



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월20일
(11) 등록번호 10-1343383
(24) 등록일자 2013년12월13일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12Q 1/02</i> (2006.01) <i>C12Q 1/00</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/48</i> (2006.01) <i>G01N 33/569</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2013-0075786</p> <p>(22) 출원일자 2013년06월28일
 심사청구일자 2013년06월28일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
 Infect Immun., Vol. 80, No. 11, Pages 3804-3811 (2012.11.)
 BMC Cancer, Vol. 8, No. 229, Pages 1-30 (2008.08.11.)</p> | <p>(73) 특허권자
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 송창화
 대전광역시 동구 용전동 신동아아파트 2동 501호
 최지애
 강원도 인제군 상남면 자포대길 399-38
 김용민
 대전시 유성구 도룡동 삼성빌리지 203호</p> <p>(74) 대리인
 김원준</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 5 항

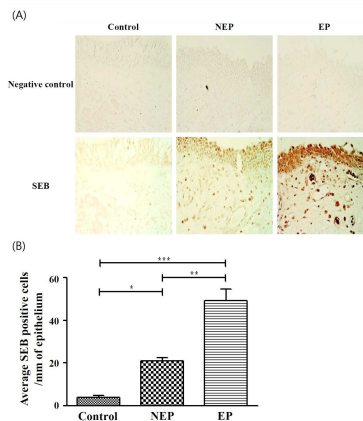
심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 소포체 스트레스를 유도하는 포도상구균 장독소 B 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 포도상구균 장독소 B(*Staphylococcus aureus* enterotoxin B, SEB)를 포함하는 소포체 스트레스 유도용 또는 활성산소종(ROS) 생성용 시약 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 폴립을 동반하는 만성부비동염의 진단을 위한 환자의 코 점막 시료에서 포도상구균 장독소 B의 분석 방법과 폴립을 동반하는 만성부비동염의 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120005764
 부처명 미래창조부
 연구사업명 선도연구센터지원사업
 연구과제명 감염신호네트워크응용연구센터
 기 여 율 1/2
 주관기관 충남대학교
 연구기간 2012.03.01 ~ 2015.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-1598
 부처명 교육과학기술부
 연구사업명 중견연구자지원사업
 연구과제명 큰포식세포의 항결핵 작동기능을 조절하는 결핵단백의 동정과 기전분석
 기 여 율 1/2
 주관기관 충남대학교
 연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

포도상구균 장독소 B(*Staphylococcus aureus enterotoxin B*, SEB)를 포함하는 소포체 스트레스 유도용 시약 조성물.

청구항 2

포도상구균 장독소 B를 포함하는 활성산소종(ROS) 생성용 시약 조성물.

청구항 3

폴립을 동반하는 만성 부비동염 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 환자의 코 점막 조직 시료로부터 포도상구균 장독소 B의 양을 측정하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

추가적으로 환자의 코 점막 조직 시료로부터 활성산소종의 양을 측정하는 방법.

청구항 5

코 점막 조직에서 포도상구균 장독소 B의 양을 저하시키거나 이로 인한 소포체 스트레스를 저해하는 그람양성 항균제, 포도상구균 장독소 B 저해제 또는 소포체 스트레스 저해제를 유효성분으로 하는 폴립을 동반하는 만성 부비동염 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 6

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 소포체 스트레스를 유도하는 포도상구균 장독소 B(*Staphylococcus aureus enterotoxin B*, SEB) 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 흔히 축농증이라 불리는 만성 부비동염(Chronic rhinosinusitis, CRS)는 부비동이 제대로 환기 및 배설되지 않아 이차적으로 부비동에 염증이 발생하고, 농성 분비물이 고이면서 염증이 심해지는 복잡한 염증성 질환이다. 만성 부비동염은 폴립(polyp)의 유무에 따라 폴립을 동반하는 만성 부비동염(CRSwNP, CRS with nasal polyps)과 폴립을 동반하지 않는 만성 부비동염(CRSsNP, CRS without nasal polyps)로 나뉜다. 폴립은 비강 내에 발견되는 양성 종양의 한 종류로 부어오른 점막의 변성으로 유래된다고 추정되며, 알레르기 천식, 아스피린 과민성, 전신 면역질환, 낭성 섬유증 등과 동반되는 경우가 많이 있다. 일반적으로 CRSwNP 환자는 CRSsNP 환자들에 비해

더욱 광범위한 부비동 감염을 보이는 경향이 있다. 폴립은 통상 외과적 수술에 의해 제거하는데, 최근 내시경에 의한 수술의 도입으로 인해 과거에 비해서는 수술이 간단해졌다고는 하지만, 비강으로부터 상당량의 조직을 제거하기 때문에 출혈 및 수술 후 통증 및 흉터를 유발하며 추가적인 외과의 방문을 요구하므로 환자에게는 여전히 불편하고 번거로운 치료과정을 거쳐야 한다.

[0003] 몇몇 연구에서는 만성 부비동염에서 포도상구균 장독소(*Staphylococcus aureus* exotoxins, SEs)와 같은 박테리아의 생성물과 박테리아의 콜로니형성이 연루되어 있다고 이야기하고 있다. 포도상구균 장독소로는 포도상구균 장독소 A(SEA), SEC1-C3, SED, 포도상구균 장독소 B(SEB)가 알려져 있다. 이들은 슈퍼항원으로써의 역할을 하며 과도한 염증반응을 동반하며 T세포를 활성화 시킨다. 포도상구균의 독소 중 SEB는 nasal polyp의 형성과정의 병인기전에 관계되어있다는 보고가 존재한다.

[0004] 최근 연구에서는 CRSwNP 환자의 상피세포가 점막염증과 산화적 스트레스를 유도하는 중요한 역할 수행하며 많은 염증성 사이토카인과 매개인자들을 분비한다고 밝혔다. 통상 중요한 염증성, 스트레스 신호체계는 소포체와 관계되어 있다. 소포체는 모든 진핵세포에 존재하는 필수적인 세포소기관으로서 신생 단백질의 당화, 이황화결합뿐 아니라 단백질의 수정과 접합의 기능을 담당하며 지질이나 스테롤의 합성장소로서의 역할도 수행한다. 또한 소포체는 세포 내 칼슘 저장소로서 소포체 내의 높은 칼슘 이온의 농도는 신생 단백질의 접합과 이황화결합 형성과 같은 소포체 기능에 필수적이다. 소포체 스트레스란 단백질 접합에 대한 소포체의 처리 능력과 축적되는 미접합 단백질 양 사이의 불균형으로 인한 소포체 기능의 항상성 파괴를 감지하고 반응하는 것을 일컫는다. 발생한 소포체 스트레스는 소포체 샤페론 단백질의 발현을 유도하여 소포체의 기능 향상, 소포체 내 미접합 단백질 축적의 감소 등과 같이 세포 내 스트레스 요인들을 제거하여 세포 소기관의 부담을 덜어 생존에 유리하게 작동한다.

[0005] 소포체 스트레스가 미접합 단백질 반응(UPR)을 활성화시키는 것은 세 가지 소포체 샤페론 단백질, protein kinase PKR-like ER kinase (PERK), inositol requiring 1 (IRE 1), activating transcription factor 6 (ATF6)을 통해 수행된다. 세포에 대한 강한 스트레스가 지속되어 소포체의 기능이 손상되면 전체를 보호하기 위해 세포자멸사가 유도되어 손상된 세포를 제거하게 된다.

[0006] 이와 같이 소포체 스트레스 반응은 다양한 세포성 스트레스에서 소포체 기능을 보존하여 세포를 보호하기 위한 중요한 보상 기전이지만, 최근에는 잘못된 신호전달 시스템으로 인하여 과도한 소포체 스트레스 반응이 유발되는 것으로 인하여 야기되는 질병들이 있다는 것이 알려지고 있다. 즉, 소포체 스트레스 반응은 특히 단백질을 합성하여 분비하는 기능이 활발한 형질세포, 췌장의 베타세포, 간세포, 조골세포와 같은 곳에서 잘 관찰되고 있으며, 신경퇴화질환 (neurodegenerative disease), 양극성 장애(bipolar disorder), 당뇨병 (diabetes mellitus), 동맥경화증 (atherosclerosis), 염증 (inflammation), 국소빈혈 (ischemia), 심장병 (heart diseases), 간질환 (liver diseases), 췌장 질환 (kidney diseases), 암(cancer) 등과 같은 여러 가지 질환의 병인으로 작용함을 보여 주고 있다. 따라서, 소포체 스트레스의 완화에 의하면 상기와 같은 소포체 스트레스 관련 질환의 발생을 예방하고 치료를 할 수 있을 것으로 제시되고 있다(특허문헌 1). 이를 위해서는 인위적으로 소포체 스트레스를 유발한 후, 이에 대한 완화효과를 갖는 물질을 스크리닝하는 것이 필요하다. 그러나 소포체 스트레스반응 기전에 대해서는 알려지지 않은 부분이 많아 이에 대한 연구가 부족한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제1002163호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명에서는 CRSwNP의 병인성에 있어 SEB가 소포체 스트레스의 연관성을 확인함으로써, SEB가 소포체 스트레스를 유발하며, 같은 질병의 환자들을 대상으로 SEB가 진단적 마커로서의 역할과 소포체 스트레스를 유도하는

SEB에 대한 치료적 타겟을 규명하였다.

- [0009] 본 발명은 소포체 스트레스를 유발하는 시약 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 소포체 스트레스와 연관된 활성산소종(ROS) 생성을 유도하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 CRSwNP 환자 또는 잠재 환자의 진단 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 또한 본 발명은 CRSwNP 환자에 대한 외과적인 수술 이외의 치료방법을 위한 치료 타겟을 제공하기 위한 것이며 CRSwNP로 진행될 수 있는 잠재적 환자를 위한 폴립형성 예방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 포도상구균 장독소 B(*Staphylococcus aureus enterotoxin B*, SEB)를 포함하는 소포체 스트레스 유도용 시약 조성물에 관한 것이다.
- [0014] SEB는 활성산소종의 생성을 통해 소포체 스트레스를 유도하므로, 본 발명의 SEB를 포함하는 조성물은 활성산소종(ROS) 생성용 시약으로 사용될 수 있다.
- [0015] SEB는 폴립을 동반하는 만성 부비동염(CRSwNP)의 진단 마커로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 다른 양태는 폴립을 동반하는 만성 부비동염(CRSwNP) 진단에 관한 것이다. 환자의 코 점막 조직 시료로부터 SEB의 양을 측정하여 정상 조직에 비해 발현이 상향 조절되었다면 환자가 CRSwNP를 동반함을 알 수 있다. 혹은 폴립을 동반하지 않는 환자의 경우에도 CRSwNP로 진행할 가능성이 높은 잠재환자임을 진단할 수 있다. 부가적으로 코 점막 조직 시료에서 활성산소종을 측정하면 더욱 확실한 진단을 내릴 수 있다. 즉, 환자의 코 점막 조직에서 정상 조직보다 활성산소종이 증가하였다면 CRSwNP를 동반하거나 CRSwNP로 진행할 가능성이 높음을 알 수 있다. 환자의 코 점막 조직 시료는 통상의 조직 시료 채취 방법에 의할 수 있으며, 인체에 일시적인 영향만을 미치므로 본 진단방법은 산업상 이용가능성이 인정되는 방법에 해당한다.
- [0016] SEB는 또한 CRSwNP의 치료 타겟으로 이용될 수 있다. 즉, 코 점막 조직에서 포도상구균 장독소 B의 양을 저하시키거나 이로 인한 소포체 스트레스를 저해하는 조성물에 의해 CRSwNP를 치료하거나, CRSwNP로의 진행을 예방할 수 있다. 상기 조성물의 구체적인 예로는 그람양성 항균제나, 포도상구균 장독소 B의 중화항체 또는 4-PBA 등과 같은 소포체 스트레스 저해제를 예로 들 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 이상과 같이 본 발명의 시약 조성물에 의하면 소포체 스트레스 유발 및 활성산소종 생성에 유용하므로 소포체 스트레스와 관련된 질병의 연구 뿐 아니라 예방 및 치료제의 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0018] 또한 본 발명의 CRSwNP 진단을 위한 분석 방법은 SEB를 진단 마커로 하여 현재 CRSwNP로 진행된 환자 뿐 아니라 CRSwNP로 진행될 잠재 환자를 효과적으로 판별할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 약학 조성물에 의하면 또한 외과적 수술에 의하지 않고도 CRSwNP 환자를 효과적으로 치료할 수 있으며, CRSwNP에 비해 더욱 광범위한 부비동 감염을 보이는 CRSwNP로의 진행을 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 CRSwNP 환자의 폴립 조직에서 SEB의 발현 정도를 보여주는 현미경 사진 및 그래프.
- 도 2는 상피세포주에서 SEB 처리 시간에 따른 소포체 스트레스 관련 단백질의 발현 증가를 보여주는 전기영동 사진 및 그래프.
- 도 3은 상피세포주에서 SEB 처리 농도에 따른 소포체 스트레스 관련 단백질의 발현 증가를 보여주는 전기영동 사진 및 그래프.
- 도 4는 활성산소종 저해제의 전처리에 의해 SEB로 자극된 상피세포주에서 소포체 스트레스 관련 단백질의 발현이 감소함을 보여주는 전기영동 사진 및 그래프.

도 5는 CRSwNP 환자의 폴립 조직에서 활성산소종의 증가를 보여주는 현미경 사진.

도 6은 CRSwNP 환자의 폴립 조직에서 소포체 스트레스 관련 단백질의 발현 증가를 보여주는 전기영동 사진 및 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하 첨부된 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.

[0022] 실시예

[0023] 실시예 1 : 만성 부비동염 환자의 폴립 조직에서 SEB 발현 측정

[0024] SEB와 만성 부비동염의 연관성을 확인하기 위하여 EP와 NEP 조직 절편 및 대조군인 정상 하위 갑개골 점막 조직에서 면역조직화학적 염색법에 의해 SEB 발현정도를 측정하였다.

[0025] 보다 구체적으로 23명의 CRSwNP 환자(34~78세, 평균 나이 45세)와 비중격 성형(septoplasty) 또는 코성형(rhinoseptoplasty) 환자 중 부비동염을 앓지 않는 10명의 대조군 환자를 대상으로 실험을 진행하였다. 부비강 질환은 병력, 임상검사, 내시경수술과 부비동의 컴퓨터 단층촬영을 기반으로 진단하였으며, 환자들은 알레르기 와 천식, 아스피린에 대한 민감성에 대한 병력은 갖지 않았다. 샘플 수집 전, 최근 기도 감염으로 4주 동안 경구용 혹은 나asal(nasal) 코르티코스테로이드(corticosteroids)나 항생제, 항 류코트리엔제와 같은 다른 약의 처방을 받은 환자나 검토중인 환자는 이 연구에서 제외하였다.

[0026] CRSwNP 환자로부터는 내시경 부비동 수술 중 폴립 샘플을 채취하였다. 채취한 샘플을 H&E stain하여 조직에 침투한 세포 중 산호성 백혈구(eosinophils)의 비율이 10%를 초과하는 폴립을 EP로 정의하고, 그렇지 않은 폴립을 NEP로 정의하였다. 총 13명의 EPs 환자와 10명의 NEPs환자가 조사되었다.

[0027] 대조군 피험자로부터는 하위 갑개골 점막(inferior turbinate mucosa)을 채취하여 샘플로 사용하였다.

[0028] 채취된 조직을 파라핀으로 고정한 후 박절하여 슬라이드에 부착시켰다. 이후 자일렌을 사용하여 파라핀을 제거해 주고 100%, 95%, and 70% 에탄올에 순차적으로 침지하여 조직 슬라이드를 제작하였다. 조직 슬라이드는 Decloaking Chamber (Biocare Medical, Concord, CA) 내에서 120°C로 가열하여 전처리하고, 비선택적 반응을 차단하기 위해 단백질 블로킹(1% fetal bovine serum (FBS) in phosphate buffered saline (PBS) and 0.3% Triton X-100 for 30 minutes)을 수행하였다. 내생의 과산화효소의 활성억제를 위해 조직 슬라이드는 1% H₂O₂가 포함된 PBS에서 20분 간 배양하였다. 1차 항체로 rabbit anti-SEB antibody(Abcam, Cambridge, MA, USA)를 1:100의 비율로 상온에서 반응시키고, PBS로 행구어 2차 항체인 goat anti-rabbit-IgG-HRP (Cell signaling)와 반응시켰다. 음성대조군은 1차 항체 대신 PBS를 처리하여 준비하였다.

[0029] 이후 슬라이드를 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하고, SEB와 GRP78에 양성반응을 갖는 세포 수를 조직의 각기 다른 세 부분에서 high-powered field(HPF, × 400)로 계수한 후 유의차를 계산하여 도 1에 나타내었다.

[0030] 도 1의 (A)는 형광현미경 사진이며, (B)는 부비동 조직 단위 면적당 SEB 양성을 나타내는 세포의 수에 대한 그래프이다. 도 1로부터 대조군에 비해 폴립 조직에서 SEB 발현 세포의 수가 증가한 것을 확인할 수 있으며, 특히 EP 상피세포층에서 발현이 현저히 증가한 것을 알 수 있었다.

[0031] 실시예 2 : 상피세포주에서 SEB에 의한 소포체 스트레스 유발 검증

[0033] SEB를 List Biological Laboratories INC(Campbell, CA, USA)로부터 제공받아 사람의 코 상피세포주인 RPMI 2650(KCLB 10030, Korea)을 자극하고 소포체 스트레스 관련 유전자인 GRP 78, p-eIF2α 및 IRE1α의 발현정도를 측정하여 SEB에 의한 소포체 스트레스의 유발 여부를 검증하였다.

- [0034] 1) SEB 자극에 의한 소포체 스트레스 관련 단백질 발현 측정
- [0035] RPMI 2650는 75-cm² culture flasks 및 10% FBS와 페니실린(100 IU/ml), 스트렙토마이신(100 µg/ml), 1% L-글루타민이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Lonza, Walkersville, MD, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건배양기에서 배양하였다. 이후, 12 well polypropylene tissue culture plate에 1×10⁵ cell/well의 수로 분주하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 부착시켰다. 부착된 세포를 하기 각 실험에 기재된 농도의 SEB로 자극하였다. 양성대조군으로는 Tunicamycin(TM, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 2µg/ml의 농도로 첨가한 실험군을 사용하였다.
- [0036] 배양하여 얻어진 세포에 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5% sodium deoxycholate, 2 mM sodium fluoride, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail이 포함된 방사능 면역침강 분석 완충액(radio-immunoprecipitation assay buffer)를 가하여 용해하였다. 이후 4℃, 13,000 rpm에서 10분 간 원심분리한 후, 상층의 단백질을 수집하고 bradford 시약을 이용하여 단백질 양을 30 µg 또는 100 µg으로 정량하였다. 이를 100℃에서 15분간 가열한 후, 12% SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel 상에서 전기영동을 수행하였다. 이 SDS-PAGE gel은 polyvinyl difluoride membrane에 전이를 수행하였으며, 5% non-fat skim milk가 포함된 tris-buffered saline tween(TBS-T; 20 mM tris, 137 mM sodium chloride, 0.1% tween-20, pH 8.0)으로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체반응은 anti-GRP78, anti-phospho (Ser-51)-eIF2α, anti-IRE1α antibody (Cell Signaling)를 4℃에서 18시간 동안 반응시켰다. 2차 항체반응은 horseradish peroxidase가 표지된 anti-rabbit IgG (Cell signaling, CA, USA) 항체와 anti-mouse IgG (Calbiochem, San Diego, CA, USA)를 5% skim milk가 포함된 TBS-T로 2,000배 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 단백질 발현 밴드 ECL (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) 용액으로 X-ray 필름에 감광시켜 검출하였다.
- [0037] 도 2는 1µg/ml의 SEB를 첨가한 후 배양 시간에 따른 웨스턴 블롯의 전기영동 사진 및 정량 그래프이다. GRP 78과 p-eIF2α의 발현 정도는 SEB의 자극에 의해 시간에 의존적으로 증가하였다. SEB 자극에 의해 IRE1α의 발현 역시 증가하였으며 3시간 처리 시 최대 발현량을 나타내었다.
- [0038] 도 3은 SEB의 6시간 처리하였을 때 처리 농도에 따른 웨스턴 블롯의 전기영동 사진 및 정량 그래프이다. 도 3에서 GRP 78과 p-eIF2α의 발현은 SEB의 농도 의존적으로 증가하였다.
- [0039] 상기 결과로부터 SEB가 소포체 스트레스를 유발하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0040] 2) 활성산소종 저해제 처리 후 SEB 자극에 의한 소포체 스트레스 관련 단백질 발현 측정
- [0041] SEB로 RPMI 2650 세포를 자극하기 전에 활성산소종 저해제인 N-acetyl-L-cysteine(NAC, Calbiochem, San Diego, CA, USA)을 0.2mM의 농도로 1시간 처리한 것을 제외하고는 상기 실시예 2의 1)과 동일한 방법에 의해 RPMI 2650를 배양하고 SEB로 자극한 후 소포체 스트레스 관련 단백질의 발현을 측정하였다. SEB의 처리농도는 1µg/ml이며, 처리시간은 6시간이었다.
- [0042] 도 4는 웨스턴 블롯의 전기영동 사진 및 정량 그래프로, TM은 양성대조군인 Tunicamycin 처리군이고, UN은 NAC 및 SEB를 처리하지 않은 음성대조군을 나타낸다. 도 4에서 GRP 78, p-eIF2α의 발현은 모두 활성산소종 저해제의 전처리에 의해 현저히 감소하였다. 이로부터 소포체 스트레스는 SEB 자극에 의해 생성된 활성산소종에 의해 야기됨을 확인할 수 있었다.
- [0043] **실시예 3 : 만성부비동염 환자의 폴립 조직에서 소포체 스트레스의 측정**
- [0044] 1) 만성 부비동염 환자의 폴립 조직에서 활성산소종(ROS)의 생성 측정
- [0045] 만성 부비동염 환자의 폴립의 발달과 활성산소종 생성의 연관을 확인하기 위하여 실시예 1에서 얻은 폴립 조직에서의 활성산소종을 dihydroethidium(DHE, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 분석법[J. Exp. Med. 204 583-594 (2007), Cell Microbiology 10 741-754 (2007)]을 이용하여 형광현미경으로 측정하고 그 결과를 도 5

의 사진에 나타내었다. 별도로 세포의 핵을 DAPI 염색을 통해 나타낸 후 도 5에 함께 도시하였다. 대조군인 정상 점막 조직에 비해 NEP에서는 약간의 활성산소 생성의 증가가 있었으나, EP 조직에서는 확연한 증가를 확인할 수 있었다.

[0046] 2) 만성 부비동염 환자의 폴립 조직에서 소포체 스트레스 관련 단백질 발현 측정

[0047] 실시예 1에서 얻은 만성 부비동염 환자의 폴립 조직에 대해 rabbit anti-GRP78 antibody(Cell Signaling)를 1차 항체로 사용한 것을 제외하고는 실시예 1 및 실시예 2의 2)와 동일한 방법에 의해 소포체 스트레스 관련 단백질의 발현을 정량하고 그 결과를 도 6에 도시하였다.

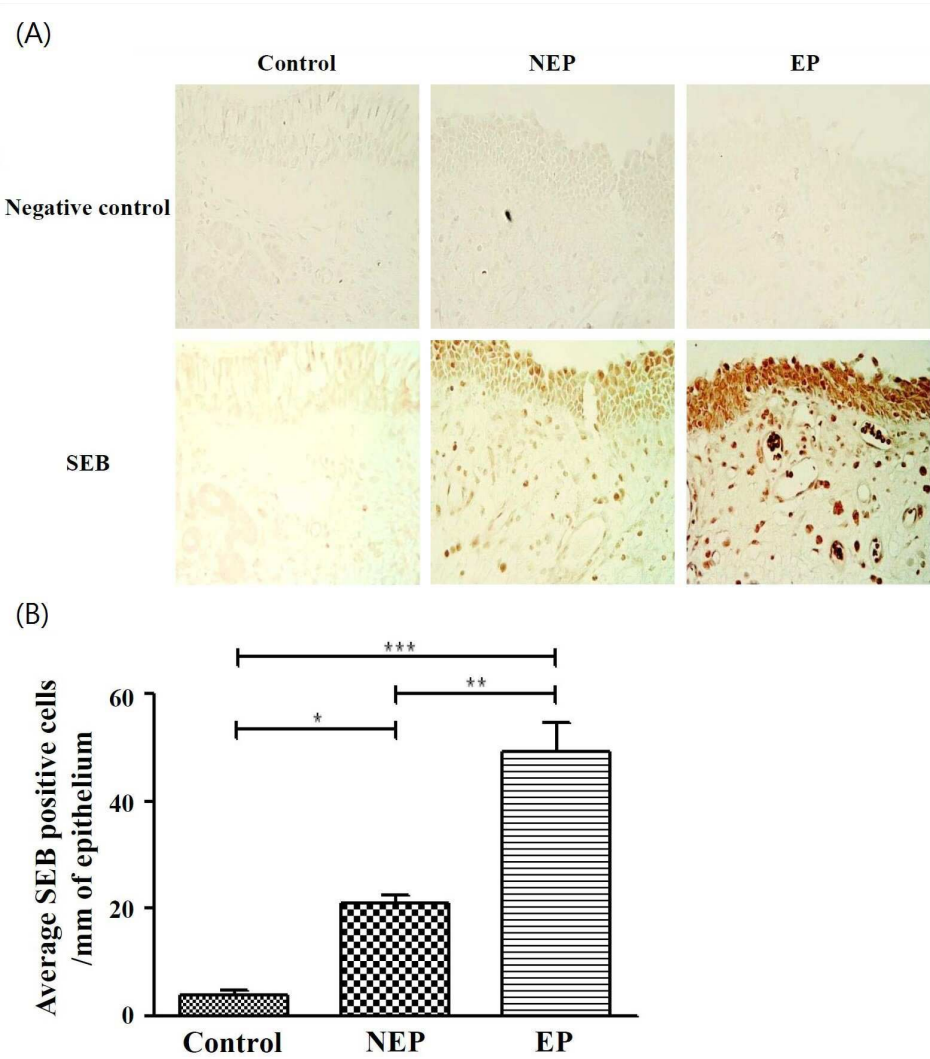
[0048] 도 6의 (A)는 각 조직에 대한 면역조직화학적 염색 사진 및 정량 결과로, 정상 점막조직이나 EP 조직에 비해 NEP 조직에서 GRP78의 발현이 크게 증가한 것을 알 수 있다. 도 6의 (B)는 웨스턴 블롯팅에 의한 전기영동 사진과 정량 결과로 면역조직화학적 염색 결과와 마찬가지로 EP 조직에서 정상 조직이나 NEP 조직에 비해 GRP78의 발현이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0049] **통계적 분석(StatisticalAnalyses)**

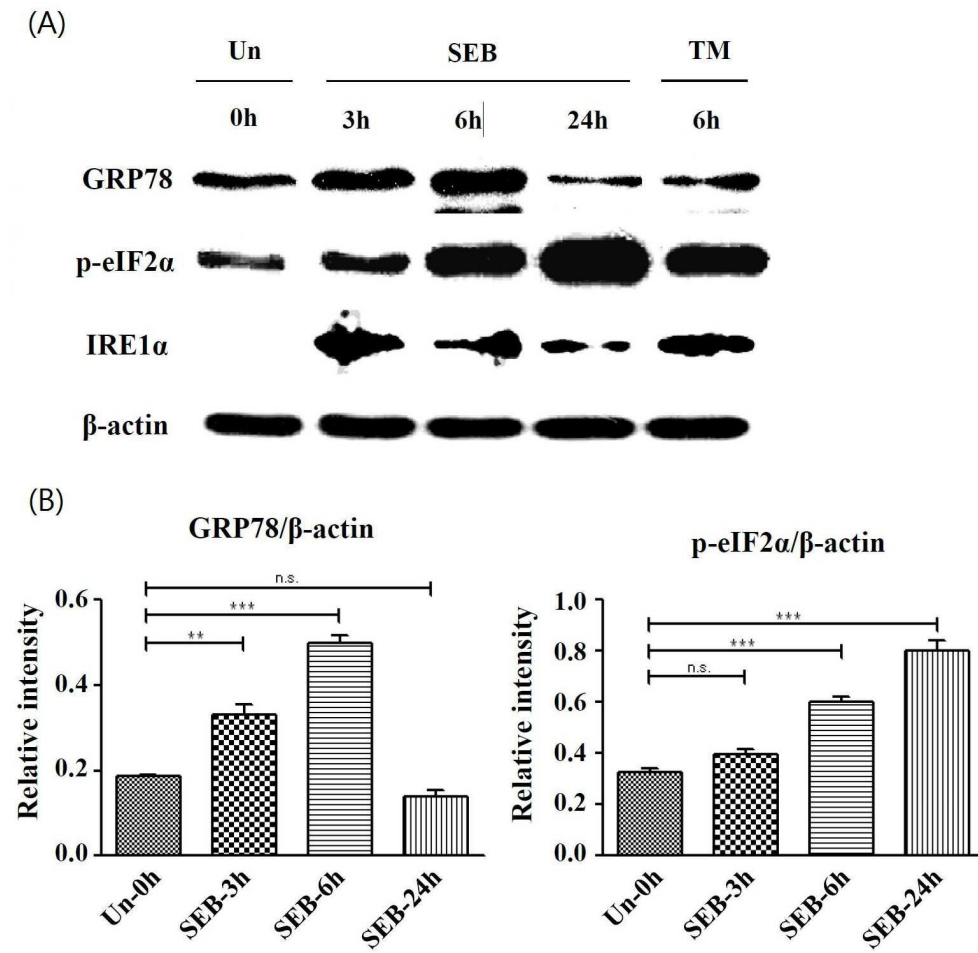
[0050] 상기 실시예에서 모든 통계적 분석은 GraphPad Prism 5(GraphPad, Inc, San Diego, CA)을 사용하였으며, A one-way ANOVA followed by Tukey's test의 A one-way ANOVA를 이용해 세 그룹간의 유의한 차이를 나타내었다.

도면

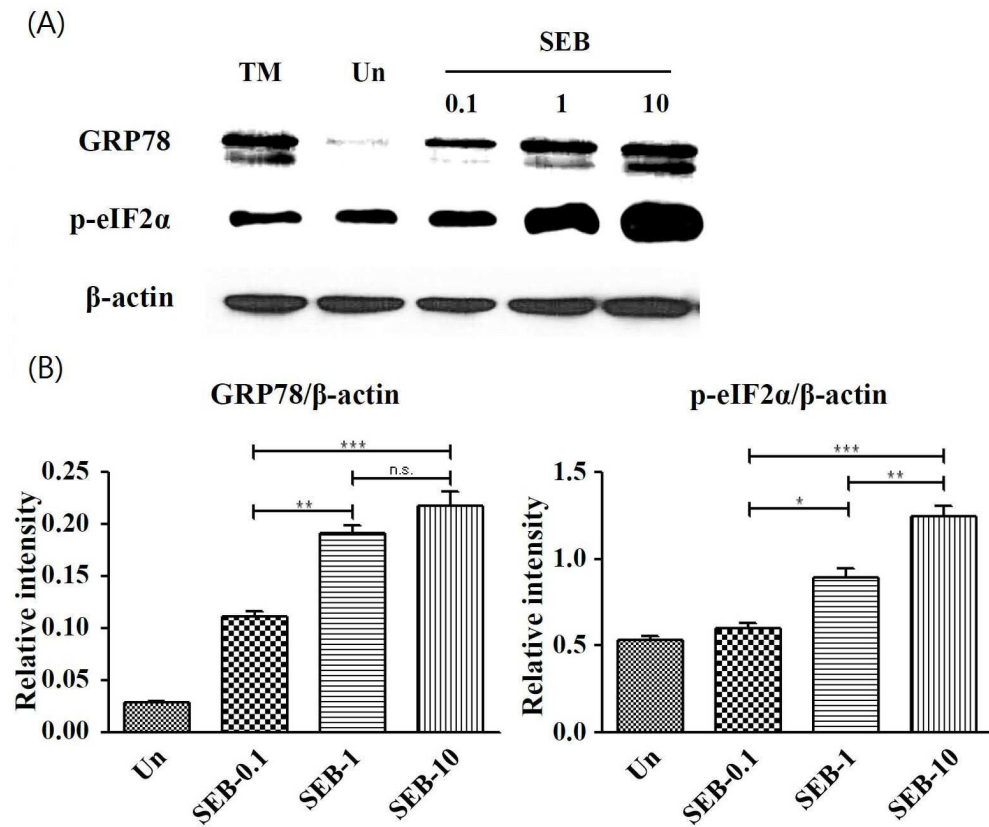
도면1



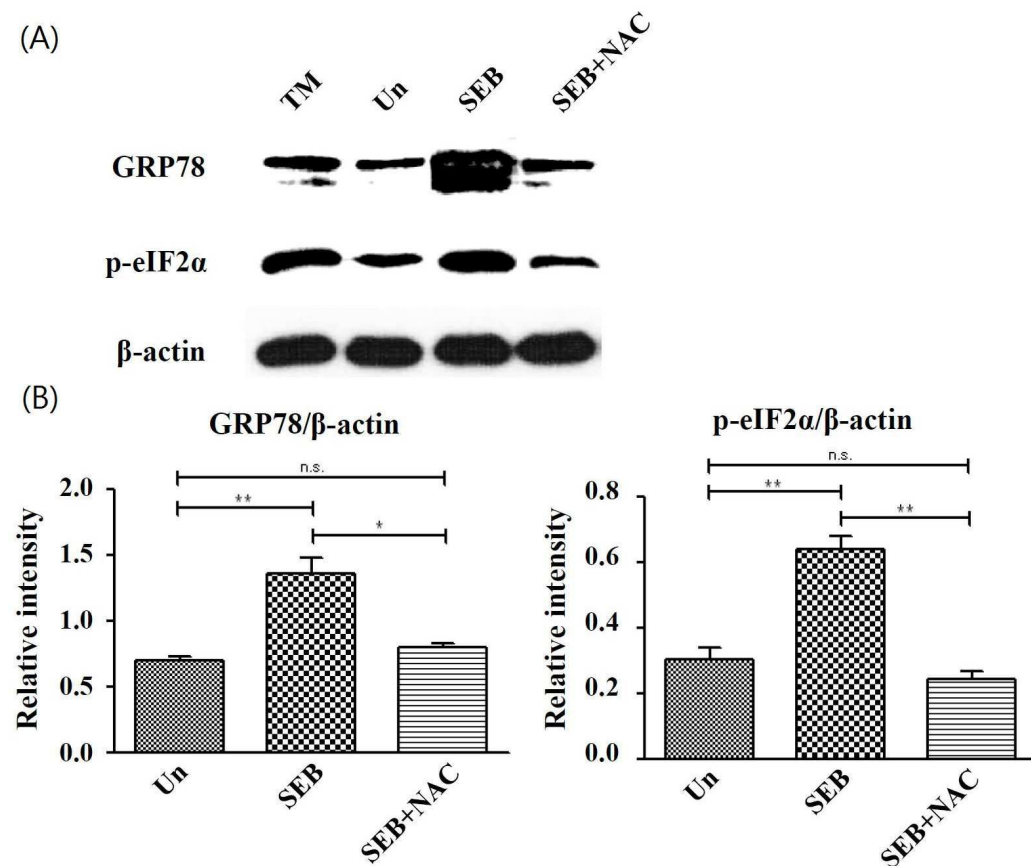
도면2



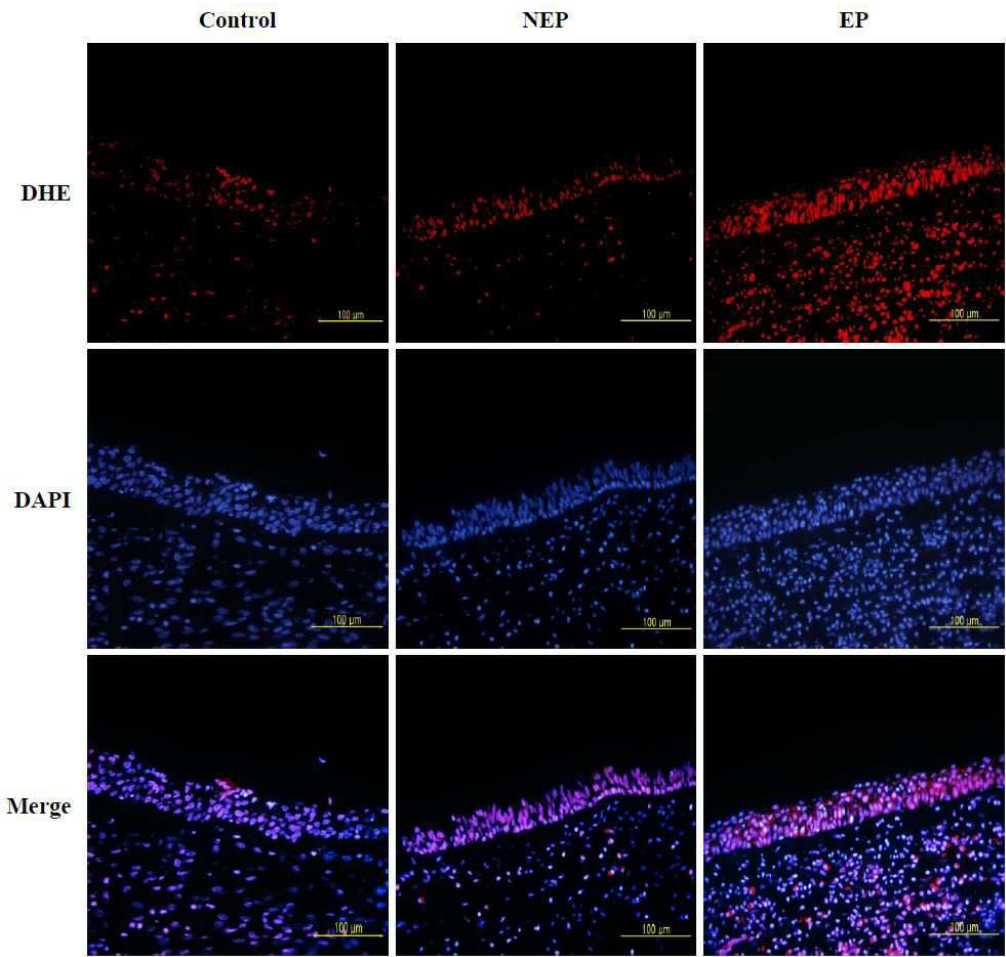
도면3



도면4



도면5



도면6

