

H₂O₂로 유도된 WB-F344 세포의 GJIC 억제에 대한 색상별 파프리카 추출물의 보호 효과

김 지 선 · 김 선 아[†]

한국방송통신대학교 자연과학대학 가정학과 식품영양전공

Protective Effects of Lipophilic Extracts from Different Colored Paprikas on Inhibition of H₂O₂-induced Gap Junctional Intercellular Communications

Ji-Sun Kim and Suna Kim[†]

Food and Nutrition in Home Economics, College of Natural Sciences, Korea National Open University,
Seoul 110-791, Republic of Korea

Abstract

This study analyzed phytochemicals, including various carotenoids, tocopherol and L-ascorbic acid, in green, yellow and orange paprikas (GP, YP and OP) and measured the preventive effects of lipophilic extracts from different colored paprikas on the blockage of gap junctional intercellular communication (GJIC), which is known as a cellular event associated with tumor promotion. Main carotenoids were lutein and β -carotene in GP, lutein, β -carotene, capsanthin, violaxanthin, β -carotene and capsorubin in YP, and lutein, β -carotene, cryptoxanthin and zeaxanthin in OP. Total carotenoid contents were 65.54 \pm 15.87 mg/100 g dw in OP, 11.98 \pm 0.69 mg/100 g dw in YP and 10.30 \pm 1.43 mg/100 g dw in GP. Tocopherol contents were highest in GP compared with in YP and OP, whereas L-ascorbic acid contents were very high in all paprikas. We determined the non-cytotoxic levels of paprika extracts by MTT assay, which showed less formation of reactive oxygen species (ROS) induced by 500 μ M H₂O₂ for 1h. Finally, we showed that pretreatment of paprika extracts prevented inhibition of GJIC induced by 500 μ M H₂O₂ by the scrape-loading/dye-transfer technique. In conclusion, each colored paprika has unique phytochemicals and showed a protective effect on inhibition of GJIC.

Key words : Paprika, carotenoid, tocopherol, ascorbic acid, reactive oxygen species, gap junctional intercellular communication

서 론

파프리카(*Capsicum annuum* L.)는 비타민 C와 E, 미네랄이 풍부하며, 파프리카 색상에 따라 다양한 종류의 지용성 색소인 카로티노이드가 함유되어 있어 과일을 대체할 수 있는 채소류로 각광받고 있다(Jeong *et al* 2006). 파프리카가 국내에 유입된 지 오래 되지 않았으나, 1990년대 중반 수출 주력 품목으로 성장하면서 파프리카 수출액이 2008년 5,417만 달러에서 2011년 6,590만 달러로 성장세를 지속하고 있으며(Jeong *et al* 2008), 농가에는 고소득 작목으로 주목받고 있다. 또한 웰빙 소비 트렌드에 힘입어 파프리카 시장은 국내에서도 크게 확대되고 있을 뿐 아니라, 다양한 색상과 다양한 크기의 파프리카가 유통되면서 그 용도가 더욱 확대되고 있다.

파프리카는 색상에 따라 다양한 종류의 카로티노이드가 함유되어 있다. 파프리카의 적색은 *Capsicum* 종에만 존재하는

capsanthin과 capsorubin에 의해 발현되고(Camera & Monéger 1978, Mínguez-Mosquera & Hornero-Méndez 1994), 노란색은 zeaxanthin, cryptoxanthin, lutein 등에 의해(Matus *et al* 1991), 주황색은 주로 β -carotene, zeaxanthin, violaxanthin, β -cryptoxanthin 등에 의해 발현된다(Weller & Breithaupt 2003). 이러한 색상의 차이는 파프리카 색상에 따라 기능성에 차이가 있을 것으로 기대되고 있다. Carotenoids는 구조적으로 과산화물과 유리라디칼로 인해 조직이 손상되는 것을 보호해 준다(Aizawa *et al* 2009). β -Carotene은 눈 건강 및 암 예방효과(Craft & Wise 1994), lutein과 zeaxanthin은 노인성 황반변증(Sedden *et al* 1994, Dwyer *et al* 2001), capsanthin은 동맥경화 및 심장질환 완화 효과(Aizawa & Inakuma 2009, Aizawa *et al* 2009) 등이 보고되고 있다. 특히 capsanthin과 capsorubin은 일중항산소(singlet oxygen) 소거 활성이 뛰어나므로(Matsufuji *et al* 1998, Maoka *et al* 2004) 노령화로 인해 발현이 증가하고 있는 대사증후군을 억제하는데 효과적인 것으로 기대되고 있다.

[†]Corresponding author : Suna Kim, Tel : +82-2-3668-4771, FAX: +82-2-3668-4188, E-mail: ksuna7@knou.ac.kr

세포 간극인 Gap junction은 세포에 존재하는 물질 전달 통로로 인접해 있는 세포간의 원활한 물질 이동을 통해 세포의 항상성을 유지하는 역할을 하며, 세포의 성장과 분화를 조절한다(Loewenstein 1981, Kang *et al* 2000). 따라서 gap junction이 손상되면, 세포간의 소통에 장애가 발생하면서 Gap junctional intercellular communication(GJIC)가 감소되고, 암세포와 같이 비정상적으로 세포가 증식하게 된다(Kumar & Gilula 1996, Saez *et al* 1989). 농약이나 과산화수소와 같은 종양을 유발하는 성분은 간상피 세포인 WB-F344 세포에서 GJIC을 억제한다는 연구 결과가 다수 보고되었다(Kang *et al* 2000, Cho *et al* 2002). 그러나 식품에서 유래하는 다양한 유효 성분은 독성 물질에 의해 유도된 GJIC의 억제를 예방하는 효과가 있다. 은행잎 추출물이 cisplatin으로 유도된 GJIC 억제에 따른 이독성으로부터 청각 유모 세포를 보호하는 효과가 있음을 보고되었고(Choi *et al* 2013), 키위에서 유래한 quercetin (Lee *et al* 2010), 와인에서 유래하는 resveratrol(Kim *et al* 2009), 포도에서 유래하는 pterostilbene (Kim *et al* 2009) 등은 과산화수소에 의해 유도된 GJIC의 억제를 예방하는 효과가 있음을 보고되었다.

본 연구에서는 파프리카의 녹색과, 노란색과, 주황색과를 수집하여 카로티노이드, 토코페롤, 아스코르브산의 함량을 측정하고, 색소 분획을 추출한 후 WB-F344 간상피 세포에 대한 세포 독성을 농도별로 비교한 후 과산화수소에 의해 유도된 세포의 ROS 생성에 대한 억제 효과를 측정하며, 색상별 파프리카 추출물이 과산화수소에 의해 억제된 GJIC의 회복에 미치는 효과를 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

파프리카는 녹색과(GP, var. Chelsea), 노란색과(YP, var. Chelsea), 주황색과(OP, var. Boogi)를 (주)농산무역(Gimje, Jeonbuk)으로부터 제공받아 사용하였으며, 세척, 비가식 부위 제거, 절단(8등분), 동결 건조하여 사용하였다. Carotenoids의 분석에 사용되는 capsorubin, violaxanthin, capsanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, β -carotene은 ChromaDex Inc.(CA, USA)로부터, α -, γ -tocopherol, L-ascorbic acid는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HPLC용 아세토니트릴과 메탄올, 아세톤은 Burdick & Jackson(SK Chemicals, Ulsan, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 증류수는 Simplicity Water Purification System(Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)을 이용하여 18.2 m Ω 수준으로 정제된 것을 사용하였다. 그 외 다른 일반 시약은 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다.

2. Phytochemicals 분석

1) 카로티노이드 분석

카로티노이드 분석을 위해 각각의 동결 건조된 파프리카 시료 2 g에 200 mL의 아세톤으로 20°C에서 2시간 동안 색이 빠질 때까지 추출한 후, 검화를 위해 파프리카의 아세톤 추출액 10 mL를 취하여 10 mL의 메탄올과 30% KOH/Methanol 용액 2 mL를 혼합하여 30°C에서 하룻동안 방치하였다. 다음 날 반응액 20 mL에 증류수를 가하고, diethylether 20 mL를 첨가한 후 10% 염화나트륨 10 mL를 첨가하였다. 충분히 방치하여 잔존하는 diethylether을 회수하고, 3회에 걸쳐 회수한 diethylether 분획을 혼합하였다. 20분 후 분리되는 하층을 제거하고 모아진 시료는 DMSO에 녹여 사용하였다. 카로티노이드 분석은 Jasco사(Jasco, Tyoko, Japan)의 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다.

2) 토코페롤 분석

토코페롤 분석을 위해 파프리카 시료 5 g과 메탄올 25 mL를 교반한 후 dichloroethane/MeOH(6:1, v/v) 70 mL를 넣어 4°C에서 30분 동안 방치하여 dichloroethane 층을 분리하였다. 잔류하는 수분을 2% Na₂SO₄를 첨가하여 제거하고, 감압 농축하며 메탄올에 녹여 10 mL로 정용하였다. 토코페롤 분석은 HPLC를 사용하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다.

3) 아스코르브산 분석

아스코르브산 분석을 위해 식품공전(KFDA 2003)에 있는 방법으로 수행하였다. 파프리카 시료 25 g과 4% 메타인산(v/v) 50 mL를 혼합하여 4°C에서 1시간 동안 혼합한 후 원심 분리하여 0.45 μ m PVDF syringe filter(Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 아스코르브산 분석은 HPLC를 사용하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다.

3. In Vitro 항산화능 및 GJIC 측정

1) 세포 배양 및 시료 준비

본 실험에서 사용한 세포주는 WB-F344 rat liver epithelial cell로서, 서울대학교 수의학과로부터 제공받아 사용하였다. 세포는 D-media(GIBCO, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C의 세포 배양기(SANYO, Tokyo, Japan)에서 배양하였다.

세포 실험에 이용한 GP, YP, OP 추출물은 phytochemicals 분석을 위한 추출법 중 카로티노이드 분석용 추출물을 이용하였다.

2) 세포 독성 시험

Table 1. HPLC conditions for analysis of carotenoids, tocopherol and L-ascorbic acid in paprika(*Capsicum annuum* L.)

Carotenoids analysis	
Column	XTerra RP C18 column(250×4.6 mm, 5 μm; Waters, Milford, MA, USA)
Mobile phase	A; 15% H ₂ O/CH ₃ OH, v/v B; 50% CH ₃ COCH ₃ /CH ₃ OH, v/v
Gradient program	at 0 min 100% A; at 20 min 55% A; at 26 min 100% A; at 33 min 0% A; at 42 min 100% A; at 45 min 100% A
Flow rate	1.5 mL/min
UV Wavelength	450 nm
Oven temperature	35 °C
Injection volume	20 μL
Tocopherol analysis	
Column	YMC-Pack ODS-AM(4.6×250 mm, 5 μm; YMC Co., Kyoto, Japan)
Mobile phase	100% CH ₃ OH
Flow rate	1.2 mL/min
UV Wavelength	292 nm
Oven temperature	25 °C
Injection volume	20 μL
L-Ascorbic acid analysis	
Column	YMC-Pack Polyamine II(4.6×250 mm, 5 μm; YMC Co., Kyoto, Japan)
Mobile phase	40 mM CH ₃ CN : 50 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ = 7:3, v/v
Flow rate	1.0 mL/min
UV wavelength	254 nm
Oven temperature	40 °C
Injection volume	20 μL

세포독성 측정을 위하여 1×10^5 cell/mL의 농도로 WB-F344 세포를 파종하여 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양한 후, GP, YP, OP 추출물이 첨가된 배지로 교환하였다. 0.1~2,000 μg/mL 범위의 GP, YP, OP 추출물을 첨가하여 24시간 동안 배양한 후, 배양이 끝난 세포의 생존율을 MTT assay에 의하여 측정하였다. MTT(Sigma Co.)시약은 5 mg/mL의 농도로 조제 후, 20 μL/well로 분주하여 다시 37°C에서 4시간 배양하였다. MTT를 환원시켜 생성된 formazan을 DMSO를 이용하여 용해시킨 후 microplate reader(Molecular devices, Sunnyvale,

CA, USA)를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 세포 독성은 대조군의 생존율에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

3) Reactive Oxygen Species(ROS) 측정

6 well 세포 배양 접시에 WB-F344 세포를 1×10^5 cell/mL의 농도로 파종하여 37°C의 CO₂ 배양기에서 세포 사이가 완전히 유착될 때까지 배양하였다. 세포 독성이 없는 농도 범위의 GP, YP, OP 추출물을 처리한 후, 500 μM H₂O₂를 포함하거나 포함하지 않은 조건에서 1시간 동안 배양한 다음 ROS에 예민한 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)를 10 μM이 되게 첨가하여 30분간 37°C의 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 30분 후 Locke's buffer(154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 5.6 mM D-glucose, 5 mM HEPES, pH 7.4)로 배지에 남아 있는 DCF-DA를 3회 세척하여 제거한 후, 세포 내 산화 과정을 통해 생성된 DCF의 형광(Ex : 485 nm; Em : 538 nm)을 측정하였다.

4) GJIC 측정

색상별 파프리카 추출물(GP, YP, OP)이 WB-F344 간상피 세포의 GJIC에 미치는 효과를 평가하기 위해, scrape loading/dye transfer(SL/DT) 방법을 사용하였다. GJIC 측정을 위하여 세포를 1×10^5 cell/mL의 농도로 파종하여 37°C의 CO₂ 배양기에서 세포 사이가 완전히 유착될 때까지 배양하였다. 10, 25 μg/mL의 GP, 10, 50 μg/mL의 YP, 5, 10 μg/mL의 OP 시료를 처리한 후 500 μM H₂O₂를 포함하거나 하지 않은 조건에서 1시간 동안 배양한 다음 0.05% lucifer yellow CH(Sigma Co.)를 첨가하고, surgical-steel-blade scraper를 이용하여 3개의 scrape line을 만들었다. 차광상태에서 3분간 실온 방치시킨 후, 4% neutral formalin 2 mL를 첨가하여 세포를 고정시킨 다음 inverted fluorescent microscope(Olympus I×71, Japan)으로 lucifer yellow가 scrape line으로부터 수직으로 이동한 거리를 관찰하였다.

4. 통계 처리

실험의 통계 분석은 Statistical Analysis System(The SAS system for windows ver. 8)을 이용하여 실험군당 평균±표준오차로 나타내었으며, 각 군의 유의차 검정은 분산 분석을 한 후 $\alpha=0.001$ 수준에서 Duncan의 다중 비교법에 의하여 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 색상별 파프리카 유래 Phytochemicals 함량

색상별 파프리카의 phytochemicals를 분석한 결과는 Table

2와 같다.

GP, YP, OP의 카로티노이드 조성을 비교한 결과, 색상별로 검출된 카로티노이드는 GP에서 lutein, β -carotene, cryptoxanthin, violaxanthin, YP에서 lutein, β -carotene, capsanthin, violaxanthin, β -carotene, capsorubin, OP에서 lutein, β -carotene, β -cryptoxanthin, zeaxanthin 등이 나타났다. 파프리카 색상별 총 함량을 비교해 보면 OP는 65.54 ± 15.87 mg/100g dw, YP는 11.98 ± 0.69 mg/100g dw, GP는 10.30 ± 1.43 mg/100g dw로 OP에서 카로티노이드 함량이 매우 높게 나타났다. 특히 GP와 YP는 동일한 품종으로 숙성 과정 중에 적색 계열이 색소가 일부 나타나기 시작한 것으로 보이나, 함량이 미미하여 전체적인 색상에는 영향을 미치지 못하고 노란색으로 발현된 것으로 보인다.

선행 연구에 따르면, 파프리카는 동일한 품종이더라도 숙성도에 따라 유효 성분의 변화가 크게 나타난다(Kim *et al* 2011). 적색과는 카로티노이드 중에서 capsanthin이 가장 많이 함유되어 있어 붉은색으로 나타나는 반면, 녹색과는 적색과와 달리 카로티노이드 중에서 lutein이 풍부하며, 클로로필 A와 B가 과량 함유되어 있어 녹색으로 발현된다. 이와 같이 파프리카에서 기인하는 카로티노이드 조성 및 함량의 차이는 색상에 따라 인체에 미치는 효과에도 차이가 있을 것으로 사료된다.

파프리카에는 카로티노이드 외에도 토코페롤 및 아스코르브산 함량이 높을 것으로 기대되고 있어 색상별로 비교한 결

과, α -토코페롤 함량은 OP가 21.46 ± 1.54 mg/100g dw, YP가 15.31 ± 0.75 mg/100g dw, GP가 7.81 ± 1.86 mg/100g dw로 OP의 α -토코페롤 함량이 유의하게 높았고, γ -토코페롤은 GP에서 35.56 ± 3.16 mg/100g dw로 가장 그 함량이 높았으며, OP에서는 검출되지 않았다. 반면, 아스코르브산 함량은 GP(832.74 ± 18.59 mg/100g dw)와 비교해서 OP($1,594.20 \pm 21.96$ mg/100g dw)와 YP($1,482.10 \pm 68.99$ mg/100g dw)에서 높게 검출되었다. 최근 γ -토코페롤이 α -토코페롤과 비교하여 심혈관질환의 위험을 낮추고, 대장암이나 전립선암 등에 대한 예방효과가 높다는 연구 결과(Campbell *et al* 2003, Kontush *et al* 1999)가 다수 보고되고 있어, 색상별 파프리카의 섭취가 건강 증진에 기여하는 효과가 매우 높을 것으로 사료된다.

2. WB-F344 간상피 세포에 대한 세포 독성

WB-F344 세포에 대해 색상별 파프리카의 독성이 없는 농도를 설정하기 위하여 MTT법을 이용하여 세포 생육 억제 효과를 측정하였다(Fig 1). WB-F344 세포에 GP, YP, OP 추출액을 농도별로 처리하여 정상대조군과 비교하여, 세포 생육이 80% 이하가 되는 농도를 세포 독성이 나타난 것으로 볼 때(Hwang *et al* 2005), GP의 경우 500 μ g/mL, YP의 경우 200 μ g/mL, OP의 경우 25 μ g/mL 농도 이상에서 normal 군과 통계적으로 유의한 차이를 보였으며, GP는 100 μ g/mL, YP는 100 μ g/mL, OP는 10 μ g/mL 이하의 농도에서 파프리카 추출물에 의한 세포 독성이 없는 것으로 나타났다.

Table 2. Qualitative and quantitative analysis of carotenoids, tocopherol, L-ascorbic acid in different colored paprika¹⁾²⁾
(unit : mg/100 g d.w.)

	GP ³⁾	YP	OP	
Carotenoids	Capsorubin	ND ⁴⁾	0.17 \pm 0.05	ND
	Violaxanthin	0.07 \pm 0.02 ^b	0.30 \pm 0.14 ^a	ND
	Capsanthin	ND	2.37 \pm 0.10	ND
	Lutein	5.25 \pm 1.78 ^b	5.71 \pm 0.93 ^b	58.14 \pm 16.10 ^a
	Zeaxanthin	ND	0.02 \pm 0.01 ^b	0.08 \pm 0.02 ^a
	β -Cryptoxanthin	0.70 \pm 0.47 ^a	0.16 \pm 0.09 ^b	0.45 \pm 0.06 ^{ab}
	β -Carotene	4.28 \pm 0.25 ^b	4.51 \pm 0.24 ^b	6.88 \pm 0.29 ^a
Total	10.30 \pm 1.43 ^b	11.98 \pm 0.69 ^b	65.54 \pm 15.87 ^a	
Tocopherol	α -Tocopherol	7.81 \pm 1.86 ^c	15.31 \pm 0.75 ^b	21.46 \pm 1.54 ^a
	γ -Tocopherol	35.56 \pm 3.16 ^a	0.48 \pm 0.12 ^b	ND
	Total	43.37 \pm 4.08 ^a	15.79 \pm 0.75 ^c	21.46 \pm 1.54 ^b
L-Ascorbic acid	832.74 \pm 18.59 ^c	1,482.10 \pm 68.99 ^b	1,594.20 \pm 21.96 ^a	

¹⁾ Each value was expressed as the mean \pm S.D of triplicate assays.

²⁾ Different letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$).

³⁾ GP: green paprika; YP: yellow paprika, OP: orange paprika

⁴⁾ ND: indicates not detected.

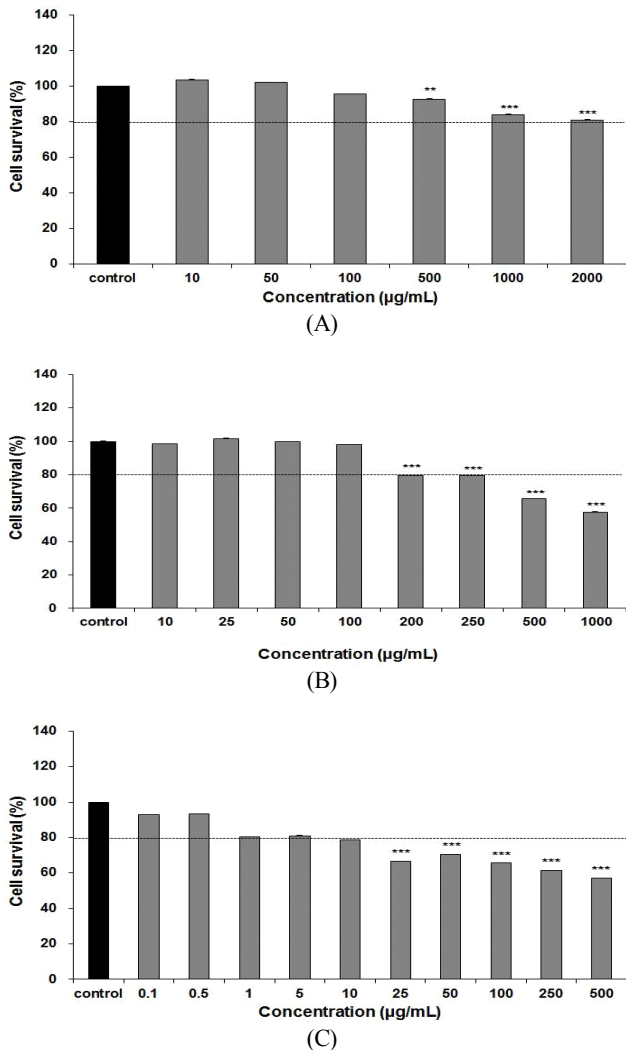


Fig 1. Cytotoxic effects of (A) GP, (B) YP and (C) OP on WB-F344 cells($p < 0.001$).

3. H₂O₂로 유도된 ROS 생성에 대한 파프리카 추출물의 억제 효과

H₂O₂는 세포 내 ROS 생성을 촉진하는 대표적인 암촉진인자로서 암 발생 초기 과정(promotion phase)에 관여하는 것으로 알려져 있다(Upham *et al* 1997). WB-F344 세포에 대한 H₂O₂의 ROS 생성을 알아보기 위해 500 µM H₂O₂를 첨가하여 ROS 생성능을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 500 µM H₂O₂를 처리한 control 군은 normal 군과 비교하여(기준값=100%) 131.89±15.95%의 ROS 생성이 증가하는 것으로 나타났다. 색상별 파프리카 추출물의 ROS 생성 억제 예방효과를 평가하기 위해 GP, YP, OP가 WB-F344 세포에 독성이 없는 농도를 고려하여 GP와 YP는 5-100 µg/mL 범위에서, OP는 0.1-10 µg/mL 범위에서 실험을 수행하였다. H₂O₂로 생성된 ROS 생성 억제 정도를 측정한 결과, GP의 경우 25 µg/mL의 농도에

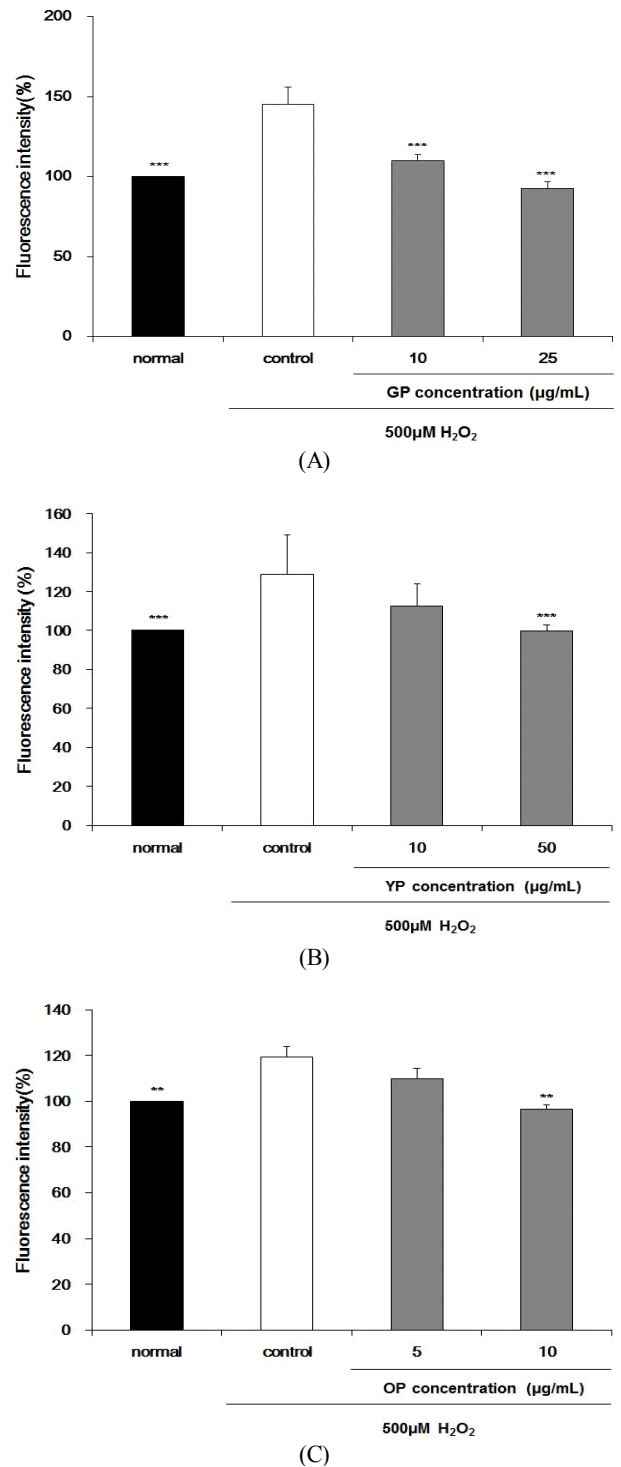


Fig. 2. Inhibitory effect of (A) GP, (B) YP and (C) OP on H₂O₂ induced cellular ROS formation in WB-F344 cells. Values are means number of communicating cells was significantly higher than that in the H₂O₂ only treatment($p < 0.001$).

서 92.48±4.31%, YP의 경우 50 µg/mL의 농도에서 99.58±3.18%, OP의 경우, 10 µg/mL의 농도에서 96.45±2.05%로 나타나,

control 군에서 500 μM H_2O_2 로 증가된 ROS 생성을 normal 군(100%)과 비슷한 수준으로 예방하는 효과를 나타낸 것으로 확인되었다. Kim *et al*(2011)은 국내산 파프리카의 색상별 성분 분석 및 항산화능 비교 연구에서 파프리카의 색상에 따라 카로티노이드의 성분 및 분포가 다르며, 그 함량 또한 차이가 있다고 밝혔다. 또한 파프리카의 색상별 ABTS와 DPPH radical 소거 활성 측정 결과, 파프리카 추출물의 농도가 증가함에 따라 radical 소거 활성이 증가하는 경향을 나타낸다고 하였다. 또한 색상별 파프리카에서 H_2O_2 가 형성되는 정도로 항산화능을 측정한 Matsufuji *et al*(2007)의 연구에서 주황색과 노란색 파프리카가 비슷한 수준이었으며, 녹색 파프리카는 이 두 색상의 파프리카보다 항산화능이 적다고 보고하였으며, 총 카로티노이드 및 토코페롤 함량과 산화 반응을 억제하는 정도와의 상관성을 평가한 결과, 상관계수(R^2)가 0.9543인 양의 상관관계를 나타내 카로티노이드와 토코페롤 함량은 파프리카의 항산화능과 양의 상관관계를 가진다고 보고하였다. 본 연구에서 H_2O_2 에 대한 ROS 생성 예방에 있어 OP가 다른 두 색상의 파프리카보다 더 저농도 수준에서도 그 효과가 나타난 이유를 OP의 카로티노이드, 토코페롤, 아스코르브산의 함량이 GP와 YP보다 유의하게 높기 때문으로 사료된다.

4. H_2O_2 로 유도된 GJIC 억제에 대한 파프리카 추출물의 보호 효과

생성된 ROS가 세포 내 신호전달과 gap junction의 신호전달에 영향을 미쳐 세포의 변형을 가져오는데, 이러한 과정은 가역적일 수 있어 차단이 가능하다(Cerutti PA 1985). 그러므로 세포 독성이 없으며, 과산화수소에 의한 ROS 생성 억제가 있는 GP, YP, OP의 농도 범위에서 GJIC의 변화를 평가하였다. GJIC의 활성 평가를 위해 SL/DT법을 이용하였는데, 이 방법은 빠르고 신뢰도가 높은 방법으로 물리적으로 세포에 자극을 가해 손상된 세포 사이로 일시적인 틈을 만들어 세포의 생육이나 군집 형성에는 영향을 끼치지 않고 발색 물질인 Lucifer yellow가 gap junction을 통해 이웃 세포로 전이된 염색 정도를 평가하는 방법이다(El-Fouly *et al* 1987). WB-F344 세포에 GP, YP, OP를 각각 농도별로 처리한 후 500 μM H_2O_2 에 의한 GJIC 억제 예방효과를 알아본 결과는 Fig. 3과 같으며, GJIC이 원활한 세포수를 직접 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. ROS 활성을 나타낸 500 μM H_2O_2 는 GJIC 측정 결과, normal 군이 100 %일 때 100 μM H_2O_2 를 처리한 control 군에서 평균 49.13 \pm 7.20% 감소하는 것으로 나타났다($p<0.01$). 색상별 파프리카 추출물의 H_2O_2 에 대한 GJIC 예방

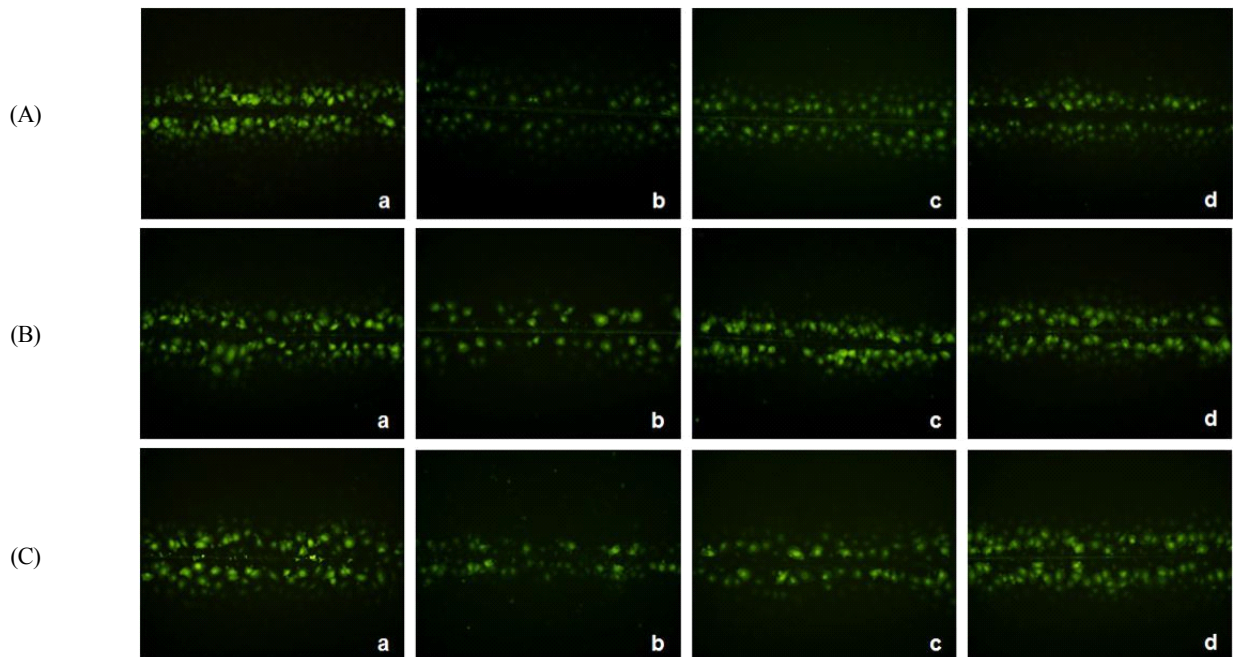


Fig. 3. Effect of (A) GP, (B) YP and (C) OP on the H_2O_2 -induced inhibition of gap-junction intercellular communication (GJIC) in WB-F344 cells. GJIC was assessed using the scrape loading-dye transfer method under and inverted fluorescence microscope (100 \times). [A] Fluorescent images of scrape-loaded cells treated GP. Cells were treated with (a) control cell, (b) H_2O_2 500 μM , (c) H_2O_2 500 μM plus GP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (d) H_2O_2 500 μM plus GP 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. [B] Fluorescent images of scrape-loaded cells treated YP. Cells were treated with (a) control cell, (b) H_2O_2 500 μM , (c) H_2O_2 500 μM plus YP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (d) H_2O_2 500 μM plus YP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (C) Fluorescent images of scrape-loaded cells treated OP. Cells were treated with (a) control cell, (b) H_2O_2 500 μM , (c) H_2O_2 500 μM plus OP 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (d) H_2O_2 500 μM plus OP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

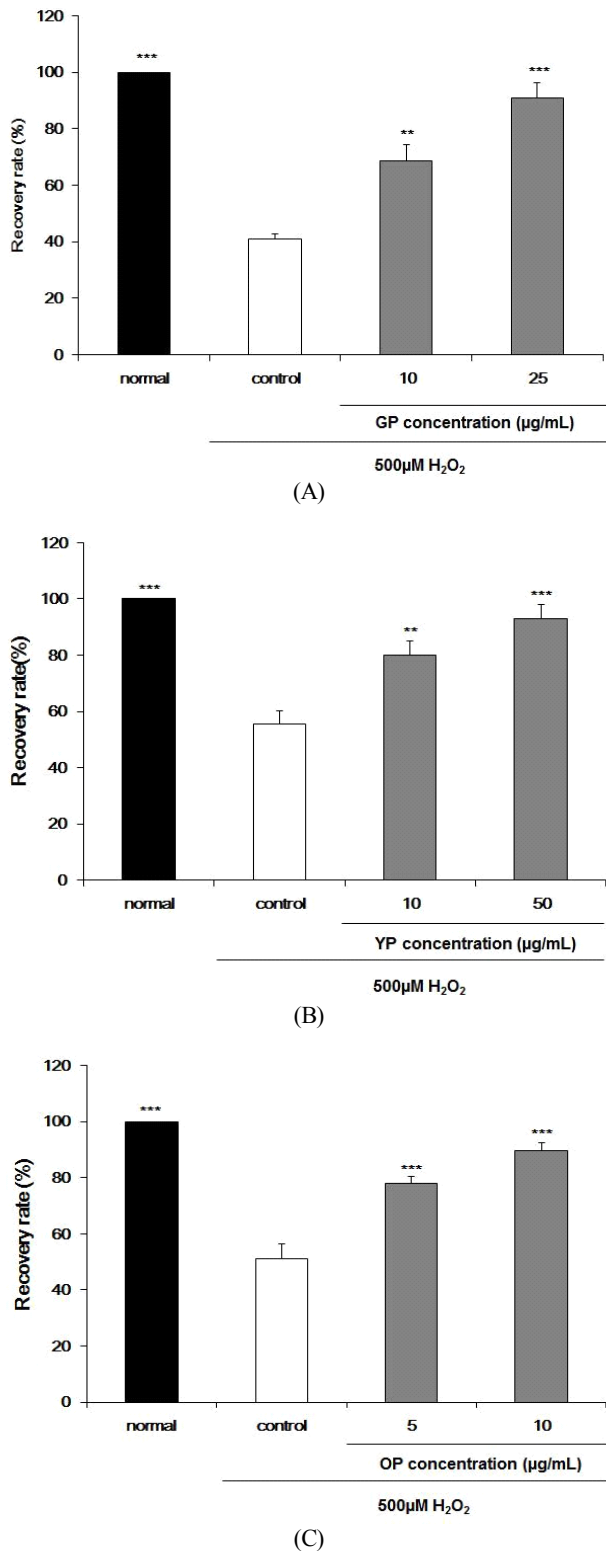


Fig. 4. Data quantified from normalizing communicated cell number from a different plate treated with (A) GP, (B) YP and (C) OP. Mean number of communicating cells was significantly higher than that of only H_2O_2 treated cells ($p < 0.001$).

효과 실험 결과, GP의 경우, 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 $68.77 \pm 5.61\%$ 와 $91.04 \pm 5.36\%$ 만큼 회복되었으며, YP의 경우 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 $79.93 \pm 5.14\%$ 와 $93.04 \pm 4.89\%$ 만큼 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 OP에서 5 $\mu\text{g/mL}$ 와 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 $78.09 \pm 2.17\%$ 와 $90.39 \pm 3.07\%$ 만큼 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 GP와 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 YP와 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 OP에서는 모두 GJIC 수준이 normal 군 수준으로 예방된 것을 확인할 수 있었다. Gap junction은 이온, 당, 아미노산, 핵산, 비타민 등의 대사물질을 인접한 세포에 직접적으로 이동시키는 세포간 물질 이동의 통로로 gap junction을 통한 세포 간 물질 이동은 세포 사이 항상성 조절 및 유지하는 역할 뿐 아니라, 세포의 성장 및 분화를 조절하는 인자로 알려져 있다(Kumar & Gilula 1996). 따라서 과산화수소를 처리하여 억제된 GJIC이 파프리카 추출물의 처리에 의해 회복된다는 것은 세포 간에 차단되었던 소통이 회복됨을 의미한다. 흥미로운 점은 억제된 GJIC의 회복 정도가 파프리카 색상에 따라 차이가 나타난 것으로 이는 파프리카의 색상에 따라 함유되어 있는 phytochemicals의 종류와 함량에 차이가 있기 때문으로 사료된다. Surh(2003)은 과채류에 있는 여러 영양성분들이 암발생 위험을 감소시킨다고 보고되고 있으며, 이들은 대체로 암예방능을 가지고 있는 비영양성분인 phytochemicals에서 기인하는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 파프리카가 색상에 따라 다른 종류의 카로티노이드가 함유되어 있으며, 토코페롤 함량에 큰 차이가 있음을 증명하였고, 이러한 차이가 ROS 생성억제능과 과산화수소로 손상된 GJIC 회복 정도에도 영향을 미친 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 파프리카의 색상별 phytochemicals 함량을 분석하고, WB-F344 간상피 세포에서 H_2O_2 에 의해 억제된 GJIC 대한 색상별 파프리카 추출물의 보호 효과를 측정하고자 하였다.

카로티노이드 조성은 GP에서 lutein, β -carotene, cryptoxanthin, violaxanthin, YP는 lutein, β -carotene, capsanthin, violaxanthin, β -carotene, capsorubin, OP에는 lutein, β -carotene, β -cryptoxanthin, zeaxanthin 등이 함유된 것으로 나타났으며, 총 함량은 OP 65.54 ± 15.87 mg/100g dw, YP 11.98 ± 0.69 mg/100g dw, GP 10.30 ± 1.43 mg/100g dw로 OP에 카로티노이드 함량이 매우 높게 나타났다. α -토코페롤 함량은 OP가 가장 높았고, γ -토코페롤 함량은 GP에서 가장 높았으며 OP에서는 검출되지 않았다. 총 토코페롤 함량은 GP가 가장 높았다. 반면, 아스코르브산 함량은 OP, YP에서 GP보다 많이 함유되어 있었다. WB-F344 세포에 세포 독성을 나타내지 않는 농도인

GP 100 µg/mL, YP 100 µg/mL, OP 10 µg/mL로 처리한 결과, H₂O₂에 대한 ROS 형성 및 GJIC 억제에 대한 예방효과는 GP의 경우, 25 µg/mL의 농도에서, YP의 경우, 50 µg/mL의 농도에서, OP의 경우 10 µg/mL의 농도에서 90% 이상 생성을 예방하는 효과를 나타냈다. 이는 WB-F344 세포에 GP, YP, OP의 처리가 세포독성을 나타내기 전 농도에서 항산화능 및 세포 간 신호 전달 체계를 예방하였음을 의미하며, 파프리카 색소상별 회복 효과의 차이는 함유되어 있는 카로티노이드의 종류 및 함량, 토코페롤, 아스코르브산 등 phytochemicals의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 한국방송통신대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

- Aizawa K, Inakuma T (2009) Dietary capsanthin, the main carotenoid in paprika(*Capsicum annuum*), alters plasma high-density lipoprotein-cholesterol levels and hepatic gene expression in rats. *Brit J Nutr* 102: 1760-1766.
- Aizawa K, Matsumoto T, Inakuma T, Ishijima T, Nakai Y, Abe K, Amano F (2009) Administration of tomato and paprika beverages modifies hepatic glucose and lipid metabolism in mice: A DNA microarray analysis. *J Agr Food Chem* 57: 10964-10971.
- Camera B, Monéger R (1978) Free and esterified carotenoids in green and red fruits of *Capsicum annuum*. *Phytochem* 17: 91-93.
- Campbell SE, Stone WI, Whaley SG, Qui M, Krishnan K (2003) Gamma(γ) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor(PPAR) gamma(γ) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. *BMC Cancer* 3: 1-13.
- Cerutti PA (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381.
- Cho JH, Cho SD, Hu H, Kim SH, Lee SK, Lee YS, Kang KS (2002) The roles of ERK1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanisms of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide. *Carcinogenesis* 23: 1163-1169.
- Choi SJ, Kim SW, Lee JB, Lim HJ, Kim YJ, Tian C, So HS, Park R, Choung YH (2013) *Ginkgo biloba* extracts protect auditory hair cells from cisplatin-induced ototoxicity by inhibiting perturbation of gap junctional intercellular communication. *Neuroscience* 6: 49-61.
- Craft NE, Wise SA (1994) Individual carotenoid content of SRM 1548 total diet and influence of storage carotenoids. *J Agric Food Chem* 41: 208-213.
- Dwyer JH, Navab M, Dwyer KM, Hassan K, Sun P, Shircore A, Hama-Levy S, Hough G, Wang X, Drake T, Merz CN, Fogelman AM (2001) Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: The Los Angeles atherosclerosis study. *Circulation* 103: 2922-2927.
- El-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC (1987) Scrape-loading and dye transfer: A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp Cell Res* 168: 422-430.
- Hwang JW, Park JS, Jo EH, Kim SJ, Yoon BS, Kim SH, Lee YS, Kang KS (2005) Chinese cabbage extracts and sulforaphane can protect H₂O₂-induced inhibition of gap junctional intercellular communication through the inactivation of ERK 1/2 and p38 MAP kinases. *J Agric Food Chem* 53: 8205-8210.
- Jeong CH, Ko WH, Cho JR, Ahn CG, Shim KH (2006) Chemical components of Korean paprika according to cultivars. *Korean J Food Preserv* 13: 43-9.
- Jeong EM, Kim WT, Kim SR, Yun SH (2008) The actual condition and subjects of paprika in Korea. Munwonsa, Korea: *Korea Rural Economic Insti.* pp 2008-2022.
- Kang KS, Kang BC, Lee BJ, Che JH, Li GX, Trosko JE, Lee YS (2000) Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb(2) on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H₂O₂. *Cancer Lett* 152: 97-106.
- Kang KS, Yun JW, Yoon B, Lim YK, Lee YS (2000). Preventive effect of germanium dioxide on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA. *Cancer Lett* 152: 97-106.
- KFDA (2003) Test method in general. *J. Food Code Separate Volume.*
- Kim JH, Lee BK, Lee KW, Lee HJ (2009) Resveratrol counteracts gallic acid-induced down-regulation of gap-junction intercellular communication. *J Nutr Biochem* 20: 149-154.
- Kim JS, Ahn J, Ha TY, Rhee HC, Kim S (2011) Comparison of phytochemical and antioxidant activities in different color stages and varieties of paprika harvested in Korea. *Korean J Food Sci Technol* 43: 564-569.
- Kim JS, Ahn J, Lee SJ, Moon B, Ha TY, Kim S (2011) Phy-

- tochemicals and antioxidant activity of fruits and leaves of paprika(*Capsicum Annuum* L., Var. Special) cultivated in Korea. *J Food Sci* 76: C193-198.
- Kim JS, Ha TY, Ahn J, Kim HK, Kim S (2009) Pterostilbene from *Vitis coignetiae* protect H₂O₂-induced inhibition of gap junctional intercellular communication in rat liver cell line. *Food Chem Toxicol* 47: 202-209.
- Kontush A, Spranger T, Reich A, Baum K, Beisiegel U (1999) Lipophilic antioxidants in blood plasma as markers of atherosclerosis: the role of α -carotene and γ -tocopherol. *Atherosclerosis* 144: 117-122.
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388.
- Lee DE, Shin BJ, Hur HJ, Kim JH, Kim J, Kang NJ, Kim DO, Lee CY, Lee KW, Lee HJ (2010) Quercetin, the active phenolic component in kiwifruit, prevents hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junction intercellular communication. *Br J Nutr* 104: 164-170.
- Loewenstein WR (1981) Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61: 829-913.
- Maoka T, Enjo F, Tokuda H, Nishino H (2004) Biological function and cancer prevention by paprika carotenoids. *Foods Food Ingrid J Jpn* 209: 203-210.
- Matsufuji H, Ishikawa K, Nunomura O, Chino M, Takeda M (2007) Anti-oxidant content of different coloured sweet peppers, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annuum* L.). *Int J Food Sci Tech* 42: 1482-1488.
- Matsufuji H, Nakamura H, Chino M, Takeda M (1998) Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J Agric Food Chem* 46: 3468-3472.
- Matus Z, Deli J, Szabolcs J (1991) Carotenoid composition of yellow pepper during ripening: isolation of β -cryptoxanthin 5,6-epoxide. *J Agric Food Chem* 39: 1907-1914.
- Mínguez-Mosquera, MI, Hornero-Méndez D (1994) Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola. *J Agric Food Chem* 42: 640-644.
- Saez JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MV (1989) Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate and to calcium ions. *P Natl Acad Sci. USA* 86: 2708-2712.
- Sedden JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, Farber MD, Gragoudas ES, Haller J, Miller DT, Yannuzzi LA, Willet W (1994) Dietary carotenoids, vitamin A, C and E, and advanced age-related macular degeneration. *J Am Med Assoc* 272: 1413-1420.
- Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature* 3: 768-780.
- Upham BL, Kang KS, Cho HY, Trosko JE (1997) Hydrogen peroxide inhibits gap junctional intercellular communication in glutathione sufficient but not glutathione deficient cells. *Carcinogenesis* 18: 37-42.
- Weller P, Breithaupt, DE (2003) Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 51: 7044-7049.

접 수: 2014년 5월 29일
 최종수정: 2014년 6월 2일
 채택: 2014년 6월 12일