

ADHD 동물모델에서 가감청심연자탕의 효과에 관한 실험연구

오영제, 류천봉, 김만기, 홍민호, 김근우, 구병수

동국대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실

An Experimental Study on the Effect of Chengsimyeonjatang-gagam Extracts on the ADHD Animal Model

Young-je Oh, Quan Feng Liu, Man-gi Kim, Min-ho Hong, Geun-woo Kim, Byung-soo Koo

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Received: August 31, 2020
Revised: September 20, 2020
Accepted: September 22, 2020

Correspondence to
Byung-soo Koo
Department of Oriental
Neuropsychiatry, Dongguk University
Ilsan Medical Center, 27 Dongguk-ro,
Ilsandong-gu, Goyang, Korea.
Tel: +82-31-961-9140
Fax: +82-31-961-9009
E-mail: koobs1009@gmail.com

Acknowledgement
This research was supported by Basic
Science Research Program through
the National Research Foundation of
Korea (NRF) funded by the Ministry of
Science, ICT & Future Planning
[2019R1F1A1060821(B.S.K.)].

Objectives: The purpose of this study was to experimentally assess the effects of Chengsimyeonjatang-gagam extracts in the animal model regarding ADHD related symptoms and indicators.

Methods: The experimental group was classified into the normal group (WKY rat) in 7, the control group (SHR rat) in 7, the low-concentration group of herbal medicines (SHR rat) in 7, and the high-concentration group of herbal medicines (SHR rat) in 7 by random sampling. The open field test was conducted three times on the 7th, 14th, and 21st days during the oral medication. After that, Y-maze test, intestinal permeability verification (L/M ratio), and Western blotting (CDK expression in the cerebral cortex) were performed in sequence.

Results: The Chengsimyeonjatang-gagam extracts reduced the activity distance in the SHR rat at 21 days in the low and high concentration groups by the open field test. It also reduced the cross-action rate in the low and high concentration groups by the Y-maze test. And the low concentration group showed 52.3% decrease in the L/M ratio compared to the SHR group. Finally, the CDK5 protein significantly increased in the low and high concentration groups.

Conclusions: This study suggests that the Chengsimyeonjatang-gagam extracts have potential to be used for the treatment of ADHD.

Key Words: Herbal medicine, ADHD, Chengsimyeonjatang, Chengsimyeonjatang-gagam, L/M ratio, CDK5.

I. 서론

주의력결핍/과잉행동장애(Attention deficit/hyperactivity disorder, 이하 ADHD)는 소아기에 나타날 수 있는 가장 흔한 정신 질환 중 하나이다. 기능이나 발달을 저해하는 지속적인 부주의 또는 과잉행동-충동성이 있을 때 진단되며, 미국의 정신질환의 진단 및 통계 편람(DSM-5)에 따라 부주의 우세형, 과잉행동/충동 우세형, 복합형으로 구분할 수 있다¹⁾. ADHD 환자에서 흔히 나타날 수 있는 동반 증상으로 우울, 불안 등이 보고된 바 있다²⁾.

ADHD의 전체 유병률은 아동은 약 5%, 성인은 약 2.5%이며 연령별로는 남아가 여아에 비해 2배 정도 높다³⁾. 소아 ADHD로 진단받은 환자 중 25%가 성인이 되어서도 지속되는 특징을 갖으며⁴⁾, 최근에는 성인에서도 발병이 증가하는 추세이다⁵⁾.

한편 현재 양방에서 ADHD 치료에 가장 많이 쓰이는 약물은 중추 신경 흥분제인 메틸페니데이트(Methylphenidate)이다⁶⁾. 이러한 정신자극제(simulant) 계열 약물은 성장기 어린이에게 중요한 식욕 저하, 불면증 및 돌연사 등의 부작용을 일으킬 수 있다⁷⁾. 최근엔 이러한 부작용들로 인해 비흥분제인 아토목세틴(Atomoxetine) 등도 쓰이고 있으나 아직 효과가 흥분제 계열에는 미치지 못한다⁸⁾. 따라서 기존 치료제의 부작용이나 약물 남용을 보완할 수 있는 한약 개발이 새로운 대안이 될 수 있다.

또한 ADHD의 원인에 관해서 명확히 밝혀진 바는 없지만 신경학적 원인을 주 요인으로 파악하며, 이외에 환경적인 요소들도 영향을 미친다고 알려져 있다⁹⁾. ADHD는 발병 기전이 다양하기 때문에 단일 표적이 아닌 복합치료제로서의 한약 발굴이 의미 있을 수 있다.

한의학에서는 ADHD와 일대일로 대응하는 개념은 없지

만, 임상 증상으로 미루어 건망(健忘), 조동(躁動), 실총(失聰) 등으로 이해할 수 있다⁴⁾. ADHD에서 전통 의학 활용에 대한 국내외 기존 연구로는 ADHD에 빈용 되는 한약재 분석¹⁰⁾, 기존 양방 치료제와의 효능 비교¹¹⁾, 양방 치료제와 병용 투여시의 치료 효과 증대에 관한 연구¹²⁾ 등이 있다. 복합한약재의 약리 기전을 규명하기 위한 실험연구는 일부 시행되고 있으나¹³⁾ 저조한 편이다.

본 연구에서는 불안에 빈용되는 사상방인 청심연자탕을 바탕으로 한 가감청심연자탕(원지, 패모, 상백피, 유근피, 감국, 천마, 산약)으로 ADHD 쥐(rat) 동물모델을 이용하여 그 작용기전을 규명하고자 했다. 이를 위해 오픈 필드 실험(Open-field test), Y-미로 시험(Y-Maze test), 락툴로스/만니톨 비율(lactulose/mannitol ratio, 이하 L/M ratio) 측정, 대뇌 피질의 사이클론 의존성 키나아제(Cyclin-Dependent Kinase, 이하 CDK-5) 발현 측정을 시행하였고, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 대상 및 방법

1. 한약 추출물의 제조

본 연구에 사용한 가감청심연자탕 추출물의 구성은 원지, 패모, 상백피, 유근피, 감국, 천마, 산약이다(Table 1). 추출물은 약재 100 g을 세말해서 30% 에탄올 1 L에 넣었고, 이후 실온에서 30분간 두었다. 다음으로 100°C에서 100분간 초탕한 후 30% 에탄올 300 ml에 추가하였고, 60분 재탕하여 추출액을 50 μm에서 여과했다. 마지막으로 여액을 -60°C 이하에서 감압 농축하였고, 이후 건조하여 취득한 건조엑스(평균 수득률 7.6%)를 사용하였다.

Table 1. Composition of Chengsimyeonjatang-Gagam Extracts

Scientific name	Herbs	歸經	氣味	用度
<i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow	遠志	肺, 心經	苦, 辛, 微溫	安神, 益智, 祛痰, 解鬱
<i>Fritillaria thunbergii</i> Miquel	貝母	肺, 心經	苦, 甘, 微寒	解熱潤肺, 散結消腫
<i>Morus alba</i> Linne	桑白皮	肺, 肝經	甘, 寒	行水消腫, 利尿, 消痰
<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> (Rehder) Nakai	榆根皮	脾, 胃, 肺, 大腸經	甘, 微寒	利水通淋, 祛痰, 消腫解毒
<i>Dendranthema indicum</i> Linne	甘菊	肝, 心經	甘, 苦, 微寒	疏散風熱, 明目, 平肝陽
<i>Gastrodia elata</i> Blume	天麻	肝經	甘, 辛, 溫, 燥	息風止痉, 平抑肝陽, 祛風通絡
<i>Dioscorea batata</i> Decaisne	山藥	脾, 肝, 腎經	甘, 溫	補脾胃, 益肺腎, 滋養

2. 실험동물 및 약물처리

본 실험에 앞서 동물 IRB 승인을 받았다(승인 번호: IACUC-2016-034-1). 실험에서는 6주령된 Wistar-Kyoto 계통의 수컷 정상 혈압쥐(Wistar Kyoto rat, 이하 WKY) 7마리와 일과성 고혈압쥐(Spontaneously Hypertensive rat, 이하 SHR) 21마리를 사용하였다. 실험군인 spontaneously hypertensive rat (SHR rat)은 ADHD의 특징들을 잘 보여 주어 ADHD 동물 모델로 가장 많이 사용된다. 실험 동물은 무작위 표본추출로 대조군(WKY-control group, n=7), ADHD군(SHR-control group, n=7), ADHD-한약재 저농도군(SHR and 한약재 저농도 group, n=7), ADHD-한약재 고농도군(SHR and 한약재 고농도 group, n=7)으로 분류하였다. 실험동물은 전 실험 기간 동안 고품 사료 및 물을 자유로이 섭취하였고, 온도는 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 60%로 유지하며 밤낮 주기(12시간 light, 12시간 dark)가 조절되는 실험실 내 환경에서 사육했다. 실험 전 동물들로 하여금 1주일의 적응기를 거치게 했고, 한약재 및 메틸페니데이트(methylphenidate)의 투여는 전 실험 기간 동안 각각의 약물 권장 기준량을 1일 1회 경구로 투여(oral feeding)했다.

3. 행동실험

1) 오픈 필드 실험(Open field test)

사각형 모양의 개방된 상자($75 \times 75 \times 25$ cm)를 제작하고, 상자 내부를 총 25개의 정사각형 구획으로 나누어 주변부와 중심부로 구분하였다. 실험 시작 1분 전 마우스를 미리 상자에 넣어 적응시킨 후, 10분 동안 상자에서 보이는 행동을 확인하였다. 마우스의 행동을 중심부에서의 활동과 주변부에서의 활동으로 구분하여 측정하고, 상자 위의 천장에 설치된 장비인 비디오 레코더(video recorder), 추적 장치(tracking device)로 녹화하여 분석하였다.

2) Y-미로 실험(Y-maze test)

Y자 모양의 미로는 3개의 가지로, 각 가지의 길이, 넓이, 높이는 50 cm, 10 cm, 25 cm이며 가지의 각도는 120도로 이루어져 있고, 세 군데의 가지를 1, 2, 3으로 정해서 모든 실험군은 동일하게 가운데 부분에서 시작하도록 조심스럽게 놓고 8분 동안 이동하는 것을 측정하였다. 실험동물이

이동하는 위치를 기록하고 연속적인 움직임을 관찰하였다. 1, 2, 3 또는 2, 3, 1 또는 3, 1, 2와 같이 연속적으로 1, 2, 3에 한 번씩 들어간 경우에만 한하여(1, 1, 2 나 2, 2, 1 또는 3, 3, 3 같은 경우 등은 제외) 1점의 점수를 주고 그 행동이 변경되는 계산은 다음과 같이 공식을 통해 확인하였다.

$$\text{Spontaneous alternation (\%)} = \frac{\text{actual alternation}}{\text{maximum alternation}} \times 100$$

*maximum alternation: total entrance number-2

4. 장 투과성 검증

실험이 종료된 후 흰쥐를 대사 케이지(metabolic cage)로 옮긴 다음, 물은 자유롭게 먹게 하되 12시간 동안 금식시켰다. 이후, 66 mg/ml의 락툴로스(lactulose)와 50 mg/ml의 만니톨(mannitol)을 포함한 1 ml의 수용성 시약을 각 흰쥐에게 관(intubation)으로 경구 투여하였고, 24시간 동안 금식하고 물은 허용한 후 소변을 채취하였다. 수집한 샘플은 분석하기 전까지 -70°C 에 저장해 두었다. 소변 내 락툴로스(lactulose)와 만니톨(mannitol)의 비율(ratio)은 Megazyme (Bray, Co. Wicklow, Ireland)의 K-Lactul과 K-Manol kit를 각각 이용해 측정하였다. 분석은 제작사의 지시에 따랐고, 소변 내 락툴로스(lactulose)와 만니톨(mannitol) 수준은 L/M 비율을 계산한 후 섭취량의 회복율로 간주하였다.

5. 웨스턴블롯팅(Western blotting)

뇌의 대뇌피질, 선조체, 해마, 흑질 등 부위에서 단백질들의 발현을 분석하기 위하여, 뇌 조직을 용해 완충액(lysisbuffer)으로 단백질을 추출한 후 원심 분리하여 상층액을 취하고, 상층액을 바이오레드(Bio-Rad) 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하여 $30 \mu\text{g}$ 의 단백질을 사용하였다. 추출된 단백질은 10%의 도네실 황산나트륨 폴리아크릴아미드겔(sodium dodecyl sulfate [SDS] polyarylamidegel)에 전기 영동시킨 후 니트로셀유소막(nitro cellulose membrane)으로 겔(gel)의 단백질을 블롯(blot)시켰다. 5% 스킨밀크(skimmilk)로 하루 밤 동안 블로킹(blocking)한 후 일차항체를 4°C 에서 밤샘(overnight)시킨 후 tris-buffered saline with 0.05% tween 20 (이하 TBST)로 10분 간격으로 3회 세척하고, 2차 항체를 1시간 30분 동안 상온에서 반

응시킨 후 다시 TBST로 10분 간격으로 4회 세척 후 화학 발광(chemiluminescence)으로 현상하였다.

6. 통계처리

모든 실험 자료는 평균값±표준오차(Mean±Standard Error)로 표시하였고, 실험 결과에 대한 통계학적 유의성은 Student's t-test로 검증하여 p값(p-value)이 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다 (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

III. 결과

1. ADHD 동물모델의 운동 활동의 거리와 움직임 시간 측정

생쥐는 새로운 환경에서 탐색행동을 하며 탐색행동의 지표는 보행활동이다. 실험은 약물 투여 동시 7일, 14일, 21일이 되는 날에 총 3회 측정했으며 측정시간은 1분간의 적응 시간을 주고 10분간 측정하였다. 그 결과 저농도 고농도 군이 3주차 때에 모두 유의성 있게 운동 활동 거리가 감소하는 것을 확인하였다(p<0.01, p<0.05, Fig. 1). 이는 ADHD에서 나타나는 과잉 행동과 유사한 행동 양식이 약물 복용 기간에 따라 억제된다고 볼 수 있다.

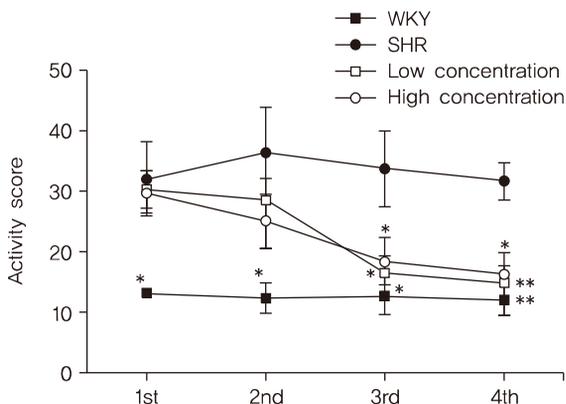


Fig. 1. Open-field test. Administration of Chengsimyeonjatang-gagam improved the ADHD impairment of SHR rat. Fig. 1 shows the distance the animal moved of open field test. The data are expressed as mean±SE (n=7, **p<0.01, *p<0.05 vs. SHR).

2. 공간 작업 기억(spatial working memory)에 대한 Y-미로 테스트(Y-maze test)

생쥐는 갔던 길로 다시 돌아가는 것보다 새로운 길을 찾는 습성이 있기 때문에 자발적인 Y-미로 검사는 새로운 환경을 탐색하려는 생쥐의 의지를 측정하는 행동 테스트이다. SHR 생쥐에서는 자발적인 Y-미로 교차율이 유의하게 감소되었고, 한약처방을 투여한 군에서는 교차 행동이 감소되는 현상을 유의하게 회복 시켰다(p<0.05, Fig. 2). 이는 ADHD에서 나타나는 기억력 저하와 유사한 인지 능력이 농도에 따라 유의성 있게 회복된다고 볼 수 있다.

3. 한약재 투여군이 ADHD 흰쥐 모델에서의 소변 내 락툴로스/만니톨(lactulose/mannitol, L/M) 비율에 미치는 영향

SHR군의 소변 내 L/M 비율은 WKY에 비해 53.6%로 증가하였으며, 저농도군은 SHR군 보다 L/M 비율이 52.3%로 감소하였고, 고농도군은 SHR군 보다 L/M 비율이 46.2%로 감소하였으므로, 저농도에서 조금 더 좋은 효능을 나타내었다(p<0.05, Fig. 3). 이는 본 추출물이 장 투과성에 대해 보호 효과를 가지며, 장-뇌 축에 근거해 ADHD를 포함한 정신 질환에 긍정적 반응임을 유추할 수 있다.

4. SHR 흰쥐 대뇌피질에서의 CDK5 단백질 변화

한약처방 저농도와 고농도군 모두에서 대뇌피질부위에서 대조군에 비교하여 CDK5 단백질이 유의성 있게(p<

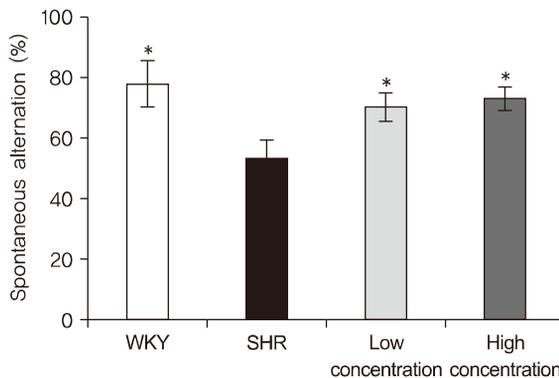


Fig. 2. Y-maze test. Administration of Chengsimyeonjatang-gagam improved the memory of ADHD rat model in the Y-maze test. The data are expressed as mean±SE (n=7, *p<0.05 vs. SHR).

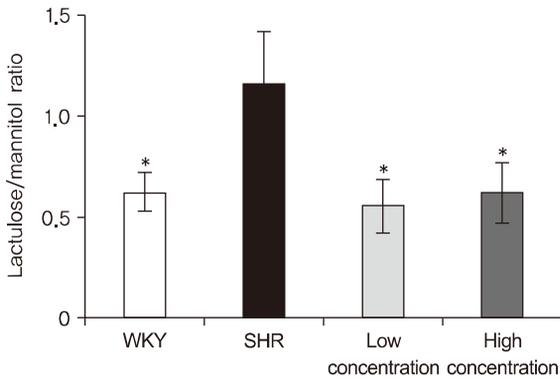


Fig. 3. Lactulose/mannitol ratio. The protective effects of Chengsimyeonjatang-gagam on the intestinal permeability in ADHD rat model and data are expressed as a ratio of lactulose to mannitol. The data are expressed as mean±SE (n=5, *p<0.05 vs. SHR).

0.05) 증가한 것을 확인하였다(p<0.01, Fig. 4). 이는 뇌 성숙 지연과 연관된 ADHD에서 뇌 발달 관련 수치를 증가시킴으로써 긍정적 반응이 작용함을 유추할 수 있다.

IV. 고찰

ADHD는 과잉행동, 충동성 및 주의력 결핍을 특징으로 하는 소아 정신과 다빈도 질환이다. 원인으로는 유전적 요인을 포함하여 뇌의 신경생물학적 요인이 결정적이라고 알려져 있다.

치료에는 약물 치료가 일반적으로 사용되며, 가장 흔히 사용되는 것은 중추 신경 흥분제인 메틸페니데이트(Methylphenidate)이다. 도파민 작용제로서 일차 치료제로 가장 흔하게 사용되며, ADHD 환자의 70~85%에서 효과를 보인다고 알려져 있다¹²⁾. 하지만 식욕 감퇴, 수면 장애, 기분 장애, 소화기계 통증, 두통 등이 유발될 수 있으며¹⁴⁾, 장기간 복용 시 성장 억제를 유발할 수 있다¹⁵⁾.

이런 부작용은 성장기 어린이들에게 특히 부정적 영향을 줄 수 있기 때문에 아토목세틴(Atomoxetine)과 같은 비중추 신경 흥분제도 사용된다. 아토목세틴은 강력한 노르에피네프린 재흡수 차단제로, 약물 남용의 가능성이 정신흥분제인 메틸페니데이트에 비해 유의성 있게 낮은 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 하지만 약물 남용 가능성을 완전히 배제할 만큼의 많은 연구가 진행되지 않았으며, 기존 연구에 따르면 ADHD 핵심 증상 경감의 효과가 메틸페니데이트에 비해 적은 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 따라서 이러한 기존 약물 치료의 문제점

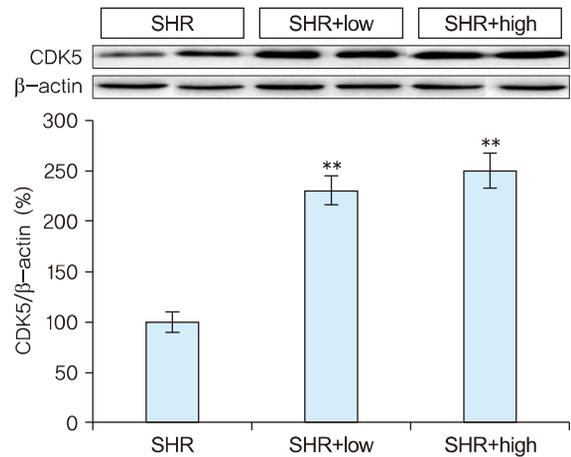


Fig. 4. CDK5 Expression in the cerebral cortex. Chengsimyeonjatang-gagam increased the CDK5 protein levels of ADHD model in the cerebral cortex. The data are expressed as mean±SE (n=3, **p<0.01 vs. SHR).

을 보완할 한약제제의 개발이 필요할 것으로 보인다.

한의학, 중의학에서도 ADHD 치료에 대해 지속적으로 연구가 시행되고 있는데, 중의학에서는 중의우세병종 중 하나로 채택되었으며 전통 의학의 전체적이고 통합적인 접근이 ADHD 치료의 또 하나의 전략으로 각광받고 있다¹⁸⁾.

한의학에서 시행한 ADHD 관련 기존 연구에 따르면 ADHD 치료에 다빈도로 활용되는 한약재로 석창포, 원지, 숙지황 등이 있으며¹⁰⁾, 단기간(6주) 무작위 임상시험에서 샤프란과 메틸페니데이트의 효능, 이상반응에 큰차이가 없으며¹¹⁾, 한약과 메틸페니데이트를 같이 사용하면 ADHD 치료 효과가 증대된다고 한다¹²⁾. 하지만 아직까지 한방제제를 이용한 ADHD 병증 치료제 개발에 대한 실험 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 ADHD 증상 개선을 위한 한약으로 가감청심연자탕을 선정해 ADHD 동물 모델로 실험하였다.

청심연자탕은 연자육, 산약, 천문동, 맥문동, 원지, 석창포, 산조인, 용안육, 백자인, 황금, 나복자, 감국으로 구성되며 사상의학에서 태음인의 간과 폐에 열이 있는 증후들을 치료하는 처방이다¹⁹⁾. 기존 연구에 따르면 태음인에게 가장 많이 쓰이는 처방 중 하나이며, 임상에서는 뇌심혈관 질환에 이어 신경정신과 질환에서 두 번째로 다용되고 있다²⁰⁾.

한편 심(心)은 한의학에서 신지(神志)를 주관하여 정신, 사유 기능을 담당하여²¹⁾ ADHD를 포함한 정신 질환과 가장 연관 깊으며, 비(脾)는 오지(五志) 중 사(思), 즉 주의 집중,

기억과 관련되어²²⁾ ADHD에서 나타나는 주의력 결핍과 연관이 깊다. 또한 담화(痰火)는 중의학에서 ADHD의 주요 병인으로 꼽고 있다²³⁾. 따라서 본 연구에서는 청심연자탕 중심(心), 비(脾), 폐(肺)를 치료하는 대표 본초인 산약(脾), 원지(心), 감국(肺)를 기본으로 하여 천마(산간풍담(散肝風痰)), 폐모(강폐담(降肺痰)), 상백피(사폐화(瀉肺火)), 유백피(통조(通燥), 윤조(潤燥)) 등 담을 치료하는 약재들을 가미하여 가감 청심연자탕을 구성하였다. 기존 연구에 따르면 중의학에서 ADHD에서 2번째로 많이 사용된 약재로 원지가 제시되었으며²⁴⁾, 천마등복합추출물이 메틸페니데이트의 효과를 증가시키는 것으로 알려져 있으며²⁵⁾, 상백피(Morus alba)가 항우울 효과가 있음을 실험적으로 연구된 바 있다²⁶⁾.

ADHD 실험을 위한 동물 모델로는 SHR rat이 흔히 사용되는데²⁷⁾, 전전두엽에서 도파민의 분비가 줄고, 노르아드레날린 농도는 늘어서²⁸⁾ ADHD의 임상 증상인 과잉행동, 충동성, 주의력 결핍 증상들을 보여주기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 SHR rat을 사용하여 ADHD 유사 신경 행동학적 증상을 확인하기 위해 운동 활동 거리 및 움직임 시간을 측정하는 오픈 필드 실험(Open field test)을 사용했으며, 실험동물의 ADHD 유사 인지능력, 단기 기억력 저하 증상을 확인하기 위하여 기억력, 순간적인 공간 인지력을 측정하는 Y 미로 실험(Y-Maze test)을 시행하였다.

실험군은 정상군, 대조군, 한약제 저농도군, 한약제 고농도군으로 나뉘었으며, 정상군은 WKYR 흰쥐에 일반사료만 먹인 군 7마리, 대조군은 SHR 흰 쥐에 일반사료만 먹인 군 7마리, 한약제 저농도군은 SHR 흰 쥐에 한약제를 100 mg/kg 농도로 실험기간동안 먹인 군 7마리, 한약제 고농도군은 SHR 흰 쥐에 한약제를 300 mg/kg 농도로 실험기간동안 먹인 군 7마리로 나뉘었다.

실험 결과 오픈 필드 실험(Open field test)에서는 저농도 고농도 군이 3주차 때에 모두 유의성 있게 과잉행동이 감소하는 것을 확인하였고, Y 미로 실험(Y-maze test)에서 SHR 생쥐에서는 자발적인 Y 미로(Y-maze) 교차 행동률이 유의하게 감소되었으며, 한약처방 투여군에서는 교차 행동을 감소시키는 현상이 유의하게 회복되었다. 즉 가감청심연자탕 투약 시 ADHD 관련 증상이 복용기간에 따라 억제되고, 농도 대비 정상수준으로 회복되는 것을 확인하였다.

ADHD의 효과적 치료를 위해 통합적 접근이 강조되고 있는데, 독성 금속 및 화학 물질, 오염 음식 등의 환경 요인

도 원인으로 지목되고 있다²⁹⁾. 이 중에서도 식이와 정신 상태의 연관성에 대해서 많이 연구되고 있는데, 장-뇌 신경축(Gut-Brain Axis)이 상호 영향을 미치며 이를 통해 장내 미생물이 정신 상태에 영향을 줄 수 있다는 가능성이 지속적으로 제기 되고 있다³⁰⁾. 따라서 장내 미생물의 균형과 ADHD의 임상증후 개선을 연관시켜 볼 수 있다. 한의학에서도 장부에 감정을 배속하고 뇌 기능을 장부로 해석한 면이 있다³¹⁾. 장상론에서는 심(心), 비(脾), 신(腎)을 축으로 수화기제(水火既濟), 심신상교(心腎相交)를 설명하고 이것이 인체의 정신적 현상, 수면 등에 관여한다고 본다. 따라서 만성 퇴행성질환에 대한 치료를 오장을 중심으로 파악할 수 있다.

이에 본 연구에서 lactulose/mannitol (L/M) 비율을 측정하였다. 이는 직접적으로 대사가 이루어지지 않는 당인 락툴로스(lactulose), 만니톨(mannitol)을 이용하여 장 투과성 정도를 측정하는 방법이다³²⁾. 락툴로스(lactulose)는 정상 소장에서는 최소로 흡수되는 큰 당이지만, 투과성이 변경되면 소변에서 쉽게 측정되기 때문에³³⁾ L/M 비율이 높아지면 장 세포 손상을 시사할 수 있다³⁴⁾. 즉 장 누수 상태가 되면 이물질로 인해 면역 반응이 일어나고 염증 상태를 유발하기 때문에, 최근 ADHD, 자폐증 등에서도 장누수 증후군이 많이 발견되고 있다³⁵⁾. 본 연구진의 실험 결과 SHR군은 소변 내 L/M 비율은 WKY에 비해 53.6%로 증가하였으며, 저농도군은 SHR군 보다 L/M 비율이 52.3%로 감소하였고, 고농도군은 SHR군 보다 L/M 비율이 46.2%로 감소하였으며, 저농도에서 조금 더 좋은 효능을 나타내었다. 즉, 가감청심연자탕 저농도 투약 시 L/M 비율이 유의하게 감소함을 확인할 수 있다.

마지막으로 ADHD는 뇌의 성숙 지연과 관련이 있다³⁶⁾. CDK5는 뉴런 세포에 풍부한 세린/트레오닌 인산화효소로서, 기억 형성에 관여하는 시냅스 가소성에 관여하며³⁷⁾, 뇌 신경 발달 과정에서 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다³⁸⁾. 이로 미루어 볼 때 CDK5 발현 증가가 ADHD 유의미한 지표로 해석될 수 있다. 따라서 본 연구에서 대뇌피질의 CDK5 발현의 정도를 측정하였다. 실험 결과 한약처방 저농도와 고농도군 모두에서 대뇌피질부위에서 대조군에 비교하여 CDK5 단백질이 유의성 있게 증가하였다.

이상의 결과를 종합하면 가감청심연자탕은 SHR rat 모델에서 ADHD에서 나타나는 주요 임상 증상인 과잉 행동, 기억, 인지 능력 저하를 유의하게 감소시킬 수 있고, 장 투과

성 정도를 나타내는 L/H ratio를 감소시키며, 뇌 발달과 관련된 CDK5 수치를 증가시킨다. 이로 미루어 볼 때 본 한약 추출물이 ADHD 예방 또는 치료 목적으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 보인다.

그러나 본 연구에서 사용된 SHR 모델은 오픈 필드 시험에서 과잉 행동이 특정 연령대에서만 나타난다는 점과, 여러 시험에서 ADHD의 증상이 일관되게 나타나지 않는다는 지적이 있어왔다는 한계를 갖는다³⁹⁾. 따라서 추후에 잘 설계된 임상 프로토콜을 통해 추가 검증이 필요할 것으로 보인다.

V. 결론

가감청심연자탕이 ADHD 임상 증상에 미치는 효능을 규명하기 위하여 오픈 필드 실험(Open field test), Y 미로 실험(Y-maze test), L/M 비율, 대뇌 피질의 CDK5 발현을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 오픈 필드 실험(Open field test)을 통해 운동 활동 거리를 측정된 결과, ADHD 모델 동물인 SHR rat에서 저농도, 고농도 군이 3주차 때에 모두 유의성 있게 운동 활동 거리가 감소하였다. 이는 가감청심연자탕 추출물이 ADHD 주요 임상 증상인 과잉 행동에 대해 유의한 감소 효과가 있음을 시사한다.

2. Y 미로 실험(Y-Maze test)를 통해 운동 활동 거리를 측정된 결과, SHR rat에서는 자발적인 Y-maze 교차 행동률이 유의하게 감소되었으며, 한약처방을 투여한 군에서는 교차 행동을 감소 현상이 유의하게 역전되었다. 이는 가감청심연자탕 추출물이 ADHD 주요 임상 증상인 주의력 결핍에 대해 유의한 감소 효과가 있음을 시사한다.

3. SHR군의 소변 내 L/M 비율은 WKY에 비해 53.6%로 증가하였으며, 저농도군은 SHR군 보다 L/M 비율이 52.3%로 감소하였고, 고농도군은 SHR군 보다 L/M 비율이 46.2%로 감소하였다. 이는 가감청심연자탕 추출물이 장 투과에 대해 보호 효과가 있음을 시사한다.

4. 한약처방 저농도와 고농도군 모두에서 대뇌피질부위에서 대조군에 비교하여 CDK5 단백질이 유의성 있게($p < 0.05$) 증가하였다. 이는 가감청심연자탕 추출물이 CDK5 단백질 수치 상승을 통해 뇌 신경 발달의 가능성이 있음을 시사한다.

REFERENCES

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth edition. Hakjisa. 2015;61-8.
2. Thomas S, Joseph B, Timothy W. Attention-deficit/hyperactivity disorder and comorbidity. *Pediatric Clinics of North America*. 1999;45(5):915-27.
3. Lee SM, Choi JW, Kim KM, Kim JW, Kim SY, Kang TW, Kim JI, Lee YS, Kim BS, Han DH, Cheong JH, Lee SY, Hyun GJ, Kim BN. The Guideline of Diagnosis and Treatment of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Developed by ADHD Translational Research Center. *Journal of the Korean Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2016;27(4):236-66.
4. Kim KB, Kim DG, Kim YH, Kim JH, Min SY, Park EJ, Baek JH, Sung HK, Yu SA, Lee SY, Lee JY, Lee HJ, Chang GT, Jeong MJ, Chai JW, Cheon JH, Han YJ, Han JK. *Hanbangsoacheongsoneonuihak(ha)*. Seoul: Ui Sung Dang Publishing. 2015:44-48.
5. Yang JW, Kim JH, Kim JW, Choi JW, Hong HJ, Joung YS. Treatment for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Adults. *Journal of Korean Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2012;23:72-89.
6. Lee SM, Choi JW, Kim KM, Kim JW, Kim SY, Kang TW, Kim IH, Lee YS, Kim BS, Han DH, Cheong JH, Lee SY, Hyun GJ, and Kim BN. The Guideline of Diagnosis and Treatment of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Developed by ADHD Translational Research Center. *Journal of the Korean Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2016;27(4):236-66.
7. Carlier R, Giorgetti V, Pirani G, Ricci B. Use of cognitive enhancers: methylphenidate and analogs. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2019;23:3-15.
8. Jeffrey H, Christopher J, Albert J, Charles D, Dustin D, Rodney J, David M. Atomoxetine and Osmotically Released Methylphenidate for the Treatment of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Acute Comparison and Differential Response. *The American Journal of Psychiatry*. 2008;165(6):721-30.
9. Korean Neuropsychiatric Association. Textbook of neuropsychiatry. iMiS COMPANY. 2016;189-94.
10. Ni XQ, Han XM, Yin DQ, Liu CQ. Study on medication regularity of traditional Chinese medicines in treating attention deficit hyperactivity disorder based on data mining. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2015;40(6):1185-91.
11. Sara B, Ali A, Ebrahim K, Seyyed M, Sina N, Erfan S, Amirhosein M, Shakiba J, Mohammad M, Mahsa S, Shahin A. Crocus sativus L. Versus Methylphenidate in Treatment of Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Randomized, Double-Blind Pilot Study. *Journal of child and adolescent psychopharmacology*. 2018;

- 29(3):1-8.
12. Ni X, Zhang Y, Han X, Lei S, Sun J, Zhou R. Traditional Chinese medicine in the treatment of ADHD: a review. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*. 2014;23(4):853-81.
 13. Fujiwara H, Tsumima R, Okada R, Awale S, Araki R, Yabe T, Matsumoto K. Sansoninto, a traditional herbal medicine, ameliorates behavioral abnormalities and down-regulation of early growth response-1 expression in mice exposed to social isolation stress. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2018;8(1):81-8.
 14. Elisa C, Amir H, Sharon B. Real-World Data on Attention Deficit Hyperactivity Disorder Medication Side Effects. *Psychiatry*. 2010;7(4):13-5.
 15. Kristian H, Birgitta P, Stefan W, Roland P, and Beate H. Methylphenidate-Related Growth Impairment. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 2004;12(1):55-61.
 16. Dopheide JA. The role of pharmacotherapy and managed care pharmacy interventions in the treatment of ADHD. *The American Journal of Managed Care*. 2009;15(5 Suppl):141-50.
 17. Barbara T, Bernard B, Jennifer G, Param K, Richard H. Diagnosis and Management of ADHD in Children. *American Family Physician*. 2014;90(7):456-64.
 18. Xinqing N, Yanli J, Xinmin H, Shuang L, Jichao S, Rongyi. Traditional Chinese Medicine in the Treatment of ADHD: A Review. *Child adolescent Psychiatric Clinics of North America*. 2014;23(4):853-81.
 19. The Society of Sasang Constitutional Medicine. *Sasang Constitutional Medicine*. Jibmoondang. 2004:298-300,418.
 20. An DY, Han SZ, Yu JS. Review of experimental and clinical studies on Cheongsimyeonja-tang in Korea. *Journal of Sasang Constitutional Medicine*. 2018;30(3):1-23.
 21. Hanuibyungrihak textbook committee. *Hanuibyungrihak*. Hanuimunhwasa. 2015:390-1.
 22. Hanuibyungrihak textbook committee. *Hanuibyungrihak*. Hanuimunhwasa. 2015:496-7.
 23. Xinqiang N, Yanli Z, Xinmin H, Shuang L, Jichao S, Rongyi Z. Traditional Chinese Medicine in the Treatment of ADHD: A Review. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*. 2014;23(4):853-81.
 24. Rongyi Z, Xinmin H, Jichao S, Jiaojiao W. Bibliometric analysis on TCM Therapy for ADHD in recent ten years. *Chinese Journal of information on traditional chinese medicine*. 2016;23(3):35-7.
 25. Shim J, Lee DS, Kim D, Son S, Kim SH. Memory improving effect of mixed herbal extract, HX106 in Alzheimer's disease model. *Planta Medica*. 2012;78:74.
 26. Lim DW, Jung JW, Park JH, Baek NI, Kim YT, Kim IH, Han DS. Antidepressant-Like Effects of Sanggenon G, Isolated From the Root Bark of *Morus Alba*, in Rats: Involvement of the Serotonergic System. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2015;38(11):1772-8.
 27. Alfredo M, Georgina G, Teresa P, Ruth T, Andrea G, Carlos C. Spontaneously hypertensive rat(SHR) as an animal model for ADHD: a short overview. *Reviews in the Neurosciences*. 2011;22(3):365-71.
 28. Lee SK, Bahn GH. Animal Models in Child and Adolescent Psychiatry. *Journal of Korean Neuropsychiatric Association*. 2007;46(4):285-94.
 29. Parris M. Attention Deficit/Hyperactivity Disorder(ADHD) in Children: Rationale for Its Integrative Management. *Alternative Medicine Review*. 2000;5(5):403-28.
 30. Marta G, Marcin W, Marek R. The gut microbiota in neuropsychiatric disorders. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2018;78(2):69-81.
 31. Lee GE, Park BY, Kim HY, Lyu YS, Kang HW. A Preliminary Study on the Development of the Core Emotion Assessment Instrument Based on the Chiljeong. *Journal of Neuropsychiatry*. 2014;25(1):109-22.
 32. Camilleri M, Nadeau A, Lamsam J, Nord S, Ryks M, Burton D, Sweetser S, Zinsmeister A, Singh R. Understanding Measurements of Intestinal Permeability in Healthy Humans with Urine Lactulose and Mannitol Excretion. *Neurogastroenterol*. 2010;22(1):15-26.
 33. Donna M, Kelley V, Zakia C, Christine A, Deborah C, Philip I. Use of Lactulose to Mannitol Ratio to Evaluate Childhood Environmental Enteric Dysfunction: A Systematic Review. *Clinical Infectious Disease*. 2014;59(4):213-9.
 34. Juby J, Axon A. Lactulose/Mannitol Test: An Ideal for Celiac Disease. *Gastroenterology*. 1989;96:79-85.
 35. Luke T, Kalpana P. Nutritional and environmental approaches to preventing and treating autism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a review. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2008;14(1):79-85.
 36. Amy L, Xavier C. Brain development and ADHD. *Clinical Psychology Review*. 2006;26(4):433-44.
 37. Tomohide M, Mika T, Naoki M, Xiaojuan H, Kodai S, Shigeyoshi I, Toshio O. Cdk5/p35 functions as a crucial regulator of spatial learning and memory. *Molecular Brain*. 2014;7:82.
 38. Kim CM, Kim H, Uhm CS, Rhyu IJ, Park SH, Suh YS. Developmental mRNA Expression of cdk5 and its Putative Regulators in Rat Brain. *Korean Association of Anatomists*. 2001;34(5):517-24.
 39. Filip S, Emilie B, Johnny S, Lucianne G, Berend O, Ronald S. Spontaneously hypertensive rats do not predict symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2006;83(3):380-90.