(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0055389
(43) 공개일자 2013년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/40 (2006.01) *A61P 11/06* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0121109
(22) 출원일자 2011년11월18일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
남명수
대전광역시 유성구 지족동 열매마을아파트 102동 402호
(74) 대리인
김종관, 권오식, 박창희

전체 청구항 수 : 총 7 항

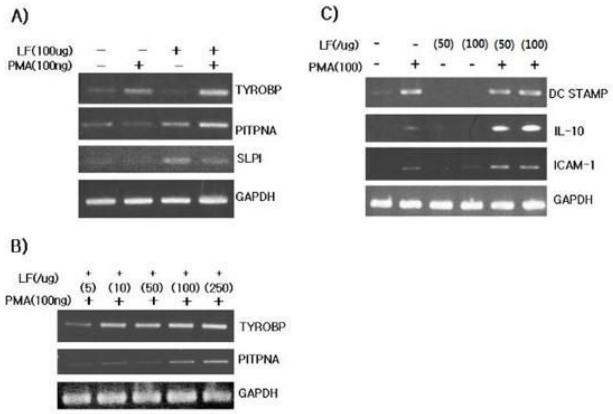
(54) 발명의 명칭 **락토페린을 함유하는 면역 조절용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 락토페린(lactoferrin)과 포로볼 12-마이리스테이트 13-아세테이트 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 을 포함하는 면역 조절용 조성물에 대한 발명으로, 특히 본 발명에 따른 조성물은 천식 및 면역질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

또한 본 발명은 상기 조성물을 제조하는 방법 및 상기 조성물을 이용한 면역조절기능 향상방법 및 면역질환 치료 또는 예방 방법에 대한 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	109149033HD110
부처명	농림수산식품부
연구사업명	기술사업화지원사업
연구과제명	유청단백질 가수분해물의 기능 평가 및 산업화 기술 개발
주관기관	충남대학교
연구기간	2010.04.10 ~ 2011.04.09

특허청구의 범위

청구항 1

락토페린(lactoferrin)과 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)을 함유하는 면역기능 조절용 조성물.

청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 락토페린 및 PMA가 PITPNA(phosphatidylinositol transfer protein, alpha), TYROBP(tyrosine kinase-binding protein), SLP1, DC STAMP, IL-10, ICAM-1, IL-1α, 또는 IFN-α 유전자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항 에 있어서, 상기 락토페린은 펩타이드 형태로 분해된 단편으로 이루어진 것을 특징으로 하는 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 락토페린은 화학적 변형된 형태 또는 유도체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 락토페린은 재조합 락토페린인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 락토페린의 함량은 0.0001 내지 100mg/ml인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)의 함량은 0.01 내지 1 μg/ml인 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 락토페린(lactoferrin)과 포로볼 12-마이리스테이트 13-아세테이트 (phorbol 12-myristate 13-acetate; 이하 'PMA'라 한다) 을 포함하는 면역 조절용 조성물에 대한 발명으로, 특히 본 발명에 따른 조성물은 천식 및 면역질환의 조절제로 유용하게 이용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 락토페린(lactoferrin)은 우유의 유청단백질에 속하는 분자량 82kDa의 철 결합 단백질로, 체액과 혈액에 존재하는 트랜스페린 패밀리(transferrin family)의 하나이다. 락토페린은 젖소의 초유에 0.8 mg/mL 정도 함유되어 있으며, 정상유에는 0.1내지0.4 mg/mL 정도의 미량이 함유되어 있다(Masson, P. L., and Heremans, J. F. (1971). Comp. biochem. Physiol. 39B, 119-129; Suzuki, T., Nonaka, M., kiyosawa, I. and ogasa, K. (1977) J. Jpn. Soc. Food Nutri. 30, 317-322).

[0003] 락토페린의 생리활성에 관한 연구는 그동안 많은 학자들에 의해 수행되었고, 다양한 기능이 있는 것으로 밝혀졌지만 생체 내에서의 정확한 기능은 아직 밝혀지지 못한 실정이다. 락토페린의 기능 중 가장 잘 알려진 것은 항균활성 기능(Arnold, R. R., Cole, M. F. and McGhee, J. R. (1977) Science 197, 263-265; Ellison, R. T., Gi되, T. J. and Laforce, F. M. (1988) Infection and Immunity. 56, 2774-2781)이고, 그 외에 염증반응의 조절 기능, 면역계의 활성화 및 골수혈구형성(myelopoiesis)의 조절기능도 있는 것으로 보고되었다(Brock, J. (1995) Immunology today 16, 417-419).

[0004] 한편, Gifford 등의 연구자들은 락토페린을 단백질 가수분해효소로 처리하여 생성된 펩타이드(Lfc, N-terminal

domain)가 락토페린보다 더 높은 활성과 다른 다양한 기능을 가지고 있다고 보고한 바 있으며(Gifford, J. L., Hunter, H. N., Vogel, H. J. (2005) Cell Mol Life Sci. 62, 2588-2598), 또한, 락토페린(Lactoferrin)은 생체 외(*in vitro*) 실험에서 선천성 면역 관련 대식세포(macrophage), 호중구(neutrophils), 호염구(basophils), 호산구(eosinophils), 비만세포(mastocytes), 또는 자연살해세포(Natural Killer cell: NK cell)들과 후천성 면역 관련 B 세포(B cell), T 세포(T cell), 또는 수지상 세포(dendritic cell)에서 염증유발(pro-inflammatory) 또는 소염(anti-inflammatory) 물질로서의 기능이 있다는 보고도 있다(Legrand, D., Elass, E., Carpentier, M. and Mazurier, J. (2005) Cell Mol. Life Sci. 62, 2549-2559; Legrand, D., Elass, E., Carpentier, M. and Mazurier, J. (2006) Biochem. Cell Biol. 84, 282-290).

[0005] 최근의 연구에서는 락토페린이 건강한 사람에게 면역과 항산화 상태를 유지시켜주는 보충제로서 기능이 있는 것으로 밝혀졌으며(Mulder, A. M., Connellan, P. A., Oliver, C. J., Morris, C. A. and Stevenson, L. M. (2008) Nutr. Res. 28, 583-589), Freiburghaus 연구진의 결과에 따르면, 락토페린으로부터 유래된 펩타이드(peptide)인 락토페리신(lactoferricin)이 인간 결장암 세포의 분화 비율을 감소시키는 것으로 나타났다(Freiburghaus, C., Janicke, B., Lindmark-M sson, H., Oredsson, S. M. and Paulsson, M. A. (2009) J. Dairy Sci. 92, 2477-2484).

[0006] Lang 등의 연구자들은 헤파란 황산프로테오글리칸(Heparan Sulfate Proteoglycans)에 결합한 락토페린이 중증급성호흡기증후군(severe acute respiratory syndrome; SARS) 감염을 방어할 수 있다고 보고했다(Lang, J., Yang, N., Deng, J., Liu, K., Yang, P., Zhang, G. and Jiang, C. (2011) PLoS ONE 6,e23710).

[0007] 상기와 같이 락토페린은 생리활성 및 면역과 관련된 것으로 알려져 있으나, 락토페린을 단독으로 사용한 경우, 만족할만한 면역조절 기능을 얻지 못하고 있는 실정으로, 락토페린의 면역조절 기능을 증진하기 위한 기술 개발이 절실한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 공보 제 2007-0048170 호: 젖산 및 락토페린을 포함하는 조성물. 공개일자 2007년 05월 08일, 출원번호:10-2007-7001696, 출원인: 네스토르메디칼 아베

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같이 락토페린을 단독으로 사용한 경우, 만족할만한 면역조절 기능을 얻지 못하는 점을 개선하기 위하여, 적절한 물질과의 병용 사용(combination use)을 통한 락토페린의 면역조절 기능 향상을 도모하고자 한다.

[0010] 즉, 본 발명은 락토페린 및 적절한 물질을 함께 포함하는 면역조절용 조성물, 특히 천식 및 면역질환의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있는 조성물을 제공하며, 상기 조성물을 제조하는 방법 및 상기 조성물을 이용한 면역조절기능 향상방법 및 면역질환 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명에서는 락토페린과 PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate)를 병용 사용할 경우, 상승작용(synergy)을 통해 면역조절 기능이 놀라울 정도로 향상됨을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0012] 구체적으로, 락토페린과 PMA를 병용처리하여 배양된 세포주에서 면역 관련 유전자의 발현을 조절하여 발현량을 현저히 증가 시키고 있음을 밝힘으로써 락토페린과 PMA의 병용에 따른 상승효과가 면역력 증강 및 자가면역질환에 보다 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0013] 락토페린이 PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate)와의 상승작용 작용을 통해 발현량을 조절할 수 있는 유전자는 하기와 같다.

[0014] PITPNA(phosphatidylinositol transfer protein, alpha) : NM_006224TYROBP(TYRO protein tyrosine kinase

binding protein) : NM_198125SLIP(secretory leukocyte peptidase inhibitor) : NM_003064ICAM1(intercellular adhesion molecule 1) :NM_000201IFN-α(interferon-α) : NM_172139

[0015] DC STAMP(dendritic cell STAMP) : NM_030788IL-1α(interleukin-1α) : NM_000575IL-10(interleukin-10) : NM_000572GAPDH(glyceraldehyde_3_phosphate dehydrogenase) : NM_002046

[0016] TYROBP는 면역글로블린-유사 수용체(immunoglobulin-like receptors)와 비공유결합하여 이를 활성화 시키는 기능을 수행하는데, 면역글로블린-유사-수용체는 자연살해 세포(killer-cell)의 활동을 억제해 건강한 세포를 공격하지 못하도록 하며, PITPNA는 생체막 사이에 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)과 포스파티딜이노시톨(Phosphatidylinositol, PtdIns) 의 전달을 촉진하는 기능을 한다.

[0017] 본 발명에서는 인간 유래 U937 세포주, mutz-3 세포주, NK-92 세포주을 배양하는 과정에서 락토페린과 PMA를 각각 단독 또는 함께 첨가하여 배양한 후, 배양된 상기의 세포주에서 유전자를 추출하고 이로부터 면역 관련 유전자의 발현량을 비교 분석함으로써, 락토페린과 PMA를 병용 사용할 경우, 상승작용에 의해 면역조절 기능이 현저히 향상됨을 발견하였다.

[0018] 본 발명에 따른 락토페린과 PMA를 포함하는 조성물은 면역조절에 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 면역력 증가, 및 자가면역질환의 예방 및 치료에 유효하게 사용될수 있다. 특히 바람직한 자가면역질환은 천식, 알레르기성 질환, 아토피 질환 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명에서의 락토페린은 그 효능이 유지되는 한, 락토페린 뿐 아니라 화학적으로 변형된 구조의 락토페린, 락토페린 유도체 및 락토페린으로부터 분해된 펩타이드 단편 등도 사용가능하며, 또한 재조합 기법으로 제조된 락토페린 및 락토페린 펩타이드도 사용가능함은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명한 것이다.

[0020] 본 발명에서의 화학적 변형으로 변형된 락토페린 또는 락토페린 유도체는 상기 기재된 바와 같이 락토페린의 기능을 유지하는 한, 그 구조가 특별히 한정되는 것은 아니지만, 천연(natural) 락토페린의 일부 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환되거나 삽입, 결실된 형태, 락토페린의 일부 기능기가 다른 기능기로 치환된 형태, 다른 기능기 또는 화합물과 접합된 형태 등을 모두 포함한다.

[0021] 본 발명의 락토페린 함량은 0.0001 내지 100mg/ml인 것이 바람직하며, 또한 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)의 함량은 0.01 내지 1 μg/ml인 것이 바람직하다.

[0022] 상기 유전자의 발현량 확인은 mRNA의 양이나 패턴을 확인하는 통상적인 생화학적 분석 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 이러한 mRNA의 양이나 패턴을 확인하기 위한 분석 방법은 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction)법, 경쟁적 PCR (Competitive PCR), 실시간중합효소연쇄반응(real-time PCR), RNase보호분석법(RNase protection assay), 노던블랏, DNA 마이크로어레이 등이 있으며, 그외에도 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 어떠한 방법이라도 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 락토페린과 PMA를 포함하는 조성물은 현저한 면역조절 기능을 가지며, 이에 따라 면역력 증가 및 자가면역 질환, 특히 천식, 알레르기성 질환 및 아토피 질환 등의 예방 또는 치료에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 락토페린과 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)를 첨가한 U937 세포주에서의 유전자 발현량 변화를 나타내는 전기영동 결과를 나타내는 도면.

(A) TYROBP 유전자, PITPNA 유전자, SLP1유전자의 발현량 비교 사진.

(B) 면역 증강물질인 100 ng PMA와 함께 락토페린의 농도(5, 10, 50, 100, 및 250 μg/ml) 증가에 따른 TYROBP 및 PITPNA 유전자의 발현량 변화 비교 사진.

(C) 락토페린의 농도 변화에 따른 DC STAMP 유전자, IL-10 유전자, ICAM-1 유전자의 발현량 변화 비교 사진.

도 2는 락토페린과 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)를 첨가한 Mutz-3 세포주에서의 유전자 발현량 변화

를 나타내는 전기영동 결과를 나타내는 도면.

도 3은 락토페린과 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)를 첨가한 NK92 세포주에서의 유전자 발현량 변화를 나타내는 전기영동 결과를 나타내는 도면.

(A) PITPNA 유전자, TYROBP 유전자의 농도변화 및 PMA 유무에 따른 유전자 발현량 변화를 나타내는 전기영동 사진.

(B) DC STAMP 유전자, IFN-α 유전자, IL-1a 유전자의 농도변화 및 PMA 유무에 따른 유전자 발현량 변화를 나타내는 전기영동 사진.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0026] 실시예 1. 동물세포주의 배양

[0027] 한국생명공학연구원 세포생물학연구실에서 제공받은 사람유래 U937, Mutz-3, NK-92 세포주를 24-웰 플레이트(well plate)에 2 × 10^5 cells/mL의 농도로 첨가하고, 락토페린100 μg과 p10(천연물 추출액)을 첨가하여 37 ℃, 5 % CO_2 세포 배양기에서 12시간 배양하였다. 덜베코 변형 이글스 배지(Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM; Gibco, USA) 배지에 10 중량% FBS(fetal bovine serum, Gibco)가 첨가된 배지가 사용되었다.

[0028] 실시예 2. 세포주로부터 total RNA 추출 및 cDNA 합성

[0029] 실시예 1에서 배양이 완료된 세포주는 TRI Reagent(Trizol)로 total RNA를 분리하였다.

[0030] 실시예 2-1. 세포주에서 total RNA의 추출

[0031] 상기 배양된 세포를 포스페이트 완충액(PBS)으로 세척한 후, TRI Reagent를 500 μl씩 분주하여 세포를 분해(lysis)한 후, 클로로포름 200 μl를 첨가하여 15초간 혼합하였다. 상기의 용액을20분간 원심분리하여 상층액을 이소프로판올 500 μl가 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 15분간 원심 분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 100 % 에탄올과 0.1 % 디에틸 피로카본에이트(diethyl pyrocarbonate (DEPC))를 75:25비율로 혼합하여 75 % 에탄올을 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 5분간 원심분리 한 뒤 상층액을 제거하고 실온에서 건조시켰다. DEPC water를 50 μl씩 분주하여 녹인 후 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 total RNA 양을 정량하였다.

[0032] 실시예 2-2. cDNA 합성

[0033] 상기에서 추출한 RNA는 M-MLV 역전사효소(M-MLV reverse transcriptase (Promega))를 이용하여cDNA로 합성하였다. Oligo(DT) primer (25 nM) 1 μl, dNTP mix (10nM) 1 μl, 추출한 RNA 1ug와 DEPC water로 11 μl를 맞추고 65 ℃에서 5분간 반응시킨 후 즉시 얼음에서 냉각시켰다. 이후 5배 완충용액 4 μl, DEPC water 1 μl, DTT (100 mM) 1 μl, 및 M-MLV reverse transcriptase 1 μl를 혼합하여 7 μl씩 각 PCR tube에 더 한 후 42 ℃에서 60분, 75 ℃에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

[0034] 실시예 3. U937세포, Mutz3 세포, 및NK92 세포에서 락토페린에 의한 조절되는 유전자 발현량 분석

[0035] 락토페린과 PMA를 각각 단독, 또는 병용 처리한 세포주 또는 처리하지 않은 세포주에서 타겟 유전자인 PITPINA(phosphatidylinositol transfer protein, alpha), TYROBP(tyrosine kinase-binding protein), SLP1, DC STAMP, IL-10, ICAM-1, IL-1α, IFN-α; 및 대조유전자인 GAPDH(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) 유전자 발현 양상을 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 조사하였다.

[0036] 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 은 94℃에서 5분 (1 cycle), 94℃에서 30초, 55℃에서 30초 그리고 72℃에서 30초 (30 cycles), 72℃에서 5분 (1 cycle)에서 수행되었다.

[0037] GAPDH 조건은 94℃에서 5분 (1 cycle), 94℃에서 30초, 55℃에서 30초 그리고 72℃에서 30초 (20 cycles), 72℃에서 5분 (1 cycle) 이었다. 타겟 및 대조 유전자의 프라이머(primer) 서열은 하기 표와 같으며, Primer express 3.0(미국 Applied Biosystems 사)를 사용하여 고안 하였다.

Gene	5′- primer -3′	position
GAPDH	GACTGCTGTCTGCCCTCTCT	sense
	GCAATTCCCTGTAGCTCTCAA	antisense
DC STAMP	CACCCACCTGCTCTGCCTGC	sense
	CCAGCACCCCAGCCTGCTTC	antisense
ICAM-1	CCGGCGCCCAACGTGATTCT	sense
	AGAAGCTGCGCCCGTTGTCC	antisense
IL-10	GCACCCACTTCCCAGGCAACC	sense
	CCCAGGGAGTTCACATGCGCC	antisense
IL-1α	GTAGCCACGTAGCCACGCCT	sense
	CCCCCTGCCAAGCACACCCA	antisense
IFN-α	TACGATGGCCTCGCCCTTTGC	sense
	TGCTCTGACAACCTCCCAGGCA	antisense
PITPNA	ACCCAGCAGCTCCACCCTCC	sense
	CATCCCCGCTCCCCACAGGA	antisense
SLPI	CCCTTCCTGGTGCTGCTTGCC	sense
	CGCTTGCACTGGCCATCCATCT	antisense
TYROBP	GTGCTCATTGCCCTGGCCGT	sense
	ACGCTGTTTCCGGGTCGCTG	antisense

[0038]

[0039] 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 산물은 0.002 % 브롬화 에티듐(ethidium bromide)이 첨가된 2% 아가로스 젤(agarose gel)에서 100v전압에서 20분간 전기영동 한 후, 자외선 광으로 유전자 발현정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 Gel Doc (Bio-Rad) 소프트웨어에 의해 분석 정량 하였다.

[0040] 실시예 3-1. U937 세포주를 이용한 락토페린의 염증 반응효과

[0041] 사람유래 단핵구세포주인 U937세포를 순수 정제된 락토페린을 처리하여 배양한 뒤 염증 관련된 유전자의 발현량을 확인하였다. 본 발명에서 발현량 차이를 확인한 유전자는 TYROBP, PITPNA, SLP1, DC STAMP, IL-10, 및 ICAM-1 유전자이며, 이들의 발현량은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)법으로 확인하였다.

[0042] 실시예 3-1-1. PITPNA와 TYROBP의 유전자의 발현량 변화 확인

[0043] 락토페린 또는 PMA 을 각각 처리한 경우, PITPNA와 TYROBP의 유전자가 거의 발현되지 않았으나, 락토페린과 면역증강물질인 PMA을 병용 처리한 경우, PITPNA와 TYROBP의 발현량이 상당히 증가(up-regulaltion) 한다는 것을 확인 하였다. 즉, 상기의 락토페린과 PMA이 상승효과(synergetic effect)를 일으켜 면역조절 기능과 관련 있는

PITPNA와 TYROBP 유전자 발현량이 현저하게 증가한 것으로 판단되며, 생체 면역활성에 영향을 줄 것으로 예상된다. 뿐만 아니라, 락토페린의 농도가 증가함에 따라 TYROBP와 PITPNA 유전자의 발현량이 농도에 의존적으로 증가하고 있음을 확인 하였다. (도 1 참조).

[0044] 실시예 3-1-2. DC-STAMP 유전자의 발현량 변화 확인

[0045] 또한, 항원제시세포로 작용하는 수지상세포 (Dendritic Cell, DC) 마커 유전자인 DC-STAMP는 락토페린만 처리된 조건에서는 제대로 발현되지 못했으나, PMA 단독으로 처리된 경우에서는 DC-STAMP유전자의 발현이 비교적 강하게 나타났다. 즉, 락토페린이 DC-STAMP 발현에는 영향을 주지 못하는 것으로 확인되었다.

[0046] 실시예 3-1-3. IL-10 유전자의 발현량 변화 확인

[0047] 과면역 반응(hyperimmune reaction)으로 발생하는 대표적인 질환인 천식, 알레르기 질환, 아토피 질환의 발병과 관련된 IL-10 유전자의 발현은 락토페린 또는 PMA 각각을 단독으로는 처리한 경우, 그 발현이 미미하지만, 락토페린과 PMA을 혼합 처리한 경우는 IL-10의 발현이 아주 강하게 증가함으로써 상기의 락토페린과 PMA가IL-10 발현에 강하게 상승작용을 하는 것으로 확인되었다.

[0048] 또한, 세포표면 당단백질 결합과 관련된 ICAM-1 유전자의 발현은 락토페린 또는 PMA각각을 단독으로 처리 경우, ICAM-1 유전자 발현이 미약하게 나타났으나, PMA와 락토페린의 혼합처리 경우는 ICAM-1의 발현이 매우 강하게 증가함으로써, 상기 락토페린과 PMA가 ICAM-1의 발현에 상승작용 하는 것으로 확인되었다(도 1 참조).

[0049] 실시예 3-2. Mutz-2 세포에서 면역관련 유전자들의 발현량 변화 분석

[0050] 수지상 세포(Dendritic cell)의 분화 전 세포인 Mutz-3 세포를 이용하여 락토페린에 의한 TYROBP, PITPNA, 및 IL-1α 유전자의 발현량 변화를 확인 하였다. 그 결과, 도2에 도시된 바와 같이, TYROBP 유전자는 락토페린을 단독으로 처리한 경우에도 강하게 발현하였으며, PMA와 혼합처리 했을 경우도 비슷한 정도로 발현하였다. 즉, 락토페린은 TYROBP 유전자 발현에 강하게 영향을 미치는 것으로 보인다. 또한 PITPNA 유전자도 락토페린을 처리된 경우에 발현량이 상당히 증가 하였다. 하지만 IL-1α 유전자 발현에는 아주 미약하게 작용하였다(도 2 참조).

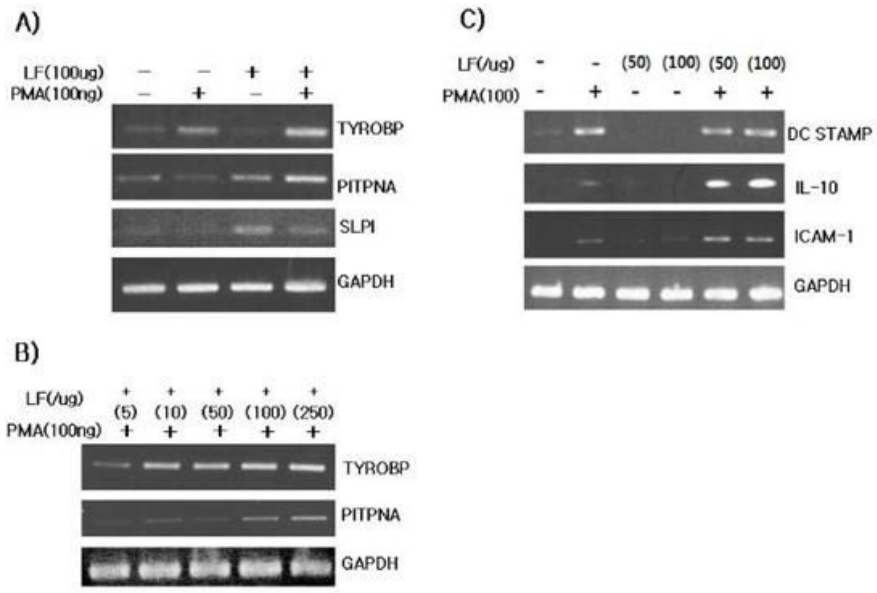
[0051] 실시예 3-3. NK92 세포에서 면역 관련 유전자들의 발현량 분석

[0052] 락토페린과 PMA를 처리한 NK92세포에서, IL-1α, DC-stamp와 IFN알파 유전자의 발현여부를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)법으로 확인하였다. IL-1α와 DC-stamp 유전자는 락토페린과 PMA 단독 처리하였을 경우 발현하지 않았는데, 상기 두 물질을 병용 처리 하였을 경우에는 발현하였다. 따라서 락토페린과 PMA 두 물질은 IL-1α와 DC-stamp 유전자의 발현에서 상승작용 하는 것으로 보인다.

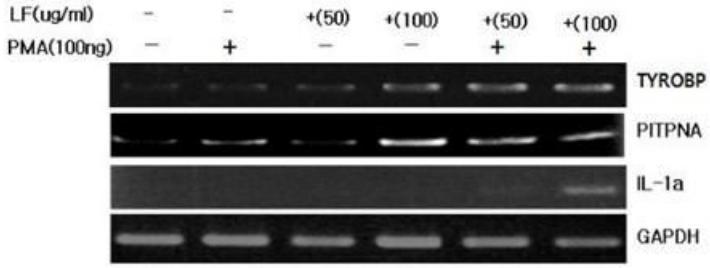
[0053] 반면, IFN알파의 유전자는 락토페린과 PMA 에 의해 영향을 받지 않았으며,. 락토페린과 PMA를 처리한NK92 세포에서 TYROBP와 PITPNA 유전자의 발현량 변화는 락토페린과 PMA 를 각각 단독으로 처리 경우에도 잘 발현되었다(도 3 참조).

도면

도면1



도면2



도면3

