

마늘의 Allicin이 사람 단핵세포의 사이토카인 생산 유전자의 발현에 미치는 영향

박 란 숙[†]

승의여자대학 식품영양과

Effects of Allicin on Cytokine Production Genes of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

Ran-Sook Park[†]

Department of Food and Nutrition, Seung-Eui Women's College

Abstract

The effect of allicin, the major component of garlic (*Allium sativum*), on the gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors was analyzed. DNA microarray which can detect expression signal of 862 genes revealed that allicin induced the expression of cytokine, chemokine, and immune-related genes in peripheral blood mononuclear cells. In contrast, allicin repressed the expression of adaptive immune-related genes, which are expressed in T helper 1 lymphocytes. Simultaneous inhibitory and stimulatory effects of allicin were found on inflammatory cells.

It is likely that allicin down-regulated the expression of specific genes that were previously up-regulated in resting cells, suggesting a new mechanism by which they exert positive and negative effect. Considering the broad and renewed interest in allicin, the profiles we describe here will be useful in designing more specific and efficient treatment strategies.

Key words : allicin, garlic, gene expression, microarray.

서 론

수 천년 전부터 마늘 (*Allium sativum*)의 의학적 효능이 알려져 왔으며, 마늘은 고추와 더불어 한국 식품에 가장 많이 사용하고 있는 향신료 중의 하나일 뿐 아니라, 마늘 성분 중 유황화합물은 생리활성이나 건강증진 효과때문에 영양학적, 면역학적, 임상학적인 연구의 대상이 되고 있다. 뿐만 아니라 최근에는 마늘을 보조제로 사용할 때의 영양학적 효과에 관한 국제 회의가 열리는 등 분자생물학적, 유전학적 방법을 이용한 마늘에 대한 연구가 어느 때보다 활발히 진행되고 있다^{1,2,3}. 마늘의 생리활성은 주로 유황 화합물에

의한 것이며, 마늘을 마쇄하였을 때 생성되는 alliin은 곧 alliinase에 의해 분해되어 allicin으로 변한다. 자극성이 심한 allicin은 실온에서 수용성 에탄올에 녹으며, 공기 중의 산소와 결합하면 자극성의 다른 30 여종의 유황화합물로 변한다^{4,5}.

마늘 성분의 정제된 형태인 allicin이나 마늘을 물리적으로 처리한 제품이거나, 또는 장기 보관한 마늘제품인 aged garlic extract(AGE) 내에 포함되어 있는 S-allylcysteine, S-allylmercaptocysteine, N-alpha-fructosyl arginine 등이 세균이나 생체세포에 영양학적 또는 의학적 효과를 나타내는 경로는 1) 마늘 성분인 allicin이 위염의 원인균인 *Helicobacter pylori*의 억제⁶, 우

[†] Corresponding author : Ran-Sook Park

리나라에서도 발생하는 이질의 원인균 *Entamoeba histolytica*의 독성인자를 억제시키고⁷⁾ 백서의 발암세포의 DNA 변화를 차단한다⁸⁾. 2) 세포 내 단백질이나 지질성분 예를 들면 고지질혈증의 원인인 cholesterol를 감소시키거나⁹⁾, 3) 대식세포의 tumor necrosis factor- α (TNF- α , 종양괴사인자) 같은 cytokines을 증가시키거나¹⁰⁾, 4) 세포의 free radical인 nitric oxide 생산을 차단하는 항산화제의 역할을 한다^{11,12)}. 5) T 림프구의 핵내 NF- κ B (nuclear factor kappa B) 활성을 억제하는 등 핵산(유전자) 수준의 변화를 일으켜 이로 인한 효소나 단백질 생산을 억제한다¹³⁾. 즉 allicin 등 마늘의 유효성분이 효과를 나타내는 작용기전은 세포 외 수준, 세포 내 지질-단백질 수준, 그리고 유전자 수준에서 allicin 이 작용하고 있기 때문이라고 할 수 있다.

마늘이 비록 식품이기는 하지만 유효성분인 sulfur compounds가 세포 외는 물론이고 세포막 지질성분 그리고 효소와 단백질은 물론이고 free radical 생성 등에 전반적인 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 특히 이와 같은 모든 변화의 궁극적 target인 핵산, 유전자 수준에서 allicin에 의한 gene expression 의 증가 또는 감소는 마늘 성분의 작용경로를 더욱 깊이 연구할 수 있는 열쇠가 될 수 있다.

따라서 본 연구에서는 신호전달 관련 유전자, cytokines 유전자, chemokines 유전자 등 사람의 약 800여 개의 유전자가 포함되어 있는 gene array (microarray)를 이용하여, allicin 투여 후 유도되는 생리활성과 직접적으로 관련되는 사람 말초혈액의 단핵구의 유전자의 발현의 down regulation 및 up regulation에 미치는 allicin의 효과를 규명하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

자연상태의 마늘을 마쇄하였을 때 alliin에서 변화된 allicin은 실온에서 불안정하여 다른 유효화합물로 바뀌기 쉽고, 국내에서의 allicin의 정제 및 정량에 기술적인 문제가 따르기 때문에 본 실험에서는 화학적으로 합성한 allicin (Nopex Co, England)을 구입하여 사용하였다. Human Cytokine Expression Array 및 hybridization kit는 R&D system (USA) 으로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 사람의 말초혈액 분리

정상인으로로부터 채혈한 헤파린 처리된 말초혈액을 동량의 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Solution,

Sigma Co)와 혼합하여 희석한 다음 Ficoll-Hypaque solution (Amersham Pharmacia Biotech.)이 있는 conical tube의 상층에 잘 올리고 실온에서 900×g로 30분간 원심분리를 시행하였다. 단핵세포층을 걷어내어 DPBS에 부유한 후, 400×g, 4℃에서 2회 세척하였다. 단핵구를 2 mM glutamine, 25 mM HEPES, 100 μg/ml의 gentamicin (GIBCO BRL Life Technologies Inc.) 등을 첨가한 10% FBS-RPMI 1640 배지 (Sigma Co.)로 재부유시키고 60 mm² culture dish (Falcon Labware)에 2 × 10⁷ cells씩 분주하여 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다.

3. Allicin이 사람 단핵구의 사이토카인 관련 유전자 발현에 미치는 효과

1) Allicin의 처리

위에서 분리한 단핵구에 allicin을 10 ng의 농도로 20시간 처리하였으며 처리 후 세포배양액을 제거한 단핵구를 이후 실험에 사용하였다. Allicin을 처리하지 않은 균을 대조군으로 설정하여 동일한 방법으로 실험하였다.

2) RNA 분리

실험군과 대조군의 단핵구에 Trizol 용액 (Gibco BRL) 5ml씩 넣어 부유한 후 부유액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 1 ml씩 분주하였다. Chloroform 200 μl를 각 tube에 가한 후 15초간 강하게 교반하고, 실온에서 3분간 방치한 후 미세원심분리기에서 12,000 rpm, 4℃, 15분간 원심분리하여 수층을 새 tube로 옮겼다. Iso-propanol 500 μl를 가하여 섞고, 실온에 10분간 방치한 후 다시 원심분리하였다. 침전된 RNA를 75% 냉각 에탄올로 1회 세척한 다음, 약 20 μl의 DEPC (Diethylpyrocyanate, Sigma Co) 처리된 증류수에 녹였다. 분리한 total RNA에 DNase I (U/ml)를 1시간 동안 처리하여 오염된 DNA를 제거하였다.

3) cDNA 합성

cDNA 합성은 R&D system 으로부터 합성 kit를 구입하여 사용법에 따라 시행하였다. 약술하면 다음과 같다. Total RNA 10 μl (약 2 μg)에 cytokine-specific primers 4 μl를 혼합하여 90℃에서 2분간 가열한 다음 42℃로 20분간 유지시켰다. RNase inhibitor (40U/μl), AMV Reverse Transcriptase (25U/μl), [α -³²P] dCTP (10 μCi/μl), 및 dNTP (dCTP는 제외)를 차례로 가하고 42℃에서 2시간 반응시켜서 cDNA를 얻었다. Sephadex

G-25 gel filtration spin column을 이용하여 순수 정제된 cDNA를 얻었다.

4) Hybridization

DNA array를 실온에서 5분간 2×SSCP 용액으로 적신 후, 65℃에서 10분간 처리한 hybridization 용액과 함께 roller bottle에 넣고 6 rpm으로 65℃에서 1시간동안 pre-hybridization을 실시하였다. 위에서 합성된 cDNA을 95℃, 10분간 가열하여 denature시킨 후 DNA array가 있는 roller bottle에 넣고 65℃에서 18시간동안 hybridization을 실시하였다. 3회 세척하고 DNA array를 공기 중에서 말린 후 phosphoimager screen에 18시간 노출시켜 cytokine의 발현 정도를 관찰하였다.

5) DNA array 분석

일본 후지필름 (Fujifilm)사에서 제공되는 ArrayGauge software (Ver. 1.2)를 이용하여 allicin을 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군에서의 cytokine 관련 유전자에 대한 발현 정도의 차이점을 분석하여 사람 단핵구의 유전자 발현에 미치는 allicin의 영향을 연구하였다.

결과 및 고찰

1. 전체 유전자 발현 분석

마늘 성분 중 allicin에 의해 유도되는 정상인 단핵구의 유전자 발현 변화를 연구하고자 한 바, allicin의 자극에 따른 유전자 발현 변화의 차이점을 분석하였다. 862개의 유전자 중 43%는 발현이 증가되었고 18%는 감소되는 결과를 확인하였다 (Fig. 1A). 대체적으로 발현이 증가한 유전자가 감소한 것보다 많았으나 그 유전자의 발현 비율은 그다지 높지 않았다. 이는 allicin의 처리시간이 20시간으로 보다 많은 시간으로 처리를 하였다면 각 유전자의 발현 정도 및 양의 변화를 뚜렷하게 확인할 수 있었으리라 생각된다. 또 한가지의 원인을 들자면 처리한 allicin의 농도이다. 마우스 대식세포의 탐식기능의 변화를 연구했던 이전 실험에서 10 ng은 실험에 사용할 적정 농도로 평가되었고¹⁴⁾ TNF- α 의 생성능력을 증가시키는 농도로 보고되었기에¹⁰⁾ 본 실험에서도 그 농도를 그대로 유지하여 사용하였다. 사람의 말초혈액으로부터 분리한 단핵구에 대해서는 보다 높은 농도로 처리하는 것이 바람직 한 것 같다.

다수의 유전자군 중에서 주요 8개 유전자군의 발현 양상을 Fig. 1B에서 보여주고 있다. 신호전달 관련 유전자 (Fig. 1B.a)의 경우, 37.4%의 발현 증가와 19.1%의

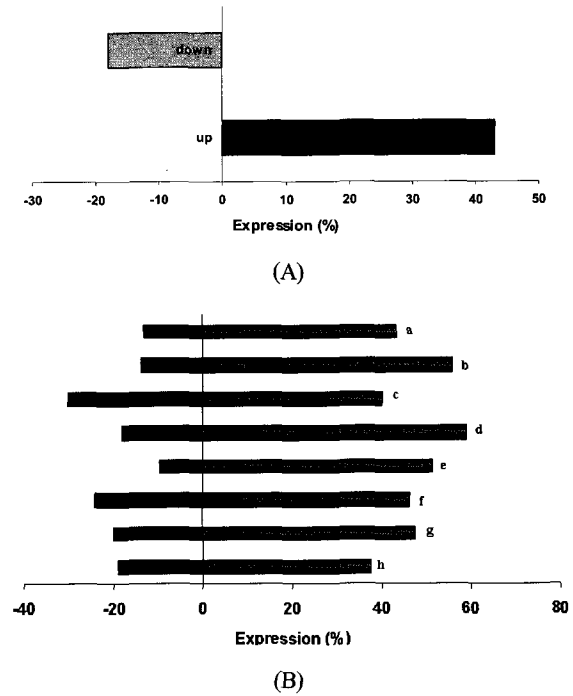


Fig. 1. Untreated and allicin-treated PBMC were analyzed for gene expression using DNA microarray. A. Global gene expression analysis. The expression of total genes was showed. B. Clustering analysis. Up- and down expression of genes among 8 major clusters; a. signal transduction, b. cell surface protein, c. interleukin & interleukin receptor, d. cytokine & cytokine receptor, e. integrin, f. chemokine & chemokine receptor, g. TNF family, h. apoptosis-related genes.

발현 감소를 보여주었다. 세포표면 단백질 (Fig. 1B.b), interleukin 관련 유전자 (Fig. 1B.c), cytokine 관련 유전자 (Fig. 1B.d)의 경우는 각각 47.5%, 46.3%, 51.4%의 발현 증가와 20%, 24.1%, 9.7%의 발현 감소를 나타내었다. Integrin (Fig. 1B.e), chemokine 관련 유전자 (Fig. 1B. f), TNF 관련 유전자 (Fig. 1B.g), apoptosis 관련 유전자 (Fig. 1B.h)의 경우는 각각 59.1%, 40%, 55.8%, 43.4%의 발현 증가를 보여주었으며, 18.2%, 30%, 13.9%, 13%의 발현 감소를 보여주었다.

이들 유전자에 대한 발현 정도를 세포의 생리활성에 있어서의 기능 변화와 연관지어서 세부적으로 분석한다면 allicin의 생체내 역할을 규명하는 데 많은 도움을 줄 것이며 이는 새롭게 제시되고 있는 allicin의 항미생물작용, 항암효과 등 다양한 효과에 대한 기전 규명에 유용하게 사용되리라 본다. 따라서 앞으로의 연구는 본 실험결과를 토대로 각 유전자와 그 기능을 연관지어 진행시키는 것이 바람직하다.

2. Allicin의 anti-inflammatory agent의 기능

TGF(transforming growth factor)- β 와 IL(interleukin)-10은 proinflammatory mediators의 생산을 억제하는 cytokine으로, 본 실험에서 TGF- β 1, IL-10, IL-10R (receptor)의 발현이 allicin에 의해 증가한 것으로 보아 allicin이 anti-inflammatory action을 가지고 있음을 입

증하였다 (Table 1). 한편으로 glucocorticoid 처치시 볼 수 있는 IL-1 β , IL-1 α , IL-8, IFN- α , IFN (interferon)- β 와 같은 proinflammatory cytokines의 발현감소 효과¹⁵⁾가 나타나지 않아 glucocorticoid와는 다른 항염증 기전을 가질 것이라 본다.

Table 1. The summary of genes related to inflammatory cytokines

Category	Function	Gene Name	Allicin		Rate
			Unstim.	Stim.	
Cytokines	Proinflammatory	gp 130	15.79	22.56	1.4
		IL-1 β	22.80	30.36	1.3
		TNFSF3	22.50	24.24	1.1
		TNFSF7	17.09	26.24	1.5
		TNFSF11	21.76	27.52	1.3
		TNFSF13	22.50	25.08	1.2
		TNFSF14	22.71	28.02	1.2
		TNFSF16	14.77	28.42	1.9
		TNFRSF1b	19.29	23.79	1.2
		TNFRSF3	19.30	31.13	1.6
		TNFRSF10d	23.37	30.63	1.3
		TNFRSF11a	21.14	24.56	1.2
		IRAK1	20.44	25.34	1.3
		Anti-inflammatory	TGF β 1	19.14	25.27
TGF β R I	21.40		23.87	1.1	
IL-1R II	24.15		27.23	1.1	
IL-1R α	23.19		21.69	0.9	
IL-10	19.99		24.66	1.2	
IL-10R	20.61		27.35	1.3	
IL-11	20.20		21.40	1.1	
Enzymatic mediators	MMP1	19.69	27.55	1.4	
	MMP7	21.27	25.99	1.2	
	MMP9	21.50	26.81	1.2	
	MMP10	22.65	29.05	1.3	
	MMP15	20.78	27.28	1.3	
	TIMP-2	17.43	22.66	1.3	
	TIMP-4	19.23	24.06	1.3	
Chemokines & receptors	I-309	19.45	23.37	1.2	
	MIP-1 β	18.12	26.31	1.5	
	MCP-3	18.23	19.17	1.1	
	Eotaxin	22.29	25.16	1.1	
	TARC	19.08	23.20	1.2	
	CCR-1	22.02	25.42	1.3	
	CCR-3	18.68	28.39	1.5	
	CCR-5	18.58	27.30	1.5	
	CCR-6	18.39	26.29	1.4	

3. Allicin에 의한 pro-inflammatory mediators 발현 유도

Allicin에 의해 proinflammatory receptor의 일부인 IL-1R I, IL-6 type receptor의 gp130 subunit, tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, 그리고 interleukin receptor associated kinase (IRAK) 와 같은 IL-1 pathway의 intracellular mediator의 발현이 증가되었다 (Table 1). 이와는 반대로 염증반응동안 분비되는 수용성 수용체에 대한 길항제인 anti-inflammatory mediator, IL-1Ra는 allicin에 의해 강력하게 발현이 감소되었다.

염증반응의 특징 중 하나는 chemokine 등에 의해 매개되는 면역세포의 유입이다. Matrix metalloproteinases (MMPs) 의 분비는 백혈구가 혈관에서 빠져나가기 쉽도록, 조직 관통을 용이하게 하여 이들의 염증반응 장소로 쉽게 이동할 수 있게 하는 염증질환에서 중요한 역할을 한다¹⁶⁾. CCR (cysteine-cysteine receptor) 같은 chemokine receptor와 metalloproteinases의 발현이 allicin에 의해 증가되는 것을 본 실험을 통해 확인하였다 (Table 1).

따라서, 이상의 결과들은 염증반응에 있어서 allicin의 중요한 역할을 보여주고 있다.

마늘이 cyclooxygenase 활성을 억제하는 기능이 있

음이 보고¹⁷⁾된 점으로 보아 항염증 효과가 있으리라 생각되며 항염증효과는 본 실험에서 보여준 위의 결과와 상응하는 내용이다. 그러나, 그 기전에 대해서는 확실히 규명되지 않았으며 이후의 실험에서는 동물실험을 통한 allicin의 효과검색 및 그 기전 규명이 필요하다.

4. Allicin의 면역기능

Table 2에서는 allicin의 면역기능에 미치는 효과를 보여주고 있다. Th1 (T helper lymphocyte 1) type의 cytokine에 비해 Th2 type cytokine의 발현이 상대적으로 증가하는 것으로 보아 T 림프구의 활성 억제효과 및 이로 인한 획득면역(adaptive immunity)의 기능을 억제하는 것으로 보였다. 한편 대식세포의 병원성 미생물 살해기전에 중요한 역할을 하는 Nitric Oxide (NO)의 조절 물질인 Nitric Oxide Synthase (NOS)의 발현에 억제효과를 보여주었다.

Feng ZH 등¹⁸⁾은 마늘 성분 중의 하나인 diallyl trisulfide (DATS)의 경우 고농도에서는 T 림프구의 활성에 억제효과가 있지만, 저농도의 경우에는 증가효과가 있다고 하였다. 또한 대식세포의 NO의 생산을 억제하는 것으로 보고¹²⁾ 한 것은 본 연구의 결과와 일치한다.

Table 2. The summary of gene expression related to human immunity

Category	Function	Gene name	Allicin		Rate
			Unstim.	Stim.	
Humoral and cellular immunity	Th1	IL-2	32.11	27.79	0.9
		IL-3	20.44	22.26	1.1
		IL-12P40	24.16	24.09	1.0
		IL-12R β1	36.99	31.75	0.9
		IL-18	37.15	23.24	0.6
		IL-18R1	37.30	37.50	1.0
		IFN- γ	21.90	18.11	0.8
	Th2	GM-CSF	30.53	27.30	0.9
		IL-3	20.44	22.26	1.1
		IL-4	23.41	29.57	1.3
		IL-5	19.62	24.06	1.2
		IL-10	19.99	24.66	1.2
		IL-13	23.43	29.65	1.3
		IL-13R α	19.21	23.05	1.2
NO metabolism	eNOS	22.56	19.84	0.9	
	iNOS	24.58	22.11	0.9	
	nNOS	39.49	33.33	0.8	

요 약

마늘의 주요 성분인 allicin 투여 후 유도되는 사람 말초혈액의 단핵구의 유전자 발현에 미치는 allicin의 효과를 규명하였다. DNA microarray를 이용하여, allicin이 chemokines, cytokine, 면역관련 유전자 및 신호전달 관련 유전자의 발현을 유도하는 것을 확인하였다. 반대로 allicin은 Th1 type의 획득면역 관련 유전자의 발현을 억제하였다. 염증세포에 있어서 allicin은 억제효과 및 자극 효과를 동시에 보여주었다. 이는 allicin이 휴지기 세포에서 먼저 증가시킨 특정 유전자의 발현을 이후에 감소시키는 결과를 보여주는 것으로 positive와 negative 효과를 발휘하는 새로운 기전을 제시하는 것이다. Allicin에 대한 광범위하고 새로운 관심을 고려해 볼 때 본 연구에서 보여주는 많은 유전자의 발현 양상은 좀 더 특징적이고 효과적인 치료법을 고안하는 데 유용할 것이다.

감사의 글

이 논문은 숭의여자대학 연구비로 수행되었습니다.

참고문헌

- Borek, C. : Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J. Nutr.*, **131**(3s):1010S~1015S (2001).
- Sumi, S., Tsuneyoshi, T., Matsuo, H. and Yoshimatsu, T. : Isolation and characterization of the genes up-regulated in isolated neurons by aged garlic extract(AGE). *J. Nutr.*, **131**(3s), 1096S~1099S (2001).
- Harris, J. C., Cottrell, S. L. and Lloyd, D. : Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 282~286 (2001).
- Josling, P. : The complete garlic handbook. Carnell plc. London, Great Britain (1994).
- Block, E. : The chemistry of garlic and onions. *Sci. Am.*, **252**, 94~99 (1985).
- O'Gara, E. A., Hill, D. J. and Maslin, D. J. : Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2269~2273 (2001).
- Ankri, S., Miron, T. and Rabinkov, M. : Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Agents. Chemother.*, **41**, 2286~2288 (1997).
- Song, K. and Milner, J. A. : Heating garlic inhibits its ability to suppress 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced DNA adduct formation in rat mammary tissue. *Nutrition*, **129**, 336~342 (1999).
- Kannar, D., Wattannapenpaiboon, N., Savige, G. S. and Wahlqvist, M. L. : Hypocholesterolemic effect of an enteric-coated garlic supplement. *J. Amer. Coll. Nutr.*, **20**, 225~231 (2001).
- Kang, N. S., Moon, E. Y., Cho, C. G. and Pyo, S. : Immunomodulating effect of garlic component, allcin, on murine peritoneal macrophages. *Nutr. Res.*, **21**, 617~626 (2001).
- Schwartz, I. F., Hershkovitz, R., Iaina, A., Gnessin, E., Wollman, Y., Chenichowski, T., Blum, M., Levo, Y. and Schwartz, D. : Garlic attenuates nitric oxide production in rat cardiac myocytes through inhibition of inducible nitric oxide synthase and the arginine transporter CAT-2 (cationic amino acid transporter-2). *Clin. Sci.*, **102**, 487~493 (2002).
- Kim, K. M., Chun, S. B., Koo, M. S., Choi, W. J., Kim, T. W., Kwon, Y. G., Chung, H. T., Timothy, R. B. and Kim, Y. M. : Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 747~756 (2001).
- Geng, Z., Rong, Y. and Lau, B. H. : S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 345~350 (1997).
- 박란속 : 마늘성분 중 Allicin 및 열처리 Allicin에 의한 마우스 대식세포의 탐식기능 변화. *숭의논총* 125~139 (1999).
- Ali, M. : Mechanism by which garlic (*Allium sativum*) inhibits cyclooxygenase activity. Effect of raw versus boiled garlic extract on the synthesis of prostanoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **53**, 397~400 (1995).
- Ashwell, J. D., Lu, F. W. and Vacchio, M. S. : Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 309~345 (2000).
- Opdenakker, G. and Van Damme, J. : Cytokines and proteases in invasive processes: molecular similarities between inflammation and cancer. *Cytokine*, **4**, 251~258 (1992).
- Feng, Z. H., Zhang, G. M., Hao, T. L., Zhou, B., Zhang, H. and Jiang, Z. Y. : Effect of diallyl trisulfide on the activation of T cell and macrophage-mediated cytotoxicity. *J. Tongji Med. Univ.* **14**, 142~147 (1994).

(2002년 6월 24일 접수)