

## 수종식물의 MCF-7 세포에 대한 세포사 및 항·증식효과

정 용 자\*

경성대학교 약학대학 약학과

Received September 19, 2003 / Accepted December 1, 2003

**Apoptotic Effects of Some Plants on MCF-7 Mammary Gland Adenocarcinoma Cells.** Yong-Za Chung\*. *Department of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea* – Many studies have been widely carried out to find out new compound having anti-cancer activity from animals and plants. Some plants have been reported to have anti-cancer effects. However, the anti-cancer effect of edible plants were seldomly evaluated. Therefore we investigated the anticancer effects of edible plants (10 samples) easily available around us by measuring number of survival cancer cells after treatment with direct cell counting and MTT analysis, and by examining the morphological change under the electromicroscope. Of the 10 samples tested, *Equisetum arvense* L., *Lactuca dentata* Mokino. var. *flaviflora* Makino. showed moderate anti-cancer effects even at the concentration of 10  $\mu$ l/ml against MCF-7 adenocarcinoma cell line. Of them, *Capsicum annuum* L. had most potent anti-cancer activity against MCF-7 adenocarcinoma cell line showing proliferation inhibited, morphological change and apoptosis at the concentration of 2  $\mu$ l/ml.

**Key words** – morphological change, *Capsicum annuum*, mammary gland adenocarcinoma cell

암의 발생원인이 유전적 요소, 환경적 요소 외에 상당부분이 잘못된 식습관에 있음이 밝혀지면서, 발암물질이 들어있는 식품을 회피하는 소극적인 방법보다 항암물질이 함유된 음식을 찾아서 먹는 적극적인 방법이 시도되고 있다. 따라서 천연물질에서 어떤 특수한 항암물질을 찾아내려는 연구와 더불어 항암물질이 함유된 음식을 찾기 위한 연구도 대단히 중요한 의미를 갖게 되었다[2,10,13,14]. 이에 우리들이 매일같이 식탁에서 접하는 식품들에서 항암물질을 찾아내려는 연구 [1]와 더불어 항암물질을 함유하고있는 음식을 찾기 위한 연구도 대단히 중요한 의미를 갖게되었다[2]. 동물성식품에 비하여 식물성식품의 항종양효과가 많이 인식되고 있고[9,11], 이에 우리 식탁에 많이 오르는 식물들을 중심으로 어느 정도 항종양효과가 있는가를 관찰해 보기 위하여 유방암세포를 배양하여, 그 증식 저해정도를 관찰하고 세포사의 과정으로 나타나는 현상들을 시험하였다. 실험대상식품은 식탁에서 자주 접할 수 있는 식용식물들로 선택하고, 실험대상세포는 유선종양세포인 mammary gland adenocarcinoma cell line (MCF-7 cell)를 배양하여 당해 세포에 대한 강한 증식억제작용을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

## 실험재료

실험재료는 Table 1과 같이 식탁에서 흔히 볼 수 있는 식

용식물들에서 유방암세포에 대한 증식저해정도를 관찰하고자, Table1의 각 시료를 선택하여 먼저 1차 증류수로 수회 세척하고, clean bench내에서 멸균한 3차 증류수로 2회 세척하여, 유발에서 쥬어, 즙을 얻었다. 사용한 각 시료는 10 g 당 추출액의 용량이 10 ml되게 하여 농도를 일정하게 하였다. 추출액은 0.45  $\mu$  cellulose acetate 막주사형 여과기(membrane syringe filter, Corning 사)로 여과시켜 시료로 사용하였다. 실험대상세포를 배양하기 위한 시약 중 fetal bovine serum (FBS), trypsin 및 RPMI 1640 배지는 Gibco BL 제품을 사용하였다. 일반 시약은 주로 sigma사 제품을 사용하였다[9].

## 세포배양

본 실험에 사용한 세포는 유선 종양세포주인 MCF-7 Mammary gland adenocarcinoma cell line (MCF-7 cell)이며, 세포배양을 위해 RPMI 1640배지를 사용하여, 10% FBS, 0.075%  $\text{NaHCO}_3$ , 100 units/ml penicilin G, (Pfizer Co.)와 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Dong-a Pharm Co.)을 첨가하고 세포배양을 위한 배지로 사용하였다. 세포 배양조건은 37°C의 95% air: 5%  $\text{CO}_2$  배양기 내에서 행했다. 배지는 약55시간에 신선배지로 교환하였다[1].

## 각 시료에 대한 실험방법

각 시료를 각 well에 50  $\mu$ l, 75  $\mu$ l, 100  $\mu$ l/ml 농도가 되게 신선한 배지 160  $\mu$ l와 함께 첨가하고, PBS (phosphate buffered saline)로 각 well의 총 용량을 180  $\mu$ l 되게 하였다. MCF-7 세포는 trypan blue를 사용하여 생균수를 센 후, 세포수가  $4 \times 10^3$ 개 되게 20  $\mu$ l씩 분주하였다. 이와 같이 시료가 첨가된 배지에서의 배양세포성장 및 착상을 관찰하기 위해

## \*Corresponding author

Tel : +82-51-620-4887, Fax : +82-51-628-6540

E-mail : yjjung@star.kyungsoong.ac.kr

Table 1. Sample name and its scientific name

No*	korean name	scientific name
1	고추잎	<i>Capsicum annuum</i> L. leaf
2	쌈바귀	<i>Lactuca dentata</i> Makino. var. <i>flaviflora</i> Makino
3	돌나물	<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge
4	들갯잎	<i>Perilla frutescens</i> Brit. var. <i>japonica</i> . Hara
5	방아잎	<i>Agastache rugosa</i> Kuntz
6	쇠뜨기	<i>Equisetum arvense</i> L.
7	쑥 갓	<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.
8	우엉잎	<i>Arctium lappa</i> L.
9	녹나무	<i>Cinnamomum camphora</i> Sieb.
10	풋고추	<i>Capsicum annuum</i> L. fruit unripen

\*The numbers of the following samples correspond to the numbers previously mentioned.

37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기내에서 48시간 배양하였다. 배양 후 세포성장정도를 확인하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)비색법으로 그 흡광도를 측정했다[7]. 측정값은 6회 실험 예를 평균하여 얻은 결과이며, 흡광도 측정치의 감소는 살아있는 세포수의 감소, 즉 항암효과가 있는 것으로 간주할 수 있다.

**세포 수 측정**

살아있는 MCF-7 세포의 수는 trypan blue 염색법으로 행하였다. 배양세포를 0.05% trypsin-EDTA로 처리하여 부유된 세포를 취하여, 0.5% trypan blue로 염색한 후, hemacytometer로 현미경하에서 세포 수를 세어 측정하였다[3]. 배양 세포의 수와 MTT법에 의한 실험결과의 유의성 확인에 이 방법을 이용하였다.

**MTT assay**

각 시료의 MCF-7세포에 대한 성장저해효과는 MTT비색 측정법을 이용하여 검색하였다. 이 방법은 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의하여 MTT가 환원되어 청색 침전물을 형성하는 원리를 이용한 분석방법이다. 생존세포수가 많을수록 청색침전물의 양이 증가하며, 반대로 흡광도의 감소는 생존세포수의 감소를 의미한다. 검사방법은 다음과 같다.

MCF-7세포는 배양병에 부착하여 성장하므로 trypsin-EDTA로 처리 후 부유상태로 취하여 일정수의 세포를 각 well에 각각 분주한 후, 시료를 첨가하여 배양하고, 2 mg/ml의 MTT를 각 well에 50 µl씩 가하고 배양기내에서 4시간 동안 방치한다. 그리고 5분간 500rpm에서 원심분리하여 상정액을 제거하고, DMSO (dimethyl sulfoxide) 150 µl씩 첨가하여 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[4,7].

**세포형태변화**

25 cm canted neck flask에 MCF-7세포 2×10<sup>5</sup>개와 신선배지 10 ml을 첨가하여 배양하였다[8]. 세포의 착상을 위해 24시간 배양 후 배지를 조심스럽게 제거하고, 준비된 시료와 신선배지를 각각의 flask에 첨가하였다. 첨가 후 배양하면서 매일 성장세포형태를 도립현미경으로 촬영하였다[1]. 세포형태 관찰기간동안의 배양조건은 상기 세포배양에서의 기준과 같이 행하였으며, 55시간에 신선배지의 교환(시료를 첨가한)을 행하고 시료는 각각 10 µl/ml씩 첨가하였다.

**실험결과 및 고찰**

**Microplate에서의 세포수에 따른 성장곡선과 흡광도**

생존세포수와 MTT비색법에 의한 흡광도의 관계는 Fig. 1에서 보이는 바와 같다. 그리고 96well microplate에 2×10<sup>4</sup> cells/ml와 5×10<sup>4</sup> cells/ml MCF-7 세포를 0.2 ml씩 접종하여, 0시간, 24시간, 48시간, 72시간 배양한 후 세포수를 측정하였다(Fig. 2). Fig. 2에서 보이는 바와 같이 세포수 5×10<sup>4</sup> cells/ml을 배양하여 얻어진 값의 변화곡선보다 2×10<sup>4</sup> cells/ml로 배양한 값의 곡선이 안정된 상승곡선을 보였으므로, 2×10<sup>4</sup> cells/ml로 48시간 배양 결과를 실험조건으로 선택하여 이 시점을 기본 배양기간으로 정하고 실험을 행하였다. 각 측정값은 6회 실험하여 평균하여 얻은 값이며, 이는 hemacytometer에 의한 세포수 측정에서도 유의성있는 결과를 얻었다[5-7].

**각 시료에 대한 MCF-7세포의 증식억제**

각 시료들을 각각 50 µl, 75 µl, 100 µl/ml 농도로 첨가한 것과 넣지 않은 well 모두에 20 µl씩 MCF-7 cell을 분주하여

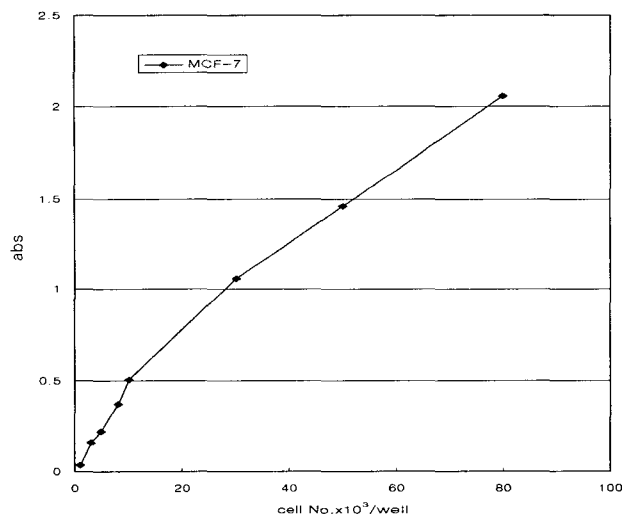


Fig. 1. The relations between the number of MCF-7 cell and the spectrometric absorbance on microplate-reader by MTT assay method.

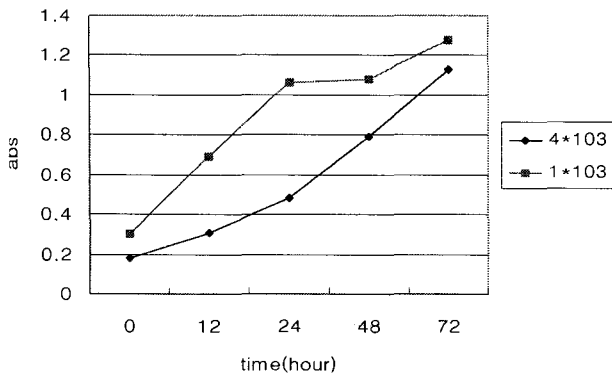


Fig. 2. The absorbance of the cells after 24 hours culture according to the inoculated cell number. The  $4 \times 10^3$  and  $1 \times 10^4$  cells/well of MCF-7 cell were inoculated, and cultured. The absorbance was measured by the MTT assay at 540 nm. The above value of 103 for square lines indicate  $10^3$ .

각 well당 세포수  $4 \times 10^3$  개/200  $\mu$ l well가 되게 하였다. 이것을 37°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 48시간 배양한 뒤 MTT 정량법으로 그 흡광도를 측정했다. MTT 정량법에 의한 흡광도 측정치의 감소는 살아있는 세포수의 감소, 즉 항암효과가 있는 것으로 간주할 수 있다. 측정값은 6회 실험 값을 평균하여 얻은 결과이다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 *Capsicum annuum*

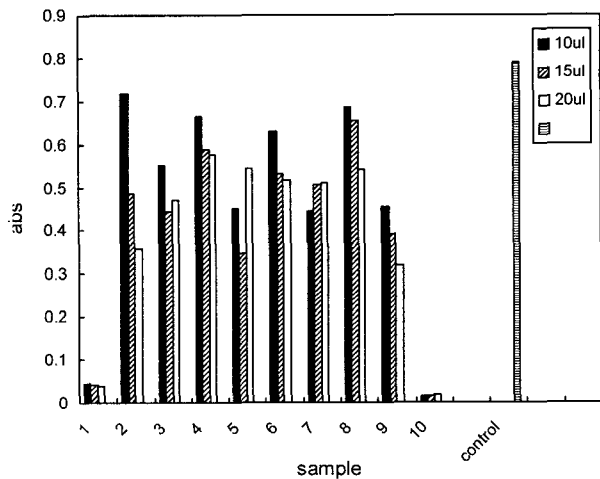


Fig. 3. Antiproliferating effects of each samples using water as solvent on MCF-7 cells. The cells were cultured at few different concentrations of the extracts. The 10  $\mu$ l, 15  $\mu$ l, and 20  $\mu$ l/well (200  $\mu$ l) of each sample were added to MCF-7 cell line. Then they were cultured for 2 days. The absorbance were measured by MTT assay. 1. *Capsicum annuum* L. Leaf 2. *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino 3. *Sedum sarmentosum* Bunge 4. *Perilla frutescens* Brit. var. *japonica*. Hara 5. *Agastache rugosa* Kuntz 6. *Equisetum arvense* L. 7. *Chrysanthemum coronarium* L. 8. *Arctium lappa* L. 9. *Cinnamomum camphora* Sieb. 10. *Capsicum annuum* L. fruit unripen.

L. 에서 살아있는 세포수의 현저한 감소를 보였다. Fig. 3의 결과에서 MCF-7세포의 증식억제효과가 높은 것을 선정하여 농도를 좀 더 세분화하여 실험하였다 그 사용농도는 10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 75  $\mu$ l, 100  $\mu$ l/ml이었고, 실험결과는 Fig. 4.a와 같다. 시료 *Capsicum annuum* L. leaf는 증식억제효과가 아주 현저하여 10 $\mu$ l/ml에서 MCF-7세포에 대한 증식억제율이 95%를 상회하였다. 이 결과에서 농도변화에 따른 세포 성장억제율의 변화가 확인되지 않았으므로 더 세분화된 저 농도까지를 실험범위로 삼고 행했다. 그 결과는 Fig. 4.b와 같이 1  $\mu$ l/ml에서 35.3%의 증식억제 효과를 보였고, 2.5  $\mu$ l/ml에서는 42.9%의 증식억제 효과를 보였으며, 7.5  $\mu$ l/ml에서는 94.8%의 감소를 나타내었다.

**MCF-7세포의 형태변화**

Table 1 시료 중 MCF-7세포에 대한 증식억제작용이 확실한 시료들을 선택하여 그 작용 양상을 확인하기 위하여 형태학적관찰을 하였다.

1. *Capsicum annuum* L. leaf 2. *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino 6. *Equisetum arvense* L. 10. *Capsicum annuum* L. fruit unripen만을 골라 행했다.

MCF-7세포는 배양병에 부착하여 성장하며, 이식배양2일에 완전히 착상하여 배양병 바닥에 붙어 자라기 시작한다. Fig. 5.에서 보이는 바와 같이 MCF-7세포는 선명한 형태를 갖추고, 계속해서 성장을 유지한다. 각 시료를 주입한 세포에

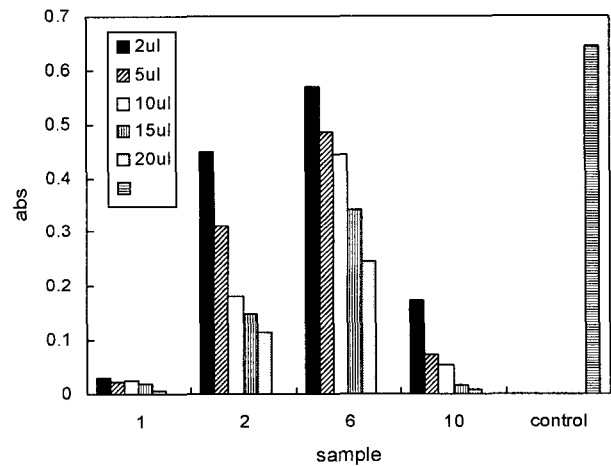


Fig. 4a. Antiproliferating effects of some samples of our examined using water as solvent on MCF-7 cells. The some more different concentrations compared to Fig. 3; 2  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 15  $\mu$ l, and 20  $\mu$ l/well (200  $\mu$ l), of the some samples were added to MCF-7 cell line. Then, the cells were cultured for 2 days. Absorbance were measured by MTT assay. 1. *Capsicum annuum* L. leaf 2. *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino 6. *Equisetum arvense* L. 10. *Capsicum annuum* L. fruit unripen.

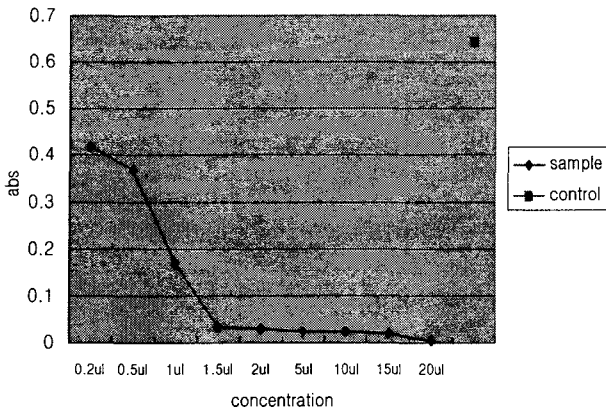


Fig. 4b. Antiproliferating effects of *Capsicum annuum* L. leaves using water as solvent on MCF-7 cells. The 0.2  $\mu$ l, 0.5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l, 1.5  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 15  $\mu$ l, and 20  $\mu$ l/ well (200  $\mu$ l) of the sample were added to MCF-7 cell line. Absorbance were measured by MTT assay. Then they were cultured for 2 days.

서는 Fig. 6-9에서 보이는 바와 같이 시료에 따른 차이는 없으나 약4일 정도에서 일부세포를 제외하고는 탈락을 보이며 세포 형태 변화를 보이기 시작했다. 그리고 14-19일 정도에서 세포는 거의 파괴되었으며, 그 주변에 파쇄 된 세포파편

들이 관찰되었다.

Fig. 6는 *Capsicum annuum* L. leaf 추출액 10  $\mu$ l/ml을 첨가한 것으로서, 이식 후 첫날부터 착상이 어렵고 3일부터는 세포탈락과 세포파괴가 일어나기 시작하여 6일째엔 모든 세포가 파괴되었다. Fig. 7는 *Capsicum annuum* L. fruit unripen 추출액 10  $\mu$ l/ml을 첨가한 것으로서, 4일째에 세포변형이 관찰되고, 7일째에 세포가 탈락되고 파괴되기 시작했으며, 14일째엔 거의 모든세포가 파괴되었다. Fig. 8는 *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino 추출액을 첨가한 것으로서, 4일째에 세포가 잘 자라지 못하고, 8일째에 파괴되기 시작하여 19일째엔 거의 모든 세포가 파괴되었다. Fig. 9는 *Equisetum arvense* L. 추출액을 첨가한 것으로서, 4일째에 세포성장은 지연되었으나 여전히 잘 자랐으며 일부세포에서 변형이 관찰되었다. 12일째에도 성장은 계속되었고 일부세포만이 변형을 보였으며 18일째에도 마찬가지였다.

### 요 약

식용식물 *Capsicum annuum* L., *Lactuca dentata* Makino., *Sedum sarmentosum* Bunge, *Perilla frutescens* Brit., *Agastache rugosa* Kuntz, *Equisetum arvense* L., *Chrysanthemum coronarium*,

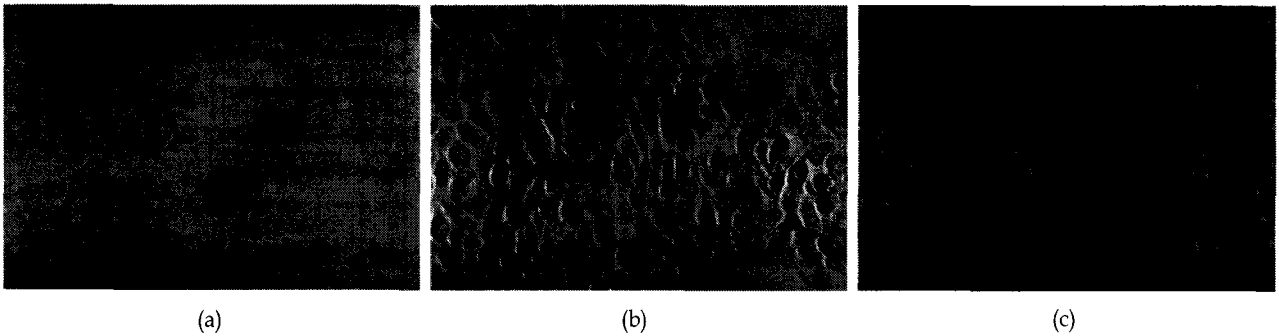


Fig. 5. The pictures above show morphology of MCF-7 cells. The description of its morphology is as follows: a) 2nd day, starting to grow on the bottom of cultural bottle. b) 6th day, continuing to grow with clear form. c) 10th day, continuing to grow with clear form.

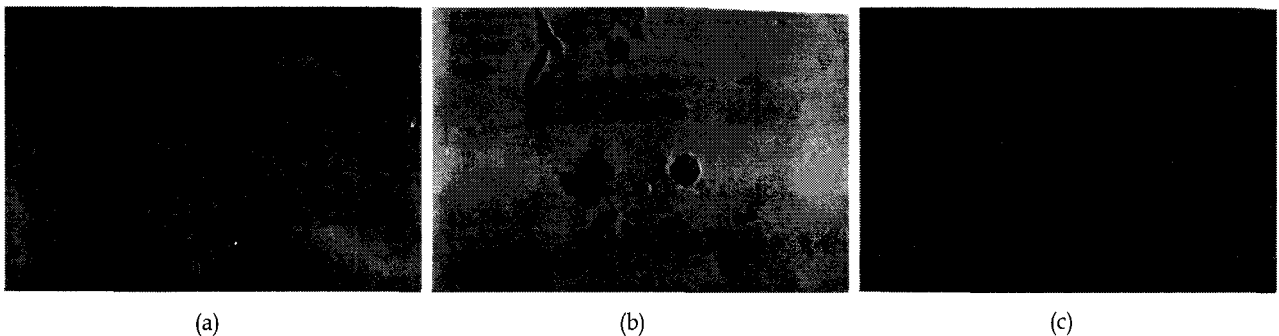


Fig. 6. The pictures above show morphologic change of MCF-7 cells that occurred at the concentration of 10  $\mu$ l/ml of *C. annuum* L. extract of leaf. The description of its morphologic changes is as follows: a) 1st day, can not grow. b) 3th day, started to be destroyed. c) 6th day, almost cells destroyed.

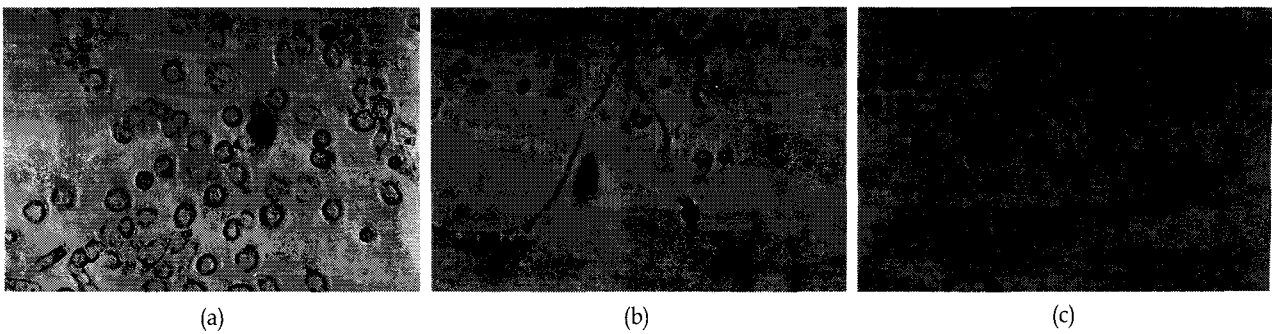


Fig. 7. The pictures above show morphologic change of MCF- 7 cells that occurred at the concentration of 10  $\mu\text{l/ml}$  of *C. annuum* L. extract of fruit unripen. The description of its morphologic changes is as follows: a) 4th day, detected morphologic change. b) 7th day, started to be destroyed. c) 14th day, almost cells destroyed.

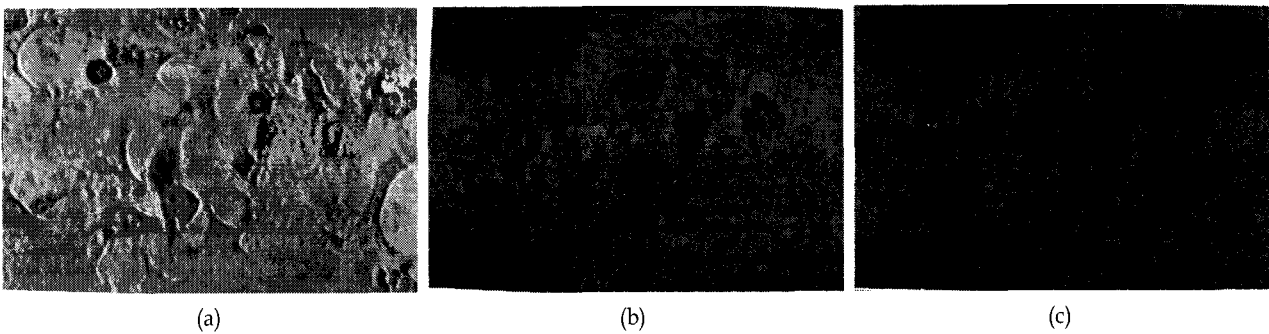


Fig. 8. The pictures above show morphologic change of MCF- 7 cells that occurred at the concentration of 10  $\mu\text{l/ml}$  of *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino. The description of its morphologic changes is as follows: a) 4th day, cannot grow. b) 8th day, many cells destroyed. c) 19th day, almost cells destroyed.

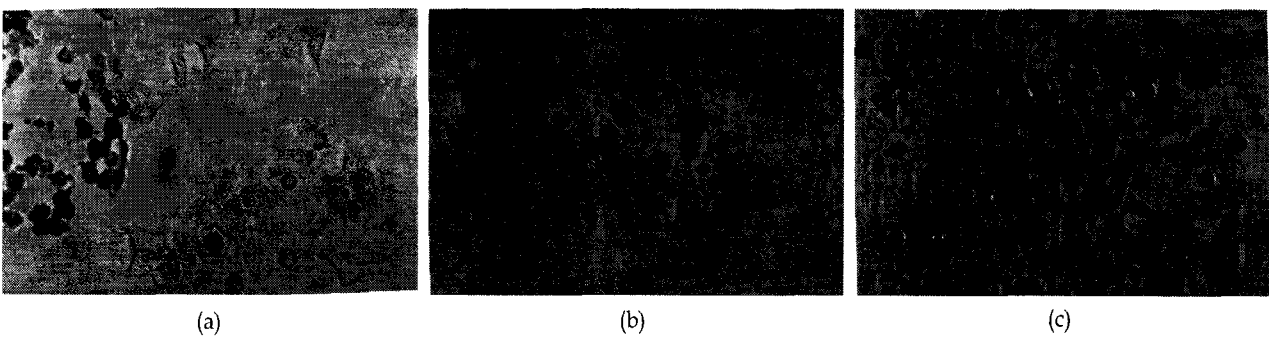


Fig. 9. The pictures above show morphologic change of MCF- 7 cells that occurred at the concentration of 10  $\mu\text{l/ml}$  of *Equisetum arvense* L.. The description of its morphologic changes is as follows: a) 4th day, continuing to grow, but mild morphologic change of some cells observed. b) 12th day, continuing to grow as before a), but morphologic change observed. c) 18th day, continuing to grow as before.

*Arctium lappa*, *Cinnamomum camphora* Sieb.들의 MCF-7 mammary gland adenocarcinoma cell line에 대한 증식억제 효과를 관찰하기 위해 MTT 비색정량법을 이용하였다. 그 결과 *Capsicum annuum* L. 추출시료를 첨가한 경우에 MCF-7세포의 성장은 현저한 감소를 보였으며, 결과에서 분명한 항암 효과를 관찰할 수 있었다. 특히 *Capsicum annuum* L. leaf은 1  $\mu\text{l/ml}$  첨가에서 35.3%의 증식억제효과를 보였고, 2.5  $\mu\text{l/ml}$ 에서 42.9%, 7.5  $\mu\text{l/ml}$ 에서 94.8%의 세포성장억제를 관찰

할 수 있었다. *Capsicum annuum* L. fruit unripen 추출물 10  $\mu\text{l/ml}$ 에서 75%, 25  $\mu\text{l/ml}$ 에서 80%의 성장억제물을 보였다. *Equisetum arvense* L.와 *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino에서도 세포성장이 억제됨을 관찰할 수 있었으며, *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino추출시료 첨가군에서는 10  $\mu\text{l/ml}$  첨가에서 30%, 25  $\mu\text{l/ml}$ 에서 52%의 성장억제물을 보였다. *Equisetum arvense* L.은 10  $\mu\text{l/ml}$  첨가군에서 11%, 25  $\mu\text{l/ml}$ 에서 25%의 성장억제물을 보였다.

배양세포의 형태변화를 관찰해 본 결과에서도, 첨가시료가 *Capsicum annuum* L. leaf인 경우 착상이 어렵고 3일부터는 세포탈락과 세포파괴가 일어나기 시작하여 6일째엔 거의 모든 세포에서 세포사현상이 관찰되었다. 그리고 *Capsicum annuum* L. fruit unripen와 *Lactuca dentata* Makino. var. *flaviflora* Makino 추출액을 첨가한 경우에도 배양4일에 세포의 변형과 성장지연이 관찰되었으며, 8일째에 파괴되기 시작하여 배양14일과 19일에 많은 세포사현상의 파편들이 관찰되었다. *Equisetum arvense* L.는 배양4일에 세포성장은 지연되었으나 여전히 잘 자랐으며 일부세포에서 변형이 관찰되었다. 12일째에도 성장은 계속되었고 일부세포만이 변형을 보였으며 18일째에도 비슷한 결과로 관찰되었다.

### 참 고 문 헌

1. Adam, R. L. P. 1982. Cell culture for biochemists. Elsevier North Holland Press, New York.
2. Ames, B. N. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radicals and degenerative disease. *Science* **221**, 1256-1264.
3. Barbara, H.O'Connor. 1984. A color atlas and instruction manual of peripheral blood cell morphology. William & Wilkins, Baltimore/London.
4. Carmichael, J., W. C. Degraff, A. Grazdar, J. D. Minna and J. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semi-automated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
5. Carrel, A. 1912. On the permanent life of tissue outside the organism. *J. Exp. Med.* **15**, 516-528.
6. Chung, Y. Z. and U. J. Lee. 1999. Anti-proliferating effects of some plants on the Hepatoma cell. *Kor. J. Clin. Pharm.* **9**, 103-107.
7. Denizot, F. and R. Lang. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival : Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Meth.* **89**, 271-277.
8. Freshney, R. Ian. 1987. Culture of animal cells —A manual of basic technique. Alan R. Liss Inc. New York.
9. Seo, J. S., Y. W. Lee, N. J. Suh and I. M. Chang. 1990. Assay of antimutagenic activities of vegetable plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**, 88-91.
10. Sugimura, T. 1982. Mutagen, carcinogens and tumor promoters in our dairy food. *Cancer* **49**, 1970-1984.
11. Sugimura, T. and S. Sato. 1983. Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res.* **43**, 2415-2421.
12. Todaro, G. J. and H. Green. 1963. Qualitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell. Biol.* **17**, 299-313.
13. Wattenberg, L. W. 1983. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res.*, **43**, 2448.
14. Wattenberg, L. W. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.*, **45**, 1.