



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월29일
(11) 등록번호 10-0808130
(24) 등록일자 2008년02월21일

(51) Int. Cl.

A61K 38/02 (2006.01) A61K 36/04 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0107896

(22) 출원일자 2006년11월02일

심사청구일자 2006년11월02일

(56) 선행기술조사문헌

US 6,217,879.

한국식품과학회지 34(2), pp.325-329, 2002년.

(73) 특허권자

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

남택정

부산 남구 문현1동 53-3번지 부광주택 B-101호

권미진

부산 부산진구 가야3동 64-25번지 (1통 6반)

황혜정

부산 사하구 괴정1동 530-1번지 협진태양아파트
3동 303호

(74) 대리인

이덕록

전체 청구항 수 : 총 1 항

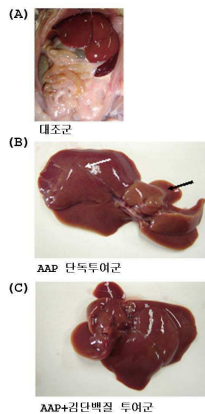
심사관 : 김윤경

(54) 홍조류 김으로부터 분리한 단백질을 포함하는아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 홍조류 김으로부터 분리한 단백질을 포함하는 아세트아미노펜 유발성 간질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 방사무늬 돌김의 열수 추출물에서 분리 정제한 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 젤 전기영동법 측정 분자량이 14kDa인 단백질은 아세트아미노펜에 의해 유발된 랫츠 간 조직의 산화적 손상과 간세포의 세포사멸을 저해하는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 P-2004-02

부처명 해양수산부

연구사업명 마린바이오 21사업

연구과제명 해조류로부터 생리기능성 신물질 생산공정개발 및 산업화

주관기관 부경대학교

연구기간 2004년 10월 ~ 2006년 12월

특허청구의 범위

청구항 1

방사무늬 돌김(*Porphyra yezoensis*)의 열수 추출물에서 분리한, 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법 측정 분자량이 14kDa인 단백질을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 아세트아미노펜 유발성 간질환 예방 및 치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <10> 본 발명은 홍조류 김으로부터 분리한 단백질을 포함하는 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 아세트아미노펜 유발성 랫즈의 산화적 간 손상과 간세포의 세포사멸을 억제하는 방사무늬 돌김의 열수 추출물에서 분리 정제한 단백질을 유효성분으로 포함하는 간 손상 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- <11> 최근 해조류의 다양한 생리화학적 효과가 검증되면서 해조류 유래 생리활성물질에 대한 관심이 고조됨에 따라 톳, 다시마, 미역, 김, 파래에서 추출한 에탄올추출물의 암세포성장 저해효과뿐만 아니라, 혈중 지질대사 개선 효과 등이 보고되었다. 우리나라 해조류 중 가장 양식 생산량이 많은 생리활성물질인 포피란의 경우, 콜레스테롤 저하작용, 항균효과 및 항암효과를 비롯하여 푸코이단의 항응고·항산화효과 등 다양한 생리적 기능도 규명되고 있다.
- <12> 일명 해태(海苔)라고도 불리는 김은 홍조식물 보라털목 보라털과의 해조류로 길이 14~25cm, 나비 5~12cm의 긴 타원모양 또는 줄처럼 생긴 달걀모양을 하고 있다. 김의 종류로는 참김(*Porphyra tenera*), 방사무늬 돌김(*P. yezoensis*), 둥근 돌김(*P. suborbiculata*) 등이 있으며, 그중 우리나라에서 양식하는 김의 주종을 이루는 것이 방사무늬 돌김이다. 김에는 특히, 칼슘과 인이 풍부하게 함유되어 있으며, 그중에서도 김에 함유되어있는 다당류인 포피란이 앞서 제시한 바와 같이, 항암, 항바이러스, 항응고작용 등의 생리효과를 가진다는 사실이 밝혀지면서 김의 생리활성물질 탐색에 많은 관심이 모아졌다. 뿐만 아니라 김에는 항산화물질인 폴리페놀이 함유되어 있으며, Han 등(*J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33, 324-330, 2004)은 김추출물이 콜라겐 합성 및 성숙가교인 피리딘올린(pyridinoline) 생성을 회복시킨다고 하였고, 그 외에 Yashizawa 등(*Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59, 1862-1866, 1995)은 김으로부터 추출한 다당류가 대식세포 촉진작용을 나타낸다고 하였으며, 다양한 김으로부터 추출한 포피란의 구조와 기능에 관한 연구도 활발히 진행되어왔다.
- <13> 아세트아미노펜(Acetaminophen, AAP)은 가장 많이 사용되고 있는 항염증치료제로, 과량 복용시 심각한 간 손상을 야기하게 된다. 실제로 미국과 영국에서는 약물에 의한 간질환 원인 중에서 가장 우위를 차지하고 있는 것이 AAP에 의한 간 손상이라고 한다. 따라서, AAP에 의해 야기되는 간 손상 메커니즘을 규명하고, 간 손상을 예방, 혹은 회복하기 위한 여러 연구들이 진행되어 왔다. Cathleen 등(*TOXICOLOGICAL SCIENCES* 84, 201-208, 2005)은 마우스에 AAP 투여시의 세포사멸현상중 하나인 PARP 활성이 나타난다고 보고하였으며, Tamara 등(*TOXICOLOGICAL SCIENCES* 76, 229-236, 2003)은 AAP가 간의 지질과산화물을 일으켜 간 손상을 야기한다고 보고하였다. 반면, Sidhartha 등(*Archives of Biochemistry and Biophysics* 369, 42-58, 1999)은 마우스에서 포도씨추출물인 프로안토시아니딘(proanthocyanidin)을 경구투여하였을 때 AAP에 의한 간세포사멸을 예방하였으며, Francisco 등(*Journal of Ethnopharmacology* 98, 103-108, 2005)은 남미에서 민간요법으로 오랫동안 사용되어온 프로티움헵타필룸(*Protium heptaphyllum*) 추출액을 투여한 결과, AAP에 의한 간 손상을 예방할 수 있다고 보고하였다.
- <14> 이에, 본 발명자들은 홍조류 김에서 분리한 단백질을 이용하여 아세트아미노펜에 의해 유발된 간 손상을 예방 및 치료하고, 이러한 효과 메커니즘을 제공하고자 본 발명을 안출하였다.
- <15> 따라서, 본 발명의 목적은 방사무늬 돌김 유래의 단백질을 이용한 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 및 치료용 조성물을 제공하고자 한다.
- <16> 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물의 아세트아미노펜 유발성 간 손상 저해 효과 메커니즘을 제공하고자 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <17> 본 발명의 상기 목적은 방사무늬 돌김의 열수 추출물에서 당을 제거한 뒤, 암모늄 설페이트를 이용하여 단백질을 추출하고, 칼럼 크로마토그래피와 HPLC를 이용하여 분리·정제한 후, 14kDa의 순수 단백질을 회수하고, 상기 김 단백질은 흰쥐와 간세포에 투여하여 아세트아미노펜(AAP)에 의한 간 손상 저해효과 및 메커니즘을 조사함으로써 달성하였다.

발명의 구성 및 작용

- <18> 본 발명은 홍조류 방사무늬 돌김의 열수 추출물에서 단백질 분리 정제 단계 및 상기 김 단백질을 흰쥐와 간세포에 투여하여 아세트아미노펜(AAP)에 의한 간 손상 저해효과 및 메커니즘을 조사하는 단계로 구성된다.
- <19> 본 발명은 방사무늬 돌김(*Porphyra yezoensis*)의 열수 추출물에서 분리한, 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법 측정 분자량이 14kDa인 단백질을 유효성분으로 함유하는 아세트아미노펜 유발성 간 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공함을 특징으로 한다.
- <20> 본 발명 조성물의 유효량은 1일 체중 1kg 당 100mg 씩 투여하였다.
- <21> 이하 본 발명의 구성을 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<22> [실시예]

<23> 실시예 1: 홍조류 김에서 단백질의 분리 및 정제

- <24> 방사무늬 돌김 80g을 증류수 2L에 침지하여 80℃에서 3시간 동안 추출한 다음 감압하여 뷰후너 깔대기로 여과하였다. 여기에 3배 부피의 에탄올을 첨가하여 침전된 당을 제거하고 남은 상층액을 취해 감압농축한 다음, 최종 농도 80%가 되도록 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 첨가한 후, 4℃에서 24시간 교반하면서 단백질을 흡착시켰다. 원심분리(8,000rpm, 4℃, 20분)하여 상층을 제거하고, 단백질이 흡착된 암모늄 설페이트를 탈이온수 약 20ml로 녹인 다음, 투석하였다(Spectra/Por membrane MWCO 3,500). 투석액은 sephadex G-75로 충전된 칼럼에 로딩하여, PBS로 용출시킨 다음 280nm에서 최대값을 나타내는 피크를 확인하고(도 1(A) 참조), 확인된 분획은 진공농축하여 0.1% 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid, TFA)이 함유된 탈이온수에 녹여 HPLC로 다시 분리하였다. 역상 아사히 팩 C4P 컬럼(Reverse-phase Asahi-Pak C4P column, 4.6mm × 250mm, 5μm 입자 크기, 아사히 케미칼 인코퍼레이션, 일본)을 사용하여 280nm에서 나타나는 단백질 피크를 확인한 후, 0.1% TFA 내 아세트나이트릴 농도를 0 - 50%까지 변화를 주어 0.8ml/min 유속으로 30분간 용출시켰다(도 1(B) 참조).
- <25> 상기에서 용출된 시료의 분자량은 12.5% SDS-PAGE로 전기영동한 후, 쿠마시 블루 염색과 실버 염색으로 확인하였다.
- <26> 도 1(C)에 나타난 바와 같이, 분리, 정제한 김 단백질은 14kDa의 분자량을 가진 단일밴드로 확인되었다. 본 발명에서는 상기 14kDa의 단백질을 간 손상에 대한 효과 실험에 적용하였다.

<27> 실시예 2: 김 단백질의 간 손상 저해 효과 실험

- <28> 상기 실시예 1에서 분리 정제된 김 단백질의 아세트아미노펜 유발성 간 손상에 대한 효과를 마우스를 이용하여 조사하였다.
- <29> 실험동물은 효창사이언스에서 분양받은 4주령의 스프라귀 달리(Sprague Dawley)계 수컷쥐(체중 100±10g)을 사용하였다. 각 10마리씩 세 그룹(대조군, AAP 단독투여군, AAP+김 단백질 투여군)으로 나누어 연립식 사육케이지에 넣고 7일간의 순치예비사육을 하였다. 이때 사육실 온도(22±1℃), 습도(50±10%) 및 명암(12시간, 08:00~18:00)을 엄격히 조절하였다. 순치예비사육을 거친 후, 일반사료와 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하면서, 2주간 식염수(saline, 대조군과 AAP 단독투여군)와 김 단백질(100mg/kg)을 경구투여하였다. DMSO에 녹인 700mg/kg의 AAP를 복강으로 투여한 후, 24시간 뒤 단두하여 채혈하였고, 각 혈액시료는 빙수 중에 1시간 방치한 후에 원심분리(3,000rpm, 15분, 4℃)하여 취한 혈청을 저온(-70℃)에 보관하면서 실험에 사용하였다. 그리고 간장을 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 그 무게를 칭량하고 그중 일부를 취해 보우인(Bouin) 용액(피크리산(picric acid) : 포르말린 : 빙초산(glacial acetate) = 15 : 5 : 1)에 고정하였다.
- <30> 동물실험의 분석결과는 각각의 군별로 평균치와 표준편차(mean±S.D.)를 사용하여 표기하였으며, 모든 자료는 윈도우용 SPSS프로그램(Statistical Package for Social Science, SPSS 인코퍼레이션, 미국 일리노이즈주 시카

고)을 이용하여 처리하였고, 반복측정에 의한 ANOVA 테스트와 Duncan's multiple range test를 적용하였다. 이때 통계적 유의도 수준은 $p < 0.05$ 에서 살펴보았다.

<31> 실험예 1: 김 단백질이 간 조직과 간 무게, 체중변화에 미치는 영향

<32> 실시예 1에서 분리 정제된 김 단백질이 간 조직과 간 무게 및 체중 변화에 미치는 영향을 조사하기 위해, 마우스의 간장조직을 떼어내 무게를 재고, 조직염색을 실시하였다.

<33> 이를 위해, 각 실험군 별로 사육한 흰쥐의 간장조직을 떼어내어 생리식염수로 가볍게 씻어 혈액을 제거하였다. 간장조직의 일부를 절단하여 0.5cm 두께로 잘라 보우인(Bouin) 고정용액에 고정하고, 동일 고정액을 사용하여 24시간 안에 조직 캡슐(tissue capsule)에 넣어 채고정하였다. 이를 수세하여 자동침투기(autotechnicon)에 넣어 순차농도알코올에 탈수하고 크실렌(xylene)으로 투명화시켰다. 포매 센터(Embedding center)에서 조직 캡슐에 파라핀을 침투시켜 포매(embedding)하여 블럭(block)으로 만들었다. 로터리 마이크로톰(Rotary microtome)으로 블럭을 5 μ m 두께로 박절하여 부유 향온수조에서 충분히 퍼지도록 둔 후 깨끗한 슬라이드 글라스에 부착시켰다. 그런 다음, 상기 슬라이드 글라스와 조직 절편을 단단히 접촉시켜주기 위해서 60℃ 정도의 온도를 유지하는 슬라이드 워머(slide warmer)에 방치하였다. 마지막으로 기본적으로 세포의 배열과 형태학적 변화를 보기 위해 모든 조직 절편을 핵과 세포질을 구분해서 볼 수 있는 헤마톡실린 & 에오신(Hematoxylin & Eosin) 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

표 1

<34>

	대조군	AAP	AAP + S.E.
초기 체중(g)	92 $\pm$ 4.40	287 $\pm$ 9.09	94 $\pm$ 4.80
최종 체중(g)	94 $\pm$ 4.15	299 $\pm$ 14.92	281 $\pm$ 15.51
체중 변화(g)	194.81 $\pm$ 7.1	205.07 $\pm$ 14.7	186.87 $\pm$ 15.5
간 무게(g)	9.41 $\pm$ 0.6	10.86 $\pm$ 0.9	9.5 $\pm$ 0.9

<35> 각 수치는 1군당 10마리의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸 것이다.

<36> 표 1에 나타난 바와 같이, 3주간 사육한 백서의 체중 변화 및 간 무게는 대조군과 두 가지 실험군인 AAP 단독투여군과 김 단백질 투여군, 모두에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

<37> 이것은 AAP 투여한 마우스에서 투여 4시간 후에 체중은 변화가 없으나, 간 무게가 증가하였다는 앞선 논문(Valentovic *et al.*, 2004)과는 반대의 결과를 얻었다. Valentovic 등은 500mg/kg AAP를 마우스에 1회 투여한 후 체중 및 간 무게를 측정하여 이와 같은 결과를 얻었다고 하였으나, 백서에 700mg/kg의 AAP를 투여한 이번 실험시스템에서는 표 1에 나타난 바와 같이 체중이나 간 무게에 변화가 없는 것으로 나타났다. 이것은 AAP 투여군의 경우 급성으로 1회 투여한 것이므로, 체중이나 간 무게가 변화가 없는 것으로 생각된다. 김 단백질 투여군에서 AAP 단독투여군과 마찬가지로 대조군과 별 차이가 보이지 않은 것은 김 단백질이 체중이나 간 무게에는 아무런 영향을 미치지 않은 것으로 보아 김 단백질이 백서에 아무런 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다.

<38> 도 2는 AAP 복강투여로 인한 간 손상 정도를 살펴본 것이다. 대조군은 선명한 선홍색인데 비해 AAP 단독투여군에서는 간 조직이 밝은 갈색을 띄었으며 곳곳에 검은 점이 관찰되었다. 그러나, 김 단백질 투여군에서는 대조군과 거의 흡사하게 깨끗한 선홍색을 나타내었다.

<39> H&E 염색을 통해 광학현미경으로 조직 내부를 관찰한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 AAP 단독투여군에서는 중심정맥(central vein) 주위에 핵분해가 다수 관찰되었는데, 이는 AAP 독성에 의한 간세포사멸을 의미한다. 반면, 김 단백질 투여군에서는 AAP 단독투여시 나타난 현상이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

<40> 실험예 2: 혈청 중의 GOT와 GPT

<41> 간기능지표인 혈청 GOT와 GPT는 간세포의 변성과 괴사를 반영하는 효소로서 간조직 손상시 혈중으로 다량 유출된다. 혈청 중의 GOT/GPT는 Reitman-Frankel의 방법에 따라 제조된 글루탐릭 옥살로아세트릭 트랜스아미나아제(Glutamic oxaloacetic transaminase, GOT) 및 글루탐릭 피루빅 트랜스아미나아제(Glutamic pyruvic transaminase, GPT) 활성측정용 혈청 트랜스아미나아제 측정용 키트(신양화학, 대한민국)를 써서 분광광도계(Ultrospec 2001 pro, 애머삼 파마시아 바이오테크, 영국)로 505nm에서 측정하고, 도 4에 그 결과를 도시하였다.

- <42> 도 4에 나타난 바와 같이, 대조군(158.97 ± 13.4 karmen)에 비해 AAP 투여시(187.95 ± 20.7 karmen) GOT가 유의적으로 증가($p < 0.05$)했으며, 김단백질(148.41 ± 6.66 karmen)에 의해 GOT치의 감소가 대조군 이하로 감소함을 알 수 있다.
- <43> 한편, GPT의 측정결과도 GOT와 유사한 경향을 나타내었는데, AAP 단독투여군(44.83 ± 11.7 karmen)에 비해 김 단백질 투여군(30.22 ± 6.6 karmen)에서 대조군(28.83 ± 7.9 karmen)과 유사한 수준으로 감소하였다.
- <44> 따라서, AAP 투여로 인해 상승된 GOT/GPT 농도를 김 단백질이 대조군 수준으로 회복시킴으로써 간 손상을 저해시킨 것으로 사료된다.
- <45> 실험예 3: 간장조직 중의 글루타티온 함량 변화
- <46> 진통제로 사용하고 있는 AAP는 간에서 대사되어 그 대사산물로 N-acetyl-*p*-benzoquinoneimine(NAPQI)가 생성된다. 이 대사산물은 글루타티온(glutathione, GSH)이 충분한 경우에는 담즙이나 노로 배설되지만 AAP를 과다복용한 경우 GSH가 감소되어 NAPQI가 간세포단백질과 결합, 세포손상을 일으키게 된다.
- <47> 따라서, 간장조직 중의 GSH 활성을 측정하였다. 이를 위해, 간장조직을 5% 설포살리실산(sulfosalicylic acid)으로 균질화시킨 후, 액체질소로 동결, 37°C 수조에 해동을 2회 반복 실시하였다. 4°C 에서 5분간 방치시킨 후 4°C , $1,000 \times g$, 10분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 상층액과 GSH 분석 키트 내 표준용액을 96-웰 플레이트에 각각 분주한 다음, 여기에 워킹 믹스처(working mixture)를 첨가하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 5분 후 NADPH를 넣고 피펫으로 혼합한 후 412nm 에서 5분 간격으로 흡광도를 측정하였다.
- <48> 도 5에 나타난 바와 같이, AAP 단독투여군의 경우 대조군에 비해 GSH 함량이 $85.39 \pm 4.81\%$ (대조군을 100%로 비교)로, 유의적인 감소를 나타내었지만, 여기에 김 단백질을 투여한 경우에는 다시 $92.16 \pm 6.36\%$ 로 회복되었다. 즉 AAP에 의해 감소하였던 글루타티온 함량이 김 단백질에 의해 증가함으로써 AAP에 의해 발생하였던 산화적 스트레스로 인한 간 손상을 억제한 것이다.
- <49> 실험예 4: 간 조직 중의 캐스파아제-3 활성 및 DNA 단편화 변화
- <50> 세포사멸은 예정된 세포의 죽음으로 조직의 항상성 유지에 중요하다. AAP에 의한 세포사멸 유형에 관해 많은 연구들이 보고되었지만 세포의 자연사인 세포사멸과 괴사 사이에서 아직까지 명확한 결론이 나와 있지는 않다.
- <51> 따라서, AAP에 의한 간 손상 시 세포사멸을 확인하기 위해 캐스파아제-3의 활성을 측정하였다. 이를 위해, 간장조직을 프로테아제 억제제(protease inhibitor)가 든 라이시스 버퍼(lysis buffer, 25mM HEPES, pH7.5, 5mM EDTA, 2mM DTT, 0.1%CHAPS)로 균질화시킨 다음, 4°C , $14,000 \times g$ 로 원심분리시켰다. 상층액을 취해 BCA 단백질 분석 키트로 단백질 농도를 측정하여 $80\mu\text{g}$ 의 단백질을 96-웰에 넣고 여기에 DEVD-pNA 기질을 넣은 후 37°C 4시간 동안 반응시켰다. 405nm 에서 흡광도를 측정하였다.
- <52> 도 6(A)에 나타난 바와 같이, AAP 단독투여군은 대조군(100%)에 비해 캐스파아제-3 활성이 증가한($143.38 \pm 10.25\%$) 반면, 김 단백질 처리로 인해 $112.21 \pm 11.52\%$ 로 다시 증가하였다.
- <53> 세포사멸 유형을 확인하기 위해 간 조직 중의 DNA를 추출해 단편화 정도를 살펴본 결과, 도 6(B)에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 AAP 단독투여군에서 확실한 DNA 단편을 관찰할 수 있었던 반면, 김 단백질 투여군에서는 AAP 단독투여군에 비해 DNA 단편을 관찰할 수 없었다.
- <54> 이상의 결과로 백서에서 AAP에 의한 간 손상시 세포사멸 유형(apoptotic mode)을 통해 세포사멸이 일어남을 확인하였으며 김 열수 추출물에서 분리한 단백질이 AAP의 세포사멸 유도를 억제효과를 나타내는 것으로 생각된다.
- <55> 실험예 5: AAP 처리에 의한 HepG2 간세포 증식과 독성 유무 조사
- <56> HepG2는 정상 간세포와 동일한 대사기전으로 성장하기 때문에, 일반적으로 세포를 이용한 간 독성 및 회복에 관한 실험에 사용된다. 상기 실험예에서 흰쥐에 AAP 투여시 나타나는 간 독성이 김 단백질에 의해 회복됨에 따라, HepG2 간세포를 이용하여 AAP가 세포사멸에 미치는 영향 및 세포증식 억제효과를 살펴보고, 세포사멸을 유도하는 AAP에 의한 캐스파아제-3 활성을 측정하여 김 단백질에 의한 간 독성 회복 메커니즘을 규명하고자 하였다.
- <57> HepG2 간세포는 ATCC(American Type Culture Collection): 기탁번호?????로부터 분양받아 사용하였다. MEM 배지에 항생제(페니실린/스트렙토마이신) 100 units/ml을 첨가하여 $0.22\mu\text{m}$ 여과기로 여과한 후, 배양 전에 우태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS)을 최종농도가 10%가 되도록 첨가하여 사용하였고, 세포는 37°C , 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양중인 세포를 일주일에 2번 배지를 교환하고, 컨플루언트(confluent) 상태가 되면

PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 뒤, 0.05% 트립신 용액으로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 피펫으로 각각의 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 동일하게 분주하였다.

<58> 세포 증식과 독성 유무 검사를 위해, HepG2 간세포를 5×10^4 cells/ml의 농도로 조정하고, 96-웰 마이크로플레이트(팔콘, 미국)에 웰 당 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 배양하였다. 24시간이 지난 후에 무혈청 배지로 교환하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 단백질 시료는 무혈청 배지에 용해한 후 희석하여 0.01% 농도까지 희석하였다. 각 농도별 희석액을 각각의 세포주에 첨가하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTS/PMS 용액(CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit, 프로메가 코퍼레이션, 미국)을 $10 \mu\text{l}$ 씩 처리하여 세포주들을 10~20 분 배양하였고, 이후에 자동 엘라이자 리더(Autometric ELIZA reader)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 생존율을 계산식 1에 따라 산출하였다. 모든 실험은 3회 반복적으로 실시하였다.

<59> [계산식 1]

$$\text{평균생존율}(\%) = \frac{\text{시료처리군의흡광도}}{\text{대조군의흡광도}} \times 100$$

<60>

<61> AAP 처리에 의한 간세포 독성 정도를 파악하기 위해, LDH 활성을 측정하였다. 즉, 2×10^4 cells/ml의 농도로 96-웰 마이크로플레이트(팔콘, 미국)에 웰 당 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 배양하였다. 24시간 후, 1% FBS가 포함된 MEM 배지로 교환하여 다시 24시간 배양한 다음, 분석용 배지 $100 \mu\text{l}$ 와 AAP $100 \mu\text{l}$ (10, 20 및 40mM)를 처리하였다. 상층액 $100 \mu\text{l}$ 를 취해 새 96-웰 마이크로플레이트로 옮긴 다음, $100 \mu\text{l}$ 의 반응 혼합액(reaction mixture, 용액 I $250 \mu\text{l}$ + 용액 II 11.25ml)를 첨가하여 호일로 빛을 차단한 상태로 $15 \sim 25^\circ\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후, 엘라이자 리더(Autometric ELIZA reader)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

<62> HepG2 간세포에서 AAP의 세포증식 저해효과를 측정하기 위해, AAP를 무혈청 배지에 첨가하여 24시간, 48시간 배양한 다음 MTT 분석을 한 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, AAP의 농도 증가와 배양시간에 따라 간세포 증식이 저해됨을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 간세포 손상 정도를 파악할 수 있는 LDH 활성이 AAP 농도에 비례하여 증가함으로써, AAP가 간세포 손상을 유도하여 간세포 성장을 저해시킴을 알 수 있었다.

<63> 실험예 6: AAP에 의한 간세포주의 세포사멸

<64> 세포사멸은 세포 내에 본래부터 존재하고 있던 자살기작이 세포내부와 외부자극에 의하여 활성화되어 계획한 대로 스스로 죽는 현상으로 세포의 괴사와는 달리 죽어가는 세포의 내용물이 세포외로 유리되지 않아 다른 세포에 손상을 주지 않는다. 형태학적으로는 세포의 비정형상과 세포막의 파괴 및 염색체의 응축과 더불어 사멸체(apoptotic body) 형성과 함께 식세포 작용을 거치며, 생화학적으로는 염색체 DNA가 큰조각에서 작은조각으로 갈라지는 DNA 단편화가 일어난다.

<65> 따라서, AAP에 의한 세포증식 저해효과가 세포사멸에 의한 현상임을 확인하기 위해, 세포의 핵 내에 있는 DNA, 특히 세포사멸이 일어난 세포 내 DNA에만 염색되는 성질을 이용하여 AAP를 첨가한 세포와 첨가하지 않은 세포를 PBS로 세척한 다음 DAPI 용액으로 염색한 후, 형광현미경으로 관찰하였다.

<66> 구체적으로, 김 단백질이 처리된 HepG2 세포를 PBS로 수세하고 3.7% 파라포름알데히드로 상온에서 10분간 고정시킨 후 형광물질인 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI), 시그마) 용액을 이용하여 10분간 염색하였다. 이들 세포를 다시 PBS로 2회 수세한 후 형광현미경(fluorescence microscope)을 이용하여 핵의 형태 변화를 정상군과 비교하였다.

<67> DNA 단편 현상을 조사하기 위해서는, 간세포에 상기 실시예 1에서 정제한 김 단백질을 농도별($0 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$)로 첨가하여 24시간 동안 배양하고, 세포 파쇄액(nuclear lysis buffer, 100mM NaCl_2 , 40mM Tris-Cl, pH 7.4, 20mM EDTA, 0.5% SDS)과 혼합하여 세포를 파쇄한 후 RNase A와 Proteinase K 처리로 RNA와 단백질을 제거하고 이소프로판올 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 다음 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA 펠렛을 용해한 후, 260nm와 280nm 파장의 분광광도계(에머삼 파마테크)로 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA $10 \mu\text{g}$ 을 2% 아가로우즈 겔에 전기영동(50V, 2시간)한 후, 에티디움브로마이드로 염색하여 자외선 등을 이용하여 관찰하였다.

<68> 도 8에 나타난 바와 같이, AAP를 첨가하여 24시간 배양한 경우, 세포수가 감소하였을 뿐만 아니라 붉은색의 세

세포사멸 유형이 유의적으로 많이 형성된 것을 확인할 수 있었고, 이와 동일하게 DNA 단편을 확인하였다.

- <69> 세포사멸은 세포 표면의 수용체를 통한 신호전달과 세포 내의 미토콘드리아의 Bax와 Bcl-2 등을 통한 캐스파아제 패밀리(caspase family)의 활성화로 나타난다. 세포사멸 신호전달 일련의 과정은 거의 단백질 상호작용에 의해 수행된다. 세포사멸을 억제하는 단백질에는 Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, 세포사멸을 촉진하는 단백질에는 Bax, Bad, Bak 등이 대표적이며, 이들 단백질의 균형이 세포사멸을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- <70> 상기 결과를 통해 AAP가 간세포의 세포사멸을 유도한다는 사실을 확인하였으므로, 세포사멸에 관련된 단백질의 발현 양상을 관찰하기 위해, 간세포에 AAP를 농도별로 처리하여 웨스턴 블랏을 실시하였다.
- <71> 이를 위해, 세포를 직경 100-mm 배양 접시에서 컨플루언트 상태의 단일층(confluent monolayer)이 될 때까지 10% FBS를 함유하는 배지로 배양한 다음, 무혈청 배지로 교환하여 24시간 배양하였다. 24시간 경과 후, 각각의 샘플들을 농도별로 첨가한 무혈청 배지로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 냉 PBS용액으로 세척한 다음 1% 트리톤이 함유된 세포 용해 완충액(cell lysate buffer)으로 세포를 회수하였다. 원심분리 후 취한 상층액에 4×램라이 샘플 완충액(Laemmli sample buffer, 13.3% SDS, 0.4 M Tris, 0.013% 브로모페놀 블루, 40% 글리세롤, pH 6.5)를 1×의 농도가 되도록 첨가하고, 마이티 스몰 II 어퍼레이투스(Mighty Small II Apparatus, 호퍼 사이언스 인스트루먼트, 미국)를 사용하여 12.5% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동하였다. 전기영동 후, 겔에 분리된 단백질은 세미-드라이 트랜스퍼 유닛(Semi-dry Transfer Unit, 시그마, 미국)를 사용하여 임모빌론-P(Immobilon-P) 멤브레인(밀리포어 코퍼레이션, 포어 크기; 0.1 μ m, 미국)으로 옮기고, 1% BSA가 함유된 1×TBS(Tris-buffered saline; 20mM Tris-base, 137mM NaCl, 1M HCl)에서 2시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 1차 항체로 4°C에서 하룻밤 방치시켰다. TBS-T(Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20)로 10분씩 3번 세척하고 1:20,000으로 희석한 항-래빗 또는 항-마우스 IgG-컨쥬게이티드 호스래디쉬 페록시다제(anti-rabbit or anti-mouse IgG-conjugated horseradish peroxidase) 2차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체로 반응시킨 멤브레인은 TBS-T로 10분간 3번 세척하고 슈퍼 시그널 웨스트 피코 스테이블 페록사이드 솔루션(Super signal west pico stable peroxide solution)과 슈퍼 시그널 웨스트 피코 루미놀/인핸서 솔루션(Super signal west pico luminol/enhancer solution)을 사용하여 X-ray 필름에 감광시켜 각각의 단백질을 밴드로 확인하였다. 이때 사용한 1차 항체는 세포사멸과 관련된 Bcl-2, PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen), 캐스파아제-3, cleaved caspase-3, PARP(Poly (ADP-ribose) Polymerase), cleaved PARP, 그리고 β -액틴 항체를 사용하였다.
- <72> 도 8에 나타난 바와 같이, 간세포에 AAP를 처리하였을 때 불활성형인 캐스파아제-3가 분할(cleavage)되면서 활성형이 증가하였고, 분할된 캐스파아제-3(cleaved caspase-3)의 증가로 인해 핵 내에 존재하는 DNA 손상을 치료하는 PARP가 116kDa에서 85kDa으로 분할이 일어나 불활성화되었다. 뿐만 아니라 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 발현은 AAP의 농도가 증가할수록 억제되었다. 이 결과를 통해 AAP에 의한 간세포의 손상은 세포사멸과 관련이 있을 것으로 생각된다.
- <73> 실험예 7: 김 단백질의 AAP에 의한 간 손상 저해효과
- <74> 상기 결과를 통하여 AAP 농도증가에 의한 간세포의 세포사멸을 유도함을 확인함에 따라, 김 단백질과 AAP를 함께 처리하여 김 단백질의 AAP에 의한 간 손상 저해효과를 확인하였다.
- <75> 먼저, 손상된 세포의 회복 여부를 파악할 수 있는 PCNA 단백질 발현 정도를 확인하였다. 이를 위해, 간장조직을 프로테아제 억제제(protease inhibitor)가 든 라이시스 버퍼(lysis buffer, 25mM HEPES, pH7.5, 5mM EDTA, 2mM DTT, 0.1%CHAPS)로 균질화시킨 다음 4°C, 14,000×g로 원심분리시켰다. 상층액을 취해 BCA 단백질 분석 키트로 단백질 농도를 측정하여 레인당 50 μ g씩 로딩하여 SDS-PAGE로 전기영동한 다음, PVDF 멤브레인(밀리포어, 미국)으로 옮겼다. 이때 표준분자량은 레인보우 폴리클라 마커(rainbow molecular marker, 애머삼)를 사용하였다. 분리된 단백질은 슈퍼 시그널 웨스트 피코 케미루미네스cent 서브스트레이트(Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, 피어스 바이오테크놀로지 인코퍼레이션, 미국)를 이용하여 캐스파아제-3 단백질의 발현을 확인하였다. 0.1% Tween 20이 든 Tris-buffered Saline(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5)에서 2시간 동안 블럭킹(blocking) 시킨 다음, TBS-T(Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20)로 15분간 2회 세척하였다. 세척한 멤브레인에 캐스파아제-3 1차 항체(Anti-caspase 3 polyclonal rabbit IgG, 산타크루즈 바이오 테크놀로지 인코퍼레이션)를 TBS-T에 1:500으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. TBS-T로 15분간 2회 세척시킨 멤브레인을 페록시다제로 표지된 항-래빗 항체(peroxidase labelled anti-rabbit antibody, 1:10000)로 2시간 반응시킨 후, 다시 TBS-T로 15분간 2회 세척한다. 슈퍼 시그널 웨스트 피코 스테이블 페록사이드 솔루션

(Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution)과 슈퍼 시그널 웨스트 피코 루미놀/인헨서 솔루션(Super Signal West Pico Luminol/Enhancer solution)을 사용하여 KODAK X-ray 필름에 감광시켰다. X-ray 필름을 현상한 후 덴시토미터(densitometer)와 Science Lab 2005(후지필름)를 이용하여 밴드를 확인하였다.

- <76> 그 결과, 간세포에 20 mM AAP만 처리한 경우($0\mu\text{g}$)에 비해 김 단백질의 처리농도가 증가함에 따라 세포회복 및 증식과 관련된 PCNA 단백질의 발현이 증가하였다.
- <77> 캐스파아제는 세포사멸 유도 활성화 신호에 의해 활성화되는 시스테인 관련 프로테아제(cystein-related proteases)로서 직접 또는 간접적으로 세포 내에 존재하는 PARP 등과 같은 많은 표적단백질의 분해에 관여하게 되므로, 캐스파아제-3의 활성화는 세포사멸 정도를 파악할 수 있는 최종산물이라 할 수 있다.
- <78> 앞서 제시한 바와 같이, 간세포에 AAP를 농도별로 처리하면, 세포사멸에 의하여 캐스파아제-3의 활성화가 증가하여 분할된(cleaved) 형태가 증가하였다. 그러므로, 김 단백질이 AAP에 의한 세포사멸을 억제하는지를 살펴보기 위하여 김 단백질과 AAP를 함께 처리한 후 캐스파아제-3의 발현 정도를 살펴보았다.
- <79> 도 9에 나타난 바와 같이, 간세포에 20mM AAP만 처리한 경우($0\mu\text{g}$), 활성화된 분할된 캐스파아제-3(cleaved caspase-3)가 증가했지만, 김 단백질 처리농도가 증가함에 따라 활성화형인 분할된 캐스파아제-3는 감소하였고 불활성형인 캐스파아제-3는 증가하였다. 즉, AAP에 의한 간세포의 세포사멸은 김 단백질에 의해 저해되어, 캐스파아제-3 활성이 감소하고, 세포증식과 관련된 PCNA 단백질 발현은 증가함에 따라 김 단백질이 AAP의 간세포 손상을 저해하는 것으로 생각된다.

발명의 효과

- <80> 상기 실시예와 실험예를 통해 살펴본 바와 같이, 본 발명은 홍조류 김으로부터 분리한 단백질을 포함하는 아세트아미노펜 유발성 간 손상 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 방사무늬 돌김의 열수 추출물에서 분리 정제한 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 젤 전기영동법 측정 분자량이 14kDa인 단백질은 아세트아미노펜에 의해 유발된 랫즈 간 조직의 산화적 손상과 간세포의 세포사멸을 저해하는 뛰어난 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 간 손상 예방 및 치료에 사용될 수 있어 의약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

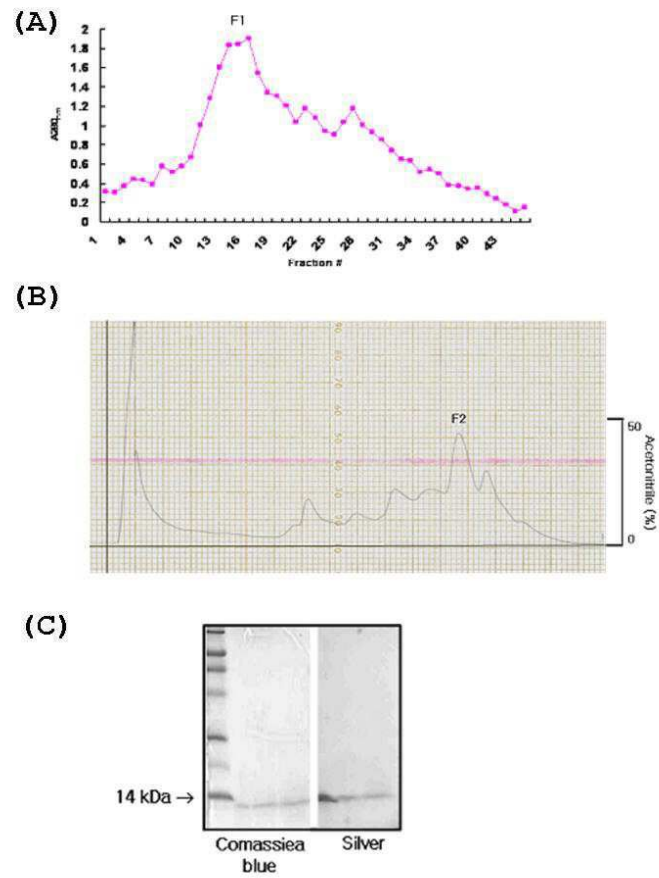
도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 세파텍스 G-75 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 방사무늬 돌김(*Porphyra yezoensis*)에서 단백질을 분리한 결과(A), 세파텍스 G-75의 역상 아사히 팩 C4P-50 C4 컬럼에서 단백질을 포함하는 분획의 HPLC 실시 결과(B), 분리된 단백질을 포함하는 분획의 염색 결과(C)를 나타낸 것이다.
- <2> 도 2는 세 가지 실험군(대조군, AAP 단독투여군, 김 단백질 투여군) 랫즈의 간 손상 정도를 나타낸 사진도이다.
- <3> 도 3은 랫즈 간 조직을 H&E 염색을 통해 광학현미경으로 조직 내부를 관찰한 사진도로서, 화살촉은 DNA 단편화 상태를, 화살표는 공동화 상태를 나타낸 것이다.
- <4> 도 4는 세 가지 실험군(대조군, AAP 단독투여군, 김 단백질 투여군)에서 채취한 혈청 중의 GOT/GPT 수치를 나타낸 이다.
- <5> 도 5는 세 가지 실험군(대조군, AAP 단독투여군, 김 단백질 투여군) 랫즈 간 조직 내 글루타티온 농도를 측정한 결과를 나타낸 것으로, 각 수치에 표시한 a, b, c는 던칸의 멀티플 레인지 테스트에 의한 각 군간의 유의한 차이($p<0.05$)를 나타낸 것이다($a>c>b$).
- <6> 도 6(A)은 AAP에 의한 간 손상시 세포사멸을 확인하기 위해 캐스파아제-3 활성을 측정한 결과를 도시한 것으로, 각 수치에 표시한 a, b, c는 던칸의 멀티플 레인지 테스트에 의한 각 군간의 유의한 차이($p<0.05$)를 나타낸 것이다($a>c>b$). 6(B)은 세포사멸 유형을 확인하기 위해 간 조직 중의 DNA를 추출하여 단편화 정도를 살펴본 결과를 도시한 것으로, 레인 1~2는 대조군, 레인 3~4는 700mg/kg의 AAP 단독투여군, 레인 5~6은 AAP + 김 단백질 투여군을 나타낸 것이다.
- <7> 도 7은 AAP를 농도별로 처리하여 배양한 HepG2 간세포의 세포증식과 세포독성을 조사한 결과를 도시한 그래프이다(* $p<0.05$).
- <8> 도 8(A)은 DAPI 염색법을 이용한 형태적 변화, (B)는 DNA 단편화, (C)는 AAP 유발성 세포사멸 동안 세포사멸 전 단백질(pro-apoptotic molecules)의 변화를 도시한 것이다.

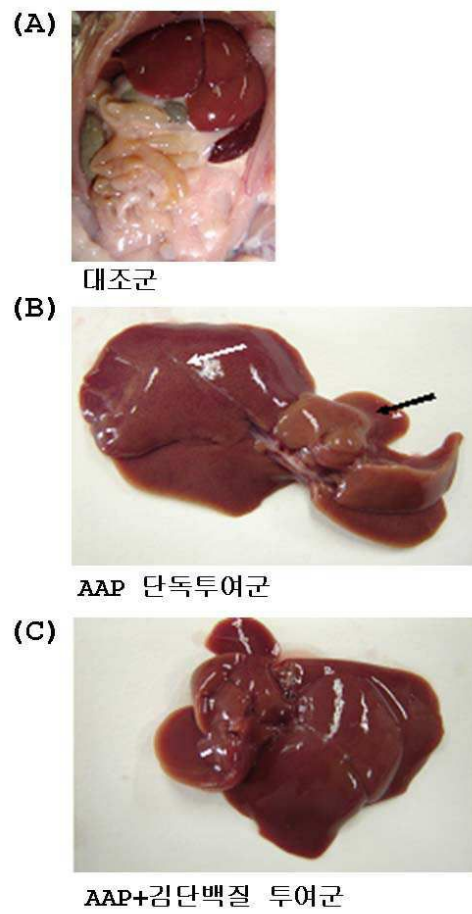
<9> 도 9는 김 단백질이 AAP에 의한 세포사멸을 억제하는지를 살펴보기 위하여 김 단백질과 AAP를 함께 처리한 후 캐스파아제-3의 발현 정도를 조사한 것이다.

도면

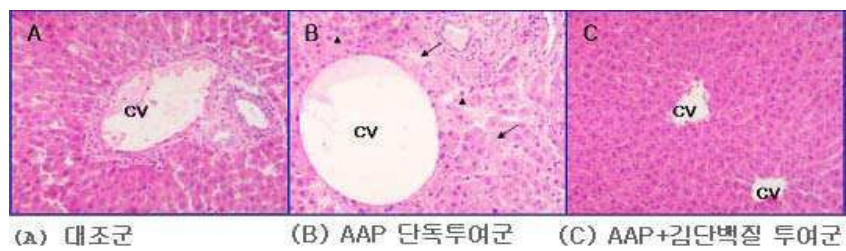
도면1



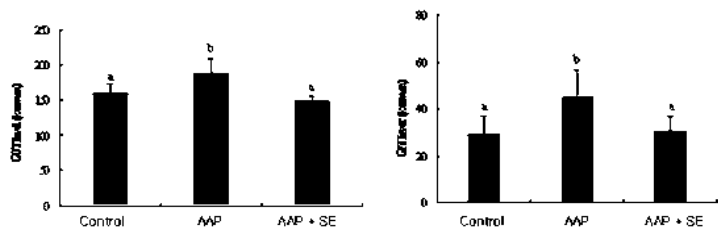
도면2



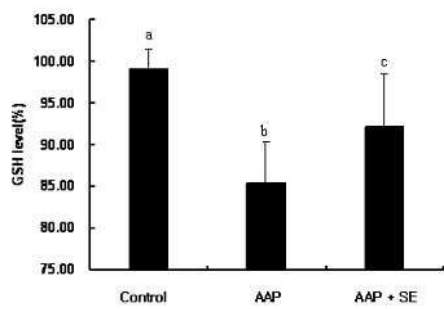
도면3



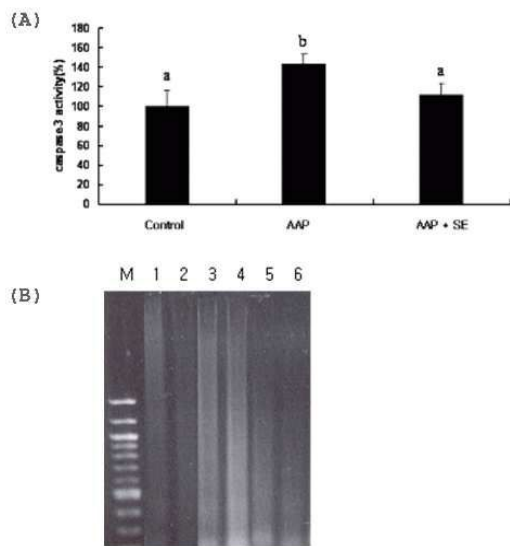
도면4



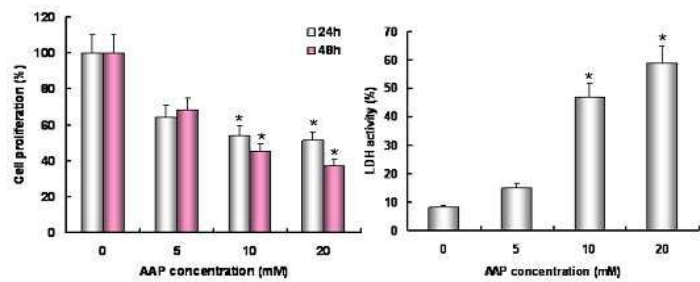
도면5



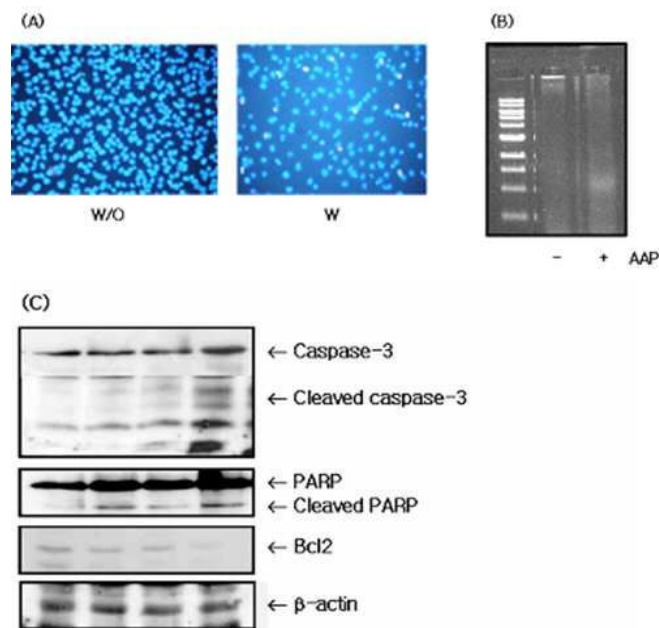
도면6



도면7



도면8



도면9

