

神經膠 星狀細胞의 細胞自滅死에 있어서 박하오일의 效果

원광대학교 한의과대학 신경정신과학교실

이성률·김태현·류영수

I. 緒 論

一般的으로 細胞의 죽음은 크게 두 가지로 區別되어 있는데 하나는 壞死(necrosis)이고 다른 하나는 細胞自滅死(apoptosis)이다. 細胞自滅死는 programmed cell death라고 하며 細胞自身の 高度로 調節된 破壞過程으로서, 身體의 構造的 平衡을 維持하는데 必須의인데^{1,2)} 이러한 細胞自滅死가 일어나는 이유는 원하지 않는 細胞를 죽이는 경우와 다음 세 가지 경우가 있다. 첫째는 分化와 恒常性維持 때문이고, 둘째는 防禦기작이며, 셋째는 老化過程에서 찾아볼 수 있다.

여기서 老化란 成熟期 以後부터 생기는 生體變化로써³⁾ 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, 適應力の 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.^{4,5)} 西洋醫學의 으로 老化는 遺傳子說에 근거하고 있으며, 韓醫學에서는 陰陽五行의 法則에 따른 生長, 化, 收, 藏의 變化過程으로 認識하여, 陰陽의 不調和^{6,7)}, 精神感動의 惡影響^{6,7)}, 氣血의 不調和^{6,7)}, 臟腑의 變化^{6,7,8)} 및 飲食의 不節制⁶⁾ 등과 聯關시켜서 說明하고 있으며 이러한 老化過程의 하나로써 나타나는 細胞自滅死가 腦에서 發生하는 것이 癡呆의 病理的 過程이자 原因의 하나라고 料想된다.

薄荷는 唇形科(꿀풀과 ; Labiatae)에 속하는 多年生, 芳香性 草本인 薄荷의 地上部 全草로서 그 性味는 辛, 涼, 味苦하고 心, 心包, 肺, 肝의 4經으로 入하는 것으로 分類되어 있으며, 發散風熱과 清頭目, 頭腦風을 治하는 것으로 記載되어 있다^{9,10,11)}. 또한 최근 들어 自然療法の 하나로써

주목을 받고 있는 香氣療法에서도 이러한 薄荷의 效能을 이용하여 pure essential oil의 형태로 嗅覺을 통해 腦의 神經系에 直接的으로 作用을 하여 記憶力低下나 頭痛, 眩暈, 失神, 神經障礙, 쇼크 등에 사용하고 있다^{12,13)}.

이에 著者는 韓醫學의 으로 芳香性開竅藥物로서 清頭目하고 頭腦風을 治療하는데 사용되어온 薄荷의 抽出物인 Peppermint Oil을 사용하여 사람의 腦 성장세포인 CCF-STTG1 細胞에 熱衝擊(heat shock)을 가한 뒤 나타나는 細胞自滅死에 있어서의 박하오일의 效果를 觀察하였으며, 臨床的 重要性을 暗示하는 結果를 얻었기에 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 1×10⁶개/35mm dish를 사용하였고, 熱衝擊은 45°C water bath에서 15분간 처리하였다. 박하오일은 熱衝擊 처리 전 30분간 前處理하며 모든 처리가 끝난 후, 37°C에서 12시간 回復시킨다. 박하오일은 Tisserand institute (UK)에서 제조한 제품을 사용하였고, 처리농도는 희석(10⁻⁴, 10⁻⁵) 수치이다.

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 2,000rpm으로 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 (1×10^6 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 100V로 1시간 동안 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 관찰하였다.

4. 세포생존도(Cell viability) 및 형태학적 특성 관찰

세포생존도는 trypan blue exclusion test에 의해 분석하였으며 죽은 세포는 trypan blue를 흡수하여 파랗게 관찰이 되고 전체 세포 수를 측정하여 백분율로 나타냈다. 세포의 형태학적 관찰을 위해서 시약을 처리한 후, cytopine으로 세포를 슬라이드글라스에 붙이고 methanol로 30분간 고정한 다음, Wright-Giemsa 염색하여 전자현미경으로 관찰한다.

5. Western blot 분석

熱衝擊과 박하오일을 처리한 후, 세포는 lysis buffer를 이용하여 단백질을 얻었다. BCA 용액으로 정량하고 50g 단백질을 15% 겔 상에서 전기영동한 후, nitrocellulose

paper에 옮긴 뒤 10% skim milk로 1시간 동안 blocking 시키고 caspase-3, PARP에 대한 항체를 처리하여 1시간 동안 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 박하오일의 效果

熱衝擊은 細胞自滅死, 즉 programmed cell death를 유발하는 것으로 잘 알려져 있다^{14,15}. 먼저 사람의 腦 星狀 細胞인 CCF-STTG1 세포에서 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 확인하기 위해 일반적으로 37°C에서 배양하는 세포를 45°C의 높은 온도에서 15분간의 熱衝擊을 가한 후, 다시 37°C에서 12시간동안 回復시켰다. 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를 보였고, 熱衝擊이 처리된 群은 약 50%의 높은 細胞自滅死 비율을 나타내었다(Fig. 1A). 그리고 薄荷를 前處理한 다음 熱衝擊을 가한 群은 10^{-4} 농도에서 약 28%, 10^{-5} 농도에서 약 20% 정도의 細胞自滅死 비율을 보임으로써 薄荷가 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 현저하게 억제하는 것을 관찰하였다. 반면에 박하오일 單獨 處理群에서는 正常 對照群과 유사한 결과를 보여 그 자체의 세포독성(cytotoxicity)은 없음을 알 수 있었다. 또한 이 세포주가 아닌, 어린 쥐의 腦에서 분리하여 일차 배양한 腦 星狀細胞에서도 박하오일이 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).

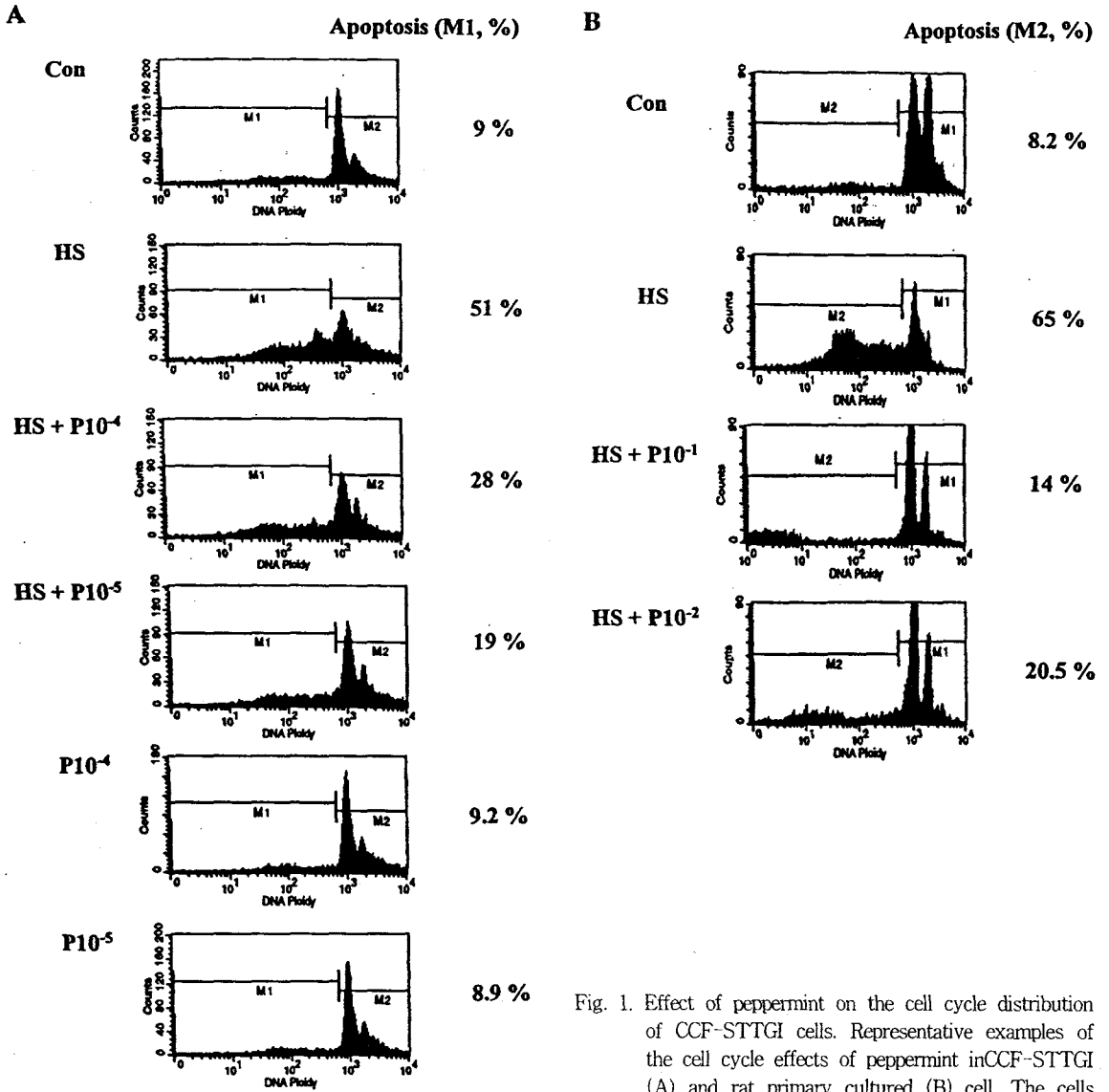


Fig. 1. Effect of peppermint on the cell cycle distribution of CCF-STTG1 cells. Representative examples of the cell cycle effects of peppermint in CCF-STTG1 (A) and rat primary cultured (B) cell. The cells were treated for 30 min with peppermint and then exposed to heat shock at 45°C for 15 min and recovered 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 fragmentation형성에 대한 박하오일의 效果

Figure. 1의 flow cytometry 분석에서 관찰할 수 있었던, 熱衝擊 單獨 處理에 의해 細胞自滅死를 유발하며, 박하오일의 前處理로 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 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 박하오일이 前處理된 群에서는 熱衝擊에 의한 DNA fragmentation이 관찰되지 않았다(Fig. 2). 또한 박하오일 單獨處理의 경우에는 control과 유사한 양상을 보였다. 여기에서 DNA ladder는 internucleosomal chromatin이 조각난 것을 나타낸다.

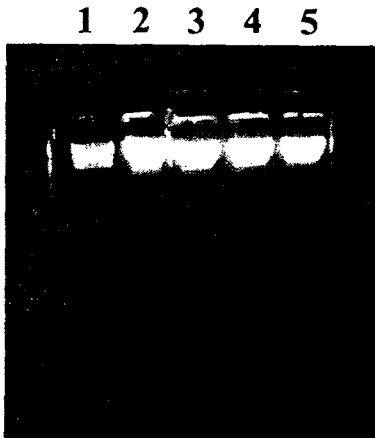


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA. The cells treated for 30 min with peppermint and then exposed to heat shock at 45°C for 15 min and recovered at 37°C for 12 hr. 20 μ g of DAN were electrophoresed in a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under UV illumination.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

3. CCF-STTG1 세포의 熱衝擊으로 유도되는 형태학적 변화와 세포생존도에 있어 박하오일의 效果

本 研究에서는 또한 형태학적 변화에 있어 박하오일의 효과를 알아보기 위해 熱衝擊과 박하오일을 동시에 처리한 후 세포의 형태를 먼저 광학현미경으로 관찰하였다. 對照群과 박하오일 單獨 處理群은 바닥에 아주 안정되게 잘 부착되어 있는 정상적인 형태를 관찰할 수 있었고, 熱衝擊 單獨 處理群은 rounding up되어 중앙에 많이 떠 있는 것을 볼 수 있었다. 그러나 박하오일을 前處理하고 熱衝擊을 준 群은 熱衝擊 單獨群에 비해 세포의 rounding up 현상이 현저히 억제되는 것을 관찰하였으며(data not shown) 또한 Wright-Giemsa로 염색하여 세포의 핵과 세포질을 전자현미경으로 자세히 관찰하였다. Figure. 3a에서 볼 수 있듯이, 對照群에서 보라색으로 진하게 염색된 부분이 핵이며 세포전체의 80% 이상의 면적을 차지하고 있고 그 보다 약하게 염색된 부분은 세포질이다. 熱衝擊을 單獨 處理하여 세포를 염색한 결과를 보면 핵이 응축하여 여러 조각으로 나뉘어져 있는 것을 볼 수 있으며 (Fig. 3b) 박하오일이 前處理된 群은 이러한 현상이 억제된 것을 관찰할 수 있다(Fig. 3c). 박하오일이 세포생존도에 미치는 영향을 알아보기 위해 熱衝擊과 박하오일을 처리한 12시간 후에 세포를 trypan blue로 염색한 결과, 熱衝擊과 薄荷가 동시에 처리된 群에서 熱衝擊 單獨群에서 보다 적은 수의 細胞自滅을 보였지만, figure. 1의 細胞自滅死 비율과 완전히 일치하지는 않았다(Fig. 4).

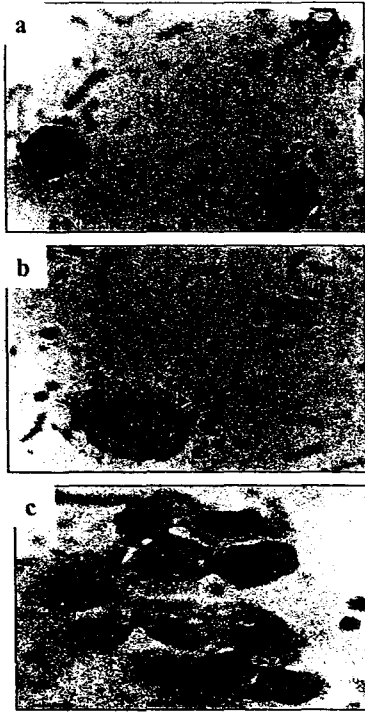


Fig. 3. Visualization of apoptosis in CCF-STTG1 cells treated with heat shock (b) or heat shock plus peppermint (1×10^6 cells/dish) (c) were incubated for 12 hr with medium alone (a). Then, the cells were cytopspined, fixed in methanol, stained with Wright-Giemsa for the determination of morphological and quantitative analysis of apoptosis, and photographed by microscope ($\times 1000$). Note the apoptotic cells with highly condensed chromatin (arrows).

Samples	Cell death (%)
1 ; Conral	7 ± 0.2
2 ; HS	25 ± 0.4
3 ; HS + Peppermint	12 ± 0.1

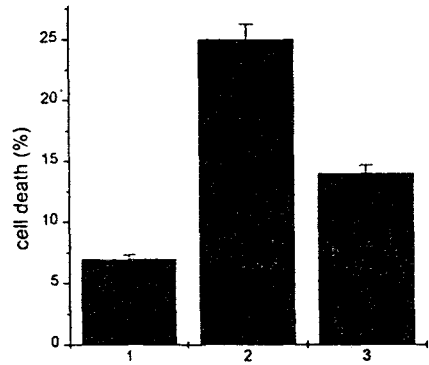


Fig. 4. Effect of peppermint on cell viability of CCF-STTG1 cells. The cells were treated for 30 min with peppermint on and then exposed to heat shock at 45°C for 15 min and recovered at 37°C for 12 hr. Cell viability was determined by a trypan blue exclusion test(see Materials and Methods).

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

熱衝擊은 caspase-3 (CPP32)의 활성을 통하여 細胞自滅死를 일으킨다^{14,15}. 細胞自滅死 동안 세포 내에서 일어나는 여러 과정 중 초기에 작용하는 것이 바로 단백질분해효소의 일종인 caspase이다. 이것은 아스파르트산 (aspartic acid) 잔기 뒤에서 잘려지는 cysteine 단백질분해효소이다. 이들이 사용하는 기질로는 포르딘(fordin), 라민 (lamin), poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) 등이 있으며¹⁶, 특히 caspase-3는 DNA repair에 사용되는 PARP를 잘라서 불활성화 시킨다. 이러한 細胞自滅 단백질분해효소의 활성화에 박하오일이 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 활성 역시 증가되었고, 또한 박하오일에 의해 caspase-3의 활성이 억제되었다. 그리고 caspase-3의 활성이 증가함에 따라 그의 기질인 PARP가 잘려나가는 것을 관찰할 수

있었다(Fig. 5). 이러한 결과는薄荷가 caspase-3의 活性調節을 통하여 細胞自滅死를 調節한다는 것을 암시하고 있다.

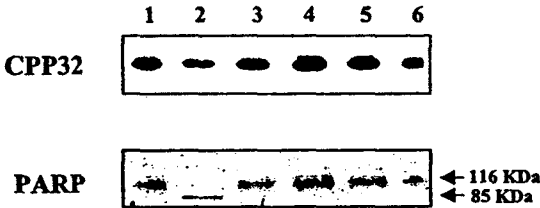


Fig. 5. Western blot analysis. 50 μ g of total protein were resolved by 15% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose paper, and analyzed by Western blotting using an anti-CPP32 and PARP polyclonal antibodies. Arrows, position of each protein. Lane 1, control; lane 2, heat shock; lane 3, heat shock plus peppermint (10⁻⁴ d); lane 4, heat shock plus peppermint (10⁻⁵ d); lane 5, peppermint alone(10⁻⁴ d) and lane 6, peppermint alone*10⁻⁵ d).

IV. 考 察

一般的으로 細胞죽음은 크게 두 가지로 區別되는데 그 하나는 細胞自滅死(apoptosis)이고, 다른 하나는 壞死(necrosis)이다. 細胞自滅死는 高度로 調節된 過程으로 nuclear chromatin의 응축, cytoplasmic shrinkage, membrane blebbing, nuclear fragmentation이 일어나며 최종적으로 apoptotic body를 형성한다. 반대로 壞死는 細胞가 너무 過激한 損傷을 입어 細胞自滅過程을 수행할 수 없을 때 일어나는 受動的인 過程으로 細胞가 腫脹되고 分離되어 그 含有物이 周圍環境으로 터져 나오는 것을 일컫는다¹⁷⁾. 細胞自滅死가 일어나는 이유는, 원하지 않는 細胞를 죽이는 경우와 다음 세가지 경우가 있는데, 첫째는 分化와 恒常性維持 때문이고, 둘째는 防禦기작이며, 셋째는 老化過程에서 찾아볼 수 있다. 老化過程으로서의 細胞自滅死는 西洋醫學의으로 다양한 假說 中の 하나인 遺傳子說에 근거하고 있는데 이는 아직까지 老化의 原因이 명확하게 밝혀지지 않았기 때문이다.

一般的인 意味에서의 老化란 生命體의 成長과 동시에 進行되는 一連의 反應으로서 成熟期 以後부터 생기는 生體變化로써³⁾ 時間的 進行에 따른 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, 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 말한다⁴⁵⁾.

西洋醫學에서는 老化의 發生原因이 學說에 따라 다소 다르지만 整理해 보면 대체로 다음과 같이 2가지로 說明이 되는데 하나는 消耗說(waste and tear theory)이고 또 하나는 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된다. 消耗說은 다시 直接的인 原因으로 생각되는 老化色素(lipofuscin)등의 細胞 體內蓄積에 老化가 나타난다는 代謝產物蓄積說과 自由遊離基들에 의해 老化가 發生한다는 自由遊離基說(free radical theory), DNA 遺傳情報의 이상으로 發生되는 異常破滅說(error-catastrophe theory), 物質과 機能이 時間이 지남에 따라 磨耗된다는 磨耗說, 免疫機能이나 中樞神經系의 低下로 인한 生體防禦機構 혹은 調節機構의 障礙說, 生理過程 중 發生되는 post-translation modifications 등으로 나누며 遺傳子說은 豫定說, 體細胞 遺傳子의 確率的 過程으로 DNA複製狀에 突然變異가 發生하고 이것이 쌓여서 細胞의 機能障礙가 發生한다는 體細胞突然變異說(somatic mutation theory)과 프로그램說(programmed aging theory) 등이 있으며^{5,18)} 그 외에도 老化는 過去에 받은 스트레스 혹은 疾病의 總合이라는 스트레스說 등이 있다⁹⁾.

반면에 韓醫學에서는 老化를 陰陽五行의 法則에 따른 生, 長, 化, 收, 藏의 變化過程으로 認識하였으며, 陰陽의 不調和^{6,7)}, 精神感動의 惡影響^{6,7)}, 氣血의 不調和^{6,7)}, 臟腑의 變化^{6,7,8)} 및 飲食의 不節制⁶⁾등과 關聯시켜서 人間의 老化에 대해서 說明하고 있다. <靈樞, 衛氣失常編>⁸⁾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>⁸⁾에서는 五臟의 老化順序에 대하여, <素問, 陰陽應象大論>⁷⁾에서는 老化에 따른 각 臟器의 機能的 構造的 變化를, <靈樞, 衛氣生血篇>⁸⁾에서는 氣血變化에 의한 身體의 變化를 言及하고 있다.

痴呆는 以上에서 언급한 老化의 病理的 形態로 理解할 수 있으며 이러한 “痴呆”의 概念은 프랑스 醫學者인 Pinel

에 의해 처음으로 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^{18,19)} 기술되었다.

一般的으로 痴呆는 意識이 淸明한 狀態에서 全般的인 認知機能의 障病을 나타내는데 보통 慢性 또는 進行性 腦疾患에 의해 發生되며 記憶力, 思考力, 指南力, 理解力, 計算能力, 學習能力, 言語 및 判斷力 등 多數의 高位大腦機能에 심각한 障病이 나타나는 知的機能의 全體的 障病(global impairment of intellectual function)를 포함하는 腦疾患에 의한 臨床症候群이다²⁰⁻²⁶⁾.

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의인 變化에 대하여 60세에 우울하고 슬프고, 80세에 틀린 말을 잘 한다는 정도의 記述을 한 것이 전부라 할 수 있으며²⁷⁾, <東醫寶鑑>에서도 老人은 특별한 病理的 狀況을 가진다고 하면서 腎間動氣의 衰退로 말미암는다고만 언급하고 있다. 痴呆라는 病名이 처음으로 기록된 文獻은 張景岳의 <景岳全書> 雜病謨²⁸⁾로서 그 이후, 呆病²⁹⁻³¹⁾, 癡狂^{32,33)}, 健忘^{34,35)}, 虛勞³⁶⁾ 등의 範疇에서 다루어졌으며³⁷⁾ 主要原因으로는 鄭 등³⁸⁾이 痰飲, 七情傷, 稟賦不足, 肝腎不足으로 크게 나누었고 郭 등³⁹⁾은 年老氣衰, 久病 或은 內風 卒中, 外傷頭腦 或은 邪毒內竄 등으로 腦絡이 痰瘀로 凝結되면 善忘, 癡呆 등의 症狀을 發한다고 하였다. 陳⁴⁰⁾은 呆病의 主要原因을 痰으로 보았고, 최근 張⁴⁰⁾도 呆從痰治로 治痰하는 藥物을 使用하여 痴呆를 治療하였다고 報告하였으나 이에 대한 研究는 初步的인 수준에 머무르고 있다.

그 밖에 臨床研究로는, 鄭 등⁴¹⁾이 痰瘀同治로 善忘, 癡呆 등의 腦萎縮에 有效한 效果를 보았다고 하였고, 徐⁴²⁾는 補腎活血化痰法으로 老年性 癡呆 患者의 記憶力과 認知機能을 改善했다고 하였지만 아직은 未洽한 實情이다.

薄荷는 脣形科(꿀풀과; Labiatae)에 속하는 多年生, 芳香性 草本인 薄荷의 地上部 全草로서 그 性味는 辛, 涼, 味苦하고 心, 心包, 肺, 肝의 4經으로 入하는 것으로 分類되어 있으며, 芳香性開竅藥物로서 發散風熱과 去痰, 淸頭目, 頭腦風을 治하는 것으로 記載되어 있다⁹⁻¹¹⁾. 또한 최근 들어 自然療法의 하나로서 주목을 받고있는 香氣療法에서

도 이러한 薄荷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 記憶力 低下나 頭痛, 眩暈, 失神, 神經障病, 쇼크 등에 사용하고 있다^{12,13)}.

Pure essential oil의 大腦機能에 미치는 影響에 대한 研究論文으로는 Gesner가 Rosemary Oil이 大腦機能 強化에 대하여, Chinchon은 Rose Oil의 抗憂鬱 立證에 대하여, Epple은 香氣療法으로 自斃兒童과 不安證患者에게 效果的인 治療結果를 報告하였으며, Peppermint Oil에 대해서는 Pechey가 記憶力維持에 관하여 報告한 바가 있다⁴³⁾.

이에 本 研究에서는 以上과 같은 박하오일의 效能에 着眼하여 熱衝擊으로 細胞自滅死를 일으켜 病的 老化를 誘發시킨뒤, 박하오일에 의한 細胞自滅死에 대한 影響을 살펴본 결과 細胞自滅死를 抑制한다는 사실을 확인할 수 있었다.

熱衝擊(heat shock)이란 正常的 成長 溫度보다 더 높은 것을 말하는데, 溫度는 細胞가 살아가는데 있어 아주 중요한 因子로써, 변화되었을 때 細胞로부터 適應할 수 있는 反應을 필요로 한다. 그 대표적인 예가 바로 heat shock response (또는 stress response)이다. Heat shock response는 細胞自身の 유전정보에 의해 發現되는 것으로, 그것이 隨伴하는 여러 가지 細胞 形態學的, 生化學的 現象이 박테리아, 고등동물을 포함하여 現存하는 거의 모든 生物體에서 비슷한 樣相으로 일어나므로, 進化的으로 잘 보존된 防禦기작이라 할 수 있다. 그 중에서 두드러진 現象은 heat shock proteins (HSPs)의 발현증가를 수반하는데 최근 들어, HSP70의 과다발현이 細胞自滅死를 방어한다는 보고가 많이 발표되고 있다⁴⁴⁾. 또한 熱衝擊은 몇몇 단백질 인산화효소를 활성화시키는데 ERK1, SAPK, p38 MAPK, MAPK kinase-2, 그리고 c-Src tyrosine kinase 등이 있다^{45,46)}. 이밖에 熱衝擊은 caspase-3의 활성을 통하여 細胞自滅死를 유발한다. 細胞自滅死가 일어나는 이유는, 원하지 않는 세포를 죽이는 경우와 다음 세가지 경우가 있는데, 첫째는 分化와 恒常性維持 때문이며, 둘째는 防禦기작이고, 셋째는 老化過程에서 찾아볼 수 있다.

恒常性 維持에 관여하는 단백질로는 BCL-2 family가

있는데 그 중에서도 bcl-2와 bcl-XL은 細胞自滅死를 억제하며, bax와 bcl-XS는 細胞自滅死를 촉진하는 것으로 알려졌다⁴⁷⁾. 그리고 C. elegans에서 많이 연구되어진 Ced-3도 세포죽음에 필요한 인자로 알려졌다⁴⁸⁾. 현재까지 포유동물에서 Ced-3의 여섯 homologs가 동정되었는데 ICE, Nedd2, CPP32, ICErel II/TX/Ich-2, ICErel III, mch2 등이며⁴⁹⁻⁵⁴⁾, 이들이 과다발현 되면 細胞自滅死가 유발되며 이들 단백질분해효소 기능을 방해함으로써 세포죽음을 억제할 수 있다. 특히 CPP32는 DNA repair에 사용되는 PARP를 잘라서 不活性化 시키는데⁵⁵⁻⁵⁷⁾, PARP의 분해는 細胞自滅死의 標識로 사용될 수 있다. 그러나 PARP가 knock-out된 쥐에서도 정상적으로 분화가 진행되는 것으로 보아 PARP의 분해가 細胞自滅死에 반드시 필요한 것은 아니다.

本人은 熱衝擊에 의한 CPP32와 PARP의 활성도를 조사한 결과, CPP32의 활성이 熱衝擊에 의해 증가하며 PARP 분해를 수반한다는 것을 확인하였고 또한 박하 前處理에 의해 이들 활성이 저하되었다. 따라서 이들 결과는 박하가 caspase-3 (CPP32)의 활성조절을 통하여 細胞自滅死를 조절한다는 것을 암시하고 있다.

최근 들어, 植物에서 抽出한 pure essential oil을 이용한 香氣療法(aromatherapy)이 여러 疾患에 有效한 治療效果를 나타내고 있는데 本 研究結果에서 규명된, 腦 星狀細胞에서 熱衝擊(heat shock)에 의해 誘發되는 細胞自滅死가 박하오일에 의해 抑制된다는 사실은, 박하오일이 사람의 腦疾患이나 老化 및 癡呆에 直, 間接적으로 좋은 治療效果를 發揮할 것으로 思料되며 이에 대한 더 많은 研究가 進行된 다음 癡呆 등 다양한 腦疾患에의 臨床的 應用이 可能할 것으로 思料된다.

V. 結 論

本 研究에서는 사람의 腦 정상세포주인 CCF-STTG1 세포를 이용하여 熱衝擊(heat shock)에 의한 細胞自滅死에 있어 박하오일의 效果를 研究하였다. 그 結果는 다음과 같다.

1. 사람의 腦 星狀細胞인 CCF-STTG1 세포에 熱衝擊

을 가하여 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.

2. 사람의 腦 星狀細胞인 CCF-STTG1 세포에 박하오일을 前處理한 다음 熱衝擊을 가한 群은 10^4 농도에서 약 28%, 10^5 농도에서 약 20% 정도의 細胞自滅死 비율을 보임으로써 박하오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 顯著하게 抑制하는 것을 觀察하였다.

3. 박하오일 單獨 處理群에서는 정상 對照群과 유사한 結果를 보여 그 자체의 세포독성(cytotoxicity)은 없음을 알 수 있었다.

4. 사람이 아닌, 어린 흰쥐의 腦에서 분리하여 일차 배양한 腦 星狀細胞에서도 박하오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 抑制하는 것을 觀察하였으며, 사람의 星狀細胞에서보다 오히려 抑制率이 높은 것을 觀察하였다.

以上の 研究結果에 따르면 사람의 腦 星狀細胞에 있어서 熱衝擊에 의한 細胞自滅死가 박하오일에 의해 抑制된다는 사실은 박하오일이 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 進行된 다음 癡呆 등 다양한 腦疾患에의 臨床的 應用이 可能할 것으로 認定된다.

VI. 參 考 文 獻

1. Ellis, R. E., Yuan, J., and Horvitz, H. R. Annu. Rev. Cell. Biol. 7, 663-698, 1991
2. Steller, H. Science 267, 1445-1449, 1995
3. 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.
4. 大韓皮膚科學會刊行委員會 : 皮膚科學, 서울, 麗文閣, p.23, 1994.
5. 徐舞圭 : 成人病, 老人病學, 서울, 高麗醫學, pp.10-14,

- 225-228, 1992.
6. 黃義完 外 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.255-271, 327-330, 1992.
 7. 洪元植 譯 : 黃帝內經素問解釋, 서울, 高文社, pp.37, 41-42, 1980.
 8. 洪元植 譯 : 黃帝內經靈樞解釋, 서울, 高文社, pp.109, 234-235, 1982.
 9. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 永林社, pp.528-529, 1992.
 10. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.245-247, 1988.
 11. 蘇新醫學院 : 中藥大辭典, 上海, 上海科學出版社, pp.1918-1926, 1998.
 12. 이세희 : 아로마테라피, 서울, 도서출판 흥익재, pp.192-195, 1995.
 13. 柳永秀 外 : 養生을 위한 香氣治療의 韓醫學的 適用과 展望, 大韓韓方內科學會誌, 19(1):505-521, 1998.
 14. Mosser, D. D., and Martin, L. H. J. Cell. Physiol. 151, 561-570, 1992
 15. Yonezawa, M., Otsuka, T., Matsui, N., and Kato, T. Int. J. Cancer 66, 347-351, 1996
 16. Cohen, G. M. Biochem. J. 326, 1-16, 1997
 17. Trump, B. F., and Ginn, F. L. in : E. Bajusz and G. Jasmin (Eds). Methods and Achievements in Experimental Pathology. Vol. 4, Karger, Basel, p. 1, 1969
 18. 이철완 : 이철완교수의 老人病研究, 서울, 一中社, pp.130-150, 1997.
 19. 박종한 : 痴呆의 原因과 治療, 대한정신약물학회지, 3(1):33-40, 1992.
 20. 곽호순 外 2人 : Mattis Dementia Rating Scale (MDRS)의 非癡 呆老人群에 대한 研究, 신경정신의학, 29(6):1398-1405, 1990.
 21. 김명호 : 痴呆(Dementia)의 정의와 분류, 대한신경과학회지, 3(1):1-4, 1985.
 22. 김진수 : Alzheimer씨 痴呆-개론 및 최신 경향-, 대한정신약 물학회지, 2(1):30-42, 1991.
 23. G David Perkin, Fred H Hochberg : Atlas of clinical neurology 2nd edition, pp.6.2-6.4, London, Wolfe, 1993.
 24. J. C. E. Underwood : General and systemic pathology 2nd edition, pp.863-865, London. Churchill living stone, 1996.
 25. John Stirling Meyer : Medical Neurology 3rd edition, pp.175-180, New York, Macmillan Publishing Company, 1979.
 26. Chui HC, Victoroff JI, Margolin D, Jagust W, Shankle R, Katzman R : Criteria for the diagnosis of ischemic vascular dementia proposed by the State of California Alzheimer's Disease Diagnostic and Treatment Centers, Neurology, 42(3Pt1):473-480, 1992.
 27. 洪元植編 : 精校黃帝內經靈樞, p.68, 241, 서울, 東洋醫學研究院, 1985.
 28. 張介賓 : 張氏景岳全書, 서울, 翰成社, pp.610-611, 1978.
 29. 錢鏡湖 : 辨證奇門全書, 서울, 甘地出版社, pp.233-235, 1990.
 30. 陳士鐸 : 國譯石室秘錄, 서울, 書苑堂, pp.102, 1984.
 31. 陳士鐸 : 辨證錄, 서울, 醫聖堂, pp.241-246, 1989.
 32. 李梴 : 編註醫學入門(卷二), 서울, 大成文化社, pp.180-182, 1984.
 33. 龔信 : 古今醫鑑, 江西, 江西科學技術出版社, pp.193-194, 1990.
 34. 龔廷賢 : 增補萬病回春, 서울, 一中社, pp.229-230, 1994.
 35. 李中梓 : 醫宗必讀, 서울, 一中社, pp.323-324, 1991.
 36. 孫思邈 : 備急千急要方(卷四十), 서울, 杏林出版社, pp.12-13, 1976.
 37. 金保岡外 : Alzheimer型 痴呆患者 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.
 38. 鄭仁哲外 : 痴呆患者 17例에 對한 臨床的 考察, 대전, 惠和醫學, 7(1):70-84, 1998.
 39. 郭宇鵬外 : 謝海洲治療腦萎縮經驗, 北京, 中醫雜誌, 38(10):586-587, 1997.
 40. 張覺人 : 呆從痰治, 上海, 上海中醫藥雜誌, 3:20-21,

- 1995.
41. 鄭仁哲, 李相龍 : 痴呆에 對한 文獻的 考察, 동의신경과학회지, 7(1):77-94, 1996.
 42. 徐恒旺 : 補腎活血化痰法治療老年性痴呆 32例, 廣州市, 《新中醫》編輯部, 29(5):55, 1997.
 43. 오홍근 : Essential Oil흡입에 대한 EAV측정치의 변화 연구-Aromatherapy의 임상적응을 위한 예비연구, 서울, MERIDIAN, 6(1):4-14, 1996.
 44. John, D. R., Kaushik, D., and James, P. K. Biochem. Biophys. Res. Commun. 241, 164-168, 1997.
 45. Dubois, M. F., and Bensaude, O. FEBS Lett. 324, 191-195, 1993.
 46. Lin, R. Z., Hu, Z. W., Chin, J. H., and Hoffman, B. B. J. Biol. Chem. 272, 31196-31202, 1997.
 47. Thompson, C. B. Science 267, 1456-1462, 1995.
 48. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. Cell 75, 641-652, 1993.
 49. Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweig, E. A., and Yuan, J. Cell 75, 653-660, 1993.
 50. Fernandes, A. T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. J. Biol. Chem. 269, 30761-30764, 1994.
 51. Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. Genes Dev. 8, 1613-1626, 1994.
 52. 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. EMBO J. 14, 1914-1922, 1995.
 53. Ferandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. Cancer Res. 55, 2737-2742, 1995.
 54. 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. J. Biol. Chem. 270, 15870-15876, 1995.
 55. 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. Nature 376, 37-43, 1995.
56. Lazebnik, Y. A., Cole, S., Cooke, C. A., Nelson, W. G., and Earnshaw, W. C. J. Cell Biol. 123, 7-22, 1993.
57. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Denoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C. Nature (London) 371, 346-347, 1994.

=Abstract=

Effect of Peppermint Oil on Apoptosis of Astrocytes

Sung-Ryull Lee · Tae-Hun Kim · Yeoung-Su Lyu

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

Recently, essential oils are used for aromatherapy. Most essential oils are said to be anti-bacterial; some may be anti-viral or anti-fungal. I investigated the effects of peppermint pure essential oil 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. We studied the heat shock-induced apoptosis through flow cytometry, DNA electrophoresis, and giemsa staining. Interestingly, these events were inhibited by pretreatment of peppermint pure essential oils in CCF-STTG1 cells. Peppermint oil also inhibited the heat shock-induced apoptosis in primary cultured rat astrocytes. In addition, this Peppermint essential oil

inhibited the heat shock-induced activation of caspase-3. These results suggest that peppermint pure essential oils may modulate the apoptosis through the activation of the interleukin-1-converting

enzyme-like protease.

Key word : peppermint oil, Dementia, Apoptosis, Astrocytes