

定志丸의 기억 및 인지기능 향상에 대한 효능 연구

정태영 · 정원춘 · 박종현^{1*}

대구한의대학교 한의과대학 진단학교실, 1: 병리학교실

Therapeutic Potential of Jeongjihwan for the Prevention and Treatment of Amnesia

Tae Young Jung, Won Choon Jeong, Jong Hyun Park^{1*}

Department of Diagnostics, 1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daeguhaany University

This study was aimed to investigate the memory enhancing effect of Jeongjihwan against scopolamine-induced amnesia in C57BL/6 mice. To determine the effect of Jeongjihwan on the memory and cognitive function, we have injected scopolamine (1 mg/kg, i.p.) into C57BL/6 mice 30 min before beginning of behavior tests. We have conducted Y-maze, Morris water-maze, passive avoidance and fear conditioning tests to compare learning and memory functions. Scopolamine-induced behavior changes of memory impairment were significantly restored by oral administration of Jeongjihwan (100 or 200 mg/kg/day). To elucidate the molecular mechanism underlying the memory enhancing effect of Jeongjihwan, we have examined the antioxidant defense system and neurotrophic factors. Jeongjihwan treatment attenuated intracellular accumulation of reactive oxygen species and up-regulated mRNA and protein expression of antioxidant enzymes as assessed by RT-PCR and western blot analysis, respectively. Jeongjihwan also increased protein levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) compared with those in the scopolamine-treated group. Furthermore, as an upstream regulator, the activation of cAMP response element-binding protein (CREB) via phosphorylation was assessed by Western blot analysis. Jeongjihwan elevated the phosphorylation of CREB (p-CREB), which seemed to be mediated partly by extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) and protein kinase B/Akt. These findings suggest that Jeongjihwan may have preventive and therapeutic potential in the management of amnesia.

Key words : amnesia, antioxidant, brain-derived neurotrophic factor, Jeongjihwan, oxidative stress, memory and cognition, scopolamine

서 론

치매는 보통 뇌의 만성 또는 진행성 질환에서 생긴 인지능력의 장애를 나타내는 뇌 증후군으로^{1,2)}, 현대의학 및 생명과학의 급속한 발전으로 치매의 본질을 분자수준에서 이해할 수 있게 되었음에도 불구하고, 발병율과 유병율은 지속적으로 증가하고 있다³⁾.

치매 환자 중 절반 이상을 차지하는 것으로 알려진 알츠하이머병(Alzheimer' disease, AD)은 진행성 퇴행성 뇌질환으로 베타아밀로이드(β -amyloid) 축적이 대표적인 신경병리학적 지표로

나타나며, 특히, 알츠하이머 환자의 뇌에서 아세틸콜린 량 및 아세틸콜린을 합성하는 효소(choline acetyltransferase, ChAT), 아세틸콜린 수용체(acetylcholine receptor, AchR)의 수가 감소하며, 아세틸콜린을 분해하는 효소인 아세틸콜린에스터라제(acetylcholine esterase, AchE) 활성이 증가된 것이 확인 되었다^{4,5)}.

기존의 연구에서는 치매 예방 및 치료, 학습 및 기억력 증가를 위해 아세틸콜린이라고 하는 신경 전달 물질의 분해를 막아 주어 콜린 신경계를 활성화 시키고자 아세틸콜린 분해 효소 억제제 (acetylcholine esterase inhibitor; AchE inhibitor)가 주로 개발되어 왔는데, 이들 약물들은 감퇴된 인지 기능을 어느 정도 개선시켜 주는 효과를 가지고 있지만, 장기간 복용시 심각한 독성이 있는 경우가 존재하여 사용에는 논란의 여지가 많은 상태이다.

* 교신저자 : 박종현, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : moguri@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2248

· 접수 : 2010/12/23 · 수정 : 2011/01/12 · 채택 : 2011/01/25

한의학적으로는 痴獸⁶⁾, 呆病⁷⁾, 健忘⁸⁾ 등이 痴呆의 범주에 해당하는 것으로 볼 수 있는데, 치매의 주요 특징인 기억력 장애는 健忘에서 그 치료법을 찾아 볼 수 있다.

본 연구에서 사용한 定志丸은 孫思邈의 『備急千金要方』⁹⁾에 수록된 처방으로, 心氣부족으로 인해 五臟의 氣가 부족해지고 심한 경우 우울해지면서 건망증이 발생한 것을 치료하며, 하¹⁰⁾, 최 등¹¹⁾, 신 등¹²⁾은 定志丸이 老化和 뇌조직의 신경세포 손상에 미치는 영향을 실험적으로 연구 보고하였다.

치매의 발병, 병인, 병리에는 단일 경로가 아니라 산화적 손상, 신경전달물질 이상, 신경영양인자 결핍 등 다양한 요소들이 복합적으로 작용하므로 예방 및 치료제 개발에도 이러한 측면이 고려되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 무스카린성 아세틸콜린 수용체 길항제로 알려진 스코폴라민으로 유도된 건망증 병태 모델에서 定志丸의 인지 및 기억력 향상을 통한 항치매 효능을 다양한 행동실험을 이용하여 검토하고 작용기전을 다각적 지표를 사용하여 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

기억 및 인지 장애를 유발하기 위하여 스코폴라민(scopolamine, SCO)을 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 定志丸(Jeongjihwan, JJH)의 처방내용과 조성은 『備急千金要方』⁹⁾에 준하였으며 약재는 계림약업사(대구)에서 구입하여 사용하였다(Table 1). 定志丸 300 g을 증류수 3 L에 넣고 100℃에서 4 시간 동안 전탕한 뒤 여과하였다. 여액을 rotary evaporator (Rotavapor R-220, BUCHI, Switzerland)를 이용하여 감압농축하고, 농축액을 -70℃의 온도에서 동결건조(Freezezone 6, Laboconco, Germany)하였다. 定志丸 열수 추출물 33.1 g (수율 : 11%)을 수득하였으며, 4℃에 보관 후 매 실험 시 증류수에 녹여 사용하였다.

Table 1. The composition of Jeongjihwan(JJH)

Herb	Scientific name	Dose(g)
人蔘	Ginseng Radix (Panax ginseng CA. Meyer)	90
白茯苓	Poria (Poria cocos Wolf.)	90
遠志	Radix Polygalae (Polygala tatarinowi Regel)	60
石菖蒲	Rhizoma Acori Graminei (Acorus gramineus Soland)	60
Total amount		300

2. 실험동물

효창사이언스(대구)에서 분양 받은 20-25 g 내외의 8주령 수컷 C57BL/6 마우스(C57BL/6 mouse)를 대구한의대학교 상동캠퍼스 사육실에서 3일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 이때 사육실의 조건은 온도 22-24℃ 및 습도 55-65%, 낮 12시간-밤 12시간 조명주기로 설정하였다.

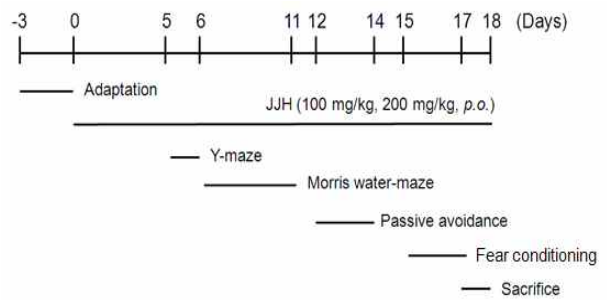
3. 실험군 설정과 실험의 진행

실험군은 정상군(SHAM), 스코폴라민만 단독으로 투여한 대조군(SCO), 스코폴라민과 定志丸을 동시에 투여한 실험군(SCO

+ JJH, 100 mg/kg, 200 mg/kg), 定志丸만 투여한 군(JJH, 100 mg/kg, 200 mg/kg)의 총 6개 그룹으로 나누고, 그룹 당 7마리의 마우스를 배정하여 실험을 진행하였다(Table 2).

기억 및 인지 장애를 유발하는 물질인 스코폴라민을 투여하기 5일전부터 定志丸을 100 또는 200 mg/kg/day의 용량으로 경구 투여하였으며, 행동실험 실시기간 동안은 행동실험 개시 1시간 전에 경구 투여하였다. 이후, 행동실험 30분 전 스코폴라민을 1 mg/kg의 용량으로 복강으로 투여하였으며, Y-미로(Y-maze test), 모리스 물-미로(Morris water-maze test), 수동회피(passive avoidance) 및 공포조건화(fear conditioning test) 실험을 실시하였다.

Table 2. Experimental schedule



4. Y-미로 실험(Y-maze test)

Y-미로 실험은 定志丸이 실험동물의 공간지각능력 및 단기 기억능력의 회복에 도움을 주는지를 알아보기 위한 실험이다. Y-미로 실험에 이용되는 기구는 Y자 모양의 120° 각도를 이루는 세 개의 가지(arm, 길이 : 28 cm, 넓이 : 6 cm, 높이 : 18 cm)로 구성되어 있으며, 흰색의 무광 아크릴 판으로 제작되었다. 각 가지를 A, B, C로 정하고 한쪽 가지에 마우스를 놓아주어 8분 동안 자유롭게 움직이도록 한 다음 각 가지에 들어간 횟수와 순서를 천정에 설치된 카메라를 통해 컴퓨터 프로그램(Ethovision 3.1, Nodulus, Netherlands)으로 관찰하여 기록하였다. 이 때 각 가지에 들어간 횟수와 순서는 꼬리가 완전히 들어간 경우에 한하며, 반복해서 동일한 가지에 다시 들어간 경우도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 순차적으로 들어간 경우 즉 ABC, CAB, BCA 등의 순서로 들어간 경우(실제 변경, actual alternation) 1점씩을 부여하였으며, % 변경 행동력(% alternation behavior)은 다음의 수학적식에 의해 계산하였다.

$$\% \text{ 변경 행동력 (\% spontaneous alteration)} = \frac{\text{실제 변경 횟수}}{(\text{총 출입 횟수} - 2)} \times 100$$

5. 모리스 물-미로 실험(Morris water-maze test)

물-미로 실험은 定志丸이 실험동물의 공간지각 능력 및 단기, 장기 기억력의 회복(short and long-term memory recovery)에 영향을 주는 측정하기 위한 실험이다. 실험장비는 원형 물탱크(stainless steel pool : 직경 120 cm, 높이 45 cm) 안에 물(수온 22±2℃)을 32 cm 높이로 채우고, 4분면의 한 구획에 도피대(escape platform, 직경 10 cm, 높이 30 cm)를 수면 2 cm 아래 위

치하도록 설치하고 흰색의 색소를 풀어 보이지 않게 하였다. 실험은 5일 동안 하루에 3번씩 세 곳에서 입수 위치를 달리하여 우연에 의해 도피대를 찾아가는 가능성을 최소화하였다. 실험동물이 도피대를 찾아가 10초 이상 머무르는 경우, 도피대를 찾아가갈 때까지 소요되는 시간을 탈출잠복기(escape latency)로 하였으며, 하루 3회 실시하여 나온 평균값을 평균탈출잠복기(mean escape latency)로 하였다. 천정에 카메라를 설치하여 컴퓨터 프로그램(Ethovision 3.1)을 이용하여 실험동물의 탈출잠복기를 기록하였다. 물-미로 실험은 실험동물이 수조 주변의 표지물을 기억하여 찾아가기 때문에 주변 환경의 변화가 없도록 표지물의 위치를 실험기간 동안 일정하게 유지하였고, 120초 안에 도피대를 찾지 못할 경우 실험동물을 도피대로 유도하여 10초 동안 머물며 위치를 기억하도록 하였다. 실험 마지막 날에는 도피대를 제거하고, 30초 동안 도피대가 존재한 사분면에 머무는 시간(time spent in platform quadrant)을 측정하는 probe test를 실시하였다.

6. 수동회피 실험 (passive avoidance test)

수동회피 실험은 동일한 구조의 조명이 있는 방과 조명이 없는 방(가로 25 cm, 세로 20 cm, 높이 20 cm)이 길로틴 문(guillotin door)으로 연결되어 있는 장치에서 수행되었다(Gemini Avoidance System, San Diego, USA). 마우스를 조명을 비추는 밝은 쪽 방에 놓고 10초간 탐색시킨 후 문을 열어 어두운 방으로 들어갈 수 있게 하였으며, 이때 어두운 방으로 들어갈 때까지 걸리는 시간을 측정하였다(학습 시험 : acquisition trial). 마우스가 어두운 방으로 들어가면 자동으로 문이 닫히고 0.5 mA의 전기 자극이 5초 동안 바닥의 철망(stainless grid)을 통해 주어졌다. 장기 기억에 미치는 定志丸의 인지기능 회복효과를 확인하고자 24시간 후 다시 마우스를 밝은 쪽 방에 놓아 주고 전기 자극을 받았던 어두운 방으로 들어가는데 걸리는 시간(step-through latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정하였다(유지 시험 : retention trial).

7. 공포조건화 실험(fear conditioning test)

공포조건화 실험은 환경적 맥락 또는 조건자극을 전기쇼크와 연합시켜 학습과 기억을 평가하는 실험이다. 이 실험은 환경적 맥락 조건화(contextual fear conditioning)와 단서 조건화(cued fear conditioning)로 나눌 수 있으며, 훈련시행은 소리자극(15초, 68~80db, 30 kHz)과 전기쇼크(1초, 0.5 mA)를 짝지어 150초 간격을 두고 2회 시행하였다. 마지막 전기쇼크가 주어진 다음 60초 후에 마우스를 조건화 상자에서 꺼내어 24시간 뒤 다음과 같은 검사를 실시하였다.

1) 맥락조건화 실험

실험동물을 동일한 조건화 상자에 둔 상태에서 소리자극을 제시하지 않고 동결반응(freezing response)을 5분 동안 측정하여 맥락에 대한 조건화된 공포반응 척도로 삼는다(해마-의존적 기억력 : hippocampal-dependent memory).

2) 단서 조건화 실험

2시간 후 맥락을 변화시키기 위해 훈련 시행과는 다른 새로

운 상자에 마우스를 넣고 훈련시행과 동일한 조건의 소리자극을 제시하여 나타나는 공포로 인해서 움직이지 않는 시간을 측정하여 단서에 대한 조건화된 공포반응 척도로 삼는다(편도체-의존적 기억력 : amygdala-dependent memory). 동결반응이란 숨쉬기를 제외한 다른 움직임이 없는 상태를 측정하였다.

8. 활성산소 생성 측정

마우스 대뇌 피질(cortex)과 해마(hippocampus) 부위 조직에 20 mM sodium phosphate buffer를 가한 후 homogenizer로 균질화한 다음 12,000 g에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 이후 상층액 50 µl에 100 mM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA, Invitrogen, USA)를 가하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치한 다음 Gemini XS fluorescence reader (Molecular Device, 미국)기를 사용하여 excitation 485 nm 및 emission 585 nm의 파장조건에서 형광강도를 측정하였다.

9. 환원형 글루타치온 (glutathione : GSH)량 측정

세포내 GSH량의 측정을 위해 BioVision사의 ApoGSHTM Glutathione Colormetric Assay Kit를 사용하였다. 대뇌 피질 부위의 조직을 취한 후 400 µl glutathione assay buffer를 가하여 homogenizer로 균질화 한 다음 12,000 g에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. NADPH generation mix, glutathione reductase와 glutathione reaction buffer 혼합액 160 µl를 micropate reader용 96-well plate에 가한 뒤 실온에서 10분간 배양하였다. 이후 20 µl의 표준용액 또는 시료를 각각 96-well에 넣고 다시 실온에서 10분간 배양하였으며, 20 µl 기질용액을 가하여 발색시킨 후 Emax microplate reader (Molecular Device, 미국)기를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료중의 GSH 농도는 표준검량 곡선으로부터 환산하여 ng/ml로 나타내었다.

10. mRNA 발현 측정(Reverse transcriptase - polymerase chain reaction : RT-PCR)

TRI reagent (Molecular Research Ceter, OH, USA)로 실험동물의 대뇌 피질 부위로부터 mRNA를 추출하였다. 분리한 mRNA는 M-MLV 역전사 효소(Promega, WI, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 42℃에서 1시간 동안 역전사 시켰다. 생성된 cDNA는 다음과 같은 합성 프라이머를 사용하여 PCR을 실시하였다(Table 3). PCR에 의해 증폭된 DNA들은 ethidium bromide로 염색된 1.5% 아가로스 젤에서 전기영동 한 뒤 UV를 조사하여 gel documentation system (TCP-20.M, Vilber Lourmat, France)으로 관찰하였다. glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 동일한 실험 조건 확인을 위한 대조 지표로 사용하였다.

11. 단백질발현 측정(Western blot analysis)

행동실험이 끝난 실험동물의 대뇌피질 부위를 분리하여, 차

갑게 한 RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20mM EGTA, 1mM DTT, 1mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail)로 균질화 하였다. 이후 4°C 에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하여 실험에 사용하였다. BCA시약으로 단백질 함량을 정량 한 뒤, 30 µg을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동 하였다. 전개시킨 겔은 PVDF membrane (Pall Corporation, USA)에 transfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST [인산완충액 (phosphate-buffered saline, PBS), 0.1% Tween-20]로 비특이적 결합을 blocking 시켰다. 3% fat-free dry milk-PBS에 일차항체를 1:1000의 희석배율로 overnight으로 불리고, PBST용액으로 10분간 3회 세척한 뒤 이차항체를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간 동안 불린 다음 PBST용액으로 다시 10분간 3회 세척하였다. 이후 enhanced chemoluminescence (ECL) 용액과 반응시켜 Amersham Chemiluminescent Immunoblotting Imaging (UVP, CA, USA) 장비를 이용하여 이미지를 촬영하였다.

Table 3. The specific sequence for each primer

Gene	PCR primer sequences	
GCL	Forward	5'-CTG ACA CGT AGC CTC GGT AA-3'
	Reverse	5'-AGA CAC GGC ATC CTC CAG TT-3'
HO-1	Forward	5'-TTG AGC AGG AAG GCG GTC TTA G-3'
	Reverse	5'-ACT TTC AGA AGG GTC AGG TGT CC-3'
GAPDH	Forward	5'-AGT GTA GCC CAG GAT GCC CTT-3'
	Reverse	5'-GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC-3'

12. 통계처리

실험결과는 평균 ± 표준오차 또는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 통계 처리를 위하여 SPSS Version 16.0 프로그램을 사용하여 하였다. 스키폴라민으로 유도된 기억 및 인지기능 손상에 대한 定志丸의 효능을 평가하기 위하여 일원배치 분산분석 (one way ANOVA)을 수행하였으며 다중분석을 위하여 Turkey test 사후검정을 실시하였다. 그룹 간 유의성은 통계수치 p값이 0.05 이하를 기준으로 판정하였다.

결 과

1. Y-미로 실험을 이용한 기억력 개선 효과

각기 다른 모양의 표지를 파악하여 순차적으로 미로를 들어가는 상대적 빈도를 측정된 변경 행동력 점수(spontaneous alteration, %)에서 정상군(SHAM), 스키폴라민만 단독으로 투여한 대조군(SCO), 스키폴라민과 定志丸을 동시에 투여한 실험군(SCO + JJH), 定志丸만 투여한 군(JJH) 사이에 통계적으로 유의한 차이를 관찰 할 수 있었다. 즉, 스키폴라민(1 mg/kg, i.p.)만을 단독으로 투여한 대조군(SCO)의 경우 기억력이 손상되어 변경 행동력 점수가 50.44 ± 1.48 %로 정상군(SHAM), 스키폴라민과 定志丸을 동시에 투여한 실험군(SCO + JJH), 그리고 定志丸만 투여한 군(JJH)과 비교하여 감소되었으며, 이는 定志丸을 투여한 실험군(SCO + JJH)에서 현저히 증가되어 통계적으로 유의한 인지 기억력 향상 효과를 보여 주었다(Fig. 1A). 실험동물의 전반적

인 행동양상 및 운동 상태를 비교 검토하기 위하여 미로를 방문한 총 횟수(number of arm entries)를 비교한 결과, 그룹간의 유의성 있는 차이는 없었으며 변경 행동력 점수와 상관계도 찾을 수 없었다(Fig. 1B).

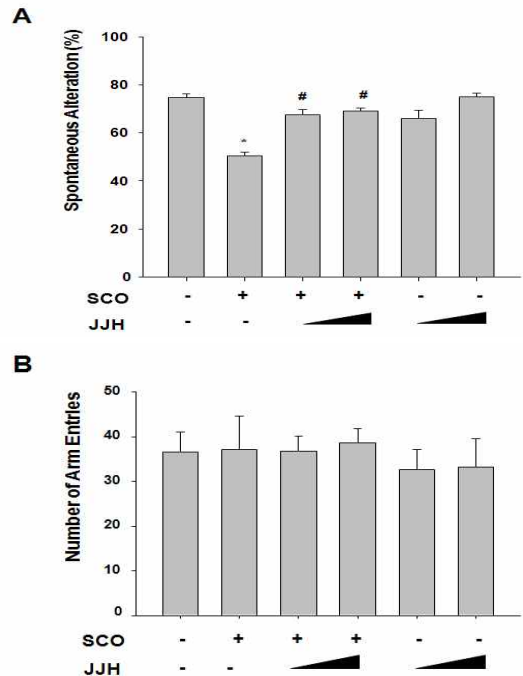


Fig. 1. Memory enhancing effect of Jeongjihwan (JJH) against scopolamine (SCO)-induced amnesia (Y-maze test) Alteration behavior (A) and total number of arm entries (B) were monitored in Y-maze test. Mice were orally administered with 100 mg/kg and 200 mg/kg of JJH or same volume of vehicle (0.9% saline) 30 min prior to SCO (1 mg/kg, i.p.) treatment and injected with SCO 30 min before conducting Y-maze test. Data are represented as mean ± S.E.M. (n=7). *p < 0.05, compared with the sham control group and #p < 0.05, compared with the SCO alone-treated group.

2. 모리스 물-미로 실험을 이용한 기억력 개선 효과

실험동물이 주변의 지표를 기억하여 숨겨진 도피대 (platform)를 찾아가는 데까지 걸리는 평균탈출잠복기(mean escape latency)를 측정된 결과, 정상군(SHAM)과 스키폴라민만 투여한 대조군(SCO)의 경우 훈련 셋째, 넷째, 다섯째 날 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 스키폴라민만 단독으로 투여한 대조군(SCO)의 경우 실험실시 기간 동안 평균탈출시간이 느린 속도로 감소하였으며, 반면 스키폴라민과 定志丸을 함께 투여한 실험군(SCO + JJH)에서는 훈련 진행과정에서 평균탈출잠복기의 감소 정도가 스키폴라민만을 투여한 실험군(SCO)에 비하여 유의성 있게 증가되었다(Fig. 2A). 특히 훈련 5일째 probe test에서 스키폴라민 투여군(SCO)의 경우 다른 군에 비하여 도피대가 있던 영역에 머무르는 시간(time spent in the platform quadrant)이 현저히 감소되었으며, 이에 반해 定志丸을 함께 투여한 실험군(SCO + JJH)에서는 도피대가 있던 자리를 기억하고 그 주변에 머무르는 시간이 증가함을 확인 할 수 있었다(Fig. 2B). 훈련실시 기간 동안(첫째, 셋째, 다섯째 날) 각 그룹의 대표적인 이동 경로를 Fig. 2C에서 보여주고 있다.

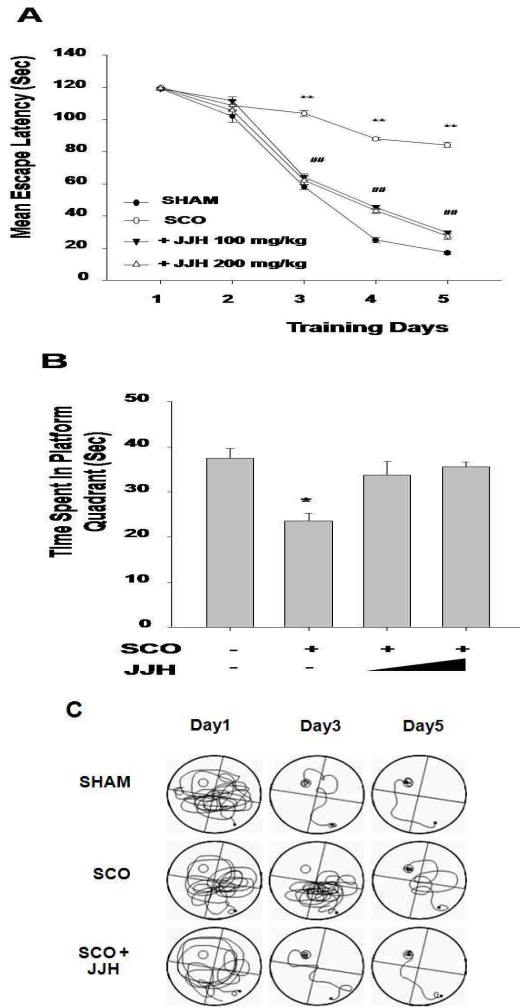


Fig. 2. Memory enhancing effect of Jeongjihwan (JJH) against scopolamine (SCO)-induced amnesia (Morris water-maze test) Memory impairment was induced by 1 mg/kg (i.p) of SCO 30 min after pre-treatment with JJH (100 mg/kg and 200 mg/kg, p.o.). A. The time spent to find the hidden platform (escape latency) was monitored by Morris water-maze test 30 min after injection of SCO for five consecutive training days. B. During probe test, the time spent in the platform quadrant was measured after removing the platform. C. The swimming pathways of each group (vehicle-treated sham control group, SCO alone-treated group, JJH-treated group in combination with SCO) at 1st, 3rd, and 5th training days were shown. Data represent means \pm S.E.M. (n=7) *p < 0.05 and **p < 0.01, compared with the sham control group. ##p < 0.01, compared with the SCO alone-treated group.

3. 수동회피 실험을 이용한 기억력 개선 효과

스코폴라민으로 유도된 기억력 손상에 대한 정저환의 개선 효과를 검토하기 위하여, 동일한 구조의 조명이 있는 방과 조명이 없는 방이 길로틴 문(guillotin door)으로 연결되어 있는 장치를 사용하여 수동회피실험(passive avoidance test)을 실시하였다. 일반적으로 마우스를 조명이 있는 방에 넣으면 어두운 곳으로 가려고 하는 습성이 있으므로, 이를 이용하여 조명이 없는 방에 들어갈 때 바닥에 설치된 철망(stainless grid)을 통해 전기적 쇼크를 주게 된다. 24시간 후 다시 조명이 있는 방에 실험동물을 넣었을 때 조명이 없는 방으로 들어가는데 까지 걸린 시간(step-through latency)을 측정하게 된다. 실험동물은 습성상 어두운 곳으로 가려하지만 전기적 쇼크를 기억한다면 이에 대한 반사적 행동으로

조명이 없는 방으로 들어가기를 회피함을 볼 수 있다. 따라서, 실험동물이 전기적 쇼크를 받았던 어두운 방으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학습과 인지능력이 좋음을 나타낸다. 스코폴라민을 단독으로 투여한 대조군(SCO)의 경우 어두운 방으로 가는데 걸리는 시간이 다른 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소되었으며, 반면 定志丸을 동시에 투여한 실험군(SCO + JJH)의 경우 현저히 증가됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 3).

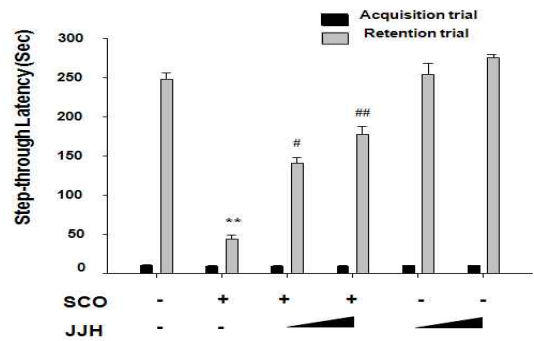


Fig. 3. Memory enhancing effect of Jeongjihwan (JJH) against scopolamine (SCO)-induced amnesia (passive avoidance test). Mice were orally administered with 100 mg/kg and 200 mg/kg of JJH or same volume of vehicle (0.9% saline) 30 min prior to SCO (1 mg/kg, i.p) treatment and injected with SCO 30 min before passive avoidance test. Acquisition trial was carried out 30 min after i.p. injection of SCO. Retention trial was performed 24 h after the acquisition trial for 300 sec. Data are represented as means \pm S.E.M. (n=7) **p < 0.01, compared with the sham control group. #p < 0.05 and ##p < 0.01, compared with the SCO alone treated group.

4. 공포조건화 실험을 이용한 기억력 개선 효과

스코폴라민으로 유도된 기억력 손상에 대한 定志丸의 개선 효과를 검토하기 위하여, 실험동물의 환경적 맥락 또는 조건자극을 전기쇼크와 연합시켜 학습과 기억을 평가하기 위하여 공포조건화 실험(fear conditioning test)을 실시하였다. 이는 다시 맥락 조건화(contextual fear conditioning)와 단서 조건화(cued fear conditioning)로 나눌 수 있다. 맥락 조건화 실험은 해마-의존적 기억력을 측정하는 실험으로 실험동물을 조건화 상자에 둔 상태에서 소리자극을 제시하지 않고 동결반응(freezing response)을 측정하게 된다. 단서 조건화 실험은 편도체-의존적 기억력을 측정하는 실험으로 훈련시행과 동일한 조건의 소리자극을 제시할 때 나타나는 공포로 인한 동결반응을 측정하게 된다. 스코폴라민의 투여로 인지기능이 감소한 실험동물(SCO)에서는 맥락 조건화(Fig. 4A)와 단서 조건화(Fig. 4B)에 대한 동결반응 시간(freezing time)이 다른 군에 비해 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 한편, 定志丸을 함께 투여한 실험군(SCO + JJH)에서는 이러한 동결반응 시간이 현저히 증가되어 해마-의존적(Fig. 4A) 및 편도체-의존적(Fig. 4B) 기억력이 용량 의존적으로 회복됨을 확인 할 수 있었다. 특히, 定志丸을 단독으로 투여한 그룹의 경우(JJH) 정상군(SHAM)과 비교하여 더 높은 동결반응 수치를 나타내었다.

5. 활성산소 생성에 대한 억제 효능

생체 내, 특히 뇌의 경우 다량의 에너지를 필요로 하며, 이러한 에너지 생산을 위한 산화 과정 중에 원치 않은 활성산소종

(reactive oxygen species, ROS)들이 생성되게 된다. 이들 활성산소는 생체 내 방어시스템중의 하나인 항산화 및 무독화 효소에 의해 대부분 소멸되지만 활성산소가 순간적으로 다량 발생하거나 만성적으로 생성되어 항산화 방어체계와의 균형이 깨지면 각종 질환의 원인이 된다. 세포내 축적된 활성산소 중 특히 peroxide류의 생성 측정을 위해 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 시약을 사용하였다. DCF-DA는 세포내로 들어가 세포내 생성된 활성산소에 의해 탈아세틸화 되면 형광을 내는 물질인 DCF로 전환된다. 본 연구에서는 활성산소종 생성에 대한 定志丸의 효과를 측정하기 위하여 마우스에 定志丸을 100 mg/kg 및 200 mg/kg의 용량으로 경구 투여 한 후 대뇌 피질과 해마를 분리하였다. 정상군(SHAM)의 경우를 기준으로 定志丸을 100 mg/kg 및 200 mg/kg의 용량으로 투여한 군(JJH)에서는 활성산소종의 생성이 각각 25% 및 15%로 감소되었다. 특히, 定志丸의 세포내 활성산소 생성 저하 효과는 해마 보다 대뇌 피질에서 높게 나왔다(Fig. 5).

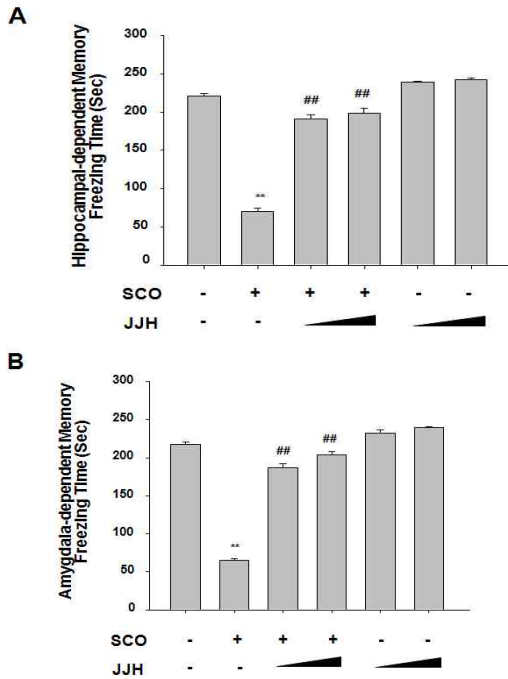


Fig. 4. Memory enhancing effect of Jeongjihwan (JJH) against scopolamine (SCO)-induced amnesia (fear conditioning test) Memory impairment was induced by 1 mg/kg (i.p) of SCO 30 min after pre-treatment with JJH (100 mg/kg and 200 mg/kg, p.o.). Sound tone and electric shock were delivered 30 min after injection with SCO. Twenty-four hour later, freezing time without any movement except breathing in the contextual and cued fear conditioning tests were monitored for 300 sec. Data are represented as mean \pm S.E.M. (n=7) **p < 0.01, compared with the sham control group and ##p < 0.01, compared with the SCO alone-treated group.

6. 산화적 손상에 대한 보호 효능

뇌조직은 산소 소모량이 높고 산화되기 쉬운 불포화지방의 함량이 높은 반면 catalase 및 글루타치온(glutathione, GSH) 등 세포내 항산화 기전들의 활성이 다른 조직에 비해 낮아 상대적으로 산화적 손상을 받기 쉬운 특성을 지닌다. 본 연구에서 산화

적 손상에 대한 定志丸의 효능을 평가하기 위하여, 마우스에 스코폴라민 및 定志丸을 투여하고 세포내 GSH량 및 지질과산화물 측정하였다. 스코폴라민을 마우스에 단독으로 투여한 결과(SCO) 세포내 GSH 합성이 83.63 \pm 9.42%로 저해 되었으며, 반면 定志丸을 100 mg/kg 및 200 mg/kg의 용량으로 함께 투여한 실험군(SCO + JJH)의 경우 스코폴라민 투여군(SCO)에 비하여 각각 92.19 \pm 6.49% 및 107.85 \pm 9.52%로 합성이 증가되었다(Fig. 6A). 뿐만 아니라 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의해 매개되는 지질과산화의 지표인 4-hydroxy nonenal (4-HNE) 생성 또한 스코폴라민 투여(SCO)에 의해 증가되었지만, 定志丸 경구 섭취(SCO + JJH)에 의해 감소됨을 western blot analysis로 확인할 수 있었다(Fig. 6B).

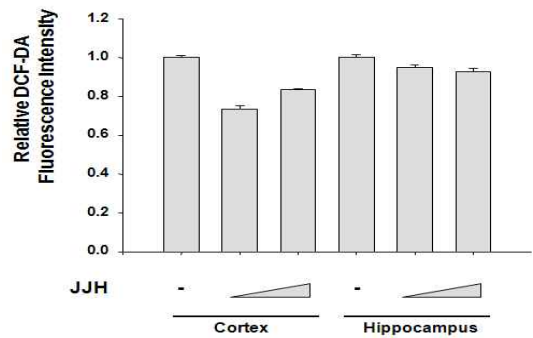


Fig. 5. Inhibitory effect of Jeongjihwan (JJH) on the intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) in the cortex and hippocampus. Mice were administered with JJH (100 mg/kg and 200 mg/kg, p.o.) or same volume of vehicle (0.9% saline). After conducting behavior tests, intracellular accumulation of ROS in the cortex and hippocampus was measured by using DCF-DA fluorescent reagent. Data are represented as means \pm S.D. (n=3).

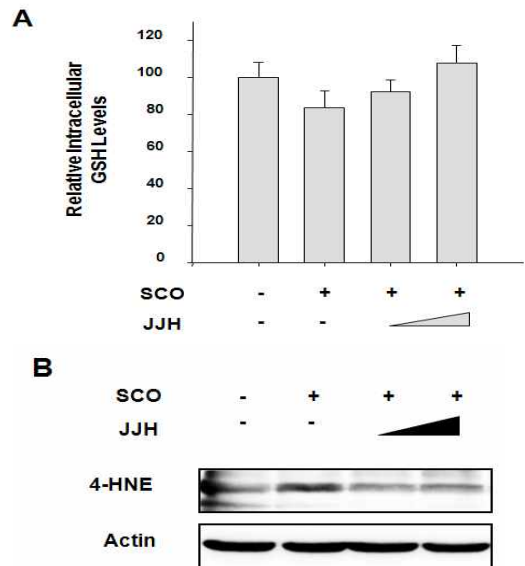


Fig. 6. Protective effect of Jeongjihwan (JJH) against oxidative stress in the brains of scopolamine (SCO)-treated mice SCO (1 mg/kg, i.p) was injected after 30 min pre-treatment with 100 mg/kg and 200 mg/kg of JJH, 30 min before behavior tests. After finishing behavior tests, intracellular levels of reduced glutathione (GSH) (A) and one of the typical markers of lipid peroxidation, 4-HNE were assessed by GSH ELISA kit and Western blot analysis, respectively. Data are represented as mean \pm S.D. (n=3).

7. 항산화 방어기능 강화 효과

세포내 GSH량은 GSH 생합성 과정의 속도 제한 효소인 γ -glutamyl cystein ligase (γ -GCL)에 의해 조절 되는 것으로 보고 되고 있으며, 定志丸 투여군에서 γ -GCL의 mRNA (Fig. 7A) 및 단백질 (Fig. 7B) 발현이 증가되는 것으로 보아 GSH 생합성의 증가는 定志丸 투여에 의한 γ -GCL 발현 증가에 의한 것임을 알 수 있었다. 또한 세포내 항산화 방어기작의 하나로 활성산소종의 하나인 superoxide를 산소와 과산화수소로 분해하는 반응을 촉매하는 superoxide dismutase (SOD)의 발현을 검토한 결과, SOD 단백질 발현 또한 定志丸 투여에 의해 증가되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 7B). 즉, 定志丸은 항산화 효소인 γ -GCL와 SOD의 발현 및 항산화 물질 GSH 생합성을 증가 시켜 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 것을 확인 할 수 있었다. 한편, 동일한 실험 조건에서 또 다른 항산화 효소중의 하나인 heme oxygenase-1 (HO-1)의 발현은 定志丸 투여에 의해 크게 영향을 받지 않았다.

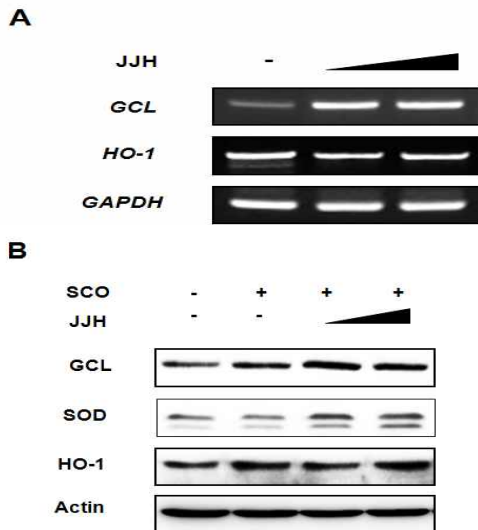


Fig. 7. Jeongjihwan (JJH)-induced mRNA and protein expression of γ -glutamylcysteine ligase (GCL) and superoxide dismutase (SOD) Mice were treated with JJH (100 mg/kg and 200 mg/kg, p.o.) or same volume of vehicle (0.9% saline) in the presence or absence of SCO. The mRNA (A) and protein (B) expression of GCL and SOD were determined by RT-PCR using specific primers and Western blot analysis with specific antibodies.

8. 신경성장인자 발현에 대한 효능

定志丸이 인지 및 기억력 향상효과를 갖는 또 다른 작용 기전으로, 장기기억 형성과 밀접한 관련이 있다고 알려진 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현 및 상위 조절 단백질의 활성을 검토하는 일련의 실험을 수행하였다. BDNF의 발현은 스코폴라민 투여(SCO)로 인하여 영향을 받지 않았지만, 定志丸을 함께 투여(SCO + JJH)함으로써 현저히 증가됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 8A). 한편, 이러한 BDNF의 발현 조절에는 다양한 상위 전사인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근 c-AMP-response element-binding protein (CREB)가 주목을 받고 있다. CREB은 기억이나 시냅스 가소성과 관련된 다양한 유전자의 프로모터(promoter) 부위에 결합하는 전사인자로,

CREB의 활성화는 기억 형성 및 강화와 관련된 유전자의 전사를 유도하게 된다. 定志丸을 경구투여 한 경우 CREB가 인산화를 통하여 활성화 되어 p-CREB의 형태가 증가되었으며(Fig. 8B), 이는 BDNF의 발현 증가를 통한 기억력 향상 효과를 매개할 것으로 추정된다. 한편, 이러한 CREB의 인산화에는 다양한 상위 인산화효소들이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 定志丸을 경구투여 한 경우 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) (Fig. 9A)와 protein kinase B (PKB)/Akt (Fig. 9B)의 인산화가 현저히 증가 되었다. 한편, 이러한 효과는 고용량(200 mg/kg)의 定志丸에서 두드러지게 나타났다.

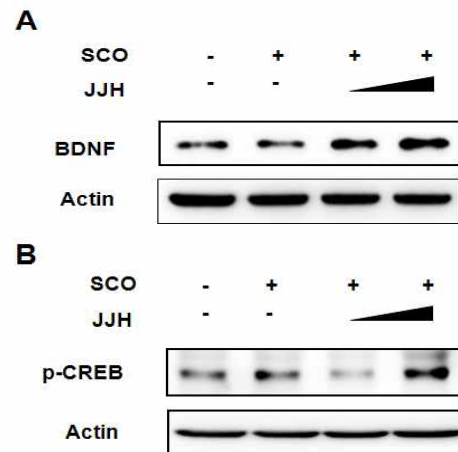


Fig. 8. Jeongjihwan (JJH)-induced up-regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and activation of c-AMP-response element-binding protein (CREB) Mice were administered with 100 mg/kg and 200 mg/kg (p.o.) of JJH or same volume of vehicle (0.9% saline) 60 min before behavior tests. Scopolamine (SCO, 1 mg/kg, i.p.) was injected after 30 min pre-treatment with JJH. The protein expression of BDNF (A) and phospho-CREB (B) was assessed by Western blot analysis using specific antibodies for BDNF and p-CREB.

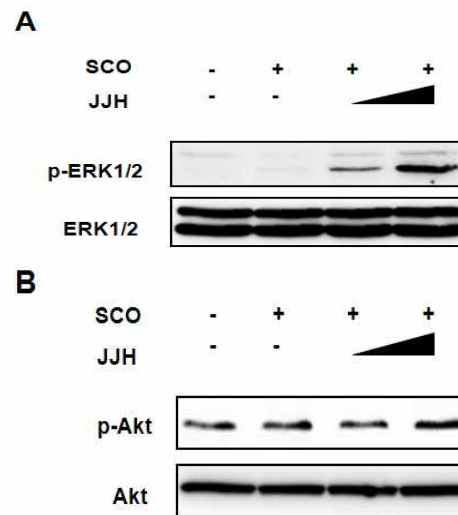


Fig. 9. Effect of Jeongjihwan (JJH) on the activation of ERK1/2 and PKB/Akt. Mice were administered with JJH (100 mg/kg and 200 mg/kg, p.o.) or same volume of vehicle (0.9% saline) 30 min before injection of SCO (1 mg/kg, i.p.). SCO was injected 30 min before conducting behavior tests. The activation of ERK1/2 and PKB/Akt via phosphorylation was examined by Western blot analysis with specific antibodies for the phosphorylated forms of ERK1/2 and PKB/Akt.

고찰

알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 뇌의 전반적 위축과 특유의 조직학적 소견, 즉 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 및 신경세포의 과립공포변성(granulovascular degeneration) 등을 특징으로 한다¹³⁾. AD의 1차적 증상인 기억력 장애는 해마와 측두엽의 콜린성 신경계 장애와 직·간접적으로 관련되어, 기저전뇌경로(basal forebrain pathway)의 콜린성 신경계의 생화학적 기능저하와 신경세포 소실은 알츠하이머병 연구자들이 일관되고 보고해온 사실이다¹⁴⁾. 알츠하이머 환자의 해마와 대뇌피질에서 콜린(choline) 흡수와 아세틸콜린(acetylcholine) 합성이 감소하는 것으로 확인되었으며, 아세틸콜린을 분해하는 효소인 acetylcholine esterase (AChE)의 발현은 높은 것으로 보고되고 있다¹⁵⁾. 또한 아세틸콜린을 합성하는 효소인 choline acetyltransferase (ChAT)의 활성도가 떨어지고¹⁶⁾, 뇌에서 니코틴성 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체(nicotinic and/or muscarinic acetylcholine receptor : nAChR and/or mAChR) 수가 감소된 것이 확인되었다⁵⁾. 따라서 아세틸콜린 대사와 관련된 지표는 알츠하이머병 환자의 임상적 정황 관찰 및 치료제 개발에 중요한 요소로 여겨진다.

기억력 장애는 치매 환자에서 가장 빈번하게 나타나는 주요 증상이며 치매 환자의 사회생활에 큰 장애를 초래하여 이에 대한 적절한 치료가 치매 환자의 삶의 질은 물론 병증의 개선에 중요한 요소라는 점에 착안하여, 본 연구는 한의학에서 기억력 장애와 관련된 健忘의 치료법에서 그 대책을 찾아보고자 시도하였다.

健忘은 기억력 저하를 주증으로 하는 병증으로¹⁷⁾, 心脾腎의 精氣의 소모로 인하여 心腎이 交流하지 못하고 腦가 空虛해져 精神作用이 약화되어 발생 된다¹⁸⁾. 사람의 精과 志는 모두 腎이 藏하고 있는데, 腎精不足으로 志氣가 쇠하고 心과 相通하지 못하므로 喜忘이 발생되고, 또 脾는 意와 思를 주관하고 心은 五臟之氣를 총괄하는데, 思慮가 과도하면 意思가 不清하고 神宮이 不識하여 健忘이 나타난다¹⁹⁾. 健忘의 치료에 있어서는 許²⁰⁾는 心血을 養하고 脾土를 理하여야 하니 凝神定志之濟로써 調理하여야 한다고 하였고, 李²¹⁾는 氣血을 大補하여야 한다고 하였고, 林²²⁾은 心腎을 交通시켜야한다고 하여 대체적으로 心脾腎 三臟의 精氣血을 다스리는 것을 위주로 하고 있으며, 腎精虧虛, 心腎不交, 心脾兩虛, 痰濁擾心, 瘀血攻心 등으로 구분하여 치료하고 있다²³⁾.

본 연구에서 사용한 定志丸은 孫思邈의 『備急千金要方』⁹⁾에 수록된 처방으로 ‘定志小丸’이라고도 하며, 人蔘, 茯苓, 遠志, 石菖蒲로 구성되어 “心氣不定, 五臟不足, 甚者憂愁悲傷不樂. 忽忽喜忘”을 치료한다고 하였으며, 이후 본 처방을 기본으로 하여 여러 서적에서 茯神, 柏子仁, 酸棗仁, 朱砂, 琥珀 등을 加味한 여러 종류의 定志丸을 제시하여 健忘이나 驚悸 등을 치료하였다.

본 방에 사용된 人蔘은 元氣를 補하고 開心益智, 安精神定魂魄하며, 茯苓은 益脾寧心の 효능이 있으며, 遠志는 心腎으로 들어가 安神益智하고 豁痰利竅하여 心氣를 開通하고, 石菖蒲는 神明을 통하고 心竅를 막은 痰을 제거함으로써 神氣를 通暢케하여²⁴⁾, 전체적으로 定志丸은 心氣不足하고 痰이 心竅를 막아 나타나

는 驚悸不安과 健忘에 효과가 있어 알츠하이머 치매환자의 기억력 장애 개선에도 효과가 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구에서는 定志丸의 인지능, 기억력 향상 및 항진망 효과를 실험적으로 규명하기 위하여, C57BL/6 마우스에 스코폴라민(scopolamine)으로 기억력 손상을 유도하고 定志丸의 기억력 손상 보호효과를 관찰하였다.

본 연구에서 사용한 물질인 스코폴라민(scopolamine)은 무스카린성 아세틸콜린 수용체 길항제로 아세틸콜린 농도를 변화시키지 않고 아세틸콜린의 활성화에 영향을 주며 뇌파검사(electroencephalograph, EEG)상에서 노인성 치매 및 알츠하이머병과 유사한 양상을 나타내므로 기억손상을 모델을 유발하는 물질로 치매 예방 및 치료제 개발에 다양하게 사용되어 지고 있다²⁵⁾. 본 연구에서 Y-미로(Y-maze), 모리스 물-미로(Morris water-maze), 수동회피(passive avoidance), 공포조건화(fear conditioning) 등의 다양한 행동실험을 실시한 결과 스코폴라민으로 유도된 인지 및 기억력 손상은 定志丸을 투여함으로써 현저히 회복되었다.

Y-미로 실험에서 스코폴라민을 복강으로 주입한 경우 기억력이 손상되어 % 변경행동력(% spontaneous alteration)이 감소되었으며, 이는 定志丸을 지속적으로 투여함으로써 정상군과 유사한 수준으로 증가되었다. 물-미로 실험에서 스코폴라민을 투여 받은 그룹은 5일간의 훈련기간 동안 숨겨진 도피대를 찾아가는데 걸리는 평균탈출잠복기(mean escape latency)가 현저히 단축되지 못하였으나, 定志丸을 투여한 그룹에서는 훈련일이 증가할수록 기억력이 급격히 향상되어 빠른 시간에 도피대를 찾아 갈 수 있었다. 수동회피실험에서 스코폴라민으로 기억력 손상을 유발한 실험동물은 전기적 쇼크를 기억하지 못하여 어두운 쪽 방으로 이동하는데 걸린 시간(step-through latency)이 짧았지만, 定志丸을 경구 섭취시킨 실험동물은 이러한 머무름 시간이 정상군과 유사한 수치로 길어졌다. 마지막으로 공포조건화 실험을 수행한 결과 해마-의존적인 기억력을 측정하는 맥락조건화 실험과 편도체-의존적인 기억력을 측정하는 단서조건화 실험에서 스코폴라민으로 인해 감소한 동결반응(freezing response)이 定志丸을 투여함으로써 현저히 증가되었다. 이전 연구에 따르면 定志丸은 중대뇌동맥 폐색으로 인한 국소 뇌허혈 모델에서 Morris water-maze로 공간 기억력을 측정한 결과 허혈로 인한 인지 및 기억력 손상에 대한 보호 효능을 나타내었다²⁶⁾. 한편, 이러한 定志丸의 효과는 아세틸콜린을 합성하는 효소인 콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase, ChAT) 발현 증가를 통하여 매개되었다²⁶⁾. 定志丸은 그밖에도 해마와 시상하부에서 또 다른 신경전달물질인 noradrenaline을 증가시켰으며¹¹⁾, 노화촉진 마우스에서 특히 연수와 뇌교 부분에서 ChAT의 활성을 증가시켜 노화로 인한 학습 및 기억력 손상을 개선하였다¹⁰⁾.

定志丸이 인지 및 기억력 향상 효능을 나타내는 작용기전을 규명하기 위하여 산화적 손상 및 생체내 항산화 방어 기작을 검토하는 일련의 실험을 수행하였다. 최근 활성산소종이 다양한 종류의 퇴행성 뇌질환과 관련되어 있음이 밝혀짐에 따라 활성산소의 생체 내 발생 및 생성억제에 관한 연구가 활발히 수행되고 있

다. 활성산소종은 산소에서 유래한 산소보다 산화력이 더 큰 분자들로, superoxide anion, 과산화수소, hydroxyl radical, singlet oxygen, peroxy radical 등을 포함하며, 미토콘드리아 (mitochondria) 전자전달계, cytochrome P450, NADPH oxidase, xanthine oxidase, cyclooxygenase 등의 다양한 효소들로부터 생성된다²⁷⁾. 특히, 치매의 원인물질인 베타아밀로이드의 경우 응집되어 다양한 활성산소종을 생성하며 반대로 인위적으로 항산화 성분 및 항산화 효소를 증가시키는 경우 베타아밀로이드에 의한 세포독성이 감소되었다²⁸⁾.

본 연구에서 스코폴라민을 장기간 투여한 경우 활성산소종의 생성 증가 및 내인성 항산화 물질 GSH 감소, 지질과산화 등의 산화적 손상이 유발되었으며 이는 定志丸을 투여함으로써 효과적으로 억제되었다. GSH는 세 개의 펩타이드로 구성된 대표적인 내인성 항산화 물질로 세포 성장, 사멸억제, 면역조절, 활성산소 소거, 무독화 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 활성산소종과의 반응으로 생성된 지질의 hydroperoxyl radical은 이웃한 불포화지질의 이중 결합으로부터 수소원자를 빼앗아 hydroperoxide와 alkyl radical로 전환되며, alkyl radical은 산소와 결합하면 새로운 hydroperoxyl radical을 형성하며 이는 연쇄적인 산화반응을 일으킨다. 이때 불포화된 알데히드를 비롯한 여러 가지 지질과산화 물질[malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE), isoprostanes 등]들이 만들어지게 된다³⁰⁾.

한편, 생체내에는 이러한 산화적 손상에 대응하는 다양한 항산화 방어체계가 존재하며, 이는 효소계 [catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), heme oxygenase-1 (HO-1), γ -glutamylcysteine ligase (GCL) 등], 결합단백질 (albumin, ceruloplasmin, ferritin, transferrin 등), 항산화 물질 [bilirubin, glutathione (GSH), vitamin, uric acid 등]로 구성된다³¹⁾. 定志丸은 특히 생체내 대표적인 항산화 효소인 GCL 및 SOD의 단백질 및 mRNA 발현을 증가시킴으로써 항산화 신경세포 보호 효능을 나타내었다.

최근 항산화 기능 강화를 통한 방어능 증가 뿐 아니라 신경세포를 보호하는 다양한 내인성 인자들에 대한 관심이 높아지고 있다. 그 중 신경세포 성장인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)는 neurotrophin family에 속하는 내인성 단백질로 다양한 신경독성 인자로부터 신경세포를 보호하고, 신경발달, 중추 및 말초 신경세포의 유지에 중요한 역할을 한다³²⁾. 본 연구에서 定志丸은 이러한 BDNF의 단백질 발현을 증가시키는 효능을 나타내었다. 이전 연구에 따르면 비선택적 무스카린 아세틸콜린 수용체 효능제(agonist)인 필로카르핀(pilocarpine)의 경우 콜린 신경계를 강화하며 해마부위에서 BDNF의 mRNA 발현을 증가시켰으며 해마-의존적 기억력 손상을 억제하였다³³⁾.

실제 BDNF 발현이 감소된 형질전환 마우스의 경우 시냅스 전달, 장기 기억력 강화, 학습 및 기억에 손상을 보이며³⁴⁾, 알츠하이머 치매 환자 및 중증 인지능 손상 환자에서 BDNF의 전구체 및 성숙형 단백질의 발현이 낮게 관찰되어 기억력 손상 정도와 BDNF의 발현 정도가 음의 상관관계를 보였다³⁵⁾. 특히, BDNF

의 single nucleotide polymorphism에서 valine이 methionine으로 치환된 경우, BDNFMet은 기억력 손상을 일으키며 치매, 정신과질환, 파킨슨병, 우울증, 양극성 질환의 발생 가능성을 높였다³⁶⁾. 그 밖에도 BDNF는 TrkB receptor를 통하여 신호를 전달하며, 이러한 신호전달에 손상이 오는 경우 아밀로이드 형성 경로 (amyloidogenic pathway)가 활성화 되어 베타아밀로이드의 생성이 더욱 증가되었고, 반면 신경전달물질 아세틸콜린의 생성이 감소되었다^{37,38)}.

이러한 BDNF의 발현을 조절하는 전사인자로 지금까지 c-AMP- response element-binding protein (CREB)가 가장 유력하게 제시되고 있다. CREB는 퇴행성 뇌질환과 관련되어 신경세포의 생존 및 보호, 시냅스 가소성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, BDNF 이외에도 Bcl-2를 비롯한 항아포토시스 (anti-apoptotic) 단백질과 항산화 효소들의 발현 조절에 관여하는 것으로 보고되었다³⁹⁾. 일반적으로 CREB는 Ser133 위치에 인산화 되어 핵내로 이동하여 활성화 되며, 이러한 인산화에는 protein kinase A (PKA), protein kinase B (PKB)/Akt, protein kinase C (PKC), calcium-calmodulin kinase IV (CAMKIV), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) 등이 상위 효소들이 작용 가능하다⁴⁰⁾. 대표적인 항치매 약제로 알려져 많은 연구가 이루어진 원지로부터 분리한 polygalasaponin XXXII 성분 및 중국석송으로부터 분리한 huperzine 성분 또한 ERK1/2 및 CREB를 활성화 시키고, BDNF의 발현을 증가시켜 스코폴라민으로 유도한 해마-의존적 기억력 손상에 대하여 보호효능을 보였다⁴¹⁾. 본 연구에서 定志丸은 특히 ERK1/2와 PKB/Akt 활성화를 통하여 CREB를 인산화 시킴으로써 BDNF의 발현을 증가시키는 효능을 나타내었다.

결론

定志丸의 인지능, 기억력 향상 및 항건망 효과를 실험적으로 규명하기 위하여, 스코폴라민(scopolamine)으로 기억력 손상을 유도하고 定志丸의 효능을 다각적으로 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

스코폴라민(1 mg/kg) 복강투여에 의해 유도되는 인지 및 기억력 손상은 定志丸(100 mg/kg 및 200 mg/kg) 경구투여에 의해 효과적으로 회복되었으며 이는 기억력을 측정하는 다양한 행동 실험(Y-미로, 모리스 물-미로, 수동회피, 공포조건화 실험)으로 확인하였다.

定志丸은 γ -glutamylcysteine ligase (GCL)와 superoxide dismutase(SOD) 등의 항산화 효소 발현 증가를 통하여 세포내 활성산소의 생성, 내인성 항산화물질 글루타치온(glutathione)의 감소, 지질과산화로 인한 산화적 손상을 억제하였다.

定志丸은 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) 와 protein kinase B/Akt (PKB)의 인산화에 의한 cAMP response element-binding protein (CREB)의 활성화를 통하여 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)의 단백질 발현을 증가시켰다.

이상의 결과는 定志丸이 항산화 기능을 가짐으로 산화적 손상을 억제하고 신경영양인자의 활성화를 유도하여 신경세포 보호함으로써 건망증을 포함한 기억력 손상 관련 질환의 예방 및 치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

참고문헌

- 김지혁, 황의완. 동의정신의학. 서울, 현대의학서적사, pp 256-271, 327-333, 1992.
- 이근후. 최신임상정신의학. 서울, 하나의학사, pp 138, 216-228, 1988.
- 서울대학교병원. 치매 노인 유병률 조사. 보건복지가족부. 2008.
- Frank, B., Gupta, S. A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Ann. Clin. Psychiatry.* 17: 269-286, 2005.
- Hermona, S., Shlomo, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature* 2: 294-302, 2001.
- 張介賓. 景岳全書. 서울, 한미의학, p 1549, 2006.
- 錢鏡湖. 辨證奇問全書. 台北, 甘地出版社, pp 222-225, 1990.
- 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울, 東洋醫學研究院, p 218, 1981.
- 孫思邈. 備急千金要方. 서울, 大星文化社, p 265, 1984.
- 하재원. 定志丸이老化에 미치는 영향 : 학습, 기억능력, 항산화력, 혈액 생화학치. 대전대학교 석사학위논문, 1996.
- 최용준, 성강경, 문병순. 定志丸이 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 實驗的 研究. 대한한의학회지 19(1):392-409, 1998.
- 신학수, 이선우, 이민구, 윤종민, 이 인, 신선호, 문병순. 定志丸과 시스플라틴의 신경교아세포종에 대한 세포고사 기전연구. 대한한의학회지 26(2):1-12, 2005.
- 민성길 외 편저. 최신정신의학. 서울, 일조각, p 203, 2006.
- 대한정신의학회. 신경정신의학. 서울, 중앙문화사, pp 507-509, 2007.
- Talesa, V.N. Acetylcholine esterase in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 122(16):1961-1969, 2001.
- Kasa, P., Rakonczay, Z., Gulya, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 52(6):511-535, 1997.
- 杜英杰. 中醫內科學. 四川:四川科學技術出版社, pp 141-142, 1985.
- 東洋學研究所. 東醫內科學. 서울:麗江出版社, pp 179-181, 1994.
- 柳熙英. 東醫精神科學. 서울, 남산당, p 57, 1988.
- 허 준. 동의보감. 서울, 남산당, p 98, 1976.
- 李 梴. 醫學入門. 서울, 大星文化社, p 514, 1980.
- 林佩琴. 類證治裁. 臺北, 旋風出版社, pp 255-257, 1978.
- 中國中醫研究院. 中醫症狀鑑別診斷學. 北京, 人民衛生出版社, pp 106-107, 2000.
- 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림사, 2004.
- Zulli, R., Nicosia, F., Borroni, B., Agosti, C., Prometti, P., Donati, P., De Vecchi, M., Turini, D., Romanelli, G., Grassi, V., Padovani, A. Increased prevalence of silent myocardial ischaemia and severe ventricular arrhythmias in untreated patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment without overt coronary artery disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 110: 791-796, 2008.
- 김희영, 손현수, 강지홍, 최우정, 이진석, 양재훈, 설재균, 이연정. 국소 전뇌 허혈 모델 백서에서 가감정지환과 오수유가 기억증진과 신경세포보호에 미치는 효과. 동의생리병리학회지. 22: 1488-1494, 2008.
- Diaz Vivancos, P., Wolff, T., Markovic, J., Pallardó, F.V., Foyer, C.H. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem. J.* 431: 169-178, 2010.
- Hsieh, H.M., Wu, W.M., Hu, M.L. Genistein attenuates D-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF- κ B binding activity in neuronal PC12 cells. *Life Sci.* 2010, in press.
- Gundacker, C., Gencik, M., Hengstschlager, M. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. *Mutat. Res.* 705: 130-140, 2010.
- Shimizu, S., Saito, M., Dimitriadis, F., Kinoshita, Y., Shomori, K., Satoh, I., Satoh, K. Protective effect of ischaemic post-conditioning on ipsilateral and contralateral testes after unilateral testicular ischaemia-reperfusion injury. *Int. J. Androl.* 2010, in press.
- Jaiswal, A.K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 1199-1207, 2004.
- Shin, M.K., Kim, H.G., Kim, K.L. A novel trimeric peptide, Neuropep-1 stimulating brain-derived neurotrophic factor expression in rat brain improves spatial learning and memory as measured by the Y-maze and Morris water maze. *J. Neurochem.* 2010, in press.
- French, S.J., Humby, T., Horner, C.H., Sofroniew, M.V., Rattray, M. Hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA levels are altered by local administration of nicotine, carbachol and pilocarpine. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 67: 124-136, 1999.
- Blurton-Jones, M., Kitazawa, M., Martinez-Coria, H., Castello, N.A., Müller, F.J., Loring, J.F., Yamasaki, T.R., Poon, W.W., Green, K.N., LaFerla, F.M. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:

- 13594-13599, 2009.
35. Barnes, P., Kirtley, A., Thomas, K.L. Quantitatively and qualitatively different cellular processes are engaged in CA1 during the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. *Hippocampus* 2010, in press.
36. Beste, C., Schneider, D., Epplen, J.T., Arning, L. The functional BDNF Val66Met polymorphism affects functions of pre-attentive visual sensory memory processes. *Neuropharmacology* 2010, in press.
37. Liu, R., Gao, M., Qiang, G.F., Zhang, T.T., Lan, X., Ying, J., Du, G.H. The anti-amnestic effects of luteolin against amyloid β 25-35 peptide-induced toxicity involve the protection of neurovascular unit. *Neuroscience* 162: 1232-1243, 2009.
38. Kwon, J., Wang, Y.L., Setsuie, R., Sekiguchi, S., Sato, Y., Sakurai, M., Noda, M., Aoki, S., Yoshikawa, Y., Wada, K. Two closely related ubiquitin C-terminal hydrolase isozymes function as reciprocal modulators of germ cell apoptosis in cryptorchid testis. *Am. J. Pathol.* 165: 1367-1374, 2004.
39. Chun, H., Hao, W., Honghai, Z., Ning, L., Yasong, W., Chen, D. CCL3L1 prevents gp120-induced neuron death via the CREB cell signaling pathway. *Brain Res.* 1257: 75-88, 2009.
40. Sands, W.A., Palmer, T.M. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal.* 20(3):460-466, 2008.
41. Xue, W., Hu, J.F., Yuan, Y.H., Sun, J.D., Li, B.Y., Zhang, D.M., Li, C.J., Chen, N.H. Polygalasaponin XXXII from *Polygala tenuifolia* root improves hippocampal-dependent learning and memory. *Acta Pharmacol. Sin.* 30: 1211-1129, 2009.