

## NF- $\kappa$ B의 활성화 억제기전을 통한 Curcumin의 U266 다발성골수종 세포주의 성장 억제효과

서울대학교 의과대학 <sup>1</sup>암연구소, <sup>2</sup>내과학교실, <sup>3</sup>서울대학교병원 임상의학연구소,  
<sup>4</sup>한양대학교병원 혈액종양학과, <sup>5</sup>오투기 중앙연구소

박주원<sup>1</sup> · 안광성<sup>1</sup> · 배은경<sup>1</sup> · 김진호<sup>5</sup> · 정승현<sup>5</sup> · 김병수<sup>1,2</sup>  
김대영<sup>2</sup> · 김병국<sup>1,2,3</sup> · 이영열<sup>4</sup> · 윤성수<sup>1,2,3</sup>

### Abrogation of U266 Multiple Myeloma Cell Proliferation Via Inhibition of NF- $\kappa$ B Activation by Curcumin

Juwon Park, M.S.<sup>1</sup>, Kwang-Sung Ahn, Ph.D.<sup>1</sup>, Eun-Kyung Bae, M.S.<sup>1</sup>, Jin-Ho Kim, M.S.<sup>5</sup>,  
Seung-Hyeon Jung, Ph.D.<sup>5</sup>, Byung-Su Kim, M.D.<sup>1,2</sup>, Dae-Young Kim, M.D.<sup>2</sup>,  
Byoung Kook Kim, M.D., Ph.D.<sup>1,2,3</sup>, Young-Yiul Lee, M.D., Ph.D.<sup>4</sup> and Sung-Soo Yoon, M.D., Ph.D.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, <sup>2</sup>Department of Internal Medicine,  
Seoul National University College of Medicine, <sup>3</sup>Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital,  
<sup>4</sup>Section of Hematology/Oncology, Hanyang University Hospital, Seoul, <sup>5</sup>Ottogi Research Center, Anyang, Korea

**Background:** Curcumin is a naturally occurring biologically active compound, and it has been shown to possess potent anti-inflammatory, anti-tumor and anti-oxidative properties. It is known for its anti-proliferative and proapoptotic effects in several cancer cells. Curcumin's effects on the mechanisms of cell survival and the expression of various cytokines were investigated in U266 cells and the *in vivo* effects of curcumin were examined using an animal model.

**Methods:** Cell proliferation assay and flow cytometry were used to examine cell proliferation, along with cell cycle analysis. The protein expressions were analyzed by Western blotting and the expressed levels of cytokines were analyzed by the ELISA method.

**Results:** Curcumin inhibited U266 cell growth in a dose-dependent and time-dependent manner. Cell cycle analysis showed an increased sub-G1 phase, a down regulated cyclinD1 expression and an induced p21 expression. Apoptosis induced a down regulated procaspase 3 expression and it induced cleaved PARP. Curcumin inhibited the IL (interleukin)-6 induced cell signal pathway via decreasing the STAT1 and 3, Erk cyclinD1 and c-myc expressions. Also, administration of 25mg/kg curcumin to a U266 animal model inhibited cancer cell engraftment in the bone marrow and it decreased the IL-6, sIL-6R and IL-8 expression levels.

**Conclusion:** Curcumin induced cell cycle arrest and apoptosis and it inhibited the IL-6 mediated signal transduction pathways in U266 cells. Similar to the *in vitro* results, curcumin inhibited cancer cell proliferation and the expression of cytokine *in vivo*. (*Korean J Hematol* 2008;43:19-27.)

**Key Words:** Curcumin, 6-aminoquinazoline, Multiple myeloma, Animal model, IL-6, sIL-6R

접수 : 2007년 10월 17일, 수정 : 2008년 12월 31일

승인 : 2008년 1월 5일

교신저자 : 윤성수, 서울시 종로구 연건동 28번지

☎ 110-744, 서울대학교 의과대학 내과학교실

Tel: 02-2072-3079, Fax: 02-762-9662

E-mail: ssysmc@snu.ac.kr

본 연구는 서울대학교병원 임상지정진료 신진연구비(03-2005-013-0), (03-2006-003-0)의 지원을 받았음.

Correspondence to : Sung-Soo Yoon, M.D., Ph.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine

28, Yeongeong-dong, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea

Tel: +82-2-2072-3079, Fax: +82-2-762-9662

E-mail: ssysmc@snu.ac.kr

## 서 론

다발성골수종은 골수에 악성 형질세포의 비정상적인 증식으로 인해 발생되며,<sup>1)</sup> 단일 클론성 면역 글로블린의 생산,<sup>2)</sup> 뼈병변,<sup>3)</sup> 고칼슘혈증,<sup>4)</sup> 빈혈<sup>5)</sup> 등을 특징으로 하는 질환이다. 세포고사 및 대사의 비정상적인 조절(dysregulation)은 다발성골수종의 병인과 화학요법내성(chemoresistance)의 요인으로 간주<sup>6)</sup>되고 있으며, 이러한 암세포의 증식에 다양한 성장인자와 사이토카인들이 관여된다고 보고되고 있다.<sup>7)</sup> 다발성골수종에서 다양한 성장인자(IL-1,<sup>8)</sup> IL-3,<sup>9)</sup> IL-6,<sup>10)</sup> TNF- $\alpha$ ,<sup>11)</sup> IGF<sup>12)</sup> 등)는 병인에 중요한 역할을 하며 세포의 생물학적 특성에 영향을 준다. 성장인자 중, IL-6의 비정상적인 활성화는 세포증식에 관련된 단백질의 발현을 지속적으로 활성화시키며, 또한 세포고사의 억제제를 유도하는 단백질의 발현을 활성화시켜 암세포의 비정상적인 증식을 촉진한다.<sup>10)</sup> 최근 자연식물에 포함된 폐놀계 물질들의 항암작용이 근래에 주목을 받게 되었고 이 물질은 항산화작용과 비스테로이드 항염제처럼 항염증작용을 한다고 보고되었다.<sup>13)</sup> 이 폐놀계 물질 중의 하나인 curcumin (diferuloylmethane)은 동인도산의 생강과에 속하는 식물인 curcuma longa (Zingiberaceae)의 뿌리에서 추출되어 인도지역의 음식에 널리 사용되는 노란색 향신료 turmeric의 주성분이다.<sup>14)</sup> Curcumin은 항염증, 항암, 항산화 효과 등 다양한 약리적 효과를 가지고 있으며,<sup>15)</sup> 다양한 고형암(대장암,<sup>16)</sup> 방광암,<sup>17)</sup> 간암<sup>18)</sup>과 혈액암(골수성백혈병,<sup>19)</sup> 림프성백혈병<sup>20)</sup> 세포의 증식을 억제하고, 세포고사를 유도하며, 암의 전이를 억제해 준다고 보고되고 있다. 하지만 curcumin이 다발성골수종의 진행과 암세포의 성장에 관여하는 인자들에 의해 활성화되는 신호전달에 미치는 영향은 자세히 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구는 다발성 골수종 세포주인 U266에서 curcumin에 의한 IL-6에 의해 유도되는 세포증식의 억제기전과 다양한 성장인자의 발현에 미치는 영향을 알아보고, 동물 모델을 이용, 생체 내에서 curcumin의 효과를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

다발성골수종 세포주 U266은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입

하였다. 세포는 15% 우태아 혈청과 100 units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin가 첨가된 RPMI1640 (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배양액을 사용, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 항온 배양기에서 배양하였고, 배양액은 3 내지 4일 간격으로 교체하며, 계대 배양하여 사용하였다.

### 2. 재료

PD98059, LY294002, SB203580, SP600125와 6-amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino) quinazoline (Calbiochem Corp., San Diego, CA, USA)는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하였으며, curcumin (Sigma, St Louis, MO, USA)은 DMSO에 25mM의 stock으로 만들어 위의 화합물들은 -20°C에 보관하였으며, 배지에 희석하여 사용하였다. 재조합 IL-6와 sIL-6R 사이토카인은 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여, 0.1% bovine serum albumin (BSA)가 첨가된 phosphate-buffered saline (PBS, PH 7.4)에 수화하여 -20°C에 보관하였다.

### 3. Cell proliferation assay

Curcumin의 농도 증가에 따른 세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해, 100  $\mu$ L의 배양액에 부유된 U266 세포주( $5 \times 10^3$ /well)를 96 well plats에 분주하고, 배양액에 희석된 각기 다른 농도의 curcumin 100  $\mu$ L을 제시된 시간으로 처리하여 배양하였다. 그런 후, 10  $\mu$ L CCK-8 용액(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 처리하여 4시간 반응시킨 후, 450nm 파장에서 microplate reader (Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, France)을 이용하여 흡광도를 측정하였다. 평균과 표준편차는 3번의 독립적인 실험에 의해 나타났다.

### 4. 유세포 측정

Curcumin을 처리한 U266 세포주를 1×phosphate-buffered saline (PBS, PH 7.4)으로 수세하고, 차가운 70% 에탄올로 고정시켰다. 다시 1×PBS로 수차례 수세 후 propidium iodine 10  $\mu$ g/mL (PI; 0.5%, Tween-20; 0.1%, RNase 100  $\mu$ g/mL)로 상온에서 30분간 염색하였다. 세포주기 분석은 Becton Dickinson fluorescence-activated cell analyzer와 cell Quest software (version 1.2)를 이용하여 분석하였다.

## 5. Western blotting

시료를 처리한 세포를 lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1% NP-40, Na-deoxycholate 0.25%, 1mM EDTA, 1mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM PMSF, aprotinin, leupeptine, pepstatin 1  $\mu$ g/mL)로 total whole cell lysate를 얻고, 정량 후 30  $\mu$ g 단백질을 10~12% gel을 이용해 SDS-PAGE를 시행 후, 분리된 단백질은 Immobilon™-P PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 300mA로 3시간 동안 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% non-fat dry milk으로 1시간 실온에서 반응하여 blocking하였다. Blocking 후 각각의 일차 항체를 처리하여 4°C에서 18~24시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TTBS로 10분 간격으로 3회 세척한 후 계속하여 1% non-fat dry milk를 넣은 TTBS에 Horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차 항체와 1시간 반응시키고 다시 한 번 TTBS로 10분 간격으로 3회 세척하였다. 세척이 끝나면 ECL solution (Amersham, USA)으로 1분간 반응 후, Kodak film에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 그 정도를 확인하였다.

## 6. ELISA 분석

IL-6, sIL-6R, IL-8과 VEGF의 Enzyme-linked immunosorbent kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 ELISA를 분석하였다. 100  $\mu$ L의 시료를 microplate의 well에 넣은 후, 실온에서 명시된 시간 동안 반응시킨 후, washing buffer로 4회 세척 후, 200  $\mu$ L conjugate를 각 well에 넣고 2시간 반응시킨 후, washing buffer로 4회 세척하였다. 그 후, 200  $\mu$ L의 substrate 용액을 넣고 20분 동안 빛이 차단되게 반응시킨 후, 50  $\mu$ L stop 용액을 넣은 후, 450nm 파장에서 microplate reader (Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, France)을 이용하여 흡광도를 측정하였다.

## 7. NOD/SCID 마우스를 이용한 다발성골수종 모델 확립

### 1) 마우스 꼬리 정맥에 U266 세포의 주사

생후 6~7주된 NOD/SCID 마우스 15마리를 <sup>137</sup>Cs-irradiator을 이용하여 300rad의 방사선에 노출시킨 후, 300  $\mu$ L의 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)에 부유된  $5 \times 10^5$  U266 세포주를 꼬리 정맥에 주입하였다.

### 2) 다발성골수종의 발생 여부 관찰

마우스에 U266 세포주를 주입하고, 6~7주 후 마우스

의 행동이상, 심한 쇠약증상이 나타나면 전신 micro 단층촬영을 시행하여, 세포주가 주입되지 않은 NOD/SCID 마우스와 비교, 분석하였다. 또한 희생시켜 마우스의 정강이 뼈를 적출하고, 골수를 슬라이드에 도말한 후, Wright-Giesma 염색으로 암세포의 존재 여부를 확인하였다.

### 3) U266 마우스 모델에 curcumin 투여

U266 마우스 모델에서 curcumin의 효과를 알아보기 위해 마우스에 U266 세포주를 주입하고 1주 후, 25mg/kg의 curcumin을 주 2회 복강 내로 투여하였다(T: 10 마리). 대조군은 동일 양의 DMSO를 투여하였다(C: 5 마리). 마우스의 몸무게의 변화를 확인하며 생존율과 행동이상을 관찰하였으며, 전신 micro 단층촬영을 시행하여 curcumin을 투여하지 않은 U266 마우스 모델과 비교, 분석하였다. Curcumin 투여 6주 후 희생시켜, 정강이 뼈를 적출하고 골수를 슬라이드에 도말하여 Wright-Giesma's 염색 후, curcumin을 투여하지 않은 마우스와의 골수에 침윤된 암세포 수의 차이를 확인하였고, 말초혈액에서 혈청을 분리하여 ELISA 분석을 시행하였다.

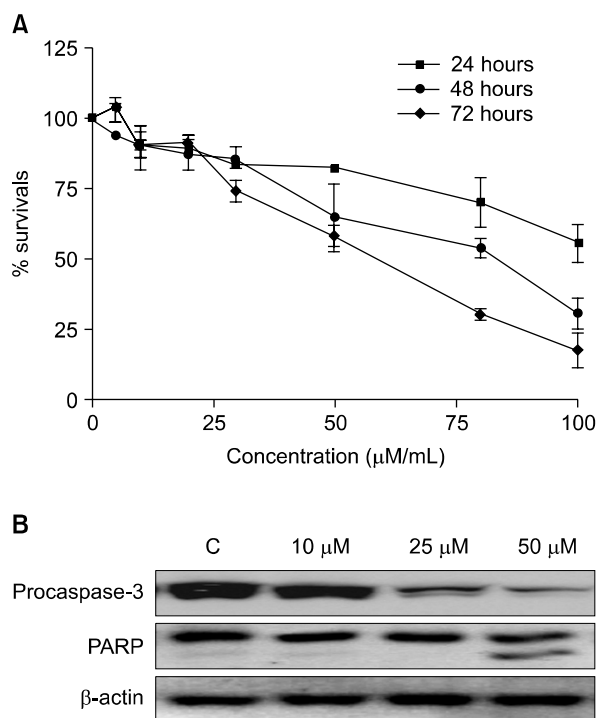
## 8. 통계처리

본 연구의 모든 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하였다. 통계 프로그램을 이용하여, 모든 실험은 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였으며, 분석은 paired t-test을 이용,  $P < 0.05$ 에서 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 1. Curcumin이 다발성골수종 세포 증식에 미치는 영향과 세포사멸 현상 규명

U266 세포주에 curcumin을 0~100  $\mu$ M까지 농도별로 처리하였을 때, curcumin의 농도가 증가함에 따라 세포의 증식이 억제되었으며, 25  $\mu$ M 이상으로 처리하였을 때, curcumin의 노출시간을 24, 48, 96시간으로 달리 하였을 때 세포의 증식이 억제되는 것이 관찰되었다(Fig. 1A). Curcumin에 의한 세포사멸 유도방식을 알아보기 위하여 세포사멸 단백질인 procaspase-3와 cleaved PARP (polyadenosine ribose polymerase)를 Western blot으로 검사해 본 결과, 25  $\mu$ M 농도부터 procaspase-3가 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 50  $\mu$ M에서 cleaved PARP의 분리가 일어나는 것이 관찰되었다(Fig. 1B). 위의 결과로 보아 U266의 세포증식은 curcumin의 시간-농도에 비례하여 억제됨을 알 수

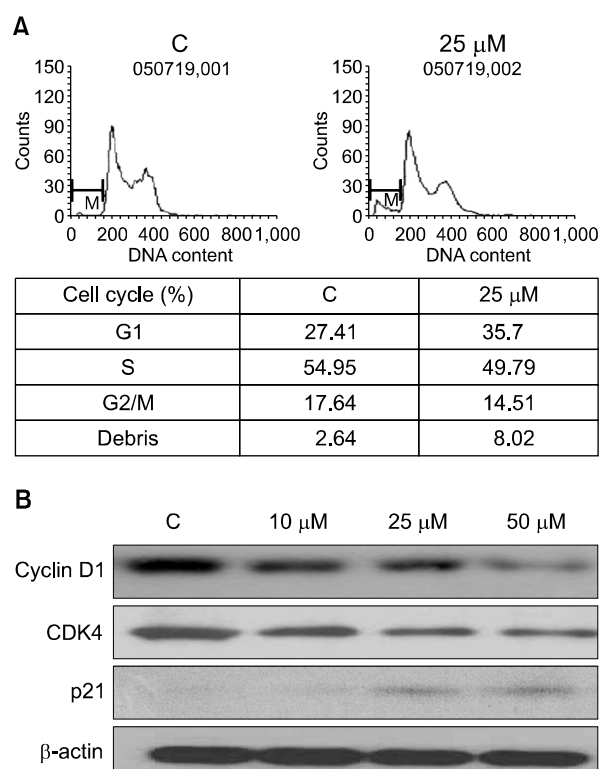


**Fig. 1.** The growth of U266 cells was inhibited and activated apoptotic related protein by curcumin treatment. Curcumin treated with at various concentrations and times and curcumin (50~75 μM) reduced cell viability by 40~60% for 72 hrs (A). U266 cell treated with indicated concentration of curcumin for 24 hrs. Apoptosis induced by exposure of 25 and 50 μM concentration of curcumin (B).

있었다. 또한 농도 의존적으로 세포사멸이 증가하며, Caspase-3와 cleaved PARP 발현의 활성화는 미토콘드리아 의존적인 경로를 통해 세포사멸을 일으키는 것을 시사한다.

## 2. Curcumin에 의한 세포주기 변화 분석

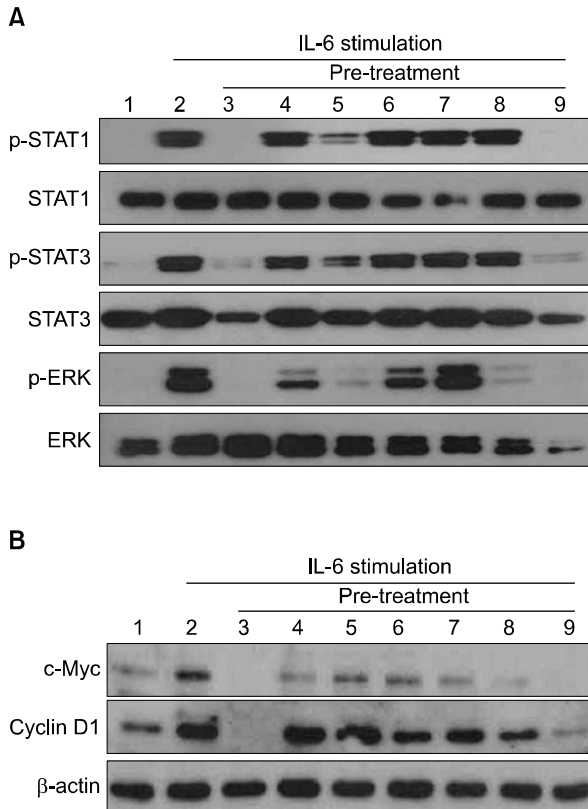
U266 세포주에 curcumin을 25 μM로 처리하고 24시간 후 유세포 측정법을 이용, 세포주기를 관찰하였다. 대조군과 비교하였을 때, curcumin 처리군에서 G1기가 1.5배 증가된 것이 관찰되었다(Fig. 2A). 이어서, curcumin (10, 25, 50 μM)를 24시간 처리한 후 세포주기 관련 단백질의 변화를 확인한 결과, 10 μM curcumin 처리에서부터 cyclin D1의 감소를 확인할 수 있었지만, cdk4의 발현에는 영향을 주지 않았다. 또한 25 μM에서부터 p21의 발현이 증가되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2B). 위의 결과로 보아 curcumin은 cyclin D1을 통하여 G1의 정지를 유도함으로써 세포증식에 영향을 주는 것을 시사한다.



**Fig. 2.** Sub-G1 was induced by curcumin treatment via inactivation of cyclin D1 in U266 cells. Sub-G1 phase increased after treating U266 cells with curcumin 25 μM for 24 hrs (A). U266 cell treated with indicated concentration of curcumin for 24 hrs. Curcumin treatment decreased expression of cyclinD1 and CDK4. Its treatment increased expression of p21 (B).

## 3. U266 세포주에서 curcumin을 포함한 다양한 신호전달 억제제가 IL-6에 의해 유도되는 신호전달 경로에 미치는 영향 분석

Curcumin이 어떠한 세포 신호 경로를 억제하는지 알아보기 위해, 다발성골수종에서 중요한 역할을 하는 성장인자 중 IL-6의 신호전달을 촉진시킨 후, curcumin을 포함한 다양한 신호전달 억제제의 효과를 알아보았다. Curcumin은 6-amino-4-quinazoline (NF-κB activator inhibitor)와 거의 유사한 양상을 보였으며, IL-6에 의해 유도되는 Erk와 STAT1, 3의 인산화를 완전히 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 또한 종양 형성에 관련된다고 알려진 전사인자인 cyclin D1과 c-myc은 NF-κB의 조절을 받는 유전자이며 curcumin 처리 시 위의 유전자의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이러한 결과는 curcumin이 다른 신호전달 억제제보다 효과적으로 IL-6에 의한 세포신호전달을 억제하며, NF-κB에 의해 중재되는 유전자의



**Fig. 3.** Effect of curcumin including various signal transduction inhibitors on IL-6 mediated cell signal in U266 cells. U266 cells were incubated with serum free culture media (RPMI-1640) for 24 hours. U266 cell pretreated with various signal transduction inhibitors including curcumin for 1hr and then stimulated with 5ng human recombinant IL-6 for 15 min. 30  $\mu$ g of whole-cell extracts were analyzed by Western blot for phosphorylated STAT1, STAT3, total STAT1, STAT3, phosphorylated Erk, and total Erk (A). Cyclin D1, c-myc and  $\beta$ -actin (B). Lane: 1. control; 2. 5ng/mL IL-6; 3. 25  $\mu$ M curcumin, 5ng/mL IL-6; 4. 20  $\mu$ M LY294002, 5ng/mL IL-6; 5. 10  $\mu$ M PD98059, 5ng/mL IL-6; 6. 20  $\mu$ M SP600125, 5ng/mL IL-6; 7. 20  $\mu$ M AG490, 5ng/mL IL-6; 8. 10  $\mu$ M SB203580, 5ng/mL IL-6; 9. 2  $\mu$ M 6-amino-4-quinazoline, 5ng/mL IL-6.

발현을 억제하는 것은 curcumin이 NF- $\kappa$ B 활성을 조절할 수 있다는 점을 시사한다.

#### 4. Curcumin이 IL-6와 sIL-6R의 발현에 미치는 영향

전술한 연구 결과에서 curcumin은 6-amino-4-quinazoline와 유사한 경향으로 IL-6 신호경로 관련 유전자의 발현을 억제하는 효과를 보였다. 따라서 curcumin이 다발성골수종의 병인에 밀접한 관련이 있는 성장인자의 발현에는 어떠한 효과를 주는지 알아보았다. Curcumin을 농도별로 처리하였을 때, IL-6 (Fig. 4A)

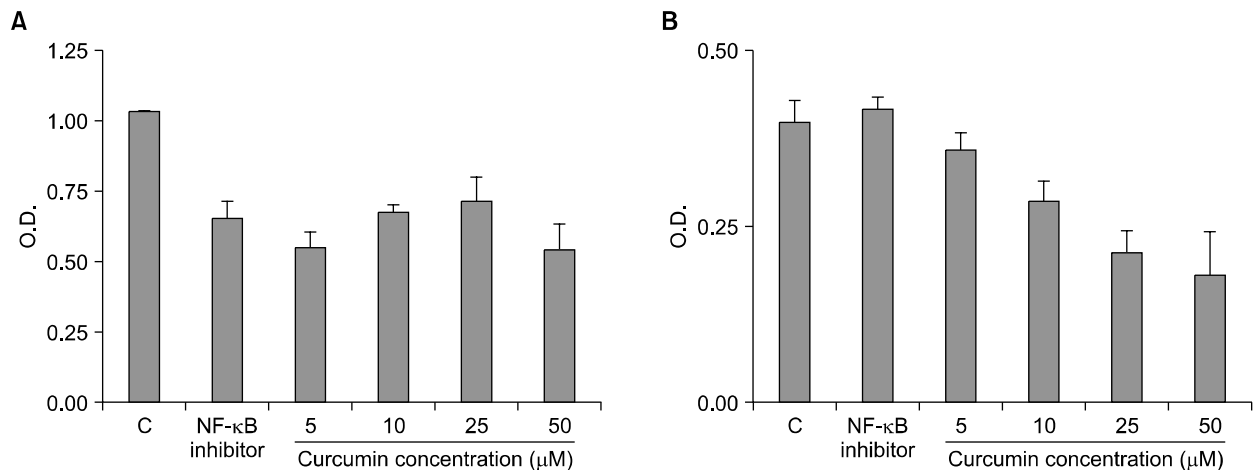
와 sIL-6R (Fig. 4B)의 발현이 감소하는 것을 알 수 있었으며, 특히 sIL-6R는 6-amino-4-quinazoline의 처리시는 감소하지 않았지만, curcumin을 처리 시 농도의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다.

#### 5. NOD/SCID을 이용한 다발성골수종 모델에서의 curcumin 효과

Curcumin에 의하여 암세포의 성장이 억제됨을 시험관 내 실험에서 관찰하였으며, curcumin의 생체 내 효과 여부를 알아보기 위해 NOD/SCID 마우스를 이용하여 이미 확립된 다발성골수종 모델을 U266 세포주를 이용하여 모델을 확립한 후, 주 2회 복강에 curcumin 25mg/kg을 6주간 투여한 결과, curcumin을 투여하지 않은 개체보다 투여한 개체에서 암세포의 침윤이 감소됨을 Wright-Giesma 염색으로 확인할 수 있었다. Curcumin을 투여하지 않는 마우스에서는 curcumin을 투여한 마우스와 비교하였을 때, 외형적인 관찰에 의하면 몸무게의 감소와 부스럼 발생, 척추가 굽어지는 현상이 관찰되었다(결과 제시하지 않음). 또한 미세 단층촬영을 통해 골밀도가 매우 낮아져 있고, 골 내부가 비어있는 것이 확인되었다(Fig. 5). 이는 다발성골수종의 병리생태학적인 현상인 뼈변을 나타내는 것을 시사하였다. 또한 말초혈액에서 추출한 혈청에서 다발성골수종에 수반되는 성장인자인 IL-6 (Fig. 6A)와 sIL-6R (Fig. 6B)의 발현이 감소되는 것을 알 수 있었고, IL-8의 발현(Fig. 6C)이 감소하는 것을 알 수 있었다.

#### 고 찰

Curcumin은 세포주기의 조절과 주요 신호전달 경로의 억제, 세포사멸 유도 관련 단백질의 발현을 활성화시키는 기전으로 다발성골수종 세포주인 U266 세포의 성장을 억제하였다. U266에서 농도에 비례하여 procaspase 3의 감소와 cleaved-PARP가 관찰됨은 미토콘드리아 의존적인 세포사멸을 유도함을 추측할 수 있었다. 또한 curcumin에 의한 세포성장 억제는 세포주기 중 cyclin D1의 발현만을 억제함으로써 G1의 정지를 유도함을 시사해 주었다. 하지만 세포주기의 조절이 극적이지 않은 것으로 보아 세포성장 억제효과에서 세포주기는 부가적인 기전임을 유추하게 되었으며, 이러한 이유로 다양한 신호전달 억제제와 함께 curcumin이 세포 신호 전달에 미치는 영향을 분석하여 보았다. 본 실험의 결과에 따르면 curcumin은 다발성골수종의 주요 신호 전달 경로 중 하나인 IL-6 신호 전달 경로를



**Fig. 4.** Secretion of IL-6 and sIL-6R were inhibited by curcumin treatment. U266 cell treated with indicated concentration of curcumin for 24 hrs after culture in serum free media for 24 hrs. The secretion of IL-6 (A) and sIL-6R (B) was decreased at treated with curcumin.



**Fig. 5.** Effect of curcumin in U266 animal model using NOD/SCID mouse. After U266 ( $5 \times 10^5$ ) cells were given via NOD/SCID mouse lateral tail vein, 25mg/kg was injected via intraperitoneum. 6 weeks later, development of bone lesions was examined using whole body micro CT imaging of NOD/SCID mouse. (A) Control, (B) Curcumin-injected SCID mouse.

억제하였다.

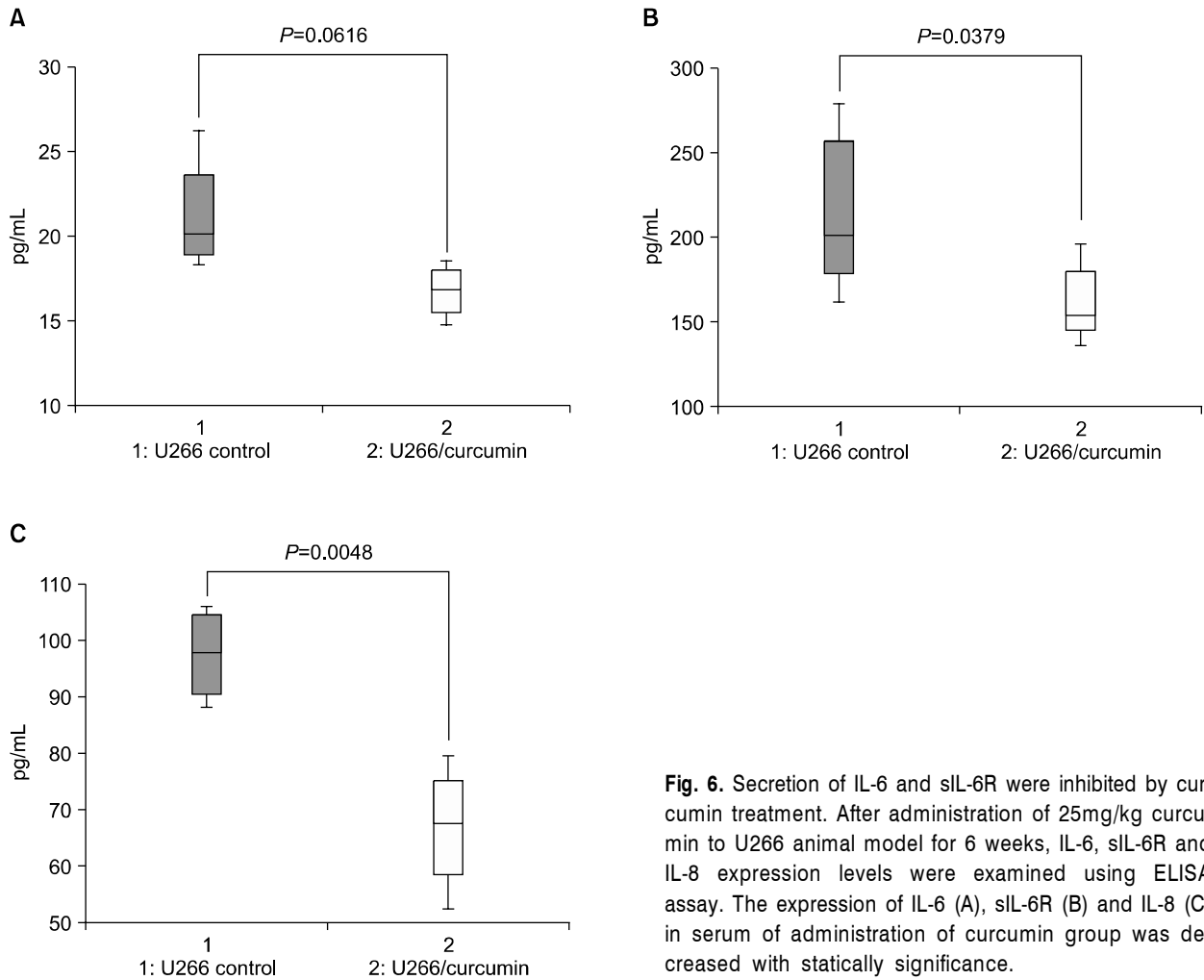
다발성골수종에서 IL-6의 비정상적인 활성화는 STAT3의 지속적인 활성화를 유도하며, 또한 세포고사의 억제를 유도하는 단백질(Bcl-xL, Mcl-1 등)의 발현을 활성화시켜 암세포의 비정상적인 증식을 촉진한다.<sup>21)</sup> Curcumin은 활성화된 STAT3의 감소와 세포증식에 관여하는 단백질 중 MAPK인 Erk의 인산화를 완전히 억제하여 세포성장과 증식을 억제하였다. 또한 NF- $\kappa$ B와 STAT3의 조절을 받는 cyclin D1과 c-myc의 감소를 확인할 수 있었으며 이러한 신호 전달 경로 억제 효과는 신호전달 타겟 억제제 중 6-amino-4-quinazoline과 매우 유사한 효과를 나타냈다.

6-amino-4-quinazoline은 NF- $\kappa$ B의 전사활성을 억제하며, TNF- $\kappa$ 의 생산을 억제하는 제제로 보고되고 있

다.<sup>22)</sup> 따라서 6-amino-4-quinazoline과 같이 curcumin도 NF- $\kappa$ B 활성을 억제하는 효과를 가지는 것으로 여겨진다.

다발성골수종 치료제인 Bortezomib (PS-341, Velcade<sup>TM</sup>)는 proteasome 억제제로, NF- $\kappa$ B의 활성을 조절하는 I $\kappa$ B의 인산화를 억제하는 기전<sup>23)</sup>을 가지고 있으며 임상결과에서도 효과가 있음이 보고되고 있다.<sup>24)</sup> 이러한 이유로 볼 때 curcumin에 의한 NF- $\kappa$ B 활성의 억제는 다발성골수종 세포성장을 억제하는 기전을 조절한다고 말할 수 있다.

U266은 autocrine과 paracrine으로 분비되는 IL-6에 의존적인 경향을 보이며(결과 제시하지 않음), NF- $\kappa$ B의 활성을 촉진시키는 성장인자(IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ )를 처리 시 IL-6의 발현이 증가함을 볼 수 있었다. 또한 IL-6에



**Fig. 6.** Secretion of IL-6 and sIL-6R were inhibited by curcumin treatment. After administration of 25mg/kg curcumin to U266 animal model for 6 weeks, IL-6, sIL-6R and IL-8 expression levels were examined using ELISA assay. The expression of IL-6 (A), sIL-6R (B) and IL-8 (C) in serum of administration of curcumin group was decreased with statically significance.

의해 IL-6의 발현이 더 유도됨을 관찰하였다(결과 제시하지 않음). 이는 IL-6는 NF- $\kappa$ B를 활성화하며, 활성화된 NF- $\kappa$ B에 의해 IL-6의 발현이 증가될 수 있음을 나타낸다. 이는 다발성골수종 환자에서 증가되어 있는 IL-6의 발현은 암세포의 성장환경에 도움이 되도록 성장인자의 발현이 활성화되고 있음을 나타낸다. 또한 sIL-6R도 다발성골수종의 병의 진행과 생존율에 밀접한 관계가 있음이 보고되어 있으며 다발성골수종 환자의 골수 혈청에서 정상인과 비교 시 매우 높게 증가되어 있음이 보고되어 있다.<sup>25)</sup> 따라서 curcumin이 다발성골수종 병인에 관련된 인자 중 IL-6와 sIL-6R의 발현양상에 미치는 변화를 알아보기 위해, U266 세포주에 curcumin을 처리 시 IL-6의 발현이 감소함을 관찰하였다. 이는 curcumin에 의해 NF- $\kappa$ B의 활성이 억제됨을 의미하며 또한 IL-6에 의해 유도되는 세포신호 전달의 억제 효과가 6-amino-4-quinazoline와 유사함을

제시해 주는 결과이다. 또한 6-amino-4-quinazoline는 sIL-6R의 발현을 억제하지 못하였지만, curcumin을 처리하였을 때에는 농도 의존적으로 sIL-6R의 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 IL-6뿐만 아니라 sIL-6R의 발현을 감소시키는 curcumin이 6-amino-4-quinazoline보다 더욱 효과적인 치료제임을 시사한다.

본 실험결과로 시험관 내에서 curcumin이 다발성골수종 세포에서 매우 효과적인 억제제임을 증명하였고, 이러한 결과를 바탕으로 curcumin의 생체 내 효과를 알아보기 위해 U266 세포주를 이용하여 동물모델을 확립하였고, 다발성골수종의 병리생태학적인 특징을 모델에서 확인할 수 있었다. Curcumin을 투여한 개체에서는 투여하지 않은 개체와 비교하였을 때 골수에 암세포의 침윤이 더 적었고 골밀도의 증가를 확인할 수 있었다. 또한 혈청에서 IL-6, sIL-6R와 IL-8의 발현

이 curcumin을 투여한 개체에서 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 curcumin이 생체 내에서도 암세포의 성장 억제와 성장인자의 발현 감소를 유도함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면, 폐놀계 화합물 중 curcumin은 IL-6 신호전달 체계를 억제하며, IL-6 및 sIL-6R의 발현을 감소시켜 다발성골수종 세포주의 성장을 억제하였다. 뿐만 아니라, cyclin D1을 통한 세포주기 정지와 미토콘드리아에 의한 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있었다. 이러한 시험관 내 결과와 상응하게 생체 내에서도 curcumin을 투여한 개체에서 암세포의 침윤이 억제되는 것이 관찰되었으며, 혈청에 존재하는 IL-6, sIL-6R와 IL-8의 발현이 감소하였다.

## 요 약

**배경:** 자연계에 존재하는 폐놀계 화합물인 curcumin은 항염증, 항암, 항산화 효과가 있으며, 다양한 암세포의 증식억제와 세포고사 효과가 보고되어 있다. 따라서 저자들은 다발성골수종에서 curcumin에 의한 세포증식의 억제기전과 다양한 성장인자의 발현에 미치는 영향을 알아보고, 동물모델을 이용, 생체 내에서 curcumin의 효과를 알아보려고 하였다.

**방법:** 세포증식에 미치는 효과를 알기 위해 cell proliferation assay를 사용하였고, 세포주기 평가는 유세포 측정법을 사용하였다. 기전 규명을 위해 다양한 단백질 발현 분석은 western blotting을 사용하였고 성장인자의 발현량을 측정하기 위해 ELISA로 분석하였다.

**결과:** U266 세포주는 curcumin에 의해 농도-시간 의존적인 세포증식의 억제효과를 보였다. Curcumin은 subG1의 증가에 의한 G1 정지를 유도하였으며, cyclin D1의 감소와 p21의 활성을 유도하였다. Pro-caspase 3의 감소와 PARP의 분리로 세포사멸이 유도되었다. IL-6의 신호 전달 체계인 STAT1, 3, Erk, cyclin D1과 c-myc의 발현의 감소가 관찰되었다. 또한 U266 세포주로 확립된 동물모델에서 curcumin을 투여 시, 골수에 암세포 침윤의 감소와 골밀도가 증가되었으며, 혈청 안에 IL-6, sIL-6R와 IL-8의 발현이 감소하였다.

**결론:** Curcumin은 다발성골수종 세포주인 U266에서 세포분열 정지와 세포사멸을 유도하였으며, 주요 기전 중 하나인 IL-6의 신호전달을 억제하였다. 또한 생체 내에서도 시험관 내 결과와 상응하게 암세포의 성장 억제와 성장인자의 발현 감소를 보였다.

## 참 고 문 헌

- 1) Hess U. The plasma cell myeloma--molecular pathogenesis and target therapies. *Ther Umsch* 2006;63:233-6.
- 2) Oyeyinka GO, Ofefi V, Maddy SQ, et al. Homogeneous immunoglobulins in Ghanaians living in Accra, Ghana. *Afr J Med Med Sci* 2004;33:311-6.
- 3) Umeda M, Adachi Y, Tomiyama J, et al. Bone lesions in elderly multiple myeloma. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2002;39:631-8.
- 4) Shionoiri A, Horiuchi T, Onouchi T, et al. Hypercalcemia induced with the plasma levels of parathyroid hormone-related peptide in multiple myeloma. *Intern Med* 2000;39:810-3.
- 5) Tucci M, Grinello D, Cafforio P, Silvestris F, Dammacco F. Anemia in multiple myeloma: role of deregulated plasma cell apoptosis. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1527-33.
- 6) Bharti AC, Shishodia S, Reuben JM, et al. Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood* 2004;103:3175-84.
- 7) Anderson KC, Lust JA. Role of cytokines in multiple myeloma. *Semin Hematol* 1999;36(1 Suppl 3):14-20.
- 8) Costes V, Portier M, Lu ZY, Rossi JF, Bataille R, Klein B. Interleukin-1 in multiple myeloma: producer cells and their role in the control of IL-6 production. *Br J Haematol* 1998;103:1152-60.
- 9) Lee JW, Chung HY, Ehrlich LA, et al. IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells. *Blood* 2004;103:2308-15.
- 10) Treon SP, Anderson KC. Interleukin-6 in multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Curr Opin Hematol* 1998;5:42-8.
- 11) Jourdan M, Tarte K, Legouffe E, Brochier J, Rossi JF, Klein B. Tumor necrosis factor is a survival and proliferation factor for human myeloma cells. *Eur Cytokine Netw* 1999;10:65-70.
- 12) Qiang YW, Kopantzev E, Rudikoff S. Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood* 2002;99:4138-46.
- 13) Nishino H, Tokuda H, Satomi Y, et al. Cancer prevention by antioxidants. *Biofactors* 2004;22:57-61.
- 14) Liao S, Lin J, Dang MT, et al. Growth suppression of hamster flank organs by topical application of cat-



- echins, alizarin, curcumin, and myristoleic acid. Arch Dermatol Res 2001;293:200-5.
- 15) Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. Planta Med 1991;57:1-7.
- 16) Koo JY, Kim HJ, Jung KO, Park KY. Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells in vitro and shows synergism with 5-fluorouracil. J Med Food 2004;7:117-21.
- 17) Sun M, Yang Y, Li H, et al. The effect of curcumin on bladder cancer cell line EJ in vitro. Zhong Yao Cai 2004;27:848-50.
- 18) Li H, Che Y, Tang W. Effects of curcumin on proliferation and apoptosis in human hepatic cells. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 2002;10:449-51.
- 19) Kuo ML, Huang TS, Lin JK. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. Biochim Biophys Acta 1996;1317:95-100.
- 20) Duvoix A, Morceau F, Schnekenburger M, et al. Curcumin-induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat. Ann N Y Acad Sci 2003;1010:389-92.
- 21) Puthier D, Bataille R, Amiot M. IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK/STAT rather than ras/MAP kinase pathway. Eur J Immunol 1999;29:3945-50.
- 22) Tobe M, Isobe Y, Tomizawa H, Nagasaki T, Takahashi H, Hayashi H. A novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation: structure-activity relationships and biological effects of 6-aminoquinazoline derivatives. Bioorg Med Chem 2003;11:3869-78.
- 23) Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. Blood 2003;101:2377-80.
- 24) Schenkein D. Proteasome inhibitors in the treatment of B-cell malignancies. Clin Lymphoma 2002;3:49-55.
- 25) Salem M, Elbaz O, Zahran M, et al. Malignancy: identification of predictors of disease status and progression in patients with myeloma (MM). Hematology 2000;5:41-5.