

황금(黃芩), 석창포(石菖蒲), 천마(天麻) 물추출액 혼합물이 배양한 흰쥐 대뇌신경세포의 활성화와 학습능력 증진 효능

배철환 · 정현정 · 정승현 · 문일수¹ · 이원철² · 신길조*

동국대학교 한의과대학 내과학 교실, ¹동국대학교 의과대학 해부학교실, ²부산대학교 한의학전문대학원

Received January 5, 2009 / Accepted May 11, 2009

Effects of Water-extract Mixture of *Scutellariae baicalensis* GEORGI, *Acorus gramineus* SOLAND and *Gastrodia elata* BLUME on Cultured Rat Cortical Neurons and Enhancement of Learning and Memory Power. Chul Hwan Bae, Hyun Jung Jung, Seung Hyun Jung, Il Soo Moon¹, Won Chul Lee² and Gil Jo Sin*. Dept. of Oriental Medicine, ¹Department of Anatomy, Dongguk University, ²Pusan National University School of Oriental Medicine - *Scutellariae baicalensis* GEORGI, *Acorus gramineus* SOLAND and *Gastrodia elata* BLUME are traditional medicines used in the treatment of incipient stroke. In this study we investigated their effects on various aspects of neuronal differentiation in single or composite forms. Water-extracts of these medicines showed neuroprotective effects on cultured rat cortical neurons in normoxia and hypoxia. To understand the mechanism for neuroprotection we carried out various cell biological assays. They stimulated initial differentiation of neuronal development (transition from stage 1 to 2), and increased the number of spines and the length and number of dendritic processes. These effects were best manifested in the experimental group, which were given a mixture of the three kinds of extracts ($p < 0.01$). To assess improvement of brain functions we carried out Morris water-maze tests for the mice that were fed on these extracts instead of water for 4 weeks. The experimental groups, especially those which were given the mixture of the three kinds of extract, showed significant ($p < 0.01$) enhancement in memory as early as one day after the learning trial. These results indicate that these three kinds of extracts have synergistic effects on neuronal protection and improvement of brain functions.

Key words : *Scutellariae baicalensis* GEORGI, *Acorus gramineus* SOLAND, *Gastrodia elata* BLUME, cortical cell culture, memory

서 론

사람의 뇌는 학습, 기억, 지성, 개성, 추리 등의 고차원적인 정신 활동을 담당하는 중요한 부위이다. 사람의 뇌는 10^{11} 개 정도의 신경세포(neuron)로 구성되며, 인체 다른 조직의 세포와는 달리, 신경세포는 증식이 되지 않는다[21]. 신경세포는 신호를 전달하는 기능을 갖고 있으며 이에 최적화된 구조와 특성을 갖고 있다. 신경세포들은 서로 연결되어 신경망(neural net)을 형성하며, 이러한 신경망이 학습과 기억을 포함한 모든 행동의 신경계적 기반이 된다[9]. 신경세포들 사이의 연결부인 연결(synapse)은 경험을 장기간의 기억으로 저장하는 바탕이 된다[47].

신경망의 생성과 소멸은 연결의 변화에 기인하며 연결의 이러한 성질을 연결가소성(synaptic plasticity)이라 한다[2,10]. 학습과정 동안에 자극을 받는 신경세포들 사이의 연결 강도는 강화되고 새로운 신경망이 형성된다. 이렇게 생성된 신경망은 학습자극의 기억으로 남게 된다. 즉, 차후에 이 신경

망이 활성을 갖게 되면 학습한 내용이 회상되는 것이다[43]. 따라서 신경망의 변화는 연결가소성에 기인한다[1,6,32].

사람의 뇌는 학습과 기억 능력이 탁월하지만 또한 노화에 따라 심각하게 손상을 잘 받는다. 가장 흔한 예는 치매(Alzheimer's disease, AD)로서 신경세포사로 인하여 학습과 기억능력을 거의 완전히 소실한다[42]. 대부분의 사람들은 치매를 경험하지 않겠지만 많은 사람들은 노화와 관련된 인지기능의 저하를 겪는다[37].

동물실험 결과, 치매 및 노화와 연관된 인지기능의 손상은 동일한 신경망의 손상에 기인한다. 그러나 치매에서는 신경세포사가 우세하며, 노화에서는 연결의 변화에 기인하는 것으로 보이며[15,30,33], 이러한 노화와 연관된 연결의 변화는 가역적이다[12,28].

황금(黃芩, *Scutellariae baicalensis* Georgi)은 쌍떡잎식물 통화식물목 꿀풀과의 여러해살이풀로서 양심거열(涼心祛熱), 사폐효(瀉肺火), 소담이기(消痰利氣)의 효능이 있는 약물로[14], 흰쥐를 이용한 허혈모델에서 해마신경세포의 보호작용[26]과 배양한 혈관내피세포의 자연사(apoptosis)를 억제하는 효능[41]이 있는 것으로 보고된 바 있다. 석창포(石菖蒲, *Acorus gramineus* SOLAND)는 천남성과(Araceae)에 속하는 다년생 초본으로서 할담선웅(割痰宣壅)하고 개규통폐(開竅通閉)의

*Corresponding author

Tel : +82-31-710-3710, Fax : +82-31-710-3780

E-mail : shingcho@joins.com

효능이 있는 약물로[14], 뿌리의 essential oil은 NMDA 수용체를 통한 신경독성을 억제하며[23], essential oil의 주요 성분인 asarone은 흥분독성으로부터 쥐의 대뇌신경세포를 보호한다[16]. 천마(天麻, *Gastrodia elata* BLUME)는 난초과(Orchdaceae)에 속하는 다년생 초본으로서 평간(平肝), 식풍(息風), 지경(止癎)시키는 효능이 있어 일질의 풍증(風證)에 적용하는 약물[14]로 신경세포 손상을 방지하고[22], 기억 형성에 효능이 있는 것으로 보고되었으며[17], 천마의 에테르 분획은 아밀로이드 베타 펩티드에 의하여 유도된 신경 세포사를 억제한다[7,8,22,46].

뇌질환 예방 효능을 나타내는 천연 물질에 대한 많은 연구와 관심에도 불구하고, 황금, 석창포, 천마의 신경세포 보호와 기억 증진효능에 대한 세포생물학적 및 동물실험은 수행된 바 없다. 본 연구에서는 황금, 석창포 및 천마의 물추출물이 뇌신경세포의 생장에 미치는 효능, 뇌세포 사멸 억제 활성, 그리고 학습과 기억 능력에 유의한 효능이 있는지를 살펴보았다.

재료 및 방법

동물

신경세포배양을 이용한 실험에서는 Sprague-Dawley계 흰쥐(대한동물실험센터)를, Morris 수중 미로(Morris water-maze)를 이용한 학습과 기억능력 측정에는 생쥐(ICR 계통, 6주령 숫컷; 대한동물실험센터)를 사용하였다.

약제 및 물추출액 제조

실험에 사용된 황금, 석창포, 천마는 대한약전 및 대한약전 한약 규격주해[19]에 근거하여 동국대학교 경주 한방병원에서 구입하였다. 황금, 석창포, 천마 각각의 뿌리를 이물을 제거하고 분말화하였다. 약제 1: 증류수 10 (w/v)으로 증류수를 가하고 상온에서 12~18시간 동안 추출한 후 $10,770 \times g$ 에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 얻고 0.2 μm 시린지 필터로 여과하였다. 시료는 -70°C 에서 냉동 보관하였으며, 실험직전 상온에서 녹여 시료로 사용하였다. 이때 각 추출물의 효능실험에서는 황금은 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 천마와 석창포는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였으며, 복합 추출물의 효능실험에서는 그 절반씩을 첨가하였다. 건조물은 1 ml 추출액 튜브를 이동하여 triplicate로 동결건조한 후 평균치를 사용하였다.

신경세포 배양

임신 18일(embryonic day 18: E18)의 Sprague-Dawley계 흰쥐 대뇌피질신경세포를 Brewer 등[3]의 방법에 따라 배양하였다. 즉, E18의 흰쥐를 dry ice가 들어있는 통속에 3~5분간 넣어 마취하고, 자궁을 가른 후 흰쥐 태아를 취하고 뇌를 잘라내었다. 대뇌피질 조직을 37°C 에서 5분간 0.25% trypsin으로 처리

하고 1 mM sodium pyruvate와 10 mM HEPES (pH 7.4)가 첨가된 HBSS용액(Invitrogen Life Technology) 5 ml로 4~5회 세척하여 반응을 중단시켰다. 조직을 1 ml Hank's 용액으로 옮기고, 끝을 불에 달구어 구멍을 작게 한 pasteur pipette으로 6~7회 통과시켜 신경세포를 분산시켰다. 이 후 분산된 세포를 모으고 세포수를 측정한다 다음 약 $1,500 \text{ cells}/\text{mm}^2$ 가 되도록 B27을 첨가한 plating neurobasal media (Invitrogen Life Technology; 100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I, 0.1 ml 25 mM glutamate, 0.1 ml 25 mM 2-mercaptoethanol)에 접종하여 5% CO_2 배양조에서 배양한다 다음 2~3일 간격으로 배양액을 feeding neurobasal media (100 ml neurobasal, 2 ml B27 supplement, 0.25 ml glutamax I)로 1/3씩 교환하였다.

저산소증 유발

Culture plate를 CO_2 Water Jacketed Incubator (Forma Scientific Inc.)를 이용하여 2% $\text{O}_2/5\%$ CO_2 환경에서 3시간 처리하여 저산소증을 유도하였다. 저산소 처리가 끝나면 배양 세포를 정상산소 환경 배양조에 옮기고 계속 배양하였다.

면역세포화학적 염색(immunocytochemistry)

배양용기(24-well plate)를 얼음 위에 올려놓고 배양액을 500 μl 의 D-인산완충용액(D-PBS; 0.1 g/l CaCl_2 , 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH_2PO_4 , 0.1 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8.0 g/l NaCl, 2.16 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)로 교환해 주었다. 5분 후 D-PBS를 4°C methanol (500 μl)로 교환하고 5분 후 -20°C methanol (500 μl)로 다시 교환한 다음 -20°C 에서 보관하였다. 20분 후 methanol을 D-PBS (500 μl)로 교환하고 15분 후 전차단용액(preblock solution; 0.05% Triton X-100, 5% 정상염소혈청)을 넣어 4°C 에서 1시간 처리하였다. 1차 항체(anti-PSD95 (postsynaptic density 95) mouse monoclonal, 1:500, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY; anti-Synaptophysin mouse monoclonal, 1:200, Sigma; anti-SynGAP α rabbit polyclonal, 1:500, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY)를 넣고 4°C 에서 1시간 반응시킨 후 실온에서 전차단용액으로 20분씩 3회 세척하였다. 형광물질이 표지된 2차 항체(anti-mouse IgG, Alexa 488-labeled, 1:2,000 혹은 anti-rabbit IgG, Alexa 568-labeled, 1:2,000)를 넣고 1시간 더 반응시킨 후, D-PBS로 15분씩 3회 세척하였다. CCD 카메라(Photometrics Inc., Germany)가 장착된 형광현미경(Leica Research Microscope DM IRE, Germany)으로 영상을 관찰하고, QFluoro version V1.0b software (Leica Microsystems AG, Germany)를 이용하여 디지털 영상을 획득하였다.

LDH assay

배양 10일(10 day *in vitro* DIV 10)에 약제를 처리하고 3일

간 배양한 후 저산소증을 유도하였다. 저산소증을 유도하기 직전, 즉 정상 산소 환경 및 저산소증 유발 후 1, 3, 5, 7일에 각각 배양액 20 μ l를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate (NADH 1 mg/ml)를 20 μ l씩 가한 다음, 상온에서 2분간 혼든 후 37°C에서 30분간 더 혼들었다. 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20 μ l씩 가하고 상온에서 20분간 혼든 후, 0.4 N NaOH를 100 μ l씩 가하고 상온에서 15분간 더 혼든 다음 ELISA reader로 흡광도(ABS₄₅₀)를 측정하였다.

Morris 수중 미로의 장치를 이용한 학습 및 기억력 측정

Morris 수중 미로(Morris water-maze)는 학습과 기억능력을 측정하는데 가장 흔히 이용된다. 수중 미로를 이용한 실험은 생쥐를 각각 대조군과 실험군으로 나누어 각 군당 12마리로 구성하여 실험하였다. 이 장치에 이용한 수조(tank)는 직경이 180 cm 높이가 50 cm인 원형 통으로 온도가 22±2°C되는 물로 35 cm 높이로 채웠다. 쥐가 피할 수 있는 발판은 직경이 12 cm인 투명한 아크릴원통으로 만들어 수면보다 1.0 cm 낮게 숨겼으며, 물에 우유를 넣어 발판이 보이지 않게 하였다. 수중 미로의 주변의 비디오카메라 등 공간 단서들을 학습기간 중 일정하게 유지하였다. 수조를 4개의 동일한 4분원으로 나누어 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분하였고, 이중 북동 4분원의 중심부에 발판을 놓았다. 각 4분원에서 한 번씩 출발하여 하루에 4번씩 4일간 학습을 시켰으며, 그때마다 발판을 찾는데 걸리는 평균 시간(초)을 측정하였다. 이때 90초 이상 걸리는 생쥐는 90초로 기록하였고, 1회의 학습이 끝나면 발판위에 올려 30초간 공간학습을 하게 한 후 다음 학습을 시켰다. 5일째에는 발판을 없애고 수영하게 하여(2회 반복) 발판이 있었던 4분원에 머무는 평균시간을 측정하였다. 이어서 발판을 물위로 올라오게 하고, 붉은 천으로 덮은 후 불을 비추어 잘 보이게 하고(가시발판시험), 수영하게 하여(2회 반복) 발판을 찾는 평균시간을 측정하여 시각장애에 의한 오류를 배제하였다.

통계처리

모든 실험은 최소 8배수로 시행하였고, 세포의 생존율은 대조군에 대한 백분율(% of control)로 표시하였다. 통계학적 유의성은 Mann-Whitney U test로 검증하였다.

결 과

배양 대뇌신경세포의 초기성장단계의 구분

E18 대뇌세포의 배양 12시간째 위상차 현미경으로 관찰하였다(Fig. 1). 대뇌신경세포는 배양 시작 후 2시간 정도부터 신경가지돌기를 내기 시작하며, 12시간 후에는 10~20 μ m까지 자란다. 대뇌세포는 배양초기에는 신경가지돌기가 없는 원형 형태(Fig. 1의 화살표머리)로서 이 단계를 층판족(lamellipodia)

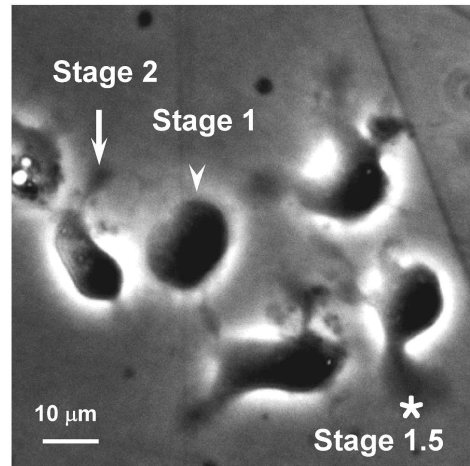


Fig. 1. A phase-contrast micrograph showing early morphological development of cultured neurons. E18 rat cortical neurons were grown in vitro for 12 hr in neurobasal medium supplemented with B27. Round shape without neurites is defined as lamellipodia stage (stage 1; arrowhead), which is followed by minor process stage (stage 2; arrow). Neurons with a fan-like process is defined as stage 1.5 (asterisk).

단계(제1단계)라고 한다. 그 후 작은 가지를 내는 단계를 작은 가지(minor process) 단계(제2단계, Fig. 1의 화살표)라 하며, 그 중간에 부채꼴 모양으로 신경가지돌기가 발생하는 단계를 제1.5단계(Fig. 1의 별표)라 하였다. 본 실험에 사용한 뉴로베이잘 배지는 혈청이 첨가되지 않은 배지로서 신경교세포는 약 10% 정도로 거의 증식이 일어나지 않아 대부분이 신경세포로 구성되어 있다.

황금 추출물(HK), 황금+천마 복합 추출물(HC), 황금+석창포 복합 추출물(HS) 및 황금+석창포+천마 복합 추출물(HSC)가 신경세포의 초기 형태발생에 미치는 영향

약제 추출물이 신경세포의 초기 형태발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 추출물을 첨가한 뉴로베이잘 배지에 E18 대뇌세포를 배양하고 그 효능을 배양 12시간 후에 관찰하였다. 대조군에 비하여 추출물을 첨가한 배지에서 자란 세포들은 일반적으로 제 1.5 및 제 2단계로 접어든 빈도가 증가하였다(Fig. 2A). 이를 통계(현미경 시야 수=20, 세포 수=400 내지 600, 4회 반복 실험)적으로 조사하였다(Fig. 2B). HK, HC, HS, HSC를 배지에 첨가하였을 경우 대조군에 비하여 제2단계 세포들의 비율이 각각 2.76±0.5, 3.07±0.6, 6.18±0.7, 7.04±0.6배로 매우 유의한(p<0.001) 증가를 보였다. 이는 이 추출물들이 신경세포의 초기 형태적 발생을 촉진하는 효능이 있음을 의미한다.

**HK, HC, HS, HSC의 신경가지돌기 수에 미치는 영향
약제 추출물이 신경가지돌기의 생성에 미치는 영향을 알아**

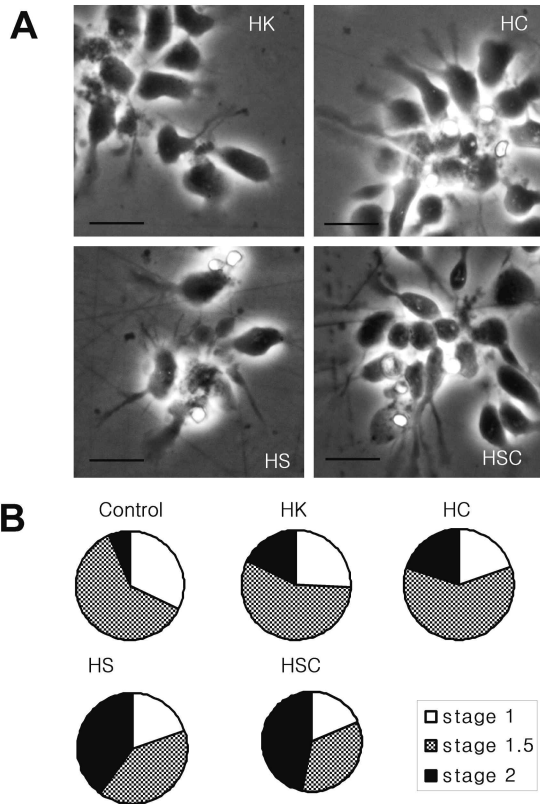


Fig. 2. Effect of various extracts on early morphological development of cultured neurons. E₁₈ rat cortical neurons were grown *in vitro* for 12 hr in neurobasal medium supplemented with B27. Extracts were added from the beginning. A, Typical phase-contrast micrographs of each cultures. Scale bar, 20 μ m. B, Statistics. In the cases of adding HK, HC, HS, and HSC to media, ratios of stage 2 cells increased significantly, 2.76 \pm 0.5, 3.07 \pm 0.6, 6.18 \pm 0.7, and 7.04 \pm 0.6 times respectively compared with the control group. p<0.01, Mann-Whitney U test. Number of the visual field=20. Number of cells=400~600. Repeat number=4. ※ HK, *Scutellaria baicalensis* GEORGI. HC, *Scutellaria baicalensis* GEORGI + *Gastrodia elata* BLUME. HS, *Scutellaria baicalensis* GEORGI + *Acorus gramineus* SOLAND. HSC, *Scutellaria baicalensis* GEORGI + *Acorus gramineus* SOLAND + *Gastrodia elata* BLUME

보기 위하여 추출물이 첨가된 뉴로베이잘 배지에 E₁₈ 대뇌세포를 배양하고 24시간 후에 관찰하였다. 대조군에 비하여 추출물을 첨가한 배지에서 자란 세포들은 일반적으로 돌기의 수가 증가하였는데 통계(현미경 시야 수=20, 세포 수=400 내지 600, 4회 반복 실험)적으로 조사하였다(Fig. 3). HK, HC, HS, HSC를 배지에 첨가하였을 경우 대조군에 비하여 돌기의 수가 각각 112.5 \pm 35, 125 \pm 40, 128 \pm 35, 150 \pm 38%로 증가하였으며, HC 및 HS의 경우 유의한(p<0.05) 증가, HSC의 경우 매우 유의한(p<0.01) 증가를 보였다. 이는 이 추출물들이 신경세포의 초기 돌기의 생성을 촉진하는 효능이 있음을 의미한다.

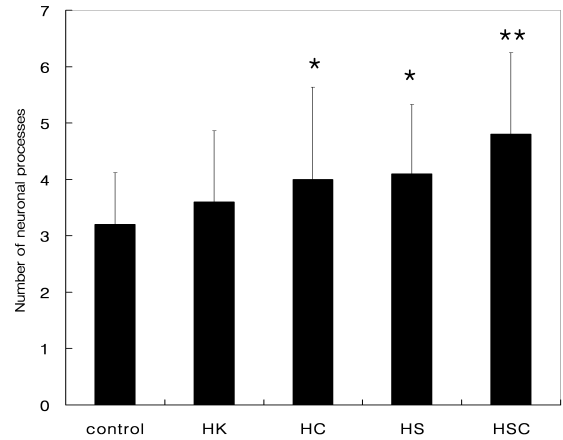


Fig. 3. Effects of various extracts on the number of neuronal processes. E₁₈ rat cortical neurons were grown *in vitro* in neurobasal medium supplemented with B27. Extracts were added from the beginning and neuronal processes were counted at 24 hr. *, p<0.05. **, p<0.01, Mann-Whitney U test. Number of the visual field=20. Number of cells=400~600. Repeat number=4.

HK, HC, HS, HSC이 신경가지돌기의 길이성장에 미치는 영향

약제 추출물이 신경가지돌기의 길이성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 추출물이 첨가된 뉴로베이잘 배지에 E₁₈ 대뇌세포를 배양하고 24시간 후에 관찰하였다. 대조군에 비하여 추출물을 첨가한 배지에서 자란 세포들은 일반적으로 돌기의 길이가 증가하였는데 통계(현미경 시야 수=20, 세포 수=400 내지 600, 4회 반복 실험)적으로 조사하였다(Fig. 4). HK, HC, HS, HSC를 배지에 첨가하였을 경우 대조군에 비하여 축삭의

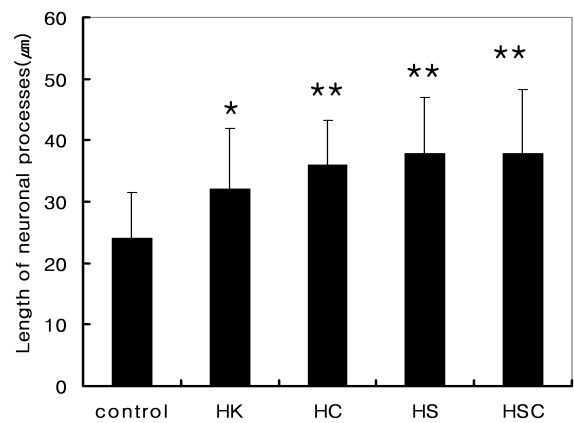


Fig. 4. Effects of various extracts on the length (μ m) of neuronal processes. E₁₈ rat cortical neurons were grown *in vitro* in neurobasal medium supplemented with B27. Extracts were added from the beginning and neuronal processes were counted at 24 hr. *, p<0.05. **, p<0.01, Mann-Whitney U test. Number of the visual field=20. Number of cells=400~600. Repeat number=4.

길이가 각각 133.3±41, 150±30, 158±37, 158±43%로 증가하였으며, HK의 경우 유의한(p<0.05) 증가, 그리고 HC, HS, HSC의 경우 매우 유의한(p<0.01) 증가를 보였다. 이는 이 추출물들이 신경세포의 초기 축삭의 길이성장을 촉진하는 효능이 있음을 의미한다.

배양한 대뇌신경세포에서 연접의 발생

연접은 DIV 3에 생성되기 시작하여 DIV 17에 거의 최고에 도달하며, DIV 7 내지 DIV 10에 가장 활발히 생성된다. DIV 14의 신경세포를 PSD95와 synaptophysin (SYN) 항체로 이중 염색하여 관찰하였다(Fig. 5). 연접후세포막 표지단백질인 PSD95(붉은색)와 연접전세포막 표지단백질인 SYN (초록색)은 신경가지돌기를 따라 분포하고 있었으며, 대부분 서로 가까이 접하고 있거나(화살표), 중첩하고 있음(노란색, 화살표머리)을 보여준다. 이는 DIV 14일에 점박이(puncta)로 보이는 PSD95의 대부분은 이미 축삭말단과 접촉하여 연접을 생성한 연접후 신경가지돌기가시(dendritic spine)임을 의미한다.

HK, HC, HS, HSC이 연접생성에 미치는 영향

약제 추출물이 연접생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 연접이 가장 활발히 생성되는 시기인 DIV 7에 추출물을 첨가하고 DIV 10에 신경세포를 PSD95 항체로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 6). 대조군에 비하여 추출물을 첨가한 배지에서 자란 세포들은 일반적으로 신경가지돌기의 개수 증가하였는데 통계(현미경 시야 수=20, 세포 수=20 내지 30, 4회 반복 실험)적으로 조사하였다(Fig. 6B). HK, HC, HS,

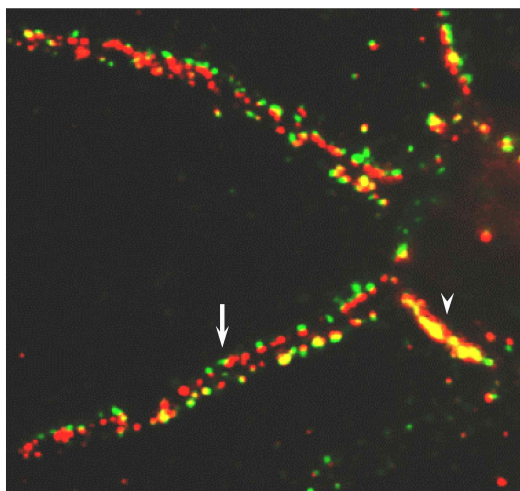


Fig. 5. Detection of dendritic spines immunocytochemistry. DIV 14 rat cortical neurons were doublestained with anti-PSD95 and anti-synaptophysin (SNP) antibodies, a postsynaptic spine and a presynaptic terminal marker, respectively. Examples of close apposition of the two proteins are indicated by arrows. Nuc, nucleus. Scale bar, 10 μm.

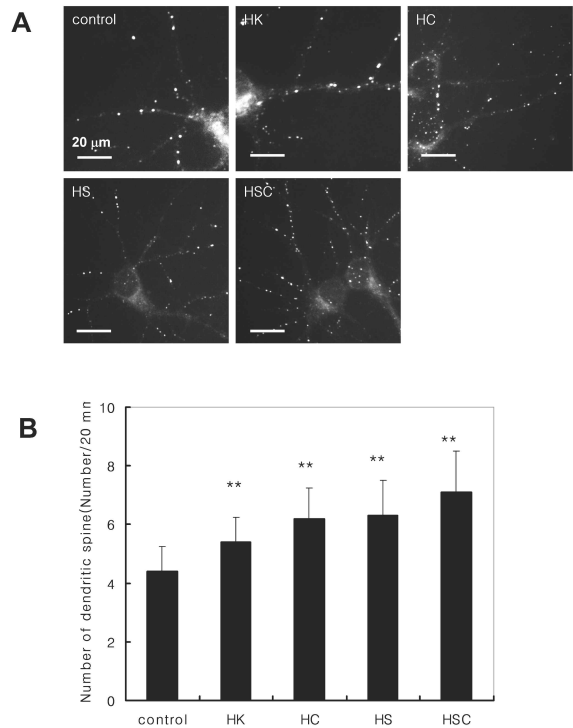


Fig. 6. Effects of various extracts on the spine density. E18 rat cortical neurons were grown *in vitro* in neurobasal medium supplemented with B27. Extracts were added on DIV 7 and spines were visualized by immunostaining with anti-PSD95 antibody. A, Typical micrographs of each stainings. B, Statistics. **, p<0.01, Mann-Whitney U test. Number of the visual field=20. Number of cells=20~30. Repeat number=4.

HSC를 배지에 첨가하였을 경우 대조군에 비하여 신경가지돌기개수의 수가 각각 123±16, 140±17, 143±22, 161±14%로 증가하였으며, 모든 실험군에서 매우 유의한(p<0.01, Mann-Whitney U test) 증가를 보였다. 이는 이 추출물들이 신경세포의 연접생성을 촉진하는 효능이 있음을 의미한다.

정상산소 배양조건에서 HK, HC, HS, HSC의 신경세포 보호 효능

추출물들이 시험관에 배양한 신경세포를 보호하는 효능을 조사하기 위하여 흰쥐 E18 대뇌신경세포를 뉴로베이잘 배지에 배양하고 DIV 10에 추출물을 첨가한 후 DIV 14에 세포의 생존율을 LDH 측정 방법으로 조사하였다. 대조군에 비하여 추출물을 첨가한 배지에서 자란 세포들은 생존율이 증가하였는데 통계(24-well plate, n=8, 4회 반복 실험)적으로 조사하였다(Fig. 7). HK, HC, HS, HSC를 배지에 첨가하였을 경우 대조군에 비하여 생존율이 각각 116±8, 115±12, 118±15, 121±13%로 증가하였으며, 모든 실험군에서 매우 유의한(p<0.01) 증가를 보였다. 이는 이 추출물들이 정상산소환경에서 배양한 신경세포의 보호 효능이 있음을 의미한다.

날수를 나타내며, Y축은 발판에 도달하기까지 걸린 시간을 초 단위로 나타낸 것으로, 이때 시간은 하루에 4번 실시하여 평균값을 취한 것이다. 학습1일째 HK는 75.3 ± 12 초, HC는 76.2 ± 6.7 초, HS는 70.5 ± 11.4 초, HSC는 67.1 ± 7.5 초로, 대조군 86.1 ± 6.1 초에 비하여 유의한($p < 0.05$) 차이를 보였으며 특히 HSC는 매우 유의한($p < 0.01$) 차이를 보였다. 이는 학습 첫날부터 추출물을 투여한 시험군은 학습효율이 대조군에 비하여 유의하게 높으며, 특히 HSC 투여군은 HK 투여군에 비하여도 매우 유의하게 높음을 의미한다. 학습2일째도 추출물을 복용한 시험군은 대조군에 비하여 모두 유의한 차이를 나타내었다. 그러나 학습3일과 4일에는 유의한 차이가 없었다. 또한 HSC 투여군은 HK에 비하여도 유의한($p < 0.05$) 감소를 보였다. 이러한 결과는 추출물을 투여한 시험군은 학습과 기억능력이 증가하여 학습2일에 거의 학습과제를 완성하는 반면 대조군은 4일이 되어야 학습이 끝남을 의미한다. 학습4일이 끝나고 5일째 발판을 없애고 수영하게 하여(2회 반복) 발판이 있었던 4분원에 머무는 평균시간에는 유의한 차이는 나타나지 않았으나($p > 0.8$), 추출물 투여군들에서 학습 증진효과 경향성을 보였다. 추출물 투여기간 동안 생쥐의 몸무게 증가는 대조군과 시험군 간에 차이가 없었다(Fig. 9F). 발판을 수면위로 올려놓고 밝게 불을 밝혀 잘 보이게 한 가지발판시험에서도 대조군과 시험군 간에 차이가 없었다. 이는 추출물 투여가 생쥐의 건강에 특별한 이상을 일으키지 않았을 뿐 아니라 단순한 체력적 차이 때문에 발판을 빨리 찾은 것이 아님을 의미한다.

고 찰

본 연구에서는 황금, 석창포, 천마의 물추출물이 흰쥐의 대뇌신경세포의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과 정상산소 환경에서 1) 신경세포의 초기 형태적 분화를 촉진하고, 2) 신경가지돌기의 수와 길이성장을 증가시키고, 3) 연접생성을 촉진하며, 4) 신경세포 보호 효능이 있었으며, 저산소증에서도 신경세포사멸을 억제하였다. 그리고 생쥐를 이용한 Morris 수중미로실험에서도 학습과 기억능력이 유의하게 증진되었다. 이러한 효능은 단일 추출물보다 여러 가지 약제를 혼합할 경우 더 상승적으로 효능을 나타내었다.

인간의 행동은 궁극적으로 뇌신경망의 활성화에 근거한다[36]. 신경망은 신경세포들의 연결이기 때문에 그 연결지점인 연접의 활성화와 연결강도의 변화 및 새로운 연접의 생성은 신경망의 형성과 직접적으로 관련이 있다. 연접이 생성되기 위하여는 축삭과 가지돌기의 성장 및 가지돌기가시의 생성이 필수적이다. 따라서 학습과 기억이 잘 일어나기 위하여는 신경세포의 이러한 활성이 촉진되어야 하며, 이러한 효능을 갖는 물질은 아마도 학습과 기억능력을 증가시킬 것이 예측된다. 실제로 연접의 생성과 제거가 성체 뇌에서 끊임없이 일어

남이 실험적으로 증명되었다. 흰쥐를 다양한 물체가 있는 환경에 놓고 여러 가지 행동을 자유롭게 경험하게 하면 신경세포의 연접밀도가 증가하며[29], 생쥐의 수염(whisker)을 자극하면 가지돌기가시의 형성이 유도된다[44]. 보다 직접적인 증거로서 체감각피질(somatosensory cortex)의 신경세포를 형광염색하고 장기적으로, 고해상도 이미지로 관찰해 보면 가지돌기가시들이 생성되거나 소멸되며, 그 속도는 감각피질을 자극하면 증가하고, 전자현미경으로 관찰해보면 새로 생성된 신경가지돌기가시 가운데 적어도 일부는 연접을 형성함이 알려졌다[27].

Cajal [4]이 경험의 결과로 뇌 구조상의 변화가 야기됨을 제시한 이후 학습에 의한 연접생성의 증거도 많이 보고되었다. 병아리를 수동회피학습을 시키고 24시간 및 48시간 후에 전자현미경으로 관찰해보면 등쪽측해마(dorsolateral hippocampus)에서 신경세포의 연접밀도가 상당히 증가하며 평균연접높이도 대조군에 비하여 상당히 달라진다[45]. 이 경우 연접밀도의 증가는 shaft (type II) 연접에 의하였는데, 연접생성 동안에 shaft synapse가 먼저 형성되고 이들이 spine synapse로 변환됨은 이미 잘 알려져 있다[11]. 동일한 학습방법을 이용한 다른 연구에 의하면 빠르게는 1시간 후에 새로운 연접의 생성이 일어난다[11,35,40]. 그리고 공간적으로 복잡한 환경에 노출된 쥐는 CA1 세포의 가지돌기가시의 밀도가 증가하고 수중미로에서 향상된 성적으로 보인다[34]. 또한 실험적으로 장기기억의 연접기전으로 알려진 장기연접강화를 유도하면 10-15분 후에 해마 CA1 추체세포의 가지돌기에서 가지돌기가시의 생성이 증가한다[5]. 이러한 사실들은 학습과정 동안 성체 뇌에서 연접생성 및 제거가 활발히 일어남을 증명한다. 따라서 연접생성을 촉진할 수 있는 물질은 학습과 기억능력을 증진시킬 수 있다고 추론할 수 있다.

그러나 불행하게도 사람의 뇌는 노화에 따라 심각하게 손상을 받는다. 가장 심각한 경우에는 치매(Alzheimer's disease, AD)와 같이 많은 신경세포의 사망으로 인하여 학습과 기억능력을 거의 완전히 소실한다. 치매와 같은 병적인 경우는 아니더라도 대부분의 인간은 노화와 관련된 인지기능의 저하를 겪는다. 치매와 인지기능의 손상은 모두 신경망의 손상에 기인한다. 다만 치매의 경우 신경세포의 사망이 주원인이며, 노화에 따른 인지기능의 손상은 신경망은 온전하지만 연접의 변화에 기인하는 것으로 보인다. 예로서, 24살의 원숭이 대뇌신경세포는 9살 된 원숭이에 비하여 가지돌기가 단순화되고 20-35%의 가지돌기가시의 수와 밀도의 감소가 일어난다[39].

다행스럽게도 연령에 따른 이러한 가지돌기의 소실은 회복 가능하다. 예로서 난소절제술을 한 쥐에 에스트로젠을 투여한 경우 신경가지돌기가시의 밀도가 약 55% 증가한다[12,28]. 이는 에스트로젠을 투여하면 신경가지돌기가시의 수를 정상수준으로 유지할 수 있으며, 뇌 기능을 회복할 수 있음을 의미한다. 흥미로운 점은 나이가 든 암컷 원숭이(perimenopausal

women에 해당하는)도 에스트로겐에 유도된 CA1 해마구역 가지돌기가지 수의 증가가 젊은 원숭이와 마찬가지로 잘 일어난다는 것이다[13]. 이러한 증가는 대뇌전두엽에서도 일어난다[12]. 난소절제를 한 늙은 원숭이에 에스트로겐을 처리하고 행동분석을 해보면 인지기능이 상당히 향상된다. 에스트로겐을 처리한 그룹은 해마 의존성 과제(delayed non-matching to sample, DNMS)와 노화에 민감한 전두엽 과제(delayed response task)에서 향상된 성적을 보인다. 이 경우 해마 의존성 과제에 에스트로겐이 영향을 크지 않았지만 노화에 민감한 전두엽 과제는 굉장히 향상시켜 젊은 원숭이 수준으로 회복시켰다[38]. 이 결과는 영장류에 있어 전두엽은 해마와 동등하게 반응성이 좋으며 따라서 해마 의존성 이외에도 보다 더 광범위한 인지기능이 회복될 수 있음을 시사한다. 또한 이런 사실은 단지 에스트로겐 뿐 아니라 다른 물질에 의하여도 노화에 의한 신경회로의 손상이 회복될 수 있으며, 노화된 연결도 가소성이 있으며 연결의 건강과 효능에 관련된 신호전달경로에 계속 반응함을 의미한다.

노화에 따른 연결기능의 손상이 회복가능하다는 사실은 매우 희망적이며, 회복효능이 있는 물질의 탐색은 매우 중요하다. 황금은 고한(苦寒)한 약물로 폐, 심, 위의 실화(實火)와 담열(痰熱), 풍열(風熱)을 제거하는 효능이 있어 장열번갈(壯熱煩渴), 습열사리(濕熱瀉痢), 한열왕래(寒熱往來), 폐열해수(肺熱咳嗽), 습열두통(濕熱頭痛), 목중종적(目中腫赤) 등의 증상에 사용한다. 반하사심탕(半夏瀉心湯), 황금탕(黃芩湯), 소시호탕(小柴胡湯)은 황금의 청열사화(清熱瀉火) 효능을 이용한 처방들이며, 황금이 포함된 중풍 초기 처방으로는 우황청심원(牛黃清心元), 대시호탕(大柴胡湯)이 대표적이다[14]. 황금은 흰쥐의 전뇌허혈 모델에서 신경방어효과[31], 저산소증 모델에서 대뇌신경세포 자연사 방지예방 및 치료 효과[25]가 보고되었다. 석창포는 신온(辛溫)한 방향성(芳香性) 약물로 개심구(開心竅), 거습축풍(祛濕逐風), 제담소적(除痰消積), 개위관중(開胃寬中)하는 효능이 있다. 임상적으로는 번민건망(煩悶健忘), 심복통(心腹痛), 혼미(昏迷), 풍비(風痺), 전간(癲癇) 등에 사용되며[14], 지황음자(地黃飲子), 총명탕(聰明湯), 안신정지환(安神定志丸), 청심온담탕(清心溫痰湯) 등은 석창포의 이러한 효능을 대표하는 처방이다. 석창포는 국소 뇌혈류량 및 혈압에 미치는 효과 및 기전[18], 뇌허혈의 신경 방어효과[20]가 보고되었다. 한편 천마는 성평(性平), 무독(無毒), 미감(味甘)한 약물로 간경(肝經)으로 들어가 평간잠양(平肝潛陽), 식풍지경(息風止癢)의 효능이 있어, 두통, 현훈, 파상풍 등에 사용되며[14], 천마구등음(天麻鉤藤飲), 반하백출천마탕(半夏白朮天麻湯) 등이 대표적 처방이다. 천마가 신경세포 손상을 방지하고[23], 기억증진 효능[16]이 있음이 보고되었으며, 천마의 에테르 분획은 아밀로이드 베타 펩티드에 의하여 유도된 신경세포사를 억제한다[22, 24]. 본 연구에서는 이 약재들의 혼합물의 효능을 신경과학적으로 검증한 결과 신경세포의 초기 형태적 분화의

촉진, 가지돌기(process)의 수와 길이성장의 촉진, 연결생성 촉진, 신경세포 보호 등에 단일약제보다 더 큰 효능이 있음을 증명하였다. 이와 같은 현상은 궁극적으로 연결의 활성을 증가시켜 학습과 기억능력이 향상되었을 것으로 사료된다.

References

- Abbott, L. F. and S. B. Nelson. 2000. Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat. Neurosci.* **3**, 1178-1183.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge. 1993. A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, E. K. Evege, and P. J. Price. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* **35**, 567-576.
- Cajal, S. R. 1991. Degeneration and Regeneration of the Nervous System. pp. 1928, Oxford University Press, London.
- Chang, F. and W. T. Greenough. 1994. Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res.* **309**, 35-46.
- Chklovskii, D. B., B. W. Mel, and K. Svoboda. 2004. Cortical rewiring and information storage. *Nature* **431**, 782-788.
- Cho, J., J. Y. Kong, D. Y. Jeong, K. D. Lee, D. U. Lee, and B. S. Kang. 2001. NMDA receptor-mediated neuroprotection by essential oils from the rhizomes of *Acorus gramineus*. *Life Sci.* **68**, 1567-1573.
- Cho, J., Y. H. Kim, J. Y. Kong, C. H. Yang, and C. G. Park. 2002. Protection of cultured rat cortical neurons from excitotoxicity by asarone, a major essential oil component in the rhizomes of *Acorus gramineus*. *Life Sci.* **71**, 591-599.
- Choe, S. Y. 2003. Synaptic plasticity and critical period in cerebrum cortex. *Biochemistry and Molecular Biology News* **23**, 288-295.
- Davis, G. W. and I. Bezprozvanny. 2001. Maintaining the stability of neural function: a homeostatic hypothesis. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 847-869.
- Doubell, T. P. and M. G. Stewart. 1993. Short-term changes in the numerical density of synapses in the intermediate and medial hyperstriatum ventrale following one-trial passive avoidance training in the chick. *J. Neurosci.* **13**, 2230-2235.
- Gibbs, R. B. and R. Gabor. 2003. Estrogen and cognition: applying preclinical findings to clinical perspectives. *J. Neurosci. Res.* **74**, 637-643.
- Hao, J., W. G. Janssen, Y. Tang, J. A. Roberts, H. McKay, B. Lasley, P. B. Allen, P. Greengard, P. R. Rapp, J. H. Kordower, P. R. Hof, and J. H. Morrison. 2003. Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys. *J. Comp. Neurol.* **465**, 540-550.
- Hoe, J. 1999. Dong-Eui-Bo-Gam. pp. 367, 961, 965, 1024, 1937, 1955, 1938, 1st eds., Byuinoonhwasa, Seoul.

15. Hof, P. R. and J. H. Morrison. 2004. The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci.* **27**, 607-613.
16. Hsieh, M. T., C. R. Wu and C. F. Chen. 1997. Gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol facilitate memory consolidation and retrieval, but not acquisition, on the passive avoidance task in rats. *J. Ethnopharmacol.* **56**, 45-54.(=2)
17. Huang, N. K., Y. L. Lin, J. J. Cheng, and W. L. Lai. 2004. Gastrodia elata prevents rat pheochromocytoma cells from serum-deprived apoptosis: the role of the MAPK family. *Life Sci.* **75**, 1649-1657.
18. Jeong, H. W., S. Y. Kang, and S. W. Bak. 1999. Effect of Rhizoma Acori Graminei extract on blood pressure and regional cerebral blood flow in rats. *Kor. J. Herbology* **14**, 81-88.
19. Ji, H. J. and S. I. Lee. 1988. Hanyack-Gyugyuk-Juhea. pp. 219, 361, 638, Korean index Co., Seoul.
20. Kang, S. J., H. S. Keum, Y. Y. Joen, E. J. Lee, C. S. Park, C. G. Park, J. H. Heo, C. H. Yang, and J. S. Cho. 2001. The neuroprotective effect of Acori graminei rhizoma extract cerebral ischemia in rats. *Korean J. Oriental Int. Med.* **22**, 341-351.
21. Kenneth, W. L. 2006. Neurology and neurosurgery illustrated. pp. 34, 4th eds., e-public. Seoul.
22. Kim, H. J., K. D. Moon, D. S. Lee, and S. H. Lee. 2003. Ethyl ether fraction of Gastrodia elata Blume protects amyloid beta peptide-induced cell death. *J. Ethnopharmacol.* **84**, 95-98.(=3)
23. Kim, H. J., K. D. Moon, S. Y. Oh, S. P. Kim, and S. R. Lee. 2001. Ether fraction of methanol extracts of Gastrodia elata, a traditional medicinal herb, protects against kainic acid-induced neuronal damage in the mouse hippocampus. *Neurosci. Lett.* **314**, 65-68.
24. Kim, H. J., S. R. Lee, and K. D. Moon. 2003. Ether fraction of methanol extracts of Gastrodia elata, medicinal herb protects against neuronal cell damage after transient global ischemia in gerbils. *Phytother. Res.* **17**, 909-912.
25. Kim, K. H., S. H. Jeong, J. W. Kim, H. S. Eum, S. H. Chung, G. G. Shin, W. C. Lee, and I. S. Moon. 2002. The effect of HwangGum (Scutellariae Radix) for delayed neuronal death on hypoxia. *Korean J. Oriental Int. Med.* **23**, 396-405.
26. Kim, Y. O., K. Leem, J. Park, P. Lee, D. Ahn, B. C. Lee, H. K. Park, K. Suk, S. Y. Kim, and H. Kim. 2001. Cytoprotective effect of Scutellaria baicalensis in CA1 hippocampal neurons of rats after global cerebral ischemia. *J. Ethnopharmacol.* **77**, 183-188.
27. Knott, G. W., C. Quairiaux, C. Genoud, and E. Welker. 2002. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* **34**, 265-273.
28. Kretz, O., L. Fester, U. Wehrenberg, L. Zhou, S. Brauckmann, S. Zhao, J. Prange-Kiel, T. Naumann, H. Jarry, M. Frotscher, and G. M. Rune. 2004. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J. Neurosci.* **24**, 5913-5921.
29. Kullmann, D. M. and S. A. Siegelbaum. 1995. The site of expression of NMDA receptor-dependent LTP: new fuel for an old fire. *Neuron* **15**, 997-1002.
30. Lamour, Y., M. H. Bassant, B. Potier, J. M. Billard, and P. Dutar. 1994. Aging of memory mechanisms. *C R Seances Soc. Biol. Fil.* **188**, 469-486.
31. Lee, B. C., K. H. Leem, Y. O. Kim, S. Y. Kim, D. K. Ahn, H. K. Park, and H. C. Kim. 1999. Neuroprotective effects of Scutellariae Radix on the brain ischemia induced by four - vessel occlusion in rats. *Kor. J. Herbology* **14**, 89-96.
32. Martin, S. J., P. D. Grimwood, and R. G. Morris. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 649-711.
33. Morrison, J. H. and P. R. Hof. 1997. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* **278**, 412-419.
34. Moser, M. B., M. Trommald, and P. Andersen. 1994. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial-learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* **91**, 12673-12675.
35. Nikonenko, I., P. Jourdain, and D. Muller. 2003. Presynaptic remodeling contributes to activity-dependent synaptogenesis. *J. Neurosci.* **23**, 8498-8505.
36. Park, M. S. 1997. Molecular Biology of mind science. pp. 23, Jisik-Sanup Publications Co., Seoul.
37. Park, T. J. 2004. Cognitive Neural Mechanisms of Aging. *The Korean Journal of Experimental Psychology* **16**, 317-336.
38. Rapp, P. R., J. H. Morrison, and J. A. Roberts. 2003. Cyclic estrogen replacement improves cognitive function in aged ovariectomized rhesus monkeys. *J. Neurosci.* **23**, 5708-5714.
39. Richard, F. T. 1996. Brain. pp. 35, 75, Sung-Won-Sa, Seoul.
40. Rusakov, D. A., H. A. Davies, I. M. Krivko, M. G. Stewart, and M. Schachner. 1994. Training in chicks alters PSA-N-CAM distribution in forebrain cell membranes. *NeuroReport* **5**, 2469-2473.
41. Suh, K. S, Y. H. Nam, Y. M. Ahn, N. J. Kim, C. Y. Park, G. Koh, S. Oh, J. T. Woo, S. W. Kim, J. W. Kim, and Y. S. Kim. Effect of Scutellariae radix extract on the high glucose-induced apoptosis in cultured vascular endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1629-1632.
42. Spires, T. L. and B. T. Hyman. 2004. Neuronal structure is altered by amyloid plaques. *Rev. Neurosci.* **15**, 267-278.
43. Stent, G. S. 1973. A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 997-1001.
44. Turner, A. M. and W. T. Greenough. 1985. Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Res.* **329**, 195-203.
45. Unal, B., P. M. Bradley, B. Sahin, S. Canan, H. Aslan, and S. Kaplan. 2002. Estimation of numerical density and mean synaptic height in chick hippocampus 24 and 48 hours after passive avoidance training. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **136**, 135-144.
46. Wang, A. 1989. Bon-cho-bi-yo. pp. 44-45, 177-180, Komoonsa. Seoul.
47. Wang, H. and H. Tiedge. 2004. Translational control at the synapse. *Neuroscientist* **10**, 456-466.