동의신경정신과학회지 제22권 제4호(2011년 12월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2011;22(4):185-199

# 기억력 감퇴 모델에서 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제의 기억력 및 인지 기능 개선에 관한 연구

김수현, 정대규

대구한의대학교 한의과대학 신경정신과학교실

## Nootropic and Anti-amnestic Effect of PPA on scopolamine-induced Cognitive Impairment in Mice

Soo-Hyun Kim, Dae-Kyoo Chung

Dept. of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dae-Gu Hanny University

### Abstract

In the present study, we assessed the effect of the PPA (*Polygala japonica* Houtt., *Polygala tenuifolia* WILLD. and *Acorus gramineus* SOLAND. mixed preparation), a traditional herbal prescription, on the learning and memory impairments induced by scopolamine. The cognition-enhancing effect of PPA was investigated using a passive avoidance test, Y-maze test and the Morris water maze test in mice. Drug-induced amnesia was induced by treating animals with scopolamine (1 mg/kg, i.p.). A single PPA (400 and 800 (mg/kg)) administration significantly reversed the scopolamine-induced cognitive impairments in the passive avoidance test ($P$ <0.05). On the Y-maze test, PPA (400 and 800 (mg/kg)) also significantly reversed scopolamine- induced cognitive impairments in mice ($P$ <0.05). PPA also improved escape latencies in training trials and increased swimming times and distances within the target zone of the Morris water maze ($P$ <0.05). These results suggest that PPA attenuates amnesic state induced by scopolamine and that these Effect are mediated by enhancing the cholinergic dysfunction.

Key Words :
P.P.A., *Polygala japonica*, *Polygala tenuifolia*, *Acorus gramineus*, Learning and memory

투고 : 2011. 08. 06. 수정 : 2011. 10. 05. 채택 : 2011. 10. 31.
교신저자 : 정대규, 포항시 남구 대잠동 907-8번지 대구한의대 부속 포항한방병원 신경정신과
Tel ) 054-281-0055, Fax ) 054-281-7464, E-mail ) 83baby@hanmail.net
이 논문은 2011년 2월 대구한의대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학 전공 석사학위논문임

# Ⅰ. 서 론

의학과 과학기술의 발달로 인간의 수명이 늘어나 고령화 사회로 접어들고 있으며, 이러한 노인 인구의 증가는 새로운 사회 문제인 치매에 많은 관심을 불러 일으켰다. 우리나라 전체 노인의 약 8.5 %에 달하는 치매는 다양한 원인질환에 의해 발생되는 전반적 뇌기능 저하 상태로 지적 황폐화와 인격의 변화, 정서 행동적 문제, 사회적 혹은 직업적 기능 장애까지 야기하는 복합적 임상 증후군이다다[1]. 치매의 유형 중에서 가장 흔한 알츠하이머형 치매(Alzheimer's disease; AD)는 뇌의 neuron에 amyloid β-peptide(Aβ)가 침적되어 시냅스 상실(synapseloss) 또는 신경원섬유 농축(neurofibrillary tangle)을 형성함으로써 발생하는 신경 퇴행성 현상이다[2,3].

한의학에서는 치매를 呆病[4,5], 健忘[6]의 범주에 포함시킨다. 원인으로는 痰飮, 痰火, 瘀血, 七情傷, 心腎不交, 肝腎不足 등이 있고, 치법으로는 消痰開鬱, 活血行氣, 滋補肝腎, 健脾益胃 등을 주로 사용한다[7-9].

靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제는 寧心安神, 祛痰散瘀의 효능이 있는 靈神草와 寧心安神, 祛痰利竅하는 遠志, 醒神益智, 開竅割痰하는 石菖蒲의 효능이 비슷한 약물을 함께 사용하여 상호작용을 증강하는 相須의 배합방법을 이용한 제제로 痰飮과 瘀血을 제거하여 心竅를 通利시키고 心氣의 울체를 散하여 뇌의 작용을 활발하게 하리라 사료된다[10-13].

치매는 만성적이고 비가역적인 특성으로 인해 사회에 심각한 영향을 미치고 있어 최근 질병관리 및 중재 개발의 측면에서 많은 연구가 지속되고 있으며 국가적인 관심 또한 높아지고 있다. 현재까지 개발된 기억력 개선 약물들에는 아세틸콜린 합성전구체, 아세틸콜린 분해 억제제 등이 있으나 효과가 미약하고 심각한 부작용과 독성 때문에 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다[14,15]. 그러므로 부작용은 최소화하고 효능은 최대화하며 원인 치료까지 가능한 새로운 기억력 개선 및 치매 치료제를 찾아내는 노력이 필요하다. 그에 대한 대안으로 생산 비용이 저렴하고 부작용이 적은 한약재를 이용한 의약품들이 많은 인기를 얻고 있으나[2,3] 이러한 기억력 개선 약물들은 대체로 합성 의약품인 AChE 억제제보다 효과가 약하기 때문에 아직까지는 더 많은 연구가 필요한 실정이다[16].

본 실험에서는 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제(PPA)의 기억력 감퇴 개선에 대한 효과를 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델을 이용하여 수동회피 시험(passive avoidance test) 및 Y-미로 시험(Y-maze test), Morris 수중미로 시험(Morris water maze test), 뇌 조직 Acetylcholinesterase (AChE) 활성 실험을 이용한 행동학적 변화를 통하여 기억력 개선 효과를 확인하고자 하였다.

# Ⅱ. 재료 및 방법

## 1. 재료

### 1) 실험동물

실험동물은 수컷의 ICR mouse(SPF/VAF CrljBgi : CD-1) 5주령을 주식회사 오리엔트(경기도, 한국)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 대구한의대 중앙 사육실에서 7일간 적응시킨 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 공급하였다.

2) 시료의 준비

본 실험에 사용한 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제는 대구한의대학교 부속한방병원에서 膏劑로 공급받아 사용하였으며, 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제(*Polygala japonica* Houtt., *Polygala tenuifolia* WILLD., *Acorus gramineus* SOLAND.)를 "PPA"라고 명명하였다. 處方에 대한 구성내용과 분량은 Table Ⅰ과 같다.

Table Ⅰ. Prescription of PPA

| Herbs | Pharmacognosy name | Dose(g) |
|---|---|---|
| 靈神草 | *Polygala japonica* Houtt. | 100 |
| 遠志 | *Polygala tenuifolia* WILLD. | 100 |
| 石菖蒲 | *Acorus gramineus* SOLAND. | 100 |
| | Total | 300 |

3) 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 chloride는 시그마(Sigma, USA)의 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다.

4) 시험장치

본 실험에 사용한 시험 장치는 아래와 같다.

(1) Evaporator(Eyela, SB-1000, Japan)

(2) Freezing Dryer(Eyela, FDU-1000, Japan)

(3) Ethovision system(Noldus, Wageningen, Netherlands)

- Morris water maze system(Scitech, Korea)

- Y-maze system(Scitech, Korea)

(4) UV/VIS spectrophotometer(Jasco V-530, Japan)

(5) Sonicator (Hwashin 410/510, Korea)

(6) Water bath (Vision Scientific, Korea)

(7) Active / Passive Avoidance System(Gemini, San Diego, USA)

(8) Animal room(Orient Bio, Korea)

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

## 2. 방법

1) 약물처리

PPA는 10 % tween 80에 100, 200, 400, 및 800 mg/kg 용량으로 현탁하여서 실험 시작 1 시간 전에 경구 투여 하였으며, 기억손상 유도를 위해 인지시험 30분 전에 scopolamine을 1 mg/kg의 용량으로 생리식염수에 녹여 복강 투여 하였다. 대조군에는 PPA 투여군과 동일 부피의 10 % tween 80을 경구 투여 하였으며, 30분 전에 생리식염수를 복강 투여 하였다. 양성 대조군에는 생리식염수에 녹인 tacrine 10 mg/kg을 실험 시작 1 시간 전에 경구 투여하고 30분전에 scopolamine을 복강 투여 하였다.

2) Passive avoidance test

(1) 조건 회피 반응 장치

조건회피반응장치는 shuttle box(52.6×17.3×21.3 cm)의 크기로 동일한 크기의 두 방으로 나뉘어 있으며, 두 방을 나누는 벽에는 gillotin 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) 실험 동물군의 분류

실험군의 분류는 대조군(Control 군), scopolamine 투여군(scopolamine 군), tacrine(10 mg/kg, p.o.) 투여 후 scopolamine 투여군(양성대조군, Sco + tacrine 군) 및 PPA(100, 200, 400 및 800 (mg/kg), p.o.) 투여 후 scopolamine 투여군(Sco + PPA 군)으로 모두 7개의 군으로 분류하였고, 실험동물 수는 각 군 당 10마리씩으로 하였다.

① 대조군

정상상태의 mouse에게 10 % tween 80을 경구로 투여한 후 학습과 test trial를 실시하였다.

② Scopolamine 군

정상상태의 mouse에게 training trial을 실시하기 1시간 전에 10 % tween 80을 경구 투여하였으며 30분 후에 증류수에 녹인 scopolamine을 1 mg/kg의 용량으로 복강 투여하였고, scopolamine 투여 30분 후에 training trial을 시행하였다. Training trial 후 아무런 처치 없이 24시간 동안 물과 사료를 충분히 공급하고 test trial를 실시하였다.

③ 양성대조군

정상상태의 mouse에게 training trial을 실시하기 1시간 전에 tacrine 10 mg/kg을 경구 투여하였으며 30분 후에 scopolamine을 1 mg/kg의 용량으로 복강 투여하였고, scopolamine 투여 30분 후에 training trial을 시행하였다. Training trial 후 아무런 처치 없이 24시간 동안 물과 사료를 충분히 공급하고 test trial를 실시하였다.

④ PPA 투여군

정상상태의 mouse에게 training trial을 실시하기 1시간 전에 PPA를 용량별로 경구 투여하였으며 30분 후에 scopolamine을 1 mg/kg의 용량으로 복강 투여하였고, scopolamine 투여 30분 후에 training trial을 시행하였다. Training trial 후 아무런 처치 없이 24시간 동안 물과 사료를 충분히 공급하고 test trial를 실시하였다.

(3) Passive avoidance test

이 방법은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법으로 수많은 연구자들이 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용되고 있는 실험방법이다. 실험은 LeDoux[17]의 방법을 응용하여 시행하였다. 실험 시작 1시간 전에 mouse를 행동관찰실로 옮기고 약물을 투여한 후 안정시켰다.

① 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 Test trial

Test trial는 training trial이 끝난 후, 24시간 후에 장기기억에 미치는 PPA 투여군의 효과를 확인하고자 실시하였다. mouse를 왕복상자에 넣고 10초 동안 탐색시간 후 gillotin door가 열리

고 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[18,19].

### 3) Morris water maze 에 의한 학습 및 기억력 측정

Passive avoidance test를 통하여 효과가 우수한 PPA 투여군을 선별하여 Morris water maze test를 실시하였다.

Morris water maze를 통한 인지력 개선에 대한 실험은 치매 개선약물의 스크리닝 방법 중 하나로 알려져 있다[20]. 본 maze의 제원은 지름 90 cm, 높이 45 cm이며 플랫폼(white platform)의 지름은 6 cm로 구성되어 있다. 수중미로의 주변은 비디오 카메라와 연결된 컴퓨터 시스템과 수온 조절용 장치 등 공간단서들을 항상 일정하게 유지시켰다.

실험 방법으로는 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 water maze test는 6일 동안 진행하는데, 첫째 날에는 각 mouse들이 물에 대하여 적응을 할 수 있도록 1분간 maze 안에서 자유로이 수영하도록 하고, 이때 플랫폼은 설치하지 않았으며, 2일 째 되는 날부터 5일 째 되는 날까지는 하루에 각각의 mouse가 1일 4회씩 10분 간격으로 1분 동안 maze에서 수영하도록 하였다. 2일 째 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.

건망증 유발 물질로는 scopolamine을 사용하며, 투여는 매일 첫 번째 입수 30분전에 1 mg/kg로 복강으로 투여하였다. 4일 동안 투여 후 마지막 5일 째에는 시간은 최대 60초를 주고, 약물투여는 하지 않았으며, 모든 실험 data는 Ethovision program을 이용하여 기록 및 측정하였다.

### 4) Y-maze test

단기기억형태의 순간 공간인지력을 평가하기 위한 방법으로 약물 투여는 passive avoidance test에서와 같은 방법으로 실시하였다. Y-maze test에 이용되는 기구는 세 개의 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(ABC, CAB, BCA; 실제 변경, actual alternation) 1점 씩을 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학식에 의해 계산하였다[21,22].

변경 행동력(%) = 실제변경(actual alternation)

/최고변경(maximum alternation)×100
(최고변경 : 총 입장횟수 - 2)

5) AChE activity assay

PPA의 활성 측정은 Ellman 등[23]이 서술한 바와 같이 acetylcholine iodide를 기제로 사용해 흡광도를 측정하는 방법을 사용하였다.

AChE시료의 제조는 Teflon homogenizer(Eyela, Japan)를 이용해 수컷 5주령 ICR mouse의 대뇌피질을 분리하여 10배의 인산완충용액(100 mM, sodium phosphate buffer, pH 8.0)을 첨가하고 조직 그라인더(Potter-Elvehjem Tissue Grinders, DaiHan, Korea)로 대뇌피질을 분쇄하여 균질액을 1,000 ×g로 10분간 4 ℃에서 원심분리 후 상등액을 수득하여 그 상등액을 AChE의 시료로 사용하였다.

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

### 3. 통계처리

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

## Ⅲ. 결 과

### 1. PPA의 passive avoidance test에서의 효과

Scopolamine (1 mg/kg, i.p.)을 투여한 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 PPA 100, 200, 400 및 800 (mg/kg)의 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 scopolamine 군은 기억시험에서 latency time이 32.13±1.08초로 control 그룹의 290.75±7.57초에 대하여 통계적으로 유의성 있게 감소하였다 ($P$ <0.05). 이는 training trial시의 전기 충격을 기억하지 못한다는 것으로 판단되어 scopolamine에 의한 기억력 감퇴모델이 잘 만들어졌다고 생각된다.

반면에 PPA 100, 200, 400 및 800 (mg/kg)로 단회 투여한 결과 각각 44.63± 6.67초, 55.13±5.53초, 110.50±9.31초 및 124.00±16.00초로 scopolamine 군의 32.13±1.08초에 대하여 통계적으로 유의성 있게 latency time이 증가하였다 ($P$ <0.05, Table Ⅱ, Fig. 1). 또한 양성대조군인 tacrine 그룹에서 145.50±16.85초로 scopolamine 군에 대하여 통계적으로 유의성 있게 latency time이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

**Table II. Effect of a Single Administration of PPA Scopolamine-induced Memory Deficits in the Passive Avoidance Test in Mice**

| Group | Dose | Training trial | Test trial |
|---|---|---|---|
| | | Latency time (sec) | |
| Control | | 21.00±4.31 | 290.75±7.57 |
| Scopolamine | 1 | 21.50±4.55 | 32.13±1.08* |
| Tacrine | 10 | 28.00±6.99 | 145.50±16.85# |
| PPA | 100 | 27.88±3.21 | 44.63±6.67 |
| | 200 | 28.88±6.87 | 55.13±5.53 |
| | 400 | 28.38±5.11 | 110.50±9.31# |
| | 800 | 27.88±6.16 | 124.00±16.00# |

Data represent means ± SEM(N = 8-10).
*$P$ <0.05 as compared with the control group, #$P$ <0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

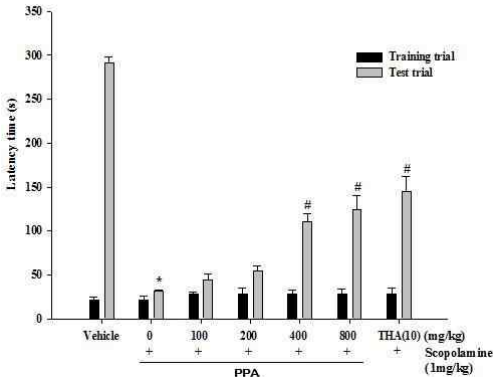



**Fig. 1. Effect of a single administration of PPA (100, 200, 400 및 800 (mg/kg), p.o.) on scopolamine-induced memory deficits in the passive avoidance test in mice.**
Data represent means±SEM(N=8-10). scopolamine (1 mg/kg, i.p.), tacrine (THA, 10 mg/kg, p.o.).
*$P$ <0.05 as compared with the control group, #$P$ <0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

## 2. PPA의 Morris water maze에 의한 학습 및 기억력 효과

PPA가 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델에서 손상된 기억에 대한 개선 효과를 passive avoidance test를 통하여 확인하였고, 공간 기억에 대한 PPA의 기억력 개선 효과를 확인하기 위하여 PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군에 추가적으로 Morris water maze 실험을 실시하였다.

### 1) Training trial of Morris Water Maze

Morris water maze test에서 4일 동안 60초 이내 플랫폼에 도달하기까지의 소요시간을 측정하는 training trial에서 제 1일째 control 군은 52.6±2.9초, scopolamine 투여군은 53.3±3.4초, scopolamine+PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군은 각각 48.9±5.5초, 51.2±3.5초, scopolamine+tacrine 투여군은 58.8 ±1.2초로 각 집단 간 유의성 있는 차이가 없었으나, 학습이 진행됨에 따라 마지막 4일째에는 플랫폼에 도달하는데 소요되는 시간이 control 군은 11.2±2.7초, scopolamine 투여군은 44.3±3.5초, scopolamine+PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군은 각각 14.3±2.9초, 14.5±1.7초, scopolamine+tacrine 투여군은 17.2±1.7초로 집단 간 유의성 ($P$ <0.05) 있는 차이를 보였다. 이에 측정 일에 따른 그룹간의 사후검정 결과, 2일째부터 scopolamine 투여군에서 control 군에 비해 학습능력이 저하되었다.

이에 비해 PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군에서는 학습수행에 유의한 증진효과가 관찰되었는데, 즉 2일째부터 플랫폼에 도달하는 소요시간이 scopolamine 투여군에 비해 통계적 ($P$ <0.05)으로 유의하게 감소하였다(Table Ⅲ, Fig. 2).

**Table III. Effect of PPA in Morris Water Maze during 4 days (Latency unit: sec)**

| Group (mg/kg) | 1st day | 2nd day | 3rd day | 4th day |
|---|---|---|---|---|
| Control | 52.6±2.9 | 22.3±4.3 | 18.3±4.0 | 11.2±2.7 |
| Scopolamine (1) | 53.3±3.4 | 47.3±4.4* | 47.4±3.5* | 44.3±3.5* |
| Tacrine (10) | 58.8±1.2 | 24.8±1.8# | 20.0±1.7# | 17.2±1.7# |
| PPA (400) | 48.9±5.5 | 24.7±5.6# | 15.6±1.7# | 14.3±2.9# |
| PPA (800) | 51.2±3.5 | 31.6±2.3# | 18.3±2.2# | 14.5±1.7# |

Each value represents the means±SEM of 8-10 mice.
*$P$ <0.05 as compared with the control group, #$P$ <0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

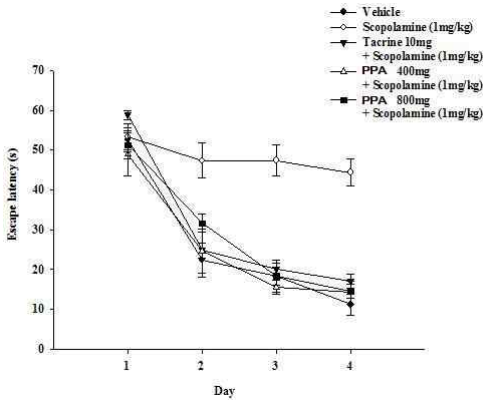



**Fig. 2. Effect of PPA on performance in the training trial sessions of the Morris water maze test in scopolamine-induced memory deficits mice.**
At 60 min before training trial session, PPA (400 and 800 (mg/kg), p.o.), tacrine (10 mg/kg, p.o.) or vehicle (same volume of 10% tween 80) solution was administered 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±SEM(n=8-10).

### 2) Retention Test of Morris Water Maze

Morris water maze test에서 마지막 날인 제 5일째 test trial를 시행하기 위해 플랫폼을 제거한 후 60초간 자유 수영을 실시하고 이를 Ethovision program을 통하여 총시간 중 플랫폼에 있었던 4분원에 머무는 시간을 측정하였다. 각 군의 기억력 측정결과는 control 군은 52.74±2.68초, scopolamine 투여군은 21.79±1.81초, scopolamine +PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군은 38.02±2.37초, 43.13±2.04초로 집단 간 유의성 ($P$ <0.05) 있는 차이를 보였다. 이에 플랫폼에 머무르는 정도에 대한 집단별 사후검정 결과, scopolamine 손상군은 control 군에 비해 유의한 ($P$ <0.05) 감소가 나타났고 PPA 투여군 (400 및 800 (mg/kg)) 에서 scopolamine 손상 군에 비해 유의성 ($P$ <0.05) 있게 증가를 보였다(Table Ⅳ, Fig. 3).

**Table Ⅳ. Effect of PPA on 5th day Retention in Morris Water Maze (Latency unit: sec)**

| Group (mg/kg) | N | Duration of 5th day Retention time (sec) |
|---|---|---|
| Control | 8-10 | 52.74±2.68 |
| Scopolamine (1) | 8-10 | 21.79±1.81* |
| Tacrine (10) | 8-10 | 43.16±3.37# |
| PPA (400) | 8-10 | 38.02±2.37# |
| PPA (800) | 8-10 | 43.13±2.04# |

Each value represents the means±SEM of 8-10 mice.
*$P$ <0.05 as compared with the control group, #$P$ <0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

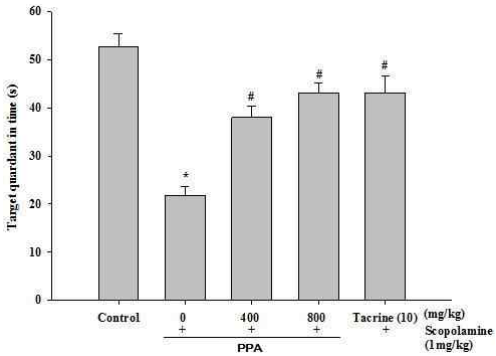



**Fig. 3. Effect of PPA on performance in the probe trial session of the Morris water maze test in scopolamine-induced memory deficits mice.**
The the probe trial sessions were composed as described in the materials and methods. Data represent means±SEM(n=8-10).
*$P$ <0.05 versus control group, #$P$ <0.05 versus scopolamine-treated group.

## 3. PPA의 Y-maze test에서의 효과

단기기억형태의 공간인지력을 평가하는 Y-maze test에 의한 변경행동력과 총 출입 횟수는 Fig. 4와 같다. Control 군과 scopolamine만 단독으로 투여한 군, scopolamine과 PPA를 동시에 투여한 실험군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다(P <0.05, Fig. 4A). 즉, scopolamine만 복강으로 투여한 군의 경우 기억력이 손상되어 변경 행동력 점수가 평균 39.31±2.97%인 반면 control 군은 평균 67.91±2.12%를 기록하였다.

한편, PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군의 경우, 53.45±2.88%, 58.87±3.69%를 기록하여, 대조군과 통계적으로 용량 의존적으로 유의한 인지기억력 향상을 보여 주었다. 반면에 각 구역으로 들어가는 총 횟수를 나타내는 total entry에서는 변화가 없는 것으로 나타나 passive avoidance test에서 확인하였듯이 spontaneous alternation이 mouse의 활동성 변화에 의해 나타난 것이 아님을 알 수 있었다(P <0.05, Fig. 4B).

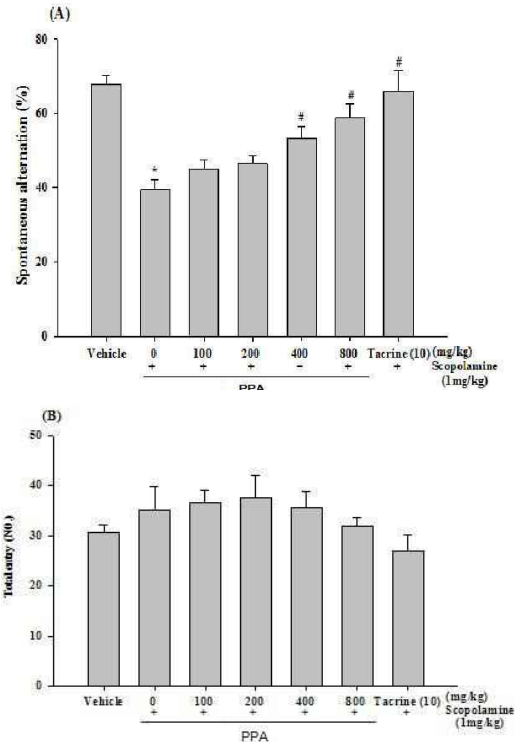



**Fig. 4. Effect of a single administration of PPA on scopolamine-induced memory deficits in Y-maze test in mice.**
A; spontaneous alternation, B; total arm entry. Data represent means±SEM(N=8-10).
*$P$ <0.05 as compared with the control group, #$P$ <0.05 as compared with the scopolamine-treated group.

## 4. PPA의 AChE 활성 측정 결과

먼저 PPA가 AChE의 활성을 억제하여 기억력 및 인지능력 개선작용이 있는지 확인하기 위하여 AChE 활성 실험을 측정하였다. 실험 결과 양성 대조군인 tacrine은 용량 의존적으로 AChE 활성을 억제하였으나 PPA의 AChE 활성 억제능 시험에서는 아무런 효과를 나타내지 않았다(Fig. 5).

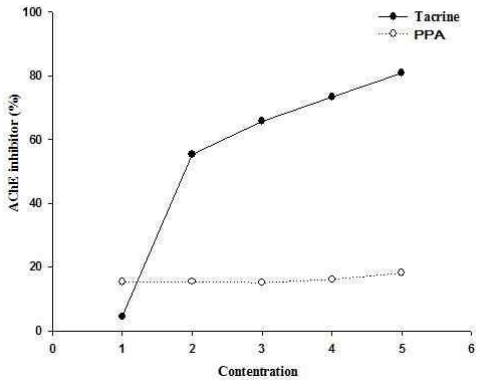



**Fig. 5. Effect of PPA on the AChE activity.**
Inhibition efficacy was expressed as percent inhibition of enzyme activity compared to the control value (100%). Each value represent means±SEM (n=3).

# Ⅳ. 고 찰

서양의학적으로 치매는 기억력의 저하를 주요한 증상으로 하며 인지 기능, 지적 능력, 감정 및 행동 변화 등에서 뚜렷한 손상을 나타내는 복합 임상 증후군으로서, 기억력, 주의력, 언어기능, 시공간 능력 등의 대뇌피질 기능장애가 발생하여 일상 사회생활을 영위하는데 큰 어려움을 겪게 되는 상태이다[24,25]. 초기 증상은 가벼운 건망증으로 시작되지만, 시간이 흐르면서 점차 증상이 악화되어 모든 뇌기능을 상실하게 된다[26]. 건망증과 치매는 모두 기억력에 문제가 생기는 질환이지만, 건망증은 시간적, 공간적인 맥락에

서 과거와 현재를 이어주는 고리인 기억 현상에 문제가 생긴 것으로 개선이 가능한 반면, 치매는 단기 기억뿐 아니라 기억력 전체가 손상되며 비가역적 경과를 가진다는 차이가 있다[27].

치매의 원인으로는 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머병이나 파킨슨병, 뇌출혈, 대사성 질환인 간성뇌병증, 윌슨병, 감염성 질환인 신경 매독, 후천성 면역결핍증, 알코올과 같은 약물중독, 뇌외상 등 여러 가지가 있다[28]. AD는 노년기에 가장 흔한 치매의 원인으로, 전 세계적으로 1500만 정도의 환자가 존재하며, 해마다 그 수가 증가하고 있다[29]. 병리학적 육안 소견으로 미만성 대뇌 피질의 위축과 이차적인 뇌실의 확장으로 나타난다. 현미경적 소견으로는 Aβ 아밀로이드를 포함하는 세포외 신경돌기반과 호은성(silver-staining)의 신경원섬유 농축체 가 신경세포질에서 관찰되며, 대뇌 동맥 혈관벽에 Aβ 아밀로이드의 축척이 보인다. 알츠하이머 환자에서는 해마와 대뇌피질에서 콜린 흡수와 아세틸콜린 합성이 감소하는 것으로 확인되었으며, 반대로 아세틸콜린을 분해하는 효소인 acetylcholine esterase(AChE)의 발현은 높은 것으로 보고되고 있다. 또한 아세틸콜린을 합성하는 효소인 choline acetyltransferase (ChAT)의 활성도가 급격히 떨어지고 이는 해마에서 최대치를 보이며, 뇌에서 니코틴성 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체 수가 감소된다[30,31]. 이러한 질병의 치료를 위해 cholinergic agonist, ACh전구체, AChE inhibitors를 사용하여 뇌의 콜린성 작용을 활성화하는 방법이 수행되고 있다[32,33].

한의학에서 현재의 AD와 유사한 최초의 개념은 張介賓의 《景岳全書》[34]에서 '痴獃'이라는 용어로 언급되었는데, "痴呆症, 凡平素無痰而或以鬱結 或以不遂 或以思慮 或以疑惑 或以驚恐而漸致痴呆言辭顚倒 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 痴呆를 정서적인 문제로 나타나는 인격의 변화로 인식하였다. 또한 陳士鐸은 《石室秘錄》[4]에서 "無非痰氣 故治呆無奇法 治痰卽治呆也"라 하여 治痰의 중요성을 강조하였고, 錢鏡湖는 《辨證奇門》[5]에서 "呆病成於鬱 鬱病必傷肝木 肝木火焚以傷心卽木爲心火所剋 肝中之血盡燥 而木爲枯土之木衣"라 하여 鬱症이 呆病을 형성할 수 있음을 언급하였다.

痴呆의 증상은 善忘善恐, 言辭顚倒, 擧動不經, 默默不言, 不飮不食, 忽笑忽歌, 忽愁忽哭, 精神淡漠 등이며, 虛證과 實證으로 나누어 虛證은 주로 肝腎陰虛 心脾兩傷 腎精虧虛 脾腎陽虛로 辨證하여 補益肝腎 滋陰養血 健脾養心 益氣補血 補益腎精 溫補脾腎 등의 治法을 應用하며, 實證으로는 痰飮과 瘀血로 因한 痰迷心竅 瘀血內低 등으로 辨證하여 割痰開竅 化濁醒神 活血化瘀通竅 등의 治法을 應用하고 있다[5,8,9,35].

본 연구에서 사용된 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제(PPA)는 효능이 비슷한 약물을 함께 사용하여 상호작용을 증강하는 相須의 배합 방법을 이용한 제제이다. 靈神草는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 애기풀(*Polygala japonica* Houtt.)의 全草로 味苦하면서 微辛하며 性은 平하여 肺, 肝, 心經에 歸經하여 寧心安神, 祛痰止咳, 散瘀止血, 解毒消腫의 효능이 있다. 遠志(Polygalae Radix)는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 遠志(*Polygala tenuifolia* WILLD)의 뿌리로 味苦辛하고 性은 微溫하며 肺, 心經에 歸經하여 寧心安神, 祛痰利竅, 消散癰腫의 효능이 있다. 石菖蒲(Acori Graminei Rhizoma)는 天南星科(Araceae)에 속한 石菖蒲(*Acorus Gramineus* SOLAND.)의 根莖으로 味苦辛하고 性은 溫하며 心, 胃經에 歸經하여 醒神益智, 開竅割痰, 化濕開胃의 효능이 있다. 이들 세 약재가 함께 작용하면 痰飮과 瘀血을 제거하여 心竅를 通利시키고

心氣의 울체를 散하여 뇌의 작용을 활발하게 할 수 있으리라 사료되었으며, 이에 본 연구를 실시하게 되었다[10-13].

靈神草, 遠志, 石菖蒲의 단일 약제에 관한 연구로는 이[36] 의 靈神草의 항우울 효과에 대한 연구, 이 등[37]의 遠志가 신경세포 손상에 미치는 효과에 대한 연구, 황 등[38]의 遠志에 의한 염증성 세포활성물질 억제 효과에 관한 연구, 최 등[39]의 石菖蒲가 치매 모델에 미치는 영향에 대한 연구 등이 있으며, 혼합 제제에 관한 연구로는 이 등[40]과 한 등[41]의 遠志 石菖蒲의 혼합추출액에 대한 항치매 효과 연구들이 있으며, 현재까지 靈神草 遠志 石菖蒲 혼합제제가 기억 및 인지 개선에 미치는 영향에 관한 연구는 보고된 바가 없다.

최근 한약재를 가공 처리하여 신약을 개발하는 방법에 대한 관심이 높아가고 있다. 치매에 있어서도 전통의약이나 민간요법으로 사용되어 온 한약재로부터 항치매 기능성 식품 및 한약재 신약을 발굴하고자 하는 연구가 미국, 유럽 및 일본 등의 선진국을 중심으로 하여 세계적으로 각광받고 있다[42]. 우리나라의 경우에도 전통적으로 사용되어 온 한약재로부터 치매 예방 및 기억력 증진소재 개발에 관심이 집중되고 있고, 다양한 약물에서 그 가능성들이 점차적으로 보고되고 있다[43]. 이러한 사실을 배경으로 하여 전통적으로 기억력 개선에 사용되어 온 한약재를 배합한 혼합제제의 효능을 확인하고자 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴모델에서 passive avoidance test, Morris water maze test 및 Y-maze test를 이용하여 PPA의 기억력 개선 효능을 검토하였다.

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 passive avoidance test는 흔히 단순 기억에 대한 효과를 입증할 때 쓰이는 모델로, 어두운 곳을 선호하는 흰쥐의 특성을 이용한 것이다[44]. 또한 Morris water maze test는 사물에 대한 공간 인지 능력을 알아보기 위한 것으로, maze에 4개의 marker를 사용하여 실험동물이 공간에 대한 식별능력을 관찰하는 실험이다. 이에 본 연구에서는 PPA가 실제로 감퇴된 기억력을 개선시켜줄 수 있는지를 검색하기 위하여 muscarinic 수용체의 길항제인 scopolamine을 투여하여 만든 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 실험을 실시하였다.

Passive avoidance test에서 scopolamine으로 유도한 기억력 감퇴 모델에서는 전기 자극에 대한 latency 시간이 정상군보다 현저히 낮음으로서 기억력 손상을 확실히 유발했다고 보이며, 양성대조군인 tacrine 투여군은 latency 시간이 정상군과 많은 차이를 보이지 않았으며 scopolamine 투여군에 비하여 latency 시간이 현저히 증가하였으므로 기억력이 개선되었음을 알 수 있었다. 실험군인 PPA 투여군에서는 100 및 200 (mg/kg) 투여군은 latency 시간이 대조군과 비교했을 때 유의성이 없었으나, 400 및 800 (mg/kg) 투여군에서는 scopolamine 투여군 그룹에 대해 유의성 있게 증가하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 따라서 scopolamine으로 유도한 건망증 생쥐의 passive avoidance test에서 latency time이 길어졌다는 것은 PPA가 콜린성 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하므로, 정상인의 기억력과 인지 기능감퇴 증상뿐만 아니라 치매질환에서도 유효한 효과가 있을 것으로 사료된다. 또한 Morris water maze test에서도 PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군이 마지막 날인 6일째 test trial를 시행한 결과 플랫폼에

있었던 4분원에 머무는 시간이 scopolamine군에 대해 유의성 있게 증가하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 2, Fig. 3). 그리고 Y-maze test에서도 scopolamine 투여군에서는 변경 행동력이 정상군보다 현저히 낮음으로서 기억력 손상을 확실히 유발했다고 보이며, 양성대조군은 변경 행동력이 정상군과 많은 차이를 보이지 않았으므로 기억력이 개선되었다고 할 수 있다. PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군에서 변경 행동력이 scopolamine 투여군과 비교했을 때 용량 의존적으로 유의성을 띠는 것으로 보아 기억력 개선에 효과가 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

본 *in vivo* 연구에서 PPA는 용량 의존적으로 기억력 및 인지 기능 개선에 효과를 나타내었으나, 아세틸콜린 분해 억제 결과에서는 전혀 효과를 확인할 수 없었다(Fig. 5). 이는 PPA의 기억력 개선 효과가 해마 신경 세포와 관계된 것이 아니라 다른 기전을 통해 효과를 발현하는 것이라 사료된다.

이상의 결과 PPA의 경구 투여를 통해 scopolamine으로 생긴 기억 및 인지 기능 장애를 개선할 수 있다는 결론을 얻었다. 이는 PPA가 cholinergic 신경계에 작용하여 학습 및 기억력을 회복시켰다는 것을 의미하며, 정상인의 기억력과 인지 기능 감퇴 증상뿐만 아니라 치매 질환에서도 유효한 효과가 있을 것으로 생각된다. 향후 PPA의 기억력 개선 작용 평가를 위하여 다양한 활성 성분에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되며, 또한 이러한 작용에 대한 기전 연구가 더욱 상세히 진행되어져야 할 필요가 있을 것이다.

# Ⅴ. 결 론

Scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 모델에서 PPA의 기억력 및 인지 기능 개선에 관한 연구를 시행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Passive avoidance test에서 PPA 400 및 800 (mg/kg)의 투여군에서 latency time이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하였다.
2. Morris water maze test에서 4일 동안 실시되는 획득 시행에서 PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군이 양성 대조군인 tacrine 투여군과 비슷한 양상으로 공간기억능력의 향상이 관찰되었다.
3. Morris water maze test에서 마지막 날 플랫폼을 maze에서 제거한 후 플랫폼이 있는 분원 안에 머문 시간을 측정한 결과, PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군 및 tacrine 투여군이 대조군과 유사하게 학습 및 기억능력이 회복되는 것을 관찰 할 수 있었다.
4. Y-maze test에서 PPA 400 및 800 (mg/kg) 투여군이 spontaneous alternation이 scopolamine 투여군에 비해 유의성 있게 증가하여 학습 및 기억력이 회복되었다는 것을 알 수 있었다.
5. 아세틸콜린 분해 효소 활성을 측정한 결과 PPA는 AChE 활성 억제능 시험에서 아무런 효과를 나타내지 않았다.

이상의 결과로 보았을 때 PPA는 기억력 개선 및 인지 능력 향상 효과를 지니는 한약재이라고 확인되며 기억과 인지 기능 장애의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

# 참고문헌


1. Lee G, Lee K, Yang S, Jun W. Quality of Life and the Associate Factors in Dementia. *J Korean Acad Psychiatr Ment Health Nurs.* 2008;17(3):273-80.
2. Kennedy DO, Scholey AB. Ginseng:potential for the enhancement of cognitive performance and mood. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003; 75:687-700.
3. Kennedy DO, Scholey AB. The psychopharmacology of European herbs with cognition-enhancingproperties. *Curr Pharm Des.* 2006;12 :4613-23.
4. 陳士鐸. 國譯石室秘錄. 서울:書苑堂. 1984:102, 316-7.
5. 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北:甘地出版社. 1990: 222-5, 233-5.
6. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:杏林出版社. 1982: 129-35, 534, 545, 550.
7. 楊思澎 外. 中醫臨床大全. 北京:北京科學技術出版社. 1991:224-30.
8. 陳輝. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. 1993: 242-51, 784-91.
9. 黃大東. 實用中醫內科學. 上海:上海科學技術出版社. 1989:378-81.
10. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울:영림사. 2000:496-7, 523-4.
11. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 역. 중약대사전. 서울:정담. 1998:424-7.
12. 吳其溶選. 植物名實圖考. 北京:世界書局. 1987 :383.
13. 中華本草委員會. 中華本草 5卷. 上海:上海科學技術出版社. 1999:57.
14. Giacobini E. From molecular structure to Alzheimer therapy. *Jpn J Pharmacol.* 1997; 74(3):225-41.
15. Giacobini E. Present and future of Alzheimer therapy. *J Neural Transm Suppl.* 2000;59 :231-42.
16. Howes MJ, Perry NS and Houghton PJ. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytother. Res.* 2003;17:1-18.
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. LeDoux JE. Emotional memory:in search of systems and synapses. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;702:149-57.
20. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984;11(1):47-60.
21. Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN. Attenuation of scopolamine induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and beta-carboline. *Psychopharmacology.* 1988;94:491-5.
22. Yamaguchi Y, Miyashita H, Tsunekawa H, Mouri A, Kim HC, Saito K, Matsuno T, Kawashima S, Nabeshima T. Effect 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.

23. 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.
24. Goldman JG. Dementia, Movement Disorders. *Encyclopedia of Movement Disorders.* 2010; 290-300.
25. Jonathan B, Vincent L, Catherine, Jane B. Psychosocial interventions for people with moderate to severe dementia:A systematic review. *Clinical Effectiveness in Nursing.* 2006; 9(1):1-15.
26. Gainotti G, Marra C. Progress and controversies in neuropsychology of memory. *Acta Neurol.* 1992;14(4-6):561-77.
27. Kim DH, Yoon BH, Kim YW, Lee S, Shin BY, Jung JW, Kim HJ, Lee YS, Choi JS, Kim SY, Lee KT, Ryu JH. The seed extract of Cassia obtusifolia ameliorates learning and memory impairments induced by scopolamine or transient cerebral hypoperfusion in mice. *J Pharmacol Sci.* 2007;105(1):82-93.
28. Dag A, Clive B. Psychiatric issues in non-Alzheimer dementias. *Clinical Neuroscience Research.* 2004;3(6):397-412.
29. Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease:Two decades of progress. *Alzheimer's and Dementia.* 2005;1(2):93-8.
30. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev.* 2003;41 :268-87.
31. Blokland A. Acetylcholine:a neurotransmitter for learning and memory. *Brain Res Rev.* 1995;21:285-300.
32. Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacology & Therapeutics.* 2000;88(2):93-113.
33. Yuki TT, Toshiaki K, Mitsuhiro S, Hiroshi K, Hachiro S, Akinori A. Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Neuropharmacology.* 2006;51(3):474-86.
34. 張介賓. 張氏景岳全書. 서울:翰成社. 1978:610-1.
35. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회 편. 한의신경정신과학. 파주:집문당. 2007:324-33.
36. 이은경. 靈神草의 항우울 효과에 대한 행동약리학적 연구. 대구한의대학교 대학원 박사학위 논문. 2009.
37. 이수배, 성낙술, 이영종. 遠志가 NMDA로 유발된 신경세포 손상에 미치는 효과. 대한본초학회지. 2005;20(2):115-25.
38. 황시영, 강형원, 류영수. 遠志에 의한 뇌성장세포로부터 염증성 세포활성물질 분필의 억제 효과에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 1999;10(1):95-108.
39. 최혁, 김상호, 이대용, 안대종, 강형원, 류영수. pCT105로 유도된 치매 모델에서 石菖蒲 수추출액이 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2002;13(2):173-94.
40. 이성률, 강형원, 김상태, 류영수. 遠志와 石菖蒲 혼합추출액의 pCT105로 유도된 신경세포암 세포주에 대한 항치매 효과. 동의병리학회지. 2003;17(4):1037-49.
41. 한원주, 김형수, 김상태, 김태헌, 류영수, 강

형원. 遠志 石菖蒲의 단독 및 혼합추출액이 CT105로 유도된 신경세포암 세포주에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2003;14(2):95-105.

42. 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.
43. 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.
44. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Brain Res Rev.* 2003;41(2-3):268-87.