일시적 국소 뇌허혈 흰쥐모델에서 遠志石菖蒲散의 뇌손상 및 인지기능 보호효과

강미선 · 장규태 · 김장현*

동국대학교 한의과대학 소아과학교실

Protective Effects *Wonjiseokchangpo-san* has on Brain Damage and Cognitive Dysfunction in Transient Focal Cerebral Ischemia

Mi Sun Kang, Gyu Tae Chang, Jang Hyun Kim*

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study was conducted to determine the effects *Wonjiseokchangpo-san* on brain damage in transient focal cerebral ischemia. Rats were used for testing in the following three models: Morris Water Maze, Eight-Arm Radial Maze, and Histochemistry. In the Morris Water Maze Model, the *Wonjiseokchangpo-san* group showed significant decrease in the 3rd and 6th training session compared with the ischemia group. A retention test, in the Morris Water Maze Model, was performed on the 7th day without the escape platform. The *Wonjiseokchangpo-san* group showed significant increase compared to the ischemia group. In the Eight-Arm radial Maze model, the *Wonjiseokchangpo-san* group showed significant decrease in the error rate compared to the ischemia group. In the density of hippocampal CA1 cell of the cresyl violet-stained section, the *Wonjiseokchangpo-san* group showed significant increase compared to the ischemia group. These results suggest that *Wonjiseokchangpo-san* may have a significant protective effect on brain damage and cognitive dysfunction in transient focal cerebral ischemia.

Key words : transient focal cerebral ischemia, *Wonjiseokchangpo-san*

서 론

기질적인 이상으로 뇌혈관에 국소적 뇌혈류 장애가 일어나면, 허혈 동안만이 아니라 재관류가 이루어진 후에도 神經細胞의 損傷이 지속적으로 일어나 恢復遲延 및 後遺症 發生의 原因이 되고 있다[1]. 일시적 국소 뇌허혈 흰쥐모델은 흰쥐의 중대뇌동맥을 일시적으로 차단한 후 재관류시킨 것으로, 주로 해마부분의 神經細胞를 損傷시키고 5-7일이 경과되면 apoptosis와 비슷한 細胞損傷과 인지 및 학습의 장애가 일어나게 되는데[2], 최근에는 이러한 허혈에 의한 神經損傷의 豫防 및 治療方法에 대하여 병리적 현상이나 神經細胞損傷이 일어나는 機轉을 硏究하고, 그것의 進行을 차단하는 새로운 치료제를 개발하는데 중점을 두고 있는 추세이다[1].

* 교신저자 : 김장현, 경기 성남 분당 수내동 87-2 동국대한방병원 소아과
· E-mail : kjh@dongguk.ac.kr, · Tel : 031-710-3724

· 접수 : 2004/09/24 · 수정 : 2004/10/21 · 채택 : 2004/11/24

학습(learning)과 기억(memory)은 고차원적인 뇌의 기능으로 학습이란 연습이나 경험에 의한 행동의 변화로 정의되며, 기억은 학습에 의해 얻어진 지식과 경험을 보관, 기록해 두었다가 필요한 때에 의식세계로 꺼내어 사용하는 능력이다[3]. 학습과 기억을 증진시키는 대표적인 처방으로 다용되는 聰明湯[4]은 遠志, 石菖蒲, 白茯神으로 구성되어 있는데, 김[5]은 건망유도백서를 이용한 실험적 연구, 이[6]는 행동실험을 통하여 聰明湯의 학습 및 기억증진에 대한 유의한 結果를 보고한 바 있다.

遠志와 石菖蒲는 각각 寧心安神, 祛痰利竅, 消散癰腫의 效能과 開竅豁痰, 醒神益智, 化濕開胃의 效能이 있으며[7], 두 藥物을 配合하면 서로 相濟되어 頭昏, 頭腦不淸, 心神不穩, 心煩意亂, 失眠, 記憶力減退 및 痴呆 等症에 應用할 수 있다[8]. 遠志에 대한 實驗的 硏究로는 Apomorphine으로 유발된 생쥐의 과행동 및 상동적 행동에 抑制效果[9], 腦 星狀細胞에 작용하여 염증을 일으키는 주요한 細胞活性物質의 生成을 抑制[10], 지질과산화 抑制[11] 및 이뇨, 진통, 해열, 수면시간 연장[12] 등의 效果가 보고된 바 있고, 石

菖蒲에 대한 實驗的 硏究로는 장관운동의 이완[13], 혈중 콜레스테롤의 수치 감소[14], 뇌신경세포 보호작용[15], 국소뇌혈류량 증가[16], 腦軟膜動脈의 直徑 擴張[17], 痙攣抑制[18], MAO 억제활성, xanthine oxidase 억제활성 및 지질과산화 抑制效果[11]가 보고된 바 있으며, 遠志와 石菖蒲의 混合投與에 대한 實驗的 硏究로는 뇌보호기능[19], 만성적 스트레스로 인한 우울 발생의 방지 및 우울과 관련된 학습능력장애에 유의한 효과가 있다[20]는 보고가 있다.

이에 저자는 遠志石菖蒲散의 일시적 뇌허혈로 인한 뇌손상과 인지 및 학습장애 보호효과를 관찰하기 위하여 흰쥐의 중대뇌동맥을 일시적으로 폐쇄, 재관류시킨 후 수중미로, 방사형 미로를 이용한 행동측정과 해마부위의 뇌신경 세포수 변화를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물

체중 280±20g의 웅성 Sprague Dawley계 흰쥐(삼육동물센터, 한국)를 일주일동안 실험실 환경(온도는 22±3℃, 습도는 50±10%)에 적응시킨 후 사용하였다. 흰쥐는 각 cage 당 3~4 마리씩 넣어 두었으며, 물과 사료(고형사료: 실험동물 쥐用, 삼양유지(株))를 자유로이 섭취하도록 하였다.

2. 실험군의 구성 및 절차

실험군의 구성은 아무 처치를 하지 않은 모의시술군(SHAM, n=6), 중대뇌동맥폐색 유발군(SAL+ISCH, n=7), 중대뇌동맥폐색 유발 후 遠志石菖蒲散 투여군(WSS+ISCH, n=5)으로 나누었으며, 각 군은 허혈 유발 후 1시간이 경과하기 전에 약물을 투여하였고, 유발 후 3주일동안 약물을 처치한 다음 1주일간 수중미로 학습을 시행하였다. 수중미로 학습이 끝난 동물은 다시 1주일간 방사형 미로를 시행하였으며, 마지막 행동검사를 실시한 후 조직검사를 하였다.

3. 약물 제조 및 투여방법

1) 약물 제조

한약재 200g(遠志 100g, 石菖蒲 100g)을 정확히 평량한 후, 수욕상에서 85% 메탄올을 사용하여 3회 추출하였으며, 추출물을 감압 농축한 후, 그 추출물을 동결건조(-66℃, 10mmHg)시켜 분말 건조하였다. 건조시켜 얻은 遠志石菖蒲散는 20.2g으로써, 수율은 10.1%였다.

2) 약물투여방법

시술 후 약물은 매일 한차례 일정한 시간인 오전 10시경에 제조된 약물을 생리식염수에 녹여(100mg/kg, p.o.) 3주간 투여한 후 행동검사를 실시하였다.

4. 폐색에 의한 국소 뇌허혈 유발

일시적인 국소 뇌허혈은 Zea Longa[21]등의 方法에 따라 중대뇌동맥을 폐색시켜 만들었다. 흰쥐를 70% N_2/30% O_2와 혼합된 5% isoflurane을 이용하여 흡입마취 유도를 한 후, 2% isoflurane으로 마취상태를 계속 유지시켰다. 흰쥐의 직장에 체온측정 탐침을 삽입하고 가온등과 가온 메트리스를 이용하여 실험기간 동안 체온을 38℃로 유지하였다. 중대뇌동맥을 폐색시키기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골혀근과 흉골저작근 사이에 총경동맥을 노출한 후 내경동맥내로 intraluminal filament (¢0.28mm, rounded tip)를 삽입하여 그 끝이 중대뇌동맥의 기시부를 지나 전대뇌동맥의 근위부까지 도달하도록 하였다. 총경동맥과 외경동맥을 결찰하여 혈류차단 2시간이 지난 후 filament를 제거하고, 우측 총경동맥을 결찰하여 측부 순환을 통해 재관류 하도록 하였다.

5. 행동측정장치에 의한 학습 및 기억력 측정

1) Morris 수중미로의 장치 및 절차

수중미로로 이용되는 수조는 직경이 180cm, 높이가 50cm인 원형 통으로 온도가 26±2℃되는 물을 30cm 높이로 채웠다. 수중미로의 주변은 비디오카메라와 실험대 위에 있는 수온 조절용 장치 등 공간단서들을 일정하게 유지하였다. 도피대는 직경이 12cm인 원형 투명 아크릴에 받침대를 부착하고, 수면보다 1.5cm 낮게 위치시켰다. 수조내의 물은 흰색 우유를 풀어서 도피대가 보이지 않게 하여 시각단서를 이용할 수 없게 하였다. 수중미로는 4개의 동일한 사분원으로 나누어 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분하고 이중 북동 사분원의 중심부에 도피대를 놓고, 나머지 중 하나를 출발위치로 사용하였다. 흰쥐들은 하루에 180초간 4시행씩 6일간 훈련을 받았으며(acquisition test), 6일째 마지막 시행이 끝나면 7일째에 자유수영 검사가 시행되었는데(retention test), 이때 흰쥐는 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게 하였다. 모든 흰쥐들의 행동은 비디오카메라로 녹화되었는데, 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대로 올라가는데 걸린 시간을 측정하고, 60초간의 검사시행에서는 훈련시에 도피대가 있었던 사분원에 머문 시간을 S-MART 프로그램(Pab Lab, Spain)을 이용하여 측정하였다.

2) 방사형 미로의 장치 및 절차

목재로 제작된 8개의 통로가 중앙의 출발영역(central platform)을 중심으로 매 45도 각도(방사형)로 뻗어 나온 형태의 장치를 이용하였다. 중앙 출발 영역은 직경 50㎝인 원에 내접하는 정팔각형 상자로 높이는 25㎝이다. 주로는 출발 상자의 각 면에 뚫린 10×25㎝ 크기의 통로와 연결되어 있으며, 길이는 70㎝이고, 흰쥐가 바깥으로 나가지 못하게 하였다. 주로의 끝에는 보상으로 제공하는 먹이나 물을 담을 수 있는 7×5×3㎝ 크기의 용기(음식 접시)를 설치하였다. 흰쥐가 주로를 출입하는 행동을 비디오카메라로 녹화하여 각 주로를 방문한 횟수와 오류 여부를 계산하였다. 실험에 들어가기 전 36시간 동안 사육 상자에서 먹이를 박탈하고 배고픔을 유발시킨 흰쥐를 행동 관찰실로 옮겨와 30분간 환경에 적응시켰다. 흰쥐를 미로의 출발 상자에 넣고 1분간 두어 상황에 적응시킨 후 1분이 지나면 각 주로로 통하는 통로를 개방하여 흰쥐가 자유롭게 미로 속을 돌아다니게 하였다. 흰쥐가 주로를 방문하여 끝까지 달리면 보상 용기에서 먹이를 먹게 하였다. 그러나 동일한 주로를 반복해서 방문하면 두 번째

방문부터는 먹이를 제공하지 않고 반응은 오류로 기록하였다. 흰쥐가 5분 동안에 8개의 주로를 모두 방문하지 못하면 시행을 중지시키고, 그 시행은 실패로 간주하였다. 5일 동안의 학습시행이 끝나고 24시간 후에 기억검사를 실시하였다. 기억검사전의 처치와 흰쥐가 4번째 주로에 들어가기까지의 과정은 학습실험에서와 동일하게 실시하였다. 흰쥐가 4번째 주로를 선택하여 들어가는 동시에 그 주로의 통로를 차단하고 30초간 지연시킨 후 다시 주로의 통로를 개방하여 흰쥐가 나머지 4개의 주로를 찾아가서 보상으로 먹이를 섭취하면 흰쥐를 출발상자에서 꺼내어 사육실로 되돌려 보냈다. 나머지 4개의 주로를 방문하여 먹이를 섭취할 때까지 흰쥐가 범하는 오류수를 기록하여 기억의 지표로 삼았다.

6. 조직화학검사

1) Cresyl violet 염색법

모든 행동 실험이 끝난 직후 흰쥐를 sodium pentobarbital (80mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후, 0.9% saline 200㎖에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액(fixative) 800㎖를 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200㎖은 2분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 600㎖는 25분간에 걸쳐 천천히 관류하였다. 고정이 끝난 흰쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 동안 후고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate beffered saline(PBS)에 넣어 4℃에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌조직에서 hippocampus 부위를 30㎛의 두께로 잘랐다. PBS로 조직을 몇 차례 씻고 xylene(5min), 100% alcohol(2min), 95% alcohol(1min), 70% alcohol(1min), D.W.(2min) 순으로 담구어 탈지, 탈수를 시킨 후, cresyl violet buffer(5min)로 염색을 하였다. 염색이 끝난 조직은 고배율(×400)에서 광학현미경으로 관찰하였다. Paxinos와 Watson의 atlas[22]에서 주어진 coordinate를 참고하여 신경세포수를 관찰하였다.

7. 통계처리

모든 측정값은 평균값±표준오차(Mean±SE)로 표시하였고, 각 실험군간의 통계학적 분석은 Window용 SPSS를 이용하였다. 각 집단간 행동 측정치의 비교는 repeated ANOVA test를 시행하였고, 조직분석법의 측정값은 one-way ANOVA를 시행하였으며, 사후검정은 Tukey test를 적용하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 신뢰구간 P<0.05에서 의미를 부여하였다.

실험성적

1. Morris 수중 미로 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

1) 국소 뇌허혈 유발모델에서 수중미로 학습의 획득시행동안 약물처치군의 효과

수중미로 학습에서 6일 동안 180초 내에 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 제 1일째 SHAM군은 131.3±23.7초, SAL+ISCH군은 144.9±21.3초, WSS+ISCH군은 108.2±5.8초로 유의성 없이 비슷하게 나타났으나, 학습이 진행됨에 따라 도피대에 도달하기까지 소요되는 시간이 3일째는 SHAM군은 70.3±15.9초, SAL+ISCH군은 119.7±17.8초, WSS+ISCH군은 55.6±5초로, 마지막 6일째는 SHAM군이 29.0±8.5초, SAL+ISCH군은 102.1±24.5초, WSS+ISCH군은 27.2±6.3초로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다[F(3,27)=5.806, P<0.01]. 이에 측정일에 따른 집단별 사후검정 결과, 3일째와 6일째에 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게(P<0.05) 감소되었다(Table 1).

Table 1. Effect of *Wonjiseokchangpo-san* on Cerebral Ischemia-Induced Deficits of the Morris Water Maze Learning Performance in the Rats.

Group\Day	Water maze (latency, time(sec))					
	1	2	3	4	5	6
SHAM(n=6)	131.3±23.7	58±23.8	70.3±15.9	56.4±25.2	30.3±11.3	29.0±8.5
SAL+ISCH(n=7)	144.9±21.3	82.6±17.8	119.7±17.8	96.8±24.2	82±21.6	102.1±24.5#
WSS+ISCH(n=5)	108.2±5.8	62.3±11.5	55.6±5*	54.5±15.5	21.9±4.3	27.2±6.3*

The task was performed with four trials per day during 6 days for the acquisition test. Significant with Turkey's test following a repeated ANOVA is indicated as #, P<0.05 vs Sham-operated group, or *, P<0.05 vs SAL+ISCH groups. All values are Mean±SE.

2) 국소 뇌허혈 유발모델에서 수중미로 학습의 검사시행동안 약물처치군의 효과

수중미로 학습에서 마지막 날인 제 7일째 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 검사시행에서 SHAM군은 3.1±0.6%, SAL+ISCH군은 1.7±0.5%, WSS+ISCH군은 4.4±0.4%로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다[F(3,27)=7.874, P<0.05]. 이에 집단별 사후검정 결과, 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게(P<0.001) 증가하였다(Table 2).

Table 2. Effect of *Wonjiseokchangpo-san* on Cerebral Ischemia-Induced Deficits of the Morris Water Maze Memory Performance in the Rats.

Group	Water maze (Time spend in quadrant (%))
SHAM(n=6)	3.1±0.6
SAL+ISCH(n=7)	1.7±0.5##
WSS+ISCH(n=5)	4.4±0.4***

The task was performed with four trials on the 7th day without the platform for retention test. Significant with Turkey's test following a repeated ANOVA is indicated as ##, P<0.01 vs Sham-operated group, or ***, P<0.001 vs SAL+ISCH groups. All values are Mean±SE.

2. 방사형 미로의 장치에 의한 학습 및 기억력 측정

1) 국소 뇌허혈 유발모델에서 방사형 미로 학습의 주로 오선택수(error rate) 및 약물처치군의 효과

방사형 미로 학습에서 5일 동안 300초 내에 한번 찾아갔던 주로를 다시 들어가는 오선택수를 측정하는 획득시행에서는 집단간의 유의성이 없었다. 그러나 방사형 미로 학습의 마지막 날인 제 6일째의 공간인지에 대한 기억검사에서 SHAM군은 1.8±0.2회, SAL+ISCH군은 3.4±0.4회, WSS+ISCH군은 2.4±0.2회로 집단간의 유의성 있는 차이를 보였다[F(3,27)=0.435, P<0.05]. 이에 집단별 사후검정 결과, 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게(P<0.05) 감소하였다(Table 3).

3. 신경세포손상 관찰

1) Cresyl violet을 이용한 신경세포 손상 및 약물처치군의 방

어 효과

해마 부위의 신경세포 염색에서 SHAM군의 염색정도를 100%로 두었을 때, SAL+ISCH군은 84.1±1.7%, WSS+ISCH군은 96.8±4.8%로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다[F(3,75)=5.310, P<0.05]. 이에 집단별 사후검정 결과, 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게(P<0.05) 세포수 증가를 나타내었다(Table 4, Fig. 1).

Table 3. Effects of *Wonjiseokchangpo-san* on Choice Accuracy of the Eight-Arm Radial Maze Task in Ischemia-Induced Rats.

Group\Day	Radial arm maze (No. of error rate)					
	1	2	3	4	5	6
SHAM(n=5)	4.7±0.3	4.3±0.2	3.7±0.3	2.5±0.3	2.2±0.3	1.8±0.2
SAL+ISCH(n=5)	4.3±0.3	4.7±0.5	4±0	3.9±0.3#	3.6±0.2	3.4±0.4#
WSS+ISCH(n=4)	4.2±0.2	4.2±0.6	3.6±0.2	3.2±0.4	3.2±0.2	2.4±0.2*

The task was started on the 5th week after ischemia and was performed with four trials per day for 6 days. Significant with Turkey's test following a repeated ANOVA is indicated as #, P<0.05 vs Sham-operated groups, or *, P<0.05 vs SAL+ISCH groups. All values are Mean±SE.

Table 4. Effects of *Wonjiseokchangpo-san* on Ischemia-Induced the Neuronal Cell Damage in the Hippocampus.

group	Cresyl violet (density(%))
SHAM(n=6)	100±0
SAL+ISCH(n=7)	84.1±1.7##
WSS+ISCH(n=5)	96.8±4.8*

The density of hippocampal CA1 cell of cresyl violet-stained sections was measured within a 100 x 100 m grid over the areas at 400 X magnification. Significant with Turkey's test following a one-way ANOVA is indicated as ##, P<0.01 vs Sham-operated groups, or *, P<0.05 vs SAL+ISCH groups. All values are Mean±SE.

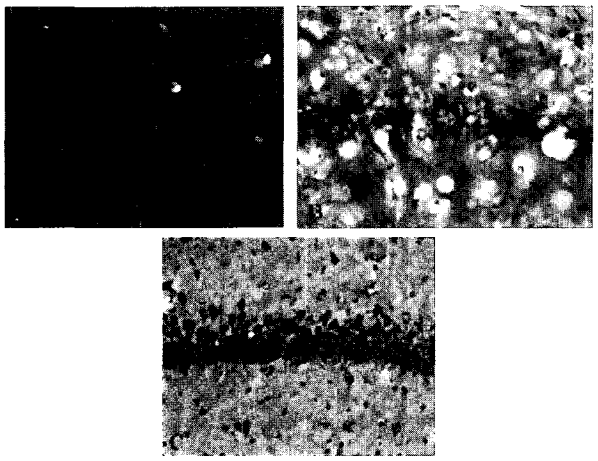

Fig. 1. Representative photographs showing the hippocampus of SHAM (A), SAL+ISCH (B), WSS+ISCH(C) groups.

고 찰

학습(learning)과 기억(memory)은 고차원적인 뇌의 기능으로 학습이란 연습이나 경험에 의한 행동의 변화로 정의되며, 기억은 학습에 의해 얻어진 지식과 경험을 보관, 기록해 두었다가 필요한 때에 의식세계로 꺼내어 사용하는 능력이다[3]. 행동수행과 인식기능을 위해서는 과거 경험을 통해 얻어 저장된 정보가 다시 이용되어야 하며, 이 저장된 정보, 즉 과거의 기억은 현재의 감각정보와 종합되어 문제해결과 창조적 반응으로 나아갈 수 있다. 기억의 과정은 등록(registration), 저장(storage) 및 회상(recall, retrieval)으로 나뉘는데, 이 중 한 부분이라도 결손이 생기면 기억장애가 나타난다. 단기기억은 짧은 synaptic circuit이 활성화되어 유지되는 것이고, 이 단기기억이 장기기억이 되기 위해서는 반복수행, 연습 등을 통하여 저장되는 과정이 필요하다[23]. 이러한 학습 및 기억은 중추신경의 콜린성 신경전달계가 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며[24], 이 콜린성 신경경로는 전뇌내측중격핵(medial septal nucleus)에 위치한 세포체에서 해마(hippocampus)로 투사되어 기억의 등록에 주된 기능을 한다[25]. 따라서 흰쥐의 중대뇌동맥을 일시적으로 차단한 후 재관류시키면, 주로 해마부분의 神經細胞가 損傷되고 5-7일이 경과되면 apoptosis와 비슷한 細胞損傷이 발생되어 인지 및 학습장애를 일으키게 된다[2].

이러한 일시적 국소 뇌허혈 흰쥐모델은 전반적이지 않고 전뇌에만 제한되어 후뇌에서의 혈류가 영향을 받지 않아 호흡과 체순환에 영향을 주지 않는다는 점에서 허혈로 인한 神經損傷의 硏究에 전반적인 허혈보다 널리 사용되고 있다. 즉, 중대뇌동맥 폐색에 의한 일시적인 전뇌허혈(transient forebrain ischemia)은 전뇌부위의 세포외 glutamate와 K+의 농도 및 세포내 Ca^{2+}의 증가로 인한 독성을 일으키고 신경세포들로 하여금 조직으로부터 탈분극하게 하나 다시 재관류시에는 정상으로 회복된다. 이때 뇌의 신피질, 해마내 CA1 영역에서 선택적으로 신경세포의 손실을 가져오며, 그 중에서 허혈에 가장 손상 받기 쉬운 해마내 CA1 pyramidal neuron은 재관류 후 3~4일이 지나면 죽기 시작한다[2]. 최근 들어 이들 세포들의 파괴는 apoptosis나 programmed cell death 발생기전으로[26], free radicals[27], glutamate 독성[28], calcium overload[29], nitric oxide(NO)[30] 및 여러 cytokines[31] 등 많은 요인들이 관여하는 것으로 알려져 있다.

한편, 학습과 기억을 증진시키는 대표적인 처방으로 다용되는 聰明湯[4] 은 遠志, 石菖蒲, 白茯神으로 구성되어 있는데, 김[5]은 건방유도백서를 이용한 실험적 연구, 이[6]는 행동실험을 통하여 聰明湯의 학습 및 기억증진에 대한 유의한 結果를 보고한 바 있다. 遠志(Polygalae Radix)는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 다년생 초본인 遠志 Polygala tenuifolia Willd. 혹은 卵葉遠志 P. sibirica L.의 뿌리를 乾燥한 것으로, 性은 微溫 無毒하고, 味는 苦辛하며 歸經은 肺 心經이다[7]. 주요성분으로는 근피에 onjisaponin A, B, C, D, E, F, G 등이 함유되어 있고, 뿌리에는 tenuidine, polygalitol 등이 함유되어 있으며, 최근에는 xanthone류와 cinnamic acid의 유도체가 분리되었다[32]. 遠志는 《神農本草經》[33]에서 "味苦溫 主咳逆傷中 補不足 除邪氣 利九竅 益智慧耳目聰明不忘 强志倍力"이라고 처음으로 기재된 이후, 寧心安神, 祛痰利竅, 消散癰腫의 效能으로 心神不安, 失眠多夢, 健忘驚悸, 神志恍惚, 咳痰不爽, 瘡瘍腫毒, 乳房腫痛 等을 治療하는데 使用되어 왔다[7].

藥理作用은 神經系統에 대한 作用으로써 鎭靜作用, 催眠作用, 抗驚厥作用, 中樞性 降壓作用, 體力 및 智力促進作用, 腦에

대한 保護作用 等이 있고, 呼吸系統에 대한 作用으로는 祛痰作用 等이 있으며, 그 외 子宮興奮收縮作用, 抗癌作用, 抗菌作用, 利尿作用, cAMP phosphodiesterase에 대한 抑制 作用, 溶血作用 等이 있다[34].

石菖蒲(Acori graminei rhizoma)는 《神農本草經》[33]에서 "味辛溫 主風寒濕痺 咳逆上氣 開心孔 補五臟 通九竅 明耳目 出聲音 久服輕身不忘不迷惑延年"이라고 처음 기재된 藥物로서 性은 溫 無毒하고 味는 辛苦하다. 石菖蒲의 주요성분으로 β-asarone (sis), asarone(trans) 등이 있지만 그 외에도 caryophyllen, α-humulene, sekihshon, amino acid, 유기산 및 당류가 함유되어 있다. 心 胃 二經으로 歸經하여 開竅豁痰, 醒神益智, 化濕開胃作用이 있어 神昏癲痫, 健忘耳聾, 噤口下痢, 中惡卒死, 脘痞不飢 等을 治療하는데 選用된다[7]. 藥理作用은 中樞神經系統에 대한 영향으로써 鎭靜作用, 催眠作用, 抗驚厥作用, 鎭痛作用, 學習·記憶促進作用, 降溫作用 等이 있고, 心血管系統에 대한 영향으로써 心臟抑制作用, 抗不整脈作用, 血壓降下作用, 局所血液循環改善作用 等이 있으며, 呼吸系統에 대한 영향으로는 止咳作用, 祛痰作用, 平喘作用 等이 있고, 그 외 消化促進作用, 病原微生物 및 寄生蟲에 대한 抑制作用, 抗癌作用, 子宮收縮作用 等이 있다[34].

이 두 藥物은 서로 相濟되어 "使氣自順而塞自開, 氣血不復上菀, 痰濁消散不蒙淸竅, 神志自可淸明"의 효과를 발휘함으로 臨床에서 常用되는 祛痰開竅의 藥對 중의 하나가 된다. 따라서 두 藥物을 配伍하여 頭昏, 頭腦不淸, 心神不穩, 心煩意亂, 失眠, 記憶力減退 및 痴呆 等症에 應用할 수 있다[8]. 최근 遠志에 대한 實驗的 硏究로는 Apomorphine으로 유발된 생쥐의 과행동 및 상동적 행동에 抑制效果[9], 腦 星狀細胞에 작용하여 염증을 일으키는 주요한 細胞活性物質의 生成을 抑制[10], 지질과산화 抑制[11] 및 이뇨, 진통, 해열, 수면시간 연장[12] 등의 效果가 보고된 바 있고, 石菖蒲에 대한 實驗的 硏究로는 장관운동의 이완[13], 혈중 콜레스테롤의 수치 감소[14], 뇌신경세포 보호작용[15], 국소뇌혈류량 증가[16], 腦軟膜動脈의 直徑 擴張[17], 痙攣抑制[18], MAO 억제활성, xanthine oxidase 억제활성 및 지질과산화 抑制效果[11]가 보고된 바 있으며, 遠志와 石菖蒲의 混合投與에 대한 實驗的 硏究로는 뇌보호기능[19], 만성적 스트레스로 인한 우울 발생의 방지 및 우울과 관련된 학습능력장애의 발생에 유의한 효과가 있다[20]는 보고가 있었다.

본 실험에서는 일시적 국소 뇌허혈 흰쥐모델에서 수중미로와 방사형 미로에서의 공간인지 학습수행과 기억력에 대한 행동변화의 관찰 및 해마부위의 Cresyl violet 염색을 이용하여 遠志石菖蒲散 투여가 학습수행과 기억력 증진 및 신경세포에 대한 보호작용에 미치는 효과를 살펴보았다. Morris 수중미로(Morris water maze)는 동물의 공간학습과 기억을 검사하기 위해 사용되며, 공간정보 외의 단서들을 통제하기 쉬운 장점이 있다. 이는 주로 장기기억 능력을 측정하는 과제로서 동물의 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억력 즉 공간기억(spatial memory)을 측정하는 실험이다. Morris 수중미로를 통한 기존의 연구에서 동물은 연령증가에 따라 학습과 기억 능력이 저하되고, 해마의 신경이 손상된 쥐는 수중미로 실험에서 학습수행과 기억력이 떨어진다고 보고된 바 있다[35].

방사형 미로(Eight-arm radial maze)에서 동물은 이 미로를 학습하는 과정에서 어떤 주로에 아직 음식이 남아 있는가와 같은 후각 단서를 사용하는 것이 아니라 주로들 사이의 공간관계를 규정하는 심적 표상인 일종의 정신적인 지도인 인지도(cognitive map)를 통해 학습되어진다[36]. 이 실험장치는 작업기억(working memory)의 성질에 대한 특별한 정보를 제공해 주는데, 작업기억이란 단기기억의 한 유형으로써 짧고 한정된 시간 내에서만 정보저장이 요구되며 즉시 사라지는 기억체계이다[36].

본 실험의 결과를 살펴보면, 먼저 수중미로 학습에서 6일 동안 180초내에 도피대에 도달하기까지의 시간을 측정하는 획득시행에서 제 1일째 SHAM군은 131.3±23.7초, SAL+ISCH군은 144.9±21.3초, WSS+ISCH군은 108.2±5.8초로 유의성 없이 비슷하게 나타났으나, 학습이 진행됨에 따라 도피대에 도달하는데 소요되는 시간이 3일째는 SHAM군은 70.3±15.9초, SAL+ISCH군은 119.7±17.8초, WSS+ISCH군은 55.6±5초로, 마지막 6일째는 SHAM군이 29.0±8.5초, SAL+ISCH군은 102.1±24.5초, WSS+ ISCH군은 27.2±6.3초로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다[$F(3,27)=5.806$, $P<0.01$]. 이에 측정일에 따른 집단별 사후검정 결과, 3일째와 6일째에 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게 감소되었는데($P<0.05$), 이는 遠志石菖蒲散 투여군의 공간 인지기억 학습수행 능력에 대한 증진효과를 보여주는 것이다.

수중미로 학습에서 마지막 날인 제 7일 째 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 검사시행에서 SHAM군은 3.1±0.6%, SAL+ISCH군은 1.7±0.5%, WSS+ISCH군은 4.4±0.4%로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였으며[$F(3,27)=7.874$, $P<0.05$], 집단별 사후검정 결과, 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게 증가하였다($P<0.001$). 이는 遠志石菖蒲散 투여군의 공간 기억력에 대한 증진효과를 보여주는 것이다. 방사형 미로 학습에서 5일 동안 300초 내에 한번 찾아갔던 주로를 다시 들어가는 오선택수를 측정하는 획득시행에서는 집단간의 유의성이 없었다. 그러나 방사형 미로 학습의 마지막 날인 제 6일째의 공간인지에 대한 기억검사에서 SHAM군은 1.8±0.2회, SAL+ISCH군은 3.4±0.4회, WSS+ISCH군은 2.4±0.2회로 집단간의 유의성 있는 차이를 보였고[$F(3,27)=0.435$, $P<0.05$], 집단별 사후검정 결과, 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군($P<0.05$)에 비하여 유의하게 감소하였다. 이는 遠志石菖蒲散 투여군의 공간인지에 대한 학습능력과 기억력의 증진효과를 보여주는 것이다.

해마 부위의 Cresyl violet을 이용한 신경세포의 염색에서 SHAM군의 염색정도를 100%로 두었을 때, SAL+ISCH군은 84.1±1.7%, WSS+ISCH군은 96.8±4.8%로 집단간에 유의성 있는 차이를 보였다[$F(3,75)=5.310$, $P<0.05$]. 이에 집단별 사후검정 결과, 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군($P<0.05$)에 비하여 유의하게 세포수가 증가되었는데, 이는 遠志石菖蒲散가 일시적 국소 뇌허혈을 유발한 해마의 신경세포손실을 방어하였음을 보여주는 것이다.

이상의 실험 결과는 일시적 국소 뇌허혈 흰쥐모델에 대한 遠志石菖蒲散의 투여가 해마의 신경세포를 보호하고 학습능력

및 기억력을 증진시키는데 유의한 효과가 있다는 것을 보여주는 것이며 경미한 주산기 가사나 두뇌손상으로 인한 일시적인 뇌허혈의 경우에 대하여 遠志石菖蒲散을 투여할 수 있는 근거로 제시될 수 있으리라 생각된다.

결 론

이에 저자는 遠志石菖蒲散의 뇌손상과 인지 및 학습장애 보호효과를 관찰하기 위하여 흰쥐의 중대뇌동맥을 일시적으로 폐쇄, 재관류시킨 후 수중미로, 방사형 미로를 이용한 행동측정과 해마부위의 뇌신경 세포수 변화를 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다. Morris 수중미로 학습의 획득시행에서 도피대에 도달하는 시간이 3일째와 6일째에 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게 감소되었다. Morris 수중 미로 학습에서 마지막 날인 제 7일째 도피대를 제거하고 도피대 영역에 머무르는 정도를 측정하는 검사시행에서 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게 증가하였다. 방사형 미로 학습의 획득시행과 공간인지에 대한 기억검사에서 오선택수가 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의하게 감소하였다. 해마 부위의 Cresyl violet을 이용한 신경세포수 측정에서 遠志石菖蒲散 투여군이 뇌허혈 유발군에 비하여 유의한 세포수 증가를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 논문게재비 지원으로 이루어졌음.

참고문헌

1. Graham DI. The pathology of brain ischemia and posibilities for therapeutic intervention. Br J Anaesth. 57:3-17, 1985.
2. Buchan AM, Pulsinelli WA. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. J Neurosci. 11:1049-1050, 1990.
3. Kufemann IL. Principles of Neural Science. 2nd ed. New York: Elsevier. pp.806-815, 1986.
4. 許浚. 東醫寶鑑. 서울. 南山堂. p.98, 2001.
5. 金英旭. 聰明湯이 健忘誘導白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響. 大田大學校 大學院, 1999.
6. Lee, Seoung-Hee. Effects of chongmyungtang on learning and memory performances in mice. Graduate School of Dongguk University, 2001.
7. 康秉秀, 高雲彩, 金先熙, 盧昇鉉, 宋昊埈, 辛民敎 등. 本草學. 서울. 永林社. pp.496-497, 523-524, 1991.
8. 楊思澍. 中醫百症用藥配伍指南. 北京. 中醫古籍出版社. pp. 528-529, 1990.
9. 정인원, 오원근, 김용식, 박주배, 안종석, 이현선 등. 遠志에 함유되어 있는 polygalasaponin계 화합물이 Apomorphine으로 유발된 생쥐의 과행동에 미치는 효과. 대한정신약물학회지 11(3):254-261, 2000.
10. 황시영 강형원, 류영수. 遠志에 의한 腦 星狀細胞로부터 炎症性 細胞活性物質 分泌의 抑制 效果에 關한 硏究. 동의신경정신과학회지 10(1):95-108, 1999.
11. 박용기, 강병수, 윤은경, 강소임, 박창훈, 이동웅 등. 신경안정 생약 추출물이 in vitro에서 신경전달효소 및 항산화계에 미치는 영향. 약학회지 44(1):22-28, 2000.
12. 朴大圭, 李琬夏. 遠志 Saponin의 利尿效果 및 中樞抑制作用에 關한 硏究. 생약학회지 14(4):178-192, 1983.
13. 김영환, 박준형. 창포 정유가 토끼의 적출장관 운동에 미치는 영향. 경북대농학지 10:19-33, 1992.
14. 姜善泰, 李泰浩. 瘀血病態模型에 미치는 川芎 石菖蒲 및 半夏의 效能에 關한 實驗的 硏究. 동의병리학회지 4:57-73, 1989.
15. 康丞樁. 石菖蒲가 腦虛血을 誘發시킨 白鼠에서의 腦神經保護效果. 慶山大學校大學院, 2001.
16. 鄭鉉雨, 康城溶, 白承化. 石菖蒲가 血壓 및 局所腦血流量에 미치는 影響. 大韓本草學會誌 14(2):81-88, 1999.
17. 李金洙, 鄭鉉雨, 康成溶. 石菖蒲가 白鼠의 腦軟膜動脈의 直徑에 미치는 機轉硏究. 大韓本草學會誌 15(2):1-7, 2000.
18. 朴慶洙. 石菖蒲 精油 香氣의 吸入이 白鼠의 痙攣抑制에 미치는 影響. 東國大學校大學院, 2000.
19. 康永祿. 遠志와 石菖蒲의 單獨 및 混合投與가 白鼠의 腦損傷에 미치는 影響. 大田大學校大學院, 1997.
20. 玄炅哲. 遠志石菖蒲散이 CMS를 받은 흰쥐의 憂鬱, 學習, 그리고 뇌의 TH 및 c-Fos 발현에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院, 2002.
21. Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Summins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 20:84-91, 1989.
22. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd de. Academic Press. 1986.
23. 민성길. 최신정신의학. 서울. 삼신문화사. pp.39-41, 1996
24. Kesner RP. Reevaluation of the contribution of the basal forebrain cholinergic system to memory. Neurobiology of Aging. 9:609-616, 1988.
25. Johnston M, Mckinney M, Coyle J. Evidence for a cholinergic projection to neocortex form neurons in basal forebrain. Proceedings of the National Academy of Science. 76:5392-5396, 1979.
26. Chrobak JJ, Hanin I, Walsh TJ. AF64A(ethycholine aziridinum ion), a cholinergic neurotoxic, selectively impairs working memory in a multple component T-maze task. Brain Research. 414:15-21, 1987.
27. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. Trends Neurosci. 8:22-26, 1995.

28. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. Neuron. 1:623-634, 1988.
29. Simon R, Swan J, Griffith T, Meldrum B. Blockade of N-methy-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. Science. 1984;247:571-574
30. Iadecola C. Dark and bright sides of nitric oxide in ischemia brain injury. Trends Neurosci. 20:132-139, 1997.
31. Schielke GP, Yang GY, Shivers BD, Betz AL. Reduced ischemia brain injury in Interleukin-1β converting enzyme-deficient mice. J Cereb Blood Flow Metabol. 18:180-185, 1998.
32. 김호철. 한약약리학. 1판. 서울. 집문당. 379-381, 411-412, 2001.
33. 徐大椿. 神農本草經百種錄(欽定四庫全書). 서울. 大星文化社. pp.562-566, 1995.
34. 鄭虎占等. 中藥現代研究與應用. 1판. 北京. 學苑出版社. pp. 1356-1364, 2121-2129, 1998.
35. Hickey RW, Akino M, Strausbaugh S, De Courtmn, Myers GM. Use of the Morris water maze and acoustic stratle chamber to evaluate neurologic injury after asphyximal arrest in rats. Pediatr Res. 39(1):77-84, 1996.
36. Olton DS. Mazes, maps and memory. American Psychologist. 34:583-596, 1979.