

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0092932 (43) 공개일자 2012년08월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/532 (2006.01)		(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(21) 출원번호	10-2011-0012869	(72) 발명자 전병화 대전광역시 서구 둔산남로 127, 204동 803호 (둔산동, 목련아파트)
(22) 출원일자	2011년02월14일	최성아 대전광역시 서구 문정로170번길 167-13 (둔산동) (뒷면에 계속)
심사청구일자	2011년02월14일	(74) 대리인 김원준

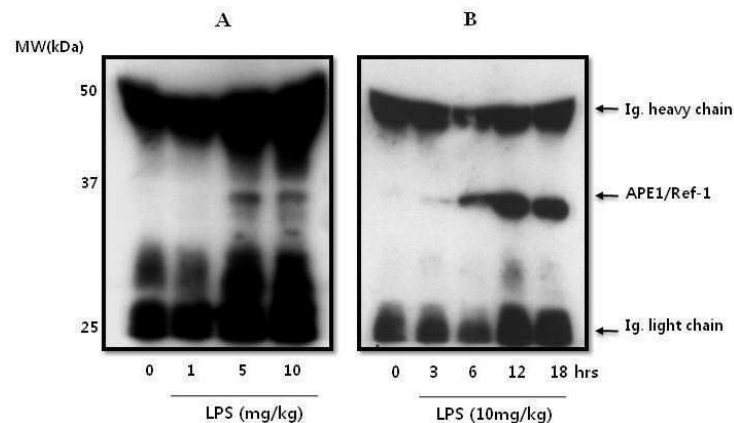
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **염증질환 및 패혈증 진단방법 및 이를 위한 키트**

(57) 요약

본 발명은 패혈증 진단 및 염증질환과 관련 질환을 진단하고 예후를 추적할 수 있는 간편하고 정확한 진단방법 및 진단을 위한 키트에 관한 것으로서, 잠재 환자로부터 채취한 혈액중의 APE1/Ref-1 단백질을 정성/정량분석하는 단계를 포함하는 염증질환 및 패혈증 진단방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

박명수

대전광역시 서구 관저북로 80, 원앙마을 209동
1805호 (관저동)

이은지

대전광역시 유성구 진잠로42번길 88, 진잠타운아파
트 101동 1009호 (원내동)

이유란

충청북도 보은군 보은읍 향교1길 3-3, 에스엠2차
아파트 102-603

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2007-020-010000-0

부처명 한국연구재단

연구사업명 기초의과학연구사업

연구과제명 감염신호네트워크응용연구센터

주관기관 충남대학교

연구기간 2009.03.01 ~ 2011.01.01

특허청구의 범위

청구항 1

잠재 환자로부터 채취한 혈액중의 APE1/Ref-1 단백질을 정성/정량분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 염증질환 및 패혈증 진단방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

- (A) 상기 혈액을 전기영동하는 단계;
 - (B) 전기영동 결과 겔에 1차 APE1/Ref-1 항체를 반응시킨 후 세척하는 단계;
 - (C) 표지체가 접합된 2차 APE1/Ref-1항체를 반응시킨 후 세척하는 단계;
 - (D) 발색제를 가하여 발색반응을 유도한 후 발색정도를 측정하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염증질환 및 패혈증 진단방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 단계(A)에서 혈액에서 혈장만을 분리하여 전기영동하는 것을 특징으로 하는 염증질환 및 패혈증 진단방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 단계(C)에서 전기영동 결과 겔로부터 전개된 단백질을 멤브레인으로 옮긴 상태에서 항체반응시키는 것을 특징으로 하는 염증질환 및 패혈증 진단방법.

청구항 5

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 2차 항체의 표지체는 HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate) 또는 RITC(rhodamine-B-isothiocyanate)인 것을 특징으로 하는 염증질환 및 패혈증 진단방법.

청구항 6

- (A) 1차 APE1/Ref-1 항체;
- (B) 표지체가 접합된 2차 APE1/Ref-1항체;
- (C) 발색제;
- (D) 세척제;를 포함하는 것을 특징으로 하는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 의한 염증질환 및 패혈증 진단 방법 수행을 위한 키트.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 패혈증 진단 및 염증질환과 관련 질환을 진단하고 예후를 추적할 수 있는 간편하고 정확한 진단방법 및 진단을 위한 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 패혈증은 몸의 조직(또는 장기)에 세균이 감염되어 세균 또는 세균이 생산하는 독성물질이 혈중에 침입하여 발생하는 중증 전신성감염증이다. 미국의 경우 해마다 750,000명의 패혈증 환자가 발생하며 국내에서도 상당히 많은 환자가 발생하는 것으로 알려져 있다.
- [0003] 패혈증은, 예를 들면 악성종양, 백혈병, 악성림프종, AIDS, 신부전, 간질환, 뇌혈관장해, 당뇨병 등의 환자, 고령자, 미숙아 등 저항력이 약한 사람에게 특히 잘 발병하여 중환자실 이환율 및 사망률의 주요한 원인이 되고 있다.
- [0004] 이와 같이 세균 감염에 의하여 발생한 전신염증반응은 조기 진단하여 치료하지 않으면 대사성 산증, 급성뇌증, 저산소증, 파종성혈관내응고변증 등의 장기기능부전과, 수액투여에도 혈압이 상승되지 않는 패혈증쇼크를 초래하여 환자의 20~60% 정도가 사망에 이르게 된다.
- [0005] 따라서 염증질환 또는 패혈증의 징후를 조기에 파악하여 대응하는 것이 매우 중요하다. 그러나 현재까지 패혈증의 진단에 결정적인 증상이나 징후, 검사법은 알려져 있지 않다. 특히 패혈증 때 나타나는 신체변화는 개인간의 차이 뿐 아니라 시간 경과에 따라서도 차이가 있기 때문에 검사실 진단이 어렵다.
- [0006] 현재 염증질환 또는 패혈증을 진단하기 위한 방법은 혈액(기타 체액)을 채취하여 배양하여 세균의 존재여부를 파악하는 배양법과 환자의 증상을 분석하여 진단하는 감별진단법이 알려져 있다. 그러나 혈액배양을 위해서는 환자로부터 혈액을 다량(60~90cc) 채취해서 1~3일간 배양해야 하는 불편함이 있을 뿐만 아니라, 중증 패혈증이나 패혈증 쇼크일 경우 환자의 50% 이상에서 배양 음성을 보이고, 감염의 원인 병소가 추정되는 경우에도 배양에서 확인되는 경우는 35%에 불과한 것으로 보고되고 있다. 또한 화상, 외상, 부신 기능부전, 췌장염, 폐색전증, 과열성 대동맥류, 심근경색, 내출혈, 심장눌림증(cardiac tamponade), 약물중독 등의 비감염성 질환도 패혈증과 유사한 임상 증상 및 징후를 나타낼 수 있다. 따라서 종래 방법으로 염증질환 또는 패혈증을 진단하는 데는 시간이나 정확도에서 어려움이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 염증질환 및 패혈증을 간편하고 빠르고 정확하게 조기에 진단할 수 있는 시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 즉, 본 발명은 패혈증 및 염증질환의 조기진단과 예후추적을 위한 바이오 마커로써 APE1/Ref-1의 타당성을 입증하고자 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 정상 대조군의 혈액에서는 검출되지 않으나 패혈증 동물모델에서는 특이적으로 검출되는 APE1/Ref-1 단백질을 제시함으로써 바이오마커로써의 타당성을 뒷받침하고자 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 패혈증 및 염증질환의 바이오마커로써 APE1/Ref-1이 정상보다 작은 분자량의 분절된 형태로 검출됨을 입증하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 잠재 환자로부터 채취한 혈액중의 APE1/Ref-1 단백질을 정성/정량분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 염증질환 및 패혈증 진단방법에 관한 것이다.

- [0012] 보다 구체적으로, 본 발명은 (A) 상기 혈액을 전기영동하는 단계; (B) 전기영동 결과 겔에 1차 APE1/Ref-1 항체를 반응시킨 후 세척하는 단계; (C) 표지체가 접합된 2차 APE1/Ref-1항체를 반응시킨 후 세척하는 단계; (D) 발색제를 가하여 발색반응을 유도한 후 발색정도를 측정하는 단계;를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0013] 이때 상기 단계(A)에서 혈액에서 혈장만을 분리하여 전기영동하는 것이 바람직하며, 상기 단계(C)에서 전기영동 결과 겔로부터 전개된 단백질을 멤브레인으로 옮긴 상태에서 항체반응시키는 것이 바람직하다.
- [0014] 본 발명에서, 상기 2차 항체의 표지체는 HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate) 또는 RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 등이 될 수 있다.
- [0015] 본 발명은 또한, (A) 1차 APE1/Ref-1 항체; (B) 표지체가 접합된 2차 APE1/Ref-1항체; (C) 발색제; (D) 세척제;를 포함하는 염증질환 및 패혈증 진단방법 수행을 위한 키트에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0016] 이상과 같이 본 발명에 의하면 인체를 포함하는 동물의 혈액에서 APE1/Ref-1 단백질의 양 또는 그의 분자량을 정확하게 측정함으로써 감염 질환 패혈증, 심뇌혈관 질환, 및 종양 등의 진단과, 나아가 질환치료 후 예후평가를 간편하고 정확하게 할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 실험백서에 LPS를 투여 후 염증반응 유도를 확인하기 위하여 혈액내 NOx측정한 결과를 보여주는 도표이다.
- 도 2는 실험백서에 LPS를 농도별, 시간별로 처리한 후 혈장에서 검출된 APE1/Ref-1의 단백질 검출량 변화를 보여주는 전기영동 결과 사진이다.
- 도 3는 LPS를 처리한 실험백서의 혈장에서 검출된 APE1/Ref-1 단백질을 시간에 따라 정량화한 결과를 보여주는 도표이다.
- 도 4는 대조군으로 정상적인 APE1/Ref-1인 단백질로써 LPS를 처리한 실험백서의 간조직에서 APE1/Ref-1 단백질을 검출한 전기영동 결과 사진이다.
- 도 5는 LPS를 처리한 실험백서의 혈장에서 검출된 APE1/Ref-1 단백질이 정상 APE1/Ref-1에 비해 분절된 형태로 검출됨을 보여주는 전기영동 결과 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.
- [0019] 한편, 본 발명의 전체 기재로부터 (A) 1차 APE1/Ref-1 항체; (B) 표지체가 접합된 2차 APE1/Ref-1항체; (C) 발색제; (D) 세척제;를 포함하는 염증질환 및 패혈증 진단방법 수행을 위한 키트를 적절하게 제작할 수 있음은 당업자에게 있어 용이할 것이므로 이에 대한 구체적인 실시예를 생략하였다.
- [0020] 본 발명은 패혈증, 심혈관질환 및 관련 염증질환의 진단 및 예후 추적용 바이오마커인 APE1/Ref-1 단백질에 관한 것이다.
- [0021] 세균의 세포벽 내독소인 lipopolysaccharide(LPS)는 지질과 다당류로 구성 되어 있으며 동물에 있어서 여러 가

지의 염증성 반응을 일으킨다. 단독 투여로도 실험동물이나 인체에 중증 패혈증, 패혈증 쇼크를 유발 할 수 있으며 이로 인하여 생성된 NO는 패혈증에 의한 전신적 염증반응과 혈액학적 변화 등의 병태 생리에 중요한 역할을 하게 된다. LPS나 전염증성 사이토카인- α (TNF- α)를 쥐에 주사하면 숙주의 전신성 염증 반응을 야기시켜 인체에서와 동일하게 중증 패혈증, 패혈증 쇼크상태를 유도할 수 있다.

[0022] 보고에 의하면 중증 패혈증 동물모델에서, 내피세포(endothelial cells)가 전응고제(procoagulant)로 작용하고, 상피세포(epithelial cells)는 투과성 변화로 인하여 생리적 장벽으로의 기능을 상실하고, 세포자멸(apoptosis)을 초래하는 것으로 알려져 있다.

[0023] APE1/Ref-1(apurinic/apyrimidinic endonuclease1/redox factor-1) 단백질은 외부의 산화적 스트레스에 의해 손상된 DNA를 복구하는 기능과 AP-1, NF- κ B와 같은 전사인자의 산화-환원성 조절기능을 갖는 것으로 알려져 있다. 이는 여러 전사인자의 DNA 결합영역에서 산화형 시스테인(cysteine) 잔기를 환원시킴으로써 전사를 용이하게 해주는 역할을 수행하게 된다. APE1/Ref-1은 모든 세포의 핵내, 세포질 및 미토콘드리아에 존재하고 발현조절은 전사단계 및 전사 후 단계 수준에서 조절되며, 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)이 APE1/Ref-1의 발현을 증가시키는 주요원인 것으로 보고되고 있다.

[0024] 연구결과에 의하면 세포내 APE1/Ref-1 단백질은 일련의 염증신호에 의하여 핵과 사이토솔간의 위치이동을 야기하는 것으로 알려져 있다. 즉 NO는 APE1/Ref-1의 93, 310번 Cystein잔기를 S-nitrosation함으로써 APE1/Ref-1 단백질이 핵에서 세포질로 이동되도록 하는 반면, 산화적인 스트레스 자극 및 O_2^- , H_2O_2 와 같은 ROS는 APE1/Ref-1을 세포질에서 핵으로 이동되도록 한다.

[0025] 내독소에 의한 세포의 활성화 및 염증반응 과정에서 대식세포가 APE1/Ref-1을 세포외로 유리시키는 현상이 본 발명자들에 의해 확인되었다. 따라서, LPS로 유도한 동물의 염증질환 조건에서 세포외, 즉 혈액에서 APE1/Ref-1을 정확하게 측정하는 능력은 감염 질환 패혈증, 심뇌혈관 질환, 및 종양 등을 진단하는 중요한 단백질 바이오마커로써 사용되며 더 나아가 질환치료 후 예후평가에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

[0026] 즉, 본 발명자들은 염증질환 및 패혈증을 조기에 진단하고 그 예후를 추적할 수 있는 혈액 내 단백질 바이오마커에 대해 연구하던 중, 패혈증 동물모델의 혈액에서 정상동물의 혈액에 비해 APE1/Ref-1 단백질이 유의하게 고농도로 존재하며 또한 그 분자량이 정상 APE1/Ref-1 단백질보다 작다는 사실을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0027] 하기 실시예에서는 패혈증 동물모델로서 실험백서에 LPS를 농도별, 시간별로 처리한 후 혈장에서 검출된 APE1/Ref-1의 단백질 검출량 변화를 제시하고 검출된 APE1/Ref-1 단백질을 시간에 따라 정량한 결과를 제시하였다. 또한 LPS를 처리한 실험백서의 혈장에서 검출된 APE1/Ref-1 단백질이 정상 APE1/Ref-1에 비해 분절된 형태로 검출됨을 보여주는 결과를 제시하였다.

[0028] 본 발명의 관심의 대상인 APE1/Ref-1 단백질은 세포 내에서 핵과 세포질에 위치이동하면서 존재하다가 일련의 염증신호에 의하여 세포외로의 배출된다. 즉 NO가 APE1/Ref-1의 Cystein 잔기를 S-nitrosation함으로써 APE1/Ref-1 단백질이 핵에서 세포질로 이동되어 궁극적으로는 염증질환의 심화정도와 비례하여 혈액으로 방출되며, 패혈증 동물모델 혈액내 APE1/Ref-1 단백질이 정상 분자량보다 작다는 사실이 본 발명자들에 의해 확인되었다.

[0029] 본 발명은, 이러한 발견에 기초한 것으로서, 인체를 포함하는 동물의 혈액에서 APE1/Ref-1 단백질의 양 또는 그 분자량을 정확하게 측정함으로써 감염 질환 패혈증, 심뇌혈관 질환, 및 종양 등의 진단과, 나아가 질환치료 후 예후평가를 간편하고 정확하게 할 수 있는 방법 및 그 방법을 수행하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0030] 본 발명에서는, APE1/Ref-1에 특이적 항체를 이용한 항원-항체 결합법(면역학적 분석법)으로 혈액 시료에서 APE1/Ref-1 단백질의 농도를 측정함으로써 패혈증 및 염증질환을 조기에 간편하게 진단하고 질병의 예후를 조기에 예측할 수 있게 하였다. 즉, 특정 개체에서 채취한 혈장에서 APE1/Ref-1를 정성/정량 분석함으로써 특정 개체에 염증질환이 있거나 발생할 가능성이 높음을 진단하고, 나아가 염증질환의 진행정도도 파악할 수 있게 되는

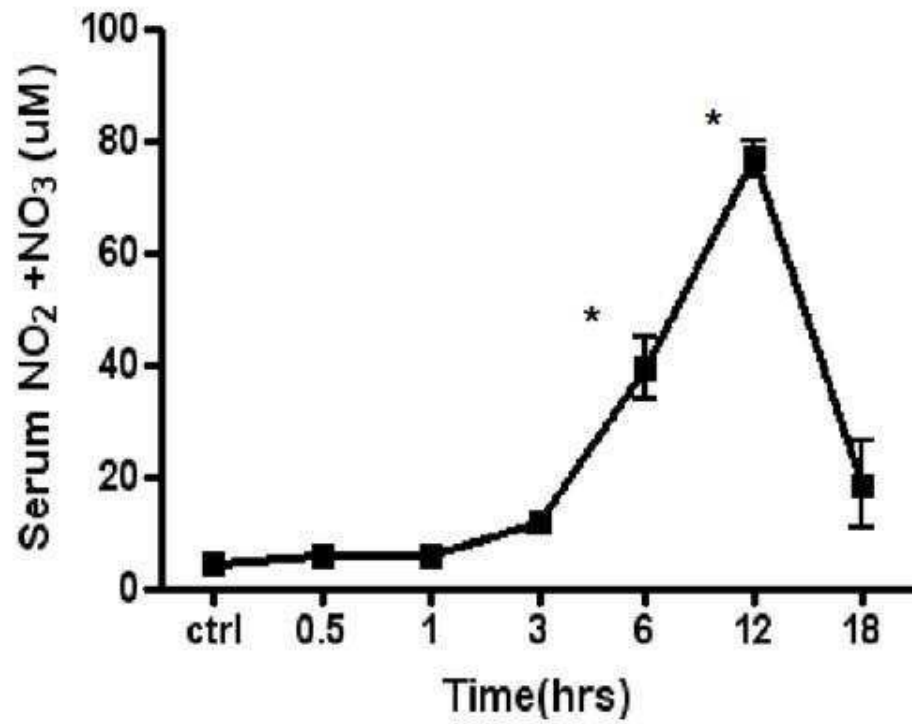
것이다.

- [0031] 본 발명에서 적용할 수 있는 면역이적 분석법은 구체적으로 다음과 같을 수 있다.
- [0032] 혈장 5 μ l를 12% SDS-PAGE를 사용하여 70V로 10시간 동안 전개 한 후 PVDF멤브레인 (polyvinylidene difluoride membrane)으로 이동시킨다. skim milk로 1시간 blocking하고 5% BSA에 1:2000비율로 희석하여 anti-APE1/Ref-1(Abcam, ab194)을 4℃에서 밤샘 반응시킨 다음 TBST완충액으로 10분씩 3번 세척한다. HRP가 붙어있는 2차 항체로 반응시킨 후 반복적인 세척과정을 거친 다음 ECL reagent로 반응시키고, 필름에 감광하여 반응에 대한 결과를 얻는다.
- [0033] 이러한 과정을 통하여 혈장 내에 APE1/Ref-1 단백질이 존재하는지, 존재한다면 어느 정도의 농도인지, 그 분자량은 어느 정도인지를 확인할 수 있다.
- [0034] 상기 면역이적 분석법을 위해서는 APE1/Ref-1에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척용액 등이 사용된다.
- [0035] 상기 2차 항체 접합체의 표지체는 발색반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등이 사용될 수 있다.
- [0036] 세척용액은 트리스 완충용액, NaCl 및 트윈 20을 포함하는 것이 바람직하며, 10 mM 트리스 완충용액, 0.15M NaCl, 및 0.1% 트윈 20으로 구성된 완충용액 (TBST)이 더욱 바람직하다. 항원-항체 결합반응 후 항원-항체 결합체에 2차 항체를 반응시킨 다음 세척용액으로 수회 세척한다.
- [0037] **실시예 : 패혈증 동물모델의 준비 및 APE1/Ref-1 단백질의 분석**
- [0038] 1. 동물모델의 패혈증 유도 및 혈액의 채취
- [0039] (1) 7-8 주령된 수컷 백서(흰쥐) 총 14마리를 사용하였다. LPS 주입하기 전에 12시간 이상 공복시킨 것을 제외하고는 먹이와 물을 자유급이하였다.
- [0040] 10mg/백서-kg 양의 LPS를 백서의 복강에 주사주입하여 패혈증을 유도하였다. 대조군에는 동량의 생리적 식염수를 같은 방법으로 주입하였다.
- [0041] (2) 소정의 시간경과 후 Ketamine 50mg/ml + Xylazine 7.5mg/ml를 복강주사하여 백서를 마취시킨 다음 복부를 절개하고 10ml 주사기를 이용하여 용혈이 일어나지 않도록 대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 헤파린이 들어있는 튜브에 옮겨 3000 rpm에서 10min 동안 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장을 각각의 e-Tube에 옮겨 -70℃에 냉동보관 하면서 실험에 사용하였다.
- [0042] 2. 동물모델의 염증반응 유도 확인: 혈액내 NO₂₊₃ 측정
- [0043] iNOS는 패혈증 개체의 혈관 내피세포에서 활성화되거나, 상피세포나 백혈구 등에서 LPS나 각종 cytokine 등에 의하여 발현이 유도되어 과량의 NO를 생성하며, NO는 패혈증에 의한 전신적 염증반응과 혈액학적 변화 등 병태생리에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 LPS의 복강내 투여로 인하여 전신성 염증반응이 유도되는지를 확인하기 혈액내 일산화질소 (nitric oxide, NO) 생성량의 측정이 필요하다. 본 실시예에서는 NO의 측정은 반감기가 매우 짧은 특성 때문에 안정한 대사물인 nitrite와 nitrate(NO₂₊₃)를 정량함으로써 NO의 농도를 간접적으로 측정하였다.

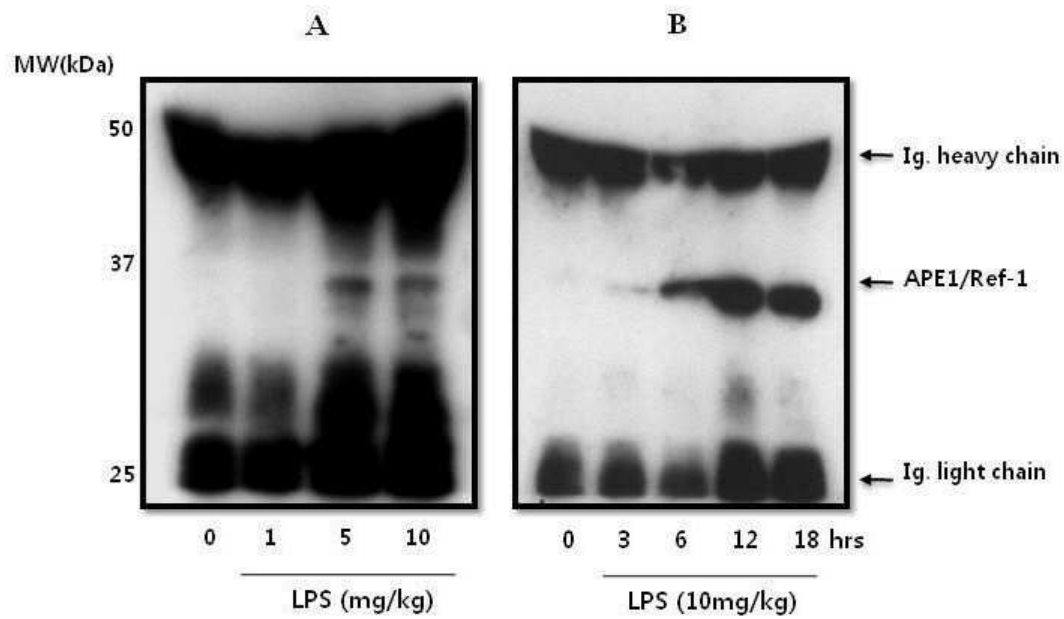
- [0044] NO_{2+3} 은 Griess reagent system (Promega, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다.
- [0045] 혈액내 NO_2+NO_3 측정을 위해 각 군에서 채취한 **혈장 중** $85\mu\text{l}$ 를 취하여 96 well plate 로 옮기고 Nitrate Reductase를 처리 후 sulfanilamide 용액 $50\mu\text{l}$ 를 첨가하고 차광하여 10분 동안 실온에서 반응시켰다. 이어서 N-1-napthylethylene diamine dihydrochloride (NED) 용액 $50\mu\text{l}$ 를 첨가하고 차광하여 10분 동안 실온에서 반응시켰다. 이후 30분 내에 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 표준검량곡선을 통해 NO_2+NO_3 생성량을 계산하였다.
- [0046] 도 1에 제시된 바와 같이, NO_2+NO_3 은 LPS투여 6시간 후 유의하게 증가되기 시작하여 12시간에 최대치를 보였으며, 이러한 NO_2+NO_3 의 증가는 18시간에 감소되는 경향을 보였으므로 전신성 염증반응이 야기된 패혈증모델이 성공적으로 유도되었음을 확인하였다.
- [0047] 3. 혈중 APE1/Ref-1의 검출
- [0048] 패혈증 동물모델의 혈장내에 APE1/Ref-1 단백질이 존재하는 지를 APE1/Ref-1항체를 이용한 면역이적분석법을 활용하여 확인하였다.
- [0049] LPS 투여 후 경과시간에 따라 각 군에서 채취한 혈장중 $5\mu\text{l}$ 를 12% SDS-PAGE를 사용하여 loading 한 후 상온에서 70V로 전기영동하였다. Gel을 유리판에서 떼어 낸 후 PVDF에 35V로 4℃에서 하룻밤동안 이동시켰다. 5% skim milk로 1시간 blocking하고 5% BSA(Bovine Serum Albumin, Sigmaaldrich)에 1:2000비율로 희석하여 anti-APE1/Ref-1을 4℃에서 밤새 반응 시킨 후 TBS-T로 10분씩 3번 세척하였다. 2차항체로 polyclonal anti-mouse를 5% skim milk에 1:5000으로 희석하여 1시간 반응시켰다. 그 후 TBS-T로 10분씩 3번 세척한 후 ECL reagent(Pierce)로 PICO분자: FEMTO분자 비율을 5:1로 하여 X-선 필름에 감광하였다. 또한 정확한 분자량 확인을 위해서 APE1/Ref-1이 나타내는 단백질의 전기영동거리를 표준단백질의 전기영동 거리와 비교하는 Labworks Image & Analysis software (UVP, Cambridge, UK) 프로그램을 이용하였다(이하 동일).
- [0050] 도 2에 제시된 바와 같이, 대조군의 혈장에서는 APE1/Ref-1 (37kDa)의 밴드가 검출되지 않았으나 LPS를 투여한 백서의 혈장에서는 APE1/Ref-1항체에 반응하는 밴드가 검출되었다. 혈장내로 유리되는 APE1/Ref-1 단백질의 양은 투여된 LPS의 농도와 투여 후 경과시간에 따라 달라지며(도 2) 투여 후 3시간부터 혈장 내에서 검출되기 시작하여 12시간 후에 최고치를 보이다가 18시간 후에는 감소하는 경향이 있음을 알 수 있다(도 3).
- [0051] 4. 유리된 APE1/Ref-1 분자량 분석
- [0052] 정상동물과 패혈증 동물모델은 마취하고 개복한 다음 간조직을 적출하였다. 조직내 APE1/Ref-1 단백질 분석을 위하여 1mg 정도의 간을 1ml의 lysis buffer가 있는 조건에서 균질기로 고르게 분쇄하고 원심분리한 후 상층액만을 취하였다. 단백질 정량을 통하여 동일한 단백질량을 12% SDS-PAGE gel에 전기영동 하였으며 정확한 분자량 확인을 위해서 Magic Mark(Invitrogen, Cat NO. LC5602)를 이용 하였다. 또한, APE1/Ref-1 단백질의 대조군으로는 Human acute monocyte leukemic cell (인간 급성 단핵 백혈구 세포)인 THP-1세포의 균질액을 사용하였다. APE1/Ref-1 단백질의 분자량을 면역이적분석법으로 분석하였으며 APE1/Ref-1 단백질의 전기영동거리와 표준단백질들의 전기영동 거리를 Labworks Image & Analysis software (UVP, Cambridge, UK) 프로그램으로 측정하여 비교분석하였다.
- [0053] 도 4에 도시된 바와 같이, LPS 1-10mg/kg 투여한 패혈증 동물모델의 간 조직에서 APE1/Ref-1은 37kDa로 정상적인 분자량임을 알 수 있다. 따라서 패혈증 동물모델에서 혈장으로 유리된 APE1/Ref-1 단백질은 LPS에 의하여 유도되는 전신염증반응에 의하여 세포 내에서 생성되는 변형체가 아님이 확인되었다.
- [0054] 한편, 도 5에 제시한 대로, 정상동물의 간 조직 균질액(도에서 E)과 패혈증 동물모델의 혈장(도에서 D)에서 검출되는 APE1/Ref-1 단백질의 분자량을 비교분석 한 결과, 정상 백서의 간 조직 균질액에서의 정상 APE1/Ref-1(도에서 L.H.로 표시됨) 분자량은 37kDa이었으나, 패혈증 동물모델의 혈장 APE1/Ref-1 단백질(도에서 APE1/Ref-1로 표시됨)의 분자량은 37kDa 보다 작게 검출되었다.

도면

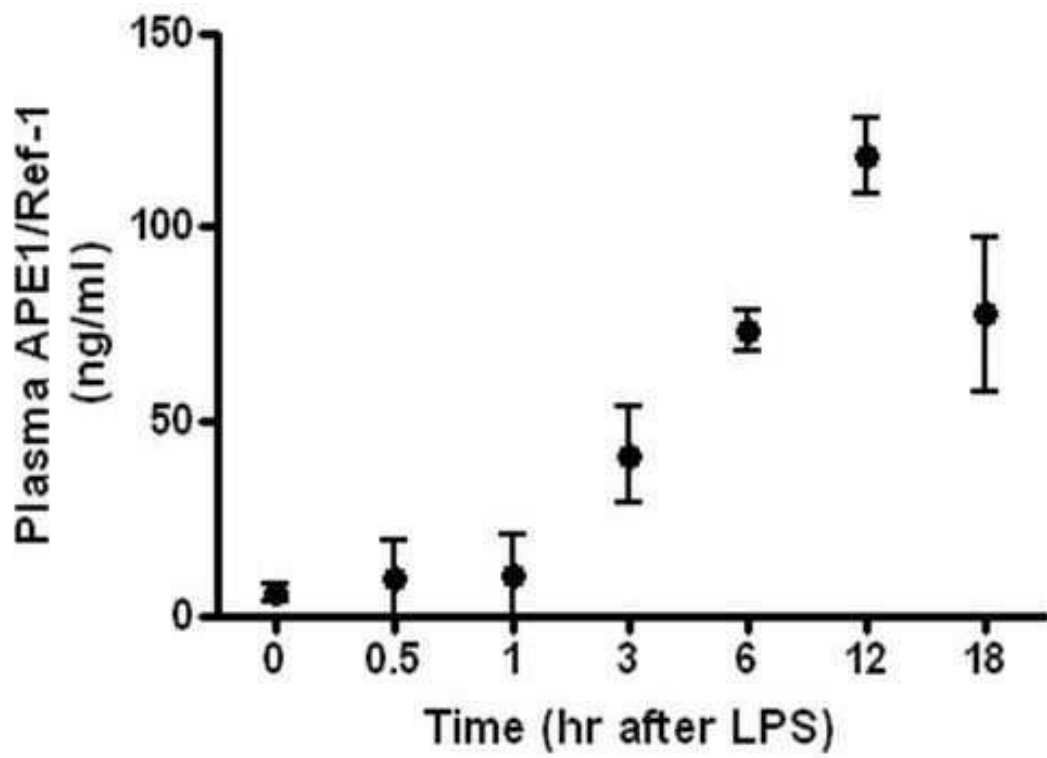
도면1



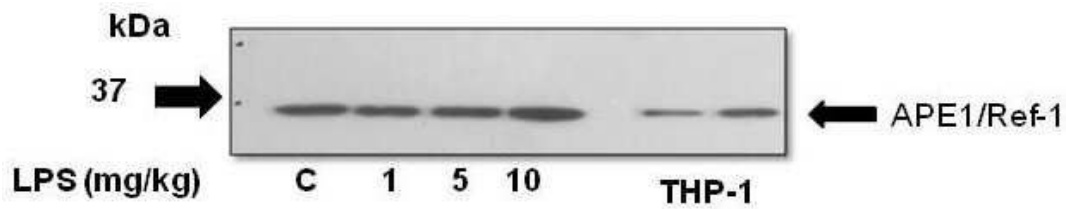
도면2



도면3



도면4



도면5

