

마늘 열수 추출물의 활성산소종 생성을 통한 인체백혈병세포의 apoptosis 유발

최우영^{1,2} · 정경태³ · 윤태경⁴ · 최병태⁵ · 이용태⁶ · 이원호² · 류충호⁷ · 최영현^{1,8,*}

동의대학교 한의과대학¹생화학교실, ⁶생리학교실, ³자연과학대학 임상병리학과, ⁴공과대학 환경공학과, ⁸대학원 바이오물질제어학과, 부산대학교 ²자연과학대학 생물학과, ⁵한의학전문대학원 해부학교실, ⁷경상대학교 농업생명과학대학 응용생명공학과

Received November 2, 2007 / Accepted November 22, 2007

Water Extract of *Allium sativum* L. Induces Apoptosis in Human Leukemia U937 Cells through Reactive Oxygen Species Generation. Woo Young Choi^{1,2}, Kyung Tae Chung³, Tae Kyung Yoon⁴, Byung Tae Choi⁵, Yong Tae Lee⁶, Won Ho Lee², Chung Ho Ryu⁷ and Yung Hyun Choi^{1,8,*}. Departments of ¹Biochemistry and ⁶Physiology, College of Oriental Medicine and Departments of ³Biomedical Laboratory Science and ⁴Environmental Engineering Major, ⁸Department of Biomaterial Control, Dongeui University, Busan 614-052, Korea; ²Department of Biology, College of Natural Sciences, ⁵Department of Anatomy, Graduate School of Oriental Medicine, Pusan National University, Busan 609-735, Korea; ⁷Division of Applied Life Science, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea. - The health benefits of garlic (*Allium sativum* L.) are derived from a wide variety of components and from the different ways it is administered. The known health benefits of garlic include cardiovascular protective effects, stimulation of immune function, reduction of blood glucose level, protection against microbial, viral and fungal infections, as well as anticancer effects. In the present study, it was examined the effects of water extract of *A. sativum* (WEAS) on the growth of cultured human tumor cells in order to investigate its anti-proliferative mechanism. Treatment of WEAS to tumor cells resulted in the growth inhibition, especially in leukemia cells, which was associated with induction of G2/M arrest of the cell cycle and apoptosis. In order to further explore the critical events leading to apoptosis in WEAS-treated U937 human leukemia cells, the following effects of WEAS on components of the mitochondrial apoptotic pathway were examined: generation of reactive oxygen species (ROS), alteration of the mitochondrial membrane potential (MMP), and the expression changes of Bcl-2 and IAP family proteins. The cytotoxic effect of WEAS was mediated by its induction of apoptosis as characterized by the occurrence of DNA ladders, apoptotic bodies and chromosome condensation in U937 cells. The WEAS-induced apoptosis in U937 cells was correlated with the generation of intracellular ROS, collapse of MMP, activation of caspase-3 and down-regulation of anti-apoptotic proteins. The quenching of ROS generation with antioxidant N-acetyl-L-cysteine conferred significant protection against WEAS-elicited ROS generation, caspase-3 activation, G2/M arrest and apoptosis. In conclusion, the present study reveals that the cellular ROS generation plays a pivotal role in the initiation of WEAS-triggered apoptotic death in U937 cells.

Key words : *Allium sativum*, G2/M arrest, apoptosis, ROS, MMP

서 론

우리의 생활과 밀접한 연관이 있는 많은 천연물들이 항암 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 파과 (Alliaceae)에 속하는 마늘(*Allium sativum* L.)은 중앙아시아와 지중해 연안이 원산지로 추정되며, 우리나라 전역에서도 다양하게 재배되어 지고 있다. 마늘은 특이한 맛과 향기 성분뿐만 아니라 다양한 생리활성 물질들이 다량 함유되어 있어 많은 인체질환의 예방이나 치료 목적으로 광범위하게 사용되어지고 있다. 현재까지 알려진 마늘의 효능으로 크게 항균 및 살충작용, 항염증 작용, 심혈관 보호 작용, 혈당 강화

작용, 간기능 개선 작용, 항암작용 등으로 대별되어 진다 [4,20,2532]. 특히 마늘의 항암작용은 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 모델에서 잘 알려져 있으며, 최근 이러한 실험적 결과들을 근거로 항암제의 개발에 많은 관심을 기울이고 있으나, 여전히 알려지지 않은 부분들이 많이 존재하며, 특히 암세포를 포함한 비정상적인 세포의 증식 억제에 관한 기전해석은 암세포에 따른 다양한 특이성을 보이기 때문에 이에 관한 지속적인 연구가 요구되어지고 있다[18,24,30].

효과적인 암의 치료와 예방에 있어서 비정상적인 세포나 암세포의 apoptosis 유발은 많은 치료제의 표적이 되고 있으며, apoptosis는 개체보존의 수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 세포의 죽음 현상으로서 중요한 수단이기도 하다[3]. Apoptosis는 세포주기 의존적 및 비의존적으로 일어날 수 있으며[7,11], apoptosis의 현상으로 세포질 및 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, DNA 단편화 등이 수반되는데 이러한

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

현상은 세포내부의 정교한 신호전달에 의해 조절된다[29,35]. Apoptosis 조절에 관여하는 가장 중요한 인자는 Bcl-2 family에 속하는 단백질들로서 apoptosis의 유도과 억제제를 동시에 조절하는 인자들로 구성되어 있다[1,5]. 또한, caspase라고 이름 붙여진 protease 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 정상적으로 증식 중인 세포에서는 pro-enzyme 형태로 존재한다. 이들은 apoptosis 유도 신호에 의해 활성화되어 직접 또는 간접적으로 세포 내 존재하는 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 등과 같은 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다[17,21]. 이외에도 apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중에서 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family에 속하는 단백질들은 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지닌다. 이들 중 몇몇 IAPs는 caspase와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다[13,14,28].

한편 주요한 자유 라디칼이 만약 짝을 이루지 않는 전자들을 보유한 산소를 갖고 있으면, 이를 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)라 한다. 하지만 세포가 γ -ray 또는 ultra violet (UV) 등의 외부 자극에 노출된 경우엔 ROS의 수준이 급격하게 증가하게 된다. 이러한 자유 라디칼의 과도한 생산은 산화 스트레스(oxidative stress)를 일으켜 세포에 치명적인 해를 입히게 되어 세포를 죽음으로 이끈다. 최근 연구에 의하면 ROS의 생성이 apoptosis 유도에도 큰 영향을 미친다고 보고되고 있다[10,26]. 또한, 어떤 자극에 의한 ROS의 생성이 mitochondrial membrane potential (MMP)의 소실을 야기시키고 이런 MMP의 소실에 의해 미토콘드리아 내의 각종 apoptotic molecule들이 세포질로 유출되어 세포는 apoptosis가 유발되어 죽음으로 이르게 된다[15,19].

본 연구에서는 마늘 추출물의 항암활성에 관한 기전을 조사하기 위하여 다양한 인체암세포주를 대상으로 항암활성의 정도를 비교하였으며, 그 중 세포독성에 대한 감수성이 가장 높았던 인체 백혈병세포를 대상으로 마늘 추출물에 의한 암세포 성장억제 효과, apoptosis의 유발 및 세포주기 진행에 미치는 영향을 조사하였으며, 이러한 과정이 ROS 의존적으로 일어나고 있음을 제시하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 마늘 열수 추출물의 처리

본 실험에 사용된 인체 간암세포(Hep3B 및 HepG2), 직장암세포(HT29 및 HCT116) 및 인체 백혈병 세포(U937 및 HL60)는 생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며, 세포의 배양을 위해 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL)과 1%의 penicillin-streptomycin (Gibco BRL) 등이 포함된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조

건하에서 배양하였다. 본 실험에 사용된 마늘은 남해지역에서 생산된 것으로서 열수 추출물(water extract of *A. sativum*, WEAS)은 고온 열수농축으로 분리하여 휘발성 및 액체 성분을 모두 제거하여 3차 증류수에 50%의 stock solution으로 만든 후 0.45 μ m의 여과지를 이용하여 걸러낸 후 해당 암세포에 적정 농도별로 처리하였다.

MTT assay를 이용한 세포 증식률의 측정

세포 배양용 6 well plate에 3×10^5 개/ml로 암세포를 분주하고 WEAS를 배지에 희석하여 각 well 당 적정 농도로 처리하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 배지로 희석하여 반응시킨 후 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco)로 각 well에 생성된 formazan을 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Agarose gel 전기영동에 의한 DNA fragmentation의 분석

정상 및 WEAS가 처리된 배지에서 24시간 동안 배양된 세포의 DNA를 추출하여 bovine pancreatic ribonuclease A (RNase A)를 처리하였다. 얻어진 DNA를 1.5% agarose gel 전기영동으로 분리하여 ethidium bromide (EtBr, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 염색한 후 UV 하에서 관찰하였다.

DAPI 염색에 의한 세포핵의 형태 관찰

준비된 세포를 3.7% formaldehyde 용액으로 고정 후, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 이용하여 15분 정도 염색하였다. 이를 phosphate buffered saline (PBS)로 수세하고 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 후, 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 정상 및 WEAS 처리에 따른 암세포 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

DNA flow cytometer에 의한 세포 주기의 분석

정상 및 WEAS가 처리된 배지에서 배양된 세포를 모아서 PBS로 수회 수세 후 CycleTEST Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 고정 및 propidium iodide (PI) 염색을 실시하였다. 염색 후 DNA flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 대조군 및 WEAS 처리군을 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) program을 사용하여 분석하였다.

Mitochondrial membrane potential (MMP) 변화의 측정

WEAS 처리에 따른 apoptosis 유발과정에서 MMP ($\Delta\Psi_m$)

의 변화 여부를 조사하기 위하여 dual-emission potential-sensitive probe인 5,5 V, 6,6 V-tetrachloro-1,1 V,3,3 V-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide (JC-1, Sigma) 염색을 실시하였다. 이를 위하여 정상 및 WEAS가 처리된 배지에서 배양된 세포들을 원심분리를 이용하여 모으고, PBS로 수세 후, 2 mg/L의 JC-1을 배지에 희석하여 37°C에서 20분간 염색하고 수세 후, flow cytometer를 이용하여 분석하였다.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay에 의한 세포독성의 분석

정상 배지에서 배양된 세포를 제거하고 배지를 모아 Triton X100을 20분전 선처리하여 음성 대조군으로 준비하고, 정상 및 WEAS가 처리된 배지에서 24시간 배양된 세포를 제거하고 배지만 따로 모았다. 여기에 LDH 처리 시약 (Roche, Swiss)을 배지에 처리한 후 적정 시간이 경과하며 ELISA reader를 이용하여 492 nM 및 690 nM에서 측정 한 후 음성 대조군과 비교 계산하여 그래프로 나타내었다.

Western blot 분석에 의한 단백질 발현의 분석

준비된 세포들을 적정량의 lysis buffer 를 첨가하여 단백질을 추출한 후 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 분리하고, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 그 후 membrane의 비특이적 단백질에 대한 blocking을 위해 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 1시간 반응시키고 PBS-T로 수회 수세하였다. 준비된 membrane에 각각의 항체를 처리하여 4°C에서 1시간 이상 반응시킨 다음 PBS-T로 수회 수세과정을 거쳤다. 그 후, 처리된 1차 항체에 대응하는 2차 항체를 처리하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 처리한 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 양을 분석하였다.

ROS 생성 변화 측정

세포 내에 축적된 ROS의 양적 변화를 조사하기 위하여 준비된 세포들을 PBS로 수세 후 fluorescent probe인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA, Molecular Probes, Leiden, Netherlands) 10 μM로 20분간 염색 후 DNA flow cytometer (Becton Dickinson)를 이용하여 분석을 하였다. ROS 생성 억제를 위한 ROS scavenger인 N-acetylcysteine (NAC)의 처리는 WEAS를 처리하기 1시간 전에 전처리 하였다.

In vitro caspase-3 activity 측정

Caspase-3의 활성 측정을 위해 colorimetric assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였으며, 제시된 방법에 준하여 준비된 세포에서 단백질을 추출하고 정량하여 각각 20 μg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 μM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-dithiothreitol] 50 μl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume 이 100 μl가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)였다. 준비된 plate를 37°C에서 2시간동안 반응시킨 후 405 nM의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

결 과

WEAS가 여러 암세포의 증식에 미치는 영향

WEAS의 암세포 증식 억제 정도를 다양한 암세포들을 대상으로 MTT assay를 통하여 조사하였다. Fig. 1의 결과에서 볼 수 있듯이 조사된 모든 종류의 암세포에서 WEAS 처리 농도 의존적으로 증식억제 효과를 보였으나, 1% 처리군에서 백혈병세포인 U937 및 HL60에서 50% 이상의 증식억제 효과가 있었으며, 간암세포에서는 약 10%, 직장암세포에서는 20-40% 정도의 증식 억제를 보여주었다. 즉 WEAS는

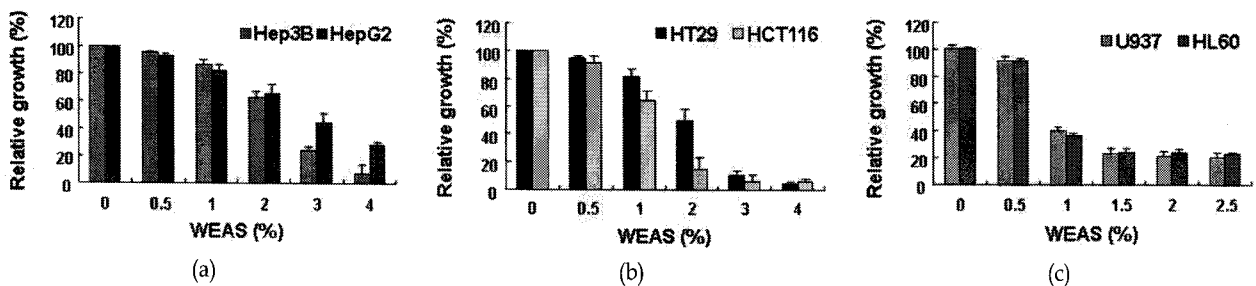


Fig. 1. Anti-proliferative effects of the water extract of *A. sativum* (WEAS) in several human cancer cell lines. Cells were treated with various concentrations of WEAS for 24 hr and MTT assay was performed. Results are expressed as average from three separate experiments. (A) Human hepatocarcinoma cell lines (Hep3B and HepG2 cells). (B) Human colon cancer cell lines (HT29 and HCT116 cells). (C) Human leukemia cell lines (U937 and HL60 cells).

조사된 암세포들 중 특히 인체 백혈병세포에서 감수성이 높게 나타났음을 알 수 있었다.

WEAS의 처리에 의한 U937 세포의 증식억제, apoptosis 유발 및 미토콘드리아 기능 손상

이상의 결과에서 WEAS에 대한 감수성이 백혈병세포에서 가장 높았으며, 이러한 증식억제 효과가 apoptosis 유발과 연계성이 있을 것으로 예측되어, U937 세포를 대상으로 WEAS의 세포독성 정도 및 형태적 변화 관찰을 실시하였다. Fig. 2B에 나타난 바와 같이, 일반적인 세포독성의 지표로 사용되는 LDH 유리의 정도는 WEAS 처리 농도가 증가할수록 동일 조건에서의 증식 억제효과(Fig. 2A)와 매우 연관성이 있는 결과를 보여주었다. Fig. 2C에서 볼 수 있듯이, WEAS 처리 농도가 증가할수록 U937 세포의 밀도는 매우 감소되었으며, 전체적으로 세포가 다소 길어지면서 불규칙적인 모양을 보여주었다. 또한 DAPI 염색에 의한 핵 모양의 변화에서도 전형적인 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰되는 염색질의 응축에 의한 apoptotic body의 형성이 WEAS 처리 농도 의존적으로 증가하였음을 알 수 있었다. 아울러 apoptosis 유도의 또 다른 지표인 DNA 단편화 역시 WEAS 처리 농도가 높아질수록 증가되는 경향성을 보여주었으며(Fig. 3A), apoptosis가 일어난 세포의 집단으로 평가되는 세포주기 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도도 WEAS 처리 농도 의존적으로 현저하게 증가되었다(Fig. 3B). 이러한 WEAS 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발은 세포 내 에너지 생산 기관으로 세포의 생존에 중요한 기능을 수행하는 미토콘드리아의 손상과 연계성을 가지는지를 조사하기 위하여 JC-1 염색에 의한

MMP 소실의 정도를 조사한 결과, Fig. 3C에 제시한 바와 같이 WEAS 처리에 의한 U927 세포의 apoptosis 유발은 미토콘드리아 기능 손상과 연계성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

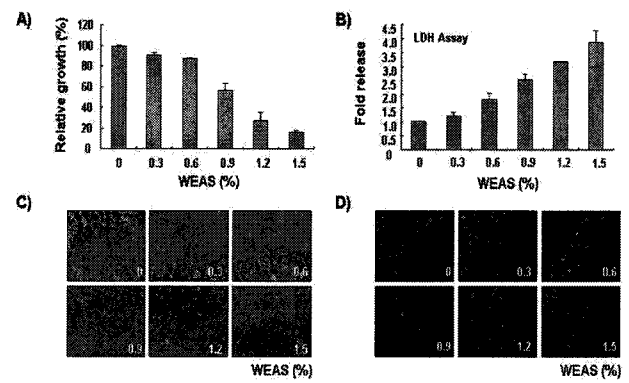


Fig. 2. Induction of apoptosis in U937 cells following incubation with WEAS. (A) After 24 hr incubation with WEAS, MTT assay was performed. Results are expressed as average from three separate experiments. (B) After 24 hr incubation with WEAS, LDH assay was performed. Results are expressed as average from three separate experiments. (C) Exponentially growing cells were incubated with WEAS for 24 hr and the cell morphology was visualized by an inverted microscope. Magnification, 200. (D) After treated with WEAS for 24 hr, the cells were fixed, stained with DAPI solution and the nuclear morphology was photographed with a fluorescence using blue filter. Magnification, 400.

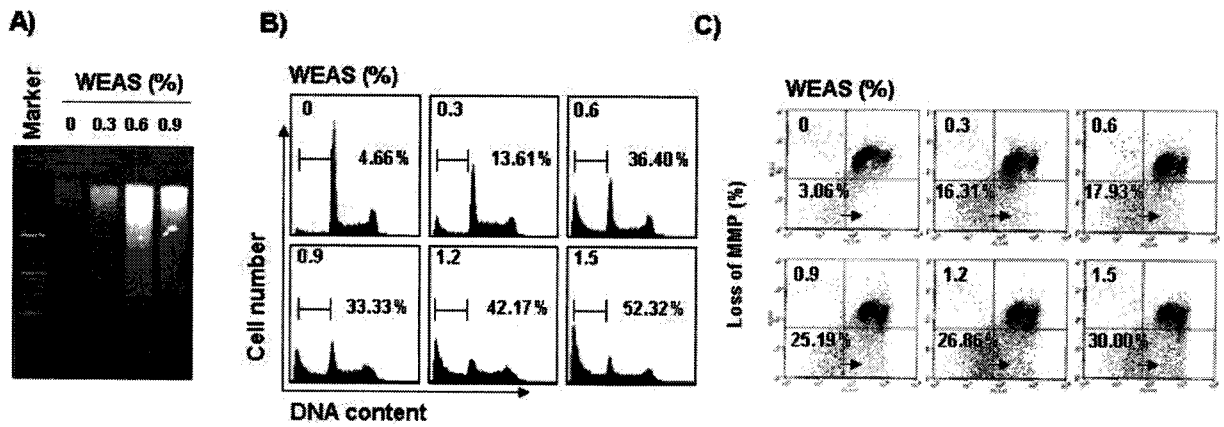


Fig. 3. Induction of DNA fragmentation, increase of sub-G1 cell population and loss of MMP of U937 following incubation with WEAS. (A) After WEAS treatment for 24 hr, the cells were collected and DNA was extracted. The DNAs were separated on 1.5 % agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with EtBr. (B) After WEAS treatment for 24 hr, the cells stained with PI for DNA flow cytometric analysis. The percentages of cells with hypodiploid DNA contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation. (C) The cells were cultured for 24 hr in the absence or presence of WEAS and stained with JC-1 at 37°C for 20 min. Mean JC-1 fluorescence intensity detected by flow cytometer. Data are mean values from representative experiments performed at least three times.

U937 세포에서 apoptosis 조절인자들의 발현에 미치는 WEAS의 영향

다음은 WEAS 처리에 의한 apoptosis 유발 기전 해석의 일환으로 주요 apoptosis 조절인자들의 발현에 미치는 WEAS의 영향을 조사하였다. 먼저 조사된 Bcl-2 family에 속하는 인자들 중, pro-apoptotic Bax의 발현이 WEAS 최고 처리 농도에서 다소 증가된 반면, anti-apoptotic 인 Bcl-2 및 Bcl-xL의 발현은 WEAS 처리 농도가 증가할수록 매우 감소되었다(Fig. 4). 그리고 본 실험 조건에서 truncation된 tBid 단백질의 발현은 관찰할 수 없었으나, 총 Bid 단백질의 발현은 현저하게 감소되어 Bid가 tBid로 전환되었을 가능성이 높음을 알 수 있었다. Caspase와의 직,간접적인 결합을 통하여 그들의 활성을 막음으로서 apoptosis 억제에 관여하는 IAP family에 속하는 단백질들은 조사된 3가지 모두에서 WEAS 처리에 의하여 농도 의존적으로 매우 감소되었다. 또한 조사된 3가지의 caspase 단백질의 비활성형 발현의 정도도 WEAS 처리에 의하여 현저하게 감소되어 WEAS 처리에 의하여 그들의 활성이 증가되었음을 알 수 있었는데, caspase의 표적 단백질인 PARP 및 β -catenin의 단편화 및 발현 저하는 WEAS 처리에 의하여 caspase가 활성화되었을 것이라는 추측을 뒷받침하여 주는 결과이다(Fig. 4).

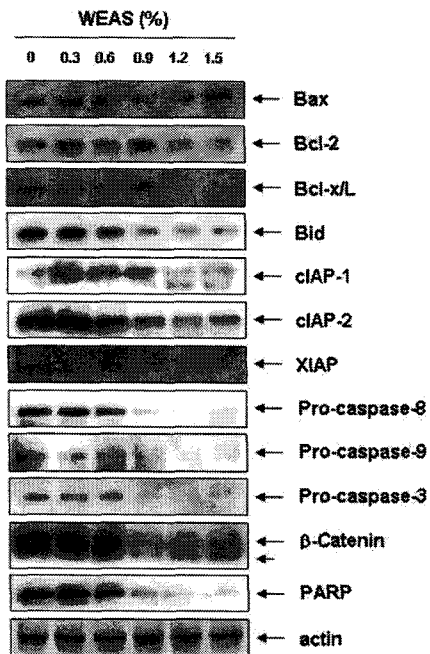


Fig. 4. Effects of WEAS treatment on the levels of apoptosis-related proteins in U937 cells. Cells were incubated with various concentrations of WEAS for 24 hr, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used an internal control.

U937 세포에서 WEAS 처리에 따른 ROS 생성의 증가에 의한 apoptosis의 유발

WEAS의 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발에 ROS의 생성과 연관성이 있는지의 여부를 조사한 결과, WEAS 처리 30분 후 ROS의 생성량이 WEAS 처리 전에 비하여 1.6배 이상 증가하였으며, ROS 생성은 처리 후 2시간까지 지속적으로 증가하다가 서서히 감소되는 경향성을 보여 주었다(Fig. 5). 이러한 ROS 생성의 증가가 WEAS 처리에 의한 것인지의 여부를 조사하기 위하여 ROS의 선택적 scavenger인 NAC을 선처리하여 WEAS에 의한 ROS 생성에 미치는 영향을 조사하였다. NAC 단독 처리의 경우 정상 배지에서 자란 세포에 비하여 ROS의 생성이 거의 되지 않았으며, WEAS 처리군에서는 NAC 처리에 의하여 정상배지에서 배양된 세포에서 생성되는 양 이하로 감소되었다. 따라서 이러한 WEAS 처리에 의한 ROS의 생성이 apoptosis 과정에 관여하는지의 여부를 조사한 결과, Fig. 5B에 나타난 바와 같이 WEAS가 처리된 세포에서 활성화되었던 caspase-3의 활성이 NAC 선 처리에 의하여 매우 유의적으로 감소되었음을 알

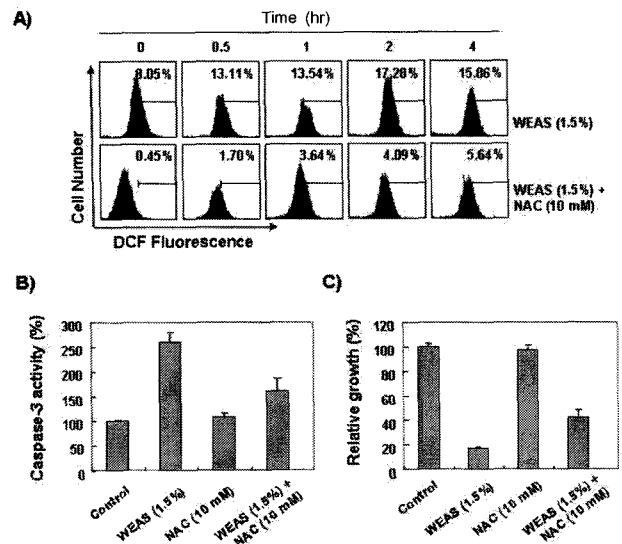


Fig. 5. Inhibition of WEAS-induced apoptosis by quenching of ROS generation in U937 cells. (A) The cells were treated with NAC (10 mM) for 1 hr before challenge with 1.5% WEAS for indicated times, and then stained with DCFH-DA at 37°C for 30 min. At each time point, the fluorescence intensity was measured by flow cytometer. (B) The cells were treated with NAC (10 mM) for 1 hr before a challenge with 1.5% WEAS for 24 hr and collected and the cell lysates were assayed for *in vitro* caspase-3 using DEVD-pNA as substrates. The relative fluorescent products were measured. Data are mean values from two representative experiments. (C) The cells grown under the same conditions as (B) were evaluated for the cell viability using the metabolic dye-based MTT assay.

수 있었다. 또한 NAC 처리에 의한 ROS 생성의 저해는 WEAS 처리에 의한 세포의 증식 억제 효능도 매우 유의적으로 차단되었음을 알 수 있었다(Fig. 5C). 이는 WEAS 처리에 의한 apoptosis 유도 과정에 ROS의 생성이 필수적으로 관여할 것임을 보여주는 결과이다.

WEAS에 의한 G2/M arrest 유발과 ROS 생성과의 상관성

다음은 WEAS 처리에 의한 암세포의 증식억제와 연관된 apoptosis 유발 과정이 세포주기 조절 측면에서 어떤 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 WEAS가 처리된 배지에서 배양된 U937 세포를 대상으로 세포주기 분포도 변화를 조사한 결과, S기에 속하는 세포의 빈도의 경우 대조군의 21.81%에 비하여 약 6.5% 정도 증가하였으며, 대조군에서 18.45%에 해당되었던 G2/M기에 속하는 세포의 빈도가 WEAS 처리 24시간 후에 34.81%로 약 1.9배 증가되었고, G1기에 속하는 세포의 빈도는 상대적으로 다소 감소되었음을 알 수 있었다(Table 1). 그러나 NAC의 선처리에 의하여 ROS의 생성을 차단시켰을 경우 대조군 수준으로 돌아오지는 못하였으나, WEAS에 의한 G2/M arrest를 어느 정도 차단하였음을 알 수 있었다. 이상의 결과는 WEAS에 의한 apoptosis의 유발은 세포주기 G2/M arrest와 연관성이 있었으며, 이때 ROS의 생성이 관여함을 보는 주는 것이다.

고 찰

마늘의 효능에 관한 많은 논문들이 발표되고 있으나, ROS의 생성과 연관된 마늘 추출물의 항암작용에 관한 보고는 최근 몇몇 연구자들에 의하여 수행되어져 왔다[6,27,33,34]. 아마도 이러한 ROS의 생성과 연관성을 지울 수 있는 가장 큰 이유는 마늘이 가지고 있는 강력한 항산화 작용에서 기인하는 것 같다. 그러나 아직까지 마늘 추출물에 의한 ROS 생성과 연관된 apoptosis 조절 및 세포주기 교란 기전에 관하여 정확하게 알려진 바 없다. 본 연구에서 마늘 추출물에 의한

암세포의 증식억제 및 apoptosis 유발 과정에서 ROS의 생성 여부를 확인하고 아울러 세포주기 교란과의 연관성을 조사하고자 하였다. 마늘 열수 추출물(WEAS)은 다양한 암세포의 증식을 억제하였으나, 백혈병세포에서의 세포독성 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다. 이러한 암세포 증식 억제가 미토콘드리아 막 전위(MMP)의 소실에 의한 미토콘드리아의 손상과 연관된 apoptosis에 의한 것임을 몇 가지 방법으로 제시하였고, apoptosis 조절에 관여하는 많은 유전자들의 발현 변화를 조사하였다. 아울러 WEAS에 의한 apoptosis 유발의 초기 단계에 ROS 생성이 관여함을 알 수 있었으며, ROS의 생성을 차단하였을 경우 WEAS에 의한 U937 세포의 증식억제 효능이 유의적으로 감소되었는데, 이는 WEAS에 의한 ROS 생성이 중요한 apoptosis 유도 인자로 작용함을 보여주는 것이었다. 또한 WEAS에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발은 ROS 생성과 연계된 G2/M arrest에 의한 것임을 알 수 있었다. 따라서 이러한 결과들은 WEAS에 의한 ROS의 생성은 세포주기 교란을 통한 apoptosis 유발의 초기 신호 전달자로서 작용함을 의미하는 것이다.

최근 많은 연구자들에 의하여 손상된 미토콘드리아는 ROS 생성을 촉진함으로써 암세포의 증식 조절 신호계가 활성화됨이 보고되어지고 있다. 그러나 미토콘드리아의 탈분극(mitochondrial depolarization)에 의한 MMP의 소실이 apoptosis와 연관되어 있는 것이 더 일반적인 것 같다. MMP의 저하는 미토콘드리아 외막의 붕괴를 초래하여 apoptosis 유발에 중요한 미토콘드리아 내 인자들이 세포질로 방출되어 caspase-9의 활성화와 연속적인 caspase-3의 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 몇몇 선행 연구에서도 마늘 추출물에 의한 MMP의 소실 및 caspase 활성 연계 가능성을 제시하여 주었듯이[6,22,31,36], 본 연구의 결과에 의하면 WEAS의 처리는 MMP의 소실을 야기하였으며, 다양한 종류의 caspase를 활성화시켰다. 또한 WEAS가 처리된 세포에서 apoptosis를 억제하는데 관여하는 유전자들의 발현은 거의 다 감소되었음을 알 수 있었고, WEAS에 의한 이러한 apoptosis 유발 현상이 ROS 생성 의존적임을 확인하였다.

Apoptosis 조절에 가장 대표적인 유전자인 Bcl-2 family에 속하는 유전자 중 Bcl-2 및 Bcl-xL과 같은 유전자는 apoptosis 유발을 억제하는 anti-apoptotic member이며, Bax 및 Bid 등은 apoptosis 유발을 촉진하는 pro-apoptotic member이다 [1]. 이들 Bcl-2 family는 서로 dimer를 이루고 있는데 Bax member의 발현이 증가하고 Bcl-2 member의 발현이 감소하면 apoptosis가 유발될 수 있는 것으로 알려져 세포 내에서 두 member에 속하는 유전자들의 상대적인 발현량의 차이는 apoptosis 유발을 예측할 수 있는 척도로 사용되어 지고 있다. 또한 이러한 Bcl-2 family에 속하는 유전자들의 발현 변화는 apoptosis의 개시자 및 실행자로 알려진 여러 caspase의 활성화에 영향을 주며, antagonist로 작용하는 IAP family의

Table. 1. DNA flow cytometric cell cycle analysis was performed comparing untreated cells with cells treated with WEAS. Cells were exposed 10 mM NAC for 1 h before a challenge with 1.5% WEAS for 24 h. Then the cells were collected and stained with PI solution for DNA flow cytometric analysis

Treatment	% of cells		
	G1	S	G2/M
Control	59.74	21.81	18.45
WEAS (1.5%)	36.79	28.39	34.81
NAC (10 mM)	57.55	23.81	18.63
WEAS (1.5%) + NAC (10 mM)	42.42	27.84	29.73

발현 변화 역시 caspase 활성을 억제함으로써 apoptosis 유발 조절인자로 작용하고 있는 것으로 알려져 있다[13,28]. 또한, PARP나 β -catenin과 같은 단백질들은 apoptosis가 유발되었음을 보여주는 지표 단백질로 활성화된 caspase-3의 표적 단백질이다[17,21]. 선행 연구들의 결과에서와 부분적으로 유사하게[23,33], Western blot 분석의 결과에서 알 수 있듯이 WEAS가 처리된 배지에서 배양된 U937 세포에서 이들 유전자들은 매우 다양한 발현 양의 변화를 보여주었는데, apoptosis를 억제하는데 관여하는 유전자들의 발현은 모두 감소된 반면, apoptosis를 유도하는 인자들은 발현이 증가되었거나 활성화되었음을 보여 주었고, 그 결과 PARP 및 β -catenin 단백질의 단편화가 초래되었음을 알 수 있었다. 따라서 WEAS 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발은 ROS 생성과 연관된 미토콘드리아의 기능 손상에 따른 caspase-9의 활성화, caspase-9의 활성화에 의한 caspase-3의 활성화, caspase-3의 활성화에 따른 표적 단백질들의 분해로 연결되는 경로를 거치는 것으로 추정된다. 그러나 본 연구에서 WEAS 처리에 따른 apoptosis 유발에서 Bid의 역할에 대한 결과는 제시하지 못하였으며, Bid의 역할은 death receptor를 통한 apoptosis 유도 경로에 관여하는 다양한 유전자들의 발현 변화와 연관되어 조사되어야 할 것이다. 특히 caspase-3 및 caspase-9의 활성화뿐만 아니라 caspase-8의 비활성형 단백질의 발현도 감소되어 WEAS 처리에 의하여 caspase-8이 활성화 되었을 것으로 예측되며, caspase-8의 활성화에 의한 Bid의 tBid로 truncation으로 tBid가 미토콘드리아 내로 유입되었을 것으로 추정되므로 이 경로에 대한 확인 실험이 추가적으로 수행되어야 할 것이다.

한편 apoptosis의 유발은 세포주기 arrest 의존 혹은 비의존적으로 일어날 수 있으나, 세포의 생존에 영향을 줄 수 있는 대부분의 항암성 물질들은 세포주기 특이적 arrest를 유발시키는 경우가 많으며, 다양한 종류의 암세포를 대상으로 한 선행 연구에서 마늘 추출물은 대부분 G2/M arrest를 유발시키는 것으로 보고되어져 왔으나[2,8,9,12,16,22,33,34] 세포주기 G2/M arrest 및 ROS 생성과의 연계성에 대한 연구는 거의 이루어진 바 없다. 본 연구의 결과에 의하면 WEAS 처리에 의한 U937 세포의 증식억제는 G2/M arrest와 연관된 apoptosis 유발에 의한 것으로 알 수 있었다. 아울러 ROS의 생성을 차단시켰을 경우 WEAS 처리에 의한 G2/M의 효과가 유의적으로 억제되어, WEAS 처리에 의한 세포주기 G2/M arrest 역시 ROS 의존적임을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 몇 가지 암세포를 대상으로 마늘 열수추출물(WEAS)의 항암활성을 조사하였으며, 비교적 높은 감수성을 보인 백혈병세포를 대상으로 세포증식억제가 apoptosis

유도와 연관성이 있음을 제시하였다. WEAS에 의한 U937 세포의 apoptosis 유도는 세포주기 G2/M arrest와 연관성이 있었으며, 다양한 apoptosis 조절 유전자들의 발현 변화를 동반하였음을 확인하였다. 이러한 apoptosis 조절 인자들의 발현변화는 미토콘드리아 막 전위의 소실과 연관성이 있었으며, WEAS에 의한 암세포의 G2/M arrest에 의한 apoptosis 유발에 ROS가 중요한 조절자로 작용함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 2007년 부산테크노파크 공모과제로 지원되는 연구비로 조성되었습니다.

참 고 문 헌

1. Antonsson, B. and J. C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* **256**, 50-57.
2. Arunkumar, A., M. R., Vijayababu, N. Srinivasan, M. M. Aruldas and J. Arunakaran. 2006. Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. *Mol. Cell Biochem.* **288**, 107-113.
3. Barisic, K., J. Petrik and L. Rumora. 2003. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta. Pharm.* **53**, 151-164.
4. Borek, C. 2006. Garlic reduces dementia and heart-disease risk. *J. Nutr.* **136**, 810S-812S.
5. Chiarugi, V., L. Magnelli, M. Cinelli and G. Basi. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol. Biol. Res.* **40**, 603-612.
6. Das, A., N. L. Banik and S. K. Ray. 2007. Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Cancer* **110**, 1083-1095.
7. de Almeida, C. J. and R. Linden. 2005. Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 1532-1546.
8. de Martino, A., G. Filomeni, K. Aquilano, M. R. Ciriolo and G. Rotilio. 2006. Effects of water garlic extracts on cell cycle and viability of HepG2 hepatoma cells. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 742-749.
9. Frantz, D. J., B. G. Hughes, D. R. Nelson, B. K. Murray and M. J. Christensen. 2000. Cell cycle arrest and differential gene expression in HT-29 cells exposed to an aqueous garlic extract. *Nutr. Cancer* **38**, 255-264.
10. Fruehauf, J. P. and F. L. Meyskens Jr. 2007. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin. Cancer Res.* **13**, 789-794.
11. Fulda, S. and K.M. Debatin. 2004. Apoptosis signaling in tumor therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1028**, 150-156.
12. Herman-Antosiewicz, A., A. A. Powolny and S. V. Singh. 2007. Molecular targets of cancer chemoprevention by garlic-derived organosulfides. *Acta. Pharmacol. Sin.* **28**, 1355-1364.

13. Holcik, M., H. Gibson and R. G. Korneluk. 2001. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**, 253-261.
14. Hussein, M. R., A. K. Haemel and G. S. Wood. 2003. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J. Pathol.* **199**, 275-288.
15. Jaeschke, H. and M. L. Bajt. 2006. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol. Sci.* **89**, 31-41.
16. Jakubikova, J. and J. Sedlak. 2006. Garlic-derived organosulfides induce cytotoxicity, apoptosis, cell cycle arrest and oxidative stress in human colon carcinoma cell lines. *Neoplasma* **53**, 191-199.
17. Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson and G. G. Poirier. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.
18. Khanum, F., K. R. Anilakumar and K. R. Viswanathan. 2004. Anticarcinogenic properties of garlic: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 479-488.
19. Kim, R., M. Emi, K. Tanabe, S. Murakami, Y. Uchida and K. Arihiro. 2006. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J. Pathol.* **208**, 319-326.
20. Kwon, S. K. 2003. Organosulfur compounds from and physiological activities. *J. App. Pharmacol.* **11**, 8-32.
21. Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier and W. C. Earnshaw. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347.
22. Lin, H. L., J. S. Yang, J. H. Yang, S. S. Fan, W. C. Chang, Y. C. Li and J. G. Chung. 2006. The role of Ca²⁺ on the DADS-induced apoptosis in mouse-rat hybrid retina ganglion cells (N18). *Neurochem. Res.* **31**, 383-393.
23. Lu, H. F., C. C. Sue, C. S. Yu, S. C. Chen, G. W. Chen and J. G. Chung. 2004. Diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis undergo caspase-3 activity in human bladder cancer T24 cells. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 1543-1552.
24. Ngo, S. N., D.B. Williams, L. Cobiac and R. J. Head. 2007. Does garlic reduce risk of colorectal cancer? A systematic review. *J. Nutr.* **137**, 2264-2269.
25. Pittler, M. H. and E. Ernst. 2007. Clinical effectiveness of garlic (*Allium sativum*). *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 1382-1385.
26. Ryter, S. W., H. P. Kim, A. Hoetzel, J. W. Park, K. Nakahira, X. Wang and A. M. Choi. 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 49-89.
27. Sabayan, B., F. Foroughinia and A. Chohedry. 2007. postulated role of garlic organosulfur compounds in prevention of valproic acid hepatotoxicity. *Med. Hypotheses* **68**, 512-514.
28. Salvesen, G. S. and C. S. Duckett. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 401-410.
29. Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**, 439-459.
30. Shukla, Y. and N. Kalra. 2007. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer Lett.* **247**, 167-181.
31. Su, C. C., G. W. Chen, T. W. Tan, J. G. Lin and J. G. Chung. 2006. Crude extract of garlic induced caspase-3 gene expression leading to apoptosis in human colon cancer cells. *In Vivo* **20**, 85-90.
32. Tattelman, E. 2005. Health effects of garlic. *Am. Fam. Physician* **72**, 103-106.
33. Wu, X. J., F. Kassie and V. Mersch-Sundermann. 2005. The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. *Mutat. Res.* **579**, 115-124.
34. Wu, X. J., T. Stahl, Y. Hu, F. Kassie and V. Mersch-Sundermann. 2006. The production of reactive oxygen species and the mitochondrial membrane potential are modulated during onion oil-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. *J. Nutr.* **136**, 608-613.
35. Wylie, A. H., J. F. Kerr and A. R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.
36. Xiao, D., J. T. Pinto, G. G. Gundersen and I. B. Weinstein. 2005. Effects of a series of organosulfur compounds on mitotic arrest and induction of apoptosis in colon cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1388-1398.