(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0036998
(43) 공개일자 2019년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/72 (2006.01) *G01N 24/08* (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/72 (2013.01)
G01N 24/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0126558
(22) 출원일자 2017년09월28일
심사청구일자 2017년09월28일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
권오란
서울특별시 용산구 서빙고로 69(용산동5가, 파크타워아파트)
임예니
경상남도 창원시 성산구 동산로 115, 118동 1906호(상남동, 대동아파트)
(74) 대리인
유미특허법인

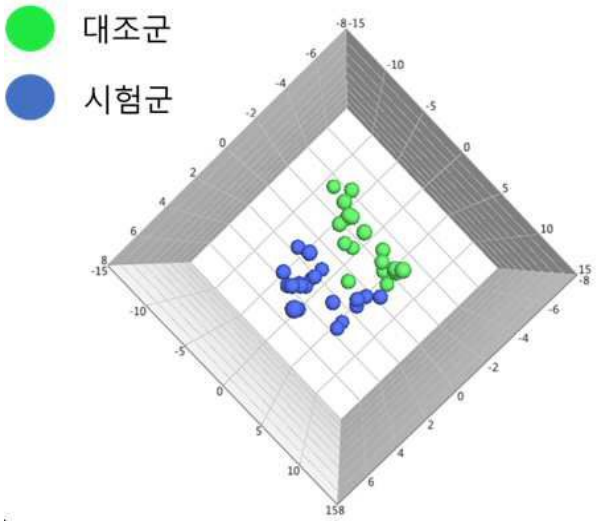
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **혈장 대사체를 이용한 혈관질환 진단용 바이오 마커**

(57) 요 약

본 발명은 대상의 혈장에 포함된 혈관질환의 진단 마커의 농도를 측정하는 혈관질환의 진단용 키트, 및 대상으로부터 채취한 혈액에서 상기 혈관질환의 진단 마커의 농도를 측정하는 방법을 포함하는 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 30/88 (2013.01)
G01N 2030/8813 (2013.01)
G01N 2800/32 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012M3A9C4048761
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 인체시험기반MC/MT효능검증기술개발
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2022.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

대상 (Subject)의 혈장에 포함된 프롤린 (proline), 피로포스페이트 (pyrophosphate), 올레아나이트릴 (oleanitrile), 스테아르산 (stearic acid), 트립토판 (tryptophan), 올레아마이드 (oleamide), 콜레스테롤 (cholesterol), 글리신 (glycine), 아스파르트산 (aspartic acid), 5-옥소프롤린 (5-oxoproline), 글루코스 (glucose), 9,12-옥타데카다이엔산 (9,12-octadecadienoic acid), 및 아라키돈산 (arachidonic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체의 농도를 측정하는 정량장치를 포함하는 혈관질환의 진단용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 정량장치는 핵자기 공명 분광 분석기 (^{1}H-NMR) 또는 크로마토그래피/질량분석기인 것을 특징으로 하는, 진단용 키트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 프롤린 (proline), 피로포스페이트 (pyrophosphate), 올레아나이트릴 (oleanitrile), 스테아르산 (stearic acid), 트립토판 (tryptophan), 올레아마이드 (oleamide), 및 콜레스테롤 (cholesterol)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상은 혈관질환자에서의 농도가 정상인 개체에 비하여 감소된 상태인 경우에 상기 대상을 혈관질환으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 진단용 키트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 글리신 (glycine), 아스파르트산 (aspartic acid), 5-옥소프롤린 (5-oxoproline), 글루코스 (glucose), 9,12-옥타데카다이엔산 (9,12-octadecadienoic acid), 및 아라키돈산 (arachidonic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상은 혈관질환자에서의 농도가 정상인 개체에 비하여 증가된 상태인 경우에 상기 대상을 혈관질환으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 진단용 키트.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 혈관질환은 심근경색증, 심부전, 동맥경화증, 부정맥, 죽상경화증, 고혈압, 동맥류, 색전증, 뇌졸중, 뇌경색, 혈전증, 또는 협심증인, 진단용 키트.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 대상은 인간을 포함하는 포유류 동물인, 진단용 키트.

청구항 7

대상 (Subject)으로부터 채취한 혈액에서 프롤린 (proline), 피로포스페이트 (pyrophosphate), 올레아나이트릴 (oleanitrile), 스테아르산 (stearic acid), 트리토판 (tryptophan), 올레아마이드 (oleamide), 콜레스테롤 (cholesterol), 글리신 (glycine), 아스파르트산 (aspartic acid), 5-옥소프롤린 (5-oxoproline), 글루코스 (glucose), 9,12-옥타데카다이엔산 (9,12-octadecadienoic acid), 및 아라키돈산 (arachidonic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체의 농도를 정량장치로 측정하는 단계; 및

상기 단계에서 측정한 혈액내 대사체의 농도를 정상인 개체 혈액의 상기 대사체의 농도와 대비하는 단계를 포함하는 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 정량장치는 핵자기 공명 분광 분석기 (^{1}H-NMR) 또는 크로마토그래피/질량분석기인 것을 특징으로 하는, 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 프롤린 (proline), 피로포스페이트 (pyrophosphate), 올레아나이트릴 (oleanitrile), 스테아르산 (stearic acid), 트립토판 (tryptophan), 올레아마이드 (oleamide), 및 콜레스테롤 (cholesterol)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상은 혈관질환자에서의 농도가 정상인 개체에 비하여 감소된 상태인 경우에 상기 대상을 혈관질환으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 글리신 (glycine), 아스파르트산 (aspartic acid), 5-옥소프롤린 (5-oxoproline), 글루코스 (glucose), 9,12-옥타데카다이엔산 (9,12-octadecadienoic acid), 및 아라키돈산 (arachidonic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상은 혈관질환자에서의 농도가 정상인 개체에 비하여 증가된 상태인 경우에 상기 대상을 혈관질환으로 진단하는 것을 특징으로 하는, 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 혈관질환은 심근경색증, 심부전, 동맥경화증, 부정맥, 죽상경화증, 고혈압, 동맥류, 색전증, 뇌졸중, 뇌경색, 혈전증, 또는 협심증인, 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 대상은 인간을 포함하는 포유류 동물인, 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대상의 혈장에 포함된 혈관질환의 진단 마커, 상기 진단 마커의 농도를 측정하는 혈관질환의 진단용 키트, 및 대상으로부터 채취한 혈액에서 상기 혈관질환의 진단 마커의 농도를 측정하는 방법을 포함하는 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현대사회의 발달로 인해 현대인들은 고지방/고탄수화물과 같은 혈관질환을 유발하는 식이섭취 패턴을 가지게 됨으로써 이와 관련된 혈관질환 발생이 증가하고있다.

[0003] 특히, 심혈관 질환(cardiovascular disease, CVD)은 세계 최고 사망률을 기록하고 있는 질병으로 세계보건기구(WHO)의 보고에 의하면 2030년까지 2360만 명이 심혈관 질환으로 사망할 것으로 예상하고 있다. 그 중 심근경색증(myocardial infarction)은 성인 돌연사 원인 1위를 차지하는 치명적인 질환으로 계속 증가하는 추세에 있다.

[0004] 심혈관 질환은 관상동맥 혈류가 막혀서 심장 근육에 산소공급의 불균형이 일어나 비가역적인 심장 근육 세포 손상이 발생하는 것이 특징이다. 관상동맥질환이 진행되면 협심증의 증세를 보이게 되는데, 협심증은 안정형 협심증(stable angina pectoris)와 불안정형 협심증(unstable angina)으로 나눌 수 있는데, 병변이 안정적으로 형성되어 반복적이고 특징적인 흉통으로 예측 진단할 수 있는 안정형 협심증(stable angina pectoris)과는 다르게, 심근경색의 경우에는 취약성 경화반(vulnerable plaque)이 파열되어 갑작스럽게 관상동맥 혈전성 폐색의 증상으로 나타난다. 이러한 취약성 경화반의 진단은 종래 혈관 내심초음파방법(intravascular ultrasound, IVUS)을 이용하는 등의 침습적 방법으로만 이루어졌으며, 현재까지 발병 전에 미리 예측하고 진단할 수 있는 바이오 마커가 없어 조기 진단에 어려움을 겪고 있다.

[0005] 현재 심혈관 질환이나 심부전의 진단으로 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), LDH(lactate dehydrogenase), CK-MB(creatine kinase-MB), 트로포닌(troponin) I, 트로포닌 T, CRP(C-reative protein) 및 BNP(B-type natriuretic peptide)가 바이오 마커로 사용되고 있지만, 고지방/고탄수화물 음식물의 섭취에 의해서 발생하는 특이적인 혈관질환에 대한 바이오 마커 또는 혈액에서 발견되는 대사체를 진단 바이오 마커로 사용함에 대해서는 알려져 있지 않다.

[0006] 따라서, 혈액에서 발견되는 대사체를 이용하여 고지방/고탄수화물 음식물의 섭취에 의해서 발생하는 특이적인

혈관질환에 대한 바이오 마커를 발굴하는 기술이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명의 하나의 목적은 대상의 혈장에 포함된 대사체를 포함하는 혈관질환의 진단 마커의 농도를 측정하는 정량장치를 포함하는 혈관질환의 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 대상으로부터 채취한 혈액에서 상기 진단 마커의 농도를 측정하는 단계; 및 상기 단계에서 측정한 혈액내 대사체의 농도를 정상인 개체의 혈액의 상기 대사체의 농도와 대비하는 단계를 포함하는 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 혈장 대사체를 포함하는 혈관질환의 진단 마커의 농도를 측정하는 정량 장치를 포함하는 혈관질환의 진단용 키트, 및 대상으로부터 채취한 혈액에서 상기 진단 마커의 농도를 측정하는 단계; 및 상기 단계에서 측정한 혈액내 대사체의 농도를 정상인 개체 혈액의 상기 대사체의 농도와 대비하는 단계를 포함하는 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0010] 구체적으로, 본 발명자들은, 시험식품 또는 대조식품을 섭취하도록 한 후 인체적용시험을 수행하여, 혈장 대사체 43종에 대해 대사체 분석을 진행한 결과, 13종의 대사체에서 유의적 변화를 확인함으로써, 상기 선별한 13종의 대사체가 혈관질환을 진단하기 위한 바이오 마커로 사용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 명세서에서 용어 "혈장 대사체"는 혈액 기원의 액상 시료로부터 수득한 대사물질을 말하며 바람직하게는, 상기 혈액 기원은 전혈이고, 더욱 바람직하게는 혈장이다. 바람직하게는, 상기 혈장 대사체를 검출하기 위해 전혈을 전처리할 수 있다. 예를 들어, 여과, 증류, 추출, 분리, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 대사체는 대사 및 대사 과정에 의해 생산된 물질 또는 생물학적 효소 및 분자에 의한 화학적 대사작용으로 발생한 물질 등을 포함할 수 있다.

[0012] 본 명세서에서 용어 "대사체의 농도가 정상인 개체에 비하여 증가"는 혈관질환이 발생하지 않은 정상 성인의 상기 대사체의 농도에 비해서 대상 환자의 상기 대사체의 농도가 유의적으로 증가된 것을 의미하며, 구체적으로 유의확률 p 값이 0.05 미만인 것을 의미하고, 보다 더 구체적으로는 p 값이 0.01 미만인 것을 의미한다.

[0013] 본 명세서에서 용어 "대사체의 농도가 정상인 개체에 비하여 감소"는 혈관질환이 발생하지 않은 정상 성인의 상기 대사체의 농도에 비해서 대상 환자의 상기 대사체의 농도가 유의적으로 감소된 것을 의미하며, 구체적으로 유의확률 p 값이 0.05 미만인 것을 의미하고, 보다 더 구체적으로는 p 값이 0.01 미만인 것을 의미한다.

[0014] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것(예컨대, 혈관질환), 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함한다.

[0015] 본 명세서에서 "환자"라는 용어는 달리 언급하지 않는 한, 대상으로서의 인간의 의미로 함께 쓰일 수 있다.

[0016] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0017] 하나의 양태로서, 본 발명은 대상(Subject)의 혈장에 포함된 프롤린 (proline), 피로포스페이트(pyrophosphate), 올레아나이트릴(oleanitrile), 스테아르산(stearic acid), 트립토판(tryptophan), 올레아마이드(oleamide), 콜레스테롤 (cholesterol), 글리신(glycine), 아스파르트산(aspartic acid), 5-옥소프롤린(5-oxoproline), 글루코스(glucose), 9,12-옥타데카다이엔산(9,12-octadecadienoic acid), 및 아라키돈산(arachidonic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 대사체를 포함하는 혈관질환의 진단 마커의 농도를 측정하는 정량 장치를 포함하는 혈관 질환의 진단용 키트에 관한 것이다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에서, 성인 남녀 112명에 대하여 고지방/고탄수화물 음료를 섭취시킨 후, 대조식품 또는 시험식품(혈관질환의 치료효능이 알려진 공지의 버섯추출물)을 섭취시키고 대사체의 변화가 일어난 6시간 후, 혈액을 채취하고 상기 혈액에서 얻은 혈장 대사체를 분석하여 혈관질환의 바이오 마커로 사용가능한 13종의 혈장 대사체를 최종적으로 선별하였다.

[0019] 상기 실험에서 고지방/고탄수화물 음료를 섭취시킨 후 대조식품을 섭취시킨 집단을 대조군이라 하고, 시험식품을 섭취시킨 집단을 시험군이라 한다.

[0020] 상기 최종적으로 선별한 13종의 혈장 대사체는 대상(Subject)의 혈장에 포함된 프롤린(proline), 피로포스페이트(pyrophosphate), 올레아나이트릴 (oleanitrile), 스테아르산(stearic acid), 트립토판(tryptophan), 올레아마이드(oleamide), 콜레스테롤(cholesterol), 글리신(glycine), 아스파르트산(aspartic acid), 5-옥소프롤린(5-oxoproline), 글루코스(glucose), 9,12-옥타데카다이엔산(9,12-octadecadienoic acid), 및 아라키돈산(arachidonic acid)이다.

[0021] 상기 프롤린(proline), 피로포스페이트(pyrophosphate), 올레아나이트릴(oleanitrile), 스테아르산(stearic acid), 트립토판(tryptophan), 올레아마이드(oleamide), 및 콜레스테롤(cholesterol)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상은 혈관질환자에서의 농도가 정상인 개체에 비하여 감소된 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 글리신(glycine), 아스파르트산(aspartic acid), 5-옥소프롤린(5-oxoproline), 글루코스(glucose), 9,12-옥타데카다이엔산(9,12-octadecadienoic acid), 및 아라키돈산(arachidonic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상은 혈관질환자에서의 농도가 정상인 개체에 비하여 증가된 것을 특징으로 할 수 있다.

[0022] 상기 대상은 인간, 원숭이 등의 영장류, 래트, 마우스 등의 설치류 등을 포함하는 포유동물, 또는 인간을 제외한 포유 동물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 상기 혈관질환은 심근경색증, 심부전, 동맥경화증, 부정맥, 죽상경화증, 고혈압, 동맥류, 색전증, 뇌졸중, 뇌경색, 혈전증, 또는 협심증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 상기 정량장치는 핵자기 공명 분광 분석기 (^{1}H-NMR) 또는 크로마토그래피/질량분석기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 정량장치는 크로마토그래피/질량분석기일 수 있다.

[0026] 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 액체-고체 크로마토그래피(Liquid-Solid Chromatography, LSC), 종이크로마토그래피(Paper Chromatography, PC), 박층 크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography, TLC), 기체-고체 크로마토그래피(Gas-Solid Chromatography, GSC), 액체-액체 크로마토그래피(Liquid-Liquid Chromatography, LLC), 포말 크로마토그래피(Foam Chromatography, FC), 유화 크로마토그래피(Emulsion Chromatography, EC), 기체-액체 크로마토그래피(Gas-Liquid Chromatography, GLC), 이온 크로마토그래피(Ion Chromatography, IC), 겔 여과 크로마토그래피(Gel Filtration Chromatograhy, GFC) 또는 겔 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography, GPC)를 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 모든 정량용 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 크로마토그래피는 기체 크로마토그래피 (Gas chromatography; GC)이다.

[0027] 상기 질량분석기는 특별한 제한없이 종래 공지된 질량 분석기를 이용할 수 있지만, 구체적으로 예를 들면, MALDI-TOF MS, Q-TOF MS, LTQ-Orbitrap MS일 수 있다._

[0028] 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 질량분석기는 특별한 제한없이 종래 공지된 질량 분석기를 이용할 수 있지만, 구체적으로 예를 들면, MALDI-TOF MS, Q-TOF MS, LTQ-Orbitrap MS이고, 보다 바람직하게는 TOF MS일 수 있다.

[0029] 상기 프롤린(proline), 피로포스페이트(pyrophosphate), 올레아나이트릴(oleanitrile), 스테아르산(stearic acid), 트립토판(tryptophan), 올레아마이드(oleamide), 및 콜레스테롤(cholesterol)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상은 혈관질환자에서의 농도가 정상인 개체에 비하여 감소된 상태인 경우에 상기 대상을 혈관질환으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 글리신(glycine), 아스파르트산(aspartic acid), 5-옥소프롤린(5-oxoproline), 글루코스(glucose), 9,12-옥타데카다이엔산(9,12-octadecadienoic acid), 및 아라키돈산(arachidonic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상은 혈관질환자에서의 농도가 정상인 개체에 비하여 증가된 상태인 경우에 상기 대상을 혈관질환으로 진단하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 대상 (Subject)으로부터 채취한 혈액에서 프롤린(proline), 피로포스페이트(pyrophosphate), 올레아나이트릴 (oleanitrile), 스테아르산(stearic acid), 트립토판(tryptophan), 올레아마이드(oleamide), 콜레스테롤(cholesterol), 글리신(glycine), 아스파르트산(aspartic acid), 5-옥소프롤린(5-oxoproline), 글루코스(glucose), 9,12-옥타데카다이엔산(9,12-octadecadienoic acid), 및 아라키돈산

(arachidonic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 대사체의 농도를 정량장치로 측정하는 단계; 및

[0031] 상기 단계에서 측정한 혈액내 대사체의 농도를 정상 대조군의 혈액의 상기 대사체의 농도와 대비하는 단계를 포함하는 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0032] 상기 프롤린(proline), 피로포스페이트(pyrophosphate), 올레아나이트릴(oleanitrile), 스테아르산(stearic acid), 트립토판(tryptophan), 올레아마이드(oleamide), 및 콜레스테롤(cholesterol)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상은 혈관질환자에서의 농도가 정상인 개체에 비하여 감소된 상태인 경우에 상기 대상을 혈관질환으로 진단할 수 있고, 상기 글리신(glycine), 아스파르트산(aspartic acid), 5-옥소프롤린(5-oxoproline), 글루코스(glucose), 9,12-옥타데카다이엔산(9,12-octadecadienoic acid), 및 아라키돈산(arachidonic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상은 혈관질환자에서의 농도가 정상인 개체에 비하여 증가된 상태인 경우에 상기 대상을 혈관질환으로 진단할 수 있다.

[0033] 상기 혈관질환의 진단용 키트에 대한사항은 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법에 대하여 동일하게 적용될 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명은 대상의 혈장에 포함된 혈관질환의 진단 마커의 농도를 측정하는 혈관질환의 진단용 키트, 및 대상으로부터 채취한 혈액에서 상기 혈관질환의 진단 마커의 농도를 측정하는 방법을 포함하는 혈관질환의 진단정보를 제공하는 방법에 관한 것으로서, 대상의 혈장에 존재하는 대사체를 이용하여 혈관질환을 간편하게 진단할 수 있는 유용성이 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 본 발명의 실시예에 따라서 고지방/고탄수화물 섭취에 따른 혈관질환에서 혈장 대사체의 변화를 OPLS-DA 방법을 이용해 다변량 분석을 해 본 결과를 나타낸 그림이다.

도 2는 본 발명의 실시예에 따라서 OPLS-DA 분석상에서 대조군과 차이가 나는 시험군의 43종의 혈장 대사체를 변수중요척도(variable importance plots; VIP) 값이 1 이상을 가지는 16종의 대사체를 선별한 결과를 나타낸 그림이다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따라서 선별한 변수중요척도(variable importance plots; VIP) 값이 1 이상을 가지는 16종의 대사체에 대하여 계층구조분석(hierarchy analysis)을 실시하여 히트맵(heat map)을 작성하여 대조군과 비교해서 시험군에서 통계적으로 유의적인 차이를 나타내는 13종의 대사체를 최종 선별한 결과를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0038] **실시예 1. 혈장 대사체를 이용하여 혈관질환 바이오 마커의 선별**

[0039] **1-1. 혈관질환의 치료효능이 알려진 식품 섭취 후 혈액 채취**

[0040] 혈장 대사체를 이용하여 혈관질환 바이오 마커를 선별하기 위해서 이화여자대학교목동병원(대한민국, 서울)에서 만 30세 이상 65세 미만의 건강한 성인 남녀112명을 모집하고, 상기 112명의 실험 대상자를 무작위로 대조군 및 시험군으로 나누고, 대조군 및 시험군 모두에 대해서 고지방/고탄수화물 음료(palm oil(롯데㈜); dextrose(대상㈜); protein powder(Nutricia))를 공복상태에서 500 mL을 단회 섭취시킨 후에, 대조군에 대해서는 대조식품(덱스트린)를 600 mg 정도 섭취시키고, 시험군에 대해서는 혈관질환의 치료효능이 알려진 공지의 버섯추출물을 600 mg 정도 섭취시키고 대사체 변화가 일어나도록 6시간 동안 휴식을 취하도록 한 후에, 112명의 실험 대상자로부터 정맥혈을 얻어 항응고제로서 EDTA가 표면 처리된 멸균 플라스틱 시험관에 채집하였고, 곧바로 원심분리를 시행하여 혈장 대사체 시료를 얻었고, 상기 수득한 모든 시료는 분석 전까지 -80℃에 보관하였다.

[0042] **1-2. 혈장 대사체 분석**

[0043] 실시예 1-1에서 얻은 혈장 대사체 시료를 분석하기 위해서 하기와 같은 방법으로 가스크로마토그램-질량분석기(Gas chromatography-time of flight mass spectrometry; GC-TOF-MS)를 사용한 분석을 수행하였다.

[0044] 구체적으로, 실시예 1-1에서 얻은 혈장 대사체 시료를 내부표준물질인 2-chloro-l-phenylalanine(Sigma-Aldrich, 47766) 10 uL를 첨가한 1,000 uL의 methanol(J.T.Baker, 9093-68)과 혼합한 후 Mixermill(SPEXSamplePrep, 8000M)을 사용하여 10분 동안 균질화시키고, 균질화 후 상층액을 1분간 sonication 시킨 후 4℃에 한 시간 보관하고, 상기 상층액을 13,500 x g로 4℃에서 10분간 원심분리 한 후 0.2 um polytetrafluoroethylene(PTFE)(Sigma-Aldrich, P0325)를 사용해 필터링한 후 건조시키고, 50 uL methoxyamine hydrochloride(Sigma-Aldrich, 226904)로 30 에서 90 분 동안 옥시미드화시킨 후, 유도체화 시키기 위해 N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide(Sigma-Aldrich, 69482)를 50 uL 넣은 후 37 에서 30 분간 반응시켜서 얻은 반응물을 GC-TOF-MS 분석하였다.

[0045] GC-TOF-MS 분석은 Agilent 7890 gas chromatograph system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 사용하였으며, Rtx-5MS 컬럼 (i.d., 30 m X 0.25 mm, 0.25 μm particle size; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA)을 사용하였고, 제조사가 제공한 프로토콜에 따라서 헬륨을 1.5 mL/mim으로 일정하게 흘려주고 상기 반응물 샘플을 1 uL 주입하고, 전면 주입구와 이송 라인의 온도는 각각 250℃와 240℃로 유지하였으며, 전자 이온화는 -70 eV에서 수행하였고, 50-1000 m/z 범위에서 데이터를 수집하였다.

[0047] **1-3. 통계분석**

[0048] 실시예 1-2에서 혈장 대사체 GC-TOF-MS 분석결과를 해석하기 위해서, 각 시료의 피크 값에 대해 SIMCA-P 소프트웨어 버전 14.1(Umetrics, Umea, Sweden)을 이용하여 직교부분최소자승판별 분석(orthogonal partial least squares-discriminant analysis; OPLS-DA)를 수행 (도 1)하였고, 변수중요척도(variable importance plots; VIP) 값이 1.0 이상인 대사체를 대조군과 시험군간 차이를 나타내는데 기여하는 대사체로 선별 (도 2)하였으며, 선별한 피크에 대하여 계층구조분석(hierarchy analysis)을 실시하여 히트맵(heat map)을 작성 (도 3)하였고, 두 군에서의 대사체들에 대한 유의적 차이는 student's t-test를 실시하여 검증함 ($p<0.05$)하였다.

[0050] **실험결과 1. 고지방/고탄수화물 섭취에 따른 혈관질환에서 혈장 대사체의 변화**

[0051] **1-1. OPLS-DA 분석상의 차이**

[0052] 실시예 1-3의 고지방/고탄수화물 섭취에 따른 혈관질환에서 혈장 대사체의 변화를 OPLS-DA 방법을 이용해 다변량 분석을 해 본 결과는 도 1에 나타나 있다.

[0053] 도 1에 의하면, 대조군과 시험군 간에 뚜렷한 다변량 분석 결과를 얻을 수 있었고, 이를 통해 대조군에 비해서 혈관질환의 치료효능이 알려진 식품을 섭취한 시험군에서의 대사체가 확연하게 차이나는 43종의 대사체를 확인할 수 있었다.

[0055] **1-2. VIP 파라미터를 이용한 16종의 혈장 대사체의 선별**

[0056] OPLS-DA 분석상에서 대조군과 차이가 나는 시험군의 43종의 혈장 대사체 중에서, 변수중요척도(variable importance plots; VIP)를 통하여 VIP값이 1이상인 것을 두 군의 차이를 가장 뚜렷하게 나타내는데 크게 기여하는 대사체라고 볼 수 있다. 도 2에 나타난 것과 같이, 43종의 대사체를 VIP 순서대로 나열하여 VIP 값이 1 이상을 가지는 16종의 대사체를 선별하였다.

[0058] **1-3. 13종의 혈장 대사체의 선별**

[0059] 도 3에 나타난 것과 같이, 선별한 변수중요척도(variable importance plots; VIP) 값이 1 이상을 가지는 16종의 대사체에 대하여 계층구조분석(hierarchy analysis)을 실시하여 히트맵(heat map)을 작성하여 대조군과 비교해서 시험군에서 통계적으로 유의적인 차이를 나타내는 13종의 대사체를 최종 선별하였다.

[0060] 상기 선별한 13종의 대사체는 표 1에 나타나 있고, 혈관질환을 나타내는 대조군에서 시험군 대비 7종의 대사체가(proline, pyrophosphate, oleanitrile, stearic acid, tryptophan, oleamide, cholesterol) 유의적으로 감소하였으며, 6종의 대사체가(glycine, aspartic acid, 5-oxoproline, glucose, 9,12-octadecadienoic acid, arachidonic acid) 유의적으로 증가하였다.

[0061] 상기 결과를 통해, 상기 선별한 13종의 대사체는 고지방/고탄수화물 섭취로 인한 혈관질환 여부를 진단할 수 있는 바이오 마커임을 확인할 수 있었다.

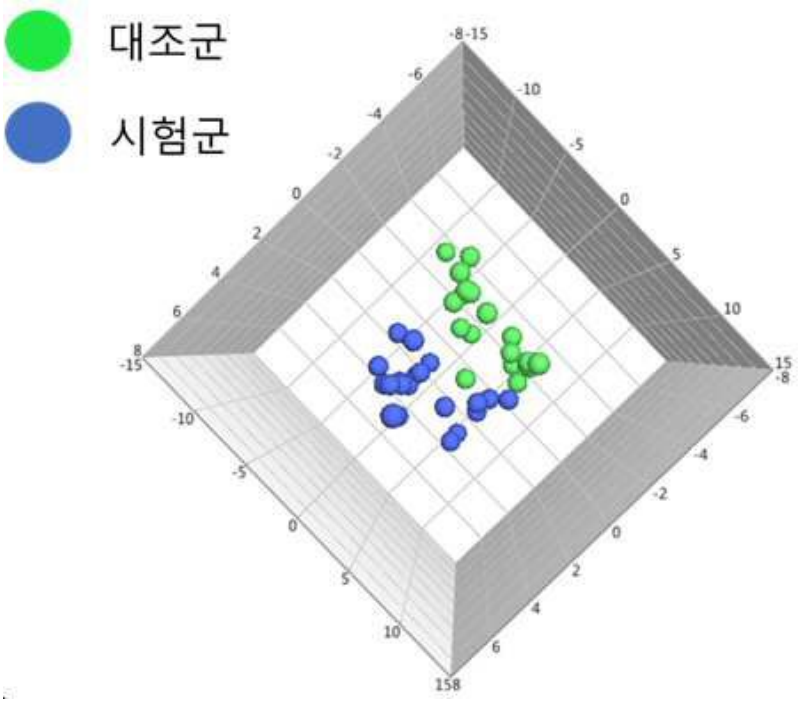
표 1

[0062]

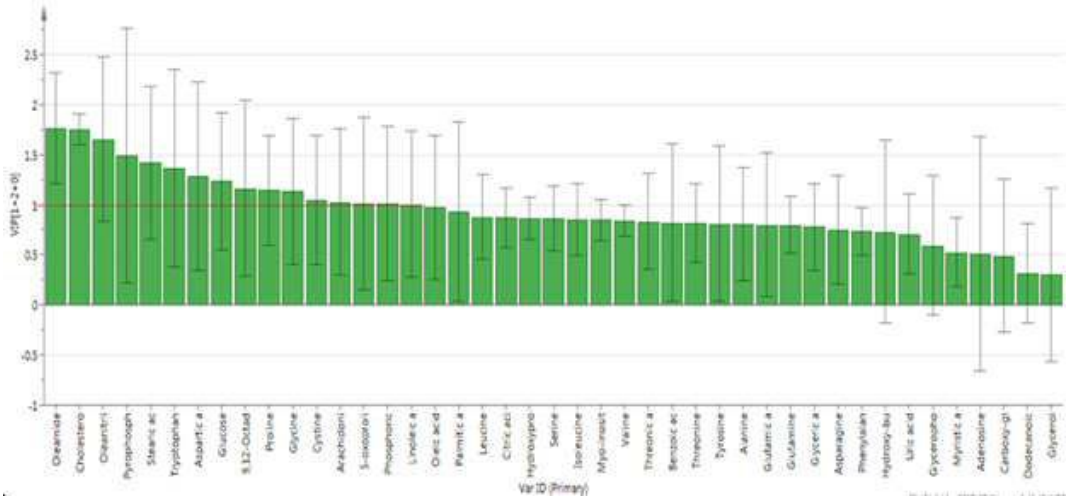
대사체	P-value
Arachidonic acid	0.0180
Aspartic acid	0.0030
Cholesterol	<0.0001
Glucose	0.0147
Glycine	0.0139
Oleamide	<0.0001
Oleanitrile	<0.0001
Proline	0.0156
Pyrophosphate	0.0013
Stearic acid	0.0002
Tryptophan	0.0015
5-oxoproline	0.0363
9,12-octadecadienoic acid	0.0085

도면

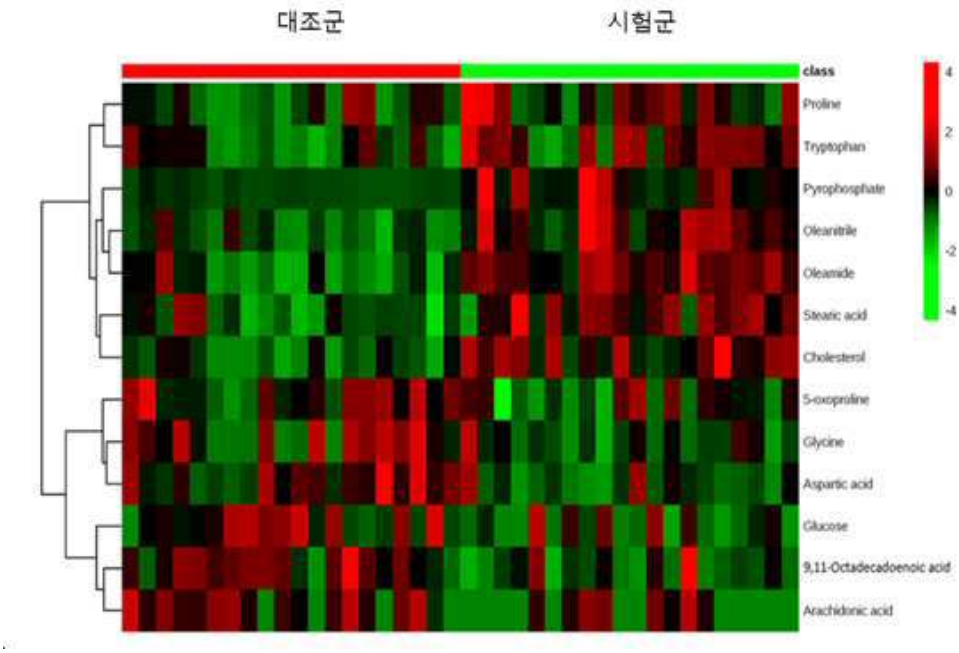
도면1



도면2



도면3


대조군
시험군
class
Proline
Tryptophan
Pyrophosphate
Oleanitrile
Oleamide
Stearic acid
Cholesterol
5-oxoproline
Glycine
Aspartic acid
Glucose
9,11-Octadecadoenoic acid
Arachidonic acid
4
2
0
-2
-4