

Curcumin과 관련 성분들의 산화방지활성과 세포독성 분석 및 구조와 활성 연관성 조사

이보현^{1,†} · 김희정¹ · 홍정일^{1,*}

¹서울여자대학교 자연과학대학 식품응용시스템학부

Antioxidant and cytotoxic activities of curcumin and its analogs: An exploration of structure-activity relationships

Bo-Hyun Lee^{1,†}, Hee Jeong Kim¹, and Jungil Hong^{1,*}

¹Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University

Abstract Bioactivities of curcumin, a major pigment of *Curcuma longa* L., have been widely investigated. In this study, the antioxidant and cytotoxic properties of curcumin and its analogs including ferulic acid, dibenzoylmethane (DBM), and tetrahydrocurcumin (THC), and their structure-activity relationships were assessed. Ferulic acid, THC, and curcumin showed strong scavenging activities against several radicals and exhibited considerable lipid peroxidation inhibitory activity. Curcumin showed the strongest cytotoxic activities against HeLa, HCT-116, IEC-6 and INT 407 cells, whereas ferulic acid did not show any cytotoxic effect up to 100 μ M against these cell lines. Cytotoxicity of curcumin and THC was significantly enhanced by superoxide dismutase and diminished by *N*-acetylcysteine. The combination treatment of curcumin and ferulic acid enhanced the cytotoxicity, whereas the combination of curcumin and DBM offset their toxicity. These results suggest that methoxy phenolic and β -diketon moieties are crucial for the antioxidant- and cytotoxic activities of curcumin, respectively.

Keywords: curcumin, ferulic acid, dibenzoylmethane, tetrahydrocurcumin, antioxidant, cytotoxicity

서 론

Curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione]은 고대로부터 사용되어온 향신료인 강황에 함유된 주요 폴리페놀 화합물이며, 현재에도 천연 식용색소 및 건강기능성 성분으로 널리 이용되고 있다(Surh and Chun, 2007). Curcumin은 세포 및 동물 실험모델, 역학조사 및 임상연구에서 다양한 질환에 대한 제어 및 예방 효과를 나타낸다고 보고되었으며(Patel 등, 2020), 대표적인 예로 항암(Aggarwal 등, 2003; Tomeh 등, 2019), 항노화(Bielak-Zmijewska 등, 2019), 및 항치매 효과(Lim 등, 2001) 등이 잘 알려져 있다. 이러한 효과에 대한 curcumin의 기작으로 산화방지 활성(Masuda 등, 1999), AP-1 및 NF- κ B 등의 전사인자 억제(Pendurthi 등, 1997), 세포증식 신호 억제(Lin 등, 2007), 아라키돈 산 대사 조절(Hong 등, 2004)과 같은 다양한 보

고가 이루어진 바 있다. 한편 암세포를 비롯한 많은 세포대상 연구에서 curcumin이 세포주기 조절, 세포 증식 억제 및 세포 사멸을 유도한다고 보고했는데, curcumin에 의한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성이 중요한 조절 메커니즘 중 하나로 제안되었다(Su 등, 2006; Woo 등, 2003). Curcumin을 비롯한 다양한 폴리페놀성 화합물은 그 구조상 특징으로 인해 활성산소종을 비롯한 각종 라디칼을 상쇄시킬 수 있는 환원활성과 산화방지효과를 일반적으로 나타내고 있으나, 반응계에 따라 ROS 생성을 유발한다고 알려져 있다(Kunwar 등, 2011).

Curcumin은 두 분자의 ferulic acid가 대칭으로 결합한 diferuloylmethane구조를 가진다. Ferulic acid는 4-hydroxy-3-methoxyphenyl (methoxy phenolic) 구조의 페놀성 부위와 carboxyl기를 가지고 있으며, 그 사이에 α , β -unsaturated group이 존재한다. Curcumin은 ferulic acid 두 분자가 탄소분자를 사이에 두고 결합하면서 또한 β -diketone구조를 형성하게 되는데 이는 용액상에서 keto form과 enol form의 전환이 일어나면서 화학적인 불안정화를 초래한다(Kotha and Luthria, 2019; Nardo 등 2008). 최근 연구에서 curcumin의 구조상 각 부위가 담당하는 생물학적 활성에 대해 보고되었으나(Tomeh 등, 2019), 천연물질의 생리활성 탐색에서 기본적으로 다루어지는 산화방지활성과 세포독성에 있어서 curcumin 각 구조 부위의 의미와 역할에 대해 면밀하게 검토된 바는 없다.

또한 curcumin은 다양한 조건에서 활성산소종을 생산하는 산화촉진 활성을 나타내며, 산화방지 활성을 가진 물질들과 조합에 의해 curcumin이 활성을 상실했에 근거하여 다양한 ROS의존성

[†]Present address: Department of Pharmacology, Physiology and Neuroscience, Rutgers, New Jersey Medical School, Newark, NJ, 07103, USA

*Corresponding author: Jungil Hong, Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea

Tel: +82-2-970-5639

Fax: +82-2-970-5977

E-mail: hjil@swu.ac.kr

Received June 1, 2021; revised July 1, 2021;

accepted July 15, 2021

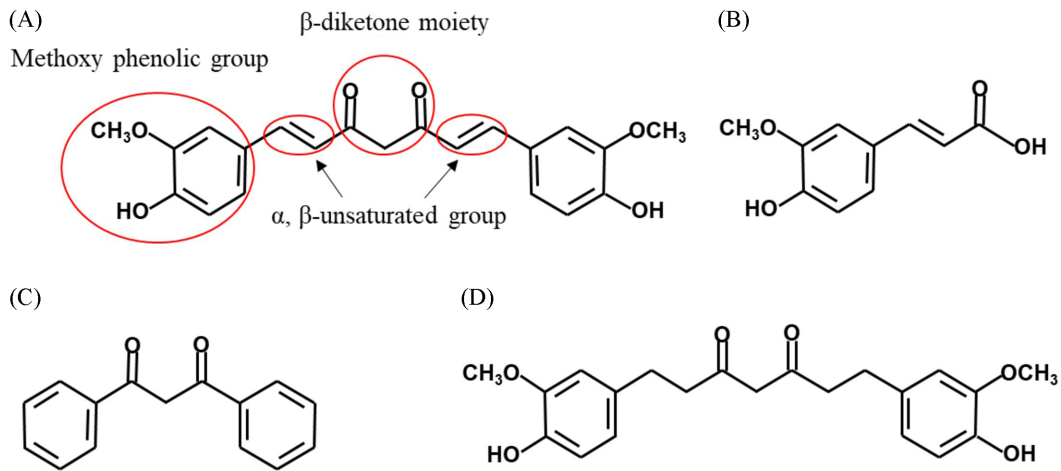


Fig. 1. Structures of curcumin (A), ferulic acid (B), DBM (C), and THC used in the present study

생리활성 기작이 보고되었다(Chen 등, 2001; McNally 등, 2007). 하지만 curcumin이 생성하는 활성산소종에 의한 간접적 활성화와 curcumin 자체 구조에서 발현되는 직접적인 활성 간에 상이한 연구결과들이 제시되었으며(Fang 등, 2005; Tomeh 등, 2019), 특히 서로 다른 형태의 산화방지제와의 조합에 의해 curcumin의 세포독성과 사멸유도 효과에서 서로 상반된 결과가 보고된 바 있다(Hong, 2007).

따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성이 보고되었으며 기능성 성분으로 가공식품에 광범위하게 적용되고 있는 curcumin과 관련 유사구조 물질로서 methoxy phenolic group의 구조를 가진 ferulic acid, β -diketone을 포함한 dibenzoylmethane (DBM), curcumin의 α , β -unsaturated carbonyl group이 환원에 의해 결합된 tetrahydrocurcumin (THC) 등을 사용하여 각종 라디칼 소거능을 비롯한 산화방지활성의 비교, 활성산소 생성 및 세포독성 등을 비교하였고, curcumin의 활성화에서 이 구조부위의 관여여부와 관련 역할을 규명하고자 하였다(Fig. 1). 한편 이들 성분들의 조합 처리에 의한 세포독성의 변화와 활성화 발현에서의 상호작용 관계도 유추하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 세포주

본 연구에 사용된 curcumin (a mixture of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin; 79.4, 16.8 and 3.8% (w/w), average molecular weight 361.05)은 Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA)에서, ferulic acid와 DBM은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. THC (~70%)는 Dr. MT Huang (Rutgers University, Piscataway, NJ, USA)로부터 기증받았다. Ammonium ferrous sulfate는 Showa Co. (Showa, Japan)에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Amresco Inc. (Solon, OH, USA)에서 구매하였다. 실험에 사용한 세포주 HeLa human cervical carcinoma (HeLa), HCT 116 human colon adenocarcinoma (HCT 116), IEC-6 normal immortalized rat intestinal epithelial 세포(IEC-6) 및 INT 407 human embryonic intestinal 세포(INT 407)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 분양 받았다. HeLa와 IEC-6는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), HCT 116는 RPMI 1640, INT 407는 Eagle's minimal essential

medium (MEM) 배지에 10% fetal bovine serum, 100 unit/mL penicillin과 0.1 mg/mL streptomycin을 첨가하여 배양하였다. INT 407 배양배지에는 추가로 1% MEM 비필수 아미노산 용액을 첨가하였다. 모든 세포는 95% 습도와 5% CO₂가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 기타 실험에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

산화방지 활성 측정

Curcumin과 관련 구조 물질의 DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois (1958)의 방법으로 측정하였다. 각 시료를 농도별로 메탄올에 희석한 후, 시료 80 μ L와 메탄올에 희석한 600 μ M DPPH 용액을 동량 첨가하여 30분간 암소에서 반응시킨 후 517 nm에서 측정하였다(Spectra Max M2, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA). ABTS 라디칼 소거 활성은 Lee (2009)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 10 mM ABTS와 10 mM potassium persulfate를 7.4:2.6의 비율로 섞어서 상온에서 24시간 저장하면서 ABTS 라디칼을 생성시키고 이를 증류수에 적정범위(흡광도 0.8-1.0)로 희석하였다. 각 시료 40 μ L에 ABTS 라디칼 용액 120 μ L를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 curcumin과 관련 구조 성분들을 320 μ M 농도로 phosphate-buffered saline (PBS)에 용해하고 25°C의 암소에서 24시간 저장한 후, 이를 각 활성 측정농도로 PBS에 희석하고 DPPH와 ABTS라디칼 소거활성을 측정하여 저장 전후의 활성을 비교하였다. 각 성분의 superoxide 라디칼 소거활성의 분석을 위해 10 mM carbonate buffer (pH 10.3)에 용해시킨 50 μ M luminol 용액 100 μ L와 50 μ L 시료용액을 혼합한 후, 200 μ M pyrogallol 용액 50 μ L를 가하여 luminol에 의한 발광의 변화를 측정하였다(Triad LT, Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA, USA) (Xie 등, 2008). Nitrite 소거활성은 100 μ M로 제조한 NaNO₂ 용액 100 μ L와 농도를 달리한 시료용액 50 μ L를 혼합하여 37°C 암소에서 1시간 저장하였다. 이후 5% H₃PO₄에 용해한 1% sulfanilamide 용액 50 μ L와 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 50 μ L를 순서대로 가하여 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Marocci, 1994).

지질산화 억제활성 측정

각 성분들의 지질산화에 대한 억제활성은 Fenton 반응으로 유도된 linoleic acid 산화반응계에서 분석하였다. 즉, 0.8% sodium

dodecyl sulfate (SDS)로 희석한 0.4% linoleic acid 기질용액 250 μ L와 농도를 달리하여 증류수에 희석한 시료용액 200 μ L를 혼합한 후, 2 mM ascorbic acid 25 μ L와 0.2 mM FeSO₄ 25 μ L를 가하여 37°C 암소에서 1시간 반응시켰다. 이 반응액에 1 M trichloroacetic acid 125 μ L와 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 125 μ L, 에탄올에 희석한 5% butylated hydroxytoluene 10 μ L를 가한 후, 95-100°C에서 5분간 발색시켜 생성된 TBA-reactive substance (TBARS)의 양을 532 nm에서 측정하였다. Ferrous ion에 대한 각 성분들의 chelating활성측정을 위하여, 80 μ M FeCl₂ 100 μ L에 농도를 달리하여 증류수에 희석한 각 시료 50 μ L를 가하고 상온의 암소에서 10분간 반응시켰다. 이 반응액에 1 mM ferrozine 50 μ L를 가하여 다시 암소에서 10분간 반응시킨 뒤, 562 nm에서 흡광도를 측정하였다(Spectra Max M2, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA).

세포독성 및 ROS 생성량 측정

각 세포를 96-well plate에 well당 1.5×10⁴로 분주하여 24시간 정도 배양한 후, serum이 포함되지 않은 각 해당 세포배지에 curcumin과 관련 구조물질들의 농도를 달리하여 24시간 처리하였다. 또한 세포독성에 영향을 주는 인자들 superoxide dismutase (SOD), catalase 또는 N-acetylcysteine (NAC)를 curcumin 및 관련 구조 성분과 혼합하여 동일한 방법으로 처리하였고 각 인자들에 대한 단독처리군을 대조군으로 하여 비교 분석하였다. 처리 세포에 대한 독성은 MTT 방법으로 평가하였다. 시료 처리배지를 제거한 세포에 0.5 mg/mL MTT를 용해한 배지로 교체하여 1-2시간 37°C에서 처리한 후, 이 MTT 용액은 제거하고 100 μ L dimethyl sulfoxide (DMSO)로 세포내 생성된 formazan 용해하여 550 nm에서 측정하였다(Triad LT, Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA, USA). 한편 curcumin과 관련구조 성분을 PBS에 용해한 후 25°C 암소에서 24시간 저장하고 생성된 ROS의 양을 ferrous oxidation-xylenol orange (FOX) assay로 분석하였다. 각 시료 40 μ L에 FOX working solution [400 μ M xylenol orange in distilled water (DW), 800 mM D-sorbitol in 200 mM H₂SO₄, 1 mM ammonium ferrous sulfate in DW (1:1:2, v/v/v)] 160 μ L를 가해 상온 암소에서 45분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하고 H₂O₂를 표준물질로 하여 정량하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 평균±표준편차로 나타냈고, 각 실험군별 유의차 분석은 Student's *t*-test 또는 One-way analysis of

variance (ANOVA)와 Tukey's honestly significant difference (HSD) test (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 실시하여 95와 99%의 유의수준에서 검정하였다. 각 시료의 라디칼 소거활성과 세포독성에 대한 IC₅₀값은 3농도 이상의 활성 결과로부터 직선부위에 대한 선형회귀식을 구하고 50% 소거나 세포사멸을 일으키는 농도를 계산하였다.

결과 및 고찰

Curcumin과 관련 구조화합물의 산화방지활성

본 연구에서는 우선 curcumin과 관련 물질들의 각종 라디칼에 대한 소거활성을 비교하여 각 구조별 역할과 중요성을 분석하였다(Table 1). DPPH와 ABTS 등의 라디칼 소거를 위해서는 활성 성분이 가지고 있는 환원력이 가장 중요한 기작으로 관여하며, 이는 전자의 공여를 통해 나타난다. 따라서 전자의 공여가 용이한 페놀성 고리구조를 가진 물질들이 일반적으로 환원력을 통한 소거활성을 나타내는데, DPPH 라디칼에 대해서 curcumin을 포함한 methoxy phenolic구조를 가진 3가지 물질이 유의적인 활성을 보였고 이 구조를 지니지 않은 DBM은 활성을 나타내지 않았다.

ABTS 라디칼 소거에 있어서는 ferulic acid가 curcumin보다 더 강한 활성을 나타냈다(Table 1). 이 결과는 반응계의 특징과 활성 성분의 물과의 친화성과 관련이 있는 것으로 판단되는데, 소수성 반응체인 DPPH 시스템에서는 비교적 비극성인 curcumin이 높은 활성을 나타낸 반면, carboxyl기로 인해 극성을 띄는 ferulic acid는 수용성 반응체인 ABTS 시스템에서 강한 활성을 나타낸 것으로 보인다. Curcumin과 유사한 소수성 성질을 가진 THC는 DPPH 라디칼 소거활성에서 curcumin보다 현저하게 낮은 활성을 보였고, 이는 curcumin이 지니고 있는 α , β -unsaturated group의 부재에 의한 것으로 판단된다. 실제 다양한 천연물질의 α , β -unsaturated carbonyl group이 그들의 산화방지 활성에 기여한다고 보고되었다(Arshad 등, 2017).

Curcumin과 THC는 superoxide anion에 대해 대단히 강한 소거활성을 보여 두 물질이 공통적으로 가지고 있는 diketone구조가 해당 활성과 관계가 있을 것으로 사료된다. 한편 nitrite 소거활성에는 다양한 기작이 관여할 수 있는데 nitrite의 산화/환원적 소거는 물론, 페놀구조 상에 nitration이나 nitrosation과 같은 직접적인 결합반응을 통한 소거도 가능하다(Lu 등, 2016). 이 소거반응에서 특히 curcumin이 상대적으로 약한 활성을 나타낸 이유에 대해서는 추후 면밀한 기전검토가 필요하다고 판단된다.

본 연구에서는 curcumin과 관련물질들의 산화방지활성과 세포

Table 1. The IC₅₀ values (μ M) of curcumin and its analogs for scavenging various radicals and nitrite

| | DPPH | | | ABTS | | | Superoxide | Nitrite |
|-----|-------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|--------|------------------------|-----------------------|
| | Fresh | PBS ¹⁾ | Fold ²⁾ | Fresh | PBS | Fold | | |
| FeA | 70.7±2.3 ^{b3)} | 176.1±19.9 ^b | 2.49** ⁴⁾ | 16.8±0.2 ^a | 20.9±0.7 ^a | 1.24** | 16.0±2.0 ^b | 22.9±1.2 ^a |
| DBM | NC ⁵⁾ | NC | - | 280.0±14.4 ^c | NC | - | NC | NC |
| THC | 68.7±1.2 ^b | 151.9±15.9 ^b | 2.21** | 26.1±0.6 ^a | 37.9±1.8 ^b | 1.45** | 7.69±1.42 ^a | 24.1±1.2 ^a |
| Cur | 39.8±0.3 ^a | 96.2±16.6 ^a | 2.42** | 29.0±0.5 ^b | 38.7±2.5 ^b | 1.33** | 6.05±0.33 ^a | 52.3±2.6 ^b |

¹⁾Analyzed after incubation in PBS for 24 h

²⁾Fold difference in IC₅₀ values between fresh and incubated compound

³⁾Different letters indicate a significant difference (*p*<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

⁴⁾Significantly different in IC₅₀ values between fresh and incubated compound according to Student's *t*-test (***p*<0.01)

⁵⁾Not calculated

Abbreviation: FeA, ferulic acid; DBM, dibenzoylmethane; THC, tetrahydrocurcumin; Cur, curcumin

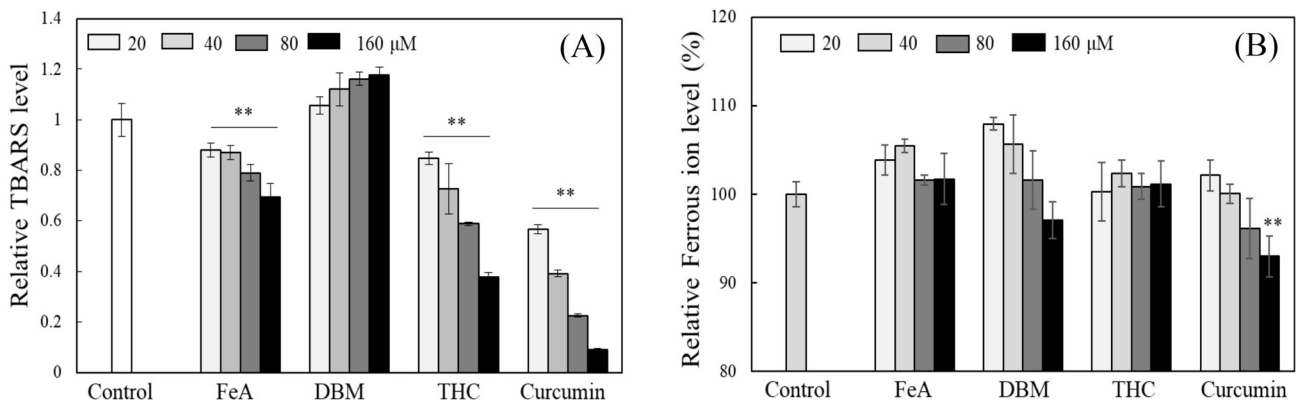


Fig. 2. Effects of curcumin and its analogs on lipid peroxidation and ferrous ion chelation. Linoleic acid oxidation was proceeded by the Fenton reaction for 1 h in the presence of different concentrations of curcumin derivatives, and formation of TBARS was analyzed (A). Their effects on ferrous ion chelation were also analyzed (B). Each value represents the mean±SD (n=4). *, ** significantly different from control according to Student's *t*-test (* p <0.05, ** p <0.01).

배양계에서의 활성을 연결시키고자 생리적 조건인 PBS상에 각 성분들을 24시간 저장한 후 DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성의 변화를 분석하였다. 모든 성분들은 PBS에서 저장 후 라디칼 소거활성이 현저하게 감소하였는데 특히 DPPH 라디칼 소거활성이 ABTS 라디칼 소거활성 보다 더 크게 감소하였다(Table 1). 이 결과를 통해 curcumin과 관련 물질들이 생리적 pH 조건에서 화학적으로 불안정하며 페놀성 고리구조 등을 포함하여 그 구조로부터 기인하는 산화방지활성 등 다양한 활성이 감소되는 것을 알 수 있다.

보다 전체적인 산화방지활성을 파악하기 위해 Fenton 반응으로 촉발되는 linoleic acid 지질산화 과정에 대해 curcumin과 관련 구조 물질들의 저해활성을 평가하였다. 그 결과 curcumin이 가장 높은 활성을 보여 20 μM에서도 50%이상의 지질산화를 억제하였으며, 이어 THC은 80 μM에서 50% 정도의 활성을 나타냈다(Fig. 2A). Ferulic acid는 20 μM에서도 유의적으로 지질산화물 감소를 유도하였으나 curcumin에 비해 대단히 약한 활성을 보였고, DBM은 본 지질 산화반응에 대한 억제활성을 나타내지 않았다. Fenton 반응은 ferrous ion의 지속적인 재생에 의해 산화반응이 유도되는데 따라서 ferrous ion에 대한 chelating 활성도 본 지질산화 억제에 관여한다. 따라서 curcumin과 관련 물질의 ferrous ion에 대한 chelating 효과를 ferrozine을 probe로 사용하여 분석하였다. 그 결과 160 μM curcumin에서만 유의적인 chelating 활성이 관찰되었으며, 그 활성도 10% 이하로서 전체적인 지질산화 억제활성에 대한 기여도는 대단히 미미한 것으로 판단된다(Fig. 2B).

이상의 결과는 각 화합물의 methoxy phenolic 구조에 의한 산화방지활성이 지질산화억제에서도 역시 중요한 역할을 담당한다는 것을 의미한다. 그러나 2분자 ferulic acid에 해당하는 curcumin의 페놀기 밀도를 감안하더라도, 두배 농도의 ferulic acid보다 curcumin이 훨씬 더 강한 활성을 나타내는 것으로 보아(IC₅₀ ~200 vs. ~25 μM), methoxy phenolic 구조 외에도 curcumin의 전체적인 구조와 소수성이 본 활성에 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다.

Curcumin과 관련 구조화합물의 세포독성

Curcumin과 관련 구조화합물을 HeLa 인간 자궁경부암 세포, HCT 116 인간 대장암 세포, IEC-6 rat 장관계 세포와 INT 407 인간 장관계 유래 세포 등 총 4종의 세포에 대해 24시간 처리하여 세포독성을 평가하였다(Table 2). Ferulic acid는 500 μM까지

모든 세포에서 50% 저해에 훨씬 미치지 못하는 미약한 세포독성을 나타냈고, curcumin은 4종 세포에서 모두 유의적으로 가장 높은 활성을 나타냈다(p <0.05). DBM과 THC은 HCT 116에서 유사한 활성을 나타냈고, IEC-6와 INT 407 정상장관계 세포주에 대해서는 THC이 DBM보다 비교적 낮은 독성을 나타냈다. 본 결과에서 산화방지활성을 나타내지 못한 DBM이 강한 세포독성을 보여, methoxy phenolic기 보다는 β-diketone 구조가 세포독성을 유발하는 중요한 구조로 판단된다.

Curcumin에 의해 생성되는 ROS가 세포사멸을 유발한다는 기존 보고에 근거하여(Su 등, 2006; Woo 등, 2003), curcumin과 관련 구조화합물들을 생리적 pH에서 24시간 저장하고 생성된 ROS량을 H₂O₂를 표준물질로 하여 정량하였다. 그 결과 curcumin으로부터 가장 많은 양의 ROS가 생성되었으나 80 μM에서 2 μM이하의 ROS가 검출되었고, ferulic acid보다 훨씬 강한 세포독성을 나타낸 DBM과 THC도 ferulic acid보다도 적은 극히 미량의 ROS를 생성하였다(Table 2). 본 결과는 각 화합물로부터 생성된 ROS가 직접적인 세포독성의 원인이 아니라는 것을 의미한다. 하지만 DBM과 THC에 비해 α, β-unsaturated carbonyl기를 가진 curcumin과 ferulic acid가 상대적으로 높은 ROS생성 능력을 보여 이 구조가 중요한 역할을 하는 것으로 판단되며 α, β-unsaturated carbonyl기가 산화적 스트레스를 유발한다는 기존 보고와도 일치한다(Niki 2009). 선행 보고에 의하면 특정 α, β-unsaturated carbonyl 화합물들의 라디칼 소거능 등 산화방지활성이 암세포에 대한 세포독성과 높은 상관관계가 있다고 보고되었으나(El-Husseiny 등, 2018), curcumin 관련 구조 화합물들에서는 이들의 산화방지활성과 세포독성 간의 연관성은 미미한 것으로 보인다.

세포독성 조절인자와 유사구조 물질과의 조합에 의한 영향

Superoxide와 H₂O₂를 각각 소거하는 효소인 SOD (5 U/mL)와 catalase (30 U/mL) 존재 하에 HeLa 세포에 24시간 curcumin을 처리하여 세포독성을 측정할 결과 유의적으로 세포독성이 증가하였으나, 산화방지제 NAC 4 mM과 함께 처리하였을 때는 오히려 curcumin의 독성이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 이 결과는 curcumin의 세포독성이 curcumin으로부터 생성되는 ROS에 의한 것이 아니라 curcumin 구조자체의 특성으로부터 기인함을 시사한다. 또한 배양매지에 4시간 미리 저장하면서 50% 이상 색도감소(Abs. 405 nm)를 유도하여 불안정화 시킨 curcumin

Table 2. The IC₅₀ values (μM) on cell viability and ROS generation level of curcumin and its analogs

| | HeLa | HCT 116 | IEC 6 | INT 407 | ROS generation ¹⁾ |
|-----|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|
| FeA | >500 ^{d2)} | >500 ^c | >500 ^c | >500 ^d | 0.33±0.02 ^b |
| DBM | 62.7±5.9 ^{cB2)} | 66.3±7.5 ^{bb} | 38.6±1.7 ^{aA} | 42.6±3.1 ^{ba} | 0.09±0.01 ^c |
| THC | 48.6±17.7 ^{ba} | 67.2±4.9 ^{ba} | 117.5±21.3 ^{bb} | 56.3±2.3 ^{cA} | 0.03±0.11 ^c |
| Cur | 24.3±4.6 ^{ab} | 16.8±1.3 ^{aA} | 25.2±2.3 ^{ab} | 28.8±1.4 ^{ab} | 1.74±0.04 ^a |

¹⁾ROS levels (H₂O₂ μM) generated from 80 μM of each compound

²⁾Different lower and uppercase letters indicate a significantly different value ($p < 0.05$) among different compounds and different cell lines, respectively, based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test.

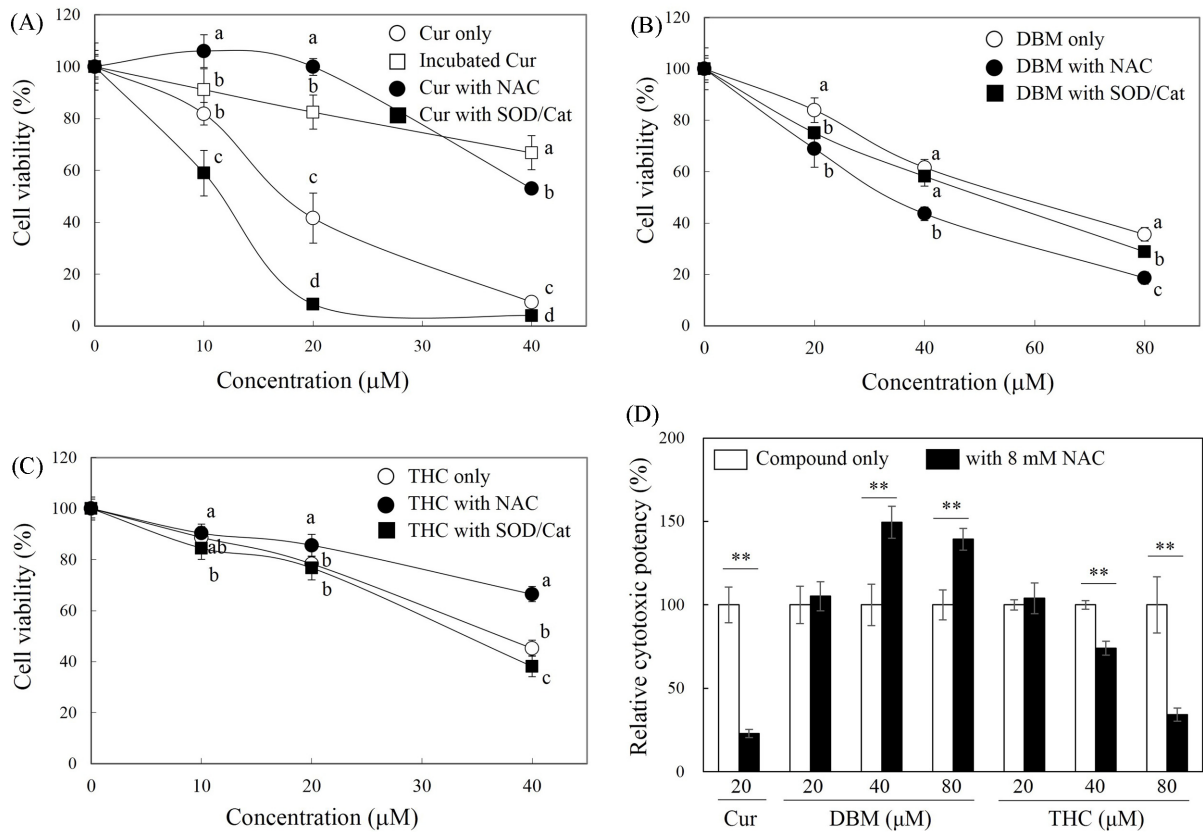


Fig. 3. Changes in cytotoxic activity of curcumin, THC, and DBM by antioxidant enzymes or NAC. HeLa cells were incubated with curcumin or 4 h-preincubated curcumin (A), DBM (B), and THC (C) in the presence or absence of 15 U/mL SOD and 30 U/mL catalase or 4 mM NAC for 24 h. Modulation of cytotoxicity of the compounds by 8 mM NAC was also analyzed (D). Each value represents the mean±SD (n=7-8). Different letters indicate a significant different effect ($p < 0.05$) at same concentration based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test. *, ** significantly different from its corresponding control according to Student's *t*-test (** $p < 0.01$).

을 세포에 처리하였을 때도 역시 세포독성이 현저하게 감소하는 결과를 얻었다(Fig. 3A). 이상의 결과는 SOD와 catalase와 같은 산화방지효소들이 세포 배양계에서 curcumin의 구조를 안정화시키며 독성을 증가시키는 반면, mM 농도 이상의 NAC는 curcumin의 세포독성을 약화시킨다는 기존 결과와 일치한다(Hong, 2007).

이에 근거하여 SOD/catalase와 NAC에 의한 curcumin 유사구조 물질인 DBM과 THC의 독성조절 효과를 평가하였다. DBM 역시 SOD/catalase에 의해 일부 세포독성 증가현상이 관찰되었고, curcumin의 경우와는 달리 4 mM NAC 존재 하에 오히려 강화된 독성이 발생되었다(Fig. 3B). THC의 경우는 curcumin과 유사한 양상을 나타내어 SOD/catalase에 의해 세포독성이 다소 증가하였으며, NAC에 의해서는 현저한 독성감소 현상을 나타냈다(Fig. 3C).

NAC에 의한 세포독성 조절 현상을 확인하기 위해 NAC의 농도를 8 mM로 높여서 세포독성을 평가한 결과, curcumin의 세포독성은 25% 이하로 약화되었으며 THC의 경우에도 농도가 증가함에 따라 NAC에 의한 세포독성의 감소가 더욱 뚜렷하게 나타났다(Fig. 3D). 하지만 DBM은 40 μM 이상의 농도에서 NAC 존재 하에 유의적인 세포 독성의 강화현상이 관찰되었다. 따라서 ROS 생성이나 산화방지 활성에 의해서가 아니라, SOD/catalase에 의한 구조의 안정화와 이로 인한 세포내 타깃과의 반응성이 더욱 증가됨에 따라 이 3종 관련 화합물들의 세포독성이 강화되는 것으로 판단된다. 특히 diketone구조가 세포독성 발현에 중요한 역할을 하는데, 이 diketone구조는 thiol성 물질들과 높은 반응성을 나타낸다고 보고되었다(Fang 등, 2005). 따라서 NAC의 thiol기가

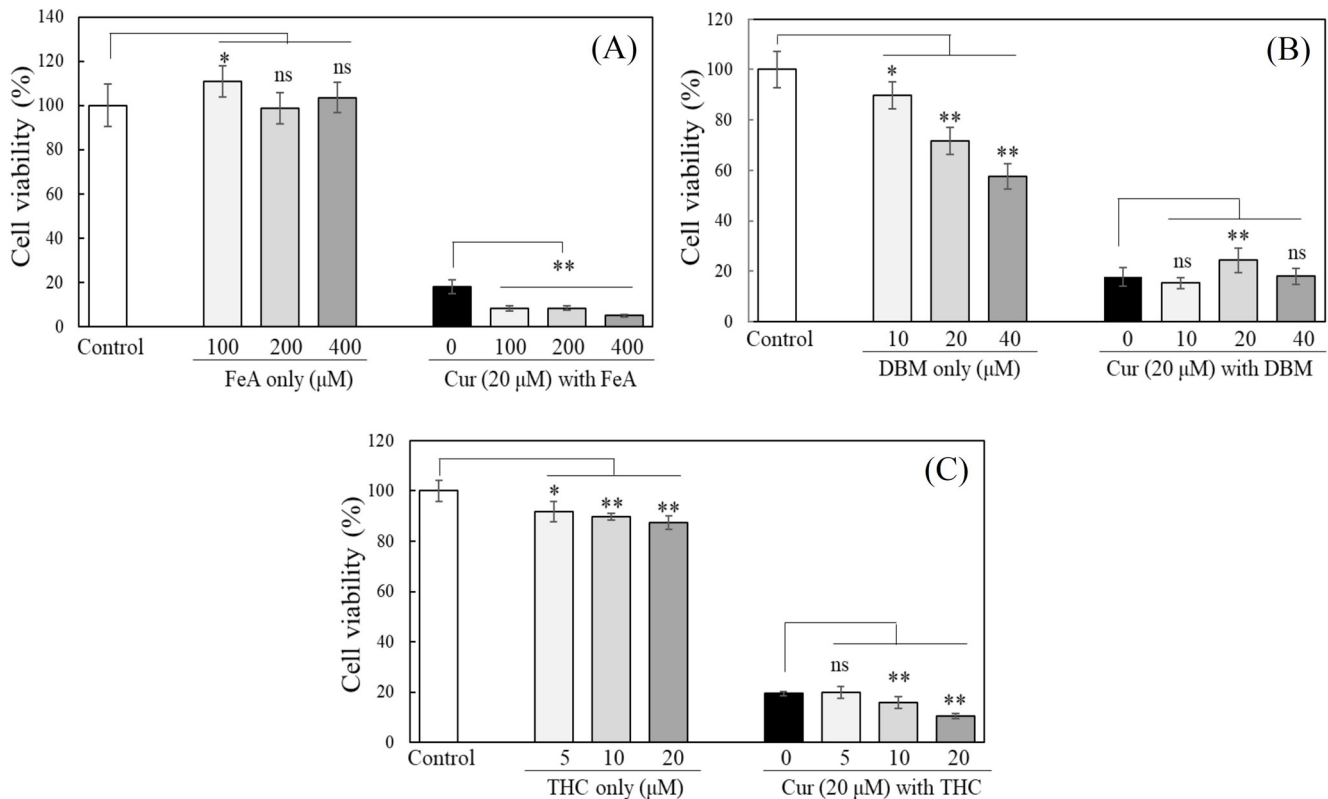


Fig. 4. Modulatory effects on cytotoxicity by combination of curcumin with its structurally related compounds. HeLa cells were incubated with curcumin in the presence or absence of ferulic acid (A), DBM (B), or THC (C). After 24 h, cell viability was analyzed using MTT assay. Each value represents the mean±SD (n=8). *, ** significantly different from its corresponding control according to Student's *t*-test (* p <0.05, ** p <0.01)

curcumin과 THC의 diketone구조와 반응하여 세포독성을 약화시키며, 이 반응은 α , β -unsaturated group의 유무와 관계없이 일어나는 것으로 보인다. 하지만 DBM은 NAC 존재 시 오히려 독성이 증가되는 상반된 결과를 보였다. 선행연구에서 mM 이하의 저농도 NAC는 오히려 curcumin의 화학적 안정화를 유도하여 세포독성을 현저하게 증가시키는 biphasic 현상이 보고되었는데(Hong, 2007), DBM의 diketone기는 NAC와의 반응성에 있어서 curcumin과 THC과는 달리 구조의 파괴 또는 안정화에 요구되는 농도가 달라지는 것으로 보이며 이를 위한 추가 관련연구가 필요할 것으로 보인다.

또한 curcumin과 유사구조물질의 조합에 의한 HeLa 세포의 독성변화를 관찰하였다. Ferulic acid는 500 μ M에서도 현저한 독성을 나타내지 않았으며, 100 μ M에서는 오히려 일부 세포성장을 촉진하는 결과를 보였다(Fig. 4A). Ferulic acid와 curcumin을 조합 처리하여 세포독성을 분석한 결과, curcumin의 독성이 유의적으로 증가하는 현상을 보였고, 세포 성장을 촉진한 100 μ M ferulic acid와의 조합에서도 세포독성이 일관되게 증가하였다(Fig. 4A). 이 결과는 ferulic acid가 가지는 산화방지활성으로 말미암아 curcumin구조의 안정화가 유도되며, 이로 인한 세포독성의 강화가 발생하는 것으로 보인다. 하지만 curcumin과 산화방지활성을 나타내지 않는 DBM의 조합에서는 DBM이 현저하게 세포독성을 유발하는 농도에서도 조합처리에 의한 독성증가는 관찰되지 않았으며 오히려 독성이 완화되는 현상도 나타났다(Fig. 4B). 이처럼 DBM에 의해 curcumin의 독성이 상쇄되는 원인으로서 diketone기와 반응하는 세포내 유사한 타깃을 두고 두 성분 간의 경쟁 가

능성을 예상할 수 있다. THC과 curcumin의 조합 시 두 성분활성의 부가적 효과에 의해 독성이 증가하는 현상이 나타났는데(Fig. 4C), THC에 의한 curcumin의 안정화 효과뿐만 아니라 이들에 의한 세포 독성발현에 있어서 상이한 세포내 타깃이 있는 것으로 판단되며 이에 대해 보고된 바 있다(Aggarwal 등, 2014).

본 연구는 curcumin과 구조적으로 관련된 물질들을 사용하여 이들의 산화방지활성 및 세포독성 발현에서 특정 구조와 역할을 구명하고자 하였다. 본 결과는 이미 알려진 바 폐놀성 구조에 의한 주로 산화방지활성이 발현되며, 특히 세포독성 발현에 diketone구조가 중요하나 각 화합물이 가지는 α , β -unsaturated group, 페놀 고리구조와 연결상태 등의 구조적 차이에 의해 세포내 타깃과 활성 발현정도가 크게 달라진다는 것을 시사한다.

요 약

본 연구에서는 curcumin과 관련 구조물질인 ferulic acid, DBM, THC를 사용하여 이들의 산화방지활성과 세포독성을 나타내는 활성과 구조 간의 연관성을 분석하였다. 각종 라디칼 소거활성과 지질산화 억제 반응에서 DBM은 거의 활성을 나타내지 못해, methoxy phenolic기가 중요한 기능 구조로 나타났으며 α , β -unsaturated carbonyl기도 이들의 산화방지 활성에 일부 관여하는 것으로 보인다. Curcumin 유도체들의 세포독성과 이들의 산화방지활성 간에는 연관성이 거의 없었으며, ROS의 생성에는 α , β -unsaturated carbonyl기가 중요한 역할을 담당하나 세포독성의 직접적인 원인이 아닌 것으로 판단된다. 세포독성 유발에는 β -diketone

구조가 중요한 역할을 하였으며, SOD/catalase 등에 의한 구조의 안정화가 세포독성을 더욱 강화시키는 것으로 판단된다. Curcumin과 ferulic acid의 조합처리에 의해 독성이 증가한 반면, DBM과 curcumin을 같이 처리 시 독성이 상쇄되었으며 THC과 curcumin은 서로 부가적인 세포독성을 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원의 한국연구재단 중견연구자 지원사업(NRF-2019R1A2C1089617)과 2021년 서울여자대학교 교내학술 연구비(연구년) 지원에 의해 수행되었음(2021-0151).

문헌

Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 23: 363-398 (2003)

Aggarwal BB, Deb L, Prasad S. Curcumin differs from tetrahydrocurcumin for molecular targets, signaling pathways and cellular responses. *Molecules* 20: 185-205 (2014)

Arshad L, Jantan I, Bukhari SN, Haque MA. Immunosuppressive Effects of natural α,β -unsaturated carbonyl-based compounds, and their analogs and derivatives, on immune cells: A review. *Front. Pharmacol.* 8:22 (2017)

Bielak-Zmijewska A, Grabowska W, Ciolko A, Bojko A, Mosieniak G, Bijoch L, Sikora E. The role of curcumin in the modulation of ageing. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 1239 (2019)

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)

Chen YC, Tsai SH, Shen SC, Lin JK, Lee WR. Alternative activation of extracellular signal-regulated protein kinases in curcumin and arsenite-induced HSP70 gene expression in human colorectal carcinoma cells. *Eur. J. Cell Biol.* 80: 213-221 (2001)

El-Husseiny WM, El-Sayed MA, Abdel-Aziz NI, El-Azab AS, Ahmed ER, Abdel-Aziz AA. Synthesis, antitumor and antioxidant activities of novel α,β -unsaturated ketones and related heterocyclic analogues: EGFR inhibition and molecular modelling study. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* 33: 507-518 (2018)

Fang J, Lu J, Holmgren A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J. Biol. Chem.* 280: 25284-25290 (2005)

Hong J, Bose M, Ju J, Ryu JH, Chen X, Sang S, Lee MJ, Yang CS. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related β -diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A₂, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis* 25: 1671-1679 (2004)

Hong J. Curcumin-induced growth inhibitory effects on HeLa cells altered by antioxidant modulators. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 1029-1034 (2007)

Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules* 24: 2930 (2019)

Kunwar A, Barik A, Sandur SK, Indira Priyadarsini K. Differential antioxidant/pro-oxidant activity of dimethoxycurcumin, a synthetic analogue of curcumin. *Free Radical Res.* 45: 959-965 (2011)

Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* 21: 8370-8377 (2001)

Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, Merritt WM, Han LY, Armaiz-Pena GN, Kamat AA, Spannuth WA, Gershenson DM, Lutgendorf SK, Aggarwal BB, Sood AK. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kB pathway. *Clin. Cancer Res.* 13: 3423-3430 (2007)

Lu Y, Dong Y, Li X, He Q. The nitrite-scavenging properties of catechol, resorcinol, and hydroquinone: a comparative study on their nitration and nitrosation reactions. *J. Food Sci.* 11:C2692-C2696 (2016)

Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract Egb 761. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* 201: 748-755 (1994)

Masuda T, Hidaka K, Shinohara A, Maekawa T, Takeda Y, Yamaguchi H. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. *J. Agr. Food Chem.* 47: 71-77 (1999)

McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Garden OJ, Wigmore SJ. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int. J. Mol. Med.* 19: 165-172 (2007)

Nardo L, Paderno R, Andreoni A, Måsson M, Haukvik T, Tønnesen HH. Role of H-bond formation in the photoreactivity of curcumin. *J. Spectrosc.* 22: 187-198 (2008)

Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Bio. Med.* 47: 469-84 (2009)

Patel SS, Acharya A, Ray RS, Agrawal R, Raghuvanshi R, Jain P. Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease. *Crit. Rev. Food Sci.* 60: 887-939 (2020)

Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV. Inhibition of tissue factor gene activation in cultured endothelial cells by curcumin. Suppression of activation of transcription factors Egr-1, AP-1, and NF-kB. *Arterioscl. Throm. Vas.* 17: 3406-3413 (1997)

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999)

Surh YJ, Chun KS. Cancer chemopreventive effects of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 595: 149-172 (2007)

Su CC, Lin JG, Li TM, Chung JG, Yang JS, Ip SW, Lin WC, Chen GW. Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca²⁺ and the activation of caspase-3. *Anticancer Res.* 26: 4379-4389 (2006)

Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao X. A Review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 1033 (2019)

Woo JH, Kim YH, Choi YJ, Kim DG, Lee KS, Bae JH, Min DS, Chang JS, Jeong YJ, Lee YH, Park JW, Kwon TK. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis* 24: 1199-1208 (2003)

Xie Z, Huang J, Xu X, Jin Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chem.* 111; 370-376 (2008)