

새로운 제형의 치매치료제제의 효능연구

김지현 · 정진용 · 채윤병 · 함대현 · 박용진¹ · 이해정 · 심인섭*

경희대학교 동서의학대학원 침구경락학교실, 1: 대전시 서구 둔산동 백남한의원

Ameliorating Effects of the Cognitive-Enhancing Korean Herbs on Neurotoxic-Induced Amnesia in Rats

Ji Hyun Kim, Jin Yong Jung, Yoon Byung Chae, Dae Hyun Hahm, Yong Jin Park¹, Hye Jung Lee, Insop Shim*

Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University,
1: Bak Nam Oriental Medical Clinic

Ancient Korean physicians have used several oriental herbs to cure dementia and these effects were described in the Korean herbal books. Some cognitive-enhancing oriental herbs have been widely used as a herbal medicine against dementia. However, few of studies have proved their efficacy in treatment for dementia. In the present study, we investigated the effects of herbal compounds, which are mainly consisted of *Uncaria sinensis*, *Corydalis yanhusuo* and *Acorus gramineus* on learning and memory in Morris water maze task and the central cholinergic system of the rats with neurotoxic medial septum lesion. In water maze test, the animals were trained to find a platform in a fixed position during 6 days and then received a 60-s probe trial in which the platform was removed from the pool on the 7th day. Ibotenic and 192 saporin lesion of the medial septum (MS) impaired the performance of maze test and degenerated choline acetyltransferase (ChAT) in the brain, which is a marker of the central cholinergic system. Daily administrations of herbal medicine (100mg/kg, p.o.) for 21 consecutive days produced significant reversals of the neurotoxic-induced deficit in learning and memory. These treatments also reduced the loss of cholinergic immunoreactive neurons in the brain induced by neurotoxin. These results demonstrated that herbal compounds ameliorated learning and memory deficits through effects on the central nervous system, partly through effect on the acetylcholine system. Our studies suggest an evidence of these herbs as treatment of Alzheimer's disease.

Key words : learning and memory, Alzheimer's disease, ibotenic lesion, ChAT, herbal medicine.

서론

인간은 노화에 따라 기억력 장애, 판단력 상실 등 인지적 결함을 동반한 치매(dementia)증상이 나타나는데 뇌가 위축되고, 대뇌피질부위로 투사하는 콜린성 신경 입력통로인 마이너트 기저핵(nucleus basalis of Meynert)의 신경세포의 수가 급격히 감소되고, 해마(Hippocampus)와 대뇌피질(Cortex)에서 choline uptake 및 아세틸콜린의 합성량과 choline acetyltransferase (ChAT)의 활성도의 감소와 니코틴성 및 무스카리닉성 아세틸콜린 수용체의 감소를 동반한다. 특히 기억력 장애는 노인에서 가장 빈번히 나타나는 인지증상으로 감각 기억력(sensory memory)

의 저하, 작업 기억력(working memory)의 저하, 응고화(consolidation) 기능 저하, 간섭에 대한 감수성(susceptibility to interference)증가 등으로 나타난다. 그리고 복잡한 운동동작의 수행능력이 저하되고 동작성 지능이 감소되는 경향을 보이는 것은 복잡한 행동과제에 대한 시작, 계획 및 평가(initiation, planning and evaluation) 기능이 저하되는 것으로 생각되고 있고 전두엽 및 변연계의 기능이 변화가 있음을 시사해준다^{1,2}. 치매의 원인에 대해서 여러가지 설들이 제기되고 있으나 아직 확실하게 검증된 바가 없고 많은 원인질환을 가지는 복합증후군이며 뇌 변성질환이다. 이중 가장 많은 것은 Alzheimer's disease(AD)로서 대체로 모든 치매의 약 50~60%를 차지한다. AD는 서양의 학에서는 유전적 요인, 뇌에서 대뇌피질의 위축, 부교감신경과 다른 신경세포의 퇴화, 신경원 섬유 농축체(neurofibrillary tangles)의 존재, 노인반(senile plaques)의 축적, 심리적, 환경적 및 생화

* 교신저자 : 심인섭, 경기 용인시 기흥읍 서천리 경희대학교 동서의학대학원
E-mail : ishim@khu.ac.kr, Tel : 031-204-4237

· 접수: 2002/02/06 · 수정: 2002/03/06 · 채택 : 2002/03/28

화적인 요인 등을 들고 있으며, 한의학적으로는 근본적으로 인지 기능이 저하된 소인을 가진 사람이 정서불화에 의해 장부기능이 허해지거나 문란해지고 이에 의해 발생한 담이나 담화가 신지를 손상시켜서 발생한다고 할 수 있다. 실제로 우리나라에서 AD의 유병율은 65~74세 사이에는 10%, 75~84세 사이에는 19%, 85세 이상에서는 47%로 나타나 있으며, 질환 환자가 약 20만명 이상에 달하고 있고, 사망률은 심혈관 질환, 악성종양, 그리고 뇌졸중에 이어 제 4위를 점하고 있으며, 2000년대 중반까지는 1500만 명의 환자가 발생되리라 예견하고 있으며 기억력과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 주어 저하된 인지기능을 개선해 줄 수 있는 약물을 개발이 필요한 실정이다³⁾. 현재까지 개발된 약물들에는 아세틸콜린 합성전구체 (acetylcholine precursor, 수용체 효능물질(receptor agonist)^{4,5)}, 아세틸콜린분해 억제제(acetylcholinesterase inhibitor)등^{6,8)}이 있으나 효과가 일시적이고 미약하며 간독성과 오심, 구토 등의 말초의 choline성 증상을 나타내는 부작용의 문제점 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다. 이러한 부작용을 최소화할수 있는 한방제제를 가미한 새로운 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

따라서 본 연구는 안전성이 높은 치매의 예방 및 치료 약물을 개발하고자, acetylcholine성 신경세포가 주로 위치한 medial septum에 acetylcholine성 신경세포를 선택적으로 손상시키는 192saporin을 투여하거나 흥분성 신경독소인 ibotenic acid를 주입한 기억력 손상모델에서 석창포, 조구등, 현호색, 황금, 천마등 국내에서 자생하는 기억증진효과를 보이는 유용한 약재조성물의 효과를 Morris 수중미로와 cholineacetyltransferase(ChAT) 면역조직화학기법(immunohistochemistry)을 이용하여 학습과 기억 및 콜린성 뉴런의 보호작용에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

연구방법

1. 동물

본 실험에 사용한 흰쥐는 Sprague-Dawley계로 생후 5주령 (220±10g)의 수컷(샘타코, 한국)을 구입하여 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%의 환경을 유지하면서 쥐용 고형사료(삼양사료, 한국)와 물을 공급 하였으며, 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2. 실험군의 구성

실험군 분리는 쥐를 모의시술군(Sham, 무처치), medial septum내 acetylcholine성 신경세포만 손상시키는 192saporin 손상군, 일반 신경세포를 손상시키는 ibotenic lesion손상군, 192saporin 손상+약물투여군, ibotenic lesion 손상+약물투여군으로 나누었고 각 군을 3주간 약물처치후 행동검사를 실시하였으며, 마지막 행동검사를 실시한 후 조직검사를 하였다.

3. 약제 제조 및 약물 투여 방법

1) 약제 제법

(1) 처방

① 수용성 추출처방 : 백작약(1종, 15kg), 당귀, 숙지황, 백하수

오, 구기자, 음양곽, 시호(6종, 각10g) 천궁, 오가피, 오미자, 삼릉(4종, 각5g)-수용성추출, 총11종

② 생약처방 : 황기, 석창포(2종, 각20g), 조구등(1종, 15g), 현호색, 천마, 오약, 황금, 동충하초(5종, 각10g), 인삼, 백자인, 산조인, 원지, 천궁, 육계, 사인, 조각자(8종, 각5g), 용뇌(1종, 3g)-생약 총17종

(2) 제법

① 수용성 추출(당귀포함11종) : 백작약(1종, 1.5kg), 당귀, 숙지황, 백하수오, 구기자, 음양곽, 시호 (6종, 각1kg), 천궁, 오가피, 오미자, 삼릉(4종, 각500g)을 각각 2-2.5mm정도 파쇄하여, 각 약재량의 8-12배의 증류수로 110℃ 이하온도로 5시간정도 가열하였다. 각 가열한 추출물은 여과하여 찌꺼기 층은 제거하고, 전분층과 증류수층은 90℃ 이하온도로 2시간정도 농축하여 70℃ 미만의 온도의 건조기에 투입하여 4-5일정도 완전 건조시킨다. 각 건조물은 분말을 내어 환제조공정을 위해 준비하였다.

② 생약처방(황기포함17종) : 황기, 석창포(2종, 각2kg), 조구등(1종, 1.5kg), 현호색, 천마, 오약, 황금, 동충하초(5종, 각1kg), 인삼, 백자인, 산조인, 원지, 천궁, 육계, 사인, 조각자(8종, 각500g), 용뇌(1종, 300g)를 각각 2-2.5mm정도 파쇄하여 환제조공정에 준비한 후 각 분말을 수용성 추출물과 합하였다. 환으로 제조하기 위해 보료(풀, 풀)를 적당량을 첨가하여 환(녹두대)으로 제조완료하였다.

2) 약물 투여방법

시술 한 동물에게 매일 한차례 일정한 시간인 오전 10시경에 환으로 제조된 약물을 생리식염수에 녹여 (100mg/kg, i.p.) 3주간 투여한 후 행동검사를 실시하였다.

4. 기억손상모델

실험군은 쥐에 sodium pentobarbital(50mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후 stereotaxic technique를 이용하여 medial septum (AP:-0.2, L: ±0.3, H:-6.2)위치에 192saporin 1μg (ATS, San Diego, CA) 또는 ibotenic acid(Sigma, S. Louis, MO) 4μg을 양쪽으로 주입하였다. 미세주입은 1ml gas-tight glass syringe (Hamilton, Reno, NV)에 폴리에틸렌 튜브(polyethylene tubing)로 연결하여 관류용 펌프(perfusion pump, Pump 22, Harvard Apparatus, South Natick, MA)를 이용하여 0.2μl/min 유속으로 주입 후에 5분간 방치한 다음 주사기(syringe)를 제거하였다. 각각 손상군에 대한 약물처치는 그 다음날부터 시행하였다. 모의 시술군은 손상약물 대신 145mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.2mM CaCl₂, 1.0mM MgCl₂로 만든 인공뇌척수액(artificial CSF)을 같은 방식으로 주입하였다.

5. 동물의 학습 및 기억검사

1) Morris 수중 미로의 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

수중미로로 이용되는 수조는 직경이 180cm 높이가 50cm인 원형 통으로 온도가 22 ± 2℃되는 물이 30cm 높이로 채워지게 하였다. 수중 미로의 주변은 비디오 카메라, 실험대, 그리고 실험대 위에 있는 수온 조절용 장치 등 공간단서들을 일정하게 유지하였다. 도피대는 직경이 12cm인 원형 투명 아크릴에 받침대를

부착하고, 수면보다 1.5cm 낮게 위치시켰다. 수중미로는 4개의 동일한 사분원으로 나누어져서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분되고 이중 북동 사분원의 중심부에 도피대가 놓여지고, 나머지 중 하나가 출발위치로 사용되었다. 쥐는 하루에 4행씩 6일간 훈련을 받으며(acquisition test), 7일째 마지막 시행이 끝나면 자유수영 검사가 시행되었는데(retention test) 이때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게 되었다. 모든 동물들의 행동은 비디오 카메라로 녹화되는데, 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대에 올라가는데 걸린 시간을 측정하였다.

2) Cholineacetyltransferase (ChAT) Immunohistochemistry

모든 행동 실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p.)로 마취시키고 saline 100 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 (fixative) 900 ml로 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200 ml은 5분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 700 ml은 25분간에 걸쳐 천천히 관류하였다. 그 다음 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2-3 시간동안 고정시키고 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 4°C에서 하루동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 medial septum 부위에서 30µm의 두께로 자른다. PBS로 조직을 몇 차례 씻고 다음에 ChAT 유전자 발현 연구에 가장 널리 사용되고 있는 primary sheep polyclonal ChAT antibody (Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE)를 사용하였다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium azide(Sigma, St. Louis, MO)로 2000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4°C에서 72시간동안 지속적으로 흔들며 주면서 배양하였다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 2시간동안 실온에서 2% 토끼 혈청을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA)에 반응시켰다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% normal goat serum을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated sheep anti-rabbit serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA)에 반응시켰다. PBST로 3번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent (Vector)에 담갔다. PBS로 몇 번 헹군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzadine를 사용하여 발현시켰다. 모든 처리를 거친 뇌 조직은 gelatine을 도포한 슬라이드에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 현미경으로 관찰하였다. 200 x 200 µm 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 200배로 확대하여 medial septum내 ChAT- immunoreactive 신경세포의 수를 측정하였다.

6. 통계처리방법

모든 측정값은 평균값±표준오차(mean±S.E.M)로 표시하였고, 각 실험군간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS를 이용하였다. 각 구간 측정치의 비교는 반복측정 이원분산분석을 시행하였고, 변역조직화분석법의 측정값은 일원분산분석을 시행하였으며, 사후검증은 LSD를 적용하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 신뢰구간 p<0.05에서 의미를 부여하였다.

결 과

1. Morris 수중미로의 획득검사결과

수중 미로 학습에서 6일 동안 180초내 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 제 1일째 모의시술군은 154.8±9.0초, ibotenic acid 손상군은 162.1±6.6초, 192saporin 손상군은 138.4±23.6초, ibotenic acid 손상+약물 투여군은 169.1±9.1초, 192saporin 손상+약물 투여군은 141.3±24.8초로 집단간 차이가 없었으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 6일째에는 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 모의시술군은 46.2±22.7초, ibotenic acid 손상군은 69.1±6.6초, 192saporin 손상군은 139.8±31.1초, ibotenic acid 손상+약물 투여군은 17.6±9.1초, saporin 손상+약물 투여군은 34.4±4.2초로 집단간 유의성 있는 차이를 보였다 [F(4,21)=3.4, p<0.05]. 이에 측정일에 따른 집단별 사후검정(LSD) 결과, 5일째부터 모의시술군에 비해 192saporin 손상군에서 학습능력이 현저히 저하되었다(p<0.01). 이에 비해, 약물 투여군에서는 학습수행에 유의한 증진효과가 관찰되었는데, ibotenic acid 손상+약물 투여군이 4일째부터 ibotenic acid 손상군에 대해 통계적으로 유의미하게 증가되었으며(각 4, 5일째 p<0.05), 192saporin 손상+약물 투여군에서 192saporin 손상군에 비해 5일째(p<0.01) 및 6일째(p<0.05)에 학습수행에 유의한 증진효과가 관찰되었다(Fig. 1 및 Fig. 2).

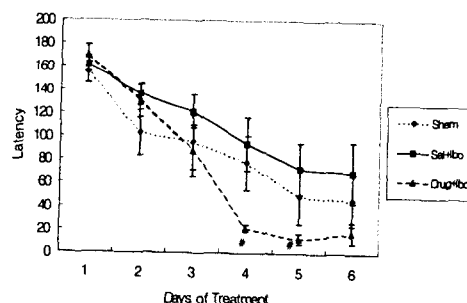


Fig. 1. Comparison of acquisition performance on the Morris water maze task among the sham, ibotenic lesioned and drug-pretreated ibotenic lesioned groups (Mean±S.E.M. of swimming time traveled per trial). #p<0.05 as compared with the corresponding data of ibotenic lesioned group.

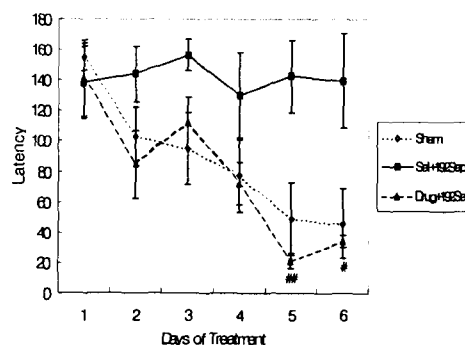


Fig. 2. Comparison of acquisition performance on the Morris water maze task among the sham, 192 saporin-lesioned and drug pretreated 192saporin-lesioned groups (Mean±S.E.M. of swimming time traveled per trial). ##p<0.01 as compared with the corresponding data of 192saporin lesioned group. #p<0.05 as compared with the corresponding data of 192saporin lesioned group.

2. Morris 수중미로의 과제점사결과

수중 미로 학습에서 마지막 날인 제 7일째에 도피대를 제거 하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 과제시행에서 모 의시술군은 5.4±0.8%, ibotenic acid 손상군은 4.8±1.5%, 192saporin 손상군은 2.7±0.7%, ibotenic acid 손상+약물 투여군은 4.4±0.6%, 192saporin 손상+약물 투여군은 3.6±0.1%로 약물 투여군이 ibotenic acid 손상군에 비해 도피대에 머무르는 정도 의 유의한 차이는 나타나지 않았으나 (p>0.7), 약물투여군에서 학습수행에 증진효과의 경향성을 보였다 (Fig. 3 및 Fig. 4).

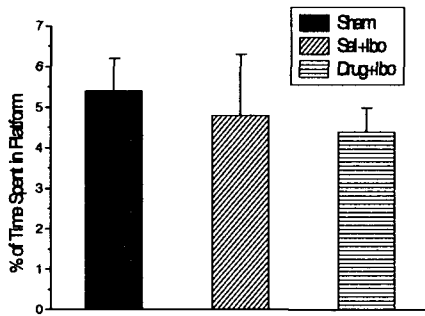


Fig. 3. Comparison of retention performance on the Morris water maze task among the sham, ibotenic lesioned and drug-pretreated ibotenic lesioned groups (Mean±S.E.M. of percentage time of platform spent swimming per trial).

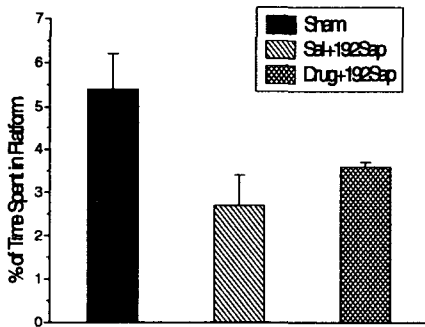


Fig. 4. Comparison of retention performance on the Morris water maze task among the sham, 192 saporin-lesioned and drug pretreated 192saporin-lesioned groups (Mean±S.E.M. of percentage time of platform spent swimming per trial).

3. Choline acetyltransferase(ChAT) 면역조직화학법

Medial septum에서 학습의 지표로 이용되는 choline acetyltransferase(ChAT)를 이용하여 ChAT를 이용하여 acetylcholine성 신경세포를 염색한 결과 Fig. 3에서 보이는 바와 같이 모의시술군은 52.0±3.2, 192saporin 손상군은 32.0±2.9, 192saporin 손상+약물 투여군은 46.0±1.5 로서 그룹간 뚜렷한 차 이는 나타났고 [F(2,14)=13.3, p>0.01], 사후검정(LSD) 결과, 모의 시술군에 비해 192saporin 손상군에서 ChAT-성 신경세포가 감소했(p<0.01), 약물 투여군에서 192saporin 손상군에 비하여 유 의하게 ChAT 발현이 증가하였다(p<0.01) (Fig. 5 및 Fig. 6).

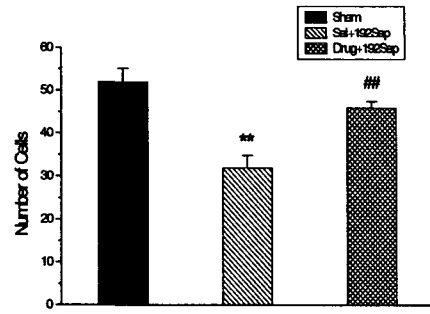


Fig. 5. The mean(±SEM) values of quantities of choline acetyltransferase(ChAT) immunoreactive cells in the medial septum among the sham, 192 saporin-lesioned and drug pretreated 192saporin-lesioned groups after water maze learning task 7 days post-operatively. The ChAT results were analysed by performing separate one way ANOVA of neurons among the sham, 192saporin lesioned and drug-treated 192saporin-lesioned groups. Post hoc comparisons were made using the least significant difference(LSD). **p<0.01 as compared with the corresponding data of sham lesion group and ##p<0.01 as compared with the corresponding data of 192saporin lesioned group.

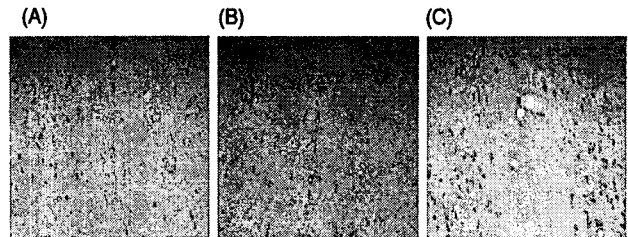


Fig. 6. Representative photographs of choline acetyltransferase(ChAT) immunoreactive cells in the medial septum among the sham(A), 192 saporin-lesioned(B) and drug pretreated 192saporin-lesioned groups(C).

고 찰

Alzheimer's disease(AD)는 1907년 Alois Alzheimer에 의 해 최초로 언급되었는데⁹⁾, 통계적 수치의 차이는 보이나 보편적 으로 동양보다는 서양에서, 남성보다는 여성에게서 발생하는 빈 도가 높으며, 65세 이상에서 빈발하여 85세 이후에는 25%이상에 서 절반에 가까운 인구가 이 질환에 이환 되는 것으로 역학적 조 사에 의하여 보고되고 있다¹⁰⁾. AD의 대표적인 증상 중의 하나는 기억력 장애인데¹¹⁾, 기억이란 개체가 정신 활동에 필요한 정보를 받아들여 뇌 속에 저장하였다가 필요한 때에 의식 세계로 꺼내 어 사용하는 능력을 말하는 것이다¹²⁾.

AD 치료에 많은 약물들이 평가되었고 그 중의 일부는 아 지도 사용되고 있다. 그럼에도 불구하고 이 질환의 인지결손을 낮게 할 수 있는 효능이 확립된 약물은 거의 없는 실정이다. 최 근 신경전달물질계에 대한 연구가 진행되고 있어서 치료에 대한 합리적 접근방법이 모색되고 있고 choline성 기능을 향진시키려 는 시도들과 함께 어떤 신경전달물질 경로가 관여하는지에 대한 과정을 규명하고자 하는 연구가 이루어지고 있다. 이에 여러 가 지 실험적 모델을 통해 접근하고 있는데 예를 들어, nitric oxide(NO)는 retrograde messenger로서 hippocampus에서 LTP 형성에 중요한 역할을 담당하는데, 이 nitric oxide의 생성에 관 여하는 nitric oxide synthase 조효소의 작용을 방해하는

L-NAME (NOS inhibitor)이라는 약물 투여로 기억을 손상시키는 모델을 사용하였고^{13,14}, non-selective M1 antagonist로서 중추신경계내의 muscarinic central cholinoreceptors의 작용을 차단하는 방법으로 scopolamine을 투여하는 모델을 사용하여 학습과 기억에 관련된 신경전달물질의 작용을 약리학적으로 차단하는 방법을 이용하였다^{15,16}. 또한, nbM(nucleus basalis magnocellularis) 등을 전기적으로 손상시키는 방법 등을 통해 학습과 기억을 손상시켜 학습과 기억증진에 관한 국소 신경기능의 이론적 연구 및 약물의 치료 효과를 보고자 하였다¹⁷. 하지만, 이러한 방법들이 학습과 기억에 관련된 특정 신경기능을 국한적으로 손상시키는 방법으로는 부족한 면이 있는 것이 현실이다. 최근 학습과 기억과 관련된 신경회로의 다양한 부위를 손상하기 위한 방법으로 kainic acid, ibotenic acid 등의 신경독소 손상(neurotoxin lesion)^{18,19}, cholinergic neurone에 대해 특이하게 immunotoxin으로 작용하는 192 IgG-saporin을 이용한 손상^{20,21}, 화학물질 손상(chemical lesion), 전해질 손상(electrolytic lesion), 스트레스 유도인 손상(stress-induced lesion) 등의²² 다양한 손상 방법을 통해 중추신경계의 학습과 기억에 관련된 신경 생리학적, 신경 병리학적 기전에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이렇듯 성공적인 모델제도는 상당한 어려움이 있으나, 학습과 기억에 관련된 뇌의 다양한 부위에서의 기능을 선택적으로 차단하는 방법을 통한 학습과 기억에 관련된 신경회로의 기능을 이해하고 기억 손상에 관련된 신경학적 기전을 규명하며, 궁극적으로 안정성이 높은 치료 및 예방약 개발을 위해 실험적 동물모델 개발이 필요하며 본 연구의 실험결과 192saporin과 ibotenic acid 손상 모델 모두 기억손상을 유발시켜 치매 모델에 적합한 것으로 사료된다.

AD에서는 대뇌의 측두엽, 전두엽, 두정엽의 일차연상영역(primary association area)이 특히 영향을 받으며, 해마와 편도핵도 심하게 영향을 받는다. 특히 해마의 CA1 부위에서 pyramidal cell들이 선택적으로 손상된다. Acetylcholine, dopamine, serotonin, GABA의 경우에는 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데²³, 그 중 AD 환자에 있어서 presynaptic neuronal marker의 생성에 관여하는 효소, 특히 choline acetyltransferase (ChAT)의 활성도가 측두엽, 해마와 편도에서 약 50~90% 정도 감소한다²⁴. 또한 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴 증상은 choline 성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있는데, AD에서 나타나는 기억력 상실과 다른 인지 결함이 신호를 전달해 주는 화학물질인 acetylcholine을 만들어 내는 신경세포의 퇴화 때문이라고 설명할 수 있으며 이 부족 현상은 acetylcholine을 분해하는 acetylcholine esterase로 더욱 심화된다²⁵. 실험적인 예로 쥐에게 medial septum과 nucleus basalis magnocellularis 부위에 ibotenic acid를 주입하였을 때 각각 hippocampus와 frontal cortex의 choline acetyltransferase의 활성이 감소하였다고 보고된 바 있다²⁶.

따라서 본 실험에서는 아세틸콜린성 신경세포가 주로 위치하는 medial septum에 흥분성 신경독소인 192saporin과 ibotenic acid를 주입함으로써 직접적으로 중추신경을 파괴할 뿐 아니라 해마로 투사되는 신경세포를 손상시켜 유도된 치매 모델에서 석창포, 조구등, 현호색, 황금, 천마 등이 함유된 새로운 복합방의

효능을 살펴보고자 하였다.

석창포(*Acorus gramineus* Soland)는 천남성과(Araceae) 다년생 초본 식물의 뿌리줄기로서 약리작용에 대한 연구로는 중추신경계에 대한 영향으로 진정작용, 건망증, 수면촉진 및 진통작용, 심혈관계통에 대한 영향으로 항부정맥작용, 혈압강하작용, 혈액순환촉진작용 등이 연구되어 있으며, 이외에도 호흡기계에 대한 진해작용 등 연구가 보고되어 있다²⁷. 최근 발표된 보고에 의하면 석창포로부터 나온 essential oil이 NMDA receptor에 작용하여 신경방어효과를 나타내었고²⁸, 석창포의 물과 메탄올 추출물이 각각 중추신경계에 효능이 있었으며^{29,30}, 또한 인지 기능 향상에 대한 보고가 있었다³¹. 석창포의 약리 성분으로 β -asarone(sis), asarone(trans) 등이 있지만 그외에도 caryophyllen, α -humulene, sekihshon, amino acid, 유기산 및 당류가 함유되어 있으며, 동의학에서는 열병으로 인한 혼수, 신경증, 건망증, 정신불안정, 식체, 우울증, 청력장애 등을 치료하는 데 사용하여 왔다³².

조구등(*Uncaria sinensis* Oliv. Havil)은 꼭두서니과(Rubiaceae) 덩굴성 목본 식물로서 한방 및 민간에서 전간 및 고혈압 치료제로 많이 사용되는 생약 중의 하나로, 이제까지 많은 연구자들이 그 성분 및 약효에 관해 보고한 바 그 주요 성분은 tetracyclic 또는 pentacyclic heteroyohimbine계 또는 oxyindole계의 알칼로이드라고 보도되었다³³. Tetracyclic oxyindole계 알칼로이드인 corynoxetine, rhynchophylline, isocorynoxetine, isorhynchophylline이 Ca^{2+} -antagonistic (contraction-inhibiting) activity를 갖는다고 Katsuya 등³⁴은 보고하였으며, 진정 작용 및 혈압강하 작용이 있다³⁵.

현호색(*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang)은 양귀비과(Papaveraceae)에 속하는 다년생 초본 식물로서 초현호색 또는 그 밖의 동속 식물의 덩이 줄기로서 어혈제거, 기침, 천식, 통증을 완화시키는 효능이 있으며, 현호색의 성분으로는 corydaline, tetrahydropalmatine, protopine, dehydrocorydaline, hydrastine, berberine 등의 알칼로이드가 분리 보고 되었다³⁶. 현호색 성분의 약리 작용으로는 corydaline의 진통작용³⁷, tetrahydropalmatine의 중추신경 억제 작용³⁸, protopine의 혈소판 응집 억제 작용³⁹, dehydrocorydaline의 소염 및 aldose reductase에 대한 저해 효과⁴⁰, hydrastine의 GABA_A 수용체에 대한 강력하고 선택적인 저해 효과⁴¹ 등이 보고 되었다. Berberine은 호흡기 자극, 일시적 저혈압 유도, tyrosine decarboxylase에 대한 저해 효과, 항균, 항진균, 항종양 작용⁴² 및 AchE에 대한 저해활성⁴³이 있다고 보고되었다. 그 외 현호색은 중추 신경계에 대한 작용으로 진통, 최면, 진정과 안정작용 및 항경련작용이 있다. Tetrahydropalmatine의 좌, 우선성 광학 이성질체의 작용은 다르게 나타나는데 좌선체는 진통, 진정 작용이 있으나 우선체에는 없다. 위장에 대한 작용으로 tetrahydropalmatine을 개의 피하에 주사해도 위액의 분비량에는 큰 영향이 없지만 대량 사용하면 위액의 총분비량은 현저히 감소되고 위액의 산성도와 소화력이 분명히 떨어진다. 내분비선에 대한 작용으로 tetrahydropalmatine은 랫트의 뇌하수체의 ACTH 분비를 촉진하며 이를 연속적으로 주사하면 ACTH의 분비를 자극하는 작용에 내성 또는 적응성이 나타난다. 또 저온 자극으로 일어나는 ACTH의 방출에 대해서 명확한 억제 작용이 있

다. 연속주사하면 더욱 갑상선의 증량도 뚜렷이 증가되어 갑상선의 기능에도 영향을 준다. 매일 피하 주사하면 마우스의 발정주기를 뚜렷이 억제한다⁴⁴⁾.

황금(*Scutellariae baicalensis* Georgi)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본식물의 뿌리로서 신농본초경⁴⁵⁾에 주제열황달(主諸熱黃疸), 축수(逐水), 하혈폐(下血閉), 악창저식(惡瘡疽蝕), 화왕(火瘍)이라고 수록되어 있으며 치장열번갈(治壯熱煩渴), 습열사리(濕熱瀉痢), 열림(熱麻), 붕루(崩癯), 태동불안(胎動不安), 제습열(除濕熱)하는 작용이 있어 임상에서 광범위하게 사용되는 약초 중의 하나이다. 황금의 약리성분으로는 baicalin, baicalein, wogonin 및 작용으로는 혈당 상승작용과 혈압 강하작용, 해열작용 등이 밝혀졌으며 항알레르기, 이완작용, 모세혈관 투과성 억제작용들이 보고되었다. 또 항염증작용, 지질대사 개선작용, 해독, 항균작용, 이뇨작용, 항암작용 등이 보고되었으며^{46,47)}, 이들 약리활성 발현은 flavonoid 성분과 밀접한 관계가 있는 것으로 되어 있다⁴⁸⁾.

천마(*Gastrodia elata*)는 난초과 다년생 기생 초본 식물의 뿌리줄기로서 신농본초경, 약성론 등의 한방에서 무독한 것으로 여겨지고 있고 주로 고혈압, 두통, 마비, 신경성 질환, 당뇨병 등의 심각한 성인병 뿐만 아니라 스트레스, 피로 등의 증상에 대하여 효능이 있는 것으로 알려져 있으며 gastrodin, p-hydroxybenzyl alcohol 등의 신경세포보호작용, 항경련작용, 항산화작용, 항균작용, 항지질과산화작용, 기억감퇴회복에 대한 실험적 근거가 많이 제시되고 있다^{49,50)}.

Ibotenic acid와 192saporin을 주입한 기억력 손상 모델에서 이들 복합한약제를 3주 동안 지속적인 투여는 수증미로검사를 이용한 행동학적 변화에 있어 공간 학습 능력 및 기억측정 결과 손상을 다소 회복시켰으며, 신경화학적 변화에 있어서 학습 및 기억에 관련된 아세틸콜린성 신경세포의 손상을 억제하였는데, 이는 해마에서 choline acetyltransferase의 활성을 증가시키는 것으로 사료된다. 이를 근거로 하여 치매에 대한 예방약 및 치료제의 개발을 위한 임상적 검증이 더 필요하다.

결 론

본 연구는 ibotenic acid와 192saporin을 medial septum에 주입하는 기억력 손상 모델에서 복합한약제를 지속적으로 투여한 후, 행동학적 방법으로 수증미로를 이용하여 학습과 기억에 대한 효과와 면역조직화학분석법으로 medial septum 부위에서 아세틸콜린성 신경세포의 활성을 살펴본 결과 다음과 같다.

수증 미로 학습의 획득시행에서 192saporin과 ibotenic acid 손상군이 모의시술군에 비해 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 유의하게 증가하였으며 5일째부터 약물 투여군에서 학습수행에 유의한 증진효과를 보였다. 수증 미로 학습의 검사시행에서 그룹간 통계적 유의미한 차이는 없었으나, 약물투여군에서 학습수행 증진효과의 경향성을 보였다. 조직분석법에서 192saporin 손상군은 모의시술군에 비해 medial septum에서 ChAT 면역반응세포의 발현을 다소 감소시켜 손상군에서 cholinergic cell의 감소와 퇴화가 많이 일어났다. 면역조직화학분석 결과 medial septum에서는 약물이 192saporin으로 손상된 ChAT 발현을 회

복시키는 소견을 보였다.

이상의 결과를 요약하면, 192saporin과 ibotenic acid 손상모델이 기억손상을 유발하여 특히 immunotoxic agent인 192saporin이 더 기억 손상을 유발시켜 치매동물모델으로 합당함을 확인하였으며, 석창포, 조구등, 현호색, 황금소, 천마 등을 함유한 한약 복합제의 지속적인 투여는 학습과 기억에 다소 효과적이고 아세틸콜린성 신경세포의 손상을 억제하는 효과를 보였으며, 치매 치료에 효과적임을 시사한다.

참고문헌

1. Andrea Eggert, M. Lynn Crismon, Larry Ereshefsky. Alzheimer's Disease. In Pharmacotherapy : a pathophysiologic approach. Dipiro JT et al. Ed., New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1325-1344, 1996.
2. National Institute of Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1996.
3. 서유현, 치매의 치료현황과 전망, life science and biotechnology 14호 특별논단
4. Levisohn CF, Isacson O. Excitotoxic lesions of the rat entorhinal cortex. Effect of selective neuronal damage on acquisition and retention of a non-spatial reference memory task. Brain Res. 564(2). 230-244, 1991.
5. Kaplan PW, Allen RP, Buchholz DW, Walters JK. A double-blind, placebo-controlled study of the treatment of periodic limb movements in sleep using carbidopa/levodopa and propoxyphene. Sleep. 16(8), 717-723, 1993.
6. Lukaszewaka L. Scopolamine impairs object exploration but not habituation in rats. Acta Neurobiol Exp(Warsz). 53(1):243-250, 1993.
7. Dawson GR, Iversen SD. The effects of novel cholinesterase inhibitor and selective muscarinic receptor agonists in tests of reference and working memory. Behav Brain Res. 57(2):143-153, 1993.
8. Dennes RP, Barnes JC. Attenuation of scopolamine-induced spatial memory deficits in the rat by cholinomimetic and non-cholinomimetic drugs using a novel task in the 12-arm radial maze. Psychopharmacology(Berl). 111(4):435-441, 1993.
9. Alzheimer, A. Uber eine eigenarte Eekrankung der Hirnrinde. Zentralbl Nervenheik. 30, 177-9, 1907.
10. Chui H, Zhang Q. Evaluation of dementia. A systematic study of the usefulness of the American Academy of Neurology's Practice Parameters. Neurology, 49:925-935, 1997.
11. 박종환. 노인의 기능 상태 평가. 신경정신의학. 34(3):636-641. 1995.
12. 장현갑 외 7인. 심리학. 서울. 교육과학사, p241-243, p247, p278-281. 1985.
13. Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S. Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide

- synthesis in the rat. *Brain Res.* 31;632(1-2), 36-40. 1993.
14. Wiley JL, Willmore CB. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on timing and short-term memory in rats. *Behav Pharmacol.* 11(5), 421-9. 2000.
 15. Carli M, Balducci C, Samanin R. Low doses of 8-OH-DPAT prevent the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal scopolamine through 5-HT(1A) receptors in the dorsal raphe.
 16. Hiramatsu M, Inoue K. Improvement by low doses of nociceptin on scopolamine-induced impairment of learning and/or memory. *Eur J Pharmacol.* 28;395(2), 149-56. 2000.
 17. 정재환, 김덕곤, 정승기, 이진용, 김장현, 조규석. 경희대학교 한의과대학 소아과학교실. 녹용 및 보아탕 가 녹용이 어린 흰쥐의 학습과 기억에 미치는 영향. *경희대논문집* 07 23(1), 2000.
 18. Sarkisian MR, Tandon P, Liu Z, Yang Y, Hori A, Holmes GL, Stafstrom CE. Multiple kainic acid seizures in the immature and adult brain: ictal manifestations and long-term effects on learning and memory. *Epilepsia.* 38(11), 1157-66, 1997.
 19. Stublely-Weatherly L, Harding JW, Wright JW. Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Res.* 15;716(1-2), 29-38. 1996.
 20. Janis LS, Glasier MM, Fulop Z, Stein DG. Intraseptal injections of 192 IgG saporin produce deficits for strategy selection in spatial-memory tasks. *Behav Brain Res.* 90(1):23-34. 1998.
 21. Shen J, Barnes CA, Wenk GL, McNaughton BL. Differential effects of selective immunotoxic lesions of medial septal cholinergic cells on spatial working and reference memory. *Behav Neurosci.* 110(5), 1181-6, 1996.
 22. Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci.* 15;20(4):1568-74, 2000.
 23. Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pieta C, Villetti G, Kendrick KM, Cuomo V. Biochemical and neurobehavioral profile of CHF2819, a novel, orally active acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 294(1), 187-194, 2000.
 24. Bullock BL. Pathophysiology. adaptation and alterations in function 4th edition. Philadelphia, Lippincott. p.1095-1097, 1996.
 25. Park CH, Kim SH, Choi W, Lee YJ, Kim JS, Kang SS, Suh YH : Novel anticholinesterase and antiamnestic activities of dehydrodiamine, a constitute of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.* 62(5), 405-409, 1996.
 26. Yamasaki R., Yamashita M., Taguchi K., Okada M., Ikeda, H. The role of two major cholinergic systems in memory acquisition and retention in the eight-arm radial maze. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 7, 173-181, 1992.
 27. 國家中醫藥管理局, 中華本草, 上海, 上海科學技術出版社, 1998.
 28. J. Cho, J. Y. Kong, D. Y. Jeung, K. D. Lee, D. U. Lee, B. S. Kang, NMDA receptor-mediated neuroprotection by essential oils from the rhizomes of *Acorus gramineus*, *Life Science* 68, 1567-1573, 2001.
 29. Jyh-Fei Liao, Sung-Yen Huang, Yüing-Ming Jan, Li-Li Yu, Chieh-Fu Chen, Central inhibitory effects of water extract of *Acorii graminei* rhizoma in mice. *J. Ethno-pharmacology*, 61, 185-193, 1998.
 30. J. Cho et al. Inhibition of excitotoxic neuronal death by methanol extract of *Acori graminei* rhizoma in cultured rat cortical neurons. *J. Ethnopharmacology*, 73, 31-37, 2000.
 31. Hsieh, M. T., Peng, W. H., Wu, C. R., Wang, W. H. The ameliorating effects of the cognitive-enhancing Chinese herbs on scopolamine-induced amnesia in rats. *Phytotherapy Research*, 14, 375-377, 2000.
 32. 이경순 외. *완역 중의약대사전*, 도서출판 청담, p2306-2312, 1999.
 33. J. D. Phillipson, S. R. Hemingway. *Lloydia*, 41(6), 503, 1978.
 34. Y. Joji, M. shuji, M. Hisashi, K. goro. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 90(3), 133, 1987.
 35. 이경순 외. *완역 중의약대사전*, 도서출판 청담, p423-427, 1999.
 36. Hao, H. and Qicheng, F. Chemical study on alkaloids from *Corydalis bulleyana*. *Plant Med.* 52, 193-198, 1986.
 37. Chin, K. C. and Hsu, P. The pharmacological activity of *Corydalis*. I, Analgesic action of *Corydalis* A. B and L. *Sheng Li Hsueh Pae* 21, 150-157, 1957.
 38. Chin, K. C., Cheng, H. G. and Hsu, P. The pharmacological activity of *Corydalis* XII. The effect of optical isomers of tetrahydropalmatine on central nervous system. *Sheng Li Hsueh Pae*, 27, 47-58, 1964.
 39. Matsuda, H., Shiimoto, H., Namba, K. and Kubo, M. Effect of protopine in blood platelet aggregation. *Planta Med.* 54, 498-501, 1988.
 40. Kubo, M., Matsuda, H., Tokuoka, K., Kobatashi, Y., Ma, S. and Tanaka, T. Studies of anti-cataract drugs from natural sources. I. Effects of a metabolic extract and alkaloidal components from *Corydalis* Tuber on in vitro aldose reductase activity. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 458-459, 1994.
 41. Huang, J. H. and Johnson, G. A. R. (+)-Hydrastine, a potent competitive antagonist at mammalian GABA_A receptors. *Br. J. Pharmacol.* 99, 727-730, 1990.
 42. Tanaka, T., Metori, K. and Kobayashi, S. Inhibitory effects of berberine-type alkaloids on elastase. *Plant Med.* 59, 200-202, 1993.
 43. Chun, Y. T., Yip, T. T., Lau, K. L., Kong, Y. G. and Sankawa, U. A biochemical study on the hypotensive effect

- of berberine in rats. *Gen. Pharmacol.* 10, 177-184. 1979.
44. 이경순 외. *완역 중의약대사전*, 도서출판 정담, p2967-2973, 1999.
45. 손성연. *신농본초경*. 2권 p13, 의도한국사영인.
46. Du X, Li B, Pan Y, Mali. A histochemical study on baicalin. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. Mar;23(3):137-8, 191. 1998.
47. Kim YO, Leem K, Park J, Lee P, Ahn D, Lee BC, Park HK, Suk K, Kim SY, Kim H. Cytoprotective effect of *Scutellaria baicalensis* in CA1 hippocampal neurons of rats after global cerebral ischemia. *J Ethnopharmacol.* Oct.77(2-3):183-8. 2001.
48. Li BQ, Fu T, Gong WH, Dunlop N, Kung H, Yan Y, Kang J, Wang JM. The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacology*. Sep;49(3):295-306. 2000.
49. Kim HJ, Moon KD, Oh SY, Kim SP, Lee SR. 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.* Nov 13;314(1-2):65-8 .2001.
50. Hsieh MT, Wu CR, Chen CF. Gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol facilitate memory consolidation and retrieval, but not acquisition, on the passive avoidance task in rats. *J Ethnopharmacol.* Mar;56(1):45-54. 1997.