

# 六味地黃湯加味方이 흰쥐의 기억능력과 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향

최 보 업

한국한의학연구원 학연협동과정

## Abstract

### The effect on gene expression profile of rat hippocampus caused by administration of memory enhancing herbal extract.

Choi Boeop

Korea Institute of Oriental Medicine

The herbal extract (YMT\_02) is a modified herbal extracts from Yukmijihwangtang (YMJ) to promote memory-enhancing. The YMJ extracts has been widely used as an anti-aging herbal medicine for hundred years in Asian countries. The purpose of this study is to: 1) quantitatively evaluate the memory-enhancing effect of YMT\_02 by behavior task, 2) identify candidate genes responsible for enhancing memory by cDNA microarray and 3) assess the anti-oxidant effect of YMT\_02 on PC12 cell.

Memory retention abilities are addressed by passive avoidance task with Sprague-Dawley (SD) male rat.

Before the training session, the rats are subdivided into four groups and administrated with YMT\_02, Ginkgo biloba, Soya lecithin and normal saline for 10 days. The retention test was performed. 24 hours after the training session. The retention time of the YMT\_02 group was significantly ( $p < 0.05$ ) delayed (~100%), whereas Ginkgo biloba and Soya lecithin treatment delayed 20% and 10% respectively.

The hippocampi of YMT\_02 and control group were dissected and mRNA was further purified. After synthesizing cDNA using oligo-dT primer, the cDNA were applied to Incyte rat GEMTM 2 cDNA microarray.

The microarray results show that prealbumin(transthyretin), phosphotidylethanolamine N-methyltransferase, and PEP-19 are expressed abundantly in the YMT\_02 treated group. Especially, PEP-19 is a neuron-specific protein, which inhibits apoptotic processes in neuronal cell. On the other hand, transcripts of RAB15, glutamate receptor subunit 2 and CDK108 are abundant in control group. Besides, neuronal genes involved in neuronal death or neurodegeneration such as neuronal-pentraxin and spectrin are abundantly expressed in control group. Additionally, the YMT\_02 shows an anti oxidative effect in the PC12 cell. The list of differentially expressed genes may implicate further insight on the action and mechanism behind the memory-enhancing effect of herbal extracts YMT\_02, for example, anti-apoptotic, anti-oxidative, and neuroprotective effects.

**Key words** : YMT\_02, Yukmijihwangtang, Passive avoidance test, Learning and Memory, anti-oxidative effect, ROS, cDNA microarray, hippocampus.

## I. 서론

記憶이란 경험의 결과나 주위환경으로부터 얻어진 정보를 저장하고 이를 다시 끄집어내어 회상하는 것을 말한다<sup>1)</sup>. 기억의 과정은 符號化, 強化, 引出의 3 단계로 구분하는데 이러한 기억의 과정에는 腦神經 연결부위의 화학적인 물질의 교류<sup>2)</sup> 뿐 아니라 短期記憶이 長期記憶으로 변환되는 과정에서 뇌의 구조적인 변화도 생기는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 그러나 기억능력을 증강시키는 약물과 그 작용 기전에 대한 구체적인 연구 발표는 아직 없었다.

韓醫學에서는 인체의 정신활동을 뇌라는 일부분에서 발현하는 현상으로 국한시키지 않고 全一의 次元에서 인식하며 감정 및 사유 등의 정신활동을 神이라 하고 그 작용면에서 오장과 관련지워 그 기능이 구체화되어 진다<sup>4)</sup>. 따라서 기억에 대한 연구도 단지 뇌 부위에만 국한하지 않고 전신적인 기능의 일부로 연구되어 지고 있다.

기존의 기억에 대한 한의학적 연구는 心과 脾의 기능과 기억의 상관성에 대한 연구가 주류를 이루었으나<sup>16,17)</sup> 최근에는 腎의 封藏之本의 특성에 따른 藏志의 기능이 무의식 속에 沈靜된 기억, 즉 현재의 의식 속에는 없지만 저장되어 있다가 회상이 가능한 長期記憶의 의미로 해석됨에 따라<sup>18)</sup>, 腎과 기억사이의 상관성에 대한 연구가 이루어졌고 또한 腎機能의 강화가 기억력을 증강시킴을 行動實驗을 통하여 입증한 논문들도 발표되었다.<sup>19)</sup> 그러나 신기능의 강화가 어떤 기전을 통하여 기억력을 증강시키는가에 대한 실험연구는 없었다. 특히 한번에 수 천 개의 유전자 발현량 차이를 동시에 비교할 수 있는 cDNA microarray를 이용한 실험은 더욱이 없었다.

이에 본 연구는 滋陰·補腎의 대표적 방제인 六味地黃湯에 補陰·補精의 효과가 있고 기억능력증진 효과가 확인된<sup>20)</sup> 枸杞子를 가미하여 보신·보정의 효력을

높인 六味地黃湯加味方(YMT\_02)을 연구 대상 처방으로 하여 흰쥐에 투여하고 passive avoidance test를 통하여 실제 기억능력이 증진되었는가를 확인하였다. 또한 기억의 강화에 있어서 핵심적인 역할을 하는 hippocampus에서 발견되는 특이 유전자들을 cDNA microarray를 이용하여 검색하고 그 유전자들의 계통을 고찰하는 한편 YMT\_02 추출물이 PC12 cell 抗酸化에 미치는 영향을 확인하여 腎機能과 기억, 로화의 상호 관련성과 기억능력 증강 기전에 관하여 살펴 본 바 의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 檢液의 調製

#### (1) YMT\_02

개별약물을 ethyl alcohol 추출한 후 여과하여 감압 농축기로 농축한 후 동결건조기로 凍結乾燥하여 개별 약물의 동결건조물을 얻었다. 개별 동결건조물은 추출 전 중량을 기준으로 비율별로 합하여 YMT\_02 동결건조물 mix를 얻은 후 1g/ml 농도로 증류수에 녹이고 10,000 g에서 15분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거한 후, 0.22 $\mu$ m filter를 통과시켜 실험에 사용하였다.

#### (2) Ginko biloba

YMT\_02의 行動實驗 결과를 비교하기 위하여 대조군으로 사용한 Ginkoba (Pharmaton, USA)는 Ginkgo biloba 잎의 동결건조물로 성분은 24% ginkgo flavone glycosides, 6% terpene lactones이며 기억력 향상효과를 지닌 건강보조식품으로 시중에 판매중이고 성인 일일 복용량은 160mg이다.

### (3) Nature Made

YMT\_02의 행동실험 결과를 비교하기 위하여 대조군으로 사용한 Nature Made (Nature Made Nutritional Products, USA)는 phosphatidyl Choline (144mg)이 기본 성분인 Soya lecithin (437mg)이 600mg/tablet에 함유된 건강보조식품으로 기억력 향상효과를 지닌 것으로 알려져 있으며 성인 일일 복용량은 600mg이다.

## 2. 行動實驗

### (1) 실험 도구

受動回避實驗(Passive avoidance test)을 위해 제작된 往復箱子(Passive avoidance box: Shuttle box)는 GEMINI Avoidance System (San Diego Instruments, San Diego, CA)의 모델을 바탕으로 크기를 60cm × 20cm × 20cm로 변경하여 정도산업(Seoul, Korea)에서 제작하였다. 이 상자는 아크릴 판을 벽으로 하여 동일한 크기의 두 방으로 나뉘어 있으며 두 방을 나누는 벽에는 가로, 세로 각 10cm인 斷頭臺 형식의 문이 있어 외부에서 상하로 열고 닫을 수 있게 하였다. 좌측 방의 뚜껑에는 매우 밝은(250W) 나트륨 전구를 달아 실험동물이 싫어하는 매우 밝은 환경을 조성할 수 있게 하였다. 우측 방의 바닥에는 전기충격을 실험동물의 발바닥에 가할 수 있도록 밑면에 스테인레스 봉을 이용한 通電裝置를 설치하였고 AC 可變電源 電氣衝擊發生機를 이용하여 2.0mA의 전기충격을 가할 수 있게 하였다. 좌측 방의 밝기를 증가시키기 위해 좌측 방의 벽은 알루미늄 호일로 코팅하여 빛의 반사를 최대화하였으며 우측 방은 무광의 검은 색으로 칠하였다. 실험동물이 어느 방에 있는지를 살피기 위해 밖에서 안을 살필 수 있도록 높이 1cm의 작은 반투명 창을 만들었다.

### (2) 실험동물군의 분류

대조군, Ginko biloba군, Nature Made군, YMT\_02군의 4개의 군으로 나누고 각 군 당 10, 10, 10, 12마리씩 실험을 진행하였다.

#### ① 대조군

정상상태의 흰쥐에게 특별한 처치 없이 물과 사료를 충분히 공급한 후 학습과 기억검사를 실시하였다.

#### ② Ginko biloba군

정상상태의 흰쥐에게 기억검사를 실시하기 전 10일간 실험동물의 체중 100g 당 2.6mg의 Ginko biloba 수용액이 투여되도록 飲用水에 희석하여 섭취하게 하였으며 학습과 기억검사가 진행되는 동안에도 계속하여 투여하였다.

#### ③ Nature Made群

정상상태의 흰쥐에게 기억검사를 실시하기 전 10일간 실험동물의 체중 100g 당 10mg의 Nature Made 수용액이 투여되도록 음용수에 희석하여 섭취하게 하였으며 학습과 기억검사가 진행되는 동안에도 계속하여 투여하였다.

#### ④ YMT\_02群

정상상태의 흰쥐에게 기억검사를 실시하기 전 10일간 실험동물의 체중 100g 당 2.6g의 YMT\_02가 투여되도록 음용수에 YMT\_02 동결건조물을 희석하여 섭취하게 하였으며 학습과 기억검사가 진행되는 동안에도 계속하여 투여하였다.

### (4) Passive avoidance test

Da Cunha<sup>21)</sup>의 방법을 응용하여 시행하였다.

### ① 학습 1일째

往復箱자의 좌측 방의 불을 켜고 좌 우측 방을 막고 있는 문을 개방한 후 실험동물을 꼬리가 문쪽으로 향하게 위치 시켰다. 실험동물은 방을 탐색하다가 본능적으로 상대적으로 어두운 우측 방으로 이동하게 된다. 우측 방으로 이동하면 1분간 우측 방을 탐색하게 한 후 실험동물을 꺼내었다. 상기 방법을 2회 반복하여 우측 방이 상대적으로 편안함을 학습시켰다.

### ② 학습 2일째

왕복상자의 좌측 방에 불을 켜고 실험동물을 꼬리가 문쪽으로 향하게 위치시키면 실험동물을 곧바로 우측 방으로 이동하게 된다. 이때 문을 닫고 우측 방의 바닥에 장치된 전기충격장치를 이용하여 실험동물의 발바닥에 2.0mA의 전기충격을 5초간 가하였다. 전기충격을 가한지 4초 후에 문을 열어주면 실험동물은 곧바로 좌측 방으로 이동하게 된다. 상기의 방법으로 우측 방에는 강력한 전기자극이 있음을 학습시켰다.

### ③ 記憶檢査(Retention test)

기억검사는 2일째의 학습이 끝난 후, 24시간 후에 실시하였다.

왕복상자의 좌측 방에 불을 켜고 문을 개방한 후 실험동물의 꼬리가 문 쪽으로 향하게 위치시켰다. 실험동물의 기억능력이 우수할 수록 학습 2일째 경험했던 강력한 전기자극을 기억하고 우측 방으로 진입하는 것을 꺼리게 된다. 앞발과 뒷발 모두가 우측 방으로 들어간 시간을 측정하였다. 측정시간은 초 단위로 기록하며 600초 이상이 경과될 경우에는 600초로 기록하였다.

## 3. cDNA Microarray

### (1) Hippocampus 적출 및 RNA 분리

Retention test 결과 retention latency가 가장 빠른 흰

쥐와 가장 늦은 흰쥐 1마리씩을 배제하고 대조군에서 retention latency가 두 번째로 빠른 흰쥐 1마리와 YMT\_02군에서 retention latency가 두 번째로 늦은 흰쥐 1마리를 선정하였다. 선정된 흰쥐를 희생시키는 과정에서 불필요한 뇌의 변화 및 외상을 막기 위하여 마취제를 사용하지 않고 單發性의 강한 충격을 脊椎部에 주어 희생시키고 신속하게 Hippocampus를 채취한 후 -70°C에서 보관하였다.

채취된 시료는 TRIzol reagent (Gibco BRL, Life Technologies, USA)를 사용하여 제조사가 제공한 protocol로 RNA를 분리하였다.

### (2) cDNA Microarray

분리된 RNA는 spectrophotometer (DU500, Beckman, Inc., USA)로 정량한 후 Oligotex mRNA midi kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 사용하여 mRNA를 정제하였다.

mRNA는 spectrophotometer로 정량한 후 600ng (50ng/ $\mu$ l)을 dry-ice 처리하여 Incyte Genomics (Palo Alto, California, USA)에 보내서 Cy5-dUTP (실험군)와 Cy3-dUTP (대조군)로 labeling하고, Incyte rat GEM 2 microarray (Incyte Genimics, Inc., USA)에 hybridization하여 primary data를 얻었다.

Incyte rat GEM 2 microarray는 SD rat의 중추신경계의 유전자를 포함하고 있는 cDNA chip으로 총 8,478개의 유전자가 들어 있고 이 중 특이 유전자는 7,747개 (annotated gene 5,087개, unannotated gene 2,660개)이다.

결과 data 분석과 plotting은 GEMTools software (Incyte Genimics, Inc., USA)를 사용하였으며 두 cDNA의 유전자 발현량 비교는 BDE (balanced differential expression)를 Formula 1. 과 같이 구하여 표시하였다. 이때 Cy5 signal value는 internal control을 이용하여 normalization한 후 사용하게 된다.

Formula 1. BDE (balanced differential expression)

$$\text{BDE} = \frac{\text{normalized Cy5 signal value}}{\text{Cy3 signal value}}$$

if BDE < 1

$$\text{BDE} = - \frac{\text{Cy3 signal value}}{\text{normalized Cy5 signal value}}$$

4. PC12 cell 抗酸化 효과

(1) PC12 cell

PC12 cell (Rat, pheochromocytoma)은 한국 세포주 은행에서 구입하여 사용하였다. (KCLB # 21721)

(2) PC12 cell의 培養

PC12 cell은 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA) 및 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Life Technologies, USA)이 함유된 RPMI 1640 배지 (Gibco BRL, Life Technologies, USA)를 사용하여, 온도와 습도가 유지되는 37°C 배양기에서 95%의 공기와 5% CO<sub>2</sub>의 혼합기체를 지속적으로 공급하면서 배양하였다.

(3) YMT\_02와 hydrogen peroxide의 처리

1 × 10<sup>5</sup> cells/ml의 PC12를 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator (Nuair, USA)에서 배양하였다. 배양액을 제거하고 YMT\_02 건조추출물을 최종농도가 20, 40, 60, 80, 100 mg/ml 농도가 되도록 배지에 희석하여 cell에 처리하고 37°C에서 24시간 동안 前處理하였다. 24시간 후 cell을 같은 배지로 1회 水洗하고 250µM hydrogen peroxide (Sigma, USA)가 포함된 배지로 30분간 처리하였다.

(4) MTS assay

細胞增殖 및 細胞毒性的 측정은 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, UK)를 사용하여 수행하였다. 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml의 PC12 cell을 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 세포에 YMT\_02가 포함된 배지에 넣고 동일한 조건에서 24시간 배양하였다. 세포를 배지로 1회 세척한 다음 hydrogen peroxide로 30분간 처리하고 각각의 well에 세포액 100µl당 20µl의 MTS 용액을 넣고 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 반응 후 microplate reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 490nm에서 UV 吸光度를 측정하였다.

(5) ROS (Reactive Oxygen Species) 측정

ROS 측정은 Zhang 등22)의 방법을 응용하여 실시하였다. 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml의 PC12 cell을 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 세포에 YMT\_02가 포함된 배지에 넣고 동일한 조건에서 24시간 배양하였다. 세포를 FBS-free 배지로 1회 수세한 다음 hydrogen peroxide로 30분간 처리하고, N',N-dimethyl formamide (amresco, USA)에 용해된 H2DCFDA(Molecular Probes, USA)를 최종농도가 50µM이 되도록 처리하여 37°C water bath에서 1시간 반응하였다. 발생된 螢光은 Fluoroscan Ascent FL(Thermo Labsystem, Finland)을 이용하여 excitation 485nm / emission 538nm에서 측정하였다.

5. 통계 처리

기억검사의 결과 data는 mean±SEM (standard error mean)로 표시하였고 결과가 非母數的 (Nonparametric)인 양상을 나타내므로 유의성 평가는 SPSS 8.0 for

windows (SPSS, Inc.)를 이용하여 Mann-Whitney U test를 실시하였다.

PC12 cell의 MTS 및 ROS 測定 결과 data는 mean±SD로 표시하였으며 유의성 평가는 SPSS 8.0 for windows (SPSS, Inc.)를 이용하여 Student t-test로 처리하였다

cDNA microarray의 대조군과 YMT\_02群의 signal value 간의 선형회귀분석에는 GraphicPad Prizm 3.02 (GraphicPad software, Inc.)를 이용하였다.

### III. 실험 결과

#### 1. 記憶能力檢査

YMT\_02가 흰쥐의 기억능력에 미치는 영향을 알아보기 위해 학습 24시간 후 기억능력 측정을 한 결과는

Table I 과 같다.

측정 결과 우측 방의 전기자극에 대한 공포를 기억함으로써 우측 방으로 가기를 주저하는 시간인 retention latency가 Ginko biloba군, Nature Made군, YMT\_02군 모두 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 YMT\_02 군만이 평균 487.6±57.42 (평균±표준오차, n=12)초로 대조군 평균 238.1±72.40(평균±표준오차, n=10)초에 비해 유의하게 길었다. (P=0.047, Mann-Whitney U test)

#### 2. cDNA Microarray

Passive avoidance test를 통하여 기억능력을 측정된 결과 대조군에서 retention latency가 두 번째로 빠른 4번 흰쥐를 선정하였고 실험군에서는 retention latency가 600 이상인 흰쥐가 6마리나 되었으므로 600인 흰쥐 중 8번을 선정하여 cDNA microarray를 실시하였다.

Table I. The retention latency of passive avoidance response.

	No. of Rat	Control	Ginko biloba	Nature Made	YMT_02
Retention latency(sec)	1	194	496	600	110
	2	48	600	0	600
	3	13	233	84	596
	4	19	600	454	54
	5	312	23	600	559
	6	600	171	114	389
	7	224	16	377	553
	8	600	24	450	600
	9	362	169	11	600
	10	103	600	0	600
	11				600
	12				600
Mean ± SEM (sec)		238.1±72.40	293.2±80.26	268.9±79.43	487.6±57.42

The retention test was performed 24 h after training session.

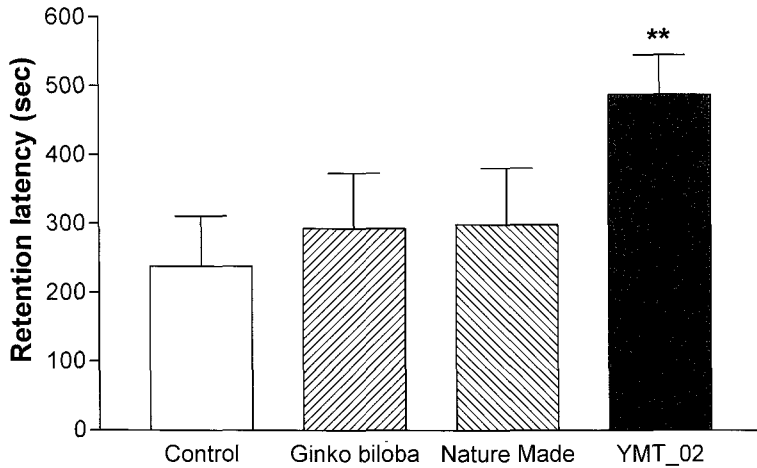


Fig. 1 The retention latency of passive avoidance response. The retention test was performed 24 h after training session.

Normal : group of rats without any treatments(n=10)

Ginko biloba : group of rats administered with 2.6mg/day of Ginko biloba for 10days(n=10)

Nature Made : group of rats administered with 10mg/day of Nature Made for 10days(n=10)

YMT\_02 : group of rats administered with 2.6g/day of YMT\_02 for 10days(n=12)

Vertical bars represent means(±SEM) of retention latencies. Comparisons were made by using Mann Whitney test.

\*\* P<0.05 vs. respective control group,

cDNA microarray의 scan 결과는 별첨자료로 첨부하였다.

대조군과 YMT\_02군의 cDNA microarray scan 결과를 log-log scale의 scatter plot으로 표시하면 Fig. 2와 같다. Cy3 signal value는 Cy3-dUTP로 labeling된 대조군의 cDNA가 DNA chip에 hybridization된 정도를 의미하며 Cy5 signal value는 Cy5-dUTP로 labeling된 YMT\_02군의 cDNA가 DNA chip에 hybridization된 정도를 의미한다. 다만 Cy5 signal value는 internal control을 이용하여 normalizing 해서 balanced Cy5 signal value를 구하였고 BDE 역시 이 수치를 이용하여 구하였다.

(-) 값을 지니는 점들은 YMT\_02군에서 많이 발현된

유전자를, (+) 값을 지니는 점들은 대조군에서 많이 발현된 유전자를 의미한다. 거의 대부분의 점들은 1의 선상에 존재함으로써 두 군에서 비슷하게 발현된 것으로 나타났다. 절대값 5이상의 점들, 즉 +5이상이거나 -5이하의 점들은 거의 모두 hybridization의 효율성 확인 및 normalization을 위한 internal control들이다.

BDE가 |2| 이상의 발현량 차이를 보인 유전자는 총 27종이었으며 이중 기능이 밝혀진 유전자는 19종, 기능이 밝혀지지 않은 유전자는 8종이었다. 이들을 다시 대조군과 YMT\_02군 각각에서 많이 발현된 유전자로 구분하여 표시하면 Fig. 2와 같다.

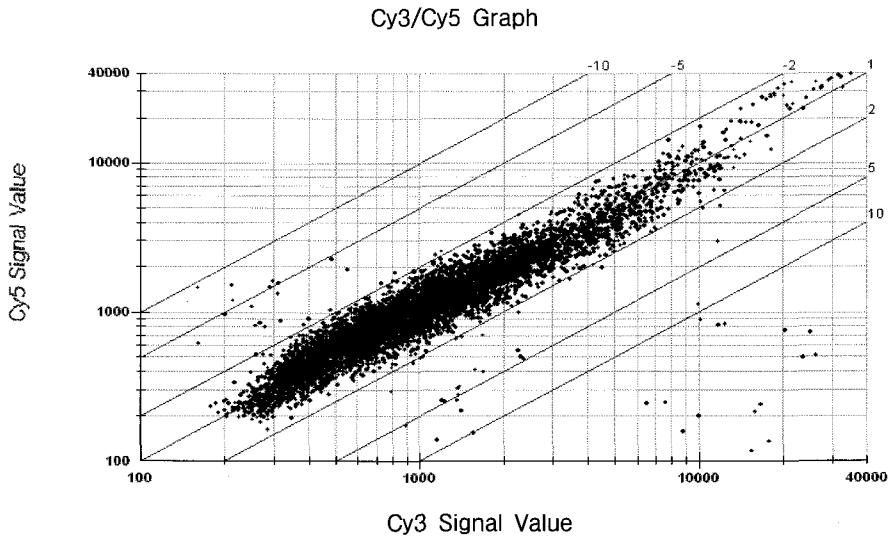


Fig. 2. Comparison of hybridization intensity.

The scatter plot of Cy5 and Cy3 signal value is shown in log-log scale. Cy3 signal value means the hybridization intensity of normal group, as Cy5 signal value, which is normalized using internal control, does that of YMT\_02 group. all dots  $> |5|$  are internal control for the analysis of the hybridization efficiency.

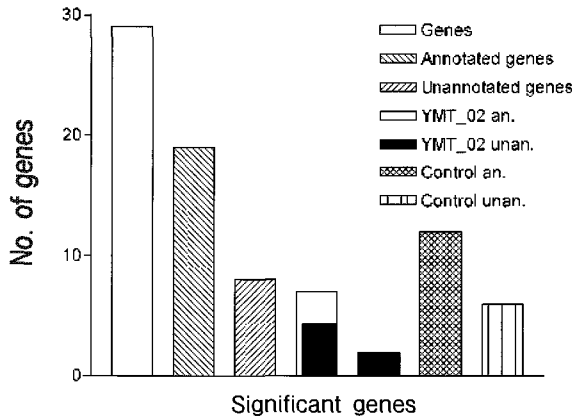


Fig. 3. Number of significant genes in Control and YMT\_02.

The genes, whose BDE is considered significant, was over 2 fold. The specific categories is labeled: (1) Genes, total number of genes which is considered significant; (2) Annotated genes, total number of annotated genes of significant genes; (3) Unannotated genes, total number of unannotated genes of significant genes; (4) YMT\_02 an., total number of annotated genes which is abundant in YMT\_02; (5) YMT\_02 unan., total number of unannotated genes which is abundant in YMT\_02; (6) Control an., total number of annotated genes which is abundant in Control; (7) Control unan., total number of unannotated genes which is abundant in Control.



의미있는 발현량 차이를 보인 유전자중 기능이 밝혀진 유전자들의 목록은 Table II.와 같다.

Table II. The genes which significantly differentially expressed in Control and YMT\_02..

Gene Name	BDE	Genbank*
Rat prealbumin (transthyretin)	-3.2	K03252
Mouse mRNA for type II 57 kd keratin.	-2.2	X03491
Rat phosphotidylethanolamine N-methyltransferase	-2.2	L14441
Rat neuron-specific protein PEP-19	-2.1	M24852
Mouse Purkinje cell protein-4 (Pcp-4)	-2.1	M96359
Rat Axl receptor tyrosine kinase	-2.0	AF046886
Mouse mRNA for type I 47 kd keratin.	-2.0	X03492
Sprague-Dawley (clone LRB9) RAB15 mRNA	2.0	M83679
Rat glutamate receptor subunit 2 (GLUR2) non-NMDA mRNA	2.0	M85035
Mouse p19 mRNA, complete cds.	2.0	U17259
Rat CDK108 mRNA.	2.0	Y17328
Rat neuronal olfactomedin-related ER localized protein (D2Sut1e)	2.1	U03414
Mouse A-X actin	2.1	J04181
Rat alpha-actin cardiac protein.	2.1	X80130
Rat calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha-subunit	2.3	J02942
membrane glycoprotein M6	2.3	S65735
Rat spectrin-like protein GTRAP41	2.3	AF225960
Rat neuronal pentraxin precursor	2.4	U18772
Rat substrate binding subunit of type II 5'-deiodinase D2p29	2.7	AF245040

The genes with negative BDE value are abundant in YMT\_02 group, while positive BDE value are abundant in Control group. \* GenBank indicates the accession number of GenBank (NCBI).

### 3. PC12 cell 抗酸化 효과

(1) Hydrogen peroxide에 의해 誘導된 PC12 cell손상에 대한 YMT\_02 추출액의 防禦效果

YMT\_02 추출액의 세포손상에 대한 방어효과를 관

찰한 결과 (Fig.4) 대조군에 비하여 YMT\_02 투여군에서 세포생존율은 저농도에서 하락하였다가 농도의 증가에 따라 상승하는 경향을 보였으며 80mg/ml 투여군과 100mg/ml 투여군에서는 각각  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ 에서 유의한 상승을 보였다

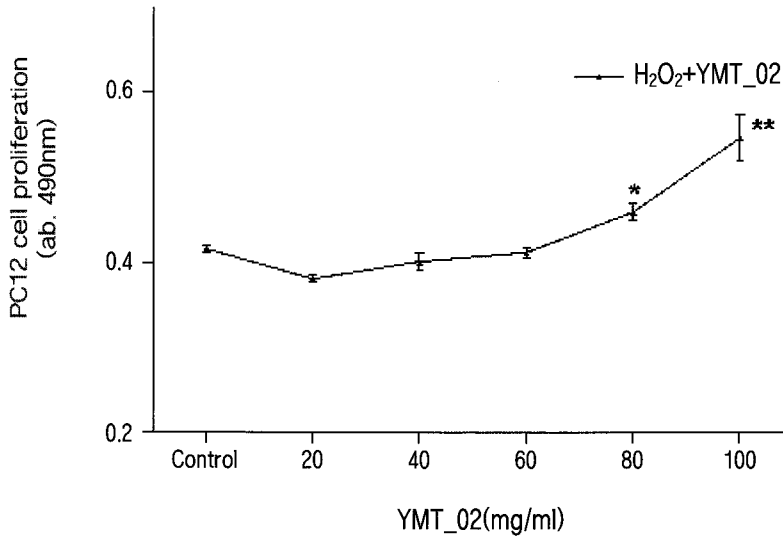


Fig. 4. Proliferation of PC12 cell in medium containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and various concentration of YMT\_02 extract after 24hr. incubation.

Control was cultured in medium without YMT\_02. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. Comparisons were made by using Student's T test.  
 \* P<0.05, \*\* P<0.01

(2) Hydrogen peroxide에 의해 誘導된 PC12 cell 손상에 대한 YMT\_02 抽出液의 ROS 發生抑制 效果

YMT\_02 추출액의 PC12 cell에서 세포손상에 의한 ROS 발생억제 효과를 관찰한 결과 (Fig.5) YMT\_02 투여군에서 농도에 따라 ROS 발생이 현저히 억제되는 경향을 보였으며 모든 농도에서 P<0.01의 유의한 발생 억제를 보였다.

(3) Hydrogen peroxide에 의해 誘導된 PC12 cell 손상에 대한 YMT\_02의 세포수 당 ROS 發生抑制 效果

PC12 cell에서의 ROS 발생량을 MTS 결과 나타난 세포수로 나눔으로써 세포 숫자 당 ROS 발생량을 확인한 결과는 다음과 같다.(Fig.6)

세포 숫자 당 ROS 발생량은 YMT\_02 투여군에서 농도에 따라 감소하는 경향을 보였으며 모든 농도에서 P<0.01의 유의한 감소를 보였다.

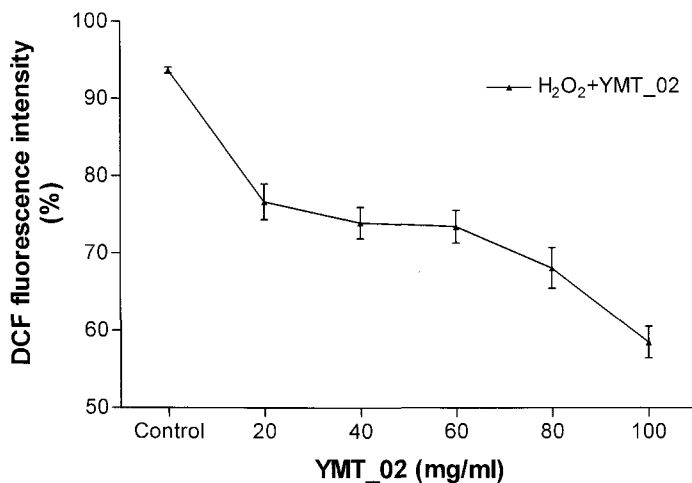


Fig. 5. ROS measurement of PC12 cell in medium containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and various concentration of YMT<sub>02</sub> extract after 24hr. incubation.

Control was cultured in medium without YMT<sub>02</sub>. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. Comparisons were made by using Student's T test. All concentrations of YMT<sub>02</sub> significantly inhibit ROS (P<0.01)

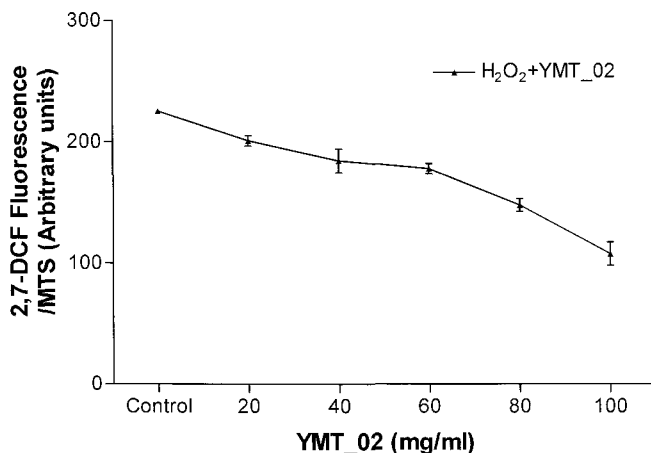


Fig. 6. Anti-oxidative effect of YMT<sub>02</sub> in PC12 cell

Control was cultured in medium without YMT<sub>02</sub>. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Data represent ROS/cell. Error bars indicate S.E.M. Comparisons were made by using Student's T test. All concentrations of YMT<sub>02</sub> significantly inhibit ROS/cell (P<0.01)

#### IV. 고찰

근대 이전의 韓醫學 문헌에서는 記憶이라는 단어의 언급을 찾아보기 어렵다. 그 이유는 한의학에서는 기억을 일체의 정신활동을 가리키는 “神”의 기능 중 일부로 파악하였기 때문이며, 感情 및 思惟活動 등의 모든 정신활동을 腦와 직접 연결하지 않고, 五臟의 기능과 관련시켜 설명함으로써 정신활동을 뇌라는 일부만이 발현하는 현상으로 국한하지 않고 인체의 全一의 次元에서 인식해 왔기 때문이다.<sup>23)</sup>

記憶의 生成과 貯藏, 想起, 消滅過程에 대하여도 기억 활동에는 기억을 회생시키는 發生機能, 불필요한 기억의 회생을 억제하는 抑制機能, 기억을 통합하여 자기화하는 統合機能, 의식화한 것이나 새로 오는 記憶材를 沈澱靜化하여 잔존시키는 沈靜機能, 정신활동을 지속시키는 推進機能<sup>15)</sup>이 있어야 한다<sup>15)</sup>고 하여 기억을 發生, 推進, 統合, 抑制, 沈靜의 五種機能의 統合作用으로 이루어지는 정신활동임을 강조하고 있다.

기억과정에서 五臟이 모두 역할을 하고 있지만, 기억을 저장하는 측면에서는 統合機能과 沈靜機能을 담당하는 脾와 腎의 기능이 중요한 의미를 지니는 것으로 보았다. 그러나 脾와 腎의 기억과 관련된 기능에 있어서 양자 간에는 차이가 있다. 비와 관련된 意는 心이 ‘憶’한 바라 하였는데 ‘憶’은 ‘追憶’, ‘回憶’이라고 하여 기억을 뜻하나 이는 의식표면에 존재하는 비교적 단기적인 기억을 의미하며<sup>24,25)</sup>, 腎과 관련된 ‘志’는 “意之所存謂之志”<sup>26)</sup>, “久存”, “專意而不移”, “事物所以不忘”<sup>27)</sup>라 하여 무의식속에 침정된 기억을 의미하며 오랫동안 기억되어 잘 잊어버리지 않는 장기기억을 의미한다.

정보를 沈靜시켜 저장하는 장부인 腎에 대하여 內經에서는 “腎藏精 精舍志”,<sup>27)</sup> “腎藏精志也”<sup>27)</sup>, “腎藏志”<sup>27)</sup>, 라 하였고 《難經本義》<sup>28)</sup>에서는 “腎藏精與志”라 하여 腎·精·志의 관계를 말하였다. 이에 대하여 李<sup>29)</sup>는

“神이 志를 藏하고 意의 所存하는 바를 志라 하니 精이 完하면 志가 藏하고 志가 藏하면 精은 더욱 完하여진다”고 하여 精의 상태에 따라 기억활동이 촉진 또는 低下된다고 하였다.

또한 腎은 精을 藏하고 精은 髓를 生하며 髓가 가장 많은 곳이 腦髓이며 뇌의 기능은 정신활동이므로 腎은 위로 腦에 통한다<sup>32,33)</sup>하였고, 대뇌의 정신활동은 腎에 속하고 기억은 대뇌정신활동의 일부로 腎은 기억활동에 관여한다<sup>34,35)</sup>고 하였으며, 《醫林改錯》<sup>36)</sup>에서는 “小兒에 있어 기억능력이 떨어지는 것은 腦髓가 불충분해서 그런 것이고, 고령자가 기억능력이 떨어지는 것은 腦髓가 점차로 줄어가기 때문이다”라고 하여 기억능력을 뇌와 직접적으로 관련시키고 있다.

腎精不足은 老化와도 깊은 관련이 있다. 《素問·上古天真論》<sup>37)</sup>에 “女子七歲 腎氣盛 …… 七七 任脈虛 太衝脈衰少 天癸竭 地道不通 故形壞而無子也. 丈夫八歲 腎氣實 …… 八八 則齒髮去 腎者主水 受五臟六腑之精而藏之”, “天壽過度 氣脈相通 而腎氣有餘也”라 하였고, 虞<sup>38)</sup>는 “腎氣盛則壽延, 腎元衰則壽夭”라 하여 腎氣의 盛衰가 老化와 수명에 깊은 관련이 있음을 言及하였다. 임상에서 노쇠로 인하여 나타나는 耳目不聽, 心失神則健忘, 飲食無味, 腰痠, 陰疝 증상과 각종 운동기장애 등은 주로 腎의 기능저하에 의해 유발되므로, 신의 기능으로 화와 밀접한 관련이 있으며 신의 기능과 기억능력과의 화를 따로 분리하여 생각하기 어렵다는 것을 알 수 있다.

六味地黃湯은 宋代 錢乙의 《小兒藥證直訣》<sup>54)</sup>에 地黃圓이란 처방명으로 최초로 수록된 이후 여러 醫家들에 의하여 腎水不足<sup>30,55)</sup>, 陰虛陽亢<sup>56)</sup>, 先天元氣不足<sup>57,58)</sup>, 腎精不足<sup>59)</sup> 등에 광범위하게 使用되었다. 近代에 尹<sup>60)</sup>은 滋陰補腎의 기초 방제로 體內 energy 원의 不足으로 代謝가 沈衰된 상태, 즉 陰虛로 인하여 발하는 일체 병증을 이 방에 가감하여 치료한다고 하였다. 이러한

六味地黃湯은 腎기능의 강화에 유효하고 기억능력을 향상시킨다는 실험결과<sup>19,39)</sup>들이 발표된 바 있다.

본 실험에서는 이와 같은 육미지황탕에 肝, 腎의 陰을 補하고 精을 補할 뿐 아니라<sup>61,62)</sup> 신기능 강화를 통하여 기억능력 향상 효과가 입증된 枸杞子<sup>20)</sup>를 君藥으로 첨가하여 補腎·補陰·補精의 효력을 강화한 六味地黃湯 加味方 (YMT\_02) 試料를 白鼠가 섭취케 하여 수동적 회피학습과 시간에 따른 妄覺檢査(Retention test)를 실시하였다.

통상적인 기억검사는 2일째의 학습이 끝난 후, 6시간, 24시간, 72시간, 168시간 후에 실시하게 되나 본 실험에서는 시간대별 기억능력을 평가하기보다는 장기기억에 주안점을 두어 기억능력의 향상을 확인하기 위한 것이었으므로 선행연구결과<sup>19,20)</sup> 가장 우수한 기억능력 증감을 보여 주었던 24시간 후 기억능력만 비교하였다.

뿐만 아니라 효과를 비교 확인하기 위하여 기억능력을 향상시키는 것으로 알려져 시중에 건강보조식품으로 판매 중인 Ginko biloba와 Nature Made도 같은 조건 하에서 투여하여 기억능력을 평가한바 모두 대조군에 비하여 retention latency가 증가하였으나 YMT\_02군에서만 유의한 (P<0.05) 증가를 나타내므로 YMT\_02가 기존의 Ginko biloba나 Nature Made보다 효과가 탁월하였다.

cDNA microarray는 YMT\_02가 기억능력을 향상시키는 유전자적 기전을 확인하여 보고자 한 것이었으므로 대조군과 YMT\_02군에 대하여서만 실시하였다. 대상 sample의 선정은 행동실험 상의 error를 최대한 배제하기 위하여 각 군에서 retention latency 성적이 가장 좋은 것과 가장 나쁜 것을 제외하고 대조군에서 두 번째로 성적이 나쁜 sample을, YMT\_02군에서 두 번째로 성적이 좋은 sample을 선택하였다.

cDNA microarray에 사용된 hippocampus는 기억의 강화기제의 증추가 되는 대뇌 부위로서, 기억의 강화는 단기기억이 장기기억으로 이전되기 위하여 반드시 거

쳐야 되는 통로이다. 특히 서술형 기억은 말초에서 받아들여진 signal이 그 signal에 관련된 대뇌피질을 통하여 받아들여지고 다시 hippocampus의 CA1이나 CA3 circuit을 거침으로써 강화되어 新皮質에 장기 저장되는 것이다. 이때 Signal의 복잡성과 강도가 크면 클수록 강화기제가 강하게 일어날 뿐 아니라 신피질에 저장되는 부위도 여러 부위가 되므로 기억은 더욱 길고 선명하게 기억되게 된다.<sup>2, 33)</sup> 이와 같은 이유로 일반적인 기억능력과 관련된 신경학적, 분자생물학적 연구는 대뇌중추 중에서 hippocampus에 초점을 맞추어 이루어지고 있다.

cDNA microarray의 scan 결과인 Cy3 signal value와 balanced Cy5 signal value (Fig. 2)의 선형회귀분석에서 slope는 0.9628±0.004였으며 R2 는 0.836으로 data의 유용성은 충분한 것으로 나타났다.

특이적으로 발현된 유전자 중 유의성 있는 것으로 판단한 유전자는 일반적으로 사용되는 BDE 의 절대값 2 이상인 것으로 하였다. (Table II.)

YMT\_02 군에서 특이적으로 발견된 유전자 (Table III) 중 관심을 끄는 것은 prealbumin이라고도 하는 transthyretin과 Axl receptor tyrosine kinase 그리고 neuron-specific protein PEP-19이다. 이 중 Axl receptor tyrosine kinase은 thyroid cell의 성장을 조절함으로써 thyroxine을 조절하고<sup>63)</sup> transthyretin은 transport protein으로서 특히 thyroxine을 혈액으로부터 뇌로 이동시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>64)</sup> 여기서 thyroxine은 NGF(nerve growth factor)발현을 증가시키는 것을 알려져 있다.<sup>65)</sup> 이로써 transthyretin이 신경세포의 성장에 간접적 영향을 미칠 것으로 류추하여 볼 수 있을 것이다.

그리고 neuron-specific protein PEP-19은 a calmodulin-regulatory protein으로서 PC12 cell의 apoptotic process를 억제할 뿐 아니라<sup>66)</sup> 신경세포의 산화를 억제하여 神經退化를 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>67)</sup>

Table III. Genes abundant in YMT\_02 (BDE  $\leq$  -2)

Gene Name	BDE	Property
Prealbumin (transthyretin)	-3.2	· a transport protein for thyroxine and retinol(68) · regulate hormone transport from blood to brain(64)
Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	-2.2	· catalyzes the synthesis of phosphatidylcholine from phosphatidylethanolamine(69)
Neuron-specific protein PEP-19	-2.1	· a calmodulin-regulatory protein, inhibits apoptotic processes in PC12 cells(66) · demonstrates resistance to degeneration and act as an inhibitor of calmodulin-dependent neuronal nitric oxide synthase(67)
Mouse Purkinje cell protein-4 (Pcp-4)	-2.1	· encodes the homolog of the rat brain-specific antigen PEP-19(70)
Axl receptor tyrosine kinase	-2.0	· a crucial role in regulating thyroid cell growth and differentiation(63)

Control 군에서 특이적으로 발견된 유전자 (Table IV) 중 관심을 끄는 것은 neuronal pentraxin과 CDK108이다. Pentraxin은 Alzheimer's disease나 퇴행성 중추신경계 질환의 병변에서 많이 발현되는 것으로 알려져 있는

것으로 신경계 퇴화의 지표로 볼 수 있다. CDK108은 mu-crystalin을 합성하는 유전자인데 mu-crystalin은 stress protein으로 알려져 있다.

Table IV. Genes abundant in control (BDE  $\geq$  2)

Gene Name	BDE	Property
Substrate binding subunit of type II 5'-deiodinase D2p29	2.7	· cAMP-induced activation protein · Type II iodothyronine 5'-deiodinase, membrane-bound enzyme, catalyzes the bioactivation of thyroid hormone in the brain(71)
Neuronal pentraxin precursor	2.4	· localized to Alzheimer diseases neurofibrillary tangles.(72)
Spectrin-like protein GTRAP41	2.3	· interact with the intracellular carboxy-terminal domain of EAAT4 and modulate its glutamate transport activity.(73)
Membrane glycoprotein M6	2.3	· major CNS myelin protein PLP/DM20(74)
Alpha-actin cardiac protein.	2.1	· associated with contractile structures in various muscle
Mouse A-X actin	2.1	· a marker to determine the prognosis and level of tumor progression of pigment cell tumors.(75)
Neuronal olfactomedin-related ER localized protein (D2Sut1e)	2.1	· Neuronal protein of unknown function(76)
CDK108	2.0	· Gene encoding mu-crystalin, which is stress protein(77)
Mouse p19	2.0	· Unknown function
Glutamate receptor subunit 2 (GLUR2) non-NMDA	2.0	· Renders heteromeric AMPA receptor assemblies CA(2+)-impermeable.(78)
RAB15	2.0	· Low molecular weight GTP binding protein · regulates aspects of synaptic vesicle membrane flow within the nerve terminal.(79) · an inhibitory GTPase in early endocytic trafficking.(80)

YMT\_02의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 세포손상에 대한 방어효과를 PC12 cell을 사용하여 관찰한 결과 대조군에 비하여 YMT\_02 투여군에서 세포생존율은 저농도에서 하락하였다가 농도의 증가에 따라 상승하는 경향을 보였으며 80mg/ml 투여군과 100mg/ml 투여군에서는 각각  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ 의 유의한 상승을 보였고 Hydrogen peroxide에 의해 유도된 PC12 cell손상에 대한 YMT\_02 추출액의 ROS 발생억제효과를 관찰한 결과 YMT\_02 투여군에서 대조군에 비하여 농도에 따라 ROS 발생이 억제되는 경향을 보였으며 모든 농도에서  $P<0.01$ 의 유의한 발생억제를 보였다.

이들을 종합하여 YMT\_02의 PC12 cell수당 ROS 발생 억제 효과를 분석하여 본 결과 YMT\_02 투여군에서 대조군에 비하여 농도에 따라 감소하는 경향을 보였으며 모든 농도에서  $P<0.01$ 의 유의한 감소를 보였다.

이러한 실험결과는 YMT\_02가 PC12 cell 산화를 억제하는 효과를 지닌다는 것을 의미한다.

## V. 結 論

六味地黃湯加味方 (YMT\_02)이 기억능력에 미치는 영향과 그 작용기전에 대하여 알아보고자 passive avoidance test로 기억능력 증강 여부를 확인한 후 그 중 기억력 증강 효과가 확인된 흰쥐의 hippocampus 부위를 채취하여 cDNA Microarray로 발현량 차이를 보

이는 유전자들을 검색하고 이들 유전자계통에 대해 고찰하는 한편 YMT\_02 추출물이 PC12 cell 抗酸化에 미치는 영향에 대하여 확인하여 본 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Passive avoidance test결과 YMT\_02 투여군에서 기억능력이 유의하게 증강되었다.
2. cDNA Microarray 결과 BDE가 |2| 이상의 발현량 차이를 보인 유전자는 총 27종이었으며 이중 기능이 밝혀진 유전자는 19종, 기능이 밝혀지지 않은 유전자는 8종이었다.
3. cDNA Microarray 결과 YMT\_02 투여군에서 신경세포의 성장에 간접적인 영향을 미치는 transthyretin 유전자와 신경퇴화를 막는 PEP-19 유전자가 많이 발현되고 신경퇴화의 지표인 pentraxin이 적게 발현되는 것으로 나타났다.
4. YMT\_02 투여군에서 PC12 cell 항산화 효과가 유익하게 인정되었다.

이상으로 볼 때 六味地黃湯加味方 (YMT\_02) 투여를 통한 腎機能의 강화는 hippocampus 神經細胞 성장에 간접적 영향을 미치는 한편 神經退化를 막고 신경세포의 老化를 억제함으로써 기억능력을 증강시킴을 알 수 있었다.

〈색인어〉 육미지황탕, 기억, 수중회피실험, 항산화효과  
유전자분석, 노화

<b>참 고 문 헌</b>
----------------

1. William F, Ganong, Ganong's 생리학, 서울, 한우리, p289, pp.291-292, 1999.
2. Kannuel, Schwartz, Jessell, Principles of Neural Science, 4th eth, Mc Graw-Hill, 2000.
3. Belcheva I et al., Lateralized learning and memory effects of angiotensin II microinjected into the rat CA1 hippocampal area. *Peptides*. 21(3):407-411, 2000.
4. Poser S, Storm DR, Role of Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenylyl cyclases in LTP and memory formation. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19:387-394, 2001.
5. Levin LR, Han PL, Hwang PM, Feinstein PG, Davis RL, Reed RR, The Drosophila learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin -responsive adenylyl cyclase. *Cell*, 68:479-489, 1992.
6. Zars T, Wolf R, Davis R, Heisenberg M, Tissue-specific expression of a type I adenylyl cyclase rescues the *rutabaga* mutant memory defect: in search of the engram. *Learning & Memory*, 7:18-31, 2000.
7. Winocur G, Roder J, Lobaugh N, Learning and memory in S100-beta transgenic mice: an analysis of impaired and preserved function. *Neurobiology of Learning & Memory*, 75:230-243, 2001.
8. Montkowski A, Holsboer F, Intact spatial learning and memory in transgenic mice with reduced BDNF. *Neuroreport*, 8:779-782, 1997.
9. van Praag H, Qu PM, Elliott RC, Wu H, Dreyfus CF, Black IB, Unilateral hippocampal lesions in newborn and adult rats: effects on spatial memory and BDNF gene expression. *Behavioural Brain Research*, 92:21-30, 1998.
10. Sharp FR, Liu J, Nickolenko J, Bontempi B, NMDA and D1 receptors mediate induction of c-fos and junB genes in striatum following morphine administration: implications for studies of memory. *Behavioural Brain Research*, 66:225-230, 1995.
11. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S, The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327-1338, 1996.
12. De Luca A, Giuditta A, Role of a transcription factor (CREB) in memory processes. *Rivista di Biologia*, 90:371-384, 1997.
13. Hall J, Thomas KL, Everitt BJ, Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 13:1453-1458, 2001.
14. Bartsch D, Ghirardi M, Casadio A, Giustetto M, Karl KA, Zhu H, Kandel ER, Enhancement of memory-related long-term facilitation by ApAF, a novel transcription factor that acts downstream from both CREB1 and CREB2. *Cell*, 103:595-608, 2000.
15. 尹吉榮, 東醫學의 方法論 研究, 서울, 成輔社, pp.33-34, 38-39, 1983.
16. 金聖經, 洪茂昌, 心機能이 學習과 記憶에 미치는 影響에 對한 實驗的 研究, 동 의 생 리 학 회 지, 15(2):1-11, 2000.
17. 박찬원, 이진우, 채한, 홍무창, 신민규, 비기능이 학습과 기억에 미치는 영향에 대한 실험적 연구, 대한한의학회지, 20(4):39-49, 2000.
18. 김광중, 김완희, 장부학의 이론과 임상, 서울, 일중사, pp.250-251, 1996.
19. 하태현, 이진우, 채한, 홍무창, 신기능이 학습과 기억에 미치는 영향에 대한 실험적 연구 동 의 생 리 학 회 지 15(1):1-16, 2000.
20. 이진우, 배현수, 홍무창, 신민규, 구기자가 백서의 기억능력 및 망각속도에 미치는 영향. 동 의 생 리 병 리 학 회 지. 15(3):84-91, 2001.
21. Da Cunha, Effect of posttraining infection of flumazenil into amygdala, hippocampus and septum on retention of habituation and inhibitory avoidance in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23:301-306, 1990.
22. Zhang HY, Tang XC, Huperzine B, a novel acetylcholinesterase inhibitor, attenuates hydrogen peroxide induced injury in PC12 cells. *Neuroscience Letters*, 292:41-44, 2000.
23. 大韓東醫生理學會編, 東醫生理學, 서울, 慶熙大學校出版局, p.389-409, 1993.
24. 王九思, 難經集注, 臺灣, 中華書局, p.187, 1985.



25. 河北醫學院, 靈樞經校釋, 北京, 人民衛生出版社 - 中社影印本, p.177, 1982.
26. 洪元植編, 精校黃帝內經靈樞, 서울, 東洋醫學研究院出版部, pp.68-69, p.333, 1985.
27. 張介賓, 類經(上), 서울, 大成文化社, p.57, 1982.
28. 滑壽, 難經本義, 台南, 世一書局印行, pp.80-81, 1972.
29. 李梴著 安秉國 外譯, 國譯編註 醫學入門(卷一), 서울, 南山堂, p.473, 1984.
30. 許 凌, 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.95, 98, 147, 395, 1976.
31. 注詡庵, 醫方集解, 臺北, 文光圖書有限公司, pp.1-5, 1977.
32. 中醫研究院 編, 中醫症狀鑑別診斷學, 北京, 人民衛生出版社, pp.73-74, 1987.
33. 楊思澍, 中醫臨床大全, 北京, 北京科學出版社, pp.224-230, 1991.
34. 顏乾麟, 老年性痴呆從於辨治的體會, 中醫雜誌, 第9期, pp.527-528, 1995.
35. 李英九 外, 六味地黃湯이 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌, 18(2):94-110, 1997.
36. 王清任, 醫林改錯, 台聯國風出版社, pp.22-25, 1975.
37. 洪元植編, 精校黃帝內經素問, 서울, 東洋醫學研究院出版部, p.92, 216, 1985.
38. 虞朴, 醫學正傳, 成輔社, 서울, p.222, 1988.
39. 李宰熙, 신민규, 김완희, 記憶과 腎의 相關性에 對한 實驗的 研究, 東醫生理學會誌, 6(1):59-76, 1991.
40. Miller N. E., Studies of fear as an acquerable drive, I. Fear as motivation and fear - reduction as reinforcement in the learning of new response. *Journal of Experimental Psychology*, 38:89-101, 1948.
41. Sansone M et al., Shuttle-box avoidance learning in mice, improvement by glucose combined with stimulant drugs, *Neurobiol Learn Mem*, 73(1):94-100, 2000.
42. Nikolova JG et al., Effect of ACE-inhibitors on learning and memory processes in rats, *Folia Med (Plovdiv)*, 42(1):47-51, 2000.
43. Trofimov SS et al., Is "scopolamine-induced amnesia" in rats the result of state-dependent learning? *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, 50(2):252-260. Russian, 2000.
44. Genkova-Papazova MG et al., The GABA-B antagonist CGP 36742 prevent PTZ-kindling-provoked amnesia in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*, 10(4):273-278, 2000.
45. Mc Quade R., A microdialysis study of the noradrenergic response in rat frontal cortex and hypothalamus to a conditioned cue for aversive, naturalistic environmental stimuli. *Psychopharmacology (Berl)*, 148(2):201-208, 2000.
46. Vekovishcheva OY. et. al., Co-housing in a stable hierarchical group is not aversive for dominant and subordinate individuals. *Neurosci Behav Physiol*, 30(2):195-200, 2000.
47. Vinogradova EP et al., The differences between sexes and strains in the capacity to acquire a passive avoidance conditioned reflex in KLA- and KHA-strain rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, 50(2):244-251. Russian, 2000.
48. Kato M et al., Focal cerebral ischemia-induced escape deficit in rats is ameliorated by a reversible inhibitor of monoamine oxidase-a, implications for a novel animal model of post-stroke depression. *Biol Pharm Bull*, 23(4):406-410, 2000.
49. Groulx I et al., Ran-mediated nuclear export of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein occurs independently of its assembly with cullin-2. *J Biol Chem*, 275(12):8991-9000, 2000.
50. Kappers WA et al., Comparison of three different in vitro mutation assays used for the investigation of cytochrome P450-mediated mutagenicity of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res*, 466(2):143-159, 2000.
51. Chiu CH et al., A recombinogenic targeting method to modify large-inserts for cis-regulatory analysis in transgenic mice, construction and expression of a 100-kb, zebrafish Hoxa-11b-lacZ reporter gene. *Dev Genes Evol*, 210(2):105-109, 2000.
52. Harman. D., Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*: 298-300, 1956.
53. Halliwell B. and J.M.C. Gutteridge, Free radicals in biology and medicine 3rd edition, Oxford university press, New York, 142, 1999.
54. 錢 乙, 小兒藥證直訣, 서울, 계축문화사, 하권 p.1, 1973.
55. 황도연, 방약합편, 서울, 남산당, pp.129-131, 166-169, 1983.
56. 武之望, 濟陰綱目, 서울, 대성출판사, p.133, 1986.
57. 孫思邈, 千金要方, 서울, 대성문화사, p.178, 195, pp.265-266, 1984.
58. 江認庵, 醫方集解, 臺北, 文光圖書有限公司, pp.1-4, 227-231, 1972.
59. 周命新, 醫門寶鑑, 서울, 동양종합통신교육출판부, pp.14

- 450, 1987.
60. 윤길영, 동의임상방제학, 서울, 명보출판사, pp.185-186, 319-320, 1985.
  61. 전국한의과대학 본초학교수 공저, 본초학, 서울, 영림사, pp.124-125, 193-195, 302-306, 336-337, 536-538, 580-581, 626-627, 1991.
  62. 新文風出版公社 : 新編中藥大辭典, 臺北, 新文風出版公社, pp.219-221, 239-240, 266-571, 832-836, 924-927, 1593-1596, 2445-2447, 2524-2526, 2562-2563, 1970.
  63. Ito T, Ito M, Naito S, Ohtsuru A, Nagayama Y, Kanematsu T, Yamashita S, Sekine I, Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma. *Thyroid* 9:563-567, 1999.
  64. Nilsson C, Lindvall-Axelsson M, Owman C, Neuroendocrine regulatory mechanisms in the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Brain Research - Brain Research Reviews* 17:109-138, 1992.
  65. Hashimoto Y, Furukawa S, Omae F, Miyama Y, Hayashi K, Correlative regulation of nerve growth factor level and choline acetyltransferase activity by thyroxine in particular regions of infant rat brain. *Journal of Neurochemistry* 63:326-332, 1994.
  66. Erhardt JA, Legos JJ, Johanson RA, Slemmon JR, Wang X, Expression of PEP-19 inhibits apoptosis in PC12 cells. *Neuroreport* 11:3719-3723, 2000.
  67. Johanson RA, Sarau HM, Foley JJ, Slemmon JR, Calmodulin-binding peptide PEP-19 modulates activation of calmodulin kinase II In situ. *Journal of Neuroscience* 20:2860-2866, 2000.
  68. Dwork AJ, Cavallaro T, Martone RL, Goodman DS, Schon EA, Herbert J, Distribution of transthyretin in the rat eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 31:489-496, 1990.
  69. Cui Z, Vance J, Chen M, Voelker D, DE. V, Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. A-specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 268:16655-16663, 1993.
  70. Chen SL, Orr HT, Sequence of a murine cDNA, pcp-4, that encodes the homolog of the rat brain-specific antigen PEP-19. *Nucleic Acids Research* 18:1304, 1990.
  71. Leonard DM, Stachelek SJ, Safran M, Farwell AP, Kowalik TF, Leonard JL, Cloning, expression, and functional characterization of the substrate binding subunit of rat type II iodothyronine 5'-deiodinase. *Journal of Biological Chemistry* 275:25194-25201, 2000.
  72. Duong T, Acton PJ, Johnson RA, The in vitro neuronal toxicity of pentraxins associated with Alzheimer's disease brain lesions. *Brain Research* 813:303-312, 1998.
  73. Jackson M, Song W, Liu MY, Jin L, Dykes-Hoberg M, Lin CI, Bowers WJ, Federoff HJ, Sternweis PC, Rothstein JD, Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. *Nature* 410:89-93, 2001.
  74. Vouyiouklis DA, Werner H, Griffiths IR, Stewart GJ, Armin-Nave K, Thomson CE, Molecular cloning and transfection studies of M6b-2, a novel splice variant of a member of the PLP-DM20/M6 gene family. *Journal of Neuroscience Research* 52:633-640, 1998.
  75. Sasase A, Mishima Y, Ichihashi M, Taniguchi S, Biochemical analysis of metastasis-related Ax actin in B16 mouse melanoma cells after chemical reversional modulation and of tumor progression-related A' actin in the ontogeny of human malignant melanoma. *Pigment Cell Research* 2:493-501, 1989.
  76. Danielson PE, Watson JB, Gerendasy DD, Erlander MG, Lovenberg TW, de Lecea L, Sutcliffe JG, Frankel WN, Chromosomal mapping of mouse genes expressed selectively within the central nervous system. *Genomics* 19:454-461, 1994.
  77. Yang J, Moravec CS, Sussman MA, DiPaola NR, Fu D, Hawthorn L, Mitchell CA, Young JB, Francis GS, McCarthy PM, Bond M, Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation* 102:3046-3052, 2000.
  78. Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS, The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. *Brain Research* 886:190-207, 2000.
  79. Elferink LA, Anzai K, Scheller RH, rab15, a novel low molecular weight GTP-binding protein specifically expressed in rat brain. *Journal of Biological Chemistry* 267:5768-5775, 1992.
  80. Zuk PA, Elferink LA, Rab15 mediates an early endocytic event in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry* 274:22303-22312, 1999.