



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0112238
(43) 공개일자 2009년10월28일

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0038009

(22) 출원일자 2008년04월24일

심사청구일자 2008년04월24일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

김명옥

경남 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호

박태주

미국 위스콘신주 53706 매디슨 엘름 드라이브 62
5위스콘신-매디슨대학

조미자

경남 진주시 가좌동 경상대학교

(74) 대리인

김동완

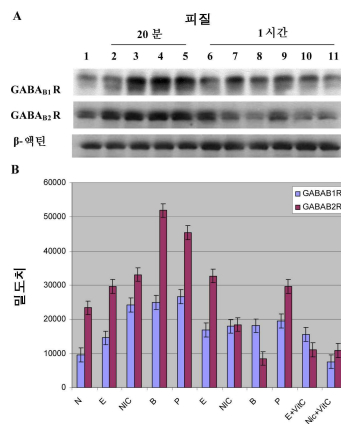
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 랫트 태아 뇌 영역에서 약물 노출에 의한 시험관 내 발현변화 측정 방법

(57) 요약

본 발명은 랫트 태아 뇌 영역에서 약물 노출에 의한 시험관 내 발현 변화 측정 방법에 관한 것으로 랫트 태아의 피질 및 해마 영역에서 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 니코틴과 비타민 C 병용, 에탄올과 비타민 C 병용과 같은 약물 노출시 시험관 내에서 감마-아미노부티르산 B1 수용체, 감마-아미노부티르산 B2 수용체, 단백질 키나제 A의 발현 변화를 측정하기 위한 방법을 제공한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

랫트 태아의 뇌 영역에서 약물 노출에 의한 감마-아미노부티르산(GABA) B1 수용체 발현 변화 측정 방법에 있어서, 피질 영역에서는 상기 감마-아미노부티르산 B1 수용체 발현은 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜 노출시 증가하고 니코틴과 비타민 C 병용시 감소하며, 해마 영역에서는 상기 감마-아미노부티르산 B1 수용체 발현은 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 에탄올과 비타민 C 병용, 니코틴과 비타민 C 병용시 모두 증가함을 특징으로 하는 발현 변화 측정 방법

청구항 2

랫트 태아의 뇌 영역에서 약물 노출에 의한 감마-아미노부티르산(GABA) B2 수용체 발현 변화 측정 방법에 있어서, 피질 영역에서는 상기 감마-아미노부티르산 B2 수용체 발현은 에탄올, 파클로펜 노출시 증가하고 니코틴, 바클로펜, 에탄올과 비타민 C 병용, 니코틴과 비타민 C 병용시 감소하며, 해마 영역에서는 상기 감마-아미노부티르산 B2 수용체 발현은 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 에탄올과 비타민 C 병용, 니코틴과 비타민 C 병용시 모두 증가함을 특징으로 하는 발현 변화 측정 방법

청구항 3

랫트 태아의 뇌 영역에서 약물 노출에 의한 단백질 키나제 A 발현 변화 측정 방법에 있어서, 피질 영역에서는 상기 단백질 키나제 A 발현은 에탄올 노출시 증가하고 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 에탄올과 비타민 C 병용, 니코틴과 비타민 C 병용시 감소하며, 해마 영역에서는 상기 단백질 키나제 A 발현은 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 에탄올과 비타민 C 병용, 니코틴과 비타민 C 병용시 모두 감소함을 특징으로 하는 발현 변화 측정 방법

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 랫트 태아 뇌 영역에서 약물 노출에 의한 시험관 내 발현 변화 측정 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 랫트 태아의 피질 및 해마 영역에서 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 니코틴과 비타민 C 병용, 에탄올과 비타민 C 병용과 같은 약물 노출시 시험관 내에서 감마-아미노부티르산 B1 수용체, 감마-아미노부티르산 B2 수용체, 단백질 키나제 A의 발현 변화를 측정하기 위한 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

- <2> 알코올 중독은 많은 국가에서 의학 및 사회 경제적으로 관련되어 있다고 여겨진다. 뇌 성장기 동안 알코올 노출은 여러 가지 유해효과, 신경 이동시 결함을 포함, 여러 뇌 영역에서 세포 손실 및 뉴런 및 시냅스 연결 수의 감소를 유도한다. 과거 20년 동안 지지된 가설은 알코올이 중추신경계에서 시냅스 커뮤니케이션의 흥분 및 억제 조절하는 신경 단백질의 서브세트와 상호작용을 한다는 것이다. 에탄올은 신경전달물질 및 신경조절자의 합성, 분비, 수용체 결합 및 신호를 조절할 수 있다.
- <3> 감마-아미노부티르산(GABA)_B 수용체는 중추신경계의 성장기 동안 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, GABA_B 수용체와 관련된 백일해 독성-민감성 G-단백질(G_i)은 아데닐산사이클라제를 저해할 수 있고, 결과적으로 cAMP 농도 및 단백질 키나제 A(PKA)-α 활성을 감소시킬 수 있다.
- <4> 상기 단백질 키나제 A 활성 감소는 GABA_B 수용체 활성화에 대하여 GABA 분비 억제에 기여하는 것으로 간주되어 왔으며, GABA 분비 억제에 관련된 GABA_B 수용체는 단백질 키나제 A, 단백질 키나제 C 또는 두 가지 모두를 통해 조절된다. 더욱이 단백질 키나제 A는 급성 및 만성 에탄올 섭취에 따른 뇌에서의 몇 가지 반응을 조절한다. 따라서 GABA_B 수용체가 세포 수준에서 투여된 약물의 효과를 조절할 수 있다. 뇌에서 GABA_B 수용체 발현 및 그 영역에서 변이시 에탄올 및 다른 약물 처리에 관련된 연구는 에탄올 약리학 및 정신흥분제 남용을 설명하는

기본적인 정보를 제공한다.

- <5> 바클로펜은 마우스에서 에탄올-유도 마취를 증가시키거나 랫트에서 에탄올 선호를 감소시키는 선택적인 GABA_B 수용체 작용제이다. 파클로펜(GABA_B 수용체 길항제)은 마우스에서 항경련제 작용뿐만 아니라 에탄올 중독과 운동 활성, 운동 조정 및 체온조절의 장애를 감소시키며, 에탄올 중독시 GABA_B 수용체의 증가된 활성을 나타낸다.
- <6> 에탄올은 신경 성숙의 성장기 동안 뇌에서 신경 취약성을 포함한 구조적이고 기능적인 이상에 대해 광범위한 영향을 끼치며 태아알코올증후군(FAS)을 야기시킨다. 종래의 연구는 에탄올이 성장하는 랫트의 전뇌에서 광범위한 세포사멸성 신경퇴행을 유도한다고 알려져 있다. 약물 남용에 대한 노출, 학습력 및 기억력은 시냅스의 구조적인 변화와 관련되어 있다.
- <7> 더욱이 니코틴에 노출된 랫트의 해마에서 발견된 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 발현의 변화는 인지능력의 니코틴-매개 조절시 수용체와의 관련에 대해 논의된다. 급성 및 만성 니코틴 노출은 장기적 활성화(LTP)의 유발을 촉진시킨다.
- <8> 뇌는 높은 비타민 C 농도를 지니고 있다. 그러나 이제 막 성장기 동안 중추신경계에서 비타민 C의 특이적인 기능이 설명되기 시작되고 있다. 비타민 C는 세포내의 항산화제, 중요한 신경보호제 성분으로 작용하고, 다른 증거는 비타민 C가 신경조절 인자로서 작용한다는 것을 나타내고 있다. 최근에 비타민 C를 포함한 항산화제 영양소는 신경계 기능에 중요하다는 것이 명확해지고 있다.
- <9> GABA_B 수용체는 성숙한 랫트 뇌의 해마에서 잘 발현되나, GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체의 역할에 대해서는 알려진 것이 거의 없으며, GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체는 에탄올 및 다른 약물에 의해 영향을 받는 배양된 뉴런에서 피질 및 해마의 성장 또는 그들의 특성이 지어지는 동안 행동하는 것으로 여겨진다.
- <10> 본 발명에서 본 발명자들은 임신 17.5일로부터 피질 및 해마 영역에서 에탄올, 니코틴, 비타민 C 및 이것의 혼합물 섭취시 단백질 수준에서 GABA_{B1}, GABA_{B2} 수용체 및 단백질 키나제 A-α의 발현 변화를 측정하였으며, 현저한 병리학적인 변화가 에탄올 및 니코틴 노출시 측정되었다. 또한 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 작용제 및 길항제의 효과가 에탄올 및 니코틴 남용에 대한 약물요법시 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체의 가능한 작용 또는 길항 효과를 측정코자 한 것이다.
- <11> 따라서 본 발명자들은 랫트 태아의 피질 및 해마 영역에서 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 니코틴과 비타민 C 병용, 에탄올과 비타민 C 병용과 같은 약물 노출시 시험관 내에서 감마-아미노부티르산 B1 수용체, 감마-아미노부티르산 B2 수용체, 단백질 키나제 A의 발현 변화를 측정하여 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <12> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 랫트 태아의 피질 및 해마 영역에서 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 니코틴과 비타민 C 병용, 에탄올과 비타민 C 병용과 같은 약물 노출시 시험관 내에서 감마-아미노부티르산 B1 수용체, 감마-아미노부티르산 B2 수용체, 단백질 키나제 A의 발현 변화를 측정코자 한 것이다.

과제 해결수단

- <13> 본 발명의 목적은 랫트 태아의 뇌 영역에서 약물 노출에 의한 감마-아미노부티르산(GABA) B1 수용체 발현 변화 측정 방법에 있어서, 피질 영역에서는 상기 감마-아미노부티르산 B1 수용체 발현은 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜 노출시 증가하고 니코틴과 비타민 C 병용시 감소하며, 해마 영역에서는 상기 감마-아미노부티르산 B1 수용체 발현은 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 에탄올과 비타민 C 병용, 니코틴과 비타민 C 병용시 모두 증가함을 특징으로 하는 발현 변화 측정 방법을 제공하는 것이다.
- <14> 또한 본 발명의 또다른 목적은 랫트 태아의 뇌 영역에서 약물 노출에 의한 감마-아미노부티르산(GABA) B2 수용체 발현 변화 측정 방법에 있어서, 피질 영역에서는 상기 감마-아미노부티르산 B2 수용체 발현은 에탄올, 파클로펜 노출시 증가하고 니코틴, 바클로펜, 에탄올과 비타민 C 병용, 니코틴과 비타민 C 병용시 감소하며, 해마 영역에서는 상기 감마-아미노부티르산 B2 수용체 발현은 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 에탄올과 비타민 C 병용, 니코틴과 비타민 C 병용시 모두 증가함을 특징으로 하는 발현 변화 측정 방법을 제공하는 것이다.

<15> 또한 본 발명의 또다른 목적은 랫트 태아의 뇌 영역에서 약물 노출에 의한 단백질 키나제 A 발현 변화 측정 방법에 있어서, 피질 영역에서는 상기 단백질 키나제 A 발현은 에탄올 노출시 증가하고 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 에탄올과 비타민 C 병용, 니코틴과 비타민 C 병용시 감소하며, 해마 영역에서는 상기 단백질 키나제 A 발현은 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 에탄올과 비타민 C 병용, 니코틴과 비타민 C 병용시 모두 감소함을 특징으로 하는 발현 변화 측정 방법을 제공하는 것이다.

효 과

<16> 본 발명의 효과는 랫트 태아의 피질 및 해마 영역에서 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 니코틴과 비타민 C 병용, 에탄올과 비타민 C 병용과 같은 약물 노출시 시험관 내에서 감마-아미노부티르산 B1 수용체, 감마-아미노부티르산 B2 수용체, 단백질 키나제 A의 발현 변화 측정 결과를 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<17> 본 발명은 랫트 태아 뇌 영역에서 약물 노출에 의한 시험관 내 발현 변화 측정 방법을 제공하는 것이다. 랫트 태아의 피질 및 해마 영역에서 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜, 니코틴과 비타민 C 병용, 에탄올과 비타민 C 병용과 같은 약물 노출시 시험관 내에서 감마-아미노부티르산 B1 수용체, 감마-아미노부티르산 B2 수용체, 단백질 키나제 A의 발현 변화를 측정하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

<18> 태아 랫트 뇌의 성장시, 감마-아미노부티르산(GABA)_B 수용체에서 시간 의존적 에탄올 중독 및 약물 효과, 기능 및 그의 조절 역할이 연구되었다.

<19> 본 발명자들은 임신 17.5일에 시험관 내의 감마-아미노부티르산 B1, 감마-아미노부티르산 B2 수용체 및 단백질 키나제 A- α 에서 에탄올, 바클로펜, 파클로펜, 니코틴, 비타민 C, 에탄올과 비타민 C의 병용 및 니코틴과 비타민 C의 병용에 따른 발현 변화를 측정하였다. 감마-아미노부티르산 B1, 감마-아미노부티르산 B2 수용체는 피질 및 해마에서 차별 발현을 나타내었다. 감마-아미노부티르산 B1, 감마-아미노부티르산 B2 수용체는 해마에서 상기 약물에 의해서 증가되었다. 피질에서 상기 수용체들은 20분 동안 상기 약물에 노출됨으로써 유의미하게 발현이 증가되었다. 1시간 동안의 노출에 의해 상기 수용체의 증가시, 감마-아미노부티르산 B1 수용체는 발현이 상당히 감소된 니코틴과 비타민 C 병용을 제외한 모든 약물에 대해서 증가된 발현을 나타낸 반면에, 감마-아미노부티르산 B2 수용체 발현은 약물 노출 1시간 후 에탄올 및 파클로펜에 대해서는 증가하였지만 다른 약물에 대해서는 현저히 감소되었다.

<20> 더욱이 피질 및 해마에서 단백질 키나제 A- α 의 발현은 에탄올에 대해 20분간의 약물 노출시 증가되고, 1시간 동안의 약물 노출시 피질에서는 단백질 키나제 A- α 를 증가시키고, 해마에서는 감소시키는 반면에 다른 모든 약물에 대해서 단백질 키나제 A- α 농도는 피질 및 해마에서 상당히 감소하였다.

<21> 이러한 측정 결과는 약물 투여에 따른 피질 및 해마의 성장기 동안 감마-아미노부티르산 B1, 감마-아미노부티르산 B2 수용체 및 단백질 키나제 A- α 의 조절 효과를 제시하고 있다. 본 발명의 측정 결과는 단백질 키나제 A- α 가 감마-아미노부티르산 B1, 감마-아미노부티르산 B2 수용체 분포와 상당히 중복됨을 나타내고, 이는 약물 투여가 단백질 키나제 A- α 전자 조절 경로의 연관을 나타내는 감마-아미노부티르산 B1, 감마-아미노부티르산 B2 수용체의 영향을 규명한 것이다.

<22> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<23> 랫트 뇌의 피질 및 해마에서 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 발현을 증가시키는 에탄올 섭취

<24> 단백질 수준에서 성장 단계 동안 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체에서 에탄올의 효과를 조사하는 것과 피질 및 해마 영역으로부터의 샘플은 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 조사되었다. 결과는 시험관 내에서 20분 및 1시간 동안 에탄올 노출시 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체가 임신 17.5일에 뇌의 피질 및 해마 영역에서 대조군과 비교시 발현이 상당히 증가한다는 것을 나타낸다(도 1, 2, 라인 2 및 6). 에탄올이 성장한 해마에서 네트워크-유도 진동 활성을 지속적으로 자극한다는 것을 나타내고 있고, 에탄올 노출은 에탄올 작용으로 미성숙 신경 네트워크를 손상시킬 수 있다.

<25> 또한 본 발명자들은 에탄올과 비타민 C의 병용 효과를 조사하였다. 1시간 동안 처리하고 대조군과 비교시 해마에서는 GABA_{B1} 및 GABA_{B2}의 발현이 상당히 증가되는 반면에 피질에서는 단백질 수준에서 GABA_{B1}은 증가되고

GABA_{B2}는 감소되었다(도 1, 2, 라인 10). 본 발명은 GABA_{B2} 보다 GABA_{B1} mRNA가 초기에 더 높은 발현 패턴을 보임을 나타내며 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체는 명확한 분배 패턴을 나타내고, 뇌의 여러 지역에서 초기 성장기 동안 잠재적으로 다른 역할을 한다는 것을 나타내고 있다.

<26> 시험관 내 바클로펜 및 파클로펜 처리에 대한 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체의 발현

<27> GABA_B 수용체는 GABA_{B1} 서브유닛으로 구성된 이질이합체이며, 이는 작용제 결합 및 세포막 및 활성 G-단백질-커플링 신호 시스템에서 GABA_{B1} 거래에 사용되는 GABA_{B2} 서브유닛에 요구되어지는 반면에 GABA_B 수용체 길항제는 반대 작용을 나타낸다. 시험관 내에서 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 발현 확인은 신경세포 상에서 GABA_B 수용체의 작용제 및 길항제인 바클로펜 및 파클로펜을 사용하여 이루어졌다.

<28> 대조군 및 바클로펜, 파클로펜 처리군으로부터의 세포는 20분 및 1시간 동안 배양되었고, 그 후 웨스턴 블롯 분석이 실시되었다. 이 결과는 대조군과 비교시 20분 및 1시간 바클로펜 및 파클로펜 처리군이 해마에서는 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 발현을 증가시키는 효과를 지님을 나타내고, 피질에서는 GABA_{B1} 및 GABA_{B2}가 20분 바클로펜 및 파클로펜 처리군에 대해서는 증가된 효과를 나타내는 반면에 1시간 처리군은 GABA_{B1}에 대해서는 증가를 나타냈으나 바클로펜에 대해서는 GABA_{B2}를 상당히 감소시켰다. 그러나 파클로펜의 경우 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 모두 상당히 증가하는 효과가 나타났다(도 1, 2 라인 4, 5, 8, 9)

<29> 피질 및 해마에서 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 발현시 니코틴 효과

<30> GABA_{B1} 및 GABA_{B2}의 패턴에서 차별 발현 변화는 니코틴 섭취가 해마에서 GABA_{B1} 및 GABA_{B2}의 발현 수준을 차별적으로 조절한다는 이전의 연구와 일치된다. 니코틴이 GABA_B 수용체 발현에 어떤 영향을 끼치는지에 관한 조사가 실시되었다. 본 발명자들은 임신 17.5일에 시험관 내에서 피질 및 해마 세포에서 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체의 발현 변화를 조사하였다.

<31> 대조군 및 니코틴 처리군으로부터의 세포는 20분 및 1시간 동안 배양되었고, 그 후 웨스턴 블롯 분석이 실시되었다. 이 결과는 20분 및 1시간 니코틴 처리군이 피질 및 해마에서 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체의 발현을 증가시키는 효과를 지닌다는 것을 나타낸다(도 1, 2, 라인 3). 이 결과는 니코틴 또는 담배 연기에 대한 만성 노출 및 만성 니코틴 주입이 뇌 보상 기능의 GABA_B 수용체-매개 조절에서 유효한 변화를 유도하지 않아서 감소된 GABA_{B1} 수용체 발현이 랫드의 해마에서 나타났다는 이전의 연구와는 달리 니코틴이 피질 및 해마에서 GABA_{B1} 및 GABA_{B2}의 증가된 발현을 나타낸다는 것을 제시하고 있다. 본 결과는 급성 니코틴 노출은 GABA_B 수용체의 발현을 증가시키는 동시에 만성 및 장기간의 노출은 니코틴에 대해 GABA_B 수용체를 민감하게 할 수 있다는 것을 제시하고 있다.

<32> 또한 니코틴과 비타민 C의 병용 효과가 시험되었다. 해마에서 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 모두는 대조군과 비교시 1시간 처리군에서는 증가되었으나 피질에서 GABA_{B1}은 변화가 없었던 반면에 GABA_{B2}는 대조군과 비교시 단백질 수준에서 현저히 감소되었다(도 1, 2, 라인 11). 이러한 결과는 비타민 C와 니코틴 혼합 처리군은 GABA_{B1} 수용체의 발현에 유효한 효과가 없다는 것을 나타내며, 비타민 C는 부분적으로 GABA_{B2} 수용체 발현시 니코틴 효과를 상쇄시킨다는 것을 제시한다.

<33> 피질 및 해마에서 단백질 키나제 A 발현시 에탄올의 조절 효과

<34> 에탄올 섭취는 이차전령 cAMP를 포함한 다양한 세포내 변화를 설명할 수 있고, 더욱이 이는 인산화 단계의 변화를 통해 단백질 키나제 A를 활성화시킬 수 있고, 다운스트림 유전자 발현 변화를 조절할 수 있다.

<35> 본 발명자들은 프라이머리 신경 세포 배양액으로 처리된 에탄올에서 단백질 키나제 A의 발현 변화를 조사하였다. 에탄올의 행동 및 생화학 효과는 단백질 키나제 A의 발현에 의해 대부분 매개된다. GABA_B 수용체 활성이 단백질 키나제 A에 어떤 영향을 받는지 조사되었고, 또한 GABA_B 수용체는 에탄올 처리하에서 단백질 키나제 A를 활성화시킬 수 있다. 에탄올 처리군은 대조군과 비교시 피질 및 해마에서 단백질 키나제 A 농도의 발현이 증가됨을 나타냈다(도 3, 라인 2 및 5, 도 4, 라인 2 및 6).

- <36> 본 발명의 측정 결과는 에탄올이 전체 단백질 키나제 A α 의 양에 어떤 효과도 일으키지 않는다는 이전의 보고와는 다르다. 이어서 바클로펜 및 파클로펜은 피질에서 20분 및 1시간 동안 단백질 키나제 A의 현저히 감소된 발현을 나타내는 반면에, 해마에서는 20분 동안은 증가되나, 1시간 후에는 감소된다(도 3, 라인 4, 7, 8, 도 4 라인 4, 5, 8, 9).
- <37> 이전의 연구는 단백질 키나제 C 활성의 약리 활성화 또는 저해가 기본적인 GABA 분비에 영향을 끼치고 바클로펜과의 반응에 영향을 끼친다는 것을 나타내고 있다. 또한 cAMP/단백질 키나제 A 연쇄반응의 저해는 기본적인 GABA 분비에 영향을 끼치고 뉴런의 서브셋에서 바클로펜의 효과를 차단하며, GABA 분비시 GABA_B 수용체 매개 저해제 작용이 단백질 키나제 A 활성 감소 및 바클로펜의 효과에 cAMP/단백질 키나제 A 경로 기여의 감소를 통해 매개된다는 것을 제안하고 있다. 또한 본 발명자들은 에탄올과 비타민 C의 병용 효과를 조사하였다. 피질 및 해마 모두에서 나타나는 단백질 키나제 A 농도는 1시간 처리(도 3, 라인 9, 도 4, 라인 10) 후 대조군에 대해서는 현저한 감소를 보이며, 이는 비타민 C는 단백질 키나제 A에서 에탄올 효과와 반대되는 작용과 관련되어 있다는 것을 제안하고 있다.
- <38> 피질 및 해마에서 단백질 키나제 A- α 발현을 조절하는 니코틴
- <39> 단백질 키나제 A에 대한 니코틴의 생화학적 효과를 확인하기 위해 본 발명자들은 임신 17.5일에 시험관 내의 피질 및 해마 세포에서 단백질 키나제 A의 발현 변화를 조사하였다. 피질 및 해마에서 니코틴은 20분 동안 단백질 키나제 A의 현저한 감소를 나타냈으며, 1시간 후 피질은 아무런 변화도 없었으나 해마는 니코틴 처리 후 단백질 키나제 A 발현이 더욱 감소되는 효과가 나타났다(도 3, 라인, 3, 6, 도 4, 라인, 3, 7). 또한 본 발명자들은 단백질 키나제 A에 대한 니코틴과 비타민 C의 혼합 효과를 조사하였다. 1시간 처리 후 해마 및 피질은 대조군과 비교시 단백질 키나제 A의 발현이 감소되었으며(도 3, 라인, 10, 도 4, 라인, 11), 이는 비타민 C는 니코틴이 비타민 C에 의해 노출되거나 피질 및 해마 신경 배양액에서 단독으로 존재할 때 단백질 키나제 A의 발현시 유의미한 효과를 지닌다는 것을 제시한다.
- <40> GABA_R 수용체 및 단백질 키나제 A- α 의 동시-국소화 및 분배
- <41> GABA_{B1} 및 GABA_B 수용체 및 단백질 키나제 A의 분배 변화를 직접적으로 관찰하기 위해서 본 발명자들은 이중 표지된 면역-형광법 실험을 실시하였다. 면역형광법 이미지는 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체가 주로 단백질 키나제 A로 동시-국소화된다는 것을 나타내고 있다. 또한 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체는 주로 세포질에서 발견되나 약간은 핵에서도 발견되고 단백질 키나제 A는 핵, 수상돌기(dendrites), 세포질에서 국소화된다(도 5,6,7).
- <42> 본 발명은 각각 에탄올 및 니코틴 중독이 GABA_{B1}, GABA_{B2} 및 단백질 키나제 A의 발현을 조절한다는 것을 증명한다. 본 결과는 임신 17.5일 초기 성장기 동안 에탄올 및 약물에 노출된 피질 및 해마에서 GABA_{B1}, GABA_{B2} 및 단백질 키나제 A의 발현패턴의 묘사를 제공한다.
- <43> 태아 성장기 동안 에탄올 노출은 세포구조학적 이상을 포함한 태아알코올증후군(FAS) 및 태아알코올효과(FAE) 및 알코올 관련 신경발달장애(ARANDS)의 결과로서 광범위한 구조적이고 기능적인 뇌 이상을 유발한다. 에탄올 처리는 피질 및 해마에서 GABA_{B1}, GABA_{B2} 수용체의 증가된 발현을 유도한다. 또한 20분 후 급성 에탄올 섭취는 단백질 키나제 A- α 서브유닛의 발현 농도를 현저히 증가시키지만, 1시간 후 에탄올 처리군은 피질에서는 동일한 증가된 효과를 나타내지만 해마에서는 현저히 감소된 효과를 나타낸다.
- <44> 본 발명의 측정 결과는 에탄올이 전체 단백질 키나제 A- α 의 양에 어떤 영향도 끼치지 않는다는 이전의 연구와는 다르다. 더욱이 단백질 키나제 A에 대한 GABA_B 수용체의 조절효과를 조사하기 위해서, 본 발명자들은 단백질 키나제 A에 대한 발현 변화를 조사하였다. 상기 결과는 바클로펜 및 파클로펜 처리는 에탄올 처리보다 상위에서 단백질 키나제 A 변화를 조절할 수 있다는 것을 나타낸다. 피질에서 20분 및 1시간 바클로펜 및 파클로펜 처리군은 전체 단백질 키나제 A- α 의 양의 현저한 감소를 나타내나, 해마에서는 20분 처리군은 증가된 효과를 나타내고 정상적인 조건하에서 1시간 처리군은 감소된 효과를 나타낸다(도 3, 라인, 4, 6, 7, 도 4, 라인 4, 5, 8, 9). 또한 바클로펜 및 파클로펜은 해마에서 20분 및 1시간 처리군의 GABA_B 수용체 발현을 증가시키지만 피질에서는 20분 처리군은 증가를 나타낸 반면에 1시간 처리군에 대해서 바클로펜은 GABA_{B1}의 발현을 증가시키지만 GABA_{B2}의 발현은 현저히 감소시킨다.

- <45> GABA_B 수용체의 특이적인 활성제인 바클로펜은 기관형적 해마 절편에서 허혈에 대항하여 신경보호에 상당히 기여한다. 여러 연구는 바클로펜의 양에 의존적이기는 하지만 바클로펜이 에탄올 흡수량을 감소시킨다는 것을 나타내고 있다. 특히 GABA_{B1}은 피질에서 초기 중추신경계 기능 성장기 동안 GABA_{B2} 보다 더욱 영향력이 있다고 여겨진다. 종래에는 GABA_B 수용체는 Gi/o α 단백질과 결합할 수 있고, 에탄올은 Gαs 또는 Gi/o-γ β를 통해 단백질 키나제 A 신호를 활성화하며, 단백질 키나제 A는 급성 및 만성 에탄올 섭취시 뇌에서 몇몇 반응을 매개한다고 여겨졌다. 에탄올 처리 동안 Gi/o α는 더욱 Gi/o-γ β를 분리시키고 더욱이 에탄올 효과를 강화시킨다. 또한 Gαs의 감소된 발현이 에탄올 진정효과의 민감성을 증가시키기 때문에 뇌에서 cAMP/단백질 키나제 A 시스템을 통한 신호를 감소시킨다.
- <46> 단백질 키나제 A 시스템은 에탄올의 행동효과에 큰 영향을 끼치지만 에탄올 효과의 정확한 메커니즘은 더욱 연구될 필요가 있다. 급성 에탄올 노출은 cAMP-신호 네트워크의 다양한 성분을 조절하고 시험관 내에서의 조사는 에탄올이 Gαs 서브유닛 활성화의 비율을 증가시키고 아데닐사이클라제(AC)와 Gαs의 상호작용을 증가시키며, cAMP 및 단백질 키나제 A에 대한 증가시킴을 나타낸다. GABA_B 수용체의 조절 효과는 GABA_B 수용체와 함께 관찰되는 행동변화의 기초가 된다.
- <47> 이러한 효과는 대사작용 또는 이동 제어 인자의 조절을 제외하고는 기능적인 GABA_B 수용체를 통해 매개되지 않는다. 초기 GABA_B 수용체의 발현은 신경발생기 동안 광범위한 생리 과정에서 GABA_B에 대한 잠재적인 기능적 역할을 부여한다. 따라서 에탄올 및 니코틴 처리는 바클로펜 및 파클로펜이 단백질 키나제 A를 조절함으로써 동일한 경로를 변화시키는 것이 가능하다.
- <48> 종래의 발견은 랫트에서 니코틴 자가-섭취를 포함한 알코올 및 정신 자극제 남용과 관련된 중독 행동을 감소시키는 GABA_B 수용체 작용제의 유효성에 대한 증거를 제공한다. 니코틴에 대한 반복적인 노출은 Gi_α 및 G_{oα}로 추측되는 G-단백질에서 GABA_B 수용체의 기능적인 결합을 감소시키는 결과를 초래한다. 도파민 영역에서 GABA_B 수용체의 하향-조절은 니코틴에 반복적으로 노출된 후 측위 신경핵 및 전두엽 피질에서 관찰된 도파민의 민감한 분비에 기여한다.
- <49> 항산화제 비타민 C는 에탄올-유도 뇌 손상 및 성장 지연의 중증도를 효과적으로 감소시킬 수 있다. 비타민 C는 활성산소의 강력한 스카벤저로서 신경보호 역할을 한다고 생각할 있고, 비타민 C는 에탄올-처리 태아에서 ROS 생성물 및 지질 과산화를 감소시킨다. 두 번째로 비타민 C는 NCAM 및 Pax6를 포함한 중요한 신경 마커의 발현을 회복시키며, 한편 이는 에탄올 처리에 의해서 하향 조절된다. 또한 세 번째로 비타민 C는 세포 밖에서 에탄올과 상호작용하고, 따라서 에탄올의 전반적인 기형유발작용을 완화시킨다.
- <50> 만성 니코틴 처리는 해마에서 높은-친화력 니코틴 결합자리를 증가시킨다. α4β2 nAChR 서브타입이 뇌에서 대부분의 높은-친화력 니코틴 결합자리를 차지하기 때문에, 본 결과는 니코틴 섭취 후 해마 및 피질에서 20분 및 1시간 처리군의 GABA_B 수용체의 증가를 제시하고 반면에 니코틴과 비타민 C, 에탄올과 비타민 C의 혼합 섭취는 해마에서는 증가, 피질에서는 GABA_{B1}, GABA_{B2}의 현저한 발현 감소를 나타낸다. 또한 1시간 후 단백질 키나제 A-α 발현은 피질 및 해마에서 비타민 C 및 니코틴의 혼합처리 동안 현저히 감소된다. 에탄올과 비타민 C, 니코틴과 비타민 C의 혼합 섭취에 의해 단백질 키나제 A-α의 감소된 발현은 에탄올 및 니코틴 중독에 대항하는 비타민 C의 반대된 역할을 나타낸다. 그러나 니코틴 및 에탄올에 민감한 랫트의 피질 및 해마에서 GABA_B 수용체 및 단백질 키나제 A-α의 조절에 대한 추가 연구는 성장기 동안 약물의 명확한 역할을 확인하기 위해서 필요하다. 그것은 초기에는 이러한 발견의 물리병리학적 의미를 완전히 이해할 수 없었지만, GABA_B 수용체의 조절 작용을 고려시 이해할 수 있었다.
- <51> 본 발명은 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 단백질이 피질 및 해마에서 차별 발현 패턴을 보인다는 것과 GABA_B 수용체 활성은 에탄올 및 니코틴 처리시 단백질 키나제 A-α의 발현 변화를 조절할 수 있다는 것을 증명한다. 급성 에탄올 섭취는 GABA_B 수용체 활성을 증가시킬 수 있고, 이것의 상호작용은 해마 GABA-활성화(ergic) 시냅스의 전반적인 에탄올 민감성을 조절한다. 에탄올이 해마 및 다른 뇌 영역에서 GABA 분비를 증가시킨다는 관찰과 관련된 이러한 발견은 GABA-활성화 신경전달의 에탄올 조절의 추가 증거를 제공하고, 비타민 C는 알코올 니코틴의 해로운 효과에 대항하는 신경보호 효과를 제공한다. 더욱이 이러한 결과는 초기 발달 성장기 동안 에탄올 및 니코틴 섭취로 인한 세포 분화, 이동 및 신경 성숙 변화에 대해 GABA_B 수용체가 관련되어 있다는 견해를 제공한다.

고, 약물은 단백질 키나제 A 전사 조절 경로와 관련된 것으로 여겨지는 GABA_B 수용체에 영향을 끼친다.

- <52> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <53> (실시예 1) 동물 처리
- <54> 암컷 (n=50) 스프래그-돌리 랫트(250 gm 몸무게, 경상대, 신경생물학 실험실)는 온도-통제 환경 6시에서부터 20 시까지 사료와 함께 광선하에 적응시켰다. 실험군의 랫트에게는 물을 주었다. 시간에 맞춰 임신(임신 0.5일과 같은 수정한 날). 임신 17.5일 후 임신한 스프래그-돌리를 펜토바르비탈 나트륨(3 mg/100 g b.w) 주사를 정맥 주사 후 목을 베어 희생시켰다. 임신 17.5일에 태아를 양막으로부터 제거 분리시켰다. 상기 태아 뇌를 피질 및 해마로 나누었다.
- <55> (실시예 2) 프라이머리 세포 배양액 및 약물 처리
- <56> 임신 17.5일에 스프래그-돌리 랫트의 피질 및 해마로부터 배양이 준비되었다. pooled 해마 및 피질 조직은 0.25% 트립신-EDTA로 20분 동안 처리되었고, 동결 칼슘- 및 마그네슘-유리 Hank's balanced salt solution(pH 7.4)에서 기계적 연화에 의해 해리되었다. 원심분리에 의해 펠렛팅한 후, 세포는 폴리-리신(0.02 g/l) 및 챔버 슬라이드로 예비-코팅된 세포 배양판에 놓여졌다(1×10^6 cells/ml). 상기 배지는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), 10% 열-불활성화 태아 우혈청, 1 mM 피루브산염, 4.2 mM 탄화수소나트륨, 20 mM HEPES, 0.3 g/l 우혈청 알부민, 50 U/ml 페니실린 및 50 mg/l 스트렙토마이신으로 구성되었다. 배양액은 5% CO₂ 및 95% 공기의 습도, 37°C의 온도에서 유지되었다. 신경아교(Neuroglia) 세포는 12시간 동안 100 μ M 시토신 β -D-Arabinofuranoside(Sigma)를 포함한 배지로 저해되었다. 5일 후, 피질 및 해마 신경 세포는 각각의 실험군 및 그 혼합군에서 정상 배지로 처리되었고 배지는 에탄올 100 mM, 니코틴 50 μ M, 바클로펜 50 μ M, 파클로펜 100 μ M 및 비타민 C 0.5 mM을 포함한다. 모든 약물 처리군은 시험관 내 배양액에서 20분 및 1시간 동안 배양되었다.
- <57> (실시예 3) 웨스턴 블롯팅
- <58> 시험관 내에서 성장한 피질 및 해마의 배양된 세포로부터 얻은 샘플이 인산 완충식염수(0.02 M PBS)에서 균질화되었다. 초원심분리(12,000 rpm, 10분 $\times$ 2) 후, 상층액은 Bio-Rad Protein 에세이를 사용하여 측정되었고, 30 μ l 단백질은 래인에 대하여 적용되었다. 상기 가용 분획(30 μ g)은 이중 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔(30% 아크릴아마이드/1% 비스/1 M 트리스/20% SDS/10% APS/TEMED) 상에서 분리되었다. 겔은 쿠마시 블루로 염색되었고, 다른 겔 상의 단백질은 니트로셀룰로소막 위로 이동되었다(48 mM 트리스에서 1시간 동안 90 V, 39 mM 글리신, 20% MeOH 및 0.037% SDS 트랜스퍼 완충액). 니트로셀룰로소막은 비-특이적 결합을 환원시키기 위해 차단 용액(0.1% (v/v) 트윈 20 및 6% (w/v) 탈지유를 포함한 트리스-완충 식염수(TBS)로 처리되었다. 면역반응은 기니어피그-유도 항-랫트 GABA_{B1}, GABA_{B2} 수용체 및 단백질 키나제 A- α 항체(1:1000, 24시간, 4 °C, Chemicon, USA) 또는 래빗-유도 항-랫트 GABA_{B1} 수용체 항체(1:1000, Abcam Limited, UK)를 사용하여 실시되었다. 행군 후에, Horseradish 퍼옥시다제-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 및 기니어피그 IgG(1:10000, Bio-Rad)가 첨가되었고 실온에서 40분 동안 배양되었다. 단백질은 프로토콜에 따라 ECL-감지 시약(Amersham Pharmacia Biotech, 웨스턴 블롯팅 감지 시약)을 사용하여 화학발광에 의해 측정되었다. 웨스턴 블롯은 컴퓨터-기초 Sigma Gel (SPSS Inc. Chicago, USA) 시스템을 사용하여 농도계측기에 의해 분석되었다. 밀도치는 평균 $\pm$ 표준오차로서 표현된다. Tukey-Kramer 다중-비교 테스트에 따른 일원변량분석은 관련된 실험군 사이의 유의미한 차이를 측정하기 위해서 실시되었다. 모든 경우에서, 통계적 유의미에 대한 수용 값은 p가 0.01보다 작을 때이다.
- <59> (실시예 4) 면역-형광법
- <60> 면역형광법은 임신 17.5일에 시험관 내의 폴리-D-리신-코팅된 챔버 슬라이드 상에서 배양시킨 일차 피질 및 해마 세포 배양액 상에서 실시되었다. 배양액은 PBS에서 4% 파라포름알데하이드로 5분 동안 고정되었고, 5분 동안 PBS에서 0.3% Triton X-100에 투과되었고, PBS에서 두 번 행구었다. 상기 세포는 37°C에서 1시간 동안 PBS에서 10% BSA로 예비-배양되었고, 4°C에서 하룻밤 1차 항체에 노출되었다. 면역반응은 기니어피그-유도 항-랫트 GABA_{B1}, GABA_{B2} 수용체(1:500, 24 시간, 4 °C, Chemicon, CA, USA), 래빗 항-랫트 단백질 키나제 A- α (1:500, Santa Cruz, USA)를 사용하여 실시되었고, 그 다음에 배양을 하고 세포를 세척하고, 2차 항체는 1:100

으로 컨쥬게이트된 항-라빗 IgG-TRITC 및 FITC, 1:150으로 컨쥬게이트된 항-기니어피그 IgG-FITC(DAKO Cytomation, Denmark)의 농도에서 적용되었다. 이중 염색을 위해, 배양은 평행하게 실시되었다. 글라스 커버 슬립은 봉입제로 글라스 슬라이드 상에 고정되었다. 이미지에 대해 본 발명자들은 Zeiss 형광 현미경 (Zeiss, Germany) 및 공초점 현미경(Olympus, Japan)을 사용하였다. 사진은 소프트 이미지 시스템 비디오 카메라로 촬영되었다.

도면의 간단한 설명

- <61> 도 1A는 에탄올에 노출된 시험관 내의 피질을 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜 및 비타민 C로 처리시 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 단백질의 변화를 측정한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다. 전체 단백질은 임신 17.5일로부터 준비되었다. 30 μ g 전체 단백질을 포함한 시험관 내의 신경 세포. 도 1B는 A에서 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 밴드의 농도계측 평가를 나타낸다. 상대적 함량은 Sigma-gel 분석 프로그램에 의해 계산되었다. 라인 1, 대조군(N), 라인 2, 에탄올(E), 100mM 20분, 라인 3, 니코틴(Nic) 50 μ M 20분, 라인 4, 바클로펜(B) 50 μ M 20분, 라인 5, 파클로펜(P) 100 μ M 20분, 라인 6, 에탄올(E), 100 mM 1시간, 라인 7, 니코틴(Nic) 50 μ M 1시간, 라인 8, 바클로펜(B) 50 μ M 1시간, 라인 9 파클로펜(P) 100 μ M 1시간, 라인 10 에탄올 100 mM + 비타민 C 0.5 mM(E+vitC) 1시간, 라인 11, 니코틴 50 μ M + 비타민 C (Nic+vitC) C 0.5 mM 1시간. 대조군과 비교시 (n-5) P <0.01. 모든 실험군은 시험관 내의 배양액에서 20분 및 1시간 동안 처리되었다.
- <62> 도 2A는 에탄올에 노출된 시험관 내의 해마를 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜 및 비타민 C로 처리시 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 단백질의 변화를 측정한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다. 전체 단백질은 임신 17.5일로부터 준비되었다. 30 μ g 전체 단백질을 포함한 시험관 내의 신경 세포. 도 2B는 A에서 GABA_{B1} 및 GABA_{B2} 수용체 밴드의 농도계측 평가를 나타낸다. 상대적 함량은 Sigma-gel 분석 프로그램에 의해 계산되었다. 라인 1, 대조군(N), 라인 2, 에탄올(E), 100mM 20분, 라인 3, 니코틴(Nic) 50 μ M 20분, 라인 4, 바클로펜(B) 50 μ M 20분, 라인 5, 파클로펜(P) 100 μ M 20분, 라인 6, 에탄올(E), 100 mM 1시간, 라인 7, 니코틴(Nic) 50 μ M 1시간, 라인 8, 바클로펜(B) 50 μ M 1시간, 라인 9 파클로펜(P) 100 μ M 1시간, 라인 10 에탄올 100 mM + 비타민 C 0.5 mM(E+vitC) 1시간, 라인 11, 니코틴 50 μ M + 비타민 C (Nic+vitC) 0.5 mM 1시간. 대조군과 비교시 (n-5) P <0.01. 모든 실험군은 시험관 내의 배양액에서 20분 및 1시간 동안 처리되었다.
- <63> 도 3A는 에탄올에 노출된 시험관 내의 피질을 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜 및 비타민 C로 처리시 단백질 키나제 A- α 단백질의 변화를 측정한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다. 전체 단백질은 임신 17.5일로부터 준비되었다. 30 μ g 전체 단백질을 포함한 시험관 내의 신경 세포. 도 3B는 A에서 단백질 키나제 A- α 밴드의 농도계측 평가를 나타낸다. 상대적 함량은 Sigma-gel 분석 프로그램에 의해 계산되었다. 라인 1, 대조군(N), 라인 2, 에탄올(E), 100mM 20분, 라인 3, 니코틴(Nic) 50 μ M 20분, 라인 4, 바클로펜(B) 50 μ M 20분, 라인 5, 에탄올(E), 100 mM 1시간, 라인 6, 니코틴(Nic) 50 μ M 1시간, Lane 7, 바클로펜(B) 50 μ M 1시간, 라인 8, 파클로펜(P) 100 μ M 1시간, 라인 9, 에탄올 100 mM + 비타민 C 0.5 mM (E+vitC) 1시간, 라인 10, 니코틴 50 μ M + 비타민 C 0.5 mM (Nic+vitC) 1시간. 대조군과 비교시 (n-5) P <0.01. 모든 실험군은 시험관 내의 배양액에서 20분 및 1시간 동안 처리되었다.
- <64> 도 4A는 에탄올에 노출된 실험관내의 해마를 에탄올, 니코틴, 바클로펜, 파클로펜 및 비타민 C로 처리시 단백질 키나제 A- α 단백질의 변화를 측정한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다. 전체 단백질은 임신 17.5일로부터 준비되었다. 30 μ g 전체 단백질을 포함한 실험관내의 신경 세포. 도 4B는 A에서 단백질 키나제 A- α 밴드의 농도계측 평가를 나타낸다. 상대적 함량은 Sigma-gel 분석 프로그램에 의해 계산되었다. 라인 1, 대조군(N), 라인 2, 에탄올(E), 100 mM 20분, 라인 3, 니코틴(Nic) 50 μ M 20분, 라인 4, 바클로펜(B) 50 μ M 20분, 라인 5, 파클로펜(P) 100 μ M 20분, 라인 6, 에탄올(E), 100 mM 1시간, 라인 7, 니코틴(Nic) 50 μ M 1시간, 라인 8, 바클로펜(B) 50 μ M 1시간, 라인 9, 파클로펜(P) 100 μ M 1시간, 라인 10, 에탄올 100 mM + 비타민 C 0.5 mM (E+vitC) 1시간, 라인 11, 니코틴 50 μ M + 비타민 C (Nic+vitC) 0.5 mM 1시간. 대조군과 비교시 (n-5) P <0.01. 모든 실험군은 실험관내의 배양액에서 20분 및 1시간 동안 처리되었다.
- <65> 도 5는 일차 배양된 임신 17.5일의 피질 신경 세포의 GABA_{B1} 수용체 및 단백질 키나제 A- α 의 동시-국소화를 나타내는 면역조직화학 결과이다. GABA_{B1} 수용체 및 단백질 키나제 A- α 의 면역형광 공초점 이미지는 동일한 뉴런에서 동시-국소화되었다. 작은 화살표는 핵의 위치를 나타내고 큰 화살표는 신경세포의 세포질 및 수상돌기

를 나타낸다. 축척 막대 = 30 μm .

<66>

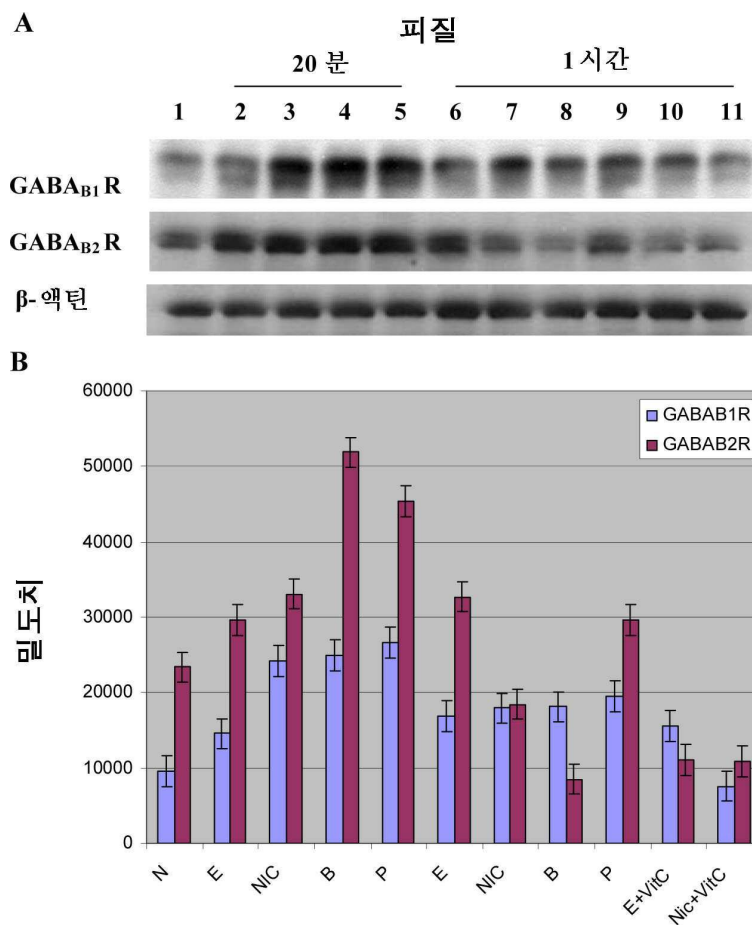
도 6은 일차 배양된 임신 17.5일의 해마 신경 세포의 GABA_{B1}, GABA_{B2} 수용체 및 단백질 키나제 A- α 의 동시-국소화를 나타내는 면역조직화학 결과이다. GABA_{B1}, GABA_{B2} 수용체 및 단백질 키나제 A- α 의 면역형광 공초점 이미지는 동일한 뉴런에서 동시-국소화되었다. 작은 화살표는 핵의 위치를 나타내고 큰 화살표는 신경세포의 세포질 및 수상돌기를 나타낸다. A는 축척 막대 = 30 μm , B는 축척 막대 = 20 μm 및 C는 축척 막대 = 10 μm .

<67>

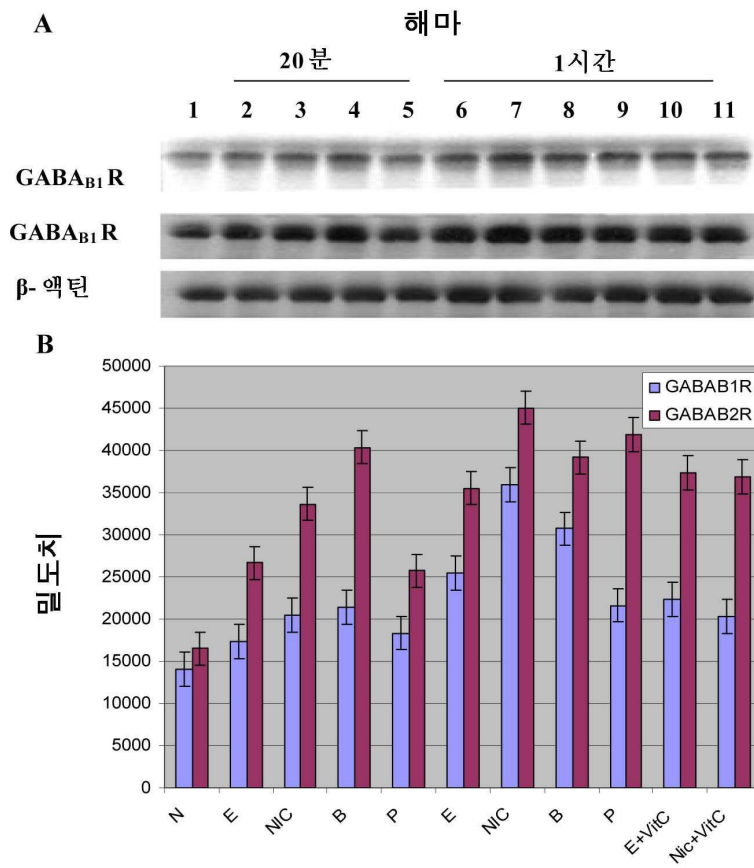
도 7은 일차 배양된 임신 17.5일의 피질 신경 세포의 GABA_{B2} 수용체 및 단백질 키나제 A- α 의 동시-국소화를 나타내는 면역조직화학 결과이다. GABA_{B2} 수용체 및 단백질 키나제 A- α 의 면역형광 공초점 이미지는 동일한 뉴런에서 동시-국소화되었다. 작은 화살표는 핵의 위치를 나타내고 큰 화살표는 신경세포의 세포질 및 수상돌기를 나타낸다. 축척 막대 = 30 μm .

도면

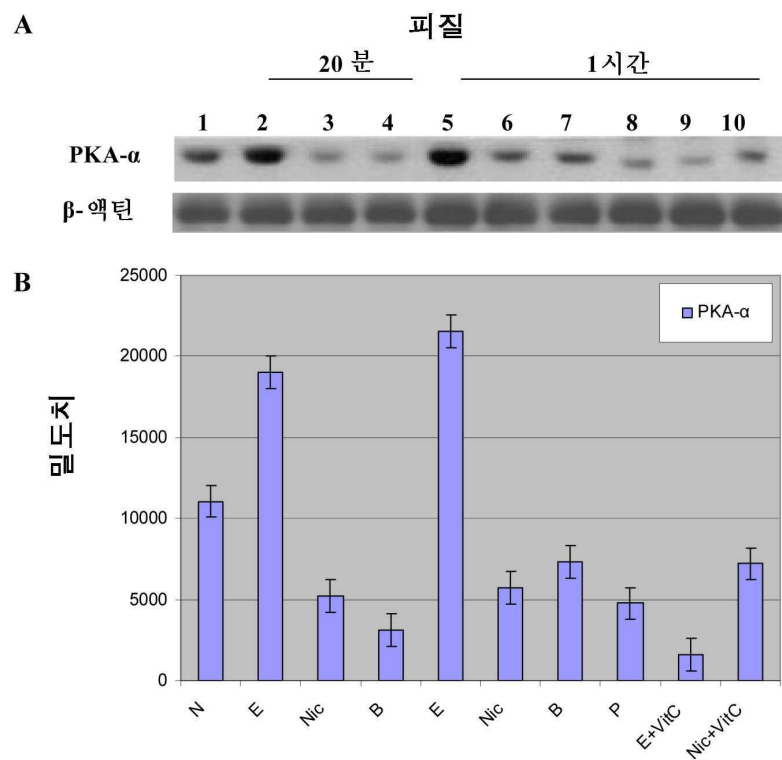
도면1



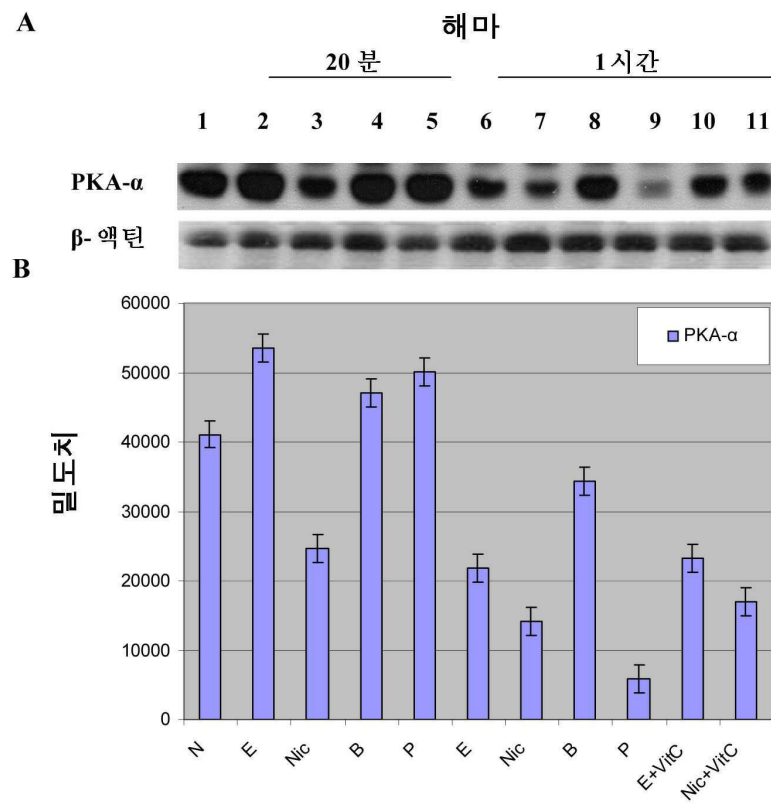
도면2



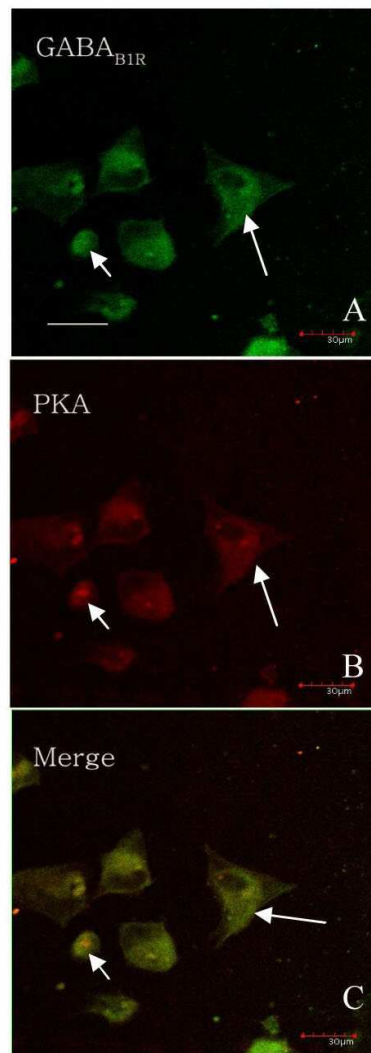
도면3



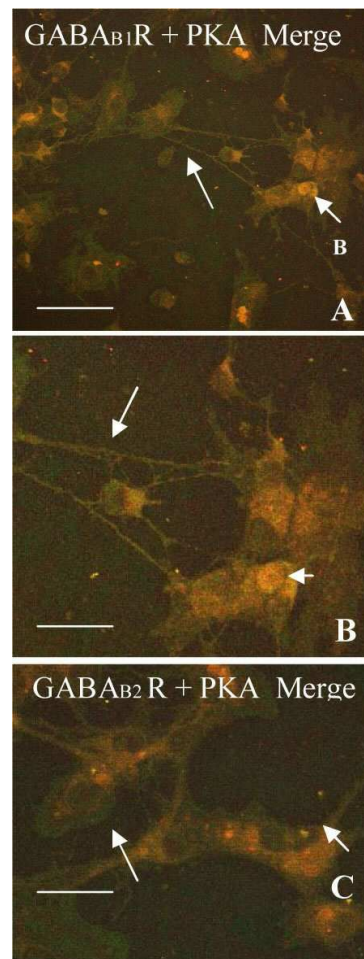
도면4



도면5



도면6



도면7

