

중풍 한방처방전의 효능비교 연구 ; 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕이 국소 전뇌허혈에 의한 학습과 기억에 미치는 효과

이봄비¹ · 정진용¹ · 김선녀² · 김호철² · 권용준³ · 함대현¹ · 이혜정¹ · 심인섭¹

경희대학교 동서의학대학원 한의과학과 ¹침구경락학교실, ²한약리학교실,
³대구카톨릭대학교 약학대학

Neuroprotective effect of *Kupunggibodan*, *Gamisamul-tang* and *Whangryunhaedok-tang* on the ischemia-induced learning and memory deficits by MCAO in the rats

Bom-Bi Lee¹, Jin-Yong Chung¹, Sun-Yeou Kim², Ho-Cheol Kim², Youn-Jun Kwon³,
Dae-Hyun Hahm¹, Hae-Jeong Lee¹, In-Sup Shim¹

¹Dept. of Oriental Medical Science and ²Dept. of Herbal Pharmacology, Graduate School of East-West Medical Science,
Kyung Hee University, Suwon, Korea, ³College of Pharmacy, Catholic University of Daegu

Abstract

Kupunggibodan(KU), Gamisamul-tang(GA) and Whangryunhaedok-tang(WH) are clinically the most popular prescriptions as an herbal medicine in the treatment of ischemia. In order to compare and evaluate their protective effects on the ischemia-induced cognitive deficits by middle cerebral artery occlusion (MCAO), we examined its ability to improve ischemia-induced cell loss and impairments of learning and memory in the Morris water maze and eight-arm radial arm maze. Focal cerebral ischemia produced a marked cell loss, decrease in acetylcholinesterase(AchE) reactivity in the hippocampus, and learning and memory deficits in two behavioral tasks. Pretreatment with WH (100 mg/kg, p.o.) produced a substantial increase in acquisition in the Morris water maze. Pretreatment with KU increased the performance of the re-entration test in the Morris water maze. WH, KU and GA caused a significant improvement in choice accuracy in radial arm maze test. WH was superior to KU and GA in performance of the radial arm maze test. Consistent with behavioral data, staining with cresyl violet showed that pretreatments with WH, but not KU and GA significantly recovered the ischemia-induced cell loss in the hippocampal CA1 area. In addition, pretreatments with WH and KU recovered the ischemia-induced reduction of AchE reactivity in the hippocampal CA1 area. These results demonstrated that KU, GA and WH have protective effects against ischemia-induced learning and memory impairments and that the efficacy was the order of WH>KU>GA in treatment of ischemia induced memory deficits. The present studies provide an evidence of KU, GA and WH as putative treatment of

· 교신저자: 심인섭, 경기도 용인시 기흥읍 서천1리 경희대학교 동서의학대학원 한의과학과 침구경락학교실, Tel. 031-201-2193,
E-mail : ishim@khu.ac.kr

· 연구비지원기관: Grants from HMP-00-CO-04-0004 and Brain Korea
21 project, Korea

vascular dementia. Supported by a fund from the Ministry of Health and Welfare(HMP-00-00-04-0004), and the Brain Korea 21 Project from Korean Ministry of Education, Korea.

Key word : Middle cerebral artery occlusion(MCAO), Learning and memory, Herbal medicine, Hippocampus, Morris water maze, Eight-arm radial maze

I. 서 론

뇌졸중이란 뇌혈관에 생기는 구조적인 변화에 기인하여 가장 흔하게 생기는 중추 신경계 질환의 하나로서 전 세계적으로 연간 4천 5백만 명 정도가 뇌졸중에 걸리고 있다. 이러한 뇌허혈로 인한 신경세포의 손상은 허혈동안 만이 아니라 재관류가 이루어진 후에도 지속적으로 일어나 환자들의 회복 지연 및 후유증 발생의 원인이 되고 있다. 국내에서도 뇌졸중의 빈도는 매우 높아서 연간 10만 명당 74명이 뇌졸중으로 사망하고 있으며 질병으로 인한 사망 원인 중 뇌졸중이 가장 높은 추세이다. 과거에는 뇌졸중에 있어서 뇌경색보다는 뇌출혈이 많이 나타났으나, 생활습관과 식생활의 서구화로 인하여 우리나라에서도 최근 점차 뇌경색이 늘어나고 있는 추세이다. 특히 50대 이후의 고령인구에서 사망률은 높아 인구의 고령화 추세를 고려할 때 이 질환의 중요성은 더욱 증가되고 있다. 최근에는 이러한 신경손상의 많은 부분이 몇 시간에서부터 며칠에 이르기까지 점진적으로 진행되고 있으며¹⁾, 이러한 연구결과에 따라 허혈에 의한 신경 손상의 예방 및 치료방법에 대하여 병리적 현상이나 신경 세포 손상이 일어나는 기전을 연구하고 있으며 그것의 진행을 차단하는 새로운 치료제를 개발하는데 중점을 두고 있는 추세이다.

뇌졸중은 신체적, 운동성 기능장애 및 기억력 장애, 판단력 상실 등 인지적 결함을 수반하여 나타나는데, 복잡한 운동동작의 수행능력이 저하되고 복잡한 행동과제에 대한 시작(initiation), 계획(planning) 및 평가(evaluation) 기능이 떨어지며, 감각 기억력(sensory memory),

작업 기억력(working memory), 응고화(consolidation) 기능 저하, 간섭에 대한 감수성(susceptibility to interference) 증가 등으로 나타난다. 학습(learning)과 기억(memory)은 인간의 고유한 고차원적인 뇌 기능으로, 학습이란 연습이나 경험에 의한 비교적 영속적인 중추신경계의 변화를 수반하며 중추신경계에 입력된 변화는 영구적 기록으로 저장되며, 기억이란 학습에 의해 얻어진 지식과 경험을 보관, 기록해 두었다가 필요한 때에 의식세계로 꺼내어 사용하는 능력을 말한다²⁾. 이러한 학습 및 기억은 뇌세포의 신경전달물질(neurotransmitter)들이 시냅스(synapse)에서 기능적, 형태학적인 변화를 일으키며, 중추의 콜린성 신경전달계³⁾가 중요한 역할을 한다⁴⁾. 이 콜린성 신경경로는 내측 중격핵(medial septal nucleus)에 위치한 세포체에서 해마(hippocampus)로 투사되며⁵⁾, 이 중 해마가 학습수행 및 기억력에 관여한다^{6,7)}. 중풍등으로 인한 해마가 손상된 실험동물들은, 방사형 미로와 Morris 수중미로와 같은 공간 기억과제를 학습하는 능력의 장애를 보인다.^{8,9)}

Middle cerebral artery occlusion(MCAO) 동물모델은 흰쥐에 일시적으로 뇌에 공급되는 혈관들을 차단한 후 재관류하게 되면 주로 해마부분의 신경세포가 손상을 입게 되는데, 5-7일이 경과되면 apoptosis와 비슷한 세포 손상과 인지 및 학습장애를 일으킨다^{10,11)}. 이러한 MCAO 동물모델은 global 하지 않고 전뇌에만 제한하여 후뇌에서의 혈류가 영향을 받지 않아, 호흡과 체순환에 영향을 주지 않는다는 점에서 허혈로 인한 신경손상의 연구에 global 전 뇌허혈보다 널리 사용되고 있다. MCAO에 의한 일시적인 전뇌허혈(transient forebrain

중풍 한방처방전의 효능비교 연구 ; 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕이 국소 전뇌허혈에 의한 학습과 기억에 미치는 효과

ischemia)은 신경세포의 괴사를 일으키는데, apoptotic type의 delayed cell death 발생기전으로 free radicals¹²⁾, glutamate 독성¹³⁾, calcium overload¹⁴⁾, Nitric oxide(NO)¹⁵⁾ 및 여러 cytokines¹⁶⁾등 많은 요인들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 개발된 치료약물들은 glutamate receptor antagonists¹⁷⁾, calcium channel antagonist¹⁸⁾, GABA neurotransmission 촉진제¹⁹⁾, NOS inhibitions²⁰⁾, antioxidants²¹⁾등이 연구되고 있으나, 효과가 일시적이고 미약하며 간독성과 오심, 구토 등의 부작용의 문제점 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다.

한약제재 및 천연물은 오래 전부터 사용되어 왔으며, 그 대부분이 식물성이다. 이러한 한약제재는 여러 방면에서 치료제로 사용되어 왔으며, 효과가 복합적이며, 부작용이 적게 나타난다. 이는 부성분이 공존하기 때문에 유효성분의 흡수가 완화되며 따라서 작용이 지속적인 장점을 가지고 있다. 한약제재중의 하나인 황련해독탕(Whangryun-Hae-Dok-tang, 黃蓮解毒湯)은 황련(Coptidis Rhizoma, 黃蓮), 황금(Scutellariae Radix, 黃芩), 황백(Phellodendris Cortex, 黃柏), 치자(Gardeniae Fructus, 梔子)의 4가지 약재로 구성되어 있으며, 중추신경과 교감신경이 흥분되어 혈액의 점도가 높으며, 혈소판응고 항진증, 혈관울혈증, 불안, 초조, 신경 정신이상, 고점도혈증으로 인한 산소공급 저하에 주로 사용되며, 혈소판응고 항진을 억제하고 혈관의 염증성출혈을 개선하며 조직세포와 뇌세포에 산소공급을 증진하며 항균작용과 항알러지작용을 한다²²⁾. 거풍지보단(祛風至寶丹, Gupunggibogan)은 『단계심법』에서 防風通聖散에 9가지 약제를 가미하여 만든 처방으로, 뇌출혈, 고혈압증, 동맥경화증, 변비증, 주사비, 피부병, 정신불안증에 주로 사용되며, 혈액의 점도 저하, 소염작용, 항알러지작용, 혈액순환 촉진, 자율신경계 조절, 비뇨기계의 염증에 소염작용을 한다고 하였다. 또한 가미사물탕(Gamisamultang, 加味四物湯)은 골수의 조혈기능 저하, 철분공급 부족, 빈혈, 혈관

운동기능 저하, 어지러움, 전신허약, 수족냉, 습관성 유산, 하혈에 주로 사용되며, 철분 공급, 적혈구 생성능력 강화, 허혈증상의 개선, 혈관운동능력 강화, 혈관 확장, 혈액순환 촉진작용을 한다²³⁾.

따라서 본 연구는 뇌졸중의 예방 및 치료 약물로 널리 사용되고 있는 한약처방약물들의 효능을 비교 검증하고자, MCAO 모델을 이용한 기억력 손상모델에서 학습 및 기억 증진효과에 유용하다고 생각되는 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕의 효과를 Morris 수중미로, 방사형 미로와 조직화학적기법(histochemistry)를 이용하여 학습수행 능력과 기억력 및 신경세포의 보호작용에 미치는 효과를 살펴보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 삼육동물센터로부터 구입한 음성 Sprague Dawley계 흰 쥐(260~300g)로, 일주일 정도 실험실 환경(온도는 22±3℃, 습도는 50±10%)에 적응시킨 후 사용하였다. 실험동물은 각 cage 당 3~4 마리씩 넣어 두었으며, 물과 사료(고형사료: 실험동물 쥐용, 삼양유지(株))를 자유로이 섭취하도록 하였다.

2. 실험군의 구성 및 절차

실험군의 분리는 쥐를 모의시술군(SHAM, n=7), Forebrain ischemia 유발군(SAL+ISCH, n=8), Forebrain ischemia 유발+황련해독탕 투여군(WH+ISCH, n=6), Forebrain ischemia 유발+거풍지보단 투여군(KU+ISCH, n=6), Forebrain ischemia 유발+가미사물탕 투여군(GA+ISCH, n=6)으로 나누었으며, 각 군은 3주간 약물 처치한 다음 1주일간 수중미로 학습을 시행하였다. 수중미로 학습이 끝난 동물은 다시 1주일간 방사형미로 학습을 시행하였으며, 마지막 행동검사를 실시한 후 조직검사를 하였다.

3. 약물 제조 및 약물 투여 방법

1) 약물 제법

(1) 처방의 구성

- 가. 황련해독탕 : 황련(5g), 황금(5g), 황백(5g), 치자(5g)-총4종
- 나. 거풍지보단 : 감초(16g), 강활(8g), 길경(8g), 당귀(20g), 대황(4g), 독활(8g), 마황(4g), 망초(4g), 박하(4g), 방풍(12g), 백작약(12g), 백출(10.4g), 석고(8g), 세신(4g), 숙지황(8g), 연교(4g), 인삼(8g), 전갈(4g), 천궁(20g), 천마(8g), 치자(4.8g), 형개(4g), 활석(24g), 황금(8g), 황련(4g), 황백(4g)-총26종
- 다. 가미사물탕 : 당귀(20g), 만형자(20g), 생선지황(20g), 지모(20g), 천궁(20g), 치자(20g), 황금(20g), 황련(20g), 황백(20g)-총9종

(2) 제법

각 한약재(200g)는 추출에 적합하도록 파쇄하여, 각 약제량의 8-12배의 증류수로 110°C 이하 온도로 3시간 정도 가열하였다. 각 가열한 추출물은 여과하여 찌꺼기 층은 제외하고 전분층과 증류수층을 65°C 이하 온도로 rotary vacuum evaporator를 이용하여 수분이 약 50%가 되도록 농축하고 이를 다시 동결건조기에 투입하여 4-5일정도 완전 건조시켰다. 건조시켜 얻은 황련해독탕(123g), 거풍지보단(71g), 가미사물탕(60g)의 수율은 각각 26.4%, 39.4%, 33.3%이며, 이를 시료로 사용하였다.

2) 약물투여방법

수술후 약물은 매일 한차례 일정한 시간인 오전 10시경에 제조된 약물을 생리식염수에 녹여(100mg/kg, p.o.) 3주간 투여한 후 행동검사를 실시하였다.

4. Occlusion에 의한 focal cerebral ischemia 유발

일시적인 국소 뇌허혈은 Zea Longa²⁴⁾ 등의 방법에 따라 중대뇌동맥을 폐색시켜 만들었다. 실험동물을 70% N₂/30% O₂와 혼합된 5% isoflurane을 이용하여 흡입마취 유도를 한 후, 2% isoflurane으로 마취상태를 계속 유지시켰다. 흰쥐의 직장에 체온측정 probe를 삽입하고 가온등과 가온 매트리스를 이용하여 실험기간 동안 체온을 38°C로 유지하였다.

중대뇌동맥을 폐색하기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골허근과 흉골저착근 사이에 총경동맥을 노출한 후 내경동맥내로 intraluminal filament(Ø0.28mm, rounded tip)을 삽입하여 그 끝이 중대뇌동맥의 기시부를 지나 전대뇌동맥의 근위부까지 도달하도록 하였다. 총경동맥과 외경동맥은 결찰하고 혈류 차단 2시간이 지난 후 filament를 제거하고 우측 총경동맥을 결찰하여 측부 순환을 통하여 재관류 하도록 하였다.

5. 행동측정장치에 의한 학습 및 기억력 측정

1) Morris 수중 미로의 장치 및 절차

수중미로로 이용되는 수조는 직경이 180cm 높이가 50cm인 원형 통으로 온도가 22±2°C되는 물을 30cm 높이로 채웠다. 수중 미로의 주변은 비디오카메라, 실험대, 그리고 실험대 위에 있는 수온 조절용 장치 등 공간단서들을 일정하게 유지하였다. 도피대는 직경이 12cm인 원형 투명 아크릴에 받침대를 부착하고, 수면보다 1.5cm 낮게 위치시켰다. 수조내의 물은 흰색 우유를 풀어서, 도피대를 보이지 않게 하여 사각단서를 이용할 수 없게 하였다. 수중미로는 4개의 동일한 사분원으로 나누어져서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분되고 이중 북동 사분원의 중심부에 도피대가 놓여지고, 나머지 중 하나가 출발위치로 사용하였다.

쥐는 하루에 180초간 4시행씩 6일간 훈련을 받으며(acquisition test), 6일째 마지막 시행이

중풍 한방치방전의 효능비교 연구 ; 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕이 국소 전뇌허혈에 의한 학습과 기억에 미치는 효과

끝나면 자유수영 검사가 시행되는데(retention test), 이때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게 하였다. 모든 동물들의 행동은 비디오키메라로 녹화되는데, 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대로 올라가는데 걸린 시간을 측정하고, 60초간의 검사시행에서는 훈련시에 도피대가 있었던 사분원에 머문 시간을 S-MART 프로그램(Pab Lab, Spain)을 이용하여 측정하였다.

2) 방사형 미로의 장치 및 절차

투명한 wood로 제작된 8개의 통로가 중앙의 출발영역(central platform)을 중심으로 매 45도 각도(방사형)로 뻗어 나온 형태의 장치를 이용하였다. 중앙 출발 영역은 직경 50cm인 원에 내접하는 정팔각형 상자로 높이는 25cm이다. 주로는 출발 상자의 각 면에 뚫린 10×25cm 크기의 통로와 연결되어 있으며, 길이는 70cm이고 동물이 바깥으로 나가지 못하게 하였다. 주로의 끝에는 보상으로 제공하는 먹이나 물을 담을 수 있는 7×5×3cm 크기의 용기(음식 접시)를 설치하였다.

실험동물이 주로를 출입하는 행동을 비디오키메라로 녹화하여 쥐가 각 주로를 방문한 횟수와 오류 여부를 계산하였다. 실험에 들어가기 전 36시간 동안 사육 상자에서 먹이를 박탈하고 배고픔을 유발시킨 쥐를 행동 관찰실로 옮겨와 30분간 환경에 적응시켰다. 쥐를 미로의 출발 상자에 넣고 1분간 두어 상황에 적응시킨 후 1분이 지나면 각 주로로 통하는 통로를 개방하여 쥐가 자유롭게 미로 속을 돌아다니게 하였다. 쥐가 주로를 방문하여 끝까지 달리면 보상 용기에서 먹이를 먹게 하였다. 그러나 동일한 주로를 반복해서 방문하면 두 번째 방문부터는 먹이를 제공하지 않고 반응은 오류로 기록하였다. 쥐가 5분 동안에 8개의 주로를 모두 방문하지 못하면 시행을 중지시키고, 그 시행은 실패로 간주하였다. 쥐가 학습 준거에 도달하는 경우 6일 후에 기억검사를 실시한다.

6. Histochemistry

1) Cresyl violet 염색법

모든 행동 실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital(80mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후, 0.9% saline 200ml에 이어 phosphate buffer으로 준비한 4% formalin 용액(fixative) 800ml로 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200ml은 2분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 800ml은 25분간에 걸쳐 천천히 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 동안 후고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4℃에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌조직에서 hippocampus 부위를 30 μ m의 두께로 자랐다. PBS로 조직을 몇 차례 씻고 xylene(5min), 100% alcohol(2min), 95% alcohol(1min), 70% alcohol(1min), D.W. (2min) 순으로 담구어 탈지, 탈수를 시킨 후, cresyl violet buffer(5min)로 염색을 하였다. 염색이 끝난 조직은 고배율($\times 250$)에서 광학현미경으로 관찰하였다. Paxinos와 Watson의 atlas²⁵⁾에서 주어진 coordinate를 참고하여 probe의 위치를 확인하였으며, 신경세포수를 관찰하였다.

2) Acetylcholinesterase(AchE) 염색법

뇌 조직을 PBS에 3회 정도 세척한 후 0.1M sodium hydrogen phosphate buffer (NaH₂PO₄ · H₂O, pH6.0) 325ml에 acetylcholine iodide 250mg을 녹인 용액에 0.1M sodium citrate 25ml, 30mM copper sulfate 50ml, 5mM potassium ferricyanide 50ml, 증류수 50ml을 넣어 혼합한 후 수초간 기다리면 옅은 녹색을 나타내는데 이때 뇌 조직을 넣고 실온에서 1~2시간 동안 배양하였다. 모든 처리를 거친 뇌 조직을 광학현미경으로 관찰하였다. 200×200 μ m 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 100배로 확대하여 hippocampus에서 AchE 신경세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, USA)을 이용하여 측정하였다.

7. 통계처리

모든 측정값은 평균값±표준오차(mean±SE)로 표시하였고, 각 실험군간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS를 이용하였다. 각 집단간 행동 측정치의 비교는 repeated ANOVA test를 시행하였고, 조직분석법의 측정값은 one-way ANOVA를 시행하였으며, 사후검정은 Tukey test를 적용하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 신뢰구간 P<0.05에서 의미를 부여하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. Morris 수중 미로의 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

1-1. Focal cerebral ischemia 유발모델에서 수중 미로 학습의 획득시행동안 약물처리군의 효과

각 군 실험동물의 학습 정도 측정은 Fig. 1과 같다. 수중 미로 학습에서 6일 동안 180초 내에 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 제 1일째 SHAM군은 116.9±11.6초, SAL+ISCH군은 124.9±7.2초, WH+ISCH군은 114.4±11.5초, KU+ISCH군은 109.3±17.9초, GA+ISCH군은 119.2±2.6초로 유의성 없이 비슷하게 나타났으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 6일째에는 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 SHAM군은 27.7±2.5초, SAL+ISCH군은 85.6±15.7초, WH+ISCH군은 14.0±3.5초, KU+ISCH군은 32.8±13.5초, GA+ISCH군은 54.2±26.5초로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다(F(4,32)=5.806, P<0.01). 이에 측정일에 따른 집단별 사후검정 결과, 4일째에는 황련해독탕 투여군이 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 감소되었으며(P<0.01), 6일째에도 황련해독탕 투여군이 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 감소되었다(P<0.01). 따라서 황련해독탕 투여군은 공간 인지기억 학습수행 능력에 대한

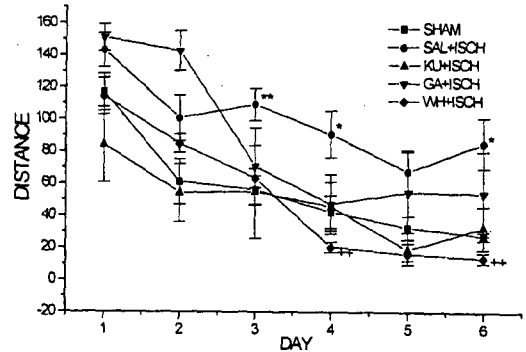


Fig. 1. Comparison of acquisition performance on the morris water maze task among the five groups of the rats. The task was started on the 3th week after ischemia-induced treatment and was performed with four trials per day for 6 days. Repeated measures of one-way ANOVA of swimming time among the groups and followed by Tukey test. *, P<0.05, **, P<0.01 as compared with the corresponding data of SHAM group. ++, P<0.01 as compared with the corresponding data of SAL+ISCH groups.

증진효과를 보여주는 것이다.

1-2. Focal cerebral ischemia 유발모델에서 수중 미로 학습의 검사시행동안 약물처리군의 효과

각 군 실험동물의 기억력 측정은 Fig. 2와 같다. 수중 미로 학습에서 마지막 날인 제 7일째 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 파지시행에서 SHAM군은 15.8±0.8초, SAL+ISCH군은 9.8±1.1초, WH+ISCH군은 13.3±0.2초, KU+ISCH군은 15.4±1.3초, GA+ISCH군은 13.0±0.4초로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다[F(4,36)=7.874, P<0.001]. 이에 집단별 사후검정 결과, 거풍지보단 투여군이 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 감소되었으나(P<0.01), 황련해독탕 투여군(P>0.101)과 가미사물탕 투여군(P>0.166)은 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 거풍지보단 투여군은 파지검사에서 공간 기억력에 대한 증진효과를 보여주는 것이

중풍 한방처방전의 효능비교 연구 ; 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕이 국소 전뇌허혈에 의한 학습과 기억에 미치는 효과

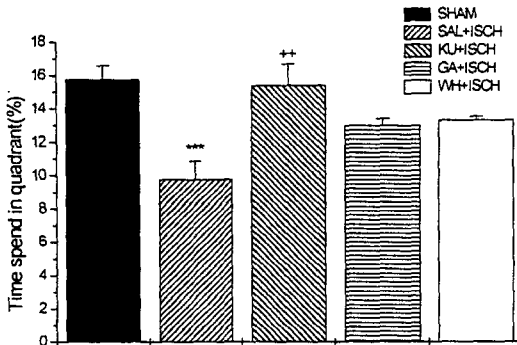


Fig 2. Comparison of retention performance on the morris water maze task among the five groups of the rats. The task was started on the 6 day after aquisition test and was performed with four trials per day for 7 day. Measures of one-way ANOVA of time spend in quadrant(%) among the groups and followed by Tukey test. ***, $P < 0.001$ as compared with the corresponding data of SHAM group. **, $P < 0.01$ as compared with the corresponding data of SAL+ISCH groups.

다.

2. 방사형 미로의 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

2-1. Focal cerebral ischemia 유발모델에서 방사형 미로 학습의 주로 정선택(correct choice) 수 및 약물처리군의 효과

각 군 실험동물의 학습수행과 기억력 정도 측정은 Fig. 3과 같다. 방사형 미로 학습에서 6 일 동안 300초내에 주로를 정확하게 찾는 횟수를 측정하는 획득시행에서 제 1일째 SHAM군은 3.1±0.2초, SAL+ISCH군은 3.3±0.3초, WH+ISCH군은 3.4±0.2초, KU+ISCH군은 3.6±0.2초, GA+ISCH군은 3.5±0.2초로 유의성 없이 비슷하게 나타났으며, 학습이 진행됨에 따라 마지막 6일째에는 SHAM군은 3.7±0.5초, SAL+ISCH군은 3.7±0.2초, WH+ISCH군은 4.5±0.2초, KU+ISCH군은 4.3±0.2초, GA+ISCH군은 3.9±0.4초로 집단간에 유의적인 차

이가 나타나지 않았다[$F(4,33)=2.018$, $P=0.115$]. 이에 학습수행과정에서 300초 동안 주어진 주로를 정확하게 찾는 정선택 수는 ischemia 유발군이 정상군에 대해 별 차이를 보이지 않았다.

또한 방사형 미로 학습에서 6일 동안 8개의 주로를 정확하게 찾는데 걸리는 시간(running time)을 측정하는 획득시행에서 제 1일째 SHAM군은 277.8±7.7초, SAL+ISCH군은 289.4±3.6초, WH+ISCH군은 271.4±0.8초, KU+ISCH군은 272.4±7.4초, GA+ISCH군은 275.0±0.4초로 유의성 없이 비슷하게 나타났으며, 학습이 진행됨에 따라 마지막 6일째에는 SHAM군은 171.9±10.1초, SAL+ISCH군은 179.1±18.7초, WH+ISCH군은 158.3±6.1초, KU+ISCH군은 158.2±6.0초, GA+ISCH군은 175.0±16.9초로 집단간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다[$F(4,20)=1.117$, $P=0.37$

6](Fig. 4). 이에 학습수행과정에서 8개의 주로를 정확하게 찾는데 걸리는 시간은 ischemia 유발군이 정상군에 대해 별 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 ischemia 유발군이 방사형 미로의 학습시행과정에서 운동장애는 일으키지 않음을 보여주는 예이다.

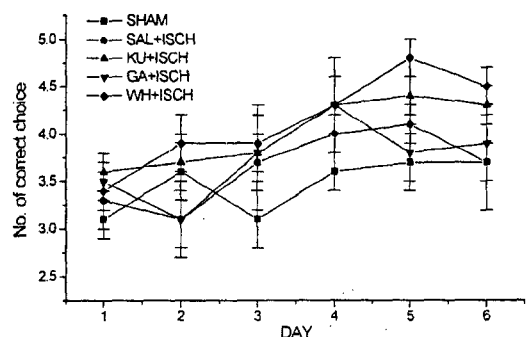


Fig 3. Comparison of acquisition performance on the eight-arm radial maze task among the five groups of the rats. The task was started on the 4th week after ischemia-induced treatment and was performed with four trials per day for 6 days. Repeated measures of one-way ANOVA in correct choices showed no

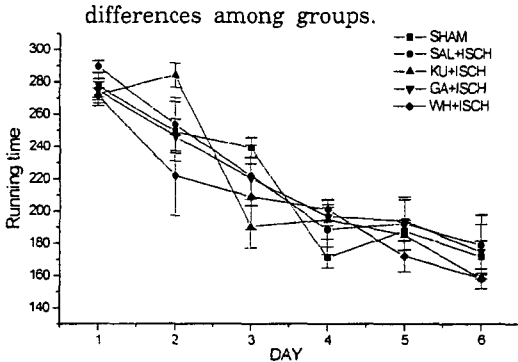


Fig 4. Comparison of acquisition performance on the eight-arm radial maze task among the five groups of the rats. The task was started on the 4th week after ischemia-induced treatment and was performed with four trials per day for 6 days. Repeated measures of one-way ANOVA in the running time revealed a groups and followed by Tukey test.

2-2. Focal cerebral ischemia 유발모델에서 방사형 미로 학습의 주로 오선택(error rate) 수 및 약물처치군의 효과

각 군 실험동물의 학습수행과 기억력 정도 측정은 Fig. 5와 같다. 방사형 미로 학습에서 6일 동안 300초내에 한번 찾아갔던 주로를 다시 들어가는 오선택 수를 측정하는 획득시행에서 제 1일째 SHAM군은 4.6±0.3초, SAL+ISCH군은 4.5±0.3초, WH+ISCH군은 4.3±0.2초, KU+ISCH군은 4.5±0.1초, GA+ISCH군은 4.6±0.2초로 유의성 없이 비슷하게 나타났으며, 학습이 진행됨에 따라 마지막 6일째에는 SHAM군은 2.0±0.3초, SAL+ISCH군은 3.6±0.4초, WH+ISCH군은 2.3±0.2초, KU+ISCH군은 2.4±0.3초, GA+ISCH군은 2.9±0.2초로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다[F(4,37)=31.650, P<0.01]. 이에 측정일예 따른 집단별 사후검정 결과, 2일째에는 황련해독탕 투여군(P<0.001)과 거풍지보단 투여군(P<0.01)이, 4일째에는 황련해독탕 투여군(P<0.05)과 가미사물탕 투여군(P<0.05)이, 5일째에는 황련해독탕 투여군(P<0.01)과 거풍지보단 투여군(P<0.001)이 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의하

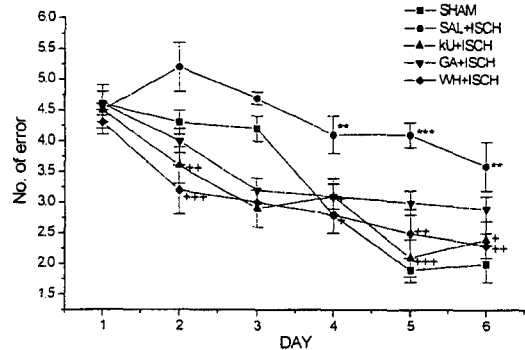


Fig 5. Comparison of acquisition performance on the eight-arm radial maze task among the five groups of the rats. The task was started on the 4th week after ischemia-induced treatment and was performed with four trials per day for 6 days. Repeated measures of one-way ANOVA in the errors revealed a groups and followed by Tukey test. **, P<0.01, ***, P<0.001 as compared with the corresponding data of SHAM group. ++, P<0.01, +++, P<0.001 as compared with the corresponding data of SAL+ISCH groups.

게 감소되었으며, 6일째에도 황련해독탕 투여군(P<0.01)과 거풍지보단(P<0.05)이 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 감소되었다. 따라서 약물 투여군들은 공간 인지에 대한 학습능력과 기억력의 증진효과가 관찰되었다.

4. 신경세포손상 관찰

4-1. Cresyl violet을 이용한 신경세포 손상 및 약물처치군의 방어 효과

각 군에서 해마에서 신경세포 손상정도도 Fig. 6-7과 같다. 해마 부위에서 신경세포의 염색정도는 SHAM군은 22.4±1.6, SAL+ISCH군은 12.6±0.9, WH+ISCH군은 19.3±2.3, KU+ISCH군은 18.9±1.5, GA+ISCH군은 13.9±1.1로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다[F(4,89)=6.771, P<0.01]. 이에 집단별 사후검정 결과, 황련해독탕 투여군(P<0.05)과 거풍지보단 투여군(P<0.05)이 ischemia 유발군에 대

중풍 한방처방전의 효능비교 연구 ; 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕이 국소 뇌허혈에 의한 학습과 기억에 미치는 효과

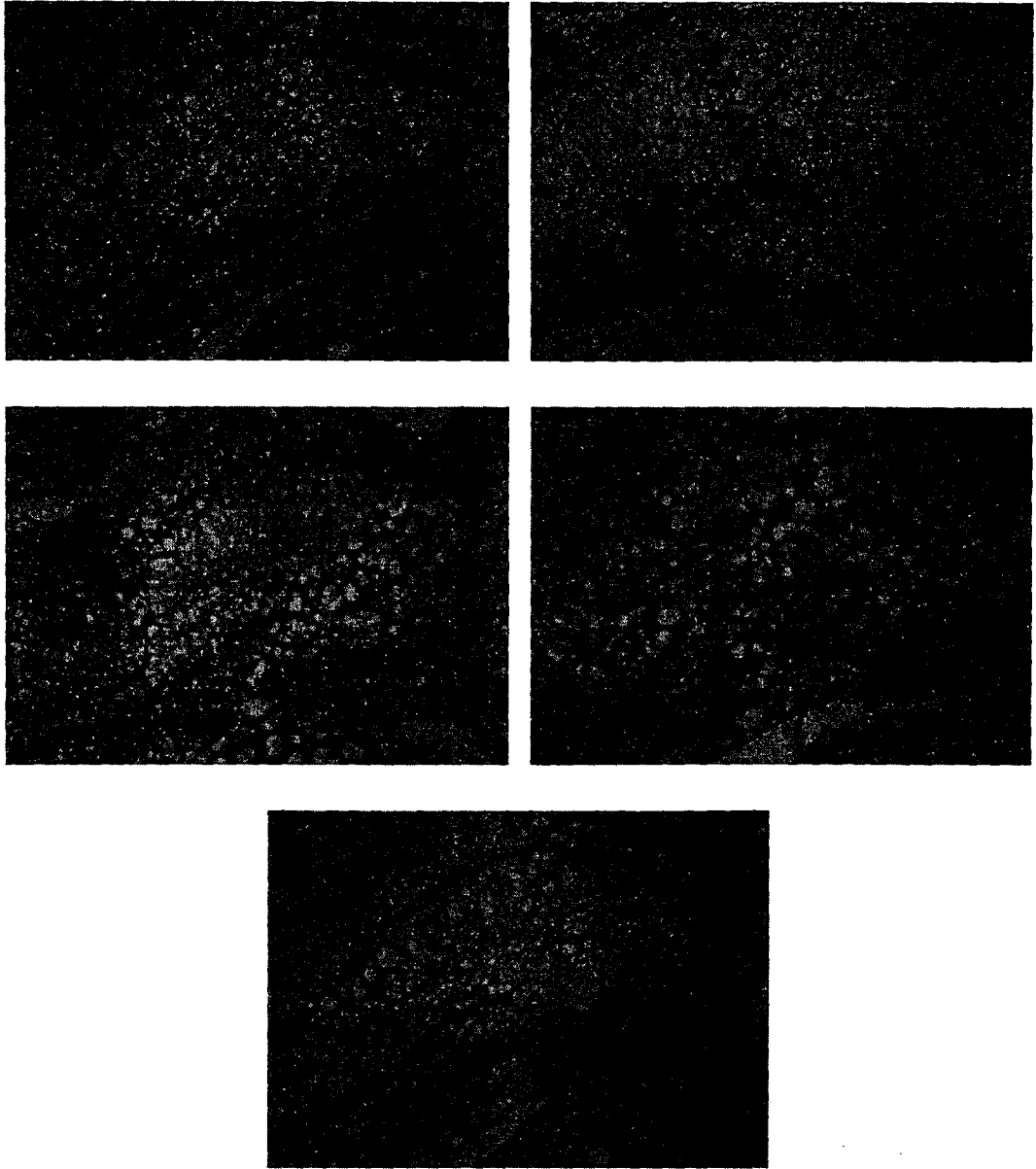


Fig. 6. Representative microphotographs of coronal sections showing cresyl violet in the hippocampus of SHAM(A), SAL+ISCH(B), KU+ISCH(C), GA+ISCH(D), WH+ISCH(E) groups.

해 통계적으로 유의하게 세포 수가 증가되었다. 이는 약물의 시료인 거풍지보단과 황련해독탕이 일시적인 국소 뇌허혈 유발로 인한 뇌의 hippocampus 신경세포의 손실을 방어하였음을 보여주는 것이다.

4-2. Acetylcholinesterase(AchE) 발현에서의 약물처치군의 방어 효과

각 군에서 해마에서 AchE 발현정도는 Fig. 8-11과 같다. 해마의 CA1 부위에서 AchE 발현

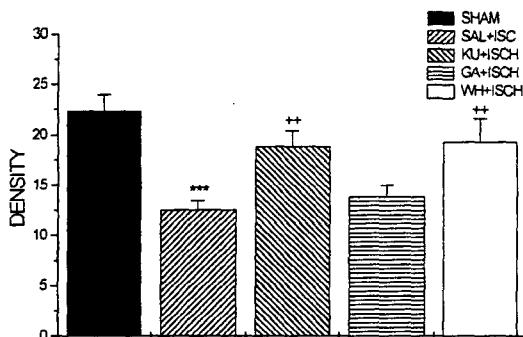


Fig. 7. The values of density of cresyl violet-stained sections in the hippocampal formation areas are shown. Measures of one-way ANOVA in the count revealed a groups and followed by Tukey test. ***, $P < 0.001$ as compared with the corresponding data of SHAM group. **, $P < 0.01$ as compared with the corresponding data of SAL+ISCH groups.

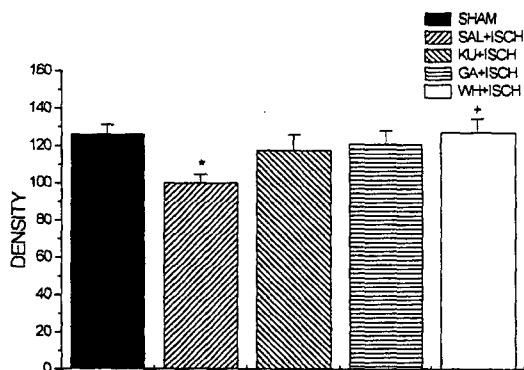


Fig. 9. The values of density of acetylcholine esterase(AChE) stained nuclei in the CA1 in the hippocampal formation areas are shown. Measures of one-way ANOVA in the count revealed a groups and followed by Tukey test. *, $P < 0.05$ as compared with the corresponding data of SHAM group. +, $P < 0.05$ as compared with the corresponding data of SAL+ISCH groups

은 SHAM군은 126.33 ± 4.73 , SAL+ISCH군은 100.28 ± 4.20 , WH+ISCH군은 127.39 ± 7.29 , KU+ISCH군은 118.08 ± 7.94 , GA+ISCH군은 121.08 ± 7.11 로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다 [$F(4,77)=3.604$, $P < 0.05$]. 이에 집단별 사후검정 결과, 황련해독탕 투여군이 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 증가되었다 ($P < 0.05$).

해마의 CA3 부위에서 AchE 발현은 SHAM군은 120.22 ± 6.56 , SAL+ISCH군은 120.33 ± 4.77 , WH+ISCH군은 129.22 ± 5.67 , KU+ISCH군은 119.17 ± 4.94 , GA+ISCH군은 106.00 ± 5.49 로 집단간에 유의적인 차이가 나타나지 않

았다 [$F(4,77)=3.604$, $P < 0.05$].

IV. 고 찰

본 실험에서는 MCAO 동물모델로 인한 수중미로와 방사형미로에서 공간 인지 학습수행과 기억력에 대한 행동의 변화를 관찰하였으며, 뇌허혈에 효과가 있다고 생각되는 한약재를 Focal cerebral ischemia 유발 후 3주 정도 지속적으로 투여하여 학습수행과 기억력 증진 및 세포보호 효과에 미치는 영향을 보았다. 공간기억능력을 측정하는 수중 미로 장치에서

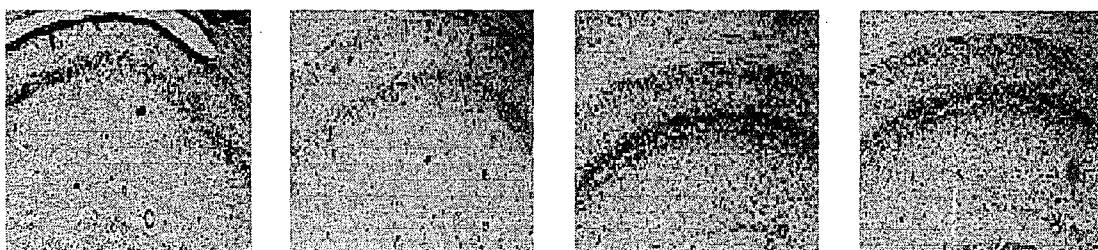


Fig. 8. Representative microphotographs of coronal sections showing AchE in the CA1 of SHAM(A), SAL+ISCH(B), KU+ISCH(C), GA+ISCH(D), WH+ISCH(E) groups.

중풍 한방처방전의 효능비교 연구 ; 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕이 국소 전뇌허혈에 의한 학습과 기억에 미치는 효과

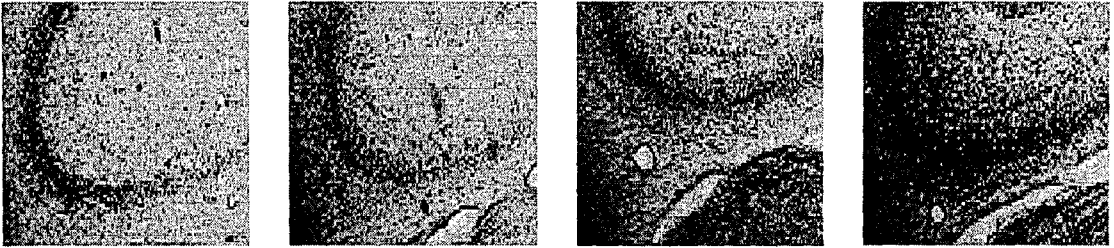


Fig. 10. Representative microphotographs of coronal sections showing AchE in the CA3 of SHAM(A), SAL+ISCH(B), KU+ISCH(C), GA+ISCH(D), WH+ISCH(E) groups.

6일 동안의 획득시행에서 황련해독탕은 학습수행에 증진 효과를 보였으며, 마지막 7일째의 검사시행에서는 거풍지보단이 공간 인지 기억력에 증진 효과를 보여주었다. 또한 작업능력을 측정하는 방사형 미로 장치에서는 학습수행 및 기억력에 대한 오선택수를 관찰 한 결과, 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕 모두 증진효과를 보였으나, 황련해독탕의 효과가 가장 뛰어났다. 또한 MCAO에 의한 해마내 뇌손상의 보호효과를 검토한 결과, 행동자료와 유사하게 황련해독탕과 거풍지보단을 투여했을때 전뇌허혈에 의한 뇌손상을 유의하게 보호하였다. 또한, 학습과 기억의 신경지표로 이용되고 있는 AchE의 활성도를 측정 한 결과, 황련해독탕 처치는 전뇌허혈에 의한 해마내 AchE의 활성

화 감소를 증가시켰다.

Morris 수중 미로(Morris water maze)는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 공간정보 외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 주로 장기기억 능력을 측정하는 과제로서 동물의 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억력 즉 공간기억(spatial memory)을 측정하는 실험이다²⁶⁾. 외부에서 일어나는 사실들에 대한 정보를 습득하여 기억하고, 그 사실들의 시·공간적 위치를 근거로 행동하는 능력인데, 이 실험에서는 동물들이 물로 채워진 수조 내에 숨겨진 도피대(escape platform)를 찾는 것을 학습한 다음 검사환경에서 이용할 수 있는 단서들의 배열 내에서 자신의 위치를 학습하여, 숨겨진 도피대를 찾아야 한다. 수중미로 내의 도피대가 시행에 무관하게 일정한 위치에 설정되었으므로 이 과제의 해결에는 공간기억이 필요하다. Morris 수중 미로를 통한 기존의 연구에서 동물은 연령증가에 따라 학습과 기억 능력이 저하된다고 보고하였으며²⁷⁾, 해마의 신경이 손상된 쥐는 수중 미로 실험에서 학습수행과 기억력이 떨어진다고 보고하였다²⁸⁾. 전뇌허혈에 의해 수중미로에서 학습수행 장애가 나타났으며, 이과제에서의 학습의 획득에는 황련해독탕의 투여가, 파지검사에서는 거풍지보단이 수행능력을 증가시켜며, 중풍에 의한 초기 인지결함에는 황련해독탕이 효과적이며 기억을 회상하는데 문제가 있을때는 거풍지보단이 더 효과가 있음을 시사한다.

방사형 미로(Eight-arm radial maze)는 Olton DS²⁹⁾에 의해 고안되었고 동물은 이 미

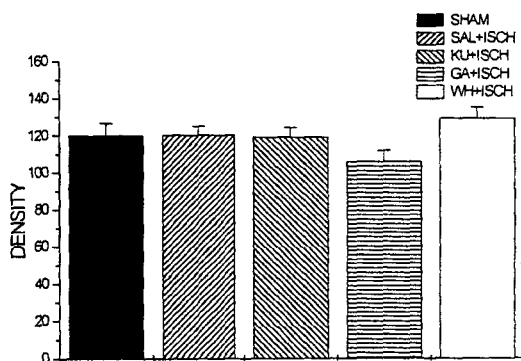


Fig. 11. The values of density of acetylcholine esterase(AchE) stained nuclei in the CA3 in the hippocampal formation areas are shown. Measures of one-way ANOVA in the count revealed a groups and followed by Tukey test.

로를 학습하는 과정에서 어떤 주로에 아직 음식이 남아 있는가와 같은 후각 단서를 사용하는 것이 아니라 주로들 사이의 공간관계를 규정하는 심적 표상인 일종의 정신적인 지도인 인지도(cognitive map)를 통해 학습되어진다³⁰⁾. 이 실험장치는 작업기억(working memory)의 성질에 대한 특별한 정보를 제공해 주는데, 작업기억이란 단기기억의 한 유형으로서 짧고 한정된 시간 내에서만 정보저장이 요구되며 즉시 사라지는 기억체계이다. 방사형 미로를 통한 기존의 연구에서 Williams CL와 MCGaugh JL³¹⁾은 기억저장작용을 매개하는 뇌영역으로고속핵(nucleus of the solitary tract)을 보고하였으며 Schacter GB³²⁾등은 glutamatergic hippocampal-accumbens pathway가 수행정보를 운동계에 전달한다고 보고하였다. 방사형 미로에서 쥐는 특별한 순서를 선호하지는 않으며, 매번의 시도마다 새로운 선택을 하는데, 이는 일시적인 기억(transient memory), 즉 단기기억이 감각자극의 후속효과이기도 하지만 계획된 행동에 필요한 일련의 영구기억(permanent memory) 즉 장기기억들을 조성하는데 필요한 단계이기도 하다. 이러한 방사형 미로는 공간에 대한 학습수행 능력과 기억력을 연구하기 위한 실험장치로서, 방사형 미로에서 학습을 기억하는 시간범위^{33,34)}, 기억의 저장작용을 매개하는 뇌조직 및 약물이 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향^{35,36)} 등에 주로 사용되어 왔다. 본 연구결과 실험동물에서 MCAO처치로 방사형미로 학습에 심각한 학습장애를 일으켰으며, 이 과제에서 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕 모두 중풍에 의한 인지결손에 회복효과를 보였으며, 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕의 순서로 효과가 좋았다.

본 실험에서 학습과 기억을 담당하고 있는 해마의 신경세포를 손상시켜 유도된 MCAO 모델에서 한약제재의 효과를 보고자 하였다. 세포손상의 염색정도를 알아보는 cresyl 염색에서 황련해독탕과 거풍지보단이 세포보호효과가 나타났으며, 황련해독탕이 해마의 CA1 부

위에서 AchE 발현이 증가하는 동일한 경향을 보이는 것으로 보아 한약제재가 아세틸콜린을 증가시킴을 알 수 있었다. AchE의 경우 아세틸콜린을 분해하는 작용을 하는 것으로 AchE 효소의 발현이 기질의 양에 좌우하므로, 본 실험에서는 AchE가 발현이 많은 것이 아세틸콜린이 많이 존재할 것으로 추정하였다. 이는 기억력 상실과 다른 인지 결함이 신호를 전달해 주는 신경화합물질인 아세틸콜린을 만들어 내는 신경세포의 퇴화때문이라고 설명을 뒷받침하고 있다³⁷⁾. 본 연구에서 사용된 동물모델인 MCAO는 일시적인 전뇌허혈(transient forebrain ischemia)을 유발하였을 때 전뇌부위의 세포의 glutamate와 K^+ 의 농도와 세포내 Ca^{2+} 의 증가로 인한 endotoxicity가 생기고 신경세포들이 조직으로부터 탈분극하게 되고, 다시 재관류시에는 정상으로 회복된다는 이치이다. 이때 뇌의 심피질, 해마내 CA1 영역에서 선택적으로 신경세포의 손실을 가져오고, 그 중에서 해마내 CA1 pyramidal neuron이 허혈에 가장 손상 받기 쉬우며, CA1 신경세포들은 재관류 후 3~4일이 지나면 죽기 시작한다. 최근 들어 이들 세포들의 파괴는 apoptosis나 programmed cell death일 것이라는 견해들이 많이 발표되었다^{10,11)}. 이들 약물들이 향후 어떤 기전에 의해 인지보호와 신경보호효과가 나타나는지에 대한 후속연구가 필요하다.

뇌허혈 치료에 많은 약물들이 평가되었고 그 중에 일부는 아직도 사용되고 있다. 그럼에도 불구하고 아직 이 질환의 인지기능의 결손을 치료할 수 있는 효능이 확립된 약물은 거의 없는 실정이다. 최근에는 신경전달물질의 효능제 및 길항제에 대한 연구가 많이 진행되고 있어서 치료에 대한 합리적 접근방법이 모색되고 있고 인지기능을 향진시키려는 시도들과 함께 신경세포의 손상 경로를 규명하고자 하는 연구가 이루어지고 있다. 현재 뇌졸중에서 사용되고 있는 약물로는 glucocorticoids, cyclophosphamide, methotrexate, aspirin, heparin, warfarin 등이 사용되고 있다³⁸⁾. 뇌졸중은 뇌에 혈액을 공급하고 있는 혈관이 막히거나 터져서 뇌

의 일부가 손상되는 병을 말하는 것으로 한의 학에서 말하는 중풍과 같은 질환이다. 이러한 뇌혈전의 원인으로는 동맥경화증이 가장 많으며, 뇌색전의 원인은 심장판막증, 심장세동, 심내막염, 심근경색증 등 심장질환으로 인한 경우와 인공심장판막증 대치술로 인한 혈전으로부터 떨어져 나온 색전조각들이 뇌동맥을 막아서 발생한다. 뇌허혈의 증상은 손상된 뇌의 부위에 따라 달라지는데, 반신마비, 발음장애, 안면마비, 실어증, 반신 감각장애, 복시현상, 운동실조, 기억장애 등이 나타난다. 이러한 다양한 요인으로 인해서 병리학적, 신경약리학적으로 특징적인 양상을 나타낸다. 한방에서는 뇌허혈은 본허표실이 질환으로 본허는 간신부족, 기혈최소에 의한 것을 말하고, 표실은 풍화담습이 응성하여 나타나는 증상을 말한다. 또 뇌허혈은 중혈맥과 중장부로 나눌 수 있는데, 중혈맥(中血脈)은 의식에 변화가 없으며, 경증이고, 중장부(中臟腑)는 의식이 혼란해지면, 중증이 다. 또 사지장애가 있는지 구구장애가 있는지에 따라 사지관절이 마음먹은 대로 움직이지 않는 중부증과 대소변이 잘 나오지 않는 중장증으로 나눈다.

본 실험에 사용된 한약제재는 오래 전부터 뇌졸중에 주로 사용된 약제로서, 황련해독탕(Hwangryun-Hae-Dok-tang, 黃蓮解毒湯)은 황련(Coptidis Rhizoma, 黃蓮), 황금(Scutellariae Radix, 黃芩), 황백(Phellodendris Cortex, 黃柏), 치자(Gardeniae Fructus, 梔子)의 4가지 단미제가 일정한 비율로 혼합된 처방으로, 진정작용, 혈관의 율혈 완화, 혈액 점도 저하, 항균 및 항알러지작용에 주로 사용된다³⁹⁾. 거풍지보단(祛風至寶丹, Gupunggibogan)은 황금, 활석, 길경, 연고 백출, 방풍, 형개, 대황, 산치자, 대황, 천궁, 당귀, 작약 등 26가지의 단미제가 혼합된 처방으로, 소염작용, 항알러지작용, 항균작용, 비노기계, 피부염증 완화, 혈액의 점도 저하, 염증질환과 고혈관 개선, 신경안정작용, 혈관운동능력 강화, 혈액순환 촉진, 간질세포에 정체된 불순물을 땀으로 배설 등 여러 작용을 하고 있다⁴⁰⁾. 가미사물탕(Gamisamul-

tang, 加味四物湯)은 당귀, 숙지황, 작약, 천궁 등 9가지의 단미제가 혼합된 처방으로 조혈작용, 빈혈완화, 혈관확장, 혈관운동능력 강화, 혈액촉진에 주로 작용 한다²³⁾.

이들 약물에 대한 연구는 지금까지 다양하게 진행되고 있지만, 뇌졸중 치료를 위한 학습수행 및 기억력 손상 회복에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 MCAO 동물 모델에서 한약제재인 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕의 효능에 대하여 연구한 결과, 3주 동안 지속적으로 투여 후 수중미로와 방사형미로검사를 이용한 행동학적 변화에 있어서 공간 학습 능력 및 기억력 손상을 증진시켰으며, 신경화학적 변화에 있어서 학습 및 기억에 관련된 해마의 신경세포의 손상을 억제시켰으며, 아세틸콜린을 증가시키는 것으로 사료된다. 이는 여러 가지 한약제재의 뇌졸중에 대한 예방 및 치료제의 개발을 위하여 본 연구에서 외에도 여러 가지 학습 파라다임을 이용하여 향후 지속적인 연구가 필요하다.

V. 결 론

본 연구는 MCAO를 이용한 기억력 손상 모델에서 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕을 지속적으로 투여한 후 행동학적 방법으로 수중미로와 방사형미로를 이용하여 학습과 기억에 대한 효과와 조직화학적분석법으로 해마 부위에서 아세틸콜린성 신경세포와 신경세포손상의 보호효과를 살펴본 결과 다음과 같다.

- 1) 수중 미로 학습의 획득시행에서 Focal cerebral ischemia 유발군이 모의시술군에 비해 도피대에 도달하는게 소요되는 시간이 유의하게 증가하였으며 4일째부터 황련해독탕 투여군에서 학습수행에 유의한 증진효과를 보였다.
- 2) 수중 미로 학습의 검사시행에서 ischemia 유발군이 파지검사에서 모의시술군에 비해 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도가 유의하게 증가하였으며 거풍지보단 투여군에서 공간 기억력에 대한

증진효과를 보였다.

- 3) 방사형 미로 학습의 학습준거 및 기억검사에서 Focal cerebral ischemia 유발군이 모의시술군에 비해 오류수가 유의하게 증가하였으며 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕 투여군으로 작업 및 공간 인지에 대한 학습능력과 기억력의 증진효과를 보였다.
- 4) 조직실험에서 ischemia 유발군은 모의시술군에 비해 해마에서 AchE 발현을 감소시켰으며, 특히 CA1 부위는 CA3 부위보다 모의시술군에 비하여 아세틸콜린의 활성감소가 많이 일어났다. 황련해독탕 투여군에서 손상된 AchE 발현을 회복시키는 효과를 보였다.
- 5) 신경세포의 염색법에서 ischemia 유발군은 모의시술군에 비해 해마에서 신경세포의 손상이 증가하였으며, 황련해독탕, 거풍지보단에서 손상된 신경세포의 손상을 보호하는 효과를 보였다.

이상의 결과에서, 황련해독탕, 거풍지보단, 가미사물탕은 Focal cerebral ischemia 유발로 인한 학습과 기억손상에 대한 회복을 증진시키고, 신경세포의 보호효과를 보여 Focal cerebral ischemia의 치료에 효능이 있으며, 중풍의 새로운 치료제로서의 가능성을 시사한다.

참고문헌

1. Graham DI. The pathology of brain ischemia and possibilities for therapeutic intervention. *Br J Anaesth*. 1985; 57: 3-17.
2. Kupfemann IL. Principles of Neural Science. 2nd ed. New York: Elsevier. 1986 : 806-815.
3. Olton DS, Wenk GL. The third generation of progress. *Psychopharmacology*. H.Y. (ed.). New York Press. miltzer. 1987 : 941.
4. Gray JA, McNaughton N. Comprasion between the behavioral effects of septal and hippocampal lesions : A review. *Neuroscience and biobehavioral Reviews*. 1982 ; 7 : 119-88.
5. Johnston M, Mckinney M, Coyle J. Evidence for a cholinergic projection to neocortex form neurons in basal forebrain. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1979 ; 76 : 5392-6.
6. Blozovski D. PA-Learning in young rats with dorsal hippocampus and hippocampoentorhinal atropine. *Pharmacology. Biochemistry and Behavior*. 1979 ; 10 : 369-72.
7. Chrobak JJ, Hanin I, Walsh TJ. AF64A(ethycholine aziridinum ion), a cholinergic neurotoxic, selectively impairs working memory in a multple component T-maze task. *Brain Research*. 1987 ; 414 : 15-21.
8. Morris RGM. An attempt to dissociate "spatial-mapping" and "working-momory" theories of hippocampal of the hippocampus. London : Academic Press. 405-32.
9. Sutherland RJ, Rodriguez AJ. The role of the fomix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. *Behavioral Brain Research*. 1989 ; 32 : 265-77.
10. Buchan AM, Pulsinelli WA. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci*. 1990; 11 : 1049-50.
11. Gill R, Foster A and Woodruff G. MK-801 is neuroprotective in gerbils when administered during the post-ishcemic period. *Neuroscience*. 1988 ; 25 : 847-55, 254.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci*. 1995 ; 8 : 22-6.

13. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron*. 1988 ; 1 : 623-34.
14. Simon R, Swan J, Griffith T, Meldrum B. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science*. 1984 ; 247 : 571-4.
15. Dawson DA. Nitric oxide and focal cerebral ischemia : multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1994 ; 6 : 299-324.
16. Schielke GP, Yang GY, Shivers BD, Betz AL. Reduced ischemia brain injury in Interleukin-1 β converting enzyme-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metabol*. 1998 ; 18 : 180-5.
17. Gill R, Foster A, Woodruff G. MK-801 is neuroprotective in gerbils when administered during the post-ischemic period. *Neuroscience*. 1988 ; 25 : 847-55.
18. Kriegelstein J. Pharmacology and drug therapy of cerebral ischemia : In *Cerebral ischemia and resuscitation* (Schurr A, Rigor BM, eds). Boca Raton. CRC. 1990 : 347-71.
19. Stermau LL, Lust WD, Ricci AJ, Ratcheson R. Role for γ -aminobutyric acid in selective vulnerability in gerbils. *Stroke*. 1989 ; 20 : 281-7.
20. Moncada C, Lekieffre D, Arvin B, Meldrum B. Effect of NO synthase inhibition on NMDA- and ischemia-induced hippocampal lesions. *Neuroreport*. 1992 ; 3 : 530-2.
21. Hall ED, Andrus PK, Smith SL, Fleck TJ, Scherch HM, Tzke BS et al. Pyrrolopyrimidines: novel brain-penetration antioxidants with neuroprotective activity in brain injury and ischemia models. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 ; 281 : 895-904.
22. Wang LM, Mineshita S. Preventive effects of unei-in and oren-gedoku-to, chinese traditional medicines, against rat paw oedema and abdominal constriction in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1996 ; 48(3) : 327-31.
23. 이진경, 강효신. 가미사물탕이 백서의 유증발행에 미치는 효과. *제한동의학술원 논문집*. 1995 ; 1(1) : 94-105.
24. Zea Linga EL, Weinstein PR, Carlson S, Summins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989 ; 20 : 84-91.
25. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Academic Press. 1986.
26. Yamazaki M, Matsuoka N, Kuratani K, Ohkubo Y, Yamaguchi I. FR121196, a potential antidementia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 ; 272(1) : 256-63.
27. Deupree DL, Turner DA, Watters CL. Spatial performance correlated with in vitro potentiation in young and aged Fisher 344 rats. *Brain Res*. 1991 ; 554(1-2) : 1-9.
28. Clark AS, Mitre MC, Brinck-Johnsen T. Anabolic androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. *Brain Res*. 1995 ; 679(1) : 64-71.
29. Olton DS. Mazes, maps and memory. *American Psychologist*. 1979 ; 34 : 583-96.
30. Brown MF, Rish PA, VonCulin JE, Edberg JA. Spatial guidance of choice behavior in the radial-arm maze. *Exp Psychol Anim Behav Process*. 1993 ; 19(3) : 165-214.
31. Williams CL, McGaugh JL. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res*. 1994 ; 654(2) : 251-6.
32. Schacter GB, Yang CR, Innis NK,

- Mogenson GJ : The role of the hippocampal-nucleus accumbens pathway in radial-arm maze performance. *Brain Res.* 1989 ; 494(2) : 339-49.
33. Beatty WW, Shavalia DA. Spatial memory in rats : Time course of working memory and effect of anesthetics. *Behavioral and Neural Biology.* 1980 ; 28 : 454-62.
34. Bolhuis JJ, Bijlsma S, Ansmink P. Exponential decay of spatial memory of rats in a radial maze. *Behavioral and Neural Biology.* 1986 ; 46 : 115-22.
35. Magnani M, Pozzi O, Biagetti R, Banfi S, Dorigotti L. Oxirecetam antagonizes the disruptive effects of scopolamine on memory in the radial maze, *Psychopharmacology.* 1992 ; 106 : 175-8.
36. McGurk SR, Levin ED, Butcher LL. Dopaminergic drug reverse the impairment of radial-arm maze performance caused by lesions involving the cholinergic medial pathway. *Neuroscience.* 1992;50(1) : 129-35.
37. De Vente J, Markerink-van IM, Van A.J, Emson PC, Axen H, Steinbusch HW. NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain : effect of lesioning dopaminergic or serotonergic pathway on nNOS and cGMP synthesis. *Eur J Neurosci.* 2000 ; 12(2) : 507-19.
38. Isselbacher EM, Eagle KA, Desanctis RW. Diseases of the aorta: In Eugene Braunwald. ed. *Heart disease a textbook of cardiovascular medicine.* 5th ed. Philadelphia. W.B. Saunders company. 1997 : 1572-1573.
39. Lin CC, Shieh DE. The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin. *American Journal of Chinese medicine.* 1996 ; 24(1) : 31-6.
40. Kimura Y, Kubo M, Kusaka K, Tani T, Higashino M, Arichi S, Okuda H. Studies on *Scutellariae radix*. V. Effects on ethanol-induced hyperlipemia and lipolysis in isolated fat cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 1982 ; 30(1) : 219-22.