

神經膠 星狀細胞에서 레몬오일에 의한 細胞自滅死의 抑制效果

원광대학교 한의과대학 신경정신과학교실

김준한 · 김태현 · 박진성 · 류영수

I. 緒 論

老化란 生, 長, 化, 收, 藏의 陰陽五行의 順行에 따른 變化過程 中の 일부분으로서 發育, 成長, 成熟과 老化的 生物學的 過程에서 생기는 形態的, 機能的 退縮, 適應力의 低下로 인해 外部環境에 대한 反應이 서서히 떨어져 결국엔 死亡에 이르는 普遍的인 生理的 現象을 말한다^{1,2)}. 韓醫學에서는 陰陽의 不調和, 精神感動의 惡影響, 氣血의 不調和, 臟腑의 變化 및 飲食의 不節制^{3,4,5)} 등과 聯關시켜서 說明하고 있으며, 西洋醫學의으로는 여러 原因說들 中에서도 遺傳子說이 가장 有力하다^{2,6)}.

이러한 老化過程에서 볼 수 있는 細胞自滅死(apoptosis)란 programmed cell death라고 하여 모든 環境 조건에서 遺傳子 發現 (gene expression)의 變化로 發生하는 세포자신의 破壞現狀이며, 身體의 구조적 平衡을 유지하는데 필수적인 요소이다⁷⁾. 따라서 細胞自滅死는 내부적 프로그램에 의해 保存되어 있으며 최종적으로 細胞의 自殺을 가져오는데, 細胞自滅死가 일어나는 이유는 원하지 않는 細胞를 죽이는 경우와 다음 세가지 경우가 있다. 첫째는 分化와 恒常性維持 때문이고, 둘째는 防禦기작이며, 셋째는 老化過程에서 찾아볼 수 있다⁸⁾.

최근 들어, pure essential oil이 自然療法이라는 이름 하에 香氣療法으로서 많이 이용되고 있는데, 이는 現代에 와서 개발된 새로운 療法이 아니라 수 천년 전부터 이집트인들이나 로마인, 그리스인들에 의해 사용되어져 온 治療法이다⁹⁾. 이러한 essential oil은 대체로 嗅覺을 통해 腦의 神經系에 直接的으로 作用을 하며, 이 가운데 레몬오일은 強壯, 祛痰, 健胃, 精血, 抗硬化作用이 있어 頭痛, 神

經痛 등에 사용하는데¹⁰⁾, 韓醫學에서도 洋檸檬이라고 하여 오래 전부터 祛痰, 消積, 破氣, 健胃의 目的으로 사용되어져 왔다¹¹⁾.

이에 本 研究에서는 레몬오일이 大腦機能에 미치는 影響을 알아보기 위해 사람의 腦 정상세포주인 CCF-STTG1 細胞에 熱衝擊(heat shock)을 가한 뒤 나타나는 細胞自滅死에 있어서의 레몬오일의 效果를 觀察하였으며, 有意性있는 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 세포배양 및 熱衝擊 처리

사람의 腦 神經膠 星狀細胞인 CCF-STTG1 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (PS)이 첨가된 RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY) 배지에서 5×10⁵ cells/ml의 농도로 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포는 1×10⁶ 개/35 mm dish를 사용하였고, 熱衝擊은 45°C water bath에서 15분간 처리하였다. 레몬오일은 熱衝擊 처리 전 30분간 前處理하며 모든 처리가 끝난 후, 37°C에서 12시간 회복시킨다. 레몬오일은 영국의 Tisserand institute 에서 제조한 제품을 사용하였고, 處置濃度는 원액을 10-4, 10-5으로 稀釋하여 사용하였다.

2. PI 염색에 의한 細胞自滅死 분석

실험하고자 하는 세포를 얻어 cell pellet을 0.5% tween-20이 첨가된 70% 에탄올로 30분간 고정시키고, 4°C에서 2,000 rpm으로 10분간 원심분리 후, PBS-B (phosphate buffered saline with 1% BSA)로 세척하였다. 고정된 cell pellet에 PI-RNase (50g/ml of propidium iodide with 11 kunits/ml of RNase)용액을 4°C에서 30분간 처리하여 DNA를 염색한다. 분석은 flow cytometry cell sorter를 이용하여 실시하였다.

3. DNA 분리 및 전기영동

DNA ladder pattern은 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. 요약하여 설명하면, CCF-STTG1 세포 (1×10⁶ cells/each group)에서 DNA는 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Co, Wisconsin Medicine, WI, USA)를 사용하여 분리하였고 분리한 genomic DNA 20g은 1.5% 아가로스 겔 상에서 100 V로 1시간동안 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 관찰하였다.

4. 세포생존도 측정

세포생존도는 trypan blue exclusion test에 의해 분석하였으며 죽은 세포는 trypan blue를 흡수하여 파랗게 관찰이 되고 전체 세포 수를 측정하여 백분율로 나타냈다.

5. Western blot 분석

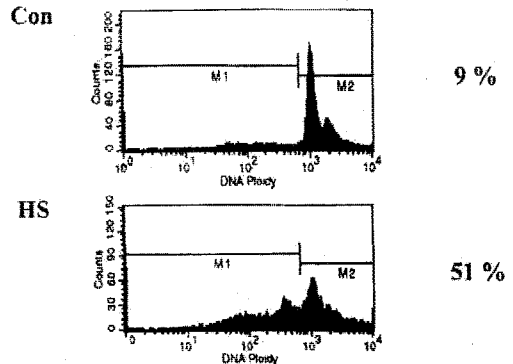
熱衝擊과 레몬오일을 처리한 후, 세포는 lysis buffer를 이용하여 단백질을 얻었다. BCA 용액으로 정량하고 50g 단백질을 15% 겔 상에서 전기영동한 후, nitrocellulose paper에 옮긴 다음 10% skim milk로 1시간동안 blocking시키고 caspase-3, PARP에 대한 항체를 처리하여 1시간동안 반응시켰다. 0.5% tween이 첨가된 PBS로 세척하고 각각에 대한 2차 항체를 처리하여 반응시켰고 PBS로 세척한 후, ECL solution kit로 검출하였다.

III. 實驗 結果

1. CCF-STTG1 세포의 熱衝擊으로 유도되는 細胞自滅死에 있어 레몬오일의 效果

사람의 腦 星狀細胞인 CCF-STTG1 세포에서 熱衝擊에 의한 細胞自滅死을 확인하기 위해 일반적으로 37°C에서 배양하는 세포를 45°C의 높은 온도에서 15분간의 熱衝擊을 가한 후, 다시 37°C에서 12시간동안 회복시켰다. 12시간 후에 세포를 모은 다음, propidium iodide로 염색하여 flow cytometry로 細胞自滅死 정도를 분석하였다. 그 결과, 對照群에서는 약 9%의 細胞自滅死을 보였고, 熱衝擊이 처리된 群은 약 50%의 높은 細胞自滅死 비율을 나타내었다(Fig. 1A). 그리고 레몬오일을 前處理한 다음 熱衝擊을 가한 群은 10⁻⁴ 농도에서 약 30%, 10⁻⁵ 농도에서 약 29%정도의 細胞自滅死 비율을 보임으로써 레몬오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死을 현저하게 억제하는 것을 관찰하였다. 반면에 레몬오일 單獨 處理群에서는 正常 對照群과 유사한 결과를 보여 그 자체의 cytotoxicity는 없음을 알 수 있었다. 또한 이 세포주가 아닌, 어린 흰쥐의 腦에서 분리하여 일차 배양한 腦 星狀細胞에서도 레몬오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死을 억제하는 것을 관찰하였으며, 사람의 星狀細胞에서보다 오히려 억제율이 높은 것을 관찰하였다(Fig. 1B).

A Apoptosis(M1, %)



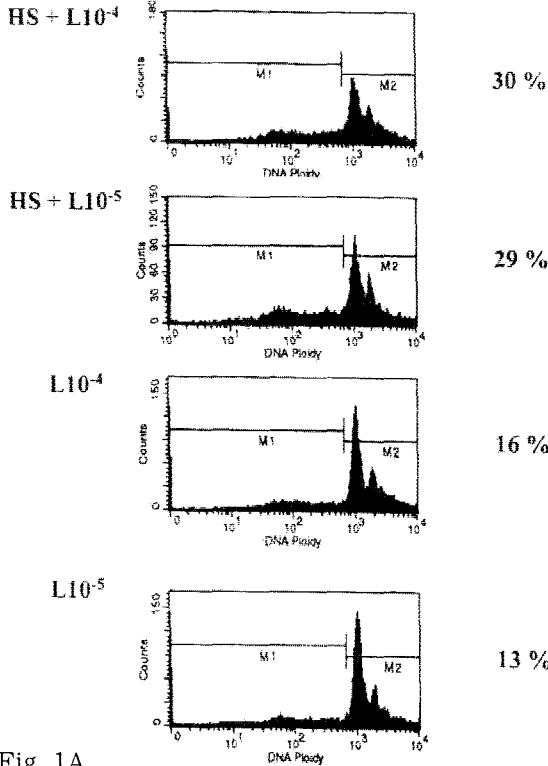


Fig. 1A

B Apoptosis(M2, %)

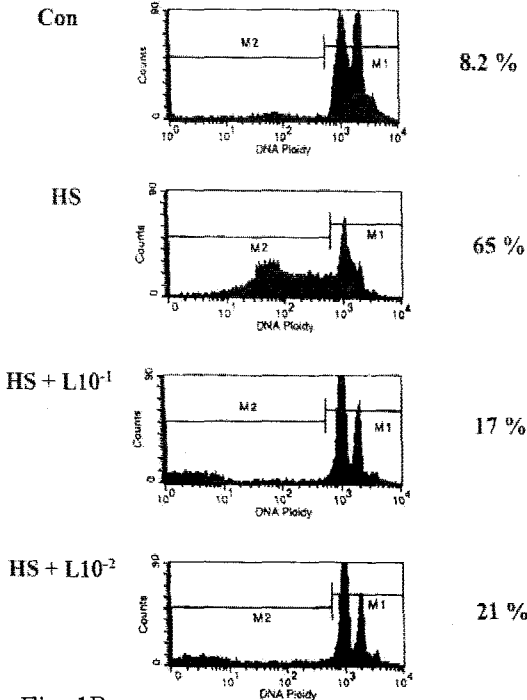


Fig. 1B

Fig. 1. Effect of lemon on the cell cycle distribution of CCF-STTG1 cell. Representative examples of the cell effects of lemon in CCF-STTG1 (A) and rat primary cultured (B) cells. The cells were treated for 30 min with lemon and then exposed to heat shock at 45°C for 15 min and recovered at 37°C for 12 hr. The cells were stained with PI solution and analyzed for DNA content by flow cytometry(see Materials and Methods). Data represent the result from one of three similar experiments.

2. CCF-STTG1 세포의 熱衝擊으로 유도되는 DNA 분열형성에 대한 레몬오일의 效果

Figure. 1의 flow cytometry 분석에서 관찰할 수 있었듯이, 熱衝擊 單獨 處理에 의해 細胞自滅死을 유발하며, 레몬오일의 前處理로 熱衝擊에 의한 細胞自滅死을 억제하였다. 그러면 細胞自滅死의 전형적 특징인 DNA ladder 상에서도 이러한 억제효과를 보이는가를 분석하기 위해 CCF-STTG1 세포에서 DNA를 분리하여 아가로스 겔 전기영동을 실시하였다. 그 결과, 熱衝擊 單獨 處理 群에서만 DNA ladder가 관찰되었고, 역시 레몬오일이 前處理된 群에서는 熱衝擊에 의한 DNA 분열이 관찰되지 않았다(Fig. 2). 또한 레몬오일 單獨處理의 경우에는 control과 유사한 양상을 보였다(data not shown). 여기에서 DNA ladder는 internucleosomal chromatin이 조각난 것을 나타낸다.

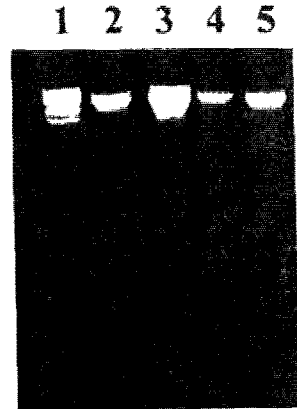


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA. The cells were treated for 30 min with lemon and then exposed to heat shock at 45°C for 15 min and recovered at 37°C for 12 hr. 20 μ g of DNA were electrophoresed in a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under UV illumination. Lane 1, marker; lane 2, control; lane 3, heat shock; lane 4, heat shock plus lemon(10⁻⁴d) and lane 5, heat shock plus lemon(10⁻⁵d).

3. CCF-STTG1 세포의 熱衝擊에 의한 세포 생존도에 있어 레몬오일의 효과

레몬오일이 세포생존도에 미치는 영향을 알아보기 위해 熱衝擊과 레몬오일을 처리한 12시간 후에 세포를 trypan blue로 염색한 결과, 熱衝擊과 레몬오일을 동시에 처리된 群에서 熱衝擊 單獨群에서 보다 적은 수의 cell death를 보였지만(Fig. 3), Figure. 1의 細胞自滅死 비율과 완전히 일치하지는 않았다.

Samples	Cell death (%)
1 ; Control	7 \pm 0.2
2 ; HS	25 \pm 0.4
3 ; HS + Lemon	14 \pm 0.3

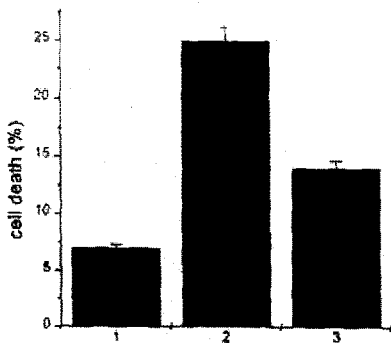


Fig. 3. Effect of lemon on cell viability of CCF-STTG1 cells. The cells were treated for 30 min with lemon on and then exposed to heat shock at 45°C for 15 min and recovered at 37°C for 12 hr. Cell viability was determined by a trypan blue exclusion test(see Materials and Methods).

4. CCF-STTG1 세포의 熱衝擊으로 유도되는 細胞自滅死의 신호전달과정에 있어 레몬오일의 효과

세포자멸 단백질분해효소의 활성화에 레몬오일이 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위해 Western blot 분석을 수행하였다. Flow cytometry, DNA 전기영동, Giemsa 염색실험 등에서 나온 결과와 마찬가지로 熱衝擊에 의해 caspase-3의 활성화 역시 증가되었고, 또한 레몬오일에 의해 caspase-3의 활성화가 억제되었다(Fig. 4). 그리고 caspase-3의 활성화가 증가함에 따라 그의 기질인 PARP가 잘려나가는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 레몬오일이 caspase-3의 活性調節을 통하여 細胞自滅死를 調節한다는 것을 암시하고 있다.

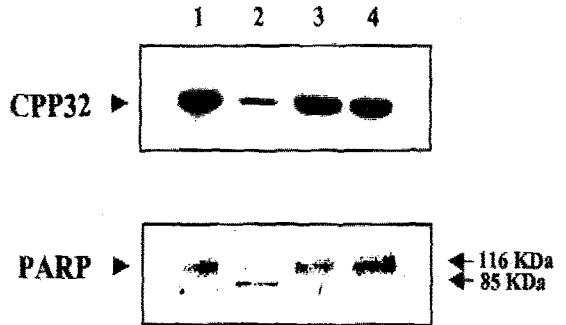


Fig. 4. Western blot analysis. 50 μ g of total protein were resolved by 15% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose paper, and analyzed by Western blotting using an anti-CPP32 and PARP polyclonal antibodies. Lane 1, control; lane 2, heat shock alone; lane 3, heat shock plus lemon (10⁻⁴d) and lane 4, heat shock plus lemon (10⁻⁵d).

5. CCF-STTG1 세포의 熱衝擊으로 유도되는 HSP70 단백질의 발현에 있어서 레몬오일의 효과

HSP70의 발현정도에 따라 細胞自滅死가 조절될 가능성을 고려하여 HSP70에 대한 Western blot분석을 시행한 결과, 熱衝擊 單獨 處理群이나 熱衝擊과 레몬오일이 같이 처리된 群에서는 HSP70 발현정도의 차이가 크지 않았다

(Fig. 5). 따라서 레몬오일에 의한 細胞自滅死 억제효과에 있어 HSP70은 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

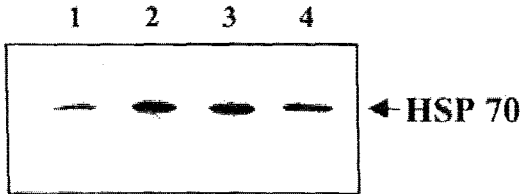


Fig. 5. Western blot analysis. 50 μ g of total protein were resolved by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose paper, and analyzed by Western blotting using an anti-HSP 70 polyclonal antibodies. Lane 1, control; lane 2, heat shock alone; lane 3, heat shock plus lemon(10⁴d) and lane 4, heat shock plus lemon(10⁵d).

IV. 考 察

老化란 生命體의 成長과 同時에 進行되는 一連의 反應¹²⁾으로서 한 個體에서 時間의 進行에 比例하여 일어나는 漸進的이고 內的인 退行性 變化로 發育, 成長, 成熟과 老化의 生物學的 過程에서 생기는 形態的 機能的 退縮, 豫備力과 適應力의 低下로 인해 外部環境에 대한 反應이 서서히 떨어져 결국엔 死亡에 歸着되는 普遍的인 生理的 現象을 말한다.^{12,6)}

韓醫學에서는 老化를 生, 長, 化, 收, 藏의 陰陽五行의 順行에 따른 變化過程 中の 일부분으로서 認識하고 있으며, 陰陽의 不調나 氣血의 不調和, 精神感動의 惡影響과 臟腑의 變化 및 飲食의 不節制^{3,4,5)} 등과 關聯시켜서 人間의 老化에 대해서 說明하고 있다. 또한 <靈樞, 衛氣失常編>³⁾에서는 “人年五十以上爲老”라 하여 五十歲를 老化가 이루어지는 時氣로 보았으며, <靈樞, 天年篇>⁵⁾에서는 五臟의 老化順序에 대하여, <素問, 陰陽應象大論>⁴⁾에서는 老化에 따른 各 臟器의 機能的 構造的 變化를, <靈樞, 營衛生會篇>³⁾에서는 氣血變化에 의한 身體的 變化를 言及하고 있다.

반면에 西洋醫學에서는 老化의 定義가 學說에 따라 다소 다른데 이는 아직까지 老化의 原因이 명확하게 밝혀지지 않았기 때문이다. 原因假說(theory)로는 크게 消耗說(waste and tear theory)과 老化가 遺傳的으로 豫定되어 不可逆的으로 經過한다는 遺傳子說로 大別되는데 消耗說은 다시 代謝產物蓄積說과 自由遊離基說(free radical theory), 異常 破滅說(error-catastrophe theory), 磨耗說, 生體防禦機構 혹은 調節機構의 障礙說 등으로 나누며 遺傳子說은 豫定說, 體細胞突然變異說(somatic mutation theory)과 프로그램說(programmed aging theory) 등이 있으며^{2,6)} 그 외에도 過去에 받은 스트레스 혹은 疾病의 總合이라는 스트레스說도 있다²⁾. 이러한 여러 原因假說 가운데 프로그램說에서의 Programmed cell death라고 하는 細胞自滅死(apoptosis)는 모든 환경조건에서 遺傳子 發現(gene expression)의 變化로 發生하는 세포자신의 破壞現狀이며, 身體의 구조적 平衡을 유지하는데 필수적인 요소로서⁷⁾ 내부적 프로그램에 의해 保存되어 있으며 최종적으로 細胞의 自殺을 가져온다. 細胞自滅死가 일어나는 이유는 원하지 않는 細胞를 죽이는 경우와 다음 세가지 경우로서 첫째는 分化와 恒常性維持 때문이고, 둘째는 防禦기작이며, 셋째는 老化過程에서 찾아볼 수 있는데⁸⁾ 이러한 老化過程의 하나로써 나타나는 細胞自滅死가 腦에서 發生하는 것이 痴呆의 病理的 過程이자 原因의 하나라고 思料된다.

病理的 老化로서의 痴呆는 各種 外因이나 病的 過程이 가해진 異常變化로서 精神的으로는 老化의 進行速度가 빠른 것이 特徵의이며 또한 精神機能的 전반적인 범위에 걸쳐서 障礙를 유발하여 日常生活에 支障을 招來하게 되는 것이 特徵의이다³⁾. 이러한 “癡呆”의 개념은 프랑스 醫學者인 Pinel에 의해 單一 疾患이 아닌 認知機能(cognitive function)의 低下를 나타내는 여러 疾患들에 對한 包括的인 概念으로^{13,14)} 기술되었으며, 一定 水準에 도달한 또는 한번 習得된 知的 能力이 腦의 여러 變性疾患들에 의해 後天性的 全體的이고 複合的인 認知機能의 低下 또는 障礙를 초래하는 보다 包括的인 概念으로 認知되었다^{13,15 17)}.

韓醫學에서는 癡呆에 관한 내용을 皇帝內經을 비롯한 초창기의 文獻에서는 찾아보기가 어렵고 단지 老人의 精

神의 변화에 대하여 60세에 우울하고 슬프고, 80세에 틀린 말을 잘 한다는 정도의 記述을 한 것이 전부라 할 수 있으며¹⁸⁾, <東醫寶鑑>에서도 老人은 특별한 病理의 狀況을 가진다고 하면서 腎間動氣의 衰退로 말미암는다고만 언급하고 있다. 痴呆라는 病名이 처음으로 언급된 文獻은 張景岳의 《景岳全書》雜病謨¹⁹⁾로서 그 이후, 呆病²⁰⁻²²⁾, 癡狂^{23,24)}, 健忘^{25,26)}, 虛勞²⁷⁾ 등의 範疇에서 다루어졌으며²⁸⁾, 文獻研究로는 李 등²⁹⁾이 痴呆의 治療에 관한 韓醫學과 現代醫學의 痴呆의 聯關性과 接近에 대해 論述하였고, 金 등³⁰⁾은 痴呆의 韓醫學의 範疇과 病因, 症狀, 治法과 西洋醫學의 病因病機, 症狀 등을 言及하였으며 襄³¹⁾은 老人性 痴呆에 관한 體質醫學의 研究를 통해 老人性 痴呆 환자 중 少陽이 四象體質中에 최고의 有病率을 보인다고 하여 發生分布와 體質針과 體質藥物의 治療方法을 통한 效果를 提示하고 있고 黃 등^{32,33)}이 痴呆에 관한 韓醫學의 臨床研究와 痴呆治療에 대한 韓醫學의 接近方法을, 李 등³⁴⁾은 老人性 痴呆에 대한 文獻的 考察을 發表하였다.

그 밖에 臨床研究로는, 鄭 등³⁵⁾이 痰瘀同治로 善忘, 痴呆 등의 腦萎縮에 有效한 效果를 보았다고 하였고, 徐³⁶⁾는 補腎活血化痰法으로 老年性 痴呆 患者의 記憶力과 認知機能을 改善했다고 하였지만 아직은 未治한 實情이다.

최근 들어, pure essential oil이 香氣療法에서 많이 이용되고 있는데, 이는 현대에 와서 개발된 새로운 요법이 아니라 수 천년 전부터 이집트인들이나 로마인, 그리스인들에 의해 사용되어졌으며 방향성 식물에서 추출한 이들 essential oil은 항박테리아성, 항바이러스성, 항균제 등의 특성을 가지고 있어서 이를 이용한 香氣療法이 여러 질환에 有效한 治療效果를 나타내고 있다⁴⁰⁾.

레몬은 韓醫學적으로 洋檸檬(Citrus limon Burm)에 해당되며 芸香科(Citrus limonia Osbeck)식물로서 味酸하고 脾胃 2經으로 入하는데 祛痰, 消積, 破氣, 健胃의 效能이 있어 痞痛, 痰癰, 生津止渴, 下氣시킨다¹¹⁾. 香氣療法에서는 이러한 洋檸檬의 效能을 이용하여 pure essential oil의 형태로 사용하고 있는데, 코로 吸入하게 함으로써 嗅覺을 통해 直接的으로 腦의 神經系에 作用을 하게 하여 頭痛, 神經痛, 眩暈, 抗高血壓 등에 사용하고 있다^{9,10)}.

精油의 大腦機能에 미치는 影響에 대한 研究論文으로

는 Gesner가 Rosemary Oil이 大腦機能 強化에 대하여, Pechey는 Peppermint Oil의 記憶力維持에 관하여, Chinchon은 Rose Oil의 抗憂鬱 立證에 대하여, Epple은 香氣治療로 自斃兒童과 不安證患者에게 效果의인 治療結果를 報告한 바가 있으나³⁷⁾ 레몬에 관한 연구결과는 발표된 바가 없다.

이에 본 研究에서는 腦의 研究機能을 수행하는데 주요한 세포로서 中樞神經系疾患 研究에 중요한 역할을 하는 腦의 大식세포인 神經膠 星狀細胞를 사용하여, 熱衝擊에 의해 老化過程에서 찾아볼 수 있는 細胞自滅死를 일으켜 病的 老化를 유발시킨 뒤, 레몬오일의 細胞自滅死에 대한 影響을 살펴보았다.

熱衝擊이란 정상적 성장 온도보다 더 높은 것을 말하며, 細胞自滅死 즉 programmed cell death를 유발하는 것으로 잘 알려져 있다^{38,39)}. 또한 온도는 세포가 살아가는데 있어 아주 중요한 인자로서, 변화되었을 때 세포로부터 적응할 수 있는 반응을 필요로 하며 그 대표적인 예가 바로 heat shock response (또는 stress response)이다. Heat shock response는 세포자신의 유전정보에 의해 발현되는 것으로, 그것이 수반하는 여러 가지 세포 형태학적, 생화학적 현상이 박테리아, 고등동물을 포함하여 현존하는 거의 모든 생물체에서 비슷한 양상으로 일어나므로, 진화적으로 대단히 conserve된 防禦기작이라 할 수 있다. 그 중에서 두드러진 현상은 heat shock proteins (HSPs)의 발현증가를 수반하는데 최근 들어, HSP70의 과다발현이 細胞自滅死를 방어한다는 보고가 많이 발표되고 있다⁴⁰⁾. 또한 熱衝擊은 몇몇 단백질 인산화효소를 활성화시키는데 ERK1, SAPK, p38 MAPK, MAPK kinase-2, 그리고 c-Src tyrosine kinase 등이 있다^{41,42)}.

사람의 腦 星狀細胞인 CCF-STTG1 세포에서 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 확인한 결과, 對照群에서는 약 9%의 細胞自滅死를 보였고 熱衝擊이 처리된 群은 약 50%의 높은 細胞自滅死 비율을 나타내었다(Fig. 1A). 그리고 레몬오일을 前處理한 다음 熱衝擊을 가한 群은 10⁻⁴ 농도에서 약 30%, 10⁻⁵ 농도에서 약 29% 정도의 細胞自滅死 비율을 보임으로써 레몬오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 현저하게 억제하는 것을 관찰하였다. 반면에 레몬오일 單

獨 處理群에서는 正常 對照群과 유사한 결과를 보여 그 자체의 cytotoxicity는 없음을 알 수 있었다. 또한 이 세포주가 아닌, 어린 흰쥐의 腦에서 분리하여 일차 배양한 腦星狀細胞에서도 레몬오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 억제하는 것을 관찰하였으며, 사람의 星狀細胞에서보다 오히려 억제율이 높은 것을 관찰하였다(Fig. 1B). 細胞自滅死의 전형적 특징을 볼 수 있는 DNA ladder상에서도 이러한 결과를 관찰 할 수 있는데 DNA ladder는 internucleosomal chromatin이 조각난 것을 나타내는 것으로서 熱衝擊 單獨 處理 群에서만 DNA ladder가 관찰되었고, 역시 레몬오일이 前處理된 群에서는 熱衝擊에 의한 DNA 분열이 관찰되지 않았다(Fig. 2). 또한 레몬오일 單獨處理의 경우에는 control과 유사한 양상을 보였다(data not shown).

세포생존도에 미치는 레몬오일의 영향에 있어서는 熱衝擊과 레몬오일이 동시에 처리된 群에서 熱衝擊 單獨群에서 보다 적은 수의 cell death를 보였지만(Fig. 3), Figure. 1의 細胞自滅死 비율과 완전히 일치하지는 않았다.

이밖에 熱衝擊은 caspase-3의 활성을 통하여 細胞自滅死를 유발하는데, 恒常性 維持를 위한 細胞自滅死에 관여하는 단백질로는 BCL-2 family가 있으며 그 중에서도 bcl-2와 bcl-XL은 細胞自滅死를 억제하고, bax와 bcl-XS는 細胞自滅死를 촉진하는 것으로 알려져 있다⁴³⁾. 그리고 C. elegans에서 많이 연구되어진 Ced-3도 세포죽음에 필요한 인자로 알려져 있다⁴⁴⁾. 현재까지 포유동물에서 Ced-3의 여섯 homologs가 동정되었는데 ICE, Nedd2, CPP32, ICErel II/TX/Ich-2, ICErel III, mch2 등이며⁴⁵⁻⁵⁰⁾, 이들이 과다발현 되면 細胞自滅死가 유발되며 이들 protease 기능을 방해함으로써 세포죽음을 억제할 수 있다. 특히 CPP32(caspase-3)는 DNA repair에 사용되는PARP를 잘라서 불활성화 시키는데(51-53), PARP의 분해는 細胞自滅死의 標識로 사용될 수 있으나 PARP가 knock-out된 쥐에서도 정상적으로 분화가 진행되는 것으로 보아 PARP의 분해가 細胞自滅死에 반드시 필요한 것은 아니다. 그러나 본 研究에서는 熱衝擊이 CPP32의 활성을 촉진하며 그의 기질인 PARP가 잘려 나가는 것을 실험에서 관찰할

수 있었으며 레몬오일의 前處理에 의해 CPP32의 활성이 억제되었다(Fig. 4). 따라서 이들 결과는 레몬오일이 CPP32의 활성을 통하여 細胞自滅死를 조절한다는 것을 암시하고 있다. 또한 HSP(heat shock proteins)70의 과다 발현이 細胞自滅死를 방어진다는 보고가 많이 발표되어⁴⁰⁾ HSP70의 발현정도에 따른 細胞自滅死의 조절 가능성을 조사하였으나, 熱衝擊 單獨 處理群이나 熱衝擊과 레몬오일이 같이 처리된 群에서는 HSP70 발현정도의 차이가 크지 않았다(Fig. 5). 이는 레몬오일에 의한 細胞自滅死 억제효과에 있어 HSP70이 별다른 영향을 미치지 않은 것으로 보인다.

以上的 研究結果로 보아 레몬오일이 腦 星狀細胞에서 熱衝擊에 의해 유발되는 細胞自滅死를 억제한다는 사실을 알 수 있었으며, 이러한 실험결과를 토대로 사람의 腦疾患이나 老化 및 癡呆에 直, 間接적으로 좋은 治療效果를 발휘할 것으로 思料되며 이에 대한 더 많은 研究가 요구된다 하겠다.

V. 結 論

本 研究는 레몬오일로서 사람의 뇌 정상세포주인 CCF-STTG1 세포를 이용하여 熱衝擊(heat shock)으로 유도되는 細胞自滅死에 있어서의 效果를 研究하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 熱衝擊으로 사람의 뇌 정상세포주인 CCF-STTG1 세포에 細胞自滅死를 유도시킨 뒤 그 정도를 확인한 결과 對照群에서는 약 9%의 細胞自滅死를 나타냈고, 熱衝擊이 처리된 群은 약 50%의 높은 細胞自滅死 비율을 보였다.
2. 정상 對照群과 레몬오일 單獨 處理群은 서로 유사한 결과를 보여 그 자체의 cytotoxicity는 없음을 알 수 있었다.
3. 레몬오일을 前處理한 다음 熱衝擊을 가한 CCF-STTG1 세포는 10⁻⁴ 농도에서 약 30%, 10⁻⁵ 농도에서

약 29% 정도의 細胞自滅死 비율을 보여 레몬오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 顯著하게 抑制함을 觀察할 수 있었다.

4. 어린 흰쥐의 뇌에서 분리하여 일차 배양한 腦 星狀細胞에서의 실험결과에서도 레몬오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 억제함을 관찰하였고, 오히려 사람의 星狀細胞에서보다도 억제율이 높은 것을 觀察할 수 있었다.

以上的 研究結果에 따르면 熱衝擊으로 유도되는 사람의 腦 星狀細胞에 있어서의 細胞自滅死는 레몬오일에 의해 有意하게 抑制되며, 이러한 사실은 老化 및 癡呆 등 사람의 腦疾患에 있어서도 直, 間接적으로 좋은 治療效果를 발휘할 것으로 認定되어 향후 이에 대한 계속적인 研究가 進行되어야 할 것으로 思料된다.

VI. 參考文獻

1. 大韓皮膚科學會刊行委員會 : 皮膚科學, 서울, 麗文閣, p.23, 1994.
2. 徐舜圭 : 成人病, 老人病學, 서울, 高麗醫學, pp.10-14, 225-228, 1992.
3. 黃義完 外 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.255-271, 327- 330, 1992.
4. 洪元植 譯 : 黃帝內經素問解釋, 서울, 高文社, pp.37, 41-42, 1980.
5. 洪元植 譯 : 黃帝內經靈樞解釋, 서울, 高文社, pp.109, 234-235, 1982.
6. 이철완 : 이철완교수의 老人病 研究, 서울, 一中社, pp.130-150, 1997.
7. Ellis, R. E., Yuan, J., and Horvitz, H. R. (1991) Annu. Rev.Cell. Biol. 7, 663-698.
8. Steller, H. (1995) Science 267, 1445-1449.
9. Robert Tisserand, Tony Balacs : Essential Oil Safety, London, Churchill Livingstone, p.146, 1995.
10. 이세희 : 아로마테라피, 서울, 도서출판 홍익재, pp.28-33, 71-74, 1995.
11. 江蘇新醫學院 : 中藥大辭典, 上海, 上海科學出版社, pp. 3879-3211, 1998.
12. 崔鎮浩 : 老化의 메카니즘과 研究方向, 生化學뉴스, 韓國生化學會, 5(3):39-53, 1985.
13. 박종한 : 癡呆의 原因과 治療, 대한정신약물학회지, 3 (1):33-40, 1992.
14. Bullock B. L. : Pathophysiology;adaptation and alterations infunction 4th edition, Philadelphia, Lippincott, pp.1095-1097, 1966.
15. 박영춘 : 神經科 領域에서의 癡呆, 대한신경과학회지, 3(1):17-22, 1985.
16. 장대일 : 癡呆, 慶熙醫學, 13(1):20-21, 1997.
17. Rowland L. P. : Merritt's Textbook of Neurology 7th edition, Philadelphia, Lea & Febiger, pp.1-6, 508-513, 1984.
18. 洪元植編 : 精校黃帝內經靈樞, 서울, 東洋醫學研究院, p.68, 241, 1985.
19. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610-611, 1978.
20. 錢鏡湖 : 辨證奇門全書, 서울, 甘地出版社, pp.233-235, 1990.
21. 陣士鐸 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, p.102, 1984.
22. 陳士鐸 : 辨證錄, 서울, 醫聖堂, pp.241-246, 1989.
23. 李梈 : 編註醫學入門(卷二), 서울, 大成文化社, pp.180-182, 1984.
24. 費信 : 古今醫鑑, 江西, 江西科學技術出版社, pp.193-194, 1990.
25. 費廷賢 : 增補萬病回春, 서울, 一中社, pp.229-230, 1994.
26. 李中梓 : 醫宗必讀, 서울, 一中社, pp.323-324, 1991.
27. 孫思邈 : 備急千急要方(卷四十), 서울, 杏林出版社, pp. 12-13, 1976.
28. 金保岡外 : Alzheimer型 癡呆患者 2例에 對한 臨床的 考察, 서울, 東醫神經精神科學會誌, 8(2):97-106, 1997.
29. 李東垣 外 : 癡呆의 治療에 關한 東西醫學的 考察, 서울, 韓醫學研究所論文集, pp.67-79, 1995.
30. 金賢兒 : 老人性癡呆에 대한 文獻的 考察, 서울, 大韓

- 韓方內科學會誌, 13(2):58-62, 66-67, 1992.
31. 裴旻星 : 老人性 痴呆에 관한 體質醫學的 研究, 서울, 大韓韓醫學會誌, 23(2):101-106, 1992.
32. 黃義完 外 4人 : 痴呆에 관한 韓醫學的 臨床 研究, 慶熙醫學, 12(2):7-20, 1996.
33. 黃義完 : 痴呆治療에 대한 韓醫學的 接近方法, 慶熙醫學, 13(1): 32- 37, 1997.
34. 이원철 外 2人 : 老人性 癡呆에 대한 文獻的 考察, 大韓韓方內科學會, 13(2):57-68, 1992.
35. 鄭仁哲, 李相龍 : 痴呆에 對한 文獻的 考察, 동의신경과학회지, 7(1):77-94, 1996.
36. 徐恒旺 : 補腎活血化痰法治療老年性痴呆 32例, 廣州省, 《新中醫》編輯部, 29(5):55, 1997.
37. 오홍근 : Essential Oil흡입에 대한 EAV측정치의 변화 연구-Aromatherapy의 임상적용을 위한 예비연구, 서울, MERIDIAN, 6(1):4-14, 1996.
38. Mosser, D. D., and Martin, L. H. (1992) J. Cell. Physiol. 151, 561-570.
39. Yonezawa, M., Otsuka, T., Matsui, N., and Kato, T. (1996) Int. J. Cancer 66, 347-351.
40. John, D. R., Kaushik, D., and James, P. K. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun. 241, 164-168.
41. Dubois, M. F., and Bensaude, O. (1993) FEBS Lett. 324, 191-195.
42. Lin, R. Z., Hu, Z. W., Chin, J. H., and Hoffman, B. B. (1997) J. Biol. Chem. 272, 31196-31202.
43. Thompson, C. B. (1995) Science 267, 1456-1462.
44. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993) Cell 75, 641-652.
45. Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweig, E. A., and Yuan, J. (1993) Cell 75, 653-660.
46. Fernandes, A. T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1994) J. Biol. Chem. 269, 30761-30764.
47. Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1994) Genes Dev. 8, 1613-1626.
48. Faucheu, C., Diu, A., Chan, A., Blanchet, A. M., Miossec, C., Herve, F., Collarddutilleul, V., Gu, Y., Aldape, R. A., Lippke, J. A., Rocher, C., Su, M., Livingston, D. J., Hercend, T., and Lalanne, J. L. (1995) EMBO J. 14, 1914-1922.
49. Ferandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1995) Cancer Res. 55, 2737-2742.
50. Munday, N. Vaillancourt, J. P., Ali, A., Casano, F. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Yamin, T. T., Yu, V. L., and Nicholson, D. W. (1995) J. Biol. Chem. 270, 15870-15876.
51. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Din, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., Munday, N. A., Raju, S. M., Smulson, M. E., Yamin, T. T., Yu, V. L., and Miller, D. K. (1995) Nature 376, 37-43.
52. Lazebnik, Y. A., Cole, S., Cooke, C. A., Nelson, W. G., and Earnshaw, W. C. (1993) J. Cell Biol. 123, 7-22.
53. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Denoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C. (1994) Nature (London) 371, 346-347.

=Abstract=

Inhibitory Effect of Lemon Oil on Apoptosis in Astrocytes

Jun-Han Kim · Tae-Heon Kim · Jin-Sung Park · Young-Su Lyu

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Won Kwang University, Iksan, Korea

We investigated the effects of lemon pure essential oils on the heat shock-induced apoptosis in

human astrocyte cell line CCF-STTG1. In previous studies, heat shock has been reported to induce the apoptosis or programmed cell death through the activation of caspase-3. Treatment of CCF-STTG1 cells with heat shock markedly induced apoptotic cell death as determined by flow cytometry. Interestingly, pretreatment of CCF-STTG1 cells with lemon pure essential oils inhibited the heat shock-induced apoptosis. Lemon also inhibited the heat shock-induced apoptosis in primary cultured rat astrocytes. To determine whether lemon inhibits the heat shock-induced activation of these apoptotic proteases, activation of CPP32 was assessed by Western blotting. Consistent

with flow cytometry, DNA fragmentation and giemsa staining, heat shock-induced activation of CPP32 was blocked by lemon pure essential oil. PARP, cysteine protease substrates were fragmented as a consequence of apoptosis by heat shock. Lemon oil inhibited the PARP fragmentation. This essential oil also inhibited the heat shock-induced activation of caspase-3. These results suggest that lemon pure essential oils may modulate the apoptosis through the activation of the ICE-like caspases.

Key word : 레몬오일, lemon oil, 치매, Apoptosis, Astrocytes