

주자독서환의 뇌기능 활성화 및 신경세포 보호효과

이유경 · 채중원

동신대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Effects of Jujadokseo-hwan on the Activation of Brain and Neuroprotective Effects

Lee Yu Gyung, Chae Jung Won

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Objectives

This study is designed to investigate the effects of Jujadokseo-hwan on the brain ability and inducing oxidative stresses.

Methods

We measured the changes of regional cerebral blood flow and mean arterial blood pressure. Then we analyzed histological examination, immunohistochemistic response and anti-oxidant activity of Jujadokseo-hwan.

Results

1. Treatment of Jujadokseo-hwan significantly increased regional cerebral blood flow but decreased mean arterial blood pressure.
2. Treatment of Jujadokseo-hwan-induced increase of regional cerebral blood flow was significantly inhibited by pretreatment with indomethacin (1 mg/kg, i.p.), an inhibitor of cyclooxygenase.
3. In histological examination through TTC stain, group I was no change, but group II showed that discolored in the most cortical part. Group III showed that decreased discolor in the cortical part.
4. In immunohistochemistic response of BDNF, group II showed that lower response effect. Group III showed that increase response effect.
5. Treatment of Jujadokseo-hwan increased proliferation rates of Glial cell effectively.
6. Treatment of Jujadokseo-hwan accelerated proliferation rates of C6 cells in vitro. In addition, protective effects on cell death induced by paraquat, rotenone and hydrogen peroxide. In addition, activity of SOD were increased by treatment with Jujadokseo-hwan.

Conclusions

In conclusion, Jujadokseo-hwan can improve of the brain ability, learning ability, memory ability and induce ischemic brain injuries.

Key words : improvement of the brain ability, neuroprotective effect, oxidate stress, Jujadokseo-hwan, brain function

I. 緒 論

뇌는 생명 유지 장기중 하나로써 전체 혈액량의 18%를 공급받지만 자체적으로 산소 및 포도당을 비축 할 수 없기 때문에 뇌조직이 고유의 기능을 수행하기 위해선 심장으로 부터 지속적인 혈액을 공급받아야 한다¹⁾.

만약 뇌로 공급되는 혈류량이 어떠한 원인으로 인해 감소하게 되면 산소 및 포도당이 부족하게 되어 뇌조직에 비가역적 손상이 유발되 운동 기능 장애, 감각 기능의 이상, 언어 장애, 기억과 인지 장애, 심할 경우 혼수상태, 식물인간 등의 심각한 신경학적 증상이 유발된다²⁻⁴⁾. 그러므로 뇌혈류의 역학적 기전은 뇌의 신경활동 및 정신 기능에 대해 대단히 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다.

한의학에서도 뇌는 인체 내 중요한 기관으로 神이 모이는 장소라 여겼으며, 뇌의 기능 중 정신사유와 의식 활동 등은 心이 주관한다 생각하였다. 血은 心主血脈, 心生血이라고 하여 心氣의 強弱이 血의 運行에 직접 작용하니 血은 心장의 박동에 따라 全身의 脈中을 끊임없이 순환하게 된다⁵⁾.

朱子讀書丸 (JDH)은 東醫寶鑑⁶⁾에 수록된 처방으로 聰明湯⁷⁾에 氣와 血을 補하고, 氣血의 순행을 돕는 人蔘, 當歸, 陳皮, 甘草 같은 약물이 추가되어 聰明湯의 효능에 心脾가 虛損되어 오는 기억력장애 시 주로 사용된다.

현재까지 JDH에 관련한 연구로 강⁸⁾은 JDH의 알츠하이머모델에 대한 기억력 향상 효과와 알츠하이머병으로 인한 치매현상에 효과가 있음을 보고 하였으며 강⁹⁾은 JDH가 알코올중독에 대한 간손상을 회복시키는 효과와 약물 자체의 기억력을 향상시키는 효과를 가지고 있음을 보고하였다. 이에 저자는 JDH가 전반적인 뇌기능 활성화에 도움이 되며 뇌신경세포

를 보호하여 학습 및 기억력에 도움이 될 수 있을 것이라는 가설을 세우고 본 연구를 기획하였다.

따라서 본 연구에서는 JDH를 사용하여 뇌혈류역학 및 뇌의 면역조직화학적 검사를 이용하여 JDH가 뇌기능 활성화, 학습 및 기억에 미치는 효과와 기전을 밝히고 나아가 신경세포에 대한 보호 작용을 규명하고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 동물

실험동물로는 체중 250 g 정도의 수컷 Sprague-Dawley계 흰 쥐(다물사이언스, 한국)를 구입하여 사용하였으며 구입한 흰 쥐는 항온항습 장치가 구비된 사육장에서 고품사료와 물을 충분히 공급하면서 1 주일 간 적응(실내온도 24±2 °C, 습도 55±5 %, 12시간 명암주기)시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 세포주

흰 쥐의 뇌세포에서 유래한 신경교세포주인 C6 glial cell은 전문배양회사 (한국세포주은행, 한국)에서 동결 상태로 구입하여 사용하였다.

3) 약제

본 실험에서 사용한 주자독서환 (Jujadokseohwan, 이하 JDH)의 구성은 東醫寶鑑⁶⁾을 기준하였고, 실험에 사용된 약제는 東新大學校 부속 목포한방병원에서 구입하여 편의상 당으로 조제하였으며, 구체적인 처방 내용은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of Jujadokseo-hwan (JDH)

韓藥名	生藥名	用量(g)
茯 神	<i>Höden um Radix</i>	40 g
遠 志	<i>Polygalae Radix</i>	40 g
人 參	<i>Ginseng Radix</i>	28 g
陳 皮	<i>Auratii nobilis Pericarpium</i>	28 g
石菖蒲	<i>Acori graminei Radix</i>	20 g
當 歸	<i>Angelicae Radix</i>	20 g
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	10 g
燈 心	<i>Junci Medulla</i>	10 g
總 計		196g

2. 方法

1) 시료의 제조

JDH 196 g을 증류수 1,500 cc에 넣고 전기 약탕기 (대웅, 한국)로 2 시간 동안 전탕하여 얻어진 추출액을 거즈로 거른 다음, 원심분리기 (Eppendorf, Germany)를 이용하여 5,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 찌꺼기를 버리고 상층액을 얻은 후 감압 농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 180 ml로 감압 농축된 다음, 동결 건조하여 최종적으로 16.83 g의 시료를 얻었으며 이를 증류수에 희석하여 농도별로 투여하였다.

2) 국소뇌혈류량 및 평균 혈압 변화 관찰

① 국소 뇌혈류량 변화 측정

흰쥐를 750 mg/kg 농도의 urethane (Sigma, U.S.A.)을 복강주사로 마취시킨 후 stereotaxic frame (DKI, U.S.A.)에 고정시킨 후 정중선을 따라 두피를 절개하여 두정골을 노출시키고 bregma의 4~6 mm 측방, -2~1 mm 전방에 직경 5~6 mm의 두개창 수술을 시행하였다. 이때 두개골을 최대한 얇게 남겨 경막 외 출혈을 방지하도록 하고 Laser doppler flowmeter (Transonic Instrument, U.S.A.)용 needle probe를 대뇌 두정엽 피질 표면에 수직이 되도록 뇌연막 동맥에

조심스럽게 근접시켰다. 이 후 일정시간 동안 안정시킨 후 JDH 1 ug/ml 투여하고 30 분 간격으로 10 배 씩 농도를 증가시키면서 변화하는 국소 뇌혈류량 (regional cerebral blood flow, rCBF)을 측정하였다.

② 평균 혈압 변화 측정

흰쥐를 750 mg/kg 농도의 urethane (Sigma, U.S.A.)을 사용하여 마취시킨 후 체온이 37 ± 0.5 °C로 일정하게 유지될 수 있도록 heat pad 위에 복와위로 고정시킨다. 이 후 JDH 1 ug/ml 투여하고 30 분 간격으로 10 배 씩 농도를 증가시키면서 변화하는 평균 혈압 (mean arterial blood pressure, MABP)을 흰쥐의 대퇴동맥에 polyethylene tube를 삽입한 후 이를 pressure transducer (Grass, U.S.A.)를 통하여 data acquisition system (Maclab, U.S.A.)으로 전송하여 측정하였다.

③ 정상 흰쥐의 뇌혈류역학 변화에 미치는 기전 관찰

JDH의 투여가 흰쥐의 rCBF 및 평균 혈압 변화에 미친 작용 기전을 알아보기 위하여 두 가지 혈관 확장 인자 억제제를 전처치하여 뇌혈류역학의 변화를 관찰하였으며 이 때, 사용한 혈관 확장 인자 억제제로 인도메타신 (indomethacin 1 mg/kg, i.p., IDN, Sigma I7378)

과 메틸렌블루(methylene blue 0.01 mg/kg, i.p., MTB, Sigma M9140)를 사용하여 이들을 각각 전처치한 후 JDH 투여 후에 변화되는 국소 뇌혈류량 및 평균 혈압을 150 분 동안 측정하였다.

3) 면역조직학적 검사

① 실험군 분류

면역조직학적 관찰을 위한 실험에서 흰 쥐를 다음과 같은 분류하였다. 실험군 I은 정상군 (n=10), 실험군 II는 허혈성 뇌졸중 유발 대조군 (n=10), 실험군 III은 허혈성 뇌졸중 유발 후 JDH 투여군 (n=10)으로 나누었다. 허혈성 뇌졸중 유발 후 신경학적 검사는 Bederson 등¹⁰⁾의 방법에 따라 공중에서 흰쥐의 꼬리를 완전히 들었을 때 일측에서의 마비증상이 일어나는지와 꼬리를 위로 들었을 때 또는 자발적으로 환측으로의 몸통회기(circling)가 일어나는지 검사를 하였다 (Table 2). 실험에 사용한 흰쥐는 신경학적 증상이 나타나는 개체만을 선별하여 실험에 사용하였으며, 면역조직화학적 검사는 실험종료 28일째에 희생시켜 표본을 제작하여 검사하였다.

② 허혈성 뇌졸중 (MCAO) 유발

허혈성 뇌졸중 유발 모델을 제작하기 위해 Nagasawa 등의 방법¹¹⁾에 따라 중대뇌동맥 (Middle Cerebral Artery : MCA) 폐쇄 수술을 시행하였다. 실험 동물실에서 적용된 흰쥐를 마취 챔버 (Royal medical, 한국)에 넣고, 70 % N₂O와 28.

5% O₂ 가스에 1.5 % enflurane을 혼합시킨 마취가스로 흡입전신마취 후 수술대에 고정시키고, 다시 마스크로 1.5 ~ 2.0 % enflurane으로 흡입시켜 수술 중 마취가 지속되도록 하였다. 체온저하를 막기 위해 수술시 직장온도계와 전기 열 패드를 이용하여 체온을 37 ± 0.5 °C로 유지하였다. 목의 중앙선을 따라 경부를 절개 후 좌측 총경동맥을 조심스럽게 미주신경과 분리시켜 노출시켰다. 총경동맥으로부터 외경동맥과 내경동맥을 주변 신경으로부터 분리해내고, 박리한 총경동맥, 외경동맥 및 내경동맥에 미리 실로 느슨하게 걸어 놓았다. 총경동맥과 외경동맥에 미리 걸어 놓은 실로 결찰하고, 내경동맥 분지는 미세혈관클립을 사용하였다. 내경동맥 분지의 기시부를 미세하게 절개하여 1.5 cm 길이의 4-0 나일론 수술용 봉합사에 실리콘 (Xantopren, Bayer Dental, Germany)으로 16 mm 길이로 코팅하여 만든 probe를 내경동맥 쪽으로 밀어 넣고 내경동맥에 걸어 둔 실을 묶어 probe를 고정하고 미세클립을 제거하였다. 수술이 끝난 후 수술부위를 봉합, 소독하고 다른 케이지에 넣어 회복시켰다. 재순환은 중대뇌동맥 폐쇄 1 시간 후 실리콘을 제외한 봉합사를 제거하였다.

③ 조직학적 검사(Histological assessment)

각 실험군은 실험 종료 후 전신 마취제인 럼푼 (바이엘코리아, 한국)을 복강주사 (0.6 mg/kg)하여 마취한 후, 심장관류를 통해 0.9 % 생리식염수와 4 % 중성 paraformaldehyde로 전 고

Table 2. Neurologic Examination Grading System

Normal	Grade 0	No observable deficit
Moderate	Grade 1	Forelimb flexion
Severe	Grade 2	Decreased resistance to lateral push (& forelimb flexion) without circling
	Grade 3	Same behavior as grade 2 with circling

정하였다. 그 후 단두하여 골절단기를 이용해 두개골을 제거하고 시신경, 후각신경 및 그 외 뇌신경들을 절단한 후에 전체 뇌를 적출하였다. 뇌를 적출하여 육안으로 손상 및 크기의 변화 등을 관찰하고, 조직 절편 제작 전까지 10 % 중성 파라포름알데하이드에 24 시간 이상 후고정하고 파라핀 포매하여 전두엽 최첨단에서부터 180 μm 간격을 두고 두께 5 μm 로 박절하였다. 박절한 뇌 절편은 손상 부위의 면적 및 세포들의 조직형태학적 구조를 관찰하기 위해 젤라틴으로 코팅 처리된 슬라이드에 부착시켜 Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) 발현을 알아보려고 면역조직화학염색을 실시하고, 통상의 탈수와 투명화 과정을 거쳐 광학현미경적 관찰을 위해 봉입을 실시하였다.

④ 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 염색

국소 허혈성 뇌손상 유발 확인을 위해 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 염색을 하였다. 동일한 방법으로 뇌의 적출을 실시하고 5 분간 냉각된 phosphate-buffered saline (PBS)에 담가두었다. 그 후 적출한 뇌는 rodent brain matrix (RBM-4000C, ASI Instruments, USA)를 이용하여 정면 극단으로부터 1 mm되는 곳부터 2 mm간격으로 두정면을 따라 절편하였다. 절편들은 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma, USA)를 2 % phosphate-buffered saline (PBS)에 완전히 용해시키고 이에 침수시켜 37 $^{\circ}\text{C}$ 배양기에서 약 30 분간 염색한 후 다시 10 % PBS로 옮겨 고정하였다.

⑤ 면역조직화학 염색

각 실험군의 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) 발현을 관찰하기 위해 슬라이드에 놓여진 뇌 절편을 각 5 분간 3 번의 xylene을 적용하여 파라핀을 제거하고, 100 %, 90 %, 80 % 알코올을 단계적으로 적용시켜 재수화 (rehydration)

하였다. tap water로 짧게 rinse 한 후 PBS로 수세하고, 0.3 % H₂O₂로 30 분간 반응 후 PBS로 수세 후 Blocking serum 처리 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 배양기에서 60 분간 반응 후 제거하였다. 그 후 1 : 500으로 희석한 1차 anti-BDNF (AB1513, Chemicon, USA)를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 처리 후 PBS로 수세하였다. 그 후 1 : 500으로 희석한 2차 anti-rabbit BDNF (vector, USA)를 60 분간 실온에서 처리하고 털어낸 후 PBS로 수세하였다. DAB로 발색하고, 증류수로 10 분씩 3 회 수세한 다음 대조염색을 위해 Hematoxylin으로 3 분간 염색한 후 흐르는 물에 수세하고 80 %, 90%, 100 % 에탄올에 각각 2 분, xylene에 2 회씩 10 분을 거쳐 탈수하였다. 그 후 모든 슬라이드에 permanent mounting media를 이용하여 봉입을 실시하였다. BDNF의 발현 정도는 면역조직화학법으로 처리한 조직 절편을 광학현미경 ($\times 200$) 하에서 해마 CA1 부위를 관찰하였으며, 다음과 같이 반정량적 방법 (semiquantitative manner)으로 구분하여 mild (+), moderate (++), severe (+++)로 평가하였다.

4) 신경세포 보호 효과 관찰

① 세포 배양

신경교세포주인 C6 glial cell은 RPMI 배지에 10 % (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)과 항생제(Antibiotic antimycotic)를 첨가한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO₂의 배양기에서 배양하였고, 세포는 T-75 플라스크의 80 % 정도 자랐을 때 세포의 탈착을 위하여 인산완충액 (Phosphate buffered saline, PBS)으로 가볍게 세척한 다음, Trypsin-EDTA (Sigma, USA)을 처리한 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분간 방치하였다가 채집하였다. 계대 배양은 평균 2.5 일에 1 회씩 시행하였다.

② 세포 증식율에 미치는 영향 측정

JDH 투여가 세포 증식율에 미치는 영향 측정은 MTT assay¹²⁾를 통해 확인하였다. C6

glial cell을 96 well plate에 5×10^3 cell/well의 농도로 분주하여 배양기에서 37 °C, 5 % CO₂를 유지하며 24 시간 동안 pre-incubation시킨 후 0 ~ 1000 µg/ml의 농도로 약물을 처리하여 24 시간 배양하였다. 그 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)를 처리하여 4 시간을 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO를 첨가하여 녹이고, Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

③ 세포 생존율에 미치는 영향 측정

JDH 투여가 세포 생존율에 미치는 영향 측정은 100mm dish에 각각 1×10^6 개의 C6 glial cell 세포를 분주하고 37 °C, 5 % CO₂를 유지하며 24시간동안 pre-incubation시킨 후, 0, 250, 500, 1000 µg/ml 농도의 약물을 처리하고 다시 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간의 배양이 끝나고, 세포를 부유 시킨 다음 trypan blue (Sigma, USA)를 1:1 비율로 첨가하고 세포계수기 (Hemocytometer) 위에서 광학현미경으로 관찰하였다. 살아있는 세포의 개수는 총 세포 개수에서 trypan blue에 염색된 세포의 개수를 차감하여 계산하였다.

④ 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호 효과 측정

산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호 효과는 MTT법¹²⁾을 변형하여 측정하였다. 먼저 C6 세포주를 96-well plate에 well 당 1×10^4 개씩 분주한 후, 37 °C, 5 % CO₂가 지속적으로 공급되는 환경에서 4 시간동안 방치하여 부착을 시행하였다. 세포의 부착이 끝난 후, JDH를 처리하고 동일한 환경에서 24 시간 동안 방치하였다. 24 시간의 배양이 끝난 후, 15 mM의 paraquat, 0.8 mM의 rotenone, 0.8 mM의 sodium nitroprusside (SNP) 그리고, 0.5 mM의 과산화수

소 (hydrogen peroxide, H₂O₂)를 각각 처리하고 37 °C, 5 % CO₂가 제공되는 환경에 4 시간 동안 방치하여 배양을 끝낸 후, 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO를 첨가하여 녹인 후 Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 광도를 측정하였다.

⑤ SOD 활성 측정

SOD 활성은 SOD assay kit (Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였다. 100mm dish에 각각 1×10^6 개의 세포를 분주하고 37 °C, 5 % CO₂를 유지하며 24 시간동안 pre-incubation시킨 후, 500 µg/ml 농도의 약물을 처리하고 다시 24 시간 동안 배양하였다. 24시간의 배양이 끝나고, 세포를 수집한 다음 -20 °C에서 20 분간 냉동 후, 항온 수조를 이용하여 37 °C에서 10 분간 방치하기를 2 회 반복 하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄가 끝난 후, 3,000 g에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 기질로 사용하였으며, 측정 과정은 kit 제조사에서 제공한 매뉴얼에 따라 진행하였으며 측정된 Optical density (OD) 값으로부터 SOD 활성도를 계산하였으며 공식은 아래와 같다.

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

A_{blank1}: slope of enzyme blank, A_{blank2}: slope of sample blank
A_{blank3}: slope of blank, A_{sample}: slope of Samples

⑥ Total glutathione 함량 측정

Total glutathione 함량 측정은 Total glutathione Quantification Kit (Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였다. SOD 활성 측정과 동일한 방법으로 효소액을 제조한 다음, Pseudo-end point method를 이용하여 glutathione 함량을 측정하였으며, 측정 과정은 kit 제조사에서 제시한 매뉴얼에 따라 진행하였으며 내용은 아래와 같다.

$$\text{Total glutathione} = (\text{O.D.}_{\text{sample}} - \text{O.D.}_{\text{blank}})$$

3. 통계처리

통계처리 방법으로는 paired sample t-test와 independent sample t-test를 사용하였다. 통계 프로그램으로는 SPSS 12 (SPSS, U.S.A.)를 사용하였고, p-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

III. 成 績

1. 흰 쥐의 국소 뇌혈류량에 미치는 효과

JDH의 투여가 흰쥐의 국소 뇌혈류량에 미치는 효과를 관찰해 본 결과는 다음과 같았다. 투여 전 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량 기저치를 $100.0 \pm 4.51 \%$ 로 환산하였을 때, JDH의 농도를 10 배 씩 증가시켜 30 분 동안의 데이터를 수집하여 분석한 결과 각각 $102.71 \pm 3.92 \%$, $100.40 \pm 5.36 \%$, $113.31 \pm 8.79 \%$ 이였으며 1000배에서 $126.91 \pm 9.75 \%$ 로 기저치보다 유의성 ($p < 0.05$)있게 증가하였다 (Fig. 1).

2. 흰쥐의 평균 혈압에 미치는 효과

JDH의 투여가 흰쥐의 평균 혈압에 미치는 효과를 관찰해 본 결과는 다음과 같았다. 투여 전 정상 흰쥐의 평균 혈압의 기저치를

$100.00 \pm 3.58 \%$ 로 환산하였을 때, JDH의 농도를 10 배 씩 증가시켜 30 분 동안의 데이터를 수집하여 분석한 결과 각각 $98.75 \pm 3.11 \%$, $95.98 \pm 3.68 \%$, $95.81 \pm 4.46 \%$, $93.88 \pm 4.38 \%$ 로 지속적으로 하강하였지만 유의성이 나타나지는 않았다 (Fig. 2).

3. 인도메타신 전처치 후 JDH 투여가 흰쥐의 국소 뇌혈류량 변화에 미치는 효과

JDH 투여로 변화된 흰쥐의 국소 뇌혈류량 변화 작용 기전을 알아보기 위하여 JDH 투여로 유의성 있게 증가된 흰쥐의 국소 뇌혈류량을 대조군으로 하고, cyclooxygenase의 억제제인 인도메타신을 전처치한 다음 JDH 투여로 변화된 흰쥐의 국소 뇌혈류량을 인도메타신 처리군으로 하여 이 둘을 비교하였다.

인도메타신을 전처치하였을 때의 국소 뇌혈류량 기저치를 $100.00 \pm 4.48 \%$ 라 하였을 때, JDH의 농도를 10 배 씩 증가시키면서 30 분 동안의 데이터를 수집하여 분석한 결과 각각 $90.09 \pm 5.22 \%$, $87.85 \pm 6.17 \%$, $93.45 \pm 4.53 \%$, $97.80 \pm 2.89 \%$ 로 대조군의 국소 뇌혈류량 변화와 비교해 보면 통계적으로 유의성 ($P < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 3).

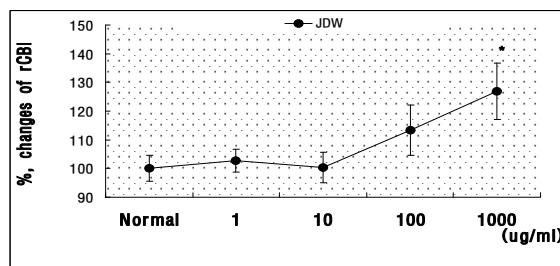


Fig. 1. Effects of JDH on the rCBF in rats.

Normal : non-treated group for 30 min ; rCBF : regional cerebral blood flow ; The present data were expressed as mean±SE of 8 experiments.

* : Statistically significance compared with Normal group (* ; $P < 0.05$).

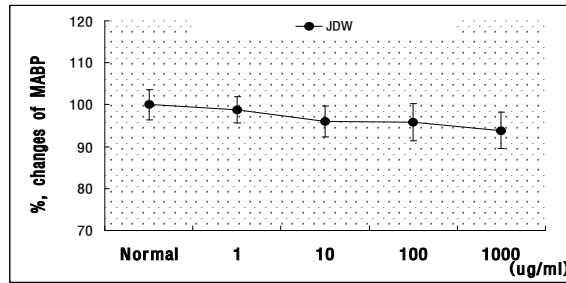


Fig. 2. Effects of JDH on the MABP in rats.

MABP : Mean arterial blood pressure

Legends are the same as Fig. 1.

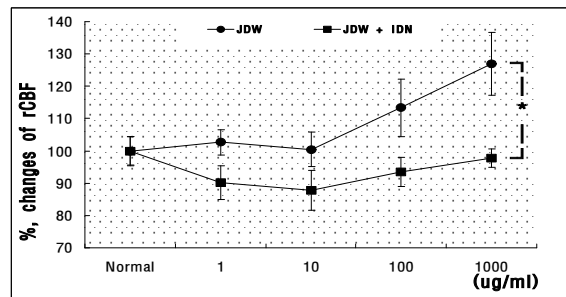


Fig. 3. Effects of JDH with indomethacin on the rCBF in rats.

JDH + IDN : indomethacin (1 mg/kg, i.p.) treated group

* : Statistically significant compared with Control group (* ; p<0.05).

4. 메틸렌블루 전처치 후 JDH 투여가 흰쥐의 국소 뇌혈류량 변화에 미치는 효과

JDH 투여로 변화된 흰쥐의 국소 뇌혈류량 변화 작용 기전을 알아보기 위하여 JDH 투여로 유의성 있게 증가된 흰쥐의 국소 뇌혈류량을 대조군으로 하고, guanylate cyclase의 억제제인 메틸렌블루를 전처치한 다음 JDH 투여로 변화된 흰쥐의 국소 뇌혈류량을 메틸렌블루 처리군으로 하여 이 둘을 비교하였다.

메틸렌블루를 전처치하였을 때의 국소 뇌혈류량 기저치를 100.00 ± 2.93 %라 하였을 때, JDH의 농도를 10 배 씩 증가시키면서 30 분 동안의 데이터를 수집하여 분석한 결과 각각 96.94 ± 5.73 %, 96.44 ± 5.28 %, 93.66 ± 6.84 %, 101.05 ± 5.95 %로 대조군에 비해 감소하

는 경향이 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 (Fig. 4).

5. 인도메타신 전처치 후 JDH 투여가 흰쥐의 평균 혈압 변화에 미치는 효과

JDH 투여로 변화된 흰쥐의 평균 혈압 변화 작용 기전을 알아보기 위하여 JDH 투여로 유의성 있게 증가된 흰쥐의 평균 혈압을 대조군으로 하고, cyclooxygenase의 억제제인 인도메타신을 전처치한 다음 JDH 투여로 변화된 흰쥐의 평균혈압을 인도메타신 처리군으로 하여 이 둘을 비교하였다.

인도메타신을 전처치하였을 때의 평균 혈압 기저치를 100.00 ± 8.47 %라 하였을 때, JDH의 농도를 10 배 씩 증가시키면서 30 분 동안의

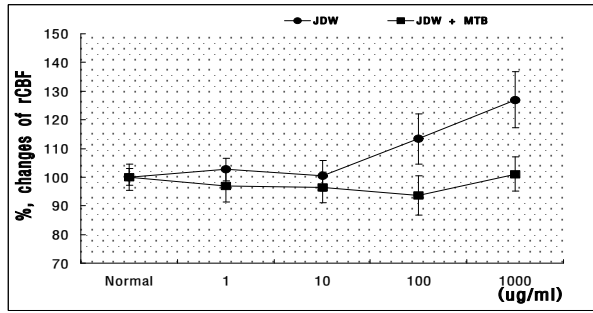


Fig. 4. Effects of JDH with methylene blue on the rCBF in rats.
 JDH + MTB : methylene blue (10 μ g/kg, i.p.) treated group

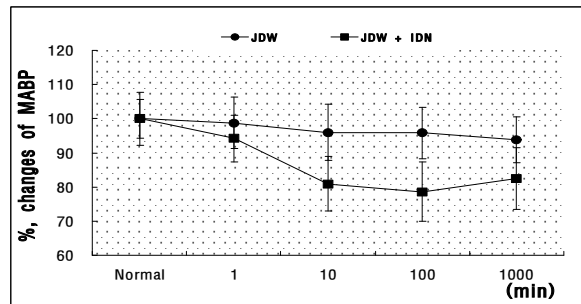


Fig. 5. Effects of JDH with indomethacin on the MABP in rats.
 JDH + IDN : indomethacin (1 mg/kg, i.p.) treated group

데이터를 수집하여 분석한 결과 각각 $94.18 \pm 9.42 \%$, $80.96 \pm 7.14 \%$, $78.63 \pm 4.68 \%$, $82.54 \pm 4.56 \%$ 로 대조군의 평균 혈압에 비해 감소하는 경향이 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 (Fig. 5).

6. 메틸렌블루 전처치 후 JDH 투여가 흰쥐의 평균 혈압 변화에 미치는 효과

JDH 투여로 변화된 흰쥐의 평균 혈압 변화 작용 기전을 알아보기 위하여 JDH 투여로 유의성 있게 증가된 흰쥐의 평균 혈압을 대조군으로 하고, guanylate cyclase의 억제제인 메틸렌블루를 전처치한 다음 JDH 투여로 변화된 흰쥐의 평균 혈압을 메틸렌블루 처리군으로 하여 이 둘을 비교하였다.

메틸렌블루를 전처치하였을 때의 평균 혈압 기저치를 $100.00 \pm 8.24 \%$ 라 하였을 때, JDH의 농도를 10 배 씩 증가시키면서 30 분 동안의 데이터를 수집하여 분석한 결과 각각 $94.04 \pm 9.73 \%$, $82.68 \pm 6.57 \%$, $79.77 \pm 7.39 \%$, $82.67 \pm 10.40 \%$ 로 대조군에 비해 감소하는 경향이 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 (Fig. 6).

7. 뇌 조직의 조직형태학적 구조 변화

뇌 조직의 육안적 조직 손상 정도 확인을 위해 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 염색으로 실시하여 관찰해 본 결과 실험군 I은 손상이 관찰되지 않았으나 실험군 II는 총경동맥 중 내경동맥에서 분지되는 중대뇌동맥에

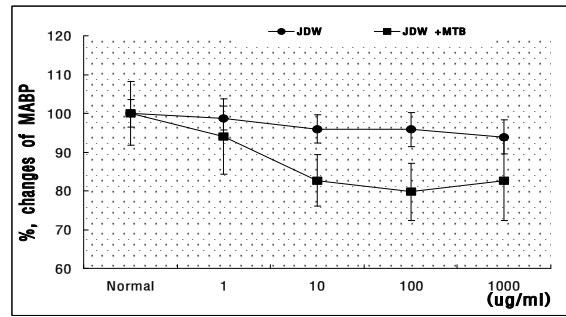


Fig. 6. Effects of JDH with methylene blue on the MABP in rats.
 JDH + MTB : methylene blue (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) treated group



Fig 7. Histological changes after 28days of focal ischemic brain injury (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride monohydrate, TTC staining, A : Group I , B : Group II, C : Group III)

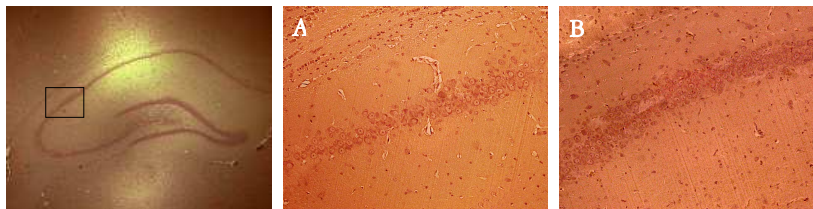


Fig 8. Immunoreactivity with the BDNF antibody in hippocampus of rats after 28 day (immunohistochemical stain, $\times 200$, A : group II, B : group III)

Table 3. Expression of BDNF Immunoreactive Neurons in Hippocampus of Rats after 28 Day

Group	II	III
examination	+	++

+: Mild expressed, ++: Moderate expressed, +++: Severe expressed

혈액을 공급하는 곳을 중심으로 대뇌 신피질 (neocortex)의 많은 부분과 대뇌 두정엽(parietal lobe)에서 심한 손상의 정도를 나타냈다. 그러나 실험군 III은 손상의 정도가 호전된 것으로 나타났다 (Fig. 7).

8. 뇌 조직의 BDNF 면역조직화학 반응

실험종료 28일째에 각 실험군의 절편들 중에서 해마 CA1 부위의 조직을 골라 BDNF에 대한 면역 반응을 검사하였다. Hematoxylin 대조염색 결과, BDNF는 강한 면역 양성 반응을

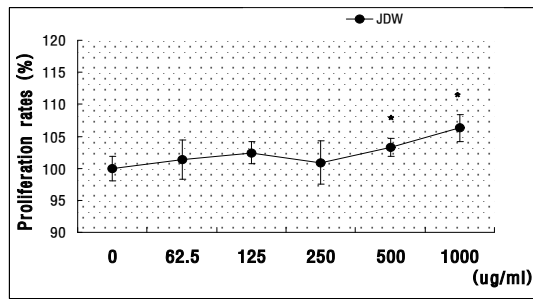


Fig. 9. Effects of JDH on proliferation rates of C6 glial cells in vitro. C6 Cells were attached 96-well plate, and added JDH as indicated concentrations respectively. After 24 hrs incubation, proliferation rates were measured using MTT methods. Result are presented as mean±SE. * : Statistically significance compared with non-treated group (* ; P<0.05).

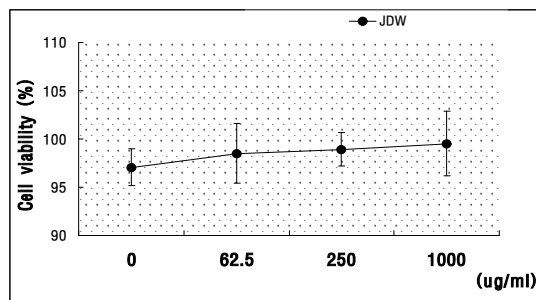


Fig. 10. Effects of JDH on cell viability of C6 glial cells in vitro. C6 Cells were attached 100 mm plate, and added JDH as indicated concentrations respectively. After 24 hrs incubation, cell viabilities were measured using trypan blue exclusion methods. Result are presented as mean±SD.

보인 세포는 세포체와 긴 세포 돌기 모양이 진한 갈색으로 관찰되었다. 실험군 II는 거의 낮은 면역반응을 보였으나 실험군 III은 실험군 II에 비하여 좀 더 높은 면역 양성 반응을 보였다(Table 3, Fig. 8).

9. JDH 투여가 세포 증식율에 미치는 영향

JDH 투여가 신경교세포주의 증식율에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 C6 glial cell에 농도별로 JDH를 투여하고 24 시간 후, 세포 증식율을 측정된 결과 500 µg/ml 이상에서 유의한 수준의 세포 증식율 증가가 관찰되었다 (Fig. 9).

10. 세포 생존율에 미치는 영향

JDH의 투여가 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과 유의할 만한 세포 생존율의 감소는 관찰되지 않았다 (Fig. 10).

11. 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 방지효과

C6세포에 500 µg/ml의 JDH를 전처리하고, paraquat, SNP, rotenone, hydrogen peroxide (H₂O₂)로 산화적 스트레스를 유발하여 JDH의 세포 사멸 방지 효과를 관찰하였다.

paraquat, rotenone 및 hydrogen peroxide 군에서는 JDH를 투여하지 않고 chemical을 단독 처리 군에서는 아무것도 처리하지 않은 normal

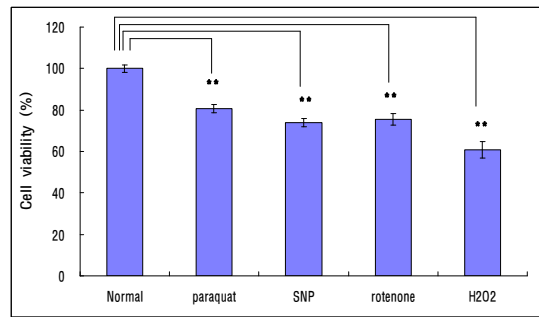


Fig. 11. Decrease of C6 glial cells on Oxidative stress induced by various chemicals
 Normal : non-treated group ; ** : Statistically significance compared with Normal (** ; P<0.01).

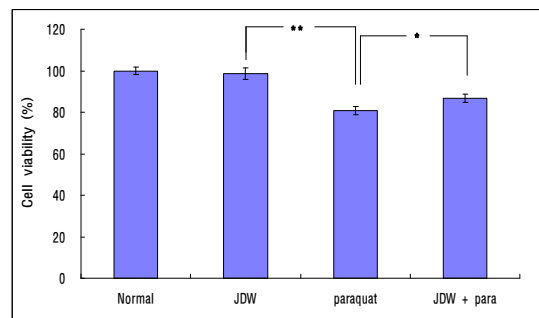


Fig. 12. Protective effects of JDH on Oxidative stress induced by paraquat in C6 glial cells.
 C6 Cells were attached 96-well plate, and added 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of JDH for 24 hr. After 24 hrs incubation, indicated concentration of paraquat was treated for 4 hr. ; Normal : non-treated ; JDH : only JDH treated ; paraquat : only paraquat treated ; JDH + para : JDH pre-treated then paraquat treated. ; ** : Statistically significance compared with Normal (** ; P<0.01). ; * : Statistically significance compared with Normal (* ; P<0.05).

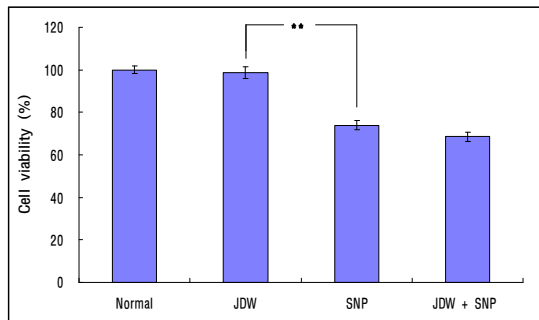


Fig. 13. Protective effects of JDH on Oxidative stress induced by SNP in C6 glial cells.
 SNP : only SNP treated ; JDH + SNP : JDH pre-treated then SNP treated. ; ** : Statistically significance compared with Normal (** ; P<0.01). Legends are the same as Fig. 12.

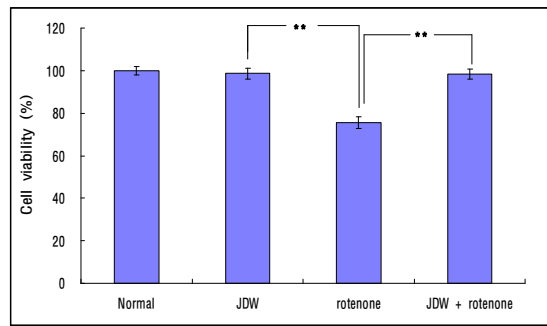


Fig. 14. Protective effects of JDH on Oxidative stress induced by rotenone in C6 glial cells.
 Rotenone : only rotenone treated ; JDH + rotenone : JDH pre-treated then rotenone treated. ; ** : Statistically significance compared with Normal (**; P<0.01). Legends are the same as Fig. 12.

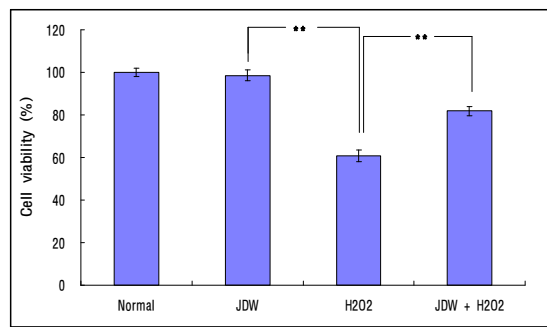


Fig. 15. Protective effects of JDH on Oxidative stress induced by H₂O₂ in C6 glial cells.
 H₂O₂ : only H₂O₂ treated ; JDH + H₂O₂ : JDH pre-treated then H₂O₂ treated. ; ** : Statistically significance compared with Normal (**; P<0.01).
 Legends are the same as Fig. 12.

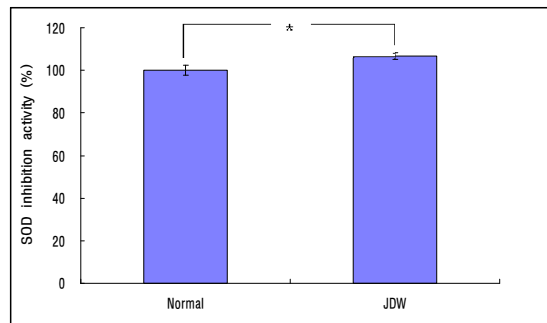


Fig. 16. Effects of JDH on SOD activities in C6 glioma cells.
 C6 Cells were attached 100 mm plate, and added 500 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ of JDH for 24 hrs.
 * : Statistically significance compared with Normal group (*; P<0.05).

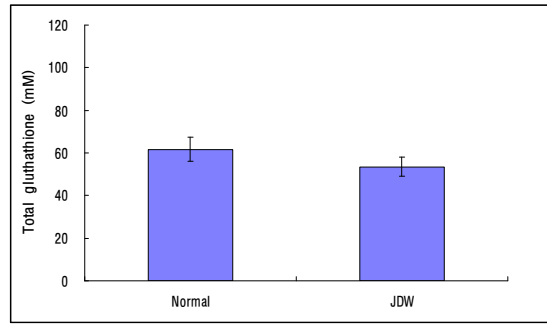


Fig. 17. Effects of JDH on production levels of total glutathione in C6 glial cells. Legends are the same as Fig. 16.

군에 비하여 세포 생존을 감소가 유의하게 관찰되었다 (Fig. 11).

JDH를 전처리한 후 paraquat, rotenone 및 hydrogen peroxide 를 처리한 군은 JDH의 전처리 없이 이들 chemical을 처리한 group 들 보다 유의하게 높은 세포 생존율을 보였다 (Fig. 12, 14, 15).

JDH 전처리 후, SNP를 처리한 군에서 SNP만을 단독으로 처리한 군에 비하여 유의하게 낮은 수준의 세포 생존율이 관찰되었다 (Fig. 13).

12. JDH 투여가 SOD 활성에 미치는 영향

C6세포에 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 JDH를 처리한 후, SOD 활성도를 측정된 결과 유의한 수준의 SOD 활성도 증가가 관찰되었다 (Fig. 16).

13. JDH 투여가 Total glutathione 함량에 미치는 영향

JDH 투여가 Total glutathione 함량에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 C6세포에 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 JDH를 처리한 후, Total glutathione 함량을 측정된 결과 모든 군에서 유의할 만한 변화는 발견할 수 없었다 (Fig. 17).

IV. 考 察

현대 사회의 급격한 발달로, 사람들이 받아 들여야 하는 정보의 양이 하루가 다르게 증가하고 있다. 따라서 학령기의 청소년들은 한정된 시간 안에 최대한 많은 정보를 처리하고자 뇌의 기능을 최대로 올리기 위해 노력하고 있다¹³⁻⁴. 이와 반대로 노인층에 있어서는 사회적 고령화로 인해 늘어난 뇌질환 및 치매와 같은 뇌와 관련한 퇴행성 질환이 중요한 문제로 대두되고 있다. 이에 따라 뇌의 작용기전 및 기능향상에 대한 사회적 관심이 전반적으로 높아지고 있는 추세이다¹⁵.

뇌는 중요한 생명 유지 장기중 하나로, 전체 혈액량의 18%를 공급받지만 자체적으로 산소 및 포도당을 비축 할 수 없기 때문에, 뇌조직이 고유의 기능을 수행하기 위해선 심장으로 부터 지속적인 혈액을 공급받아야 한다¹¹. 따라서 만약 이러한 과정 중 어느 것이라도 비정상 이 된다면 뇌기능에 심각한 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어 뇌혈류가 전면 정지되면 5-10초 내에 무의식상태에 빠지는데, 이것은 뇌세포로의 산소 전달 부족으로 뇌대사의 대부분이 중단되기 때문이다¹⁶.

뇌의 정상혈류량은 휴식시 50-55 ml/100

g/min 인데 어떤 이유로 인해 뇌로 공급되는 혈류량이 15~18 ml/100 g/min 으로 감소하게 되면 세포의 신경 접합부에서 신경자극의 전달이 제대로 이루어지지 않게 된다. 상태가 더욱 심해져 뇌혈류량이 10 ml/100 g/min 이하로 감소하게 되면 산소 및 포도당이 부족하게 되어 뇌조직에 비가역적 손상이 유발되¹⁷⁾ 운동 기능 장애, 감각 기능의 이상, 언어 장애, 기억과 인지 장애, 심할 경우 혼수상태, 식물인간 등의 심각한 신경학적 증상을 유발된다²⁻⁴⁾. 그러므로 뇌에 대한 뇌혈류 역학적 기전은 뇌의 신경활동 및 정신 기능에 대해 대단히 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다.

한의학에서도 뇌는 인체 내 중요한 기관으로 元神之府¹⁸⁾, 身之元首¹⁹⁾, 天谷²⁰⁾등이라 하여 神이 모이는 장소라 하였으며, 心은 뇌의 기능 중 정신사유와 의식 활동 주관한다 생각하여 心을 君臟, 神明之心 등이라 하였다²¹⁾. 血은 心主血脈, 心生血이라고 하여 心氣의 強弱이 血의 운행에 직접 작용하니 血은 심장의 박동에 따라 전신의 脈中을 끊임없이 순환하게 된다⁹⁾.

朱朱子讀書丸 (JDH)은 동의보감에 수록된 처방으로 주자가 이 약을 먹으며 공부를 하여 하루에 천 권의 책을 외었다는 고사에서 유래하였으며, 心脾가 虛損되어 오는 기억력장애에 주로 사용되고 있는 약이다⁶⁾.

JDH의 구성은 遠志, 茯神, 人蔘, 陳皮, 石菖蒲, 當歸 甘草로, 聰明湯에 人蔘, 當歸, 陳皮, 甘草 같은 약물들이 추가되어 聰明湯⁷⁾의 효능에 氣와 血을 補하는 약물들이 추가되어, 기력이 없고 피곤한 사람들의 기억력 감퇴에 유용하다.

JDH을 구성하고 있는 각각의 약물에 대해 살펴보면 遠志는 安神益智 開竅豁痰 散鬱化痰하여 驚悸를 몰아내고 정신을 안정시키며

心氣를 진정시켜 더욱 총명하게 하며, 茯神은 寧心安身의 효능이 있어 心을 보하고 驚悸, 健忘, 忿怒 등의 감정을 진정시키며, 人蔘은 補氣固脫, 補脾氣, 益肺氣 生津止渴 安神益智하여 元氣를 補하고 갈증을 멎게 하고, 生津하여 營과 衛를 조화하며, 陳皮는 清熱燥濕 滲腸止利 清肝明目하여 熱을 내리고 濕을 제거하며 눈을 밝게 하고, 石菖蒲는 除痰開竅, 醒神健腦 化濕開胃하여 心竅를 열어주고 痺症, 風症을 치료하며, 當歸는 補血調經 活血行氣 止痛 潤腸通便하여 血虛 血滯를 막론하고 血症의 군약, 부인과의 良藥이며, 甘草는 清熱 止渴 利尿 解毒하는 효능이 있어 發熱로 渴症이 나는 것을 치료한다. 燈心은 清熱利水 清心除煩하는 효능이 있어 肺熱을 瀉하고 心火를 내리는데 芩방에는 포함되지 포함되어있지 않지만, JDH을 복용시 이것을 달인 물로 복용하므로 본 실험에서는 처방에 포함하여 조제하였다²²⁾. 또한 본 실험에서는 수은을 함유하여 장기간 복용시 주의를 필요한 朱砂는 제거한 후 실험에 사용하였다.

국내외에 현재 사용되고 있는 기억력 개선 및 뇌신경 활성화에 관련된 치료제들은 항콜린 약물, 대사항진약물, 혈액순환개선제 등이 있다²³⁻⁴⁾. 하지만 이러한 약물치료는 일시적인 효과만 나타낼 뿐 근본적인 치료가 되지 못하며, 이 약물들이 기전상 부교감신경을 자극하기 때문에 惡心, 嘔吐등, 심하면 우울증, 불면증, 혈압, 변비 등을 야기하기도 한다²⁵⁾. 따라서 부작용이 적으면서도 뇌기능을 활성화시킬 수 있으며 근본적 치료까지 가능한 새로운 기억력 개선제 및 뇌기능 활성제를 찾아내고 그 효과를 입증하여 개발하는 노력이 절실히 요구되고 있다.

현재까지 JDH에 관련한 연구로 강 등⁸⁾은 JDH가 알츠하이머모델에 대한 기억력 향상

효과 및 알츠하이머병으로 인한 치매현상에 효과가 있음을 보고 하였으며, 강⁹⁾은 알코올중독에 대한 JDH의 간손상을 회복시키는 효과와 약물자체의 기억력을 향상시키는 효과가 있음을 보고하였다. 이에 저자는 JDH가 전반적인 뇌기능 활성화에 도움이 되며 뇌신경세포를 보호하여 학습 및 기억력에 도움이 될 수 있을 것이라는 가설을 세우고 본 연구를 기획하였다.

따라서 본 연구에서는 JDH를 사용하여 뇌혈류역학 및 뇌의 면역조직화학적 검사를 이용하여 JDH가 뇌기능 활성화, 학습 및 기억에 미치는 효과와 기전을 밝히고 나아가 신경세포에 대한 보호 작용을 규명하고자 하였다.

JDH 추출물의 뇌혈류에 미치는 효과를 알아보기 위하여 rCBF 및 MABP를 측정하였으며, 그 작용 기전을 알아보기 위하여 인도메타신 (indomethacin 1 mg/kg, i.p., IDN, Sigma I7378) 과 메틸렌블루(methylene blue 0.01 mg/kg, i.p., MTB, Sigma M9140), 두 가지 혈관 확장 인자 억제제를 전처치하여 뇌혈류역학의 변화를 관찰하였다.

rCBF은 뇌혈관 저항에 반비례하며 뇌관류압에 비례하는데, 뇌관류압은 생리적 상태하에서 뇌정맥압이 매우 낮기 때문에 평균 동맥압에 비례하게 된다²⁷⁾. 또한 뇌혈관 저항은 뇌혈관 직경과 반비례하므로 정상범위의 뇌혈류를 유지할 위해선, 혈압하강의 경우 뇌혈관은 확장, 혈압상승의 경우 뇌혈관은 수축되어야 한다^{17,26)}.

실험결과 rCBF는 정상흰쥐에서 JDH 추출물의 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였으며 특히 1000 μ g/ml 농도의 JDH 투여시 유의하게 증가하였다 (Fig. 1). 또한 MABP는 농도에 따라 지속적으로 하강하였지만 유의성은 나타나지는 않았다 (Fig. 2). rCBF이 뇌혈관의 직경

에 비례한다²⁷⁾고 하였을 때 JDH 추출물은 MABP에 작용하기도 하지만 그보다는 뇌혈관의 직경을 확장시킴으로 rCBF가 유의하게 증가된 것으로 생각되었다.

이에 따라 JDH 추출물이 어떤 경로에 의해 뇌혈관을 확장시켰는지를 알아보기 위하여 혈관 확장 기전과 연관된 cyclooxygenase관련 경로 및 guanylate cyclase 관련 경로에 대한 차단제를 전처치하고 JDH 추출물과 어떻게 상호작용하는지를 살펴보았다.

IMD는 prostaglandin의 생합성 과정을 관여하는 cyclooxygenase를 억제하는 약물로 대체로 cyclooxygenase에 의하여 일차적으로 생성되는 물질이 prostaglandin G (PGG)이며 이는 강력한 혈관 확장 물질 중 하나로 reductase나 isomerase에 의하여 PGE₂, PGD₂ 등의 실제 활성 물질로 변형된다²⁸⁾. MTB는 cyclic guanosine monophosphate의 생성하며 guanylate cyclase를 억제하는 약물²⁹⁾로 궁극적으로 nitric oxide에 의한 혈관 이완을 막는다³⁰⁾.

본 실험 결과에서 IDM의 전처치는 JDH에 의한 rCBF의 증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 3). 하지만 IDM을 전처치한 다음 MABP의 변화를 살펴본 결과 대조군에 MABP에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유효하지는 않았다 (Fig. 5). 이러한 결과 JDH의 rCBF를 증가시키는 기전은 혈관 확장과 연관이 있으며 그중에서도 cyclooxygenase와 관련된 기전과 관계가 있음을 알 수 있었다.

본 실험에서 MTB를 전처치 한 후 JDH 투여시 rCBF는 대조군에 비해 감소하는 경향이 보였으나 통계적으로 유의하지 못하였다 (Fig. 4). 또한 MBT를 전처치한 다음, MABP의 변화를 살펴본 결과 역시 대조군에 비해 감소하는 경향이 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다 (Fig. 6). 이상의 결과들을 종합해 보면 JDH

추출물은 정상 흰쥐의 뇌혈류량을 증가시켰으며, rCBF 증가에는 guanylate cyclase 관련 기전이 다소 관여하지만 주로 cyclooxygenase의 기전과 관련이 있는 것으로 보여진다.

이러한 결과들에서 JDH이 뇌혈류를 증가하여 뇌의 기능 활성을 돕고 나아가 허혈성 뇌질환의 증상을 개선하고 학습 및 기억 향상에 좋은 효과를 미칠 것으로 사료되어 뇌의 면역조직화학적 연구를 실시하였다.

백서의 중대뇌동맥의 일시적으로 차단하면 뇌조직에 공급되는 산소와 포도당의 양이 감소되며 뇌손상을 유발하게 된다. 일시적인 허혈성 뇌손상은 글루탐산 (glutamate) 수용체를 활성화 시키며 K^+ 의 농도 및 세포내 Ca^{2+} 의 이온 기울기를 변화시켜 손상된 신경세포에 탈분극화가 발생한다. 추후 재관류를 시키면 정상으로 회복되지만 이 때 뇌의 신피질, 해마내 CA1 영역의 신경세포에 선택적 손상이 오게 되며 그 중 허혈에 가장 손상 받기 쉬운 CA1 pyramidal neuron은 재관류 후 3~4일이 지나면 죽게 되어 인지 및 학습장애를 일으키게 된다³¹⁻²⁾.

본 연구에서는 뇌 조직의 조직형태학적 구조 변화를 관찰하기 위하여 흰쥐의 뇌 조직의 육안적 조직 손상 정도를 살펴보았다. 국소 허혈성 뇌손상 유발 확인을 위해 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 염색으로 실시하였다. TTC 염색은 육안적 조직 손상 정도를 빠르게 평가할 수 있는 장점이 있는데 정상세포에서는 미토콘드리아내의 탈수소효소 (dehydrogenase)와 반응하여 붉게 보이거나 뇌허혈에서는 탈수소효소가 소실되어 염색이 되지 않아 백색으로 보여 비가역적 손상 여부를 알 수 있는 지표로 널리 사용된다³³⁻⁴⁾.

이 실험의 결과 정상군인 실험군 I은 특이할 손상이 관찰되지 않았고 MCAO를 시행하고 JDH를 투여하지 않은 실험군 II는 총경동

맥 중 내경동맥에서 분지되는 중대뇌동맥에 혈액을 공급하는 곳을 중심으로 대뇌 신피질 (neocortex)의 많은 부분과 대뇌 두정엽 (parietal lobe)에서 심한 손상의 정도를 나타냈던 것에 비해 비해 JDH를 투여한 실험군 III은 손상의 정도가 호전된 것으로 나타났다 (Fig. 7). 이는 JDH의 투여가 일시적 뇌허혈로 인한 뇌세포 손상을 어느 정도 방지함을 의미한다.

신경 손상 후 신경에서 세포사 반응과 더불어 내인성의 신경보호적 반응도 함께 일어나는데 신경보호반응기전에 관련된 인자로 신경영양성 인자들을 들 수 있다. 신경 양성 인자들 중 대표적인 것들로 BDNF, NGF, NT-3, NT-4/5 등이 있으며 이들로 인해 신경연접이 강화되는데, 그 중 특히 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)는 신경의 기능과 생존에 필수적 물질로써 신경원의 생존과 선택적인 분화를 증가시킨다³⁵⁾. BDNF를 이용한 면역조직화학 염색은 해마, 편도체, 시상, 후각계 투사영역, 신피질의 피라미드층, 소뇌 등에서 관찰되는데³⁶⁾, 이는 학습이나 기억과 관련성이 높은 부위들로 BDNF는 신경발달, 신경손상 후 재생, 환경, 운동 등의 영향을 측정하는 지표로 많이 사용된다³⁷⁻⁸⁾. 또한 BDNF는 학습을 수행하거나 운동을 할 때 증가하며, 기억과 같은 인지 기능에 관여한다³⁹⁾.

해마 (Hippocampus)는 외측뇌실 측두각의 바닥에 융기된 해마 (sea horse) 모양의 구조로 변연계의 한부분이다. 해마는 대뇌 피질에 비해 훨씬 크기는 작지만 학습과 기억의 중추로 이곳은 기억의 획득, 저장 재생이 있어 중요한 역할을 수행함이 알려졌다. 해마 손상시 학습 능력과 기억 능력이 저하되고 손상 전의 단기 기억이 상실된다⁴⁰⁾.

이러한 관점에서 허혈성 뇌손상 후 JDH의 투여의 신경학적 회복과 그 회복의 기전을 알

아보기 위해 신경학적 회복과 기전에 기초가 되는 BDNF중 특히 해마부위의 BDNF의 발현을 비교하여 JDH의 학습수행과 기억력 증진 및 신경세포에 대한 보호 작용에 미치는 효과를 규명하고자 하였다.

각각의 실험군 절편들 중에서 해마 CA1 부위의 조직을 골라 BDNF에 대한 면역 반응을 검사하였는데 실험군 II는 매우 낮은 면역 반응을 보였으나 실험군 III은 실험군 II에 비하여 좀 더 높은 면역 양성 반응을 보였다 (Table 3, Fig. 8). 이는 JDH가 해마의 신경 세포 손상을 어느 정도 방어하였음을 보여주는 것이다.

이상의 결과로 보면 JDH의 투여가 인위적 뇌허혈로 인한 손상을 어느 정도 방지하며 해마부위의 신경세포를 손상으로부터 보호하여 학습능력 및 기억력을 증진시키는데 효과가 있을 것으로 사료된다.

다음으로 JDH의 신경세포 보호효과를 살펴 보기 위하여 세포 증식을 및 생존율에 미치는 영향 및 산화적 스트레스를 유발하는 약물들에 의하여 유발되는 세포 사멸에 미치는 영향을 관찰하였고, JDH에 의한 SOD 활성과 total glutathine 함량변화를 알아보았다.

본 연구의 결과에서 C6 glial cell에 JDH를 농도별로 투여하고 24시간 후 세포 증식을 측정한 결과, 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 유의한 수준의 세포 증식을 증가가 관찰되었다 (Fig. 9). 또한 JDH는 모든 농도에서 특별한 세포 독성은 나타나지 않았다 (Fig. 10). 이러한 결과로부터 JDH가 신경 손상 환자의 뇌 또는 신경 조직을 재생 시킬 수 있다는 가능성을 발견하였다.

신경교세포주에 대하여 증식을 증가 소견을 보인 JDH에 대하여 C6세포에 상기 실험을 통하여 정해진 JDH의 최소 유효 농도 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 JDH를 전처리하고, paraquat, SNP, rotenone, hydrogen peroxide (H_2O_2)로 산화적 스트레스

를 유발하여 JDH의 세포 사멸 방지 효과를 관찰하였다.

사용된 Paraquat는 비특이성 광범위한 산화 환원제로 그라목손 (Gramoxone)으로 알려져 있는 강력한 제초제이며 주로 각종 중독 작용, 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 일으킨다⁴¹⁻². sodium nitro-prusside (SNP)은 생체 내에서 nitric oxide (NO)를 발생시켜 산화적 스트레스를 유발시키며⁴³, 활성산소 형태의 하나이며 강력한 산화력이 있어 견사나 양모등의 표백제 소독약, 폭약 등으로 사용되는 hydrogen peroxide (H_2O_2), 그리고 농약, 살충제 용도로 사용되며, 생체 내의 각종 세포에 산화적 손상을 통하여 apoptosis를 유발하는 rotenone⁴⁴⁻⁵을 사용하였다.

본 연구의 결과에서 JDH를 투여하지 않고 상기한 4가지 chemical만을 단독 처리한 군에서는 모두 C6 세포의 생존율을 유의하게 감소되었다 (Fig. 11). 이러한 생존율 감소에 대하여 JDH를 전처리한 후 paraquat, rotenone 및 hydrogen peroxide 를 처리한 군은 유의하게 높은 세포 생존율을 보였지만 (Fig. 12, 14, 15), SNP를 처리한 군에서는 특별한 보호효과를 발휘하지 못하였으며, 오히려 유의하게 낮은 수준의 세포 생존율이 관찰되었다 (Fig. 13).

superoxide dismutase (SOD)는 가장 대표적 항산화 효소로 포유동물에서는 세포질에 CuZn-SOD가 mitochondria내에는 Mn-SOD가 있는 것으로 알려져 있다⁴⁶. SOD는 세포에 해로운 superoxide radical을 hydrogen peroxide로 전환시키며, 체내에 지나치게 증가한 활성산소를 제거하여 독성이 없어지게 한다⁴⁷. 본 연구 결과에서 JDH는 유의한 수준의 SOD활성 증가를 보였으며 (Fig. 16) 이는 산화적 스트레스에 대한 보호효과를 보충 설명할 수 있는 자료라 생각된다.

Glutathione (GSH)은 대표적인 항산화제로 free radical과 peroxide와 같은 reactive oxygen species (ROS)로부터 세포를 보호해 주는 역할을 한다⁴⁸⁾. GSH는 대부분은 환원형으로 존재하며, ROS에 의하여 산화되면서 항산화 활성을 발휘하게 된다. 산화된 GSH는 glutathione reductase에 의하여 다시 환원형으로 돌아간다⁴⁹⁾. 본 연구에서 JDH에 의한 total glutathione 함량의 변화에 유의성은 보이지 않았다 (Fig. 17). 종합하면 JDH은 SOD 활성 증가로 인한 항산화 효과를 통하여 뇌 및 신경 세포의 손상을 방지할 수 있는 작용이 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과들을 정리하면, JDH의 투여는 뇌혈류를 증가하여 뇌기능 활성을 돕고 뇌조직의 허혈성 손상을 회복시키며, 해마의 BDNF를 보호하여 학습능력 및 기억력을 증진하는데 도움을 주며, 다양한 산화적 스트레스로 유발된 신경세포 손상을 억제하는 효과를 가지고 있었다. 이에 따라 JDH은 뇌기능 향상에 도움을 줄 수 있으며 학습 능력 향상 및 기억력 증진, 나아가 허혈성 뇌손상과 관련된 증상 등의 매우 광범위한 분야에서 긍정적인 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

V. 結 論

朱子讀書丸 (JDH)이 뇌기능 활성화와 학습수행 및 기억력 증진에 미치는 효과 및 기전을 밝히기 위하여 흰 쥐의 국소 뇌혈류 및 평균혈압의 변화와 뇌허혈 후 약물 투여로 조직형태학적 및 면역조직화학적 개선 효과 그리고 신경교세포주에서의 항산화 효과 관찰 하였으며 그 결과는 아래와 같다.

1. 정상 흰쥐에 JDH를 투여하였을 경우 rCBF은 유의성 있게 증가하였으나 MABP

은 감소하였다.

2. 정상 흰쥐에서 cyclooxygenase의 억제제인 인도메타신을 전처치한 후 JDH를 투여하였을 경우 인도메타신 처리군의 국소 뇌혈류량은 대조군에 비해 유의한 수준으로 감소하였으며 평균 혈압은 유의한 변화를 보이지 않았다.
3. 뇌허혈 흰 쥐의 뇌조직형태학적 검사에서 JDH의 투여는 뇌손상의 정도를 호전시켰다.
4. 해마 CA1 부위의 조직을 골라 BDNF에 대한 면역 반응을 검사한 결과, JDH를 투여한 군에서 좀 더 높은 면역 양성 반응을 보였다.
5. JDH의 처리는 신경교세포주의 증식율을 유의성 있게 증가시켰다.
6. JDH를 투여하였을 경우 Paraquat, rotenone, hydrogen peroxide에 의하여 유발되는 세포 사멸이 유의하게 감소되는 것이 관찰되었으며 유의한 수준으로 SOD활성을 증가시킴을 확인하였다.

이상의 결과들을 정리하면, JDH의 투여는 뇌혈류를 증가하여 뇌기능 활성을 돕고 뇌조직의 허혈성 손상을 회복시키며, 해마의 BDNF를 보호하여 학습능력 및 기억력을 증진하는데 도움을 주며, 다양한 산화적 스트레스로 유발된 신경세포 손상을 억제하는 효과를 가지고 있었다. 이에 따라 JDH은 뇌기능 향상에 도움을 줄 수 있으며 학습 능력 향상 및 기억력 증진, 나아가 허혈성 뇌손상과 관련된 증상 등의 매우 광범위한 분야에서 긍정적인 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

參考文獻

1. Raymond D. Adams Maurice Victor Allan H. Ropper. 신경과학. 서울: 정담. 1998:715-61.
2. 전국한의과대학 병리학교실. 한방병리학. 제천:한의학문화사. 2001:27-31, 43-6, 69-81, 165-72.
3. 조남근. 족삼리 자침이 혈압과 뇌혈류역학에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999;16(4):307-19.
4. 조남근. 용천혈의 자침 및 애구 시술이 혈압과 국소뇌혈류량에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1998;15(2):227-36.
5. 배병철 역. 금석황제내경소문. 서울:정보사. 1994:118-9,383-4,628.
6. 허준. 동의보감.서울:법인문화사; 1999:191.
7. 허준. 동의보감.서울:법인문화사; 1999:190.
8. 강혁수, 임강현, 고흥. 주자독서환의 아밀로이드베타로 유발된 생쥐 알츠하이머모델에 대한 효과. 대한한방내과학회지. 2006;27(1): 253-64.
9. 강인탁. 알코올 중독에 대한 주자독서환의 학습능력향상 및 간손상회복 효과. 우석대학교 대학원논문집. 2007.
10. Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M., Nishimura M.C., Davis R.L. & Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke. 1996;17(3): 472-6.
11. Nagasawa H. & Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. Stroke. 1989;20(8): 1037-43.
12. Mari M, Seiji K, Kenji F, Airo T and Toshimasa N. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MtT/Se cell proliferation assay. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2006;209(5):413-21.
13. Lockhart BP, Lestage PJ. Conition enhancing or neuroprotective compounds for the treatment of cognitive disorders. why? when? which? Exp Gerontol. 2003;38(1-2):119-28
14. Simard M, van Reekum R. Memory assessment in studies of cognition-enhancing drugs for Alzheimer's disease. Drugs Aging. 1999; 14(3):197-230.
15. 김은선, 박동운, 이종은. 뇌질환 치료제 I, 산업시장분석. 서울:한국과학기술정보연구원. 2006:25-55.
16. 나영신. 뇌혈관질환에서 SPECT와 PET의 임상적 응용. 대한핵의학회지.2003;37(1): 1-12.
17. 대한신경외과학회. 신경외과학. 서울:중앙문화사. 1998:150-6,275-6.
18. 이시진. 본초강목중국의학대계. 서울:여강출판사. 1995:650-1.
19. 손사막. 비급천금요방. 중국의학대계. 서울: 여강출판사. 1995:896-8.
20. 허준. 동의보감.서울:법인문화사. 1999:487.
21. 이천. 의학입문. 서울:의성당. 1994:126.
22. 황도연. 신증방약합편. 서울:영림사. 2002:376, 388, 407, 439, 442, 489, 515, 533.
23. Giacobini E. From molecular structure to Alzheimer therapy. Jpn J Pharmacol. 1997; 74(3):225-41.
24. Giacobini E. Present and future of Alzheimer therapy. J Neural Transm Suppl. 2000;59: 231-42.
25. Bachurin SO. Medicinal chemistry approaches

- for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Med Res Rev.* 2003; 23(1):48-88.
26. Harris RJ, Symon L, Branston NM, Bayhan M. Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia, *J.Cereb Blood Mrtab.* 2001:203-9.
 27. 김우겸. 인체의 생리. 서울:서울대학교 출판부. 1985:20-47,107-118.
 28. Wang Q, Pelligrino DA, Paulson OB, Lassen NA. Comparison of the effects of NG-nitro-L-arginine and indomethacin on hypercapnic cerebral blood flow increase in rats. *Brain Res.* 1994;641(2):257-264.
 29. Iwamoto J, Yoshinaga M, Yang SP, Krasney, J.Methylene blue inhibits hypoxic cerebral vasodilation in awake sheep, *J.Appl Physiol.* 1992;73(6):2226-32.
 30. Okura Y, Takeda K, Honda S, Hanawa H, Watanabe H, Kodama M, Izumi T, Aizawa Y, Seki S, Abo T. Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific type 1 helper T cells in rats. *Circ Res.* 1998;82(10)1035-42.
 31. Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology.* 2008;55(3):363-89.
 32. Buchan AM, Pulsinelli WA. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci,* 1990;11:1049-50.
 33. Aronowski J., Ostrow P., Samways E., Strong R., Zivin J.A. & Grotta J.C. Graded bioassay for demonstration of brain rescue from experimental acute ischemia in rats. *Stroke.* 1994;25(11):2235-2240.
 34. Goldlust E.J., Paczynski P.P., He Y.Y., Hsu C.Y. & Goldberg M.P. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. *Stroke.* 1996;27(9): 1657-62.
 35. Kerege F, Bondilfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM, Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor(BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet activity. *Biol Psychiatry,* 2005;57: 1068-72.
 36. Connor B, Dragunow M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Reviews.* 1998;27(1):1-39.
 37. Legutko B, Li X, Skolnick P. Regulation of BDNF expression in primary neuron culture by LY392098, a novel AMPA receptor potentiator. *Neuropharmacology.* 2001;40(8): 1019-27.
 38. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 2002; 25(6):295-301.
 39. Gomez-Pinilla F, Vaynman S. A “deficient environment” in prenatal life may compromise systems important for cognitive function by affecting BDNF in the hippocampus. *Exp Neurol.* 2005;192:235-43.
 40. Eichenbaum H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanism and neural codes. *Behav Brain Res.* 2000;127: 199-207.
 41. Wills BK, Aks S, Maloney GE, Rhee J,

- Brand R, Sekosan M. The effect of amifostine, a cytoprotective agent, on paraquat toxicity in mice. *J Med Toxicol.* 2007;3(1):1-6.
42. Krasowska A, Sigler K. Cell-protective and antioxidant activity of two groups of synthetic amphiphilic compounds-phenolics and amine N-oxides. *Folia Microbiol.* 2007; 52(6):585-92.
43. Mullens W, Abrahams Z, Francis GS, Skouri HN, Starling RC, Young JB, Taylor DO, Tang WH. Sodium nitroprusside for advanced low-output heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 15:52(3):200-7.
44. Molina-Jiménez MF, Sánchez-Reus MI, Andres D, Cascales M, Benedi J. Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Brain Res.* 2004 ;1009(1-2):9-16.
45. Zhang JG, Nicholls-Grzemski FA, Tirmenstein MA, Fariss MW. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. *Chem Biol Interact.* 2001;138(3):267-84.
46. Corpas FJ et al. The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physio.* 2006;47(7):984 - 94.
47. Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* 2001;6(4):145-50.
48. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(8):1499 - 503.
49. Pastore A, Piemonte F, Locatelli M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, Federici G. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin. Chem.* 2003;47(8):1467 - 9.