

마늘성분 Allicin에 의해 차별적으로 발현되는 유전자군의 발현 분석

김경호¹ · 김민정² · 김종식² · 표석능¹ · 김병오^{3*}

¹성균관대학교 약학과, ²안동대학교 생명과학과, ³경북대학교 생태자원응용학부

Analysis of Differentially Expressed Genes by Allicin in Human Colorectal Cancer Cell. Kim, Kyung-Ho¹, Min-Jung Kim², Jong-Sik Kim², Suhkneung Pyo¹, and Byung-Oh Kim^{3*}. ¹Division of immunopharmacology, School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea, ²Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea, ³Department of Applied Biology, Kyungpook National University, Sangju 702-701, Korea – We investigated anti-cancer and anti-proliferative activity of alliin and analyzed global gene expression changes by alliin treatment in human colorectal HCT116 cells. As a result, alliin decreased cell viabilities in a dose and time-dependent manner and induced apoptosis. Oligo DNA microarray analysis, we found that 7,840 genes were up-regulated more than 2-folds, whereas 10,010 genes were down-regulated more than 2-folds by 50 μ M alliin treatment. To confirm specific gene expressions, we performed RT-PCR. Consistent with the results of DNA microarray analysis, alliin dramatically induced ATF3 and NAG1 gene expression. Interestingly, NAG-1 protein expression was dependent on p53 presence. Taken together, our present results increase the knowledge of the molecular mechanism of anti-cancer and anti-proliferative activity mediated by alliin in human colorectal cancer cell.

Key words: Allicin, oligo DNA microarray, gene expression, ATF3, colorectal cancer

서 론

마늘(*Allium sativum*)의 약용 효과는 B.C 1550년(Egyptian Codex Ebers)에도 알려져 있다[4, 21]. 마늘은 마늘 가루정(garlic powder tablet)이나 증기 멸균 마늘 기름(garlic oil) 등 여러 형태로 정제 할 수 있어서, 최근 건강 식품으로 널리 이용되고 있다[11, 12, 15]. 마늘의 구성 성분 중 하나인 알린(allin)은 마늘을 자를 때 세포가 파괴되면서 알리나아제(allinase)라는 효소의 작용에 의해 매운맛과 냄새가 나는 알리신(allicin)으로 변하게 된다[5, 20]. 이러한 알리신은 강한 항균 활성을 가지고 있으며, 최근 보고에 의하면 혈관을 확장시켜 혈액 순환을 원활하게 하고[18, 25], 소화를 촉진시키며 인슐린 분비를 도와 당뇨병과 같은 질병 치료에 효과가 있다고 알려져 있다[1, 2, 10, 13, 26].

마늘은 대장암의 치료와 예방에서 임상적 실험을 통하여 그 효능 및 치료 효과가 인정되고 있으나[3, 16] 약제의 작용기전에 관한 체계적이며 과학적인 근거 자료가 부족한 실정이다[7, 17, 24]. 그리고 대부분 알려진 마늘 성분에 대한 연구에서 암세포의 apoptosis를 유발하며[6], 이는 caspase 의존성 경로로 진행되는 것으로 보고 되었다[19, 22]. 그러나 allicin에 의한 apoptosis 경로 및 항암 작용에 대한 정확한

기전은 알려져 있지 않다[8-9, 14, 23].

따라서, 본 연구에서는 HCT116 대장암 세포주 모델에서 마늘 성분인 allicin 처리에 의한 대장암 세포독성 효과를 연구하고, 형태적 변화를 관찰하였다. 또한, DNA microarray를 통해 allicin 처리에 의한 유전자 발현 변화를 분석하였다. 이러한 연구는 마늘 함유 allicin에 의한 항암 활성 및 암예방 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

재료 및 방법

세포배양 및 재료

본 연구에 사용된 HCT116 대장암 세포주는 미국의 ATCC로부터 구매하였으며, p53 null HCT116 세포주는 Bert Vogelstein 박사(Johns Hopkins University)로부터 분양 받았다. 세포주의 배양은 10% FBS(Fetal Bovine Serum, GIBCO Inc. USA)와 1% penicillin/streptomycin(WeiGENE Inc. Korea)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO Inc. USA)에서 수행하였고, 배양조건은 37°C, 5% CO₂조건의 배양기에서 실시하였다. Phytochemical인 allicin은 LKT Biotech.(USA)와 NPC Biotechnology Inc.(Korea)에서 구입하여 사용하였다.

세포형태 변화 관찰

Allicin의 처리에 따른 대장암 세포주의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 세포 형태를 관찰하였다. 즉, 대장암

*Corresponding author

Tel: 82-54-530-1216, Fax: 82-54-530-1218

E-mail: kimb@knu.ac.kr

세포주 HCT116와 p53 null HCT116 세포주를 6 well plate 에 well 당 2×10⁴개의 세포를 분주하고 24시간 동안 배양한 후, allicin의 최종 처리 농도가 0, 25 μM, 50 μM, 그리고 100 μM이 되도록 처리하였다. 추가적으로 24시간 배양한 후, 역상 현미경(Leica DMIL, Wetzlar, Germany)의 100배 배율 하에서 세포주의 형태 변화를 대조군과 비교 관찰 하고 현미경에 설치된 카메라(Olympus Megapixel 4.0, Japan)를 이용해 well 단위로 촬영하였다.

Cell viability assay(MTT assay)

Allicin의 처리에 따른 대장암 세포주의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여, cell viability assay를 수행하였다. 즉, 96 well plate에 well당 3×10³개의 HCT116 세포를 분주한 다음, allicin을 다양한 시간 동안 처리하였다. 즉, allicin의 최종 처리농도가 25 μM, 50 μM, 100 μM가 되도록 처리하고, 대조군으로는 DMSO(0.1%)를 3, 6, 12, 그리고 24시간 동안 처리하였다. 처리 후 각 well의 media를 제거하고 MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide) 용액(Sigma, USA) 5 mg/mL을 각 well당 10 μL 씩 넣고 37°C, 5% CO₂배양기에서 4시간 동안 반응 시킨 다음, 상층액을 제거 후 DMSO 15 μL씩 주입하고 37°C에서 5분간 방치한 뒤, NanoQuant Plate™(Tecan Trading AG, Switzerland)를 이용하여 580 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 결과 수치는 4개의 독립적인 well에서 수행한 값을 mean±SD 값으로 나타내었다.

Hoechst 33342 염색

Apoptosis 의 형태학적 특징 중 chromatin condensation 여부를 확인하기 위하여 Hoechst 33342염색으로 조사하였다. allicin 100 μM을 24시간 처리한 후, 3.7% formaldehyde로 30분간 고정하였다. 고정된 세포에 Hoechst 33342로 세포의 핵을 염색한 후 형광 현미경으로 chromatin condensation의 여부를 조사하였다.

Total RNA 추출

Total RNA의 분리는 Qiagen RNeasy mini kit(Qiagen, USA)를 이용하여 제조사의 manual에 따라 수행하였다. 정제한 total RNA는 정량한 후, oligo DNA microarray 실험, RT-PCR 등에 사용되었다.

Oligo DNA Microarray 실험

DNA microarray는 Genomictree사에 위탁하여 수행하였으며, 미국 Microarrays사의 48.5 K Human Array-Illumina HEEBO oligo microarray를 사용하였다. 세포주로부터 분리한 total RNA를 주형으로 하여, 역전사 반응을 수행하였다. 역전사 과정 동안 대조군 세포(DMSO 처리)에서 분리한 total RNA는 Cy3-dUTP를 이용하고, 실험군 세포(allicin 처

리)에서 분리한 total RNA는 Cy5-dUTP를 이용하여 각각 labeling하였다. 만들어진 probe는 QIAquick PCR purification kit(Qiagen, USA)를 이용하여 정제 하고 난 후, 하나의 tube에 모은 다음 Microcon 30(Millipore, USA)을 이용하여 농축하였다. 최종 만들어진 probe를 pre-hybridization을 마친 DNA microarray에 적용한 다음, 65°C water bath에서 16시간 hybridization하였다. 일련의 세척과정 후, 원심분리를 하여 DNA microarray를 건조시켰다. 반응을 마친 DNA microarray는 Axon사의 Genepix4000B scanner(USA)를 이용하여 scan한 다음, 미국 Agilent사의 Gene Spring 7.3 프로그램을 이용하여 분석하였다. Normalization 방법은 intensity independent(LOWESS) normalization을 사용하였고, 유전자의 filtering은 median의 값의 합이 1,000 이상이 되는 유전자 중 2배 이상 up-regulation 되거나 down-regulation 되는 유전자를 중심으로 실시하였다.

Reverse transcription-PCR

Total RNA 5 μg을 이용하여 42°C에서 50분간 역전사 반응을 수행하였다. 만들어진 cDNA(최종 부피 60 μL)를 주형으로 하여, 유전자 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 즉, cDNA 2 μL, forward primer와 reverse primer를 각각 1 μL, PCR master mix(SeeGene Inc. Korea) 10 μL, 증류수 6 μL로 PCR mixture를 제조하고, PCR의 조건은 94°C에서 5분 후 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 25 cycle 증폭 후 72°C에서 10분간 extension반응을 시행하였다. PCR product는 전기영동을 수행한 후 UV 하에서 사진 촬영 하였다.

Western blot analysis

인간 대장암 세포주 HCT116 세포주와 p53-null HCT116를 60 mm dish에 각각 접종 후, 약 24시간 뒤에 allicin을 농도 별로 처리한 다음, 다시 24시간 뒤에 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 RIPA buffer(20 mM Tris-Cl[pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM NaCL, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μg/mL leupeptin)용액을 200 μL 처리하여 가볍게 tapping한 후 얼음 위에서 15분간 lysis 시킨 다음 4°C centrifuge에서 14,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 단백질을 추출하였다. 전기영동은 NuPage 4-12% acrylamide gel(Invitrogen, USA)을 이용하였으며, transfer를 마친 membrane은 5% non-fat skim milk(Bio-Rad, USA)가 함유된 1X TBS-T(0.1% Tween-20, 100 mM Tris-Cl[pH 7.5], 0.9% NaCl)에서 1시간 blocking 하였다. 1차 antibody 처리는 5% skim milk가 함유된 1X TBS-T 용액을 사용하여 4°C에서 12시간 이상 수행하고 TBS-T 용액으로 15분간 3회 세척하였고, 2차 antibody의 경우에는 같은 조성으로 실온에서 1시간 수행한

후 일련의 세척과정을 마쳤다. 세척 후 Western Lighting Plus-ECL(Perkin Elmer, USA)을 사용하여 발광시켜 X-ray film에 expose한 후 확인하였다. 본 실험에서 사용된 1차 antibody로는 anti-NAG-1, anti-p53, anti-ACTIN이 사용되었다. NAG-1 antibody를 제외한 모든 항체는 Santa Cruz사(USA)와 Cell Signaling사(USA)로부터 구입하였고 NAG-1 antibody는 미국 NIEHS(National Institute of Environmental Health Sciences)의 Dr. Eling group으로부터 제공 받았다.

결과 및 고찰

Allicin 처리에 의한 대장암 세포주 형태 변화 관찰

대장암 세포주 HCT116와 p53-null HCT116에 allicin 처리에 의한 세포의 형태적 변화를 확인하기 위하여 allicin을 농도별로(25, 50, 100 µM) 24시간 동안 처리한 후, 형태적 변화를 관찰하였다. 그 결과 두 세포주 모두 allicin 처리에 의해 농도 의존적으로 세포가 사멸됨을 확인하였다(Fig. 1A, B).

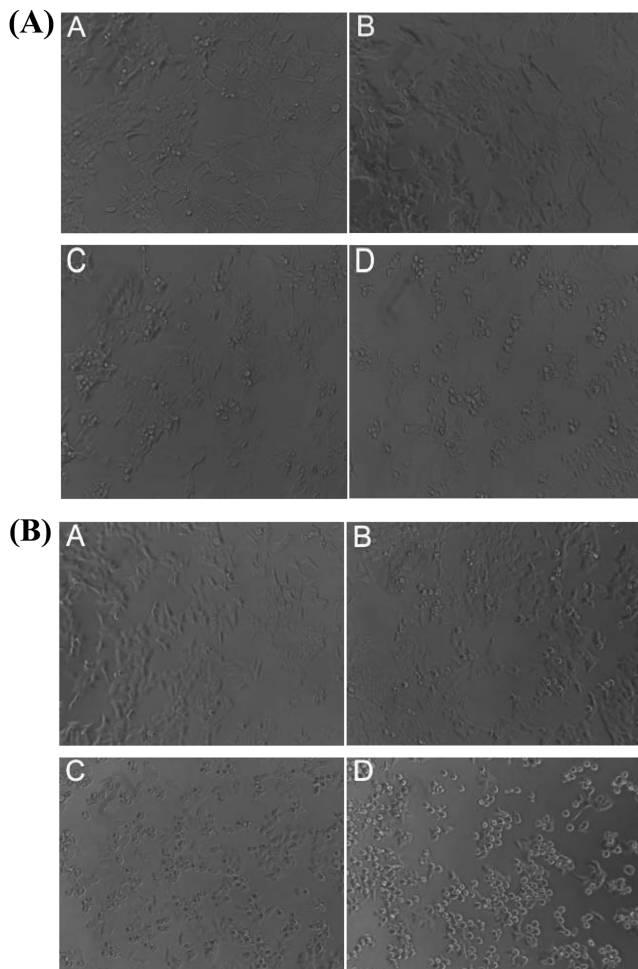


Fig. 1. Detection of cell death by allicin treatments for 24 hr. HCT116 cells (A) or p53 null HCT116 cells (B) were treated with four different doses (0, 25, 50, and 100 µM) of allicin for 24 hr.

Allicin에 의한 HCT116 세포의 생존율 연구

Allicin 처리에 따른 대장암 세포주 HCT116의 생존율을 정량화 하기 위하여, MTT 용액을 이용하여 cell viability assay를 수행하였다. 즉, allicin의 최종 처리농도가 25, 50, 100 µM이 되도록 처리한 후, 3시간, 6시간, 12시간 그리고 24시간 동안 배양하였다. Fig. 2A에서와 같이, allicin을 대조군과 비교 하였을 때 모든 allicin 처리군에서 세포 생존율이 낮아짐을 확인하였다. 이러한 결과는 Fig. 1에서와 같이 allicin의 처리 농도가 증가됨에 따라 배양 dish에 고착되어 있는 세포 수가 줄어드는 것과 일치하는 결과이다. 한편,

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR.

Gene Name	GenBank Acc. No.	Primer Sequences
<i>NAG-1</i>	NM_004864	F: 5'-CTCTCAGATGCTCCTGGTGT-3' R: 5'-GAATATCCCAGCTCTGGTT-3'
<i>ATF3</i>	NM_001030287	F: 5'-TGGTGTTTGAGGATTTTGTCT-3' R: 5'-ATTTCTTTCTCGTCGCTCT-3'
<i>GAPDH</i>	NM_002046	F: 5'-CTGACCTGCCGTCTAGAAAA-3' R: 5'-GAGCTTGACAAAGTGGTCGT-3'

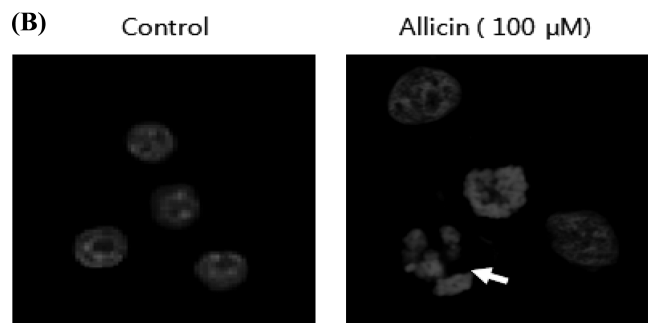
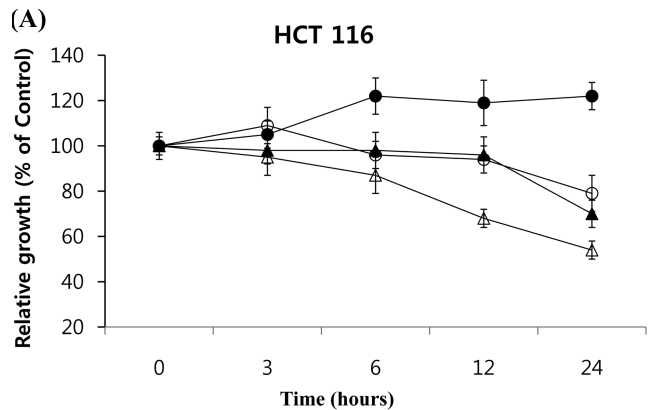


Fig. 2. Effects of allicin on HCT116 cell viability. (A) HCT116 cells were plated at 3,000 cells/well in a 96-well plate and incubated with 0, 25, 50 or 100 µM of allicin at various times. After each treatment, cell viability was measured using MTT solution. Symbols: ●, 0 micro M; ○, 25 micro M; ▲, 50 micro M; △, 100 micro M. (B) Apoptotic changes observed after Hoechst 33342 (10 µg/mL) staining for 30 min. Cells were treated with 100 µM allicin for 24 h.

Table 2. Several up-regulated genes more than 2 folds by 50 μ M allixin treatment.

No.	Gene Name	GeneBank Acc.No	Gene Description	Fold change
1	CDKN1A	NM_000389	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	7.25
2	SOD1	NM_000454	superoxide dismutase 1	5.91
3	ATF3	NM_001040619	activating transcription factor 3	4.06
4	PTEN	NM_000314	phosphatase and tensin homolog	3.94
5	RUNX1	NM_001001890	runt-related transcription factor 1	3.17

MTS 용액을 이용한 cell viability assay의 결과에서는 전혀 세포생존율의 변화가 관찰되지 않았다(data not shown). 이러한 연구결과는 allixin 혹은 이의 대사물이 MTS 용액의 발색에 방해할 하는 것으로 생각된다. 한편, 이러한 allixin에 의한 세포 생존율의 감소 원인을 확인하기 위하여 Hoechst 염색을 수행하였다. 그 결과 allixin 처리군에서 apoptosis의 대표적인 현상인 핵 condensation을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 이러한 결과를 바탕으로 allixin 처리에 따른 암 세포 생존율의 감소의 원인을 유전자 발현 차원에서 확인하기 위하여 oligo DNA microarray 실험을 수행하였다.

DNA microarray를 이용한 유전체 전체 수준에서의 유전자 발현분석

HCT116 대장암 세포주에 allixin 처리에 따른 차별적으로 발현되는 유전자군을 선별하고자 oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. HCT116 세포주에 50 μ M Allixin을 24시간 동안 처리한 후, total RNA를 추출하여 사용하였다. 그 결과 allixin 처리에 따른 발현양의 차이를 보인 유전자 중, 2배 이상 up-regulation된 유전자는 7,840개, 2배 이상 down-regulation된 유전자는 10,010개로 각각 분류 되었다. Up-regulation된 유전자 중 일부를 Table 2에 나타내었다. 이 중 ATF3(Activation Transcription Factor 3)는 전사조절인자로서 세포사멸과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

RT-PCR을 이용한 유전자 발현 분석

DNA microarray 결과를 입증하기 위하여 allixin에 의해

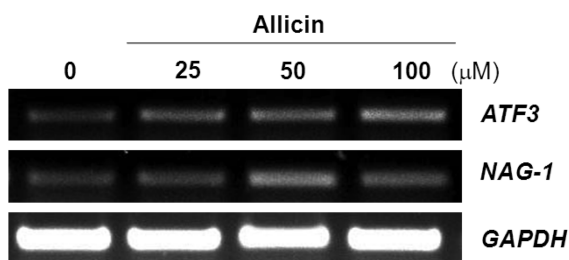


Fig. 3. NAG-1 and ATF3 gene expressions in allixin-treated HCT116 cells. HCT116 cells were incubated with 25, 50 or 100 μ M of allixin for 24 hr. Total RNA was prepared for RT-PCR with gene specific primers.

2배 이상 up-regulation된 유전자 중 ATF3 유전자와 항암 유전자인 NAG1를 선택하여 RT-PCR을 수행하였다. Fig. 3에서 allixin을 농도 의존적으로 처리한 후, ATF3와 NAG1 유전자 발현을 확인한 결과, ATF3 유전자는 처리한 allixin의 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였고, 이에 반해 NAG1 유전자는 50 μ M allixin의 처리군에서 가장 높은 발현을 보여 주었다(Fig. 3).

Allixin에 의한 NAG1 단백질 발현의 p53 의존성 분석

allixin에 의하여 NAG-1 단백질 발현이 암 억제 유전자인 p53에 의존적인지 확인하기 위하여, p53 null인 HCT116 세포주를 이용하여 실험하였다. 즉, HCT116 세포주에 3가지의 다른 농도(25, 50, 100 μ M)의 allixin을 처리하고, 이에 반해 p53 null인 HCT116 세포주에는 50 μ M의 농도의 allixin을 처리하였다. Fig. 4에서와 같이 HCT116 세포주에는 allixin에 의해서 p53 단백질의 발현이 약간 증가되는 것 같으나, p53 null인 세포주에는 p53의 발현이 확인되지 않았다. NAG-1 단백질은 HCT116 세포주에서는 대조군과 비교하였을때, 처리한 allixin의 농도 의존적으로 발현이 증가된 반면, p53 null인 HCT116 세포주에서는 대조군과 비교하였을때, 50 μ M Allixin을 처리한 경우 NAG-1 단백질의 발현의 증가가 확인되지 않았다(Fig. 4). 이러한 연구결과는 allixin에 의한 항암 유전자인 NAG-1의 발현은 p53 의존적으로 이루어짐을 시사한다.

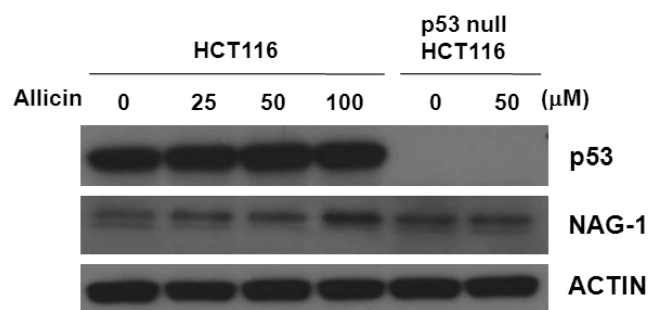


Fig. 4. Comparison of NAG-1 expression in HCT116 and p53 null HCT116 by allixin treatment. HCT116 cells and p53 null HCT116 cells were treated with allixin for 24 hr. Total proteins were prepared from treated cell and used for Western blot analysis.

요 약

본 연구에서는 마늘성분 allicin에 의한 항암 기전 및 화학적 암 예방법의 분자 생물학적 기전을 이해하기 위한 연구의 일환으로, 마늘성분 중의 하나인 allicin이 인체 대장암 세포주 HCT116의 증식에 미치는 영향을 확인하였다. allicin의 처리에 따라 세포사멸이 나타나며 생존율이 감소함을 확인하였다. 또한 oligo DNA microarray 실험을 통하여 allicin에 의해 발현되는 유전자 중 발현량의 차이를 보인 유전자중 2배 이상 up-regulation된 유전자는 7,840개, 2배 이상 down-regulation된 유전자는 10,010개로 각각 분류되었다. 이 중, ATF3유전자의 발현을 확인하였고, 또 다른 항암 유전자인 NAG-1 유전자의 발현을 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과, allicin처리에 의해 항암유전자인 ATF3의 발현과 NAG1 유전자의 발현이 증가함을 확인하였다. 또한 p53 null HCT116 세포주를 이용하여 allicin에 의한 NAG1 단백질의 발현을 확인한 결과, allicin은 p53 유전자 의존적으로 NAG-1 단백질을 발현함을 확인하였다. 결론적으로 allicin은 세포주기나 세포사멸에 관련된 많은 유전자들의 발현 변화를 유도함으로써 암세포 성장억제 활성을 갖는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2009년 KNU(경북대학교) 학술연구비에 의하여 수행되었습니다. 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Agarwal, K. C. 1996. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med. Res. Rev.* **16**: 111-124.
2. Aggarwal, B. B., S. Banerjee, U. Bharadwaj, B. Sung, S. Shishodia, and G. Sethi. 2007. Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **73**: 1024-1032.
3. Aggarwal, B. B. and S. Shishodia. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.* **14**: 1397-1421.
4. Ahmed, N., L. Laverick, J. Sammons, H. Zhang, D. J. Maslin, and H. T. Hassan. 2001. Ajoene, a garlic-derived natural compound, enhances chemotherapy-induced apoptosis in human myeloid leukaemia CD34-positive resistant cells. *Anticancer Res.* **21**: 3519-3523.
5. Arditti, F. D. A. Rabinkov, T. Miron, Y. Reisner, A. Berrebi, M. Wilchek and D. Mirelman. 2005. Apoptotic killing of B-chronic lymphocytic leukemia tumor cells by allicin generated in situ using a rituximab-alliinase conjugate. *Mol. Cancer Ther.* **4**: 325-331.
6. Baek, S. J., J. S. Kim, F. R. Jackson, T. E. Eling, M. F. McEntee, and S. H. Lee. 2004. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* **25**: 2425-2432.
7. Baek, S. J., K. S. Kim, J. B. Nixon, L. C. Wilson, and T. E. Eling. 2001. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol. Pharmacol.* **59**: 901-908.
8. Baek, S. J., L. C. Wilson, and T. E. Eling. 2002. Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. *Carcinogenesis.* **23**: 425-434.
9. Baek, S. J., R. Okazaki, S. H. Lee, J. Martinez, J. S. Kim, K. Yamaguchi, Y. Mishina, D. W. Martin, A. Shoieb, M. F. McEntee, and T. E. Eling. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia. *Gastroenterology.* **131**: 1553-1560.
10. Balasenthil, S. K. S. Rao, and S. Nagini. 2002. Altered cytokeratin expression during chemoprevention of experimental hamster buccal pouch carcinogenesis by garlic. *J. Oral. Pathol. Med.* **31**: 142-146.
11. Belloir, C. V. Singh, C. Daurat, M. H. Siess, and A. M. Le Bon. 2006. Protective effects of garlic sulfur compounds against DNA damage induced by direct- and indirect-acting genotoxic agents in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **44**: 827-834.
12. Dorai, T and Aggarwal, B. B. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* **25**: 129-140.
13. Ghodrati Azadi, H. S. H. Ghaffari, G. H. Riazhi, S. Ahmadian, and F. Vahedi. 2008. Antiproliferative activity of chloroformic extract of Persian Shallot, *Allium hirtifolium*, on tumor cell lines. *Cytotechnology.* **56**: 179-185.
14. Gu, Y., C. F. Zhu, H. Iwamoto, and J. S. Chen. 2005. Genistein inhibits invasive potential of human hepatocellular carcinoma by altering cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* **11**: 6512-6517.
15. Johnson, I. T. 2007. Phytochemicals and cancer. *Proc. Nutr. Soc.* **66**: 207-215.
16. Kim, H. Y. and E. J. Yang. 1993. A study on dietary factors related to the incidence of stomach cancer and colon cancer in Korea. *Kor. J. Nutr.* **26**: 603-614.
17. Lee, S. H., J. S. Kim, K. Yamaguchi, T. E. Eling, and S. J. Baek. 2005. Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce expression of NAG-1 in a p53-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**: 63-69.
18. Lee, S. J., J. H. Shin, M. J. Kang, W. J. Jung, J. H. Ryu, R. J. Kim, and N. J. Sung. 2010. Antioxidants activity of aged red garlic. *J. Life Sci.* **20**: 775-781.
19. Li, Y., J. Liu, X. Liu, K. Xing, Y. Wang, F. Li, and L. Yao. 2006. Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated AKT and caspase-9. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **135**: 181-192.

20. Miron, T. M. Mironchik, D. Mirelman, M. Wilchek, and A. Rabinkov. 2003. Inhibition of tumor growth by a novel approach: in situ allicin generation using targeted alliinase delivery. *Mol. Cancer Ther.* **2**: 1295-301.
21. Münchberg, U. A. Anwar, S. Mecklenburg, and C. Jacob. 2007. Polysulfides as biologically active ingredients of garlic. *Org. Biomol. Chem.* **5**: 1505-1518.
22. Oommen, S. R. J. Anto, G. Srinivas, and D. Karunakaran. 2004. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* **485**: 97-103.
23. Rahman, K. W., Y. Li, Z. Wang, S. H. Sarkar, and F. H. Sarkar. 2006. Gene expression profiling revealed survivin as a target of 3,3'-diindolylmethane-induced cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cell. *Cancer Res.* **66**: 4952-4960.
24. Son, E. W. S. J. Mo, D. K. Rhee, and S. Pyo. 2006. Inhibition of ICAM-1 expression by garlic component, allicin, in gamma-irradiated human vascular endothelial cells via downregulation of the JNK signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* **6**: 1788-1795.
25. Wilson, L. C. S. J. Baek, A. Call, and T. E. Eling. 2003. Non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) is induced by genistein through the expression of p53 in colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer.* **105**: 747-753.
26. Yang, S. T. 2007. Antioxidants activity of extracts of aged black garlic on oxidation of human low density lipoprotein. *J. Life Sci.* **17**: 1330-1335.

(Received Sep. 14, 2010/Accepted Oct. 6, 2010)