(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0083324
(43) 공개일자 2011년07월20일

(51) Int. Cl.
A61K 31/375 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0003495
(22) 출원일자 2010년01월14일
심사청구일자 2010년01월14일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
김명옥
경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호
박문석
경상남도 진주시 가좌동 900
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

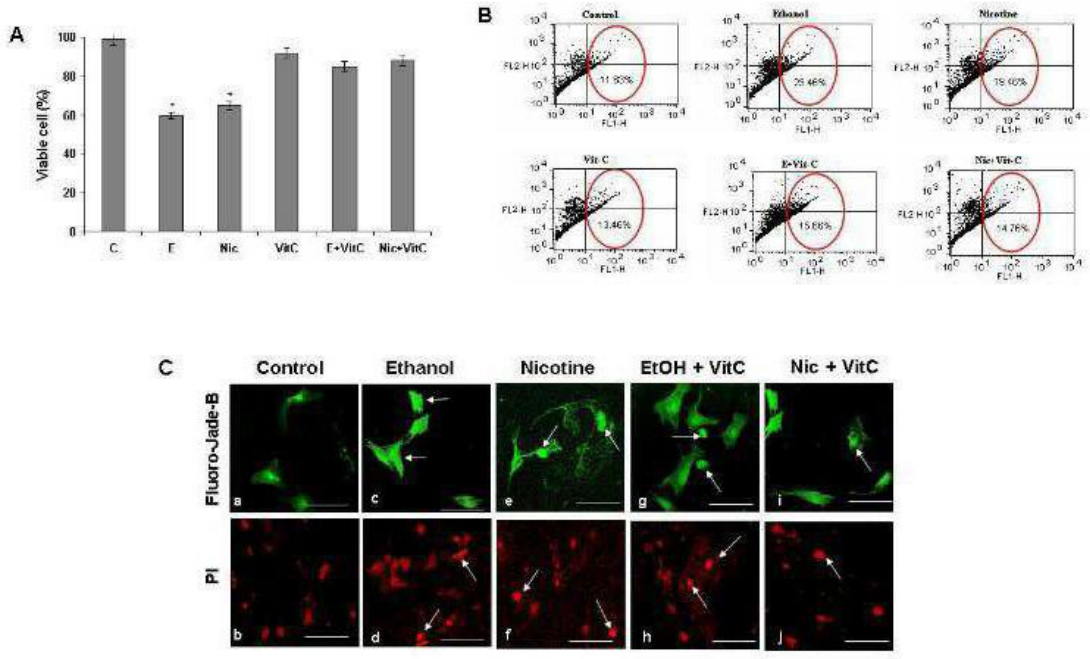
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 비타민 C를 포함하는 태아의 신경세포 보호용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 모체의 알코올 또는 니코틴 섭취에 의한 태아를 신경손상으로부터 보호할 수 있는 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 알코올 또는 니코틴에 노출된 모체 내 태아의 신경세포 손상을 예방 또는 치료하기 위한 비타민 C를 포함하는 조성물 및 상기 조성물을 모체에 투여함으로서 태아의 신경세포를 보호하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(72) 발명자

박태주

경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호

양병철

경기도 수원시 권선구 오목천동 농촌진흥청 축산연구소

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 03-2009-0074

부처명 과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 중견과학자 지원사업

연구과제명 태아 신경장애 동물모델에서 세포간의 신호전달 및 세포사멸 이상 발현 연구 ; siRNA의 응용

기여율

주관기관 경상대학교

연구기간 2009년 03월 01일 ~ 2010년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

비타민 C를 포함하는 알코올 또는 니코틴에 노출된 모체 내 태아의 신경세포 보호용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 모체는 임신 초기 모체인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신경세포 보호는 태아의 알코올 관련 신경발달이상(ARNDS) 질환을 예방 또는 치료함으로써 달성되는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신경세포는 해마 또는 대뇌 피질 내 신경세포인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 비타민 C는 $1x10^6$개 세포 당 0.5mM의 양으로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 알코올 또는 니코틴에 의하여 증가된 $GABA_B$ 수용체의 발현을 감소시키고, 증가된 단백질 키나제 발현을 감소시킴으로써 태아의 해마 또는 대뇌 피질 내 신경세포를 보호하는 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 모체의 알코올 또는 니코틴 섭취에 의한 태아를 신경손상으로부터 보호할 수 있는 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 알코올 또는 니코틴에 노출된 모체내 태아의 신경세포 손상을 예방 또는 치료하기 위한 비타민 C를 포함하는 조성물 및 상기 조성물을 모체에 투여함으로서 태아의 신경세포를 보호하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알코올 및 니코틴은 정신활성물질로 가장 많이 쓰이고 있으며, 알코올 중독은 많은 국가에서 의학적 사회경제적으로 문제시되고 있다. 이러한 에탄올은 신경전달물질 및 신경조절물질의 합성, 방출, 수용체 결합 및 신호를 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다. 뇌 성장 기간 중의 에탄올 노출은 신경이동에서의 결함, 몇몇 뇌 부위에서의 세포감소 및 시냅스 연결과 뉴런 수 결손 등의 역효과를 일으키는 것으로 확인되었다.

[0003] 특히, 태아(임신 초기의 embryo 또는 임신 중기 이후의 fetus)에 있어서 에탄올은, 신경부위 성장 기간 동안 뇌에서 신경의 취약한 부분에 넓은 부위의 구조적 및 기능적 변형에 영향을 미쳐 태아 알코올 증후군(FAS:Fetal Alcohol Syndrom)을 일으킨다. 특히 뉴런은 시냅스형성 기간 동안에 에탄올 유도성 신경퇴화에 좀 더 취약한데, 사람의 경우 이러한 시냅스 형성기간은 임신 3개월 후부터 출생 후 까지 계속되는 것으로 알려져 있으며, 이 시기에 뇌가 급격히 성장한다.

[0004] 그 중 감마 아미노부티르산 B1 수용체(Gamma-aminobutyric acid B1 receptor, 이하 "$GABA_{B1}R$")는 중추신경계의 성장기 동안 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, $GABA_{B1}R$와 결합된 백일해 독성-민감성 G-단백질(G_i)은 아

데닐산 사이클라제(adenylate cyclase)를 저해할 수 있고, 그 결과 cAMP 농도 및 단백질 키나제 A(PKA)-α 활성을 감소시킬 수 있다. 단백질 키나제 A 활성의 감소는 $GABA_B$ 수용체 활성에 대한 반응으로 GABA 분비를 저해하는 원인이 되는 것으로 여겨졌으며, GABA 분비의 억제를 매개하는 $GABA_B$ 수용체는 단백질 키나제 A, 단백질 키나제 C 또는 두 가지 모두를 통해 매개된다고 알려져 있다. 더욱이 단백질 키나제 A는 뇌에서 급성 및 만성 알콜 섭취에 따른 반응을 조절한다. 또한, 니코틴에 노출된 랫트의 해마에서 확인되는 $GABA_{B1}R$, $GABA_{B2}R$의 발현 변화는 니코틴-매개성 인지 조절의 유도와 관련하여 논의되고 있으며, 급성 에탄올 노출은 태아 랫트의 뇌에서 $GABA_{B1}R$ 발현을 눈에 띄게 감소시킨다.

[0005] 바클로펜은 마우스에서 에탄올 유도 마비를 증가시키거나 랫트에서 에탄올 선호를 감소시키는 선택적 $GABA_B$ 수용체 작동제(agonist)이며, 파클로펜($GABA_BR$ 길항제)은 중독시 $GABA_B$ 수용체의 증가된 활성을 가져옴으로써, 마우스에서 항경련작용 뿐만 아니라 운동활성, 운동 협응력 및 체온조절 능력을 손상시키는 것과 같은 에탄올 중독을 감소시킨다.

[0006] 뇌에는 고농도의 비타민 C가 존재함에도 불구하고 성장기간 동안 중추신경계에서 상기 비타민 C의 기능 규명은 아직까지 명확히 규명되지 않고 있다. 비타민 C는 세포 내 항산화제이며 신경조절 인자로서 일부 작용한다고 알려져 있다. 최근, 비타민 C를 포함하는 항산화제 영양소가 신경학적 기능에 중요하다는 사실이 보고되기도 하였다.

[0007] 알코올 의존증은 신경계 2차 메신저 경로의 분자적 및 세포적 변화의 이해를 통하여 두드러진 발전이 이루어졌다. 적어도 하나의 에탄올 작용부위는 cyclic AMP 의존적 신호 전달 경로와 상호작용하는 곳이 존재한다. 이와 같이 $GABA_B$ 수용체 서브유닛은 세포 내 수준에서 에탄올 및 니코틴의 영향을 조절할 수 있다. $GABA_B$ 수용체는 성숙한 랫트의 뇌 해마에서 잘 발현되지만 배양된 뉴런에서의 대뇌피질 및 해마 성장 또는 그들의 특성에 $GABA_{B1}$ 수용체, $GABA_{B2}$ 수용체가 어떤 역할을 하는지는 거의 알려져 있지 않다.

[0008] 이에 본 발명자들은 비타민 C가 태아의 뇌신경 발달 및 보호에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 임신한 랫트의 피질 및 해마영역에서 에탄올, 니코틴, 비타민 C 및 그들의 공동처리 하는 한편, $GABA_{B1}$ 수용체, $GABA_{B2}$ 수용체 및 PKA의 발현 변화를 연구 하였다. 그 결과, $GABA_B$ 수용체 서브유닛 발현에서의 비타민-C의 영향과 에탄올 및 니코틴과 비타민-C 공동처리의 효과는 에탄올 및 니코틴 중독의 약물 치료에서 $GABA_B$ 수용체에 대해 반대역할을 함으로써, 단백질 키나제 발현을 통해 비타민 C(항산화제)가 FAS-관련 뇌손상에 대한 치료적인 접근법이 될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 비타민 C를 포함하는 알코올 또는 니코틴에 노출된 모체 내 태아의 신경세포 보호용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 알코올 또는 니코틴에 노출된 모체에 비타민 C를 투여함으로써 발생 초기 태아의 신경세포를 보호하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 비타민 C를 포함하는 알코올 또는 니코틴에 노출된 모체 내 태아의 신경세포 보호용 조성물에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 용어 "태아"는 포유류의 모체 안에서 자라는 유체를 나타내며, 쥐, 토끼, 말, 소, 양, 개, 고양이 및

원숭이 등이 있으며 상기 예에 의해 본 발명의 태아의 종류가 제한되는 것은 아니다. 바람직하게 본 발명의 태아는 포유류의 태아로서 랫트 또는 인간의 태아일 수 있다. 또한 이러한 태아는 모체의 임신 기간 및 태아의 발달 정도에 따라 임신 초기의 태아인 embryo 또는 임신 중기 이후의 태아인 fetus로 분류될 수 있다. 바람직하게 본 발명의 태아는 신경세포가 발생하고 성장하는 시기의 태아로서, 특히 신경 발생의 초기 단계로 알려진 임신 초기의 태아(embryo)이다. 더욱 바람직하게 본 발명의 태아는 임신 초기에 해당하는 임신 2개월 이후의 인간 태아이며, 더욱 바람직하게는 임신 2개월 내지 8개월의 인간 태아, 보다 바람직하게는 임신 3개월 내지 5개월, 가장 바람직하게는 임신 3개월째의 태아이다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 상기 임신 초기 기간에 대응하는 임신 17.5일 랫트에 있어서의 비타민 C의 효과를 확인하였다.

[0013] 본 발명에서 용어 "신경세포"는 근육을 포함한 타 세포의 작용을 조절하는 세포로서, 일반적 세포와 달리 전기적 방법으로 신호를 전달하며 발생 단계가 끝난 후에는 더 이상 분열하지 않는 세포이다. 이처럼 신경세포는 분열 횟수의 제한에 의해 손상시 복구가 거의 불가능하며, 따라서 발생시 정상적으로 분열이 완료되어 정상기능을 수행할 수 있게 하는 것이 무엇보다 중요하다. 바람직하게 본 발명의 조성물을 이용한 신경세포 보호 효과는 신경세포가 존재하는 위치나 크기에 관계없이 모든 신경세포를 보호할 수 있으며, 더욱 바람직하게 신경세포는 태아 뇌의 해마 영역 또는 대뇌 피질 영역에 존재하는 신경세포 일 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 임신 17.5일의 스프레그-돌리 랫트를 희생시키고, 양막으로부터 제거 분리한 랫트 태아의 뇌를 해마와 피질에 있어서의 신경세포 보호 효과를 확인하였다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 용어 "에탄올"이란 탄소 2개의 에탄(ethan)에서 수소 원자 하나가 하이드록시기 (-OH)로 치환된 알코올의 한 종류로서 에틸알코올(ethyl alcohol)이라고도 한다. 무색의 가연성 화합물로서 용매, 소독제, 연료 등으로 많이 사용되며, 신경계와 관련하여서는 에탄올을 섭취할 경우 대뇌 기능 억제로 인해 흥분 상태가 되고, 이후 중추신경 억제의 효과가 나타난다. 에탄올이 함유된 알코올성 음료를 지나치게 자주 마시면 습관성이 생기고 중독에 이르게 된다. 이러한 에탄올은 예방 가능한 선천성 장애(Preventable cause of birth defects), 정신 지체(mental retardation) 및 신경 발달 장애(neurodevelopmental disorders)를 일으키는 주요 요인 중 하나로서, 임산부의 에탄올 섭취는 장기 인지(long-term cognitive), 신경 행동 장애(neurobehavioral disruption), 성장 결핍(growth deficits), 및 간질(epilepsy)을 나타내는 중추 신경 시스템(Central nervous system)의 발달에 손상을 일으킨다. 본 발명에서는 이러한 에탄올을 섭취한 모체에 손상이 효과적으로 억제됨을 최초로 확인하였다.

[0015] 본 발명에서 사용되는 용어 "니코틴" 이란 유기 화합물로서 담배의 주된 알칼로이드이다. 니코틴은 유리상태에서 산소를 포함하지 않는 소수의 액상 알칼로이드의 일종으로, 무색이며 맹독성이 있다. 니코틴은 신경전달물질과 거의 유사하기 때문에 뇌의 다양한 기능에 영향을 주며 중독(의존증)을 일으키게 된다. 니코틴은 지적기능과 관련되어 있는 신경전달물질인 아세틸콜린과 수용체를 공유하고 있어 태아 때 어머니의 흡연에 의해 그 수용체가 손상을 받으면 아세틸콜린이 분비되어도 수용체와 결합을 하지 못하게 되어 청각능력에 손상을 가져온다. 본 발명의 조성물은 이러한 니코틴을 섭취한 모체에 의해 발생될 수 있는 모체내 태아의 신경 손상을 효과적으로 억제함을 최초로 확인하였다.

[0016] 본 발명의 용어 "$GABA_B$수용체"란 신경세포에서 발견되는 수용체중 하나로서, GABA 수용체는 리간드 의존성 이온채널을 개방함으로써 즉각적으로 Cl-가 유입됨으로서 신경세포를 과분극(억제) 시키는 것으로 알려져 있다. $GABA_B$수용체는 G-단백질과 연결된 구조로 세포막의 이온채널인 K채널을 활성화 시키며, 비간접적 억제성을 지닌다. $GABA_{B1}$수용체란, GABA 수용체의 소단위체를 구성하는 하나의 구성 요소로서, GABA 수용체는 $GABA_A$ 및 $GABA_B$ 서브타입(subtype)으로 나누어진다. 또한 $GABA_B$는 $GABA_{B1}$ 및 $GABA_B$의 두 소단위체(subunit)로 구성되어 있다. 이전의 연구들은 시냅스 전 $GABA_B$수용체(presynaptic $GABA_B$ Receptor)가 흥분성(excitatory) 및 억제성(inhibitory) 신경전달물질 모두의 분비를 조절하는 것으로 보고하고 있다. 본 발명에서는 비타민 C를 포함하는 조성물을 모체에 투여함으로써 태아의 신경세포 내에서 상기와 같은 $GABA_B$수용체의 발현이 감소함을 확인하였다.

[0017] 본 발명의 용어 "PKA(Protein Kinase A)"란, PKA는 두 개의 조절 및 촉매 서브유닛으로 이루어진 cyclic AMP(cAMP) 의존적 효소로서, cAMP에 의하여 활성화된 PKA가 PK(phosphorylase kinase)를 활성화 시키고, PK가 포스포릴라아제를 활성화 시켜 목적 단백질을 인산화 시키는 기능을 한다. 본 발명에서는 비타민 C를 포함하는 조성물을 모체에 투여함으로써 태아 신경세포 내 PKA의 발현이 감소함을 확인하였다.

[0018] 본 발명의 조성물은 상기와 같이 알코올 또는 니코틴에 의하여 증가된 $GABA_{B1}$ 수용체, $GABA_{B2}$ 수용체 및 PKA의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0019] 구체적으로 본 발명의 실시예에서는, 상기 실시예에서 얻어진 태아의 피질 및 해마세포를 배양하여 에탄올, 니코틴, 비타민 C를 단독처리하는 한편, 다른 실험개체에는 에탄올 및 비타민 C, 니코틴 및 비타민 C를 각각 30분, 1시간 처리하였다. 이후, 비타민 C 공동 처리한 군을 에탄올, 니코틴의 단독 처리군과 비교하여 $GABA_{B1}$ 수용체, $GABA_{B2}$ 수용체 및 PKA 발현이 감소 되었음을 확인하였다(도 1 내지 4).

[0020] 본 발명의 조성물을 이용하는 경우, 모체 내 태아의 신경세포를 보호함으로써 태아의 알코올 또는 니코틴 관련 질환을 예방할 수 있다. 본 발명의 알코올 또는 니코틴 관련 질환은 모체가 상기 물질을 직접 또는 간접적으로 섭취함으로써, 궁극적으로 태아에 상기 알코올 또는 니코틴이 노출되어 유발되는 신경계 질환을 모두 포함한다. 이러한 질환의 예로 FAS-관련 뇌손상 질환(모체의 알코올 섭취에 의해 태아에게 정신지체, 소뇌증, 저체중, 짧은 안검열 등의 증상을 나타내는 태아 질환)또는 알코올 관련 신경발달이상(ARNDS), 태아발육저해, 태아기형, 신생아 돌연사 증후군 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 조성물로 치료 또는 예방 가능한 질환이 제한되는 것은 아니다. 바람직하게 본 발명의 조성물은 태아의 $GABA_{B1}$ 수용체 및 PKA 발현을 감소시킴으로써, ARNDS 또는 FAS 관련 뇌손상을 예방 및 치료할 수 있다. 구체적으로 본 발명의 실시예에서는, 해마와 피질 세포에 에탄올 및 니코틴을 비타민 C와 함께 처리하고, 배양한 후, OD 값을 측정한 결과, 대조군과 비교하여 세포 생존률이 유의하게 증가함을 확인하였다(도 5A). 또한, 니코틴 및 에탄올을 비타민 C와 함께 처리하는 경우 미토콘드리아막 전위 회복에 긍정적 영향을 미침을 관찰할 수 있었으며, fluoro-jade-B 와 PI 염색을 이용한 신경퇴화 유도 실험에서도 비타민 C가 에탄올 및 니코틴의 작용을 상쇄하는 결과를 보였다(도 5B 및 도 5C).

[0021] 본 발명의 비타민 C를 포함하는 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체로, 경구 투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우 정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 한약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화 할 수 있다. 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시 벤조에이트, 프로필 하이드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 또한 본 발명의 조성물의 경구, 정맥 내, 피하, 피 내, 비강 내, 복강 내, 근육 내, 경피 등 다양한 방식을 이용하여 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 바람직하게 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 또한 조성물의 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 연령 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성 성분인 약물의 종류에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있으므로, 상기 투여량에 의해 본 발명이 범위가 한정되는 것은 아니다. 바람직하게 본 발명의 조성물은 $1X10^6$개의 세포당 0.1내지 1mM로 투여될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 0.3 내지 0.7mM, 보다 바람직하게는 0.4 내지 0.6mM, 가장 바람직하게는 $1X10^6$개의 세포당 0.05mM로 투여될 수 있다.

[0023] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 알코올 또는 니코틴에 노출된 모체에 비타민 C를 투여함으로써 발생 초기 태아의 신경 세포를 보호하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게 본 발명의 조성물을 임신 초기 모체에 투여하는 경우, 니코틴에 의한 신경세포 발달의 억제 또는 손상을 경감시키거나 차단함으로써 태아의 신경 세포를 보호할 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 조성물을 이용하는 경우, 모체의 니코틴 또는 알코올 섭취에 의해 뇌 관련 질환이 예상되는 태아에 있어서 신경보호 효과를 나타냄으로써, 태아의 뇌질환 및 뇌 관련 기형 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1A는 피질에서 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 비타민 c를 장, 단기간 처리하였을 때 $GABA_{B1}R$, $GABA_{B2}$ 리셉터 서브유닛 단백질 발현에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸다. 도 1B에서 밀도값은 $GABA_{B1}R$, $GABA_{B2}$ 리셉터의 상응 단백질의 ±SEM (n=4)의 의미로 표현된다. Y축에서의 밀도값은 임의단위(AU)로 표시된다. 액틴이 로딩 대조군으로 사용되었다. 래인 1, 대조군(C), 래인 2, 에탄올(E), 100mM 30분, 래인 3, 니코틴(Nic) 50 μM 30분, 래인 4, 바클로펜(B) 50 μM 30분, 래인 5, 파클로펜(P) 100 μM 30분, 래인 6, 에탄올, 1시간, 래인 7, 니코틴 1시간, 래인 8, 바클로펜 1시간, 래인 9, 파클로펜 1시간, 래인 10, 비타민 C 0.5 μM 1시간, 래인 11, 에탄올과 비타민 C(E+vitC) 1 시간, 래인 12, 니코틴과 비타민 C(Nic+vitC) 1시간. 대조군과 비교시 *P<0.05, *P<0.01.

도 2A는 해마에서 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 비타민 c를 장, 단기간 처리하였을 때 $GABA_{B1}R$, $GABA_{B2}$ 리셉터 서브유닛 단백질 발현에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸다. 도 2B에서 밀도값은 $GABA_{B1}R$, $GABA_{B2}$ 리셉터의 상응 단백질의 ±SEM (n=4)의 의미로 표현된다. Y축에서의 밀도값은 임의단위(AU)로 표시된다. 액틴이 로딩 대조군으로 사용되었다. 래인 1, 대조군(C), 래인 2, 에탄올(E), 100mM 30분, 래인 3, 니코틴(Nic) 50 μM 30분, 래인 4, 바클로펜(B) 50 μM 30분, 래인 5, 파클로펜(P) 100 μM 30분, 래인 6, 에탄올, 1시간, 래인 7, 니코틴 1시간, 래인 8, 바클로펜 1시간, 래인 9, 파클로펜 1시간, 래인 10, 비타민 C 0.5 μM 1시간, 래인 11, 에탄올과 비타민 C(E+vitC) 1 시간, 래인 12, 니코틴과 비타민 C(Nic+vitC) 1시간. 대조군과 비교시 *P<0.05, *P<0.01.

도 3A는 피질에서 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 비타민 c를 장, 단기간 처리하였을 때 단백질 키나제-α 단백질 발현에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸다. 자세한 순서는 실시예에서 언급하였다. 도 3B에서 밀도값은 단백질 키나제-α 의 상응 단백질의 ±SEM (n=4)의 의미로 표현된다. Y축에서의 밀도값은 임의단위(AU)로 표시된다. 액틴이 로딩 대조군으로 사용되었다. 래인 1, 대조군(C), 래인 2, 에탄올(E), 100mM 30분, 래인 3, 니코틴(Nic) 50 μM 30분, 래인 4, 바클로펜(B) 50 μM 30분, 래인 5, 에탄올, 1시간, 래인 6, 니코틴 1시간, 래인 7, 바클로펜 1시간, 래인 8, 파클로펜 1시간, 래인 9, 비타민 C 0.5 μM 1시간, 래인 10, 에탄올과 비타민 C(E+vitC) 1 시간, 래인 11, 니코틴과 비타민 C(Nic+vitC) 1시간. 대조군과 비교시 *P<0.05, *P<0.01.

도 4A는 해마에서 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 비타민 c를 30분, 한시간 처리하였을 때 단백질 키나제-α 단백질 발현에 대한 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸다. 자세한 순서는 실시예에서 언급하였다. 도 4B 에서 밀도값은 단백질 키나제-α의 상응 단백질의 ±SEM (n=4)의 의미로 표현된다. Y축에서의 밀도값은 임의단위(AU)로 표시된다. 액틴이 로딩 대조군으로 사용되었다. 래인 1, 대조군(C), 래인 2, 에탄올(E), 100mM 30분, 래인 3, 니코틴(Nic) 50 μM 30분, 래인 4, 바클로펜(B) 50 μM 30분, 래인 5, 파클로펜(P) 100 μM 30분, 래인 6, 에탄올, 1시간, 래인 7, 니코틴 1시간, 래인 8, 바클로펜 1시간, 래인 9, 파클로펜 1시간, 래인 10, 비타민 C 0.5 μM 1시간, 래인 11, 에탄올과 비타민 C(E+vitC) 1 시간, 래인 12, 니코틴과 비타민 C(Nic+vitC) 1시간. 대조군과 비교시 *P<0.05, *P<0.01.

도 5A는 한 시간 동안 에탄올 및 니코틴 노출에 따른 신경세포 생존력에서의 비타민-C의 역할은 세포 생존력에 영향을 주는 것을 나타낸다(MTT assay로 측정). 각 세로 행은 3개의 독립적인 실험을 의미하며, 각 실험마다 6개의 플래이트가 있다. 자세한 순서는 실시예에서 언급하였다. *P<0.05,는 ANOVA(Tukey Kramer test)의 반복적인 측정에 기본을 두고 있다. 도5B는 에탄올, 니코틴, 비타민-C, 에탄올+비타민-C, 니코틴+비타민-C를 한 시간 처리하였을 때 JC-1 염색에 의한 미토콘드리아 막 전위의 유세포 분석이다. 미토콘드리아 세포막 전위의 소실은

FL1 형광의 증가와 관련되어있다. 낮은 미토콘드리아 막전위(총 셀수의 백분율)를 갖는 세포의 정량은 유세포 분리기에 의하여 검출되는 것과 같은 에탄올, 니코틴, 비타민-C와 다른 결합에 의하여 유도된다. 자세한 순서는 실시예에 언급되어 있다. 결과는 세 개의 독립적인 실험의 ±SEM 의미로 나타난다. 도 5C에서 비타민-C는 피질 신경세포(a-j)에서 신경원성 조직의 사멸을 감소시킨다. 대조군, 에탄올, 니코틴, 에탄올+비타민-C 및 니코틴+비타민-C에서 피질세포의 공촛점 이미지. 피질 세포는 1시간 동안 노출되고 fluoro-Jade-B 및 PI 염색을 이용하여 신경퇴화에 접근할 수 있다(a-j). 자세한 순서는 실시예에서 언급하였다. 스케일 바=fluoro-Jade-B에서는 20㎛, PI 염색에서는 30㎛.

도 6A는 임신기간 17.5일에서의 일차 배양된 피질 신경세포의 $GABA_{B1}R$ (A), $GABA_{B2}R$ (B) 및 $GABA_{B1}R$, $GABA_{B2}R$ 서브유닛과 단백질 키나제-α가 공존하는 것을 면역 형광법으로 나타낸 것이다. 같은 신경원성 세포에서 $GABA_{B1}R$, $GABA_{B2}R$ 서브유닛과 단백질 키나제-α의 공존의 면역 형광법 이미지. 자세한 순서는 실시예에서 언급하였다. 작은 화살표는 핵에서의 위치를 나타내고 큰 화살표는 신경세포의 세포질 및 수지상돌기를 나타낸다. A와 B의 스케일 바= 30㎛. 스케일 바=C는 30㎛, b는 20㎛, c는 10㎛.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0027] **실시예 1. 시약 및 항체의 준비**

[0028] DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), α-MEM, FBS(Fetal bovine serum) 및 다른 세포 배양 시약은 Gibco-BRL(Grand Island, NY)에서 구입하였다. 시토신 β-D-아라비노 퓨라노사이드(Cytosine β-D-Arabino Furanoside), 트리졸 시약(Life Technologies, Rockvilles, MD). 면역반응은 래빗 단클론 IgG $GABA_{B1}$ 및 PKA-α 항체(Cell signaling, Santa Cruz) 또는 래빗-유래 항-랫트 $GABA_{B1}$ 수용체 항체(Abcam Limited, UK)를 사용하여 수행하였다. 세척 후, horseradish 퍼옥시다아제와 염소 항-래빗 및 기니아 피그 IgG (Bio-Rad) 및 항-래빗 IgG-TRITC 및 래빗 항-염소 IgG-FITC 콘쥬게이트(DAKO Cytomation, Denmark)와 결합하였다. 다른 시약은 모두 Sigma chemical에서 구입하였다(St. Louis, MO, USA).

[0029] **실시예 2. 동물처리**

[0030] 암컷 (n=50) 스프래그-돌리 랫트(250g, 경상대, 신경생물학샐험실, 진주, 대한민국)는 온도-통제 환경에서 6시부터 20시까지 사료와 함께 빛이 있는 환경에서 사육하였다. 시간에 맞춰 임신[수정한 날을 임신 0.5일로 봄]. 임신 17.5일 후 임신한 스프래그-돌리를 펜토바르비탈 나트륨(3mg/100g b.w)을 정맥주사 한 후 목을 베어 희생시켰다. 임신 17.5일의 태아를 양막으로 부터 제거 분리시킨 후, 상기 태아의뇌를 해마와 피질로 나누었다.

[0031] **실시예 3. 일차 세포배양 및 약물 처리**

[0032] 임신 17.5일의 스프레그-돌리 랫트의 피질 및 해마로부터 배양이 준비되었다. 용출 된 해마 및 피질 조직은 0.25% 트립신-EDTA로 20분 동안 처리되었고, 동결 칼슘 및 마그네슘-유리 HBSS(Hank's balanced salt solution)(pH 7.4)에서 기계적 연화에 의해 해리되었다. 원심분리에 의하여 펠렛을 모은 후, 세포는 폴리-리신(0.02g/l) 및 챔버 슬러이드로 미리 코팅된 세포 배양판에 놓여졌다.($1X10^6$ cells/ml). 상기 배지는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium), 10% 열-불활성화 우혈청, 1mM 피루브산염, 4.2mM 탄화수소나트륨, 20mM HEPES, 0.3g/l 우혈청 알부민, 50U/ml 페니실린 및 50mg/l 스트렙토마이신으로 구성되었다. 배양은 5% CO_2 및 95% 습도, 37℃의 온도에서 진행되었다. 신경아교(Neuroglia) 세포는 12시간 동안 100μM 시토신 β-D-아라비노 퓨라노사이드(Cytosine β-D-Arabino Furanoside)포함한 배지에 의하여 저해되었다. 3일 후, 피질 및 해마 신경세포는 정상 배지(대조군(C)) 및 에탄올 100mM(E) 포함 배지, 니코틴 50μM(Nic) 포함 배지, 바클로펜 50μM(B) 포함 배지, 파클로펜 100μM(P) 포함 배지, 비타민 C 0.5mM(Vit-C) 포함 배지, 에탄올 100mM 및 비타민 C 0.5mM(E plus vit-C) 포함 배지, 니코틴 50μM 및 비타민 C 0.5 mM(Nic plus vit-C)포함 배지와 같은 다른 군

들로 처리되었다. 모든 약물 처리군은 시험관 내 배양으로 30분 및 1시간 동안 37℃에서 배양하였으며, 이후 세포는 수득한 후 -70℃에 저장하였다.

[0033] **실시예 4. 웨스턴 블랏팅**

[0034] 웨스턴 블랏 분석은 이전 연구에서 실시되었던 방법으로 진행하였다(Naseer et al., 2009). 간단히, 피질 및 해마의 일차 배양 세포로부터 얻은 샘플은 세포 용해액에서 균질화되고 단백질 추출 면역 반응은 래빗 단클론 IgG $GABA_{B1}$, p-CREB 및 PKA-α (1:1000, 24시간, 4℃, Santa Cruz, Cell signaling) 또는 래빗 유래 항-랫트 $GABA_{B1}$ 수용체 항체(1:1000, Abcam Limited, UK)를 이용하여 수행하였다. 세척 후, Horseradish 퍼옥시다제 결합 염소 항-마우스 및 염소 항-래빗 IgG HRP (1:10000, Bio-Rad)를 가하고 실온에서 2시간동안 배양하였다. 단백질은 ECL-감지 시약(Amersham Pharmacia Biotech, 웨스턴 블랏팅 감지 시약)을 사용하여 화학발광에 의해 측정되었다. 웨스턴 블랏은 컴퓨터-기초 Sigma Gel(SPSS Inc. Chicago, USA) 시스템을 사용하여 농도계측기에 의해 분석되었다.

[0035] **실시예 5. MTT 분석**

[0036] [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) 실험은 에탄올과 니코틴 노출에 따른 피질 및 해마에 미치는 에탄올과 니코틴의 독성을 측정하기 위하여 사용되었다. 모은 세포는 96 웰 플래이트에서 배양하고 에탄올, 니코틴, 비타민 C, 에탄올 및 비타민 C, 니코틴 및 비타민 C로 처리하였다. MTT(Sigma, St. Louis, MO)는 HBSS에서 최종 농도가 5mg/mL이 되도록 용해되었으며, 신선한 상태에서 바로 사용하거나 -20℃에서 보관하였다. MTT 용액 10μ는 6 채널 피펫을 사용하여 최종 MTT 농도가 0.5mg/mL이 되도록 각 웰에 가하였으며 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 유기용제에 용해된 포르마잔(Formazan)은 가해지고 10~20분 동안 교반하였다. 플레이트는 마이크로 플레이트 리더 분광 편광기로 550~570 nm(L1) 및 620~650 nm(L2)에서 스캐닝하여 값을 측정하였다:620~650 nm 흡광도 결과는 셀 부유물 및 웰 결함이 측정된 것이다. 최종 OD(Optical Density)는 OD=L1-L2의 식을 이용하여 얻고 이는 세포 생존률을 계산에 사용되었으며 (처리 웰의 흡광도/ 대조군 웰의 흡광도)X100로 표시하였다.

[0037] **실시예 6. JC-1을 이용한 미토콘드리아 막전위 측정**

[0038] 미토콘드리아 막전위를 측정은 제조사의 프로토콜에 따라 JC-1 미토콘드리아 막전위 검출 키트(Biotium Inc., Hayward, CA, USA)를 사용하여 관찰하였다. JC-1은 미토콘드리아 막 전위에 따라 녹색 또는 붉은색 형광을 방출한다: 녹색 신호는 탈분극한 미토콘드리아를, 붉은 신호는 분극 미토콘드리아를 나타낸다(Reers et al., 1991). 이와 같이 붉은 색에서 녹색으로의 형광 변화는 미토콘드리아 막전위의 감소를 나타낸다. 간단하게, 신경세포는 폴리-리신(0.02g/l) 및 챔버 슬러이드로 미리 코팅된 세포 배양판에 놓여졌다.($1X10^6$ cells/ml). 상기 배지는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium), 10% 열-불활성화 우혈청, 1mM 피루브산염, 4.2mM 탄화수소나트륨, 20mM HEPES, 0.3g/l 우혈청 알부민, 50U/ml 페니실린 및 50mg/l 스트렙토마이신으로 구성되었다. 배양은 5% CO_2 및 95% 습도, 37℃의 온도에서 진행되었다. 신경아교(Neuroglia) 세포는 12시간 동안 100μM 시토신 β-D-아라비노 퓨라노사이드(Cytosine β-D-Arabino Furanoside)포함한 배지에 의하여 저해되었다. 3일 후, 피질 및 해마 신경세포는 정상 배지(대조군(C)) 및 에탄올 100mM(E) 포함 배지, 니코틴 50μM(Nic) 포함 배지, 바클로펜 50μM(B) 포함 배지, 파클로펜 100μM(P) 포함 배지, 비타민 C 0.5mM(Vit-C) 포함 배지, 에탄올 100mM 및 비타민 C 0.5mM(E plus vit-C) 포함 배지, 니코틴 50μM 및 비타민 C 0.5 mM(Nic plus vit-C)포함 배지와 같은 다른 군들로 처리되었다. 모든 약물 처리군은 시험관 내 배양으로 30분 및 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 3개의 배양 플레이트에서 약물 처리된 세포를 모은 후 JC-1을 사용하여 37℃에서 15분 동안 반응하고 1X assay buffer로 두 번 재 부유 하였다. 미토콘드리아 막전위의 변화는 단세포 수준에서 FACSCalibur 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 의하여 아래 조건 하에서 측정되었다.:FL1, 511 volts; FL2, 389 volt; FL1-10.5% FL2; FL2-25.9% FL1; 488nm 아르곤 전자 레이저 및 585nm 밴드 패스 필터. 총 10,000개의 세포는 CellQuest software, version 3.0(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 의하여 분석되며, 총 세포율과 같은 낮은 미토콘드리아 막전위를 갖는 세포의 정량이 실시되었다.

[0039] **실시예 7. Fluoro-Jade-B 및 프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI) 염색**

[0040] Fluoro-Jade-B 염색은 이전해 실행되었던 방법으로 실시되었다(Schmued and Hopkins, 2000). 간단히, 면역형광법은 시험관 내 폴리-D-라이신 코팅 챔버 슬라이드에서 배양된 임신 17.5일의 1차 피질 세포에서 시행되었다. 세포는 에탄올, 니코틴 에탄올 및 비타민 C, 니코틴 및 비타민 C와 같이 다른 군으로 처리하였다. 모4든 약물 처리 군은 시험관 내 배양으로 37℃에서 한 시간 동안 배양하였다.

[0041] 배양된 세포는 PBS에서 4% 파라포름알데하이드로 5분간 고정되었고 -70℃에서 보관하였다. 다음날 3시간 동안 슬라이드를 외부에서 건조시킨 후 0.06% 과망간산 칼륨 용액에서 10분간 이동시켰다. 물로 세척한 후, 슬라이드는 0.1% 아세트산 및 0.0004% Fluoro-jade-B(Calbiochem, San-Die해, California, USA)에서 20분간 침습시켰다. 슬라이드를 3X 증류수로 세척하고, 55℃에서 10분간 건조하였다. 공촛점 현미경(Fluoview Olympus, Japan)에서 FITC 필터를 사용하여 이미지를 관찰하였다. PI 염색은 이전에 실시되었던 방법에 따라 진행되었다(Fraker et al., 1995; Johson 1995). PI 슬라이드는 실온에서 부드럽게 교반하며 PBS에서 1μg/ml PI 용액에 20분간 담궈두었고 PBS로 10분간 2번 세척하였다. 글래스 커버 슬립은 봉입제로 글래스 커버에 고정되었다. PI 필터는 PI 염색을 검출하는데 사용되었다(붉은색).

[0042] **실시예 8. 면역-형광법**

[0043] 면역형광법은 임신 17.5일에 시험관 내의 폴리-D-리신이 코팅된 챕버 슬라이드 상에서 배양시킨 일차 피질 및 해마 세포 상에서 실시되었다. 배양 세포는 PBS에서 4% 파라포름알데하이드로 5분 동안 고정되었고, 5분간 PBS에서 0.3% Triton X-100에서 투과되었고, PBS로 두 번 세척하였다. 상기 세포는 37℃에서 1시간 동안 PBS에 희석한 10% BSA로 예비 배양되었고, 4℃에서 하룻밤 동안 1차 항체에 노출되었다. 면역반응은 기니아 피그 유래 항-랫트 $GABA_{B1}$, $GABA_2$ 수용체 (1:500, 24시간, 4℃, Chemicon, CA, USA), 래빗 항-랫트 PKA-α (1:500, Santa Cruz, USA)를 이용하여 수행되었으며, 그 다음으로 배양 세포를 세척하고, 2차 항체는 1:100으로 컨쥬게이트된 항-래빗 IgG TRITC 및 FITC, 1:150으로 컨쥬게이트된 항 기니아피그 IgG FITC(DAKO Cytomation Denmark)의 농도에서 적용되었다. 글라스 커버 슬립은 봉입제로 글라스 슬라이드 상에 고정되었다. 이미지에 대하여 본 발명자들은 Zeiss 형광 현미경(Zeiss, Germany) 및 공초점 현미경(Olympus, Japan)을 사용하였다. 사진은 소프트 이미지 시스템 비디오 카메라로 촬영하였다.

[0044] **실시예 9. 데이터 분석 및 통계**

[0045] 웨스턴 블랏에서의 목적밴드는 Sigma Gel 시스템 (SPSS Inc, Chicago, IL) 기반의 컴퓨터를 사용하여 농도계측기에 의하여 스캔되고 분석되었다. 농도는 ±SEM으로 표현된다. Tukey-Kramer 다중-비교 테스트에 따른 일원변량분석은 관련된 실험군 사이의 유의미한 차이를 측정하기 위해서 실시되었다. 모든 경우에서, 통계적 유의미에 대한 수용값은 대조군과 비교하여 p가 0.05보다 작을 때이다.

[0046] **결과**

[0047] **에탄올의 투여에 의한 피질과 해마에서의 $GABA_{B1}$, $GABA_2$ 수용체의 발현 증가 및 비타민 C에 의한 반대효과**

[0048] 단백질 수준의 초기 발달 단계에서 에탄올이 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 서브유닛에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 피질 및 해마에서 얻은 샘플을 웨스턴 블랏을 이용하여 분석하였다. 30분 및 1시간 동안 시험관에서 에탄올 노출시 피질 및 해마신경에서 $GABA_{B1}$, $GABA_2$ 수용체 서브유닛의 발현은 대조군과 비교하여 유의한 증가를 나타내었다(도 1, 2, 래인 2, 6). 또한 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 서브유닛의 발현에서 비타민 C의 영향을 조사하기 위하여 피질 및 해마에 직접 비타민 C, 비타민 C 및 에탄올을 동시에 처리하였다. 해마에서 비타민 C 및 에탄올 공동처리군은 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 서브유닛은 비타민 C 대조군(도 2, 래인 10)과 비교하여 유의한 발현 증가를 보였고, 에탄올 처리군도(도 2, 래인 6)과 비교하여서 거의 변화가 없었다. 반면에 피질 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 에서는 1시간 에탄올 처리군에서 발현감소를 나타내었다(도 1, 래인 6). 본 발명자들의 이전 연구에서는 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수

용체는 뚜렷한 분포 패턴을 보이고 뇌의 여러 부위에서 초기 발달기간동안 잠재적으로 다른 역할을 맡고 있음을 밝혔는데, 이러한 결과를 종합하면 에탄올 처리가 $GABA_B$ 수용체의 발현을 증가시키는 반면, 비타민 C와 에탄올을 동시 처리한 군은 에탄올 단독 처리군과 비교하여 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체의 발현이 감소 됨에 따라 비타민 C가 에탄올의 작용을 반대가 되도록 하는 것을 알 수 있다.

[0049] **바클로펜 및 파클로펜 처리에 대한 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체의 발현**

[0050] 시험관 내에서 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 발현 확인은 신경세포 상에서 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체이 작용제 및 길항제인 바클로펜과 파클로펜을 사용하여 이루어졌다. 대조군 및 바클로펜, 파클로펜 처리군으로부터 세포를 30분, 1시간 배양한 후, 웨스턴블랏을 실시하였다. 대조군과 비교시 바클로펜의 30분, 1시간 처리는 해마와 피질에서 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체의 증가 효과를 나타냈으며 바클로펜의 장기간 노출은 피질에서 $GABA_{B2}$ 수용체가 감소하는 경향을 나타냈다(도 1, 2, 래인 4, 5, 8, 9). 이는 바클로펜과 파클로펜의 처리가 30분과 1시간 처리 시 다른 영향을 나타내는 시간 의존적인 반응을 보이며, $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체에 30분간 처리를 한 환경에서는 눈에 띄는 바클로펜 유도 증가 효과를 보고한 본 발명자의 이전 연구 결과와 같다.

[0051] **피질 및 해마에서 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 서브유닛의 발현시 니코틴의 효과**

[0052] 발달단계 동안 니코틴이 $GABA_{B2}$ 수용체에 미치는 영향을 확인하기 위하여 본 발명자들은 피질 및 해마에서 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 서브유닛의 발현 변화를 조사하였다. 30분 및 1시간 니코틴 처리에 따라 피질 및 해마에서 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 발현 증가를 보였다(도 1, 2, 래인 3). 이는 니코틴이나 담배연기에 대한 만성적인 노출 후 나타나는 랫트 해마에서의 $GABA_{B1}$ 수용체 발현감소와 만성적인 니코틴 주입이 뇌 보상기능의 $GABA_B$ 수용체-매개 조절에서 유의한 변화를 유도한다고 밝혀진 이전 연구와 다른 결과이다. 그러므로 본 결과에서 급성 니코틴 노출은 $GABA_B$ 수용체의 발현을 증가시키는 동시에 만성 또는 장기간 노출에 니코틴에 대해 $GABA_B$ 수용체에 대해 민감하게 작용한다는 연구결과를 제시하였다. 또한, 비타민 C와 니코틴의 동시 처리가 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체의 발현에 미치는 영향 역시 시험하였다. 비타민 C와 니코틴의 동시 처리는 니코틴만 처리한 군과 비교하여 피질 및 해마에서 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체의 발현이 유의하게 감소됨을 보였다(도 1, 2, 래인 7, 11). 이 결과는 비타민 C와 니코틴의 동시 처리가 초기 뇌 발달기간중 니코틴의 해로운 효과를 상쇄하여 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 발현에 중요한 영향을 줄 수 있음을 나타냈다.

[0053] **에탄올에 의한 피질 및 해마 세포에서의 PKA 발현 조절**

[0054] 에탄올의 섭취는 이차 전령 cAMP를 포함한 다양한 다른 세 포내 변화를 설명할 수 있고 더욱이 이는 인산화 변화에 따른 상태를 이끌어낸다. 에탄올 처리시 $GABA_B$ 수용체 활성이 PKA에서 갖는 영향과 단백질 키나제 활성을 위한 $GABA_{B1}$ 수용체의 역할을 조사하기 위하여 웨스턴 블랏을 이용하여 PKA의 단백질 수준을 분석하였다. 대조군과 비교시 에탄올의 처리에 의해 피질 및 해마에서 PKA가 증가됨을 나타내었다(도 3, 래인 2, 5, 도 4, 래인 2). 이 결과는 PKA-α의 양에 에탄올이 미치는 영향이 없다고 발표한 이전 보고 된다. 이어서 바클로펜과 파클로펜은 피질에서 30분, 1시간 처리시 PKA이 현저하게 감소되었으나 해마에서는 30분 처리에서 증가되고 1시간 처리에서는 감소되었다(도 3, 래인 4, 7, 8, 도 4, 래인 4, 5, 8, 9).

[0055] 또한 본 발명자들은 담백질 키나제 발현 수준에서 비타민 C와 에탄올을 동시 처리하는 것에 대한 영향도 연구하였다. 피질 및 해마에서 PKA는 1시간 처리후에 대조군과 비교하여 유의한 감소를 보였으며, 이는 비타민 C가 PKA에서 에탄올의 반대 작용을 한다는 것을 보여준다.

[0056] **피질 및 해마에서 니코틴에 의한 PKA 발현 조절**

[0057] PKA 발현 수준에 대한 니코틴의 생화학적 효과를 확인하기 위하여 피질 및 해아에서 PKA의 발현 변화를 조사하

였다. 니코틴의 30분 및 1시간 노출은 PKA의 유의한 감소를 타나냈다(도 3, 래인 3, 6, 도 4, 래인 3, 7). 또한, PKA 발현에서 비타민 C와 니코틴의 동시 처리 효과를 조사하였다. 1시간 처리시 해마에서는 대조군과 비교하여 PKA의 발현이 감소하였고(도 4, 래인 12), 이는 비타민 C가 니코틴과 동시 또는 단독으로 투여될 때 PKA 발현에 중요한 영향을 갖고 있다는 것을 나타낸다. 그러므로 비타민 C는 PKA 발현을 조절하는 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 서브유닛 조절 역할을 하며 약물 중독을 포함한 에탄올 및 니코틴의 정신약리학적인 영향의 예방을 위한 새로운 접근법을 제시하였다.

[0058] **신경세포에서 비타민 C의 니코틴 및 에탄올 유도 신경퇴화 보호**

[0059] 에탄올과 니코틴의 신경세포 처리는 세포 생존력에 영향을 미친다. 에탄올과 니코틴에 대항하여 세포를 보호하는 비타민 C의 역할은 독성 영향을 조절하는 것이다. 비타민 C를 1시간 동안 처리한 세포를 니코틴과 에탄올을 처리하고 MTT 분석을 이용하여 대조군과 비교한 세포의 생존율과 세포성장을 확인하였다. 에탄올 및 니코틴과 함께 처리된 비타민 C는 1시간 배양 후 대조군과 비교하여 세포 생존력이 눈에 띄게 증가한 결과를 보였다(도 5A). 이처럼 세포생존력이 증가하는 것으로 보아 비타민 C와 에탄올 및 니코틴의 동시 투여시 에탄올 및 니코틴의 작용을 감소시키는 것을 확인하였다. 또한, 에탄올, 니코틴, 비타민 C, 에탄올 및 비타민 C, 니코틴 및 비타민C를 처리한 그룹에서 미토콘드리아의 막 전위는 형광염색자인 JC-1을 이용하여 측정하였다. 미토콘드리아의 JC-1의 흡수는 유세포 분석기에 의하여 확인할 수 있고 어느 부위에서 미토콘드리아의 막 전위가 감소했는지는 FL-1의 형광 증가와 관련이 있다(도 6A). 도 6에서, 신경세포에서 에탄올과 니코틴의 처리는 낮은 미토콘드리아 막전위를 갖는 세포의 눈에 띄는 부분 모집단의 출현이 있는 반면, 비타민 C와 에탄올 및 니코틴의 동시 처리는 니코틴 및 에탄올 단독 처리군과 비교하여 미토콘드리아의 막 전위가 회복됨을 확인하였다(도 5B).

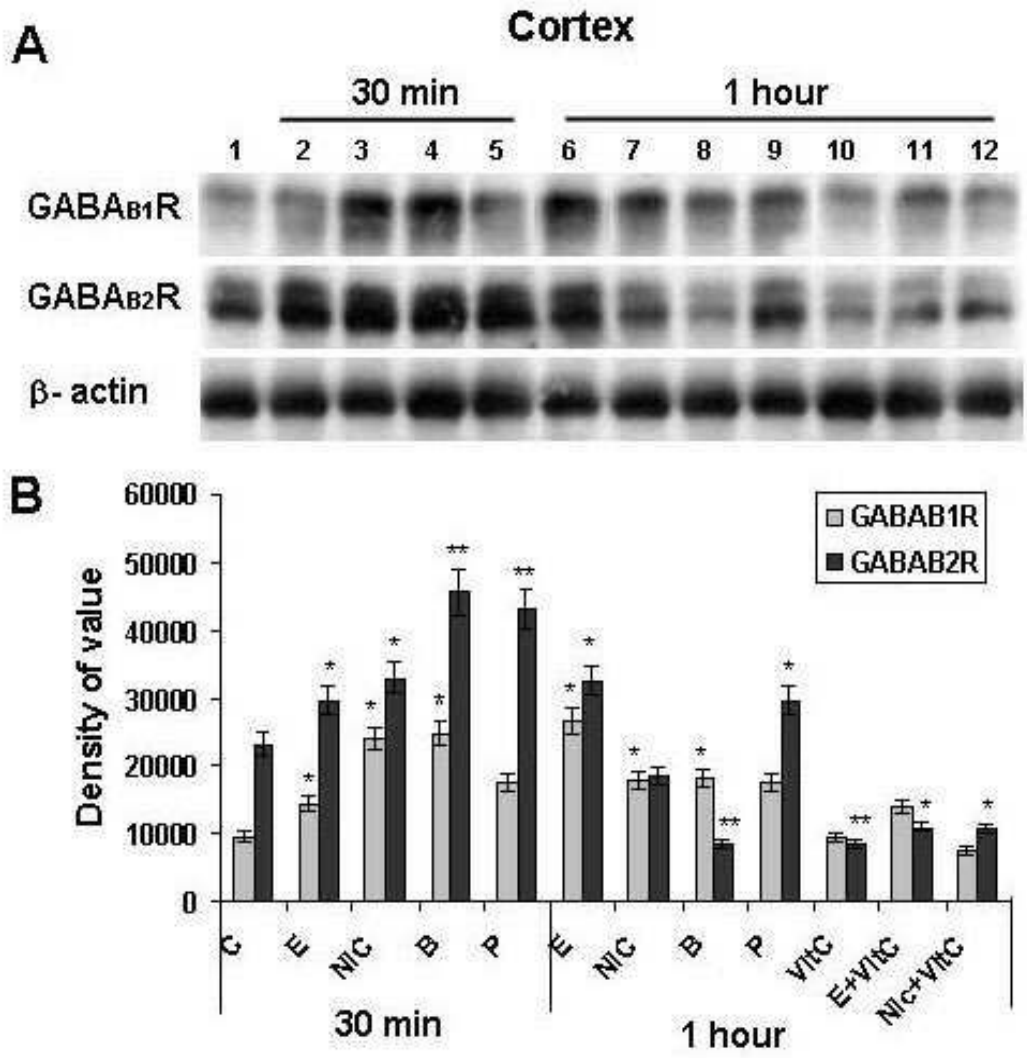
[0060] 에탄올 및 니코틴 처리 후 신경세포에 미치는 비타민 C의 영향을 확인하기 위하여, fluoro-jade-B 및 PI 표지 면역형광법을 실시하였다. Fluoro-jade-B 및 PI 염색은 신경손상에 대한 뛰어난 마커이고, 세포 배양시 에탄올과 니코틴을 처리한 뇌의 신경퇴화 부위를 확인할 수 있었다. 이와는 반대로, 에탄올 및 비타민 C, 니코틴 및 비타민 C를 처리한 세포는 fluoro-jade-B 및 PI 염색의 감소를 보이며, 이는 웨스턴 블랏, MTT 분석 및 유세포 분리기 분석 결과와 일치하였다. 그 결과로 신경퇴화의 유도는 에탄올 및 비타민 C, 니코틴 및 비타민 C 동시 처리를 한 세포와 비교하여 에탄올, 니코틴 단독 처리세포의 경우에서 더 눈에 띄게 높았다(도 5C).

[0061] **초기 신경세포 배양에서 $GABA_B$ 수용체와 PKA의 공존 및 분포**

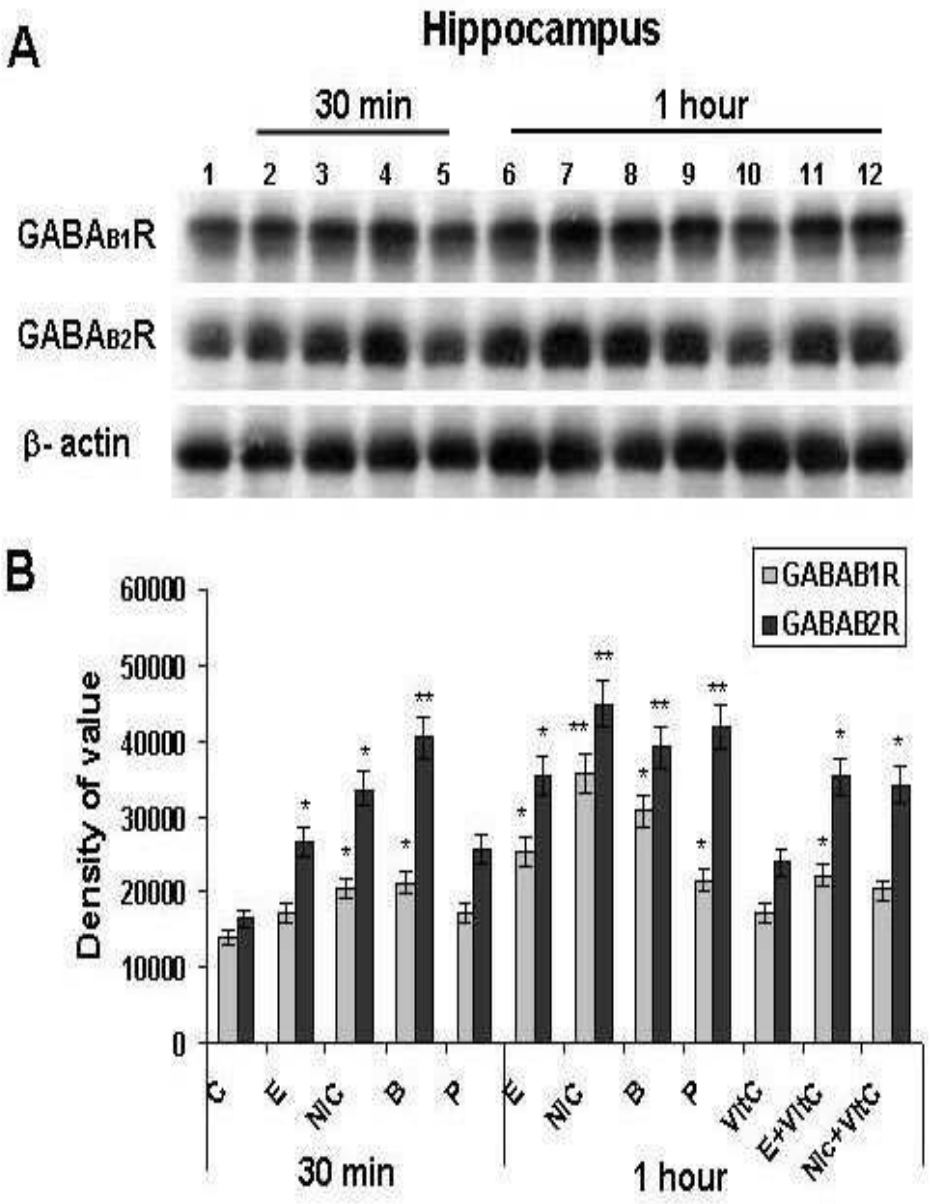
[0062] $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 서브유닛과 PKA 분포 변화를 직접적으로 관찰하기 위하여 본 발명자들은 이중 표지 면역형광법을 실시하였다. 면역형광법 이미지는 대조군과 약물처리 조건 모두에서 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체 서브유닛이 주로 PKA와 함께 위치하는 것으로 나타났다. 또한 $GABA_{B1}$, $GABA_{B2}$ 수용체는 세포질에서 주로 발견되며 핵에서는 적게 발견되지만, PKA는 핵, 수지상돌기, 세포질에 주로 위치하고 있음을 확인하였다.

도면

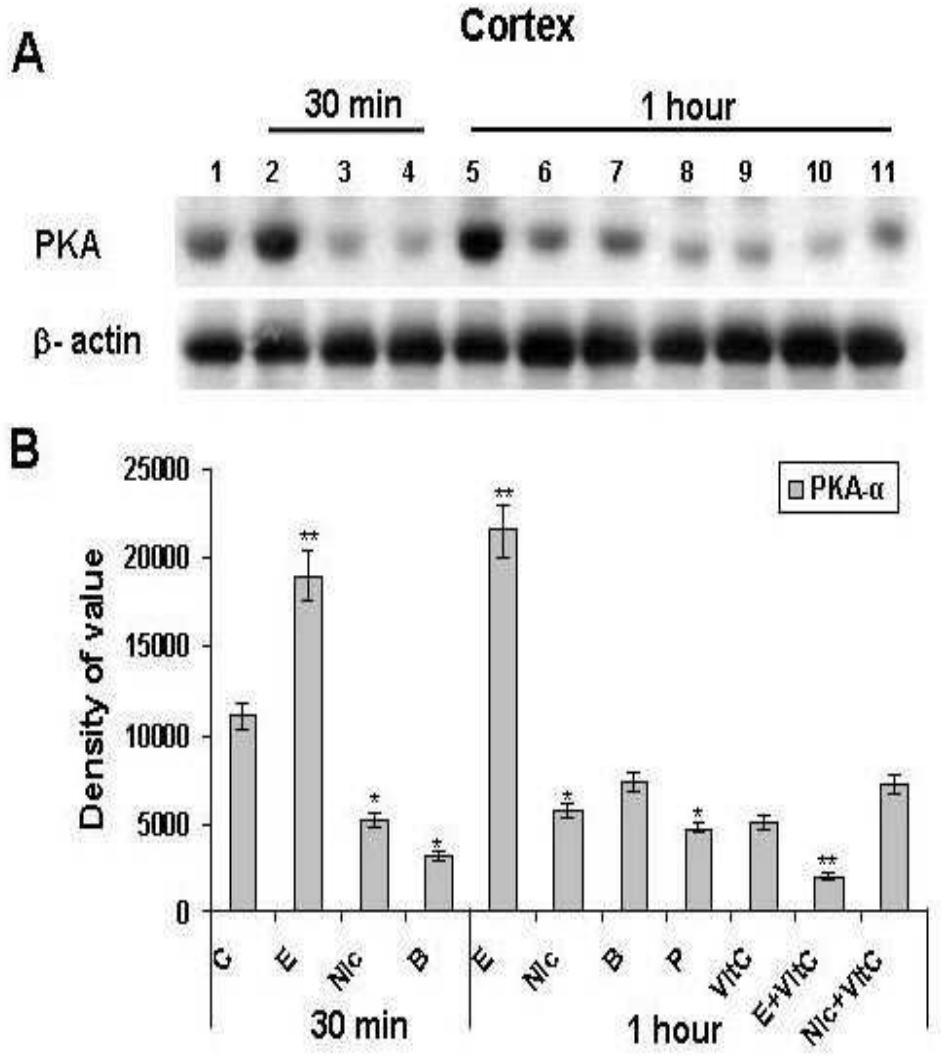
도면1


A
Cortex
30 min
1 hour
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
GABAB1R
GABAB2R
β- actin
B
Density of value
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
GABAB1R
GABAB2R
C E NIC B P E NIC B P VitC E+VitC NIc+VitC
30 min
1 hour

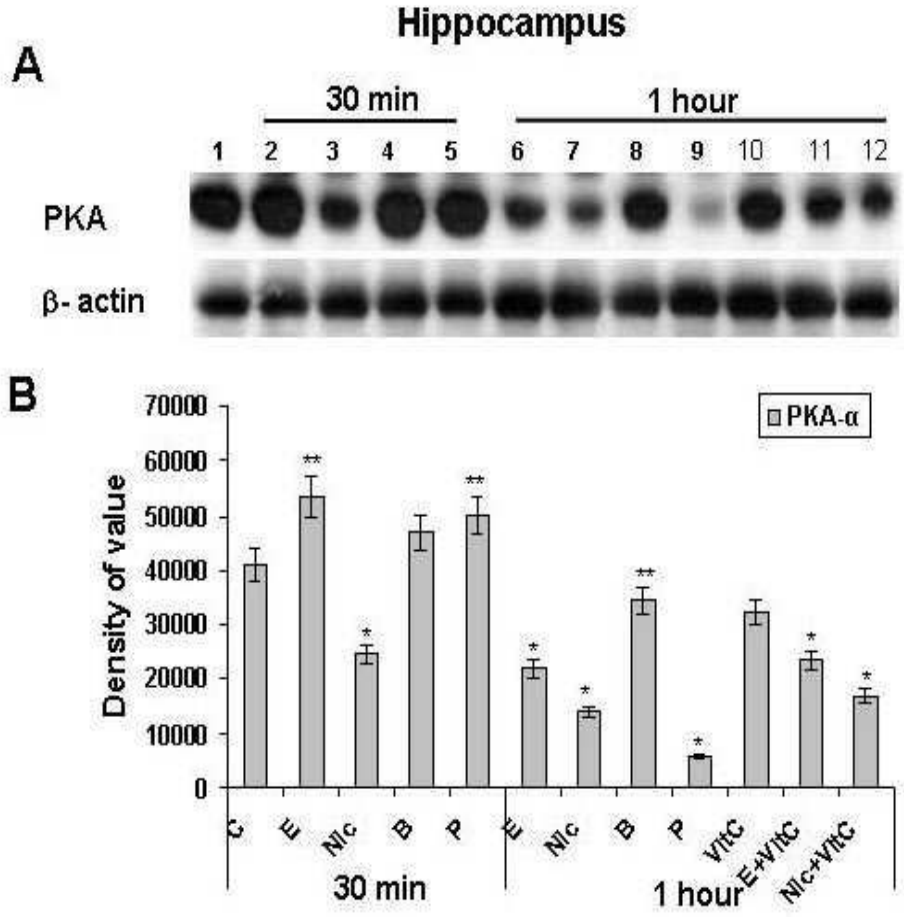
도면2


A
Hippocampus
30 min
1 hour
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
GABAB1R
GABAB2R
β-actin
B
GABAB1R
GABAB2R
Density of value
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
C E N/C B P E N/C B P V/hC E+V/hC N/c+V/hC
30 min
1 hour

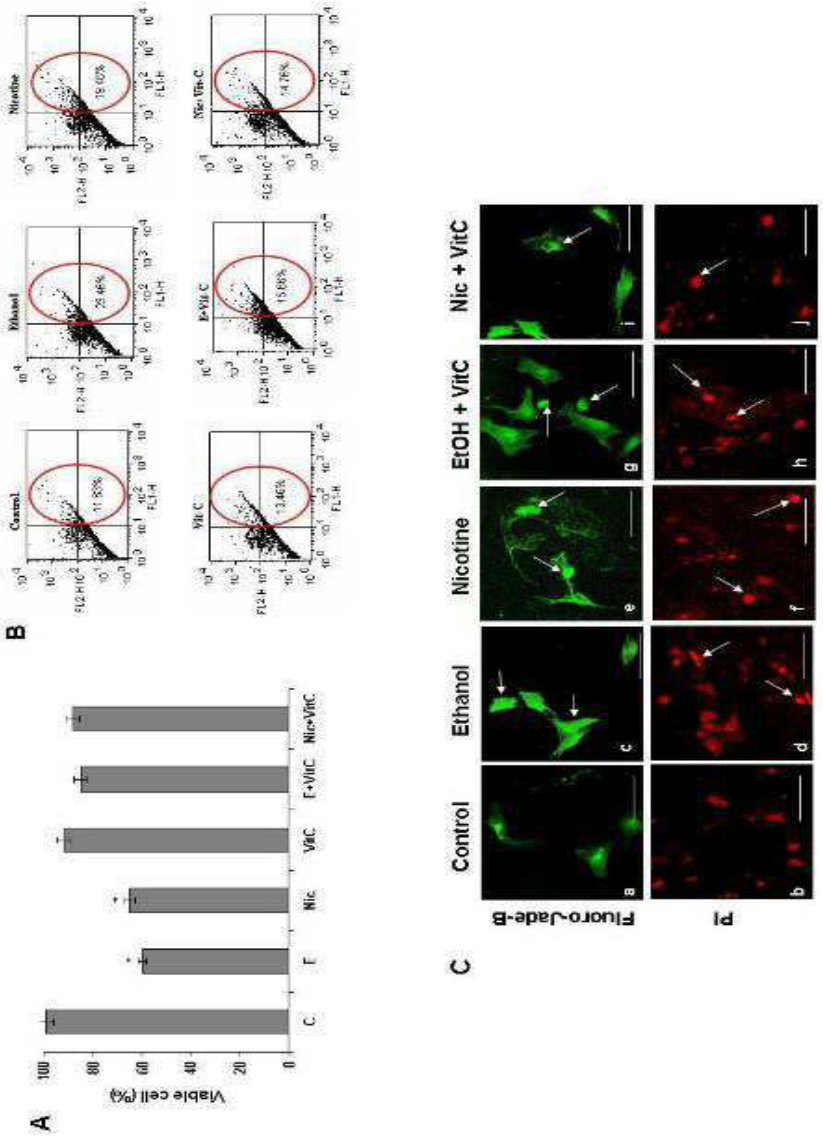
도면3


A
Cortex
30 min
1 hour
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
PKA
β- actin
B
PKA-α
Density of value
25000
20000
15000
10000
5000
0
C E Nic B
30 min
E Nic B P VitC E+VitC Nic+VitC
1 hour

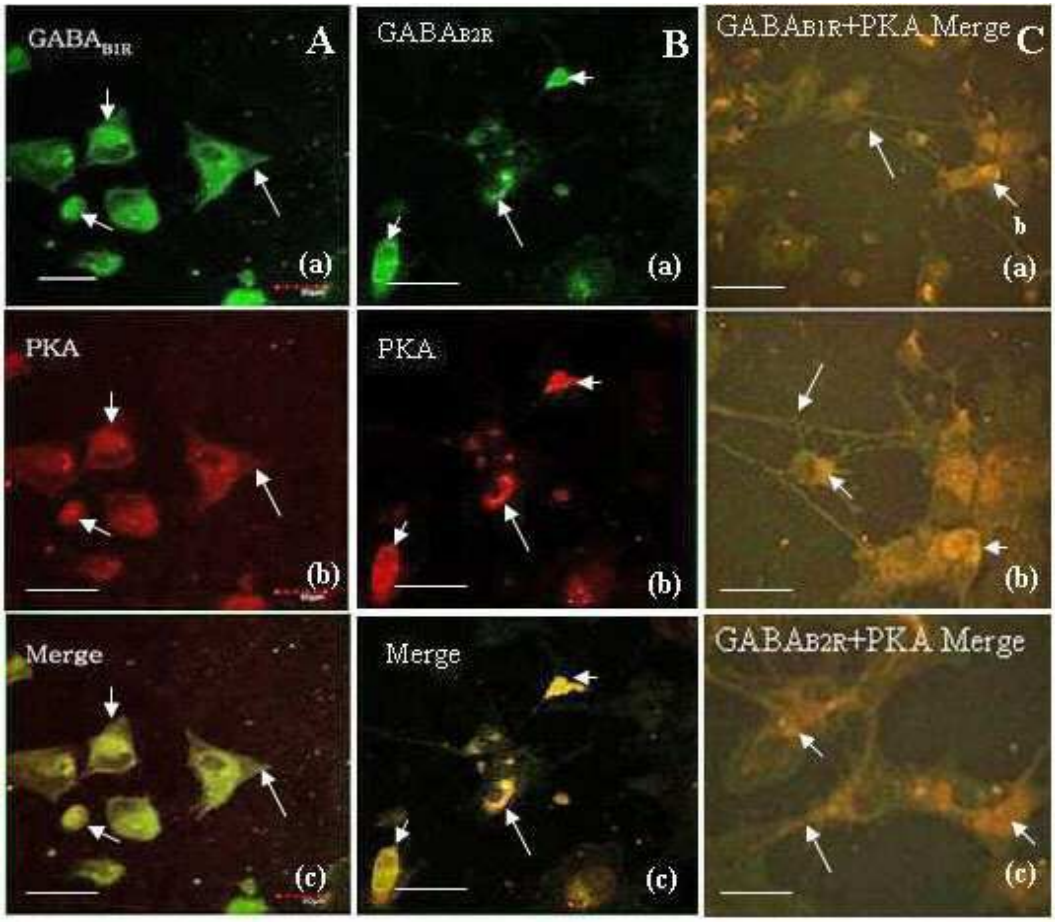
도면4


A
Hippocampus
30 min
1 hour
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
PKA
β- actin
B
PKA-α
Density of value
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
C E NIc B P E NIc B P VitC E+VitC NIc+VitC
30 min
1 hour

도면5


A
Viable cell (%)
C
E
Nic
VitC
E+VitC
Nic+VitC
B
Control
Ethanol
Nicotine
Vit C
E+Vit C
Nic+Vit C
C
Control
Ethanol
Nicotine
EtOH + VitC
Nic + VitC
Fluoro-Jade-B
PI

도면6


GABA$_{B1R}$
A
(a)
GABA$_{B2R}$
B
(a)
GABA$_{B1R}$+PKA Merge
C
b
(a)
PKA
(b)
PKA
(b)
(b)
Merge
(c)
Merge
(c)
GABA$_{B2R}$+PKA Merge
(c)