

健腦飲이 海馬損傷白鼠의 記憶 및 學習機能 恢復에 미치는 영향

노상용¹ · 엄현섭 · 지규용*

동의대학교 한의과대학, 1: 한방바이오연구센터

Effects of Geonne-Eum on Learning and Memory Function in Model Rat Injured by Ibotenate

Sang Yong Rho¹, Hyun Sup Eom, Gyo Yong Chi*

Department of Oriental Medicine, Biomedical Research Center of Oriental Medicine, Dongeui University

In order to make the efficient prescription and cope with various senile dementia, learning and memory functions of Sprague-Dawley model rats were tested with Morris water maze at first. And to evaluate the effects of the sample drug(GM) on choline acetyltransferase and acetylcholine esterase, immunoreactive measurement and enzymatic activity measuring were carried out. Rats were injected with ibotenic acid through hippocampus CA1 and CA3 area. The results are as following. GM improves the learning ability in the acquisition test and memory function in the retention test significantly. And GM increases the level of ChAT which is synthesizing acetylcholine in CA3 area, and at the same time it increases the level of AChE which is resolving acetylcholine. These results show that GM improve the cholinergic catabolism and anabolism, and the increment of metabolic activity of cholinergic system contributes to the recovery of damaged learning and memory function by ibotenic acid. So it can be concluded that GM will be helpful to cholinergic brain disease induced by primary or senile reduction of acetylcholine secretive activity.

Key words : Geonne-Eum(健腦飲), dementia, memory, learning, AChE, ChAT

서론

최근 의료기술의 비약적인 발전으로 인해 인간의 수명이 현저히 연장되면서 치매환자의 수도 비례하여 늘어나고 있다. 痴呆의 有病率은 보고자에 따라 편차가 많지만 65~74세 사이에는 대개 7~10%, 75-84세 사이에는 19~25%, 85세 이상에서는 25~47%로 나타나 있으며¹⁾, 현재 서구사회에서는 65세 이상 인구의 약 10%, 80세 이상 인구의 약 40-50%에서 알쯔하이머병(Alzheimer's disease, AD)이 발생되고 있다. 이미 미국에서는 이 질환 환자가 400만 명, 우리 나라에서는 약 20만 이상에 달하고 있고, 사망률도 심혈관 질환, 악성종양, 그리고 뇌졸중에 이어 제 4위를 점하고 있으며 일본과 중국에서도 혈관성 치매에 비해 AD의 발병율이 해마다 증가하고 있다. 그러므로 노령화 사회에 접어든 의료선진국가에서는 치매질환의 의료 및 사회경제적 중요성이 점차 커지고 있다. 또한 질병의 역사적인 변화패턴으로

보면 지금의 成人病 위주에서 앞으로는 정신방면의 질환으로 변화할 것이라 예상되고 있는데²⁾ 결국 뇌신경계 및 정신계통 질환이 미래의 주요한 의학적 과제로 부상될 것이라 생각한다.

痴呆는 일상생활을 영위하는 데 장애를 초래할 수 있을 정도로 지적 기능과 기억력이 상실되는 臨床 症候群이며 수년에 걸쳐 진행되면서도 의식은 정상³⁾이다. 따라서 의식을 제외한 記憶力, 思考力, 理解力, 計算能力, 學習能力, 言語 및 判斷力 등이 광범위하게 손상⁴⁾되며 행동 및 인격의 변화로 인한 일상생활의 장애가 반드시 수반된다. 한의학에서 痴呆는 주로 健忘이나 痴狀, 呆病의 범주에 속하며 원인으로는 痰飲, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이 관계가 깊다⁵⁾. 이러한 이론에 근거하여 여러 연구자들이 七福飲⁶⁾, 調胃升清湯⁷⁾, 溫膽湯⁸⁾, 定志丸⁹⁾, 蓼茸地黃湯¹⁰⁾, 蘇合香元¹¹⁾, 香附子八物湯¹²⁾, 麝香蘇合元¹³⁾, 加減補陽還五湯¹⁴⁾ 등의 처방에 대해서 유효성 실험을 실시하였다. AD의 병태모형은 일반적으로 생화학이나 분자생물학 방면에서는 유전자 변이 마우스(transgenic mouse)를 사용하고¹⁵⁾¹⁶⁾ 있지만 대부분의 행동약리실험에서는 白鼠에 수술적으로 scopolamine¹⁷⁾이나 ibotenic acid¹⁸⁾ 등의 전처치 操作을 통해 病態를 조성하여 사용

* 교신저자 : 지규용, 부산광역시 진구 양정동 45-1, 동의대학교 한의과대학
· E-mail : cgyu@dongeui.ac.kr Tel : 051-850-8659
· 접수 : 2003/02/08 · 수정 : 2003/03/18 · 채택 : 2003/04/07

하는 경우가 많다. AD에서 가장 중요한 일차 증상은 기억력 감퇴인데 이는 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있다¹⁹⁾. 즉 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 esterase (AChE)로 더욱 심화되고 choline acetyltransferase(ChAT)의 활성은 감소된다²⁰⁾.

본 연구는 기억력 감퇴에 사용되고 있는 健腦飲이 기억에 관련된 해마영역의 손상 후에 기억력과 학습능력의 개선에 어느 정도의 변화를 가져오는지를 확인하고, ChAT와 AChE의 변동에 미치는 효과를 측정하기 위해 기획되었다. 그러므로 본 논문에서는 치매의 연구 범위를 좁혀서 기억과 인지학습기능의 회복능력에 미치는 영향을 중심으로 하되 다만 치매의 형성에는 전체적인 心身의 상태에 따라 결정되는 점을 고려하여 치료처방은 단미제가 아닌 複方으로 구성하였다. 이러한 맥락에서 전세계적으로, 특히 선진국에서 더욱 문제가 되는 痴呆(Dementia)를 효과적으로 억제할 수 있는 방제를 탐색하여 치료약으로 개발하고자 하였으며 실험결과 유의한 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물 및 약재

250~300g의 Sprague Dawley(SD)系 雄性白鼠를 대한실험동물센터에서 供給받아 使用하였다. 動物은 實驗室 環境(溫度 22±1℃, 濕度 50±5%)에 2週日間 適應시킨 후 健康한 白鼠만을 實驗에 使用하였다. 食餌는 固形飼料(三養社, Korea)와 精製水를 자유로이 攝取케 하였다. 實驗에 使用된 藥材는 광명제약(주)에서 購入한 규격한약품을 精選하여 使用하였으며 健腦飲(GM)의 處方構成은 鹿茸과 龜板을 위주로 한 聽明丸加減方²¹⁾이다.

Table 1. Prescription of Geonne-Eum

한약명	생약명	합량
鹿茸	Cervi plantotrichum Cornu	12g
龜板	Testudinis Plastrum	12g
其他		8g

2. 檢液의 調製

健腦飲 10첩 분량 320g을 3,000ml round flask에 넣고 蒸溜水 2,000ml를 添加하였다. 먼저 鹿茸과 龜板을 2時間 加熱 抽出하고 濾過紙를 利用하여 沈澱物을 제거한 후, 다시 타약재를 첨가하여 1시간동안 水煎하였다. 이 濾過液을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 減壓 濃縮하고 이 濃縮液을 -84℃ deep freezer에서 4時間 동안 放置하였다가 24時間 동안 freeze dryer로 凍結乾燥하여 粉末을 얻었으며 이를 적당히 희석하여 實驗에 使用하였다.

3. 실험방법

1) 머리수술(surgery)

먼저 male Sprague-Dawley rat을 sodium pentobarbital (50mg/kg)로 복강주사하여 마취하였다. Stereotaxic frame(Koff)에 5μl Hamilton syringe를 놓고 ibotenic acid(Sigma)를 phosphate buffered saline(PBS)에 1μg/μl로 희석한 다음 hippocampus의 CA1 부위에 1μl 주입하여(0.2μl/min) 신경세포 손상(lesion)을 유발하였다. 2~3일의 회복기간 후 GM(100mg/kg, 100mg/ml)을 총 28일간 1일 1회 경구투여하고 29일째 Morris 수중미로(water maze)에 의한 공간 학습 및 기억력 측정을 시작하였으며 수중미로훈련을 시행하는 7일간에도 시행 30분 전 GM을 경구투여하였다. AchE와 ChAT의 activity 측정부위는 CA1-3인데 hippocampus CA1 부위 coordinate AP=-3.8mm, ML=±2.0mm, DV=-3.2mm CA3 부위 coordinate AP=-5.3mm, ML=±5.0mm, DV=-6.0mm이다²²⁾.

2) 공간 학습과 기억력(spatial learning and Memory) 측정 및 평가

학습능력과 기억력 측정은 Morris 수중미로(water maze)를 이용하였다. 수중미로로 이용되는 수조는 직경이 1.8m~2m인 원형수조(circular pool)이며 온도가 27±2℃ 되는 물로 약 30cm 깊이로 채운 후 무독성 흰물감(non-toxic white paint)이나 우유로 물의 색을 흐리게 하였다. 수조는 4개의 동일한 사분원으로 나누어 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분하고 사분원의 중심부에 도피대(escape platform)를 수면보다 1~1.5cm 낮게 설치하였다. 수조 주변은 4개의 다른 모형을 이용하여 외부 단서(extramaze cues)를 벽에 부착하고 주위 환경을 동일하게 유지하였다. 측정기간은 총 7일인데 먼저 획득 시험(acquisition test)은 6일간 하루에 4차례 훈련시키고 이때 180초 동안 출발에서부터 도피대에 올라가는데 걸린 시간(latency)과 거리(path length)를 측정하였다. 획득 시험 실시후 기억 시험(retention test)은 7일째 자유 수영 검사로 시행하는데 이때 도피대를 치우고 실험 동물들이 90초 동안 도피대의 2배 직경 안에서 머무는 시간과 거리를 측정하여 평가하였다.

3) Choline acetyltransferase Immunohistochemistry

행동 실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p.)로 마취시키고 saline 100ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액(fixative) 900ml로 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200ml는 5 분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 700ml는 25 분간에 걸쳐 천천히 관류하였다. 그 다음 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2-3 시간동안 고정시키고 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4℃에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌조직을 배측(dorsal)과 복측(ventral)의 해마, medial septum 및 diagonal band 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-100을 첨가한 PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium azide(Sigma, St. Louis, MO)로 2000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4℃에서

72시간동안 지속적으로 흔들어 주면서 배양하였다. 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 담구었다. PBS로 몇 번 헹군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzadine을 사용하여 발현시켰다. 모든 처리를 거친 뇌조직을 gelatin coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 현미경으로 medial septum내 ChAT-immunoreactive한 신경세포의 수를 관찰하였다.

4) Acetylcholine esterase의 Activity 측정

행동실험이 끝난 후 Sodium pentobarbital(100mg/kg, i.p.)로 실험 동물을 마취한 상태에서 0.9% 생리 식염수(100ml)와 4% formalin인산완충액(500ml)을 심장에 관류시킨 다음, 뇌를 적출하여 4% formalin-인산고정액에 2~3시간 담가둔 후, 20% sucrose를 함유한 인산완충액(PBST)에 담고 4°C에서 12시간 저장하였다. 다음 날 뇌를 급속냉동한 후 microtome을 이용하여 30µm의 절편을 제작한 다음 몇 개의 절편은 cresyl violet 염색을 거쳐 위치와 손상부위를 microscope로 확인하였다. 먼저 20ml 0.2M PBST에 10µl의 acetylcholine(Ach)과 2% normal goat serum(NGS 400µl) 8 drop과 0.15% sodium azide(Sigma, StLouis, MO, 20mg)를 넣어 일차 항체(primary antibody)용액을 만들었다. 그리고 뇌조직 절편을 24-well plate에 각각 담고 일차 항체용액을 500µl 정도 넣어 4°C cold chamber에서 73시간 숙성하였고 이차항체(secondary antibody)용액은 20ml 0.2M PBST에 1% goat blacking serum 4 drop과 biotinylated anti-rabbit made in goat(200:1)을 넣어 만들었다. 일차 항체와 결합시킨 뇌조직을 PBST에 3회 씻어낸 후 이차 항체용액을 500µl 정도 넣어 상온에서 2시간 숙성하였다. 20ml 0.2M PBST에 ABC kit의 A 8 drop과 B 8 drop을 넣어 ABC 용액을 만들고 이차항체와 결합시킨 뇌조직을 PBS에 3회 씻고 ABC 용액에 넣어 상온에서 2시간 숙성하였다. 마지막으로 200µl Nicl(nickel chloride 8%, 80mg/ml H₂O)와 67ml hydrogen peroxide(3%, 30% H₂O₂에 190µl)와 20ml 0.1M Tris(1.55g Trimza/100ml H₂O, pH=7.2)를 10mg DAB(diaminobenzidene)에 넣어 DAB 용액을 만든 다음 뇌조직을 PBS에 3회 씻고 DAB 용액에 2분간 담구었다가 꺼내 coverglass에 올려 현미경하에서 AChE 밀도(density)를 측정하였다.

5) 통계처리

실험결과는 MS Excel 97을 이용하였으며 정상군과 실험군 및 실험군간에 표현되는 특성차이의 유의성에 대한 분석은 Student's t-test와 시간을 단일변수로 하는 분산분석법(repeated one-way ANOVA)을 사용하였고 유의수준은 p<0.05로 하였다.

실험결과

1. 건뇌음투여군에 대한 Morris 수중미로의 획득검사결과

각 군의 수중 미로 학습에서 도피대에 도달하기까지의 시간

변화는 Table 2과 같다. 6일동안 180秒 內에 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 정상군(무시술군), 모의시술군, ibotenic acid손상군, ibotenic acid손상+GM 투여군의 집단간 차이가 있었으며 학습이 진행됨에 따라 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 집단간 차이를 보였다. 이에 측정일에 따른 집단별 사후검정(LSD) 결과, 제1일째부터 모의시술군에 비해 ibotenic acid손상군의 학습능력이 현저히 저하되었다(p<0.05). 이에 비해, GM 투여군에서는 학습수행에 유의한 증진효과가 관찰되었는데, ibotenic acid손상군에 비해 1일째부터(p<0.05) 학습수행에 유의한 증진효과가 나타났고 획득시행동안 도피대에 도달하는 시간이 유의하게 감소하였다 (p<0.05).

Table 2. Effect of GM on the acquisition test and the retention test of water maze task.

Group	acquisition test			
	1st day	2nd day	3rd day	4th day
Normal	78.1±11.87 ^a	76.9±8.93	31.60±5.62	40.6±4.29
Sham	108.9±12.76	94.3±11.94	29.5±7.89	19.4±4.68
Lesion	150.1±13.21	120.8±13.35	101.5±16.39	52.3±5.55
GM	110.1±24.6	93.8±18.1	52.4±21.9	17.0±3.5

Group	acquisition test		retention test
	5th day	6th day	7th day
Normal	21.8±2.18	16.8±3.89	11.9±2.02
Sham	22.8±4.48	20.2±3.54	10.9±1.07
Lesion	37.6±7.97	35.4±6.68	6.0±0.61
GM	23.6±4.0	17.8±3.9	12.5±1.27

Comparison of acquisition performance on the Morris water maze task among the four groups of the rats. Mean swimming time traveled per trial. Mean values of the four trials per day for 6 days for each of the four groups are shown. Comparison of retention performance on the Morris water maze task among the four groups of the rats. Means time spent in annulustwice the size of platform). Repeated measures of ANOVA of swimming time between the sham and ibotenic acid lesion group. a : Mean ± Standard Error

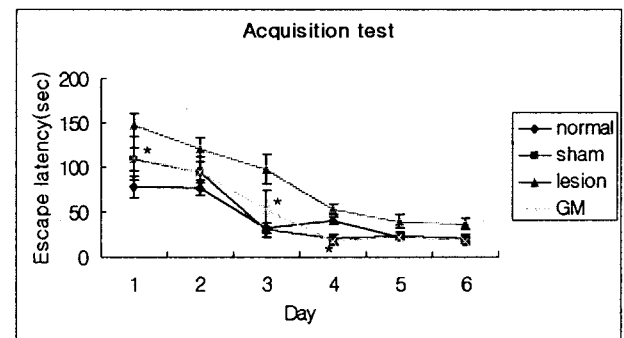


Fig. 1. Acquisition of the water escape task in a circular pool by normal rats, sham-operated rats, rats after bilateral injections of 6µg/µl ibotenic acid into the hippocampus(CA1) and GM-treated rats. Session means and standard errors of the means(S.E.M) of the latency to escape onto a submerged platform. Data were analyzed by repeated ANOVA and followed by LSD test. #, P<0.05 vs sham group *, P<0.05 vs lesion group

2. 건뇌음 투여군에 대한 Morris 수중미로의 把持檢査結果

각 군의 수중 미로 학습에서 파지시행에 의한 도피대에 머무르는 시간은 Table 1.의 retention test 결과와 같다. 마지막 날인 제 7일째에 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 把持시행에서 정상군(무시술군), 모의시술군, ibotenic acid 손상군, ibotenic acid손상+GM 투여군간 도피대에

머무르는 시간에서 유의한 차이가 나타났으며 ibotenic acid 손상 +GM투여군에서 ibotenic acid 손상군에 비해 학습수행에 유의한 증진효과를 보였다 ($P < 0.05$).

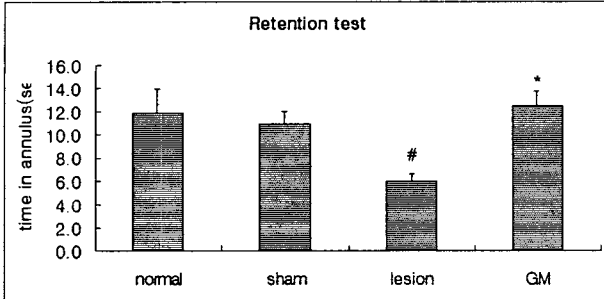


Fig. 2. Effect of normal, sham surgery, bilateral hippocampal lesions, GM on the performance of rats in the spatial escape task during the probe trial. The lesions were induced by ibotenic acid. Means and standard errors of the means (SEM) of the time spent in annulus (twice the size of platform). Data were analyzed by repeated ANOVA and followed by LSD test. #, $P < 0.05$ vs sham group. *, $P < 0.05$ vs lesion group

3. Hippocampus에서의 choline acetyltransferase(ChAT) 발현

해마의 CA1부위와 CA3부위에서 학습의 지표로 이용되는 ChAT를 이용하여 acetylcholine성 신경세포를 염색한 결과는 Table 2와 같다. 모의시술군, ibotenic acid 손상군, ibotenic acid 손상+GM약물투여군의 집단간 사후검정(LSD) 결과 모의시술군에 비해 ibotenic acid 손상군에서 ChAT가 유의하게 감소했고 ($p < 0.05$), CA1부위에서 ibotenic acid 손상군에 비해 GM 투여군의 ChAT 발현이 증가하는 경향이 관찰되었으며, CA3부위에서 GM 투여군이 ibotenic acid 손상군에 비하여 ChAT 발현이 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$).

Table 2. ChAT activity and AchE activity in hippocampus

Experimental group	ChAT		AchE	
	CA1	CA3	CA1	CA3
Sham	22.72±0.98 ^a	23.16±0.41	126.11±2.94	122.5±3.59
Lesion	19.94±0.94	18.77±1.21	114.94±1.99	116.22±2.41
GM	20.88±1	22.52±1.14	123.16±3.22	123.38±3.25

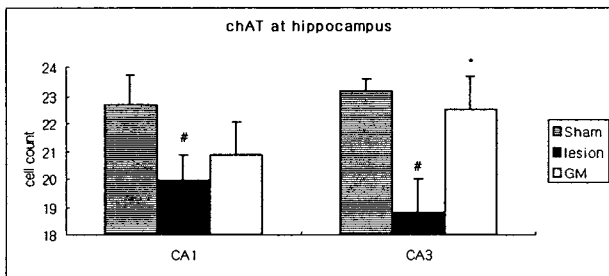


Fig. 3. The mean (±SEM) values of quantities of ChAT immunostained nuclei in the hippocampus (CA3) of the experimental groups after water maze learning task 7 days post-operatively. The ChAT results were analyzed by performing separate one way ANOVA of neurons among the groups followed by post hoc comparisons using the least significant difference (LSD). #, $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of sham group. *, $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of ibotenic acid lesion group.

4. Hippocampus에서의 AchE 발현

해마의 CA1부위와 CA3에서 AchE 발현의 결과는 Table 2와 같다. 모의시술군, ibotenic acid 손상군, ibotenic acid 손상+GM 약물투여군의 그룹간 사후검정(LSD) 결과 ibotenic acid 손상군은 모의시술군에 비해 AchE 발현의 차이는 유의하게 감소한 것으로 나타났고 (각 $p < 0.05$), CA1에서 ibotenic acid 손상+GM 약물투여군이 ibotenic acid 손상군에 대해 AchE 발현량이 유의하게 증가하였고 ($p < 0.05$) CA3에서는 증가의 경향성은 있었으나 유의성은 인정되지 않았다.

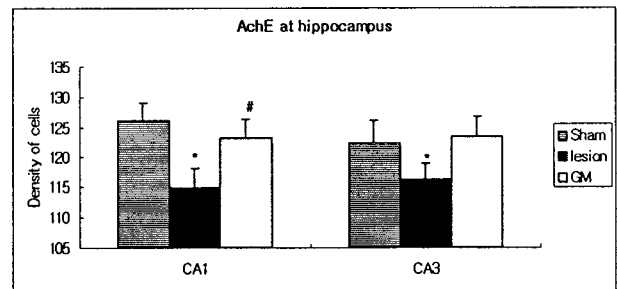


Fig. 4. The percentage (±SEM) of sham values of density of AchE stained nuclei in the different hippocampal formation areas of the experimental groups after water maze learning task 7 days post-operatively. The AchE results were analyzed by performing separate one way ANOVA of neurons among the groups followed by post hoc comparisons using the least significant difference (LSD). #, $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of sham group. *, $p < 0.05$ as compared with the corresponding data of ibotenic acid lesion group.

총괄 및 고찰

최근 학습과 기억에 관련된 신경회로의 다양한 부위를 손상하기 위한 방법으로 kainic acid, ibotenic acid 등의 신경독소 손상(neurotoxin lesion)²³⁾²⁴⁾, cholinergic neurone에 대해 특이하게 immunotoxin으로 작용하는 192 IgG-saporin을 이용한 손상²⁵⁾²⁶⁾, 화학물질 손상(chemical lesion), 전해질 손상(electrolytic lesion), 스트레스 유도된 손상(stress-induced lesion) 등의²⁷⁾ 다양한 손상 방법을 통해 중추신경계의 학습과 기억에 관련된 신경 생리학적, 신경 병리학적 기전에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이렇듯 치매에 적합한 모델제도는 상당한 어려움이 있으나, 학습과 기억에 관련된 뇌의 다양한 부위에서의 기능을 선택적으로 차단하는 방법을 통한 학습과 기억에 관련된 신경회로의 기능을 이해하고 기억손상에 관련된 신경학적 기전을 규명하는 방법이 시도되고 있다. 또 이러한 실험동물모델의 활용을 통하여 궁극적으로 안정성이 높은 치료약 및 예방약 개발이 필요한데 본 연구의 실험결과 ibotenic acid에 의한 손상에서 모든 동물에게 고루 기억손상을 유발시켜 치매 모델에 적합한 것으로 사료된다. Alzheimer's disease(AD)에서는 대뇌의 측두엽, 전두엽, 두정엽의 일차연상영(primary association area)이 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 있는데²⁸⁾, 그 중 AD 환자에 있어서 presynaptic neuronal marker의 생성에 관여하는 효소, 특히 ChAT의 활성도가 측두엽, 해마와 편도체에서 약 50~90% 정도 감소한다²⁹⁾. 또한 AD의 1차 증상인 기억력 감퇴 증상은 choline성 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 심화된다³⁰⁾. 실험적인 예로 쥐에게 medial septum과 nucleus basalis magnocellularis 부위에 ibotenic acid를 주입하였을 때 각각 hippocampus와 frontal cortex의 ChAT의 활성이 감소하였다고 보고된 바 있다³¹⁾. 우선 인지기능 손상에 대한 병증모델을 만들기 위해 glutamatergic neurotransmission을 파괴하는 한편 basal forebrain에서 cholinergic neuron의 고갈(depletion)을 일으키기도 하는³²⁾ ibotenic acid를 뇌의 해마영역(CA1-3)에 주입하여 신경세포를 손상시켰다. 그렇지만 ibotenic acid는 신경세포를 비정상적으로 과잉활화시켜 세포손상을 일으키기 때문에 hippocampus 뿐만 아니라 entorhinal cortex 및 thalamus영역까지도 심각한 손상을 미치기도 한다³³⁾³⁴⁾. 이러한 문제점 때문에 radiofrequency 또는 electrical shock을 이용한 damage를 입히는 방법이 고안되었지만 이 경우에는 neuron과 glia를 불문하고 needle passage 주위에 있는 모든 조직이 손상된다는 문제가 있다. 따라서 본 실험의 목적이 손상의 국소정위를 확인하기 위한 것이 아니고 neurotransmitter에 대한 작용임을 고려할 때 ibotenic acid에 의한 손상이 보다 적절한 모델이라고 판단하였다.

한의학에서 痴呆는 神志病에 해당되며 흔히 呆病이라 하고 속칭 妄靈이라고도 한다. 明代 張景岳의 치매에 대한 설명을 보면 <景岳全書·雜證謬·痴呆>를 보면 “痴呆證, 凡平所無痰或以鬱結, 或以不遂, 或以思慮, 或以疑惑, 或以驚恐而漸致痴呆, 言辭顛倒, 舉動不經, 或多汗, 或善愁, 其證則千奇萬怪, 無所不至, 脈必或弦, 或數, 或大, 或小, 變易不常”이라 하여 오늘날의 치매증상과 거의 유사하다. 이를 정리해 보면 치매환자의 의식은 정상이지만 사유활동이 완전히 못하고, 기억력과 계산력이 떨어지며, 이해능력이나 언어기능도 감퇴된다. 주위의 여러 사물이나 정황을 정확히 분석종합하여 적절히 반응하지 못하며, 정서불안과 수시 변동, 哭笑喜怒 등의 감정표출이 불합리하고 심지어 주변 사람이나 사물과의 관계를 인지하기도 어렵게 되어 정상적인 생활을 할 수 없게 된다. <內經>에서 神志와 관련된 기능이나 병은 <素問·靈蘭秘典論>에서 “心者, 君主之官, 神明出焉”이라 한 것처럼 주로 심과 유관한 것으로 보는 것이 일반적이다. 그렇지만 한편으로 <素問·脈要精微論>에서 “頭者, 精明之府, 頭傾視深, 精神將奪矣”라 하고 唐代 孫思邈이 <千金方>에서 “頭者, 人神所注, 氣血精明三百六十五絡上歸頭”라 한 것과 明代 李時珍이 <本草綱目>에서 “腦爲元神之府”라 한 것, 清代 王清任이 <醫林改錯>에서 “靈機記性 不在心在腦”라 한 언급을 통해 볼 때 사유활동과 知能등의 고위정신기능은 점차 心에서 腦로 대체되어 간 것을 볼 수 있다.

치매의 病因에 대해서 陳³⁵⁾은 血虧氣弱으로 인한 心神失養, 혹은 肝腎不足과 腦髓不充 등이라 소개하였지만 특히 脾腎虧損과 脾虛痰阻를 중시하였다. 그렇지만 여러 서적을 종합하여 보면³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾ 先天不足, 痰濁阻竅, 氣滯血瘀, 熱毒傷腦, 心肝火旺, 肝腎虧損, 心脾兩虛, 脾腎兩虛 등이 고루 제시되고 있는데 임상실제에 합당하다. 또한 임상상 痴呆와 감별해야 할 질환으로는 癲病과 狂病, 肝病이 있다. 세가지 모두 神志病이긴 하지만 癲病은 精神이 抑鬱되어 表情이 없고 沈默하며 말하더라도 言語에 조리가 없으며 움직이려 하지 않는 陰證이 많다. 반대로 狂病은 精神이 亢進되어 煩躁不寧하고 날뛰고 때리며 욕하고 화를 내는 등의 陽證이 많다. 그렇지만 癲病은 發作性 精神異常으로 痙攣抽搐과 意識喪失이 나타나 認知記憶機能 손상을 위주로 하는 呆病이나 癲·狂病과는 다르다. 그렇지만 姚培發등의 임상경험³⁹⁾으로 보면 痴呆를 증후에 따라 單純型和 抑鬱型, 躁狂型 등으로 분류하여 치료하기도 하는데 이는 神志病의 공통성을 반영하는 것으로 볼 수 있다. 특히 노년기에 주로 나타나는 AD는 腎精不足에 의한 것이 가장 흔한데 본 실험에서 사용한 鹿茸과 龜板 또한 이에 근거하고 있다⁴⁰⁾. 鹿茸은 Cervidae과에 속한 梅花鹿 또는 馬鹿과 그 近緣動物의 未骨化된 幼角을 잘라 건조한 것이다⁴¹⁾. 效能은 補陽生精, 養血益髓하며 強筋健骨하여 久服하면 不老한다고 하였는데 虛損과 神疲 眩暈 耳鳴 등의 뇌신경관련 증후에 사용할 수 있다. 龜板은 Emydidae과에 속한 鼈의 배 및 등판이다. 효능은 滋陰潛陽, 補心腎, 健骨益陰하여 骨痿腰痛, 崩漏帶下, 耳鳴眩暈 등의 老化性 질환에 사용할 수 있다. 이처럼 하나는 補陽을 주로 하고 하나는 補陰을 주로 하므로 노년기 腎精不足으로 인한 치매질환에 배합하여 사용함으로써 腎의 沈靜作用을 보다 강화할 수 있을 것으로 사료된다.

GM의 효과를 확인하기 위한 첫번째 획득시험에서 ibotenate에 의해 손상된 대조군은 정상군 및 sham 수술군보다 학습능력이 현저히 감소되어 병증모델이 정상적으로 유발되었음을 알 수 있다. 또한 GM을 투여한 군에서 1일째부터 줄곧 유의하게 학습능력을 향상시킨다는 것을 알 수 있다. 또한 7일째 실시한 기억시험(retention)에서도 통계적으로 유의한 효과를 보임으로써 기억능력의 개선이 일시적인 것이 아니라 장기간 유지될 수 있음을 입증하였다. 한편 이러한 학습 및 기억능력의 개선이 ibotenate에 의해 손상된 cholinergic neuron의 화학적 활성화에 기여한 정도를 평가하기 위해 ChAT를 측정하였는데 여기에서도 GM군은 CA3영역에서 유의하게 증가하였다. 그렇지만 CA1 구역에서는 증가의 경향성만 나타났고 유의성은 인정되지 않았는데 어쨌든 이로써 Ach의 합성을 증가시켰을 것으로 추정된다. 그리고 AChE에 대한 실험에서도 GM 투여군은 CA1에서 통계적으로 유의하게 분해효소를 증가시켰다. 이렇게 볼 때 본 실험에 사용된 GM은 acetylcholine의 대사작용을 활성화시킴으로써 ibotenic acid로 손상된 cholinergic damage에 대하여 유의성있게 개선시켰으므로 hippocampus에서 cortex에 이르는 콜린성 뉴런의 고갈을 억제하여 학습능력과 기억능력을 향상시킨 것으로 볼 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 健腦飲은 효과적인 기억 손상 및 치매성 증후개선제로 활용될 수 있을 것이다. 다만 보다

구체적인 적용범위와 기전을 확정하기 위해서는 glutamate, serotonin, GABA 등에 대한 광범위한 영향 및 neurohormone, hormonal interaction 등과 genetic control 등에 대한 폭넓은 추가연구가 필요할 것으로 사료된다. 특히 鹿茸과 龜板의 약재 특성상 collagen이 풍부하여 amyloid malformation에 의한 치매형성과 과정에 대해서도 일정한 기여가 있을 것으로 추정되지만 구체적인 추사가 있어야 한다고 생각된다.

결론

Ibotenic acid에 의해 유발된 콜린성 신경계의 손상에 대한 健腦飲의 학습 및 기억능력 개선효과와 Ach의 분해 및 합성에 대한 약리작용을 평가하기 위한 본 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다. 健腦飲은 손상백서의 획득시험에서 유의성 있게 학습능력을 향상시켰고, 손상백서의 파지시험에서 유의성 있게 기억능력을 향상시켰으며, acetylcholine을 합성하는 ChAT를 CA3에서 유의성 있게 증가시킴으로써 cholinergic system의 활성을 향상시켰다. 또 acetylcholine을 분해하는 AChE를 유의성 있게 증가시킴으로써 cholinergic system의 분해활성을 향상시켰다.

따라서 이러한 결과들로부터 健腦飲이 acetylcholine의 합성과 분해대사과정을 모두 촉진시켰음을 알 수 있으며 이러한 양면적인 작용이 cholinergic damage에 의한 학습 및 기억능력을 향상시켰으므로 향후 노화과정에서 대사활성 감소로 형성된 콜린작용성 뇌질환에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

- Manton KG, Singer BH, Suzman R. Estimates and Projections of Dementia-Related Service Expenditures, Forcasting the Health of Elderly Populations, Springer Series in Statistics. New York: Springer-Verlag, 207-38, 1993.
- 池圭籍, 辨證理論의 匯通과 疾病現象의 理解를 爲한 研究, 慶熙韓醫大論文集 第13卷, pp.298-300, 1990.
- 배철영, 이영진, 노인의학, pp. 198-203, 고려의학, 서울, 1996.
- 郭隆琛 : 圖解腦神經外科學, 서울, 第一醫學社, pp.27~31, 1992.
- 정인철, 이상룡, 導痰益氣活血湯이 알츠하이머질환 病態 모델의 生化學的 變化 및 行動에 미치는 影響, 동의생리병리학회지 15(2): 260, 2001.
- 손정석, 류영수, 七福飲이 老化 白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 8(2):25~38, 1997.
- 우주영 외, 調胃升清湯이 흰쥐의 방사형미로 학습과 기억에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 8(1): 69~80, 1997.
- 鄭仁哲, 李相龍, 溫膽湯이 腦組織이 酸化作用에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 8(2):51~62, 1997.
- 崔龍垓, 成麗慶, 文炳淳. 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌,

- 19(1):392~409 1998.
10. 金保岡, 李相龍. 蓼茸地黃湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 9(1):59~72, 1998.
11. 홍대성, 김종우, 황의완. 麝香蘇合元이 情緒反應性과 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 10(1):17~38, 1999.
12. 유재면 외, 香附子八物湯이 흰쥐의 방사형 迷路學習과 記憶에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지, 9(2):1~24, 1998.
13. 이조희 외, 麝香蘇合元이 흰쥐의 방사형 미로 학습과 기억에 미치는 영향, 동의신경정신과학회지, 9(2):37~44, 1998.
14. 文誠秀 · 李相龍 : 加減補陽還五湯이 생쥐의 學習과 記憶의 減退 및 Acetylcholinesterase의 抑制에 미치는 影響, 동의신경정신과학회지 11(1):19~36, 2000.
15. Kotilinek LA, Bacskai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT, Younkin S, Ashe KH. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease, J Neurosci. 22(15):6331-5, 2002.
16. Michael D. Kane, William J. Lipinski, Michael J. Callahan, Feng Bian, Robert A. Durham, Roy D. Schwarz, Alex E. Roher, and Lary C. Walker. Evidence for Seeding of -Amyloid by Intracerebral Infusion of Alzheimer Brain Extracts in-Amyloid Precursor Protein-Transgenic Mice J. Neurosci. 20: 3606-3611, 2000.
17. Smythe JW, Murphy D, Timothy C, Gul GH, Costall B.: Cognitive dysfunctions induced by scopolamine are reduced by systemic or intrahippocampal mineralocorticoid receptor blockade, Pharmacol Biochem Behav 56(4):613-21, 1997.
18. Jenkins TA, Latimer MP, Alderson HL, Winn P: Determination of acetylcholine and dopamine content in thalamus and striatum after excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus in rats, Neurosci Lett. 322(1): 45-8, 2002.
19. Andreani A, Leoni A, Locatelli A, Morigi R, Rambaldi M, Pietra C, Villetti G: 4-Aminopyridine derivatives with anti-amnesic activity, Eur J Med Chem, 35(1): 77-82, 2000.
20. Park CH, Kim SH, Choi W, Lee YJ, Kim JS, Kang SS, Suh YH : Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydrodiamine, a constituent of Evodia rutaecarpa. Planta Med. 62(5), 405-409, 1996.
21. 申卿熙, 蒼濟證方, 三藏苑, 서울, p. 229, 1990.
22. Paxino Watson, Rat Brain Atlas, 1982.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. Bullock BL. *Pathophysiology. adaptation and alterations in function* 4th edition. Philadelphia, Lippincott. p. 1095-1097, 1996.
 30. Park CH, Kim SH, Choi W, Lee YJ, Kim JS, Kang SS, Suh YH : Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydrodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.* 62(5), 405-409, 1996.
 31. 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.
 32. Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, Egan JM, Greig NH.: Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like Peptide-1 and exendin-4. *J Pharmacol Exp Ther.* Sep;302(3):881-8, 2002.
 33. Kara L. Agster, Norbert J. Fortin, and Howard Eichenbaum. The Hippocampus and Disambiguation of Overlapping Sequences, *J Neurosci*, 22(13):5760-5768, 2002.
 34. Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS. The hippocampus and Pavlovian fear conditioning: reply to Bast et al. *Hippocampus*, 2002.
 35. 陳貴廷 楊思澍主編, 實用中西醫結合診斷治療學, 中國醫藥科學技術出版社, pp. 824-26, 1991.
 36. 趙金鐸 中醫症狀鑑別診斷學, 上海, 人民衛生出版社, pp.73-4, 1987.
 37. 黃文東: 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 379-80, 1986.
 38. 黃培新, 劉茂才主編: 神經科專病中醫臨床診治, 北京, 人民衛生出版社, pp. 91-3, 2000.
 39. 夏承義: 姚培發教授治療老年性痴呆的用藥特點, *新中醫*, 23(8): 55-56, 1991.
 40. 魏小龍: 海馬學記憶功能有關基因及六味地黃湯益智作用与基因表達 關係的研究, *生理科學進展*, 31(3): 227-230, 2000.
 41. 전국한의과대학본초학교수 공편저: 本草學, 영림사, 서울, p. 545, 1998.