동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 19. No. 2, 2008

蓮花香 정유액이 glioma cell에 미치는 효과

김인자, 이주연, 최방섭, 김근우, 구병수
동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of the Essential Oil of Nelumbo nucifera Flower on Glioma Cells

In-Ja Kim, Joo-Yeon Lee, Bang-Seob Choi, Geun-Woo Kim, Byung-Soo Koo
Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine DongGuk University

Abstract

Objective : Herb medicines are potential sources of useful edible and medicinal plants. They are used as a drug because of their various biological activities such as immunomodulatory, antiviral, and antitumor functions. Nelumbo nucifera have been applied in Chinese herbal prescriptions to improve tissue inflammation. However, it has not been elucidated on the effect of the flower of Nelumbo nucifera in cells.

Method : In the present study, to examine the effect of that on glioma cells, U87, the essential oil was extracted from the flower of Nelumbo nucifera (NN essential oil). U87 cells were exposed to different concentrations of 2-40 ug/ml of NN essential oil in ethanol. Cell viability was measured by MTT assay at 24 h. To find out the intracellular target signal molecule(s) for this antiproliferative activity of NN essential oil, phosphorylation of Akt, ERM, MAPK or p38 proteins were examined by Western blot analysis. To study long term effect of
NN essential oil in U87 cells, the image of cells treated with NN essential oil for 4 days were obtained.

Results and Conclusion :.
NN essential oil was shown to exhibit antitumor activity in glioma cells, at a broad range of concentrations of 10-40 ug/ml. The phosphorylation of Akt and Endoplasmic Reticulum Matrix (ERM) proteins which known to be involved in the cell death, were gradually decreased to 2 hours after addition 20 ug/ml of NN essential oil. However, the phosphorylation

투고일 : 6/9 수정일 : 7/6 채택일 : 7/15
* 교신저자 : 김근우 주소 : 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2번지 동국대학교 분당한방병원 신경정신과.
Tel : 031-710-3740 Fax : 031-710-3780 E-mail : kgwoo86@hanmail.net

of mitogen-activated protein (MAPK) and p38 was found to increase in NN essential oil treated cells. NN essential oil treated cells showed decreased glioma cell number.

These results provide a possible NN essential oil-induced inhibitory signal for tumor cell proliferation that is initiated by the decrease in Akt activity. Moreover, it is likely that the activation of p38 is required for the NN essential oil-induced inhibition of tumor proliferation.

Key Words : Nelumbo nucifera, Glioma cell, Western blot

Ⅰ. 緖 論

현대의학에서 암의 치료는 모든 세포를 죽인다는 개념에서 시작한다[1]. 지난 수십 년간 암을 정복하고자 하는 인류의 소망을 이루기 위해 기존의 치료방식인 수술요법, 방사선요법, 항암화학요법 등이 단독 혹은 복합으로 시도되었으나 아직 궁극적인 해결책에 이르지 못하고 있으며, 많은 연구자들은 이들 요법만으로 암을 정복하기에는 한계가 있다는 인식을 하고 있다. 이에 암을 정복할 수 있는 가능성을 지닌 새로운 치료법으로 기대를 모으고 있는 치료방식 중의 하나가 면역요법이다[2].

한의학에 있어서 암의 병리는 "正虛邪實, 氣滯血瘀, 臟腑失調, 濕痰凝聚, 毒熱內結"로 귀결된다[3]. 즉 암이라는 實證의 기저에는 《素門 · 評熱病論》[4]에 "邪之所湊, 其氣必虛", 《靈樞 · 百病始生篇》[5]에 "壯人無積, 虛則有之"라 하였듯이 正氣虛라는 인식이 깔려있다. 따라서 한의학의 암 치료 원칙은 정체관념과 변증론치의 원칙 하에서 扶正祛邪를 단계별로 실시하는 것이다. 즉, 《醫宗必讀 · 積聚》[6]에 "初者, 病邪初起, 正氣尙强, 邪氣尙淺, 則任受攻, 中者, 受病漸久, 邪氣較深, 正氣較弱, 任受且攻且補, 末者, 病魔經久, 邪氣浸凌, 正氣消殘, 則任受補."라 하였듯이 초기에는 瀉法 위주로, 중기에는 補法과 瀉法을 겸용하고 말기에는 補法 위주로 한다[7].

신경교종은 뇌와 척수의 내부에 있는 신경교세포에서 기원하는 종양으로서 반 이상이 악성이며 양성인 분화형 신경교종도 시간이 지나면 악성화 되는 경향이 있다. 또한 신경교종은 원발성 뇌종양의 약 50%를 차지하며, 대부분은 주위 정상 조직을 침투하여 자라고, 빠른 성장을 보이며, 수술로 완전 제거하는 것이 어렵다. 수술, 방사선치료, 화학요법 등 적극적인 치료에도 불구하고 대부분의 경우 단시간 내에 재발하며 예후가 나쁜 종양으로 매년 사망하는 예와 새로 진단되는 수가 비슷하다[8]. 임상증상은 발병부위에 따라 달리 나타나며 두통, 구토, 간질 등이 대표적이다[9].

근래에 유럽에서 심도있는 연구가 진행되고 있는 향기요법은 자연에서 추출한 향유를 이용하여 면역계를 활성화시켜 질병을 치료, 예방하는 자연치료의학의 하나다[10]. 향기요법에 관하여 《名醫類案》[11]에서는 許胤宗의 熏蒸法을 이용한 치료를 인용하여 "此非智者通神之法, 不能回也. 蓋人之口通乎地, 鼻通乎天, 口以養陰, 鼻以養陽, 天主淸, 故鼻不受有形而受無

形; 地主濁, 故口受有形而兼乎無形也." 이라 하여 그 원리를 설명하고 있다.

연꽃(*Nelumbo nucifera*)은 다년생 초본으로 睡蓮科(Nymphaeaceae)[12] 수생식물이다. 성질이 溫하고 甘味로 心, 肝에 歸經[13]하며 固腎, 澁精, 止血효능이 있다고 하여 遺精, 滑精, 頻尿, 遺尿, 吐血[14] 등의 증상에 써왔으며 《醫學入門》[15]에서는 연꽃의 효능을 "鎭心, 益氣色駐顔."이라 하였다. 그리고, 淸暑除熱 효능과 天疱瘡을 치료[13]한다고도 하였다.

현재까지 신경교종에 관하여 한의학적으로 이루어진 연구는 胡桃 약침의 신경교종 세포 유발 저산소증 방어효과에 대한 보고[16] 및 鬱金을 이용한 신경교종 등의 항암효과에 대한 동물실험 연구 보고[17] 등이 있다.

蓮花의 약물적 효능에 관한 보고는 蓮花에서 추출한 香의 흡입이 정신신경계에 미치는 영향에 관한 연구[18]에서 진통효과, 항경련효과, 항우울효과 등을 규명하였다. 그러나 蓮花香을 이용한 신경교종 세포 활성 억제에 관한 연구는 지금까지 없어, 이에 蓮花에서 추출한 향기 정유액을 배양 신경교종 세포에 투여한 뒤 MTT assay 및 Western blot 분석, 그리고 영상분석의 방법을 통하여 관찰한 결과, 암세포 증식 억제에 대한 유효한 성적을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

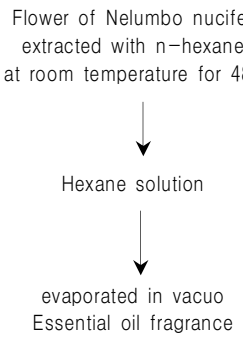
1. 材料

1) 약재

연꽃(*Nelumbo nucifera*, Nymphaeaceae, NN)은 경기도 고양시 소재 개인농원에서 4월에 채취된 것을 구입하여 사용하였으며 완전 건조된 꽃잎을 분쇄하여 분말로 만든 후 향기액을 추출하였다.

2) 香氣液의 製造

건조된 연꽃 87g을 분말로 만든 다음, *n*-hexane 2ℓ를 넣고 실온에서 48시간 방치하여 추출하였다 (Scheme 1). 방치하는 동안 자주 저어주면서 가능한 많은 精油香氣液이 추출되도록 하였다. 추출액을 여과한 다음, 여액중의 *n*-hexane을 증류하여 제거하고 암록색의 맑은 精油香氣液 (essential oil of NN) 1.3g을 얻었다. 세포주 실험을 위해 精油香氣液을 에탄올에 20 mg/ml 이 되도록 녹인 후 0.2 microne filter로 여과하였다.



Scheme 1. Preparation of the essential oil fragrance from the flowers of Nelumbo nucifera.

3) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 glioma U-87 세포는 Koean Cell Line Bank (KCLB; Korea)에서 구입을 하였다. 세포는 37°C, 5% CO^2 incubator에서 10 % Fetal Bovine Serum(FBS ; Sigma, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, USA)을 사용하여 배양하였다. 오염 방지를 위해 항생제로 100unit / ml penicillin, 100ug / ml streptomycin(Gibco/BRL, USA) (PS) 을 첨가하였다. Trypsin-EDTA(Gibco/BRL)를 처리하여 계

대 배양하였다. 배지는 2-3일 마다 교환하여 주었다.

2. 방법

1) 세포의 배양

glioma U-87 세포의 배양액은 DMEM + FBS 10%의(v/v) + PS 1%(v/v)를 사용하였으며 직경 100 nm 둥근 플레이트를 사용하여 세포를 증식하였다. Conflunence가 80%가 되었을 때 trypsin (0.5/100ml, 최종농도) 으로 세포를 회수한 후에 플레이트 당 2 x 10^6개씩 배양하였다. 세포배양조건이 37°C, 5%의 CO^2 조건에서 대개 2-3일 정도씩 소요되었다.

2) 세포활성도 측정(MTT assay)

신경교종세포 증식억제 효과를 측정하기 위해 MTT assay[19]를 시행하였다.

MTT assay는 우선 24 well plate에 glioma U - 87 세포(5x10^3cells / well)를 12시간 배양한 후 FBS를 첨가하지 않은 serum free medium, DMEM (Invitrogen) 으로 교환하여 4시간동안 안정화시키고, 1, 2, 5, 10, 20 및 50 ug/ml 농도로 향기액을 첨가하여 24시간 배양을 하였다.

그리고 3 - (4,5 - Dimethylthiazol - 2-yl)-2,5-diphenyl-tetra-zolium bromide(MTT. Sigma) 2mg / ml를 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma)로 용해시켜 590nm의 파장에서 microplate reader(Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 계산하였다.

세포활성도(Cell Viability, %)는 다음과 같이 정의를 하였다. 정상군의 값을 control로 하여 이때의 O.D. 값을 세포의 활성도가 100% 라고 정의하고, 나머지 군의 측정한 O.D. 값을 상대치로 환산하여 값을 얻었다. 즉, Cell Viability = 실험치 / control 군의 값이다.

연꽃의 향기액이 미치는 효과는 배양액에서의 약물의 농도를 기준으로 최소 2ug/ml에서 최고 50ug/ml를 포함하여 5개의 농도에서 실시하였다.

3) Western blot 분석법 [20]

연화향 정유액에 의한 신경교종 세포의 증식억제에 대한 효과를 측정하기 위해 각 세포주에 세포살상 효과가 중간 정도인 40ug/ml농도의 연꽃 추출액을 처리하고 이 세포들로부터 단백질을 추출하여 각 단백질에 대한 western blot을 시행하였다.

모든 세포 용해질들은 표본 완충제(62.5 mmol/1 Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2 - mercaptoethanol) 내에 boiling cell에 의해 만들어졌다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid (BCA, Pierce)법을 사용하였다. 정량된 단백질 시료 50 ug는 4 - 12% sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gradient gel (Invitrogen) 전기 영동법(SDS - PAGE)으로 분리되었고, nitrocellulose paper (Amersham) 로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막을 Ponceau-S로 염색하여 단백질이 완전하게 옮겨졌음을 확인하고 0.1 % Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline (TBS-T) 로 씻은 후 5% 탈지분유 액으로 30분 이상 blocking 하였다. 각 단백질은 항체와 함께 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후, blot을 2차 항체와 함께 1시간 반응시켰다. 2차 항체 반응 뒤 막을 씻고 enhanced chemiluminiscence system (ECL, Pierce)으로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비 (LAS-3000, Fuji)를 이용하였다.

① Akt 활성도 측정

연꽃 추출액에 의한 신경교종 세포의 증식 억제에 대한 효과를 측정하기 위해 단백질을 추출하여 p-Akt 항체에 대한 western blot을 시행하였다.

② ERM(Endoplasmic Reticulum Matrix)[21]단백질 활성도 측정

세포사멸에 관련된 또 다른 단백질로 세포골격에 영향을 미치는 것으로 알려진 ERM 단백질의 활성정도를 면역blot으로 시행하였다.

③ MAPK (mitogen activated protein kinase) 활성도 측정

신호전달 단백질 중 하나로 세포 증식, 분화 및 사멸에 중요한 역할을 하는 단백질인 MAPK의 활성화 정도를 인산화 특이 항체를 이용하여 관찰하였다.

④ p38 활성도 측정

연화향 정유액이 glioma 세포를 어떤 기전으로 사멸시키는가를 확인하기 위해 세포가 스트레스를 받거나 사멸 시 활성이 증가된다고 보고 되어있는 단백질 중 p38의 활성을 인산화 특이 항체를 이용하여 관찰하였다. 보통 세포사멸의 세포내 신호전달 체계는 세포가 사멸되기에 앞서 일어나므로 연화향 정유액을 처리한 후 5, 10, 30, 60분에 세포를 용해시켜 단백질을 추출한 후 면역blot을 시행하였다.

4) 형태학적 변화의 영상 분석

연화향 정유액이 신경교종 세포에 미치는 영향을 관찰하기 위해 세포의 형태학적 변화를 영상분석하였다. 500배 희석한 연화향 정유액을 처리한 신경교종세포를 1일과 4일이 지난 후, 세포의 형태학적 변화를 각각 광학 현미경 (Leica DMI 6000B)과 카메라(Leica DFC 480), image analysis program (Leica Q Win V3)을 이용하여 100배 배율로 관찰하였다. 그리고 檢液을 사용하지 않은 細胞株를 대조군으로 하여 각각 비교하였다.

Ⅲ. 實 驗 結 果

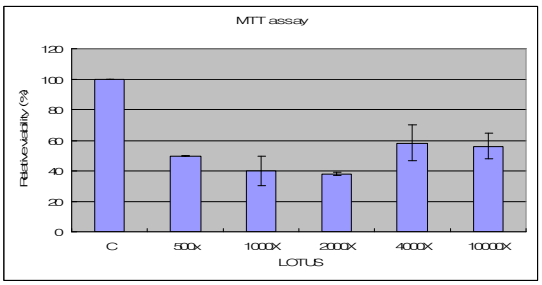
1. MTT 에 의한 세포 활성도 변화 측정

표1과 같이 희석한 연화향 정유액을 처리한 신경교종 세포를 24시간이 지난 뒤 MTT assay법을 이용하여 세포 활성도를 측정하고 그 결과를 표1 및 그림 1로 나타내었다. 표1 및 그림 1에서 보는 바와 같이 40 ug/ml에서 10 ug/ml 의 연꽃 추출액 농도에서 공히 세포 활성도가 50% 이하로 저하되었다. 그러나 5ug/ml 과 2ug/ml에서는 각각 58%, 56%의 활성도를 나타내었다. 특히 주목할 만 한 점은 40ug/ml에서 세포 활성도는 49.6%였고, 10ug/ml과 20ug/ml의 세포 활성도는 각각 39.9%, 37.9%였다.

Table 1. The Effects of Lotus Extracts on Glioma Cell Viability.

구분	농도	cell viability (%)
C	0 ug/ml	100
500x	40 ug/ml	49.57495
1000X	20 ug/ml	39.92584
2000X	10 ug/ml	37.85183
4000X	5 ug/ml	58.27526
10000X	2 ug/ml	56.01045

Fig. 1. The effects of NN essential oil on glioma cell viability.



2. Western blot 분석

1) Akt의 활성도 측정

40 ug/ml의 연화향 정유액을 신경교종세포에 처리한 후 인산화 특이 항체를 이용하여 Western blot 분석으로 Akt의 활성도를 측정하여 그 결과를 그림 2로 나타내었다. 그림 2에서 보는 바와 같이 연화향 정유액을 처리하지 않은 대조군에 비해 연화향 정유액을 처리한 신경교종세포의 Akt의 인산화가 저하되었으며, 시간이 지날수록 활성도가 감소하고 있다.

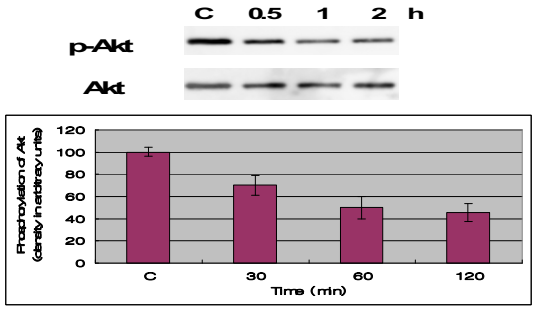


Figure 2. NN essentila oil suppressed Akt activity in glioma cells, U-87.
The data represent the means ± S.E. of three independent experiments.
C: Unstimulated U-87 cells.

2) ERM 단백질 활성도 측정

40 ug/ml의 연화향 정유액을 신경교종세포에 처리한 후 인산화 특이 항체를 이용하여 Western blot 분석으로 ERM의 활성도를 측정하여 그 결과를 그림 3으로 나타내었다. 그림 3에서 보는 바와 같이 연화향 정유액을 처리하지 않은 대조군에 비해 연화향 정유액을 처리한 신경교종세포의 ERM 단백질의 인산화가 저하되었으며, 시간이 지날수록 활성도가 감소하고 있다. 그러나 ERM 단백질의 양은 변화하지 않았으므로 이는 ERM 단백질의 인산화만 저하되었음을 시사한다.

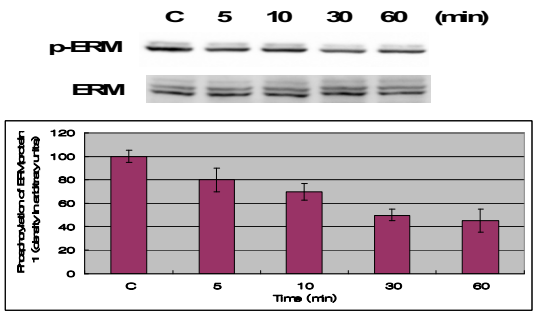


Figure 3. NN essential oil suppressed ERM proteins phosphorylation in glioma cells, U-87. The data represent the means ± S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated U-87 cells.

3) MAPK (mitogen activated protein kinase) 의 활성도 측정

40 ug/ml의 연화향 정유액을 신경교종세포에 처리한 후 인산화 특이 항체를 이용하여 Western blot 분석으로 MAPK의 활성도를 측정하여 그 결과를 그림 5로 나타내었다. 그림 5에서 보는 바와 같이 연화향 정유액을 처리하지 않은 대조군에 비해 연화향 정유액을 처리한 신경교종세포의 MAPK의 인산화가 증가되었다. 5분부터 활성도가 증가하기 시작해 10분에 최고치에 이르렀고, 30분부터 점차 감소하기 시작하였다.

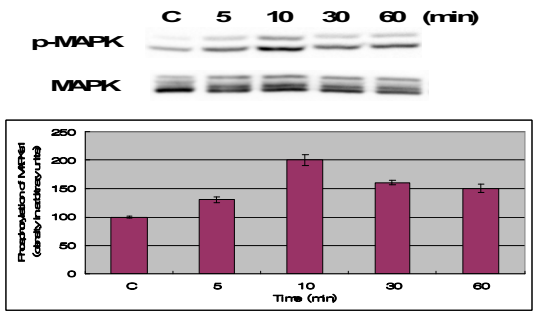


Figure 5. NN essential oil induce MAPKs phosphorylation in U-87 cells.
The data represent the means ± S.E. of three independent experiments. C: Unstimulated U-87 cells.

4) p38의 활성도 측정

40 ug/ml의 연화향 정유액을 신경교종세포에 처리한 후 인산화 특이 항체를 이용하여 Western blot 분석으로 P38의 활성도를 측정하여 그 결과를 그림 4로 나타내었다. 그림 4에서 보는 바와 같이 연화향 정유액을 처리하지 않은 대조군에 비해 연화향 정유액을 처리한 신경교종세포의 ERM 단백질의 인산화가 증가하였다. 그리고 p38의 인산화는 10분에 가장 많이 증가하였으며 30분부터 증가분이 감소하였다.

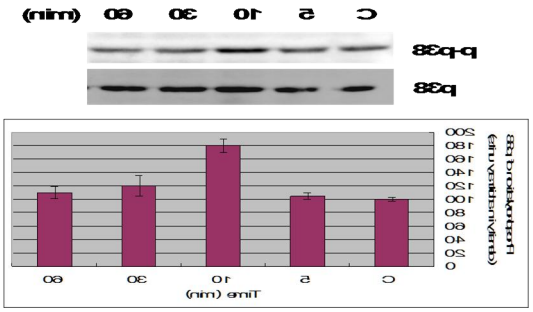


Figure 4. NN essential oil induced p38 phosphorylation in glioma cells, U-87. The data represent the means ± S.E. of three independent experiments.
C: Unstimulated U-87 cells.

3. NN essential oil 처리한 glioma cell의 영상분석

500배 희석한 연화향 정유액을 처리한 신경교종세포와 대조군의 세포를 1일과 4일이 지난 후 세포들의 형태학적 변화를 그림3으로 나타내었다. 그림3 에서 보는 바와 같이 연화향 정유액을 처리한 1일과 4일 경과 후 신경교종 세포의 형태학적 변화가 각각 크게 나타났다. 그리고 세포질 안쪽으로 검은색의 침착물이 생성된 것을 볼 수 있다.

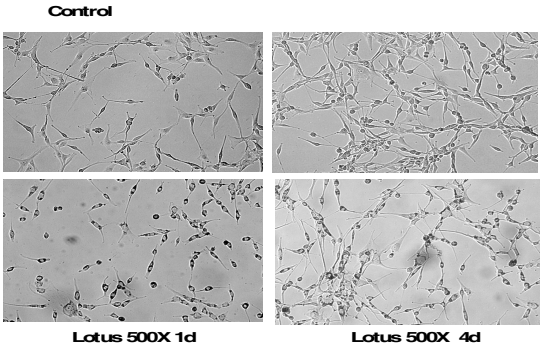


Fig. 3. 각 500배 희석한 연화향 정유액 (lotus)로 처리한 glioma cell의 사진.
C: Unstimulated U-87 cells.

Ⅳ. 考 察

과학기술의 발전에 따른 생활 및 의료수준의 향상에도 불구하고 산업발전에 따른 환경오염, 스트레스 증가, 발암물질에 노출 등 그 역기능 때문에 전세계적으로 암으로 인한 사망률이 증가하고 있다.[22,23)]

지난 수십 년간 암을 정복하고자 하는 인류의 소망을 이루기 위해 기존의 치료방식인 수술요법, 방사선요법, 항암화학요법 등이 단독 혹은 복합으로 시도되었으나 아직 궁극적인 해결책에 이르지 못하고 있으며, 많은 연구자들은 이들 요법만으로 암을 정복하기에는 한계가 있다는 인식을 하고 있다.

현대의학에서 암의 치료는 모든 세포를 죽인다는 개념에서 시작한다. 대부분의 항암제는 세포내 유전인자의 본체인 핵산의 합성을 억제하거나 핵산에 직접 결합하여 그 기능을 손상시킴으로써 효과를 나타낸다. 그러나 이들 항암제는 암세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포, 특히 세포분열이 활발한 조직세포에도 손상을 입히기 때문에 골수기능저하, 위장점막손상, 탈모증 등 여러 부작용이 나

타나게 된다. 또한 항암제는 항암효과 이외에 면역억제 작용이 있다.

한의학에서는 암과 일치하는 용어는 없지만 암에 대한 인식은 일직부터 있었다. 암에 대한 기술은 殷墟의 甲骨文에서 "瘤"라 하여 처음 나타나며, 이후《黃帝內經》[4,5]에서 積聚, 腸覃, 石瘕, 溜(瘤), 五臟之積,《外臺秘要》[24]에서積聚, 石癰 등 구체적으로 언급돼 있다[25-27].

한의학에 있어서 암의 병리는 正虛邪實, 氣滯血瘀, 臟腑失調, 濕痰凝聚, 毒熱內結로 귀결된다. 즉 암이라는 實證의 기저에는 《素門 · 評熱病論》에 "邪之所湊, 其氣必虛", 《靈樞 · 百病始生篇》에 "壯人無積, 虛則有之"라 하였듯이 正氣虛라는 인식이 깔려있는 것이다. 따라서 한의학의 암 치료 원칙은 정체관념과 변증론치의 원칙 하에서 扶正祛邪를 단계별로 실시한다. 즉, 《醫宗必讀 · 積聚》에 "初者, 病邪初起, 正氣尙强, 邪氣尙淺, 則任受攻; 中者, 受病漸久, 邪氣較深, 正氣較弱, 任受且攻且補; 末者, 病魔經久, 邪氣浸凌, 正氣消殘, 則任受補"라 하였듯이 초기에는 瀉法 위주로, 중기에는 補法과 瀉法을 겸용하고 말기에는 補法 위주로 한다.

한의학적 암 치료방법은 正氣補養 및 補血을 위주로 하면서 破積, 活血, 解鬱, 行氣 등의 治法[28,29]을 겸용한다. 따라서 한의학적으로 암을 치료할 경우 현대의학을 이용한 암 치료의 부작용이나 면역억제 반응은 나타나지 않을 뿐 아니라 오히려 면역기능은 증진된다.

신경교종은 뇌와 척수의 내부에 있는 신경교세포에서 기원하는 종양으로서 반 이상이 악성이며 양성인 분화형 신경교종도 시간이 지나면 악성화 되는 경향이 있다. 또한 신경교종은 원발성 뇌종양의 약 50%를 차지하며 종양을 구성하는 세포의 형태에 따라 성상세포종 (가장 악성인 교모세포종을 포함하면 원발성뇌종양의 25%정도를 차지), 핍지교세포종(원발성뇌종양의 약2.5%), 상의종(약2.5%), 맥락총 유두종(약0.5%), 수모세포종(약2.8%) 등으로 분류된다. 신경교종의 대부분은 주위 정상 조직을 침투하여 자라고, 빠른 성장을 보이며, 수술로 완전 제거하는 것이 어렵다. 수술, 방사선치료, 화학요법 등 적극적인 치료에도 불구하고 대부분의 경우 단시간 내에 재발하며 예후가 나쁜 종양으로 매년 사망하는 예와 새로 진단되는 수가 비슷하다. 임상증상은 발병부위에 따라 달리 나타나며 두통, 구토, 간질 등이 대표적이다.

신경교종에 대한 한의학적 치료는 肝腎陰虛, 肝風內動型, 脾腎陽虛型, 濕痰內阻型, 肝膽實熱, 瘀毒內結型 等 6가지로 분류하여 진행한다[30]. 특히 신생물은 《素問 · 至眞要大論》에 "堅者削之", "結者散之"라 하였듯이 消堅散結法을 겸해야만 한다.

일반적으로 한약은 약물의 기미와 경중에 따라 인체에 흡수됐을 때 상승, 또는 하강을 한다. 李杲[31]는 ",辛甘之藥滋胃, 當升當浮...", "溫熱氣....."味薄風藥, 升發以伸陽氣..."라고 하여 氣味가 溫熱,辛甘에 속한 약물은 상승한다고 하였다. 그리고 花葉류, 가벼운 질감, 酒炒의 약물들도 또한 상승작용을 한다[11].

또한 근래에 유럽에서 심도있는 연구가 진행되고 있는 향기요법은 자연에서 추출한 향유를 이용하여 면역계를 활성화시켜 질병을 치료, 예방하는 자연치료의학의 하나다. 향유는 휘발성이 강하고 지방에 잘 녹는 특성[32]이 있어서, 내복은 물론 흡입법, 확산법, 목욕법, 습포, 마사지 등의 방법 등을 이용하여 다양한 치료방법을 구사할 수 있다. 정유액 분자가 인체로 유입되는 경로는 후각로, 혈액운행경로, 그리고 피부를 통하는 경로[33] 등 다양하다. 따라서 연꽃향은 BBB(Blood-Brain Barrier)를 통과시키기 위해 용량을 과다 투여할 필요가 없다.

연꽃(*Nelumbo nucifera*)은 다년생 초본으로

睡蓮科(Nymphaeaceae) 蓮의 꽃이며 성질이 溫하고 甘味다. 心, 肝에 歸經하며《東醫寶鑑》[34]에서는 "蓮花 性煖無毒. 鎭心, 輕身駐顔, 入香甚妙. 一名佛座鬚, 卽蓮花蘂也. 蓮花蘂, 澁精氣"라 하여 마음을 진정시키고 몸을 가볍게 하며, 늙는 것을 방지할 뿐만 아니라, 향료에 넣어 쓰면 매우 좋다고 하였다. 연꽃은 固腎, 澁精, 止血효능이 있다고 하여 遺精, 滑精, 頻尿, 遺尿, 吐血 등의 증상에 써왔다. 《日華子諸家本草》[35]에서는 연꽃의 효능을 "鎭心, 益色駐顔."이라 하였고, 《日用本草》[35]에서는 "澁精氣."라 하였으며, 《滇南本草》[35]에서는 "淸婦人血逆昏迷."라 하였다. 그리고 《本草再新》[35]에서는 "淸心凉血, 解熱毒, 治驚癇, 消濕去風, 治瘡疥."[15]라 언급하고 있다.

蓮花 향기액의 정유 성분 중에서 함량이 0.7 % 이상인 성분은 모두 9종으로 에스테르류 5종, 불포화탄화수소류 2종 및 포화탄화수소류 2종이다. 이 가운데 에스테르류인 metylhexadecanoate가 가장 함량이 많았고 다음으로는 9,12 - methyloctadecadienoate로, 주성분은 방향성을 가진 에스테르류다[15].

蓮花의 약물적 효능에 관하여, 金[15]은 실험동물을 대상으로 蓮花 香氣液 흡입이 정신신경계에 미치는 영향을 검증하였다. 진통효과, 항경련효과, 항우울효과, 수면증강효과 및 기억증진효과를 조사하고 신경계와 관련된 효소들의 활성변화를 관찰하여 蓮花香이 파킨슨병, 노인성 우울증, 알츠하이머병, 불면 등의 신경정신과 분야에 효과가 있을 것으로 기대된다고 보고하였다.

그리고 蓮花 추출액이 염증반응을 억제시키는 효과[36]가 있는 것으로 알려져 있으며 그 기전으로는 말초혈중 단핵세포 (peripheral blood mononuclear cells)의 세포증식주기(cell cycle progression)를 변화시키고, 사이토카인 생성억제를 통해 항염증반응에 효과가 있다는 보고가 있다[37].

현재까지 신경교종 세포에 관하여 한의학적으로 이루어진 연구로는 胡桃 약침의 신경교종세포 유발 저산소증 방어효과에 대한 보고[13] 및 鬱金을 이용한 신경교종 등의 항암효과에 대한 동물실험 연구 보고[14] 등이 있었으나, 蓮花香을 이용한 신경교종 세포 활성 억제에 관한 연구는 없었다.

따라서 蓮花香 精油液이 신경교종 세포의 증식을 억제시켜 항암효과가 있는가를 알아보기 위해 본 연구에서는 MTT assay 법을 이용한 세포 활성도, Western blot 분석을 통한 세포생존 및 사멸에 관여하는 Akt, ERM, MAPK, p38의 활성화 정도, 영상분석의 방법으로 신경교종세포의 형태변화를 관찰하였고, 따라서 蓮花香에 의해 신경교종세포의 증식이 억제되었음을 알았다.

MTT assay 법을 이용한 세포 활성도는 연화향 정유액의 농도가 0%일 경우 신경교종세포의 활성도는 100%였으나 연화향 정유액을 신경교종세포에 처리했을 경우 모두 60% 이하의 세포 활성도를 나타내었다. 이는 넓은 범위의 연꽃 추출액 농도로 암세포를 사멸시킬 수 있다는 근거를 제시하는 것이다. 그러나 40 ug/ml에서 10 ug/ml 의 연화향 정유액 농도에서 공히 세포 생존율이 50% 이하로 저하되었지만 5ug/ml 과 2ug/ml에서는 각각 58%, 56%의 생존률을 나타내었다. 특히 주목할 만 한 점은 40ug/ml에서 암세포 생존률은 49.6%였고, 10ug/ml과 20ug/ml의 세포 생존률은 각각 39.9%, 37.9%였다. 이는 적어도 10ug/ml이상의 연꽃 추출액 농도가 되어야 50% 이상의 암세포를 사멸시킬 수 있고, 또 농도가 높을수록 암세포 사멸 확률이 높다는 것은 아니라는 것을 제시하는 것이다.

Akt는 단백질 세린/트레오닌 인산화 효소로서 세포생존과 세포대사에 관여하는 단백질 합

성을 조절하며, 세포사멸에 영향을 주는 다른 단백질 인산화효소를 조절하는 전사인자를 인산화 시킨다.[38] 기능은 뇌종양 및 신경교종을 포함한 다양한 암세포의 발생 및 진행에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 蓮花香에 의한 Akt 단백질의 인산화 억제는 암세포의 생존을 억제시켜 항암효과를 나타낼 수 있음을 시사한다. 40 ug/ml 농도의 연화향 정유액을 신경교종세포에 처리한 후 시간이 지날수록 Akt의 인산화가 저하되었다. 이 같은 결과는 Akt의 활성도가 연꽃 추출액으로 인해 낮아짐으로써 암세포가 증식을 하지 못하고 세포사멸로 유도되는 것을 나타내는 것이다.

ERM은 세포골격에 영향을 미치는 것으로 세포사멸에 관련된 또 하나의 단백질이다. 연화향 정유액을 처리하지 않은 대조군에 비해 연화향 정유액을 처리한 신경교종세포의 ERM 단백질의 인산화가 저하되었으며, 시간이 지날수록 활성도가 감소하였다. 그러나 ERM 단백질의 양은 변화하지 않았으므로 이는 ERM 단백질의 인산화만 저하되었음을 시사하며 암세포가 증식을 하지 못하고 세포 사멸로 유도되는 것을 나타내는 것이다.

그리고 MAPK 신호전달계는 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질 및 세포핵 내부로 전달하는 과정에 관여하는 대표적인 신호전달계이다. 특히 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸 등의 조절기전에 관여한다고 알려져 있다. MAPK 신호전달계의 군에는 p38도 포함돼있다.[39] MAPK의 활성화 정도를 인산화 특이 항체를 이용하여 관찰한 결과, 연화향 정유액을 처리하지 않은 대조군에 비해 연화향 정유액을 처리한 신경교종세포의 MAPK의 인산화가 증가되었다. 5분부터 활성도가 증가하기 시작해 10분에 최고치에 이르렀고, 증가분이 30분부터 점차 감소하기 시작하였다.

세포가 스트레스를 받거나 사멸 시 활성이 증가된다고 보고 되어있으며 MAPK 신호전달계 단백질 중 하나인 p38의 활성을 인산화 특이 항체를 이용하여 관찰하였다. 연화향 정유액을 처리하지 않은 대조군에 비해 연화향 정유액을 처리한 신경교종세포의 p38 단백질의 인산화가 증가하였다. 그리고 p38의 인산화는 10분에 가장 많이 증가하였으며 30분부터 증가분이 점차 감소하였다. MAPK와 p38의 인산화 증가는 항암 유전자인 p53의 발현을 촉진하는 등 암세포의 증식 억제를 의미하는 것이다.

본 연구에서 연화향을 처리한 신경교종세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과 세포 증식뿐만 아니라 연화향을 처리한 후 4일까지 배양했을 때 연화향 정유액을 처리한 신경교종 세포의 형태학적 변화가 대조군에 비해 크게 나타났다. 그리고 형태학적 변화는 1일 경과후보다 4일 경과 후의 변화가 크게 나타났으며, 세포질 안쪽으로 검은색의 침착물이 생성된 것을 볼 수 있었다. 이러한 침착물이 세포에 미치는 영향은 향후 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

이상의 결과로 볼 때 신경교종세포의 치료제로 연화향이 사용할 수 있는 가능성을 제시한다.

Ⅴ. 結 論

蓮花香 정유액이 Glioma Cell에 미치는 효과를 실험적으로 규명하기 위해 蓮花香 정유액을 Glioma Cell에 투여한 후 MTT assay 법을 이용한 세포 활성도 측정, 세포 생존 및 사멸에 관여하는 Akt 단백질의 활성화 정도 측정, 그리고 세포의 형태학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 蓮花香 정유액을 투여한 Glioma Cell의 활성도는 모두 억제되었으나 억제 정도가 농도에 비례하는 것은 아니었다. Glioma Cell의 활성도를 가장 효율적으로 억제하는 농도는 실험결과 10 ug/ml 농도였으며, 20 ug/ml 농도도 이와 거의 근접하였다.

2. 蓮花香 정유액을 투여한 Glioma Cell은 시간이 지날수록 Akt의 인산화 저하, ERM의 인산화 저하, MAPK의 인산화 증가 및 p38의 인산화 증가의 결과가 나타나 암세포의 증식이 억제되었다.

3. 蓮花香 정유액을 투여한 Glioma Cell의 수적 감소가 나타났고, 세포질에 검은 침착물이 생성되었다.

이상의 결과로 보아 연화향은 Glioma Cell에 대하여 항암효과를 나타내고 있으며 적정 농도로 투여할 때 그 효과는 증폭될 것임을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. 김경환. 이우주의 약리학 강의 제4판. 서울:의학문화사. 1997:633-6.
2. 서울대학교 의과대학편. 종양학. 서울:서울대학교 출판부. 2001:189.
3. 李家庚, 屈松柏 主編. 中醫腫瘤防治大全. 北京:科學技術文獻出版社. 1994:45,76.
4. 山東中醫學院 河北醫學院 校釋. 黃帝內經素問校釋. 北京:人民衛生出版社. 1982.
5. 郭靄春 編著. 黃帝內經靈樞校注語譯. 天津:天津科學技術出版社. 1989.
6. 傳世藏書·子庫·醫部 編委會 整理. 傳世藏書·子庫·醫部 6卷. 海南:海南國際新聞出版中心. 1995:9296.
7. 張伯臾 主編. 中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1985:188.
8. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울:대한신경외과학회. 2001:171-6.
9. 이광우 편저. 임상신경학. 서울:E*PUBLIC. 2006:427.
10. 주경옥. 향, 향수, 향기. 서울:세창출판사. 1995:168-171.
11. 구병수 역. 名醫類案. 서울:동국대학교출판부. 2005:17.
12. 신민교 편저. 임상본초학. 서울:영림사. 2000:504.
13. 江蘇新醫學院 編. 中藥大辭典. 上海:上海科學技術出版社. 1986:1804.
14. 葉顯純 主編. 中藥學. 上海:上海中醫學院出版社. 1985:132,725.
15. 李梴 編著. 醫學入門. 上海:上海科學技術文獻出版社. 1997:473.
16. Youn HM, Heo JY, Ahn CB. Effect of Juglans sinensis Dode extract on chemical hypoxia-induced cell injury in human glioma cells. 대한침구학회지. 2003;20(2):173-183.
17. 박상현. 울금의 폐암, 자궁암, 신경교종 및 전립선암에 대한 항암효과 연구. 경희대 대학원. 박사학위논문. 2006.
18. 김용래. 연화향 흡입이 정신신경계에 미치는 영향에 관한 연구. 동국대학교 대학원. 석사학위논문. 2004.
19. Sladowski. D, Steer. S. L, Clothier. R. H, and Balls. M. An improved MTT assay. J. Immunol. Methods. 1993;157:203-7
20. Jeong H, Koo H, Oh E, Chae H, Kim C, Cho K, et al. Nitric oxide production by high molecular weight water soluble

chitosan via nuclear factor-kappaB activation. Int J Immunopharmacol. 2000;22:923-33.
21. 의학계열 교수 27인 공역. 의학 생리학 제10판. 서울:정담. 2002:14.
22. 서울대학교 의과대학편. 종양학. 서울:서울대학교 출판부. 1992:1-3,31-44.
23. 김정순. 疫學原論. 서울:신광출판사. 1990:233-254.
24. 王燾撰. 四庫醫學叢書 外臺備要方. 上海:上海古籍出版社. 1991:736-396.
25. 郁仁存. 中國腫瘤學. 北京:科學技術出版社. 1990:233-254.
26. 嚴世芸 主編. 中醫學術史. 上海:上海中醫學院出版社. 1989:289.
27. 顧伯華 主編. 實用中醫外科學. 上海:上海科學技術出版社. 1985:148.
28. 錢伯文. 腫瘤的 辨證施治. 上海:上海科學技術出版社.
29. 李岩. 腫瘤病. 北京:人民衛生出版社. 1982:2-8.
30. 許濟群 主編. 方劑學. 上海:上海科學技術出版社. 1983:1-10.
31. 李杲撰. 脾胃論. 沈陽:遼寧科學技術出版社. 1997:4,6.
32. 박용익 역. 실용 아로마테라피. 서울:역락. 2003:28.
33. 고혜정, 김연주외 2인 옮김. 홀리스틱 테라피스트를 위한 아로마테라피. 서울:군자출판사. 2005:30-2.
34. 許浚 編著. 東醫寶鑑. 北京:中國中醫藥出版社. 1995:870.
35. 嚴世芸 主編. 中國醫籍通考 第1卷. 上海:上海中醫學院出版社. 1990:1087,1227,1256,1281.
36. Mukherjee. P. K, Saha. K, Das. J, Pal. M. and Saha. B. P. Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of *Nelumbo nucifera*. *Planta Medica.* 1997:63 4,367 - 9.
37. Chih-Peng Liu, Wei-Jern Tsai, Yuang-Lian Lin, Jyh-Fei Liao, Chieh-Fu Chen, and Yuh-Chi Kuo. The extracts from *Nelumbo Nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. Life Sci. 2004;75(6):699-716.
38. 대표역자 정병갑. 분자세포생물학 제2판. 서울:한우리. 2002:506.
39. 심재영, 조현철외 2인. 봉약침액이 RAW264.7세포의 COX-2, P38, ERK 및 JNK에 미치는 영향. 대한약침학회회지. 2003;6(2):86.