ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2016** Vol. 26. No. 9. 1082~1087 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2016.26.9.1082

- Note -

Inhibition of Interleukin-1α-induced Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability by Curcumin Treatment in Caco-2 Cells in Caco-2 Cells

Choon Young Kim*

Department of Food Science and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Korea

Received July 16, 2016 /Revised October 5, 2016 /Accepted October 10, 2016

The intestinal tight junction (TJ) plays an important role as a paracellular barrier. Impaired TJ permeability and enhanced proinflammatory cytokine production are crucial pathophysiological mechanisms in inflammatory bowel diseases (IBDs). Although proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interluekin-1 beta, which are markedly increased in IBD patients, have been reported to increase intestinal TJ permeability, the role of interleukin-1 alpha (IL-1α) in the TJ has not been studied. Phytochemicals could prevent proinflammatory cytokine-caused TJ alteration. Curcumin (CCM), a biologically active component of turmeric, has a strong anti-inflammatory activity. The purpose of this study was to elucidate the effect of IL-1α on intestinal epithelial TJ permeability and the role of CCM in IL-1α's action on TJ in an *in vitro* intestinal epithelial system, Caco-2 monolayers. The TJ integrity of Caco-2 monolayers was estimated by measuring the flux of FITC-labeled dextran and transepithelial electrical resistance (TEER). Apical IL-1α (100 ng/ml) treatment elevated TJ permeability and suppressed TEER of Caco-2 monolayers. Pretreatment with CCM (20 μM) for 30 min significantly inhibited IL-1α-induced TJ alterations, such as increased TJ permeability and decreased in TEER values. These results demonstrated that IL-1α-induced increases in Caco-2 TJ permeability and CCM blocked the action of IL-1α in the TJ.

Key words : Caco-2 cells, curcumin, interleukin-1α, intestinal epithelial tight junction, permeability

서 론

소장세포는 소화, 흡수, 물리적·화학적 장벽을 제공하여 외부 자극에 방어하는 등의 다양한 기능을 한다. 소장의 상피세포는 융모(villi) 구조로 되어 있으며 탄수화물 분해효소인 sucrase-isomaltase 및 malltase-glucoamylase와 단백질 분해효소인 peptidases 등 소화효소(brush boarder enzymes)가 존재하여 식품의 소화를 돕는다[22]. 또한 영양소, 물, 이온 등의 물질은 수동수송이나 능동수송와 같은 세포횡단수송(transcellular transport)의 방법으로 흡수된다[22]. 소장은 병원성 세균 독소, 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)이나 다른 외부 요인의 자극에 반응하는 화학적 장벽을 제공한다. 소장세포 사이의 치밀이음부(tight junction, TJ)는 세포와 세포 사이에 존재하는 단백질 네트워크로 세포 외부와 내부 사이의 물질수송(paracellular transport)에 관여하는 물리적 장벽 역할을 한다. TJ는 병원성 세균이나 독소물질 등과 같은 거대 분자 물질의 체내 유입을 차단한다[5, 22].

***Corresponding author**
Tel : +82-53-810-2871, Fax : +82-53-810-4769
E-mail : cykim@yu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

TJ는 occludin, claudins, junctional adhesion molecular 및 tricellulin과 같은 내재성 막단백질(integral transmembrane proteins)과 zonula occludes (ZO)와 같은 구조 표면 막단백질(peripheral membrane proteins)이 복잡한 네트워크를 형성하여 격벽(barrier) 기능을 함으로써 감염이나 염증으로부터 우리 몸을 방어하는 중요한 역할을 한다[26]. 그러나 염증성 장질환(inflammatory bowel disease), 비만, 지방간염(nonalcholic steatohepatitis), 비알콜성 지방간질환(nonalcoholic fatty acid liver disease)과 같은 질환에서는 TJ가 느슨해져 장점막의 투과성이 비정상적으로 증가(leaky gut syndrome)되며, 이로 인해 전신의 염증 반응이 유발되어 질병의 증상이 더욱 악화된다고 알려져 있다[7, 10, 12, 14, 19]. 염증성 장질환 환자의 경우 소장 내 염증과 TJ의 투과성이 높아지는 특성이 있으며 이는 소장 내부와 혈액 내 interleukin-1beta (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), interferon-gamma (INF-ɣ) 및 tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)와 같은 염증성 사이토카인의 증가와 밀접한 관련이 있다[21]. 고지방식이에 의해 유도된 비만 및 당뇨 마우스에서도 혈액 내 높은 농도의 염증성 사이토카인 및 미생물 독소가 관찰되며 TJ의 손상이 특징으로 나타난다[8, 9]. TNF-α에 의한 TJ 손상은 nuclear factor-kappa B (NF-κB) 신호기전의 활성을 통해 TJ 구조단백질 ZO-1의 단백질 발현을 억제시킴으로써 TJ를 느슨하게 만든다[17, 18]. IL-1β 역시 TJ를 손상시키는데 TNF-α와 달리 ZO-1 단백질 발현에 영향을 미치지 않고 occludin 단백질의 발현을 감소시키는 것으로 알려져 있다[2, 4].

TJ의 치밀도의 약화가 여러 질병의 원인이 되거나 악화에 기여하기 때문에 TJ의 안정화를 통해 소장의 격벽기능을 강화시킨다면 이러한 질병을 예방하거나 증상을 완화시킬 수 있다. 다수의 연구에서 phytochemicals의 경우 염증성 사이토카인에 의한 TJ 손상을 방지하는 것이 알려져 있다[23, 24]. TNF-α와 INF-ɣ의 혼합 처리가 Caco-2 세포 단층의 TJ을 손상시키며, 반면 berberine 처리에 의해 저해된다고 보고되었다[13]. Genistein의 경우 Caco-2 세포 단층의 TJ를 강화시킴으로써 병원성 미생물 *Escherichia coli*나 *Salmonella* Typhimurium의 소장세포 내 투과를 저해시킨다[13]. Curcumin (CCM)은 강황의 노란색 색소 성분이며 NF-κB 신호기전의 강력한 저해제로 항염증 작용을 한다[20]. CCM의 처리가 염증성 사이토카인에 의한 TJ 관련 단백질의 발현 억제를 막는 효능은 잘 알려져 있다[4, 18]. CCM 전처리는 염증성 사이토카인 외에 비만과 밀접한 관련이 있는 leptin 호르몬에 의한 TJ의 약화를 예방하며, 이는 JAK-STAT 신호기전을 억제하기 때문이다[16].

다른 염증성 사이토카인 TNF-α와 IL-1β의 TJ에 대한 역할은 잘 알려져 있는데 반해, 장에서 높은 농도로 발견되며 국소적 염증반응을 일으키는 주요한 염증성 사이토카인 interleukin-1alpha (IL-1α)의 TJ에 대한 역할은 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 IL-1α와 CCM이 소장의 TJ에 미치는 영향을 밝히고자 Caco-2 세포를 이용하여 TJ의 integrity와 paracellular permeability를 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료

세포배양 실험에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 0.25% trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin, sodium pyruvate, fetal bovine serum (FBS) 등은 Thermo Scientific사(Waltham, MA, USA)의 제품을 사용하였다. Transwell permeable supports (0.4 μm pore, Cat# 3401)는 Corning (Corning, NY, USA)의 제품을 사용하였다. Fluorescein isothiocyannate-dextran (FITC-dextran, MW 4000 Da), curcumin (CCM), interleukin-1 alpha (IL-1α), dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 기타 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

Caco-2 세포주의 배양 조건

Human Caco-2 세포주는 American Type Culture Collection에서 구입하였으며 1,000 IU/ml penicillin, 1,000 μg/ml streptomycin과 10 mM sodium pyruvate를 첨가한 10% FBS-DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 조건의 incubator에서 계대배양하였다. Caco-2 세포를 대략 $5\sim10\times10^4$ cells/well의 농도로 12- 또는 24-well plate에 seeding하였으며 2~3일에 한번씩 배양배지를 교환하면서 21일 동안 배양하였다. Caco-2 세포는 seeding한 후 4~5일 후에 단층(monolayer) 세포를 형성하며 21~24일 배양 시 완전히 분화가 되며 분화가 완료된 세포를 실험에 사용하였다.

MTT assay를 이용한 IL-1α의 세포독성 시험

IL-1α 처리가 Caco-2 세포의 증식(proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl- 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 실시하였다[15]. Caco-2 세포를 대략 5×10^4cells/well의 농도로 24-well plate에 seeding한 후 21일 배양 후 IL-1α를 농도별(0, 1, 10, 50, 100 ng/ml)로 첨가하여 24시간 배양한 후 MTT 용액(5 mg/ml)을 첨가하였다. 이 plate를 37°C에서 1시간 배양한 후 배지를 제거하고, DMSO를 첨가하여 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. IL-1α의 Caco-2 세포에 대한 세포독성 효과는 대조군 흡광치에 대한 백분율로 표시하였다.

FITC-dextran을 이용한 Caco-2 세포주의 paracellular permeability 활성 측정

IL-1α 처리가 Caco-2 단층 세포의 물질 투과성 미치는 영향을 관찰하기 위하여 21일 동안 collagen-coated polycarbonate membrane transwell inserts (0.4 μm pore size, 12 mm membrane diameter)에 배양한 Caco-2 세포를 이용하여 실험하였다. DMSO (0.1%)나 20 μM CCM를 basolateral compartment에 처리하여 30분 배양하여 제거한 후 100 ng/ml의 IL-1α를 apical compartment에 첨가하였다. IL-1α처리 24시간 후 배지를 모두 제거하고 transwell 상층부에 FITC-dextran (100 μg/ml)을 넣고 배양시켜 세포막을 통과한 FITC-dextran (size of 4000 Da)의 형광도를 하층부 배지에서 측정하였다. FITC-dextran의 형광도는 excitation wavelength 485 nm와 emission wavelength 535 nm 조건으로 맞춘 fluorescence plate reader (Molecular Devices, Chicago, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. Caco-2 단층 세포의 물질 투과성(paracellular permeability)은 아래의 식을 통해 계산하여 "% of control"로 나타내었다.

$$\textit{Paracellular permeability} = \frac{\text{처리군의 형광도} - \text{처리군의 초기 형광도}}{\text{대조군의 형광도} - \text{대조군의 초기 형광도}} \times 100$$

Transepithelial electrical resistance (TEER) 측정을 통한 Caco-2 세포주의 tight junction integrity 확인

IL-1α 처리가 Caco-2 단층 세포의 TJ의 integrity에 미치는 영향을 검증하기 위하여 epithelial voltohmmeter (Millicell ERS system, Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 transepithelial electrical resistance (TEER)값을 측정하였다.

Caco-2 세포를 collagen-coated polycarbonate membrane transwell inserts (0.4 μm pore size, 12 mm membrane diameter)에 21일간 배양하여 0.1% DMSO나 20 μM CCM를 30분 동안 transwell 하층부(basolateral compartment)에 처리한 후 제거하고 100 ng/ml의 IL-1α를 transwell 상층부(apical compartment)에 첨가하여 24시간 배양하였다. IL-1α와 CCM 처리에 따른 Caco-2 단층 세포의 전기 저항치(transepithelial electrical resistance, TEER)로 TJ integrity를 확인하였다.

Total RNA 추출 및 RT-PCR을 이용한 염증성 사이토카인 유전자 발현 분석

TEER 분석과 동일한 실험 조건에서 준비된 Caco-2 세포에서 TriZol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후 정량한 RNA를 SuperScript II kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. Reverse transcription mixture는 Invitrogen사의 protocol에 따라 준비하여 25°C에서 5분간 반응한 다음 42°C에서 50분간 반응 후 70°C에서 15분간 처리하여 반응을 종료하였다. Reverse transcription reaction으로 합성된 cDNA를 template로 사용하여 관심 유전자를 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 PCR 방법으로 증폭하였다. 각 PCR 단계는 denaturation (96°C에서 30초), annealing (60°C에서 30초), extension (72°C에서 30초)의 조건으로 설정하여 이 단계를 18S RNA 유전자 증폭은 28 cycles을 TNF-α와 IL-6 유전자 증폭은 35 cycles을 반복하였다. PCR에서 사용한 primer의 염기서열정보는 다음과 같다. *TNF-a* (forward, 5′- TGT AGC CCA TGT TGT AGC AAA C - 3′; reverse, 5′- TTG AAG AGG ACC TGG GAG TAG A -3′); *IL-6* (forward, 5′- ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC - 3′; reverse, 5′- GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G -3′); *18S rRNA* (forward, 5′- TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT -3′; reverse, 5′- ACT CAT TCC AAT TAC AGG GCC TCG -3′). 이 때 *18S rRNA*를 housekeeping 유전자로 internal control로 사용하였다. 각 증폭 산물들을 2% agarose gel을 이용하여 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 ultra violet 파장 하에서 확인하였다.

통계 처리

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였다. 통계 분석은 SAS 9.4 프로그램을 이용하여 분산분석 후 Dunnette t-test를 실시하여 α=0.05의 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

IL-1α 처리에 의한 Caco-2 세포의 cell viability

다양한 농도(0, 1, 10, 50, 100 ng/ml)의 IL-1α를 24시간 처리한 후 세포생존율을 평가한 결과 1 ng/ml 이상의 농도에서는 대략 20%의 세포생존율이 저해함을 확인하였다(Fig. 1). 그러나 특이적으로 농도 의존적인 관계를 보이지 않았다. 본 연구에서는 IL-1α를 Caco-2 세포에 처리하였을 때 약한 독성을 확인할 수 있었으나 기존 연구에서는 IL-1α를 HCT116 세포에 처리하였을 때 세포성장을 전혀 억제하지 않는다고 알려져 있다[11]. Bruewer 등[6]의 연구에 따르면 TNF-α와 INF-ɣ가 세포사멸(apoptosis)과 TJ의 integrity를 손상시키나 세포사멸의 억제가 TJ 손상을 막지 못하므로 TNF-α와 INF-ɣ처리에 의한 TJ 기능 억제는 세포사멸과는 비의존적인 경로에 의해 일어난다. 그러므로 IL-1α의 세포독성이 TJ 손상에 관련이 없을 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 100 ng/ml의 IL-1α를 Caco-2 세포 단층의 TJ integrity에 미치는 영향에 대한 향후 연구에 사용하였다.

IL-1α과 curcumin 처리가 Caco-2 세포 단층의 paracellular permeability에 미치는 영향

IL-1α이 TJ를 통한 물질 이동에 미치는 영향 즉 TJ의 투과성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 FITC-dextran의 flux를 측정하였다. FITC-dextran은 paracellular transport 경로를 통해 세포 단층의 상부에서 하부로 이동함으로 투과성이 높을수록 TJ이 느슨한 것으로 판단할 수 있다. IL-1α (100 ng/ml)가 TJ을 통한 FITC-dextran의 이동에 미치는 영향을 24시간 동안 관찰하여 그 결과를 Fig. 2A에 나타내었다. 대조군에서 시간이 경과함에 따라 FITC-dextran이 단층 상부에서 하부로 이동하였고 8시간 이후 유의적인 결과를 관찰할 수 있었다. 반면 IL-1α 처리군에서는 대조군에서 관찰되는 정상적인 TJ을 통한 FITC-dextran의 이동에 비해 빠르게 FITC-dextran이 이동함을 관찰하였고 처리 2시간 이후부터 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 2). 이 결과는 IL-1α가 TJ 조절과

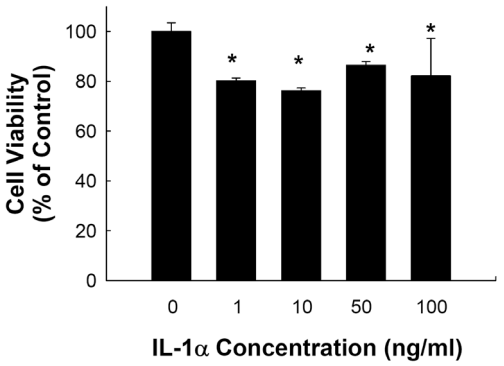

Fig. 1. Effect of increasing concentrations of IL-1α on Caco-2 cell viability. Increasing concentrations of IL-1α range from 0 ng/ml to 100 ng/ml were added to the apical compartment of Caco-2 monolayers for 24 hr. IL-1α caused decrease in cell viability of Caco-2 cells. Data represent means ± SD (n=3). *, $p<0.05$ vs. control.

연관되어 있음을 보여준다.

항염증 효능이 있다고 알려진 CCM이 IL-1α 처리로 인해 증가한 TJ 투과성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 20 μM의 CCM을 30분간 전처리한 후 위와 동일하게 IL-1α를 24시간 처리하였다. Fig. 2B에 나타낸 바와 같이 대조군에 비해 IL-1α 처리군은 FITC-dextran의 flux를 약 2.5배 증가시켰으나 CCM 전처리군에서는 IL-1α에 의해 증가된 FITC-dextran의 flux가 억제되어 대조군과 유사한 결과를 보였다. 즉 CCM이 IL-1α의 작용을 완전히 억제함으로 TJ의 손상을 예방한다는 것을 알 수 있었다. 본 연구 결과는 CCM 전처리가 leptin에 의한 TJ의 손상을 예방한다는 결과와 유사하였다[16].

IL-1α과 CCM 처리가 Caco-2 세포 단층의 TEER에 미치는 영향

Caco-2 세포 단층의 상층부에 IL-1α (100 ng/ml)를 24시간 처리하였을 때 TJ의 integrity의 변화를 확인하기 위하여 trans-epithelial electrical resistance (TEER)를 측정하였다. Caco-2 세포단층의 전기적 저항을 측정한 TEER 측정치는 TJ의 integrity를 알아보는 지표이며 TEER 값이 클수록 integrity가 우수함을 나타낸다. TEER측정 실험에서 IL-1α의 처리에 의해 TEER값이 Caco-2 세포 단층에서 확인되는 기본 TEER값보다 약 16% 이상 유의적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 3). 이 결과는 Fig. 2에서 관찰된 결과와 동일하며, IL-1α가 Caco-2 세포 단층의 TJ을 손상시킴을 확인할 수 있었다.

CCM 전처리가 IL-1α이 TJ 손상을 억제하는지의 여부를 조사하기 위하여 20 μM의 CCM을 Caco-2 세포 단층 하부에 30분간 전처리한 후 100 ng/ml의 IL-1α를 처리하여 TEER의 변화를 측정하였다. IL-1α 처리에 의한 TEER값의 감소는 CCM 전처리를 통해 억제되어 대조군의 TEER 값과 유사한 것으로 확인된 바 CCM의 IL-1α 활성에 대한 저해능을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 이는 Fig. 2B에서 확인한 바와 같이 CCM이 IL-1α의 TJ 손상을 예방한다는 결과와 동일하였다.

이상의 결과를 통하여 관찰된 IL-1α 처리에 의한 TJ의 손상 및 CCM 전처리를 통한 억제는 기존 연구에서 보고된 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1β와 TNF-α에 의한 TJ integrity 감소와 유사하였다[1-4, 17, 18]. Fig. 3B의 결과에 따르면 IL-1α 처리는 염증성 사이토카인 TNF-α와 IL-6의 유전자발현을 상승시켰으나 항염증 물질로 알려진 CCM 전처리는 IL-1α의 TNF-α와

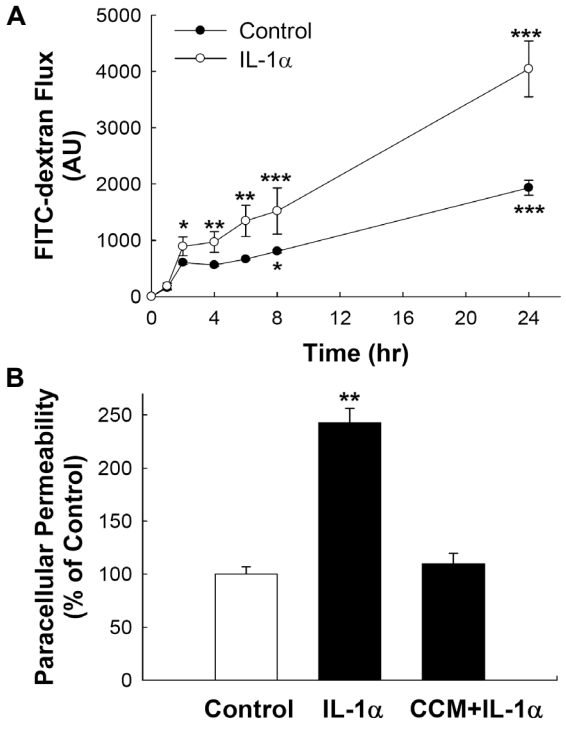

Fig. 2. Time-course effect of IL-1α on paracellular permeability of Caco-2 cells (A) and inhibitory effect of curcumin pretreatment on IL-1α-induced increase in paracellular permeability (B). (A) Apical IL-1α (100 ng/ml) treatment time-dependently increased FITC-dextran flux in Caco-2 cells. AU stands for arbitrary unit. Data represent means ± SD (n=3). *, p<0.05; **, p<0.001; ***, p<0.0001 vs. values at 0 hr. (B) Basolateral pretreatment with 20 μM curcumin (CCM) for 30 min blocked IL-1α-induced increase in paracellular permeability. Data represent means ± SD (n=3). **, p<0.001 vs. control.

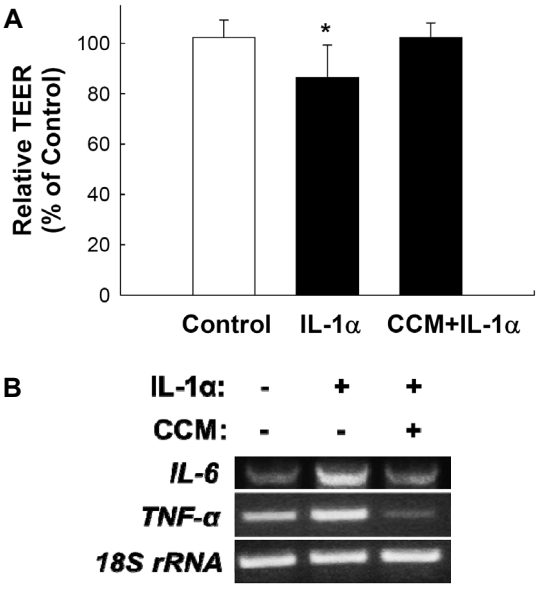

Fig. 3. Preventive effect of curcumin on IL-1α-induced drop in transepithelial resistance (TEER) of Caco-2 cells. Filter-grown Caco-2 monolayers were treated with IL-1α (100 ng/ml) for 24 hr after either vehicle or 20 μM curcumin (CCM) treatment for 30 min. (A) IL-1α (100 ng/ml) led decrease in TEER but CCM pretreatment prevented IL-1 α action. (B) Gene expression of inflammatory cytokines were upregulated by IL-1α (100 ng/ml) treatment but CCM pretreatment prevented it. Data represent means ± SD (n=3). *, p<0.05 vs. control.

IL-6 유전자 발현에 미치는 영향을 억제함을 확인하였다. IL-1α의 작용이 NF-κB 신호기전을 활성화를 통해 작용한다고 알려있으므로 CCM 전처리에 의한 IL-1α의 작용 억제는 기존에 알려진 바와 같이 NF-κB 신호기전 억제와 연관성이 있으리라 사료된다[4, 18].

본 연구는 염증성 사이토카인 IL-1α의 TJ에 대한 역할을 처음으로 밝히고 IL-1α에 의한 TJ integrity 감소가 CCM 전처리로 거의 완전히 예방될 수 있음을 밝혔다. 염증성 사이토카인의 TJ 손상이 TJ 구성단백질의 발현을 감소시킨다고 알려져 있으므로 IL-1α가 TJ 구성단백질의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 그리고 작용 기작이 무엇인지를 밝히는 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

References

1. Al-Sadi, R., Ye, D., Boivin, M., Guo, S., Hashimi, M., Ereifej, L. and Ma, T. Y. 2014. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLoS One* **9**, e85345.
2. Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K. and Ma, T. Y. 2008. Mechanism of IL-1β-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol.* **180**, 5653-5661.
3. Al-Sadi, R., Ye, D., Said, H. M. and Ma, T. Y. 2011. Cellular and molecular mechanism of interleukin-1β modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 970-982.
4. Al-Sadi, R. M. and Ma, T. Y. 2007. IL-1β causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol.* **178**, 4641-4649.
5. Berkes, J., Viswanathan, V. K., Savkovic, S. D. and Hecht, G. 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* **52**, 439-451.
6. Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C. A., Madara, J. L., Hopkins, A. M. and Nusrat, A. 2003. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J. Immunol.* **171**, 6164-6172.
7. Brun, P., Castagliuolo, I., Di Leo, V., Buda, A., Pinzani, M., Palu, G. and Martines, D. 2007. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, G518-525.
8. Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G. G. and Delzenne, N. M. 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* **58**, 1091-1103.
9. Cani, P. D., Rottier, O., Goiot, Y., Neyrinck, A., Geurts, L. and Delzenne, N. 2008. Changes in gut microbiota control intestinal permeability-induced inflammation in obese and diabetic mice through unexpected dependent mechanisms. *Diabetologia* **51**, S34-S35.
10. Edelblum, K. L. and Turner, J. R. 2009. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 715-720.
11. Geoffroy, F. J., Allegra, C. J., Sinha, B. and Grem, J. L. 1994. Enhanced cytotoxicity with interleukin-1 alpha and 5-fluorouracil in HCT116 colon cancer cells. *Oncol. Res.* **6**, 581-591.
12. Giorgio, V., Miele, L., Principessa, L., Ferretti, F., Villa, M. P., Negro, V., Grieco, A., Alisi, A. and Nobili, V. 2014. Intestinal permeability is increased in children with non-alcoholic fatty liver disease, and correlates with liver disease severity. *Dig. Liver Dis.* **46**, 556-560.
13. Gu, L., Li, N., Li, Q., Zhang, Q., Wang, C., Zhu, W. and Li, J. 2009. The effect of berberine *in vitro* on tight junctions in human Caco-2 intestinal epithelial cells. *Fitoterapia* **80**, 241-248.
14. Harhaj, N. S. and Antonetti, D. A. 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in *pathophysiology*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1206-1237.
15. Kim, C. Y., Bordenave, N., Ferruzzi, M. G., Safavy, A. and Kim, K. H. 2011. Modification of curcumin with polyethylene glycol enhances the delivery of curcumin in preadipocytes and its antiadipogenic property. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 1012-1019.
16. Kim, C. Y. and Kim, K. H. 2014. Curcumin prevents leptin-induced tight junction dysfunction in intestinal Caco-2 BBe cells. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 26-35.
17. Ma, T. Y., Boivin, M. A., Ye, D., Pedram, A. and Said, H. M. 2005. Mechanism of TNF-α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **288**, G422-430.
18. Ma, T. Y., Iwamoto, G. K., Hoa, N. T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M. A. and Said, H. M. 2004. TNF-α-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-κB activation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **286**, G367-376.
19. Marchiando, A. M., Shen, L., Graham, W. V., Edelblum, K. L., Duckworth, C. A., Guan, Y., Montrose, M. H., Turner, J. R. and Watson, A. J. 2011. The epithelial barrier is maintained by *in vivo* tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology* **140**, 1208-1218.
20. Menon, V. P. and Sudheer, A. R. 2007. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **595**, 105-125.
21. Neurath, M. F. 2014. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 329-342.
22. Shimizu, M. 2010. Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 232-241.
23. Suzuki, T. and Hara, H. 2011. Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 401-408.
24. Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M. and Roy, N. C. 2011. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary

components. *J. Nutr.* **141**, 769-776.
25. Wells, C. L., Jechorek, R. P., Kinneberg, K. M., Debol, S. M. and Erlandsen, S. L. 1999. The isoflavone genistein inhibits internalization of enteric bacteria by cultured Caco-2 and HT-29 enterocytes. *J. Nutr.* **129**, 634-640.
26. Zihni, C., Mills, C., Matter, K. and Balda, M. S. 2016. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* advance online publication.

초록 : Caco-2 세포에서 커큐민 처리에 의한 IL-1α로 유도된 소장 상피세포의 tight junction 투과성 저해

김춘영*
(영남대학교 식품영양학과)

본 연구에서는 염증성 사이토카인 IL-1α가 소장의 tight junction (TJ)의 integrity에 미치는 영향을 평가하고 항염증 효능이 있다고 알려진 curcumin (CCM)이 IL-1α에 의한 TJ 손상 예방효과를 알아보고자 Caco-2 세포 모델을 이용하여 실험하였다. Caco-2 세포 단층의 TJ integrity에 대한 IL-1α의 영향을 FITC-dextran flux와 transepithelial electrical resistance (TEER)를 측정하여 검증하였다. IL-1α를 100 ng/ml의 농도로 Caco-2 세포 단층의 상부에 24시간 동안 처리하였을 때 처리 2시간 이후 FITC-dextran의 flux가 유의적으로 증가하였고, IL-1α 처리시간에 비례하여 상승하였다. 또한 IL-1α의 처리는 TEER 값을 유의적으로 감소시켜 IL-1α에 의한 TJ 손상을 확인할 수 있었다. 반면 CCM의 전처리는 이러한 IL-1α에 의한 TJ 기능 저하를 거의 완전히 예방하는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로 염증성 사이토카인 IL-1α이 TJ의 integrity 조절에 부정적인 영향을 미치며 이는 강황에서 발견되는 CCM 전처리에 의해 효과적으로 억제될 수 있음을 보여준다. 본 연구 결과와 관련되어 TJ 구성단백질 발현 및 작용 기작에 대한 분자세포생물학적 연구와 *in vivo* 연구가 필요하다.