대한외과학회지 : 제62권 제2호
Vol. 62, No. 2, February, 2002

□ 원 저 □

인간 대장암 세포주에서 Capsaicin에 의한 세포고사에 관한 연구

울산대학교 의과대학 울산대학교병원 외과학교실, [1]울산대학교 생명과학부, [2]건국대학교 의과대학 외과학교실

김규열 · 양경민[1] · 표종옥[1] · 성무경[2] · 박웅채[2] · 최대화 · 남창우 · 나양원 · 고병균 · 박건춘 · 임영철 김병삼[1] · 조홍래

Study of Capsaicin-induced Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines

Gyu Yeol Kim, M.D., **Kyung Min Yang[1], Jong Ok Pyo[1], Mu Kyung Sung,** M.D.[2], **Ung Chae Park,** M.D.[2], **Dae Hwa Choi,** M.D., **Chang Woo Nam,** M.D., **Yang Won Nah,** M.D., **Byung Kyun Ko,** M.D., **Kun Choon Park,** M.D., **Young Cheol Im,** M.D., **Byung Sam Kim[1],** and **Hong Rae Cho,** M.D.

Purpose: Numerous investigations have been conducted in order to determine the potential carcinogenic or chemopreventive activity of capsaicin. The aim of this study is to characterize the effects of capsaicin on colon cancer cells, and provide valuable information concerning the application of capsaicin in chemoprevention as well as for therapeutic purposes.
Methods: CoLo320DM and LoVo cells (human colon cancer cell line) were treated with capsaicin. In order to access cell viability and altered morphology, an MTT assay was performed and the cells were microscopically examined. Decreasing DNA staining was accessed by FACS. The cells were stained with FITC labeled annexin V and analyzed by FACS to detect cellular membrane alteration during apoptosis. The cells were stained with DiOC6(3) and Hydroethidine and analyzed by FACS in order to access ROS and $\Delta\Psi_m$.
Results: Capsaicin decreased cell viability in a dose-dependent manner. Capsaicin produced a cell morphology corresponding to the apoptotic features including cell shrinkage and chromatic condensation. Capsaicin treated cells induced a loss of nuclear DNA leading to hypoploidy in a dose-dependent manner. Cells were excluded by double staining with PI and FITC labeled annexin v and detected by FACS. We show that treatment of CoLo320DM, L0Vo cells with increasing concentrations of capsaicin parallel an increase in the percentage of red fluorescent cells (HE→Eth) that reflect ROS hypergeneration and a decrease in the percentage of green fluorescent cells that reflect $\Delta\Psi_m$ disruption.
Conclusion: These results clearly demonstrate that capsaicin-induced colon cancer cell death is apoptotic. **(J Korean Surg Soc 2002;62:103-111)**

Key Words: Capsaicin, Apoptosis, Colon cancer
중심 단어: Capsaicin, 세포고사, 대장암

Department of Surgery, College of Medicine, Ulsan University, Ulsan University Hospital, [1]Department of Life Science, Ulsan University, Ulsan, [2]Department of Surgery, College of Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea

서 론

성인 암의 대부분이 폐, 대장, 자궁 등의 상피 세포 암이라는 것은 이러한 조직들이 외부환경에 자주 노출됨으로써 악성화되기 쉬운 것을 반영하는 것이다. 실제로, 전체 암의 약 80~90%가 화학물질이나 방사선, 바이러스 등의 외부환경요인에 의한 것으로 알려져 있다. 최근에 암에 대한 역학조사와 실험적 연구를 통해 인간이 섭취하는 식이 중의 특정 성분이 암의 원인이나 예방에 중요한 역할을 한다는 사실을 밝혀내고 있으며, 식이요인이 전체 암 사망률에 기여하는 정도가 거의 35%에 이른다고 한다. 이러한 환경적 발암물질의 제거나 혹은 최소한 이것들에 대한 노출을 피함으로써 대부분의 암에서 암을 예방할 기회를 가지게 되며, 이것이 일차적 예방의 기본이 된다. 최근에, 발암기전의 세포단위 혹은 분자 차원에서의 이해가 진보하면서 암의 예방, 즉 화학적 예방에 대한 새로운 기대가 생기게 되었다. 화학적 예방의 정의는 자연산이나 합성의 특정 화학물질을 이용하여 발암기전의 과정을 억제, 둔화시키거나 혹은 역전시키는 것이다. 최초로 Michael Sporn(*1*)이 시도하였으며, 실험적 발암기전을 둔화시키기 위해 레티노이드를 사용하였다.

Capsaicin (trans-8-mehtyl-N-vanillyl-6-nonenamide)는 고추

책임저자 : 조홍래, 울산시 동구 전하동 290-3번지
㉾ 682-060, 울산대학교병원 일반외과
Tel: 052-250-7100, Fax: 052-250-8071
E-mail: hrcho@uuh.ulsan.kr
접수일 : 2001년 11월 2일, 게재승인일 : 2002년 1월 8일
위 논문은 2000년도 울산대학교 대학 학술연구비에 의해 지원되었음.

의 매운맛의 주성분이고 향신료나 약제로 오래 전부터 사용되었다. 이것은 전 세계적으로 널리 사용되고 있으며 특히 동남 아시아와 라틴아메리카에서의 소비가 많은 것으로 알려져 있다. 고추에 들어 있는 capsaicin의 농도는 0.1~1.0% 정도이고 한국에서의 성인 일일 소비량은 2.5~25 mg/60 kg 정도이다. Capsaicin에 대한 연구는 주로 신경 생리학적인 효과에 대해 집중되어 왔으며, capsaicin은 일차 감각신경과 작용하여 신경의 흥분, 탈감작, 그리고 신경독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 작용은 capsaicin에 대한 특이한 수용체의 활성화로 매개되며 통증을 경감시키는 치료 목적으로 이용해 왔다.(*2,3*) 최근에는 capsaicin의 발암성 또는 항암성에 대한 연구들이 보고되고 있는데, 상반된 결과들을 보이고 있다. Capsaicin 자체가 돌연변이를 유발할 수 있으며 종양형성을 조장한다는 보고가 있는 반면,(*4,5*) 다양한 다른 발암 인자들에 의한 돌연변이나 종양형성을 방지하는 효과가 있으며, 암 세포주 등에서 세포 성장을 억제한다는 보고도 있다.(*6,7*) 또, 형질전환세포에서 capsaicin에 의해 유도되는 세포고사(apoptosis)에 대한 보고들도 있다.(*8-10*)

Capsaicin은 한국인 식이에 널리 이용되고 있는 중요한 향신료이며, 최근에 증가 추세를 보이고 있는 대장암에서 capsaicin의 영향을 알아보는 것은 암의 예방과 나아가서는 암의 치료제로서의 가능성에 대한 연구일 수 있다. 따라서 저자는 대장암 세포주에 대한 capsaicin의 영향을 알아보기 위해 capsaicin으로 처리한 세포의 생활력을 관찰하였으며 capsaicin에 의한 대장암 세포주의 죽음이 세포고사에 의한 것인지 여부를 세포의 형태의 변화와 DNA 함량, annexin V 염색, 그리고 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)의 생성과 미토콘드리아 막전위의 변화 등을 관찰함으로써 알아보고자 했다.

방 법

1) 실험재료

인간의 대장암 세포주인 CoLo320DM과 LoVo 세포주는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 세포배양 배지(RPMI1640)와 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)는 GibcoBRL사(Grand Island NY, USA)로부터, 항생제(페니실린과 스트렙토마이신)와 DNA 염색 시약인 propidium iodide (PI)는 SIGMA사(St. Louis MO, USA)로부터 구입하였다. Dihydroethidine, $DiOC_6(3)$, MTT(13-[4,5-Dimehtylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), capsaicin도 SIGMA사로부터 구입하였다. 그리고, annexin V는 Pharmingen사(San Diego CA, USA)에서 나온 annexin V-FITC (fluorescein isothiocyanate) 세포고사 검출 키트를 사용하였다.

2) 세포의 배양

인간의 대장암 세포주인 CoLo320DM과 LoVo 세포를 37°C, 5% CO_2/95% air배양기에서 10% FBS, 1% 항생제(100 U/ml penicillin G-streptomycin sulfate)가 들어있는 RPMI1640 배지로 배양하였다.

3) MTT 염색을 통한 세포생활력 검사

세포를 Trypsin/EDTA로 현탁한 후 세포의 생활력을 관찰하기 위해 CoLo320DM과 LoVo 세포 현탁액 100 ul를 96 well plate (510^4 cell/well)에서 4시간 동안 배양하였으며, 0~0.5 mM 농도의 capsaicin을 처리하여 배지100 ul를 넣고, 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 20 ul (5 mg MTT/ml in PBS) MTT용액을 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. MTT가 들어 있는 배지를 버리고 100 ul acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가하여 3분 동안 녹인 후 현탁하여 490 nm filiter ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

4) 세포의 형태학적 변화

세포를 Trypsin/EDTA로 현탁한 후 100 mm^2 배양접시에 510^5 cells/ml의 세포를 4시간 동안 배양한 후, 80% 이상의 세포 생활력을 감소시킨 0.5 mM의 capsaicin을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포를 차가운 인산염완충식염수(phosphate buffer saline; PBS)로 두 번 씻어낸 다음, 세포 원심 분리하여 슬라이드 유리에 세포를 부착시킨 후 실온에서 70% 에탄올로 30분 동안 고정하였다. Hematoxylin과 Eosin으로 염색한 후 400배 광학 현미경으로 관찰하였다.

5) DNA 함량 분석

세포를 Trypsin/EDTA로 현탁한 후 100 mm^2 배양접시에 510^5 cells/ml의 세포를 4시간 동안 배양한 다음 0~0.5 mM의 capsaicin을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양을 마친 세포를 차가운 인산염완충식염수로 두 번 씻어낸 다음 70% 에탄올로 4°C에서 30분간 고정한 후 DNA삽입 색소인 PI로 염색하여 유세포분석기(FACS)로 분석하였다.

6) Annexin V 염색

세포는 Trypsin/EDTA로 현탁한 후 100 mm^2 배양접시에 510^5 cells/ml의 세포를 4시간 동안 배양한 다음 0, 0.3, 0.5 mM의 capsaicin을 처리하여 다시 4시간 동안 배양한 후 차가운 인산염완충식염수로 씻어내고, PI와 FITC-labeled annexin V로 37°C에서 15분간 이중 염색을 하여 유세포분석기로 분석하였다.

7) 미토콘드리아 막전위($\Delta\Psi m$) 변화와 ROS생성에 대한 유세포분석

미토콘드리아 막전위($\Delta\Psi_m$) 변화와 ROS의 생성을 관찰

하기 위해 세포(5×10^5 cells/ml)에 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mM의 capsaicin을 처리하여 3시간 동안 배양한 후 인산염완충식염수로 씻어낸다. $DiOC_6$(3) 20 nM과 Dihydroethidine (HE) 2 uM로 37°C에서 20분간 염색한 후 유세포분석기로 분석하였다.

8) 자료 분석

모든 실험은 3번 시행하였으며, 실험결과는 대조군의 %로 표시하였다. 모든 대조군은 capsaicin을 제외한 동일 배지로 배양하였다. 실험결과는 Student's t test로 각 변수를 비교하였다. p value가 0.05 이하인 경우에 통계학적으로 의미가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1) 대장암 세포주의 생활력에 대한 Capsaicin의 효과

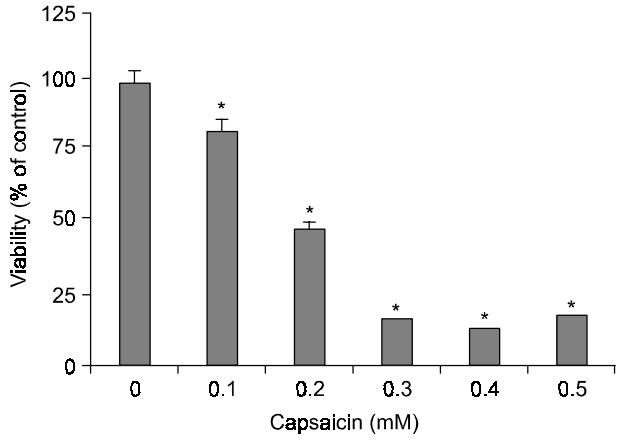
CoLo320DM과 LoVo에서 capsaicin의 농도가 0.2 mM일 때 대조군에 비해 약 50%의 생활력의 감소를 보였고, 0.3 mM 이상에서는 약 80% 이상의 세포생활력의 감소를 보였다. Capsaicin의 농도가 0.2 mM 이상에서 $p<0.05$로 통계적 유의성이 있었다. Capsaicin의 농도와 세포 생활력간의 상관분석을 한 결과, 처리한 capsaicin의 농도가 증가할수록 세포의 생활력은 감소하였다(Fig. 1, 2).

2) Capsaicin에 의한 세포의 형태학적 변화

Capsaicin에 의한 형태학적인 변화를 대조군과 비교하여 관찰한 결과 capsaicin으로 처리한 CoLo320DM과 LoVo cells에서 세포고사를 시사하는 세포의 수축으로 인한 크기의 감소와 염색질 농축이 보였다(Fig. 3).

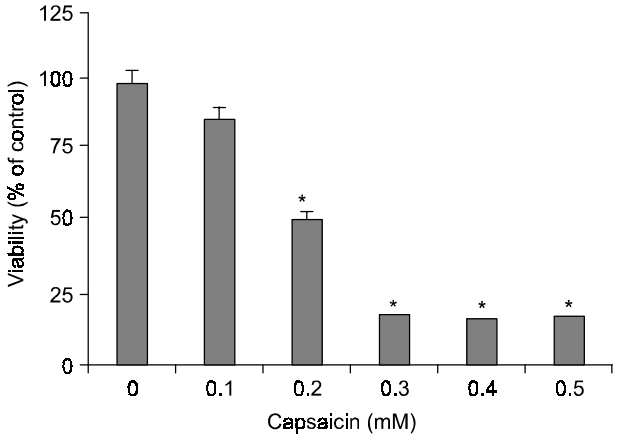
3) Capsaicin에 의한 대장암 세포주의 DNA함량의 감소

핵 DNA의 소실로 인한hypoploidy를 DNA삽입 색소인 PI로 염색하여 유세포분석기로 분석한 결과, sub-G1peak가 capsaicin의 농도가 증가할수록 커져서 capsaicin의 농도가



Capsaicin conc.	Cell viability (Mean±SD%)
Control	100.095±2.361
0.1 mM	83.095±2.903
0.2 mM	47.952±5.972
0.3 mM	16.238±1.377
0.4 mM	12.848±7.276
0.5 mM	17.238±2.007

Fig. 1. Effects of capsaicin on the viability of human colon cancer cell line. The viability of CoLo320DM cells were assessed by MTT assay. Cells were treated with various concentrations of capsaicin for 24 hrs ($P<0.05$ compared to control). Correlation analysis between cell viability of CoLo320DM and capsaicin concentration was done (Pearson correlation r=0.93, $P<0.01$).



Capsaicin conc.	Cell viability (Mean±SD%)
Control	100.000±8.786
0.1 mM	87.059±12.665
0.2 mM	51.716±6.922
0.3 mM	17.500±2.533
0.4 mM	16.176±2.875
0.5 mM	16.765±1.794

Fig. 2. Effects of capsaicin on the viability of human colon cancer cell line. The viability of LoVo cells were assessed by MTT assay. Cells were treated with various concentrations of capsaicin for 24 hrs ($P<0.05$ compared to control). Correlation analysis between cell viability of LoVo and capsaicin concentration was done (Pearson correlation r=0.936, $P<0.01$).

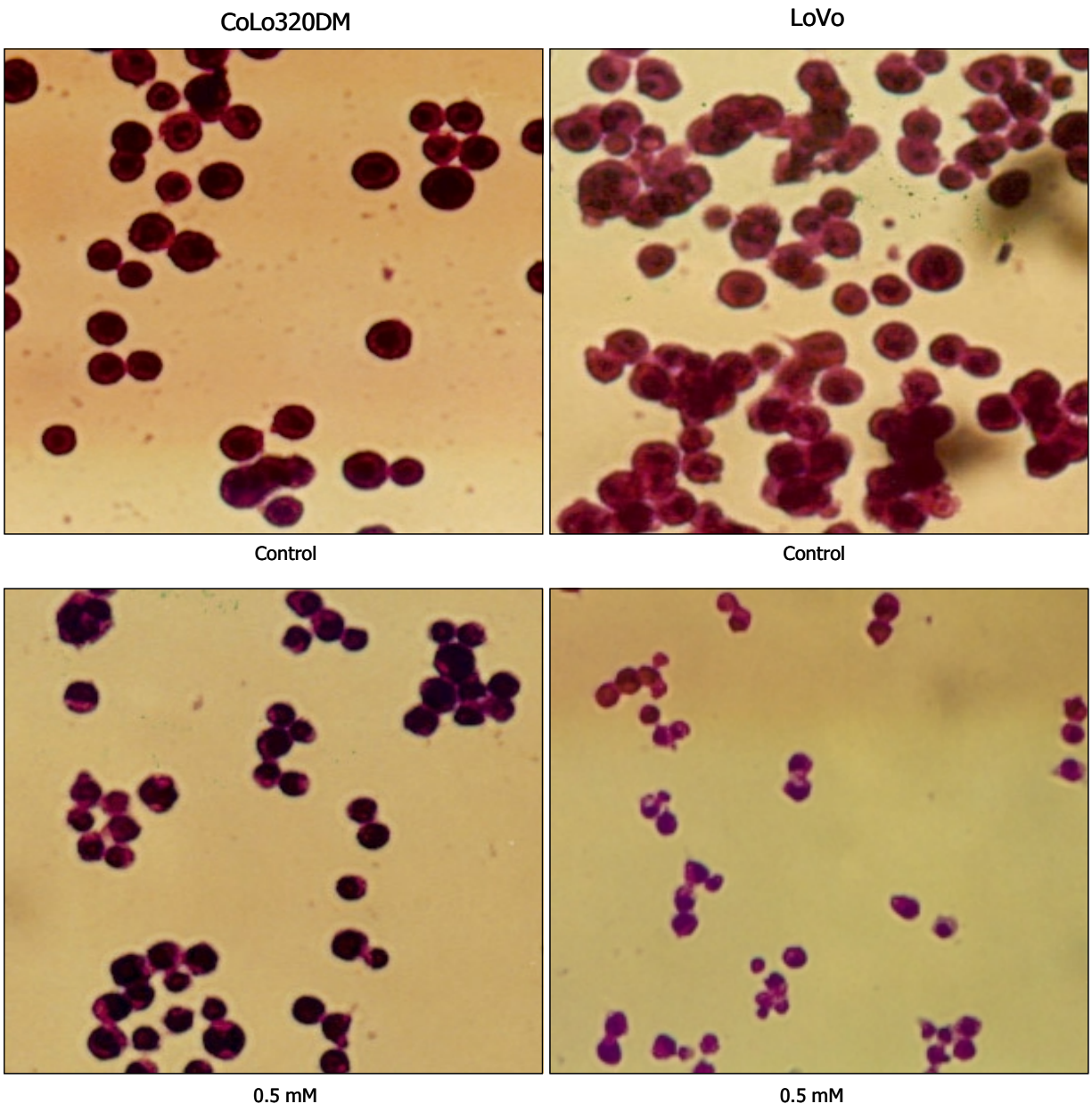


Fig. 3. Morphology of capsaicin treated colon cancer cell line. Cells were incubated with 0.5 mM capsaicin for 24 hrs, stained with hematoxylin and eosin. Untreated CoLo320DM and LoVo cells showed normal distribution of chromatin, but capsaicin treated cells showed condensed chromatin. The cell volume of capsaicin-treated CoLo320DM and LoVo were also decreased.

0.5 mM일 때 CoLo320DM세포에서 약 22%를 보였다(Fig. 4A). LoVo세포에서도 마찬가지로, sub-G1 peak가 농도 의존적으로 증가하였으며, 0.5 mM capsaicin에서 40%를 넘었다(Fig. 5A). 이러한 농도와 DNA함량 감소의 관계는 상관 분석을 통해서 더욱 확실히 알 수 있었다(Fig. 4B, 5B).

4) Annexin V 염색

CoLo320DM과 LoVo 세포가 4시간에서 조기 세포고사를 반영하는 구역의 백분율이 증가하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 LoVo세포에서 더 뚜렷이 나타났다.

5) Capsaicin에 의한 미토콘드리아 막전위($\Delta\Psi$m)의 감소와 ROS생성의 증가

그래서 ROS에 의해 산화되면 붉은색 형광을 띠는 Ethidine으로 변하는 HE(비형광)와 DiOC6(3)(녹색 형광)로 염색한 후 유세포 분석기로 분석하였다. CoLo320DM과 LoVo cell이 capsaicin의 농도가 증가할수록 HE가 Ethidine으로 전환되어 적색 형광을 띠는 세포의 양이 증가하며, DiOC6(3)

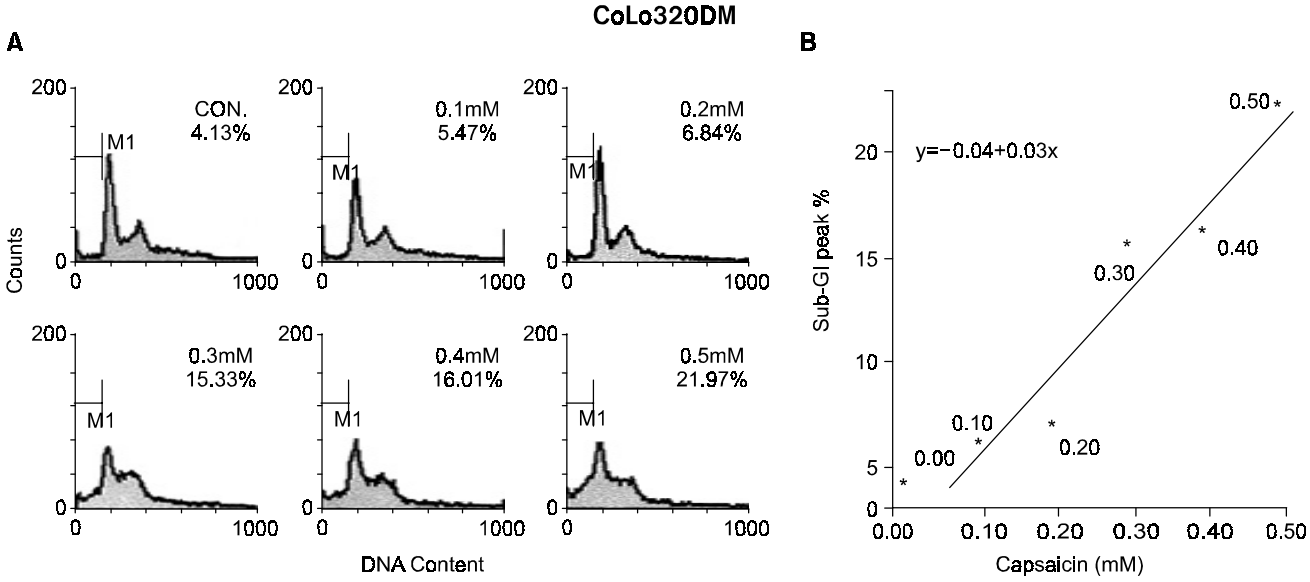


Fig. 4. Induction of apoptosis in CoLo320DM. Cells were cultured for 24 hrs with 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 0.5 mM capsaicin. Cells were washed in cold PBS and fixed in 70% ethanol for 30 min in 4°C. Then cells were stained with propidium iodide and immediately subjected to flowcytometer. Correlation analysis between capsaicin concentration and sub-G1 peak was done (r=0.96, P<0.01).

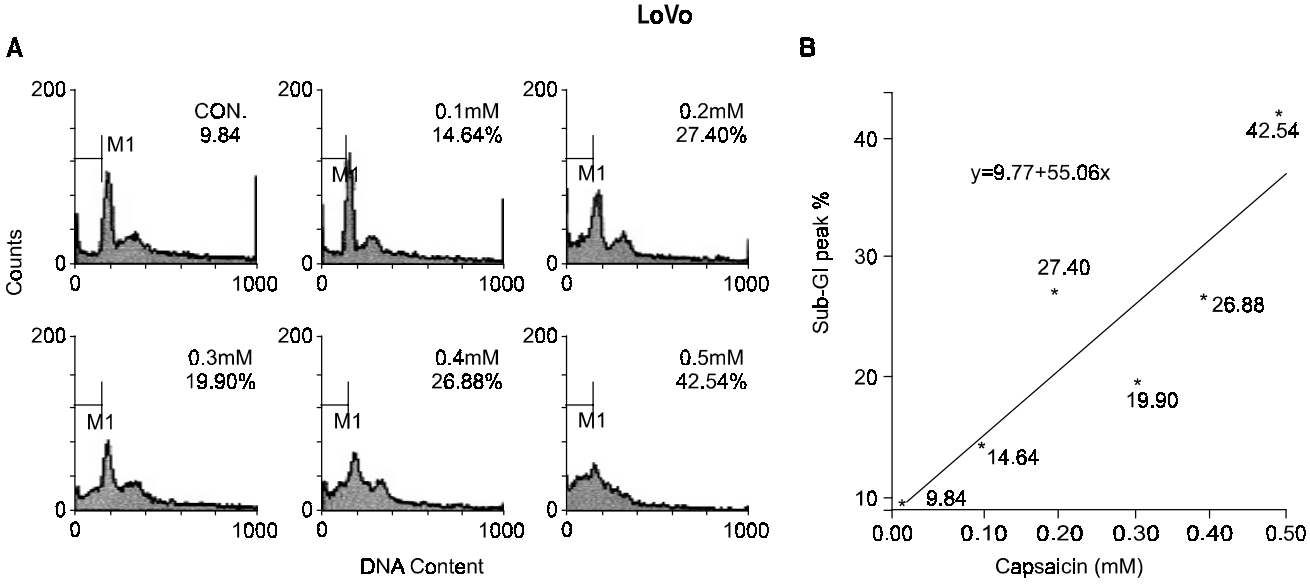


Fig. 5. Induction of apoptosis in LoVo. Cells were cultured for 24 hrs with 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mM capsaicin. Cells were washed in cold PBS and fixed in 70% ethanol for 30 min in 4°C. Then, cells were stained with propidium iodide and immediately subjected to flowcytometer. Correlation analysis between capsaicin concentration and sub-G1 peak was done (r=0.86, P<0.05).

의 염색에 의한 녹색 형광은 감소하였다(Fig. 7, 8).

고 찰

최근에 암에 대한 역학조사와 실험적 연구를 통해 식이요인이 암의 원인과 예방에 중요한 역할을 하며 암 사망률에 대한 기여도도 35%에 이르는 것으로 밝혀졌다. 이러한 발암원을 완전히 제거하는 것이 일차적 예방의 기본을 이루지만 환경적 발암원에 어느 정도의 노출은 불가피하므로 발암원을 중화시키거나 그들의 악영향을 방어하는 방법, 즉 화학적 예방이 현실적으로 중요하다고 할 수 있겠다. 화학적 예방의 일차적 목표는 이것에 합당한 효과적인 물질

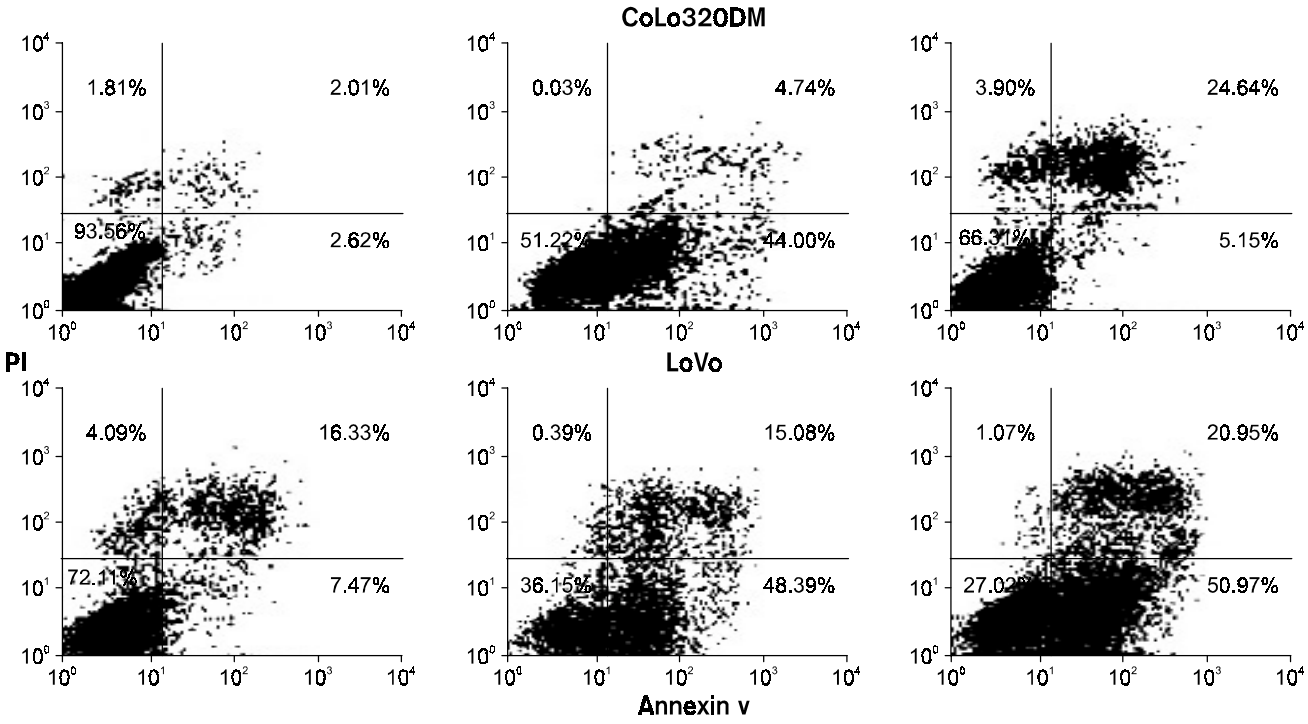


Fig. 6. Effects of capsaicin by annexin v staining in CoLo320DM and LoVo. Cells were cultured for 4 hrs with 0, 0.3, 0.5 mM capsaicin and washed in cold PBS. Cells were excluded by double staining with PI and FITC-labeled annexin v for 15min in 37°C and detected by flowcytometer.

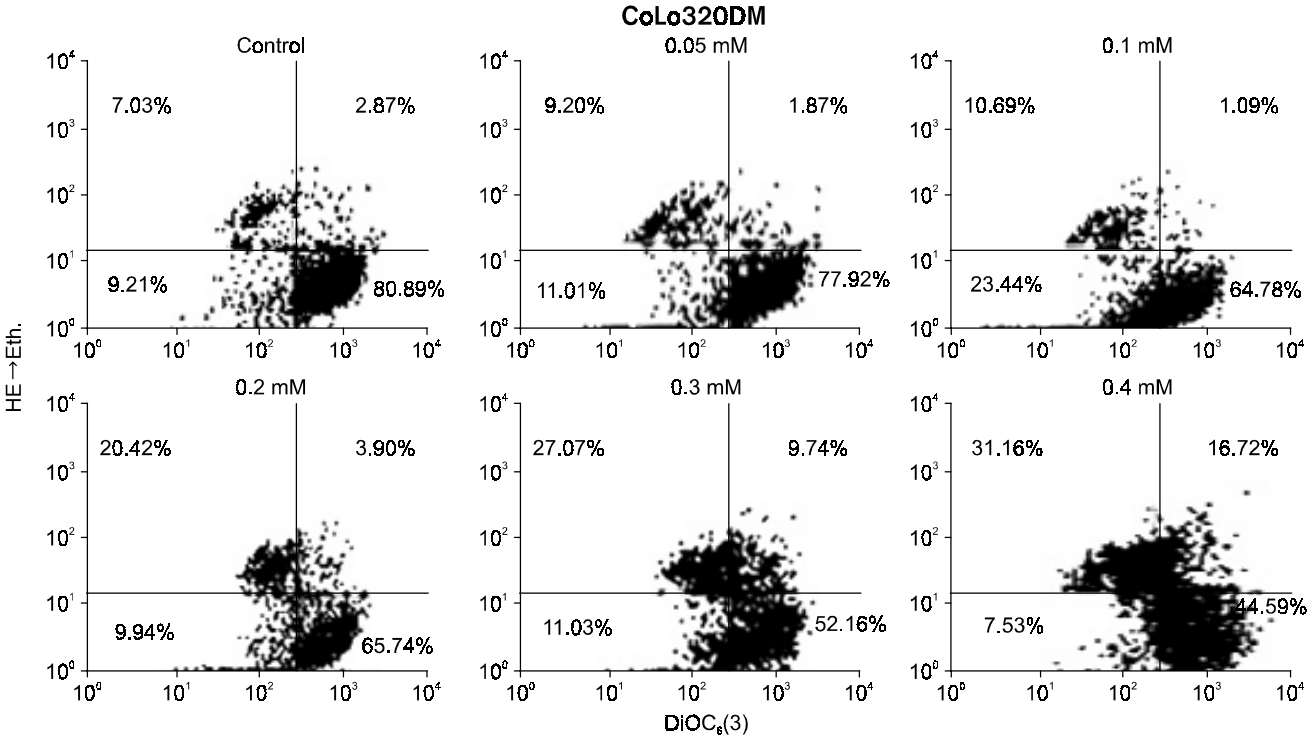


Fig. 7. Induction of ROS generation and mitochondrial membrane potential by capsaicin in CoLo320DM. Cells were cultured for 3 hrs with 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mM capsaicin. Cells were washed in cold PBS and were stained with HE and $DiOC_6(3)$ for 20 min in 37°C. Then the simultaneous ROS generation and m disruption detected by flowcytometer.

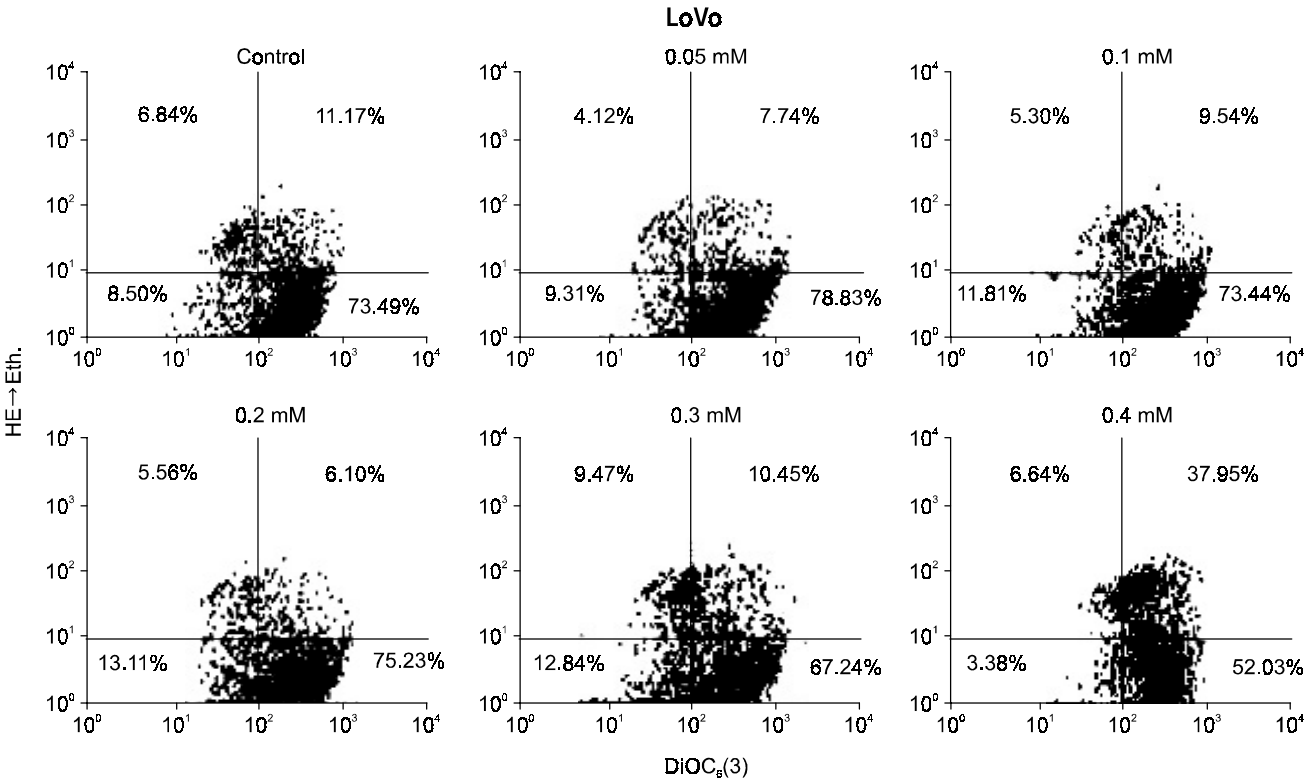


Fig. 8. Induction of ROS generation and mitochondrial membrane potential by capsaicin in LoVo. Cells were cultured for 3 hrs with 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mM capsaicin. Cells were washed in cold PBS and were stained with HE and $DiOC_6(3)$ for 20 min in 37°C. Then the simultaneous ROS generation and $\Delta\Psi$m disruption detected flowcytometer.

을 찾아내어 적절한 임상연구를 통하여, 결국에는 그 결과를 인간에게 응용하는 데 있다. 그리고, 많은 화학적 예방과 치료제들이 종양세포에서 세포고사를 유발함으로써 그 작용을 나타낸다고 알려져 있다.(*11*) 최근의 인간과 동물실험에 따르면, 종양의 발생은 복잡한 다단계의 과정이며 이것은 상피세포의 증식과 분화 그리고 세포고사를 조절하는 항상성의 기전이 지속적으로 파괴됨으로써 생긴다고 한다. 대장암 또한 세포고사의 지속적인 억제로 발생한다고 알려져 있다. 특히 대장에서 세포 증식과 세포고사 사이의 균형은 세포집단을 일정하게 유지하는 데 있어 결정적이며, 이러한 기전이 조절되지 않으면 항상성이 깨지게 되고 세포의 과증식이 일어나 클론의 확장을 초래한다.(*12-14*) 수술이나 방사선 치료, 항암 화학요법 등의 진보에도 불구하고 과거 수십 년간 대장암의 완치율이 크게 증가하지 못하는 반면, 몇몇의 항발암성의 잠재력을 가진 물질들이 대장암 예방을 위한 노력의 일환으로 연구되었다.(*14-16*)

세포고사는 다세포 개체의 적절한 발달과 기능에 필수적인 것이다. 불필요하고 손상되어 주위의 건강한 세포에 악영향을 끼칠 수 있는 세포들을 제거함으로써 조직의 구조적, 기능적 항상성을 유지할 수 있다. 세포고사에서 염색질의 분자학적 특징의 변화는 양이온 의존성의 내핵산 분해효소에 의한 DNA의 순차적인 파괴로 보여지는데, 처음에는 30~50 kb의 큰 단편으로 부서지며, 결국에는 180~200 bp의 뉴클레오좀 단편으로 된다. 핵에서 변화가 일어나기 전에 미토콘드리아의 막간 전위의 감소와 ROS생성이 증가하게 되고, 세포질에서는 단백질의 교차결합이 트랜스글루타미나제의 작용으로 일어나며 세포골격 세사의 집합이 줄지어 나란히 일어난다. 세포질 내 세망이 늘어나서 세포막과 합쳐지며 접합 부위에 천연두와 같은 분화구를 만든다. 세포막 인지질의 비대칭성과 미세융모, 그리고 세포간 결합의 소실로 세포막의 구조적 온전성이 손상된다. 세포들은 각각 서로 인접한 세포들과 분리되고 극적으로 줄어들며 돌기를 내어서 막으로 싸여진 "apoptotic bodies"로 분리된다. 조직 내의 인접 세포나 탐식구가 고사된 세포와 apoptotic body를 인지하여 재빨리 탐식한다.(*17*)

고추의 매운맛의 주성분인 capsaicin은 많은 약리 및 생리적 작용이 보고되었다. 포유류에서 capsaicin의 대사는 위장관을 통해 빠르게 전달되어 문맥을 통해 흡수되어 그 대사물이 소변을 통해 24시간 내에 배출된다. Capsaicin은 생체이물 대사 효소와 상호 작용을 하며, 특히 여러 가지 화학발암원과 염색체이상을 일으키는 물질을 활성화시키거나 해독하는 과정에 관여하는 미소체 사이토크롬 P450의존성

모노옥시겐나제와 상호 작용을 한다.(*17,19*)

고추에 있는 capsaicin의 염색체 변이를 일으키는 특성과 발암성에 대한 많은 연구들이 있었지만 그 결과는 상반되는 것이었다.(*18,20*) 서 등(*20*)은, 다량의 capsaicin을 먹었을 경우는 괴사나 궤양, 심지어는 발암작용과도 연관이 있다고 하였다. Capsaicin은 사이토크롬 P450의존성 복합기능 산화효소에 의해 활성화된 중간 산물로 대사되며 이러한 중간 산물이 목표 세포의 DNA와 비가역적인 형태로 작용하여 염색체 이상이나 악성 변화를 자극하게 된다. 반대로, capsaicin이 발암원의 대사 과정을 변화시킬 수 있는데 이것이 화학적 예방에 capsaicin을 이용하고자 하는 근거가 되는 것이다. 이러한 사실은 특정 화학 발암원의 대사와 그 물질의 DNA와의 결합, 그리고 발암원의 돌연 변이 유발성 및 종양 발생 효과에 억제 작용을 한다는 사실들로 뒷받침될 수 있다.(*20*)

Capsaicin이 다양한 세포주에서 세포고사를 유발하며 세포 성장을 억제한다는 사실들이 여러 연구에서 밝혀져 있다.(*8,9,21*) Capsaicin에 의한 세포고사의 분자학적 기초는 capsaicin을 포함하는 vanilloid와 원형질막 산화 환원계(plasma membrane redox system; PMOR)와 특수한 작용을 하는 것에 근거한다. 이러한 작용은 NADH 산화효소를 억제해서 생기는데, 이로 인해 과다한 ROS가 생성되고 결국 세포고사의 경로를 걷게 된다.(*8,9*) 그리고 capsaicin은 NF-B를 차단하여 NF-B 하류를 억제하는 것으로 알려져 있다.(*22*) 그러므로, 항암성과 항염증성을 가지는 capsaicin 유사 물질들이 인간의 암에 대항하는 약제로의 가능성이 있을 것으로 생각한다.

본 실험에서는 capsaicin으로 처리한 대장암 세포는 세포 생활력이 용량 의존적으로 감소하는 것을 보여주었다. 이러한 세포 생활력의 감소가 세포고사에 의한 것인지 여부를 여러 가지 실험을 통해 관찰하였다. Annecxin V염색과 ROS생성 및 미토콘드리아 막전위 변화를 통해 세포고사 시 일어나는 초기변화를 관찰하였고, DNA 함량을 유세포 분석기로 관찰하여 세포고사 시 나타나는 후기 변화를 관찰하였다. 본 실험의 결과는 LoVo세포는 capsaicin의 농도가 control, 0.3, 0.5 mM로 증가하면 초기 세포고사 세포로 생각되는 세포들이 증가하는 반면, CoLo320DM세포는 0.3 mM에서 증가하였다가 0.5 mM에서 오히려 감소하였으며, 괴사된 세포나 세포고사가 많이 진행된 세포의 수가 증가되었다. 이것은 시간 의존성에 대한 실험 결과와 상응하는 결과로 생각되며, 초기 세포고사를 보기 위해 4시간의 배양시간을 주었는데, CoLo320DM세포의 세포고사 진행시간이 LoVo의 시간보다 훨씬 빨라서 고농도의 capsaicin으로 처리할 경우 세포고사가 많이 진행되고, 나아가서 괴사된 세포들이 증가한 것으로 생각한다. 결과적으로, annexin V염색에 의한 결과는 초기 세포고사를 보여주는 것이라 하겠다. Capsaicin에 의한 ROS와 막전위의 변화가 세포고사에서 신호전달 물질로 작용한다는 증거들은 많이 있다. 즉, 미토콘드리아 막전위의 감소로 인해 ROS의 생성이 증가하여 세포고사를 유도할 수 있다. 본 실험의 결과도 미토콘드리아 막전위 변화로 인한 ROS생성의 증가와 capsaicin에 의해 유도되는 세포고사가 밀접한 연관이 있는 것을 보여주었다. 대부분의 항암 치료제가 암세포에서 세포고사를 유도하며, 이러한 세포고사가 ROS의 과다생성과 관련이 있음을 고려할 때, capsaicin이 미토콘드리아 막전위를 변화시키고 이로 인해 ROS생성이 증가되는 것은 의미 있는 것이라 하겠다. 세포고사를 확인하는 여러 가지 다른 검사 방법이 있지만 이 실험에서 보여준 결과들은 세포고사를 시사하는 기초적인 자료를 제시하기에는 충분하다고 할 수 있겠다.

결 론

본 실험의 결과에 따르면, capsaicin은 시간과 용량 의존적으로 세포의 생활력을 감소시키고, 세포의 수축과 DNA 분절을 야기하며, DNA 함량을 감소시킨다. 또한, capsaicin은 ROS의 생성을 증가시키고 $\Delta\Psi_m$를 파괴시킨다. Capsaicin에 의해 유도되는 세포고사의 실질적인 기전은 아직까지 확실하게 밝혀지지 않고, capsaicin에 의한 세포 내의 신호전달 물질들의 변화와 그들의 상관관계를 고찰하는 것이 과제로 남아 있기는 하지만, 이러한 결과는 capsaicin에 의해 유도되는 세포의 죽음이 세포고사에 의한 것임을 확실히 보여준다.

REFERENCES

1) Sporn MB, Roberts AB. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. J National Cancer Institute 1984;73:1381-7.
2) Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid(Capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacological Reviews 1999;51:159-211.
3) McCleane G. Topical application of doxepin hydrochloride, capsaicin and a combination of both produces analgesia in chronic human neuropathic pain: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. Br J Clin Pharmacol 2000;49:574-9.
4) Lawson T, Gannett P. The mutagenicity of capsaicin and dihydrocapsaicin in V79 cells. Cancer Letters 1989;49:109-13.
5) Toth B, Rogan E, Walker B. Tumorigenicity and mutagenicity studies with capsaicin of hot peppers. Anticancer Research 1984;4:117-9.
6) Surh YJ. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. Mutation Research 1999;428:305-27.
7) Morre DJ, Chueh PJ, Morre DM. Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1995;92:1831-5.
8) 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 and Differentiation 1996;7:1315-25.

9) 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 and Differentiation 1998;9:277-86.

10) Macho A, Calzado MA, Munoz-Blanco J, Gomez-Diaz C, Gajate C, Mollinedo F, Navas P, Munoz E. Selective induction of apoptosis by capsaicin in transformed cells: the role of reactive oxygen species and calcium. Cell Growth and Differentiation 1999;6:155-65.

11) Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. Blood 1993; 81:151-7.

12) Pasi AJ, Robert JM. Chemoprevention of colorectal cancer. The New England J of Medicine 2000;342:1960-8.

13) Robert SC, Yang-YF, Joanne RL. Effects of diet on colonic-programed cell death: molecular mechanism of action. Toxicology Letters 2000;112-113:411-4.

14) Hemant KR, Marc B, Brendan PF Jr, Ramesh KW, Sharon MN, David E, Thomas A. Brasitus. Selective preservation of protein kinase C- in the chemoprevention of azoxymethane-induced colonic tumors by piroxicam. FEBS Letters 1995;366: 143-5.

15) Anthony C, Diane B, Gerard C, Nicolas A, Charles P, Claudette B. Caspase-8 activation independent of CD95/CD95-L interaction during paclitaxel-induced apoptosis in human colon cancer cells (HT29-D4). Biochem Pharmacol 2000;60: 1579-84.

16) Liang Q, Rashid H, Eleana S, Steven JS, Basil R. Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma. Biochem Pharmacol 1998;55:53-64.

17) Pyo JO. Mechanism of Capsaicin-Induced Stomach Cancer Cell Death; 2000.

18) Surh YJ, Lee SS. Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. Life Sciences 1995;56:1845-55.

19) Surh YJ, Ahn SH, Kim KC, Park JB, Sohn YW, Lee SS. Metabolism of capsaicinoids: Evidence for alipathic hydroxylation and its pharmacological implications. Life Sciences 1995; 56:305-11.

20) Surh YJ, Lee SS. Capsaicin in hot chilli pepper: Carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen. Food and Chemical Toxicology 1996;34:313-6.

21) Jung MY, Kang HJ, Moon A. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. Cancer Letters 2001;165:139-45.

22) Singh S, Natarajan K, Aggarwal BB. Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) is a potent inhibitor of nuclear transcription factor-kappa B activation by diverse agents. J Immunol 1996;157:4412-20.