

HT22 세포에서 Curcumin 유도체가 Heme Oxygenase-1 발현에 미치는 효과

정용관 · 이윤정* · 천현자* · 류일환* · 지연주* · 채권우* · 김영숙* · 손지우* ·
강현규* · 이성희* · 안인파* · 정현택* · 배현옥*[#]

원광대학교병원 마취통증학과, *원광대학교 의약자원연구소

(Received August 8, 2011; Revised August 9, 2011; Accepted August 11, 2011)

Effect of Curcumin Derivatives on Heme Oxygenase-1 Expression in HT22 Cells

Yong-Kwan Cheong, Yun-Jung Lee*, Hyun-Ja Chun*, Il-Hwan Ryu*, Yeon-Ju Jee*, Gwon-U Chae*, Young-Sook Kim*,
Ji-Ue Shon*, Hyun-Gyu Kang*, Sung-Hee Lee*, Ren-Bo An*, Hun-Taeg Chung* and Hyun-Ock Pae*[#]

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, School of Medicine, Iksan 570-711, Korea

*Medical Resources Research Institute (MeRRI), Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract — Curcumin, of which a critical characteristic is the capacity of crossing the blood-brain barrier, has been reported to induce the expression of neuroprotective heme oxygenase (HO)-1. The aim of this study is to compare HO-1-inducing capacity and neuroprotective activity of curcumin, its demethoxy (demethoxycurcumin, DMC; *bis*-demethoxycurcumin, BDMC) and hydrogenated derivatives (tetrahydrocurcumin, THC) in mouse hippocampal HT22 cells. Curcumin attenuated glutamate-induced cell death through HO-1 expression. DMC lacking a methoxy group on one of the aromatic rings possessed slightly lower activity in HO-1 expression and neuroprotection than curcumin. Similarly, BDMC, which lacks two methoxy groups on both of the aromatic rings, showed less activity than curcumin. These findings suggest that the presence of methoxy groups on the aromatic ring is required to enhance neuroprotective HO-1 expression. The reduction of the diarylheptadienone chain of curcumin by hydrogen, as in THC, was accompanied by a complete loss of ability to induce HO-1 expression and neuroprotection, suggesting that the conjugated double bonds of the central seven-carbon chain of curcumin may be essential for its ability to induce neuroprotective HO-1 expression. Our findings may provide useful information for further development of neuroprotective HO-1 inducers.

Keywords □ hippocampal neuron, curcumin derivative, heme oxygenase-1, oxidative stress

비정상적인 신경세포의 사멸은 알츠하이머 증후군, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 증후군과 같은 중추 신경계의 퇴행성 뇌질환의 중요한 요인으로 알려져 있다.¹⁾ 산화 스트레스는 신경세포의 사멸을 유발하는 중요한 인자로 고려되고 있다.²⁾ 그러나 산화 스트레스가 어떤 세포내 신호전달 체계를 통해서 신경세포의 사멸을 유도할 수 있는지에 대해서는 명확하지 않다. 신경세포에는 산화 스트레스에 저항할 수 있는 다양한 항산화 방어기전이 있다.³⁾ 이러한 산화 스트레스에 대한 항산화 방어기전으로 산화 스트레스에 반응하여 발현되는 다양한 항산화 효소가 있다.³⁾ 이러한 항산화 효소 중에서 heme oxygenase-1(HO-1)은 신경세포 보호

효과가 크기 때문에 최근 많은 주목을 받고 있다.⁴⁾ HO-1은 산화성 heme을 분해하여 일산화탄소, 철 이온 및 biliverdin을 생성한다.⁴⁾ HO-1이 어떤 기전으로 항산화 효과를 나타내는지 명확하지 않지만, HO-1 발현에 의한 산화성 heme의 분해 및 분해된 생성물에 의한 활성산소(reactive oxygen species; ROS)의 제거 등이 복합적으로 작용하여 항산화 효과를 나타내는 것으로 믿어지고 있다.⁵⁾ 신경계 질환에서 HO-1 발현은 산화 스트레스를 감소시켜 신경세포 사멸을 억제한다.^{4,5)} 따라서 신경세포에서 HO-1 발현을 조절할 수 있는 약물은 산화 스트레스와 관련이 있는 뇌질환의 치료에 사용될 수 있다. 신경세포에서 HO-1 발현을 유도하는 여러 종류의 천연물질이 보고되었다.⁶⁻⁹⁾ 그러나 이들 천연물질이 뇌혈관관문(blood-brain barrier; BBB)을 통과하여 뇌 신경세포에 직접적으로 작용하는지, 보다 많은 연구가 필요하다.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-850-6925 (팩스) 063-842-6925
(E-mail) hopae@wku.ac.kr

Curcumin은 강황(*Curcuma longa* L.)의 괴근(rhizome)에서 1815년에 최초로 분리되었고, 1913년에 curcumin의 화학적 구조가 밝혀졌다. 강황의 괴근에서 황색을 나타내는 분획에는 약 77%의 curcumin, 17%의 demethoxycurcumin(DMC) 및 3%의 bis-demethoxycurcumin(BDMC)이 함유되어 있으며, 이들은 다양한 생리활성 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ Curcumin은 BBB를 통과하여 뇌 신경세포에 직접적으로 영향을 줄 수 있다.¹¹⁾ 세포내에서 curcumin은 이것의 환원 형태 tetrahydrocurcumin(THC)로 빠르게 전화되어 curcumin의 약리 활성이 상실된다.¹²⁾

본 연구에서는 curcumin, DMC, BDMC 및 THC가 신경세포에서 HO-1 발현을 유도할 수 있는지 조사하고, 이러한 HO-1 발현이 산화 스트레스에 의한 신경세포의 사멸을 억제할 수 있는지 조사하였다. 또한, 이들 curcumin 유도체의 구조적 차이점을 비교하여, 신경세포에서 curcumin의 어떤 작용기가 HO-1 발현의 조절에 관여하는지 조사하였다. Curcumin 유도체의 HO-1 발현 및 세포보호 효과를 조사하기 위하여 생쥐의 해마유래 HT22 세포를 사용하였다. HT22 세포는 glutamate 수용체가 없는 세포로서 glutamate를 처리할 경우, 신경흥분독성(excitotoxicity)이 아닌 산화 스트레스로 인하여 세포의 손상이 발생하며, 산화 스트레스로 인한 퇴행성 뇌질환 연구에 있어서 유용한 *in vitro* 실험모델 중의 하나이다.¹³⁾

실험방법

재료 및 시약

저자들이 앞선 연구에서 보고한 것같이, curcumin, DMC 및 BDMC는 강황(*Curcuma longa* L.)의 괴근(rhizome)에서 분리하였다.¹⁴⁾ THC, ferulic acid, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 3'-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 및 L-glutamate는 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HO-1 및 β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Tin protoporphyrin(SnPP)는 Porphyrin Products(Logan, UT, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco/Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다.

세포배양 및 세포 생존율 측정

HT22 세포주는 김윤철 교수(원광대학교)로부터 분양하여 사용하였다. 이 세포는 항생제(100 U/ml 페니실린 A와 100 U/ml의 스트렙토마이신) 그리고 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 배양되었으며, 37°C, 5% CO₂ 및 적절한 습도가 유지된 세포 배양기에서 배양되었다. 세포 생존율은 MTT 세포 생존율 분석법에 의해서 평가하였다. MTT는 황색 물질로서 살아있는 세포에

의해 보라색의 포르마잔 산물로 환원된다. 이 과정은 활성화 미토콘드리아가 필요하며, 죽은 세포들은 유의적인 양의 MTT를 환원하지 않는다. 세포는 5×10^5 cells/ml의 농도로 24-well flat-bottom plate에서 배양되었다. 이 세포를 배양기에 12시간의 방치한 후, 다양한 농도의 시료를 6시간 동안 처리한 후에 배양배지를 새로운 배지로 교체하고, 여기에 3 mM glutamate를 18시간 동안 세포에 처리하였다. 이후에 세포배양액을 교체하고, 50 μ g/ml이 되도록 MTT를 첨가하여 2~4시간 동안 반응시켰다. MTT와 생존 세포로부터 생성된 포르마잔을 0.1% SDS 용액으로 용해하여 570 nm 또는 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율로서 표시하였다.

Western blot 분석

일정 시간 특정 농도의 시료에 노출된 HT22 세포를 회수하여 4°C phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하고, 1분간 얼음 위에 보관하였다. HT22 세포에 RIPA buffer[150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 50 mM glycerophosphate, 20 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄ 및 protease inhibitor]를 첨가한 다음, 4°C, 14,000×g에서 20분간 원심분리하고 상등액을 튜브에 옮겼다. 단백질 함량은 BCA 시약(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 측정하였다. 세포 분획은 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리되었고, 분리된 단백질은 니트로셀룰로오스 막으로 전이시켰다. 이후, 막을 상온에서 1시간 동안 5% 무지방유가 포함된 blocking buffer[0.1% Tween 20 및 Tris-buffered saline(pH 7.4)]로 blocking하였다. 이 막에 HO-1 (1:1000 희석) 또는 β -actin(1:1000 희석) 항체를 4°C에서 12시간 동안 부착시켰다. 이후, 막을 PBS-Tween 20으로 4차례 세척한 후, 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 반응시켰다. 특이적 밴드는 ELC detection system(Amersham Biosciences)와 X-ray 필름을 사용하여 확인하였다.

통계처리

Data는 Student's *t*-test 또는 one-way ANOVA 후에 Newman-Keuls multiple comparison test를 사용하여 분석하였다. Data는 최소 3번 이상의 독립적인 실험에서 구해진 평균값 \pm 표준편차 표현하였다. $P < 0.05$ 일 경우, 유의적인 차이를 보이는 것으로 판단하였다.

실험결과 및 고찰

본 연구에 사용된 ferulic acid, curcumin, DMC, BDMC 및 THC의 화학적 구조를 Fig. 1에 제시하였다. 이들 각각을 1 μ M에서 10 μ M까지의 농도로 HT22 세포에 24시간 처리하여 세포

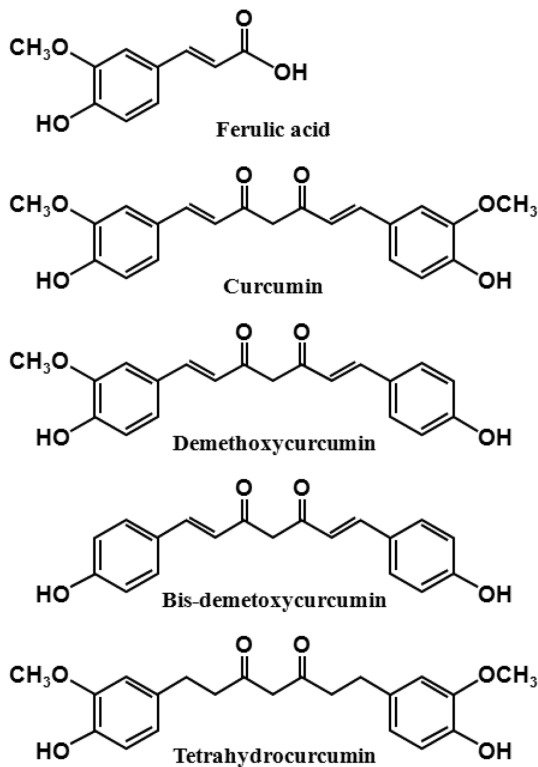


Fig. 1 – Chemical structures of ferulic acid, curcumin and demethoxy and hydrogenated derivatives of curcumin.

생존율을 조사하였다. 대조군의 세포 생존율과 처리군의 세포 생존율 간에는 큰 차이가 없었다. HT22 세포에서 curcumin은 농도 의존적으로 HO-1 발현을 유도하였으나, ferulic acid는 HO-1 발현에 효과가 없었다(Fig. 2A). 18시간 3 mM glutamate를 HT22 세포에 처리할 경우 세포 생존율이 40%까지 감소하였으나, 6시간 동안 curcumin을 먼저 처리하고 glutamine을 처리할 경우 세포 생존율이 80%까지 증가하였다(Fig. 2B). 즉, curcumin은 glutamate의 세포독성을 감소시키는 세포보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다. Curcumin과 다르게 ferulic acid는 세포보호 효과가 없었다. Curcumin에 의한 세포보호 효과가 HO-1 발현과 관련이 있는지 조사하기 위하여, HO-1 활성 억제제인 SnPP와 curcumin을 함께 처리하였다. Curcumin을 단독 처리한 경우에 발견되었던 세포보호 효과가 SnPP 처리에 의해서 크게 감소하였다(Fig. 2B). 50 μ M의 SnPP 자체는 세포 생존율 변화에 큰 영향을 미치지 않았다. 이런 결과로부터, curcumin에 의한 세포보호 효과는 curcumin에 의한 HO-1 발현과 관련이 있음을 확인할 수 있었다. Curcumin과 유사하게 DMC 및 BDMC 역시 HO-1 발현을 유도하였고, 또한 glutamate의 세포독성을 유의하게 감소시켰다(Fig. 3). 그러나 HO-1 발현 정도 및 세포보호 효과에는 다소 차이가 있었다. 10 μ M에서 각각의 세포보호 효과를 상대적으로 비교할 경우 두 개의 methoxy group을 가진

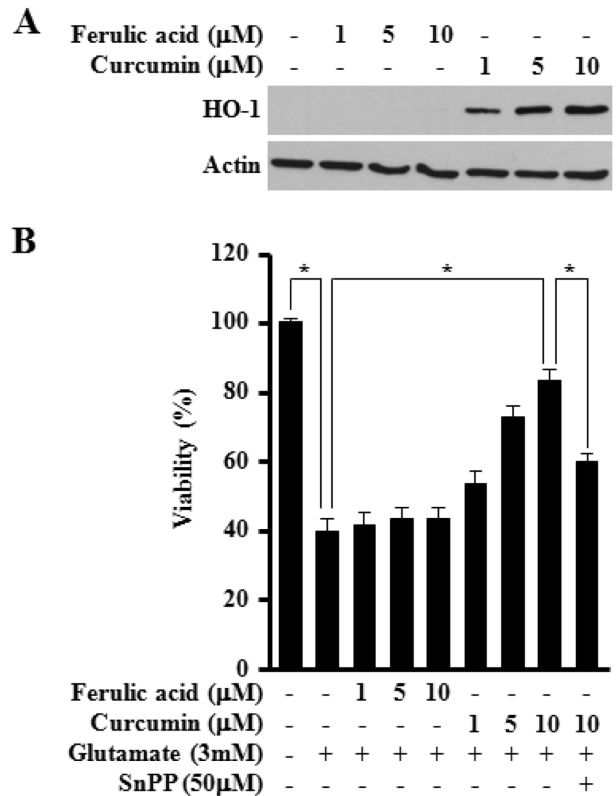


Fig. 2 – Effects of ferulic acid and curcumin on HO-1 expression and glutamate-induced neurotoxicity. HT22 cells were pre-incubated for 6 h with ferulic acid and curcumin at indicated concentrations, and exposed for 18 h to 3 mM of glutamate in the absence or presence of 50 μ M of SnPP. Western blotting analysis for HO-1 expression was carried out after 6 h pre-incubation (A) and cell viability was determined after 18 h exposure to glutamate (B). Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with each respective group.

curcumin에서 가장 크게 관찰되었고, methoxy group이 하나도 존재하지 않는 BDMC에서 가장 적게 관찰되었다(Fig. 3). Curcumin과 다르게, 구조적으로 중앙 7개 탄소에 2개의 이중결합이 없는 THC는 HO-1 발현 및 세포보호에 효과가 없었다(Fig. 4). 세포내에서 HO-1 발현은 이것의 발현을 유도하는 핵인자 Nrf2의 활성 증가와 관련이 있다.¹⁵⁾ 일반적인 상태에서 Nrf2는 세포질에 존재하며, Keap1과 결합하여 Nrf2-Keap1 복합체를 형성한다. 여러 가지 원인에 의해서 Nrf2가 Keap1에서 분리되면, Nrf2는 핵의 내부로 이동하여 HO-1 mRNA의 전사를 지시하는 DNA의 특정 부위에 결합한다.¹⁵⁾ Curcumin은 Nrf2의 활성을 증가시킬 수 있다.¹⁶⁾ 그러나 curcumin이 어떤 기전으로 Nrf2의 활성을 증가시켜, HO-1 발현을 유도시킬 수 있는지는 명확하지 않다. 특히, curcumin에 존재하는 어떤 작용기가 HO-1 발현과 직접적으로 관련이 있는지 조사될 필요성이 있다. THC와 다르게 curcumin은 두 개의 α, β -unsaturated carbonyl group을 가지고

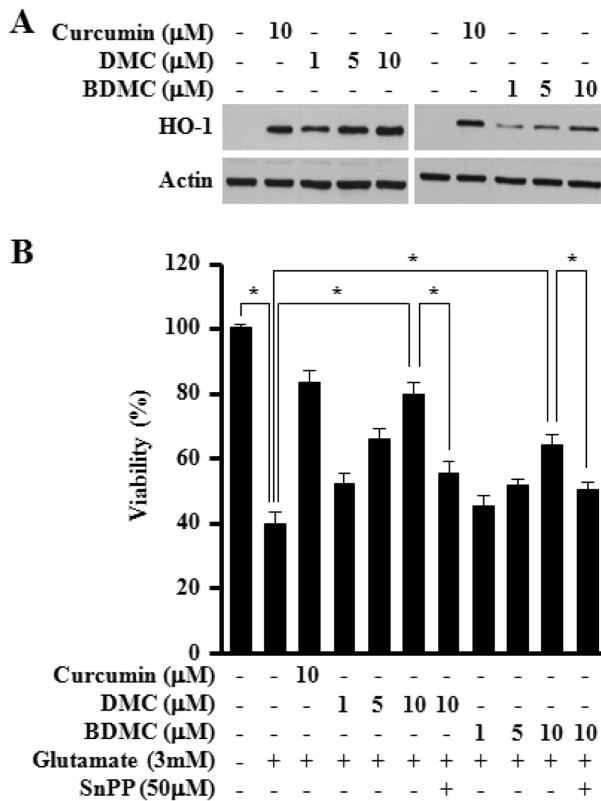


Fig. 3 – Effects of DMC and BDMC on HO-1 expression and glutamate-induced neurotoxicity. HT22 cells were pre-incubated for 6 h with each compound at indicated concentrations, and exposed for 18 h to 3 mM of glutamate in the absence or presence of 50 μM of SnPP. Western blotting analysis for HO-1 expression was carried out after 6 h pre-incubation (A) and cell viability was determined after 18 h exposure to glutamate (B). Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. * P <0.05 compared with each respective group.

있다. THC에서는 HO-1 발현 효과가 없고, curcumin, DMC 및 BDMC에서만 HO-1 발현 효과가 있는 것으로 보아, curcumin에 존재하는 α,β -unsaturated carbonyl group은 HO-1 발현에 중요한 요소라 판단된다. 그러나 α,β -unsaturated carbonyl group이 어떤 세포내 기전으로 HO-1 발현을 유도할 수 있는지 많은 연구가 필요하다. Surh 등은 α,β -unsaturated carbonyl group이 Nrf2-Keap1 복합체를 구성하는 Keap1의 특정 부위에 결합하여, Keap1의 입체적 모양을 변형시키고, 그 결과 Nrf2가 Keap1에서 분리되어 핵의 내부로 이동하여 HO-1 mRNA의 전사를 촉진할 수 있음을 보였다.¹⁷⁾

구조적으로 유사한 curcumin, DMC 및 BDMC에는 동일하게 α,β -unsaturated carbonyl group이 존재한다. 그러나 HO-1 발현 정도 및 세포보호 효과는 다소 차이가 있다. 이들 화합물의 화학 구조의 비교로부터 HO-1 발현 정도의 차이는 methoxy group의 개수 차이와 관련이 있음을 알 수 있을 것이다. 즉, methoxy

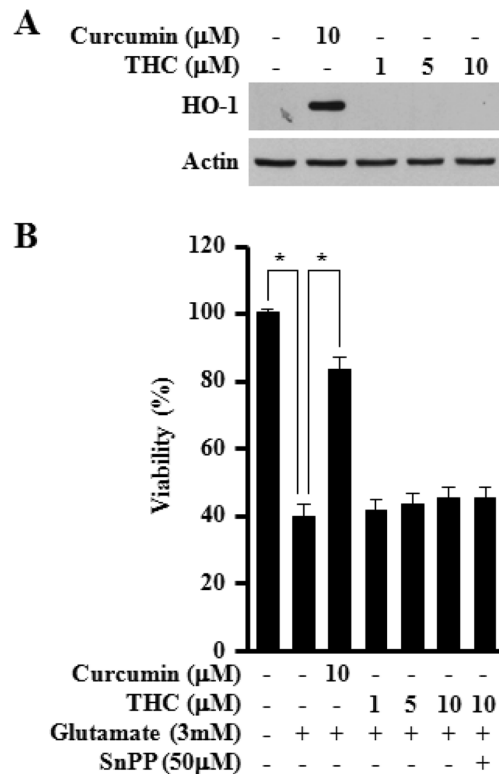


Fig. 4 – Effects of THC on HO-1 expression and glutamate-induced neurotoxicity. HT22 cells were pre-incubated for 6 h with THC at indicated concentrations, and exposed for 18 h to 3 mM of glutamate in the absence or presence of 50 μM of SnPP. Western blotting analysis for HO-1 expression was carried out after 6 h pre-incubation (A) and cell viability was determined after 18 h exposure to glutamate (B). Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. * P <0.05 compared with each respective group.

group의 수가 증가할수록 HO-1 발현 효과가 증가한다. 그러나 methoxy group 수가 증가할수록 HO-1 발현이 증가하는 이유에 대해서는 명확하지 않으며, 보다 많은 연구가 필요하다. Hsu와 Cheng은 curcumin 유도체의 methoxy group 개수가 많을수록 세포의 내부로 더 많이 유입될 수 있음을 보였다.¹⁸⁾

결론

본 연구는 HT22 신경세포에서 curcumin 유도체의 HO-1 발현 및 세포보호 효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다: 1) curcumin 유도체에 의한 HO-1 발현은 세포보호 효과와 관련이 있고, 2) curcumin 유도체에 존재하는 methoxy group의 개수가 많을수록 HO-1 발현 및 세포보호 효과가 크게 관찰되었으며, 3) curcumin 유도체에 존재하는 α,β -unsaturated carbonyl group은 HO-1 발현 및 세포보호 효과에 필수적인 인자로 확인되었다. 본 연구의 결과는 HO-1 발현을 목적으로 하는 신경세포보호 약물

의 개발에 사용될 수 있을 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단 중점연구소 지원 연구비(J03201)에 의해 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Ramassamy, C. : Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology* **545**, 51 (2006).
- Emerit, J., Edeas, M. and Bricaire, F. : Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **58**, 39 (2004).
- Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I. and Wozniak, L. A. : A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Current Medicinal Chemistry* **17**, 3262 (2010).
- Ryter, S. W., Alam, J. and Choi, A. M. : Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews* **86**, 583 (2006).
- Takeda, A., Itoyama, Y., Kimpara, T., Zhu, X., Avila, J., Dwyer, B. E., Perry, G. and Smith, M. A. : Heme catabolism and heme oxygenase in neurodegenerative disease. *Antioxidants & Redox Signaling* **6**, 888 (2004).
- Ansari, N., Khodaghali, F. and Amini, M. : 2-Ethoxy-4,5-diphenyl-1,3-oxazine-6-one activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death. *European Journal of Pharmacology* **658**, 84 (2011).
- Wang, H. Q., Sun, X. B., Xu, Y. X., Zhao, H., Zhu, Q. Y. and Zhu, C. Q. : Astaxanthin upregulates heme oxygenase-1 expression through ERK1/2 pathway and its protective effect against beta-amyloid-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Brain Research* **1360**, 159 (2010).
- Tanaka, A., Hamada, N., Fujita, Y., Itoh, T., Nozawa, Y., Inuma, M. and Ito, M. : A novel kavalactone derivative protects against H₂O₂-induced PC12 cell death via Nrf2/ARE activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18**, 3133 (2010).
- Lin, C. W., Wu, M. J., Liu, I. Y., Su, J. D. and Yen, J. H. : Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-driven HO-1 expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 4477 (2010).
- Jurenka, J. S. : Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review* **14**, 141 (2009).
- Rahman, I., Biswas, S. K. and Kirkham, P. A. : Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology* **72**, 1439 (2006).
- Lin, J. K., Pan, M. H. and Lin-Shiau, S. Y. : Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *Biofactors* **13**, 153 (2000).
- Behl, C. : Effects of glucocorticoids on oxidative stress-induced hippocampal cell death: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology* **33**, 689 (1998).
- Jeong, G. S., Oh, G. S., Pae, H. O., Jeong, S. O., Kim, Y. C., Shin, M. K., Seo, B. Y., Han, S. Y., Lee, H. S., Jeong, J. G., Koh, J. S. and Chung, H. T. : Comparative effects of curcuminoids on endothelial heme oxygenase-1 expression: ortho-methoxy groups are essential to enhance heme oxygenase activity and protection. *Experimental & Molecular Medicine* **38**, 393 (2006).
- Pae, H. O., Son, Y., Kim, N. H., Jeong, H. J., Chang, K. C. and Chung, H. T. : Role of heme oxygenase in preserving vascular bioactive NO. *Nitric Oxide* **23**, 251 (2010).
- Kelsey, N. A., Wilkins, H. M. and Linseman, D. A. : Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules* **15**, 7792 (2010).
- Surh, Y. J., Kundu, J. K. and Na, H. K. : Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Medica* **74**, 1526 (2008).
- Hsu, C. H. and Cheng, A. L. : Clinical studies with curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **595**, 471 (2007).