



1,2-Dimethylhydrazine에 의해 유발된 Colonic Aberrant Crypt Foci에 대한 마늘추출물의 암예방효과

김태명¹ · 류재면¹ · 권현정¹ · 황인국² · 반정옥³ · 정현상² · 홍진태³ · 김대중¹

¹충북대학교 수의과대학, ²충북대학교 농업생명환경대학, ³충북대학교 약학대학

Chemopreventive Effects of Garlic Extracts on Rat Colonic Aberrant Crypt Foci Induced by 1,2-Dimethylhydrazine

Tae Myoung Kim¹, Jae Myun Ryu¹, Hyun Jung Kwon¹, In Guk Hwang², Jung Ok Ban³,
Heon Sang Jeong², Jin Tae Hong³ and Dae Joong Kim¹

¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763,

²College of Agriculture, Life and Environments Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763,

³College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Received August 2, 2007; Accepted December 4, 2007

Garlic (*Allium sativum* L.) with the food supplement material and medicine was used traditionally in Asia and Europe. Epidemiological studies revealed that the intake of garlic reduced incidences of various cancer including digestive system. The present study was designed to investigate the effect of garlic ethanol extract on the development of colonic aberrant crypt foci (ACF) induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in male F344 rats. Five-week-old rats were given four times for two weeks to subcutaneous injections by DMH (30 mg/kg body weight) to induce ACF. The animals were divided into groups that fed diet containing garlic ethanol extract at five different doses (0.1, 0.2, 0.5, 2, 5%), respectively, animals were evaluated for the total number of ACF and total aberrant crypts (AC) per colon detected from methylene blue-stained rat colon. ACF were formed in animals in DMH-treated group. The feeding suppressed potently the appearance ACF in the colon of rats. Especially, fed diet containing garlic ethanol extract at intermediate dose (0.5%) significantly reduced the number of ACF and AC per colon ($p < 0.05$). Garlic ethanol extract inhibited DMH-induced overexpression of Activator Protein-1 (AP-1) and β -catenin genes related to cell proliferation that also upregulated the expression of p21Waf1/Cip1 mRNA, a cell cycle-regulating gene. These results suggested that garlic ethanol extract may inhibit ACF formation, β -catenin gene as the early preneoplastic marker of malignant potential in the process of colon carcinogenesis.

Key words: Garlic, Aberrant crypt foci (ACF), 1, 2-Dimethylhydrazine (DMH), Colon carcinogenesis.

서 론

우리나라의 5대 사망원인인 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨병, 자살로 인한 사망자수가 14만 명으로 전체 사망자의 절반이상(총사망자의 57.1%)을 차지하고 있다. 이중 1위를 차지하고 있는 암은 그 발생률이 최근 10년 동안

꾸준히 증가하고 있으며, 사망률 또한 매우 높은 편이다(통계청, 2004). 그중 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 대장암 발생빈도가 급격하게 증가하고 있다.

다단계 과정으로 일어나는 암 발생 단계는 처음에 하나의 세포내에서 일어나며, 개시(initiation), 촉진(promotion), 진행(progression)의 과정으로 구분할 수 있다. 암 개시단

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

계는 발암물질이 DNA와 반응하여 유전자 변이를 초래하는 비가역적 과정으로 계속적으로 종양 촉진제에 노출이 되지 않는 한 암세포로 전환될 수 있는 잠재력만을 가지고 있다. 암 촉진단계(promotion)는 상대적으로 오랜 시간을 두고 서서히 진행되는 과정으로 암 개시된 세포의 증식을 유도하여 전암병변(prenoplastic lesions) 상태의 세포군집을 형성시킨다. 암 개시단계와는 달리 암 촉진단계는 원인이 제거되면 이전 단계로 되돌아갈 수 있는 가역적인 단계이다. 암 진행단계(progression)는 비교적 양성인 병소가 악성으로 되어, 침입성(invasiveness) 전이능(metastatic potential)이 증가한 신생물(neoplasm)로 전환되는 단계이다(Surh, 2003). 이렇듯 암 발생은 한순간에 이루어지지 않고 오랜 시간에 걸쳐 일어난다. 화학발암물질인 1,2-dimethylhydrazine(DMH)은 간에서 azoxymethane(AOM)으로 대사되고 계속해서 methylazoxymethanol(MAM, $\text{CH}_3[\text{O}]\text{NH}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{OH}$)로 대사되어 methylcarbonium ion(CH_3^+)이 형성 되고, DNA와 반응하는 최종발암원(ultimate carcinogen)으로서 작용한다(Corpet and Tache, 2002). DMH 나 AOM과 같은 화학발암물질을 설치류에 투여하면 대장점막에 변이가 일어나게 되는데 이때 정상 선와(crypt)보다 2~3배 이상 크고 넓은 움 주변지역(preicryptal zone)을 가지며 핵은 크고 중첩되어 있는 변형된 이상선와(aberrant crypt colonic mucosa, AC)를 나타내고, 이와 같이 변형된 선와와 그들이 집합적으로 모여 형성된 이상선와소(Aberrant crypt foci colonic mucosa in rodents, ACF)라는 전암병변이 생성되고, 이들 전암병변의 지속적인 증식이 이루어지면 종양으로 발전 가능성이 높아지게 된다(Bird, 1995).

발암물질의 생체로의 유입은 정상적인 세포주기 조절에 영향을 미쳐 비정상적인 증식 및 암세포화를 초래한다. 정상적인 세포주기는 G1-S-G2-M기의 4단계로 나뉘는데, G1기는 외부의 신호전달에 의해 세포주기의 진행이 결정되고, S기는 DNA 합성이 이루어지고, M기는 세포의 분열이 이루어지는 시기이다(Grana and Reddy, 1995). 세포주기의 진행은 cyclin과 cyclin dependent kinase(CDK)의 복합체들로 각 단계에 따라 특정 복합체들이 순차적으로 활성화 된다. G1기에서 S기로 진행되기 위해서는 cyclin D/CDK4와 cyclin E/CDK2 복합체의 기능이 요구되며, DNA 복제 및 세포분열에는 cyclin A/CDK1과 cyclin B/CDK1 복합체의 활성화가 필요하다. 이들 cyclin/CDK 복합체의 활성화는 cyclin dependent kinase inhibitor(CDKI)인 p16^{INK4}와 p21^{waf1/cip1} 발현에 의해 조절될 수 있다. 이온화 방사선이나 자외선 조사 그리고 발암물질 등에 의해 세포의 DNA가 손상을 받으면 p53의 발현이 증가하고, p21^{waf1/cip1}의 발현이 증가하거나 감소한다. 세포내

p21^{waf1/cip1} 양이 증가하면 cyclin, CDK 그리고 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)과 결합하여 복합체를 이루게 되고 PCNA의 기능도 억제됨으로 DNA 합성이 저해되고, 세포주기의 G1기에 정지하게 되어 더 이상의 세포증식이 이루어지지 않는다(EI-Deiry *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1995). 또한 다양한 세포내 신호전달 경로들이 핵내 전사인자인 nuclear factor kappa B(NF- κ B) 및 activator protein-1(AP-1)의 활성화를 통하여 매개되는 것으로 알려져 있다(Surh, 2003). 핵내전사인자인 AP-1은 세포증식 및 분화를 조절하는데 중요한 역할을 한다. AP-1은 세포내 신호전달 체계의 다양한 내외부의 자극에 대한 반응을 매개하는 보편적인 전사인자로서, AP-1의 과도한 기능적 활성화는 종양촉진 및 악성암화과정을 초래한다(Dong *et al.*, 1994).

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 물질로 가장 으뜸으로 꼽고 있다. 1844년 독일의 화학자 Wertheim이 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(creatine), 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 and Tansey, 1977), 항균작용은 유기유황화합물이 중요한 인자인 것으로 추측되고 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). 동물실험을 통해 각종 장기에서 알리신의 암예방 효과 및 암세포 성장억제 효과를 입증하는 연구 보고가 많이 이루어져 있으며(Fleischauer and Arab, 2001), 마늘의 항암성분을 규명하기 위한 연구가 다양하게 연구되고 있다. Garlic oil은 열에 의해 여러 종의 새로운 화합물로 변한다는 사실이 밝혀졌다(Block *et al.*, 1992). 마늘의 항암성분은 열이나 다른 물리적 방법에 의해 이차적으로 형성되는 생리활성 성분들에 의한 것으로 생각되고 있다. 이에 본 연구에서는 생마늘과 열처리를 하여 변화를 준 마늘의 추출물이 DMH의 투여로 인하여 유발된 랫드 대장발암과정에 미치는 영향에 대하여 알아 보았다.

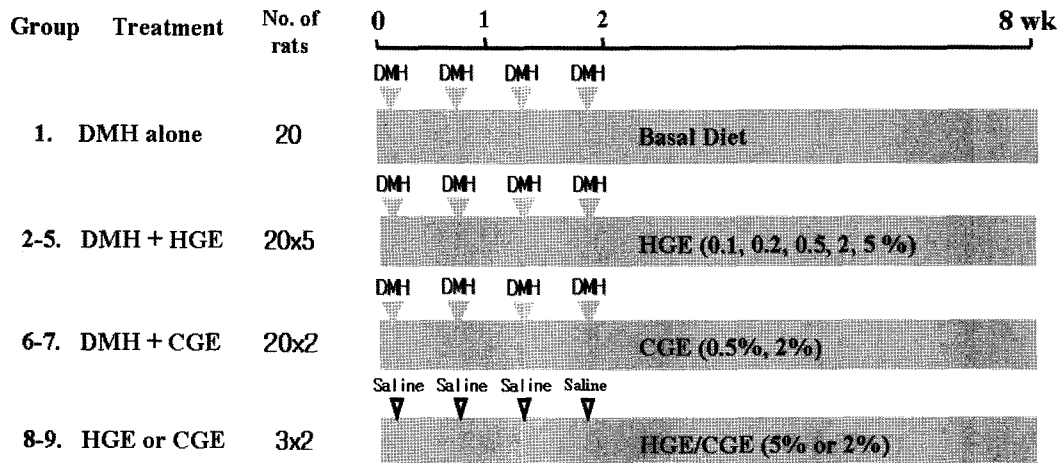


Fig. 1. The protocol for the chemopreventive effects of processed and crude garlic extract (HGE, CGE) on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH, 30 mg/kg).

재료 및 방법

시험물질의 추출. 시험물질로는 마늘을 세절하여 열을 가하여 가공 처리한 열처리 추출물(Heat-processed Garlic Extract, HGE)과 열을 가하지 않고 추출한 생마늘 추출물(Crude Garlic Extract, CGE)을 이용하였다. HGE는 120°C에서 2시간 처리한 뒤, 50% 에탄올로 감압 추출하였고, CGE는 열가공을 하지 않고 세절한 뒤, 50% 에탄올로 추출하여 50 Brix로 농축하여 사용하였다.

실험동물 및 사육환경. 실험동물은 5주령된 F344계 수컷 랫드(SLC Inc., Shizuoka, Japan) 166마리를 사용하였다. 이들 랫드를 사육상자(polysulfonate cage)에 3~4마리씩 넣어 사육하였다. 실험기간 동안의 사육환경은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 환기횟수 10~15회/h, 인공조명(12시간 점등, 12시간 소등), 조도 150~300 lux의 조건을 유지하였다. 기초사료로 Teklad Global 18% protein rodent diet(Harlan, In, USA)을 급여하였고, 필터를 이용하여 여과한 정제수를 자유로이 섭취하도록 하였다. 사육기간 동안 주 1회 체중과 사료섭취량을 측정·기록하였으며, 임상증상관찰을 통하여 이상 유무를 확인하였다.

대장발암물질 및 시험물질의 투여. 대장발암물질로는 1,2-dimethylhydrazine(DMH; Sigma Co. Ltd., USA)를 사용하였으며, 투여량은 30 mg/kg의 용량으로 citrate buffer solution에 용해하여 두경부 피하로 주당 2회씩 2주간 총 4회 투여하였다.

실험군은 발암물질을 투여하고 기초사료만을 급여한 DMH 단독투여군, 발암물질의 처리와 동시에 0.1%, 0.2%,

0.5%, 2%, 5%의 열가공 마늘 추출물을 투여한 DMH + HGE 투여군, 발암물질의 처리와 동시에 0.5% 와 2%의 생마늘 추출물을 투여한 DMH + CGE 투여군, 발암물질을 처리하지 않고 5%의 열처리 가공 마늘 추출물만을 투여한 HGE 단독투여군 그리고, 2%의 생마늘 추출물을 투여한 CGE 단독투여군으로 구성하였다(Fig. 1). 시험물질은 사료에 혼합한 후 pellet으로 제조하여 급여하였다.

부검 및 대장암 전암병변의 검사. 마지막 시험물질 투여 후 24시간 동안 절식시킨 다음 대장의 AC와 ACF를 관찰하기 위하여 부검을 실시하였다. 부검시 체중과 적출한 모든 장기의 무게를 측정하여 기록하였으며, 적출한 장기는 10% 중성완충 포르말린으로 고정하였다.

적출한 대장은 0.85% saline과 10% 중성완충 포르말린을 1:1로 섞은 용액으로 대장을 부풀려 30분~1시간 동안 전고정하고, 부풀린 대장을 펼쳐 대장이 뒤틀리지 않도록 여과지(Advantec No. 2, Toyo, Japan)에 부착하여 10% 중성완충 포르말린으로 다시 고정하였다. 고정이 끝난 대장을 펼쳐 0.3~0.5% 메틸렌블루(methylene blue)로 염색을 하여 AC 및 ACF의 총수를 $\times 40$ 및 $\times 100$ 현미경 시야에서 측정하였다. 마리당 AC 및 ACF의 총수를 측정하고, 또한 1~3개의 AC를 가지는 ACF와 4개 이상의 AC를 가지는 ACF의 수를 비교 분석하였다(Fig. 2).

대장 점막의 β -catenin 및 $p21^{waf1/cip1}$ mRNA 발현양 측정(reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR). 대장조직을 50~100 mg 정도로 잘게 자른 후 액체질소로 동결시킨 다음 -70°C 이하로 냉동보관 하였다가 사용하였다. 대장조직 50~100 mg에 TRIzol(Invitrogen, USA) 1 ml를 첨가한 후 막자사발을 이용하여 분쇄하였다.

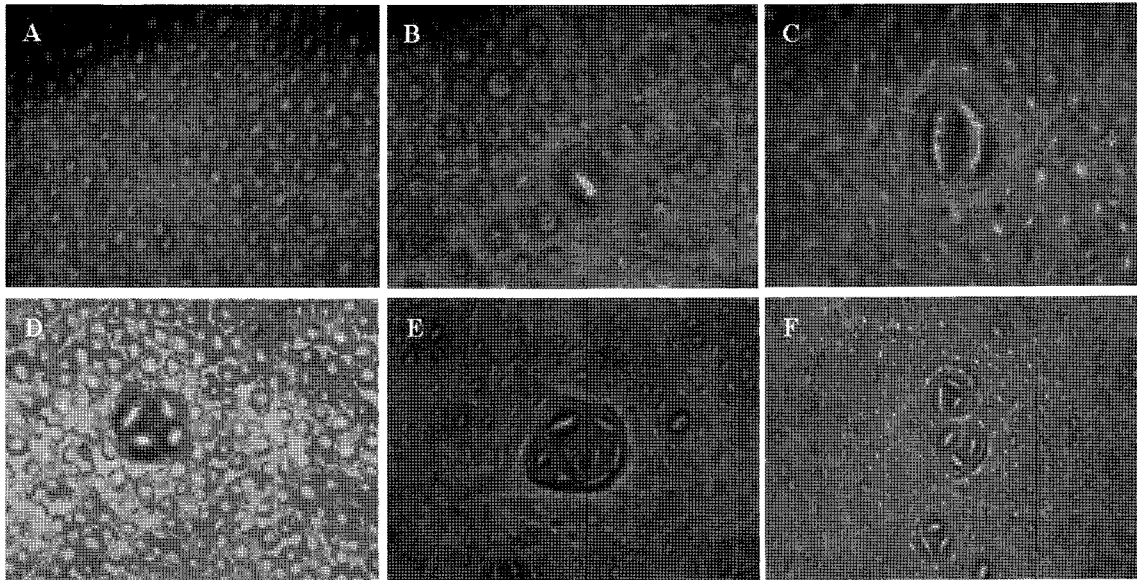


Fig. 2. Representative observation of methylene blue stained aberrant crypt foci (ACF) in the colonic mucosa of rats treated with DMH. A, colonic mucosa; B, one-crypt foci; C, two-crypt foci; D, four-crypt foci; E, eight-crypt foci; F, diverse ACF.

4°C 환경하에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 다음 상층액을 새로운 튜브에 옮긴 다음 500 μ l의 isopropanol을 첨가하여 교반 혼합하였다. 다시 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 한 다음 상층액을 제거하고 75% 에탄올용액으로 세척하여 4°C, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 RNA 펠렛을 충분히 건조시키고 50 μ l의 RNA rehydration 용액을 첨가하여 RNA를 용해시켰다. RNA를 1 : 100으로 희석하여 260 nm/280 nm 흡광도 비율이 1.8~2.0의 범위에 드는지 확인한 후 흡광도를 측정하였다. 추출한 RNA를 45°C에서 30분간 배양한 다음 다시 94°C에서 5분간 배양한 후 다음과 같은 조건으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였다. PCR 조건은 변성 94°C에서 4분, 결합 55°C에서 30초, 합성 72°C에서 1분을 35회 반복한 뒤 최종 합성은 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 산물은 -20°C에서 보관하면서 사용하였다. PCR 산물을 Tris acetate ethylenediamineetraacetic acid(TAE) 완충용액을 사용하여 2% agarose gel에서 전기영동 하여 etidium bromide (2 μ g/ml)로 5분간 염색하였다. β -Catenin primer의 염기서열은 forward primer가 5'-GGTGGRCGTTAATAA-AGCTG-3', reverse primer가 5'-CATTTGTATTCTGCATGGTG-3'이었고, p21^{waf1/cip1} primer의 염기서열은 forward primer가 5'-GTCTTGCACCTCTGGTGTCTC-3', reverse primer가 5'-CGCTTGGAGTGATAGAAATC-3' 이었다.

대장 점막의 p21^{waf1/cip1} 단백질 발현양 측정. 대장조직 50~100 mg에 lysis buffer 1 ml을 가하여 조직분쇄기를

이용하여 분쇄한 후, 잘 교반하여 2시간 동안 4°C에서 용해시켰다. 반응이 끝나면 시료를 1.5 ml tube에 담아 30초 동안 vortex 하고 4°C에서 23,000 \times g로 1시간 동안 원심분리하였다. 상층액을 취하여 최종 추출물의 단백질량을 Bio-rad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, Inc. USA)를 사용하여 측정하였다. 정량이 된 단백질에 lysis buffer와 5배의 sample buffer를 섞어 단백질량을 같게 한 후 100°C의 heat block에서 5분 동안 boiling 한 후, 잠깐 동안 원심분리 하여 시료를 모았다. Separating gel(12%)과 stacking gel(5%)을 만든 다음 전기영동을 하고 transfer하였다. Transfer가 끝난 gel은 Coomassie Blue 염색용액에 10분 담가둔 후 탈 염색 용액으로 옮겨 남은 단백질을 확인하였다. Transfer된 membrane은 tris phosphate-buffered saline-tween 20(TBS-T)용액으로 washing한 후 약간 물기를 제거하고 TBS-T 용액으로 희석한 약 5% bovine serum albumin(BSA)로 약 2시간 정도 blocking한 후 TBS-T 용액으로 여러 번 세척하였다. 1차 항체로 p21^{waf1/cip1}(Cell Signaling, UK)를 사용하였고, 2차 항체 mouse IgG-HRP(Cell Signaling, UK) 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액에 1분 정도 반응시켜 필름을 카세트에 올려놓고 찍은 다음 현상하여 관찰하였다.

대장 점막의 AP-1 활성 측정. 대장조직 50~100 mg에 10 mM HEPES(pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol(DTT), 0.2 mM PMSF로 구성된 완충액 A를 400 μ l 넣어 10분간 vortex한 후 4°C

에서 15,000 rpm로 6분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액은 버리고 얻어진 침전물은 20 mM HEPES(pH 7.9), 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 20%(v/v) glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF로 구성된 차가운 완충액 C를 100 µl 넣어 20분간 vortex한 후 4°C에서 15,000 rpm로 6분간 원심분리하여 상층액만 취하였다. 최종추출물의 단백질양은 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정하였다. 핵 단백질추출물의 DNA 결합부위에 AP-1 oligonucleotide의 결합정도를 알아보기 위해 EMSA를 수행하였다. AP-1 oligonucleotide probe (Promega, USA)의 염기서열은 5'-CGCTTGATGATGCA-GCCGGAA-3', 5'-TTCCGGCTGACTCATAACGCG-3'이다. 10배의 polypolynucleotide kinase buffer에 250 µCi [³²P]ATP을 혼합한 후 추가적으로 증류수를 넣고 이 혼합액에 T4 kinase를 최종적으로 넣어 반응이 일어나도록 37°C에서 10분간 방치하였다. 반응 후 0.5 M EDTA와 Tris EDTA(TE) buffer를 넣어 희석함으로써 oligonucleotide 혼합액을 만들었다. Polyacrylamide : bis(30% : 0.8% w/v), 증류수, 5배의 TBE(500 mM Tris(pH 8.0), 450 mM boric acid, 5 mM EDTA)를 혼합한 용액에 10%(w/v) ammonium persulfate와 TEMED를 부가 혼합하여 6% non-denaturing gel을 조제한 다음, 깨끗이 세척한 후 조립된 전기영동 유리판에 용액을 부어 gel을 형성하였다. 정량한 시료에 5배의 binding buffer를 첨가하여 10분간 실온에서 방치하였다. 여기에 [³²P]로 표식한 AP-1 oligonucleotide를 넣고 20분간 실온에 방치한 후 bromphenol blue dye가 함유된 10배의 loading dye를 첨가하고 전기영동 gel에 loading 하였다. 전기영동 buffer는 0.5배의 TBE buffer를 사용하였으며, 전기영동 gel을 150 V에서 1시간 30분간 running 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 3 M filter paper에 polyacrylamide gel을 올

려놓고 slab gel dryer(SE-1160, Hoefer Scientific Co. USA)로 80°C에서 1시간 건조 시킨 후 감광시켰다. 감광된 X-ray film(Kodak Bio-Max film, USA)을 현상하여 결합능의 활성도를 확인하였다.

통계학적 분석. 각각의 실험결과에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하고, 분산이 동질성을 갖는 경우 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의적인 차이가 있는 시험군을 알아내기 위하여 Dunnett's t-test를 실시하였다.

결 과

체중변화, 사료섭취량 및 장기 무게. 시험 전 기간을 통하여 모든 실험동물들이 시험물질에 기인한다고 생각되는 특이적인 임상증상은 관찰되지 않았다. CGE 단독 투여군에서 다른군에 비해 1~2주에 체중과 사료섭취량이 증가하는 경향을 나타내고, 8주간의 실험에서 각 군간 체중의 변화와 사료섭취량의 변화에 있어서 유의한 차이는 발견되지 않았다. 8주간 마늘추출물을 투여하여 내부 장기에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해서 장기의(간, 비장, 신장)의 손상 여부를 조사하였다. 부검시 육안소견에서는 특이사항이나 병변을 발견할 수 없었다. 주요장기(간, 비장, 신장)의 중량을 측정하여 각 군간 절대장기중량 및 체중에 대한 상대장기중량을 비교분석했을 때 유의한 차이를 발견하지 못하였다(Table 1). 따라서 마늘 추출물의 식이로 인한 영향은 나타나지 않는 것으로 생각된다.

대장암 전암병변 ACF 및 AC의 검사. 정상대조군과 마늘추출물 단독투여군에서는 ACF가 전혀 발견되지 않았

Table 1. Body weight, food intake and relative organ weights of rats treated with DMH and/or heat-processed garlic extract (HGE) or crude garlic extract (CGE)

Treatments	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Food intake (g/day)	Relative organ weight (%)			
				Liver	Spleen	Kidney	
						Left	Right
DMH alone	110.83 ± 4.79	282.01 ± 14.55	15.6 ± 0.99	2.55 ± 0.13	0.23 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.02
DMH + HGE 0.1%	110.13 ± 5.17	284.25 ± 16.56	15.2 ± 1.14	2.46 ± 0.15	0.21 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.02
DMH + HGE 0.2%	110.98 ± 3.85	279.79 ± 14.64	15.4 ± 1.99	2.49 ± 0.16	0.22 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.02
DMH + HGE 0.5%	110.80 ± 4.71	283.77 ± 15.21	15.4 ± 1.19	2.46 ± 0.13	0.23 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02
DMH + HGE 2%	110.81 ± 4.66	280.70 ± 14.98	15.58 ± 0.60	2.53 ± 0.12	0.24 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02
DMH + HGE 5%	110.78 ± 4.66	281.69 ± 9.95	15.92 ± 0.59	2.62 ± 0.08	0.24 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.02
DMH + CGE 0.5%	110.77 ± 4.69	295.22 ± 14.47	16.51 ± 0.53	2.52 ± 0.15	0.23 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02
DMH + CGE 2%	110.74 ± 4.71	283.72 ± 11.47	15.74 ± 0.41	2.52 ± 0.12	0.24 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.02
HGE 5%	99.34 ± 1.78	277.69 ± 14.82	15.94	2.86 ± 0.45	0.26 ± 0.02	0.35 ± 0.05	0.33 ± 0.05
CGE 2%	119.91 ± 0.76	304.82 ± 17.61	17.42	2.50 ± 0.11	0.24 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.00

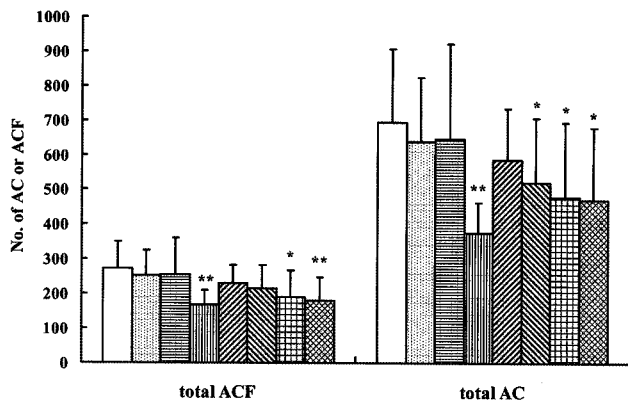


Fig. 3. Effect of heat-processed or crude garlic extracts (HGE, CGE) on colonic aberrant crypt foci (ACF) and aberrant crypts (AC) formation induced by DMH. □, DMH alone; ▨, DMH + HGE 0.1%; ▩, DMH + HGE 0.2%; ▪, DMH + HGE 0.5%; ▫, DMH + HGE 2%; ▬, DMH + HGE 5%; ▮, DMH + CGE 0.5%; ▭, DMH + CGE 2%. *Significantly different from those of the DMH alone at $p < 0.05$. **Significantly different from those of the DMH alone at $p < 0.01$.

으나, DMH 단독투여군과 DMH + HGE, DMH + CGE 군에서는 ACF가 유발되었다. 총 AC와 ACF의 발생율은 DMH 단독투여군에서 694.8 ± 211.72 , 272.9 ± 78.20 개로 나타났다. DMH + HGE 0.5% 투여군은 AC는 376.2 ± 88.09 개, ACF는 166.8 ± 44.80 개 발생하여

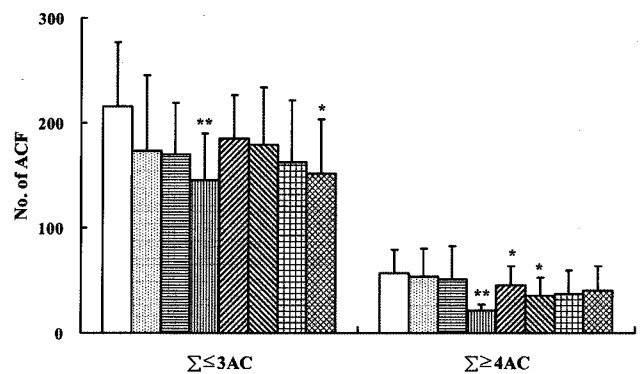


Fig. 4. Effect of heat-processed and crude garlic extracts (HGE, CGE) on colonic aberrant crypt foci (ACF) formation induced by DMH. □, DMH alone; ▨, DMH + HGE 0.1%; ▩, DMH + HGE 0.2%; ▪, DMH + HGE 0.5%; ▫, DMH + HGE 2%; ▬, DMH + HGE 5%; ▮, DMH + CGE 0.5%; ▭, DMH + CGE 2%. *Significantly different from those of the DMH alone at $p < 0.05$. **Significantly different from those of the DMH alone at $p < 0.01$.

DMH 단독투여군에 비하여 각각 46%, 40%의 발생개수 감소를 보였으며, DMH + HGE 5% 투여군은 520.3 ± 185.41 , 214.6 ± 69.75 개가 발생하여 각각 25%, 22%로 발생개수의 감소를 보여, 총 AC와 ACF의 발생 개수가 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). 또한 DMH + CGE 2% 투여군은 472.1 ± 208.19 , 181.5 ± 67.37 개가 발생

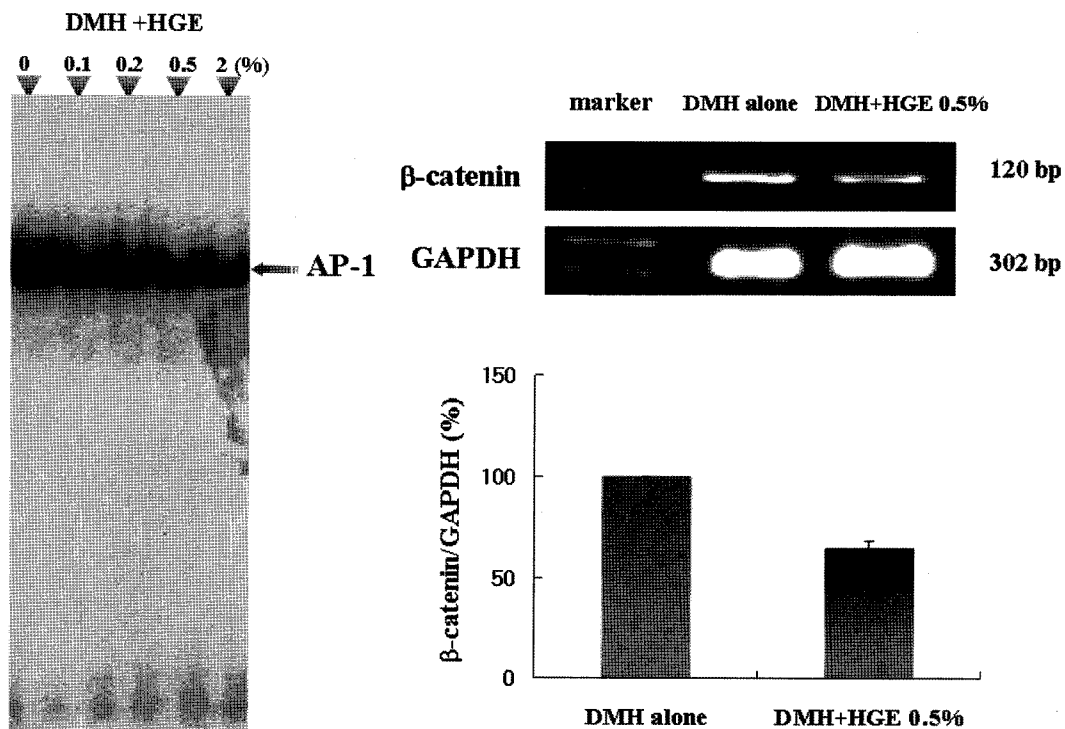


Fig. 5. AP-1 and β -catenin expression of rats treated with colon carcinogen (DMH) and DMH + HGE. AP-1 expression was determined by electrophoresis mobility shift assay (EMSA) (left). β -catenin expression was determined by RT-PCR (right).

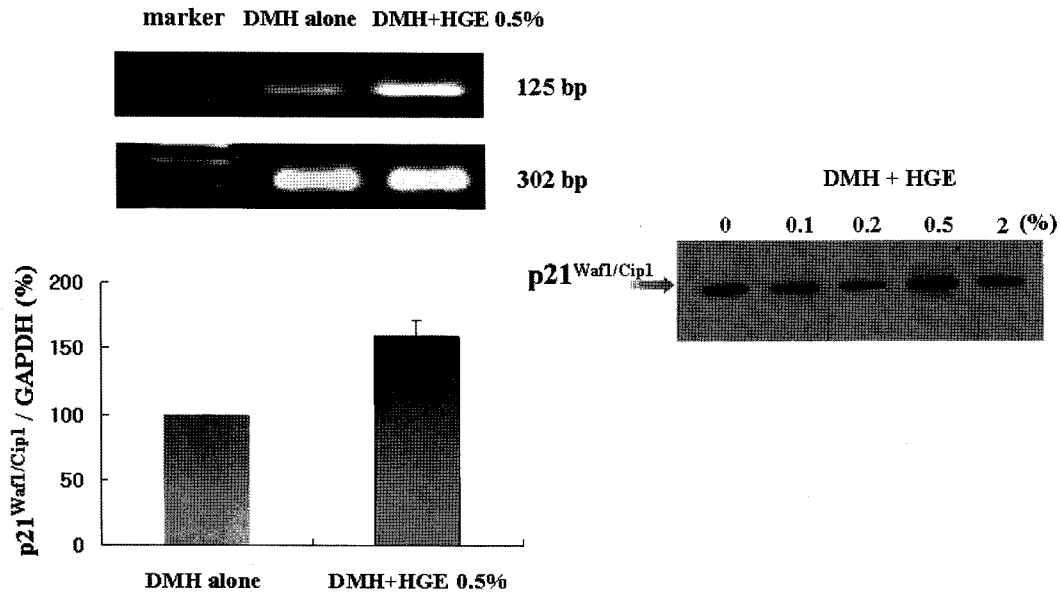


Fig. 6. p21^{Waf1/Cip1} mRNA (left) and protein (right) expression of the rats treated with DMH alone and DMH + HGE, assessed by RT-PCR and western blotting, respectively.

하여 각각 28%, 34%로 발생개수의 감소를 보여, 총 AC와 ACF의 발생 개수가 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$) (Fig. 3). 종양으로의 발전가능성이 높은 4AC의 개수에 있어서는 DMH 단독투여군은 57.29 ± 22.01 개가 발생하였으나, DMH + HGE 0.5% 투여군에서 21.35 ± 5.87 개로 발생개수가 약 67% 감소를 보였다(Fig. 4).

AP-1, β -catenin 및 p21^{Waf1/Cip1}의 발현양상. DMH의 투여로 AP-1의 활성이 증가하였으나, 마늘 추출물에 의해 AP-1의 활성이 농도 의존적으로 현저히 억제되었다(Fig. 5). 또, DMH 단독투여군에서는 β -catenin mRNA의 발현이 일어났으나, DMH + HGE 0.5% 처리군에서 DMH 단독투여군에 비하여 현저하게 감소하는 것으로 나타났다. 한편, DMH + HGE 0.5% 처리군은 DMH 단독처리군에 비하여 p21^{Waf1/Cip1}의 발현양이 증가하였다(Fig. 6).

고 찰

화학발암물질인 DMH나 AOM을 이용하여 인위적으로 랫드나 마우스와 같은 설치류에서 대장암을 유발할 수 있다. DMH나 AOM을 설치류에 투여하면 대장점막에 이상 선화과 이상선화소가 형성이 되는데, Bird(1995)가 정량 측정할 이래로 많은 연구자들이 생약, 또는 그 추출물 등의 대장암 예방효과를 검색하는데 이용하고 있으며, 설치류의 ACF는 사람의 대장암 초기병변과 유사하여 인체의 대장암 예방에 중요한 지표로 사용되고 있다(Han *et al.*,

2001). AC는 정상 선화보다 크고 넓은 움 주변지역(pericryptal zone)을 가지고 있으며, 핵은 크고 중첩되어 있는 변형이 된 선화(움)인데, 이들 AC의 집합체가 ACF이다. ACF가 생성되는 시기는 다단계 발암 과정 중 발암개시 세포가 증식이 일어나는 발암촉진단계(promotion stage)라고 말할 수 있다. 이러한 비정상적인 증식을 거쳐 폴립(polyp)이나 샘종(adenoma)으로 진행될 수 있으며 종국에는 악성종양으로 발전할 가능성이 매우 높다. 종양으로 발전되기 전에 더 이상의 이상증식을 억제하는 것이 암예방 방법 중의 한 가지라고 할 수 있다.

본 연구에서 마늘추출물은 대장점막의 AC와 ACF의 생성을 현저히 감소시키는 결과를 나타냈다(Fig. 3, 4). 특히 생마늘 에탄올 추출물과 열처리 에탄올 추출물을 이용하여 실험을 진행하였는데, HGE 투여군은 CGE 투여 농도의 1/4 농도에서 더 뛰어난 암예방 효과를 보였다. DMH의 처리로 핵내 전사인자인 AP-1의 활성이 증가하지만, HGE의 투여에 의해 농도 의존적으로 현저히 감소하였다(Fig. 5). AP-1은 세포의 분화나 증식에 있어서 여러 가지 유전자의 발현을 조절하는 전사인자이다. AP-1은 jun과 fos family로 구성된 전사복합 단백질로 외부 신호에 의한 자극시 초기에 활성화되어 세포의 증식에 필요한 유전자의 발현을 조절한다. AP-1은 다른 전사인자들과 같이 DNA-결합부위(basic zipper, bZIP)와 전사 활성부위로 이루어져 있다. AP-1은 DNA-결합부위군으로 c-Jun/c-Fos heterodimer 또는 c-jun/c-jun homodimer을 형성하고 염기 아미노산으로 이루어진 부위는 표적유전자의 promoter

에 있는 특정 DNA와 결합하여 전사활성을 유도한다. 이것의 전사활성은 성장인자, 자외선, 암유전자, protein kinase C(PKC)를 활성화시키는 암 촉진제들과 같은 다양한 신호전달 물질에 의해 그 양이 증가하거나 인산화와 같은 단백질의 변형으로 조절된다(Eferl and Wagner, 2003). 세포증식, 발암과정 및 종양의 진행에서 AP-1 단백질의 증가가 이루어진다는 보고가 있다(Albrecht *et al.*, 2004). DMH가 AP-1의 활성을 촉진하여 세포증식이 일어나고, 발암화과정이 진행되는 대장점막의 증식을 마늘 추출물이 억제하는 효과를 보였는데, 이는 다른 식품 유래 화합물(curcumin, capsaicin, resveratrol 및 tea catechins)의 치료로 AP-1의 활성을 억제하였다는 보고와 일치한다(Manna *et al.*, 2000; Surh, 2003).

p21^{waf1/cip1}은 CDKI로서 세포증식이 일어나고 있는 세포에서 더 이상의 증식이 일어나지 않도록 세포주기 중 G1기에서 G2기로 진행되는 것을 억제한다. p21^{waf1/cip1}결핍 마우스에 AOM을 투여 하였을 때, 정상마우스에 AOM을 투여 하였을 때보다 ACF의 수가 증가함으로써 대장에서 p21^{waf1/cip1}가 종양 억제 유전자로서의 역할을 한다는 보고가 있으며(Poole *et al.*, 2004), 대장암 세포에서 diallyl disulfide의 처리에 의해 p21^{waf1/cip1}의 mRNA와 단백질의 발현이 증가한다는 보고가 있다(Druesne *et al.*, 2004). 이와 같은 결과와 유사하게 열HGE의 치료로 인하여 p21^{waf1/cip1}의 발현이 증가하였다(Fig. 6). 이는 세포의 이상 증식이 일어나 ACF로 변형이 일어나고 있는 대장점막이 마늘 추출물의 처리에 의해 더 이상 증식이 일어나지 않고, 종양으로의 진전이 저해될 수 있음을 시사하고 있다.

마늘에서 분리된 대부분의 성분들은 본래 마늘에 함유되어 있던 것보다 2차적으로 생성된 성분이 더 높은 생리활성을 나타내는데, 2차적으로 생성되는 물질로는 diallyl polysulfide, diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide 등의 황화합물과 polyphenols 등을 들 수 있다(Kwon, 2003). 이들 생리활성물질들은 항균 및 살충작용, 심장질환의 예방, 항암작용을 나타내는 것으로 알려지고 있다(Kwon, 2003). AC와 ACF의 생성 수가 열처리 추출물에서 많이 감소한 것은 열처리에 의해 2차적으로 생성된 생리활성 성분이 대장 점막의 ACF의 생성에 억제효과를 나타낸 것으로 사료된다.

대장암 화학발암물질인 DMH는 간에서 azoxymethane (AOM), methylazoxymethanol(MAM)으로 대사되어 대장의 점막 내 상피세포에 유전자 돌연변이를 일으켜 종양으로의 진전되게 된다. 이때 세포의 비정상적인 증식이 일어난 전암병변으로 ACF가 생성이 되고, 이중 일부는 β -catenin이 축적된다(Mori *et al.*, 2004). β -Catenin은 세포벽에서 E-cadherin 및 actin과 결합하여 부착연접

(adherens junctions)을 형성하며, 이복합체는 상피 세포 간의 결합을 담당하여 구조적 기능과 세포의 성장과 분화를 조절하는 인자로 작용하여 상피세포의 고유한 생물학적 특성을 유지하는 단백질이다. β -Catenin은 APC에 의해 인산화 되고, ubiquitination을 수반함으로써 proteasomes에 의해 분해되어야 하는데, APC 유전자의 변이나 β -catenin 자신의 돌연변이로 인하여 APC와 결합하지 못하고 세포질내에 축적된다(Surh, 2003). β -Catenin이 안정화되면 핵내로 이동하여 lymphoid enhancer factor (LEF)나 T cell factor와 같은 전사인자들과 결합하게 된다. 이는 결국 다양한 유전자들의 전사 활성화를 유발시킨다. β -Catenin이 안정화에 의해 전사과정이 활성화되는 많은 유전자들은 대부분 세포주기조절이나 세포유착과 같은 과정에 밀접하게 관련되어 있다. 세포질에 축적된 β -catenin이 핵내로 들어가 핵내 전사인자로서 작용하여, 다양한 발암유전자들의 발현에 관여한다(Korinek *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997; Surh, 2003). DMH 단독 투여군에서는 β -catenin mRNA가 발현 되었으나, DMH + HGE 0.5% 투여군에서 β -catenin mRNA의 발현이 DMH단독투여군에 비하여 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면, 대장발암물질인 DMH의 투여로 인하여 생성된 ACF의 총수가 열처리 마늘 에탄올 추출물 투여군에서 감소하였으며, 세포의 증식과 분화를 조절하는 AP-1을 억제하고, p21^{waf1/cip1}의 발현을 증가시켜 지속적인 세포증식을 저해함은 물론(Druesne *et al.*, 2004), 세포내에 안정화되어 축적된 β -catenin발현을 억제하여 발암진행을 완화하는 것으로 사료된다(Takahashi and Wakabayashi, 2004).

감사의 글

본 연구는 2003년도 한국학술진흥재단 선도연구자지원 사업(과제번호 KRF-2003-041-E20239)의 지원을 받아 수행된 연구입니다. 본 연구는 2단계 두뇌한국21사업지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Aberle, H., Schwartz, H. and Kemler, R. (1996). Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell Biochem.*, **61**, 514-523.
- Albrecht, C., Borm, P.J. and Unfried, K. (2004). Signal transduction pathways relevant for neoplastic effects of fibrous and non-fibrous particles. *Mutat. Res.*, **553**, 23-35.
- Barone, F.E. and Tansey, M.R. (1977). Isolation, purification, identification, synthesis and kinetics of activity of the anti-

- candidal component of *Allium sativum* and a hypothesis for its mode of action. *Mycologia*, **69**, 713-825.
- Bird, R.P. (1995). Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.*, **93**, 55-71.
- Block, E. (1992). The organosulfur chemistry of genus *Allium*-implications for the organic chemistry of sulfur. *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 1135-1178.
- Challier, B., Perarnau, 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.
- Chang, F., Syrjanen, S. and Syrjanen, K. (1995). Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J. Clin. Oncol.*, **13**, 1009-1022.
- 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.
- Corpet, D.E. and Tache, S. (2002). Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr. Cancer*, **43**, 1-21.
- Dong, Z., Birrer, M.J., Watts, R.G., Matrisian, L.M. and Colburn, N.H. (1994). Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 609-613.
- Druesne, N., Pagniez, A., Mayeur, C., Thomas, M., Cherbuy, C., Duee, P.H., Martel, P. and Chaumontet, C. (2004). Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21^{waf1/cip1} expression in human colon tumor cell lines. *Carcinogenesis*, **25**, 1227-1236.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.
- Femia, A.P., Bendinelli, B., Giannini, A., Salvadori, M., Pinzani, P., Dolara, P. and Caderni, G. (2005). Mucin-depleted foci have β -catenin gene mutations, altered expression of its protein, and are dose- and time-dependent in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Int. J. Cancer*, **116**, 9-15.
- Eferl, R. and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 859-868.
- Fleischauer, A.T. and Arab, L. (2001). Garlic and cancer: a critical review of epidemiologic literature. *J. Nutr.*, **131**, 1032S-1040S.
- 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.
- Grana, X. and Reddy, E.P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinase (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs). *Oncogene*, **11**, 211-219.
- Han, B.S., Kim, D.J., Ahn, B., Kim, K.S., Kang, J.S., Moon, J.Y., Hong, C.M. and Jang, D.D. (2001). Chemopreventive effects of chitosan on rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane. *Kor. J. Vet. Pathol.*, **5**, 29-34.
- Hirose, Y., Kuno, T., Yamada, Y., Sakata, K., Katayama, M., Yoshida, K., Qiao, Z., Hata, K., Yosyimi, N. and Mori, H. (2003). Azoxymethane-induced β -catenin accumulated crypts in colonic mucosa of rodents as an intermediate biomarker for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **24**, 107-111.
- 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**, 2-18.
- 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**, 125-133.
- 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.*, **523/524**, 99-107.
- 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 β -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 β -catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell*, **1**, 145-155.
- 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.
- Kwon, S.K. (2003). Organosulfur compounds from *Allium sativum* and physiological activities. *J. Appl. Pharmacol.*, **11**, 8-32.
- Manna, S.K., Mukhopadhyay, A. and Aggarwal, B.B. (2000). Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, Activator protein-1 and apoptosis: Potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J. Immunol.*, **164**, 6509-6519.
- Mori, H., Yamada, Y., Kuno, T. and Hirose, Y. (2004). Aberrant crypt foci and β -catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **566**, 191-208.
- Morin, P.J. (1999). β -catenin signaling and cancer. *Bioessays*, **21**, 1021-1030.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H.,

- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1997). Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science*, **275**, 1787-1789.
- 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**, 453-9.
- 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.
- Stopera, S.A. and Bird, R.P. (1993). Immunohistochemical demonstration of mutant p53 tumour suppressor gene product in aberrant crypt foci. *Cytobios*, **73**, 73-88.
- Surh, Y.J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev.*, **3**, 711-780.
- Takahashi, M. and Wakabayashi, K. (2004). Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.*, **95**, 475-480.
- Wong, N.A. and Pignatelli, M. (2002). Beta-catenin: a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am. J. Pathol.*, **160**, 389-401.
- 통계청 (2004). 2003년 사망원인통계결과. <http://www.nso.go.kr/>