

## Effects of Aged Black Garlic Extracts on the Tight Junction Permeability and Cell Invasion in Human Gastric Cancer Cells

Dong Yeok Shin<sup>1</sup>, Moo Kyoung Yoon<sup>2</sup>, Young-Whan Choi<sup>3</sup>, Oh-Cheon Gweon<sup>4</sup>, Jung-In Kim<sup>5</sup>, Tae Hyun Choi<sup>6</sup> and Yung Hyun Choi<sup>1,7\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

<sup>2</sup>Vegetable Research Division, National Institute of Horticulture & Herbal Science, Suwon 440-706, Korea

<sup>3</sup>Department of Horticultural Bioscience, College of Natural Resource and Life Sciences, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

<sup>4</sup>Department of Hotel Culinary Arts & Bakery, Gyeongnam Provincial Namhae College, Namhae 668-801, Korea

<sup>5</sup>School of Food and Life Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

<sup>6</sup>Department of Ophthalmic Optics, Daegu Technical University, Daegu 704-742, Korea

<sup>7</sup>Department of Biomaterial Control, Graduate School and Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Received February 11, 2010 / Accepted February 17, 2010

Garlic (*Allium sativum*) has been well-known as a folk remedy for a variety of ailments since ancient times, and it is well documented that enhanced garlic consumption leads to a decrease in incidences of cancer. Tight junctions (TJs) are critical structures for the maintenance of cellular polarity, acting as paracellular permeability barriers and playing an essential role in regulating the diffusion of fluid, electrolytes and macromolecules through the paracellular pathway. Matrix metalloproteinases (MMPs) have been implicated as possible mediators of invasiveness and metastasis in some cancers. In this study, we investigated the potential effects of water extract of aged black garlic (ABG) on the correlation between tightening of TJs and anti-invasive activity in human gastric carcinoma AGS cells. The inhibitory effects of ABG on cell motility and invasiveness were found to be associated with increased tightness of TJs, which was demonstrated by an increase in transepithelial electrical resistance. Additionally, the activities of MMP-2 and -9 in AGS cells were inhibited by treatment with ABG, and this was also correlated with a decrease in the expression of their mRNA and proteins. Furthermore, RT-PCR and immunoblotting results indicated that ABG repressed the levels of the claudin proteins, major components of TJs that play a key role in the control and selectivity of paracellular transport. In conclusion, these results suggest that ABG treatment may inhibit tumor metastasis and invasion, and therefore may act as a dietary source to decrease the risk of developing cancer.

**Key words** : Aged black garlic, tight junction, MMP, invasion

### 서 론

세포사이의 몇 가지 junction 중 tight junction (TJ)은 다이나믹한 구조를 가지고 있으며, 상처회복과 염증, 특히 암의 발생과 진행 동안 구조적 변화를 유발한다. Epithelial sheet 안쪽에 존재하는 TJ는 선단(apical)에 위치하는 몇 가지 단백질 복합체(multi-protein complex)로 paracellular pathway를 통한 병원성 물질과 거대분자의 차단하고 이온 물질과 미량분자의 통과 조절을 위해 intercellular strand를 형성 한다 [14,19,21]. 그리고 TJ 사이의 연결 단백질인 ZO-1과 claudin family 단백질은 액틴과 연결되어 세포극성의 유지에도 중요하다[10,12,14,16,18]. 1970년대 초 상피세포 유래 종양에서 TJ 구조의 다양한 변화가 보고[11]된 이후, 투과성상피세포의 전

기적 저항성(transepithelial electrical resistance, TER)이 암세포에서 정상 조직보다 높게 형성되어 있음이 보고된 바 있다 [16,24].

최근 TJ 구성 단백질로서 관심을 모으고 있는 claudin family 단백질은 막단백질로 인접세포의 claudin 단백질군의 세포 외 영역과 서로 인접되어있다고 알려져 있다[13,21]. 현재 21 종류의 transmembrane 단백질을 포함하는 claudin family는 TJ strand의 중요한 구성요소로 큰 범위에서 TJ의 투과도 특성(permeability characteristics)을 결정하는 것으로 알려져 있다 [24,25]. 또한 TJ는 세포막의 apical과 basolateral 사이에 지방과 단백질의 이동을 막는 연속적인 circumferential "fence"를 형성하므로 세포의 극성의 형성과 유지에도 claudin 이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어지고 있다[19]. 따라서 이러한 TJ 단백질인 claudin의 부조로 인한 TJ의 구조적 변화는 암세포의 초기 침윤과 전이에 관련된 명백한 증거로 제시되어지고 있으므로, TJ 단백질(claudins, ZO-1 및 occludin 등) 및 TJ 관

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-850-8649, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

련단백질(E-cadherin 등)과 그들의 전사활성에 관여하는 다양한 전사인자들(snail 등)에 대한 연구의 중요성이 강조되어 지고 있다[8,23,25,26]. 한편 암세포의 침윤이나 전이를 포함한 다양한 병리·생리학적 반응에 기본적으로 요구되는 matrix metalloproteinases (MMPs)는 세포외 기질의 분해에 중심적인 역할을 하는 zinc와 calcium 의존적 효소이다[7,17,22]. MMPs는 비활성형인 zymogen의 형태로 발현된 후 세포가 처한 환경에 따라 활성형으로 변화되기도 한다[4,5]. 특히 MMP-2 및 -9는 gelatin이나 다양한 콜라겐의 분해에 중심적인 역할을 하며, 그들의 발현은 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)에 의하여 조절되기도 한다[5,7].

마늘(garlic, *Allium sativum*)은 전통적으로 식용뿐만 아니라 건강 기능성 식품으로 많은 관심을 모으고 있는 식품의 하나이며. 특히 최근 미국 시사주간지 타임지가 정한 10대 장수식품 중의 하나이다. 마늘의 효능에 관해서는 이미 많은 연구가 이루어진 바 있으며, 항암작용을 포함한 다양한 질병의 예방과 치료에 매우 효과적임이 입증되어 지고 있다[3,9]. 최근 기능성 식품으로 많은 관심을 모으고 있는 흑마늘(aged black garlic)은 생마늘을 일정한 온도와 습도에서 숙성 발효시켜 만든 것으로서, allicin에서 나는 특유의 자극적인 맛을 제거하고 숙성과정에서 수용성 유향 아미노산인 S-allyl-L-cysteine과 폴리페놀의 함량을 증가시킨 것이다. 특히 S-allyl-L-cysteine의 함량을 증가시킴으로써 생마늘에 비하여 항산화력의 상승으로 심혈관계 질환의 예방과 항암작용이 매우 높을 것으로 보고되어지고 있다[1,2,6,9]. 본 연구실에서도 그동안 마늘의 항암활성에 대한 지속적인 연구를 수행하였으며, 최근 흑마늘 추출물이 생마늘 추출물에 비하여 항암작용이 매우 높다는 것을 보고한 바 있다[15,20]. 그러나 현재까지 흑마늘 추출물의 항암작용에 대한 생리·생화학적 기전에 대한 연구는 상대적으로 매우 미비한 실정이며, 암세포의 증식억제 및 세포사멸(apoptosis) 유도관련 연구는 진행된 바 있으나, 암세포의 전이 억제에 관련된 연구는 거의 이루어진 바 없다. 본 연구에서는 흑마늘 추출물의 항암활성 효능 검증의 일환으로 암세포의 전이 억제 여부를 인체위암세포를 대상으로 전이 조절 표적자로 관심을 모으는 TJ의 형성과 그들 구성 성분에 미치는 흑마늘 열수 추출물의 효능을 중심으로 조사하였다.

## 재료 및 방법

### AGS 위암세포의 배양 및 시료의 처리

AGS 인체 위암세포는 한국생명공학연구소에서 분주 받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. 흑마늘 열수 추출물(water extract of aged black garlic, ABG)은 인체대학

교 식품영양학과 김정인 교수연구실에서 제공받았으며[15], ABG의 처리를 위하여 AGS 세포를 6 well에 1×10<sup>5</sup>개/ml 정도 분주하여 24시간 동안 안정화시켰다. ABG는 세포에 처리하기 직전 적정 농도로 배지에 첨가하여 녹인 후 주사기용 필터 유닛(0.22 μm의 pore size)을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 배지를 갈아주면서 직접 처리하였다.

### MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

24시간 동안 안정화시킨 AGS 세포에 48시간 동안 ABG를 처리한 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 μl씩 분주하고 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 100 μl씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포이동성(Cell motility assay) 조사

ABG 처리에 의한 AGS 세포의 이동성에 미치는 영향을 wound healing 방법으로 비교하였다. 이를 위하여 rat tail collagen (20 μg/ml, BD Biosciences, Bedford, MA, USA)이 코팅된 30 mm culture dish에 AGS 세포를 confluency를 이룰 때까지 배양한 후 serum free 배지로 희석한 ABG를 처리하고 pipette tip으로 scratch를 만들었다. 그 후 시간의 결과에 따른 wounded area로의 세포 이동성의 변화 정도를 도립현미경(Carl Zeiss, Germany, 40 배) 하에서 관찰하였다.

### In vitro invasiveness assay

ABG에 의한 AGS 세포의 침윤성 억제 가능성의 여부를 알아보기 8 μm pore size의 갖는 transwell insert (Corning Costar Corp.)를 이용한 transwell invasion 방법을 적용하였다. Transwell insert는 matrigel 100 μg/ml의 Matrigel로 코팅하여 침윤을 유도하였다. Matrigel 코팅이 끝난 transwell은 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에 24시간 동안 건조하였으며, FBS가 첨가되지 않은 RPMI-1640 배지로 희석한 AGS 세포를 5×10<sup>4</sup>개/well씩 첨가하여 48시간 동안 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 내피세포를 바닥에 부착시켰다. 그 후 matrigel에 침윤된 세포의 수를 200배 현미경 시야에서 계수하여 비교하였다.

### Transepithelial electrical resistance (TER) 변화 조사

ABG에 의한 AGS 세포의 침윤성억제가 TJ의 tightness 증가와 연관이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 12-well polycarbonate membranes (1 cm<sup>2</sup> surface area, 0.4 mm pore size, Costar, Corning, NY, USA)에 2×10<sup>5</sup> cells/ml개의 AGS 세포를 처리하여 일정시간 배양하여 이때 세포막에 걸리는 전류의

전기 저항치(trans epithelial electrical resistance, TER)를 EVOM Epithelial Tissue Volt ohmmeter (World Precision Instruments, FL)로 측정하여 단층 세포(monolayer)의 integrity를 비교하였다. 다양한 농도의 ABG를 배양 세포에 48 시간 처리하여 TER을 측정하여 세포 tight junction과 paracellular 투과성에 미치는 ABG의 영향을 평가하였다. 측정 시 4군데 각각 다른 영역을 측정하여 평균하여 사용하였다.

RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

동일 조건에서 준비된 AGS 세포를 대상으로 TRIzol B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Biotechnology, Korea)를 이용하여 2 µg의 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자(Table 1)를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 ultra violet (UV) 하에서 확인하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

준비된 세포들에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenyme-

thylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 단백질을 분리한 후, Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량 한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 적정 항체를 이용하여 해당 단백질의 발현 변화를 비교하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)과 Amersham Corp.에서 구입하였으며, enhanced chemiluminescence (ECL) 용액은 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

MMPs 활성 분석을 위한 gelatin zymographic analysis

AGS 세포에서 matrix metalloproteinase (MMP)-2 및 MMP-9의 활성을 관찰하기 위하여 gelatin zymography를 시행하였다. ABG가 48시간 동안 처리된 AGS 세포의 배양액을 0.25% gelatin이 포함된 10% polyacrylamide gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 2.5% Triton X-100 용액에서 15 분간 수세하고 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM CaCl<sub>2</sub>를 지닌 완충액으로 37°C 에서 24시간 반응시켰다. 이후 Coomassie

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
MMP-2	Sense	5'-CTT CTT CAA GGA CCG GTT CAT-3'
	Antisense	5'-GCT GGC TGA GTA GAT CCA GTA-3'
MMP-9	Sense	5'-TGG GCT ACG TGA CCT ATG ACC AT-3'
	Antisense	5'-GCC CAG CCC ACC TCC ACT CCT C-3'
TIMP-1	Sense	5'-TGG GGA CAC CAG AAG TCA AC-3'
	Antisense	5'-TTT TCA GAG CCT TGG AGG AG-3'
TIMP-2	Sense	5'-GTC-AGT-GAG-AAG-GAA-GTG-GAC-TCT-3'
	Antisense	5'-ATG-TTC-TTC-TCT-GTG-ACC-CAG-TC-3'
E-cadherin	Sense	5'-GAA CAG CAC GTA CAC AGC CCT-3'
	Antisense	5'-GCA GAA GTG TCC CTG TTC CAG-3'
snail	Sense	5'-TAT GCT GCC TTC CCA GGC TTG-3'
	Antisense	5'-ATG TGC ATC TTG AGG GCA CCC-3'
Claudin-1	Sense	5'-TCA GCA CTG CCC TGC CCC AGT-3'
	Antisense	5'-TGG TGT TGG GTA AGA GGT TGT-3'
Claudin-2	Sense	5'-ACA CAC AGC ACA GGC ATC AC-3'
	Antisense	5'-TCT CCA ATC TCA AAT TTC ATG C-3'
Claudin-4	Sense	5'-TGG ATG AAC TGC GTG GTG CAG-3'
	Antisense	5'-GAG GCG GCC CAG CCG ACG TA-3'

blue R-250 (Bio-Rad)으로 염색하고 MMP-2 및 MMP-9 활성에 의하여 분해된 gelatin band를 관찰하였다. 전기영동을 시행한 시료의 양은 전체 단백질의 양으로 보정 후 사용하였다.

## 결과 및 고찰

ABG 처리에 의한 AGS 위암세포의 이동성 및 침윤성 억제 세포독성을 나타내지 않는 범위의 ABG 농도 처리가 AGS 위암세포의 이동성을 억제시킬 수 있는지의 조사를 위한 조건 설정을 위하여 적정 농도의 ABG를 48시간 처리 후 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1A의 결과에 의하면 48시간 처리 조건에서 0.5 mg/ml 처리군에서도 약 90% 이상의 생존율을 보이며서 세포사멸 현상은 관찰되지 않았기에, 향후 실험을 위한 처리 조건으로 설정하였다. 세포독성을 보이지 않는 범위에서 시간의 경과에 따른 ABG의 AGS 위암세포 이동성 억제 여부를 wound healing 방법으로 조사한 결과, 정상 배지에서 배양된 AGS 위암세포의 경우 시간의 경과에 따라 wounded area로의 세포 이동성이 증가하는 것을 확인 할 수 있었으나, ABG를 처리한 군에서는 48시간이 경과하여도 암세포의 이동이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 1B).

Fig. 1B의 결과에서 나타난 ABG의 AGS 위암세포 이동성

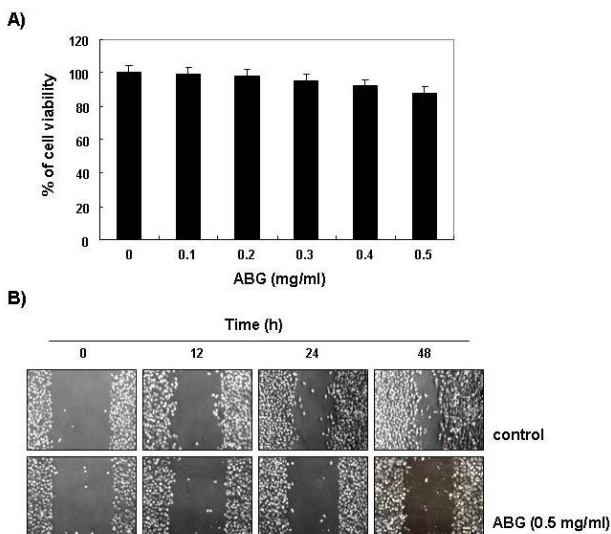


Fig. 1. Inhibition of cell growth and motility of human gastric carcinoma AGS cells by water extract of aged black garlic (ABG). (A) AGS cells were treated with the indicated concentrations of ABG for 48 hr and cell viability was estimated by an MTT assay. (B) Cells were grown to confluency on 30-mm cell culture dishes and then a scratch was made through the cell layer using a pipette tip. After washing with PBS, serum free media (to prevent cell proliferation) containing either vehicle or 0.5 mg/ml ABG was added for the indicated times. Photographs of the wounded area were taken to evaluate cell movement into the wounded area.

억제가 암세포의 침윤성 억제와 연관성이 있는지를 transwell plate에 matrigel을 코팅한 조건에서 세포의 침윤성 정도로 조사하였다. Fig. 2B에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 ABG가 처리된 조건에서 유의적으로 침윤된 세포의 수가 처리 농도 의존적으로 강력히 감소되었음을 알 수 있었으며, ABG에 의한 AGS 위암세포의 이동성 억제는 침윤성 억제와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

본 연구실의 선행 결과에 의하면, ABG의 48시간 3.0 mg/ml 처리군에서 AGS 위암세포의 생존율은 30% 정도로 나타났으며, 3.5 mg/ml 처리군에서는 거의 10% 이하로 떨어졌다. 또한 이러한 ABG 처리에 의한 AGS 위암세포의 증식 억제 효과는 세포사멸(apoptosis) 유도에 의한 것임을 보고한 바 있다[20]. 이는 ABG 처리 농도가 암세포에 세포독성을 보이는 조건에서는 apoptosis에 의한 항암활성이 증대될 수 있지만, 세포독성을 보이지 않는 저농도 조건에서도 암세포의

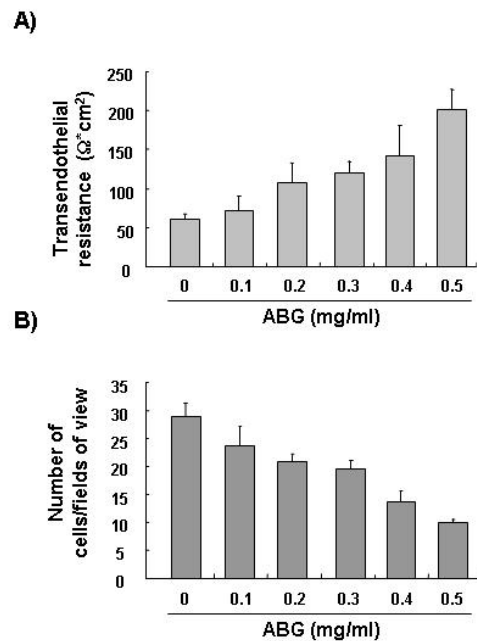


Fig. 2. Effect of ABG on TER values and invasion in AGS cells. (A) Cells were treated with the indicated concentrations of ABG for 48 hr and the TER values were measured as described in materials and methods. Results are shown as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. (B) Cells pretreated with the indicated concentrations of ABG for 6 hr were plated onto the apical side of matrigel coated filters in serum-free medium containing either vehicle or ABG. Medium containing 20% FBS was placed in the basolateral chamber to act as a chemoattractant. After 48 hr, the cells on the apical side were wiped off using a Q-tip. Next, the cells on the bottom of the filter were stained using hematoxylin and Eosin Y then counted. Data are shown as the mean of triplicate samples and represent the invasive cell numbers compared with those of control cells.

이동성을 약화시켜 암세포의 전이를 억제할 수 있을 가능성이 높음을 의미하는 결과이다.

AGS 위암세포의 tight junction (TJ) 형성에 미치는 흑마늘 열수 추출물의 영향

TER 측정은 세포의 투과성을 알아보는 transport study를 시작할 때 세포(monolayer)의 confluence와 integrity의 알아봄으로서 TJ의 기능 강화(tightness) 정도를 평가하는 지표로 적용할 수 있다[16,19,24]. 따라서 ABG 처리에 의한 AGS 위암세포의 침윤성 억제가 TJ의 기능 강화를 증가시키는지의 여부를 조사하기 위하여 ABG 처리에 의한 TER 변화 여부를 측정 한 결과는 Fig. 2A에 나타내었다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이 ABG의 처리 농도 증가에 따라 TER의 값이 점차 증가되어 0.5 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 약 4배 정도 증가되었다. 이러한 ABG 처리에 의한 TER 증가는 TJ 활성화에 영향을 주어 세포의 결합 효과를 상승 시킨 것으로서 암세포의 이동성 및 침윤성의 억제는 TJ의 기능 강화와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

AGS 위암세포 MMPs 및 TIMPs의 발현에 미치는 흑마늘 열수 추출물의 영향

이상의 결과를 통하여 관찰된 ABG 처리에 의한 AGS 위암세포 이동성 및 침윤성의 억제와 TER의 증가는 ABG가 강력한 항전이 효과를 가지고 있음을 보여주는 결과들이다. 따라서 ABG의 항전이에 관여하는 유전자들의 관련성 정도를 조사하기 위하여 먼저 matrix metalloproteinase (MMP) 및 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)의 발현 변화를 RT-PCR로 조사하였다. 이를 위하여 다양한 시간 동안 0.5 mg/ml ABG가 처리된 AGS 위암세포의 RNA를 분리하여 해당 유전자들의 primer를 이용하여 RT-PCR를 실시하였다. Fig. 3A에 나타낸 바와 같이 ABG의 처리 시간이 증가할수록 MMP-2의 발현은 다소 감소되었으나, MMP-9의 발현은 큰 변화가 없었다. 그러나 TIMP의 경우, TIMP-1 및 TIMP-2의 발현 모두가 ABG 처리 시간이 증가에 따라 점차적으로 증가되었다. MMPs의 발현 증가에 따른 그들 효소의 활성 증가는 암세포의 전이에 필수적이지만, 이들의 발현은 TIMP에 의하여 억제될 수 있으므로, 이는 ABG가 TIMP의 발현 증가를 통하여 MMP의 발현이 부분적으로 억제될 수 있음을 보여 주는 결과이다.

Fig. 3A에서 나타낸 ABG 처리에 의한 MMPs 및 TIMPs의 발현 변화가 MMPs 단백질 및 그들의 활성 감소와 직접적인 연관성을 가지는지의 여부를 조사하기 위하여 동일 조건에서 배양된 AGS 위암세포를 대상으로 Western blotting 및 zymography 분석을 실시한 결과는 Fig. 3B 및 C에 나타낸 바와 같다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이 ABG의 처리 시간이 증가할수록 단백질 수준에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현이 점차 감소하였으며, ABG 처리 농도가 증가할수록 그들의 효소적

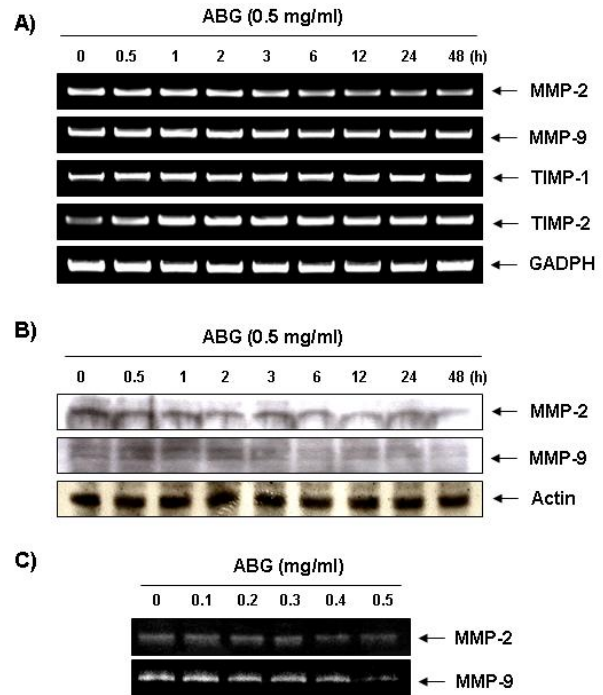


Fig. 3. Effect of ABG on TIMPs and MMPs expression and activities of MMPs in AGS cells. (A) The cells were treated with 0.5 mg/ml ABG for the indicated times. Total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were then subjected to PCR and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) Cells were treated with 0.5 mg/ml ABG for the indicated times, were lysed, and proteins separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels. Western blotting was then performed using anti-MMP-2 and anti-MMP-9 antibodies, and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (C) After incubation with the indicated concentrations of ABG for 48 hr, medium was collected, and the activities of MMP-2 and -9 were measured by zymography.

활성도 다소 억제되었음을 알 수 있다. 이는 ABG의 항전이 효능이 MMPs의 활성 감소와 연관되어 있음을 보여주는 결과이다.

AGS 위암세포의 TJ 조절 유전자의 발현에 미치는 ABG의 영향

최근 연구에 의하면 TJ 구성단백질들(특히 claudin 단백질군)이 암세포의 전이에 매우 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다[13,21]. Claudin 단백질은 막단백질로 인접세포의 claudin 단백질군의 세포의 영역과 서로 인접되어있다고 알려져 있다. 21 종류의 transmembrane 단백질을 포함하는 claudin family는 TJ strand의 중요한 구성요소로 큰 범위에서 TJ의

투과도 특성(permeability characteristics)을 결정 한다. 또한 TJ는 세포막의 apical과 basolateral 사이에 지방과 단백질의 이동을 막는 연속적인 circumferential "fence"를 형성하므로 세포의 극성의 형성과 유지에도 claudin 이 중요하다[19,25]. 따라서 이러한 TJ 단백질인 claudin의 부조로 인한 TJ의 파괴는 암세포의 초기 침윤과 전이에 관련한 명백한 증거로 최근 연구되어지고 있다. 이와 같이 TJ 단백질은 아울러 TJ 관련 단백질(E-cadherin, Snail 등)들과의 상호 작용을 통하여 암세포의 전이를 조절할 수 있다[8,23,25,26]. 따라서 ABG의 항전이 효능이 이들 TJ 조절인자들의 발현에 영향을 줄 수 있을 것으로 추정되어 몇 이들 인자들의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 Western blotting 방법으로 조사하였다. Fig. 4에 나타낸 바와 같이 ABG의 처리 시간이 증가할수록 조사된 3가지의 claudin 유전자들의 발현이 특히 번역 수준에서 감소되었는데, 이는 AGS 위암세포에서 ABG에 의한 claudins 발현 억제

는 post-transcriptional 수준에서 이루어짐을 알 수 있었다. 아울러 세포-세포 연결(cell-cell adhesion) 역할과 전이/종양억제 단백질 기능을 가지는 E-cadherin의 발현[23,25]은 전사 및 번역 수준에서 ABG 처리 시간이 증가에 따라 점차 감소되었다. 그리고 많은 암세포에서 E-cadherin의 발현 감소와 연계되면서 다양한 암세포 전이 조절 관련 유전자들의 전사활성에 중요한 역할을 할 것으로 기대되는 Snail의 발현[8,26]은 점차 증가되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2007년도 지식경제부 지원 경남도립남해대학 지역연고산업육성사업인 보물섬 클러스터 구축을 통한 남해마늘산업 핵심역량강화사업 및 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: 7-19-42)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## References

- Ahmad, M. S., M. Pischetsrieder, and N. Ahmed. 2007. Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. *Eur. J. Pharmacol.* **561**, 32-38.
- Allison, G. L., G. M. Lowe, and K. Rahman. 2006. Aged garlic extract and its constituents inhibit platelet aggregation through multiple mechanisms. *J. Nutr.* **136**, 782S-788S.
- Ariga, T. and T. Seki. 2006. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review. *Biofactors* **26**, 93-103.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo, and J. A. Engler. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**, 197-250.
- Chandler, S., K. M. Miller, J. M. Clements, J. Lury, D. Corkill, D. C. Anthony, S. E. Adams, and A. J. Gearing. 1997. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J. Neuroimmunol.* **72**, 155-161.
- Chauhan, N. B. 2006. Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *J. Ethnopharmacol.* **108**, 385-394.
- Consolo, M., A. Amoroso, D. A. Spandidos, and M. C. Mazzarino. 2009. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease. *Int. J. Mol. Med.* **24**, 143-152.
- Kato, M. 2005. Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **27**, 1677-1683.
- Khanum, F., K. R. Anilakumar, and K. R. Viswanathan. 2004. Anticarcinogenic properties of garlic: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 479-488.
- Madara, J. L., C. Parkos, S. Colgan, A. Nusrat, K. Atisook, and P. Koustzani. 1992. The movement of solutes and cells across tight junctions. *Ann. NY Acad. Sci.* **664**, 47-60.

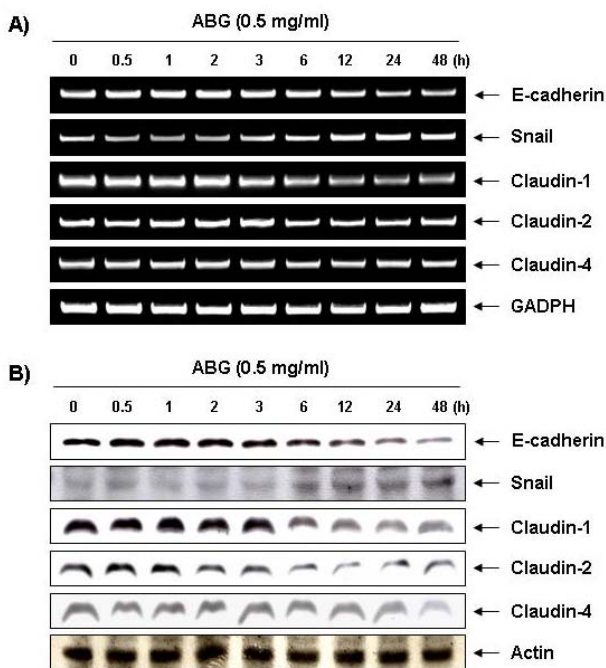


Fig. 4. Effect of ABG on the expression of claudins, E-cadherin and Snail mRNA and proteins in AGS cells. (A) The cells were treated with 0.5 mg/ml ABG for the indicated times. Total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were then subjected to PCR and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) Cells grown under the same conditions as Fig. 4A were lysed and equal amounts of proteins were separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels. Western blotting was then performed using the indicated antibodies, and an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

11. Martinez, P. A. 1970. Ultrastructural modifications of intercellular junctions between tumor cells. *Lab. Invest.* **22**, 605-614.
12. McCartney, M. D. and C. D. Cantu. 1992. Rabbit corneal epithelial wound repair: tight junction reformation. *Curr. Eye Res.* **11**, 15-24.
13. Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1996. Claudin multigene family encoding fourtransmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 511-516.
14. Mullin, J. M. 1997. Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. *J. Exp. Zool.* **279**, 484-489.
15. Park, C., O. C. Gweon, Y. H. Choi, and J. I. Kim. 2009. Aged black garlic inhibits cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by phorbol 12-myristate-13-acetate through Inactivation of nuclear factor- $\kappa$ B. *Cancer Prev. Res.* **14**, 161-170.
16. Peralta, S. A., J. M. Mullin, K. A. Knudsen, and C. W. Marano. 1996. Tissue remodeling during tumor necrosis factor-induced apoptosis in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **270**, F869-F879.
17. Rawlings, N. D. and A. J. Barrett. 1995. Evolutionary families of metallopeptidases, *Methods Enzymol.* **248**, 183-228.
18. Riehl, T. E. and W. F. Stenson. 1994. Mechanisms of transit of lipid mediators of inflammation and bacterial peptides across intestinal epithelia. *Am. J. Physiol.* **267**, G687-G695.
19. Schneeberger, E. E. and R. D. Lynch. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286**, C1213-C1228.
20. Shin, D. Y., M. K. Yoon, Y. W. Choi, O. C. Gweon, J. I. Kim, and Y. H. Choi. 2009. Apoptosis induction by aged black garlic extracts in AGS human gastric carcinoma cells. *Cancer Prev. Res.* **14**, in press.
21. Swift, J. G., T. M. Mukherjee, and R. Rowland. 1983. Intercellular junctions in hepatocellular carcinoma. *J. Submicrosc. Cytol.* **15**, 799-810.
22. Tak, P. P. and B. Bresnihan. 2000. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum.* **43**, 2619-2633.
23. Tunggai, J. A., I. Helfrich, A. Schmitz, H. Schwarz, D. Günzel, M. Fromm, R. Kemler, T. Krieg, and C. M. Niessen. 2005. E-cadherin is essential for *in vivo* epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J.* **24**, 1146-1156.
24. Van Itallie, C. M. and J. M. Anderson. 2004. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiol.* **19**, 331-338.
25. Wong, A. S. and B. M. Gumbiner. 2003. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J. Cell Biol.* **161**, 1191-1203.
26. Yokoyama, K., N. Kamata, E. Hayashi, T. Hoteiya, N. Ueda, R. Fujimoto, and M. Ngayama. 2001. Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells *in vitro*. *Oral. Oncol.* **37**, 65-71.

초록 : 흑마늘 추출물이 인체위암세포의 tight junction 투과성 조절과 세포 침윤성 억제에 미치는 영향

신동역<sup>1</sup> · 윤무경<sup>2</sup> · 최영환<sup>3</sup> · 권오천<sup>4</sup> · 김정인<sup>5</sup> · 최태현<sup>6</sup> · 최영현<sup>1,7\*</sup>

(<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실, <sup>2</sup>국립원예특작과학원 채소과, <sup>3</sup>부산대학교 생명자원과학대학 원예생명과학과, <sup>4</sup>경남도립남해대학 호텔조리제빵과, <sup>5</sup>인제대학교 식품생명과학부, <sup>6</sup>대구공업대학 안경광학과, <sup>7</sup>동의대학교 대학원 바이오품질제어학과 및 블루바이오 소재개발센터)

본 연구에서는 흑마늘 열수 추출물(ABG)의 암세포 전이억제 효능을 검증하였다. AGS AGS 인체위암세포의 이동성과 침윤성을 억제하였으며, 이는 TER의 증가와 연관성이 있었다. 또한 ABG에 의한 AGS 위암세포의 침윤성 억제는 TIMPs 발현 증가에 의한 MMPs의 발현 및 활성 저하에 의한 것임을 알 수 있었다. 아울러 AGS 위암세포에서 과발현을 나타내는 TJ 단백질인 claudins의 발현 저하 등이 ABG의 항전이 효과에 연관되어 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과는 흑마늘 열수 추출물이 단순한 암세포의 증식억제를 통한 암예방 및 항암활성 뿐만 아니라 암세포의 전이 또한 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주며, 이와 연관된 보다 구체적인 분자세포생물학적 접근 및 *in vivo* 연구의 필요성이 요구됨을 의미한다.