

四六湯加味方이 흰쥐의 學習 및 記憶에 미치는 影響

박보경, 장규태, 김장현

동국대학교 한의과대학 소아과학교실

An experimental Study on the Effects of *saruktanggamibangbang* on Memory and Learning of Rats

Park Bo Koung, Chang Gyu Tae, Kim Jang Hyun
Department of pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objective: This study was conducted to find out the effect of *saruktanggamibang*(SRT) on memory and learning of rats.

Methods: The morris water maze was used. It was performed Acquisition test, Retention test of water maze. After Behavioral test, it was investigated AChE cell numbers of CA1 and CA3 on hippocampus.

Results: of water maze revealed that acquisitive abilities of SAP+SRT group significantly improved on 3, 4, 5th day compared with SAP+Saline group. Retention test of water maze didn't reveal that retentive abilities of SAP+SRT group significantly improved comparing with another group. ChAT cell numbers of medial septum of SAP+SRT group significantly increased compared with SAP+Saline group. AChE cell numbers of CA1 and CA3 on hippocampus of Sham+SRT group significantly increased compared with Sham group. And AChE cell numbers of CA1 and CA3 on hippocampus of SAP+SRT group significantly increased compared with SAP+Saline group.

Conclusion: *Saruktanggamibang*(SRT) has an effect on memory and learning of rats

Key word: Memory and Learning, *saruktanggamibangbang*

I. 緒 論

最近 競爭化되고 있는 사회 여건속에서人間이 지니고 있는 高次元的인 精神活動 중 學習과 記憶의 能力增進에 대한 關心이 그 어느 때보다 增加되고 있는 實情이다¹⁾. 學習은 연습이나 經驗에 의하여 물리적으로 뇌에 지속적인 變化가 생긴 것을 말하며, 그 變化를 記憶이라고 한다²⁾. 記憶은 또한 學習된 내용을 貯藏하고 다시 꺼내어 使用하는 能力을 말하는데²⁾, 學習과 記憶은 서로 불가분의 관계에 있으며 학습은 記憶의 양과 질을 통해서만 그 결과를 측정할 수 있다³⁾.

한의학에서는 記憶을 한의학적 인지과정인 神의 일부로 인식하며⁴⁾ 『黃帝內經 靈樞·本神編』⁵⁾에서는 “所以任物者謂之心, 心有所憶者謂之意, 意之所存者謂之志”라 하여 ‘心’, ‘意’, ‘志’를 記憶과정으로 기술하였고, 記憶을 주관하는 臟器로는 『靈樞·本神篇』⁵⁾에 “腎盛怒不止則傷志, 志傷則喜忘其前言”라 하여 ‘志’는 堅定不移의 記憶을 의미하는 것으로 記憶生理은 주로 腎에서 담당하는 것으로 알려져 왔다⁴⁾. 以後 記憶에 관한 作用은 腎보다는 腦에서 담당하는 것으로 認識이 전환되어 李時珍은 “腦는 元神支府”⁶⁾라 하여 腦가 인간의 중추 신경계통을 지배하는 것으로 이해되었으며, 이후 王⁷⁾은 “靈記記性 不在心在腦”의 표현으로 記憶은 心보다는 腦에서 이루어진다고 하였다. 이 같은 記憶에 관계하는 주된 臟器로 腦와 腎 이외에도 心과 脾를 들 수 있다. 心과 脾의 기능은 腦의 대사기능을 촉진하는 血의 생성과 순환을 주관하여 記憶作用에 관여한다⁴⁾.

한의학에서는 記憶의 증진을 목표로 한약을 투여하여 임상적 효과를 인정하고 있으며⁸⁾ 최근 記憶장애에 대한 한의학적 연구로 損傷腦

에 대한 한약의 학습과 記憶력 증진의 효능에 관한 실험연구가 시도되고 있다⁹⁾.

四六湯은 調血 化血 活血 補血하는 四物湯¹⁰⁾과 滋腎, 補腎하는 六味地黃湯¹¹⁾을 合方한 處方으로 補血, 調益榮衛, 補腎水, 滋陰의 效果를 지니며 실험상 犬毛의 成長을 促進시키고, 貧血을 回復시키며 testosterone生成을 增加시킨다고 報告되었으나¹²⁾ 학습 및 記憶에 미치는 영향에 대해 연구된 바는 없었다.

이에 저자는 이러한 四六湯에 白茯神, 遠志, 酸棗仁, 香附子, 玄蔘, 石菖蒲, 化濕開胃, 砂仁, 및 人蔘을 加味하여 학습 및 記憶에 미치는 영향을 연구하고자 수중미로장치를 이용한 행동 실험 및 흰쥐 대뇌의 변화를 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 動物

體重 280±10 g의 Sprague-Dawley系 수컷 흰쥐(샘타코, 韓國)를 購入하여 溫度 23±3°C, 相對濕度 50±10%의 環境을 유지하면서 쥐용 固形飼料(삼양사료, 한국)과 물을 供給하였으며, 1週日間 實驗室 環境에 適應시킨 후 使用하였다.

2) 藥材

약재는 동국대학교 한방병원에서 구입하여 사용하였다. 처방의 내용은 四六湯加味方 1첩 분량을 기준으로 하였으며 처방내용과 분량은 다음과 같다.

약명	생약명	용량(g)
白茯苓	Poria Hoelen	7.5
山藥	Dioscorea Rhizoma	5.625
山茱萸	Corni Fructus	5.625
熟地黃	Rehmannoa Radix Preparata	4.5
當歸	Angelica Gigantis Radix	4.5
白芍藥	Paeonia Radix	4.5
川芎	Cnidii Rhizoma	4.5
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	3.75
澤瀉	Alismatis Rhizoma	3.75
白茯苓	Hoelen	3.75
遠志	Polygala Radix	3.75
酸棗仁	Zizyphi Semen	3.75
香附子(炒)	Cyperi Rhizoma	3.75
玄參	Scrophulariae Radix	3.75
石菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	3.75
砂仁	Amomum Xanthioides Fructus.	3.75
人蔘	Ginseng Radix	2.625
Total Amount		73.125

2. 方法

1) 實驗群의 分類

흰쥐를 아무런 처치를 하지 않은 모의시술 군(Sham), 모의시술군에 四六湯加味方을 투여한 군(Sham+SRT), acetylcholine성 신경세포만 손상시키는 Saporin을 투여후 Saline을 투여한 군(SAP+Saline), saporin을 투여한 후 四六湯加味方을 투여한 군(SAP+SRT)으로 나누었고 모든 군은 군당 6-12마리씩 분류하였다.

2) 藥材 製造 및 藥물 투여 방법

本 實驗에 使用한 경구투여용 약제는 생약 270 g에 1000 ml의 증류수를 가하여 3 시간 가열한 후 전탕을 얻었다. 이는 임상용량(1 g/kg)의 5배(5 g/kg)에 해당되는 농도이다. Sham+SRT는 실험 시작하면서 3주 동안, SAP+SRT는 Saporin을 투여후 3주 동안 매일 한

차례 일정한 시간인 오후 10 시경에 흰쥐체중 100 mg당 1.6 ml을 경구 투여하였다.

3) Intracranial Injections of immunolesioning agent, 192 saporin

Sodium pentobarbital로 흰쥐를 마취한 다음 (50 mg/kg. i.p.) 수술용 고정장치를 이용하여 stainless steel 주사 삽입관을 medial septum (AP:-0.1; L; 0.3; H:-6.2) 부위에 주입하였다. 흰쥐에게 192 saporin (ATS, San Diego, CA) 4 μ l 또는 생리식염수를 양측으로 주사하였다. 미세투석은 관류펌프에 장착된 1.0 ml gas-tight glass syringe (Hamilton, Reno, Nevada) 에 연결된 삽입관을 통해 이루어졌다. 모든 주사는 분당 0.2 μ l 의 속도로 1 μ l씩 투여한다. 약물 투여 후 삽입관은 5 분 후에 제거되었다.

4) Morris 수중 미로의 장치에 의한 學習 및 記憶力 測定

수중미로로 이용되는 수조는 직경이 180 cm 높이가 50 cm인 원형 통으로 온도가 22 ± 2 °C 되는 물이 30 cm 높이로 채워지게 하였다. 수중 미로의 주변은 비디오 카메라, 실험대, 그리고 실험대 위에 있는 수온 조절용 장치 등 공간단서들을 일정하게 유지하였다. 도피대는 직경이 12 cm인 원형 투명 아크릴에 받침대를 부착하고, 수면보다 1.5 cm 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 4 행씩 6일간 훈련을 받으며(획득실험 : acquisition test), 7 일째 마지막 시행이 끝나면 자유수영 검사시행이 삽입되었는데(記憶실험 : retention test) 이때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60 초간 수영을 하게 하였다. 모든 동물들의 행동은 비디오 카메라로 녹화되는데, 훈련 시행에서는 출발에서부터 올라가는데 걸린 시간을 측정(Smart traker V1.1, Korea)하며, 자유수영 검사시행에서는 도피대 주변 반경 2 배에서 머무른 시간과 거리를 측정하였다.

5) Acetylcholinesterase(AChE), Cholineacetyltransferase(ChAT) Immunohistochemistry

모든 행동 실험이 끝난 직후 흰쥐를 sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p.)로 마취시키고 saline 100 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 (fixative) 500 ml로 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200 ml은 5 분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 300 ml 은 25 분간에 걸쳐 천

천히 관류하였다. 그 다음 뇌를 꺼내 길은 고정액으로 2-3 시간 동안 고정시키고 20 % sucrose가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 4 °C에서 하루동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌조직을 배측(dorsal)과 복측(ventral)의 해마(hippocampus), 내측 중격(medial septum) 부위에서 30 μ m의 두께로 자른다. PBS로 조직을 몇 차례 씻고, 다음에 ChAT와 AchE expression 연구에 가장 널리 사용되는 primary rabbit polyclonal ChAT 및 AchE antibody (Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE)를 사용하였다. Primary antibody는 0.3 % Triton-X100 (PBST)에서 2 % normal goat serum 과 0.001 % kehole limpit hemocyanin (Sigma)로 2000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 primary anti-serum에 4 °C에서 72 시간동안 지속적으로 흔들며 주면서 배양하였다. 그 후 3 번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음, 2 시간 동안 실온에서 2 % normal goat serum을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated rabbit anti-rabbit serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA)에 반응시켰다. PBST로 3 번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2 시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent (Vector)에 담구었다. PBS로 몇 번 행군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzadine를 사용하여 발현시켰다. 통제군 조직에는 primary antibody를 생략하거나 nonimmune rabbit serum으로 대체하였는데 이들 두 경우 다 특정 표지가 나타나지 않았다. 모든 케이스 곁에 명확한 라벨을 표시해 두었다. 모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 현미경으로

관찰하였다. 200 x 200 μm 크기의 microscope 4각 격자 (rectangle grid)를 사용하여 200배로 확대하여 ChAT-immunoreactive 신경세포의 수를 측정하였다.

6) 統系處理

各 群의 統計處理는 Window용 SPSS 10.0을 利用하여 分散分析法에 의한 分散比를 통하여 各 群 사이의 平均值 差異에 대한 有意性を 檢定하는 방법(One-way ANOVA)을 사용하였는데, $\alpha=0.05$ 水準에서 LSD test를 이용하여 個別比較하였다.

피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득 시행에서 제 1 일째는 각 집단간 유의성 없이 비슷하게 나타내었으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 6 일째에는 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 감소하였다($p<0.001$). 이에 측정 일에 따른 집단별 사후검정을 실시한 결과, 4 회 시도한 평균시간은 SAP+Saline이 가장 시간이 오래 걸렸으며, SAP+Saline과 SAP+SRT에 3, 4, 5, 6일에 유의성 있는 차이가 나타났으며(각각 $p<0.05$), 학습수행에 유의한 증진효과가 관찰되었다(Table 1).

2) 記憶檢査 (Retention Test of Water Maze : Duration, Distance)

수중미로장치를 사분원으로 나누고 도피대를 제거한 후 60 초간 자유수영을 실시하고 이를 비디오 카메라로 녹화하여 총 시간 중 도피대가 있었던 곳에 머무는 시간의 %를 측정하는 것을 Duration으로 정하여 측정하고, 60 초간 간 거리에서 도피대가 있었던 곳에 있던 거리의 %를 Distance로 정하여 측정하였다. 각 집단간 차이를 검정하기 위하여 사후검증

Ⅲ. 成 積

1. 學習 및 記憶에 미치는 影響

1) 獲得 檢査(Aquisition test of Water Maze)
수중 미로 학습에서 6 일 동안 180 초내 도

Table 1. Effect of SRT on acquisition of water maze test(sec)

group	No. of animal	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day
Sham	10	128.4±20.1	76.0±19.5	39.9±18.5	39.2±13.1	20.1±6.4	18.6±7.1
Sham+SRT	6	115.1±22.5	56.6±12.8	26.5±3.0	36.2±6.6	13.4±3.6	18.2±6.0
SAP+Saline	12	173.9±1.6	134.2±11.7	146.7±15.0*	142.7±12.3*	121.5±14.1*	109.2±20.0*
SAP+SRT	7	110.9±12.0	57.3±15.1	42.3±12.2#	63.3±11.7#	35.7±7.6#	29.2±4.3#

Sham : Untreated group.

Sham+SRT : Sham group in saruktanggamibang treatment

SAP+Saline : 192 Saporin injection group.

SAP+SRT : Injection of Saporin 192 with saruktanggamibang treatment

* : $p<0.05$, compared with Sham group

: $p<0.05$, compared with SAP+Saline group

한 결과, SAP+Saline군과 Sham군에서만 유의성을 보였으며($p<0.001$), SAL+SRT는 유의성을 나타내지 않았다(Table 2).

2. 내측중격(medial septum)에서의 세포 보호효과

내측 중격의 ChAT(Cholineacetyltransferase) cell의 수를 측정하였다. 내측 중격에서의 ChAT cell의 수는 Sham이 평균 15.1개, Sham+

SRT이 11.6개, SAP+Saline이 4.6개, SAP+SRT이 8.2개였다. 각 집단 차이를 검증한 결과, 집단간 유의성이 있었다($p<0.0001$). 사후 검증법을 이용하여 이들 집단간 개별 차이를 비교한 결과, Sham에 비해 SAP+Saline에서, 그리고 Sham+SRT에서 각각 세포수가 줄어들었으며($p<0.01$, $p<0.01$), SAP+saline에 비하여 SAP+SRT에서는 세포수가 유의성 있게 ($p<0.01$) 증가하였다(Table 3).

Table 2. Effect of SRT on Retention test

group	No. of animal	Duration (%)	Distance (%)
Sham	10	5.96±0.8	6.39±0.6
Sham+SRT	6	6.67±0.9	7.25±0.8
SAP+Saline	12	2.41±0.8**	2.84±0.9**
SAP+SRT	7	3.30±0.9	4.04±1.1

Sham : Untreated group.
 Sham+SRT : Sham group in saruktanggamibangbang treatment
 SAP+Saline : 192 Saporin injection group.
 SAP+SRT : Injection of Saporin 192 with gamoisayuktang treatment
 ** : $p<0.01$, Compared with Sham group

Table 3. Effect of SRT on ChAT-cells in the medial septem(MS)

group	No. of animal	Cell Number in MS
Sham	10	15.1±1.4
Sham+SRT	6	11.6±0.8
SAP+Saline	12	4.6±1.3**
SAP+SRT	7	8.2±0.9##

Sham : Untreated group.
 Sham+SRT : Sham group in saruktanggamibangbang treatment
 SAP+Saline : 192 Saporin injection group.
 SAP+SRT : Injection of 192 Saporin injection with saruktanggamibangbang treatment
 ** : $p<0.01$, compared with Sham group
 ## : $p<0.01$, compared with SAP+Saline group

3. 해마(Hippocampus)에서의 AchE의 발현

해마에서는 각 부위에 따라 CA1, CA3로 나누어 AchE의 density를 측정하였다. CA1, CA3부위에서 CA1, CA3부위에서 Sham에서는 평균이 각각 24.0, 41.5였으며, Sham+SRT는 11.3, 36.5, SAP+Saline에서는 각각 14.9, 39.0이었으며, SAP+SRT에서는 각각 2.2, 20.4였다. 이들의 집단간 차이를 검증한 결과 CA1과 CA3에서 각각 집단간 유의한 차이가 있었다($p < 0.01$, $p < 0.001$). 각 집단간 차이를 검정하기 위하여 사후검정법에 의하여 개별 비교한 결과, CA1에서 Sham이 SAP+Saline에 비하여 유의한 차이를 보였다($p < 0.01$). Sham+SRT는 Sham에 비해($p < 0.01$), 그리고 SAP+SRT는 SAP+Saline에 비해 AchE의 발현이 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$). 또한 CA3에서 Sham은 SAP+Saline과 차이가 없었으며, Sham+SRT는 Sham에 비해($p < 0.01$), 그리고 SAP+SRT는 SAP+Saline

에 비해($p < 0.05$) AchE의 발현이 유의하게 감소하였다(Table 4).

IV. 考 察

개체가 환경에 대한 지식을 습득하여 그 경험을 토대로 주변 환경의 변화에 적응하여 행동하는 과정을 學習(learning)이라고 하고 학습의 결과 습득한 지식을 저장하였다가 필요할 때 회상하는 과정을 記憶(memory)이라고 한다^{14, 16}. 學習과 記憶은 서로 불가분의 관계에 있으며 學習은 記憶의 양과 질을 통해서만 그 결과를 측정할 수 있다³⁾.

學習과 記憶을 담당하는 腦構造는 해마, 편도체, 내측 중격, 그리고 신피질등이다²⁾. 내측 중격핵은 해마와의 밀접한 연결로 인해 중격해마체계(septohippocampal system)로 불리

Table 4. AchE at Hippocampus.

group	No. of animal	Density of Ache-reactive cells	
		CA1	CA3
Sham	10	24.0±1.0	41.5±1.0
Sham+SRT	6	11.3±0.3**	36.5±1.0*
SAP+Saline	12	14.9±0.7**	39.0±1.4
SAP+SRT	7	2.2±0.1##	20.4±0.5##

Sham : Untreated group.

Sham+SRT : Sham group in saruktanggamibangbang treatment

SAP+Saline : 192 Saporin injection group.

SAP+SRT : Injection of 192 Saporin injection in saruktanggamibangbang treatment

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, compared with Sham group

: $p < 0.01$, compared with SAP+Saline group

위 진다. 이 체계가 설치류의 학습과 기억에서 중요한 역할을 한다는 설명은 상당한 증거들에 의해 지지되었다. 내측 중격핵의 뉴런은 해마로 투사되는 것으로 알려져 있는데 이 뉴런들 중 50%는 콜린성이며, 내측 중격핵의 손상은 해마의 콜린성 섬유의 표지를 감소시킨다는 사실이 많은 연구자들에 의해 확인되었다. 기저 전뇌 콜린성 체계의 구조들 중 해마가 다양한 공간학습에 관여한다는 사실은 분명히 입증되었다. 해마가 손상된 흰쥐들은 방사성 미로, Morris 수중미로와 같은 공간 기억과제를 학습하는 능력의 장애를 보였다. 내측 중격핵 손상에 의한 공간학습능력의 장애도 입증되어 왔는데 그 손상은 방사성 미로과제와 수중미로과제의 학습장애를 초래하였다¹⁷⁾.

해마는 학습과 기억손상에 중요한 역할을 하는데 특히 해마의 CA1 부위에서 추체세포(pyramidal cell)들이 선택적으로 손상되면 학습과 기억의 장애가 심각하게 나타난다. Ach, dopamine, serotonin, GABA의 경우에는 노화에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데²⁷⁾, 그 중 Alzheimer's disease(AD) 환자에 있어서 시냅전 신경 표지자(presynaptic neuronal marker)의 생성에 관여하는 효소, 특히 ChAT의 활성도가 측두엽의 신피질(neocortex), 내측중격과 편도등에서 약 50~90% 정도 감소한다²⁸⁾. 또한 AD의 1차 증상인 기억력 손상 증상은 콜린성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있는데, AD에서 나타나는 기억력 상실과 다른 인지 결함이 신호를 전달해 주는 화학물질인 Ach을 만들어 내는 신경세포의 퇴화 때문이라고 설명할 수 있으며 실험적인 예로 쥐에게 내측 중격과 NBM(Nucleus Basalis Magnocellularis) 부위에 ibotenic acid을 주

입하였을 때 각각 ChAT의 활성이 감소하였다고 보고된 바 있다²⁹⁾. 또한 Ach이 해마에서 줄어드는데 현재 치매의 치료제로써 AchE를 억제하여 해마내에서의 Ach의 작용을 증진시키려는 시도가 이루어지고 있다^{30,31)}.

한편 腦의 神經傳達物質 中の 하나인 acetylcholin(Ach)은 皮質下 領域에 특히 많이 분포되어 있다. 腦의 神經 活動 水準이 腦 組織에 放出된 Ach의 水準과 關係되기 때문에 Ach는 뇌에서 흥분적 機能을 하여^{14,18,19)}, 學習과 記憶을 促進시키고²⁰⁾, Ach의 水準이 低下되면 이로 因하여 記憶이 低下되며^{21,22)} 이에 對한 回復 能力에 관한 研究가 알려져 있다^{23,24)}. 뇌에서의 Ach 분비에 대한 경로는 크게 두 가지로 볼 수 있는데, 내측 중격이나 브로카 대화영역(diagonal band of Broca : DBB)에서 해마로 투사되거나, 기저핵(basal nucleus)에서 대뇌피질(cerebral cortex)로 투사되는 경로가 있다²⁵⁾. Ach은 choline acetyltransferase(ChAT : 콜린아세틸 전이 효소)에 의해 촉매된 반응에서 합성되고(acetyl CoA + choline \leftrightarrow Ach + CoA). 또한 Ach acetylcholinesterase(AchE)에 의해 choline과 acetate로 분해된다. (Ach \rightarrow choline + acetate), 따라서 이들 두 효소의 발현정도를 살펴봄으로서 기억력과 밀접한 관계가 있는 신경전달물질인 Ach의 양을 가늠할 수 있다²⁶⁾.

한의학에서는 記憶을 한의학적 인지과정인 神의 일부로 인식하며⁴⁾, 「黃帝內經 靈樞·本神編」⁵⁾에서는 “所以任物者謂之心, 心有所憶者謂之意, 意之所存者謂之志”라 하여 ‘心’, ‘意’, ‘志’를 記憶과정으로 기술하였다. 특히 ‘心’, ‘意’, ‘志’ 등은 記憶의 3단계 과정인 記銘(registration), 貯藏(retention), 再生(recall)의 순서와도 類似한 것으로 비교되어진다

³²⁾ 記憶을 주관하는 臟器로 內經에서 「靈樞·本神篇」⁵⁾에 “腎盛怒不止則傷志, 志傷則喜忘其前言”라 하여 ‘志’는 堅定不移의 記憶을 의미하는 것으로 記憶生理는 주로 腎에서 담당하는 것으로 알려져 왔다. 以後 記憶에 관한 作用은 腎보다는 腦에서 담당하는 것으로 認識이 전환되어 李時珍은 “腦는 元神支府”라 하여 腦가 인간의 중추 신경계통을 지배하는 것으로 이해되었으며,⁶⁾ 이후 王⁷⁾은 “靈記記憶性 不在心在腦”의 표현으로 記憶은 心보다는 腦에서 이루어진다고 하였다. 그러나 腎은 精을 藏하고 精은 髓를 生하여⁵⁾, 腦는 髓之海이며⁶⁾, 腎은 위로 腦에 通한다³³⁾고 하였으며 「素問·宣明五氣篇」腎藏志 등의 표현을 종합하면 腦의 기능은 腎精과 밀접한 관계가 있다고 할 수 있다. 따라서 腎精이 充滿한 경우 記憶 능력도 좋아져 사물을 잊지 않고 記憶할 수 있으며, 반대로 腎精이 虧損한 경우 腦髓가 不足하게 되어 意志가 衰退하여지고 사물에 대한 記憶이 減退되어 健忘症이 나타남을 알 수 있다⁴⁾. 이 같은 記憶에 관계하는 주된 臟器로 腦와 腎 이외에도 心과 脾를 들 수 있다. 心과 脾의 기능은 腦의 대사기능을 촉진하는 血의 생성과 순환을 주관하여 記憶作用에 관여한다. 이처럼 記憶過程은 心과 脾 그리고 腎의 相互 有機的인 調節機能에 의해서 발현된다⁴⁾.

최근의 學習과 記憶에 관한 한의학적 연구를 살펴보면 문헌고찰과 함께 손상 腦에 대한 한약의 學習과 記憶力 증진의 효능에 관한 실험 연구가 시도되고 있다⁹⁾. 禹³⁴⁾와 李³⁵⁾는 調胃升清湯이 記憶을 증진시킨다고 보고하였고, 李³⁶⁾는 荊防地黃湯을 이용하여 학습과 記憶에 미치는 영향을 밝혔으며, 鄭³⁷⁾은 鹿茸 및 補兒湯加鹿茸이, 金³⁸⁾은 聰明湯이 학습 및 記憶에 효과가 있음을 보고하였다.

四物湯은 陳의 『太平惠民和劑局方』³⁾에 最初로 收錄된 處方으로 一切 血虛 및 婦人 經病에 調血 化血 活血 補血하는 目的으로 立方되어 以後 歷代醫書에 廣範圍하게 活用되어왔다¹⁰⁾. 구성약물을 보면 當歸는 生血하는 君藥으로, 熟地黃은 滋血하는 臣藥으로, 白芍藥은 收斂하는 佐藥으로, 川芎은 血中の 氣를 行하게하는 使藥으로 보았다³⁹⁻⁴²⁾.

六味地黃湯은 『金櫃要略』⁴³⁾의 八味腎氣丸에서 附子, 桂皮를 去하여 錢乙의 『小兒藥證直訣』에 地黃元으로서 最初로 收錄된 處方으로 一切 先天不足 또는 腎氣虛乏病에 滋腎, 補腎하는 目的으로 사용되었다¹¹⁾. 處方構成을 보면 熟地黃은 滋陰補腎하는 君藥으로, 山茱萸와 山藥은 溫補肝腎하고 健脾固腎하는 臣藥으로, 茯苓은 滲濕健脾하고 牡丹皮는 清熱煖肝하고 澤瀉는 利水滲濕하는 助瀉藥으로 보았다⁴⁴⁻⁴⁶⁾.

四六湯은 血病의 通治方인 四物湯과 生精滋陰의 基本方인 六味地黃湯을 合方한 것으로 全身衰弱, 陰血不足, 肝腎兩虛, 陰虛內熱, 虛火上炎 등의 症候에 活用된다⁴⁷⁾. 四六湯에 對한 實驗研究로서는 黃¹²⁾은 四六湯이 犬毛의 成長을 促進시키고, 貧血을 回復시키며 Testosterone生成을 增加시킨다고 報告하여 補血, 調益榮衛, 補腎水, 滋陰의 效果를 立證하였고 이⁸⁾는 六味地黃湯이 記憶을 향상시키는 효과가 있다고 하여 記憶과 腎의 연관성을 입증하였다. 또한 鄭⁴⁷⁾은 加味四六湯이 Cyclospine A로 손상된 肝臟組織에 組織學的 有意성이 있으므로, 肝毒性뿐 아니라 腎毒性의 부작용을 감소시키는데 活用될 수 있을 것으로 사료된다고 하였다.

四六湯加味方은 補血, 調益榮衛, 補腎水, 滋陰하는 四六湯에 白茯苓, 遠志, 酸棗仁, 香附子, 玄蔘, 石菖蒲, 砂仁, 그리고 人蔘을

加味하여 寧心安神, 祛痰開竅, 理氣解鬱, 益氣滋陰 등의 效能을 강화한 처방이다¹³⁾.

본 연구에서는 흰쥐를 대상으로 아세틸콜린성 신경세포가 주로 위치하는 생쥐의 내측 중격(medial septum)에 흥분성 신경독소인 192 사포린을 주입함으로써 직접적으로 중추신경을 파괴하고, 四六湯加味方을 투여한 후 Morris 수중미로를 이용하여 학습 및 기억능력을 관찰하였다. 이후 흰쥐를 마취시키고 뇌를 적출하여 기억력과 관련된 해마로 투사되는 Ach의 생성장소인 내측 중격내에서 시냅전 신경 표지자(presynaptic neuronal marker)의 생성에 관여하는 효소인 ChAT (choline acetyltransferase)의 활성도를 관찰하여 세포보호효과를 관찰하였으며, 동시에 Ach가 분비되는 해마내에서 AchE의 억제정도를 관찰하여 학습과 기억에 미치는 영향을 관찰하였다.

기억검사에서 흰쥐를 Sham, Sham+SRT, SAP+Saline, SAP+SRT로 나누었고 모든 군은 군당 6-12마리씩 분류하였다.

Morris 수중미로는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 주로 장기기억능력을 측정하는 과제로서 유기체가 주변에 있는 여러 단서들을 사용하고 기억하는 능력, 즉 공간준거기억을 측정하는 것이다⁴⁸⁾. 이는 비협조적인 동물도 쉽게 실험할 수 있고 후각 단서가 없으며, 어떤 동물도 쉽고 빨리 학습하도록 하는 이점이 있으며, 흰쥐로 사용된 쥐는 수년간의 행동적 신경 생리학적 연구를 통해서 공간학습능력이 매우 좋다는 것이 밝혀지고 있다¹⁷⁾.

수중미로는 30 cm 높이로 물이 채워져 있으며 도피대는 수면보다 1.5 cm 낮게 위치시켰다. 쥐는 6 일간 훈련을 받으며(획득검사 : acquisition test), 출발에서부터 올라가는데

걸린 시간을 측정하며 학습능력을 검사하였으며 7 일째 마지막 시행이 끝나면 자유수영 검사가 시행되었는데(기억검사 : retention test) 이때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60 초간 수영을 하여 도피대 주변 반경 2배에서 머무른 시간과 거리를 측정하여 기억능력을 검사하였다.

획득검사에서 Sham군은 실험 제 3, 4 및 5일에서 39.9±18.5, 39.2±13.1 및 20.1±6.4 sec로 나타났으며 Sham+SRT에서는 26.5±3.0, 36.2±6.6, 및 13.4±3.6 sec로 SAP+Saline군에서는 146.7±15.0, 142.7±12.3, 및 121.5±14.1 sec로, SPA+SRT에서는 42.3±12.2, 63.3±11.7, 및 35.7±7.6 sec으로 나타나 Sham과 SAP+Saline, 또한 SAP+Saline과 SPA+SRT 사이에 유의성(P<0.05)있는 차이를 나타내어 학습수행에 유의한 증진효과가 관찰되었다.

기억검사에서 Sham에서는 5.96±0.8, 6.39±0.6 sec, Sham+SRT에서는 6.67±0.9, 7.25±0.8 sec, SAP+Saline에서는 2.41±0.8, 2.84±0.9 sec, 그리고 SPA+SRT에서는 3.30±0.9, 4.04±1.1 sec으로 나타나 Sham과 SAP+Saline 사이에만 유의성 있는 차이를 나타내었고 SPA+SRT는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

내측 중격의 ChAT cell의 수는 Sham에서는 15.1±1.4개, Sham+SRT에서는 11.6±0.8개, SAP+Saline에서는 4.6±1.3개, 그리고 SPA+SRT에서는 8.2±0.9개로 나타나 Sham에 비해 SAP+Saline과 Sham+SRT에서 각각 세포수가 유의성 있게 감소하였으며(p<0.01, p<0.01), SAP+Saline에 비해 SAP+SRT에서 세포수가 유의성 있게 증가하여(p<0.01), 四六湯加味方이 Saporin으로부터 아세틸콜린성 신경세포를 보호하는 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

해마에서는 각 부위에 따라 CA1, CA3로 나누어 AchE의 density를 측정하였다. AchE의 density는 CA1, CA3부위에서 Sham에서는 각각 평균 24.0, 41.5, Sham+SRT는 11.3, 36.5, SAP+Saline은 14.9, 39.0, SAP+SRT는 2.2, 20.4였다. 각 집단간 차이를 검정하기 위하여 사후검정법에 의하여 개별비교한 결과, CA1에서 SAP+Saline이 Sham에 비해 유의성 있게 감소하였고($p < 0.01$), Sham+SRT는 Sham에 비해($p < 0.01$), 그리고 SAP+SRT는 SAP+Saline군에 비해 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$). 또한 CA3에서 Sham은 SAP+Saline과 차이가 없었으며($p < 0.09$), Sham+SRT는 Sham군에 비해($p < 0.01$), 그리고 SAP+SRT는 SAP+Saline군에 비해 유의성 있게 AchE의 발현이 감소하여($p < 0.05$) 해마의 CA1, CA3 부분에서 四六湯加味方이 AchE를 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 四六湯加味方은 해마에서 AchE의 작용을 억제함으로써 Ach작용을 강화하여 기억 및 학습 증진 효과가 있는 것으로 볼 수 있다.

이상의 결과를 종합해 보면 四六湯加味方은 Morris 수중미로를 이용한 행동실험에서 학습수행에 유의한 증진효과가 있었고, 내측 중격에서는 흥분성 신경독소인 사포린으로부터 아세틸콜린성 신경세포의 보호작용을, 해마에서는 AchE의 억제작용을 관찰할 수 있어 결과적으로 기억 및 학습 증진에 효과가 있는 것으로 생각된다.

V. 結 論

四六湯加味方이 흰쥐의 학습 및 기억능력에 미치는 영향을 연구하고자 아세틸콜린성 신경세포가 주로 위치하는 생쥐의 내측 중격(medial septum)에 Saporin을 주입하여 중추 신경을 파괴하고 四六湯加味方을 투여한 후 Morris 수중미로를 이용하여 획득검사 및 기억검사를 실시하였다. 이후 흰쥐를 마취시키고 뇌를 적출하여 내측 중격에서 ChAT(choline acetyltransferase)의 활성도를 측정하여 세포 보호효과를 관찰하였으며, 동시에 해마에서 AchE의 억제 정도를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 획득검사에서는 SAP+Saline에 비해 SAP+SRT가 도피대에 도달하기까지의 시간이 3, 4, 5, 6일에 유의성 있게 감소하여, 四六湯加味方 약물 투여군에서 학습수행에 유의한 증진효과가 관찰되었다
2. 기억검사에서는 도피대가 있었던 곳에 머무는 시간과 거리를 측정하였으나 四六湯加味方 투여군이 증가하였으나 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.
3. 내측 중격의 ChAT cell의 수는 SAP+Saline에 비해 SAP+SRT의 세포수가 유의성 있게 증가하였다.
4. 해마의 CA1과 CA3에서 AchE를 측정 한 결과 Sham+SRT는 Sham에 비해 유의성 있게 감소하였고, SAP+SRT는 SAP+Saline군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

參考文獻

1. 함기선, 신문균, 최홍식. 神經生理學. 서울: 현문사. 1997:263-268.
2. 문양호. 學習과 記憶의 生理學的 基礎(I). 神經심리학적 개관. 인지과학. 1996;7(3): 7-60.
3. 장동환 외2인. 심리학 입문. 서울:박영사. 1991:214,267,272,313.
4. 류영수, 최공환. 記憶장애에 관한 동서의학적 비교연구. 동의신경정신과학회지. 1996; 7(1):155-166.
5. 馬元臺, 張隱庵. 黃帝內經素問靈樞合編. 台聯:國風出版社. 1986:『素問』532, 『靈樞』57-58, 464.
6. 이시진. 본초강목. 중의약출판사. 1998:825.
7. 王淸任編著. 醫林改錯(卷上). 台聯:國風出版社. 22-23
8. 李載熙. 記憶과 腎과의 關聯性에 대한 實驗的 研究. 大韓東醫生理學會誌. 1991;6 (1):59-76.
9. 백지성, 김중우, 황의완. 우황청심원이 NOS inhibitor 에 의한 흰쥐의 학습 및 記憶장애에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지.1999;10(2):115-126.
10. 劉景源 點校. 태평혜민화제국방. 인민위생출판사. 1985:310.
11. 金達鎬 譯. 소아약증직결. 서울:醫聖堂. 2002:110.
12. 黃敬植. 四六湯 煎湯液이 犬毛의 成長 및 白鼠의 內分泌에 미치는 影響. 慶熙大韓醫大論文集. 1981;4:103-111.
13. 한의과대학본초학교수편저. 本草學. 서울:영림사. 1992:302,496,493,354,192,523,294, 531.
14. 金基錫 譯. 腦. 서울:星苑社. 1989:253-267,104,110,115,118.
15. 金祐謙. 中樞神經生理學. 서울:생명의이치. 1988:231-244.
16. 성호경 외. 生理學. 서울:의학문화사. 1977: 667-678.
17. 정봉교, 윤병수, 박순권. 흰쥐의 내측중격핵 손상이 Morris 수중미로과제의 학습에 미치는 효과. 한국심리학회지. 1993;5:29-44.
18. 李寬鎔, 金基重. 生理心理學. 서울:法文社. 1986:168-176.
19. 韓大燮. 藥理學. 서울:藥事研究社. 1976: 134.
20. Mitsura Segawa, Hiroshi Saito and Nobuyshi Nishiyama. Alteration in choline acetyltransferase and tyrosine hydroxyrase activities of various brain areas after the acquisition of active avoidance tasks in mice. Biogenic Amines. 1990;7(2):171-180.
21. Lippa A.S., Pelham R.W., Beer B., Crichtett D.J., Dean R.J., Bartus R.T. Brain cholinergic dysfunction and memory in aged rats, Neurobiol. Aging. I.1965:13-19.
22. McKinney M., Coyle J.T., Hedreen J.C. Topographic analysis of the innervation of the rat neocortex and hippocampus by basal forebrain cholinergic system. J. Comp. Neurol.. 1983;217:103-121.
23. Christie J.E., Shering A., Ferguson J., Glen A.I.M. Physostigmine and arecholine : Effects of intravenous infusion in Alzheimer presenile dementia

- Br. J. Psychiatry. 1981;138:46-50.
24. Davis K.L. and Mohs R.C. Enhancement of memory process in Alzheimer's disease with multiple-dose intravenous physostigmine, Am. J. Psychiatry. 1982;139:1421-1422.
 25. Eric R. Kandel, James H. Schwartz and Thomas M. Jessell. Principles of neural science, 4th ed. McGraw-Hill. 894,1153-1154.
 26. Jack R. Cooper, Floyd E. Bloom and Robert H. Roth. The biochemical basis of neuropharmacology. 7th ed. Oxford University Press. 194-222.
 27. 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. 2000;294(1):187-194.
 28. Bullock BL. Pathophysiology. adaptation and alterations in function. 4th edition. Philadelphia:Lippincott. 1996: 1095-1097.
 29. 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. 1992;7:173-181.
 30. De vente J, Markerink-van Ittersum M, Van Abeelen J, Emson PC, Axen H. Steinbusch HW. NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain; effect of lesioning dopaminergic or serotonergic pathway on nNOS and cGMP synthesis. Eur J Neurosci. 2000;12(2): 507-519.
 31. 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. 1996;62(5):405-409.
 32. 大韓東醫生理學會編. 東醫生理學. 서울:경희대출판국. 1993:383-384.
 33. 李超形 外. 腎主生殖與排卵機理初步探討. 中醫雜誌. 1982;23(6):69.
 34. 禹周令. 調胃升清湯이 흰쥐의 放射型迷路學習과 記憶에 미치는 影響. 서울:慶熙大學校大學院. 1997.
 35. 李雄錫. 調胃升清湯이 Alzheimer's disease 모델 白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響. 서울:慶熙大學校大學院. 1998.
 36. 李在嫻. 荊防地黃湯이 흰쥐의 Morris 수중미로 學習과 記憶에 미치는 影響. 서울:慶熙大學校大學院. 1997.
 37. 鄭宰煥. 鹿茸 및 補兒湯加鹿茸이 어린 흰쥐의 學習과 記憶에 미치는 影響. 서울:慶熙大學校大學院. 1999.
 38. 金英旭. 聰明湯이 健忘誘導白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響. 大田:大田大學校大學院. 1999.
 39. 申佶求. 申氏本草學. 서울:壽文社. 1979: 80-95.
 40. 辛民教. 本草維新. 서울:慶花文化史. 1979: 78.
 41. 李尙仁. 本草學. 서울:修書院. 1981:101-

- 107.
42. 李尙仁外. 韓方臨床應用. 서울:成輔社. 1982:299,395,399,402.
 43. 張仲景. 金櫃要略. 裕昌德書院. 1960: 93,105.
 44. 尹吉永. 韓方臨床方劑學. 서울:明寶出版社.
 45. 정진모. 中醫處方解說 臨床應用. 서울: 癸丑文化社. 1986:84-86.
 46. 蔡仁植. 孟華燮 譯. 醫方集解. 서울:大成文化社. 43-49.
 47. 鄭翰聖, 姜允皓. 加味四六湯이 Cyclo-sprine A로 손상된 肝臟, 脾臟 組織에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1994;15(1): 183-192.
 48. Beatty W.W., Shavalia D.A. Rat spatial memory, USA, Animal Learning and Behavior(4). 1980:550-552.