



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0112201
(43) 공개일자 2013년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 29/74 (2006.01) *C07C 31/08* (2006.01)

C07B 63/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0034409

(22) 출원일자 2012년04월03일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신전로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

홍용기

부산광역시 해운대구 해운대해변로 85 우동 경동
아파트 103동 703호

문일수

경상북도 경주시 황성동 청우아파트 303동 1303호

(74) 대리인

박병석, 서장찬

전체 청구항 수 : 총 3 항

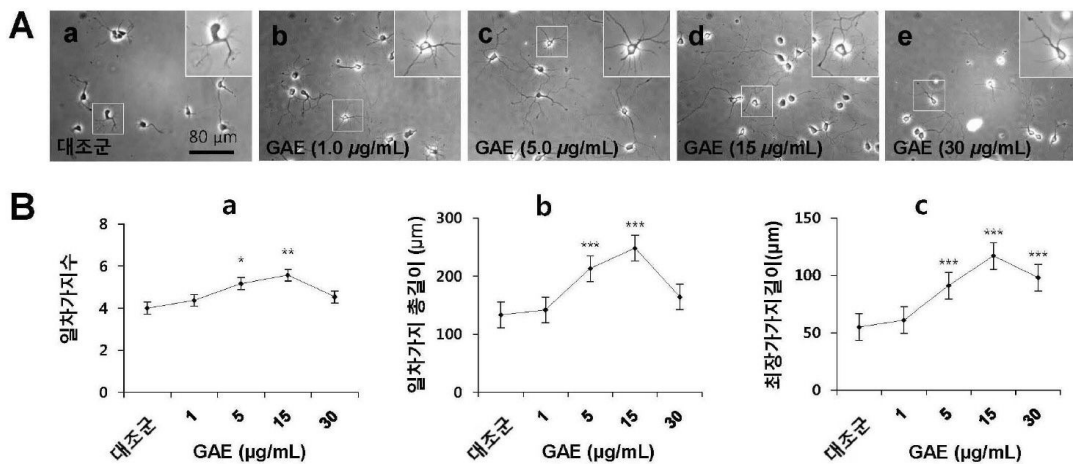
(54) 발명의 명칭 신경세포구축의 발달 및 복잡성을 촉진하는 해양 조류 우뚝가사리의 에탄올 추출물, 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 해양 조류 우뚝가사리[겔리디움 아만시이(*Gelidium amansii*)]의 신경돌기(가지돌기 및 축삭) 생성 촉진 활성[neurite (dendrite and axon) outgrowth promoting activity; NOPA] 및 신경돌기(가지돌기 및 축삭) 성장(분지 및 길이성장) 촉진 활성[neurite growth (branching and lengthening) promoting activity; NGPA] 효능에 관한 것이다.

대표도

최적농도의 결정



특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 조류 시료를 수집하는 단계;
- (b) 조류 시료를 세척하는 단계;
- (c) 세척된 시료를 건조 및 분쇄하는 단계;
- (d) 조류 시료의 분말에 에탄올을 붓고 진탕시키는 단계;
- (e) 진탕 후, 슬러리를 원심분리한 후, 상층액을 여과시키는 단계;
- (f) 단계 (e)에서 수득된 여액을 진공하에 농축시키고 완전히 건조시키는 단계;
- (g) 단계 (f)에서 건조된 에탄올 추출물을 칭량하는 단계;
- (h) 추출물을 디메틸 설펍사이드(DMSO) 속에 용해시켜 분취량을 제조하는 단계;
- (i) 원시 해마 신경세포를 배양하는 단계;
- (j) 배양한 해마 신경세포에 단계 (h)에서 수득한 GAE를 처리하는 단계 및
- (k) GAE의 신경세포의 신경돌기(가지돌기 및 축삭) 생성 촉진 활성[neurite (dendrite and axon) outgrowth promoting activity; NOPA) 및 신경돌기(가지돌기 및 축삭) 성장(분지 및 길이성장) 촉진 활성[neurite growth (branching and lengthening) promoting activity; NGPA) 효능의 검증하는 단계를 포함하여, 우뚝가사리의 에탄올 추출물을 제조하는 방법.

청구항 2

신경돌기 생성 촉진 활성(NOPA) 및 신경돌기 성장 촉진(NGPA) 효능을 가진, 제1항에 따른 방법에 따라 제조된 신경세포의 우뚝가사리의 추출물.

청구항 3

제2항에 있어서, 효능을 나타내는 최적 농도가 신경세포 배양 배지 mL 당 1 내지 30 μ g인 우뚝가사리의 에탄올 추출물.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 신경학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 해양 조류, 우뚝가사리[젤리디움 아만시이(Gelidium amansii)]의 에탄올 추출물(GAE)을 사용하여 신경돌기(가지돌기 및 축삭)의 생성 촉진 및 성장(분지 및 길이성장) 촉진 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 인간의 기대수명이 증가함에 따라, 정상적인 뇌 노화(brain ageing)와 신경세포(neuron)의 병리학적 변성으로 인한 신경학적 질환은 노인들 사이에서 관심이 증가하고 있다. 신경학적 질환의 발병기전은 부위-특이적인 신경학적 변성, 및 신경영양성 인자(neurotrophic factor)의 감소로 인해 주로 유발되는 위축증(degeneration)과 관련되어 있다(참조: Siegel and Chauhan, 2000; Connor and Dragunow, 1998; 및 Schaeffer et al., 2009). 신경영양성 인자는 신경 분화, 성장, 발달, 기능, 가소성(plasticity) 및 생존에 있어서 중요하다(참조: Huang and Reichardt, 2001).
- [0003] 신경세포(neuron 또는 nerve cell)는 신경돌기(neurite)가 나 있는 것이 특징이며, 돌기에는 신호를 받는 가지돌기(dendrite)와 신호를 전달하는 축삭(axon)이 있다. 뇌의 기능은 수많은 신경세포들이 가지돌기와 축삭으로 서로 연결되어 형성된 신경회로(neural circuit)에 근거를 두고 있으며, 이 신경회로가 손상을 입으면 뇌기능에 이상이 오는 신경학적 질환이 된다. 물리적 충격에 의한 뇌의 외상(traumatic injury), 혈관이상에 의한 뇌졸중

(stroke), 유전적 이상에 의한 알츠하이머병(Alzheimers disease) 및 헌팅톤병(Huntingtons disease) 등과 같은, 급성 및 만성 뇌질환 둘다에 있어서 일반적인 특징은 신경가지의 손상과 신경세포의 과도한 손실에 의한 신경회로의 소실이다(참조: Christensen et al., 2010; 및 Sari, 2011). 이러한 병인 뿐 아니라 정상적인 노화에서도 끊임없이 손상을 받아 돌기들이 위축되고 신경세포는 죽어간다.

[0004] 따라서, 이의 예방 및 치료전략 가운데 하나는 뇌에서 신경영양인자 또는 이들의 유도인자의 이용성을 증가시키는 것이다. 실제로, 신경영양인자인 세레브로라이신(cerebrolysin)을 복용하면 인지기능이 향상되는 등 치매개선효과가 있으며(참조: Alvarez et al., 2006), 신경아교세포에서 얻은 신경영양인자를 파킨슨병(Parkinson disease) 환자 뇌의 조가비핵(putamen)에 주사하면 운동기능이 향상된다(Lang et al., 2006). 또한 신경영양인자에 의한 신경돌기발생(neuritogenesis)은 손상된 신경회로를 부분적으로나마 회복함으로써 신경학적 질환의 증상을 호전시킨다는 보고들이 있다(참조: Lee and Son, 2009; Giovanni and Marlene, 2002; Galvan and Bredesen, 2007; 및 Chuang, 2010; Schaeffer et al., 2009). 이와 같이, 신경세포 세포구조를 조절할 수 있는 신경영양 인자는 신경학적 질환을 예방하거나 회복시킬 수 있다.

[0005] 따라서, 천연 또는 합성 기원의 신규하고 강력한 신경돌기발생 약물을 찾고자 하는 조사가 집중되고 있다. 지금까지, 신경활성 물질에 대한 조사는 주로 육지자원에 집중되어 있다(참조: Kim, 2010; 및 Mantle et al., 2000). 그러나, 해양환경에 방대한 자원들이 존재하며 이들 중의 대부분은 아직 탐색되지 않고 있다. 주요 해양 생물 중 하나인 해초류(seaweeds)는 신경영양 인자들을 가지고 있을 잠재적 자원이다. 더구나, 해초류는 한국을 비롯한 동남아시아 국가들에서 인기있는 음식재료로 소비되고 있으며, 일부 해초들은 전통의약에서 사용되어 왔다. 몇 가지 약리학적 효과를 가진 생활성 화합물의 공급원으로서 해초류 또는 해양 거대조류가 탐색되어 왔으며, 현재까지 연구된 바로, 해초류 가운데 미역[온다리아 핀나티피다(Undaria pinnatifida)]은 비만을 방지하는 효능이 있고(참조: Maeda et al., 2005), 이 외에도 항산화, 항노화, 및 항암 활성 등이 많이 보고되었다(참조: Smit, 2004).

[0006] 그러나, 해초류의 신경영양 효과에 대해서는 거의 관심이 집중되지 않았다. 가마이(Kamei)와 사가라(Sagara)는, 해초류인, 모자반[사르가수스 마크로카르푸(Sargassum macrocarpum)]과 자니아 아드하렌스(Jania adharens)가 쥐 부신 수질 친크롬 세포주(rat adrenal medulla pheochromocytoma cell line) PC12D의 가지돌기생성을 촉진한다는 것을 보고하였다(참조: Kamei and Sagara, 2002). 그러나 이 세포주는 말초신경계(peripheral nervous system)의 신경내분비세포(neuroendocrine cell)이다. 지금까지, 중추신경계(central nervous system, CNS)의 신경세포에서 해초의 신경영양 활성을 평가하는데 이용가능한 정보는 없었다. 따라서, 해양 조류로부터 신경영양 물질을 발견하려는 노력이 크게 바람직할 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Alvarez XA, Cacabelos R, Laredo M, Couceiro V, Sampedro C, Varela M, Corzo L, Fernandez-Novoa L, Vargas M, Aleixandre M, Linares C, Granizo E, Muresanu D, Moessler H. 2006. A 24-week, double-blind, placebo-controlled study of three dosages of Cerebrolysin in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 13: 43-54.
- (비특허문헌 0002) Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasalTM, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35: 56-576.
- (비특허문헌 0003) Cao D, Xue R, Xu J, Liu Z. 2005. Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. *J Nutr Biochem* 16: 538-546.
- (비특허문헌 0004) Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O. 2010. Intracellular Abeta triggers neuron loss in the cholinergic system of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31: 1153-1163.
- (비특허문헌 0005) Chuang TT. 2010. Neurogenesis in mouse models of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802: 872-880.

- (비특허문헌 0006) Connor B, Dragunow M. 1998. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev* 27:1-39.
- (비특허문헌 0007) Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8: 1454-1488.
- (비특허문헌 0008) Galvan V, Bredesen DE. 2007 Neurogenesis in the adult brain: implications for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6: 303-310.
- (비특허문헌 0009) Giovanni AC, Marlene OB. 2002. Memory deficits in Alzheimer's patients: A comprehensive review. *Neuropsychol Rev* 3: 119-169.
- (비특허문헌 0010) Goslin K, Asmussen H, Banker G. 1998. Rat hippocampal neurons in low-density culture. In *Culturing Nerve Cells*, Banker G, Goslin K (eds), 2nd edn. MIT Press: Cambridge, MA; 339-370.
- (비특허문헌 0011) Huang EJ, Reichardt LF. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
- (비특허문헌 0012) Kamei Y, Sagara A. 2002. Neurite outgrowth promoting activity of marine algae from Japan against rat adrenal medulla pheochromocytoma cell line, PC12D. *Cytotechnology* 40: 99-106.
- (비특허문헌 0013) Kim Y. 2010. Neuroprotective phenolics in medicinal plants. *Arch Pharm Res* 33: 1611-1632.
- (비특허문헌 0014) Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M. 2006. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* 59: 459-466.
- (비특허문헌 0015) Lee E, Son H. 2009. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep* 42: 239-244.
- (비특허문헌 0016) Lein PJ, Higgins D. 1989. Laminin and a basement membrane extract have different effects on axonal and dendritic outgrowth from embryonic rat sympathetic neurons in vitro. *Dev Biol* 136: 330-345.
- (비특허문헌 0017) Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K. 2005. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 392-397.
- (비특허문헌 0018) Mantle D, Pickering AT, Perry EK. 2000. Medicinal plant extracts for the treatment of dementia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *CNS Drugs* 13: 201-213.
- (비특허문헌 0019) McAllister AK. 2000. Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex* 10: 963-973.
- (비특허문헌 0020) Moon IS, Cho SJ, Jin I, Walikonis R. 2007. A simple method for combined fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry. *Mol Cells* 24: 76-82.
- (비특허문헌 0021) Poirazi P, Mel BW. 2001. Impact of active dendrites and structural plasticity on the memory capacity of neural tissue. *Neuron* 29: 779-796.
- (비특허문헌 0022) Sanes JR. 1989. Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu Rev Neurosci* 12: 491-516.
- (비특허문헌 0023) Sari Y. 2011. Huntington's disease: from mutant Huntington protein to neurotrophic factor therapy. *Int J Biomed Sci* 7: 89-100.
- (비특허문헌 0024) Schaeffer EL, Novaes BA, da Silva ER, Skaf HD, Mendes-Neto AG. 2009. Strategies to

promote differentiation of newborn neurons into mature functional cells in Alzheimer brain. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 33: 1087-1102.

(비특허문헌 0025) Seress L. 2001. Morphological changes of the human hippocampal formation from midgestation to early childhood. In Handbook of developmental cognitive neuroscience, Nelson CA, Luciana M (eds). MIT Press: Cambridge, MA; 45-58.

(비특허문헌 0026) Sholl DA. 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. J Anat 87: 387-406.

(비특허문헌 0027) Siegel GJ, Chauhan NB. 2000. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. Brain Res Brain Res Rev 33: 199-227.

(비특허문헌 0028) Smit AJ. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. J Appl Phycol 16: 245-262.

(비특허문헌 0029) Suh KT. 1997. Classification of herbs in decoction part of Donguibogam. Ph.D. Thesis. Kyungshung University, Busan, Korea; 138.

(비특허문헌 0030) Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A, Guillemin R. 1986. Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. Proc Natl Acad Sci USA 83: 3012-3016.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은, 흰쥐 렛트의 해마 신경세포의 일차배양물(primary culture)에서 우뚝가사리로부터의 에탄올 추출물(Gelidium amansii ethanol extracts; GAE)의 신경돌기발생 활성(neuritogenic activity)에 대해 평가하였다. 그 결과, 본 발명자들은 우뚝가사리 에탄올 추출물(GAE)이 강력한 신경돌기발생 활성을 나타냄을 발견하였다.
- [0009] 이에, 본 발명의 목적은 우뚝가사리의 에탄올 추출물(GAE)의 제조 방법, 및 당해 방법으로 수득된, 신경세포구축의 발달 및 복잡성을 촉진하는 우뚝가사리의 에탄올 추출액(GAE)을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기과 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0011] (a) 조류 시료를 수집하는 단계;
- [0012] (b) 조류 시료를 세척하는 단계;
- [0013] (c) 세척된 시료를 건조 및 분쇄하는 단계;
- [0014] (d) 조류 시료의 분말에 에탄올을 붓고 진탕시키는 단계;
- [0015] (e) 진탕 후, 슬러리를 원심분리한 후, 상층액을 여과시키는 단계;
- [0016] (f) 단계 (e)에서 수득된 여액을 진공하에 농축시키고 완전히 건조시키는 단계;
- [0017] (g) 단계 (f)에서 건조된 에탄올 추출물을 칭량하는 단계;
- [0018] (h) 추출물을 디메틸 설펡사이드(DMSO) 속에 용해시켜 분취량을 제조하는 단계;
- [0019] (i) 일차 해마 신경세포(primary hippocampal neuron)를 배양하는 단계;
- [0020] (j) 배양한 해마 신경세포에 단계 (h)에서 수득한 GAE를 처리하는 단계 및
- [0021] (k) GAE의 신경세포의 신경돌기 생성 및 성장 촉진 효능의 검증하는 단계를 포함하여, 우뚝가사리의 에탄올 추

출물을 제조하는 방법을 제공한다.

- [0022] 추가로, 본 발명은 상기한 방법들에 의해 수득된 것으로서 신경세포의 성숙촉진과, 신경돌기 발생 및 성장 촉진 효능을 가진 우뚝가사리의 에탄올 추출물(GAE)을 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에서 제공하는 우뚝가사리의 에탄올 추출물(GAE)은 신경세포의 1단계로부터 2단계로의 초기 분화를 유의적으로 촉진하며, 신경돌기의 수, 길이, 및 가지치기 빈도와 같은 축삭 및 가지돌기 발달의 지수를 증가시킨다. GAE의 이러한 효과의 최적 농도는 15 μ g/mL이며 투여량-의존적이다. 이들 결과는, 해양 조류가 신경영양 잠재능에 대한 촉망되는 후보물임을 나타낸다.
- [0024] 또한 GAE는 신경영양인자로 작용하여 신경계의 발생 단계 뿐 아니라 정상적인 노화(normal ageing) 및 신경변성 질환(neurodegenerative disease)에서 신생 신경세포의 발달촉진과 기존 신경세포들의 신경돌기 성장촉진 및 위축(atrophy) 방지를 통하여 뇌질환을 예방하고 치료하며, 정상뇌기능을 향진시키는데 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 최대 신경돌기 생성 촉진 효과(neurite outgrowth promoting activity; NOPA)에 대한 GAE의 농도 최적화를 나타낸다.

배아태령 18일(embryonic day 18; E18) 랫트 해마 신경세포를 폴리-DL-라이신-피복된 커버슬립 위에서 나타낸 농도의 우뚝가사리의 에탄올 추출물(GAE) 또는 비히클[DMSO, <1%(w/v); 대조군]과 함께 3일 동안 배양하고 획득한 상을 분석하였다.

도 1a는 표시한 농도의 GAE가 포함된 배지에서 자란 신경세포들의 대표적인 위상차 현미경사진을 나타낸다. 바아 규모, 80 μ m, 모든 영상에 대해 적용됨.

도 1b는 1차 신경돌기(a), 1차 신경돌기의 총 길이(total length of primary neurites; TLPN; b) 및 최장 신경돌기(c)의 길이에 대한 통계적 분석을 나타내며, 이는, 추출물이 투여량-의존적 방식으로 신경돌기 발달을 증진시킴을 입증하며 15 μ g/mL농도에서 최고의 효능이 있음을 보여준다. 데이터 점은 평균 SEM(n=30개의 개개의 신경세포)을 나타낸다. 통계적 의의는 비히클(대조군)과 비교하였다: * p < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

도 2는 신경세포의 발달 전체 기간을 통한 GAE의 신경세포 성숙(neuronal maturation) 촉진효능을 나타낸다. GAE를 15 μ g/mL 농도로 첨가하여 배양한 신경세포를 배양 후 24시간, 시험관내 일수(day in vitro; DIV) 7일(DIV 7), 10일(DIV 10), 14일(DIV 14)에 찍은 위상차 현미경 사진을 도 2에 나타내었다. 각각의 영상에서 하나의 전형적인 신경세포(확대됨)가 삽화로 나타나 있다. 바아 규모, 80 μ m, 모든 영상에 적용됨; 삽화의 경우, 20 μ m.

도 2a는 신경세포를 폴리-DL-라이신(PDL) 피복된 기질 위에서 24시간 동안 배양한 것을 나타내는 사진이다. 배양 후 24시간은 아직 해마신경세포가 발달초기(1~2) 단계이다. 대조군(도 2a, 대조군)에서는 작은 돌기가 아직 1~2개인 발달 2 단계에 머무르고 있다. 그러나 GAE가 첨가된 배지에서 자란 신경세포들은 다수의 가지들이 생성되어 있으며(도 2a, GAE), 또한 축삭으로 분화된 가지가 있는 발달 3 단계의 세포도 상당 수 있었다(도 2a, GAE, 화살표). 이는 신경세포의 발달 초기에 세포체로부터 새로운 돌기가 싹트는 신경돌기 생성 촉진 활성(neurite outgrowth promoting activity, NOPA) 활성이 있음을 증명한다.

도 2b는 신경세포를 PDL 피복된 기질 위에서 배양시킨 후 대표적인 영상을 DIV(시험관내 일수) 7, 10 및 14일째에 획득한 위상차 현미경 사진을 나타내었다. 배양 후 7일째는 주로 가지돌기(dendrite)의 길이가 성장하는 발달 4 단계이며, 10일째 이후는 세포가 성숙하는 발달 5 단계이다. 이 시기에 신경돌기들의 복잡성(neurite complexity)이, 대조군에 비하여, GAE가 첨가된 배지에서 자란 신경세포들에 더 높음을 알 수 있다. 이는 GAE가 대조군 배양물과 비교하여 발달 3~5 단계에서 신경돌기(가지돌기 및 축삭)들의 길이가 길어지고 분지가 생성되는 신경돌기 성장 촉진활성(neurite growth promoting activity; NGPA)이 있음을 증명한다.

도 3은 신경세포 발달의 초기 NOPA에 대한 GAE의 효과를 나타낸다.

배아 랫트 해마 신경세포는 폴리-DL-라이신-피복된 커버슬립 위에서 GAE(15 μ g/mL) 또는 비히클[DMSO, <1%(w/v)]과 함께 24 또는 48시간 동안 배양하였다.

도 3a는 신경세포의 초기 발달 단계를 나타내는 위상차현미경 사진이다. 신경세포는 폴리-DL-라이신-피복된 커버슬립 위에서 GAE(15/mL) 또는 비히클과 함께 배양하였다. 신경세포는 1단계[라멜리포디아(lamellipodia)](a)에서 2 단계(소수의 작은 돌기)(c)로 발달하였다. 라멜리포디아와 작은 돌기 단계 사이에 1.5 단계(b)로 불리는 전이단계가 존재하며, 이는 부채모양의 돌기를 지닌 신경세포를 나타낸다. 바아 규모, 80 μ m; 삽화의 경우 10 μ m.

도 3b는 24시간(a) 또는 48시간(b)의 배양 후 계수된 각각의 발달 단계에 있는 신경세포의 통계이며, 이는, GAE가 신경세포가 1 단계에서 2 단계로 진행되는 발달 속도를 유의적으로 가속화시킴을 입증한다. 바아 내의 값은 각 단계에 속하는 신경세포의 퍼센트를 나타낸다(계수한 세포수 = 400~500개).

도 3c는 단극(a), 두극(B) 및 다극(c)을 가진 신경세포를 나타내는 대표적인 위상차현미경사진이다. 바아 규모, 10 μ m.

도 3d는 24시간(a) 또는 48시간(b)의 배양 후 계수된 돌기의 수에 따라 단극, 두극 또는 다극 신경세포의 퍼센트를 나타내며, 이는 GAE가 들어있는 배지 속에서 성장시키는 경우 신경세포의 대부분이 다극 특성으로 발달하였음을 나타낸다. 바아 내의 값은 각 단계에 속하는 신경세포의 퍼센트를 나타낸다(계수한 세포수 = 400~500개).

도 4는 배아(E18) 랫트 해마 신경세포의 가지돌기(dendrite) 형태 발달에 있어서 GAE의 1차가지돌기 생성(NOPA) 및 길이 성장(NGPA) 촉진 효과를 나타낸다. 신경세포는 폴리-DL-라이신-피복된 커버슬립 위에서 GAE(15/mL) 또는 비히클[DMSO, <1%(w/v)]과 함께 1 내지 5일 동안 배양하였다. 이후에 신경세포를 고정시키고 안키린 G(적색) 및 알파-튜불린(녹색)에 대해 이중-면역염색하였다. 안키린 G는 축삭 시작 분절(axon initial segment; AIS; 화살표)에서 특징적으로 농축되어 있으나, 가지돌기에는 부재하였다. 때때로, 배양된 신경세포에는 축삭이 하나보다 더 많았다(GAE에서 화살표, DIV 5일).

도 4a는 DIV 1, 3 및 5일 배양물로부터의 대표적인 해마 신경세포의 면역형광성 영상을 나타낸다. 가지돌기 나무(dendritic tree)의 복잡성에 있어서 GAE의 효과에 주목한다. 바아 규모, 40 μ m, 모든 영상에 적용된다.

도 4b는 1차 가지돌기 수(a) 및 1차 가지돌기의 총 길이(TLPD; b)를 나타낸다. 이들의 수치가 늘어남은 GAE의 가지돌기 생성 촉진 및 길이성장 촉진 효능을 입증한다. 바아는 평균 SEM(n = 30개 신경세포)을 나타낸다.

도 5는 배아(E18) 랫트 해마 신경세포의 가지돌기 형태 발달에 있어서 GAE의 NGPA[가지돌기 분지(branching) 촉진 및 길이성장 촉진(lengthening)] 효과에 대한 솔분석(Sholl analysis)을 나타낸다. 신경세포를 도 4에 나타낸 바와 동일한 배양 조건하에서 성장시켰다. 당해 도는 도 4a에 나타낸 동일한 각각의 사진에 대해 생성된다.

도 5a는 각각의 DIV에서 하나의 신경세포 당 각 분지차수(branching order)에 있는 가지돌기 분지 수, 도 5B는 가지돌기 분지의 총 길이(total length of dendritic branch; TLDB)를 나타낸다. GAE에 의하여 2차 및 3차분지가 증가됨과 이들의 길이가 유의하게 증가되었음을 주목하며, 이는 GAE의 가지돌기 분지 효능과 길이성장 효능을 통계학적으로 입증한다. 바아는 평균 SEM(n = 30개 신경세포)을 나타낸다. 도 5c는 분지차수를 설명하는 신경세포의 모식도이다. 통계적 의미는 비히클(대조군)과 비교하였다: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** P < 0.001.

도 5d는 가지돌기 교차(cross), 도 5E는 분지 점(branching point), 도 5f는 분지 끝(branch tip)에 대한 솔분석(Sholl analysis)을 나타낸다. 데이터 점은 평균 SEM(n=30개의 신경세포)을 나타낸다. 세포중심에서부터의 동심원 상에서 계수한 이들의 형태계측학적 수치가 모두 증가되었음을 주목하며, 이는 GAE의 분지(가지치기) 촉진 및 길이성장 촉진 효능을 통계학적으로 입증한다. 도 5g는 신경세포와 솔분석을 설명하는 모식도이다.

도 6은 배아 랫트 해마 신경세포의 축삭 발달에 있어서 GAE의 NGPA 효과를 나타낸다. 신경세포를 도 5에 나타낸 바와 동일한 배양 조건하에서 성장시켰다. 당해 도는 도 5a에 나타낸 동일한 각각의 사진에 대해 생성된다.

도 6a 내지 6d는 축삭 발달의 형태적 분석으로 차례로 축삭축(dendritic shaft)의 길이(a), 세포 당 각 차수에 있는 축삭곁가지(axon collateral branch; ACB) 수(b), 축삭 곁가지의 총 길이(total length of axon collateral branch; TLACB; c) 및 이를 설명하는 신경세포 모식도(d)를 나타낸다. 바아는 평균 SEM(n=30개 신경세포)를 나타낸다. 축삭의 형태계측학적 지수가 모두 증가하였음을 주목하며, 이는 GAE의 축삭 성장 및 곁가지치기 촉진 효능을 형태학적으로 입증한다.

도 6e 내지 6h는 축삭 형태의 술 분석으로 축삭의 교차(e), 축삭 결가지 분지점 (axon collateral branch point; ACBP; f), 축삭 결가지 끝(axon collateral branch tip; ACBT; g), 및 이를 설명하는 신경세포 모식도(h)을 나타낸다. 데이터 점은 평균 SEM(n=30개의 신경세포)을 나타낸다. 축삭의 모든 형태계측학적 지수가 증가하였음을 주목하며, 이는 GAE의 축삭 결가지치기 및 길이성장 촉진 효능이 있음을 통계적으로 증명한다. 통계적 의미는 비히클(대조군)과 비교하였다: * p < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 신경영양 인자는 신경세포 발달을 지지하는 것 외에 신경변성 질환에서 성숙한 신경세포의 위축을 방지하기 위해서 필수적이다. 본 출원인은 랫트 해마 신경세포를 발달시키는데 있어서 해초류의 일종인 우뚝가사리의 에탄올 추출물(GAE)이 강력한 신경돌기생성 및 길이성장 촉진 활성을 나타냄을 검증하였다.

[0027] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

물질 및 방법

우뚝가사리 시료의 수집 및 가공

[0030] 우뚝가사리를 한반도 남쪽의 해안선을 따라 수집하였다. 시료를 담수로 세척하여 착생식물과 염을 세척 제거하고 실온에서 1주일 동안 그늘에서 건조하였다. 이후에, 건조된 시료들을 분쇄기[HMF-340, 한일사(Hanil Co.,) 한국, 서울 소재]로 분쇄하고 밀봉된 시료봉지 속에 -20℃에서 암실 조건하에 추가의 시험을 위해 저장하였다. 식물 명을 향명(local name) 또는 일반명(common name)으로 확인하였다(참조: Suh, 1997). 바우처(Voucher) 시료는 홍용기박사의 실험실(부경대, 한국 부산 소재)에 기탁하였다.

일차 해마 신경세포의 배양 및 추출물 처리

[0032] 세포배양에 필요한 시약들은 특별한 언급이 없는 한 Invitrogen 사(Carlsbad, CA, USA) 제품을 사용하였다. 임신 13일째에 임신 13일째에 주문하여 12/12시간의 암실 주기 및 사료와 물에 자유로이 접근할 수 있도록 한 우리에 조절된 온도로 가두었다. 실험은 동국대학교 실험동물윤리위원회에 의해 승인되었다. 임신 18일째에, 임신한 랫트를 이소플루오란으로 마취시키고 태아를 수집하였다. 이후에 태아 해마를 뇌로부터 해부하고 신경세포 배양물을 앞서 보고된 바와 같이(참조: Brewer et al., 1993; 및 Goslin et al., 1998), 제조하였다.

[0033] 요약하면, 해부된 해마를 헹크스 균형 염 용액(Hanks balanced salt solution: HBSS) 속에 수집하고, 조직을 HBSS 속에서 0.25%(w/v) 트립신으로 12분 동안 37℃에서 분해함으로써 해리시키고 불로 처리하여 등급화된 파스퇴르 피펫으로 연마하였다. 해리된 세포를 혈구계로 계수하고 1.0×10^4 - 2.0×10^4 개 세포/cm²의 밀도로 24-웰 배양 플레이트 속에서 폴리-DL-라이신(PDL)(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)으로 피복된 직경 12mm 유리 커버슬립 위에 접종(플레이트팅)하였다. 배양물을 B27 첨가물을 넣은, 혈청이 없는 뉴로베이잘 속에 유지하고 37℃에서 5% CO₂/95% 공기 하에 배양하였다. GAE 또는 비히클[DMSO, 최종 농도 <1.0%(v/v)]을 세포 접종 전에 배지에 가하였다. 정상 대조군(배지만) 및 비히클 대조군(배지와 DMSO)을 시험 시료로 처리한 것과 항상 비교하였다.

면역세포화학

[0035] 면역염색을 위하여, 커버슬립 위의 고정된 신경세포를 투불린 알파-아단위[마우스 모노클로날 12G10, 1:1000 희석; Developmental Studies Hybridoma Bank, 아이오와대(University of Iowa), 미국] 및 안키린 G(토끼 모노클로날 h-215, 1:50 희석; Santa Cruz Biotechnology Inc.)에 대한 1차 항체에 이어서 2차 항체[Alexa Fluor 488-접합된 염소 항-마우스 IgG(1:1000) 및 Alexa Fluor 568-접합된 당나귀 항-토끼 IgG(1:1000), Molecular Probes]를 처리하고 기술된 바와 같이(참조: Moon et al., 2007) 형광염색하였다.

영상 획득

[0037] 나타낸 시간에 커버슬립 위의 신경세포를 돌베코 인산 완충 염수(Dulbeccos phosphate buffered saline: DPBS, Invitrogen)로 간단히 세척하고 일련의 파라포름알데하이드/메탄올 고정 과정(참조: Moon et al., 2007)에

의해 고정시켰다. I3 S, N2.1 S 및 Y5 여과기 시스템이 장착된 현미경 DM IRE2(Leica Microsystems AG, 독일 베를린 소재)를 사용하여 위상차 및 형광영상(1,388 x 1,039 픽셀)을 고 해상 CoolSNAP CCD 카메라(Photometrics Inc., 독일 소재)로 Leica FW4000 소프트웨어를 사용하는 컴퓨터의 제어하에 획득하였다.

[0038] 영상 분석 및 정량화

[0039] 형태 분석 및 정량화를 단일 신경돌기 트레이서 플러그-인(simple neurite tracer plug-in: National Institute of Health, USA) 및 Sholl plug-in(<http://biology.ucsd.edu/labs/ghosh/software>)을 사용하여 영상(Image J 버전 1.45) 소프트웨어로 수행하였다. 1차 신경돌기(세포체로부터 직접 기원한 신경돌기)의 수, 1차 신경돌기의 총 길이(TLPN; 1차 신경돌기의 길이의 합) 및 축삭 길이와 같은 형태 계측을 하였다. 가지돌기 분지 및 축삭 끝가지 차수(order)를 또한 분석하였다. 1차 분지는 1차 신경돌기로부터 기원한 것들이며; 2차 및 3차 분지는 1차 및 2차 분지 각각으로부터 기원한 것들이다. 축삭 및 가지돌기 나무의 가지상 정도를 평가하기 위하여, 본 출원인은 솔 분석(Sholl analysis)(참조: Sholl, 1953)을 사용하였다. 가지돌기 또는 축삭 교차는, 가지돌기, 축삭 또는 이들의 분지/2차 분지가 솔 중심원을 교차하는 지점이다. 연속적인 동심원 사이, 즉 각각의 연속적인 10 μ m 방사상 원내에서 분지 점 및 분지 끝(tip)의 수를 계수하였다. 인접한 신경세포와 가지가 서로 섞이지 않는 신경세포(최저 30개 세포)를 선택하여 분석하였다. 상이한 발달 단계(참조: Dotti et al., 1988)에 있는 신경세포를 획득한 영상에서 계수하였다. 또한, 단극(unipolar), 두극(bipolar) 또는 다극(multipolar) 특징에 이르는 세포를 계수하였다. 본 연구에서, 배지에 아무 것도 첨가하지 않은 정상 대조군과 비히클[DMSO, 1.0%(v/v) 이하] 대조군의 신경세포는 매우 유사한 성장 패턴을 나타내었다. 따라서, 본 출원인은 형태 계측 분석 동안 추출물-처리된 배양물을 비히클 대조군과 항상 비교하였다.

[0040] 데이터 분석

[0041] 유의적인 통계학적 차이($p < 0.05$)를 SPSS 소프트웨어(버전 16.0)로 포스트 후 두칸 다중 비교(post hoc Duncan multiple comparison)로 변이의 단일-방식 분석(one-way analysis)을 사용하여 분석하였다.

[0042] 결과

[0043] 신경돌기 성장 촉진 활성(neurite outgrowth promoting activity: NOPA)에 대한 GAE의 최적 농도

[0044] NOPA에 대한 GAE의 농도 의존성을 평가하기 위하여, 본 출원인은 해마 신경세포 배양물에 1 내지 30 μ g/mL 범위의 GAE를 가하였다. 3일 동안 성장시킨 배양물의 대표적인 위상차 현미경상을 도 1A에 나타내었다. 1차 신경돌기의 수 및 총 길이(TLPN), 및 최장 신경돌기의 길이와 같은 성장 지수는 GAE-처리된 배지에서 배양시킨 신경세포에서 농도-의존적으로 증가하였으며 15 μ g/mL에서 최대로 이르렀다(도 1B). 따라서, GAE를 다음 시험부터는 15 μ g/mL로 첨가하였다.

[0045] 신경세포의 발달 전체 기간을 통한 GAE의 신경가지 발달 촉진효능

[0046] GAE를 15 μ g/mL 농도로 첨가하여 배양한 신경세포를 배양 후 24시간, 7일(DIV 7), 10일(DIV 10), 14일(DIV 14)에 찍은 위상차 현미경 사진을 도 2에 나타내었다. 배양 후 24시간은 아직 해마신경세포가 발달초기(1~2) 단계에 있다. 대조군(도 2A, 대조군)에서는 작은 돌기가 아직 1~2개인 발달 2 단계에 머무르고 있다. 그러나 GAE가 첨가된 배지에서 자란 신경세포들은 다수의 돌기들이 생성되어 있으며(도 2A, GAE), 또한 축삭으로 분화된 돌기가 있는 발달 3 단계의 세포도 상당 수 있었다(도 2A, GAE, 화살표). 배양 후 7일째는 주로 가지돌기(dendrite)의 길이가 성장하는 발달 4 단계이며, 10일째 이후는 세포가 성숙하는 발달 5 단계이다. 이 시기들 사진을 도 2B에 나타내었는데 대조군에 비하여 신경돌기들의 복잡성(neurite complexity)이 GAE가 첨가된 배지에서 자란 신경세포들에 더 높음을 알 수 있다. 이 결과는 GAE가 신경세포의 발달 촉진효능이 발달 초기 뿐 아니라 전체 단계를 통하여 신경돌기의 발달을 촉진함을 증명한다.

[0047] GAE의 신경세포 발달 초기 신경돌기 생성 촉진 활성(neurite outgrowth promoting activity; NOPA)

[0048] 뇌의 초기 발생에서 신경세포로 분화한 세포는 돌기가 없는 둥근 모양이다. 이들을 생체에서 분리하여(원주의

경우 보통 태령 18-19일) PDL 피복된 커버스립에 배양하면 기질에 부착과 거의 동시에 부채모양의 라멜리포디아를 내고(발달 1단계), 12시간 정도 후에는 몇 개의 작은 돌기(small processes 또는 small neurites)들이 생성된다(발달 2단계). 이렇게 생성된 돌기 가운데 하나가 급격히 자라기 시작하여 축삭(axon)이 되고(발달 3단계), 그 후에 나머지 돌기들이 자라기 시작하여 가지돌기(dendrite)가 된다(발달 4단계). 이어서 축삭과 가지돌기는 많은 분지(가지치기 branching)를 하게 되고, 특히 가지돌기들은 수많은 분지를 하여 복잡한 형태의 가지돌기나무(dendritic tree)를 형성하는 성숙단계(발달 5단계)에 들어간다. 따라서 신경세포의 성숙 축진은 신경세포 발달 초기(발달 1~2단계)에 세포체로부터 새로운 돌기가 싹트는 신경돌기 생성 촉진 활성(neurite outgrowth promoting activity, NOPA) 활성과, 발달 3~5 단계에서 신경돌기(가지돌기 및 축삭)들의 길이가 길어지고 분지가 생성되는 신경돌기 성장 촉진활성(neurite growth promoting activity; NGPA)으로 나누어 볼 수 있다.

[0049] GAE를 15 μ g/mL 농도로 첨가하여 배양한 신경세포와 대조군 신경세포를 배양 후 24시간 후에 위상차 현미경사진을 찍고 발달 1단계 및 발달 2단계 세포로 분류하고, 그 중간단계(minor process가 되기 직전의 부채모양의 큰 분지를 갖는 세포)를 발달 1.5단계로 정의하였다(도 3A). GAE가 포함된 배지에서 자란 신경세포들은 배양 24시간 후 관찰하였을 경우 대부분(95%) 발달 2단계에 들어갔다(도 3B-a, GAE). 그러나 대조군 배양에서는 약 50%의 세포만이 이 단계에 들어갔다(도 3B-a, 대조군). 48시간 후에는 GAE가 포함된 배지에서 자란 세포들은 거의 모두가 발달 2단계에 들어갔으며(도 3B-b, GAE), 대조군에서는 아직 1/4 정도는 분지가 생성되지 않은 발달 1단계에 머물고 있었다(도 3B-b, 대조군).

[0050] 분지들의 수에 따라 단극(1개), 두극(2개) 및 다극(2개 이상)으로 분류할 경우(도 3C) GAE 배지에서 성장시킨 세포들의 대부분은 24시간 이내에 2개 이상의 분지를 갖는 다극 단계에 들어갔다(도 3D-a). 반면 대조군은 1/4 정도의 세포만이 이 단계에 들어갔으며 33%는 48시간에서도 아직 두극 단계에도 들어가지 못하였다(도 3D-b). 이러한 결과들은 GAE가 신경세포의 발달 초기에 세포체(soma)에서 신경돌기가 생성되는(neurite outgrowth) 것을 촉진하여 신경세포를 보다 이른 시간에 성숙시키고 신경돌기들의 복잡성을 증가시키는 효능이 있음을 증명한다.

[0051] **GAE의 신경돌기 성장[분지(branching) 및 길이성장(lengthening)] 촉진 효능(neurite growth promoting activity; NGPA)**

[0052] **GAE의 가지돌기 성장 촉진 효능**

[0053] 신경세포는 신호를 주고받는 부분이 서로 다른 극성을 띤 세포이다. 신호를 받는 가지돌기는 복수이고 복잡한 분지를 한다. 가지돌기의 길이가 증가되거나 분지가 증가되면 신경회로를 만드는데 긍정적인 효과가 있다. 이는 특히 손상된 신경회로를 회복하는데 중요하게 작용한다. GAE가 가지돌기의 발달에 미치는 영향을 가지돌기 분지 차수(dendritic branching order), 1차 가지돌기의 수(number) 및 1차 가지돌기의 총길이(total length of primary dendrites, TLPD)를 조사하여 알아보았다.

[0054] 배양 1~5일[days in vitro (DIV) 1~5] 사이 신경세포들은 계속적으로 가지돌기의 길이와 복잡성이 증가되었다. 가지돌기와 축삭을 구분하기 위하여 신경세포를 안키린(ankyrine) G(적색)와 알파-투불린(녹색)으로 이중면역염색하였다. 안키린 G는 축삭시작분절(axon initial segment, AIS)에 높은 밀도로 존재하며, 알파-투불린은 세포 골격의 미세소관(microtubule)을 형성하는 단백질로 세포 전체에 분포한다. 따라서 신경세포를 이 두 단백질에 대한 항체로 이중염색하면 AIS는 붉은색(reddish color)을 띄게 된다(도 4A, 화살표). 가끔 배양한 신경세포는 1개 이상의 축삭을 갖기도 한다(도 4A, GAE, DIV 5). GAE는 이 기간 내내 대조군에 비하여 1차 가지돌기의 수를 약 50%(도 4B-a), 1차 가지돌기 총길이(TLPD)를 약 100% 증가시켰다(도 4B-b). 배양 1일째는 아직 축삭이 분화되지 않았기 때문에 전체 돌기에서 하나를 뺀 값을 가지돌기 수로 정하였다.

[0055] 이 결과는 GAE가 세포체로부터 가지돌기의 생성(NOPA) 뿐 아니라 생성된 가지돌기들의 길이성장(lengthening)을 촉진하는 효능이 있음을 증명한다.

[0056] GAE가 포함된 배지에서 3~5일간 자란 해마신경세포들은 대조군보다 가지돌기 분지 차수(도 5)가 더 증가되었다. 가지돌기의 분지를 분석한 결과, GAE는 1차, 2차 및 3차 분지들의 수를 현저히 증가시켰다(도 5A). 대조군에 비하여 GAE가 포함된 배지에서 자란 신경세포들은 1차 가지돌기 분지(primary dendritic branch)의 수가 2배, 이차 가지돌기 분지는 3배 증가하였다. 더구나 GAE를 포함하는 배지에서 자란 신경세포들은 배양 5일째(DIV 5)에 1차 가지돌기 분지가 생성되었으나, 대조군에서는 이런 분지가 없었다. 분지 수가 늘어났기 때문에

가지돌기 분지 총길이(total length of dendritic branches, TLDB)도 수배 증가하였다(도 5B).

[0057] 술 분석을 통하여 GAE가 분지에 미치는 영향을 보다 더 자세히 분석하였다. 술분석법은 세포체중심을 중점으로 반지름을 증가시키면서 그린 동심원이 가지돌기와 교차하는 수를 측정하는 것이다. 교차점 뿐 아니라, 연속되는 두 동심원 사이에 위치하는 분지점(branching point) 및 분지 끝(branch tip)도 측정하였다. GAE가 포함된 배지에서 자란 신경세포들은 대조군에 비하여 이러한 측정 지수들을 현저히 증가시켰다. 즉, 가지돌기의 교차점은 2.5배 증가되었는데(도 5D), 이러한 교차점들은 반지름 140 μ m원에서도 있었다. 반면 대조군은 반지름 80 μ m 원 이상에는 없었다. 이는 GAE의 가지돌기 길이성장 촉진효능에 의하여 가지돌기의 길이가 길어졌기 때문이다. GAE는 총 가지돌기 분지점(total dendritic branching points)을 3.5배 증가시켰다(도 5E). 대조군의 경우 반지름 40 μ m 이상에서는 분지점이 없었지만, GAE 배지에서는 반지름 110 μ m까지 분지점이 있었다. GAE는 총 가지돌기 분지 끝(total dendritic branch tips)의 수를 2배 증가시켰으며, 세포 중심에서 140 μ m까지 분지끝이 있었고 30-40 μ m 동심원 사이에서 가장 많은 분지끝이 있었다(도 5F). 반면 대조군 세포는 20-30 μ m 동심원 사이에 가장 많은 분지끝이 있었으며 90 μ m 이상에는 분지끝이 없었다.

[0058] 이러한 결과들은 GAE가 신경세포의 성숙과 가지돌기의 길이성장 뿐 아니라 분지를 촉진함을 증명한다.

[0059] GAE의 축삭 성장 촉진 효능

[0060] 성장기 뇌의 발생과 성숙 후 뇌손상의 회복단계에서 축삭의 성장이 빠르고 결가지(collateral)가 잘 쳐지는 것은 신경회로의 형성과 재생에 긍정적으로 작용한다. 따라서 축삭의 형태계측지수(morphometric parameter)들을 측정하여 GAE가 축삭의 발달에 미치는 영향을 알아보았다.

[0061] 배양한 신경세포들은 DIV 1-5 동안 계속하여 발달하여 복잡성이 증가되었다. GAE는 축삭축(axonal shaft)의 길이를 이 기간 내내 대조군에 비하여 유의적으로(50~100%) 증가시켰다(도 6A). 배양 3일 및 5일째에 관찰하였을 때, 가지돌기의 발달과 마찬가지로 GAE는 축삭의 결가지치기(axonal collateral branching)를 촉진하였다. GAE는 1차, 2차 및 3차 축삭결가지 수를 유의적으로 증가시켰다(도 6B). 대조군과 비교하였을 때 1차 결가지수는 2배, 2차 결가지는 4배 증가하였다. 더구나 대조군에서는 3차 결가지가 배양 5일째에 나타나는데, GAE 배지에 키운 세포들은 배양 3일째 3차 축삭결가지가 나타나는 것으로 보아 축삭 결가지치기를 촉진하는 효능이 있었다. 결가지의 수가 증가되었기 때문에 축삭결가지총길이(TLACB) 역시 몇 배 증가하였다(도 6C). 이 결과들은 GAE가 축삭축 및 결가지의 길이성장 촉진과 결가지치기 촉진 효능도 있음을 증명한다.

[0062] 술 분석을 해보면 GAE는 축삭 교차 점수, 축삭 결가지 분지 점(axon collateral branch point, ACPBP) 및 결가지 끝(axon collateral branch tip, ACPBT)를 유의하게 증가시켰다. GAE 배지에서 자란 신경세포들은 축삭 교차 점수가 2.5배 증가되었으며, 교차점이 60 μ m 동심원에서 최고점으로 200 μ m 동심원상까지 존재하였다(도 6E). 반면 대조군 세포들은 160 μ m 동심원선상까지 존재하였다(도 6E). 또한 GAE는 50과 60 μ m 동심원 사이를 정점으로 축삭 결가지 분지 점을 3.5배 증가시켰다(도 6F). 반면 대조군은 20과 30 μ m 동심원 사이에 가장 많은 축삭 결가지 분지점이 있었다(도 6F). 이와 유사하게 GAE는 축삭 결가지 끝 수를 3배 증가시켰으며 60과 70 μ m 동심원 사이를 정점으로 160 μ m 동심원까지 분포하였다(도 6G). 그러나 대조군의 경우 40과 50 μ m 동심원 사이를 정점으로 130 μ m 동심원까지 분포하였다(도 6G). 이러한 결과들은 GAE가 축삭의 길이성장(lengthening)과 결가지치기(collateral branching)를 촉진함을 증명한다.

[0063] 토의

[0064] 신경돌기 성장은 신경세포의 구조 및 기능적 극성(polarity)의 확립에 중요하다(참조: Dotti et al., 1998; Cao et al., 2005; 및 Poirazi and Mel, 2001). 더욱이, 가지돌기의 적절한 성장 및 분지는 신경계 기능에 중요하다(참조: McAllister, 2000). 신경영양 인자가 신경세포의 생존 및 발달에 중요하며 또한 신경학적 질환에서 이들의 변성을 예방하는데 있어서 중요한 역할을 하기 때문에, 잠재적인 신경영양 물질에 대한 탐색은 치료학적 신경과학에서 촉망되는 분야이다.

[0065] 본 출원인의 연구는 우뭇가사리 추출물(GAE)은 축삭 및 가지돌기의 세포 구축의 복잡성을 증가시키는데 있어 매우 효과적임을 증명한다. 이미, 문헌[참조: Kamei and Sagara (2002)]에서, 갈조류인 사르가숨 마크로카르pum(Sargassum macrocarpum)으로부터의 메탄올 추출물 및 적조류인 자니아 아드하렌스(Jania adharens)로부터의 인산완충용액(PBS) 추출물이 신경영양 활성을 나타내고 PC12D 세포로부터의 가지돌기 및 축삭의 생성을 유도하

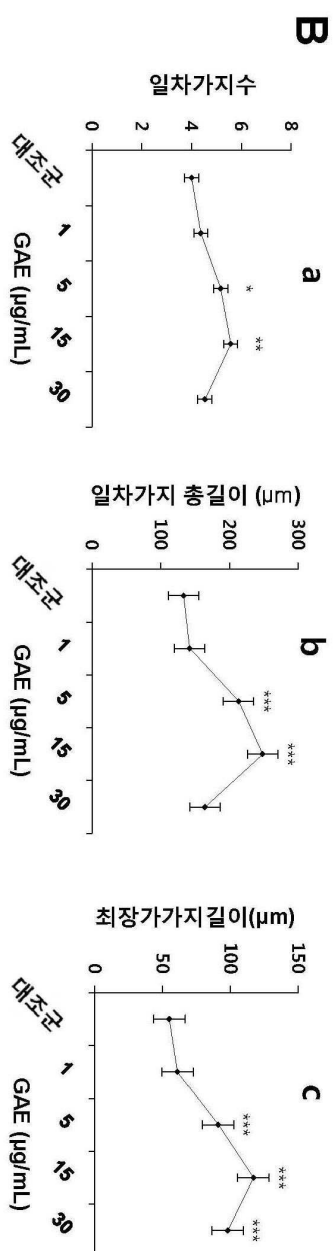
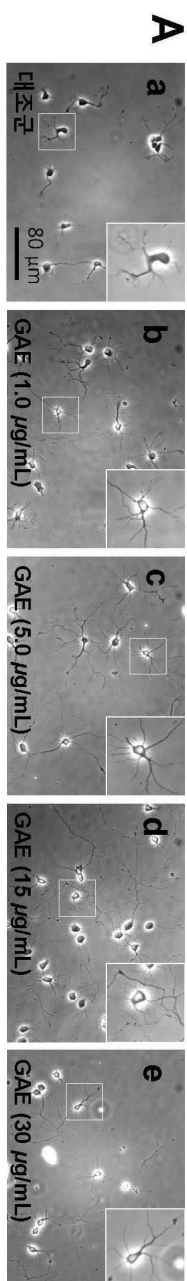
였음을 보고하였다. 본 출원인의 연구와 함께 이들 보고는, 해양 조류가 신경영양 인자에 대한 촉망되는 공급원임을 시사한다.

[0066] 신경돌기를 빨리 생성하는 신경세포는 보다 강력하게 가지내기(arborization)를 할 것이다. 본 출원인의 데이터는, 신경세포 발달이 GAE에 의해 유의적으로 자극되었음을 나타낸다. 즉, 신경세포 발달에 있어서 GAE의 효능은 다극성 특징을 획득하기 위한 시간이 단축된 것이 증명한다. 당해 효과는 신경세포 배양물의 후기 성장에서 지속되었으며 축삭 및 가지돌기의 가지수와 길이를 증가시켰다. 외인성 신경영양 인자는 변성된 신경세포를 회복시키고 성체에서 기억 손상을 개선시킬 수 있음이 동물실험으로 입증되었다(참조: Connor and Dragunow, 1998; 및 Lee and Son, 2009; Schaeffer et al., 2009)

[0067] 앞서의 보고들에 의하면, 출생전 및 출생 후 초기 연령 동안 신경세포의 생존 또는 분화를 촉진하는 신경영양 인자는 성인에서도 신경세포를 위축으로부터 보호한다(참조: Seress, 2001; 및 Connor and Dragunow, 1998). 따라서, GAE는 배아 단계 신경세포의 발달에 있어 NOPA를 나타내었지만 성체 뇌에서도 유사한 NOPA 효과를 나타낼 수 있는 것으로 추정된다. 해초는 동남 아시아의 나라에서 인기 있는 식재료이며, 우뚝가사리는 중국, 일본, 타이완 및 한국에서 소비되는 중요하고 일반적인 식용가능한 적조류이다. 이는 해초로 인한 독성 또는 중독이 없음을 나타낸다. 따라서, 해초는 일반적으로 뇌 건강 및 사람 웰빙의 촉망되는 후보물질일 수 있으며, 본 발명은 이러한 가능성에 대한 증거를 제공한다.

[0068] 이상, 본 발명은 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구체적이 양태들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 양태들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

최적농도의 결정

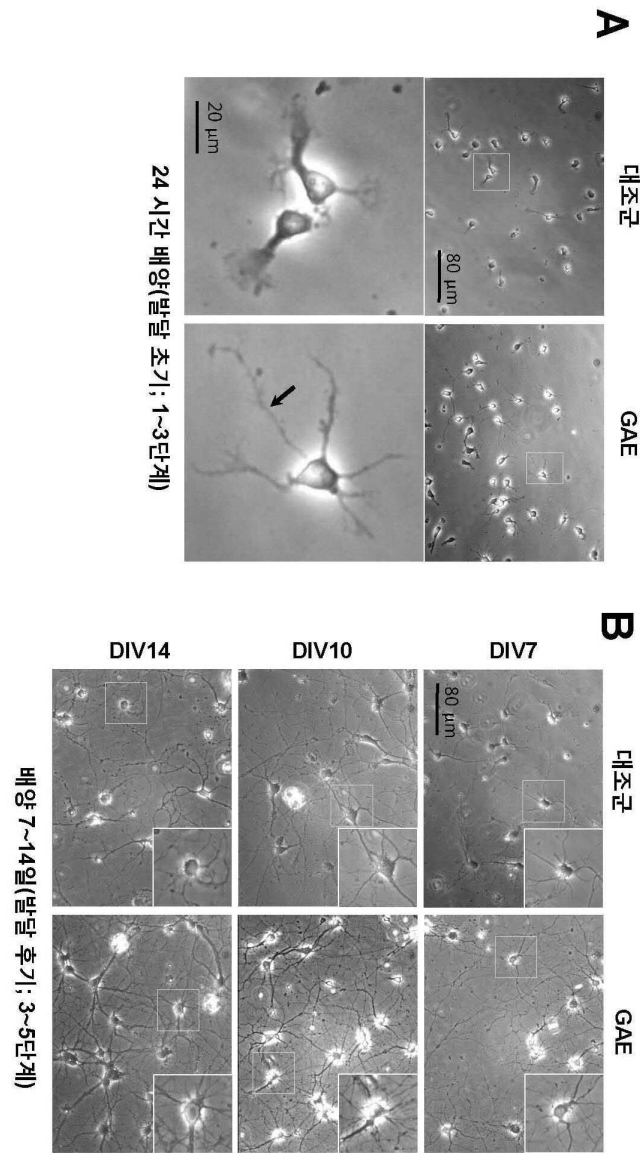


도면

도면1

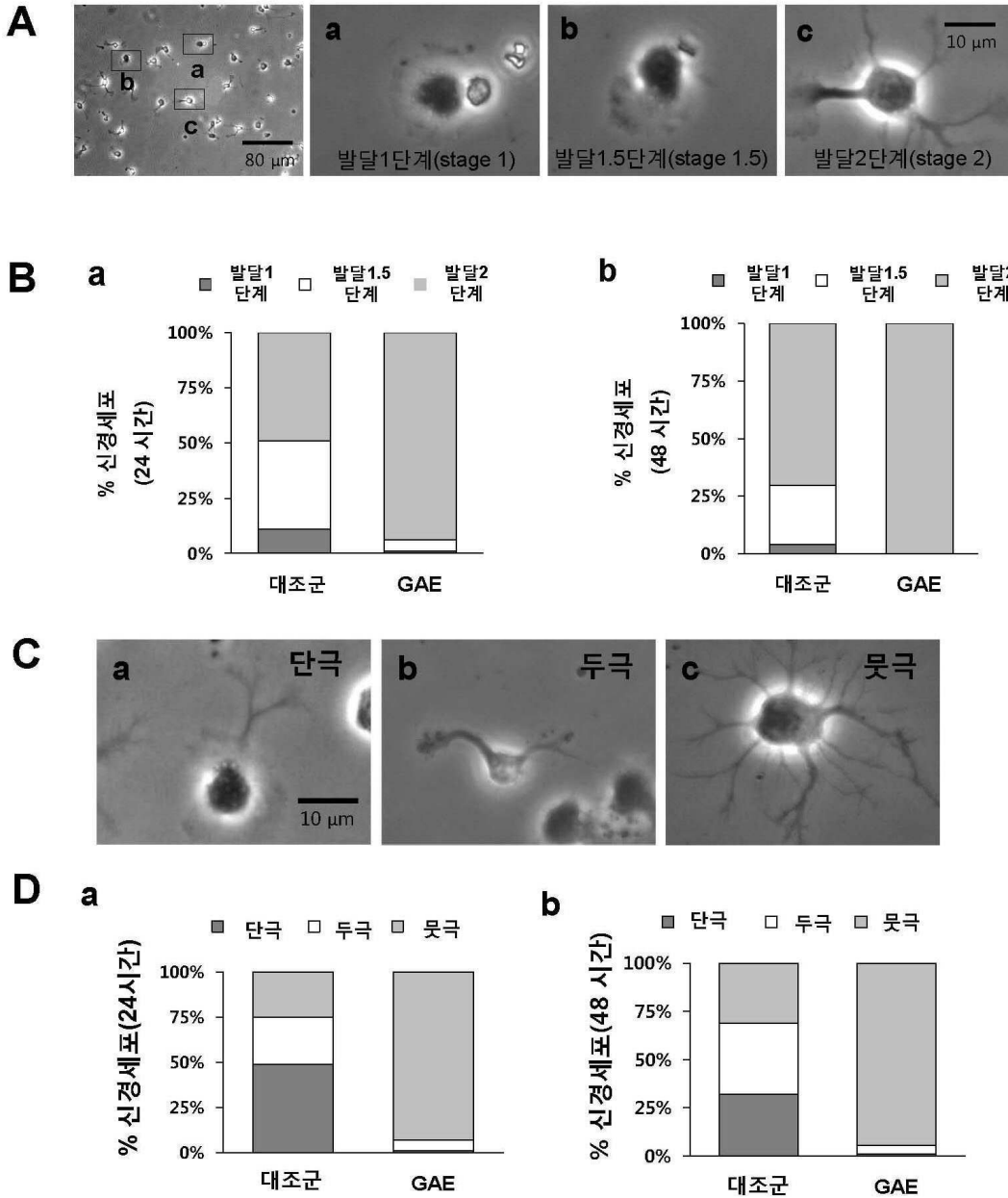
도면2

발달 전체과정을 통한 GAE의 효능



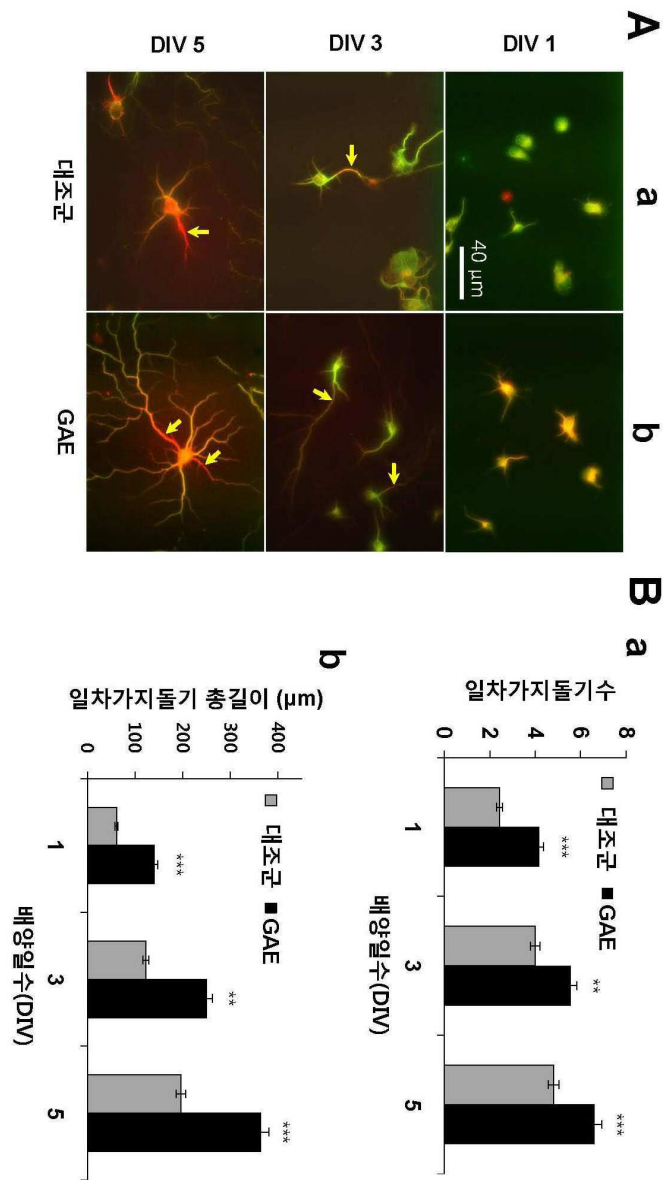
도면3

신경세포 초기(1-2단계) 발달 촉진 효능



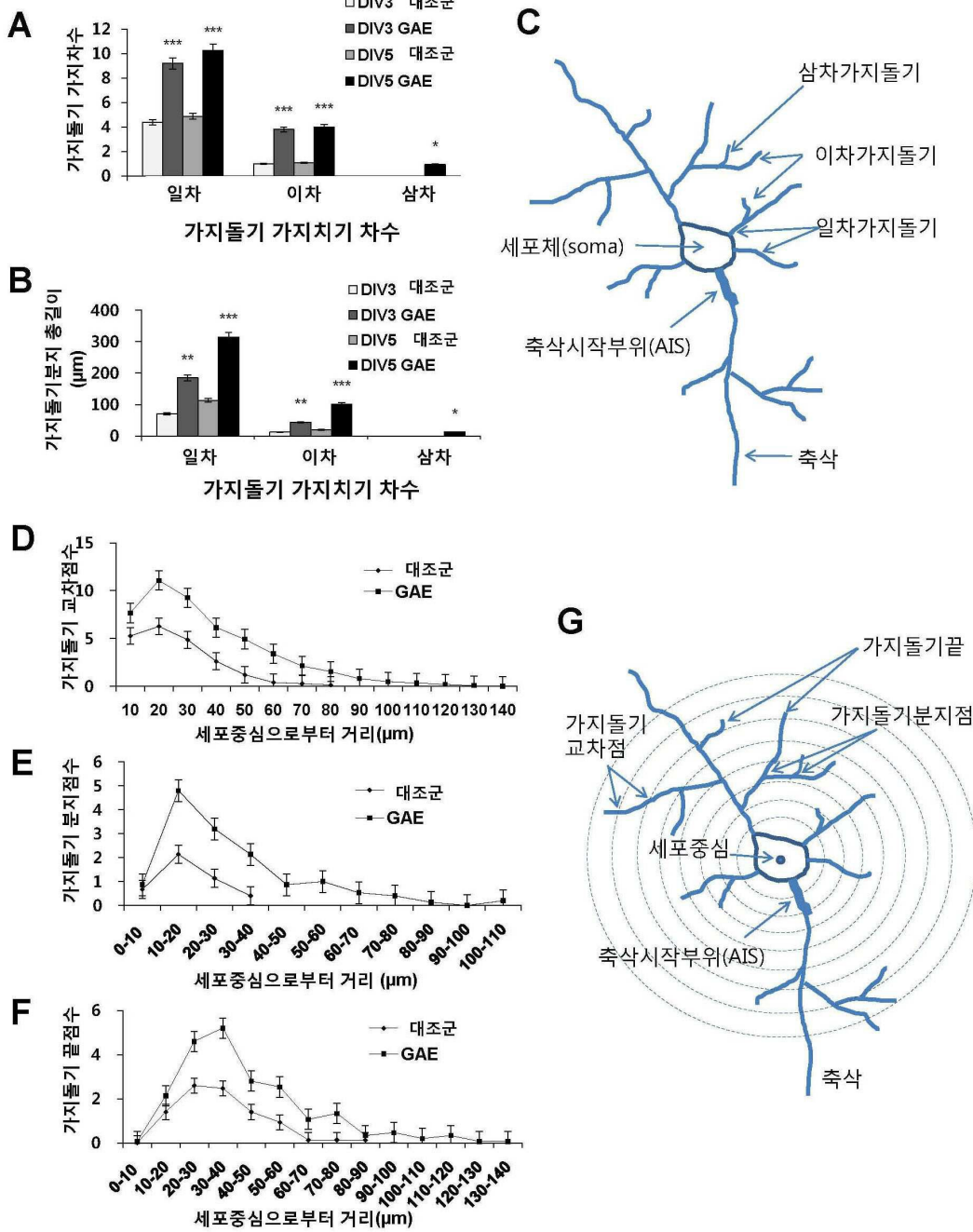
신경세포 후기(3-5단계) 발달 촉진

도면4



도면5

가지돌기 가지치기 촉진 NGPA 솔루션



도면6

