

나 혜 경 교수지도

석사학위청구논문

위 점막세포에서 curcumin에 의한
15-Hydroxyprostaglandin
dehydrogenase 발현 유도

2011

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

장 지 혜

위 점막세포에서 curcumin에 의한
15-Hydroxyprostaglandin
dehydrogenase 발현 유도

나 혜 경 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2011년 5월

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

장 지 혜

인 준 서

장지혜의 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

성신여자대학교 대학원

논문개요

강황의 주원료인 curcumin은 다양한 세포주, 동물 실험 그리고 임상 연구 결과를 통해 대표적인 화학적 암예방제로 알려져 있다. 15-Prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH)는 암화과정에 중요한 역할을 하는 prostaglandin E_2 (PGE_2)를 15-keto- PGE_2 로의 전환을 촉진함으로써 PGE_2 불활성화시킨다. 최근 보고된 많은 연구 결과에 따르면, 정상조직에서 15-PGDH 높은 발현이 관찰된 반면 대장암, 위암, 폐암, 췌장암, 갑상선 암, 유방암 등에서 발현이 억제되고, 유전적으로 *15-PGDH* 결여시킨 마우스에서 종양형성이 두드러지게 증가하고, *15-PGDH*를 과발현시 세포사멸, 전이 및 침윤 억제를 통해 발암과정을 저해한다고 보고되었다. 즉 새로운 종양억제 유전자로서 15-PGDH의 역할이 제시되고 있다. 그러나 아직까지 15-PGDH의 발현이 어떻게 조절되는지에 대한 기전연구는 미비한 실정이다. 커큐민의 암예방 효능이 15-PGDH 발현증가와 관련있다는 연구결과는 전무하다. 따라서 본 연구에서는 랫드의 위점막 상피세포에서 커큐민에 의해 15-PGDH의 발현이 유도되는지 확인하고, 이의 작용기전을 살펴보고자 하였다. 먼저 랫드의 위 점막세포인 RGM-1 세포에서 독성이 없는 농도를 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 결과 10 μM 농도 처리 시 세포독성이 없음을 확인하고 이후 모든 실험을 10 μM 농도에서 진행하였다. 커큐민이 15-PGDH의 발현을 유도하는지 알아보기 위해서 다양한 농도의 커큐민을 RGM-1 세포에 처리 후 시간별로 15-PGDH 단백질 발현과 RNA 발현 변화를 살펴보았다. 결과 커큐민 10 μM 에서, 6시간 처리했을 때 15-PGDH의 발현이 최대로 유도되었다. 다음으로, 커큐민이 15-PGDH의 transcriptional activity를 유도하는지 15-PGDH promoter deletion mutant plasmid를 RGM-1 세포에 transfection 한 후 luciferase activity를 측정하였다. 결과

커큐민은 15-PGDH 프로모터에 존재하는 CREB와 AP-1의 전사인자 활성화를 유도하였다. 15-PGDH 발현 변화에 mitogen-activated protein kinases (ERK1/2, JNK1/2, p38 MAPKs)이 관여하는지 알아보기 위해 이들 발현 및 인산화 정도를 western blot analysis를 통해 확인하였다. 결과 커큐민 처리에 의해 ERK1/2, JNK1/2의 인산화가 유도되었으나, 이들 MAPKs의 약물학적 억제제에 의해서는 저해되기 보다 오히려 15-PGDH의 발현을 유도함을 확인하였다. 그리고 이들 MAPKs의 억제제들 단독 처리에 의해 15-PGDH의 발현이 증가됨을 확인하였다. 커큐민의 α,β -unsaturated carbonyl group이 커큐민의 생리활성을 나타내는데 중요하다 알려져 있다. 커큐민의 α,β -unsaturated carbonyl group 중 이중 결합이 제거된 테트라하이드로커큐민(THC)을 RGM-1 세포에 처리한 결과 THC는 15-PGDH 발현을 유도하지 못하였다. 본 결과 커큐민의 α,β -unsaturated carbonyl group이 15-PGDH 발현에 중요한 역할을 함을 시사한다.

목 차

논문개요

I.	서론.....	1
II.	본론.....	8
1.	연구재료 및 연구방법.....	8
1)	연구재료.....	8
2)	세포배양.....	9
3)	MTT assay.....	10
4)	RT-PCR.....	12
5)	Western blotting.....	13
6)	Luciferase assay.....	14
7)	통계분석.....	15

2.	연구결과.....	16
1)	Curcumin의 세포 독성 효과.....	16
2)	RGM-1 cell에서 15-PGDH 발현에 대한 curcumin의 영향	18
3)	15-PGDH mRNA 발현에 대한 curcumin의 영향.....	21
4)	Curcumin에 의한 15-PGDH 조절기전.....	23
5)	Curcumin에 의한 CREB, AP-1 발현.....	24
6)	Curcumin에 의해 유도된 15-PGDH 발현에 대한 항산화제 및 MAPK저해제의 영향.....	27
7)	15-PGDH 발현에 대한 tetrahydrocurcumin (THC)의 영향.....	31
III.	결론 및 고찰.....	35
IV.	참고문헌	

Abstract

List of Figures

- Figure 1. The PGE₂ pathway.
- Figure 2. Role of the 15-PGDH
- Figure 3. schematic showing multiple biological activities of tumeric/curcumin.
- Figure 4. The chemical structure of curcumin, a yellow coloring ingredient of turmeric.
- Figure 5. Effects of curcumin on the viability of RGM-1 cells.
- Figure 6. Effects of curcumin on 15-PGDH expression.
- Figure 7. Effects of curcumin on 15-PGDH expression at the indicated time.
- Figure 8. Effects of curcumin on 15-pgdh mRNA expression in RGM-1 cells.
- Figure 9. Curcumin-induced activation of the 15-PGDH promoter.

- Figure 10. Effects of curcumin on AP-1 and CREB expression.
- Figure 11. Effects of curcumin on MAPKs in RGM-1 cells.
- Figure 12. Effects of MAPKs inhibitors on Curcumin-induced 15-PGDH expression.
- Figure 13. Effects of antioxidant NAC on curcumin-induced 15-PGDH expression.
- Figure 14. The chemical structures of curcumin and tetrahydrocurcumin(THC)
- Figure 15. Effects of curcumin and tetrahydrocurcumin (THC) on 15-PGDH expression.
- Figure 16. The proposed mechanisms for curcumin-induced 15-PGDH expression in RGM-1 cells

I. 서론

COX-2는 위 종양에서 arachidonic acid에서 prostanoid로의 전환에 있어 중요한 효소이다 (Fig. 1). COX-2는 전이 전 단계에서 세포 형성의 장애와 종양생성을 상승 시킨다 [1-3]. COX-2는 성장인자, 사이토카인, 종양촉진인자 등에 의하여 유도되어 염증반응 및 병적상태에서 작용하는 프로스타글란딘을 합성하여 apoptosis가 일어나지 않도록 억제하여 종양 발생을 촉진시키고 세포의 기질을 분해하는 효소를 활성화 하여 종양침윤을 증가 시킨다 [4].

PGE₂ 는 위 세포에서 주요한 프로스타글란딘이고 위 점막 세포의 다양한 생리적인 요소와 병리적인 기능을 수행 한다 [5]. prostanoid인 PGE₂ 는 angiogenesis (혈관형성), invasion (침윤과정), metastasis (전이)의 조절을 통해서 발암과정을 촉진 한다 [6, 7]. PGE₂ 는 암 세포의 세포증식을 유도 하며, apoptosis에 저항성을 갖게 하고, 혈관신생 및 침윤과정을 촉진함으로써, 암화과정을 촉진한다. 따라서 PGE₂ 로 조절된 신호전달은 암 예방에 있어 중요한 지표가 되었다 [8]. 비정상적으로 증가된 PGE₂ 레벨은 다양한 암 조직에서 빈번히 관찰되며 위장의 발암과 종양진행에 있어 중요한 화학적 조절 인자 이다 [9, 10]. 종양 조직에서 PGE₂ 의 양은 PGE₂ 에 의한 발암과 종양 진행의 촉진을 결정 짓는 중요한 요인이 될 수 있다 [11]. 따라서 COX-2 와 PGE₂ 레벨은 종양과 암 진행에 관련이 높음을 시사 한다 [12].

15-PGDH는 PGE₂의 탈수소화 과정을 통해 13,14-dihydro 15-keto PGE₂를 생성하는데 관여하는 효소로서 PGE₂ 활성을 상당히 줄여줄 수 있다 (Fig. 2). 즉 15-PGDH는 암화과정에 중요한 역할을 하는 PGE₂ 를 분해하는 효소로서 최근 종양억제 유전자로 알려져 있다[13]. 15-PGDH는 암화과정에 중요

한 역할을 하는 PGE를 분해하는 효소로서 이의 조절기전에 대한 연구들이 끊임없이 진행되고 있다 [14]. 임상실험에서 대장, 폐, 유방, 전립선 종양에서 15-PGDH 발현은 36~94%가 감소되어 있었다 [15]. 발암과 암 진행에서 15-PGDH가 연루되어있음을 보여주는 많은 연구 결과가 제시되었다. 이러한 증거가 될 수 있는 연구로는 위암환자의 65~80%가 15-PGDH 단백질 발현이 down-regulation 되어있음을 immunohistochemistry에 의해서 발견했다 [16-18]. 또한 15-PGDH wildtype 마우스에 비해 15-PGDH gene knockout된 mouse 모델에서 대장종양은 두드러지게 증가했다 [19]. 최근 연구에서 대장, 유방, 폐 암에서 15-PGDH의 종양 억제 활성을 제안 하였는데 이런 질병에서 15-PGDH는down-regulated 되거나 발현되지 않았고 [20-24], 15-PGDH knockout mice는 대장에서 증가된 종양을 보여주었다 [25]. 반면에 wild-type 에서는 15-PGDH가 과발현 되면서 종양 성장의 감소를 이끌었거나 폐, 유방, 그리고 대장 암 mouse 모델에서 종양형성을 지연시켰다 [26, 27]. 이러한 발견은 15-PGDH가 종양 억제자로서의 기능을 한다고 제시한다.

카레의 주원료인 강황 (薑黃; *Curcuma longa* L.)은 생강과 (Zingiberaceae)에 속하며 인도가 원산지이고 열대아시아지역에서 재배되는 다년생식물이다. 뿌리는 한약재로서 혈맥 (血脈)을 소통하여 어체 (瘀滯)를 제거하는 활혈화어약 (活血化瘀藥)이며, 카레 (curry)등 착색성 향신 식품원료, 또는 방향건위 (芳香健胃), 이담 (利膽), 진통제 (鎮痛劑) 등 생약으로 사용하는 약용식물이다 [28]. 강황은 이용부위에 따라 한약재료 쓰이는데, 강황의 덩이뿌리를 울금 (鬱金)이라고 하고 [29] 강황의 뿌리줄기를 강황 (薑黃)이라고 한다 [30]. 강황의 주성분은 curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin 등 curcuminoid 색소성분과 ar-turmerone, curlone, α-turmerone, β-turmerone, bisacumol, zingiberene 등 휘발성 정유성분이다. 약리효과는 항염, 간장보호, 소화기 및 심혈관계에 대한 작용, 항혈소관

응집, 혈중지질강하, 항산화, 항돌연변이, 항종양, 항균작용 등이며 이러한 약리효과의 주성분은 curcumin으로 알려져 있다 (Fig.3) [31, 32].

curcumin (diferuloylmethane)은 polyphenol이며 강황의 화합물이다 (Fig. 4). 전통적으로 curcumin은 항종양제로서 약물치료에 효과적으로 사용되었고 [33], 다양한 암 세포에서 세포확산을 저해하고 암 예방을 위해 사용되었다. [34] 또한 동물 모델로 시행한 선행 연구에서는 curcumin으로 인한 대장, 위, 식도 암에서의 화학적 암 예방 효과를 나타내었다. curcumin은 다양한 인간 암 세포에서 세포확산을 방해하고, 암 예방을 위해서 사용되었다. 역학적 조사에서는 카레를 자주 섭취하는 사람들에게서 암의 발병이 적게 나타나고, 그 이유가 카레의 주성분인 강황의 curcumin 때문임이 밝혀졌다 [35]. 인도 요리에 tumeric을 많이 사용하는 것이 인도에서 암의 발생률이 낮은 원인으로 보여 진다. curcumin의 암 예방 효과는 광범위하게 연구되고 있고 기존의 연구들도 많이 있다 [36]. 기존의 연구에서 curcumin이 mice에서 MNNG에 의해 유도된 종양을 저해하고 rats에서 위암을 저해했다고 보고하였다 [37]. 또한 수많은 동물 연구에서는 다양한 조직에서 종양이 curcumin에 의해서 저해되었음이 언급되었다 [38].

다양한 암종에서 종양억제 유전자로서의 15-PGDH의 역할이 제시되고 있음에도 불구하고 아직 명확한 기전과 그 역할에 대해서 일관되게 정립된 논문은 많지 않다. 또한 curcumin의 항암효과를 확인한 연구들은 많이 있지만, curcumin에 의한 15-PGDH의 발현연구는 전무한 실정이다.

따라서 이 연구에서는 강황의 성분인 curcumin의 항염증 효과를 토대로 Rat 위 점막세포 RGM-1에서 15-PGDH의 발현이 유도되는지 확인하고 그 분자적 기전을 알아보려고 한다.

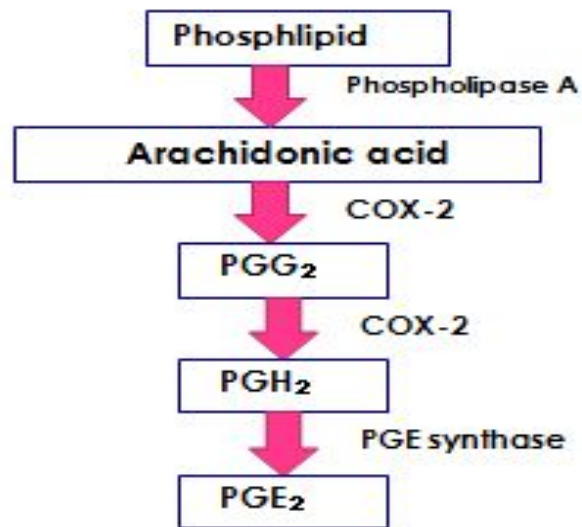


Figure. 1. The PGE₂ pathway.

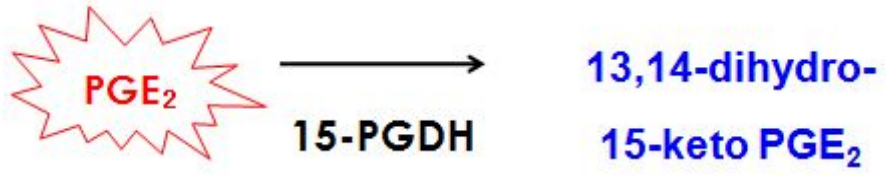


Fig. 2. Role of the 15-PGDH

Biological Effects of Turmeric/Curcumin

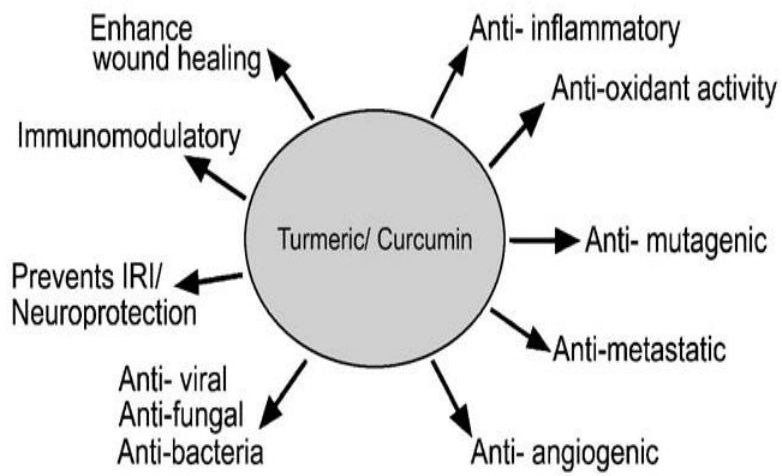


Fig. 3. Schematic showing multiple biological activities of turmeric/curcumin.

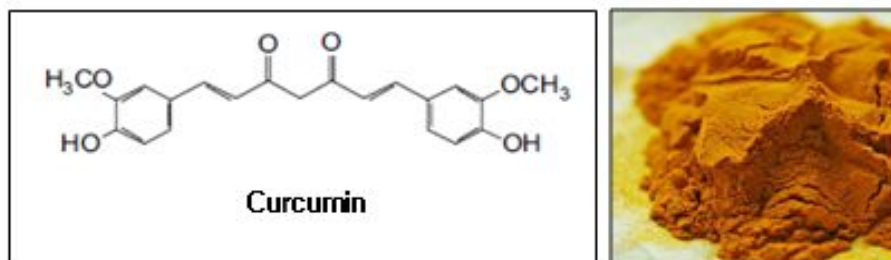


Fig. 4. The chemical structure of curcumin, a yellow coloring ingredient of turmeric.

II. 본론

1. 연구재료 및 연구방법

1) 연구재료

본 연구에 사용한 Rat 위 점막 정상 세포주 RGM-1은 가천의대에서 분양받아 사용하였다. Curcumin과 dihydro-curcumin 은 Cayman Chemical co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구매하였다. Dulbecco's modified Eagle'smedium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구매하였다. 15-PGDH 는 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)로부터 구매하였다. Western blotting을 위한 Secondary antibody는 Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA)에서 구매하였고, ECL chemiluminescent kit는 Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK)에서 구매하였다. Bicinchoninic acid (BCA) 단백질 분석 시약은 Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)의 제품을 사용하였다. Polyvinylidene difluoride membranes은 Gelman Laboratory (Ann Arbor, MI, USA)로부터 구매하였다.

2) 세포배양

Rat 위 점막 정상 세포주 RGM-1을 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제가 첨가된 DMEM 배양액을 사용하여, 95%의 습도가 유지되는 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양 하였다. 세포는 2-3일에 한번 씩 계대배양 하였다.

세포의 stock은 plate의 배지를 제거한 후 PBS로 두 번 세척 후, 0.5% Trypsin을 3ml 분주하고 CO₂ incubator 안에서 약 3분간 incubation 시켰다. 3분후에 DMEM배지 3ml을 분주하여 Trypsin의 작용을 멈추고 50ml conical tube에 세포를 모아 1,200rpm에서 3분간 원심분리 해주었다. 배지를 제거한 후 80% FBS와 10%의 DMSO, 10% 배지를 첨가하여 Cryo tube에 1ml씩 분주하여 -70°C에서 4시간 동안 보관하였다가 -180°C의 액체 질소 탱크에 넣어 사용 전 까지 보관 하였다.

3) MTT assay

Curcumin 에 의한 세포의 생존율을 측정하기 위해서 MTT assay를 측정하였다. MTT assay는 세포의 증식을 측정하기 위한 방법으로 표준 비색분석법(standard colorimetric assay)이라고 한다. 일반적으로 hemocytometer를 이용하여 생존 세포수를 세거나 광학밀도 (optical density)를 측정하는 방법이 사용되지만 많은 양을 측정 시 시간과 노력이 필요이상으로 요구되고 부정확한 결과를 가져올 수 있다. 이를 대체하기 위해 개발된 MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소작용 (dehydrogenases) 에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 보라색을 띠는 비수용성의 MTT- formazan 결정으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로써 신속하고 정확하게 많은 양의 세포 증식을 측정할 수 있다. 보라색이 진할수록 세포가 많이 살아 있는 것이다. 보라색 crystal은 물에 녹지 않기 때문에 DMSO를 넣어야 한다. 따라서 formazan을 녹이기 위해 media를 제거하고 넣게 된다. 보라색 crystal(formazan)은 DMSO에 용해되고 흡광도 (Optical Density)는 500-600nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있는 세포의 수와 직선적인 상관관계를 나타내게 된다. 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 그러나 측정할 well의 세포의 농도가 너무 낮거나 높은 범위에 있으면 살아있는 세포의 농도와 흡광도 사이의 직선적인 비례관계가 성립되지 않게 되므로 최적의 세포농도를 결정하는 과정을 거쳐야 한다.

세포주를 96 well plate에 300 μ l씩 첨가하여 24 시간동안 37°C, CO₂ incubator에서 배양한 후, Curcumin을 각각 0, 5, 10, 15, 25 μ g/ml 의 농도로 제조하여 RGM-1 세포에 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 MTT용액을 300 μ l 씩 첨가하여 두 시간 동안 배양하였다.

Formazan을 확인한 후 배지를 완전히 제거하고 well 바닥에 형성된 Formazan을 녹이기 위해 300 μ l의 DMSO를 첨가하고 10분간 녹여준 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 curcumin 을 처리하지 않은 대조군 과 비교하여 세포성장 억제율을 나타내었다.

4) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

curcumin이 단백질 발현뿐만 아니라, mRNA 발현에도 영향을 주는지 알아보기 위해 RNA를 분리하였다. 1~3 µg의 RNA에 oligo DT 1 µL를 포함하여 총량이 11 µL가 되도록 DEPC (diethyl pyrocarbonate) water를 첨가한 후 72°C에서 10분간 incubation하고 여기에 reaction buffer (5×RT buffer 4 µL, 2.5µM dNTP 4 µL) 8 µL를 첨가하여 42°C에서 2분간 incubation하고, RT enzyme 1 µL를 첨가하여 42°C에서 50분, 72°C에서 15분간 incubation하였다. Autoclave water, band master, 10X buffer, dNTP, primer A,B, template DNA, Taq polymerase 를 혼합하여 94°C에서 2분간 1주기를 시행한 후 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 30주기를 반복 수행하여 DNA를 증폭하였다. Primers는 reverse transcription을 위해서 사용되었다: 15-PGDH 5'-GGCATAATCGGATTCACACG-3' (forward) 5'-CGAGGCCGTGATCTTCATAA-3'(reverse) 그리고 GAPDH, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (forward) 5'-ACGGATACATTGGGGGTAGG-3' (reverse) . Primers는 transcription을 위해서 사용되었다. 증폭된 DNA를 회수하여 1% agarose gel로 전기영동을 실시하여 결과를 확인하였다.

5) Western blot analysis

Curcumin 처리된 RGM-1 세포는 60mm dish에서 48시간 동안 배양한 후 cold phosphate-buffered saline (PBS)와 함께 harvest되었고, lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP-40, protease inhibitors] 와 함께 1시간 동안 ice안에서 방치되었다. 후에 4°C에서 13,000 g로 15분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 그리고 BCA protein assay kit (Pierce; Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질 농도를 결정하였다. 단백질 샘플은 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel로 실시하였고, 분리된 단백질을 전기적 방법으로 2시간 동안 200mV에서 polyvinylidene difluoride membrane (Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA) 으로 transfer한 후, membrane을 blocking buffer (1XPBS, 0.1% Tween-20, 5% skim milk)에 넣고 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBST buffer로 10분간 3번 씩 washing 해주었다. PBST에 3% skim milk 와 1:1000으로 일차 항체를 처리하여 4°C에서 overnight 시키고 다시 한번 10분간 3번씩 PBST로 washing 해준 후 anti-rabbit 2차 항체를 사용해 2시간 동안 반응 시킨 뒤 ECL 시스템을 이용하여 발색시키고 필름에 감광시켰다.

6) Luciferase assay

위 정상세포 RGM-1 세포는 12well plate에 배양되었다. 배양세포의 밀도가 50%에 도달하였을 때 새로운 배양액으로 교체하고 37°C의 CO₂ 배양기에 두었다가 1시간 뒤에 transfection 과정을 시행하였다. Transfection에 사용할 DNA는 1µg 농도로 Opti-MEM reduced serum medium (Invitrogen USA) 100 µl에 혼합하였다. 이 후 lipofectin (Invitrogen, USA) 10 µl를 Opti-MEM reduced serum medium (Invitrogen, USA) 100 µl에 혼합하여 실온에 20분간 두었다. 이후 DNA용액과 lipofectin용액을 혼합하여 실온에서 15분간 두었다. 동시에 배양세포를 Opti-MEM reduced serum medium (Invitrogen, USA)로 세척하였다. 마지막으로 Opti-MEM reduced serum medium (Invitrogen, USA) 800 µl를 DNA lipofectin 혼합액 200 µl에 첨가하여 세포에 가하였다. 이후 37°C의 CO₂ 배양기에 24시간 동안 두었다가 serum 함유 DMEM 배양액 1mL로 교환하여 24시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 이후 배양된 세포를 PBS 용액으로 2회 세척하고 세포용해액 100 µl씩을 가하여 -70°C에서 15초간 두었다. 이 후 cell scraper로 세포를 긁어 모아서 얼음위의 micro tube에 모았다 13,000 rpm에서 2분간 원심분리한 뒤 상층액을 새로운 micro tube에 옮기고 12 well의 luminometer microwell plate에 한 well당 20 µl를 가하였다. 이후 luciferase assay 시약 A와 시약 B (BD Pharmingen, USA)를 증류수 10 mL씩에 녹여서 Berthold microplate luminometer (Berthold Detection Systems, Germany)를 이용하여 luciferase activity를 측정하였다.

7) 통계분석

모든 자료는 평균±표준오차로 나타내었고 One-way ANOVA로 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 New-man keuls를 실시하여 유의성을 검증하였다.

2. 연구결과

1) RGM-1 세포에 대한 curcumin의 세포독성효과

Rat 위 점막 정상 세포인 RGM-1 세포주에 curcumin을 0, 5, 10, 15, 25 μM 까지 농도별로 처리한 후 MTT assay를 이용하여 cell viability를 측정하였다. 결과, curcumin의 농도가 높아짐에 따라 RGM-1 세포의 viability가 감소하여, 15 μM 농도 처리 시에는 50%, 20 μM 농도 처리 시에는 70%, 25 μM 농도 처리 시에는 90%의 증식 억제 효과가 나타났다 (fig. 5).

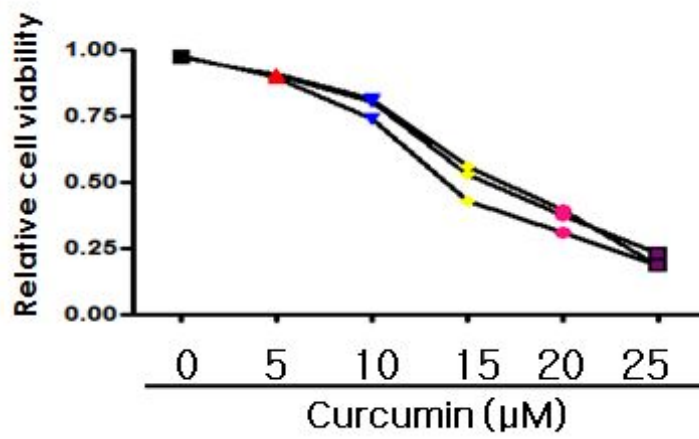


Fig. 5. Effects of curcumin on the viability of RGM-1 cells. RGM-1 cells were treated with indicated concentrations of curcumin.

2) RGM-1 cell에서 15-PGDH의 발현에 대한 curcumin의 영향.

RGM-1 세포에 curcumin을 각각 0 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM 로 6시간 (Fig. 6A), 12시간 (Fig. 6B) 처리한 후 15-PGDH 발현 변화를 Western blot analysis를 통해 확인하였다. 결과 두 시간 모두에서 Curcumin을 10 μM 처리했을 때 15-PGDH 발현이 최대로 유도되었다. 따라서 15-PGDH 발현이 최대로 유도되었던 curcumin 10 μM 을 선정하여 향후 실험을 진행하였다. 이후 curcumin 10 μM 을 RGM-1 세포에 0, 3, 6, 12, 24시간 처리한 결과 6시간 에서 15-PGDH 발현이 최대로 유도됨을 확인하였다 (Fig. 7). 이 결과 RGM-1 세포에 10 μM 의 curcumin 6시간 처리시 15-PGDH 발현이 최대로 유도됨을 알 수 있었다.

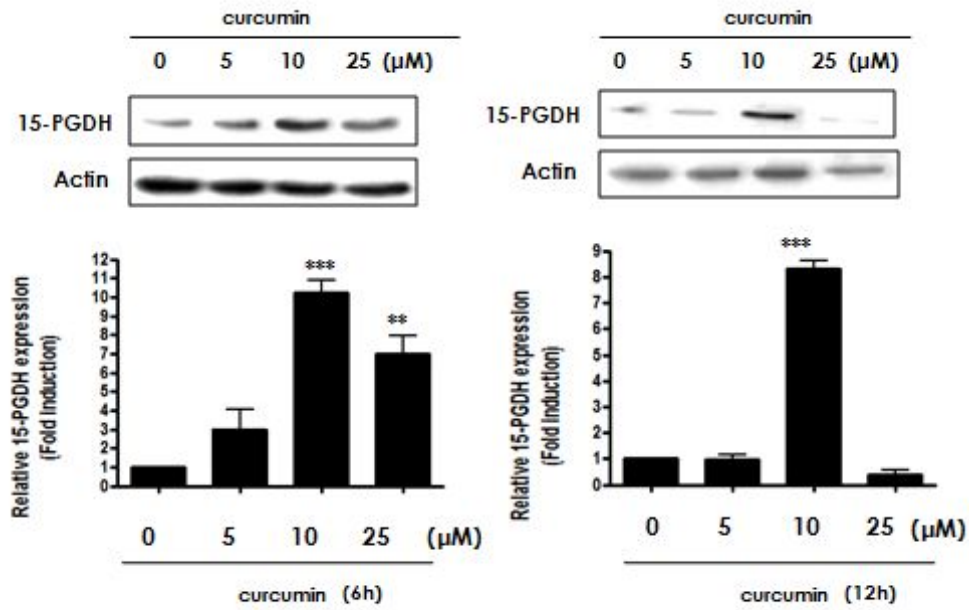


Fig. 6. Effects of curcumin on 15-PGDH expression. RGM-1 cells were treated with 5, 10, 25 μM of curcumin for 6h (A), 12h (B) Actin was used as an equal loading control for normalization. **p<0.05 ***p<0.001 .

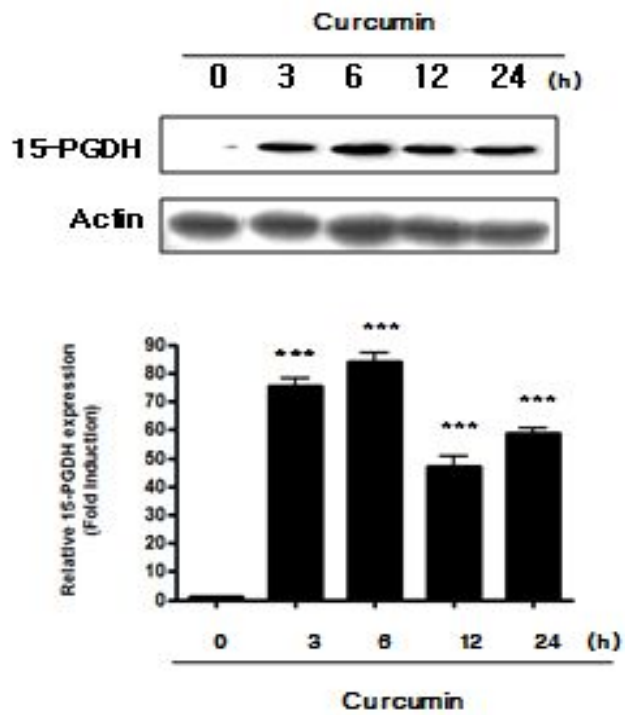


Fig. 7. Effects of curcumin on 15-PGDH expression at the indicated time. RGM-1 cells were treated with 10 μ M of curcumin for 3, 6, 12 or 24h. Actin was used as an equal loading control for normalization. *** $p < 0.001$.

3) 15-PGDH mRNA 발현에 대한 curcumin의 영향

MTT 분석방법 과 Western blotting을 통해 가장 높은 세포 증식 과 15-PGDH 발현을 보인 10 μ M 농도의 curcumin을 RGM-1 세포에 처리하여 RNA 분리 하여 RT-PCR을 수행하였다. 결과 curcumin 6시간 처리하였을 때 15-PGDH mRNA 발현이 최대로 증가하였다 (Fig. 8).

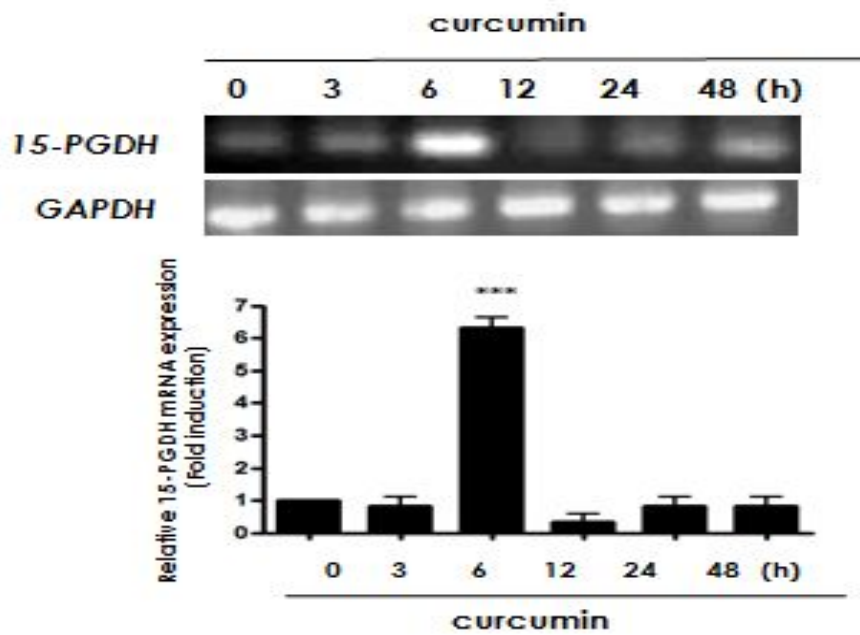


Fig. 8. Effects of curcumin on 15-pgdh mRNA expression in RGM-1 cells. The expression of 15-pgdh mRNA was determined by quantitative RT-PCR. The level of GAPDH mRNA was used as an internal control

***p<0.001.

4) Curcumin에 의한 15-PGDH 조절기전

종양 억제 단백질로써 15-PGDH의 역할이 점차 밝혀짐에 따라, 이 단백질의 발현을 조절하는 기전에 대한 연구들이 이어지고 있다. 그 기초적 연구의 일환으로 15-PGDH의 유전자 구조와 염기서열에 대해 보고되었다. 15-PGDH의 5'-flanking region 2.4 kb안에 activating protein-1 (AP-1), cAMP-responsive element binding protein (CREB), C/EBP α, β 와, Ets family member가 결합 할 수 있는 binding site (Fig. 9A)가 있고, 이들 전사인자가 binding site에 결합함으로써 15-PGDH의 발현이 조절된다.

본 연구에서 curcumin에 의해 유도되는 15-PGDH 발현에 어떠한 전사인자가 관여하는지 알아보기 위하여 12시간 (Fig. 9B) 과 24시간 (Fig. 9C) 동안 curcumin을 처리한 후 luciferase assay를 실시하였다. Curcumin은 15-PGDH 전체 promoter 부위가 들어있는 플라스미드 (-2368)로 변형된 세포에서 최대의 luciferase 활성을 보인 반면, 2개의 CREB 와 2개의 AP-1 전사인자가 결합하는 binding site가 없는 -1024, 세포에서는 70%의 감소를 보였다. 아울러, 2개의 AP-1 binding site가 소멸된 -388 플라스미드와, 이어 Ets binding site가 제거된 -203 플라스미드에서는 대조군과 거의 비슷한 luciferase 활성을 보였다. 본 결과는, curcumin에 의한 15-PGDH 발현에 CREB나 AP-1 전사인자가 중요한 역할을 함을 알 수 있다.

5) Curcumin에 의한 CREB, AP-1 발현

curcumin에 의해 CREB와 AP-1 단백질 발현이 증가하는지 확인해보기 위해 RGM-1 세포에 1, 3, 6, 9시간동안 curcumin 10 μ M을 처리하였다.

결과 curcumin에 의해 CREB와 AP-1 패밀리에 속한 c-Jun과 c-Fos의 발현증가를 확인할 수 있었다 (Fig. 10).

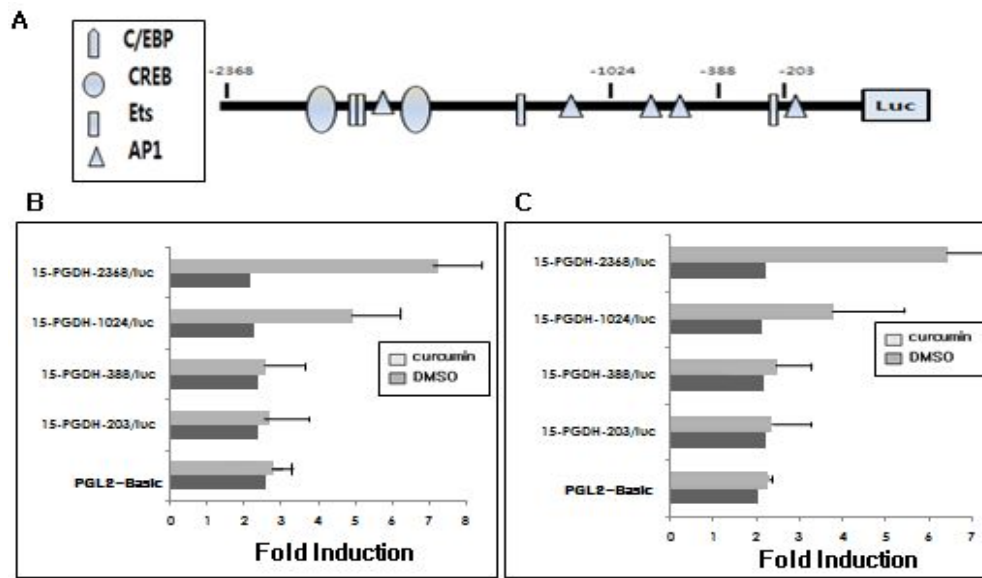


Fig. 9. curcumin-induced activation of the 15-PGDH promoter. (A) A schematic representation of the 15-PGDH promoter. (B) RGM-1 cells were co-transfected with 1 μ g of 15-PGDH promoter deletion constructs (-2368, -1024, -388 and -203) ligated to luciferase for 12h (B) or 24h (C) and cells were lysed with reporter lysis buffer for the measurement of luciferase activity. Fold induction in the luciferase activity was normalized to β -galactosidase activity.

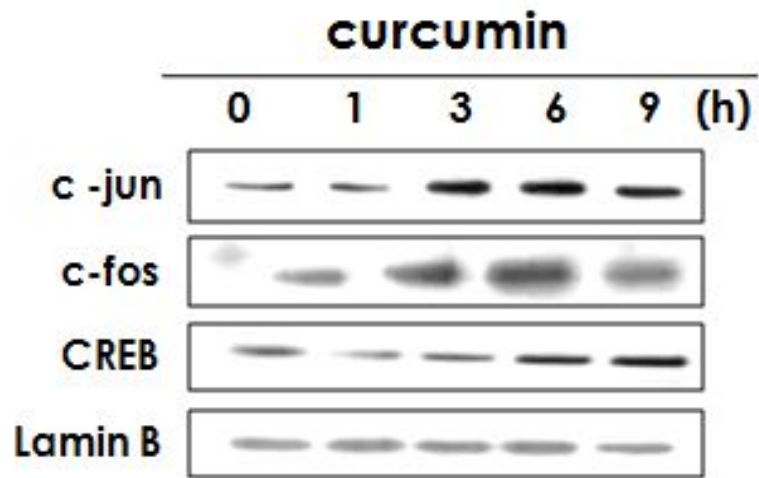


Fig. 10. Effects of curcumin on AP-1 and CREB expression.

6) curcumin에 의해 유도된 15-PGDH 발현에 대한 항산화제 및 MAPK 저해제의 영향

Curcumin에 의한 15-PGDH의 발현변화에 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 활성화가 관여하는지 살펴보기 위해 curcumin에 의한 ERK, JNK, p38 인산화 정도를 살펴보았다. 결과 커큐민에 의한 ERK와 JNK의 인산화가 증가하다 (Fig. 11).

따라서 MAPKs 억제제를 처리하였을 때 15-PGDH 발현이 감소할 것이라는 예상을 하며 MAPKs의 억제제를 처리한 후 15-PGDH 발현변화를 Western blotting을 통해 측정하였다. 예상과 다르게 각각의 MAPKs 억제제들은 커큐민에 의해 유도된 15-PGDH 발현을 더욱 증가시켰고 커큐민을 처리하지 않고 MAPKs 억제제 단독 처리로도 15-PGDH 발현 증가가 관찰되었다 (Fig. 12). 따라서 커큐민에 의해 유도된 15-PGDH 발현에 MAPKs가 관여하지 않는 것으로 생각되어진다.

curcumin이 종양을 발생시키는 활성산소인 ROS를 억제한다는 연구결과를 토대로 ROS의 inhibitor인 항산화 N-acetylcysteine (NAC)를 처리하였다. 하지만 정상세포주인 RGM-1 세포주에서 NAC는 15-PGDH 발현에 영향을 주지 못하는 것을 확인하였다 (Fig. 13).

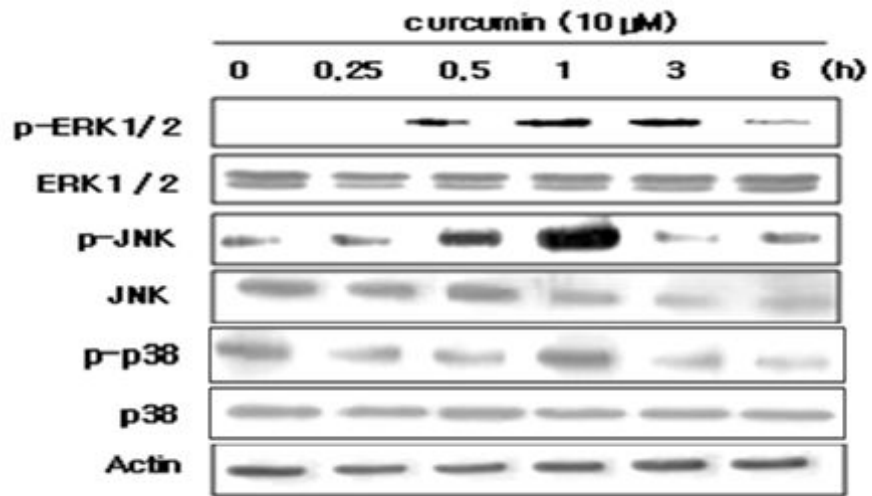


Fig. 11. Effects of curcumin on MAPKs in RGM-1 cells. the cells were treated with curcumin (10 μM) for indicated time and then pretreated with ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p-p38 and actin antibody.

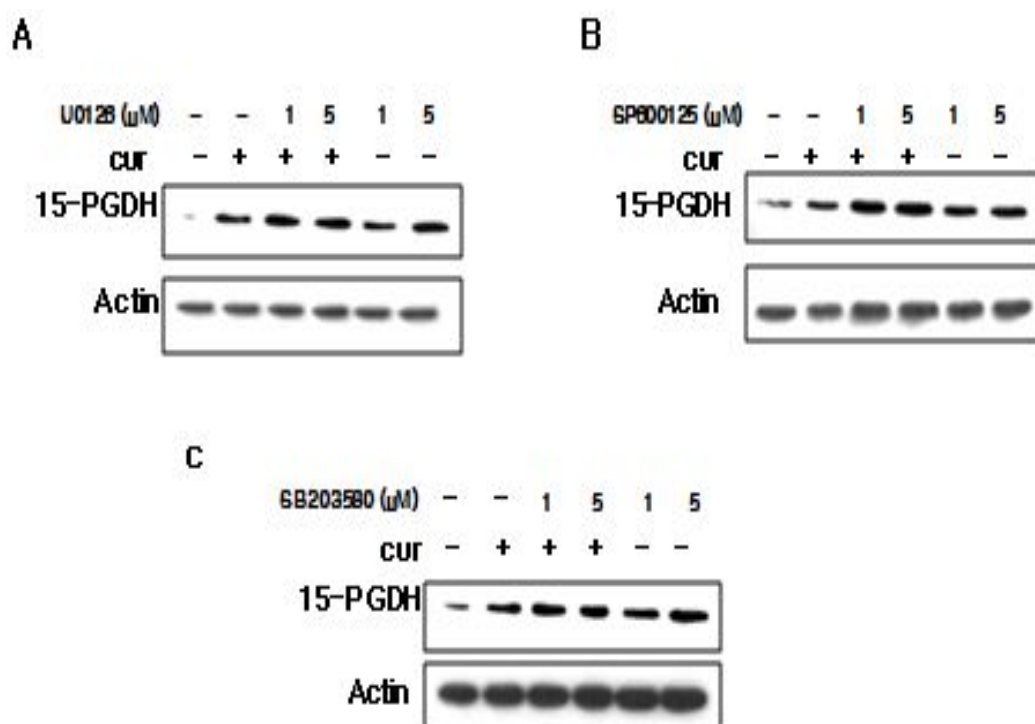


Fig. 12. Effects of MAPKs inhibitors on Curcumin-induced 15-PGDH expression. RGM-1 cells were pretreated with MAPKs inhibitors such as U0126 (A) SP600125 (B), or SB203580 (C) for 2 hour, and additional curcumin 10 μ M for 6h. Total cell lysates were subjected to Western blotting with anti-PGDH. The same blot was reprobred with anti- β -actin as an internal control.

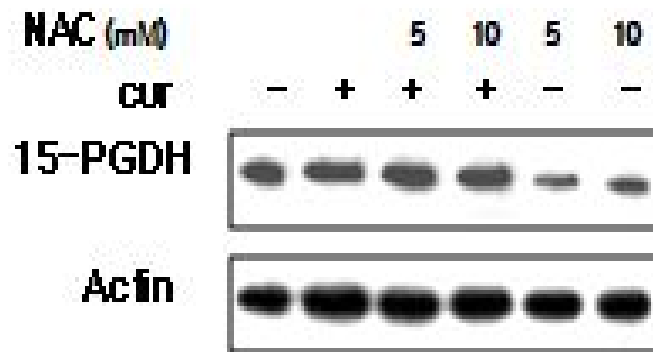


Fig. 13. Effects of antioxidant NAC on curcumin-induced 15-PGDH expression . RGM-1 cells were treated 5 mM or 10 mM NAC for 2 hour, and then either left untreated or treated with 10 μ M curcumin for 6 h. Total cell lysates were subjected to Western blotting with anti-PGDH antibody. The same blot was reprobbed with anti- β -actin antibody as an internal control.

7) 15-PGDH 발현에 대한 Tetrahydrocurcumin의 영향

Curcumin은 높은 친전자성 α,β -unsaturated carbonyl을 가지고 있는데 이것은 free sulfhydryl groups을 가지고 있는 단백질과 반응할 수 있다 [39]. 그것은 친전자성 파이토케미칼들이 thiy radical을 올려준다고 알려져 있으며 [40], 친전자체에서 유도된 thiy radical은 세포내의 sulfhydryl 잔여물과 함께 상호작용할 수 있다 [41-43]. curcumin에 존재하는 α,β -unsaturated carbonyl group은 curcumin의 생물학적 활성을 결정짓는 중요한 부위이다. curcumin에 의한 15-PGDH 발현에 α,β -unsaturated carbonyl moiety가 관여하는지 확인하기 위해 RGM-1 세포에 α,β -unsaturated carbonyl group의 이중 결합이 제거된 tetrahydrocurcumin (THC) (Fig. 14)을 처리한 결과 curcumin은 15-PGDH 발현을 증가시키는 반면, tetrahydrocurcumin은 15-PGDH 발현을 유도하지 못하였다 (Fig. 15). 이러한 결과는 curcumin의 α,β -unsaturated carbonyl group이 15-PGDH 발현에 중요한 역할을 함을 시사한다.

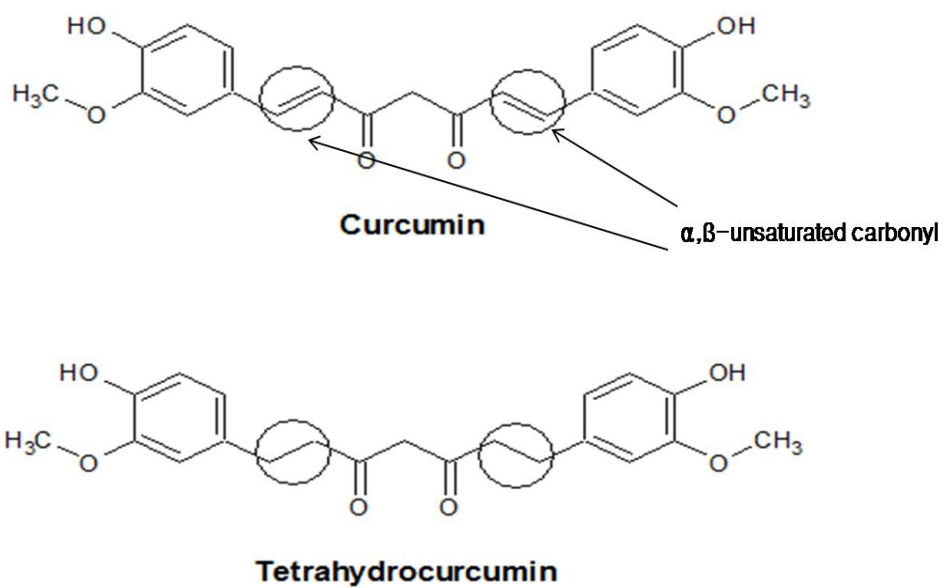


Fig. 14. The chemical structures of curcumin and tetrahydrocurcumin (THC).

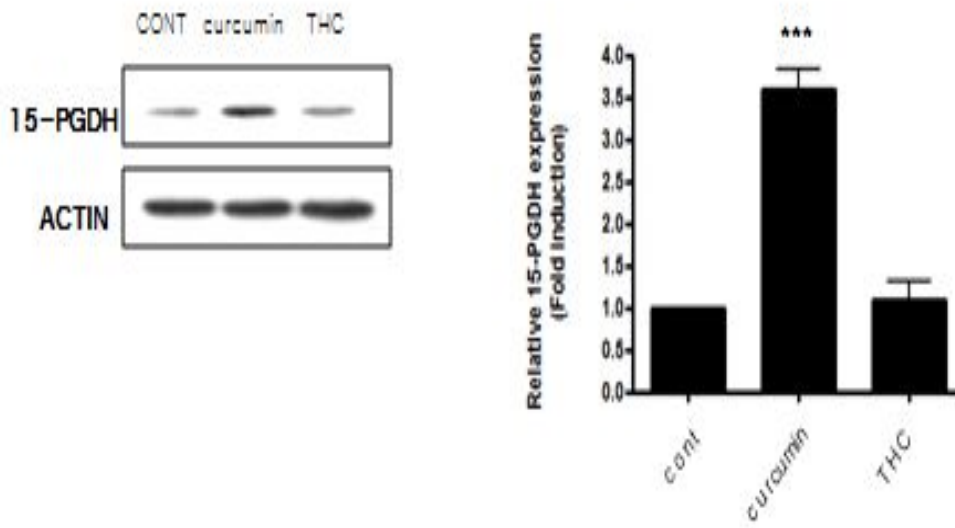


Fig. 15. Effects of curcumin and tetrahydrocurcumin (THC) on 15-PGDH expression. RGM-1 cells were treated with 10 μ M of curcumin for 6h. *** $p < 0.001$

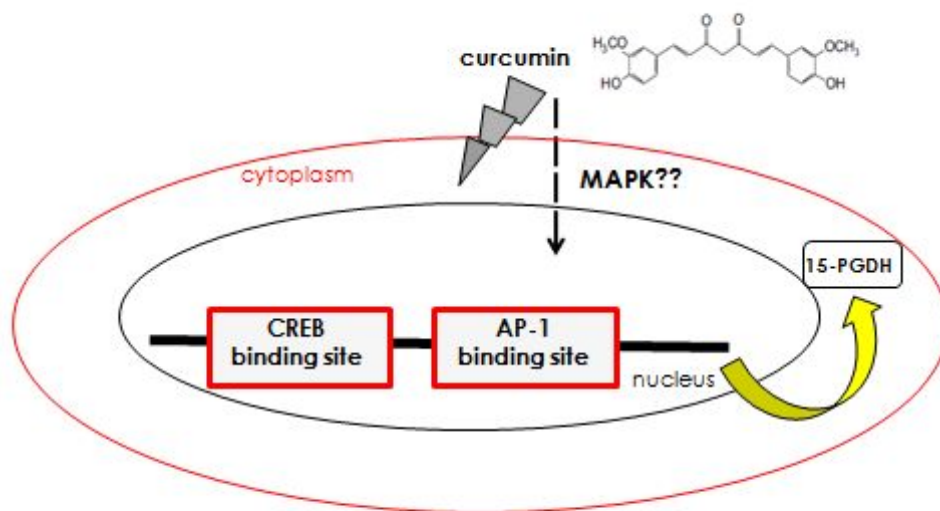


Fig. 16. The proposed mechanisms for curcumin-induced 15-PGDH Expression in RGM-1 cells.

Ⅲ. 결론 및 고찰

Curcumin을 비롯한 capsaicin, resveratrol, EGCG등 과 같은 식이 파이토 케미칼들은 발암의 개시와 촉진단계를 예방하는 것으로 알려져 있다 [44]. Curcumin (diferuloylmethane)은 polyphenol이며 약물학적으로 강황의 화합물이다. tumeric에서 노란색을 띠는 주요한 curcuminoids는 diferuloylmethane (curcumin), demethoxycurcumin (curcumin II), bisdemethoxycurcumin (curcumin III)과 최근에 확인된 cyclocurcumin 이다 [45]. Curcumin이 발암 예방에 관여한다는 연구 결과들이 다수 보고 되었다. Curcumin은 대장암 세포에서 AKT 신호경로를 저해하여 p53의 활성을 증가시킴으로서 세포의 증식 억제와 apoptosis를 유도한다 [46]. 또한 두경부 암 세포에서는 curcumin에 의해 유도된 apoptosis에 caspase-3 활성화가 관여했다 [47]. 본 연구에서는 Rat 위 정상세포 RGM-1에서 curcumin에 의한 15-PGDH 발현 증가를 확인하였다. 한편, curcumin의 α,β -unsaturated carbonyl group의 이중 결합을 제거한 tetrahydrocurcumin 은 15-PGDH 발현 증가에 영향을 미치지 못하였다.

대부분의 염증 반응은 ERK1/2라 불리는 p44/42 MAPK, JNK, p38 MAPK 가 대표적인 pathway로 알려져 있다 [48]. Curcumin은 PMA anisomycin, UV-C, gamma radiation, TNF 와 sodium orthovanadate 와 같은 물질들에 의해 활성화되는 JNK 활성을 저해하였는데, 이는 curcumin 이 MAPKKK 또는 이의 상위 신호 분자 활성을 저해함으로써 JNK pathway에 영향을 준다고 하였다 [49]. Curcumin은 MEKK1-JNK pathway와 이의 하위 신호전달 분자인 AP-1 과 NF-kB signaling을 저해하였으며, 이는 curcumin의 항종양 및 항암 효능을 설명 할 수 있다 [50]. 본 연구에서도 MAPK inhibitor 에 의해 curcumin에 의해 유도된

15-PGDH 발현이 저해되지 않았으며, curcumin 처리에 의해 ERK1/2 과 JNK1/2 의 인산화가 확인 되었기 때문에 curcumin에 의한 15-PGDH 발현에 MAPKs 가 관여하지 않는 것으로 사료된다. 결론적으로 curcumin이 MAPK signaling에 영향을 미치지 않으면서 15-PGDH를 induction 시키는 것으로 사료된다.

cAMP response element-binding (CREB)는 여러 유전자들의 전사조절인자로 잘 알려져 있고 성장 조절유전자들의 활성화에 관여하며 세포증식, 분화 및 생존에 매우 중요한 세포내 인자이다. CBP는 cAMP response element-binding (CREB) 와 adenoviral E1A 의 결합 인자다 [51, 52]. CREB는 cAMP response element-binding transcription factor로, 특정 DNA sequence에 결합해 downstream gene의 transcription을 조절한다. signal이 receptor와 결합하여 유발되는 signal transduction pathway를 통해 활성화 되며, 활성화된 CREB는 CRE region에 결합하여 CBP (CREB binding protein)를 불러들이고 이를 통해 특정 gene의 활성을 조절한다. CBP는 다양한 염기서열 특이적 DNA 결합 전사인자들에 대한 활성보조인자로서 DNA복구, 세포성장, 세포분화 및 세포사멸 등의 다양한 세포활동에 관여한다 [53]. CREB는 CRE (cAMP 반응순서, TGACTCA)에 결합하는 단백질로 CRE를 갖는 유전자 전사는 cAMP 농도 상승에 응답하여 유도된다. CREB는 bZIP구조의 43kDa단백질로 호모 2합체를 형성하여 DNA에 결합한다. CREB는 인산화효소A에 의해 133번 세린이 인산화 되고, 인산화 CREB는 공활성화인자 CREB 결합단백질에 결합하여 전사를 활성화한다. CRE에 결합하는 단백질은 인산화효소A에 의해 활성화하는 CREB형과 활성화하지 않은 CRE-BP1형으로 나뉜다. 이전의 연구에서 CREB의 활성화가 인간 구강암종 세포주에서 apoptosis를 유도했다 [54]. 또한 두경부암에서 CREB가 세포사멸에 관여함을 확인했다 [55].

AP-1 family는 Jun (c-jun, Jun B, Jun D), Fos (c fos, Fos B, Fra 1,

Fra2), 활성 전사 인자 (ATF 2, ATF3, B ATF) 단백질의 homo 와 hetero dimers로 구성되어 있다 [56]. 이러한 dimeric transcription factors는 TRE, CRE site 에 결합한다 [57]. 이와 같이 AP-1은 여러 단백질의 재조합으로 구성된다. AP-1 활성 조절은 specific protein kinases 와 몇몇의 transcriptional coactivators와 함께 상호작용을 한다. AP-1 활성은 종양 진행과 전이에 관여한다고 알려져 있다. 기존의 연구에서 gingerol이 종양세포에서 AP-1을 활성화시켜 apoptosis를 유도하고, anti-apoptotic 단백질의 발현을 억제하여 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 억제한다고 하였다 [58]. curcumin은 AP-1에 의해서 종양 관련 유전자인 TNF- α 의 발현을 억제하였다 [59, 60]. 본 연구에서는 curcumin에 의하여 AP-1 family인 c-Jun, c-Fos 와 CREB의 발현증가를 확인하였다.

결론적으로, 본 연구 결과 curcumin은 CREB 와 AP-1 signaling pathway를 통해 15-PGDH 발현을 유도하며 이는 curcumin의 새로운 항암 기전으로 제시 될 수 있다. 아울러, 위암을 비롯한 다른 암의 치료와 예방을 위한 분자적 지표로써 고려될 수 있을 것이라 사료된다.

IV. 참고문헌

1. Ristima ki A, Honkanen N, Jan ka la H , Sipponen P, Ha rko nen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:1276-80.
2. Saukkonen K, Rintahaka J, Sivula A, et al. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis. *APMIS* 2003;111: 915-25.
3. Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1923-31.
4. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and downregulates Bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Research* 1998; 10: 4245-9.
5. Eberhart, C.E. and R.N. Dubois, Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 1995. 109(1): p. 285-301.
6. Gupta, R.A. and R.N. Dubois, Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer*, 2001. 1(1): p. 11-21.
7. Wang, D. and R.N. Dubois, Prostaglandins and cancer. *Gut*, 2006. 55(1): p. 115-22.

8. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*, 2007. 282(16): p. 11613-7.
9. Pugh, S. and G.A. Thomas, Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut*, 1994. 35(5): p. 675-8.
10. Rigas, B., I.S. Goldman, and L. Levine, Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med*, 1993. 122(5): p. 518-23.
11. Tatsuwaki, H., et al., Reduction of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression is an independent predictor of poor survival associated with enhanced cell proliferation in gastric adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 2010. 101(2): p.550-8.
12. Eberhart, C.E., et al., Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 1994. 107(4): p. 1183-8.
13. Ensor, C.M. and H.H. Tai, 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1995. 12(2-3): p. 313-9.
14. Dannenberg, A.J., et al., Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol*, 2001. 2(9): p. 544-51.
15. Yan M, Rekro RM, Platzer P, et al., 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF- β -induced suppressor of human gastrointestinal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 17468-73.

16. Liu, Z., et al., Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 2008. 29(6): p. 1219-27.
17. Jang, T.J., Y.S. Ji and K.H. Jung, Decreased expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in gastric carcinomas. *Yonsei Med J*, 2008. 49(6): p. 917-22.
18. Thiel, A., et al., 15-hydroxyprostaglandin is down-regulated in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(14): p. 4572-80.
19. Myung S.J., et al., 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(32): p. 12098-102.
20. Yan M, Rerko RM, Platzer P, Dawson D, Willis J, Tong M, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 17468-73.
21. Backlund MG, Mann JR, Holla VR, Buchanan FG, Tai HH, Musiek ES, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J Biol Chem* 2005; 280: 3217-23.
22. Ding Y, Tong M, Liu S, Moscow JA, Tai HH. NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) behaves as a tumor suppressor in lung cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26: 65-72.
23. Myung SJ, Rerko RM, Yan M, Platzer P, Guda K, Dotson A, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in

- vivo suppressor of colon tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 12098-102.
24. Wolf I, O'Kelly J, Rubinek T, Tong M, Nguyen A, Lin BT, et al. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. Cancer Res 2006; 66: 7818-23.
 25. Backlund MG, Mann JR, Holla VR et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. J Biol Chem 2005; 280: 3217-23.
 26. Ding Y, Tong M, Liu S, Moscow JA, Tai HH. NAD⁺-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) behaves as a tumor suppressor in lung cancer. Carcinogenesis 2005; 26: 65-72.
 27. Myung SJ, Rerko RM, Yan M et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 12098-102
 28. Kwan-Su Kim. Quantitative Determination and Stability of Curcuminoid Pigments from Turmeric (*Curcuma longa* L.) Root 2005; 50: 211-215.
 29. 대한약전 제8개정, 2002.
 30. 대한약전외한약규격집, 2002.
 31. Sharma, R. A., A.J. Gescher, and W.P.Steward.2005. Curcumin: The story so far. Eur. J. Cancer 41(13): 1955-1968.

32. Tang, W. and G. Eisenbrand. 1992. Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. Chapter 52. Curcuma spp. Springer-Verlag. Berlin. p. 401-415.
33. Aggarwal, B.B., A. Kumar, and A.C. Bharti, Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 2003. 23(1A): p. 363-98.
34. Kunnumakkara, A.B., P. Anand, and B.B. Aggarwal, Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett*, 2008. 269(2): p. 199-225.
35. Kunnumakkara, A.B., P. Anand, and B.B. Aggarwal, Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett*, 2008. 269(2): p. 199-225.
36. Conney, A.H., Enzyme induction and dietary chemicals as approaches to cancer chemoprevention: the Seventh DeWitt S. Goodman Lecture. *Cancer Res*, 2003. 63(21): p. 7005-31.
37. Aggarwal, B.B., et al., Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. *Biochem Pharmacol*, 2007. 73(7): p. 1024-32.
38. Huang, M.T., et.,al Inhibitory effects of dietary curcumin

on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res*, 1994. 54(22): p. 5841-7.

39. Shibata, T., et al., Thioredoxin as a molecular target of cyclopentenone prostaglandins, *J Biol Chem*, 2003. 278(28): p. 26046-54.
40. Foresti, R., et al., Differential activation of heme oxygenase-1 by chalcones and rosmolic acid in endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 312(2): p. 686-93.
41. Heiss, E., et al., Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem*, 2001 .276(34): p. 32008-15.
42. Rossi, A., et al., Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinases. *Nature*, 2000. 403(6765): p. 103-8.
43. Cernuda-Morollon, E., et al., 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem*, 2001. 276(38): p. 35530-6.
44. Surh, Y.J., Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(10): p. 768-80.
45. Kiuchi, F., et al., Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1993. 41(9): p. 1640-3.
46. Carnero, A 2010. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr. Pharm. res.* 16, 34-44.

47. Huang MT, Newmark HT, and Frenkelk: Inhibitor effect of curcumin on tumorigenesis in mice. *J. cell. Biochem. Suppli*, 1997; 27: 26-34.
48. Chen, Y.R., G. Zhou, and T.H. Tan, c-Jun N-terminal kinase mediates apoptotic signaling induced by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Mol Pharmacol*, 1999. 56(6): p. 1271-9.
49. Rao, T.S., N. Basu, and H.H. Siddiqui, Anti-inflammatory activity of curcumin analogus. *Indian J Med Res*, 1982. 75: p. 574-8.
50. Joe, B. and B.R. Lokesh, Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1224(2): p. 255-63.
51. Lazennec G, Thomas JA, Katznellenbogen BS. 2001. Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77: 193 - 203.
52. Maher BS, Hughes HB III, Zubenko WN, Zubenko GS. 2009. Genetic linkage of region containing the CREB1 gene to depressive disorders in families with recurrent, early-onset, major depression: A re-analysis and confirmation of sex-specific effect. *Am J Med Genet Part B* 153B:10 - 16.
53. Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in

transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001;276:13505-8.

54. Jung Hyun Chang, MD1, Joo-Heon Yoon, MD,1,2 Eun Chang Choi, MD,1 Kun Wayn Lee, MD,1 Chang Il Cho, MD1 and Kyung-Su Kim, MD1,2 Mechanism of Apoptosis Induced by Ginkgo Biloba Extract(Egb 761) in Oral Cavity Cancer Cell Lines. *Korean J Otolaryngol* 2006;49:1181-7.
55. Pietras K, Ostman A, Sjoquist M, Buchdunger E, Reed RK, Heldin CH, et al. Inhibition of platelet-derived growth factors reduces interstitial hypertension and increase transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* 2001;61:2929-34.
56. Shaulian, E. and M. Karin, AP-1 as a regulator of cell life and death, *Nat Cell Biol*, 2002. 4(5): p. E131-6.
57. Angel, P. and M. Karin, The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1991. 1072(2-3): p. 129-57.
58. Dorai T, Aggarwal BB, 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett* 215; 129-140.
59. Huang, T.S., S.C. Lee, and J.K. Lin, Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(12): p. 5292-6.
60. Xu, Y.X., et al., Curcumin inhibits IL 1 alpha and TNF-alpha induction of AP-1 and NF-kB DNA-binding activity in bone marrow stromal cells. *Hematopathol Mol Hematol*, 1997. 11(1): p. 49-62.

Abstract

Curcumin-induced 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in Gastric Normal Cell

Ji-Hye, Jang

Department of Food & Nutrition,

The Graduate School,

Sungshin Women's University

Curcumin is a polyphenol and pharmacologically active compound of the perennial herb *Curcuma longa* (commonly known as turmeric). Overproduction of prostaglandin E₂ (PGE₂) has been reported to be implicated in carcinogenesis. The intracellular level of PGE₂ is regulated not only by its biosynthesis, but also by its degradation process. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) is the key enzyme that catalyzes the first step in the degradation of PGE₂. In the present study, we have examined the chemoprotective effects of curcumin in the

gastric normal cells (RGM-1). We observed that curcumin upregulates 15-PGDH expression in gastric normal cells (RGM-1). By using deletion constructs of 15-PGDH promoter, we found that CREB or AP-1 is the most essential determinant for 15-PGDH induction. In contrast, tetrahydrocurcumin which lacks the α,β -unsaturated carbonyl group failed to expression 15-PGDH, suggesting that the α,β -unsaturated carbonyl group of curcumin plays a critical role in RGM-1 cells. These results suggest that curcumin increases 15-PGDH expression through the activation of CREB / AP-1 transcription factor, and 15-PGDH may be a novel gastric cancer.

감사의 글

눈 깜박할 사이에 2년이란 시간이 흘러 이 논문을 완성하게 되었습니다.

바쁘신 중에도 저를 열심히 지도해 주신 나혜경 교수님께 먼저 감사의 말씀을 드립니다. 첫 제자인 만큼 더욱 더 열심히 하는 모습 보여드리고 싶었는데, 항상 기대에 못 미친 점 죄송합니다. 소중한 가르침을 주신 안홍석 교수님, 한영숙 교수님, 이명숙 교수님, 윤현근 교수님, 이승민 교수님, 표영희 교수님, 고성희 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 저의 논문이 완성되기까지 많은 도움을 주신 서울대학교의 차영남 교수님, 서영준 교수님, 지강동 교수님, 박종민 박사님께 진심으로 감사드립니다.

옆에서 항상 응원해 주고 많은 도움을 준 소중한 동생 영욱이, 실험실 생활과 조교 생활에 버거워할 때마다 상냥하게 가르쳐준 우리, 힘들 때마다 힘이 되어준 우리Family인 S.T.A.R들...순영이 언니, 소진이, 소미. 그리고 식영과 식구들 예진이, 지선이 모두에게 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

조금은 늦은 나이에 다시 학교생활을 하면서 힘들고 속상할 때마다 힘을 북돋아주고 위로해준 나의 15년지기 친구들 “세봉파”...(결혼에 임신까지 요즘 정말 행복해 보이는 김정, 천상여자 이쁜이 임정, 키는 제일 크지만 마음은 제일 여린 저비, 갑부집 며느리가 된 세봉, LG의 능력자 혜자)에게도 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로 지금까지 저를 믿고 튼튼한 밑거름이 되어주신 부모님, 하늘에서도 저를 위해 기도해주고 계실 우리 할머니, 가끔씩 용돈으로 날 감동시키는 지훈이 오빠, 나의 투정까지도 묵묵히 받아준 성환이, 나의 가족 모두에게 감사의 마음을 전합니다.

사랑합니다.