



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0035120
(43) 공개일자 2011년04월06일

(51) Int. Cl.

C12N 5/02 (2006.01) *C12N 5/07* (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2009-0092686

(22) 출원일자 2009년09월29일

심사청구일자 2009년09월29일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

강다원

경상남도 진주시 가좌동 주공그린빌아파트 106동 1503호

한재희

경상남도 진주시 초전동 805 현대아파트 101동 201호

(74) 대리인

손민

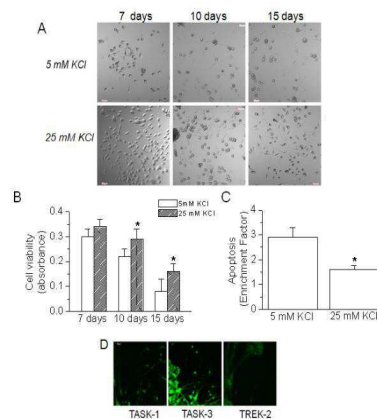
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 고농도의 칼륨을 포함하는 체외 세포 배양용 조성물

(57) 요약

본 발명은 세포의 체외 배양 시 세포자멸사를 억제하기 위한 조성물에 관한 것으로서, 상세하게는 고농도의 칼륨을 포함하는 세포자멸사 억제용 배지 조성물, 상기 조성물 및 항산화제를 포함하는 배지 조성물, 상기 조성물과 항산화제 및 동결 보호제를 포함하는 배지 조성물, 및 상기 배지 조성물들을 이용하여 체외 배양 세포의 세포자멸사를 억제하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20080101-080-057-001-01-00/R01-2007-00020746-0/KRF

부처명 농촌진흥청/교육과학기술부/교육부

연구관리전문기관

연구사업명 현장협력기술개발/기초과학연구사업(특정기초연구사업)/중점연구소

연구과제명 이온통로 역할규명을 통한 한우 번식장애 대처기술 개발/상처치유 촉진물질 개발 연구 :
포타슘 통로 조절에 의한 상처 치유 기전 규명/신경조직 손상과 이온항상성

기여율

주관기관 경상대학교/경상대학교/경상대학교

연구기간 2008년 01월 01일 ~ 2008년 12월 31일/2008년 09월 01일 ~ 2009년 08월 31일/2008년 09월
01일 ~ 2009년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

10mM 내지 50mM의 칼륨을 포함하는 세포자멸사 억제용 배지 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 칼륨의 농도는 20mM 내지 25mM인 배지 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물에 항산화제를 추가로 포함하는 배지 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항산화제는 베타-머캅토에탄올(β -mercaptoethanol, β -ME) 또는 글루타치온(glutathione)인 배지 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 조성물에 동결 보존제를 추가로 포함하는 배지 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 동결 보존제는 EFS 용액인 배지 조성물.

청구항 7

제1항, 제3항 또는 제5항의 배지 조성물을 이용하여 체외 배양 세포의 세포자멸사를 억제하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 배지 조성물의 칼륨 농도는 20mM 내지 25mM인 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 세포의 체외 배양 시 세포자멸사를 억제하기 위한 조성물에 관한 것으로서, 상세하게는 고농도의 칼륨을 포함하는 세포자멸사 억제용 배지 조성물, 상기 조성물 및 항산화제를 포함하는 배지 조성물, 상기 조성물과 항산화제 및 동결 보호제를 포함하는 배지 조성물, 및 상기 배지 조성물들을 이용하여 체외 배양 세포의 세포자멸사를 억제하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 살아있는 세포는 생리 기능이나 생물학적 활성을 띠며, 고정된 세포와는 달리 생리 활동을 실시간으로 연구할 수 있다는 점에서 그 활용 가치가 매우 크다. 그럼에도 불구하고, 개체로부터 분리된 세포는 분리된 후 얼마 지나지 않아 본연의 생리학적 기능 또는 생물학적 활성이 소실되어 연구가 불가능한 난점이 존재하여 왔다.

[0003] 따라서 이러한 세포를 그대로 동결하여 보존한 후, 연구 수행을 위해 이를 용해시키는 방법에 대한 다양한 연구가 이루어졌으며, 세포막 투과형 동결 보존제로서 DMSO(dimethyl sulfoxide), 에틸렌 글라이콜(ethylene glycol) 또는 글리세롤(glycerol)등을 이용하거나, 세포막 비투과형 동결 보존제로서 폴리비닐 피롤리돈 등을 이용하여 동결 보존하는 방법이 이용되어 왔다. 그러나 이러한 동결 보존제를 고농도로 처리하는 경우 세포에 대해 독성을 나타내는 것으로 보고되었으며, 배양을 수행해야 하는 세포의 경우 동결 보존제에 의해 세포의 증식이 저해되어, 미리 세포로부터 동결 보존제를 제거해야만 하는 한계점이 따랐다. 또한 동결 보존은 고가의 냉동 장치를 반드시 필요로 하며, 동결 후 용해하는 과정을 반드시 거쳐야 하므로 연구자들에게 불편함이 제기되었을 뿐만 아니라, 세포 중에는 동결 보존하는 경우가 불가능한 경우도 있어, 살아있는 세포를 보존 및 연구하

기 위한 세포 배양 및 보존에 있어서 새로운 방법이 요구되고 있다.

[0004] 이러한 요구에 따라 독성을 나타내지 않는 물질을 함유하는 세포 보존액으로 다당류의 레반 또는 레반 올리고당을 함유하는 보존액, 1-케스토스를 함유하는 유효성분으로 함유하는 보존액, 트레할로스 및 매트릭스 단백질 충전재 및 다당류 완충액을 함유한 조성물 또는 항산화 작용을 갖는 폴리페놀을 포함하는 보존액(국제공개공보 등에 대해 개발된 바 있으며, 물 및 알콜에 킬레이트를 부가한 용액 내 세포를 현탁 시키는 경우, 37도에서 약 3 주간 세포를 보호할 수 있는 기술에 대해서도 개시된 바 있다.

[0005] 그러나 상기 방법들은 여전히 세포 생리 기능을 유지하는 작용이 부족하고, 제제학적으로 불안정할 뿐만 아니라, 배양액을 제조하기 위해 고가의 화합물이 필요하다는 점에서 여전히 한계점이 존재하여 왔다.

[0006] 이에 본 발명자들은 세포를 체외 배양함에 있어서, 세포의 세포자멸사를 억제함으로써 체외 배양되고 있는 세포의 생존능을 증가시킬 수 있는 배양 조성물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 고농도의 칼륨을 포함하는 배양 조성물을 첨가하는 것만으로 상기 목적을 달성할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 10mM 내지 50mM의 칼륨을 포함하는 세포자멸사(apoptosis) 억제용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 배지 조성물을 이용하여 체외 배양 세포의 세포자멸사를 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0009] 따라서 하나의 양태로서 본 발명은 10mM 내지 50mM의 칼륨을 포함하는 세포자멸사(apoptosis) 억제용 배지 조성물에 관한 것이다.

[0010] 칼륨은 세포 내 산-염기의 평형 조절, 수분 조절, 신경 조절 및 신경 기능의 보존, 혈관 확장, 혈압 유지 및 뇌의 산소 공급 작용에 관여하는 원소로서, 칼슘과 함께 신경 전달의 자극과 근육의 수축 작용에 필수적인 성분이다. 이러한 칼륨은 세포 내 화학반응에 필수 성분인 동시에 영양물질의 세포벽 통과를 조절하는 것으로 알려져 있으며, 생체 내 생명활동에 필수적인 원소이다.

[0011] 대부분의 세포의 막은 칼륨 채널을 가지고 있는데, 이들 칼륨 채널을 통한 칼륨의 이동은 흥분성 조직의 정상적인 기능 유지에 매우 중요하다. 세포막을 통한 칼륨 농도 경사가 안정막 전압을 결정하며, 칼륨의 이동은 세포 분화, 호르몬 분비, 신경전달물질 분비 및 세포자멸사와 같은 세포 내에서 일어나는 다양한 생리적 기능에 관여한다. 특히, 하나의 칼륨이 이동할 때 8개의 물 분자가 동반된다고 알려져 있으며, 신체에 존재하는 칼륨의 대부분은 세포 내 액에 존재하는데, 세포 내 칼륨농도는 150 mEq/L, 세포 외 칼륨농도는 4.5 mEq/L 되기 때문에 칼륨의 이동방향은 세포 바깥쪽을 향한다. 따라서 칼륨 분포를 변화시키는 병적상태가 발생하면 세포들은 위축(shrinkage)되며 세포자멸사 현상을 맞이하게 되므로, 세포자멸사를 유발시키는 주요한 원인으로 작용할 수 있다. 세포자멸사 초기에 나타나는 세포의 위축은 세포의 용적이 감소된 상태를 말하는 것으로 활성화된 이온 채널(ion channel)들이 관여하며 일반적으로 세포자멸사 초래 자극 후, 1 내지 4 시간 이내에 발생된다. 이러한 현상은 전형적인 세포자멸사의 양상인 시토크롬 C(Cytochromes C) 방출, 사립체 막 전압 소실, 캐스페이즈(caspase) 활성화, DNA 분절과 같은 다른 생물학적 변화보다 앞서 발생된다. 세포자멸사성 세포용적 감소(apoptotic volume decrease, AVD) 현상이 발생된 후 증가된 단백분해능은 뉴클레오타이드 분절을 유도하는 중요한 현상이며, 세포자멸사를 유도하는 자극에 의해 외인성 경로와 내인성 경로로 나뉘어 세포를 사멸시킨다.

따라서 세포자멸사의 초기신호인 세포용적감소를 억제하는 경우 세포 자멸사로부터 자유로울 것이라는 점에 착안하여, 각각의 세포에 적합한 배양액에 고농도의 칼륨을 첨가함으로써 부분적으로 세포자멸사를 억제시킬 수 있을 것이라는 가설을 세우고, 본 발명의 조성물을 세포 체외 배양시 처리한 결과 효과적인 세포자멸사 억제능이 나타남을 확인하였다.

[0012] 또한 칼륨 이온을 공급하기 위하여 세포 배양 시 3 내지 5mM 의 농도로 첨가하는 것이 일반적임에 반해, 본 발명의 조성물은 고농도의 칼륨을 포함하는 것을 특징으로 한다. 종래에 알려진 배양액은 이러한 고농도의 칼륨에 대해 개시한 바 없고, 칼륨의 농도를 기재하고 있는 경우라도, 나트륨의 농도와 함께 상대적인 비율로 결정되어 온 것이 불과하였으며, 구체적으로 나트륨 이온의 몰 농도가 칼륨 이온이 몰 농도에 비하여 동등하거나 커야 하는 조건을 부가하고 있었다. 그러나 본 발명에서는 10mM 이상 바람직하게는 20mM 이상의 고농도로 칼륨을 포함하는 배양을 위한 조성물을 사용하는 경우, 배양되는 세포의 생존능을 증가시킴을 확인하였으며, 이러한 칼륨의 농도는 나트륨의 농도와는 독립적으로 결정될 수 있다.

[0013] 본 발명의 고농도의 칼륨을 포함하는 조성물에 있어서 칼륨 이온을 공급할 수 있는 공급원은, 세포의 배양에 있어서 성장을 저해하거나 독성을 유발하지 않는 공급원이라면 제한되지 않으며, 통상의 칼륨 공급 물질이 제한 없이 사용될 수 있다. 바람직하게 칼륨 이온을 포함하는 칼륨 공급원은 염화칼륨(KCl) 또는 질산칼륨(KNO₃)일 수 있으나, 상기 예에 의해 공급 가능한 칼륨의 형태가 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 염화칼륨의 농도가 20mM 또는 25mM 이 되도록 하여 세포 배양액으로 공급하였다.

[0014] 본 발명의 고농도의 칼륨과 함께 공급될 수 있는 배지는 배양하고자 하는 세포의 종류에 따라 통상적으로 이용되는 배양 배지 또는 배양액을 제한 없이 사용할 수 있다. 특정 세포를 배양하기 위하여 필요한 필수 구성 요소를 포함하는 배지 및 해당 배지의 구성 성분은 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 발명의 체외로 분리된 세포의 배양을 위한 배지는 이러한 통상적인 배지에 추가적으로 고농도의 칼륨을 포함하는 조성물을 첨가함으로써 달성될 수 있다. 당업계에서 사용되는 배지의 예를 들면, 소뇌과립세포의 경우에는 Neurobasal medium을 이용할 수 있고, 각질형성세포 또는 피부섬유아세포의 경우에는 DMEM(Eagle's minimal essential medium) 배지를 사용할 수 있다.

[0015] 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 세포의 종류는 제한되지 않으나, 바람직하게 인간의 체외 배양세포 또는 소의 체외 배양세포의 세포자멸사를 억제하는데 유용하다.

[0016] 본 발명에서의 용어, “세포자멸사(apoptosis)”란 세포가 유전자에 의해 제어되어 사멸하는 방법 중 하나로서, 세포사멸 또는 자가사멸 등으로도 명명되며, 세포의 괴사(necrosis)와는 구별된다. 세포자멸사는 이상이 생긴 세포를 제거하는 일을 수행하며, 괴사와는 달리 능동적인 사멸과정을 취한다. 다세포생물에서 유전자 발현에 의한 세포의 세포자멸사는 발생과 항상성 유지를 위한 필수적 과정이다. 이 과정에서 세포 유전자의 조각화(fragmentation)와 세포의 수축(shrinkage) 등이 일어나며, 조각난 세포 유전자는 세포질에 싸여 작은 포낭 형태로 식세포활동에 의해 제거(phagocytosis)된다. 따라서 세포자멸사는 세포괴사(necrosis)와는 달리 염증반응을 일으키지 않으며, 일반적으로 정상적인 생명활동과는 다른 환경에 노출되는 경우 이를 감지하여 세포 스스로 세포자멸사 경로를 취할 수 있는 세포 내 프로그래밍된 과정이다. 예를 들면 암 세포에 있어서 세포자멸사가 수행되는 것으로 알려져 있으며, 세포 집단의 일부 또는 단세포가 체외로 노출되는 경우에도, 정상적인 생명활동을 수행하지 못하고 세포자멸사의 경로에 진입하게 된다. 바람직하게 본 발명은 이러한 체외 노출된 세포에 있어서 세포자멸사를 최소화하기 위한 배양액 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 고농도의 칼륨을 포함하는 배양액 조성물을 이용하는 경우, 세포자멸사 활성이 억제되어 체외에서의 세포 생존 기간이 길어짐을 확인하였다. 구체적으로 이러한 세포자멸사 억제 작용은 대부분의 세포에 존재하는 이온의 이동 통로를 조절함으로써 달성될 수 있으며, 특히 본원 발명의 조성물인 고 농도 칼륨 조건을 유지하는 경우, 세포 내 칼륨 채널을 통한 칼륨의 세포외 이동을 저해함으로써 세포의 체적 변화를 감소시켜 세포자멸사를 막을 수 있음을 확인하였다.

- [0017] 바람직하게 본 발명의 칼륨 농도는 일반적으로 세포 배양시 사용되는 농도(3 내지 5 mM)이상의 칼륨 농도를 가지며, 더욱 바람직하게 10 mM 내지 50mM일 수 있고, 보다 바람직하게는 20mM 내지 25mM 일 수 있다. 칼륨의 농도가 5 mM 이상 또는 10mM 이하인 경우는 일반적인 생리학적 고농도의 칼륨농도로서, 생체 내에서처럼 다양한 종류의 칼륨채널 조절에 의한 보상현상이 나타날 수 있으므로 본 발명의 목적을 달성하기 어렵다. 그러나 10 내지 50 mM 칼륨 농도는 약리학적 고농도로서 체외에서 수행되는 실험에 사용될 수 있다. 바람직하게 20 mM 이상의 칼륨농도는 칼륨채널이 열리는 것을 차단시키는 역할을 충분히 수행할 수 있다. 그러나 50 mM을 초과하는 칼륨농도는 세포에 대한 독성 때문에 본 발명에 사용하기 부적합하다(막전압을 탈분극시키기 위해서만 사용하는 농도임). 따라서 10 mM 이하 또는 50 mM 이상의 칼륨용액은 세포자멸사 억제 조절을 확인하기에 부적합하며, 본 발명의 목적을 달성하기 위한 농도는 10 내지 50mM, 더욱 바람직하게는 20 내지 25mM 이다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 20mM 또는 25mM의 칼륨 배양액을 포함하는 배지 조성물을 체외 세포 배양에 사용하는 경우, 장기간 배양 시 일반 농도(5mM 칼륨)에 처리한 대조군에 비해 살아있는 세포의 숫자가 많음을 확인하였으며, 이러한 효과는 배양시간이 길어질수록 현저함을 확인하였다(도 1). 아울러 이러한 고농도의 칼륨을 세포에 처리하는 경우에도 세포에 독성을 유발하지 않음을 확인하였다.
- [0018] 다른 하나의 양태로서 본 발명은 10mM 내지 50mM의 칼륨을 포함하는 배지 조성물 및 항산화제를 포함하는 세포 자멸사 억제용 배지 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명의 조성물은 체외 배양되는 세포의 세포자멸사를 억제하는 한편, 이들의 생존능을 증가시키기 위하여 본 발명의 고농도의 칼륨을 포함하는 배지 조성물에 추가적으로 항산화제를 포함할 수 있으며, 상기 항산화제를 추가로 포함하는 조성물을 이용하는 경우 고농도의 칼륨만을 이용하는 경우에 비하여 세포자멸사 억제능이 현저하게 증가함을 확인하였다(도 5). 종래에는 세포의 체외 배양 기간을 증가시키기 위해 새로운 어느 한 가지의 기능을 갖는 화합물질을 처리함으로써, 배양기간을 증가시키고자 하는 시도가 있었으나, 이와 같이 종래에 알려진 두 물질 중 배양을 최적화하기 위한 특정 두 물질을 병용 처리하는 방법에 대해서는 알려진 바 없다. 나아가 상기기와 같은 병용 처리에 있어서 물질 선택의 최적성 뿐만 아니라, 이전에 전혀 사용하지 않던 범위의 농도를 처리함으로써 체외 배양 세포의 세포자멸사 억제능이 현저히 향상된다는 사실도 본 발명에서 최초로 규명하였다. 본 발명에서는 상기와 같은 고농도의 칼륨을 처리할 뿐만 아니라, 상기 배양액에 바람직한 항산화제를 최적의 농도로 처리함으로써 기존의 배양시간 및 고농도의 칼륨을 처리한 경우의 배양시간 보다 현저하게 증가한 배양 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [0020] 현재, 세포의 체외배양 시 활성산소(reactive oxygen species, ROS)에 의해 발생하는 세포자멸사를 항산화제를 이용하여 억제하려는 많은 연구들이 수행되고 있다. 특히, 수정란의 체외배양은 난관 내보다 높은 농도의 산소에 세포가 노출되기 때문에 과량의 활성산소가 발생되고, 이들 유리산소기(oxygen free radical)들은 산화 스트레스를 초래하여 미토콘드리아의 호흡억제작용, 세포막의 유동성 감소, 각종 효소의 불활성화 및 DNA와 RNA의 손상을 초래하는 등 난포란의 성숙 및 체외발달을 저해하는 것으로 알려져 있다. 본 발명은 상기 수정란과 같이 세포의 증식 또는 분화에 있어서 발생하는 활성 산소를 제거함으로써 세포 생존 시간을 증가시키고 ROS로 인해 사멸하는 세포를 감소시키기 위한 조성물을 제공한다.
- [0021] 이전의 연구에 있어서, 세포자멸사 억제에 있어서 항산화제의 사용은 많은 연구자들이 응용하고 있음에도 이를 이용한 조성의 변화와 연계한 항산화제의 사용 즉, 조절된 칼륨 농도, 특히 고농도의 칼륨 용액과 병용 처리함으로써 세포자멸사를 억제할 수 있음을 제안하지 못하였다. 본 발명에서는 고농도의 칼륨용액으로 세포자멸사의 초기현상을 억제하는 한편, 이에 항산화제를 병용 첨가하여 세포자멸사에 따른 세포내 변화들을 동시에 억제함으로써, 상승적인 효과를 유도하였다. 특히, 동결 후 나타나는 세포막 주변의 세포자멸사는 이온 채널 조절 및 막단백질 변화 조절을 요구하는데, 항산화제 및 고농도 칼륨은 단독 사용하는 경우보다 이를 병용 처리하는 경우 세포막 및 세포내의 변화를 복합적으로 조절함으로써 각각을 단독 처리하는 경우에 예상할 수 없었던 세포 자멸사 억제 기능을 효과적 수행할 수 있음을 확인하였다.
- [0022] 본 발명에서 고농도의 칼륨 배양액에 추가될 수 있는 항산화제의 종류는 당업계에서 사용될 수 있는 통상적인 항산화제가 제한 없이 사용될 수 있으며, 그 예로 베타-머캅토에탄올(β -mercaptoethanol, β -ME), 글루타치온(Glutathione, GSH), 아스코르브산(ascorbic acid), 비타민 E, 베타카로틴, 라이코펜, 코엔자임 Q-10

(coenzyme Q-10), 셀레늄, 크롬 및 마그네슘 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명에서 사용 가능한 항산화제의 종류가 제한되는 것은 아니다. 바람직하게 항산화제는 β -ME 또는 글루타치온일 수 있으며, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 고농도의 칼륨 및 β -ME를 포함하는 배양액을 사용하여 증가된 세포자멸사 억제능 및 세포 생존능 증가 활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0023] 또한 본 발명에서 사용되는 항산화제의 종류는 배양되는 세포의 종류 및 양, 사용되는 칼륨의 농도, 기본 배지 또는 기본 배양액의 종류에 따라 당업자에 의해 적절한 농도로 결정될 수 있으며, 본 발명자들이 실험한 결과 바람직한 농도는 20 내지 30 μ M 로 설정될 수 있음을 확인하였다. 보다 상세하게 본 발명의 바람직한 실시예에서는 β -ME를 25 μ M 로 하여 배양을 수행한 결과, 세포자멸사를 억제하는 한편, 세포 생존을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0024] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 10mM 내지 50mM의 칼륨을 포함하는 배지 조성물, 항산화제 및 동결 보존제를 포함하는 세포자멸사 억제용 배지 조성물에 관한 것이다.

[0025] 본 발명의 조성물은 체외 배양되는 세포의 세포자멸사를 억제하는 한편, 이들의 생존능을 증가시키기 위하여 본 발명의 고농도의 칼륨을 포함하는 배지 조성물 및 항산화제 외에 추가적으로 동결보존제를 포함할 수 있다.

[0026] 세포는 세포의 장기간 보관 및 취급을 용이하게 하기 위하여 필요에 따라 잉여의 세포를 동결 보존할 수 있다. 이러한 동결 보존은 그 후 필요시에 세포를 용해하게 되는데, 용해된 세포는 생존하여 정상적으로 분열이 일어나기도 하지만 세포자멸사 현상이 나타나 더 이상의 분열이 나타나지 않기도 한다. 이와 같은 동결 및 용해 후 세포자멸사를 억제하기 위하여 다양한 동결 보존제가 개발되어 왔다. 따라서 본 발명에서는 동결 보존 및 용해 후에도 세포 생존능을 최대로 증가시키기 위하여, 고농도 칼륨 및 항산화제에, 동결에 필요한 동결 보존제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용 가능한 동결 보존제의 종류는 당업계에서 사용될 수 있는 통상적인 동결 보존제가 제한 없이 사용될 수 있으며, 그 예로 EFS 용액, EDS 용액 및 VS 용액 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명에서 사용 가능한 동결 보존제의 종류가 제한되는 것은 아니다. 바람직하게 동결 보존제는 FBS(fatal bovine serum), PBS, 에틸렌글라이콜(ethyleneglycol), 피콜(ficoll) 및 수크로스(sucrose)를 포함하는 용액을 포함하는 EFS 용액일 수 있다.

[0028] 또한 사용되는 동결 보존제의 종류 및 구성은 배양되는 세포의 종류 및 양, 사용되는 칼륨의 농도, 사용되는 항산화제의 농도, 기본 배지 또는 기본 배양액의 종류에 따라 당업자에 의해 적절하게 결정될 수 있으며, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 10% FBS를 포함하는 PBS에 40% (v/v) 에틸렌글라이콜(ethyleneglycol), 18% 피콜(ficoll) 70 및 0.3M 수크로스(sucrose)가 최종 농도가 되도록 혼합한 EFS 용액을 사용하여 동결 후 용해를 수행하였다. 그 결과, 동결 후 용해하여 사용하는 경우에도 높은 효율로 세포자멸사를 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0029] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 상기 배지 조성물을 이용하여 체외 배양 세포의 세포자멸사를 억제하는 방법에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 체외 배양 세포의 세포자멸사 억제 방법은 상기 기술한 조성물을 사용하여 수행될 수 있으며, 구체적으로는 통상적인 배양 배지 또는 배양 용액에 고농도의 칼륨 용액을 포함하는 조성물을 첨가함으로써 달성될 수 있다. 나아가 체외 배양 세포의 세포자멸사 억제 효과는 고농도의 칼륨을 포함하는 조성물 및 항산화제를 추가적으로 포함하는 조성물을 이용하여 달성될 수 있으며, 동결시킨 후 용해하여 사용하는 경우에 있어서도 높은 세포 생존률을 유지하기 위해서 상기 조성물 외에 추가적으로 동결 보존제를 추가적으로 포함함으로써 달성될 수 있다. 고농도의 칼륨을 포함하는 조성물, 항산화제 및 동결 보존제의 바람직한 종류, 농도 등에 대해서는 상기 기술한 바와 같으며, 본 발명의 조성물을 사용하는 경우 기존의 배양 배지만을 이용하여 체외 세포를 배양하

는 경우보다 높은 세포 자멸사억제능 및 세포 생존률을 가질 수 있다.

효 과

[0031] 본 발명의 고농도의 칼륨을 포함하는 세포 배양용 조성물을 사용하는 경우, 체외 배양의 경우에도 세포체적을 일정하게 유지시킬 수 있어 세포자멸사를 억제할 수 있으며, 이에 따라 세포자멸사 억제에 따른 세포의 생존기간 증가로 생체 및 체외실험의 횟수를 줄여 윤리적이고 경제적인 실험이 가능하다.

[0032] 또한 본 발명의 고농도 칼륨의 배양용 조성물을 이용하는 경우, 세포 배양 초기에 필요한 성장촉진인자와 같은 효과를 보임에 따라 세포의 초기배양 시 활용함으로써 더욱 큰 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0033] 실시예1. 고농도 칼륨에 의한 세포자멸사(apoptosis) 억제능 분석

[0034] 고농도 칼륨에 의한 세포자멸사 억제능 분석은 MTT, TUNEL 염색 및 ELISA 분석을 통하여 실시하였다.

[0035] (1-1) 세포배양

[0036] 6-7일령의 흰쥐로부터 분리된 소뇌과립세포를 Neurobasal 배양액 및 고농도의 칼륨이 포함된 배양액에서 배양하였다. 소뇌과립세포의 수를 계산하여 배양접시에 분주한 후 37℃, 5%의 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 배양하였으며, 2일마다 배양 상태를 확인하고 배양액을 교환하였다. 고농도 칼륨 효과를 확인하기 위하여 15일간 배양하였다.

[0037] (1-2) MTT 정량

[0038] 소뇌과립세포를 24 well 배양접시에 각 well당 200 μ l (2×10^4 cells/ml) 씩 넣고 37℃, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 24시간 배양하여 세포를 배양접시에 부착시킨 후 각각의 시약들을 처리한 후 1일-15일 동안 배양기에서 배양하였다. 배양 완료 후, 각 well에 PBS에 녹인 5 μ g/ml 농도의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma Co.)를 20 μ l씩 첨가 한 후, 150 rpm에서 5 분간 흔들어서 MTT를 잘 섞어준 뒤 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 완전히 제거한 후 DMSO (dimethylsulfoxide)를 각 well당 200 μ l씩 넣고 150 rpm에서 5분간 흔들어 형성된 포르마잔(formazan)을 잘 녹였다. 그 후 ELISA 리더 (ELISA reader) (Infinite F200, TECAN)로 MTT 흡광도를 조사하여 대조군과 비교하였다.

[0039]

[0040] (1-3) TUNEL 염색을 통한 세포자멸사 확인

[0041] 세포자멸사를 확인하기 위하여 in situ cell death detection kit (Roche, Germany)를 이용하여 TUNEL 염색을 실시하였다. 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 세포에 TUNEL 반응 혼합물(TUNEL reaction mixture)의 침투를 용이하게 하기 위해 삼투성(permeabilization) 용액을 30분간 처리하고 15분간 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 TUNEL 반응 혼합물 (TdT and Fluorescein-dUTP)을 처리하여 37℃에서 1 시간 동안 반응 시켰다. 이때 양성 대조군(positive control)은 DNase를 37℃에서 1시간 동안 처리 후 TUNEL 반응 혼합물로 반응 시키고, 음성 대조군(negative control)은 말단 트랜스퍼라제(terminal transferase)를 제외한 TUNEL 반응 혼합물로 반응 시켰다. 이 후 PBS로 15분간 3회 세척하였고 핵 염색을 위해 PI(propidium iodide) 염색을 수행하였다. 이후 세포를 wet mounting하여 형광현미경으로 세포자멸사를 관찰하였다.

[0042] (1-4) ELISA 분석을 통한 세포자멸사 확인

[0043] Cell death detection ELISA plus kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용하여 세포자멸사를 측정하였다. 소뇌과립세포를 배양접시에 일정시간 배양 후 트립신을 처리하여 분리한 뒤 PBS로 세척하고 1.5ml E-
Tube로 옮겼다. 각 튜브에 세포가 10^4 개씩 존재하도록 한 후 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 조심스럽게 제

거한 후 각각의 E-tube에 200 μ L의 용해 완충액을 첨가하여 15~25℃에서 30분간 반응 시켰다. 튜브를 다시 10분간 원심분리 한 후 각각의 상층액 20 μ L를 streptavidin이 코팅된 96 well 배양접시에 옮겼다. 각각의 배양접시에 면역 반응액을 80 μ L씩 첨가하고 호일로 감싼 후 300rpm에서 15~25℃의 온도에서 2시간 동안 반응 시켰다. 용액을 제거하고 반응액으로 3회 세척 후 각각의 우물에 ABTS용액을 100 μ L씩 첨가하고 250rpm으로 10~20분 동안 충분한 발색반응이 보일 때까지 반응 시켰다. 그 후 405nm에서 ELISA판독기로 흡광도를 측정 하였다.

[0044] 7일령 흰쥐 소뇌과립세포를 비롯한 척수후근신경절세포, 난관상피세포, 각질형성세포에 고농도의 칼륨을 첨가해 본 결과 소뇌과립세포는 5 mM의 칼륨을 포함한 배양액에서는 6-7일간의 생존을 보이는 반면 25 mM의 칼륨이 첨가된 배양액에서는 15일 이상의 생존을 보였다(도 1). 도 1에 나타낸 바와 같이 25 mM 염화칼륨(KCl) 용액에 노출된 소뇌과립세포는 5 mM 칼륨용액에 비하여 현저히 높은 생존율을 보였다(도 1A, 1B). 또한 세포자멸사도 유의하게 감소시킬 수 있음을 확인하였다(도 1C, $p < 0.05$). 본 도에는 나타나지 않았지만 척수후근신경절세포 및 난관상피세포에 고농도 칼륨을 첨가했을 때도 역시 세포의 생존도가 대조군에 비해 높은 것을 확인하였다.

[0045] 흰쥐 소뇌과립세포에서 TASK-1, TASK-3 및 TREK-2 채널 발현을 확인하기 위하여 면역염색을 수행한 결과 TASK-3가 강하게 발현됨을 확인하였다(도 1D).

[0046] 면역염색은 다음과 같이 수행하였다.

[0047] 일차항체(primary antibody)로는 K_{2P} 통로 중 상업적으로 판매되고 있는 항체, TREK-2, TASK-1, 및 TASK-3(Alomone labs, Jerusalem, Israel)를 사용하였다. 4% paraformaldehyde가 들어 있는 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.3)을 사용하여 세포를 실온에서 30분간 고정시킨 후 PBS로 세포를 5분간 3번 세척한 후 비특이적 반응의 억제에 위해 1시간 30분 동안 실온에서 Triton X-100을 포함한 normal goat serum으로 세포를 전처리한다. 세포들은 세척 없이 일차항체에 4℃에서 16시간 동안 노출시키고, 대조군은 일차항체 대신 일차항체 희석용액에 노출시킨다. 16시간 후 일차항체를 PBS로 세척하고 이차항체(secondary antibody)를 1시간 30분 동안 실온에서 처리한 후 세포를 PBS로 3번 이상 세척하여 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 K_{2P} 통로의 발현을 조사하였다.

[0048]

[0049] TASK-1, TASK-3, TREK-2 채널은 전기 생리학 실험기법에 의하여 소뇌과립세포에서 발현되는 칼륨채널로 잘 알려져 있으며 이들 채널은 소뇌과립세포의 세포자멸사와 관련 있을 것으로 예상되었다. 본 발명에서 칼륨채널의 발현을 면역염색으로 재확인 한 결과 TASK-3 통로의 발현이 가장 우세하였다. TASK-1, TASK-3 및 TREK-2 채널은 background 칼륨통로로서 세포의 안정막 전압을 일정하게 유지시켜주는 중요한 기능을 한다. 특히, TREK-2 채널은 저산소증이나 허혈로부터 세포를 보호하는 역할을 하고 TASK-1과 TASK-3 채널은 세포자멸사와 관련 있음이 보고되었다. 특히, 이들 채널은 세포 내외의 pH에 의해 조절되는 특징을 가지고 있다. 칼륨채널의 차단이 신경세포, 피부세포 및 수정란에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보고자 고농도 칼륨용액을 사용하여 본 발명이 수행하였다.

[0050] 그 결과, 각질형성세포 및 섬유아세포 역시 25 mM 칼륨용액에 노출되었을 때 과산화수소에 의한 세포자멸사 현상이 억제되었음을 확인하였다.

[0051] 각질형성세포와 섬유아세포에 고농도 칼륨의 독성은 보이지 않았다(도 2A와 2B). 본 발명에서 과산화수소는 세포자멸사를 유도하기 위하여 사용되었다. 생쥐 및 한우 수정란에서도 과산화수소에 의한 세포자멸사 현상이 억제되었다(도 2C 및 2D).

[0052] 실시예 2. 고농도의 칼륨 및 항산화제 첨가에 의한 세포자멸사 억제능 분석

[0053] 본 발명자들은 고농도 칼륨 용액 및 항산화제에 의한 세포자멸사 억제 효과를 확인하기 위하여 다음의 조성물을 사용하였다(표 1).

표 1

	배양 세포	배양에 사용된 조성물
1	소뇌과립세포	Neurobasal medium + 20 mM KCl + 25 μ M β -ME
2	각질형성세포	DMEM + 20 mM KCl + 25 μ M β -ME
3	피부섬유아세포	DMEM + 20 mM KCl + 25 μ M β -ME
* 각 세포들은 세포배양액 첨가제에 24시간 이내의 노출을 허용한다. β -ME: β -mercaptoethanol DMEM: Eagle's minimal essential medium		

[0054]

[0055] 그 결과, 본 발명의 고농도 칼륨 및 항산화제를 포함하는 조성물을 처리하는 경우, 상기 두 조성물의 병용 처리에 의해 생쥐 수정란의 배발달을 촉진함과 동시에 과산화수소에 의한 세포자멸사 현상을 억제함을 확인하였다(도 3).

[0056] 실시예 3. 고농도 칼륨, 항산화제 및 동결보존 첨가에 의한 세포자멸사 억제능 분석

[0057] 본 발명에서는 고농도의 칼륨, 항산화제 및 동결 보존제를 첨가하는 배양 조성물의 세포자멸사 억제능 효과를 확인하기 위하여 EFS 용액, 20 mM KCl 및 25 μ M β -ME를 사용하였으며, 상기 동결 보존제로서 10% fetal bovine serum을 포함한 phosphate buffered saline에 40% (v/v) ethyleneglycol, 18% (w/v) ficoll 70 및 0.3 M 수크로스(sucrose)가 최종농도가 되도록 혼합 제조하여 기본 동결 보존제로 사용하였다 (EFS 용액).

[0058] 또한 동결 보존 및 용해 후에도 세포의 증가된 세포 생존능이 나타나는지 확인하기 위하여 다음과 같은 동결 보존 및 용해 과정을 실시하였다.

[0059] 5×10^5 개의 피부세포 및 10개의 한우 수정란을 EFS 동결보존액에 1분간 평형을 실시한 후 동결 튜브 및 플라스틱 스트로우 내에 주입하여 즉시 -196°C 의 액체질소에 침지하였다. 동결세포의 용해 방법은 동결튜브 및 스트로우를 액체질소에서 꺼내어 공기 중에서 10초간 노출시킨 후 $30\sim 37^{\circ}\text{C}$ 의 물에 침지시켜서 흔들면서 용해하였다. 용해된 세포들은 0.5M 수크로스 용액에 4분간 평형시킨 다음 0.25M의 수크로스에 3분간 평형시킨 후 각각 D-PBS로 3~4회 세척한 다음 5분간 정지시킨 후 세포에 적합한 배양액으로 3~4회 세척하여 용해과정을 완료하였다.

[0060] 본 발명에서는 고농도 칼륨과 항산화제를 포함하는 조성물에 추가적으로 EFS 동결 보존제를 첨가함으로써, 세포를 동결한 후 용해하여 그 결과를 확인한 결과 높은 생존율을 보였다. 도 4는 한우의 배반포를 동결 및 용해 한 후 터널(tunnel) 염색을 실시하여 세포자멸사 정도를 확인하였다. 도 4A에서 보는 바와 같이 이러한 세포자멸사가 세포막 근처에서 나타나는 것을 알 수 있었다. 또한 한우 배반포를 동결 및 용해 후 생존율을 비교해 본 결과 동결에 의한 세포자멸사를 고농도 칼륨용액 및 항산화제가 유의하게 억제할 수 있음을 확인하였다(도 4B). 이러한 데이터로부터 고농도 칼륨 및 항산화제는 과산화수소수 및 동결에 의한 각질형성세포의 세포자멸사를 유의하게 억제할 수 있음을 알 수 있었다(도 5).

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 흰쥐 소뇌과립세포의 세포자멸사에 있어서 고농도 칼륨의 효과를 나타낸 것으로서, (A) 소뇌과립세포의 15일간 배양 시 나타나는 세포자멸사 현상, (B) MTT-test 결과, (C) ELISA 방법을 이용한 세포자멸사 확인, 및 (D) 소뇌과립세포에서 발현되는 칼륨 채널을 관찰한 결과이다.

[0062] 도 2는 인간피부세포 및 생쥐 2 세포기배의 세포자멸사에 있어서 고농도 칼륨의 효과를 나타낸 것으로서, (A) 및 (B)는 각질형성세포 및 섬유아세포에서 고농도 칼륨의 독성효과를 확인한 사진이고, (C)는 과산화수소수에 의한 생쥐 2 세포기배의 세포자멸사에 있어서 고농도 칼륨의 효과를 확인한 사진이며, (D)는 고농도 칼륨의 생쥐 2세포기배 세포자멸사 억제 효과를 나타낸 도이다.

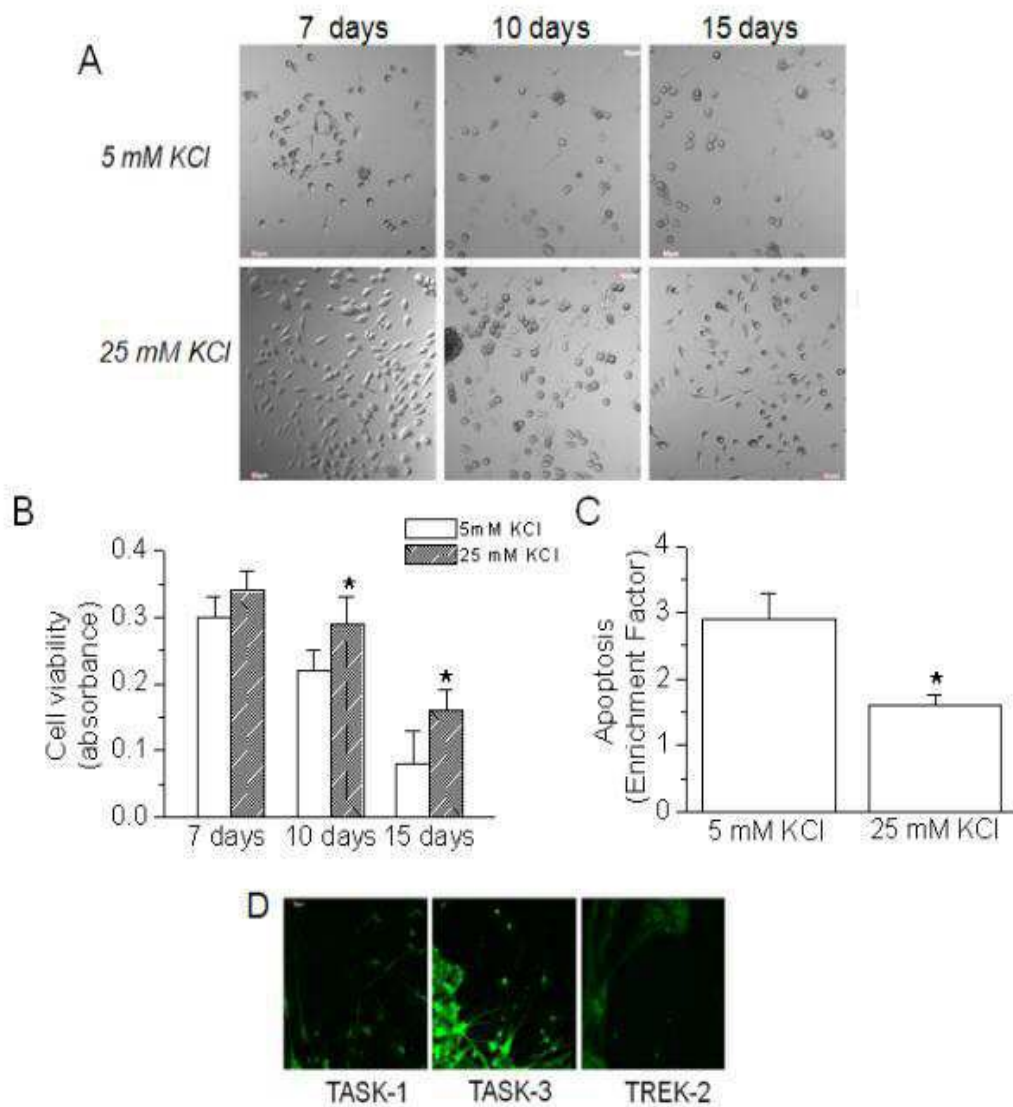
[0063] 도 3은 생쥐 수정란의 사멸 및 발달에 있어서 항산화제의 효과를 나타낸 것으로서, (A)는 생쥐 2세포기배의 체외발달에 있어서 β -머캅토에탄올(β -ME)의 효과를 확인한 사진이고, (B)는 과산화수소에 의해 유도된 세포자멸사에 있어서 β -ME와 고농도 칼륨의 효과를 확인한 사진이다.

[0064] 도 4는 동결 및 용해된 한우 배반포에 있어서 고농도 칼륨과 항산화제의 세포자멸사 억제 효과를 나타낸 것으로서, (A)는 한우배반포배의 동결 및 용해 후 보인 세포자멸사 (녹색: 세포자멸사 터널 염색 결과, 빨강: 핵 PI 염색 결과) 결과를 나타낸 사진이며, (B)는 동결 및 용해된 배반포의 세포자멸사에 있어서 고농도 칼륨과 항산화제의 효과를 나타낸 그래프이다.

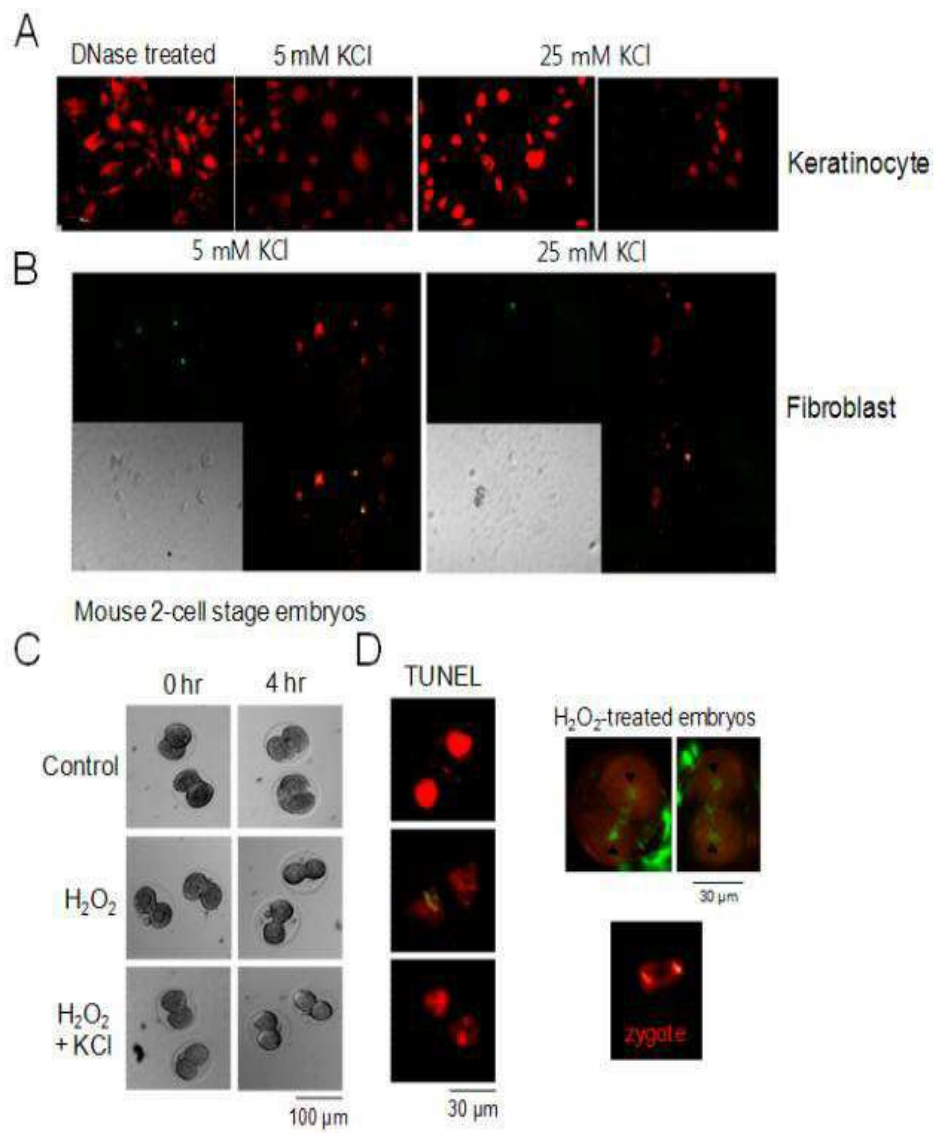
[0065] 도 5는 고농도 칼륨과 항산화제의 과산화수소수 및 동결에 의한 인간각질형성세포의 세포자멸사 억제 효과를 나타낸 그래프로써, (A)는 과산화수소수에 의한 세포자멸사에 있어서 고농도 칼륨과 항산화제의 효과를 나타낸 것이고, (B)는 동결에 의한 세포자멸사에 있어서 고농도 칼륨과 항산화제의 효과를 나타낸 그래프이다.

도면

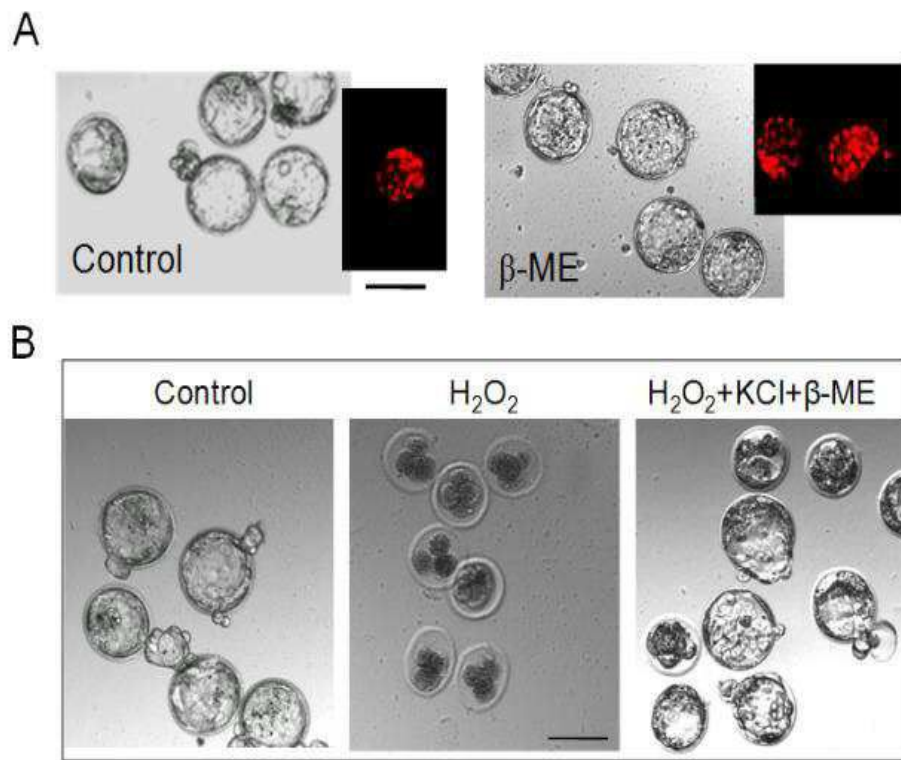
도면1



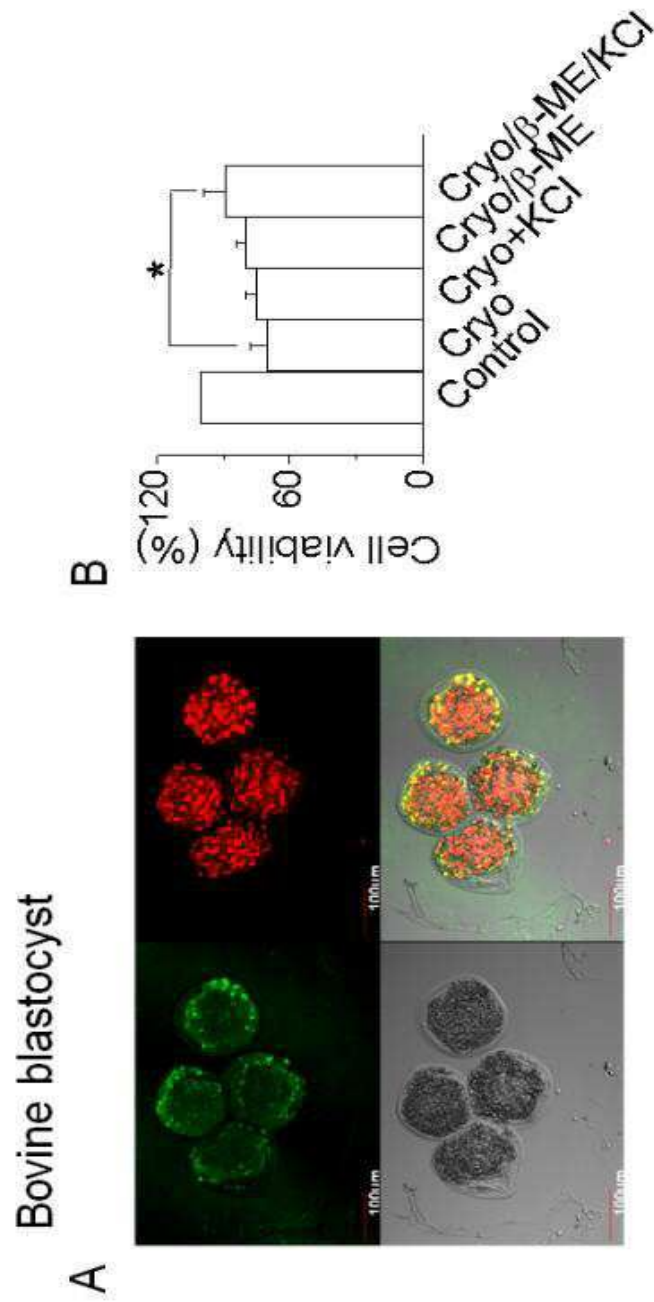
도면2



도면3



도면4



도면5

