



Original Article / 원저

淸腦明神丸이 뇌혈류저하 흰쥐의 학습 및 기억 장애 개선에 미치는 영향

장숙희, 황원덕*

동의대학교 한의과대학 내과학교실

Ameliorating Effects of Cheongnoemyeongsin-hwan on Learning and Memory Impairment Induced by Cerebral Hypoperfusion in Rats

Suk Hee Chang, Won Deuk Hwang*

Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine,
Dong-Eui University

ABSTRACT

Objectives : Cheongnoemyeongsin-hwan (CNMSH) is a herb medicine to treat cognitive impairment. This study was investigated the effects of CNMSH on learning and memory impairment induced by cerebral hypoperfusion. Cerebral hypoperfusion was produced chronically by permanent bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) in rats.

Methods : CNMSH was administered orally once a day (250 mg/kg) for 28 days starting at 4th week after the BCCAO. The acquisition of learning and the retention of memory were tested on 9th week after the BCCAO using the Morris water maze. In addition, effect of CNMSH on neuronal apoptosis and β -amyloid accumulation in the hippocampus was evaluated with immunohistochemistry and Western blotting.

Results : 1. CNMSH and ChAL significantly shortened the escape latencies on the 2nd day of acquisition training trials.

2. ChAL significantly prolonged the swimming time spent in the target and peri-target zones and CNMSH also significantly prolonged the swimming time spent in the peri-target zone.

3. CNMSH and ChAL significantly increased the number of target heading in the retention test.
4. ChAL significantly shortened the time of the 1st target heading in the retention test, but CNMSH insignificantly shortened the time of that.
5. CNMSH and ChAL significantly increased the memory score in the retention test.
6. CNMSH and ChAL significantly attenuated the reduction of CA1 neurons, but insignificantly attenuated the reduction of CA1 thickness.
7. CNMSH and ChAL significantly attenuated the up-regulation of Bax expression in the CA1 of hippocampus.
8. CNMSH and ChAL significantly attenuated the up-regulation of caspase-3 expression in the CA1 of hippocampus.
9. CNMSH and ChAL significantly attenuated the β -amyloid accumulation in the CA1 of hippocampus.
10. CNMSH and ChAL significantly attenuated the up-regulation of APP expression in the CA1 of hippocampus.
11. CNMSH and ChAL significantly attenuated the up-regulation of BACE-1 expression in the CA1 of hippocampus.

Conclusions : The results show that CNMSH attenuates neuronal apoptosis and β -amyloid accumulation in the hippocampus and alleviates the impairment of learning and memory produced by chronic cerebral hypoperfusion. These results suggest that CNMSH may be a beneficial medicinal herb to treat cognitive impairment associated with neurodegenerative diseases.

Key Words : Cheongnoemyeongsin-hwan (CNMSH), bilateral common carotid artery occlusion, neurodegenerative diseases, hippocampus.

I. 서론

치매 (dementia)는 노화 상태에서 나타나며, 또한 다양한 원인으로 인해 인지기능과 관련된 뇌 부위가 손상되어 기억력과 시공간 파악능력 등이 지속적이고 전반적으로 저하된 임상 증후군을 말한다¹⁾. 그러므로 치매는 단일 질환이 아니라 여러 가지 뇌질환에서 복합적으로 나타난다. 치매의 원인 질환 중에서 가장 큰 비율을 차지하는 것은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD)과 혈관성 치매 (Vascular dementia, VaD)이며, 그 밖의 루이체 치매, 전측두엽 퇴행, 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌질환들과 두부 외상, 뇌종양, 대사성 질환, 결핍성 질환, 중독성 질환 그리고 감염성 질환 등의 다양한 원인 질환에 의해서도 치매가 발생할 수 있다²⁾. 알츠하이머병과 혈관성 치매 모두에서 인지장애가 유발되는 병리적 기전에는 비정상적인 뇌혈류 저하를 포함한 혈관인자가 작용하며³⁾, 만성적인 뇌혈류 저하는 신경세포 손상과 인지기능 장애를 유발

하는 요인이 된다⁴⁾. 또한 알츠하이머병에서 세포자연사 (apoptosis)와 β -amyloid의 침착에 의한 신경세포 손상이 주요 원인이라는 것은 잘 알려진 사실이다⁵⁾.

청뇌명신환(淸腦明神丸)은 기억력증진과 치매예방을 목적으로 개발된 환약으로서, 元代 危亦林이 황제계 진상한 拱辰丹을 근간으로 하고 있다. 危亦林的 醫書인 世醫得效方에 최초로 언급된 拱辰丹에 대해 東醫寶鑑 雜病篇 虛勞에서는 타고난 원기를 든든히 하여 五臟自和, 百病不生하게 하는 데에 拱辰丹을 쓴다고 하였다⁶⁾. 본 환은 拱辰丹의 麝香, 鹿茸, 當歸 등을 주재로 하였으며, 拱辰丹의 山茱萸를 山藥으로 바꾸었고, 본방에 龍眼肉, 遠志, 人蔘, 肉桂, 附子, 沈香, 龍腦를 추가하여 구성하였다. 본 연구에 사용된 청뇌명신환은 陰陽俱虛證의 聖藥인 拱辰丹의 효능에 추가로 현대인의 정신적인 과로로 인한 허로와 이로 인한 기억력감퇴와 치매예방을 목적으로 저자가 임상에서 사용중인 처방이다. 그러나 청뇌명신환의 탁월한 효능에 비하여 그에 대한 실험적인 근거는 전무한 실정이다.

그러므로 청뇌명신환이 만성적인 뇌혈류저하 상태에

*Corresponding author : Won Deuk Hwang, Department of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-850-8625, Fax : +82-51-853-4036, E-mail : wdhwang@deu.ac.kr

• Recieved : February 6, 2017 / Revised : February 21, 2017 / Accepted : February 25, 2017

서의 학습 및 기억 장애에 미치는 영향을 관찰하기 위해 흰쥐에서 양측 총경동맥을 영구 폐쇄하는 방법으로 만성적인 뇌혈류저하를 유발하고⁷⁾, 4주 후부터 청뇌명신환을 4주간 경구투여한 다음 Morris water maze를 사용하여 학습 및 기억 행동에 미치는 영향을 측정하였다. 또한 해마에서 신경세포 손상과 Bax 및 caspase-3 발현을 면역조직화학염색으로 관찰하였으며, β -amyloid 침착과 관련하여 Congo red 염색과 APP 및 BACE1 발현을 관찰한바 유의한 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

II. 실험방법

1. 실험동물

실험동물은 나라바이오텍 (Nara Biotechnology, Seoul, Korea)에서 구입한 280-300 g의 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였으며, 온도 (21-23 °C)와 습도 (40-60%) 및 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료가 자유롭게 공급되도록 사육되었고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물의 조제 및 투여

본 실험에 사용한 처방은 청뇌명신환으로 그 구성 약물은 아래의 Table 1과 같으며, 본 실험에 사용된 청뇌명신환(淸腦明神丸, Cheongnoemyeongsin-hwan, CNMSH)은 人蔘(Ginseng Radix Alba), 當歸(Angelicae Gigantis Radix) 山藥(Dioscoreae Rhizoma)과 龍眼肉(Longan Arillus)을 각 24 g, 肉桂(Cinnamomi Cortex) 12 g, 遠志(Polygalae Radix) 6 g, 麝香(Moschus)과 沈香(Aquilariae Lignum) 각 1 g, 龍腦(Borneolum, 중국) 0.2 g, 이상을 세말한 후, 여기에 鹿茸(cornus cervi parvum) 24 g과 附子(Aconiti Lateralis Radix Preparata) 6 g을 5시간 정도 끓인 膠 24g을 추가한 후, 꿀 160 g으로 구성된 총 300.2g의 환약을 4g 씩으로 75개를 만든 후, 무작위 1환을 선정하여 금박으로 조제하였다. 본 실험에는 청뇌명신환 250 mg/kg 씩을 1일 1회 4주 동안 (총 28일간) 경구투여 하였으며, 대조약물로는 choline alphoscerate 20 mg/kg과 donepezil hydrochloride 0.08 mg/kg을 1일 1회 4주 동안 동일하게 경구투여 하였다.

Table 1. Herbal Constitution of cheongnoemyeongsin-hwan(CNMSH)

Korean/Chinese name	Pharmaceutical name	Dose(g)
Insam/人蔘	Ginseng Radix Alba	0.32
Danggwi/當歸	Angelicae Gigantis Radix	0.32
Sanyak/山藥	Dioscoreae Rhizoma	0.32
Yongannyuk/龍眼肉	Longan Arillus	0.32
Yukgye/肉桂	Cinnamomi Cortex	0.16
Wonji/遠志	Polygalae Radix	0.08
Sahyang/麝香	Moschus	0.002
Chimhyang/沈香	Aquilariae Lignum	0.002
Yongnoe/龍腦	Borneolum	0.0004
Nogyong/鹿茸	Cornus Cervi Parvum	0.32
Buja/附子	Aconiti Lateralis Radix Preparata	0.08
Bongmil/蜂蜜	Honey	2.133
Total Amounts		4

3. 실험군의 구분

실험동물을 무작위로 5개 군으로 구분하였다. 대조군 (Control)에는 양측 총경동맥의 영구폐쇄 (permanent bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO)를 실시하였고, Sham군 (Sham)은 대조군과 같이 BCCAO를 실시하기 위한 준비수술은 하였으나 BCCAO는 실시하지 않았다. 청뇌명신환 투여군 (Sample)과 대조약물군 (ChAL)은 대조군과 같이 BCCAO를 실시하고 4주 후부터 4주 동안 (BCCAO 실시 후 5-8주, 총 28일간) 1일 1회 씩 경구투여하였다. 정상군에는 아무 처치를 하지 않았으며 실험 지표들의 기준으로만 삼고 실험결과를 제시하지는 않았다. 실험동물은 각 군 당 12마리씩, 총 60마리를 사용하였다.

4. 양측 총경동맥의 영구폐쇄

만성적인 뇌혈류저하 상태를 유발하기 위해 BCCAO를 실시하였다. 실험동물을 10 mg/kg의 tiletamine과 zolazepam (50:50; Zoletil, Virbac Laboratoris, Carros, France) 복강주사로 마취하였으며, 수술 동안 Electronic Temperature Controller (CMA150, CMA, Sweden)를 사용하여 정상체온 (37±0.5 °C)을 유지하였고, 추가적인 마취가 필요할 시 1.0% isoflurane (with 70% N₂O + 30% O₂ gas)의 흡입마취를 실시하였다. 전정부 피부를 절개하고 주위 혈관 및 신경들의 손상없이 총경동맥을 분리하여 5-0 굵기의 실크 재질의 수술실로 고리를 만든 다음 자연적으로 풀리지 않도록 2차례 이상 완전하게 결찰하였다. 이후 전정부

근육과 피부를 봉합하고 마취에서 깨어나게 하였으며, 마취에서 깨어난 후 신경학적 이상 행동을 보이는 실험동물은 실험에서 제외하였다.

5. Morris 수중미로에 의한 학습 훈련

Morris 수중미로 실험은 Smith 등의 방법⁸⁾을 변형하여 BCCAO 실시 후 9주째에 4일간 실시하였으며, 첫 3일간은 학습 훈련을, 4일째에는 공간기억력을 측정하였다. Morris 수중미로 실험장치는 원형 수조와 도피대 및 computerized video-tracking system (Panlab, Cornella, Spain)으로 구성되었다. 수조는 직경 190 cm, 높이 40 cm인 원통형 플라스틱으로 만들어졌으며, 도피대는 직경 15 cm, 높이 27 cm의 원통형으로 백색 아크릴로 만들었다. Video tracker는 수조 위 2.4 m에 설치된 CCD카메라와 컴퓨터로 구성되었으며, 실험동물의 행동 추적 및 분석은 SMART™ software (ver. 2.5; Panlab, Cornella, Spain)를 사용하였다. 수조에는 온도가 23±1 °C 되는 물을 도피대가 1.0 cm 깊이로 잠기도록 28.0 cm 높이로 채웠으며, 1 kg의 탈지분유를 물에 풀어 도피대가 보이지 않도록 하였다. 수조의 주위에 각종 모형의 공간단서 (visual cue)들을 설치하였으며, 실험기간 동안 실험대, 컴퓨터, 의자 등 실험실 내 환경 및 실험자의 위치 또한 일정하게 유지하였다. 수중미로는 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)의 사분면으로 나누어 구분하였으며, 이 중 남서(SW) 사분면의 중앙부에 도피대를 설치하였다 (Fig. 1).

수중미로 학습훈련은 실험동물 당 1일 8회 3일간 동일한 시간대에 실시하였으며, 매 수영 때마다 수조의 정중앙에서부터 실험동물의 머리를 북(N)-동(E)-남(S)-서(W)-북(N)-동(E)-남(S)-서(W) 방향으로 향하게 한 상태로 수영을 시작하게 하였다. 실험동물이 수조 속에서 자유롭게 수영하면서 스스로 숨겨진 도피대를 찾아 올라가도록 하였으며, 스스로 도피대를 찾아낸 실험동물은 10초간 도피대 위에서 머물면서 자유롭게 주위를 관찰하도록 하였고 도피대에 도달한 시간을 기록하였다. 60초 이내에 도피대를 스스로 찾아내지 못한 실험동물은 실험자가 조심스럽게 도피대 쪽으로 유도한 다음 10초간 도피대 위에서 머물면서 자유롭게 주위를 관찰하도록 하였으며, 도피대에 도달한 시간은 60초로 기록하였다.

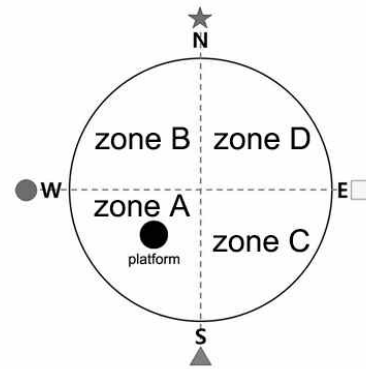


Fig. 1. Schematic diagram of platform position in the swimming pool and computerized grid design used in the retention test. Discrete zones are labeled with letters, the platform site representing the target.

6. Morris 수중미로에 의한 공간기억력 측정

Morris 수중미로 실험 4일째에 공간기억력 유지 검사를 실시하였다. 각 군의 실험동물들을 도피대가 제거된 동일한 수조에서 1회 60초간 자유롭게 수영하면서 도피대를 찾도록 하였으며, 그 수영 경로를 video tracker를 통해 궤적을 추적하여 컴퓨터 분석시스템에 저장하였다. 컴퓨터 분석시스템 상에서 수조의 공간을 각각 사분면으로 나누었으며 (Fig. 1), 60초 동안 각 구역에서의 수영시간 (time spent in zones), 도피대 위치에 찾아간 횟수 (number of target heading), 처음으로 도피대 위치에 도달한 시간 (time for 1st target heading)을 분석하였다. 또한 각각의 구역에 점수를 할당하고, 각 구역을 수영한 시간에 각 구역의 점수를 곱한 값의 합산 [(time in target × 10) + (time in zone A × 8) + (time in zone B × 4) + (time in zone C × 4) + (time in zone D × 1) = memory score]으로 기억유지점수 (memory score)를 계산하였다. 공간기억력 측정을 위한 구역의 도안과 기억유지점수의 설정은 Smith 등의 연구방법을 변형하여 사용하였으며 [Ref-1], 분석과 계산에는 SMART™ software가 사용되었다.

7. 뇌조직의 처리

Morris 수중미로 실험이 끝난 후 각 군의 실험동물을 6마리 씩 무작위로 선택하여 6마리는 조직염색용으로, 6마리는 western blotting용으로 사용하였다. 조직염색을 위한 실험동물은 Zoletil로 깊게 마취한 다

을 개홍하고, 심장을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출하여 24시간 동안 post-fixation하고, sucrose 용액에 담가 침전시킨 다음 뇌조직을 -40°C 의 dry ice-isopentane 용액으로 동결시켰다. 동결조직은 cryocut으로 30 μm 두께의 횡단절편으로 제작하여 조직염색에 사용하였다.

8. 뇌조직의 염색

1) Cresyl violet 염색

뇌조직 신경세포들의 조직학적 소견을 관찰하기 위해, 0.5% cresyl violet 용액으로 염색한 다음 수세하고 탈수, 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

2) Bax와 caspase-3의 면역조직화학염색

뇌조직 절편을 0.05 M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H_2O_2 에서 10분간 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 PBS로 3회 씻어 낸 후, rabbit anti-Bax antibody (1:200, ab7977, Abcam, UK)와 rabbit anti-caspase-3 antibody (1:300, BS1518, BioWorld, USA)를 1차항체로 사용하여 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C 에서 반응시켰다. 이후 2차항체에 반응시키고, avidin-biotin complex (Vector Laboratories, USA) 방법에 따라 0.05 % DAB (Sigma-Aldrich, USA)로 발색한 다음 통상적인 면역조직화학염색법에 따라 조직표본을 제작하였다.

3) Congo red 염색

$\text{A}\beta$ 침착을 관찰하기 위해, 조직표본을 PBS에 2회 씻은 후 젤라틴 코팅된 슬라이드에 붙여 24시간 동안 실온에서 말린 다음 Congo red solution (0.5% in 50% ethanol)에서 20분간 염색하고 흐르는 물에서 수세하였다. 발색 조절을 위해 alkaline alcohol solution (1% in 50% ethanol)을 사용하였으며, 이후 수세하고 탈수, 봉입하여 조직표본을 제작하였다.

9. 해마 신경세포의 관찰

각각 염색된 뇌조직을 CCD카메라 (DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)

을 사용하여 영상을 저장하고, ImageJ software (Ver. 1.44p, NIH, USA)를 사용하여 해마의 CA1 부위에서 신경세포의 수 및 면역염색 발현의 강도 등을 측정하였다. 각 실험동물 당 4장의 조직표본, 각 조직표본 당 4개의 시야에서 측정하여 그 평균값을 각 실험동물의 측정치로 사용하였다.

10. Western blotting

Western blotting용 실험동물은 즉시 뇌를 적출하고 해마 조직을 분리하여 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail; Sigma, USA)에 넣어 균질화하고 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 단백질 총량은 Bradford 방법을 사용하여 정량하였으며, 50 μg 의 단백질을 포함한 표본을 SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 세분하고, Western blotting을 시행하였다. 1차항체는 mouse anti-APP antibody (MAB34, Millipore, USA)와 rabbit anti-BACE1 antibody (ab2077, Abcam, UK) 및 mouse anti- β -actin antibody (MAB1501, Millipore, USA)를 사용하였다.

11. 통계처리

본 논문에 제시된 자료들은 Mean \pm Standard error로 표시되었다. 각 자료의 통계적 유의성 검증은 Student's *t*-test를 사용하여 $p < 0.05$ 이상의 유의수준으로 검정하였으며, 추가로 Morris 수중미로에 의한 학습 훈련 결과는 one-way ANOVA를 사용하여 분석하였다.

III. 결과

1. 도피대 회피시간의 변화

3일간의 수중미로 학습 훈련에서 도피대를 찾아 오르기까지의 회피시간 (escape latency)을 측정한 결과, 1일차 8회의 수영훈련에서 Sham군은 1회 차에 52.3 ± 3.1 초에서 8회 차에 23.6 ± 4.4 초로 회피시간이 단축되었다. Control군은 1회 차에 58.0 ± 1.0 초에서 8회 차에 35.3 ± 4.4 초로 단축되었으며, Sham군에 비해 2회와 3회 차에서는 $p < 0.01$, 4회 차부터 6회 차까지는 $p < 0.05$ 의 유의한 회피시간 연장이 관찰되었다. ChAL군은 1회 차에 57.4 ± 1.1 초에서 8회 차에

25.3±3.6 초로 단축되었으나 모두 Control군에 비해 유의한 회피시간의 단축을 나타내지는 않았다. 1일차 8회 수영 전체에 대한 one-way ANOVA 검증결과는 $F(2,21)=3.5068$, $p=0.0485$ 로 유의한 회피시간의 변화가 관찰되었다. Sample군은 1회 차에 54.9±2.2 초에서 8회 차에 28.3±4.0 초로 단축되었으나 모두 Control군에 비하여 유의한 회피시간의 단축을 나타내지는 않았다. 1일차 8회 수영 전체에 대한 one-way ANOVA 검증결과는 $F(2,21)=3.8970$, $p=0.0364$ 로 유의한 회피시간의 변화가 관찰되었다 (Fig. 2).

2일차 8회의 수영훈련에서 Sham군은 1회 차에 30.9±4.0 초에서 8회 차에 11.9±3.0 초로 회피시간이 단축되었다. Control군은 1회 차에 47.5±4.5 초에서 8회 차에 24.0±3.7 초로 단축되었으며, Sham군에 비해 1회와 2회 차에는 $p<0.05$, 4회, 5회, 6회 차에는 $p<0.01$, 7회 차에는 $p<0.001$, 8회 차에는 $p<0.05$ 의 유의한 회피시간 연장이 관찰되었다. ChAL군은 1회 차에 29.6±4.1 초에서 8회 차에 9.2±1.6 초로 회피시간이 단축되었으며, Control군에 비해 1회에서 $p<0.01$, 2회와 4회 차에서 $p<0.05$, 6회와 7회 차에는 $p<0.001$, 8회 차에서 $p<0.05$ 의 유의한 회피시간의 단축을 나타내었다. 2일차 8회 수영 전체에 대한 one-way ANOVA 검증결과는 $F(2,21)=7.0952$, $p=0.0044$ 로 매우 유의한 회피시간의 변화가 관찰되었다. Sample군은 1회 차에 39.5±3.2

초에서 8회 차에 16.4±1.2 초로 단축되었으며, Control군에 비해 4회와 5회 차에 $p<0.05$, 6회 차에 $p<0.001$, 7회 차에 $p<0.01$ 의 유의한 회피시간의 단축을 나타내었다. 2일차 8회 수영 전체에 대한 one-way ANOVA 검증결과 역시 $F(2,21)=4.6117$, $p=0.0219$ 로 유의한 회피시간의 변화를 나타내었다 (Fig. 2).

3일차 8회의 수영훈련에서 Sham군은 1회 차에 20.6±4.0 초에서 8회 차에 7.8±1.6 초로 회피시간이 단축되었다. Control군은 1회 차에 37.9±4.6 초에서 8회 차에 14.3±1.1 초로 단축되었으며, Sham군에 비해 1회에 $p<0.05$, 2회에 $p<0.01$, 4회, 5회, 6회 차에 $p<0.05$, 8회 차에 $p<0.01$ 의 유의한 회피시간 연장이 관찰되었다. ChAL군은 1회 차에 18.8±2.0 초에서 8회 차에 11.4±1.2 초로 회피시간이 단축되었으며, Control군에 비해 1회에서 $p<0.001$, 2회 차에서 $p<0.05$ 의 유의한 회피시간 단축을 나타내었다. 2일차 8회 수영 전체에 대한 one-way ANOVA 검증결과는 $F(2,21)=5.1755$, $p=0.0149$ 로 유의한 회피시간의 변화가 관찰되었다. Sample군은 1회 차에 25.3±4.7 초에서 8회 차에 12.7±2.1 초로 단축되었으며, Control군에 비해 2회 차에서만 $p<0.05$ 의 유의한 회피시간 단축을 나타내었다. 2일차 8회 수영 전체에 대한 one-way ANOVA 검증결과는 $F(2,21)=4.2711$, $p=0.0278$ 로 유의한 회피시간의 변화를 나타내었다 (Fig. 2).

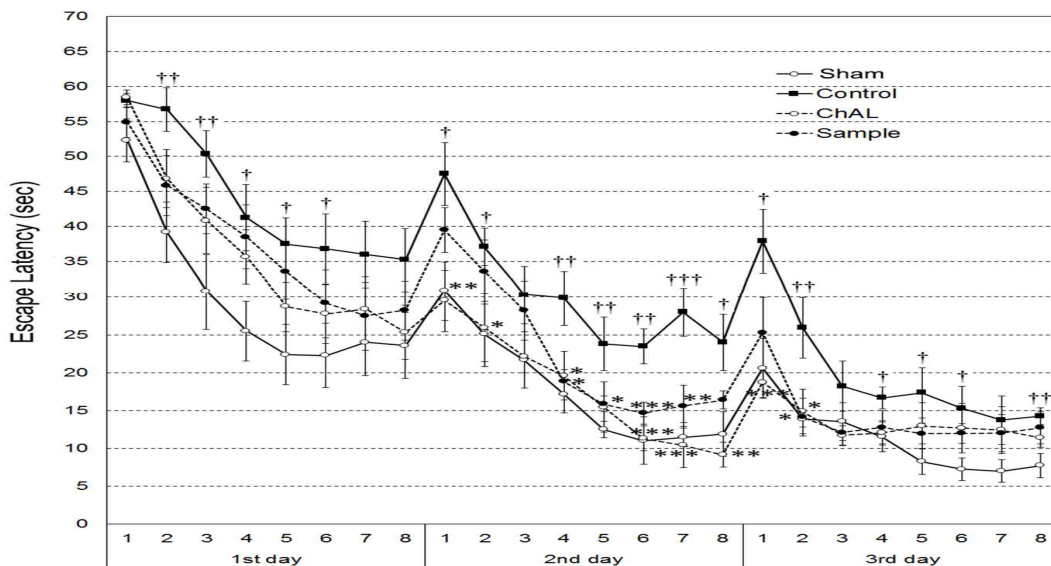


Fig. 2. Effect of CNMSH on escape latency in the acquisition training trials. CNMSH treatment significantly shortened the escape latency on the 2nd day compared to the Control group. Data are represented by mean ± SEM (n=12 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (†, $p<0.05$; ††, $p<0.01$; †††, $p<0.001$), between Control and ChAL or Sample groups (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$).

2. 수중미로 구역별 수영시간의 변화

수중미로 실험 4일째에 도피대를 제거한 상태에서 60초간 자유 수영을 하는 동안 도피대 위치를 중심으로 각 구역별 수영시간을 측정된 결과, Sham군은 target zone에서 2.2 ± 0.4 초, zone A에서 29.8 ± 1.6 초, zone B에서 9.6 ± 1.7 초, zone C에서 11.3 ± 1.4 초 및 zone D에서 7.1 ± 1.1 초를 수영하였다. Control군은 각각 1.1 ± 0.2 초, 18.0 ± 2.5 초, 22.1 ± 2.5 초, 5.5 ± 1.3 초 및 13.3 ± 2.3 초로 Sham군에 비해 target zone ($p < 0.05$)과 zone A ($p < 0.001$) 및 zone C ($p < 0.01$)에서 유의성 있는 수영시간의 감소를 나타

내었고, zone B ($p < 0.001$)와 zone D ($p < 0.05$)에서의 수영시간은 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 3,4). ChAL군은 각각 2.5 ± 0.5 초, 26.3 ± 2.2 초, 13.9 ± 1.8 초, 10.1 ± 1.1 초 및 7.2 ± 1.3 초로 Control군에 비해 target zone과 zone A 및 zone C에서 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 수영시간의 증가를 나타내었고, zone B와 zone D에서는 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 수영시간은 감소가 관찰되었다 (Fig. 3,4). Sample군은 각각 1.8 ± 0.3 초, 25.1 ± 1.5 초, 17.8 ± 1.4 초, 6.9 ± 0.8 초 및 8.4 ± 1.2 초로 Control군에 비해 zone A에서 수영시간이 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 3,4).

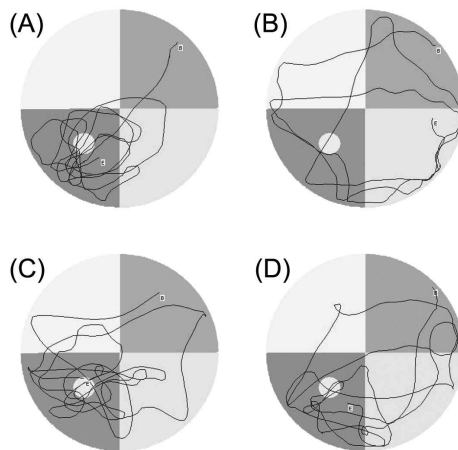


Fig. 3. Representative swimming tracks in the retention test of the Sham (A), Control (B), ChAL (C) and Sample (D) groups. The control group was subjected to permanent bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO). The Sample group was treated with 250 mg/kg of CNMSSH for 28 days (once a day) starting on 4 weeks after the BCCAO.

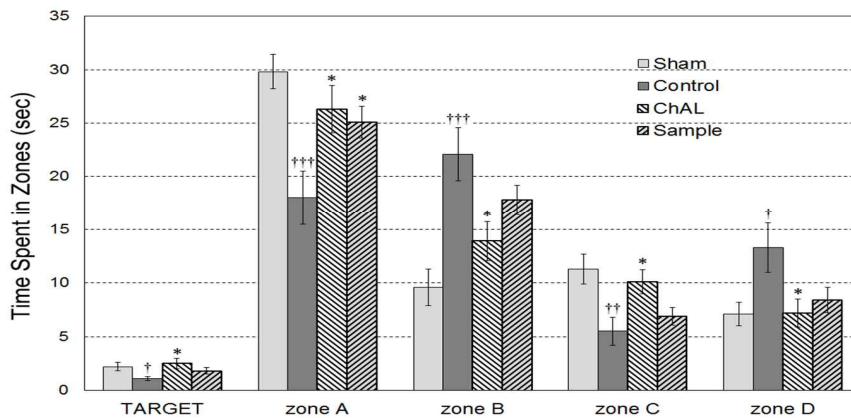


Fig. 4. Effect of CNMSSH on the time spent in discrete zones. CNMSSH treatment significantly prolonged the swimming time spent in zone A compared to the Control group. Data are represented by mean \pm SEM ($n=12$ in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (\dagger , $p < 0.05$; $\dagger\dagger$, $p < 0.01$; $\dagger\dagger\dagger$, $p < 0.001$), between Control and ChAL or Sample groups ($*$, $p < 0.05$).

3. 도피대를 찾아간 횟수의 변화

수중미로 실험 4일째에 도피대를 제거한 상태에서 60초간 자유 수영하는 동안 도피대를 찾아간 횟수는 Sham군은 3.9 ± 0.5 회였고, Control군은 1.9 ± 0.4 회로 Sham군에 비해 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였다.

ChAL군은 3.8 ± 0.5 회로 Control군에 비해 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 증가를 나타내었고, Sample군은 3.4 ± 0.6 회로 Control군에 비해 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 3,5).

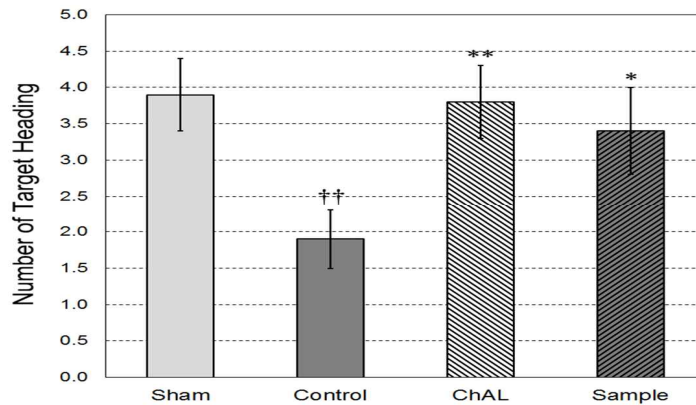


Fig. 5. Effects of CNMSH on the number of target heading. CNMSH treatment significantly increased the number of target heading compared to the Control group. Data are represented by mean \pm SEM (n=12 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (††, $p < 0.01$), between Control and ChAL or Sample groups (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

4. 처음 도피대를 찾아간 시간의 변화

수중미로 실험 4일째에 도피대를 제거한 상태에서 60초간 자유 수영하는 동안 처음으로 도피대를 찾아간 시간은 Sham군은 11.7 ± 1.2 초였고, Control군은 18.8 ± 2.1 초로 Sham군에 비해 유의성 ($p < 0.01$) 있게 증가하였

다. ChAL군은 13.1 ± 1.7 초로 Control군에 비해 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 단축을 나타내었고, Sample군은 16.4 ± 2.4 초로 Control군에 비해 유의성 있는 단축을 나타내지 못하였다 (Fig. 3,6).

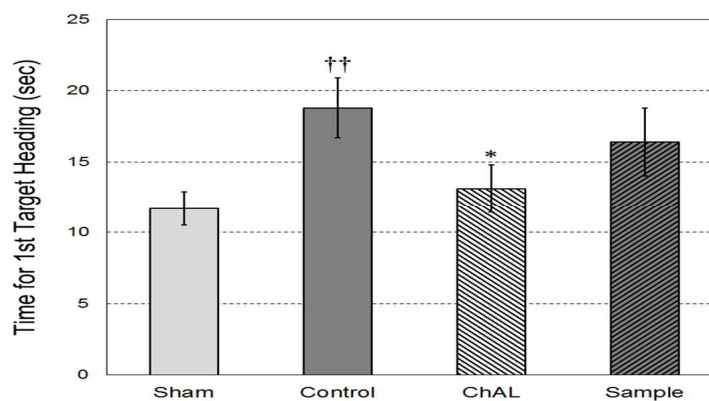


Fig. 6. Effects of CNMSH on the time for the 1st target heading. CNMSH treatment did not show a significant change in the time for the 1st target heading compared to the Control group. Data are represented by mean \pm SEM (n=12 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (††, $p < 0.01$), between Control and ChAL or Sample groups (*, $p < 0.05$).

5. 기억유지 점수의 변화

수중미로 실험 4일째에 도피대를 제거한 상태에서 60초간 자유 수영하는 동안 각 구역에서의 수영시간과 각 구역에 부여된 점수로부터 계산된 기억유지점수는 Sham군은 351.1±10.1 점이었으며, Control군은 278.7±16.5

점으로 Sham군에 비해 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였다. ChAL군은 338.6±12.4 점으로 Control군에 비해 $p < 0.01$ 의 유의성 있는 증가를 나타내었고, Sample군은 326.0±10.4 점으로 Control군에 비해 $p < 0.05$ 의 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 3,7).

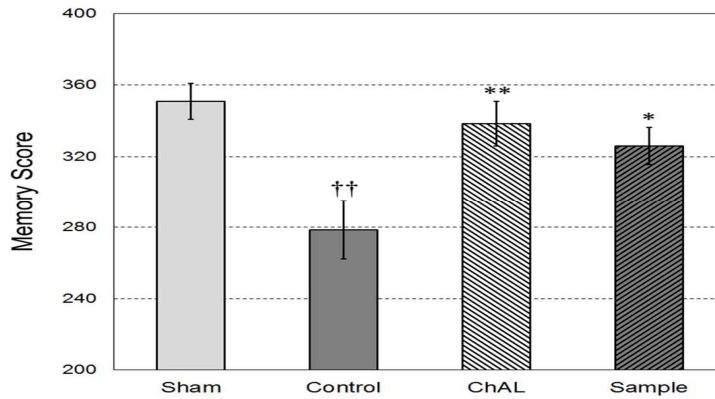


Fig. 7. Effect of CNMSH on the memory score in the retention test. CNMSH treatment significantly increased the memory score compared to the Control group. Data are represented by mean ± SEM (n=12 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (††, $p < 0.01$), between Control and ChAL or Sample groups (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

6. 해마 CA1 신경세포 수 및 두께의 변화

해마 CA1의 500 μm 길이에서 신경세포 수를 측정 한 결과, Sham군은 179.8±3.0 개/500 μm 이었고 Control군은 123.8±5.3 개/500 μm로 Sham군에 비해 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있는 감소를 나타내었다. 이에 비해 ChAL군은 146.9±4.2 개/500 μm로 Control군에 비해 유의성 ($p < 0.01$) 있는 CA1 신경세포 수의 증가가 관찰되었으며, Sample군은 141.9±5.0

개/500 μm로 역시 Control군에 비해 유의성 ($p < 0.05$) 있는 CA1 신경세포 수의 증가가 관찰되었다 (Fig. 8,9). 해마 CA1의 두께를 측정 한 결과, Sham군은 55.8±1.7 μm 이었고 Control군은 38.3±4.4 μm로 Sham군에 비해 유의성 ($p < 0.01$) 있는 감소를 나타내었다. 이에 비해 ChAL군은 43.6±1.6 μm, Sample군은 45.0±4.7 μm로 모두 Control군에 비해 두께가 증가 되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 8,10).

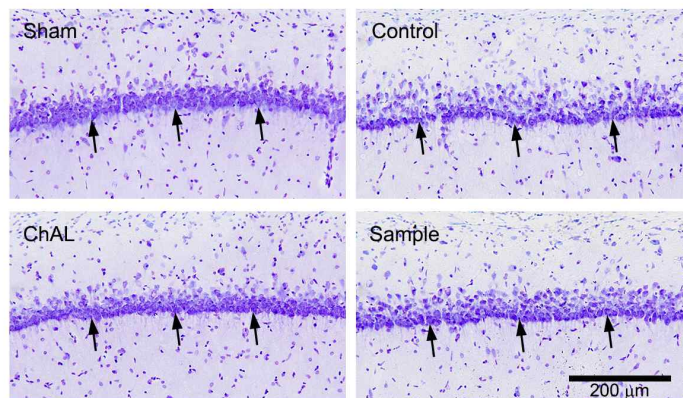


Fig. 8. Representative photographs of the cresyl violet-stained hippocampus of the Sham, Control, ChAL, and Sample groups. The thickness of CA1 and the number of CA1 neurons were reduced by BCCAO, while the reduction of that was attenuated with CNMSH treatment. Scale bar is 200 μm.

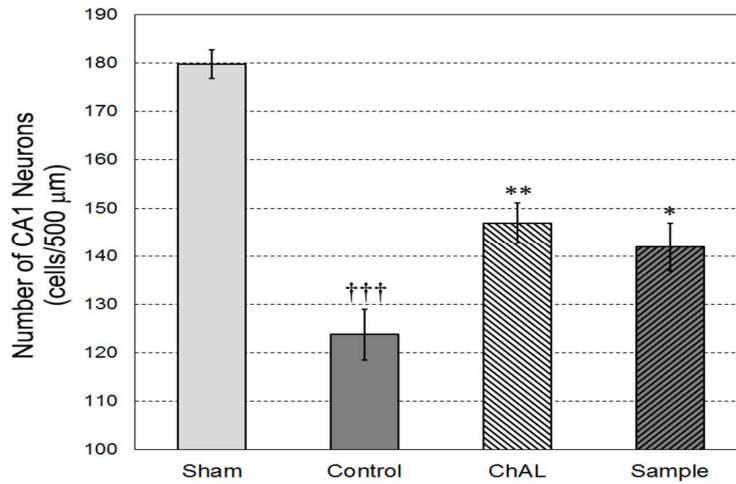


Fig. 9. Effect of CNMSH on the number CA1 neurons in the hippocampus. CNMSH treatment significantly attenuated the reduction of CA1 neurons compared to the Control group. Data are represented by mean \pm SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (†††, p<0.001), between Control and ChAL or Sample groups (*, p<0.05; **, p<0.01).

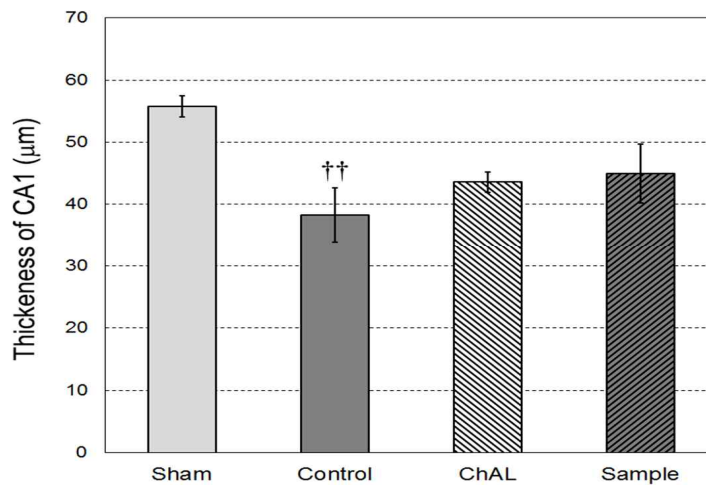


Fig. 10. Effect of CNMSH on the thickness of CA1 in the hippocampus. CNMSH treatment did not attenuate the reduction of thickness of CA1 compared to the Control group. Data are represented by mean \pm SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (††, p<0.01), between Control and ChAL or Sample groups (not significant statistically).

7. 해마에서 Bax 발현의 변화

해마 CA1 구역에서 Bax 발현 강도를 Sham군을 기준으로 하여 증가율을 측정한 결과, Sham군의 100.6 \pm 1.0 %에 비해 Control군은 126.0 \pm 2.9 %로 매우 유의성 (p<0.001) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 ChAL

군은 116.6 \pm 2.7 %로 Control군에 비해 유의성 (p<0.05) 있게 Bax 발현 정도가 감소하였으며, Sample군은 115.6 \pm 3.6 %로 역시 Control군에 비해 유의성 (p<0.05) 있게 Bax 발현 정도가 감소하였다 (Fig. 11,12).

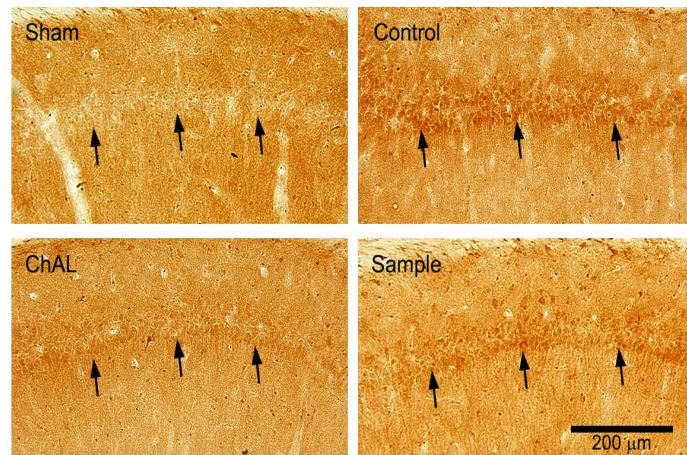


Fig. 11. Representative photographs of the Bax immunostained hippocampus of the Sham, Control, ChAL, and Sample groups. The optical densities of the Bax-expressing cells were increased by BCCAO, while the increase of that was attenuated with CNMSH treatment. Scale bar is 200 μ m.

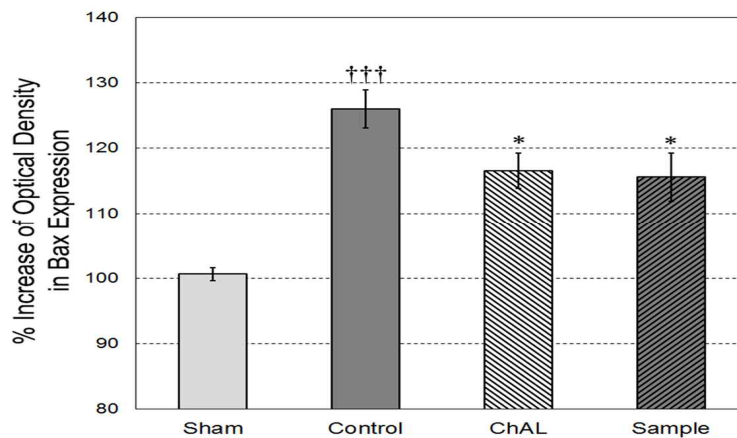


Fig. 12. Effect of CNMSH on the Bax-expressing cells in the hippocampus. CNMSH treatment significantly attenuated the increases in optical density of the Bax-expressing cells in the CA1 of hippocampus compared to the Control group. Data are represented by mean \pm SEM ($n=6$ in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups ($\dagger\dagger\dagger$, $p<0.001$), between Control and ChAL or Sample groups ($*$, $p<0.05$).

8. 해마에서 caspase-3 발현의 변화

해마 CA1 구역에서 caspase-3 발현 강도를 Sham 군을 기준으로 하여 증가율을 측정된 결과, Sham군의 100.1 ± 1.7 %에 비해 Control군은 173.8 ± 5.8 %로 매우 유의성 ($p<0.001$) 있는 증가를 나타내었다. 이에

비해 ChAL군은 134.2 ± 10.2 %로 Control군에 비해 유의성 ($p<0.01$) 있게 caspase-3 발현 정도가 감소하였으며, Sample군은 131.2 ± 9.3 %로 역시 Control군에 비해 유의성 ($p<0.05$) 있게 caspase-3 발현 정도가 감소하였다 (Fig. 13,14).

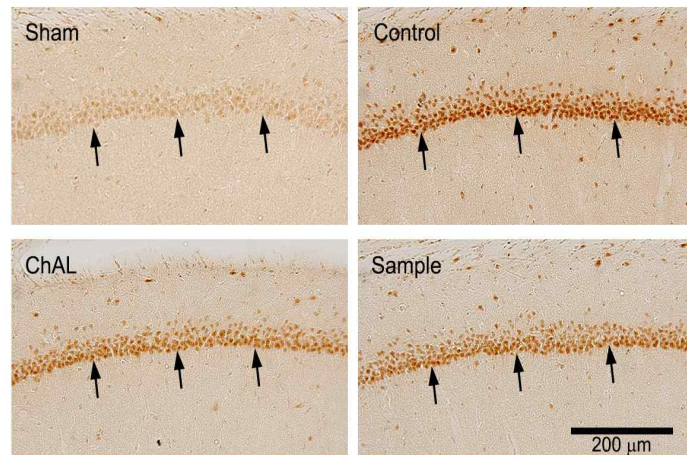


Fig. 13. Representative photographs of the caspase-3 immunostained hippocampus of the Sham, Control, ChAL, and Sample groups. The optical densities of the caspase-3-expressing cells were increased by BCCAO, while the increase of that was attenuated with CNMSH treatment. Scale bar is 200 μ m.

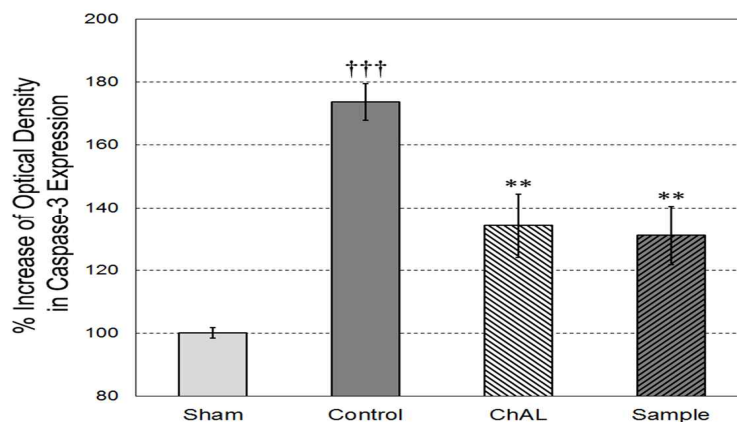


Fig. 14. Effect of CNMSH on the caspase-3-expressing cells in the hippocampus. CNMSH treatment significantly attenuated the increases in optical density of the caspase-3-expressing cells in the CA1 of hippocampus compared to the Control group. Data are represented by mean \pm SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (†††, p<0.001), between Control and ChAL or Sample groups (**, p<0.01).

9. 해마에서 Congo red 염색강도의 변화

해마 CA1 구역에서 β -amyloid 침착을 Congo red 로 염색하고 Sham군을 기준으로 하여 증가율을 측정 한 결과, Sham군의 101.4 \pm 2.4 %에 비해 Control군은 159.6 \pm 4.7 %로 매우 유의성 (p<0.001) 있는 증가

를 나타내었다. 이에 비해 ChAL군은 134.4 \pm 9.3 %로 Control군에 비해 유의성 (p<0.05) 있게 염색강도가 감소하였으며, Sample군은 141.4 \pm 6.2 %로 역시 Control군에 비해 유의성 (p<0.05) 있게 염색강도가 감소하였다 (Fig. 15,16).

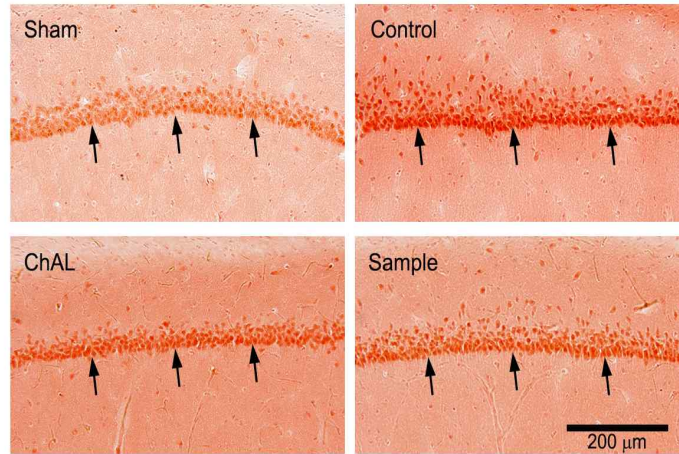


Fig. 15. Representative photographs of the Congo red stained hippocampus of the Sham, Control, ChAL, and Sample groups. The optical densities of the Congo red were increased by BCCAO, while the increase of that was attenuated with CNMSH treatment. Scale bar is 200 μm .

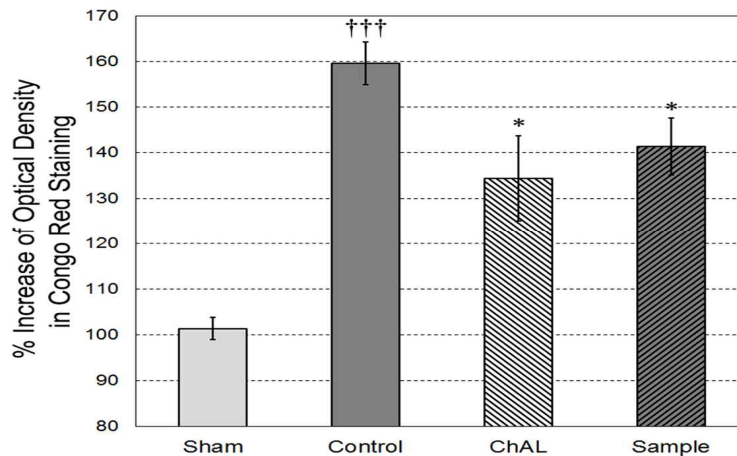


Fig. 16. Effect of CNMSH on the β -amyloid accumulation stained by Congo red in the hippocampus. CNMSH treatment significantly attenuated the increases in optical density of the Congo red in the CA1 of hippocampus compared to the Control group. Data are represented by mean \pm SEM ($n=6$ in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups ($***, p<0.001$), between Control and ChAL or Sample groups ($*, p<0.05$).

10. 해마조직에서 amyloid precursor protein (APP)

발현의 변화

해마조직에서 APP 발현을 western blotting 방법으로 측정된 결과, Sham군의 101.3 ± 1.0 %에 비해 Control군은 131.9 ± 3.4 %로 매우 유의성 ($p<0.001$)

있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 ChAL군은 112.3 ± 3.8 %로 Control군에 비해 유의성 ($p<0.01$) 있는 APP 발현의 감소가 관찰되었고, Sample군은 118.9 ± 4.5 %로 역시 Control군에 비해 유의성 ($p<0.05$) 있는 APP 발현의 감소가 관찰되었다 (Fig. 17).

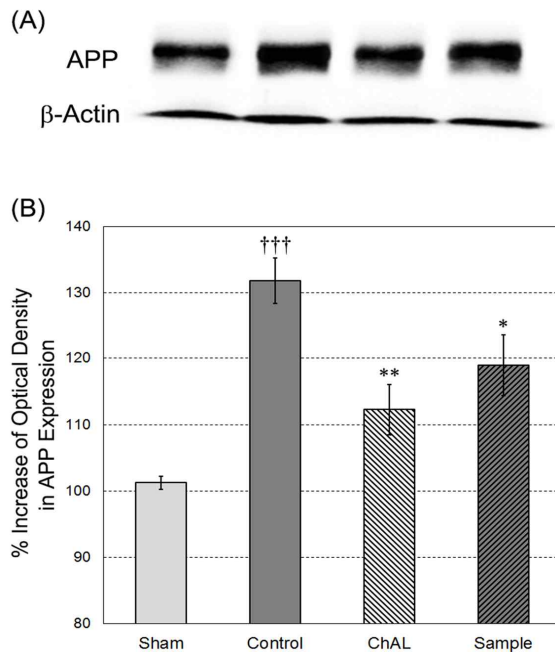


Fig. 17. Effect of CNMSH on the APP expression in the hippocampus. (A) Representative western blots illustrating differences in the bands of APP. (B) CNMSH treatment significantly attenuated the upregulation of APP expression compared to the Control group. Data are represented by mean \pm SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (†††, $p < 0.001$), between Control and ChAL or Sample groups (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

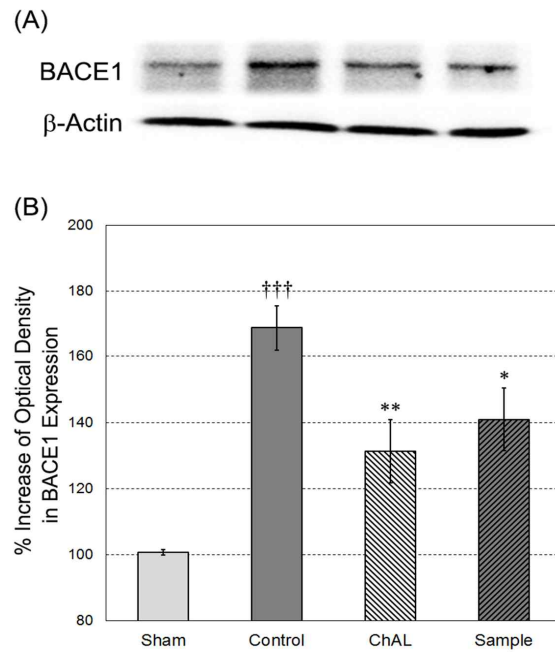


Fig. 18. Effect of CNMSH on the BACE1 expression in the hippocampus. (A) Representative western blots illustrating differences in the bands of BACE1. (B) CNMSH treatment significantly attenuated the upregulation of BACE1 expression compared to the Control group. Data are represented by mean \pm SEM (n=6 in each group). Statistical significances were compared between Sham and Control groups (†††, $p < 0.001$), between Control and ChAL or Sample groups (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

11. 해마조직에서 beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) 발현의 변화

해마조직에서 BACE1 발현을 western blotting 방법으로 측정 한 결과, Sham군의 100.8 ± 0.8 %에 비해 Control군은 168.7 ± 6.8 %로 매우 유의성 ($p < 0.001$) 있는 증가를 나타내었다. 이에 비해 ChAL군은 131.2 ± 9.6 %로 Control군에 비해 유의성 ($p < 0.01$) 있는 BACE1 발현의 감소가 관찰되었고, Sample군은 141.0 ± 9.5 %로 역시 Control군에 비해 유의성 ($p < 0.05$) 있는 BACE1 발현의 감소가 관찰되었다 (Fig. 18).

IV. 고찰

청뇌명신환은 元代 危亦林이 황제에게 진상한 拱辰丹을 근간으로 하였다. 危亦林은 拱辰丹에 대하여 “..., 固天元一氣, 使水昇火降, 則五臟自和, 百病自去, 此方主之.”이라 하였다⁹⁾. 청뇌명신환은 拱辰丹의 麝香, 鹿茸, 當歸 등을 주재로 하였으며, 拱辰丹의 山茱萸를 山藥으로 바꾸었고, 본방에 人蔘, 肉桂, 附子, 龍眼肉, 遠志, 沈香, 龍腦를 추가하여 구성된 처방이다. 이상의 약재들을 살펴보면, 현대인들의 위장운동의 부담을

덜어 주기 위하여 拱辰丹의 山茱萸를 山藥으로 바꾸었고, 人蔘, 肉桂, 附子是 전신 기능 활성화를 목적으로 추가하였으며, 龍眼肉, 遠志, 沈香, 龍腦 등은 뇌의 기능을 활성화하여 현대인의 정신적인 스트레스로 생긴 기억력감퇴 및 치매예방을 목적으로 추가하였다. 山藥의 性은 溫無毒하고 味는 苦甘하여 脾胃經에 歸經하여 補脾益胃, 燥濕和中하는 효능이 있어, 脾胃氣弱, 不思飲食, 倦怠少氣, 泄瀉, 痰飲 등을 치료한다¹⁰⁾. 또한 hyperglycemia, hyperlipidemia와 같은 위장관 기능의 문제로 인한 질병 치료에 효능이 있음이 진¹¹⁾, Nishimura N¹²⁾ 등의 연구에서 밝혀졌다. 그러므로 위장운동의 부담을 덜어주기 위한 목적으로 山茱萸를 山藥으로 대체하여 본 처방에서 사용되었다. 人蔘은 微溫, 甘微苦, 無毒하여 大補元氣, 補裨益氣, 生津, 寧神益智하는 효능이 있으며¹³⁾, 최근에는 허¹⁴⁾, 김¹⁵⁾, 진¹⁶⁾ 등의 연구에 의하여 신경세포 손상 방어효과가 있음이 보고되었다. 肉桂의 性은 熱하고, 味는 辛甘하여 溫中散寒, 溫經通脈하는 효능이 있으며¹⁷⁾, 고¹⁸⁾의 신생혈관 촉진 생성 작용, 김¹⁹⁾의 대식세포의 염증반응에 미치는 영향 등이 보고되고 있다. 附子是 回陽救逆, 溫中止痛, 逐風寒濕邪 등의 효능이 있으며²⁰⁾, 권²¹⁾의 폐암 세포에 대한 독성효과, Zhu Z²²⁾의 脾胃 溫補 기능에 관한 연구 등이 보고되었다. 따라서 人蔘, 肉桂, 附子是 여러 기전을 통해 전신 기능 활성화를 목적으로 사용되었다. 龍眼肉은 性味가 味甘質潤하여 心, 脾 二經을 補益하고 營血을 滋養한다고 알려져 있으며²³⁾, 대식세포의 염증반응과 cytokine에 영향을 미쳐 항염증 효과가 있음이 김²⁴⁾의 연구에서 보고되었다. 遠志의 味는 苦辛, 性은 微溫하여 寧心安神, 祛痰開竅, 消散腫痛의 작용을 하며 神昏, 驚悸, 不眠, 健忘 등을 치료한다²⁵⁾. 또한 최신 연구에서 TNF- α 와 IL-1 β 등의 염증성 사이토카인을 억제하고 NF- κ B pathway에 작용하는 기전이 밝혀졌다²⁶⁾. 沈香은 氣味가 辛溫하고, 脾, 肺, 腎의 氣滯로 인한 증상을 소통하여 치료하는 약제로서²⁷⁾, 최근 Kim YC²⁸⁾의 과민반응 억제에 관한 연구가 보고된 바 있다. 龍腦는 開竅醒神, 清熱止痛, 散鬱火하는 효능을 지니고 있으며²⁹⁾, 항 뇌빈혈 효능이 있음이 Kong QX³⁰⁾의 연구에서 보고되었다. 이상의 연구 및 문헌에 근거하여 龍眼肉, 遠志, 沈香, 龍腦를 뇌의 기능을 활성화하여 현대인의 정신적인 스트레스로 생긴 기억력감퇴 및 치매예방을 목적으로 사용하였다.

만성적인 뇌혈류 저하를 유발하는 BCCAO는 점진적이고 장기간 지속되는 인지장애와 함께 신경세포 손상을 초래한다⁷⁾. BCCAO 이후 해마의 신경세포 손상과 명확한 학습 및 기억 장애는 급성기가 지난 약 4주 이후부터 관찰된다고 하였다³¹⁾. 이에 따라 본 연구에서는 흰쥐에 BCCAO를 실시하고 4주가 지난 다음부터 4주간 청뇌명신환을 투여한 다음 5주째 (BCCAO 이후 9주째)에 Morris water maze를 이용한 학습 및 기억 행동을 측정하였다. 그 결과, 1일 8회 3일간의 학습 훈련에서 도피대를 찾아 오르기까지의 회피시간은 Sham군과 BCCAO의 대조군, ChAL군 및 청뇌명신환 투여군 사이에 유의성 있는 회피시간의 변화가 관찰되었으며, ChAL군과 청뇌명신환 투여군 모두 2일과 3일 차에 대조군에 비해 유의성 있는 회피시간의 단축을 나타내었다. 이는 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 학습 능력의 저하를 개선하는 효능이 있음을 보여주는 것이다. Morris water maze 실험 4일째 기억행동 측정에서 청뇌명신환투여군은 대조군에 비해 도피대 주변부 (zone A)에서 수영한 시간이 유의하게 증가하였다. 60초 수영 동안 처음으로 도피대를 찾아간 시간은 대조군에 비해 차이가 없었으나 도피대를 찾아간 횟수는 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 각 구역별 수영시간과 부여된 점수로 계산된 기억유지 점수 또한 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 3일간의 훈련에 의해 학습된 도피대의 위치를 대조군에 비해 청뇌명신환 투여군이 더 잘 기억하고 있다는 것을 보여주는 것이다. ChAL군은 양성대조약물로 choline alfoscerate가 투여되었다. Choline alfoscerate는 이전의 acetylcholinesterase (AChE) inhibitor와는 달리 직접적인 콜린성 전구물질로 acetylcholine의 생성과 분비를 증가시켜 퇴행성 뇌질환이나 혈관성 질환에 의한 인지장애를 개선하는 효능을 나타낸다^{32,33)}. 본 실험의 결과, 청뇌명신환은 양성대조약물인 choline alfoscerate의 효능에 다소 미치지지는 못하였지만 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 학습능력의 저하와 기억장애를 개선하는 효능이 있는 것으로 판단된다. 그러나 복합 처방인 청뇌명신환과 단일 화학물질인 choline alfoscerate의 직접적인 효용성 비교는 제한점이 많으므로 이에 대해서는 임상적인 추가 연구가 필요한 것으로 판단된다.

만성적인 뇌혈류 저하는 뇌조직에 산소와 글루코스의 공급 부족을 야기하여 신경세포의 대사 장애를 유

발하고, 이러한 대사 장애는 신경세포의 단백질 분해, 지질의 과산화, reactive oxygen species (ROS)의 생성 등을 통해 세포를 사망에 이르게 한다³⁴⁾. 뇌혈액 상태에서 해마의 신경세포들은 자연사 기전에 의해 사망하며, 그로 인해 유발되는 해마 CA1의 신경세포 감소는 학습과 기억의 장애를 유발하는 주요 원인이 된다³⁵⁾. 이러한 신경세포의 자연사에 관여하는 주요 인자가 Bax와 caspase-3이다. Bax는 대표적인 세포자연사 유발인자이고, caspase-3은 세포자연사를 실행하는 주요 인자이다³⁶⁾. Bax는 세포내 미토콘드리아의 막투과성을 증가시키고, cytochrome C와 같은 세포자연사 유발인자들을 생성하여 세포자연사를 유도한다³⁷⁾. 미토콘드리아에서 생성된 cytochrome C는 caspase-9를 통해 caspase-3을 생성하며, 이후 caspase-3은 caspase-activated DNase를 생성하여 세포핵의 DNA를 조각내고, 세포핵의 염색질 응축 (chromatin condensation)을 일으키고, 세포골격을 분해하여 세포가 사망하는 자연사 기전을 유발하게 한다³⁸⁾. Morris water maze 실험에서 청뇌명신환이 BCCAO에 의한 학습 및 기억 장애를 유의하게 개선하는 결과가 확인되었으므로 그 기전을 관찰하기 위해 해마의 신경세포 손상에 대한 영향을 관찰하였다. 그 결과, 대조군은 만성적인 뇌혈류 저하에 의해 해마 CA1의 두께와 신경세포 수가 감소하였으며, 청뇌명신환 투여군은 대조군에 비해 해마 CA1 신경세포 수의 감소를 유의하게 억제된 것이 관찰되었다. 또한 청뇌명신환은 해마의 CA1 구역에서 BCCAO에 의해 증가된 Bax와 caspase-3 발현을 대조군에 비해 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 해마 CA1 신경세포 수 감소의 억제 작용과 함께 청뇌명신환이 BCCAO에 의한 해마의 신경세포 자연사를 억제하는 작용이 있음을 보여주는 것으로 판단된다.

본 연구에서는 BCCAO에 의한 β -amyloid 응집 및 APP와 BACE-1의 발현을 살펴보았다. Congo red 염색법은 β -amyloid에 의한 amyloid 응집을 확인할 수 있는 방법 중 하나이다³⁹⁾. 본 연구에서 Congo red로 염색한 해마 부위를 관찰한바, A β 응집이 증가한 대조군에 비해 ChAL군과 청뇌명신환을 투여한 Sample군 모두 유의성 있는 β -amyloid 응집의 감소가 관찰되었다. APP는 β -amyloid를 형성하는 전구물질로 APP가 β -secretase에 의해 잘려지고 다시 γ -secretase에 의해 잘려지는 과정의 결과로 β -

-amyloid가 생성된다⁴⁰⁾. β -secretase는 beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE-1)로 알려져 있으며, APP에서 β -amyloid를 생성하는데 근본적인 역할을 한다⁴¹⁾. APP로부터 β -amyloid 생성이 낮아지면 알츠하이머병이 억제되며, BACE-1이 알츠하이머병 환자의 뇌에서 과발현 된다는 것 등으로^{42,43)}, APP 및 BACE-1이 β -amyloid 생성에 관여하고 있다는 것을 알 수 있다. 해마조직에서 western blotting 방법으로 APP와 BACE-1 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 ChAL군과 청뇌명신환을 투여한 Sample군 모두 유의성 있는 APP와 BACE-1 발현의 감소가 관찰되었다. 이러한 결과는 청뇌명신환이 β -amyloid 생성을 억제하는 효능이 있음을 추측하게 한다.

한편, 청뇌명신환의 근간이 되는 拱辰丹에 대한 연구보고들을 살펴보면, 拱辰丹이 CT105를 처리한 PC-12와 THP-1 세포실험에서 proinflammatory cytokine인 TNF- α 와 IL-1 β 및 IL-6 발현을 억제하고 AChE 활성과 APP 발현을 억제하는 작용을 통해 치매에 유의한 효능이 있음이 보고된바 있고⁴⁴⁾, 拱辰丹과 靈神草, 遠志, 石菖蒲 혼합제제가 scopolamine으로 유도된 기억력 손상 동물모형에서 기억력 개선과 인지능력을 향상시키는 효능을 나타내었다고 보고되었다⁴⁵⁾. 또한 拱辰丹은 알츠하이머형 치매 환자에 대한 임상연구에서 인지기능을 향상시킨다고 보고되었다⁴⁶⁾. 이러한 치매에 대한 拱辰丹의 효능 연구의 결과들 또한 청뇌명신환의 효능을 간접적으로 보완하는 결과로 생각된다.

본 연구의 결과들을 총괄하면, 拱辰丹을 근간으로 한 청뇌명신환은 만성적인 뇌혈류 저하에 의한 학습 및 기억 장애를 유의하게 개선하였으며, 해마 CA1의 신경세포 손상을 억제하고, Bax와 caspase-3 발현을 억제하는 작용을 나타내었다. 또한 해마에서 β -amyloid의 응집과 APP 및 BACE-1 발현을 억제하였다. 이러한 결과는 청뇌명신환이 해마의 신경세포 자연사를 억제하는 작용과 β -amyloid 생성을 억제하는 작용에 의해 학습과 기억 장애를 개선하는 것으로 설명할 수 있으며, 그러므로 청뇌명신환은 인지기능 장애를 수반하는 퇴행성 뇌질환에 대해 유용한 약물이 될 수 있다는 것을 보여주는 결과로 판단된다.

V. 결론

청뇌명신환이 만성적인 뇌혈류저하 상태에서의 학습 및 기억 장애에 미치는 영향을 관찰하기 위해 흰쥐에서 양측 총경동맥을 영구 폐쇄하는 방법으로 만성적인 뇌혈류저하를 유발하고 4주 후부터 청뇌명신환을 4주간 경구투여한 다음 Morris water maze를 사용하여 학습 및 기억 행동에 미치는 영향을 측정하였다. 또한 해마에서 신경세포 손상과 Bax 및 caspase-3 발현을 면역조직화학염색으로 관찰하였으며, β -amyloid 침착과 관련하여 Congo red 염색과 APP 및 BACE1 발현을 관찰한바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. Morris water maze의 학습훈련 2일차에서 대조약 물인 ChAL과 CNMSH은 모두 도피대로의 회피시간을 대조군에 비해 유의성 있게 단축시켰다.
2. ChAL은 도피대 (target)와 도피대에 가까운 zone A에서의 수영시간을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰으며, CNMSH은 도피대에 가까운 zone A에서 만 수영시간을 유의하게 증가시켰다.
3. ChAL과 CNMSH은 도피대를 찾아간 횟수를 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다.
4. ChAL은 처음으로 도피대를 찾아간 시간을 대조군에 비해 유의하게 단축시켰으며, CNMSH은 대조군에 비해 단축시켰으나 유의성은 없었다.
5. ChAL과 CNMSH은 기억유지 점수를 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다.
6. ChAL과 CNMSH 모두 해마 CA1 신경세포 수의 감소를 유의하게 억제하였으며, 해마 CA1 두께의 감소를 억제했으나 유의성은 없었다.
7. ChAL과 CNMSH 모두 해마 CA1 구역에서 Bax 발현의 증가를 유의하게 억제하였다.
8. ChAL과 CNMSH 모두 해마 CA1 구역에서 caspase-3 발현의 증가를 유의하게 억제하였다.
9. ChAL과 CNMSH 모두 해마 CA1 구역에서 β -amyloid 침착을 유의하게 억제하였다.
10. ChAL과 CNMSH 모두 해마조직에서 APP 발현 증가를 유의하게 억제하였다.
11. ChAL과 CNMSH 모두 해마조직에서 BACE1 발현 증가를 유의하게 억제하였다.

이러한 결과들은 청뇌명신환이 만성적인 뇌혈류저하에 의한 해마 신경세포의 자연사를 억제하며, β -amyloid

침착을 억제하는 작용에 의해 학습과 기억 장애를 개선하는 효능이 있음을 보여준다.

References

1. Fotuhi M, Hachinski V, Whitehouse PJ. Changing perspectives regarding late-life dementia. *Nat Rev Neurol*. 2009;5:649-658.
2. Kurz A, Perneczky R. Neurobiology of cognitive disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 2009;22:546-551.
3. Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol*. 2010;120:287-296.
4. Luckhaus C, Flub MO, Wittsack HJ, Grass-Kapanke B, Janner M, Khalili-Amiri R, Friedrich W, Supprian T, Gaebel W, Modder U, Cohnen M. Detection of changed regional cerebral blood flow in mild cognitive impairment and early Alzheimer's dementia by perfusion-weighted magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2008;40:495-503.
5. Nakamura T, Lipton SA. Redox regulation of mitochondrial fission, protein misfolding, synaptic damage, and neuronal cell death: potential implications for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Apoptosis*. 2010;15:1354-363.
6. Heo Jun, The Dongui Bogam. Yeo-Gang Publisher. 2001:1750.
7. Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2007;54(1):162-180.
8. Smith DH, Okiyama K, Thomas MJ, McIntosh TK. Effects of the excitatory amino acid receptor antagonists kynurenate and indole-2-carboxylic acid on behavioral and neurochemical outcome following experimental brain injury. *J Neurosci*. 1993;13:5383-5392.
9. Ui Yeok Lim, 『Se-eui-deuk-hyo-bang』. Capter 1, Part 1. Beijing: Chinese Medicine Publisher, 1996:131.
10. Kim-Dong Suk, O Chan Ho, Lee Sang Yong,

- Effects of Chukchunwhan-extracts on the Urine Metabolism in Rat . Journal of physiology & pathology in Korean Medicine 2002;16(2):257-261.
11. Jeon JR, Lee JS, Lee CH, Kim JY, Kim SD, Nam DH, Effect of ethanol extract of dried Chinese yam(*Dioscorea batatas*) flour containing dioscin on gastrointestinal function in rat model. Arch pharm Res. 2006;29(5):348-353.
 12. Nishimura N, Tanabe H, Yamamoto T, Fukushima M, Raw Chinese yam (*Dioscorea opposita*) promotes cecal fermentation and reduces plasma non-HDL cholesterol concentration in rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2011;57(5):340-347.
 13. Shin Min Gyo, 『Clinical Herbal Medicine』. Young Lim Publisher. 1989:166-167.
 14. Heo Yong Seok, Gene expression profiling of SH-SY5Y cells in neuroprotective effect of total ginsenosides on H(2)O(2) induced neurotoxicity . Sang Ji University, Doctorate Thesis 2005.
 15. Kim Jil Soo, The Cytotoxicity mechanism of Polychlorinated biphenyls(PCBs) on Neural SK-N-MC Cells and Defense effect of Korean Ginseng. Won Gwang University. 2001.
 16. Jeon Byeong Hoon, Gang Ik Shin, Moon Byung Soon, Effect of Korean Ginseng on Oxidant-induced Neurotoxicity in Cultured Bovine Oligodendrocytes. The Journal of Pathology in Korean Medicine. 1998;12(1):96-101,
 17. The Herbal Medicin Professor of Korean Medicine College. Young Lim Publisher. 2000;336-337.
 18. Go Jung Min, Lee Sang Hoon, Back Young Hyun, Choe Do Young, Stimulatory effect of Cinnamomum cassia extract on angiogenesis through regulation of VEGF. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2009;26(1):153-162.
 19. Kim Hyung Suk, No Jeong Doo, Effects of Cinnamomi Cortex Pharmacopuncture on LPS-induced Inflammatory Response in Macrophage. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2012;29(1):15-24.
 20. Shin Min Gyo, 『Color Clinical Herbal Medicine』. Nam san dang. 1986:263-265.
 21. Gwon gang Bum, Kim Eun Gyung, Moon Hyung Chul, Song Young Seon, Ryu Do Gon, Cytotoxic Effects of Radix Aconiti Extract in Lung Cancer Cell Lines. The Journal of Korean Medicine Society. 2006;15(1):106-112.
 22. Zhu Z, Shen Y, Zhang M, Chen G, Ma S, Pharmacological study on spleen-stomach warming and analgesic actions of Aconitum carmichaeli Debx. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 1992;17(4): 238-241.
 23. The Herbal Medicin Professor of Korean Medicine College. Young Lim Publisher. 2004;641-642.
 24. Kim Mi Lim, Im Eun Mi, Effects of Longanae Arillus Water Extract on Inflammatory Response and Cytokines in Mouse Macrophage Cells. The Journal of oriental obstetrics & gynecology. 2014;27(2):1-11.
 25. Gang Byung Soo, Kim Young Pan, 『Clinical Accorted Herbal Medicine for the Logic of Systematic composition. 2nd Album.』 Young Lim Publisher. 1996:309-11.
 26. Anti-inflammatory activity of the water extract of Polygala tenuifolia Willd. The Journal of Internal Korean Medicine Society. 2013;34(2):204-214.
 27. Shin Min Gyo, 『Clinical Herbal Medicine』. Young Lim Publisher. 1986:390-391.
 28. Kim YC, Lee EH, Lee YM, Kim HK, Song BK, Lee EJ, Kim HM, Effect of the aqueous extract of Aquilaria agallocha stems on the immediate hypersensitivity reactions. J Ethnopharmacol. 1997;58(1):31-38.
 29. Ser Bu Il, Jung Guk Young, 『Easy Herbal Medicine. Revised Edition II』 Daegu-Haany University Publisher. 2012:383.
 30. Kong QX, Wu ZY, Chu X, Liang RQ, Xia M, Li L, Study on the anti-cerebral ischemia effect of borneol and its mechanism. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2013;11(1):161-4.
 31. Pappas BA, de la Torre JC, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. Brain Res.

- 1996;708:50–58.
32. Amenta F, Carotenuto A, Fasanaro AM, Rea R, Traini E. The ASCOMALVA trial: association between the cholinesterase inhibitor donepezil and the cholinergic precursor choline alphoscerate in Alzheimer's disease with cerebrovascular injury: interim results. *J Neurol Sci.* 2012;322(1–2):96–101.
 33. Amenta F, Carotenuto A, Fasanaro AM, Rea R, Traini E. The ASCOMALVA (Association between the Cholinesterase Inhibitor Donepezil and the Cholinergic Precursor Choline Alphoscerate in Alzheimer's Disease) Trial: interim results after two years of treatment. *J Alzheimers Dis.* 2014;42 Suppl 3:S281–288.
 34. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 2010;460:525–542.
 35. Bennett SA, Tenniswood M, Chen JH, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T, Pappas BA. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *Neuroreport.* 1998;9:161–166.
 36. Tatton WG, Chalmers–Redman R, Brown D, Tatton N. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol.* 2003;53 (suppl 3):S61–72.
 37. Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann NY Acad Sci.* 1999;887:18–30.
 38. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 2000;256:12–18.
 39. Zussy C, Brureau A, Delair B, Marchal S, Keller E, Ixart G, Naert G, Meunier J, Chevallier N, Maurice T, Givalois L. Time–course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid beta fragment in rats. *Am J Pathol.* 2011;179:315–334.
 40. Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol.* 2003;70:1–32.
 41. Vassar R, Bennett BD, Babu–Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta–secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 1999;286:735–741.
 42. De Strooper B, Annaert W. Novel research horizons for presenilins and gamma–secretases in cell biology and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:235–260.
 43. Cole SL, Vassar R. The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta–secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *J Biol Chem.* 2008;283:29621–25.
 44. Hwang Sun Mi, Jung Dae Gyu. The Effects of KongJinDan(KJD) on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT105. *Journal of Oriental Neuropsychiatry.* 2004;15:103–18.
 45. Choe Chul Hong, Kim Su Hyu, Jung Dae Gu. Studies on the Nootropic and Anti–amnesic and Anxiolytic–like Effects of G.J.D, P.P.A. and G.J.D–P.P.A. in Mice. *Journal of Oriental Neuropsychiatry.* 2011;22:85–105.
 46. Jung Hyo Chang, Jang Ha Jung, Seong Wo Young, Lee Soeng Hyun, Son Ji Hyung, Han Seung Hye. A study of Gongjin–dan in patients with mild Dementia of Alzheimer type. *Journal of Oriental Neuropsychiatry.* 2004;15:141–148.