



사람 대장암 세포주에서 Diallyl Disulfide의 세포증식억제 및 Apoptosis 유도 효과

김태명¹ · 류재면¹ · 권현정¹ · 우관식² · 정현상² · 홍진태³ · 김대중¹
¹충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소, ²농과대학 식품공학과, ³약학대학

Inhibition of Cell Proliferation and Induction of Apoptosis by Diallyl Disulfide in Human Colon Cancer Cell lines

Tae Myoung Kim¹, Jae Myun Ryu¹, Hyun Jung Kwon¹, Koan Sik Woo², Heon Sang Jeong², Jin Tae Hong³ and Dae Joong Kim¹

¹College of Veterinary Medicine & Research Institute of Veterinary Medicine,
²Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
³College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Received December 17, 2005; Accepted December 21, 2005

ABSTRACT. Epidemiological and laboratory studies provide insight into the anti-carcinogenic potential of garlic and its constituent compounds. Garlic is appealing as an anti-carcinogenic agent due to its ability to induce apoptosis *in vitro*. Diallyl disulfide (DADS) is one of the major components of garlic that used to determine inhibition of cell proliferation and induced apoptosis in human colon cell lines. In this study, human colorectal cancer cell lines (LOVO, HCT-116, SW-480) were exposed to DADS. The inhibitory effects of DADS dose level more than 50 μ M in the cell viability of all cell lines. Cell growth activity inhibits of human colon cancer cell lines. The inhibitory effects of DADS dose level more than 25~50 μ M in the cell growth using MTT assay. We found that DADS may have the apoptosis action (chromatin condensation, DNA fragmentation) using DAPI staining and increased the expression of caspase-3 at the dose level more than 100 μ M, decreased the expression level of β -catenin at dose dependent in the western blotting. We suggest that DADS may have a potential candidate as cancer chemopreventive agents.

Keywords: Cancer chemopreventive agent, Garlic, Diallyl disulfide (DADS), Human colorectal cancer cell lines (LOVO, HCT-116, SW480), Apoptosis.

서 론

다단계 암발생과정을 걸쳐 발생하는 대장암(colorectal cancer, CRC)은 현재 미국, 캐나다, 유럽과 같은 서구사회에서 남녀 성인의 높은 암 발생률과 사망률을 기록하고 있으며, 현재 우리나라에서도 서구화된 식생활과 같은 여러 가지 생활양식의 변화로 인하여 발생빈도가 급격하게 증가하고 있다. 다양한 검사 방법과 치료방법이 개발·발

전되어가고 있으나 이렇다 할 감소는 보이지 않고 꾸준히 증가하고 있다. 이러한 관점에서 대장암의 진행이 이루어진 뒤에 치료하는 것이 아닌 발생과정에서 의약품이 아닌 식품 및 생약관련 물질중의 항암물질 또는 암예방 물질에 관한 관심이 높아지고 있으며, 이들 식품 및 생약관련 물질을 이용한 연구가 여러 연구자들에 의해 이루어지고 있다.

마늘(*Allium sativum* L.)은 수세기 동안 많은 나라에서 혈액순환, 노화 예방, 살균·항종양효과가 있는 것으로 알려져 있으며(Kwon, 2003), 각종 증상의 예방 및 치료에 널리 이용되고 있다. 그리고 미국 국립암연구소(National Cancer Institute, NCI)에서는 암예방 물질 중 가장 으뜸으

Correspondence to: Dae Joong Kim, College of Veterinary Medicine & Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
E-mail: kimdj@cbu.ac.kr

로 뽑고 있다. 1844년 독일의 화학자 *Wertheim*이 steam distillation을 통해 처음으로 garlic oil을 제조하고 성분을 분석하여 마늘의 주성분이 유기유황화합물임을 밝힌 이후에 과학적인 연구가 시작 되었다. 마늘에는 알리신(allicin), 알리인(allin) 스코르디닌(scordinin), 크레아틴(creathine), 알리나아제(allinase), 알리티아민(allithiamin, 활성vitamin B1), 게르마늄(germanium), 셀레늄(selenium) 등 여러 가지 성분이 함유되어있다(Kwon, 2003). 알리신(allicin)은 항균작용과 항진균작용이 있음이 밝혀져 있으며(Barone et al., 1997), 항균작용은 유기유황화합물이 중요한 인자인 것으로 추측되어지고 있다(O'Gara et al., 2000). 마늘의 항암작용에 대해서는 독일, 이탈리아, 프랑스에서 이루어진 위암환자와 유방암에 대한 암예방효과 조사연구에 나타나 있다(Challier et al., 1998; Klipstein-Grobusch et al., 1998). 또한 미국 Iowa에서 대장암발생율을 조사한 결과 마늘을 자주 섭취하는 사람에서는 35% 감소하였다는 보고가 있으며(Steimetz et al., 1994), azoxymethane으로 대장암을 유발한 랫드에서 전암병변을 줄인다는 보고가 있다(Sengupta et al., 2004). 동물실험을 통해 각종 장기에서 알리신의 암예방 효과 및 암세포 성장억제 효과를 입증하는 연구가 많이 보고 되고 있으며(Fleischauer et al., 2001), 마늘의 항암성분을 규명하기 위한 연구가 다양하게 연구되고 있다. Garlic oil은 열에 의해 여러 종의 새로운 화합물로 변한다는 사실이 밝혀졌다(Block et al., 1992). 열이나 다른 물리적 방법에 의해 이차적으로 형성되는 생리활성 성분들이 항암효과를 나타내는 것으로 생각되고 있다.

본 연구에서는 마늘의 유기유황화합물중 diallyl disulfide (DADS)가 사람의 대장암 세포 증식에 미치는 영향을 알아봄으로써 식품성분의 항암효과 검색에 있어 기초적인 자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료 및 세포배양

마늘의 황화합물 분획 중 diallyl disulfide(DADS)는 Sigma(Saint Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포주는 사람 유래 대장암세포인 LOVO, SW480, HCT-116을 한국세포주은행(KNCC, 서울대학교 의과대학 암연구소)으로부터 분양 받아 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/ml penicillin G, 50 µg/ml streptomycin을 첨가한 RPMI1640(Gibco Co. USA) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 5분간 trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양 하였다.

세포의 형태 관찰

세포의 밀도가 70~80% 이상이 되면 24 well plate에 2×10⁵ cells/ml의 세포를 1 ml씩 분주하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 담겨있는 배지를 버리고 시료를 배지에 희석하여 각 well에 넣어주었다. 이를 24시간 동안 배양한 뒤 각 농도별, 시간별 세포의 형태를 광학현미경으로 관찰하여 ×100에서 사진 촬영하였다.

MTT assay

세포 생존율을 측정하는 방법으로, 96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 세포를 100 µl씩 파종하여, 5% CO₂, 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well당 새로운 배지 200 µl씩 넣어준 후 MTT((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma)를 2 mg/ml의 농도로 준비하여 50 µl씩 첨가하여 3시간에서 4시간 동안 반응을 시켰다. 각 well당 시험물질 220 µl를 제거하고, 보라색물질 30 µl만 남긴 후 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 150 µl 첨가하여 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader(EL808, Bio-Tek Instruments, Inc., Vermont, USA)에서 540 nm 흡광도로 OD(optical density)값을 측정한다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정한 값을 산출하였다.

DAPI staining for detection of apoptotic cell

8 well chamber slide에 5×10⁵ cells/ml의 세포를 각 400 µl씩 넣고 24시간 동안 배양한 후 시료를 처리 후 24시간 동안 반응시킨 뒤 반응이 끝난 후 배지를 버리고 75 mM KCl을 500 µl 정도 넣고 5분간 반응시켰다. 그 다음 acetic acid와 methanol을 1 : 3으로 혼합하여 만든 뒤 이를 500 µl 정도 넣어서 5분간 반응시켜 세포를 고정하였다. 고정이 끝나면 상온에서 완전히 말린 뒤 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole-2HCl) staining 용액 1 µg/µl을 100 µl 정도 떨어뜨려 10분간 염색한 뒤 PBS로 세척하였고, 봉입하여 형광현미경으로(×100 또는 ×200)으로 관찰하였다.

단백질 발현 분석(Western blot analysis)

원하는 물질의 처리가 끝나면 세포를 모으고, 모은 세포를 담겨있던 배지와 함께 1000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 2 ml의 차가운 PBS로 두 번 세척하였다. 여기에 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.2% SDS, PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride) 100 µg/ml, aprotinin 50 µg/ml, Igapal 630(또

는 NP-40) 1%, NaF 100 mM, sodium deoxychoate 0.5%, EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid - Sigma) 0.5 mM, EGTA(ethylene glycol-bis(β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid - Sigma) 0.1 mM로 조성된 lysis buffer를 50~100 μ l 가해 잘 혼합한 뒤 2시간 동안 4°C에서 세포용해를 하였다. 반응이 끝나면 시료를 1.5 ml tube에 담아 30초 동안 혼합하고, 4°C 23,000 g에서 1시간 동안 원심분리 하였다. 상층액을 취하여 최종추출물의 단백질을 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정하였다. 정량이 된 단백질에 Lysis Buffer와 sample buffer를 섞어 단백질 양을 같게 하여 100°C heat block에서 5분 동안 가열(boiling)한 후, 잠깐 동안 원심분리 하여 시료를 모았다. Separating gel (12%)과 stacking gel (5%)을 만든 다음, 전기영동을 하고 transfer하였다. 단백질의 이동이 끝난 gel은 염색용액(Coomassie Blue staining soln.)에 10분 담가둔 후 탈 염색 용액으로 옮겨 남은 단백질을 확인하였고, transfer된 membrane은 TBS-T 용액으로 세척한 후 약간 물기를 제거하고, TBS-T 용액으로 희석한 약 5% BSA로 약 2시간 정도 blocking한 후 TBS-T 용액으로 여러 번 세척한다. 1차 항체로 caspase-3(Santa cruz biotechnology, Santa Cruz, CA., USA), β -catenin(Cell signaling Tech. Inc., Beverly, MA., USA)를 사용하였고, 2차 항체 goat IgG-HRP(Santa cruz biotechnology, Santa Cruz, CA., USA) 반응시킨 후 ECL 용액에 1분 정도 반응시켜 필름을 카세트에 올려놓고 찍은 다음 현상하여 관찰하였다.

결 과

DADS의 처리에 따른 암세포 형태 변화

사람대장암세포인 HCT 116, LOVO 및 SW480를 이용하여 실험을 하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 DADS의 농도에 따른 세포의 형태학적 변형이 관찰되었는데, 50 μ M 이상의 농도에서 이미 많은 암세포들이 부착능력을 상실하여 배지 위로 부유하기 시작하였으며, 부착되어 있는 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다. 세포의 형태학적 변형이 일어나기 시작했으며, 200 μ M과 500 μ M에서는 대부분의 세포가 사멸하여 배지 위로 부유하였다.

MTT assay

시료를 대장암 세포에 처리한 결과 사람 대장암 세포인 LOVO, HCT-116, SW480에서, 마늘의 유기유황성분중 하나인 DADS의 세포 성장억제를 관찰할 수 있었다. 세가지 대장암 세포에서 성장을 억제하는 것으로 나타났다. HCT-116 세포에 DADS의 농도가 증가함에 따라 암세포의 생존율은 농도 의존적으로 점차 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. DADS 100 μ M의 농도로 처리하였을 때 61%의 생존율을 나타내었으며, DADS 200 μ M의 농도에서는 60%의 생존율을 보였다. SW480 세포에서도 100 μ M의 농도에서 69%의 생존율을 보였고, 200 μ M의 농도에서 47%의 생존율을 보였다. LOVO 세포에 100 μ M의 농도로 처리하였을 때 54%의 생존율을, 200 μ M의 농도에서는 52%의 생존율을 나타냈다.

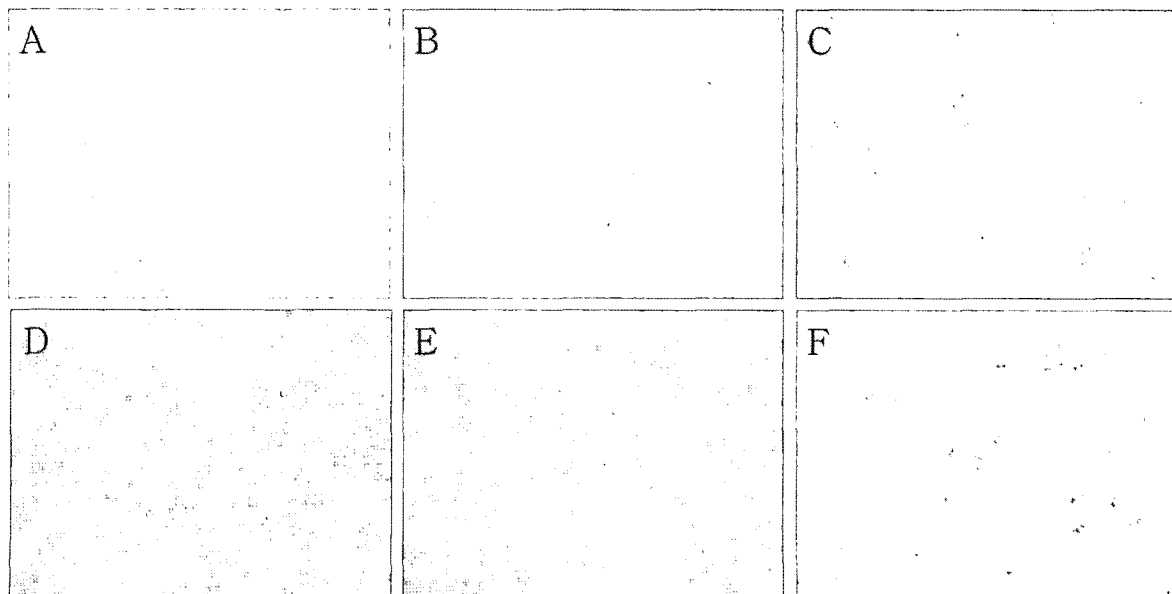


Fig. 1. Morphological changes in LOVO human colon cancer cell line treated with DADS for 24 hr. A: control, B: 25 μ M, C: 50 μ M, D: 100 μ M, E: 200 μ M, F: 500 μ M.

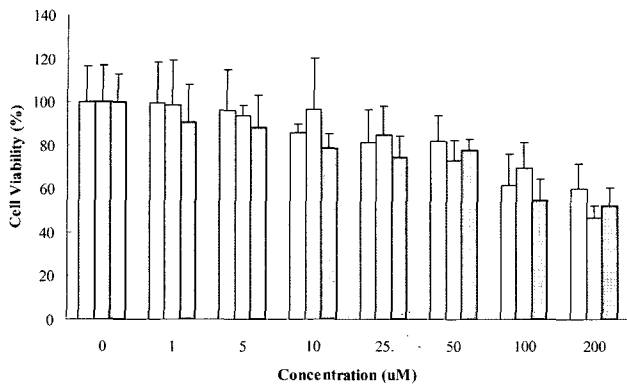


Fig. 2. Human colon cell lines were exposed to DADS for 24 hr and cytotoxicity was measured using MTT assay. ▨: HCT-116, ▤: SW480, ▩: LOVO.

DAPI 형광염색을 이용한 apoptosis 확인

8 well chamber slide에 5×10^5 cells/ml의 세포를 각 400 μ l씩 넣고 24시간 동안 배양한 후 시료를 처리하고, DAPI 염색을 실시하였다. 핵의 단편화와 염색질의 응축을 보이는 세포를 apoptosis가 일어나는 것으로 판독하고 관찰하였다. 대장암 세포에 DADS를 처리함으로써 apoptosis의 유도, 핵의 응축 및 분절(apoptotic body)이 나타나는 것을 현미경에서 관찰할 수 있었다. 물론 모든 세포에서 apoptosis가 일어나 사멸한 것은 아니지만, 많은 수의 세포에서 관찰되었다(Fig. 3). 따라서 DADS가 apoptosis를 유도하여 암세포의 성장 및 증식을 억제하는 것으로 판단된다.

Western blot을 이용한 apoptosis 관련 단백질 (Caspase-3) 및 β -catenin의 발현 확인

LOVO 대장암세포에 DADS를 24시간 동안 처리 하였을 때, 100 μ M 이상의 농도에서 caspase-3의 발현은 증가하였다(Fig. 4). β -Catenin의 발현은 100 μ M의 농도에서 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Apoptosis에 관여하는 단백질중의 하나인 caspase-3의 발현 증가는

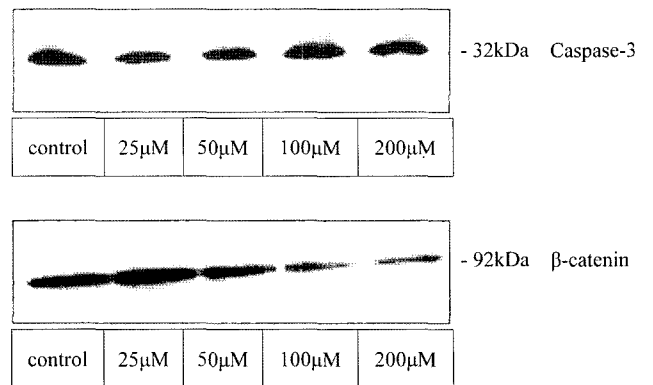


Fig. 4. LOVO Human colon cell line was treated with diallyl disulfide for 24 hr and expression of caspase-3 & β -catenin was analysed.

DADS가 apoptosis를 유발하여 대장암세포의 증식 및 성장을 억제하는 것으로 사료 된다.

고 찰

사람에서 암발생 원인의 약 35%는 우리가 섭취하는 음식과 밀접한 관계가 있다고 보고된바 있다(Doll *et al.*, 1987). 음식과 암의 상관성을 뒷받침하는 예로서, 대장암과 유방암은 육류와 지방섭취가 많은 북미나 유럽국가에서 그 발생률이 높은 반면, 곡류와 야채를 주식으로 하는 남미와 아시아에 있어서는 상대적으로 낮게 나타나는 것을 들 수 있다. 많은 역학연구를 통해 탄수화물이나 섬유소와 같은 macronutrients나 비타민, 미네랄과 같은 micronutrients들이 암의 발생률을 낮춘다는 사실이 밝혀졌고, 특히 녹황색 채소, 과일에 풍부하게 들어있는 항산화 비타민들(vitamin A, vitamin C 및 vitamin E)과 베타카로틴 등의 비타민 전구물질들의 암예방효과는 익히 잘 알려져 있다. 이것들은 우리가 일상적으로 섭취하는 것들이며, 항산화 비타민 외에도 아직 알려지지 않은 수많은 암예방 작용이 있는 화합물들이 들어있다. 이들 식품유래

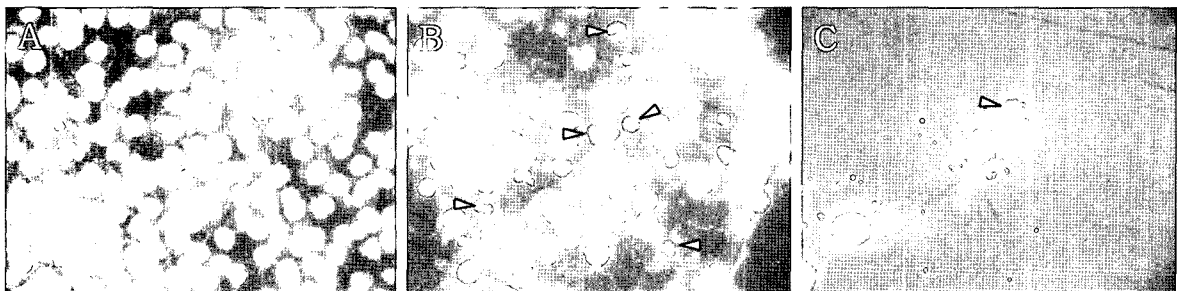


Fig. 3. LOVO Human colon cell line was stained by DAPI, the modifications of nuclear morphology of treated with DADS (arrows show apoptotic bodies). A: control, B: exposure to 100 μ M DADS ($\times 100$), C: exposure to 100 μ M DADS ($\times 200$).

화학물질들을 총칭하는 피토케미칼(Pytochemical)들은 대부분 식물의 2차 대사산물로서 그 중에는 헤충이나 주변 동물 또는 자외선으로부터 스스로를 보호하기 위해 만들어진 방어물질들도 많다. 식품에 들어있는 피토케미칼들이나 기타 독성이 없는 화학물질, 또는 이들의 화합물을 이용하여 정상세포의 암화과정을 억제, 지연 또는 역전시킴으로써 보다 적극적으로 암에 대한 위협도를 줄이려는 "화학적 암예방(cancer chemoprevention)"이 최근 많은 관심을 끌고 있다. 식품성분중 안전한 화학물질을 사용하여 정상세포가 암세포로 전환되지 못하도록 사전에 방지하는 화학적 암예방은 항암제를 투여하여 치료하는 기존의 화학요법에 비해 암정복을 위해 상당히 효과적이고 실리적인 방법으로 각광받고 있다(Kim, 1998; Surh, 2003).

본 실험의 결과 우리가 식품으로서 많은 양을 섭취하고 있으며, 마늘에 존재하는 피토케미칼 중의 하나인 DADS를 사람 대장암세포에 처리한 후 암세포의 형태 변화를 관찰하였다. 암세포는 DADS의 처리농도가 높아짐에 따라 심한 형태학적 변화가 나타났다. 50 μM 이상의 농도에서 암세포가 응축되고, 배양접시의 바닥에 붙어있지 못하고 배지 위로 부유하는 암세포가 많이 관찰되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 암세포의 부착능력의 상실 및 암세포의 분화(differentiation)가 수반되었을 가능성을 의미하는 것으로 사료된다. 아울러 암세포의 형태적 변형 및 부착 능력 상실 등의 정도는 DADS의 처리에 따른 암세포 증식율(proliferation), 즉 MTT assay를 통하여 알아본 암세포 생존율 감소와 잘 일치되는 결과이다. LOVO, HCT-116, SW480 세가지 암 세포주 모두 농도의존적으로 세포의 생존율이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. DADS 처리 농도 200 μM 에서 LOVO 세포주는 38% 정도만이 생존하였으며, HCT-116은 45%, SW480은 32%의 생존율을 보였다(Fig. 2). 사람유래 대장암 세포인 LOVO (colorectal adenocarcinoma), HCT-116(colorectal carcinoma), SW480(colorectal adenocarcinoma) 세가지 세포주 모두 암종(carcinoma)이기는 하지만, 그 중 LOVO 세포주는 전이(metastasis)가 일어난 세포주이며 또한 Dukes' type C에 해당한다. 전이 암세포주인 LOVO 세포주가 사멸에 이르는 것이 apoptosis에 의한 것인지를 알아보기 위해 DAPI 형광염색을 실시하였을 때, DADS를 처리한 군에서 세포의 핵이 응축되고 핵의 분절이 형성되어 apoptotic body가 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 3). DADS가 apoptosis를 유도하여 암세포의 생존율을 떨어뜨리는 것으로 판단하여 apoptosis에 밀접하게 관련된 caspase-3의 발현을 western blot을 통하여 확인 하였다. 최근 caspase라 이름 붙여진 ICE/CED-like protease

family는 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자로 작용할 수 있는 것으로 보고 되고 있다(Evans *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1997). 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 세포에서 핵과 미토콘드리아의 외막에 많이 존재하며(Reed *et al.*, 1998; Tasujimoto *et al.*, 1998), 이들의 활성화는 bcl-2/bax family의 발현 정도에 의존하거나 그렇지 않을 수도 있다. Caspase-3는 proenzyme 형태로 존재하다가 bcl-2/bax family에 의해 활성화되거나, caspase-8, 9, 10에 의해 활성화 되어 직접 또는 간접적으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다. 따라서 caspase중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3의 발현 정도를 조사 하였다(Fig. 4). Caspase-3는 DADS의 농도 25~50 μM 에서 대조군과 비슷한 정도의 발현을 보였지만, 100 μM 와 200 μM 에서 높은 발현을 보였다. 이러한 결과는 DADS가 caspase-3의 세포 내 농도를 증가시켜 apoptosis에 이르게 할 수 있는 가능성을 가지고 있다고 할 수 있다. β -Catenin은 세포벽에서 E-cadherin 및 actin과 결합하여 부착 연결(adherens junction)을 형성하며, 이복합체는 상피 세포간의 결합을 담당하여 구조적 기능과 세포의 성장과 분화를 조절한다(Aberle *et al.*, 1996). 또한 Wnt신호전달경로에도 관련이 있으며, 전사인자로도 작용하는데, β -catenin의 핵내 이동은 다양한 암과도 관련되어 있다(Morin, 1999). β -Catenin은 종양 억제 유전자로 알려진 adenomatous polyposis coli (APC)/axin 복합체와 결합한 상태에서 먼저 casein kinase I(CK I)에 의해 ser(45)의 인산화가 이루어지고 glycogen synthase kinase 3(GSK3)에 의하여 인산화 되며, 인산화된 β -catenin은 ubiquitination을 수반함으로써 proteasomes에 의해 분해되어야 하는데, APC 유전자의 변이나 β -catenin 자신의 돌연변이로 인하여 APC와 결합하지 못하고 세포질 내에 축적된다(Kitagawa *et al.*, 1999; Surh, 2003). 세포질에 축적된 β -catenin이 핵내로 들어가 핵내 전사인자로서의 작용을 하게 되어, 많은 발암유전자의 발현에 관여한다(Korinek *et al.*, 1997; Morin, 1999; Surh, 2003). β -Catenin이 안정화되면 핵내로 이동하여 lymphoid enhancer factor(LEF)나 T cell factor(TCF)와 같은 전사인자들과 결합하게 된다. 이는 c-myc, cyclinD-1, gastrin, human matrilysin(MMP7), keratin1, urokinase plasminogen activated receptor(uPAR), CD44, ITF-2 등 다양한 유전자들의 전사 활성화를 유발시킨다(Kolligs *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002). β -Catenin이 안정화에 의해 전사과정이 활성화되는 많은 유전자들은 대부분 세포주기 조절이나 세포 유착, cellular development와 같은 과정에 밀접하게 관련되어 있다. β -Catenin의 발현

은 DADS의 농도가 높아짐에 따라 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과는 암세포 내 과발현을 나타내었던 β -catenin의 발현양을 낮추어 세포주기에 영향을 주어 apoptosis를 유도 했을 가능성을 시사한다고 할수 있다. 결과적으로 마늘의 성분인 DADS는 caspase-3나 β -catenin과 같은 세포 내에서 apoptosis나 세포주기 조절을 하는 인자에 영향을 미쳐 대장암세포의 증식과 성장을 억제할 수 있다는 추정을 할 수 있다. 물론 좀 더 명확한 기전의 이해를 위해 세포주기, 발암유전자 및 억제유전자, apoptosis에 관여하는 다른 많은 유전자, 단백질의 발현에 관한 추가적인 실험이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 한국학술진흥재단 선도연구자지원 사업의 지원을 받아 수행된 연구임 (과제번호 KRF-2002-041-E00239).

참고문헌

- Barone, F.E. and Tansey, M.R. (1977): Isolation, purification, identification, synthesis and kinetics of activity of the anticarcinogenic component of *Allium sativum* and a hypothesis for its mode of action. *Mycologia*, **69**, 713-825.
- Block, E. (1992): The organosulfur chemistry of genus *Allium*-implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 1135-1178.
- Challier, B., Peramau, J.M. and Viel, J.F. (1998): Garlic, onion and cereal fibre as protective factors for breast cancer: a French case-control study. *Eur. J. Epidemiol.*, **14**, 737-747.
- Chung, J.G., Lu, H.F., Yeh, C.C., Cheng, K.C., Lin, S.S. and Lee, J.H. (2004): Inhibition of N-acetyltransferase activity and gene expression in human colon cancer cell lines by diallyl sulfide. *Fd. Chem. Toxicol.*, **42**, 195-202.
- Evans, V.G. (1993): Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.*, **17**, 461-476.
- Fleischauer, A.T., Poole, C. and Arab, L. (2000): Garlic consumption and cancer prevention: meta-analyses of colorectal and stomach cancers. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**, 1047-1052.
- Fleischauer, A.T. and Arab, L. (2001): Garlic and cancer: a critical review of epidemiologic literature. *J. Nutr.*, **131**, 1032-1040.
- Hudson, E.A., Howells, L.M., Gallacher-Horley, B., Fox, L.H., Gescher, A. and Manson, M.M. (2003): Growth-inhibitory effects of the chemopreventive agent indole-3-carbinol are increased in combination with the polyamine putrescine in the SW480 colon tumour cell line. *BMC Cancer*, **3**, 2.
- Kim, D.J., Shin, D.H., Ahn, B., Kang, J.S., Nam, K.T., Park, C.B., Kim, C.K., Hong, J.T., Kim, Y.B., Yun, Y.W., Jang, D.D. and Yang, K.H. (2003): Chemoprevention of colon cancer by Korean food plant components. *Mutat. Res.*, **524**, 99-107.
- Kim, D.J., Kang, J.S., Ahn, B., Kim, K.S., Park, K.H., Choi, K.S., Surh, Y.J. and Kim, N.D. (2001): Chemopreventive effect of 2-(allylthio)pyrazine (2-AP) on rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane (AOM). *Cancer Lett.*, **166**, 125-33.
- Kim, D.J. (1998): Dietary factors and cancer prevention. *Cancer Preven. Res.*, **3**, 24-39.
- Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K. and Nakayama, K. (1999): An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *EMBO J.*, **18**, 2401-2410.
- Klipstein-Grobusch, K., Kroke, A., Voss, S. and Boeing, H. (1998): Influence of lifestyle on the use of supplements in the Brandenburg nutrition and cancer study. *Z. Ernahrungswiss.*, **37**, 38-46.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., Van Wichen, D., Weger, R.D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Clevers, H. (1997): Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*, **275**, 1784-1787.
- Kolligs, F.T., Nieman, M.T., Winer, I., Hu, G., Van Mater, D., Feng, Y., Smith, I.M., Wu, R., Zhai, Y., Cho, K.R. and Fearon, E.R. (2002): ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell*, **1**, 145-155.
- Kwon, S.K. (2003): Organosulfur compounds from *Allium sativum* and physiological activities. *J. Appl. Pharmacol.*, **11**, 8-32.
- Kweon, S.H., Park, K.A. and Choi, H.M. (2003): Chemopreventive effect of garlic powder diet in diethylnitrosamine-induced rat hepatocarcinogenesis. *Life Sci.*, **73**, 2515-2526.
- Morin, P.J. (1999): Beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays*, **21**, 1021-1030.
- Nagata, S. (1997): Apoptosis by death factor. *Cell*, **88**, 355-365.
- Ocker, M., Herold, C., Ganslmayer, M., Hahn, E.G. and Schuppan, D. (2003): The synthetic retinoid adapalene inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells *in vitro*. *Int. J. Cancer*, **107**, 453-459.
- O'Gara, E.A., Hill, D.J. and Maslin, D.J. (2000): Activities of garlic oil, garlic powder and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **20**, 14-18.
- Oommen, S., Anto, R.J., Srinivas, G. and Karunakaran, D. (2004): Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Euro. J. Pharmacol.*, **485**, 97-103.
- Sengupta, A., Ghosh, S. and Das, S. (2004): Modulatory influence of garlic and tomato on cyclooxygenase-2 activity, cell proliferation and apoptosis during azoxymethane induced colon carcinogenesis in rat. *Cancer Lett.*, **208**, 127-136.
- Steinmetz, K.A., Kushi, L.H., Bostick, R.M., Folsom, A.R. and Potter, J.D. (1994): Vegetables, fruit and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, **139**, 1-15.
- Surh, Y.J. (2003): Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev.*, **3**, 711-780.
- Wong, N.A. and Pignatelli, M. (2002): Beta-catenin: a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am. J. Pathol.*, **160**, 389-401.