

## 5-Fluorouracil과 Capsaicin의 병용에 의한 HT-29 대장암세포 사멸 증진 효과

이윤석 · 이종숙 · 김정애<sup>#</sup>

영남대학교 약학대학

(Received April 6, 2009; Revised April 24, 2009; Accepted May 4, 2009)

### Combined Treatment with 5-Fluorouracil and Capsaicin Induces Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells

Yun Seok Lee, Jong-Suk Lee and Jung-Ae Kim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

**Abstract** — Fluorouracil (5-FU) is one of the most widely used chemotherapeutic drugs in the treatment of advanced colorectal cancer patients. Capsaicin (N-vanillyl-8-methyl-alpha-nonenamide), a spicy component of hot pepper, is a homovanillic acid derivative that preferentially induces cancer cells to undergo apoptosis. The purpose of the present study is to examine whether capsaicin enhances the anticancer effect of 5-fluorouracil in HT-29 human colon cancer cells by inducing apoptosis, and whether PPAR $\gamma$  is involved in the capsaicin action in combination treatment with 5-FU. Treatment of the cells with either 5-FU or capsaicin alone for 48 h had little effect on the cell viability up to 50  $\mu$ M concentration, whereas co-treatment of the cells with capsaicin in the presence of 5-FU for 48 h significantly decreased the cell viability in a concentration-dependent manner. In addition, caspase-3 activity, a marker enzyme for apoptosis, was significantly increased by the combined treatment with 5-FU and capsaicin compared to the 5-FU or capsaicin alone treatment. Also, treatment with troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) agonist, further enhanced the effect of the combination treatment on the cell viability and caspase-3 activity, and bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), a PPAR $\gamma$  antagonist, blocked the effect of the combination treatment. These results suggest that the combination treatment of HT-29 cells with 5-FU and capsaicin induces apoptotic cell death at relatively low concentration than each drug alone, and the combination treatment may be associated with the PPAR $\gamma$  pathway activation.

**Keywords** □ 5-fluorouracil, capsaicin, HT-29 human colon adenocarcinoma cells, peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), combination therapy

대장암(colon cancer)은 현재 우리나라 암 발생빈도에서 위암, 폐암, 간암에 이어 네 번째를 차지하는 암으로 최근 단백질이나 동물성지방 섭취의 급격한 증가에 따르는 식생활의 서구화와 더불어 그 발생빈도가 크게 늘어나고 있다.<sup>1)</sup>

5-Fluorouracil(5-FU)은 대장암을 포함하여 소화선암, 비뇨생식기암, 피부암, Hodgkin병, 임파유종 등과 같은 다양한 고형암 치료에 널리 이용되는 약물이다.<sup>2)</sup> 5-FU는 thymidylate synthetase를 억제하여 DNA 합성을 억제하는 항대사성 항암제로서 DNA 복제는 물론 RNA에 의한 단백질 합성을 억제하고, 세포막 기능 억제 등의 작용을 나타낸다.<sup>3)</sup> 그러나, 다른 항암제들과 마찬가지로 5-FU는 표적효소 thymidylate synthase(TS)의 과발현

과 약물의 대사 관련 효소, 세포주기 조절 및 세포 사멸에 관련된 인자들의 변화 등 고유 내성 및 유도 내성의 발현에 인한 감수성의 저하로 약물의 효율성이 떨어진다고 알려져 있다.<sup>4)</sup> 암세포의 5-FU에 대한 반응률은 20~35% 정도로 낮다. 이런 5-FU의 감수성 저하를 극복하기 위한 일환으로 DNA의 탈메틸화 또는 히스톤의 탈아세틸화 저해제 등을 이용한 유전자의 불활성화, 화학요법과의 병용 사용에 대한 연구가 진행되고 있다.<sup>5-7)</sup> 뿐만 아니라, 다른 항암제와의 병용(예, cisplatin, mitomycin C, DTIC, methotrexate, doxorubicin) 투여시에도 단독 투여시보다 뚜렷한 효능의 차이를 보이지 않는다고 알려져 있다.<sup>8)</sup> 따라서, 새로운 기작의 화합요법제(Chemotherapeutic agent)를 발굴하여 5-FU 와 병용시 항암 효능을 획기적으로 높이고자 하는 연구가 진행되고 있다.<sup>5,6)</sup>

Capsaicin(8-Methyl-N-vanillyl-6-nonenamide)은 homovanillic acid 유도체로서 고추의 매운 맛을 가진 성분이다. Capsaicin의

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 053-810-2816 (팩스) 053-810-4654  
(E-mail) jakim@yu.ac.kr

고용량 섭취는 위암의 발생을 촉진하는 위험 인자로 보고되었으나 최근에는 capsaicin의 위장보호효과 및 암세포 사멸 유도 효과에 대한 연구결과가 발표되고 있다.<sup>9,10)</sup> Capsaicin은 여러 종류의 형질 변환 세포주의 성장 억제와 leukemia, stomach cancer, glioblastoma, neuroblastoma와 같은 암세포에서 apoptosis 유도 효과를 나타낸다.<sup>11-14)</sup> 또한, Kim 등은 capsaicin의 대장암 세포 사멸 작용은 peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR $\gamma$ ) pathway를 경유하여 apoptosis를 유도한다고 발표하였다.<sup>15)</sup>

PPAR $\gamma$ 는 steroid receptor superfamily에 속해있는 ligand-activated nuclear hormone receptor의  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ 의 3개의 subtype 중 하나이며, 지방 세포의 분화와 당 대사에 관여할 뿐 아니라, 세포 증식과 염증 반응의 조절에도 관여한다. 또한, PPAR $\gamma$ 는 악성 조직에서 광범위하게 발현되고 있으며, PPAR $\gamma$  ligand들이 암세포의 성장 저해와 대장암, 유방암 등 암세포의 괴사를 유도한다고 보고되고 있다.<sup>16)</sup>

이에 본 연구에서는 인체 대장암에 항암효과가 있다고 알려진 고추의 매운 성분인 capsaicin이 5-FU와 병용하였을 때의 암세포 사멸 효능 여부 및 그 작용 기전에서 PPAR $\gamma$ 과의 관련성을 조사하고자 하였다.

## 실험 방법

### 시약

본 실험에 사용한 fetal bovine serum(FBS)와 penicillium/streptomycin(PS), RPMI1640 배지는 Hyclone사(Rockville, MA, U.S.A.)에서 구입하였다. Trypsin solution, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), sodium pyruvate, dimethyl sulfoxide(DMSO), capsaicin, 5-fluorouracil(5-FU) salt powder는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 세포배양(Cell culture)

HT-29 사람 대장 상피세포는 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin(PS), 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid(HEPES), 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/l sodium bicarbonate가 함유된 RPMI1640 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였으며, 세포가 배양 flask에 80% 이상 자라면 1:4의 비율로 계대하면서 본 실험에 사용하였다.

### 세포 생존율 측정(MTT assay)

HT-29 세포를 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> 농도가 되게 배양한 후 시료들을 처리하였다. 일정시간 처리 후에 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 5

mg/ml 용액을 각 well에 처리하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 배지를 제거한 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 넣어 형성된 formazan 크리스탈을 녹여서 540 nm의 파장에서 microplate reader(Molecular Devices, VersaMAX, U.S.A.)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### Caspase (cysteinyl aspartate-specific proteinases)-3 activity assay

Caspase-3 활성은 Apoalert caspase colorimetric assay kit (BD Bioscience, CA, USA)로 측정하였다. 즉, cell lysate에 50  $\mu$ M DEVD-pNa, caspase-3 substrate가 포함되어 있는 10 mM DTT를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 pNA의 enzyme-catalyzed 방출을 405 nm의 파장에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

## 실험 결과 및 고찰

### 항암제 5-FU와 천연성분 capsaicin의 병용에 의한 암세포독성 증가 효과

사람 대장암 세포 HT-29에 capsaicin과 5-FU를 농도별로 각각 2일 또는 6일간 처리하여 세포 생존율을 조사한 결과(Fig. 1), capsaicin 또는 5-FU 각각을 48시간 동안 처리한 경우 50  $\mu$ M 농도까지 세포 생존율에 큰 영향이 없는 반면, 5-FU를 6일간 지속적인 처리를 하였을 경우에는 10  $\mu$ M 농도에서도 세포 생존율이 40% 이하로 감소하는 것으로 나타났다.

Capsaicin과 5-FU의 약물간의 병용효과를 조사하고자, 5-FU

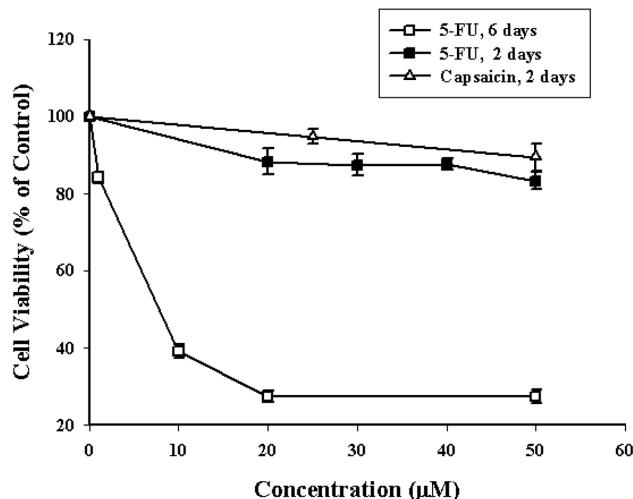


Fig. 1 – The Effect of 5-FU or capsaicin alone on the viability of HT-29 cells. Cells treated for 2 days and 6days with 5-FU and 2 days with capsaicin were analysed for viability by MTT assay. The data represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

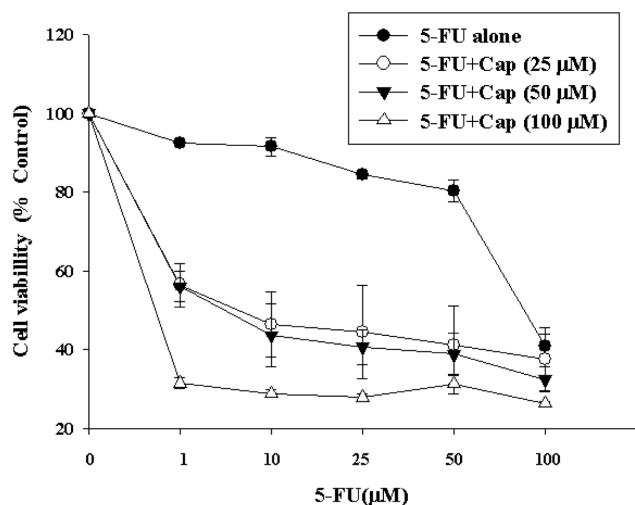


Fig. 2 – The Effect of combined treatment with 5-FU and capsaicin on the viability of HT-29 cells. Cells treated with 5-FU either alone or 5-FU and capsaicin for 2 days were analysed for viability by MTT assay. The data represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

와 capsaicin을 병용하여 48시간 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 5-FU 단독 처리에서 50 μM 농도까지 80% 이상 유지되던 세포 생존율이 capsaicin과의 병용 처리시에는 세포 생존율이 농도의존적으로 현저히 저하되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 천연 성분 capsaicin이 항암제 5-FU의 세포 독성을 상승시킬 수 있음을 나타내 주는 것이다.

Capsaicin과 5-FU 병용에 의한 세포 독성이 apoptosis에 의한

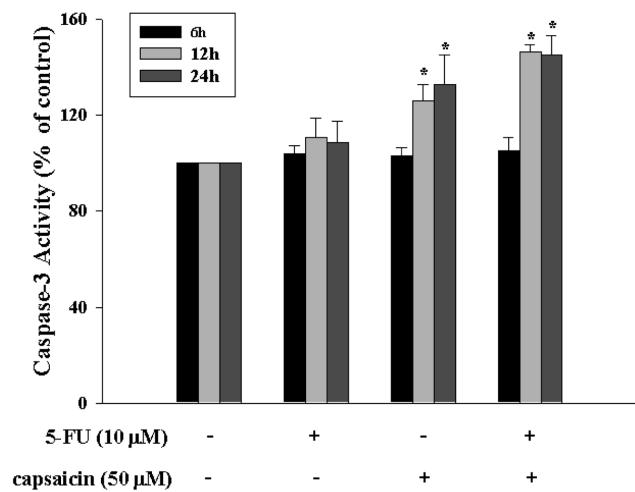


Fig. 3 – Time dependent activation of caspase-3 by 5-FU, capsaicin, and combined treatment with 5-FU and capsaicin in HT-29 cells. Cells were incubated with 5-FU (10 μM) alone or in the presence of capsaicin (50 μM) for each designated time. The caspase-3 activity was determined using a caspase-3 assay kit. The data represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. \*P<0.05, compared to control.

것인지 확인하기 위해 apoptosis 유도의 결정적 marker 분자로 잘 알려진 caspase-3의 활성을 측정하였다.<sup>17,18)</sup> Capsaicin 단독 처리의 경우, 시간 의존적으로 caspase-3의 활성이 증가 되었으나, 5-FU 단독 처리의 경우, caspase-3의 활성에 유의한 효과를 발휘하지 못하였다. Capsaicin과 5-FU의 병용 처리의 경우, 각 약물 단독 처리의 경우 보다 caspase-3 활성이 더욱 증가됨을 확인하였다(Fig. 3).

#### 항암제 5-FU와 capsaicin 병용 효과에서 PPAR $\gamma$ 의 역할

Capsaicin의 대장암 세포 사멸 작용이 PPAR $\gamma$ 를 경유한다고 보고된 바 있는 것처럼<sup>13)</sup> HT-29 대장암 세포에서 5-FU와 capsaicin의 병용에 의한 세포 사멸 증가 효과가 PPAR $\gamma$  ligand를 경유하여 나타나는지를 조사하기 위해, PPAR $\gamma$  agonist인 troglitazone과 PPAR $\gamma$  antagonist인 BADGE를 전 처리한 후 세포 사멸 효과를 측정하였다. PPAR $\gamma$  ligand들이 암세포의 성장 저해와 대장암, 유방암 등 암세포의 괴사를 유도한다는 기준의 보고<sup>14)</sup>와 마찬가지로 본 연구에서도 troglitazone의 경우 단독 투여가 HT-29 암세포의 생존율을 감소시키고(Fig. 4), caspase-3 활성은 증가시키는 작용을 나타내었다(Fig. 5). Troglitazone의 전 처리는 세포 생존율에 대한 5-FU와 capsaicin의 병용 효과를 증가시키는 반면, PPAR $\gamma$  antagonist인 BADGE의 전 처리에 의해서는 5-FU와 capsaicin의 병용 효과가 약화되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 뿐만 아니라, caspase-3 활성에 대한 5-FU와 capsaicin의 병

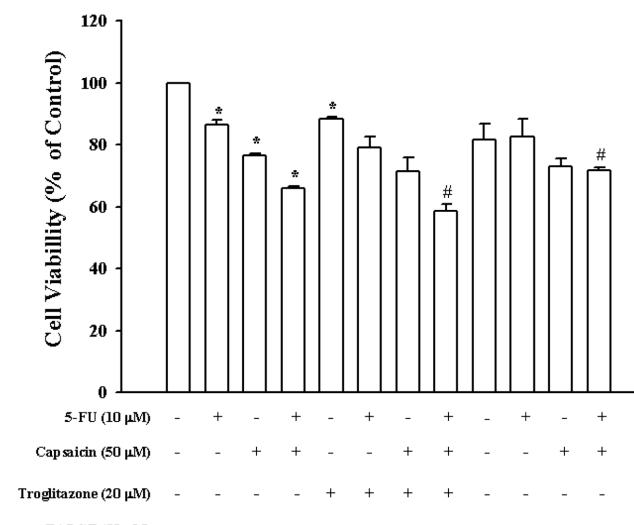


Fig. 4 – The effect of troglitazone and BADGE on the viability of 5-FU and capsaicin co-treated HT-29 cells. Cells were treated with or without troglitazone (50 μM) or BADGE (50 μM) in the presence or absence of 5-FU (10 μM) and capsaicin (50 μM), for 48h. Cell viability was measured by MTT assay. The data represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. \*P<0.05, compared to control, #P<0.05, compared to combination treatment.

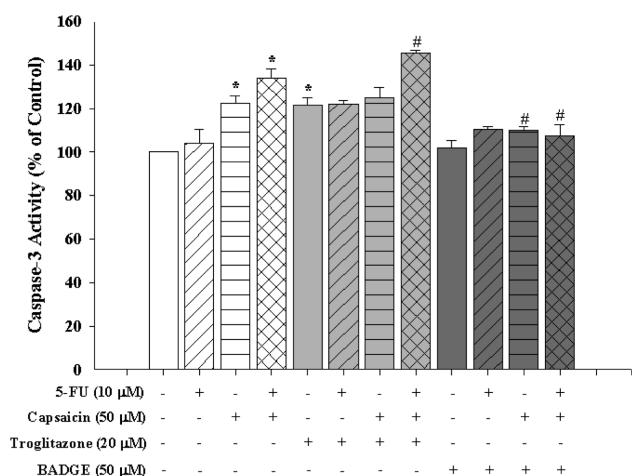


Fig. 5 – The effect of troglitazone and BADGE on the caspase-3 activity in 5-FU and capsaicin co-treated HT-29 cells. Cells were treated with or without troglitazone (50  $\mu$ M) or BADGE (50  $\mu$ M) in the presence or absence of 5-FU (10  $\mu$ M) and capsaicin (50  $\mu$ M), for 48 h. The caspase-3 activity was determined using a caspase-3 assay kit. The data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P$ <0.05, compared to control, # $P$ <0.05, compared to combination.

용 효과가 troglitazone에 의해 더욱 증가하고, BADGE에 의해 서는 그 병용 효과가 차단됨을 확인하였다(Fig. 5). 이는 5-FU와 capsaicin의 병용에 의한 암세포 사멸효과는 PPAR $\gamma$  경로를 경유하여 진행됨을 의미한다.

## 결 론

5-FU는 thymidylate synthase 효소를 억제하여 세포내 뉴클레오타이드 생합성을 방해함으로써 암세포의 증식을 저해하는 항암제로 여러 종류의 암 치료에 널리 쓰이고 있으나, 그 부작용 또한 크다고 알려져 있다. 본 연구에서는 세포 생존율 및 caspase-3 활성에 큰 영향이 없는 저용량의 5-FU를 capsaicin과 병용 처리 하였을 경우에 농도의존적으로 세포 독성 및 caspase-3 활성 증가가 유도됨을 확인하였다. 뿐만 아니라, 5-FU와 capsaicin의 병용 효과는 PPAR $\gamma$  경로를 경유하여 나타남을 확인하였다. 이상의 연구결과는 저용량의 항암제와 암세포 사멸작용이 있는 천연성분을 병용함으로써 항암제의 부작용 발현을 낮추는 동시에 효율적인 암세포 사멸 효과를 발휘하는 효과적인 항암 병용요법 제로서의 가능성이 큼을 의미한다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-204-E00119).

## 참고문헌

- 1) Kim, D. W., Bang, Y. J., Heo, D. S. and Kim, N. K. : Colon cancer in Korea: characteristics and trends. *Tumori* **88**, 262 (2002).
- 2) Poon, M. A., O'Connell, M. J., Moertel, C. G., Wieand, H. S., Cullinan, S. A., Everson, L. K., Krook, J. E., Mailliard, J. A., Laurie, J. A. and Tschetter, L. K. : Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **7**, 1407 (1989).
- 3) Santi, D. V., McHenry, C. S. and Sommer, H. : Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* **13**, 471 (1974).
- 4) Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A. M., Cahambaz, J., Lacorte, J. M., Staedel, C. and Lesuffleur, T. : Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int. J. Cancer* **98**, 498 (2002).
- 5) Zhang, Y. Q., Tang, X. Q., Sun, L., Dong, L., Qin, Y., Liu, H. Q., Xia, H. and Cao, J. G. : Rosiglitazone enhances fluorouracil-induced apoptosis of HT-29 cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *World J. Gastroenterol.* **13**, 1534 (2007).
- 6) Kim, M. Y., Son, J. K., Lee, S. K. and Kuh, H. J. : Combinatorial effect of 5-FU and epigenetic silencing repressors in human colorectal cancer cells. *Yakhak Hoeji* **49**, 511 (2005).
- 7) Kanda, T., Tada, M., Imazeki, F., Yokosuka, O., Nagao, K. and Saisho, H. : 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes hepatoma and pancreatic cancer cell lines. *Oncol. Rep.* **14**, 975 (2005).
- 8) Kessinger, M. A., Foley, J. F. and Lemon, H. M. : Adriamycin, mitomycin C, and 5-fluorouracil in combination for advanced colorectal adenocarcinoma previously treated with 5-fluorouracil. *Cancer. Clin. Trials* **2**, 317 (1979).
- 9) Szolcsanyi, J. and Bartho, L. : Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. *J. Physiol. Paris* **95**, 181 (2001).
- 10) Surh, Y. J., Lee, E. and Lee, J. M. : Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mutat. Res.* **402**, 259 (1998).
- 11) Ito, K., Nakazato, T., Yamato, K., Miyakawa, Y., Yamada, T., Hozumi, N., Segawa, K., Ikeda, Y. and Kizaki, M. : Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res.* **64**, 1071 (2004).
- 12) Kim, J. D., Kim, J. M., Pyo, J. O., Kim, S. Y., Kim, B. S., Yu, R. and Han, I. S. : 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.* **120**, 235 (1997).
- 13) Lee, Y. S., Nam, D. H. and Kim, J. A. : Induction of apoptosis by capsaicin in A172 human glioblastoma cells. *Cancer Lett.* **161**, 121 (2000).
- 14) Lee, Y. S., Kwon, E. J., Jin da, Q., Park, S. H., Kang, Y. S., Huh, K. and Kim, J. A. : Redox status-dependent regulation of cyclooxygenases mediates the capsaicin-induced apoptosis in human neuroblastoma cells. *Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **21**, 113 (2002).
- 15) Kim, C. S., Park, W. H., Park, J. Y., Kang, J. H., Kim, M. O., Kawada, T., Yoo, H., Han, I. S. and Yu, R. : Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in HT-29 human colon cancer cells. *J. Med. Food* **7**, 267 (2004).
- 16) Sarraf, P., Mueller, E., Jones, D., King, F. J., DeAngelo, D. J., Partridge, J. B., Holden, S. A., Chen, L. B., Singer, S., Fletcher, C. and Spiegelman, B. M. : Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat. Med.* **4**, 1046 (1998).
- 17) Muzio, M., Chinnaian, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Dixit, V. M. : FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95(Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817 (1996).
- 18) Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M. and Salvesen, G. S. : Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J. Biol. Chem.* **272**, 7797 (1997).