

## 마늘성분 SAC 및 Hydrogen Peroxide에 의한 줄기세포의 유전자 발현 윤곽

\*박 란 숙

승의여자대학교 식품영양과

### Gene Profile of Mesenchymal Stem Cell Induced by SAC or Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

\*Ran-Sook Park

Dept. of Foods & Nutrition, SoongEui Women's College, Seoul 100-751, Korea

#### Abstract

Though hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) causes a deleterious effect to cells with its reactive oxygen species resulting in cell death, S-allyl cysteine (SAC, a bioactive organosulfur compound of aged garlic extract) has been known to have a cytoprotective effect. Few reported profiles of gene expression of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SAC treated human cord blood derived mesenchymal stem cells (MSC). This study revealed changes in the profile of twenty-one genes grouped by oxidative stress, antioxidant, cell death, anti-apoptosis and anti-aging by quantitative real time PCR. A concentration of 100 μM of SAC or 50 μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was applied to MSC which show moderate growth and apoptosis pattern. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment enhanced expression of eleven genes out of twenty-one genes compared with that of control group, on the contrary SAC suppressed expression of eighteen genes out of twenty-one genes except C ros oncogene. SAC decreased expression of oxidative stress genes such as SOD1, CAT and GPX. These results seemed consistent with reports which elucidated over-expression of NF-kB by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and suppression of it by SAC. This study will confer basic information for further experiments regarding the effects of SAC on gene levels.

Key words: S-allyl cysteine, hydrogen peroxide, gene expression, real time PCR

#### 서 론

마늘은 S-allyl cysteine(SAC)를 포함한 phytochemical을 풍부하게 갖고 있어 심장질환, 당뇨병, 암의 예방에 크게 효험이 있다(Amagase H 2006). 마늘의 시험관 내 항산화 능력(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)은 5,708 μmol TE/100 g로 알려졌다(www.oracvalues.com/garlic-raw). 마늘의 유효 성분인 organosulfur compounds 중에서 수용성인 S-allyl cysteine(SAC)와 S-allylmercaptocysteine이 있고, 지용성인 diallyl sulfide, diallyldisulfide와 diallyltrisulfide 등이 있다. 마늘을 잘게 잘라 20% 에탄올에 보관하면 aged garlic extract(AGE)가 되는데, 실온에서 24개월까지 보관하면 5개의 organosulfur compound가

생성된다. 이 중 SAC는 1개월에 5.9 mg/g, 12개월 7.1 mg/g, 24개월 7.2 mg/g dry weight으로 안정된 형태를 유지하고 있으며, SAC는 산화 스트레스에 대한 항산화 활성을 비롯한 여러 가지 유익한 효과가 있다고 알려졌다(Colin-Gonzalez 등 2012). 생마늘로 섭취하면 위궤양을 유발하기 때문에(Amagase 등 2001), 대부분 익혀 먹거나, 김치를 만드는 데 첨가하거나, 찌개나 국 등에 넣어서 먹는다. 따라서 우리가 음식에 첨가하여 마늘을 섭취할 때, 수용성 organosulfur compound가 더 많이 체내에 흡수된다고 볼 수 있다.

최근 마늘 성분의 뇌 보호 효과가 알려지기 시작하였다(Aguilera 등 2010; Rojas 등 2011). SAC는 뇌허혈손상모델인 렛트의 중뇌동맥을 차단하여 유발한 oxidative stress 관련 뇌손상에서

\* Corresponding author: Ran-Sook Park, Dept. of Foods & Nutrition, SoongEui Women's College, Seoul 100-751, Korea. Tel: +82-2-3708-9119, Fax: +82-2-3708-9121, E-mail: ransook@sewc.ac.kr

보는 항산화 효소인 GPx(glutathione peroxidase), GR(glutathione reductase), SOD(superoxide dismutase), CAT(catalase)의 활성을 회복시켜 손상을 완화하였다(Ashafaq 등 2012). 이때 혈관 차단 없이 SAC만 투여한 군은 생리식염수 처치한 군과 비교하면 항산화 효소 활성 수치에는 유의한 영향이 없었다. 아울러 SAC 투여한 뇌의 육안 검사에서 경색 부위가 줄어들었고, 뇌 세포 소실이 줄어들었으며, 신경학적 행동검사의 호전을 가져왔다고 한다. 반응성 산화유리기(reactive oxygen species) 손상을 일으키는 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 처치한 신경세포에서 SAC는 유의한 신경 보호 효과가 있었으며, Alzheimer's disease model mice에서 신경신호전달에 필요한 pre-synaptic protein인 synaptosomal associated protein(SNAP)와 synaptophysin 수치를 증가시켰다(Ray 등 2011).

한편, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC)를 SAC로 전처리하면 대표적 산화손상제인 과산화수소를 처리하여도 대조군에 비하여 생존율을 유의하게 보존하였으며, 과산화수소에 의한 catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 생산의 down regulation을 차단하였다(Park RS 2009). 또한 중뇌동맥을 차단하여 유발한 뇌허혈 손상동물에서 항산화 효소(catalase, SOD, Glutathione reductase, GPx)의 양이 급격히 감소하는데, SAC가 이 항산화 효소들을 유의하게 유지시켰다(Ashafaq 등 2012).

세포는 영양과 대사, 외부 및 내부자극에 대한 신호전달, 그리고 세포분열을 통한 증식의 중추이다. 손상 받은 세포나 조직, 또는 실험동물이 SAC 투여 후 반응성 산소유리기를 제거하고, 항산화 효소를 유도한다는 뜻은 SAC가 세포의 유전자 수준 즉 DNA에 변화를 일으켜 새로운 정보가 RNA로 전사되고, RNA에서 번역과정을 통해 새로운 단백질을 생산해 세포기능의 변화가 일어나게 된다. 그러므로 SAC의 생활성 효과(bioactive effect)를 추구하기 위해서는 보다 근본적 수준 즉 유전자 profile을 연구할 필요성이 제기되었다.

줄기세포(stem cells)는 동일한 줄기세포를 self-renewal(자가증식)하는 능력과 특정한 세포로 분화하는 기능을 갖고 있다. 심근세포나 피부세포 등 대부분의 체내세포들이 이미 특수한 기능을 하도록 정해져 있지만, 줄기세포는 분화나 자가증식과 관련된 신호를 받기 전에는 재생, 분화를 하지 않는다(NIH 2001). 중간엽 줄기세포는 산모의 태반에서 비교적 쉽게 분리할 수 있는 세포로서, 자가증식을 할 수 있으며, 지방 세포, 골 세포, 연골 세포, smooth muscle cell 등으로 분화하는 특성이 알려졌으며(Pittenger MF 등 1999), 태줄에서 얻은 MSC는 조혈모 증식인자를 생산하여, 제대혈로 소아의 백혈병을 치료할 때 조혈모 줄기세포와 함께 골수 형성에 중요한 역할을 한다(Deans & Moseley 2000).

이번 연구는 SAC나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생리활성을 catlase, SOD, gluta-

thione peroxidase 등 항산화 단백질의 양을 측정하거나 western blot하던 연구보고들(Park RS 2009, 2011)과 달리 근본적으로 식품인 마늘성분이 세포의 유전자 수준의 변화를 유도할 수 있는지, 있다면 구체적으로 어떤 유전자의 프로파일을 변화시키는 지 확인하고자 하였다. 마늘성분과 관련된 단백질들의 변화를 일으키는 유전자 변화의 profile을 검색하기 위하여, 임의로 유전자를 oxidation stress, anti-oxidants, cell death, ageing, apoptosis, proliferation 등 7개군으로 구분하였다. SAC나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 MSC에 투여한 후, 이들 유전자 발현의 copy 수를 측정할 수 있는 real time PCR(정량 PCR, polymerase chain reaction) 방법으로 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. MSC의 분리 및 배양

산모의 동의를 얻어, 서울 시내 소재 제대혈은행에 보관 중 인공어 제대혈을 제공 받아 사용하였다. 제대혈을 실온에서 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 동량 희석하고, 15 ml cornical tube에 비중이 1.077인 Ficoll-Paque™ Plus 6 ml를 분주한 후 동량 희석액 9 ml를 첨가하고 750 g, 30분 동안 상온에서 원심분리하여 단핵세포층을 분리하였다. 분리된 단핵세포를 DMEM/Low glucose 기초배지에 FBS(Fetal Bovine Serum) 10%를 첨가한 배지에 부유하고, 6 well에 well당 1×10<sup>7</sup> 세포들을 분주하여 1주일간 배양하고, 비부착 세포는 제거하고 새로운 배지를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 부착된 세포에 3~4일 간격으로 배지를 교환해 주면서 MSC colony가 확인되면 0.25% Trypsin-EDTA를 처치하여 25 cm<sup>2</sup> 배양 플라스크로 옮겨 증식하였고, 70~80% confluence를 이루면 75 cm<sup>2</sup> 플라스크에 옮겨 충분한 양을 증식하였다.

분리된 줄기세포가 배양용기 내에서 confluence를 이루면 Trypsin-EDTA로 처리하여 부유시키고 수세한 후 계수하여 증식 정도를 확인하고, 1계대(passage, P)라고 하였다. 1/5양은 계대배양하고, 나머지는 1×10<sup>6</sup> cell/ml의 농도로 분주하고, 원 칩한 세포에 동결배지 10% DMSO(Dimethyl Sulfoxide)가 첨가된 FBS 0.5 ml로 부유하여 액체질소탱크에 보관하였다가 실험에 사용하였다. 제대혈 MSC는 면역표식자로 확인한 결과 CD29, 44, 105 양성으로 MSC임을 확인하였다(Park RS 2009).

### 2. 분리한 MSC의 계대배양 특성에 따른 구분

MSC를 계대배양하면서 증식된 세포를 각각의 초기계대(passage)에서부터 증식이 멈추는 말기 또는 증식률의 변화가 없을 때까지 관찰, 계수하고 이를 그래프화하였다. 계대특성에 따라 약 5계대에서 증식이 멈추는 Quiescent(Q) type, 약 10번의 계대에서 멈추는 Moderate(M) type, 20계대 이상에서 증

식이 활발한 Rapid(R) type으로 구분하였다. Automatic cell counter(ADAM-MC Digital-Bio, Korea)를 이용하여 세포수와 생존율을 계수하였다.

### 3. 세포 사멸(Apoptosis) 검색염색

분석할 Q, M, R type의 세포부유액 0.5 ml( $5 \times 10^5$  cell/ml)을 1,000 g, 5분간 원침하여 배양액을 제거하고, 같은 양의 냉 PBS로 부유하고 수세한 후, binding buffer와 함께 Annexin V-FITC(Fluorescein Isothiocyanate)를 첨가하였다. 빛이 차단된 상온에서 15분간 반응시킨 후 상층액을 제거한 후 같은 양의 buffer로 부유한 후 propidium iodide 10  $\mu$ l를 첨가하고, 빛이 차단된 냉장 상태에서 10분간 반응한 후 형광현미경(올림푸스 도립형광현미경)으로 세포 사멸 정도를 판단하였다.

### 4. SAC와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 적정농도 결정

실험에 사용할 마늘성분 SAC(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>S, 東京化成, 일본)의 적정농도를 탐색하기 위하여 6 well 배양용기에 M type의 만기(8 passage, 8P) 세포를 triplicate로  $1 \times 10^4$  cell/well로 분주한 1,000  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 농도의 희석액을 7일간 2회 투여하여 배양하고 증식된 세포수를 확인하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Sigma Co, USA)는 M type 8P를 동량으로 분주하고, over night하여 안정화 시킨 후 500  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M의 농도로 2시간 동안 처치하고 수세한 후 새로운 배지로 교환하였다. 추가로 7일간 2회 배지를 교환하면서 배양한 후 세포수와 생존율을 확인하였다.

### 5. 유전자 카피수를 측정하기 위한 Real-time(정량) PCR

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도유전자로 생각되는 유전자를 위에 언급한 7개군으로 나눈 다음, 독일 Roche사에 각각의 유전자들의 특정한 DNA 염기서열인 probe들의 labeling을 주문하였다. 실험에 사용할 MSC는 M type의 8 P를 해동한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양하였다. 각 well에 SAC 또는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처치하였으며, 본 실험에 산화적 스트레스에 관련된 유전자들을 대상으로 spot check 하였다.

각 군으로 나눈 유전자들의 발현을 확인하고자 대조군, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>군, SAC군의 세포들을 수확하여 high pure RNA isolation kit(Roche Co, Germany)로 RNA를 추출하고, RNase inhibitor 20U를 첨가해 실험에 사용하였다. 로슈사의 cDNA synthesis kit의 설명서 방법대로 oligodT(2.5  $\mu$ M)와 random hexamer primers (60  $\mu$ M)를 합성할 tube에 넣고, transcriptor reverse transcriptase (10U/ $\mu$ l) 첨가하고 25°C에서 10분간 반응시켰다. 50°C에서 60분간 cDNA를 합성한 후 real-time PCR용 master mixtures(Tag polymerase, buffer, dNTP mix 포함)와 함께 probe가 표지된 plate에 넣고 Light Cycler 480(Roche)에서 각각의 샘플을 pre-

incubation 1회, amplification(95°C, 10 sec/60°C, 30 sec/72°C, 1 sec) 40회, cooling 1회하여 증폭된 genomic DNA copy 수를 확인하였다.

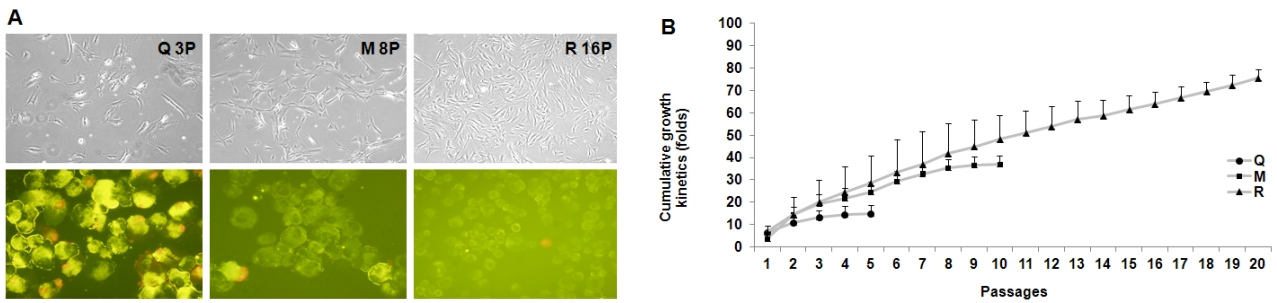
### 6. 통계

SAC와 hydrogen peroxide 적정 농도 결정을 위한 실험에서는 측정을 triplicate하여 mean $\pm$ S.D.치로 그래프를 그렸으며, 통계학적 유의성은 검정하지 않았다. 본 실험의 목적이 SAC와 hydrogen peroxide로 유도되는 유전자 발현의 대략적 윤곽을 파악하는데 있었기 때문에 유전자 카피수의 정량적 측정은 2회에 걸쳐서 시행하였으며, 카피수는 mean $\pm$ S.D.치로 하였다. 실제 검색해야 할 유전자가 많았기 때문에 개개 유전자 카피수의 유의성 검증보다는 2회 측정된 카피수의 몇 배 증가 또는 감소인가를 표시하였다. 본 실험에서는 2배 이상 증가하는 경우는 유전자 카피수 변동의 의미가 있는 것으로 판단하였다. 전체 24개의 유전자들을 96 well plate에 3개의 참고 유전자와 함께 넣고, 대조군, hydrogen peroxide군, SAC군으로 나누는 실험을 2회 반복해서 얻은 유전자(target gene) 카피수 발현값을 mean $\pm$ SD로 표시한 다음 reference genes(ACTB, HPRT1과 GAPDH)값으로 나누어 normalize하고, 차이가 큰 값들을 서로 비교하고자 anti-log<sub>10</sub>값으로 처리하여 그래프와 표를 작성하였다.

## 결 과

### 1. MSC 증식 유형별 형태학적 관찰과 세포 사멸 검색

증식 유형에 따라 구분한 Q type, M type, R type 은 세포 사멸 염색에서 세포 크기의 변화와 세포질과 핵의 염색성 변화에 따른 세포 사멸 염색에 분명한 차이가 있었으며(Fig. 1A), 증식곡선에서도 분명한 차이가 있었다(Fig. 1B). 증식이 원활하지 않아 5P에서 멈추었던 Q type은 도립현미경 관찰에서 배양세포는 흩어져 있었으며, 세포 사멸 염색은 annexin V-FITC (annexin, 세포질의 변화 관찰)는 초기의 세포 사멸을 보여주는데 황색으로 염색이 되고, propidium iodide(PI, 핵의 변화 관찰)는 늦은 세포 사멸을 관찰하는 방법으로 떨어져 나간 핵이 적색으로 염색이 되는데, Q type은 세포가 커지고 세포질이 황색으로 염색이 되고, 핵이 적색으로 되는 세포들이 많았다. R type 16P는 도립현미경 관찰에서 방추상의 세포들이 밀집하여 자라는 형태가 관찰되었고, 세포 사멸 염색에 양성으로 보이는 세포는 소수였다. M type 8P는 R type보다는 세포 밀집도가 떨어지고, 세포 사멸 염색에서 양성으로 보이는 세포들이 더 많았다. 정리하면, MSC는 세 가지 타입(Q, M, R) 별로 growth kinetics(R>M>Q)와 세포의 비대 정도(Q>M>R)가 달랐으며, 세포 사멸 염색에서도 각각의 사멸 정도가 Q는

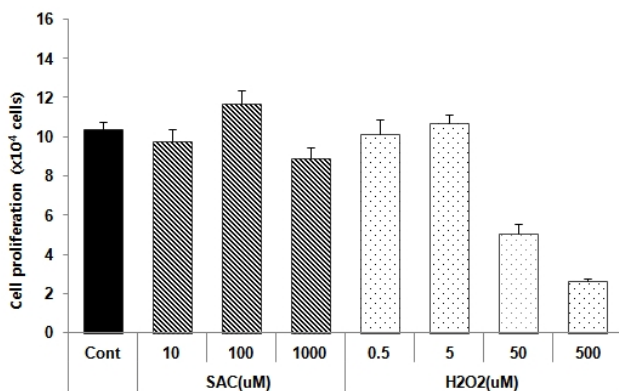


**Fig. 1. Changes of morphology and apoptosis level according to growth kinetics on human UCB MSCs.** (A) Morphologic change of three different Q, M, and R type of MSC at magnification of  $\times 100$  for upper pictures,  $\times 400$  for lower pictures. (B) Apoptosis stain of the types. P is initial letter of passage. X axis presents passage and Y axis presents folds of cell proliferation. Value represent mean $\pm$ S.D. of data from triplicated experiments.

annexin에 90% 이상, PI 60% 이상의 양성을 나타냈고, M은 annexin에 30% 정도와 PI에 10% 정도이었으며, R은 annexin에 10% 이하, PI에 1% 이하로 분명하게 구별되었다(Fig. 1A).

## 2. SAC와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 적정농도와 실험에 사용할 MSC passage의 결정

증식 특성에 따라 임의로 구분한 Q type의 MSC는 증식이 느리고 5P 정도에서 계대가 멈추었기 때문에 hydrogen peroxide에 의한 reactive oxygen stress에 취약하다고 판단하였고, R type은 20 P 넘어서도 증식이 잘 되기 때문에 과산화수소 손상이 별다른 효과를 보지 못할 가능성이 있어서 M type을 실험에 사용하였으며, 보통 10P에서 성장이 멈추었기 때문에 8 P가 SAC나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 영향을 분석하기에 적당하다고 판단하여 8 P의 MSC를 실험세포로 정하였다. SAC와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 dose dependent 한 농도로 투여하고 확인한 결과, 약 20% 내외의 증식을 유도한 SAC 100  $\mu$ M과 세포를 약 50% 정도 살해한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ M



**Fig. 2. Determination of optimal concentration of SAC and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on M type MSC 8P.** Value represent mean $\pm$ S.D. Y axis means cell number. Data came from triplicated experiments.

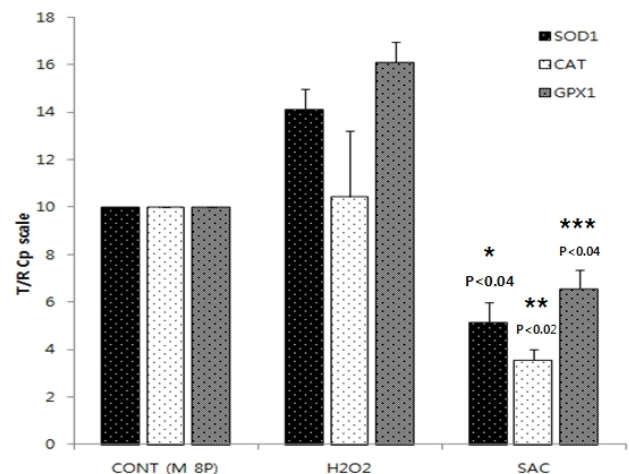
을 실험에 사용할 적정 농도로 결정하였다(Fig. 2).

## 3. SAC 또는 Hydrogen peroxide로 유도한 oxidative stress genes의 발현

MSC8P의 세포를 이용하여 산화적 스트레스와 관련된 유전자들(SOD1, CAT, GPX1)의 발현에 미치는 SAC의 영향을 우선적으로 확인한 결과, M type과 wild type의 8P에 투여한 SAC군은 대조군에 비하여 산화적 스트레스에 관련된 유전자 모두가 유의하게 적게 발현하였다(Fig. 3).

## 4. SAC와 Hydrogen Peroxide로 처치한 유전자 발현의 윤곽

Fig. 3의 예비 실험 결과에 M type 8P를 이용하여 1) oxidative stress에 관련된 유전자들(SOD1, CAT와 GPX1)뿐만 아



**Fig. 3. SAC treatment reduced expression of oxidative stress genes of M type 8P of MSC.** SAC 100  $\mu$ M treatment suppressed expression of SOD1, CAT and GPX1 significantly.

니라, 2) anti-oxidants(COQ2, ATOX1과 PRDX3), 3) cell death (MADD, FAS와 STAT5a), 4) anti-apoptosis와anti-aging과 관련된 ROS pathway(ROS1, NOXO1과 MAPK1), 5) anti-proliferation (WNT3a, GLI1과 GNL3), 6) cell proliferation에 관여하는 유전자들(STAT1, GTF3a와 NFE2L2)의 발현을 아무런 처치가 없는 대조군 대비 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 투여군과 SAC 투여군 간의 발현값을 reference genes(ACTB, HPRT1과 GAPDH) 값으로 나누어 normalize하고 차이가 큰 값들을 서로 비교하고자 anti-log<sub>10</sub>값으로 처리하고 도식화하였다(Fig. 4).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>군에서는 대조군에 비하여 대부분의 유전자가 over expression되었으나, SAC군에서는 대부분이 억제되었다. SAC 군은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>군과 비교하면 약 14개의 유전자(SOD1, CAT, GPX1/ ATOX1/ MADD, FAS, STAT5a / ROS1와 MAPK1/ GLI1와 GNL3/STAT1, GTF3a, NFE2L2)들을 뚜렷하게 억제하였다. SAC는 산화적 스트레스에 관련된 유전자(SOD1, CAT와 GPX1) 발현을 줄이고, ATOX1 감소 발현을 통한 anti-oxidant로, cell death(MADD, FAS, STAT5a, MAPK1), aging(ROS1와 MAPK1), apoptosis(GLI1, GNL3), anti-apoptosis(STAT1, GTF3a와 NFE2L2)에 관련된 유전자들을 억제하였다.

#### 5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SAC 군의 유전자 발현의 fold changes

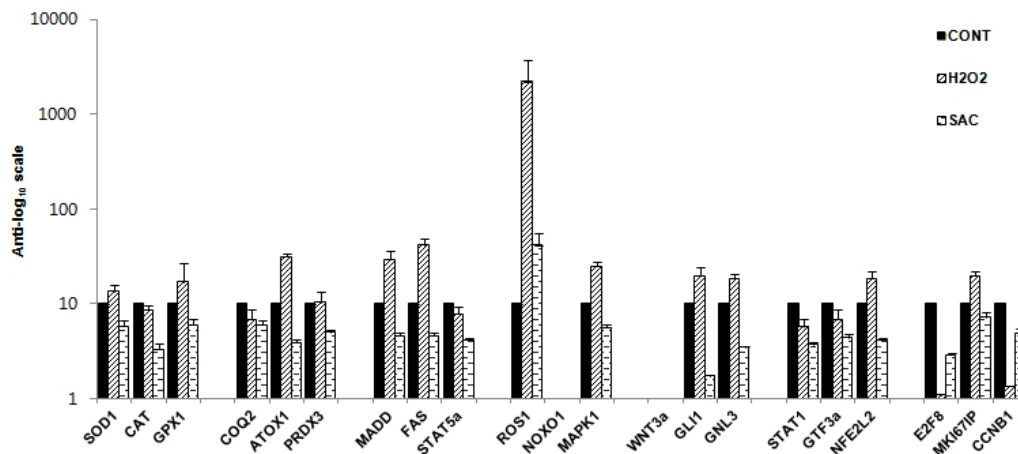
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SAC 처치가 MSC 유전자 발현에 미치는 영향을 reference 유전자들의 발현값을 기준으로 normalize한 target Cp값(crossing point, 자세한 내용은 로슈의 Light Cycler 매뉴얼 참조)으로

전환하여 몇 배의 증감이 있는지 표시하였다(Table 1).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치에 의해 대조군보다 증가를 보이는 유전자는 3.29배의 ROS1(C-ros oncogene1)과 1.62배의 fas(TNF receptor super-family 8), 1.5배의 ATOX1(ATX1 antioxidant protein 1) 유전자 등이다. SAC 처치는 모든 유전자들이 대조군에 비하여 낮게 발현되었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>군 SAC 군을 비교하여 보면 가장 많은 증가를 보이는 유전자는 세포분열과 주기에 관련된 E2F8(11.5배) [E2F transcription factor 8] 유전자와, CCNB(5.31배)[cyclinB1] 유전자였다. Oxidative stress, antioxidants, cell death, antiapoptosis와 antiaging, cell proliferation 관련 유전자는 모두 감소하였으며, GLI1(5.38배 감소), ATOX1(2.54배 감소), FAS(2.46배 감소)의 순서였다.

## 고 찰

생체는 영양 즉 macronutrients와 micronutrients을 통하여 성장하며 기능한다. 세포의 기능은 본질적으로 유전자 수준의 활성을 통해 transcription, translation 과정을 통해 생산된 효소나 단백질에 달려 있다. 마늘의 AGE 성분 중 가장 안정된 형태로 많이 포함되어 있는 SAC가 항산화 효과가 있음은 많은 보고들이 입증하고 있지만(Colin-Gonzalez 등 2012; Amagase H 2006), MSC에 미치는 영향 특히 유전자 수준에 관한 변화에 대해서는 보고된 논문은 소수였으며(Geng 등 1997; Tobon-Velasco 등 2012), 특히 SAC 처치 후 다수의 유전자의 profile



**Fig. 4. Profile of genes expression of control, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and SAC group of MSC.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group showed over expression of eleven genes out of twenty-one genes, in contrast SAC group inhibited expression of eighteen genes comparing with those of control group except ROS1 gene. Genes suppressed by SAC appeared to be related with oxidative stress (already confirmed in Fig. 2, SOD1, CAT and GPX1), cell death (MADD, FAS and MAPK1), aging (MAPK1) and apoptosis (GLI1, GNL3, STAT1, STAT5a, GTF3a and NFE2L2), cell proliferation (STAT1 and STAT5a) and anti-oxidants (COQ2 and PRDX3) The diagram displayed results from control, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and SAC group. Values of target gene expression were normalized by dividing with 3 reference genes (ACTB, HPRT1 and GAPDH) in duplicated experiments.

Table 1. Summarize of gene profile expressed on SAC against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Groups	Genes	Description	Mean of T/R Cp			
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	SAC	Folds	P value
Oxidative stress	SOD1	Superoxide dismutase1	1.13	0.76	▼1.50	0.035
	CAT	Catalase	0.93	0.51	▼1.82	0.023
	GPX1	Glutathione peroxidase1	1.19	0.78	▼1.53	0.037
Antioxidants	COQ2	Coenzyme Q2	0.83	0.78	▼1.06 <sup>1*</sup>	0.653
	ATOX1	ATX1 antioxidant protein1	1.50	0.59	▼2.54	0.003
	PRDX3	Peroxiredoxin3	1.00	0.70	▼1.42 <sup>1*</sup>	0.081
Cell death	MADD	MAP-kinase activating death domain	1.46	0.66	▼2.21	0.008
	FAS	TNF receptor superfamily6	1.62	0.66	▼2.46	0.004
	STAT5a	Signal transducer & activator of transcription5a	0.89	0.62	▼1.44	0.039
Antiapoptosis and antiaging	ROS1	C-ros oncogene1	3.29	1.60	▼2.06	0.021
	NOXO1	NADPH oxidase organizer1	0.00	0.00	ND <sup>2*</sup>	
	MAPK1	Mitogen activated protein kinase1	1.39	0.75	▼1.85	0.006
Cell proliferation	WNT3a	Wingless-type MMTV integration3	0.00	0.00	ND <sup>2*</sup>	
	GLI1	GLI family zinc finger1	1.29	0.24	▼5.38	0.004
	GNL3	Small nucleolar RNA	1.26	0.54	▼2.33	0.004
Cell proliferation via antiapoptosis	STAT1	Signal transducer & activator of transcription1	0.75	0.57	▼1.32	0.134
	GTF3a	General transcription factor3a	0.83	0.64	▼1.30	0.159
	NFE2L2	Nuclear factor (erythroid-derived 2) like2	1.26	0.62	▼2.03	0.008
Cell division & cycle	E2F8	E2F transcription factor8	0.04	0.46	▲11.5	0.332
	MKI67IP	MKI67 interacting nucleolarphosphoprotein	1.29	0.86	▼1.5	0.012
	CCNB1	CyclinB1	0.13	0.69	▲5.31	0.003

Numerical value indicates decrement (▼) and increment (▲) in the fold of gene copy expression. ND means gene could not be detected in the design of this experiment. T means target genes and R for reference genes.

을 연구한 논문은 찾아보기가 어려웠다.

SAC에 의해 E2F8과 CCNB1을 제외한 거의 모든 유전자의 발현이 감소를 보이는 원인은 SAC가 transcription이 일어나는데 가장 중요한 역할을 하는 NF-kB(nuclear factor kappa B)활성을 dose dependent하게 억제하였다는 보고가 본 실험의 결과를 뒷받침한다(Ho 등 2001). MSC에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처치하면 reactive oxygen species에 의한 손상이 발생하고, 이를 제거하기 위한 SOD, GPX1 효소가 증가하게 되며, 이에 따른 유전자 발현이 다소 증가하였으나, SAC 투여군은 oxidative stress 유전자들을 감소시켜 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 투여 때와 대조를 이루었다. 또한 마늘의 AGE나 SAC는 hydrogen peroxide를 직접 제거하는 기능을 갖고 있음이 알려졌다(Ide & Lau 2001).

MSC의 생존율을 50%까지 감소시키는 용량의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 투여에서도 oxidative stress 관련 유전자들의 큰 폭으로 변동하지 않았던 이유는 다른 세포들과 달리 사람의 MSC는 *in vitro*에서 oxidative stress의 ROS 및 RNS(reactive nitrogen species)를 제거하는 능력이 있었기 때문(Valle-Prieto & Conget 2010)이

라고 추측하였다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 약 1.5배의 증가를 보였던 Antioxidant 1 (ATOX1)는 trans-Golgi network에서 SOD에 copper를 전달하는 기능을 가진 copper chaperone 역할을 한다. 따라서 SOD는 copper와 ATOX1의 transcription factor에 의해 positive regulation 된다고 한다(Itoh 등 2009). 다시 말하면 ATOX1 유전자가 증가하면 SOD 유전자가 증가한다고 볼 수 있다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치는 MSC의 세포 사멸을 일으키고, NF-kB 활성이 일어나면 세포 사멸과 관련된 MADD 유전자, MAPK1 유전자 및 FAS 유전자 발현의 증가는 MAP kinase-activating death domain(MADD) protein이 생성되고, 이 단백질은 type 1 tumor necrosis factor receptor와 상호작용하며, mitogen-activated protein kinase(MAPK)를 활성화시킨다는 보고(Schievella 등 1977)와 일치하며, MADD와 MAPK1 유전자의 발현 양상이 연계되는 것으로 보인다. FAS는 위에서 언급된 tumor necrosis factor receptor의 superfamily member 6(TNFRSF6)로, programmed cell death(apoptosis)가 진행되는 세포의 표면에 발현되는 death

receptor(apoptosis antigen 1, APO-1)로, 세포 사멸과 밀접하게 관련되어 있다고 한다(Maheshwari 등 2009).

ROS1은 C-ros oncogene1의 약칭이며, 실제로는 tyrosine kinase receptor(티로신인산화수용체)의 유전자이다. Hydrogen peroxide에 의해 MAPK가 활성화되는 경로는 tyrosine kinase 의존하기 때문(Tabet 등 2005)에 본 실험에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치한 MSC에서 ROS1 발현이 증가함은 당연한 일이며, MAPK1, MADD 발현의 증가도 여기에 연계되어 있다. SAC 투여는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 보다 약 2배 정도 감소하였다. Hydrogen peroxide는 줄기세포의 DNA와 단백질에 영향을 미쳐 줄기세포가 정지 상태에서 분화단계로 들어가게 만들어 줄기세포의 소실을 가져와 결국은 life span에 영향을 준다고 한다(Liu & Finkel 2006). Ito 등(2004)은 hydrogen peroxide의 scavenger인 N-acetyl-L-cysteine(NAC) 처치로 조혈모 줄기세포의 기능을 회복하였다고 보고하였다.

세포 사멸과 증식에 관한 유전자 프로파일 중 NOXO1과 WNT3a 유전자가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치나 SAC 처치 모두에서 발현되지 않았다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 세포 증식보다는 세포의 사멸과 관계가 있기 때문에 중앙 발생에 관여하는 WNT 유전자는 발현되지 않을 가능성이 높다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 organogenesis 및 carcinogenesis와 관계있는 WNT 경로를 억제한다는 보고가 이를 뒷받침해 주고 있다(Shin 등 2004). 또한 Ho 등(2001)이 보고한 바와 같이 SAC는 transcription factor인 NF- $\kappa$ B를 억제하는 기능이 있기 때문에 역시 WNT 유전자 발현이 검출되지 않았다고 본다. NOXO1은 NADPH oxidase를 만드는 유전자이며, 주로 탐식세포에서 미생물을 살해하는 hydrogen peroxide 또는 superoxide를 생산하는 역할을 하는데(Takeya & Sumimoto 2006), 본 실험에서는 양자 모두 발현하지 않았다. 그 이유는 SAC는 세포를 안정화시키고, MSC는 특별한 기능을 하도록 분화된 탐식세포가 아니고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 탐식과 관련된 것이 아니라 세포 사멸의 방향으로 MSC를 자극하였기 때문에 NOXO 유전자 발현과는 거리가 멀다고 사료된다.

세포 분열과 세포 주기에 관련된 E2F8(E2F transcription factor 8) 및 CCNB1(cyclin B1)은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치에서는 발현이 거의 없는 상태였으나, SAC 군에서는 대조군에 비하여 낮지만 발현이 상대적으로 증가하였음을 알 수 있다. 그러나 대조군보다 낮은 발현이기 때문에 생리활성의 의미를 부여하기는 어려웠다.

## 요약 및 결론

세포 보호 효과가 잘 알려진 마늘의 유효성분인 S-allyl cysteine(SAC)과 reactive oxygen species 생성의 대표적 물질인 hydrogen peroxide가 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(MSC)의 oxidation stress, antioxidant, cell death, antiapoptosis 및 antiaging

등에 관련된 유전자 발현의 프로파일을 정량적 PCR 방법으로 연구하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>군, SAC 군을 비교하여 21개 유전자 발현량을 대조군과 비교하였다. 중간 정도의 계대증식속도와 세포 사멸 염색 정도를 보이는 MSC세포(M type)를 이용하여 50% 정도의 세포를 죽이는 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 SAC 농도는 100  $\mu$ M를 사용하였다.

Hydrogen peroxide 처치한 MSC는 대조군에 비하여 11개의 유전자 발현이 증가하였지만, SAC 처치군에서는 21개 유전자 중 18개 유전자가 억제되었다. SAC 군은 SOD1, CAT와 GPX 등 산화적 스트레스에 관련된 유전자 발현을 감소시켰다. SAC는 ATOX1 발현 감소를 통해 anti-oxidant로서 역할을 하고, cell death, aging, apoptosis 관련 유전자 발현을 감소시켰다. SAC나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치군에서는 세포가 증식할 때나 중앙세포에서 볼 수 있는 WNT3a와 탐식세포 등에서 볼 수 있는 NOXO1의 발현을 측정할 수 없었다.

이상의 결과로 마늘성분인 SAC이나 산화성 스트레스의 원인인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하면 조직이나 혈중의 항산화 효소의 감소나 증가, 단백질 발현의 수준을 넘어서 MSC 유전자 카피수의 fold 변화를 일으키고 있음을 확인하였다. 본 연구를 통하여 항산화 효과가 인정된 식품의 유전자 프로파일에 대한 연구형태를 제시하였으며, 이번 실험에서 얻은 결과를 바탕으로 특정 유전자 그룹을 선택하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 손상에 대한 SAC의 보호효과를 연구할 계획이다.

## 감사의 글

본 연구는 숭의여자대학교 학술연구비로 수행되었으므로 감사드립니다.

## 참고문헌

- Aguilera P, Chanez-Cardenas ME, Oritz-Plata A, León-Aparicio D, Barrera D, Espinoza-Rojo M, Villeda-Hernández J, Sánchez-García A, Maldonado PD. 2010. Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by cellular antioxidant systems. *Phytomedicine* 17:241-247
- Amagase H, Petesch BL, Matuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* 131: 955s-962s
- Amagase H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr* 136:716S-725S
- Ashafaq M, Khan MM, Raza SS, Ahmad A, Khuwaja G, Javed H, Khan A, Islam F, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F. 2012.

- S-allyl cysteine mitigates oxidative damage and improves neurologic deficit in a rat model of focal cerebral ischemia. *Nutr Res* 32: 133-143
- Bongso A, Lee EH. 2005. Stem cells: Their definition, classification and sources. In *Stem Cells, from Bench to Bedside*, ed by Bongso A and Lee EH, pp1-13, World Scientific, Singapore
- Colin-Gozalet AL, Santana RA, Silva-Islas CA, Chanez-Cardenas ME, Santamaria A, Maldonado PD. 2012. Review Article. The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract and S-Allylcysteine-induced protection. *Oxid Med Cell Longev* 16 pages, Epub 2012 May
- Deans RJ, Moseley AB. 2000. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *ExpHematol* 28:875-884
- Geng Z, Rong Y, Lau BHS. 1997. S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med* 23:345-350
- Ho SE, Ide N, Lau BHS. 2001. S-allyl cysteine reduces oxidant load in cells involved the atherogenic process. *Phytomedicine* 8:39-46
- Ide N, Lau BHS. 2001. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kB activation. *J Nutr* 131:1020S-1026S
- Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiya K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW, Suda T. 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431:997-1002
- Itoh S, Ozumi K, Kim HW, Nakagawa O, McKinney RD, Folz RJ, Zelko IN, Ushio-Fukai M, Fukai T. 2009. Novel mechanism for regulation of extracellular SOD transcription and activity by copper: Role of antioxidant-1. *Free Radic Biol Med* 46:95-104
- liu J, Finkel T. 2006. Stem cell aging: What bleach can teach. *Nat Med* 12:383-384
- Maheshwari A, Mistro MM, Aggarwal A, Sharma RK, Nandan D. 2009. Pathways involved in testicular germ cell apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*. *FEBS J* 276:870-881
- NIH. 2001. Stem cells: scientific progress and future research directions
- Park RS. 2009. Effect of S-allylcysteine (SAC) on the proliferation of umbilical cord blood (UCB)-derived mesenchymal stem cells (MSCs). *Korean J Food & Nutr* 22:313-319
- Park RS. 2011. Effect of oxygen concentration, physical trauma on proliferation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell. *Korean J Food & Nutr* 24:803-807
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 8:111-137
- Ray B, Chauhan NB, Lahiri DK. 2011. Oxidative insults to neurons and synapse are prevented by aged garlic extract and S-allyl-L-cysteine treatment in the neuronal culture and APP-Tg mouse model. *J Neurochem* 117:388-402
- Rojas P, Serrano-Garcia N, Medina-Compos ON, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Ruiz-Sánchez E. 2011. S-allylcysteine, a garlic compound, protects against oxidative stress in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced parkinsonism in mice. *J Nutr Bio Chem* 10:937-944
- Schievella AR, Chen JH, Graham JR, Lin LL. 1997. MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272: 12069-12075
- Shin SY, Kim CG, Jho EH, Rho MS, Kim YS, Kim YH, Lee YH. 2004. Hydrogen peroxide negatively modulates Wnt signaling through downregulation of  $\beta$ -catenin. *Cancer Lett* 212:225-231
- Tabet F, Schiffrin EL, Touyz RM. 2005. Mitogen-activated protein kinase activation by hydrogen peroxide is mediated through tyrosine kinase-dependent, protein kinase C-independent pathways in vascular smooth muscle cells: upregulation in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 23:2005-2012
- Takeya R, Sumimoto H. 2006. Forum review. Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases. *Antioxid Redox Signal* 8:1523-1532
- Tobon-Velasco JC, Vazquez-Victorio G, Macias-Silva M, et al. 2012. S-allyl cysteine protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in the rat striatum: Involvement of Nrf2 transcription factor activation and modulation of signaling kinase cascades. *Free Radic Biol Med* 53:1024-1040
- Valle-Prieto A, Conget PA. 2010. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cell Develop* 19:1885-1893

---

접 수 : 2012년 10월 22일  
 최종수정 : 2012년 11월 12일  
 채 택 : 2012년 11월 14일