

生慧湯이 흰쥐의 學習과 記憶에 미치는 影響

柳錦龍* · 張奎台** · 金璋顯**

(*天道堂 韓醫院 · **東國大學校 韓醫科大學 小兒科學教室)

Effects of Saenghyetang on Learning and Memory Performances in Mice

Geum-Ryoung Yu* · Gyu-Tae Chang** · Jang-Hyun Kim**

(*cheondodang oriental clinic · **Dept. of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Seoul, Korea)

<Abstracts>

The effects of the oriental herbal medicine Saenghyetang(SHT, 生慧湯), which consists of *Rehmanniae Radix* (熟地黃 九蒸: was made by 9th steam) 40g, *Corni Fructus*(山茱萸) 16g, *Polygalae Radix*(遠志) 8g, *Zizyphi Spinosae Semen*(酸棗仁)* 2g, *Biotae Semen*(柏子仁 去油: oil ingredient was removed) 20g, *Poria Cocos*(茯苓) 12 g, *Ginseng Radix*(人蔘) 12 g, *Acori Graminei Rhizoma*(石菖蒲) 2g, *Sinapis Semen*(白芥子) 8g, on learning ability and memory were investigated.

Hot water extract(HWE) and ethanol extract(EE) from SHT were used for the studies. Learning ability and memory are related to modifications of synaptic strength among neurons that interactive. Enhanced synaptic coincidence detection leads to improved learning ability and memory. If the NMDA receptor, a synaptic coincidence detector, acts as a graded switch for memory formations, enhanced signal detection by NMDA receptors should enhance learning ability and memory. It was shown that NR2B was increased in the forebrains of oriental medicine-administrated mice, leading to enhanced activation of NMDA

receptors and facilitating synaptic potentiation in response to stimulation at 10-100 Hz.

These HWE-SHT treated mice exhibited that superior ability in learning and memory when performing various behavioral tasks, showing that NR2B is enhanced by HWE-SHT treatment and also is critical in gating the age-dependent threshold for plasticity and memory formation. NMDA receptor-dependent modifications, which were mediated in part by HWE administration, of synaptic efficacy, therefore, represent a mechanism for associative learning ability and memory. Results suggest that oriental medical enhancement of NR2B contributes to increase intelligence and memory in mammals.

On the other hand, to examine the effects of EE-SHT on the learning ability and memory in experimental mice, EE-SHT was tested on passive and active avoidance responses. The EE-SHT ameliorated the memory retrieval deficit induced by ethanol in mice, but not other memory impairments. EE-SHT(10, 20 mg/100 g, p.o.) did not affect the passive avoidance responses of normal mice in the step through and step down tests, the conditioned and unconditioned avoidance responses of normal mice in the shuttle box, lever press performance tests and the ambulatory activity of normal mice in a normal condition. However, EE-SHT at 20 mg/kg significantly decrease the spontaneous motor activity during the shuttle box test, and also to extend the sleeping time induced by pentobarbital in mice. These results suggest that SHT has an ameliorating effect on memory retrieval impairments and a weak tranquilizing action.

I. 緒 論

學習이란 우리를 둘러싸고 있는 세상, 즉 주위 환경으로부터의 情報와 知識을 腦에 貯藏하는 過程이고 記憶이란 그

貯藏된 情報와 知識을 再生하는 過程이다¹⁾.

NMDA 수용체는 연접(시냅스)과 밀착되어 감지되는 것으로 記憶形成에 대한 단계적 연결고리로서 작용하는²⁻⁴⁾,

NR1 아단위와 다양한 NR2 아단위로 구성되는 신경세포성 복합체(heteromeric complexes)이다^{5,6)}. NR1 아단위는 채널기능에 必須的인 반면 NR2 아단위는 채널의 關門과 Mg^{2+} 依存性を 調節한다⁷⁾. 해마(hippocampus)와 대뇌피질(cortex) 같은 成人의 前腦部位에서 NR2A와 NR2B 아단위만이 NR1 아단위와 함께 수용체 복합체를 形成하는데 이용될 수 있다. 實驗室內에서 재조합 NR1-NR2B 복합체는 NR1-NR2A 복합체보다 더욱 긴 흥분성 시냅스후전위(EPSPs)을 나타낸다⁸⁾. 生體內에서 NR2B의 수용체 복합체와의 결합증가는 NMDA 수용체의 시냅스 일치 감지를 증가시키도록 한다. NR2B 발현은 靑少年에서 成人으로 移行하는 동안에 낮은 段階로 조절되며⁹⁾, NMDA 채널의 흥분성시냅스후전위의 持續성이 段階的적으로 감소하는 것과 연관된다¹⁰⁾. 이는 NMDA에 의해 媒介된 適應性を 감소시킬 수 있고 아마도 노래하는 새, 원숭이 그리고 成人의 減退된 記憶力を 설명할 수도 있다^{11,12)}.

生慧湯은 清代 陳士鐸의 辨證錄에 처음 記載되어 있으며, 辨證奇門에서 補心腎하는 作用으로 初老의 記憶力 喪失이나 健忘症을 治療하는데 사용되었다¹³⁾. 韓醫學에서 記憶力 喪失의 原因은 稟賦不足, 思慮過多, 心虛, 痰飲, 腎衰, 心腎

不交와 瘀血이며^{14,15,16)}. 특히 臟腑生理學的인 觀點으로써, 記憶은 心·腎과 密接한 關係가 있으며, 生慧湯이 補心腎하므로 記憶力 喪失을 豫防할 수 있을 것으로 思料되며, 아울러 記憶力 增進에도 역시 밀접한 關係가 있다.

이에 著者는 生慧湯의 熱水抽出物과 에탄올抽出物의 效果를 研究하기 위해 受動的, 能動的 回避 實行, 수용체 복합체로의 NR2B 結合 實驗, NR2B 발현과 NMDA 媒介 適應性を 이용하여 記憶과 學習過程에 대한 影響의 結果를 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 實驗動物

行動을 分析하기 위한 실험에는 C57B/6의 생쥐를 사용하였고, 면역학적 그리고 분자생물학적 分析을 위한 實驗에는 5-6주된 ddY-strain 수컷 생쥐를 사용하였다. 모든 동물들은 實驗 전 溫度와 濕도가 調節된 室內에서 1週日 동안 적응시켜 사용하였다.

2. 生慧湯 熱水抽出物の 分離

生慧湯은 東國大學校 韓方病院에서

구입하였으며 處方內容 및 1貼의 分量은 다음과 같다.

生慧湯 50g은 熱水抽出하여 35g 抽出物을 얻었으며, 生慧湯 熱水抽出物의 投與는 각각 10mg/100g(生慧湯 熱水抽出物 10), 20mg/100g(生慧湯 熱水抽出物 20)씩 經口 投與하였다.

藥名	生藥名	分量(g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	37.500
柏子仁	<i>Biotae Semen</i>	18.750
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	15.000
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	11.250
白茯苓	<i>Paria</i>	11.250
白芥子	<i>Sinapis Semen</i>	7.500
遠志	<i>Polygalae Radix</i>	7.500
酸棗仁	<i>Zizyphi Spinosae Semen</i>	1.875
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	1.875
總量		112.500

3. 生慧湯 에탄올抽出物과 化學物質

生慧湯 에탄올抽出物은 50% 알코올을 이용하여 抽出하였고, 에탄올 溶液을 2% 收率의 抽出物로 濃縮하였으며, 實驗을 시행하기 전에 4℃로 유지시켰다. 生慧湯 에탄올抽出物 10, 20(生慧湯의 에탄올抽出物로 10, 20 mg/100 g)은 實驗에서 經口로 사용되었고, 이 用量은 생쥐의 正常的인 行動과 痛症 敏感度에 變化를 주지 않은 것으로 觀察되었다. scopolamine hydrobromide, 에탄올, chlorpromazine hydrochloride와

pentobarbital-sodium salt는 市販된 製品을 사용하였다.

4. 해마(Hippocampus) 細胞培養과 記錄

해마 뉴론의 일차 培養은 단일 신생아기의 생쥐를 選擇하여 進行되었다. 全細胞 切片의 記錄은 Liu, G. 등의 方法에 의하여 進行되었다¹⁷⁾. 記錄은 1kHz의 low-pass filter를 가진 200B 통합 patch-clamp 擴大鏡으로 觀察하였으며, Data는 Digidata 1200B A/D 변환기를 사용하는 10 kHz에서 結果를 도출하였다. Glutamate 전류는

Monyer, H. 등의 方法에 의하여 誘發하였다⁸⁾.

5. RT-PCR and Northern hybridization

組織의 부분 標本들은 PBS로 두 번 洗滌하였고, total RNA는 매뉴얼에 說明되었듯이 RNA Isolation Kit, RIK 2.11 (Iowa Biotechnology Corp. Japan)을 사용하여 細胞로부터 抽出하였다. total RNA는 또한 Chomczynski 과 Sacchi (1987)의 方法¹¹⁾에 根據하여 guanidine thiocyanate, phenol,

chloroform으로 추출하였다. Poly (A)⁺ RNA는 oligo (dT)-cellulose column을 통하여 두 가지 連續的인 과정에 의해 분리되었다. RT-PCR은 RNA LA PCR kit Ver. 1.1 (TaKaRa Co. Japan)을 사용하여 실행되었다. 역전사를 위해 total RNA는 증류수에서 유리된 9.5 μ l의 RNase으로 溶解되었다. 4 μ l의 25 mM MgCl₂, 2 μ l의 10 × RNA PCR 완충제 (100 mM Tris HCl (pH 8.3)와 500 mM KCl), 2 μ l의 10 mM dNTP 혼합물, 0.5 μ l의 RNase 억제제 (40 units/ μ l), 1 μ l의 AMV 역전사 XL (5 units/ μ l), 1 μ l의 random 9 mers. (50 pmol/ μ l)가 추가되었다. 20 μ l의 모든 反應容積은 30°C에서 10분 동안 그리고 40°C에서 30분 동안 培養되었고, 99°C에서 5분간 역전사 활동을 破壞하였다. 표적 유전자의 N-종말부에 대응하는 P1 primer는 cDNA를 擴大하기 위해 사용되었다. DNA 擴大는 2 μ l의 10 × 반응 완충제, 1.2 μ l의 25 mM MgCl₂, 1 μ l의 200 μ M dNTP 混合物, 1 μ l의 각 primer (10 pmol/ μ l), 0.1 μ l의 Taq polymerase enzyme (TaKaRa Co. Japan), 3.7 μ l의 精製된 물, 10 μ l의 표본을 포함하는 20 μ l의 反應容積에서 實行되었다. 反應 混合物는 20 μ l의 無機物 오일로 차단되었고, TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 (TaKaRa Co.

Japan)에 준비되었다. 증폭은 94°C에서 5분간 표본을 가열한 다음에 94°C에서 1분간 50 週期的 變性を 시킨 후 50°C에서 1분간 가열 후 냉각과 72°C에서 1분간 확장을 실행하였다. 增幅된 物質은 1% (w/v) agarose gels에서 전기영동으로 分析하였다.

Northern hybridization을 위해 각 표본을 2.2 M formaldehyde-1.0% agarose gels 상에서 5 micrograms의 크기로 나뉘어졌다. mRNA는 Zeta 탐측막이나 나일론막(GeneScreen plus, NEN, Boston, MA, USA)으로 移動되었고 UV 교차결합에 의해 固定되었다. [³²P]deoxy-CTP로 표지된 補體 DNA (cDNA) 탐측자(10⁷ cpm/ml)와의 Prehybridization 과 hybridization은 42°C의 50% formamide, 5 × SSC (1 × SSC = 150 mM NaCl과 15 mM sodium citrate, pH 7.0), 0.2%의 polyvinylpyrrolidone, BSA과 250 μ g/ml의 切斷된 연어 精子 DNA을 포함한 Ficoll, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM sodium phosphate (pH 6.5), transfer RNA (25 μ g/ml) 속에서 進行되었다. 필터는 실온에서 5분간 네 번 2 × SSC-0.1% SDS로 洗滌되었고, 다음으로 15분간 50°C에서 두 번 洗滌하였다. Autoradiography (XAR-5 film, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA)

는 northern blots을 分析하는데 사용되어졌으며, band는 濃度計를 이용하여 量을 測定하였다. 모든 data는 β -actin mRNA abundance로 標準化 되었으며, 이는 反應에 대한 正常的인 變化를 나타내지 않았다.

6. Western blot analysis

생쥐의 免疫血清은 精製된 NR2B ($M_r = 100$ kDa)에 一알맞게 準備되었고, Boehringer Mannheim GmbH에서 구입하였다. 단백질의 Western immunoblotting은 biotinyl-anti-IgG (Vector Laboratories Inc., CA, U.S.A) 염소와 streptavidin-horseradish peroxidase system (Promega, Madison, WI, USA)를 이용한 Gooderham 등의 方法¹⁸⁾에 의해 進行되었다.

7. 行動 實驗

1) 새로운 物體 認識 課題

實驗에 사용된 생쥐들은 각각 열려진 방(20 × 20 × 10 high inches)에 3일 동안 適應하도록 하였다. 訓練 과정 중 두 가지 새로운 物體를 열려진 방에 놓고 5분 동안 探索하도록 하였다. 각각의 物體를 탐색하는데 소요된 시간을 측정하였다. 記憶 維持 試驗에서는 생쥐를 같

은 방에 다시 넣고 訓練에 사용했던 친숙한 物體 중 하나를 새로운 物體로 바꾼 후 5분 동안 자유롭게 探索하도록 하였다. 두 物體를 探索하는데 걸리는 총 시간에 대한 두 物體(훈련 과정) 중 하나 또는 새로운 物體(記憶 維持 過程)를 探索하는데 걸리는 時間의 比인 參考值를 認知 記憶 측정에 사용하였다.

2) 恐怖 條件 課題

TruScan multi-parameter activity monitor(Coulbourn Instruments, USA)를 裝着한, 恐怖 조건 쇼크를 줄 수 있는 방(10×10×10 inches high)을 準備하였다. 조건자극(Conditional stimulation:CS)은 2800Hz의 85dB의 소리를 사용하였고 무조건刺戟(Unconditional stimulation:US)은 갑작스럽고 연속적인 0.75mA의 발바닥 쇼크를 사용하였다. CS와 US를 준 후에 생쥐의 즉각적인 固定(freezing)반응을 測定하기 위하여 방에서 30초간 머물게 하였다. 記憶 維持 實驗에서는 각각의 생쥐를 쇼크를 줄 수 있는 방에 다시 넣고 3분 동안 固定 반응을 기록하였다(전후적 조건). 이후에 생쥐를 새로운 방에 넣고 소리(암시)를 주기 전 3분간 관찰하였다(pre-CS). 그 후 즉시 3분간 CS와 동일한 소리를 주고 固定반응을 記錄하였다(암시적 조건).

3) 恐怖 消滅 實驗

訓練 24시간 후, 처음으로 생쥐에게 消滅 試驗을 실시하였다. 각각의 消滅 試驗은 전후적, 그리고 암시적 消滅로 構成되었다. 먼저 생쥐는 쇼크를 줄 수 있는 방에 個別的으로 넣고 전후적 消滅을 測定하기 위하여 US를 주지 않고 3분 동안 觀察하였다. 그 이후 생쥐를 새로운 방으로 옮겨서 3분 동안 pre-CS 반응을 測定하고(소리가 주어지지 않은 상태에서), 그 후 3분 동안 소리가 주어진 상태에서 암시적 조건을 측정하였다. 그런 후, 同一한 네 가지 消滅 試驗을 2시간 간격으로 시행하고 固定 反應을 記錄하였다.

4) 水中 迷路 課題

水中 迷路 裝置는 圓形의 풀(지름 1m)을 준비하였고 實驗 節次는 Tsien, J.Z. 등의 方法¹⁹⁾을 사용하였다. 訓練 프로토콜은 6개의 과정으로 구성되었다(하루 매 과정 당 4회 시도). 생쥐의 움직임은 비디오카메라로 追跡하였고 플랫폼을 찾아가는 걸리는 시간을 記錄하였다. 더불어 두 가지의 이동 實驗을 하였다. 첫 번째는 세 번째 과정 끝에 시행하였고 두 번째는 마지막 과정 끝에 시행하였다. 이동 實驗에서는 플랫폼을 除去하고 60초 동안 생쥐가 풀에서 자유롭게 수영하도록 하였다(Fig. 1).

水中 迷路의 각 4分圓에서 걸리는 시간을 기록하였고, 空間 選擇(spatial preference)에 대한 生慧湯 熱水抽出物의 影響을 測定하기 위하여 Student's t-test를 사용하였다.

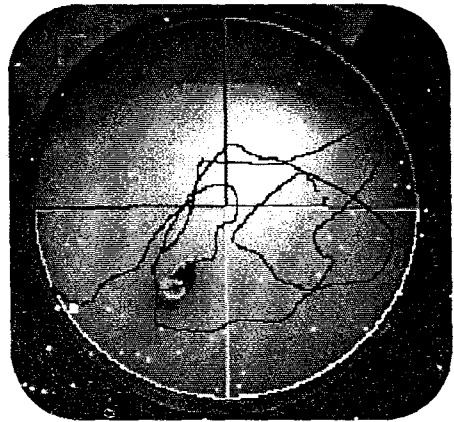


Fig. 1. Water maze task

8. 受動的 回避 實行

1) Step through test

實驗을 위한 기구상자는 두 구획으로 나누고 통과할 수 있는 구멍이 있는 칸막이벽을 장치하였다. 한쪽 방은 밝고 다른 쪽 방은 어둡게 하였다. 생쥐가 밝은 곳에서 어두운 곳으로 이동하자마자, 바닥의 격자를 통하여 처벌성의 전기쇼크가 주어졌다(Fig. 2). 생쥐가 어두운 곳으로 들어가는데 걸리는 시간을 기록하였다. 첫 번째 날에는 각각의 생쥐에게 어두운 곳에 들어가면 처벌성의 전

기쇼크가 주어진다습을 시켰다. 24 시간 후, 다시 10마리의 생쥐를 밝은 곳에 넣고 300초 동안 머무르게 하였다. 어두운 곳으로 들어가지 않은 생쥐의 수와 걸리는 시간을 기록하였다²⁰⁾.

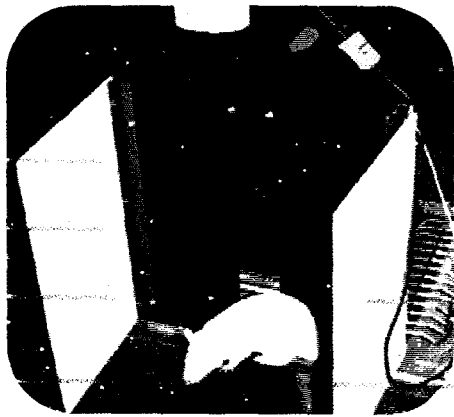


Fig. 2. Passive avoidance task

2) Step down test

전기 자극기가 연결된 바닥 격자가 있는 직사각형의 방이 사용하였다. 생쥐가 방의 구석에 놓여진 고무판을 내려오면, 처벌성의 쇼크를 주었다. 첫 번째 달에는 각각의 생쥐에게 10분 동안 학습을 시켰다. 학습 중 마지막 5분 동안 고무판을 내려온 생쥐의 숫자(誤謬의 수)와 내려오지 않은 생쥐의 숫자(성공의 수)를 기록하였다. 24시간 후, 3분간 시험을 시행하여 誤謬의 수와 成功의 數를 같이 기록하였다²⁰⁾.

3) 實驗 節次

(1) 生慧湯 에탄올抽出物이 정상 생쥐의 記憶過程에 미치는 영향
生慧湯 에탄올抽出物은 記憶 登錄 (memory registration), 統合 (consolidation) 또는 回復(retrieval) 過程 각각의 效果를 證明하기 위하여 學習 30분전, 學習 직후 또는 시험 30분전에 經口로 投與하였다. 각 군마다 12마리의 생쥐를 임의로 사용하였다.

(2) 生慧湯 에탄올抽出物의 記憶力이 損傷된 생쥐에 미치는 영향
생쥐는 임의로 대조군과 두 개의 실험군으로 분류하였는데 한 실험군은 10 mg/100g의 生慧湯 에탄올抽出物을 다른 하나는 20 mg/100g를 투여하였다. 각 군마다 12마리의 생쥐를 사용하였다.

a) 記憶 登錄 損傷(Memory registration impairment)

生慧湯 에탄올抽出物을 투여 10분 후, 記憶 登錄 過程을 妨害하기 위하여 30%에탄올을 投與하였다. 20분 후 學習을 시켰다.

b) 記憶 統合 損傷(Memory consolidation impairment)

生慧湯 에탄올抽出物을 學習 전 30분전에 투여하였다. 記憶 統合 過程을 損傷시키기 위하여 學習 직후 귀를 통하여 생쥐에게 전기적 경련쇼크(ECS)를 주었다.

c) 記憶 回復 損傷(Memory retrieval impairment)

첫째 날에 생쥐에게 학습을 시키고, 둘째 날에는 生慧湯 에탄올抽出物 投與 10분 후, 記憶 回復 過程을 損傷시키기 위하여 생쥐에게 40% 에탄올 또는 전기적 경련 쇼크(ECS)를 주었다. 20분 후, 시험을 실시하였다.

9. 能動的 回避 實行

1) Shuttle box test²¹⁾

赤外線 두 세트를 서틀 박스 장치의 긴 쪽에 각각 설치하였다. 부저와 램프를 천장에 설치하고, 박스의 격자바닥에는 전기 자극기를 연결하였다. 첫 번째 실험 프로그램은 다음과 같다. (1) 40초의 간격 (2) 10초간의 CS, (CS동안 경고 부저와 램프가 켜짐) (3) 10초간의 US, (US 기간동안 부저와 램프와 더불어 36 V AC 강도의 전기자극이 주어짐) 만약 생쥐가 CS 또는 US 기간동안 赤外線 양 쪽을 모두 방해하면, 즉시 전기 쇼크를 除去하였다. CS 기간동안의 赤外線 방해는 조건부 회피 반응(Conditional avoidance response: CAR)으로, US 기간동안의 방해는 무조건 회피 반응(Unconditional avoidance response: UAR)으로 간주하였다. CS와 US 기간에 방해가 없는 시도는 실패

로 간주하였다. CAR 또는 UAR과 관계없는 생쥐의 行動은 自發的 運動能力(Spontaneous motor activity: SMA)으로 간주하였다. 한 과정은 60번의 실험으로 구성되었다.

2) Lever press test²¹⁾

lever press test가 시행되는 방의 한 쪽에 스테인리스 스틸 레버를 수직으로 장치하였다. 부저와 램프는 천장에 장치하였고 격자바닥에는 전기자극기를 연결하였다. 變數, 時間 計劃과 資料 分析은 전기자극을 피하기 위하여 赤外線을 방해하는 것 대신 레버를 누르게 하는 것을 제외하고는 Shuttle box test와 同一하게 準備하였다.

3) 實驗過程

(1) 生慧湯 에탄올抽出物의 記憶 登錄 效果

生慧湯 에탄올抽出物을 實驗 15분전에 經口로 投與하였고, shuttle box와 lever press test는 7일 동안 매일 같은 시간에 實驗하였다. 각 군은 8마리로 구성되었다.

(2) 生慧湯 에탄올抽出物의 記憶 回復 效果

며칠동안 教育을 시킨 후, shuttle box test에서 CAR이 80% 이상, lever press test에서 50% CAR 이상인 생쥐

를 선택하였다. 基礎 實行 水準을 決定하기 위하여 shuttle box와 lever press test를 3일 동안 시행하였다. 넷째 날에 生慧湯 에탄올抽出物을 投與하고 15분 후에 두 실험을 한 시간 동안 시행하였다. 넷째 날의 자료를 셋째 날의 資料와 比較하였다. 6마리의 생쥐를 한 군으로 사용하였다.

10. 運動能力

運動能力은 지름 18cm, 높이 18cm의 tilting-type round activity cage를 사용하여 測定하였다(Fig. 3). 生慧湯 에탄올抽出物을 투여 직후와 24시간 후에 30분 동안 運動能力을 測定하였다. (N=9)

11. Pentobarbital-誘導 睡眠

saline, chlorpromazine 또는 生慧湯 에탄올抽出物 投與 15분 후, Pentobarbital을 생쥐에게 投與하고, 睡眠 持續 시간을 測定하였다. 각 군마다 9마리의 생쥐를 사용하였다.

12. 統計

成功한 생쥐의 比率에 대한 結果는 chi-square test로, 記憶 回復 實驗의 CAR과 SMA 자료는 paired t-test로,

睡眠 延長 實驗의 結果는 Student's t-test를 이용하여 分析하였다. 다른 자료들의 分析에는 Mann-Whitney's U-test와 ANOVA test를 이용하였다.

III. 實驗結果

1. 生慧湯 熱水抽出物(HWE-SHT)이 NR2B 生成에 미치는 效果

NR2B 아단위가 시냅스 適應性과 記憶을 調節하는데 중요한 역할을 하는지 檢査하기 위하여, NR2B-特異性 oligonucleotide DNA primers를 사용한 RT-PCR 增幅 方法에 의해 생쥐의 前腦에서의 NR2B 아단위의 表現에 대한 生慧湯 熱水抽出物의 效果를 實驗하였다. 生慧湯 熱水抽出物을 口腔投與받은 생쥐들은 正常的인 成長과 體重을 나타내었다. 개방된 장소에서의 이들의 行動은 野生型의 대조군과 다르지 않았고, 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐에서 發作이나 痙攣은 觀察되지 않았다. Northern blot 分析에 의하면 NR2B 表現은 皮질과 해마에 많았고 시상, 뇌간과 소뇌에 서도 약간 表現되었다(Fig. 3)

Western blot 分析에서는 대조군에 비해 處置된 생쥐의 皮질과 해마에서 두 배의 NR2B 단백질이 檢出되었으며

(Fig. 4), NR1 단백질에서도 역시 약간의 상승이 있으나, 이 부위에서의 NR2A 발현에는 변화가 없었다. 이는 수용체 복합체에서의 NR2A에 대한 NR2B의 비율과 NMDA 수용체의 총수 모두 증가되었다는 것을 의미한다.

2. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐에서 새로운 物體의 認識 記憶(敎育 過程과 記憶 維持 實驗에서 探索의 選擇)

10-100 Hz 刺戟에 대한 反應의 選擇적인 增強이 最適의 加減성 곡선을 나타내는지 實驗하기 위하여, 前腦 部位와 관련된 多樣的 學習課題를 시행하였다. 모든 行動·實驗은 生慧湯 熱水抽出物의 處置에 대한 盲檢으로 進行되었다.

처음에 시각적인 認識 記憶을 測定하기 위하여 새로운 物體 認識 課題를 사용하였다. 이는 人間과 齧齒類와 같은 種에서 進化론적으로 보전되며, 해마를 필요로 한다²²⁻²⁴. 이러한 課題의 難易度를 增加하기 위하여, 實驗材料와 方法에서 언급된 것과 같이 5분 敎育 프로토콜을 사용하였다. 敎育하는 동안 생쥐가 두 새로운 事物을 탐색하는데 걸린 시간에 큰 차이는 없었으며, (탐색 選擇에 의해 제시되듯이)(Fig. 5), 이것은 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐와 대조군



Fig. 3. Expression of NR2B mRNA in HWE-treated mice
Lane 1, cortex/striatum; Lane 2, amygdala; Lane 3, hippocampus; Lane 4, brain stem; Lane 5, thalamus; lane 6, cerebellum.
Arrow indicate the position of NR2B

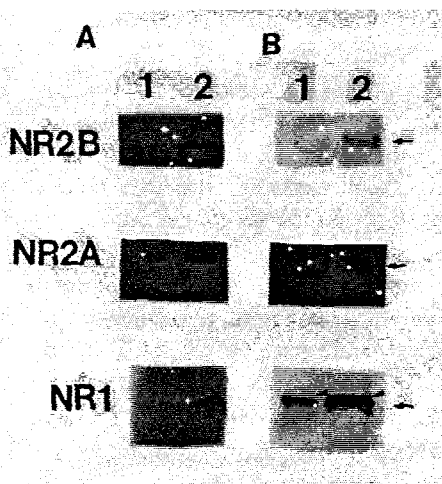


Fig. 4. Synaptic NMDA-receptor protein in cortex (A) and hippocampus (B) in both HWE-treated mice (2) and wild type control (1)

The same immunoblot was used for blotting with antibodies against NR1 (relative molecular mass 120K), NR2A (170K) and NR2B (180K).

의 생쥐 모두 物體를 탐색을 위한 비슷한 정도의 호기심과 動機賦與를 가지고 있다는 것을 意味한다. 記憶 維持 實驗 동안, 敎育 과정에서 사용된 친숙한 物

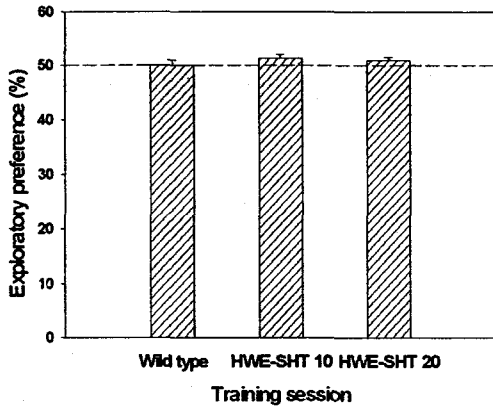


Fig. 5. Enhanced novel-object recognition memory in HWE-treated mice: Exploratory preference in the training session

The base line is 50% corresponding to preference at chance (50%). The amount of time spent exploring the two objects was the same for HWE-treated mice and wild type mice.

Figure shows the temporary feature of the enhanced long-term memory in the HWE-treated mice (HWE-SHT 10, n = 15; HWE-SHT 20, n=12; wild type, n=10). HWE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g HWE-SHT was orally given. Data expressed as mean±S.E.

體 중 하나가 세 번째 새로운 物體로 交替되었고 動物들에게 5분간 탐색하도록 하였다. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐와 대조군의 생쥐 모두 1시간 記憶 維持 實驗에서 새로운 物體에 대하여 類似한 選擇을 나타내었다(Fig. 6). 이는 모든 그룹이 똑같이 1시간 동안 오래된 物體에 대한 記憶을 維持하고 있다는 것을 意味한다.

그러나 記憶 維持 實驗이 1일 또는 3

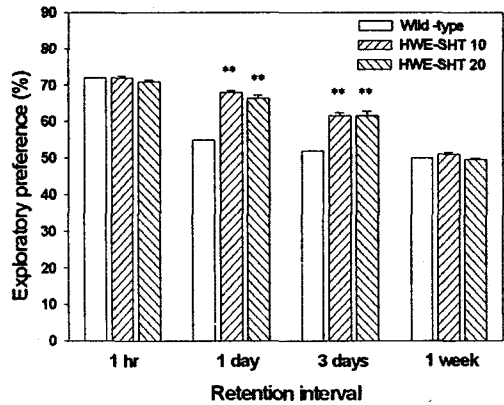


Fig. 6. Enhanced novel-object recognition memory in HWE-treated mice: Exploratory preference in retention test

The base line is 50% corresponding to preference at chance (50%). The amount of time spent exploring the two objects was the same for HWE-treated mice and wild type mice.

Figure shows the temporary feature of the enhanced long-term memory in the HWE-treated mice (HWE-SHT 10, n = 15; HWE-SHT 20, n=12; wild type, n=10). HWE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g HWE-SHT was orally given. Data expressed as mean±S.E. ** : P<0.01 between HWE-treated and wild type, ANOVA test.

일 후에 시행되었을 때, 生慧湯 熱水抽出物 10과 20으로 處置된 생쥐 모두 새로운 物體에 대하여 대조군의 생쥐보다 더 강력한 選擇을 나타내었다. 이는 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐가 더 오랜 기간의 記憶을 가진다는 것을 가리킨다. Dunnett's test를 사용한 統計的인 分析에서 대조군과 生慧湯 熱水抽出物 處置 생쥐는 1일(P<0.01)과 3일

($P < 0.01$)의 維持 實驗에서 의미 있는 差異를 나타냈으나, 生慧湯 熱水抽出物의 두 가지 다른 用量으로 處置된 생쥐 사이에는 差異가 없었다. 그러므로 增強된 長期間의 記憶은 生慧湯 熱水抽出物 處置 量과는 무관하였다. 그러나 敎育 1주 후, 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐의 選擇은 기본적인 水準으로 돌아온 것으로 나타났다.

3. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐의 敎育 후 전후적 恐怖 記憶에 대한 效果(敎育 1시간, 1일, 10일 후 전후적 공포 조건)

다음으로 두 가지 형태의 聯想 感情 記憶을 평가하였다. : 전후적 공포 조건과 암시적 공포 조건. 생쥐들은 혐오스러운 무조건 자극과 짝지어진 중립성 조건 자극(소리와 같은), 혹은 조건 자극과 무조건 자극을 짝지움으로써 조건화된 전후적 恐怖를 學習하게 된다. 전후적 恐怖 條件은 해마-의존적이고, 반면에 암시적 恐怖 條件은 해마-비의존적이다²⁵⁾. 공포조건 의 두 가지 형태에는 NMDA 수용체의 활성이 요구된다^{26,27)}.

분리된 그룹을 이용하여 敎育 1시간, 1일, 10일 후 전후적, 암시적 공포 조건을 測定하였다. 먼저 전후적 恐怖 記憶을 分析하였다. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐는 좀더 강한 고정 反應을

일관적으로 보여주었다. ANOVA는 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐와 대조군의 생쥐 사이에 즉각적인 고정반응에는 有意한 差異가 없었으나, 1시간 ($P < 0.05$), 1일($P < 0.05$), 10일($P < 0.05$)에 實驗했을 때는 전후적 고정반응에서 유의한 차이를 보였다. 게다가 統計的 分析에서는 대조군과 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐 사이에 유의한 차이를 나타냈으나, 두 가지 다른 用量의 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐 사이에는 유의한 差異가 없었다(Fig. 7, 8, 9).

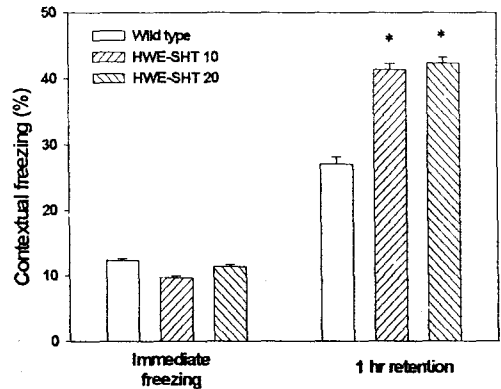


Fig. 7. Enhancement of contextual fear memory of 1 hour after training in HWE-treated mice (Contextual conditioning 1 hour after training) HWE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g HWE-SHT was orally given. Data expressed as mean±S.E. * : $P < 0.05$ between HWE-treated and wild type, ANOVA test.

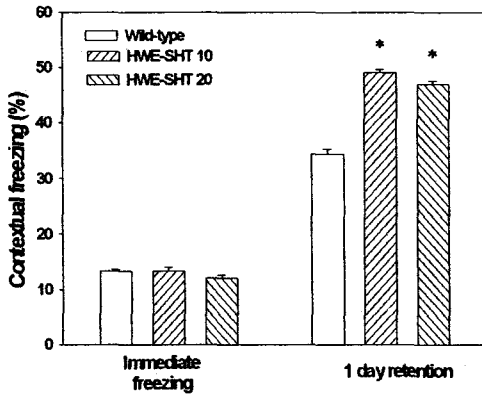


Fig. 8. Enhancement of contextual fear memory of 1 day after training in HWE-treated mice (Contextual conditioning 1 day after training) HWE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g HWE-SHT was orally given. Data expressed as mean±S.E. * : P<0.05 between HWE-treated and wild type, ANOVA test.

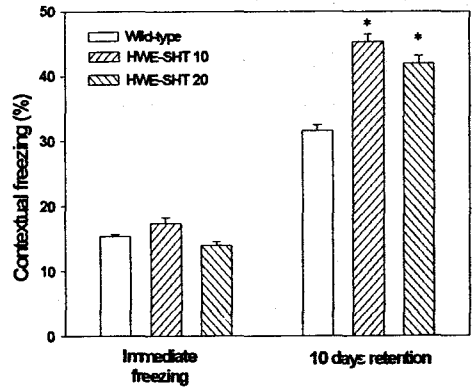


Fig. 9. Enhancement of contextual fear memory of 10 days after training in HWE-treated mice (Contextual conditioning 10 days after training) HWE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g HWE-SHT was orally given. Data expressed as mean±S.E. * : P<0.05 between HWE-treated and wild type, ANOVA test.

4. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐의 教育 후 암시적 恐怖 記憶에 대한 效果(教育 1시간, 1일, 10일 후의 암시적 공포 조건)

NMDA 수용체는 편도(대뇌)와 피질에서도 많이 표현되기 때문에 암시적 恐怖 條件을 觀察하였다. One-way ANOVA에서는 教育 1시간(P<0.05), 1일(P<0.01), 10일(P<0.05) 후에 實驗하였을 때 대조군보다 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐에서 소리에 대한 고정 반응이 의미있게 증가하였음을 보여주었다(Fig. 10, 11, 12). 統計的 分析은 대조군과 두 가지 다른 用量的 生慧湯 熱

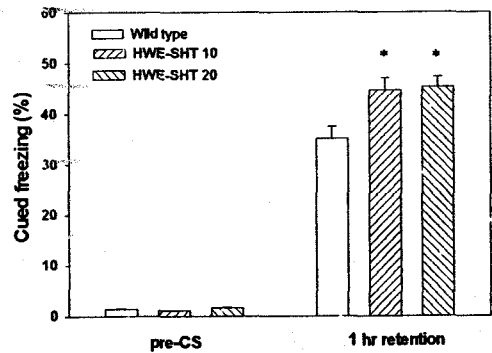


Fig. 10. Enhancement of cued fear memory of 1 hour after training in HWE-treated mice (Cued fear conditioning 1 hour after training) HWE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g HWE-SHT was orally given. Data expressed as mean±S.E. * : P<0.05 between HWE-treated and wild type, ANOVA test.

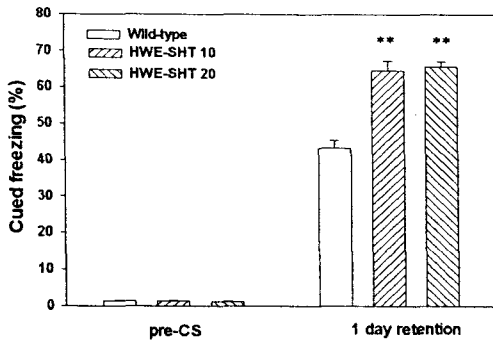


Fig. 11. Enhancement of cued fear memory of 1 day after training in HWE-treated mice (Cued fear conditioning 1 day after training) HWE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g HWE-SHT was orally given. Data expressed as mean±S.E. ** : P<0.01 between HWE-treated and wild type, ANOVA test.

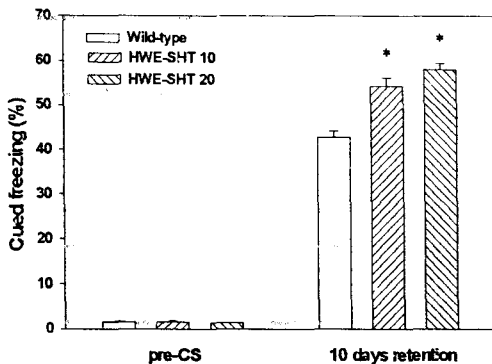


Fig. 12. Enhancement of cued fear memory of 10 days after training in HWE-treated mice (Cued conditioning 10 days after training) HWE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g HWE-SHT was orally given. Data expressed as mean±S.E. * : P<0.05 between HWE-treated and wild type, ANOVA test.

水抽出物로 處置된 생쥐 사이에서 의미 있는 差異를 보여주었다(P<0.05, 각각). 세 가지 상투적인 行動(주춤하는 것/달리는 것, 점프하는 것, 소리를 내는 것)을 誘導하는데 필요한 電流의 最少量이 대조군과 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐에서 유사하게 나타났으므로(data는 생략), 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐에서 변형된 통증 反應에 의해 전후적, 암시적 恐怖 記憶이 증강된 것은 아니다.

5. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐의 空間 學習에 대한 效果(水中 迷路 訓練에서의 脫出 潜在力)

마지막으로, 숨겨진 플랫폼 水中 迷路를 사용하여 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐의 空間 學習을 實驗하였다. 이는 해마에 있는 NMDA 수용체의 활성이 요구되는 實驗이다. Fig. 13 에서 보는 바와 같이, 대조군과 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐 모두 플랫폼을 脫出하는데 걸리는 시간은 教育 과정에 따라서 減少하였다. 그러나 과정을 통하여 의미 있는 差異를 보였다(P<0.01). 이는 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐의 空間 學習이 대조군보다 훨씬 빠르다는 것을 意味한다. 더욱이 統計的 分析은 세 번째 과정에서 의미 있는 差異를 나타냈으며(P<0.05), 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐의 學習能力이 더

뛰어나다는 것을 확인할 수 있다.

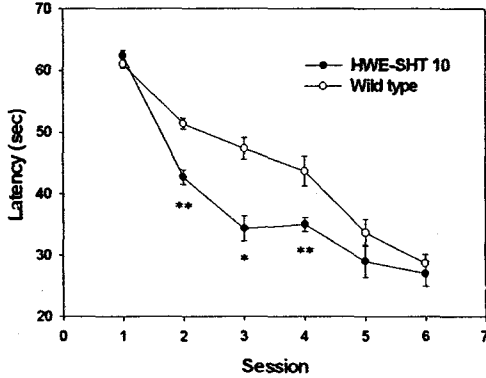


Fig. 13. Enhanced performance in the hidden-platform water maze task by HWE-treated mice (Cued fear conditioning 1 hour after training). Escape latency (mean±S.E.) in water maze training (HWE-SHT 10, n=16; wild type, n=10).
 HWE-SHT 10: 10 mg/100 g HWE-SHT was orally given.
 Data expressed as mean±S.E.
 * : P<0.05, ** : P<0.01 between HWE-treated and wild type.

6. 受動的 回避 實行에 대한 生慧湯 에탄올抽出物の 效果

1) 正常 생쥐

正常 생쥐에서 生慧湯 에탄올抽出物은 step through test의 過程에서 어두운 방으로 들어가는 데 걸리는 시간, step down test에서의 誤謬 횟수, 두 實驗의 失敗率에 영향을 미치지 못했다. 이는 生慧湯 에탄올抽出物은 正常 생쥐의 受動的 回避 實行에 영향을 미치지

못한다는 것을 意味한다.

2) 記憶 損傷 생쥐

生慧湯 에탄올抽出物은 30% 에탄올로 야기된 記憶 登錄 損傷을 개선하지 못하였고, step through test와 step down test에서 실행된 전기 경련 쇼크 (Electric convulsive shock: ECS)에 의해 야기된 記憶 統合 缺陷과 記憶 回復 妨害를 증강시키지 못하였다.

40% 에탄올로 일으킨 記憶 回復 損傷의 경우에 20 mg/100 g의 生慧湯 에탄올抽出物은 어두운 방으로 들어가는 데 걸리는 시간을 증가시켰고(Fig. 14),

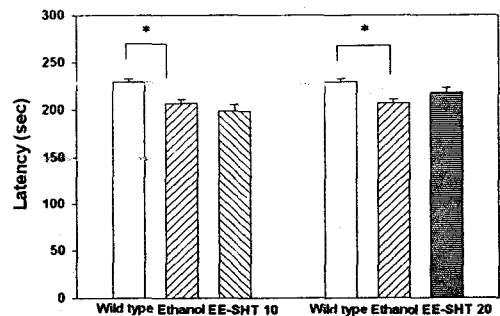


Fig. 14. Effects (time elapse) of EE-SHT on memory retrieval impairment induced by 40% ethanol in the step through test

Ethanol : mice orally treated with 40% ethanol before 20 minutes on the testing trial.
 EE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g EE-SHT was orally given before 30 minutes on the testing trial(n=12).
 Time elapsed before the mice entered the dark compartment (latency) is shown.
 Data expressed as mean±S.E.
 * : P<0.05 vs control, Mann-Whitney's U-test.

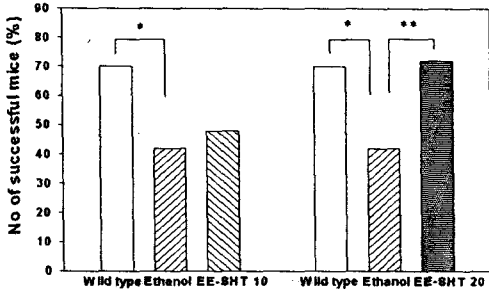


Fig. 15. Effects (Percentage of mice not entering the dark compartment in the testing trial) of EE-SHT on memory retrieval impairment induced by 40% ethanol in the step through test

Ethanol: mice orally treated with 40% ethanol before 20 minutes on the testing trial. EE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g EE-SHT was orally given before 30 minutes on the testing trial(n=12).

*: P<0.05 vs control, **: P<0.01 vs ethanol, chi-square test.

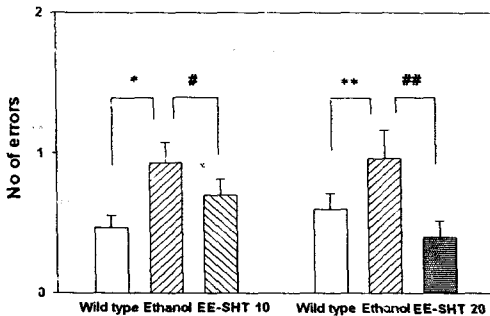


Fig. 16. Effects (number of stepping down events in the testing trial) of EE-SHT on memory retrieval impairment induced by 40% ethanol in the step down test

Ethanol: mice orally treated with 40% ethanol before 20 minutes on the testing trial. EE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g EE-SHT was orally given before 30 minutes on the testing trial(n=12).

Data expressed as mean ± S.E. *: P<0.05, **: P<0.01 vs control, #: P<0.05, ##: P<0.01 vs ethanol, Mann-Whitney's U-test.

step through test에서 成功率을 증가시켰다(Fig. 15). 10, 20 mg/100 g의 두 가지 用量의 生慧湯 에탄올抽出物은 step down test에서 誤謬 횟수를 의미 있게 감소시켰고(Fig. 16), 成功率을 증가시켰다(Fig. 17).

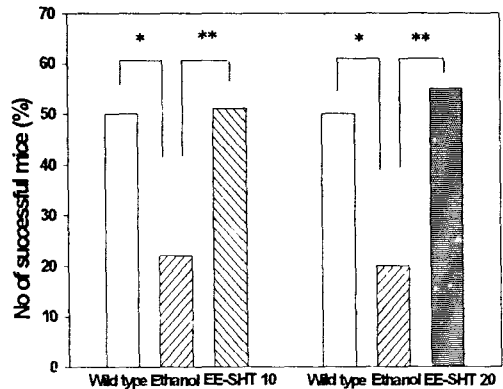


Fig. 17. Effects (percentage of mice not stepping down in the testing trial) of EE-SHT on memory retrieval impairment induced by 40% ethanol in the step down test

Ethanol: mice orally treated with 40% ethanol before 20 minutes on the testing trial. EE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g EE-SHT was orally given before 30 minutes on the testing trial(n=12).

*: P<0.05 vs control, **: P<0.01 vs ethanol, chi-square test.

7. 正常 생쥐에서 能動的 回避 實行에 대한 生慧湯 에탄올抽出物의 效果

1) Shuttle box test

記憶 登錄 實驗에서, 대조군과 生慧湯 에탄올抽出物 10 mg/100 g로 處置된

군은 점차적으로 더 높은 CAR 수준을 보여주었으나(Fig. 18), 生慧湯 에탄올抽出物 10 mg/100 g로 處置된 생쥐는 과정 마지막 날에 SMA의 의미 있는 감소를 보여주었다(Fig. 19). 生慧湯 에탄올抽出物 20 mg/100 g로 處置된 경우는 마지막 과정에서 CAR(Fig. 18)과 SMA(Fig. 19)을 감소시켰다. CAR, UAR과 誤謬 횟수에는 의미 있는 영향을 미치지 못했다.

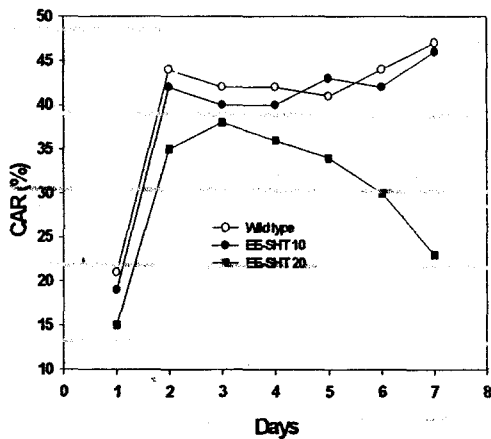


Fig. 18. Effects (the mean values of CAR (%) in the shuttle box tests) of EE-SHT on memory registration in conditioned avoidance tests
EE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g EE-SHT was orally given before 10 minutes on the daily session(n=8).

記憶 回復 實驗에서 CAR, UAR, 誤謬 횟수와 SMA에 있어서 대조군과 生慧湯 에탄올抽出物로 處置된 생쥐 사이에는 의미있는 차이가 없었다.

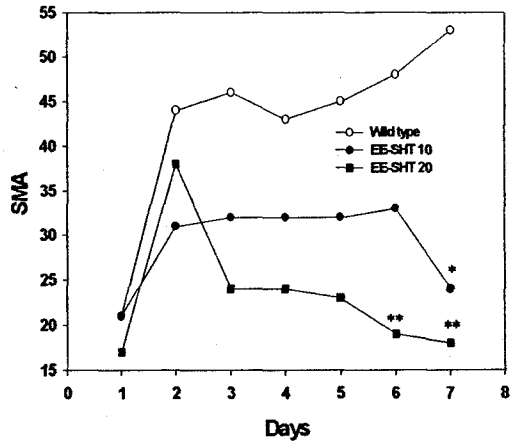


Fig. 19. Effects (the mean values of SMA in the shuttle box tests) of EE-SHT on memory registration in conditioned avoidance tests
EE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g EE-SHT was orally given before 10 minutes on the daily session(n=6).
*: P<0.05, **: P<0.01 vs control, Mann-Whitney's U-test.

2) Lever press test

記憶 登錄 實驗에서, 生慧湯 에탄올抽出物로 處置된 군은 대조군보다 계속해서 낮은 CAR과 SMA 수치를 보였다(Fig. 20, Fig. 21). 그리고 대조군과 같은 UAR과 誤謬 횟수를 나타내었다. 記憶 回復 實驗에서 CAR, SMA, UAR 그리고 誤謬 횟수는 대조군과 生慧湯 에탄올抽出物로 處置된 군 사이에 의미 있는 차이가 없었다(Table I).

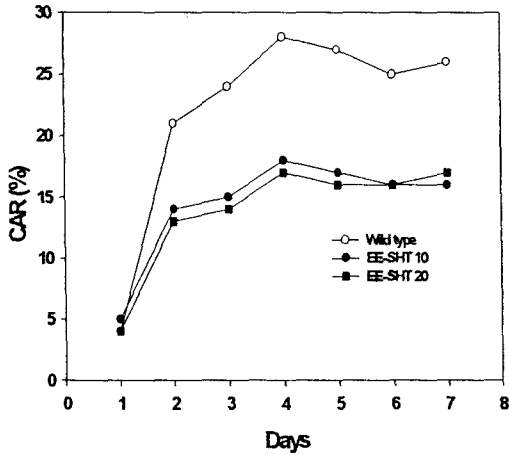


Fig. 20. Effects (the mean values of CAR (%) in the lever press) of EE-SHT on memory registration in conditioned avoidance tests

EE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g EE-SHT was orally given before 10 minutes on the daily session(n=8).

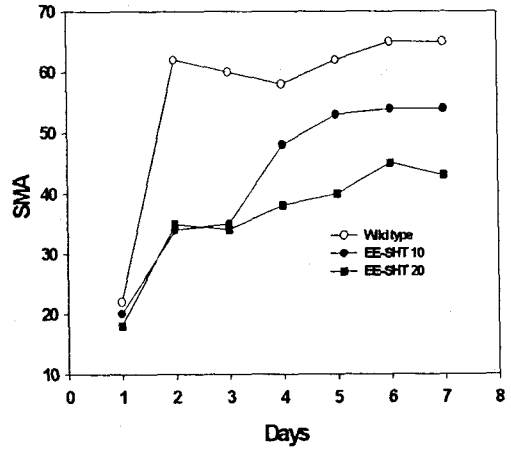


Fig. 21. Effects (the mean values of SMA in the lever press) of EE-SHT on memory registration in conditioned avoidance tests

EE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g EE-SHT was orally given before 10 minutes on the daily session(n=6).

Table 1. Effects of EE-SHT on memory retrieval process in active avoidance performances

Treatment	CAR (%)		SMA(number of movement)	
	PRE	POST	PRE	POST
Shuttle box test				
Wild type	76.3±5.2	79.4±2.1	36.2±4.3	38.3±6.2
EE-SHT 10	80.3±3.2	72.5±3.2	43.4±5.1	26.3±6.1
EE-SHT 20	80.4±2.6	75.3±2.3	35.5±4.3	29.3±2.6
Lever press test				
Wild type	64.4±3.3	73.6±5.7	65.3±4.6	87.7±13.1
EE-SHT 10	54.6±7.3	76.3±2.1	103.7±21.2	80.3±13.7
EE-SHT 20	62.5±5.2	68.5±6.2	123.3±16.4	76.7±11.2

PRE: Before shuttle box and lever press test.

POST: After shuttle box and lever press test.

EE-SHT 10, 20: 10, 20 mg/100 g EE-SHT was orally given(n=6).

Data expressed as mean±S.E. Analysed by paired t-test.

8. 生慧湯 에탄올抽出物の 運動 能力에 대한 效果

生慧湯 에탄올抽出物 10과 20 mg/100 g은 投與 직후와 24시간 후에 시행된 tilting type ambulometer test에서 運動 能力에 의미있는 영향을 미치지 못하였다.

9. 生慧湯 에탄올抽出物の pentobarbital- 誘導 睡眠에 대한 效果

pentobarbital로 誘導된 睡眠時間은 生慧湯 에탄올抽出物 20 mg/100 g의 投與로 의미 있게 延長되었지만, 10 mg/100 g에서는 의미 있는 延長이 나

Table II. Effects of EE-SHT on pentobarbital-induced sleep

	Sleeping time (minutes)
Saline	42.2±4.3
Chlorpromazine (2 mg/kg)	79.3±8.8**
EE-SHT 10 mg/100 g	49.7±6.2
EE-SHT 20 mg/100 g	56.8±5.3*

Pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) was administrated 15 minutes after chlorpromazine (2 mg/kg, i/p.) or EE-SHT (10, 20 mg/100 g, p.o.) treatment(n=9).

* : P<0.05, ** : P<0.01 vs Saline, Student's t-test.

타나지 않았다. 能動的 대조군인 Chlorpromazine 은 睡眠時間을 현저하게 延長하였다(Table II).

IV. 考 察

學習이란 우리를 둘러싸고 있는 세상, 즉 주위 환경으로부터의 情報와 知識을 腦에 貯藏하는 過程이고 記憶이란 그 貯藏된 情報와 知識을 再生하는 過程이다¹⁾.

현재 高位腦機能의 基盤이 되는 대뇌 神經細胞의 研究는 視覺系에 있어 가장 進전을 보이고 있다. 視覺系에 관한 研究로 主觀적으로는 統一적인 視覺體驗이 大腦에서의 情報處理에 있어서는 병렬적으로 處理되고 있다는 사실이 밝혀졌다. 예를 들면 우리들은 '빨간 사과가 나무에서 떨어진다.'는 것을 統一적 意識으로 體驗한다. 그러나 腦에서는 사과라는 형태, 빨간 색, 떨어진다는 운동이 각각 별개의 領域에서 處理되는 것이다. 이 竝列分散型의 情報處理過程이 腦 안에서 어떻게 統合되어 統一적인 意識體驗을 誘導하는가 하는 것이 解決해야 할 腦의 큰 문제(결합문제)이다. 學習이라는 것을 神經의 加소성으로 說明하기도 한다. 틀림없이 神經系의 加소성에 의한다고 믿고 있는 현상으로는 習慣性, 過敏性, 古典的 條件化, 使役的 條件化,

刻印, 버릇들이기, 模倣, 그리고 言語의 學習을 비롯한 學習이라고 지칭하는 것들이 있다. 하지만 풀어야 할 의문이 더 많다. 腦機能의 研究에서 뉴런이나 시냅스 그리고 뉴런간의 연합 등 하드웨어적인 研究와 그것에 基礎하는 直感的 理解나 假設 그리고 數理的 모델을 이용한 理論的 研究를 並行하는 것이 중요하다¹⁾.

NMDA 수용체는 연결(시냅스)와 일치되어 감지되는 것으로 記憶形成에 대한 단계적 연결고리로서 작용하고²⁻⁴⁾, NR1 아단위와 다양한 NR2 아단위로 構成되는 ... 신경세포성 ... 복합체(heteromeric complexes)이다^{5,6)}. NR1 아단위는 채널기능에 必須的인 반면 NR2 아단위는 채널의 關門과 Mg^{2+} 依存성을 調節한다⁷⁾. 해마(hippocampus)와 대뇌피질(cortex) 같은 成人의 前腦部位에서 NR2A와 NR2B 아단위만이 NR1 아단위와 함께 수용체 복합체를 形成하는 데 이용될 수 있다. 實驗室內에서 재조합 NR1-NR2B 복합체는 NR1-NR2A 복합체보다 더욱 긴 흥분성 시냅스후전위(EPSPs)을 나타낸다⁸⁾. 生體內에서 NR2B의 수용체 복합체와의 결합증가는 NMDA 수용체의 시냅스 일치 감지를 증가시키도록 한다. NR2B 발현은 靑少年에서 成人으로 移行하는 동안에 낮은 段階로 조절되며⁹⁾, NMDA

채널의 흥분성시냅스후전위의 持續性이 段階的적으로 감소하는 것과 연관된다¹⁰⁾. 이는 NMDA에 의해 媒介된 適應性을 감소시킬 수 있고 아마도 노래하는 새, 원숭이 그리고 成人의 減退된 記憶力을 설명할 수도 있다^{11,12)}.

NMDA 수용체는 시냅스의 가소성과 記憶 形成에 대한 年齡依存的 역치의 關門調節을 위한 단계화된 分子 스위치로서 작용한다. 시냅스 效能의 NMDA-依存的 調節은 聯想學習能力과 記憶의 多樣性에 根源的인 메커니즘을 나타낸다. 結果들은 前腦에서 10-100 Hz 범위 내의 神經 活動이 學習된 情報의 코드화와 貯藏에 중요한 作用을 한다는 것을 가리키고 있다. 더불어 記憶 過程에서 分子 스위치로서의 NR2B의 證明은 學習과 記憶의 障礙를 治療하는 潛在的인 새로운 目標로 주목을 받고 있다. 본 研究는 韓藥 治療에 의해 지능과 기억력이 증가된 哺乳動物을 창조하는데 대한 戰略을 보여줄 것이다.

生慧湯은 清代 陳士鐸의 辨證錄에 처음 記載되어 있으며, 辨證奇門에서 補心腎하는 作用으로 初老의 記憶力 喪失이나 健忘症을 治療하는데 사용되었다¹³⁾.

韓醫學에서 記憶力 喪失의 原因은 稟賦不足, 思慮過多, 心虛, 痰飲, 腎衰, 心腎不交와 瘀血이며¹⁴⁻¹⁶⁾. 특히 臟腑生理學的인 觀點으로써, 記憶은 心·腎과 密

接한 關係가 있으며, 生慧湯이 補心腎하므로 記憶力 喪失을 豫防할 수 있을 것으로 思料되며, 아울러 記憶力 增進에도 역시 밀접한 關係가 있다.

生慧湯은 熟地黄, 山茱萸, 遠志, 酸棗仁, 柏子仁, 茯苓, 人蔘, 石菖蒲, 白芥子の 9가지 本草로 構成되어 있으며, 熟地黄은 補血, 填髓, 滋腎精하고²⁸⁾, 山茱萸는 補益肝腎하며²⁹⁾, 遠志는 心神不安과 健忘을 治療하는데 사용되고²⁹⁾, 酸棗仁은 補肝, 寧心, 斂汗, 生津하며²⁹⁾, 柏子仁은 益智, 寧神하고³⁰⁾, 茯苓은 健脾寧心하며²⁹⁾, 人蔘은 大補元氣, 安神하고³¹⁾, 石菖蒲는 神昏, 癲癇, 健忘을 治療하는데 사용되며²⁹⁾, 白芥子는 溫肺祛痰한다²⁹⁾.

生慧湯 熱水抽出物로 正常 생쥐를 處置했을 때, NR2B mRNA의 발현은 주로 대뇌피질/선조체, 편도체에서 뚜렷하고 해마에서 약간의 증가가 나타난다. 그러나 뇌간, 시상, 소뇌에서는 거의 나타나지 않았다. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐 모두에서 해마와 대뇌피질에서의 시냅스 NMDA-수용체 단백질에 대한 immunoblot의 結果는 NR2A (170K)와 NR2B (180K)가 높게 調節되는 것으로 나타났다. 訓練 과정과 記憶 維持 實驗에서 탐색 選擇은 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐에서 物體 認識 기억의 증강을 보여주었다. 生慧湯 熱水抽出物로 處置받은 생쥐에서 증강된 長期 記憶이

一時的으로 관찰되었다. 전후적 恐怖 記憶의 증강은 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐에서 教育 1시간, 1일, 10일 후 관찰되었고, 教育 1시간, 1일, 10일 후의 암시적 恐怖 記憶에서도 유사한 結果가 나타났다.

條件 反射 理論에 근거한 能動的 回避 實驗에서 生慧湯 에탄올抽出物은 能動的 記憶으로 引導된 反應인 CAR에 영향을 끼치지 못하였다. 이는 生慧湯 에탄올抽出物이 正常 생쥐에서 直接的인 記憶 增強 效果를 가지고 있지 않다는 것을 의미한다.

많은 記憶 損傷 모델이 만들어져 記憶과 學習過程의 研究에 사용되고 있다³²⁻³⁴⁾. 30% 에탄올로 誘導된 記憶 制限 缺損 생쥐, 40% 에탄올로 誘導된 記憶 回復 損傷 생쥐, ECS 誘導 記憶 統合 缺損 생쥐와 ECS 誘導 記憶 回復 缺損 생쥐와 4가지 모델을 實驗에 이용하였다. 生慧湯 에탄올抽出物은 오직 40% 에탄올로 誘導된 記憶 回復 損傷만을 개선시켰다. 이로써 生慧湯 에탄올抽出物이 에탄올의 作用을 妨害하지만 choline이나 다른 神經 전달물질을 방해하지는 않는다는 것을 추측할 수 있으며 또한 生慧湯 에탄올抽出物이 記憶 回復 過程에 주로 작용한다는 것도 유추할 수 있다.

에탄올의 神經毒性은 잘 研究되어 있

다³⁵⁻³⁸). 에탄올은 短期, 長期의 記憶 損傷을 誘發하고, 實驗 전후의 에탄올의 投與 結果는 에탄올 誘導 記憶 缺損이 특히 choline과 adrenaline 같은 神經傳達者에 대한 영향에 起因하고 大腦의 神經細胞가 腦에서 에탄올의 주된 表迹임을 시사한다[33,36]. 본 研究의 實驗에서 生慧湯 에탄올抽出物은 에탄올로 誘導된 記憶 損傷을 개선시키지만 scopolamine 誘導 記憶 障礙는 개선시키지 못했다. 生慧湯 에탄올抽出物과 記憶 過程 사이의 關係를 說明할 수 있기 위해서는 더 심도 있는 研究가 必要하다.

生慧湯 에탄올抽出物은 Shuttle box test의 마지막 과정과 Lever press test에서 SMA를 감소시켰다. 그러나 經口로 投與된 직후와 24시간 후 정상 상태에서 正常 생쥐의 運動 能力을 변화시키지는 못했다. 이는 環境的인 刺戟에 의해 야기된 흥분상태에서 증가된 運動 能力 水準을 감소시키는 것으로 生慧湯 에탄올抽出物은 鎮靜 또는 不安緩和 作用을 가지고 있음을 가리킨다.

生慧湯 에탄올抽出物은 誤謬 횟수에 影響을 미치지 않았으므로, 비록 생쥐의 痛症 敏感 水準에 影響을 미치지 않았다 할지라도, 生慧湯 에탄올抽出物로 處置된 생쥐에서의 더 낮은 CAR 數値는 部分的으로 鎮靜 또는 不安緩和 作用에 의한 것이라 할 수 있다. 生慧湯 에탄올

抽出物은 pentobarbital에 의해 유도된 睡眠時間을 용량의존적으로 延長시켰으며 이는 鎮靜 또는 不安緩和 作用이 있음을 시사한다.

비록 學習과 記憶 過程에 대한 生慧湯의 效果를 說明하기 위하여 보다 나은 研究가 필요하지만, 이 論文의 結果는 中樞神經系에 대한 生慧湯의 效果에 관한 研究에 基礎的인 資料를 提供할 것이다.

V. 結 論

수용체 복합체와 NR2B의 結合 實驗, NR2B 발현, NMDA 媒介 適應性, 受動的 및 能動的 回避 實行 實驗을 이용하여 記憶과 學習過程에 대한 生慧湯의 熱水抽出物과 에탄올抽出物의 效果에 대한 研究를 進行하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 生慧湯 熱水抽出物의 經口 投與 후 Northern blot 分析에 의한 NR2B 발현은 皮질과 해마에 풍부하였고 시상, 뇌간과 소뇌에 약간의 발현이 있었고, Western blot 分析에서는 대조군에 비해 處置된 생쥐의 皮질과 해마에서 두 배의 NR2B 단백질이 檢出되었다.
2. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐에

서 새로운 物體의 認識 記憶은 教育 과정에서 두 가지 새로운 事物은 탐색하는데 걸린 시간에 큰 차이는 없었으며, 記憶 維持 實驗에서 두 군의 實驗 생쥐는 1시간 記憶 維持 實驗에서 새로운 物體에 대하여 유사한 選擇을 나타내었다. 그러나 대조군과 生慧湯 熱水抽出物 處置 생쥐는 1일 ($P<0.01$)과 3일($P<0.01$)의 記憶 維持 實驗에서 의미 있는 差異를 나타냈으며, 生慧湯 熱水抽出物의 두 가지 用量으로 處置된 생쥐 사이에는 差異가 없었다.

3. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐의 教育 후 전후적 恐怖 記憶에 대한 效果는 즉각적인 고정반응에는 유의한 差異가 없었으며, 1시간($P<0.05$), 1일($P<0.05$), 10일($P<0.05$)에 實驗하였을 때는 전후적 기억에서 유의한 差異를 나타냈으나, 두 가지 用量 抽出物로 處置된 생쥐 사이에는 유의한 差異가 없었다.

4. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐의 教育 후 압시적 恐怖 記憶에 대한 效果는 教育 1시간($P<0.05$), 1일($P<0.01$), 10일($P<0.05$) 후에 대조군보다 소리에 대한 反應에서의 고정반응이 의미 있게 증가하였고, 대조군과 두 用量 抽出物로 處置된 생쥐 사이에서 의미 있는 差異를 보여주

었다($P<0.05$, 각각).

5. 生慧湯 熱水抽出物로 處置된 생쥐의 空間 學習에 대한 效果를 水中 迷路 訓練에서 脫出에 걸리는 시간으로 實驗한 結果, 탈출에 걸리는 시간은 教育 과정에 따라 감소하였으나 과정동안 의미 있는 差異를 보였으며 ($P<0.01$), 세 번째 과정에서 의미 있는 差異를 보여주었다($P<0.05$).

6. 受動的 回避 實行에 대한 生慧湯 에탄올抽出物의 效果는 正常 생쥐에서 step through test의 過程에서 어두운 방으로 가는데 걸리는 시간, step down test에서의 誤謬 횟수, 두 實驗의 失敗率에 영향을 미치지 못했고, 記憶 損傷을 손상시킨 생쥐의 경우 40% 에탄올로 야기된 記憶 回復 損傷에서 20 mg/100 g의 生慧湯 에탄올抽出物이 어두운 방으로 들어가는데 걸리는 시간을 증가시켰고, step through test에서 成功率을 증가시켰으며, 두 用量은 step down test에서 誤謬 횟수를 의미 있게 감소시켰고, 成功率을 증가시켰다.

7. 能動的 回避 實行에 대한 生慧湯 에탄올抽出物의 效果는 正常 생쥐에서 Shuttle box test의 記憶 登錄 實驗에서 대조군과 生慧湯抽出物 10 mg/100 g로 處置된 군은 점차적으로 CAR 수준이 높아졌고, 마지막

과정에서 SMA의 의미있는 감소를 보였다. 20 mg/100 g의 경우는 마지막 과정에서 CAR과 SMA를 감소시켰으나, CAR, UAR과 誤謬 횟수에는 의미있는 영향을 미치지 못했으며, Lever press test의 記憶 登錄 實驗에서 대조군보다 지속적으로 낮은 CAR과 SMA 수치를 보였고, 대조군과 같은 UAR과 誤謬 횟수를 나타내었다.

8. 生慧湯 에탄올抽出物の 運動 能力에 대한 效果는 두 用量 모두 投與 직 후와 24시간 후에 시행된 tilting type ambulometer test에 의해 測定된 運動能力에 의미 있는 영향을 미치지 못하였다.
9. 生慧湯 에탄올抽出物の pentobarbital-誘導 睡眠에 대한 效果는 20 mg/100 g의 投與로 의미 있게 延長이 나타났지만, 10 mg/100 g에서는 의미 있는 延長이 나타나지 않았다.

〈參考文獻〉

- 1) 박찬웅. 뇌, 학습과 기억의 구조, 서울, 서울대학교 출판부, 1-5 (1998).
- 2) Stevens, C.F. and Sullivan, J. Synaptic plasticity. *Curr. Biol.* 8, T151-153 (1998).
- 3) Bliss, T.V. and Collingridge, G. L. A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39 (1993).
- 4) Bear, M. F. and Malenka, R.C. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 389-399 (1994).
- 5) Nakanishi, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603 (1992).
- 6) Hollmann, M. and Heinemann, S. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31-108 (1994).
- 7) Monyer, H. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256, 1217-1221 (1992).
- 8) Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540 (1994).
- 9) Sheng, M., Cummings, J., Roldan, I.A., Yan, Y.N. and Yan, I.Y. Changing subunit composition of

- heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368, 144-147 (1994).
- 10) Okabe, E. Hippocampal synaptic plasticity in mice overexpressing an embryonic subunit of the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 18, 4177-4188 (1998).
- 11) Hestrin, S. Activation and desensitization of glutamate-activated channels mediating fast excitatory synaptic currents in the visual cortex. *Neuron* 9, 991-999 (1992).
- 12) Kuhl, P.K. Learning and representation in speech and language. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 812-822 (1994).
- 13) 錢松, 辨證寄聞, 서울, 행림출판, 104 (1963).
- 14) 金完熙 外, 東醫生理學, 서울, 경희대학교출판국, 279-280, 325-326 (1993).
- 15) 金完熙 外, 臟腑辨證論治, 서울, 성보사, 169-170 (1986)
- 16) 尹吉榮, 동의학의 방법론 연구, 서울, 성보사, 25, 33-34, 100 (1983).
- 17) Liu, G., Choi, S. and Tsien, R. W. Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of post synaptic AMPA receptors of synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron*, 22, 395-409 (1999).
- 18) Gooderham, K. in *Techniques in Molecular Biology* (Walkerand, J. M., and Gaastra, W., eds.). Croom Helm Publishers, London, U.K. 49-87, (1983).
- 19) Tsien, J.Z., Huerta, P.T. and Tonegawa, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87, 1327-1338 (1996).
- 20) Segawa, M., Saito, N. and Nishiyama, N. *Biogenic Amines* 7, 191-196 (1990).
- 21) Zhou Y., Saito H. and Nishiyama N. Effects of *Acorus gramineus* Soland on learning and memory performances in mice. *Shoyakugaku*, 46, 103-108 (1992).
- 22) Reed, J.M. and Squire, R.L. Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. *Behav. Neurosci.* 111,667-675 (1997).
- 23) Myhrer, T. Exploratory behav. *Neurosci.* 102, 356-362 (1988)

- 24) Mumby, D.G. Ischemia-induced object-recognition defects in rats are attenuated by hippocampal ablation before or soon after ischemia. *Behav. Neurosci.* 110, 266-281 (1996).
- 25) Phillips, R.G. and LeDoux, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106, 274-285 (1992).
- 26) Kim, J.J., Fanselow, M.S., DeCola, J.P. and Landeira-Fernandez, J. Selective impairment of long-term but not short-term conditional fear by the N-methyl-D-aspartate antagonist APV. *Behav. Neurosci.* 106, 591-596 (1992).
- 27) Davis, M., Hitchcock, J. and Rosen, J.B. *The Physiology of Learning and Memory* (ed. Bower, G.H.) (Academic Press, New York, 1987).
- 28) 李挺, 編註醫學入門, 서울, 남산당. 203 (1994).
- 29) 全國韓醫科大學本草學教室 編, 本草學, 서울, 영림사, 303, 453, 493, 496, 523, 626 (1991).
- 30) 申佶求, 申氏本草學, 서울, 수문사, 117 (1987)
- 31) 江蘇新醫學院, 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社. 29, (1982).
- 32) Saito, S., Lee C-H, and Soella, M. *Annu. Anim. Psychol.* 21, 19-23 (1971).
- 33) Kucharski, D. *Science* 238, 786-289 (1987).
- 34) Hock, F. J. *Neuropsychobiology* 17, 145-152 (1987).
- 35) Schaeffer, K.W. and Parson, O.A. *Int. J. Neurosci.* 38, 311-316 (1988).
- 36) Scheema-Dhadli, S., Halperin, F. A., Sonnenberg, K., MacMillan, V. and Haplerin, M.L. *Biochem. Cell. Biol.* 65, 458-463 (1987).
- 37) Blozovski, D. *Neurosci. Lett.*, 89, 114-119 (1988).
- 38) Crawford, A. *Drug Alcohol Depend.* 10, 279-285 (1978).