

원 저

허혈유발 흰쥐에 있어서의 인지장애에 미치는 가감총명탕의 효과

안기영, 이성균, 이승희, 이재원, 신진봉, 송봉근, 이언정
원광대학교 한의과대학 한방내과학교실

Neuroprotective Effect of *Gagamchongmyung-tang* on the Deficits of Learning and Memory by MCAO in the Rat

Ki-young An, Seong-kyun Lee, Seung-hee Lee, Jae-won Lee,
Jin-bong Shin, Bong-keun Song, Eon-jeong Lee

Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objective : *Gagamchongmyung-tang* is clinically one of the most popular prescriptions as an herbal medicine for the treatment of amnesia. In order to evaluate its neuroprotective effects on the ischemia-induced cognitive deficits caused by middle cerebral artery occlusion (MCAO), we examined its ability to reduce impairments of learning and memory of rats in the Morris water maze.

Method and Result : Focal cerebral ischemia produced a decrease in acetylcholine transmission in the hippocampus, and deficits of learning and memory in the Morris water maze task. Treatment with two types of *Gagamchongmyung-tang*, methanol and water extracts, produced a substantial increase in acquisition in the Morris water maze. Treatment with methanol extract of *Gagamchongmyung-tang* increased the performance of the retention test in the Morris water maze.

Consistent with behavioral data, immunohistochemical data showed that treatment with methanol extract, but not water extract, of *Gagamchongmyung-tang* significantly recovered reduction of AchE and ChAT reactivity in the hippocampal CA1 area.

Conclusion : These results demonstrated that methanol extract of *Gagamchongmyung-tang* has protective effects against ischemia-induced learning and memory impairments, and provided evidence of methanol extract of *Gagamchongmyung-tang* as a putative treatment for amnesia, vascular dementia, and longer memory.

Key Words : *Gagamchongmyung-tang*, neuroprotective effects, middle cerebral artery occlusion (MCAO)

서 론

인지기능이란 인간의 고유한 고차원적 뇌 기능으로, 기억과 학습에 의해 습득된 언어의 구사와 이해 능력, 지남력, 문제 해결 능력, 판단력, 사회 생활능력 등을 말한다¹⁾.

학습(learning)이란 경험에 의해 뇌에 비교적 지속적인 변화가 생기고, 다음 행동의 변화가 초래되는 것을 말하며, 기억(memory)이란 학습에 의

-
- 접수 : 2006년 8월 3일 · 논문심사 : 2006년 8월 10일
 - 채택 : 2006년 8월 26일
 - 교신저자 : 이언정, 전북 전주시 덕진구 덕진동2가 원광대학교 전주한방병원 6내과
(Tel : 063-270-1016, Fax : 063-270-1594,
E-mail : ejlee@wonkwang.ac.kr)
 - 이 논문은 2005학년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었음.
-

해 얻어진 경험들을 저장하였다가 필요시에 의식 세계로 다시 꺼내 사용하는 능력을 말한다²⁾.

기억과 관련된 뇌의 해부학적 구조는 해마 (hippocampus), 뇌궁(formix), 유두체(mammillary body), 전상핵(anterior thalamic nuclei)등 변연 계와 상행망상체(ascending reticular formation)등 으로 단기 기억은 편도체와 해마가 관여하고, 장기 기억은 측두간을 통과하는 하위 측두하피질 및 미상핵과 시상침을 연결하는 신경섬유가 관계하고 있다고 알려져 있으나 기억은 뇌의 어느 한 부분의 독립적인 활동이 아니고, 뇌 안의 많은 신경 회로들이 서로 교신하여 새로운 학습의 자극에 따라 여러 변화를 일으키는 현상이다³⁾.

학습과 기억은 뇌세포의 신경전달물질(neuron-transmitter) 들이 시냅스(synapse)에서 기능적, 형태적인 변화를 일으키며, 중추의 콜린성 신경전달 계가 중요한 역할을 한다^{4,5)}. 이 콜린성 신경 경로는 내측중격(medial septum) 및 기저핵(nucleus basalis)에 위치한 세포체에서 해마(hippocampus)로 투사되며⁶⁾, 이 중 해마가 학습수행 및 기억력에 관여 한다^{7,8)}. 전뇌허혈 등으로 해마가 손상된 실험동물들은 방사형미로와 Morris 수중미로와 같은 공간 기억과제를 학습하는 능력의 장애를 보인다^{9,10)}.

한의학에서는 기억을 한의학적 인지과정인 神의 일부로 인식하며¹¹⁾ [黃帝內經 靈樞 本神編]¹²⁾에서 “所以任物者謂之心 心有所憶者謂之意 意之所存者謂之志”라고 하여 ‘心’, ‘意’, ‘志’를 기억과정으로 기술하였고, [醫學心悟]¹³⁾에서는“腎主智 腎虛則智不足 故善忘其前言”이라고 하여 ‘智’가 부족하면 전에 말한 것을 잘 잊는다고 한 것으로 보아 ‘智’를 기억과 비슷한 의미로 사용하였다.

기억과 인지장애 관한 대표적인 병증으로 健忘證이 있는데, 이는 [黃帝內經 素問 五常政大論]¹²⁾에서 “太陽司天 寒氣下臨 心氣上從 而火灼明 … 善忘”이라 하여 ‘善忘’으로 표현된 이래 역대의가에 의해 자주 언급되어 왔다.

東醫寶鑑 健忘編¹⁴⁾에는 引神歸舍丹, 定志丸, 開心散, 加減固本丸, 加減茯苓湯, 聰明湯, 歸脾湯, 加減補心湯, 降心丹, 壯元丸, 加味壽星元, 朱子讀書丸, 孔子大聖枕中方 등 13가지의 처방이 나오는데, 처방에 공통적으로 쓰인 원지, 인삼 백복령 등을 기본으로, 聰明湯에 뇌세포활성을 도와주는 약리작용이 있는 백작약, 오미자를 가감하여 임상에서 사용하고 있는 加減聰明湯으로 실험을 진행하였다. 聰明湯은 [東醫寶鑑] 內經篇에 “多忘”을 치료한다고 기재되어 있는 처방으로, 역대의가들은 총명탕을 기억력 감퇴, 건망증 등의 질환을 치료하는데 활용해 왔다¹⁵⁾.

총명탕의 학습과 기억능력개선에 대한 효과를 관찰한 기존의 연구는 scopolamine으로 기억상실을 유도한 동물모델을 대상으로 한 것으로, scopolamine 동물모델은 중추 아세틸콜린계를 차단하여 기억과 인지능력 감퇴를 유도한 것이어서 혈관성 치매 등 허혈성 뇌신경 질환에서의 기억 인지능력 감퇴를 설명하기에는 한계가 있는 것이 사실이다.

따라서 본 연구에서는 혈관성 치매를 비롯한 뇌 허혈성 변화로 유도된 기억과 인지능력 저하에 대한 총명탕의 효과를 연구하였다.

본 실험에 사용된 middle cerebral artery occlusion (MCAO) 흰쥐 모델은 일시적으로 뇌에 공급되는 혈관들을 차단한 후 재관류하게 되고, 이로 인해 해마 부분의 신경세포가 손상을 입고, 인지 및 학습 장애를 일으킨다^{16,17)}.

신경세포의 손상을 전뇌에만 제한하며 후뇌에서의 혈류가 영향을 받지 않아, 호흡과 체순환에 영향을 주지 않는다는 점에서 허혈로 인한 신경손상의 연구에 global 전뇌허혈보다 널리 사용되고 있다¹⁸⁾.

본 연구는 인지능력 기억능력 학습능력에 증진에 효과가 있다고 생각되는 가감총명탕의 효능을 실험 분석하고자, MCAO 흰쥐 모델을 이용한 기억력 학습능력 손상모델에서 Morris 수중미로와 조직화학적기법(histochemistry)을 이용하여, 학습

수행능력과 기억력 및 인지능력, 신경세포의 보호 작용에 미치는 효과를 살펴보고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 샘타코 동물센터로부터 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 흰쥐를 흡입 마취시킨 후 경부 피부를 절개하고 흉골허근과 흉골저작근 사이에 총경동맥을 노출한 후 intraluminal filament를 삽입하지 않고 다른 실험군과 같은 시간을 방치한 후 피부봉합을 한 모의시술군 (SHAM, n=5), ischemia 유발군(ISCH, n=5), ischemia 유발+약물 A 처치군(A+ISCH, n=6), ischemia 유발+약물B 처치군(B+ISCH, n=6)으로 나누었으며, 각 군은 ischemia 유발 1시간 후에 처음 약물을 처치하였으며, 또한 유발 후 2주일 동안 약물을 처치하였다. 약물투여 후 1주일간 수중미로 검사를 시행하였으며, 마지막 행동검사가 끝난 후 조직검사를 실시하였다.

3. 약물 제조 및 약물 투여 방법

1) 약물 제조

(1) 처방의 구성

A약물 : 백복령, 원지, 백작약, 인삼, 오미자 각 4g 물추출

B약물 : 백복령, 원지, 백작약, 인삼, 오미자 각 4g 메탄올추출

(2) 제법

물추출물 : Sample 300g을 추출에 적합하게 파쇄(粗切)하여 정제수를 가해 70℃의 수욕상에서 5시간씩 2회 추출한 다음 추출물을 여과지(Whatman No. 1 filter paper)로 여과한 다음 감압 농축하였다. 감압 농축한 추출물을 동결건조(Ilshin freeze dryer)하여 얻은 30g을 실험에 사용하였다.(수율 10%)

Methanol추출물 : Sample 300g을 추출에 적합하도록 파쇄(粗切)하여 70%의 메탄올을 가해 70℃의 수욕상에서 5시간씩 2회 추출한 다음 추출물을 여과지(Whatman No. 1 filter paper)로 여과한 다음 감압 농축하였다. 감압 농축한 추출물을 동결건조(Ilshin freeze dryer)한 후 얻은 37g을 실험에 사용하였다.(수율 12%)

2) 약물투여방법

시술 후 약물(100mg/kg)은 매일 한차례 일정한 시간인 오전 10시경에 제조된 약물을 생리식염수에 녹여 2주간 구강투여한 후 행동검사를 실시하였다.

4. MCAO에 의한 뇌 허혈 유발

일시적인 국소 뇌 허혈은 Zea Longa 등의 방법에 따라 중대뇌동맥을 폐색시켜 만들었다. 실험동물을 70% N₂O/30% O₂와 혼합된 5% isoflurane을 이용하여 흡입마취 유도를 한 후, 2% isoflurane으로 마취상태를 계속 유지시켰다. 흰쥐의 직장에 체온측정 probe를 삽입하고 가온등과 가온 메트리스를 이용하여 실험기간 동안 체온을 38℃로 유지하였다.

중대뇌동맥을 폐색하기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골허근과 흉골저작근 사이에 총경동맥을 노출한 후 내경동맥내로 치과 인상제(Durelon, germany)가 발라진 intraluminal filament(Ø0.28mm, rounded tip)을 삽입하여 그 끝이 중대뇌동맥의 기시부를 지나 전대뇌동맥의 근위부까지 도달하도록 하였다.

총경동맥과 외경동맥은 결찰한 후 혈류차단 2 시간이 지난 후 인상제가 중대뇌동맥내에 위치하도록 intraluminal filament를 제거하고 우측 총경동맥을 결찰하여 측부 순환을 통하여 재관류를 시켰다.

5. 행동 측정 장치에 의한 학습 및 기억력 측정: 수중미로 장치와 절차

수중미로로 이용되는 수조는 직경이 180cm, 높이가 50cm인 원형 통으로 온도가 26±2℃되는 물이 30cm 높이로 채웠다. 수중 미로의 주변은 비디오 카메라, 실험대, 그리고 실험대 위에 있는 수온 조절용 장치 등 공간단서들을 일정하게 유지하였다. 도피대는 직경이 12cm인 원형 투명 아크릴에 받침대를 부착하고, 수면보다 1.5cm낮게 위치시켰다. 수조내의 물은 흰색 물감을 풀어서, 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 하나를 출발위치로 사용하였다.

실험동물들은 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 비디오 카메라로 녹화되는데, 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대로 올라가는데 걸린 시간을 측정하고, 60초간의 검사시행에서는 훈련 시에 도피대가 있었던 사분원에 머문 시간을 S-MART 프로그램 (PanLab, S-Mart program)을 이용하여 측정하였다.

6. Histochemistry

1) 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. 200×200μm 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 100배로 확대하여 hippocampus에서 AchE 신경세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, USA)을 이용하여 측정하였다.

2) Choline acetyltransferase(ChAT) Immunohistochemistry

뇌 조직을 PBS에 3회 정도 세척한 후 ChAT 유전자 발현 연구에 가장 널리 사용되고 있는 primary sheep polyclonal ChAT antibody (Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE, USA)를 사용하였다. 1차 항체는 PBS에 0.2% Triton X-100 첨가한 PBST에서 2% 토끼혈청과 0.1% sodium azid(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 2000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4℃에서 72시간동안 지속적으로 흔들며 주면서 배양하였다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 2시간동안 실온에서 2% 토끼 혈청을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 반응시켰다. PBS로 3번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent(Vector)에 담구었다. PBS로 몇 번 행군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzadine (DAB)을 사용하여 발현시켰다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 관찰하였다. 200×200

μm 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 100배로 확대하여 hippocampus에서 ChAT 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 Window 용 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.

실험결과

1. Morris 수중미로의 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

1) MCAO 유발모델에서 수중미로 학습의 획득 시행동안 약물처리군의 효과

각 군 실험동물의 학습 정도 측정은 Fig. 1과 같다. 수중미로 학습에서 6일 동안 180초 내에 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 제1일째 SHAM군은 134.53±3.49초, ISCH군은 128.87±13.61초, A+ISCH군은 137.06±10.55초, B+ISCH군은 139.11±17.18초로 유의성 없이 비슷하게 나타났으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 6일째에는 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 SHAM군은 16.60±1.22초, ISCH군은 46.67±8.12초, A+ISCH군은 21.61±4.14초, B+ISCH군은 19.44±3.26초로 집단간의 유의성이 있는 차이를 보였다[F(3,18)=4.774, P<0.05]. 이에 측정일에 따른 사후검정결과, 5일째에는 B약물 투여군이 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 감소되었으며(P<0.05), 6일째에는 A약물 투여군과 B약물 투여군이 모두 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 감소되었다(P<0.01). 따라서 A약물과 B약물은 공간 인지기억 학습수행 능력에 대한 증진효과를 보여준다. (Fig.1.)

2) MCAO 유발모델에서 수중미로 학습의 검사 시행동안 약물처리군의 효과

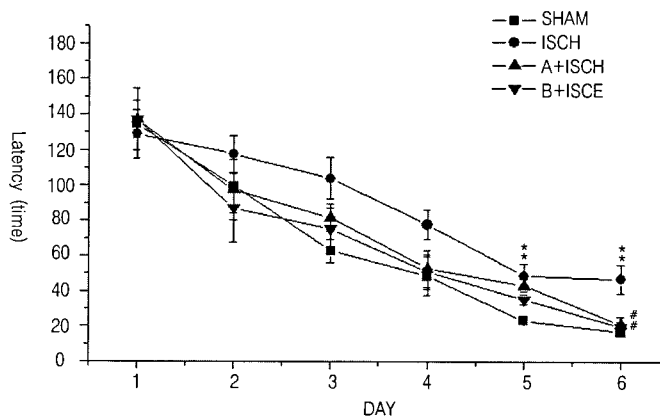


Fig. 1. Comparison of acquisition performance on the Morris water maze task among the four groups of the rats. The task was started on the 2nd week after drug treatment and was performed with four trials per day for 6 days. Repeated measures of one-way ANOVA of swimming time among the groups and followed by Tukey's test. **, P<0.01 as compared with the corresponding data of SHAM group. ##, P<0.01 as compared with the corresponding data of ISCH group.

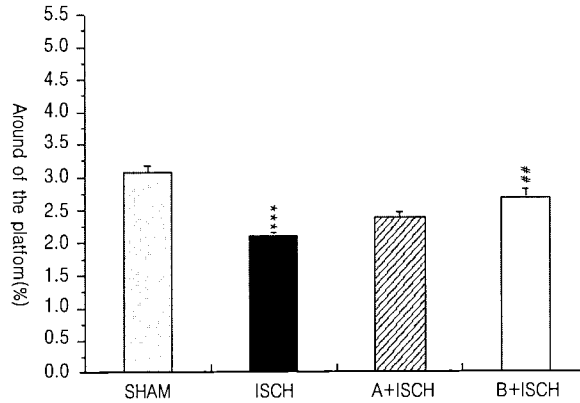


Fig. 2. Comparison of retention performance on the Morris water maze task among the four groups of the rats. The task was started on the 6 days after aquisition test and was performed with four trials per day for 7th day. Measures of one-way ANOVA of time spend in quadrant(%) among the groups and followed 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 ISCH group.

각 군 실험동물의 기억력 측정은 Fig. 2와 같다. 수중미로 학습에서 마지막 날인 제7일째 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 파지시행에서 SHAM군은 $3.08 \pm 0.09\%$, ISCH군은 $2.12 \pm 0.04\%$, A+ISCH군은 $2.39 \pm 0.08\%$, B+

ISCH군은 $2.69 \pm 0.12\%$ 로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다 [$F(3,18)=17.480, P < 0.001$]. 이에 집단별 사후검정 결과, A약물 투여군은 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 ($P < 0.208$), B약물 투여군은 ischemia

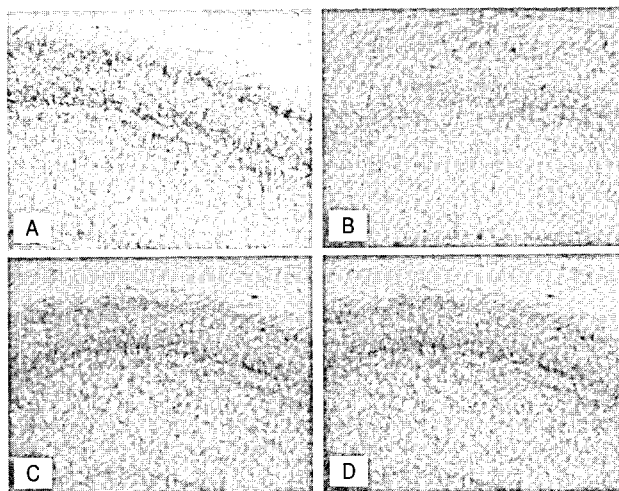


Fig. 3. Representative microphotographs of coronal sections showing AchE in the CA1 of SHAM(A), ISCH(B), A+ISCH(C) and B+ISCH(D). The scale bar represents $100\mu m$.

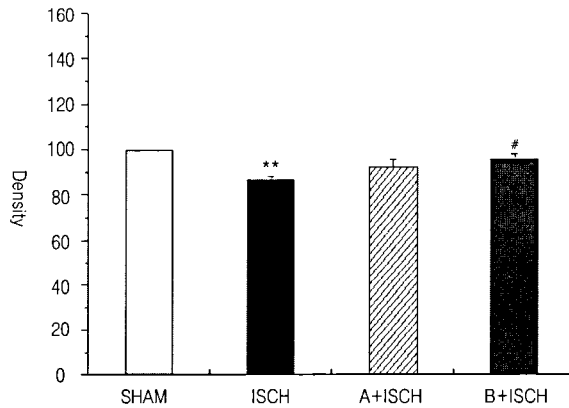


Fig. 4. The values of density of acetylcholine esterase (AChE) stained neurons in the areas are shown. Measures of one-way ANOVA in the count revealed a groups and followed by Tukey test. **, $P < 0.01$ as compared with the corresponding data of SHAM group. #, $P < 0.05$ as compared with the corresponding data of ISCH group.

유발군에 대해 통계적으로 유의하게 증가되었다 ($P < 0.01$). 따라서 B약물은 파기검사서 공간 기억력에 대한 증진효과를 보여준다.(Fig.2.)

2. 신경세포손상 관찰

1) Acetylcholinesterase(AChE) 발현에서의 약물 처치군의 방어 효과

각 군의 해마에서 AChE 발현정도는 Fig. 3-4와 같다. 해마의 CA1 부위에서 AChE 발현은 SHAM 군의 염색정도를 100%로 두었을 때, ISCH군은 $86.66 \pm 1.26\%$, A+ISCH군은 $91.88 \pm 3.26\%$, B+ISCH군은 $95.73 \pm 1.95\%$ 로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다[F(3,65)=6.413, $P < 0.001$].

이에 집단별 사후검정 결과, B약물 투여군이

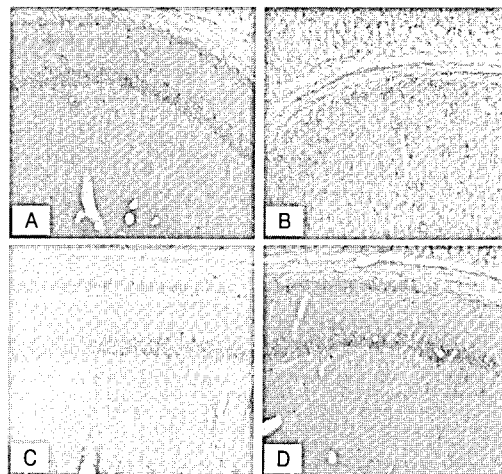


Fig. 5. Representative microphotographs of coronal sections showing ChAT in the CA1 of SHAM(A), ISCH(B), A+ISCH(C) and B+ISCH(D). The scale bar represents $100\mu\text{m}$.

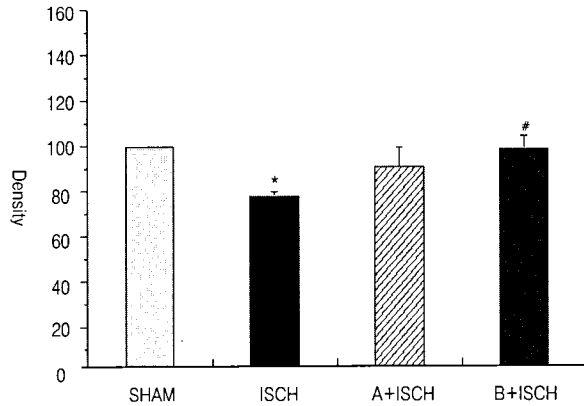


Fig. 6. The values of density of Choline acetyltransferase (ChAT) stained neurons in the areas are shown. Measures of one-way ANOVA in the count revealed a groups and followed by Tukey test. **, $P < 0.01$ as compared with the corresponding data of SHAM group. #, $P < 0.05$ as compared with the corresponding data of ISCH group.

ISCH 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 증가되었다($P < 0.05$). (Fig. 3-4.)

2) Choline acetyltransferase(ChAT) 발현에서의 약물처리군의 방어 효과

각 군의 해마에서 ChAT 발현정도는 Fig. 5-6과 같다. 해마의 CA1 부위에서 ChAT 발현은 SHAM군의 염색정도를 100%로 두었을때, ISCH군은 $78.03 \pm 1.69\%$, A+ISCH군은 $90.96 \pm 8.28\%$, B+ISCH군은 $98.78 \pm 5.35\%$ 로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다[F(3,65)=3.226, $P < 0.05$]. 이에 집단별 사후검정 결과, B약물 투여군이 ISCH 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 증가되었다($P < 0.05$). (Fig. 5-6)

고찰

본 연구에서는 MCAO 흰쥐 모델을 대상으로 하여 수중미로에서 공간인지 및 학습수행과 기억 능력에 대한 행동의 변화를 관찰하였으며, 학습 능력과 기억력을 강화시킨다고 생각되어지는 가감총명탕을 focal cerebral ischemia 유발 후 2주간 정도 지속 투약하여, 인지능력 학습능력과 기억력

증진에 관한 효과를 연구하였다.

Morris 수중미로(Morris water maze)는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용하며, 공간 정보 외에 다른 시각적 후각적 정보들을 쉽게 차단하거나 제어 할 수 있는 장점이 있다. 이는 주로 장기기억 능력을 측정하는 과제로서 동물의 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력 즉 공간기억(spatial memory)을 측정하는 것이다¹⁹⁾.

Morris 수중미로를 통한 기존의 기억평가 실험으로 Clark 등은 androgen양 합성물질인 anabolic-androgenic steroid(AAS)가 해마체에 변형에 미치는 영향을 평가하면서, 해마의 신경이 손상된 쥐는 수중미로 실험에 있어서 학습능력과 기억력이 떨어진다고 보고하였다²⁰⁾.

공간기억능력을 측정하는 수중미로 장치에서 획득시행 5일째부터 가감총명탕의 메탄을 추출물 투여군이 ischemia 유발군에 비해 도피대에 도달하는 시간이 통계적으로 유의하게 감소되었고, 6일째는 가감총명탕 물추출물 투여군과 메탄을 추출물 투여군 모두 ischemia 유발군에 비해 도피대에 도달하는 시간이 통계적으로 유의하게 감소되었다. 따라서 두가지 모두 공간인지 기억 학습수

행 능력에 대한 증진효과를 보여주었다.

수중미로 학습에서 7일째 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 파지시행에서 가감총명탕의 물추출물 투여군은 ischemia 유발군에 비해 통계적으로 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 가감총명탕의 메탄올 추출물 투여군은 ischemia 유발군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다. 가감총명탕의 메탄올 추출물 투여군은 파지검사에서 공간 기억력에 대한 증진 효과를 보여주었다. 이러한 결과는 가감총명탕의 물추출물이나 메탄올 추출물 모두 학습 수행 능력을 향상시키는 것을 의미하는 것이고, 가감총명탕의 메탄올 추출물의 경우에는 학습 수행 능력 뿐만 아니라 학습내용의 회상 과정에 있어서도 증진효과가 있는 것을 의미한다.

학습과 기억의 신경지표로 이용되고 있는 AchE의 활성도와 ChAT의 활성도를 측정한 결과, 가감총명탕 물추출물과 메탄올 추출물 모두 ischemia 유발군 보다 유의있게 증가하였다.

물추출물에 비해서 메탄올 추출물이 AchE의 활성도와 ChAT의 활성도를 더 증가시킨 것으로 보아 국소 뇌허혈 유발로 인한 뇌의 해마 신경세포 손상을 방어하는데 있어서도 더 효과적인 것으로 보인다.

ChAT는 아세틸콜린을 합성하는데 중요한 효사이므로 ChAT 발현 증가가 아세틸콜린을 증가시킨다고 보며, AchE의 경우 아세틸콜린을 분해하는 작용을 하는 것으로 AchE 효소의 발현이 기질의 양에 좌우하므로, 본 실험에서는 AchE의 발현이 많은 것이 아세틸콜린이 많이 존재할 것으로 추정하였다²¹⁾.

이는 기억력 상실과 인지 결함이 신경신호를 전달해 주는 신경화학물질인 아세틸콜린을 만들어내는 신경세포의 퇴화 때문이라는 설명을 뒷받침하고 있다²²⁾.

가감총명탕은 백복령, 원지, 인삼, 오미자, 백작약의 단미제가 일정 비율로 혼합된 처방으로, [東

醫寶鑑 健忘編²³⁾에 “多忘”을 치료한다고 기록되어 있고, [醫部全錄²⁴⁾에 “不善記而多忘者”를 치료한다고 되어있는 등 역대의가들에게 기억력 감퇴, 건망 등의 병증을 치료하는 데 자주 활용되었던 처방이다.

처방 구성약물의 개별효능을 살펴보면 백복령은 다공균과(Polyporaceae)에 속하며, 소나무 뿌리에 기생하는 不定形의 菌核이다. 性味는 甘 淡 平하고, 心 脾 肺 經 歸한다. 利 水 滲 濕 建 脾 補 中 寧 心 安 神하는 효능이 있다²⁵⁾. 성분은 포도당의 다당체인 pachyman과 triterpenoid인 pachymic acid 및 스테로이드로서 ergosterol 등이 있다.

실험적으로 물추출물과 에탄올 추출물이 일과성의 혈당상승 후 저하작용을 나타내는 것으로 보고되었다. 다당체는 항종양작용이 있어 mouse의 육종 sarcoma180에 대한 억제율이 96.88%에 이른다. CCl₄로 유도된 간손상을 현저히 회복시키며 간세포 괴사를 방지한다²⁶⁾. 또한, 실험적으로 흰쥐에 있어서 국소 뇌허혈량의 증가를 보여주었다²⁷⁾.

원지는 원지과(Polygalaceae)에 속한 다년생 초본인 원지의 뿌리를 건조한 것으로서 그 歸經은 心 腎이고 性味는 苦 辛 溫 등으로 분류되어 있다. 去 痰 利 竅 安 神 益 智하는 효능이 있다²⁸⁾. 또한 효능에 관한 연구로 안신작용, 이뇨효과 및 중추억제작용, 뇌 성상세포로부터 염증성 세포활성물질 분비의 억제효과, potential antipsychotic efficacy, antiinflammatory activity 등이 보고된 바 있다²⁹⁾. 원지의 항 스트레스 효과에 대한 연구로 사회, 심리적 스트레스를 생쥐에게 부하하면서 원지추출물을 100mg/kg로 5일간 투여한 결과, 스트레스 자극에 의해 분비량이 증가되는 코티코스테론의 분비를 유의하게 감소시키는 실험결과도 보고되었다³⁰⁾. 원지 메탄올 추출물은 신경세포의 사멸을 유의하게 보호하는 효과를 나타낸다는 실험보고도 있다³¹⁾.

백작약은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속한 다년생초본인 함박꽃과 산작약의 根이다. 性味

는 苦酸涼 하고 肝脾로 歸經한다. 柔肝止痛 養血斂陰 平抑肝陽하는 효능이 있다³²⁾. 백작약과 주초 백작약은 고농도에서 자발운동 실조현상과 rotor rod 법에 의한 진정효과가 있는 것으로 보고 되었고, 수면시간 연장효과도 보고 되었다³³⁾.

인삼은 오가피과(Araliaceae)에 속한 다년생초 본인 인삼의 根이다. 甘微苦溫 하고 脾肺로 歸經한다. 大補元氣 補脾益氣 生津寧神益智하는 효능이 있다³⁴⁾. 인삼의 함수 에탄올 엑스는 부신피질 호르몬의 하나인 gluco-corticoid 의 분비를 촉진시키는 작용이 있어, 각종 스트레스에 대하여 부신피질 기능의 강화에 유효하다. 또한 대뇌피질을 자극하여 choline 작동성을 증가해서, 혈압강하, 호흡촉진, 실험적 과혈당의 억제, insuline 작용증강, 적혈구 및 헤모글로빈 증강, 소화관 운동항진 등의 작용이 보고되고 있다. 그 밖에 인삼에서 만든 고분자 성분을 주체로 한 prostisol에 단백질 및 DNA 합성촉진 작용이 있다. 인삼의 saponin 분화에 항피로작용, 작업능력 증진작용, 성선발육 촉진작용, 혈당치 강하작용 등이 있다³⁵⁾. 신경세포 보호 효과에 대한 실험으로, 소의 배양 신경세포에 산소자유기로 독성을 유발하여 신경세포의 생존율을 관찰한 결과, 인삼추출물이 산소자유기의 독성을 방어하는데 효과적인 것으로 연구되었다³⁶⁾.

오미자는 목련과(Magnoliaceae)에 속한 다년생 낙엽 蔓木인 오미자나무의 성숙한 果實이다. 酸溫 하며 肺腎으로 歸經한다. 斂肺滋腎 生津斂汗 澀精止瀉하는 효능이 있다³⁷⁾. 오미자의 약리작용 중 중추신경계에 대한 작용으로 진정작용, 수면시간연장, 노화방지작용 등이 보고 되어 있으며, 임상에서는 驚悸, 脫營, 虛煩, 不眠 신경성노이로제 등 정신신경계 질환에 다용하고 있다³⁸⁾. 또한, 실험적으로 H₂O₂의 산화적 손상으로 유도된 신경독성을 방어하는데 매우 효과적인 것으로 보고된 바도 있다³⁹⁾.

본 연구에서는 MCAO 동물모델에서 가감총명탕의 학습수행 능력과 기억능력에 미치는 효과를 2주동안 지속적으로 투여 후 수중미로와 조직화학적 기법을 통해 알아보았다.

실험결과, 가감총명탕은 수중미로시험을 이용한 행동학적 변화에 있어서 공간학습능력 및 손상된 기억능력을 증진시켰으며, 신경화학적 변화에 있어서 학습 및 기억에 관련된 것으로 알려진 해마의 신경세포의 손상을 억제하였다.

또한 신경전달물질인 아세틸콜린의 양을 증가시킨 것으로 사료된다.

특히, 본 실험에서 가감총명탕의 물추출물과 메탄올 추출물에 실험결과를 비교해보면 효율적인 면에 있어서 메탄올 추출물이 더 효과적인 것으로 보인다.

한의학에서 약재의 수치법 중에 酒炙라는 방법이 있는데 이는 술을 보료로 사용하여 약물과 함께 拌炒하는 것을 뜻한다. 또한 한약의 湯劑法 중에 酒水相拌이라는 것이 있는데 이는 술과 물을 일정 비율로 하여 湯煎하는 것이다. 실제 추가적인 연구나 임상에 적용하는 데 있어서, 酒炙法 같은 수치법이나 酒水相拌煎 같은 여러 가지 다양한 용매를 이용하는 製劑法을 이용하는 연구가 필요할 것으로 보인다.

본 실험결과를 통해 가감총명탕으로 혈관성 치매, 기억력 감퇴 및 학습 능력 향진제로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 MCAO를 이용한 기억력 손상모델에서 가감총명탕을 투여한 후 수중미로 실험을 통해 학습과 기억에 대한 효과와 조직화학분석법으로 해마 부위에서 아세틸콜린성 신경세포와 신경세포손상의 보호효과를 살펴본 결과 다음과 같다.

1) 수중 미로 학습의 획득시행에서 ischemia 유발군이 모의시술군에 비해 도피대에 도달하는 시

간이 유의하게 증가하였으며, 5일째 부터는 가미총명탕 메탄올 추출물 투여군이 ischemia 유발군에 비해 도피대에 도달하는 시간이 통계적으로 유의하게 감소되었고, 6일째에는 가미총명탕 물 추출물 투여군과 가미총명탕 메탄올 추출물 투여군이 모두 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 감소하였다. 따라서 가미총명탕 물 추출물과 가미총명탕 메탄올 추출물은 공간 인지 기억 학습 수행 능력에 대한 증진효과를 보였다.

2) 수중 미로 학습의 검사 시행에서 가미총명탕 물 추출물 투여군은 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았고, 가미총명탕 메탄올 추출물 투여군은 ischemia 유발군에 대해 통계적으로 유의하게 증가하였다. 따라서 가미총명탕 메탄올 추출물은 파지검사에서 공간 기억력에 대한 증진효과를 보였다.

3) 조직실험에서 ischemia 유발군은 모의시술군에 비해 해마의 CA1부위에서 AchE 발현이 감소하였으며, 가미총명탕 메탄올 추출물 투여군에서 손상된 AchE 발현을 회복시키는 효과를 보였다.

해마의 CA1 부위에서 ChAT 발현은 ischemia 유발군이 모의시술군에 비해 감소하였으며, 집단별 사후 감정 결과 가미총명탕 메탄올 추출물 투여군의 ChAT 발현이 ischemia 유발군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다. 이상의 결과에서 가감총명탕은 MCAO 동물모델에서 유도된 학습과 기억 손상에 대한 회복을 증진시키고, 신경세포의 보호 효과를 보이며, 혈관성 치매의 치료제나 기억력 감퇴 및 학습 능력 향진제로 이용할 수 있는 가능성을 시사한다.

참고문헌

1. 박종환, 김희철. 노화에 관련된 인지기능감퇴. 계명의대논문집, 1997;16(3):382-389.
2. Kugemann IL. Principles of Neural Science. 2nd ed. New York : Elsevier. 1986 : 806-815.
3. 박만상. 정신생물학, 서울. 지식산업사. 1994: 222-235.
4. Olton DS, Wenk GL. The third generation of progress. Psychopharmacology. H.Y. (ed.). New York Press. meltzer. 1987:941.
5. Gray JA, McNaughton N. Comprasion between the behavioral effects of septal and hippocampal lesions : A review. Neuroscience and biobehavioral Reviews. 1982;7:119-88.
6. Johnston M, Mckinney M, Coyle J. Evidence for a cholinergic projection to neocortex form neurons on basal forebrain. Proceedings of the National Academy of Science. 1979;76:5392-6.
7. Blozovski D. PA-Learning in young rats with dorsal hippocampus and hippocampoentorhinal atropine. Pharmacology. Biochemistry and Behavior. 1979;10:369-72.
8. Chrobak JJ, Hanin I, Walsh TJ. AF64A (ethycholine aziridinum ion), a cholinergic neurotoxic, selectivity impairs working memory on a multiple component T-maze task. Brain Research. 1987;414:15-21.
9. Morris RGM. An attempt to dissociate "spatial-apping" and "working memory" theories of hippocampal of the hippocampus. London : Academy Press. 405-32.
10. 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.
11. 류영수, 최공한. 기억장애에 관한 동·서의학적 비교 연구. 동의신경정신과학회지. 1996;7(1): 155-156.
12. 馬元臺, 張隱庵. 黃帝內經素問靈樞合編, 台聯. 國風出版社. 1996, 素問:532, 靈樞:57-58, 464.
13. 程國彭. 醫學心悟, 香港. 旅風出版社. 1961:

- 209-210.
14. 許浚 東醫寶鑑. 驪江出版社. 1994 : 내경편 제1권 114-117.
 15. 이종길, 강형원, 류영수. 뇌신경교 정상세포로부터 중앙괴사인자 알파의 생성에 있어서 총명탕의 효과. 동의신경정신과학회지 1999;10(1): 109-110.
 16. 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.
 17. Gill R, Foster A and Woodruff G. MK-801 is neuroprotective in gerbils when administered during the post-ischemic period. Neuroscience. 1988;25:847-55, 254.
 18. 이봄비 외 7인. 중풍 한방처방전의 효능비교 연구. 대한경락경혈학회지 2002;19(2):63-78.
 19. Yamazaki M, Matsuoka N, Kuratani K, Ohkubo Y, Yamaguchi I, FR121196, a potential antidemetia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. J Pharmacol Exp Ther. 1995;272(1): 256-263.
 20. Clark AS, Miltre MC, Brinck-Johnsen T. Anabolic androgenic steroid and adrenal steroid effects on hippocampal plasticity. Brain Res. 1995;679(1):64-71.
 21. 지규용. 보태음이 해마손상 백서의 기억기능회복에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002; 16(6):1236-1242.
 22. De Vente J, Markerinek-van IM, Van AJ, 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 an cGMP synthesis. Eur J Neurosci. 2000;12(2):507-19.
 23. 許浚 東醫寶鑑. 驪江出版社. 1994 : 내경편 제1권 115.
 24. 陳羅雷等: 古今圖書集成醫部全錄(第7冊), 北京, 人民衛生出版社, 1983:2150.
 25. 신민교. 임상본초학. 영림사. 1991:250-251.
 26. 생약학교재편찬위원회. 생약학 . 동명사. 2005: 289-290.
 27. 심진찬 외 5인. 백복령과 백하수오의 약리작용에 관한 연구. 한국전통의학지. 2002;12(1):139-152.
 28. 신민교. 임상본초학. 영림사. 1991:370-371.
 29. 이수배, 성낙무, 이영종. 원지가 NMDA로 유발된 신경세포 손상에 미치는 효과. 대한본초학회지. 2005;20(2):122.
 30. 김경호 외 5인. 원지 추출물이 사회 심리적 스트레스에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003; 18(1):99-108.
 31. 이수배외 2인. 원지가 NMDA로 유발된 신경세포 손상에 미치는 효과. 대한본초학회지. 2005; 20(2):115-125.
 32. 신민교. 임상본초학. 영림사. 1991:223.
 33. 홍남두 외 3인. 백작약이 중추신경계 및 적출장관에 미치는 영향. 약제학회지. 1986;16(3): 124-131.
 34. 신민교. 임상본초학. 영림사. 1991:166.
 35. 생약학교재편찬위원회. 생약학 . 동명사. 2005: 149-150.
 36. 전병훈외 2인. 인삼이 산소유리기로 손상된 척수 신경세포의 손상에 미치는 영향. 대한동의 병리학회지. 1998;12(1):96-101.
 37. 신민교. 임상본초학. 영림사. 1991:241
 38. 황일택 외 5인. 뇌혈류와 혈압에 미치는 오미자의 효능에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2003; 17(5):1224-1230.
 39. 이종화 외 3인. Hydrogen peroxide로 손상된 대뇌신경세포에 미치는 오미자의효과에 관한 연구. 동의생리병리학회지. 2003;17(1):101-104.