

Curcumin 이 microglia 의 활성화에 미치는 영향

정기경[#] · 이상진* · 이선우 · 강석연 · 김태균 · 강주혜 ·
홍성렬* · 주일로** · 김승희 · 한형미

식품의약품안전청 국립독성연구소 약리부,
*성균관대학교 생명자연자원과학대학, **아주대학교 의과대학
(Received July 10, 2000)

Effects of Curcumin on the Microglial Activation

Ki Kyung Jung[#], Sang Jin Lee*, Sun Woo Yi, Seog Youn Kang, Tae Gyun Kim,
Ju Hye Kang, Sungyoul Hong*, Ilo Jou**, Seung Hee Kim and Hyung Mee Han

Department of Pharmacology, National Institute of Toxicological Research, KFDA,
Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul, 122-704, Korea

*College of Life Science and Natural Resources, Sungkyunkwan University, Suwon, 440-746, Korea

**Ajou University, School of medicine, Suwon, 442-749, Korea

Abstract — Microglia, brain resident macrophages, play a central role in the inflammatory responses of the brain and are activated in brain injuries and several neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease, thereby aggravating the course of these diseases. In this study, the effects of plant-derived compounds such as curcumin or gingerol on the microglial activation were examined. Microglial cultures were prepared from 2~3 week mixed primary glial cultures obtained from the cerebral cortex of 1~2 day old rats and identified by immunocytochemistry using microglial-specific antibody OX-42. Microglia were activated by lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ) and the effect of curcumin or 6-gingerol on the microglial activation was examined. Specific parameters measured to monitor microglial activation were nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) release. Curcumin (1~10 μ M) inhibited NO release induced by LPS and IFN- γ in a dose-dependent manner whereas 6-gingerol (2~20 μ M) did not have any effect on LPS/IFN- γ -induced NO release. The levels of PGE₂ and TNF- α induced by LPS and IFN- γ were also inhibited by 1~10 μ M curcumin in a dose-dependent manner. These results showed that curcumin could modulate microglial activation.

Keywords □ Microglia, curcumin, gingerol, nitric oxide, PGE₂, TNF- α .

Microglia는 중추신경계에 상주하는 macrophage로서 뇌손상 및 외부로부터의 이물질 침입시 활성화되어 세포증식능과 포식작용을 가진 원형의 세포로 변형된다. Microglia는 활성화되면 세포에 독성을 나타내는 reactive oxygen species(ROS)를 분비하여 외부로부터의 이물질에 대한 일차적인 방어역할을 담당하기도 하지만 뇌손상, Alzheimer's disease 등의 병리학적

상태에서 활성화되어 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 cytokine^{1,2}과 nitric oxide(NO)^{3,4} 및 prostaglandin(PG)⁵을 다량 분비하여 염증 및 면역반응에 참여함으로써 병의 상태를 더욱 악화시키는 원인이 되기도 한다.

Microglia에 의해 분비된 TNF- α 와 IL-1은 macroglia인 astrocytes를 활성화시키며 활성화된 astrocyte는 세포분열을 왕성하게 하며 antichymotrypsin과 apolipoprotein E를 분비하여 염증 및 β -amyloid에 의한 neuronal cytotoxicity를 촉진시킨다. 뿐만아니라 TNF-

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1812 (팩스) 02-380-1814

α 와 NO는 oligodendrocytes를 손상시킴으로써 신경세포의 demyelination을 일으키고 myelin gene의 발현을 억제한다. 또한 최근에 발표되는 일련의 연구결과들은 microglia가 표면에 있는 수용체를 통해 노인성 치매의 원인 물질로 생각되는 β -amyloid의 독성을 매개 혹은 증폭시킨다는 증거들을 제시하고 있다.⁶⁻⁸) 따라서 microglia의 활성화는 뇌질환의 발생과 관련이 있는 것으로 생각되어지며, microglia의 활성화를 증가 혹은 감소시키는 물질은 뇌질환의 정도에 영향을 미칠 것으로 추측된다.

지금까지 microglia를 활성화시키는 가장 효과적인 물질은 lipopolysaccharide(LPS)인데, LPS의 신호전달체계는 LPS가 membrane receptor인 CD14에 결합하여 세포내 단백질의 tyrosine phosphorylation을 일으키고, 이를 시작으로 kinase cascade를 통해 mitogen-activated protein kinase(MAPK)를 활성화시키는 것으로 보고되어 있다.^{9,10}) 세포막 수용체 활성화에 의한 MAPK의 활성화를 매개하는 kinase로는 protein kinase C와 phosphatidylinositol 3-kinase가 알려져 있으며 그 이후 아직까지 잘 밝혀지지 않은 여러 단계를 거쳐서 TNF- α , IL-1 등의 cytokine과 NO, PGE₂ 등의 물질을 분비하여 염증 및 면역반응에 참여하게 된다.

이와 같은 지금까지의 연구보고에 근거하여 본 연구에서는 식품 및 천연물에 함유되어 있는 천연 항염증 물질들이 microglia 활성화에 미치는 영향에 대하여 규명하고자 하였다. 여러 가지 알려진 천연 항염증물질들중 카레의 주성분으로서 항염증작용, 항암작용 및 항산화작용이 있는 것으로 알려진 curcumin(diferuoylmethane)^{11,12})과 항염증작용이 있는 것으로 알려진 생강¹³)의 주성분인 gingerol이 microglia에 미치는 영향에 관하여 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Curcumin은 Sigma chemical Co.(St. Louis, MD., U.S.A.)로부터, gingerol은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.로부터 구입하여 사용하였다. Nitric oxide(NO)를 측정하기 위한 Griess reagent와 nitric oxide synthase(NOS) inhibitor인 aminoguanidine(AG)은 Sigma chemical Co.(St. Louis, MD., U.S.A.)로부터, PGE₂ EIA kit와 TNF- α EIA kit는 Amersham

Pharmacia Biotech UK Ltd.(Buckinghamshire, HP7 9NA, England)로부터 구입하여 사용하였고 lipopolysaccharide(LPS, from Salmonella enteritidis prepared by phenol extraction)는 Sigma chemical Co.(St. Louis, MD., U.S.A.)로부터, interferon- α (rat, recombinant)는 Life Technologies로부터, OX-42 antibody(anti-rat CD11b monoclonal antibody)는 Chemicon International Inc.으로부터, Glial fibrillary acidic protein(GFAP) antibody는 Transduction Laboratories로부터 구입하여 사용하였으며 그 외의 시약은 특급 이상의 것을 사용하였다.

실험방법

Microglial cell culture - 태어난지 1~2일된 Sprague Dawley 흰쥐의 대뇌 피질로부터 microglia를 분리하기 위하여 해부 현미경하에서 뇌막을 제거한 대뇌피질을 minimal essential media(MEM) 용액 2 ml에 넣고 주사기를 이용하여 단일세포로 만들었다. 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 MEM용액에 희석한 다음 75 cm² T-flask에 넣고 2~3주간 배양하였다. 2~3주간 배양후 flask를 흔들어 microglia를 떼어낸 후 나일론 mesh(40 μ m²)를 통과시켜 cell clump를 제거한 다음 24-well plate에 다시 배양하였다. 5% CO₂, 37°C에서 15분 incubation 한 다음 plate에 붙지않는 세포들(주로 astrocytes 등)을 제거하기 위해 2~3회 serum-free media로 세척한 다음 complete MEM 배지를 넣어준 후 24시간 뒤에 실험에 사용하였다.

Microglia의 순도 결정 - 배양된 세포가 microglia인지를 확인하기 위해 culture slide에 1×10⁵ cells/well이 되도록 배양한 후 acetone : methanol(1 : 1) 용액으로 30분동안 고정하였다. 고정된 세포를 microglia에 특이적인 OX-42(CD11b) antibody(1 : 50)와 astrocyte에 특이적인 GFAP antibody(1 : 400)로 반응시킨 후 immunoperoxidase system을 이용하여 발색시킨 후 현미경으로 관찰하였다.

NO 측정 - 배양한지 2~3주된 microglia를 여러농도의 curcumin 혹은 gingerol로 처리한 다음 계속해서 2시간 후에 그 배지에 1 μ g/ml LPS와 30 U/ml IFN- γ 로 처리하여 NO 분비를 유도하였다. 48시간 후에 분비된 NO가 산화되어 형성된 nitrite를 microplate assay방법으로 정량하였다. 간략히 설명하면 배지의 상등액 50 μ l를 취하여 동량의 Griess reagent(0.1%

naphthylethylene diamine, 1% sulfanilamide, 2.5% H_3PO_4)를 넣은 다음 10분 후에 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 $NaNO_2$ 를 1 μM 에서 100 μM 까지 표준 검량선을 작성하였다.

TNF- α 측정 - 배양한지 2~3주된 microglia에 curcumin을 0.5% acetone을 함유한 MEM 배지에 녹여 1, 2, 5, 10 μM 이 되도록 처리한 다음 계속해서 2시간 후에 그 배지에 1 $\mu g/ml$ LPS와 30 U/ml IFN- γ 를 각well에 처리하였다. 48시간후에 분비된 TNF- α 를 enzyme immunoassay(EIA) 방법으로 정량하였다. TNF- α antibody로 coating된 well에 sample 50 μl 를 넣고 1시간 동안 상온에 놓아둔 다음 2~3회 씻어주고 biotinylated secondary antibody 50 μl 를 넣은 후 2시간동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후 streptavidin-HRP(horseradish peroxidase) conjugate를 붙이고 peroxidase substrate인 3, 3', 5, 5' tetramethyl-benzidine(TMB)를 넣고 발색시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

PGE₂ 측정 - 배양한 microglia에 curcumin을 0.5% acetone을 함유한 MEM 배지에 녹여 1, 2, 5, 10 μM 이 되도록 처리한 다음 계속해서 2시간 후에 그 배지에 1 $\mu g/ml$ LPS와 IFN- γ 를 처리하였다. 48시간후에 분비된 PGE₂를 enzyme immunoassay(EIA) 방법으로 정량하였다. secondary antibody로 coating된 well에 sample과 PGE₂ antibody, PGE₂-peroxidase conjugate를 차례로 넣은 후 1시간 동안 상온에서 incubation 하였다. 그 다음 peroxidase substrate인 TMB를 넣고 발색시킨 다음 1 M H_2SO_4 를 넣고 반응을 종료시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

Microglial cell culture 및 확인 - 생후 1~2일된 Sprague-Dawley 흰쥐로부터 대뇌피질을 분리하여

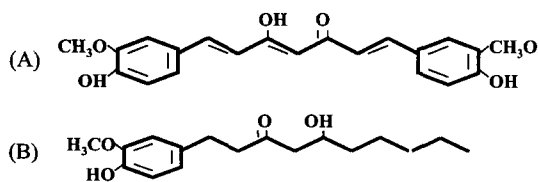


Fig. 1 - Chemical structures of (A) curcumin and (B) gingerol.

2~3주간 culture하면 astroglial monolayer위에 붙어 자라는 아메바 형태의 microglial cell들이 관찰되었다 (Fig. 2A). 이들 세포들을 분리하여 subculture한 다음 24시간 후 관찰하면 다양한 형태의 microglial cell들을 볼 수 있었다(Fig. 2B). 이들 세포를 microglial-specific OX-42(CD11b) antibody와 astroglial-specific glial fibrillary acidic protein(GFAP) antibody를 이용하여 immunocytochemical analysis를 한 결과, 95% 이상이 microglial cell들이 확인되었다(Fig. 3).

LPS와 IFN- γ 에 의한 microglial activation 유도 - LPS와 IFN- γ 에 의한 microglial activation 정도

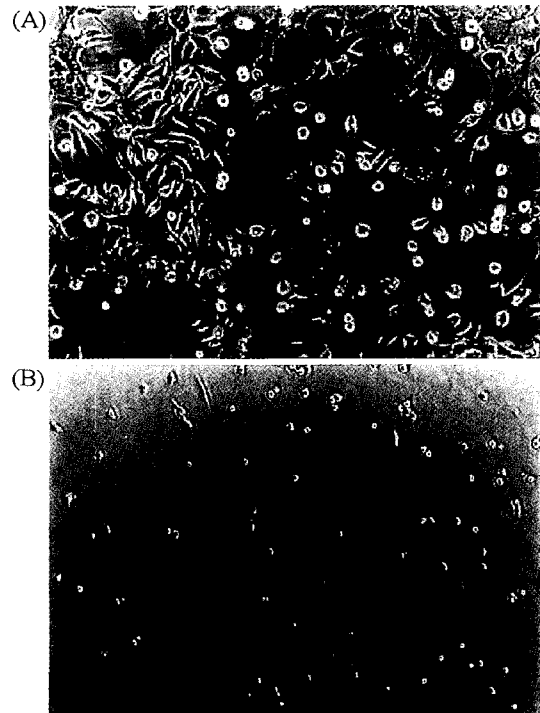


Fig. 2 - (A) Mixed cell culture from rat neonatal cerebral cortices. The brains were removed from neonatal rats (1-2 days old) and gently triturated with a Pasteur pipette in MEM containing 10% FBS. The cell suspension was added into a 75 cm² flask. Primary cell cultures were maintained in 10% FBS/MEM at 37°C for 14 days. (B) Microglial cells. Microglial cells were collected, centrifuged, and disseminated onto 24-well plates at a concentration of 1×10^5 cells/well. After 15 min, the medium was changed and the cells were washed twice with MEM to remove non-adherent cells including astrocytes. One day later, the cells were used for experiments.

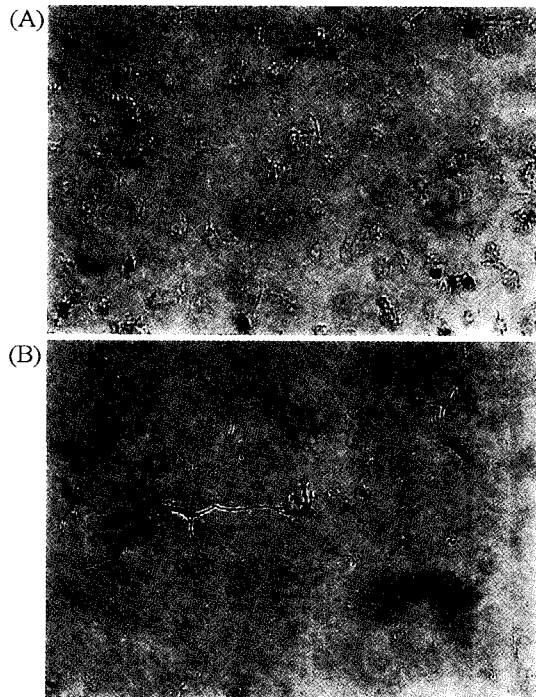


Fig. 3 – (A) Microglial cells were stained by using OX-42 antibody. (B) Astrocytes were stained by using GFAP antibody. Immunohistochemistry was carried out by Vectastain® Elite ABC kit.

를 확인하기 위하여 LPS를 0.01, 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도로, IFN- γ 를 1, 10, 100 U/ml로 microglial cells을 자극하고 배지에 분비된 nitrite를 측정된 결과, LPS만의 농도가 증가함에 따라 용량의존적으로 nitrite의 양이 증가하였으며 LPS와 IFN- γ 를 다양한 농도로 함께 처리하였을 때에는 용량의존적으로 nitrite의 양이 증가하였을 뿐만아니라 LPS 단독투여보다 상승효과가 있었다. 그러나 IFN- γ 를 단독으로 처리하였을 때에는 1, 10 U/ml에서 NO 생성을 유도하지 못했으며 100 U/ml에서만 소량의 NO 생성이 유도되었다(Fig. 4A).

IFN- γ 에 의한 최적의 상승효과를 알아보기 위하여 LPS의 농도를 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 고정시키고 IFN- γ 의 농도를 10, 30, 50, 100 U/ml로 처리하였을 때 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 과 IFN- γ 30, 50, 100 U/ml에서 높은 상승효과가 있었지만 이들간에는 유의성있는 차이가 없었다(Fig. 4B). 따라서 이후 실험에서는 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 과 IFN- γ 30 U/ml로 microglia의 활성화를 유도하였다.

Curcumin과 6-gingerol에 의한 NO 생성 억제 효과 – Curcumin과 6-gingerol이 LPS와 IFN- γ 로 micro-

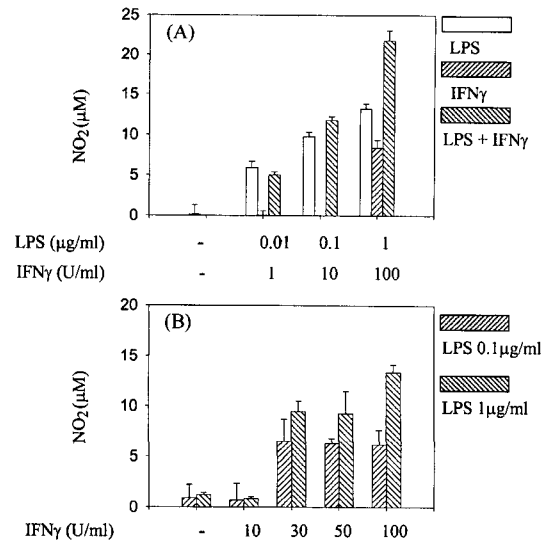


Fig. 4 – Dose dependence of nitrite production induced by LPS and/or IFN- γ in rat microglial cells. Microglial cells were subcultured for 24 hr in 10% FBS/MEM. Cells were incubated for 18 hr in the absence or in the presence of increasing concentrations of LPS and/or IFN- γ . The supernatants were collected and analyzed for nitrite level by Griess reaction. Results are the mean \pm standard deviation ($n=3$).

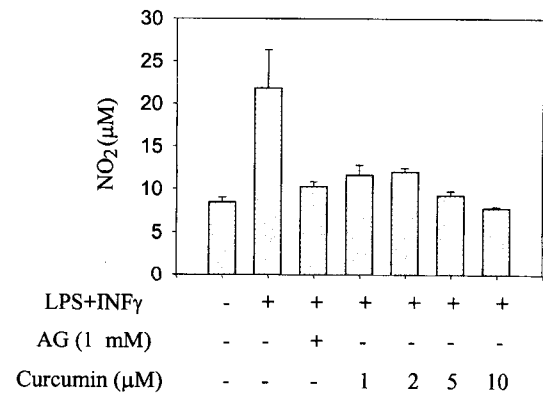


Fig. 5 – Effect of curcumin on LPS/IFN- γ -induced nitrite production in rat microglial cells. Cells pretreated with the indicated concentrations of curcumin were stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ of LPS and 30 U/ml of IFN- γ . Conditioned medium was collected at 48 hr, and nitrite level was determined by Griess reaction. Results are the mean \pm standard deviation ($n=3$).

glia의 활성화를 유도했을 때 생성되는 NO를 억제하는 지 알아보기 위해 LPS와 IFN- γ 투여 2시간전에 이들 물질들을 microglia에 처리한 다음 Griess reagent를

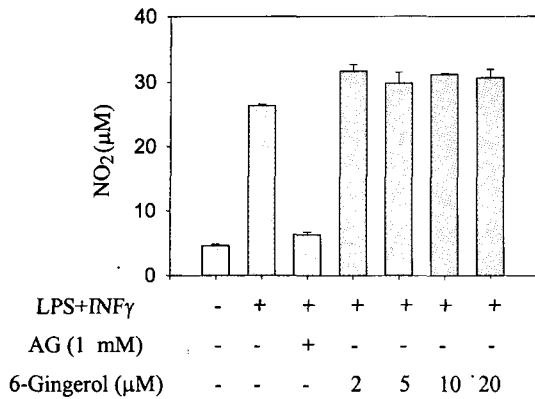


Fig. 6 – Effect of 6-gingerol on LPS/IFN- γ -induced nitrite production in rat microglial cells. The experiment was performed as described in the legend of Fig. 4. Results are the mean \pm standard deviation (n=3).

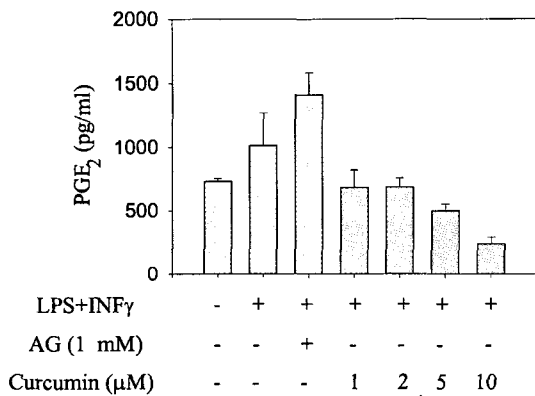


Fig. 7 – Effect of curcumin on LPS/IFN- γ -induced PGE $_2$ production in rat microglial cells. The experiment was performed as described in the legend of Fig. 4. The concentrations of PGE $_2$ were measured with enzyme immunoassay (EIA) kits (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Results are the mean \pm standard deviation (n=3).

이용하여 배지에 분비된 nitrite를 측정 한 결과, Curcumin 은 1~10 μ M 농도에서 용량의존적으로 NO 생성을 감소시켰음을 알 수 있었다(Fig. 5). 그러나 6-gingerol은 2~20 μ M 농도에서 NO 생성에 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 6).

Curcumin에 의한 PGE $_2$ 및 TNF- α 생성 억제 효과 – Curcumin이 PGE $_2$ 및 TNF- α 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 LPS와 IFN- γ 로 microglia의 활성화를 유도하고 enzyme immunoassay(EIA) kit를 이용하여 배지에 분비된 PGE $_2$ 및 TNF- α 를 정량한 결

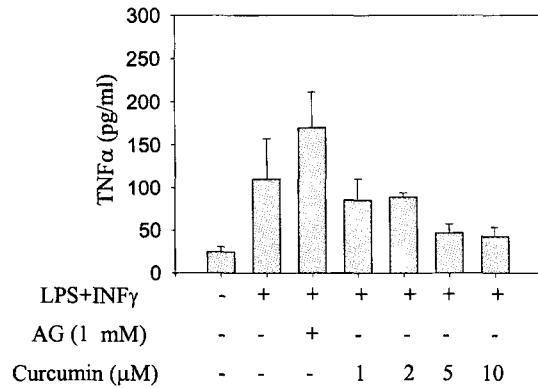


Fig. 8 – Effect of curcumin on LPS/IFN- γ -induced TNF- α secretion in rat microglial cells. The experiment was performed as described in the legend of Fig. 4. The concentrations of TNF- α were measured with enzyme immunoassay (EIA) kits (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Results are the mean \pm standard deviation (n=3).

과, Curcumin 1~10 μ M 농도에서 용량의존적으로 PGE $_2$ 및 TNF- α 의 생성이 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 7, 8). 그러나 NOS inhibitor인 aminoguanidine (AG)을 처리한 군에서는 LPS와 IFN- γ 를 처리한 군보다도 오히려 PGE $_2$ 및 TNF- α 의 생성이 증가하였다.

고 찰

Microglia는 뇌손상 및 외부로부터 이물질 침입시 활성화되어 일차적인 방어역할을 담당하지만 만성염증을 동반하는 퇴행성 뇌질환과 같은 병리학적 상태에서는 염증 및 세포독성을 매개하는 물질들, 즉 nitric oxide, TNF- α , PGE $_2$, interleukin-1(IL-1)등을 지속적으로 생성 분비함으로써 오히려 병을 악화시키는 원인이 되고 있다. 최근 Alzheimer's disease, Parkinson disease등의 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료에 항염증 약물인 ibuprofen¹⁴⁾이나 dexamethasone¹⁵⁾과 같은 비스테로이드성 및 스테로이드성 소염제를 이용하려는 시도들이 이루어지고 있다. 따라서 microglia의 활성화를 억제할 수 있는 물질들이 이들 뇌질환을 예방할 수 있다고 사료되어 본 연구에서는 천연 항염증물질들 중 카레의 주성분으로서 항염증작용, 항암작용 및 항산화작용이 있는 것으로 알려진 curcumin(diferuloyl methane)과 항염증작용이 있는 것으로 알려진 생강의 주성분인 gingerol이 LPS와 IFN- γ 로 활성화된 microglia

로부터 생성되는 nitric oxide, TNF- α , PGE₂의 변화에 미치는 영향을 알아보았다. Curcumin을 1~10 μ M 농도로 처리후 LPS와 IFN- γ 로 활성화된 microglia로부터 분비된 NO를 측정할 결과 용량의존적인 생성억제효과를 보였으며 10 μ M에서 거의 100% 저해되었고, IC₅₀는 2~5 μ M 사이였다. 이러한 결과는 Brouet등¹⁶⁾이 LPS와 IFN- γ 로 활성화된 macrophage에서 NO생성 억제효과에 대한 curcumin의 IC₅₀가 6 μ M이었다고 보고한 바와 비슷하였다. 뿐만아니라 curcumin은 *in vitro*,¹⁷⁻¹⁹⁾ *in vivo*²⁰⁾에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 유전자 발현을 억제할 뿐만아니라 iNOS의 발현을 조절하는 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 억제하는 것으로 보고되어 있다. 그러나 iNOS activity를 억제하는지는 아직까지 보고된 바 없으며 iNOS 발현을 조절하는 또다른 경로인 cAMP level을 조절하는지도 아직까지 밝혀져 있지 않다. 향후 활성화된 microglia에서 curcumin이 iNOS의 발현 등, NO 생성에 관여하는 signaling pathway를 어떻게 조절하는지 연구해야할 것으로 사료된다.

LPS와 IFN- γ 로 활성화된 microglia에서 curcumin 처리군은 PGE₂ 및 TNF- α 의 생성을 용량의존적으로 감소시켰다. 그렇지만 NOS inhibitor인 aminoguanidine(AG)을 처리한 군에서는 LPS와 IFN- γ 를 처리한 군보다도 오히려 PGE₂ 및 TNF- α 의 생성이 증가하였다. LPS와 IFN- γ 를 처리한 군에서 PGE₂의 생성이 적게 유도된 이유는 IFN- γ 에 의해 COX-2 유전자의 발현이 억제²¹⁾되었기 때문으로 사료된다. Minghetti등²¹⁾은 NO가 COX-2 유전자의 발현을 억제함으로써 PGE₂의 생성을 억제하기 때문에 NOS inhibitor인 NMMA를 처리하게 되면 NO 생성이 억제되어 PGE₂의 생성이 증가하게 된다고 보고하였으며, 이와 같은 보고는 본연구의 결과와 같은 맥락이라 할 수 있다. 그러나 NO가 TNF- α 의 생성을 조절할 수 있는지는 아직까지 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 curcumin이 뇌의 염증반응에서 중요한 역할을 하는 microglia의 활성을 조절함으로써 항염증작용을 나타낼 가능성을 시사하고 있으며, 향후 curcumin이 활성화된 microglia에서 PGE₂ 및 TNF- α 의 생성에 관여하는 upstream signaling pathway와 *in vivo* 동물모델을 사용한 연구등을 통하여 curcumin에 의한 뇌의 염증반응 조절기전 및 활용가능성을 규명하여야 할 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Guilian, D., Baker, T. J., Shih, L. and Lachman, L. B. : Interleukin-1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J. Exp. Med.*, **164**, 594 (1986).
- 2) Lee, S. C., Liu, W., Dickson, D. W., Brosnan, C. F. and Berman, J. W. : Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. *J. Immunol.*, **150**, 2659 (1998).
- 3) Chao, C. C., Hu, S., Molitor, T. W., Shaskan, E. C. and Peterson, P. K. : Activated microglia mediated neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol.*, **149**, 2730 (1992).
- 4) Colossanti, M., Perichini, T., Pucchio, T.D., Gromo, F. and Lauro, G. M. : Human ramified microglial cells produce nitric oxide upon Escherichia coli lipopolysaccharide and tumor necrosis factor stimulation. *Neurosci. Lett.*, **200**, 144 (1995).
- 5) Minghetti, L. and Levi, G. : Induction of prostanoid biosynthesis by bacterial lipopolysaccharide and isoproterenol in rat microglial cultures. *J. Neurochem.*, **65**, 2690 (1995).
- 6) Yan, S., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zaho, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Naworth, P., Stern, D. and Schmidt, A. : RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's diseases. *Nature*, **382**, 685 (1996).
- 7) Guilian, D., Haverkamp, L., Yu, J., Karshin, W., Tom, D., Li, J. and Kirkpatrick, J. : Specific domains of β -amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J. Neurosci.*, **16**, 6021 (1996).
- 8) Khoury, J., Hickman, S., Thomas, C., Cao, L., Silverstein, S. and Loike, J. : Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to β -amyloid fibrils. *Nature*, **382**, 716 (1996).
- 9) Nick, J., Avdi, N., Gerwins, P., Johnson, G. and Worthen, G. : Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, **156**, 4457 (1996).
- 10) Sutherland, C., Heath, A., Pelech, S., Young, P. and Gold M. : Differential activation of the ERK, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases by CD40 and the B cell antigen receptor. *J. Immunol.*, **157**, 3381 (1996).

- 11) Huang, M. T., Newmark, H. L. and Frenkel K. : Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **27**, 26 (1997).
- 12) Kumar, A., Dhawan, S., Hardegen N. J. and Aggarwal B. B. : Curcumin (diferuloyl-methane) inhibition of tumor necrosis factor(TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor-kappa B activation. *Biochem. Pharmacol.*, **55**(6), 775 (1998).
- 13) Park, K. K., Chun, K. S. and Lee J. M. and Surh Y. J. : Inhibitory effects of [6]-gingerol, a major pungent principle of ginger, on phorbol ester-induced inflammation, epidermal ornithine decarboxylase activity and skin tumor promotion in ICR mice. *Cancer Lett.*, **129**(2), 139 (1998).
- 14) Mitchell, J. A. and Warner, T. D. : Cyclo-oxygenase-2 : pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br. J. Pharmacol.*, **128**(6), 1121 (1999).
- 15) Murialdo, G., Barreca, A., Nobili, F., Rollero, A., Timossi, G., Gianelli, M. V., Copello, F., Rodriguez, G. and Polleri, A. : Dexamethasone effects on cortisol secretion in Alzheimer's disease : some clinical and hormonal features in suppressor and nonsuppressor patients. *J. Endocrinol. Invest.*, **23**(3), 178 (2000).
- 16) Brouet, I. and Oshima, H. : Curcumin, an anti-tumor promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**(2), 533 (1995).
- 17) Chan, M. MY. : Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem. Pharmacol.*, **49**(11), 1551 (1995).
- 18) Sreejayan and Rao, M. N. A. : Nitric oxide Scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.* **49**, 105 (1997).
- 19) Chan, M. MY. Ho, C. T. and Huang, H. I. : Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and tumeric on inflammation-induced nitrite production. *Cancer Lett.*, **96**, 23 (1995).
- 20) Chan, M. MY., Huang, H. I., Fenton, M. R. and Fong, D. : *In vivo* Inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem Pharmacol.*, **55**, 1955 (1998).
- 21) Minghetti, L., Polazzi, E., Nicolini, A., Creminon, C. and Levi, G. : Interferon- γ and nitric oxide down-regulate lipopolysaccharide-induced prostanoid production in cultured rat microglial cells by inhibiting cyclooxygenase-2 expression. *J. Neurochem.*, **66**, 1963 (1996).