(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0090044
(43) 공개일자 2014년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/122 (2006.01) *A61K 31/375* (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0002284
(22) 출원일자 2013년01월08일
심사청구일자 2013년01월08일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김명옥
경남 진주시 가호로44번길 7, 102동 303호 (호탄동, 대동아파트)
울라, 이크람
경남 진주시 진주대로 501
(74) 대리인
손민

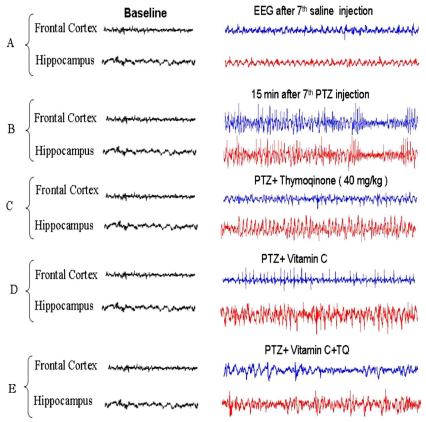
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는 신경세포 보호용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경세포 보호용 조성물, 신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 및 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명의 타이모퀴논 및 비타민 C를 동시에 포함하는 조성물은 신경세포를 보호하는 효과를 가져, PTZ에 의해 유도된 간질, 발작과 같은 신경 질환을 예방할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012-0009521
부처명	교육과학기술부
연구사업명	미래유망 융합기술 파이오니어사업
연구과제명	치매(뇌기능항진 조절) 치료 천연신물질 소재개발 나노담체 적합형 약물 기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	경상대학교
연구기간	2012.09.01 ~ 2018.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경세포 보호용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신경세포 보호는 신경세포의 사멸 억제에 의해 달성되는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신경세포는 해마 신경세포인 것인 조성물.

청구항 4

타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 신경 질환은 발작 (seizure) 또는 간질 (epilepsy)인 것인 약학 조성물.

청구항 6

타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 신경 질환은 발작 (seizure) 또는 간질 (epilepsy)인 것인 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경세포 보호용 조성물, 신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 및 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간질 (epilepsy)은 반복적인 발작을 주 증상으로 하는 질병으로, 뇌의 주요 신경 질환 중 하나이며, 전 세계 인구의 0.5-1.0 % 정도에서 간질 장애가 발생하는 것으로 알려져 있다. 간질로 고통받는 대부분의 환자는 일반적으로 뇌의 한 부분에서 시작하고 확산되는 초점성 발작 (focal seizure)에 의해서 고통받고 있다. 일반적으로 간질은 뇌의 뉴런 거대집단에서 과도한 비정상적 전기 방전과 주변 뉴런 및 하나의 뇌반구 또는 반구 (hemisphere) 모두에 영향을 주어 확산됨에 의해 발작이 시작된다. 현재 발작이 뇌 손상 촉진 및 특정 상황에서 신경세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있고, 신경세포의 구조와 기능에 영향을 줄뿐만 아니라 비치명적 병리

생리학적 효과를 유발할 수 있다. 발작으로 인한 뇌 손상은 매우 복잡하고 신경세포 사멸에 기여하는 많은 요소와 관련된다. 이러한 요소에는 유전적 요인과 흥분세포독성(excitotoxicity), 산화 스트레스, 칼슘의 상당 유입과 같은 다른 생물학적 현상이 포함된다.

[0003] 펜틸렌테트라졸 (Pentylenetetrazole, PTZ)은 $GABA_A$ 수용체 작용제 (agonist) 및 γ-아미노 부티르산 $(GABA)_A$ 수용체에 대한 chloride ionophore (염화물 이온통로구) 복합체의 차단 역할을 하고, 인간의 복잡한 간질에 대한 모델에 사용되어 왔다. 화학적으로 PTZ에 의해 유도된 발화(kindling)가 가장 일반적이고 약리학적으로 유도된 모델이다. 발작 중에 뉴런의 장기적인 자극 및 흥분에 의해 손상으로 이어질 수 있으며, 정확한 메커니즘은 아직 완전히 밝혀지지 않았다. 중추 신경계에서 산화 스트레스와 관련한 카이닌산 (kainic acid) 모델, PTZ 발화 (kindling) 모델, PTZ 유도 발작 같은 간질의 다양한 설치류 모델이 많은 보고서에서 제시되고 있다. 간질성 발작이 신경 결손 및 뇌신경계 퇴행 기전 (neurodegeneration)을 이끄는 많은 메커니즘을 통해 뇌 손상을 유발한다. 산화 스트레스, 칼슘 유입, 미토콘드리아의 기능장애, 특히 억제 신경전달 물질인 GABA의 감소 및 증가된 신경세포의 흥분성 등이 뇌 손상을 유발하는 메커니즘에 포함된다. 간질성 발작에 의해 유도된 뇌신경계 퇴행 기전 (neurodegeneration)은 매우 복잡하고, 뇌의 다른 부분에 있는 많은 세포와 분자의 변화가 이에 포함된다. 흔히 해마 (hippocampus)의 뇌신경계 퇴행 기전 (neurodegeneration)을 유발하는 급성 발작은 최근 TUNEL, Fluoro-Jade B와 silver staining 기법을 사용하여 형태학적 접근 방식에 의해 보고되었다. 급성 PTZ는 오로지 사이토카인 분비만 유도하는데 반해, 발화(kindling)의 경우는 증가된 대뇌 피질의 TNF-α, IL-10, PGE2와 caspase-3의 함량을 보여주었다.

[0004] 감마 - 아미노 부티르산 (Gamma-amino butyric acid, GABA)은 뇌의 주요 억제 신경 전달 물질이며 $GABA_A$, $GABA_B$ 및 $GABA_C$의 다른 유형의 수용체를 통해 영향을 준다. 간질 설치류 모델에서 역할이 입증된 $GABA_B$ 수용체 (R)는 중추신경계통 (CNS)의 발달 동안 중요한 역할을 한다. PTZ는 $GABA_A$ 수용체를 통해 경련제 효과를 가지고, 주요 GABAergic과 glutamatergic 시스템에 영향을 미친다. $GABA_A$와 $GABA_B$Rs 둘 다 신경 세포의 흥분성과 간질의 발생 기전 (epileptogenesis) 제어에 관여하지만, 일반적인 경련성 발작을 제어하는 $GABA_A$Rs의 관련성은 많이 알려져 있지 않다. 뇌에서 흥분-억제 균형을 유지하는데 있어서 중요한 역할을 하는 $GABA_B$ 수용체 (R) 발현량의 변화는 발작의 발달을 야기한다.

[0005] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 PTZ에 의해 유도된 간질성 발작과 GABA 및 신경 질환 등과의 관계를 연구하던 중, 천연 유래 화합물인 타이모퀴논과 비타민 C가 상기 신경 질환에 효과가 있으며, 신경세포 보호에 탁월한 효과가 있음을 발견하고, 이를 병용 투여하였을 때 특히 시너지 효과를 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경세포 보호용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 하나의 목적은 타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경세포 보호용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명에서 용어, "타이모퀴논(thymoquinone)"은 회향 꽃 (*Nigella sativa*) 종자유의 주 활성 성분으로 알려진 화합물로서, 약학적으로 진통제, 항염증, 독소루비신 유도 심장독성과 같은 자유 라디칼 형성 요인에 대한 강력한 항산화 활성 등 다양한 특성을 가지는 활성 퀴논이다. 본 발명에서는 펜틸렌테트라졸 처리시 타이모퀴논을 전처리하는 실험을 통하여, 상기 타이모퀴논이 신경세포의 사멸을 억제함으로써 신경세포를 보호할 수 있고, 신경 질환을 예방할 수 있는 효과가 있음을 확인하였으며, 특히 하기 비타민 C와 함께 병용하여 사용하면 시너지 효과를 갖는다는 것을 확인하였다.

[0011] 본 발명에서 용어, "비타민 C(vitamin c)"는 인체의 기능과 건강 유지를 위한 미량 원소 중 하나로 아스코르빈산 (ascorbic acid)이라고도 불리며, 강력한 항산화제로 알려져 있다. 본 발명에서는 펜틸렌테트라졸 처리시 비타민 C를 전처리하는 실험을 통하여, 상기 비타민 C가 신경세포의 사멸을 억제함으로써 신경세포를 보호할 수 있고, 신경 질환을 예방할 수 있는 효과가 있음을 확인하였으며, 특히 상기 타이모퀴논과 함께 병용하여 사용하면 시너지 효과를 갖는다는 것을 확인하였다.

[0012] 본 발명에서 용어, "신경세포"는 신경계를 구성하는 주된 세포로, 근육을 포함한 타 세포의 작용을 조절하는 세포로서, 일반적 세포와 달리 전기적 방법으로 신호를 전달하며 발생 단계가 끝난 후에는 더 이상 분열하지 않는 세포를 의미한다. 이처럼 신경세포는 분열 횟수의 제한에 의해 손상시 복구가 거의 불가능하며, 따라서 발생시 정상적으로 분열이 완료되어 정상기능을 수행할 수 있게 하는 것이 무엇보다 중요하다. 특히 펜틸렌테트라졸에 노출된 신경세포의 보호는 간질성 발작을 일으키게 되므로 중요하며, 타이모퀴논 및 비타민 C의 병용 사용이 펜틸렌테트라졸에 노출된 신경세포를 보호하는 효과가 있음을 본 발명자들에 의해 최초로 규명되었다.

[0013] 본 발명의 조성물을 이용한 신경세포 보호 효과는 신경세포가 존재하는 위치나 크기에 관계없이 모든 신경세포를 보호할 수 있으며, 바람직하게는 태아 뇌의 해마 영역에 존재하는 해마 신경세포 (hippocampal neuronal cell) 일 수 있다.

[0014] 본 발명에서 용어, "펜틸렌테트라졸(PTZ)"은 펜테트라졸(pentetrazol) 또는 펜타메틸렌테트라졸(pentamethylenetetrazol)로도 알려져 있으며, 순환계 및 호흡기 촉진제로도 사용되는 약물이다. 이러한 PTZ는 해마에서 뉴런을 감소시키고, 산화스트레스에 의해 신경세포사를 유도하는 발작(seizures-induced neuronal death)을 일으키는 것으로 알려져 있으며, PTZ에 의해 성숙한 랫트의 뇌에서 PTZ에 의해 유발되는 발작이 신경세포의 아폽토시스(apoptosis)를 유도하는 카스파제-3를 활성화시키는 것으로도 알려져 있다.

[0015] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 타이모퀴논 및 비타민 C를 단독 또는 병용 처리하였을 때, 펜틸렌테트라졸(PTZ)에 의한 간질 발작 동물 모델에서 사망률을 감소시키고, 신경세포의 사멸을 억제하고 신경세포를 보호하는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0016] 구체적으로, PTZ를 투여한 랫트에서는 EEG 뇌파검사에서 다극서파와 극서파 복합체 형태가 나타나나, 타이모퀴논 및 비타민 C를 전처리하는 경우 비정상적인 뇌파가 현저히 감소함을 확인하였고(도 1), 타이모퀴논 및 비타민 C를 전처리하는 경우 PTZ 처리에 의해 급격히 감소하는 $GABA_{B1}$ 수용체의 함량이 회복되고(도 2), 급격히 증가되는 PKA 단백질의 함량이 정상화되는 것을 확인하였다(도 3).

[0017] 또한, 아폽토시스를 유발하는 전-세포사멸 Bax 단백질과 아폽토시스 및 프로그램 세포사와 관련된 항-세포사멸 Bcl-2 단백질의 발현과 관련하여, PTZ 투여군에서는 Bax 발현이 증가하고, Bcl-2 발현이 감소하나, 타이모퀴논 및 비타민 C를 전처리하는 경우 이러한 발현량의 변화가 회복됨을 확인하였으며(도 4), 세포사멸의 마커인 카스파제-3 발현 측정 결과 및 FJB 염색/니슬 염색법을 이용한 실험에서도 타이모퀴논 및 비타민 C가 신경세포 사멸 및 손실을 억제함을 확인하였다.

[0018] 더불어, PTZ에 의해 유도된 간질성 발작 동물 모델에서는 몇몇 실험 동물은 사망에 이르렀으나, 타이모퀴논 및 비타민 C를 투여하는 경우 생존율이 증가함을 확인하였다.

[0019] 따라서, 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명에서 용어, "신경 질환"은 중추신경계, 말초신경계 및 근육에서 발생되는 신경계 관련 질환을 총칭하는 의미로서, 본 발명의 목적상 바람직하게는 뇌와 관련된 신경 질환일 수 있다.

[0021] 보다 바람직하게는 상기 신경 질환은 간질 (epilepsy), 발작 (seizure), 간질성 발작 (epileptic seizure), 정신분열증 (schizophrenia), 공황장애 (panic disorder), 및 알츠하이머, 파킨슨병 및 헌팅턴병 등과 같은 신경퇴행성 질환일 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 간질, 발작 또는 간질성 발작일 수 있다.

[0022] 상기 약학 조성물은 상기에서 언급한 바와 같이, 신경세포 사멸을 억제하고 신경세포를 보호함으로써, 신경 질환을 예방 또는 치료하는 효과가 있으며, 본 발명에서는 타이모퀴논 및 비타민 C를 전처리하였는바 예방 효과를 직접적으로 확인하였다.

[0023] 본 발명의 타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는 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 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.

[0024] 또한 본 발명의 조성물은 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.

[0025] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 타이모퀴논 및 비타민 C를 유효성분으로 포함하는, 신경 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0026] 본 발명에 따른 타이모퀴논 및 비타민 C는 상기 약학 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 간질, 발작과 같은 신경 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있는데, 식품 종류는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 과자류, 빵류, 면류 등과 같은 각종 식품류, 물, 청량음료, 과실음료 등의 드링크류, 껌, 차, 비타민 복합제, 조미료류, 건강기능식품 등이 있다.

[0027] 본 발명의 음료 조성물은 필수 성분으로서 타이모퀴논 및 비타민 C를 함유하는 외에는 액체 성분에 특별한 제한은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등과 같은 단당류; 말토스, 수크로즈 등과 같은 이당류; 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 다당류; 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당알코올이 사용될 수 있다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마킨, 스테비아 추출물 등), 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탄 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 건강기능식품은 기재로 되는 식품의 제조공정 중에 상술한 본 발명에 따른 타이모퀴논 및 비타민 C를 첨가하는 공정을 가함으로써 또는 기재로 되는 식품의 제조 후에 상술한 본 발명에 따른 타이모퀴논 및 비타민 C를 첨가하는 공정을 가함으로써 용이하게 얻을 수 있다. 이때 필요에 따라 맛과 냄새 교정제를 첨가하여도 좋다.

[0029] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이 같은 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 타이모퀴논 및 비타민 C를 동시에 포함하는 조성물은 신경세포를 보호하는 효과를 가져, PTZ에 의해 유도된 간질, 발작과 같은 신경 질환을 예방할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 1주일간 약물 투여 후 PTZ 최종 주입 15분 후의 랫트의 뇌파 검사 (EEG, electroencephalographic) 기록을 나타낸다. (A) 대조군, (B) PTZ 투여군, (C) TQ 40 + PTZ 투여군, (D) 비타민 C + PTZ 투여군, (E) TQ + 비타민 C + PTZ 투여군.

도 2는 대뇌 피질(A)과 해마(B)에서 $GABA_{B1}$ 수용체 발현에 대한 TQ과 비타민 C의 효과를 나타낸 결과이다.

도 3은 대뇌 피질(A)과 해마(B)에서 PKA-α 발현에 대한 TQ과 비타민 C의 효과를 나타낸 결과이다.

도 4는 대뇌 피질(A, C)과 해마(B, D)에서 Bax 단백질(A, B) 및 Bcl-2 단백질(C, D) 발현에 대한 TQ과 비타민 C의 효과를 나타낸 결과이다.

도 5는 대뇌 피질(A)과 해마(B)에서 카스파제-3 (caspase-3)의 활성화에 영향을 미치는 TQ와 비타민 C의 효과를 나타낸 결과이다.

도 6은 PTZ에 의해 유도된 신경퇴화 (neurodegeneration)된 대뇌 피질과 해마의 신경 세포를 FJB 염색한 사진을 나타낸다.

도 7은 PTZ에 의해 유도된 신경퇴화 (neurodegeneration)된 대뇌 피질과 해마의 신경 세포를 크레실 바이올렛 염색한 사진을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0033] **실시예 1: 시약 준비**

[0034] 타이모퀴논 (TQ, thymoquinone) 및 비타민 C (Ascorbic acid)는 시그마 알드리치 (Sigma Aldrich)로부터 구입하였다. Fluoro-Jade B는 Chemicon 사 (Chemicon International, USA)로부터 구입하였고, 모든 다른 시약들은 최고의 분석 수준 등급으로 상업적 공급자로부터 구입하였다.

[0035] **실시예 2: 동물 모델 및 약물 투여**

[0036] 실험 동물로서 성숙한 SD (Sprague-Dawley)계 랫트(250-300g)를 사용하였다. 성숙한 SD계 랫트를 온도 습도 조절실에 수용하고, 음식과 물을 자유롭게 섭취하게 했으며, 06:00-20:00 h 주야 사이클을 유지시켰다.

[0037] 상기 랫트를 무작위로 각 그룹별 6마리씩 8개 그룹으로 하기 표 1에 기재된 바와 같이 나누어 테스트하였다.

표 1

그룹	약물 처리	투여 방법
대조군	0.9% Saline (1 ml/kg saline)	복강주사
PTZ 투여군	50 mg/kg PTZ	복강주사
TQ 투여군	40 mg/kg TQ	경구투여
TQ 20 + PTZ 투여군	20 mg/kg TQ / 50 mg/kg PTZ	TQ 경구투여 (PTZ 투여 2h 전)/ PTZ 복강주사
TQ 40 + PTZ 투여군	40 mg/kg TQ / 50 mg/kg PTZ	TQ 경구투여 (PTZ 투여 2h 전)/ PTZ 복강주사
TQ 100 + PTZ 투여군	100 mg/kg TQ / 50 mg/kg PTZ	TQ 경구투여 (PTZ 투여 2h 전)/ PTZ 복강주사
비타민 C + PTZ 투여군	250 mg/kg vitamin C / 50 mg/kg PTZ	vitamin C 복강주사 (PTZ 투여 2h 전)/ PTZ 복강주사
TQ + 비타민 C + PTZ 투여군	40 mg/kg TQ / 250 mg/kg vitamin C/ 50 mg/kg PTZ	TQ 경구투여 (PTZ 투여 2h 전)/ vitamin C 복강주사 (PTZ 투여 2h 전)/ PTZ 복강주사

[0038]

[0039] 펜틸렌테트라졸 (Pentylenetetrazole, PTZ)은 사용 전에 0.9% 생리식염수 용액에 용해하고, 복강주사로 투여하였다. 타이모퀴논 (TQ, thymoquinone)은 PTZ 복강주사 2h 전에 경구 투여하고, 비타민 C (Ascorbic acid)는 PTZ 복강주사 2h 전에 복강 주사하여 처리하였다. 모든 약물은 매 실험 전, 즉각 준비하여 신선하게 사용하고 1주일 동안 약물을 투여하였다.

[0040] **실시예 3: 발작 행동 및 뇌파 검사 (electroencephalography, EEG)를 통한 발작 (seizure) 형태 평가**

[0041] 매일 PTZ 주사 후, 랫트는 케이지에서 분리하여 매일 최소 10-30분 동안 행동을 관찰하였다. 모든 실험동물 그룹은 매일 일반화된 발작 평가를 위해 주의 깊게 모니터하였다. PTZ 주사에 의해 유발된 발작은 점수를 매기고 분류하였으며, 그 유발 시점, 발작 반응시간 및 사망률을 기록하였다. 경련성의 행동은 PTZ의 최대 하위 경련성의 복용량 (50mg/kg)을 복강주사하고 3-5분 내에 시작되었다. 이 복용량은 90%의 랫트에서 경련을 유발하였고, 반복적인 주사로 그 증상을 더 심화시켰다. 본 발명에 사용한 쥐는 단계 4와 5에 해당하는 발작을 보여주었다.

[0042] 반복적인 PTZ 주사로 유발된 발작은 일부 변경사항을 더하여 경련성의 등급을 매기는 Racine의 스케일에 따라 점수화 하였다. PTZ 투여에 의해 결과적으로 발생한 발작은 이와 같이 점수화되었다:

[0043] 단계 0, 무반응; 단계 1, 귀와 안면 수축; 단계 2, 몸을 통해 축 방향으로 경련성 급증; 단계 3, 간대성근경련 반사 (myoclonic jerks)와 엉덩이를 받치고 서거나 뒷발로 서서 앞발을 들고 있는 자세 (rearing); 단계 4, 간헐적 경련으로 옆으로 쓰러지는 증상; 단계 5, 반복적으로 심각한 강직성간대 경련 또는 치명적인 경련; 단계 6, 사망 발생.

[0044] 발작 반응시간은 약물 투여 및 발작 발병 사이의 분 시간의 평균 길이로 정의하였다. 일반적인 발작은 대칭적 앞다리와 뒷다리의 긴장, 뒷다리의 간헐성 경련과 뒤집어지는 움직임으로 특징지었다. 처음 발작이 일어나거나 혹은 처음보다 후에 발작이 다소 발생하기 때문에 종종 실험동물은 또 다른 발작 형태를 가지며, 따라서 발작 기간은 하나의 결합된 발작 양상으로 평가하기 위해 각 동물에 대해 복합적인 발작의 합으로 계산하였다. 쥐에 주사하고 발작을 관찰한 연구원은 각 랫트의 PTZ 투여 조건에 대해 모르며, 각 대상에 대한 처음 발작 발병 반응시간, 전체 발작 기간, 발작 에피소드(episode) 수를 기록하였다.

[0045] 뇌파 검사 (electroencephalography, EEG) 데이터는 증폭기 (amplifier, LAXTHA, LXEJ 108)를 사용하여 30분 동안 기록하였고 뇌파 검사 (electroencephalography, EEG) 기록실에서 250 Hz로 디지털화하였다. 전체 EGG 샘플은 이전에 정의한 바와 같이 간질 모양 활동파의 존재에 대한 육안 검사에 의해 분석하였다.

[0046] **실시예 4: 웨스턴 블롯 (western blot) 분석**

[0047] 다양한 단백질의 양은 웨스턴블롯 (western blot) 분석으로 각기 다른 그룹에서 측정했다. 실험동물은 PTZ 투여 1주일 후에 희생시켰으며, 후에 재빠르게 적출한 뇌, 피질 (cortex)과 해마는 주의 깊게 해부하고 드라이아이스로 얼렸다. 뇌 조직은 분해효소 저해제 혼합물 (protease inhibitor cocktail)을 포함한 0.2 M 인산완충식염수 (phosphate-buffered saline, PBS)에 균질화 (homogenization) 하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 분석 키트 (Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)를 사용하여 측정했다. 동량의 전체 단백질 (샘플 당 30 ㎍)은 환원 조건 (reducing condition) 하에서 10-15% SDS-PAGE 겔로 전기영동 했고 polyvinylidene difluoride (PVDF, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 멤브레인으로 이동시켰다. 분자량의 전반적 범위로 전환 가능한 전 염색 (pre-stained)된 단백질 마커 (6-175 kDa, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA)를 동시에 전기영동 하고, 검출된 단백질의 분자량을 결정하는 데 사용하였다. 멤브레인은 비특이적 결합 (non-specific binding)을 감소시키기 위해 5% (w/v) 탈지유 (skim milk)로 블로킹 (blocking)하고, 면역블로팅 (immunoblotting)은 하기 표 2에 나타낸 바와 같이 다른 1차 항체를 사용하여 수행하였다. 면역복합체 (immunocomplex)는 증강 화학 발광 (enhanced chemiluminescence, Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit, GE Healthcare, UK)법을 사용하여 가시화하였다. 엑스-레이 필름 (X-ray film)을 촬영하고, 밴드 (band)의 광학농도 (optical density)는 컴퓨터 기반 시그마 겔 프로그램, 버전 1.0 (computer-based Sigma Gel program, version 1.0, SPSS, Chicago, IL, USA)로 분석하였다.

표 2

Treatment Groups (Dose mg/kg)	Mortality	Seizure time (min)	Median Seizure
Normal	----------	---------	----------
PTZ (50mg/kg)	2/6	5.9±0.8	6
Thymoquinone (40mg/kg)	----------	---------	----------
Thymoquinone+PTZ	----------	3.4±0.6	5.5
Thymoquinone+PTZ	----------	2.1±0.9	3
Thymoquinone+PTZ	----------	2.3±0.7	3
Vitamin C +PTZ	1/6	4.2±0.3	4
Thymoquinone +Vitamin C +PTZ	----------	3.7±0.4	3

[0048]

[0049] **실시예 5: 조직 수집 및 조직학적 염색을 위한 샘플 준비**

[0050] 실험동물은 마지막 PTZ 주사, TQ (타이모퀴논, thymoquinone)와 비타민 C 약물 투여 1주일 후 희생시켰다. 대조군 랫트와 PTZ를 투여하고 TQ 또는 비타민 C를 전처리한 랫트로부터의 뇌 절편은 염색을 위해 사용되었다. 조직분석 (그룹 당 n = 4-5 마리 실험동물)을 위해, 랫트는 차가운 4% 포르말린 (4% paraformaldehyde, 4% 파라포름알데하이드)을 이용하여 심장으로 관류고정하고 뒤이어 1X 인산완충식염수 (phosphate-buffered saline, PBS)를 관류시켰다. 뇌는 밤새 4% 포르말린으로 후 고정시키고, 튜브의 바닥에 뇌 조직이 가라앉을 때까지 20% 수크로오스 용액에 옮겨 놓았다. 뇌 조직은 O.C.T compound(A.O., USA)로 임베딩 (embeding) 하여 얼리고, 18-㎛ 절편은 CM 3050C 크라이오스탯 (저온유지장치, cryostat, Leica, Germany)을 사용하여 관상면 (coronal plane)으로 자른다. 절편은 규소와 양이온 처리된 슬라이드 (probe-on plus charged slide, Fisher, USA)에 붙여놓았다 (thaw-mounted).

[0051] **실시예 6: Fluoro-Jade B 염색**

[0052] Fluoro-Jade B (FJB) 염색은 일부 변경사항을 더하여 이전에 서술한 대로 수행하였다. PTZ를 1주일 동안 투여하

고 최종 주사 2시간 후에 실험동물은 깊게 마취시키고, 0.9% 생리식염수 용액을 심장으로 관류시키고 뒤이어 0.1 M 인산완충식염수 (phosphate-buffered saline, PBS)에 4%로 희석되어 있는 차가운 포르말린 (4% paraformaldehyde, 4% 파라포름알데하이드)으로 관류 고정하였다. 뇌 절편 (위에서 서술한 대로 준비된)은 슬라이드에 붙여 놓고 밤새 (overnight) 자연 건조시켰다. 슬라이드는 1% 수산화 나트륨 (sodium hydroxide) 과 80% 에탄올 용액에 5분, 그리고 70% 알코올에 2분 동안 순차적으로 담그고 뒤이어 물에도 2분 동안 담근다. 슬라이드는 0.06% 과망간산 칼륨 용액 (potassium permanganate solution)에 10분 동안 옮기고 물로 헹구어 낸 다음, 0.1% 아세트산 (acetic acid)과 0.01% FJB (Chemicon International, USA) 용액에 20분 동안 담궜다. 슬라이드는 물로 2번 씻어내고 10분 동안 건조시켰다. 글라스 커버 슬립 (glass cover slip)은 봉입제 (mounting medium)을 사용하여 슬라이드에 올려놓았다. 공초점 레이저 현미경 (confocal laser scanning microscope, Fluoview FV 1000, Olympus, Japan)의 FITC 필터로 green (녹색) FJB 염색을 감지했다. 각 절편의 여러 부위에 있는 FJB-양성 (positive) 세포는 투여 조건을 알지 못하는 관찰자에 의해 계산하였다.

[0053] **실시예 7: 니슬 소체 (nissle body)의 크레실 바이올렛 (cresyl violet) 염색**

[0054] 크레실 바이올렛 (cresyl violet)은 신경 세포 손실의 조직학적 시험 및 측정을 위한 조직 절편을 염색하는데 사용하였다. 성인 랫트 뇌의 니슬 조직학적 소견과 사멸되거나 손상된 뉴런의 존재 유무는 18-㎛ 두께의 뇌 절편을 현미경 슬라이드에 장착하여 분석하였다. 성인 랫트의 8개 실험 그룹으로부터 준비된 절편은 고농도 알코올 (70-100%)로 탈지시키고, 저농도 알코올 (95-70%)로 수화시킨 다음 아세테이트 버퍼 (acetate buffer, pH 5.0)로 씻어내고 약 15분 동안 0.25% 크레실 바이올렛 (cresyl violet)으로 염색했다. 절편은 물로 씻어내고 에탄올로 건조시켰다. 이미지는 형광현미경 (fluorescent light microscope)으로 촬영하였다.

[0055] **실시예 8: 데이터 분석 및 통계 처리**

[0056] 웨스턴 블롯에서 밴드 (band)는 시그마 겔 시스템 (SPSS Inc., Ghicago, IL)을 사용하여 덴시토미트리 (densitometry, 현상 후의 사진 재료에 기록된 화상 농도를 규격에 따라 엄밀하게 정해진 방법에 따라 측정)에 의해 스캔 분석하였다. 농도 값은 평균 ± 표준오차 (SEM, standard Error of the Mean)으로 표현하였다. 그룹 간 차이는 스튜던트의 T 검정 (Student's t-test)에 이어 일원분산분석 (one-way analysis of variance, on-way ANOVA)을 사용하여 분석하였다. 모든 분석에서 p 값이 0.05 이하일 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0057] **실험예 1: 발작 (seizure) 중 행동 관찰 및 뇌파 검사 (EEG)**

[0058] PTZ 유발 (PTZ-induced)의 최대 하위 경련성의 복용량 (50mg/kg)에 의해 일반화된 발작의 전개는 PTZ를 5일 투여하였을 때 관찰되었다. 1주일 투여 후 누적된 데이터를 분석하였다. 성인 랫트에서 PTZ에 의해 유발된 발작은 일반적으로 뒷다리 경련으로 시작되고 뒤이어 누워 있는 동안 전형적인 네 다리의 강직성간대경련이 일어나고 심지어 몇 실험동물은 사망에 이르렀다.

[0059] 반면, TQ (타이모퀴논)와 비타민 C를 투여한 실험군은 PTZ만 투여한 그룹과 비교했을 때, 생존 실험동물의 수가 유의성 있게 증가하였다. PTZ를 투여한 그룹 6마리 중 2마리가 죽어 33%의 사망률을 보인데 반해, 비타민 C 그룹은 16%의 사망률을 보였다. TQ (타이모퀴논)을 투여한 그룹은 사망률이 관찰되지 않았으며, 생존율이 100%로 증가하였다 (표 3).

표 3

[0060]

No	Primary antibody	Size	Source	Company	Secondary antibody
1	Bax (Polyclonal)	23 kDa	Rabbit	Santa Cruz	Goat anti rabbit HRP
2	Bcl-2	27 kDa	Rabbit	Santa Cruz	Goat anti rabbit HRP
3	$GABAB_{R1}$	130 kDa	Rabbit	Santa Cruz	Goat anti rabbit HRP
4	Caspase-3 (Polyclonal)	35 kDa	Rabbit	Cell signaling	Goat anti rabbit HRP
5	pCREB	43 kDa	Rabbit	Cell signaling	Goat anti rabbit HRP
6	PKA α	40 kDa	Rabbit	Santa Cruz	Goat anti rabbit HRP
7	β-Actin	42 kDa	Rabbit	Sigma	Goat anti rabbit HRP

[0061] TQ (타이모퀴논)의 최대 효과는 복용량 40 mg/kg에서 관찰 되었다. 발작을 입증하기 위해, EEG (뇌파 검사, electroencephalography)는 30분 동안 모니터링 하였고 PTZ 주입 후 15분에 시작되었다. 선택한 복용량 40 mg/kg의 TQ와 비타민 C 250 mg/kg을 전 처리 하였을 때, 효과적으로 뇌파검사 (EEG)에서 비정상적 뇌파가 감소하는 데 반해, PTZ를 투여한 랫트에서는 다극서파 (polyspike)와 극서파 복합체 형태인 결과를 보여준다 (도 1).

[0062] **실험예 2: 대뇌 피질과 해마에서 $GABA_{B1}$ 수용체와 PKA-α의 발현에 대한 TQ와 비타민 C의 효과**

[0063] PTZ 투여와 비교하여 대뇌 피질과 해마에서 $GABA_{B1}$ 수용체와 PKA-α의 함량에 있어서 TQ와 비타민 C의 효과를 연구하였다. 웨스턴블롯팅 분석은 PTZ 그룹에서 뇌의 대뇌 피질과 해마 부위에서 $GABA_{B1}$ 수용체의 함량이 급격히 감소하는 것을 보여주고 있는데 반해, TQ와 비타민 C를 전처리하였을 경우 그 양상이 반전되고 $GABA_{B1}$ 수용체 함량이 유지되었다 (도 2). 이러한 변화는 모든 실험 그룹에서 대뇌 피질과 비교하여 해마에서 훨씬 더 두드러졌다.

[0064] 한편, PKA (단백질 인산화 효소 A, protein kinase A)는 간질의 발생 기전에 이르는 분자 및 세포의 작용에 관련될 가능성이 있는 신경 전달의 주요 조절자이다. 따라서 PTZ 유발 발작 모델에서 PKA의 단백질 함량을 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. PKA 단백질 함량은 대조군 그룹 (control)과 비교하여 대뇌 피질 및 해마에서 PTZ 그룹의 PKA 함량이 증가한 것을 확인하였으며, 부위의 민감도 영향으로 해마에서 증가량의 변화가 두드러진 것을 알 수 있다. PKA의 증가된 활성은 PTZ에 의해 유도된 발작이 장기적으로 지속되었기 때문이다. 이에 반해, TQ와 비타민 C를 전처리한 모든 테스트 농도에서 PKA 함량이 정상화된 것을 확인할 수 있었다 (도 3). 특히, TQ와 비타민 C를 모두 전처리한 군에서는 PKA의 단백질 함량이 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0065] **실험예 3: PTZ 유도 발작 모델의 대뇌 피질과 해마에서 Bax와 Bcl-2 발현 수준에 영향을 미치는 TQ와 비타민 C의 효과**

[0066] 아폽토시스를 유발하는 전-세포사멸 (pro-apoptotic) Bax 단백질과 아폽토시스 및 프로그램 세포사와 관련된 항-세포사멸 (anti-apoptotic) Bcl-2 단백질은 Bcl-2 패밀리의 멤버이고 미토콘드리아에서 세포사멸 과정의 중요한 조절자이다.

[0067] TQ와 비타민 C가 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 대조군 및 각각의 처리군에서 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현량을 확인하였다. 웨스턴블롯팅 분석 결과, 대뇌 피질 부위에서는 Bax 및 Bcl-2 단백질의 두드러진 발현 차이를 보이지는 않았으나, 해마에서는 대조군에 비하여 PTZ 투여군에서 전-세포사멸 단백질인 Bax는 발현이 증가하고 항-세포사멸 단백질인 Bcl-2는 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, TQ와 비타민 C를 전처리한 군에서는 이러한 발현량의 변화가 회복되어 Bax의 발현이 감소하고 Bcl-2의 발현이 증가하는 현상을 확인하였다 (도 4). 이러한 결과를 통하여, TQ 및 비타민 C가 랫트에서 PTZ에 의해 유도된 세포

사멸을 억제할 수 있는 가능성이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0068] **실험예 4: PTZ 유도 발작 모델의 카스파제-3 (caspase-3)의 활성화에 영향을 미치는 TQ와 비타민 C의 효과**

[0069] 세포사멸의 주요 마커로 알려져 있는 카스파제-3 (caspase-3)의 발현 측정을 통하여 TQ와 비타민 C의 신경 세포 사멸에 대한 효과를 확인하고자 하였다.

[0070] 먼저, PTZ에 의해 유도된 발작이 카스파제-3의 활성화를 일으키는지 확인하기 위하여, 웨스턴블로팅을 이용하여 랫트의 대뇌 피질과 해마에서 카스파제-3의 발현량 변화를 관찰하였다. 그 결과, 대조군에 비하여 PTZ를 투여한 군에서 대뇌 피질과 해마 모두에서 카스파제-3의 발현이 현저히 활성화된 것을 확인하였다. 반면, TQ과 비타민 C를 투여한 군에서는 카스파제-3의 발현량이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 TQ 및 비타민 C를 함께 투여한 군에서는 카스파제-3의 발현량이 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (도 5). 이러한 결과는 PTZ에 의해 유도된 신경 세포사멸, 즉 카스파제-3의 활성화가 TQ 및 비타민 C 투여에 의해 저해되고, TQ 및 비타민 C가 발작의 해로운 영향으로부터 뇌를 보호하는 가능성이 있음을 시사한다.

[0071] **실험예 5: PTZ에 의해 유도된 신경퇴화 (neurodegeneration)에 대한 TQ와 비타민 C의 효과**

[0072] PTZ 유발 발작 (PTZ-induced seizure)이 신경 세포 사멸을 초래하는지 판단하기 위하여, 신경세포의 취약성 (neuronal vulnerability)에 대한 신뢰할 수 있는 실험 기법인 FJB 염색을 수행하였다. 음이온 (anionic) 형광색소 (fluorochrome) Fluoro-Jade B (FJB)는 PTZ 투여 후 여러 시간 지점 (time point)에 퇴화한 뉴런을 염색하는데 사용했다.

[0073] FJB-양성 (positive) 세포는 1주일 동안 식염수 (saline)를 주사한 대조군 (control) 그룹의 대뇌 피질과 해마 둘 다에서 관찰되지 않았다. 1주일 동안 PTZ를 투여한 경우에는 대뇌 피질과 해마 부위 둘 다에서 전체 FJB-양성 (positive) 세포 수가 상당히 증가하였고, 이를 통해 과도한 신경세포 손실이 PTZ 주입 그룹에서 유발됨을 Fluro-Jade B (FJB) 염색법에 의해 확인하였다 (도 6). 또한, PTZ 주입 그룹에 TQ와 비타민 C를 전처리하였을 경우, 각각 대뇌 피질과 해마 둘 다에서 FJB-양성 (positive) 세포의 수가 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

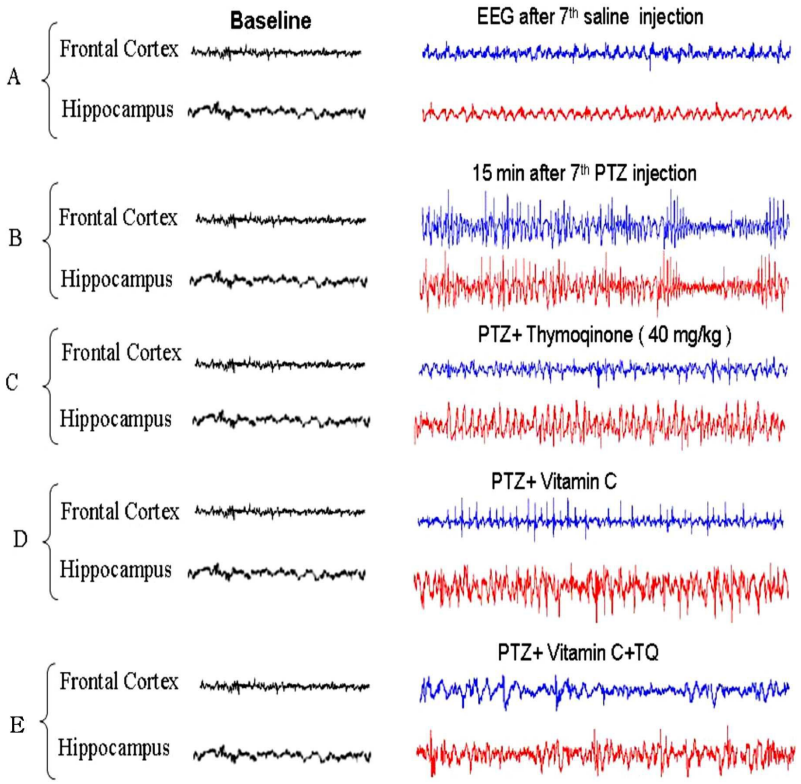
[0074] 추가적으로, 1주일 동안 약물 처리 후, PTZ 투여에 의해 유도된 성인 랫트 뇌의 대뇌 피질과 해마의 신경 세포 사멸의 정도와 TQ와 비타민 C에 의한 신경 세포 보호 정도를 평가하기 위하여, 니슬 (nissl) 염색법을 수행하였다.

[0075] 그 결과, PTZ 투여 그룹의 대뇌 피질과 해마에서 사멸한 신경 세포의 분명한 징후 (즉, 작거나 크게 응축, 분할, 어두운 파란색 (dark-blue) 핵과 세포 사멸한 소체 (apoptotic body)가 포함 된 세포)를 발견했다. 대조군 (control) 실험동물 그룹에서는 형태학적으로 두 뇌 영역의 신경세포가 정상적인 형태를 보이는 데 반해, PTZ-투여 실험동물 그룹에서는 두 뇌 영역에서 신경세포 손실, 액포화 (vacuolization) 및 조직 붕괴 정도가 두드러지게 증가했다 (도 7). 반면, PTZ 투여 그룹에 TQ와 비타민 C를 전처리하는 경우에는, 뇌 부위에 훨씬 더 적은 액포화 (vacuolization) 현상이 일어나고 신경 세포 손실이 줄었음을 확인할 수 있었다.

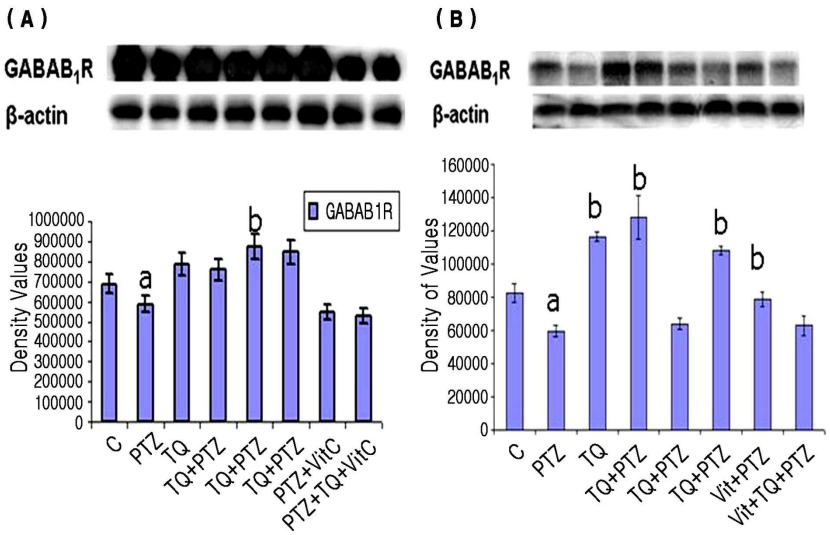
[0076] 이러한 결과를 통하여, PTZ는 신경 세포의 사멸 및 손실을 유도할 수 있으며, TQ 및 비타민 C는 이러한 신경 세포를 보호할 수 있는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

도면

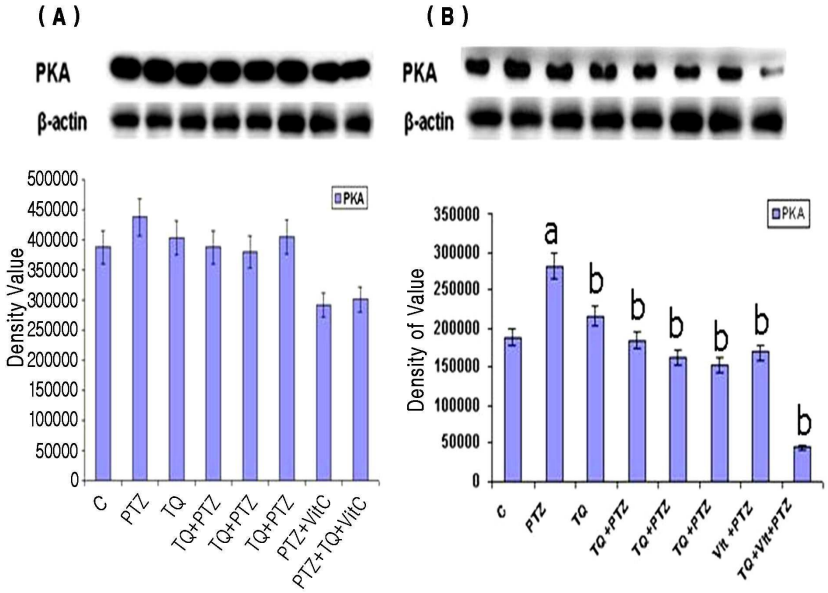
도면1


Baseline
EEG after 7th saline injection
A
Frontal Cortex
Hippocampus
15 min after 7th PTZ injection
B
Frontal Cortex
Hippocampus
PTZ+ Thymoqinone (40 mg/kg)
C
Frontal Cortex
Hippocampus
PTZ+ Vitamin C
D
Frontal Cortex
Hippocampus
PTZ+ Vitamin C+TQ
E
Frontal Cortex
Hippocampus

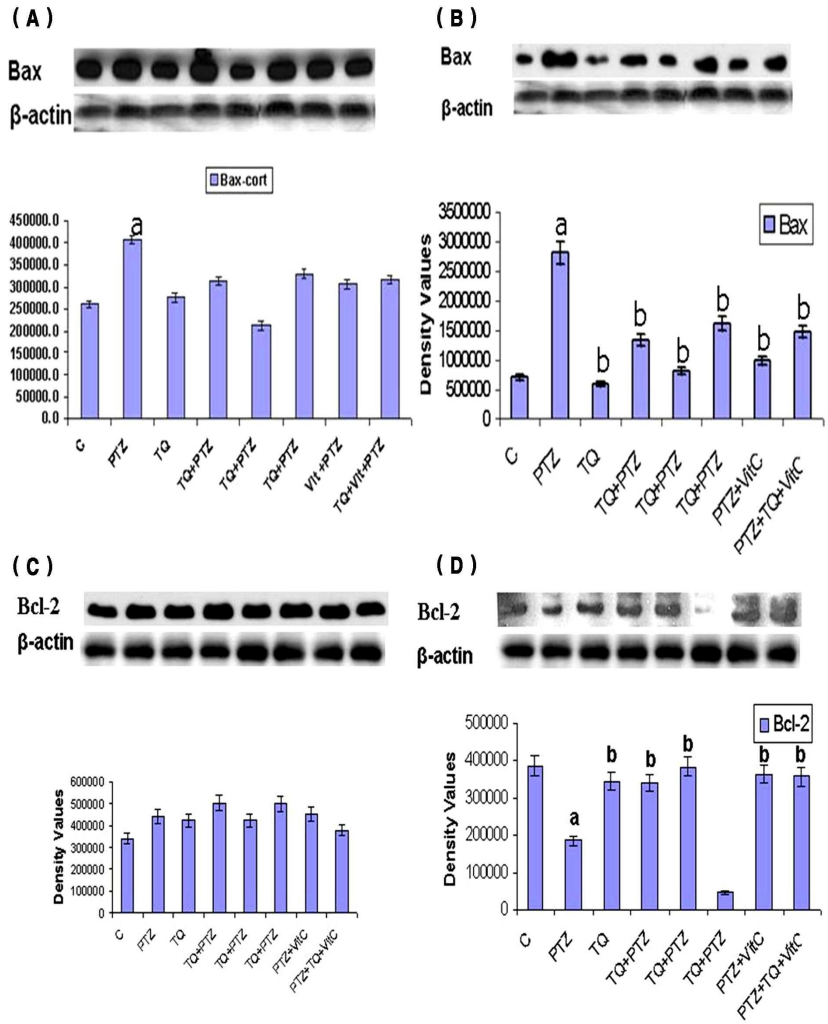
도면2


(A)
GABAB1R
β-actin
GABAB1R
Density Values
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
a
b
C
PTZ
TQ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
PTZ+VitC
PTZ+TQ+VitC
(B)
GABAB1R
β-actin
Density of Values
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
a
b
b
b
C
PTZ
TQ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
Vit+PTZ
Vit+TQ+PTZ

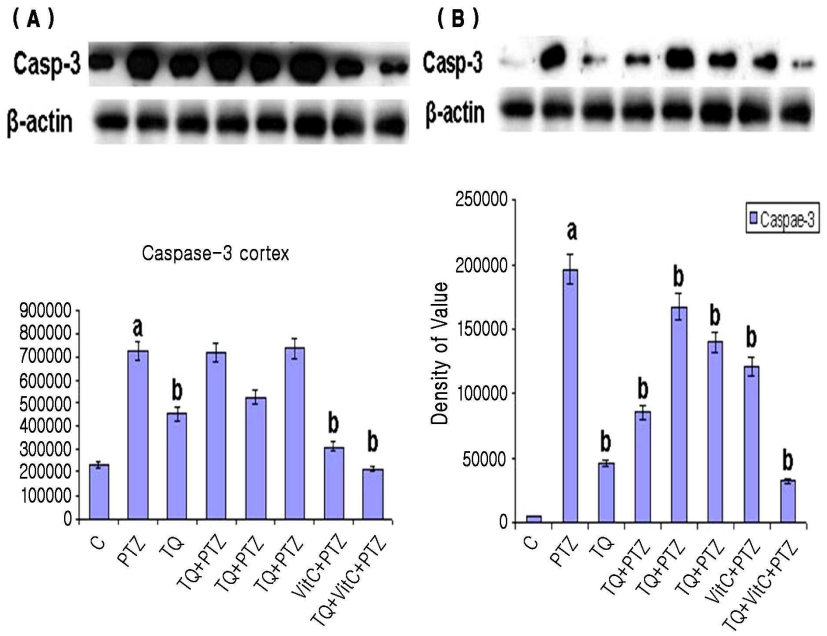
도면3


(A)
PKA
β-actin
(B)
PKA
β-actin
Density Value
PKA
C
PTZ
TQ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
PTZ+VitC
PTZ+TQ+VitC
Density of Value
PKA
a
b
C
PTZ
TQ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
Vit +PTZ
TQ+Vit+PTZ

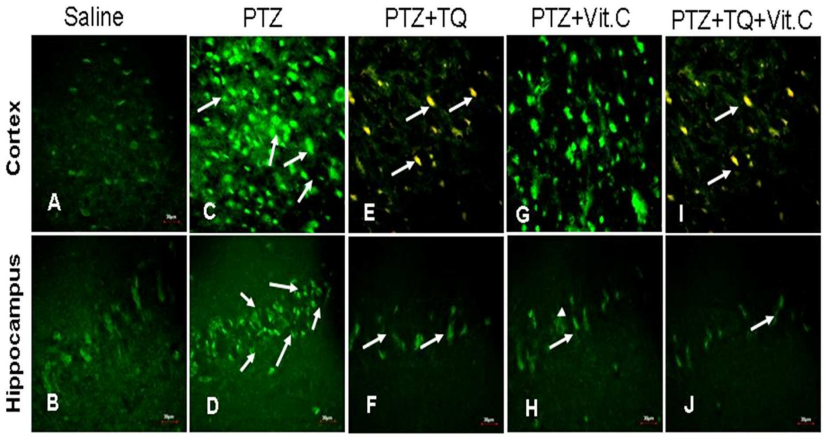
도면4


(A)
Bax
β-actin
Bax-cort
a
b
C
PTZ
TQ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
Vit+PTZ
TQ+Vit+PTZ
(B)
Bax
β-actin
Density Values
Bax
a
b
C
PTZ
TQ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
PTZ+VitC
PTZ+TQ+VitC
(C)
Bcl-2
β-actin
Density Values
C
PTZ
TQ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
PTZ+VitC
PTZ+TQ+VitC
(D)
Bcl-2
β-actin
Density Values
Bcl-2
a
b
C
PTZ
TQ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
PTZ+VitC
PTZ+TQ+VitC

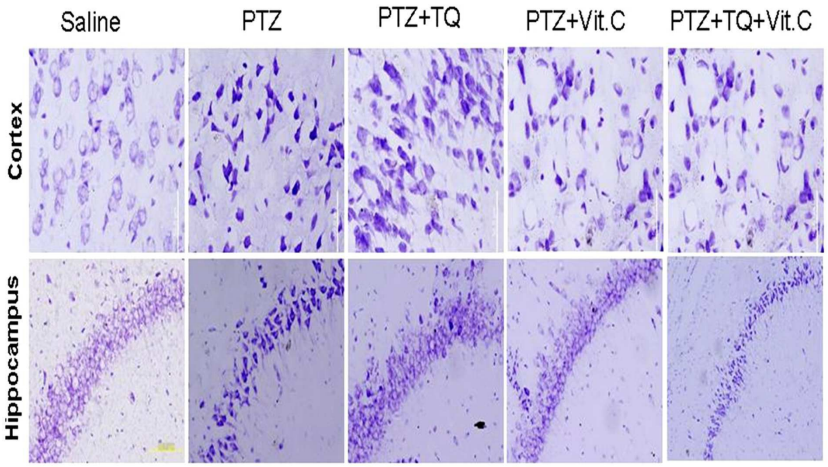
도면5


(A)
Casp-3
β-actin
(B)
Casp-3
β-actin
Caspase-3 cortex
Density of Value
Caspae-3
C
PTZ
TQ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
TQ+PTZ
VitC+PTZ
TQ+VitC+PTZ

도면6


Saline
PTZ
PTZ+TQ
PTZ+Vit.C
PTZ+TQ+Vit.C
Cortex
Hippocampus
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J

도면7


Saline
PTZ
PTZ+TQ
PTZ+Vit.C
PTZ+TQ+Vit.C
Cortex
Hippocampus