동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 18. No. 1, 2007

加減補心湯의 구강투여가 Intraluminal Filament 挿入術에 依해 誘發된 白鼠의 虛血性 腦損傷에 미치는 影響

류승준, 이충식, 박보라, 서종훈*, 강형원, 류영수, 김태헌
원광대학교 한의과대학 한방신경정신과 교실
원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과 *

The effects of Gagambosim-Tang of focal brain ischemic injury induced by Intraluminal Filament insertion in the rats

Seung-Jun Ryu, Chung-Sik Lee, Bo-ra Park, Jong-Hoon Seo*,
Hyung-Won Kang, Yeong-Su Lyu, Tae-Heon Kim
Dept. of Neuropsychiatry, college of Oriental Medicine, Wonkwang University
Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University*

Abstract

Objective : The aim of this study was to investigate effects of Gagambosim-Tang(GBT) of focal brain ischemic injury induced by intraluminal filament insertion in the rats.

Method : The ischemia was induced by intraluminal filament insertion into middle cerebral artery. Eight-arm radial maze was designed for the behavioral task. Gagambosim-Tang was orally administrated in SD rats for 21 days. The task was started on the 4th week after focal brain injury, and performed two trials per day for 6days. The effects of Gagambosim-Tang on neuroprotective agents in cresyl violet, choline acetyltranferase(ChAT), nerve growth factor (NGF)-stain and c-Fos with ischemic injury were investigated.

Results : The errors in the eight-arm radial maze task were significantly decreased in normal group compared with control group on 2-6days, GBT 1X(42.2 mg/ml)orally administrated group on 1days, GBT 6X(253.2 mg/ml) on 3, 5, 6days. The rate of correct choice was increased in normal and GBT 6X groups. The neuroprotective effect in the hippocampal CA1 was increased in normal and GBT 1X, GBT 6X groups compared with control group. The density of ChAT in the hippocampal CA1 was increased in normal and GBT6X groups compared with control group. The density of NGF in the hippocampal CA1 was increased normal and GBT6X groups compared with control group. The number of c-Fos-positive neurons in the hippocampal CA1 was increased in normal and GBT 6X groups compared with control group.

Conclusion : These results suggest that Gagambosim-Tang may have protective effect on dementia.

Key words : Gagambosim-Tang, herb, dementia, ischemic injury, intraluminal filament insertion

---

투고일 : 2/16 수정일 : 3/14 채택일 : 3/15
교신저자: 김태헌, 전북 익산시 신룡동 344-2 원광대학교 한의과대학 신경정신과교실
Tel: 062-670-6472, E-mail: jayou88@daum.net

Ⅰ. 서 론

서양의학에서는 腦가 인간활동의 전영역을 統括하는 control center로서 의식활동과 다양한 감정, 행동 그리고 고차원적인 정신세계까지도 담당하는 것으로 알려져 있다[1].

韓醫學에서는 이러한 腦에 대해 단순히 腎과 관련된 생리기관의 하나로 보거나[2,3], 奇恒之府 중의 하나로써 인식하였으나[2] 後代에 腦에 대한 인식이 진일보하여 "腦爲元神之府"[4], "人之記性 皆屬腦中"[5]이라 하여 사람의 정신·사유활동과 腦의 기억간에 밀접한 관련이 있음을 말하였으며, 특히 "腦爲元神, 心爲識神, 腦中之神, 体也; 心中之神, 用也"[6]라고 하여 腦와 心 모두가 정신기능을 주관한다는 心腦共主神明說을 주창함으로써 腦와 心에 대한 진일보된 견해를 보여 주었고 임상에서도 이를 적극적으로 활용하여 왔다[11].

이러한 腦의 病理로 韓醫學에서는 "髓海有餘 輕徑多力……髓海不足 腦轉耳鳴 脛痠眩冒……"[3]라고 하여, 腦髓의 機能이 失調되거나 減退되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 知能低下, 健忘, 痴呆 등의 임상증상이 나타난다고 하였고[8], 서양의학에서는 중풍과 치매를 대표적인 뇌의 질환으로 보고 있으며 뇌허혈이 주요 원인으로 알려져 있다.

뇌허혈에 의한 신경세포의 손상은 초기와 후기로 나누는데 초기에는 대부분 뇌졸중에 의해 유발된 허혈로 인해 일시적 혈관폐쇄가 일어나 산소부족으로 신경세포가 괴사(necrosis)하게 되고, 후기에는 재관류 후 활성산소에 의해 apoptosis, 즉 지연성 세포사(Delayed Neuronal Death)가 일어나게 된다[9].

이러한 허혈성 신경세포손상은 혈관성 치매의 주된 원인이 되며[10] 뇌허혈을 유발하는 동물실험모델로는 전뇌 허혈을 유발하는 방법[11-13]과 국소 허혈을 유발하는 방법[14]이 있는데 본 실험에서는 백서의 우측 중대뇌동맥을 폐색시켜 뇌허혈을 야기한 후 재관류를 시켜 국소 뇌허혈을 유발하는 방법을 사용하였다. 이러한 방법은 뇌허혈이 前腦부분에만 국한되고 後腦부분에서는 혈류흐름에 별다른 영향이 없어 호흡과 체순환에 영향을 주지 않기 때문에 뇌허혈 유발 중에 백서의 사망을 최소화 할 수 있을 뿐 아니라 시술이 비교적 용이하고, 두개골 절개가 없어 손상 범위가 넓지 않아 널리 사용되는 방법이다[15].

본 실험에 사용한 加減補心湯은 龔의<古今醫鑑·健忘>[16]에 "治諸虛健忘等症"이라고 처음 수록되었으며 이후 許의<東醫寶鑑·健忘門>[17]에 諸虛健忘을 치료한다고 기록되어 있는데, 補心健脾 醒腦開竅 安神 滋陰補腎의 작용을 나타낼 수 있을 것으로 여겨지며 健忘뿐만 아니라 痴呆에도 일정한 효과가 있을 것으로 사료되나 아직까지 加減補心湯을 이용한 실험연구는 전무한 실정이다.

이에 著者는 加減補心湯이 백서의 중대뇌동맥 폐색으로 야기된 허혈성 뇌손상에 어떤 영향을 미치는지를 알아보고자, 방사형 미로학습과 조직화학적 기법을 사용하여 신경세포의 손상에 대한 방어 효과를 관찰한바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 삼육동물센터로부터 구입한 260~300 g, 8주령의 수컷 Sprague-Dawley계 白

鼠로, 일주일 정도 실험실 환경(온도는 22±3 ℃, 습도는 50±10%)에 적응시킨 후 사용하였다. 각 cage당 3~4마리씩 넣어 두었으며, 물과 사료(고형사료, 삼양유지(주))를 자유로이 섭취하도록 하였다.

2. 약 재

본 실험에 사용된 加減補心湯은 <東醫寶鑑>[17]에 의거하였으며, 내용과 1貼 分量은 다음과 같다. 약재는 원광대학교 부속 광주한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였다.

韓藥名	生 藥 名	用 量
陳皮	Aurantii nobilis Pericarpium	10 g
白茯苓	Poria cocos Wolf	10 g
當歸	Angelicae gigantis Radix	10 g
白芍藥	Paeoniae Radix	10 g
生地黃	Rehmanniae Rhizoma Radix	10 g
遠志 製	Polygalae Radix	10 g
麥門冬	Liriopis Tuber	10 g
酸棗仁 炒	Zizyphi Spinosi Semen	10 g
黃柏 酒炒	Phellodendri Cortex	10 g
知母 酒炒	Anemarrhenae Rhizoma	10 g
人蔘	Ginseng Radix	6 g
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	6 g
石菖蒲	Acori graminei Rhizoma	6 g
甘草	Glycyrrhizae Radix	6 g
	Total Amount	124 g

3. 검액의 조제

加減補心湯 2첩분량을 증류수 1,000 ml와 함께 24시간 동안 증류수를 계속 보충해가며 끓인 다음 여과지로 여과한 후, 고속원심분리기(Centricon T-42K, Italy)로 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액은 rotary vaccum evaporator(Buchi, Netheland)로 수분을 증발시켜 50 ml로 감압농축하였으며, 농축된 검액을 동결건조기(삼원, 한국)로 -70 ℃에서 동결 건조시켜 최종적으로 15.2 g의 시료를 얻었다. 최종적으로 얻어진 시료는 경구투여를 위하여 각 농도별로 증류수에 희석하여 사용하였다.

4. 실험군의 구성 및 절차

실험군들은 白鼠를 정상(Normal, n=8)군, Ischemia 유발(Control, n=8) 군, Ischemia 유발 후 加減補心湯 각 1배 구강투여군(이하 GBT 1X군, 42.2 mg/ml, n=8), 3배 구강투여군(이하 GBT 3X군, 126.6 mg/ml, n=8), 6배 구강투여군(이하 GBT 6X군, 253.2 mg/ml, n=8)으로 5군으로 나누었다.

Ischemia 유발 3시간 후부터 각 군은 1回/1日(오전 10시) 치료를 시작하여, 21일간 加減補心湯을 각각 1.5 ml씩 구강 투여한 다음 22일부터 27일까지 誤行路 선택수를 측정하고 28일에 正行路 선택율을 측정하여 행동검사를 행한 다음 白鼠를 관류 고정하여 조직검사를 하였다.

5. Occlusion에 의한 허혈성 국소 뇌손상 유발

국소 뇌허혈은 Zea Longa[24] 등의 방법에 따라 우측중대뇌동맥을 폐색시켜 만들었다. 白鼠를 70% N_2와 30% O_2가 혼합된 5% isoflurane

을 이용하여 흡입마취 유도를 한 후 2% isoflurane으로 계속 유지시켰다.

白鼠의 직장에 체온측정 probe를 삽입하고 가온등과 가온 메트리스를 이용하여 실험기간 동안 체온을 38 ℃로 유지하였다. 우측 중대뇌동맥을 폐색하기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골혀근과 흉골저작근 사이에 우측총경동맥을 노출한 후 우측내경동맥의 원위부를 최대한 확보하고 난후 혈관 미세클립(WPI, USA)을 이용하여 결찰하였고, 우측내경동맥과 intraluminal filament사이의 출혈을 방지하기 위하여 6-0 silk suture실을 이용하여 우측총경동맥 근위부 및 우측외경동맥 분지부를 결찰하였다. 우측총경동맥에서 우측외경동맥과 우측내경동맥의 분지부에서 1 cm정도 되는 우측 내경동맥의 원위부에 미세혈관 가위(WPI, USA)를 사용하여 구멍을 내었다. 미세혈관클립을 제거한 후 우측내경동맥내로 20 mm의 치과 인상제(Durelon, Germany)가 발라진 intraluminal filament(직경 0.28 mm, rounded tip)를 우측 내경동맥상의 구멍에 intraluminal filament가 faint resistance의 느낌이 느껴질 때까지(약 17 mm)부드럽게 삽입하여 그 끝이 우측중대뇌동맥까지 도달하도록 한 후, 우측내경동맥상의 intraluminal filament 삽입부위를 가볍게 묶어 출혈을 방지하였다. 이를 2시간 동안 유지한 후 우측총경동맥과 우측외경동맥의 결찰부위를 풀고, 혈류차단 인상제가 중대뇌동맥 내에 위치하도록 intraluminal filament를 제거하고 측부순환을 통하여 재관류를 시켰다.

6. Eight-arm radial maze task

목재로 제작된 8개의 통로가 중앙의 출발영역(central platform)을 중심으로 매 45도 각도(방사형)로 뻗어 나온 형태의 장치를 이용하였다 (Fig. 1). 중앙 출발 영역은 직경 50 cm인 원에 내접하는 정팔각형 상자로 높이는 25 cm이다.

走路는 출발 상자의 각 면에 뚫린 10×25 cm 크기의 통로와 연결되어 있으며, 길이는 70 cm이고 동물이 바깥으로 나가지 못하게 하였다. 走路의 끝에는 보상으로 제공하는 먹이나 물을 담을 수 있는 7×5×3 cm 크기의 용기(음식 접시)를 설치하였다. 白鼠가 走路를 출입하는 행동을 비디오카메라로 녹화하여 白鼠가 각 走路를 방문한 횟수와 오류 여부를 계산하였다. 실험에 들어가기 전 36시간 동안 사육 상자에서 먹이를 박탈하고 배고픔을 유발시킨 白鼠를 행동 관찰실로 옮겨와 30분간 환경에 적응시켰다.

획득시행동안의 誤行路 선택수는 白鼠를 미로의 출발 상자에 넣고 1분간 두어 상황에 적응시킨 후 1분이 지나면 각 走路로 통하는 통로를 개방하여 白鼠가 자유롭게 미로 속을 돌아다니게 하였다. 白鼠가 走路를 방문하여 끝까지 달리면 보상 용기에서 먹이를 먹게 하였다. 그러나 동일한 走路를 반복해서 방문하면 두 번째 방문부터는 먹이를 제공하지 않고 남은 주행로수를 오류횟수로 기록하였으며, 白鼠가 300초 동안에 8개의 走路중 1走路도 방문하지 못하면 오류횟수는 8로 기록하고 획득시행을 중지시켰다.

검사시행동안의 正行路 선택율은 白鼠가 6일 동안의 획득시행에서 학습 준거에 도달하는 경우 7일째에 기억을 관찰하는 검사를 시행하여, 4분 안에 8개의 走路중 2개의 走路를 택해 들어가면 출발 상자에 다시 넣어 30초 동안 머무르게 한 후 나머지 6개의 走路중 바르게 선택한 주행로의 수를 백분율로 환산하여 正行路 선택율로 기록하였으며, 30초 동안 머무른 후 240초까지 나머지 6개 走路중 1주로도 방문하지 못하면 0%로 기록하고 검사시행을 중지시켰다.

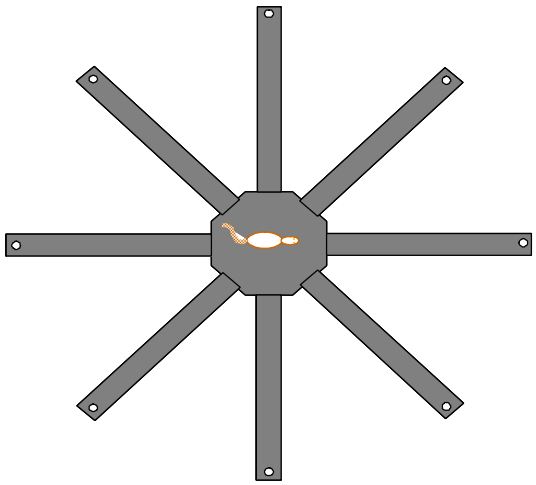


Fig. 1. Apparatus of eight-arm radial maze. Number of errors: The task was started on the 4th week after focal-ischemic treatment, and performed four trials per day for 6days. Rate of Correct choice: The task was started on the 7day after acquisition test.

7. Immunohistochemistry

1) Cresyl violet 염색

모든 행동 실험이 끝난 직후 白鼠를 pentobarbital sodium (100 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후, 0.9% saline 200ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액(fixative) 800 ml로 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200 ml는 2분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 800 ml는 25분간에 걸쳐 천천히 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 경과 후 고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4 ℃에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌조직을 hippocampus 부위를 30 μm의 두께로 잘랐다. PBS로 조직을 몇 차례 씻고 xylene(5 min), 100% alcohol(2 min), 95% alcohol(1 min), 70% alcohol(1 min), D.W.(2 min)순으로 옮겨 담아 탈지, 탈수를 시킨 다음 Cresyl violet buffer(5 min)로 염색을 하였다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경을 사용하여 40배로 확대하여 관찰하였고, 신경세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다.

2) Choline acetyltransferase(ChAT) 및 Nerve Growth Factor(NGF) 염색

뇌 조직을 PBS에 3회 정도 세척한 후 ChAT 유전자 발현 연구에 가장 널리 사용되고 있는 primary sheep ChAT anti-body(1:1,500, polyclonal, Cambridge Research Bio-chemicals, Wilmington, DE, U.S.A.)와 anti-NGF(1:500, polyclonal, Snata Cruz Biltechnology Inc., California, U.S.A.)를 사용하였다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100을 첨가한 PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium acid(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)로 2000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4℃에서 72시간 동안 지속적으로 흔들어 주면서 배양하였다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 2시간 동안 실온에서 2% 토끼 혈청을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.)에 반응시켰다. PBST로 3번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent(Vector)에 위치시켰다. PBS로 몇 번 헹군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzidine (DAB)을 사용하여 발현시켰다. 통제군 조직에는 1차 항체를 생략하거나 nonimmuno sheep serum으로 대체하였는데, 이들 두 경우 다 특정 표지가 나타나지 않았다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 40배로 확대하여 hippocampus에서 ChAT-immunoreactive 및

NGF-immunoreactive 신경 세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다.

3) c-Fos 단백 염색

뇌 조직을 PBS(phosphate buffer saline)에 3회 정도 세척한 후 primary sheep c-fos anti-body(1:1,500, polyclonal, Cambridge Research Bio-chemicals, Wilmington, DE, USA)를 사용하였다. 1차 항체는 PBS에 0.3% triton X-100 첨가한 PB(phosphate buffer)에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium acid(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 2,000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4 ℃에서 24시간동안 지속적으로 흔들어 주면서 배양하였다. 그 후 3번 이상 조직을 PBS로 씻은 다음 2시간 동안 실온상태에서 10 mM PB에 200배 희석한 biotinylated anti-sheep serum(Vector Laboratories, Burlingame, USA)에 반응시켰다. PB로 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 diaminobenzidine(DAB)을 사용하여 발현시켰다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 광학현미경(light microscope magnification × 200)으로, periaqeductal gray(PAG)에서 c-Fos -immunoreactive 신경세포의 밀도를 scion image program(Scion Corp, USA)을 이용하여 측정하였다.

8. 통계처리

모든 측정값은 평균값 표준오차(mean±SE)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS 12.0(USA)를 이용하였다. 각 집단간 행동 측정치중 誤行路 선택수의 비교는 repeated ANOVA test를 시행하였고, 正行路 선택율, 뇌혈류, 혈압 및 면역조직 화학분석법의 측정값은 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 신뢰구간 $P<0.05$에서 의미를 부여하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 방사형 미로 학습에서 誤行路 선택수

백서의 공간 기억 능력을 관찰하기 위하여 각 군에 대하여 eight-arm radial maze task를 통한 방사형 미로학습 중 誤行路 선택수를 측정한 결과, 1일째에 있어서 Normal군은 4.4±0.18회, Control군은 5.9±0.48회, GBT 1X군은 5.8±0.28회, GBT 3X군은 6.2±0.28회, GBT 6X군은 5.8±0.43회를 각각 나타내었으며, Control군에 비하여 Normal군에서 유의한 감소($P<0.05$)를 나타내었다.

실험 진행에 따라 Control군에 비해 Normal군은 2일~6일째에 모두 유의하게 감소($P<0.01$)하였고, Control군에 비해 GBT 1X군은 2일째에 유의한 감소($P<0.05$)를, GBT 6X군은 3일째에 유의한 감소($P<0.01$)를, 5일째에 유의한 감소($P<0.05$)를, 6일째에 유의한 감소($P<0.01$)를 각각 나타내었다(Table 1, Fig. 2).

Table 1. The number of errors in the eight-arm radial maze task in focal brain injury

Group	1	2	3	4	5	6
Normal	4.4±0.18*	3.6±0.47**	3.1±0.23**	2.6±0.38**	2.0±0.43**	0.9±0.13**
Control	5.9±0.48	6.2±0.21	6.0±0.35	5.3±0.42	5.5±0.42	4.8±0.26
GBT 1X	5.8±0.28	5.4±0.18*	6.0±0.41	5.0±0.62	5.2±0.37	4.8±0.37
GBT 3X	6.2±0.28	6.2±0.28	5.5±0.43	4.8±0.74	5.3±0.42	4.8±0.32
GBT 6X	5.8±0.43	5.8±0.15	3.8±0.60**	4.6±0.56	3.8±0.43*	3.2±0.28**

Gagamboshim-Tang was orally administrated in SD rats for 21 days. The task was started on the 4th week after focal brain injury, and performed two trials per day for 6days. Repeated Measures of one-way ANOVA(Tukey test) of in the errors revealed among the groups[(F(5.36)=14.978, P<0.001)]. Results are shown as means ± S.E. *, P<0.05, **, P<0.01 as compared with the corresponding data of control group.

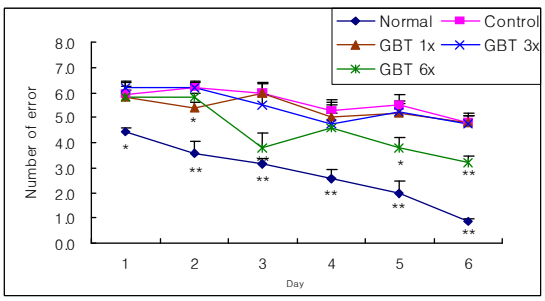


Fig. 2. Acquisition curves of the eight-arm radial maze task in focal brain injury. The task was started on the 4th week after focal brain injury, and performed two trials per day for 6days. Repeated Measures of one-way ANOVA(Tukey test) of in the errors revealed among the groups[(F(5.41)=11.519, P<0.001)]. Results are shown as means ± S.E. *, P<0.05, **, P<0.01 as compared with the corresponding data of control group.

2. 방사형 미로 학습에서 正行路 선택율

백서의 공간 기억 능력을 관찰하기 위하여 각 군에 대하여 eight-arm radial maze task를 통한 방사형 미로학습 중 正行路 선택율을 측정한 결과, Normal군은 73.3±7.18%, Control군은 30.6±7.36%, GBT 1X군은 40.0±3.45%, GBT 3X군은 41.7±5.27%, GBT 6X군은 60.0±3.45%로 각각 나타났으며, Control군에 비하여 Normal군이 유의한 증가(P<0.01)를, GBT 6X군이 유의한 증가(P<0.05)를 각각 나타내었다(Table 2, Fig. 3).

Table 2. The rate of correct choice on the eight-arm radial maze task in focal brain injury

	Normal	Control	GBT 1X	GBT 3X	GBT 6X
AV	73.3**	30.6	40.0	41.7	60.0*
SE	7.18	7.36	3.45	5.27	3.45

Gagamboshim-Tang was orally administrated in SD rats for 21 days. The task was started on the 7day after acquisition test, and performed four trials. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as means ± S.E. *, P<0.05, **, P<0.01 as compared with the corresponding data of control group.

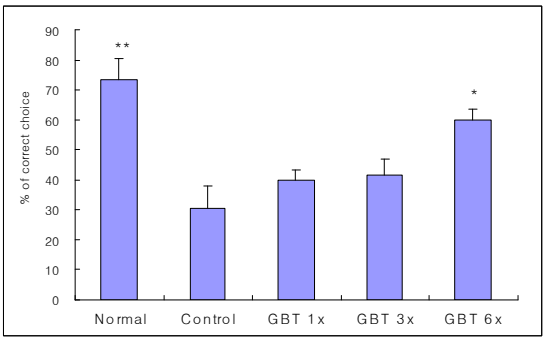


Fig. 3. Retention histogram of the eight-arm radial maze task in focal brain injury. The task was started on the 7day after acquisition test, and performed four trials. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as means ± S.E. *, P<0.05, **, P<0.01 as compared with the corresponding data of control group.

3. Cresyl violet을 이용한 신경세포 손상 방어효과

Hippocampal CA1 부위를 Cresyl violet에 염색하여 신경세포의 손상방어 효과를 정량적으로 관찰한 결과, Normal군은 35.3±1.54, Control군은 24.2±2.31, GBT 1X군은 31.3±1.91, GBT 3X군은 31.3±2.64, GBT 6X은 33.4±2.84로 각각 나타났으며, Control군에 비해 Normal군이 유의한 증가($P<0.01$)를, GBT 1X군이 유의한 증가($P<0.05$)를, GBT 6X군이 유의한 증가($P<0.05$)를 각각 나타내었다(Table 3, Fig. 4).

Hippocampal CA1 부위를 Cresyl violet 염색하여 신경세포의 손상방어 효과를 조직학적으로 관찰한 결과, Normal군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도가 높게 나타났으며, GBT 3X군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도는 비슷한 정도로 나타났고, GBT 1X군과 GBT 6X군은 Control군에 비하여 발현이 높게 나타났다(Fig. 5).

Table 3. The values of density of Cresyl Violet-stained sections in the hippocampal CA1

	Normal	Control	GBT 1X	GBT 3X	GBT 6X
AV	35.3**	24.2	31.3*	31.3	33.4*
SE	1.54	2.31	1.91	2.64	2.84

The values of density of Cresyl violet-stained sections in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E. **, $P<0.01$, as compared with the corresponding data of control group.

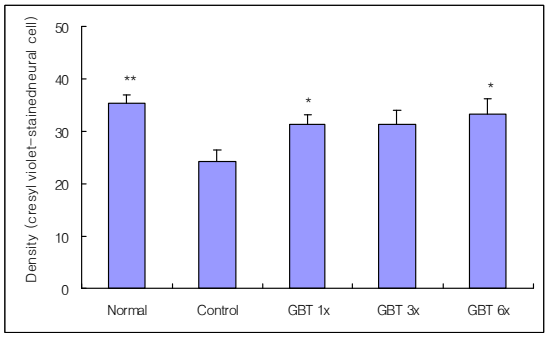


Fig. 4. The values of density of Cresyl violet-stained sections in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E. **, $P<0.01$, as compared with the corresponding data of control group.

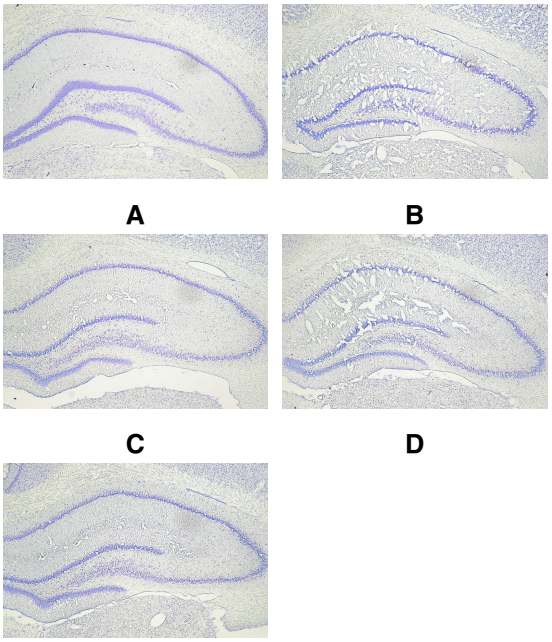


Fig. 5. Representive microphotographs of coronal sections in the hippocampal CA1. As compared with density of B group, that of the density of A group($P<0.01$), C group($P<0.05$), E group($P<0.05$) was increased. A:Normal, B:Control, C:GBT 1X, D:GBT 3X, E:GBT 6X. Cresyl violet-stain. ×40.

4. ChAT 발현에 미치는 영향

Hippocampal CA1 부위의 ChAT-immunoreactive 신경세포 발현 상태를 정량적으로 평가한 결과, Normal군은 39.4±1.82, Control군은 24.8±1.12, GBT 1X군은 28.3±1.91, GBT 3X군은 25.0±2.71, GBT 6X군은 29.0±0.94로 각각 나타났으며, Control군에 비하여 Normal군이 유의한 증가($P<0.01$)를, GBT 6X군이 유의한 증가($P<0.05$)를 각각 나타내었다(Table 4, Fig. 6).

Hippocampal CA1 부위의 ChAT-immunoreactive 신경세포 발현을 조직학적으로 관찰한 결과, Normal군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도가 높게 나타났으며, GBT 3X군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도는 비슷한 정도로 나타났고, GBT 1X군은 Control군에 비하여 발현이 다소 높은 경향을 나타내었고, GBT 6X군은 Control군에 비하여 발현이 높게 나타났다(Fig. 7).

Table 4. The values of density of ChAT stained nuclei in the hippocampal CA1

	Normal	Control	GBT 1X	GBT 3X	GBT 6X
AV	39.4**	24.8	28.3	25.0	29.0*
SE	1.82	1.12	1.91	2.71	0.94

The values of density of Choline acetyltransferase(ChAT) stained nuclei in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E. *, $P<0.05$, as compared with the corresponding data of control group.

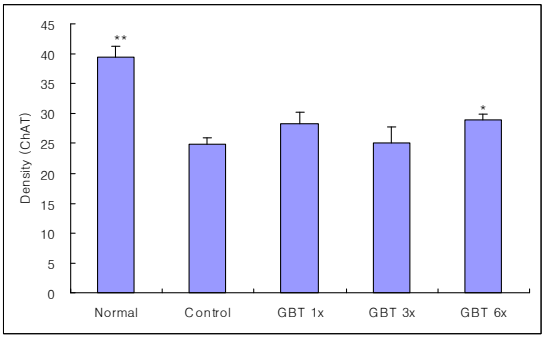


Fig. 6. The values of density of Choline acetyltransferase(ChAT) stained nuclei in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E. *, $P<0.05$, as compared with the corresponding data of control group.

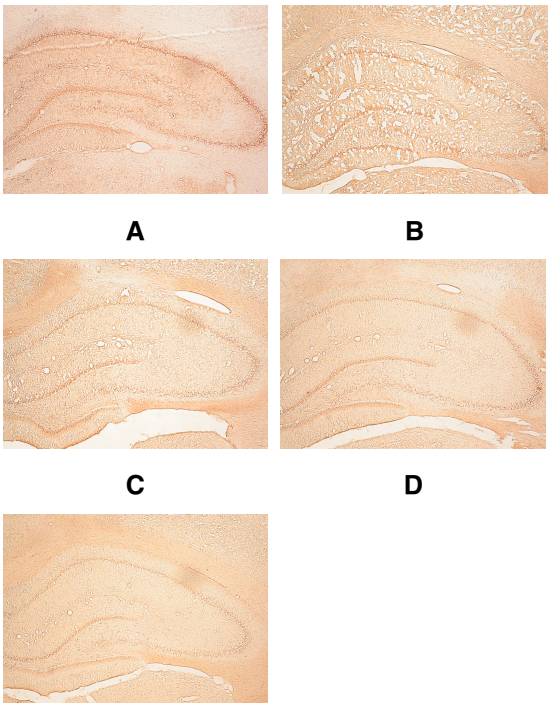


Fig. 7. Representive microphotographs showing density of ChAT in coronal sections at the hippocampal CA1. As compared with density of B group, that of the density of A group($P<0.01$), amd E group($P<0.05$) was increased. A:Normal, B:Control, C:GBT 1X, D:GBT 3X, E:GBT 6X. ×40.

5. NGF 발현에 미치는 영향

Hippocampal CA1 부위의 NGF-immunoreactive 신경세포 발현 상태를 정량적으로 평가한 결과, Normal군은 39.0±3.00, Control군은 24.0±1.80, GBT 1X군은 29.5±4.15, GBT 3X군은 27.5±2.52, GBT 6X군은 31.6±2.93로 각각 나타났으며, Control군에 비하여 Normal군이 유의한 증가($P<0.01$)를, GBT 6X군이 유의한 증가($P<0.05$)를 각각 나타내었다(Table 5, Fig. 8).

Hippocampal CA1 부위의 NGF-immunoreactive 신경세포 발현을 조직학적으로 관찰한 결과, Normal군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도가 높게 나타났으며, GBT 3X군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도는 비슷한 정도로 나타났고, GBT 1X군은 Control군에 비하여 발현이 다소 높게 나타났고, GBT 6X군은 Control군에 비하여 발현이 높게 나타났다(Fig. 9).

Table 5. The values of density of NGF stanied nuclei in the hippocampal CA1

	Normal	Control	GBT 1X	GBT 3X	GBT 6X
AV	39.0**	24.0	29.5	27.5	31.6*
SE	3.00	1.80	4.15	2.52	2.93

The values of density of Nerve growth factor(NGF) stained nuclei in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ as compared with the corresponding data of control group.

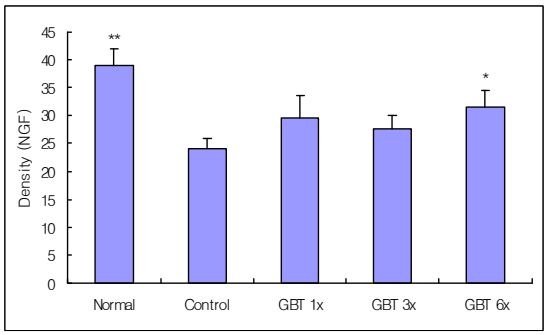


Fig. 8. The values of density of Nerve growth factor(NGF) stained nuclei in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E. *, $P<0.05$, **, $P<0.01$ as compared with the corresponding data of control group.

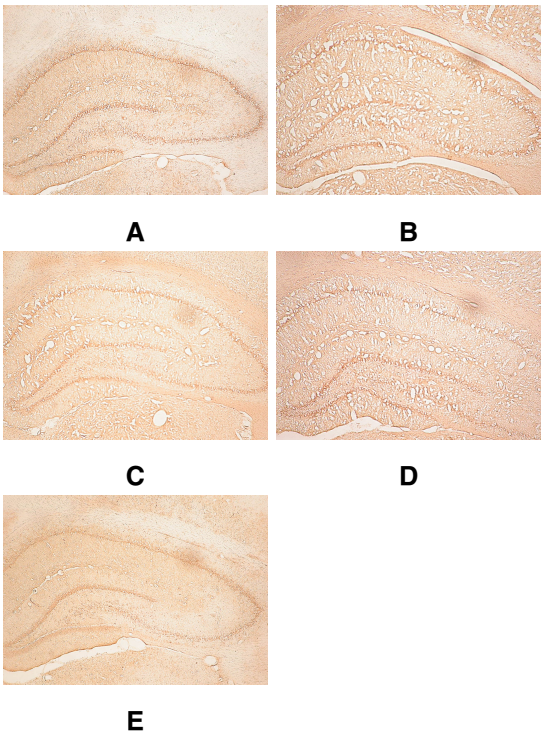


Fig. 9. Representive microphotographs showing density of NGF in coronal sections at the hippocampal CA1. As compared with density of B group, that of the density of A group($P<0.01$) and E group($P<0.05$) was increased. A:Normal, B:Control, C:GBT 1X, D:GBT 3X, E:GBT 6X. ×40.

6. c-Fos 발현에 미치는 영향

Hippocampal CA1 부위의 c-fos 단백 발현 상태를 정량적으로 평가한 결과, Normal군은 27.6±5.11, Control군은 51.8±9.07, GBT 1X군은 73.5±36.61, GBT 3X군은 76.5±13.25, GBT 6X군은 30.8±3.29로 나타났으며, Control군에 비하여 Normal군이 유의한 감소($P<0.05$)를, GBT 6X군이 유의한 감소($P<0.05$)를 각각 나타내었다(Table 6, Fig. 10).

Hippocampal CA1 부위의 c-fos 단백 발현을 조직학적으로 관찰한 결과, Normal군은 Control군에 비하여 발현이 적게 나타났으며, Control군에 비하여 GBT 1X군과 GBT 3X군에서 발현이 높게 나타났고, GBT 6X군에서 발현이 낮게 나타났다(Fig. 11)

Table 6. The values of density of c-Fos stanied nuclei in the hippocampal CA1

	Normal	Control	GBT 1X	GBT 3X	GBT 6X
AV	27.6*	51.8	73.5	76.5	30.8*
SE	5.11	9.07	36.61	13.25	3.29

The number of c-Fos stained nuclei in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E. *, $P<0.05$, as compared with the corresponding data of control group.

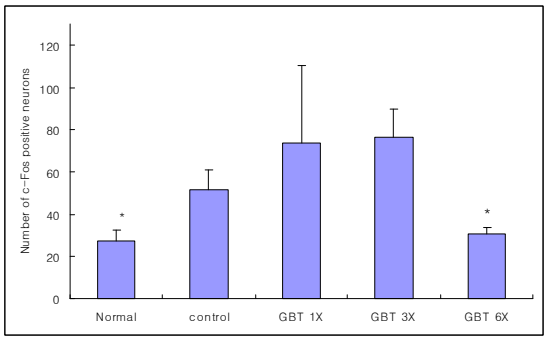


Fig. 10. The number of c-Fos stained nuclei in the hippocampal CA1 are shown. Measures of Mann-Whitney U test in the count revealed a groups and followed by noparametric test. Results are shown as mean±S.E. *, $P<0.05$, as compared with the corresponding data of control group.

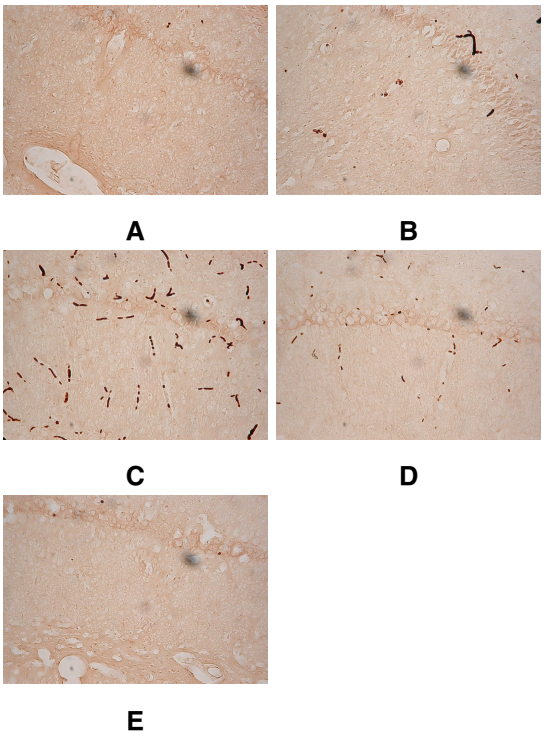


Fig. 11. Representive microphotographs showing number of c-Fos in coronal sections at the hippocampal CA1. As compared with density of B group, that of the density of A and E group($P<0.05$) was decreased. A:Normal, B:Control, C:GBT 1X, D:GBT 3X, E:GBT 6X. ×200.

Ⅳ. 고 찰

서양의학에서는 腦가 인간활동의 전영역을 統括하는 control center로서 인간의 고위정신기능이 대뇌피질에서의 신경세포활동에 의해 발현된다고 인식하여 인식, 사고, 판단 등의 역동적인 의식활동과 다양한 감정, 행동 그리고 더 나아가 고차원적인 정신세계까지도 담당하는 것으로 알려져 있다[1,2].

韓醫學에서는 이러한 腦에 대해 <素問·陰陽應象大論篇>[2]에서 "腎生骨髓"라고 하여 腦를 단순히 腎과 관련된 生理器管의 하나로써 보거나[3], <素問·五臟別論篇>[2]에서와 같이 "或而腦髓爲臟 或而爲腑……故藏而不瀉, 名曰奇恒之府"라고 하여 奇恒之府 중의 하나로써 인식하였다. 그러나 後代에 腦에 대한 인식이 진일보하여 明代의 李[4]는 "腦爲元神之府 而鼻爲命門之竅"라고 하여 처음으로 腦가 神을 總括하는 주체적인 기관임을 말하였고, 淸代의 王[5]은 "人之記性 皆屬腦中" "小兒無記性者 腦髓未滿 高年無記性者 腦髓漸空"이라 하여 사람의 精神·思惟活動과 腦의 記憶간에 밀접한 관련이 있음을 말함으로써 오늘날의 서양의학적인 腦와 유사한 인식을 하였다. 특히 張[6]은 "腦爲元神, 心爲識神, 腦中之神, 体也; 心中之神, 用也"라고 하여 인간의 고위정신기능인 '神明'을 元神과 識神으로 구별하여 腦와 心 모두가 정신기능을 주관한다는 心腦共主神明說을 주창함으로써 腦와 心에 대한 진일보된 견해를 보여 주었고 임상에서도 이를 적극적으로 활용하여 왔다[7].

이러한 腦의 病理로는《靈樞·海論篇》[3]에 "髓海有餘 輕徑多力……髓海不足 腦轉耳鳴 脛痠眩冒……"라고 하였으며, 腦髓의 이런 기능이 失調되거나 減退되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘, 知能低下, 痴呆 등의 임상증상이 나타나고[8] 주요원인에 대해서는 肝腎虛弱, 稟受不足, 心脾陽虛, 痰瘀 등이라고 하였다[18, 19].

치매란 정상적인 지적 수준을 갖춘 사람의 뇌에 생긴 기질적 병변으로 인해 전반적인 인지기능의 장애를 나타내는 질환으로 의식이 맑은 상태에서도 기억이나 사고력, 지남력, 이해, 계산, 학습, 언어 및 판단력 등을 포함하는 다수의 고위 대뇌기능에 장애를 보이는 후천적 임상증후군을 말한다[20]. 원인별 유병률을 보면 알츠하이머형 치매와 혈관성 치매가 대표적으로 두 형태 및 혼합형이 전체의 80-90%를 차지한다[21].

이 중 Alzheimer's disease (AD)는 진행성 치매로 점진적인 뇌위축에 따른 현저한 기억장애를 특징으로 한 원발성 퇴행성 대뇌질환으로[22], 원인에 있어서는 아직 확실히 밝혀진 바가 없는 가운데[23], 신경반 구조의 주된 구성성분이며 amyloid precursor protein(APP)로 부터 잘려 나온 amyloid β protein (이하 Aβ)이 되기 직전의 물질로 추정되는 C 단백질이 주된 병인물질로 알려지고 있다[24].

반면에 혈관성 치매의 경우 대다수는 뇌졸중 후에 나타난다. 뇌졸중에 의한 뇌신경세포의 손상은 허혈로 야기되는 산소부족에 의한 것과 재관류시에 나타나는 활성산소에 의한 것이 있는데, 대부분의 뇌허혈은 일시적이며 뇌허혈 당시보다는 재관류시에 산소가 조직으로 재공급될 때 활성산소가 생성되어 조직 손상이 더욱 강하게 일어난다[25].

특히 이러한 치매 가운데에서도 혈관성 치매는 뇌혈관 질환이 우리나라에서 발병률이 높기 때문에 중요한 질환이며[10] 다른 치매와 달리 예방과 치료에 가능성이 많은데도 불구하고 상대적으로 많은 연구가 이루어지지 않고 있어 이에 대한 연구가 절실한 실정이다[20].

韓醫學에서 痴呆에 대한 최초의 기록은 明代

張[26]의 <景岳全書・雜病模, 癲狂痴獸篇>에 痴獸란 病名으로 처음 언급되었으며, 以後, 呆病[27], 癲狂[28], 健忘[28),45], 虛勞[30] 등의 範疇에서 다루어졌는데[31),32], 淸代의 陳[41]은 그의 著書 <石室秘錄>에서 呆의 症狀과 함께 治療에서 治痰의 중요성을, 錢[27]은 <辨證奇聞全書>에서 呆病의 病因病機와 症狀에 관하여 비교적 자세한 설명을, 黃[33]등의 <實用中醫內科學>에서는 "痴呆于稱呆病..... 數日不之飢餓等 此類患者多不能獨自處理日常生活 甚至不能 抵御危險傷害" 이라 定義하였다. 主된 原因으로 陳[41]은 呆病의 主要原因을 痰으로 보았고, 錢[27]은 肝氣鬱結과 胃氣衰退로 胸中의 痰이 鬱滯되어 痴呆가 發한다고 하였으며, 黃[33]등은 肝腎不足을 老年痴呆의 主要한 病因으로 보았다.

또한 기억력 장애가 주증상인 "健忘"에 대한 기록으로는 <素問・調經論>[34]에 "血幷於下氣幷於上亂而喜忘", <靈樞・大惑論>[34]에 "上氣不足, 下氣有餘, 腸胃實而心肺虛, 虛則營衛留於下, 久之不以時上, 故善忘也" 그리고 <靈樞・本神篇>[34]에서는 "腎盛怒而不止則傷志志傷則喜忘其前言"이라고 하였다. <東醫寶鑑>[17]에서는 <古今醫鑑>[26], <丹溪心法附餘>[35], <醫學入門>[28], <萬病回春>[29]등 많은 의서의 내용을 인용하여 여러 원인들을 언급했으며, 處方으로는 引神歸舍丹, 定志丸, 開心散, 加減固本丸, 加味茯苓湯, 聰明湯, 歸脾湯, 加減補心湯등이 있다. 이러한 處方들 중에서 加減固本丸[29]은 "中風後健忘"에 쓴다는 구절이 있는데 이는 뇌졸중 후에 유발되는 혈관성 치매에 대해 이미 그 당시에도 원인과 증상을 유사하게 인식하고 있었음을 추측할 수가 있다.

이러한 痴呆와 健忘에 대한 개념들은 현대의학에서 말하는 치매와 완전히 일치한다고는 볼 수 없으나, 遲鈍, 健忘, 終日不語, 神志淡漠, 閉戶獨處, 口中喃喃自語, 言辭顚倒, 擧動不經, 忽笑忽哭 등의 증상들이 현대의학에서 말하는 치매와 매우 흡사함을 알 수가 있다[36].

본 실험에 사용한 加減補心湯은 龔의<古今醫鑑・健忘>[26]에 "治諸虛健忘等症"이라고 처음 수록되었으며 이후 許의<東醫寶鑑・健忘門>[17]에 기재되어 활용되어 왔다. 구성약물에 대하여 살펴보면 人蔘 白朮 白茯苓 甘草 등은 四君子湯을 이루는 약물들로서 補氣健脾하며, 當歸 生地黃 白芍藥 등은 四物湯을 이루는 약물등로서 補血養陰 할 수 있다. 石菖蒲 遠志製酸棗仁炒는 開竅安神하는 작용을 하며, 麥門冬은 補心淸熱, 知母 黃柏 酒炒는 滋陰降火 補腎陰의 대표적인 약물들이다. 따라서 이들 약물들의 배합인 加減補心湯은 補心健脾 醒腦開竅安神 滋陰補腎의 작용을 나타낼 수 있을 것으로 여겨지며 健忘뿐만 아니라 痴呆에도 일정한 효과가 있을 것으로 사료되나 아직까지 加減補心湯을 이용한 실험연구는 전무한 실정이다.

본 실험에서는 백서의 중대뇌동맥 폐쇄를 통해 뇌허혈을 야기하는 방법을 사용하였는데 이러한 방법은 뇌허혈이 前腦부분에만 국한되고 後腦부분에서는 혈류흐름에 영향을 주지 않기 않기 때문에 뇌허혈 유발 중에 백서의 사망을 최소화 할 수 있어 있을 뿐만 아니라 시술이 비교적 용이하고, 두개골 절개가 필요 없어 손상 범위가 넓지 않아 널리 사용되고 있는 방법이다 [15].

본 실험처럼 백서의 뇌에 공급되는 중대뇌동맥을 차단한 후 주위 혈관을 통해 재관류하게 되면 5-7일 경과 후에 apoptosis와 비슷한 세포손상과 인지 및 학습장애를 일으키게 되는데[37], 신경세포의 손상은 다른 부위에 비해 hippocampus의 CA1 pyramidal neuron등에서 선택적으로 발생 하게 되며 그 기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다[38].

Hippocampus는 medial septal nucleus에 위치한 세포체로부터 투사되는 choline성 신경전달경로로써[39] 학습수행 및 기억력에 관여하는

데, hippocamppus의 손상은 방사형 미로와 같은 공간 기억과제를 학습하는 능력에 장애를 보이게 된다[40]. 본 실험에서도 Ischemia 유발 후 아무런 처치를 하지 않은 대조군의 경우에 학습장애가 심하고, 신경방어 작용이 현저히 낮아진 것으로 관찰되었다.

방사형 미로는 공간 기억과제를 학습하는 학습능력과 학습된 것을 유지하도록 하는 기억력을 알아보기 위한 장치로서, 학습을 기억하는 시간범위, 기억의 저장작용을 매개하는 뇌 조직 및 신경전달물질 등의 약물이 방사형 미로 학습과 기억에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구에 주로 사용된다[41].

본 실험은 미로수행에 관여하며 공간 위치에 대한 단기기억을 중계하는 hippocampus에 대해 신경세포손상의 방어 효과를 관찰해 보았다. 그 결과 誤行路 선택수를 측정하는 획득시행에서 제 1일째는 Normal군을 제외한 실험군들에서는 유의성 없게 나타났으나, 학습이 진행됨에 따라 Control군에 비해 Normal군은 2일~6일째 유의하게 감소하였고($P<0.01$), GBT 1X군은 2일째 ($P<0.05$)에 유의하게 감소하였으며, GBT 6X군은 3일째($P<0.01$), 5일째($P<0.05$), 6일째($P<0.01$)에 유의하게 감소되었다(Table 1, Fig. 2). 그리고 正行路 선택율에서는 Normal군은 73.3±7.18%, Control군은 30.6±7.36%, GBT 1X군은 40.0±3.45%, GBT 3X군은 41.7±5.27%, GBT 6X군은 60.0±3.45%로 각각 나타났으며, Control군에 비하여 Normal군이 유의한 증가($P<0.01$)를, GBT 6X군이 유의한 증가($P<0.05$)를 각각 나타내었다(Table 2, Fig. 3).

이와 같은 결과로 뇌허혈성 모델에서 加減補心湯의 구강투여가 학습장애 및 기억력 회복 효과를 나타냄을 알 수 있었는데 특히 GBT 6X군에서는 誤行路 선택수, 正行路 선택율에서 모두 유의성 있는 변화가 있어 다른 군에 비해 우수함을 알 수 있었다.

또한 방사형 미로에서 나타난 효과를 조직학적으로 평가하기 위해 Cresyl violet염색, ChAT, NGF 및 c-Fos의 발현정도를 관찰하였다.

각 군에서 hippocampal CA1 부위를 Cresyl violet에 염색하여 신경세포의 손상방어 효과를 정량적으로 관찰한 결과 Control군에 비해 Normal군($P<0.01$), GBT 1X군($P<0.05$), GBT 6X군($P<0.05$) 이 유의한 증가를 보였고(Table 3, Fig. 4), 조직학적으로 관찰한 결과 Normal군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도가 높게 나타났으며, GBT 3X군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도는 비슷한 정도로 나타났고, GBT 1X군과 GBT 6X군은 Control군에 비하여 발현이 높게 나타났다(Fig. 5). 이는 加減補心湯의 구강투여가 국소뇌허혈로 유발된 Hippocampus에서 신경세포의 손상을 방어하였음을 보여주고 있다.

또한 hippocampal CA1부위의 ChAT 발현상태를 정량적으로 평가한 결과는 Control군에 비해 6X군이 유의하게 증가하였고($P<0.05$)(Table 4, Fig. 6), 조직학적으로 관찰한 결과는 Normal군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도가 높게 나타났으며, GBT 3X군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도는 비슷한 정도로 나타났고, GBT 1X군은 Control군에 비하여 발현이 다소 높은 경향을 나타내었고, GBT 6X군은 Control군에 비하여 발현이 높게 나타났다(Fig. 7). ChAT 발현 정도가 증가한다는 것은 기억력 및 학습능력의 저하가 회복되고 있음을 의미한다고 볼 수 있다.

Nerve growth factor(NGF)는 1950년대 Levi-Montalcini가 mouse sarcoma에서 분리한 27kD의 단백질로서 교감성 말초신경 세포와 감각신경 세포에서 신경영양물질로서 작용

한다[42]. NGF는 신경계에 광범위하게 분포되어 있으며, 특히 NGF receptor에 대한 면역조직화학 연구에 의하면 NGF가 MS, DBB, NBM등에 많이 존재하며 choline성 신경세포와 공존함이 밝혀졌다[43]. 이러한 NGF가 해마에 注入되면 역행성 축삭 이동에 의해 MS-DBB complex의 choline성 신경세포에까지 전달되며[44], Ach 합성 효소인 choline acetyl-transferas(ChAT)의 합성과 방출을 증가시켜 choline성 신경세포의 재생 및 변성방지 역할을 하고[45], 그 외에도 중추신경계와 말초 신경계에 중요한 영향을 미친다[46]. 최근에는 배양된 pheochromo-cytoma(PCI2)세포에서 NGF가 ChAT[47]와 galanin[48]의 발현을 유도한다는 보고도 있다.

본 실험에서 hippocampal CA1 부위의 NGF 발현 상태를 정량적으로 평가한 결과는 GBT 6X군($P<0.05$)에서 유의한 증가를 보였고 (Table 5, Fig. 8), 조직학적으로 관찰한 결과는 Normal군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도가 높게 나타났으며, GBT 3X군은 Control군에 비하여 신경세포 발현의 농도는 비슷한 정도로 나타났고, GBT 1X군은 Control군에 비하여 발현이 다소 높게 나타났고, GBT 6X군은 Control군에 비하여 발현이 높게 나타났다(Fig. 9). NGF 발현의 유의성 있는 증가는 Cresyl violet염색으로 본 신경손상 정도의 감소 및 ChAT의 발현정도가 증가하는 것과 일관성이 있으며 결국 加減補心湯의 구강투여가 신경세포의 재생 및 변성방지 역할에 일정한 효과가 있음을 증명하고 있다.

해마 부위에서 c-Fos는 조기 발현 유전자의 하나로서 세포외 자극에 대하여 매우 짧은 반감기를 갖는 mRNA를 생산하여 순식간에 발현되는 특성이 있다[49]. c-Fos의 생성을 유도하는 세포외 자극으로는 신경전달 물질, 탈분극 조건, 칼슘유입을 자극하는 인자, 신경성장요소 외에도 경련, 허혈, 저산소증, 고체온, 직접적인 뇌손상, 스트레스, 통증, 에탄올 등이 있다. 자극을 주지 않은 상태의 성숙 뇌에서 c-Fos는 뇌 전역 특히 이상피질(piriform cortex), 전후각핵(anterior olfactory nucleus), 분계선조(stria terminalis)등에 발현하며 변연계에도 발현을 하여 정상적인 신경세포 기능에 관여하는 것으로 추정되고 있다[50]. 정상적인 중추신경계는 여러 가지 외부 자극에 반응해서 즉각적이고 일시적으로 c-Fos를 생성한다. 이러한 조기 발현 유전자는 신경세포에서만 발현되는 것은 아니지만 신경세포의 활성도를 측정하는 지표로 흔히 사용된다[51].

해마에서 일어나는 단기 및 장기 기억의 기전은 신경전달 물질의 수용체 활성화 이후 신경전달 체계의 활성화에 의한 것으로 보여지고 있다[52]. 특히 장기 기억은 조기 발현 물질 및 후기 반응 유전자의 발현에 의해 형성되는 것으로 추정되고 있는데 조기 발현 유전자인 c-Fos는 CRE부위를 가지고 있어 유전자 전사 활성인자인 CREB(cyclic AMP response element-binding protein)의 결합에 의하여 그 발현이 증가되고 후기 반응 유전자의 발현에도 관여하여 장기 기억을 형성하는 것으로 알려져 있다[53]. 이처럼 해마부위에서 c-Fos의 발현과 기억능력 간에는 밀접한 연관이 있을 것으로 추정되고 있다[52].

본 실험에서 hippocampal CA1 부위의 c-Fos 발현 상태를 정량적으로 평가한 결과 GBT 6X군($P<0.05$)에서 유의한 감소를 보였고 ($P<0.05$)(Table 7, Fig. 10), 조직학적으로 관찰한 결과는 Normal군은 Control군에 비하여 발현이 적게 나타났으며, Control군에 비하여 GBT 1X군과 GBT 3X군에서 발현이 높게 나타났고, GBT 6X군에서 발현이 낮게 나타났다 (Fig. 11). 이는 위의 Cresyl violet염색으로 본 신경세포손상 정도의 감소 및 ChAT와 NGF의

발현정도가 증가하는 것과 함께 뇌허혈에 의한 대사적 스트레스를 억제하여 신경세포손상에 일정한 보호효과가 진행되었음을 알 수 있었다.

이상과 같이 白鼠의 중대뇌동맥을 폐색시켜 유발된 허혈성 국소 뇌손상 모델에 대한 加減補心湯의 구강투여 실험 결과 방사형 미로를 이용한 행동학적 변화에 있어 공간 학습능력 및 기억측정에서 유효한 회복이 관찰되었고, 신경화학적 변화에 있어서도 hippocampal CA1에서 choline성 뉴런의 보호 작용에 일정한 효과를 관찰하였는데, 특히 加減補心湯의 6X군의 경우 거의 모든 항목에서 유의성을 보임으로써 加減補心湯의 경우 濃度도 실험 결과에 상당한 영향을 미쳤음을 관찰할 수 있어 임상적 응용시 고려해야할 사항으로 사료되며 추후 다른 약재 및 처방과도 비교실험을 통해 객관적 진료 표준화가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

加減補心湯이 백서에 중대뇌동맥폐색으로 야기된 허혈성 뇌손상에서 방사형 미로학습과 신경세포 손상에 의한 효과를 연구한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 방사형 미로 학습에서 誤行路 선택수는 대조군에 비해 加減補心湯 1배 구강투여군은 2일째에 유의하게 감소하였으며, 加減補心湯 6배 구강투여군은 3일, 5일 및 6일째에 유의하게 감소되었다.

2. 방사형 미로 학습에서 正行路 선택율은 Control군에 비해 加減補心湯6배 구강투여군이 유의하게 증가하였다.

3. Cresyl violet 염색을 통한 신경세포 손상방어 효과에서는 Control군에 비해 加減補心湯 1배 구강투여군, 加減補心湯 6배 구강투여군이 유의하게 증가하였다.

4. ChAT 발현에서 Control군에 비해 加減補心湯 6배 구강투여군이 유의하게 증가하였다.

5. NGF 발현에서 Control군에 비해 加減補心湯 6배 구강투여군이 유의하게 증가하였다.

6. c-Fos 발현에서 Control군에 비해 加減補心湯 6배 구강투여군이 유의하게 감소하였다.

이상의 연구결과를 종합하여 보면 加減補心湯은 뇌허혈로 유발된 백서의 기억력 회복과 신경세포 손상을 억제하였으므로, 뇌의 혈관성 허혈 증후에 의한 치매에 대해서도 임상적 활용이 가능할 것으로 사료되며 향후 이에 대한 지속적인 연구가 진행되어져야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 金基錫譯. Richard F. Thompson著. 腦. 서울:星苑社. 1989:28, 35.
2. 楊維傑編. 黃帝內經譯解(素問). 서울:成輔社. 1980:1-12, 42-61, 100-103, 131-145, 206-211, 455-468, 701-704.
3. 李淸福・劉渡舟 編著. 中醫精神醫學. 天津:天津科學技術出版社. 1988:211-212.
4. 李時珍. 本草綱目. 서울:高文社

1973:603-604.
5. 王淸任. 醫林改錯. 臺聯:國風出版社. 1975:22-25.
6. 程如海. 略論張錫純心腦共主神明說. 北京:北京中醫學大學學報. 1996;19(6):12.
7. 鄭彝倫. 從腦神與五臟神相關學說探討郁症的 治原則.北京:中醫學硏究. 1998;14(7):3-4.
8. 柳道坤. 東醫生理學講義. 益山:圓光大學校出版局 1996:267-270, 365-377, 413-415, 506-507.
9. 오연환, 정승현, 박인식, 신길조, 이원철. 淸肺瀉肝湯이 중대뇌동맥 폐쇄 후 재관류에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(2):161-174.
10. 김원찬, 김영석, 문상관, 고창남, 조기호, 배영섭, 이경섭, 박정미. 중풍환자의 혈관성치매에 대한 임상적 관찰. 대한한방내과학회지. 1998;19(2):50-59.
11. Pulsinelli WA and Brierley JB. A new method of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke. 1979;10:267-272.
12. Smith ML, Bendek G, et al. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat, 2. A 2-vessel occlusion model. Acta Neural Scand. 1984;69:385.
13. Ogata J, Fujishima M, Tamaki K, et al. An ultra-structural study of developing cerebral infarction following bilateral carotid artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. Act Neuropath. 1977;40:171-177.
14. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Summins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989;20:84-91.
15. 김인세, 박두진, 권재영, 김해규 외. 백서의 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 허혈성 뇌손상 모델에서 Dexamethasone과 MK-801이 뇌부종 형성에 미치는 영향. 대한마취과학회지. 1999;37:327-333.
16. 龔信. 중화의서집성 古今醫鑑. 북경:中醫古籍出版社. 1999:124-125.
17. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:여강출판사. 1994:123-126.
18. 郭字鵬外. 謝海洲治療腦萎縮經驗. 北京:中醫 雜誌. 1997;38(10):586-587.
19. 張明准外. 心-腦-神志病辨證論治. 黑龍江科 學技術出版社出版. 1988:5-10, 100-112.
20. 곽동일. 노인성 痴呆. 노인정신의학. 1997;1(1):3-15.
21. 김현아. 노인성 치매에 관한 동서의학적 비교 고찰. 대한한방내과학회지. 1992;13(2):58-62, 66-67.
22. Hamdy RC, Tumbull JM, Clark W, Lancaster MM. Alzheimer's disease. A handbook for caregivers 2nd edition. Activities. 1995;19(3):65~66.
23. Reznik-Wolf H, Machado J, Haroutuian V, DeMacro L, Walter GF, Goldman B, Davidson M, Johnston JA, Lannfelt L, Dani SU, Friedman E. Somatic mutation analysis of the APP and Presenilin 1 and 2 genes in Alzheimer's disease brain. J Neurogenet. 1998;12(1):55-65.
24. Li WY, Butler JP, Hale JE, McClure DB, Little SP, Czilli DL, Simmons LK. Suppression of an amyliod beta peptide-mediated calcium chnnel response by a secreted beta-amyloid precursor protein. Neuroscience. 2000;95(1):1-4.

25. McCord, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N. Engl. J. Med. 1985;312(3):159~163.
26. 張介賓. 國譯 景岳全書. 第三冊. 서울:大星文化社. 1992:841-849.
27. 錢鏡湖. 辨證奇聞全書. 서울:甘地出版社. 1990:233-235.
28. 李梴. 編註醫學入門. 卷二. 서울:大星文化社. 1984:180-182.
29. 龔廷賢. 增補萬病回春. 서울:一中社. 1994:229-230.
30. 孫思邈. 備急千急要方. 卷四十. 서울:杏林出版社. 1976:12-13.
31. 李東垣 外. 痴呆에 관한 東西醫學的 比較考察. 대한한방내과학회지. 1995;16(1):2-5, 11, 14.
32. 鄭仁哲 外. 痴呆에 對한 文獻的 考察, 동의신경정신과학회지. 1996;7(1):77-94.
33. 黃大東 外. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1989:378-381.
34. 馬元臺, 張隱庵. 黃帝內經素問靈樞合編. 臺北:臺聯國風出版社. 1986:59, 411, 464, 532.
35. 走震亨. 丹溪心法附餘. 서울:大星文化社. 1993:358-359.
36. 황의완, 김종우, 이조희, 엄효진, 이승기. 치매에 대한 한의학적 임상 연구, 동의신경정신과 학회지. 1996;7(1):1-13.
37. Buchan AM, Pulsinelli WA. Hpothermia but not the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. J Neurosci. 1990;11:1049-1050.
38. Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, et al. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. Neurology. 1987;37:1281-1286.
39. Johnston M, Mckinney M, Coyle J. evidence for a cholinergic projection to neocortex form neurons in basal forebrain. Proceedings of th National Academy of Science. 1979;76:5392-5396.
40. Sutherland RJ, Rodriguez AJ. The role of the fomix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. Behavioral Brain Research. 1989;32:265-277.
41. Miyagawa M, Honma T, Sato M. Effect of subchronic exposure to toluene and reference memory in rats. Neurotoxicol Teratol. 1995;17(6):657-664.
42. Levi-Montalcine R and Angeletti PU. The nerve growth factor. Physiol Res. 1968;8:534-559.
43. Kordower JH, Bartus RT, Bothwell M, et al. Nerve growth factor immunoreactivity in the nonhuman primat(Cebus apella) ; distribution, morphology, and colocalization with choloinergic enzmes. J Comp Neurol. 1988;277:465-486.
44. Schwab ME, Otten U, and Agid Y. Nerve growth factor(NGF) in the rat CNS. Brain Res. 1979;168;473-483.
45. Gage FH, armstrong DM, Willians LR, et al Morphological response of axotomised septal neurones to nerve growth factor. Jcomp Neurol. 1988;269:147-155.
46. Hefti F, Hartikka J, Eckenstein F, et al. Nerve growth factor increases choline acetyltransferase but not survival of fibero utgrowth of cultured fetal septal cholinergic neurons. Neuroscience. 1985;14:55-68.
47. Heumann RM, Schwab R, and Thoenen

H. Nerve growth factor mediated induction of choline acetyltransferase in PCI2 cells ; Evaluation of th site of action of nerve growth factor and the involvement of lysosomal degradation products of nerve growth factor. J Neurosci. 1984;4:3039-3050.

48. Kapaln LM, Hooi SC, Abracrinkas DR, et al. Neuroendocrine regulation of galanin expression. Neu York:MacMillan. 1991:43-65.
49. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. Science. 1988; 240:1328-1331.
50. 이원택, 손민균, 정경승, 이홍석, 박경아. 말초신경 손상이 실험적으로 유발된 흰쥐의 척수신경절 및 척수 후각내 신경세포의 형태학적 변화에 관한 연구. 대한해부학회지. 1997;30:495-510.
51. Lima D, Avelino A, Coimbra A. Differential activation of c-fos in spinal neurones by distinct classes of noxious stimuli. Neuroreport 1993;4:747-750.
52. Zahn PK, Brennan TJ. Intrathecal metabotropic glutamate receptor antagonists do not decrease mechanical hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. Anesthesiology. 1998;87:1354-1359.
53. Zahn PK, Brennan TJ. Lack of effect of intrathecally administered N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in a rat model for postoperative pain. Anesthesiology. 1998;88:143-156.