동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 20. No. 4, 2009

當歸 香氣液이 Rat의 뇌신경줄기세포의 分化와 增殖에 미치는 영향

박세환, 강재현, 정영수, 김근우, 구병수
동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실

The Effect of an Essential Oil Fragrance from *Radix Angelica Sinesis* on Differentiation and Proliferation of Neural Stem Cells of Rat

Se-Hwan Park, Jae-Hyun Kang, Young-Su Jung, Geun-Woo Kim, Byung-Soo Koo
Dept. of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Dong-Guk University

Abstract

Objectives :
In this study, an essential oil fragrance from Danggwi was administrated into the neural stem cell and the effect of the essential oil on the differentiation and proliferation of the neural stem cells were observed.

Methods :
The establishment of the neural stem cell was identified via Nestin, DAPI dye. An essential oil fragrance from Danggwi was administrated with a proved optimum level for the survival of the cell through MTT assay. Also, according to the analysis of Western blot, the essential oil fragrance from Danggwi promotes the phosphorylating of Akt, Erk, ERM protein.

Results :
MTT assay showed increased in GFAP. The result indicates that the differentiation to astrocyte is promoted. The phosphorylation levels of ERM, Erk and Akt were increased at 60 min after addition of 5 ug/ml of essential oil fragrance from Danggwi and sustained to 48 hours. These imply that essential oil fragrance from Danggwi may induce the survival and the proliferation of the differentiated cells.

투고일 : 11/6 수정일 : 11/30 채택일 : 12/1
교신저자 : 구병수, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 일산한방병원 신경정신과
Tel : 031-961-9140, Fax : 031-961-9009, E-mail : koobs@dongguk.ac.kr
이 논문은 2009년 2월 동국대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학 전공 석사학위 논문임

Conclusions :
These results suggest that the essential oil fragrance from Danggwi can be effective for the in vivo study of degenerative neuronal disease using neural stem cell.

Key Words :
Neural stem cell, Danggwi, Essential oil, Degenerative neuronal disease

Ⅰ. 서 론

줄기세포는 태생기 전능세포(pluripotent cell)를 지칭하는 것으로 이는 어떤 조직으로도 발달 할 수 있는 세포를 의미한다.[1] 이는 몸 안에 있는 다른 세포와는 분명히 차이가 있으며 3가지 특성을 가지고 있다. 즉 줄기세포는 장기간 동안 자신이 스스로 분열하고 증식하는 능력이 있으며, 줄기세포는 항상 미분화 상태를 유지하고, 조건이 주어지면 특수한 기능성 세포로 분화할 수 있다[2].

신경줄기세포는 성체 및 배아 줄기세포에서 모두 유래되는데 이를 이용하여, 뇌졸중, 척수손상 및 신경퇴행성질환 등의 치료에 사용될 수 있다[3,4].

성상세포(Astrocyte)는 신경교세포(glial cell) 중 가장 수가 많은 세포로[5,6] 신경계의 항상성 유지, 성장인자와 대사물질의 공급을 담당한다고 알려져 있다[7]. 성상세포는 또한 조직 손상 시 뇌의 반응을 조절하는데 중요한 역할을 하며 이들의 활성화가 알츠하이머병과 같은 신경 질환뿐만 아니라 뇌졸중이나 정신적인 충격과 연계하는 기전에도 관여 한다[8-10]. 이 밖에도 여러 가지 자극에 반응하여 inflammatory cytokine과 신경 성장인자를 생성, 분비함으로써 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있다[11].

향기요법은 다양한 천연식물에서 추출한 천연향유성분(essential oil)을 질병의 치료와 예방에 이용하여 신체적, 정신적 건강을 도모하는 것으로[12,13] 한의학에서는 현대의 향기요법과 같은 정제된 방향성 정유를 이용한 치료법에 대한 구체적 언급을 한 것을 찾아보기 어렵지만, 쑥을 이용한 熏法이 古來로부터 사용되어 왔고[14] 『素門·金匱眞言論』[15]에서 '東方靑色 入通於肝 其臭臊, 南方赤色 入通於心 其臭焦, 中央黃色 入通於脾 其臭香, 西方白色 入通於肺 其臭腥, 北方黑色 入通於腎 其臭腐'라 하여 五臟과 香臭와의 관계를 밝혀 놓았다. 서양에서의 향기요법은 주로 면역계를 활성화시키거나 신경계에 작용하여 신체를 건강하게 하고 마음과 정서를 안정시키는 작용을 한다고 보고 있다[16]. 후각에 대해 서양의학적으로 알려진 부분은 후각자체보다는 후각의 자율신경계 조절과 정서적 행동에 미치는 영향이다. 또한 최근의 이론에 의하면 후각반응은 시간적, 공간적 요소도 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다[17].

當歸(Angelica Gigantis Radix)는 산형과(Umbelliferae)에 속하는 다년생 초목인 참당

귀(Angelica Gigas Nakai)의 뿌리를 건조한 것으로 補益藥중에서 補血藥의 대표약이다[18].

당귀의 효과에 대한 연구에서 임 등[19]은 당귀약침액의 항산화효과, 전 등[20]은 허혈성 뇌손상의 억제 및 신경세포 보호효과가 있음을 보고하였다.

천연약물을 이용한 신경줄기세포의 증식과 분화에 관한 연구들로는 張[21], 單[22], 繆[23], 司[24], 劉[25] 등의 연구를 찾아볼 수 있다.

파킨슨병, 알츠하이머병, 근위축성축삭경화증 등의 중추신경계 질환은 특정 신경세포의 영구적 손실에 의해 초래되며 이러한 중추신경조직은 스스로의 회복이 제한되어 있어 아직까지 근본적인 치료법이 없는 실정이며 줄기세포를 이용한 치료에 가장 우선적으로 고려되고 있는 질환이다[26].

이에 본 저자는 기존의 연구들을 기초로 퇴행성 신경질환에 관한 in vivo 실험을 하기에 앞서 당귀 향기액을 in vitro에서 신경줄기세포에 처리하고 여러 지표 등을 측정한 결과 당귀 향기액이 신경줄기세포의 분화촉진에 유의한 효과가 있음을 관찰할 수 있었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실 험

1. 재료

1) 동물

발생 14일 된 Sprague-Dawley rat의 전뇌부분을 얻어서 뇌막을 완전히 제 거했다.

2) 當歸 香氣液 조제

실험에 사용한 당귀는 제천산 참당귀(Angelicae Gigantis Radix)로 경동시장에서 구입하였다.

당귀 1 kg을 분말로 만든 다음, n-hexane 2 ℓ를 넣고 실온에서 48시간 방치하여 추출하였다. 방치하는 동안 12시간마다 1번씩 저어주면서 가능한 많은 精油 香氣液이 추출되도록 하였다. 추출액을 여과한 다음, 여액인 n-hexane을 증류하여 제거하고 황갈색의 맑은 精油 香氣液 29.7 g을 얻었다(Fig. 1).

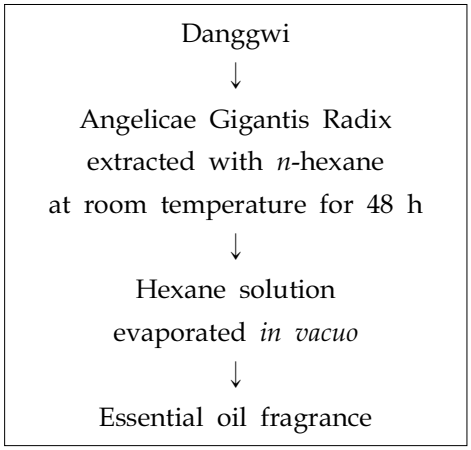


Fig. 1. Preparation of the essential oil fragrance from Angelicae Gigantis Radix.

2. 방법

1) 신경줄기세포의 배양 및 계대배양

발생 14일 된 rat의 전뇌부분을 얻어서 뇌막을 완전히 제거한 후 준비된 조직에 10 ug/ml의 DNase I (Invitorgen, USA)과 0.025% trypsin (Invitorgen, USA)을 처리하고, 상온에서 5분간 반응시켰다. 여기에 10 ml의 10% FBS(Invitorgen, USA)가 포함된 DMEM/F12(Gibco, USA)을 넣어 trypsin(Invitorgen, USA)활성을 저해한 후, 1000 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 이후 상층액을 제거하고, HBSS(Invitorgen, USA)로 씻어준 후 피펫을 이용하여 조직을 잘 풀어주어 단일세포를 얻었다. 얻어진 세포는 10% B27 supplement, 40 ng/ml bFGHF, EGF

(Invitorgen, USA)가 포함된 DMEM/F12에서 배양하였다. 3-4일마다 새로운 배지로 교체하여 배양하였다. 배양된 신경구는 6-7일마다 0.025% trypsin을 처리하여 단일세포로 만들어 준 뒤, 105 cells/ml의 밀도로 계대배양하였다.

2) 신경줄기세포의 형광염색

신경줄기세포의 확인을 위해서 Nestin[27] 발현을 위한 포매염색과 DAPI[28](4-6-diamidino-2-phenylindoline) 염색을 이용하였다.

3) MTT assay

MTT(tetrazlium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 -diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA) assay는 Sladowski의 방법[29]을 따라 행하였다.

當歸香에 의한 신경줄기세포의 증식능을 알아보기 위해 10 ㎍/ml의 poly-L-ornithine을 24 well plate에 coating하고, 신경구를 4시간 동안 안정화시키고, 여러 농도의 당귀향을 첨가하여 7일 동안 배양하였다. 그리고 MTT 용액을 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethysulfoxide (DMSO; Sigma, USA)로 용해시켜 580 nm의 파장에서 microplate reader (Molecular divices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

세포 생존율 (Cell viability, %)은 다음과 같이 정의를 하였다. 정상군의 값을 control로 하고 이때의 O.D. 값을 세포의 생존도가 100%라고 정의하고, 나머지 군의 측정한 O.D. 값을 상대치로 환산을 하면 다음과 같다.

Cell viability
= (실험군 값/ 정상군 값) * 100

4) 신경줄기세포의 분화양상관찰

MTT assay를 통한 세포활성도 결과 5 ㎍/㎖ 농도의 當歸 香氣液을 신경줄기세포가 확립된 plate에 처리하였으며, 분화양상을 살펴보기 위하여 Nestin[27], tau[30], GFAP(Glial fibrillary acidic protein)[31] 등 각각의 표지자를 관찰하였다.

5) Western blot analysis

當歸 香氣液에 의한 신경교세포의 활성도에 대한 효과를 측정하기 위해 각 세포주에 5 ㎍/㎖농도의 當歸 香氣液을 처리하고 이 세포들로부터 10 min, 30 min, 1 h, 24 h, 48 h의 각 시간대에 단백질을 추출하여 Akt[32,33], Erk[34], ERM[35] 등의 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, USA)법을 사용하였다. 정량된 단백질 시료 50 ㎍는 4-12% sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gradient gel (Invitrogen, USA) 전기영동법(SDS-PAGE)으로 분리되었고, nitrocellulose paper (Amersham, USA) 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 blocking하였다. 각 단백질은 항체와 함께 4^{0}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, USA)으로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비 (LAS

-3000, Fuji, Japan)를 이용하였다.

(1) Akt 활성도 측정

當歸 香氣液에 의한 신경줄기 분화세포의 증식과 생존에 대한 효과를 측정하기 위하여 단백질을 추출하여 p-Akt 항체에 대한 Western blot을 시행하였다.

(2) Erk 활성도 측정

當歸 香氣液에 의한 신경줄기 분화세포의 분열과 분화, 생존, 침습 및 전이 등에 대한 효과를 측정하기 위하여 단백질을 추출하여 p-Erk 항체에 대한 Western blot을 시행하였다.

(3) ERM 활성도 측정

세포사멸과 관련된 또 다른 단백질로서 세포골격에 영향을 미치는 것으로 알려진 ERM 단백질의 활성정도를 p-Erk 항체에 Western blot을 통해 관찰하였다.

6) Data 분석 및 통계처리

모든 측정값은 평균값 표준편차(mean±S.D.)로 표시하였고, 각 실험군간의 통계학적 분석은 window용 SPSS Program의 one-way ANOVA 방식으로 시행하였으며, 사후 검증은 Tukey test를 통해 검증하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 p값이 0.05이하인 경우에 유의한 것으로 인정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 신경 줄기 세포 분리 및 신경구 형성확립

1) 신경구 형성확립

Basic fibroblast growth factor(bFGF)와 epidermal growth factor(EGF)가 첨가된 배지를 이용하여 배양한 결과 신경줄기세포가 선택적으로 증식되면서 신경구[46]를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

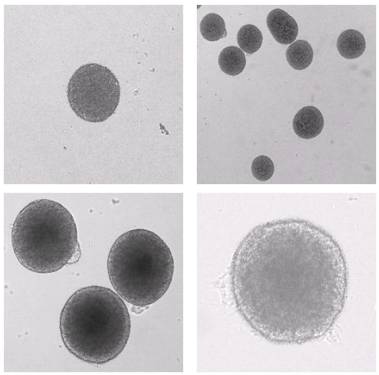


Fig. 2. Establishment of neurosphere from neural stem cell.

2) 형광염색을 통한 신경구의 줄기세포 능력 확인

신경줄기세포의 표지자로 알려진 Nestin의 발현을 위한 염색과 핵표지자인 DAPI 형광염색을 통해 관찰함으로써 신경줄기세포로서의 능력을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

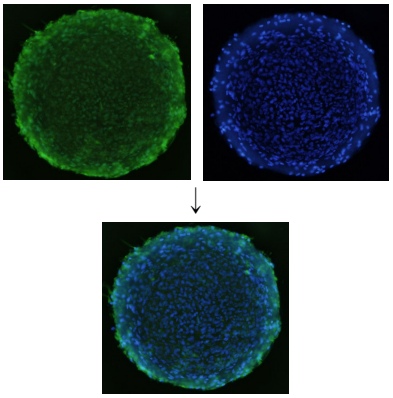


Fig. 3. A - Nestin dye, B - DAPI dye, C - A+B.

2. MTT assay

MTT assay를 통한 세포 활성도 측정에서

當歸 香氣液의 농도를 5 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 20 ㎍/㎖으로 각각 처리하여 세포의 활성도를 측정한 결과 5 ㎍/㎖에서 최대의 세포활성도가 측정되었으며 10 ㎍/㎖, 20 ㎍/㎖에서는 대조군에서보다 저하되는 결과를 보였다(Table Ⅰ, Fig. 4).

Table Ⅰ. The Effect of Essential Oil Fragrance from Danggwi on Proliferation of Primary Neuronal Cell

Group	Ave.	STDEV
C	1.034	0.040
당귀 (5 ug/ml)	1.240	0.105
당귀 (10 ug/ml)	0.005	0.001
당귀 (20 ug/ml)	0.008	0.001

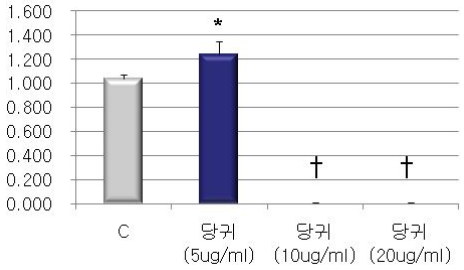


Fig. 4. The effect of essential oil fragrance from Danggwi on proliferation of primary neuronal cell.
C : None-treated primary neuronal cell
*p<0.01 compared with None-treated primary neuronal cell.
†p<0.01 compared with None-treated primary neuronal cell.

3. 단백질 발현을 통한 當歸 香氣液에 대한 신경 줄기 세포의 변화

當歸 香氣液을 신경 줄기 세포에 처리한 결과 신경 줄기 세포 표지자인 Nestin의 발현이 현저히 감소하였으며, 신경세포 표지자인 Tau의 발현 역시 감소하였다. 그러나 성상세포의 표지자인 GFAP의 발현증가가 확연하게 드러나는 것으로 보아 이미 신경줄기세포가 성상세포로 분화하여 발현이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

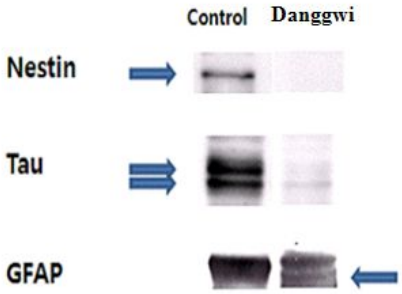


Fig. 5. Protein analysis after administratin essential oil fragrance from Danggwi.

4. Western blot 분석

當歸 香氣液을 신경줄기 세포에 처리하였을 때, 인산화 과정을 통해 세포의 생존, 증식, 성장, 분화 및 운동성에 영향을 주는 단백질들의 인산화 촉진 효과를 관찰하였다.

1) Akt의 인산화 촉진 효과

當歸 香氣液을 처리한 경우 BAD, Caspase-9 등 여러 apotosis machinery를 인산화 하여 그 활성을 억제[32,33]함으로써, growth factor에 의한 신경세포의 생존에 중요한 역할을 하는 Akt의 인산화 작용을 촉진하는 것으로 當歸 香氣液 처리 후 30분 이후로는 지속적으로 인산화작용이 일어나며, 1시간에 최대의 인산화 촉진 작용이 나타남을 알 수 있다. 또한 24시간, 48시간 후에도 지속적으로 인산화 과정이 활발하게 이루어지고 있음을 알 수 있다(Fig. 6).

2) Erk의 인산화 촉진 효과

當歸 香氣液을 처리한 경우 세포의 분열과 분화, 생존, 침습, 전이에 중요한 역할을 하는 Erk의 인산화 작용을 촉진하는 것으로 관찰되었으며 처리 후 10분 후부터 인산화가 활발하게 진행되며 1시간 후 최대의 효과를 보인다. 그러나 24시간이 지나면서는 오히려 인산화과정이 둔화됨을 보였다(Fig. 7).

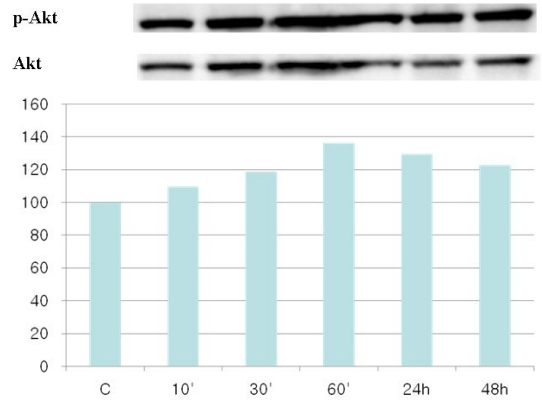


Fig. 6. Essential oil fragrance from Danggwi induces phosphorylation of AKT in differentiated neural stem cell.
C : None-treated primary neuronal cell

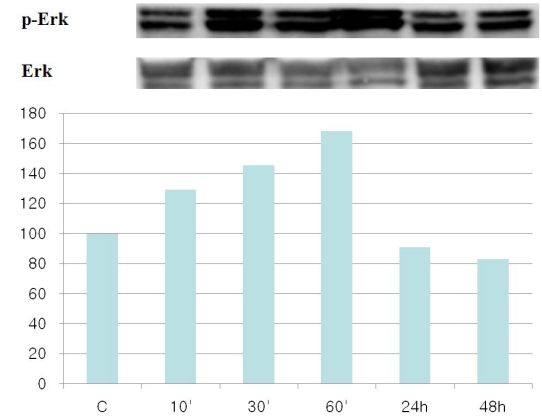


Fig. 7. Essential oil fragrance from Danggwi induces phosphorylation of Erk in differentiated neural stem cell.
C : None-treated primary neuronal cell.

3) ERM의 인산화 촉진 효과

當歸 香氣液을 처리한 경우 세포고정, 세포막의 파상운동과 융모의 형성 등에 영향을 미치는 ERM의 인산화 작용을 촉진하는 것으로 관찰되었으며 처리 후 1시간에서 최대의 인산화 작용이 관찰되었으며 그 이후로도 지속적으로 인산화 과정이 나타나고 있음을 알 수 있다(Fig. 8).

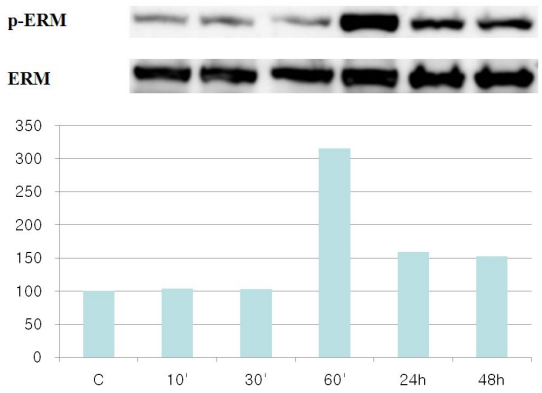


Fig. 8. Essential oil fragrance from Danggwi induces phosphorylation of ERM in differentiated neural stem cell.
C : None-treated primary neuronal cell.

Ⅳ. 고 찰

배아 줄기세포는 심근세포, 췌장세포, 골세포, 혈관세포 등으로 분화할 수 있으며 이 중 신경줄기세포(neural stem cell)는 다양한 부위와 발생과정에서 자가 증식하며 모든 신경계통의 세포로 분화할 수 있는 세포이다[36]. 신경줄기세포는 뇌의 부위에 따라 각기 다른 종류의 줄기세포를 가지고 있으며 성인의 중추 신경계 뿐만 아니라 말초신경에서도 분리 된다[3,4]. 보통 신경줄기세포는 포유동물의 배아 중추신경계 기저앞뇌, 해마, 소뇌, 대뇌피질과 성체의 중추신경계 뇌실아래 구역과 해마에서 분리될 수 있다[37-39].

신경줄기세포는 basic fibroblast growth factor(bFGF)와 epidermal growth factor(EGF)가 첨가된 배지를 이용하면 신경줄기 세포가 선택적으로 증식되면서 신경구를 형성하게 되는데[40] 신경구에는 신경세포와 신경교를 포함하고 있으며 이러한 신경구는 계속해서 새로운 신경구를 형성하게 된다[41].

이러한 신경줄기세포가 제대로 분화되었는가를 확인하기 위해서는 각각의 고유한 세포표면 항원이나 특정 발현물질이 나타나는지 확인하여야 하며 가장 많이 사용되어지는 것은 intermediated filament의 일종인 Nestin이다[42-44]. Nestin은 제 Ⅵ형에 속하는 중간세사단백질의 하나로 중추신경계의 발생 중에 신경줄기세포에서 발현되다가 신경세포로 분화하면 신경세사(neurofilament)로 대체된다. Nestin 유전자는 4개의 axon과 3개의 intron으로 구성되어 있으며, 이 중 첫 번째 intron은 근육세포의 발생에서, 두 번째 intron은 신경발생 과정에서 Nestin의 발현을 조절하는 enhancer 역할을 하는 것으로 알려져 있다[27,45,46]. 또한 DAPI 염색을 통하여 핵의 존재 여부를 관찰할 수 있다.

Okabe[47]의 연구와 Zhang[48]의 연구 등에서 살펴볼 수 있듯이 다분화성 신경줄기세포들은 성장인자를 이용하면 형태적, 면역학적으로 신경세포나 신경교세포의 특성을 발현하는 세포로 분화시킬 수 있는데 Epithermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor(bFGF, FGF2), brain derived neurotrophic factor(BDNF) 등의 인자에 의해 신경세포(neuron), 성상세포(astrocyte), 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)로 분화될 수 있다[36,40,49,50].

이들 세포 중 성상세포는 중추신경계에 가장 많이 존재하는 세포로[5,6] nerve growth factor, glial-derived nerve groeth factor 등 여러 신경 성장인자들을 분비함으로써 신경세포의 신호전달기능을 보조하며 대사에 필요한 에너지와 아미노산 등을 제공하여 신경세포의 정상 기능 유지와 생존을 도운다[52]. 또한 신경세포가 신호전달 작용을 할 때 분비하는 신경전달 물질을 받아들이며, 이 때 변화된 세포외액의 이온조성을 원상태로 회복시킴으로써 항상성을 유지하여 신경세포가 다음 신호전달을 원활히 수행할 수 있도록 도와주는 작용을 한다[52]. 그리고 중추신경계에서 일어나는 면역 반응이나 염증 반응에도 관여하고 있으며[53], 여러 가지 cytokine들에 반응하거나 이들을 만들어내기도 하고[5,11], 조직 손상 시 뇌의 반응을 조절하는데 중요한 역할을 하며 이들의 활성화가 알츠하이머병과 같은 신경 질환 뿐만 아니라 뇌졸중이나 정신적인 충격과 연계하는 기전에도 관여하는 등 신경계의 손상 및 재생과도 관련이 있다[8-10].

이러한 성상세포의 발현은 GFAP[31]를 측정함으로써 확인할 수 있는데 본 실험에서 확립된 신경줄기세포에 當歸 香氣液을 처리하였을 때 Nestin의 발현이 줄어들고 GFAP의 발현이 크게 증가하는 것으로 보아 當歸 香氣液이 신경줄기세포가 성상세포로 분화하는데 영향을 미쳤다고 할 수 있다.

香氣療法은 다양한 천연식물에서 추출한 천연향유성분(essential oil)을 질병의 치료와 예방에 이용하여 신체적, 정신적 건강을 도모하는 것으로[12,13] 현대적 의미의 체계적인 아로마 테라피의 역사는 비교적 짧은 편이며 1928년 프랑스의 Ren-Maurice Gattefoss가 처음 사용하면서 알려지게 되었다. 이후 별다른 관심을 받지 못하다가 1964년 프랑스 의사 Jean Valnet가 아로마 테라피란 책을 출판하면서 점차 대중에 알려지기 시작하였다[54].

한의학에서의 향기요법을 역대문헌에서 살펴보자면 『素門·金匱眞言論』[15]에서 '東方靑色 入通於肝 其臭臊, 南方赤色 入通於心 其臭焦, 中央黃色 入通於脾 其臭香, 西方白色 入通於肺 其臭腥, 北方黑色 入通於腎 其臭腐'라 하여 五臟과 香臭와의 관계를 밝혀놓

았으며, 後漢의 張仲景의 『仲景全書』[55], 唐代의 『千金要方』[56], 『外臺秘要』[57], 宋代의 『聖濟總錄』[58], 明代의 『壽世保元』[59], 『本草綱目』[60] 등에서 香袋法, 香沈法, 香衣法, 香甁法, 香脂法, 香汁法, 香豆法, 香漿法, 取噓法, 熏法 등의 향기를 이용한 치료법들이 소개되어 있다.

當歸는 氣血混亂을 '能引諸血 各歸其所當歸之經'함으로써 안정시킨다고 하여 붙여진 이름으로[61] 건귀, 산단, 백단, 등의 이명으로 불리며[18,62] 우리나라에서는 참당귀(Angelicae Gigas NAKAI)의 뿌리를 이용하고 있다[18]. 性은 溫 無毒하고 味는 甘辛하며, 歸經은 心肝 脾經 이며, 효능은 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸 하며 癥瘕結聚, 崩漏, 血虛頭痛, 眩暈, 痿痺, 腸燥便難, 癰疽瘡瘍 등을 치료한다[18]. 當歸의 甘味는 補하고 辛味는 散하며 苦味는 泄하고 溫性은 通氣케하여 補血和血하며 또한 行氣止痛하는 효능이 있어 心 肝 脾 三經으로 작용한다[63].

현재 연구된 當歸의 주요한 有效成分은 정유 및 coumarin계 유도체인 decursin, decusinol, nodakenetin, β-sitosterol, umbelliferan nodakenin 등과 butylidene phthalide, 비타민B12, 비타민A류 등이며[18,63] 향기요법에 응용되는 당귀향을 내는 當歸中의 揮發油 주성분은 butylidene phthali-de, n-valerophenone-o-carboxylic acid, Δ^{2-4}dihydrophthalic anhydride와 다량의 蔗糖, 비타민 B12, 비타민A류 물질이다[18].

當歸의 약리적인 효능은 면역증강작용[65], 성선 자극작용, 진정작용, 중추신경계통의 진정효과[66]가 있음이 밝혀졌다. 또한 當歸는 항산화효과[19], 염증억제 및 진통작용[62], 허혈성 뇌손상 억제 및 신경세포 보호효과[20] 등이 있는 것으로 알려졌다.

천연약물을 이용한 신경줄기세포의 증식과 분화에 관한 연구들로는 張[21]의 人蔘皂苷의 신경줄기세포 증식으로 學習 및 記憶力 촉진에 관한 연구, 單[22]의 定志小丸이 치상핵 신경줄기세포와 學習 및 記憶力에 미치는 영향에 대한 연구, 繆[23]의 銀杏內酯의 신경줄기세포의 분화에 대한 영향에 관한 연구, 司[24]의 三七總皂苷의 신경줄기세포의 증식과 분화에 관한 실험적 연구, 劉[25] 등의 補陽還五湯이 저혈당과 저산소증이 유발되어 손상된 신경줄기세포의 분화와 이행에 관한 연구를 찾아볼 수 있다.

신경줄기세포에 관련한 선행연구와 當歸의 기존 연구를 바탕으로 본 연구에서는 14일 된 생쥐의 배아로부터 뇌신경 조직을 분리, 배양하여 신경줄기세포군을 확보하고 當歸 香氣液을 처리하여 신경줄기세포의 분화 양상을 관찰하였으며 분화 후 세포의 증식과 활성화에 미치는 영향을 관찰함으로써 當歸 香氣液이 신경줄기세포의 분화와 증식에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 관찰하였다.

즉 영상분석의 방법으로 신경구의 형성에 따른 신경줄기세포의 확립 등을 관찰하고 MTT assay 법을 이용하여 세포 활성도를 측정하였다. 또한 Western blot 분석을 통한 세포 생존 및 사멸에 관여하는 Akt, Erk, ERM 등의 활성화 정도를 측정함으로써 분화된 세포의 증식과 성장의 촉진 정도를 관찰하였다.

bFGF와 EGF가 첨가된 배지를 이용하여 배양한 결과 다량의 신경구가 형성됨을 관찰할 수 있었으며 Nestin 염색과 DAPI 염색을 통하여 발현정도를 관찰함으로써 생쥐의 배아에서 분리 배양된 세포가 신경줄기세포라는 것을 확인할 수 있었다.

MTT assay를 통하여 세포의 사멸과 증식

에 대한 선행연구를 실시하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 tetrazolium을 청자색을 띄는 비수용성의 formazan으로 환원시키는 세포의 능력을 이용하는 검사법이다. formazan의 흡광도는 580 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 세포가 살아있고 대사가 왕성한 세포의 산화 환원력을 반영한다[67]. 먼저 당귀와 신침을 같이 처리한 결과 같은 농도에서 當歸 香氣液이 신침보다 양호한 세포증식 효과를 보였다. 이를 기초로 5 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 20 ㎍/㎖ 농도의 當歸 香氣液을 실험한 결과 5 ㎍/㎖의 농도에서 최대의 효과가 나타남을 알 수 있었다.

이러한 선행실험을 근거로, 확립된 신경줄기세포에 當歸 香氣液을 처리하였을 때 Nestin의 발현이 줄어들고 GFAP의 발현이 크게 증가하는 것으로 보아 當歸 香氣液이 신경줄기세포가 성상세포로 분화하는데 영향을 미쳤다고 할 수 있다.

외부 자극에 의한 세포내 신호전달계에는 상호작용을 하는 많은 단백질들이 관여한다. 특히 성장 인자의 자극에 의한 신호전달계의 변화는 세포 변형이나 또는 세포 증식에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 성장 인자에 의한 자극은 세포막에 존재하는 수용체에 의하여 일련의 신호전달계를 거쳐 반응으로 나타난다[68].

Akt는 단백질 serine / threonin kinase의 한 종류로 세포생존과 세포대사에 관여하는 단백질 합성을 조절하며, 세포사멸에 영향을 주는 다른 단백질 인산화효소를 조절하는 전사인자를 인산화 시키고[32,69,70] BAD, Caspase-9등 여러 apotosis machinery를 인산화 하여 그 활성을 억제함으로써[32,33], growth factor에 의한 신경세포의 생존에 중요한 역할을 하는데 Akt의 활성화 촉진 및 증가는 세포의 성장과 생존을 의미한다. 5 ㎍/㎖ 농도의 當歸 香氣液을 처리한 결과 지속적으로 p-Akt의 활성화가 유지되었는데 이러한 결과는 當歸 香氣液의 투여로 Akt의 활성도가 증가함으로써 분화된 세포의 지속적인 생존을 의미하는 것이다.

Akt의 아래 신호 전달 물질로는 ERM 단백질이 보고된바 있으며[71], ERM 단백질은 세포질내에서 분자내 상호작용을 통해 불활성 상태로 존재하다가 외부에서 신호가 전달되면 그 결합이 풀리면서 활성화되어 세포막 단백질과 골격단백질을 연결시켜준다. 활성화 기전은 C-말단의 트레오닌 잔기의 인산화이다[72]. ERM은 세포골격에 영향을 미치는 것으로 세포사멸에 관련된 또 하나의 단백질로 세포고정, 세포막의 파상운동과 융모의 형성 등에 영향을 미친다[35]. 當歸 香氣液을 처리하지 않은 대조군에 비해 當歸 香氣液을 처리한 세포의 ERM 단백질의 인산화가 증가되었으며, 처리 후 1시간에서 최대의 인산화가 측정되었으며 48시간이 되어도 어느 정도의 인산화 작용은 유지되었다. 시간이 지날수록 활성도가 감소하였다. 그러나 ERM 단백질의 양은 크게 변화하지 않았으므로 이는 ERM 단백질의 인산화만 증가되었음을 시사하며 분화된 세포가 지속적으로 증식하고 있음을 나타내는 것이다.

Erk는 MAPKs(Mitogen-activated protein kinase)의 한 종류로서[73] 세포외 자극으로부터 세포막에 위치한 수용체가 활성화되면, 이 신호를 핵과 세포질로 전달하여 세포의 증식, 사멸, 분화, 이동 등의 생물학적 반응을 매개하는 중요한 신호전달체계이다[74,75]. Erk의 활성화 증가는 세포의 증식과 분화를 의

미[76]한다고 볼 수 있는데 當歸 香氣液의 투여로 p-Erk의 활성도의 증가는 분화된 세포의 증식과 분화가 활발하게 일어나고 있음을 시사하는 것이다.

본 실험에서는 當歸 香氣液을 배양된 신경줄기세포에 투여하였을 때 나타나는 변화를 형광염색을 통하여 관찰하였으며 當歸 香氣液에 의한 세포의 증식과 성장에 대하여 Akt, Erk, ERM 등의 인산화를 이용하여 검증하였다.

이러한 결과는 當歸 香氣液이 신경줄기세포의 분화와 분화된 세포의 성장과 증식을 유도하며 그 시간을 유지하고 연장시키는 역할을 할 수 있음을 제시한 것이다. 따라서 이상의 결과를 종합해 보면 當歸 香氣液은 신경줄기세포가 퇴행성 뇌신경질환의 발생과 진행에 중요한 역할을 담당하는 성상세포로의 분화를 촉진하고 분화된 세포의 생존과 증식 및 분화를 촉진하는 작용을 하는 것으로 판단되며 이러한 실험결과를 바탕으로 추후 in vivo 상태에서 퇴행성 뇌신경질환의 실험을 통하여 실제 치료로제로서의 가능성에 대한 연구와 當歸 香氣液의 신경줄기세포의 분화와 증식에 관한 효과를 더욱 자세히 평가하기 위하여 다양한 실험 모델의 개발 및 그 기전을 규명하는 연구가 이루어져야 할 것이라고 사료된다.

Ⅴ. 결 론

퇴행성 신경질환 치료의 일환으로 in vitro에서 當歸 香氣液을 rat의 뇌신경줄기세포에 처리 후 성상세포의 분화, MTT assay, western blot에 의한 Akt, Erk, ERM의 인산화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 신경줄기세포에 當歸 香氣液을 처리하였을 때 성상세포로의 분화가 촉진된다.

2. MTT assay에서 5 ㎍/㎖의 농도에서 세포의 생존도가 가장 높았다.

3. 當歸 香氣液은 Akt, Erk, ERM의 인산화를 촉진함으로써 신경줄기세포의 분화 뿐만 아니라 분화된 세포의 생존과 증식을 유지하도록 한다.

참고문헌

1. 서광식. 줄기세포란 무엇인가?. 경희의학. 2005;21(2):110-6.
2. 최욱환, 장성규. 줄기세포 치료의 연구 현황 및 최신 지견. Korean Journal of Obsterics and Gynecology. 2007;50(4):569-79.
3. Rietze RI, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF. Purication of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. Nature. 2001;412:736-9.
4. Kruger GM, Mosher JT, Bixby D, Joseph N, Iwashira T, Morrison SJ. Neural crest stem cell persis in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responssiveness. Neuron. 2002;35:657-69.
5. Ridet JL, Malhorta SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrcytes: cellular and molecular cues to biological function. Trends Neurosci. 1997;20:570-7.
6. Tacconi MT. Neuroal death : is there a role for astrcytes? Neurochem Res. 1998;

23:759-65.
7. Robins DS, Shirazi Y, Drysdayle BE, Lieberman A, Shin HS, Shin ML. Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrcytes. J Immunol. 1987;139: 2593-7.
8. Levine JB, Kong J, Nadler M, Xu Z. Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic latral sclerosis(ALS). Glia. 1999;28:215-24.
9. Pekny M, Johanson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perimann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisen J. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. J Cell Biol. 1999;145:503-14.
10. Tao R, Aldskogius H. Glial cell response, complement and apolipoprotein J expression following axon injury in the neonatal rat. J Neurocytol. 1999;28:559-70.
11. Raivich G, Jones LL, Werner A, Bluthmann H, Doetschmann T, Kreutzberg GW. Molecular signals for glial activation: pro-and anti-inflammatory cytokines in the injured brain. Acta Neurochir Suppl. 1999;73:21-31.
12. Buckle J. Use of aromatherapy as a complementary treatment for chronic pain. Alternative Therapies in Health & Medicine. 1999;5(5):42-51.
13. Wheeler Robins JL. The science and art of aromatherapy. Journal of Holistic Nursing. 1999;17(1):5-17.
14. 靈樞經校釋. 北京:人民衛生出版社. 1982: 289-90.
15. 任應秋. 黃帝內經章句索引. 北京:人民衛生出版社. 1986:17.
16. 김준희, 김봉인, 김진경. 아로마 선호에 관한 연구. 한국주관성연구학회. 2003;8:158-61.
17. 김종철, 박미애, 김명자. 일차 의료인을 위한 아로마테라피의 소개. 가정의학회지 2002 ;23(4):423-5.
18. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 1991:578-80.
19. 임종국, 안준철, 문진영. 당귀약침액의 항산화 효능에 관한 연구(2). 대한침구학회지. 1997;14(1):383-96.
20. 전연이, 박치상, 박창국. 當歸의 虛血性 腦損傷 抑制作用 및 神經細胞 保護效果. 대한본초학회지. 2003;18(4):25-35.
21. 張均田. 人蔘皂苷 Rg1的促智作用機制對神經可望性和神經發生的影響. 藥學學報. 2005 ;40(5):385-8.
22. 單德紅, 柴紀嚴, 王德山. 定志小丸對抑鬱模型大鼠齒狀回神經干細胞和學習記憶能力的影響.中醫藥學刊. 2005;23(8):1426-7.
23. 繆兵, 高建新, 劉星霞. 銀杏內酯B對神經細胞活性影響的實驗研究. 山東醫藥. 2004 ;44(20):16-8.
24. 司銀楚, 成龍, 洪慶濤 等. 三七總皂苷促進離體胎鼠皮層神經干細胞增殖, 分化的實驗研究. 中國體視學與圖像分析. 2004;9(2) :78-83.
25. 劉柏炎, 蔡光先. 補陽還五湯對低溏低氧損傷神經干細胞移行分化的影響. 中國藥物與臨床. 2005;5(3):171-3.
26. Isacson O, Deacon T. Neural transplantation studies frvea the brain's capacity for continuous reconstruction. Trends Neurosci. 1997;20:477-82.
27. Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U. Nestin

mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. Brain res Dev Brain Res. 1995;84:109-29.

28. 권희욱, 이광호, 강포순, 조춘규, 양춘우, 양춘모, 박종태. 백서에서 척수의 허혈/재관류 손상시 Neuronal Nitric Oxide Synthase의 발현, 대한마취과학회지. 2007;52:449-53.
29. Sladowski. D, Steer SL, Clothier RH, Balls M. An improved MTT assay, J. Immunol. Methods. 1993;157:203-7.
30. Schraen-Maschke S, Dhaenens CM, Delacourte A, Sablonniere B. 2004 Microtubule-associated protein tau gene: a risk factor in human neurodegenerative diseases. Neurobiol Dis. 2004;15(3):449-60.
31. Nonaka J, Yoshikawa M, Ouji Y, Matsuda R, Nishimura F, Yamada S, Nakase H, Moriya K, Nishiofuku M, Ishizaka S, Sakaki T. CoCl(2) inhibits neural differentiation of retinoic acid-treated embryoid bodies. J Biosci Bioeng. 2008;106(2):141-7.
32. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y. Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell. 1997;91:231-41.
33. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science. 1998;282:1318-21.
34. Sebolt - Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. Nat Rev Cancer. 2004;4:937-47.
35. Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization : lesson from ERM(ezrin/radixin/moesin) proteins. J Biol Chem. 1999;9(21):1259-62.
36. Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig C, van der Kooy D. Is there a neurak cell in the mammalian forebrain. Trends Neurosci. 1996;19:387-93.
37. Gage FH. Mammalian neural stem cell. Science, 2000;287:1433-8.
38. pagano SF. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. stem cells. 2000;18:295-300.
39. Rao MS. Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. Anat. Rec. 1999;257:137-48.
40. Reynolds BA, W Tetzlaff, S Weiss. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocyte. J. Neurosci. Res. 1992;12:4565-74.
41. Kornblum HI. Introduction to Neural Stem Cells. Stroke. 2007;38(2):810-6.
42. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. Histol Hospital. 2005;20(2):665-71.
43. 권광원, 김미란, 서해영, 이영돈, 김성수. 신경줄기세포의 냉동보관법. 대한해부학회지. 2004;37(6):499-508.
44. 조명수, 오선경, 문신용. 배아줄기세포의 신경세포로의 분화. 인구의학연구논집. 2003;16:7-13, 43.

45. Hockfield S, Mckay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. J Neurosci. 1985;5:3310-28.
46. Lendahl U, Zimmerman LB, Mckay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell. 1990 ;60:585-95.
47. Okabe S, Forsberg KN, Spiro AC, Segal M, Mckay RD. Development of neural precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mechanism Develop. 1996;59:89-102.
48. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thompson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2001;19:1129-33.
49. Kilpatrick TJ, Barlett PF. Cloning and growth of multipotential neural precursor. Requirements for proliferation and differentiation. Neuron. 1993;10:255-65.
50. Murphy MJ, Drago PF, Barlett. Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro, J. Neurosci. Res. 1990;25 :463-75.
51. Goss JR, O'Malley ME, Zou L, Styren SD, Kochanek PM, Dekosky ST. Astrocytes are the major source of nerve growth factor upregulation following traumatic brain injury in the rat. Exp Neurol. 2000;22:3231-326.
52. Caltin MC, Guizzetti M, Costa LG. Effects of ethanol on clacium homeostasis in the nervous system: implications for astrocytes. Mol Neurobiol. 1999;19:1-14.
53. Benveniste EN, Sparacio SM, Bethea JR. Tumor necrosis factor-α enhances interferon-ɣ mediated class Ⅱ antigen expression on astrocytes. J Neuroimmunol. 1989;25 :209-19.
54. 오현주, 송태원. 문헌에 나타난 향기요법에 대한 고찰. 한방재활학회지. 1997;7(1) :546-60.
55. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:현성사. 1978 :610-1.
56. 孫思邈. 千金要方. 서울:대성문화사. 1995 ;315.
57. 王壽. 外臺秘要. 서울:성보사. 1975:249-54, 840, 844, 848-9.
58. 趙佶. 聖濟總錄 43卷. 北京:人民衛生出版社. 1987:822-5.
59. 龔廷賢. 壽世保元. 上海:上海科學技術出版社. 1995:290-3.
60. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社. 1982:883-7.
61. 李仲梓. 醫宗必讀. 臺北:大方出版社. 1978 :76, 79.
62. 김용진, 황치원. 당귀가 백서의 뇌손상 및 심혈관계에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(4):37-46.
63. 정종길. 當歸. 醫林 323. 2005:12-5.
64. 李沆雨, 趙顯國, 朴涌基. 土川芎과 日川芎의 效能 및 品質比較에 관한 硏究 - 두種類의 川芎과 川芎·當歸 配合時의 血管 弛緩效能. 大韓本草學會誌. 1999;14(1) :55-60.
65. Lee S, Lee YS, Jung SH, Shin KH, Kim BK, Kang SS. Anti-tumor activities of decursinol angelate and decursin from Angelica gigas. Arch. Pharm.Res. 2003

;26:727-30.
66. 柳康秀. 참당귀根의 Coumarin 成分에 관한 연구. 약학회지. 1967;11:22.
67. Marshall, NJ, Goodwin, CJ, Holt SL. A critical assessment of the use of microulture tetazolium assays to measure cell growth and function. Growth regul. 1995;5:69-84.
68. 김세훈, 김형중, 박영년, 조상호. 비소세포성 폐암종에서 Extracellular Signal Regulated kinase[ERK]의 발현. 대한병리학회지. 2001 ;35(5):361-7.
69. 정병갑 역. 분자세포생물학 제2판. 서울: 도서출판 한우리. 2002:506.
70. Franke TF, Kaplan D, Cantley LC. P13K. Downstream AKT blocks apoptosis. Cell. 1997;88:435-7.
71. Shiue H, Musch MW, Wang Y, Chang EB, Turner JR. Akt2 phosphorylates ezrin to trigger NHE3 translocation and activation. J Biol Chem. 2005;280(2) :1688-95.
72. Hirao M, Sato N, Kondo, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita Sh, Tsukita Sa. Regulation mechanism of ERM protein/plasma membrane association : Possible involvement of phosphatidyl turnover and Rho-dependent signaling pathway. J. Cell Biol. 1996;135 :37-51.
73. Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinase are regulated. J Biol Chem. 1995 ;270:14843-6.
74. Chuderland D, Seger R. Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. Mol Biotechnol. 2005;29:57-74.
75. Shamloo M, Rytter A, Wieloch T. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning. Neuroscience. 1999;93 :81-8.
76. Magnuson NS, Beck T, Vahidl H, Hahn H, Smola U, Rapp UR. The Raf-1 serine / threonine kinase. Semin Cancer Biol. 1994;5:247-53.