



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0121874
(43) 공개일자 2017년11월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
C12N 5/0653 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0050683
(22) 출원일자 2016년04월26일
심사청구일자 2016년04월26일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
조광원
광주광역시 남구 회재로1186번길 24, 104동 1004호 (주월동, 호반베르디움1차아파트)
정신구
전라남도 나주시 내동길 4-1 (송월동)
(74) 대리인
특허법인아이엠

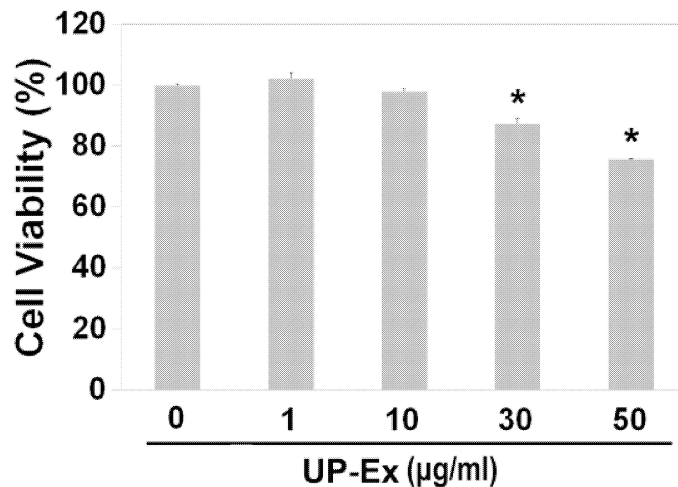
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **참미역 추출물을 유효성분으로 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액 및 상기 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법**

(57) 요약

본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액 및 상기 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 참미역 추출물을 유효성분으로 포함함으로써, 줄기세포의 활성산소 감소, 항노화 향상 및 골아세포와 지방세포로의 분화능력을 증대시킬 수 있는 중간엽 줄기세포의 배양액 및 상기 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- C12N 5/0654** (2013.01)
- C12N 2500/32 (2013.01)
- C12N 2500/38 (2013.01)
- C12N 2500/42 (2013.01)
- C12N 2500/76 (2013.01)
- C12N 2501/33 (2013.01)
- C12N 2501/999 (2013.01)
- C12N 2506/1346 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|----------|---------------------------------------|
| 과제고유번호 | 1525005028 |
| 부처명 | 해양수산부 |
| 연구관리전문기관 | 한국해양과학기술진흥원 |
| 연구사업명 | 해양수산생명공학기술개발 |
| 연구과제명 | 해양바이오 지역특화 선도기술 개발(해조류 유래 식/의약 소재 개발) |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 주관기관 | 조선대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2015.09.01 ~ 2016.07.31 |

명세서

청구범위

청구항 1

참미역(*Undaria pinatifida*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 중간엽 줄기세포 배양액은

줄기세포 배지; 및

참미역 추출물;을 포함하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양액.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 참미역 추출물은

상기 줄기세포 배지를 기준으로 1 μ g/ml 내지 10 μ g/ml 함유되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양액.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 줄기세포 배지는

소태아혈청(FBS, Fetal Bovine Serum), L-글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 배양용 배지인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양액.

청구항 5

제 2항에 있어서,

상기 줄기세포 배지는

이소부틸메틸산틴(IBMx; isobutylmethylxanthin), 덱사메타손(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin) 및 인슐린(insulin)을 포함하는 지방세포 분화용 배지인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양액.

청구항 6

제 2항에 있어서,

상기 줄기세포 배지는

덱사메타손(dexamethasone), 엘-아스코르브산(L-ascorbic acid) 및 베타-글리세로포스페이트(beta-glycerophosphate)을 포함하는 골아세포 분화용 배지인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양액.

청구항 7

제 1항에 있어서,
상기 참미역 추출물은
유기용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양액.

청구항 8

제 7항에 있어서,
상기 유기용매는 에탄올인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양액.

청구항 9

중간엽 줄기세포를 1차 배양하는 단계; 및
배양된 중간엽 줄기세포를 상기 줄기세포 배지 및 참미역(*Undaria pinatifida*) 추출물;을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에 2차 배양하는 단계;를 포함하는 중간엽 줄기세포의 배양방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,
상기 참미역 추출물은
상기 줄기세포 배지를 기준으로 1 µg/ml 내지 10 µg/ml 함유되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,
상기 줄기세포 배지는
줄기세포 배양용 배지, 지방세포 분화용 배지 또는 골아세포 분화용 배지인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법.

청구항 12

제 9항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 중간엽 줄기세포의 배양방법으로 배양된 중간엽 줄기세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액 및 상기 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 참미역 추출물을 유효성분으로 포함함으로써, 줄기세포의 활성산소 감소, 항노화 향상 및 골아세포와 지방세포로의 분화능력을 증대시킬 수 있는 중간엽 줄기세포의 배양액 및 상기 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 줄기세포(stem cell)는 조직이나 기관의 분화된 세포들 사이에 존재하는 미분화 세포로서, 끊임없이 스스로 증식하는 자가재생능력(Self Renewal)과 신체 내의 모든 조직세포로 분화할 수 있는 능력(Differentiation to specific tissue)을 가진 세포이다.
- [0004] 이와 같은, 줄기세포는 배아 줄기세포와 성체 줄기세포로도 나눌 수 있다. 즉, 출생 후부터 우리 몸에 있는 여러 종류의 조직에 존재하는 성체줄기세포(Adult Stem Cell)와 인간 생명의 시초가 되는 수정란에서 유래하는 배아 줄기세포(Embryonic Stem Cell)의 두 종류로 구분될 수 있다.
- [0005] 이 중, 성체 줄기세포는 신체의 각 조직에 소량으로 존재하는 세포로, 특정한 조직을 구성하는 세포이며 이의 대표적인 예로 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell)가 있다.
- [0006] 이러한 중간엽 줄기세포는 몸이 항상 건강한 상태로 유지되는 데에 필요한 세포를 제공하며, 또한 손상이 발생하였을 때 손상된 부위로 이동한 다른 장기에 있던 줄기세포와 함께 손상된 조직으로 분화하여 복구한다.
- [0007] 또한, 중간엽 줄기세포는 배아줄기세포와 다르게 수정란의 파괴가 없어 윤리적으로도 문제가 되지 않는다.
- [0008] 이에 따라, 중간엽 줄기세포는 신속한 연구가 진행되어 임상 적용이 가능한 단계까지 도달한 상태이다.
- [0009] 한편, 환자의 치료를 위해서는 다량의 중간엽 줄기세포가 필요하여, 동종이식을 위해 환자로부터 줄기세포를 추출하여 이용된다.
- [0010] 하지만, 환자로부터 추출할 수 있는 줄기세포의 양은 제한적이며, 추출한 줄기세포를 이용하여 줄기세포를 배양할 때에는, 줄기세포의 노화가 진행되어, 치료적 실효성이 떨어지게 되는 문제점이 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 한국공개특허, 제 10-2013-0057682호, 제대혈 중간엽 줄기세포의 세포 노화유도방법 및 그 억제 방법 및 그 억제용 조성물.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 이러한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 참미역 추출물을 유효성분으로 포함함으로써, 줄기세포의 활성산소를 감소시킬 수 있고, 줄기세포의 노화 현상을 억제시킬 수 있는 중간엽 줄기세포의 배양액 및 상기 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 골아세포와 지방세포로의 분화능력을 향상시킬 수 있는 중간엽 줄기세포의 배양액 및 상기 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 참미역(*Undaria pinatifida*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액을 제공한다.
- [0018] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포 배양액은 줄기세포 배지; 및 참미역 추출물;을 포함한다.
- [0019] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 참미역 추출물은 상기 줄기세포 배지를 기준으로 1 µg/ml 내지 10 µg/ml 함유

된다.

- [0020] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 줄기세포 배지는 소태아혈청(FBS, Fetal Bovine Serum), L-글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 배양용 배지이다.
- [0021] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 줄기세포 배지는 이소부틸메틸산틴(IBMx; isobutylmethylxanthin), 덱사메타손(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin) 및 인슐린(insulin)을 포함하는 지방세포 분화용 배지이다.
- [0022] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 줄기세포 배지는 덱사메타손(dexamethasone), 엘-아스코르브산(L-ascorbic acid) 및 베타-글리세로포스페이트(beta-glycerophosphate)을 포함하는 골아세포 분화용 배지이다.
- [0023] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 참미역 추출물은 유기용매로 추출된다.
- [0024] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 유기용매는 에탄올이다.
- [0025] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포를 1차 배양하는 단계; 및 배양된 중간엽 줄기세포를 상기 줄기세포 배지 및 참미역(*Undaria pinatifida*) 추출물;을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에 2차 배양하는 단계;를 포함하는 중간엽 줄기세포의 배양방법을 더 제공한다.
- [0026] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 참미역 추출물은 상기 줄기세포 배지를 기준으로 1 µg/ml 내지 10 µg/ml 함유된다.
- [0027] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 줄기세포 배지는 줄기세포 배양용 배지, 지방세포 분화용 배지 또는 골아세포 분화용 배지이다.
- [0028] 또한, 본 발명은 본 발명의 중간엽 줄기세포의 배양방법으로 배양된 중간엽 줄기세포를 더 제공한다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명은 다음과 같은 우수한 효과를 가진다.
- [0031] 먼저, 본 발명의 중간엽 줄기세포의 배양액 및 상기 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법에 의하면, 참미역 추출물을 유효성분으로 포함함으로써, 줄기세포의 활성산소를 감소시킬 수 있으며, 줄기세포의 노화현상을 억제시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0032] 또한, 본 발명의 중간엽 줄기세포의 배양액 및 상기 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법에 의하면, 골아세포와 지방세포로의 분화능력을 향상시킬 수 있는 장점을 지닌다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 중간엽 줄기세포 배양액 내의 참미역 추출물의 농도에 따라 배양된 중간엽 줄기세포의 세포독소(cytotoxicity)를 확인한 그래프이다.
- 도 2는 과산화수소 스트레스 조건에서, 중간엽 줄기세포 배양액의 참미역 추출물의 농도에 따라 배양된 줄기세포의 세포독소를 확인한 그래프이다.
- 도 3은 농도별 과산화수소 스트레스 조건에서, 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포의 세포독소를 확인한 그래프이다.
- 도 4는 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포와 참미역 추출물을 포함하지 않은 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포의 세포사멸관련 단백질의 발현량을 보여주는 결과이다.
- 도 5는 과산화수소 스트레스 조건에서, 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포와 참미역 추출물을 포함하지 않은 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포의 반응 산소 종(ROS) 분석결과이다.
- 도 6은 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포와 참미역 추출물을 포함하지 않은 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포의 반응 산소 종(ROS) 분석결과이다.

도 7은 과산화수소 스트레스 조건에서, 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포와 참미역 추출물을 포함하지 않은 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포의 항산화 효소 발현량을 확인한 결과이다.

도 8은 7계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포의 반응 산소 종(ROS) 분석 결과이다.

도 9는 7계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포의 항산화 효소 발현량을 비교한 결과이다.

도 10은 7계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포의 노화관련 단백질의 발현량을 비교한 결과이다.

도 11은 7계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포의 지방세포 분화능 및 골아세포 분화능을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어는 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어를 선택하였으나, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있는데 이 경우에는 단순한 용어의 명칭이 아닌 발명의 상세한 설명 부분에 기재되거나 사용된 의미를 고려하여 그 의미가 파악되어야 할 것이다.
- [0036] 이하, 첨부한 도면에 도시된 바람직한 실시예들을 참조하여 본 발명의 기술적 구성을 상세하게 설명한다.
- [0037] 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화 될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐 동일한 참조번호는 동일한 구성요소를 나타낸다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 따른 중간엽 줄기세포 배양액은 줄기세포의 활성산소 감소, 항노화 및 골아세포와 지방세포로의 분화능력을 향상시키기 위한 배양액으로서, 참미역(*Undaria pinatifida*) 추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0040] 한편, 상기 참미역 추출물은 항암효과, 동맥경화증, 지질대사와 염증치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 본 발명에서는 상기 참미역 추출물을 유효성분으로 이용하여, 줄기세포의 활성산소 감소, 항노화 및 골아세포와 지방세포로의 분화능력을 향상시킬 수 있는데, 기술적 특징이 있다.
- [0041] 또한, 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포 배양액은 줄기세포 배지 및 참미역 추출물을 포함하여 이루어질 수 있다.
- [0042] 여기서, 상기 참미역 추출물은 상기 줄기세포 배지를 기준으로 1 μg/ml 내지 10 μg/ml 함유되는 것이 바람직하다.
- [0043] 그 이유는 상기 참미역 추출물이 상기 줄기세포 배지를 기준으로 하여, 1 μg/ml 미만일 경우에는 배양된 중간엽 줄기세포의 노화효과가 미미하고, 10 μg/ml를 초과할 경우에는 배양된 중간엽 줄기세포에 세포독성이 발생할 수 있기 때문이다.
- [0044] 또한, 상기 참미역 추출물은 유기용매로 추출될 수 있으며, 상기 유기용매로서 에탄올이 이용되는 것이 바람직하다.
- [0045] 또한, 상기 줄기세포 배지는 배양용 배지, 지방세포 분화용 배지 또는 골아세포 분화용 배지일 수 있다.
- [0046] 여기서, 상기 배양용 배지는 소태아혈청(FBS, Fetal Bovine Serum), L-글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함한다.
- [0047] 또한, 상기 지방세포 분화용 배지는 이소부틸메틸산틴(IBMx; isobutylmethylxanthin), 텍사메타손

(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin) 및 인슐린(insulin)을 포함한다.

- [0048] 또한, 상기 골아세포 분화용 배지는 덱사메타손(dexamethasone), 엘-아스코르브산(L-ascorbic acid) 및 베타-글리세로포스페이트(beta-glycerophosphate)을 포함한다.
- [0049] 즉, 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포의 배양액은 줄기세포의 배양, 지방세포로의 분화, 골아세포로의 분화를 위한 배양액으로 이용될 수 있는 것이다.
- [0051] 또한, 본 발명은 본 발명의 중간엽 줄기세포 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법을 더 제공한다.
- [0052] 먼저, 중간엽 줄기세포를 1차 배양한다.
- [0053] 이때, 상기 중간엽 줄기세포는 소태아혈청(FBS, Fetal Bovine Serum), L-글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 배양용 배지에서 배양된다.
- [0054] 다음, 배양된 중간엽 줄기세포를 상기 중간엽 줄기세포 배양액을 이용하여 2차 배양한다.
- [0055] 여기서, 상기 중간엽 줄기세포 배양액은 중간엽 줄기세포 배지 및 참미역 추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0056] 또한, 상기 참미역 추출물은 전술할 바와 동일한 추출물이며, 동일한 농도(1 μg/ml 내지 10 μg/ml)로 이용되므로 이에 대한 중복되는 설명을 생략한다.
- [0057] 한편, 2차 배양하는 시간은 6시간 내지 48시간인 것이 바람직하다.
- [0058] 그 이유는 배양하는 시간인 6시간 미만일 경우에는 배양된 중간엽 줄기세포의 노화 방지효과가 미미하고, 48시간을 초과할 경우에는 배양된 중간엽 줄기세포의 경우 세포 독성이 증대될 수 있으며, 노화 방지 효과가 일정 수준 이상 증대되지 않기 때문이다.
- [0059] 이때, 상기 줄기세포 배지는 상기 줄기세포 배지는 배양용 배지, 지방세포 분화용 배지 또는 골아세포 분화용 배지일 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포의 배양방법으로 배양된 중간엽 줄기세포를 제공한다.
- [0062] (실시예 및 비교예)
- [0063] 중간엽 줄기세포 1차 배양
- [0064] 본 발명에는 CEF0(Cell engineering for origin, korea)에서 구입한, 인간 골수유래 중간엽 줄기세포를 사용하였다.
- [0065] 상기 중간엽 줄기세포를 공급자의 지시에 따라 T75 flasks(Becton Dickinson, USA)에서 배양하였다.
- [0066] 또한, 상기 중간엽 줄기세포는 다른 자극 보조제 또는 비타민의 공급 없이 10% FBS, L-글루타민, 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 인간 골수유래 중간엽 줄기세포 배지에서 배양하였다.
- [0067] 이때, 상기 중간엽 줄기세포는 37℃, 5% CO₂의 배양기에서 배양하면서, 7번 계대배양한 중간엽 줄기세포(P-7), 17번 계대배양한 중간엽 줄기세포(P-17)를 준비하였다.
- [0068] 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포 배양액에서 2차 배양
- [0069] 실시예로, 7번 계대배양한 중간엽 줄기세포(P-7), 17번 계대배양한 중간엽 줄기세포(P-17)를 각각 상기 골수유래 중간엽 줄기세포 배지 및 참미역 추출물을 포함하는 배양액에 2차 배양하였다.
- [0070] 또한, 비교예로, 7번 계대배양한 중간엽 줄기세포(P-7), 17번 계대배양한 중간엽 줄기세포(P-17)를 각각 상기 참미역 추출물을 포함하지 않는 상기 골수유래 중간엽 줄기세포 배지에 2차 배양하였다.
- [0072] (실험예 1)
- [0073] 본 실험에서는 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포 배양액 내의 참미역 추출물의 농도에 따라 배양된 중간엽 줄기

세포의 세포독소(cytotoxicity)를 확인하였다.

- [0074] 이를 위해, 본 실험에서는 7번 계대 배양한 중간엽 줄기세포(P-7)를 이용하였다.
- [0075] 상기 배지를 기준으로 각각 0 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액을 제조하였으며, 각각의 배양액에 상기 중간엽 줄기세포(P-7)을 24시간 동안 2차 배양하였다.
- [0076] 이후, 배양한 중간엽 줄기세포에서 세포 활성도를 분석(MTT assay)하였으며, 그 결과를 도 1에 도시하였다.
- [0077] 그 결과, 1 µg/ml 내지 10 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포는 세포 독성(cytotoxicity)이 발견되지 않았으나, 10 µg/ml 농도를 초과할 경우에는 세포독성이 발생하는 것을 확인하였다.
- [0079] (실험예 2)
- [0080] 본 실험에서는 과산화수소 스트레스 조건에서, 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포 배양액 내의 참미역 추출물의 농도에 따라 처리된 중간엽 줄기세포의 세포독성(cytotoxicity)를 확인하였다.
- [0081] 이를 위해, 상기 7번 계대 배양한 중간엽 줄기세포(P-7)를 이용하였다.
- [0082] 상기 배지를 기준으로 각각 0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액을 제조하였으며, 각각의 배양액에 상기 중간엽 줄기세포(P-7)을 24시간 동안 2차 배양하였다.
- [0083] 또한, 과산화수소의 농도는 1mM의 농도범위에서 수행하였다.
- [0084] 이후, 배양된 중간엽 줄기 세포에서 세포 활성도를 분석(MTT assay)하였으며, 그 결과를 도 2에 도시하였다.
- [0085] 그 결과, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml의 농도로 참미역 추출물을 포함하는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포는 참미역 추출물을 포함하지 않은 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포에 비해, 과산화수소 스트레스에 대한 내성이 높아, 세포 활성도가 높은 것을 확인하였다.
- [0087] (실험예 3)
- [0088] 본 실험에서는 농도별 과산화수소 스트레스 조건에서, 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포의 세포독성(cytotoxicity)를 확인하였다.
- [0089] 이를 위해, 상기 7번 계대 배양한 중간엽 줄기세포(P-7)를 이용하였다.
- [0090] 상기 배지를 기준으로 5 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액을 제조하였으며, 상기 배양액에 상기 중간엽 줄기세포(P-7)을 24시간 동안 2차 배양하였다.
- [0091] 또한, 과산화수소의 농도는 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 3mM의 농도범위에서 수행하였다.
- [0092] 이후, 배양된 중간엽 줄기세포에서 세포 활성도를 분석(MTT assay)하였으며, 그 결과를 도 3에 도시하였다.
- [0093] 그 결과, 참미역 추출물을 포함하는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포(UP-Ex-MSCs)는 참미역 추출물을 포함하지 않는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포(Ctrl-MSCs)에 비해, 모두 세포 활성도가 높은 것을 확인하였다.
- [0095] (실험예 4)
- [0096] 본 실험에서는 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포와 참미역 추출물을 포함하지 않은 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포의 세포사멸관련 단백질의 발현량을 확인하였다.
- [0097] 이를 위해, 상기 7번 계대 배양한 중간엽 줄기세포(P-7)를 이용하였다.
- [0098] 상기 배지를 기준으로 참미역 추출물을 포함하지 않은 배양액 2개, 5 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액 1개를 제조하였으며, 상기 배양액에 상기 중간엽 줄기세포(P-7)을 24시간 동안 2차 배양하였다.
- [0099] 이후, 참미역 추출물을 포함하지 않은 배양액 1개와 5 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액 1개에는

과산화수소 1mM로 한시간 동안 처리하였다.

- [0100] 그리고, 수확한 중간엽 줄기세포에서 세포 사멸관련 단백질(p53, Cleaved caspase-3)의 단백질 발현량을 면역블롯으로 분석하였으며, 그 결과를 도 4에 도시하였다.
- [0101] 그 결과, 과산화수소 조건하에서, 참미역 추출물을 포함하는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포는 참미역 추출물을 포함하지 않는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포에 비해 세포 사멸관련 단백질(p53, Cleaved caspase-3)의 단백질 발현량이 줄어든 것을 확인할 수 있었다.
- [0102] 즉, 실험예 1 내지 실험예 4를 통하여, 참미역 추출물의 최적의 농도는 상기 배지를 기준으로 1 µg/ml 내지 10 µg/ml인 것을 확인할 수 있었으며, 참미역 추출물을 포함하는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포는 세포보호 효과가 개선되며, 세포사멸 관련 단백질의 발현량이 줄어든 것을 확인할 수 있었다.
- [0104] (실험예 5)
- [0105] 본 실험에서는 과산화수소 스트레스 조건에서, 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포와 참미역 추출물을 포함하지 않은 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포의 반응 산소 종(ROS) 분석을 수행하였다.
- [0106] 이를 위해, 상기 7번 계대 배양한 중간엽 줄기세포(P-7)를 이용하였다.
- [0107] 상기 배지를 기준으로 참미역 추출물을 포함하지 않은 배양액 2개, 5 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액 1개를 제조하였으며, 상기 배양액에 상기 중간엽 줄기세포(P-7)을 24시간 동안 2차 배양하였다.
- [0108] 이후, 참미역 추출물을 포함하지 않은 배양액 1개와 5 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액 1개에는 과산화수소 1mM로 한시간 동안 처리하였다.
- [0109] 그리고, 수확한 중간엽 줄기세포의 반응 산소 종(ROS) 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 5에 도시하였다.
- [0110] 도 5에 도시된 바와 같이, 과산화수소 조건하에서, 참미역 추출물을 포함하는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포는 참미역 추출물을 포함하지 않는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포에 비해 활성산소가 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0112] (실험예 6)
- [0113] 본 실험에서는 과산화수소 스트레스가 없는 조건에서, 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포와 참미역 추출물을 포함하지 않은 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포의 반응 산소 종(ROS) 분석을 수행하였다.
- [0114] 이를 위해, 상기 7번 계대 배양한 중간엽 줄기세포(P-7)를 이용하였다.
- [0115] 상기 배지를 기준으로 참미역 추출물을 포함하지 않은 배양액과, 5 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액을 제조하였으며, 상기 배양액에 상기 중간엽 줄기세포(P-7)을 24시간 동안 2차 배양하였다.
- [0116] 그리고, 수확한 중간엽 줄기세포의 반응 산소 종(ROS) 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 6에 도시하였다.
- [0117] 도 6에 도시된 바와 같이, 참미역 추출물을 포함하는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포는 참미역 추출물을 포함하지 않는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포와 비교하여 활성산소의 차이가 없음을 확인할 수 있었다.
- [0119] (실험예 7)
- [0120] 본 실험에서는 과산화수소 스트레스 조건에서, 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포와 참미역 추출물을 포함하지 않은 중간엽 줄기세포 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포의 항산화 효소 발현량을 확인하였다.
- [0121] 이를 위해, 상기 배지를 기준으로 참미역 추출물을 포함하지 않은 배양액 2개, 5 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액 1개를 제조하였으며, 상기 배양액에 상기 중간엽 줄기세포(P-7)을 24시간 동안 2차

배양하였다.

- [0122] 이후, 참미역 추출물을 포함하지 않은 배양액 1개와 5 µg/ml 농도의 참미역 추출물을 포함하는 배양액 1개에는 과산화수소 1mM로 한시간 동안 처리하였다.
- [0123] 그리고, 수확한 중간엽 줄기세포에서 항산화 효소 관련 인자(SOD1, SOD2, Catalase)의 단백질 발현량을 면역블랏으로 분석하였으며, 그 결과를 도 7에 도시하였다.
- [0124] 그 결과, 도 7에 도시한 바와 같이, 과산화수소 조건하에서, 참미역 추출물을 포함하는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포는 참미역 추출물을 포함하지 않는 배양액에서 배양된 중간엽 줄기세포에 비해 항산화 효소 관련 인자(SOD1, SOD2, Catalase)의 단백질 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0125] 즉, 실험예 5 내지 실험예 7를 통하여, 참미역 추출물을 포함하는 줄기세포 배양액에서 배양된 줄기세포는 항산화 효과가 있는 것을 확인할 수 있다.

- [0127] (실험예 8)
- [0128] 본 실험에서는, 7계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포의 반응 산소 종(ROS) 분석을 수행하였으며, 도 8에 도시하였다.
- [0129] 그 결과, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포(P-17/UP-Ex)는 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포(P-17)에 비해 ROS 레벨이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

- [0131] (실험예 9)
- [0132] 본 실험에서는, 7계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포의 항산화 효소 관련 인자(SOD1, SOD2, Catalase)의 단백질 발현량을 분석하였으며, 도 9에 도시하였다.
- [0133] 그 결과, 도 9에 도시한 바와 같이, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포(P-17/UP-Ex)는 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포(P-17)에 비해 항산화 효소 관련 인자(SOD1, SOD2, Catalase)의 단백질 발현량이 미약하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

- [0135] (실험예 10)
- [0136] 본 실험에서는, 7계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포의 노화관련 단백질의 발현량을 분석하였으며, 도 10에 도시하였다.
- [0137] 그 결과, 도 10에 도시한 바와 같이, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포(P-17/UP-Ex)는 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포(P-17)에 비해 노화관련 인자(P16, P21, P53)의 단백질 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

- [0139] (실험예 11)
- [0140] 본 실험에서는, 7계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서 처리된 중간엽 줄기세포의 지방세포 분화능 및 골아세포 분화능을 확인하였으며, 그 결과를 도 11에 도시하였다.
- [0141] 이때, 지방세포 분화능력을 확인하기 위해서는 Oil red O 염색법을 이용하였고, 골아세포 분화능력을 확인하기 위해서는 Alizarin Red S 염색법을 이용하였다.
- [0142] 도 11에 도시한 바와 같이, 17계대(passage) 배양되고 참미역 추출물을 포함하는 중간엽 줄기세포 배양액에서

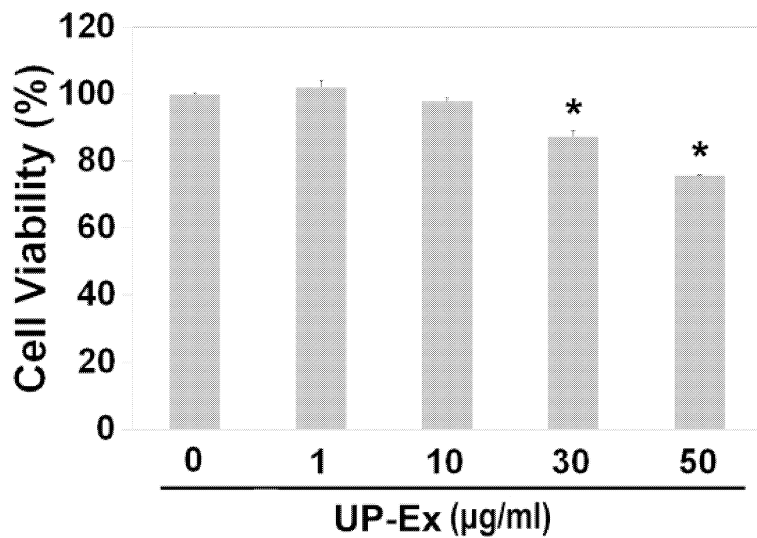
처리된 중간엽 줄기세포(P-17/UP-Ex)는 17계대(passage) 배양된 중간엽 줄기세포(P-17)에 비해, 지방세포의 분화능력 및 골아세포의 분화능력이 모두 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0144] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 중간엽 줄기세포의 배양액 및 상기 배양액을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양 방법은, 배양된 줄기세포의 활성산소를 감소시키고 노화현상을 억제시킬 수 있으며, 골아세포와 지방세포로의 분화능력을 향상시킬 수 있는 장점을 지닌다.

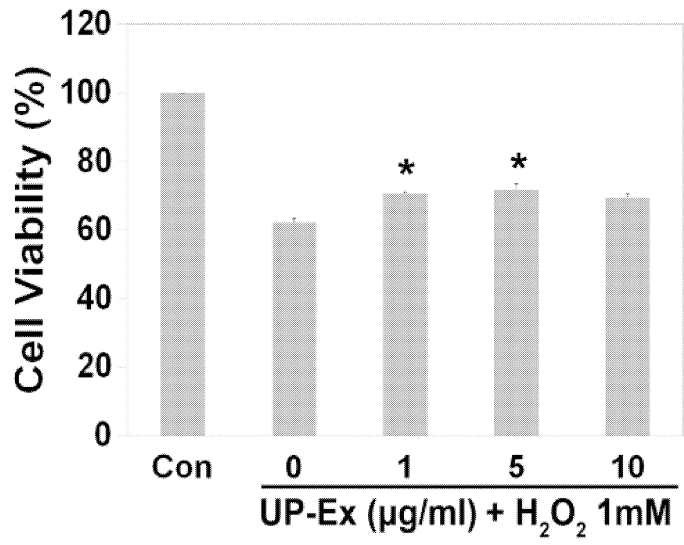
[0145] 이상에서 살펴본 바와 같이 본 발명은 바람직한 실시예를 들어 도시하고 설명하였으나, 상기한 실시예에 한정되지 아니하며 본 발명의 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변경과 수정이 가능할 것이다.

도면

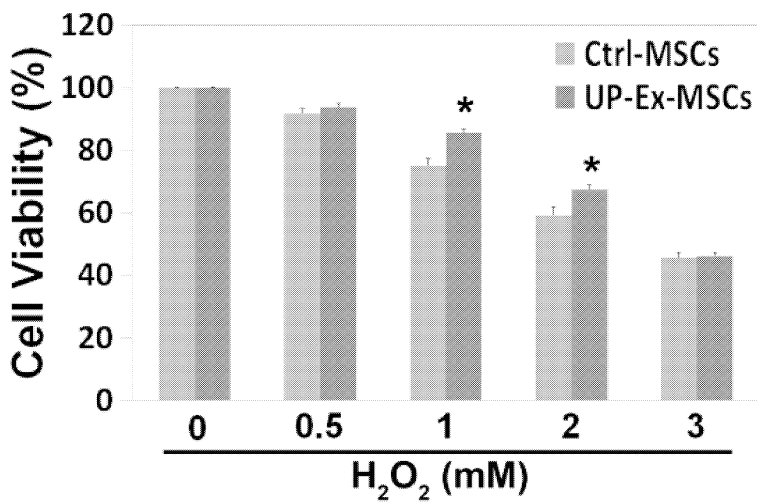
도면1



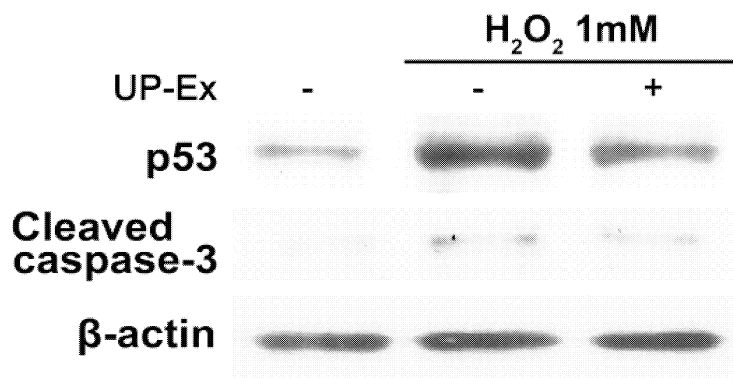
도면2



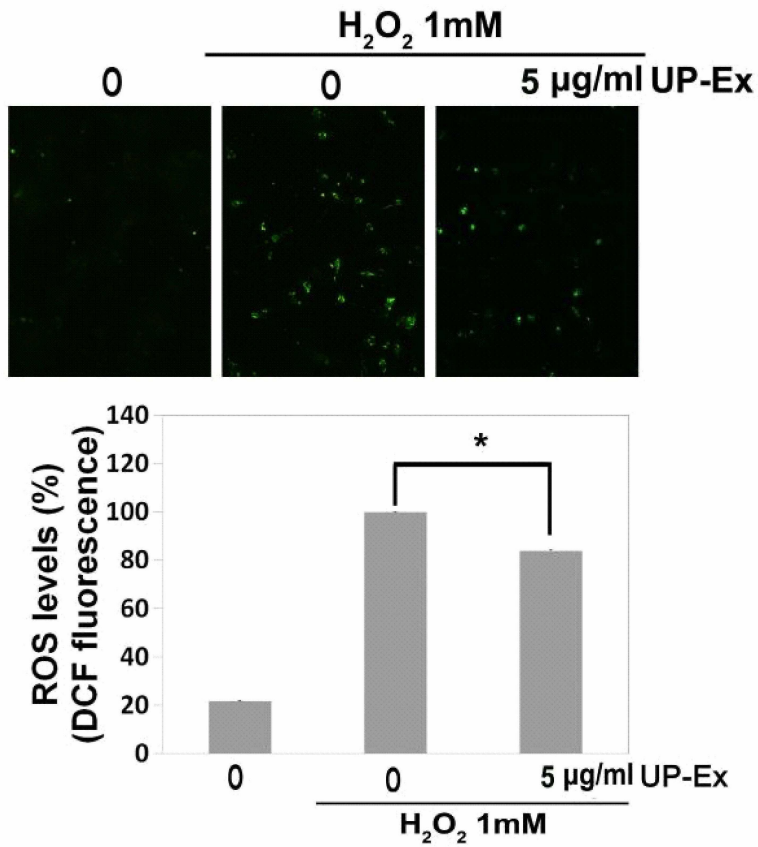
도면3



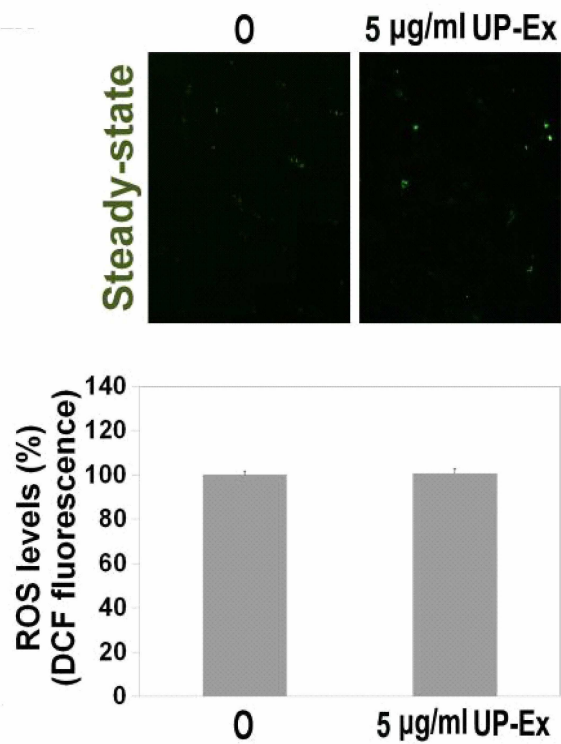
도면4



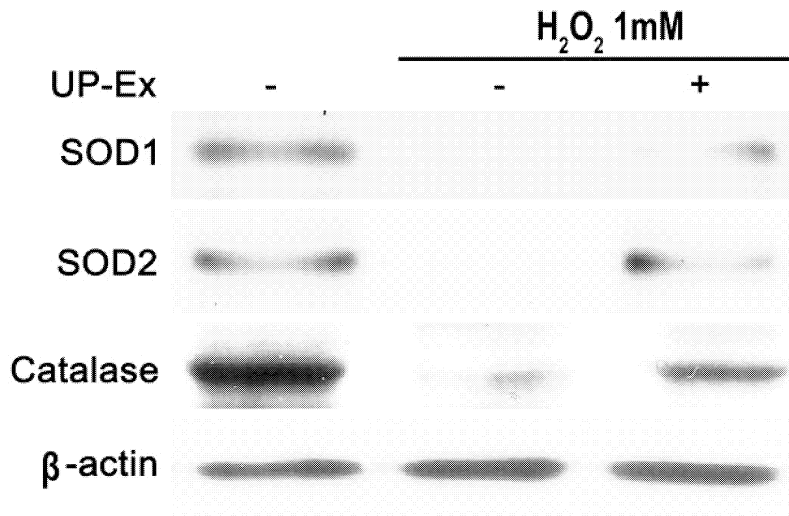
도면5



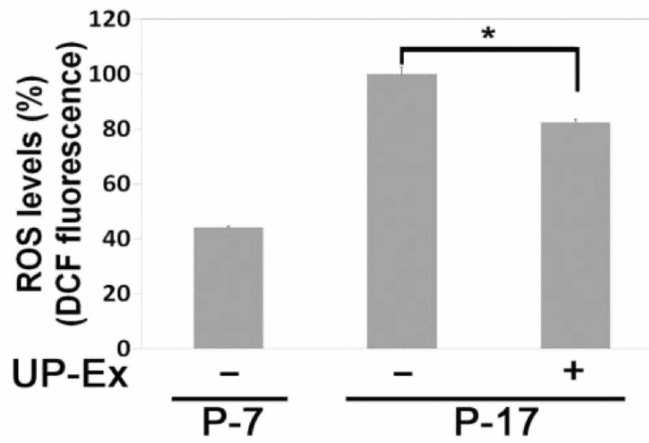
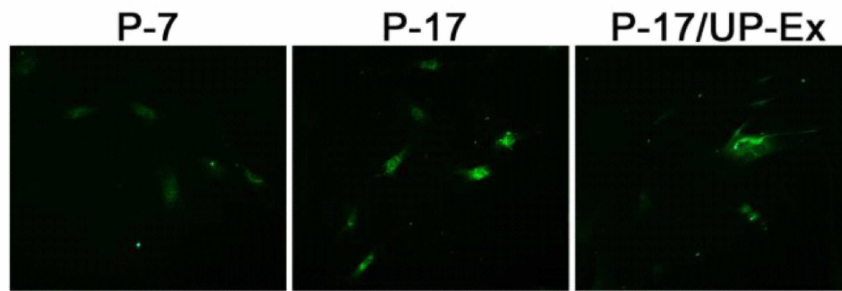
도면6



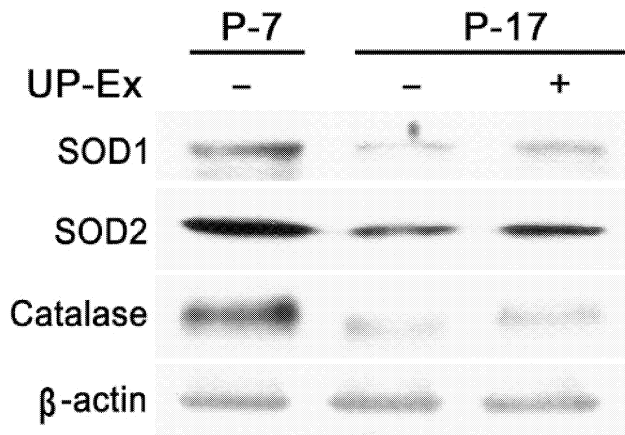
도면7



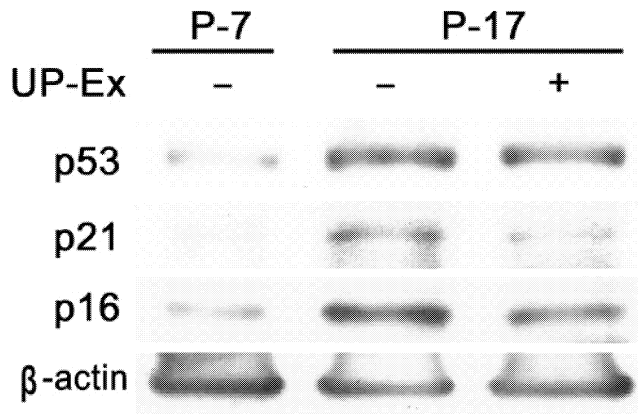
도면8



도면9



도면10



도면11

