



## B16-F10 Murine Melanoma 세포의 암전이 억제가 미치는 Diallyl Disulfide의 효과

강미경<sup>1</sup> · 전혜승<sup>1</sup> · 염영나<sup>1</sup> · 황명실<sup>1</sup> · 박미선<sup>1</sup> · 김옥희<sup>2</sup>

<sup>1</sup>국립독성연구원 독성연구부, <sup>2</sup>부산지방식품의약품안전청

## The Effects of Diallyl Disulfide on Antimetastatic Potential of B16-F10 Murine Melanoma Cells

Mi-Kyung Kang<sup>1</sup>, Hye-Seung Jun<sup>1</sup>, Yung-Na Yum<sup>1</sup>, Myung-Sil Hwang<sup>1</sup>,  
Mi-Sun Park<sup>1</sup> and Ok-Hee Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Toxicological Research, National Institute of Toxicological Research, Seoul 122-704

<sup>2</sup>Busan Regional Korea FDA, Busan 608-829, Korea

Received September 6, 2006; Accepted November 14, 2006

**ABSTRACT.** Diallyl disulfide (DADS), an oil-soluble organosulfur compound in garlic has been reported to suppress tumor growth and to induce apoptosis in cancer. In the present study, we investigated the effects of DADS on pulmonary metastasis of B16-F10 murine melanoma cells. DADS (i.p. 40 mg/kg) significantly ( $p < 0.05$ ) reduced the number of pulmonary metastatic nodules (48%) in experimental pulmonary metastasis assay. We also found that DADS inhibited adhesion, invasion and migration of B16-F10 melanoma cells in a dose-dependent manner. To study the antimetastatic potential of DADS, we performed the effects of DADS on matrix metalloproteinase activity. DADS significantly inhibited the expression of matrix metalloproteinase-2 activity in B16-F10 cells by gelatin zymography. These results suggest that DADS prevent metastasis in part through suppression of migration of B16-F10 melanoma cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2 responsible for degradation of extracellular matrix.

**Keywords:** Diallyl disulfide, B16F10 melanoma cells, Experimental pulmonary metastasis assay, Invasion, Matrix metalloproteinase-2

### 서 론

암의 치료(수술요법, 방사선요법, 화학요법 및 면역요법)는 그동안 수많은 시도와 연구를 통하여 상당한 수준에 이르렀음에도 불구하고 그 한계와 문제점은 완전히 해결되지 않았으며, 대부분의 암 사망은 통계적으로 암전이에 기인되고 있다. 암전이 현상은 1차 종양 부위에서 이탈된 전이성을 가진 악성 암세포가 새로운 조직에서 2차 종양을 형성하는 것으로 이동(migration), 침윤(invasion), 혈관신생(angiogenesis) 등의 일련의 과정이 수반되며(Poste

and Fidler, 1980), 세포의 복잡하고 다단계적인 세포 신호 전달에 의해서 개시되고 진행된다(Keely *et al.*, 1998). 이러한 각각의 암전이 단계를 저해함으로써 암세포의 전이를 막고 치료의 부작용을 최소화할 수 있는 암 억제제 개발에 대한 연구가 최근 많은 연구자들에 의해 활발히 진행 중이다.

한편, 지금까지 행해진 수많은 *in vivo*와 *in vitro* 실험 및 역학 조사 결과에 따르면 암의 유발이 식이나 기호, 습관 등 개인 환경에 의해 촉진된다고 밝혀짐에 따라(Bertram *et al.*, 1987), 최근 암의 퇴치 방향은 조기 진단이나 치료보다는 식품을 통한 화학적 암 예방(chemoprevention)이 크게 각광을 받고 있다(Weinstein, 1985). 화학적 암 예방은 비타민이나 식물성 추출물 등 독성이 없는 안전한

Correspondence to: Ok-Hee Kim, Busan Regional Korea FDA, Yongdang-Dong 123-7, Nam-Gu, Busan 608-829, Korea  
E-mail: [kimkfd@kfda.go.kr](mailto:kimkfd@kfda.go.kr), [receptacle@hanmail.net](mailto:receptacle@hanmail.net)

화학물질(phytochemical)이나 그 혼합물을 이용한 암예방의 새로운 전략으로, 암환자에게 항암제를 투여하는 기존의 화학치료 요법(chemotherapy)과는 다른 개념이다 (Sporn and Newton, 1979). 현재 genistein, EGCG, resveratrol, curcumin 등을 포함한 약 2000여종의 phytochemical에 대한 chemopreventive agents가 연구되고 있으나(Surh, 2003), 이들이 임상에 이용되기까지는 많은 시간이 걸리는 것으로 예상된다.

마늘은 수세기를 통하여 음식물과 향신료로 사용되어 왔으며(Agarwal, 1996), 마늘의 항균 효과가 보고된 이래(Cavallitto *et al.*, 1944), 마늘과 마늘 구성성분은 항생제, 생체내 지질강하효과, 항 혈소판응집효과, 약물대사 항진 및 혈관장애 개선, 바이러스와 곰팡이 치료 등에 걸쳐 다양한 연구가 행해졌고 그 효과가 보고되었다(Banerjee *et al.*, 2003). 또한 마늘에 들어있는 유기 황 화합물이 세포내 glutathione(GSH) 및 glutathione-S-transferase(GST) 활성을 증가시켜 항암활성을 가지는 것으로 보고되었다(Amagase and Milner, 1993; Wargovich *et al.*, 1988). 특히 마늘의 지용성 화합물인 diallyl disulfide(DADS)는 수용성화합물보다 더 효과적인 항암활성을 가지는 물질로(Sundaram and Milner, 1993), 종양세포의 성장을 억제하고 돌연변이 유발성 저해 효과를 가진다고 보고되었다(Kwon *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2001; Goldberg and Josephy, 1987). 또한 Koh 등은 DADS가 항산화 활성을 가짐으로써 뇌세포의 세포사멸을 억제한다고 보고하였다(Koh *et al.*, 2005).

그러나, 지금까지 DADS의 화학적 암 예방에 관련된 연구는 종양의 성장과 생존에 관한 것이 대부분이며 암 전이에 관한 연구는 더욱 미비하다. 따라서 본 연구에서는 C57BL/6 마우스를 이용한 B16-F10 melanoma 세포의 폐암전이 모델을 확립하여 마늘의 주성분인 DADS가 암 전이에 미치는 효과를 확인하고, B16-F10 암세포를 이용하여 DADS로 인한 암세포의 이동성(migration), 침윤성(invasion) 및 효소 측정 등을 통하여 암전이 효과를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

Diallyl disulfide(DADS, purity 80%)는 Fluka 회사(Bucha, Switzerland)로부터 구입하였으며, Eagle's minimal essential medium(MEM), Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS), fetal bovine serum(FBS), sodium pyruvate, non-essential amino acid 및 penicillin-streptomycin은 Gibco 회사(Gland Island, NY, USA)에

서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 methylcellulose는 Sigma 회사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 그 외의 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 실험동물

본 연구에 사용된 5~6주령의 SPF(specific pathogen free) C57BL/6 수컷 마우스는 국립독성연구원에서 분양 받아 1주일 동안 순화하여 사용하였으며, 사육 환경은 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 20\%$ , 12시간 조명을 유지시켰고, 사료 및 음수는 제한 없이 섭취시켰다.

### 세포주 및 배양조건

C57BL/6 마우스에서 유래된 악성 흑색종인 B16-F10 melanoma 세포는 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. B16-F10 melanoma 세포는 10% FBS, 100  $\mu\text{g/ml}$  penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin을 첨가한 MEM 배지에서  $37^\circ\text{C}$  포화 습도로 유지되는 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다.

### *In vivo* 폐암전이 모델을 이용한 DADS의 암전이 억제 효과 조사

마늘 성분인 DADS가 B16-F10 세포의 종양형성에 미치는 영향은 마우스를 이용한 *in vivo* 폐암전이 모델을 이용하여 조사하였다(Fidler and Hart, 1982). C57BL/6 마우스를 각각 대조군(암세포 무처리군)과 DADS 처리군(0, 10, 20, 40 mg/kg)으로 나누고 각 군당 8마리씩 배치하여 실험을 수행하였다. 0.1%(w/v) methylcellulose가 들어있는 생리적 식염수에 현탁한 DADS를 각 농도별로 0.2 ml 씩, 주 3회 4주동안 복강투여 하였다. 복강투여 일주일 후 HBSS에 현탁한 B16-F10 세포( $5 \times 10^5$  cells/ml)를 0.2 ml 씩 C57BL/6 마우스의 꼬리정맥내로 주사하였다. 암세포 이식 21일 후 부검하여 폐에 전이된 종양의 수를 측정하여 DADS의 암전이 억제 또는 촉진 여부를 조사하였다.

### DADS가 B16-F10 murine melanoma 세포의 성장에 미치는 영향 조사

B16-F10 melanoma 세포에 미치는 효과는 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetra-zolium bromide]방법으로 조사하였다(Rubinstein *et al.*, 1990). 96 well plate에  $2 \times 10^4$  cells/ml의 B16-F10 세포를 분주하고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 의 배양조건에서 하룻밤 동안 배양하였다. DMSO에 녹인 DADS를 농도별(0, 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ )로 24시간 동안 처리하였으며 DMSO는 세포 배양액에 대하여 0.1% 미만이 되도록 하였다. 배양

24시간 후 배지를 제거하고 인산완충용액으로 희석된 2.0 mg/ml의 MTT 용액을 각 well당 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C에서 4시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 생성된 formazan crystal에 DMSO를 가하여 녹여낸 후 microplate reader (E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험 결과는 세포를 배양하지 않은 처리군에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, DADS에 대한 각 세포의 생존율은 시험물질이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 환산하였다.

#### DADS가 B16-F10 murine melanoma 세포의 부착성에 미치는 영향 조사

B16-F10 melanoma 세포의 세포 부착 활성에 미치는 DADS의 영향을 조사하기 위하여, collagen-IV coated microplate를 사용하였다(Pasqualini *et al.*, 1996). 50  $\mu$ g/ml 농도로 용해시킨 collagen을 96 well microplate에 50  $\mu$ l씩 분주하고 하룻밤동안 건조한 후, 1.0% BSA (bovine serum albumin)가 첨가된 PBS로 세척하여 사용하였다. Collagen-IV coated microplate에 B16-F10 세포( $2 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l)를 분주한 후 DADS를 농도별(0, 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M)로 처리하고 4시간 동안 배양하였다. PBS로 3회 세척하여 부착하지 않은 세포를 제거하고, 부착된 세포에 MTS/PMS(Promega) mixture를 20  $\mu$ l/well씩 첨가하여 다시 4시간 배양한 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### DADS가 B16-F10 murine melanoma 세포의 침윤성에 미치는 영향 조사

0.05 mg/ml Matrigel(Collaborative Biomedical products, Bedford, MA)로 처리된 polycarbonate filters(8  $\mu$ m pore size)를 24 well plate에 장착하고 필터 상부에 B16-F10 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well로 분주한 후 DADS를 농도별(0, 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M)로 처리하고 배양하였다. 배양 12시간 후 필터를 제거하고 하부로 침윤된 세포에 MTS/PMS(Promega) mixture를 20  $\mu$ l/well씩 첨가하여 다시 4시간 배양한 후 590 nm에서 흡광도를 측정하여 DADS가 암세포의 침윤성에 미치는 영향을 조사하였다(Moon *et al.*, 2000).

#### DADS가 B16-F10 murine melanoma 세포의 이동성에 미치는 영향 조사

B16-F10 세포의 이동성에 미치는 DADS의 효과를 조사하기 위하여, 6 well plate에 B16-F10 세포( $5 \times 10^5$  cells/well)를 분주하고 배양하였다. 배양 24시간 후 배지를 제거하고 25  $\mu$ g/ml의 mitomycin C를 30분간 전처리

하여 세포의 증식을 억제시킨 후 세포의 표면에 injury line을 만들었다. PBS를 이용하여 2회 세척 후 DADS를 농도별(0~50  $\mu$ M)로 처리하고 각각 0, 6, 24시간대별로 세포가 이동하는 것을 현미경으로 관찰하였다(Yamamura *et al.*, 1996).

#### In vitro gelatin zymography를 이용한 MMP-2 및 MMP-9의 효소활성 조사

B16-F10 melanoma 세포에 DADS를 농도별(0, 5, 10, 25, 50  $\mu$ M)로 처리하고 24시간 동안 배양한 후, 배양 배지를 수거하여 1.0 mg/ml의 젤라틴이 함유된 겔을 이용하여 전기영동 하였다(Moon *et al.*, 2000). 전기영동이 끝난 후 겔을 washing buffer(50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5% Triton X-100, 1.0  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>)로 세척한 후 incubation buffer(50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 0.15 NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>)에 넣어 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 다음, 0.1% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 Gel-Doc(Bio-Rad) 및 Quantity one(Bio-Rad)으로 분석을 하였다.

#### 통계분석

실험결과의 통계학적 처리는 unpaired Student's t-test를 사용하였으며  $p < 0.05$  수준 이하에서 유의성을 결정하였다.

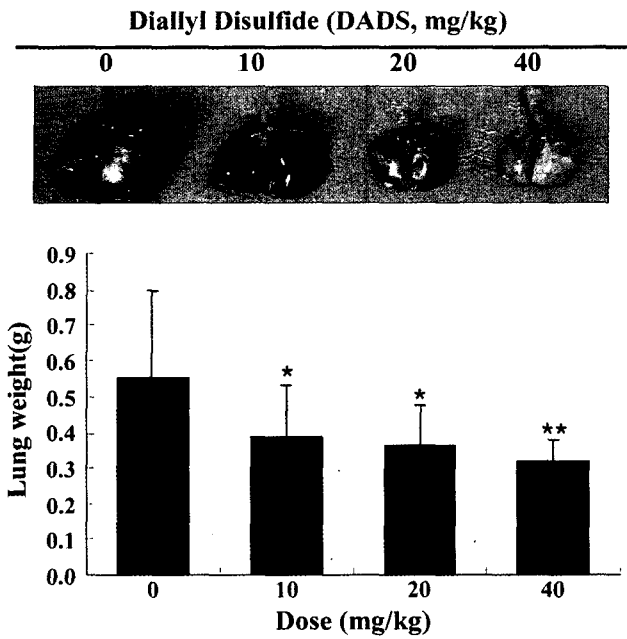
## 연구 결과

#### In vivo 폐암전이 모델을 이용한 DADS의 종양 전이 억제활성

DADS가 B16-F10 세포의 폐종양 형성에 미치는 영향은 C57BL/6 마우스를 이용한 in vivo 폐암전이 모델로 조사하였다. 암세포이식 21일 후 폐로 전이된 종양의 수를 측정하여 본 결과, B16-F10 세포에 의한 C57BL/6 마우스의 폐종양 형성이 DADS의 투여에 의해서 현저히 감소되었다(Fig. 1). DADS를 투여하지 않고 암세포만을 이식시킨 종양 대조군의 경우, 암세포에 의해서 전이된 종양 colony수가  $125 \pm 31$ 개로 관찰되었다. 그러나 DADS를 10, 20, 40 mg/kg로 복강 투여한 C57BL/6 마우스군에서는 각각  $84 \pm 14$ 개,  $67 \pm 18$ 개,  $65 \pm 13$ 개의 종양 colony가 관찰되어 암세포에 의한 폐전이 각각 33%, 46% 및 48%까지 억제되었다(Table 1).

#### B16-F10 murine melanoma 세포 증식에 미치는 DADS의 영향

DADS에 의한 C57BL/6 마우스의 폐암전이 억제 효과



**Fig. 1.** Effects of DADS on the experimental pulmonary metastasis of the B16-F10 cells in male C57BL/6 mice. The administration of DADS solution was started 7 days before the injection of B16-F10 cells and continued for 3 weeks as described in Materials and methods. After 4 weeks, the number of colonies and the weight of their lungs were measured. Data are mean  $\pm$  SD of three independent experiments (n = 20). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 vs none.

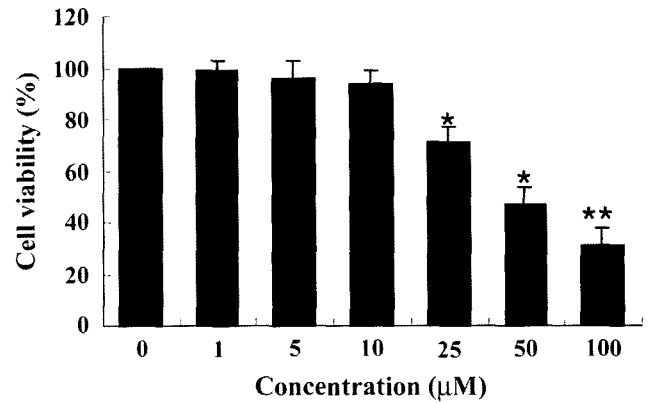
**Table 1.** Effects of DADS on lung colonization of B16-F10 melanoma cells in male C57BL/6 mice

DADS (mg/kg)	No. of lung colonies <sup>a</sup>	Inhibition (%) <sup>b</sup>
0	125 $\pm$ 31	-
10	84 $\pm$ 14	33*
20	67 $\pm$ 18	46**
40	65 $\pm$ 13	48**

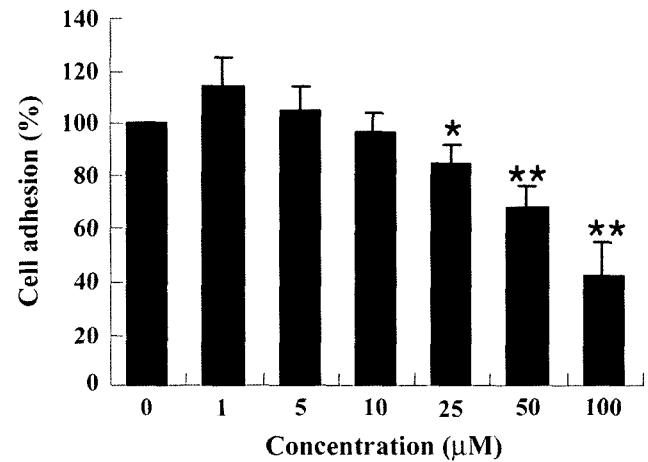
<sup>a</sup>The number of metastasis lung colonies were measured at day 28 days as described in Materials and methods. Data are mean  $\pm$  SD of three independent experiments (n = 20).

<sup>b</sup>A inhibition rate was observed in the number of lung metastasis colonies in compared with control. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 vs none.

가 B16F10 세포의 성장 억제를 통하여 일어나는지 알아 보기 위하여, B16-F10 세포에 DADS를 각각 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M의 농도로 24시간 동안 처리한 후 MTT assay를 수행하였다. Fig. 2에서와 같이 DADS는 25  $\mu$ M 미만의 농도에서는 B16-F10 세포의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다. 그러나 25  $\mu$ M 이상의 농도에서는 B16-F10 세포의 증식이 현저히 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. DADS의 농도가 25, 50 및 100  $\mu$ M 일 때 B16-F10 세포는 대조군에 비해 각각 71.24%, 47.02% 및



**Fig. 2.** Effects of DADS on the cell viability of B16-F10 melanoma cells. The cells were treated with various concentration of DADS for 24 hrs and cell viabilities were determined by MTT assay as described in Materials and methods. Results of triplicate experiments were expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 vs none.

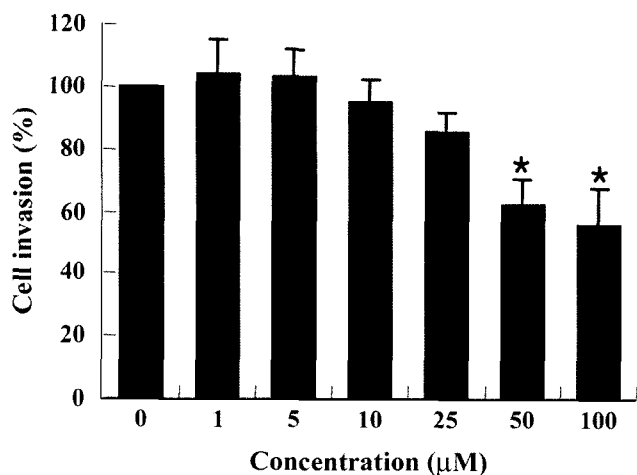


**Fig. 3.** Effects of DADS on B16-F10 melanoma cells adhesion. The cells were treated with various concentration of DADS for 24 hrs were subjected to *in vitro* invasion and adhesion assays as described in Materials and methods. Results of triplicate experiments were expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 vs none.

30.57%의 생존율을 보였으며, IC<sub>50</sub>는 약 54  $\mu$ M 정도로 나타났다(Fig. 2).

**B16-F10 murine melanoma 세포의 부착 및 침윤에 미치는 DADS의 영향**

DADS에 의한 B16-F10 세포의 *in vivo* 암전이 억제 활성이 *in vitro* 활성과 어떤 상관관계가 있는지 알아보기 위하여, B16-F10 세포에 DADS를 농도별(0~100  $\mu$ M)로 처리하고 암세포의 부착성과 침윤성에 미치는 영향을 조사하였다. B16-F10 세포의 부착성은 DADS의 농도 의존



**Fig. 4.** Effects of DADS on B16-F10 melanoma cells invasion. The cells were treated with various concentration of DADS for 24 hrs were subjected to *in vitro* invasion and adhesion assays as described in Materials and methods. Results of triplicate experiments were expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs none.

적으로 감소되었다(Fig. 3). DADS의 농도가 25, 50 및 100  $\mu\text{M}$ 일때 B16-F10 세포의 부착성은 각각 15%, 32% 및 58% 정도 감소되었다. 또한 DADS는 B16-F10 세포의 침윤성에도 영향을 미쳤다(Fig. 4). B16-F10 세포의 부착성에서 관찰된 바와 마찬가지로, 10  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서는 침윤성이 감소되지 않았으나 그 이상의 농도에서는 DADS의 농도의존적으로 B16-F10 세포의 침윤성이 감소

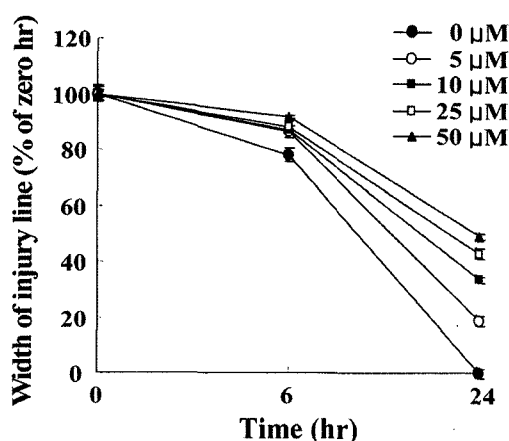
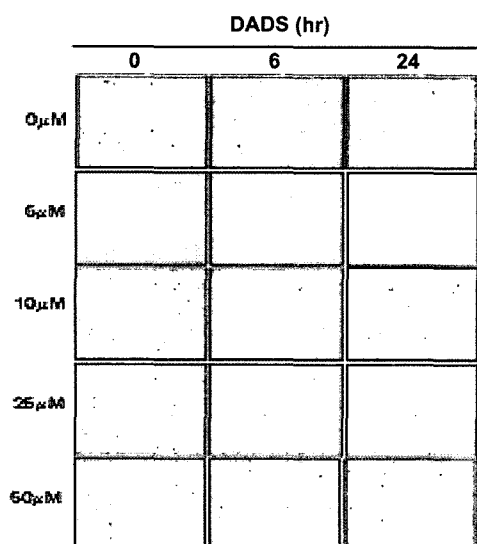
되었다. 각각 25, 50, 및 100  $\mu\text{M}$ 의 DADS에 의해서 B16-F10 세포의 부착성은 약 15%, 32% 및 58% 정도 감소하였다.

#### B16-F10 murine melanoma 세포의 이동성에 미치는 DADS의 영향

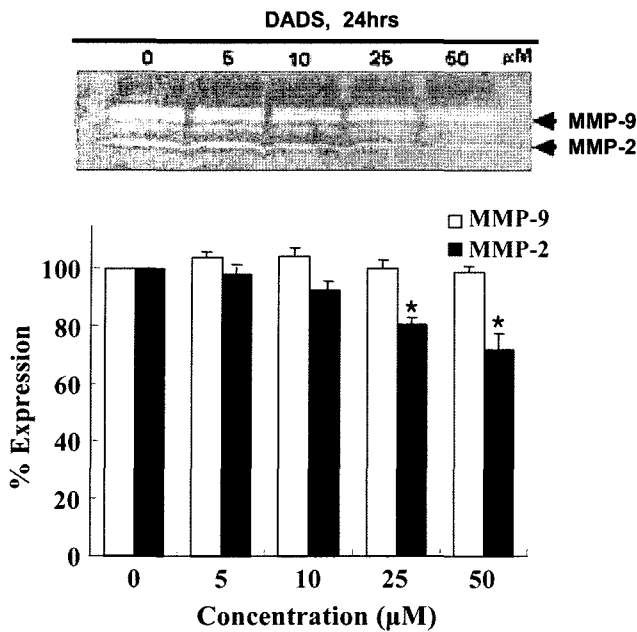
B16-F10 세포의 *in vitro* 활성에 대한 DADS의 효과가 암세포의 침윤성뿐만 아니라 이동성에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여, DADS를 각각 0, 5, 10, 25, 및 50  $\mu\text{M}$ 의 농도로 0, 6, 24시간 동안 처리한 후 wound migration을 조사하였다(Fig. 5). DADS를 처리하지 않은 대조군의 B16-F10 세포는 24시간 이내에 migration이 완료되어 injury line이 사라지는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 DADS를 처리한 실험군의 경우 DADS의 농도에 따라 각각 19%, 34%, 43% 및 49%의 이동성이 억제되었다.

#### DADS가 B16-F10 murine melanoma 세포의 MMP-2 및 MMP-9 효소 활성에 미치는 영향

DADS에 의한 B16-F10 세포의 침윤성 저해 효과가 기저막 단백질 분해효소의 활성에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여, B16-F10 세포에 DADS를 농도별(0~50  $\mu\text{M}$ )로 처리하고 MMP-2 및 MMP-9의 효소 활성도를 gelatin zymography 방법으로 조사하였다. B16-F10 세포에 DADS를 24시간 동안 처리한 결과, DADS의 농도가 증가함에 따라 암세포의 MMP-2 효소 활성도는 5, 10, 25 및 50  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 각각 2, 7, 20 및 28% 감소되었다



**Fig. 5.** Effects of DADS on B16-F10 melanoma cells migration. The cells were treated with various concentration of DADS after pretreatment with 25  $\mu\text{g/ml}$  mitomycin C for 30 min were subjected to *in vitro* wounding migration assay as described in Materials and methods. Cell migration was observed with microscope ( $\times 40$ ) at 0, 6, and 24 hrs. Results of triplicate experiments were expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs none.



**Fig. 6.** Zymographic analysis of B16-F10 murine melanoma cells treated with DADS. MMP-2 and MMP-9 activity were measured by gelatin zymography assay using the media of B16F10 cells treated with various concentration of DADS for 24 hrs. Results of triplicate experiments were expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs none.

(Fig. 6). 그러나 DADS의 농도 증가에 따른 MMP-9 효소 활성도는 유의성 있게 변화하지 않았다.

## 고 찰

마늘의 유기 황 화합물인 DADS는 암세포의 성장을 억제하고 apoptosis를 유도하며(Kwon *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2001), 히스톤 아세틸화를 증가시켜 마우스 erythroleukemic 세포의 분화를 유도한다고 보고되었다(Lea and Ayyala, 1997). 본 연구결과(Fig. 2)에서 마늘의 지용성 유기 황 화합물인 DADS는 마우스의 악성 흑색종인 B16-F10 세포의 성장을 유의성 있게 저해하였다. DADS의 처리 농도가 높아짐에 따라 응축되고 배지위로 부유하는 세포가 관찰된 것으로 보아 DADS가 전이성 암세포주인 B16-F10 세포의 세포성장을 억제하는 것으로 생각된다(Kwon *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2001). 이러한 DADS에 의한 암세포의 성장저해에 따른 형태적 변형 및 부착능력 상실은 cell adhesion assay를 통하여 관찰된 암세포의 부착을 감소와 일치하였다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 B16-F10 세포의 integrin과 fibronectin 사이의 상호결합의 약화가 세포 생존을 감소시키며 apoptosis를 유도한다는 Qian 등(2005)의 보고와 마찬가지로, DADS

에 의한 암세포의 성장억제 효과는 B16-F10 세포의 부착성 억제 능력과 관련 있는 것으로 보여진다. 그러나 DADS에 의한 B16-F10 세포의 부착성 상실과 세포 성장 억제에 관한 상관성에 대하여서는 더욱 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

또한 DADS는 마우스의 폐암전이 모델을 이용한 B16-F10 세포의 *in vivo* 암전이를 현저히 억제하였다. 10, 20, 40 mg/kg의 DADS를 복강투여하고 폐로 전이된 종양의 수를 측정 한 결과, 전이된 종양의 수가 각각 33%, 46%, 48%까지 농도 의존적으로 감소되어, 마늘 성분인 DADS가 암전이 억제에 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1, Table 1). 이러한 연구 결과는 마늘의 DADS가 B16-F10 melanoma 세포의 성장뿐만 아니라 전이도 억제하는 것을 보여주며, 마늘의 ajoene에 의한 폐암전이가 억제된다는 Taylor 등(1995)의 보고와 비슷한 양상을 보였다.

최초로 암 발생 장소에서 전이성을 가진 악성 암세포가 다른 새로운 조직으로 전이되어 이차종양을 형성하기 위해서는 이동 및 침윤, 혈관 신생 등의 일련의 과정을 동반하게 된다(Poste and Fidler, 1980). 특히 암세포의 침윤과 전이 단계는 세포의 기질을 분해하는 과정이 반드시 필요하며 이때 matrix metalloproteinases(MMPs), serine proteases, cystein proteases와 aspartic proteases 등의 여러 단백질 분해 효소가 작용한다(Curran and Murray, 1999; McCawley and Matrisian, 2000). 그중 가장 강력하고 중요하게 작용하는 단백질 분해효소는 MMPs이며, 약 20여종의 MMPs 중에서 type IV 콜라겐을 분해하는 MMP-2와 MMP-9이 각종 종양의 국소 침윤이나 전이 과정에 관여 한다고 알려져 있다(Zeng *et al.*, 1999; Papatoma *et al.*, 2000). 본 연구에서 DADS는 B16F10 melanoma 세포의 침윤을 억제하였으며(Fig. 4), MMP-9의 활성보다는 MMP-2의 활성을 효과적으로 억제하였다(Fig. 6). 이러한 결과들은 curcumin이 MMP-2 분비를 억제함으로써 MCF10A 세포의 침윤 활성화에 관여한다는 보고(Kim *et al.*, 2001)에서와 마찬가지로, DADS에 의해서 B16-F10 melanoma 세포의 MMP-2 활성이 감소되어 암세포의 침윤성이 억제됨으로써 암전이 활성이 일부 감소된 것으로 보인다. 일반적으로 MMPs에 의한 세포기저막 분해 작용은 tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMPs)에 의해서 주로 조절되며(Iwata *et al.*, 1996), MMPs와 TIMPs의 분비의 불균형으로 인하여 기저막이 분해되고 침윤과 전이가 일어난다고 알려져 있다(Liotta *et al.*, 1991). 그중 TIMP-2는 MMP-2와 복합체를 형성하여 MMP-2의 세포외 기질 분해능을 억제한다고 보고되었다(Greene *et al.*, 1996; Strongin *et al.*, 1993). 따라서 DADS가 MMP-2의 활성 뿐만아니라

TIMP-2 발현에도 영향을 미치는지에 대한 연구가 필요할 것으로 간주된다.

기존의 보고에 의하면 암세포의 이동은 PI3 kinase 또는 MAPKs가 조절한다고 알려져 있으며(Kundra *et al.*, 1994), pancreatic stellate cells이나 neuroblastoma cell의 경우 PI3Kinase와 MAPKs 사이의 cross-talk에 의해서 세포 이동이 일어난다고 한다(Pola *et al.*, 2003; Masamune *et al.*, 2003). 또한 Akt 하위 신호 전달 단백질인 GSK-3 $\beta$ 가 세포이동을 조절한다는 보고도 있다 (Schlessinger and Hall, 2004). 본 연구 결과에 따른 DADS의 암전이 억제 결과는 암의 예방과 치료에 도움이 될 수 있을 것으로 기대되어지나 DADS의 임상적 적용을 위해서는 암세포의 이동성 억제에 미치는 명확한 작용기전 및 임상에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Agarwal, K.C. (1996): Therapeutic action of garlic constituents. *Med. Res. Rev.*, **16**, 111-124.
- Amagase, H. and Milner, J.A. (1993): Impact of various source of garlic and their constituents on 7,12-dimethylbenzo[a]-anthracene binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis*, **14**, 1627-1631.
- Banerjee, S.K., Mukherje, P.K. and Maulik, S.K. (2003): Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytother. Res.*, **17**, 97-106.
- Bertram, J.S., Kolonel, L.N., Meyskens, F.L. Jr. (1987): Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans. *Cancer Res.*, **47**, 3012-3031.
- Cavallitto, C.J., Buck, J.S. and Suter, C.M. (1944): Alliucin, the antibacterial principle of Allium sativum. II. Determination of the chemical structures. *J. Amer. Chem. Soc.*, **66**, 1952-1954.
- Curran, S. and Murray, G.I. (1999): Matrix metalloproteinase in tumor invasion and metastasis. *J. Pathol.*, **189**, 300-308.
- Fidler, I.J. and Hart, I.R. (1982): Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*, **217**, 998-1003.
- Goldberg, M.T. and Josephy, P.D. (1987): Studies on the mechanism of action diallyl sulfide, an inhibitor of the genotoxic effects of cyclophosphamide. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **65**, 467-471.
- Greene, J., Wang, M., Liu, T.E., Raymond, L.A., Rosen, C. and Shi, Y.E. (1996): Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinases 4. *J. Biol. Chem.*, **271**, 30375-30380.
- Hong, Y.S., Ham, Y.A., Choi, J.H. and Kim, J.G. (2000): Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expressions of Bcl-2, Bax and p53 in non small cell lung cancer. *Exp. Mol. Med.*, **32**, 127-134.
- Iwata, H., Kobayashi, S., Iwase, H., Masaoka, A., Fujimoto, N., and Okada, Y. (1996): Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn. J. Cancer. Res.*, **87**, 602-611.
- Keely, P., Parise, L. and Juliano, R. (1998): Integrins and GTPases in tumor cell growth, motility and invasion. *Tren. Cell. Bio.*, **8**, 101-106.
- Kim, M.S., Kang, H.J. and Moon A. (2001): Inhibition of invasion and induction of apoptosis by curcumin in H-ras-transformed MCF10A human breast epithelial cells. *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 349-354.
- Kwon, K.B., Yoo, S.J., Ryu, D.G., Yang, J.Y., Rho, H.W., Kim J.S., Park, J.W. and Park, B.H. (2002): Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 41-47.
- Koh, S.H., Kwon, H.S., Park, K.H., Ko, J.K., Kim, J.H., Hwang, M.S., Yum, Y.N., Kim, O.H., Kim, J.H., Kim, H.T., Do, B.R., Kim, K.S., Kim, H.W., Roh, H.J., Yu, H.J., Jung, H.K. and Kim, S.H. (2005): Protective effect of diallyl disulfide on oxidative stress-injured neuronally differentiated PC12 cells. *Mol. Brain Res.*, **133**, 176-186.
- Kundra, V., Escobedo, J.A., Kazlauskas, A., Kim, H.K., Rhee, S.G., Williams, L.T. and Zetter, B.R. (1994): Regulation of chmotaxis by the platelet-derived growth factor receptor- $\beta$ . *Nature*, **367**, 474-476.
- Lea, M.A. and Ayyala, U.S. (1997): Differentiating and growth inhibitory effects of diallyl disulfide on cancer cells. *Int. J. Oncol.*, **11**, 181-185.
- Liotta, L.A., Strrg, P.S. and Stetler-Stevenson, W.G. (1991): Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, **64**, 327-336.
- McCawley, L.J. and Matrisian, L.M. (2000): Matrix metalloproteinase: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol. Med. Today*, **6**, 149-156.
- Moon, A., Kim, M.S., Kim, T.G., Kim, S.H., Kim, H.E., Chen, Y.Q. and Kim, H.R.C. (2000): H-ras, but not N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: A role for MMP-2 in the H-ras induced invasive phenotype. *Int. J. Cancer.*, **85**, 176-181.
- Nakagawa, H., Tsuta, K., Kiuchi, K., Senzaki, H., Tanaka, K., Hioki, K. and Tsubura, A. (2001): Growth inhibitory effects of diallyl disulfide in human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*, **22**, 891-897.
- Papathoma, A.S., Petraki, C., Grigorakis, A., Papakonstantinou, H., Karavana, V., Stefanakis, S., Sotsiou, F. and Pintzas, A. (2000): Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res.*, **20**, 2009-2014.
- Pasqualini, R., Bourdoulous, S., Koivunen, E., Woods, J.R. and Ruoslahti, E. (1996): A polymeric form of bronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types. *Nat. Med.*, **2**, 1197-1203.
- Pola, S., Cattaneo, M.G. and Vicentini, L.M. (2003): Antimigratory and anti-invasive effect of somatostatin in human neuroblastoma cells. *J. Bio. Chem.*, **278**, 40601-40606.
- Poste, G. and Fidler, I.J. (1980): The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, **8**, 139-146.

- Qian, F., Zhang, Z.C., Wu, X.F., Li, Y.P. and Xu, Q. (2005): Interaction between integrin  $\alpha 5$  and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **333**, 1268-1275.
- Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D.A., Monks, A. and Boyd, M.R. (1990): Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **82**, 1113-1118.
- Schlessinger, K. and Hall, A. (2004): GSK-3 $\beta$  sets snail's pace. *Nature Cell Bio.*, **6**, 913-915.
- Sporn, M.B. and Newton, D.I. (1979): Chemoprevention of cancer and retinoids. *Fed Proc.*, **38**, 2528-2534.
- Strongin, A.Y., Marmer, B., Grant, G.A. and Goldberg, G.I. (1993): Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14033-14039.
- Sundaram, S.G. and Milner, H.A. (1993): Impact of organosulfur compounds in garlic on canine mammary tumor cells in culture. *Cancer Lett.*, **74**, 85-90.
- Surh, Y.J. (2003): Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev.*, **3**, 711-780.
- Talyor, P., Noriega, R., Farah, C., Abad, M.J., Arsenak, M. and Apitz, R. (2006): Ajoene inhibits both primary tumor growth and metastasis of B16/BL6 melanoma cells in C57BL/6 mice. *Cancer Lett.*, **239**, 298-304.
- Wagovich, M.J., Woods, C., Eng, V.W.S., Stephens, L.C. and Gray, K. (1988): Chemoprevention of N-nitrosomethylamine-induced esophageal cancer in rats by the naturally occurring thioether, diallyl sulfide. *Cancer Res.*, **48**, 6872-6875.
- Weistein, I.B. (1985): Cancer prevention; Recent progress and future opportunities. *Cancer Res.*, **51**, 5080-5085.
- Yamamura, S., Nelson, P.R. and Kent, K.C. (1996) Role of protein kinase C in attachment, spreading, and migration of human endothelial cells. *J. Surg. Res.*, **63**, 349-354.
- Zeng, Z.S., Cohen, A.M. and Guillem, J.G. (1999): Loss of basement membrane type IV collagens is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, **20**, 749-755.