



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0111417
(43) 공개일자 2020년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/748 (2014.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61P 1/00 (2006.01) A61P 1/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/748 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0031055
(22) 출원일자 2019년03월19일
심사청구일자 2019년03월19일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
남택정
부산광역시 남구 고동골로 91-2(문현동,
부광연립)
정수진
부산광역시 남구 용소로13번길 104, 404호(
대연동, 대동레미안)
(74) 대리인
김순웅

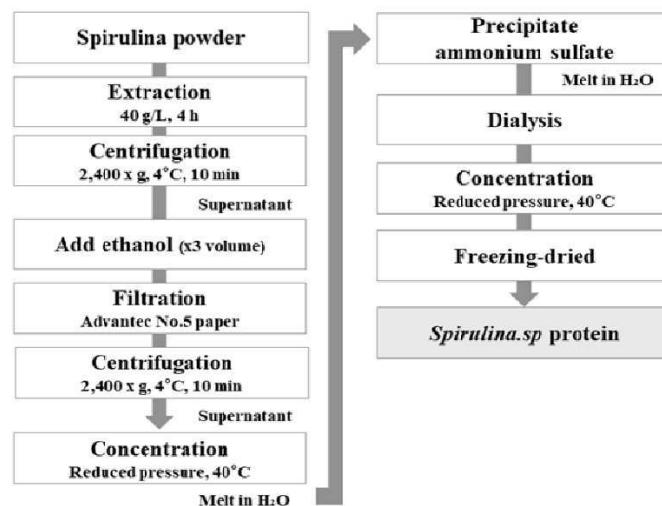
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 스피루리나 유래 단백질을 포함하는 위장질환 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 스피루리나 유래 단백질을 포함하는 위장질환 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 스피루리나 조단백질을 포함하는 상피세포 증식 촉진용 조성물, 위장질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질은 장 상피세포 표면의 상피세포 성장인자 수용체의 인산화를 통해 관련 신호전달 경로를 활성화시킴으로써 장 상피세포의 증식을 유도하는 효과를 가지고 있는바, 위장질환의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)

A61P 1/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/32 (2013.01)

A23V 2250/206 (2013.01)

A23V 2250/546 (2013.01)

(72) 발명자

최정욱

부산광역시 동래구 아시안드대로154번길 51(사직동)

이민경

부산광역시 동래구 아시안드대로 234, 102동 2705호(온천동, 온천동반도보라스카이뷰)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345284427

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)

연구과제명 해산식물 유래 항노화 소재 개발 및 분자 작용 메커니즘

기 여 율 1/1

과제수행기관명 부경대학교

연구기간 2018.07.01 ~ 2019.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

스피루리나 조단백질(Spirulina crude protein, SPCP)을 포함하는 상피세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 스피루리나 조단백질은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출된 스피루리나 추출물에 포함된 당 및 암모늄 설페이트를 제거한 것인, 상피세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 스피루리나 조단백질은 15 내지 20kDa의 크기인, 상피세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 상피세포는 소장 상피세포인, 상피세포 증식 촉진용 조성물.

청구항 5

스피루리나 조단백질을 포함하는 위장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 위장질환은 위궤양, 위염, 십이지장 궤양, 소화성 궤양, Zollinger-Ellison 증후군, 역류성 식도염, 수술 후 궤양, 비스테로이드성 소염진통제(NSAID)로 인한 위 또는 십이지장궤양 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상인, 위장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

스피루리나 조단백질을 포함하는 위장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 위장질환은 위궤양, 위염, 십이지장 궤양, 소화성 궤양, Zollinger-Ellison 증후군, 역류성 식도염, 수술 후 궤양, 비스테로이드성 소염진통제(NSAID)로 인한 위 또는 십이지장궤양, 장상피화생 및 위암으로 구성된 군으로부터

터 선택되는 1 이상인, 위장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스피루리나 유래 단백질을 포함하는 위장질환 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 스피루리나 조단백질을 포함하는 상피세포 증식 촉진용 조성물, 위장질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 위장관의 표면은 장 상피세포(Intestinal epithelial cells, IECs)의 단층으로 덮여있어 음식물을 소화시키고 영양소를 흡수하며 외부유해인자와 미생물에 의한 감염으로부터 인체를 보호한다. 이러한 기능이 원활히 이루어지지 않으면 흡수장애 및 이차감염을 유발하므로 장벽과 이를 구성하는 장 상피세포의 항상성을 유지하는 것은 매우 중요하다. 장 상피세포는 다른 신체조직에 비해 유해한 자극에 노출될 가능성이 높으므로 빠르게 성장하는 특성을 지니고 있으며, 위장관의 점막이 손상을 입으면 손상부위에 인접한 상피세포가 손상부위로 이동하고 이후 세포분열을 통해 증식함으로써 장 점막의 항상성을 유지할 수 있다. 이러한 장 상피세포의 조절과정은 주로 다양한 성장인자, 신경전달물질 및 내분비세포의 매개체에 의해 조절되는 복잡한 과정이다. 특히 장 상피세포를 포함한 상피세포의 증식촉진과 관련하여 상피세포 증식인자(epidermal growth factor, EGF) 펩타이드 패밀리가 가장 널리 연구된 성장인자로 알려져 있으며, 신호전달 경로를 통해 전달되는 세포외 신호는 세포주기 조절을 통해 장 상피세포의 증식을 조절하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 한편, 위장질환은 식이와 매우 밀접한 질환으로, 현대인의 생활양식 변화와 식습관의 서구화로 인해 위장질환을 겪고 있는 이들이 증가하고 있다. 특히 염증성 장 질환(Inflammatory bowel disease, IBD)을 비롯한 다양한 위장질환이 장 점막의 표면에 반복적인 손상을 유발하여 장 상피세포의 결함을 초래한다는 연구결과가 보고되었다. 따라서 위장질환으로 인한 손상된 장 점막의 치유와 예방을 위한 방법으로 장 상피세포를 기반으로 한 연구의 중요성이 커지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이에 본 발명자들은 손상된 장 점막의 재생에 관한 연구를 수행하던 중 스피루리나 조단백질이 장 상피세포의 증식을 촉진시킨다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0005] 따라서 본 발명의 목적은, 스피루리나 조단백질을 포함하는 상피세포 증식 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은, 스피루리나 조단백질을 포함하는 위장질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스피루리나 조단백질을 포함하는 상피세포 증식 촉진용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 스피루리나 조단백질을 포함하는 위장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 스피루리나 조단백질을 포함하는 위장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질은 장 상피세포 표면의 상피세포 성장인자 수용체의 인산화를 통해 관련 신호전달 경로를 활성화시킴으로써 장 상피세포의 증식을 유도하는 효과를 가지고 있는바, 위장질환의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질의 제조방법을 나타낸 도이다.

도 2는 SDS-PAGE 방법으로 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질의 크기를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 MTS 분석법으로 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 소장 상피세포의 세포 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 형태학적 분석을 통해 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 소장상피세포의 세포 형태에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 상처 치유 분석방법으로 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 세포 이동에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 웨스턴 블롯팅을 통해 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 EGRF 및 EGFR 결합 단백질의 발현에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 웨스턴 블롯팅을 통해 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 MAPK/ERK 신호전달 경로에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 MEK 발현 억제제를 이용하여 MEK 발현이 억제된 소장 상피세포에서 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 세포 증식에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 웨스턴 블롯팅을 통해 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 PI3K/Akt 신호전달 경로에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 웨스턴 블롯팅을 통해 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 mTOR 신호전달 경로에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 PI3K 발현 억제제를 이용하여 PI3K 발현이 억제된 소장 상피세포에서 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 세포 증식에 미치는 영향을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 세포주기 분석을 통해 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 소장 상피세포의 세포주기에 미치는 영향을 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 13 및 14는 웨스턴 블롯팅을 통해 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 처리된 세포에서 세포주기 조절 단백질의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 15는 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질이 세포 증식 관련 신호전달 경로 및 세포주기 조절에 미치는 영향을 도식화한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0013] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 스피루리나 조단백질을 포함하는 상피세포 증식 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명에 있어서, “스피루리나(spirulina)”는 아열대 및 열대지역의 알칼리성 호수에서 서식하는 시아노박테리아로, 세포 내 엽록소(녹색) 및 피코시아닌(청색)을 포함하며, 나선형의 세포 구조를 가지는 청록색 미세조류를 의미한다.
- [0015] 본 발명에 있어서, “조단백질(crude protein)”은 가공하지 않은 순수한 단백질로써, 단백질 외에 아미노산, 아마이드, 암모니아 화합물 및 배당체 등을 포함한다.
- [0016] 본 발명의 구체예에서, 스피루리나 조단백질은 스피루리나 추출물을 제조한 후 단백질 침전과정을 통해 수득된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 단백질 침전과정은 순수한 단백질을 분리하기 위한 과정으로써, 암모늄 설페이트 염 침전법을 이용하여 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 재부유시킨 후 투석막을 이용하여 잔류 암모늄 설페이트를 제거하여 스피루리나 조단백질을 얻었다.
- [0017] 상기 스피루리나 추출물은 당업계에서 공지된 추출, 분리 및 분획하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출, 분리 및 분획하여 수득한 것을 사용할 수 있다. 본 발명에서 정의된 “추출물”은 적절한 용매를 이용하여 스피루리나로부터 추출 처리에 의해 얻어지는 것이며, 예를 들어 스피루리나의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함하며, 그 중에서도 극성용매 가용 추출물인 것이 바람직하다.

- [0018] 상기 스피루리나 추출물은 다양한 추출 용매와 추출 방법에 따라 추출될 수 있으며, 스피루리나로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 물 또는 유기용매, 예를 들어 상기 용매로는 물, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등의 탄소수 1 내지 4의 알코올 등을 단독으로 또는 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 본 발명 추출물의 추출 용매로 물을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 추출 온도는 10 내지 100℃인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 20 내지 25℃이나, 이에 제한되지 않는다. 또한 추출방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 침지법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법이 사용될 수 있으며, 특히 침지법을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0020] 상기와 같이 물 또는 유기용매를 이용하여 추출물을 얻은 이후에는 당업계에서 알려진 통상의 방법으로 상온에서 농축, 가열, 여과 및 투석하여 액상물을 얻을 수 있으며, 또는 추가로 용매를 증발, 분무건조 또는 동결건조할 수도 있다.
- [0021] 본 발명의 구체예에서, 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질은 1 내지 45kDa의 크기인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 15 내지 20kDa의 크기이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 구체예에서, 상기 상피세포는 장 상피세포인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 소장 상피세포이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명에 따른 스피루리나 조단백질은 상피세포의 표면에 있는 EGFR의 인산화를 통해 MAPK/ERK 및 PI3K/Akt 신호전달 경로를 활성화시키며, 이러한 신호전달 경로가 세포주기 진행을 촉진함으로써 소장 상피세포의 증식을 촉진하는 효과가 있는바, 상피세포 증식 촉진용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따른 상피세포 증식 촉진용 조성물은 생체 내 또는 생체 외에서 상피세포의 증식을 촉진시키기 위한 시약 조성물 또는 배지 조성물인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 스피루리나 조단백질을 포함하는 위장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, “위장질환”은 위장 점막의 표면에 발생한 손상 또는 염증으로 인한 질환을 의미하며, 상기 위장질환의 예로는 위궤양, 위염, 십이지장 궤양, 소화성 궤양, Zollinger-Ellison 증후군, 역류성 식도염, 수술 후 궤양, 비스테로이드성 소염진통제(NSAID)로 인한 위 또는 십이지장궤양, 장상피화생, 위암 등이 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 1일 1 내지 1,000mg/kg일 수 있으나, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되

지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.

[0033] 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 상기 비경구 투여 방식으로는 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등이 포함되며, 상기 약학적 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 스피루리나 조단백질을 포함하는 위장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명에 따른 위장질환 예방 또는 개선용 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품 조성물의 제형 또한 식품 조성물로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 또한 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등), 식품첨가제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물을 건강기능식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 바람직하게는 50 중량부 이하, 보다 바람직하게는 25 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 조절 및 위생을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안정성 면에서 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 스피루리나 조단백질을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0040] 또한, 상기 식품 조성물은 스피루리나 조단백질 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0044] 실험 재료 및 기기

[0045] 본 연구에 사용한 스피루리나는(주)Adw1에서 제조한 건조분말을 구입하여 사용하였다. American Type Culture Collection(ATCC, USA)로부터 정상 소화관 세포주인 IEC-6(intestinal epithelial, Rat)를 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 필요한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), 소태아혈청(FBS), 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin, P/S)과 인산염 완충용액(phosphate-buffered saline, PBS)은 Gibco BRL(Life

Technologies, Gibco BRL, Gaitherberg, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0046] 세포 생존율을 측정하기 위하여 Promega 사(Madison, WI, USA)에서 CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit를 구입하여 사용하였으며, MEK 억제제인 U0126과 PI3 키나아제 억제제인 LY294002는 Cell signaling(Beverly, MA, USA) 제품을 사용하였다.

[0047] 웨스턴 블롯팅을 위해 사용한 1차 항체와 2차 항체는 각각 Santa Cruz Biotechnology(CA, USA) 및 Cell signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 30% 아크릴아마이드(acrylamide, 29:1)와 단백질 스탠다드 마커인 dual color marker는 BIO-RAD(Richmond, CA, USA) 제품을 사용하였으며, 전기영동 후 멤브레인을 블로킹하기 위한 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)은 MP biomedical(Irvine, CA, USA) 제품을 사용하였다. 검출 시약으로 Super signal West Pico Luminol/Enhancer 용액과 Supersignal West Pico Stable Peroxide Solution(Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA)을 이용하였으며, Azure c300(Azure biosystems, Dublin, CA, USA)으로 현상하였다.

[0048] 세포주기는 BD Cycletest™ Plus DNA kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 제품을 사용하여 분석하였으며, 유세포분석기(FACSVerse flow cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 세포주기를 측정하였다.

[0050] 실험예 1. SDS-PAGE

[0051] 스피루리나 조단백질(Spirulina crude protein, 스피루리나 조단백질)의 크기를 확인하기 위해 스피루리나 조단백질(50 µg/ml)을 15% 폴리아크릴아미드 겔에 로딩하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동된 겔을 쿠마시 블루(7% 아세트산, 40% 메탄올, 0.1% coomassie brilliant blue) 용액으로 실온에서 약 1시간 동안 염색시킨 후 탈색 용액(7% 아세트산, 20% 메탄올)으로 약 1시간 동안 탈색시킨 후 염색된 밴드를 확인하였다.

[0053] 실험예 2. 세포의 배양

[0054] 본 실험에서 사용한 IEC-6 세포는 100mm 세포배양 접시에서 배양하였으며, DMEM 배지를 사용하여 37° C 및 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 상기 DMEM 배지는 10% FBS, 페니실린(100 units/ml), 스트렙토마이신(100 µg/ml)을 1% 함유한다. 세포 배양 중 배지는 48시간 마다 교환하였고, 세포가 70 내지 80% 정도 컨플루언트해지도록 배양하였다. 배양된 세포는 PBS로 2회 세척한 후 트립신을 처리하여 계대배양 하였다.

[0056] 실험예 3. 세포 증식 분석

[0057] 3-1. MTS 분석

[0058] 스피루리나 조단백질이 IEC-6 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTS 분석을 수행하였다. 96-웰 플레이트에 1×10⁴ cells/well로 세포를 균일하게 분주하고, 세포 부착을 위해 24시간 동안 배양하였다. 세포부착 후 SFM(serum free medium)으로 배지를 교환하여 4시간 동안 추가 배양하고, 스피루리나 조단백질을 농도별로(0, 12.5, 25, 50 µg/ml) 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. MTS/PMS 용액(Promega corporation, Madison, WI, USA)을 첨가하여 37° C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 30분 동안 반응시킨 후 Gen5™ ELISA Microplate Reader(Bio-Tek Houston, TX, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0060] 3-2. 형태학적 확인

[0061] IEC-6 세포에 스피루리나 조단백질을 처리하였을 때 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. 구체적으로, IEC-6 세포를 6-웰 플레이트에 분주한 후 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 약 40% 성장하였을 때 스피루리나 조단백질을 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 스피루리나 조단백질을 처리한 세포를 PBS로 2회 세척한 후 위상차 현미경을 이용하여 세포형태를 관찰하였다.

[0063] 실험예 4. 상처 치유 분석(Wound-healing assay)

[0064] 상처 치유 분석을 통해 스피루리나 조단백질이 IEC-6 세포의 세포이동(cell migration)에 미치는 영향을 확인하였다. 6-웰 플레이트에 세포를 분주한 후 10% FBS가 함유된 배지에서 100%가 되도록 배양하였다. 이 후 멸균된 200 μ l 피펫의 팁 끝을 사용하여 웰의 정 가운데 부분을 일정하게 스크래치를 냈으며, 이를 PBS 2회 세척한 후 현미경으로 사진을 촬영하였다. 그다음 SFM으로 4시간 더 배양한 후 스피루리나 조단백질을 0, 12.5, 25, 50 μ g/ml의 농도로 각각 처리한 후 배양하였다. 24시간 후 PBS 세척을 하고 현미경으로 사진을 촬영하여 세포의 이동정도를 확인하였으며, 각각의 간격은 Image J 소프트웨어(version 4.16; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 스피루리나 조단백질 처리 24시간 전 간격에 대한 스피루리나 조단백질 처리 24시간 후 간격의 백분율로 나타내었다.

[0066] 실험예 5. MEK/PI3K 억제제

[0067] IEC-6 세포를 96-웰 플레이트에 시딩한 후, 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시키고, SFM 배지로 교환하였다. 배지를 교환한지 4시간 후, MEK 억제제인 U0126 10 μ M과 PI3K 억제제인 LY294002 50 μ M을 세럼프리-DMEM 배지에 희석하여 처리하였다. 억제제 처리 1시간 후 스피루리나 조단백질을 세포에 50 μ g/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 세포생존율을 MTS 분석을 통해 확인하였다. 상기 MTS 분석은 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다.

[0069] 실험예 6. 웨스턴 블롯팅

[0070] 6-1. 전체 세포 용해물 추출

[0071] 전체 세포 용해물을 추출하기 위하여, 스피루리나 조단백질을 농도별(0, 12.5, 25, 50 μ g/ml)로 처리한 IEC-6 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 세척된 세포에 프로테아제 억제제(1mg/ml 아프로티닌, 1mg/ml 류펩틴, 1mg/ml 펩스타틴 A, 200mM Na₃VO₄, 500mM NaF, 100mM PMSF)를 첨가한 RIPA 용해 완충액(1% NP-40, 0.25% 소듐 데옥시콜레이트, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.5)을 첨가한 후 30분 동안 냉장보관 하였다. 그 후 얼음 위에서 각 실험군의 세포 용해물을 회수 하였다. 회수한 세포 용해물은 원심분리(18,000xg, 4° C, 30분)하였다. 원심분리 후 상층액을 이용하여 BCA 분석을 통해 정량한 후 실험에 사용하였다.

[0073] 6-2. 단백질 발현 및 분석

[0074] 스피루리나 조단백질을 농도별로 처리한 IEC-6 세포에 용해 완충액을 분주하여 4° C의 저온에서 30분 방치한 후 세포 용해물을 원심분리하였다. 그 후 상층액을 취하여 단백질 농도를 측정하였다. 각각의 실험군들의 단백질 농도를 45 μ g/ml로 동일하게 정량한 후 5X 샘플 완충액과 혼합하여 샘플을 준비하였다. 준비된 샘플을 100° C의 워터베이스에서 약 5분 동안 끓인 후 사용하였다.

[0075] 각 군의 샘플을 폴리아크릴아미드 겔에 로딩한 후 전기영동하였으며, 듀얼 컬러 마커(BIO-RAD, USA)를 이용하여 표준분자량을 나타내었다. PVDF 멤브레인(Millipore, USA)으로 트랜스퍼하였다. 트랜스퍼 후 멤브레인은 1% BSA/TBS-T를 이용하여 실온에서 1시간 30분 동안 블로킹하고, 1차 항체를 1:1,000 또는 1:500 으로 희석해 4° C에서 밤새도록 반응시켰다. 그 후 멤브레인을 TBS-T로 15분 씩 2회 세척하였다. 이 후 1:10,000 비율로 희석한 2차 항체를 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이 후 멤브레인을 TBS-T로 15분 씩 2회 세척하였다. 현상을 위해, Super Signal West Pico Stable Peroxide 용액과 Super Signal West Pico Luminol/ Enhancer 용액(Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA)을 멤브레인과 반응시키고, 형광 젤 이미지 분석장치(Azure biosystems, CA, USA)로 현상한 후 스캐닝하여 나온 밴드로 단백질 발현 수준을 확인하였다. 또한 밀도 측정(densitometry) 분석은 Multi-Gauge software version 3.0(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

[0077] 실험예 7. 세포주기 분석

[0078] 스피루리나 조단백질에 의한 세포주기 변화를 확인하기 위해, BD Cycletest™ Plus DNA kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하였다. IEC-6 세포를 분주하고, 10% FBS를 함유한 DMEM 배지로 배양하였다. 세포가

약 40 내지 50%로 증식했을 때 SFM으로 배지를 교환하고 4시간 후 스피루리나 조단백질을 농도별로 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 PBS로 세포를 부유시켜 원심분리(300xg, 20° C, 5분)하였으며, 펠릿을 버퍼 용액을 이용하여 회수하였다.

[0079] 회수된 세포는 BD Cycletest™ Plus DNA kit의 매뉴얼에 따라 염색을 진행하였다. 앞서 준비한 세포분획을 원심 분리 후 상층액을 제거 한 후 실온에서 트립신 완충액과 트립신 억제제 및 RNase 완충액을 각각 10분씩 반응시켰다. 그 후 얼음 위에서 PI 염색 용액을 첨가하고 빛을 차단하여 10분 동안 반응시켰다. 반응 후 50 μm 나일론 메쉬에 여과하였으며, BD FACSVerse flow cytometer(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 세포주기를 측정하였다.

[0080] 측정된 데이터는 ModFit LT software(version 2.0; Verity Software House Inc., Topsham, ME, USA)를 이용하여 DNA 함량에 따라 세포주기의 각 구획을 나누었다. 세포주기의 각 구획에 있는 세포의 수는 존재하는 총 세포의 백분율로 지정되었다.

[0082] 실험예 8. 통계학적 분석

[0083] 모든 실험에서 분석한 각각의 군의 결과는 평균과 표준편차(mean ± SD)를 사용하여 표기하였다. 또한 각 군의 유의성 검증을 위해 ANOVA 시험과 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 윈도우용 SPSS 프로그램(Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용해 적용하였다. 이 때, 통계적 유의도 수준은 ** $P < 0.01$ 과 * $P < 0.05$ 이다.

[0085] 실시예 1. 스피루리나 조단백질(Spirulina crude protein, SPCP)의 제조

[0086] 스피루리나 조단백질은 도 1에 나타낸 바와 같이 제조하였다. 구체적으로, 스피루리나 조단백질을 제조하기 위하여(주)Adwe1에서 제조된 스피루리나 건조분말을 사용하였다. 스피루리나 건조분말 40g을 증류수 1L에 침지시켜 상온에서 4시간 동안 교반 후 원심분리(2,400xg, 4° C, 10분)하여 상층액을 분리하였다. 당을 침전시키기 위하여 분리한 상층액에 대해 3배 부피에 달하는 에탄올을 첨가하여, 4° C에서 24시간 동안 반응시켰다. 24시간 후 당과 잔사를 제거하기 위하여 다시 원심분리(2,400xg, 4° C, 10분) 후 감압 여과하였으며, 얻어진 여과액을 감압 농축하였다. 상기 농축액에 80% 황산암모늄을 첨가하여 농축액에 포함된 단백질을 침전시켰다. 단백질이 침전된 농축액을 탈 이온수로 충분히 투석하여 염을 제거 후 동결건조기로 건조하여 스피루리나 조단백질을 수득하였다.

[0088] 스피루리나 조단백질을 확인하기 위하여, 상기 실험예 2의 방법으로 SDS-PAGE를 수행하였다. SDS-PAGE를 수행한 결과는 도 2에 나타내었다.

[0089] 도 2에 나타낸 바와 같이, 15 내지 20kDa 사이에서 두 개의 단백질 밴드를 확인하였다.

[0091] 실시예 2. 스피루리나 조단백질에 의한 IEC-6 세포 성장촉진효과

[0092] 2-1. 스피루리나 조단백질이 IEC-6 세포 증식에 미치는 영향

[0093] 래트에서 유래한 소장 상피세포인 IEC-6 세포의 증식에 스피루리나 조단백질이 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTS 분석을 수행하였다. MTS 분석은 상기 실험예 3-1의 방법으로 수행하였으며, 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0094] 도 3에 나타낸 바와 같이, IEC-6 세포에 스피루리나 조단백질을 0, 12.5, 25, 50 μg/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 약 125%, 140%, 153%로 농도의존적인 세포증식을 관찰하였다. 이후 실험은 스피루리나 조단백질 0, 12.5, 25, 50 μg/ml의 농도 범위에서 진행하였다.

[0096] 스피루리나 조단백질이 IEC-6 세포의 형태에 미치는 영향을 상기 실험예 3-2의 방법으로 확인하였으며, 그 결과는 도 4에 나타내었다.

- [0097] 도 4에 나타난 바와 같이, 스피루리나 조단백질 처리군은 대조군에 비교하여 세포의 형태학적 변화는 관찰할 수 없었으며, 대조군보다 세포수가 많아진 것을 육안으로 확인할 수 있었다.
- [0099] MTS 분석 및 형태학적 확인을 통해, 스피루리나 조단백질은 형태학적 변화 없이 소장 상피세포를 증식시킨다는 것을 확인하였다.
- [0101] **2-2. 스피루리나 조단백질이 IEC-6 세포 이동에 미치는 영향**
- [0102] 스피루리나 조단백질이 IEC-6 세포의 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 실험에 4의 방법으로 상처 치유 분석을 하였다. 스피루리나 조단백질을 처리한 IEC-6 세포의 상처 치유 분석 결과는 도 5에 나타내었다.
- [0103] 도 5에 나타난 바와 같이, IEC-6 세포에 스크래치를 낸 후 스피루리나 조단백질을 0, 12.5, 25, 50 µg/ml의 농도로 24시간 동안 처리하였을 때, 스크래치의 간격이 점차 좁혀지는 것을 관찰하였다.
- [0104] 또한 각각의 간격을 측정하여 세포 이동의 정도를 스피루리나 조단백질 처리 전 간격에 대한 스피루리나 조단백질 처리 후 간격의 백분율로 나타낸 결과, 스피루리나 조단백질을 처리하지 않았을 때는 스크래치 후 약 135%의 이동이 이루어진데 반해, 스피루리나 조단백질을 처리하였을 때는 약 215%, 296%, 386%로 농도의존적인 세포이동 증가가 확인되었다.
- [0105] 상기 결과는 스피루리나 조단백질은 24시간 내 IEC-6 세포의 증식뿐만 아니라 세포의 이동을 촉진시킨다는 것을 의미한다.
- [0107] **실시예 3. 스피루리나 조단백질에 의한 세포증식 신호전달 분석**
- [0108] **3-1. EGFR(Epidermal growth factor receptor) 및 EGFR 결합 단백질에 미치는 영향**
- [0109] 앞서 스피루리나 조단백질이 IEC-6 세포의 증식 및 이동을 촉진시키는 것을 확인하였다. 스피루리나 조단백질이 장 상피세포의 증식을 어떻게 조절하는지 기전을 확인하기 위해, 본 실시예에서는 성장인자에 의해 활성화되어 신호전달을 매개하는 EGFR 및 EGFR 결합 단백질의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 상기 웨스턴 블롯팅은 상기 실험에 6의 방법으로 수행하였으며, 그 결과는 도 6에 나타내었다.
- [0110] 도 6에 나타난 바와 같이, 스피루리나 조단백질 처리 24시간 후 EGFR의 인산화가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 더불어 EGFR 결합 단백질인 Shc, Grb2 및 Sos1 단백질 발현도 증가하는 것을 확인하였다.
- [0112] **3-2. MAPK/ERK 신호전달 경로에 미치는 영향**
- [0113] **3-2-1. MAPK/ERK 신호전달 경로 분석**
- [0114] 상기 실시예 3-1에서 스피루리나 조단백질이 IEC-6 세포의 EGFR 인산화를 증가시키고, 상기 EGFR 결합 단백질인 Shc, Grb2 및 Sos1의 발현 증가로 세포증식이 유도되는 것을 확인하였다.
- [0115] 하위신호전달 경로에는 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 EGFR의 하위신호전달 경로로 알려진 미토겐 활성화 단백질 키나아제(mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 경로 중 세포주기 진행, 세포 이동, 생존, 분화 대사 및 세포의 증식 조절에 관여하는 세포외 신호 조절 키나아제(extracellular signal-regulated kinases, ERK) 경로의 단백질 발현을 분석하였다. 상기 신호전달 경로 분석은 실험에 6의 방법에 따라 수행하였으며, 그 결과는 도 7에 나타내었다.
- [0116] 도 7에 나타난 바와 같이, 스피루리나 조단백질을 처리한 후 Ras 발현의 증가와 함께 그 하위인자인 Raf-1, MEK-1 및 ERK-1/2 인산화가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 상기 결과는 IEC-6 세포가 스피루리나 조단백질 처리로 인해 세포표면의 EGFR로부터 Ras가 신호를 받아 그 뒤로 순차적인 인산화를 통해 세포증식이 유도된다는 것을 의미한다.
- [0118] **3-2-2. MEK 발현억제가 세포증식에 미치는 영향**

- [0119] 앞선 실시예에서 IEC-6 세포에 스피루리나 조단백질을 처리하였을 때 MAPK/ERK 경로가 순차적으로 활성화되는 것을 확인하였다. 이에, MEK 발현 억제제인 세포증식에 미치는 영향을 확인하였다. 구체적으로, MEK 억제제인 U0126을 사용하여 MEK 발현을 억제하고, MTS 분석을 통해 스피루리나 조단백질이 IEC-6 세포증식에 미치는 영향을 조사하였다. MEK 발현 억제 및 MTS 분석은 각각 실험예 5 및 3에 개시된 방법으로 수행하였으며, 그 결과는 도 8에 나타내었다.
- [0120] 도 8에 나타낸 바와 같이, IEC-6 세포에 U0126을 단독으로 처리하였을 때 세포증식이 억제되는 것을 확인하였다. 반면에 스피루리나 조단백질을 단독으로 처리하였을 때 세포증식이 촉진되었다. 그러나 10 μ M의 U0126을 1시간 처리한 후, 스피루리나 조단백질을 처리한 결과 대조군 수준으로 세포증식이 억제되는 것을 확인하였다.
- [0121] 상기 결과는 스피루리나 조단백질이 MAPK/ERK 경로를 통해 IEC-6 세포의 증식촉진을 유도하는 것을 의미한다.
- [0123] **3-3. PI3K/Akt 신호전달 경로에 미치는 영향**
- [0124] **3-3-1. PI3K/Akt 신호전달 경로 분석**
- [0125] EGFR의 다른 하위경로인 PI3K/Akt 신호전달 경로도 IEC-6 세포의 증식에 관여하는지에 대해 조사하였다. 스피루리나 조단백질을 IEC-6 세포에 처리한 후 관련된 단백질의 발현을 실험예 6의 웨스턴 블롯팅 방법으로 확인하였으며, 그 결과는 도 9에 나타내었다.
- [0126] 도 9에 나타낸 바와 같이, 스피루리나 조단백질 처리군은 PI3K의 조절부위인 p85 및 촉매부위인 p110의 발현이 대조군에 비해 증가하였다. 또한 PDK1 발현의 증가와 더불어 Akt의 인산화의 증가도 확인하였다.
- [0127] 상기 결과는 스피루리나 조단백질은 EGFR 및 Ras에 의해 조절되는 하위신호전달 경로인 PI3K/Akt 경로의 활성화를 유도하여 IEC-6 세포의 증식을 촉진한다는 것을 의미한다.
- [0129] **3-3-2. mTOR 신호전달 경로 분석**
- [0130] Akt에 의해 활성화되어 세포의 성장에 관여하는 하위신호전달 경로로 mTOR(mammalian target of rapamycin)와 p70S6K(p70 ribosomal protein S6 kinase)의 발현을 실험예 6의 웨스턴 블롯팅으로 분석하였으며, 그 결과는 도 10에 나타내었다.
- [0131] 도 10에 나타낸 바와 같이, IEC-6 세포에 스피루리나 조단백질을 농도별로 처리했을 때 mTOR의 인산화가 증가하는 것을 확인하였고, 그 하위인자인 p70S6K의 인산화 증가로 인해 그 활성이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0132] 상기 결과는 스피루리나 조단백질에 의한 세포 증식 자극신호가 PI3K/Akt 경로의 활성화를 통해 하위신호전달 경로인 mTOR 경로로 전달됨으로써 IEC-6 세포 증식이 유도된다는 것을 의미한다.
- [0134] **3-3-3. PI3K 발현 억제제인 세포증식에 미치는 영향**
- [0135] PI3K 발현을 억제제인 세포증식에 미치는 영향을 확인하였다. 구체적으로, PI3K 억제제인 LY294002를 사용하여 PI3K 발현을 억제하고, MTS 분석을 통해 스피루리나 조단백질이 IEC-6 세포증식에 미치는 영향을 조사하였다. PI3K 발현 억제 및 MTS 분석은 각각 실험예 5 및 3에 개시된 방법으로 수행하였으며, 그 결과는 도 11에 나타내었다.
- [0136] 도 11에 나타낸 바와 같이, IEC-6 세포에 LY294002를 단독으로 사용하였을 때 세포증식이 억제되었으며, 스피루리나 조단백질을 단독으로 처리하였을 때는 세포증식이 증가하였다. 그러나 50 μ M의 LY294002를 1시간 처리한 후 스피루리나 조단백질을 처리하였을 때 대조군 수준으로 세포증식이 억제되는 것을 확인하였다.
- [0137] 상기 결과로부터 스피루리나 조단백질이 PI3K/Akt 경로를 통해 IEC-6 세포의 증식을 촉진시키는 것을 확인하였다.
- [0139] **실시예 4. 스피루리나 조단백질이 세포주기에 미치는 영향**

[0140] **4-1. 세포주기 분석**

[0141] 상기 실시예 3에서 스피루리나 조단백질에 의한 IEC-6 세포의 증식과 관련 신호전달 메커니즘을 확인하였다. 이러한 증식을 촉진하는 신호전달 경로의 활성화가 세포주기 진행에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 스피루리나 조단백질이 세포주기에 미치는 영향은 상기 실험에 7의 방법으로 조사하였으며, 그 결과는 도 12에 나타내었다.

[0142] 도 12에 나타낸 바와 같이, 분석 결과 IEC-6 세포에 스피루리나 조단백질을 처리하였을 때 G0/G1기 구간 비율이 약 81%에서 66%로 감소하였으며, S기 구간 비율은 약 23%에서 31%로 증가하였다. 상기 결과로부터 스피루리나 조단백질로 인하여 G0/G1기에서 S기로의 진행을 촉진시킴으로써 세포증식이 증가하는 것을 확인하였다.

[0144] **4-2. 세포주기 조절 단백질 분석**

[0145] 상기 실시예 4-1에서 IEC-6 세포에 스피루리나 조단백질을 처리하였을 때 G0/G1기 비율 감소와 더불어 S기 비율이 증가함에 따라 G1기에서 S기로 세포주기 진행이 촉진되는 것을 확인하였다. 이에, 세포주기의 S기로 진행을 조절하는 사이클린, 사이클린 의존성 키나아제(cyclin-dependent kinase, Cdk) 및 그 외 관련 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블롯팅(실험예 6)으로 확인하였다. 세포주기 조절 단백질의 발현을 분석한 결과는 도 13 및 14에 나타내었다.

[0146] 도 13에 나타낸 바와 같이, S기 진행에 관여하는 사이클린 D1, 사이클린 E, Cdk2, Cdk4 및 Cdk6의 발현이 증가하였으며, pRb의 발현도 농도 의존적으로 증가하였다.

[0147] 또한 도 14에 나타낸 바와 같이, 사이클린-Cdk의 활성화는 Cdk 억제제에 의해 억제되며, CKIs에 속하는 p21 및 p27의 발현양상을 확인하였을 때, 농도 의존적인 감소를 확인하였다.

[0148] 상기 결과는 스피루리나 조단백질이 세포주기를 조절하는 여러 단백질의 발현을 조절하여 세포증식을 증가시킨다는 것을 의미한다.

[0150] 종합적으로 본 발명자들은 스피루리나 조단백질이 소장 상피세포의 표면에 있는 EGFR의 인산화를 통해 MAPK/ERK 및 PI3K/Akt 신호전달 경로를 자극하고 활성화시키며, 이러한 신호전달 경로가 G1기에서 S기로의 세포주기 진행을 촉진함으로써 소장 상피세포의 증식을 촉진한다는 것을 확인하였다(도 15). 따라서 본 발명의 스피루리나 조단백질은 위장질환의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

[0152] 이하, 제제예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 제제예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 제제예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.

[0154] **제제예 1. 위장질환 예방 또는 치료용 조성물의 제조**

[0155] **1-1. 산제의 제조**

[0156] 스피루리나 조단백질 20mg

[0157] 유당 100mg

[0158] 탈크 10mg

[0159] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0161] **1-2. 정제의 제조**

[0162] 스피루리나 조단백질 10mg

[0163] 옥수수전분 100mg

- [0164] 유당 100mg
- [0165] 스테아린산 마그네슘 2mg
- [0166] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

- [0168] **1-3. 캡슐제의 제조**
- [0169] 스피루리나 조단백질 10mg
- [0170] 결정성 셀룰로오스 3mg
- [0171] 락토오스 14.8mg
- [0172] 마그네슘 스테아레이트 0.2mg
- [0173] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

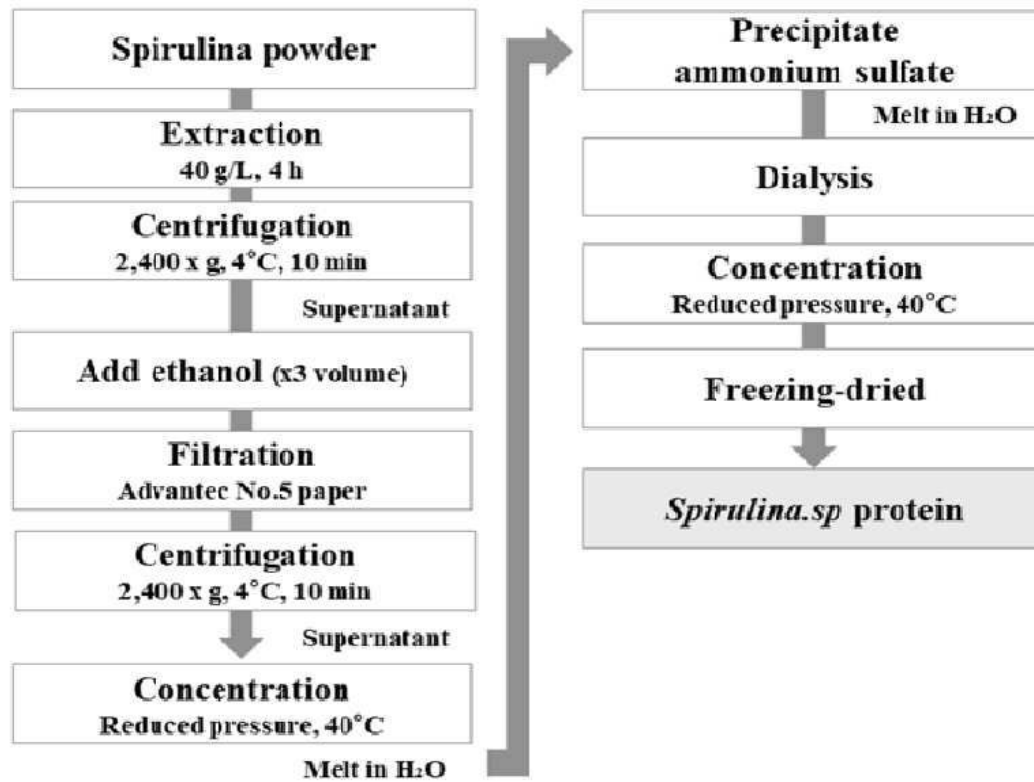
- [0175] **1-4. 주사제의 제조**
- [0176] 스피루리나 조단백질 10mg
- [0177] 만니톨 180mg
- [0178] 주사용 멸균 증류수 2974mg
- [0179] 인산이나트륨 이수화물 26mg
- [0180] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

- [0182] **1-5. 액제의 제조**
- [0183] 스피루리나 조단백질 20mg
- [0184] 이성화당 10 g
- [0185] 만니톨 5 g
- [0186] 정제수 적량
- [0187] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

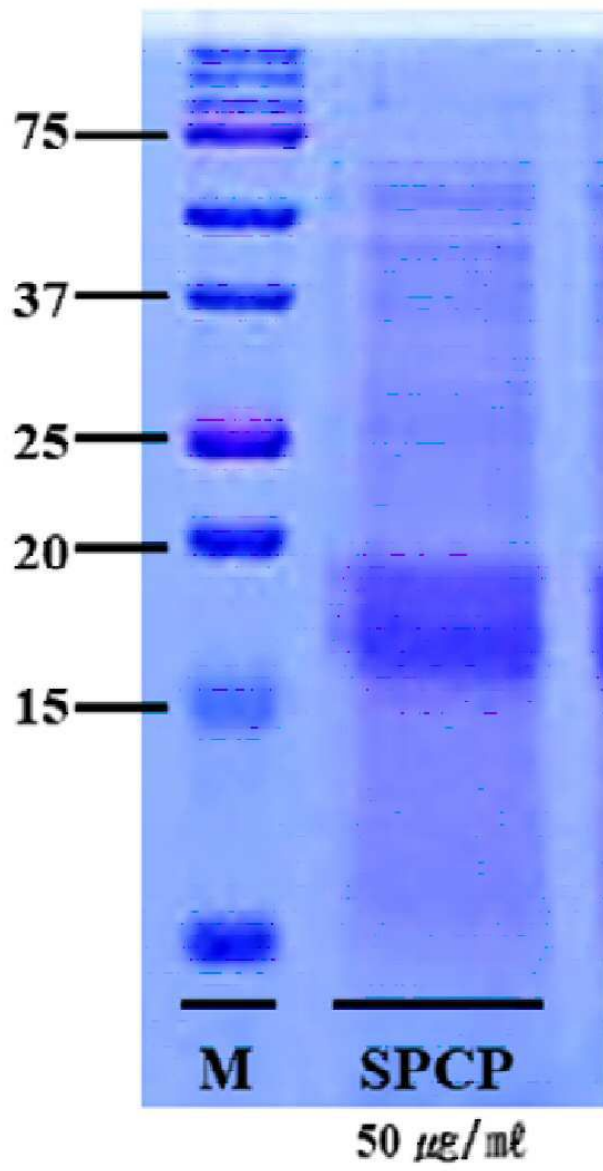
- [0189] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

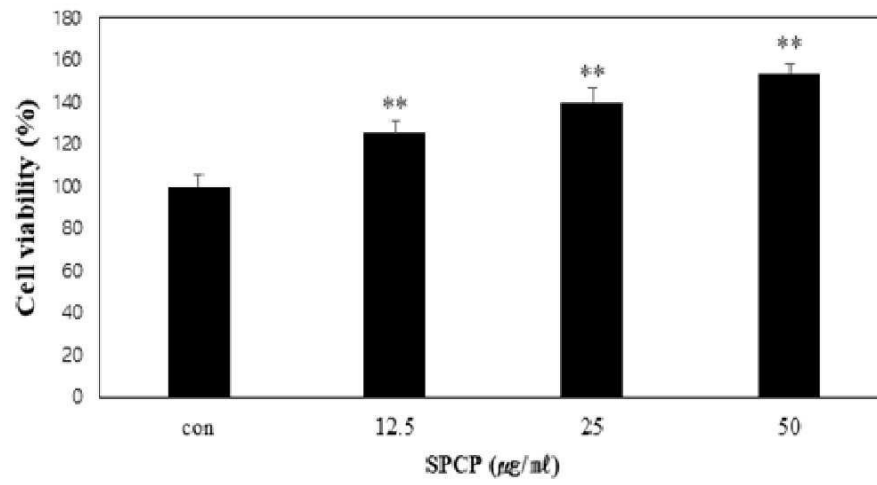
도면1



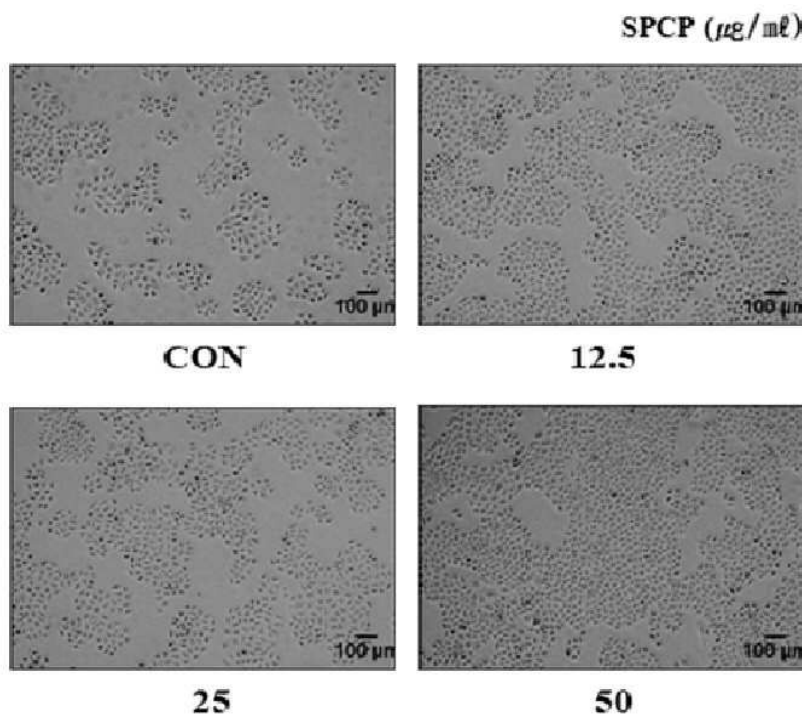
도면2



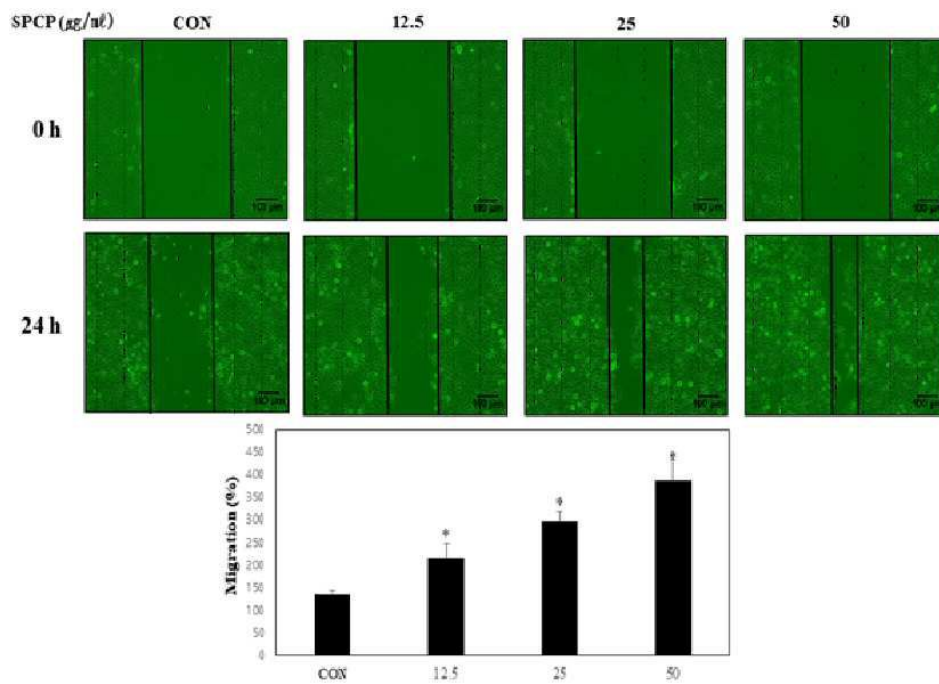
도면3



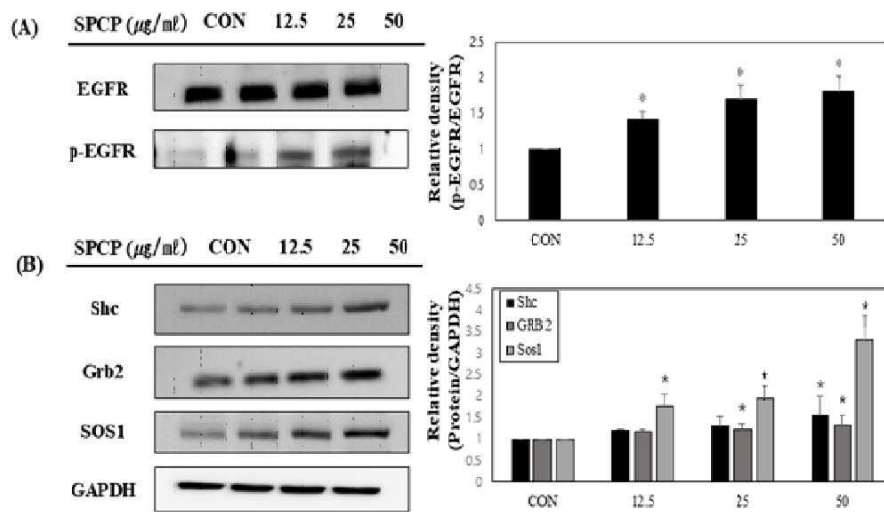
도면4



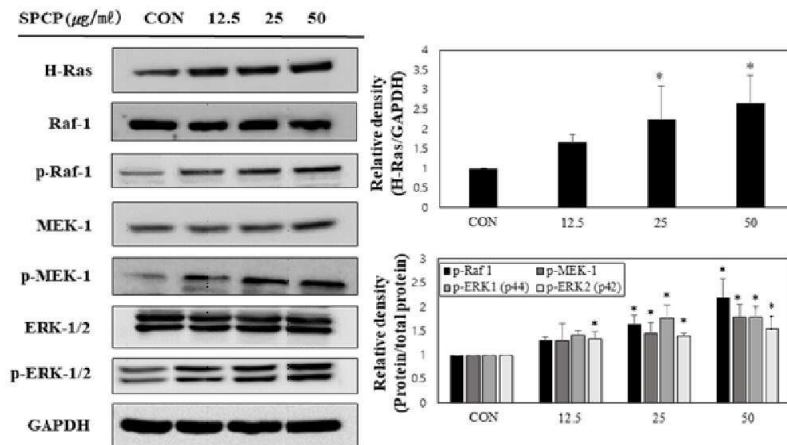
도면5



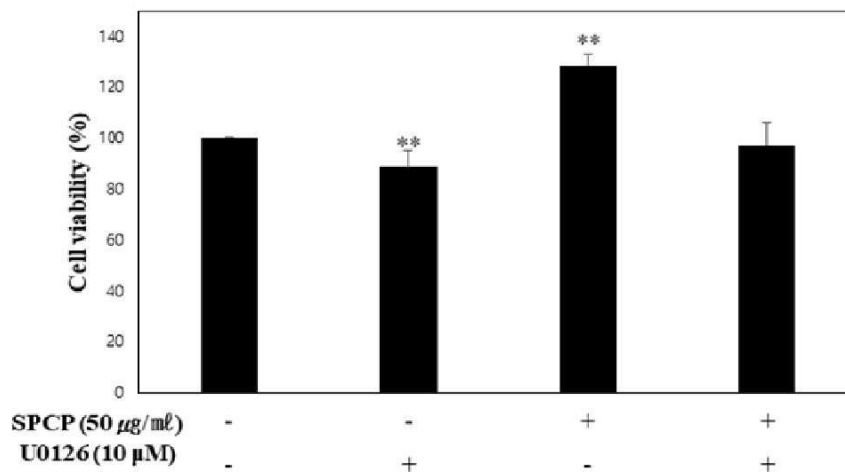
도면6



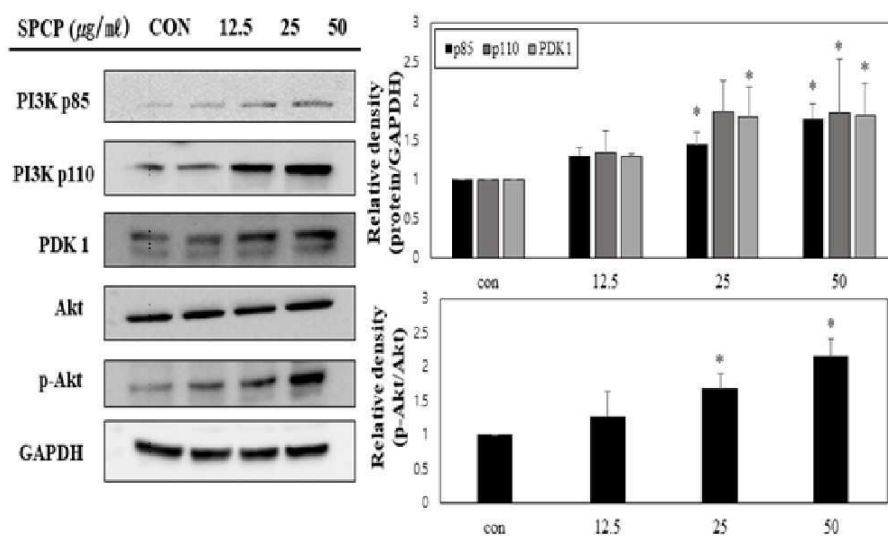
도면7



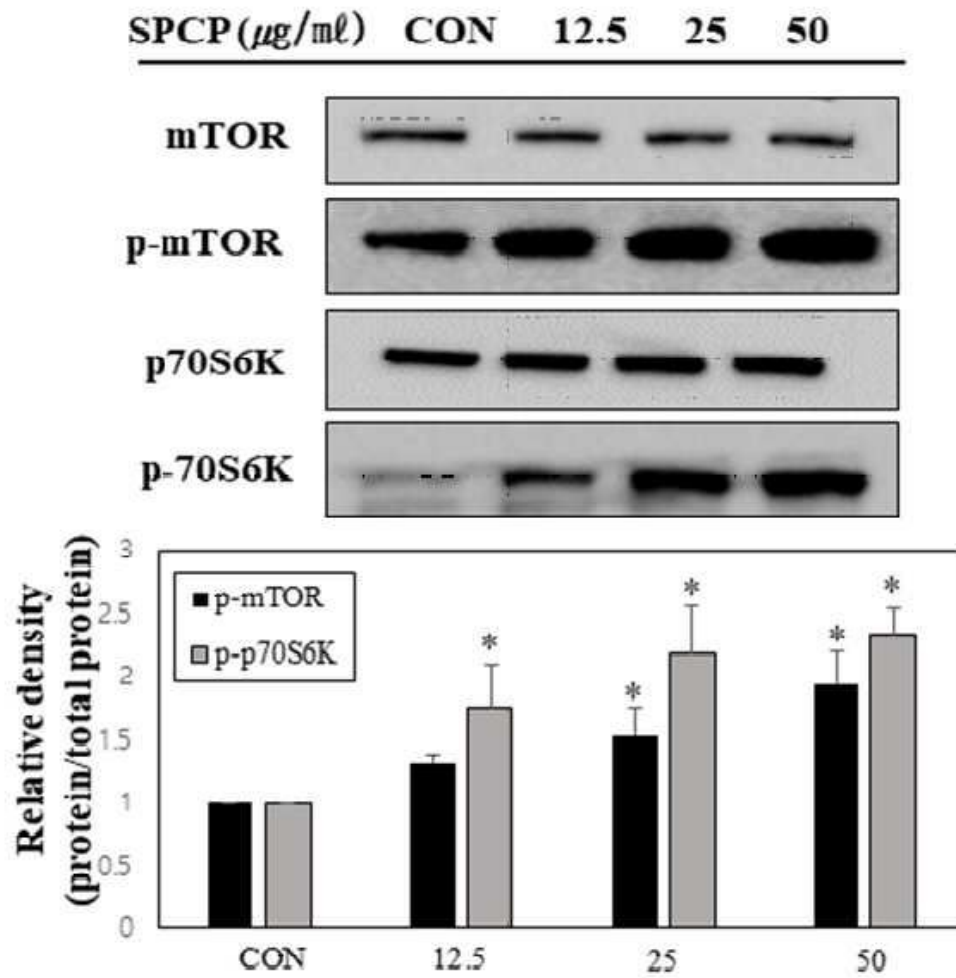
도면8



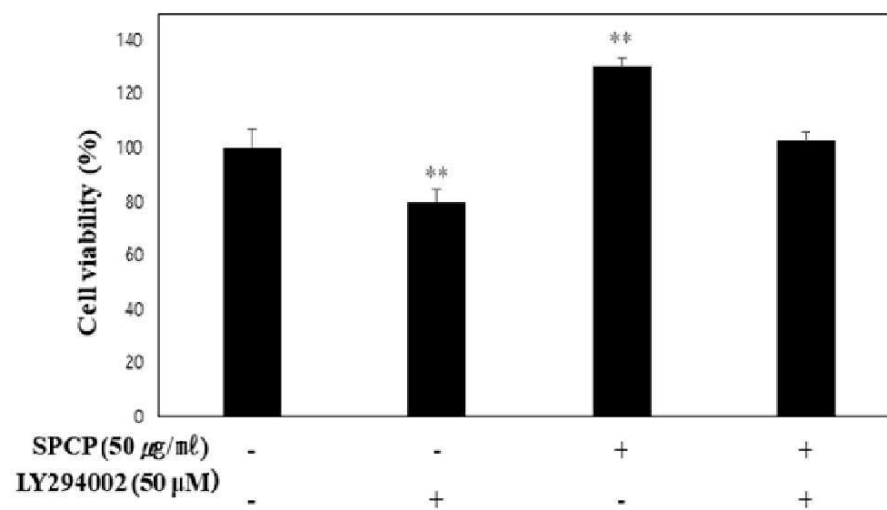
도면9



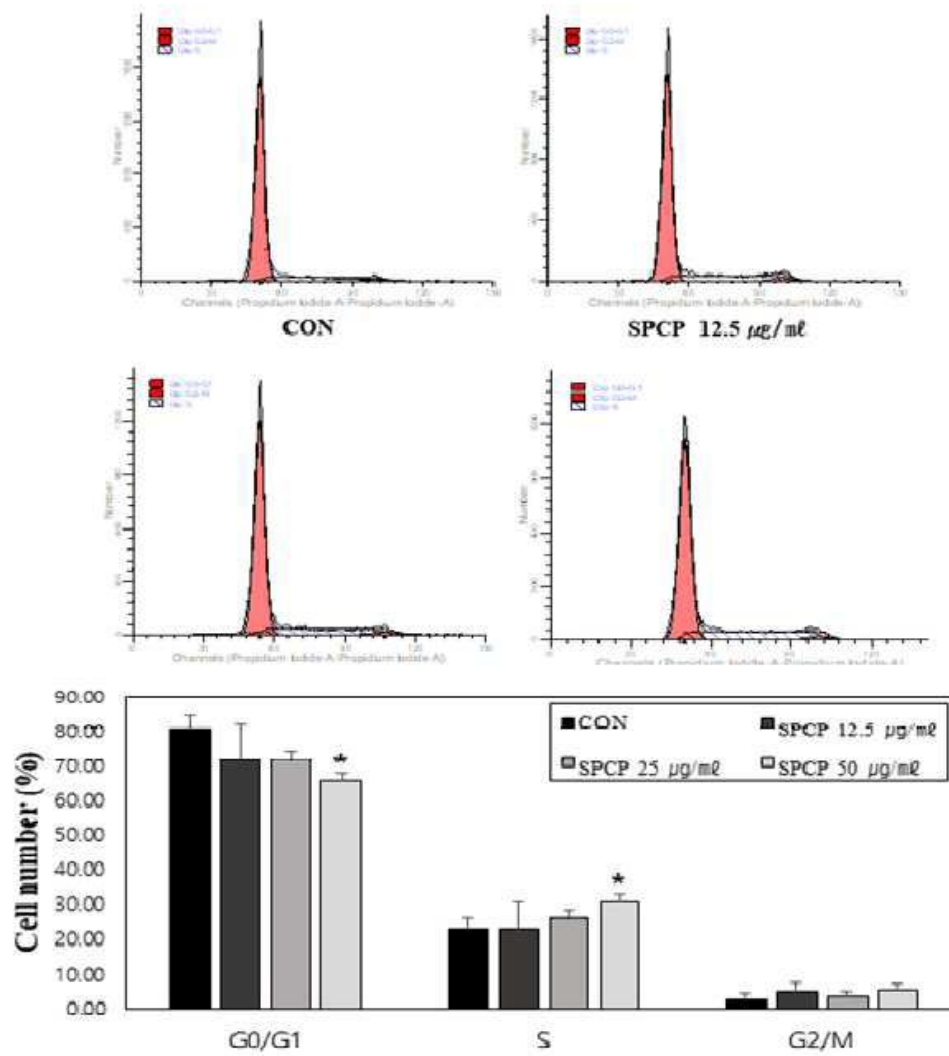
도면10



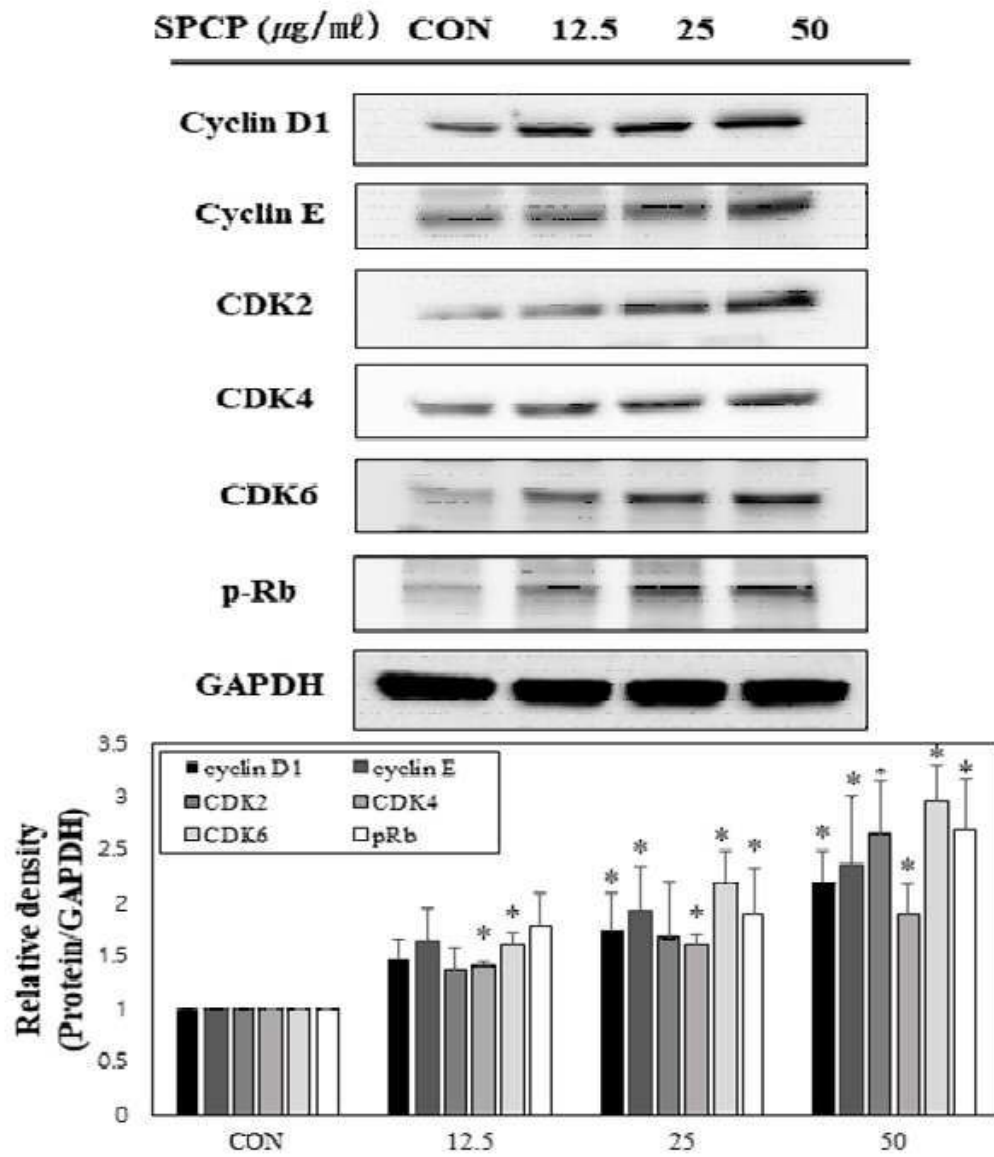
도면11



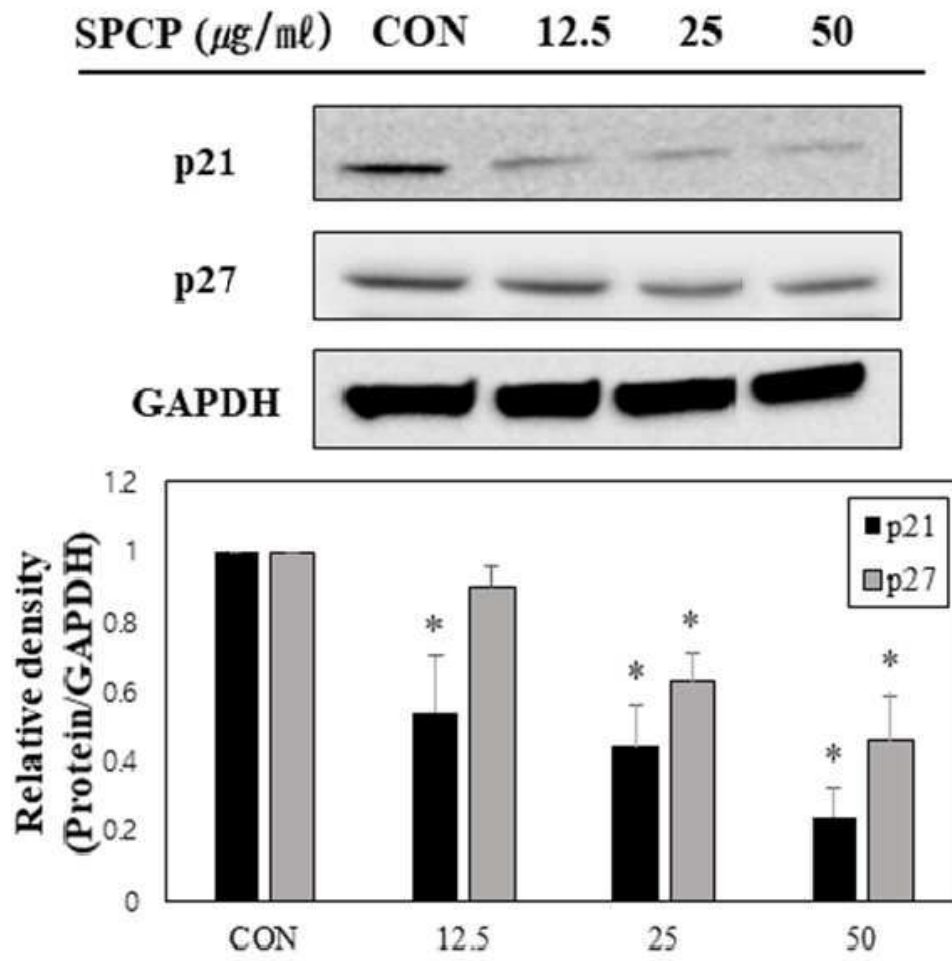
도면12



도면13



도면14



도면15

