

TREK-1 채널에 대한 플라보노이드의 효과

김양미^{1*}, 김경아²

¹충북대학교 의과대학 생리학교실, ²충북대학교 의과대학 의공학교실

The effect of flavonoids on the TREK-1 channel

Yangmi Kim^{1*} and Kyung-Ah Kim²

¹Dept. of Physiology, College of Medicine, Chungbuk National University

²Dept. of Biomedical Engineering, College of Medicine, Chungbuk National University

요 약 TREK-1 채널은 two-pore 도메인 포타슘 (K2P) 채널로서 세포내 pH, 세포막의 신전, 불포화 지방산, 온도, 휘발성 마취제, 신경세포방아물질에 의해 잘 조절된다. TREK-1 채널은 포타슘 이동에 의해 신경세포의 흥분성과 안정막전압을 조절한다. 최근 TREK-1은 전립선 암세포에서도 과발현됨이 확인되었다. 이러한 중요성에도 불구하고, TREK-1 채널에 대한 플라보노이드 효과는 거의 알려지지 않았다. 본 연구의 목적은 전기생리학적 방법 중의 하나인 excised inside-out patch기법을 이용하여 TREK-1 채널을 조절하는 플라보노이드를 탐색하는 것이다. TREK-1 채널이 발현된 CHO 세포에서 단일채널 패치고정 방법을 이용하여 커큐민 (curcumin), EGCG (epigallocatechin-3-gallate), 퀘르세틴 (quercetin)에 의한 TREK-1 채널의 차단효과를 증명하였다. 퀘르세틴과 커큐민의 차단효과는 가역적으로 회복되었으나 EGCG는 거의 회복되지 않았다. 퀘르세틴, EGCG, 커큐민의 상대적 채널 활성화도 (relative channel activity)는 $73 \pm 2.3\%$ (n=5), $91 \pm 3.2\%$ (n=7), $94 \pm 5.6\%$ (n=4)까지 감소하였다. CHO 세포에 발현된 TREK-1 채널에 대한 커큐민, 퀘르세틴, EGCG의 IC₅₀는 각각 $1.04 \pm 0.19 \mu\text{M}$, $1.13 \pm 0.26 \mu\text{M}$, $13.5 \pm 2.20 \mu\text{M}$ 이었다. 이러한 결과는 플라보노이드가 TREK-1 채널을 억제하며, 이 조절은 신경계 또는 종양세포에서 플라보노이드의 약리학적 작용 중의 하나임을 제시한다.

Abstract TREK-1 channel is a member of the two-pore domain potassium (K2P) channel family that is regulated by intracellular pH, membrane stretch, polyunsaturated fatty acids, temperature, and some neuroprotectant agents. TREK-1 channel can influence neuronal excitability by regulating leakage of potassium ions and resting membrane potential. TREK-1 channel has been shown to be overexpressed in prostate cancer cells. Although the importance of these properties, relatively little is known about flavonoid effects in the regulations of TREK-1 channel. The purpose of the study was to screening of flavonoids as the TREK-1 channel modulator using one of electrophysiological techniques such as excised inside-out patch configuration. We demonstrated blocking effect on TREK-1 channel by flavonoids such as epigallocatechin-3-gallate (EGCG), curcumin and quercetin in CHO cells transiently expressing TREK-1 channel. The inhibition of TREK-1 channel by quercetin and curcumin was reversible, whereas EGCG was little reversible. Quercetin, EGCG and curcumin decreased the relative channel activity to 73%, 91% and 94%, respectively. The half-inhibitory concentration (IC₅₀) of curcumin, quercetin and EGCG was $1.04 \pm 0.19 \mu\text{M}$, $1.13 \pm 0.26 \mu\text{M}$ and $13.5 \pm 2.20 \mu\text{M}$ in CHO cells expressing TREK-1 channel, respectively. These results indicate that flavonoids might regulate TREK-1 and this regulation might be one of the pharmacological actions of flavonoid in nervous systems and cancer cells.

Key Words : TREK-1, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Curcumin, Quercetin, Flavonoid, Single Channel

본 논문은 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비에 의하여 수행되었음.

*교신저자 : 김양미(yangmik@chungbuk.ac.kr)

접수일 11년 04월 27일

수정일 (1차 11년 05월 10일, 2차 11년 05월 19일)

게재확정일 11년 06월 09일

1. 서론

TREK-1 채널은 two-pore 도메인 포타슘 채널 (two-pore domain potassium channel, K2P) 중 허혈 시 나타날 수 있는 세포내외의 변화 즉 세포막 신전, 불포화 지방산의 증가, 세포내 pH의 산성화, 온도의 증가에 반응하여 안정막 전압 (resting membrane potential)을 결정할 뿐만 아니라 글루타메이트 같은 신경전달물질에 의한 신경 활동도를 조절하는 것으로 알려져 있다[1]. TREK-1 채널을 유전적으로 없앤 쥐는 마취제에 대한 저항성, 통증에 대한 민감성, 항우울제에 대한 저항성을 가지며, 허혈시 더욱 쉽게 신경손상이 일어남도 확인되었다[2-4]. 최근 들어 TREK-1 채널이 신경세포 뿐만 아니라 전립선 암세포에서도 발견되고 있음이 보고되면서 암세포에서도 TREK-1 채널의 생리학적 역할의 중요성이 제시되었다[5]. 그래서 많은 연구자들이 이 채널을 조절하는 약제에 대한 검색을 시도하였다[4, 6, 7]. 그 결과로 휘발성 마취제 뿐만 아니라 chloral hydrate, trichloroethanol 같은 비휘발성 마취제에 의해서도 활성화됨이 보고되었고 [8], 근위축성 측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis)의 치료제로 사용되면서 신경세포 손상보호제로 알려진 riluzole에 의해 활성화됨을 확인 하였다[9]. 또한 신경세포 손상보호약물로 알려진 sipatragine과 lamotrigine, 그리고 항울제인 fluoxetine에 의해 억제됨이 보고되었다[7]. 이처럼 TREK-1 채널의 생리학적 역할이 강조 되면서 다양한 물질에서 이 채널을 표적으로 하는 활성화제 또는 억제제를 찾는 연구가 시도되어 지고 있다[10,11].

그러한 시도 중 하나로 본 연구에서는 TREK-1 채널의 표적으로 하는 플라보노이드를 탐색하여 TREK-1 채널의 활성화 또는 억제제로서의 가능성 조사하였다. 플라보노이드는 사람에게 이로온 효과 때문에 임상에 응용 하려는 시도가 오래전부터 있었다[12-16]. 또한 플라보노이드는 천연추출물이고 오랫동안 사람들이 즐겨 먹어왔던 음식이나 차에 포함되어 있기 때문에 채널 조절제로서 실패할 가능성이 적고 채널이라는 특이적인 표적에 작용하기 때문에 반응 농도가 낮다면 TREK-1 채널 조절제로서 이용할 수 있을 것이다.

플라보노이드의 채널에 대한 조절효과는 cystic fibrosis Cl⁻ 채널 (CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) [17], inositol 1,4,5-triphosphate receptor Ca²⁺ 채널 [18], Ca²⁺-activated K⁺ 채널 [19], K_{v1.5} 채널 [20], hERG (human Ether-à-go-go Related Gene) 채널[21], K_{v1.4} 채널 [22], Ca²⁺ 채널 [23] 등 다양한 종류의 채널을 표적으로 하여 연구되었다. 이렇게 플라보노이드가 분자수준에서 연관성이 없는 다양한 이온채널 활성을 조절하고 있음은 분자적으로 연관성이 없는 TREK-1 채널도 조절 할 수 있을 것으로 생각되어 본 연구를 시작하였다.

본 연구에 사용한 플라보노이드는 커큐민, EGCG, 퀘르세틴이다. 커큐민 (curcumin, diferuloylmethane)은 심황 (*Curcuma longa*)의 뿌리에서 분리된 화합물로서 카레의 성분이며[13, 14], EGCG (epigallocatechin-3-gallate)는 녹차에 주로 들어있는 폴리페놀이고[24], 퀘르세틴 (quercetin, 3,5,7,3,4-pentahydroxyflavone)은 양파, 사과, 차 그리고 붉은 포도주에 많이 있는 폴리페놀이다[25]. 이 플라보노이드들은 분자수준에서는 전자인자, 성장인자, 효소, 싸이토키인의 발현이나 활성을 조절하는 세포내 신호경로를 이용하여 항염, 항산화, 항암, 항알러지등의 효과를 나타낸다[26-30]. 본 연구에서는 CHO 세포에 발현된 TREK-1 채널에서 플라보노이드에 의한 억제 효과를 단일 채널 수준에서 조사하였다.

2. 재료 및 방법

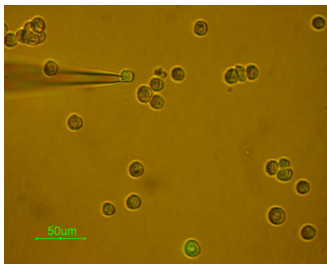
2.1 TREK-1의 발현

트랜스팩션을 위해 CHO (Chinese Hamster Ovary) 세포는 35 mm 배양접시에 세포가 50-80% 정도까지 자랄 때까지 10% fetal calf serum (Life technology, Calsbad, CA, USA)을 넣은 α -MEM을 사용하여 배양하였다. pcDNA3.1 vector (Life technology, Carlsbad, CA, USA)에 클로닝된 TREK-1 (Genbank accession No: AF385402)을 Lipofectamine (Life technology, Calsbad, CA, USA)을 이용하여 트랜스팩션 하였다. 그 과정을 요약하면 Lipofectamine, green fluorescence protein (GFP) 플라스미드 DNA, TREK-1 플라스미드 DNA를 Opti-MEM (Life technology, Calsbad, CA, USA)을 함께 넣어 6시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 6시간 후 20% fetal calf serum이 들어있는 α -MEM 배양액 1 ml을 넣어주고 하룻밤 동안 배양하였다. 전기생리학적 기록을 하기위해서 세포는 0.25% 트립신 (trypsin)으로 처리하여 Poly-D-lysine (Sigma, St Louis, MO, USA)이 처리된 12 mm 유리글래스로 옮겨 실험에 사용하였다. 트립신 처리 후 세포가 글래스에 붙으면 1 시간 후부터 2~3 일 동안 실험에 사용하였다. 트립신 처리 전후의 단일채널역학 (single channel kinetics)은 변하지 않았다. 본 실험에 사용된 커큐민, 퀘르세틴, EGCG는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였고, 모든 용액은 실험 직전 만들어 사용하였다. 용매로 사용된 DMSO의 최종 농도는 0.1%를 넘지 않았고, DMSO는 단일채널역학에 영향을 주지 않았다.

2.2 전기생리학적인 방법

실험에 사용할 용액 중 유리전극 (pipette)과 세포내

(bath) 용액은 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA 로 구성하였고, pH는 7.2로 적정하여 사용하였다. 단일채널전류 (single channel current)는 막전압 고정법 (voltage clamp technique) 중의 하나인 팻취고정기법 (patch clamp technique)을 이용하여 기록하였다[31]. 단일채널전류를 기록할 때에는 유리전극은 2-3 MΩ 저항의 전극을 사용하였고, 전류기록 시에는 팻취고정 증폭기(patch clamp amplifier, Axopatch 200B, Axon Instruments, Union City, CA, USA)로 GΩ seal 이상의 팻취 이상의 것만 기록하였다. 전류는 10 kHz의 샘플링 비율로 digidata interface (Digidata 1322A, Axon instrument, Union City, CA, USA)를 이용하여 컴퓨터에 저장하였다. 전류는 형광현미경 (TE 2000, Nikon, Japan)을 이용하여 녹색 형광이 확인된 세포에서 기록하였고 (그림 1), 기록되는 신호는 8-pole Bessel filter (-3dB, Frequency Device)를 사용하여 2 kHz에서 필터 하였다. 모든 데이터는 pCLAMP 프로그램 (version 9.02, Axon instrument, Union City, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 모든 데이터는 전류의 크기 (amplitude, pA), 채널의 평균 열린 시간 (dwell time 또는 mean open time, ms), 이온채널 활성도 (NP_o, N은 이온통로의 수, P_o는 활성을 가진 채널의 열릴 확률)을 분석하였다. 모든 실험은 실온에서 시행하였다 (23-25 °C).



[그림 1] 전기생리학적 기록시 TREK-1이 과발현된 CHO 세포의 모양

[Fig. 1] Morphology of TREK-1 overexpressing CHO cells during electrophysiological recordings

2.3 데이터 분석

TREK-1 전류에 대한 플라보노이드의 농도-반응 그래프를 그리기 위해 Origin software (OriginLab, Corp, Northampton, MA, USA)에서 Hill equation, $y = 1/(1+(IC_{50}/[FL])^n)$ 식을 사용하였다. y는 상대적 채널 활성도를 나타내며, IC₅₀는 플라보노이드에 의해 TREK-1 채널이 50% 억제되는 값이며 n은 Hill 상관계수, FL은 플라보노이드 농도이다. 모든 수치는 평균 ± S.E.M으로 나타내었다. 플라보노이드 처리전의 평균값과 플라보노이드 처리후 평균값의 차이는 unpaired (independent) Student's t-test를

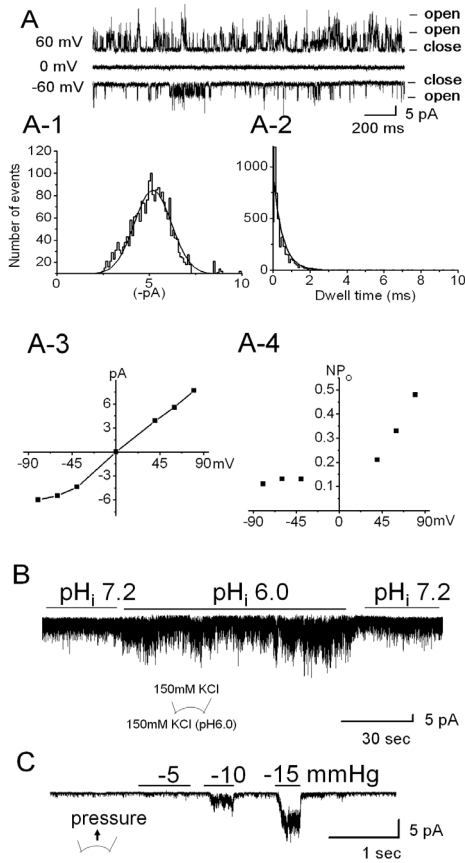
사용하였고, P는 0.05 이하로 통계학적으로 유의하였다.

3. 결과

3.1 TREK-1 단일채널 (single channel)의 일반적인 성상

TREK-1의 단일채널전류 (single channel current)를 기록하기 위해 excised inside-out patch 모드를 사용하였고, 세포내 (bath) 용액과 세포밖 (pipette) 용액은 동일하게 150 mM KCl 용액을 사용하여 기록하였다. Inside-out patch 모드에서 음전압 (negative voltage)으로 막전압을 고정하면 내향전류 (inward current) 즉 아래방향으로 열리는 전류가 기록되며, 양전압 (positive voltage)으로 막전압을 고정하면 외향전류(outward current) 즉 위쪽으로 보이는 전류가 기록된다. 그림 2에서 "close"는 채널이 닫힘을 의미하여 "open"은 채널이 열림을 의미한다. 그림 2는 TREK-1 채널의 단일채널 양상을 나타낸 것이다. 막전압에 따른 단일채널의 양상 (그림 2A)과 전류의 크기 히스토그램 (amplitude histogram) (그림 2A-1) 채널의 평균열린시간 (mean-open time) (그림 2A-2), 전류-전압 곡선 (그림 2A-3), 그리고 막전압에 따른 채널 활성도 (NP_o)(그림 2A-4)를 나타내었다 (그림 2). 전류의 크기 히스토그램과 평균열린시간은 -60 mV에서 분석하였다 (그림 2 A-1 과 A-2). 약 80 pS (pico-simen)의 전도도와 0.7 ms 내외의 dwell time을 가진 단일채널이 기록되었다. 막전압에 따른 전류-전압곡선은 선형 모양 (linear shape)을 보였고 (그림 2A-3), TREK-1은 막전압이 증가함에 따라 채널 활성도가 증가되었다 (그림 2A-4).

TREK-1은 세포내 산성 pH에 민감하게 반응하고, 세포막의 신전에 의해 활성화 되는 성질을 가지고 있다[32]. 그러므로 그 효과를 확인하기 위해 세포내 pH를 7.2 에서 6.0 으로 산성화 시키면 TREK-1 채널의 활성도가 12.4배 증가하였고, 세포내 pH를 7.2 로 바꾸어 주면 활성이 억제되어 처음 수준으로 회복되었다 (그림 2B). 또한 세포막을 유리전극을 통해 음압을 가하여 세포막을 인위적으로 -5 mmHg, -10 mmHg, -20 mmHg 로 점진적으로 신전시켜주면 음압이 가해 지지 않았을 때 보다 각각 2.0 배, 8.7 배 25.4배까지 증가 하였다 (그림 1C). 이러한 결과는 CHO 세포에 TREK-1 이 잘 발현되고 있음을 시사하고 그 효과는 이전 보고들과 유사하였다[33, 34]. TREK-1 발현되지 않은, 즉 녹색형광을 띄지 않는 세포에서는 어떠한 전류도 기록되지 않았다 (n=10).



[그림 2] 단일채널기록법에 의한 TREK-1의 일반적인 전기 생리학적 특성
 [Fig. 2] General electrophysiological characteristics of TREK-1 using single channel recording techniques

3.2 TREK-1에 대한 플라보노이드의 효과

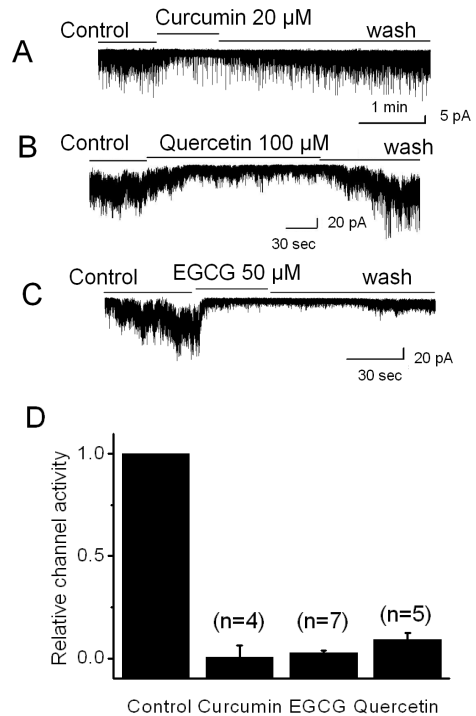
TREK-1을 조절하는 플라보노이드를 검색하기 위해 먼저 커큐민의 효과를 관찰하였다. 커큐민에 대한 TREK-1의 억제효과는 2008년 Enyeart 등이 부신피질 세포에서 whole cell configuration 방법으로 보고 한 바 있다[11]. 본 실험에서 단일채널 (single channel) 수준에서 커큐민의 TREK-1에 대한 효과를 조사하였다. 커큐민 20 μM을 세포내에 처리하면 채널 전도도가 86 pS에서 60 pS으로 감소되었고, 감소된 전류는 커큐민을 제거해 준 후에도 처음처럼 완전히 회복되지는 않았다(표 1, n=3). 커큐민 처리 후 평균열린시간의 변화도 0.57 ± 0.04ms에서 0.1 ms 정도 감소하였고 커큐민을 제거해 준 후에도 커큐민 처리 전으로 회복하지 못하였다(표 1). 이러한 결과는 커큐민이 채널의 일부분을 직접적으로 차단하여 작용할 수 있음을 시사한다. 커큐민 처리 후

채널의 상대적 활성도 (relative channel activity)는 94.0 ± 5.6% (n=4) 까지 감소하였다(그림 3A와 3D). 이러한 활성 감소는 열린채널수 (number of open channel)의 감소 및 채널크기의 감소에 기인한다(그림 4A-1과 4A-2).

[표 1] 플라보노이드에 의한 TREK-1의 단일통로 전류의 크기 변화 및 평균 열린 시간 변화

[Table 1] Change in mean open time and single channel current amplitude of TREK-1 by flavonoids

	단일통로크기 pA ± S.E.	n	평균열린시간 ms±S.E.	n
Control	-5.26 ± 0.25	4	0.57 ± 0.04	3
Curcumin	-4.01 ± 0.09	4	0.45 ± 0.14	3
Wash	-4.41 ± 0.56	4	0.48 ± 0.10	3
Control	-4.88 ± 0.20	5	0.88 ± 0.20	5
Quercetin	-4.47 ± 0.17	5	0.76 ± 0.11	5
Wash	-4.87 ± 0.18	5	1.02 ± 0.17	5
Control	-5.06 ± 0.13	5	0.84 ± 0.19	7
EGCG	-3.70 ± 0.26	5	0.74 ± 0.18	7
Wash	-4.17 ± 0.40	5	0.72 ± 0.16	7



[그림 3] TREK-1에 대한 플라보노이드의 효과
 [Fig. 3] The effect of flavonoids on TREK-1

다음은 사람들이 차(tea)로 거의 매일 마시고 있는 녹차의 성분인 EGCG에 대한 TREK-1에 대한 효과를 조사하였다. TREK-1 채널의 전도도는 EGCG 50 μM 적용 전 84 pS에서 EGCG 처리 후 61 pS까지 감소시켰으며 EGCG를 제거하여도 68 pS 까지 밖에 회복되지 않았다 ($n=7$, 그림 3C). 이러한 효과는 TREK-1에 대한 EGCG의 친화도가 커큐민 보다 높고 가역적이지 않음을 시사한다. 평균열린시간 또한 EGCG 처리 후 점점 감소하였다 (표 1). 이러한 결과 또한 EGCG와 커큐민이 TREK-1 채널에 더욱 강하게 결합되어 채널을 조절하고 있음을 시사한다. 이러한 효과로 인해 EGCG 처리 후의 채널의 상대적 활성도는 $91.0 \pm 3.2\%$ (그림 3C와 3D) 까지 감소하였다.

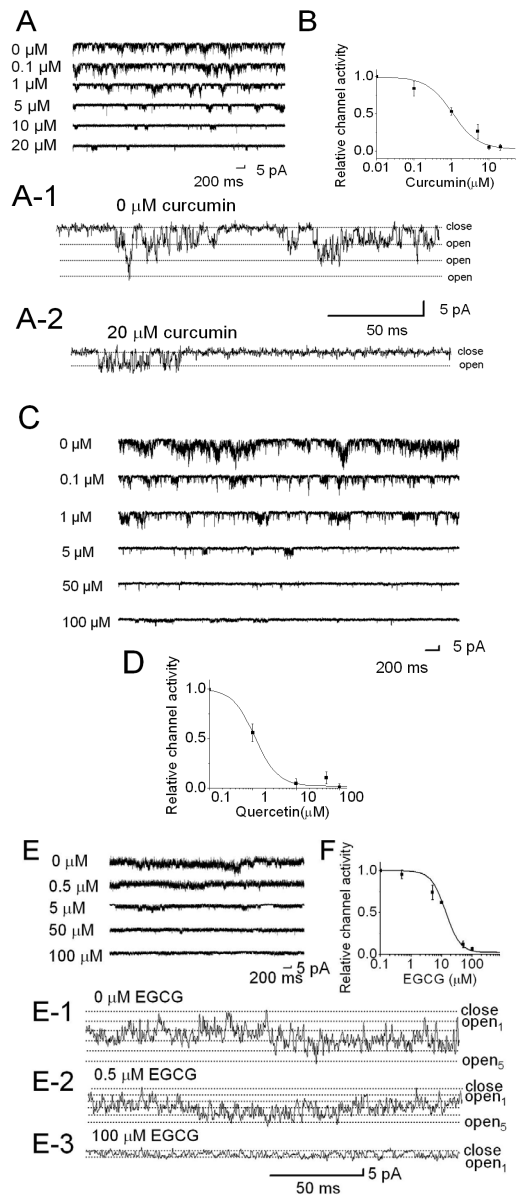
퀘르세틴은 주로 Ca^{2+} -activated K 채널 (K_{Ca}) 를 활성화시키는 것으로 알려져있다[35]. TREK-1에서 퀘르세틴 100 μM 은 81 pS 크기의 전류를 75 pS로 약간 감소시켰으나 퀘르세틴을 제거해 주면 거의 정상 수준으로 회복하였다. 이러한 결과는 퀘르세틴은 채널에 가역적으로 작용하는 것임을 시사한다. 채널의 평균열린시간도 0.88 ± 0.20 ms에서 0.76 ± 0.11 ms로 감소하였다가 오히려 1.02 ± 0.17 ms 더 증가함이 확인되었다($n=5$, 표 1). 이상의 결과는 퀘르세틴은 EGCG나 커큐민과 달리 TREK-1 채널에 가역적으로 작용하여 TREK-1 채널에 쉽게 결합하고 쉽게 채널에서 해리될 수 있음을 시사한다. 퀘르세틴에 의한 상대적 활성도는 $73.0 \pm 2.3\%$ ($n=5$)로서 EGCG나 커큐민보다는 TREK-1 억제 효과가 적었다 (그림 3B와 D).

3.3 TREK-1에 대한 플라보노이드의 농도 의존성

세 종류의 플라보노이드에 의해 TREK-1이 억제되는 것을 확인 하였으므로 TREK-1 채널 활성에 대한 플라보노이드의 농도에 따른 채널 활성도의 변화를 조사하였다 (그림 4). 그림 4는 플라보노이드 농도에 따른 TREK-1의 채널 활성도 변화를 단일채널 trace로 나타내었다. 그림 4A의 그림을 시간을 확장하여 그린 그림 4A-1과 그림 4A-2에서 보여 지듯이 커큐민의 농도가 증가함에 3개 이상 활성을 보이던 채널이 하나만 활성을 나타내고 있다. 커큐민의 처리 후, 활성된 채널의 수가 줄어들음을 확인하였다(그림 4A-1 과 A-2). 커큐민의 IC_{50} 값은 $1.04 \pm 0.19\mu\text{M}$ 이었다 (그림 4B).

또한 퀘르세틴 실험에서도 퀘르세틴이 투여되지 않았을 경우 활성을 나타내던 여러 개의 채널이 퀘르세틴 투여에 의해 그 수가 줄어들어 채널의 활성이 떨어짐을 알 수 있었다. 즉 퀘르세틴 농도가 높아질수록 활성화된 채널수가 줄어들어 상대적 채널 활성도가 줄어들음을 알 수 있었다. 퀘르세틴의 IC_{50} 값은 $1.13 \pm 0.26 \mu\text{M}$ 이었다 (그림 4C와 D).

EGCG 실험에서는 퀘르세틴이나 커큐민과 유사하게 활성 채널의 수가 줄어들고 동시에 저농도의 EGCG 적용 시에는 활성채널 수는 줄지않고 전류의 크기만 작아지는 현상을 볼 수 있었다. 고농도의 EGCG에서는 활성채널수가 줄어들어 채널 활성이 줄어들음을 알 수 있었다 (그림 4E-1, E-2, E-3). EGCG의 IC_{50} 값은 $13.5 \pm 2.20 \mu\text{M}$ 로 관찰 되었다.



[그림 4] TREK-1에 대한 플라보노이드의 농도 의존성 [Fig. 4] Dose dependency of flavonoids on TREK-1

4. 고찰 및 결론

플라보노이드는 많은 약리학적 관심을 받아왔고 다른 질병을 예방 또는 치료를 위한 흥미로운 일차적으로 화합물로 생각되어지고 있다. 본 연구에서는 클론된 TREK-1 채널을 CHO 세포에 과발현한 세포에서 단일채널 기록법으로 TREK-1 채널에 대한 커큐민, EGCG, 퀘르세틴과 같은 플라보노이드의 억제효과를 μM 수준에서 나타냄을 확인하였다.

플라보노이드의 종류와 채널 종류에 따라 상반된 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 플라보노이드에 대한 채널 조절 효과는 채널 종류에 따라 작용이 다르게 나타나며, 임상적으로 적용할 경우 장기나 조직의 채널의 분포에 따라 여러가지 조건을 고려해야 할 것으로 생각된다. 퀘르세틴의 효과의 예를 보면 Ca^{2+} -activated K 채널 (K_{Ca})이나 CFTR Cl^- 채널, Ca^{2+} 채널, 그리고 $\text{K}_{\text{v}1.5}$ 채널에서는 퀘르세틴이 채널을 활성화 시키지만 [20, 23, 35, 36], 신경세포의 글라이신 유발 전류(glycine-induced current, I_{Gly}) [37], 5-HT-유발 내향 전류 (I_{5HT}) [38], acetylcholine 감수체 매개 이온전류 (acetylcholine receptor mediated ion current, I_{Ach}) [39]과 같이 신경전달 물질에 의해 매개되는 전류는 퀘르세틴에 의해 억제된다. 이러한 보고는 TREK-1 채널에서도 억제 또는 활성이라는 두 가지 효과를 고려해야 함을 시사한다. 하지만 퀘르세틴에 의한 채널 활성 효과는 퀘르세틴이 세포내 Ca^{2+} 를 증가 시키는 것으로 알려져 있어 세포내 Ca^{2+} 에 의해 조절되는 채널이라면 퀘르세틴에 의해 활성화 될 수 있다[40]. 하지만 TREK-1은 세포내 Ca^{2+} 에는 조절 되지 않는 채널이기 때문에 채널 활성효과는 배제할 수 있었고 억제효과만 관찰 할 수 있었다.

TREK-1에 대한 EGCG의 억제 효과는 심장에서 긴 QT 증후군 (LQT syndrome)과 연관성이 있는 hERG 채널에서의 효과와 유사하였다[21]. 하지만 TREK-1 채널을 50% 억제하는 농도 (IC_{50})인 $13.5 \pm 2.20 \mu\text{M}$ 은 hERG 전류의 IC_{50} $6.0 \mu\text{M}$ [21] 보다 2 배정도 높았다. 하지만 여전히 EGCG는 TREK-1 채널에 대해 μM 수준으로 억제하기 때문에 채널 억제제로서는 유효할 것으로 생각된다. 이러한 추측은 다른 종류의 채널 즉 뇌에서 클로닝 된 $\text{K}_{\text{v}1.5}$ 의 IC_{50} $101.2 \mu\text{M}$ 에 비하면 10 배 이상 낮은 농도이므로 더욱 신뢰할 만하다[41]. 이처럼 채널 종류에 따라 플라보노이드가 채널에 작용하는 농도가 다르기 때문에 플라보노이드를 임상적으로 적용시킬 경우 장기의 종류나 조직에 따라 채널의 분포를 고려하여 그 효과가 다르게 나타날 수 있음을 시사한다.

커큐민의 채널에 대한 효과 또한 다양하다. CFTR Cl^- 채널 [42]을 제외한 대부분의 채널, 즉 $\text{K}_{\text{v}1.4}$ [22], Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} 채널 (CRAC) [18] 그리고 부신

피질세포에서 기록된 TREK-1 [11]에서는 억제 효과를 나타낸다. 부신피질세포에서 기록된 TREK-1에 대한 커큐민의 IC_{50} $0.93 \mu\text{M}$ 은 본 연구에서 얻은 TREK-1의 IC_{50} $1.04 \mu\text{M}$ 와 유사한 농도였다[11]. 이러한 결과는 whole cell patch configuration 방법이나 single channel patch configuration 방법으로 유사한 결과를 얻을 수 있음을 뒷받침한다.

플라보노이드의 채널에 대한 IC_{50} 는 플라보노이드의 종류에 약간의 차이는 있으나 본 연구에서 시도된 세 가지 종류의 플라보노이드에 대한 TREK-1의 IC_{50} 는 모두 μM 수준이었다. 커큐민, EGCG, 퀘르세틴은 μM 수준에서 TREK-1을 억제할 수 있어 TREK-1을 표적으로 하는 플라보노이드로서 신경세포나 심장세포, 종양세포 등 질병 예방 및 치료에 응용 될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 얻은 결과는 플라보노이드를 직접 세포내에 적용하는 방법으로 얻은 결과이다. TREK-1의 경우 채널단백질의 C-말단과 N-말단이 세포내에 있고 C-말단에 세포막의 신전 및 pH를 조절하는 부분이 있어 본 실험에서 관찰된 플라보노이드 또한 이 부분에 작용할 가능성이 크다[32]. 즉 플라보노이드의 세포내로 적용으로 나타나는 채널 활성억제효과는 플라보노이드가 채널 단백질과 직접적으로 상호작용할 수 있음을 시사한다. 또한 플라보노이드에 의한 TREK-1 채널의 억제 효과가 채널의 dwell time에는 많은 영향을 주지 않고 단일채널전류의 크기의 변화, 즉 전도도의 변화에 의해 달라진다는 결과 (표 1 과 그림 4)는 플라보노이드가 TREK-1 채널의 pore 부분을 점령함으로써 채널의 열리고 닫힘을 조절 할 수 있음을 시사한다.

플라보노이드가 TREK-1 채널을 억제한다는 결과는 TREK-1 뿐만 아니라 다른 종류의 K2P 채널단백질을 표적으로 하는 신약개발의 가능성을 주고 있다.

References

- [1] E. Honore, "The neuronal background K2P channels: focus on TREK1", *Nat Rev Neurosci*, 8(4), pp. 251-261, April, 2007.
- [2] C. Heurteaux, et al., "Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype", *Nat Neurosci*, 9(9), pp.1134-1141, September, 2006.
- [3] C. Heurteaux, et al., "TREK-1, a K^+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia", *Embo J*, 23(13), pp.2684-2695, July, 2004.
- [4] Y. Maruyama, et al., "TREK-1: a potential target for novel antidepressants", *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku*

- Zasshi, 27(4), pp. 147-151, August, 2007
- [5] I. Voloshyna, et al., "TREK-1 is a novel molecular target in prostate cancer", *Cancer Res*, 68(4), pp. 1197-1203, February, 2008.
- [6] S. J. Tsai, "Sipatrigine could have therapeutic potential for major depression and bipolar depression through antagonism of the two-pore-domain K^+ channel TREK-1", *Med Hypotheses*, 70(3), pp. 548-550 August, 2008.
- [7] H. J. Meadows, et al., "The neuroprotective agent sipatrigine (BW619C89) potentially inhibits the human tandem pore-domain K^+ channels TREK-1 and TRAAK", *Brain Res*, 892(1), pp. 94-101, February, 2001.
- [8] A. J. Patel, et al., "2P domain K^+ channels: novel pharmacological targets for volatile general anesthetics", *Adv Exp Med Biol*, 536, pp. 9-23. 2003.
- [9] F. Duprat, et al., "The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K^+ channels TREK-1 and TRAAK", *Mol Pharmacol*, 57(5), pp.906-912, May, 2000.
- [10] E. J. Kim, et al., "Baicalein and wogonin are activators of rat TREK-2 two-pore domain K^+ channel", *Acta Physiol (Oxf)*, pp. 1748-1716, February, 2011.
- [11] J. A. Enyeart, et al., "Curcumin inhibits bTREK-1 K^+ channels and stimulates cortisol secretion from adrenocortical cells", *Biochem Biophys Res Commun*, 370(4), pp. 623-628, June, 2008.
- [12] C. Chen, et al., "Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance", *Life Sci*, 87(11-12), pp. 333-338, September, 2010.
- [13] A. Goel, et al., "Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic", *Biochem Pharmacol*, 75(4), pp. 787-809, February, 2008.
- [14] G. M. Cole, et al., "Neuroprotective effects of curcumin", *Adv Exp Med Biol*, 595, pp. 197-212. 2007.
- [15] B. E. Bachmeier, et al., "Matrix metalloproteinases in cancer: comparison of known and novel aspects of their inhibition as a therapeutic approach", *Expert Rev Anticancer Ther*, 5(1), pp. 149-163, February, 2005.
- [16] M. M. Manson, et al., "Innovative agents in cancer prevention", *Recent Results Cancer Res*, 166, pp. 257-275. 2005.
- [17] B. Illek, et al., "Flavonoids stimulate Cl conductance of human airway epithelium in vitro and in vivo", *Am J Physiol*, 275(5 Pt 1), pp. L902-910, November, 1998.
- [18] D. H. Shin, et al., "Inhibition of Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} channel (CRAC) and K^+ channels by curcumin in Jurkat-T cells", *J Pharmacol Sci*, 115(2), pp. 144-154. 2011.
- [19] S. Nishida, et al., "Possible Involvement of Ca Activated K Channels, SK Channel, in the Quercetin-Induced Vasodilatation", *Korean J Physiol Pharmacol*, 13(5), pp. 361-365, October, 2009.
- [20] L. Yang, et al., "Quercetin activates human $K_{v1.5}$ channels by a residue I502 in the S6 segment", *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 36(2), pp. 154-161, February, 2009.
- [21] K. Kelemen, et al., "Green tea flavonoid epigallocatechin -3-gallate (EGCG) inhibits cardiac hERG potassium channels", *Biochem Biophys Res Commun*, 364(3), pp. 429-435, December, 2007.
- [22] H. Liu, et al., "Curcumin potentially blocks $K_{v1.4}$ potassium channels", *Biochem Biophys Res Commun*, 344(4), pp. 1161-1165, June, 2006.
- [23] S. Saponara, et al., "Quercetin as a novel activator of L-type Ca^{2+} channels in rat tail artery smooth muscle cells", *Br J Pharmacol*, 135(7), pp. 1819-1827, April, 2002.
- [24] M. D. Brown, "Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer", *Altern Med Rev*, 4(5), pp. 360-370, October, 1999.
- [25] K. V. Hirpara, et al., "Quercetin and its derivatives: synthesis, pharmacological uses with special emphasis on anti-tumor properties and prodrug with enhanced bio-availability", *Anticancer Agents Med Chem*, 9(2), pp. 138-161, February, 2009.
- [26] C. K. Wong, et al., "House dust mite allergen Der p 1 elevates the release of inflammatory cytokines and expression of adhesion molecules in co-culture of human eosinophils and bronchial epithelial cells", *Int Immunol*, 18(8), pp. 1327-1335, August, 2006.
- [27] R. Aalinkeel, et al., "The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90", *Prostate*, 68(16), pp. 1773-1789, December, 1.2008.
- [28] J. H. Lee, et al., "Curcumin, a constituent of curry, suppresses IgE-mediated allergic response and mast cell activation at the level of Syk", *J Allergy Clin Immunol*, 121(5), pp. 1225-1231, May, 2008.
- [29] E. J. Lee, et al., "Quercetin and kaempferol suppress immunoglobulin E-mediated allergic inflammation in RBL-2H3 and Caco-2 cells", *Inflamm Res*, 59(10), pp. 847-854, October, 2010.
- [30] D. O. Moon, et al., "Curcumin attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by regulating nitric oxide", *Biochem Biophys Res Commun*, 375(2), pp. 275-279, October, 2008.
- [31] O. P. Hamill, et al., "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches", *Pflugers Arch*, 391(2), pp.85-100,

August, 1981.

- [32] F. Maingret, et al., "Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel", *J Biol Chem*, 274(38), pp. 26691-26696, September, 1999.
- [33] A. Dedman, et al., "The mechano-gated K(2P) channel TREK-1", *Eur Biophys J*, 38(3), pp. 293-303, March, 2009.
- [34] F. Maingret, et al., "TREK-1 is a heat-activated background K⁺ channel", *Embo J*, 19(11), pp. 2483-2491, June, 2000.
- [35] A. Cogolludo, et al., "The dietary flavonoid quercetin activates BK_{Ca} currents in coronary arteries via production of H₂O₂. Role in vasodilatation", *Cardiovasc Res*, 73(2), pp. 424-431, January, 2007.
- [36] L. C. Pyle, et al., "Activation of CFTR by the Flavonoid Quercetin: Potential Use as a Biomarker of $\Delta F508$ CFTR Rescue", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 43(5), pp. 607-616, December, 2009.
- [37] H. Sun, et al., "Quercetin subunit specifically reduces GlyR-mediated current in rat hippocampal neurons", *Neuroscience*, 148(2), pp. 548-559, August, 2007.
- [38] B. H. Lee, et al., "Quercetin inhibits the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-mediated ion current by interacting with pre-transmembrane domain I", *Mol Cells*, 20(1), pp. 69-73, August, 2005.
- [39] B. H. Lee, et al., "Quercetin Inhibits $\alpha 3\beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Ion Currents Expressed in *Xenopus Oocytes*", *Korean J Physiol Pharmacol*, 15(1), pp. 17-22, February, 2011.
- [40] E. H. Lee, et al., "Effects of quercetin on single Ca²⁺ release channel behavior of skeletal muscle", *Biophys J*, 82(3), pp. 1266-1277, March, 2002.
- [41] B. H. Choi, et al., "Effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate, the main component of green tea, on the cloned rat brain K_{v1.5} potassium channels", *Biochem Pharmacol*, 62(5), pp. 527-535, September, 2001.
- [42] A. L. Berger, et al., "Curcumin stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activity", *J Biol Chem*, 280(7), pp. 5221-5226, February, 2005.

김 양 미(Yangmi Kim)

[정회원]



- 1993년 2월 : 경상대학교 수의학 과(수의학석사)
- 1997년 8월 : 경상대학교 수의학 과(수의학박사)
- 1997년 12월 ~ 2000년 6월 : Chicago Medical School 박사후 연수

- 2000년 9월 ~ 2003년 2월 : 서울대학교 의과대학 생 리학교실 BK21 계약조교수
- 2003년 3월 ~ 현재 : 충북대학교 의과대학 의학과 부 교수

<관심분야>

전기 생리학, 막수송 생리학

김 경 아(Kyung-Ah Kim)

[정회원]



- 1991년 2월 : 충북대학교 물리학 과(이학사)
- 1993년 2월 : 충북대학교 물리학 과(이학석사)
- 2001년 8월 : 충북대학교 의용생 체공학과(공학박사)
- 2005년 3월 ~ 현재 : 충북대학교 의과대학 의학과 부교수

<관심분야>

생체계측, 호흡기류센서, 호흡생리학