포의 용해질로부터 세포 단백질을 제조하였다. 즉 세포를 2회 차가운 PBS로 세척 후 100 mm 배양용기에 1 mL의 PBS-TDS(1×PBS, 1% Triton X-100, 0.05% sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.5  $\mu$ /mL leupeptin, 1 mM EDTA, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 0.2 mM PMSF)용액을 첨가, 15분간 얼음 위에서 방치 후 13,000 rpm에서 5분 간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였다. 10  $\mu$ g의 용해질을 7.5% mini gel SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 니트로 셀룰로스 막(Hybond-C, Amersham pharmacia biotech, Piscataway, NJ, USA)에 80 V로 2시간 동안 전기적으로 이동하였다. 니트로 셀룰로스 막의 블로킹은 5% 탈지분유가 함유된 TBST (TBS+0.1% Tween 20)용액에서 상온에서 1시간동안 실시하였다. 각각의 1차 항체를 1:1,000으로 TBST용액에 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세척하였다.

2차 항체로는 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham pharmacia biotech, Piscataway, NJ, USA)를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하였다. TBST로 3회 세척 후 ECL기질(Amersham pharmacia biotech, Piscataway, NJ, USA)과 1분 반응 후 X-Ray 필름에 감광시켰다.

## 9. 통계처리

통계 방법 처리는 Student's t-test를 사용하여 P값을 구하였으며 P값은 0.05 미만일 때 통계학적인 유의성을 인정하였다.

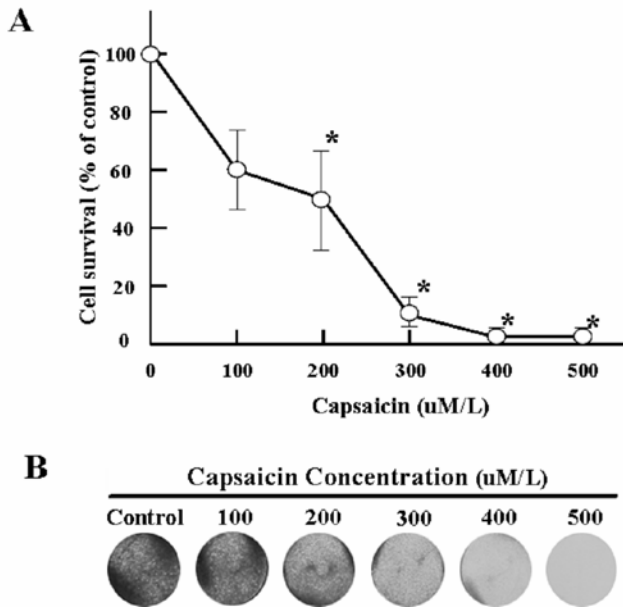
## 결 과

### 1. 위암 세포주의 성장에 대한 capsaicin의 효과

SNU-668 세포의 성장에 대한 capsaicin의 효과를 분석한 결과 capsaicin의 농도가 200  $\mu$ M/L일때 대조군에 비해 약 50%의 세포 성장이 억제되었다. Capsaicin의 농도가 200  $\mu$ M/L 이상에서 통계적 유의성을 보였으며 처리한 capsaicin의 농도가 증가할수록 세포의 성장은 감소되었다(Fig. 1A). 아울러 살아있는 세포의 정도를 측정하기 위하여 생존세포만을 용기에 부착시키고 crystal violet으로 염색한 결과 위의 결과와 동일하게 capsaicin의 농도가 증가할수록 생존 세포의 수는 감소되었다(Fig. 1B).

### 2. Capsaicin에 의한 세포의 핵 응축 변화

Capsaicin에 의한 세포 내에서의 형태학적 변화를 알아보기



**Fig. 1.** Effect of capsaicin on cell survival in SNU-668 gastric cancer cells. Cells were treated with various concentration of capsaicin for 2 days. Cell survival was analyzed by the trypan-blue method (A) and clonogenic survival assay by crystal violet staining (B). The number of cells were determined and the results presented are mean  $\pm$  SD of triplicates. \* $P < 0.05$  as compared with control.

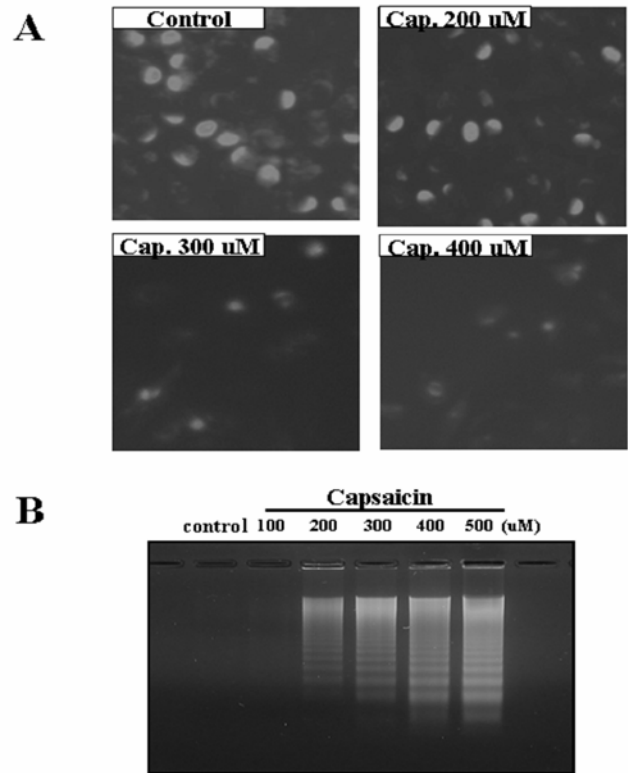
위하여 세포핵만을 특이적으로 염색시키는 Hoechst 용액을 사용하여 세포핵의 모양을 대조군과 비교하여 관찰한 결과 capsaicin의 농도에 의존하여 세포 자멸사를 시사하는 세포 수축으로 인한 크기의 감소와 핵 응축이 증가하였다(Fig. 2A).

### 3. Capsaicin에 의한 DNA 단편화

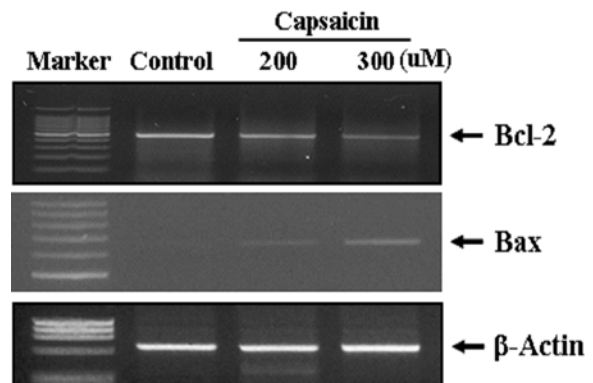
Capsaicin으로 처리 시 SNU-668 세포의 성장 억제와 세포자멸사에 의한 것인지를 확인하고자 세포자멸사가 발생하면 endonuclease에 의해 DNA가 180-200 bp 크기의 oligonucleosome으로 잘리게 되어 한천 겔에 전기영동에서 특징적인 사다리 모양을 보이는 현상을 이용해 세포자멸사 발생 여부를 관찰하였다. Capsaicin의 처리 시 DNA 단편화 현상을 보여 세포자멸사가 일어났음을 알 수 있었으며 capsaicin의 처리 농도가 증가할수록 DNA 단편화는 증가되었다(Fig. 2B).

### 4. Capsaicin에 의한 Bcl-2, Bax mRNA의 발현 변화

SNU-668 위암 세포주에서 capsaicin 처리 후 세포자멸사를 예방 또는 지연시켜 세포의 생존을 연장시키는(anti-apoptosis) Bcl-2의 발현은 capsaicin의 농도가 증가 할수록 대조군에 비해 현저한 감소를 보였다. 반면 세포자멸사를 촉진하는(pro-apoptosis) 단백질 Bax의 발현은 농도가 증가할수록 대조군에 비해 현저히 증가를 보였다. 이는 capsaicin에 의한 SNU-668 세포에서 세포자멸사를 유도하는 중에 capsaicin의 농도에 의존하여



**Fig. 2.** Effect of capsaicin on the induction of apoptosis in SNU-668 gastric cancer cells. (A) Nuclear morphological analysis. Cells were treated with various concentration of capsaicin for 2 days and stained with Hoechst 33258 for nuclear staining. Stained cells were examined by fluorescence microscopy. (B) Internucleosome DNA fragmentation. DNA was extracted and analyzed by agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.

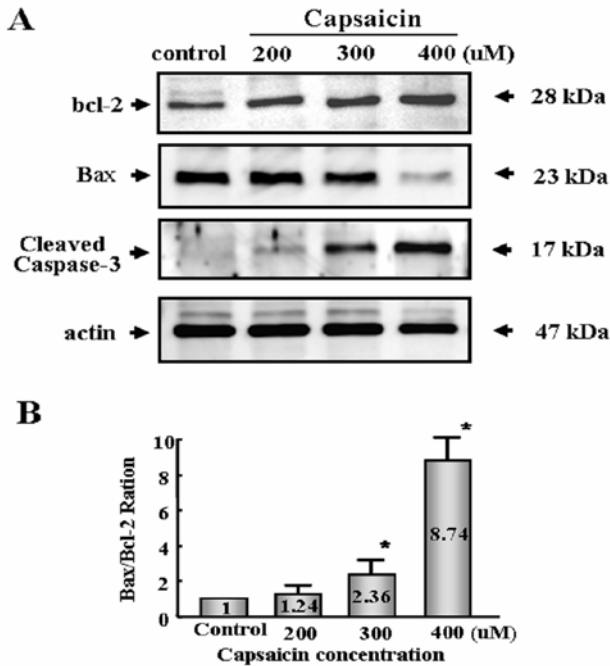


**Fig. 3.** Effect of capsaicin on the expression of Bcl-2, Bax mRNA in SNU-668 gastric cancer cells. Cells were treated with various concentrations of capsaicin for 2 days and the expression of Bcl-2, Bax mRNA by capsaicin were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Each mRNA level is normalized versus the corresponding actin mRNA level.

Bcl-2의 감소와 Bax의 증가를 보이는 것을 시사한다(Fig. 3).

### 5. Capsaicin에 의한 apoptosis-related proteins 발현 변화

SNU-668 세포에서 capsaicin에 의한 세포자멸사가 유도되는 과정에서 분자학적 기전을 확인하기 위하여 Bcl-2, Bax, caspase-3와 같은 세포자멸에 관련된 단백질(apoptotic related proteins)의 발현을 Western blot 분석을 시행하였다. Caspase-3의 활성화는 capsaicin의 농도가 증가 할수록 대조군에 비해 증가하는 것을 보였으며, 세포 자멸을 예방 또는 지연시켜 세포의 생존을 연장시키는(anti-apoptosis) 단백질 Bcl-2의 발현은 capsaicin의 농도가 증가 할수록 대조군에 비해 감소를 보였다. 반면에 세포 사망을 촉진하는(pro-apoptosis) 단백질 Bax의 발현은 capsaicin의 농도가 증가 할수록 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 4A). 대조군에 비해 capsaicin을 처리한 세포에서 농도에 의존하여 bcl-2/bax ratio가 현저히 감소하였다(Fig. 4B). 이상의 결과는 capsaicin이 caspase-3의 활성화와 bcl-2/bax ratio를 감소시킴으로써 세포에서 세포자멸사를 유도하는 것을 의미한다.



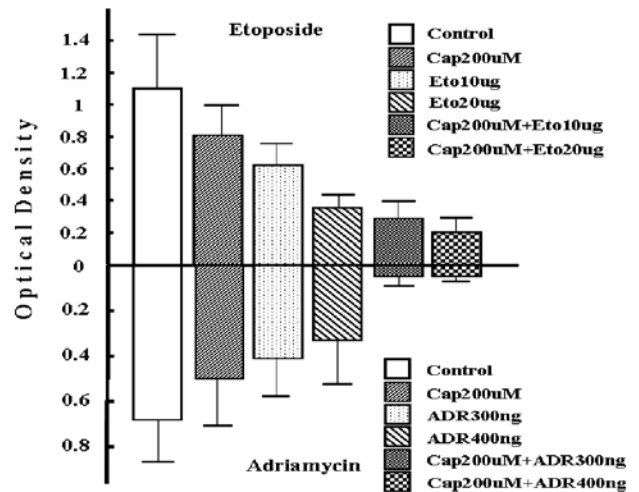
**Fig. 4.** Effect of capsaicin on the expression of apoptosis-related proteins in SNU-668 gastric cancer cells. Cells were treated with various concentrations of capsaicin for 2 days. (A) Apoptosis-related protein expression was analyzed by Western immunoblot analysis with specific antibodies. To confirm equal protein levels, the same blot was stripped and developed with an anti-actin antibody. (B) The ratio of Bax/Bcl-2 expression in the capsaicin treated cells was increased in a dose-dependent manner. A bar graph was generated from the densitometric analysis from three separate experiments. The results represent means  $\pm$  S.E. \* $P < 0.05$  as compared with control.

### 6. Capsaicin에 의한 항암제의 감수성에 대한 효과 분석

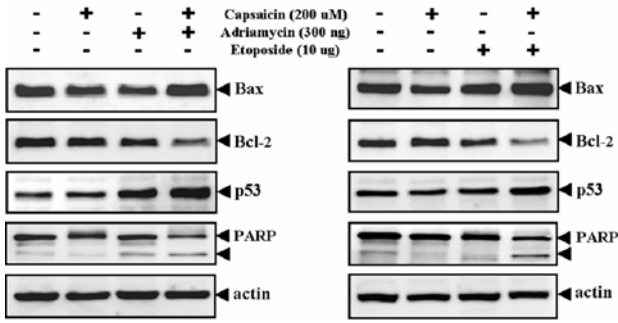
capsaicin에 의하여 항암제 etoposide, adriamycin의 감수성이 증가되는 지를 알아보기 위하여 SNU-668 위암세포에 세포 성장을 절반 정도를 억제하는 일정 농도 0.2 mM의 capsaicin과 농도 별 각 항암제를 같이 처리하여 2일 간 배양 하고 MTT assay로 분석하였다. Fig. 5에서와 같이 SNU-668 세포주에 항암제 doxorubicin, cisplatin 혹은 etoposide를 첨가하였을 때 항암제의 농도와 암세포 생존율은 용량 반응관계를 보였으며 항암제와 capsaicin을 동시에 투여 한 경우 항암제 단독 투여하는 것보다 SNU-668 위암세포의 증식을 현저히 억제하였으며, capsaicin의 병요투여 시 항암제의 감수성의 상승효과를 관찰할 수 있었다. 항암제와 capsaicin을 동시에 투여 한 경우 항암제 단독 투여하는 것보다 SNU-668 위암세포의 증식을 현저히 억제하는 분자학적 기전을 분석하기 위하여 Bcl-2, Bax, p53, PARP와 같은 세포자멸에 관련된 단백질의 발현을 Western blot 분석을 시행하였다. 항암제와 capsaicin을 동시에 투여 한 경우가 대조군이나 단독 투여군에 비하여 Bcl-2는 감소하였으며 Bax, P53, PARP는 현저히 증가하여 세포자멸사를 촉진하였음을 알 수 있었다(Fig. 6).

### 고찰

최근 사람과 동물실험에 따르면 종양의 발생은 복잡한 다단계의 과정이며 이것은 세포의 증식과 분화 그리고 세포자멸사를 조절하는 항상성의 기전이 지속적으로 파괴됨으로써 생긴다고 한



**Fig. 5.** Effect of capsaicin on the cellular sensitivity to anti-cancer drug in SNU-668 gastric cancer cells. Cells were co-treated with 200  $\mu$ M capsaicin and/or various concentration of adriamycin (ADR) or etoposide (Eto) for 2 days. Cell cytotoxicity was measured by an MTT assay, and is presented as optical density. The results are the mean  $\pm$  S.E. of three separate experiments performed in triplicate wells. \* $P < 0.05$  as compared with control.



**Fig. 6.** Effect of capsaicin on the expression of apoptosis-related proteins by anticancer drug in SNU-668 gastric cancer cells. Cells were co-treated with 200 μM capsaicin and/or various concentrations of adriamycin and etoposide for 2 days. Apoptosis-related protein expression was analyzed by Western immunoblot analysis with specific antibodies. To confirm equal protein levels the same blot was stripped and developed with an anti-actin antibody.

다. 위암 또한 세포사의 지속적인 억제로 발생한다고 알려져 있다<sup>11)</sup>. 따라서 최근 세포자멸사 유도 물질 혹은 관련 유전자들이 이용한 치료 방법에 많은 관심을 가지게 되었고 궁극적으로는 선택적이고 효과적인 암세포의 자멸을 유도하여 암의 치료율을 높이는 목적으로 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>2)</sup>.

Capsaicin(trans-8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide)은 고추의 매운맛의 주성분이고 향신료나 약제로 오래 전부터 전 세계적으로 널리 사용되고 있으며 특히 동남아시아와 라틴아메리카에서 소비가 많은 것으로 알려져 있다. 고추에 들어있는 capsaicin의 농도는 0.1-1.0% 정도이고 한국에서의 성인 일일 소비량은 2.5-25 mg/60kg 정도이다<sup>12)</sup>. Capsaicin의 대사는 위장관을 통해 빠르게 전달되어 문맥을 통해 흡수되고 그 대사물이 소변을 통해 24시간 내에 배출된다. Capsaicin은 생체이물 대사 효소와 상호작용을 하며, 특히 여러 가지 화학 발암원과 염색체이상을 일으키는 물질을 활성화시키거나 해독하는 과정에 관여하는 미소체 사이토크롬 P450 의존성 monooxygenase와 상호 작용을 한다<sup>13)</sup>.

동물이나 사람에서 여러 종류의 손상에 대해 capsaicin은 위내 구심성 지각 신경세포를 활성화하여 위점막의 혈류 증가, 점액 분비, 중탄산염 분비 등 여러 가지 생리적인 기능을 매개하여 위점막을 보호하는 것으로 알려졌다<sup>14)</sup>. 이와 같이 capsaicin에 대한 연구는 주로 신경 생리학적 효과에 대하여 집중되어 왔으나 최근에는 발암성 또는 항암성에 대한 상반된 결과들이 보고되고 있다<sup>15)</sup>. Capsaicin 자체가 돌연변이를 유발할 수 있으며, 종양형성을 조장한다는 보고가 있는 반면<sup>16)</sup>, 다양한 발암 인자들에 의한 돌연변이나 종양형성을 방지하는 효과와 여러 암 세포주 등에서 세포자멸사를 유도하며 세포 성장을 억제한다는 사실들이 여러 연구에서 밝혀져 있다<sup>17-19)</sup>. 본 연구에서도 위암세포의 세포자멸사를 유도하며 위암세포의 성장을 억제하였다.

Capsaicin에 의한 세포자멸사의 분자학적 기초는 capsaicin을 포함하는 vanilloid와 원형질막 산화 환원계(plasma membrane

redox system;PMRS)와의 특수한 작용을 하는 것에 근거한다. 이러한 작용은 NADH 산화효소를 억제해서 생기는데, 이로 인해 과도한 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되고 결국 세포자멸사의 경로를 걷게 된다<sup>20)</sup>. Capsaicin은 세포사가 유도되는 농도에서 ROS의 농도와 지질 과산화현을 현저히 감소시키며<sup>21)</sup> 그리고 IκBα의 안정화와 IκB kinase(IKK) 활성을 억제하므로써 IκBα의 분해를 막아 NF-κB의 p65 subunit의 핵내로 이동을 억제하여 NF-κB의 기능을 차단하는 것으로 보고되었다<sup>22)</sup>. 그러므로 항암성과 항염증성을 가지는 capsaicin 유사 물질들이 인간의 암에 대항하는 약제로의 가능성이 있을 것으로 생각되어 본 연구도 SNU-668 위암 세포에 대해서 capsaicin의 세포자멸사를 유도하여 항암 효과의 가능성을 평가하게 되었다. 실험의 결과로는 capsaicin의 농도에 따라 SNU-668 위암세포의 증식을 현저히 억제하는 것을 알았으며, 이러한 capsaicin의 증식 억제는 DNA 단편화, 핵 응축과 caspase 활성화에 의해 세포자멸사의 유도에 의한 것으로 입증되었다.

Caspase의 활성화는 여러 세포들에서 세포자멸사 과정을 유발한다<sup>23)</sup>. 최근에는 이러한 pro-caspase-3의 활성화는 cytochrome C가 미토콘드리아로부터 세포질로 이동이 되면서 시작되는 것으로 밝혀졌다<sup>24)</sup>. 항 세포자멸사의 종양성 단백질인 Bcl-2는 미토콘드리아에 작용해 cytochrome C의 분비 및 caspase 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있으며 반면 Bax는 이 과정을 촉진시킨다<sup>25)</sup>. Capsaicin에 의해 유도되는 세포자멸사가 진행되는 신호전달 체계를 분석하기 위하여 본 저자들은 자멸체(apoptotic bodies) 형성에 중요한 역할을 하는 caspase-3 활성화에 관심을 가졌다. 본 연구에서도 capsaicin이 SNU-668 세포에서 caspase-3의 활성화를 유도하여 Bcl-2의 현저한 감소와 bax의 증가를 보였다. 이는 capsaicin에 의한 SNU-668 세포에서 세포자멸사를 유도하는 중에 Bcl-2의 감소가 caspase-3 활성화를 가속화를 시킬 것으로 시사한다. 이러한 결과는 Bcl-2의 과잉발현이 capsaicin에 의해 유도되는 세포자멸사를 억제한다는 Macho 등의 결과와 잘 일치하였다<sup>26)</sup>.

최근에는 Bcl-2가 세포자멸사를 억제하는 능력이 Bcl-2 family 간의 균형에 의존한다는 주장이 대두되고 있다. Bax는 Bax/Bax 동질이합체(homodimer) 또는 Bcl-2와 이종이합체(heterodimer)를 형성하는데 Bcl-2/Bax 이종이합체와 Bax/Bax 동질이합체의 비율이 세포자멸사를 결정한다는 것이다. 즉 세포사멸을 촉진하는 단백질인 Bax는 Bcl-2와 이종이합체를 형성하여 Bcl-2의 항 세포자멸사 효과에 반대로 작용한다<sup>27)</sup>. 따라서 개개의 단백질의 레벨보다는 Bax에 대한 Bcl-2의 비율이 세포의 생존/사망을 결정할 때에 더 중요하다<sup>28)</sup>. 본 연구에서도 SNU-668 세포에서 세포자멸사의 반응을 유발할 가능성이 있는 capsaicin에 의해 pro-apoptotic Bax에 대한 anti-apoptotic Bcl-2의 비율이 현저히 감소하였다. 다양한 자극에 의해 세포자멸사가 유도되는 세포에서 Bax 단백질과 그 mRNA 레벨 모두가 증가되며 더욱이 Bax 과잉발현은 세포자멸사를 촉진시킨다<sup>29)</sup>. 본 연구에

서도 capsaicin 처리가 Bax의 발현을 현저히 증가시키는 것은 pro-apoptotic bax 단백질의 증가는 SNU-668 세포에서 capsaicin에 유도되는 세포자멸사에 매우 중요한 역할을 할 것이다. 더욱이 DNA 손상 시 종양억제유전자 p53은 G1 cyclin-dependent kinase(CDK)의 억제자인 p21 유전자의 발현을 유도하여 세포를 G1기에서 진행을 정지시키고 정상세포주기를 조절하거나, p53의 발현과 활동능을 증가시켜 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다. 그러나 p53이 세포자멸사를 유도하는 정확한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않으나, Miyashita 등<sup>30)</sup>에 의하면, p53에 의한 세포자멸사가 bax의 전사를 증가시킴으로써 이루어진다는 보고가 있다. 본 연구에서도 capsaicin에 의해 bax 뿐만 아니라 p53의 발현이 증가되어 세포자멸사를 더욱 유발한 것으로 사료된다. 특히나 항암제와 capsaicin을 동시에 투여 한 경우 항암제 단독 투여하는 것보다 항암제에 대한 감수성이 현저히 증가하고 세포자멸사를 더욱 유도하는 것으로 보아 capsaicin이 항암제의 chemosensitizer로 좋은 대안이 될 것으로 사료된다.

모든 결과를 종합하면 본 연구에서는 capsaicin은 caspase-3의존적 경로를 통하여 SNU-668 세포에서 세포자멸사를 유도하는 것으로 알았으며 항암제의 chemosensitizer의 효과가 있으므로 이를 이용하여 위암의 효과적인 항암치료제와 항암치료에 잘 듣지 않는 위암환자의 항암제 민감성 유도제의 일환으로 가능성이 있다. 그러나 향후 보다 자세한 항암기전에 대한 연구와 많은 임상적용의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

**목적 :** 한국인 음식에 널리 이용되고 있는 중요한 향신료인 고추에 많이 들어있는 capsaicin이 최근 많은 연구를 통해 암을 예방하고 더 나아가 치료할 수 있는 성분으로 밝혀지고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 한국인이 많이 섭취하고 있는 식이성분인 capsaicin이 한국인에 많은 위암세포의 세포자멸사의 유도물질로 가능성을 알아보고 이를 항암치료의 일부분으로 시도하고자 하였다.

**방법 :** 한국인의 위암세포주인 SNU-668 세포에 capsaicin을 처리한 후 세포 생존은 trypan blue 와 crystal violet 분석, 세포 독성은 MTT 분석, 세포사 분석은 핵 응축과 DNA 분절화 실험, bcl-2와 bax의 mRNA 발현은 역전사 중합효소 연쇄반응, 세포사와 관련된 단백질 발현은 Western immunoblot analysis로 분석하였다. Capsaicin에 의해 항암제의 감수성이 증가되는 지를 알아보기 위하여 일정 농도의 capsaicin과 농도 별 각 항암제를 같이 처리하여 2일 간 배양 하고 MTT assay로 분석하였으며 이와 관련된 세포사와 관련된 단백질 발현을 분석하였다.

**결과 :** capsaicin의 농도에 따라 SNU-668 위암세포의 증식을 현저히 억제하였으며, 이러한 capsaicin의 증식 억제는 DNA 단편화, 핵 응축과 caspase 활성화에 의해 세포자멸사의 유도에 의한 것으로 입증되었다. 더욱이 capsaicin에 의해 pro-apopto-

tic Bax에 대한 anti-apoptotic Bcl-2의 비율이 현저히 감소하고, caspase-3활성이 증가하였다. Capsaicin을 처리한 세포는 처리하지 않은 세포에 비하여 etoposide나 adriamycin에 의해 유도되는 세포사멸에 더욱 감수성을 보였다.

**결론 :** 이상의 연구에서 capsaicin은 caspase-3 의존적 경로를 통하여 SNU-668 세포에서 세포자멸사를 유도하며 항암제의 감수성을 증가시키므로 위암의 효과적인 항암치료제와 항암제 민감성 유도제의 일환으로 가능성이 있다.

## References

- 1) Kim YS, Park HA, Kim BS, Yook JH, Lee MS. Efficacy of screening for gastric cancer in a Korean adult population: a case-control study. *J Korean Med Sci* 2000;15:510-5.
- 2) Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-26.
- 3) Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995;146:16-9.
- 4) Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-9.
- 5) Hong SP, Ha SH, Park IS, Kim WH. Induction of apoptosis in colon cancer cells by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Yonsei Med J* 1998;39:287-95.
- 6) Mountz JD, Zhou T, Wu J, Wang W, Su X, Chen J. Regulation of apoptosis in immune cells. *J Clin Immunol* 1995;15:1-16.
- 7) Key TJ, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. The effect of diet on risk of cancer. *Lancet* 2002;360:861-8.
- 8) Kato S, Aihara E, Nakamura A, Xin H, Matsui H, Kohama K, et al. Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1115-21.
- 9) Aggarwal BB, Takada Y, Oommen OV. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;13:1327-38.
- 10) Kondo S, Yin D, Takeuchi J, Morimura T, Oda Y, Kikuchi H. Bcl-2 gene enables rescue from in vitro myelosuppression induced by chemotherapy. *Br J Cancer* 1994;70:421-6.
- 11) Anti M, Armuzzi A, Gasbarrini G. Epithelial cell turnover and apoptosis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;Suppl 3: S276-8.
- 12) Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid(Capsaicin) receptors and mechanism. *Pharmacol Rev* 1999;51:159-212.
- 13) Surh YJ, Ahn SH, Kim KC, Park JB, Sohn YW, Lee SS. Metabolism of capsaicinoids: Evidence for aliphatic hydroxylation and its pharmacological implications. *Life sci* 1995;56:305-11.
- 14) Lo YC, Yang YC, Wu IC, Kuo FC, Liu CM, Wang HW, et al. Capsaicin-induced cell death in a human gastric adenocarcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 2005;11:6254-7.
- 15) Surh YJ, Lee SS. Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food Chem Toxicol* 1996;34:313-6.

- 16) Lawson T, Gannett P. The mutagenicity of capsaicin and dihydrocapsaicin in V79 cells. *Cancer Lett* 1989;49:109-13.
- 17) Kim JD, Kim JM, Pyo JO, Kim SY, Kim BS, Yu R, et al. Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. *Cancer Lett* 1997;20:235-41.
- 18) Mori A, Lehmann S, O'Kelly J, Kumagai T, Desmond JC, Pervan M, et al. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:3222-9.
- 19) Sanchez AM, Sanchez MG, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Diaz-Laviada I. Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. *Apoptosis* 2006;11:89-99.
- 20) Wolvetang EJ, Larm JA, Moutsoulas P, Lawen A. Apoptosis induced by inhibitors of the plasma membrane NADH-oxidase involves Bcl-2 and calcineurin. *Cell Growth Differ* 1996;7:1315-25.
- 21) Lee JS, Chang JS, Lee JY, Kim JA. Capsaicin-induced apoptosis and reduced release of reactive oxygen species in MBT-2 murine bladder tumor cells. *Arch Pharm Res* 2004; 27:1147-53.
- 22) Singh S, Natarajan K, Aggarwal BB. Capsaicin is a potent inhibitor of nuclear transcription factor-kappa B activation by diverse agents. *J Immunol* 1996;157:4412-20.
- 23) Alnemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 1997;64:33-42.
- 24) Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275: 1132-6.
- 25) Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-32.
- 26) Macho A, Blazquez MV, Navas P, Munoz E. Induction of apoptosis by vanilloid compounds does not require de novo gene transcription and activator protein 1 activity. *Cell Growth Differ* 1998;9:277-86.
- 27) Kobayashi T, Ruan S, Clodi K, Kliche KO, Shiku H, Andreeff M, et al. Overexpression of Bax gene sensitizes K562 erythroleukemia cells to apoptosis induced by selective chemotherapeutic agents. *Oncogene* 1998;16:1587-91.
- 28) Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
- 29) Yin XM, Oltvai Z, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. *Nature* 1994;369:321-3.
- 30) Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 27:293-9.