



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0085609
(43) 공개일자 2010년07월29일

(51) Int. Cl.

A61K 31/198 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0005003

(22) 출원일자 2009년01월21일

심사청구일자 2009년01월21일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

(72) 발명자

송동근

강원도 춘천시 한림대학길 39 한림대학교 의과대학 약리학교실

홍장원

강원도 춘천시 한림대학길 39 한림대학교 의과대학 약리학교실

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

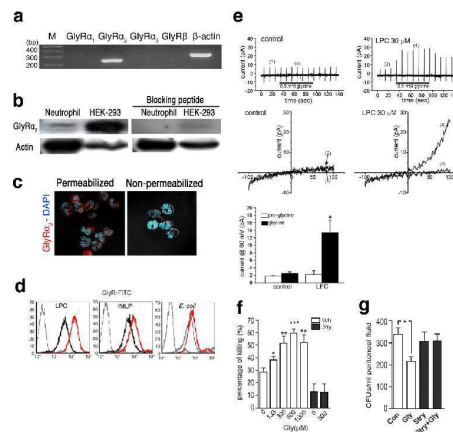
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 호중구의 미생물 사멸활성을 강화하는 글라이신

(57) 요약

본 발명은 호중구의 미생물 사멸활성을 강화하는 글라이신에 관한 것으로서, 글라이신이 일정량 이상 함유된 조성물을 섭취하거나 체내에 주입함으로써 호중구의 미생물 사멸활성을 강화하여 항생제를 사용하지 않거나 다량 사용하지 않더라도 효과적으로 미생물을 사멸하거나 제거할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김택근

강원도 춘천시 한림대학길 39 한림대학교 의과대학
약리학교실

김성준

서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 의과대학 생
리학교실

함화용

강원도 춘천시 한림대학길 39 한림대학교 의과대학
약리학교실

민태권

서울시 성북구 석관동 261 한화제약 개발팀

남주석

강원도 춘천시 한림대학길 39 한림대학교 의과대학
약리학교실

정전섭

강원도 춘천시 한림대학길 39 한림대학교 의과대학
약리학교실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2005-022-01000-0

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초의과학연구센터(MRC)

연구과제명 감염성질환제어연구센터(IDMRC)

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2008년 03월 01일 ~ 2009년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

생체 내로 글라이신을 투여하여 혈액 내 글라이신 농도를 300 μ M 이상 800 μ M 이하가 되도록 하여 호중구의 살균활성을 강화하는 방법.

청구항 2

생체 내로 글라이신을 투여하여 혈액 내 글라이신 농도를 300 μ M 이상 800 μ M 이하가 되도록 하여 병원성 미생물을 제거하는 방법.

청구항 3

글라이신을 활성성분으로 함유하는 항미생물용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 조성물에는 약학적으로 가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 하는 항미생물용 약학 조성물.

청구항 5

글라이신을 활성성분으로 함유하는 항미생물용 식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 조성물에는 식품학적으로 가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 하는 항미생물용 식품 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 호중구(neutrophil)의 미생물 사멸활성(microbicidal activity)을 강화하는 글라이신에 관한 것으로서, 글라이신이 일정량 이상 함유된 조성물을 섭취하거나 체내에 주입함으로써 호중구의 미생물 사멸활성을 강화하여 항생제를 사용하지 않거나 다량 사용하지 않더라도 미생물을 사멸하거나 제거할 수 있다.

배경 기술

[0002] 항생제 저항성 미생물의 증가와 새로운 항생제 개발의 지연은 인류보건에 심각한 위협으로 작용하고 있다. 호중구(neutrophil)는 미생물 감염에 대해 일선의 방어자 역할을 담당한다. 기존의 항미생물 치료법과 비교할 때 호중구의 항미생물활성 증가법은 이론적으로 항생제 저항성을 보이는 미생물까지도 포괄적으로 적용되는 효과적인 방법이다. 이러한 접근은 기존의 일반적인 항미생물제제를 보완하여 난치성 미생물감염을 치료하는데 성공적인 전략이 될 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0003] 따라서, 본 발명은 항생제 저항성 미생물 또는 생체 내로 침입한 미생물을 효과적으로 제거하는 방법 및 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0004] 항생제 저항성 미생물이 점점 증가하고 새로운 항생제의 개발이 지연됨에 따라 미생물 감염을 막는 새로운 접근법이 요구되고 있다. 침입한 미생물에 대한 일선의 방어자인 호중구의 살균능력을 향상시키는 것이 바로 이러한 항미생물 치료법에 직접적인 도움을 줄 수 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 글라이신이 호중구의 미생물(세균과 진균을 포함하며, 본 발명에서는 병원성 미생물을 의미하는 것임) 사멸활성(*in vitro*)과 미생물 제거능력(*in vivo*)을 향상시키며 NADPH 옥시다제에 의해 매개되는 활성산소의 생산도 향상시킬뿐만 아니라 TRPM2 매개에 의해 대장균을 대식한 호중구 내의 칼슘농도를 증가시킴을 밝혀내어 본 발명에 이르게 되었다. 글라이신은 또한, p38MAPK 저해제인 SB203580에 의존적으로 용액상 음세포작용과 아주로필 과립(azurophil granule)-파고좀(phagosome)의 융합을 향상시켰다. 이러한 결과를 통해 GlyR α 2의 활성화는 활성산소/칼슘/ p38MAPK로 이어지는 신호전달과정을 통해 아주로필 과립-파고좀 융합을 향상시키며 이를 통해 결국 호중구의 살균 능력을 향상시킴을 알 수 있다.

[0006] 본 발명은 생체 내로 글라이신을 투여하여 혈액 내 글라이신 농도를 300 μ M 이상 800 μ M 이하가 되도록 하여 호중구의 미생물 사멸활성을 강화하는 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 생체 내로 글라이신을 투여하여 혈액 내 글라이신 농도를 300 μ M 이상 800 μ M 이하가 되도록 하여 세균, 곰팡이를 비롯한 병원성 미생물을 제거하는 방법을 제공한다.

[0008] 생체 혈액 내 정상적인 글라이신 농도가 약 250 μ M이므로 글라이신 농도를 증가시켜 미생물 사멸활성을 보기 위해서는 최소 300 μ M 이상의 글라이신이 필요하며, 800 μ M를 초과하면 글라이신 농도 증가에 따른 효과의 증대가 없어 비경제적이다.

[0009] 또한, 본 발명은 글라이신을 활성성분으로 함유하는 항미생물용 식품 조성물 또는 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물에 식품학적 또는 약학적으로 가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 하는 병원성 미생물에 의한 감염 예방 또는 치료용 식품 조성물 또는 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 상기 병원성 미생물에 의한 감염 예방 또는 치료, 개선을 위한 글라이신을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 상기 글라이신을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 글라이신의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0014] 본 발명에 따른 글라이신을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물 및 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해

당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명의 글라이신을 유효성분으로 포함하는 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 현탁제, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형물로 사용될 수 있다.

[0016] 상기 경구형 제형물은 경구 투여를 위한 고형제제와 액상제제를 포함하는 의미이며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0017] 본 발명의 글라이신을 함유하는 조성물의 바람직한 투여량은 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 글라이신을 함유하는 조성물은 글라이신의 양을 기준으로 1일 0.0001 내지 1000mg/kg으로, 좀더 효과적이기 위해서는 0.01 내지 500mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량과 투여횟수는 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 조성물은 병원성 미생물 침투에 의한 감염 예방 또는 치료, 개선을 위하여 단독으로 또는 항생제 등 화학 치료 방법과 병용하여 사용할 수 있다.

[0019] 아울러, 본 발명의 조성물은 병원성 미생물에 의한 감염 예방 또는 개선을 목적으로 건강식품의 형태로 제조될 수도 있다. 본 발명 조성물의 유효성분인 글라이신을 식품 첨가물로 사용할 경우 상기 글라이신을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 글라이신이 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0020] 상기 식품 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0021] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기2천원 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1~20g, 바람직하게는 약 5~12g이다.

[0022] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만, 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0~20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0023] **인간 호중구 내의 글라이신 수용체**

[0024] 종래에는 인간 호중구에 글라이신 수용체가 존재하는지, 그렇다면 어떤 타입이 발견되었는지에 대한 보고가 없었다. RT-PCR을 통해 분석해 본 결과, GlyR $\alpha 2$ 가 발현됨을 알 수 있었다(도 1a); 이 결과는 서열분석을 통해 증명되었다 (결과제시안함). GlyR $\alpha 2$ 의 단백질상의 발현도 웨스턴블랏을 통해서 확인하였다 (도 1b). 이러한 결과로부터 인간 호중구 내에는 단일 형태의 GlyR $\alpha 2$ 가 발현됨을 알 수 있다. 의외로 GlyR $\alpha 2$ 의 세포 밖에 위치하는 N-말단부분에 대한 항체를 이용하여 공초점현미경으로 GlyR $\alpha 2$ 의 위치를 조사해본 결과, 활성화되지 않은 호중구에서는 GlyR $\alpha 2$ 가 주로 세포 내에 존재하는 것으로 나타났다(도 1c). 하지만, 호중구 자극인자인 LPC(lysophosphatidylcholine) 또는 fMLP(formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)는 세포 내에 존재하는 GlyR $\alpha 2$ 를 세포막으로 이동하도록 도왔다(도 1d). 대장균에 노출시에도 세포내에 존재하는 GlyR $\alpha 2$ 가 세포막으로 이동하였다(도 1d). 또한, LPC를 처리한 호중구에서 글라이신에 의한 염소이온의 흐름이 측정되었다(도 1e).

[0025] 도 1f와 같이 글라이신은 그 자체로 호중구의 살균활성을 농도의존적으로 증가시키며, $EC_{50}=238 \mu M$ 이다. 이러한 효과는 글라이신 저해제인 스트리크닌 처리에 의해 사라졌다(도 1f). 인 비보(In vivo) 실험에서 글라이신을 30mg/kg으로 처리했더니 세균 제거능력이 증가되었고, 이러한 효과는 스트리크닌 처리에 의해 소멸되었다(도 1g).

[0026] **글라이신 수용체(GlyR)-활성산소-칼슘이온에 의한 신호전달경로**

[0027] NADPH 옥시다제와 그 산물인 활성산소는 호중구의 살균활성에 중요한 역할을 한다. 따라서 NADPH 옥시다제 저해제인 DPI(Diphenyleneiodonium) 처리가 글라이신에 의한 살균활성 증가에 미치는 영향을 조사하였다. 분명하게 DPI 처리에 의해 글라이신에 의한 살균활성 증가효과가 소멸되었다(도 2a). 다음으로 대장균을 대식한 호중구에서 글라이신이 활성산소의 발생을 증가시키는지 조사하였다. 활성화되지 않은 호중구에서 글라이신은 활성산소의 발생에 영향을 미치지 않았으나(도 2b), 대장균을 대식한 호중구에서는 글라이신이 스트리크닌에 민감하게 활성산소의 발생을 증가시켰다(도 2b).

[0028] 호중구 내의 칼슘이온농도가 살균 활성에 중요한 영향을 미치므로, 대장균을 대식한 호중구에서 글라이신이 칼슘이온의 농도를 증가시키는지 조사하였다. 그 결과, 활성화되지 않은 호중구에서 글라이신은 칼슘이온의 농도에 영향을 미치지 않았으나(도 2c 왼쪽 패널), 대장균을 대식한 호중구에서는 DPI에 민감하게 칼슘이온의 농도를 현저히 증가시켰다(도 2c 오른쪽 패널).

[0029] TRPM2는 호중구에서 대표적인 TRP 채널이며, TRPM2 채널의 활성화는 활성산소에 의해 증가된다는 사실이 잘 알려져 있다. 호중구에 TRPM2에 특이적인 shRNA를 처리하였더니 글라이신에 의한 칼슘이온의 증가와(도 2d) 호중구의 살균 활성(도 2e)이 감소하였다. 이러한 결과로부터 대장균을 대식한 호중구에는 글라이신 수용체-활성산소-칼슘이온으로 이어지는 신호전달체계가 존재함을 알 수 있다. 이 호중구 내에서는 사이토크롬 b558이 세포막으로 이동하였으며(도 2f) 이러한 결과는 글라이신 수용체와 NADPH 옥시다제가 서로 협동함을 나타낸다.

[0030] **글라이신은 p38 MAPK를 통해 아주로필 과립-파고작용의 융합을 촉진한다.**

[0031] 아주로필 과립-파고작용의 융합과 아주로필 과립에 포함되어 있는 호중구 엘라스타제(elastase)나 카텝신 G(cathepsin G)와 같은 호중구 단백질분해효소가 호중구의 살균 활성에 중요하다. 호중구의 용액상태에서의 음세포작용은 아주로필 과립의 분비에 중요하다. 따라서, 글라이신이 용액상태에서의 음세포작용을 증가시키는지 루시퍼 옐로우의 흡수를 측정함으로써 조사하였고, 공초점 현미경상에서 CD63과 자이모산(zymosan) 입자의 융합을 조사함으로써 아주로필 과립-파고작용의 융합을 측정하였다. 도 3a, b에서 보는 바와 같이 글라이신은 용액상태에서의 음세포작용과 아주로필 과립-파고작용의 융합을 효과적으로 증가시켰는데 이러한 효과는 글라이신 저해제인 스트리크닌과 NADPH 옥시다제 저해제인 DPI에 의해 소멸되었다. 이러한 결과는 글라이신에 의해 유도된 활성산소가 용액상태에서의 음세포작용과 아주로필 과립-파고작용의 융합에 중요하게 관여하고 있음을 말해주고 있다. 단백질 분해효소의 저해제가 글라이신(도 3c)에 의한 호중구의 항균 활성증가를 막았다.

[0032] p38 MAPK는 마크로파지에서 파고작용의 성숙과 용액상태에서의 음세포작용, 그리고 호중구에서 세포내 사이토크롬 b558의 세포막으로 이동에 관여한다. 따라서, p38 MAPK의 저해제인 SB203580가 글라이신에 의해 유도되는 용액상태에서의 음세포작용, 아주로필 과립-파고작용의 융합 및 항균 활성에 미치는 효과를 조사하였다. 도 3a~c와 같

이 p38 MAPK의 저해제인 SB203580는 글라이신에 의해 유도되는 이러한 효과를 모두 저해하였다.

[0033] **고 찰**

[0034] 본 발명에서 우리는 호중구의 살균 활성의 증가에 있어 GlyR $\alpha 2$ 가 세포막으로 이동하고, 글라이신이 이동된 GlyR $\alpha 2$ 를 거쳐 염소이온의 유입을 증가시킨다는 새로운 기작을 밝혔다(도 3d). 염소이온의 유입은 NADPH 옥시다제의 활성증가로 이어져(사이토크롬 b558 의 구성인자인 Nox도 대장균을 대식한 호중구의 세포막으로 이동함) 결국 활성산소를 증가시킨다. 증가된 활성산소는 TRPM2 채널의 활성을 증가시키고, 세포내 염소이온도 이 채널의 활성증가를 야기시킨다.

[0035] NADPH 옥시다제는 호중구의 항균 활성에 필수적이다. 본 발명에서 글라이신/글라이신 수용체는 NADPH 옥시다제를 활성화시키는데, 이 현상은 대장균이나 PMA에 의해 활성화된 호중구에서만 일어난다(도 2b).

[0036] NADPH 옥시다제 활성이 떨어지면 단백질 분해효소를 많이 함유하고 있는 아주로필 과립의 분비가 저해되는 것으로 알려져 있는데 CGD(chronic granulomatus disease)가 있는 호중구나 DPI를 처리한 호중구에서 바로 아주로필 과립분비의 감소현상이 관찰된다. 또한 대장균을 대식한 호중구에서 같은 현상이 발견된다. DPI를 처리할 경우 아주로필 과립-과교종의 융합이 저해되는 것은(도 3b) 호중구에 의한 항균 활성에서 중요한 산화적 기작과 단백질 분해현상이 상호 의존적임을 말해주고 있다.

[0037] 사람과 쥐의 생체 혈액 내 글라이신 농도는 $250 \mu\text{M}$ 수준으로, 호중구의 항균 활성을 충분히 증가시키기에는 충분하지 않다(도 1g). 사실 스트리크닌 자체는 글라이신의 배지내 농도가 $133 \mu\text{M}$ 인 인비트로 실험에서 호중구의 자체 항균 활성에는 영향을 주지 않았고(결과제시 안함), 대장균을 복강내 주입한 쥐에서의 세균 제거능력에도 영향을 주지 않았는데(도 1h), 이는 글라이신의 농도가 충분하지 않은데 기인한 것으로 파악된다. 따라서, 호중구에서 글라이신의 농도를 높여주면(도 1g) 항미생물제가 효과적이지 못할 경우 여러 감염성 미생물의 치료에 효과적이다.

효 과

[0038] 항생제와 같은 항미생물제제의 살균력과 저항성이 문제가 되고 있는 상태에서 생체 내의 글라이신 농도를 높임으로써 호중구의 살균활성을 강화하여 생체 내로 침입한 세균을 사멸하거나 제거할 수 있으므로, 본 발명은 세균에 의한 질병의 치료 및 예방에 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0039] 이하에서는 좀더 구체적인 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0040] <방법>

[0041] <호중구 준비>

[0042] 호중구는 헤파린 처리한 건강한 사람의 정맥 혈액으로부터 정제하였다. 간단히 설명하면, 호중구는 히스토파크(Histopaque)-1077에서 밀도원심분리로 분리한 다음 텍스트란 침전하였다. 잔류 적혈구는 저삼투압 용균법(hypotonic lysis)으로 제거하였다. 호중구의 순도는 Diff Quik 염색에 따라 95% 이상인 것으로 나타났다. 호중구의 생존율은 트리판 블루(trypan blue) 염색 결과 99% 이상이었다. 분리단계 이후 호중구는 RPMI-1640이 들어 있는 5% FBS(fetal bovine serum)에 분산시켰다.

[0043] <인간 호중구의 세균사멸 활성 측정법(Assay of bactericidal activity of human neutrophils)>

[0044] 폴리라이신 코팅된 커버슬립에 부착된 인간 호중구는 인간 혈청으로 면역 흡소된 이.콜리를 호중구/이.콜리 1:10의 비율로 20분간 흡수하도록 두었다. 흡수되지 않은 세균을 제거한 후 호중구를 담체 또는 글라이신에 15분간 노출시켰다. 간단히 설명하면, 호중구($4 \times 10^6/\text{ml}$)를 13-mm 플라스틱 커버슬립(오버나잇으로 0.05% 폴리-L-라이신으로 코팅함)에 시드하고 24-웰 플레이트에 1시간 동안 습기가 공급되는 CO_2 배양기(5% CO_2 와 95% 공기)에

서 배양하였다. 커버슬립은 이.콜리(10% 인간 혈청으로 30분간 옹소닌화한 이.콜리(DH5-α)를 오버나잇 배양 함)를 포함하는 60-mm 디쉬(6 커버슬립/디쉬)에 전달되어 호중구/이.콜리 1:10의 비율로 20분간 식균작용 (phagocytosis)이 일어나도록 하였다. 20분 후 커버슬립은 RPMI(500μl), 담체 또는 글라이신(133, 300, 500, 1000 μM)을 함유하는 24-웰 플레이트에 이동되었다. 15분 후 커버슬립을 차가운 증류수가 들어 있는 24-웰 플레 이트에 한 시간 동안 두어 호중구를 용균하였다(15분 배양 후 CFU). 어떤 커버슬립은 15분의 LPC 배양 없이 20 분의 식균작용 후 곧바로 차가운 물에 넣었다(15분 배양 전 CFU). 이.콜리는 LB 한천 플레이트에서 37℃로 오버 나잇 배양하고 생존 콜로니를 카운트하였다. 사멸한 세균의 퍼센트는 $100 \times (1 - 15\text{분 배양 후 CFU} / 15\text{분 배양 전 CFU})$ 로 계산하였다.

[0045] 다양한 저해제들의 효과를 시험하기 위하여 스트리크닌(strychnine) (1 μM), DPI(1 μM), 단백질 저해제 혼합물 (protease inhibitor cocktail) {류펩틴(leupeptin) 10 μg/ml, N-토실-L-류신 클로로메틸케톤(N-tosyl-L-leucin chloromethyl ketone) 10 μg/ml, 펩스타틴 A(pepstatin A) 10 μg/ml, 아프로타닌(aprotinin) 10 μg/ml 및 페닐메 틸술폰일 플로라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride) 1mM} 또는 SB203580(10 μM)의 존재 하에 세균사멸 활성 을 측정하였다. 모든 배지에는 5% FBS가 추가되었다.

[0046] <복강 주사한 이.콜리의 제거(Clearance of intra-peritoneally injected *E. coli*)>

[0047] 6주령 수컷 ICR 마우스(체중 25-28g)를 사용하였다. 동물실험 방법은 한림대 동물실험위원회의 승인을 받았다. 마우스에 이.콜리 5×10^8 를 복강주사하였다. 마우스는 이.콜리 주사 전에 PBS 또는 스트리크닌(0.4 mg/kg)을 30 분간 미리 피하주사하였다. 이.콜리 주사 30분 후 담체(PBS) 또는 글라이신(30mg/kg)을 피하주사하였다. 이.콜 리 주사 8시간 후 마우스를 희생시키고 복강액(peritoneal lavage fluid)을 모아 혈액 한천 베이스 플레이트 (blood agar base plates; Trypticase™ Soy Agar Deeps, BD) 상에 37℃ 오버나잇으로 배양하고 CFU를 카운트하 였다.

[0048] <RT-PCR>

[0049] 트리졸제(Trizol reagent, Invitrogen)를 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 인간 호중구로부터 총RNA를 분리 하였다. 첫번째 cDNA 가닥은 SuperScript (Invitrogen)로 제조하였고, cDNA의 1/10은 각 PCR에 이용하였다. PCR 프라이머의 서열은 다음과 같다:

[0050] GlyR α 1,
 [0051] 5'-TGCAATAGCGCTTTCTGGTT-3' (정방향),
 [0052] 5'-TCCGGGAGATCCTTAGCAAT-3' (역방향);
 [0053] GlyR α 2,
 [0054] 5'-GGAACGCCAAATGGGATATT-3' (정방향),
 [0055] 5'-TGGACATCTTCATGCCGAAT-3' (역방향);
 [0056] GlyR α 3,
 [0057] 5'-TTCTCCAATCCTGG GTCTC-3' (정방향),
 [0058] 5'-TCCTGATGTCCTGCCCATTA-3' (역방향);
 [0059] GlyR β
 [0060] 5'-AAAAATGGAATGACCCAGG-3' (정방향),
 [0061] 5'-ATCCAGAAGGAAAGCCAGGA-3' (역방향);
 [0062] β 액틴(β actin),
 [0063] 5'-TGGAGTCCTGTGGCATCCACGAAAC-3' (정방향),

[0064] 5'-AAGCATTTGCGGTGGACGATGGAG-3' (역방향).

[0065] <웨스턴블랏 분석(Western blot analysis)>

[0066] 세포를 NP40 차가운 용균완충액(50mM 트리스(pH 8.0), 137mM NaCl, 1% NP40, 10% 글리세롤, 1mM Na_3VO_4 , 1mM PMSF, 단백질 저해제 혼합물(Sigma))으로 용균하였다. 인간 호중구와 GlyR $\alpha 2$ 로 트랜스펙션된 HEK293 셀라인에서 GlyR $\alpha 2$ 를 탐지하는 웨스턴 블랏은 항-GlyR $\alpha 2$ 항체(N-18: sc17279, Santa Cruz Biotechnology)를 1:1000로 희석하여 수행하였다. 블로킹 펩타이드는 Santa Cruz Biotechnology사 제품이다. 항-액틴 항체(Santa Cruz Biotechnology)는 로딩 대조군(loading control)으로 사용하였다. HEK293-TRPM2 셀라인에서 표지된 TRPM2 단백질은 항-Flag 단일클론항체(Sigma)를 1:5000로 희석하여 탐지하였다. 목표 단백질의 존재는 화학발광법(chemiluminescence method, Amersham Biosciences)으로 탐지하였다.

[0067] <면역형광현미경법(Immunofluorescence microscopy)>

[0068] 호중구는 2% PFA(paraformaldehyde)로 15분간 실온에서 고정하였다. 세포들은 0.05% Triton X-100로 10분간 실온에서 삼투화(permeabilize)되었다. 3% BSA(bovine serum albumin)가 포함된 PBS로 한 시간 동안 블로킹한 후 호중구를 블로킹 완충액으로 1:25 또는 1:50 희석한 항-GlyR $\alpha 2$ 항체(N-18: sc-17279, Santa Cruz Biotechnology), 항-CD63 (556019, BD Bioscience) 항체, 항-CD66b 항체 (MCA216, AbD Serotec) 및 CD35 (555451, BD Bioscience)로 한 시간 동안 배양하였다. 실온에서 한 시간 배양한 다음 세포는 PBS로 세 번 세척하고 최종 1:500으로 희석한 Alexa Fluor® 594 토끼 항-염소 IgG, F(ab')₂ 및 Alexa Fluor® 488 토끼 항-마우스 IgG, F(ab')₂로 한 시간 배양하였다. 세포는 PBS로 세 번 세척한 후 마운팅 배지를 이용하여 마운트하였다. 육안 관찰 및 자이즈 LMS 510 레이저 스캐닝 공초점 현미경(Carl Zeiss)으로 이미지 레코딩하였다.

[0069] <플로우 사이토메트리(Flow cytometry)>

[0070] GlyR $\alpha 2$ 의 표면 발현을 분석하기 위하여 호중구(3×10^6 /ml)를 RPMI-1640 내에서 LPC 30 μM 또는 fMLP 1 μM 로 5분간 자극하였다. 그리고나서 호중구를 Cytofix™ (BD Pharmingen)로 5분간 고정하였다. 호중구를 Pharmingen 염색 완충액(BSA) (BD Pharmingen)으로 세척하고, Alexa Fluor® 488 카복시산 석신이미딜 에스터 결합된 항-GlyR $\alpha 2$ 항체로 30분간 실온에서 염색하였다. 항-GlyR $\alpha 2$ 항체는 제조자의 프로토콜에 따라 Alexa Fluor 488 카복시산 석신이미딜 에스터와 결합시켰다. 호중구는 Pharmingen 염색 완충액(BSA) (BD Pharmingen)으로 세척하고 구아바 이지사이트(Guava Easycyte) (GE Healthcare) 상에 획득하였다. 분석은 FCS 발현 V3 (De novo software)를 이용하였다. Alexa Fluor 488-결합된 마우스 IgG1 (BD Pharmingen)은 아이소타입 대조군(isotype control)으로 사용되었다. 플라보사이토크롬(flavocytochrome) b₅₅₈의 표면 발현을 분석하기 위하여 호중구(3×10^6 /ml)는 이.콜리로 1:10의 비율로 20분간 RPMI-1640 내에서 자극시켰다. 그리고나서 호중구는 Pharmingen 염색 완충액(BSA) (BD Pharmingen)으로 세척하고, PE 표지된 항-플라보사이토크롬 b₅₅₈ (MBL international)로 한 시간 동안 염색하였다. 호중구는 Pharmingen 염색 완충액(BSA)(BD Pharmingen)으로 세척한 후 구아바 이지사이트(Guava Easycyte)(GE Healthcare) 상에 획득하였다. 분석은 FCS 발현 V3 (De novo software)로 수행하였다.

[0071] <활성산소 측정>

[0072] 호중구가 이.콜리를 흡수하도록 20분간 두었다. 흡수되지 않은 이.콜리를 세척한 후 호중구는 DPI의 존재 하 또는 DPI가 없는 상태로 15분간 담체 또는 LPC(30 μM)에 노출시킨 후 형광 프로브인 2',7'-디클로로디하이드로플루오레신 디아세테이트(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCF-DA)(10 μM)로 10분간 배양하였다. 그리고 나서 PBS로 두 번 세척하고 형광을 측정하였다.

[0073] <플루오-3과 MQAE 형광 측정(Fluorescence measurement of Fluo-3 and MQAE)>

[0074] 형광을 내는 Ca^{2+} 지시약 플루오-3(Fluo-3)를 이용하여 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 를 측정하였다. 호중구는 HEPES 생리식염용액 (HEPES-PSS)(단위는 mM) (NaCl 140, KCl 5, MgCl_2 1, CaCl_2 1, 글루코스 10, HEPES 10)에 30분간 37°C로 플루오-3 AM($5\mu\text{M}$)로 로딩되었다. HEPES-PSS로 세척한 후 플루오-3 AM-로딩된 호중구는 5% FBS와 $133\mu\text{M}$ 글라이신이 보충된 HEPES-PSS에 재현탁하고 $3 \times 10^6/\text{ml}$ 의 밀도로 96-웰 플레이트에 놓았다. 플루오-3 AM 로딩된 호중구 내의 칼슘을 490nm/526nm에서 스펙트라마кс(Spectramax) M2/e 형광 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였다. 형광 발광 판독은 매 10초마다 기록되었다. 측정된 형광값에서 첫 5분간의 평균 형광값을 빼었다. 이.콜리를 1:10의 비율로 20분간 가하였다. 그 후 글라이신 1mM를 가하였다.

[0075] <세포 배양>

[0076] TRPM2-트랜스펙션된 HEK293 세포는 10% FBS, 페니실린(100units/ml) 및 스트렙토마이신(100units/ml)이 부가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 37°C, 5% CO_2 배양기로 배양하였다. TRPM2 발현을 유도하기 위하여 세포는 실험 전 독시사이클린(doxycycline) (dox; $1\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 최소 24시간 동안 배양하였다.

[0077] <마이크로 RNA-적응된 TRPM2 shRNA 트랜스펙션(Transfection with microRNA-adapted shRNA of TRPM2)>

[0078] ShRNAmir 타게팅 TRPM2를 Open Biosystems (AL, USA)에서 구입하였다. 서열은 다음과 같다: TRPM2에 대한 shRNAmir; 5'-TGC-TGT-TGA-CAG-TGA-GCGACC-TGC-TAT-CCT-GGG-AGA-TCT-ATA-GTG-AAG-CCA-CAG-ATG-TATAGA-TCT-CCC-AGG-ATA-GCA-GGG-TGC-CTA-CTG-CCT-CGG-A-3'. 호중구는 Amaxa Nucleofector TechnologyTM를 이용하여 짧은 헤어핀 RNA로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션은 제조자의 지시대로 수행하였다. 간단히 설명하면, 1×10^7 호중구를 인간 단핵구 뉴클레오펙터 용액(human monocyte nucleofector solution) ($100\mu\text{l}$) (human monocyte transfection kit, cat#VPA-1007, Amaxa Biosystems, Germany) 내에 실온에서 재현탁한 다음 $3\mu\text{g}$ 의 TRPM2에 대한 shRNA(shRNA against TRPM2), pmaxGFP (Amaxa Biosystems, Germany) 또는 대조군 shRNAmir를 가하였다. 트랜스펙션은 프로그램 Y-001을 이용하여 Amaxa[®] Nucleofector II 내에서 수행하였다. 그 후 즉시 호중구를 2.5ml 인간 뉴클레오펙터 배지로 희석하고 24시간 동안 습도가 유지되는 CO_2 배양기에서 배양하였다. 일반 트랜스펙션 효율을 평가하기 위하여 트랜스펙션된 세포 내에서 24시간 후 pmaxGFP의 발현을 FACS 분석하였다. 호중구는 하비스트하여 BD cytofixTM (BD Pharmingen, USA)로 고정하고 pmaxGFP 발현은 Guava EasyCyteTM (Guava Technologies, USA)에서 측정하였다. 평균 pmaxGFP 발현은 $11.3 \pm 0.7\%$ (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$)였다.

[0079] <전세포 기록(Whole-cell recordings)>

[0080] TRPM2-트랜스펙션된 HEK293 세포는 Pulse 8.5 software (HEKA, Lamprecht, Germany) 퍼스널 컴퓨터가 장착된 EPC앰플리파이어로 패치 클램프 기술을 이용하여 전세포 모드로 연구하였다. 패치 피펫은 보로실리케이트(borosilicate) 모세관(PP-83 puller, Narishige, Tokyo, Japan)으로부터 4-5m Ω 저항으로 끌어당겼다. 시리즈 저항(Series resistances)은 HEK293 세포가 -60mV일 때 15-20M Ω 데이터는 샘플링 속도(sampling rate) 3 kHz로 기록되었고, 10 kHz로 필터링되었다. 피펫과 다양한 농도의 염소 이온을 함유한 외부 용액은 다음과 같다: **외부 용액:** (단위 mM) 정상 normal Tyrode's (NT) 용액: NaCl 145, KCl 3.6, MgCl_2 1, CaCl_2 1.3, 글루코스 5, HEPES 10 with a pH of 7.4 (NaOH로 산도 조절). **내부용액(Internal solution):** (단위 mM) 저- Cl^- Cs^+ -용액: Cs-글루타메이트 140, NaCl 8, MgCl_2 1, MgATP 3, EGTA 10, HEPES 10, (pH 7.2, CsOH로 산도 조절). 모든 실험은 실온($22 \pm 1^\circ\text{C}$)에서 수행하였다. 레코딩 챔버는 외부 용액으로 ~10 ml/min 비중으로 과냉각(superfused)되었다.

[0081] <루시퍼 옐로우 흡수 측정(Measurement of lucifer yellow uptake)>

[0082] 호중구(4×10^6 /ml)를 5% FBS가 함유된 HBSS에 현탁시키고 이.콜리를 1:10 비율로 흡수하도록 20분 동안 두었다. 흡수되지 않은 이.콜리를 세척한 후 호중구는 루시퍼 엘로우(0.5mg/ml) 존재 하에 글라이신 또는 담체와 15분간 배양하였다. 그리고 나서 호중구는 차가운 PBS로 두 번 세척하고 아이스콜드 비이온화 증류수로 한 시간 동안 용균하였다. 식균된 루시퍼 엘로우는 스펙트라맥스(Spectramax) M2/e 형광 마이크로플레이트 판독기 (Molecular Devices)로 428nm 여기파장, 536nm 방출파장으로 측정하였다.

[0083] <아주로필 과립과 자이모산 융합(Fusion of azurophil granule and zymosan)>

[0084] 텍사스 레드 표지된 자이모산 입자(Z-2843, Molecular Probes)를 10% 인간 혈청 내에서 20분간 37℃로 배양한 후 PBS(pH 7.4)로 두 번 세척하고 PBS에 재현탁하였다. 글라스 커버슬립에 부착한 호중구(4×10^6 /ml)를 37℃로 한 시간 동안 24-웰 플레이트에서 배양하였다. 커버슬립은 텍사스 레드 표지된 자이모산이 함유된 60-mm 디쉬로 1:10 비율로 옮겼다. 20분 후 호중구를 세척하여 대부분의 세포의 텍사스 레드 표지된 자이모산을 제거하였다. 호중구는 24-웰 플레이트에 넣고 글라이신 500 μ M를 가하였다. 15분 후 실험시료를 PBS로 두 번 세척한 후 2% 파라포름알데히드(PFA)로 15분간 실온에서 고정하였다. 세포는 0.05% Triton X-100를 10분 동안 실온에서 처리하여 삼투성이 되도록 하였다. 3% BSA 함유 PBS로 1시간 블로킹한 후 호중구를 블로킹 완충액으로 1:50 희석한 항-CD63 항체 (556019, BD Biosciences)로 한 시간 동안 실온 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 후 알렉사 플루오(Alexa Fluor) 488 항-마우스 2차 항체(최종 희석 1:500)로 한 시간 배양하였다. PBS로 3회 세척한 후 세포를 마운팅 배지에 올렸다. 12 내지 16개의 공초점 이미지는 LSM 510 레이저 스캐닝 공초점 현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 수집하였다. 이미지 분석은 LSM 이미지 시험 소프트웨어(Zeiss)로 수행하였다. 이미지는 0.52 μ m 두께의 단일 섹션으로 표시된다.

[0085] <통계분석>

[0086] 모든 통계 데이터는 Graphpad Prism 4.0 (Graphpad software)으로 분석하였다. 생존률 데이터는 로그-랭크 테스트로 분석하였다. 모든 다른 데이터는 two-tailed Student's *t*-test 또는 ANOVA로 평가하였다. 본페로니 테스트(Bonferroni test)를 사후 비교(post hoc comparison) 목적으로 이용하였다. 표준편차 < 0.05는 통계학적 중요성을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0087] 도 1은 인간 호중구의 글라이신 수용체에 대한 데이터이다.

[0088] **a**는 인간 호중구 글라이신 수용체 서브타입을 RT-PCR 분석한 결과이다. **b**는 인간 호중구 내의 GlyR α 2와 양성 대조군으로서 GlyR α 2-트랜스팩션된 HEK293 세포에 대한 웨스턴 블랏 결과이다. GlyR α 2에 대한 블로킹 펩타이드가 있거나 없는 상태에서 수행하였다. **c**는 호중구의 GlyR α 2 공초점 분석 결과이다. 호중구는 Triton X-100으로 삼투성이 있도록 또는 없도록 하고 항-GlyR α 2 항체 (적색)로 염색하였다. **d**는 LPC(lysophosphatidylcholine) 및 fMLP(formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)에 대응한 GlyR α 2의 세포막 상 발현에 대한 대표적인 FACS 히스토그램이다. 호중구는 LPC(30 μ M) 및 fMLP(1 μ M)로 5분간 처리하였다. 고정 후 호중구는 FITC-결합된 항-GlyR α 2 항체로 30분간 염색하였다. **e**는 호중구에서 글라이신에 의한 Cl^- 전류의 측정 결과이다. **f와 g**는 PBS 또는 스트리크닌(0.4 mg/kg)을 30분간 미리 처리하고, 이.콜리 5×10^8 를 복강주사하고, 30분 후 담체(PBS) 또는 글라이신(30mg/kg)을 피하주사하여 이.콜리 주사 8시간 후 마우스를 희생하여 복강액 내의 CFU를 카운트하여 얻은 결과이다. *n*=그룹 당 9-10. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001 by Student's *t*-test.

[0089] 도 2는 글라이신 수용체-활성산소- Ca^{2+} 신호전달 체계를 나타내는 데이터이다.

[0090] **a**는 글라이신 유도 세균사멸 활성 강화에 대한 NADPH 옥시다제 저해제인 DPI의 효과를 나타내는 데이터이다. 호중구를 DPI(1 μ M)로 처리한 후 1시간 후에 HBSS 배지에 글라이신(500 μ M) 처리하였다. **b**는 호중구의 활성산소 생성에 대한 글라이신의 효과를 나타낸다. 호중구는 20분간 이.콜리에 노출시켰다. 흡수되지 않은 이.콜리를 세척하여 제거하고 15분간 글라이신(500 μ M) 이 있는 상태 또는 없는 상태로 배양하였다. 호중구에서 활성산소 생

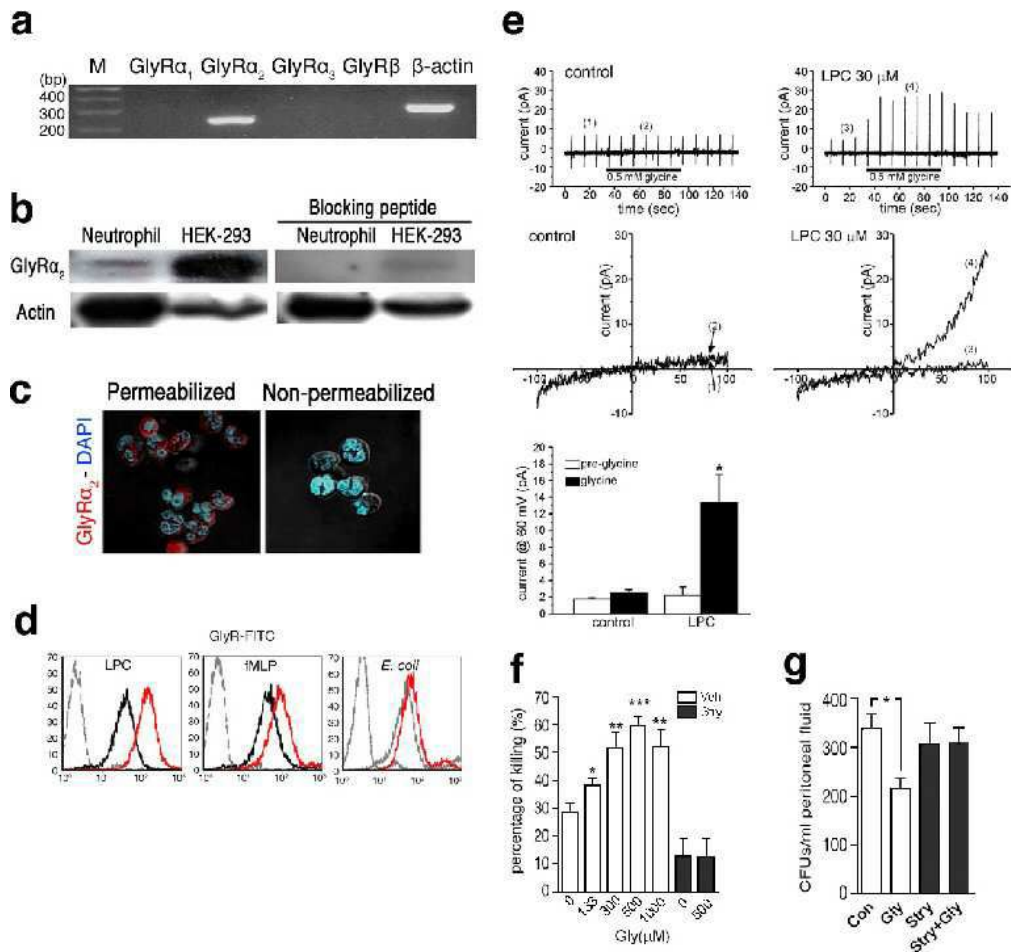
산을 DCF-DA로 측정하였다. **c**는 이.콜리에 노출된 호중구에서 $[Ca^{2+}]_i$ 에 대한 글라이신의 효과를 나타낸다. 호중구는 20분간 이.콜리에 노출하였다. 그리고 글라이신(1mM)이 있는 상태 또는 없는 상태로 배양하였다. 우측 패널은 호중구를 이.콜리에 노출시키기 전 15분간 DPI(1 μ M)로 선처리한 것이다. **d와 e**는 글라이신(1mM)-유도 호중구 내 $[Ca^{2+}]_i$ 증가에 대한 TRPM2-특이적 shRNA의 효과를 나타낸다(**d**). 글라이신(500 μ M)-유도 세균사멸활성 강화에 대한 TRPM2-특이적 shRNA의 효과(**e**). 호중구는 TRPM2에 대한 shRNA로 트랜스펙션되었다. 24시간 후 호중구 내 $[Ca^{2+}]_i$ 과 세균사멸활성에 대한 글라이신의 효과를 측정하였다. **f**, 플라보사이토크롬 b558의 세포막 발현에 대한 대표적인 FACS 히스토그램. 호중구는 이.콜리에 20분간 노출되었다. **a-e**, 세 번의 실험 평균값을 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ by Student's *t*-test.

[0091] **도 3은 글라이신이 p38 MAPK을 통해 아주로과립-파고종의 융합을 촉진함을 설명하는 데이터와 모식도이다.**

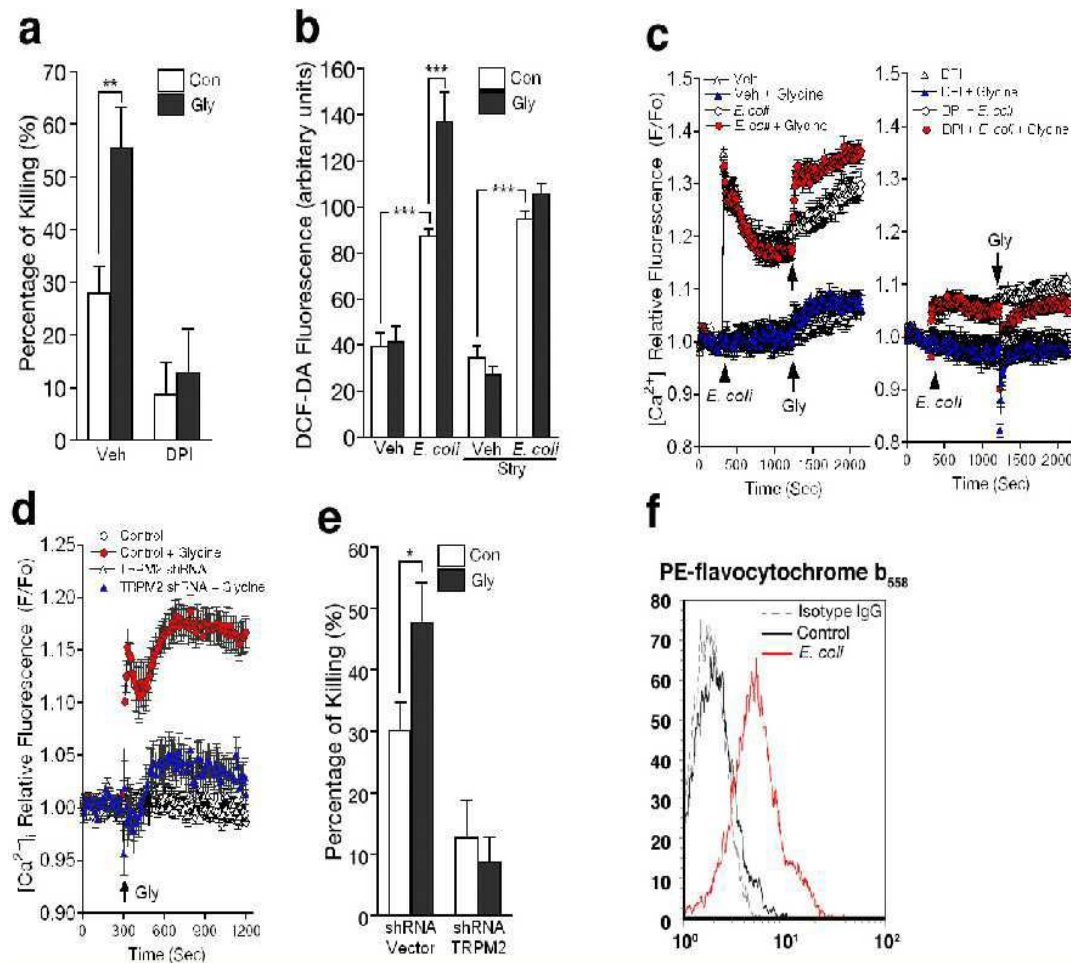
[0092] **a**, 글라이신-유도 액상 음세포작용(fluid-phase pinocytosis) 강화에 대한 스트리크닌, DPI 및 SB203580의 영향. 호중구에서 루시퍼 옐로우 흡수를 액상 음세포작용으로 측정하였다. 호중구는 이.콜리에 20분간 노출시켰다. 식균되지 않은 이.콜리는 세척해 제거하였고 호중구는 0.5mg/ml 루시퍼 옐로우 존재 하에 15분간 글라이신(500 μ M)과 함께 배양하였다. 스트리크닌(1 μ M), DPI(1 μ M) 또는 SB203580(10 μ M)를 15분 배양 동안 가하였다. 호중구는 아이스콜드 증류수에 한 시간 동안 담가 용균하였고, 형광을 측정하였다. **b**, 자이모산-CD63 융합에 대한 스트리크닌, DPI 및 SB203580의 효과. 호중구는 20분간 텍사스-레드 융합된 자이모산을 섭취하도록 하였다. 식균되지 않은 자이모산 입자는 세척하여 제거하였고 호중구는 스트리크닌, DPI 또는 SB203580의 존재 하에 글라이신과 함께 배양하였다. 호중구는 고정하여 항-CD63 항체로 염색하였다. 공촛점 이미지 12 내지 16개를 LSM 510 레이저-스캐닝 공촛점 현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 수집하여 LSM 이미지 시험 소프트웨어(Carl Zeiss, Germany)로 분석하였다. CD63과 자이모산 입자의 융합은 매 0.52 μ m-두께 슬라이스마다 분석되었다. **c**, 글라이신-유도 세균사멸활성 강화에 대한 단백질 저해제 혼합물과 SB203580의 효과. 호중구는 먼저 단백질 저해제 혼합물 또는 SB203580으로 한 시간 동안 처리한 후 이.콜리에 노출시켰다. **a-c**, 세 번 실험의 평균값을 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. ***, $P < 0.001$ by Student's *t*-test. **d**, GlyRa2 매개 호중구 세균사멸활성 강화 모델.

도면

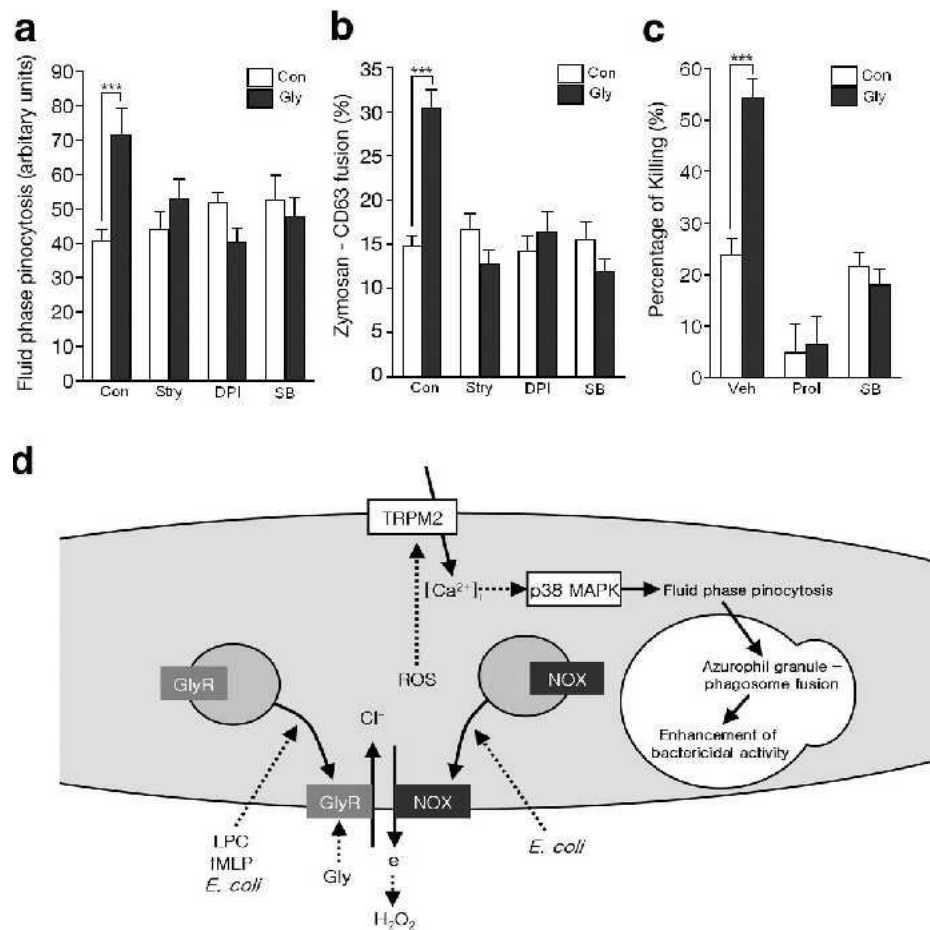
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
 <120> Glycine which enhance neutrophil microbicidal activity

<130> HallymU-dksong-glycine

<160> 11

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR forward primer of GlyRa1

<400> 1

tgcaatagcg ctttctgggtt

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR reverse primer of GlyRa1

<400> 2

tccgggagat ccttagcaat

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer of GlyRa2

<400> 3

ggaacgcaa atgggatatt

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer of GlyRa2

<400> 4

tggacatctt catgccgaat

20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer of GlyRa3

<400> 5
 ttctccaat cctgggtctc 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer of GlyRa3

<400> 6
 tcctgatgtc ctgcccatta 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer of GlyRb

<400> 7
 aaaaatggaa tgaccccagg 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer of GlyRb

<400> 8
atccagaagg aaagccagga 20

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of b actin

<400> 9
tggagtctg tggcatccac gaaac 25

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of b actin

<400> 10
aagcatttgc ggtggacgat ggag 24

<210> 11
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shRNAmir against TRPM2

<400> 11
tgctgttgac agtgagcgac ctgctatcct gggagatcta tagtgaagcc acagatgtat 60

agatctccca ggatagcagg gtgcctactg cctcgga 97