황련해독탕 전탕액과 약침액이 치매유발생쥐의 인지와 기억에 미치는 영향

권영완^{id} · 강태리^{id} · 이상룡^{id}

우석대학교 한의과대학 경혈학교실

Effects of Hwangryunhaedok-Tang Decoction & Hwangryunhaedok-Tang Pharmacopuncture Solution on the Cognitive & Memory Impairment Induced by Scopolamine in Mouse Model

Young-Wan Kwon, Tae-Ri Kang, Sang-Ryong Lee

Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Woo-Suk University

Objectives : This research was performed to investigate the effects of Hwangryunhaedok-tang decoction and Hwangryunhaedok-tang Pharmacopuncture at BL10 on cognition and memory impairment in a mouse dementia model induced by scopolamine. **Methods :** Fifty ICR mice were divided into 6 groups : Normal group (n=5), Control group (n=9), Positive control group for pharmacopuncture group (n=9, Donepezil 0.75 mg/kg), Positive control group for oral administration group (n=9, Donepezil 5 mg/kg), Pharmacopuncture group (n=9, Hwangryunhaedok-tang Pharmacopuncture undiluted solution 10 ml/kg), and Oral administration group (n=9, Hwangryunhaedok-tang 200 mg/kg). For a mouse dementia model, 1 mg/kg scopolamine was intraperitoneally administered to ICR mice. Hwangryunhaedok-tang pharmacopuncture was administered on BL10 for 4 weeks at intervals of 2 days. Hwangryunhaedok-tang decoction was given orally for 4 weeks every day. Morris water maze and passive avoidance test were conducted followed by measurement of acetylcholine concentration, acetylcholinesterase activity, and the amount of BDNF and p-CREB in the brain. **Results :** 1. In the Morris water maze test, the time spent staying around the platform significantly increased in the pharmacopuncture group and oral administration group than in the control group. 2. In the passive avoidance test, the time spent in the bright room significantly increased in the pharmacopuncture group and oral administration group than in the control group. 3. The level of acetylcholine in brains increased in the pharmacopuncture group and oral administration group than in the control group. Also, the activity of acetylcholinesterase decreased in the pharmacopuncture group and oral administration group than in the control group. 4. The expression of BDNF and p-CREB decreased in the control group, but increased in the pharmacopuncture group and oral administration group. **Conclusions :** These results suggest that Hwangryunhaedok-tang decoction and Hwangryunhaedok-tang pharmacopuncture at BL10 may have cognition and memory-enhancing effect in scopolamine-induced dementia in ICR mice via controlling the content of acetylcholine and the activity of acetylcholinesterase, and activating BDNF and p-CREB.

Key words : BL10, Hwangryunhaedok-tang , Pharmacopuncture, BDNF, p-CREB, acetylcholine

Received October 11, 2019, Revised November 28, 2019, Accepted December 4, 2019

Corresponding author: **Sang-Ryong Lee**

Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Woo-Suk University, 61 Seonneomeo 3-gil, Wansan-gu, Jeonju 54986, Korea
Tel: +82-63-290-9000, Fax: +82-63-290-1557, E-mail: lisr@daum.net

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

치매(癡呆)는 고전 의서에서 呆病이라하여 癡證에 포함하여 기록하였으며¹⁾ 뇌의 신경세포가 손상되어 기억력을 포함한 인지기능 장애로 인해 일상생활이나 사회생활에 지속적으로 지장을 가져오는 상태를 지칭했다²⁾.

치매에 대한 한의학계 연구는 정 등(2004)이 공진단³⁾, 이 등(2016)이 귀비탕⁴⁾, 박 등(2008)이 보중익기탕⁵⁾을 이용한 약물 치료 효과에 대해 연구하였으며, 신 등(2011)은 백회혈⁶⁾을, 박 등(2001)은 신백혈과 조해혈⁷⁾을 이용한 침구 치료법에 대한 연구를 진행한 바 있다.

황련해독탕은 황련, 황금, 황백, 치자로 구성된 방제로 清熱, 瀉火, 解毒의 기본 방이다⁸⁾. 궤양성 대장염⁹⁾, 비염¹⁰⁾, 암¹¹⁾, 각막염¹²⁾ 등에 대한 연구가 보고되었고, 황련해독탕 약침은 황련, 황금, 황백, 치자를 증류 추출한 약침으로 實熱, 裏熱證에 사용하는 약침이다¹³⁾. 경향통¹⁴⁾, 우울증¹⁵⁾, 지루성피부염¹⁶⁾, 알러지성 비염¹⁷⁾ 등에 대한 효과에 대한 연구가 있었다.

천주(BL10)는 족태양방광경에 속하고, 俠項後髮際 大筋外廉陷 中에 위치하며, 해부학적으로는 승모근 상에서 후두부로 향하는 대후두신경과 후두동정맥이 지나는 혈위이다¹⁸⁾. 주치하는 증상으로는 두통, 항강, 고혈압, 낙침, 발열, 정신병 등이 있으며, 기억력을 증강시키는 혈위로 알려져 있다¹⁹⁾.

기존의 선행 연구들에서 황련해독탕과 황련해독탕 약침이 여러 질환에 대하여 연구되어졌으나, 치매 유발 생쥐의 인지와 기억에 미치는 영향에 대하여 동시에 이루어진 연구는 전무하였고, 천주혈은 경락경혈학 및 해부학적으로 두뇌와 연관된 질환에 응용될 가능성이 있을 것으로 예측되어 선택하였다.

이에 본 논문에서는 황련해독탕 전탕액과 약침액이 scopolamine으로 유발한 치매 모델 생쥐의 인지와 기억에 미치는 영향을 알아보고자, 행동실험과 뇌신경 세포에 대한 면역염색을 실시하여 그 효과를 알아본 결과, 유의미한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 동물: 실험동물은 체중이 약 26 g~28 g의 ICR계 mouse, 7주령 모델(수컷)을 하나바이오테크(경기도 안산, 한국)로부터 분양 받아, 온도(26.8±0.5)℃, 상대습도(48.4±1.7)%, 조명(07:00~19:00)의 항온 항습 환경의 사육장에서 일반식이(AIN-93G diet)를 공급하였으며 식수를 자유롭게 섭취하도록 하여, 일주일간 검역과 순화를 거친 후 건강한 실험동물을 사용하였다. 본 연구의 모든 동물 실험은 기관 동물 보호 및 실험 위원회(SEMI-18-04)에 의해 승인되었으며, 그에 따른 절차는 실험실 동물의 관리 및 사용을 위한 지침에 명시된 표준을 준수하였다.

2) 황련해독탕 약침액의 제조: 황련, 치자, 황백, 황금을 20 g씩 2시간 증류수 침전 후 세정하고, 건조 시켜 분말 형태로 제조하여 2 L 플라스크에 증류수 1 L로 수증기 증류 냉각방식으로 증류액을 제조했다. 회수된 증류액 (회수율 35%)을 여과지 0.2 μm에 한번 그리고 여과지 0.1 μm에 재차 여과하여, 염도와 pH를 보정 후 멸균하여 냉장 보관 (2℃~8℃)하여 사용하였다.

3) 황련해독탕의 제조: 황련, 치자, 황백, 황금을 120 g씩 증류수 1500 ml를 가하여 120분간 가열하여 얻은 전탕액을 여과지 0.2 μm에 여과한 후 5000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 동결건조기에 넣고 이를 영하 45℃로 급속 냉각하여 진공 상태에서 승화시켜 건조 시켰다. 건조 시켜 얻은 황련해독탕 (82 g)을 시약 분쇄기로 분쇄하고 분말형태로 제조 후 냉동보관 (영하 50℃)하여 시료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 군 분리 및 시료투여 및 취혈시술: 실험을 위해 총 50마리의 실험동물을 6군으로 나눠 배정하였다(Table 1). 각각의 군은 다음과 같이 정상군 (N, n=5), 대조군 (C, n=9), 황련해독탕 약침액 시술 양성대조군 (PS, n=9), 황련해독탕 경구투여 양성대조군 (PP, n=9), 황련해독탕 약침 시술군 (SS, n=9), 황련해독탕 경구투여군

Table 1. Experimental design of animals

Group	Group name	Mice	Treatment	Routes of administration
Normal	N	5	Saline	Saline i.p.
Control	C	9	Saline	Scopolamine 1 mg/kg, i.p.
Positive control	PS	9	Donepezil 0.75 mg/kg	Scopolamine 1 mg/kg, i.p.
	PP	9	Donepezil 5 mg/kg	Scopolamine 1 mg/kg, i.p.
Sample	SS	9	H-tang pharmacopuncture solution	Scopolamine 1 mg/kg, i.p.
	SP	9	H-tang 200 mg/kg	Scopolamine 1 mg/kg, i.p.

P.O: Oral administration, 10 ml/kg, BW, P.P: Pharmacopuncture, 10 ml/kg, BW, H-tang: Hwangryunhaedok-tang.

(SP, n=9)으로 분리하였다. 실험동물의 기억력을 손상시키기 위해, 정상군을 제외한 5군에 Scopolamine 1 mg/kg 복강 주사하였고 양성대조군 PS에는 Donepezil 0.75 mg/kg 약침시술, PP에는 Donepezil 5 mg/kg 경구 투여하였다. 실험군 SS에는 황련해독탕 약침 순수원액 10 ml/kg, BW 약침 시술하였고, SP에는 황련해독탕 시료 200 mg/kg를 경구 투여하였다. SP와 PP에는 1일에 1회씩 4주간에 걸쳐 총 28회에 경구 투여하였으며, PS와 SS에는 천주(BL10)에 양측 2일에 1회씩 4주간에 걸쳐 총 14회에 걸쳐 시술하였다. 시술한 천주(BL10)는 제 1경추 아래 양 옆쪽 각 1.5cm에 상응하는 부위로 혈위를 정하였다¹⁸⁾.

3. 행동 실험

1) **수조미로실험**: 수조(100×30 cm)에 물을 채우고, 검은색 물감으로 불투명하게 하여 플랫폼이 보이지 않게 수면 아래 1 cm에 위치하도록 설치하였다. 실험동물이 수조에서 플랫폼에 도달하는 시간을 측정하였는데, 1회당 120초를 진행하였으며, 총 2회 진행하였다. 120초 내에 도달하지 못하면 플랫폼 위에 올려 10초동안 인지시킨 후, 4일에 걸쳐 2회씩 훈련을 실시하였다. 실험동물이 120초 내에 플랫폼에 도달하게 되면 실험에 필요한 훈련이 완료된 것으로 보았다.

실험에 필요한 훈련이 완료된 실험동물에 대하여 탈출 지연시간을 측정하였다. 탐침 실험은 실험에 필요한 훈련을 진행한 수조에서 플랫폼을 제거한 후, 플랫폼이 있던 구역(A)에 실험동물이 머무는 시간을 측정하였다. 각 실험동물 당 수명 시간은 총 60초로 하여 실험을 진행하였다. 데이터는 수조 위에서 카메라로 촬영하여 스마트 비디오 추적 시스템 프로그램을 사용하여 분석하였다.

2) **수동회피실험**: 수동회피실험은 실험동물의 기억력 평가를 위해 측정하였으며, 측정기기 Shuttle box (Electric grid floor, Ugo, Italy)는 25×15 cm 크기의 두 개의 방으로 이루어져 있고, 두 개의 방 사이에는 칸막이 문이 10×10 cm 크기로 설치하였다. 각 방은 조명 전구를 설치하여 조명할 수 있도록 하였으며, 조명을 어둡게 한 방에서 실험을 진행하였다. 두 개의 방 중 한 쪽 방에 실험동물을 넣고 조명을 켜고 칸막이를 열어 주었으며, 실험동물이 조명이 없는 방으로 들어가게 될 때 자동적으로 칸막이가 닫히도록 설정하였다. 1일 째에는 실험동물을 한쪽 어두운 상자에 1분간 적응하게 한 후 불빛을 비추고 소음을 일으켜, 마우스가 반대쪽 밝은 상자로 이동하게 하였다. 24시간 후 실험동물을 동일한 곳에 있는 어두운 상자에 넣고 20초 후에 다시 조명을 비추고 소음을 일으켰다. 2초 뒤 전기 충격을 주어 인식하게 하였다. 24시간 후 동일한 실험을 진행하여, 총 120초 동안 밝은 방에 머무는 시간을

측정하였다.

4. 실험동물의 처치 및 효소원의 조제

행동 실험이 종료된 실험동물은 16시간동안 먹이를 주지 않고, 이산화탄소로 마취시킨 후 복부를 절개하여 개복하고, 1 ml 주사기를 이용하여 아래대정맥에서 채혈하였다. 뇌 조직은 physiological saline에 세척한 후에 수분을 제거하여 10배의 균질화 buffer (12.5 mM 인산나트륨 buffer pH 7.0, 400 mM 염화나트륨)에 넣고 균질화하여 1,000x g에서 10분간 4℃에서 원심분리 후 상층 액을 효소원으로 사용하였다.

5. 뇌 조직의 아세틸콜린 함량 및 아세틸콜린에스테라제 측정

1) **아세틸콜린 함량 측정**: 뇌 조직의 아세틸콜린 함량 측정은 96-well plate에 뇌 조직 효소원을 50 μ l를 첨가하여 1% hydroxylamine 50 μ l를 첨가, 혼합한 후 염화수소를 이용하여 pH 1.2±0.2로 조절하여 염화제이철(10% in 0.1 N 염화수소)을 500 μ l 가한 후 혼합, 흡광도 530 nm에서 측정하였다.

2) **아세틸콜린에스테라제 측정**: 뇌 조직의 아세틸콜린에스테라제 양의 측정은 96-well plate에 0.1 M Tris 완충제, pH 8.0을 300 μ l, 0.01 M DTNB 20 μ l, 뇌 조직 효소원을 10 μ l를 연속 첨가하고 absorbance 측정 바로 전에 기질인 0.1 M acetylcholine chloride 10 μ l를 첨가하여 405 nm에서 absorbance 변화를 5분 관찰하였다.

6. 뇌 조직 Western blot

BDNF (Brain derived neurotrophic factor)는 신경 영양인자로 중추신경계에서 신경세포들의 생존 및 성장을 도와 신경세포의 분화 및 특성을 조절하는데 관련된 인자이며, 제대로 뇌에 공급되지 않을 시 퇴행성 뇌질환의 원인이 되는 물질이며, CREB는 전사 활성인자로, BDNF는 CREB-sensitive gene에 해당한다. 또 CREB는 자극을 받지 않은 세포에서는 인산 화되지 않고 전사활성이 없거나 적지만, 인산화한 CREB (p-CREB)는 전사의 효율이 높아지는 것으로 알려져 있다²⁰⁾ BDNF와 CREB 분석을 위해 뇌 조직을 PBS 완충제 300 μ l에 넣은 후 균질기로 조직을 깨뜨려 부신 후, 800 rpm으로 10 초간 원심 분리하여 상층액만 사용하였다. Cell lysis 완충제 50 μ l를 넣고 30분간 얼음으로 incubation 한 뒤 4℃에서 14,000 rpm으로 20분 간 원심 분리하였다.

Bradford assay방법으로 protein을 일정하게 분량을 정한 후, protein의 SDS폴리아크릴 아미드젤 전기영동을 이용하여 크기 별

로 분리하였다. 반 건조 전송방식(Bio-Rad, USA)으로 니트로셀룰로오스 막에 이동시킨 후 5% 탈지유를 함유한 Blocking 완충제(0.5 % 탈지유, 1× PBST 완충제)를 1시간 처리하였다. 1× PBST 완충제로 10분, 3회 세척 후, 일차 항체인 BDNF (Santa cruz), p-CREB (Ser133), total-CREB (Santa cruz)을 1:1000의 비율로 처리한 후 4℃에 12시간 반응시켜, 1× PBST 완충제로 각 10분, 3회 세척하였다. Western Blot 검출 세트(Biorad, hercules, USA)를 이용하여 막과 반응시킨 후 Chemi-Doc 장비(Bio-Rad, USA)로 발현 정도를 관찰하였으며, β -actin, total-CREB으로 보정하여 비교하였다.

7. 면역조직화학적 염색(Immunohistochemistry staining)

뇌 조직 주변에 있는 조직들을 제거한 후 Bouin 용액으로 고정시키고 일정한 농도의 에탄올로 탈수한 후, 투명과정을 거쳐 paraffin으로 포매하였다. 포매한 뇌 조직을 paraffin 포매하여 순서대로 조직 절편(4 μ m)을 제작하였다. 각 개체의 조직마다 일정한 기준 없이 검경판을 선택하여 자일렌으로 파라핀을 제거한 후 흡수 하였다. Proteinase와 열처리로 항원성을 회복시킨 후, methanol에 hydrogen peroxide를 넣어 3% 혼합용액을 제조 후 조직 절편에 처리하여 효소의 촉매활성을 제거하였다. 그리하고 나서 IgG의 결합을 차단시키기 위해 2% normal goat serum을 30분 동안 처리하였다. Rabbit BDNF antibody (Santa cruz, USA), 그리고 Rabbit p-CREB antibody (Santa cruz, USA)를 1:100으로 희석하여 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 후 phosphate buffer

saline으로 각 5분 3회 세척하고, 과산화효소가 결합되어 있는 IgG 항체를 반응시키고, 다시 물로 수세하여 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 발색 시켰다. 희석 배율은 1:100, 현미경 배율은 100배로 촬영하였다.

8. 뇌조직의 단백질 정량

단백질의 함량은 Bradford assay에 준하여 bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., USA)을 기준으로 하여 측정하였다.

9. 통계처리

실험 데이터의 통계 처리는 평균치와 표준편차를 산정하였으며, 유의성을 정하는 검사는 Analysis of variance (ANOVA) t-test를 이용하였다.

결 과

1. 수중 미로 실험

C군 대비 N군의 경우 도피대 주위를 찾아가는 시간이 유의수준으로 증가하였으며, scopolamine 단독 투여한 C군은 A에 머무는 시간이 감소한 것으로 보아, 학습을 통한 기억력이 손실되었음을 확인하였다. 한편, 황련해독탕을 4주간 투여한 경우, A에 머무는 시간이 C군 대비 증가하였으며 특히, 천주(BL10) 황련해독탕 약침을 시술한 SS군에서 $p < 0.001$ 유의 수준으로 증가하였다(Fig. 1).

Fig. 1. Effects of Hwangryunhaedok-tang on scopolamine-induced impairment of memory in water maze test.

1) Values are expressed as mean $\pm$ S.D. for groups of 5~9 experiments. 2) * $p < 0.05$ vs. C, † $p < 0.001$ vs. C. 3) N : Normal, C : Control, PS : Donepezil 0.75 mg/kg, pharmacopuncture (BL10), PP : Donepezil 5 mg/kg, P.O, SS : Hwangryunhaedok-tang, pharmacopuncture (BL10) 10 ml/kg, BW, SP : Hwangryunhaedok-tang, 200 mg/kg, P.O. 4) A : Target point zone.

2. 수동 회피 실험

C군(63.8 ± 13.2 sec)의 경우, N군(110.4 ± 11.6 sec)에 비해 인지 및 기억이 감퇴하여 조명이 켜있는 곳에 멈춰 있는 시간이 유의적으로 감소하였다. 반면, 천주(BL10) 황련해독탕 약침을 시술한 SS군과 황련해독탕을 경구 투여한 SP 군의 경우 밝은 공간에 머무는 시간이 유의적으로($p < 0.001$) 증가하였다(Fig. 2).

Fig. 2. Effects of Hwangryunhaedok-tang on scopolamine-induced impairment of memory in passive avoidance test.

1) Values are expressed as mean ± S.D. for groups of 5~9 experiments. 2) * $p < 0.05$ vs. C, † $p < 0.001$ vs. C. 3) N : Normal, C : Control, PS : Donepezil 0.75 mg/kg, pharmacopuncture (BL10), PP : Donepezil 5 mg/kg, P.O, SS : Hwangryunhaedok-tang, pharmacopuncture (BL10) 10 ml/kg, BW, SP : Hwangryunhaedok-tang, 200 mg/kg, P.O.

Fig. 3. Effects of Hwangryunhaedok-tang on brain acetylcholinesterase activity and acetylcholine concentration in scopolamine-induced mice.

1) Values are expressed as mean ± S.D. for groups of 5~9 experiments. 2) * $p < 0.05$ vs. C. 3) N : Normal, C : Control, PS : Donepezil 0.75 mg/kg, pharmacopuncture (BL10), PP : Donepezil 5 mg/kg, P.O, SS : Hwangryunhaedok-tang, pharmacopuncture (BL10) 10 ml/kg, BW, SP : Hwangryunhaedok-tang, 200 mg/kg, P.O.

3. 뇌 조직에서 아세틸콜린에스터라제 활성과 아세틸콜린 함량에 미치는 영향

C군은 아세틸콜린의 분해를 촉진시키는 아세틸콜린에스터라제의 활성(0.549 ± 0.031 U/mg protein)이 N군에 비해 유의적으로($p < 0.05$) 증가하였으며, 그에 따라 뇌 조직에서 아세틸콜린에스터라제의 함량(31.699 ± 0.720 μmole/mg protein)은 유의수준으로 감소하였다. 한편, 천주(BL10) 황련해독탕 약침을 시술한 SS군과 황련해독탕을 경구 투여한 SP군의 경우, C군과 비교하여 아세틸콜린에스터라제 활성은 감소하고, 아세틸콜린 함량은 유의적으로 증가하였다(Fig. 3).

4. 신경 영양 인자(BDNF)와 상위 전사 인자(p-CREB (ser133))에 미치는 영향

1) p-CREB (ser 133)의 단백질 발현 양: C군과 N군을 비교하였을 때, p-CREB (ser 133)의 단백질 발현 양이 감소한 것과 천주(BL10) 황련해독탕 약침을 시술한 SS군에서 유의적으로($p < 0.05$) p-CREB (ser 133)의 발현양이 증가하는 것을 확인하였다. 경구 투여에서는 황련해독탕을 경구 투여한 SP군과 C군을 비교해보면, 증가하는 경향은 있었으나, 통계적 유의성은 없었으며(Fig. 4), 이는 면역조직화학염색을 통해서도 확인할 수 있었다(Fig. 5).

2) BDNF의 단백질 발현 양: C군과 N군의 BDNF 단백질 발현 양을 비교하였을 때, 유의적으로($p < 0.05$) 감소하였다. 반면, SS군과 SP군의 BDNF의 발현 양이 증가하였다. 특히 약침 시술한 SS군에서 $p < 0.001$ 유의수준으로 증가하였으며(Fig. 6), 면역조직화학염색을 통해서도 확인할 수 있었다(Fig. 7).

Fig. 4. Effects of Hwangryunhaedok-tang on brain protein band and ratio of p-CREB (ser 133)/CREB in scopolamine-induced mice.

1) Values are expressed as mean $\pm$ S.D. for groups of 5~9 experiments. 2) * $p < 0.05$ vs. C. 3) N : Normal, C : Control, PS : Donepezil 0.75 mg/kg, pharmacopuncture (BL10), PP : Donepezil 5 mg/kg, P.O, SS : Hwangryunhaedok-tang, pharmacopuncture (BL10) 10 ml/kg, BW, SP : Hwangryunhaedok-tang, 200 mg/kg, P.O.

Fig. 5 Immunohistochemical staining of p-CREB (ser 133) protein expression in the hippocampus ($\times 100$, $\times 200$).

N : Normal, C : Control, PS : Donepezil 0.75 mg/kg, pharmacopuncture (BL10), PP : Donepezil 5 mg/kg, P.O, SS : Hwangryunhaedok-tang, pharmacopuncture (BL10) 10 ml/kg, BW, SP : Hwangryunhaedok-tang, 200 mg/kg, P.O.

고찰

치매를 유발할 수 있는 원인질환은 여러 가지가 있으나, 알츠하이머병에 의한 알츠하이머성 치매가 50~60%를 차지한다²¹⁾. 알츠하이머 병은 Alzheimer가 처음으로 기재하였고¹⁾, 징후는 전형적

으로 최근 기억 기능과 집중력의 손상이며, 언어기술, 시각-공간지각력, 추상적인 생각, 그리고 판단력의 부재 및 성격의 변화가 동반된다²⁰⁾.

황련해독탕은 唐代 王燾의 外臺秘要에 '崔氏方'으로 인용된 처방으로 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子로 이루어져 있으며²²⁾, 清熱, 瀉火, 解毒

Fig. 6. Effects of Hwangryunhaedok-tang on brain protein band and ratio of BDNF/ β -actin in scopolamine-induced mice.

1) Values are expressed as mean $\pm$ S.D. for groups of 5~9 experiments.
2) * p <0.05 vs. C, † p <0.001 vs. C.
3) N : Normal, C : Control, PS : Donepezil 0.75 mg/kg, pharmacopuncture (BL10), PP : Donepezil 5 mg/kg, P.O, SS : Hwangryunhaedok-tang, pharmacopuncture (BL10) 10 ml/kg, BW, SP : Hwangryunhaedok-tang, 200 mg/kg, P.O.

Fig. 7. Immunohistochemical staining of BDNF protein expression in the hippocampus (x100, x200).

N : Normal, C : Control, PS : Donepezil 0.75 mg/kg, pharmacopuncture (BL10), PP : Donepezil 5 mg/kg, P.O, SS : Hwangryunhaedok-tang, pharmacopuncture (BL10) 10 ml/kg, BW, SP : Hwangryunhaedok-tang, 200 mg/kg, P.O.

의 기본 방이다⁸⁾. 황련해독탕은 궤양성 대장염⁹⁾, 비염¹⁰⁾, 암¹¹⁾, 각막염¹²⁾ 등에 대한 효과가 연구되어졌으며, 뇌신경계 연구로는 이등(2002)이 보고한 뇌 허혈 동물 모델에서 인지기능 회복 및 신경보호 효과²³⁾와 공 등(2004)이 보고한 뇌 허혈 동물 모델에서 공간

인지 능력과 기억력 개선 효과에 대한 연구²⁴⁾가 있었다.

황련해독탕 약침은 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子로 구성되었으며, 實熱, 裏熱症에 사용된다¹³⁾, 황련해독탕 약침은 경향통¹⁴⁾, 우울증¹⁵⁾, 지루성피부염¹⁶⁾, 알러지성 비염¹⁷⁾ 등에 대한 임상적 효과에 대해 연

구되어졌으며, 뇌신경계 연구로는 김 등(1999)은 중풍²⁵⁾, 장 등(2003)은 기능성 두통²⁶⁾, 이 등(2015)은 안면신경마비에 대한 치료 효과²⁷⁾를 보고한 연구가 있었다.

천주(BL10)는 膀胱經의 經穴로²⁸⁾, 俠項後髮際 大筋外廉陷中 부위 第一頸椎下 兩傍 각 1.5촌 處에 위치하는 혈위이다¹⁸⁾. 문헌상 頭眩, 頭痛, 頭重, 癰瘤, 驚癇 등의 頭部 및 腦神經 疾患에 상용되었다²⁹⁾. 朱 등(2003)이 현훈³⁰⁾, 朱(1999)가 편두통³¹⁾, 董 등(2005)이 척추뇌저동맥순환부전에 대한 치료효과³²⁾에 대해 보고한 연구가 있으며, 천주(BL10) 약침 연구로는 서 등(2018)이 자하거 약침을 이용하여 산발성 소뇌 운동실조에 대한 치료효과를 보고하였다³³⁾. 천주(BL10)에 위치한 근육은 두반근, 두판상근, 경판상근, 승모근 등이 있고, 혈관으로는 후두정맥과 후두동맥 등이 있으며, 신경으로는 대후두신경이 있다^{18,29)}. 본 연구에서는 천주(BL10) 약침 시술이 인지기능 및 기억력 개선에 긍정적인 효과를 미칠 것으로 판단하고 취혈하였다.

수증 미로 실험은 알츠하이머 동물 유발 모델의 한의학 연구에 다수 이용되었으며 주로 장기 기억을 평가하는 방법이다³⁴⁾. 수증 미로 실험을 통해 도피대 주위에서 머무는 시간을 확인한 결과, 황련해독탕을 경구 투여한 군과 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군의 경우 scopolamine만 단독 투여한 C군에 비해 유의적으로 머무는 시간이 증가한 것을 확인하였으며, 이는 황련해독탕 경구 투여와 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술 모두 기억에 대한 기억력 회복 효과가 있을 것으로 사료된다.

수동 회피 실험은 불쾌 자극에 대한 기억의 지속시간을 측정하기 위해 사용되는 방법으로³⁵⁾, 학습 기억력을 주로 평가하는 실험 방법이다³⁶⁾. 수동 회피 실험(Passive avoidance test)을 통해 밝은 방에 머무는 시간을 측정한 결과, 황련해독탕을 경구 투여한 군과 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군의 경우 scopolamine만 단독 투여한 C군에 비해 유의적으로 머무는 시간이 증가한 것을 확인하였으며, 이는 황련해독탕 경구 투여와 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술 모두 기억에 대한 기억력 회복 효과가 수동회피실험을 통해서도 확인된 것으로 사료된다.

아세틸콜린은 뇌의 뉴론에서 신경전달 물질로 뇌의 신경질과 해마에 강력한 콜린성 신경 지배에 관여 한다³⁷⁾. 알츠하이머 환자는 대뇌피질로 향하는 아세틸콜린 투입이 감소하여 인지기능 저하와 이상행동이 나타난다²⁾. 아세틸콜린에스테라제는 강력한 가수분해효소로서²⁰⁾, 아세틸콜린은 아세틸콜린에스테라제에 의해 가수분해되면 신경전달물질로서의 그 작용이 소실된다³⁷⁾. 아세틸콜린 함량 및 아세틸콜린에스테라제의 활성을 확인한 결과, 황련해독탕을 경구 투여한 군과 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군의

경우 scopolamine만 단독 투여한 C군에 비해 아세틸콜린 함량은 유의미하게 증가하였고, 아세틸콜린에스테라제의 활성은 유의미하게 감소한 것을 확인하였다. 이는 황련해독탕 경구투여와 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술 모두 콜린성 신경 전달 활성을 회복하는 효능이 있는 것으로 사료된다.

p-CREB 단백질 발현 양을 확인한 결과, Scopolamine을 단독 투여한 C군과 N군을 비교하였을 때, p-CREB 단백질 발현 양이 감소한 것을 확인하였고, 황련해독탕을 경구 투여한 군은 C군과 대비하여 증가하는 경향성을 보였으나 통계적 유의성이 없었으며, 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군에서는 유의적으로($p < 0.05$) p-CREB (ser133)의 발현양이 증가하였다.

BDNF의 단백질 발현 양을 측정한 결과, Scopolamine을 단독 투여한 C군과 정상군인 N군의 단백질 발현 양을 비교해보면, 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다. 반면, 황련해독탕을 경구 투여한 군은 C군 대비 BDNF의 단백질 발현이 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었고, 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군은 $p < 0.001$ 유의수준으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

해마(hippocampus)는 뇌의 측두엽에 위치하며, 장기기억생성에 중요한 역할을 담당하고 있다³⁸⁾. 각 군의 해마 부위를 면역조직화학적 염색을 시행하여 p-CREB (ser 133)의 단백질 발현 양을 관찰한 결과, Scopolamine을 단독 투여한 C군과 N군을 비교하였을 때, p-CREB (ser 133)의 단백질 발현 양이 감소한 것을 확인하였으며, 황련해독탕을 경구 투여한 군은 C군 대비 증가하는 경향을 보였고, 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군에서도 발현 양이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

또 각 군의 해마 부위를 면역조직화학적 염색을 시행한 후 BDNF 단백질 발현 양을 관찰한 결과, Scopolamine을 단독 투여한 C군은 정상군인 N군과 단백질 발현 양을 비교하였을 때 감소한 반면, 황련해독탕을 경구 투여한 군은 C군 대비 BDNF의 단백질 발현 양이 증가하였고, 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군에서도 발현 양이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 보면, scopolamine으로 유발한 치매쥐 모델을 이용한 수증 미로 실험 및 수동 회피 실험에서 황련해독탕을 경구 투여한 군과 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 실험군은 유의성이 있는 인지 능력의 회복이 관찰되었으며, 아세틸콜린(Acetylcholine) 함량 및 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase)의 활성은 황련해독탕을 경구 투여한 군과 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 실험군에서 유의미한 영향이 있었다. p-CREB (ser 133)의 단백질 발현 양과 BDNF의 단백질 발현 양에 있어 황련해독탕을 경구 투여한 군과 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 실험군에

서 모두 영향이 있는 것으로 나타났으나, 황련해독탕을 경구 투여한 군은 통계적으로 유의성은 없었고 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 실험군은 유의한 영향이 있었다. 고로 황련해독탕을 경구 투여보다는 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술이 신경영양인자 감소로 인한 퇴행성 기억력 감퇴에 더 효과적일 것으로 사료된다. 다른 한편으로 수증미로 실험 및 p-CREB (ser 133)의 단백질 발현 양 분석 등에서 정상군보다 황련해독탕 경구 투여한 군과 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군에서 결과가 더 높게 나온 것은 기억력 회복의 치료 효과를 넘어서는 기억력 증진효과로 해석해 볼 수도 있다. 그러나 다만 본 연구는 황련해독탕의 경구 투여와 천주(BL10) 약침 시술에 대한 유의한 결과를 얻었을 뿐이고, 정상군에 대하여 투여 및 시술 시 기억력의 증진을 확인하는 실험이 아니었기 때문에, 기억력 증진의 효과에 대해서는 별도의 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또 실험에서 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군의 비교를 다른 약침시술과 비교하여 황련해독탕 약침액의 효과를 확인하였지만, 따로 천주혈 자침군(Dry needle group)을 설정하지 않아 시술 도구 및 방법에 따른 효과 차이를 확인 할 수 없었다. 이에 대해서도 차후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

황련해독탕 전탕액 경구 투여와 천주(BL10) 황련해독탕 약침이 scopolamine으로 유발한 치매 쥐 모델의 인지 및 기억에 미치는 영향을 실험적으로 알아보고자 수증미로실험, 수동회피실험을 통한 행동학적 변화와 면역조직화학적 염색을 통한 신경학적 영향을 관찰 한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 수증미로실험에서 플랫폼 주위에서 머무는 시간을 확인한 결과, 황련해독탕 전탕액 경구 투여한 군과 천주(BL10) 황련해독탕 약침시술한 군에서 scopolamine만 단독 투여한 대조군에 비해 유의적으로 머무는 시간이 증가하였다.
2. 수동회피실험을 통해 밝은 방에 머무는 시간을 측정한 결과, 황련해독탕 전탕액 경구 투여한 군과 천주(BL10) 황련해독탕 약침시술한 군에서 scopolamine만 단독 투여한 대조군에 비해 유의적으로 머무는 시간이 증가하였다.
3. 아세틸콜린 함량 및 아세틸콜린에스터라제의 활성을 확인한 결과, 황련해독탕 전탕액 경구 투여한 군과 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군에서 scopolamine만 단독 투여한 대조군에 비해 아세틸콜린의 함량은 증가하였으며, 아세틸콜린에스터라제의

활성이 억제되었다.

4. BDNF의 상위 전사 인자로 알려진 CREB의 단백질 발현은 scopolamine 단독 투여한 대조군에서 감소하였으나, 황련해독탕 전탕액 경구 투여한 군은 CREB 단백질 발현이 증가하였으나 유의성은 없었으며, 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군은 단백질 발현이 유의적으로 증가하였다.

5. 신경 영양 인자인 BDNF의 단백질 발현은 scopolamine 단독 투여한 대조군에서 감소하였으나, 황련해독탕 전탕액 경구 투여한 군은 BDNF 단백질 발현이 증가하였으나 유의성은 없었으며, 천주(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군은 단백질 발현이 유의적으로 증가하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 동물 행동 실험에서 황련해독탕 전탕액을 경구 투여한 군과 천주혈(BL10) 황련해독탕 약침 시술한 군은 유의성 있는 인지 및 기억 능력의 향상을 보였으며, 이는 황련해독탕 전탕액 경구 투여와 천주혈(BL10) 황련해독탕 약침시술이 중추 신경계에서 아세틸콜린의 함량 및 아세틸콜린에스터라제의 활성 조절에 영향을 주고, 신경 영양 인자인 BDNF와 상위 전사 인자인 CREB의 단백질 발현에 관여하는 결과로 사료된다. 다만 황련해독탕 전탕액 경구 투여와 천주혈(BL10) 황련해독탕 약침시술이 모두 인지 및 기억 개선에 효과가 있었으나, 통계적 유의성과 연관 지어볼 때 황련해독탕 전탕액 경구 투여보다 천주혈(BL10) 황련해독탕 약침시술이 인지 및 기억 개선에 더 효과적일 것으로 사료된다.

Acknowledgement

None.

Funding

None.

Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

References

1. Hwang UW, Kim JH. *Oriental Neuropsychiatry*. 1st ed. Pusan : Modern medicine publisher. 1987 : 267, 269-71.
2. Lee GW. *Textbook of Neurology*. 2nd ed. Seoul : Panmumeducation. 2014 : 26, 567, 573, 575-6, 583-4, 657.
3. Jang HJ, Sung WY, Lee SH, Son JH, Han SH, Jung HC. A study of Gongjin-dan in patients with mild dementia of Alzheimer type. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2004 ; 15(2.) : 141-8.
4. Lee HM, Kim JH, Yang SB, Lee HJ, Cho SY, Park SU, et al. A Case Report of Alcohol-Related Dementia Treated with Korean Medicine, Including Gwibi-Tang-Gami. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2016 ; 37(4) : 678-84.
5. Park K, Kim HJ, Son JY, Kwak MA, Kim SM, Kim D, et al. Case of Vascular Dementia Treated with Bojungikki-tang-gamibang. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2008 ; 22(4) : 943-7.
6. Shine YJ, Choi YG, Jang WS. The Effect of Moxibustion Therapy on Dementia Patients: Evaluated by K-BNT. *The Journal of East-West Medicines*. 2011 ; 36(2) : 51-61.
7. Park WS, Lee TY, Kim SY, Lee KG, Yuk SW, Lee CH, et al. The Immediate Effect of Electroacupuncture at the B62 (Shinmaek) K 6 (Chohae) on the EEG of Vascular Dementia. *THE ACUPUNCTURE*. 2001 ; 18(2) : 67-78.
8. Yoon YG. *Herbal Formula & Explanation of Prescription*. 1st ed. Seoul : Euisungdang. 2004 : 759-60.
9. An JH, Choi EY, Lee SH, Park IS, Lim SW. Effects of Hwangryunhaedok-tang on DSS-induced Colitis. *Korea Journal of Oriental Medicine*. 2006 ; 27(2) : 182-95.
10. Son MJ, Jeong YM, Kim YH, Lee DH, Kim SH. Therapeutic effect of the traditional herbal formula, Hwangryunhaedok-tang, on rhinitis : A Review of the experimental study. *The Journal of Korean Oriental Ophthalmology & Otorhinolaryngology & Dermatology*. 2017 ; 30(1) : 74-86.
11. Sung HK, Min SY, Kim JH. The Effect of Hwangryunhaedok-tang on Proliferations of Various Human Cancer Cells. *The Journal of Pediatrics of Korean Medicine*. 2013 ; 27(1) : 59-68.
12. Kim IS, Seo JJ, Kim KG, Ha DR, Shin MK, Kim E, et al. Antimicrobial Activity of Hwangryunhaedok-tang Extract against Keratitis. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2014 ; 35(3) : 288-97.
13. Korean Pharmacopuncture Institute Academic Committee. *Pharmacopunctureology*. 1st ed. Seoul : Elsevier Korea L.L.C.. 2008 : 72, 155-6, 166.
14. Kim YJ, Kim TR, Woo CH, Shin BC. Comparative Effectiveness of Hwangryunhaedok-tang Pharmacopuncture, Essential Bee Venom Pharmacopuncture and Jungsongouhyul Pharmacopuncture for Cervical Pain caused by Traffic Accidents: A Retrospective Observational Study. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 2018 ; 28(2) : 83-9.
15. Je JT, Lee SK. The Clinical pilot study of Hwangryunhaedok-tang Pharmacopuncture therapy on Post-stroke depression. *Journal of Pharmacopuncture*. 2010 ; 13(2) : 67-73.
16. Hong CH. Two cases of seborrheic dermatitis treated by Hwangryunhaedok-tang pharmacopuncture therapy. *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology*. 2012 ; 25(2) : 68-75.
17. Cho JY, Kim YJ, Kim EJ, Lee SD, Kim KS. The Effects of Hwangryunhaedok-tang Pharmacopuncture by the Anti-inflammatory Action of Suppression of iNOS Production on Mice with Allergic Rhinitis. *The Acupuncture*. 2012 ; 29(1) : 89-101.
18. Lee SR. *Acupointology*. 1st ed. Seoul : Cheong-Hong. 2007 : 387.
19. Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. *The acupuncture and moxibustion (I)*. Paju: Jipmoondang; 2000 : 474-5.
20. Dale P, George JA, David F, William CH, Anthony-Samuel LM, Leonard EW. *Neuroscience*. 1st ed. Seoul : World Science. 2014 : 111-2, 158, 532-7, 715.
21. Korean Neuropsychiatric Association. *Neuropsychiatry*. 2nd ed. Seoul : Hanauihagsa. 1998 : 211-3.
22. Shin JY. *Explanation of Bangyakhappyeon*. 1st ed. Seoul : Sungbosa. 2000 : 215.
23. Lee BB, Chung JY, Kim SY, Kim HC, Kwon YJ, Hahm DH, et al. Neuroprotective effect of Kupunggibodan, Gamisamul-tang and Hwangryunhaedok-tang on the ischemia-induced learning and memory deficits by MCAO in the rats. *Korean Journal of Acupuncture*. 2002 ; 19(2) : 63-78.

24. Kong MJ, Ha NN, Lee HY, Kim YT, Rho SJ, Kim HC. Effect of Hwangryunhaedok-tang and its modified prescription on the recovery of spatial cognitive function in the brain ischemia induced by four-vessel occlusion in rats. *The Korea Journal of Herbology*. 2004 ; 19(4) : 161-8.
25. Kim YS, Kim CH, Kim YS, Kim NJ. Experimental studies on the safety of hwangryunhaedok-tang extract solution for herbopuncture. *The Journal of Korean Medicine*. 1999 ; 20(2) : 54-62.
26. Jang HH, Lee DY, Lee SH, Kang HW, Lyu YS. Clinical studies on Hwangryunhaedok-tang herbal acupuncture therapy on headache. *Journal of Pharmacopuncture*. 2003 ; 6(1) : 52-60.
27. Lee JH, Yang TJ, Kim SU, Jeong JY, Ma YH, Oh JS, et al. Efficacy between Hwangryunhaedok-tang Pharmacopuncture Therapy and Hominis Placenta Pharmacopuncture Therapy on Peripheral Facial Paralysis : Retrospective Comparision Study. *Korean Journal of Acupuncture*. 2015 ; 32(4) : 199-207.
28. Jacqueline F, Adrian W. *Medical Acupuncture*. 1st ed. Seoul : KCA Press. 2001 : 436.
29. Ahn YK. *Collection of Acupuncture*. 1st ed. Seoul : Sungbosa. 2002 : 336.
30. Zhu GX, Yue H, Chen HD. Therapeutic effect of spurting Tianzhu acupoint on cervical vertigo. *Chinese Acupuncture*. 2003 ; 23(11) : 665-8.
31. Zhu GX. Clinical Observation on 52 Cases of Cervical Migraine Treated with Acupuncture at Tianzhu Point. *Journal of Yunnan College of Traditional Chinese Medicine*. 1999 ; 22(1) : 49-50.
32. Dong YX, Zhang M, Sun XF. Effect of acupuncture at Fengchi and Tianzhu on vertebrobasilar insufficiency. *Chinese Acupuncture*. 2005 ; 25(12) : 841-3.
33. Seo HJ, Kang AH, Han DG, Sung JY, Oh JH, Lee YR, et al. A Case Report of a Sporadic Spinocerebellar Ataxia Patient with Herniated Intervertebral Lumbar Discs Treated with Traditional Korean Medicine. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2018 ; 39(5) : 994-1003.
34. Han DY, Park NE, Kim SH, Jeong DK. The Effect of Oral Administration of Herbal Medicines on Memory in Alzheimer's Disease Animal Models: A Review of Animal Study Reports Published in Korea. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2017 ; 28(4) : 360-71.
35. Jo YK, Lee TH. Anti-stress effects of Sihoueokgantang in the passive avoidance test and the forced swimming test. *Herbal Formula Science*. 2007 ; 15(2) : 147-60.
36. Wang SB, Ahn EM, Jung JW. The fruits of *Crataegus pinnatifida* Bunge ameliorates learning and memory impairments induced by scopolamine. *The Korea Journal of Herbology*. 2009 ; 24(4) : 165-71.
37. Kim KH. *Lee Woo Joo's Pharmacology Lecture*. 4th ed. Seoul : Uihagmunhwasa. 1998 : 180-1.
38. Kim DK, Kim DH, Kim SH, Kim JB, Song KY, Shin YC, et al. *KO-MOON-SA'S MEDICAL DICTIONARY*. 3th ed. Seoul : Komoonasa. 2001 : 2039.