

# Curcumin이 PWM에 의해 활성화된 Epstein-Barr 바이러스 변형 사람 B 림프종 세포의 사멸에 미치는 효과

유상채 · 이장석<sup>1</sup> · 정명수<sup>1</sup> · 이기남<sup>1\*</sup>

원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, 1: 원광대학교 한의과대학 예방의학교실

## Apoptotic Effects of Curcumin on the Epstein-Barr Virus-Transformed Human B Lymphoma Cells Activated by PWM

Sang Chae Ryu, Jang Suk Lee<sup>1</sup>, Myong Soo Chong<sup>1</sup>, Ki Nam Lee<sup>1\*</sup>

Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine,  
1: Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The results of this study intended to clarify the apoptotic effects of curcumin on Epstein-Barr virus transformed human B lymphoma (EBV-B) cells are summarized as follows: It was found that curcumin induced endoplasmic reticulum(ER) stress as well as apoptotic cell death in EBV-B cells, although the magnitude of action was insignificant. When EBV-B cells activated by pokeweed mitogen (PWM) were treated with the same concentrations of curcumin, it was found that higher ER stress (GRP78, P-PERK, XBP-1, ATF6, and CHOP expressed) increased unfold protein response (UPR) and thus, apoptosis attributed to ER stress, compared to non-activated EBV-B cells In conclusion, it is expected that curcumin will play an important role for leukemia treatment.

Key words : curcumin, epstein-barr virus transformed human B lymphoma, PWM (Pokeweed mitogen), endoplasmic reticulum stress response, apoptotic cell death

### 서 론

Curcumin(Turmeric yellow, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>)<sup>1)</sup>은 生薑科(생강과; Zingiberaceae)에 속한 多年生草本인 姜黃 *Curcuma wenyujin*<sup>2,3)</sup>= *C. aromatica*<sup>4)</sup>, 천울금 *C. chuanyujin*<sup>2)</sup>, 강황 *C. longa*<sup>2)</sup>, 봉아출 *C. aeruginosa*<sup>2,3)</sup>= *C. phaexcaulis*<sup>4)</sup> 및 광서아출 *C. kwangsinsis*<sup>2,3)</sup> 등의 塊根<sup>2)</sup>, 根莖<sup>2)</sup>에 共通으로 함유된 有效成分 가운데 主要한 成分이다<sup>1,2,5)</sup>. Curcumin은 자연적으로 발생하는 turmeric에서 분리된 노란 색소로서<sup>6)</sup> 利膽<sup>1)</sup>, 抗菌<sup>1,3)</sup> 등의 약리작용이 있다.

소포체(Endoplasmic reticulum, ER)스트레스란 소포체 내의 조절단계인 폴딩(folding)과 당화를 저해하는 모든 환경, 그리고 이 환경으로 인해 발생하는 세포 수준의 반응을 통칭하는 말이다<sup>7)</sup>. 다만 평균적인 항상성을 유지하고 있는 세포에서는 일상적으로 폴딩에 문제가 발생하며, 이러한 폴딩 상의 문제가 세포 자

체의 두 가지 능력인 단백질의 폴딩을 강화시키는 능력과 폴딩에 계속해서 문제가 발생된 단백질을 분해해서 청소하는 능력을 통해 균형을 이루고 있다. 소포체 스트레스가 발생하는 환경이 되면 세포는 스스로 문제를 자각하고 이 두 가지 능력을 강화시킴과 동시에, 세포 내에서 합성되는 단백질의 양을 줄임으로써 문제를 해결하고자 한다. 이 같은 일련의 세포 반응을 unfolded protein response(UPR)라고 한다<sup>7,9)</sup>.

ER스트레스는 UPR을 촉발시킨다. 포유동물세포에서 UPR은 3가지 ER스트레스-저항성 센서로 구성되는 신호전달 네트워크로 구성되어 있는바, 이들은 포유동물세포에서 UPR은 ER스트레스에 존재하는 센서로 구성되는 신호전달 네트워크로 구성되어 있다. Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase(PERK), inositol-requiring enzyme 1(IRE1), 그리고 activating transcription factor 6(ATF6)와 같은 세 가지가 존재한다<sup>7,9)</sup>.

UPR 유도는 일반적인 단백질합성을 감소시키며, 발생기 단백질의 ER스트레스로의 유입을 감소시키고, 그리고 ER스트레스 저항성 샤페론 전사, 효소의 접힘, 축적된 misfolded 단백질의 축적을 예방하기 위한 단백질 분해 기전의 성분을 증가시키는 결

\* 교신저자 : 이기남, 익산시 신용동 원광대학교 한의과대학 예방의학교실

· E-mail : kinam1@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6836

· 접수 : 2012/03/20 · 수정 : 2012/04/20 · 채택 : 2012/04/26

과를 가져온다. 이러한 misfolded 단백질은 단백질 성숙 과정을 통해서 더 이상 진행되지 못하게 예방하면서 ER스트레스 조절시스템에 의해서 인식되고 ER스트레스에 보유된다. UPR은 세포가 양면성 환경 스트레스에 대해 생존할 수 있게 한다<sup>7-9</sup>. 그러나, 만약 스트레스가 심각하거나 지속된다면, UPR 활성화는 결국 세포 주기를 조절하거나 세포사멸에 이르게 한다<sup>10-17</sup>.

Curcumin은 항암, 항염증, 항산화, 항증식 효과 등과 같은 여러 가지 약리학적 활성을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>6,18,19</sup>. Curcumin은 정상 세포보다 몇 가지 종류의 암세포에 대해 효과적으로 세포사멸을 일으킨다. Curcumin에 의하여 유도된 세포사멸의 가능한 기전은 증가된 Bax에 의해 시작되는 caspase의 활성화, 미토콘드리아 기능저하와 관련있다고 보고되어 왔으며, 그것은 pro-apoptotic 활성을 가지는 Bcl-2계 단백질이다<sup>20-22</sup>.

Curcumin은 강한 항염증과 면역억제 성질을 가지고 있다. Curcumin은 다양한 면역세포들의 cellular 반응과 성장을 조절하는 것을 보여 왔으나<sup>23</sup> curcumin이 B세포의 세포사멸효과에 대한 研究報告는 없었다. 이에 저자는 curcumin이 ER스트레스 반응의 유도를 통해서 암세포화된 B세포의 세포사멸을 유도한다는 것을 관찰하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

Curcumin, pokeweed mitogen(PWM), 그리고 Thapsigargin(TG)는 Sigma-Aldrich(St Louis, Mo)에서 구입하였으며, Bcl-2, procaspase-3, PERK, CHOP와  $\beta$ -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif)에서 구입하였고 phosphor(p)-IRE1a에 대한 항체는 Novus Biologicals (Littleton, CO)에서 구입하였다. 또 ATF6에 대한 항체는 Biomol(PlymouthMeeting, Pa)에서 구입하였으며 p-PERK and Xbp-1에 대한 항체는 Biologend(San Diego, Calif)에서 구입하였고 GRP78에 대한 항체는 Stressgen(Ann Arbor, MI)에서 구입하였으며, 다른 모든 화합물들은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포배양

Epstein-Barr virus-transformed B(EBV-B)세포는 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100 ug/ml streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 medium(Gibco, BRL)에서 기본적으로 배양하였으며 세포들은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>환경의 세포배양기 속에서 배양하였다<sup>24</sup>.

#### 2) Western Blot 과 Densitometry Analyses

처리 후, 세포를 수확하여 찬 PBS로 2회 세척하였다. 세포는 150mM NaCl, 1.0% IGEPAL®CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, protease inhibitor cocktails, phosphatase inhibitor cocktails로 20분간 처리하여 용해시켰다. 용해액은 4°C, 13,000rpm에서 15분간 원심분리시켜서 상등액을 모았다. 단백질은 BCA protein assay reagent(Pierce)로

정량하였다. 샘플은 Laemmli buffer로 5분간 끓였고, 동일량의 단백질들(50 $\mu$ g of protein)이 8% to 12% SDS-PAGE로 분리되었으며, 이후 poly(vinylidene difluoride) 멤브레인으로 옮겨졌다. 멤브레인은 0.1% Tween 20을 포함하는 5% nonfat milk 용액(PBS-T)으로 30분간 blocking하였고, BCL-2(1:500), procaspase-3(1:500), p-PERK(1:500), p-IRE1a(1:500), XBP-1(1:1000), ATF6(1:500), GRP78(1:1000), CHOP(1:500)에 대한 항체와 함께 3시간 동안 배양하였다. PBS-T로 세 번을 세척한 후, 멤브레인은 horseradish peroxidase - conjugated 2차 항체에 60분간 배양하였다. PBS-T로 5회 세척 후, 멤브레인은 chemiluminescent solution에 5분간 배양하였고 단백질 밴드는 x-ray film 상에 가시화시켰다. Densitometry 분석을 위하여, optical density(the gray-scale value of pixels: 0 to 255)는 Scion Image를 사용하는 inverted digital images(Scion Corp, Frederick, Md)를 이용하여 측정하였다<sup>25,26</sup>.

#### 3) 세포사멸 측정을 위한 Annexin V-FITC 염색

Curcumin과 함께 배양된 시간대별로 다양한 스트레스 유도체들에 노출된 세포들은 1000 g에서 5분간 원심분리 하였으며, pellets은 1.0 ml의 PBS와 1.0 ml 의 cold binding buffer(10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>)로 두 번 세척하였다. 세포는 100 ul의 binding buffer에 재현탁하였고, 상온의 어두운 곳에서 2 ul의 Annexin V-FITC 용액과 10 ul PI 용액에 15분간 염색하였다. 그리고나서, 샘플은 400 ul의 binding buffer에 희석되었고 30분 이내에 유세포분석기를 통하여 분석하였다. 모든 샘플에 대해 최소 50,000 세포들을 유지하였으며, 샘플들은 FACScalibur flow cytometer(BD Biosciences, Erembodegem, Belgium)로 분석하였다<sup>25</sup>.

#### 4) 유세포분석기를 통한 DNA Content 분석

세포들은 6 well dishes에서 배양되었고 처리에 노출되었다. 세포는 수확한 후 한차례 ice-cold PBS로 세척하였고, 원심분리하여 얻은 pellete은 70% ice-cold 에탄올로 고정하였다. PBS로 한 차례 세척한 후, 세포들은 37°C에서 20분간 RNase digeste하였다. 이후, 10분간 50  $\mu$ g/ml PI로 염색하였다. DNA contents는 FACScalibur flow cytomet ERS(BD Biosciences, Erembodegem, Belgium)를 사용하여 분석하였다. 세포사멸성 세포의 마커인 sub-G1가 diminished DNA content의 발생이다<sup>27</sup>.

#### 5) 통계학적 분석

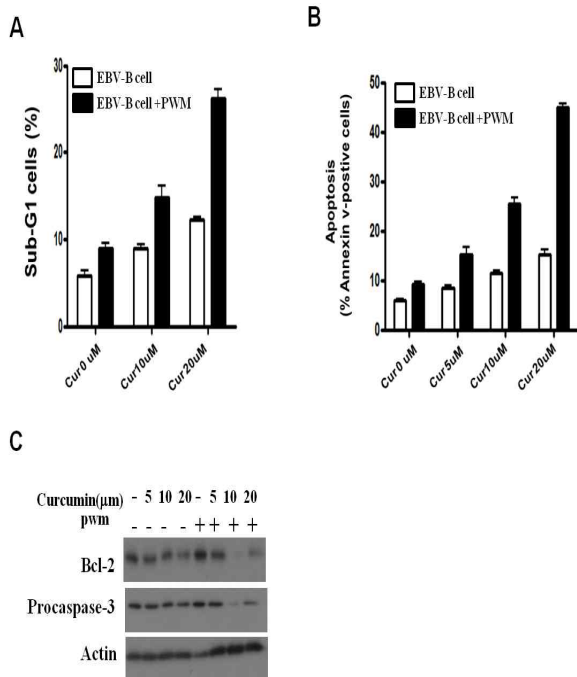
통계학적 분석은 GraphPad Prism software version 4(GraphPad Software Inc., San Diego, CA)를 통하여 이루어졌다. 3 또는 그 이상의 그룹을 비교하기 위해, 다양성의 t-test에 의한 one-way 분석을 사용하였다. 데이터는 최소한 3번의 독립적인 실험들의 평균(M)  $\pm$  표준편차(SD)로 표현하였다.

## 결 과

### 1. curcumin의 EBV-B 세포의 세포사멸에 대한 효과

Curcumin은 in vitro 실험에서 다른 암세포의 죽음을 유도하는 것을 보여 왔다. 반면, 이러한 phytochemical은 정상세포에

대해서는 독성을 나타내지 않는다. EBV-B세포에서, curcumin은 PWM에 의한 비자극 세포에 대해 농도 의존적으로 sub-G1 분획 (Fig. 1A)과 annexin V 염색된(Fig. 1B) 세포수를 증가시켰다. 그러나 curcumin은 PWM-자극 EBV-B세포에 대해서는 sub-G1의 분획과 annexin V 염색된 세포수를 더 많이 증가시켰다. 즉 curcumin은 PWM으로 자극이 안된 EBV-B세포에서 어느 정도 apoptosis를 유도하지만 PWM으로 자극된 세포에서 apoptosis를 더욱 증가시킴을 알 수 있다(Fig. 1). Curcumin에 의하여 유도된 세포사멸은 증가된 Bax에 의해 시작되는 caspase의 활성화, 미토콘드리아 기능저하와 관련 있다고 보고되었고, 그것은 pro-apoptotic 활성을 가지는 Bcl-2계 단백질이다. PWM으로 자극이 안 된 그리고 PWM으로 자극된 EBV-B 세포에서, curcumin에 의한 세포사멸의 유도는 anti-apoptotic Bcl-2 발현의 감소와 procaspase-3의 감소율을 동반하였다(Fig. 1C).

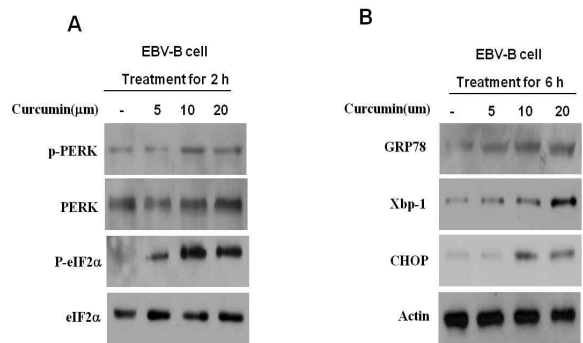


**Fig. 1. Effects of curcumin on apoptosis of EBV-B cells.** Cells were preincubated for 48h with presence or absence 5 mg/mL PWM and were then exposed for 12 hours (A and B) or 6h (C) to indicated concentrations of curcumin. sub-G1 fraction, quantification of apoptotic cells and Western blot analysis were performed as described in Materials and Methods.

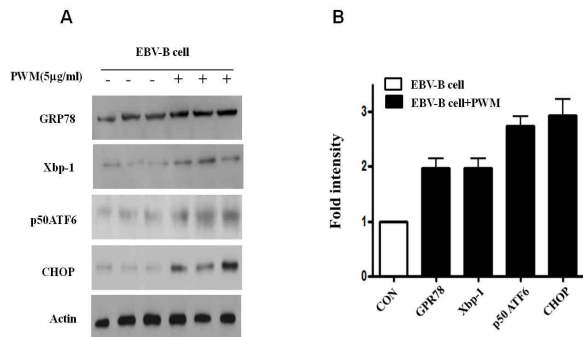
## 2. Curcumin과 PWM이 EBV-B 세포의 UPR에 미치는 영향

ER스트레스는 UPR을 촉발시킨다. Curcumin이 B세포에 있어서 ER스트레스를 야기하는지를 조사하기 위해, 몇 가지 ER스트레스-특이적 신호들을 측정하였다. 먼저, PERK와 eIF2a의 인산화 경향을 측정하였다. 왜냐하면, ER스트레스-저항성 트랜스멤브레인 카이네이저인 PERK는 ER의 lumen에서 축적된 unfolded 단백질에 대한 반응에서 세포질내 카이네즈(kinase)를 오토인산화시킨다고 알려져 있고, 활성화된 PERK는 eIF2a를 포함하는 몇몇 세포질 내 단백질을 인산화시킬 수 있기 때문이다. 본 연구에서, Western blot 분석을 통하여 세포가 curcumin과 함께 2시간동안 배양되었을 때 PERK와 eIF2a의 인산화가 증가되

는 것을 알 수 있었다(Fig. 2A). 다음으로 GRP78/Bip, Xbp-1, 그리고 CHOP/GADD153의 발현을 조사하였다. Fig. 2B에서, curcumin에 의한 GRP78/Bip, Xbp-1 그리고 CHOP/GADD153의 발현이 curcumin 처리 6시간 후에 급격하게 증가되었음을 나타내고 있다. PWM이 EBV-B 세포에서 ER스트레스를 야기하는지를 조사하였다. Fig. 3에서 보여지듯이, PWM 그 자체가 Xbp-1, ATF6 그리고 CHOP/GADD153의 발현을 증가시켰다.



**Fig. 2. Effects of curcumin on unfolded protein response of EBV-B cells.** Cells were incubated for 2 hours (A) or 6 hours (B) with indicated concentrations of curcumin. Western blot analysis for p-PERK, p-eIF2, GRP78, Xbp-1 and CHOP were performed as described in materials and methods.



**Fig. 3. Effects of PWM on unfolded protein response of EBV-B cells.** Cells were incubated for 48 hours with 5 ug/mL PWM. Western blot analysis (A) for GRP78, Xbp-1, ATF6 and CHOP, and densitometry analysis (B) were performed as described in materials and methods. Blots shown are representative of 3 independent experiments.

## 3. Curcumin이 활성화된 EBV-B 세포의 unfolded protein response(UPR)에 대한 효과

Fig. 3과 4에서 보듯이, curcumin은 PWM로 자극된 EBV-B 세포의 GRP78, Xbp-1과 CHOP의 발현을 증가시켰다. ER스트레스는 ER에서 작동하는 pro-세포사멸성 그리고 항-세포사멸성 분자들 간의 불균형에 기인하는 세포사멸과 관련된다고 알려져 왔고, curcumin은 위에서 기술하였듯이, PWM으로 자극된 EBV-B 세포에서 심각한 ER스트레스를 야기하였기 때문에, 본 연구는 curcumin이 장기적인 ER스트레스를 유도한 후, 그것이 결국 세포의 세포사멸을 야기한다는 가설을 세웠다. 이 가설을 증명하기 위해, curcumin이 EBV-B세포에서 ER스트레스-유도 세포사멸을 야기하는지의 여부를 조사하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보듯이 Annexin V/PI 염색과 유세포분석기를 통해서 확인한 결과 생존율 감소는 세포사멸에 기인하였다. 즉, Fig. 5의 A에서 보듯이 대

조균이나 PWM과 TG를 단독으로 처리하였을 때보다 PWM과 TG를 동시 처리할 경우 세포사멸을 나타내는 sub G1 분획인 M1에 포함되는 죽은 세포수가 현저히 증가하였고, Annexin V/PI로 염색한 결과인 B의 경우 PWM과 TG를 병용 투여한 경우가 대조군이나 PWM 혹은 TG를 단독 처리한 경우보다 사멸된 세포가 큰 폭으로 증가하였다.

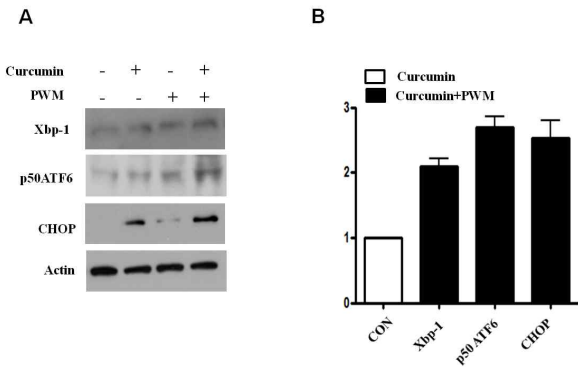


Fig. 4. Effects of curcumin on unfolded protein response of activated EBV-B cells. Cells were preincubated for 48 hours with presence or absence 50g/mL PWM and were then exposed for 6 hours to indicated concentrations of curcumin. Western blot analysis (A) for Xbp-1, ATF6 and CHOP, and densitometry analysis (B) were performed as described in materials and methods.

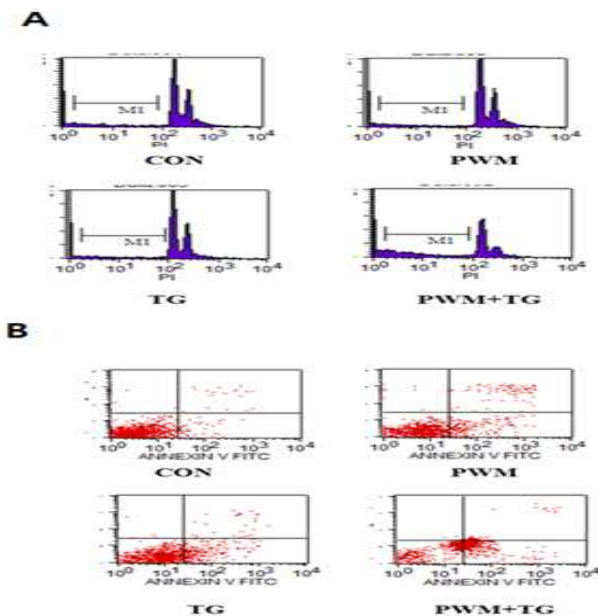


Fig. 5. Effects of TG on apoptosis of EBV-B cells. Cells were preincubated for 48 hours presence or absence with 5mg/mL PWM and were then exposed for 12 hours to indicated concentrations of 2mmol TG (A and B). Quantification of apoptotic cells were performed as described in materials and methods.

## 고찰

Curcumin(Turmeric yellow,  $C_{21}H_{20}O_6$ )<sup>1)</sup>은 생강과(Zingiberaceae)에 속한 多年生草本인 온울금 Curcuma wenyujin<sup>2)</sup>, 천울금 C. chuanyujin<sup>2)</sup>, 강황 C. longa<sup>2)</sup>, 봉아줄 C.

aeruginosa (= C. aeruginosa)<sup>2)</sup> 및 광서아줄 C. kwangsinis<sup>2)</sup> 등의 塊根<sup>2)</sup>, 根莖<sup>2)</sup>에 공통으로 함유된 유효성분 가운데 주요한 성분이다.

이러한 Curcumin, 이 함유된 이 식물들의 塊根<sup>2)</sup>, 根莖<sup>2)</sup>은 한의약에서 각각 鬱金<sup>3-5)</sup>, 薑黃<sup>2-5)</sup>, 蓬朮<sup>2)</sup> 혹은 莪朮<sup>3)</sup>이라고 칭하며 前者는 辛·苦, 寒 無毒하고 心·肝·膽 三經에 작용하여 涼血清心, 行氣解鬱, 活血止痛, 疏肝利膽 등의 효능이 있어 神志不清, 驚癇, 癲狂, 脇痛, 痛經, 月經不調, 癥瘕積塊, 吐血衄血, 濕熱黃疸 등의 병증을 치료하고 中者는 苦·辛, 溫 無毒하고 脾·肝 二經에 작용하여 破血行氣, 通經止痛 등의 효능이 있어 血瘀氣滯의 諸證, 脇痛, 經閉腹痛, 風濕臂痛, 跌打損傷, 瘡癰 등을 치료하며 後者는 辛·苦, 溫 無毒하고 肝·脾 二經에 작용하여 行氣破血, 消積止痛 등의 효능이 있어 血氣心痛, 飲食積滯, 脘腹脹滿疼痛, 血滯經閉, 痛經, 癥瘕積聚, 打撲損傷 등의 병증을 치료하는데 응용하고 있는데 주로 동남아시아의 아열대지방에서 자생하거나 재배되고 있다<sup>2)</sup>.

Curcumin이 Epstein-Barr 바이러스로 변형된 사람 B 림프종 세포에 미치는 세포사멸효과를 알아보기 위하여 실험한 결과 curcumin이 PWM으로 자극되거나 자극되지 않은 EBV-B세포에 있어서 세포사멸을 유도한다는 것을 증명하였다. 그러나 PWM으로 자극된 EBV-B세포는 농도 의존성 경향을 보이며 더욱 세포사멸성 세포죽음을 보였다.

Caspase 3의 활성화는 세포사멸이 일어나는 동안 사건들을 초기에 조절하며, 그것은 세포형태학에 있어서의 변화와 DNA 절단을 유도하는 데 있어서 필요하다. Caspase 3는 cytoskeletal 구조를 유지하는데 책임이 있는 cytoplasmic과 핵단백질의 주요 부분의 절단을 매개한다<sup>28)</sup>. B세포 림포마-2(Bcl-2)계 단백질은 anti- 그리고 pro-세포사멸성 단백질을 둘 다 포함하고 있다. Bcl-2와 Bcl-XL은 Bcl-2계 단백질의 anti-apoptotic을 일으키는 주요 단백질들이며, B 림포마에서 발현되어진다. 이러한 각각의 단백질들은 부분적으로 B세포활성화 이후 생존을 유지하는 것에 책임이 있다<sup>29,30)</sup>.

PWM으로 자극된 그리고 curcumin으로 처리된 EBV-B세포는 세포사멸성 세포죽음을 나타내는 Bcl-2와 caspase 3의 감소를 보였다. ER는 단백질 합성, 전사 후 조절, 적당한 접힘, 그리고 새롭게 합성된 막 단백질과 분비형 단백질의 성숙에 대해 책임이 있는 사이토플라즈믹 구획이다. 고농도의 단백질의 존재로 인하여, ER 속에 존재하는 다양한 샤페론은 folding-competent 상태에서 단백질을 유지시키고 뭉침으로부터 단백질 접힘 중간물질을 막는다<sup>7-9)</sup>. 그러나 하이폭시아(hypoxia), 영양결핍, 이화화결핍의 감소, 그리고 어떤 단백질들의 과발현 등을 포함하는 일정 범위의 세포독성 조건하에서, 단백질 misfolding이 적당한 ER 기능의 붕괴를 통하여 일어나며, 그것은 ER에서 unfolded 단백질의 축적과 뭉침을 초래한다. ER에서 이러한 비정상적인 증상을 모아서 ER스트레스라고 부른다<sup>31)</sup>.

포유동물에서 이러한 ER스트레스 막 단백질, 즉 IRE-1(inositol requiring element 1), ATF(activating transcription factor) 6 그리고 PERK(protein kinase-like ER resistance kinase)

가 존재하며, 이들은 ER스트레스를 인지하고 ER스트레스 chaperones glucose-regulated protein(GRP78/Bip)와 같은 ER스트레스 cheperones을 유도하는 전사인자들을 활성화시키거나 또는 새로운 단백질의 합성을 저해하기 위하여 eukaryotic initiation 인자 2(eIF2)를 인산화 시킨다. 이러한 과정들을 unfolded 단백질 반응(UPR)이라고 부른다<sup>14,15</sup>. UPR활성화의 기본 효과는 ER스트레스를 보호하기 위해 디자인되었지만, 그들은 또한 다른 기관들에 대한 손상을 제한하고 prolonged 스트레스를 경험하는 세포를 제거함으로써 세포기관들을 보호하기도 한다. 심각한 ER스트레스의 조건하에서, 세포는 적응할 수 없고, UPR은 세포사멸을 촉발시킨다<sup>16</sup>. ER스트레스와 세포사멸을 연결시키는 몇 가지 기전이 제시되었다<sup>17</sup>. ER스트레스는 capase-12와 C/EBP homologous protein/growth arrest, 그리고 CHOP/GADD153(DNA damage-inducible gene 153)를 활성화시켜줌으로써 apoptosis가 일어나는 과정에 관련된 ER스트레스 specific cascade을 일으킨다<sup>16,17</sup>. 많은 연구자들이 curcumin이 다른 세포에서 pro-세포사멸 ER스트레스를 유도할 수 있다고 보고하였다<sup>11-17</sup>.

EBV-B세포에서 curcumin에 의하여 유도된 세포사멸에 관련된 분자기전을 알기 위해, 본 연구는 ER스트레스의 개시를 유도하는 UPR의 신호전달 물질을 측정하한 결과 curcumin은 PERK, eIF2a, GRP78, 그리고 cleaved Xbp-1 전사인자를 증가시켰다. 이는 curcumin이 EBV-B세포에서 ER스트레스를 일으키는 능력을 가지고 있다는 것과 관련된 세포사멸을 유도한다는 것을 제시한다.

Curcumin 뿐만 아니라 PWM은 EBV-B세포에서 ER스트레스를 유도하였다. 이러한 UPR은 “physiologic” UPR로서 “ER스트레스” 또는 “terminal” UPR과는 다르며, 이것은 심각한 또는 prolonged ER스트레스를 야기하는 화학물질 또는 영양결핍에 의해 유도된다<sup>16,17</sup>. 이러한 결과는 UPR components가 PWM으로 자극된 EBV-B세포에서 이미 많이 발현되어 있다는 것을 알 수 있다. 또한, curcumin은 자극이 안 된 EBV-B세포에서보다 PWM-자극된 EBV-B세포에서 더 심각한 UPR을 야기하였다. 결과적으로 curcumin은 자극이 안 된 EBV-B세포보다 PWM으로 자극된 EBV-B세포에서 더 높은 세포사멸성 EBV-B세포죽음을 유도하였다.

UPR 신호전달 경로 중에서, CHOP는 표적세포에 있어서 chronic 그리고 excessive ER스트레스가 세포사멸성 세포죽음을 일으킬 때, pro-세포사멸성 분자로서 알려져 있다<sup>7-10</sup>). 이 실험에서 curcumin은 PWM으로 자극된 EBV-B세포에서 더 많은 CHOP의 발현을 유도하였다. 이러한 결과들은 PWM으로 자극된 세포들이 curcumin으로 처리되었을 때, EBV-B세포가 더 죽는다는 사실과 일치한다.

PWM으로 자극된 EBV-B세포의 세포사멸성 세포죽음이 ER스트레스에 의하여 유도된 UPR에 의해 야기되는지의 여부를 더 확실하게 하기 위해, PWM으로 자극된 EBV-B 세포에 ER스트레스 유도제로서 잘 알려진 TG를 처리한 결과 TG는 또한 자극되지 않은 EBV-B세포보다 PWM으로 자극된 EBV-B세포에서 더

높은 세포사멸성 세포죽음을 유도하였다.

결과적으로 curcumin이 증식하는 B세포에 있어서 부가적인 UPR을 증가시킴으로써 라이젠드-매개 확장하는 B세포의 클론에 세포사멸성 세포죽음을 유도에 의한 B세포에 의한 백혈병 치료제로 사용 될 수 있을 것으로 생각한다.

## 결 론

Curcumin이 Epstein-Barr 바이러스로 변형된 사람 B 림프종 세포에 미치는 세포사멸효과를 알아보기 위하여 실험한 결과 다음과 같이 요약할 수 있었다.

Curcumin은 Epstein-Barr 바이러스(EBV)로 변형된 사람 B 림프종에서 endoplasmic reticulum(ER) 스트레스를 줄 뿐만 아니라 세포사멸성 세포죽음을 유도하지만 그 작용이 미미함을 알 수 있었다.

PWM(Pokeweed mitogen)에 의해 활성화된 EBV-B세포에서는 같은 농도의 curcumin을 처리하였을 때, 활성화되지 않은 EBV-B세포에서보다는 ER스트레스의 증가(GRP78, P-PERK, XBP-1, ATF6, CHOP 등의 발현)로 unfolded protein response(UPR)를 증가시킴으로서 ER스트레스에 의한 세포사멸성 세포죽음을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

결과적으로 울금, 강황 등의 塊根, 根莖에 공통으로 함유된 유효성분인 curcumin이 백혈병의 치료에 훌륭한 역할을 할 수 있을 것으로 생각되어진다.

## 감사의 글

이 논문은 2011학년도 원광대학교 교비지원에 의해서 수행되었음.

## 참고문헌

1. 中國中草藥情報. 植物有效成分手冊. 北京, pp 281-282, 1986.
2. 辛民教. 精華 臨床本草. 圖書出版 永林社, 서울, pp 479-481, 491-492, 531-532, 2010.
3. 中華本草 編纂委. 中華本草. 上海人民出版社, 上海, 8: 642, 1999.
4. 蔡光先. 湖南藥物志. 湖南科技出版社, 湖南, pp 2578-2581, 3352-3354, 3475-3476, 2004.
5. 鄭善燮, 辛民教. 圖解鄉藥(生藥)大事典(植物篇). 圖書出版 永林社, 서울, pp 256-259, 1990.
6. Jain, S.K., DeFilippis, R.A. Medicinal Plants of India. Algonac, MI, Reference, p 120, 1991.
7. Schroder, M., Kaufman, R.J. ER stress and the unfolded protein response, Mutat. Res. 569: 29-63, 2005.
8. Zhang, K., Kaufman, R.J. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease, Neurology 66: S102-109, 2006.

9. Schroder, M., Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response, *Annu. Rev. Biochem.* 74: 739-789, 2005.
10. Faitova, J., Krekac, D., Hrstka, R., Vojtesek, B. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11: 488-505, 2006.
11. Ibba, M., Soll, D. Quality control mechanisms during translation, *Science* 286: 1893-1897, 1999.
12. Wickner, S., Maurizi, M.R., Gottesman, S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins, *Science* 286: 1888-1893, 1999.
13. Ellgaard, L., Molinari, M., Helenius, A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway, *Science* 286: 1882-1888, 1999.
14. Brewer, J.W., Diehl, J.A. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 12625-12630, 2000.
15. Brewer, J.W., Hendershot, L.M., Sherr, C.J., Diehl, J.A. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8505-8510, 1999.
16. Mc Cullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., Holbrook, N.J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state, *Mol. Cell. Biol.* 21: 1249-1259, 2001.
17. Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D., Ron, D. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival, *Mol. Cell.* 7: 1153-1163, 2001.
18. Ammon, H.P., Wahl, M.A. Pharmacology of Curcuma longa, *Planta Med.* 57(1):1-7, 1991.
19. Leung, A. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics, New York, Wiley, pp 313-314, 1980.
20. Karmakar, S., Banik, N.L., Patel, S.J., Ray, S.K. Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells, *Neurosci. Lett.* 407: 53-58, 2006.
21. Uddin, S., Hussain, A.R., Manogaran, P.S., Al-Hussein, K., Plataniias, L.C., Gutierrez, M.I., Bhatia, K.G. Curcumin suppresses growth and induces apoptosis in primary effusion lymphoma, *Oncogene* 24(47):7022-7030, 2005.
22. Sen, S., Sharma, H., Singh, N. Curcumin enhances Vinorelbine mediated apoptosis in NSCLC cells by the mitochondrial pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(4):1245-1252, 2005.
23. Ranjan, D., Johnston, T.D., Wu, G., Elliott, L., Bondada, S., Nagabhushan, M. Curcumin blocks cyclosporine A-resistant CD28 costimulatory pathway of human T-cell proliferation, *J. Surg. Res.* 77(2):174-178, 1998.
24. Chen, C., Jeon, H., Johnston, T.D., Gedaly, R., McHugh, P.P., Ranjan, D. Cyclosporin A-Induced Lipid and Protein Oxidation in Human B-Cells and in Epstein-Barr Virus-Infected B-Cells is Prevented by Antioxidants, *J. Invest. Surg.* 21: 201-208, 2008.
25. Pae, H.O., Jeong, S.O., Jeong, G.S., Kim, K.M., Kim, H.S., Kim, S.A., Kim, Y.C., Kang, S.D., Kim, B.N., Chung, H.T. Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353(4):1040-1045, 2007.
26. Kim, K.M., Pae, H.O., Zheng, M., Park, R., Kim, Y.M., Chung, H.T. Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress, *Circulation Research* 101: 919-927, 2007.
27. Demidenko, Z.N., Kalurupalle, S., Hanko, C., Lim, C.U., Broude, E., Blagosklonny, M.V. Mechanism of G1-like arrest by low concentrations of paclitaxel: next cell cycle p53-dependent arrest with sub G1 DNA content mediated by prolonged mitosis. *Oncogene* 27: 4402-4410, 2008.
28. Nur-E-Kamal, A., Gross, S.R., Pan, Z., Balklava, Z., Ma, J., Liu, L.F. Nuclear translocation of cytochrome c during apoptosis, *J. Biol. Chem.* 279: 24911-24914, 2004.
29. Chao, D.T., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 family: regulators of cell death, *Annu. Rev. Immunol.* 16: 395-419, 1998.
30. Droin, N.M., Green, D.R. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease, *Biochim. Biophys. Acta.* 1644: 179-188, 2004.
31. Mori, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum, *Cell* 101: 451-454, 2000.