



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0127881
(43) 공개일자 2013년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/155 (2006.01) A61K 31/122 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0051712

(22) 출원일자 2012년05월15일

심사청구일자 2012년05월15일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김명옥

경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호

박문석

경상남도 진주시 가좌동 900

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

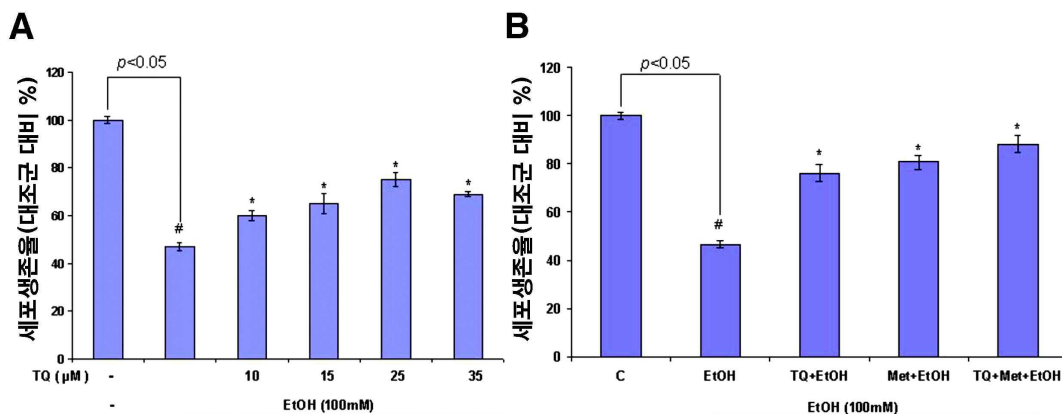
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 메트포민 및/또는 타이모퀴논을 포함하는 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 메트포민(Metformin, Met) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물 및 메트포민(Metformin, Met) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 개선 또는 예방용 건강기능식품에 관한 것이다. 또한, 상기 조성물에 타이모퀴논(Thymoquinone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 조성물 및 상기 건강기능식품에 타이모퀴논(Thymoquinone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 건강기능식품 역시 본 발명의 구성에 포함된다. 본 발명의 조성물 및 건강기능식품을 이용하는 경우, 모체의 알코올 섭취에 의해 신경 관련 질환이 예상되는 태아에 있어서 신경보호 효과를 나타냄으로써 태아의 알코올 노출에 의한 신경질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김태현

경상남도 진주시 가좌동 900

이혜령

경상남도 진주시 가좌동 900 경상대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF 2012-0004789

부처명 한국연구재단

연구사업명 융합파이오니아

연구과제명 나노/뇌질환소재 BNIT 융합기술을 이용한 스마트 플랫폼 표적약물 전달 및 뇌기능향진 조
질물질 · 기법 기술개발

기 여 율 70/100

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.04.01 ~ 2012.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ 008075

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대 바이오그린 21

연구과제명 고기능성 국내산 농산물 천연신물질에서 신경장애 및 퇴행성 뇌질환 개선(치료)제 개발
및 모색

기 여 율 30/100

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

메트포민(Metformin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 타이모퀴논(Thymoquinone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 신경질환은 뇌수종(hydrocephalus), 소두증(microcephaly), 대뇌피질형성이상(cerebral dysplasia), 뇌용량형성부전증(agenesis of the corpus callosum) 및 태아 알코올 증후군(fetal alcohol syndrom)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 조성물.

청구항 5

메트포민(Metformin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 개선 또는 예방용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 건강기능식품은 타이모퀴논(Thymoquinone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 건강기능식품.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 신경질환은 뇌수종(hydrocephalus), 소두증(microcephaly), 대뇌피질형성이상(cerebral dysplasia), 뇌용량형성부전증(agenesis of the corpus callosum) 및 태아 알코올 증후군(fetal alcohol syndrom)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 질환인 것인 건강기능식품.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 메트포민(Metformin, Met) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물 및 메트포민(Metformin, Met) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 개선 또는 예방용 건강기능식품에 관한 것이다. 또한, 상기 조성물에 타이모퀴논(Thymoquinone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 조성물 및

상기 건강기능식품에 타이모퀴논(Thymoquinone) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 건강기능식품 역시 본 발명의 구성에 포함된다.

배경 기술

- [0002] 알코올(에탄올)은 정신활성물질로 가장 많이 쓰이고 있으며, 알코올 중독은 많은 국가에서 의학적 사회경제적으로 문제시되고 있다. 이러한 알코올은 신경전달물질 및 신경조절물질의 합성, 방출, 수용체 결합 및 신호를 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다. 뇌 성장 기간 중의 에탄올 노출은 신경이동에서의 결합, 몇몇 뇌 부위에서의 세포감소 및 시냅스 연결과 뉴런 수 결손 등의 역효과를 일으키는 것으로 알려져 있다.
- [0003] 태아(임신 초기의 수정란 또는 임신 중기 이후의 태아)에 있어서 에탄올은 신경부위 성장 기간 동안 뇌에서 신경의 취약한 부분에 넓은 부위의 구조적 및 기능적 변형에 영향을 미쳐 태아 알코올 증후군(Fetal Alcohol Syndrom, FAS)을 일으킨다. 특히, 뉴런은 시냅스 형성기간 동안에 에탄올 유도성 신경퇴화에 좀 더 취약한데, 사람의 경우 이러한 시냅스 형성기간은 임신 3개월 후부터 출생 후까지 계속되는 것으로 알려져 있으며, 이 시기에 뇌가 급격히 성장한다. 따라서, 임산부가 알코올을 섭취하는 경우에 모체 내 태아의 뇌 성장 및 발달에 심각한 문제를 초래하는 것으로 알려져 있다. 특히, 음주여성의 60%에서 임신 후 4주까지 임신여부를 모르고 있었던 것으로 보고되었고, 태아 알코올 증후군은 선진국에서 1,000명의 신생아에서 0.97건으로 보고되고 있다.
- [0004] 에탄올에 의한 태아의 신경질환 유발과 관련하여 현재까지 구체적인 기작에 대해서는 아직까지 명확히 알려진 바가 거의 없다. 다만, 에탄올은 세포사멸 연관 유전자 발현의 변형을 통해 세포 죽음을 유도하는 것으로 알려져 있는데, 최근에 에탄올에 의한 세포사멸에 있어 지속적인 Ca^{2+} 의 과적에 의해 하류 캐스페이즈 활성화와 관련된 포스트 미토콘드리아 작용이 활성화되는 기작이 관여되어 있음이 일부 보고되고 있다.
- [0005] 한편, 메트포민(metformin)은 비-인슐린 의존성 당뇨병(non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM)의 치료기술에서 사용되어온 경구용 항고혈당 약물로서, 고혈당 상태의 다양한 내피세포에서 투과 전이 통로(PTP) 개방 및 그에 따른 세포 죽음을 저해한다고 알려져 있다. 최근, 산화적 스트레스에 노출되었을 때 프라이머리 신경세포에서 메트포민이 세포사멸 반응을 중지시킬 수 있다는 것이 또한 보고되었다. 이러한 사실을 통해 메트포민이 고혈당 관련 질환 치료뿐만 아니라, 신경퇴행성 질환 및 당뇨병-연관 신경병리 치료에 사용되어질 수 있는 가능성이 대두되고 있는 실정이다.
- [0006] 또한, 타이모퀴논(Thymoquinone, TQ)은 대회향(*Nigella sativa*) 종자유의 주성분으로 알려져 있다. 일년생 식물로 검은 씨 또는 검은 커민으로 알려진 대회향은 전통적으로 기침, 기관지염, 열 및 독감을 포함하는 다양한 질병에 대해 사용되어 왔으며, 타이모퀴논은 항산화 효과를 통해 세포내 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)를 직접적으로 감소시켜 혈청 또는 당의 소실에 의해 유도되는 PC12세포의 사멸을 억제하는 효과가 있음이 알려져 있다. 또한, 최근에 본 발명자들이 만성 틴루엔 노출에 의한 해마에서 산화적 스트레스를 감소시켜 신경세포 사멸을 억제하는 효과를 확인하여 보고한 바 있다.
- [0007] 그러나, 아직까지 메트포민과 타이모퀴논을 이용한 알코올에 의해 유발되는 신경세포 사멸 및 태아발생과의 상관관계에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다.
- [0008] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 임신중 알코올 노출에 의한 신경세포 손상을 방지하는 물질에 대하여 연구한 결과, 임신한 랫트의 해마영역에 메트포민 또는 타이모퀴논을 각각 또는 혼합하여 처리하는 경우에 신경세포의 사멸을 억제할 수 있음을 확인함으로써 뇌손상에 대한 치료적인 접근법이 될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

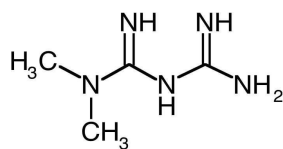
- [0009] 본 발명의 목적은 메트포민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경 질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물에 타이모퀸 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 메트포민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 개선 또는 예방용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 건강기능식품에 타이모퀸 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 개선 또는 예방용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 메트포민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 추가로, 본 발명은 상기 조성물에 타이모퀸 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명에서 용어, "메트포민(Metformin, Met)"은 비-인슐린 의존성 당뇨병의 치료에 널리 사용되어온 경구용 항고혈당 약물의 하나인 화합물로서, 그 화학적 구조는 하기 화학식 1로 표시된다. 본 발명에서는 상기 메트포민이 그 단독으로도 알코올에 의한 신경세포 손상 방지 효과를 나타내고, 하기 타이모퀸과 함께 병용하여 사용하면 시너지 효과를 갖는다는 것을 확인하였다.

[0016]

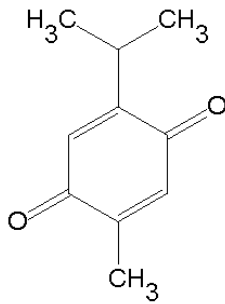
[0017] [화학식 1: 메트포민]



[0018]

- [0019] 본 발명에서 용어, "타이모퀸(Thymoquinone, TQ)"은 대회향(*Nigella sativa*) 종자유의 주성분으로 알려진 화합물로서, 그 화학적 구조는 하기 화학식 2로 표시된다. 상기 타이모퀸은 그 단독으로도 알코올에 의한 신경세포 손상 방지 효과를 발휘할 수 있으나, 메트포민과 병용하여 사용하였을 때, 시너지 효과를 나타낼 수 있다.

[0020] [화학식 2: 타이모퀴논]



[0021]

[0022] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 메트포민 및 타이모퀴논을 단독 또는 병행처리하였을 때, 알코올에 의한 신경세포 손상 방지 효과 및 병용 시너지 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0023] 따라서, 알코올에 의한 신경세포 손상 방지 효과를 갖는 메트포민 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물은 알코올에 의한 신경세포 손상과 관련된 태아 알코올 증후군(fetal alcohol syndrome), 뇌수종(hydrocephalus), 소두증(microcephaly), 대뇌피질형성 이상(cerebral dysplasia), 뇌용량형성부전증(agenesis of the corpus callosum) 및 뉴런 아교세포 헤테로피아(neuronal-glia heteropias) 등의 질환의 치료 또는 예방 효과를 나타낼 수 있다.

[0024] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 염"은 화합물의 상대적으로 무독성인 무기 및 유기산 부가염을 의미한다.

[0025] 본 발명의 화합물은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 이의 염 및 용해성 화합물로 제조될 수 있다.

[0026] 염으로는 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과같은 수혼화성 유기용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0027] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 제조할 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예를 들어, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0028] 상기 메트포민 및 타이모퀴논의 화합물의 염은, 달리 지시되지 않는 한, 메트포민 및 타이모퀴논에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들면, 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 염으로는 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0029] 본 발명의 메트포민 및 타이모퀴논은 알코올에 의한 신경세포 손상 방지 효과를 나타내는 한 이들의 이성질체 및 유도체를 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어, "이성질체"는 화학식은 같으나 동일하지는 않은 화합물의 관계를 의미하며, 이러한 이성질체

의 종류에는 구조 이성질체, 광학 이성질체 및 부분입체이성질체가 있다. 입체이성질체란, 동일한 화학적 구성을 갖지만, 공간 중에서 원자 또는 기의 배열의 측면에서 상이한 화합물 의미하고, 광학 이성질체(거울상 이성질체)는 서로 겹치지 않는 거울상을 갖는 한 화합물의 두 입체이성질체를 의미하며, 부분입체이성질체는 둘 이상의 비대칭 중심을 가지고 그것의 분자들이 서로 거울상이 아닌 입체이성질체를 의미한다.

[0031] 본 발명에서 용어, "유도체"는 메트포민 또는 타이모퀸은 화합물의 구조 일부를 다른 원자나 원자단으로 치환하여 얻어지는 화합물을 의미한다.

[0032] 본 발명에서 용어, "태아"는 포유류의 모체 안에서 자라는 유체를 의미하며, 상기 포유류의 예로는 쥐, 토끼, 말, 소, 양, 개, 고양이, 원숭이 및 인간 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 태아의 종류가 제한되는 것은 아니다. 바람직하게, 본 발명의 태아는 포유류의 태아로서 랫트 또는 인간의 태아일 수 있다.

[0033] 또한, 이러한 태아는 모체의 임신 기간 및 태아의 발달 정도에 따라 임신 초기의 태아인 수정란(embryo) 또는 임신 중기 이후의 태아인 태아(fetus)로 분류될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 태아는 신경세포가 발생하고 성장하는 시기의 태아로서, 특히 신경 발생의 초기 단계로 알려진 임신 초기의 수정란(embryo)일 수 있으며, 보다 바람직하게는 본 발명의 태아는 임신 초기에 해당하는 임신 2개월 이후의 인간 태아일 수 있고, 보다 더 바람직하게는 임신 2개월 내지 8개월의 인간 태아, 보다 더 바람직하게는 임신 3개월 내지 5개월, 가장 바람직하게는 임신 3개월째의 태아일 수 있다.

[0034] 본 발명의 일실시예에서는, 예시적으로 상기 임신 초기 기간에 대응하는 임신 17.5일 스프레그-돌리 랫트에 있어서의 메트포민 또는 타이모퀸의 단독 및 혼합 효과를 확인하였다.

[0035] 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. 특히, 에탄올에 노출된 신경세포의 보호는 태아의 추후 발생에 있어서도 중요하며, 메트포민 또는 타이모퀸의 단독 및 혼합 사용이 에탄올에 의해 노출된 신경세포를 보호하는 효과가 있음은 본 발명자들에 의해 최초로 규명되었다.

[0036] 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.

[0037] 본 발명의 일실시예에서는, 예시적으로 임신 17.5일의 스프레그-돌리 랫트를 희생시키고, 양막으로부터 제거 분리한 랫트 태아의 뇌에 대한 신경세포 보호 효과들을 해마 신경세포를 대상으로 하여 확인하였다.

[0038]

[0039] 본 발명에서 용어, "알코올(에탄올)"은 탄소 2개의 에탄(ethan)에서 수소원자 하나가 하이드록시기(-OH)로 치환된 알코올의 한 종류로서 에틸알코올(ethyl alcohol)이라고도 한다. 이러한 에탄올은 무색의 가연성 화합물로서, 용매, 소독제, 연료 등으로 많이 사용되며 신경계와 관련하여서는 에탄올을 섭취할 경우 대뇌 기능 억제에 의해 흥분 상태가 되고, 이후 중추신경 억제의 효과가 나타난다. 에탄올이 함유된 알코올성 음료를 지나치게 자주 마시면 습관성이 생기고 중독에 이르게 된다. 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, 임신부의 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.

[0040] 본 발명에서 용어, "임신 중 알코올 노출에 의한 신경질환"은 모체가 임신 중 알코올을 섭취하는 경우, 태아의 뇌 발달 과정에 이상이 발생하여 시각계 또는 청각계의 형성과 관련된 기형을 유발하거나 신경전달계의 기능장애 등을 일으켜 발생한 태아 기형 질환을 의미하여, 생체 내의 세포의 분화, 신경세포의 이동을 지체시키고, 아포토시스 또는 세포 유착분자에 영향을 받아서 발생하는 태아 기형 발생 질환을 포함한다. 이러한 임신 중 알코올 노출에 의한 태아 기형 질환의 예로는 태아 알코올 증후군(fetal alcohol syndrome), 뇌수종(hydrocephalus), 소두증(microcephaly), 대뇌피질형성 이상(cerebral dysplasia), 뇌용량형성부전증(agenesis

of the corpus callosum) 및 뉴런 아교세포 헤테로피아(neuronal-glia heteropias) 등이 있으나, 상기예에 의해 임신 중 알코올 노출에 의한 태아 기형 질환이 제한되는 것은 아니다.

[0041] 바람직하게 본 발명은 상기 질환들 중 태아 알코올 증후군에 대한 치료제로 사용될 수 있는데, "태아 알코올 증후군"이란, 임신 중 과도하게 알코올을 섭취한 모체에서 태어난 신생아의 알코올과 관련된 선천성 기형으로 신체적·정신적인 이상을 나타낸다. 일반적으로 태아 알코올 증후군에서 태아는 정신지체, 소뇌증, 저체중, 짧은 안검열(아래위 눈꺼풀이 맞닿는 면) 등 4가지 특징적인 증세가 나타나며, 출생 후 성장지체, 팔, 다리 및 관절이상, 학습장애, 심장질환, 외부 생식선과 컷볼 기형 등의 특징이 나타난다. 이 밖에 섬세하게 움직이거나 크게 움직이는 능력이 부족하고, 근력이 약하면서 떨림증이 나타나며, 과도하게 행동하거나 사회성이 떨어지고 판단력을 잃는 등의 행동장애가 나타나기도 한다.

[0042] 본 발명에서는 이러한 알코올(에탄올)을 섭취한 모체 내 태아의 신경세포 손상이 메트포민 또는 타이모킨논의 단독 및 병용처리에 의하여 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

[0043] 구체적으로, 본 발명의 실시예에서는 태아의 신경세포를 배양하여 에탄올, 메트포민 또는 타이모킨논을 단독처리 또는 병용처리한 후, 생존율을 측정하였다. 그 결과, 대조군과 비교하여 메트포민 또는 타이모킨논을 단독처리 또는 병용처리한 세포의 생존율이 유의하게 증가함을 확인하였다(도 1). 또한, 에탄올과 메트포민 또는 타이모킨논을 단독처리 또는 병용처리와 함께 처리하는 경우 세포 아포토시스 유발에 관련된 단백질인 Bax, PARP, 케스페이즈-3 및 케스페이즈-9의 발현 감소, 세포질로 방출되는 사이토크롬 C의 양의 감소, 아포토시스를 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2의 발현이 증가 및 미토콘드리아 막 전위의 회복과 DNA 손상을 방지함을 확인하였다(도 2 내지 도 7).

[0044] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체로, 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 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, 텍스트로즈, 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, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0045] 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.

[0046] 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 1×10^5 개의 세포당 0.1 내지 2 mM로 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 0.3 내지 1.5 mM, 보다 더 바람직하게는 0.4 내지 1.2 mM, 가장 바람직하게는 1×10^5 개의 세포당 1 mM로 투여될 수 있다.

[0047] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 치료 방법을 제공한다.

[0048] 본 발명에서 용어 "개체"는 임신중 알코올에 의한 신경세포 손상 방지 효과를 갖는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간과 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물을 의미한다. 임신중 알코올에 의한 신경세포 손상 방지 효과를 갖는 메트포민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여함으로써, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환, 예컨대 태아 알코올 증후군, 뇌수종, 소두증, 대뇌피질형성 이상, 뇌용량형성부전증 및 뉴런 아교세포 헤테로피아 등을 효과적으

로 예방 및 치료할 수 있다. 또한, 상기 메트포민과 병용 처리하였을 때, 시너지 효과를 갖는 타이모퀸논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여함으로써, 상기 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환들을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0050] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 메트포민 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 개선 또는 예방용 건강기능식품을 제공한다.

[0051] 추가로, 본 발명은 상기 건강기능식품에 타이모퀸논 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환 개선 또는 예방용 건강기능식품을 제공한다.

[0052] 본 발명에 따른 메트포민 또는 타이모퀸논은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 임신중 알코올 노출에 의한 신경질환의 개선 또는 예방을 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.

[0053] 본 발명의 음료 조성물은 필수 성분으로서 메트포민 또는 타이모퀸논을 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; 텍스트린, 사이클로텍스트린 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. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.1 mg 내지 2.0 g, 바람직하게는 약 0.1 mg 내지 1.0 g이다.

[0054] 본 발명의 건강기능식품은 기재로 되는 식품의 제조공정 중에 상술한 본 발명에 따른 메트포민 또는 타이모퀸논을 첨가하는 공정을 가함으로써 또는 기재로 되는 식품의 제조 후에 상술한 본 발명에 따른 메트포민 또는 타이모퀸논을 첨가하는 공정을 가함으로써 용이하게 얻을 수 있다. 이때 필요에 따라 맛과 냄새 교정제를 첨가하여도 좋다.

[0055] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(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. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 당 약 20 중량부 이하의 범위 내에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0056] 본 발명의 조성물 및 건강기능식품을 이용하는 경우, 모체의 알코올 섭취에 의해 신경 관련 질환이 예상되는 태아에 있어서 신경보호 효과를 나타냄으로써 태아의 알코올 노출에 의한 신경질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리가 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 생존에 미치는 영향을 확인한 그래프이다.

도 2는 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리가 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 세포내 Ca^{2+} 농도에

미치는 영향을 확인한 그래프이다.

도 3은 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리가 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 Bcl-2(A) 및 Bax(B) 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 웨스턴 블랏 결과를 보인 사진이다.

도 4는 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리가 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 사이트크롬 C(A) 및 절단된 활성화 케스페이즈-9(B) 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 웨스턴 블랏 결과를 보인 사진이다.

도 5는 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리가 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 케스페이즈-3(A) 및 절단된 활성화 PARP(B) 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 웨스턴 블랏 결과를 보인 사진이다.

도 6은 에탄올, 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리한 세포에 JC-1 염색을 하여 유세포 분석기로 미토콘드리아 막전위 분석 결과(A) 및 형광 염색물질인 FJB 및 PI를 사용하여 신경세포의 형태학적 변화를 관찰한 공초점 현미경 사진(B)이다.

도 7은 에탄올, 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리한 세포에 형광 염색물질인 TUNEL 및 DAPI를 사용하여 DNA 손상을 관찰한 공초점 현미경 사진(A) 및 TUNEL 분석법을 이용하여 DNA 손상 정도를 정량화하여 나타낸 그래프(B)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 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.

[0059] 실시예 1. 동물의 준비

[0060] 암컷 (n=12) 스프래그-돌리 랫트(250 g, 경상대, 신경생물학실험실, 진주, 대한민국)는 온도-통제 환경에서 6시부터 20시까지 사료와 함께 빛이 있는 환경에서 사육하였다. 가임기에 수정한 날을 임신 0.5일로 하였다. 임신 17.5일 후 임신한 스프래그-돌리를 펜토바르비탈 나트륨(3 mg/100 g b.w)을 정맥주사 한 후 목을 베어 희생시켰다. 동물은 실험실 동물 보호 표준 가이드라인에 따라 처리되었고, 모든 실험 절차는 한국 경상대학교 생물학과, 응용 생명과학부의 동물 윤리 위원회에 의해 승인받았다.

[0061] 실시예 2. 일차 세포배양 및 약물 처리

[0062] 임신 17.5일의 태아기 랫트의 해마로부터 배양을 준비하였다. 분리한 임신한지 17.5일째 되는 해마 조직을 0.25% 트립신-EDTA로 20분 동안 처리하였고, 동결 칼슘 및 마그네슘-유리 HBSS(Hank's balanced salt solution, pH 7.4)에서 기계적 연화에 의해 해리하였다. 원심분리에 의하여 펠렛을 모은 후, 세포를 폴리-리신(poly-lysine, 0.02 g/ℓ) 및 챔버 슬라이드로 미리 코팅된 세포 배양판에 놓았다.(1×10^6 cells/ml). 배지는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium), 10% 열-불활성화 우혈청(heat-inactivated fetal bovine serum), 1 mM 피루브산염, 4.2 mM 탄화수소나트륨, 20 mM HEPES, 0.3 g/ℓ 우혈청알부민, 50 U/ml 페니실린 및 50 mg/ℓ 스트렙토마이신으로 구성하였다. 배양은 5% CO₂ 및 95% 습도, 37℃의 온도에서 진행하였다.

[0063] 4일 후, 해마 신경세포를 정상배지(대조군 C); 에탄올 100 mM 포함 배지(EtOH); 타이모퀸논(TQ) 25 μM 및 에탄올 100 mM 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민(Met) 10 mM 및 에탄올 100 mM 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸논(TQ) 25 μM, 메트포민(Met) 10 mM 및 에탄올 100 mM 포함 배지(TQ+Met+EtOH)에 각각 처리하였으며, 모든 약물 처리군은 시험관 내 배양으로 12시간 동안 37℃에서 배양하였다.

[0064] 실시예 3. 웨스턴 블랏팅

[0065] 일차 배양한 해마 신경세포를 단백질 저해제로 100 mM PMSF가 함유된 세포용해액(Cell signaling #9803)에서 균질화하고, 얼음 상에 20분간 방치한 후 4분간 초음파(파쇄 15초, 멈춤 10초)를 사용하여 파쇄하였다. 이후 초원심분리 (12,000 rpm, 10분, 2회)를 통해 단백질을 포함하는 상등액을 분리하였다. 단백질 함량은 시료당 30 μℓ에 바이오-라드 단백질 분석 시약(Bio-Rad Protein Assay)을 사용하여 295 nm의 흡광도를 측정하여 확인하였다. 상기 시료 30 μℓ을 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔(30% 아크릴아마이드, 1% 비스, 1 M 트리스, 10% SDS,

10% APS, TEMED) 2장에 동일한 방법으로 분리하였다. 하나의 겔은 코마시블루로 염색하고, 다른 하나는 분리된 단백질을 48 mM 트리스, 39 mM 글라이신, 20% 메탄올 및 0.037% SDS를 함유하는 트랜스퍼 완충용액에서 90 V로 1시간 동안 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 이후, 비특이적인 결합을 감소시키기 위해 단백질이 옮겨진 니트로셀룰로오스 막을 블로킹 용액[0.1% (v/v) 트윈 20 및 6% (w/v) 탈지분유를 포함하는 트리스 완충용액(TBS)]으로 처리하였다. 단백질 추출 면역 반응은 래빗 다클론 IgG Bax, Bcl-2, 사이토크롬 C(cytochrome C), 케스페이즈-3(Caspase-3) 및 케스페이즈-9(Caspase-9) 항체(1:1000, 24 시간, 4°C, Santa Cruz, Cell signaling) 또는 토끼유래 항-마우스 Bax, Bcl-2, 사이토크롬 C, 케스페이즈-3 및 케스페이즈-9 항체(1:1000, Abcam Limited, U K)를 이용하여 수행하였다. 세척 후, Horseradish 퍼옥시다제 결합 염소 항-마우스 및 염소 항-래빗 IgG HRP(1:10000, Bio-Rad)를 가하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 단백질은 ECL-감지시약(Amersham Pharmacia Biotech, 웨스턴 블랏팅 감지 시약)을 사용하여 화학발광에 의해 측정하였다. 웨스턴 블랏은 컴퓨터-기반 Sigma Gel(computer-based Sigma Gel, SPSS Inc. Chicago, USA) 시스템을 사용하여 농도계측기에 의해 분석하였다. 농도는 $\pm$ 표준오차로 표현하였다. Tukey-Kramer 다중-비교 테스트(Tukey-Kramer multiple-comparisons test)에 따른 일원변량분석(One-way ANOVA analysis)은 관련된 실험군 사이의 유의미한 차이를 측정하기 위해서 실시하였다.

[0066] 실시예 4. MTT 분석

[0067] MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]를 사용한 성장 분석을 위하여 지수성장기에 있는 1차 해마 신경세포를 취하였다. 에탄올 노출에 따른 피질 및 해마에 미치는 에탄올의 독성을 측정하기 위하여 MTT 실험을 수행하였다. 해마유래 신경세포(1×10^5 cells/well)를 96 웰 플레이트에서 배양하고, 1차 실험군으로 정상배지; 100 mM 에탄올; 100 mM 에탄올에 각각 10, 15, 25 및 35 μ M 타이모퀸(TQ)을 처리하였으며, 2차 실험군으로 정상배지; 100 mM 에탄올; 25 μ M 타이모퀸(TQ) 및 100 mM 에탄올; 10 mM 메트포민(Met) 및 100 mM 에탄올; 25 μ M 타이모퀸(TQ), 10 mM 메트포민(Met) 및 100 mM 에탄올을 처리하였다. MTT 용액을 최종 MTT 농도가 0.5 mg/ml이 되도록 각 웰에 가하였으며 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 유기용제에 용해된 포르마잔(Formazan)을 가하여 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 결합이 측정된 것이다. 최종 OD(Optical Density)는 $OD=L1-L2$ 의 식을 이용하여 얻고 이를 세포 생존율을 계산하는데 사용하였으며, (처리 웰의 흡광도/ 대조군 웰의 흡광도) $\times$ 100로 표시하였다.

[0068] 실시예 5. 세포 내 Ca^{2+} 측정

[0069] 세포 내 Ca^{2+} 농도를 형광 Ca^{2+} 지표인 아세토キシ메틸 에스테르 퓨라-2/AM을 사용하여 측정하였다(Malgaroli et al., 1987). 4일 배양 및 12시간 처리 후, 배양된 신경세포(1×10^6 세포 농도, 3세트)를 크랩스 버퍼에 두 번 세척 후, 37°C 5% CO_2 가 공급되는 배양기에서, 5 μ M 퓨라-2/AM을 포함하는 DMEM 배지에서 60분동안 배양하였다. 상기 배양된 세포를 로크 용액(pH 7.8)으로 두 번 세척 후 $[Ca^{2+}]_i$ 의 퓨라-2 형광 신호를 형광 분광광도계를 이용하여 측정하였다(MA, 보스턴, 퍼킨 엘머, LS50B). 제논 램프로부터 방출되는 빛은 340에서 380 nm 사이의 밴드 통과필터에서 변환되었고, 510nm에서 방출된 형광은 광자 계측 포토멀티플라이어를 사용하여 나타내었다. 340/380-nm 형광 비율을 평균 2초 간격으로 측정하였다. 형광 신호를 컴퓨터와 보편적인 이미지 소프트웨어 또는 마이크로 맥스 II 컴퓨터와 소프트웨어(origin 7)를 이용하여 분석하였고 저장하였다. 세포내 칼슘을 기준에 설명한대로 상기 언급된 비율 방법을 사용하여 결정하였다(Gryniewicz et al., 1985).

$$[Ca] = K_d \times \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \times \frac{Sf2}{Sb2}$$

[0071] K_d : 세포내의 225 nM의 퓨라-2 Ca^{2+} 상호작용의 해리상수

[0072] R : 340 nm 및 380 nm에서 형광 비율

[0073] Rmin : 제로 Ca^{2+} 비율

[0074] Rmax : 포화 Ca^{2+} 비율(염화 칼슘 이용)

[0075] Sf2 : 제로 Ca^{2+} 의 380 nm에서 형광값

[0076] Sb2 : 포화 Ca^{2+} 의 380 nm에서 형광값

[0077] 실시예 6. JC-1을 이용한 미토콘드리아 막전위 측정

[0078] 미토콘드리아 막전위를 측정하기 위하여 제조사의 프로토콜에 따라 JC-1 미토콘드리아 막전위 검출 키트(Biotium Inc., Hayward, CA, USA)를 사용하였다. JC-1은 미토콘드리아 막 전위에 따라 녹색 또는 붉은색 형광을 방출한다: 녹색 신호는 탈분극한 미토콘드리아를, 붉은 신호는 분극 미토콘드리아를 나타낸다(Reers et al., 1991).

[0079] 이와 같이 붉은 색에서 녹색으로의 형광 변화는 미토콘드리아 막전위의 감소를 나타낸다. 신경세포를 폴리-리신(0.02 g/l) 및 챔버 슬라이드로 미리 코팅된 세포 배양판에 놓았다($1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$). 배지는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium), 10% 열-불활성화 우혈청(heat-inactivated fetal bovine serum), 1 mM 피루브산 염, 4.2 mM 탄화수소나트륨, 20 mM HEPES, 0.3 g/l 우혈청 알부민, 50 U/ml 페니실린 및 50 mg/l 스트렙토마이신으로 구성하였다. 배양은 5% CO_2 및 95% 습도, 37°C 의 온도에서 진행하였다. 4일 후, 해마 신경세포를 정상배지(대조군 C); 에탄올 100 mM 포함 배지(EtOH); 타이모퀸(TQ) $25 \mu\text{M}$ 및 에탄올 100 mM 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민(Met) 10 mM 및 에탄올 100 mM 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸(TQ) $25 \mu\text{M}$, 메트포민(Met) 10 mM 및 에탄올 100 mM 포함 배지(TQ+Met+EtOH)에 처리하였다. 모든 약물 처리군을 시험관 내 배양으로 12시간 동안 37°C 에서 배양하였다. 3개의 배양 플레이트에서 약물 처리된 세포를 모은 후 JC-1을 사용하여 37°C 에서 15분 동안 반응시키고, $1 \times$ assay buffer로 두 번 재부유하였다. 미토콘드리아 막전위의 변화를 단세포 수준에서 FACS Calibur 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 의하여 아래 조건 하에서 측정하였다.

[0080] FL1, 511 volts; FL2, 389 volt; FL1-10.5% FL2; FL2-25.9% FL1; 488 nm 아르곤 전자 레이저 및 585 nm 밴드 패스 필터. 총 10,000개의 세포는 CellQuest software, version 3.0(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 의하여 분석하였으며, 총 세포율과 같은 낮은 미토콘드리아 막전위를 갖는 세포의 정량을 실시하였다.

[0081] 실시예 7. Fluoro-Jade-B 및 PI 염색

[0082] Fluoro-Jade-B(FJB) 염색은 폴리-D-라이신-코팅된 챔버 슬라이드에서 배양된 GD 17.5 프라이머리 대뇌피질 세포를 이용하여 수행하였다. 4일된 배양체를 37°C 에서 12시간 처리한 후, 5분 동안 4% 파라포름알데히드를 포함하는 PBS로 고정하여 -70°C 에서 보관하였다. 보관된 슬라이드는 3시간 동안 공기 건조하여 다음의 순서로 처리하여 분석에 사용하였다; 0.06% 포타슘 퍼망간네이트 용액에 10분간 처리 후, 증류수로 세척하고, 0.0004% FJB(Calbiochem, San Diego, 캘리포니아, 미국)를 포함하는 0.1% 초산에 20분간 처리 후, 다시 증류수로 3회 세척하였다. 세척된 슬라이드를 10분간 55°C 에서 건조한 후 공초점 현미경에 FITC 필터를 사용하여 관찰하였다(Olympus Fluoview FV1000, 일본).

[0083] PI(propidium iodide) 염색을 위해 슬라이드를 $1 \mu\text{g/ml}$ 농도로 PI를 첨가한 PBS로 상온에서 20분간 처리한 후, 10분간 PBS로 두번 세척하였다. 글래스 커버 슬립을 마운팅 배지를 사용하여 세척된 슬라이드 글래스 위에 고정하여 분석에 사용하였다.

[0084] 실시예 8. TUNEL 및 DAPI 염색

[0085] 세포 사멸의 통상적인 특징을 감지하기 위해, 세포를 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling; GenScript Corporation, 미국)로 염색하였고 $4',6\text{-diamidino-2-}$

phenylindole(DAPI)를 사용하여 대비 염색하였다. TUNEL 염색은 In Situ Cell Death Detection kit Fluorescein (Genescript, 미국)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 실시하였다. 세포는 또한 DAPI(Molecular Probes, Eugene, 오레곤, 미국)로 상온에서 10분간 항온처리하여 증류수로 세척한 후, 글래스 커버 슬립을 마운팅 배지를 사용하여 슬라이드 글래스 위에 고정하였다. DAPI 필터를 사용하여 DAPI 염색(청색)을 감지하였고, FITC 필터를 사용하여 TUNEL 염색(녹색)을 감지하였다. TUNEL-양성(녹색) 및 DAPI-양성(청색) 염색 패턴은 공초점 현미경을 사용하여 획득하였다(Fluoview FV 1000, 올림푸스, 일본). 각 섹션의 다른 구역에서의 TUNEL-양성 세포의 수는 처리 조건을 알지 못하는 관찰자에 의해 확인되었다.

[0086] 실시예 9. 데이터 분석 및 통계

웨스턴 블랏의 밴드는 Sigma Gel 시스템(SPSS Inc, Chicago, IL) 기반의 컴퓨터를 사용하여 농도 계측기에 의하여 스캔하여 분석하였다. 농도는 $\pm$ 표준오차로 표현하였다. Tukey-Kramer 다중-비교 테스트에 따른 일원변량분석은 관련된 실험군 사이의 유의미한 차이를 측정하기 위하여 실시하였다. 모든 경우에서, 통계적 유의미에 대한 수용 값은 대조군과 비교하여 *p가 0.05보다 작을 때이다.

[0088] 결과

[0089] 1. 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 생존율에 미치는 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리 효과

메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리가 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 생존에 미치는 영향을 조사하기 위해 MTT 분석을 수행하여, 도 1A 및 도 1B에 나타내었다. 그 결과, 에탄올에 노출된 대뇌 피질 세포는 12시간 처리 후 신경세포 생존율이 감소하였지만, 타이모퀸논(TQ)을 함께 처리하였을 때는 그 생존율 감소가 둔화되는 것을 확인하였고, 타이모퀸논(TQ)을 25 μ M 농도로 처리하였을 때 가장 높은 생존율을 나타내는 것을 확인하였다(도 1A).

또한, 100 mM 에탄올과 10 mM 메트포민(Met)을 함께 처리한 경우에 있어서도 신경세포 생존율이 증가하고, 100 mM 에탄올과 25 μ M 타이모퀸논(TQ) 및 10 mM 메트포민(Met)을 동시에 처리한 경우에 가장 높은 생존율을 나타내는 것을 확인하였다(도 1B).

이러한 결과는 타이모퀸논(TQ) 및 메트포민(Met)이 단독으로도 알코올에 의해 유발되는 신경세포 독성으로부터 신경세포를 보호하는 효과가 있음을 나타내며, 타이모퀸논(TQ) 및 메트포민(Met)이 조합되어 사용되는 경우, 시너지 효과를 갖는 것을 나타낸다.

[0093] 2. 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 세포내 Ca^{2+} 농도에 미치는 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리 효과

메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리가 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 세포내 Ca^{2+} 농도에 미치는 영향을 조사하기 위해 형광물질인 Ca^{2+} 지시자, Fura-2를 사용하여 측정하여, 도 2에 나타내었다. 그 결과, 에탄올 단독 처리 시에 대조군에 비하여 증가된 세포내 Ca^{2+} 농도는 타이모퀸논 및 에탄올 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민 및 에탄올 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸논, 메트포민 및 에탄올 포함 배지(TQ+Met+EtOH) 처리 시에 감소되는 것을 확인하였다(도 2).

이러한 결과는 타이모퀸논(TQ) 및 메트포민(Met)이 단독으로도 알코올에 의해 유발되는 신경 세포사멸과 연관되어 있는 세포내 Ca^{2+} 농도 증가를 감소시키는 효과를 갖는 것을 나타낸다.

[0096] 3. 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현에 미치는 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리 효과

아포토시스 및 프로그램 세포사(programed cell death)를 조절하는데 관련된 Bcl-2 및 Bax 단백질 발현에 미치는 메트포민 또는 타이모퀸논의 단독 또는 병용처리의 효과를 확인하기 위하여, 신경세포에 에탄올, 메트포민

또는 타이모퀸을 단독 또는 병용처리하여 Bcl-2 및 Bax의 양을 확인하여 도 3에 나타내었다. 그 결과, 에탄올 단독 처리 시에 대조군에 비하여 감소된 Bcl-2의 발현량이 타이모퀸 및 에탄올 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민 및 에탄올 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸, 메트포민 및 에탄올 포함 배지(TQ+Met+EtOH) 처리 시에 증가되는 것을 확인하였다(도 3A).

[0098] 또한, 에탄올 단독 처리 시에 대조군에 비하여 증가된 Bax의 발현량 역시 타이모퀸 및 에탄올 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민 및 에탄올 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸, 메트포민 및 에탄올 포함 배지(TQ+Met+EtOH) 처리 시에 감소되는 것을 확인하였다(도 3B).

[0099] 이러한 결과는 타이모퀸(TQ) 및 메트포민(Met)이 단독으로도 세포자멸사를 억제하는 Bcl-2의 발현을 증가시키고, 동시에 세포자멸사를 유도하는 Bax의 발현을 감소시킴으로써, 알코올에 의해 유발되는 신경세포의 아포토시스를 예방할 수 있음을 나타낸다. 또한, Bax의 발현량 감소에 있어서는 타이모퀸(TQ) 및 메트포민(Met)이 조합되어 사용되는 경우, 시너지 효과를 갖는 것을 나타낸다.

[0100] **4. 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 사이토크롬 C 발현 및 케스페이즈-9 단백질 활성화에 미치는 메트포민 또는 타이모퀸의 단독 또는 병용처리 효과**

[0101] 아포토시스와 관련된 사이토크롬 C 발현 및 케스페이즈-9의 활성화에 미치는 메트포민 또는 타이모퀸의 단독 또는 병용처리의 효과를 확인하기 위하여, 신경세포에 에탄올, 메트포민 또는 타이모퀸을 단독 또는 병용처리하여 사이토크롬 C 및 활성화 상태의 절단된 케스페이즈-9 단백질의 양을 확인하여 도 4에 나타내었다. 그 결과, 에탄올 단독 처리 시에 대조군에 비하여 증가된 사이토크롬 C의 발현량이 타이모퀸 및 에탄올 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민 및 에탄올 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸, 메트포민 및 에탄올 포함 배지(TQ+Met+EtOH) 처리 시에 감소되는 것을 확인하였다(도 4A).

[0102] 또한, 에탄올 단독 처리 시에 대조군에 비하여 증가된 절단된 케스페이즈-9의 발현량 역시 타이모퀸 및 에탄올 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민 및 에탄올 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸, 메트포민 및 에탄올 포함 배지(TQ+Met+EtOH) 처리 시에 감소되는 것을 확인하였다(도 4B).

[0103] 이러한 결과는 타이모퀸(TQ) 및 메트포민(Met)이 단독으로도 아포토시스를 유도하는 사이토크롬 C 및 절단된 케스페이즈-9의 발현을 감소시킴으로써, 알코올에 의해 유발되는 신경세포의 아포토시스를 예방할 수 있음을 나타낸다.

[0104] **5. 에탄올에 의해 손상된 신경세포의 케스페이즈-3 및 PARP 단백질 절단에 미치는 메트포민 또는 타이모퀸의 단독 또는 병용처리 효과**

[0105] 아포토시스와 관련된 케스페이즈-3 및 케스페이즈-3의 작용에 의해 절단되어 활성화되는 PARP 단백질에 미치는 메트포민 또는 타이모퀸의 단독 또는 병용처리의 효과를 확인하기 위하여, 신경세포에 에탄올, 메트포민 또는 타이모퀸을 단독 또는 병용처리하여 케스페이즈-3 및 절단된 케스페이즈-3 단백질의 양을 확인하여 도 5에 나타내었다. 그 결과, 에탄올 단독 처리 시에 대조군에 비하여 증가된 케스페이즈-3의 발현량이 타이모퀸 및 에탄올 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민 및 에탄올 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸, 메트포민 및 에탄올 포함 배지(TQ+Met+EtOH) 처리 시에 감소되는 것을 확인하였다(도 5A).

[0106] 또한, 에탄올 단독 처리 시에 대조군에 비하여 증가된 절단된 PARP 단백질의 양 역시 타이모퀸 및 에탄올 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민 및 에탄올 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸, 메트포민 및 에탄올 포함 배지(TQ+Met+EtOH) 처리 시에 감소되는 것을 확인하였다(도 5B).

[0107] 이러한 결과는 타이모퀸(TQ) 및 메트포민(Met)이 단독으로도 아포토시스를 유도하는 케스페이즈-3의 발현을 감소시킴으로써, 케스페이즈-3에 의해 절단되어 활성화되는 PARP의 절단된 단백질의 양을 감소시킴으로써, 알코올에 의해 유발되는 신경세포의 아포토시스를 예방할 수 있음을 나타낸다.

[0108]

[0109] **6. 에탄올, 메트포민 또는 타이모퀸의 단독 또는 병용처리에 따른 신경세포의 면역형광염색법을 통한 형태학적 평가**

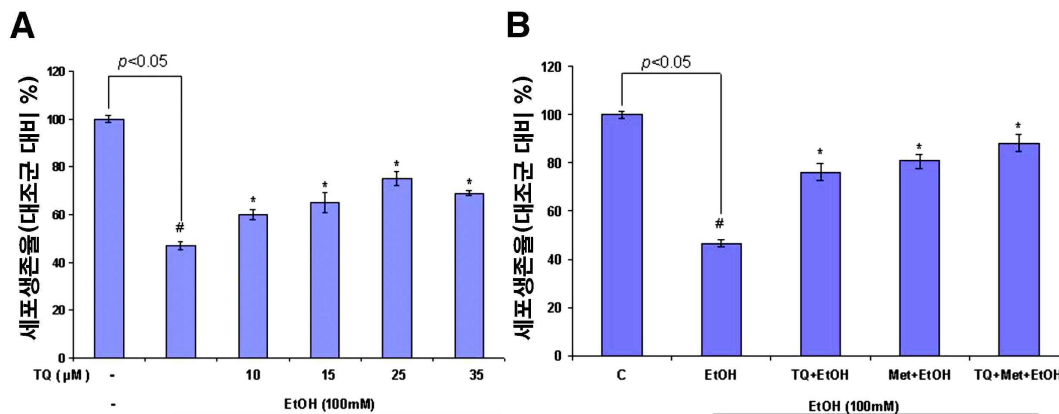
[0110] 메트포민 또는 타이모퀸의 단독 또는 병용처리가 에탄올에 의해 손상된 신경세포에 미치는 형태학적 변화를 확인하기 위하여 형광 염색물질인 JC-1를 사용하여 미토콘드리아 막전위의 변화를 관찰하여 도 6A에 나타내었다. 그 결과, 에탄올 단독 처리 시에 대조군에 비하여 미토콘드리아 막전위가 감소하여 미토콘드리아 내부에서 FL1 형광이 증가하였으나, 타이모퀸 및 에탄올 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민 및 에탄올 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸, 메트포민 및 에탄올 포함 배지(TQ+Met+EtOH) 처리 시에 처리 시에 감소되는 것을 확인하였다(도 6A). 또한, 형광 염색물질인 FJB 및 PI를 사용하여 신경세포의 형태학적 변화를 관찰하여 도 6B에 나타내었다. 그 결과, 에탄올 단독 처리 시에 대조군에 비하여 오그라드는 등의 세포사멸과 관계된 신경세포의 형태 변화가 많이 관찰되었으나, 타이모퀸 및 에탄올 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민 및 에탄올 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸, 메트포민 및 에탄올 포함 배지(TQ+Met+EtOH) 처리 시에 처리 시에 세포사멸과 관계된 신경세포의 형태 변화가 적게 관찰되어지는 것을 확인하였다(도 6B).

[0111] 추가적으로, 메트포민 또는 타이모퀸의 단독 또는 병용처리가 에탄올에 의해 손상된 신경세포에 미치는 형태학적 변화를 확인하기 위하여 형광 염색물질인 TUNEL 및 DAPI를 사용하여 세포사멸의 특징 중의 하나인 DNA 손상을 관찰하여 도 7에 나타내었다. 그 결과, 에탄올 단독 처리 시에 대조군에 비하여 DNA 손상이 증가하여 TUNEL 및 DAPI 형광이 증가하였으나, 타이모퀸 및 에탄올 포함 배지(TQ+EtOH); 메트포민 및 에탄올 포함 배지(Met+EtOH); 타이모퀸, 메트포민 및 에탄올 포함 배지(TQ+Met+EtOH) 처리 시에 처리 시에 감소되는 것을 확인하였다(도 7A 및 도 7B).

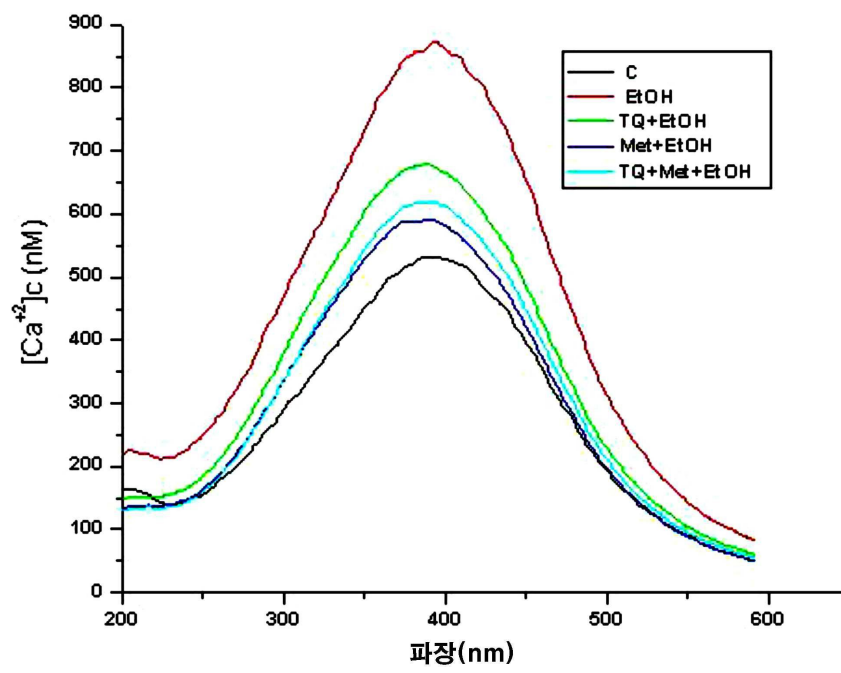
[0112] 이러한 결과는 타이모퀸(TQ) 및 메트포민(Met)이 단독으로도 알코올에 의해 유발되는 신경 세포사멸과 연관되어 있는 미토콘드리아 막전위 증가 및 DNA 손상을 감소시키는 효과가 있음을 나타내며, 타이모퀸(TQ) 및 메트포민(Met)이 조합되어 사용되는 경우, 시너지 효과를 갖는 것을 나타낸다.

도면

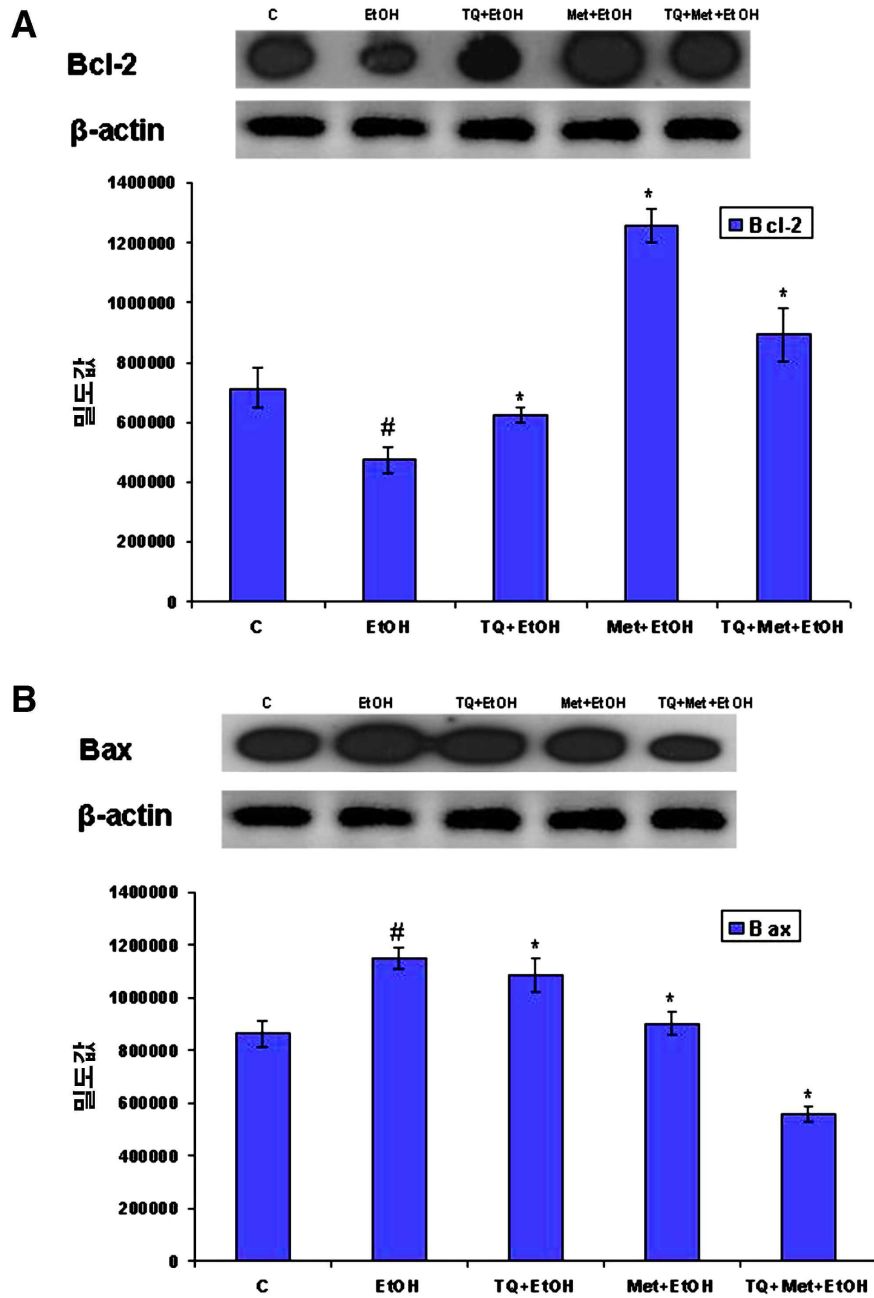
도면1



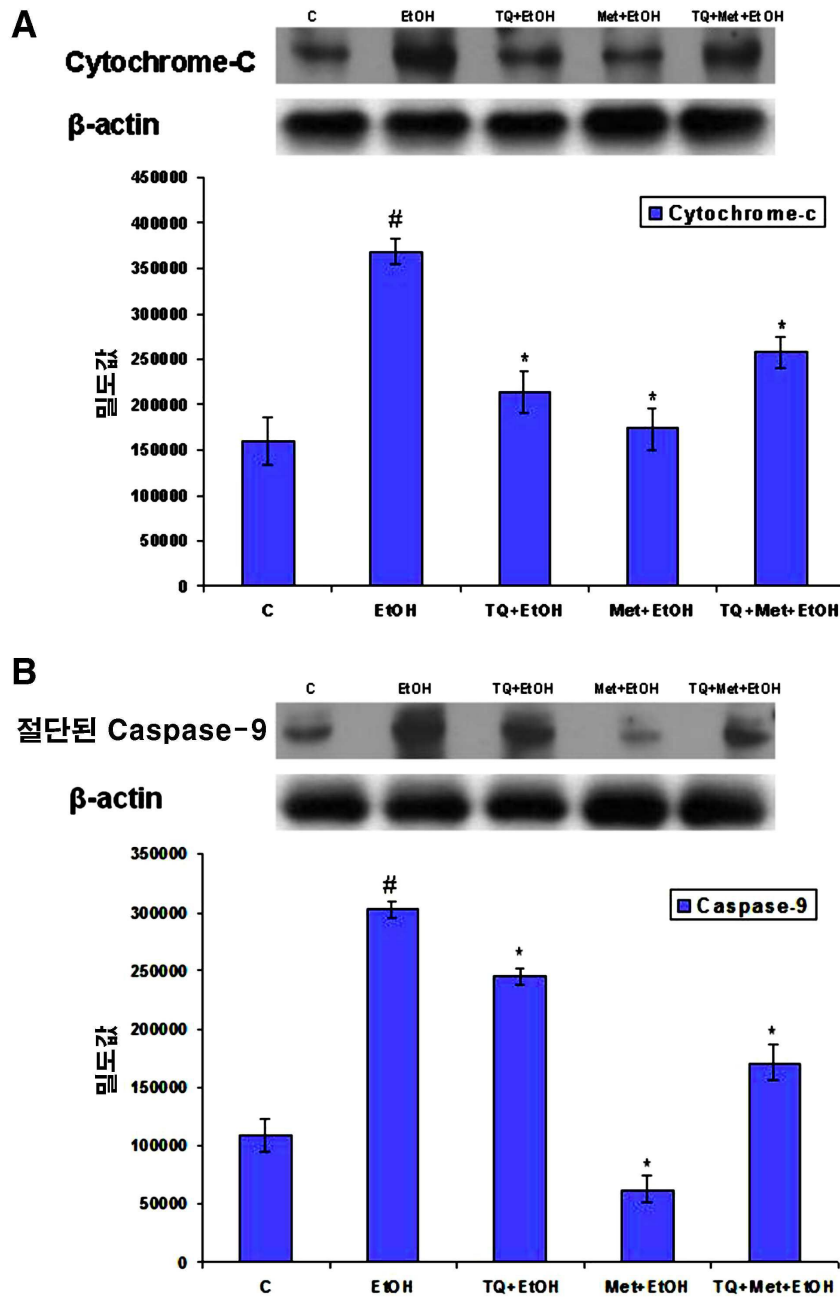
도면2



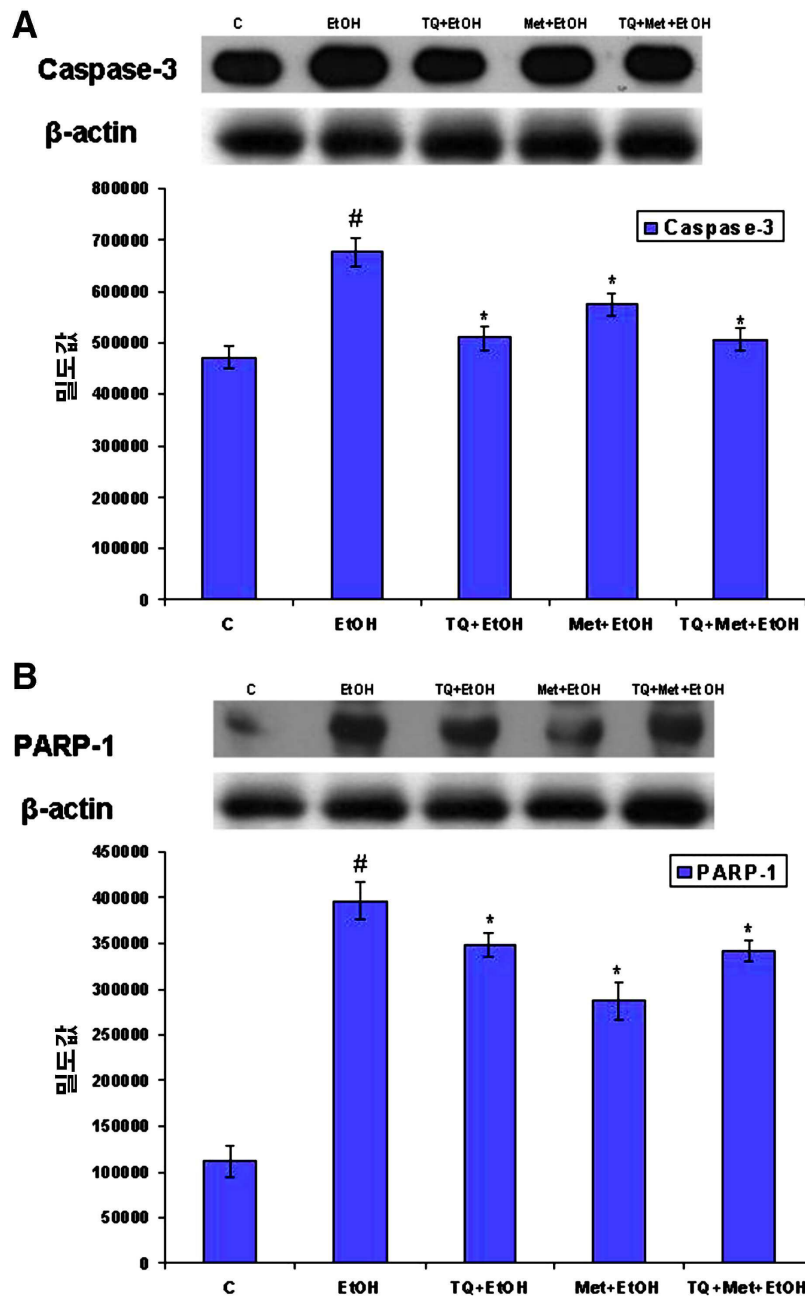
도면3



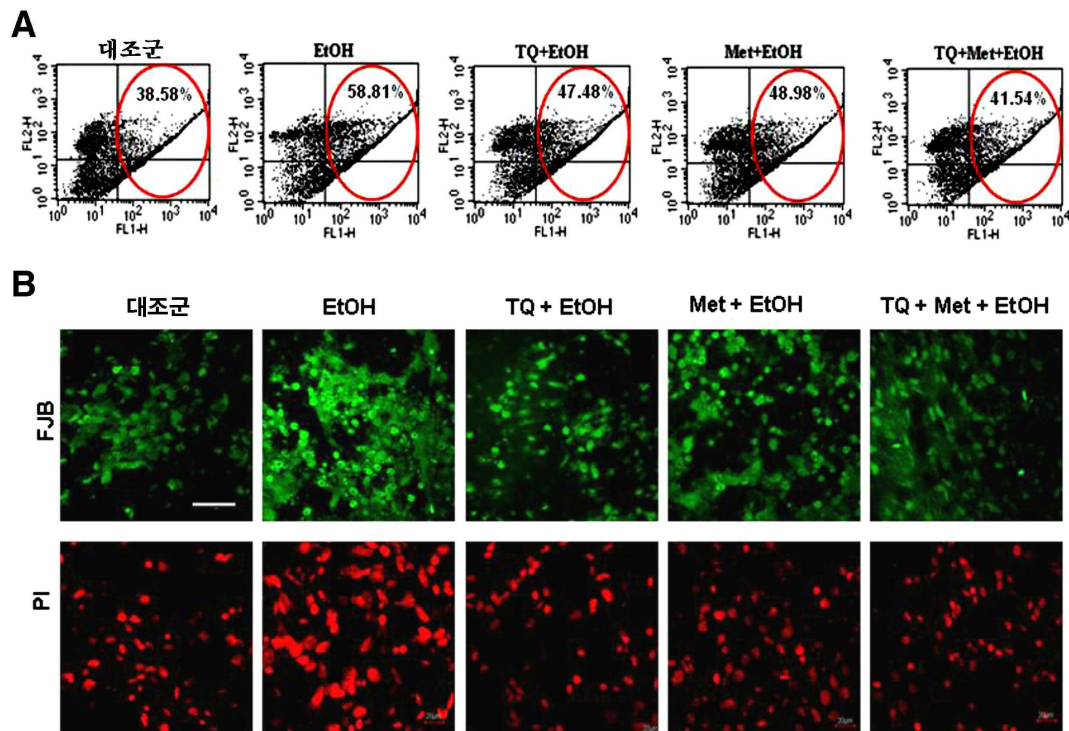
도면4



도면5



도면6



도면7

