



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0128945
(43) 공개일자 2009년12월16일

(51) Int. Cl.

A61K 31/565 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0054943

(22) 출원일자 2008년06월12일

심사청구일자 2008년06월12일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

김명옥

경남 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호

성환후

경기 수원시 권선구 서둔동 농촌진흥청 축산과학원

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김동완

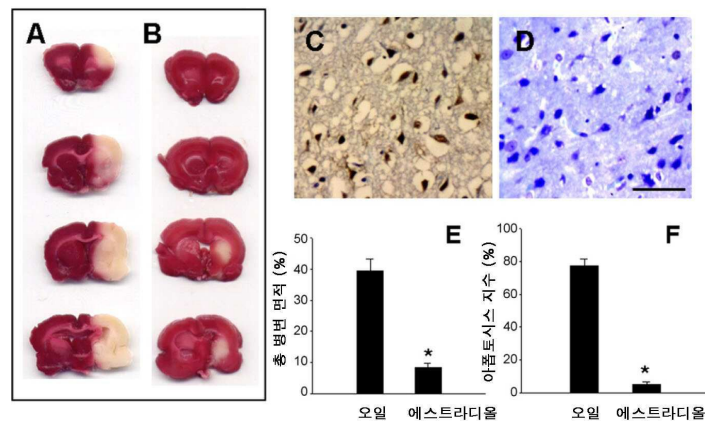
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 국소 대뇌 허혈성 손상 치료용 에스트라디올

(57) 요약

본 발명은 단백질 키나제 B(Akt)의 다운스트림 내의 라파마이신 포유류 타겟(mTOR) 및 p70S6 키나제의 인산화를 유도하여 뇌 허혈성 손상을 보호하는 에스트라디올을 제공한다. 또한 상기 에스트라디올은 대뇌 피질 부위의 뇌 허혈성 손상에 효과적이나 선조체 부위의 뇌 허혈성 손상에는 비효과적임을 특징으로 한다.

대표도



(72) 발명자

고필욱

경상남도 진주시 가좌동 경상대학교 수의과대학

성진희

경상남도 진주시 가좌동 경상대학교 대학원응용생명과학부

특허청구의 범위

청구항 1

단백질 키나제 B(Akt)의 다운스트림 내의 라파마이신 포유류 타겟(mTOR) 및 p70S6 키나제의 인산화를 유도하여 뇌 허혈성 손상을 보호하는 에스트라디올

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 에스트라디올은 대뇌 피질 부위의 뇌 허혈성 손상에 효과적이나 선조체 부위의 뇌 허혈성 손상에는 비효과적임을 특징으로 하는 에스트라디올

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 에스트라디올은 대뇌 피질 부위의 피루브산 탈수소효소 키나제 1(PDK1)의 세린 241 및 세린 473의 인산화를 통한 활성화를 통해 뇌 허혈성 손상을 보호함을 특징으로 하는 에스트라디올

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 국소 대뇌 허혈성 손상 치료용 에스트라디올에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 라파마이신 포유류 타겟(mammalian target of rapamycin, mTOR)/p70S6 키나제 경로를 통한 국소 대뇌 허혈성 손상 치료용 에스트라디올에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 주요 생식선 성 호르몬인 에스트라디올은 미성숙 및 성체 뇌에서 유효한 신경영양 및 신경보호 역할을 한다. 특히 임상적 연구는 에스트라디올은 뇌졸중 위험을 저하시키고 알츠하이머병의 발병률 및 진행을 감소시킴을 나타내었다. 에스트라디올은 흥분독성 아미노산 및 산화 스트레스를 포함한 다양한 신경 자극에 반응하여 발생하는 세포 사멸을 저해한다.
- <3> 또한 본 발명자들은 종전 연구에서 에스트라디올이 단백질 키나제 B(Akt)의 손상-유도 감소 및 그의 다운스트림 타겟의 인산화를 방지함으로써 허혈성 뇌 손상에 의해 유발되는 세포 사멸을 보호함을 규명하였다.
- <4> 포스포티딜이노시톨 3-키나제(PI3-K)/Akt 신호 경로는 성장 인자 및 인슐린에 의해 활성화되고 세포 성장, 아포토시스 및 생존을 포함한 여러 세포 기능의 조절에 중요한 역할을 한다. 라파마이신(rapamycin)의 포유류 타겟(mTOR)은 PI3-K 경로의 구성요소이다. Akt의 업스트림 타겟인 피루브산 탈수소효소 키나제 1(PDK1)은 세린/트레오닌 잔기 상에서 Akt를 인산화시킨다. Akt는 세린 2448 잔기 상에서 mTOR을 직접 인산화시키고, 인산화된 mTOR은 단백질 합성 및 세포 성장의 중추 조절제로서 작용한다. 성장 인자에 반응하여 mTOR 키나제는 40s 리보솜 서브유닛의 기능성 사이트인 S6 리보솜 단백질(S6)의 인산화를 조절하는 p70S6 키나제를 인산화시킨다. 따라서 mTOR/p70S6 키나제는 세포 성장 및 세포 주기 진행에 필수적이다.
- <5> 종전 연구는 대뇌 허혈성 뇌 손상이 p70S6 키나제의 탈인산화를 통해 단백질 합성의 개시를 억제시킴을 보고하였다. 종전 연구가 PI3-K/Akt 경로의 활성화를 통한 에스트라디올의 신경보호 효과를 입증하였으나 mTOR 및 p70S6 키나제와 같은 Akt의 다른 다운스트림 타겟에 대한 정보가 거의 존재하지 않는다.
- <6> 따라서 본 발명은 뇌졸중-유사 허혈성 손상에 대한 에스트라디올의 신경보호 효과를 측정하고 단백질 키나제 B(Akt) 및 그의 다운스트림 타겟인 라파마이신 포유류 타겟(mTOR) 및 세린/트레오닌 키나제의 일종인 p70S6 키나제의 활성화를 통한 에스트라디올의 신경보호 효과를 측정하여 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 뇌졸중-유사 허혈성 손상에 대한 에스트라디올의 신경보호 효과를 측정코자 한 것이다. 또한 본 발명은 단백질 키나제 B(Akt) 및 그의 다운스트림 타겟인 라파마이신 포유류 타겟(mTOR) 및 세린/트레오닌 키나제의 일종인 p70S6 키나제의 활성화를 통한 에스트라디올의 신경보호 효과를 측정코자 한 것이다.

과제 해결수단

<8> 본 발명의 목적은 단백질 키나제 B(Akt)의 다운스트림 내의 라파마이신 포유류 타겟(mTOR) 및 p70S6 키나제의 인산화를 유도하여 뇌 허혈성 손상을 보호하는 에스트라디올을 제공하는 것이다.

<9> 또한 상기 에스트라디올은 대뇌 피질 부위의 뇌 허혈성 손상에 효과적이나 선조체 부위의 뇌 허혈성 손상에는 비효과적임을 특징으로 한다.

<10> 또한 상기 에스트라디올은 대뇌 피질 부위의 피루브산 탈수소효소 키나제 1(PDK1)의 세린 241 및 세린 473의 인산화를 통한 활성화를 통해 뇌 허혈성 손상을 보호함을 특징으로 한다.

효과

<11> 본 발명의 효과는 뇌졸중-유사 허혈성 손상에 대한 에스트라디올의 신경보호 효과를 제공하는 것이다. 또한 본 발명은 단백질 키나제 B(Akt) 및 그의 다운스트림 타겟인 라파마이신 포유류 타겟(mTOR) 및 세린/트레오닌 키나제의 일종인 p70S6 키나제의 활성화를 통한 에스트라디올의 신경보호 효과를 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<12> 본 발명자들은 종전 에스트라디올이 Akt 및 그의 다운스트림 타겟 Bad 및 FKHR의 활성화를 통해 신경 세포 사멸을 방지함을 규명한 바 있다. 본 발명은 에스트라디올이 라파마이신 포유류 타겟(mTOR) 및 p70S6 키나제를 포함한 Akt의 다른 다운스트림 타겟을 통해 생존 경로를 조절하는지 여부를 측정한 것이다.

<13> mTOR는 Akt의 다운스트림 타겟이고 단백질 합성, 세포 성장 및 세포 주기 진행의 중추 조절제임은 알려져 있다. 성체 암컷 랫트는 난소 절제되고 중대뇌 동맥 폐색(MCAO) 전 에스트라디올로 처리되었다. 중대뇌 동맥 폐색 24시간 후 뇌가 채취되고 경색 부위가 분석되었다.

<14> 본 발명은 에스트라디올이 경색 부위를 유의적으로 감소시키고 대뇌 피질 내 TUNEL 염색에 대한 양성 세포수를 감소시킴을 확인하였다. 뇌 손상은 포스포-mTOR 및 포스포-p70S6 키나제의 감소를 유도하였다. 에스트라디올은 Akt 활성화 및 mTOR와 p70S6 키나제의 활성화를 통한 뇌경색 손상-유도 감소 및 S6 활성화의 후속 손상 감소를 방지하였다.

<15> 본 발명은 에스트라디올이 mTOR 및 p70S6 키나제 활성화를 통한 뇌경색 손상-유도 감소를 방지함으로써 뇌 손상에 대한 중요한 보호 역할을 함을 나타낸다.

<16> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<17> TTC 염색은 오일-처리 대조군과 비교시 에스트라디올 투여가 경색 부위를 유의적으로 감소시킴을 나타내었다(도 1A 및 B). 특히 에스트라디올의 보호 효과가 대뇌 피질에서 유의적으로 나타났다. 그러나 에스트라디올은 선조체의 손상을 보호하지는 않았다. 허혈 병변 면적은 오일- 및 에스트라디올-처리 동물에서 각각 $38.55 \pm 2.35\%$ 및 $8.95 \pm 0.95\%$ 이었다(도 1E).

<18> 오일-처리 동물에서 TUNEL-양성 세포수는 경색 영역에서 유의적으로 증가된 반면 에스트라디올-처리 동물의 대뇌 피질에서 유의적으로 감소되었다(도 1C 및 D). TUNEL-양성 세포의 비율은 오일- 및 에스트라디올-처리 동물의 동측 피질 내에서 각각 $76.55 \pm 3.45\%$ 및 $5.75 \pm 1.05\%$ 이었다(도 1F).

<19> 본 발명은 대뇌 피 내 Ser²⁴¹ 및 Ser⁴⁷³에서 PDK1의 인산화에 의한 PDK1 및 Akt의 활성화를 조사하였다. 웨스턴 블롯은 뇌 손상이 포스포-PDK1 및 포스포-Akt 수치의 감소를 유도하고 에스트라디올이 포스포-PDK1 및 포스포-Akt의 손상-유도된 하향-조절을 방지함을 나타내었다. 포스포-PDK1의 수치는 오일- 및 에스트라디올-처리 동물의 동측 피질에서 각각 0.58 ± 0.02 및 0.93 ± 0.03 이었다(도 2A). 포스포-Akt의 수치는 오일-처리 동물의 동측 피질에서 0.48 ± 0.04 이고, 에스트라디올-처리 동물에서는 0.87 ± 0.03 이었다(도 2B).

<20> 더욱이 에스트라디올은 포스포-mTOR, 포스포-p70S6 키나제 및 포스포-S6의 손상-유도된 감소를 방지하였다.

포스포-mTOR의 수치는 오일- 및 에스트라디올-처리 동물의 동측 피질에서 각각 0.47 ± 0.02 및 0.85 ± 0.04 이었다 (도 2C). 포스포-p70S6 키나제의 수치는 오일-처리 동물의 동측 피질에서 0.48 ± 0.02 이고 에스트라디올-처리 동물에서는 0.91 ± 0.03 이었다(도 2D). 유사하게는 포스포-S6의 수치는 오일- 및 에스트라디올-처리 동물의 동측 피질에서 각각 0.67 ± 0.04 및 0.96 ± 0.04 이었다(도 3A).

- <21> 면역조직화학 염색은 포스포-S6에 대한 양성 세포수가 대측 피질과 비교시 오일-처리 동물의 동측 피질에서 감소됨을 나타내었다(도 3B 및 D). 그러나 에스트라디올-처리 동물의 동측 피질 내 양성 세포수는 대측 피질의 수치와 동일하게 유지되었다(도 3C 및 E).
- <22> 에스트라디올은 MCAO에 의해 유도되는 허혈성 손상에 대해 뇌를 보호하고 대뇌 피질의 배양된 외식편 내에서 유효한 신경보호 작용을 발휘한다. 에스트라디올의 신경보호 효과는 피질에서 가장 현저하다. 본 발명은 에스트라디올이 대뇌 피질에서 경색 부피를 유의적으로 감소시키나 선조체 영역에서 세포 사멸을 유의적으로 방지하지는 못함을 입증하였다. R. Tsuchida et al., J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 17 (1997) 1066-1073에서는 MCAO 이후 영역-특이적 효과가 피질 및 선조체에 대한 차별적 혈액 관류를 부분적으로 반영하고; MCAO가 피질과 비교시 선조체에서 더 큰 정도로 혈류를 차단함을 입증하였다.
- <23> TUNEL 방법을 이용하여 본 발명은 에스트라디올이 대뇌 피질에서 아포토시스 세포수를 유의적으로 감소시킴을 나타내었다. 따라서 본 발명은 에스트라디올이 아포토시스성 세포 사멸의 저해를 통해 신경보호 효과를 매개함을 명백히 확인시켰다.
- <24> PI3-K/Akt 신호 경로는 세포 사멸의 억제 및 다양한 세포의 세포 생존의 자극에 중요한 역할을 한다. 더욱이 뇌 손상에 대한 에스트라디올의 신경보호 효과는 Akt의 인산화를 통해 매개된다. 본 발명은 에스트라디올이 Akt 및 그의 업스트림 타겟인 PDK1의 인산화의 손상-유도된 감소를 방지함을 확인하였다.
- <25> 종전 연구는 MCA 폐색 1시간에 Akt 인산화의 일시적 상향-조절을 입증하였다. 더욱이 에스트라디올은 손상에 의한 Akt 인산화의 초기 조절을 증가시킨다. M. Shibata et al., Brain Res. 942 (2002) 1-10에서는 Akt 인산화의 상향-조절이 초기 단계의 허혈에서 신경보호 역할을 함을 나타내었다.
- <26> 최근 본 발명자들은 에스트라디올이 MCAO 24시간에 Akt 및 그의 다운스트림 타겟인 Bad, FKHR 및 GSK3 β 의 인산화의 손상-유도된 감소를 방지함으로써 신경보호 역할을 함을 확인하였다. 종전 연구가 PI3-K/Akt 경로의 활성화를 통한 에스트라디올의 신경보호 효과를 입증하였으나 mTOR 및 p70S6 키나제와 같은 Akt의 다른 다운스트림 타겟에 관한 정보는 거의 존재하지 않는다. 본 발명은 mTOR 및 p70S6 키나제의 활성화 및 S6의 인산화에 대한 허혈성 뇌 손상에 대한 에스트라디올의 역할에 집중하였다.
- <27> 본 발명의 결과는 포스포-mTOR 및 포스포-p70S6 키나제의 수치가 뇌 손상 후 감소되고 에스트라디올이 포스포-mTOR 및 포스포-p70S6 키나제 수치의 이러한 하향-조절을 방지함을 나타내었다.
- <28> mTOR/p70S6 키나제는 단백질 합성의 조절 및 세포 사멸의 조절에 매우 중요한 역할을 하고, 일부 연구는 이들이 손상에 대한 보호 효과를 발휘함을 나타낸다. Akt/mTOR/p70S6 키나제-신호전달 경로는 경색증에 대한 심장보호에 필수적 역할을 지닌 것으로 나타났다. 종전 연구는 알츠하이머병의 형질전환 모델의 피질 내 mTOR 및 p70S6 키나제의 인산화 형태의 감소 수치를 입증하였다. 더욱이 일시적 국소 허혈 뇌 손상은 인산화된 Akt 및 p70S6 키나제의 수치를 유의적으로 감소시키고 p70S6 키나제 및 eIF2B의 탈인산화를 통해 번역의 개시 단계 억제를 유발한다.
- <29> mTOR 및 p70S6 키나제의 탈인산화는 단백질 합성의 저해 및 세포 사멸을 나타낸다. 본 발명은 에스트라디올이 Akt 활성화 및 mTOR 및 p70S6 키나제의 인산화의 손상-유도된 감소 및 S6 인산화의 후속 감소를 방지함을 입증하였다.
- <30> 특히 면역조직화학 분석은 허혈성 영역 내 포스포-S6에 대한 양성 세포수의 유의적인 감소를 나타낸 반면 에스트라디올의 존재시 이들은 무손상 영역과 동일한 수치로 유지되었다. 인산화된 S6은 5' 올리고피리미딘 구역 mRNA의 번역을 매개하고 이러한 그룹의 mRNA는 리보솜 단백질과 같은 세포주기 진행과 관련된 단백질을 암호화한다. 포스포-S6의 감소는 세포주기의 지연을 나타낸다.
- <31> 본 발명은 Akt 활성화 및 mTOR 및 p70S6 키나제의 인산화의 유지가 에스트라디올 처리 후 무손상 크기의 감소와 관련됨을 나타낸다. 따라서 에스트라디올은 무손상 mTOR/p70S6의 다운스트림 타겟인 포스포-S6을 영역과 동일한 수치로 유지시켰다. 결론적으로 본 발명은 허혈성 뇌 손상 동안 mTOR/p70S6 키나제/S6 조절을 매개한다는 사실을 입증하였다.

- <32> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <33> (실시예 1) 실험동물의 처리
- <34> 모든 절차는 미국 국립보건원에서 공표된 실험 동물의 관리 및 이용에 대한 가이드 54에 따라 수행되었다. 성체 암컷 Sprague-Dawley 랫트(225~250 g)가 본 발명에 이용되었다. 랫트는 오일-처리군 및 에스트라디올-처리군(그룹 당 n=15)으로 무작위로 분리되었다. 동물은 제어된 온도(25℃) 및 조명(12시간 광/12시간 암) 조건 하에서 수용되었고 사료 및 물에 자유로운 접근이 허용되었다. 동물은 양측 난소 절제되었고 참기름(Sigma, St. Louis, MO, USA) 또는 17β-에스트라디올(180 μg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 함유한 실라스틱 캡슐로 이식되었다. 이러한 패러다임의 에스트라디올 처리는 랫트 발정주기 동안 관찰되는 기본 혈중 수치와 동일한 에스트라디올 수치를 생성한다. 난소절제술 및 처리 2주 후 랫트는 뇌경색을 유도하도록 중대뇌 동맥 폐색(MCAO)이 진행되었다.
- <35> (실시예 2) 실험동물의 뇌 허혈 유도
- <36> MCAO 실시 전 동물은 소듐 펜토바비탈(sodium pentobarbital)(100 mg/kg)로 마취되었다. MCAO는 E.Z. Longa et al., Stroke 20 (1989) 84-91에 기술된 바와 같이 유도되었다. 우측 총경 동맥, 내경 동맥 및 외경 동맥이 노출되었고 4/0 단일선 나일론 봉합사가 내경 동맥을 통해 중대뇌 동맥의 기저로 삽입되었다. 영구 폐색 24시간 후 동물이 희생되고 뇌가 신속하게 채취되었다. 이들 뇌는 2 mm 두께의 관상 절편으로 절단되었다. 이들 절편은 2% 염화트리페닐테트라졸륨(TTC; Sigma, St. Louis, 79 MA, USA)에서 20분간 인큐베이트되고 10% 포르말린 내에 고정되었다. 염색된 절편은 Nikon CoolPIX990 디지털 카메라로 촬영되었고 Image-ProPlus 4.0 소프트웨어(Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)에 의해 허혈 병변에 대해 측정되었다. 각각의 절편의 허혈 병변 백분율은 전체 절편 면적에 대한 경색증 면적 비율에 의해 계산되었다. TTC 염색 및 병변 면적 분석 후 절편은 파라핀에 함몰되고 TUNEL 염색을 위해 절단되었다. TUNEL 조직화학은 DNA 무사분열 검출 키트(Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 수행되었다. TUNEL 염색된 절편에서 각 절편에 대해 5개의 영역이 대뇌 피질에서 선택되었다. TUNEL-양성 세포는 ×400 배율에서 광학 현미경을 이용하여 정량화되었다. 전체 세포수 및 TUNEL-양성 세포수가 각각의 영역에서 수득되었다. TUNEL-양성 세포의 백분율은 각각의 영역 내의 전체 세포수에 대한 TUNEL-양성 세포수의 백분율로 기재되었다.
- <37> (실시예 3) 에스트라디올에 의한 뇌 허혈 손상 보호
- <38> 웨스턴 블롯 분석을 위해 뇌는 동측 및 대측 피질로 절개되었다. 조직은 급냉되고 10 μM 류페틴 및 200 μM 염화페닐메틸설포닐을 함유한 완충액(1×PBS 내 1% Triton X-100, 1 mM EDTA(pH 7.4))에 용해되었다. 용해질은 초음파 처리되고 4℃에서 20분간 12,000 rpm으로 원심분리되었다. 상청액이 수집되었고 각 용해질의 단백질 농도는 비신코닌산(bicinchoninic acid, BCA) 키트(Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 측정되었다. 전체 단백질(30 μg)은 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 상에서 각각에 레인에 적용되었다. 전기영동 및 면역블롯팅 후 염화폴리-비닐리덴(PVDF) 멤브레인(Millipore, Billerica, MA, USA)이 0.1% Tween-20을 함유한 Tris-완충 식염수(TBST) 내에서 세척된 후 하기 항체와 함께 인큐베이트되었다: 1차 항체로서 항-포스포-PDK1(Ser²⁴¹), 항-포스포-Akt(Ser⁴⁷³), 항-포스포-mTOR(Ser²⁴⁴⁸), 항-포스포-p70S6 키나제(Thr³⁸⁹), 항-포스포-S6 리보솜 단백질(Ser^{235/236}) 및 항-α 튜불린(1:1000로 희석, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). 또한 멤브레인은 2차 항체(1:5000, Pierce, Rockford, IL, USA)와 함께 인큐베이트되었고 ECL 웨스턴 블롯 분석 시스템이 제조사의 프로토콜에 따라 검출에 이용되었다.
- <39> 면역조직화학 조사를 위해 뇌는 0.1 M 인산 완충 식염수 내 4% 파라포름알데하이드에서 고정되었고 크리오마이크로톰(cryomicrotome) 상에서 15 μm 두께로 절단되었다. 절편은 PBS 내의 1% 정상 염소 혈청으로 1시간 동안 차단된 후 가슴 챔버 내에서 4℃로 15시간 동안 항-인-S6 리보솜 단백질(Ser^{235/236}) 항체(1:200로 희석, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 함께 인큐베이트되었다. PBS로 세척 후 절편은 1시간 동안 비오틴-컨쥬게이트된 염소 항-토끼 IgG(PBS 내 1:200)와 함께 인큐베이트된 후 Vector ABC Elite 키트(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)의 아비딘-비오틴-과산화효소 복합체와 함께 1시간 동안 인큐베이트되었다. 절편은 PBS로 세척되고 0.03% 과산화수소를 지닌 DAB 용액과 함께 3분간 인큐베이트되었다. 절편은 크레실 바이올렛으로 대조염색되고 다단계 알코올로 탈수되고 투명화되었다. 절편은 현미경 하에서 관찰된 후 촬영되었다.

<40> 모든 데이터는 평균±SEM으로 표기된다. TTC 염색 및 TUNEL 염색의 통계 분석은 비쌍대 Student t-테스트를 이용하여 수행되었다. 비교 차이는 *P<0.01에서 유의적인 것으로 고려되었다. 웨스턴 블롯 분석의 강도 분석은 SigmaGel 1.0(Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) 및 SigmaPlot 4.0(SPSS Inc., Point Richmond, CA, USA)을 이용하여 수행되었다. 각 그룹 내 웨스턴 블롯 분석 결과는 일원분산분석(AVOVA) 및 Student t-테스트에 의해 비교되었다. 비교 차이는 *P<0.05에서 유의적인 것으로 고려되었다.

도면의 간단한 설명

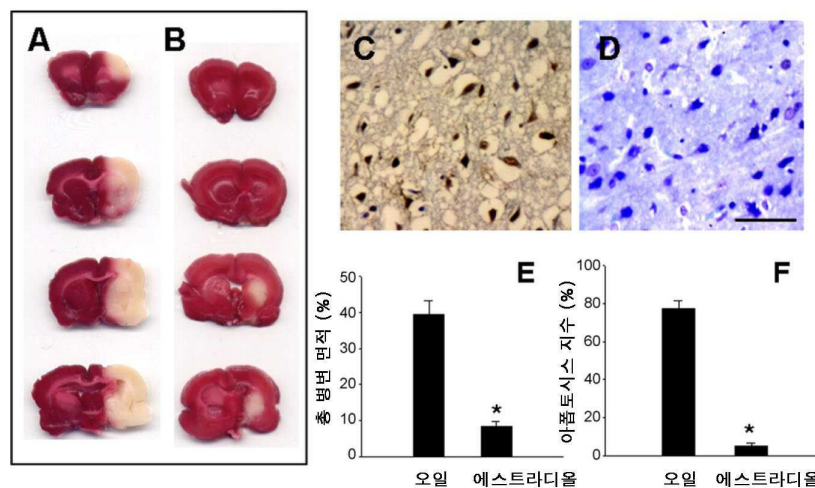
<41> 도 1A 및 B는 MCAO 전 오일- 및 에스트라디올-처리 랫트의 뇌 조직 내 사진이다. 뇌 절편은 TTC로 염색되었다. 허혈 영역은 백색이고, 무손상 영역은 적색으로 염색되었다. 에스트라디올 처리는 대뇌 피질을 허혈성 뇌 손상으로부터 유의적으로 보호하였다. 도 1C 및 D는 대뇌 피질의 TUNEL 염색 사진이다. TUNEL 염색의 양성 세포는 에스트라디올-처리 랫트에서 현저하게 감소되었다. 축척 막대 = 200 μ m. 도 1E는 병변 면적/전체 뇌 절편 면적으로 계산된 허혈성 병변 면적의 백분율을 나타낸다. 도 1F는 각각의 영역 내의 TUNEL-양성 세포수/전체 세포수로 기재된 TUNEL-양성 세포의 백분율을 나타낸다. 데이터(n=5)는 평균±SEM으로 표기된다. *P<0.01.

<42> 도 2는 동측 및 대측 피질 내 포스포-PDK1(A), 포스포-Akt(B), 포스포-mTOR(C) 및 포스포-p70S6 키나제(D)의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다. 랫트는 MCAO 전 오일(오일로 표지) 또는 에스트라디올(E로 표지)로 처리되었다. 각 레인은 개별적 실험 동물을 표시한다. 농도계측 분석은 α -튜블린에 의해 표준화된 항체 유닛(A.U.)로 표기된다. 데이터(n=5)는 평균±SEM으로 표기된다. *P<0.01.

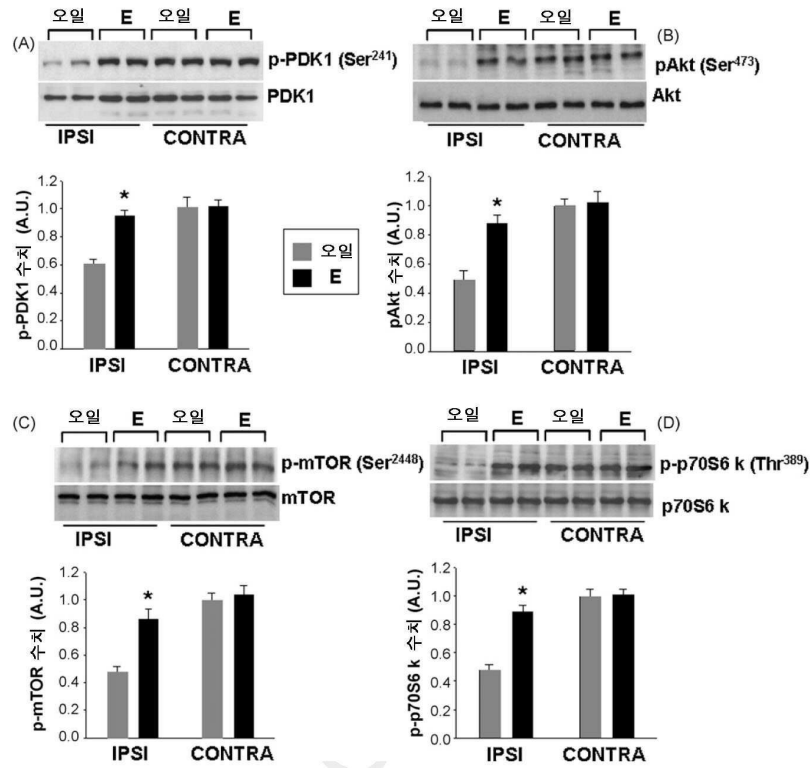
<43> 도 3A는 동측 및 대측 피질 내 포스포-S6의 웨스턴 블롯 분석을 나타내고, 도 3B-E는 동측 및 대측 피질 내 포스포-S6의 면역-염색을 나타낸다. 랫트는 MCAO 전 오일(오일로 표지) 또는 에스트라디올(E로 표지)로 처리되었다. 각 레인은 개별적 실험 동물을 표시한다. 농도계측 분석은 α -튜블린에 의해 표준화된 항체 유닛(A.U.)로 표기된다. 데이터(n=5)는 평균±SEM으로 표기된다. *P<0.05. 양성 세포는 오일-처리 랫트의 동측 피질에서 감소되었다. 화살표는 양성 세포를 나타낸다. 축척 막대 = 100 μ m.

도면

도면1



도면2



도면3

