

## Diallyl Sulfide와 Diallyl Disulfide에 의한 랫드의 간암발생 억제효과에 관한 연구

김배환 · 이영순\*

서울대학교 수의과대학

## Study on the Inhibitory Effects of Diallyl Sulfide and/or Diallyl Disulfide in the Rat Hepatocarcinogenesis

Bae-Hwan KIM and Yong-Soon LEE\*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

(Received November 8, 1995; accepted December 8, 1995)

**Abstract**—This study examined the anti-cancer effects of diallyl sulfide(DAS) and/or diallyl disulfide(DDS), major components of garlic oil, with the DEN-PH model in rats, by the numbers and areas per cm<sup>2</sup> of induced glutathion S-transferase placental form(GST-P) positive foci and silver-stained nucleolar organizer regions(Ag-NORs) counts per nuclei in liver as indicator. Sprague-Dawley( SD) rats were given the diethylnitrosamine(DEN, 200 mg/kg, i.p.) as initiator and 2 weeks later, in experiment I, rats were treated with DAS(200 mg/kg, i.g.) and/or DDS(50 mg/kg, i.g.) for 6 weeks, respectively and concomitantly and also were given the same dose of DAS and/or DDS prior to DEN treatment for 2 weeks, and in experiment II, rats were treated with potential cancer promoter, 2-acetylaminofluorene (2-AAF, 20 mg/kg, i.g.). The DAS and/or DDS were treated prior to 2-AAF for 8 weeks, respectively and concomitantly. Then the anti-promoting effects of DAS and/or DDS were assessed. All rats were subjected to the two-thirds partial hepatectomy(PH) at week 3 and sacrificed at week 8. In experiment I, DAS and/or DDS treatment only prior to DEN showed inhibition of the development of GST-P positive foci. In experiment II, DAS and/or DDS treatment prior to 2-AAF promotion showed obvious inhibition of the development of GST-P positive foci in numbers and areas and AgNORs counts. In conclusion, We found DAS and/or DDS had the preventive effects on the hepatocarcinogenesis in rats and the concomitant treatment had some additive effects compared with the each treatment and AgNORs counts correlated well with the preneoplastic hepatic lesion.

**Keywords** □ garlic, diallyl sulfide, diallyl disulfide, anticancer effects, GST-P, AgNORs, liver, rats.

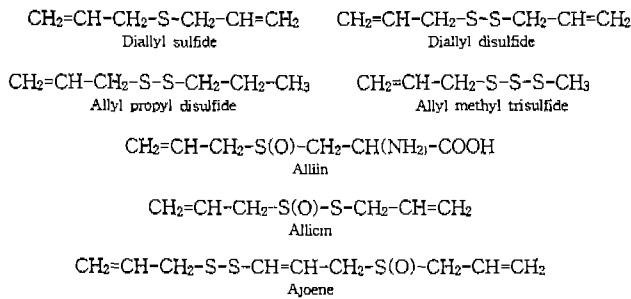
어느 특정 신선한 과일이나 야채등을 많이 먹는 지역에서 암의 발생이 적게 나타난다는 역학적 조사에 의해 이런 음식물에 포함되어 있는 자연생성황화물의 변이원성 및 발암성에 대한 억제효과에 관심을 갖게 되었다(Davis, 1989; Wargovich, 1988). 그 중에서 마늘은 우리민족의 식생활과 밀접한 관계를 맺고 있으며, 또한 의약품으로도 중요시 되어 온 식품으로 그 구성성분의 화학적 구조와 의학적 효과 및 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

마늘의 구성성분중 예방효과(chemopreventive effect)

를 나타내는 것은 주로 마늘기름(garlic oil)을 이루고 있는 organosulfur compounds로서, 그 화학적인 구조를 보면 특징적인 강한 냄새를 지니게하는 'allyl'(CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>3</sub>)이나 'methyl'(CH<sub>3</sub>)기 등이 sulfur기에 결합하고 있는 thioether 형태를 지니고 있다(Sparnins 등, 1988) (Text-Fig. 1). 이 마늘기름중의 여러 sulfur compounds의 구성비율은 비록 그 분석방법에 따라 다르게 나타날 수 있지만, 대개 60%의 diallyl disulfide(DDS), 14%의 diallyl sulfide (DAS), 6%의 allyl propyl disulfide(APDS), 4~10%의 allyl methyl trisulfide(AMT) 및 그외의 미량 물질로 이루어져 있다(Dausch, 1990) (Text-Fig. 1).

이런 마늘에 대한 약물학적 작용실험에 대한 연구는

\* To whom correspondence should be addressed.



Text-Fig. 1. Organosulfur compounds in garlic.

생마늘(raw garlic)뿐만 아니라 다양한 추출 형태(oil, juice, powder and purified compounds)로도 진행되어지고 있다(Dausch, 1990). 마늘의 의학적인 예방 및 치료에 대한 보고 예를 보면, 살균 및 항생(Focke 등, 1990), 항진균(Yoshida 등, 1987)뿐만 아니라, 혈액내의 혈당, 지방 및 콜레스테롤 저하(Chang 등, 1980)와 혈액응고, 혈소판응집 억제 및 혈전용해(Harenberg 등, 1988)등의 동맥경화예방(Kamanna 등, 1982)과 심장질환예방(Rietz 등, 1993)에서 항암에 이르기까지 많은 연구들이 진행되고 있다.

특히, 최근들어 마늘 추출성분중 organosulfur compounds 고유의 생화학적, 암리학적 성질에 더 초점이 맞춰지고 있는데, 특히 마늘의 주요향미를 내는 성분으로 알려진 thioether구조의 diallyl sulfide에 대한 보고가 많다. 이 diallyl sulfide는 이미 다장기 모델을 통해 그 항암성이 인정되었을 뿐만 아니라(Jang 등, 1991), 1,2 dimethylhydrazine(DMH)유도의 결장암(Sumiyoshi 등, 1990) 및 간암(Hayes 등, 1987)과, N-nitrosomethylbenzylamine(NMBA)유도의 식도종양(Wargovish 등, 1988), 방사선조사에 의한 colonic nuclear toxicity(Baer 등, 1989)등이 억제됨이 보고되었고, cyclophosphamide유도의 방광 및 모낭의 nuclear aberrations(Goldberg, 1987)도 억제된다고 보고되었다.

또한 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)유도의 피부발암형성과 (Meng 등, 1990) 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)(Nishino 등, 1986) 및 benzoyl peroxide(BPO) (Athar 등, 1990)등에 의한 피부발암촉진이 억제되며, N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine(MNNG)에 의한 위의 pepsinogen 1 altered pyloric glands 발현도 억제됨이 보고되었다(Jang 등, 1989).

한편, 최근들어 조직에서 은과 친화성이 있는 nucleolar organizer regions(AgNORs)의 수와 세포증식능 사이에 밀접한 상관성이 있다고 보고되어, AgNORs의 세포의 증식능을 알아보는데 매우 유용한 지표로 인정되고 있다(Giri 등, 1989; Rosa 등, 1990).

따라서 본 연구는 최근 항암등 여러질병의 예방효과가 알려진 마늘기름(garlic oil)의 주요성분인 diallyl sulfide(DAS)와 diallyl disulfide(DDS)를 각각 또는 병용투여

하였을때, 랫드를 이용한 중기발암성 모델(Ito 등, 1988)에서, 간발암의 유발과 촉진단계에 미치는 영향과, 2-acetylaminofluorene(2-AAF)에 의한 간발암촉진에서 항촉진 효과가 있는지 여부를 알아보기 위해 수행하였다. 그 지표로는 간 전암병소 검색에 있어 가장 특이적이라고 알려진 glutathione S-transferase placental form(GST-P) 양성병소와, 최근들어 세포 증식활성의 지표로 많은 연구가 진행되고 있는 AgNORs수를 이용하여 그 상관관계와 유용성도 알아보고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

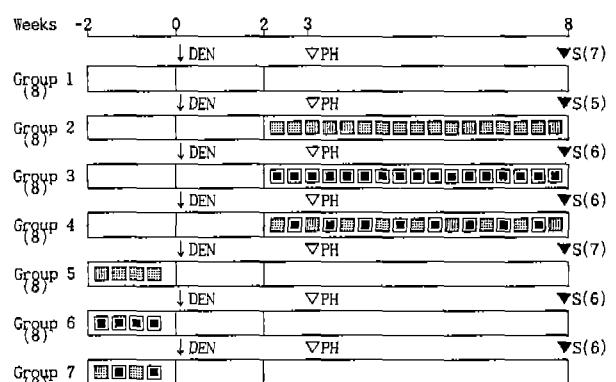
서울대학교 실험동물 사육장에서 생후 5주령의 수컷 Sprague-Dawley(SD) 랫드 100 마리를 분양받아 1주일간 사육실 환경에 순응 시키면서 동물의 건강상태를 확인한 후 6주령에 실험에 사용하였다.

### 실험설계 및 투여물질

#### 실험 I

이 실험은 diethylnitrosamine(DEN, SIGMA) 유도의 hepatocarcinogenesis에 있어, 마늘 추출물인 diallyl sulfide(DAS, Aldrich)와 diallyl disulfide(DDS, Aldrich)를 각각 또는 병용투여해 주었을 때 발암 유발과 촉진 단계에 미치는 변화효과를 분석하였다.

총 56마리의 수컷 랫드를 각 군당 8마리씩 7개군으로 나누어, 제 2군, 3군, 4군은 DAS와 DDS를 corn oil(SIGMA)에 녹여 1주에 3회씩 실험개시후 2주후 부터 8주 까지 promotion stage에 6주동안 경구로 각각 또는 병용투여하였으며, 제 5군, 6군, 7군은 DAS와 DDS를 제 2, 3, 4군과 같은 용량, 같은 방법으로 간암유발 2주전부터(preinitiation stage) 경구로 각각 또는 병용투여 하



Text-Fig. 2. Design of the experiment I. ↓ DEN: A single dose of diethylnitrosamine(200 mg/kg B.W.), i.p. ▽ PH: 2/3 partial hepatectomy ▼S( ): sacrifice numbers ■: Diallyl sulfide(DAS) 200 mg/kg B.W., i.g., three times a week; □: Diallyl disulfide(DDS) 50 mg/kg B.W., i.g., three times a week; ■□: DAS+DDS concomitantly, i.g., three times a week.

였다.

모든 시험군의 랙드는 시험개시일에 간암 유발물질인 DEN(200 mg/kg)을 생리식염수에 용해시켜 복강내로 1회 투여하였고 3주후에는 간세포의 증식을 증폭시킬 목적으로 간의 좌우 중심엽 및 좌측 외엽을 약 2/3 정도 잘라내는 간 부분절제술(partial hepatectomy, PH)을 실시하였다.

## 실험 II

이 실험은 2-Acetylaminofluorene(2-AAF)의 간발암촉진에 있어서 DAS, DDS 및 두물질 병용투여가 발암촉진을 얼마나 억제하는지 여부를 관찰하였다.

총 40마리의 수컷 랙드를 각 군당 8마리씩 5개군으로 나누어, 실험개시일에 1군을 제외한 모든 군은 간암 유발물질인 DEN(200 mg/kg)을 생리식염수에 용해시켜 복강내로 1회 투여하였고 1군은 control군으로 saline만 투여하였으며, 제 2군, 3군, 4군, 5군은 모두 실험개시 2주부터 8주까지 6주동안 간암 촉진물질인 2-AAF(20 mg/kg)를 1% carboxymethyl cellulose(CMC, SIGMA)에 부유시켜 1주에 3회씩 경구로 투여하였다.

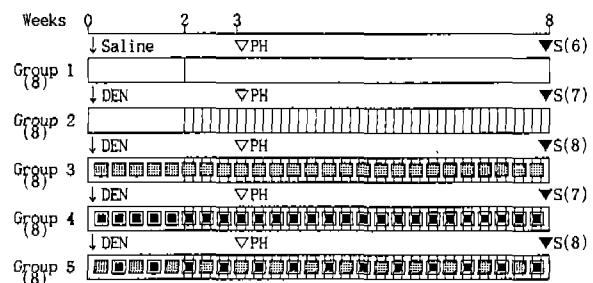
이때, 3군은 DEN투여후 부터 1주일에 3회씩 DAS를 2-AAF 투여전에 8주간 전처치하였으며, 4군은 DDS를, 그리고 5군은 DAS와 DDS를 병용 전처치하여 주었다. 역시 모든 시험군은 실험개시 3주후에 간세포 증식을 위해 간 부분절제술(PH)을 실시하였다.

### 간장의 광학현미경적 관찰 및 면역조직화학적 염색

간 조직내의 Glutathion S-transferase placental form(GST-P) 양성병소의 분포를 확인하기 위해 avidin biotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 면역조직화학적 염색을 하였다(Ogiso 등, 1985). GST-P 양성병소의 수와 면적은 칼라 화상분석기(Cambridge Instruments, Quantimet 520)를 이용하여 측정하였다. 또한 일부의 간은 10% phosphate buffered formaline solution에 고정하여 H & E staining에 사용하였다.

### Silver-binding nucleolar organizer regions(AgNORs)의 염색 및 측정

부검과 동시에 절개한 간조직을 10 % 포르밀린에 고정한 후, 4 μm 두께의 파라핀 포매조직절편을 만들어 xylene으로 탈파라핀시키고 에틸알콜과 중류수를 거쳐 합수시켰다. 슬라이드에 silver colloid 용액을 도포한 후 빛을 차단하도록 뚜껑을 덮어 실온에서 40분가량 반응시킨 다음, 흐로는 물과 중류수에 수세하고 탈수과정을 거쳐 glycerin jelly로 봉입하였다. 여기서 silver colloid 용액은 1% 포름산용액(formic acid solution)에 젤라틴(gelatin)을 2% 되도록 녹인 용액과 50% 질산은 용액(silver nitrate solution)을 1 : 2 비율로 섞어 조제하였다(Kaneko 등, 1991). 400배 배율에서 평균 200개 간세포내의 AgNORs 수를 측정한 후 각 군당 평균하여 한개의 핵당 AgNORs 수를 표시하였다. 측정기준은 핵내에서 분명하고 진한 갈색으로 염색된 경우만 측정하고, 크기가



**Text-Fig. 3.** Design of the experiment II. ↓ DEN: A single dose of diethylnitrosamine(200 mg/kg B.W.), i.p.; ▽ PH: 2/3 partial hepatectomy; ▼ S( ): sacrifice numbers; □: Diallyl sulfide(DAS) 200 mg/kg B.W., i.g., three times a week; ▨: Diallyl disulfide(DDS) 50 mg/kg B.W., i.g., three times a week; ▨□: DAS+DDS concomitantly, i.g., three times a week; ▨▨: 2-Acetylaminofluorene(AAF) 20 mg/kg B.W., i.g., three times a week.

작고 불분명한 갈색반점은 제외시켰다.

### 자료의 통계처리

GST-P 양성병소의 수와 면적은 two-tailed t-test를 이용하여 대조군과 비교, 분석하였다. 기타 자료는 General Linear Model(SAS Institute, Version 6.03, 1988)을 이용하여 분산분석에서 유의성 있는 항목에 대해 유의수준 p<0.05에서 Duncan's multiple range test를 하였다.

## 결 과

### 체중변화 및 간장의 상대중량비

실험I에서 제 2, 3, 4군의 경우만 8주후 체중의 유의성 있는 감소를 나타내었다(Table I). 실험 II에서는 제 2, 3, 4군에서 체중이 정상대조군인 제 1군에 비해 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Table II). 그리고 실험I, II 모두 간암 유발물질인 DEN 투여후 체중이 다소 감소하다가 1주후부터 다시 증가 되었으며, 3주째 간부분절제술 실시후 체중증가가 다소 완만해지는 경향을 보였다. 간장의 상대중량비에 있어서는 실험 I의, promotion stage에 DAS와 DDS를 투여한 제 2, 3군의 경우만 부검시 체중에 대한 간장의 상대중량비에 있어서 제 1군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다.

### 육안 및 광학현미경적 소견

실험 I의 경우에는 모든 군에서 특이적인 육안적인 병변은 찾아볼 수 없었으며 광학현미경적 관찰결과 간암 유발물질인 DEN을 투여한 제 1군에서 주위 정상조직과 구분되는 GST-P 양성병소가 약간 관찰되었다. 이 병소는 DAS와 DDS를 전처치한 제 5, 6, 7군에서 억제된 양상을 보였다.

실험 II의 경우, DEN으로 유발하고 2-AAF로 발암촉진시킨 제 2군의 경우 대조군인 제 1군에 비해 간의 변연부가 대체로 종창되어 둔탁해져 있고, 전 개체의

**Table I.** Final Body Weight and Relative Liver Weight Ratio in Experiment I

Group	Treatment	No. of rats (sacrificed)	Final Body weight (g)	Final Liver weight (g)	Liver/Body weight ratio (%)
1	DEN	7	338.03±39.33	8.55±1.13	2.53±0.12
2	DEN → DAS	5	289.40±28.40*	8.64±1.10	2.98±0.15*
3	DEN → DDS	6	292.05±5.18*	8.88±0.96	3.04±0.28*
4	DEN → (DAS+DDS)	6	297.60±9.92*	8.83±1.11	2.96±0.29
5	DAS → DEN	7	317.80±33.80	8.36±0.69	2.64±0.19
6	DDS → DEN	6	331.32±26.31	9.06±0.63	2.75±0.29
7	(DAS+DDS) → DEN	6	320.24±15.86	8.88±0.94	2.77±0.22

DEN, diethylnitrosamine; DAS, diallyl sulfide; DDS, diallyl disulfide; \* Significantly different from group 1 ( $p<0.05$ ); Values are expressed as mean± S.D.

**Table II.** Final Body Weight and Relative Liver Weight Ratio in Experiment II

Group	Treatment	No. of rats (sacrificed)	Final Body weight (g)	Final Liver weight (g)	Liver/Body weight ratio (%)
1	Saline	6	352.16±49.34	10.88±1.94	3.08±0.20
2	DEN → AAF	7	278.34±35.43 <sup>a</sup>	10.06±2.80	3.57±0.70
3	DEN → DAS → AAF	8	281.85±23.46 <sup>b</sup>	9.19±1.35	3.27±0.50
4	DEN → DDS → AAF	7	279.06±10.22 <sup>b</sup>	8.57±0.74	3.07±0.19
5	DAS → DAS+DDS → AAF	8	310.28±33.28	9.86±2.49	3.13±0.52

DEN, diethylnitrosamine; AAF, 2-acetylaminofluorene; DAS, diallyl sulfide; DDS, diallyl disulfide; <sup>a</sup> Significantly different from group 1 ( $p<0.01$ ), <sup>b</sup> Significantly different from group 1 ( $p<0.05$ ), Values are expressed as mean± S.D.

**Table III.** Numbers and Areas of GST-P Positive Foci in Livers of SD Rats Fed Garlic in Experiment I

Group	Treatment	No. of rats (sacrificed)	GST-P positive foci	
			No./cm <sup>2</sup>	Area (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
1	DEN	7	8.45±2.02	0.79±0.21
2	DEN → DAS	5	5.94±1.26	0.53±0.12
3	DEN → DDS	6	6.13±1.02	0.53±0.19
4	DEN → (DAS+DDS)	6	9.12±3.09	0.79±0.29
5	DAS → DEN	7	4.79±1.69	0.44±0.11*
6	DDS → DEN	6	5.32±3.02	0.40±0.19*
7	(DAS+DDS) → DEN	6	5.09±2.74	0.42±0.18*

DEN, diethylnitrosamine; DAS, diallyl sulfide; DDS, diallyl disulfide; \* Significantly different from group 1 ( $p<0.05$ ), Values are expressed as mean± S.D.

간표면에는 많은 수의 회백색 증식결절(hyperplastic nodule)이 관찰되는 등 전체적으로 간 표면이 매우 불안정 이상을 관찰할 수 있었다. 그러나 DAS 또는 DDS를 2-AAF전에 처치시켜준 제 3, 4, 5군에서는 매우 작은 결절이 산발적으로 관찰되어 제 2군에 비해 많이 줄어든 양상을 보였다. 광학현미경적 관찰 결과, 제 2군에서는 증식성 결절들이 주위정상조직의 실질조직을 압박하고, 결절내 혈과 세포질이 공포성 변화를 보이며, 정상적인 hepatic cord가 소실되어 있었으며, 세포의 염색성은 약간의 호산성 또는 호염기성을 나타내었다. 이 조직을 면역학적 염색을 하였을 때, GST-P 양성병소는 주위 정상조직과 경계가 뚜렷하게 다양한 크기의 결절로 관찰되었으며, 그 면적은 전체 간조직의 절반이상을 덮을

정도로 증식되어 있었다. 반면, DAS 또는 DDS를 전처치한 제 3, 4, 5군의 경우에는 주위가 명확한 다양한 결절은 많이 관찰할 수 있었지만 제 2군에 비해 그 분포정도와 결절의 크기가 유의성있게 억제되어 있음을 관찰할 수 있었다.

#### GST-P 양성병소의 수와 면적

실험 종료후 부검한 간조직 1cm<sup>2</sup>당 증식결절 및 증식소의 수와 면적은 Table III, IV와 같다.

실험 I의 경우, 간암 유발물질인 DEN을 투여하기 전에 DAS 또는 DDS를 전처치하였을 때, GST-P 양성병소의 면적에 있어서만 대조군인 제 1군에 비해 약한 억제를 보였다( $p<0.05$ ). 실험 II의 경우에는, 간암 유발물질인 DEN 처치후 2-AAF로 촉진시킨 제 2군에 비해, DAS

**Table IV.** Numbers and Areas of GST-P Positive Foci in Livers of SD Rats Fed Garlic in Experiment II

Group	Treatment	No. of rats (sacrificed)	GST-P positive foci	
			No./cm <sup>2</sup>	Area (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
1	Saline	6	0.00±0.00	0.00±0.00
2	DEN→AAF	7	42.67±8.34	49.98±12.38
3	DEN→DAS→AAF	8	29.86±6.67*	5.28±1.78**
4	DEN→DDS→AAF	7	31.79±5.52*	4.21±0.97**
5	DEN→DAS+DDS→AAF	8	28.45±7.67*	2.39±1.10**

DEN, diethylnitrosamine; AAF, 2-acetylaminofluorene; DAS, diallyl sulfide; DDS, diallyl disulfide; \* Significantly different from group 2 ( $p<0.05$ ) \*\* Significantly different from group 2 ( $p<0.001$ ) <sup>a</sup> Significantly different from Group 3, 4 ( $p<0.05$ ) Values are expressed as mean±S.D.

**Table V.** Mean Numbers of AgNORs per Nucleus in Experiment I

Group	Treatment	No. of rats (sacrificed)	No. of AgNORs
1	DEN	7	2.06±0.38
2	DEN→DAS	5	2.35±0.35
3	DEN→DDS	6	1.88±0.27
4	DEN→(DAS+DDS)	6	1.82±0.34
5	DAS→DEN	7	2.06±0.43
6	DDS→DEN	6	2.04±0.32
7	(DAS+DDS)→DEN	6	1.65±0.21*

DEN, diethylnitrosamine; DAS, diallyl sulfide; DDS, diallyl disulfide; AgNORs, silver-binding nucleolar organizer regions

\* Significantly different from group 1 ( $p<0.05$ )

**Table VI.** Mean Numbers of AgNORs per Nucleus in Experiment II

Group	Treatment	No. of rats (sacrificed)	No. of AgNORs
1	Saline	6	1.77±0.28
2	DEN→AAF	7	3.01±0.54*
3	DEN→DAS→AAF	8	2.13±0.39**
4	DEN→DDS→AAF	7	2.34±0.42*
5	DAS→DAS+DDS→AAF	8	2.01±0.38**

DEN, diethylnitrosamine; AAF, 2-acetylaminofluorene; DAS, diallyl sulfide; DDS, diallyl disulfide; AgNORs, silver-binding nucleolar organizer regions \* Significantly different from group 1 ( $p<0.001$ ) \* Significantly different from group 2 ( $p<0.05$ ) \*\* Significantly different from group 2 ( $p<0.01$ )

또는 DDS를 2-AAF에 전처치한 제 3, 4, 5군에 있어 GST-P 양성병소의 수( $p<0.05$ )와 면적( $p<0.001$ )에 있어 모두 유의성있는 억제를 관찰할 수 있었다.

DAS와 DDS를 병용 투여했을 경우와 각각 투여했을 때와의 GST-P 양성병소의 변화에서는, 실험 2의 제 5군이 제 3군과 4군에 비해 면적에서만 유의성있는 억제효과를 관찰할 수 있었다( $p<0.05$ ).

#### AgNORs 수의 측정

실험종료후 부검한 간조직을 AgNORs 염색한 후, 평균

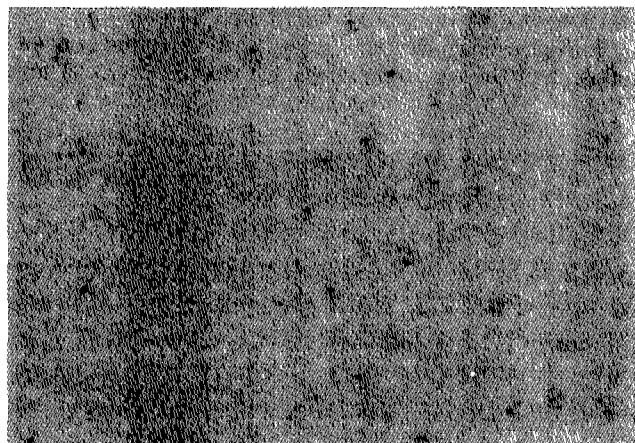


Fig. 1. Normal control livers stained for AgNORs ( $\times 200$ ). Most nuclei possess only one or two AgNOR dots.

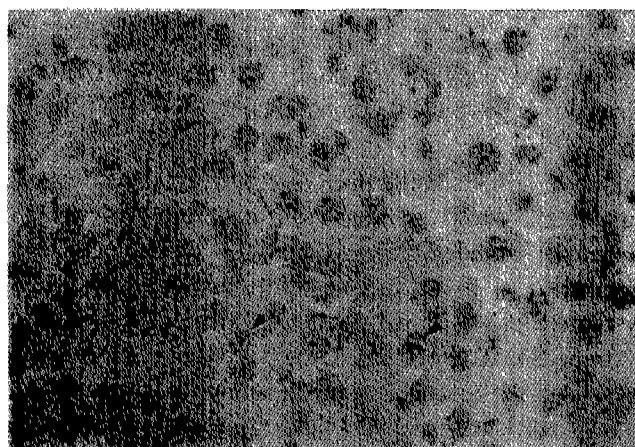
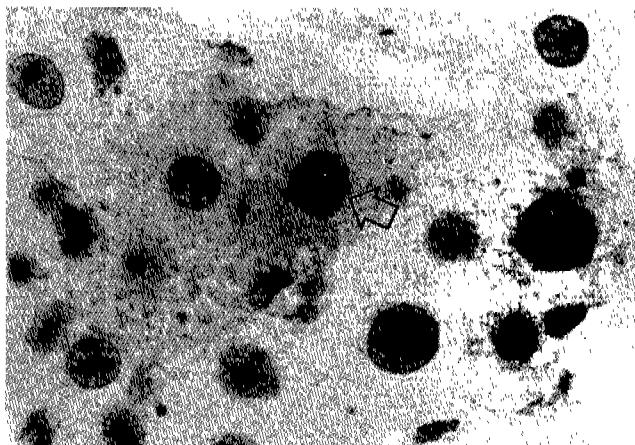


Fig. 2. Hepatocytes of the preneoplastic lesion stained for AgNORs promoted with 2-AAF after DEN-initiation ( $\times 200$ ). Many hepatocytes have an increased numbers of AgNORs and/or large, irregularly shaped AgNORs (arrow) compared with Fig. 1.

200개의 간세포내의 AgNORs 염색 dot의 수를 측정하여 각 군당 평균한 값은 Table V, VI과 같다.

실험 I의 경우, 간암 유발물질인 DEN을 투여한 제 1



**Fig. 3.** Higher magnification of Fig. 2. Most nuclei contain multiple dots. One nucleus contains eight dots(arrow) ( $\times 1,000$ ).

군과 비교해 볼때, DAS와 DDS를 병용으로 전처치한 제7군만 약한 유의성( $p<0.05$ )을 보였다.

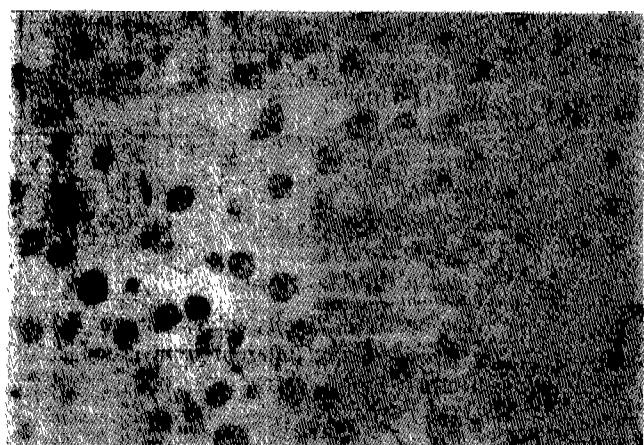
실험 II의 경우에서는, 간암 유발물질인 DEN 처치후 2-AAF로 촉진시킨 제 2군이 무처치 대조군인 제 1군(Fig. 1)에 비해 핵내의 크고 불규칙한 형태로 염색된 AgNORs 갈색 dot들이 그 수와 면적에 있어서 크게 증가된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2, 3,  $p<0.001$ ). 그러나 2-AAF 전에 DAS와 DDS를 각각 또는 병용으로 전처치한 제 3군( $p<0.01$ ), 제 4군( $p<0.05$ ), 제 5군( $p<0.01$ )에 있어서는 제 2군에 비해 유의성 있는 억제를 나타내었다(Fig. 4).

## 고 찰

최근 발암을 예방할 수 있는 자연생성황화물(natural occurring organosulfur compounds)에 대한 역학적조사 및 실험적연구들이 많이 진행되어지고 있다.

마늘은 독특한 향미를내는 지용성의 organosulfur compounds인 diallyl sulfide(DAS), diallyl disulfide(DDS), dipropyl sulfide(DPS), dipropyl disulfide(DPDS), ajoene등과, 수용성의 organosulfur compounds인 S-allyl cysteine(SAC), S-propyl cysteine(SPC), S-allyl mercapto cysteine(SAMC), cysteine(CySH) 등이 의학적 효과를 나타내는 성분으로 알려져 있다(Sumiyoshi 등, 1990). 그 약효는 일반적으로 allyl기의 수와 비례하며, allyl기를 propyl기로 대치시킨 saturated compounds에서는 큰 약효가 없는 것으로 알려져있다. 이 구조에서 분자내 sulfur 원자의 수는 주로 발암에 방어할 수 있는 표적장기를 결정한다(Sparnins 등, 1988).

이번 실험에서는 마늘기름(garlic oil)의 주요 구성성분이며, allyl기가 sulfur기에 결합된 thioether 구조를 이루고 있는 DAS와 DDS를 사용하여, 발암의 유발과 촉진단계에 미치는 영향(실험 I)과 강력한 발암촉진제의 발암촉진에 있어서의 항촉진효과(실험 II)를 조사하였다.



**Fig. 4.** AgNORs staining in diallyl sulfide(DAS) pretreatment group before 2-AAF promotion ( $\times 200$ ). Many cells are decreased the numbers of black dots in each nucleus compared with Fig. 2.

실험결과, 실험 I에서 DAS와 DDS를 preinitiation stage에 처치한 경우에는 GST-P 양성병소의 면적에 있어서 유의성있는 감소가 관찰되었으므로 DAS와 DDS가 DEN의 발암유발에 있어 미리 예방할 수 있음을 알 수 있었으며, promotion stage에 처치했을 때에는 유의성 있는 결과가 없었으므로 DAS와 DDS는 DEN 유발후의 간발암에 있어 발암촉진효과가 없음을 알 수 있었다. 실험 II에서는 DAS와 DDS 모두 2-AAF의 발암촉진에 있어 강한 억제효과를 나타냈으며 병용투여가 각각 투여했을때보다 더 유의성 있는 억제를 나타내었다.

서론에 언급한 바와 같이 마늘성분들은 이런 항암성이외에도 많은 의학적인 효과를 지니고 있으나 그에 대한 독성도 연구가 되어져있다(Dausch 등, 1990). 특히 사람에 있어서 마늘에 의한 contact dermatitis, asthma 등의 알레르기 반응이 잘 알려져 있다(Lembo 등, 1991).

마늘의 예방치료효과의 기전에 대해서도 많은 연구가 진행되어지고 있는데, 일반적으로 phase 1 enzyme인 cytochrome P<sub>450</sub> IIE1을 선택적으로 억제하여 procarcinogen이 간에서 carcinogen으로 활성화되는 것을 막아주어 간내 microsomes내에서의 수준을 낮춰주며, 또한 phase 2 enzyme인 GST의 유도를 촉진하여 많은 발암원들의 배설을 촉진하여 해독에 관여하는 것이라 알려져 있다(Brady 등, 1991). 결국 마늘은 직접 작용하는 발암물질에 큰 효과가 없고, 대사적 활성을 필요로 하는 procarcinogen에 용량상관적으로 좋은 억제효과를 나타낼 수 있으리라 생각된다.

그리고 구조내의 sulfur기에 의한 약리작용도 인정되는데, 이 sulfur기는 발암물질의 대사체가 세포의 DNA와 결합하는 것을 막을뿐만 아니라, microsomal mixed function oxidase(MFO) 반응의 빠른 활성으로 phase 1 detoxification에 관여하고, thiol compound에 의해 간효소(GST, DT-diaphorase) 유도로 해독에도 관여한다. 또한

-S-SO- (Sulfoxide)기가 -SH group과 반응하여 세포증식억제를 일으켜 종양형성을 억제할 수 있다는 보고 예도 있다(Dausch 등, 1989; Dorant 등, 1993).

본 연구에서는 이런 마늘에 대한 예방치료효과를 알아보는 지표로, 전암병변에 있어 가장 특이적인 지표로 알려져 있는 GST-P 효소와, 최근에 세포증식능의 지표로 각광받고 있는 AgNORs를 사용하여 그 항암성을 알아보고 그 상관성여부도 알아 보았다.

Nucleolar organizer regions(NORs)는 핵소체(nucleolus)내에 존재하는 여러 염색체(chromosome)에서 분리되어져 있는 커다란 DNA loops와 여기에서 전사되어진 ribosomal RNA gene의 덩어리가 있는 부위를 말한다. NORs는 사람과 침팬지에서는 세포의 분열중기(metaphase)에 13, 14, 15, 21, 22번 염색체의 short arm에 위치하며, 세포분열의 간기(interphase)에 전자현미경적으로 관찰하면 밀집된 섬유부분(dense fibrillar component)과 섬유성중심부(fibrillar center)로 관찰되어진다(윤 등, 1992). 세포 유전학자들은 이 NORs에 은을 이용한 빠르고 간편한 1단계 염색법을 개발하여 더욱 선명하고 특이적인 염색이 가능하도록 발전시켜 병리조직에서도 AgNORs의 측정이 가능하게 만들었다. 이 NORs의 은 염색에서는 DNA가 염색되는 것이 아니고, RNA 전사장소와 관련되어 ribosome형성에 촉매역할을 해주는 RNA-binding protein 및 small ribonucleoprotein particles가 염색되는 것인데, 이 핵단백의 carboxyl기, disulfide기 및 sulfhydryl기가 은과 친화성이 있는 것을 이용한 반응이다. 이로서 증가된 NORs를 간접적으로 측정할 수 있게 된다. 실제 NORs의 수는 정상 이배체(diploid) 세포에서 20개이지만, 조직에서 은 염색을 하면 핵소체안에 모여서 나타나므로 1-2개 정도로 관찰된다. 그러나 세포증식이 활발해져서 핵소체가 분산되거나, 세포의 ploidy가 증가되어 염색체의 수가 증가될 때, 또는 전사능(transcriptional activity)이 증가될 때, 은 염색한 NORs(AgNORs) 수가 증가하게 된다(윤 등, 1992). 결국 악성종양의 세포에서는 훌어져 있는 NORs의 수가 증가되기 때문에 AgNORs의 수가 정상보다 증가하게 되는 것이다.

실제로 간발암(Tanaka 등, 1989)뿐만아니라 폐암(Kaneko 등, 1991), 위암(Rosa 등, 1990), 유방암(Giri 등, 1989), 방광암(Takeuchi 등, 1990), 심근염(Leblanc 등, 1991), 임파증(Crocker 등, 1987), 장의 선암(Derenzini 등, 1988), 피부의 기저세포암(Egan 등, 1988a) 및 어린이의 섬유육종(Egan 등, 1988b)에서의 양성병변이 정상 대조군과 비교해 볼때 모두 유의성있는 차이를 나타내고 있어, 진단 및 예후판단에 도움을 줄수 있음을 시사해주고 있다.

AgNORs의 수는 은 염색의 시간, 조직절편의 두께, 고정액종류 및 검색자에 따라서 상이한 결과를 얻을수도 있으나 모든실험에서 세포증식이 활발한 군의 Ag-

NORs의 수가 정상보다 증가된다는 사실은 일치한다. 그리고 이 AgNORs 염색은 bromodeoxyuridine(BrdU) 면역염색(Tanaka 등, 1989)과 DNA flow cytometry(Giri 등, 1989) 등의 결과와 비교하여 볼때 좋은 상관성을 나타냄이 증명되어 있다. 결국 이 AgNORs는 세포 증식에 있어서 좋은 지표가 될수 있으리라 사료된다.

본 연구의 경우에도 DEN 유발후 2-AAF로 발암촉진시킨 경우 AgNORs염색 갈색 dot들이 정상대조군에 비해 그 수와 면적에 현저한 유의성있는 증가를 보였는데, 이 유의성있는 증가는 DAS와 DDS를 2-AAF의 발암촉진전에 전처치시켜 줌으로써 유의성있게 감소됨이 관찰되었다. 이 결과는 GST-P 효소의 면역조직화학적 염색 결과와 같은 경향을 나타내고 있는 결과로써, 결국 두 지표는 전암병변에 있어 좋은 상관성 있는 지표라 사료된다. 결국 랫드의 간발암에 있어 마늘추출물은, 독성을 감안하여 적당한 용량을 사용할 때 좋은 예방효과가 있음이 인정된다. 그러나 그 기전에 대해서는 아직도 의견이 분분한 상태이다. 앞으로 마늘의 organosulfur compounds에 대한 생화학적 성분 이해와, 그 작용기전에 대해서 계속 더 많은 연구가 필요하며, 다른 식물내의 자연생성황화물에 대한 항암성 여부에 대해서도 계속 관심을 가지고 검색이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

본 연구는, 최근 항암등 여러 의학적인 예방효과가 인정되고 있는 마늘기름(garlic oil)의 주요성분인 diallyl sulfide(DAS)와 diallyl disulfide (DDS)를 각각 또는 병용투여하였을때, 간발암의 유발과 촉진단계에 미치는 영향과(실험 I), 2-acetylaminofluorene(2-AAF)에 의한 간발암촉진에 항촉진효과가 있는지의 여부를 알아보기 위해(실험 II), GST-P 효소와 AgNORs 염색을 지표로 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

DAS와 DDS는 독성을 감안하여 적당한 용량을 선택하여 사용하면, 발암물질이 투여되기 전에 미리 예방적으로 전처치하여 좋은 예방효과를 얻을 수 있으며, 또한 두물질을 병용투여하였을 경우에는 각각 투여했을 때보다, 좀더 좋은 상가작용을 기대할 수 있으리라 생각된다. 그리고 또한 세포증식능의 지표인 AgNORs염색은 간의 전암병변과 좋은 상관성 있는 결과를 나타내는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Athar, M., Raza, H., Bichers, D. R. and Mukhtar, H. (1990). Inhibition of benzoyl peroxide-mediated tumor promotion in 7,12-DMBA-initiated skin of sencar mice by antioxidants nordihydroguaiaretic acid and diallyl sulfide. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 162-165.
- Baer, A. R. and Wargovich, M. J. (1989). Role of ornithine

- decarboxylase in diallyl sulfide inhibition of colonic radiation injury in the mouse. *Cancer Res.* **49**, 5073-5076.
- Brady, J. F., Wang, M. H., Hong, J. Y., Xiao, F., Li Y., Ning, S. M., Lee, M. J., Fukuto, J. M., Gapac, J. M. and Yang, C. S. (1991). Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase enzymes and cytotoxicity by diallyl sulfide. *Toxicol. and appl. pharmacol.* **108**, 342-354.
- Chang, M. L. W. and Johnson, M. A. (1980). Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. *J. Nutr.* **110**, 931-936.
- Crocker, J. and Nar, P. (1987). Nucleolar organizer regions in lymphoma. *J. Pathol.* **151**, 111.
- Dausch, J. G. and Nixon, D. W. (1990). Garlic: A review of its relationship to malignant disease. *Preventive Medicine* **19**, 346-361.
- Davis, D. L. (1989). Natural anticarcinogens, carcinogens, and changing patterns in cancer: Some speculation. *Environ. Res.* **50**, 322-340.
- Derenzini, M., Romagnoli, T., Mingazzini, P. and Marrazzini, V. (1988). Interphagic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. *Virchows Archiv B Cell Pathol.* **154**, 334.
- Dorant, E., Brandt, P. A., Goldbohm, R. A., Hermus, R. J. J. and Sturmans, F. (1993). Garlic and its significance for the prevention of cancer in humans; a critical view. *Br. J. Cancer* **67**, 424-429.
- Egan, M. J. and Crocker, J. (1988a). Nucleolar organizer regions in cutaneous tumors. *J. Pathol.* **154**, 247.
- Egan, M. J., Raafat, F., Crocher, J. and Smith, K. (1988b). Nucleolar organizer regions of fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. *J. Clin. Pathol.* **41**, 31.
- Focke, N., Feld, A. and Lichtenhaler, H. K. (1990). Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. *FEBS* **261**(1), 106-108.
- Giri, D. D., Nottingham, J. F., Lawry, J., Dundas, S. A. C. and Underwood, J. C. E. (1989). Silver-binding nucleolar organizer regions(AgNORs) in benign and malignant breast lesions: Correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J. of Pathol.* **157**, 307-313.
- Goldberg, M. T. and Josephy, P. T. (1987). Studies on the mechanism of action of diallyl sulfide, an inhibitor of the genotoxic effects of cyclophosphamide. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**, 465-471.
- Harenberg, J., Giese, C. and Zimmermann, R. (1988). Effect of dried garlic on blood coagulation, fibrinolysis, platelet aggregation and serum cholesterol levels in patients with hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* **74**, 247-249.
- Hayes, M. A., Rushmore, T. H. and Goldberg, M. T. (1987). Inhibition of hepatocarcinogenic responses to 1,2-dimethylhydrazine by diallyl sulfide, a component of garlic oil. *Carcinogenesis* **8**(8), 1155-1157.
- Ito, N., Tsuda, J., Tatematsu, M., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T., Uwagawa, S., Kagawa, M., Ogiso, T., Masui, T., Imaida, K., Fukushima, S. and Asamoto M. (1988). Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats-an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis* **9**(3), 387-394.
- Jang, J. J., Cho, K. J., Myong, N. H., Kim, S. H. and Lee, S. J. (1989). Modifying effects of capsaicin, allyl sulfide, indole-3-carbinol and germanium on the induction of pepsinogen 1 altered pyloric glands in rats initiated with MNNG. *Environ. Mutagens and Carcinogens* **9**(1), 47-55.
- Jang, J. J., Cho, K. J., Lee, Y. S. and Bae, J. H. (1991). Modifying responses of allyl sulfide, indole-3-carbinol and germanium in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* **12**(4), 691-695.
- Kamanna, V. S. and Chandrasekhara, N. (1982). Effects of garlic (*Allium sativum L.*) on serum lipoproteins and lipoprotein cholesterol levels in albino rats rendered hypercholesterolemic by feeding cholesterol. *Lipids* **17**, 483-488.
- Kaneko, S., Ishida, T., Sugio, K., Yokoyama, H. and Sugimachi, K. (1991). Nucleolar organizer regions as a prognostic indicator for stage 1. Non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **51**, 4008-4011.
- Leblanc, B., Mompon, P. R. and Esperandieu, O. (1991). Nucleolar organizer regions in cardiac lesions induced by doxorubicin. *Toxicol. Path.* **19**, 176-182.
- Lembo, G., Balato, N., Patruno, C., Auricchio, L. and Ayala, F. (1991). Allergic contact dermatitis due to garlic(*Allium sativum*). *Contact Dermatitis* **25**, 330.
- Meng, C. L. and Shyu, K. W. (1990). Inhibition of experimental carcinogenesis by painting with garlic extract. *Nutr. Cancer* **14**, 207-217.
- Nishino, H., Yoshioka, K., Iwashima, A., Takizawa, H., Konishi, S., Okamoto, H., Okabe, H., Shibata, S., Fufiki, H. and Sugimura, T. (1986). Glycyrrhetic acid inhibits tumor-promoting activity of teleocidin and 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage mouse skin carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* **77**, 33-38.
- Ogiso, T., Tatematsu, M., Tamano, S., Tsuda, H. and Ito, N. (1985). Comparative effects of carcinogens on the induction of placental glutathione S-transferase positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinomas in a long-term assay. *Toxicol. Pathol.* **13**, 257-265.
- Rietz, B., Isensee, H., Strobach, H., Makdessi, S. and Jacob, R. (1993). Cardioprotective actions of wild garlic(*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Molecular and Cellular Biochemistry* **119**, 143-150.
- Rosa, J., Mehta, A. and Filipe, M. I. (1990). Nucleolar organizer regions in gastric carcinoma and its precursor stages. *Histopathology* **16**, 265-269.
- Sparnins, V. L., Barany, G. and Wattenberg, L. W. (1988). Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo[a]pyrene-induced neoplasia and glutathione S-transferase activity in the mouse. *Carcinogenesis* **9**(1), 131-134.
- Sumiyoshi, H. and Wargovich, M. J. (1990). Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organosulfur compounds. *Cancer Res.* **50**, 5084-5087.
- Takeuchi, T., Tanaka, T., Ohno, T., Yamamoto, N., Kobayashi, S., Kuriyama, M., Kawada, Y. and uw (1990). Nucleolar organizer regions in rat urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Virchows Ar-*

- chiv. B Cell Pathol. **58**, 383-387.
- Tanaka, T., Takeuchi, T., Nishikawa, A., Takami, T. and Mori, H. (1989). Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenylacetamide in rats: Comparison with bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *Jpn. J. Cancer Res.* **80**, 1047-1051.
- Wargovich, M. J., Woods, C., Eng, V. W. S., Stephens, L. C. and Gray, K. (1988). Chemoprevention of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats by the naturally occurring thioether, diallyl sulfide. *Cancer Res.* **48**, 6872-6875.
- Yoshida, S., Kasuga, S., Hayashi, N., Ushiroguchi, T., Matsuura, H. and Nakagawa, S. (1987). Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl. and Environ. Microbiol.* **53**(3), 615-617.
- 윤기중, 한원철, 최찬, 문형배 (1992). Nucleolar Organizer Regions와 유세포 분석기를 이용한 혈액의 배수성 검사를 통한 유방암종의 비교연구. *대한병리학회지* **26**, 117-124.