

Curcumin에 의한 혈관
평활근세포의 증식억제 기전규명

연세대학교 대학원
의 과 학 과
성 희 진

Curcumin에 의한 혈관
평활근세포의 증식억제 기전규명

연세대학교 대학원
의과학과
성희진

Curcumin에 의한 혈관
평활근세포의 증식억제 기전규명

지도 정 광 회 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2004 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

성 희 진

성희진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 정 광 회 인

심사위원 장 양 수 인

심사위원 안 용 호 인

연세대학교 대학원

2004 년 6 월 일

감사의 글

2002년 3월, 설렘과 두려움으로 시작한 대학원 생활이 이제야 끝을 내게 되었습니다. 2년 6개월이라는 짧지 않은 시간동안 힘들고 괴로운 일도 많았지만 항상 옆에서 지켜봐주던 많은 이들 덕분에 기쁘고 즐거운 일이 더 많았습니다. 부족한 점이 많은 논문이지만 대학원 생활의 결실이 된 학위 논문의 첫 장을 빌어 고마운 분들에게 감사의 뜻을 전하고자 합니다.

바쁘신 중에도 많이 모자란 저를 졸업까지 할 수 있도록 지도해 주신 정광희 지도교수님께 제일 먼저 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 친절하게 논문 심사를 맡아주신 장양수 교수님과 안용호 교수님과 옆에서 웃음으로 격려해주신 황기철 교수님께도 이 면을 통해 감사의 마음을 전합니다.

2년 반이라는 시간동안 항상 제 곁에 있어준 우리 심혈관 연구소 식구들에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 저의 무한한 호기심에 항상 웃으며 대답해주시며 저의 정신적 지주 역할을 해주신 손영덕 선생님과 지도교수님과 함께 저를 꼼꼼하게 지도해주신 홍성유 선생님, 같은 실험실에서 항상 웃어주시던 서정철 선생님과 짧은 시간이지만 같이 생활하면서 잘 챙겨주신 송희상 선생님께도 감사드립니다. 실험실 생활을 하면서 든든한 버팀목이 되어주었던 수정언니, 수현언니, 인학언니와 항상 같이 생활하면서 잘 웃어주며 기댈 수 있도록 옆에 있어준 소연언니, 멀리서나마 힘을 주던 상현오빠에게도 고맙다고 말하고 싶습니다.

지금은 많이 떨어져 있어 항상 볼 수 없는 사람들이지만 존재감만으로도 큰 힘이 되어주는 경혜언니, 진우언니, 보희와 옆에서 세심하게 신경 많이 써준 현수오빠와 항상 웃어주던 김일권 선생님께도 제 마음을 전하고 싶습니다.

전혀 다른 길을 가고 있지만 제가 하는 일을 이해하려고 노력해주고 많이 신경써준 미술학원 오빠들과 우리 여우발 식구들에게도 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 미술학원 원장님, 영운오빠와 항상 웃을 수 있도록 만들어주는 진오오빠와 세현오빠, 가끔씩 만나도 한결같은 진성오빠와 우리 모임의 막내이자 항상 이쁜 행동만 하는 귀여운 보라에게도 고맙다고 말하고 싶습니다. 조금의 동일성도 가

지지 않고도 잘 어울리며 막내라고 잘 챙겨준 수령언니와 시은언니, 미영언니 뿐만 아니라 상수오빠, 지훈오빠, 민수오빠, 성근오빠. 용기오빠, 덕규오빠와 그 외의 모든 여우발 식구들에게도 감사의 마음을 전하고자 합니다.

마지막으로 우리 동갑내기 친구들, 많은 해를 같이 보내며 같이 웃고 고민하던 여러 친구들에게도 옆에 있어줘서 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 초등학교 때부터 저를 알아왔던 정연이와, 그 친구를 생각하는 것만으로도 나에게 힘을 주는 단짝 친구 은진이, 대학생활을 하면서 동고동락을 같이 해온 혜영, 효정, 지은, 명숙이와 실험실 선배이면서 잘 챙겨주었던 새아에게도 고맙다는 말을 전하며, 지은이의 2세가 건강하게 잘 자랐으면 좋겠다는 바람도 전합니다.

우리 가족들, 짜증만 부리며 힘들다는 말만하는 못된 딸을 항상 사랑으로 감싸주는 엄마, 아빠께 이면을 빌어 언제나 감사하다고 그리고 사랑한다고 말하고 싶고 언니로서 제대로 챙겨주지 못했던 우리 집 막내 현진에게도 너무 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 끝으로 모든 이들이 건강하고 행복하게 살았으면 좋겠다는 제 바람도 여기에 적어봅니다.

2004년 6월 성희진

<차례>

그림 차례	IV
표 차례	VI
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 재료	6
2. 방법	6
가. 혈관 평활근세포의 분리 및 배양	6
나. 혈관 평활근세포의 부착 억제실험	7
다. 혈관 평활근세포의 증식 억제실험	7
라. Cytoskeleton staining 분석	8
마. 혈관 평활근세포 내 신호전달계 변화분석	8
(1) Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) 을 통한 c-myc의 변화관찰	8

(2) Immunoblot에 의한 p-ERK 및 p-MEK의 분석	9
바. DNA laddering을 통한 apoptosis 확인	10
사. Two-dimensional electrophoresis (2-DE)를 통한 발현 단백질의 변화분석	11
(1) 혈관 평활근세포의 2-DE	11
(2) Curcumin 유도성 변화 단백질의 in-gel digestion 및 질량분석	12
아. Curcumin-diglucoside (CDG)의 활성분석	12
III. 결과	14
1. 혈관 평활근세포의 부착 억제결과	14
2. 혈관 평활근세포의 증식 억제결과	14
3. Cytoskeleton staining 분석결과	17
4. 혈관 평활근세포 내 신호전달계 변화 분석결과	17
가. Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) 을 통한 c-myc의 변화관찰	17
나. Immunoblot에 의한 p-ERK 및 p-MEK의 분석	20
5. DNA laddering을 통한 apoptosis 확인	23

6. 2-DE를 통한 발현 단백질의 변화분석	25
가. 혈관 평활근세포의 2-DE	25
나. Curcumin 유도성 변화 단백질의 in-gel digestion 및 질량분석	29
7. Curcumin-diglucoside (CDG)의 활성분석	36
IV. 고찰	38
V. 결론	41
참고문헌	42
영문요약	45

그림 차례

그림 1. Curcumin의 구조	5
그림 2. Curcumin에 의한 혈관 평활근세포의 부착 억제 효과	15
그림 3. Curcumin에 의한 혈관 평활근세포의 성장 억제 효과	16
그림 4. Curcumin에 의한 혈관 평활근세포의 세포골격계 변화	18
그림 5. Curcumin에 의한 혈관 평활근세포에서의 mRNA 발현 저해효과	19
그림 6. Curcumin에 의한 ERK의 활성변화	21
그림 7. Curcumin에 의한 MEK의 활성변화	22
그림 8. Curcumin에 의한 DNA laddering 현상	24
그림 9. 혈관 평활근세포에서 curcumin 처리에 의한 2-DE pattern 비교	26
그림 10. Curcumin 처리 3시간 경과 후 대조군과 실험군 2-DE gel spot 분석 및 gel information	27

그림 11.	Curcumin 처리 24시간 경과 후 대조군과 실험군 2-DE gel spot 분석 및 gel information	28
그림 12.	Curcumin 3시간 처리한 gel에서 분리한 spot의 확대	30
그림 13.	Curcumin 24시간 처리한 gel에서 분리한 spot의 확대	31
그림 14.	Spot 1 단백질의 MALDI-TOF-MS 분석결과 spectrum 및 아미노산 서열	32
그림 15.	Spot 3 단백질의 MALDI-TOF-MS 분석결과 spectrum 및 아미노산 서열	33
그림 16.	Spot 5 단백질과 spot 6 단백질의 MALDI- TOF-MS 분석결과 spectrum 및 아미노산 서열	34
그림 17.	α -Glucosidase에 의한 CDG의 활성 분석	37

표 차례

표 1. MALDI-TOF-MS 분석에 의한 프로테옴 규명 ...35

국문 요약

Curcumin에 의한 혈관 평활근세포의 증식억제 기전규명

동맥경화나 혈관조형술 후의 혈관재협착(restenosis)은 혈관 평활근세포 및 염증세포의 활성화와 세포외 기질 (extracellular matrix; ECM) 단백질들의 비정상적인 축적에 의해 일어난다. 보통 혈관 내에서의 평활근세포는 혈관의 tone을 유지하기 위해 수축형 형질 (contractile form)로 존재하다가 혈관 내피세포 층의 손상으로 인하여 혈액에 노출되면 증식형 형질 (synthetic form)로 전환된다. 혈관 내피세포층의 손상으로 인하여 노출된 혈관 평활근세포는 각종 성장인자 및 ECM 단백질들과 접촉하여 세포 증식 및 이동의 자극을 받아 인체의 경우 재협착증이라는 질병과 함께 심하게는 혈관이 막히는 증상이 야기된다. 본 연구에서는 인도산 생강인 울금 (*Curcuma longa* L.)으로부터 추출된 polyphenol류인 curcumin을 혈관 평활근세포에 처리하여 curcumin에 의한 세포 증식억제 효과 및 그 작용 기전을 밝히고자 한다.

Curcumin을 처리한 세포내 골격 변화는 α -tubulin으로 염색한 세포를 형광현미경으로 관찰하였고 PDGF 자극에 의한 세포 증식억제와 연관된 세포 신호전달계의 변화는 western blotting과 RT-PCR을 통해 규명하였으며, apoptosis 유발여부는 DNA laddering을 통해 관찰하였다. 또한 two-dimensional electrophoresis (2-DE) 및 in-gel digestion, MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry)를 통해 세포내 단백질 변화 양상을 확인하였다.

그 결과, curcumin은 serum과 PDGF의 자극에 의한 혈관 평활근세포의 증식을 농도에 비례하여 억제하였으며, 세포주기를 G1에서 정지시킨 후 궁극적으로 세포를 apoptosis로 가게 만들었다. 또한 PDGF의 자극에 의한 *c-myc*의 mRNA 수준은 확연히 줄어드는 것을 확인할 수 있었으나,

고농도의 curcumin 처리 시 세포 수축이 일어남에도 불구하고 세포 내 골격변화는 없는 것으로 나타났다. Curcumin을 처리하였을 때 세포의 변화가 일어나기 시작하는 시점과 세포 수축이 일어나 부유하는 시점에서의 단백질발현 양상은 대조군과 비교해 보았을 때, 대사에 관련된 단백질의 종류나 양은 줄어들고, heat shock protein이나 stress protein의 경우는 증가한 것을 확인할 수 있었다.

이 논문에서는 쥐의 대동맥유래 혈관 평활근세포에서 curcumin에 의한 증식억제 기전과 apoptotic 효과, transduction signal과 유전자 및 단백질 발현 양상을 규명하였다. 또한 물에 용해되지 않는 curcumin에 두 개의 당 그룹을 붙여 수용성으로 만든 curcumin-diglucoside (CDG)의 활성화 및 혈관 평활근세포의 증식 억제효과도 함께 관찰하였다.

핵심 되는 말: 혈관 평활근세포, curcumin, 세포 부착 및 증식 억제, 세포내 신호전달, apoptosis, proteomics

Curcumin에 의한 혈관 평활근세포의 증식억제 기전규명

<지도교수 정 광 회>

연세대학교 대학원 의과학과

성 희 진

I. 서론

관상동맥 협착증의 치료를 위해 시행되는 관상동맥성형술 (PTCA : percutaneous transluminal coronary angioplasty)은 시술 환자의 약 30-40%에서 6개월 이내에 혈관 재협착(restenosis)이 유발된다는 문제점을 안고 있다. 혈관재협착이나 동맥경화는 혈관 평활근세포 및 염증세포의 활성화와 세포외 기질 (extracellular matrix: ECM) 단백질들의 비정상적인 축적에 의해 일어난다.^{1,2} 보통 혈관 내에서의 평활근세포는 혈관의 tone을 유지하기 위해 수축형 형질(contractile form)로 존재하다가 혈관 내피세포층의 손상으로 인하여 혈액에 노출이 되면 증식형 형질(synthetic form)로 전환된다. 혈관 내피세포층의 손상으로 인하여 노출된 혈관 평활근세포는 각종 성장인자 및 ECM 단백질과 접촉하여 세포 증식 및 이동의 자극을 받아 인체의 경우 재협착증이라는 부작용을 유발한다. 세포 신호전달은 cytoplasmic kinase의 활성화, 성장인자 수용체 및 이온 채널 (ion channel)등을 조절하여 직·간접적으로 세포 주기의 조절에 의한 세포의 증식, 사멸 및 분화 등에 광범위한 영향을 미친다고 알려져 있다.³

현대인에 있어서 심혈관질환의 발생증가가 식생활과 높은 연관성이 있다는 보고를 근거로 이들 질환에 대한 1차 예방 및 치료 효과를 입증하고자, 인체에 안전한 천연식물 소재의 유효성분을 섭취하여 항혈전 및 항동

맥경화 활성화에 대한 연구들이 활발하게 수행되고 있다.⁴ 예를 들어, 적색 포도주와 심혈관 질환의 상관관계,⁵ 동맥경화와 eicosapentaenoic acid (EPA) 및 docosahexaenoic acid (DHA)의 상관관계,⁶ 전통발효식품인 낱두와 혈전과의 상관관계,⁷ 녹차의 항혈전과 혈중 콜레스테롤 강하작용 및 항암효과,⁸ 청국장, 된장, 젓갈, 김치 등의 항혈전 연구 등이 보고 되었다.⁹

최근 새로운 천연식품 소재로 울금의 주성분인 curcumin이 여러 가지 질환에 대한 예방효과가 보고 되면서 주목받고 있다. 카레 및 염료의 주요 원료로 오랫동안 인도, 중국, 일본 등에서 약용식물로 사용되어온 생강과 식물인 울금(鬱金, 학명 *Curcuma longa* L.)은 다양한 생리활성을 나타낸다. 울금의 주 성분인 curcumin의 구조 (그림 1)와 효능에 대한 과학적 연구가 활발히 진행되면서 광범위한 질병에 대해 예방효과가 밝혀졌는데, 이 화합물의 주요한 약리작용으로는 항산화작용, 항혈전효과, 혈중 콜레스테롤 저하, 간에 과다 축적된 중성지방에 대한 분해 작용, 세포사멸에 의한 암세포의 성장과 전이 억제효과, 베타아밀로이드 형성을 억제할 통한 노인성치매 치료와 예방효과, 피부염증에 대해 항염증 기능 등이 보고 되고 있다. Curcumin에 대한 현재까지의 대부분의 연구는 위에 언급한 바와 같이 curcumin의 anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-cancer 기능에 의한 항암 및 항알츠하이머 등에 대한 효능에 초점을 맞추고 있다.^{10,11,12}

심혈관계 질환에 관련된 curcumin의 약리활성에 대한 연구는 일부 심혈관계 세포의 증식 억제효과 및 이와 연관된 세포 신호 전달계의 변화가 부분적으로 관찰된 바 있으나,^{13,14,15} 이에 관한 구체적인 작용기작에 대해서는 현재 거의 알려져 있지 않다.

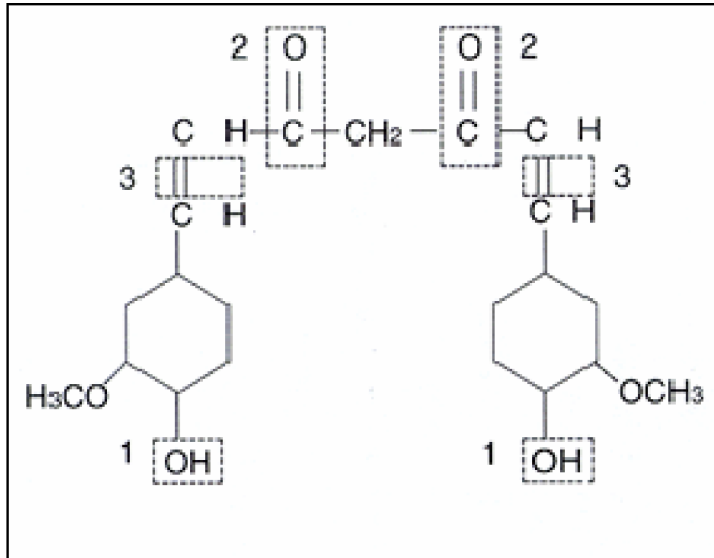


그림 1. Curcumin의 구조. 수산기(1)는 항산화 작용에 관여하고 케토 그룹(2)은 항염증작용, 항암작용, 항변이 작용에 관여하며, 이중결합(3)은 항염증작용, 항암작용, 항변이 작용에 관여한다.

본 연구에서는 심혈관계 질환, 특히 혈관재협착증 억제 약물로서의 curcumin의 가능성을 확인하고자 curcumin을 혈관 평활근세포에 처리하였을 때 세포의 증식, 부착, 이동 등에 미치는 효과를 조사하였다. 또한 이 curcumin의 세포내 작용 기작을 규명하고자 이 화합물에 의한 apoptosis의 유발 여부, 세포골격계의 변화, 세포 신호전달 체계의 변화 등을 western blotting, RT-PCR, 그리고 프로테오믹의 분석 등을 통해 관찰하였다.^{2,16,17}

II. 재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 세포는 Sprague-Dawley 흰쥐의 대동맥유래 평활근세포를 직접 분리하여 사용하였고, 세포 배양에 필요한 시약인 Dulbecco's modified Eagle' medium (DMEM), Phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS) 및 trypsin은 Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 실험에 쓰인 Tris-glycin gel은 Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고, Immobilon-P transfer membrane은 Millipore Co. (Bedford, MA, USA)에서, curcumin과 β -actin, α -tubulin monoclonal antibody는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하였다.

2-DE에 사용된 장비 및 시약 (13 cm IPG strips pH 3-10 non linear, sample grinding kit, strip holder, IPGphor, SE 600)은 Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였고, 모든 시약은 특급 및 일반시약을 사용하였다.

2. 방법

가. 혈관 평활근세포의 분리 및 배양

혈관 평활근세포는 Sprague-Dawley 흰쥐 (수컷, 10주령)의 대동맥을 Chamley-Campbell¹⁸등의 방법에 따라 직접 분리한 다음 serum-free DMEM (Invitrogen Co, Carlsbad, CA, USA)으로 옮기고 연결조직을 제거하였다. 분리해낸 대동맥을 1 mg/ml의 collagenase type 1과 0.5 mg/ml의

elastase을 포함한 DMEM으로 옮겨 37°C에서 30분간 처리하여 adventitia를 제거한 후 다시 같은 효소 혼합액에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 20,000rpm에서 3분간 원심분리한 뒤 100 units/ml의 penicillin, 100 µg/ml의 streptomycin (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS)을 포함한 DMEM으로 pellet을 재부유시켜 배양하였다.

나. 혈관 평활근세포의 부착 억제실험

혈관 평활근세포의 부착 억제실험을 위하여 trypsin처리로 떼어낸 세포를 0.2% FBS가 포함된 DMEM에 부유시킨 후 1.5 ml microtube에 분주하고, curcumin을 다양한 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 30분 동안 배양하였다. 96-well flat bottom plates에 40,000 cells/100 µl의 농도로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3시간동안 부착시킨 후 PBS로 2회 세척하여 미부착 세포들을 제거하였다. 3.7% formaldehyde로 고정시키고 crystal violet을 이용해 부착세포들을 염색한 다음, 96-well plate를 ELISA reader (Model 550, Bio-Rad, USA)에 넣고 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포 부착율을 계산하였다.

다. 혈관 평활근세포의 증식 억제실험

혈관 평활근세포를 5,000 cells/well의 농도로 10% FBS가 함유된 DMEM 배지 100 µl에 부유시켜 96-well flat bottom plates에 24시간동안 부착시킨 후 0.2% FBS가 포함된 DMEM 배양액에서 48시간 동안 serum을 고갈시켜 세포증식을 미리 억제시켜 놓았다. 그 다음, 5% FBS와 10 ng/ml의 platelet-derived growth factor (PDGF) (Upstate Group Inc, Charlottesville, VA, USA)가 함유된 DMEM으로 교체한 뒤 curcumin을 다양한 농도로 처리하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에

서 배양하였다. 배양이 끝난 후 succinate-tetrazolium reductase의 활성에 의한 생존세포의 측정시약인 Premix WST-1 cell proliferation assay kit (Takara Co, Otsu, Japan)를 이용하여 세포증식을 측정하였다.

라. Cytoskeleton staining 분석

혈관 평활근세포를 5,000 cells/well의 농도로 부착시킨 후 24시간 후 세포 배양액을 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 교체하고 50 μ M 및 100 μ M curcumin을 처리한 후 세포가 부유하는 시점까지 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포가 부유하기 시작하면 PBS로 세척한 후 3.7% formaldehyde로 고정시키고 0.1% Triton X-100으로 세포막에 구멍을 낸 뒤 2% BSA, 0.025% sodium azide를 이용하여 세포를 block시켰다.

α -tubulin monoclonal antibody를 넣고 30분에서 1시간 정도 반응시킨 후 0.2%(v/v) Tween-20을 포함한 phosphate buffered saline (PBS-t)로 세척하였다. 세척한 세포를 goat anti-mouse IgG (H+L) FITC antibody와 10 ng/ml diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 어두운 곳에서 염색한 뒤 다시 PBS-t로 세척한 후 cover slide로 덮고 세포가 붙어 있는 well을 형광현미경으로 관찰하였다.

마. 혈관 평활근세포 내 신호전달계 변화분석

(1) Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통한 *c-myc*의 변화관찰

혈관 평활근세포에서 PDGF에 의해 유도되는 proto-oncogene의 발현변화를 확인하기 위하여 PCR primer인 *c-myc*의 sense primer; gtcacgatgccctcaacgtg와 antisense primer; aagtccaagttctgtcagaaggaa를 화학 합성하였다. 혈관 평활근세포를 0.2% FBS가 포함된 DMEM 배양액

에서 48시간 배양하여 세포증식을 억제시켜 놓은 후, curcumin 50 μ M을 30분 동안 전 처리하고 PDGF 10 ng/ml을 30분 동안 처리하였다. 처리한 세포를 4°C에서 PBS로 세척한 후 Ultraspec II RNA isolation kit (Biotechx, Huston, TX, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 reverse transcription kit (Promega Co. Madison, WI, USA)를 이용하여 반응시킨 다음, 이 반응물을 template로 확인하고자 하는 유전자의 발현수준을 PCR을 통해 분석하였다. 이때 세포의 RNA양에 대한 대조군으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA에 대한 primer (sense: accacagtccatgccatcac, antisense: tccaccacctgttgctgta)를 이용하여 상대적인 양을 보정하였다.

(2) Immunoblot에 의한 p-ERK 및 p-MEK의 분석

Culture plate (100 mm)에서 50~60% 정도 증식한 혈관 평활근세포를 0.2% FBS가 포함된 DMEM 배양액에서 48시간 반응시켜 세포증식을 억제시켜 놓았다. 그 다음 5% FBS와 10 ng/ml PDGF 등의 성장인자 및 curcumin (50 μ M)이 함유된 DMEM으로 교체하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포는 4°C의 PBS로 세척하고 세포 lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM Na₂ EDTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃ VO₄, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF)에 넣어 얼음에서 15분 동안 파쇄 하였다. 4°C에서 13,000rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 BCA protein assay (Pierce Biotechnology Inc. Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질농도를 측정하였다. 획득한 단백질을 10~20% Tris-glycine gel에서 전기영동한 다음 methanol을 처리한 Immobilon-P transfer membrane (Millipore Co, Bedford, MA, USA)으로 전기 이동하였다. Membrane을 10% (w/v) skim milk (Difco, Spark, MD)를 포함한 PBS-t로 block시켜 비특이적 background를 없애고, blocking solution에

primary antibody (p-ERK, p-MEK, β -actin)를 넣어 붙여준 다음 PBS-t로 3회 세척하였다. Membrane을 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated secondary antibody로 45분 반응시킨 후, PBS-t로 세척하였다. 그 다음 enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 membrane을 현상하였다.

바. DNA laddering을 통한 apoptosis 확인

Culture plate (100 mm)에서 50~60% 정도 증식한 혈관 평활근세포를 0.2% FBS가 포함된 DMEM 배양액에서 48시간 반응시켜 세포증식을 억제시켜 놓았다. 그 다음 10% FBS가 함유된 DMEM으로 배양액을 교체한 후 실험군에 50 μ M 및 100 μ M curcumin을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 48시간 배양하였다. 배양 후 배지가 있는 상태에서 세포를 긁어모은 후 20,000 rpm에서 2분간 원심분리하고 4 $^{\circ}$ C에서 PBS로 1회 세척하였다. 이 상태에서 세포에 digestion buffer (100 mM NaCl, 100 mM Tri-HCl [pH 8.0], 25 mM EDTA [pH 8.0], 0.5% SDS, 0.2mg/ml proteinase K)를 넣고 50 $^{\circ}$ C에서 14~18시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 digestion buffer와 동량의 phenol을 넣고 흔든 후 4 $^{\circ}$ C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 microtube로 옮긴 후 상층액 부피의 1/2에 해당하는 양의 phenol과 상층액 부피와 동량의 chloroform을 넣어 다시 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층액에 동량의 chloroform을 넣고 원심분리한 후 여기서 얻은 상층액에 3M sodium acetate와 ethanol을 넣어 -20 $^{\circ}$ C에서 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 3차 증류수에 녹인 후 DNase-free RNase를 처리하고 1.5% agarose에 loading하여 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 조사로 관찰하였다.

사. Two-dimensional electrophoresis (2-DE)를 통한 발현 단백질의 변화분석

(1) 혈관 평활근세포의 2-DE

Culture plate (100 mm)에서 50~60% 정도 증식한 혈관 평활근세포를 0.2% FBS가 포함된 DMEM 배양액에서 48시간 반응시켜 세포증식을 억제시켜 놓았다. 그 다음 10% FBS가 함유된 DMEM으로 배양액을 교체한 후 대조군에는 0.05% DMSO를 첨가하고, 실험군에는 50 μ M curcumin을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 3, 24시간 배양하였다. 세포는 4 $^{\circ}$ C의 PBS로 1회 세척하고 extraction buffer (40 mM Tris-base, 8 M urea, 4% CHAPS, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF)를 넣은 다음 sample grinding kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ, USA)를 이용해 파쇄 하였다. Cell lysate를 4 $^{\circ}$ C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 BCA protein assay (Pierce Biotechnology Inc. Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질농도를 측정하였다. 획득한 단백질을 rehydration buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 2% v/v IPG buffer, a trace of bromophenol blue)와 섞어 strip holder (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ, USA)에 loading하였다.

완충용액과 단백질 혼합액이 loading 되어 있는 strip holder에 pH 3-10 non linear (NL) immobiline dry strip을 끼우고 그 위에 dry strip cover fluid를 첨가한 뒤 strip holder의 뚜껑을 닫고 immobilized pH gradient (IPG) phor에 넣은 후 12시간 동안 strip을 rehydration 시키고, 20,000 volt의 전기를 걸어주었다.

Strip을 꺼내 10 mg/ml DTT와 25 mg/ml iodoacetamide를 포함한 SDS-equilibrium buffer (0.5 M Tris-HCl [pH 8.8], 6 M urea, 30% w/v glycerol, 2% w/v SDS, a trace of bromophenol blue)에 넣어 각각 15분씩 두 단계의 equilibration step을 시행한 다음 12% sodium dodecyl

sulfate-polyacrylamide gel에 strip을 loading하여 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 colloidal solution (17% ammonium sulfate, 3% phosphoric acid, 0.1% coomassie brilliant blue G-250, 34% methanol)으로 염색한 후 증류수로 비특이적 염색을 제거하였다. 염색된 gel을 scan하여 2D 영상분석 시스템인 EasyPro-2D (BioBud Co. Ltd. Korea)를 통해 분석하였다.

(2) Curcumin 유도성 변화 단백질의 in-gel digestion 및 질량분석

염색된 gel을 scan하여 software를 통해 분석한 후 발현차이가 많이 나는 spot을 gel에서 분리하였다. 분리한 spot의 염색을 제거하기 위해 spot을 50% acetonitrile (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Missouri, USA)와 25 mM ammonium bicarbonate (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Missouri, USA) 혼합액에 넣고 37°C에서 교반하면서 반응시킨 후, spot의 염색이 완전히 제거되었을 때 100% acetonitrile에 넣고 37°C에서 교반하여 spot을 탈수시킨 뒤 Speed-vac. (MAXI Dry Lyo, 115V, Heto-Holten, Allerod, Denmark)을 이용해 완전히 건조시켰다. 탈수시켜 하얗게 변한 spot에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin을 넣고 얼음에서 30분 이상 보관하여 rehydration 시킨 뒤 37°C에서 교반하면서 16시간 반응시킨 용액을 Selfpack POROS 10 R2와 Oligo R3 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) 혼합 column으로 염을 제거하고 MALDI-TOF MS (Voyager-DE STR, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 질량 분석하였다.

아. Curcumin-diglucoside (CDG)의 활성분석

혈관 평활근세포를 5,000 cells/well의 농도로 10% FBS가 함유된 DMEM 배지 100 μl 에 부유시켜 96-well flat bottom plates에 24시간동

안 부착시킨 후 0.2% FBS가 포함된 DMEM 배양액에서 48시간 동안 serum을 고갈시켜 세포증식을 미리 억제시켜 놓았다. 그 다음, 5% FBS와 PDGF가 함유된 DMEM으로 교체한 뒤 curcumin과 CDG를 다양한 농도로 처리한 후 100℃에서 5분간 heat-inactivation한 α -glucosidase를 처리한다. 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양한 다음 succinate-tetrazolium reductase의 활성에 의한 생존세포의 측정시약인 Premix WST-1 cell proliferation assay kit (Takara Co, Otsu, Japan)를 이용하여 CDG의 세포증식 억제 및 α -glucosidase에 의한 CDG의 활성을 측정하였다.

III. 결과

1. 혈관 평활근세포의 부착 억제결과

혈관 평활근세포의 부착은 curcumin의 농도에 비례하여 저해됐으며, 부착 억제에 대한 IC₅₀ 값은 약 40 μ M로 확인되었다 (그림 2). Curcumin을 처리하지 않은 세포의 optical density (O. D.) 값을 기준으로 환산하였을 때 25 μ M과 50 μ M의 curcumin을 처리한 경우 각각 약 38%와 56%의 세포부착 억제효과를 보였다.

2. 혈관 평활근세포의 증식 억제결과

혈관 평활근세포에서 10ng/ml PDGF 자극에 의한 증식은 curcumin 농도에 비례하여 세포의 증식이 강하게 억제되었다 (그림 3). PDGF에 의한 세포증식 억제실험에서 IC₅₀값은 약 20 μ M이었으며, 이는 curcumin의 세포부착 억제 시 나타낸 IC₅₀ (40 μ M) 값보다 절반 정도 낮은 값이었다.

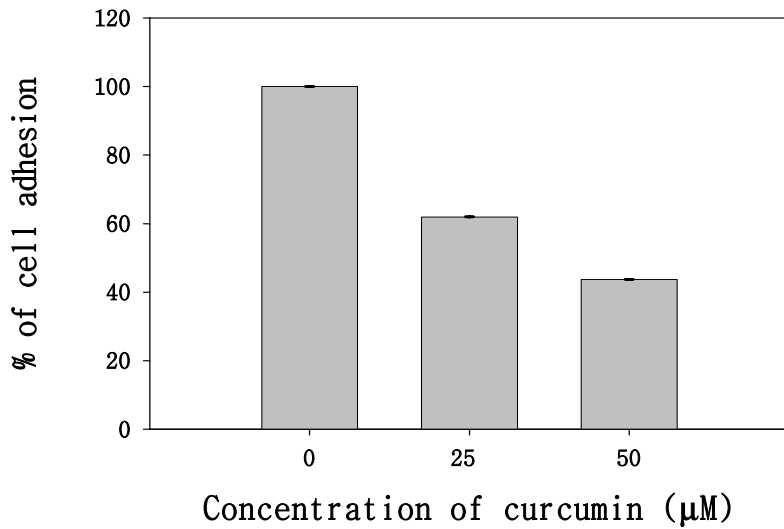


그림 2. Curcumin에 의한 혈관 평활근세포의 부착 억제효과. 가로축은 curcumin의 농도를 나타낸 것이며, 세로축은 cell adhesion의 O. D 값을 %로 전환하여 나타낸 것이다.

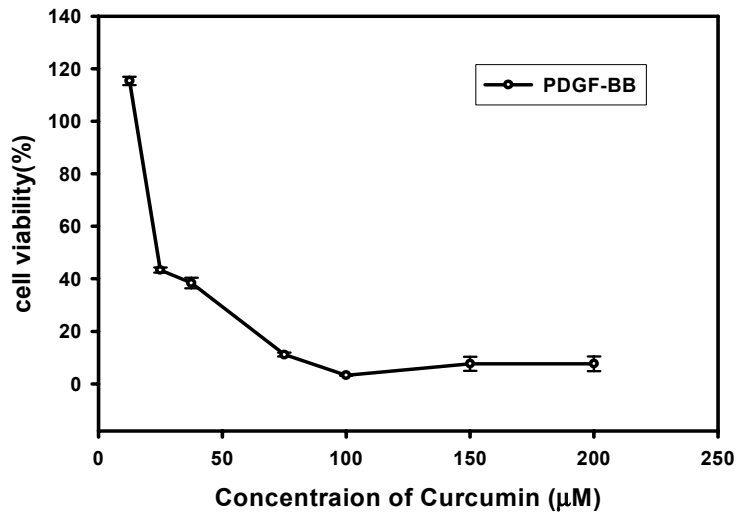


그림 3. Curcumin에 의한 혈관 평활근세포의 성장 억제 효과. 그래프의 세로축은 성장인자에 의한 세포성장을 percentage (%)로 나타낸 것이며, 10 ng/ml의 PDGF에 의해 유도된 성장은 curcumin 농도에 의존적으로 억제되었고 이 때의 IC_{50} 값은 약 20 μM 로 측정되었다.

3. Cytoskeleton staining 분석결과

혈관 평활근세포에 curcumin을 처리하면 시간이 지남에 따라 세포의 형태가 원형에 가까운 모습으로 변하는 것을 현미경을 통해 확인하였다. 세포가 수축할 때 세포골격계에 어떤 변화가 있는지를 알아보기 위하여 curcumin의 처리군과 비처리군의 α -tubulin 변화양상을 관찰하였고, 이에 대응하는 핵의 모습을 DAPI 염색을 통해 확인하였다. 그 결과 그림 4에서 보는 것과 같이 처리군에서의 세포골격계는 비처리군과 비교했을 때 변화가 거의 없음을 관찰하였다.

4. 혈관 평활근세포 내 신호전달계 변화 분석결과

가. Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통한 c-myc의 변화관찰

그림 4에서 보는 바와 같이 c-myc, GAPDH를 RT-PCR로 mRNA의 발현 양상을 분석해 본 결과 혈관 평활근세포에서 대조군 (0.2% FBS DMEM)과 비교했을 때 curcumin을 처리한 세포에서는 c-myc의 발현이 감소되는 것을 볼 수 있었다. 그림 5의 (가)에서 보는 바와 같이 GAPDH는 거의 동일한 발현양상을 보이는 데 반해, (나)에서는 대조군에 비해 10 ng/ml PDGF를 처리한 세포에서 c-myc의 발현이 증가하는 것을 볼 수 있으며, curcumin을 전 처리하고 10 ng/ml PDGF를 처리한 경우에는 c-myc의 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 curcumin이 ERK → c-myc을 통한 transcription pathway를 막아 세포의 성장을 억제하여 세포 주기를 멈추게 한다는 것을 보여주었다.

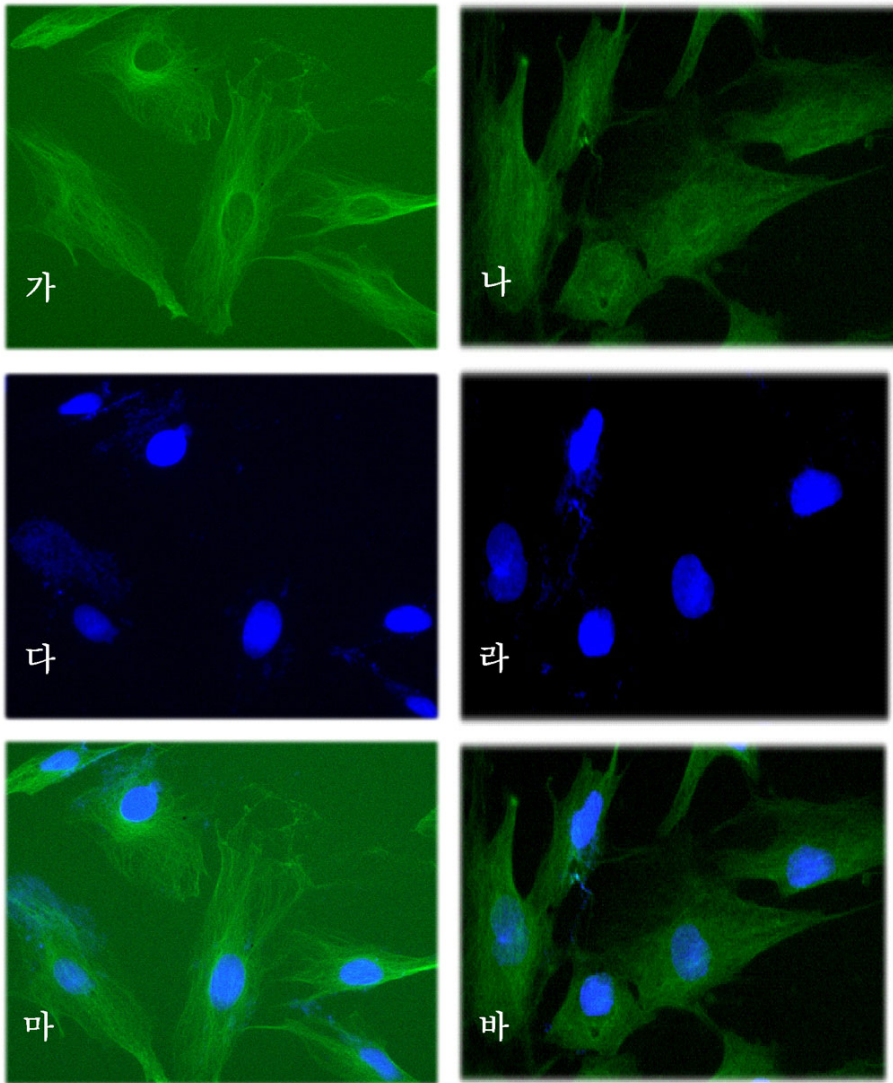


그림 4. Curcumin에 의한 혈관 평활근세포의 세포골격계 변화. 가)와 다), 마)는 대조군 세포의 α -tubulin과 핵, α -tubulin과 핵의 overlap 모습이고, 나)와 라) 및 바)는 100 μ M의 curcumin을 48시간 처리한 세포의 α -tubulin과 핵, α -tubulin과 핵의 overlap 모습이다. 대조군과 비교하였을 때 curcumin 처리군의 α -tubulin과 핵의 모습에 변화가 없음을 확인 할 수 있다.

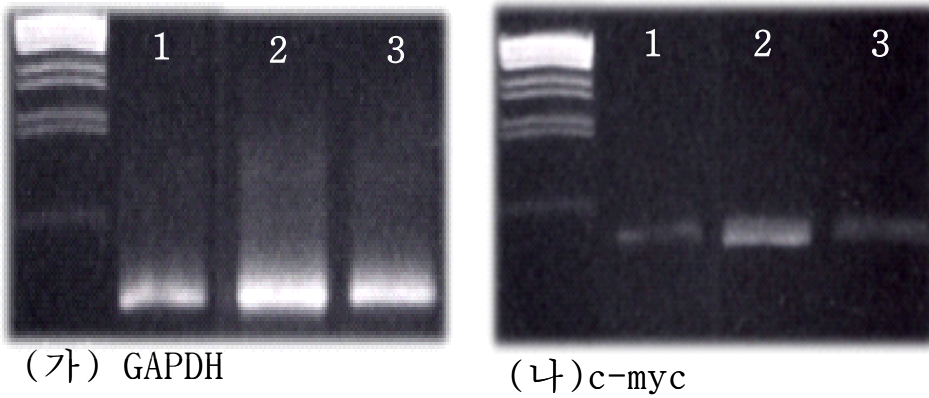


그림 5. Curcumin에 의한 혈관 평활근세포에서의 mRNA발현 저해효과. 1번 lane은 대조군이고, 2번 lane은 10 ng/ml PDGF를 처리한 군이며, 3번 lane은 50 μ M curcumin을 30분 전 처리한 후 10 ng/ml PDGF를 처리한 실험군이다. 그림에서 왼쪽 끝 lane은 λ /BstII DNA size marker를 나타낸다.

나. Immunoblot에 의한 p-ERK 및 p-MEK의 분석

Curcumin의 혈관 평활근세포에 대한 증식억제기작을 분석하기 위하여

western blotting을 시행하였다. Curcumin이 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 extracellular signal-regulated kinase (ERK)의 활성화와 세포성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 성장인자인 PDGF를 처리한 혈관 평활근세포에서 curcumin에 의한 MEK와 ERK의 인산화 반응변화를 비교하였다. 그 결과 curcumin을 처리하지 않은 군에서는 PDGF 자극에 의해 ERK와 MEK의 인산화가 유도되고 계속 유지되는 것을 확인할 수 있었으나, curcumin을 처리한 군에서는 시간이 경과함에 따라 ERK와 MEK의 인산화 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그림 6에서 보는 바와 같이 대조군에서 ERK의 인산화는 PDGF 처리 10분 후부터 증가해 24시간까지 계속 유지되는 반면에, 50 μ M curcumin을 처리한 군에서는 8시간부터 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있었다. MEK도 비슷한 결과를 나타내었는데 그림 7에서 보듯이, PDGF를 처리하고 15분 후부터 MEK의 인산화가 현저히 증가하였고, MEK의 인산화가 줄어든 후 대조군에서는 증식을 위해 2시간 후부터 MEK의 인산화가 증가하는 것에 비해 curcumin을 처리한 군에서는 계속 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

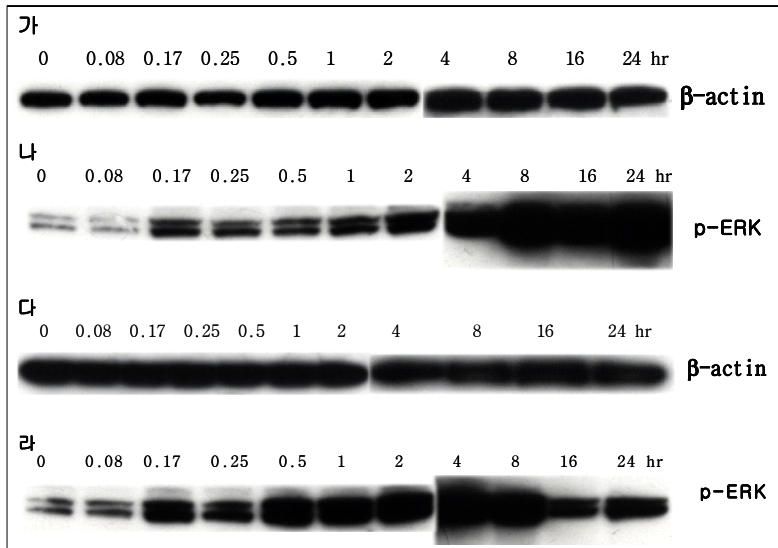


그림 6. Curcumin에 의한 ERK의 활성변화. 나)에서 보듯이 10ng/mlPDGF를 처리하여 세포를 자극시켰을 때 curcumin 비처리군에서 ERK의 인산화는 시간이 지남에 따라 증가하였고, 라)에 나타난 것처럼 50 μ M curcumin 처리군은 ERK의 인산화가 증가하였다가 감소하였다. 가)와 다)는 나)과 라)에 해당하는 시료의 β -actin을 control로 보여주는 결과이다.

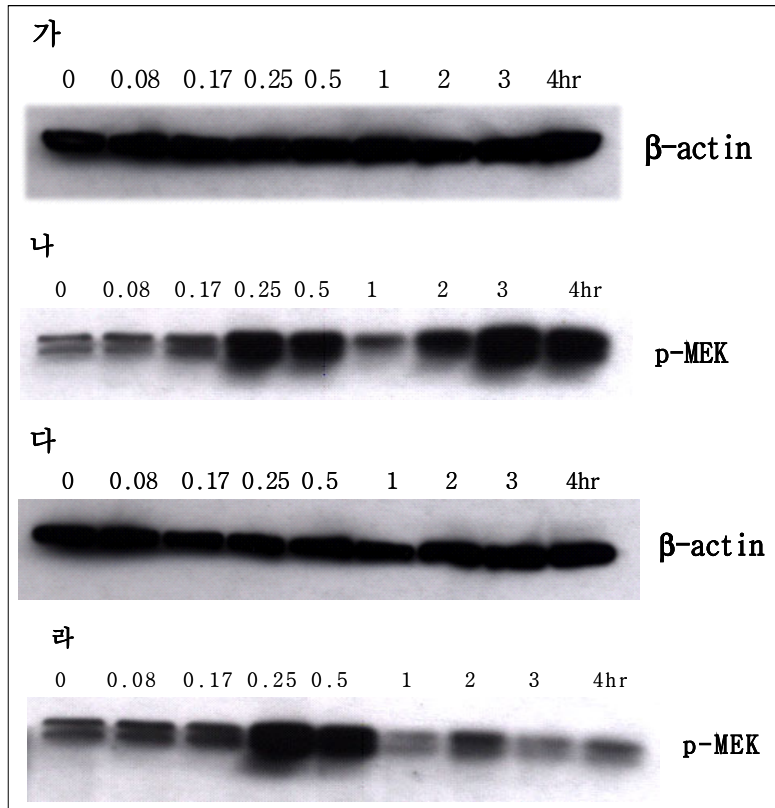


그림 7. Curcumin에 의한 MEK의 활성변화. Curcumin 비처리군에서 MEK의 인산화는 PDGF 처리 후부터 증가하였고 (나), 50 μ M curcumin을 전 처리하고 10ng/ml PDGF로 자극시킨 실험군에서는 MEK의 인산화가 증가되었다가 감소되는 것을 확인하였다 (라). (가)와 (다)는 (나)과 (라)에 해당하는 시료의 β -actin을 control로 보여 주는 결과이다.

5. DNA laddering을 통한 apoptosis 확인

특별한 조각의 pattern으로 잘라지는 DNA degradation은 apoptosis의 대표적인 특징이며, 이 현상은 agarose gel 전기영동을 통하여 약 200 base pairs까지의 multimer로 이루어진 DNA ladder로 보인다.² DNA fragmentation은 일정한 간격의 DNA 절단으로 특징적이며, necrosis에 의한 random fragmentation과 정반대의 결과이다. 혈관 평활근세포에 100 μM 의 curcumin을 처리하고 48시간 후에 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 agarose gel 전기영동을 한 결과, 그림 8에서 보듯이 DNA ladder는 ethidium bromide-stained gel에 의해 확인되었다. 이와 대조적으로 curcumin을 처리하지 않은 2번과 4번 lane의 DNA는 fragmentation patten를 보이지 않았고, 50 μM 의 curcumin을 처리한 3번 lane은 100 μM 의 curcumin을 처리한 5번 lane보다는 DNA fragmentation이 덜 진행되었음을 확인할 수 있었다.

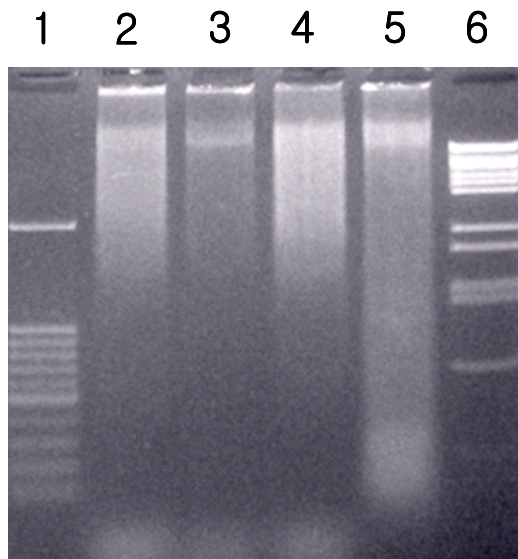


그림 8. Curcumin에 의한 DNA laddering 현상. 혈관 평활근세포에 50 μM , 100 μM 의 curcumin을 48시간동안 처리한 후 genomic DNA를 분리해 DNA의 fragmentation을 확인하였다. 1번 lane은 100bp size marker이며, 6번 lane은 λBstII size marker를 나타낸다. 3번과 5번 lane은 50 μM , 100 μM 의 curcumin을 48시간 처리한 군이며, 2번과 4번 lane은 각각에 대한 대조군이다.

6. 2-DE를 통한 발현 단백질의 변화분석

가. 혈관 평활근세포의 2-DE

혈관 평활근세포에 curcumin을 처리하였을 때 세포 내에서 발현되는 단백질의 변화를 보기 위하여 2-DE를 실시하였다. 그림 9는 2-DE를 실시하고 난 후 coomassie brilliant blue G-250으로 염색한 gel 사진이며, 나)와 라)는 curcumin을 3시간과 24시간 처리한 사진이며 가)와 다)는 각각에 대한 대조군 사진이다. 그림에서 가로축은 isoelectric focusing (IEF)을 나타내고, 세로축은 SDS-PAGE를 나타낸다. 그림 10과 11은 curcumin을 3시간과 24시간 처리한 시료를 각각 EasyPro-2D software (BioBud, Co. Ltd.)를 이용해 gel을 분석한 자료이며, gel information에 total spot 개수와 일치된 spot 개수 등이 나타나 있다. 그림에서 reference gel의 주황색 테두리는 land marker를 나타내고, 노란색은 land marker를 제외한 나머지 spot을 나타내며, sample gel의 주황색 테두리는 역시 land marker를 나타내고, 파랑색은 reference gel의 spot과 matched spot을, 초록색은 unmatched spot을 나타내었다. 대조군과 비교했을 때 curcumin을 오래 처리한 gel에서는 spot의 개수가 줄어든 것을 확인할 수가 있었고, 대조군에 비해 면적이 2배 이상 줄어들거나 늘어난 spot도 software 분석을 통해 확인할 수 있었다.

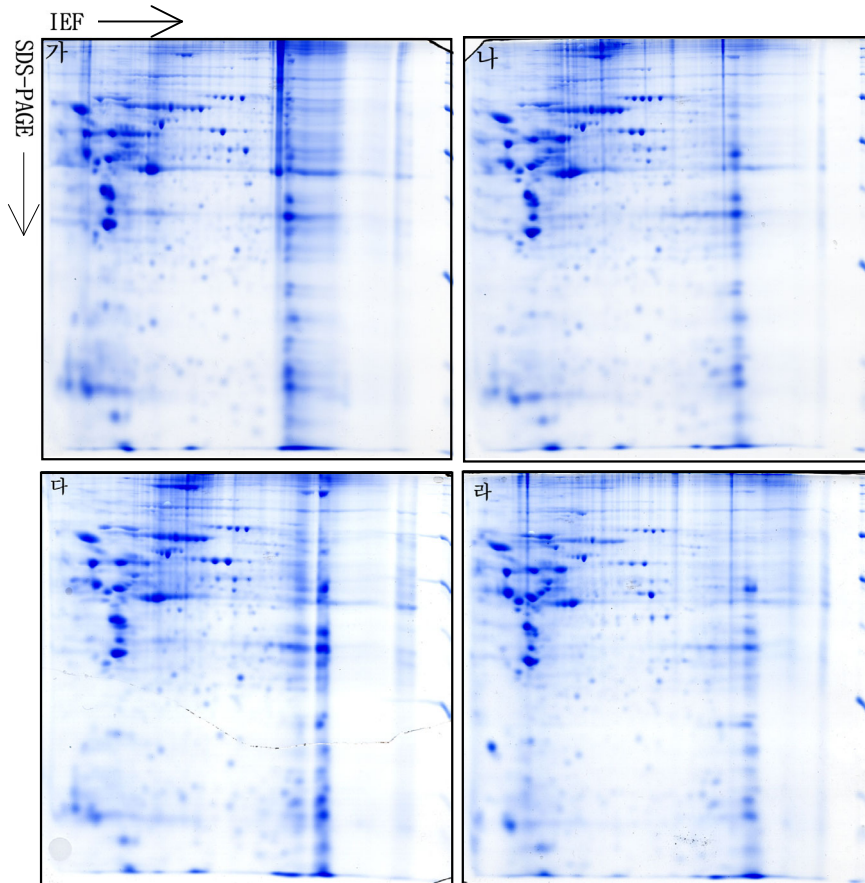
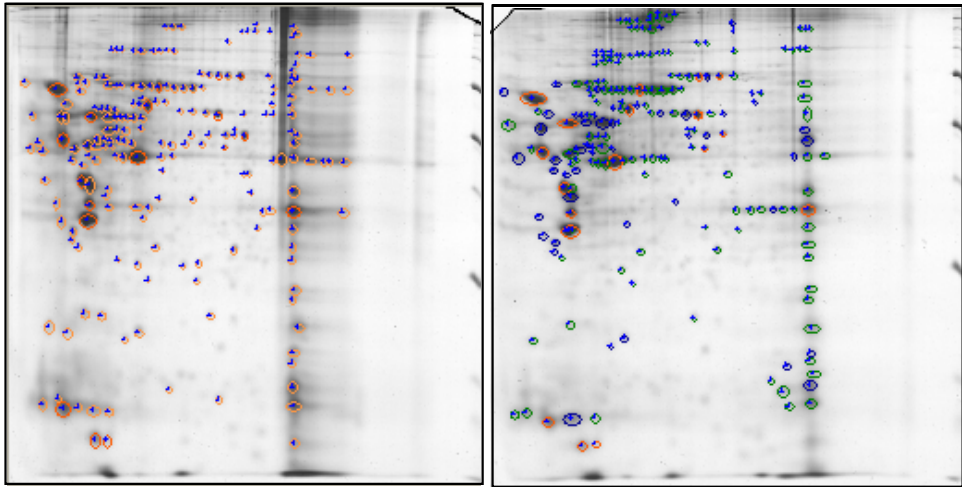


그림 9. 혈관 평활근세포에서 curcumin 처리에 의한 2-DE pattern 비교. 가)와 다)는 3시간과 24시간에 대한 대조군이고, 나)와 라)는 50 μ M curcumin을 처리하고 3시간과 24시간 후에 모은 sample이다. 그림에서 가로축은 IEF를 나타낸 것이고, 세로축은 SDS-PAGE를 나타냈다.



Gel Information Viewer

Sample Number: [Reference Gel]

File Name: CTL 3hr BW.tif

Image Width: 1024 pixel

Image Height: 1039 pixel

Total Spot Number: 205

Matched Spot Number: 205

Gel Information Viewer

Sample Number: [Sample 1]

File Name: Cur. 50uM 3hr BW.tif

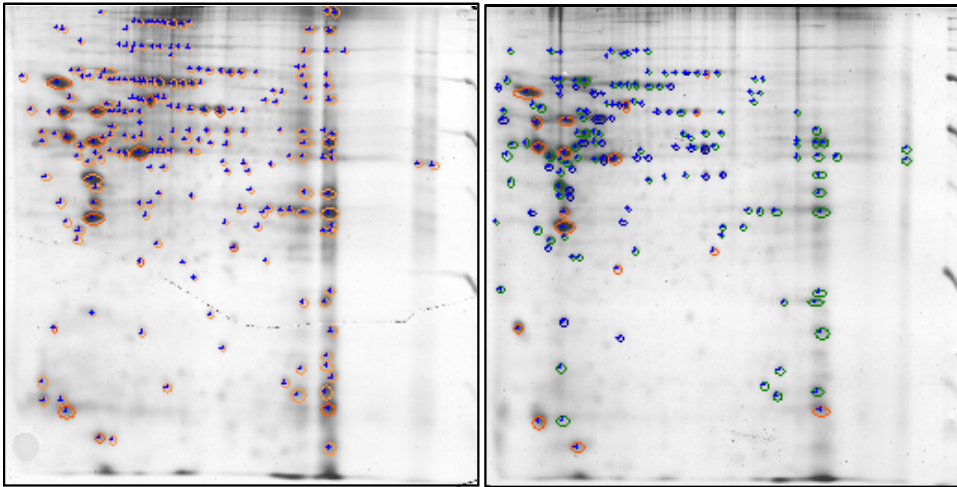
Image Width: 1024 pixel

Image Height: 1040 pixel

Total Spot Number: 205

Matched Spot Number: 74

그림 10. Curcumin 처리 3시간 경과 후 대조군과 실험군 2-DE gel spot 분석 및 gel information. Reference gel의 주황색과 노란색 테두리는 각각 landmark와 landmark를 제외한 나머지 spot을 나타내며, sample gel의 주황색 테두리는 land marker, 파랑색과 초록색 테두리는 reference gel과 matched spot 및 unmatched spot을 나타내었다.



Gel Information Viewer	
Sample Number:	[Reference Gel]
File Name:	CTL 24hr BW.tif
Image Width:	1024 pixel
Image Height:	1043 pixel
Total Spot Number:	214
Matched Spot Number:	214

Gel Information Viewer	
Sample Number:	[Sample 1]
File Name:	Cur. 50uM 24hr BW.tif
Image Width:	1024 pixel
Image Height:	1031 pixel
Total Spot Number:	160
Matched Spot Number:	65

그림 11. Curcumin 처리 24시간 경과 후 대조군과 실험군 2-DE gel spot 분석 및 gel information. Reference gel의 주황색과 노란색 테두리는 각각 land marker와 land marker를 제외한 나머지 spot을 나타내며, sample gel의 주황색 테두리는 land marker, 파랑색과 초록색 테두리는 reference gel과 matched spot 및 unmatched spot을 나타내었다.

나. Curcumin 유도성 변화 단백질의 in-gel digestion 및 질량분석

EasyPro-2D를 통해 gel을 분석한 결과는 그림 10, 11과 같으며 이를 바탕으로 대조군과 실험군에서 2배 이상 차이가 나는 spot을 분리하여, in-gel digestion 및 MALDI-TOF MS 분석을 실시하였다. 그림 12의 spot number 1과 2는 curcumin 3시간 처리 시 대조군에 비해 2배 이상 줄어든 spot이며, 3은 2배 이상 늘어난 spot이다. 그림 13의 spot number 4와 5는 curcumin 24시간 처리 시 대조군에 비해 2배 이상 줄어든 spot이며, 6은 2배 이상 늘어난 spot이다. 그림 14, 15, 16은 그림 12와 13의 spot을 동정한 MALDI-TOF MS 분석 결과로 각 spot의 spectrum과 match된 단백질의 sequence를 나타낸 것이고 밑줄 친 굵은 sequence는 단백질 고유 sequence와 spot sequence가 match되는 sequence를 나타내며, 표 1은 그림 14, 15, 16의 결과를 토대로 data base에서 검색한 단백질을 총괄적으로 나타낸 것이다. Spot을 동정한 결과 annexin V나 대사에 관련된 amylase는 현저히 줄어든 것을 관찰할 수 있었고, keratin 관련 단백질인 vimentin이나 calcium signal 관련 단백질인 caldendrin은 증가한 것을 관찰할 수 있었다.

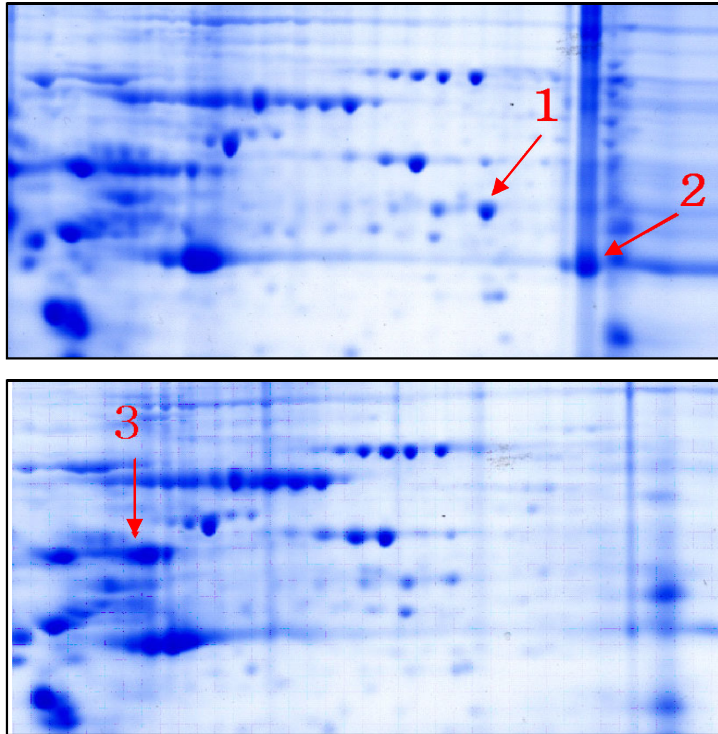


그림 12. Curcumin 3시간 처리한 gel에서 분리한 spot의 확대. 위의 그림은 curcumin을 처리하지 않은 시료의 gel이고 아래 그림은 50 μ M curcumin을 3시간 처리한 gel의 부분 확대사진이다.

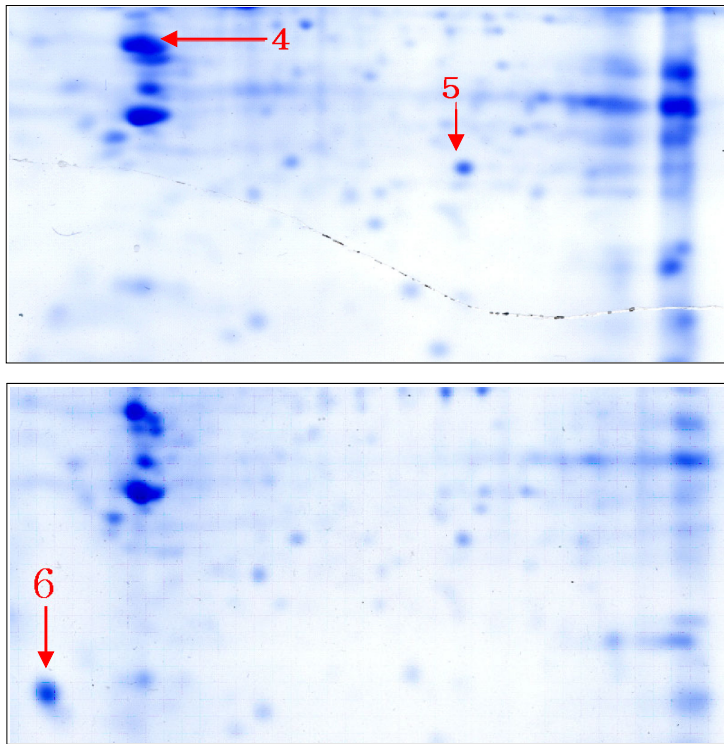
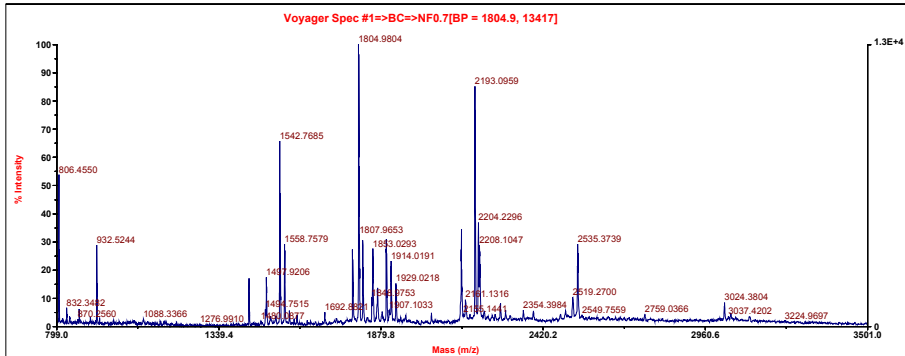


그림 13. Curcumin 24시간 처리한 gel에서 분리한 spot의 확대. 위의 그림은 curcumin을 처리하지 않은 시료의 gel이고 아래 그림은 50 μ M curcumin을 24시간 처리한 gel의 부분 확대사진이다.

1 (A)

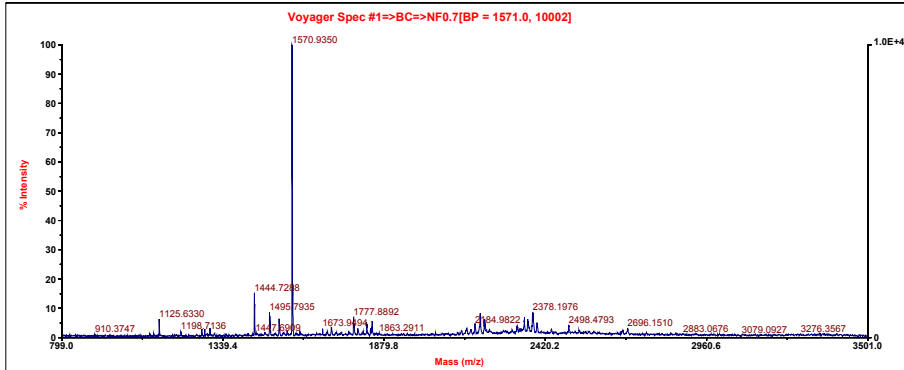


1 (B)

1 GECCSGTESR SRLSLRLPSV SPGPSFLPPQ RSYCQNFTMS ILKIHAREIF
 51 DSRGNPTVEV DLYTAKGLFR AAVPSGASTGIYEALERDNDKTRFMGKGV
 101 SKAVEHINKT IAPALVSKKL NVVEQEKIDQLMIEMDGTENKSKFGANAIL
 151 GVSLAVCKAG AVEKGVPLYR HIADLAGNPE VILPVPAFNV INGGSHAGNK
 201 LAMQEFMILPVGASSFREAM RIGAEVYHNL KNVIKEKYGK DATNVGDEGG
 251 FAPNILENKE ALELLKSAIA KAGYTDQVVIGMDVAASEFYRAGKYDLDFK
 301 SPDDASRYITPDQLADLYKS FIKDYPVVSIEDPFDQDDWD AWQKFTATAG
 351 IQVVGDDLTVTNPKRIAKAA GEKSCNLLL KVNQIGSVTE SLQACKLAQS
 401 NGWGVMSHRSGETEDTFIA DLVVGLCTGQ IKTGAPCRSE RLAKYNQILR
 451 IEEELGSKAK FAGRSFRNPLAK

그림 14. Spot 1 단백질의 MALDI-TOF-MS 분석결과 spectrum 및 아미노산 서열. (A)은 spot의 spectrum 결과이고, (B)는 아미노산 서열의 결과이다. (B)에서 밑줄 친 굵은 글씨는 protein 고유의 아미노산 서열과 spot의 서열 중 일치하는 서열을 나타내며, 분석결과 Enolase 1 단백질의 internal sequence임을 알 수 있다.

3 (A)

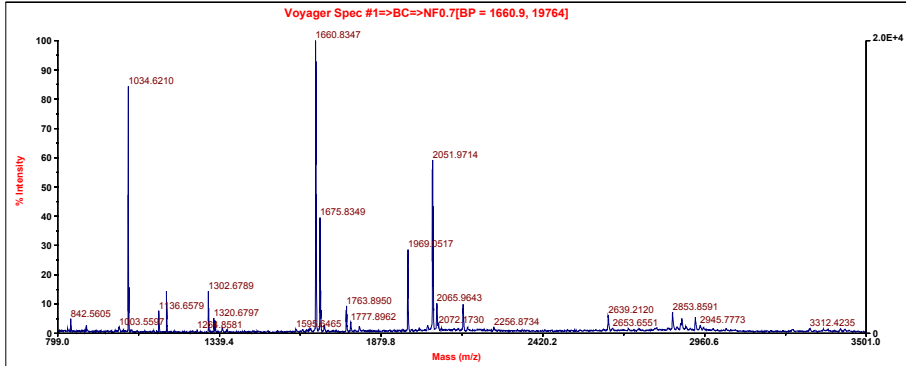


3 (B)

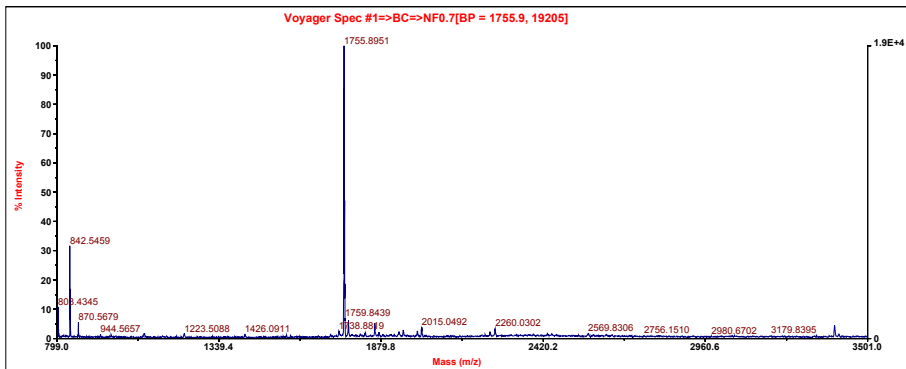
1 MSTRSVSSSS YRRMFGGSGT SSRPSSNRSY VTTSTRTYSLGSALRPSTSR
 51 SLYSSSPGGAYVTRSSAVRL RSSMPGVRL QDSVDFSLAD AINTEFKNTR
 101 TNEKVELQEL NDRFANYIDKVRFLEQQNKI LLAELEQLKG QGKSRLGDLY
 151 EEEMRELRRQ VDQLTNDKAR VEVERDNLAEDIMRLREKLQ EEMLQREEAE
 201 STLQSFQRDV DNASLARLDL ERKVESLQEE IAFLKKLHDE EIQLQAQIQ
 251 EQHVQIDVDV SKPDLTAALR DVRQQYESVA AKNLQEAEW YKSKFADLSE
 301 AANRNDALRQAKQESNEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL ERQMREMEEN
 351 FALEAANYQD TIGRLQDEIQ NMKEEMARHLREYQDLLNVKMALDIEIATY
 401 RKLLEGEESR ISLPLPNFSSLNLRETNLESLPLVDTHSKRLLIKTVETR
 451 DGQVINETSQ HHDDLE

그림 15. Spot 3 단백질의 MALDI-TOF-MS 분석결과 spectrum 및 아미노산 서열. (A)은 spot의 spectrum 결과이고, (B)는 아미노산 서열의 결과이다. (B)에서 밑줄 친 굵은 글씨는 protein 고유의 아미노산 서열과 spot의 서열 중 일치하는 서열을 나타내며, 분석결과 Vimentin 단백질의 internal sequence임을 알 수 있다.

5 (A)



6 (A)



6 (B)

1 MGNCVKSP~~LR~~ NLSRKMRQEE KTSYMAVQTS EDGLADGGEL PGPLMMLAQN
 51 CAVMHNLLGP ACIFLRKGF~~A~~ ENRQPDR~~SLRPEEIEELREAFRE~~FDKDKDG
 101 YINCRDLGNC MRTMGYPTE MELIELSQQI NMNLGGHVDF DDFVELMGPK
 151 LLAETADMIG VKELR~~DAFREFD~~TNGDGEISTSELREAMRK LLGHQVGH~~RD~~
 201 IEEIIRDVDL NGDGRVDFEE FVRMMSR

그림 16. Spot 5 단백질과 spot 6 단백질의 MALDI-TOF-MS 분석결과 spectrum 및 아미노산 서열. 5 (A)와 6 (A)은 각 spot의 spectrum 결과이고, 6 (B)은 아미노산 서열의 결과이다. 6 (B)에서 밑줄 친 굵은 글씨는 protein 고유의 아미노산 서열과 spot의 서열 중 일치하는 서열을 나타내며, 분석결과 Caldendrin 단백질의 internal sequence임을 알 수 있다.

표 1. MALDI-TOF MS 분석에 의한 프로테옴 규명

Spot number	M. W (kDa)	pI	Protein I. D	Assession #	Sequence coverage (%)	Protein function
1	51.20	6.70	Eno1 protein	AAH63174	28	Glycolysis pathway
3	53.70	5.06	vimentin	S22119	23	Cytoskeletal keratin
5	35.88	5.20	Recombinant Rat Annexin V, Quadruple Mutant	1BC1	18	Anti-inflammatory protein
6	25.90	4.77	Caldendrin, isoform S2	CAC42417	15	Calmodulin-like protein

7. Curcumin-diglucoside (CDG)의 활성분석

불용성인 curcumin에 2개의 당그룹을 붙여 수용화한 CDG를 가지고 혈관 평활근세포의 증식억제 기작을 실험 해 본 결과, CDG 자체만으로는 혈관 평활근세포에 영향을 주지 않았지만, α -glucosidase를 처리하여 curcumin으로 전환시켰을 때에는, 혈관 평활근세포의 증식을 억제하였다.

그림 17에서 보듯이 CDG 자체만으로는 증식억제를 전혀 하지 않았지만, 35 units의 α -glucosidase를 30분간 전 처리하여 첨가한 경우에는 curcumin과 비슷한 활성을 보이며 혈관 평활근세포의 증식을 억제하였다.

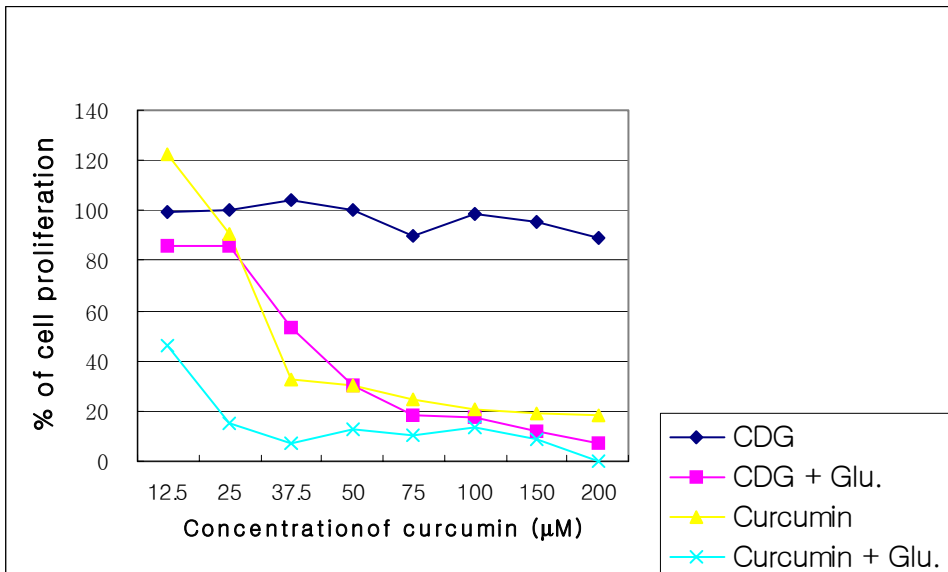


그림 17. α -Glucosidase에 의한 CDG의 활성 분석.

IV. 고찰

동맥경화나 혈관성형술 후에 나타나는 혈관 재협착증 (restenosis)은 혈관 평활근세포 및 염증세포의 활성화와 extracellular matrix (ECM) 단백질들의 비정상적인 축적에 의해 일어난다.² 보통 혈관 내에서의 평활근세포는 혈관의 tone을 유지하기 위해 수축형 형질(contractile form)로 존재하다가 혈관 내피세포층의 손상으로 인하여 혈액에 노출이 되면 증식형 형질(synthetic form)로 전환된다. 혈관 내피세포층의 손상으로 인하여 노출된 혈관 평활근세포는 각종 성장인자 및 extracellular matrix(ECM) 단백질과 접촉하여 세포 증식 및 이동의 자극을 받아 인체의 경우 재협착증이라는 질병과 함께 심하게는 혈관이 막히는 증상이 야기된다. 그러므로 anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-proliferation 기능이 알려져 있는 curcumin은 동맥경화와 재협착증의 치료에 매우 효과적일 것이며⁹, 본 연구에서는 curcumin에 의한 혈관 평활근세포의 부착, 증식 및 이동 억제 효과를 보기위하여 WST에 의한 세포생존을 측정 및 RT-PCR, western blotting등을 실시하였고, apoptosis 유발 여부를 관찰하기 위하여 DNA laddering을 관찰하였다.

Curcumin은 serum과 PDGF 에 의해 유도된 mitogenesis를 억제한다고 보고 되어 있으며², 본 실험에서는 5% FBS를 함유한 배지와 PDGF 자극에 대한 반응을 이용하여 실험하였다. 혈관 평활근세포의 부착은 curcumin의 농도에 비례하여 저해하였으며 혈관 평활근세포 증식의 경우도 curcumin 농도에 비례하여 억제되었다 (그림 2). PDGF 자극에 대한 c-myc의 발현 양상을 RT-PCR로 분석해 본 결과, 혈관 평활근세포에서 대조군과 비교했을 때 curcumin을 처리한 세포에서는 c-myc의 발현이 감소되는 것을 볼 수 있었다. 이는 curcumin이 ERK에서 c-myc으로 통하는 transcription pathway를 막아 세포의 성장을 억제하여 세포 주기를 G₁ stage에서 멈추게 한다는 것을 확인한 새로운 결과이다. 이와 관련하여 curcumin이 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와

extracellular signal-regulated kinase (ERK)의 활성화와 세포성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 성장인자인 PDGF를 처리한 혈관 평활근세포에서 curcumin에 의한 MEK와 ERK의 인산화 반응변화를 비교하였다.

그 결과 curcumin을 처리하지 않은 군에서는 PDGF 자극에 의해 ERK와 MEK의 인산화가 유도되고 계속 유지되는 것을 확인할 수 있었으나, curcumin을 처리한 군에서는 시간이 경과함에 따라 ERK와 MEK의 인산화 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Curcumin이 세포의 성장을 억제하여 세포 주기를 멈추게 하고 결국에는 apoptosis로 이어지게 만든다는 것을 선행연구인 caspase-3 activity와 annexin V-fluorescein isothiocyanate staining을 통해 확인하였고, DNA laddering을 통해 다시 한 번 입증하였다. 특별한 조각의 pattern으로 잘라지는 DNA degradation은 apoptosis의 대표적인 특징이며, 이 현상은 agarose gel 전기영동을 통하여 약 200 base pairs까지의 multimer로 이루어진 DNA ladder로 보인다. DNA fragmentation은 일정한 간격의 DNA 절단으로 특징적이며, necrosis에 의한 random fragmentation과 정반대의 결과이다. 혈관 평활근세포에 100 μ M의 curcumin을 처리하고 48시간 후에 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 agarose gel 전기영동을 한 결과 DNA fragmentation을 확인할 수 있었다.

혈관 평활근세포에 curcumin을 처리하면 시간이 지남에 따라 세포의 형태가 원형에 가까운 모습으로 변하는 것을 현미경을 통해 확인하였다. 세포가 수축할 때 세포골격계의 알아보기 위하여 curcumin 처리군과 비처리군의 α -tubulin 변화양상을 관찰하였고, 비처리군과 비교했을 때 처리군에서의 세포골격계의 변화는 거의 없음을 관찰하였다. 혈관 평활근세포에 curcumin을 처리하였을 때 세포내에서 발현되는 단백질의 변화를 보기 위하여 two dimensional electrophoresis (2-DE)를 실시하였다. EasyPro-2D를 통해 gel을 분석한 결과 curcumin처리 3시간 경과후의 sample은 처리하지 않은 sample과 비교해 보았을 때, 전체 spot의 수가 확연하게 차이 나지 않는 것을 확인하였으나, curcumin처리 24시간 경과

후의 sample은 처리하지 않은 sample에 비해 spot의 수가 많이 줄어든 것을 확인 할 수 있었고, 이는 curcumin 처리에 의해 발현되는 단백질이 줄어든다고 해석할 수 있었다. 두 set의 gel에서 발현양이 2배 이상 차이나는 spot을 분리하여, in-gel digestion 및 MALDI-TOF MS 분석을 실시한 결과 annexin V나 대사에 관련된 amylase가 현저히 줄어든 것을 관찰할 수 있었고, keratin 관련 단백질인 vimentin이나 calcium signal 관련 단백질인 caldendrin은 늘어나는 것을 관찰할 수 있었다.

마지막으로 불용성인 curcumin에 2개의 당그룹을 붙여 만든 수용성 CDG를 이용하여 혈관 평활근세포의 증식억제기작을 실험 해 본 결과, CDG 자체만으로는 혈관 평활근세포의 증식에 영향을 주지 않았지만, α -glucosidase를 처리하여 당과 curcumin과의 결합을 끊게 되면, 증식 억제에 있어서 curcumin과 비슷한 억제효과를 보였다. Curcumin에 비해 2개의 glucoside가 붙어 있는 수용성 CDG는 in-vitro 실험에서 효과가 없는데, 이는 glucoside가 붙어 있기 때문에 세포 내로 침투가 어려워 작용을 못 하는 것이고, α -glucosidase를 처리하면 세포 밖에 존재하던 CDG의 glucoside가 떨어져 세포 안으로 들어가 작용을 하는 것이라 생각된다.

따라서 세포 증식에 있어서 뿐만 아니라 세포 부착 및 증식 억제에 α -glucosidase에 의해 분해 된 CDG를 처리하면 curcumin과 같은 결과가 나올 것으로 예측된다. Curcumin을 처리한 혈관 평활근세포의 단백질 분석도 좀더 많은 동정을 계속 시행하면 매우 흥미로운 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대되며, 세포의 증식억제에 관련된 새로운 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

인도산 생강인 울금의 뿌리로부터 추출된 polyphenol류인 curcumin을 혈관 평활근 세포에 처리하여 curcumin의 세포 증식 억제 기작 연관된 세포 신호 전달계의 변화 및 apoptosis 유발 여부와 단백질 발현양상을 관찰하고자 하였다. 그 결과 curcumin이 혈관 평활근세포의 부착과 증식을 억제하는 것을 확인할 수 있었고, curcumin을 처리하였을 때 세포가 수축되어 부유함에도 불구하고, α -tubulin이나 α -actin 같은 cytoskeleton에는 변화가 없는 것이 관찰되었다. 또한 대조군에서는 PDGF에 의한 자극에 대해 c-myc과 같은 proto-oncogene의 발현이 증가하는 것에 비해 curcumin을 처리한 군에서는 현저히 감소하였다. PDGF를 처리한 혈관 평활근세포에서 curcumin을 처리하지 않은 군에서는 PDGF 자극에 의해 ERK와 MEK의 인산화가 유도되고 계속 유지되는 것을 확인할 수 있었으나, curcumin을 처리한 군에서는 시간이 경과함에 따라 ERK와 MEK의 인산화 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 DNA ladder를 통해 apoptosis로 가는 것을 볼 수 있었다. 세포 내 signal 변화 뿐 아니라 단백질 발현양상의 변화를 보기 위해 2-DE와 MALDI-TOF MS 분석을 실시한 결과 curcumin을 24시간 처리한 군에서는 spot의 수가 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었고, 대조군에 비해 curcumin을 처리한 군에서는 대사와 관련된 단백질이 줄어들며, keratin 관련 단백질인 vimentin이나 calcium signal 관련 단백질인 caldendrin은 늘어나는 것을 관찰할 수 있었다. 마지막으로, 불용성인 curcumin에 2개의 당그룹을 붙여 만든 수용성 CDG의 실험 결과, CDG 자체만으로는 혈관 평활근세포에 영향을 주지 않았지만, α -glucosidase를 처리하여 당과 curcumin과의 결합이 끊어짐으로써 증식에 있어서 curcumin과 비슷한 억제효과를 보였다.

참고문헌

1. Ludergan CF, Foegh ML, Ramwell PW. Peptide inhibition of myointimal proliferation by angiopeptin, a somatostatin analogue. *J.Am.Coll. Cardiol.* 1991;17(6 Supple B):132B-136B.
2. Chen HW, Huang HC. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cell. *British J. of Pharmacol.* 1998;124:1029-1040
3. Giancotti FG, Rouslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-1032.
4. Wang JD, Narui T, Kurata H, Takeuchi K, Hashimoto T, Okuyama T. Hematological studies on naturally occurring substances. Part I. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 1998;5:2236-2238
5. Goldberg DM. Does wine work? *Clin. Chem.* 1995;21:32-35
6. Harris WS, Connor WE, McMurry MP. The comparative reductions of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats: Salmon oil versus vegetable oils. *Metabolism* 1983;32:179-184
7. Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 1987;43:1110-1111

8. Yamaguchi Y, Hayashi M, Yamazoe H, Kunitomo M. Preventive effects of green tea extract on lipid abnormalities in serum, liver and aorta of mice fed an atherogenic diet. *Nippon Yakurkgaku Zasshi* 1991;97:329-337
9. Ahn SH, Lee JH, Park HR, Kwon ST, Koh YS, Sohn YD et al. Effect of curcuminoids and natural plants extract mixture on the cardiovascular system in the experimental animals. *Kor. J. Nutrition* 2003;36:101-108
10. Lu YP, Chang RL, Lou YR, Huang MT, Newmark HL, Reuhl KR et al. Effect of curcumin on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and ultraviolet B light-induced expression of c-Jun and c-Fos in JB6 cells and in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 1994;15:2363-2370
11. Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Hirose Y, Wang A, Mori H et al. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of β -carotene. *Cancer Res.* 1994;54:4653-4659
12. Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell. Biochem.* 1995;22:169-180
13. Huang HC, Jan TR, Yeh SF. Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* 1992;221:381-384

14. Kakar SS, Roy D. Curcumin inhibits TPA induced expression of c-fos, c-jun and c-myc proto-oncogenes messenger RNAs in mouse skin. *Cancer Lett.* 1994;87:85-89
15. Huang MT, Deschner EE, Newmark HL, Wang ZY, Ferraro TA, Conney AH. Effect of dietary curcumin and ascorbyl palmitate on azoxymethanol-induced colonic epithelial cell proliferation and focal areas of dysplasia. *Cancer Lett.* 1992;64:117-121
16. Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J et al. Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. *Circulation* 2002;105:2404-2410
17. Hwang KC, Lee KH, Jang Y. Inhibition of MEK1,2/ERK mitogenic pathway by estrogen with antiproliferative properties in rat aortic smooth muscle cells. *J. of Steroid Biochem. and Mol. Biol.* 2002;80:85-90
18. Chamley JH, Cambell GR, McConnell JD, Groschel-Stewart U. Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in subculture. *Cell Tissue Res.* 1977;177:503-522

Abstract

Anti-proliferative mechanism of curcumin in vascular smooth muscle cell

Hee Jin Sung

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kwang Hoe Chung)

Atherosclerosis and post-angioplasty restenosis are characterized by the abnormal activation of vascular smooth muscle cell (VSMC) and inflammatory cells, and the excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins. In general, VSMC which is a contractile form maintains the blood vessel, but VSMC is transformed into a synthetic form by blood. When vascular endothelial cell is injured, VSMC is activated via contacting with growth factors and ECM proteins. The activation of VSMC causes the neointimal hyperplasia and finally interferes blood flow.

In this study, we treated curcumin, an anti-oxidant and anti-inflammatory compounds, isolated from the root of the plant *Curcuma longa* L. to rat aortic smooth muscle cells (RAoSMCs) to investigate its anti-proliferative mechanism. Cytoskeletal change of RAoSMC treated with curcumin was characterized by α -tubulin staining and cell signaling changes were also investigated by western blotting and RT-PCR analysis. Apoptosis of the cells treated with

curcumin was demonstrated by DNA laddering analysis. Also, protein changes of curcumin-treated RAOsMC were determined by 2-D electrophoresis, in-gel digestion, MALDI-TOF MS, and proteome bioinformatics analysis.

These results showed that curcumin inhibited serum- and PDGF-stimulated proliferation of RAOsMCs in a dose-dependent manner, by arresting G0/G1 phase of cell cycle and inducing apoptosis.

Also the mRNA level of *c-myc* in PDGF-stimulated RAOsMCs was significantly reduced, and cytoskeleton was not changed in spite of cell shrinkage. Proteomics studies revealed that enzymes which is participated in metabolism were reduced and heat shock protein or stress protein were increased.

These results suggest that the effect and inhibitory mechanism of curcumin on vascular smooth muscle cells are due to specific inhibition of the PDGF-signaling pathway, cell cycles, and activation of apoptosis. Also, we have tested the biological effects of curcumin-diglucoside (CDG) which is a soluble derivative of curcumin on SMC.

Key Words : vascular smooth muscle cell, curcumin, anti-adhesive and anti-proliferative effect, signal transduction, apoptosis, proteomics