(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0078200
(43) 공개일자 2022년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0167479
(22) 출원일자 2020년12월03일
심사청구일자 2020년12월03일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(주)메디레독스
대전광역시 유성구 대학로 99, 901호 비-4 (궁동, 충남대학교 산학연교육연구관)
(72) 발명자
전병화
대전광역시 서구 둔산남로 127, 204동 803호(둔산동, 목련아파트)
주희경
대전광역시 서구 만년로 25, 102동 701호(만년동, 강변아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

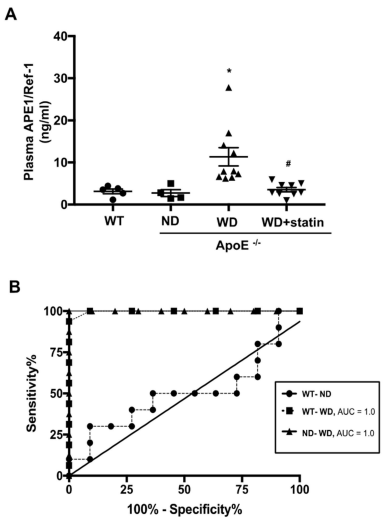
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **고지혈 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법**

(57) 요 약

본 발명은 고지혈증 상태인 (잠재)환자가 죽상경화증 증상을 가지는지 여부를 빠르고 경제적으로 판단하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 고지혈증 환자 혈액 중의 APE1/Ref-1 단백질의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 고지혈증 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
G01N 2800/323 (2013.01)
(72) 발명자
이유란
대전광역시 중구 보문로63번길 7, 502호(부사동)
이은옥
대전광역시 서구 유등로 503, 203호(용문동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315491
과제번호	2014R1A6A1029617
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학중점연구소지원사업
연구과제명	혈관염증제어 및 유효성평가기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

고지혈증 환자 혈액 중의 APE1/Ref-1 단백질의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 고지혈증 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

(A) 잠재 환자가 고지혈증 환자인지를 판별하는 1차 확인단계;

(B) 고지혈증 환자로 판별된 경우, 환자로부터 채취된 혈청 중의 APE1/Ref-1 단백질의 농도가 소정농도 이상인지를 판별하는 2차 확인단계;를

포함하는 것을 특징으로 하는 고지혈증 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법.

청구항 3

(A) APE1/Ref-1 항체가 코팅된 플레이트;

(B) 발색 표지체가 접합된 APE1/Ref-1 검출 항체; 및

(C) 발색제;를 포함하는 것을 특징으로 하는 청구항 1 또는 2 중 어느 한 항에 의한 고지혈증 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법 수행을 위한 키트.

청구항 4

(A) APE1/Ref-1 항체가 코팅된 플레이트;

(B) APE1/Ref-1 검출 항체;

(C) 발색 표지체가 접합된 2차 항체; 및

(D) 발색제;를 포함하는 것을 특징으로 하는 청구항 1 또는 2 중 어느 한 항에 의한 고지혈증 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법 수행을 위한 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고지혈증 상태인 (잠재)환자가 죽상경화증 증상을 가지는지 여부를 빠르고 경제적으로 판단하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 죽상경화증(atherosclerosis)은 오래된 수도관이 녹이 슬고 이물질이 침착하여 지름이 좁아지게 되는 것처럼, 주로 혈관의 가장 안쪽을 덮고 있는 내막(endothelium)에 콜레스테롤이 침착하고 내피세포의 증식이 일어난 결과 '죽종(atheroma)'이 형성되는 혈관질환을 말한다. 죽종 내부는 죽처럼 묽고 그 주변 부위는 단단한 섬유성 막인 '경화반'으로 둘러싸이게 되는데, 경화반이 불안정하게 되면 파열되어 혈관 내에 혈전(thrombus; 피떡)이 생긴다. 또한 죽종 안으로 출혈이 일어나는 경우 혈관 내부의 지름이 급격하게 좁아지거나 혈관이 아예 막히게 되고, 그 결과 말초로의 혈액순환에 장애가 생긴다. 국내 죽상경화증 환자는 2019년 기준 10만명으로 연 약 5%

씩 증가하고 있다.

[0003] 죽상동맥경화로 결국 혈관이 좁아지거나 막히게 되면 그 혈관이 담당하는 말초로의 혈액순환에 장애가 생기므로, 좁아진 혈관에 따라 증상이 다르게 나타나게 된다. 죽상동맥경화는 주로 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥(심장혈관), 뇌에 혈액을 공급하는 뇌동맥과 경동맥(목의 혈관), 신장의 신동맥 및 말초혈관을 침범하고, 이로 인해 협심증, 심근경색(일명 심장마비) 등의 허혈성 심장질환, 뇌경색과 뇌출혈 등의 뇌졸중(일명 중풍), 신장의 기능이 저하되는 신부전 및 허혈성 사지 질환이 나타나게 된다. 이렇게 죽상경화증은 발생하는 위치와 악화 정도에 따라 다양한 질병을 초래하기 때문에 그의 진단 및 상태의 확인과 관리가 매우 중요하다.

[0004] 고지혈증(hyperlipidemia)은 혈액 중의 지질의 일종인 콜레스테롤(cholesterol)이나 중성지방(triglyceride)의 양이 정상수치보다 높아진 상태로서 그 자체로는 증상이 없다. 그러나 콜레스테롤 등 지질이 혈관의 내피에 쌓여 동맥 등이 좁아지면 죽상경화증으로 발전하기 때문에 고지혈증은 죽상경화증의 가장 중요한 위험인자로 취급되고 있다. 국내 고지혈증 환자는 2019년 기준 220만명이 넘고 연 약 10% 증가 추세에 있다. 고지혈증 여부는 혈액검사로 간단하게 판정할 수 있다.

[0005] 고지혈증이 죽상경화증으로 발전할 가능성이 높고, 죽상경화증이 여러 가지 심각한 질병을 유발하므로 특히 고지혈증 환자는 죽상경화증이 발생했는지 여부를 지속적으로 관찰하고 관리할 필요가 있다.

[0006] 종래 죽상경화증 검사는 그 발생위치에 따라 허혈성 심장질환의 경우 심장혈관 CT(컴퓨터단층촬영술) 혹은 심장혈관조영술, 말초혈관질환은 CT혈관조영술이나 말초 혈관조영술, 경동맥 질환은 경동맥 초음파나 MRA(자기공명혈관조영술), 뇌졸중은 뇌 MRI(자기공명영상), 뇌 MRA 등으로 이루어진다. 그런데 검사방법에서 알 수 있듯이 종래 검사방법은 ㉮ 시간과 비용이 소요되며 ㉯ 환자에게 위험을 초래할 수 있고 무엇보다도 ㉰ 특정 부위를 검사한 결과로 다른 부위에 죽상경화증이 있는지 여부를 알 수 없다(예를 들면 심장 혈관조영술로 심장에 죽상경화증이 있는지 없는지를 안다고 해서 다른 부위에 죽상경화증이 있는지를 알 수 없음)는 한계가 있다.

[0007] 따라서 고지혈증을 가진 사람이 신체 어딘가에 죽상경화증이 있는지를 주기적으로 검사하는 것은 시간적, 경제적, 심리적, 신체적으로 큰 부담이 될 수밖에 없다.

[0008] 등록특허 10-1506314에는 동맥 경화의 병변을 특이적으로 검출하기 위하여 마커로서, 동맥경화 진단용 폴리펩티드, 동맥경화 진단용 유전자 검출용 프로브, 동맥 경화 마커 유전자 검출용 DNA 칩, 동맥경화 마커 폴리펩티드의 발현을 검출하는 동맥 경화의 검출방법 등이 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 등록특허 10-1506314

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 고지혈증이 확인된 사람의 혈액을 검사하는 간단한 방법으로 죽상경화증이 있는지, 있다면 그 진행 정도를 안전하면서도 신속하고 간단하게 진단할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 고지혈증 환자 혈액 중의 APE1/Ref-1 단백질의 농도를 측정하는 것을 특징으로 하는 고지혈증 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명에 의한 고지혈증 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법은, (A) 잠재 환자가 고지혈증 환자인지를 판별하는 1차 확인단계; (B) 고지혈증 환자로 판별된 경우, 환자로부터 채취된 혈청 중의 APE1/Ref-1 단백질의 농도가 소정농도 이상인지를 판별하는 2차 확인단계;를 포함할 수 있다. 이때 잠재 환자가 '고지혈증 환자'인지 여부는 예를 들면 혈액검사처럼 본 발명이 속하는 기술분야에 널리 알려진 방법에 의해 확인될 수 있음은 당연하다.

[0013] 또한 본 발명은, 항원항체 반응과 발색반응을 이용한 고지혈증 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법

수행용 키트에 관한 것이다.

[0014] 즉 본 발명은, (A) APE1/Ref-1 항체가 코팅된 플레이트; (B) 발색 표지체가 접합된 APE1/Ref-1 검출 항체; 및 (C) 발색제;를 포함하는 고지혈증 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법 수행을 위한 키트에 관한 것이다. 최종적으로 플레이트 세척을 위한 세척제가 추가될 수도 있을 것이다.

[0015] 한편, 전술한 바와 같은 키트에 사용되는 '발색 표지체가 접합된 APE1/Ref-1 검출 항체'는 기술적으로 제조가 불가능한 것은 아니지만 직접 제조한다면 비경제적일 수 있다. 따라서 키트의 사용시 한 단계 작업이 더 필요하게 되더라도 획득이 용이한 원료를 사용하는 것이 더 효율적일 수 있다. 이러한 취지에서 또 다른 형태로서 본 발명은, (A) APE1/Ref-1 항체가 코팅된 플레이트; (B) APE1/Ref-1 검출 항체; (C) 발색 표지체가 접합된 2차 항체; 및 (D) 발색제;를 포함하는 고지혈증 환자의 죽상경화증 진단을 위한 정보 제공방법 수행을 위한 키트에 관한 것이다.

[0016] 단백질 농도 측정을 위한 키트 자체는 종래 알려져 있으므로 키트에 대한 구체적인 구조와 사용방법에 대한 설명을 생략한다.

발명의 효과

[0017] 이상과 같은 본 발명에 의하면 고지혈증 징후를 보이는 (잠재)환자가 죽상경화증이 나타나는지, 그렇다면 어느 정도로 진행되었는지를 간단하면서 신속하게 측정할 수 있어 병증에 빠르고 효율적으로 대처할 수 있게 된다.

[0018] 복잡하고 비용과 시간이 소요되는 종래 전형적인 죽상경화증의 진단방법과 비교하여 본 발명에 의해 간단한 혈액검사를 통해 고지혈증 환자의 죽상경화증으로의 진행여부 또는 그 정도를 최종적으로 또는 사전적으로 간편하게 검사할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 실시예의 각 실험군에서 혈장 지질과 포도당 농도를 보여주는 도표.

도 2는 실시예의 각 실험군에서 혈액학적 지표의 변화를 보여주는 도표.

도 3a~3c는 실시예의 각 실험군에서 죽상 동맥경화성 플라크가 형성된 대동맥에서 APE1/Ref-1 발현증가를 확인하기 위한 Oil Red O 염색, 면역조직화학 분석, 면역블로팅 결과를 보여주는 사진과 도면.

도 4a~4c는 실시예 각 실험군의 대식세포, 내피세포, 평활근세포에서 APE1/Ref-1 발현이 공동 국소화됨을 보여주는 사진.

도 5는 실시예 각 실험군에서 혈장 APE1/Ref-1 수준을 보여주는 도표.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 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. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0021] **[실시예]**

[0022] **1. 실험 과정**

[0023] **(1) 실험 동물의 준비**

[0024] 죽상경화증 동물모델 수립을 위해 8주된 수컷 아포 단백질 E- 녹아웃 마우스 (ApoE-/-마우스, Jackson Laboratory, 미국 ME, Bar Harbor)와 연령 및 성별이 일치하는 대조군 마우스(C57BL/6J 마우스, 두열바이오텍, 한국)를 24℃에서 12/12 명암주기로 수용하면서 물과 차우(chow)를 자유롭게 투여하였다.

[0025] 다음 표와 같이 마우스를 4개의 군으로 구분하여 20주간 식이하였다.

	마우스	식단	개체수
WT	C57BL/6J	정상식단[1)]	8
ND	ApoE-/-	정상식단	10
WD		서양식단[2)]	10
WDS		서양식단+atorvastatin[3)]	10

[0026]

[0027] 1) 정상식단 : cat.# 2918, Envigo, Madison, MI, USA

[0028] 2) 서양식단 : cat.# TD 88137, Envigo, Madison, MI, USA

[0029] 21% fat, 34% sucrose, 19.5% casein, and 0.2% cholesterol

[0030] 3) atorvastatin (Pfizer Ltd., New York, NY, USA), 20 mg/kg/day 경구투여

[0031] 동물실험 프로토콜은 충남대학교 동물실험윤리위원회의 승인(2019037-CNU-43, 2019)을 받았다.

[0032] **(2) 혈액 세포 및 화학 분석**

[0033] 식이 시작 후 20주에 마우스를 희생시켰다. 하룻밤 식이를 중단한 후 아침에 깊이 마취된 마우스의 심장에서 혈액 샘플을 수집하였다.

[0034] 전혈로부터 적혈구(RBC) 수, 헤모글로빈(Hb), 헤마토크릿(Hct), 혈소판(Plt) 수 및 백혈구(WBC) 수를 측정하였다. 백혈구(WBC) 중 호중구(neutrophils), 림프구(lymphocytes), 단핵구(monocytes), 호산구(eosinophils) 및 호염구(basophils) 수도 측정하였다.

[0035] 통상의 방법으로 분리된 혈장으로 혈액 화학(혈장 콜레스테롤, 중성 지방, 지단백질 및 포도당 수치 등) 분석을 수행하였다.

[0036] 혈장 중 APE1/Ref-1 농도는 APE1/Ref-1 샌드위치 효소 결합 면역 흡착 분석 키트(MediRedox Inc., 대전, 대한민국)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 측정되었다.

[0037] **(3) 면역 분석**

[0038] ① 면역블로팅

[0039] 마우스의 대동맥 조직을 RIPA 완충액(Cell Signaling, USA)에서 잘게 자르고 초음파처리기(Hielscher, Teltow, Germany)로 균질화하였다. 이어서 동맥 조직을 12000 rpm에서 15분 동안 원심분리하고 상등액(대동맥 용해물)을 수집하였다.

[0040] 상등액을 10% SDS-PAGE 후 다음 표의 항체를 이용하여 면역블로팅을 수행하였다.

	cat.#	출처
항-VCAM-1	1:1000, cat.# MAB6434	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
항-galectin-3	1:000, cat.# AF1197	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
항-APE1/Ref-1	1:1000, cat.# MR-MA14	MediRedox (Daejeon, Korea)
항-β-actin	1:5000, cat.# A5316	Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)

[0041]

[0042] ② 면역조직화학

[0043] 통상의 방법으로 마우스 대동맥 조직을 고정하고 3㎛ 두께로 절편화한 다음 위 표 1~3 항체(각각 1:200, 1:200, 1:300 비율)와 함께 4℃에서 하룻밤 방치하였다. 이후 양고추냉이과산화효소-접합 항-토끼 및 항-마우스 2차 항체(각각 1:1000 비율)를 적용하였다. 비 면역 토끼 IgG 및 마우스 IgG를 음성 대조군으로 하여 면역염색의 특이성을 평가하였다. 절편을 헤마톡실린으로 역염색하고 탈수한 다음 현미경(Motic Microscopy, Richmond, BC, Canada)을 사용하여 조직학적 염색을 디지털화 하고 TS view 7 소프트웨어 (Microscope.com, Roanoke, VA, USA)를 사용하여 분석하였다.

[0044] ③ 면역형광

[0045] 통상의 방법으로 마우스 대동맥 조직을 고정하고 10㎛ 두께로 절편화한 다음 3% 과산화수소에 담가 탈수하였다. 대동맥 절편은 다음 표의 항체와 함께 4℃에서 하룻밤 방치하였다.

	cat.#	출처
항-CD31	1:40, cat.# ab28364	Abcam (Cambridge, MA, USA)
항-SM22α	1:400, cat.# ab14106	Abcam (Cambridge, MA, USA)
항-galectin-3	1:200, cat.# AF1197	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
항-APE1/Ref-1	1:300, cat.# MR-MA14	MediRedox (Daejeon, Korea)

[0046]

[0047] 이어서 형광표지인자가 부착되어 있는 Alexa Fluor® 488-conjugated anti-rabbit IgG, Alexa Fluor® 647-conjugated anti-mouse IgG, 또는 Alexa Fluor® 647-conjugated anti-IgG 항체 중 하나를 실온에서 60분간 방치하였다. 절편을 4′,6-diamidino-2-phenylindole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA)로 핵을 염색하고 고정한 다음 Leica 공초점 현미경 (Leica-Microsystems, Germany)을 사용하여 디지털 현미경 검사를 하였다.

[0048] **(4) 오일 레드 O 염색**

[0049] 다음으로, 마우스 대동맥 조직을 종래 알려진 방법(Zhou, Q.; Liao, J.K. Statins and cardiovascular diseases: From cholesterol lowering to pleiotropy. Curr. Pharm. Des. 2009, 15, 467-478.)에 따라 Oil red O로 염색하여 죽상경화성 병변을 정량화하였다.

[0050] 죽상경화성 병변을 포함하는 영역의 정량화를 위해 염색된 대동맥의 이미지를 캡처하였다. 전체 Oil Red O 염색된 대동맥의 디지털 이미지는 종래 알려진 방법(Mohanta, S.; Yin, C.; Weber, C.; Hu, D.; Habenicht, A.J. Aorta Atherosclerosis Lesion Analysis in Hyperlipidemic Mice. Bio Protoc. 2016, 6, e1833.)에 따라 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 평가하였다.

[0051] **(5) 통계 분석**

[0052] 각 수치들은 평균±평균의 표준오차로 표현되었다. 데이터는 일원 분산 분석 및 사후 Bonferroni 보정을 사용한 다중 비교 분석을 사용하여 분석되었다. $p<0.05$는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 버전 8 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA)을 사용하여 수행되었다.

[0053] **2. 결과 및 분석**

[0054] **(1) 혈장 지질 및 혈당**

[0055] 각 실험군에서 혈장 지질과 포도당 프로파일을 평가하여 아래 표와 도 1에 그래프로 나타내었다.

Parameters (mg/dL)	WT	ND	WD	WDS
총 콜레스테롤	107.7±6.4	335.1±39.6	1134.0±75.6*	968.8±48.3*
LDL	10.3±1.8	202.0±15.7	722.6±53.4*	591.2±39.4*
HDL	102.0±5.7	43.3±8.4	101.6±6.4*	101.4±9.2*
트리글리세리드	56.6±5.1*	117.1±11.7	134.2±10.4*	130.0±11.3*
포도당	134.2±5.3	81.4±11.1	105.2±10.4	100.4±9.0

[0056]

[0057] * P <0.05

[0058] WT에 비해 다른 군들의 총 혈장 콜레스테롤, LDL 및 트리글리세리드의 농도가 유의미하게 증가하였다.

[0059] **(2) 혈액학적 지표**

[0060] 전체 혈구 수와 백혈구/림프구 비율(NLR)을 사용하여 변화된 혈액학적 지표 를 조사하였다(아래 표, 도 2 참조).

Parameters	WT	ND	WD	WDS
Red blood cells ($\times10^6$cells/μL)	9.6±0.1	8.8±0.2	9.1±0.3	8.5±0.2
Hemoglobin (g/dL)	13.4±0.2	12.2±0.3	12.4±0.4	11.9±0.2
Hematocrit (%)	50.8±0.8	45.2±0.4	45.6±1.7	42.3±0.9
MCV (fL)	52.8±1.0	51.3±0.9	50.4±1.0	49.7±0.6
MCH (pg)	14.0±0.1	13.8±0.1	13.7±0.1	14.0±0.1
MCHC (g/dL)	26.5±0.5	27.0±0.3	27.4±0.6	28.1±0.3
Platelets ($\times10^3$cells/μL)	954.1±51.1	943.0±130.2	782.0±82.3	841.3±81.5
White blood cells ($\times10^3$cells/μL)	2.0±0.3	1.9±0.3	2.4±0.4	1.61±0.2
Neutrophil (%)	50.8±5.6	33.8±4.0	59.5±4.3*	39.1±3.6#
Lymphocyte (%)	46.0±5.8	64.4±4.1	33.9±3.8*	56.3±3.9#
Monocyte (%)	1.0±.0.3	0.9±0.2	4.3±0.8*	2.7±0.7
Eosinophil (%)	2.1±1.1	0.3±0.2	1.6±0.4	1.1±0.2
Basophil (%)	0.1±0.1	0.7±0.3	0.8±0.2	0.8±0.2
NLR	1.1±0.2	0.5±0.1	2.3±0.6*	0.89±0.5#

[0061]

[0062] RBC 수치, 헤모글로빈 및 헤마토크리트 수치, 혈소판 수치는 실험군에서 변하지 않았으나 WBC 종류 수는 상당히 변하였다. WD의 호중구 비율은 크게 증가 (33.8% for ND vs. 59.5% for WD, $p < 0.05$)한 반면, 림프구 비율은 감소(64.4% for ND vs. 33.9% for WD, $p < 0.05$)하였다.

[0063] 흥미롭게도, WD와 WDS를 비교하면, atorvastatin 처리에 의해 WBC 종류의 변화가 억제되었는데, 이는 atorvastatin이 항염증 효과를 발휘함을 시사한다.

[0064] NLR은 염증의 지표이며 죽상경화증과 관련이 있는데, 서양식 식이를 한 ApoE-/-마우스(WD)에서 NLR이 증가되었으며, atorvastatin 처리(WDS)에 의해 그 증가가 억제되었다.

[0065] 이러한 결과는 죽상경화증 마우스(ApoE-/-마우스)를 서양식 식단으로 식이하면 마우스에 전신 염증과 고 콜레스테롤 혈증을 유발한다는 것을 보여준다.

[0066] **(3) 죽상경화증 마우스의 대동맥에서 APE1/Ref-1 발현 증가**

[0067] APE1/Ref-1 발현이 죽상 동맥경화증에서 변화되었는지 여부를 조사하기 위해 먼저 죽상 동맥경화성 플라크의 형성을 평가하였다.

[0068] 대동맥을 절제하고 대동맥의 안면(en face) 영역을 위 1(4)에 제시된 방법에 따라 염색하고 디지털 이미지를 얻고 분석하였다.

[0069] 도 3a는 대동맥에서 죽상 경화성 플라크의 오일 레드 O 염색 및 정량화 결과로서, 위쪽은 각 실험군 마우스에서 얻은 전체 대동맥의 대표적인 이미지이고, 아래쪽은 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석된 마우스의 전체 대동맥에서 Oil Red O 양성 영역의 상대적 백분율을 나타낸다. 각 막대는 평균 ± SEM (n = 3), * $p < 0.05$, vs. ND, # $p < 0.05$, vs. WD을 보여준다(이하 동일).

[0070] 도 3b는 실험군 마우스의 흉부 대동맥에서 APE1/Ref-1, VCAM-1 및 갈렉틴-3 발현에 대한 면역 조직화학 분석 결과이다. 위 사진은 대동맥 조직을 3,3'-diaminobenzidine 시약으로 발색하고 헤마톡실린으로 카운터 염색한 현미경 사진(배율 40배, 눈금 막대 50㎛)이고, 아래쪽은 대조군 WT와 비교하여 양성 면역 표지 수준의 변화배수 그래프이다.

[0071] 도 3c는 각 실험군에서 얻은 대동맥 조직 용해물을 사용하여 APE1/Ref-1, VCAM-1 및 갈렉틴-3 발현에 대한 면역 블로팅 결과이다. 상대 밴드 강도는 β-액틴의 강도로 정량화되었다.

[0072] 도 3a에서 볼 수 있듯이, 야생형 대조군(WT)과 정상식이 ApoE-/-마우스 (ND)와 비교하여, 서양식식이군(WD)에서 전체 대동맥과 대동맥궁(aortic arches)에서 플라크 영역이 크게 증가하였다. 그러나 atorvastatin 투여군(WDS)은 WD에 비해 플라그 면적이 현저히 감소하였다.

[0073] 다음으로, 혈관 염증 마커인 VCAM-1과 대식세포 마커인 갈렉틴-3을 사용한 면역 표지법으로 서양식 식단에 의해 대동맥 조직의 염증이 유도되었는지 조사하였다. 그 결과 WT 및 ND 그룹의 대동맥에서 VCAM-1 및 갈렉틴-3의 발현 수준이 낮았으나, 서양식식이를 먹인 WD의 대동맥에서 VCAM-1 및 갈렉틴-3 발현은 현저하게 증가하였다(도 3b). WD의 대동맥에서 갈렉틴-3은 특히 플라크의 지방 줄무늬 또는 거품 세포 및 죽상 동맥 경화성 미세 동맥류 부위에서 증가하였다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 서양식식이군(WD)의 대동맥 조직에서, APE1/Ref-1 발현은 염증지표 발현과 함께 전체 대동맥 벽에서 현저하게 증가하였다.

[0074] 이어서, 대동맥 조직에서 APE1/Ref-1 발현이 변했는지 여부를 정량적으로 분석하기 위해 western blotting을 수행하였다(도 3c 참조). 도면에 나타난 바와 같이, 대동맥 APE1/Ref-1 발현은 WT 또는 ND 그룹에 비해 서양식식이를 섭취한 WD에서 현저하게 증가하였다.

[0075] 또한, VCAM-1 및 갈렉틴-3의 발현은 정상식이군(ND)에 비해 WD의 대동맥에서 유의하게 증가하였다. atorvastatin 처리군 WDS와 비교해 보면, WD 마우스에서 APE1/Ref-1, VCAM-1 및 갈렉틴-3의 상향 조절된 발현은 atorvastatin 처리에 의해 강력하게 억제됨을 알 수 있다.

[0076] 이상의 결과는 죽상 경화증 마우스의 대동맥 조직에서 염증지표 발현과 함께 APE1/Ref-1 발현이 증가했음을 보여주는 것이다.

[0077] **(4) 죽상 경화성 플라크의 대식세포 및 내피 세포에서 APE1/Ref-1의 발현 증가**

[0078] 죽상 경화성 플라크는 내피 세포, 평활근 세포, 대식세포 및 거품 세포를 포함하는 이질적인 세포 집단으로 구성된다. 이에 서양식 식단을 먹인 ApoE-/-마우스인 WD의 대동맥에서 APE1/Ref-1의 발현이 증가되는 플라크 내 세포를 조사하였다.

[0079] 죽상 경화성 플라크에서 대식세포, 내피 세포 및 평활근 세포를 식별하기 위해 마우스 대동맥의 조직 절편에서 세포 특정 마커를 사용하여 특정 형광 이미지 결과를 도 4a~4c에 첨부하였다. 각 도면에서 아래쪽 이미지 (magnification 400×)는 위 이미지 (magnification 40×, scale bar 50㎛)의 흰색 사각형 부분을 확대한 것이다. 대동맥 조직은 각각 Alexa Fluor® 647-접합 항-갈렉틴-3 항체 (적색), Alexa Fluor® 647-접합 항-CD31 항체 (적색) 또는 Alexa Fluor® 647-접합 항 -SM22α 항체 (적색), 및 Alexa Fluor® 488-접합 항-APE1/Ref-1 (녹색)으로 면역 표지되었고, 세포핵(파란색)은 DAPI로 염색되었다.

[0080] 도 4a는 ND와 WD의 흉부 대동맥에서 APE1/Ref-1 및 갈렉틴-3에 대한 면역 형광 라벨링 이미지이다. 갈렉틴-3에 대한 적색 형광 신호를 사용하여 대식세포를 검출하였다. 이미지에서 흰색 화살표는 대식세포(주황색-노란색 신호)에서 갈렉틴-3과 APE1/Ref-1이 함께 존재(공동 국소화, co-localization)하는 것을 나타낸다.

[0081] 도면에서 볼 수 있듯이, 대식세포 마커 갈렉틴-3 (적색)의 발현은 ND의 대동맥에서 검출되지 않았으나 WD에서는 발현이 증가하였다. APE1/Ref-1 (녹색)은 WD 마우스에서 높게 발현되었다. APE1/Ref-1에 대한 신호는 갈렉틴-3

(빨간색)에 대한 신호와 병합되어 대식세포에서 APE1/Ref-1의 공동 국소화를 나타낸다.

[0082] 도 4b는, ND와 WD의 흉부 대동맥에서 APE1/Ref-1 및 CD31에 대한 면역 형광 라벨링 이미지이다. 도면에 나타나듯이, APE1/Ref-1 (녹색)에 대한 신호는 주로 WD 마우스의 대동맥에서 내피 세포에 대한 특정 마커인 CD31 (빨간색)에 대한 신호와 병합되었다. 이것은 APE1/Ref-1 발현이 내피 층에서 증가되었음을 시사한다.

[0083] 도 4c는, ND와 WD의 흉부 대동맥에서 APE1/Ref-1 및 SM22α의 면역 형광 라벨링 이미지이다. 도면에 나타나듯이, 평활근세포의 특정 마커인 SM22α (빨간색)에 대한 신호는 ND와 WD 모두에서 APE1/Ref-1 (녹색)에 대한 신호와 병합되지 않았다. 이러한 결과는 서양식식이를 먹인 ApoE-/-마우스 WD의 죽상 동맥경화성 플라크의 대식세포 및 내피세포에서 APE1/Ref-1 발현이 증가되었음을 시사한다.

[0084] **(5) WD의 혈장 APE1/Ref-1 수준 현저히 상승**

[0085] WD의 죽상 동맥경화성 플라크에서 APE1/Ref-1의 발현이 증가한다는 것을 확인한 후, 죽상 경화성 염증에서 혈장 APE1/Ref-1 수준이 상승했는지 샌드위치 ELISA 분석으로 조사하였다(도 5 참조).

[0086] WT 및 ND의 혈장 APE1/Ref-1은 각각 3.12 ± 0.57 ng / ml 및 2.74 ± 0.82 ng / ml로 실험군 사이에 큰 차이가 없었다. 그러나 WD의 혈장 APE1/Ref-1 수준은 ND 그룹에 비해 유의하게 증가(11.36 ± 2.17 ng/mL for WD vs. 2.74 ± 0.82 ng/mL as for ND)하였다. WD에서의 APE1/Ref-1의 증가는 atorvastatin 처리에 의해 억제(11.36 ± 2.17 ng/mL for WD vs. 3.54 ± 0.52 ng/mL for WDS)되었다(도 5에서 A 참조). 이는 APE1/Ref-1의 혈장 수치가 염증을 동반한 고 콜레스테롤 혈증 상태에서 증가했음을 시사한다.

[0087] ROC(receiver operating characteristic)을 이용한 분석은 죽상 동맥경화증에 대한 바이오 마커로서 혈장 APE1/Ref-1의 유용성을 평가하고 최적의 컷오프 값을 결정하였다. ROC 곡선을 기반으로, WT와 비교하여 WD에서 죽상 동맥경화증 진단을 위한 혈장 APE1/Ref-1 수준의 컷오프 값은 4.90 ng/ml 였는데(도 5에서 B 참조), 이때 ROC 곡선 아래의 면적은 1.0, 민감도는 100%, 특이도는 91%였다. 유사하게, ND와 비교하여 WD에서 죽상 경화증 진단을 위한 혈장 APE1/Ref-1 수준의 컷오프 값은 5.64 ng/ml로 설정되었으며 ROC 곡선 아래 면적은 1.0, 감도는 100%, 특이도는 90%였다.

[0088] **(6) 혈장 APE1/Ref-1 수준과 혈액학적 지표의 상관관계**

[0089] 어떤 혈액학적 지표가 혈장 APE1/Ref-1 수준과 상관관계가 있는지 분석하였다. 상관관계 분석은 WT와 ND 또는 WD의 세 군에서 수행되었다(아래 표 참조)

혈액학적 지표	WT, ND 및 WD 사이			WD 및 WDS 사이		
	R	95% CI[a]	P 값	R	95% CI[a]	P 값
총 콜레스테롤	0.609	0.213 to 0.833	0.006	0.366	-0.106 to 0.703	n.s
LDL	0.616	0.224 to 0.836	0.005	0.277	-0.203 to 0.649	n.s
트리글리세리드	0.288	-0.192 to 0.656	n.s	-0.055	-0.497 to 0.409	n.s
단핵구	0.382	-0.088 to 0.712	n.s	0.059	-0.406 to 0.500	n.s
호중구	0.313	-0.165 to 0.671	n.s	0.611	0.217 to 0.834	0.005
림프구	-0.347	-0.692 to 0.127	n.s	-0.616	-0.836 to -0.224	0.005
NLR	0.633	0.251 to 0.845	0.004	0.786	0.515 to 0.914	<0.001

[0090]

[0091] 표의 왼쪽 패널에 나타난 바와 같이, 혈장 APE1/Ref-1 수치는 총 콜레스테롤 수치 (r = 0.61), LDL (r = 0.62), 호중구/림프구 비율 (NLR, r = 0.63)과 높은 상관관계를 보인다. 이것은 높은 콜레스테롤, LDL 및 NLR이 증가된 APE1/Ref-1 수치와 상관관계가 있는 중요한 요인임을 시사한다.

[0092] atorvastatin 처리 동안 혈장 APE1/Ref-1 수준과 혈액학적 지표 사이의 상관관계를 평가하기 위해, WD와 아토르

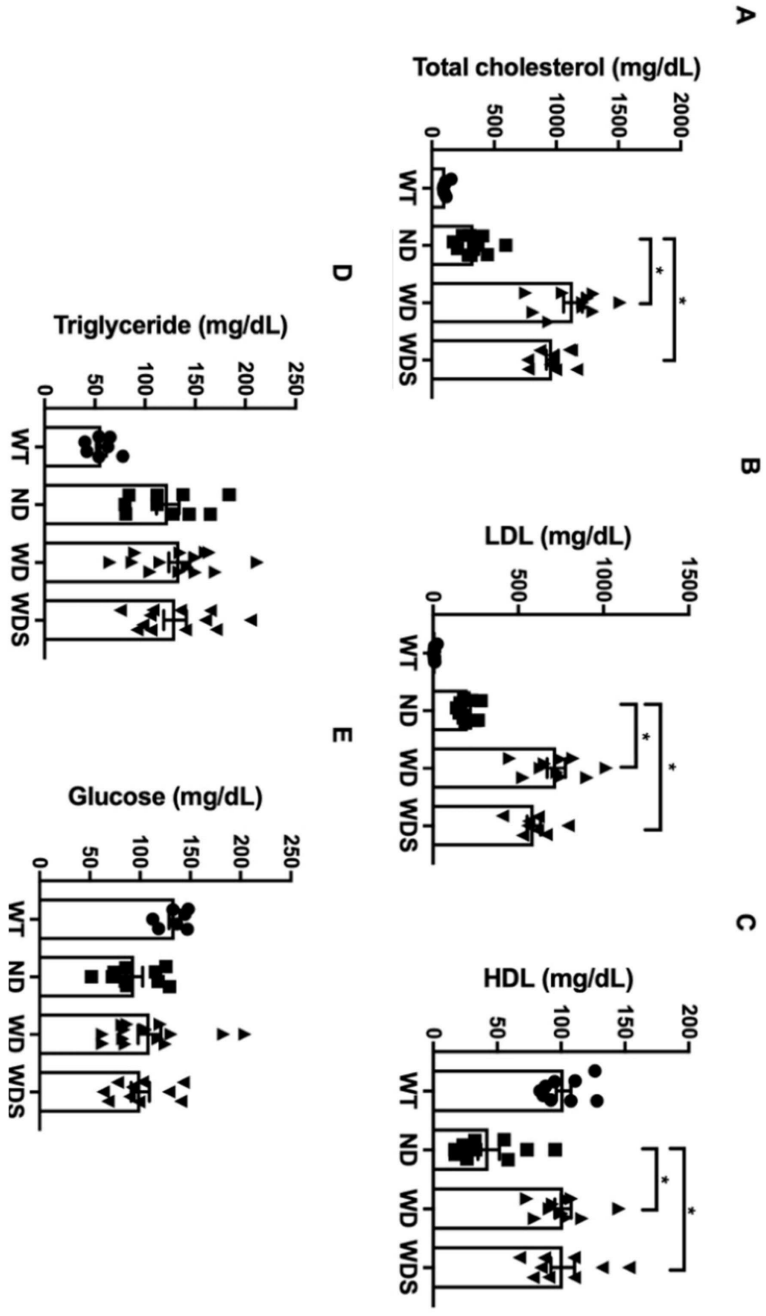
바스타틴-처리된 WDS간의 상관분석을 하였다. 표의 오른쪽 패널에 나타난 바와 같이, 혈장 APE1/Ref-1 수치는 호중구 수 (r = 0.61), 림프구 수 (r = -0.62) 및 NLR (r = 0.79)과 유의한 상관관계가 있었으나, 총 콜레스테롤 (r = 0.37)과 같은 지질 프로필과는 상관관계가 없었다. 이는 APE1/Ref-1의 혈장 수준이 주로 전신 염증의 지표로 사용되는 호중구/림프구 비율과 관련이 있음을 나타낸다.

[0093] 이상과 같은 실시예에서 알 수 있듯이, 고지혈증 마우스에서 죽상 동맥경화성 플라크가 생기고, 플라크의 대식세포 및 내피 세포에서 APE1/Ref-1 발현이 증가하여 혈중으로 분비된다. 즉, 염증을 동반한 고 콜레스테롤 혈증 상태에서 APE1/Ref-1의 혈장 수치가 증가하는 것이다.

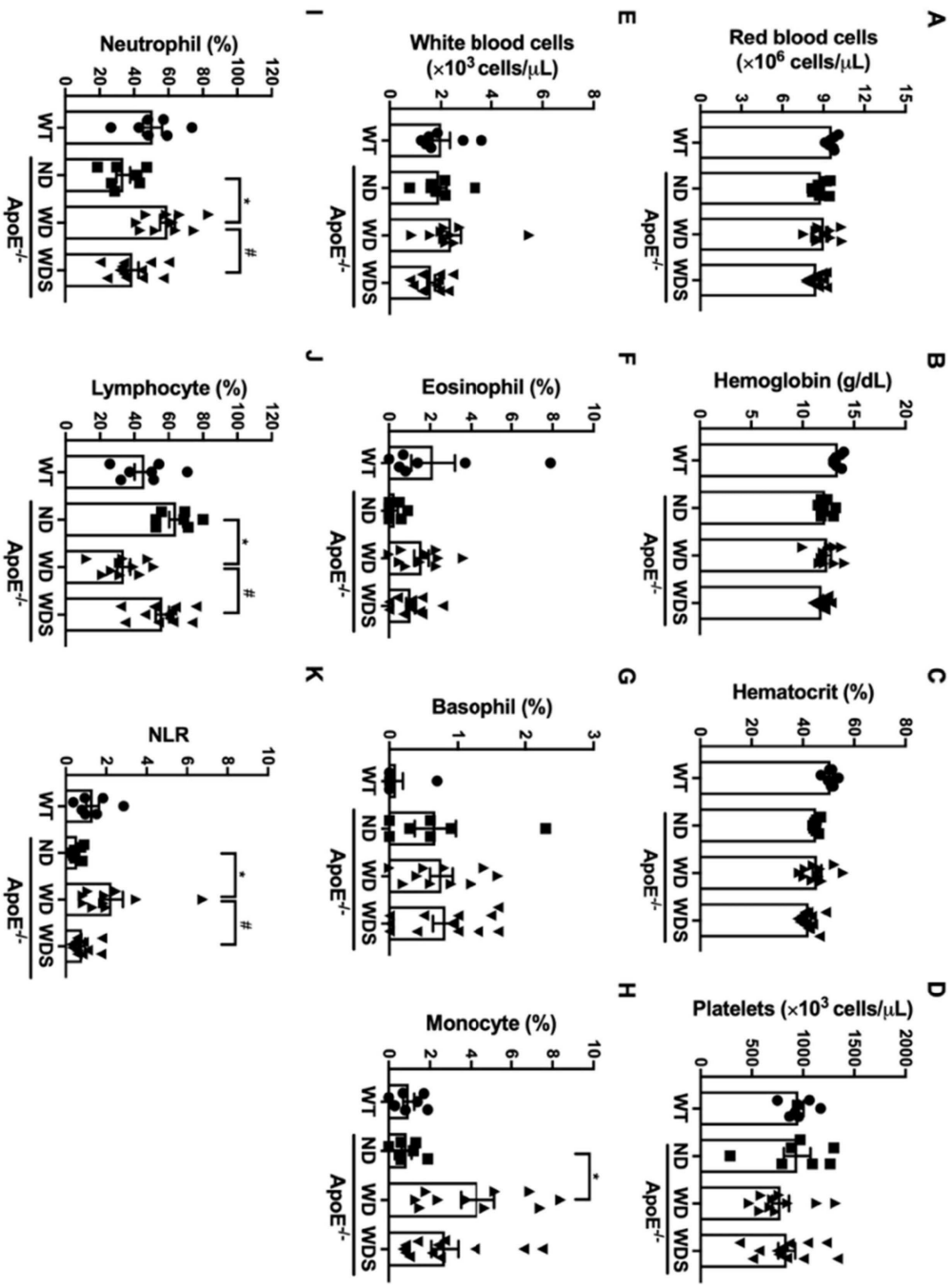
[0094] 이러한 결과는, 고지혈증 혈액의 APE1/Ref-1 수치를 분석함으로써 죽상경화증이 있는지, 그 정도는 어떤지를 판단할 수 있음을 시사한다.

도면

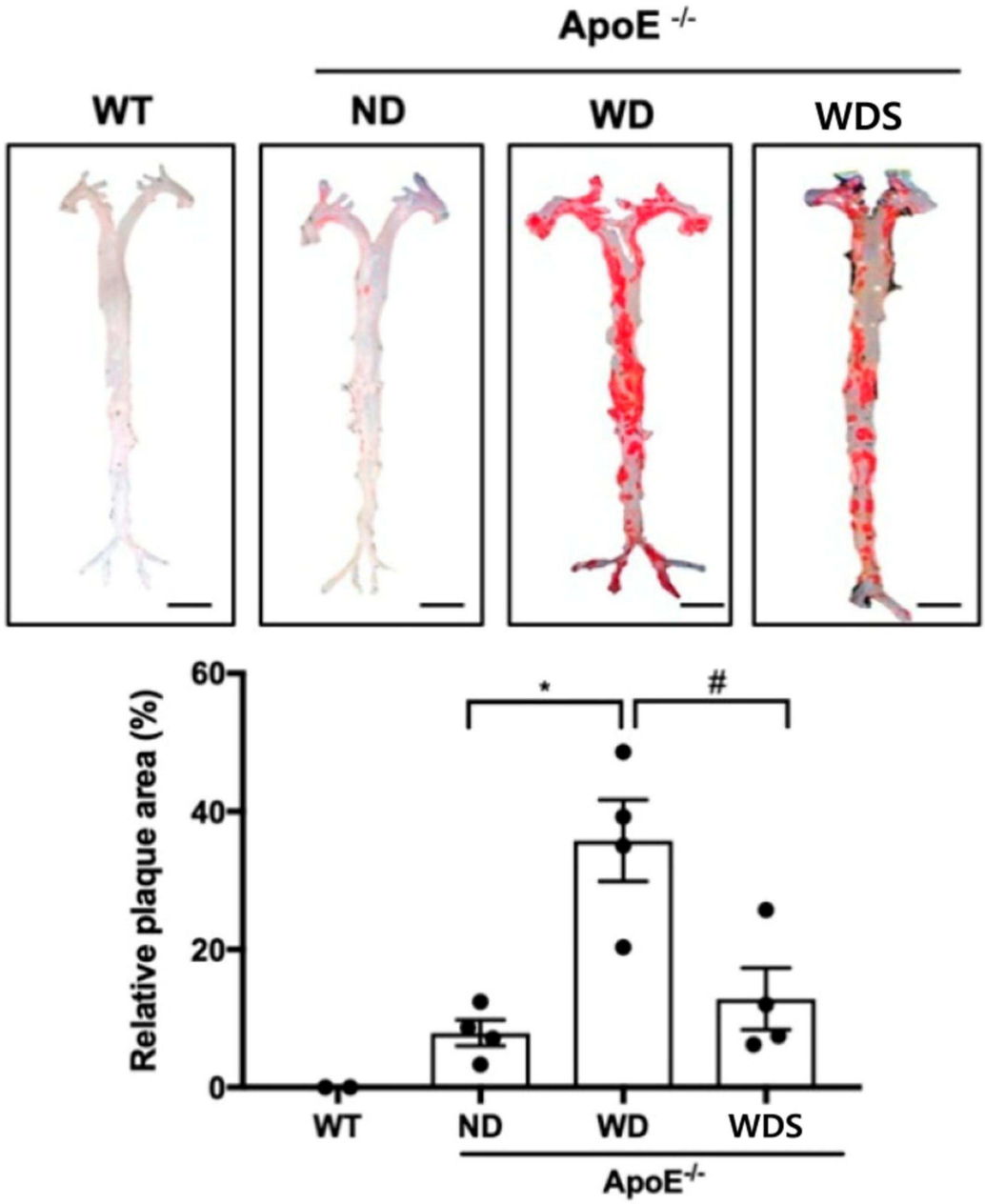
도면1



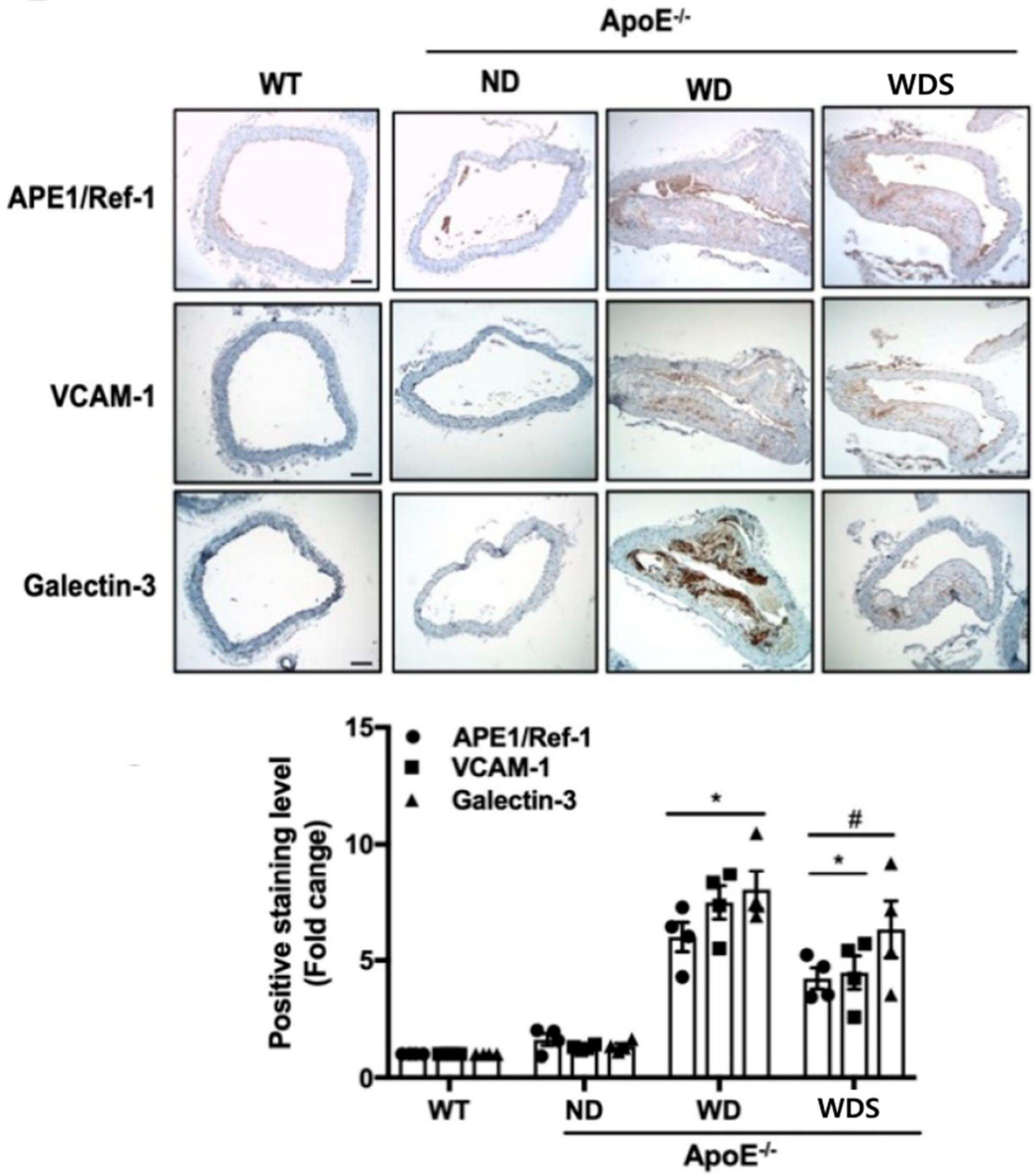
도면2


A
Red blood cells (×10^6 cells/μL)
B
Hemoglobin (g/dL)
C
Hematocrit (%)
D
Platelets (×10^3 cells/μL)
E
White blood cells (×10^3 cells/μL)
F
Eosinophil (%)
G
Basophil (%)
H
Monocyte (%)
I
Neutrophil (%)
J
Lymphocyte (%)
K
NLR
WT
ND
WD
WDS
ApoE-/-

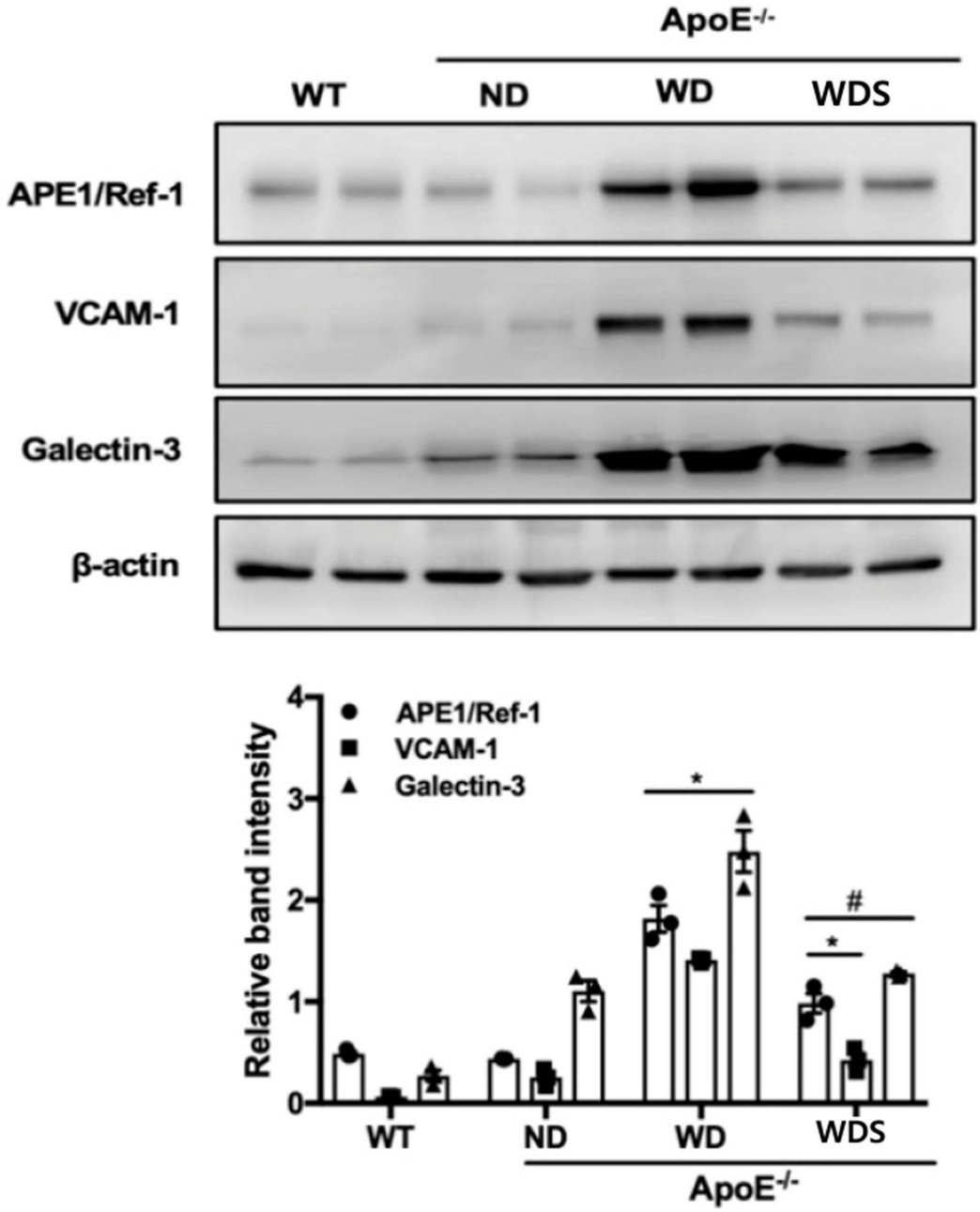
도면3a


ApoE -/-
WT
ND
WD
WDS
Relative plaque area (%)
60
40
20
0
*
#
WT
ND
WD
WDS
ApoE-/-

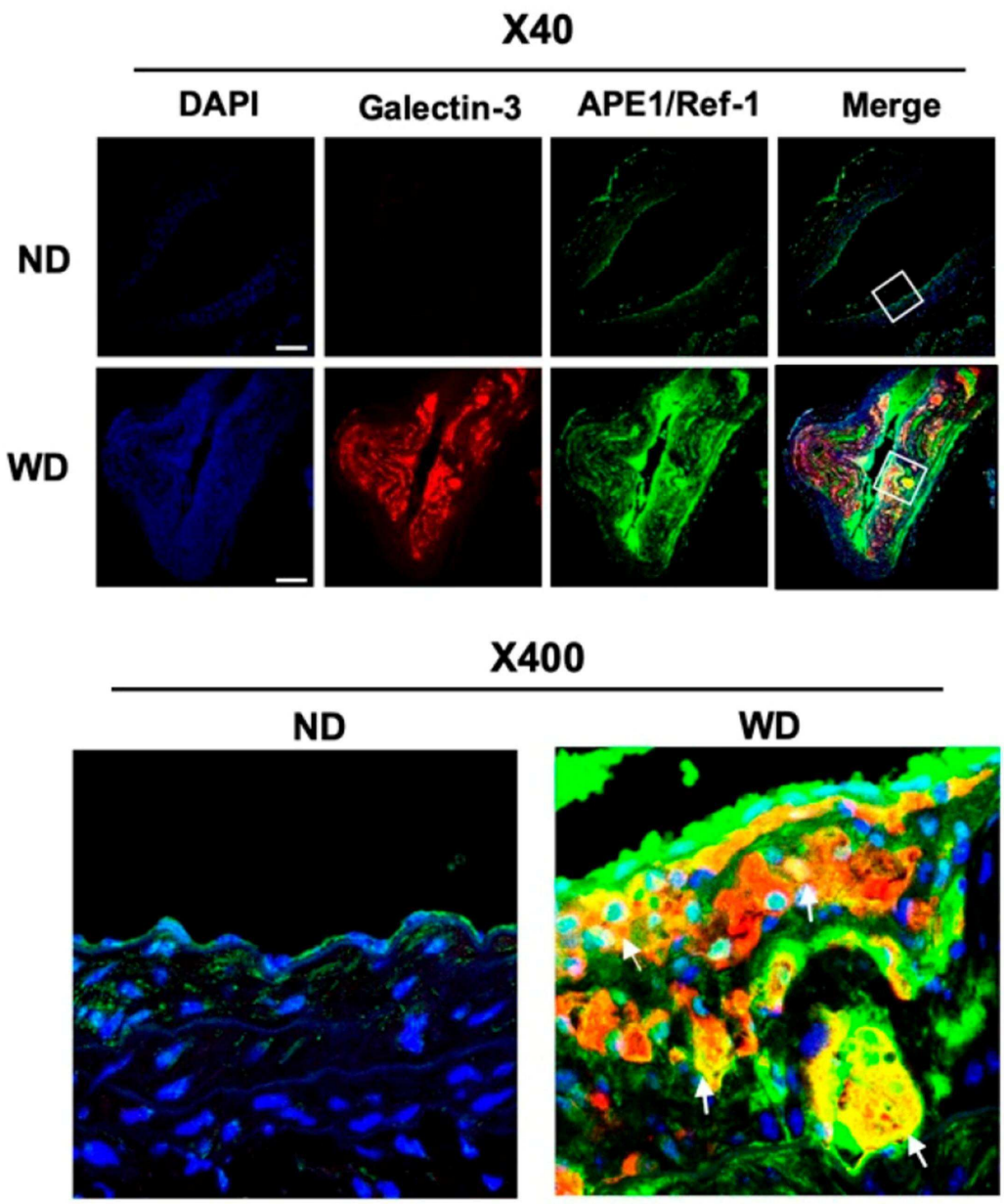
도면3b


ApoE-/-
WT
ND
WD
WDS
APE1/Ref-1
VCAM-1
Galectin-3
Positive staining level (Fold cange)
15
10
5
0
APE1/Ref-1
VCAM-1
Galectin-3
*
#
*
WT
ND
WD
WDS
ApoE-/-

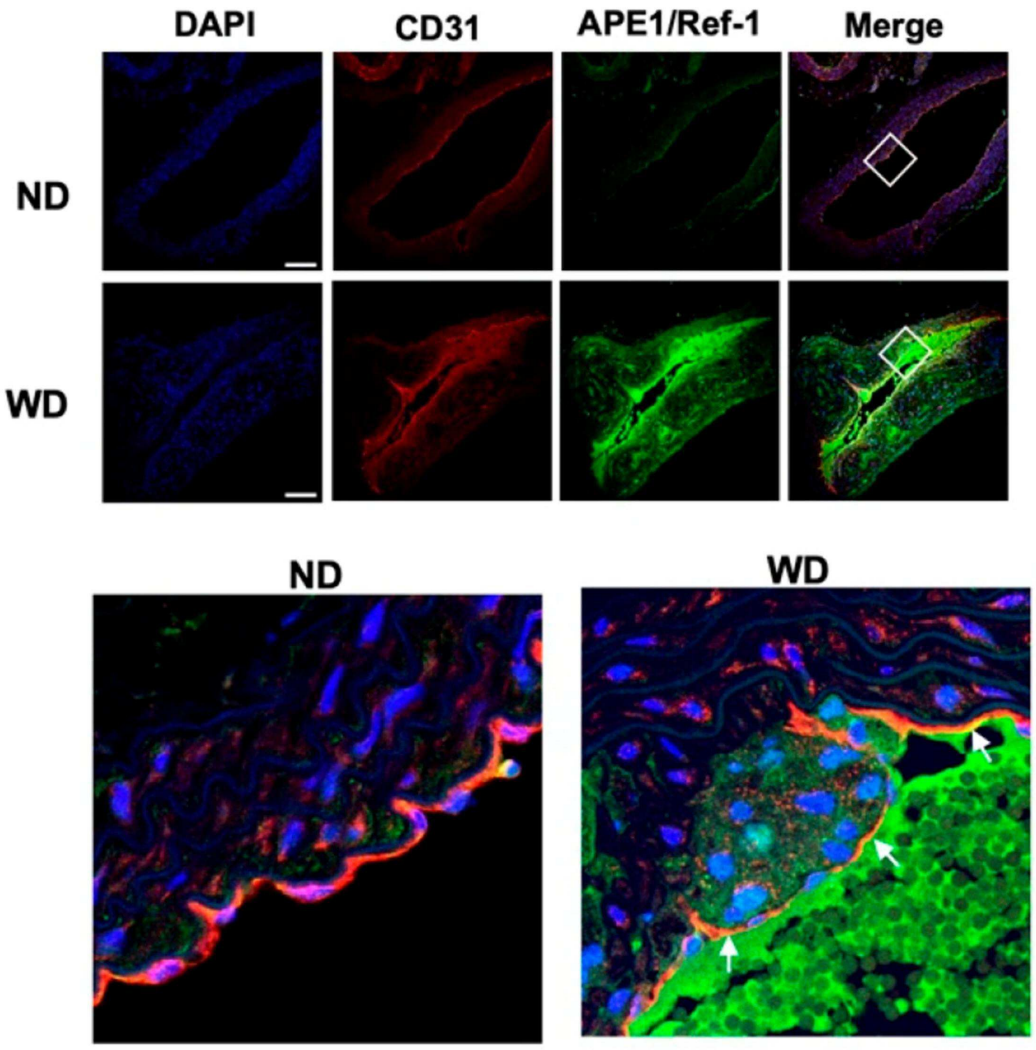
도면3c


ApoE-/-
WT
ND
WD
WDS
APE1/Ref-1
VCAM-1
Galectin-3
β-actin
Relative band intensity
APE1/Ref-1
VCAM-1
Galectin-3
*
#
*
WT
ND
WD
WDS
ApoE-/-

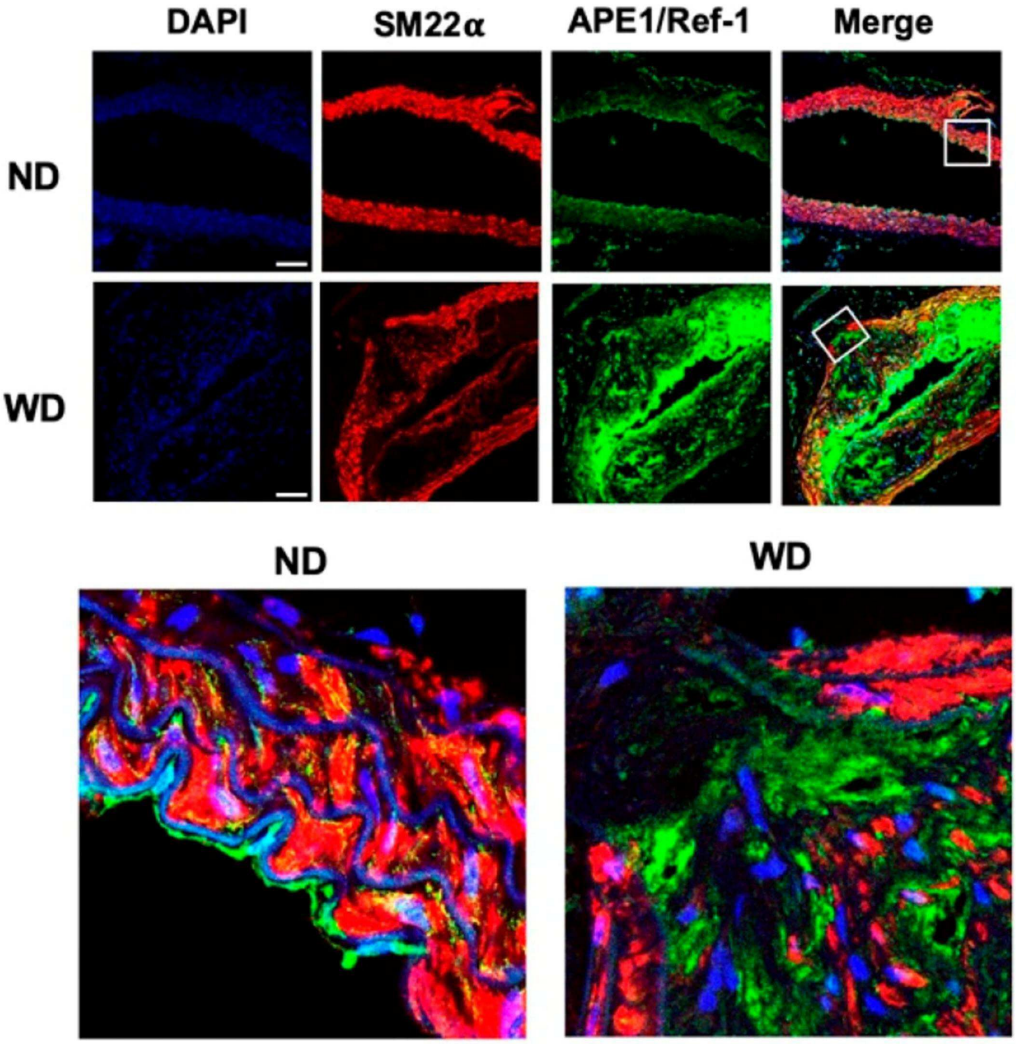
도면4a



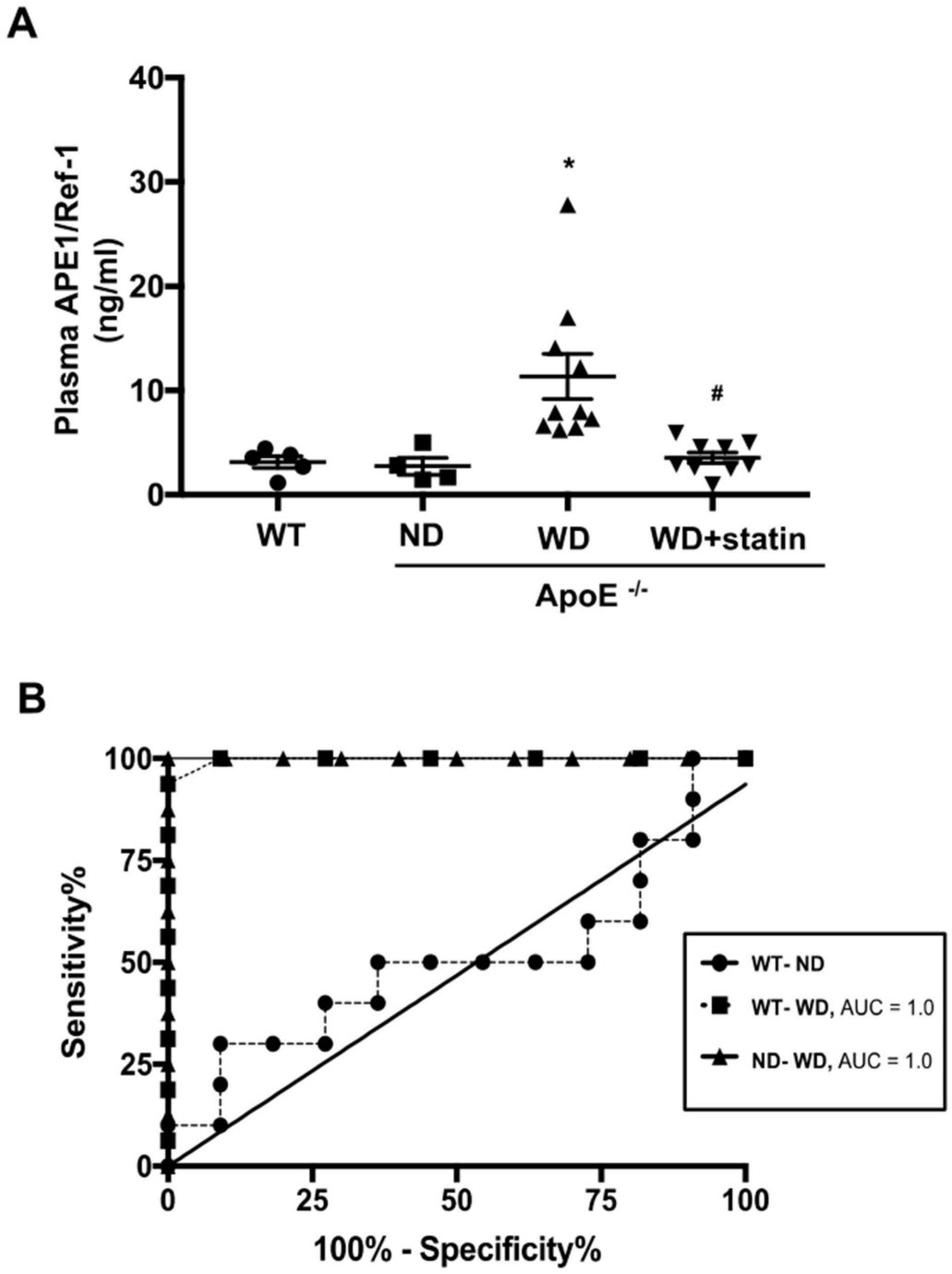
도면4b



도면4c



도면5


A
Plasma APE1/Ref-1 (ng/ml)
40
30
20
10
0
*
#
WT
ND
WD
WD+statin
ApoE -/-
B
Sensitivity%
100
75
50
25
0
0
25
50
75
100
100% - Specificity%
WT- ND
WT- WD, AUC = 1.0
ND- WD, AUC = 1.0