

## 마늘 성분인 Diallyl Disulfide의 유방암 세포주(MCF-7)에 대한 세포사멸 유도기전에 관한 연구

포천 중문의과대학교 외과학교실, <sup>1</sup>성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 일반외과, <sup>2</sup>분자치료연구센터 및 <sup>3</sup>고려대학교 의과대학 외과학교실

박해린 · 서정민<sup>1</sup> · 박경숙<sup>2</sup> · 장항석 · 남석진<sup>1</sup> · 배정원<sup>3</sup> · 이경포 · 양정현<sup>1</sup> · 구범환<sup>3</sup>

### Diallyl Disulfide from Garlic Induces Apoptosis through a Caspase Dependent Pathway in Human Breast Cancer Cell Line, MCF-7

Hai-Lin Park, M.D., Jung-Min Suh, M.D.<sup>1</sup>, Kyungsook Park, Ph.D.<sup>2</sup>, Hang-Seok Chang, M.D., Seok-Jin Nam, M.D.<sup>1</sup>, Jung-Won Bae, M.D.<sup>3</sup>, Kyung-Po Lee, M.D., Jung-Hyun Yang, M.D.<sup>1</sup> and Bum-Hwan Koo, M.D.<sup>3</sup>

**Purpose:** Diallyl disulfide (DADS), an organosulfur compound in garlic, has been reported to be effective in inhibiting the growth of several human tumor cell lines. The aim of this study was to determine whether DADS induced growth inhibition in MCF-7 breast cancer cell lines and to understand the molecular mechanism by which DADS acts. **Methods:** MCF-7 cell lines were incubated with various concentrations of DADS for various time intervals and the cytotoxicity was determined by MTT assay. We examined the changes of intracellular proteins related to apoptosis, such as bcl-2, bax and PARP in cells treated with DADS. To study the expression level of bcl-2 and bax, which serve as modulators of apoptosis, we performed RT-PCR and western blot analysis.

**Results:** MCF-7 cells treated with DADS led to the suppression of viability and proliferation in both a time and concentration dependent manner. Microscopic observation revealed typical features of apoptosis in the DADS-treated cells, further verified in nuclear DAPI staining. Flow cytometry analysis with FITC-annexinV and propidium iodide (PI) demonstrated that the apoptotic cell population with AnnexinV+/PI- increased dramatically from ~0.8% to ~75% after 24h exposure to 500  $\mu$ M DADS in MCF-7 cells. Cell

cycle analysis demonstrated that the number of apoptotic cells increased with the increasing time of the DADS treatment. Additionally, furthermore, we investigated the effects of DADS on apoptosis related gene expression in MCF-7 cells. PARP cleavage was markedly increased in the DADS treated cells with time. This result indicated that DADS induced the caspase-dependent apoptotic pathway. We also found down-regulation of bcl-2, however no significant change of Bax expression was observed after DADS treatment.

**Conclusion:** Taken together, these results indicate that DADS induces apoptosis by activating a caspase pathway involving the activation of Bcl-2 but not of Bax. Our findings suggest chemotherapeutic potentials of DADS in human breast cancer. (*J Korean Surg Soc* 2001;61:119-129)

**Key Words:** Diallyl disulfide, Garlic, MCF-7 breast cancer cell line, Apoptosis

**중심 단어:** 마늘, 유방암 세포주, 세포사멸

Department of Surgery, Pochon CHA University College of Medicine, <sup>1</sup>Department of Surgery, Sungkyunkwan University, Samsung Medical Center, <sup>2</sup>Molecular Therapy Research Center and <sup>3</sup>Department of Surgery, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

## 서 론

대부분의 인체에 발생하는 암은 환경 및 생활습관에 영향을 받으며 환경요인 중에는 우리가 평소 섭취하는 음식물이 암의 발생과 사망에 관여하고 있는 것으로 알려져 있고(1-3) 암 예방에도 관여하고 있는 것으로 추정된다. 그러나 구체적으로 어떤 음식, 어떤 성분이 암 발생을 유도하고 억제하는가 하는 것은 아직 모르는 부분이 더 많다. 그 중 마늘은 몇몇 연구자들에 의해 항암 효과가 있는 것으로 보고되었다. 특히 마늘은 우리 나라 사람들에 있어서 흔히 섭취하는 음식 중 하나로 신 등(4)에 의하면 한국 여성에서의 식이습관과 유방암 발생 위험과의 관련성

책임저자 : 박해린, 서울시 강남구 역삼 1동 650-9  
☎ 135-081, 포천중문의과대 강남차병원 일반외과  
Tel: 02-3468-3206, Fax: 02-558-1112  
E-mail: PHL1@netsgo.com  
접수일 : 2001년 8월 17일, 게재승인일 : 2001년 8월 22일  
본 논문의 요지는 2001년 춘계외과학술대회에서 구연되었음.

에 관한 연구에서 마늘이 유방암에 대한 보호효과가 있다고 하였으며 박 등(5)은 마늘 식이가 위암의 발생을 억제하는 효과를 보인다고 보고하였다.

마늘은 수용성 sulfur compound인 S-allyl-cysteine (SAC), S-ethyl-cysteine (SEC), S-propyl-cysteine (SPC)과 지용성 sulfur compound인 diallyl sulfide (DAS), diallyl disulfide (DADS), diallyl trisulfide (DATS) 등의 성분으로 구성되어 있는 물질로 Buiatti (6), Mei (7) 등은 역학 연구에서 마늘의 섭취량과 위암의 발생이 반비례하는 것으로 보고했다. 마늘의 항암 효과를 밝히기 위한 동물실험을 통한 in vivo 연구로 Wargovich 등(8)은 diallyl sulfide를 섭취시킨 74%의 쥐에서 dimethyl hydralazine (DMH)으로 유도된 대장, 직장선암의 생성이 억제되었으며 N-nitrosomethyl benzylamine (NMBA)에 유도되는 중앙생성이 완벽하게 예방되었음을 보고하였다. Xiyu 등(9)은 fresh garlic, diallyl trisulfide, 5-FU, mitomycin C, cis-DDP 등을 이용하여 위암 세포에 대한 항암 효과를 비교하였는데 mitomycin C가 가장 강력하였고 fresh garlic은 현저한 세포 사멸을 보였으며 diallyl trisulfide는 5-FU보다 강한 암세포 사멸을 가져왔다고 보고하였다. 1996년 Schaffer 등(10)은 Sprague-Dawley rat에 각각 garlic powder, 수용성S-allyl cysteine (SAC), 지용성 diallyl disulfide (DADS)를 2주간 경구로 섭취시킨 세 군과 섭취시키지 않은 대조군을 나누어 N-Methyl-N-nitrosourea (MNU)를 투여하여 비교 실험을 시행한 결과 MNU 투여 3시간 후 allyl sulfur compound를 섭취한 군의 간 조직과 유방 조직에서 MNU 유도 DNA alkylation 정도가 현저히 억제되었음을 보고하였으며, MNU 투여 23주 후 암 발생률에 있어서도 대조군에 비해 각각 76%, 41%, 53% 정도로 감소되었다고 보고하였다.

이러한 연구들에도 불구하고 아직 인간 유방암 세포에 대한 마늘의 항암효과에 대한 연구는 거의 희박한 편이어서 정립된 이론이 없으며 마늘이 유방암의 빈도를 낮추는데 공헌하고 있다는 역학 조사들은 있었으나 그에 대한 분자생물학적 기전은 확실히 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 인간 유방암 세포주 MCF-7 cell line을 사용하여 마늘의 essential oil의 60% 이상을 차지하는 DADS의 세포독성효과를 조사하였으며 독성효과로 인해 초래된 세포사에 대해 여러 실험을 시행하여 유방암세포의 세포주기에 미치는 영향 및 세포주기 조절 단백질의 발현에 미치는 영향을 분석함으로써 마늘의 항암효과 기전을 알아보하고자 하였고 세포사와 관련된 유전자들의 발현양상을 연구하고자 하였다.

## 방 법

### 1) 시약 및 항체

배지로 사용한 Dulbecco's minimum essential medium

(DMEM)과 fetal bovine serum은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Diallyl disulfide (DADS), Propidium iodide (PI), 3-(4-,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Bcl-2와 Bax에 대한 항체는 Oncogene research product에서 구입하였고  $\beta$ -actin과 Poly (ADP-ribose)polymerase(PARP)에 대한 항체는 Oncogene research products사와 Boehringer-Mannheim (Mannheim, Germany)사에서 각각 구입하였다.

### 2) 세포주 및 세포배양

본 연구에 이용된 유방암 세포주는 MCF-7 cell line으로 ATCC (American Type Culture Collection, MD, USA)로부터 분양받아 사용하였다. 이 세포주를 10% 우태아 혈청, 100 U/mL penicillin과 100  $\mu$ g/mL streptomycin이 함유된 DMEM을 기본 배양액으로 하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 항온, 항습 세포배양기에서 배양하였으며 주 2~3회 배지를 교환하였다. 계대배양은 Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 분리하였다.

### 3) 세포 독성 시험

DADS의 세포독성 효과를 알아보기 위하여 MCF-7 세포주에 다양한 농도의 DADS를 처치한 후 3일간 배양한 다음 MTT assay 방법을 이용하였다. 이 방법의 개요는 살아있는 미토콘드리아 효소는 MTT를 환원시켜 formazan을 형성시킬 수 있으므로 formazan의 농도를 ELISA 분석기로 흡광도 측정을 함으로써 생존한 세포의 수를 간접적으로 알 수 있어 약물을 처치한 세포와 처치하지 않은 대조군 세포의 흡광도를 구해 백분율로 세포 생존율을 표시하였다. 방법을 간략히 기술하면,  $1 \times 10^4$  세포를 200  $\mu$ l의 세포 배양액에 부유시킨 후 96-well microplate에 일정하게 넣은 후 세포를 안정시키기 위하여 하룻밤 배양시켰다. DADS를 DMSO에 녹여 다양한 농도로 각 well에 첨가하였고 대조군에는 약물이 없는 DMSO만을 첨가하였다. 이를 0, 8, 16, 24, 48, 72시간 간격으로 배양한 후 MTT 시약을 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 그 후 microplate를 200 g에서 10분간 원심분리하여 세포가 없는 상층액을 제거하고 DMSO를 200  $\mu$ l씩 각 well에 첨가하여 보라색 결정체(formazan crystal)를 녹인 후 ELISA 분석기를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 4) 세포사(apoptosis) 확인을 위한 위상차 현미경 검사 와 DAPI 핵 염색

DADS가 MCF-7에 대해 어떤 기전으로 세포 독성 효과를 일으키는지 확인하기 위해 우선적으로 DADS처리 후 변화된 세포의 모양을 위상차 현미경으로 세포를 관찰하였다. MCF-7 세포( $2 \times 10^5$  cell/ml)를 500  $\mu$ M DADS와 함께

48시간 배양 후 trypsin-EDTA를 이용해 세포 배양기(6 well plate)로부터 분리하였다. 분리한 세포를 200 g에서 5분 동안 원심 분리시킨 후 PBS로 한번 세척해 주고 위상차 현미경 관찰 후 그 세포를 각각 떨어뜨려 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)-methanol (1 µg/ml) 용액에 담근 후 37°C 암실에서 15분 동안 방치함으로써 핵이 염색될 수 있게 하였다. 염색이 끝난 후 세포를 90% glycerol을 포함한 mounting 용액에 부유시키고 형광 현미경 하에서 DADS를 처리하지 않은 대조군의 세포핵과 비교하였다.

**5) Flow cytometry를 이용한 세포사 검사: Annexin V와 PI 이중염색**

DADS에 의해 세포사가 유도된 세포들을 Flow cytometry를 이용하여 정량적으로 분석하였다. 첫째로, 세포사가 유도된 세포에서 나타나는 노출된 phosphatidyl serine (PS)을 annexin V를 사용하여 간접적으로 확인함으로써 시간 경과에 따라 세포사가 이루어진 세포의 비율을 측정하였다. 또한 이때 PI를 사용하여 necrosis가 된 세포도 측정될 수 있게 하였다. DADS에 의해 초래된 세포의 자연사(apoptosis) 군의 비율을 확인하기 위하여 Boehringer-Mannheim사의 Annexin-V-FLUOS staining kit을 사용하여 실험을 수행하였다. DADS를 처리한 5×10<sup>5</sup>개의 세포를 수확하여 PBS로 세척한 후 binding buffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>)로 부유시켰다. 그 부유된 세포액에 1 µg/ml Annexin V와 10 µg/ml PI를 첨가한 후 암실에서 15분 동안 방치함으로써 Annexin V와 PI가 세포 구성요소와 반응할 수 있게 하였다. 그 후 FACS로 반응 정도를 측정하였다.

**6) Sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 관찰**

Fan 등(11)의 방법에 따라 PI 염색을 수행하였다. 즉, 세포(1×10<sup>6</sup>)를 채취한 후 PBS로 세척한 다음 70% 에탄올로 고정 시켰다. 고정된 세포를 PBS로 부유시킨 후 100 µg/ml ribonuclease A와 50 µg/ml의 PI를 섞은 후 37°C 암실에서 30분 동안 반응시킴으로써 각 세포의 DNA를 염색시켰다. 염색 후 fluorescence activated cell analyzer (FACS, Beckton-Rick, USA)를 사용하여 각 세포의 “Sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>” 영역을 측정하였다.

**7) Bcl-2와 bax의 RNA 분리 및 RT-PCR 분석**

세포사의 modulator로 작용하는 분자인 bcl-2와 bax의 발현 양상이 어떻게 변하는지 RT-PCR과 Western blot방법을 사용하여 조사하였는데 총 RNA 분리를 위해 Ambion사의 RNAwiz를 사용하였다. 방법을 간략히 설명하면 1×10<sup>7</sup>개 세포에 RNAwiz용액 1 ml를 첨가하여 균질화시킨 후 chloroform 200 µl를 첨가한 뒤 4°C 10,000×g로 30분간 원심 분리하여 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는

isopropanol를 사용하여 원심 분리함으로써 정제하였고 정제한 총 RNA는 50 µl의 diethylpyrocarbonate (DEPC)-water에 용해시켜 흡광 측정기로 광학 밀도(Å 260/280)를 측정하여 RNA의 함량과 순수성을 평가하였다. 다음으로 cDNA 합성을 위해 RNA 2 µg을 random hexamer 1 µg (100 pmol), MMLV (Moloney Murine Leukemia virus) reverse transcriptase 1 µl (20×10<sup>3</sup> U/ml Boehringer mannheim, Germany), 5X cDNA buffer, 15 mM dNTP 1 µl, Rnase inhibitor 0.5 µl (50 U/ul)와 혼합하여 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이렇게 합성된 cDNA를 template로 하여 분석하고자 하는 3'과 5'primer를 각각 20 pmol씩 넣고 Taq polymerase 0.5 µl (1 U/µl, Boehringer Mannheim Co, Germany), 10X PCR buffer 5 µl, 15 mM dNTP 1 µl, cDNA 5 µl를 넣어 총 50 µl가 되도록 DEPC-water로 조절하였다. PCR은 DNA thermocycler (Perkin-Elmer-Cetus Co, CA, USA)를 사용하여 94°C 1분, 57°C 1분, 72°C 1분을 1cycle로 하여 30 cycles을 실시하여 증폭하였다. 그리고 β-actin을 internal control로 사용하여 반정량적인 분석에 사용하였다.

**8) Western blot 분석**

DADS에 의해 유도된 자연사의 세포내 기전을 규명하기 위하여 자연사와 관련되어 있는 단백질의 변화와 발현 양상을 조사하였다. 우선 116 kDa DNA 결합 단백질인 PARP가 DADS에 의해 cleavage 되는지 여부를 확인하였고 bcl2와 bax의 발현 양상을 단백질 수준에서 알아보려고 하였다. 세포(5×10<sup>5</sup>)를 500 µM DADS와 함께 0, 8, 16, 24, 48, 72시간 동안 배양한 다음 수확하여 lysis buffer [10 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 5 mM EDTA, 5 mM Na azide, 10 mM NaF, 1 mM Na-ortho-vanadate, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml lupeptin, 10 µg/ml pepstain, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]를 이용하여 세포막을 파괴시켰다. 그리고 파괴된 세포액은 10,000 g에서 30분 동안 원심분리 후 상층액을 얻었고 상층액속에 함유된 단백질량은 소 혈청 알부민을 표준으로 이용해서 Bradford 방법으로 정량하였다. 각 검체로부터 50 µg의 단백을 sample buffer (20% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 4% SDS, 125 mM Tris, pH 6.8, 0.1 mg bromophenol blue)에 용해시켜 100°C에서 5분간 끓인 후 10% 또는 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 100 V로 120분간 전기영동하였다. 전기영동 후 gel에 존재하는 단백을 electroblotting 방법으로 polyvinylidene difluoride (PVDF) 막에 옮겼다. 비특이적인 결합을 차단하기 위하여 PVDF 막을 5% 탈지분유를 함유한 PBS-tween (PBS-T) 용액에 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 1차 항체를 희석하여 막과 1시간 동안 반응시켰고 이때 사용한 1차 항체에 대해서, 생쥐 단클론 항체 PARP은 1 : 1,000으로 희석하였고, 생쥐 단클론 항체 bcl-2는 1 µg/

ml, bax는 2  $\mu\text{g/ml}$ , 토끼 단클론 항체  $\beta\text{-actin}$ 은 1 : 5,000으로 희석하여 사용하였다. 1차 항체 반응 후 PBS-T로 막을 충분히 세척하였고 다시 horse radish peroxidase와 결합되어 있는 2차 항체와 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 마찬가지로 막을 PBS-T로 충분히 세척하였다. 이렇게 면역 반응을 거친 각각의 막을 Amersham사의 ECL system을 사용하여 film에 감광시켰다.

**9) DADS가 정상 인간 섬유모세포에 미치는 효과에 관한 연구**

DADS가 MCF-7 유방암 세포주에 대하여 세포독성 효과를 보인다는 사실에 견주어 정상세포에 대해서는 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해 정상 인간 섬유모세포를 세포배양하여 세포독성 실험을 하였다. MCF-7 세포주에 대해 사용했던 DADS 농도 즉 0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$ 의 DADS를 섬유모세포에 처리한 후 MTT assay와 flow cytometry에 의한 세포사 분석을 시행하여 유방암 세포주에서 보였던 결과와 비교하였다.

**결 과**

**1) DADS가 MCF-7 세포주에 미치는 세포 독성에 대한 영향**

Fig. 1A에서 보여 주는 바와 같이 DADS에 의한 세포 독성 효과는 농도 의존적으로 증가하여 750  $\mu\text{M}$ 에서 가장 현저히 세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났으나 세포 성장 억제비율은 500  $\mu\text{M}$ 에서 가장 크게 나타났다. 또한 다양한 시간 동안 DADS를 세포에 노출시켰을 때 시간 의존적으로 그 효과가 증가하여 72시간에 가장 독성효과가

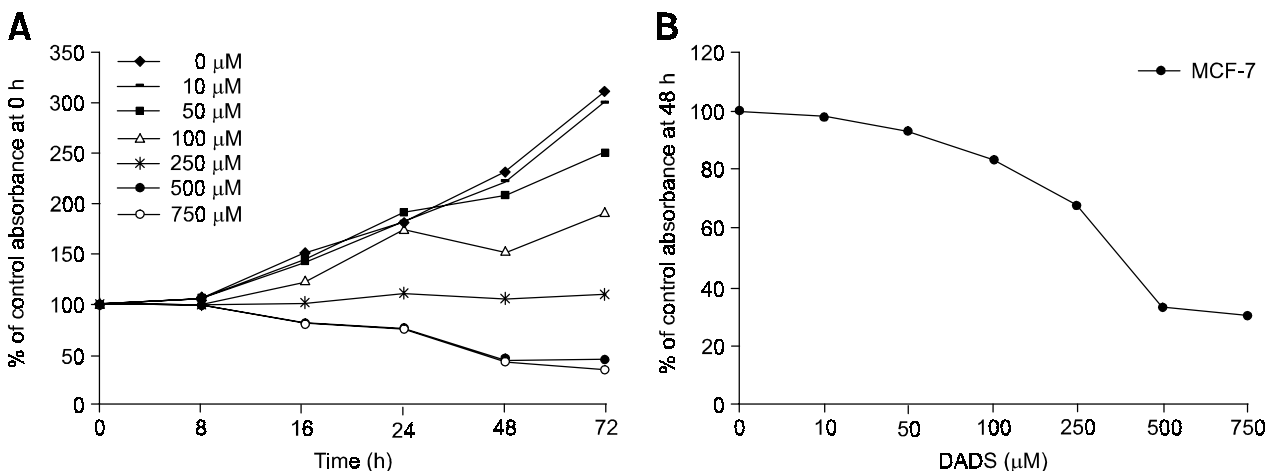
강하였으나 세포 성장 억제 비율은 48시간 동안 노출시켰을 때 가장 크게 나타났다. 결론적으로 Fig. 1B에서 보는 바와 같이 MCF-7에 나타난 DADS에 의한 세포독성 효과는 500  $\mu\text{M}$  농도에서 48시간 동안 노출시켰을 때 가장 컸음을 알 수 있었다.

**2) DADS에 의한 MCF-7 세포 핵과 세포질의 모양 변화**

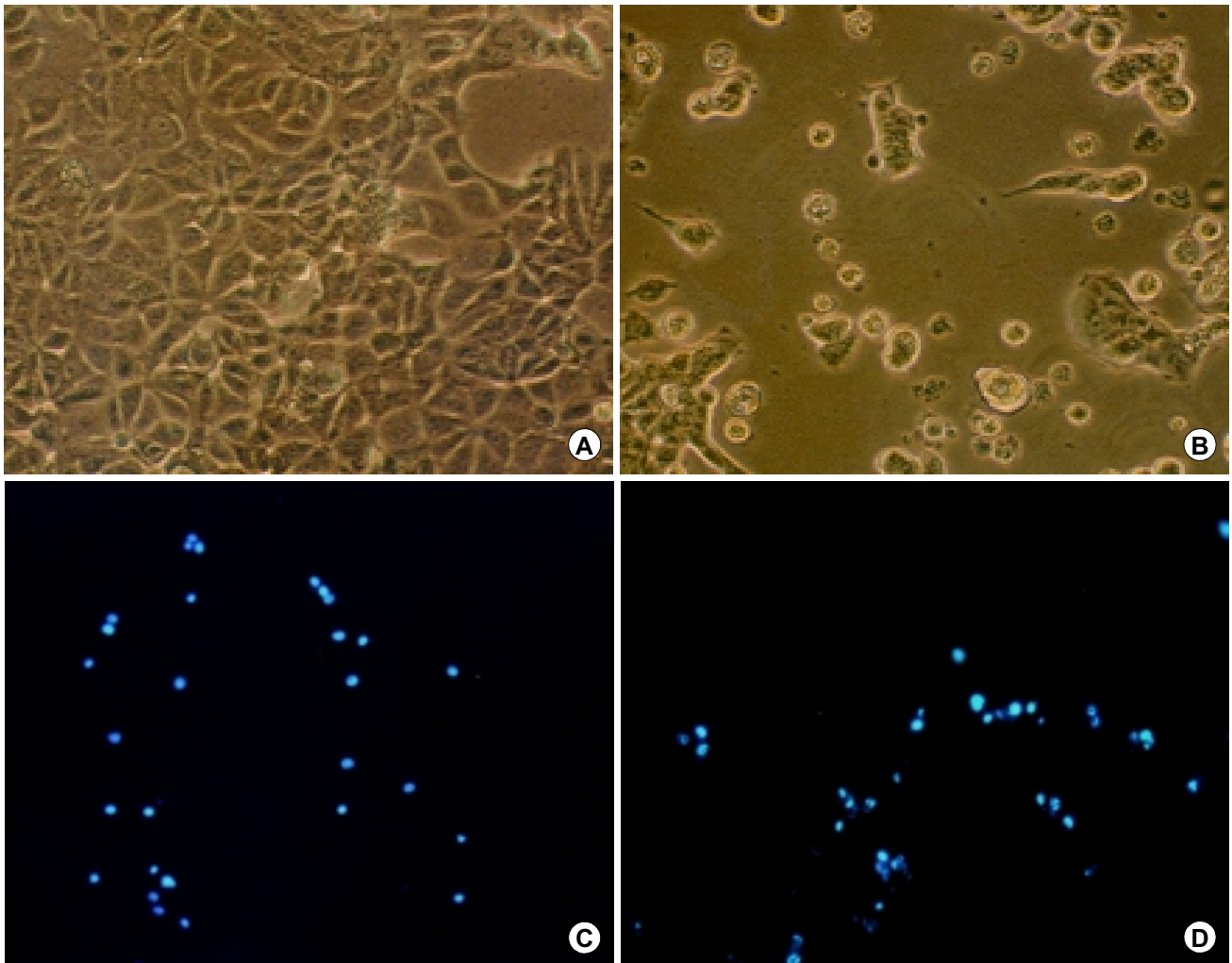
세포독성 효과를 가장 크게 보인 500  $\mu\text{M}$  DADS를 세포에 48시간 노출시킨 후 위상차 현미경으로 관찰한 결과 대조군 세포의 모양이 전형적인 상피세포 형을 유지하고 있는 반면(Fig. 2A) DADS에 노출된 세포의 모양은 위축되었거나 부정형 또는 둥근 형으로 바뀌었고 전형적인 apoptosis 세포의 특징인 세포 blebbing 현상을 보였다(Fig. 2B). 그리고 세포사가 된 세포의 다른 특징인 DNA 분절 현상이 일어나는지 확인하기 위하여 형광 DNA 염색액인 DAPI를 사용하여 핵을 염색한 후 형광 현미경으로 관찰한 결과 대조군 세포의 핵은 둥글고 완전하며 분절되지 않은 반면(Fig. 2C), DADS를 처리한 세포의 핵은 비교적 작고 모양이 일정하지 않으며 분절된 형태로 나타났다(Fig. 2D).

**3) Flow Cytometry에 의한 세포사 분석**

세포사멸 분석 결과 500  $\mu\text{M}$  DADS 처리 후 12시간에 세포사멸이 진행된 세포는 4.2%였고 24시간 후는 63%, 48시간 후는 75%로 그 비율이 증가하였다(Fig. 3). 반면 괴사가 일어난 세포의 비율은 48시간 노출시 9.1% 증가하는 것에 그쳤다(Fig. 3. 오른쪽 위 panel). 다음은 세포를 알코올로 고정한 후 PI 염색액을 이용해 핵을 염색함으로써 DNA 양을 측정하였는데 DADS 처리 후 분석 총 세포수에 대한 세포사멸 분석의 비율이 12시간에 17.8%에서 24



**Fig. 1.** Time (A) and dose (B) dependent induction of cell death by DADS in MCF-7 cells. Growth inhibition induced by DADS was detectable after 16 hours and the maximum effect was observed at 48 hours with 500  $\mu\text{M}$  DADS which inhibited cell growth up to 65%.



**Fig. 2.** Effect of DADS on morphology of MCF-7 breast cancer cells (phase-contrast microscopy and DAPI staining). Untreated cells displayed typical epithelial cell patterns: a cluster of cells growing in a polygonal shape (A). Within 48 hours of treatment with 500 mM DADS, cells were changed in morphology, including shrinkage, irregular shape and surface blebbing (B). Nuclei of untreated cells maintained normal nuclear morphology (C), whereas nuclei of DADS treated cells became condensed and fragmented (D).

시간 후 33%, 48시간 후 57.9%로 나타났다(Fig. 4).

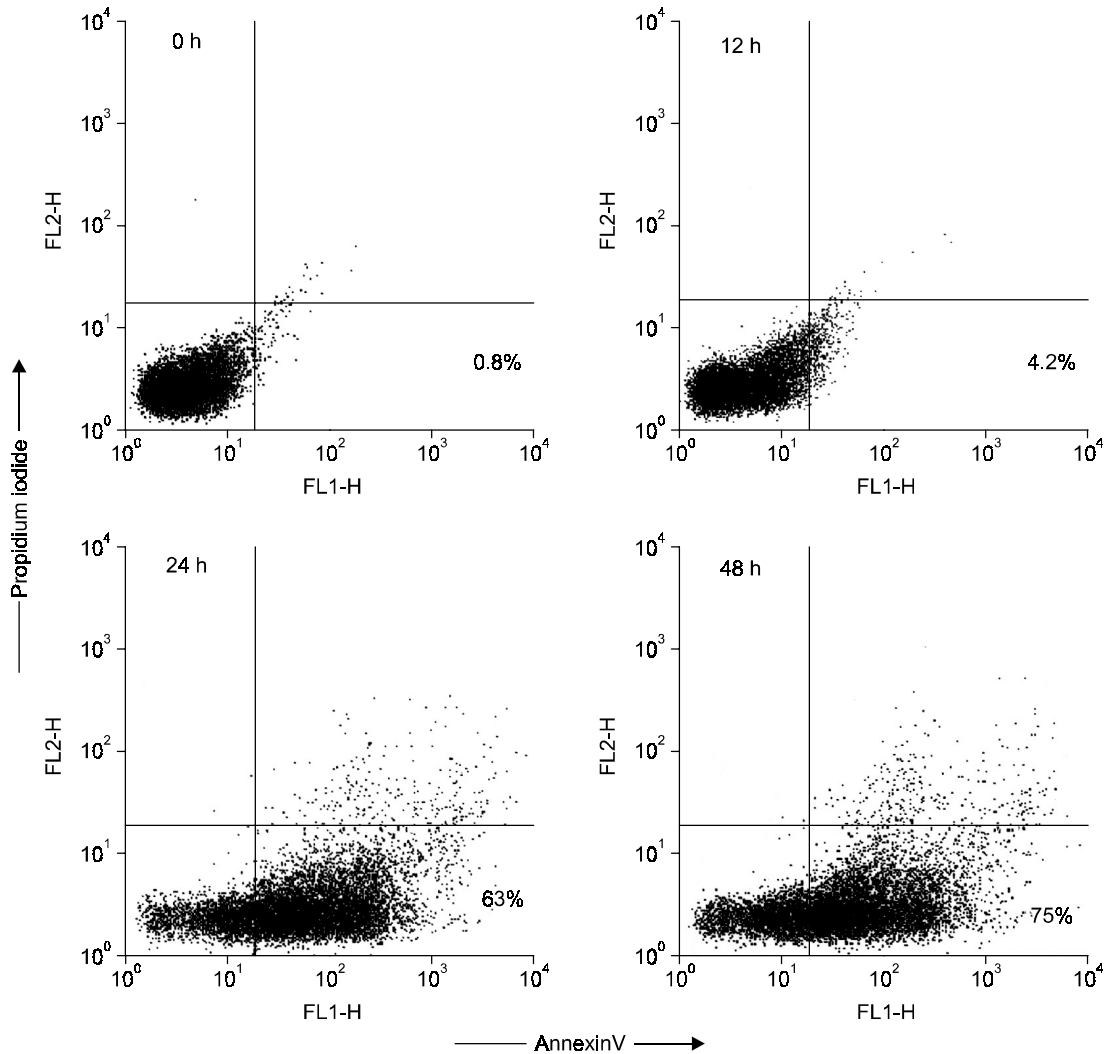
#### 4) DADS가 MCF-7 세포 내 PARP cleavage와 bcl-2, bax의 발현 양상에 미치는 영향

우선 116 kDa DNA 결합 단백질인 PARP가 DADS에 의해 cleavage 되는지 보았는데 Fig. 5에서 보여주는 바와 같이 DADS 처리 후 12시간부터 85 kDa fragment가 나타남을 확인할 수 있었다. 이 cleaved form 단백질은 시간이 경과함에 따라 그 양이 증가하였고 원래 단백질인 116 kDa PARP는 비례적으로 그 양이 감소하는 양상을 보였다(Fig. 5B). 또한 apoptosis의 modulator로 작용하는 분자인 bcl-2와 bax의 발현 양상이 어떻게 변하는지 RT-PCR과 Western blot방법을 사용하여 조사하였는데 Bcl-2

의 경우 RNA level이 DADS 처리 72시간 후에 70%까지 감소하였고(Fig. 6A), 단백질 발현 또한 RNA와 동일한 비율로 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 6B). 그러나 bax의 경우는 RNA와 단백질 모두의 발현에 변화가 거의 없었다(Fig. 7).

#### 5) DADS가 MCF-7 세포주와 정상 인간 섬유모세포에 미치는 효과에 대한 비교

DADS를 섬유모세포에 처리한 후 MTT assay를 통해 분석한 결과 MCF-7 세포가 100  $\mu$ M에서 세포독성효과를 보이기 시작하여 500  $\mu$ M에서 가장 높은 세포성장억제 효과를 보였던 반면 섬유모세포의 경우에는 500  $\mu$ M에서조차도 10% 이내의 미약한 세포독성 효과를 나타내었다(Fig.



**Fig. 3.** Flow cytometry analysis of FITC-AnnexinV and PI double staining. Apoptotic cell population with FITC-AnnexinV+/PI+ was dramatically increased from 0.8% at 0 hour to 75% at 48 hour after exposure to 500  $\mu$ M DADS in MCF-7 cells.

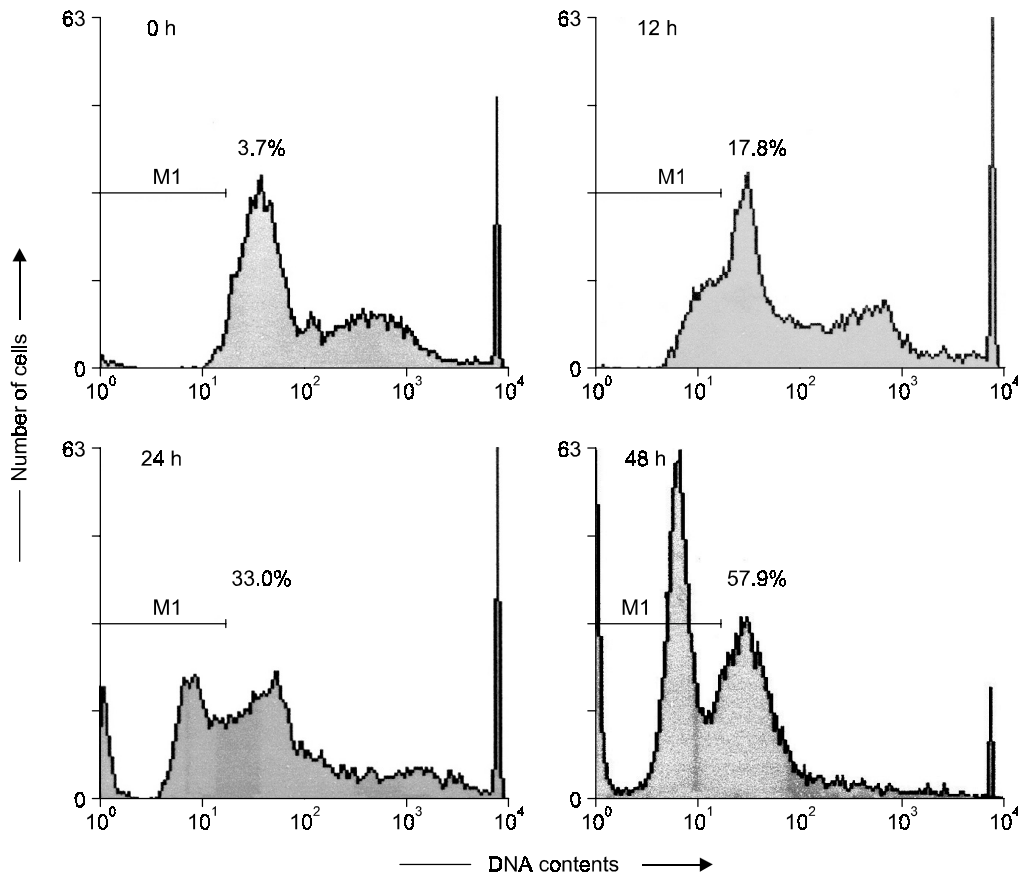
8). 이런 효과를 재 증명하기 위해 flow cytometry에 의한 apoptosis를 분석하였는데 Fig. 9에서 보는 바와 같이 DADS 500  $\mu$ M 농도에서 MCF-7세포의 경우 72% (panel B)의 세포사를 보여준 반면 섬유모세포의 경우 같은 조건에서 15% (panel D) 정도의 세포사를 일으키는 것에 그쳤다.

### 고 찰

마늘의 필수지방(essential oil)의 60% 이상을 차지하는 DADS는 지용성 황화합물로서 세포의 성장을 억제하거나 세포사를 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 MCF-7 세포주에 대한 DADS의 세포 증식억제 효과는 50  $\mu$ M까지는 대조군에 비해 별차이가 없었으나 100  $\mu$ M에서부터 세포의 성장이 억제되는 것을 볼 수 있었으며 500  $\mu$ M에서부터 현저히 세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났

다. 다양한 시간 동안 DADS를 세포에 노출 시켰을 때 시간 의존적으로 그 효과가 증가하였고 48시간에 세포 성장 억제 비율이 가장 크게 나타나 DADS에 의한 세포 증식억제 효과는 500  $\mu$ M 농도에서 48시간 동안 노출시켰을 때 가장 현저히 나타났음을 알 수 있었다.

기존에 알려졌던 세포사멸의 형태인 세포괴사(necrosis)와 대별되는 shrinkage necrosis라고 명명되었던 능동적 세포의 사멸을 1972년 Kerr 등(12)이 세포사(apoptosis)로 명명하였으며 최근에는 세포예정사(programmed cell death)라고도 부르고 있는데 세포사멸의 특징적 소견은 세포크기의 축소, 세포막표면에서 세포막으로 싸여져 있는 용기가 돌출하는 현상(membrane blebbing), 세포내용물이 세포로부터 떨어져 나온 apoptotic body, 핵의 염색사 응축(chromatin condensation), 핵의 분절(nuclear fragmentation) 등이 있다. 본 연구에서는 DADS의 증식억제 기전이 자연사에

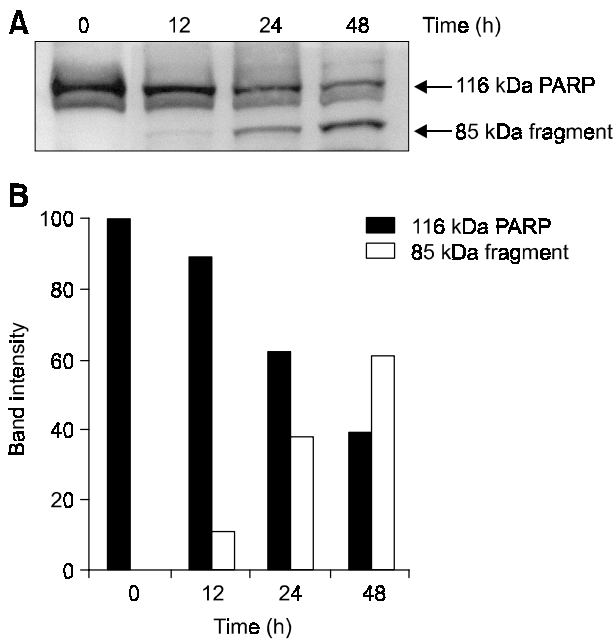


**Fig. 4.** Flow cytometry analysis with PI staining reveals that the percentage of apoptotic cells with subdiploid DNA staining (region M1) were increased in time dependent manner.

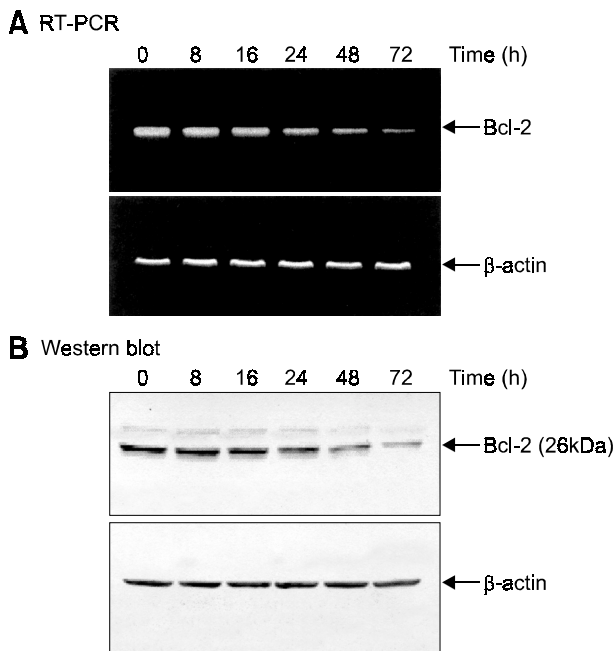
의한 것인지를 알아보기 위해 세포 증식억제 효과를 가장 크게 보인 500  $\mu$ M DADS를 세포에 48시간 노출시킨 후 위상차 현미경으로 세포를 관찰하였다. 대조군 세포의 모양이 전형적인 상피세포 형을 유지하고 있는 반면 DADS에 노출된 세포는 크기가 축소되고 부정형으로 바뀌었고 세포막으로부터 용기가 돌출되는 현상인 membrane blebbing 및 세포내용물이 세포로부터 떨어져 나온 apoptotic body를 볼 수 있었다. DNA 염색액인 DAPI를 사용하여 핵을 염색한 결과 apoptosis가 된 세포의 또 다른 특징인 DNA 분절 현상이 나타나는 것을 발견하였다. Apoptosis의 초기단계에서 나타나는 세포표면의 변화 중 하나인 세포막 내벽에서 외벽으로의 phosphatidylserine (PS)의 translocation으로 인하여 세포막표면에 노출된 PS가 annexin V에 결합하는 것을 간접적으로 확인함으로써 DADS에 의해 세포사가 유도된 세포들을 정량적으로 분석하였는데 500  $\mu$ M DADS 처리 후 12시간에 세포사가 진행된 세포는 4.2%였고, 24시간 후는 63%, 48시간 후는 75%로 그 비율이 증가하였다. 또한 괴사가 된 세포도 세포막의 integrity를 잃음으로써 PS가 세포막에 노출되는데 이때 propidium iodide를 사용하여 자연사가 된 세포와 구별하여 별도로

측정할 수 있는데 괴사가 일어난 세포의 비율은 48시간 노출시 9.1% 증가하는 것에 그쳤음을 알 수 있었다. 이러한 실험결과에서 DADS의 MCF-7 유방암 세포주에 대한 세포증식억제 기전은 시간 및 농도 의존적 자연사에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

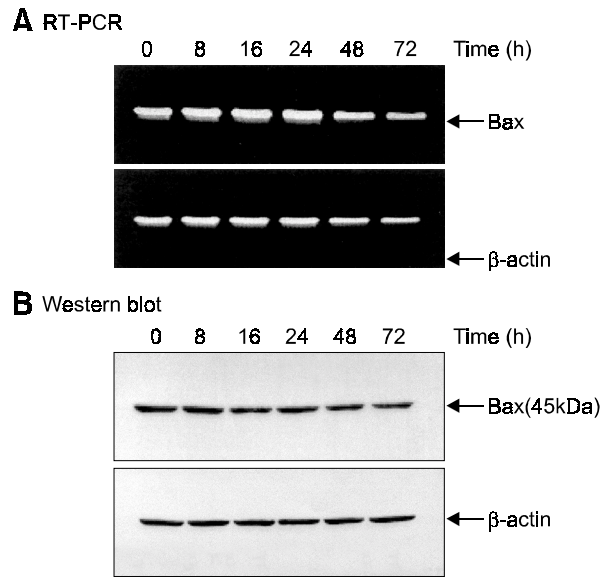
최근 단백질 분해 기능을 가지면서 세포사멸의 신호를 실행하는 유전자로서 단백질 분해 효소 cysteine protease의 가족인 caspase가 알려져 있으며 이들은 단백질내의 aspartate 장기를 포함하여 특정부위를 절단하는 특징을 가지고 있는데 세포사멸의 신호를 받게 되면 caspase 계열이 활성화되는 cascade를 거치게 되고 최종적으로 활성화된 caspase-1, -3 및 4 등이 세포 내 중요 단백질 즉 생존신호에 관련된 단백질을 불활성화시키고 세포사멸의 억제기능에 참여하는 단백질의 경우에는 절단함으로써 세포사멸을 실행하는 것으로 밝혀져 있다. 이러한 단백질 중 하나인 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)는 DNA strand breaks에 대한 반응으로 NAD로부터 poly (ADP-ribose)를 생산하는 DNA repair 관련 효소로서(13) DNA 복제(replication)(14)와 전사(transcription)(15) 등의 과정에 관련되어 있다. PARP는 거의 대부분의 apoptosis 형태에서 절단되는 기



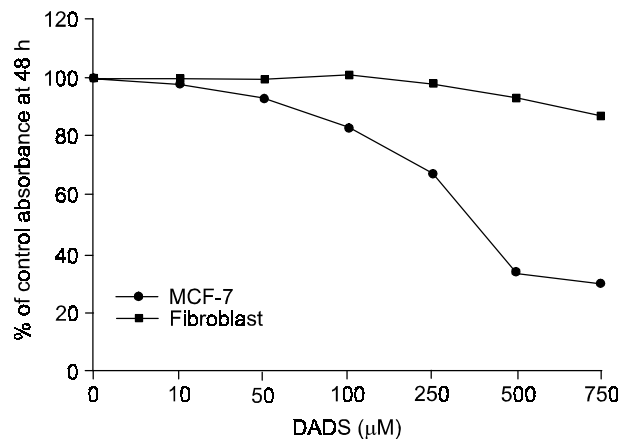
**Fig. 5.** Immunoblotting analysis revealed that DADS-triggered apoptotic signal leads the proteolytic cleavage of PARP. 500  $\mu$ M DADS induced cleavage of PARP into its fragmented form p85 at 12 hours after exposure and the portion of cleaved fragment was increased in time dependent manner.



**Fig. 6.** RT-PCR and Western blot analysis for bcl-2. mRNA expression level of bcl-2 was decreased in DADS exposed cells and the reduction of bcl-2 was by 70% after 72 hour treatment (A). The protein expression level of bcl-2 was decreased in the same way as mRNA (B).



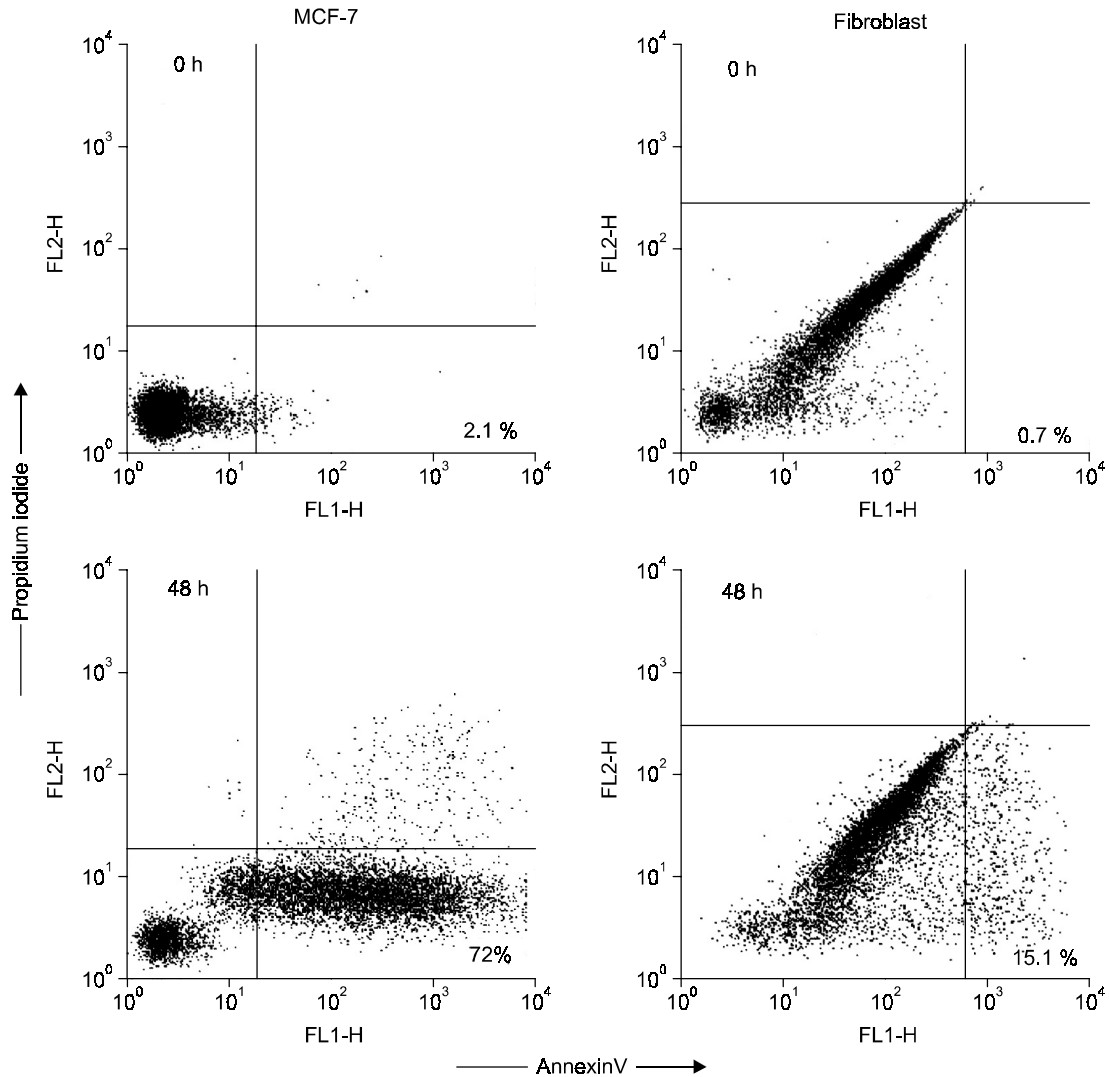
**Fig. 7.** RT-PCR and Western blot analysis of Bax. There was no significant change in expression of Bax mRNA and protein.



**Fig. 8.** Comparison of growth inhibition effect of DADS on normal fibroblast and MCF-7 cells by MTT assay. Normal Fibroblast exposed to DADS showed slight growth inhibition (10%) even in 500  $\mu$ M DADS. However, in MCF-7 cells maximum effect up to 65% was observed at 48 hours with 500  $\mu$ M DADS.

질로서 caspase에 의해 초기에 절단되는 기질 중의 하나이다.(16,17) Germain 등(18)에 의하면 in vitro에서는 caspase-1을 비롯한 거의 모든 caspases들이 PARP를 절단하여 24-와 89-kDa의 세포사멸 절편으로 전환할 수 있지만 in vivo에서는 caspase-3와 7만이 PARP의 절단에 관련이 있는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 자연사를 확인하기 위해 116 kDa DNA 결합 단백질인 PARP의 cleavage 여부를 확인하였는데 DADS 처리 후 12시간부터 116 kDa fragment의 양이 감소하는 양상을 보였으며 대신 cleaved form





**Fig. 9.** Apoptotic cell population with FITC-AnnexinV+/PI+ was increased from 0.7% at 0 hour to 15.1% at 48 hour after exposure to 500  $\mu$ M DADS in fibroblast, whereas 2.1% at 0 hour to 72% at 48 hours in MCF-7 cells.

단백질인 85 kDa fragment가 시간이 경과함에 따라 비례적으로 그 양이 증가하였음을 알 수 있었다. 또한 Germain 등(18)은 그들의 실험에서 caspase-7이 caspase-3에 비해 훨씬 효율적으로 PARP 절단에 관여한다고 주장하였고 본 연구에 사용된 세포주는 caspase-3 결핍 MCF-7 cell line이므로 마늘의 성분인 DADS는 caspase-7의 활성화를 유도하여 PARP를 cleavage 시킴으로써 apoptosis가 초래하였을 것으로 생각된다.

최근까지 마늘이 가지고 있는 항암효과에 관한 여러 연구에도 불구하고 마늘이 어떠한 생화학적 기전을 통해 암 억제 능력을 발휘하는지 정확히 밝혀져 있지 않은데 1988년 Sadhana 등(19)과 1989년 Belman 등(20)은 DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene)에 의해 유도된 nude mouse의 피부암에서 마늘에서 추출한 sulfhydryl이 epidermal lipoxigenase와 ornithine decarboxylase의 활성도를 떨어뜨려 tumor

promoter의 초기 사건인 phospholipid의 phosphorylation을 억제함으로써 항암 효과를 발휘하였다고 하였다.

1986년 Lau 등(21)은 쥐의 방광에 발생시킨 transitional cell carcinoma에 대해 25 mg의 garlic extract를 intralesional route와 intraperitoneal route로 나누어 투여 비교하였는데 intralesional 치료가 종양 성장 억제 작용이 훨씬 강하였고 대식세포와 림프구 생성의 증가와 이들에 의한 종양세포 세포독성파괴를 볼 수 있었다고 하며 이들의 작용은 TNF 등 lymphokine의 생성 증가에 의한 NK cell 활성도의 증가와 관련이 있어 마늘 추출물의 면역치료 효과를 제시하였다. 1995년 Sundaram 등(22)은 DADS가 Ca<sup>2+</sup>-ATPase의 활성도를 낮추어 세포 내 calcium농도의 지속적인 상승을 유도함으로써 자연사를 포함한 여러 치명적 암 세포소멸 과정을 촉진시킨다고 하여 DADS에 의한 calcium homeostasis의 변화가 종양세포의 성장억제 및 세포독성(growth

inhibition/cytotoxicity)과 관련이 있다고 하였다. 1996년 Singh 등(23)은 nude mice에서 DADS가 H-ras oncogene transformed tumor의 성장을 억제하였다고 보고하였는데 이들에 의하면 DADS를 경구 섭취한 쥐에서 대조군에 비해 종양 조직 내 p21 H-ras level이 현저히 감소한 것을 관찰하였으며 더욱이 간 조직과 종양 조직내 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase의 현저한 억제를 보여 DADS의 투여로 인한 항암효과가 p21 H-ras membrane association의 억제와 관련이 있다고 하였다. 또한 마늘의 항암 효과 작용 기전은 carcinogen 생성의 변화(24)와 간의 phase I (p450)과 phase II enzyme에 의한 bioactivation의 변화(25) 즉 allyl sulfide가 간의 phase I 효소 생성을 증가시켜 발암물질 생성을 억제함으로써 항암 작용을 할 것으로 보는 견해도 있다. 최근 Zhang 등(26)은 MCF-7 세포주에 대한 tamoxifen의 항암작용이 bcl-2의 down regulation에 의한 apoptosis에 의해 유도된다고 보고하였다. 인간의 림프종의 발생과 밀접하게 관련된 것으로 알려진 proto-oncogene인 bcl-2는 1988년 Vaux 등(27)에 의해 처음으로 조혈세포에 의해 유도된 세포사멸을 방지하는 것으로 밝혀졌으며 Hockenbery 등(28)이 bcl-2의 세포사멸억제 기능이 세포사멸(programmed cell death)와 직접적인 관련이 있음을 보고하였다. 최근 bcl-2와 구조적으로 유사한 많은 단백질들이 bcl-2 family로 구성되어 있는데 일부는 bcl-2와 같이 자연사를 억제하여 세포사멸 억제 단백질로 분류되며 bax 등은 자연사를 촉진하는 세포사멸 촉진 단백질로 구분된다. 정상상태에서 bcl-2와 bax는 이형중합체(heterodimer)로 존재하며 radiation injury, 세포독성 항암치료 등의 스트레스에 의한 DNA damage를 받으면 p53 단백질이 up-regulation되고 이로 인하여 세포 내 bax의 발현이 증가되어 bax homodimer 쪽으로 평형이 기울면 bax와 bcl-2가 이형중합체를 형성하고 남은 bax 간에는 동형중합체(homodimer)를 형성하게 되어 세포는 사멸된다. 반대로 bcl-2가 많이 존재하면 잉여의 bcl-2간에 동형중합체를 형성하여 세포사멸이 억제된다. 이러한 bcl-2/bax heterodimer complex의 비율이 50% 이하로 떨어지게 되면 세포사가 진행될 수 있다. DNA damage는 p53의 up-regulation을 초래하고 p53은 p21 의존성 세포주기 중 G1 phase arrest를 가져와 S와 M phase로 들어가기 전 DNA 복구가 가능하도록 시간을 연장시켜주며 p53에 의해 활성화된 DNA 수복 단백질(Gadd45)에 의해 DNA repair가 완료되면 다시 세포가 증식하기 시작한다. DNA 손상이 심각하여 수복할 수 없는 상태가 되면 p53 단백질은 자연사를 일으키는데 이러한 p53의 G1 주기 checkpoint 역할에 대해 'guardian of genome'으로 명명되었다. 또한 p53은 bax 유전자의 활성화나 bcl-2의 불활성화를 직접 유도하여 자연사를 유도하는 것으로 보고되고 있다.(29) 본 연구에서 bcl-2와 bax의 발현 양상이 어떻게 변하는지 RT-PCR과 Western blot방법

을 사용하여 조사 한 결과 bcl-2의 경우 RNA level이 DADS 처리 후 72시간 후에 70%까지 감소하였고 단백질 발현 또한 RNA와 동일한 비율로 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 bax의 경우는 RNA 수준과 단백질 수준에서의 발현에 변화는 거의 없었음을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 bcl-2의 down regulation이 자연사 억제를 저해하고 마늘에 의해 초래되는 자연사에 있어서 결정적 역할을 담당하는 것임을 보여준다고 할 수 있겠다.

DADS가 MCF-7 유방암 세포주에 대하여 세포독성 효과를 나타내는데 반해 정상 인간 섬유모세포에서는 세포독성 효과가 경미하였는데 MCF-7 세포주에 대해 사용했던 DADS 농도를 섬유모세포에 처리한 후 MTT assay를 통해 분석한 결과 MCF-7 세포가 100  $\mu$ M에서 세포독성효과를 보이기 시작하여 500  $\mu$ M에서 가장 높은 세포성장억제 효과를 보였던 반면 섬유모세포의 경우에는 500  $\mu$ M에서조차도 10% 이내의 미약한 세포독성 효과를 나타내었다. Flow cytometry에 의한 apoptosis를 분석한 결과 DADS 500  $\mu$ M 농도에서 MCF-7 세포의 경우 72%가 세포사를 보여준 반면 섬유모세포의 경우 같은 조건에서 15% 정도의 세포사를 일으키는 것에 그쳐 DADS가 정상 세포 사멸을 초래하지는 않는 것을 알 수 있었다.

## 결 론

유방암 세포주(MCF-7)에 DADS를 투여하는 경우 caspase-7의 활성화가 초래되고 이에 의한 PARP의 cleavage가 일어나는 caspase-dependent pathway를 통해 세포사멸이 이루어지는 것으로 생각된다. 또한 DADS는 bcl-2를 직접 down-regulation함으로써 bcl-2/bax의 비율의 감소를 가져와 세포사멸을 유도하는 것으로 생각된다. 이 연구는 마늘이 유방암 세포에 대해 항암효과를 가지고 있음을 증명하였을 뿐만 아니라 예방적 복용을 통한 유방암 예방의 이론적인 근거를 제시하였다고 판단되며 신선한 마늘이나 그 성분이 암 예방 기능뿐 아니라 술 후 보조요법의 하나로 항암제나 호르몬 요법과 병합 사용하여 항암효과를 상승시키는 역할에 기여할 수 있으리라 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Doll R. The lessons of life: Keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res* 1992;52:2024s-9s.
- 2) Milner JA. Mechanisms for nutritional inhibition of carcinogenesis. In *Nutrition and Cancer Prevention: Investigating their Role in Cancer*. Marcel Dekker, New York; 1989. p.54-84.
- 3) Potter JD. Epidemiology of diet and cancer: evidence of human maladaptation. In *Macronutrients: Investigating their Role in Cancer*. Marcel Dekker, New York; 1992. p.55-84.
- 4) Shin MH. Case-Control study about the relation between the

- habit of food intake and the risk of breast cancer incidence in Korean Women. *J Korean Med Assoc* 1999;42:564-73.
- 5) Park HS, Kim HS, Choi SY, Jung CK. The investigation about the effect of food to the development of stomach cancer. *J Korean Epidem* 1998;20:82-101.
  - 6) Buiatti V, Pall D, Decarli A, Amadiro D, Avellini C, Bianchi S, et al. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int J Cancer* 1989;44:611-6.
  - 7) Mei X, Wang ML, Han N. Garlic and gastric cancer: The inhibitory effect of garlic on the growth of nitrate reducing bacteria and on the production of nitrite. *Acta Nutrimenta Sinica* 1985;7:173-6.
  - 8) Wargovich MJ. Diallyl sulfide, a favor component of garlic (*Allium sativum*), inhibits dimethylhydralaxine-induced colon cancer. *Carcinogenesis* 1987;8:487-9.
  - 9) Xiyu P. Comparison of the cytotoxic effect of fresh garlic, diallyl trisulfide, 5-florouracil (5-FU), mitomycin (MMC), and cis-DDP on two lines of gastric cancer cells. *Chung Hua Chung Liu Tsa, Chih* 1985;7:103-5.
  - 10) Schaffer EM, Liu JZ, Green J, Dangler CA, Milner JA. Garlic and associated allyl sulfur 1996;19:199-204.
  - 11) Fan S, Smith ML, Rivet II DJ, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, et al. Disruption of p53 function sensitize breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylling. *Cancer Res* 1995;55:1649-54.
  - 12) Kerr JKR, Wyllie AH, Curie AR. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
  - 13) Satoh MS, Poirier GG, Lindahl T. Dual function for poly (ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry* 1994;14:7099-106.
  - 14) Yoshida S, Simbulan CM. Interaction of poly (ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha. *Mor Cell Biochem* 1994;138:39-44.
  - 15) Oei SL, Griesenbeck J, Ziegler M, Schweiger M. A novel function of poly (ADP-ribosyl)ation: silencing of RNA polymerase II-dependent transcription. *Biochemistry* 1998;10:1465-9.
  - 16) Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) Polymerase: an early marker of chemotherapy induced apoptosis. *Cancer Res* 1993;1:3076-985.
  - 17) Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, et al. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995;2:801-9.
  - 18) Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG. Cleavage of automodified poly (ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence of involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 1999;274:28379-84.
  - 19) Sadhana AS, Rao AR, Kucheria K, Bijani V. Inhibitory action of garlic oil on the initiation of benzopyren induced skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett* 1988;40:193-7.
  - 20) Belman S, Solomon J, Segal A, Block E, Nad Barany G. Inhibition of soybean lipoxygenase and mouse skin tumor promotion by onion and garlic components. *J Biochem Toxicol* 1989;4:151-60.
  - 21) Lau BHS, Woolley, Marsh CL, Barker GR, Koobs DH, Torrey RR. Superiority of intralesional immunotherapy with *Corynebacterium parvum* and *Allium sativum* in control of murine transitional cell carcinoma. *J Urol* 1986;136:701-5.
  - 22) Sundaram SG, Milner JA. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1996;17:15-20.
  - 23) Singh SV, Mohan RR, Agarwal R, Benson PJ, Hu X, Rudy MA, et al. Novel anti-carcinogenic activity of an organosulfide from garlic: inhibition of H-ras oncogene transformed tumor growth in vitro by diallyl disulfide is associated with inhibition of p21H-ras processing. *Biochem Biophys Research Communications* 1996;225:660-5.
  - 24) Dion ME, Agler M, Miler JA. S-allyl cysteine inhibits nitrosomorpholine formation and bioactivation. *Nutr Cancer* 1997; 28:1-6.
  - 25) Schaffer EM, Liu JZ, Milner JA. Garlic powder and allyl sulfur compounds enhance the ability of dietary selenite to inhibit 7, 12-dimethyl-benzanthracene-induced mammary DNA adducts. *Nutr Cancer* 1997;27:162-8.
  - 26) Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, et al. Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-XL, without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Research* 1999;5:2971-7.
  - 27) Vaux DL, Cory S, Adams J. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335:440-2
  - 28) Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.
  - 29) Miyashita T, Krajewski S, Wang HG. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994;9:1799-805.