

## 혈관 생리 활성화에 미치는 alliin의 효능

서정화 · 김정민 · 안선영 · 조진구 · 김종민 · 박헌용\*

단국대학교 분자생물학과, BK21 RNA 전문인력양성팀, 나노센서바이오텍연구소

Received June 8, 2009 / Accepted July 15, 2009

**Effect of Alliin on Vascular Functions.** Jeonghwa Seo, Jeongmin Kim, Sunyoung Ahn, Jingu Cho, Jongmin Kim and Heonyong Park\*. *Department of Molecular Biology & Institute of Nanosensor and Biotechnology, BK21 Graduate Program for RNA Biology, Dankook University, 126, Jookjeon-dong, Suji-ku, Yongin-si, Gyeonggi-do, 448-701, Korea* - Little is known about the cardiovascular roles of alliin, a functional component in garlic that has been used as food material. Thus, we examined a broad range of cardiovascular activities of alliin in this study. From our in vitro experiments, alliin was determined to act as a stimulant to induce endothelial cell proliferation and endothelial cell migration. Since endothelial cell proliferation and migration are highly associated with angiogenesis and wound healing, alliin is suggested as a regulator to control angiogenesis and wound healing. In addition, alliin was elucidated to prevent lipopolysaccharide (LPS)-induced adhesion of THP-1 leukocytes to endothelial cells and LPS-induced homotypic THP-1 cell aggregation. These inhibitory effects indicate that alliin is likely to act as an anti-atherosclerotic and anti-thrombotic factor, because leukocytic adhesion to endothelial cells and homotypic leukocyte aggregation are highly associated with atherosclerosis and thrombosis, respectively. Our additional findings show that alliin has no effect on the production of nitric oxide (NO), an important vasoregulator. In conclusion, alliin is suggested as a regulator for controlling various cardiovascular functions.

**Key words :** Alliin, endothelial cells, adhesion, migration, proliferation

### 서 론

마늘(*Allium sativum*)은 오래 전부터 독특한 맛과 향을 지닌 식품으로 많이 사용되어 왔고, 항균, 항진균, 항바이러스, 면역 반응 개선, 항산화제로서의 기능을 가지고 있다고 알려져 왔다[10]. 또한 마늘 추출물은 isoproterenol 유발 심근이상 억제, 고지혈증 감소효과를 일으키는 등, 죽상동맥경화와 관련한 여러 심혈관 질환을 예방하고 치료하는데 효과가 있다고 알려져 있다[2,6,19]. 마늘추출물을 이용한 세포실험결과에서도 콜레스테롤합성의 중요 조절 효소인 hydroxymethyl-glutaryl-CoA reductase 억제효과가 관찰되는 등[8], 마늘의 주요 성분이 심혈관 기능과 밀접하게 연계되어 있음을 알 수 있다.

마늘의 효능을 나타내는 주요 성분은 황 화합물들로 알려져 있고[1], 대표적으로 알려진 성분은 allicin (allyl 2-propene-thiosulfinate or diallyl thiosulfate), allyl methyl thiosulfonate, 1-propenyl allyl thiosulfate,  $\gamma$ -L-glutamyl-S-alkyl-L-cysteine 등이 있으며, 그 중 allicin이 가장 생리활성이 잘 알려진 성분이다[3]. 생마늘에는 allicin이 존재하지 않으며, 마늘을 잘게 파쇄하거나 분쇄할 경우 아미노산의 하나인 cysteine에서 유래한 sulfoxide인 alliin (S-allyl cysteine sulfoxide)이 allinase에 의해 allicin으로 변환된다[9,12]. Alliin은 열이나 산에

안정하여, 익힌 마늘, 마늘초, 흑마늘에도 존재한다[20]. Alliin은 항암[13], 고지혈증 억제[16], 항당뇨[21], 항산화 효과[21]를 갖는 것으로 알려져 있다.

Alliin의 생리기능에 관한 연구는 지난 수년간 많은 연구자들에 의해 진행되어 왔으나 혈관기능에 관한 alliin의 역할을 규명하는 연구는 상대적으로 매우 적었다. 혈관은 내피층과 혈관평활근 그리고 결합조직으로 이루어져 있고, 내피층은 유동하는 혈액과 직접 접촉하면서 혈관의 기능의 항상성을 조절한다. 따라서 혈관 내피층에서 일어나고 있는 내피세포의 성장, 세포사멸, 세포이동이나 세포신호전달체계의 활성화 등은 혈관의 생리기능, 예를 들면, 혈관형성, 혈관긴장, 혈관 리모델링 등에 중요하게 관여한다[2]. 따라서 alliin의 혈관기능을 이해하기 위해서 혈관내피세포의 성장과 세포사멸, 혈관이동 및 세포신호전달체계에 alliin이 어떻게 관여하고 있는지를 규명하는 것이 필수적이다. 이와 같은 연구는 혈관의 병리기능에 alliin이 어떻게 역할을 하고 있는지를 이해하는 것보다 밀접하게 연계되어 있다.

혈관에서 진행되는 대표적인 질환은 동맥경화이다. 동맥경화는 혈관에서 발생하는 질환으로, 초기에는 염증반응으로 진행된다. 염증반응이 시작되는 부위에서 화학주성 사이토카인들이 분비되면 단핵구와 같은 혈구세포가 병소 부위의 내피층에 부착하면서 단핵구나 백혈구 등이 내피층 안으로 이동(trans-endothelial migration)하게 된다. 내막 안으로 들어간 단핵구가 대식세포나 포말세포로 변환된 후 콜레스테롤 등이

#### \*Corresponding author

Tel : +82-31-8005-3193, Fax : +82-31-8005-3191

E-mail : heonyong@dankook.ac.kr

축적되면 동맥경화반이 형성된다[14].

본 연구에서는 현재까지 많은 연구가 이루어지지 않았던 alliin의 혈관기능을 포괄적으로 이해하기 위하여 혈관 내피 세포의 성장과 세포사멸, 혈관 내 상처를 치유하고 혈관 형성의 중요한 과정 중 하나인 혈관 내피 세포의 이동, 혈관을 확장시키고 혈소판 응집을 방해하는 산화질소 측정, 죽상동맥경화의 발달에 중요한 단계인 이중 세포간 부착현상, 상처 치료의 초기 단계인 혈구 세포의 응집 등 다양한 혈관 기능에 alliin이 미치는 영향을 관찰하고, alliin에 의한 세포 내 신호 전달의 변화와 다양한 유전자의 조절 패턴을 western blot과 RT-PCR을 통해 확인하는 등 세포 수준에서 일어나는 alliin의 다양한 기능을 조사함으로써 alliin의 새로운 혈관 기능에 관한 가능성을 제시코자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

Alliin은 Sigma-Aldrich (USA)사에서 제공하는 시약을 구입하여 증류수에 녹여 사용하였다.

### 세포배양

소 대동맥 내피세포인 BAEC (bovine aortic endothelial cell)은 세포 외 기질에 부착하여 자라는 세포(adhesion cell)로, 소의 대동맥에서 추출한 후 계대 수 3에서 8 사이의 일차세포를 실험에 사용하였다. BAEC은 20% 소태아혈청(fetal bovine serum, Wel GENE Inc., Korea)과 0.5% 항생제(streptomycin/penicillin)가 포함된 DMEM (glucose 1 g/liter Wel GENE Inc.)를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. THP-1은 부유세포(suspension cell)로 T-플라스크에 배양하였으며, 10% 소태아혈청과 0.5% 항생제(streptomycin/penicillin)가 첨가된 RPMI1640 (Wel GENE Inc.)를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 세포성장 실험

세포성장은 [<sup>3</sup>H]-Thymidine 편입 정도를 측정하여 평가하였다. 0.5% 소태아혈청이 첨가된 DMEM에 BAEC을 24시간 동안 배양한 후, 다양한 농도의 alliin을 24시간 처리한 뒤, [<sup>3</sup>H]-Thymidine (3.3~4.8 TBq/mM)을 1 시간 동안 전처리 하였다. 그 후 5% trichloroacetic acid (TCA)로 세척한 후, 세포를 0.2 N NaOH, 2% SDS (sodium dodecyl sulfate)로 분해하여 얻은 분해액을 액체섬광계수기를 이용하여 방사능을 측정하였다. 세포 분해액의 단백질량은 Lowry 분석법으로 정량하여 세포 수의 변이를 보정하였다.

### 세포사멸 실험

전면 성장한 BAEC을 16~18 시간 동안 혈청기아시킨 후 다

양한 농도의 alliin을 처리하였다. 처리는 0, 2, 4, 8, 16, 24 시간 동안 처리하였고, 시간 경과에 따른 변화를 현미경을 이용해 사진 촬영하여 기록했으며, 세포사멸 세포(등골고 부유 상태에 있는 세포)를 계산하여 세포사멸 비율을 결정하였다.

### Western Blot

전면 성장한 BAEC에 다양한 농도의 alliin을 20시간 처리한 후 혈청기아 배지에서 20시간 배양한 뒤 분해 완충액(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, pH 7.5)으로 분해하였다. 그 후 원심분리를 통해 상층액을 획득하여, 세포 분해액으로 사용하였다. 각 실험조건에서 얻은 세포분해액은 단백질량을 측정하여 동일한 양의 총 단백질을 포함하는 일정량의 세포 분해액 내의 단백질을 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리시켰다. SDS-PAGE의 단백질은 PVDF (polyvinylidene fluoride)막으로 이동시켜 고정하고 분석하고자 하는 표적 단백질에 해당하는 1차 항체와 반응 후, 2차 항체를 반응시킨 뒤, 화학발광 검출법을 통해 X-선 필름에 현상한 후 western 결과를 관찰하였다.

### 세포부착 실험

전면 성장시킨 BAEC을 혈청기아배지를 이용하여 16 시간 동안 추가로 배양했다. 또한 THP-1 세포를 배양한 후 10 μM의 Calcein AM (Sigma, USA)을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 45 분간 반응시키고, PBS (phosphate buffered saline)를 이용하여 3회 세척하였다. Calcein AM으로 염색시킨 THP-1을 BAEC이 부착된 기관 위에 동량으로 첨가하여 부착된 THP-1 세포를 형광 현미경으로 관찰하였다. 부착된 세포와 전체 세포의 비율을 계산하여 정량화 하였다.

### 세포이동 실험

전면 성장한 BAEC에 2 mM Thymidine (Sigma-Aldrich)를 24 시간 동안 처리하여 세포의 성장을 중지시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 그 후 스크래퍼 칼라기(scraper)를 이용하여 창상 선을 만든 후 다시 PBS로 2회 세척하고 다양한 농도의 alliin을 처리하였다. 세포이동 정도는 일정한 시면적에 이동한 세포수를 세어 이동한 세포수의 비율을 계산하여 평가하였다.

### THP-1 응집 측정

THP-1을 24시간 동안 배양한 후, 혈청기아 배지로 12시간 배양한 후에 alliin을 각 농도 별로 처리하여 8 시간까지 시간 별로 진행되는 응집 현상을 현미경으로 관찰하였다.

### 산화질소(NO) 측정

35 mm 배양접시에 분주된 BAEC을 24 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양한 후 혈청기아 배지로 16 시간 동안 배양

하였다. HEPES 완충액(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4)으로 2회 세척하여 치환한 HEPES 완충액에 alliin을 농도 별로 처리하였다. 그 후 세포를 수확하여 초음파파쇄로 분해한 후 세포 분해액을 13,000 rpm으로 10 분간 원심분리를 하여 상층액을 분획하였다. 산화질소를 측정하기 위해 상층액과 100 nM의 DAF-2 (diaminofluoresceins)를 15 분간 상온에서 반응시킨 후 형광분석계(Spectrofluorophotometer RF-5301 PC, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 형광스펙트럼(Ex: 495 nm, Em: 515 nm)을 측정하여 분석하였다.

RT-PCR

정량 분석 후 2 µg의 RNA를 주형으로 사용하면서 역전사 효소(M-MLV reverse transcriptase, Promega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이렇게 합성된 cDNA를 다시 주형으로 하여 PCR로 ECE-1 (endothelin converting enzyme-1)과 eNOS (endothelial nitric oxide synthase)의 전사체를 확인하였다. ECE-1와 eNOS 프라이머의 불임온도는 60°C로 동일하게 하였으며 대조군으로 사용된 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 역시 60°C로 동일하게 하였고, 28 주기를 실시한 후, PCR 생산물을 1.5% 환천 겔 전기영동으로 확인하였다. 실험에 사용된 프라이머는 아래와 같다.

ECE-1:

5'-CCACAAGACTGCCCCCTCCAT-3' (forward)  
 5'-GCCCCAACACCCATCAGAGTTG-3' (reverse)

eNOS:

5'-TGACAAGCCGTATACGTACCCAGA-3' (forward)  
 5'-CGGTAGAGCCATAGTGGGAATGACA-3' (reverse)

GAPDH:

5'-CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA-3' (forward)  
 5'-CAACCTGGTCTCAGTGTAGCCTA-3' (reverse)

결 과

혈관내피세포 성장 실험결과

BAEC 세포를 이용하여 alliin이 혈관 생리 활성 가운데 하나인 내피세포 성장에 어떤 영향을 미치는 지 실험하였다. Alliin을 농도 별(0, 0.1, 1, 10, 20 µM)로 처리한 후 [<sup>3</sup>H]-Thymidine 편입을 통해서 세포 성장을 평가하였다(Fig. 1). 그림 1에서 보는 바와 같이, alliin의 농도가 증가할수록 [<sup>3</sup>H]-Thymidine 편입이 증가하는 것을 알 수 있었으며, 특히 20 µM의 alliin을 처리하였을 경우, [<sup>3</sup>H]-Thymidine은 2배 정도 현격하게 증가함을 확인할 수 있었다. 이렇게 농도 의존적으로 [<sup>3</sup>H]-Thymidine 편입이 증가하는 것은 alliin이 혈관내피세포의 증식을 촉진함을 의미한다.

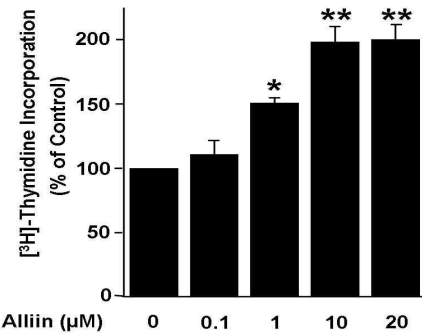


Fig. 1. Alliin increases [<sup>3</sup>H]-Thymidine incorporation. BAECs were serum-starved for 24 hr and treated with none or various concentration of alliin. Then the cells were incubated with 1 microCi/ml [<sup>3</sup>H]-Thymidine and washed thoroughly with ice-cold 5% TCA. After cell lysis, [<sup>3</sup>H]-Thymidine incorporation was monitored by radioactivity. Data were plotted on the bar graph (mean±SE, n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01

혈관내피세포 사멸 실험결과

Alliin이 혈관내피세포의 성장을 촉진한다는 것을 확인하였으므로, 다음으로 혈관 내피층에서 일어나는 세포사멸에는 alliin이 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. BAEC은 세포 외 기질에 부착하여 자라는 세포이기 때문에 죽은 세포는 모양이 둥글고 부유하고 있는 세포로 변화한다. 따라서 세포 사멸은 모양이 둥글고 부유하고 있는 세포의 수를 세어서 측정하였다. BAEC의 세포사멸은 혈청기아로 유도하였고, alliin이 세포 사멸에 미치는 효과는 혈청기아 상태에서 alliin을 처리하여 평가하였다. Fig. 2A에서 볼 수 있듯이, alliin을 처리하지 않은 대조군에 비해 alliin을 처리한 실험군에서 세포사멸 정도가 감소하였으며, alliin의 농도가 높아질수록 세포사멸이 더 많이 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 alliin이 세포사멸을 억제한다는 사실을 다시 한 번 확인하기 위하여 western blot을 통해 세포사멸과 관련된 단백질인 procaspase-3와 active caspase-3양을 검출함으로써 caspase의 활성을 조사하여 세포사멸 억제효과를 확인하였다. Fig. 2B에서 보는 것과 같이, alliin의 처리 농도가 높아질수록 active caspase-3의 양이 감소함을 알 수 있었다. 이는 alliin의 농도가 높아질수록 세포사멸의 정도가 감소함을 의미한다.

백혈구의 내피층 부착에 관한 실험결과

동맥경화는 동맥혈관 벽의 염증으로 인하여 발생하는 질환으로[7], 백혈구가 혈관 내피층에 부착하는 것은 이러한 염증 반응의 한 단계이다[11]. 따라서 백혈구가 혈관 내피층에 부착하는 정도를 관찰함으로써 동맥경화의 발생 가능성을 간접적으로 평가할 수 있다. Lipopolysaccharide (LPS)는 그람양성균 세포벽 외막을 구성하는 주요 성분으로 염증반응을 유도한다[18]. 백혈구와 혈관내피세포에 LPS를 처리한 후 배양하면 염

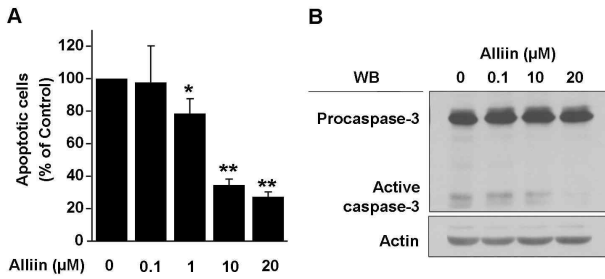


Fig. 2. Alliin decreases endothelial cell apoptosis. A. Confluent BAECs were starved for 16 hr and then the cells were incubated for additional hours (24 hr) with none or various concentration of alliin. Then the apoptotic cells (round shrunken cells) were counted under a microscope. The bar graphs represent the percentage of apoptotic cells (mean±SE, n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01. B. Cell apoptosis was confirmed by the caspase-3 activity. Starved cells that were treated with indicated concentrations of alliin were lysed. Proteins of the lysed cells were resolved by SDS-PAGE, electrotransferred to PVDF membranes and immunoblotted with antibodies specific for caspase-3.

증반응으로 인해 두 세포간의 부착이 일어난다. 하지만 alliin을 LPS와 함께 세포에 처리하였을 경우 THP-1 세포와 BAEC 간의 부착이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 alliin이 동맥경화의 발생을 억제할 수 있는 기능을 보유할 가능성이 높을 것임을 암시하는 것이다.

혈관내피세포 이동에 관한 실험결과

Alliin이 또 다른 혈관기능인 혈관내피세포 이동에 미치는 영향은 어떠한지 조사하였다. 혈관내피세포의 이동은 혈관 형성 과정과 상처 치유 과정 중 일어나는 단계 중 하나로 혈관내피세포 이동 측정은 혈관 형성과 상처 치유 과정에 alliin이 미치는 영향을 평가해 볼 수 있는 방법이다. 본 연구에서는 thymidine을 처리하여 세포 증식을 억제한 후 스크래퍼 칫과기를 이용하여 창상선을 만든 뒤 이동한 세포 수를 세어서 평가하였다. Fig. 4에서 보듯이 혈관내피세포의 이동 정도는 alliin의 농도가 높아질수록 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 alliin이 혈관생성을 유도할 수 있으며, 혈관의 상처 치유에 관여함을 의미한다.

백혈구 동종세포간 응집 실험결과

혈관에 상처가 생기면 혈전이 형성되어 출혈을 방지하게 되는데, 백혈구 동종세포간 응집은 혈전이 형성되는 단계에서 발생하는 현상이다[5]. 그러나 혈관 안에서 형성하는 혈전은 혈류를 따라 이동하다 혈관을 막아 뇌졸중이나 심근경색과 같은 혈관질환을 일으키기도 한다. Fig. 5에서 보듯이 THP-1 세포에 alliin을 처리하였을 경우 THP-1 동종세포간 응집이 일어나지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 alliin 자체는 혈전을 형성하는 데에는 아무런 영향을 미치지 않음을 의미한다.

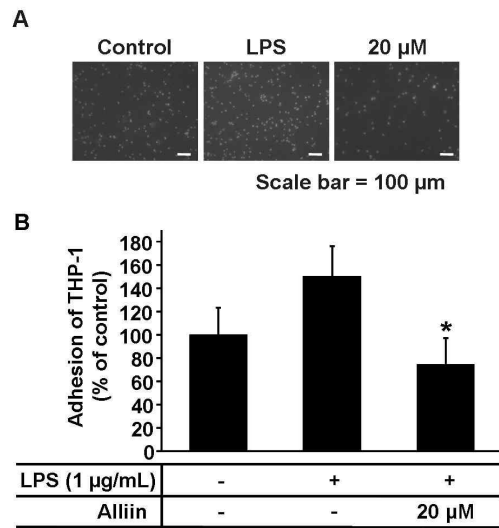


Fig. 3. Alliin inhibits LPS induced adhesion of leukocytes to endothelial cells. BAECs were starved for at least 16 hr and then cells were treated for 6 hr with none, 1 μg/ml of LPS with indicated concentrations of alliin. Before adding THP-1 cells to endothelial cells, THP-1 cells (5-6×10<sup>6</sup> cells/ml) were stained with 10 μM Calcein AM. Then, THP-1 cells were aliquot into the BAEC culture dishes. After 1 h additional incubation, adherent cells were observed under the fluorescent microscope in panel A. Bar graphs in panel B show the adherent cells in the same field (mean±SE, n=3). \*P<0.05

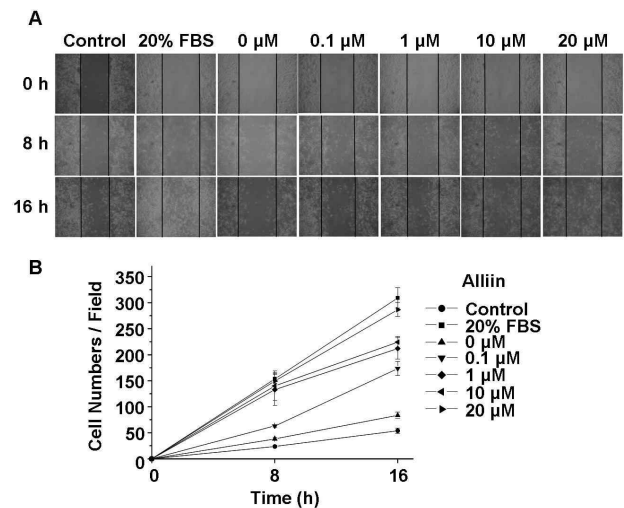


Fig. 4. Alliin induces endothelial cell migration. Confluent BAECs were incubated with none, 20% FBS or the indicated concentration of alliin after synchronized with 2 mM thymidine for 24 hr. Then the cells were wounded with a scraper and additionally incubated for various hours. We then observed the migrated cells under a microscope. Representative pictures were shown in panel A. Then we counted the migrated cells in the same visual field. In panel B, data were plotted on line graphs (mean±SE, n=5).

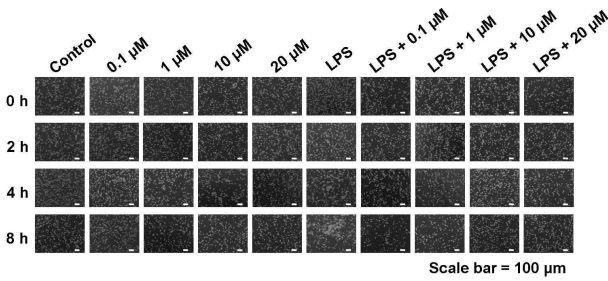


Fig. 5. Alliin inhibits LPS-induced THP-1 aggregation. THP-1 cells were starved in the starvation media for 12 hr, and treated with alliin for the indicated periods (0, 2, 4, 8 hr). The homotypic aggregation of THP-1 cells was observed under a microscope.

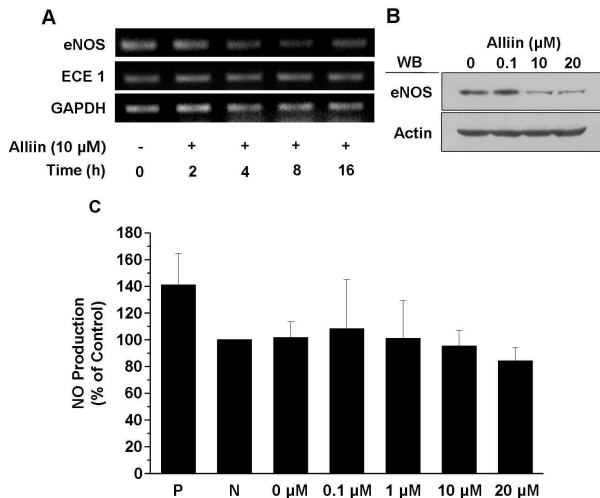


Fig. 6. Alliin inhibits the eNOS expression and has no effect on the acute NO production of endothelial cells. A. Confluent BAECs were starved in the starvation media for 16 hr, and treated 1 μM alliin for the indicated periods (0, 2, 4, 8, 16 hr). Then, mRNA was purified and used as a template for RT-PCR. RT-PCR was performed as described in materials and methods. B. Starved cells that were treated with indicated concentrations of alliin were lysed. Proteins of the lysed cells were resolved by SDS-PAGE, electrotransferred to PVDF membranes and immunoblotted with antibody specific for eNOS. C. BAECs were incubated for 15 min with none, 150 nM SNAP or the indicated concentration of alliin in HEPES after serum starved. Then the cells were reacted with 100 nM DAF-2. Production of NO was examined by DAF fluorescence. Data was plotted on the bar graph (mean±SE, n=5).

그러나 LPS를 THP-1세포에 처리한 경우, THP-1 동종세포간 응집이 일어났고, alliin을 LPS와 함께 THP-1 세포에 처리하였을 경우 LPS만 처리한 양성 대조군에 비해 THP-1 세포의 응집이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 위의 결과는 alliin이 혈전 형성을 억제하는 기능을 갖고 있음을 의미하며, alliin의 이와

같은 효과는 뇌졸중이나 심근경색과 같은 혈관질환의 발생을 억제기능과 연관되어 있음을 예측할 수 있다.

산화질소 생산 측정 실험결과

산화질소는 다양한 생리적 기능을 하지만 특히 혈관계와 관련 지어 혈관확장, 혈소판 응집 억제, 호중구의 부착 억제 [15] 및 동맥경화 발생 억제와 같은 기능을 하는 다양한 혈관 조절 인자이다[5]. 혈관내피세포에서 산화질소는 eNOS에 의해 L-arginine으로부터 합성된다[4]. 먼저 alliin이 eNOS의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 BAEC에 alliin을 처리한 후 eNOS의 mRNA 발현(Fig. 6A)과 단백질 발현 정도(Fig. 6B)를 각각 RT-PCR과 western blot을 통해 관찰하였다. Fig. 6A에서 보듯이 혈관내피세포에 10 μM alliin을 처리하였을 경우 시간이 지날수록 ECE-1의 mRNA 양은 변하지 않지만 eNOS mRNA 양은 감소하는 것을 알 수 있었다. eNOS의 단백질양 정도 역시 alliin의 농도가 높아질수록 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 6B). Alliin의 장시간 처리가 eNOS의 발현을 억제시킨다는 것은 최소한 alliin이 산화질소의 양을 증가시키지 못함을 의미한다. 한편 alliin이 짧은 시간 내에 eNOS의 활성을 증가시키는지 알아보기 위하여, alliin을 짧은 시간 동안 처리한 후 산화질소가 세포 내에서 증가하는지 확인해 보았다. 그 결과, Fig. 6C에서 보는 바와 같이 alliin의 단시간 처리는 산화질소의 생성에는 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 alliin이 가진 다양한 혈관 기능은 산화질소와 관련이 없을 것으로 추측할 수 있다.

고 찰

마늘은 고대부터 독특한 향과 맛을 지닌 식품으로 많이 이용되어 왔다. 마늘의 성분 중 주로 생리적인 기능을 하는 것은 alliin이다. 하지만 생마늘에는 allicin은 존재하지 않으며, 대신 allicin의 전구체인 alliin과 alliin을 allicin으로 변환시켜주는 allinase가 세포 내 다른 구획에 존재하다가 마늘을 파쇄하거나 잘게 썰게 되면 분비된 allinase에 의해 alliin이 allicin으로 변환된다. Allicin은 휘발성이 크며 화학적으로 불안정하기 때문에 마늘을 통째로 익히거나 가공한 마늘초, 흑마늘, 또는 건조된 마늘을 건강식품으로 이용할 경우 allicin의 형태로 섭취할 수는 없으며, alliin과 allinase의 형태로 섭취하게 된다. 따라서 이렇게 섭취한 alliin이 생체 내에서 어떤 생리활성을 갖는지 평가하는 것은 의미가 있다.

본 연구를 통해, alliin이 갖고 있는 혈관내피세포의 다양한 생리활성을 조사한 결과, alliin이 혈관내피세포의 기능장애를 개선할 수 있는 생리기능을 갖는 분자로서의 가능성을 확인하였다. 본 연구를 통해 alliin이 세포 수준에서 나타내는 생리활성을 요약하면 다음과 같다. (1) Alliin은 혈관내피세

포의 증식을 유발하며 세포사멸은 억제한다. (2) Alliin의 처리는 LPS에 의하여 백혈구가 혈관 내피층에 부착되는 것을 억제시키며, LPS에 의해 촉발되는 백혈구 동종간의 응집도 억제한다. (3) 또한 alliin의 처리는 혈관내피세포의 세포 이동을 촉진한다.

Alliin이 작용하는 세포수준에서의 기능들은 alliin은 생체 수준에서도 다양한 생리적인 기능을 갖고 있음을 의미한다. 먼저, alliin이 세포의 증식과 이동을 유발하는 세포 수준에서의 기능은, 세포의 증식과 이동이 혈관생성과 혈관의 상처 치유에 필수적인 과정이기 때문에 alliin이 혈관생성을 촉진하고 혈관의 상처 치유에 도움을 줄 수 있다는 것을 의미한다. 또한 백혈구가 혈관 내피층에 부착하는 현상은 염증 반응의 하나로써, 동맥경화의 발생과 밀접한 관련이 있기 때문에, 염증 반응을 유도하는 LPS가 THP-1세포를 혈관내피세포에 부착시키는 것을 억제하는 alliin의 세포 기능은 alliin이 동맥경화의 발생을 억제시킬 수 있음을 의미한다. 동맥경화반이 형성되는 초기 단계의 진행과정을 살펴보면, 단핵구와 같은 혈구세포가 염증반응이 시작하는 병소에 화학주화성물질에 의하여 모이게 되고 이러한 혈구세포가 혈관의 내피층에 부착한 후, 내피층 안 쪽으로 이동하여 포말세포로 분화하여 일어나는 일련의 과정이 동맥경화반 발생 초기에 일어난다. 이와 같이 단핵구의 내피세포 부착은 동맥경화발생의 초기 과정 중에 일어나는 필수적인 과정 중의 하나로, alliin이 보여준 단핵구의 내피층 부착을 억제하는 기능은 동맥경화발생을 억제하는 병리학적 억제 기능과 연계되어 있음을 의미한다.

한편 본 연구에서 혈전형성과 밀접하게 연관되어 있는 THP-1 동종세포간 응집현상을 관찰해본 결과, alliin은 THP-1 세포의 응집 형성을 유도하지 않으며, 오히려 LPS에 의해 유도된 THP-1 세포의 응집을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 alliin의 세포수준에 보여준 LPS 유발 THP-1 동종간 세포응집 억제현상은 뇌졸중이나 심근경색을 일으키는 혈전의 형성을 억제하는 기능이 있음을 암시한다.

혈관기능과 연계된 다양한 세포수준에서 일어나는 alliin의 기능을 조사해 보았으나 각 기능에 관한 alliin의 분자생물학적 기전에 관해서는 아직 이해되지 않고 있다. 분자 생물학적 이해를 하기 위하여 혈관기능에 중요한 역할을 하고 있는 산화질소의 생산과 alliin이 어떤 관계가 있는지 알아보기 위하여 eNOS의 발현 혹은 활성화에 alliin이 어떤 역할을 하는지 알아보았으나, 산화질소의 생산에 alliin은 관여하지 않음을 알 수 있었다. 오히려 alliin은 산화질소를 생산하는 eNOS의 발현을 억제하는 것으로 보아 alliin이 일으키는 다양한 혈관기능은 산화질소와 관계가 없는 것으로 추측된다.

본 연구결과를 종합해보면 alliin이 혈관내피세포의 여러 가지 생리활성을 조절하여 동맥경화를 비롯한 다양한 심혈관계 질환의 치료를 위한 물질일 가능성을 제시하고 있다.

## 요 약

고대부터 식품으로 많이 이용되어 왔던 마늘의 성분중의 하나인 alliin의 혈관 생리활성을 조사하기 위해 다양한 실험을 수행하였다. Alliin은 혈관내피세포의 증식과 이동을 증진시키는 기능이 있으며, 이는 alliin이 혈관형성을 촉진하고 혈관의 상처 치유에 도움을 줄 수 있음을 의미한다. 또한 alliin은 염증반응을 일으키는 과정에 나타나는 THP-1 세포의 혈관내피세포 부착을 억제하며, 혈전을 형성하는 THP-1 동종세포간 응집을 억제하는 기능도 갖고 있음이 확인되었다. 이와 같은 alliin의 세포 기능은 혈관의 주요 질환인 동맥경화의 발생 및 뇌졸중이나 심근경색의 원인이 되는 혈전의 형성 등을 억제할 수 있음을 의미한다. 한편 혈관의 주요 조절자 중의 하나인 산화질소의 생산에는 alliin이 관여하지 않음을 확인하였다. 종합해 보면, alliin은 혈관세포의 여러 가지 생리기능을 조절하는 혈관생리기능 개선제로 활용할 가능성이 있는 물질이다.

## 감사의 글

이 연구는 단국대학교 대학원 연구보조장학금의 지원으로 이루어진 것임.

## References

1. Ariga, T. and T. Seki. 2006. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review. *Biofactors* **26**, 93-103.
2. Balsara, R. D. and V. A. Ploplis. 2008. Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis. *Thromb Haemost.* **100**, 1029-1036.
3. Banerjee, S. K. and S. K. Maulik. 2002. Effect of garlic on cardiovascular disorders. *Nut. J. Rev.* **19**, 1-4.
4. Brune, B. 2003. Nitric oxid : NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ.* **10**, 864-869.
5. Choi, S., J. Park, J. Kim, K. In, and H. Park. 2008. *Acanthopanax senticosus* extract acts as an important regulator for vascular functions. *J. Life Science* **18**, 701-707.
6. El-Sabban, F. and H. Abouazra. 2008. Effect of garlic on atherosclerosis and its factors. *East Mediterr. Health J.* **14**, 195-205.
7. Galkina, E. and K. Ley. 2009. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol. Rev.* **27**, 165-197.
8. Gebhardt, R. 1993. Multiple inhibitory effects of garlic extracts on cholesterol biosynthesis in hepatocytes. *Lipids* **28**, 613-619.
9. Iberl, B., G. Winkler, B. Muller, and K. Knobloch. 1990. Quantitative determination of alliin and alliin from garlic by HPLC. *Planta Med.* **56**, 320-326.
10. Iciek, M., I. Kwicien, and L. Wlodek. 2009. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds.

- Environ. Mol. Mutagen. Rev.* **50**, 247-265.
11. Kaperonis, E. A., C. D. Liapis, J. D. Kakisis, D. Dimitroulis, and V. G. Papavassiliou. 2006. Inflammation and atherosclerosis. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **31**, 386-393.
  12. Kourounakis, P. N. and E. A. Rekkas. 1991. Effect on active oxygen species of alliin and *Allium sativum* (garlic) powder. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **74**, 249-252.
  13. Lebon, A. M., M. F. Vernevaux, L. Guneno, R. Kahane, J. Auger, I. Arnault, T. Haffner, and M. H. Siess. 2002. Effects of garlic powder with varying alliin contents on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **3**, 339-344.
  14. Libby, P., P. M. Ridker, and A. Maseri. 2002. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135-1143.
  15. Moncada, S. and A. Higgs. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**, 2002-2012.
  16. Nakamura, H. and M. Ishikawa. 1971. Effect of S-allyl cysteine sulphoxide on cholesterol metabolism. *Kanwa* **12**, 673-675.
  17. Rabinkov, A., T. Miron, L. Konstantinovski, M. Wilchek, D. Mirelman, and L. Weiner. 1998. The mode of action of alliin : trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1379**, 233-244.
  18. Saluki-Juszczak, J. and B. Wachowicz. 2005. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. *Postepy Biochem.* **51**, 280-287.
  19. Sangeetha, T. and S. D. Quine. 2006. Preventive effect of S-allyl cysteine sulfoxide (alliin) on cardiac marker enzymes and lipids in isoproterenol-induced myocardial injury. *J. Pharm. Pharmacol.* **58**, 617-623.
  20. Sangeetha, T. and S. D. Quine. 2007. Preventive effect of S-allyl cysteine sulfoxide (alliin) on lysosomal hydrolases and membrane-bound ATPases in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **21**, 118-124.
  21. Sheela, C. G. and K. T. Agusti. 1995. Antiperoxide effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from *Allium sativum* Linn and guggulipid in cholesterol fed rats. *Indian J. Exp. Biol.* **33**, 337-341.
  22. Warshafsky, S., R. S. Kamer, and S. L. Sivak. 1993. Effect of garlic on total serum cholesterol. A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **119**, 599-605.