

육미지황탕가미방에 의한 흰쥐 기억력 향상과 관련된 Hippocampus 부위의 특이 유전자 발현에 대한 연구

심대식¹ · 노삼웅¹ · 이진우¹ · 이은아² · 조종운² · 배현수^{1,2} · 신민규¹ · 홍무창^{1*}

1: 경희대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 퓨리메드(주) 기업부설연구소

Effect of Memory-enhancing Herbal Extract (YMT_02) on Modulating Pentraxin, PEP-19 and Transthyretin gene Expression in Rat Hippocampus

Dea Sik Sim¹, Sam Woong Rho¹, Jin Woo Lee¹, Eun A Lee²,
Chong Woon Cho², Hyun Su Bae^{1,2}, Min Kyu Shin¹, Moo Chang Hong^{1*}

1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, 2: Purimed R&D Institute

The herbal extract(YMT_02) is a modified extracts from Yukmijihwang-tang(YMJ) to promote memory-enhancing. The YMJ extracts has been widely used as replenishing yin and tonifying the kidneys herbal medicine for hundred years ia Asian countries. The purpose of this study is to: 1) quantitatively evaluate the memory-enhancing effect of YMT_02 by passive avoidance test, 2) statistical evaluation of candidate gene expression (pentraxin, PEP-19, transthyretin) in rat hippocampus. The hippocampi of YMT_02 and control group were dissected and mRNA was further purified. After synthesizing cDNA using oligo-dT primer, the cDNA were applied to Real Time PCR. The results were as follows : 1) passive avoidance test showed enhancing memory retentin by YMT_02 treatment, 2) expression of pentraxin, that accelerate degenerating of neuronal cell, was significantly decreased, 3) the mRNA of genes that has been known to be associated with protecting neuronal cell degeneration, such as PEP-19 and transthyretin, were significantly increased upon YMT_02 treatment. From above results, the administration of YMT_02 which tonify the function of Kidneys could enhance the ability of memory and learning. In addition, the administration of YMT_02 enhance memory retention through modulating particular gene (pentraxin, PEP-19, transthyretin) expressions in hippocampu

Key words : Yukmijihwang-tang, pentraxin, PEP-19, transthyretin, memory, learning, mRNA expression

서론

기억이란 일련의 정신활동중 개체가 필요한 정보를 받아들여 저장하였다가 필요한 때에 의식세계로 꺼내어 사용하는 능력을 말한다^{1,2)}. 한의학에선 정신활동을 정신과 신체의 상호 보완적인 통일체라는 일원론적인 관점에서 보았다. 즉 정신적인 현상들도 五神으로 요약하여 인체의 오장과 결부시키고 이러한 기초위에서 정신의 작용은 오장의 원활한 활동 및 상호협조로 이루어지는 것으로 인식하였다³⁾. 이 五神은 人神이 분화되어 나타나는 정신으로 각기 오장에 저장되어 서로 다른 정신작용을 발휘하며 인간의 정신활동을 이해하는데 핵심이 되는 개념으로 보았다⁴⁾.

서양의 심리학에서는 기억에 대해 부호화, 저장 및 인출의 세

단계 행위로 구분하여 설명하고 있으며⁵⁾ 형태적으로는 단기 기억과 장기 기억으로 구분할 수도 있겠다. 장기기억은 현재 우리 무의식에서 잠정적으로 활동하며 쉽게 망각되는 단기기억⁶⁾이 반복되거나 강력한 신호일 경우 대뇌 Hippocampus부의 기억의 강화기제를 통하여 장기 기억화 된다는 보고가 있었다⁷⁾.

김 등⁸⁾은 현재의 의식속에는 없지만 저장되어 있다가 생각으로 떠올릴 수 있는 장기기억이 精를 바탕으로 한 志가 된다고 하였으며 이 등⁹⁾도 志가 장기기억을 의미함을 말한바 있다. 근래 기억능력 향상에 대한 관심이 증가되어 많은 한의학적인 실험 및 연구가 진행되어 왔고 腎기능을 강화시키는 육미지황탕, 숙지황, 구기자 등의 투여로 실험 동물의 장기 기억이 증강됨을 확인할 수가 있었고⁹⁻¹¹⁾ 이러한 연구들의 경향은 주로 어떤 장부의 강화나 어떤 방제나 어떤 단방으로 기억능력 향상에 초점을 맞춘 연구들이다. 최근의 연구는 기억 능력 향상이 어떠한 기전으로 이루어지는가에 대한 연구로서 최¹²⁾에 의하면 腎기능을 강화하는

* 교신저자 : 홍무창, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학
· E-mail : hongmc@khu.ac.kr · Tel : 02-961-0323
· 접수 : 2003/03/17 · 수정 : 2003/04/19 · 채택 : 2003/05/26

육미지황탕가미방의 투여로 기억능력 향상이 확인 된 흰쥐의 Hippocampus에서 발현하는 약8,000개의 유전자들을 검색하여 발현양의 차이가 의미가 있다고 보여진 총27개의 유전자중에서 신경퇴화 지표물질인 pentraxin (Neuronal pentraxin precursor)¹³⁾, 신경퇴화 억제와 관련된 PEP-19 (Neuron-specific protein PEP-19)¹⁴⁾, 신경세포 성장에 간접적으로 관련된 transthyretin¹⁵⁾ 등에 대하여 보고하였다. 그러나 기억과 관련하여 수천개의 유전자 발현양을 비교하여 기억능력 증강에 대한 대략적 기전을 제시하였으나 개개 유전자에 대하여 다수의 샘플을 이용한 통계적 유의성 평가가 부족하여, 본 연구에서는 상기의 3가지 유전자 발현양상을 중심으로 통계적으로 분석하였다.

이에 저자는 보음보신의 대표적 방제인 육미지황탕에 기억능력 증강 효과가 있는 구기자를 가미한 육미지황탕가미방을 투여 처방으로 하여 흰쥐의 기억력의 향상을 확인한 후 대뇌 Hippocampus에서 추출한 pentraxin, PEP-19, transthyretin 유전자의 발현양을 여러마리의 흰쥐를 대상으로 한 실험에서 Realtime ReverseTranscription-Polymerase Chain Reaction 방법으로 검증하여 그 통계적 유의성을 평가하고 Hippocampus에서 관여하는 유전자를 통하여 기억력 증강 기전에 대한 知見을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조 및 투여

1) 육미지황탕가미방 (YMT_02)

본 실험에 사용한 약재는 최¹²⁾가 사용한 시료의 알코올 추출물 표품을 경희대학교 한의과대학 생리학교실로부터 제공받아서 약재의 추출 전 배합비율대로 회수율을 이용하여 배합해서 사용하였다. 배합한 시료는 1 g/ml 농도로 증류수에 완전히 녹이고 불용성 물질을 제거하기 위하여 10,000 × g에서 15분간 원심분리한 후 상청액을 떠내서 0.22 μm filter를 통과시켜 사용하였다.

YMT_02의 처방내용 및 용량, 회수율은 Table 1.과 같다.

Table 1. Contents of YMT_02

Herbs	Dose	Retrieval rate
熟地黄 <i>Rehmanniae Radix Preparata</i> (Korea)	16 g	19.83%
枸杞子 <i>Lycii Fructus</i> (Korea)	16 g	20.05%
山藥 <i>Dioscoreae Rhizoma</i> (Korea)	8 g	10.22%
山茱萸 <i>Corni Fructus</i> (Korea)	8 g	41.64%
白茯苓 <i>Poria</i> (Korea)	4 g	1.11%
牡丹皮 <i>Moutan Cortex</i> (Korea)	4 g	21.45%
澤瀉 <i>Alismatis Rhizoma</i> (Korea)	4 g	20.92%
Total	60 g	

2) 시료의 투여

실험동물에게 기억검사를 실시하기 전 10일간 실험동물의 체중 100 g 당 400 mg의 YMT_02가 투여되도록 YMT_02 알코올 추출물을 첨가한 음용수를 섭취하게 하였으며 학습과 기억검사가 진행되는 동안에도 계속하여 투여하였다.

2. 행동실험

1) 실험동물

실험동물은 체중 180 g 전후의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 샘타코 Bio Korea (오산, 한국)에서 구입하여 실험실 환경에서 2주일간 적응시킨 후 250-300 g의 체중이 되었을 때 사용하였으며, 대조군과 실험군 각각 10마리씩 배당하였다. 물과 고형사료(제일사료 주식회사, 대전)는 충분히 공급하여 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실 내의 온도는 22 ± 2°C, 습도는 50 ± 10%를 유지하였고 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로 하였다.

2) 왕복상자 (Passive avoidance box)

수동회피실험을 위해 제작된 왕복상자는 GEMINI Avoidance System (San Diego Instruments, USA)의 모델을 바탕으로 크기를 60 cm × 20 cm × 20 cm로 변경하여 정도산업 (Seoul, Korea)에서 제작하여 사용하였다. 이 상자는 아크릴 판을 벽으로 하여 동일한 크기의 두 방으로 나뉘어 있으며 두 방을 나누는 벽에는 가로, 세로 각 10 cm인 단두대 형식의 불투명 문이 있어 외부에서 상하로 열고 닫을 수 있게 하였다. 좌측 방의 뚜껑에는 250 W의 나트륨 전구를 달아 실험동물이 싫어하는 밝고 뜨거운 환경을 조성하였다. 우측 방의 바닥에는 전기충격을 실험동물의 발바닥에 가할 수 있도록 밀면에 스테인레스 봉을 이용한 통전장치를 설치하였고 AC 가변전원 전기충격발생기를 이용하여 2.0 mA의 전기충격을 가할 수 있게 하였다. 좌측 방의 밝기 및 온도를 증가시키기 위해 좌측 방의 벽은 알루미늄 호일로 코팅하여 빛의 반사를 최대화하였으며 우측 방은 무광의 검은 색으로 칠하였다. 실험동물의 위치를 밖에서 확인하기 위하여 위쪽에 높이 1 cm의 작은 반투명 창을 만들었다.

3) Passive avoidance test

실험은 Da Cunha의¹⁶⁾ 방법을 응용하여 시행하였다.

(1) 학습 (Training session)

학습은 2일 동안 진행되었다. 실험 시작 1시간 전에 실험동물을 행동관찰실로 옮기고 안정시켰다.

① 학습 1일째 : 왕복상자의 좌측 방의 불을 켜고 중간개폐문을 개방한 후 실험동물을 꼬리가 문쪽으로 향하게 위치시켰다. 실험동물은 방을 탐색하다가 본능적으로 어둡고 서늘한 우측 방으로 이동하게 된다. 실험동물이 우측 방으로 이동하면 1분간 우측 방을 탐색하게 한 후 실험동물을 꺼내었다. 이와 같은 방법을 2회 반복하여 우측 방이 상대적으로 안락한 환경임을 학습시켰다.

② 학습 2일째 : 왕복상자의 좌측 방에 불을 켜고 실험동물을 꼬리가 문쪽으로 향하게 위치시키면 실험동물은 곧바로 우측 방으로 이동하게 된다. 이때 중간개폐문을 닫고 우측 방의 바닥에 장치된 전기충격장치를 이용하여 실험동물의 발바닥에 2.0 mA의 전기충격을 5 초간 가하였다. 전기충격을 가한지 4 초 후에 문을 열어주면 실험동물은 곧바로 좌측 방으로 이동하게 된다. 이런 식으로 우측 방에는 강하고 불쾌한 전기자극이 있음을 학습시켰다.

(2) 기억검사 (Retention test)

기억 검사는 2일째의 학습이 끝난 후, 24시간 후에 실시하였다. 왕복상자의 좌측 방에 불을 켜고 중간 개폐문을 연 상태에서

실험동물의 꼬리가 문 쪽으로 향하게 우측 방에 위치시켰다. 실험동물의 기억능력이 우수할 수록 학습 2 일째 경험했던 불쾌한 전기자극을 기억하고 우측 방으로 진입하는 것을 꺼리게 된다. 앞발과 뒷발 모두가 우측 방으로 들어간 시간을 측정하였다. 측정시간은 초 단위로 기록하며 600 초 이상이 경과될 경우에는 600 초에서 종료하고 600 초로 기록하였다.

3. Realtime RT-PCR

1) Total RNA의 분리

실험동물의 증추신경계에 미치는 영향을 최소화하기 위해 마취제를 사용하지 않는 한편 대뇌에 손상을 주지 않기 위해 척추에 단발성의 강한 손상을 주어 희생시킨 뒤 양측 Hippocampus를 채취하여 200 μ g의 Trizol solution (Invitrogen Life Technologies, Rochville, USA)에 담아 -80 $^{\circ}$ C에서 보존하였다. 제조사의 protocol에 준하여 total RNA를 분리하였다. Hippocampus 조직은 pellet pestle을 이용하여 균질화 하였다. 균질화된 용액에 300 μ l의 Trizol solution을 첨가하고 가볍게 vortex한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 용액에 다시 100 μ l의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리하였다. 상청액을 새로운 tube에 옮기고 여기에 250 μ l의 Isopropanol을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리하였다. 상청액을 제거한 후 pellet을 500 μ l의 75% ethanol로 세척한 후 4 $^{\circ}$ C에서 7,500 \times g로 5분간 원심분리 하였다. 상청액을 제거한 후 pellet을 건조하고 250 μ l의 DEPC (diethylpyrocabonate) 처리 증류수에 녹여 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc. Fullerton, USA)로 정량하여 0.25 μ g/ μ l의 농도가 되게 하였다.

2) cDNA의 합성 (Reverse Transcription)

Single strand cDNA의 합성은 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Rochville, USA)을 이용하여 제조사의 protocol에 준하여 실시하였다. 2 μ g의 total RNA에 1.1 μ l의 10 \times DNase I Reaction buffer, 1 μ l의 1 U/ μ l DNase I (Invitrogen Life Technologies, Rochville, USA)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 11 μ l이 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었는지 모를 DNA를 제거하였다. 반응후 1 μ l의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 PCR 반응을 하였다. 10 μ l의 반응액에 1 μ l의 0.5 μ g/ μ l Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen Life Technologies, Rochville, USA)를 첨가한 후 70 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4 μ l의 5 \times first strand buffer, 1 μ l의 10 mM each dNTPs, 2 μ l의 0.1M Dithiothreitol, 1 μ l의 200 U/ μ l M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5 μ l의 40 U/ μ l RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies, Rochville, USA), 5.5 μ l DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 μ l로 만들고 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양하여 enzyme를 불활성화 하였다.

3) Realtime PCR (Polymerase Chain Reaction) 반응

각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 Realtime PCR을 실시하였다. 1 μ l의 cDNA에 12.5 μ l의 2 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), 각각 1.5 μ l의 5 μ M sense, antisense primer (Genotech co. Daejun, Korea), 8.5 μ l의 증류수를 넣어 25 μ l가 되게 한 후 Gene Amp 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Warrington, UK)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 최초 denaturation한 후 95 $^{\circ}$ C 15초, 62 $^{\circ}$ C 45초를 40 cycle 반복하였다. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), Pentraxin (Neuronal pentraxin precursor), PEP-19 (Neuronal specific protein PEP-19), transthyretin 유전자의 primer sequence는 Table 2와 같다.

Table 2. Sequences of primer Used for Realtime PCR

Gene	Primer sequence	Amplicon Size (bp)
GAPDH	sense: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'	236
	antisense: 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'	
Pentraxin	sense: 5'-AAG GAG GTT GTG TCC AGG TG-3'	243
	antisense: 5'-ATG GAC CTG TGT GGA AGG AG-3'	
Transthyretin	sense: 5'-CTC TGG TCA TCG CCA CTA CA-3'	185
	antisense: 5'-CCG AGT TGC TAA CAC GGT TT-3'	
PEP-19	sense: 5'-ACC GTC CAT CCA GAA ATG AG-3'	160
	antisense: 5'-GAG GAA AAT CGT TGC AGA GG-3'	

cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도당 3개씩 PCR 하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 amplification이 threshold에 도달한 Cycle number (Ct)를 기준으로 standard curve를 그려서 정량하였고 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization하였다. PCR 반응의 종료 후 60-95 $^{\circ}$ C 사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하고 peak가 하나인지를 확인하는 한편 2% agarose gel에서 band의 size를 확인함으로써 non-specific PCR product나 primer dimer 등이 없는지를 확인하였다.

4) 전기영동

2% agarose gel에서 PCR 반응액 5 μ l를 loading하고 1 \times TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetate pH 8.1, 2 mM EDTA)에서 100 volt, 30분 동안 전기영동한 후 Ethidium Bromide로 염색하여 GEL-DOC (Photodoc system, Bio-Rad, USA)에서 확인하였다.

5) Data의 처리

PCR data는 GeneAmp 5700 software (PE Biosystems, Warrington, UK)을 이용하여 얻었고 mean \pm S.D.로 표시하였다. 통계처리는 SPSS 8.0 for windows (SPSS, Inc. USA)를 이용하여 행동실험 결과는 Mann-Whitney test, RT-PCR 결과는 Student T-test로 각각 처리하였으며, 선형회귀분석 및 plotting은 GraphicPad Prizm 3.02 (GraphicPad software, Inc. USA)를 이용하였다.

실험결과

1. 기억능력평가

YMT_02가 흰쥐의 사건기억의 장기 보유에 미치는 영향을 알아보기 위해 학습 24시간 후 기억 능력 측정을 한 결과는 Fig. 1과 같다. 측정 결과 우측 방의 전기자극에 대한 공포를 기억함으로써 우측 방으로 가기를 주저하는 시간인 retention latency가 실험군 (n=10)에서 568.7±72.40초로 대조군 (n=10)의 238.1±72.40초에 비해 유의성있게 길었다.(p=0.0026, Mann-Whitney test).

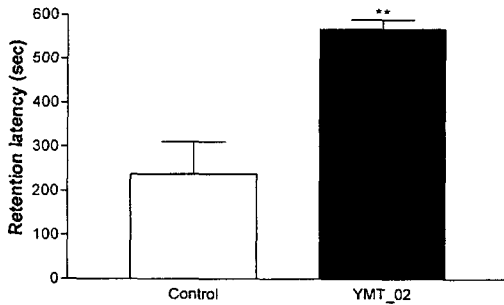


Fig. 1. The retention latency of passive avoidance response. The retention test was performed 24 h after training session. Control : group of rats without any treatments (n=10), YMT_02 : group of rats administered with 400 mg/100g/day of YMT_02 for 10 days (n=10). Comparisons were made by using Mann-Whitney test. ** p<0.01 vs. respective control group.

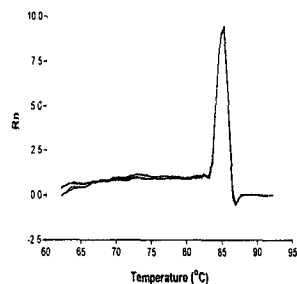
2. Realtime RT-PCR

실험군과 대조군 각각의 hippocampus에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 Realtime PCR함으로써 특정 유전자의 발현량의 평가한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 Internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 작성된 standard curve는 Fig. 2와 같다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R2는 0.9944로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. 작성된 standard curve를 기준으로 하여 평가한 각 sample의 상대적 양은 Table 3과 같다.

A. Dissociation curve of GAPDH



B. Standard Curve of GAPDH

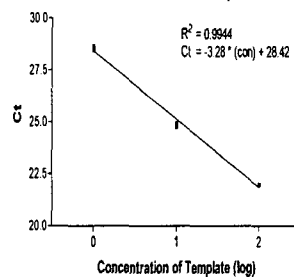


Fig 2. Dissociation and Standard curve of GAPDH as internal control A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 60 to 93°C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer. B: Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

Table 3. Relative expression level of GAPDH

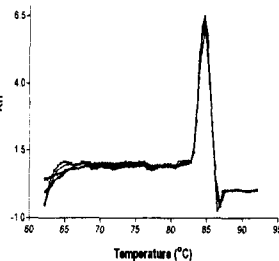
Control	Expression level of GAPDH	YMT_02	Expression level of GAPDH
C1	185.25±10.87	Y1	119.73±12.43
C2	250.13±23.14	Y2	216.16±17.14
C3	203.20±19.36	Y3	247.78±21.51
C4	197.27±12.24	Y4	226.41±19.85
C5	183.49±17.27	Y5	218.76±15.03
C6	225.21±19.04	Y6	216.57±21.50
C7	193.00±18.51	Y7	243.00±19.97
C8	218.18±19.03	Y8	228.18±25.03
C9	226.67±22.72	Y9	226.37±18.24
C10	214.24±25.91	Y10	194.74±11.51

The relative expression levels of GAPDH were obtained according to standard curve.

2) Pentraxin

Pentraxin 유전자에 대한 Realtime PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 3과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9992로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of Pentraxin



B. Standard Curve of Pentraxin

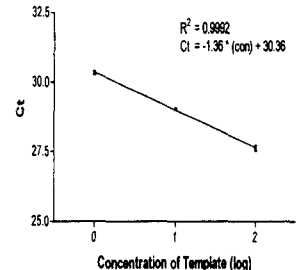


Fig 3. Dissociation and Standard curve of Pentraxin

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 Pentraxin 유전자의 상대적 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 4). 실험군에서의 Pentraxin mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 1.96배 유의성있게 적게 발현된 것으로 나타났다 (p<0.05).

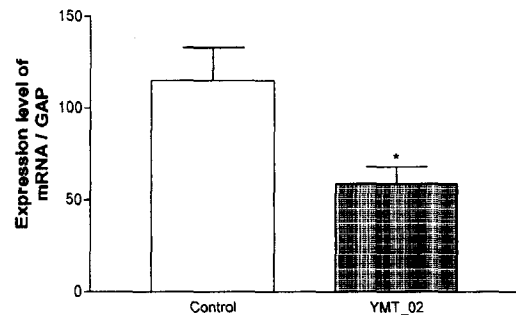


Fig 4. Expression level of Pentraxin Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. * : p<0.05 vs Control group

3) PEP-19

PEP-19 유전자에 대한 Realtime PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 5과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9996으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

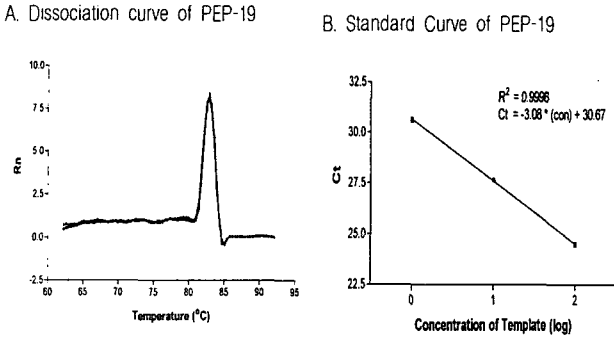


Fig 5. Dissociation and Standard curve of PEP-19

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 PEP-19 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 6). 실험군에서의 PEP-19 mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 1.80배 유의성있게 많이 발현된 것으로 나타났다 (p<0.05).

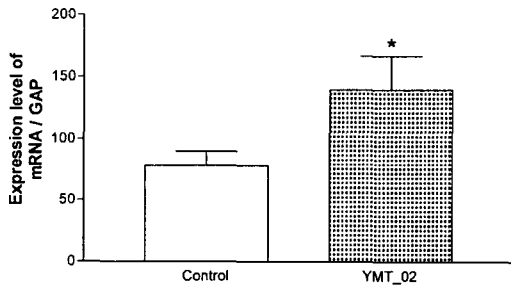


Fig 6. Expression level of PEP-19 Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. * : p<0.05 vs Control group

4) Transthyretin

Transthyretin 유전자에 대한 Realtime PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 7과 같다.

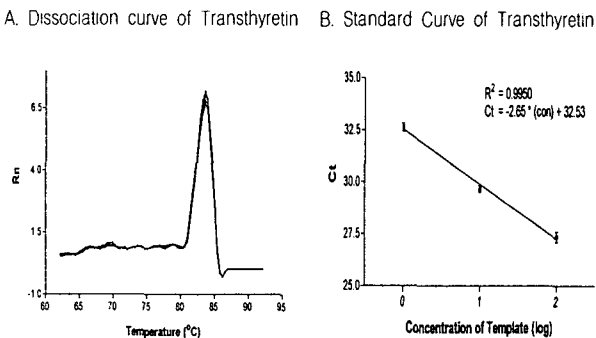


Fig 5. Dissociation and Standard curve of Transthyretin

Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀 분석결과 R2는 0.9950으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 Transthyretin 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 6). 실험군에서의 Transthyretin mRNA의 발현량은 대조군에 비하여 2.23배 유의성있게 많이 발현된 것으로 나타났다 (p<0.01).

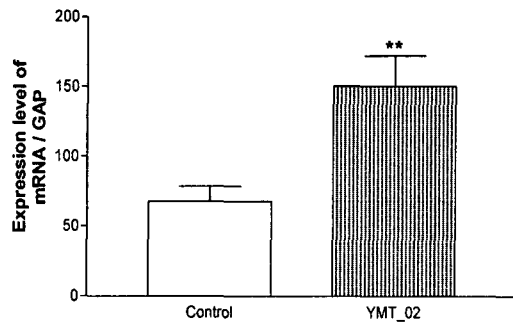


Fig 6. Expression level of Transthyretin Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH. ** : p<0.01 vs YMT_02 group

고찰

한의학과 서양의학의 정신생리학을 규정해 본다면 정신-신체의 일원론과 이원론의 비교로 볼 수 있겠다. 즉 정신적인 과정과 신체적인 과정의 분리를 의미하는 것이 이원론이며 形神一體의 관점에서 보는 것이 한의학의 일원론이라 하겠다⁶⁾. 따라서 인간이 정신활동을 뇌라는 일부분에서 발현하는 현상으로 국한시키지 않고 전일적 차원에서 이러한 현상을 神이라 하여 오장과 연관되어 그 기능을 구체화하였다¹⁷⁾.

오장이란 생체기능의 발현을 특징으로 귀속시킨 개념으로서 그 중 腎의 경우 침정, 배설에 관련되는 제기능을 포괄하는 것이며 넓게는 腎臟, 膀胱, 骨, 髓, 髮, 耳, 命門, 三焦, 前陰, 後陰 등이 腎기능계를 의미한다. 또한 腎의 精을 간직하고, 髓와 骨을 주관하며, 髓를 生하고 또한 納氣하는 기능을 함으로서 인체의 生髓, 生長發育, 老衰와 밀접한 관계가 있다고 할 수 있겠다¹⁸⁾. 腎과 관련하여 《內經》^{19,20)}과 《難經本義》²¹⁾에서는 腎은 精을 藏하고 精은 志를 머물게 한다는 腎, 精, 志의 관계를 언급하였고, 두뇌는 精髓의 집합체임을 밝히고 있으며^{19,20)}, 精이 인간의 정신활동의 물질적 기초가 됨을 말하였다¹⁹⁾. 또한 精의 인체의 우주에 대하여는 精이 炁를 따라 상하를 승강하여 뇌와 상통하고 있음을 밝혀왔다고 하겠다^{22,23)}. 五神 중 志가 腎에 귀속됨을 알 수가 있으며, 《靈素節注類篇》²⁴⁾에서 이에 대해 주석하기를 “志, 腎之神也 主記持事物 志傷故喜忘其前言”이라 하여 志를 기억으로 보았다. 이에 대해 김⁶⁾ 등은 앞에서 언급한바와 같이 장기 기억이 志가 된다고 하였으며, 志란 作強官能으로 의식사항을 정화하여 침정의식으로 존치 함으로서 무의식화 하였다가 총동을 받으면 의식화할 수 있는 정신활동이며, 정신활동의 관념화 경향성을

의미한다고 하였다. 윤¹⁷⁾은 기억의 생성과 저장, 상기, 소멸과정에 대하여 “기억 활동에는 기억을 회생시키는 발생기능, 불필요한 기억의 회생을 억제하는 억제기능, 기억을 자기화하는 통합기능, 의식화한 것이나 새로 오는 기억재를 침전 정화하여 잔존시키는 침정기능, 정신활동을 지속시키는 추진기능이 있어야 한다”고 하여 기억과정에서 오장이 모두 각각의 역할을 하고 있지만 기억을 저장하는 측면에서는 腎의 침정기능이 가장 중요하다고 하였다. 따라서 腎과 관련된 志는 무의식속에 침정된 기억을 의미하며 오랫동안 망각되지 않는 장기 기억을 의미한다 하겠다. 서양의 심리학에서는 기억을 해내는 행위는 기억과정의 세 가지 측면에서의 성공을 함축한다고 하였다. 첫 번째는 부호화로서 정보의 획득과 관련하여 정보가 저장되는 형태, 즉 부호를 지칭하며 두 번째는 저장으로 부호화된 경향이 어떤 기록(기억흔적)을 남겨서 영구적인 형태로 저장되는 것이다. 마지막 측면은 저장된 모든 기억흔적중에 특정한 것을 선택하여 기억해 내려고 시도하는 시점, 즉 인출을 말한다²⁵⁾. 또한 기억은 기억저장의 독특한 구조적 특징에 따라 감각기억, 단기기억, 장기기억의 세 가지 종류로도 나눌 수 있다. 감각기억은 지각과정과 비슷한 것으로서 잠시 동안 남아 있다가 순간적으로 사라지는 기억이고, 단기 기억은 부호화되어 저장되기 전까지의 기억으로 반복을 통하여 장기 기억 속으로 전이되지 않으면 망각되며 지속시간이 약 30 초 이내로 매우 한정적인 기억이다. 장기기억은 현재의 의식속에는 없지만 어딘가 저장되어 있어 상기 가능한 기억으로, 반복연습을 통하여 정보를 체계적으로 조직하여 저장하고 용량이나 지속시간에는 제한이 없다 하겠다^{26,27)}. 이러한 단기기억은 五神중 脾의 意와 관련하여 살펴볼 수 있는데 意는 心이 ‘憶’한바라 하였고 ‘憶’은 ‘追憶’, ‘回憶’이라고 하여 기억을 뜻하나 이는 의식표면에 존재하는 비교적 단기적인 기억을 의미하며^{28,29)}, 장기기억은 腎의 志와 관련하여 志는 “意之所存謂之志”¹⁹⁾, “久存”, “專意而不移”, “事物所以不忘”^{28,29)}이라하여 무의식속에 침정된 오래동안 잘 잊어버리지 않는 장기기억을 의미한다고 볼 수 있겠다. 따라서 단기기억은 의식이 집중되어 있는 상태에서 주어진 정보를 잠깐 집중하여 기억하는 “意”의 개념이며, 장기기억은 이미 무의식속에 저장되어 필요에 의해 상기해 낼 수 있는 “志”의 개념으로 볼 수 있겠다. 腎과 기억장애라는 측면에서는 “喜忘”, “善忘”이라 하여 “腎의 怒함이 그치지 않으면 志가 傷하여 앞의 말을 잘 잊어버린다”고 하였으며^{19,30,31)}, “腎은 志와 精을 藏하고, 精은 髓를 生하여 腦와 通한다”하였으므로 精의 쇠약은 기억력의 저하를 유발할 수 있다 하겠다.

본 연구에 이용된 육미지황탕은 《金匱要略》³²⁾의 腎氣丸에서 육계와 부자를 거하고 입방한 방제로, 宋代 錢乙의 《小兒藥證直訣》³³⁾에 地黃丸이란 처방명으로 최초로 수록되어 여러 의가에 의해 腎水不足^{34,35)}, 陰虛陽亢³⁶⁾, 先天元氣不足^{37,38)}, 腎精不足³⁹⁾ 등에 광범위하게 사용되었으며, 근대에 윤⁴⁰⁾은 陰虛로 발생하는 일체 병증에 본방을 가감하여 치료한다고 하였고, 하⁹⁾에 의해 기억능력 증강이 확인되었다. 구기자는 “性味는 平甘하며 肝腎을 補하고, 精血을 生하는 효능이 있다”^{41,42)}하였으며 이⁸⁾에 의해 기억능력 증강을 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 이에 근거하

여 육미지황탕에서 구기자를 균약으로하여 보신, 보음, 보정의 효력을 강화한 육미지황탕가미방을 흰쥐에게 섭취하게 하여 수동적 회피학습과 시간에 따른 망각검사를 실시하였다. 기억능력의 평가 방법으로는 수중 T 미로⁴³⁾, Morris 수중 미로⁴⁴⁾ 등을 이용한 공간지각 능력의 평가와, 왕복상자에서의 수동회피실험⁴⁵⁾을 통한 사건기억능력의 평가 등이 알려져 있다. 일반적으로 기억이라 함은 공간에 대한 기억능력이 아닌 특정사건이나 단어 등에 대한 기억을 의미하므로, 미로를 이용한 평가보다는 수동회피실험이 더 적당하다 할 수 있으며 왕복상자를 이용한 수동회피실험은 불쾌자극에 대한 기억의 지속시간을 측정하기 위해 사용되어 왔는데, 비협조적인 동물도 쉽게 실험할 수 있고, 어떤 동물도 짧은 시간에 용이하게 학습시킬 수 있는 이점이 있으며, 특히 흰 쥐는 수년간의 행동생리학적 연구를 통해 왕복상자를 이용한 수동회피실험에 적합한 동물임이 입증되어 약물 투여 후 기억 능력 평가실험⁴⁶⁻⁵⁰⁾, 중풍이나 종양 등 뇌질환 동물모델을 이용한 기억능력 평가실험^{51,52)}, 유전자의 차이에 따른 기억능력 평가실험^{53,54)} 등 다양한 분야의 행동실험에 활용되어 왔다. 통상적 기억 검사는 2일째의 학습이 끝난 후, 6시간, 24시간, 72시간, 168시간 후에 실시하게되나, 본 실험에서는 시간대별 기억능력을 평가하기보다는 장기기억능력의 향상을 확인하는데에 초점을 두어 선행연구 결과 중 가장 우수한 기억능력 증강을 보여 주었던 24시간 후 기억능력만을 비교하였다. 그 결과 기억능력 측정결과 전기자극에 대한 공포를 기억함으로써 우측방으로 가기를 주저하는 시간인 retention latency이 실험군과 대조군에서 각각 약 568 초, 238초로 육미지황탕가미방을 투여한 실험군이 장기 기억능력이 월등히 향상된 것을 알 수 있었다. 최근 최¹²⁾ 등은 기억능력 향상이 어떠한 기전을 통하여 이루어지는가에 초점을 두어 연구하여 흰쥐의 Hippocampus에서 추출한 pentraxin, PEP-19, transthyretin 유전자 발현량의 차이가 있음을 보고하였다. Hippocampus에 대하여는 기억의 강화는 단기기억이 장기기억으로 반드시 거쳐야 하는 통로로써 특히 서술형 기억은 말초에서 받아들여진 신호가 그신호에 관련된 대뇌피질을 통하여 받아들여지고 다시 Hippocampus의 CA1이나 CA3 circuit를 거침으로써 시냅스에 장기 저장되는 것으로 신호의 복잡성과 강도가 클수록 강화기제가 강하며 시냅스에 저장되는 부위도 여러 부위가 되므로 더욱 길고 선명하게 기억된다고 하였다⁷⁾. 본 연구의 대상유전자인 pentraxin유전자는 A-P protein 과 C-R protein과 같은 pentraxin family중 하나로써 주로 소뇌, Hippocampus, 대뇌피질에게서 많이 발현되고⁵⁵⁾, 알츠하이머병이나 퇴행성 중추신경계 병변에서 많이 발현되는 치매 유발인자로서, 신경퇴화 지표물질이기도 하고¹³⁾ 뇌허혈모델에서 pentraxin은 증가하여 뇌세포 손상의 지표가 됨이 보고되었고⁵⁶⁾, 치매환자의 대뇌에서 볼 수 있는 senile plaques나 neurofibrillary tangles에서 많이 발현되어 뇌세포의 손상을 촉발하는 중요한 인자로 보았다⁵⁷⁾. 따라서 pentraxin은 신경 퇴화가 진행될수록 이와 비례하게 나타난다는 사실에 비추어 실험결과 발현량이 대조군에 비해 약 1.96배 (p<0.05) 적게 나타났으므로 신경 세포의 퇴화 속도가 대조군에 비해 억제되었음을 암시하며 이는 기억력의 저하를 예방하는 효

과라고 생각할 수 있겠다. PEP-19유전자는 실험결과 대조군에 비해 약 1.80배 ($p < 0.05$) 많이 나타났으며, 이 유전자는 calmodulin-regulatory protein으로서 PC12 cell의 apoptic process를 억제하고⁵⁸⁾, 신경 퇴화 속도를 감소시키는 작용을 하며¹⁴⁾, basal ganglia에서 많이 발현되며 치매나 huntington's disease 환자의 소뇌에서 상당히 감소하는 것을 확인할 수 있었고⁵⁹⁾, calmodulin이 매개하는 세포내 신호전달 메커니즘을 조절하는 small protein으로 알려져 있다⁶⁰⁾. 따라서 PEP-19는 신경 세포 퇴화의 억제에 관련하여 기억력의 향상에 영향을 미치는 것으로 볼 수 있겠다. Transthyretin유전자는 실험결과 대조군에 비해 약 2.23배 ($p < 0.01$) 많이 나타났으며, 이 유전자는 prealbumin이라고도 하고, transport protein으로써 thyroxine (nerve growth factor 발현증가 역할)을 뇌로 이동시키는 작용을 하며⁶¹⁾, 치매유발 주물질인 beta-amyloid와 결합하여 이를 제거하는 역할을 담당하는 protein이고, 치매환자의 뇌척수액에서 감소되는 것을 볼 수 있으며 senile plaque형성과 반비례적으로 나타나며⁶²⁾, amyloid의 섬유화를 방지하여 transthyretin의 농도저하가 치매의 유발을 촉진할 수 있음이 알려져 있으며⁶³⁾, 공포기억 유발시 amygdala에서 transthyretin의 증가함을 볼 수 있어 기억의 재생이나 기억유지와도 관련이 있으며⁶⁴⁾, 헝가리인 중 기억저하, hearing 저하, 편두통 등의 증상이 나타나는 meningocerebrovascular amyloidosis환자에서 transthyretin의 돌연변이가 많이 관찰되었음을 보고하였다⁶⁵⁾. 따라서 transthyretin은 신경 세포 보호와 성장에 직,간접적으로 관련하여 기억력의 향상에 영향을 미치는 것으로 볼 수 있겠다.

이러한 결과로 장기 기억능력의 향상은 Hippocampus의 신경 세포 보호, 성장 및 퇴화 억제가 관련됨을 유추할 수 있었으며, 학습능력의 강화는 Hippocampus의 신경 세포 보호, 성장 및 퇴화 방지에 영향을 미치는 것으로 볼 수 있겠다. Alan J. Parkin은 Hippocampus를 제거하였을 때 기존에 저장되어있던 기억은 보존되나 새로운 장기기억은 불가능하다는 것과, Hippocampus는 기억의 장기화에 반드시 거쳐야 할 초기 pathway라는 사실을 말하였고, 기억의 저장에는 전두엽, Hippocampus를 포함한 측두엽, 간뇌의 작용이 있어야 함을 언급하였다⁶⁶⁾. 따라서 기억이라는 정신활동의 기전을 분석하기 위해서는 상기 해부학적 부위에 대한 연구도 필요하지만 일련의 정신활동에 대한 단지 해부학적인 일면에서의 연구는 복합적인 생명발현 현상을 단순한 구조적인 면으로만 인식하게 할 수 있음을 간과해서는 안될 것이며 기억과 관련하여 학습능력의 강화가 대뇌의 다른 부분에도 영향을 미친다는 한의학적 내용을 중심으로한 보충 연구가 필요하다고 하겠다.

결 론

육미지황탕가미방이 기억능력에 미치는 영향과 그 작용기전에 대해 알아보고자 수동회피실험을 통해 기억능력 증감을 확인한 후, 그 중 기억력 증강효과가 확인된 흰쥐의 Hippocampus 부위를 채취하여 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성, Realtime RT-PCR로 pentraxin, PEP-19, transthyretin 유전자 발현량의 측

정을 통하여 육미지황탕가미방이 흰쥐의 기억능력에 미치는 영향에 대하여 확인하여 본 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

수동회피실험 결과 육미지황탕가미방 투여군에서 기억능력이 유의하게 증강되었다. Pentraxin mRNA의 발현량은 Realtime RT-PCR 결과 발현량은 대조군에 비하여 1.96배 유의성 있게 감소되었다 ($p < 0.05$). PEP-19 mRNA의 발현량은 Realtime RT-PCR 결과 대조군에 비하여 1.80배 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.05$). Transthyretin mRNA의 발현량은 Realtime RT-PCR 결과 대조군에 비하여 2.23배 유의성 있게 증가되었다 ($p < 0.01$).

이상으로 볼 때 육미지황탕가미방 투여를 통한 학습능력의 강화는 Hippocampus 신경 세포 보호, 성장 및 퇴화에 관련된 유전자의 발현을 조절하여 직,간접적으로 기억능력을 증강시킬 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 벤처 및 중소기업기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (01-PJ4-PG4-01VN01-0372)

참고문헌

1. 장동환 등, 심리학입문, p.183, 210-11, 상조사, 서울, 1997.
2. 장동환 등, 심리학입문, pp.93-97, 110-115, 241-85, 교육과학사, 서울, 1992.
3. 정창현, 박찬국, 神에 대한 연구, 경희대학교 논문집 19(2): 174-223, 1996.
4. 최성욱 외, 五神에 관한 연구, 동의생리병리학회지 15(3): 367-72, 2001.
5. 장현갑 외 공역, Henry Gleitman's 심리학, pp.325-6, 시그마 플러스, 서울, 2002.
6. 대한동의생리학회 편, 동의생리학, p.389-409, 일지사, 서울, 2002.
7. Kannedel, Schwartz and Jessell, Principles of Neural Science, 4th edition, Mc Graw-Hill, 2000.
8. 이충렬, 홍무창, 동의학에서의 인지과정에 대한 고찰, 동의생리학회지 5(1):163-169, 1990.
9. 하태현, 이진우, 채한, 홍무창, 학습능력이 학습과 기억에 미치는 영향에 대한 실험적 연구, 동의생리학회지 15(1):1-16, 2000.
10. 박승원, 숙지황이 기억과 망각 속도에 미치는 영향에 대한 연구, 경희대학교 석사학위논문, 2001.
11. 이진우, 배현수, 홍무창, 신민규, 구기자가 백서의 기억능력 및 망각속도에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 15(3):84-96, 2001.
12. 최보업, 배현수, 신민규, 홍무창, 육미지황탕가미방이 흰쥐의 기억능력과 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 16(5):1025-34, 2002.
13. Duong, T., Acton, P. J. and Johanson, R. A. The in vitro neuronal toxicity of pentraxins associated with Alzheimer's disease brain lesions. Brain Research 813(2):303-12, 1998.

14. Johanson, R. A., Sarau, H. M., Foley, J. J., Slemmon, J. R. Calmodulin-binding peptide PEP-19 modulates activation of calmodulin kinase II In situ, *Journal of Neuroscience* 15;20(8):2860-6, 2000.
15. Hashimoto, Y., Furukawa, S., Omae, F., Miyama, Y. and Hayashi, K. Correlative regulation of nerve growth factor level and choline acetyltransferase activity by thyroxine in particular regions of infant rat brain. *Journal of Neurochemistry* 63(1):326-32, 1994.
16. Da Cunha, C., Wolfman, C., Huang, C. H., Walz, R., Koya, R., Bianchin, M., Medina, J. H. and Izquierdo, I. Effect of post-training injections of flumazenil into the amygdala, hippocampus and septum on retention of habituation and of inhibitory avoidance in rats. *Braz J Med Biol Res.* 24(3):301-61, 1991.
17. 윤길영, 동양학의 방법론 연구, pp.33-4,38-9, 성보사, 서울, 1983.
18. 두호경, 동의신계내과학, p.4-8, 동양의학연구원 출판부, 서울, 1986.
19. 楊維傑 編, 黃帝內經譯解(靈樞), p.85, 87, 89, 104, 281, 589, 成輔社, 서울, 1980.
20. 楊維傑 編, 黃帝內經譯解(素問), p.52,95,210, 成輔社, 서울, 1980.
21. 涓壽, 難經本義, pp.80-1, 世一書局印行, 台南, 1972.
22. 李挺, 懸壺醫學入門, p.11, 翰成社, 서울, 1983.
23. 채인식, 한방임상학, p.28, 대성문화사, 서울, 1987.
24. 章楠, 靈素節注類篇, 절강과학기술출판사, 절강, 1985.
25. 장현갑 외 공역, Henry Gleitman's 심리학, pp.325-6, 시그마 플러스, 서울, 2002.
26. 이주용 역, 학습심리학, pp.1-16, 203-29, 성신여자대학교 출판부, 서울, 1991.
27. 장현갑 외, 심리학, pp.93-7,110-5,241-85, 교육과학사, 서울, 1992.
28. 王九思, 難經集注, p.187, 中華書局, 臺灣, 1982.
29. 河北醫學院, 靈樞經校釋(上), p.177, 人民衛生出版社, 北京, 1982.
30. 類經翻譯推進會 譯, 類經, pp.287-8, 海東醫學社, 서울, 2001.
31. 沈頌, 病機彙論, p.851, 人民衛生出版社, 北경, 1996.
32. 張機, 仲景全書, 金匱要略方論, p.34,37, 유창덕서점, 서울, 1960.
33. 錢乙, 小兒藥證直訣(下), p.1, 계축문화사, 서울, 1973.
34. 허준, 동의보감, p.95, 98, 147, 395, 남산당, 서울, 1976.
35. 황도연, 방약합편, pp.129-31, 166-99, 남산당, 서울, 1983.
36. 武之望, 濟陰綱目, p.133, 대성출판사, 서울, 1986.
37. 孫思邈, 千金要方, p.178, 195, 265-6, 대성문화사, 서울, 1984.
38. 汪認庵, 醫方集解, pp.1-4,227-31, 文光圖書有限公司, 臺北, 1992.
39. 周命新, 醫門寶鑑, pp.14, 450, 동양종합통신교육출판부, 서울, 1987.
40. 윤길영, 동의임상방제학, pp.185-6,319-20, 명보출판사, 서울, 1985.
41. 신길구, 申氏本草學, pp.13-6, 110-2, 수문사, 서울, 1988.
42. 전국한의과대학 본초학교실, 本草學, pp.597-8, 영림사, 서울, 1991.
43. 이재희, 신민규, 김완희, 기억과 랩의 상관성에 대한 실험적 연구, 동의생리학회지, 6(1):59-76, 1991.
44. 김성경, 홍무창, 심기능이 학습과 기억에 미치는 영향에 대한 실험적 연구, 동의생리학회지 15(2):1-11, 2000.
45. Miller, N. E. Studies of fear as an scquerable drive, I. Fear as motivation and fear-reduction as reinforcement in the learning of new response. *Journal of Experimental Psychology*, 38:89-101, 1948.
46. Belcheva, I., Ternianov, A., Georgiev, V. Lateralized learning and memory effects of angiotensin II microinjected into the rat CA1 hippocampal area. *Peptides* 21(3):407-11, 2000.
47. Sansone, M., Battaglia, M. and Pavone, F. Shuttle-box avoidance learning in mice, improvement by glucose combined with stimulant drugs. *Neur Learn Mem*, 73(1):94-100, 2000.
48. Nikolova, J. G., Getova, D. P., Nikolov, F. P. Effect of ACE-inhibitors on learning and memory processes in rats, *Folia Med (Plovdiv)*. 42(1):47-51, 2000.
49. Trofimov, S. S., Borlikova, G. G., Kravchenko, E. V., Inozemtsov, A. N., Ostrovskaia, R. U. and Voronina, T. A. Is "scopolamine-induced amnesia" in rats the result of state-dependent learning? *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*. 50(2):252-60, 2000.
50. Genkova-Papazova, M. G., Petkova, B., Shishkova, N., Lazarova-Bakarova, M. The GABA-B antagonist CGP 36742 prevent PTZ-kindling-provoked amnesia in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 10(4):273-8, 2000.
51. Kato, M., Iwata, H., Okamoto, M., Ishii, T. and Narita, H. Focal cerebral ischemia-induced escape deficit in rats is ameliorated by a reversible inhibitor of monoamine oxidase-a: implications for a novel animal model of post-stroke depression. *Biol Pharm Bull.* 23(4):406-10, 2000.
52. Groulx, I., Bonicalzi, M. E. and Lee, S. Ran-mediated nuclear export of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein occurs independently of its assembly with cullin-2. *J Biol Chem.* 275(12):8991-9000, 2000.
53. Kappers, W. A., van Och, F. M., de Groene, E. M. and Horbach, G. J. Comparison of three different in vitro mutation assays used for the investigation of cytochrome P450-mediated mutagenicity of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 466(2):143-59, 2000.
54. Chiu, C. H., Amemiya, C. T., Carr, J. L., Bhargava, J., Hwang, J. K., Shashikant, C. S., Ruddle, F. H., Wagner, G. P. A recombinogenic targeting method to modify large-inserts for cis-regulatory analysis in transgenic mice, construction and expression of a 100-kb, zebrafish Hoxa-11b-lacZ reporter gene. *Dev Genes Evol.* 210(2):105-9, 2000.
55. Schlimgen, A. K., Helms, J. A., Vogel, H. and Perin, M. S. Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to

- acute phase proteins of the immune system. *Neuron*. 14(3):519-26, 1995.
56. Kim, Y., Sohn, N., Kang, C. and Soh, Y. DNA array reveals altered gene expression in response to focal cerebral ischemia. *Brain Res Bull*. 58(5):491-8, 2002.
 57. McGeer, E. G., Yasojima, K., Schwab, C. and McGeer, P. L. The pentraxins: possible role in Alzheimer's disease and other innate inflammatory diseases. *Neurobiol Aging* 22(6):843-8, 2001.
 58. Erhardt, J. A., Legos, J. J., Johanson, R. A., Slemmon, J. R. and Wang, X. Expression of PEP-19 inhibits apoptosis in PC12 cells. *Neuroreport* (17):3719-23, 2000.
 59. Utal, A. K., Stopka, A. L., Roy, M. and Coleman, P. D. PEP-19 immunohistochemistry defines the basal ganglia and associated structures in the adult human brain, and is dramatically reduced in Huntington's disease. *Neuroscience* 86(4):1055-63, 1998
 60. Slemmon, J. R., Feng, B. and Erhardt, J. A. Small proteins that modulate calmodulin-dependent signal transduction: effects of PEP-19, neuromodulin, and neurogranin on enzyme activation and cellular homeostasis. *Mol Neurobiol* 22(1-3):99-113, 2000.
 61. Nilsson, C., Lindvall-Axelsson, M., Owman, C. Neuroendocrine regulatory mechanisms in the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Brain Research Reviews* 17(2):109-38, 1992.
 62. Merched, A., Serot, J. M., Visvikis, S., Aguillon, D., Faure, G. and Siest, G. Apolipoprotein E, transthyretin and actin in the CSF of Alzheimer's patients: relation with the senile plaques and cytoskeleton biochemistry. *FEBS Lett*. 425(2):225-8, 1998.
 63. Serot, J. M., Christmann, D., Dubost, T. and Couturier, M. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63(4):506-8, 1997.
 64. Stork, O., Stork, S., Pape, H. C. and Obata, K. Identification of genes expressed in the amygdala during the formation of fear memory. *Learn Mem*. 8(4):209-19, 2001.
 65. Garzuly, F., Vidal, R., Wisniewski, T., Brittig, F., Budka, H. Familial meningocerebrovascular amyloidosis, Hungarian type, with mutant transthyretin (TTR Asp18Gly). *Neurology* 47(6):1562-7, 1996.
 66. 이영애, 박희경 공역, Alan Parkin's 기억연구의 실제와 응용, pp.10-4, 시그마플러스, 서울, 2001.