

HL-60 세포에서 Diallyl Disulfide의 Daunorubicin 유발 Apoptosis 항진효과

구본선¹⁾ · 양정예²⁾ · 손희숙³⁾ · 권강범⁴⁾ · 지은정^{2)§}

전북대학교 의과대학 생화학교실,¹⁾ 전북대학교 치과대학 구강생화학교실,²⁾
전북대학교 식품영양학과,³⁾ 원광대학교 한의과대학 생리학교실⁴⁾

Diallyl Disulfide Enhances Daunorubicin-Induced Apoptosis of HL-60 Cells

Koo, Bon-Sun¹⁾ · Yang, Jeong-Yeh²⁾ · Shon, Hee-Suk³⁾
Kwon, Kang-Beom⁴⁾ · Jhee, Eun-Jeong^{2)§}

Department of Biochemistry,¹⁾ School of Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Department of Oral Biochemistry,²⁾ School of Dentistry and Institute of Oral Bioscience,
Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Department of Food and Nutrition,³⁾ Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Department of Physiology,⁴⁾ Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

ABSTRACT

Diallyl disulfide (DADS), a component of garlic (*Allium sativum*), has been known to exert potent chemopreventive activity against various cancers. In this study, the synergistic effect of DADS and daunorubicin on the cytotoxicity of HL-60 cells, a human leukemia cell line, was investigated. DADS at 25 M greatly potentiated daunorubicin-induced cell death, decreasing cell viability to 50% of the control. Daunorubicin-induced apoptosis was accompanied by the activation of caspase-3, the degradation of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) and D4-GDI, and DNA fragmentation, which were blocked by pre-treatment with acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-dialdehyde (Ac-DEVD-CHO). Treatment that combined 25 M DADS and 100 nM daunorubicin caused a similar degree of caspase-3 activation, PARP and D4-GDI degradation, and DNA fragmentation to that caused by treatment with 250 nM daunorubicin alone. These results indicate that combined therapy using daunorubicin with DADS, a component of food, and garlic can effectively decrease the therapeutic dose of daunorubicin, preventing the severe side effects of daunorubicin. (*Korean J Nutrition* 36(8) : 828~833, 2003)

KEY WORDS : diallyl disulfide, daunorubicin, synergistic effect, apoptosis.

서 론

마늘 (*Allium sativum*)은 예로부터 식품으로서 혹은 치료약물로서 사용되어온 경엽채소류이다.¹⁾ 마늘에 대하여 좀 더 과학적인 접근이 이루어진 것은 마늘의 구성 성분에 대해 화학적 구조를 분석한 이후부터이다. 추출하는 방법에 따라 차이가 있지만 마늘을 구성하고 있는 성분은 소수성인 diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide, allicin 등이 있고, 친수성인 S-allyl cysteine 등이 있다.²⁾ 마늘의 독특한 맛과 냄새는 allicin이라고 하는 성분에 의한 것인데

allicin은 마늘을 자르거나 갈 때 allin으로부터 allinase라고 하는 효소에 의해 형성된다. Allicin은 마늘을 굽거나 열을 가하면 diallyl disulfide와 diallyl trisulfide로 분해된다.³⁾ 항암효과와 관련해서 관심을 끄는 성분은 diallyl disulfide (DADS)이다. DADS는 세포막이나 세포질의 -OH기를 함유하고 있는 물질을 변화시켜 대장암, 식도암, 폐암, 피부암, 위암 및 유방암의 발생을 억제한다.⁴⁾ 이러한 항암 효과가 있는 마늘의 성분과 그 작용 기전이 최근 밝혀지고 있으며 특히 Kwon 등⁵⁾은 DADS가 HL-60 세포에서 caspase-3의 활성화를 증가시켜 apoptosis를 일으킨다고 보고하였다.

세포가 병원균이나 물리적 손상에 의해서 수동적으로 죽는 현상을 necrosis라 한다면 apoptosis는 세포의 능동적인 죽음을 의미한다. 즉 조직이나 기관의 성장이나 어떠한 공격에 대한 방어작용, 또는 노화의 과정에서 항상성을 유

접수일 : 2003년 7월 3일

채택일 : 2003년 10월 2일

§ To whom correspondence should be addressed.

지하기 위하여 일어나는 것으로서, 개체의 효율적인 생존을 위하여 세포가 소멸되는 것을 의미한다.⁶⁻⁸⁾ 이러한 apoptosis 시 나타나는 특성으로는 chromatin의 condensation, apoptotic body의 형성, DNA fragmentation 등이 있다. Caspase (cysteiny aspartate-specific proteinase)는 일명 killer protease라고 불리며 apoptosis를 일으키는 중요한 cysteine protease이다.^{9,10)} Caspase는 활성화되면 adhesion molecule, cytoskeleton, cell cycle을 조절하는 물질을 분해할 수 있으며, 핵 내에 존재하면서 DNA repair에 관여하는 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)와 세포질 내에 존재하는 GDP dissociation inhibitor인 D4-GDI를 분해한다고 알려져 있다. 지금까지 12종류의 caspase가 보고되었고, 이 중 caspase-3의 활성화는 세포의 apoptosis에 중요하게 관여한다.^{11,12)}

암의 치료는 그 동안 수많은 시도와 연구를 통하여 상당한 수준에 이르렀으나 아직도 그 한계와 문제점이 해결되지 못한 것이 사실이다. 악성종양 치료에 사용되는 여러 가지 항암제들은 정상세포와 암세포를 선택적으로 구분하지 못하고 주로 활발하게 분열하고 있는 세포들이 영향을 받기 때문에 숙주에서의 부작용이 필연적으로 뒤따르고 있으며, 선택적 독성이 심각한 편이다. 각종 동물실험을 통해 항암제는 DNA를 손상시키고, 면역 감시체계의 붕괴를 일으킨다.¹³⁾ 이와 같이 암 치료에 사용중인 항암제는 정상세포에도 독성을 나타내고, 암세포에 대하여 내성을 형성케 함으로써 많은 문제점을 야기 시킨다.

Daunorubicin은 1939년 미생물로부터 분리한 붉은 물질로, 순수한 물질은 고체로서 섭씨 208~209℃에서 녹는 성질을 가지고 있다. 이것은 idarubin, doxorubicin, adriamycin과 같은 anthracycline antibiotic이다. 1950년대에 항생제로 사용하려 하였으나 세균에 대한 효과는 매우 높았지만, 사람의 감염에 사용하기에는 너무나 독성이 강해서 사용할 수 없었다. 1960년대에 antitumor properties 연구 시에 암세포에 효과가 있음이 확인되었고, 특히 solid tumor 세포보다는 leukemia 세포에 더 효과적이었다. 작용 기전은 DNA 복제를 억제함으로써 세포분열과 성장을 방해한다. 즉 DNA 이중나선구조가 분리되고 난 후 재접착하는 과정에 작용하는 topoisomerase의 작용을 억제함으로써 수많은 DNA strand가 생기게 되고 이 때문에 세포가 죽게 된다.¹⁴⁾ 또한 세포내에서 daunorubicin 분자내의 quinone portion이 formaldehyde의 생성을 촉진시키고 formaldehyde는 amino-sugar portion과 반응하여 daunorubicin을 활성화시킨다. 이것이 DNA안에 intercalate 하여 virtual cross-link를 형성하고 DNA를 alkylation시킨다.¹⁵⁾ Dau-

norubicin의 부작용은 정상세포를 mutation시킬 수 있고, 궤양을 형성할 수 있으며, 장기간 사용시 심장에 독성을 나타낼 수 있는데 cardiac myocytes를 사멸시켜, 심장근육의 기능에 방해를 주게 된다. 이것은 회복이 불가능하다. 또한 피부색이 검게 변하거나 붉은색으로 변할 수 있으며, 설사나 붉은 소변, 오심, 구토, 탈모등의 부작용이 올 수 있다.¹⁶⁾ Daunorubicin은 항암제로서 높은 치료 효과에도 불구하고 cardiotoxicity등의 부작용 때문에 실제 사용에 많은 제한을 받고 있다. 따라서 인체에는 독성을 나타내지 않으면서 기존 항암제의 항암 효과를 증가시키고, 적은 농도의 항암제를 투여하여도 같은 효과를 나타낼 수 있는 물질이 임상에 이용될 수 있다면, 암의 화학요법에 있어서 많은 이점을 가져다 줄 것이며 이는 항암제를 개발하는 것 이상의 의미 있는 일이 될 것이다.

본 연구는 마늘의 주성분인 DADS를 기존의 항암제인 daunorubicin과 함께 백혈병의 세포주인 HL-60 세포에 처리하여 DADS가 daunorubicin에 의한 암세포의 사멸을 증가시킬 수 있는지 확인하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 세포배양

사람 백혈구 암세포주인 HL-60 세포는 American Type Culture Collection (ACTT)에서 구입하였으며, 세포배양액은 RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10%의 fetal bovine serum과 2 mM glutamine, antibiotics로는 penicillin 60 mg/l, streptomycin 100 mg/l, amphotericin B 50 μl/l을 첨가하여 사용하였다. 세포배양은 산소가 95%, CO₂가 5%, 온도가 37℃인 CO₂ 세포배양기에서 이루어졌다.

2. 세포의 생존율을 위한 MTT 측정

세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 방법으로 측정하였다.¹⁷⁾ 96 well culture plate에 세포를 정상 대조군과 실험군으로 나누어 1 × 10⁶ 세포씩 분주하고, 실험군에 DADS와 daunorubicin등의 시약을 처리하여 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양 후 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 씻고, 각 well에 MTT (100 μg/0.1 ml)를 넣어 37℃에서 1시간 처리하였다. 살아있는 세포는 MTT로 인하여 보라색 불용성 formazan을 형성한다. 이것을 측정하기 위하여 dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 μl를 첨가하여 세포를 녹인 다음 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도

를 측정하였다. 세포생존율은 정상 대조군과 실험군의 흡광도를 비교하여 백분율 (%)로 표시하였다.

3. Caspase-3 활성도 측정

60 mm culture dish에 세포를 정상 대조군과 실험군으로 나누어 5.2×10^5 세포씩 분주하고, 실험군에 DADS와 daunorubicin 등의 시약을 처리하였다. 이를 37°C에서 24시간 배양한 후, 4°C의 PBS로 2회 씻어주었다. 여기에 lysis buffer (0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5)로 4°C에서 30분 처리하여 세포를 깨뜨리고 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 얻었다. 상층액의 단백질을 정량한 후, 상층액 30 μ g과, caspase substrate인 Ac-DEVD-AFC (Pharmingen Inc, San Diego, CA, USA)를 5 μ l, caspase assay buffer (10% glycerol, 2 mM DTT, 20 μ M HEPES, pH 7.5) 500 μ l를 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. Caspase-3의 활성도는 기질인 Ac-DEVD-AFC가 caspase-3에 의해 형광물질인 AFC로 분해된다. 이것을 spectrofluorophotometer를 사용하여 400 nm (excitation wavelength)와 505 nm (emission wavelength)에서 측정하였다.

4. Poly-(ADP-ribose) Polymerase와 D4-DGI의 Western blot

60 mm culture dish에 세포를 정상 대조군과 실험군으로 나누어 5.2×10^6 세포씩 분주하였다. 실험군에 daunorubicin과 DADS 등의 시약을 처리하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포를 수거하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 얻었다. 이 상층액의 단백질을 정량하여 동량을 PARP는 10%, D4-GDI는 14%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분자량 크기에 따라 분리하였다. 이 gel을 nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 transfer시키고, 2% bovine serum albumin (BSA)로 30분간 blocking 시켰다. Blocking된 membrane에 PARP antibody와 D4-DGI antibody (Transduction Lab, Lexington, KY, USA)를 넣어 반응시킨 후 씻어주고, 여기에 alkaline phosphatase가 결합된 secondary antibody를 붙인 후 BCIP/NBT 용액 하에서 발색시켰다.

5. DNA 분절 확인을 위한 Gel electrophoresis

60 mm culture dish에 세포를 정상 대조군과 실험군으로 나누어 5.2×10^6 씩 분주하고 실험군에 시약을 처리하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 세포를 수거하여 cell pellet을 얻은 뒤, 500 μ l의 lysis buffer (0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 넣고

실온에서 15분간 놓아둔 후 11,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 pellet을 얻었다. 여기에 phenol/chloroform (1 : 1)을 넣어 DNA를 extract하였다. 이를 100% ethanol로 원심하여 침전시키고 그 pellet를 70% ethanol로 2회 씻어낸 후 TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹인 다음 단백질을 정량하여 각각 일정한 양을 2%의 agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 등 아래에서 DNA 분절을 확인하였다.

6. 단백질 정량

HL-60세포의 cytosol의 단백질 정량은 Bradford method¹⁸⁾로 측정하였고 BSA로 표준곡선을 잡았으며 각 시료당 3회 측정하였다.

7. 통계분석

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균 (mean)과 표준편차 (standard deviation, SD)를 산출하였으며 통계적인 유의성이 $p < 0.01$ 과 $p < 0.001$ 내에서 검증된 결과를 표시하였다.

결 과

1. 세포 생존율

항암제인 daunorubicin과 DADS가 HL-60세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 daunorubicin을 농도별로 10 nM에서 1000 nM까지 처리하였고, 각각의 daunorubicin 농도에 25 μ M DADS를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군으로 나누어 실험하였다. 세포생존율은 시약처리 후

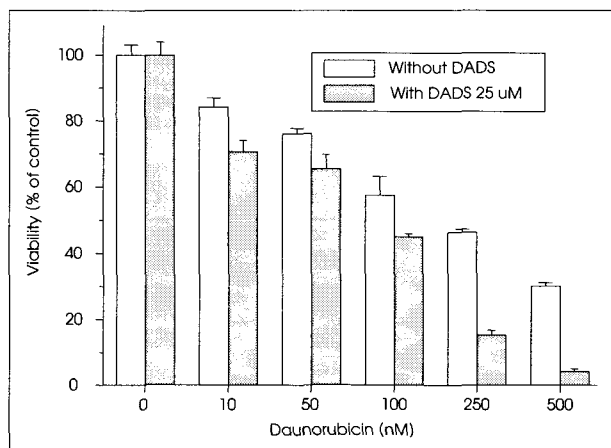


Fig. 1. Effect of DADS on daunorubicin-induced cell death. HL-60 cells were treated various concentrations (0 – 1000 nM) of daunorubicin with or without 25 μ M DADS for 24 h and viability was determined by MIT assay. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of A_{550} of treated a control cells. Each value is the mean \pm S.D. of four independent experiments.

24시간 후에 MTT assay를 실시하여 비교하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 daunorubicin 10 nM을 단독 처리한 경우 세포생존율은 84%를 나타냈으며, daunorubicin 10 nM과 25 μ M DADS를 같이 처리한 군의 세포생존율은 70.6%를 나타내었다. Daunorubicin 250 nM 단독 처리시 세포생존율은 46.4%를 나타내었고, daunorubicin 250 nM과 25 μ M DADS를 같이 처리한 군은 세포생존율이 20%를 나타내었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 daunorubicin 단독 처리시보다 DADS를 함께 처리하였을 경우 세포생존율이 50%이상 감소한 것으로서, DADS가 daunorubicin에 의한 세포사멸을 증가시키는 효과가 있음을 보여준 것이다.

2. Daunorubicin과 DADS에 의한 Caspase-3의 활성화 및 CPP32의 Proteolytic cleavage

HL-60세포에 daunorubicin과 DADS를 처리하였을 경우, caspase-3 활성화는 정상대조군에 비해 daunorubicin 250 nM을 단독으로 처리한 경우와 daunorubicin 100 nM과 DADS 25 μ M를 같이 처리 한 경우 모두 5.5배 증가하였다 (Fig. 2). 이는 daunorubicin 100 nM과 25 μ M

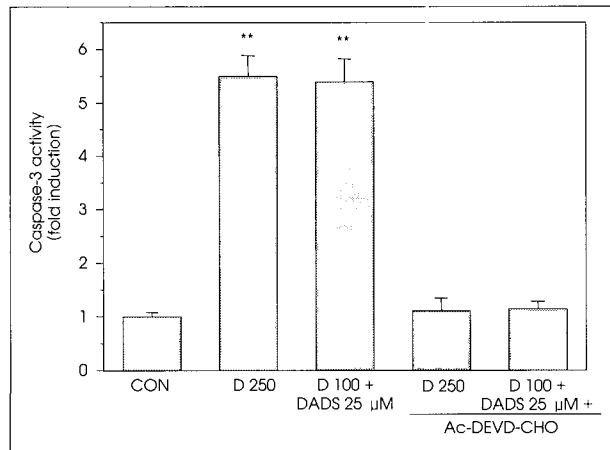


Fig. 2. Caspase-3 activity after treatment with daunorubicin (D) with or without DADS. Cells were treated with either 250 nM daunorubicin or 100 nM daunorubicin + 25 μ M DADS for 24 h in the presence or absence of 3 μ M Ac-DEVD-CHO. Cytosolic extracts were prepared and assayed for caspase activity. Values represent mean + S.D. of six separated experiments (Significant difference **: $p < 0.01$).

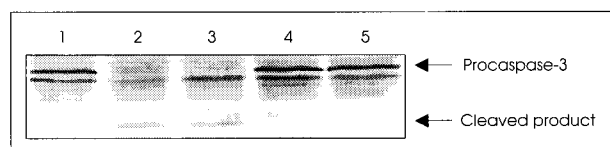


Fig. 3. The cleavage of CPP32 by daunorubicin with or without DADS. The cleavage of CPP32 was analyzed by western blotting in various conditions. Lane 1, control; Lane 2, 250 nM daunorubicin; Lane 3, 100 nM daunorubicin + DADS 25 μ M; Lane 4, 250 nM daunorubicin + 3 μ M Ac-DEVD-CHO; Lane 5, 100 nM daunorubicin + DADS 25 μ M + 3 μ M Ac-DEVD-CHO.

DADS를 같이 처리한 경우 daunorubicin 250 nM을 단독으로 처리한 것과 같은 효과를 나타내는 것이며, 각각에 caspase-3 inhibitor인 Ac-DEVD-CHO를 처리하였을 경우, caspase-3의 활성화는 정상대조군과 같은 수준으로 전혀 증가하지 않았다.

또한, Fig. 3에서 보는 바와 같이 caspase-3의 proform인 CPP32의 proteolytic cleavage는 정상 대조군에서는 거의 일어나지 않은 반면, daunorubicin 250 nM 단독 처리시와 daunorubicin 100 nM과 DADS 25 μ M를 함께 처리 시의 CPP32의 proteolytic cleavage가 거의 같은 정도로 일어났다 (Fig. 3). Caspase-3 inhibitor인 Ac-DEVD-CHO 처리시에는 CPP32의 proteolytic cleavage가 거의 일어나지 않았다.

3. Daunorubicin과 DADS에 의한 PARP와 D4-GDI의 Cleavage

PARP의 분해는 daunorubicin 250 nM 단독 처리 시와 daunorubicin 100 nM과 DADS 25 μ M를 함께 처리 시, 모두 같은 정도로 116 kD에서 85 kD으로 분해되었고, caspase-3 inhibitor인 Ac-DEVD-CHO 처리시에는 PARP의 분해가 정상대조군과 같이 거의 일어나지 않았다 (Fig. 4). D4-GDI의 분해는 정상대조군에 비해 daunorubicin 250 nM 단독으로 처리시와 daunorubicin 100 nM과 25 μ M DADS를 함께 처리시, D4-GDI의 분해도는 같은 정도로 28 kD에서 23 kD으로 분해되었고, caspase inhibitor인 Ac-DEVD-CHO 처리시에는 D4-GDI의 분해가 정상 대조군

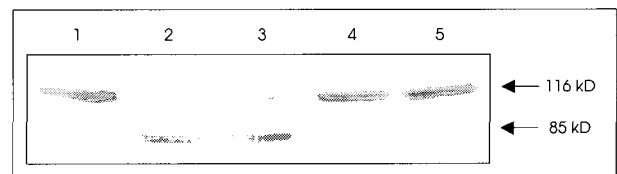


Fig. 4. The cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase by daunorubicin with or without DADS. The cleavage of PARP was analyzed by western blotting in various conditions. Lane 1, control; Lane 2, 250 nM daunorubicin; Lane 3, 100 nM daunorubicin + DADS 25 μ M; Lane 4, 250 nM daunorubicin + 3 μ M Ac-DEVD-CHO; Lane 5, 100 nM daunorubicin + DADS 25 μ M + 3 μ M Ac-DEVD-CHO.

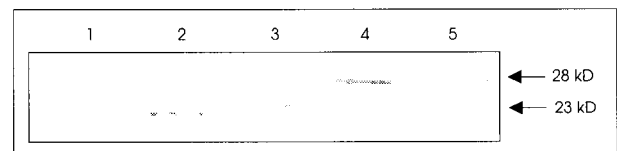


Fig. 5. The cleavage of D4-GDI by daunorubicin with or without DADS. The cleavage of D4-GDI was analyzed by western blotting in various conditions. Lane 1, control; Lane 2, 250 nM daunorubicin; Lane 3, 100 nM daunorubicin + DADS 25 μ M; Lane 4, 250 nM daunorubicin + 3 μ M Ac-DEVD-CHO; Lane 5, 100 nM daunorubicin + DADS 25 μ M + 3 μ M Ac-DEVD-CHO.

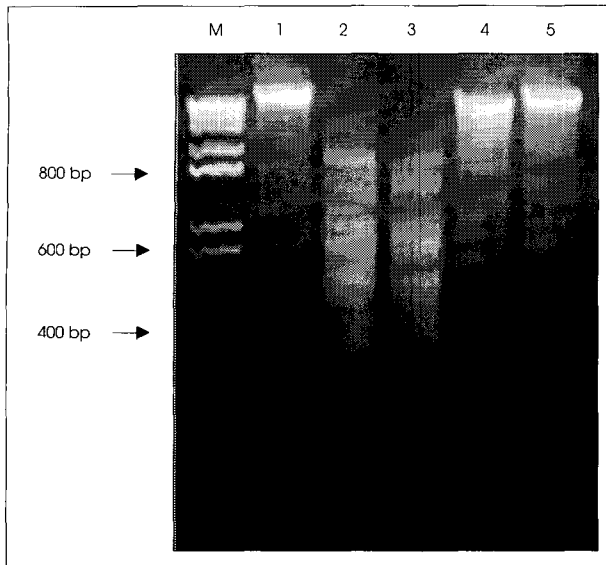


Fig. 6. Induction of DNA fragmentation by daunorubicin with or without DADS. HL-60 cells were treated with various condition for 24 h and analyzed on 2% agarose gel electrophoresis. Lane 1, control; Lane 2, 250 nM daunorubicin; Lane 3, 100 nM daunorubicin + DADS 25 μ M; Lane 4, 250 nM daunorubicin + 3 μ M Ac-DEVD-CHO; Lane 5, 100 nM daunorubicin + DADS 25 μ M + 3 μ M Ac-DEVD-CHO.

과 같이 거의 일어나지 않았다 (Fig. 5).

4. DNA 분절

DNA 분절은 정상대조군에서는 일어나지 않았고 daunorubicin 250 nM을 단독으로 처리했을 시와 daunorubicin 100 nM과 DADS 25 μ M을 함께 처리 시, 거의 같은 정도로 DNA 분절이 일어났다. 각각에 caspase-3 inhibitor 인 Ac-DEVD-CHO 처리시에는 DNA 분절이 일어나지 않았다 (Fig. 6).

고 찰

한국인의 주요 사망 원인 중 암으로 인한 사망은 최근 사망 순위 중 2위를 차지하고 있다. 해를 거듭할 수록 암 환자는 늘어나고 있으며 그 치료법 또한 많은 발전을 이루어 온 것도 사실이다. 그러나 암의 치료에서 기존의 항암제들은 암 세포 주에 대해 직접적인 살상을 목표로 하고 있기 때문에 세포독성 효과는 있지만 대부분 개체 저항력을 떨어뜨리는 부작용 등의 많은 문제점을 가지고 있다.¹³⁾ 그래서 인체에 부작용이 없는 식품중의 성분으로 암을 치료하려는 연구들이 계속되고 있으며 많은 성분이 암의 치료에 효과가 있다는 보고들이 나오고 있다. 식품 중에 들어있는 carotene 은 폐, 위, 식도, 구강암의 발생을 줄이며, 과일과 채소에 많이 함유되어있는 vitamin C는 위암에 대하여 보호작용을 하

고, 고식이섬유소는 결장 암과 계실염의 위험을 줄인다는 보고가 있다.¹⁴⁾ 자연식품으로 섭취한 수천 종의 phytochemical이 서로 다른 생체 내 반응을 활성화시키거나 또는 억제시켜 인체에 독이 없이 항암 효과를 나타내고 내성을 저지시키므로 암 환자에게 복합적인 투여의 필요성이 증대되고 있다.¹⁵⁾ 따라서 오랫동안 복용되어온 향신료나 식품첨가물 중에서 그 안정성이 인정된 자연산물의 항암 효과를 점검하는 일은 중요한 일이 아닐 수 없다. 많은 chemopreventive agents 중에서 마늘은 수세기를 통하여 음식물과 향신료로 사용되어 왔는데, 매운맛을 내는 성분인 DADS가 각종 암에 효과가 있다는 내용들이 보고되고 있다.^{3,5,20)}

본 연구에서는 백혈병 세포 주에 항암제인 daunorubicin과 마늘의 성분인 DADS를 함께 처리함으로써 daunorubicin의 용량을 줄이는 것을 기본 개념으로 하여 연구를 시작하였다. 백혈병 세포주인 HL-60 세포에 daunorubicin을 처리하였을 경우, 25 μ M DADS를 함께 처리 시에는 단독 처리시보다 같은 농도의 daunorubicin에서 세포 생존율이 50% 감소하였다. 이것은 DADS가 항암제인 daunorubicin의 작용을 항진시킨 것으로 볼 수 있다.

최근에 선택적으로 암세포에 작용하여 apoptosis를 유도하는 것이 항암제 개발의 한 방법으로 사용되고 있는데, apoptosis는 약물, 화학약품, 질병, 방사선이나 Fas나 TNF-R1과 같은 death receptor로 인한 signal이 암세포 내로 오게 되면, mitochondria의 membrane potential을 변화시키거나 reactive oxygen species (ROS)를 형성시켜 세포 내로 AIF, cytochrom C, Apaf-1 등을 분비하게 되고 이들이 caspase-3를 활성화 시켜서 apoptosis를 유발하게 된다.^{4,21)}

HL-60세포에 daunorubicin을 처리하면 caspase의 활성이 증가하고, 다음 단계인 PARP 및 D4-GDI의 cleavage, DNA 분절 등을 관찰할 수 있어, daunorubicin이 여러 가지 apoptosis 경로 중 caspase-3의 활성화를 통해 apoptosis를 유발시킴을 알 수 있었다. 이 때 항암제인 daunorubicin 250 nM 단독으로 처리하였을 때와 daunorubicin 100 nM과 DADS 25 μ M을 함께 처리하였을 경우에 모두 정상 대조군보다 caspase-3 활성화도가 5.5배 증가하였다. 이것은 항암제인 daunorubicin 농도 100 nM에서 25 μ M DADS를 첨가할 경우에는 250 nM의 daunorubicin과 같은 효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다. 또한 caspase-3의 기질인 PARP와 D4-GDI의 분해도와 DNA 분절도 daunorubicin 250 nM 단독 처리 시와 daunorubicin 100 nM과 DADS 25 μ M을 함께 처리하였을 경우 같은 정도로 분해가 일어났다. 이로서 DADS를 daunorubicin

과 병합하여 사용할 경우 암세포의 apoptosis에 있어서 항암제인 daunorubicin의 양을 현저히 줄이면서도 동일한 효과를 나타낼 수 있다는 사실을 확인하였다. Daunorubicin과 같은 항암제의 부작용이 약물의 농도와 밀접한 관계가 있음을 고려할 때, 식품 성분인 DADS와의 병합 요법을 사용하면 현저히 항암제의 투여 용량을 줄일 수 있고, 따라서 심근세포 사멸과 같은 부작용을 줄일 수 있어 효과적으로 daunorubicin 치료를 적용하는데 큰 도움이 될 수 있으리라 생각된다.

식품의 성분인 DADS를 사용함으로써 인체에 부작용이 심한 항암제인 daunorubicin의 용량을 절반 이하로 줄일 수 있었다는 본 연구의 결과는 앞으로도 암의 치료에 있어서 병합 요법으로서의 식품의 성분에 대한 연구가 더욱 필요함을 시사해 준다 하겠다.

결론

본 연구에서는 마늘의 주성분인 diallyl disulfide (DADS)를 기존의 항암제인 daunorubicin과 동시 처리하였을 때, 항암제 단독 처리군 보다 절반 이하의 농도에서 백혈병 세포주인 HL-60 세포의 apoptosis가 일어남을 확인하였다. 25 μ M DADS의 존재 하에서 HL-60 세포주에 daunorubicin을 처리하면 daunorubicin 단독 처리시보다 암세포의 생존율은 50% 감소하였다. Caspase-3의 활성도는 daunorubicin 250 nM 단독 처리시와, daunorubicin 100 nM과 25 μ M DADS를 함께 처리하였을 경우 비슷하게 5.5 배 정도의 증가함을 관찰할 수 있었다. Caspase-3의 기질인 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)와 D4-GDI의 분해, DNA 분절도 daunorubicin 250 nM 단독 처리시와 daunorubicin 100 nM와 25 μ M DADS 병합 처리시 모두 같은 정도로 일어났다. Daunorubicin과 같은 항암제의 부작용이 약물의 농도와 밀접한 관계가 있음을 고려할 때, 식품 성분인 DADS와의 병합 요법을 사용하면 현저히 항암제의 투여 용량을 줄일 수 있고, 따라서 심근세포 독성과 같은 부작용을 줄일 수 있어 효과적으로 daunorubicin 치료를 적용하는데 큰 도움이 될 수 있으리라 생각된다.

Literature cited

- 1) 현영희, 구분순, 송주은, 김덕숙 공저. 식품재료학. 형설출판사, pp.113-114, 2001
- 2) Yamasaki T, Lau BH. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidant injury. *Nippon Yagurikaku Zasshi* 110 (1) : 138-141, 1997
- 3) Munday R, Munday CM. Low doses of diallyl disulfide, a compound derived from garlic, increase tissue activities of quinone reductase and glutathione transferase in the gastrointestinal tract of the rat. *Nutr Cancer* 34 (1) : 42-48, 1999
- 4) Sundaram SG, Milner JA. Diallyl disulfide inhibits the proliferation of human tumor cells in culture. *Biochem Biophys Acta* 1315: 15-20, 1996
- 5) Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, Yang JY, Rho HW, Kim JS, Park JW, Kim HR, Park BH. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharm* 63: 41-47, 2002
- 6) Allen PD, Bustin S, Newland AC. The role of apoptosis (programmed cell death) in hemopoiesis and immune system. *Blood Rev* 7 (1) : 63-73, 1993
- 7) Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449, 1995
- 8) Kannan K, Sushil KJ. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiol* 7 (27) : 153-163, 2000
- 9) Kaushal GP, Singh AB, Shah SV. Identification of gene family of caspases in rat kidney and altered expression in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 274: 587-598, 1998
- 10) Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA. Inhibition of interleukin 1 converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2007-2012, 1997
- 11) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462, 1995
- 12) Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer protease. *Trends Biochem Sci* 22 (8) : 299-306, 1997
- 13) Penn I. Chemical immunosuppression and human cancer. *Cancer* 34: 1474-1480, 1974
- 14) Taatjes DJ, Georgio G, Katheryn R, Tad HK. Redox pathway leading to the alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin. *J Med Chem* 40 (8) : 1276-1286, 1997
- 15) Fenick DJ, Taatjes DJ, Koch TH. Doxoform and Daunoform: anthracycline-formaldehyde conjugates toxic to resistant tumor cells. *J Med Chem* 40 (16) : 2452-2461, 1997
- 16) Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL, Bon Hoff AL, Rozwncweig M, Muggia FM. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 91: 710-717, 1979
- 17) Oez S, Platzer E, Welte K. A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes. *Bult* 60: 97-102 1990
- 18) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- 19) Champe PC, Harvey RA. Biochemistry 2nd edition, pp.312-316, 1999
- 20) Sheen LY, Sheu SF, Tsai SJ, Meng RH, Lii CK. Effects of garlic components diallyl disulfide, on cell viability, lipid peroxidation, glutathione concentration and its related enzyme activities in primary rat hepatocytes. *Am J Chin Med* 27 (1) : 95-105, 1999
- 21) Green DR, Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281: 1309-1312, 1998