동의신경정신과 학회지 제22권 제2호(2011년 6월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2011;22(2):85-105

拱辰丹과 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제의 기억력과 인지기능 개선 및 항불안에 관한 연구

최철홍, 김수현, 정대규

대구한의대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Studies on the Nootropic and Anti-amnestic and Anxiolytic-like Effects of G.J.D-P.P.A. in Mice

Cheol-Hong Choi, Soo-Hyun Kim, Dae-Kyoo Chung

Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Abstract

Objectives :

The purpose of this study was to characterize the neuroprotective effects and anxiolytic-like effects of Gongjin-dan and *Polygala japonica, Polygala tenuifolia, Acorus gramineus* mixed pills(G.J.D-P.P.A.).

Methods :

The neuroprotective effects of G.J.D-P.P.A. determined by the passive avoidance and Y-maze tasks and Morris water maze task, and the anxiolytic-like effects of the G.J.D-P.P.A. using an elevated plus-maze(EPM) in mice.

Results :

Drug-induced amnesia was induced by treating animals with scopolamine(1 mg/kg, i.p.). A single G.J.D-P.P.A.(400 and 800 mg/kg) administration significantly enhanced cognitive function and attenuated scopolamine-induced cognitive impairments as determined by the passive avoidance and Y-maze tasks($P < 0.05$) and also reduced escape-latency on the Morris water maze task($P < 0.05$). The administration of GJD-PPA(400 and 800 mg/kg) significantly increased the percentage of time spent in open arms and entries into the open arms of the EPM compared with saline-treated control group($P < 0.05$). Moreover, there were no changes in the locomotor activity and myorelaxant effects in any group compared with saline-treated control group.

Conclusions :

These results suggest that GJD-PPA dramatically possesses the anti-amnestic and cognitive-enhancing activities related to the memory processes, and promotes the anxiolytic-like activity in mice.

Key Words :

Gongjin-dan, *Polygala japonica, Polygala tenuifolia, Acorus gramineus*, Learning and memory, Anxiety

투고 : 2011. 05. 09. 수정 : 2011. 06. 08. 채택 : 2010. 06. 13.
교신저자 : 정대규, 경북 포항시 남구 대잠동 907-8번지 대구한의대 포항한방병원
Tel) 054-281-0055, Fax) 054-281-7463, E-mail) chung@dhu.ac.kr
이 논문은 2011년 2월 대구한의대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 박사학위 논문임

Ⅰ. 緖 論

치매(Dementia)는 여러 가지 원인질환에 의해 기억력을 비롯한 인지기능이 저하되고 불안, 우울, 행동장애 등의 비인지적 증상들이 동반되며 대개 만성적으로 진행하여 일상생활의 유지에도 장애를 초래하는 증후군이다[1]. 불안과 우울은 치매에서 가장 흔하게 나타나는 정서적 문제로, 불안은 광범위하게 매우 불쾌한, 그리고 막연히 불안한 느낌으로, 생체가 친숙하지 않은 환경에 적응하고자 할 때 나타나는 기본적인 반응양상이며 이와 관련하여 신체증상과 행동증상이 동반된다[2]. 이러한 정서적 문제는 인지 기능의 악화를 초래하고, 또한 불안은 인지기능과 일상생활수행능력이 낮을수록 그 정도가 높아진다[3]. 이런 치매에는 Alzheimer's Disease(AD), Vascular Dementia(VD), 중독성 치매 등이 있으며 이 중 AD가 50% 이상을 차지한다[4].

현재 치매에 사용되는 약물들이 있지만 이들은 효과가 일시적이며 간독성과 다른 수용체와의 작용 등으로 장기간 사용하는 데는 문제가 있고[5], 불안을 치료하는 benzodiazepine계 약물은 임상적으로 항불안 효과뿐만 아니라 과도한 진정, 근육이완 등의 부작용 때문에 사용에 신중을 기해야 하는 단점이 있어[6], 부작용이나 독성이 적은 새로운 치료약물의 개발 및 기존 약재의 효능을 재발견하여 치료에 이용할 필요성이 있다.

한의학에서 치매는 痴呆[7], 呆病[8]의 범주에, 불안은 驚悸와 怔忡[9,10]의 범주에 속한다. 痴呆의 원인은 稟賦不足, 肝腎不足, 心腎不交, 七情傷, 痰飮 등이 있고 塡精補髓, 滋補肝腎, 割痰順氣 등의 治法이 있으며, 驚悸와 怔忡의 원인은 心膽虛怯, 心血虧損, 心氣不足, 肝腎陰虛, 痰飮內停 등이 있고 補血安神, 祛痰淸神, 寧心壯膽 등의 治法이 있다[11].

拱辰丹은 《世醫得效方》[12]에 최초로 수록된 처방으로, 天元一氣를 固密하게 하고 水升火降을 순조롭게 하여 心腎을 補益하고 臟腑의 虛損을 治療하는 補益强壯劑로 노화로 인한 각종 질환에 사용되어 왔다[13]. 遠志와 石菖蒲는 聰明湯[13]의 구성약재로 기억력을 개선시키는 효능이 있고, 靈神草는 이[14]의 연구에서 항우울 효과가 있는 것으로 보고되어 함께 사용하면 寧心安神, 祛痰利竅하여 心鬱을 散할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 拱辰丹과 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제를 같이 사용하면 心腎交通, 寧心安神하여 기억력과 인지기능을 개선하고 항불안 작용을 할 수 있을 것으로 사료된다.

최근 기억장애나 불안에 대해 임상에서 활용되는 복합처방이 학습과 기억력 감퇴에 미치는 영향에 대한 연구[15]와 복합처방 및 단일 약물의 항불안 효과에 대한 연구[16]가 보고되었으나, 拱辰丹과 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제가 기억력과 인지기능 개선 및 항불안 효과에 대한 연구는 아직 보고된 적이 없었다.

이에 저자는 拱辰丹과 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제의 기억력과 인지기능 개선 및 항불안 효과를 실험적으로 규명하고자, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델의 생쥐를 이용하여 Passive avoidance test, Morris water maze test, Y-maze test 및 뇌 조직 Acetylcholinesterase (AchE) 활성 실험을 이용한 동물행동실험을 통하여 기억력 개선 작용을 관찰하였고, 또한 Elevated plus-maze, Open field test, Horizontal wire test를 이용한 동물행동실험을 통하여 항불안 효과를 관찰하고, 이러한 항불안 작용이 어떤 기전을 통하여 발생하는지 5-HT_{1A}수용체와 $GABA_A$ 수용체의 antagonist를 사용하여 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 材料

1) 실험동물

실험동물은 수컷의 ICR mouse (SPF/VAF CrljBgi: CD-1) 5주령을 주식회사 오리엔트(경기도, 한국)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 대구한의대 동물실에서 7일간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도 23±3 ℃, 습도 50±10% 내외, 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지된 사육실에서 다섯 마리씩 polycarbonate mice cage에 수용하여 사육하였으며, 적응기간 동안 사료와 물을 제한 없이 공급 받았다.

2) 시험물질

본 실험에 사용한 tacrine(9-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroacridine hydrochloride), (-) scopolamine hydrobromide, acetylthiocholine iodide and DTNB (5, 5′-dithiobis [2-nitrobenzoic acid]), Tween 80 (Polyethylene glycol sorbitan monooleate), Sodium chloride, Diazepam(7-chloro-1,3-dihyrdo-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepine-2-one), WAY 1000635 (N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexane carboxamide maleate salt), Imipramine hydrochloride(10,11-Dihydro-N, N-dimethyl-5H-dibenz[b,f]azepine-5-propan-aminehydrochloride), flumazenil($C_{15}H_{14}FN_3O_3$)은 시그마(Sigma, USA)의 제품을 사용하였으며 기타 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다.

3) 시료의 준비

본 실험에 사용한 拱辰丹(이하 G.J.D; Gongjin-dan)과 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제(이하 P.P.A.; *Polygala japonica, Polygala tenuifolia, Acorus gramineus*)는 대구한의대학교 부속한방병원에서 공급받아 사용하였으며 拱辰丹과 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제를 일정 비율(1:1)로 혼합 제조한 복방 혼합제제를 "G.J.D-P.P.A."이라고 명명하였다. 處方에 대한 구성내용과 1제의 분량은 Table Ⅰ과 같다.

Table Ⅰ. Prescription of G.J.D-P.P.A.

Herbs	Pharmacognosy name	Dose (g)
麝香	Moschus / *Moschus moschiferus*	18.75
鹿茸	Cervi Pantotrichum Corunu / *Cervus nippon*	150
當歸	Angelicae Gigantis Radix /*Angelica gigas*	150
山茱萸	Corni Fructus / *Cornus officinalis*	150
靈神草	Polygalae Folium / *Polygala japonica*	156.25
遠志	Polygalae Radix / *Polygala tenuifolia*	156.25
石菖蒲	Acori graminei Rhizoma / *Acorus gramineus*	156.25
	Total	937.5

4) 시험장치

본 실험에 사용한 시험 장치는 아래와 같다

Evaporator(Eyela, SB-1000, Japan)

Freezing dryer(Eyela, FDU-1000, Japan)

Ethovision system(Noldus, Wageningen, Netherlands)

- Morris water maze system(Scitech, Korea)
- Y-maze system(Scitech, Korea)
- Elevated plus-maze(Scitech, Korea)
- Experimental box for place preference(Scitech, Korea)

Sonicator(Hwashin 410/510, Korea)

Water bath(Vision Scientific, Korea)

Active / Passive avoidance system(Gemini, San Diego, USA)

Animal room(Orient Bio, Korea)

Obital shaker(Dai Han Sci, SHO-2D, Korea)

Teflon homogenizer(Eyela, Japan)

Potter-Elvehjem Tissue Grinders(DaiHan, Korea)
UV Spectrophotometer(Mecasys Co. Ltd., Optizen 2120, Korea)

2. 方法

1) 약물처리

G.J.D-P.P.A.를 생리식염수에 녹여 100, 200, 400 및 800 mg/kg 용량으로 실험 시작 1시간 전에 경구투여하였으며, 기억손상 유도를 위해 인지시험 30분 전에 scopolamine을 1 mg/kg의 용량으로 생리식염수에 녹여 복강투여하였다. 대조군에는 G.J.D-P.P.A.군과 동일 부피의 10 % Tween 80을 경구투여하였으며, 30분전에 생리식염수를 복강투여하였다. Tacrine군에는 생리식염수에 녹인 tacrine(10 mg/kg)을 실험 시작 1시간 전에 경구투여하고 30분전에 scopolamine을 복강투여하였다.

항불안 실험에서도 동일한 방법으로 G.J.D-P.P.A.를 투여하였으며, Diazepam군으로는 diazepam (1 mg/kg, i.p)을 실험 30분 전에 복강투여하였다. 약물투여는 실험 시작 1시간 전에 투여가 종료되도록 하였으며, 대조군은 10% Tween 80을 경구투여하였다.

2) 수동회피시험(Passive avoidance test)

(1) 조건회피 반응장치(Gemini avoidance system)

조건회피 반응장치는 shuttle box(52.6×17.3×21.3 cm)의 크기로 동일한 크기의 두 방으로 나뉘어 있으며, 두 방을 나누는 벽에는 guillotine door(8.9×8.9 cm)가 설치되어 있어 자동으로 상하로 열고 닫을 수 있게 되어 있다. 우측 방에는 매우 밝은 전구가 설치되어 있어 실험동물이 싫어하는 밝은 환경을 조성할 수 있게 하였다. 좌측 방에는 빛이 전혀 들어오지 않게 하여 실험동물이 상대적으로 편안함을 느끼게 하였다.

(2) 수동회피시험

실험은 LeDoux[17]의 방법을 응용하여 시행하였다.

실험 시작 1시간 전에 mouse를 행동관찰실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시켰다.

① 학습시험(training trial)

왕복상자의 우측 방에 불을 켜고 mouse의 머리가 gillotin door의 반대쪽으로 향하게 살며시 내려놓는다. mouse를 10초간 탐색시킨 후 gillotin door를 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다. mouse는 방을 탐색하다가 본능적으로 어두운 좌측 방으로 이동하게 되는데, 이때 gillotin door가 열린 후 40초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 mouse는 실험에서 제외시켰다. 일단 mouse가 어두운 쪽으로 들어가면 gillotin door가 닫히고 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 grid 바닥을 통해 흐르게 되고 mouse는 이를 기억하게 된다. gillotin door가 열린 후 mouse가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다.

② 기억검사(test trial)

기억검사는 학습시험이 끝난 후, 24시간 후에 장기기억에 미치는 G.J.D군, P.P.A.군 및 G.J.D-P.P.A.군의 효과를 확인하고자 실시하였다. mouse를 왕복상자에 넣고 10초 동안 탐색시간 후 gillotin door가 열리고 어두운 쪽으로 mouse의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time; 머무름 시간)을 300초까지 측정하였다. 어두운 쪽으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다[18].

3) Morris 수중미로 장치(Morris water maze)에 의한 학습 및 기억력 측정

수동회피시험을 통하여 효과가 우수한 G.J.D 군, P.P.A군. 및 G.J.D-P.P.A.군을 선별하여 Morris 수중미로 시험을 실시하였다.

Morris 수중미로 장치를 통한 인지력 개선에 대한 실험은 이미 치매 개선약물의 스크리닝의 한 방법으로 알려져 있다[19]. 본 maze의 제원은 지름 90 cm, 높이 45 cm이며 플랫폼(white platform)의 지름은 6 cm로 구성되어 있다. 수중미로의 주변은 비디오카메라와 연결된 컴퓨터 시스템과 수온조절용 장치 등 공간단서들을 항상 일정하게 유지시켰다.

실험방법으로는 maze에 물의 높이가 30 cm가 되도록 물을 채우고 mouse가 플랫폼을 볼 수 없도록 물 높이의 1 cm 밑에 설치하였다. Maze에는 4개의 marker를 사용하여 4분원이 되도록 나누어서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분하였고, maze의 한 4분원에 플랫폼을 설치하였다. Morris 수중미로 실험은 6일 동안 진행하는데, 첫째 날에는 각 mouse들이 물에 대하여 적응을 할 수 있도록 1분간 maze 안에서 자유로이 수영하도록 하고, 이때 플랫폼은 설치하지 않았으며, 두 번째 날부터 5일 째 되는 날까지는 하루에 각각의 mouse가 1일 4회씩 10분 간격으로 1분 동안 maze에서 수영하도록 하였다. 두 번째 되는 날부터 5일 째가 되는 4일간 1회의 실험방법은 이미 maze 안에 설치한 플랫폼에 1분 이내에 10초간 올라가 있는 mouse는 실험을 마치고 1분 이내에 플랫폼을 찾지 못하거나 플랫폼에 10초간 올라가 있지 않은 mouse는 실험종료 후 인위적으로 10초간 플랫폼에 올려둔 후 실험을 종료하며, 이때 플랫폼의 위치는 같은 자리에 고정시켰다. 6일 째 되는 날에는 플랫폼을 maze에서 제거한 후 플랫폼이 있던 분원에 mouse가 머문 시간을 측정하였다.

기억력 손상 유발 물질로는 scopolamine을 사용하며, 투여는 매일 첫 번째 입수 30분전에 1 mg/kg로 복강투여하였다. 4일 동안 투여 후 마지막 5일째에는 시간은 최대 60초를 주고, 약물투여는 하지 않았으며, 모든 실험 data는 Ethovision program(Noldus, Netherlands)을 이용하여 기록 및 측정하였다.

4) Y-미로시험(Y-maze test)

약물 투여는 수동회피시험에서와 같은 방법으로 실시하였다. Y-미로시험에 이용되는 기구는 3개의 arm으로 구성되어 있으며 각 arm의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 arm이 접하는 각도는 120°이다. 모든 실험 장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성되어 있다. 각 가지를 A, B, C로 정한 후 한쪽 가지에 mouse를 조심스럽게 놓고 8분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 mouse가 들어간 가지를 기록하였다. 이 때 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 1점(실제변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학식에 의해 계산된다[20].

변경 행동력(%)

= 실제변경(actual alternation) / 최고변경(maximum alternation) X 100

(최고변경 : 총 입장횟수 - 2)

5) 아세틸콜린 분해 효소 활성 측정(AChE activity assay)

G.J.D-P.P.A.의 활성 측정은 Ellman 등이 서술

한 바와 같이 acetylcholine iodide를 기제로 사용해 흡광도를 측정하는 방법을 사용하였다[21].

AChE의 제조는 Teflon homogenizer를 이용해 mouse의 대뇌피질을 분리하여 10배의 인산완충용액(400 mM NaCl를 포함한 12.5 mM 인산완충용액, pH 7.0)을 첨가하고 조직그라인더(Potter-Elvehjem Tissue Grinders)로 대뇌피질을 분쇄하여 균질액을 1,000 ×g로 10분간 4℃에서 원심분리 후 상등액을 수득하여 그 상등액을 AChE의 시료로 사용하였다.

G.J.D-P.P.A.를 각 농도별로 인산완충용액(100 mM, sodium phosphate buffer, pH 8.0)으로 200 μg/ml의 농도가 되도록 희석하고 희석한 검색 대상 물질 1.5 ml, 완충용액 2.6 ml, 75 mM acetylthiocholine iodide 용액 20 μl 및 Ellman 시약(buffered Ellman's reagent: 10 mM DTNB(5.5'-dithiobis-bis(2-nitrobenzoic acid)) 및 15 mM $NaHCO_3$로 구성된 용액) 100 μl를 혼합하여 25℃에서 30분간 반응시킨다. 그 후 이 용액에 400 μl의 enzyme source를 가하고 5분 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다(Optizen 2120UV). 이때, 대조군으로는 AChE시료를 첨가하지 않고 대신에 saline을 첨가한 반응액을 사용하며 또한, acetylthiocholine iodide를 첨가하지 않고 반응시켜 흡광도를 측정함으로써, G.J.D-P.P.A.와 효소활성 측정용 시약 사이의 비특이적 반응은 일어나지 않음을 확인하고, G.J.D-P.P.A.를 첨가하지 않은 반응액의 AChE 활성도를 100 %로 하였을 때 각 검색 대상 물질을 첨가한 반응액의 AChE 활성 저해도를 확인하였다.

6) Elevated plus-maze(EPM)

(1) EPM을 이용한 G.J.D-P.P.A.의 항불안 작용 확인

항불안 효과는 웅성 ICR mice를 이용하여 EPM에서 측정하였다. Diazepam군(양성대조군)은 diazepam(1 mg/kg, i.p)을 실험 30분 전에 복강투여하였고, G.J.D-P.P.A.군은 100, 200, 400 및 800 mg/kg 용량으로 경구투여하였다. 약물투여는 실험 시작 1시간 전에 투여가 종료되도록 하였다. 대조군은 10% Tween 80을 경구투여하였다. 각 군은 8 - 10마리로 하였다.

약물 투여가 종료된 후 항불안 효과의 측정은 검정색의 아크릴로 제작된 EPM을 이용하였다. 이 장치는 바닥에서 50 cm 높이에 설치된 십자형(+) 미로로서, 4개의 통로 가운데 마주보는 2개(길이 30 cm, 폭 5 cm)는 개방되어 있고, 크기가 동일한 다른 2개의 통로는 높이 20 cm의 벽으로 둘러싸여 있다. 중심 platform은 가로 5 cm 및 세로 5 cm로 하였고, maze의 중앙부 천장에 비디오카메라를 설치하여 동물의 행동을 기록하였으며 광도는 20 lux로 조정하였다. 실험을 시작할 때 mouse는 maze의 open arm에 머리를 밖으로 향하게 놓은 다음 maze를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 행동은 5분 간 관찰하였으며, mouse가 open arm과 closed arm에 머문 시간, 각 arm의 출입 횟수 및 총 이동거리 등을 EthoVision program(Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands)으로 각각 측정하여 항불안 효과를 측정하였다[22]. 각 arm의 출입 횟수는 open arm 이나 closed arm의 교차점을 기준으로 할 때 어느 쪽으로나 네 발이 완전하게 진입되었을 때를 1회로 하고 open arm과 closed arm에 대하여 각각 측정한다. 각 arm에 머문 시간의 측정은 각 arm에 진입된 후 머물러 있던 시간의 총 합을 측정하였다. 각 실험이 끝난 후에는 전 실험동물의 흔적을 지우기 위해 70 % alcohol로 깨끗이 닦아 다음 실험에 영향을 주지 않도록 하였다.

(2) WAY 100635와 flumazenil의 길항작용

G.J.D-P.P.A.의 항불안 효과의 작용 기전을 관찰하기 위해 5-HT_{1A} 수용체의 antagonist인 WAY 100635와 $GABA_A$ 수용체의 antagonist인 flumazenil을 사용하여 EPM에서 측정하였다. G.J.D-P.P.A.는 400 mg/kg 용량으로 경구투여하였으며 실험 시작 30분 전에 각각 WAY 100635(0.3 mg/kg, i.p.)와 flumazenil(10 mg/kg, i.p.)을 병용 투여하였다. 대조군은 10% Tween 80을 동일 용량으로 경구투여하였다. 각 군은 8-10마리로 하였다.

7) Open field test(OFT)

Locomotor activity는 실험동물의 활동성을 측정하는 장치로 약물의 항불안 작용이 동물의 활동성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 실험방법이다. Locomotor activity는 자가 제조된 OFT용 box에서 측정하였다[23]. OFT용 box는 가로 41.5 cm, 세로 41.5 cm, 높이 43 cm가 되도록 제조하고, 하나의 box에서 한 마리씩 측정하였다. G.J.D-P.P.A.군은 100, 200, 400 및 800 mg/kg 용량으로 경구투여하였으며 약물 투여는 실험 시작 1시간 전에 종료되도록 하였다. 대조군은 10% Tween 80을 동일 용량으로 경구투여하였다. 아울러 EPM을 이용한 locomotor activity는 총 이동거리, rearing 횟수로 측정하며 이는 EthoVision program (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands)을 이용하여 측정하였다.

8) Horizontal wire test(HWT)

HWT는 실험동물의 근육이완 상태를 확인하는 실험방법이다. 일반적으로 항불안 약물들은 졸음, 근육이완 등의 부작용을 야기하므로 G.J.D-P.P.A.가 이러한 부작용이 발생하는지를 HWT를 통해 확인하였다. HWT는 양쪽에 기둥을 설치하고 바닥으로부터 30 cm의 높이로 하여 직경 1 mm, 길이 40 cm의 wire를 수평으로 설치하여 측정하였다. 먼저 mouse의 앞발이 wire를 쥐게 한 다음, 꼬리를 아래쪽으로 향하여 놓은 후 한 쪽 뒷발이 wire를 쥐거나, 앞발이 10초 이상 wire에 매달려 있으면 통과로 인정하였다[24].

대조군, 양성대조군인 Diazepam군 및 G.J.D-P.P.A.군을 EPM 시험 완료 후, 5분 간격으로 2번의 HWT를 실시하여 2회의 평균값을 이용하였다.

3. 統計處理

모든 실험 결과는 one way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 통계처리 하였고, 유의성이 인정될 경우 Student-Newman-Keuls Method를 이용하여 95 %($P < 0.05$)신뢰 수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

Ⅲ. 結 果

1. G.J.D-P.P.A.의 수동회피시험에서의 효과

1) G.J.D-P.P.A.의 수동회피시험

Scopolamine(1 mg/kg, i.p.)을 투여한 기억력 감퇴 동물 모델을 이용하여 G.J.D-P.P.A. 100, 200, 400 및 800 mg/kg의 경구 단회투여에 의하여 추출물이 기억력 손상을 억제하여 주는 효과가 있는지 여부를 수동회피 측정 장치를 이용하여 확인하였다.

Scopolamine(1 mg/kg, i.p.)의 투여에 의한 기억력 손상 여부를 확인한 결과 Scopolamine군은 기억시험에서 latency time이 34.75±2.39초로 대조군의 290.75±7.57초에 대하여 통계적으로 유의성 있게 감소하였다($P<0.05$). 이는 학습시험시의

전기 충격을 기억하지 못한다는 것으로 판단되어 scopolamine에 의한 기억력 감퇴 모델이 잘 만들어졌다고 생각된다.

반면에 G.J.D-P.P.A. 100, 200, 400 및 800 mg/kg로 단회 투여한 결과 각각 69.75±17.81초, 85.00±24.65초, 107.63±12.74초 및 141.25±19.92초로 Scopolamine군의 34.75±2.39초에 대하여 통계적으로 유의성 있게 latency time이 증가하였다 ($P<0.05$, Fig. 1).

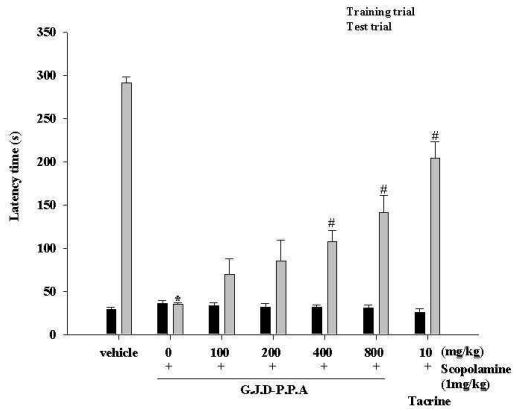


Fig. 1. Effect of a single administration of G.J.D-P.P.A.(100, 200, 400 and 800 mg/kg, p.o.) on scopolamine-induced memory deficits in the passive avoidance test in mice.
Data represent means±S.E.M(N = 8-10). *P < 0.05 as compared with the control group, #P < 0.05 as compared with the scopolamine -treated group.

2. G.J.D-P.P.A.의 Morris 수중미로 장치에 의한 학습 및 기억력 효과

G.J.D-P.P.A.가 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델에서 손상된 기억에 대한 개선 효과를 수동회피시험을 통하여 확인하였고, 공간기억에 대한 G.J.D-P.P.A.의 기억력 개선 효과를 확인하기 위하여 추가적으로 Morris 수중미로 시험을 실시하였다.

1) Morris 수중미로 장치에서의 학습시험 (Training trial)

Morris 수중미로 학습시험에서 4일 동안 60초 이내 플랫폼에 도달하기까지의 소요시간을 측정한 결과 제 1일째 대조군은 52.6±2.9초, Scopolamine군은 53.3±3.4초, Tacrine군은 58.8±1.2초, scopolamine +G.J.D-P.P.A. 400 및 800 mg/kg 투여군은 각각 54.6±3.4초, 51.6±2.7초로 각 집단 간 유의성 있는 차이가 없었으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 4일째에는 플랫폼에 도달하는데 소요되는 시간이 각각 17.9±1.7초, 15.3±3.0초로 집단 간 유의성($P < 0.05$) 있는 차이를 보였다(Fig. 2).

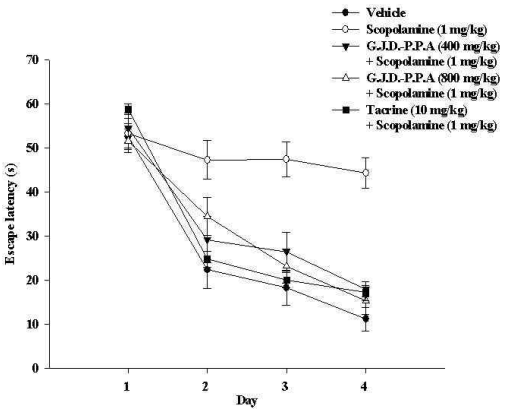


Fig. 2. Effect of G.J.D-P.P.A. on performance in the training trial sessions of the Morris water maze task in scopolamine-induced memory deficits mice.
At 60 min before training trial session, G.J.D-P.P.A. (400 and 800 mg/kg, p.o.) or vehicle(same volume of 10% Tween 80) solution was administered to mice. Memory impairment was induced by scopolamine treatment(1 mg/kg, i.p.). The training trial sessions were composed as described in the Materials and Methods. Data represent means±S.E.M(n=8-10).

2) Morris 수중미로 장치에서의 기억검사 (Retention Test)

Morris 수중미로 학습시험에서 마지막 날인 제 5일째 기억검사를 시행하기 위해 플랫폼을 제거한 후 60초간 자유 수영을 실시하고 이를

Ethovision program을 통하여 총 시간 중 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간을 측정하였다. 각 군의 기억력 측정결과는 대조군은 52.74±2.68초, Scopolamine군은 21.79±1.81초, Tacrine군은 33.16±3.36초, scopolamine+G.J.D-P.P.A. 400 및 800 mg/kg 투여군은 41.67±2.23초, 46.55±2.32초로 집단 간 유의성(P<0.05) 있는 차이를 보였다. 이에 플랫폼에 머무르는 정도에 대한 집단별 사후검정 결과, Scopolamine군은 대조군에 비해 유의한(P<0.05) 감소가 나타났고 G.J.D-P.P.A. 400 및 800 mg/kg에서 Scopolamine군에 비해 유의성(P<0.05) 있게 증가를 보였다(Fig. 3).

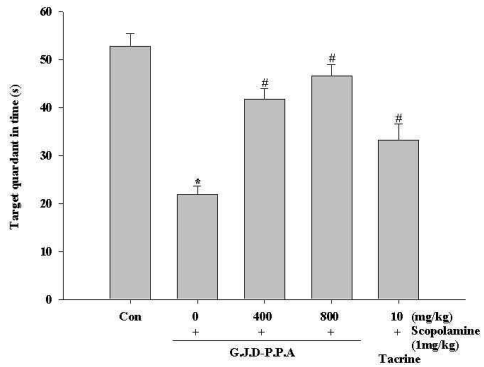


Fig. 3. Effect of G.J.D-P.P.A. on performance in the probe trial session of the Morris water maze task in scopolamine-induced memory deficits mice.
The the probe trial sessions were composed as described in the Materials and Methods. Data represent means±S.E.M(n = 8-10). (*P < 0.05 versus control group, #P < 0.05 versus scopolamine-treated group).

3. G.J.D-P.P.A.의 Y-미로시험 (Y-maze test)에서의 효과

단기기억 형태의 공간인지력을 평가하는 Y-미로 시험에 의한 변경행동력과 총 출입 횟수는 Fig. 4와 같다. 대조군과 Scopolamine군, G.J.D-P.P.A. 군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 관찰 할 수 있었다(P<0.05, Fig. 4). 즉, Scopolamine군의 경우 기억력이 손상되어 변경 행동력 점수가 평균 20.80±3.25%인 반면 대조군은 평균 59.54±2.42%를 기록하였다. 한편, G.J.D-P.P.A. 400 및 800 mg/kg 투여군의 경우 43.66±2.24%, 48.04±3.28%를 기록하여, 대조군과 통계적으로 용량 의존적으로 유의한 인지기억력 향상을 보여 주었다. 반면에 각 구역으로 들어가는 총 횟수를 나타내는 total entry에서는 변화가 없는 것으로 나타나 수동회피 시험에서 확인 하였듯이 spontaneous alternation이 mouse의 활동성 변화에 의해 나타난 것이 아님을 알 수 있었다(P<0.05, Fig. 4).

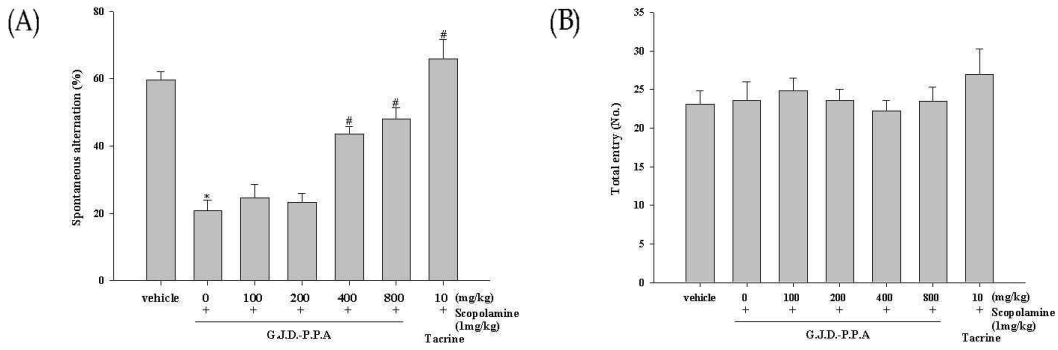


Fig. 4. Effect of a single administration of G.J.D -P.P.A. on scopolamine-induced memory deficits in Y-maze test in mice.
A; spontaneous alternation, B; total arm entry. Data represent means ± S.E.M(N = 8-10). *P < 0.05 as compared with the control group, #P < 0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

4. G.J.D-P.P.A.의 AChE 활성 측정 결과

먼저 G.J.D-P.P.A.가 AChE의 활성을 억제하여 기억력 및 인지능력 개선작용이 있는지 확인하기 위하여 AChE 활성시험을 측정하였다. 실험결과 양성대조군인 Tacrine군은 용량 의존적으로 AChE 활성을 억제하였으나 G.J.D-P.P.A. 군의 AChE 활성 억제능 시험에서는 아무런 효과를 나타내지 않았다(Fig. 5).

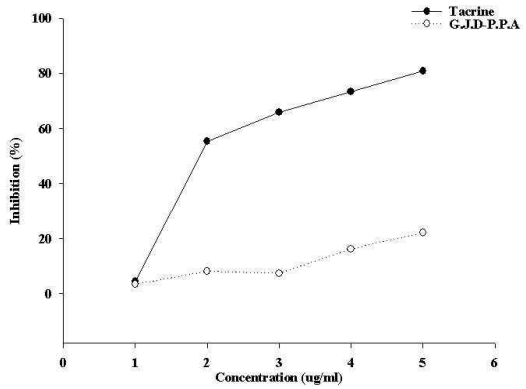


Fig. 5. Effects of G.J.D, P.P.A., G.J.D-P.P.A. on the acetylcholinesterase activity.
Inhibition efficacy was expressed as percent inhibition of enzyme activity compared to the control value(100%). Each value represent means ± S.E.M(n = 3).

5. Elevated plus-maze(EPM)에서 G.J.D-P.P.A.의 항불안 효과 및 작용 기전

1) Open arm에서 머문시간 및 출입 횟수

EPM를 이용한 G.J.D-P.P.A.의 항불안 효과를 Fig. 6에 나타내었다. 대조군에서 보는 바와 같이 mouse들은 전형적으로 open arm에 머무른 시간이나 open arm에 출입하는 것을 두려워하는 경향이 있었다. Fig. 6에서 알 수 있는 바와 같이, 대조군에서 open arm에 머무는 시간과 open arm에 출입한 횟수의 백분율은 각각 37.64±1.20%와 46.51±1.29%로 나타났다. 이에 반해 양성대조군인 diazepam 1 mg/kg 투여군에서는 open arm에 머무는 시간과 open arm에 출입한 횟수의 백분율이 각각 55.91±2.40%와 61.72±2.19%로 대조군에 비해 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다($P<0.05$, Fig. 6). 또한 G.J.D-P.P.A.군에서도 400 및 800 mg/kg에서 open arm에 머무는 시간의 백분율이 각각 57.68±2.61%와 49.90±3.09%로 나타났고 open arm에 출입한 횟수의 백분율이 각각 63.27±1.31%와 59.08±1.87%로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였음을 관찰할 수 있었다($P<0.05$, Fig. 6). 특히 400 mg/kg을 투여한 경우는 open arm에서 머무는 시간이 양성대조군으로 사용한 Diazepam군과 유사하게 나타났음을 관찰할 수 있었다.

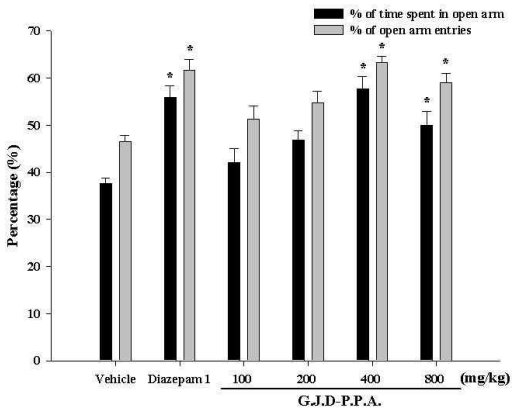


Fig. 6. Effect of a single treatment of the water extract of G.J.D-P.P.A. and diazepam (Dia) on the percentage of the time spent in and the number of entries into the elevated plus-maze over a 5-min test period in the mice.
Each bar represents mean±S.E.M of 8-10 mice. *P* values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test(*$P < 0.05$ as compared with the vehicle group).

2) WAY 100635I 및 flumazenil의 길항 작용

G.J.D-P.P.A.의 항불안 작용이 어떤 신경계를 경

유하여 발생하는지를 확인하기 위하여 antagonism study를 EPM을 통하여 확인하였다. 항불안 작용과 관련이 깊은 serotonin 신경계와 GABA 신경계와의 관계를 주요 target으로 설정하여 실험 시작 1시간 전에 G.J.D-P.P.A.를 투여하고 계속해서 실험 시작 30분 전에 각각 serotonin 수용체의 길항제(5-HT_{1A} receptor antagonist)인 WAY 100635(0.3 mg/kg, i.p.)와 GABA 수용체의 길항제($GABA_A$ receptor antagonist)인 flumazenil(10 mg/kg, i.p.)을 병용 투여하여 EPM을 실시하였다. Fig. 7에서 알 수 있는 바와 같이 G.J.D-P.P.A. 400 mg/kg 투여군에서 open arm에 머무는 시간의 백분율이 47.91±1.72%로 나타났고, open arm에 출입한 횟수의 백분율이 55.68±1.60%로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였음을 관찰할 수 있었다(P<0.05, Fig. 7). 그러나 G.J.D-P.P.A. 400 mg/kg 투여군에 flumazenil를 병용 투여한 그룹과 G.J.D-P.P.A. 400 mg/kg 투여군에 WAY 100635를 병용 투여한 그룹에서 open arm에 머무는 시간의 백분율이 각각 49.09±2.52%와 30.61±3.21%로 나타났고, open arm에 출입한 횟수의 백분율이 각각 49.29±1.40%와 42.04±2.38%로 단독으로 투여한 G.J.D-P.P.A. 400 mg/kg 투여군과 G.J.D-P.P.A. 400 mg/kg 투여군에 flumazenil를 병용 투여한 그룹은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였지만 G.J.D-P.P.A. 400 mg/kg 투여군에 WAY 100635를 병용 투여한 그룹은 G.J.D-P.P.A. 400 mg/kg 투여군에 비해 유의성 있게 감소되었음을 관찰할 수 있었다(P<0.05, Fig. 7). 결과적으로, G.J.D-P.P.A.의 항불안 작용이 serotonin 수용체의 길항제(5-HT_{1A} receptor antagonist)인 WAY 100635(0.3 mg/kg, i.p.)의해 완전히 차단되어지는 것으로 보아 G.J.D-P.P.A.가 serotonin 신경계를 경유하여 항불안 작용을 나타냄을 확인할 수 있었다.

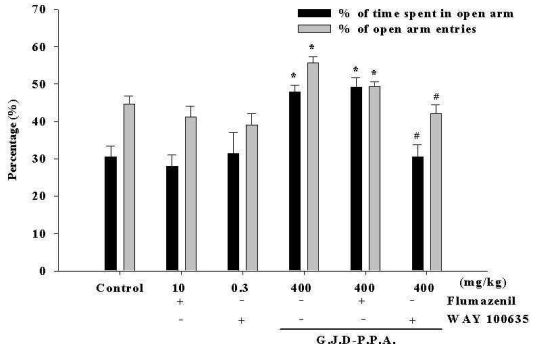


Fig. 7. Anxiolytic-like effects of G.J.D-P.P.A. were blocked by Way 100635 but not by flumazenil.
The data is expressed as the mean(± S.E.M.) of the percentage of the time spent in and the number of entries into the open arms of the elevated plus-maze, 1 h after the oral administration of G.J.D-P.P.A.(400 mg/kg), G.J.D-P.P.A.(400 mg/kg) + Way 100635(0.3 mg/kg) or flumazenil(10 mg/kg) (30 min prior testing, i.p.), or control; N = 8-10 mice per group. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test(*P < 0.05 versus the vehicle - treated group, #P < 0.05 as compared with the G.J.D-P.P.A. - treated group).

6. Open field test

G.J.D-P.P.A.의 항불안 작용이 단순한 활동성의 증가로 인하여 생기는지를 확인하기 위하여 OFT를 실시하였다. Locomotor activity는 실험동물의 활동성을 측정하는 장치로 약물의 항불안 작용이 동물의 활동성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 실험방법이다.

Table Ⅱ에서 알 수 있듯이 양성대조군인 diazepam 5 mg/kg 투여군에서 실험동물의 활동성이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하고 있음을 확인하였다. 이는 diazepam의 고용량으로 인한 현저한 근육이완 및 활동성의 감소를 나타내고 있다. 그러나 G.J.D-P.P.A.군의 총 이동거리는 각각 1987.70±65.54 cm, 2123.31±84.26 cm, 2247.54±66.26 cm, 2104.30±100.03 cm로 총 이동거리에서 대조군 및 G.J.D-P.P.A.군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Table Ⅱ).

Table Ⅱ. The effects of G.J.D-P.P.A. on the locomotor activity in the OFT.

Group	Dose (mg/kg)	Locomotor Activity (cm)
Control		2019.95 ± 60.26
Diazepam	5	948.40 ± 77.31*
G.J.D-P.P.A.	100	1987.70 ± 65.54
	200	2123.31 ± 84.26
	400	2247.54 ± 66.26
	800	2104.30 ± 100.03

7. Horizontal wire test

G.J.D-P.P.A.가 일반적인 항불안 약물들이 가지는 근육이완의 부작용을 나타내는지 확인하기 위하여 HWT를 실시하였다. Fig. 8에서 알 수 있듯이 양성대조군인 diazepam 5 mg/kg 투여군에서 실험동물이 wire에 매달리는 행동이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하고 있음을 확인하였다. 그러나 G.J.D-P.P.A.군에서는 대조군에 비교하여 어떠한 유의성 있는 변화를 관찰 할 수 없었다($P<0.05$, Fig. 8). 이러한 결과로 보아 G.J.D-P.P.A.는 일반적인 항불안 약물들의 투여로 발생하는 근육이완의 부작용이 전혀 없음을 확인할 수 있었다.

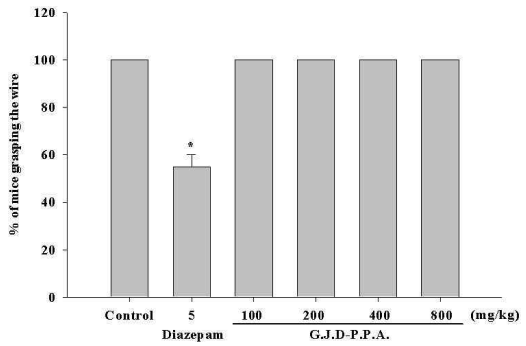


Fig. 8. Performance of mice in the HWT 1h after oral administration of control, diazepam (5 mg/kg), or G.J.D-P.P.A..
Data represent percentage of mice grasping the wire after administration of G.J.D-P.P.A. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 8-10 mice. *P* values for group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test(*$P < 0.05$ versus the control group).

Ⅳ. 考 察

의학이 발달함에 따라 인류는 다양한 질환을 극복하고 수명이 크게 연장되었다. 2008년 우리나라 고령자 통계에 따르면, 총 인구 중 65세 이상 인구가 차지하는 비율은 10.3%로, 10년 전인 1998년 6.6%에 비해 3.7% 증가하였다[25]. 이러한 증가는 앞으로도 지속될 것으로 예측되고 있어, 2018 년에는 노인 인구 비율이 14% 이상인 고령사회에, 2026년에는 노인 인구비율이 20% 이상인 초고령 사회에 도달할 것으로 전망된다[25]. 이와 같은 급속한 인구의 노령화와 관련된 문제 중 하나인 노인성 치매는 대표적인 노인성 퇴행성 질병으로 연령의 증가에 비례하여 이환률이 증가하고 있다[26]. 2008년 한국의 치매 유병률은 65-74세 사이에는 3%, 75-84세 사이에는 19%, 85세 이상에서는 47%정도이며 65세 이상 노인 인구 중 8.04%로 40만 명을 넘을 것으로 추정되며, 2020년에는 77만 명으로 2008년에 비해 2배 가량 증가 될 것으로 전망되고 있다[25]. 현재 서구사회에서는 65세 이상 인구의 약 10%, 80세 이상 인구의 약 40-50%에서 AD가 발생되고 있으며, 일본과 중국에서도 VD에 비해 AD의 발병률이 해마다 증가하고 있다[4].

치매는 여러 가지 원인질환에 의해 야기되는 기억력을 비롯한 인지기능의 저하를 특징으로 하는 증후군으로, 대개 만성적으로 진행하여 기억력, 사고력, 지남력, 이해력, 계산능력, 학습능력, 언어 및 판단력 등을 포함하는 고도의 대뇌기능의 장애를 나타내며, 또한 이차적으로 자아존중감 저하, 불안, 우울, 행동장애, 수면장애, 인격변화 등의 정신과적인 증상이 동반되기도 한다[27]. 이런 치매에는 AD, VD, 중독성 치매 등이 있으며 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고,

VD는 약 20% 이상, 중독성 치매는 약 10% 정도를 차지하는 것으로 알려져 있다[4]. AD는 1907년 독일의 Alois Alzheimer가 치매환자 뇌의 해마(hippocampus)와 neocortex에서 신경세포가 손실되어 있고, 노인반(senile plaque, SPs)과 신경원섬유농축제(neurofibrillary tangle, NFTs) 같은 비정상적 구조가 있음을 처음 관찰함으로서 알려졌다[28]. 증상으로는 주위에 대한 무관심, 자발성의 결여, 기억력 저하, 지남력 감퇴, 정서불안, 소란 또는 우울, 무언, 무반응, 대소변실금 등을 보이며[2], 생존율은 발병 후 약 5-12년 정도로 보고되고 있고, 보편적으로 동양보다 서양에서, 남성보다 여성에서 빈도가 높다[29]. VD는 뇌출혈이나 뇌경색 등으로 인해 뇌혈관 장애가 생겨 발생하는 치매로 한국, 일본, 중국 등 동양 여러 나라에서 많이 볼 수 있다[2].

AD는 뇌의 퇴행성 변화에 의한 질환으로 β amyloid peptide(βA), estrogen, apolipoprotein E, preseniline, oxidant(hydrogen, superoxide, hydroxyl radicals), 염증, 사고에 의한 손상, 신경 전달 물질, 신경 영양 인자 등의 많은 유발인자가 관여하는 것으로 알려져 있다[30].

또한, 최근 신경 전달 물질의 감소가 뇌의 노화와 관련이 있음이 보고되고 있는데, AD에서는 cholinergic system, noradrenergic system, somatostain, dopamine, serotonin, GABA 등의 수준이 현저히 낮아지며[31], AD의 1차 증상인 기억력 감퇴현상은 choline성 신경계와 밀접한 관계가 있다는 증거가 다양하게 제시되고 있고, 특히 acetylcholine을 생성하는 세포의 퇴행과 acetylcholine을 분해하는 효소인 AChE의 증가로 인해 악화된다는 증거가 다양하게 제시되고 있어 acetylcholine을 측정하여 AD환자의 임상적 증거를 관찰하는 방법들이 모색되고 있다[32]. 비록 원인 요법은 아니지만 감퇴된 choline성 신경계를 보충해주고 개선해 줄 수 있는 약물들에는 acetylcholine 합성 전구체인 lecithin[33], 수용성 활성제(receptor agonist)인 RS-86, nicotine 등[34]과 acetylcholine 분해 억제제인 tacrine[35], E2020 등[36]이 있다. 이들은 현재까지의 다른 치료제에 비해 효과가 우수한 것으로 알려져 있으나 효과가 지속적이지 않고 일시적이며 간독성과 다른 수용체와의 작용 등으로 장기간 사용하는 데는 문제가 있다[5].

치매에 동반되는 비인지적 기능 증상 중에서 가장 흔히 관찰되는 정신증상은 정서장애(Disturbances of Mood)로 그 중에서도 대부분의 치매 환자에서 가장 쉽게 발견되는 문제는 불안과 우울이다[37]. 1996년 세계노인정신의학회(International Psychogeriatric Association)는 치매환자에서 흔히 나타나는 불안, 우울, 배회, 초조, 불면 등의 치매행동심리증상을 'Behavioral and Psychological Symptoms in Dementia(BPSD) 라고 총칭하고 있다[38].

불안은 광범위하게 매우 불쾌한, 그리고 막연히 불안한 느낌으로, 생체가 친숙하지 않은 환경에 적응하고자 할 때 나타나는 가장 기본적인 반응양상이며, 불안과 관련하여 신체증상(가슴 두근댐, 혈압상승, 빈맥, 진땀, 반사항진, 동공확대, 떨림, 위장장애, 빈뇨 등 자율신경계 항진증)과 행동증상(과민성, 서성댐 등)이 동반되기도 한다[2]. 정상인도 위험이나 고통이 예견될 때, 또는 예기치 않은 상황에 직면했을 때 불안현상을 경험하게 된다[2]. 인간은 정상적인 불안(어린아이의 어머니와의 분리, 첫 등교, 첫 번 데이트, 노화, 죽음 등에 직면했을 때 나타나는 불안)을 통해 성장하고 변화하며, 정체성을 획득하고, 인생의 의미를 깨닫는다[2]. 그러나 같은 자극에도 부적절하게 반응하게 되는 병적 불안은 소위 신경증적 장애, 각 종 정신병적 장애, 인격 장애 또는 기질적 신체질환이 있을 때 나타난다[39].

불안을 일으키는 원인은 아직 확실하게 밝혀져 있지는 않으나 사회심리학적, 생물학적, 유전적 요인이 상호 영향을 미치는 것으로 생각되고 있다[2]. 또한, 치매에서 예측 가능할 정도로 비율적으로 감소하는 인지기능의 저하와는 달리 불안의 발생은 치매의 정도와 무관하게 발생하여 불안과 인지기능 장애는 발병원인이 다를 것으로 추정되며, 불안은 환자 자신과 환자가 처해있는 환경이나 유병기간에 따라 그 정도가 매우 다르게 나타난다[40].

불안을 치료하는 약물에 대한 연구는 주로 오래된 약물에 대한 재평가 및 적응증 확대와 새로운 약물의 개발, 특히 5-hydroxytryptamine (5-HT) 재흡수 억제제 등의 개발에 관심이 모아지고 있다[41]. 현재 빈용되는 약물은 benzodiazepine 계 약물, zolpidem, hydroxyzine, buspirone 등이 있으나 임상적으로 항불안 효과뿐만 아니라 과도한 진정, 근육이완, 금단 현상의 유발 등의 부작용 때문에 사용에 신중을 기해야 하는 단점이 있다[42].

한의학에서 기억에 대한 내용은 《內經·靈樞》[43]에 "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 하였으며 이 중 "憶"자는 기억의 의미로 사물에 대한 保持, 回憶, 再生의 과정을 의미하며, 《內經·素問》[43]에서 "脾藏意", "腎藏志"라고 하여 기억의 주관이 心이외에 脾, 腎과도 관계있음을 설명하고 있다.

痴呆를 韓醫學에서는 痴呆[7], 呆病[8]의 범주로 변증시치 하였다. 明代 張景岳의 《景岳全書》[7]에서 처음으로 '痴獃'라는 병명을 쓰면서 痴呆라는 개념이 등장하였는데, "痴獃症 凡平素無痰而或以鬱結 或以不遂 或以思慮 或以疑惑 或以驚恐而漸至痴獃 言辭顚倒 擧動不經 或多汗 或善愁 其症則千奇萬怪 無所不至, 脈必或弦或數, 或大或小, 變易不常…"이라 하여 치매가 정서적인 문제와 인격의 변화로 형성된다고 인식하였다. 陳士鐸은 《石室秘錄》[8]에서 "無非痰氣 故治呆無奇法 治痰卽治呆也"라 하여 痴呆의 원인과 治法을 제시하였다. 또 王淸任은 《醫林改錯》[44]에서 "小兒無記性者 腦髓未滿 高年無記性者 腦髓漸空"이라 하여 小兒의 先天不足이나 老人의 虛勞로 인한 腦髓不足이 痴呆의 원인이 될 수 있음을 설명하였다. 근래 中醫學에서는 그 원인을 痰飮, 稟賦不足, 肝腎不足, 心腎不交, 七情傷 등으로 분류하여 割痰順氣, 塡精補髓, 滋補肝腎 등을 治法으로 제시하고 있다[11].

불안과 유사한 개념을 韓醫學에서는 驚悸와 怔忡[9,10]으로 표현하였는데, 이는 가슴이 躁動하고 잘 놀래며 마음이 不安한 것을 자각하는 證候로, 대개 맥박이 불규칙하게 느끼는 경우가 많다[45]. 驚悸와 怔忡은 《內經》[43]에서 "心澹澹大動", "心掣", "心惕惕", "心下鼓", "氣動應衣" 등의 증상이 보이나 그 개념이 명확하지 않았으며, 《傷寒明理論》[46]에서 "悸者 心忪是也 築築惕惕然動, 怔忡者 忪忪不能自安者是矣"라고 하고, 《醫學正傳》[9]에서 "怔忡者, 心中惕惕然動搖而不得安靜, 無時而作者是也, 驚悸者, 驀然而跳躍悸動, 而有欲厥之狀, 有時而作者是也"라고 하여 驚悸와 怔忡을 구별하였다. 또한 《醫學入門》[10]에서 "怔忡因驚悸而久而成 怔忡久則健忘"이라 하여 驚悸에서 怔忡으로, 怔忡에서 健忘으로 변화한다고 하였다. 근래 中醫學에서는 驚悸와 怔忡의 원인을 心膽虛怯, 心血虧損, 心氣不足, 肝腎陰虛, 痰飮內停, 血脈瘀阻 등으로 분류하여 補血安神, 祛痰淸神, 寧心壯膽 등을 治法으로 제시하고 있다[11].

拱辰丹은 元代 危亦林의 《世醫得效方》[12]에 최초로 수록된 처방으로 이후 많은 의가들에 의해 임상에서 활용되어 왔다. 본 방은 峻補下元之品으로 助陽補精하는 鹿茸, 養血潤燥하는 當歸, 固精强陰, 助陽收澁하는 山茱萸, 通十二經, 開關利

竅하는 麝香으로 구성되어 전체적으로 溫無毒, 甘苦辛鹹하며 心, 腎, 肝經에 歸經한다. 鹿茸, 當歸, 山茱萸는 補肝腎兼心하고 麝香은 이들의 藥性을 十二經으로 通行케하여 天元一氣를 固密하게 하고 水升火降을 순조롭게 하므로 心腎을 補益하고 臟腑의 虛損을 豫防 및 治療하는 補益强壯劑로 노화로 인한 각 종 질환에 사용되어 왔다[13].

遠志와 石菖蒲는 聰明湯[13]의 구성약재로 기억력을 개선시키는 효능이 있는데, 遠志(Polygalae Radix)는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 遠志(*Polygala tenuifolia* WILLD.)의 뿌리로 味는 苦辛하고 性은 微溫, 無毒하며 肺, 心經으로 歸經하여 寧心安神, 祛痰利竅하는 효능이 있고, 石菖蒲(Acori Graminei Rhizoma)는 天南星科(Araceae)에 속한 石菖蒲(*Acorus gramineus*)의 根莖을 건조한 것으로 性은 溫, 無毒하고, 味는 辛苦하여 心, 胃經으로 歸經하여 化濕開胃, 開竅豁痰, 醒神益智하는 효능이 있다[47]. 이[14]의 연구에서 항우울 효과가 있는 것으로 보고된 靈神草(*Polygala japonica* Houtt)는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 애기풀의 줄기와 잎을 건조시킨 것으로 味는 苦하면서 微辛하고 性은 平하며 肺, 肝, 心經에 歸經하여 祛痰止咳, 散瘀止血, 寧心安神하는 효능이 있다[47]. 이러한 靈神草, 遠志, 石菖蒲는 비슷한 효능을 가진 약물들로 同用하여 사용하면 寧心安神, 祛痰利竅, 開竅豁痰하여 氣滯를 通하게 하고 祛痰하므로 心鬱을 散할 수 있을 것으로 생각된다. 이와 같은 효능으로 拱辰丹과 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제를 같이 사용하면 交通心腎, 寧心安神하여 老化와 鬱滯로 인한 기억력과 인지기능 저하를 개선하고, 불안을 감소시키는 효과가 있을 것으로 사료된다.

최근 천연자원을 가공 처리하여 신약과 건강기능성 제품을 개발하는 방법에 대한 관심이 높아져가고 있고, 치매에 있어서도 전통의약이나 민간요법으로 사용되어온 천연물로부터 항치매 기능성 식품 및 천연물 신약을 발굴하고자 하는 연구가 미국, 유럽 및 일본 등의 선진국을 중심으로 하여 세계적으로 각광 받고 있다[48]. 우리나라의 경우 전통적으로 사용되어 온 한약재로부터 치매예방 및 기억력증진소재 개발에 관심이 집중되고 있고, 다양한 약물에서 그 가능성들이 점차적으로 보고되고 있다. 국내에서는 천연식물인 오수유로부터 유래한 dehydroevodiamine 성분이 현재 임상시험 중으로 알려져 있으며 또한 광동제약에서는 뇌혈관 및 심장 순환 등의 이상으로부터 발생되는 혈관성 치매의 예방 또는 치료제의 개발을 진행하고 있는 것으로 알려져 있다[49].

최근 기억장애나 불안에 대한 실험적 연구로는 한 등[15]이 임상에서 활용되는 복합처방의 학습과 기억 감퇴에 미치는 영향에 대해 보고하였고, 손 등[16]이 Elevated plus-maze를 이용한 복합처방 및 단일 약물의 항불안 효과에 대해 보고하였다. 拱辰丹에 대한 실험적 연구로는 황 등[50]이 拱辰丹이 Alzheimer's disease 病態 모델에 미치는 영향에 대해 보고하였다. 靈神草, 遠志, 石菖蒲의 단일 약제에 관한 연구로는 이 등[14]의 靈神草의 항우울 효과에 대한 연구와 김 등[51]의 遠志 추출물이 사회 심리적 스트레스에 미치는 영향에 대한 연구, 최 등[52]의 石菖蒲가 치매 모델에 미치는 영향에 대한 연구 등이 보고되었으나, 拱辰丹과 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제가 기억력과 인지기능 개선 및 항불안 효과에 대한 연구는 아직 보고된 적이 없었다.

이에 저자는 拱辰丹과 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제의 기억력과 인지기능 개선 및 항불안 효과를 실험적으로 규명하고자, scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델의 생쥐를 이용하여

Passive avoidance test, Morris water maze test, Y-maze test 및 뇌 조직 Acetylcholinesterase (AchE) 활성 시험을 이용한 동물행동실험을 통하여 기억력 개선 작용을 확인하고자 하였고, 또한 Elevated plus-maze, Open field test, Horizontal wire test를 이용한 동물행동실험을 통하여 항불안 효과를 관찰하고, 이러한 항불안 작용이 어떤기전을 통하여 발생하는지 5-HT_{1A}수용체와 $GABA_A$ 수용체의 antagonist를 사용하여 확인하고자 하였다.

기억력 개선 및 인지능력 향상에 사용되고 있는 모델에는 Passive avoidance test나 Radial maze, Morris water maze, Y-maze test, Noble object recognition test, Fear conditioning test 등이 있는데 이 중 수동회피시험은 흔히 단순기억에 대한 효과를 입증할 때 쓰이는 모델로, 어두운 곳을 선호하는 흰쥐의 특성을 이용한 것이다. 또한 Morris 수중미로 시험은 사물에 대한 공간인지능력을 알아보기 위해 maze에 4개의 marker를 사용하여 실험동물이 공간에 대한 식별능력을 관찰하는 실험이다. 이에 본 연구에서는 G.J.D-P.P.A.가 실제로 감퇴된 기억력을 개선시켜줄 수 있는지를 검색하기 위하여 muscarinic 수용체의 길항제인 scopolamine을 투여하여 만든 기억력 감퇴 동물 모델을 이용하여 실험을 실시하였다.

수동회피시험에서 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 모델에서는 전기 자극에 대한 latency 시간이 대조군보다 현저히 낮음으로서 기억력 손상을 확실히 유발했다고 보이며, 양성대조군인 Tacrine군은 latency time이 대조군과 많은 차이를 보이지 않았으며 Scopolamine군에 비하여 latency time이 현저히 증가하였으므로 기억력이 개선되었음을 알 수 있었다. 실험군인 G.J.D-P.P.A. 군에서 100 및 200 mg/kg 투여군은 latency time이 대조군과 비교했을 때 유의성이 없었으나, 400 mg/kg 및 800 mg/kg 투여군에서는 모두 Scopolamine군에 대해 유의성 있게 증가하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 따라서 scopolamine으로 유도한 기억력 손상 생쥐의 수동회피시험에서 latency time이 길어졌다는 것은 G.J.D-P.P.A.가 콜린성 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하고, 정상인의 기억력과 인지기능감퇴 증상뿐만 아니라 치매질환에서도 유효한 효과가 있을 것으로 생각되어진다. 또한 수중미로 시험에서도 G.J.D-P.P.A. 400 및 800 mg/kg 투여군이 마지막 날인 6일째 기억검사를 시행한 결과 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간이 Scopolamine군에 대해 유의성 있게 증가하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 2-3). 그리고 Y-미로 시험에서도 Scopolamine군에서는 변경행동력(spontaneous alternation)이 대조군보다 현저히 낮음으로서 기억력 손상을 확실히 유발했다고 보이며, 양성대조군은 변경행동력이 Scopolamine군보다 유의성 있게 증가하였으므로 기억력이 개선되었다고 할 수 있다. 즉, G.J.D-P.P.A. 400 및 800 mg/kg 투여군에서 변경행동력이 Scopolamine군과 비교했을 때 용량 의존적으로 유의성을 띠는 것으로 보아 기억력 개선에 효과가 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 그러나 이러한 기억력 개선 효과가 기존의 약물이 보여주고 있는 아세틸콜린 분해효소 억제와 관련이 있는지 알아보기 위한 실험에서는 G.J.D-P.P.A.의 아세틸콜린분해 억제결과에서 전혀 효과를 확인할 수 없었다(Fig. 5). 이는 기억에 중요한 기능을 하는 해마 신경세포에 대한 G.J.D-P.P.A.의 효과가 아닌 다른 기전을 통한 효능으로 발현될 것으로 추론될 수 있을 것이다.

이상의 기억력 감퇴 개선 실험에서 G.J.D-P.P.A. 투여군이 Scopolamine군에 비해 유의한 결과를

보였다.

불안에 대한 모델에는 Geller-type이나 Vogel-type의 Anticonflict tests, Hole-board test, Social interaction test, Elevated plus-maze(EPM) 등이 있는데 이 중 EPM은 흔히 불안 완화제나 불안 유도약물의 효과를 입증할 때 쓰이는 모델로, 좁고 어두운 곳을 선호하는 흰쥐의 특성을 이용한 것이다. 벽이 설치된 closed arm 보다는 벽이 없는 open arm에서 더 많은 불안을 느끼기 때문에 불안이 많은 동물일수록 open arm에 머무는 기간이 짧다. 항불안 약물의 검색은 open arm에서 머문 시간의 연장 및 open arm으로의 진입횟수의 증가로서 평가되는데 이는 closed arm의 진입 횟수 및 머문 시간의 감소로 표현된다. 따라서 불안에 대한 G.J.D-P.P.A.의 효능을 확인한 결과 EPM을 이용한 본 연구에서 G.J.D-P.P.A. 400 mg/kg 및 800 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 open arm에서 머무른 시간에 대한 백분율이 증가하였으며, 또한 open arm으로의 출입횟수에 대한 백분율도 증가하였다. Locomotor activity의 활동성 실험에서도 총 이동거리의 변화가 없었으며, 또한 Horizontal wire test(HWT)에서도 대조군과 약물투여군 사이에 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 G.J.D-P.P.A.가 근이완 및 행동과다의 부작용이 없으면서 항불안 작용을 가지고 있음을 의미하는 것이라고 할 수 있다(Table Ⅱ, Fig. 8).

Serotonin 신경계는 봉선핵(raphe nucleus)에서 방출되는 신경섬유로서 hypothalamus와 hippocampus 및 cerebral cortex까지 퍼져있는 신경계이다. Serotonin은 중추신경계에 광범위하게 존재하고 있는 신경전달물질로서 정신기능의 조절에 많은 관여를 하는데, 특히 감정조절, 각성, 공격성 행동, 수면작용, 체온조절, 기억 및 학습, 통증 전달, 성행위, 음식섭취, 운동조절작용, 생물학적 리듬, 스트레스 반응과 여러 가지 신경내분비 기능, 뇌의 발달과 성숙에 관여한다고 알려져 있다. 또한 serotonin 신경계 이외에도 많이 사용되고 있는 항불안제인 benzodiazepine계 약물의 작용기전은 억제적 신경전달물질인 γ-aminobutyric acid(GABA)의 강화라고 알려져 있다. GABA는 포유류 뇌에서 중요한 억제성 신경전달 물질로 시냅스 후 $GABA_A$수용체의 복합체에서 chloride 이온의 시냅스 후 세포(postsynaptic cell)내로의 투과력을 증가시킴으로써 큰 과분극을 일으켜 시냅스전달의 억제를 일으킨다. 중추신경계의 모든 부위에서 벤조디아제핀류는 GABA에 의한 chloride ion의 투과력을 강화하여 간접적으로 GABA 신경전달을 촉진하는 것으로 알려졌다. 본 실험에서는 G.J.D-P.P.A.가 어느 신경계를 경유하여 항불안 작용을 나타내는지 확인하기 위하여 specific $5\text{-}HT_{1A}$ receptor antagonist인 WAY 100635와 $GABA_A$ receptor antagonist인 flumazenil를 이용하여 G.J.D-P.P.A.의 항불안 작용에 대한 길항작용을 확인한 결과 $5\text{-}HT_{1A}$ receptor antagonist인 WAY 100635에 의하여 G.J.D-P.P.A.의 항불안 작용이 완전히 차단되었음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 G.J.D-P.P.A.가 serotonin 신경계를 경유하여 항불안 작용을 나타내고 있음을 알 수 있었다(Fig. 7). 본 실험에 양성대조군으로 사용한 diazepam은 benzodiazepine 수용체의 agonist로 작용하여 진정효과를 유발시켜 항불안 작용을 가진다고 보고되어 있다. 그러나 본 연구에서 사용한 diazepam 5 mg/kg 투여에 의해 총 이동거리가 감소하여 과량 복용으로 과다한 진정효과가 발현된다는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 그러나 G.J.D-P.P.A. 투여에서 총 이동거리 측정 및 HWT에서 알 수 있듯이 G.J.D-P.P.A.의 항불안 작용이 benzodiazepine계 약물과는 달리 근육이완이나 과다한 진정효

과가 나타나지 않음을 확인할 수 있다.

결론적으로, 본 연구의 결과에서 G.J.D-P.P.A.의 경구투여를 통해 scopolamine으로 유도된 기억력 및 인지 기능 장애를 개선할 수 있음을 알 수 있었고, 이는 G.J.D-P.P.A.가 cholinergic 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하며, 정상인의 기억력과 인지 기능 감퇴 증상뿐만 아니라 치매 질환에서도 유효한 효과가 있을 것으로 생각된다. 또한 G.J.D-P.P.A.의 경구투여를 통해 근육이완이나 진정 등의 부작용 없이 항불안 작용을 나타냄을 알 수 있었고, 특히 serotonin 신경계와 관련이 있음을 알 수 있었다. 향후 G.J.D-P.P.A.의 기억력 개선 작용 및 항불안 작용의 평가를 위하여 다양한 활성 성분에 대한 연구와 다양한 실험 모델의 개발이 필요할 것으로 생각되며, 또한 이러한 작용에 대한 기전 연구가 더욱 상세히 진행되어져야 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ. 結 論

본 연구에서는 G.J.D-P.P.A.의 기억력 개선 효과를 조사하기 위하여 scopolamine으로 유도된 기억력 손상 모델을 이용하여 수동회피시험, Y-미로시험 및 Morris 수중미로 시험을 이용해 행동학적 변화를 통하여 G.J.D-P.P.A.의 기억력 개선 능력 여부를 확인 하고자 하였다. 또한 G.J.D-P.P.A.의 항불안 효능을 탐색하기 위하여 EPM, HWT 및 OFT와 같은 동물 행동실험을 통하여 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 수동회피시험에서 G.J.D-P.P.A. 400 및 800 mg/kg의 투여군에서 latency time이 Scopolamine 군에 비해 유의성 있게 증가하였다.
2. Morris 수중미로 시험에서 G.J.D-P.P.A. 400 및 800 mg/kg 투여군이 양성대조군인 Tacrine 군과 비슷한 양상으로 공간기억능력의 향상이 관찰되었다.
3. Y-미로시험에서 G.J.D-P.P.A. 400 및 800 mg/kg 투여군이 spontaneous alternation이 Scopolamine 군에 비해 유의성 있게 증가하였다.
4. 아세틸콜린 분해 효소 활성시험을 측정한 결과 G.J.D-P.P.A.는 아세틸콜린 분해 효소 활성 억제능 시험에서 아무런 효과를 나타내지 않았다.
5. EPM을 이용한 항불안 연구에서 G.J.D-P.P.A.의 400 mg/kg 및 800 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 open arm에서 머무른 시간의 백분율이 증가하였고, open arm으로의 출입 백분율 또한 증가하였다.
6. EPM을 이용한 길항실험에서 5-HT_{1A} receptor antagonist인 WAY 100635에 의해 G.J.D-P.P.A. 400 mg/kg의 항불안 효능이 차단되는 것이 관찰되었다.
7. OFT를 이용한 locomotor activity 측정에서도 G.J.D-P.P.A.의 모든 용량에서 총 이동거리의 변화가 없었으며, 또한 HWT에서도 대조군과 약물투여군 사이에 차이를 나타내지 않았다.

이상의 결과로 보아 Scopolamine으로 유도한 기억력감퇴 모델을 이용한 본 연구에서 G.J.D-P.P.A. 투여군에서 기억력 개선 및 인지능력 향상 효과를 지니는 천연물이라고 확인되어지며, 항불안 연구에서도 활동성 감소 및 근육이완이나 진정 등의 부작용이 없으면서 우수한 항불안 작용을 가지는 한약제제라고 생각되며 이러한 작용이 특히 serotonin 신경계와 관련이 있음을 시사하고 있다. 향후 G.J.D-P.P.A.의 작용의 평가를 위하여 다양한 실험 모델의 개발이 필요할 것으로

생각되며 또한 이러한 작용에 대한 기전 연구가 더욱 상세히 진행되어져야 할 필요성이 있다고 사료된다.

참고문헌

1. 대한한방신경정신과학회 편. 한방신경정신의학. 파주:집문당. 2006:117-24, 125-30, 203-12.
2. 민성길. 최신정신의학. 서울:一潮閣. 2005:189-98, 297-329.
3. Ferretti L, McCurry SM, Logsdon R, Gibbons L, Teri L. Anxiety and Alzheimer's disease. Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology. 2001;14(1):52-8.
4. Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, Bruce AJ, Wyss-Coray T, Mark RJ, Mucke L. Cellilar signaling roles of TGFβ, TNFα and βAPP in brain injury responses and Alzheimer's disease. Brain Res Rev. 1997;23:47-61.
5. Giacobini E. Present and future of Alzheimer therapy. J Neural Transm Suppl. 2000;59: 231-42.
6. Chouinard G, Lefko-Singh K, Teboul E. Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zoplicone, and zolpidem. CellMolNeurobiol. 1999;19(4):533-52.
7. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
8. 陳士澤. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102.
9. 虞博. 醫學正傳. 北京:人民衛生出版社. 1963:274.
10. 李梴. 醫學入門. 서울:南山堂. 1982:487-8.
11. 陳輝. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993: 242-51, 784-91.
12. 危亦林. 世醫得效方. 北京:人民衛生出版社. 1990: 271.
13. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:법인문화사. 1999:189-90, 1180.
14. 이은경. 靈神草의 항우울 효과에 대한 행동약리학적 연구. 대구한의대학교 대학원 박사학위 논문. 2009.
15. 한신희, 길기정. 인삼산사복합방(人蔘山査複合方)이 Alzheimer성 치매 병태(病態) 생쥐의 뇌조직 손상에 미치는 효과. 대한본초학회지. 2006;21(4):123-31.
16. 손세규, 임채광, 김광중. Elevated plus-maze를 이용한 芍藥甘草湯의 항불안 효과. 동서의학. 2010;35(3):107-23.
17. LeDoux JE. Emotional memory system in the brain. Behav Brain Res. 1993;58(1-2):69-79.
18. Ebert, U. Kirch, W. Scopolamine model of dementia: electro- encephalogram findings and cognitive performance. Eur J Clin Invest. 1998;28(11):944-9.
19. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods. 1984;11(1):47-60.
20. Yamaguchi Y, Miyashita H, Tsunekawa H, Mouri A, Kim HC, Saito K, Matsuno T, Kawashima S, Nabeshima T. Effects of a novel cognitive enhancer spiro[imidazo-[1,2-a] pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one(ZSET1446), on learning impairments induced by amyloid-beta 1-40 in the rat. J Pharmacol. 2006; 317(3):1079-87.
21. Ellman, GL, courtney KD, Andres JV and Feather-Stone RM. A new and rapid colormetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem., Pharmacol. 1961;7:88-95.
22. Handley SR, Tricklebank MD. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists

in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1995;327:1-5.

23. Overstreet DH, Pucilowski O, Rezvani AH, Janowsky DS. Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. Psychopharmacology(Berl). 1995;121(1):27-37.
24. Hattesohl M, Feistel B, Sievers H, Lehnfeld R, Hegger M, Winterhoff H. Extracts of Valeriana officinalis L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. Phytomedicine. 2008;15(1-2):2-15.
25. 조맹제, 김기웅, 김병희, 김문두, 김봉조, 김신겸 등. 치매 노인 유병률 조사. 보건복지가족부. 2008.
26. 조은영, 조은희, 김소선. 가족 상호관계가 치매노인 가족원의 부담감에 미치는 영향. 한국노년학. 2010;30(2):421-37.
27. 오세관. 신경전달물질과 뇌질환. 서울:신일상사. 2005:345-64.
28. Bains JS, Shaw CA. Neurodegeneration disorders in humans: The role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. Brain Research Review. 1997;25:335-58.
29. 이가옥. 노인생활실태 분석 및 정책과제. 한국보건사회연구원. 1994;114-32.
30. Mattson MP, Chan SL, Camandola S. Presenilin mutations and calcium signaling defects in the nervous and immune system. Bioessays. 2001;23(8):733-44.
31. Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra 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):187-94.
32. Trabace L, Cassano T, Steardo L, Pietra 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):187-94.
33. Higgins JP, Flicker L. Lecithin for dementia and cognitive impairment. Cochrane Database Syst Rev. 2000;(4):CD001015.
34. Womer DE, Shannon HE. Reversal of pertussis toxin-induced thermal allodynia by muscarinic cholinergic agonists in mice. Neuropharmacology. 2000;39(12):2499-504.
35. Ventura M, Sternon J. Anticholinesterase agents in Alzheimer's disease. Rev Med Brux. 2001; 22(4):387-93.
36. Cheng DH, Tang XC. Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. Pharmacol Biochem Behav. 1998;60(2):377-86.
37. Greenwald BS, Kramer-Ginsberg E, Marin DB, Laitman LB, Hermann CK, Mohs RC, Davis KL. Dementia with coexistent major depression. American Journal of Psychiatry. 1989;146:1472-8.
38. 박건우. 치매의 행동신경심리증상에 대한 비약물학적 접근. 대한치매학회지. 2004;3(1):24-8.
39. Sandford JJ, Argyropoulos SV, Nutt DJ. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part1: Basic neruobiology. Pharmacol. Ther. 2000;88 :197-212.

40. 한설희. 치매의 행동심리증상의 개관. 대한치매학회지. 2004;3(1):1-4.
41. Leo RJ. Movement disorders associated with the serotonin selective reuptake inhibitors. Clin Psychiatry. 1996;57(10):449-54.
42. Hoffman EJ, Mathew SJ. Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies. Mt Sinai J Med. 2008;75(3):248-62.
43. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞素問. 서울:東洋醫學硏究院. 1985:37, 68, 124, 196, 217-8, 229, 229, 342.
44. 王淸任. 醫林改錯. 台北:中國醫藥叢書. 1975:22-5.
45. 이근후 외. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사. 1988:138, 216-28.
46. 成無己. 傷寒明理論. 上海:科學技術出版社. 1980:28.
47. 전국한의과대학본초학교수 편. 本草學. 서울:永林社. 1999:496-7, 520-2, 523-4, 545-6, 578-80, 626-7.
48. Hsieh MT, Peng WH, Wu CR, Ng KY, Cheng CL, Xu HX. Review on experimental research of herbal medicines with anti-amnesic activity. Planta Med. 2010;76(3):203-17.
49. Park CH, Lee YJ, Lee SH, Choi SH, Kim HS, Jeong SJ, Kim SS, Suh YH, Dehydroevodiamine-HCl prevents impairment of learning and memory and neuronal loss in rat models of cognitive disturbance. J Neurochem. 2000;74(1):244-53.
50. 황선미, 정대규. 拱辰丹이 CT105로 유도된 Alzheimer's disease 病態 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2004;15(2):103-18.
51. 김경호, 정현우, 이동원, 김정숙, 김영균, 조수인. 遠志 추출물이 사회 심리적 스트레스에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(1):99-108.
52. 최혁, 김상호, 이대용, 안대종, 강형원, 류영수. pCT105로 유도된 치매모델에서 石菖蒲 수추출액이 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2002;13(2):173-94.