

허혈성 뇌손상 백서에서 孔子大聖枕中方이 학습과 기억에 미치는 영향

유수향 · 채중원

동신대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Effects of Gonjadaesungchimjoongbang on Learning Ability and Memory after Ischemic Brain Injury in Rats

Ryu Su Hyang, Chae Jung Won

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Objectives

The purpose of this study is to evaluate the effect of Gonjadaesungchimjoongbang on spatial learning abilities and memories in ischemic brain injury.

Methods

Rats were separated into three groups; (1) Normal, (2) Saline medication after ischemic brain injuries (control), (3) Gonjadaesungchimjoongbang medication after ischemic brain injuries (experiment). Ischemic brain injuries was induced by MCA occlusion and reperfusion. Morris water maze test was conducted for spatial learning and memory tests. Then, the change of BDNF in the hippocampus(7th, 14th day) was examined by immunohistochemistry.

Results

In Morris water maze test, spatial learning abilities and memory functioning were considerably increased in the experiment group as oppose to control group on 7th and 14th day ($p < 0.01$). Moreover, immunohistochemistic response of BDNF in the hippocampus indicated that the more increased immune reaction was found in the experiment group as oppose to the control group on 7th and 14th day.

Conclusions

Gonjadaesungchimjoongbang can improve the learning abilities and memories in ischemic brain injury.

Key words : Gonjadaesungchimjoongbang, Learning ability, Memory, BDNF

I. 서론

현대 사회의 급격한 발달로 사람들이 받아들여야 하는 정보의 양이 하루가 다르게 증가하며 이에 따른 정보 처리 능력이 중요시되고 있다.

학습이란 우리를 둘러싸고 있는 세상, 즉 주위 환경으로부터의 정보와 지식을 뇌에 저장하는 과정이고, 기억은 그 저장된 정보, 지식, 경험들을 필요시에 의식 세계로 다시 꺼내 사용하는 능력을 말한다¹⁾. 학습과 기억은 서로 불가분의 관계에 있으며 학습은 기억의 양

■ 투 고 : 2011년 3월 24일, 수 정 : 2011년 4월 21일, 채 택 : 2011년 4월 22일
■ 교신저자 : 채중원, 전라남도 목포시 상동 834번지 동신대학교목포한방병원 소아과
(Tel : 061-280-7906, Fax : 061-280-7788 E-mail : lancia20@hanmail.net)

과 질을 통해서만 그 결과를 측정할 수 있다²⁾. 해마 (hippocampus)는 학습과 기억의 형성과정에 기여하는 중요한 뇌영역으로, 신경의 발생기뿐만 아니라 성장 이후에도 신경세포가 지속적으로 생성되는 특징을 가지고 있다³⁾. 따라서 출생 후의 신경세포 생성율은 해마 기능과 밀접한 연관성을 가지고 있어 신경세포생성의 감소는 인지기능의 손상을 수반하는 반면에, 신경세포 생성의 증가는 학습 및 기억 능력을 향상시킨다⁴⁾.

뇌손상 후 신경화학적 변화는 세포사(cell death) 반응뿐만 아니라 내인성 신경보호반응도 함께 일어나 신경보호효과가 나타나는데, 이 때 중요한 역할을 하는 것이 신경영양인자(neurotrophin)이며, 회복 과정에서 신경 연결부 가소성(synaptic plasticity)을 유도한다⁵⁻⁶⁾. 이러한 신경영양인자 가운데 BDNF(brain-derived neurotrophic factor)는 신경세포의 성장, 발달, 그리고 신경 가소성에 중요한 물질이면서 신경 손상에 대한 저항을 높여 신경세포의 생존을 향상시킨다⁷⁾.

한의학에서는 기억을 인지 과정인 神의 일부로 인식 하였으며, 健忘을 心藏神, 脾舍意思, 腎藏精主志의 생리기능을 바탕으로 心, 脾, 腎과 밀접하게 관련되어 있다고 보았다⁸⁾. 健忘의 원인으로는 心脾虛損, 心腎不交, 精竭神衰, 痰瘀痺阻가 있는데, 神明之府인 腦를 영양하지 못하거나 痰이 心竅를 막을 경우 神이 조화를 잃게 되므로 健忘이 발생한다⁹⁾.

孔子大聖枕中方(Gonjadaesungchimjoongbang, GDCB)은 萬病回春¹⁰⁾에 기재되고 東醫寶鑑에 인용된 처방으로 龜板, 龍骨, 遠志薑製, 石菖蒲로 구성되었으며 그 효능에 대해 “服之令人聰明”이라 하여¹¹⁾ 고차원적인 인지 기능이 중요시되는 현대 사회에서 그 응용 가능성이 많을 것으로 사료되나 학습 및 기억과 같은 인지능력 향상에 대해 실험적으로 입증한 사례는 찾아

보기 힘들었다.

따라서 본 연구에서는 孔子大聖枕中方의 허혈성 뇌 손상에 따른 기억과 학습능력 저하에 대한 개선효과를 입증하고자 Morris 수중미로(Morris water maze)를 사용하여 인지적 및 신경학적 운동행동평가를 시행하였고, 면역조직화학적 방법을 이용하여 손상된 해마 부위에서 BDNF의 발현 양상을 관찰하였다. 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험에서는 체중 약 250±50g의 Sprague-Dawley계 백서(8주령, 雄, 대한실험동물)를 각 군당 14마리씩 할당하여 총 42마리를 사용하였다. 사육실은 전 실험기간 동안 항온(25±1℃), 항습(55±10%), 12시간은 밝게, 12시간은 어둡게 유지하도록 하였다. 실험기간 중 고형사료(삼양사료, Korea)와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

실험동물은 각 군당 14마리씩 할당하여 정상군(n=14), 허혈성 뇌손상 유발 대조군(n=14), 허혈성 뇌손상 유발 후 GDCB 처치군(n=14)으로 구분하였다 (Table 1).

2) 약제

본 실험에서 사용한 孔子大聖枕中方의 구성은 東醫寶鑑¹¹⁾을 기준으로 하였고, 실험에 사용된 약제는 東新大學校 附屬木浦韓方病院에서 구입하였으며, 1일분의 처방 내용은 아래의 Table 2와 같다.

Table 1. Classification of Experimental Groups

Groups	Intervention	Day of examination	
		7 th day	14 th day
Normal	Saline medication	7	7
Control	Saline medication after ischemic brain injury	7	7
Experiment	GDCB medication after ischemic brain injury	7	7

Table 2. Prescription of Gonjadaesungchimjoongbang(GDCB)

韓藥名	生藥名	用量(g)
龜板	<i>Testudinis Plastrum</i>	5.625
龍骨	<i>Fossilis Osis Mastodi</i>	5.625
遠志	<i>Polygalae Radix</i>	5.625
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	5.625
總計		22.5g

2. 방법

1) 시료의 투여

GDCB을 분말로 제조한 후 0.225 g을 0.5 ml의 탁주에 용해하여 2일 1회씩 zonde를 이용하여 경구 투여하였으며 각 군은 허혈성 뇌손상 유발 1일 후부터 약물 처치를 시작하였고 2주일 동안 처치하였다.

2) 허혈성 뇌손상 유발

허혈성 뇌손상 유발 백서 모델은 Longa 등¹²⁾의 방법을 이용하였다. 우선 백서를 마취 챔버(Royal medical, Korea)에 넣고, 70% N₂O와 28.5% O₂가스에 1.5% 엔플루란(enflurane)을 혼합시킨 마취가스로 전신마취 후 다시 마스크로 1.5~2.0% 엔플루란을 흡입시켜 마취를 지속하였다. 이 후 백서의 전정부 중앙선을 따라 피부를 절개하여 좌측 총경동맥(common carotid artery)을 노출시키고 총경동맥을 따라 근위부로 진행하여 외경동맥과 내경동맥을 분리한 다음 총경동맥과 외경동맥을 묶어서 고정하였다. 그리고 총경동맥 분지부에 monofilament nylon(4.0호)을 이용하여 중대뇌동맥의 가는 혈관을 폐쇄하고 수술부위를 봉합한 후 소독하였다. 재관류(reperfusion)는 MCA 폐쇄 2시간 후에 다시 마취를 시켜 실리콘을 제외한 봉합사를 제거하였다.

3) 실험모델의 적절성 확인

신경학적 증상이 나타나는 개체만 선별하기 위해 다음과 같은 두 가지 방법으로 확인하였다. Garcia 등¹³⁾이 제시한 신경학적 검사는 6개의 항목으로 케이지 내에서 백서의 움직임, 공중에서 꼬리를 잡았을 때 다리의 평형적 움직임, 앞발이 지면에 닿았을 때 앞발의 움직임, 철망을 오르는 모습, 몸통자극에 대한 반응, 콧수염 자극에 대한 반응으로 구성되었다. 이 중 앞의 세 항목은 최하 0점에서 최고 3점, 뒤의 세 항목은 최하 1점에서 최고 3점을 줄 수 있어 전체 점수를 3점에서 18점까지로 표시하였다.

또한, 허혈성 뇌손상 유발 24시간 후에 pentobarbital sodium(4 mg/kg)을 복강 주사하고 뇌를 적출하여 5분간 냉각된 인공 뇌척수액에 담근 후, 적출한 뇌를 2,3,4-triphenyltetrazolium chloride(Sigma, USA)를 포함하는 phosphate-buffered saline(PBS)에 30분간 담가두었다. 그리고 나서 37°C에 20분간 배양한 후 2% paraformaldehyde 용액에 고정하여 뇌경색 여부를 확인하였다.

4) 공간학습 및 기억력 검사

GDCB이 인지기능에 미치는 효과를 알아보기 위하여 허혈성 뇌손상 유발 7일과 14일 후에 Morris 수중미로검사를 실시하였다. 수중미로로 이용되는 수조는 직경이 150 cm, 높이가 50 cm인 원형 통으로 온도가 25±1°C로 유지되는 물을 30 cm 높이로 채웠고, 수중미로 주변은 비디오카메라, 실험대, 그리고 실험대 위에 있는 수온 조절용 장치 등 공간 단서들을 일정하게 유지시켰다. 내부에는 검은색으로 페인트를 칠해서 백서의 흰색과 구분되도록 하였다. 또한 도피대(escape platform)는 직경 15 cm, 높이 30 cm인 원형 투명 아크릴에 받침대를 부착하고, 수면보다 2 cm 낮게 위치시켰다. 수조 내의 물은 흰색 물감을 풀어서 도피대를 보이지 않게 하여 시각단서를 사용할 수 없게 하였다. 수중미로는 4개의 동일한 사분원으로 나뉘 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분하였다. 이중 남서 사분원의 중심부에 도피대를 놓고, 나머지 중 하나를 출발위치로 사용하였다.

실험에 사용된 백서는 허혈성 뇌손상 유발 전, 하루에 180초간 4번씩 6일간 훈련을 시켰다. 평가는 수조 안의 백서가 출발에서부터 도피대로 올라가는데 걸린 시간을 측정하고, 행적을 SMART JUNIOR 프로그램(PanLab, Spain)을 이용하여 분석하였다.

5) 조직절편제작

실험이 종료된 후 백서를 전신 마취제인 럼퐁(바이엘코리아, Korea)으로 복강주사(0.6 mg/kg)하여 마취한 후, 심장관류를 통해 0.9% NaCl 용액으로 관류 수세하였다. 혈액이 제거된 후에는 4% 중성 paraformaldehyde로 관류하여 조직 전고정을 실시하였고, 전고정된 실험동물로부터 뇌를 적출하여 24시간 동안 4% paraformaldehyde로 후고정하였다. 후고정이 끝난 조직은 에탄올을 이용한 탈수과정과 자일렌(xylene)을 이용한 세정과정을 거쳐 파라핀 포매(paraffin embedding)를 시행하였다. 제작된 파라핀 블록(paraffin block)은 미세절단기(Sakura 2040, Japan)를 이용하여 5 µm 두께로 박절한 후 슬라이드를 제작하여 면역조직화학 염색을 실시하였다.

6) 면역조직화학염색

실험 종료 후에 해마에서 BDNF의 면역조직화학염색을 실시하였다. 먼저, 뇌 조직절편을 0.01M PBS로 여러 번 세척한 후 남아 있는 고정액 성분을 제거하기

Table 3. Comparison of Neurological Examination after 1st Day Ischemic Brain Injury (score)

Group	Day of examination		t
	Pre	1 st day	
Control	13.5±0.21	10.7±0.33	-3.125**
Experiment	13.2±0.37	10.1±0.17	-3.524**
t	-0.211	-0.382	

All values are showed mean±SD

** : Significance of the difference was assessed by Paired t-test(**: p<0.01)

Control : Saline medication after ischemic brain injury

Experiment : GDCB medication after ischemic brain injury

위하여 1% normal blocking serum sodium borohydride로 1시간 처리하였다. 면역조직화학염색을 위한 전처리과정으로 0.3%의 과산화수소(hydrogen peroxide) 용액에 20분간 처리하였다. 다시 0.01M PBS로 여러 번 세척한 후 Novostain Super ABC Kit(Novocastra Lab., Benton Lane, UK)를 사용하여 20분간 반응시키고 1:500으로 희석한 anti-BDNF (AB1513, Chemicon, USA)로 4℃에서 24시간 처리한 후 0.01M PBS로 수세하고, 희석된 이차항체액으로 30분간 배양하였다. 다시 PBS로 세척하고 Novostain Super ABC Reagent로 30분간 배양하고 PBS로 세척하였다. 발색을 위해 DAB(BUF021B, Serotec Ltd, U.)에 10분간 적용 후 Mayer's Hematoxyline(MHS-32, Sigma, USA)으로 대조염색을 실시하였으며, 흐르는 물에 5분간 수세하고 슬라이드 표본을 건조시킨 후 통상의 탈수과정을 거쳐 봉입하였다. 봉입한 조직을 광학현미경(BX50, Olympus Optical Co., Japan)과 현미경에 장착된 CCD 카메라(Foculus, Germany)로 촬영 후 해마영역에서의 BDNF 발현정도를 반정량적 방법으로 평가하였다.

3. 통계처리

본 연구의 통계학적 분석은 SPSS 12.0 ver. for windows®을 사용하였다. 각 군의 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었고, 허혈성 뇌손상 유발 확인 검정은 전, 후의 차이 비교를 위하여 대응표본 t-검정을 하였고, 군간 차이를 알아보기 위하여 독립 표본 t-검정을 하였다. 각 실험군내의 시간 경과에 따른 차이를 비교하기 위해 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였고, 사후분석은 Tukey's multiple range test를 실시하였다. 분석 시 유의수준을 α=0.05로 설정하여 검정하였다.

III. 실험 결과

1. 허혈성 뇌손상 유발 확인

1) 신경학적 검사

허혈성 뇌손상 유발 24시간 후 신경학적 검사를 실시한 결과, 대조군 및 실험군은 13.5±0.21점에서 10.7±0.33점, 13.2±0.37점에서 10.1±0.17점으로 각각 유의한 차이를 보여(p<0.01) 뇌 손상 후 신경학적 문제가 발생함을 확인할 수 있었으며, 유발 전·후의 군간 차이를 알아보기 위하여 각 군별 독립표본 t-검정을 실시한 결과 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 3).

2) 뇌 조직의 육안적 손상 확인

국소 허혈성 뇌손상 유발 확인을 위해 TTC 염색을 실시한 후 이를 관찰해 본 결과 정상군과 비교 시 뇌졸중을 유발한 실험군의 신경세포에서 총경동맥 중 내경동맥에서 분지되는 중대뇌동맥에 혈액을 공급하는 곳을 중심으로 백색으로 붉게 염색되지 않아 뇌손상이 발생하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

2. 공간학습 및 기억력 검사

허혈성 뇌손상 유발 후 GDCB의 공간학습 및 기억력 평가를 위해 Morris 수중미로검사를 실시한 결과 유

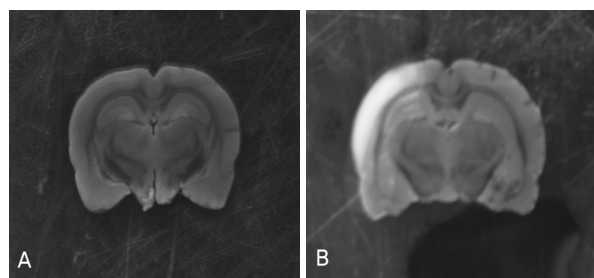


Fig. 1. Histological changes after 1st day of focal ischemic brain injury (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride monohydrate, TTC staining, A : Normal B : Stroke induced)

Table 4. Effect of GDCB Medication on the Morris Water Maze Test (sec)

Groups	Days			
	Pre	1 st day	7 th day ^{###}	14 th day ^{###}
Normal	65.73±4.88	55.93±5.50	42.67±5.00 ^{†††}	29.47±4.42 ^{†††}
Control	67.13±4.31	57.73±4.57	51.07±4.70	43.00±5.60
Experiment	66.07±5.52	54.40±4.31	47.40±4.45	36.60±4.87 ^{††}

Values are showed mean ± SD.

: Significance of the difference was assessed by One-way ANOVA(###: p<0.001)

†† : Statistically significance compared with control group (††: p<0.01)

††† : Statistically significance compared with control group (†††: p<0.001).

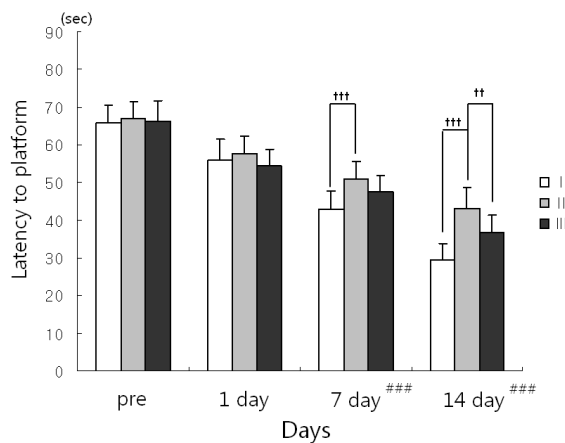


Fig. 2. Effect of GDCB medication on the morris water maze test

Values are showed mean ± SD.

I : Normal

II : Saline medication after ischemic brain injury(Control)

III : GDCB medication ischemic brain injury(Experiment)

: Significance of the difference was assessed by One-way ANOVA(###: p<0.001)

†† : Statistically significance compared with group II(††: p<0.01)

††† : Statistically significance compared with group II(†††: p<0.001).

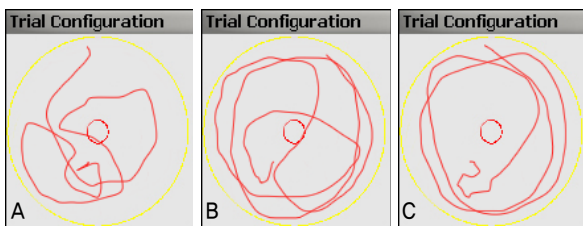


Fig. 3. Effect of GDCB medication on the morris water maze test on 7th days (A : Normal, B : Control, C : Experiment)

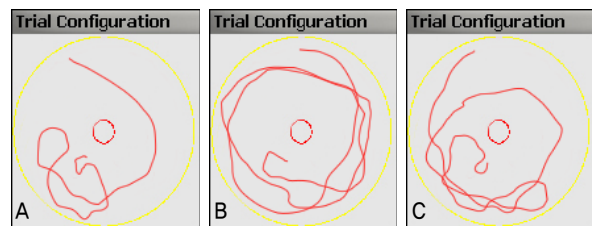


Fig. 4. Effect of GDCB medication on the morris water maze test on 14th days (A : Normal, B : Control, C : Experiment)

발 7일 후에 대조군의 51.07±4.70초와 비교 시 정상군은 42.67±5.00초, 실험군은 47.40±4.45초로 각각 통계학적으로 유의한 차이를 보였고 (p<0.001), 유발 14일 후에서도 대조군의 43.00±5.60초와 비교하면 정상군은 29.47±4.42초, 실험군은 36.60±4.87초로 각각 통계학적으로 현저한 차이를 보였다 (p<0.001)(Table 4, Fig. 2, 3, 4).

3. 조직학적 평가

허혈성 뇌손상 후 GDCB이 공간학습 및 기억력에 미치는 효과를 알아보기 위해 해마부위에서 BDNF의 면역조직화학법을 적용하여 조직학적 소견을 비교 관찰한 결과, 뇌손상 유발 7일째에서는 대조군에서 ± 반응을 보였으나 실험군에서 이보다 증가된 + 반응을 보였으며, 유발 14일째에는 대조군에서는 7일째에 비해 다소 증가된 ++ 반응을 보인 반면, 실험군은 현저히

Table 5. Change of BDNF Immunoreactivity on GCDB in Hippocampus within Each Groups

Time (day)	Group	
	Control	Experiment
7 th day	±	++
14 th day	+	+++

± : Slight, + : Mild, ++ : Moderate, +++ : Severe
 Control : Saline medication after ischemic brain injury
 Experiment : GDCB medication after ischemic brain injury

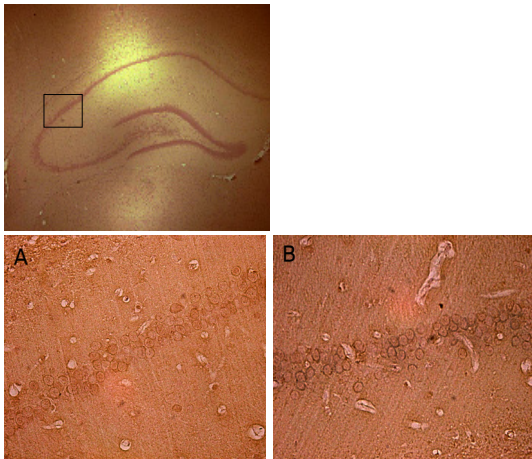


Fig. 5. Immunoreactivity with the BDNF Antibody in hippocampus of rats at 7th days (immunohistochemical stain, X400, A : Control, B : Experiment)

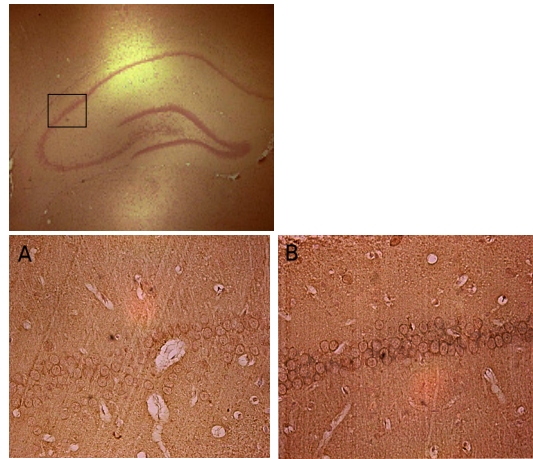


Fig. 6. Immunoreactivity with the BDNF Antibody in hippocampus of rats at 14th days (immunohistochemical stain, X400, A : Control, B : Experiment)

증가된 +++ 반응을 보였다(Table 5, Fig. 5, 6).

IV. 고찰

개체가 환경에 대한 정보를 습득하여 이를 토대로 주변 환경의 변화에 적응하여 행동하는 과정을 학습이라 하고, 학습의 결과로 습득한 지식을 저장하였다가 필요할 때 회상하는 과정을 기억이라고 한다¹⁾.

인간의 고차원적 기능을 담당하는 뇌는 항상 혈중 산소공급에 지대한 영향을 받고 뇌혈류의 지속성은 하부 뇌간의 조절 하에 유지되는데, 동물 실험에서 4~5분 이상 혈류가 멈춘 경우 뇌에 비가역적인 손상이 오게 된다¹⁴⁾. 특히 해마가 손상된 백서들은 방사성 미로, Morris 수중미로와 같은 공간 기억과제를 학습하는 능력에서 장애를 보였다¹⁵⁾. 해마는 학습과 기억의 형성과정에 기여하는 중요한 뇌영역으로, 신경의 발생기뿐만 아니라 성장 이후에도 신경세포가 지속적으로 생성되는 특징을 가지고 있다³⁾. 따라서 출생 후의 신경세포 생성율은 해마 기능과 밀접한 연관성을 가지고 있어 신경세포 생성의 감소는 인지기능의 손상을 수반하는 반면에, 신경세포 생성의 증가는 학습 및 기억 능력을

향상시킨다⁴⁾.

뇌손상 후 신경화학적 변화는 세포사(cell death) 반응뿐만 아니라 내인성 신경보호반응도 함께 일어나 신경보호효과가 나타나는데, 이 때 중요한 역할을 하는 것이 신경영양인자(neurotrophin)이며, 회복 과정에서 신경 연결부 가소성(synaptic plasticity)을 유도한다⁵⁻⁶⁾. 이러한 신경영양인자에는 NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6가 확인되었으며 이들 중 두 번째로 발견된 BDNF는 돼지의 뇌에서 처음 추출되었고 12.3 KDa의 분자량과 120개의 아미노산 단백질로 구성된 물질이다¹⁶⁾. BDNF는 해마, 편도체, 시상, 후각계 투사영역, 신피질의 피라미드층, 소뇌 등 광범위한 중추 신경 조직 내에서 발견되며¹⁷⁾ BDNF의 수용체인 TrkB와 결합하여 신경의 손상을 방지하고, 축삭의 성장을 유도해 최종적으로 기능적 회복을 돕는 역할을 담당하는 것으로 확인되었다¹⁸⁾. 또한 다양한 학습과정에서 기억의 형성¹⁹⁾과 형성된 기억을 장기기억으로 전환해 유지하는데 필수적이다²⁰⁾. 해마에서의 BDNF 발현증가는 신경세포의 생성과 생존을 향상시켰고²¹⁾ 해마에서 신경세포증식이 세포 사멸을 보상받지 못해 유발되는 알츠하이머형 치매 환자의 경우에는 해마 BDNF 단백질이

70%까지 감소하였음이 관찰되었다²²⁾.

한의학에서는 기억을 인지 과정인 神의 일부로 인식하였으며 健忘을 心藏神, 脾舍意主思, 腎藏精主志의 생리기능을 바탕으로 心, 脾, 腎과 관련되어 있다고 보았다⁸⁾. 健忘의 원인으로는 心脾虛損, 心腎不交, 精竭神衰, 痰瘀痺阻가 있다⁹⁾. 腎은 精을 藏하고, 精은 髓를 生하여²³⁾ 髓之海인 腦와 통하게 되어²⁴⁾ 腎精이 充足한 경우 사물을 잊지 않고 기억할 수 있으나 腎精이 不足할 경우 기억력이 감퇴된다. <靈樞·本神篇>에서도 “腎盛怒而不止則傷志, 志傷則善忘其前言”이라 하여 뇌의 기능은 腎臟과 밀접하게 관련되어 있음을 알 수 있다²⁵⁾. 또한 神明之府인 腦의 대사기능을 촉진하는 血의 생성과 순환을 心과 脾가 주관하므로 心脾兩虛의 경우 腦를 영양하지 못하여 腦神이 조화를 잃게 되어 健忘이 발생한다.

孔子大聖枕中方은 萬病回春¹⁰⁾에 기재된 것을 東醫寶鑑¹¹⁾에서 인용한 처방으로 龜甲, 龍骨, 遠志, 石菖蒲 네 가지 약물을 가루 내어 술에 타서 복용하면 총명을 되찾는다 하였다. 본 실험에서는 龜甲을 구하기 힘들어 東醫寶鑑의 처방대로 龜甲 대신에 龜板을 쓰고 遠志는 薑製하여 약물을 구성하였다. 健忘의 치료 효과에 대해 임상과 실험에서 입증된 聰明湯의 구성약물인 遠志와 石菖蒲는 각각 寧心安神, 祛痰開竅, 消散癰腫하는 효능과 化痰開竅, 化濕行氣, 醒神健腦, 和中開胃하는 효능을 가지고 있다²⁵⁾. 龜板은 滋陰潛陽, 益腎健骨, 養血補心하는 효능을 가지고 있어 달여서 복용하면 益氣資智하고 식욕을 증진시키며 腎陰不足과 陰虛陽亢으로 인한 증상을 치료하고, 龍骨은 平肝潛陽, 鎮驚安神, 斂汗固精止血하는 효능이 있어 驚癇癲狂, 怔忡健忘, 失眠多夢, 自汗盜汗, 遺精淋濁, 子宮출혈 등을 치료한다²⁵⁻⁶⁾. 遠志에 대한 실험적 연구로는 뇌성상세포에 작용하여 염증을 일으키는 주요한 세포활성물질의 생성을 억제²⁷⁾, 이노효과 및 중추억제작용²⁸⁾, 神經細胞死의 보호 효과²⁹⁾가 있는 것으로 알려졌고, 石菖蒲에 대한 실험적 연구로는 혈중 콜레스테롤의 수치 감소³⁰⁾, 국소 뇌혈류량 증가³¹⁾, 경련 억제 효과³²⁾, 면역 조절 및 항암효과³³⁾가 보고된 바 있다. 즉, 孔子大聖枕中方은 健忘의 원인이 되는 痰飲을 없애면서 安神시키는 遠志, 石菖蒲에 骨髓를 生하는 腎精을 補하고 潛陽하는 龜板, 汗精血의 陰을 수렴하며 鎮驚安神하는 용골이 더해져 陰虛로 인해 발생하는 학습 및 기억의 저하를 치료할 수 있을 것으로 생각된다.

이에 저자는 GDCB의 허혈성 뇌손상에 따른 기억과

학습능력 저하에 대한 개선효과를 입증하고자 Morris 수중미로를 사용하여 인지적 및 신경학적 운동행동평가를 시행하였고, 조직화학적 방법을 이용하여 손상된 해마 부위에서 BDNF의 발현 양상을 관찰하였다.

먼저 허혈성 뇌손상 여부를 파악하기 위하여 허혈성 뇌손상 유발 24시간 후 신경학적 검사를 실시한 결과, 대조군 및 실험군은 13.5±0.21점에서 10.7±0.33점, 13.2±0.37점에서 10.1±0.17점으로 각각 유의한 차이를 보여 실험에 적합함을 알 수 있었다. 또한 뇌 조직의 육안적 손상 확인을 위해 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 염색을 실시하였다. TTC 염색은 육안적 조직 손상 정도를 빠르게 평가할 수 있는 장점이 있으며, 정상 세포에서는 미토콘드리아 내의 탈수소효소와 반응하여 붉게 보이거나 뇌허혈에서는 탈수소효소가 소실되어 염색이 되지 않아 백색으로 보여 비가역적 손상 여부를 알 수 있는 지표로 널리 사용된다³⁴⁻⁵⁾. TTC 염색 소견으로는 정상군과 비교 시 뇌졸중을 유발한 실험군의 신경세포에서 총경동맥 중 내경동맥에서 분지되는 중대뇌동맥에 혈액을 공급하는 곳을 중심으로 백색으로 붉게 염색되지 않아 뇌손상이 발생하였음을 확인할 수 있었다.

이번 연구에 사용한 허혈성 뇌손상 백서는 일시적으로 뇌에 들어가는 혈관을 차단한 후 재관류시킨 것으로, 주로 해마부분 신경세포의 손상을 입게 되어 인지 및 학습 장애가 일어난다³⁶⁻⁷⁾.

Morris 수중미로는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 동물이 주변에 있는 여러 단서들을 사용하고 기억하는 능력, 즉 공간기억(spatial memory)을 측정하는 실험이다³⁸⁾. 이는 어떤 동물도 쉽고 빠르게 학습하도록 하며 공간 이외의 단서를 통제할 수 있다는 이점이 있다. 본 연구에서는 공간학습능력이 매우 좋다고 밝혀진³⁹⁾ 백서들을 물로 채운 수조 내에서 숨겨진 도피대(escape platform) 찾기를 훈련한 다음 자신의 위치를 학습하게 하여 매번 도피대까지 도달하는 시간을 측정하였다.

허혈성 뇌손상 유발 후 GDCB의 공간학습 및 기억력 평가를 위해 수중미로검사를 실시한 결과의 분석은 측정시기에 따른 각 군의 도피대 도달 시간을 비교하기 위하여 one-way ANOVA를 실시한 결과 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(7일, 14일; p<0.001). 사후검정을 통한 측정시간별 비교에서는 유발 7일 후에 대조군의 51.07±4.70초와 비교 시 정상군은 42.67±5.00초, 실험군은 47.40±4.45초로 각각 통계학적으로 유의한 차이를 보였고 (p<.001), 유발 14일 후에서도 대조군의

43.00±5.60초와 비교해 정상군은 29.47±4.42초, 실험군은 36.60±4.87초로 각각 통계학적으로 현저한 차이를 보여(p<0.001) GDCB 투여가 공간 기억 및 학습수행 능력에 대해 개선 효과를 나타냈다고 생각된다.

뇌손상 후 일어나는 내인성 신경보호에는 신경연접의 강화를 비롯한 신경연접부 가소성(synaptic plasticity)이 포함되는데, 이 때 신경영양인자의 활성이 중요한 역할을 하게 된다^{5,6)}.

GDCB 투여가 공간학습 및 기억력에 미치는 효과를 알아보기 위해 허혈성 뇌손상 유발 7일과 14일 후에 해마에서 신경영양인자 중 하나인 BDNF의 면역조직화학법을 적용하여 조직학적 소견을 비교 관찰한 결과 유발 7일째에서 대조군에서 ± 반응을 보였으나 실험군에서는 이보다 증가된 + 반응을 보였으며, 유발 14일째에 대조군에서는 ++ 반응을 보인 반면, 실험군은 현저히 증가된 +++ 반응을 보였으며 이는 GDCB의 투여가 해마에서 신경영양인자인 BDNF의 활성화에 영향을 준 것으로 생각된다.

이상의 실험결과로 보아 허혈성 뇌손상 백서에서 GDCB의 투여가 공간 학습 능력 및 기억력 손상을 개선하는데 기여하였으며, 학습 및 기억의 인지능력과 관련된 해마의 신경영양인자 활성화에 효과가 있는 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구는 허혈성 뇌손상에 따른 기억과 학습능력 저하에 대한 孔子大聖枕中方(GDCB)의 효과를 알아보고자 Morris 수중미로를 사용하여 인지적 및 신경학적 운동행동을 평가하였고, 조직화학기법을 이용하여 뇌허혈로 손상된 해마 부위에서 BDNF의 발현 양상을 관찰해 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Morris 수중미로에서 각 군의 도피대 도달 시간을 비교한 결과 허혈성 뇌손상 유발 후 대조군에 비해 孔子大聖枕中方을 투여한 실험군은 7일째와 14일째에 유의한 차이를 보였다.
2. 면역조직화학적 기법을 통한 해마 부위에서 BDNF의 발현은 대조군에 비해 孔子大聖枕中方을 투여한 실험군에서 7일째에서부터 14일째까지 면역 반

응이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

이상에서 孔子大聖枕中方의 투여가 허혈성 뇌손상 이후 학습 및 기억의 인지능력 개선에 기여한 것으로 생각되며, 향후 이에 대한 지속적인 연구가 이루어진다면 임상에서 학습능력저하와 같은 인지 장애에 광범위하게 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

VI. 參考文獻

- 1) 박찬웅. 뇌, 학습과 기억의 구조. 서울:서울대학교 출판부. 1998:1-5.
- 2) 장동환 외 2인. 심리학 입문. 서울:박영사. 1991:214, 267,272,313.
- 3) Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 1998;4:1313-7.
- 4) Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature.* 2001;410:372-6.
- 5) Connor B, Dragunow M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Reviews.* 1998;27(1):1-39.
- 6) Levine E, Dreyfus C, Black I. Differential effects of NGF and BDNF on voltage-gated calcium currents in embryonic based forebrain neurons. *J. Neurosci.* 1995;15:3084-91.
- 7) Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, and Nabeshima T. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J. Neurosci.* 2000;20:7116-21.
- 8) 류영수, 최공환. 기억장애에 관한 동서의학적 비교 연구. *동의신경정신과학회지.* 1996;7(1):155-66.
- 9) 대한한방신경정신과학회. *한방신경정신의학.* 파주:집문당. 2005:233-8.
- 10) 陳柱杓. 對譯萬病回春. 서울:법인문화사. 2007:519.
- 11) 許浚. 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 2005:335-9.
- 12) Longa EZ, Weinstein PR, Carison S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20(1):84-91.
- 13) Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to

- middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*. 1995;26:627-34.
- 14) Raymond DA, Maurice Victor, Allan HR. 아담스 신경과학. 서울:정담. 1998:715-22.
- 15) 정봉교, 윤병수, 박순권. 흰쥐의 내측중경핵 손상이 Morris 수중미로과제의 학습에 미치는 효과. 한국심리학회지. 1993;5:29-44.
- 16) Barde Y, Edgar D, Theonen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1(5):549-53.
- 17) Connor B, Dragunow M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Reviews*. 1998;27(1):1-39.
- 18) 김식현, 남기원. 신경영양성 인자와 역할. 대한물리치료학회지. 1999;11(2):131-7.
- 19) Lee JL, Everitt BJ, and Thomas KL. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*. 2004;304:839-43.
- 20) Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JL, Goldin A, Izquierdo I and Medina JH. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2008;105:2711-6.
- 21) Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castren M and Castren E. Brain-derived neurotrophic factor and anti-depressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci*. 2005;25:1089-94.
- 22) Murray KD, Gall CM, Jones EG, and Isackson PJ. Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase messenger RHA expression in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 1994;60:37-48.
- 23) 馬元臺, 張隱庵. 黃帝內經素問靈樞合編. 台聯:國風出版社. 1986:素問-532, 靈樞-57,58,464.
- 24) 이시진. 본초강목. 중의약출판사. 1998:825.
- 25) 韓醫科大學 本草學 編輯委員會. 本草學. 서울:永林社. 2004:530-1, 535-6, 565-6, 662-3.
- 26) 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균의 역. 中藥大辭典. 서울:鼎談. 2001:519-22, 2306-12, 3168-72, 3305-10.
- 27) 황시영, 강형원, 류영수. 원지에 대한 뇌 성장세포로부터 염증성 세포활성물질 분비의 억제 효과에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):95-108.
- 28) 박대규, 이완하. 원지 Saponin의 이노효과 및 증추억제 작용에 관한 연구. 생약학회지. 1983;14(4):178-92.
- 29) 이영종, 성낙술, 이수배. 원지가 NMDA로 유발된 신경세포 손상에 미치는 효과. 대한분초학회지. 2005;20(2):115-25.
- 30) 강선태, 이태호. 어혈병태모형에 미치는 천궁, 석창포 및 반하의 효능에 관한 실험적 연구. 동의병리학회지. 1989;4:57-73.
- 31) 정현우, 강성용, 백승화. 석창포가 혈압 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향. 대한분초학회지. 1999;14(2):81-8.
- 32) 박경수. 석창포 정유 향기의 흡입이 백서의 경련억제에 미치는 영향. 동국대학교대학원 학위논문. 2001:1-47.
- 33) 오찬호, 이창현. 석창포의 면역조절 및 항암효과. 동의생리병리학회지. 2007;21(4):869-73.
- 34) Aronowski J, Ostrow P, Samways E, Strong R, Zivin JA & Grotta JC. Graded bioassay for demonstration of brain rescue from experimental acute ischemia in rats. *Stroke*. 1994;25(11):2235-40.
- 35) Goldlust EJ, Paczynski PP, He YY, Hsu CY & Goldberg MP. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. *Stroke*. 1996;27(9):1657-62.
- 36) Buchan AM, Pulsineli 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.
- 37) Gill R, Foster A, Woodruff G. MK-801 is neuroprotective in gerbils when administered during the post-ischemic period. *Neuroscience*. 1988;25:847-55.
- 38) Yamazaki M, Matsuoka N, Kuratani K, Ohkubo Y, Yamaguchi I. FR121196, a potential antidementia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. *J. Pharmacol Exp Ther*. 1995;272(1):256-63.
- 39) 정봉교, 윤병수, 박순권. 흰쥐의 내측중경핵 손상이 Morris 수중미로과제의 학습에 미치는 효과. 한국심리학회지. 1993;5:29-44.