

원 저

일시적 국소 뇌허혈 흰쥐모델에서 祛風至寶丹의 뇌손상 및 인지기능 보호효과

정성욱, 장규태, 김장현

동국대학교 한의과대학 소아과학교실

Protective Effects of *Geupunggibodan* on Brain Damage and Cognitive Dysfunction in Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats

Sung-Wook Jung, Gyu-Tae Chang, Jang-Hyun Kim

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University
Department of Nursing Science, Kyunghee University²⁾

Objectives : This study was conducted to determine the effects of *Geupunggibodan* on brain damage in transient focal cerebral ischemia in rats.

Methods : Rats were used for testing in the following three models: Morris water maze, eight-arm radial maze, and histochemistry.

Results : In the Morris water maze model, the *Geupunggibodan* group showed significant decrease in the 3rd, 4th and 6th training sessions compared with the ischemia group. A retention test in the Morris water maze model was performed on the 7th day without the escape platform. The *Geupunggibodan* group showed significant increase compared to the ischemia group. In the eight-arm radial maze model, the *Geupunggibodan* group showed significant decrease in the error rate compared to the ischemia group. In the density of hippocampal CA1 cell of the cresyl violet-stained section, the *Geupunggibodan* group showed significant increase compared to the ischemia group.

Conclusions : These results suggest that *Geupunggibodan* may have a significant protective effect on brain damage and cognitive dysfunction in transient focal cerebral ischemia.

Key Words: transient focal cerebral ischemia, *Geupunggibodan*

서론

- 접수 : 2004년 9월 25일 · 논문심사 : 2004년 12월 6일
- 채택 : 2004년 12월 26일
- 교신저자 : 장규태, 경북 경주시 석장동 1090-1번지 동국대학교부속 경주한방병원 소아과
(Tel; 054-770-1260, Fax; 054-770-1500, E-mail; gchang@dongguk.ac.kr)

* 본 연구는 동국대학교 논문게재장려금 지원으로 이루어졌음.

뇌는 중추신경계의 일부로 생명현상을 조절하고 감각 및 운동기능을 통합하고 사고, 기억, 감정, 언어 등의 고등기능을 총괄적으로 관장한다. 인지기능과 관계되는 뇌의 구조는 해마(hippocampus), 유두체(mamillary) 특정부위의 시상핵(thalamic nuclei) 등의

변연계와 상행망상체(ascending reticular formation)이며, 단기기억은 편도체와 해마가 관여하고, 장기기억은 측두간을 통과하는 하위 측두피질 및 미상핵과 시상을 연결하는 신경섬유가 관계하고 있다¹⁾.

뇌세포에 혈액공급이 차단되는 뇌허혈이 일어나면, 산소를 공급받지 못한 신경세포는 흥분성 신경전달물질인 glutamate를 방출하여 세포내 Ca²⁺의 유입을 증가시키며, 많은 세포내 효소들이 활성화되어 세포괴사를 일으켜 뇌신경세포는 비가역성 손상을 입게 된다²⁾.

일시적 국소 뇌허혈 흰쥐모델은 일시적으로 뇌에 공급되는 혈관들을 차단한 후 재관류시킨 것으로,

주로 해마부분 신경세포의 손상을 입게 되는데 5-7일이 경과되면 apoptosis와 비슷한 세포손상과 인지 및 학습의 장애가 일어난다³⁾ 뇌허혈로 인한 뇌손상의 병태생리가 차츰 밝혀지기 시작하면서, 뇌허혈 급성기에 신경세포의 손상을 최소화할 수 있는 연구와 적절한 보호약물의 개발이 중요한 과제로 부각되고 있다.

뇌허혈을 유발시킨 후 한약을 투여하여 유의한 효과를 본 연구로는 서⁴⁾의 사물탕가미방, 김⁵⁾의 성향정기산과 곽향정기산, 손⁶⁾의 양격산화탕, 홍⁷⁾의 방풍당귀음에 대한 연구 등이 보고된 바 있다.

祛風至寶丹은 <丹溪心法>⁸⁾에 수록된 防風通聖散에

Table 1. The Amount and Composition of *Geupoongjibodan*

韓藥名	生藥名	重量(g)
滑石	Talcum	24
川芎	Crudii Rhizoma	20
當歸	Angelicae Gigantis Radix	20
甘草	Glycyrrhizae Radix	16
防風	Ledebouriellae Radix	12
白芍藥	Paeoliae Radix	12
白朮	Attractylodis Macrocephalae Rhizoma	10.4
石膏	Gypsum Fibrosum	8
黃芩	Scutellariae Radix	8
桔梗	Piatycodi Radix	8
熟地黃	Rehmanniae Radix	8
天麻	Gastrodiae Rhizoma	8
人蔘	Ginseng Radix	8
獨活	Notopterygii Rhizoma	8
羌活	Angelicae Pubescentis	8
梔子	Fructus Gardeniae	4.8
連翹	Fructus Forsythiae	4
荊芥	Herba Schizonepetae	4
薄荷	Herba Menthae	4
麻黃	Ephedrae Herba	4
芒硝	Natrii Sulfas	4
黃連	Coptidis Rhizoma	4
大黃	Rhei Rhizoma	4
黃柏	Phellodendri Cortex	4
細辛	Asiasari Radix	4
全蝎	Scorpio	4
Total amount		223.2

益血하는 熟地黄, 補氣하는 人蔘, 祛風하는 羌活, 獨活, 天麻, 細辛, 全蝎, 除熱하는 黃柏, 黃連을 加하여 構成된 處方이며, 祛風清熱의 作用이 있어, 臨床에서 頭痛, 眩暈, 中風昏倒, 精神蒙昧 등에 포괄적으로 應用되고 있으며, 腦出血, 高血壓症, 動脈硬化症, 便秘症, 酒躄鼻, 皮膚病, 精神不安症에 주로 사용되고 있다⁹⁾.

祛風至寶丹의 실험적 연구로는 정¹⁰⁾의 Mongolian Gerbil의 가역성 뇌허혈모델에 미치는 영향과 한¹¹⁾의 혈관이완효능과 기전에 관한 연구가 보고된 바 있었으나 뇌손상과 인지기능 보호효과에 대한 구체적인 연구는 없었다.

이에 저자는 祛風至寶丹의 일시적 뇌허혈로 인한 뇌손상과 인지 및 학습장애에 보호효과를 관찰하기 위하여 Middle cerebral artery occlusion(MACO) 동물모델을 이용하여 Morris 수중미로, 방사형미로를 이용한 행동측정과 hippocampus 부위의 뇌신경세포수 변화를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 材料

(1) 動物

體重 280±20g의 웅성 Sprague Dawley계 흰쥐(삼육동물센터, 한국)를 일주일동안 실험실 환경(온도는 22±3℃, 습도는 50±10%)에 적응시킨 후 사용하였다. 흰쥐는 각 cage 당 3-4 마리씩 넣어 두었으며, 물과 사료(고형사료: 실험동물 쥐용, 삼양유지(株))를 자유로이 섭취하도록 하였다.

(2) 藥材

본 실험에 사용된 祛風至寶丹의 처방내용은 丹溪心法⁹⁾에 의거하였으며 藥材는 東國大學校 附屬韓方病院에서 購入하여 정선한 것을 사용하였다. 처방내용과 분량은 Table 1과 같다.

2. 方法

(1) 檢液의 製造

祛風至寶丹 1貼을 추출에 적합하도록 파쇄하여, 각 약제량의 8-12배의 증류수로 110℃ 이하 온도로 3시간 정도 가열하였다. 각 가열한 추출물은 여과하여 찌꺼기 층은 제외하고 전분층과 증류수층을 65℃ 이하 온도로 rotary vacuum evaporator를 이용하여 수분이 약 50%가 되도록 농축하고 이를 다시 동결건조기에 투입하여 4-5일정도 완전 건조시켰다. 건조시켜 얻은 祛風至寶丹은 71g으로써 수율은 약 31.8%며, 이를 시료로 사용하였다.

(2) 實驗群의 分類 및 節次

실험군의 구성은 아무 처치를 하지 않은 모의시술군 (SHAM, n=7), 중대뇌동맥 폐색 유발군 (SAL+ISCH, n=8), 중대뇌동맥폐색유발 후 祛風至寶丹 투여군(GJD+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) 藥物投與方法

GJD+ISCH군은 시술 후 檢液을 매일 한차례 일정한 시간인 오전 10시경에 생리식염수에 녹여 (100mg/kg, p.o.) 3주간 투여한 후 행동검사를 실시하였고, SHAM군과 SAL+ISCH군에서는 동량의 생리식염수를 투여하였다.

(4) 閉塞에 의한 局所 腦虛血 誘發

일시적인 국소 뇌허혈은 Zea Longa¹²⁾ 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 가운데과와 가운 매트리스를 이용하여 실험기간 동안 체온을 38℃로 유지하였다.

중대뇌동맥을 폐색하기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골허근과 흉골저작근 사이에 총경동맥을 노출한 후 내경동맥내로 intraluminal filament(Ø 0.28mm, rounded tip)을 삽입하여 그 끝이 중대뇌동맥의 기시부를 지나 전대뇌동맥의 근위부가

지 도달하도록 하였다. 총경동맥과 외경동맥은 절찰하고 혈류차단 2시간이 지난 후 filament를 제거하고 우측 총경동맥을 절찰하여 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 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 되는 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 풀어, 도피대를 보이지 않게 하여 시각단서를 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 끝나면 자유수영 검사가 시행되는데(retention test), 이때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게 하였다. 모든 동물들의 행동은 비디오카메라로 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

목재로 제작된 8개의 통로가 중앙의 출발영역(central platform)을 중심으로 매 45도 각도(방사형)로 뻗어 나온 형태의 장치를 이용하였다. 중앙 출발영역은 직경 50cm인 원에 내접하는 정팔각형 상자로 높이는 25cm이다. 주로는 출발 상자의 각 면에 뚫린 $10 \times 25\text{cm}$ 크기의 통로와 연결되어 있으며, 길이는 70cm이고 동물이 바깥으로 나가지 못하게 하였다. 주로의 끝에는 보상으로 제공하는 먹이나 물

을 담을 수 있는 $7 \times 5 \times 3\text{cm}$ 크기의 용기(음식 접시)를 설치하였다.

실험동물이 주로를 출입하는 행동을 비디오카메라로 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) 조직화학검사

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°C 에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌조직에서 hippocampus 부위를 $30\mu\text{m}$ 의 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 atlas¹³⁾에서 주어진 coordinate를 참고하여 probe의 위치를 확인하였으

Table 2. Effect of *Gupunggibodan* on Cerebral Ischemia-Induced Deficits of the Morris Water Maze Learning Performance in the Rats.

Group\Day	Water maze (latency; time(sec))					
	1	2	3	4	5	6
SHAM (n=7)	131.3±23.7	58±23.8	70.3±15.9,	56.4±25.2	30.3±11.3	29.0±8.5
SAL+ISCH (n=8)	144.9±21.3	82.6±17.8	119.7±17.8**	96.8±24.2*	77.9±21.6	102.1±24.5*
GJD+ISCH (n=6)	116.9±5.8	61.3±11.5	56.3±5#	42.8±15.5##	33.1±4.3	27.7±6.3##

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. #, $p<0.05$, ##, $p<0.01$ as compared with the corresponding data of SAL+ISCH groups. All values are Mean±SE.

며, 신경세포수를 관찰하였다.

(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 $p<0.05$ 에서 의미를 부여하였다.

결 과

1. Morris 수중 미로의 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

(1) 수중미로 학습의 획득시행동안의 효과

수중 미로 학습에서 6일 동안 180초내에 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 실험 제 3일, 제 4일 및 제 6일에서 SHAM군은 각각 70.3

±15.9초, 56.4±25.2초 및 29.0±8.5초이였으며, SAL + ISCH군은 119.7±17.8초, 96.8±24.2초 및 102.1±24.5초로 증가한데 비하GJD + ISCH군은 56.3초, 42.8±15.5초 및 27.7 ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.01$) 감소를 나타내었다(Table 2).

(2) 수중미로 학습의 파지시행동안의 효과

수중미로 학습에서 마지막 날인 제 7일 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 파지시행에서 SHAM군은 15.8±0.8초, SAL + ISCH군은 9.8±1.1초, GJD + ISCH군은 15.4±1.3초로 유의성($p<0.001$) 있는 차이를 보였다. 이에 집단별 사후검정 결과, 祛風至寶丹 투여군이 뇌허혈 유발군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 증가를 나타내었다(Table 3).

2. 방사형 미로의 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

(1) 방사형 미로 학습의 정선택(correct choice) 수

방사형 미로 학습에서 6일 동안 300초내에 주로를 정확하게 찾는 횟수를 측정하는 획득시행에서 제 1일째 SHAM군은 3.11±0.2회, SAL + ISCH군은

Table 3. Effect of *Gupunggibodan* on Cerebral Ischemia-Induced Deficits of the Morris Water Maze Memory Performance in the Rats.

Group	Water maze (Time spend in quadrant (sec))
SHAM(n=7)	15.8±0.8
SAL+ISCH(n=8)	9.8±1.1***
GJD+ISCH(n=6)	15.4±1.3##

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. All values are Mean±SE.

Table 4. Effects of *Gupunggibodan* on Choice Accuracy of the Eight-Arm Radial Maze Task in Ischemia-Induced Rats.

Group \ Day	Radial arm maze (No. of error rate)					
	1	2	3	4	5	6
SHAM(n=5)	4.6±0.3	4.3±0.2	4.0±0.2	2.8±0.3	3.2±0.3	3.3±0.2
SAL + ISCH(n=5)	4.5±0.3	5.0±0.3	4.8±0.1	4.1±0.3**	4.5±0.3***	4.6±0.4**
GJD + ISCH(n=4)	3.5±0.2	3.7±0.3	3.1±0.3	3.2±0.2	3.2±0.2##	2.8±0.2###

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. All values are Mean±SE.

3.75±0.3회, GJD+ISCH군은 2.88±0.2회로 비슷하게 나타났으며, 학습이 진행됨에 따라 마지막 제 6일에는 SHAM군은 4.40±0.5회, SAL + ISCH군은 4.00±0.2회, GJD+ISCH군은 5.30±0.2회로 집단간에 유의한 차이가 나타나지 않았다(data not shown).

(2) 방사형 미로 학습의 정선택에 걸리는 시간

방사형 미로 학습에서 6일 동안 8개의 주로를 정확하게 찾는데 걸리는 시간(running time)을 측정하는 획득시행에서 제 1일 SHAM군은 277.8±7.7초, SAL + ISCH군은 289.4±3.6초, GJD+ISCH군은 272.4±7.4초로 비슷하게 나타났으며, 학습이 진행됨에 따라 마지막 제 6일에는 SHAM군은 171.9±10.1초, SAL+ISCH군은 179.1±18.7초, GJD+ISCH군은 158.2±6.0초로 집단간에 유의한 차이가 나타나지 않았다(data not shown).

(3) 방사형 미로 학습의 오선택(error rate)

수 방사형 미로 학습에서 6일 동안 300초내에 한번 찾아갔던 주로를 다시 들어가는 오선택 수를 측정하는 획득시행에서 제 1일에는 SHAM군은 4.6±

Table 5. Effects of *Gupunggibodan* on Ischemia-Induced the Neuronal Cell Damage in the Hippocampus.

group	Cresyl violet (density(%))
SHAM(n=7)	28.6±2.0
SAL + ISCH(n=8)	7.09±1.7***
GJD + ISCH(n=6)	15.4±1.4##

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. All values are Mean±SE.

0.3회, SAL+ISCH군은 4.5±0.3회, GJD+ISCH군은 3.5는 SHAM군은 3.2±0.3회, SAL+ISCH군은 4.5±0.3회, GJD + ISCH군은 3.2±0.2회로, 마지막 제 6일에는 SHAM군은 3.3±0.2회, SAL+ISCH군은 4.6±0.4회, GJD + ISCH군은 2.8±0.2회로 집단간에 유의성 있는($p<0.01$) 차이를 보였다. 이에 측정일에 따른 집단별 사후검정 결과, 제 5일, 제 6일에는 GJD + ISCH군이 SAL + ISCH군에 비하여 유의하게 ($p<0.01$, $p<0.001$) 감소되었다(Table 4).

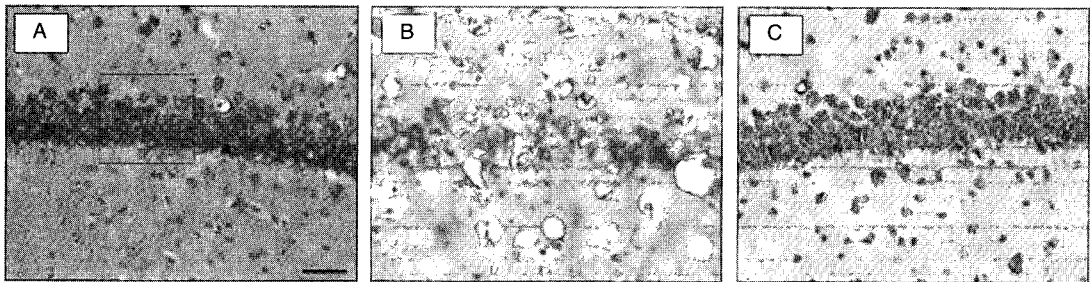


Fig. 1. Representative photographs showing the hippocampus of SHAM (A), SAL+ISCH (B), GJD+ISCH(D) groups.

3. 신경세포손상 관찰

(1) Cresyl violet을 이용한 신경세포 손상 및 약물 처치군의 방어 효과

해마 부위에서 신경세포의 염색정도는 SHAM군은 28.6 GJD+ISCH군은 15.4±1.5%로 유의성 있는 ($p<0.01$) 차이를 보였다. 이에 집단별 사후검정 결과, GJD+ISCH군이 SAL+ISCH군에 비하여 유의하게 ($p<0.01$) 세포 수가 증가되었다(Table 5, Fig. 1).

고 찰

學習이란 練習이나 經驗에 의한 비교적 영속적인 수행의 증가 또는 변화가 일어나는 것이고, 記憶이란 學習에 의하여 얻어진 知識과 經驗을 보관, 기록해 두었다가 필요한 때에 의식세계로 꺼내어 사용하는 능력을 말한다¹⁴⁾. 이러한 學習 및 記憶은 뇌세포의 신경전달물질(neurotransmitter)들이 시냅스(synapse)에서 기능적, 형태학적인 변화를 일으키며¹⁵⁾, 중추의 콜린성 신경전달계가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다¹⁶⁾. 이 콜린성 신경질로는 전뇌 내측 중격핵(medial septal nucleus)에 위치한 세포체에서 해마(hippocampus)로 투사되며, 이중 해마가 학습수행 및 기억력에 관여한다¹⁷⁾. 해마가 손상된 실험동물들은 방사형 미로와 Morris 수중미로와 같은 공간 기억과제를 학습하는 능력의 장애를 보인다¹⁸⁾.

記憶과 관련된 韓醫學 文獻을 살펴보면 <三因極一病證方論>¹⁹⁾에서는 “意者 記所注事”라고 하였고, <東醫寶鑑>²⁰⁾에서는 “意者 記而不忘者也, 志者 專意而不移者也.”라고 하여 ‘意’와 ‘志’의 記憶으로서의 정의를 기록하였다. <醫學心悟>²¹⁾에서는 “腎主智 腎虛則智不足 故喜忘其前言”이라고 하여 ‘智’가 부족하면 잘 잊는다고 한 것으로 보아 ‘智’를 記憶과 동일한 의미로 이해한 것으로 보인다.

韓醫學에서 方劑藥物을 이용한 記憶增進에 대한 研究를 살펴보면, 우²²⁾는 調胃升清湯이 학습과 기억을 증진시키는 효과를 발휘하는 것으로 보고하였으며, 조²³⁾는 荊防地黃湯이 學習과 作業記憶의 결함을 改善시키는 효과가 있는 것으로 보고하였으며, 박²⁴⁾

은 星香正氣散이 學習과 記憶力 향상에 효과가 있는 것으로 보고하고 있다.

內經에서는 기억을 주관하는 臟器로 ‘知’는 固定不移의 기억을 의미하는 것으로 주로 腎에서 담당하는 것으로 알려져 왔다. 이후 기억에 관한 작용은 腎보다는 腦에서 담당하는 것으로 인식이 전환되는 것을 알 수 있으나, 腦를 정수의 집합체로 보아 腎에 귀속시킴으로써 서의학적으로 밝혀진 기억 등 정신활동의 중추로서의 뇌의 이론과 한의학에서 기억작용을 신 또는 신의 장하는 정에 귀속시키는 이론사이의 간격을 설명하고 있다. 한의학에서 기억 등의 모든 정신활동을 뇌와 직접적으로 연결하여 설명하지 않고 오장의 기능과 관련시켜 설명하는 것은 정신활동을 뇌에 한정하여 정신현상의 부분이 발현하는 현상으로 국소화하지 않고 인간 개체 전일체 차원에서 인식하는 것을 의미한다. 따라서 한의학에서의 기억현상에 대한 인식은 전반적으로 서양의 심리학에서의 인식에 비해 상대적이며 전체성적 관점에서 이루어진 것이다²⁵⁾.

MCAO 동물모델은 원취에 일시적으로 뇌에 공급되는 혈관들을 차단한 후 再灌流하게 되면 주로 해마부분의 신경세포가 손상을 입게 되는데, 5-7일이 경과되면 apoptosis와 비슷한 細胞 損傷과 認知 및 學習障를 일으킨다²⁶⁾. 이러한 MCAO 동물모델은 global 하지 않고 前腦에만 제한하여 後腦에서의 혈류가 영향을 받지 않아, 呼吸과 體循環에 영향을 주지 않는다는 점에서 虛血로 인한 神經損傷의 研究에 global 전뇌허혈보다 널리 사용되고 있다.

본 實驗에서는 MCAO 동물모델로 인한 수중미로와 방사형미로에서 空間 認知 學習修行과 記憶力에 대한 行動의 變化를 관찰하였으며, 腦虛血에 효과가 있다고 생각되는 韓藥製材를 Focal cerebral ischemia 유발 후 3주 정도 지속적으로 투여하여 學習修行과 記憶力 增進 및 細胞保護 效果에 미치는 영향을 보았다. 마지막 7일제의 검사시행에서는 祛風至寶丹이 空間 認知 記憶力에 增進 效果를 보여주었다. 또한 作業能力을 測定하는 방사형 미로 장치에서는 學習修行 및 記憶力에 대한 誤選擇數를 관찰 한 결과, 祛

風至寶丹이 增進效果를 보였다. 또한 MCAO에 의한 해마내 뇌손상의 보호효과를 검토한 결과, 행동자료와 유사하게 祛風至寶丹을 투여했을때 전뇌허혈에 의한 뇌손상을 유의하게 보호하였다.

Morris 수중 미로(Morris water maze)는 동물의 空間學習과 記憶을 檢査하기 위해 사용되며, 공간정보 외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 주로 長期記憶 能力을 측정하는 과제로서 동물의 주변에 있는 단서들을 사용하여 記憶力 즉 空間記憶 (spatial memory)을 측정하는 실험이다²⁷⁾. 外部에서 일어나는 사실들에 대한 情報를 習得하여 記憶하고, 그 사실들의 時空間的 位置를 根據로 行動하는 能力인데, 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 空間記憶이 필요하다. Morris 수중 미로를 통한 기존의 研究에서 동물은 年齡增加에 따라 학습과 기억 能力이 低下된다고 보고하였으며²⁸⁾, 해마의 신경이 손상된 쥐는 수중 미로 실험에서 학습수행과 기억력이 떨어진다고 보고하였다²⁹⁾. 전뇌허혈에 의해 수중미로에서 학습수행장애가 나타났으며, 이 과제에서의 파지검사에서는 祛風至寶丹이 수행능력을 증가시켜며, 中風에 의한 記憶을 回想하는데 문제가 있을때는 祛風至寶丹이 효과가 있음을 시사한다.

방사형 미로(Eight-arm radial maze)는 Olton DS³⁰⁾에 의해 고안되었고 동물은 이 미로를 學習하는 과정에서 어떤 주로에 아직 음식이 남아 있는가와 같은 嗅覺 端緒를 사용하는 것이 아니라 주로들 사이의 空間關係를 규정하는 心的 表象인 일종의 정신적인 地圖인 인지도(cognitive map)를 통해 學習되어진다³¹⁾. 이 실험장치는 作業記憶(working memory)의 성질에 대한 특별한 情報를 제공해 주는데, 作業記憶이란 短期記憶의 한 유형으로서 짧고 한정된 시간 내에서만 정보저장이 요구되며 즉시 사라지는 기억체계이다. 방사형 미로를 통한 기존의 研究에서 Williams

CL와 McGaugh JL³²⁾은 記憶貯藏作用을 매개하는 腦領域으로고속핵(nucleus of the solitary tract)을 보고하였으며, Schacter GB³³⁾ 등은 glutamatergic hippocampal-accumbens pathway가 수행정보를 운동계에 전달한다고 보고하였다. 방사형 미로에서 쥐는 특별한 순서를 선호하지는 않으며, 매번의 시도마다 새로운 선택을 하는데, 이는 一時的인 기억(transient memory), 즉 短期記憶이 感覺刺戟의 후속효과이기도 하지만 계획된 행동에 필요한 일련의 永久記憶(permanent memory) 즉 長期記憶들을 조성하는데 필요한 단계이기도 하다. 이러한 방사형 미로는 공간에 대한 학습수행 능력과 기억력을 연구하기 위한 실험장치로서, 방사형 미로에서 學習을 記憶하는 時間範圍^{34,35)}, 記憶의 貯藏作用을 매개하는 腦組織 및 藥物이 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향³⁶⁾ 등에 주로 사용되어 왔다. 본 연구결과 실험동물에서 MCAO처치로 방사형미로 학습에 심각한 學習障碍를 일으켰으며, 이 과제에서 祛風至寶丹이 증풍에 의한 인지결손에 회복효과를 보였다.

본 實驗에 사용된 祛風至寶丹은 黃芩, 滑石, 桔梗, 連翹, 白朮, 防風, 荊芥, 大黃, 山梔子, 川芎, 當歸, 芍藥 등 26가지 약재의 처방으로, 消炎작용, 抗알러지작용, 抗菌작용, 泌尿器系, 皮膚炎症 緩和, 血液의 粘度 低下, 炎症疾患 개선, 神經安靜작용, 血管運動 能力 강화, 血液循環 促進, 간질세포에 정체된 불순물을 땀으로 배설 등 여러 작용이 있으며³⁷⁾, 祛風清熱의 作用이 있어, 臨床에서 頭痛, 眩暈, 中風昏倒, 精神蒙昧 등에 포괄적으로 應用되고 있어, 腦出血, 高血壓症, 動脈硬化症, 便秘症, 酒齶鼻, 皮膚病, 精神不安症에 주로 사용된다⁹⁾.

祛風至寶丹 方劑에 대한 實驗研究로는, 정¹⁰⁾ 祛風至寶丹이 전뇌허혈 모델에 미치는 영향에 대하여 가역성 전뇌허혈로 인한 뇌세포손상을 감소시키는 것으로 보고하였으며, 한¹¹⁾은 祛風至寶丹이 혈관이완 효과와 기전에 관하여 연구하여 수축혈관에 대하여 유의한 이완효과가 있음을 보고 하였지만 學習修行 및 記憶力 損傷 回復에 대한 研究는 미비한 실정이다.

본 實驗에서 學習과 記憶을 담당하고 있는 해마의 神經細胞를 損傷시켜 유도된 MCAO 모델에서 한약 제재의 효과를 보고자 하였다. 세포손상의 염색정도를 알아보는 cresyl 염색에서 祛風至寶丹이 細胞保護 효과가 나타났다. 본 연구에서 사용된 동물모델인 MCAO는 일시적인 전뇌허혈(transient forebrain ischemia)을 유발하였을 때 전뇌부위의 세포의 glutamate와 K⁺의 농도와 세포내 Ca²⁺의 증가로 인한 endotoxicty가 생기고 신경세포들이 조직으로부터 탈분극하게 되고, 다시 재관류시에는 정상으로 회복된다는 이치이다. 이때 뇌의 신피질, 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 발표되었다²⁶⁾.

본 실험의 결과를 살펴보면, 수중미로 학습에서 6일 동안 180초내에 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 실험 제 3일, 제 4일 및 제 6일에서 SHAM군은 각각 70.3±15.9초, 56.4±25.2초 및 29.0±8.5초이였으며, SAL+ISCH군은 119.7±17.8초, 96.8±24.2초 및 102.1±24.5초로 증가한데 비하여 GJD+ISCH군은 56.3초, 42.8±15.5초 및 27.7±6.3초로 유의성 있는(p<0.05, p<0.01, p<0.011) 감소를 나타내었다. 이는 祛風至寶丹 투여군의 공간 인지기억 학습수행 능력에 대한 증진효과를 나타낸다.

수중미로 학습에서 마지막 날인 제 7일 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 파지시행에서 SHAM군은 15.8±0.8초, SAL+ISCH군은 9.8±1.1초, GJD+ISCH군은 15.4±1.3초로 유의성 있는 차이를 보였다. 이에 집단별 사후검정 결과, 祛風至寶丹 투여군이 뇌허혈 유발군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 증가를 나타내었다. 이는 祛風至寶丹 투여군의 공간 기억력에 대한 증진효과를 나타낸다.

방사형 미로 학습에서 6일 동안 300초내에 한 번

찾아갔던 주로를 다시 들어가는 오선택 수를 측정하는 획득시행에서 제 1일 SHAM군은 4.6±0.3회, SAL+ISCH군은 4.5±0.3회, GJD+ISCH군은 3.5±0.2회로 유의성 없이 비슷하게 나타났으며, 학습이 진행됨에 따라 제 5일에는 SHAM군은 3.2±0.3회, SAL+ISCH군은 4.5±0.3회, GJD+ISCH군은 3.2±0.2회로, 마지막 제 6일에는 SHAM군은 3.3±0.2회, SAL+ISCH군은 4.6±0.4회, GJD+ISCH군은 2.8±0.2회로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다. 이에 측정일에 따른 집단별 사후검정 결과, 제 5일(p<0.01), 제 6일(p<0.001)에는 GJD+ISCH군이 SAL+ISCH군에 비하여 유의하게 감소되었다. 따라서 祛風至寶丹 투여군은 공간 인지에 대한 학습능력과 기억력의 증진효과를 나타낸다.

해마 부위에서 신경세포의 염색정도는 SHAM군은 28.6±1.6%, SAL+ISCH군은 7.0 GJD+ISCH군은 15.4±1.5%로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다. 이에 집단별 사후검정 결과, GJD+ISCH군이 SAL+ISCH군에 비하여 유의하게(p<0.01) 세포 수가 증가되었다. 이는 약물의 시료인 祛風至寶丹이 일시적인 국소 뇌허혈 유발로 인한 뇌의 hippocampus 신경세포의 손실을 방어하였음을 보여 준다.

이상의 실험 결과를 종합하여 보면 MCAO 동물모델에서 祛風至寶丹이 空間 學習 能力 및 記憶力 損傷을 回復시켰으며, 學習 및 記憶에 관련된 해마의 神經細胞의 損傷을 抑制시켜 記憶能力을 保護시키는 것으로 보아 學習 및 記憶障礙에 임상적으로 활용할 가치가 있는 것으로 생각되고, 이와 관련된 질환의 치료에 있어 기초적인 자료가 될 것이며 향후 보다 객관적이고 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각 된다.

결론

祛風至寶丹의 뇌손상과 인지기능 보호효과를 관찰하기 위하여 흰쥐의 중대뇌동맥을 일시적으로 폐쇄, 재관류시킨 후 수중미로, 방사형 미로를 이용한 행

동측정과 해마부위의 뇌신경 세포수 변화를 관찰한 바 다음과 같은 결론은 얻었다.

1. Morris 수중 미로 학습의 획득시행에서 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 祛風至寶丹 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게 감소하였다.

2. Morris 수중 미로 학습에서 마지막 날인 제 7일째 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 과제시행에서 祛風至寶丹 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게 증가하였다.

3. 방사형 미로 학습의 획득시행과 공간인지에 대한 기억검사에서 祛風至寶丹 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 오선택수가 유의하게 감소하였다.

4. 해마 부위의 신경세포의 염색법에 의한 신경세포수 측정에서, 祛風至寶丹 투여군은 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게 세포수가 증가되었다.

참고문헌

1. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 1991:29-30, 101-102, 227
2. Kurt J. Isselbacher. 해리슨내과학. 서울:도서출판 정담. 1997:2384
3. 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;11:1049-1050
4. 서창훈. 사물탕가미방이 중대뇌동맥폐쇄에 의한 뇌허혈손상에 미치는 영향. 동의대학교 대학원. 2003
5. 김선영. 흰쥐의 중대뇌동맥 결찰로 유발된 뇌허혈에서 성향정기산과 광향정기산이 신경세포에 미치는 효과. 동국대학교 대학원. 2001
6. 손상근. 양곡산화당이 뇌혈류 및 뇌허혈 손상에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2000
7. 홍천표. 방풍당귀음이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류 모델에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2000
8. 朱震亨. 丹溪心法. 台北:五洲出版社. 1981:1-5
9. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:의성당.

1998:628

10. 정완우. 祛風至寶丹의 Mongolian Gerbil의 가역성 전뇌허혈 모델에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2000
11. 한성호. 祛風至寶丹의 혈관이완효능과 기전에 관한 연구. 동국대학교 대학원. 2001
12. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Summins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20:84-91
13. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. U.S.A: Academic Press. 1986:218-230
14. 김영채. 학습심리학. 서울:博英社. 1991:3-18
15. Olton DS, Wenk GL. The third generation of progress. *Psychopharmacology.* H.Y.(ed.). New York Press: meltzer. 1987:941
16. Kesner RP. Reevaluation of the contribution of the basal forebrain cholinergic system to memory. *Neurobiology of Aging.* 1988;9:609-616
17. Galey D, Toumane A, Durkin T, Jeffard R. In vivo modulation of septohippocampal cholinergic in mice: Relationships with spatial reference and working memory performance. *Behavioral Brain Research.* 1989;32:163-172
18. Sutherland RJ, Rodriguez AJ. The role of the fomic/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. *Behavioral Brain Research.* 1989;32:265-277
19. 陣無擇. 三因極一病證方論. 서울:성보사. 1977:310-312
20. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1966:95
21. 程國彭. 醫學心悟. 香港:旅風出版社. 1961:209-210
22. 우주영, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권. 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향. *동의신경정신과학회지.* 1997;8(1):12-18
23. 조운숙, 황의완, 김현택, 박순권. 荊防地黃湯이

- Alzheimer's disease 모델백서의 학습과 기억에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지, 1998;9(1):35-44
24. 박정현, 김종우, 황의완. 星香正氣散이 NOS Inhibitor 투여에 의한 백서의 학습 및 기억장애에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지, 1999;10(2):56-64
25. 대한동의생리학회. 동의생리학. 서울:경희대학교 출판국, 1993:408-409
26. 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;11:1049-1050
27. Yamazaki M, Matsuoka N, Kuratani K, Ohkubo Y, Yamaguchi I. FR121196, a potential antimentia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;272(1):256-263
28. 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):1-9
29. Hickey RW, Akino M, Strausbaugh S, De Courtmn, Myers GM. Use of the Morris water maze and acoustic strattle chamber to evaluate neurologic injury after asphyximal arrest in rats. *Pediatr Res.* 1996;39(1):77-84
30. Olton DS. Mazes, maps and memory. *American Psychologist.* 1979;34:583-596
31. 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
32. Willians CL, McGaugh JL. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidnace and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 1994;654(2):251-256
33. 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):339-349
34. Brown MF, Rish PA, Vonculin JE, Edberg JA. Spatial guidance of choice behavioral in the radial-arm maze. *Exp Psychol Anim Behav Process.* 1993;19(3):165-214
35. Schantz SL, Seo BW, Moshtaghian J, Peterson RE, Moore RW. Effect of gestational and lactational exposure to TCDD or coplanar PCBs on spatial learning. *Neurotoxicol Teratol.* 1996;18(3):305-313
36. Miyagawa M, Honma T, Sato M. Effect of subchronic exposure to toluene and reference memory in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1995;17(6):657-664
37. Chen JH, Ho HO, Yen KY, Yan LL. Hepatoprotection by "dangqui-long-hwei-wan" in male mice. *American Journal of Chinese Medicine.* 2000;28(1):115-21