

총명탕과 초콜릿 첨가 총명탕의 학습 및 기억장애에 대한 효능 비교연구

김성준¹, 박원상¹, 최 현⁴, 김범희, 신정원³, 손영주², 손낙원¹, 정혁상
경희대학교 한의과대학 해부학교실, 한의학연구소,
¹경희대학교 동서의학대학원 신경과학 및 뇌질환전공
²상지대학교 한의과대학 부인과학교실,
³워싱턴대학교 의과대학 해부학 및 신경생물학교실, ⁴(주)함소아 제약

ABSTRACT

A Comparative Study for Effects of Chongmyungtang and Chocolate Mixed Chongmyungtang on Learning and Memory Impairment

Seong-Joon Kim¹, Won-Sang Park¹, Hyeon Choi⁴, Bum-Hoi Kim, Jung-Won Shin³,
Young-Joo Sohn², Nak-Won Sohn¹, Hyuk-Sang Jung

Dept. of Anatomy & Institute of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University
¹Dept. of Neuroscience and Brain Disease, Graduate School of East-West Medicine, Kyung Hee University
²Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Sangji University,
³Dept. of Anatomy & Neurobiology, School of Medicine, Washington University in St. Louis, USA
⁴Hamsosa Pharmaceutical Co.

With tablets and powder, decoction has been a widely-used method of medicine formula. However, for these formulas have unique bitter tastes and flavors of herbal component materials as it is, the compliance of herbal medicine is severely decreased especially for female and younger

-
- 교신저자 : 정혁상
 - 서울 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학 해부학교실, 한의학연구소
 - Tel : 02-961-9449 Fax : 02-961-0327 E-mail : jhs@khu.ac.kr
 - 접수 : 2008/ 03/ 03 채택 : 2008/ 06/ 07

patients. Consequently, expected treatment effects can't be acquired completely.

If loathsome tastes and flavors of decoction were effectively reduced while pharmacological activity were kept intact, the compliance could be promoted Chong-Myung-Tang has been widely prescribed for student patients with memory. This study shows that Chong-Myung-Tang+chocolate have no difference from Chong-Myung-Tang in terms of pharmacological activity. Sensory difference with net chocolate was also surved.

In order to observe the difference of Chong-Myung-Tang+chocolate and Chong-Myung-Tang, memory impairment was induced by intraventricular injection of $A\beta_{25-35}$ peptides on mice and Chong-Myung-Tang and Chong-Myung-Tang+chocolate were administered orally for 14 days.

In water maze task, improvement of learning ability during acquisition period and significant increase of memory score during retention period resulted from the treatment of Chong-Myung-Tang and Chong-Myung-Tang+chocolate with respect to the $A\beta$ -injected control animals.

Furthermore, the $A\beta_{25-35}$ toxicity on the hippocampus was assessed with immunohistochemistry (Bax, TUNEL), and differences in antioxidant activity was observed through TBARS and DPPH test.

We employed sensory tests using chocolate flavor, herb flavor, and bitter taste & hardness as standards to show sensory differences with net chocolate.

In this study, it is demonstrated that Chong-Myung-Tang+chocolate do not disturb the pharmacological activity of Chong-Myung-Tang, and have no sensory difference with net chocolate. Chong-Myung-Tang+chocolate can be used to enhance the compliance remarkably and thought of as an effective, functional formula to maximize expected treatment.

Key word : Chong-Myung-Tang, Chong-Myung-Tang+chocolate, $A\beta_{25-35}$, learning and memory, Bax, TUNEL, TBARS, DPPH

1. 서 론

학습과 기억을 증진시키는 대표적인 처방으로 청소년들에게 자주 처방되는 총명탕(聰明湯)은 허

준의 <東醫寶鑑 · 內景編>에서 “多忘”을, <醫部全錄>에서는 “不善記而多忘者”를 치료하는 것으로 기재되어 있으며, 기억력 감퇴, 건망 등의 병증을 치료하는 데에 활용되어 왔다. 최근에는 총명탕의 학습 및 기억증진 효능에 대하여 건망유도 백서를

이용한 실험적 연구¹⁾와 행동실험²⁾을 통하여 유의한 효능이 보고된바 있으며, 베타아밀로이드 주입에 의해 유발된 알츠하이머형 치매에 대한 apoptosis 억제효과³⁾가 보고되었고, 구성약물인 원지와 석창포에 대해서는 지질과산화 억제효과⁴⁾가 보고된 바 있다.

전통적으로 한의학 임상에서 가장 광범위하게 사용되고 있는 제형은 당제, 환제 그리고 산제이다. 하지만 이런 제형들은 구성 한약재 고유의 맛과 향을 거의 그대로 가지고 있기 때문에 특히 소아, 청소년 그리고 여성 환자들의 복용 순응도를 떨어뜨려서 기대했던 치료효과를 발휘하기 어렵게 만드는 요인으로 작용하고 있다. 한약의 약리작용을 그대로 보존하면서도 한약 고유의 맛과 향에 대한 거부감을 효과적으로 줄여준다면 복용 순응도를 높임으로써 의도된 효과를 완전히 발휘할 수 있을 것이다.

본 연구에서는, 초콜릿을 이용한 총명탕의 제형 개선에 착안하여 일차적으로 초콜릿과 총명탕 동결건조분말을 혼합하여 가나슈 형태로 셀 내부에 충전하여 성형하는 방법으로 제형을 개발하고, 순수 초콜릿과 초콜릿첨가 총명탕의 초콜릿향, 한약향, 쓴맛 및 경도 등의 관능검사 차이를 관찰하였다. 더 나아가 총명탕에 초콜릿을 첨가하였을 때 초콜릿이 기존 총명탕의 약리 효능에 미치는 영향을 비교 관찰하였다. *in vivo* 실험으로, 생쥐의 뇌실 내에 베타아밀로이드(A β 25-35)를 주입하여 알츠하이머형 치매를 유발시키고 총명탕과 초콜릿첨가 총명탕을 각각 경구투여 한 후, 수중미로검사(water maze test)를 통해 학습과 기억력 장애의 회복정도와 면역조직화학적 방법을 통해 생쥐 뇌의 해마조직에서 Bax와 TUNEL 양성반응 신경세포의 변화를 비교 관찰하였다. 또한 *in vitro* 실험으로, Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)와 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 실험을 통하여 항산화능력의 차이를 비교 관찰하였다.

총명탕과 초콜릿첨가 총명탕에 대한 관능검사와 학습 및 기억장애에 대한 효능 비교 실험 모두에서 유의한 결과를 얻은 본 실험연구의 결과는 한약의 제형 및 효능 개선을 위하여 유의한 기본적인 자료가 될 수 있기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 초콜릿 제형의 관능실험

1) 초콜릿의 제조

관능평가를 실시하기 위해 100% 순수 초콜릿과 총명탕+초콜릿을 같은 모양으로 제조하였다. 각각의 구성비는 아래 표와 같다.

Table 1. Recipes of chocolate with and without Chong-Myung-Tang extracts

Sample	Chong-Myung-Tang extracts (g)	Dark londo chocolate (g)	Rum (ml)	Cream (g)
Chong-Myung-Tang+chocolate	17	58	1	35
Pure chocolate	0	75	1	35

15개 분량(15회 복용 분)의 총명탕초콜릿을 만들기 위해 초콜릿 125g(론도, 스위스 로잔느), 생크림 35g(서울 우유), 총명탕 농축엑기스 17g, 럼주 1mL, dark chocolate shell 15개를 준비하였다.

먼저 셀 코팅용으로 사용할 초콜릿 50g을 템퍼링하여 녹여서 준비한다. 초콜릿 58g을 녹인 후 생크림 35g, 총명탕 농축 엑기스 17g을 섞어 가나슈(ganache)를 만든다. 준비한 shell에 가나슈를 부어 속의 3/4정도 부어 굳힌다. 약 10분 뒤 굳은 shell 초콜릿 위에 템퍼링한 초콜릿을 부어 완전한

shell 모양을 잡는다. 템퍼링하여 녹인 초콜릿으로 shell 위쪽 입구를 채운 뒤, 다시 굳힌 후, shell 초콜릿을 템퍼링한 초콜릿에 담가 겉을 코팅한 후 모양을 낸다. 순수 초콜릿 제조 방법은 위의 과정 중에서 총명탕 농축 엑기스를 섞는 과정만 제외하면 동일하다.

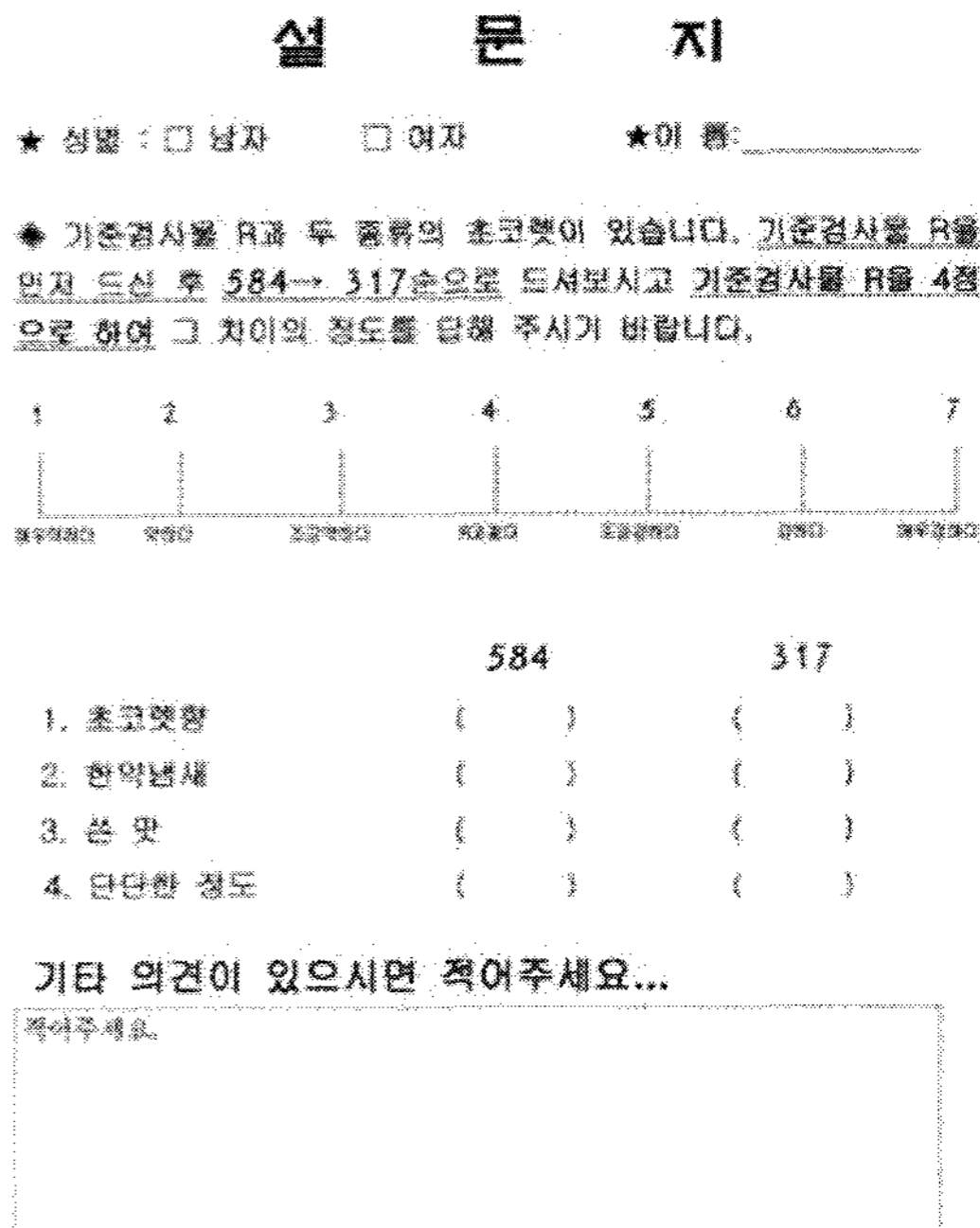
2) 관능평가

총명탕초콜릿의 관능적 품질특성을 알아보기 위하여 정해진 조건에 따라 제조된 시료의 맛과 향 및 조직감의 품질을 평가하였으며, 시료의 특성은 시료의 특성은 초코렛향, 한약냄새, 쓴맛과 단단한 정도의 차이로 하였다. 패널은 사원미 테스트를 거쳐 선발한 후 다년간 식품의 품질 차이 검사를 수행한 전문 패널로 구성하였으며 인원은 16명이었으며 이들에게 2회 반복하여 평가를 하게 하였다.

총명탕초콜릿을 실험군으로 하여 초콜릿 100%인 대조군과 비교하도록 하였다. 먼저 대조군의 향미를 평가한 다음 이를 기준으로 실험시료와 비교하도록 하였으며, 이 때 대조군(R)의 모든 묘사 강도를 4로 하여 실험군과 비교하게 하였다. 한편 제시된 시료 중 대조군(R)과 동일한 시료를 hidden control로 제공하여 실험시료와 상대 비교가 되도록 하였다^{5,6)}.

시료는 오전 10시에 제공되어 실험하였으며 묘사 분석법에 의해 냄새, 맛, 조직감 순으로 평가하게 하였으며 패널에게 제공된 설문지는 아래 그림 (Fig. 1)과 같다.

제공된 시료의 모든 특성은 7점법으로 평가하였으며 SPSS 통계프로그램을 이용하여 분석하였다. 기술통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균±표준편차로 요약하였으며, 각 집단간의 유의성은 ANOVA test with multiple comparisons (Duncan's method)로 분석하였고, 유의수준은 0.05 이하로 하였다.



설문에 응해 주셔서 감사합니다.

Fig. 1. Sheet of sensory evaluation

2. in vivo 약리효능 실험

1) 실험동물

실험동물은 샘타코(주)에서 구입한 11주령, 약 25-30g사이의 BALB/c계 수컷 생쥐를 사용하였다. 생쥐는 온도 (21~23℃), 습도 (40~60%), 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되었으며, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약물의 제조

시중에서 구입한 총명탕 120g을 3차 증류수로 전탕하고, 전탕액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결 건조(-70℃, 10mmHg)하여 총명탕 17.0g의 농축엑기스를 얻었다. 수율은 14.2%였다. 초콜릿은 시중에서 스위스 로잔느사의 룬도(다크) 초콜릿을 구입하여 사용하였다.

Table 2. Contents of Chong-Myung-Tang.

	학명	용량
원지	<i>Polygalae Radix</i>	4g
석창포	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	4g
백복신	<i>Poria cocos</i>	4g
	합	12g

3) 실험군의 분리와 $A\beta_{25-35}$ 주입을 통한 치매유발
실험군 분리는 모의시술군(Sham, n=8), 대뇌외 측뇌실(lateral ventricle) 내에 $A\beta_{25-35}$ 를 주입한 $A\beta_{25-35}$ 주입군($A\beta$ inj. ; n=8), $A\beta_{25-35}$ 주입 후 14일간 총명탕을 경구투여한 총명탕투여군(Chong-Myung-Tang ; n=8), $A\beta_{25-35}$ 주입 후 14일간 총명탕+초콜릿을 경구투여한 총명탕초콜릿투여군(Chong-Myung-Tang+chocolate ; n=8)으로 나누었다.

실험에 사용된 $A\beta_{25-35}$ (A4559, Sigma-Aldrich, U.S.A)는 독성을 높이기 위해 실험 전에 37°C에서 72시간 보관하여 서로 응집될 수 있도록 하였다. 실험군 생쥐를 sodium pentobarbital(50mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후 입체정위 수술장치(stereotaxic apparatus)를 이용하여 고정하고 생쥐 뇌의 피부를 박리한 다음 알츠하이머병 병태 생쥐 모델을 만들기 위하여 $A\beta_{25-35}$ 를 우외측뇌실 내로 주입하는데, $A\beta_{25-35}$ 가 주입되는 우외측뇌실의 위치는 본 실험 전에 미리 트립판 블루염색시약(trypan blue stain)을 주입해 붉으므로써 육안으로 확인하였다. 그 위치는 bregma(두개골 계측점)에서 caudal(꼬리쪽)방향으로 0.5mm, midline(정중선)에서 오른쪽으로 1.0mm, 구개골 표면에서 2.0mm 깊이의 지점이며, 26-gage 미세주사기를 통해 5 μ l(mg/ml)의 양을 약 15초 동안 천천히 주입하였다. 모의시술군의 경우는 같은 시술과정으로 $A\beta_{25-35}$ 를 주입하는 대신 같은 양의 생리식염수를 뇌실 내로 주입하였다.

4) 약물의 투여

시술 후 약물은 매일 한차례 일정한 시간인 오전 10시경에 제조된 약물을 생리식염수에 녹여 2주간 투여한 후 행동검사를 시행하였다. 실험동물에의 약물 투여량은 건조 총명탕 12g에 대한 체중 비례로 계산하여 체중 100g 당 총명탕 24.0 mg, 총명탕 24.0 mg + 초콜릿 24.0 mg을 매일 1회 경구투여 하였다.

5) Morris 수중 미로 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

수중 미로로 이용되는 수조는 직경이 90cm, 높이가 35cm인 원형통으로 온도가 23 \pm 1°C되는 물이 20.5cm 높이로 채워지게 하였다(Fig.3). 수중 미로의 주변은 비디오카메라, 실험대, 그리고 수조 주위에 각종 도형 모형의 공간단서(visual cue)들을 설치하고 동일하게 유지하였다. 도피대는 직경이 10cm, 높이가 20cm인 원통형 투명 아크릴받침대로 수면보다 약 0.5cm 낮게 위치시켰다. 또한 물에 분유를 일정량 혼합함으로써 불투명하게 하여 실험용 쥐의 육안으로는 도피대를 찾아갈 수 없게 만들었다. 수중 미로는 사분면으로 나누어져서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분되어 이중 북동(NE) 사분면의 중심부에 도피대가 놓여지고, 반대 측인 남서(SW) 사분면의 중심부가 출발지점으로 사용되었다.

실험쥐들은 수조 속에서 자유롭게 수영할 수 있도록 하였는데, 숨겨진 도피대를 찾아서 도달하는 시간을 측정하였다. 스스로 도피대를 찾아낸 실험쥐들은 약 10초간 도피대 위에서 머물면서 자유롭게 주위를 관찰하도록 허용하였으며, 60초 이내에 도피대를 스스로 찾아내지 못한 쥐들은 실험자가 조심스럽게 도피대 쪽으로 유도하여 도달할 수 있도록 하였다. 수중 미로 실험은 이러한 방식으로 시술 후 14일째 되는 날로부터 3일간 시행되었는데 첫째날 5회, 둘째날 3회 시행한 후 마지막 날에는 자유수영 검사(retention test)가 시행되는데, 이 때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간

수영을 하게 하였다. 모든 동물들의 행동은 비디오 카메라로 녹화 기록된 후, SMART 프로그램을 이용하여 분석되었다.

6) 공간 기억력 유지 검사

수중 미로 검사 마지막 날에는 각 군의 동물들에게 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하는 자유 수영 검사를 시행하였는데, 수조를 5개의 구역으로 나누고 도피대로 부터의 거리에 따라 각각의 구역에 서로 다른 점수를 할당하였다. (Zone 1 : -1, Zone 2 : +3, Zone 3 : +8, Zone 4 : +5, Target(Platform) : +10, Fig. 3.). 그 후, 각 실험 동물들이 60초간 자유롭게 수영하며 도피대를 찾도록 하였는데, 그 궤적을 기록하여 각각의 구역별로 머문 시간과 부여된 점수의 곱을 합산하여 공간 기억력 유지능력에 대한 총 점수를 산출하였다.

실험결과분석은 Student's t-test를 행하여 $P < 0.05$ 를 유의성이 있다고 평가하였다.

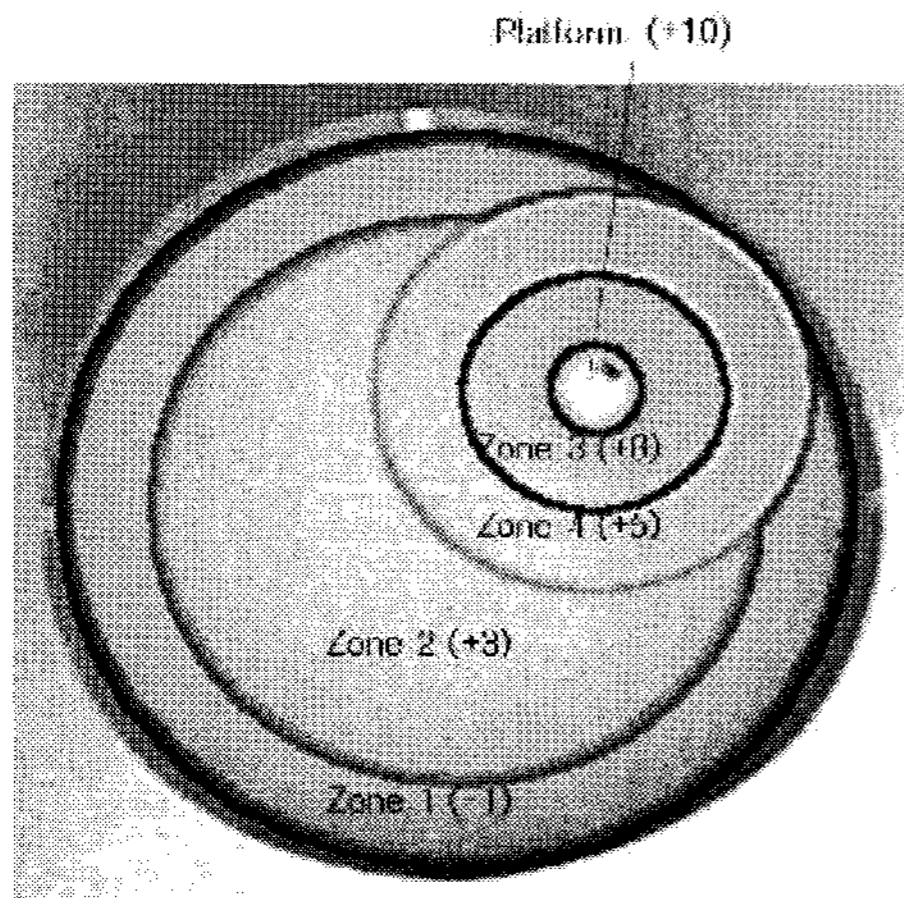


Fig. 2. The zones divided by the distance from the platform. The different points was allocated to each zone. (Zone 1 : -1, Zone 2 : +3, Zone 3 : +8, Zone 4 : +5, Target (Platform) : +10)

7) 뇌조직의 처리

모든 행동실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital (25mg/kg, i.m.)로 마취시키고 saline 100ml에 이어 4% formalin 고정액(fixative)으로 심장을 통해 관류하였다. 이 후 뇌를 꺼내어 같은 고정액으로 24시간 동안 고정시키고 20% sucrose 가 함유된 완충액(phosphate buffer saline : PBS)에 넣어 4°C에서 하루 동안 보관하였다. 적출된 뇌는 20 μ m의 두께로 동결절편되었다.

8) 면역조직화학염색

뇌조직 절편을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H₂O₂에서 10-15분 정도 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain)과 bovine serum albumin (Sigma)을 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 3회 씻어낸 후, primary antibody를 처리하였다. Primary antibody는 anti-Bax (B-9, 1:200, Santa Cruz, CA, USA), anti-Tau (MN1000, 1:200, Pierce Endogen, USA) 그리고 anti-MAP2(M4403, 1:100, Sigma, USA)로, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 12시간 반응시켰다.

이후 조직을 PBS로 씻어내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법 (ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 한 시간씩 반응시켰다. 다음 NiCl₂·H₂O (Sigma, USA)를 섞은 diaminobenzidinetetrachloride (Sigma, USA)에서 5-10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

9) TUNEL 염색

뇌조직 절편을 0.05M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 0.3% H₂O₂에서 10-15분 정도 반응시킨 다음 다시 PBS로 3회 씻어낸 뒤 실온에서 equilibration buffer로 10분간 반응시킨다. 이후 PBS로 3회 씻어낸 뒤 37°C에서 working strength TdT enzyme으로 1시간 반응시켰다.

다시 PBS로 3회 씻어낸 뒤 실온에서 working

strength stop/wash buffer로 10시간 반응시켰다. PBS로 3회 씻어낸 뒤 실온에서 anti-digoxigenin peroxidase conjugate로 1시간 반응시킨 후 PBS로 3회 씻어낸 뒤 0.01% H₂O₂ Tris-buffer에 최종농도를 0.05%로 맞춘 diaminobenzidinetetrachloride (Sigma, USA) 용액에서 5-10분간 발색 반응시키고, 조직을 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드에 붙인 후 2-3시간 건조시킨 다음 탈수, 봉합하여 조직표본을 제작하였다.

3. in vitro 약리효능 실험

1) TBARS Test

TCA(thiochloroacetic acid, Sigma) 35% 용액을 만들어 은박지에 싸서 냉장보관 한 후 fresh한 상태로 실험 직전 sonication하였으며, TBA(thiobarbituric acid, Sigma) 0.75% 용액은 실험 직전에 제조하였다.

시료인 총명탕과 총명탕초콜릿은 각각 10000ppm, 5000ppm, 1000ppm의 농도로 phosphate buffer(pH 7.0)로 녹여서 준비하였고, 기질 용액은 Linoleic acid(Sigma) 0.3M을 사용하였으며 각 Test tube에 실험군은 기질용액 9.6ml + 시료 0.4ml, 양성대조군은 기질용액 9.6ml + BHT(Sigma) 0.4ml 그리고 음성대조군은 기질용액 9.6ml + EtOH 0.4ml을 혼합한 후 은박지로 감싸 빛을 제거하고 용매가 날아가지 않게 para film으로 감아 주었다.

40°C water bath에 12 hr incubation한 후 각 test tube에 TBA 2ml과 TCA 1ml을 넣고 95°C에서 30분간 incubation 후에 10분간 찬물에서 식힌 후 chloroform 1ml과 acetic acid 1ml을 넣어 준 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 ELIZA reader를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARS 함량은 다음 식으로 산정하였다.

$$\text{TBARS level}(\%) = \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100$$

2) DPPH 자유기 소거능 측정

DPPH 시료를 125uM 농도로 에탄올에 녹여 준비한다. DPPH 농도는 시료의 항산화활성 정도에 따라 희석하면서 최적의 농도로 제조하였다.

실험군은 각각 1000ppm, 5000ppm, 10000ppm의 농도로 phosphate buffer(pH 7.0)에 녹여 준비하였으며, 양성대조군은 DPPH 용액 3ml에 BHT(Sigma) 10000ppm 300μl를 그리고 음성대조군은 DPPH 용액 3ml에 phosphate buffer 300μl를 첨가 한 후 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분 반응시켜 ELIZA reader를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical의 소거활성은 다음 식으로 산정하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity}(\%) = \left(1 - \frac{\text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}}\right) \times 100$$

III. 실험성적

1. 한방 초콜릿의 관능평가 결과

총명탕 추출물을 첨가한 초콜릿의 관능적 품질 특성을 100% 초콜릿을 대조군으로 하여 상대 평가하였다. 평가 결과는 두 가지 시료의 차이를 검증할 수 있는 T-test로 통계 처리를 하여 5%에서 각 관능적 특성의 유의적 차이를 평가하였다.

초콜릿 100%의 대조군을 관능적 특성의 프로파일 강도 4로 하여 평가한 결과 대조군과 동일한 시료인 hidden control의 초콜릿 냄새, 한약냄새, 쓴맛 및 단단한 정도의 강도가 각각, 4.19, 3.75, 3.69 및 3.63으로 측정되었고 총명탕을 혼합한 시료의 경우 각각 3.94, 4.63, 4.19 및 4.00으로 두 시료간의 유의적인 차가 없는 것으로 나타났다.

한편 이 결과를 QDA(Quantitative descriptive analysis)로 나타내면 아래 그림(Fig. 3)과 같으며 각각의 관능적 품질 강도를 선으로 연결한 면적을 비교하여 볼 때 전반적으로 유사한 결과를 보였다.

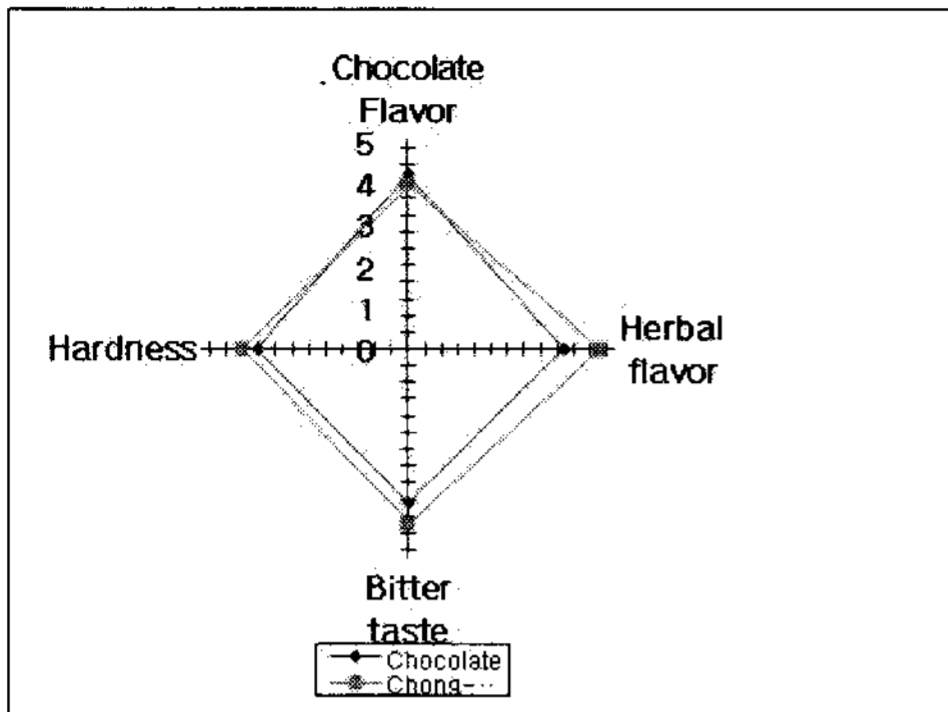


Fig. 3. Comparison of QDA profiles of chocolate with chocolate mixed by dried Chong-Myung-Tang

2. Morris 수중 미로의 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

수중 미로 장치 실험에서 각 군의 실험동물들이 도피대를 찾아서 오르기까지의 회피시간 (Escape Latency)은 아래와 같다(Fig. 4.) 모의시술군(Sham)의 경우 학습검사 시행기간동안 전반적으로 측정 횟수가 증가함에 따라 회피시간이 점차 감소하는 것이 관찰되었다. 특히 첫째 날과 둘째

째 날의 첫 번째 시행 즉, 1회(51.0±5.5sec)와 2회(26.5±7.2sec) 사이 그리고 6회(29.4±4.3sec)와 7회(17.4±5sec) 사이에서 가장 큰 감소폭을 보였으며, 첫째 날 5회 시행을 마친 후 24시간이 지난 뒤의 6회째 시행에서는 회피시간이 약간 상승함이 관찰되었다.

반면에 Aβ₂₅₋₃₅ 주입 군에서는 모의시술군에 비해 상대적으로 회피시간의 감소가 적었으며, 검사 둘째 날의 첫 번째 시행인 6회(54.6±4.0sec)에서는 회피시간이 첫째 날의 1회(53.1±7.4sec)의 그것과 비슷한 수준으로 다시 증가되는 것이 관찰되었다. 총명탕 투여군과 총명탕초콜렛 투여군에서는 시행 횟수에 따른 회피시간이 Aβ₂₅₋₃₅ 주입군에 비해 유의하게(P<0.01) 감소되는 것이 관찰되었다.

특히 마지막 시행인 8회 시행에서는 총명탕(21.3±18.7sec) 투여군과 총명탕초콜렛 투여군(26.0±19.0sec) 모두 Aβ₂₅₋₃₅ 주입 군(46.0±3.8sec)에 비해 뚜렷한 감소를 보였다.

총명탕 투여군과 총명탕초콜렛 투여군에서는 시행 횟수에 따른 회피시간의 유의한 차이는 나타나지 않았다.

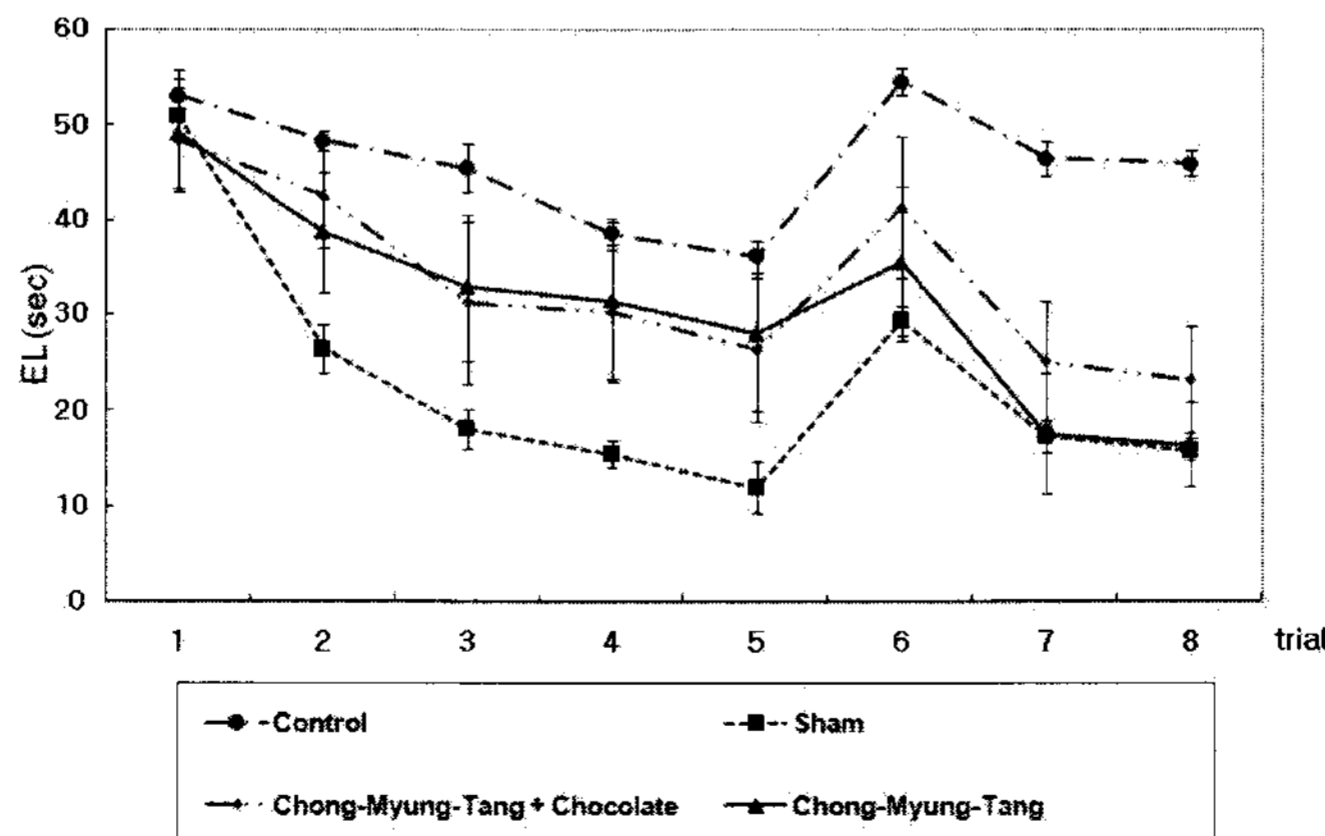


Fig. 4. Effect of Chong-Myung-Tang, Chong-Myung-Tang+ chocolate on the place learning in the water-maze test in Aβ₂₅₋₃₅-treated mice.

Aβ₂₅₋₃₅ or normal saline were administered i.c.v. 14 days before the first training day. A solution of Chong-Myung-Tang, Chong-Myung-Tang+ chocolate and normal saline were given orally once daily for 14 days after surgery. * P < 0.01 vs. the Aβ inj. (EL = Escape Latency)

3. 공간 기억력 유지 검사

수중 미로 검사 셋째날인 마지막 날에는 각 군의 동물들에게 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하는 자유 수영 검사를 시행하여 공간 기억력 유지 정도를 측정하였다. 우선, 모의시술군(Sham)의 경우 실험 동물들이 이전 도피대가 있던 자리를 쉽게 찾아내고 그 주변에서 계속 맴도는 형태를 보이고 있음이 관찰되었다. 반면에 Aβ₂₅₋₃₅주입군의 동물들은 이전 도피대의 자리를 잘 찾아내지 못하며 또한 활동성도 모의시술군에 비해 현저히 떨어짐이 관찰되었다. 그러나 총명탕 투여군, 총명탕초콜릿 투여군의 경우 모두 이전의 도피대 위치

를 찾아가는 능력이 활동성에 있어 상당한 호전이 있음이 관찰되어 졌다.

또한 공간 기억력 유지능력을 측정하기 위하여 수조를 도피대로부터의 거리에 따라 5구역으로 나누고 각 구역에 각기 다른 점수를 부여하고 실험 동물이 그 구역에 머문 시간과 점수를 곱하여 합산한 총 점수에서도 Aβ₂₅₋₃₅주입군(231.4±43.9)은 모의시술군(264.1±39.1)에 비해 현저히 낮았으며 총명탕투여군(259.1±73.4), 총명탕초콜릿투여군(247.2±62.8)은 Aβ₂₅₋₃₅주입군에 비해 유의성 있는(모두 P<0.05) 증가를 나타냈다.

Table 3. The Mean Memory Retention Points over Groups.

	Sham	Aβ inj.	Chong-Myung-Tang +chocolate	Chong-Myung-Tang
zone 1	9.7	11.3	12.9	12.0
zone 2	31.2	38.1	26.8	19.3
zone 3	7.8	2.8	7.3	11.8
zone 4	9.7	5.5	11.9	12.3
Platform	0.6	0.1	0.45	1.1
Total	201.1±12.0**	152.7±8.4	189.9±23.3*	213.4±23.0*
n	8	8	8	8

At day 3, each mouse was allowed to swim freely for 60s and the total points of each mouse were calculated in summation of multiplying swimming times by different points of each zone.

** p < 0.01, * p < 0.05 v.s Aβ inj. group. (mean±SEM)

4. Bax 단백질의 면역조직화학염색

모의시술군의 실험동물 뇌해마 CA1 영역에서의 Bax 단백질 발현은 매우 약한 편이었으나, Aβ₂₅₋₃₅주입군에서는 Bax 단백질의 발현이 비교적 강한 편이었다. 반면에, Aβ₂₅₋₃₅주입+총명탕투여군과 Aβ₂₅₋₃₅주입+총명탕초콜릿투여군에서는 Bax 단백질의 발현이 Aβ₂₅₋₃₅주입군에 비해 상대적으로 약해짐이 관찰되었다.

Table 4. Changes of Bax-Reactivity in the Hippocampus.

Sham	-
Aβ inj.	++
Chong-Myung-Tang+chocolate	+
Chong-Myung-Tang	+

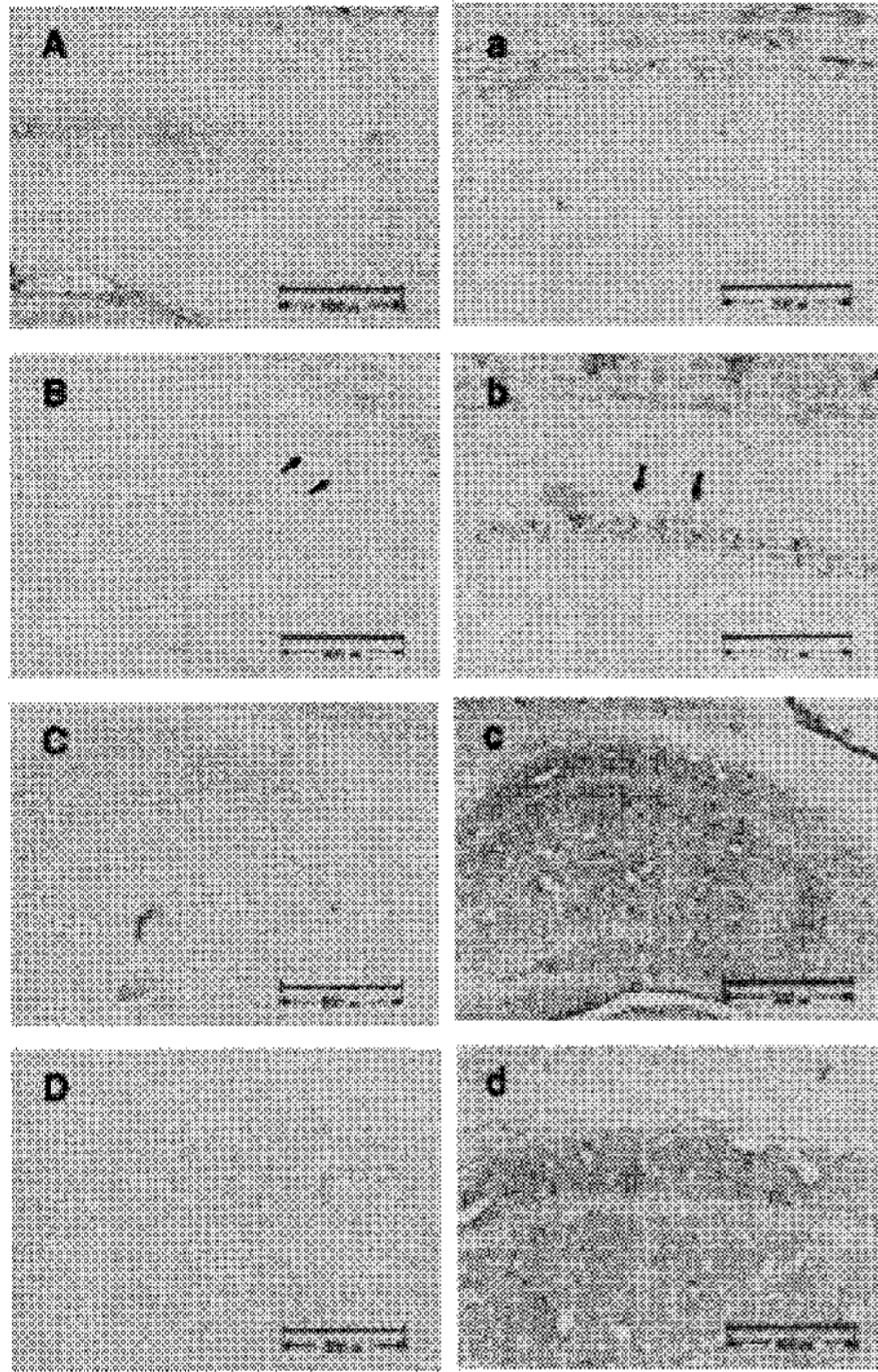


Fig. 5. Immunohistochemical analysis of Bax protein in sections from the Sham (A, a), Aβ25-35 injected (B, c), Chong-Myung-Tang + chocolate (C, c) and Chong-Myung-Tang (D, d) treated group 14 days after surgery.

Bax expression was scarcely observed in the cytoplasm of CA1 neurons in Sham group. Immunoreactivity of Bax was detected very strongly in CA1 neurons at 14 days after Aβ25-35 i.c.v injection(B, b arrows). In CA1 neurons of Chong-Myung-Tang + chocolate (C, c) and Chong-Myung-Tang (D, d) treated group, immunoreactivity of Bax was decrease obviously compare to Sham group. (A, B, C, D; ×100, a, b, c, d: ×200). Scale bar A, B, C, D = 500 μm ; a, b, c, d = 200 μm. A, B, C, D show the whole feature of hippocampus and a, b, c, d show magnified CA1 area in A, B, C, D.

5. TUNEL 염색

뇌해마 CA1 영역의 뇌세포에 대하여 TUNEL

염색을 시행한 결과, 모의시술군의 실험동물의 뇌해마조직에서는 TUNEL 염색에 양성을 보인 세포가 존재하지 않았으나 Aβ25-35 주입군에서 TUNEL 염색양성 반응을 나타내는 세포가 관찰되었다. 총명탕투여군과 총명탕초콜렛투여군에서도 TUNEL 염색양성 반응세포가 관찰되었으나 미약한 편이었으며, 전체적으로 각 군의 TUNEL 염색에 대한 양성반응은 유의성있는 큰 변화를 보이지는 않았다(Fig. 6).

6. 총명탕과 총명탕초콜렛의 TBARS 함량 비교 및 DPPH 자유기 소거능 측정

TBARS의 경우 총명탕 및 총명탕초콜렛 시료는 음성대조군에 비해 각각의 농도에서 유의하게 지질 과산화를 억제하였으나 시료군에 따른 큰 차이를 보이지는 않았다(Table 5).

Table 5. Effect of Chong-Myung-Tang + chocolate and Chong-Myung-Tang on lipid peroxidation

Group ¹⁾	Concentration (ppm)	1st.	2nd.	3rd.	Mean±S.D.
Chong-Myung-Tang	1,000	73.95	76.21	75.50	75.22±1.15 ^{c2)}
	5,000	64.17	60.21	66.30	63.56±3.09 ^b
	10,000	71.03	71.10	77.30	73.14±3.60 ^c
Chong-Myung-Tang + chocolate	1,000	75.84	71.88	70.80	72.84±2.65 ^c
	5,000	86.62	78.80	77.23	80.88±5.03 ^c
	10,000	82.98	69.40	75.20	75.86±6.81 ^c
BHT	10,000	40.20	33.86	44.21	39.42±5.22 ^a

1) All mean values are triplicate determinations. Mean ± standard deviation.

2) Values in the same column that are followed by a different letter are significantly different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

DPPH 의 경우 모든 시료군에서 항산화활성을 보였으며, 농도에 따라 유의적으로 활성이 향상되었다. 반응시작 40분과 50분에서 총명탕초콜렛

1000ppm군이 총명탕 1000ppm군보다 유의하게 높은 항산화 활성을 보였으며, 반응시작 50분에서 총명탕초콜렛 5000ppm군이 총명탕 5000ppm군보다 유의하게 높은 항산화 활성을 보였다. 그러나 반응시작 40분에서 총명탕 10000ppm군이 총명탕초콜렛 10000ppm군보다 유의하게 높은 항산화 활성을 보였으나 전체적으로 총명탕과 총명탕초콜렛 군과의 유의한 차이는 없었다(Fig. 7).

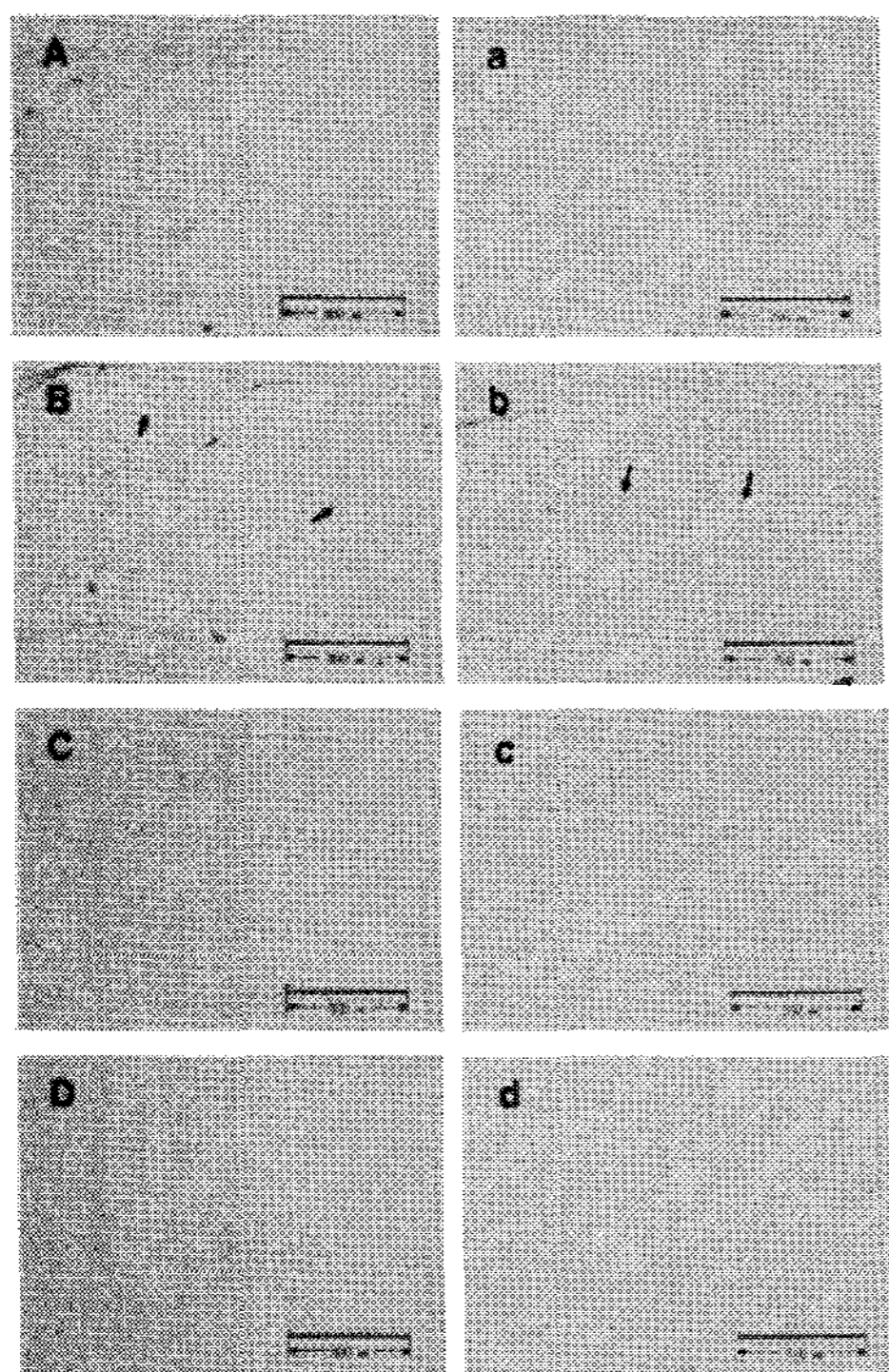


Fig. 6. Terminal transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL) staining of hippocampal CA1 pyramidal neurons in Sham (A, a), A β injected (B, b) Chong-Myung-Tang+chocolate (C, c) and Chong-Myung-Tang (D, d) treated group 14 days after surgery.

TUNEL reaction-positive neurons were not present in Sham group and positive stainings for TUNEL reaction

in A β injected group were detected(B, b Arrows). Chong-Myung-Tang+chocolate (C, c) and Chong-Myung-Tang (D, d) treated group hardly ever showed TUNEL reaction-positive neurons. But, there were no significant changes among groups. (A, B, C, D; $\times 100$, a, b, c, d; $\times 200$). Scale bar A, B, C, D = 500 μm ; a, b, c, d = 200 μm . A, B, C, D show the whole feature of hippocampus and a, b, c, d show magnified CA1 area in A, B, C, D.

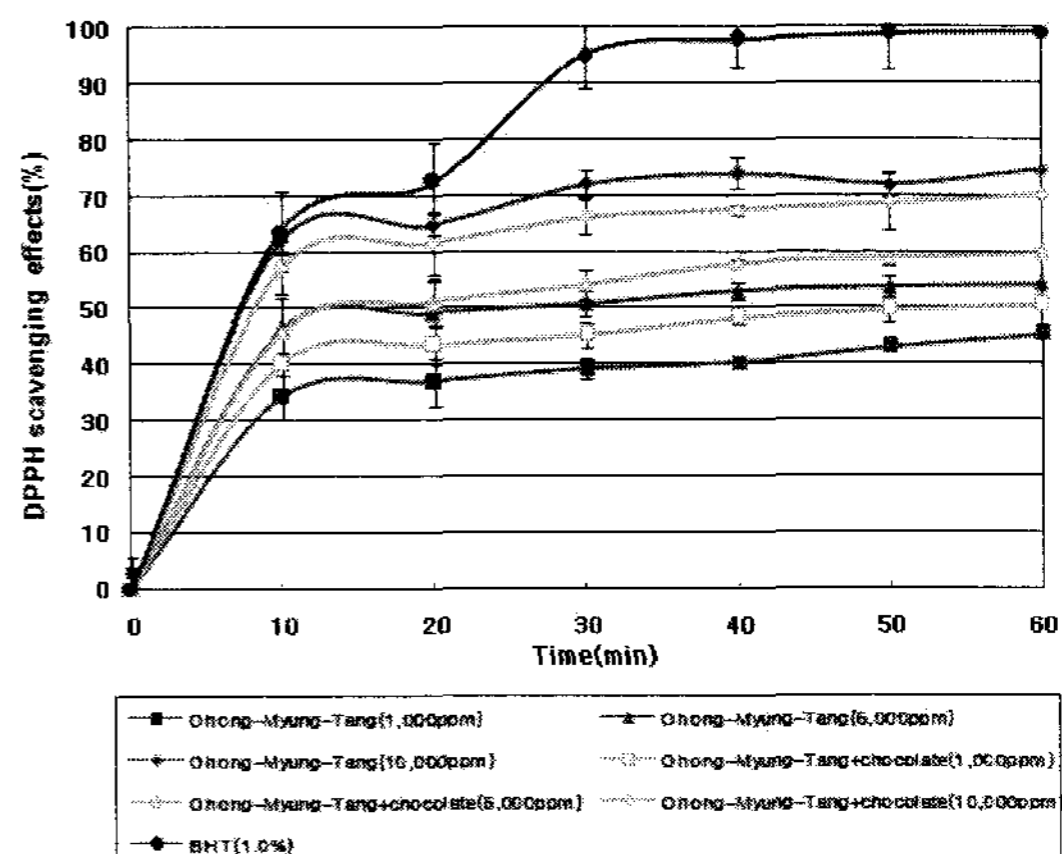


Fig. 7. Scavenging effect of Chong-Myung-Tang +chocolate and Chong-Myung-Tang on DPPH radical.

IV. 고 찰

한약의 제형은 <黃帝內經>에 소개된 13종의 처방에 湯, 丸, 散, 膏, 酒의 5종류 제형이 기록되어 있으며, 그 이후 藥露, 錠, 條, 線, 熏煙, 熏洗, 滴耳, 坐藥 등의 제형이 개발되어 이용되고 있다. 이러한 제형은 질병을 효율적으로 치료하기 위한 방제 운용의 경험적 결과이며 한의학의 발전과 함께 제형의 종류도 효과를 좀 더 극대화하고 사용이 편리해지는 방향으로 다양해지고 있다.

그 중 탕제는 한의학 임상에서 가장 빈번하고 널리 이용되는 제형이나 그 단점이 많이 제기되고 있어 새로운 형태의 한방제형의 개발의 필요성이 요구되고 있다. 탕제에 있어 맛과 향, 냄새는 탕제의 장점이 되기도 하지만 단점으로 받아들여지기

도 하는데, 특히 20세 미만의 소아나 청소년들에게 한약을 투여함에 있어 한약 특유의 냄새와 쓴맛으로 인해 환자들의 복용 순응도가 떨어져 약물을 제대로 복용하지 못하고 따라서 의도된 약물의 효과를 나타내지 못하는 사례가 상당히 많으므로 한약의 맛을 개선한 한약제형을 개발할 필요성이 절실한 실정이다. 한방병원에 내원한 환자들에 대한 설문조사에서도 약효가 동일하다면 한약 고유의 맛과 향을 개선한 제형을 복용하겠다는 응답이 다수를 차지하고 있다⁷⁾.

하지만 이러한 문제점들을 극복하기 위해 그간 한의계에선 증류한약을 위시해서 엑스제제, 캡슐제, 정제, 시럽, 사탕, 젤리, 약조청 등의 제형변화를 통해 한약 복용의 거부감을 줄이기 위해 여러 가지 노력을 해 왔지만 그 활용범위나 빈도는 아직 미미한 수준이어서 실효를 거두지 못하고 있는 것이 현실이다.

최근 초콜릿 · 코코아의 영양학적 가치와 생리 기능성이 밝혀지면서 기능성 식품으로 새롭게 인식되고 있다^{8,9)}. 코코아 분말의 주요 구성성분은 단백질과 탄수화물이다. 탄수화물의 2/3는 식이섬유이고 나머지는 대부분 전분이며 당분은 거의 없다. 지방함량은 코코아 제품 형태 따라 0~24%이며, 비타민과 미네랄이 함유되어 있다. 코코아 버터는 포화도가 매우 높아 포화지방산 함량이 약 62%로 주로 스테아린산과 팔미틴산이며, 나머지는 불포화지방산인 올레인산이다. 일반적으로 장쇄의 지방산은 건강에 좋지 않은 것으로 알려져 있으므로 지금까지 상식은 초콜릿은 건강에 나쁜 것이라는 이미지였다. 그러나 최근 코코아 버터와 초콜릿을 이용한 동물실험 및 사람에게 대한 면밀한 임상실험 결과 정상적으로 섭취하거나 과잉 섭취하여도 혈청 총 콜레스테롤과 LDH가 증가하지 않으며 콜레스테롤의 산화를 방지하여 동맥경화와 심장병에 대한 예방효과가 있는 것이 밝혀졌으며, 코코아 버터의 체내 흡수율 또한 70%에 불과해 과잉 칼로리의 염려도 적은 것으로 나타났다

^{10,11,12)}. 또한 카카오 추출물 중 flavan-3-ol 화합물이 충치의 원인이 되고 있는 *Streptococcus mutans*균에 의해 생성된 glucosyltransferase (GTase)의 작용을 저해하여 충치예방효과를 나타낸다는 연구결과도 보고된 바 있다^{13,14)}.

본 실험에서는 총명탕초콜릿과 총명탕과의 생물학적 동등성을 판단하기 위해 기존에 보고되었던 총명탕의 여러 효과 중 A β ₂₅₋₃₅에 의한 학습능력 저하와 기억유지능력의 감퇴에 대한 방어효과와 A β ₂₅₋₃₅의 뇌실 내 주입 후에 발생하는 뇌해마 CA1 영역에서의 Bax 단백질의 발현 및 TUNEL 염색에 대한 양성반응의 억제효과, 베타 아밀로이드 유도성 세포독성에 대한 방어효과 그리고 지질항산화 효과를 TBARS 함량 및 DPPH 측정법을 통해 비교해 보았다. 또한 총명탕초콜릿과 기존 100% 초콜릿과의 관능적 차이를 관능평가를 통해 살펴보았다.

먼저 실험동물에 알츠하이머병과 유사한 질병 상태를 유도시키기 위해 A β 로 유발되는 치매 동물모델을 채택하였으며^{15,16)}, 특히 가장 직접적이며 신경세포독성이 강한 것으로 알려진 A β ₂₅₋₃₅를 3일간 37°C에서 응집시킨 후 실험쥐 뇌의 뇌실에 직접 주입함으로써 치매를 유발시켰다.¹⁷⁾

치매유발 후 Morris 수중 미로(Morris water maze) 검사를 시행하였다. 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 실험이다¹⁸⁾. Morris 수중미로를 통한 기존의 연구에서 동물은 연령증가에 따라 학습과 기억 능력이 저하되고, 해마의 신경이 손상된 쥐는 수중미로 실험에서 학습수행과 기억력이 떨어진다고 보고된 바 있다¹⁹⁾. 실험쥐들은 수조 속에서 자유롭게 수영하면서, 숨겨진 도피대를 찾아서 도달하는 시간을 측정하였다. 수중 미

로 실험은 $A\beta_{25-35}$ 주입 시술 후 14일째 되는 날로부터 3일간 시행되었는데 첫째 날 5회, 둘째 날 3회 시행한 후 마지막 날에는 자유수영 검사 (retention test)를 시행하였다. 이 때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게 하였다. 그 결과, 수중 미로 장치 실험에서 각 군의 실험 동물들이 도피대를 찾아서 오르기까지의 회피시간 (escape latency)은 모의시술군(Sham)의 경우 학습검사 시행기간동안 전반적으로 측정 횟수가 증가함에 따라 회피시간이 점차 감소하는 것이 관찰되었다. 특히 첫째 날과 둘째 날의 첫 번째 시행 즉, 1회와 2회 사이 그리고 6회와 7회 사이에서 가장 큰 감소폭을 보였으며, 이는 실험쥐들이 수조 속에서 유평하는 횟수가 증가함에 따라 도피대의 위치를 학습하고 있다는 것을 나타내는 결과라 할 수 있다. 반면에 $A\beta_{25-35}$ 주입군에서는 모의시술군에 비해 상대적으로 회피시간의 감소가 적었으며, 검사 둘째 날의 첫 번째 시행인 6회에서는 회피시간이 첫째 날의 1회의 그것과 비슷한 수준으로 다시 증가되는 것이 관찰되었다. 이것은 뇌실내로 $A\beta_{25-35}$ 를 주입한 실험쥐의 경우 학습능력이 저하되었음을 나타낸다고 할 수 있다. 총명탕 투여군과 총명탕초콜릿투여군에서는 시행 횟수에 따른 회피시간이 $A\beta_{25-35}$ 주입군에 비해 유의하게 감소되는 것이 관찰되었다. 특히 마지막 시행인 8회 시행에서는 총명탕과 총명탕초콜릿 모두 $A\beta_{25-35}$ 주입군에 비해 뚜렷한 감소를 보였으나 두 군 사이에 유의한 차이는 없었다. 이 같은 실험결과를 통해 볼 때 총명탕과 총명탕초콜릿이 $A\beta_{25-35}$ 의 뇌실 내 주입에 의해 발생하는 학습능력 감퇴에 대한 동등한 방어 작용이 있음을 추측할 수 있다.

또한, 공간기억력 유지에 대한 총명탕과 총명탕초콜릿의 영향을 살펴보기 위해 수중 미로 검사 마지막 날에는 각 군의 동물들에게 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하는 자유 수영 검사를 시행한 결과, 모의시술군(Sham)의 경우 실험 동물

들이 이전 도피대가 있던 자리를 쉽게 찾아내고 그 주변에서 계속 맴도는 형태를 보이고 있음이 관찰되었다. 반면에 $A\beta_{25-35}$ 주입 군의 동물들은 이전 도피대의 자리를 잘 찾아내지 못하며 또한 활동성도 모의시술군에 비해 현저히 떨어짐이 관찰되었다. 그러나 총명탕투여군과 총명탕초콜릿투여군은 이전의 도피대 위치를 찾아가는 능력이 활동성에 있어 상당한 호전이 있음이 관찰되었으며, 구역별 할당된 점수와 머문 시간의 곱을 합산한 총 점수에서도 $A\beta_{25-35}$ 주입군은 모의시술군에 비해 현저히 낮았으며 총명탕투여군과 총명탕초콜릿투여군은 $A\beta_{25-35}$ 주입군에 비해 유의성 있는 증가를 보였으며 두 군 차이에 유의한 차이는 없었다. 이러한 결과는 총명탕초콜릿이 총명탕의 학습능력 감퇴에 대한 방어작용 뿐 아니라 $A\beta_{25-35}$ 의 뇌실 내 주입에 의해 발생하는 공간기억력 감퇴에 대한 방어작용과 동등한 효능을 보인다는 것을 입증하는 것이라 할 수 있다.

한편, 실험동물의 뇌실에 $A\beta_{25-35}$ 를 주입함으로써 유발되는 치매모델과 연관된 apoptosis의 유발에 Bcl-2 family의 가능성 여부를 조사하였다.

Apoptosis는 다양한 유전자의 발현에 의하여 조절되는데 그 중 가장 중요한 유전자로 알려진 Bcl-2 family에 속하는 유전자 산물들은 apoptosis를 직접적으로 유발하거나 억제하는데 관여하며, 그들 사이의 상대적인 유전자 발현의 양적 차이에 의해 apoptosis 유발 여부가 결정되어진다²⁰⁾. Bcl-2 family의 대표적 유전자인 Bcl-2 member에 속하는 유전자 산물들은 anti-apoptotic 인자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax member에 속하는 유전자들은 pro-apoptosis 인자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다²¹⁾.

조사 결과 Bax의 발현이 선택적으로 $A\beta_{25-35}$ 의 주입에 의해 증가됨을 관찰하였으며, 2주간의 총명탕과 총명탕초콜릿의 투여는 $A\beta_{25-35}$ 에 의한 Bax의 발현을 유의적으로 차단시켜 주었으며 두 군 사이에 유의한 차이는 없었다. 또한 TUNEL

(Tdt-mediated dUTP nick end labeling) 염색방법은 terminal deoxynucleotidyl transferase(Tdt)를 이용하여 기질 반응 후에 염색하여 현미경으로 염색유무를 확인함으로써 in situ로 apoptosis를 확인할 수 있는 표준방법으로 알려져 있으며^{22,23)}, 본 실험에서는 A β ₂₅₋₃₅의 주입에 의해 발현이 미세하게 증가됨이 관찰되었으나 전체적으로 유의한 차이는 없었다.

또한, 총명탕과 총명탕초콜렛의 항산화 능력의 차이를 확인해보기 위해 TBARS 함량 및 DPPH에 의한 자유기 소거활성을 분석하였다.

과산화지질은 생체막의 불포화지방산과 활성산소가 반응하여 발생하는 물질로 생체막과 조직의 손상을 유도하는 것으로 알려져 있으며, TBA의 반응물질인 TBARS 함량을 정량분석하면 과산화지질의 양을 측정할 수 있다^{24,25,26,27)}.

DPPH는 짙은 자주색을 나타내며 그 자체가 질소 중심의 라디칼로서, 라디칼 전자의 비편재화에 의해 안정된 상태로 존재한다. 에탄올에 용해된 DPPH는 517nm에서 최대 흡광도를 나타내며 시료의 환원력에 의해서 시료 첨가와 함께 흡광도가 감소한다^{28,29)}.

그 결과 두 군 모두 음성대조군에 비해 유의하게 TBARS와 DPPH 농도를 떨어뜨렸으며, 총명탕초콜렛군이 총명탕군에 비해 항산화 효과가 약간 높았으나 두 군 간에 유의한 차이는 없었다.

마지막으로 총명탕초콜렛의 관능적 품질특성을 100% 초콜렛을 대조군으로 하여 상대적으로 평가하였다. 시료의 관능적 특성으로서는 초콜렛 냄새, 한약냄새, 쓴맛, 및 단단한 정도를 선정하여 실험한 결과 총명탕초콜렛인 실험군과 초콜렛 100%인 대조군의 전반적인 관능적 품질차이가 없는 것으로 평가되었다.

감사의 글

본 연구는 (주)함소아 제약 R&D센터의 지원에 의한 결과임.

This study was supported by Hamsoa Pharmaceutical Co. R&D Center.

참고문헌

1. 김영옥 외. 총명탕이 건망유도백서의 학습과 기억에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지 1998; 8(2):464-79
2. 이승희. Effects of chongmyungtang on learning and memory performances in mice. 동국대학교 대학원. 2001.
3. 박은경. 총명탕이 베타아밀로이드에 의한 학습과 기억장애에 미치는 효과, 경희대학교 대학원. 2006.
4. 박용기 등. 신경안정 생약 추출물이 in vitro에서 신경전달효소 및 항산화계에 미치는 영향. 약학회지. 2000;44(1):22-8.
5. 古川秀子. おいしさを測る-食品官能検査の實際. 幸書房. 1994
6. 김보경 외. 총명탕과 향부자총명탕의 추출물, 나노분말 제형을 이용한 치매에 관한 연구, 동의신경정신과학회지. 2006;17(1):79-105.
7. 최현정 등. 한약제형 선호도에 관한 설문조사, 경희의학. 2004;20(1):46-57.
8. 김석진. β -Carotene과 오렌지향을 함유하는 Calcium Alginate Gel Beads 첨가 초콜렛의 품질 특성. 부경대학교 산업대학원. 2004.
9. 이진영 외. 홍맥파우더를 첨가한 기능성 초콜렛의 제조 및 특성. 한국식품영양학회지. 2003; 16(2):116-22.
10. 변유량. 초콜릿·코코아의 최신 연구동향, 제 1회 초콜릿, 카카오 국제 학술 심포지움. 1998:9-20.
11. 이상호. 초콜릿. 국민영양. 2000;215:16-24.

12. Kurosawa T, Itoh F, Nozaki A, Nakano Y, Katsuda S, Osakabe N, Tsubone H, Kondo K, Itakura H. Suppressive effect of cocoa powder on atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *J Atheroscler Thromb.* 2005;12(1):20-8.
13. 안봉전 외. Theobroma cacao L. 외피로부터 새로운 Flavan-3-ol 화합물의 Glucosyltransferase 저해효과. *한국식품과학회지.* 1995;27(1):92-6.
14. Osawa K, Miyazaki K, Shimura S, Okuda J, Matsumoto M, Ooshima T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *J Dent Res.* 2001;80(11):2000-4.
15. Patat A, Klein MJ, Surjus A, Hucher M, Granier J. RU 41656 does not reverse the scopolamine-induced cognitive deficit in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;41:225-31.
16. Ramsden M, Henderson Z, Pearson H. Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility status. *Brain Res* 2002;956:254-61.
17. Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rydel RE, Fuson KS, Brigham EF, Wright S, Lieberburg I, Becker GW, Brems DN, et al. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol.* 1994;45(3):373-9.
18. Olton DS. Mazes, maps, and memory. *Am Psychol.* 1979;34(7):583-96.
19. Hickey RW, Akino M, Strausbaugh S, De Courten-Myers GM. Use of the Morris water maze and acoustic startle chamber to evaluate neurologic injury after asphyxial arrest in rats. *Pediatr Res.* 1996;39(1):77-84.
20. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993;75(2):241-51.
21. Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M, Basi G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res.* 1994;40(7-8):603-12.
22. Gahm C, Holmin S, Wiklund PN, Brundin L, Mathiesen T. Neuroprotection by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase after experimental brain contusion. *J Neurotrauma.* 2006;23(9):1343-54.
23. He XJ, Nakayama H, Dong M, Yamauchi H, Ueno M, Uetsuka K, Doi K. Evidence of Apoptosis in the Subventricular Zone and Rostral Migratory Stream in the MPTP Mouse Model of Parkinson Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(9):873-82.
24. 김영언 외. 녹차, 메밀, 포도잎 추출물이 고콜레스테롤 급여 흰쥐의 지질대사, TBARS 및 혈액응고에 미치는 영향. *한국식품과학회지.* 2004;36(6):979-85.
25. 박선영 외. 가미소건중탕이 D-galactose로 노화를 유발시킨 백서의 항산화능에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 2005;19(1):153-71.
26. 최무영 등. 솔잎분말이 고 콜레스테롤 급여 흰쥐의 체지방구성과 TBARS량에 미치는 영향. *한국식품과학회지.* 2000;32(5):1186-90.
27. Lee, E. Effects of Green tea on Serum lipid composition and TBARS chicks with oxidized Lipid. *Life Sci. Research Ins.* 1998;5:51-6.
28. 오중학 외. DPPH 방법을 통한 녹차의 항산화 활성에 대한 연구. *한국식품영양과학회지.* 2004;33(7):1079-84.
29. 조현열 외. 오미자약침액의 NO, DPPH 소거 및 IL-4에 대한 억제작용. *대한경락경혈학회지.* 2003;20(1):45-55.