

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0107129 (43) 공개일자 2009년10월13일
(51) Int. Cl.		(71) 출원인
<i>G01N 33/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01)		경상대학교산학협력단
<i>G01N 33/48</i> (2006.01)		경상남도 진주시 가좌동 900
(21) 출원번호 10-2008-0032463		(72) 발명자
(22) 출원일자 2008년04월08일		김명옥
심사청구일자 2008년04월08일		경남 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호
		성환후
		경기 수원시 권선구 서둔동 농촌진흥청
		(뒷면에 계속)
		(74) 대리인
		김동완

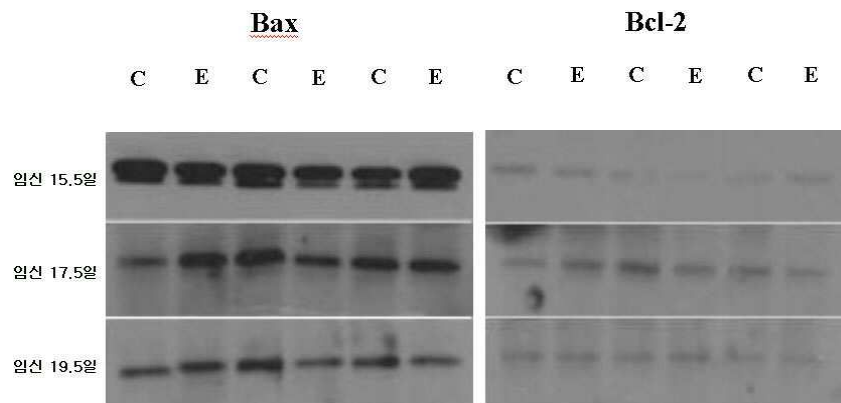
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 임신 중 에탄올 섭취로 인한 랫트 태아 뇌에서 B a x 및 B c l-2 발현 변화 측정 방법

(57) 요약

본 발명은 임신 중 에탄올 섭취로 인한 랫트 태아 뇌에서 Bax 및 Bcl-2 발현 변화 측정 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 본 발명은 임신 중 에탄올 섭취는 랫트 태아의 뇌에서 뇌 영역 특이적 및 임신기간 특이적으로 아폽토시스 관련 단백질 Bax 및 Bcl-2 발현 변화를 야기시킴을 측정하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(72) 발명자

민관식

경기 안성시 석정동 67 환경대학교

조미자

경남 진주시 가좌동 경상대학교

특허청구의 범위

청구항 1

임신 중 에탄올 섭취는 랫트 태아의 뇌에서 뇌 영역 특이적 및 임신기간 특이적으로 아폽토시스 관련 단백질 Bax 및 Bcl-2 발현 변화를 야기시킴을 특징으로 하는 방법에 있어서, 랫트 태아의 전뇌는 임신 17.5일에 Bax 단백질 발현을 유의적으로 증가시키고, 랫트 태아의 중뇌는 임신 17.5일에 Bax 단백질 및 Bcl-2 단백질 발현을 유의적으로 감소시키고, 랫트 태아의 후뇌는 임신 15.5일에 Bax 단백질 발현을 유의적으로 증가시킴을 특징으로 하는 방법

청구항 2

임신 중 에탄올 섭취는 랫트 태아의 뇌에서 뇌 영역 특이적 및 임신기간 특이적으로 아폽토시스 관련 단백질 Bax에 대한 Bcl-2 발현 비율을 변화시킴을 특징으로 하는 방법에 있어서, Bax에 대한 Bcl-2 발현 비율(Bcl-2/Bax)은 랫트 태아의 전뇌에서 임신 17.5일 및 임신 19.5일에 유의적으로 감소하고, 랫트 태아의 중뇌에서 임신 19.5일에 유의적으로 증가하고, 랫트 태아의 후뇌에서 임신 19.5일에 유의적으로 증가함을 특징으로 하는 방법

청구항 3

임신 중 에탄올 섭취는 랫트 태아의 뇌에서 아폽토시스 관련 단백질 Bax의 영역 특이적으로 발현이 증가되는 방법에 있어서, 랫트 뇌 영역의 피질, 해마, 시상 및 소뇌중부에서 Bax 단백질 발현이 국소적으로 증가됨을 특징으로 하는 방법

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 임신 중 에탄올 섭취로 인한 랫트 태아 뇌에서 Bax 및 Bcl-2 발현 변화 측정 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 본 발명은 임신 중 에탄올 섭취는 랫트 태아의 뇌에서 뇌 영역 특이적 및 임신기간 특이적으로 아폽토시스 관련 단백질 Bax 및 Bcl-2 발현 변화를 야기시킴을 측정하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 세포 이동 및 분화는 태아의 중추신경계(CNS)의 성장에 중요한 과정이다. 이러한 과정을 통해 세포예정사는 필수적인 메커니즘이다. 세포예정사는 다양한 영역에서 세포 타입, 개체수 및 기능을 구별하고 이러한 과정을 중재하는 유도인자 또는 저해인자로서 아폽토시스 결정인자를 가진다.
- <3> 세포예정사는 불필요한 세포 또는 나머지 세포를 신경성장인자 또는 생존 인자를 통제함으로써 제거시킨다. 이러한 세포사는 자연적으로 발생하는 신경계 세포사멸이라고 불리고 이는 정확하고 정밀하게 진행된다. 부정확한 세포사멸은 태아의 뇌에서 종양형성 또는 영양실조와 같은 기형과 변형을 유발할 수 있다.
- <4> 세포예정사에 대한 결정적인 인자 중에 하나는 Bcl-2 패밀리의 단백질이다. 특히 Bax 및 Bcl-2는 주요 아폽토시스 단백질이고 아폽토시스 유도인자 및 저해인자로서 행동한다. DNA 단편의 신호로 자극된 Bax는 미토콘드리아에서 세포질까지 방출되는 시토크롬 C를 유발시킨다. 결과적으로 시토크롬 C는 직접적으로 아폽토시스를 촉진시키는 카스파제 3, 6, 7 및 9를 자극한다. 그러나 세포예정사 저해인자로서 Bcl-2는 Bax의 작용을 저해하고 시토크롬 C의 방출을 막는다. 태아 내의 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현은 성장 기간 및 태아 뇌의 영역에 따라서 변화되고 차별적인 아폽토시스와 관련되어 있다.
- <5> 에탄올 노출은 임신기간 동안 다양한 메커니즘을 통해 태아 뇌에 부정적인 영향을 유발시킨다. 에탄올은 신경세포의 사멸을 유도한다. 활성 산소와 같은 자유 라디칼의 증가 및 뉴런에서 항산화제의 감소시 에탄올은 미토콘드리아의 투과성 및 기능에 영향을 미친다. 결과적으로 이들은 Bax와 같은 미토콘드리아 단백질의 분비를 자극하고 Bcl-2와 같은 생존 인자의 작용을 억제한다. 따라서 에탄올은 태아의 내에서 정상적인 세포예정사의

변화를 일으킨다.

- <6> 종래의 연구에서는 태아기의 에탄올 노출은 생체 내의 세포의 분화, 뉴런의 이동을 지체시키고, 세포예정사 또는 세포유착분자에 영향을 미친다고 알려져 있다. 태아 알코올 증후군, 뇌수종, 소두증, 대뇌피질형성이상, 뇌용량형성부전증 및 뉴런-아교세포 헤테로피아는 에탄올에 의한 비정상적인 뉴런 세포 증식 및 분화로부터 유래된다. 따라서 임신 중의 에탄올 노출은 태아기 뇌의 성장에 매우 위험한 것으로 간주된다.
- <7> 본 발명에서 임신한 랫트에 경구로 10% 에탄올을 섭취시킨 후, 태아기 뇌 성장에 모체의 에탄올 노출이 미치는 영향을 측정하기 위해서 임신 15.5일에서 19.5일까지 전뇌, 중뇌 및 후뇌를 포함한 태아의 뇌에서 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현의 변화를 측정함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 임신한 랫트에 경구로 10% 에탄올을 섭취시킨 후, 태아기 뇌 성장에 모체의 에탄올 노출이 미치는 영향을 측정코자 한 것이다. 즉 임신 15.5일에서 19.5일까지 전뇌, 중뇌 및 후뇌를 포함한 태아의 뇌에서 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현의 변화를 측정코자 한 것이다.

과제 해결수단

- <9> 본 발명의 목적은 임신 중 에탄올 섭취는 랫트 태아의 뇌에서 뇌 영역 특이적 및 임신기간 특이적으로 아폽토시스 관련 단백질 Bax 및 Bcl-2 발현 변화를 야기시킴을 특징으로 하는 방법에 있어서, 랫트 태아의 전뇌는 임신 17.5일에 Bax 단백질의 발현을 유의적으로 증가시키고, 랫트 태아의 중뇌는 임신 17.5일에 Bax 단백질 및 Bcl-2 단백질의 발현을 유의적으로 감소시키고, 랫트 태아의 후뇌는 임신 15.5일에 Bax 단백질의 발현을 유의적으로 증가시킴을 특징으로 하는 방법을 제공하는 것이다.
- <10> 한편 본 발명의 또다른 목적은 임신 중 에탄올 섭취는 랫트 태아의 뇌에서 뇌 영역 특이적 및 임신기간 특이적으로 아폽토시스 관련 단백질 Bax에 대한 Bcl-2 발현 비율을 변화시킴을 특징으로 하는 방법에 있어서, Bax에 대한 Bcl-2 발현 비율(Bcl-2/Bax)은 랫트 태아의 전뇌에서 임신 17.5일 및 임신 19.5일에 유의적으로 감소하고, 랫트 태아의 중뇌에서 임신 19.5일에 유의적으로 증가하고, 랫트 태아의 후뇌에서 임신 19.5일에 유의적으로 증가함을 특징으로 하는 방법을 제공하는 것이다.
- <11> 한편 본 발명의 또다른 목적은 임신 중 에탄올 섭취는 랫트 태아의 뇌에서 아폽토시스 관련 단백질 Bax의 영역 특이적으로 발현이 증가되는 방법에 있어서, 랫트 뇌 영역의 피질, 해마, 시상 및 소뇌충부에서 Bax 단백질의 발현이 국소적으로 증가됨을 특징으로 하는 방법을 제공하는 것이다.

효 과

- <12> 본 발명의 효과는 임신한 랫트에 경구로 10% 에탄올을 섭취시킨 후, 태아기 뇌 성장에 모체의 에탄올 노출이 미치는 영향을 측정한 것이다. 즉 임신 15.5일에서 19.5일까지 전뇌, 중뇌 및 후뇌를 포함한 태아의 뇌에서 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현의 변화를 측정한 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <13> 세포 증식 및 분화는 성장하는 태아 랫트의 뇌에서 중요한 과정이며, 여기서 세포예정사(PCD)는 중요한 역할을 한다. 세포예정사에 대한 결정적인 인자 중에 하나는 Bcl-2 패밀리의 단백질이고, 여기서 Bax는 세포사를 유도하고 Bcl-2는 세포예정사 저해제로서 행동한다.
- <14> 모체의 음주는 태아 알코올 증후군(FAS) 또는 임신 기간 동안 태아의 뇌의 기형을 유발시킨다. 본 발명의 목적은 모체의 알코올 노출이 태아의 뇌가 성장하는 동안 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현과 관련된 세포예정사를 변화시키는 지 여부를 측정하는 것이다.
- <15> 임신한 랫트에 10% 에탄올을 구강으로 섭취시킨 후 임신 15.5일부터 19.5일까지 성장한 태아의 샘플로부터 웨스턴 블롯, *in situ* 혼성화 및 면역조직화학으로 전뇌, 중뇌 및 후뇌를 포함한 태아 랫트의 뇌에서 Bax 및 Bcl-2 단백질의 발현을 조사하였다.
- <16> Bax 단백질에 대한 Bcl-2의 비율(Bcl-2/Bax)은 Bax 단백질은 임신 15.5일 태아 대조군의 전뇌 및 중뇌에서(후뇌

는 제외) 에탄올 처리군과 비교시 증가한다. 더욱이 Bcl-2는 임신 17.5일 태아 대조군의 중뇌에서 에탄올 처리군 보다 증가한다. 이것은 에탄올에 의한 자연적인 세포예정사 과정의 변화로 여겨진다.

<17> 또한 Bcl-2 및 Bax 단백질의 차별발현은 피질, 해마, 시상 및 소뇌의 분화 및 이동영역에서 발견되었다. 본 발명의 결과는 에탄올이 임신기간 및 영역 의존적 방식으로 Bax 및 Bcl-2의 발현을 변화시킴으로써 태아 랫트의 뇌의 세포 분화 및 이동 영역에서 세포예정사에 영향을 미친다는 것이다. 더욱이 본 발명은 에탄올이 Bax 및 Bcl-2 발현의 변화를 통해 FAS-관련된 태아의 뇌 성장을 변화시킨다는 증거를 제공한다.

<18> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<19> 임신 15.5, 17.5, 및 19.5일에 태아 랫트의 뇌에서 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현의 변화

<20> 대조군과 10% 에탄올이 처리된 태아 랫트 뇌 모두 다른 영역에서 Bax 단백질은 23 kDa에서 명확한 단일 밴드로 확인되었고, Bcl-2 단백질은 28 kDa에서 약하게 나타났다(도 1). 상기 단백질의 발현은 Bax 단백질이 임신 15.5일에서부터 19.5일까지 감소된 두 개의 실험군에서 연령 및 영역 의존성으로 나타났고, Bcl-2의 일시적인 증가는 임신 17.5일에 감지되었다(도 1).

<21> 대조군 및 10% 에탄올 처리군에서 세포예정사와 관련된 두 단백질의 발현의 연령-의존적 양의 변화는 임신 15.5일에 나타나며 도 2에 나타내었고, Bax 단백질은 에탄올 처리군의 전뇌 및 중뇌에서 유의미하게 감소($p<0.05$)되었으나 각 대조군과 비교시 후뇌($p<0.01$)에서 현저히 증가하였다(도 2A). 또한 도 2A는 임신 17.5일에 에탄올 처리군의 전뇌에서 Bax의 높은 발현과 중뇌에서 낮은 발현을 나타낸다($p<0.01$). 더욱이 임신 19.5일에, Bax 단백질 발현은 전뇌에서 유의미하게 증가하지만($p<0.05$), 중뇌 및 후뇌 모두에서 감소되었다($p<0.05$)(도 2A). 그러나 Bcl-2 단백질 발현은 임신 17.5일에 중뇌를 제외하고는 에탄올 처리 후, 실험군 모두에서 유의미한 변화는 없었다($p<0.01$)(도 2B).

<22> 세포예정사시 에탄올의 효과를 측정하기 위해서 본 발명자들은 Bax에 대한 Bcl-2의 비율을 계산하였다(Bcl-2/Bax). 10% 에탄올 처리군의 Bcl-2/Bax 비율은 각각의 대조군과 비교시 임신 17.5일 및 19.5일의 전뇌(도 3A) 및 후뇌(도 3C), 임신 19.5일의 중뇌(도 3B)에서 유의한 차이($p<0.01$)가 나타났다. 또한 본 발명자들은 대조군과 에탄올 처리군간의 비율 차이를 비교하였고(도 3D), 그 결과를 임신 15.5일로부터의 값과 임신 17.5일($p<0.05$) 및 19.5일($p<0.01$)의 간의 유의한 차이로 나타내었다.

<23> 임신 15.5, 17.5 및 19.5일의 태아 랫트 뇌에서 Bax 및 Bcl-2의 영역-특이적 변화

<24> 면역조직화학 염색상은 임신 15.5일 및 17.5일에 10% 에탄올 처리군의 피질, 해마, 시상 및 소뇌중뇌에서 Bax 단백질의 강한 국소화를 나타낸다. 임신 17.5일에 Bax 단백질 발현은 에탄올 처리에 의해서 대뇌피질의 신피질(neocortex of cerebral cortex), 해마, 시상, 대뇌기저핵(선조 신경상피(striatal neuroepithelium)에서부터 뇌실 인접구역까지), 후각망울, 중뇌의 분화구역(뿔개앞부분(pretegmentum)에서부터 중뇌피개 tegmentum)까지)에서 현저히 증가된다(도 4, 5). 더욱이 Bax 단백질은 도 4 및 5에 나타난 바와 같이, 임신 17.5일에 에탄올 처리군에서 피질판 영역(cortical plate zone)에서부터 중간영역까지 불규칙적으로 국소화된다. 더욱이 임신 19.5일에 에탄올 처리군의 Bax 면역반응성은 대뇌신피질(cerebral neocortex), 후각망울, 시상하부, 소뇌의 푸르기니에 세포층, 교뇌 및 뿔개안부분과 둔덕(colliculus)을 포함한 중뇌에서 차별적으로 발현된다(도 5). 또한 본 발명은 10% 에탄올 처리 후, 임신 15.5일 및 17.5일에 대뇌피질 및 후각뇌의 분화구역과 임신 19.5일에 중격(septum) 및 창백핵(pallidum)의 신경상피조직에서 Bcl-2 단백질의 약한 발현을 나타낸다(도 4).

<25> 태아 랫트 뇌에서 임신 15.5일 및 17.5일에 Bax 및 Bcl-2 mRNAs의 발현 변화

<26> 태아 랫트 뇌의 다른 영역에서 에탄올 처리의 유무에 따른 Bax 및 Bcl-2 mRNAs의 발현이 *in situ* 혼성화에 의해서 조사되었다. 자가방사선상의 흰색 화살표는 임신 15.5일에 대조군의 피질 및 해마를 포함한 전뇌와 후뇌에서 Bax mRNA의 높은 발현(도 4B)과 반면에 같은 조건에서 에탄올 처리 후, Bax mRNA의 현저히 낮은 발현(도 4A)을 나타내고 있다. 또한 Bcl-2 mRNA 발현이 임신 17.5일에 대조군 태아 랫트의 전뇌, 중뇌 및 후뇌에서 우세하게 나타났다(도 4A). 더욱이 흰색 화살표는 안티-센스 프로브에 의해 감지한 바와 같이 10% 에탄올 처리군에서 Bcl-2 mRNA의 약한 발현을 나타낸다(도 4B).

<27> 이동 및 분화 과정동안 태아 뇌에서 아포토시스 인자의 발현 변화에 대한 세포예정사시 모체의 에탄올 섭취 효과

<28> 세포 증식 및 분화는 태아 뇌 성장에서 중요한 두 가지 과정이며, 여기서 세포예정사에 관한 중요한 인자인 세포예정사 및 Bcl-2 패밀리를 포함한 단백질은 중요한 역할을 한다. 태아기는 임신 초기에 모체의 에탄올의 악영향으로

인해 다른 시기보다 매우 민감하고 중요하다. 또한 임신 중 모체의 음주 행동은 FAS뿐만 아니라 태아 뇌의 기형을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 종래의 연구는 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현과 태아 뇌 분화 및 성장과 관련된 세포예정사의 연관성에 대한 확실한 판단을 내리기에는 부족하다. 따라서 본 발명은 모체의 에탄올 노출이 태아 뇌의 성장 동안 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현과 관련된 세포예정사를 변화시킬 수 있는지 없는지 여부를 관찰하고, 세포예정사 메커니즘과 에탄올 효과 사이의 관계를 규명하는 것이었다. 랫트 태아기는 단계 I (임신 11~14일; 임신초기와 관련된 뇌 성장의 초기 단계), 단계 II(임신 15~19일; 임신중기에 따른 뇌 성장의 중간 단계) 및 단계 III(임신 20~22일; 임신말기에 관련된 뇌 성장 단계의 마지막)으로 나눌 수 있다. 본 발명에서 본 발명자들은 세포 증식, 이동 및 분화가 신경 조직 및 뇌의 구조를 구성하기 위해 활발히 진행되는 단계 II 랫트 태아를 사용하였다. 더욱이 상기 단계는 임신한 모체의 삼분기 중 두 번째 분기에 관련되어 있다.

<29> 알려진 바와 같이, 에탄올은 뇌에서 신경의 개체수를 감소시키고 뇌 질량의 손실을 포함하는 기형을 유발시킨다. 한편 신경의 정상적인 개체수는 세포예정사 또는 세포사멸에 의해 통제되며 이는 자연적인 메커니즘으로 발생한다. 본 발명에서 본 발명자들은 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 각각 아포토시스 유도제 또는 저해제로서 Bax 및 Bcl-2 단백질의 발현 변화를 조사하였고, 전체 세포 개체수를 통제하기 위한 프로그램 과정이 결과로 임신 15.5일에서부터 임신 19.5일까지 낮은 Bax 발현을 밝혔다. 더욱이 본 발명에서 Bcl-2의 일시적인 감소는 세포사와 세포 생존의 균형을 유지하기 위해 아포토시스 유도제로서 세포수를 조절한다. 상기 과정을 변화시킴으로써 에탄올은 중추신경계에서 항상성 환경을 파괴한다. 일반적으로 에탄올 노출은 미토콘드리아 투과성 또는 이온 항상성의 변화를 매개하는 Bax를 통해 세포사를 증가시킨다. 본 결과는 종래의 연구를 확증하나 에탄올 처리에 대한 Bcl-2의 무의미한 변화를 보고한 종래의 연구와는 대조된다.

<30> 더욱이 본 결과는 임신 17.5일에 Bax 단백질의 무의미한 변화를 나타내고 있다. 아포토시스-유도 인자의 기능이 전뇌에서 임신 17.5일로부터 Bcl-2 및 Bax의 비율과 비율차이를 고려하면 감소한다는 것을 나타낸다. 이는 신경 세포의 분화 및 성장시 다른 신경을 보호한다는 것으로 여겨지고, 에탄올을 처리한 신경 세포의 민감성은 단계 II 태아 랫트 뇌의 각각의 영역에서 다른 것으로 여겨진다. 마지막 가능성은 에탄올에 의해 아포토시스 인자, Bax 및 Bcl-2로 세포 개체수를 조절하는 항상성의 저해이며, 이는 종양과 같은 형태학적인 질병을 유발시킬 수 있다.

<31> 에탄올에 의한 태아 뇌의 이동 및 분화 영역에서 Bax 및 Bcl-2 단백질 발현의 변화

<32> 본 발명은 에탄올이 아포토시스와 관련된 주요 단백질인 Bax, Bcl-2의 발현을 변화시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서 에탄올은 자연적으로 발생하는 신경 세포사에 영향을 끼치는 것으로 여겨지고, 상기 변화는 에탄올 처리군 태아 뇌의 이동 및 분화 영역에서 일어난다. 면역조직화학염색 연구에서 피질 영역 및 중뇌의 분화 영역에서 뉴런은 Bax 단백질이 높은 발현을 나타낸다. 대조적으로 Bcl-2 발현은 대뇌피질 및 후각뇌의 분화영역, 중격 및 창백핵의 신경상피세포에서는 낮다. 더욱이 Bcl-2는 태아 뇌의 피질 영역에서 불규칙적으로 국소화된다. 따라서 상기 관찰을 기반으로 본 발명자들은 시각계 또는 청각계의 형성과 관련된 기형뿐만 아니라 신경전달계의 역기능과 관련된 장애를 예상한다. 본 발명에서 에탄올에 의한 임신 17.5일 태아의 피질, 해마, 시상 및 중뇌에서 증가된 Bax 발현은 민감성, 지능, 기억 및 운동 기능의 역기능을 유도하는 것이 가능하고, 이는 신경발생시 에탄올에 대한 태아 뇌의 높은 감수성을 제한한다.

<33> 따라서 상술한 바와 같이 본 결과 및 지지되는 종래의 관찰에서 에탄올은 중추신경계의 형성을 저해하고 세포예정사를 변화시킨다고 결론지을 수 있으며, 이는 자연적인 생리적 현상이고, 태아 뇌의 이동 및 분화 영역에서 Bax 및 Bcl-2 발현과 관련된 아포토시스의 변화에 의한 병리적 과정이다. 본 결과는 에탄올이 연령 및 영역 의존적 방식으로 Bax 및 Bcl-2의 변화를 유도한다는 것을 나타내기 때문에, 처음으로 본 발명자들은 Bax 및 Bcl-2 발현의 변화를 통해 태아 뇌의 FAS-관련된 성장 장애를 설명하였다.

<34> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<35> 동물 및 조직 준비

<36> 암컷(n=40) 스프래그-돌리 랫트(250 gm 몸무게, 경상대, 신경생물학 실험실)는 온도-통제 환경 6시에서부터 20시까지 사료와 함께 광선하에 적응시켰다. 임신한 랫트는 10% 에탄올(처리군, n=30) 및 식염수(대조군, n=10)를 구강으로 섭취하였다. 시간에 맞춰 임신한(임신 0.5일과 같은 수정한 날) 랫트는 임신 15.5일, 17.5일 및 19.5일에 희생시키고 태아의 뇌 샘플을 나누었다. *in situ* 혼성화 및 면역조직화학을 위해 태아는 4% 중성 완충 포름알데히드에 48시간 동안 4℃에서 고정되었고, 20% 수크로오스 포스페이트 완충액에 24시간 동안 에멀

전시켜 냉동 보호시키고, 그리고 나서 동결된 조직 섹션은 가운데-및 측면(mid-and lateral)의 시상면(sagittal plane)으로 만들었다.

<37> (실시예 1) 면역조직화학

<38> 태아 뇌 섹션은 37°C에서 건조되었고, 0.02M 인산완충식염수(PBS, pH 7.4)로 15분 동안 완전히 세척하였다. 내인성 퍼옥시다아제 활성을 막기 위해서 뇌 섹션을 0.5% 과요오드산으로 5분 동안 배양시키고, 정상 염소 혈청(1:20)에서 90분 동안 실온에서 전이시키고 이어서 하룻밤 다클론성 래빗-유도 프라이머리 항체로 Bax 및 Bcl-2 각각(PBS에서 1:500으로 희석; Santa Cruz)을 4°C에서 배양시켰다. 그 후 바이오틴 결합된 염소 항-래빗 세컨더리 항체(PBS에서 1:200으로 희석; 벡터)로 90분 동안 실온에서 배양시키고, 섹션은 아비딘-바이오틴 결합된 퍼옥시다아제 복합체(PBS에서 1:50으로 희석; 벡터)로 표지 되었고 이어서 PBS에서 3,3'-디아미노벤지딘-H₂O₂로 5분 동안 염색되었다. 슬라이드는 광학현미경 하에서 관찰되었고, 사진 촬영되었다.

<39> (실시예 2) 웨스턴 블롯 분석

<40> 태아 뇌는 동결 세포 라이스스 완충액(Cell Signaling)과 혼합되었고, 균질화되었다. 상기 단백질을 함유량은 표준으로 우혈청 알부민(BSA)을 사용하여 Bio-Rad 단백질 분석 용액으로 Bradford assay를 실시하여 295nm에서 분광광도계로 측정하였다. 상기 단백질은 5분 동안 가열되었고 환원 조건 하에서 12.5% 소듐 도데실설페이트 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 통해 분석되었다. 전-염색된 단백질 마커(브로드 범위: 6-175 kDa; Biolabs)는 단백질의 분자량의 측정을 위해 동시에 실시되었다. electroblot을 통하여 PVDF 세포막으로 겔 전이(39 mM 글리신, 48 mM 트리스, 20% 메탄올 및 0.037% SDS 전기이송 완충액에서 1시간 동안 90 볼트) 및 전기영동 트랜스퍼 세포(electrophoretic transfer cell) 상에서 반건조(semidry)(15 볼트, 90 분)가 실시되었다. 그리고 나서 상기 세포막은 비-특이적인 결합을 환원시키기 위해서 TBST 완충액(20 mM 트리스-염산 pH 7.4, 500 mM 염화나트륨 및 0.01% Tween-20)에서 5% 탈지유를 포함한 차단 용액으로 처리되었다. 면역반응은 4°C에서 하룻밤동안 TBST(1:500; Santa Cruz)로 희석된 프라이머리 항체를 사용하여 실시되었다. 래빗-유도된 항-Bax(23 kDa) 및 항-Bcl-2 (28 kDa) 다클론성 IgG는 상기 목적을 위해 사용되었다. 래빗 항-액틴 다클론성 IgG(42 kDa; 1:500; Sigma)는 균일한 적가(uniform loading)를 확인하기 위해서 제어인자로서 사용되었다. Horseradish 퍼옥시다아제-콘쥬게이트된 염소 항-래빗 IgG(TBST에서 1:1000으로 희석; Santa Cruz)는 세컨더리 항체로서 사용되었다. 상기 단백질 밴드는 프로토콜(Amersham)에 따라 증진된 화학발광(ECL) 웨스턴 블롯 감지 시스템을 사용하여 측정되었고 이어서 엑스-레이 노출이 실시되었다. Bax 및 Bcl-2 단백질 밴드의 농도는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용하여 측정되었다.

<41> (실시예 3) *in situ* 혼성화

<42> cRNA 프로브의 합성 : 랫트 Bax 및 Bcl-2 cRNA 프로브는 pGEM[®]-3Z 재조합 서브클론으로부터 합성되었다. 안티센스 Bcl-2 및 Bax cRNA 프로브는 T7 RNA 폴리머라제로 Bcl-2 및 Bax 각각으로부터 전사되었고, NotI로 라이너화(linerize)를 실시했다.

<43> 센스 프로브는 T7 RNA 폴리머라제로 전사시켰다. 특이적 활성을 지닌 [³⁵S]-UTP-표지된 프로브 1x10⁹ cpm/ μ g은 실험관 내에서 전사키트(Promega)를 사용하여 준비되었다. 안티센스 및 센스 프로브는 Sephadex G-50 DNA grade 컬럼을 사용하여 정제되었고, 0.1% 소듐 데도실설페이트(SDS), 1 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 10 mM 트리스 및 10 mM 디티오프로판(DTT)을 포함한 SET 완충액(pH 7.4)으로 용출되었다. 프로브 90% 이상이 정제된 프로브의 폴리아크릴아마이드 겔 분석은 예상했던 결과였다.

<44> *in situ* 혼성화 : 동결된 섹션 슬라이드는 실험군 및 대조군으로부터 준비되었고 10 μ g 두께의 냉동-섹션은 양전하 슬라이드 프로브 상에서 해동-장착되었다. 공기-건조된 슬라이드는 2x-염화나트륨 시트르산나트륨 완충액(SSC: 0.5 M 염화나트륨 및 0.3 M 시트르산나트륨, pH 7.0)에서 세척되었다. 프로테아제 K 처리 및 조직의 아세틸화 후, 상기 섹션은 전-혼성화 완충액(50% 포름아마이드, 0.6 M 염화나트륨, pH 7.5의 10 mM 트리스-염산, 0.02% 피콜, 0.02% 폴리비닐피롤리돈, 0.1% BSA, pH 8.0의 1 mM EDTA 및 텍스트란 설페이트)으로 프로브의 비-특이적인 결합의 환원을 위해 37°C에서 1시간 동안 처리되었다. 전-혼성화 완충액의 제거 후, 슬라이드는 혼성화 완충액(전-혼성화 완충액 플러스 프로브)으로 커버되었다. 안티센스 또는 센스 프로브를 지닌 혼성화가 추가적으로 50 μ g/ml 효모 tRNA, 10 mM DTT (10%) 및 전-혼성화 용액의 RNA 프로브 당 5x10⁵ cpm을 지닌 상기와 동일한 용액에서 실시되었고, 60°C에서 밤새동안 배양되었다. 그 후, 상기 슬라이드는 후-혼성화 완충액에서 후-혼성화되었고, 이어서 30분 동안 2x-SSC 완충액으로 세척되었다. 상기 섹션은 20분 동안 RNase A (50

$\mu\text{g/ml}$)로 처리되었고 따뜻한 2x-SSC 완충액(50℃)에서 두 번 세척되었고, 65℃에서 15분 동안 0.1x-SSC를 포함한 세척된 완충액으로 이동되어, 에탄올에 의해 연속적으로 탈수되었다. 슬라이드는 프로토콜에 따라 자기방사법 엑스-레이 필름(Amesham)에 노출되었고, 슬라이드를 Kodak NTB-2 에멀전 용액에 담가놓았다. 그 후, 메틸 그린 대비 염색제로 착색된 슬라이드는 암-시야 현미경에서 관찰되었고 사진 촬영되었다.

<45> 통계적 분석

<46> 웨스턴 블롯에 대해, 밀도값은 평균±표준오차(n=5)로서 표현된다. Student's t-test는 대조군과 10% 에탄올 처리군간의 유의한 차이를 측정하기 위해서 수행되었다. 모든 경우에서 통계적 유의성에 대한 수용 값은 p가 0.05보다 작을 때이다.

도면의 간단한 설명

<47> 도 1은 임신 15.5, 17.5 및 19.5일에 대조군(C) 및 10% 에탄올 처리군(E)으로부터 성장하는 태아 랫트 뇌의 서로 다른 영역에서 Bax 및 Bcl-2 단백질의 면역블롯 분석을 나타낸 것이다. 대표 항체로 표지 후 Bax 단백질은 명확한 밴드로 확인되는 반면에 Bcl-2는 약하게 감지된다.

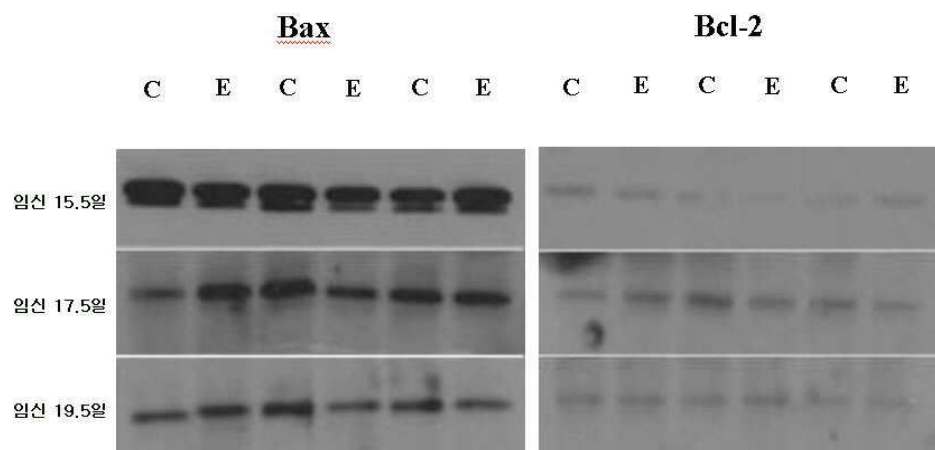
<48> 도 2는 임신 15.5, 17.5 및 19.5일에 대조군 및 10% 에탄올 처리군으로부터 태아 랫트 뇌의 서로 다른 영역에서 Bax (A) 및 Bcl-2 (B) 발현시 에탄올의 효과를 나타낸 것이다. NFB, 대조 전뇌; EFB, 에탄올 처리 전뇌; NMB, 대조 중뇌; EMB, 에탄올 처리 중뇌; NHB, 대조 후뇌; EHB, 에탄올 처리 후뇌. 도 1의 Bax 및 Bcl-2 단백질 밴드의 밀도의 평균±표준오차(n=5)는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용하여 계산 후 나타내었다. 대조군과 비교시 *p<0.05, **p<0.01.

<49> 도 3은 임신 15.5, 17.5 및 19.5일에 대조군 및 10% 에탄올 처리군에서 Bcl-2/Bax 단백질의 정량분석을 나타낸 것이다. 에탄올 처리군(점선)의 Bcl-2/Bax 비율은 대표 대조군(실선)과 비교시 전뇌(A), 중뇌(B) 및 후뇌(C)에서 현저한 차이를 보인다. D는 대조군과 에탄올 처리군 간의 비율 차이를 나타낸다. 대조과 비교시 *p<0.05, **p<0.01.

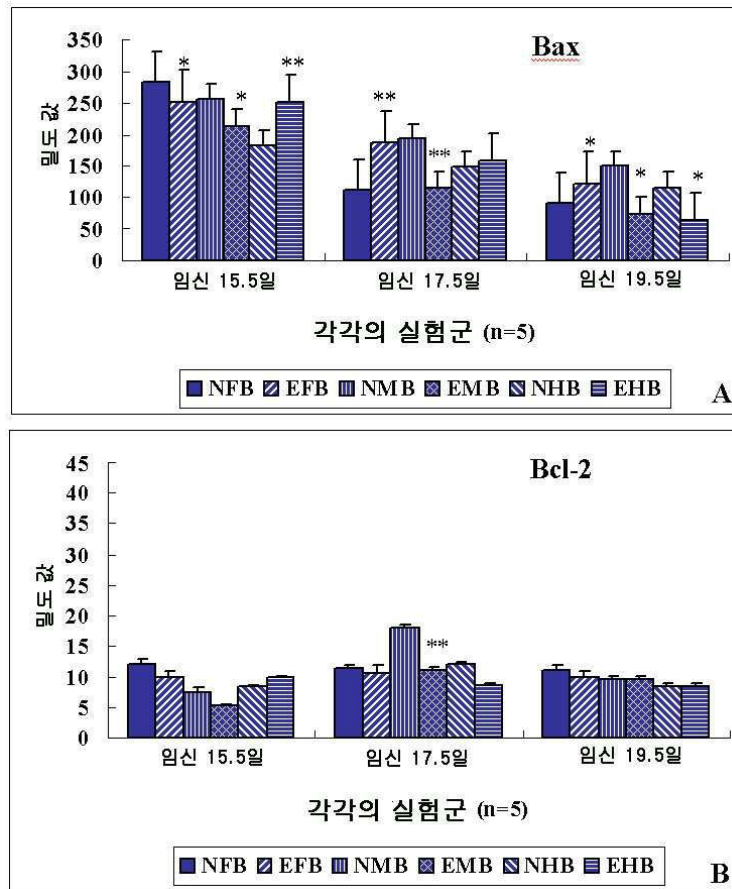
<50> 도 4는 임신 17.5일에 10% 에탄올 처리 태아 랫트의 피질, 시상, 해마 및 중뇌에서 Bax 단백질의 면역조직화학 대표도이다. Bax 단백질은 임신 17.5일에 대조군(C) 보다 10% 에탄올 처리군(A,B)의 피질 영역에서 매우 국소화된다. C1, 피질영역; CZ, 피질판영역; IZ, 중간영역; K1, 해마영역; M, 중뇌영역; T1, 시상영역; V, 측뇌실; VZ, 심실영역. 축적 막대: 300 μm (A) 및 100 μm (B,C).

도면

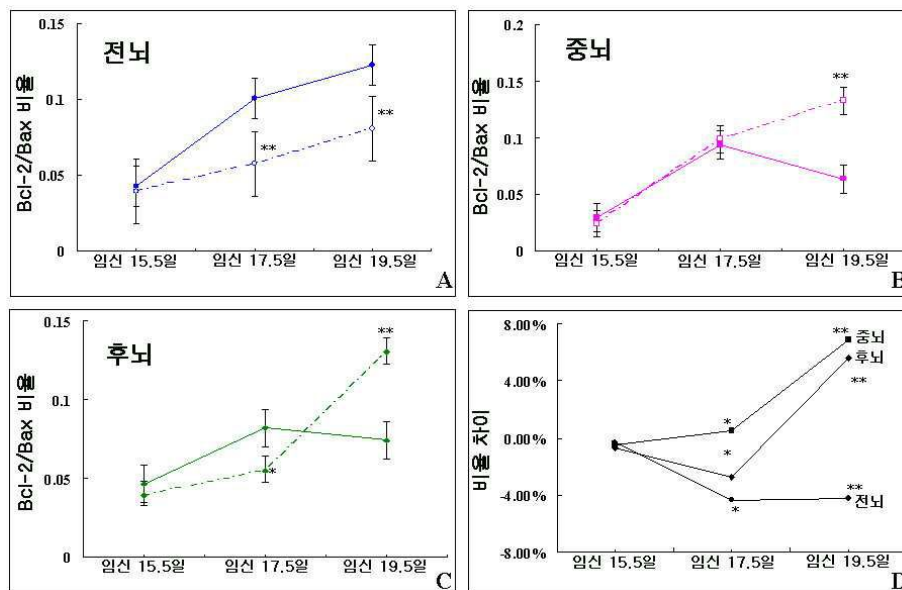
도면1



도면2



도면3



도면4

