(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0060557
(43) 공개일자 2009년06월15일

(51) Int. Cl.
A01K 67/027 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0127425
(22) 출원일자 2007년12월10일
심사청구일자 2007년12월10일

(71) 출원인
금오공과대학교 산학협력단
경상북도 구미시 양호동 1 금오공과대학교 내
계명대학교 산학협력단
대구 달서구 신당동 1000번지
(72) 발명자
지광환
대구 수성구 범어4동 서한두레맨션 102동 1002호
유동찬
대구 남구 봉덕2동 1064-55번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인맥

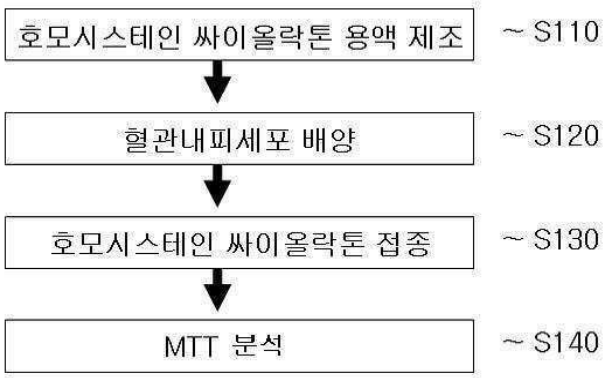
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 혈관내피세포 장애유발 동물모델의 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 혈관내피세포 장애유발 동물모델의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 호모시스테인-싸이올락톤을 인산완충액에 용해시켜 용액으로 제조하는 단계; 혈관내피세포를 배양하는 단계; 및 상기 혈관내피세포 배양액에 상기 호모시스테인-싸이올락톤 용액을 접종하는 단계를 포함하여 구성되는 본 발명에 따른 혈관내피세포 장애유발 동물모델을 이용하여 심근경색, 협심증, 뇌졸중, 심부전, 치매, 알츠하이머, 골다공증 등과 같은 다양한 질환의 치료제를 개발할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김보은

경북 구미시 신평1동 98-9번지

조현남

울산 동구 화정동 642-4번지

권오형

대구 남구 이천동 대성유니드아파트 106동 1703호

전가영

대구 달서구 두류1동 825-20번호

이인선

대구 수성구 황금동 368번지 롯데화성캐슬 골드파크 1416동1803호

양선아

대구 수성구 범어4동 서한두레맨션 102동 1002호

이삼빈

대구광역시 달서구 이곡동 무지개타운 102-306

특허청구의 범위

청구항 1

호모시스테인-싸이올락톤을 인산완충액에 용해시켜 용액으로 제조하는 단계;

혈관내피세포를 배양하는 단계; 및

상기 혈관내피세포 배양액에 상기 호모시스테인-싸이올락톤 용액을 접종하는 단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포 장애유발 동물모델의 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 호모시스테인-싸이올락톤 용액 첨가 후, MTT 분석을 이용하여 세포사멸을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포 장애유발 동물모델의 제조방법.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 혈관내피세포는 $NaHCO_3$, HEPES, FBS 및 항생제를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 22시간 내지 24시간 동안 배양되는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포 장애유발 동물모델의 제조방법.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 혈관내피세포 배양액에 호모시스테인-싸이올락톤 용액을 0.1 내지 10 mM의 농도로 접종하는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포 장애유발 동물모델의 제조방법.

청구항 5

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 동물모델은 심근경색, 협심증, 뇌졸중, 심부전, 치매, 알츠하이머 및 골다공증으로 이루어진 군에서 선택된 질환 치료를 위한 것을 특징으로 하는 혈관내피세포 장애유발 동물모델의 제조방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 심근경색, 협심증, 뇌졸중, 심부전, 치매, 알츠하이머, 골다공증 등과 같은 다양한 질환의 치료제 개발에 유용한 혈관내피세포 장애유발 동물모델의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 최근의 호모시스테인과 관련한 연구에 따르면, 호모시스테인은 심혈관계 질병 위험인자로서 잘 알려져 있으며, 단일 형태로서 위험인자가 아닌 호모시스테인과 관련된 다양한 형태의 호모시스테인을 포함하는 의미로 알려져 있다.

<3> 총 호모시스테인(Total-homocysteine; tHcy)이 생체 내에서 존재하는 구성비를 살펴보면, 단일 형태의 호모시스테인의 경우 약 1%(0.1 μM) 정도로만 존재하는 반면, 그 외에 존재하는 tHcy은 호모시스테인이 서로 다이설파이드(disulfide bond) 결합된 형태와 단백질에 포함된 시스테인이 호모시스테인과 다이설파이드 결합된 형태이다.

<4> 그리고 호모시스테인-싸이올락톤(homocysteine-thiolactone; HTL)과 같은 유사체 형태로서 혈액 속에 대부분 존재한다. HTL은 메티오닌(methionine)의 대사과정 중 발생하는 아미노산으로, 황(sulfur)을 포함하는 링 구조로

이루어져 있다.

<5> 혈장으로부터 증가된 tHcy 수준은 심혈관계 질환과 뇌졸중에 밀접한 관련이 보고된 사례가 있으며, 퇴행성 신경계통에 관련된 치매와 알츠하이머병 역시 관련이 있음이 알려져 있다. 이러한 현상은 tHcy과 사람의 질병사이에서 복합적인 메커니즘으로 인하여 발생하고 있을 것으로 판단되고 있다.

<6> 그 외에도 혈중 호모시스테인과 골다공증 사이의 상관관계가 있음이 추가적으로 알려져 질병의 위험인자로서 많은 분야에서 주목을 끌고 있다. Hcy은 생체 (*in vivo*) 및 실험실내 실험 (*in vitro*)을 통하여 강력한 활성 산소족 (reactive oxygen species, ROS)을 발생시키는 물질로서 알려져 있다.

<7> 이와 같은 ROS가 증가하는 주변 환경에서 발생되는 혈관내피세포로부터의 세포사멸과 내피세포 손상의 원인물질들은 고혈압, 흡연, 심장질환 등과 함께 호모시스테인이 주요한 위험 인자로 알려져 있다.

<8> 혈관내피세포의 기능성 장애가 발생하는 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않았지만, 증가된 다양한 외부 인자에 의해서 혈관내피세포의 세포사멸(apoptosis)이 유도 되고 내피세포의 수축, 확장기능을 할 수 없는 상태가 된 것으로 예상된다.

<9> 혈관내피세포는 혈액과 조직 사이에서 매우 중요한 역할을 수행하고 있다. 혈전의 형성을 방해하고, 지질단백질의 대사와 혈관의 수축과 이완을 조절하는 기능을 갖고 있으며, 면역 반응에도 어느 정도의 역할을 함으로써 항상성을 유지하는데 매우 중요하다.

<10> 이러한 혈관내피세포가 손상되면 손상 부위에서 혈소판의 유치(adhesion)와 응집(aggregation)이 매우 빨리 발생하면서 동시에 혈액 응고 과정이 활성화된다. 혈관내피세포의 장애는 결과적으로 혈액 응고와 섬유소 용해에 관여하는 세포들의 기능 변화를 가져와 결국은 동맥경화와 함께 동맥에서 혈전 형성이 일어난다.

<11> tHcy과 관련된 혈관내피세포의 여러 가지 해부학적, 기능적인 이상이 다양하게 보고된 바 있으며, 이는 동맥경화증이 혈관내피세포의 기능장애의 결과로 발생한다는 점에서 매우 중요한 의미를 가지고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<12> 이에, 본 발명자는 호모시스테인-싸이올락톤을 혈관내피세포에 직접 주입하고, 배양한 후 야기되는 혈관내피세포의 기능이상을 MTT 분석으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<13> 따라서, 본 발명의 목적은 여러가지 질병을 유발하는 인자로 알려진 호모시스테인 싸이올락톤을 이용한 혈관내피세포 장애유발 동물모델의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

<14> 또한, 본 발명의 다른 목적은 혈관내피세포 장애유발 동물모델을 이용하여 심근경색, 뇌졸중 등 다양한 질환의 치료제를 개발하는 데에 있다.

과제 해결수단

<15> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<16> 호모시스테인-싸이올락톤을 인산완충액에 용해시켜 용액으로 제조하는 단계;

<17> 혈관내피세포를 배양하는 단계; 및

<18> 상기 혈관내피세포 배양액에 상기 호모시스테인-싸이올락톤 용액을 접종하는 단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 혈관내피세포 장애유발 동물모델의 제조방법을 제공한다.

<19> 또한, 본 발명은 상기 호모시스테인-싸이올락톤 용액 첨가 후, MTT 분석을 이용하여 세포사멸을 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

<20> 상기 혈관내피세포는 $NaHCO_3$, HEPES, FBS 및 항생제를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 22시간 내지 24시간 동안 배양되는 것이 바람직하며, 이때 상기 범위를 벗어나 과도하게 배양되면 배지상의 pH 변화로 인한 세포의 괴사와 활성에 대한 문제가 야기될 수 있는 반면, 배양시간이 부족하면 세포밀도부족 문제가 야기될 수 있다.

<21> 또한, 상기 혈관내피세포 배양액에 호모시스테인-싸이올락톤 용액을 0.1 내지 10 mM의 농도로 접종하는 것이 바람직하며, 이때 상기 범위를 벗어나 고농도로 접종하면 생존율이 50% 이하로 나타나는 문제가 야기될 수 있는

반면, 저농도로 접종하면 세포사멸을 발생시킬 수 없는 문제가 야기될 수 있다.

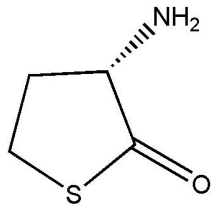
<22> 또한, 본 발명에 따른 동물모델을 이용하면 심근경색, 협심증, 뇌졸중, 심부전, 치매, 알츠하이머 및 골다공증으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 질환을 치료하거나 예방하는 물질을 개발할 수 있다.

<23> 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

<24> 먼저, 호모시스테인-싸이올락톤(HTL)의 제조단계(S110)는 pH 7 내지 7.4의 인산완충액(PBS)에 HTL을 용해시켜 제조한다.

<25> 상기 HTL은 하기 화학식 1과 같이 황(S)을 함유하고 있으며, 메티오닌 대사에서 발생하는 아미노산으로, 분자량이 153.6g/mole이고, 산성조건일 때 Hcy으로 환원되는 특징이 있으며, 반면에 중성조건일 때 벤젠 링 구조를 형성하는 것으로 알려져 있다.

화학식 1

<26> 

<27> 일반적으로, HTL은 화학 구조적으로 안정성을 기하기 위하여 시약에 HCl이 포함되어 있으며, 물에 용해하면 pH가 산성으로 나타나고 환원이 쉽게 되면서 안정적이지 않은 문제가 있어 안정적인 구조로 유지하는 것이 중요하다.

<28> 따라서, 본 발명에서는 상기 PBS로서 137mM의 NaCl, 2mM의 KCl 및 10mM의 인산완충액으로 구성된 것을 사용하며, pH를 7 내지 7.4로 유지한다.

<29> 상기 PBS에 용해된 HTL은 인산완충액의 pH 보정에 의해서 중성으로 pH를 유지할 수 있기 때문에, 24시간 동안 37℃에 보관하더라도 환원율이 5% 이하인 것으로 확인된다.

<30> 또한, 혈관내피세포 배양단계(S120)는 다음의 방법으로 배양한다.

<31> 소 혈관내피세포 배양용 기본배지(5%의 L-글루탐산이 첨가된 RPMI 1640배지: 25mM $NaHCO_3$, 25mM HEPES, 열처리된 FBS 10%, 항생제 1%)에 소 혈관내피세포(Calf Pulmonary Artery Endothelial cell; CPAE)의 배양액을 1% 접종하여, 37℃에서 24시간 동안 배양한다. 이때 배양된 세포 수는 $1X10^4$개인 것이 바람직하다.

<32> 또한, 준비된 혈관내피세포 배양액에 0.1 내지 10mM의 HTL 용액을 접종하여 세포사멸을 유도한다(S130).

<33> 마지막으로, HTL 용액을 접종한 배양액을 96well에 분주하고, PBS에 녹인 MTT 시약(2mg/ml)을 이용하여 4시간에 걸쳐서 염색을 한 후, UV-분광기(540nm 영역)에서 발색정도를 비교하여 세포 생존율을 확인함으로써 세포사멸 효과를 확인한다(S140).

<34> 본 발명에 따라 배양된 혈관내피세포 기능성 장애유발 동물모델을 이용하여 혈관내피세포를 연구할 수 있고, 또한 혈관내피세포 장애로 인해 야기되는 질환들, 예를들어 심근경색, 협심증, 뇌졸중, 심부전, 치매, 알츠하이머, 골다공증 등과 같은 질환들에 대한 치료물질을 개발할 수 있다.

효 과

<35> 본 발명에 따라 제조되는 혈관내피세포 장애유발 동물모델을 이용하면 심근경색, 협심증, 뇌졸중, 심부전, 치매, 알츠하이머, 골다공증 등과 같은 다양한 질환의 치료제를 검색하고 개발할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<36> 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 하기에 제시한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<37> **<실시예 1>**

<38> 황을 함유한 아미노산인 호모시스테인 싸이올락톤(HTL)을 PBS(phosphate buffered saline)에 넣고 완전히 용해될 때까지 교반시켰다. 이때, 사용된 PBS는 137mM의 NaCl, 2mM의 KCl 및 10mM의 인산완충액으로 구성되며, pH 7.4였다.

<39> 그리고, HTL의 농도를 0.1, 1, 5 및 10mM로 나누어 균일하게 녹이고 테스트튜브에 넣어 준비하였고, 4℃의 냉장고에 보관하여 사용하였다.

<40> 이렇게 준비된 HTL 용액의 안정성을 TLC, UV-visible 흡수스펙트럼 및 DTNB 분석을 통하여 확인하였고, 각각 도 2 내지 도 4에 도시된 바와 같이 HTL의 환원율이 5% 이하로 확인되었다.

<41> 소 혈관내피세포 배양용 기본배지(5%의 L-글루탐산이 첨가된 RPMI 1640배지: 25mM $NaHCO_3$, 25mM HEPES, 열처리된 FBS 10%, 항생제 1%)에 소 혈관내피세포(Calf Pulmonary Artery Endothelial cell; CPAE)의 배양액을 1% 접종하여, 37℃의 CO_2 환경에서 24시간 동안 배양하였다(도 5 참조).

<42> 이때 배양되는 세포의 수를 측정하여 1ml 당 $1X10^4$개를 유지하도록 하였다.

<43> 준비된 HTL 용액을 0.1 내지 10mM의 다양한 농도로 상기 배양된 혈관내피세포에 주입한 후 24시간 동안 다시 배양하였다(도 6 및 도 7 참조).

<44> 상기 배양된 세포를 96웰 플레이트에 옮기고, PBS에 용해된 MTT 시약(2mg/ml)으로 4시간 동안 염색하였다(도 8 참조).

<45> 상기 염색에 의한 발색정도를 UV-분광기(540nm 영역)에서 검토한 결과, 도 9에 도시된 바와 같이 HTL 주입군이 HTL을 주입하지 않은 대조군에 비해 50% 이하의 세포 생존율을 나타내었고, 따라서 HTL의 세포사멸 효과를 확인할 수 있었다.

<46> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다.

<47> 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

<48> 도 1은 본 발명에 따른 혈관내피세포 장애유발 동물모델 제조방법에 관한 모식도이고,

<49> 도 2 내지 도 4는 각각 호모시스테인-싸이올락톤(HTL)의 환원정도를 분석한 TLC 분석사진, UV-visible 흡수스펙트럼 및 DTNB 분석 스펙트럼이고,

<50> 도 5는 배양된 소 혈관내피세포의 위상차 전자현미경 사진이고,

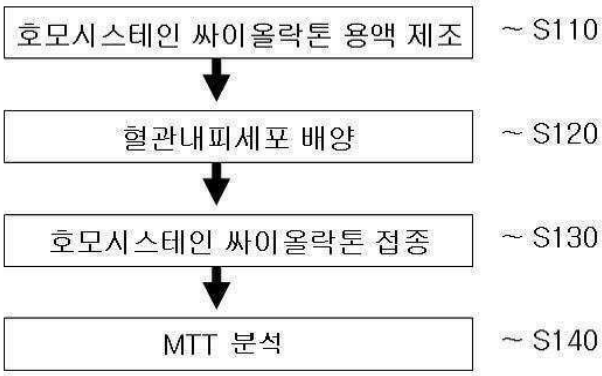
<51> 도 6 및 도 7은 각각 0.1mM 및 10mM의 호모시스테인-싸이올락톤이 첨가되어 24시간 배양된 소 혈관내피세포의 배양사진이고,

<52> 도 8는 MTT 시약을 첨가하여 발색된 혈관내피세포의 사진이고,

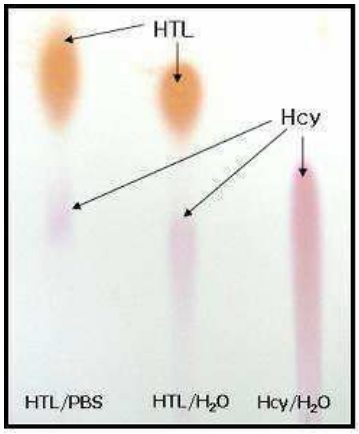
<53> 도 9는 소 혈관내피세포의 생존율을 MTT 분석한 것이다.

도면

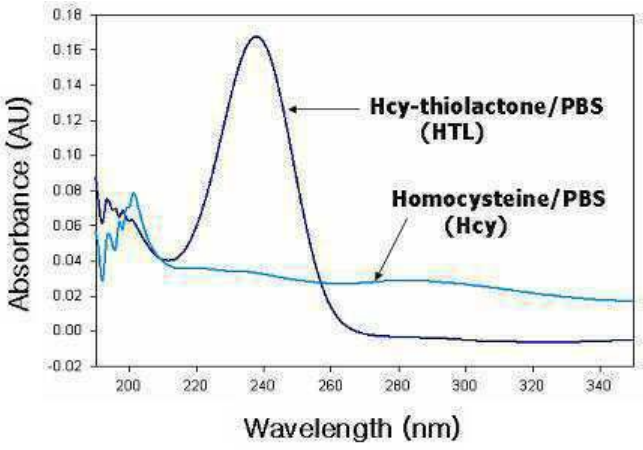
도면1



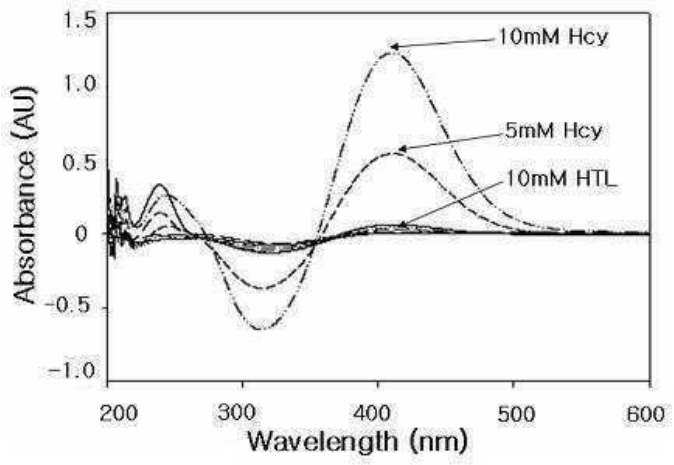
도면2



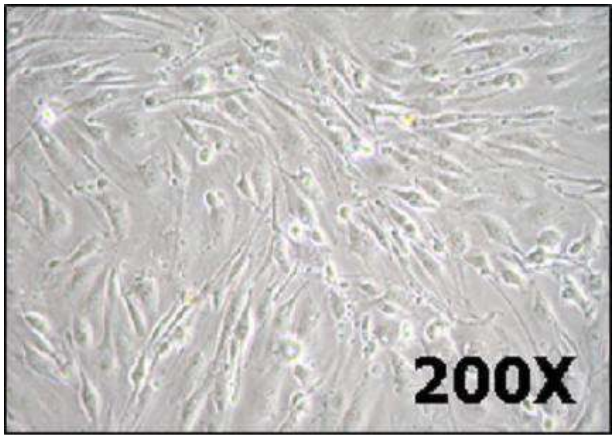
도면3



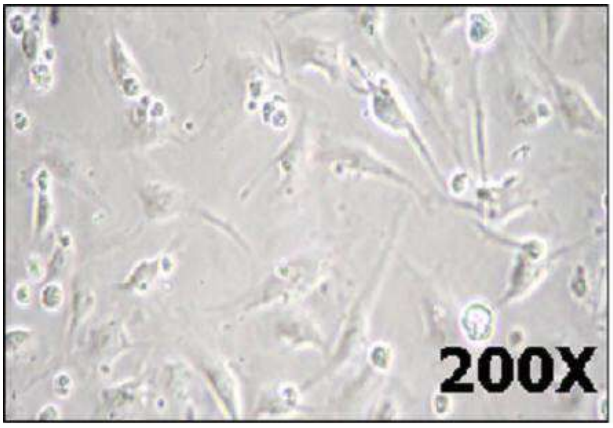
도면4


1.5
1.0
0.5
0
-0.5
-1.0
Absorbance (AU)
200
300
400
500
600
Wavelength (nm)
10mM Hcy
5mM Hcy
10mM HTL

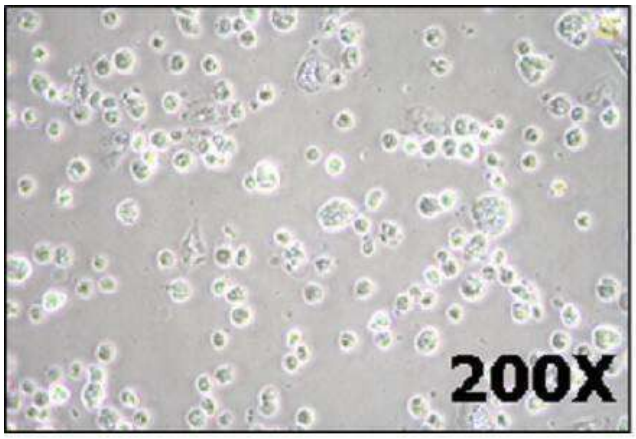
도면5


200X

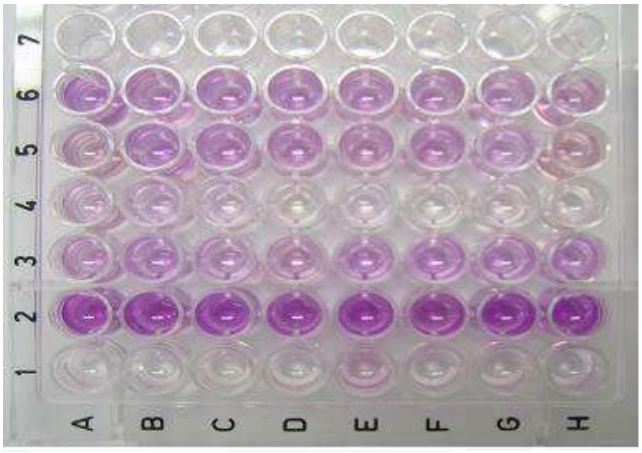
도면6


200X

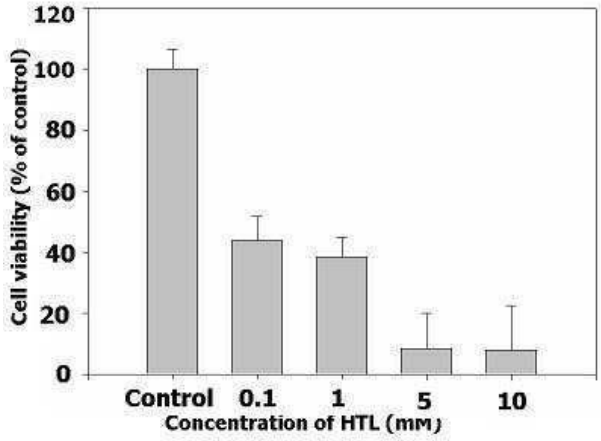
도면7


200X

도면8


1
2
3
4
5
6
7
A
B
C
D
E
F
G
H

도면9


120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (% of control)
Control
0.1
1
5
10
Concentration of HTL (mM)