

동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 11, No. 2, 2000

神經膠 星狀細胞에서 주니퍼오일에 의한 細胞自滅死의 抑制 效果

원광대학교 한의과대학 신경정신과학교실

김태형 · 김태현 · 이성률 · 류영수

I. 緒 論

老化란 生命體의 成長과 동시에 進行되는 一連의 反應으로써 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 및 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)}.

계획된 세포죽음(programmed cell death)이라고 하는 細胞自滅死(apoptosis)는 遺傳子 發現(gene expression)의 變化로 發生하는 細胞自身的 破壞現狀으로서, 이러한 細胞自滅死는 內部的 프로그램에 의해 保存되어 있으며 老化過程의 주된 病理現狀으로 설명되고 있고, 最終的으로 細胞의 自殺을 가져온다^{3,4)}.

韓醫學에서는 이러한 人間의 老化에 대해 陰陽五行에 따른 生, 長, 化, 收, 藏의 자연적 變化過程으로 認識하였으며, 陰陽과 氣血의 不調和나 精神感動의 惡影響, 臟腑의 變化 및 飲食의 不節制 등과 聯關시켜서 說明하고 있다⁵⁻⁷⁾. 반면에 西洋醫學에서는 老化의 發生原因이 學說에 따라 다소 다르지만 크게 消耗說(waste and tear theory)과 遺傳子說로 大別된다⁸⁾.

痴呆는 以上에서 언급한 老化의 病理的 形態로 理解할 수 있다. 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 障得를 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 障得가 나타나는 知的機能의 全體的 障得를 포함하는 腦疾患에 의한 臨床症候群이다⁹⁻¹¹⁾.

杜松實¹²⁻¹⁴⁾은 노간주나무(*Juniperus rigida* Sieb. et

Zucc)의 익은 열매로서 神經安定, 鎮定, 祛風除濕, 鎮痛, 健胃, 祛痰, 抗菌作用이 있으며 神經性疾患, 關節炎, 痛風, 浮腫, 赤痢, 尿路生殖器疾患 등에 쓴다.

최근 들어 自然療法의 하나로써 주목을 받고있는 香氣療法(Aroma therapy)에서는 이러한 杜松實의 效能을 이용하여 pure essential oil의 형태로 사용하고 있는데, 주로 抗神經障得, 鎮驚, 強壯, 健胃, 利尿作用 및 항류마티즘의 治療特性이 있는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 그러나 Juniper Oil에 의한 腦神經細胞의 實驗的 研究은 아직 접해 보지 못했다.

이에 著者は 杜松實의 抽出物인 Juniper Oil을 사용하여 사람의 腦 정상세포주인 CCF-STTG1 細胞에 熱衝擊(heat shock)을 가한 뒤 나타나는 細胞自滅死에 있어서의 주니퍼오일의 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 2×10^6 cells/ml의 농도로 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포는 1×10^6 개/35mm dish를 사용하였고, 熱衝擊은 46°C water bath에서 15분간 처리하였다. 주니퍼오일은 熱衝擊 처리 전 30분간 前處理하며 모든 처리가 끝난 후, 37°C에서 12시간 回復시킨다. 주니

퍼오일은 영국의 Tisserand institute (UK)에서 제조한 제품을 사용하였고, 처리농도는 원액을 10-4, 10-5으로 稀釋하여 사용하였다.

2. propidium iodide(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 원심분리한 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 유식세포분석기 (flow cytometry)를 이용하여 실시하였다.

3. DNA 분리 및 전기영동

DNA ladder 양상은 아가로스 겔 전기영동에 의해 분석하였다. 즉, CCF-STTG1 세포(1×106cells/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. 세포생존율(Cell viability) 측정

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

5. Western blot 분석

熱衝擊과 주니퍼오일을 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 1시간동안 blocking시키

고 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 주니퍼오일의 效果

熱衝擊은 細胞自滅死, 즉 programmed cell death를 유발하는 것으로 잘 알려져 있다^{16,17}. 먼저 사람의 腦星狀細胞인 CCF-STTG1 細胞에서 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 確認하기 위해 一般的으로 37°C에서 培養하는 細胞를 46°C의 높은 온도에서 15분간의 熱衝擊을 가한 후, 다시 37°C에서 12시간동안 回復시켰다. 12시간 후에 細胞를 모은 다음, PI로 染色하여 유식 세포분석기로 細胞自滅死 정도를 分析하였다. 그 결과, 對照群에서는 4.52%의 細胞自滅死를 보였고, 熱衝擊이 처리된 群은 약 30.27%의 높은 細胞自滅死 비율을 나타내었다(Fig. 1). 그러나 주니퍼오일을 前處理한 다음 熱衝擊을 가한 群은 10-4 농도에서 12.66%, 10-5 농도에서 20.13% 정도의 細胞自滅死 비율을 보임으로써 주니퍼오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 현저하게 抑制하는 것을 觀察하였다. 반면에 주니퍼오일 單獨 處理群에서는 正常 對照群과 유사한 結果를 보여 그 자체의 細胞毒性(cytotoxicity)은 없음을 알 수 있었다. 실제 주니퍼오일이 細胞生存率에 미치는 影響을 알아보기 위해 熱衝擊과 주니퍼오일을 처리한 12시간 후에 細胞를 trypan blue로 염색한 結果, 熱衝擊과 주니퍼오일이 동시에 처리된 群에서 熱衝擊과 單獨群에서보다 죽은 細胞 수가 약간 적었으나 有意性있는 差異는 없었다(data not shown).

- 神經膠 星狀細胞에서 주니퍼오일에 의한 細胞自滅死의 抑制 效果 -

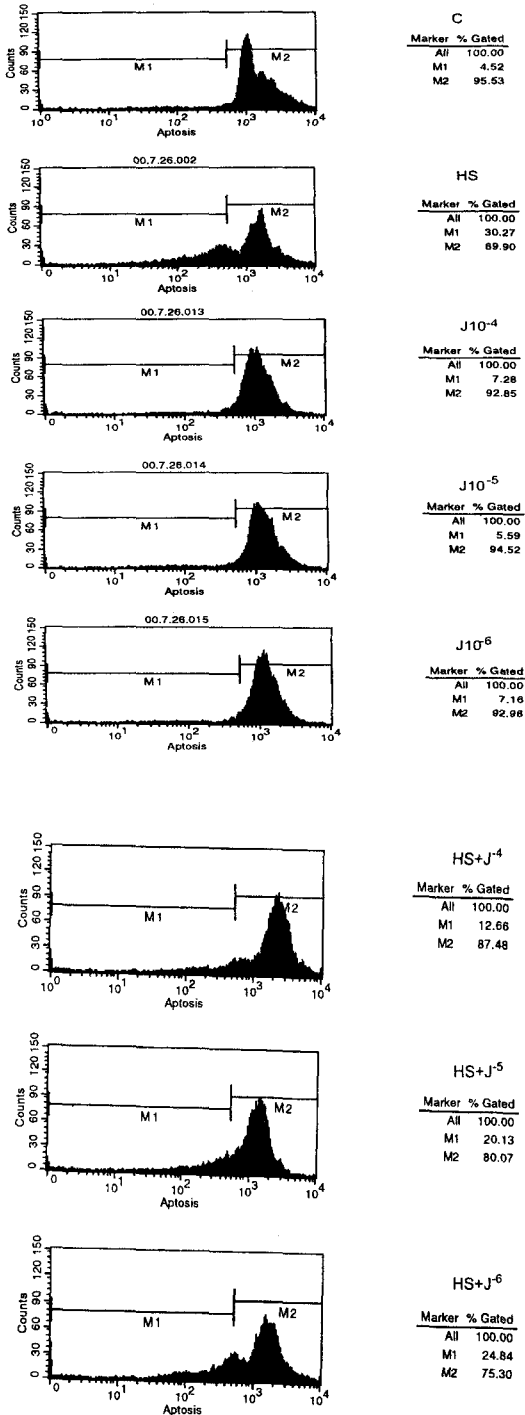


Fig. 1. Effect of juniper oil on the cell cycle distribution

of human astrocyte cells. The cells (2×10^6 cells/ml) were pretreated with juniper oil for 30min and then exposed to heat shock at 46°C for 30min and recovered at 37°C for 12hr. The cells were stained with PI solution and analyzed for DNA content by flow cytometry (see Materials and method). Data represent the result from one of three similar experiments.

2. CCF-STTG1 세포의 熱衝擊으로 유도되는 DNA 切片化 형성에 대한 주니퍼오일의 效果

Fig. 1의 유식 세포분석기 分析에서 觀察할 수 있었듯이, CCF-STTG1 細胞에 熱衝擊 單獨 處理에 의해 細胞自滅死을 유발하며, 주니퍼오일의 前處理로 熱衝擊에 의한 細胞自滅死을 抑制하였다. 이번에는 細胞自滅死의 전형적 특징인 DNA ladder형성에 있어서도 이러한 抑制效果를 보이는가 를 分析하기 위해 CCF-STTG1 세포에서 DNA를 分離하여 아가로스 겔 전기영동을 實施하였다. 그 결과, 熱衝擊 單獨 處理 群에서만 DNA ladder가 觀察되었고, 역시 주니퍼오일 이 前處理된 群에서는 熱衝擊에 의한 DNA 切片化가 觀察 되지 않았다(Fig. 2). 또한 주니퍼오일 單獨處理의 경우에는 對照群과 유사한 양상을 보였다(data not shown). 여기에서 DNA ladder는 internucleosomal chromatin이 조각난 것을 나타낸다.

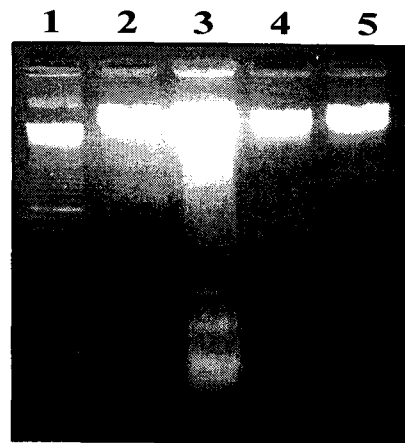


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA. Human astrocyte cells (1×10^6 cells/ml) were pretreated with juniper oil for 30min and then exposed to heat shock at 46°C for 30min and recovered at 3

7°C for 12hr. 20 μ g of DNA were electrophoresed in a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under UV illumination. Lane 1, maker; lane 2, control; lane 3, heat shock alone; lane 4, juniper oil alone(10⁻⁴ dilution); lane 5, heat shock plus juniper oil(10⁻⁴ dilution)

3. CCF-STTG1 세포의 熱衝擊에 의한 주니퍼오일 효과의 세포수준 觀察

주니퍼오일의 효과를 세포 수준에서 보다 실감있는 형태 관찰을 위해 Wright-Giemsa 염색실험을 수행하였다. Fig. 3에 제시한 바와 같이 熱衝擊에 의해 심하게 일어난 핵 크로마틴 응축이 주니퍼오일을 처리한 群에서는 觀察되지 않는다.

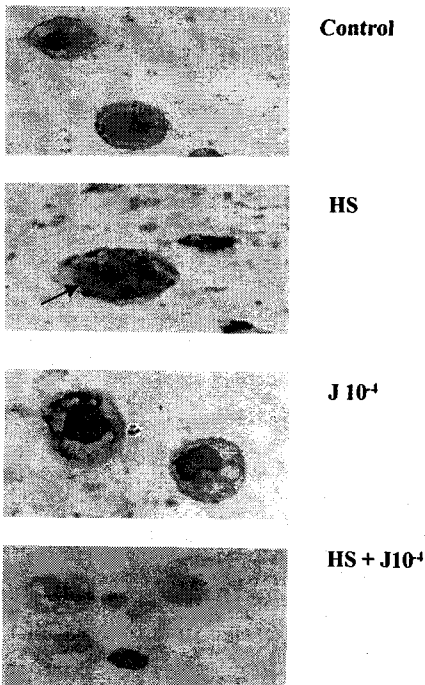


Fig. 3. Visualization of apoptosis in human astrocyte cells treated with medium alone (A) or heat shock alone (B) or juniper oil alone (C) or heat shock plus juniper oil (D) for 12hr. The cells(1 \times 10⁶cells/ml) were cytopspined, fixed in methanol, stained with Wright-Giemsa for the determination

of morphological and quantitative analysis of apoptosis, and photographed by microscope(\times 100). Note the apoptotic cells with highly condensed chromatin. HS, heat shock; J, juniper.

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

熱衝擊은 caspase-3(CPP32)의 活性을 통하여 細胞自滅死를 일으킨다^{16,17)}. 細胞自滅死 동안 細胞 內에서 일어난 여러 과정 중 初期에 作用하는 것이 바로 단백질분해효소의 一種인 caspase이다. 이것은 아스파르트산(aspartic acid) 잔기 뒤에서 잘려지는 cysteine 단백질분해효소이다. 이들이 사용하는 기질로는 포르딘(fordin), 라민(lamin), polymerase (PARP) 등이 있으며¹⁸⁾, 특히 caspase-3는 DNA repair에 사용되는 PARP를 잘라서 不活性化 시킨다. 이러한 細胞自滅 단백질분해효소의 活性에 주니퍼오일이 어떠한 影響을 미치는가를 조사하기 위해 Western blot 분석을 수행하였다. 유식 세포분석기, DNA 전기영동, Giemsa 염색실험 등에서 나온 結果와 마찬가지로 熱衝擊에 의해 caspase-3의 活性 역시 增加되었고, 또한 주니퍼오일에 의해 caspase-3의 活性이 抑制되었다(Fig. 4). 그리고 caspase-3의 活性이 增加함에 따라 그의 기질인 PARP가 89kDa 으로 잘려나가는 것을 觀察할 수 있었다. 이러한 結果는 주니퍼오일이 caspase-3의 活性의 抑制를 통하여 細胞自滅死를 調節한다는 것을 암시하고 있다.

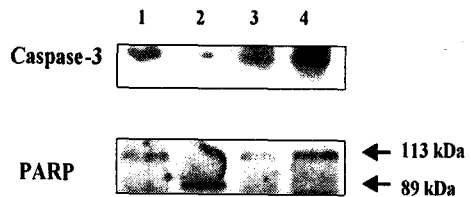


Fig. 4. Western blot analysis, 50 μ g of total protein were resolved by 15% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose paper, and analyzed by Western blotting using an anti-Caspase and PARP polyclonal antibodies. Arrows, position of each protein; lane 1, control; lane 2, heat shock; lane 3, juniper oil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

IV. 考 察

老化的 定義는 受精에서 죽음까지의 生體의 變化를 의 미함(aging)과 同時에 成熟期以後의 生體의 老衰 (senescence)現象을 表現하는 것으로 알려져 있다. 이같은 老化現象은 몸의 變化로 나타나는 構造 및 機能의 變化를 總稱하는 것으로 時間의 經過에 따라 일어나는 不可逆的 退行性的 性質을 가진 것으로 環境에 대한 適應力 低下로 결국 죽음의 確率이 늘어나는 現象이라고 할 수 있다¹⁹⁾.

이러한 老化에 대해 韓醫學에서는 陰陽五行에 따른 生長, 化, 收, 藏의 자연적 變化過程으로 認識하였으며, 陰陽과 氣血의 不調이나 精神感動의 惡影響, 臟腑의 變化 및 飲食의 不節制 등과 關聯시켜서 人間의 老化에 대해 說明하고 있다⁵⁻⁷⁾. 이와 관련된 記錄으로는 <靈樞·衛氣失常篇>⁷⁾에서 “人年五十以上爲老”라 하여 50세를 老化가 이루어지는 時期로 보았고, <靈樞·天年篇>⁷⁾에서는 五臟의 老化順序와 壽命이 百歲임을 말하였으며, <素問·陰陽應象大論>⁶⁾에서는 老化에 따른 각 臟器의 機能의 構造의 變化를, <靈樞·營衛生會篇>⁷⁾에서는 氣血變化에 의한 身體的 變化를, <素問·上古天真論>⁶⁾에서는 人間의 出生과 發育 成長 成熟 老化의 過程을 腎藏精氣의 盛衰로 說明하였다^{20,21)}.

한편 西洋醫學에서는 老化的 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 발생되는 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의 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 그 외에도 老化는 過去에 받은 스트레스 혹은 疾病의 總合이라는 스트레스說 등이 있다^{8,22)}.

老化에 따른 여러가지 身體的인 變化로는 특히 腦神經系統에서 腦의 重量이 年齡增加에 따라 60歲 以上에서 平均 100g이 減少하며, 老年痴呆의 경우는 100g 以上の 급격한 腦의 重量減少를 招來하고, 神經細胞數의 減少, 腦室의 擴大, 腦回轉의 萎縮, 神經軸索의 萎縮, Alzheimer形 神經原纖維의 變化, 細胞內 봉입체의 形成 등의 沈着物의 形成, 神經細胞內의 老化色素沈着, 老人性 神經斑, Lewy小體 등이 出現하는 組織病理學的 變化 以外에도 動脈內膜의 細胞增殖과 肥厚, 動脈內膜下層과 內彈力膜의 纖維化와 退行性變性등의 腦血管性 變化 그리고 Cholinergic系, Noradrenergic系, Dopamin과 같은 神經傳達物質의 減少 등은 生化學的 變化를 誘發시키는 것으로 알려져 있다^{8,23-26)}.

세포죽음(cell death)은 細胞의 生産과 消失에서 均衡을 이루어 一定한 모습의 個體를 유지하는데 필수적인 現狀일 뿐만 아니라 조직 및 기관의 發生과 成長過程에서도 많은 細胞들이 죽어가고 있다. 成熟한 細胞라 하더라도 一定期間 동안 機能을 수행한 후 老衰期를 거쳐 죽게 되는데 細胞의 壽命은 細胞에 따라 매우 다양하여 수일인 것에서 수십 년 또는 그 이상 개체의 壽命과 같이 하는 細胞도 있다. 즉 細胞의 죽음은 크게 두 가지로 區別되어 있는데 하나는 細胞自滅死(apoptosis)이고 다른 하나는 壞死(necrosis)로서 壞死와 細胞自滅死는 形態學的, 生化學的으로 差異가 있다. 계획된 세포죽음(programmed cell death)이라고 하는 細胞自滅死(apoptosis)는 高度로 調節된 過程으로서 모든 環境條件에서 遺傳子 發現(gene expression)의 變化로 發生하는 細胞自身の 破壞現狀이며, 身體의 構造的 平衡을 維持하는데 必須的으로서^{3,4)}, 이러한 細胞自滅死는 內部的 프로그램에 의해 保存되어 있으며 最終的으로 細胞의 自殺을 가져온다. 細胞自滅死 機能異常은 免疫缺乏證, 神經退化性疾患, 그리고 腫瘍과 같은 人間에게 해로운 여러 疾病을 가져올 수 있다²⁷⁾. 細胞自滅死는 正常成人의 組織에서 細胞의 恒常性 維持에 重要

한 役割을 하며²⁸⁾, 核·細胞質의 凝縮과 細胞質은 膨脹하지 않고 오히려 대다수 소기관들이 正常인 狀態로 容積이 줄어들며, 細胞表面의 膜이 細胞質속으로 陷入하여 細胞質을 여러 部位로 나누고, 이들이 다양한 形態의 조각으로 分離되는 이른바 apoptotic body를 形成하여 大食細胞나 隣接한 細胞에 의해 飽食 處理되는 過程을 거친다^{27,29)}. 또한 細胞自滅死와 聯關된 核의 凝縮은 180base pair 정도의 oligomer가 oligonucleosomal DNA 切片化의 結果로 觀察된다³⁰⁾. 반대로 細胞壞死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 주위 환경으로 터져 나오는 것을 일컫는다³¹⁾. 또한 細胞壞死는 炎症과 密接한 關係를 가지고 있으며 細胞의 浮腫, 미토콘드리아의 機能低下, 리소좀효소의 放出을 일으킨다³²⁾.

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의 多樣한 假說 中の 하나인 遺傳子說에 근거하고 있는데 이는 아직까지 老化의 原因이 명확하게 밝혀지지 않았기 때문이다.

杜松實¹²⁻¹⁴⁾은 노가지나무과에 속하는 상록교목인 노간주나무(*Juniperus rigida* Sieb. et Zucc.)의 익은 열매로서 神經安定, 鎮定, 祛風除濕, 鎮痛, 健胃, 祛痰, 抗菌作用이 있으며 神經性疾患, 關節炎, 痛風, 浮腫, 赤痢, 尿路生殖器疾患 등에 쓴다. 精油成分으로는 α -pinene, myrene, carene, limonene, p-cymene 등이 含有되어 있으며, 잎에는 amentoflavone, podocarpusflavone A, hinokiflavone 이 含有되어 있다. 최근 들어 自然療法의 하나로서 주목을 받고있는 香氣療法에서는 이러한 杜松實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 한다¹⁵⁾.

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, Chinchén은 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 관하여³³⁾, 李³⁴⁾는 神經膠星狀細胞의 細胞自滅死에 대한 Peppermint Oil의 效果에 대해 報告하였으나, 著者は Juniper oil이 腦神經 變化에 影響을 미칠 수 있을 것으로 示唆되어 熱衝擊으로 細胞自滅死를 일으켜 病的 老化를 誘發시킨 뒤, Juniper oil의 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 높게 열을 올려 충격 스트레스를 주는 것을 말하는데, 溫度는 細胞가 살아가는데 있어 아주 중요한 因子로서, 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 방위한다는 보고가 많이 발표되고 있다³⁵⁾. 또한 熱衝擊은 몇몇 단백질 인산화효소, 즉 ERK1, SAPK, p38 MAPK, MAPK kinase-2, 그리고 c-Src tyrosine kinase등을 活性化시킨다^{36,37)}.

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 4.52%의 細胞自滅死를 보였고 熱衝擊이 처리된 群은 약 30.27%의 높은 細胞自滅死 비율을 나타내었다(Fig. 1). 그러나 주니퍼오일을 前處理한 다음 熱衝擊을 가한 群은 10-4농도에서 12.66%, 10-5농도에서 20.13%정도의 細胞自滅死 비율을 보임으로써 주니퍼오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 顯著하게 抑制하는 것을 觀察할 수 있었다. 반면에 주니퍼오일 單獨 處理群에서는 正常 對照群과 유사한 結果를 보여 그 자체의 cytotoxicity는 없음을 알 수 있었다. 細胞自滅死의 典型的 特徵을 볼 수 있는 DNA ladder상에서도 이러한 結果를 觀察 할 수 있는데 DNA ladder는 internucleosomal chromatin이 조각난 것을 나타

내는 것으로서 熱衝擊 單獨處理 群에서만 DNA ladder가 觀察되었고, 역시 주니퍼오일이 前處理된 群에서는 熱衝擊에 의한 DNA 分裂이 觀察되지 않았다(Fig. 2). 또한 주니퍼오일 單獨處理의 경우에는 對照群과 유사한 양상을 보였다(data not shown). 그리고 細胞水準에서의 주니퍼오일의 影響을 觀察하기 위해 Wright-Giemsa 染色을 수행한 결과 핵 크로마틴 응축이 관찰되지 않았다(Fig. 3).

이밖에 熱衝擊은 caspase-3의 活成을 통하여 細胞自滅死를 誘發한다. 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 抑制하며, bax와 bcl-XS는 細胞自滅死를 促進하는 것으로 알려졌다²⁷⁾. 그리고 C. elegans에서 많이 연구되어진 Ced-3도 세포죽음에 필요한 因子로 알려졌다³⁸⁾. 현재까지 포유동물에서 Ced-3의 여섯 homologs가 동정되었는데 ICE, Nedd2, CPP32, ICERel II/TX/Ich-2, ICERel III, mch2 등이며³⁹⁻⁴¹⁾, 이들이 過多發顯 되면 細胞自滅死가 誘發되며 이들 蛋白質分解酵素 機能을 妨害함으로써 세포죽음을 억제할 수 있다. 특히 caspase-3는 DNA repair에 사용되는 PARP를 잘라서 不活性化 시키는데¹⁵⁻¹⁷⁾, PARP의 分解는 細胞自滅死의 標識者로 사용될 수 있다. 그러나 PARP가 knock-out된 쥐에서도 正常的으로 分化가 진행되는 것으로 보아 PARP의 分解가 細胞自滅死에 반드시 필요한 것은 아니다. 그러나 본 研究에서는 熱衝擊이 caspase-3의 活性을 촉진하며 그의 기질인 PARP가 잘려 나가는 것을 實驗에서 觀察할 수 있었으며 주니퍼오일의 前處理에 의해 caspase-3의 活性이 抑制되었다(Fig. 4). 그리고 caspase-3의 活性이 增加함에 따라 그의 기질인 PARP가 89kDa으로 잘려 나가는 것도 관찰할 수 있었다. 따라서 이들 결과는 주니퍼오일이 caspase-3의 활성을 통하여 細胞自滅死를 조절한다는 것을 암시하고 있다.

本人은 熱衝擊에 의한 caspase-3와 PARP의 활성도를 조사한 결과, caspase-3의 활성이 熱衝擊에 의해 증가하며 PARP 分解를 수반한다는 것을 확인하였고 또한 주니퍼

오일 前處理에 의해 이들 활성이 저하되었다. 따라서 이들 결과는 주니퍼오일이 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, 본 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 주니퍼오일에 의해 抑制된다는 사실은, 주니퍼오일이 사람의 腦疾患이나 老化 및 痴呆에 直, 間接적으로 좋은 治療效果를 發揮할 것으로 思料되나, 향후 腦疾患에 대한 臨床的 應用을 위한 研究가 더 많이 進行되어야 할 것으로 思料된다.

V. 結 論

本 研究에서는 주니퍼오일이 熱衝擊(heat shock)에 의한 스트레스로 생기는 사람의 腦 成상세포주인 CCF-STTG1 세포를 이용하여 細胞自滅死에 미치는 效果를 研究한 결과는 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 4.52%의 細胞自滅死를 보였고, 熱衝擊이 가해진 群은 약 30.27%의 높은 細胞自滅死 비율을 나타내었다.

2. 사람의 腦 星狀細胞인 CCF-STTG1 세포에 주니퍼오일을 前處理한 다음 熱衝擊을 가한 群은 10-4농도에서 12.66%, 10-5농도에서 20.13% 정도의 細胞自滅死 비율을 보임으로써 주니퍼오일이 熱衝擊에 의한 細胞自滅死를 顯著하게 抑制하는 것을 觀察하였다.

3. 주니퍼오일 單獨 處理群에서는 正常 對照群과 유사한 結果를 보여 오일 자체의 세포독성(cytotoxicity)은 없음을 확인하였다.

4. 주니퍼오일은 熱衝擊에 의한 腦 成상세포의 DNA 절편화를 抑制하였다.

5. 주니퍼오일은 熱衝擊에 의해 增加하는 caspase-3의 活性을 抑制하였으며, 이러한 結果는 주니퍼오일이 caspase-3의 活性을 통하여 細胞自滅死를 調節한다는 것을 암시하고 있다.

VI. 參 考 文 獻

1. 崔鎮浩 : 老化的 메카니즘과 研究方向, 生化學뉴스, 韓國生化學會,5(3):39-53, 1985.
2. 大韓皮膚科學會刊行委員會 : 皮膚科學, 서울, 麗文閣, p.23, 1994.
3. Ellis, R. E., Yuan, J., and Horvitz, H. R. (1991) Annu. Rev. Cell.Biol. 7, 663-698.
4. Steller, H. (1995) Science 267, 1445-1449.
5. 柳熙英 : 東醫精神科學, 서울, 慶苑文化社, pp.103, 116-119, 1983.
6. 洪元植 譯 : 黃帝內經素問解釋, 서울, 高文社, pp.37, 41-42, 1980.
7. 洪元植 譯 : 黃帝內經靈樞解釋, 서울, 高文社, pp.109, 234-235, 1982.
8. 徐舞圭 : 成人病, 老人病學, 서울, 高麗醫學, pp.10-14, 225-228, 1992.
9. 金명호 : 痴呆(Dementia)의 정의와 분류, 대한신경과 학회지, 3(1): 1-4, 1985.
10. G David Perkin, Fred H Hochberg : Atlas of clinical neurology 2nd edition, pp.6.2-6.4. London, Wolfe, 1993.
11. John Stirling Meyer : Medical Neurology 3rd edition, pp.175-180, New York, Macmillan Publishing Company, 1979.
12. 朴志賢 外 : 中國漢方醫藥大事典(4), 서울, 學文出版, p.172, 1995.
13. 安德均 : 原色 韓國本草圖鑑, 서울, 教學社, p.324, 1998.
14. 韓醫學大辭典 編纂委員會 : 韓醫學大辭典, 서울, 圖書出版 情談, p.389, 1998.
15. 이세희 : 아로마테라피, 서울, 도서출판 홍익재, pp. 161-164, 192-195,1995.
16. Mosser, D. D., and Martin, L. H. (1992) J. Cell. Physiol. 151,561-570.
17. Yonezawa, M., Otsuka, T., Matsui, N., and Kato, T. (1996) Int. J.Cancer 66, 347-351.
18. Cohen, G. M. (1997) Biochem. J. 326, 1-16.
19. 조유향 편저 : 노인병학, 서울, 현문사, p.43, 1995.
20. 魏明 外 : 眞氣와 養生抗老化, 서울, 一中社, 中醫雜誌,4:101-103, 1994.
21. 史秋海 : 試論女性老衰與天癸 腎的關係, 河北省, 河北中醫 18(5):2-3, 1996.
22. 이철완 : 이철완교수의 老人病研究, 서울, 一中社, pp. 130-150, 1997.
23. 黃義完外 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp. 256-271, 327-330,1992.
24. 이중달 : 그림으로 설명한 병리학, 서울, 高麗醫學, pp.752-753, 1991.
25. 리정복 : 長壽學, 평양, 科學百科事典出版社, p.41, 89, pp.64-68, 1987.
26. 이길상 : 世界長壽村探訪, 서울, 大光文化社, pp.199-203, 1978.
27. Thompson, C. B. (1995) Science 267, 1456-1462.
28. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Br. J.Cancer 26, 239-257.
29. Corcoran, G. B., Fix, L., Jones, D. P., Moslen, M.T., Nicotera, P., Oberhammer, F. A., and Buttyan, R. (1994) Toxicol. Appl.Pharmacol. 128, 169-181.
30. Wyllie, A. H. (1980) Nature (London) 284, 555-556.
31. Trump, B. F., and Ginn, F. L. (1969) in : E. Bajusz and G. Jasmin (Eds). Methods and Achievements in Experimental Pathology. Vol.4, Karger, Basel, p. 1.
32. Trump, B. F., and Berezsky, I. K. (1995) FASEB J. 9, 219-228.
33. 오홍근 : Essential Oil흡입에 대한 EAV측정치의 변화연구-Aromatherapy의 임상적응을 위한 예비연구, 서울, MERIDIAN, 6(1):4-14, 1996.
34. 李成律 外 : 神經膠 星狀細胞의 細胞自滅死에 있어서 박하오일의 效果, 東醫神經精神科學會誌, 7(1):77-94,

1996.

35. John, D. R., Kaushik, D., and James, P. K. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 164-168.
36. Dubois, M. F., and Bensaude, O. (1993) *FEBS Lett.* 324, 191-195.
37. Lin, R. Z., Hu, Z. W., Chin, J. H., and Hoffman, B. B. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 31196-31202.
38. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993) *Cell* 75, 641-652.
39. Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweig, E. A., and Yuan, J. (1993) *Cell* 75, 653-660.
40. Fernandes, A. T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 30761-30764.
41. Kumar, S., Kinoshita, M., Noda, M., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1994) *Genes Dev.* 8, 1613-1626.
42. 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.
43. Ferandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1995) *Cancer Res.* 55, 2737-2742.
44. 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.
45. 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.
46. Lazebnik, Y. A., Cole, S., Cooke, C. A., Nelson, W. G., and Earnshaw, W. C. (1993) *J. Cell Biol.* 123, 7-22.
47. 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 Apoptosis of Human Astrocytes by Juniper Oil

Taeheong Kim · Taeheon Kim
Sungryull Lee · Yeongsu Lyu

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

In previous studies, heat shock has been reported to induce the apoptosis or programmed cell death through the activation of caspase-3. I investigated the effect of juniper pure essential oil on the heat shock-induced apoptosis in human astrocyte cell line CCF-STTG1. Treatment of the astrocytes with heat shock markedly induced apoptotic cell death. However, pretreatment of the astrocytes with juniper oil inhibited the heat shock-induced apoptosis. To determine whether juniper 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 juniper oil. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), cysteine protease substrates were fragmented as a consequence of apoptosis by heat shock. Juniper oil inhibited the PARP fragmentation. This juniper oil also inhibited the heat shock-induced activation of caspase-3. These results suggest that juniper oil may modulate the apoptosis through the activation of the interleukin-1-converting enzyme-like protease.