

연구노트

**Curcumin은 ovalbumin에 의해서 유도된  
inducible nitric oxide synthase 억제**

김지수 · 안희진 · 신화정<sup>1</sup> · 구교정<sup>1</sup> · 엄상훈 · 이청호 · 민인순<sup>2</sup> · 윤형선\*  
순천향대학교 임상병리학과, <sup>1</sup>순천향대학교 의료과학과, <sup>2</sup>순천향대학교 보건행정경영학과

**Curcumin Inhibits Ovalbumin-Induced Inducible  
Nitric Oxide Synthase Expression**

Ji Soo Kim, Hee Jin Ahn, Hwa-Jeong Shin<sup>1</sup>, Gyo-Jeong Gu<sup>1</sup>, Sang Hoon Eum,  
Chung Ho Lee, In Soon Min<sup>2</sup>, and Hyung-Sun Youn\*

Department of Biomedical Laboratory Science, SoonChunHyang University

<sup>1</sup>Department of Medical Science, SoonChunHyang University

<sup>2</sup>Department of Healthcare Management, SoonChunHyang University

**Abstract** Egg allergy has been reported as the most prevalent food hypersensitivity among children. One of the major egg allergens is ovalbumin (OVA). OVA is the major protein in the egg white, comprising 54% of its total protein content. Curcumin isolated from *Curcuma longa* has been used as folk remedies in order to treat many chronic diseases for many years. In the present report, we present biochemical evidence that curcumin inhibits the NF-κB activation induced by OVA. Curcumin also inhibits OVA-induced iNOS expression and nitrite production. These data suggest new approaches for the development of efficient anti-allergic strategies.

**Keywords:** ovalbumin, egg allergy, NF-κB, inducible nitric oxide synthase, nitrite

서 론

우리가 일상적으로 먹는 여러 식품 중에는 항염증·항알러지 효과를 가지고 있는 여러 기능성 물질들이 포함되어 있다. 이러한 기능성 물질들은 병원균과 같은 여러 pro-inflammatory 자극에 의해서 유도된 전사인자 nuclear factor-κB(NF-κB)의 활성화를 억제시킨다(1-5). 기능성 물질들 중의 하나로 카레의 주성분인 curcumin[(1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione]이 있다. Curcumin은 *Curcuma longa* 안에서 발견되며, 노란색을 띠고 있는 phytochemicals이며, IκB kinase β(IKKβ)를 분자학적인 타깃으로 하여 lipopolysaccharide(LPS), phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), tumor necrosis factor-α(TNFα), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등의 자극제에 의해서 유도된 NF-κB의 활성화를 억제시킨다(6-9). Curcumin은 또한 LPS에 의해서 유도된 cyclooxygenase-2(COX-2)와 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 발현을 억제시킨다(2,8). 또한, 선행 연구에 의해 curcumin은 LPS에 의해서 유도된 Toll-like receptor 4(TLR4)의 동종이합체(homodimerization) 형성을 억제하여 NF-κB 활성화를 억제한다는 것을 보고하였다(2).

계란 흰자 단백질인 ovalbumin(OVA)과 ovomucoid(OVM)가 주요한 계란 알러젠으로 알려져 있다(10). OVA와 OVM는 계란 흰자 단백질 중 약 65%를 차지하고 있으며 특히, OVA는 계란 흰자 단백질 중 약 54%로 가장 많은 비율을 차지하고 있는 인당 단백질(phosphoglycoprotein)이다. 현재까지 알려진 가장 효과적인 계란 알러지 치료방법은 계란을 먹지 않는 것이었지만, 음식문화의 발달로 계란을 이용한 음식들이 많아지면서 계란을 피하는 것은 더욱 어려워지게 되었다. 특히 MMR(measles, mumps, rubella)백신을 포함한 여러 바이러스 백신들은 계란을 이용해서 제조하고 있기 때문에 계란 알러지는 백신접종에 있어서 중요한 이슈로 떠오르고 있다(10).

염증은 여러 질병과 관련이 있는 병태생리학(pathophysiology)적인 현상이다(11). 특히, 유도 효소(inducible enzymes)인 iNOS, COX-2와 NADPH oxidase(NOX)가 염증 질환 발현에 중요한 역할을 한다(11). 특히 iNOS의 free radical NO의 세포 독성 효과 때문에 염증과 관련된 질병을 유도한다(12).

선행연구에서 OVA이 iNOS의 발현을 유도한다는 것을 보고하였다(13). 이번 연구에서는 curcumin이 OVA에 의해서 유도된 iNOS 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. 이러한 연구는 앞으로 알러젠에 의한 알러지 치료제 개발에 초석이 될 것으로 기대한다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 ovalbumin은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)회사로부터 구입하였다. LPS(lipopolysaccharide)는 List Biological

\*Corresponding author: Hyung-Sun Youn, Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 336-745, Korea  
Tel: 82-41-530-3086  
Fax: 82-41-530-3085  
E-mail: hyoun@sch.ac.kr  
Received June 6, 2012; revised July 2, 2012;  
accepted July 4, 2012

Lab(San Jose, CA, USA) 회사로부터 구입하였다. iNOS 항체는 BD Biosciences(San Jose, CA, USA) 회사로부터,  $\beta$ -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA) 회사로부터 구입하였다. 그 외 시약들은 Sigma-Aldrich 회사로부터 구입하였다.

### 세포 배양

RAW264.7 세포들(a murine monocytic cell line, ATCC TIB-71)은 10% (v/v) FBS, 100 units/mL Penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 포함하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다. 세포들은 5% CO<sub>2</sub>/air를 포함하고 있는 37°C 배양기 안에서 배양하였다.

### Plasmid

NF- $\kappa$ B발광 plasmid는 F. Mercurio(Signal Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA), iNOS발광 plasmid는 Daniel Hwang(University of California, Davis, CA, USA), Heat shock protein(HSP) 70- $\beta$ -galactosidase plasmid는 R. Modlin(University of California, Los Angeles, CA, USA)으로부터 제공받았다. Transfection을 위한 모든 DNA는 EndoFree Plasmid Maxi kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하였다.

### Transfection과 발광효소 유전자 분석(luciferase reporter gene assay)

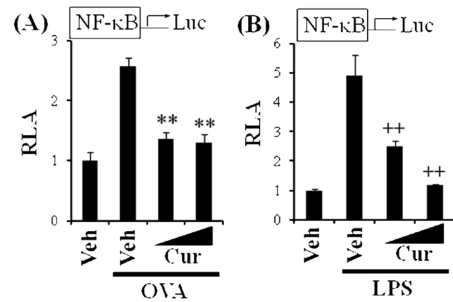
NF- $\kappa$ B와 iNOS발광효소 유전자 분석은 선행연구에서 사용한 방법에 의하여 분석하였다(1,2). RAW264.7세포를 48 well plates에 균등 분주(0.8 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well)하였고, 24시간 후 50-60% 정도의 증식을 보일 때 plasmid DNA를 transfection하였다. 발광효소 plasmid와 HSP70- $\beta$ -galactosidase plasmid는 Superfect transfection 시약(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 세포 안으로 transfection 시켰다. 발광 효소의 활성화는 luciferase assay system(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다. 발광 효소의 활성화는  $\beta$ -galactosidase의 활성화를 측정하여 표준화시켰다.

### Immunoblotting

선행연구의 방법에 의하여 단백질 추출물들은 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에서 분리되어 polyvinylidene difluoride membrane으로 전기영동에 의해서 이전되었다(14,15). Membrane은 0.1% Tween 20 그리고 5% 탈지 건조된 우유를 포함하고 있는 phosphate-buffered saline을 가지고 blocking 하였다. Membrane은 1차 항체를 가지고 blotting하고, horseradish peroxidase와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음, iNtRON western blot detection system(Seongnam, Korea)을 사용하여 원하는 단백질을 규명하였다.

### Nitrite Assay

선행연구의 방법에 의하여 RAW264.7 세포로부터 nitrite 추출물이 준비되었다(16). Supernatant 100 mL씩 96 well plate에 넣고, 분주기를 사용하여 Griess reagent 150 mL를 첨가하였다. 공기를 제거한 후 플레이트 리더기를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준용액으로 sodium nitrite 용액이 사용되었다.



**Fig. 1. Curcumin inhibits NF- $\kappa$ B activation induced by ovalbumin or LPS.** (A) RAW 264.7 cells were transfected with NF- $\kappa$ B-luciferase reporter plasmid and pre-treated with curcumin (10, 20  $\mu$ M) for 1 h and then treated with OVA (100  $\mu$ g/mL) (A) or LPS (10 ng/mL) (B) for an additional 8 h. Relative luciferase activity (RLA) was normalized with  $\beta$ -galactosidase activity. Values are mean $\pm$ SEM (n=3). \*\*, Significantly different from OVA alone (A),  $p$ <0.01. ++, Significantly different from LPS alone (B),  $p$ <0.01. Veh, vehicle; OVA, ovalbumin; Cur, curcumin.

## 결과 및 고찰

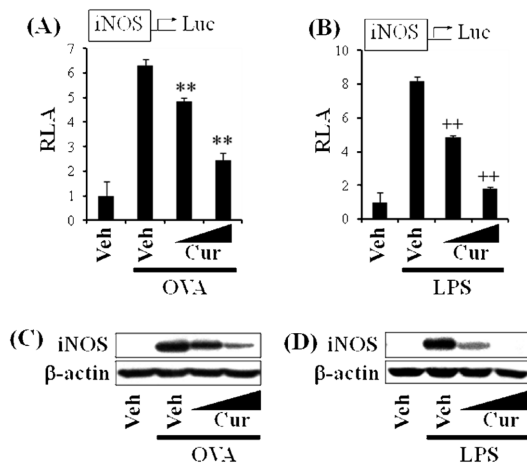
### Curcumin은 ovalbumin과 LPS에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제

선행연구에서 OVA이 NF- $\kappa$ B를 활성화 시키며, 활성화된 NF- $\kappa$ B에 의해서 유도되는 단백질인 iNOS의 발현을 유도하는 것을 밝혀내었다(13). TLR4 agonist인 LPS 또한 NF- $\kappa$ B를 활성화 시키며, iNOS의 발현을 유도한다(17). 이번 연구에서 우리는 curcumin이 OVA과 LPS에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화 및 iNOS발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 먼저 curcumin이 OVA과 LPS에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 알아본 결과, curcumin은 OVA과 LPS에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하였다(Fig. 1).

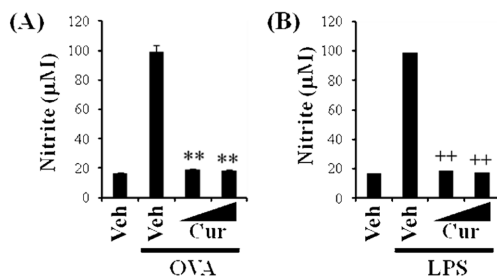
### Curcumin은 ovalbumin과 LPS 의해서 유도된 iNOS의 발현을 억제

다음 실험으로 curcumin이 NF- $\kappa$ B 활성화에 의해서 유도되는 유전자인 iNOS의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 먼저 iNOS 발광효소 유전자 분석법에 의하면 curcumin은 OVA과 LPS에 의해서 유도된 iNOS의 발현을 억제시켰다(Fig. 2A, 2B). Curcumin은 OVA과 LPS에 의해서 유도된 iNOS 단백질 발현을 억제시키는 것을 western blotting 방법을 통하여 확인하였다(Fig. 2C, 2D). 또한 curcumin은 OVA과 LPS에 의해서 유도된 iNOS의 생성물인 nitrite의 생성을 억제시켰다(Fig. 3). 이러한 결과들은 curcumin이 OVA에 의해서 유도된 알리지 반응을 조절할 수 있다는 것을 보여주는 결과라 사료된다.

Nitric oxide(NO)는 대기중의 가장 풍부한 질소와 산소 두 기체의 1:1 조합물이다. 1987년까지 NO는 전기화학반응의 오염물질이나 부산물로 여겨져 왔지만, 오늘날에는 포유동물 세포가 아미노산 L-arginine으로부터 NO를 만들고, 이 NO는 세포에서 다른 세포 사이의 신호 전달을 위해 사용한다(18). NO는 미세한 nanomol 농도에서 soluble guanylate cyclase를 가역적으로 활성화 시키며(19), cytochrome c oxidase를 억제한다(20). NO는 또한 단백질 안에 있는 cysteine을 니트로실화(nitrosylation) 함으로써 단



**Fig. 2. Curcumin inhibits iNOS expression induced by ovalbumin or LPS.** (A,B) RAW 264.7 cells were transfected with iNOS luciferase reporter plasmid and pretreated with 10 or 20  $\mu$ M curcumin for 1 h and then treated with OVA (100  $\mu$ g/mL) (A) or LPS (10 ng/mL) (B) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase enzyme activities were determined. Values represent the mean $\pm$ SEM (n=3). \*\*, significantly different from OVA alone,  $p < 0.01$  (A). ++, Significantly different from LPS alone,  $p < 0.01$  (B). C,D RAW 264.7 cells were pretreated with 10 or 20  $\mu$ M curcumin for 1 h and then further stimulated with OVA (100  $\mu$ g/mL) (A) or LPS (10 ng/mL) for 8 h. Cell lysates were analyzed for iNOS and  $\beta$ -actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; OVA, ovalbumin; Cur, curcumin.



**Fig. 3. Curcumin inhibits nitrite production induced by ovalbumin or LPS.** (A,B) RAW 264.7 cells were pretreated with 10 or 20  $\mu$ M curcumin for 1 h and then treated with OVA (100  $\mu$ g/mL) (A) or LPS (10 ng/mL) (B) for an additional 20 h. The amounts of nitrite in supernatant were measured using Griess reagent. Values represent the mean $\pm$ SEM (n=3). \*\*, significantly different from OVA alone,  $p < 0.01$  (A). ++, Significantly different from LPS alone,  $p < 0.01$  (B). Veh, vehicle; OVA, ovalbumin; Cur, curcumin.

백질의 기능을 변형시킨다(21). Aconitase, NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase를 포함한 Fe-S clusters를 가지는 Haem을 포함하고 있는 효소들과, non-haem metalloenzymes, ribonucleotide reductase, DNA 자체 등은 NO의 억제나 손상에 민감하다(22).

NO의 생성은 3개의 NOSs인 endothelial NOS(eNOS), neuronal NOS(nNOS), inducible NOS(iNOS)에 의해서 유도된다(12). iNOS는 감염이나 염증성 인자(proinflammatory stimuli)에 의해서 유도되는 효소인데 반해서, eNOS, nNOS는 항상 발현되어 있는 효소이다(12). 3개의 NOS isoforms 중에서, 동물의 병리생리학과 가장 분명하게 연결된 것은 iNOS의 과발현이라 할 수 있다. iNOS는 최초로 쥐 대식세포(murine macrophages) 안에서 발견되었다(23). 활성화되지 않은 대식세포에서는 iNOS는 발현되지 않지만,

LPS 또는 다양한 pro-inflammatory cytokines(interleukin-1, interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ )의 자극에 의해서 iNOS는 활성화되며 iNOS단백질이 발현된다(24). 특히, iNOS에 의해서 생성된 nitric oxide는 peroxynitrite를 형성하기 위하여 O<sub>2</sub>와 결합했을 때, 여러 효소와 신호 전달 체계에 영향을 미친다(12). 또한 사람에서 iNOS의 발현은 말라리아나 비뇨생식기 같은 특정한 장기의 감염에 대한 방어 체계로서 중요한 역할을 한다(25).

## 요약

본 연구에서 curcumin이 계란 알러젠 중의 하나인 OVA에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화 및 iNOS 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. Curcumin은 OVA에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화와 iNOS 발현을 억제시켰다. 이러한 결과는 curcumin이 계란 알러젠인 OVA에 의해서 유도된 NF- $\kappa$ B의 활성화와 iNOS의 발현을 억제하여 염증반응이나 알러지와 같은 만성적인 질병들을 조절할 수 있다는 것을 보여주는 중요한 결과라 사료된다. 이러한 연구는 추후 알러지 작용기전 규명 및 알러지 치료제 개발에 중요한 역할을 할 것으로 기대한다.

## 문헌

1. Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: Molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J. Immunol.* 175: 3339-3346 (2005)
2. Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem. Pharmacol.* 72: 62-69 (2006)
3. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* 3: 768-780 (2003)
4. Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor- $\kappa$ B as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit. Care Med.* 31(1 Suppl): S105-S111 (2003)
5. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem. Pharmacol.* 72: 850-859 (2006)
6. Pan MH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of I $\kappa$ B kinase and NF $\kappa$ B activation in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1665-1676 (2000)
7. Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, Sartor RB. Curcumin blocks cytokine-mediated NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I- $\kappa$ B kinase activity. *J. Immunol.* 163: 3474-3483 (1999)
8. Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 206: 533-540 (1995)
9. Kang G, Kong PJ, Yuh YJ, Lim SY, Yim SV, Chun W, Kim SS. Curcumin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression by inhibiting activator protein 1 and nuclear factor kappaB bindings in BV2 microglial cells. *J. Pharmacol. Sci.* 94: 325-328 (2004)
10. Mine Y, Yang M. Recent advances in the understanding of egg allergens: Basic, industrial, and clinical perspectives. *J. Agr. Food Chem.* 56: 4874-4900 (2008)
11. Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, iNOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer* 121: 2357-2363 (2007)

12. Vallance P. Nitric oxide: Therapeutic opportunities. *Fund. Clin. Pharmacol.* 17: 1-10 (2003)
13. Lee AN, Park SJ, Jeong AR, Lee JR, Park HJ, Kim SJ, Min IS, Youn HS. Ovalbumin induces cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 110-113 (2011)
14. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem. Pharmacol.* 72: 850-859 (2006)
15. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Auranofin, as an anti-rheumatic gold compound, suppresses LPS-induced homodimerization of TLR4. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 350: 866-871 (2006)
16. Lim HJ, Lee HS, Ryu JH. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by tussilagone from *Farfarae flos* in BV-2 microglial cells. *Arch. Pharm. Res.* 31: 645-652 (2008)
17. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17: 1-14 (2005)
18. Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monitor* 7: 801-819 (2001)
19. Ignarro LJ. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int.* 55(Suppl): S2-S5 (1996)
20. Brown GC. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 369: 136-139 (1995)
21. Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675-683 (2001)
22. Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxy-nitrite. *Mutat. Res.* 424: 37-49 (1999)
23. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* 144: 278-283 (1990)
24. Palmer RM, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 193: 398-405 (1993)
25. Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg JB, Kremsner PG. Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J. Infect. Dis.* 184: 330-336 (2001)