

TREK통로 차단제의 한우 정자 생존성 및 운동성 억제 효과

강다원^{1,2}, 김은진^{1,2}, 한재희^{1,2*}
¹경상대학교 의과대학 생리학교실, ²건강과학연구원

Inhibitory Effect of TREK Channel Blockers on Sperm Viability and Motility of Korean Native Bull

Dawon Kang^{1,2}, Eun-Jin Kim^{1,2} and Jahee Han^{1,2*}

¹Department of Physiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52727, South Korea

²Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52727, South Korea

ABSTRACT

Antioxidants have been added to cryoprotectant or *in vitro* culture medium for sperm to reduce the detrimental damage, such as reactive oxygen species. However, curcumin, an antioxidant, shows dual effect on the viability and progressive motility of bovine sperm exposed to hydrogen peroxide. Low concentration of curcumin increases sperm viability and progressive motility, whereas high concentration of curcumin reduces them. This study was performed to identify whether TREK-1 channel is related to low sperm viability and motility induced by high concentration of curcumin. Curcumin reduced TREK-1 channel activity in a dose-dependent manner. TREK-1 channel was expressed in sperm obtained from Korean native bull. Treatment with TREK-1 channel blockers, such as curcumin, fluoxetine, GdCl₃, and spadin, significantly reduced sperm viability and motility ($p < 0.05$). However, TREK-1 channel activators showed different effect; linoleic acid showed an increase in sperm viability and motility, and wogonin did not affect them. These results show that TREK-1 channel is involved in the regulation of sperm viability and motility. In particular, high concentration of curcumin might reduce sperm viability and progressive motility of Korean native bull through blockage of TREK-1 channel.

(Key words: Curcumin, Korean native bull, Sperm motility, Sperm viability, TREK-1 channel)

서론

동물번식 분야에서 동결정액의 사용은 가축의 유전적 다양성 보존 및 인공수정/체외수정 시술의 편리성과 효율성에 기여하여 왔으나 정자 생존율의 경우 동결정액이 신선정액에 비해 여전히 낮은 편이다. 이러한 정자의 낮은 생존율은 정자 동결 시 발생하는 활성산소에 의해 나타나는 것으로 알려져 왔는데(Sapanidou 등, 2015; Amidi 등, 2016), 동결정자의 생존성과 운동성을 높이기 위해 다양한 종류의 항산화물질을 정자 보존액에 넣거나 체외수정 시 항산화물질을 첨가하여 정자의 운동성을 높이려는 연구가 활발히 수행되고 있다(Sapanidou 등, 2015; Amidi 등, 2016; Tvrdá 등, 2016; Almeida 등, 2017; Bandy 등, 2017).

항산화물질의 하나인 커큐민(curcumin)은 돼지정자와 소정자를 산화스트레스로부터 보호하는 것으로 알려져 있는데(전

과 김, 2013; Tvrdá 등, 2016), 한우 정자에서 커큐민은 농도 의존적으로 과산화수소에 의해 생성된 활성산소를 감소시킨다(화 등, 2016). 항산화효과가 높은 고농도의 커큐민은 한우 정자의 생존성과 운동성을 감소시키고, 저농도의 커큐민은 과산화수소에 노출된 정자의 생존성과 운동성을 증가시킨다(화 등, 2016). 고농도 커큐민에 의한 정자의 생존성 및 운동성의 저하는 커큐민의 항산화효과 이외의 다른 효과에 의해 나타났을 것으로 추정된다.

정자는 다양한 종류의 이온통로를 발현하는데 세포의 안정 막전위를 일정하게 유지하는데 관여하는 two-pore domain 칼륨통로의 하나인 TWIK-related two-pore domain K⁺ (TREK)-1 통로가 한우 정자에서 발현한다(Hur 등, 2009). TREK-1 통로의 활성화는 커큐민에 의해 억제된다(Enyeart 등, 2008; 김과 김, 2011). TREK 통로는 체외배양 시 발생하는 다양한 인자(온도, pH, 신전, 활성산소)에 의해 그 활성이 조절되어(Kim, 2003),

* Correspondence: Jahee Han

Phone: 82-55-772-8042; Fax: 82-55-772-8049

E-mail: jheehan@gnu.ac.kr

여러 분자신호의 타겟이 되고 있다. TREK-1 통로의 차단은 세포의 막전위를 탈분극시키고 세포의 용적을 증가시키므로 세포의 사멸과도 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Lu 등, 2017).

본 연구에서는 고농도 커큐민에 의한 정자의 생존성과 운동성 감소가 TREK 통로의 차단에 의해 나타나는지를 확인하고자 TREK 통로 조절제를 한우정자에 처리하여 생존성 및 운동성의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 정액은 농협중앙회 한우개량사업소에서 판매하는 KPN 동결정액을 사용하였다. 스트로에 들어있는 동결정액은 37°C 항온수조에서 30초간 용해 후 Ham's F-10 배양액으로 희석하여 실험에 사용하였고, 커큐민과 우고닌(wogonin)은 DMSO와 NaOH(0.2 N)를 1:1로 혼합한 용매에 용해시켜 사용하였으며, 플루옥세틴(flouxetine)과 리놀레산(linoleic acid)은 DMSO와 EtOH에, 스파딘(spadin)과 가돌리늄($GdCl_3$)은 물에 용해시켰다. 배양액을 이용하여 최종 농도로 희석하였으며, 대조군은 여러 농도의 약물이 처리된 그룹과 비교하기 위하여 각각의 처리군과 동일한 농도의 용매를 처리하였다. 본 연구에 사용된 시약 및 배양액은 별도의 표시가 없는 경우 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

2. 이온전류의 기록

TREK-1 및 GFP (green fluorescence protein) 플라스미드(plasmid) DNA가 핵산전달감염(transfection)된 HEK-293 세포를 유리커버슬립 위에 배양하였다. 실험에 사용한 유리전극(pipette) 용액은 150 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA로 조성되었고, 세포외(bath) 용액은 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM glucose, 10 mM HEPES로 조성하였다. 유리전극과 세포의 용액의 pH는 각각 7.3, 7.4로 적정하였다. 전류는 도립 형광현미경(Axiovert 135, Zeiss, Germany)을 이용하여 GFP 녹색을 발광하는 세포에서 기록하였다. 세포가 부착된 유리커버슬립을 도립 형광현미경 위에 설치된 용기로 옮긴 후 미세조정기(MP-225, Sutter Instrument, Novota, CA, USA)를 이용하여 tip 저항이 4~8 M Ω 인 유리전극을 세포의 세포막에 접근시키고 10~20 cmH $_2$ O 정도의 음압을 가하여 giga seal(seal resistance > 1G Ω)을 형성시킨 후 순간적으로 음압을 높여 세포막을 파열시켜 whole-cell patch를 형성하였다. 실험용액은

1 mL/min의 속도로 관류시키며, 실온에서 실험을 수행하였다. Patch clamp 증폭기(Axopatch 200B, Axon Instruments, Union City, CA, USA), pCLAMP(version 10.0, Axon) 및 Digidata 1322(Axon)를 사용하여 막 전압 고정과 램프 자극을 적용하였는데, 막 전압은 -80 mV로 고정하고 -120 mV부터 60 mV까지 865 ms의 자극을 가한 후 전류를 기록하였으며, Patch clamp 증폭기를 통해서 나온 전류 신호는 컴퓨터의 하드디스크에 저장하였다.

3. 역전사증합효소증합반응 (RT-PCR)

Total RNA는 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 정자로부터 추출하였는데, 추출된 total RNA는 Superscript preamplification system(Invitrogen, USA)과 oligo(dT)를 이용하여 cDNA로 합성되었다. 합성된 cDNA는 소(bovine)에 특이적으로 작용하는 primer (TREK-1, NM_174686, sense : CTGATTTGCTGGATCCTAAG, antisense: CTGATTTGATTGGAGGTGTT / glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), NM_001034034, sense: CAGCGACTCACTCTTC TAC, antisense: GGAAGTCAGGATTCTCAGT)를 이용하여 증폭시켰다. 증폭산물은 염기서열 분석을 통하여 확인하였다.

4. 면역세포화학염색

한우의 정자에서 TREK-1 통로의 존재를 확인하기 위하여 면역세포 화학염색을 실시하였다. 유리 슬라이드에 도말된 정자는 4% paraformaldehyde가 들어 있는 완충용액(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.3)을 이용하여 실온에서 30분간 고정하였으며, 고정된 정자는 PBS로 5분간 3번 수세하였다. 비특이적 반응을 억제하기 위하여 1시간 30분 동안 실온에서 Triton X-100을 포함한 normal goat serum을 정자에 전처리하였다. 정자는 수세 없이 4°C에서 16시간 동안 TREK-1 일차항체(primary antibody, Alomone labs, Jerusalem, Israel)에 노출되었으며, 음성 대조군(negative control)은 일차항체 대신 일차항체 희석용액에 노출되었다. 일차항체 배양 16시간 후 PBS로 정자를 수세하고 이차항체(secondary antibody, FITC-conjugated anti-rabbit IgG)를 실온에서 1시간 30분 동안 처리하였다. 이차항체의 반응 후 정자를 PBS로 3번 이상 수세한 후 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 TREK-1의 발현을 조사하였다.

5. 정자생존성 및 전진성 운동 평가

용해된 정액을 SpermFilter[®] 40%, 80% 층이 만들어진 튜브의 40% 층 위에 얹어, 200 g에서 20분 동안 원심분리 시킨 후 80% 층 아래로 이동된 정자를 회수하여 1 mL의 80% SpermFilter[®]와 혼합하고 4 mL의 배양액이 들어있는 새로운 튜브로 옮겨 200 g에서 10분간 다시 원심분리하였다. 원심분

리 후 정장과 불순물이 제거된 운동성이 있는 정자만을 회수하여 생존성과 전진성 운동 평가에 사용하였다. 정자(15300/ μ L)는 10배 희석하여 1시간 또는 4시간 동안 TREK 통로 조절제에 노출시키면서 튜브를 45도 기울여 37°C, 5% 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 배양하였다. Swim-up 처치된 정자가 들어있는 배양액 10 μ L를 회수하여 혈구계산관위에 올려놓고 400배율의 현미경에서 운동성을 평가하였다. 4개의 영역을 계산하여 운동성 있는 정자와 움직이지 않는 정자로 분류하였는데, 지속적으로 움직이면서 전진하는 정자를 전진성 운동성이 있는 정자로 판단하였다. 연속적인 세 번의 계산으로 평균값을 구하였다.

생존성 검사는 Calcein AM (AAT Bioquest®, Sunnyvale, CA, USA)과 propidium iodide (PI)를 이용하여 실시하였다. Calcein AM은 살아있는 세포의 세포막을 투과하고 PI는 살아있는 세포의 세포막을 통과할 수 없다. 따라서 녹색을 보이는 세포는 살아있는 세포로, 빨간색으로 염색된 세포는 죽은 세포로 구분한다. 운동성 평가에 사용된 10 μ L를 제외한 나머지 배양액 100 μ L를 새로운 튜브로 옮겨 Calcein AM(5 μ M)과 PI(2 mg/mL)를 넣어 37°C에서 20분간 빛을 차단한 상태로 배양하였다. 배양 후 PBS로 세 번 수세하였다. 수세 후 정자에 FBS가 들어있지 않는 배양액을 넣고 이미지 접시로 옮긴 후 공초점현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 생존성을 형광이미지로 분석하고, 시야(x40)에 분포하는 녹색과 빨간색을 보이는 정자의 수를 헤아려 그 비율을 계산하였다.

6. 통계학적 분석 및 실험 성적의 처리

실험 결과의 통계처리는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 처리구간의 유의성을 검정하였고($p < 0.05$), 결과들은 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

결 과

1. 커큐민에 의한 TREK 통로 활성 감소

커큐민이 TREK 통로의 활성을 조절하는지를 확인하고자 TREK-1 통로가 과발현된 HEK-293 세포에서 whole-cell 전류를 기록하였다. TREK-1 통로에 커큐민(10 μ M)을 처리하였을 때 TREK-1 전류는 대조군(커큐민을 처리하지 않은 상태에서 HEK-293 세포에서 발현되는 TREK-1 통로의 전류)에 비해 55 \pm 8.6% 감소하였는데(Fig. 1A and Fig. 1C), 커큐민에 의한 전류의 감소는 커큐민 제거에 의해 다시 회복되었다(Fig. 1B). 그리고 커큐민의 농도가 증가함(1, 10, 100 μ M)에 따라 TREK-1 통로의 활성이 농도-의존적으로 감소하였다(Fig. 1C).

2. 한우 정자에서 TREK-1 통로 발현

TREK-1 통로의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR 및 면역화학 염색을 실시하였다. GAPDH 발현량과 비교하여 분석한 결과 TREK-1 mRNA 발현량은 난소에 비해 정자에서 낮게 발현하였다(Fig. 2A). 면역화학 염색은 TREK-1 단백질이 한우 정자에서 발현함을 확인하였다(Fig. 2B).

3. 정자의 생존성 및 전진성 운동에 있어서 TREK-1 조절제의 효과

정자의 생존성과 전진성 운동에 있어서 TREK-1 통로의 차단제 및 활성제의 효과를 확인하기 위하여 TREK-1 통로 차단제로 알려진 커큐민, 스파딘, 플루옥세틴, 가돌리늄과 활성제로 알려진 우고닌, 리놀레산을 여러 농도(1, 10, 30 μ M)로 준비하여 1시간 또는 4시간 동안 정자 배양액에 처리하였다. 수세 후 Calcein과 PI로 염색하여 정자 생존율을 조사하였다.

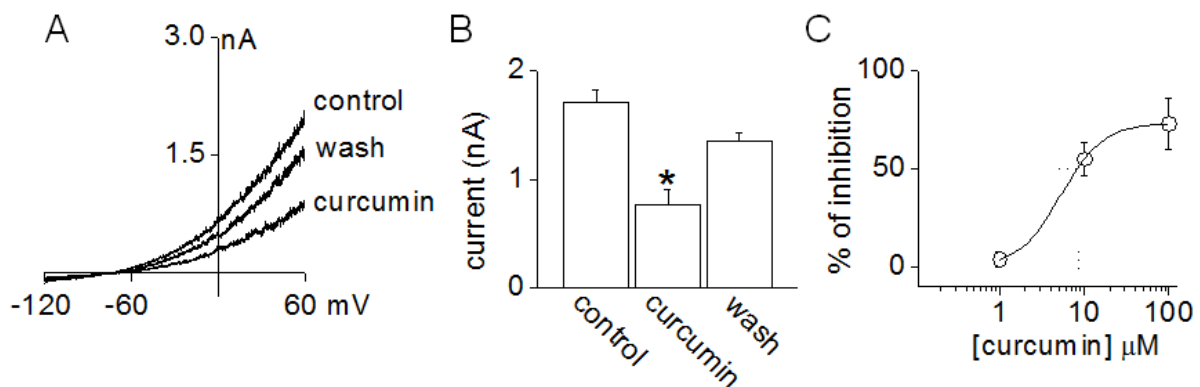


Fig. 1. Inhibition of TREK-1 channel by curcumin. Whole-cell currents were recorded in 5mM KCl, and the current levels at +60 mV were analyzed. (A) Inhibition of TREK-1 current by 10 μ M curcumin. (B) Summary of the effect of curcumin on TREK-1 current. (C) Inhibition curves of curcumin on TREK-1 current. Data represent the mean \pm SD of five repeated experiments. * $p < 0.05$ compared to the control.

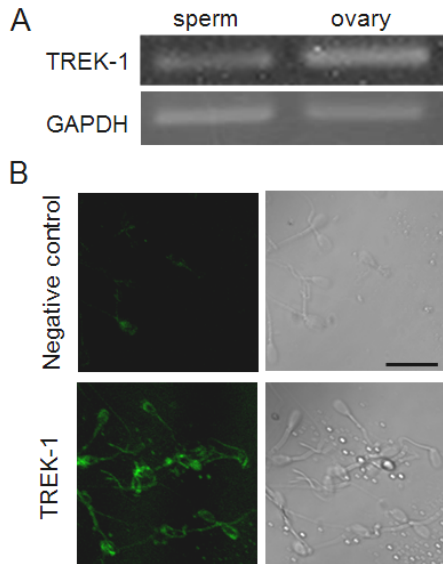


Fig. 2. Expression of TREK-1 channel in bovine sperm. (A) TREK-1 mRNA expression in sperm and ovary. (B) Immunocytochemical analysis of TREK-1. Fluorescent images labeled with channel-specific antibodies and FITC (fluorescence isothiocyanate)-conjugated anti-rabbit IgG. Negative control was produced by omission of primary antibody. Scale bar represents 30 μ m.

Fig. 3A는 약물 처리 없이 시간에 따른 정자의 생존력 감소를 보여주는데, 녹색(carcein)은 살아있는 정자를 빨간색(PI)은 죽은 정자를 보여준다. 시간이 경과함에 따라 죽은 정자의 수가 증가하였다. TREK-1 통로 차단제를 4시간 동안 처리한 후 정자의 생존력을 분석한 결과, TREK-1 통로 차단제의 농도 (1, 10, 30 μ M)가 증가함에 따라 정자의 생존률이 유의적으로 감소하였다. 커큐민, 스파딘, 플루옥세틴, 가돌리늄 30 μ M을 처리하였을 때, 생존률은 각각 15 ± 13 , 55.7 ± 10 , 11.3 ± 10 , $66.2\pm 8\%$ 를 보였고(Fig. 3B), 전진성 운동을 보이는 정자 역시 각각의 대조군에 비해 TREK-1 통로 차단제(1, 10, 30 μ M)를 1시간 동안 처리 시 농도 의존적으로 감소하였다. 커큐민, 스파딘, 플루옥세틴, 가돌리늄 30 μ M을 처리 시 전진성 운동을 보이는 정자의 수는 유의적으로 감소하였는데, 운동성을 보이는 정자의 비율은 각각의 처리군에서 50 ± 4 , 60 ± 10 , 49 ± 6 , $10\pm 2\%$ 를 보였다(Fig. 3B). 그러나 TREK-1 통로 활성화제로 본 연구에서 사용한 우고닌과 리놀레산은 다른 효과를 보였는데, 우고닌 30 μ M은 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았으나, 리놀레산 30 μ M은 유의적으로 정자의 생존성과 전진 운동성을 각각 18.2 ± 5.6 , $24.8\pm 7.1\%$ 증가시켰다.

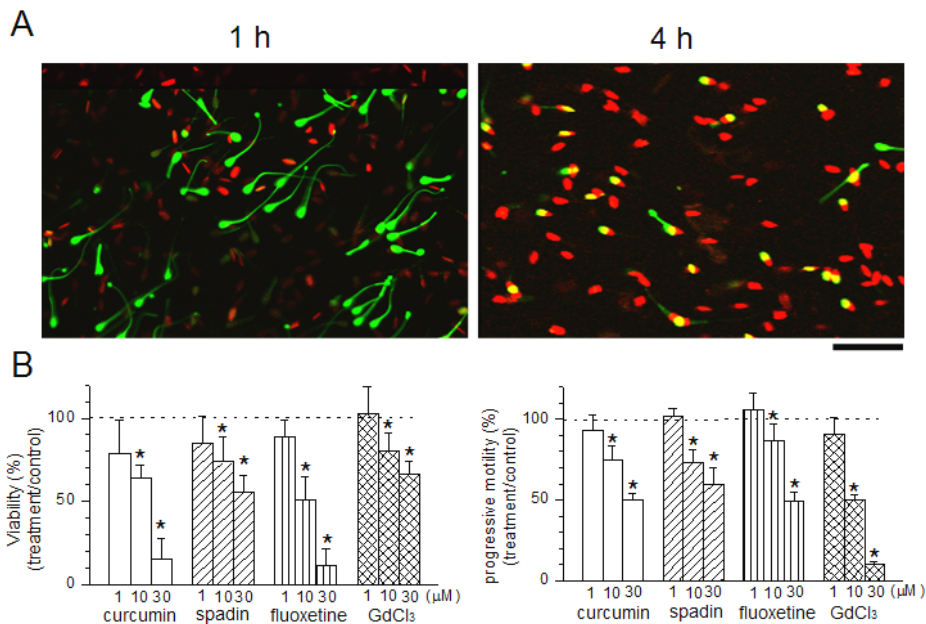


Fig. 3. Effect of TREK-1 modulators on sperm viability and progressive motility. (A) Live and dead staining of bovine sperm with Carcein and PI. The sperm was cultured *in vitro* for 1 h and 4 h. Green (Carcein-signal) and red (PI-signal) show live and dead sperm, respectively. Scale bar represents 60 μ m. (B) Summary of sperm viability and progressive motility. The rate was normalized to each corresponding control. Data represent the mean \pm SD of three repeated experiments. * $p < 0.05$ compared to the control.

고 찰

정자의 생존성과 전진성 운동에 있어서 TREK-1 통로 조절제의 효과를 분석하였는데, TREK-1 통로 차단제는 정자의 생존성과 전진성 운동을 보이는 정자의 수를 감소시켰으나 본 연구에 사용된 TREK-1 통로 활성화제인 우고닌과 리놀레산은 다른 효과를 보였다. 리놀레산은 생존성 및 운동성을 증가시켜 연구의 가설을 충족시켰으나, 우고닌은 정자의 생존성과 운동성에 영향을 주지 않은 것으로 확인되었다. 본 연구의 결과에서, TREK-1 통로 차단제에 의한 정자의 생존성 및 운동성 감소는 TREK-1 통로가 정자의 생존성 및 운동성에 관여함을 주장할 수 있으나 활성화제의 일관되지 않은 결과는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다. 그러나 여러 종류의 TREK-1 통로 차단제가 일관되게 농도-의존적으로 정자의 생존성 및 운동성을 감소시키므로 한우 정자의 생존성 및 운동성에 있어서 TREK-1 통로가 관여함을 보고한다.

본 연구에 사용된 TREK-1 통로 조절제는 TREK-1 통로의 조절뿐만 아니라 세포내 다양한 신호에 의해 조절 받고, 여러 분자들을 조절한다. 예를 들어, 커큐민은 TREK-1 통로를 차단하여 활성을 감소시키고, 세포에 항산화효과(Kumar와 Singh, 2015; Kumar 등, 2016; Tejada 등, 2016)를 나타내어 정상세포 증식효과 및 암세포 사멸효과(Lim 등, 2016; Park 등, 2016)를 보이기도 한다. 이와 같이 대부분의 물질은 단 하나의 특정 효과를 나타내지는 않는다. 리놀레산은 소 TREK-1 통로의 활성을 촉진시킨다(Danthi 등, 2003). TREK-1 통로와 같은 칼륨통로의 활성은 세포의 막전위를 재분극 또는 과분극시키고, 세포의 용적을 일정하게 유지하면서 세포에 보호효과를 나타낼 수 있다. 그러나 TREK-1 통로를 활성화 시키는 물질로 확인된 우고닌(Kim 등, 2011)은 정자의 생존성 및 운동성에 영향을 주지 않았는데, 우고닌은 황금추출물로 항염증, 항암 효과가 있어 염증 질환 및 암에서 보호 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Chen 등, 2008; Wu 등, 2016). 산화스트레스 또는 염증 반응이 일어났을 때는 우고닌이 효과를 보이지만, 정상 세포에서는 어떤 효과도 나타내지 않는다. 본 연구에 사용된 정자는 swim-up에 의해 운동성이 있는 정자만을 수집하였으므로 정상 정자로 분류하는 것이 적합하다. 우고닌이 만약 TREK-1 통로를 활성화시켜 그 효과를 나타낸다면 한우 정자는 TREK-1 통로를 발현하므로 그 효과는 분명 나타나야할 것으로 생각된다. 그러나 우고닌이 정자의 생존성과 운동성에 효과를 보이지 않는 것으로 보아 TREK-1 활성화 효과 보다는 우고닌의 다른 효과(활성산소 및 독성)가 정자에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다(Liu 등, 2016).

TREK-1 통로의 역할을 정확히 분석하기 위해서는 TREK-1 유전자 결손 생쥐로부터 정자를 확보하던지 TREK-1 유전자가

조작된 정자를 이용하여 생존성 및 운동성 분석이 필요하다고 생각된다. 그리고 TREK-1 통로만을 조절할 수 있는 특정 조절제의 개발도 TREK-1 통로의 역할 규명에 필요하다고 사료된다. 이상의 결과를 종합하여, 고농도 커큐민은 TREK-1 통로를 차단하여 막전위 및 세포용적 변화를 유도하였으며, 그 변화는 한우 정자의 생존성 및 운동성의 감소를 초래하였을 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 고농도 커큐민에 의한 정자의 생존성 및 운동성 감소 이전에 TREK-1 통로가 관여하는지를 확인하고자 하였는데, 커큐민은 TREK-1 통로 활성을 농도-의존적으로 감소시켰다. TREK-1 통로는 한우 정자에서 발현하였고, TREK-1 통로 차단제(커큐민, 플루옥세틴, 가돌리늄, 스파딘)는 정자의 생존성과 운동성을 감소시켰다. 그러나 TREK-1 통로의 활성화제는 약물에 따라 다른 효과를 나타내었는데, 리놀레산은 정자의 생존성과 운동성을 증가시켰고, 우고닌은 영향을 주지 않았다. 이상의 결과는 정자의 생존성과 운동성 조절에 TREK-1 통로가 관여함을 알 수 있다. 특히, 고농도 커큐민은 TREK-1 통로를 차단하여 정자의 생존성과 운동성을 저하시키는 것으로 생각된다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구는 한국연구재단 선도연구센터 지원 사업(바이오항노화의과학연구센터, NRF-2015R1A-5A2-008833)에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Almeida FC, Silva SV, Souza HM, Gomes WA, Lima Filho JA, Wicke AA, Batista AM and Guerra MM. 2017. Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis. *Andrologia* 49:e12623.
- Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M and Nekoonam S. 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and Tissue Bank* 17:745-756.
- Banday MN, Lone FA, Rasool F, Rashid M and Shikari A. 2017. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its

- cryopreservation. *Cryobiology* 74:25-30.
- Chen LG, Hung LY, Tsai KW, Pan YS, Tsai YD, Li YZ and Liu YW. 2008. Wogonin, a bioactive flavonoid in herbal tea, inhibits inflammatory cyclooxygenase-2 gene expression in human lung epithelial cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 52:1349-1357.
- Danthi S, Enyeart JA and Enyeart JJ. 2003. Modulation of Native TREK-1 and Kv1.4 K⁺ Channels by Polyunsaturated Fatty Acids and Lysophospholipids. *J. Membrane Biol.* 195:147-164.
- Enyeart JA, Liu H and Enyeart JJ. 2008. Curcumin inhibits bTREK-1 K⁺ channels and stimulates cortisol secretion from adrenocortical cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370:623-628.
- Hur CG, Choe C, Kim GT, Cho SK, Park JY, Hong SG, Han J and Kang D. 2009. Expression and localization of two-pore domain K⁺ channels in bovine germ cells. *Reproduction* 137:237-244.
- Kim D. 2003. Fatty acid-sensitive two-pore domain K⁺ channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 24:648-54.
- Kim EJ, Kang D and Han J. 2011. Baicalein and wogonin are activators of rat TREK-2 two-pore domain K⁺ channel. *Acta Physiologica* 202:185-192.
- Kumar A and Singh A. 2015. A review on mitochondrial restorative mechanism of antioxidants in Alzheimer's disease and other neurological conditions. *Front. Pharmacol.* 6:206.
- Kumar G, Mittal S, Sak K and Tuli HS. 2016. Molecular mechanisms underlying chemopreventive potential of curcumin: Current challenges and future perspectives. *Life Sci.* 148:313-328.
- Lim W, Jeong M, Bazer FW and Song G. 2016. Curcumin Suppresses Proliferation and Migration and Induces Apoptosis on Human Placental Choriocarcinoma Cells via ERK1/2 and SAPK/JNK MAPK Signaling Pathways. *Biol. Reprod.* 95:83.
- Liu X, Tian S, Liu M, Jian L and Zhao L. 2016. Wogonin inhibits the proliferation and invasion, and induces the apoptosis of HepG2 and Bel7402 HCC cells through NF κ B/Bcl-2, EGFR and EGFR downstream ERK/AKT signaling. *Int. J. Mol. Med.* 38:1250-1256.
- Lu L, Zhang G, Song C, Wang X, Qian W, Wang Z, Liu Y, Gong S and Zhou S. 2017. Arachidonic acid has protective effects on oxygen-glucose deprived astrocytes mediated through enhancement of potassium channel TREK-1 activity. *Neurosci. Lett.* 636:241-247.
- Park BH, Lim JE, Jeon HG, Seo SI, Lee HM, Choi HY, Jeon SS and Jeong BC. 2016. Curcumin potentiates antitumor activity of cisplatin in bladder cancer cell lines via ROS-mediated activation of ERK1/2. *Oncotarget* 7: 63870-63886.
- Sapanidou V, Taitzoglou I, Tsakmakidis I, Kourtzelis I, Fletouris D, Theodoridis A, Zervos I and Tsantarliotou M. 2015. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology* 84:1273-1282.
- Tejada S, Manayi A, Daglia M, Nabavi SF, Sureda A, Hajheydari Z, Gortzi O, Pazoki-Toroudi H and Nabavi SM. 2016. Wound Healing Effect of Curcumin: A Review *Curr. Pharm. Biotechnol.* 17:1002-1007.
- Tvrđá E, Tušimová E, Kováčik A, Paál D, Greifová H, Abdramanov A and Lukáč N. 2016. Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 172:10-20.
- Wu X, Zhang H, Salmani JM, Fu R and Chen B. 2016. Advances of wogonin, an extract from *Scutellaria baicalensis*, for the treatment of multiple tumors. *Onco. Targets Ther.* 9:2935-2943.
- 김양미, 김경아. 2011. TREK-1 채널에 대한 플라보노이드의 효과. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society* 12:2660-2667.
- 전예진, 김대영. 2013. 미니돼지 정자의 동결보존에 미치는 Curcumin의 항산화 효과. *J. Chitin. Chitosan.* 18:190-197
- 화정석, 김은진, 류지현, Adrian S. Siregar, 박창윤, 최창용, 강다원. 2016. 산화스트레스에 노출된 정자의 생존성 및 운동성에 있어서 커큐민의 이중효과. *J. Emb. Trans.* 31: 299-305

Received September 20 2017, Revised September 22, 2017,

Accepted September 25, 2017