



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0067205  
(43) 공개일자 2022년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/077 (2010.01) A61K 31/7048 (2006.01)  
A61K 36/28 (2006.01) A61P 1/02 (2006.01)  
A61P 19/00 (2006.01) C12N 9/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C12N 5/0654 (2013.01)  
A61K 31/7048 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0153666  
(22) 출원일자 2020년11월17일  
심사청구일자 2020년11월17일

(71) 출원인  
강원대학교산학협력단  
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자  
임기택  
강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트  
112동 2308호

이옥환  
강원도 춘천시 서부대성로 33 e편한세상 103동  
304호

(74) 대리인  
구현서

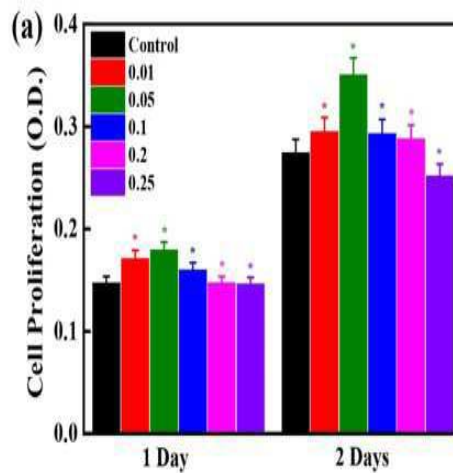
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 곤드레 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주인대 줄기세포의 치조골 분화용 조성물 및 그 용

(57) 요약

본 발명은 곤드레 추출물 및/또는 펙톨리나린을 유효성분으로 포함하는 포함하는 치주인대 줄기세포의 치조골 분화용 조성물에 관한 것으로, 곤드레 추출물 및/또는 펙톨리나린은 골 형성 관련 유전자 발현의 현저한 향상이 관찰되어 조직 공학 응용 분야에서 사용할 수 있다.

대표도 - 도4a



(52) CPC특허분류

*A61K 36/28* (2013.01)

*A61P 1/02* (2018.01)

*A61P 19/00* (2018.01)

*C12N 9/16* (2013.01)

*C12Y 301/03001* (2013.01)

*C12N 2501/999* (2013.01)

*C12N 2506/1361* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

곤드레 추출물을 유효성분으로 포함하는 줄기 세포 증식 촉진용 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서 상기 곤드레 추출물의 농도는 0.05%(w/v)인 것을 특징으로 하는 줄기 세포 증식 촉진용 조성물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서 상기 곤드레 추출물은 알코올 추출물인 것을 특징으로 하는 줄기 세포 증식 촉진용 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 줄기 세포는 인간 치주 인대 줄기 세포인 것을 특징으로 하는 줄기 세포 증식 촉진용 조성물.

#### 청구항 5

곤드레 추출물을 유효성분으로 포함하는 ALP(Alkaline phosphatase) 유전자 의 전사 촉진용 조성물.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서 상기 곤드레 추출물의 농도는 0.05%(w/v)인 것을 특징으로 하는 ALP(Alkaline phosphatase) 유전자의 전사 촉진용 조성물.

#### 청구항 7

곤드레 추출물을 유효성분으로 포함하는 RUNX2(Runt-related transcription factor 2) 유전자의 단백질 발현 촉진용 조성물.

#### 청구항 8

제 7항에 있어서 상기 곤드레 추출물의 농도는 0.05%(w/v)인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 9

인 비트로에서 세포에 곤드레 추출물을 처리하여 해당 세포에서 ALP(Alkaline phosphatase) 유전자의 전사를 촉진하는 방법.

#### 청구항 10

인 비트로에서 세포에 곤드레 추출물을 처리하여 해당 세포에서 RUNX2(Runt-related transcription factor 2) 유전자의 단백질 발현을 촉진하는 방법.

#### 청구항 11

펙툴리나린을 유효성분으로 포함하는 줄기 세포 증식 촉진용 조성물.

#### 청구항 12

펙툴리나린을 유효성분으로 포함하는 골 형성 분화 및 뼈 세포 발달 촉진용 조성물.

## 발명의 설명

**기술분야**

[0001] 본 발명은 곤드레 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주인대 줄기세포의 치조골 분화용 조성물 및 그 응용에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 체내에는 인체를 지지하는 조직으로 200여개의 뼈(bone)와 각기 다른 뼈를 연결하는 조직인 연골(cartilage)로 구성되어 있다. 이들은 중요한 장기의 보호, 조혈화에 필요한 미세 환경제공과 같은 기본적인 다양한 기능을 제공하여 준다. 또한 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉, 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다.

[0003] 따라서 성장이 끝난 성인의 뼈는 멈추지 않고 죽는 날까지 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수과정을 매우 역동적·지속적으로 반복 재생하면서 균형을 유지하게 된다. 이를 골재형성(bone remodeling)이라고 한다(Yamaguchi A et al, Tanpakushitsu Kakusan Koso, 50(6Suppl), pp664-669, 2005) 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 순환(turnover)은 성장과 스트레스에 의해서 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 적절히 뼈의 기능을 유지하는데 필수적이다(Cohen-Solal M et al, Therapie, 58(5), pp391-393, 2003)

[0004] 골재형성에는 크게 두 종류의 세포가 관여하는 것으로 알려져 있다. 두 세포 중 하나는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)이고, 다른 하나는 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)이다. 이들은 서로 다른 세포에서 유래하는데 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)가 분화되어 조골세포(osteoblast), 근원세포(myoblast), 지방세포(adipocyte), 섬유아세포(fibroblast), 연골세포(chondrocyte) 등의 세포로 분화되고, 조혈모세포(hematopoietic stem cell)가 분화되어 파골세포(osteoclast), 대식세포(macrophage), T 세포(T cell), B 세포(B cell), 수지상세포(dendritic cell), 호염구(basophile), 호산구(eosinophile), 호중구(neutrophile), 혈소판(platelet), 적혈구(Red blood cell) 등의 세포로 분화된다.

[0005] 조골세포 주요 분화인자인 Runx2(Runt-related transcription factor 2), 근원세포 주요 분화인자인 MyoD, 지방세포 주요 분화인자인 PPAR  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$ ), 연골세포 주요 분화인자인 Sox9 등은 서로의 발현을 억제조절하며 분화를 유도한다(Yamashita S et al., Exp Cell Res, 315(13), pp2231-40, 2009, Charles A et al, Exp Cell Res, 300(2), pp406-17, 2004, David V et al, Endocrinology, 148(5), pp2553-62, 2007, Hill TP et al, Dev Cell, 8(5), pp727-38, 2005, Wang H et al, J Bone Miner Res, 23(6), pp939-48, 2008, Lengner CJ et al, J Biol Chem, 280(16), pp15872-9, 2005)

[0006] 또한 연골세포 분화의 주요 인자인 Sox9은 조골세포의 성숙과 분화를 억제시키고, 조골세포의 분화인자인 Wnt는 Runx2를 촉진시키나 Sox9은 분해시켜 억제시키며 조골세포의 분화인자인 osterix는 연골세포의 분화를 억제한다(Dy P et al., Dev Cell, 13;22(3), pp597-609, 2012, Gunil I et al., 대한류마티스학회지, 15(1), 2008, Tominaga H et al., J Bone Miner Metab, 27(1), pp36-45, 2009)

[0007] 조골세포는 RANKL(Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)과 이것의 유도 수용체(decoy receptor)인 OPG(Osteoprotegerin)를 생성한다. RANKL이 파골 전구세포(osteoclast progenitor cells) 표면에 있는 수용체인 RANK(Receptor activator of NF- $\kappa$ B)에 결합하면 파골 전구 세포가 거대 다핵 파골세포로 성숙화(maturation)되어 골 흡수(bone resorption)가 일어난다. 그러나 OPG가 RANKL과 결합하면 RANKL과 RANK간 결합이 차단되어 파골세포의 형성이 억제되고 필요 이상의 골 흡수가 일어나지 않게 된다(Theill LE et al., Annu Rev Immunol, 20, pp795-823, 2002; Wagner EF et al., Curr Opin Genet Dev, 11, pp527-532, 2001) 이러한 파골세포의 활성화로 오래된 뼈의 흡수 또는 파괴가 이루어지며 이는 뼈에 구멍을 내어 적은 양의 칼슘이 혈류로 방출되어 신체기능을 유지하는데 사용된다(William J et al, Nature, 423, pp337342, 2003)

[0008] 한편, 뼈세포에서 생성된 조골세포는 교원질로 구멍을 채우고 칼슘과 인의 침착물(hydroxyapatite)을 덮어서 단단한 새로운 뼈를 만들어 골격을 재건한다(Stains JP et al., Birth Defects Res C Embryo Today, 75(1), pp72-80, 2005) 뼈가 파괴되기 시작하여 다시 새로운 뼈로 재형성 되기까지는 약 100일 정도 걸린다(Schwarz EM et al., Curr Opin Orthop, 11, pp329-335, 2000) 유아에서는 1년 내에 뼈의 칼슘이 100% 바뀌지만 성인에서는 매년 골격의 약 10~30%가 이런 과정을 통하여 재형성되며, 파골속도와 조골속도가 동일해야만 전과 같은 골밀도를 유지할 수 있다.

[0009] 이러한 두 과정 즉, 골흡수와 골형성은 서로 밀접하게 연결되어 이루어지고 골의 정상적인 구조를 유지하는데 중요하다. 한편, 고령화 사회에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증(Osteoporosis)은 여러 가지 원인에 의하여

뼈의 질량이 감소하고 뼈 조직의 미세구조의 퇴화로 골절 위험이 지속적으로 증가하는 질환으로 뼈를 구성하는 미네랄(특히, 칼슘)과 기질이 감소한 상태이며, 골재형성의 균형이 깨져서 파골작용이 조골작용보다 증가된 상태에서 발생한다(Iqbal MM, South Med J, 93(1),pp2-18, 2000)

[0010] 정상적인 뼈 내부는 그물망처럼 치밀한 구조를 이루고 있으나, 골다공증의 경우에는 구조 사이의 간격이 넓어지고 미세구조가 얇아져 약해짐으로써 조그만 충격에도 뼈가 쉽게 골절될 수 있는 상태로 진행된다(Stepan JJ et al., Endocr Regul, 37(4), pp225-238, 2003)

[0011] 골다공증은 폐경기의 시작과 동시에 급속한 골 손실(년간 2~3%)이 나타나며 척추의 압박 및 손목뼈가 쉽게 골절될 위험이 증가하는 폐경기 이후의 골다공증(Postmenopausal osteoporosis), 70세 이상의 남녀 노인에게 서서히 발생하며(연간 05~1%) 골반골(hip bone)과 척추뼈의 점진적인 골손실을 가져오는 노년기의 골다공증(Senile osteoporosis), 그리고 연령에 상관없이 질병(내분비질환, 위장관질환, 약성종양)이나 약물(부신피질호르몬, 항암화학요법, 갑상선호르몬, 항경련제, 항응고제, methotexate, cyclosporine, GnRH 등), 알코올, 흡연, 사고로 인해 발생하는 2차 골다공증(Secondary osteoporosis)으로 분류된다(Rosen CJ, N Engl J Med, 353(6), pp595-603, 2005; Davidson M, Clinician Reviews, 12(4), pp75-82, 2002)

[0012] 현재 골다공증 예방 및 치료에 사용되고 있는 약제는 대부분 골흡수를 억제하는 작용을 하기 때문에 이미 진행된 골소실을 완전히 회복할 수 없으며, 따라서 궁극적인 목표인 골다공증의 발생을 완전히 예방할 수 없는 것이 현실이다.

[0013] 이에 골다공증의 예방과 치료를 위해 골형성 증가에 관한 연구가 최근 주목받고 있으며 골조직 재생능력에 미치는 영향 등에 대한 과학적인 접근이 필요한 실정이다 (Chp SH et al., Korean J Obstet Gynecol 39:1497-1506, 1996, Boonen A et al., J Internal Medicine, 242:285-290, 1997)

[0014] 또한 치주질환은 병의 정도에 따라 치은염과 치주염으로 나눌 수 있으며, 박테리아에 의한 염증으로 잇몸과 잇몸뼈 주변까지 진행된 경우를 치주염이라고 한다. 치주염이 심할수록 치주낭의 깊이가 깊어지게 되며, 치주낭이 깊어지면서 치주인대에 염증이 생기게 되고 골소실이 일어나게 되는 것이 치주질환이다. 치주조직을 치유시키기 위하여 치아와 치조골을 연결하는 치주인대 재형성이 필요하며, 이러한 치유과정에서 가장 중요한 것은 조골세포의 증식이라고 알려져 있다. 치주인대 세포는 조골세포와 유사한 특성을 가지며 분화되어 경조직을 형성한다.

[0015] 현재 국내외에서 치주치료제로서 개발된 천연물 유래 약물로는 옥수수(Zea Mays L) 추출물이 유일하며, 인사돌이라는 상품명으로 시판되고 있으나 약리기전이 밝혀지지 않았다.

[0016] 현재 치주질환에 탁월한 효과를 나타내는 약물로서 개발된 것은 없으며 특히 치주인대 줄기세포의 치조골 분화를 촉진하여 치주질환을 치료하고자 하는 시도는 없었다.

[0017] [선행특허 문헌]

[0018] 대한민국 특허공개번호 제10-2014-0061825호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0019] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 치주인대 줄기세포의 치조골 분화를 촉진하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 다른 목적은 치주인대 줄기세포의 치조골 분화를 향상시키는 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0021] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 곤드레 추출물을 유효성분으로 포함하는 줄기 세포 증식 촉진용 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 곤드레 추출물의 농도는 0.05%(w/v)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0023] 본 발명의 다른 구현예에 있어서 상기 곤드레 추출물은 물 또는 알코올 추출물인 것이 바람직하고, C1에서 C4 알코올 추출물인 것이 더욱 바람직하고, 메탄올 추출물인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 줄기 세포는 인간 치주 인대 줄기 세포인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0025] 또 본 발명은 곤드레 추출물을 유효성분으로 포함하는 ALP(Alkaline phosphatase) 유전자의 전사 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서 상기 곤드레 추출물의 농도는 0.05%(w/v)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0027] 또한 본 발명은 곤드레 추출물을 유효성분으로 포함하는 RUNX2(Runt-related transcription factor 2) 유전자의 단백질 발현 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서 상기 곤드레 추출물의 농도는 0.05%(w/v)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0029] 또 본 발명은 인 비트로에서 세포에 곤드레 추출물을 처리하여 해당 세포에서 ALP(Alkaline phosphatase) 유전자의 전사를 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0030] 또한 본 발명은 인 비트로에서 세포에 곤드레 추출물을 처리하여 해당 세포에서 RUNX2(Runt-related transcription factor 2) 유전자의 단백질 발현을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0031] 또한 본 발명은 펙툴리나린을 유효성분으로 포함하는 줄기 세포 증식 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0032] 또한 본 발명은 펙툴리나린을 유효성분으로 포함하는 골 형성 분화 및 뼈 세포 발달 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0034] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0035] *Cirsium setidens* (Dunn) Nakai.(이하, '곤드레'라 함)는 주로 한국에서 발견되는 야생 다년초이다. 곤드레에는 항산화, 항암, 항 종양 및 항염 작용을 하는 여러 가지 생리 활성 식물 화학 물질이 포함되어 있다.
- [0036] 본 발명에서는 곤드레 메탄을 추출물에서 펙툴리나린을 핵자기 공명 (NMR) 분광법 및 매트릭스 지원 레이저 증착/이온화 비행 시간 (MALDI-TOF) 질량 분석법을 활용하여 동정 및 분석하였다.
- [0037] 배양 48 시간 후 대조군과 비교하여 곤드레 추출물의 존재에서 향상된 세포 생존력이 관찰되어 생체 적합성을 시사하였으며, 생체 적합성이 배양된 배지의 곤드레 농도에 의해 크게 영향을 받는다는 사실은 흥미로운 결과이다.
- [0038] 상대적으로 높은 세포 생존율은 다른 것에 비해 0.05 % 곤드레 함량 배지에서 관찰되었다. 특히, 인간 치주인대 줄기세포 (hPDLSC)는 곤드레 추출물의 존재 하에서 무기화 가능성을 보여주는 대조군보다 더 무기화가 발현되었다. 곤드레의 존재 하에서 Col1, Runx2, BSP 및 ALP와 같은 다른 전사 마커의 더 나은 발현은 뼈 조직의 특이성에 대한 우수한 골 형성 잠재력을 추가로 확인 시사한다.

**발명의 효과**

- [0040] 본 발명에서 알 수 있는 바와 같이, 곤드레의 메탄을 추출물은 주로 펙툴리나린으로 구성되어 있고, 분리된 hPDLSC는 줄기성 가능성을 유지했다. 특히, 대조군과 비교하여 곤드레의 존재에서 더 높은 세포 생존력이 관찰되었으며, 생존력은 배지의 곤드레 함량에 의해 광범위하게 영향을 받았다. 이들 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.25 %) 중에서 0.05 %가 다른 농도보다 더 큰 세포 생존력을 나타냈다. 세포 이동 연구는 또한 0.05 %가 세포 활동 개선을 위한 이상적인 농도임을 지지하였으며, 0.05 % 곤드레 농도의 존재에서 더 강렬한 무기질화 결절 형성이 발생했으며 대조군은 더 큰 골 형성 잠재력을 보였다.
- [0041] 또한, 치료 7 일 및 14 일 후 다른 농도에 비해 0.05 % 농도의 곤드레의 존재에서 골 형성 관련 유전자 발현의 현저한 향상이 관찰되어 조직 공학 응용 분야에서 잠재적인 사용을 시사한다. 이러한 결과를 바탕으로 곤드레가 골 형성 강화에 효과적이며 천연, 식용 및 골 형성 제제로 유용 할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0042] 도 1은 *C. setidens*(곤드레)에서 메탄올로 추출한 생리 활성 식물 화학 물질의 1H-Nuclear magnetic resonance (NMR) 스펙트럼으로 펙톨리나린 화학 성분의 존재를 나타냄,
- 도 2는 2, 5-DHB를 매트릭스로 사용하는 곤드레의 메탄올 추출 샘플의 매트릭스 지원 레이저 탈착/이온화 비행 시간(MALDI-TOF) 질량 스펙트럼으로, 화살표는 Da의 두 조각난 피크 사이의 간격을 나타내며, 조각난 이온은 ~ 98, 106, 139, 253 및 288 Da에서 나타났음,
- 도 3은 인간 치주 인대 줄기 세포 (hPDLSC)의 분리 및 특성화를 나타낸 그림으로, (a) 인간 어금니에서 hPDLSC의 존재에 대한 개략도, (b) 다른 시간 간격 후 배양된 줄기 세포의 형태, (c) hPDLSC의 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석 및 (d) 다른 유도 배지에서 21 일의 치료 후 hPDLSC의 다중 계통 분화 가능성,
- 도 4는 hPDLSC의 세포 독성 및 이동 잠재력 평가를 나타낸 그림으로, (a) 표시된 시간 간격에서 서로 다른 농도의 곤드레 존재 하에서 hPDLSC의 세포 생존력 데이터 및 (b-c) 표시된 시간 간격에서 곤드레 존재 하의 스크래치 치유 분석 (mag. 10x). 데이터는 3 회 반복 실험 (n = 3)의 평균 ± SD이며, \* p < 0.05에서 통계적 유의성이 있음,
- 도 5는 곤드레 추출물의 존재에서 hPDLSCs의 시험관 내 분화 잠재력을 나타낸 그림으로, (a) 표시된 시간 간격 (mag. 10x)에서 서로 다른 곤드레 농도의 존재 하에서 hPDLSC의 광물화된 결절 형성 잠재력, 및 (b) 14일 후 표시된 곤드레 농도의 존재 하에서 hPDLSC의 알칼리성 포스파타제(ALP) 활성 배양 일수(mag. 10x),
- 도 6은 곤드레 분말 존재 하에서 골 형성 특이적인 유전자 마커 및 단백질의 발현 평가를 나타낸 그림으로, (a-b) 각각 처리 7 일 후 및 14 일 후 상이한 농도의 곤드레 존재 하에서의 mRNA의 상대적 발현 수준. (c) 곤드레 (0, 0.01, 0.05 및 0.1 %) 처리 후 Runx2 및 OSX의 웨스턴 블롯 (WB) 분석; (d) ImageJ 소프트웨어를 사용하여 WB를 정량화하고 데이터를 α- 튜불린으로 정규화함. 데이터는 3 회 반복 실험 (n = 3)의 평균 ± SD이며 \* p < 0.05 및 \*\* p < 0.01에서 통계적 유의성이 있음,
- 도 7은 hPDLSCs의 gondre 유도 odontoblastic 분화에 대한 가상 도면.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0043] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0045] 실시예 1: *C. setidens*의 메탄올 추출물 추출 및 특성화

[0046] 곤드레 분말은 대한민국 강원대학교 식품생명공학과에서 얻었다. 생리 활성 식물 화학물질의 추출은 Jeong et al. (Jeong HC, Shim Y-S, Rhee YK, et al: Quantification of marker compounds in *Cirsium setidens* Nakai by HPLC-DAD. Food Science and Biotechnology 22: 1481-1486, 2013)을 변형하여 수행되었다.

[0047] 요약하면, 메탄올을 실온에서 충분한 양의 건조된 곤드레 분말에 첨가하고, 4 시간 동안 연속적으로 기계적으로 교반하였다. 그 후 혼합물을 여과하여 원하지 않는 입자를 제거하고 추출을 3 회 반복하였다.

[0048] 수득된 용액을 30 분 동안 원심 분리(4000 rpm / 10 °C)하고, 추가 분석을 위해 상청액을 분리하였다. 메탄올 추출물에 존재하는 식물 화학물질의 화학 구조는 DMSO-d6 용매에서 1H-NMR (JNM-ECZ400S / L1) 및 매트릭스 지원 레이저 증착/이온화 (비행 시간) MALDI-TOF 질량 분석법(Bruker Autoflex 속도 TOF / TOF, 독일)을 사용하여 분석하였다..

[0050] 실시예 2: 인간 치주 인대 줄기 세포(human periodontal ligament stem cell, hPDLSC)의 배양

[0051] 인간의 세 번째 어금니는 세 명의 젊은 남자(18 ~ 22 세)으로부터 채취되었다. 이 프로토콜은 서울대학교 치과 병원 기관 심의위원회 (대한민국 서울, IRB 번호 05004)의 승인을 받았으며 각 환자로부터 서면 동의를 받았다. 1 차 세포 배양은 Jin et al.(Jin B and Choung P-H: Tissue Engineering Part A 22: 721-732, 2016)에 의해 설명 된 절차에 따라 확립되었다.

[0052] 요약하면, hPDLSC는 추출된 제 3 대구치에서 서서히 분리하고 3mg/mL 콜라게나제 1 형 (Worthington Biochem., Freehold, NJ, USA) 및 4mg/mL dispase (Boehringer-Mannheim, Germany)의 용액으로 37°C에서 1 시간 동안 처

리했다.

[0053] 그 용액을 40 $\mu$ m 스트레이너(Falcon-BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)에 통과시켜 세포 현탁액을 얻었다. 유도된 세포는 10 % 소 태아 혈청 (FBS) (Gibco BRL, NY, USA), 100  $\mu$ mol/L 아스코르브산 2-phosphate (Sigma-Aldrich, MO, USA), 2mM 글루타민, 100U/mL 페니실린 및 100  $\mu$ g/mL 스트렙토마이신 (Biofluids, MD, USA)가 보충된 알파-변형 Eagle 's 배지 (알파-MEM, Gibco BRL, NY, USA)에서 배양되었고 37 ° C에서 5 % CO<sub>2</sub> 에서 배양되었다. 배지는 24 시간 후에 교체되었고 3-4 일마다 교체되었다. 증식 및 분화 연구에는 2 계대 또는 3 계대의 일차 세포만 사용되었다.

[0055] 실시예 3: 유세포 분석

[0056] 면역 표현형을 특성화하기 위해 계대 3에서 중간엽 줄기 세포 관련 표면 마커의 발현을 유세포 분석으로 분석하였다. 약  $1 \times 10^6$  개의 세포를 3.7 % 파라포름알데히드(Sigma-Aldrich, USA)로 10 분 동안 고정한 다음 1 % 소 혈청 알부민 (BSA)(ICN Biomedicals, OH, USA)을 함유하는 인산염 완충 식염수 (PBS) 용액 (한국, 웰 레진)에 30분 동안 재현탁하여 비특이적 항체 결합 부위를 차단하였다. 다음으로, 세포를 CD34, CD13, CD90 및 CD146에 대한 특정 항체와 함께 4 ° C에서 1 시간 동안 배양한 다음, 형광 이차 항체와 함께 실온에서 1 시간 동안 배양했다. 모든 항체는 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입했다. CD13, CD90 및 CD146-양성 및 CD34-음성 세포의 백분율을 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 캘리버 유세포 분석기(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA)로 측정했다. 데이터는 Cell Quest Pro 소프트웨어 (Becton Dickinson, CA, USA)를 사용하여 분석되었다.

[0058] 실시예 4: 세포 독성 및 이동 분석

[0059] 비색 3-(4,5-디메틸타졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT) 분석 키트 (Promega, Madison, WI, US A)를 사용하여 세포 증식 및 세포 독성을 측정했다.

[0060] 요약하면, 세포를 96- 웰 플레이트 (웰당  $1 \times 10^4$  개 세포)에 과중하고 원하는 기간 동안 배양한 다음 다양한 농도의 콘드레 분말(0.01, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.25 %(w/v))로 필요한 기간 동안 처리했다. 이러한 농도는 증식 효과가 있었다.

[0061] 콘드레가 없는 배지는 음성 대조군으로 간주되었다. 처리가 끝날 때 염료 용액 (15  $\mu$ L)을 첨가한 다음, 5 % CO<sub>2</sub>에서 37 ° C에서 4 시간 동안 추가로 배양했다. 가용화된 포르마잔 생성물은 100  $\mu$ L의 가용화/정지 용액을 배지에 첨가하여 얻었다. 형성된 생성물은 595 nm에서 ELISA 플레이트 판독기를 사용하여 정량화되었다 (참조로 655 nm에서 판독 값 포함). 모든 실험은 세 번 수행되었으며 값은 평균  $\pm$  표준 편차 (SD)로 표시된다.

[0062] 본 발명자들은 gondre의 존재하에 hPDLSC의 결합 치유 잠재력을 평가하기 위해 마이그레이션 분석을 수행했다. 이를 위해, 세포를 6-웰 플레이트에 과중하고 ~ 90 % 함유까지 성장시켰다. 다음으로 세포 단층을 플라스틱 팁 (1mm)으로 감고 PBS (2 회)로 세척하여 세포 과편을 제거했다. 굵은 세포는 콘드레와 함께 또는 없이 배양되었다. 상처 부위의 세포 이동은 광학 현미경 (Olympus U-SPT, Olympus, Japan)을 사용하여 0, 12, 24 및 48 시간의 시간 간격 후에 모니터링되었다.

[0063] 세포 이동은 상처 가장자리(t = 0에서 시작 지점)에서 가장 먼 이동 지점까지 세포를 이동하여 이동 한 거리를 측정하여 정량화되었다.

[0065] 실시예 5:hPDLSC의 다-계통 분화

[0066] 세포를 21 일 동안 적절한 보충제로 자극하면서, 골 형성, 연골 형성, 지방 형성 및 신경성 분화 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 배양하여 hPDLSCs의 골 형성, 연골 형성, 지방 형성 및 신경성 분화 잠재력을 각각 조사했다.

[0067] 21 일의 처리 후, 세포를 pH 4.2에서 2 % 알리자린 레드 S 염색 (ARS), 1 % 알시안 블루, 0.3 % 오일 레드 O 염료 (모두 미국 Sigma-Aldrich에서 제공) 및 Nissl 염색으로 염색했다. 염색된 세포를 역광 현미경으로 시각화



하여 각각 골 형성, 연골 형성, 지방 형성 및 신경 분화의 지표인 석회화된 기질, 프로테오글리칸, 지방 액포 및 Nissl 체를 검출했다.

[0069] 실시예 6: 체외 분화 및 광물화

[0070] 세포 ( $4 \times 10^4$ )는 50 % 내지 60 % 함유점에 도달할 때까지 10 % FBS를 포함하는  $\alpha$ -MEM이 있는 24 웰 플레이트에서 배양되었다. 세포를 10 % 포르말린 용액 (경기도 덕산 화학)으로 고정한 후 0.1 % Triton X-100으로 5 분간 배양하였다. 그런 다음 배양된 세포를 제조업체의 프로토콜에 따라 백혈구 ALP 키트 (Sigma-Aldrich, USA)로 염색했다. 광물화된 결절은 처리 14 일에 pH 4.2에서 2 % ARS로 염색하여 검출했다. 광물화를 위해 세포는 무기화를 위해 세포는 50 ug/ mL 아스코르브산, 10 mM  $\beta$ - 글리세로 포스페이트 및 100 nM 텍사메타손(Sigma-Aldrich, USA)이 포함된 골 형성 분화 배지에서 14 일 동안 배양되었다.

[0072] 실시예 7:RNA 분리 및 실시간 증합 효소 연쇄 반응 (qPCR) 분석

[0073] 본 발명자들은 hPDLSC에서 골 형성 관련 유전자의 발현을 평가하기 위해 qPCR을 사용했다(Kim H-B, Jin B, Patel DK, *et al*: IEEE transactions on nanobioscience 18: 463-468, 2019;Dutta SD, Patel DK, Seo Y-R, *et al*: Journal of Nanomaterials 2019: 2019).

[0074] 요약하면, 세포 ( $1 \times 10^6$ )는 분화 유도 조건 하에서 2 주 동안 60mm 배양 접시에서 배양되었으며, 제조업체의 지침에 따라 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 처리 된 세포로부터 RNA를 분리했다.

[0075] 다음으로, 역전사 효소 (Superscript II Preamplication System, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 2 $\mu$ g의 총 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. qPCR에는 SYBR Green PCR Master Mix (ABI Prism 7500; Applied Biosystems, Warrington, UK)가 사용되었다.

[0076] 실험 조건은 다음과 같았다: 95 ° C에서 15 초 동안 변성 40 사이클, 60 ° C에서 1 분 증폭. 모든 반응은 삼중으로 진행되었고 하우스 키핑 유전자인 하이포크 산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HPRT)로 정규화되었다.

[0077] 주기 역치 값을 계산하고 비교하여 대조군 및 곤드레 처리 그룹에서 유전자 발현 수준을 평가했다.

[0078] hPDLSC 및 곤드레 처리 된 대응 물에서 상대적인 mRNA 발현 수준을 히스토그램에 표시했다. 콜라겐 1 (Col1), 런트 관련 전사 인자 2(Runx2), 뼈 시알로 단백질(BSP), 알칼리성 포스파타제(ALP) 및 HPRT의 발현 수준을 평가했다. 이 분석에 사용된 특정 프라이머 세트는 표 1에 나열되어 있다.

표 1

[0079]

Gene	GenBank No.	Sequences
Col1	NM007742	5'- GTCCTCTTAGGGCCACT -3'
		5'- CCACGTCTCACCATTGGGG -3'
Runx2	NM_001146038	5'- CGCACGACAACCGCACCAT -3'
		5'- CAGCACGGAGCACAGGAAGTT -3'
BSP	L09555	5'-AACTTTTATGTCCCCCGTTGA-3'
		5'-TGGACTGGAACCGTTTCAGA-3'
ALP	NM007431	5'- CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA -3'5'- GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT -3'
HPRT	NM_000194	5'- GGCTATAAGTCTTTGCTGACCTG-3'
		5'-CCACAGGGACTAGAACCTGCTA-3'

[0080] 표 1은 real-time PCR 분석에 필요한 프라이머 서열로

[0081] 약어: Col1, type 1 collagen; Runx2, runt-related transcription x2; BSP, bone sialoprotein; ALP, alkaline phosphatase; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase.

- [0083] 실시예 8: 웨스턴 블롯 분석
- [0084] 곤드레- 유도된 단백질 발현 수준은 웨스턴 블롯팅으로 결정되었다. 이를 위해, 세포를 1mM 페닐메틸설포닐플루오라이드를 함유하는 RIPA 완충액으로 용해시키고 원심 분리하고 깨끗한 Eppendorf 튜브에 수집했다. 단백질 농도는 BSA 단백질 분석 키트 (Bio-Rad Laboratories, Bio-Rad, USA)를 사용하여 분석되었다. 동일한 부피의 단백질(25  $\mu$ g)을 나트륨도데실설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 (SDS-PAGE)에 의해 분리하고 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막(GE Healthcare, Chicago, USA)으로 옮겼다. Runx2 및 OSX에 대한 1 차 항체는 Abcam (영국)에서 구입했다.
- [0085] 블롯은 양고추냉이 과산화효소 결합 2차 항체 (Cell Signaling Technology, MA, USA)를 사용하여 디벨로프되었고 겔 문서화 이미징 시스템 (Chemi-Doc XRS + Imaging System, Bio-Rad, USA)을 사용하여 시각화되었다. 블롯은 ImageJ 소프트웨어 (ImageJ v1.8, NIH, USA)를 사용하여 정량화되고  $\alpha$ -튜불린으로 정규화되었다.
- [0087] 본 발명의 통계 분석과 관련하여 Origin Pro 9.0 소프트웨어를 사용하여 일원 분산 분석으로 통계 분석을 수행했다. 모든 실험은 3 회(n = 3)로 수행되었으며 결과는 평균 OD  $\pm$  표준 편차 (SD)로 표시된다. 대조군과 실험군 간의 유의한 차이를 비교하기 위해 Tukey의 사후 분석을 수행했다. \* p <0.05에서 통계적 유의성이 고려되었다.
- [0089] 이하, 상기 실시예의 결과를 상술한다.
- [0090] 추출물의 특성화:
- [0091] 양성자 스펙트럼은 구조에 존재하는 다양한 종류의 양성자를 식별하는 데 사용되는 강력한 분석 도구이다. 이 정보는 특정 물질의 화학적 구성을 설명하기 위한 실질적인 지원을 제공한다.
- [0092] 곤드레 메탄올 추출 샘플의 1H-NMR 스펙트럼을 도 1에 나타내었다. NMR 스펙트럼은 이전에 보고(Lim H, Son KH, Chang HW, Bae K, Kang SS and Kim HP: Anti-inflammatory activity of pectolinarigenin and pectolinarin isolated from *Cirsium chanroenicum*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 31: 2063-2067, 2008)된 펙톨리나린 패턴과 유사하며, 이는 추출된 물질이 주로 펙톨리나린으로 구성되었음을 시사한다.
- [0093] 양성자 NMR 스펙트럼은 0.83-2.2 ppm의 화학적 이동( $\delta$ ) 영역에서 여러 피크를 나타내며, 이는 메틸 및 메틸렌 수소 부분에 해당한다. 다른 화학 환경으로 인한 다른 양성자의 화학적 이동은 양성자 스펙트럼에 자세히 표시된다. 2, 5-Dihydroxybenzoic acid(2, 5-DHB)-보조 매트릭스를 사용하는 메탄올 추출 샘플의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 도 2에 나타내었다.
- [0094] 2, 5-DHB 매트릭스가 MALDI-TOF 분광법의 신호의 강도를 향상한다는 것은 잘 확립되어 있다. 흥미롭게도 두 개의 조각난 피크 사이의 간격은 일정하지 않았다. 이는 추출된 샘플에서 다양한 결합과 관련된 다양한 화학적 부분이 존재하기 때문이다. 두 피크 사이의 간격은 ~ 147 Da와 149 Da로 구조에 각각 포도당과 람노오스 단위가 있음을 시사한다. 또한 측정 중에 절단된 글리코시드 연결과 연결되었다고 추론할 수 있다. ~ 288에서 신호의 출현은 포도당 단위에 연결된 메탄올 추출물에 플라본 구조의 존재를 보여준다.
- [0095] 1H-NMR 및 MALDI-TOF에서 얻은 데이터에 따르면 본 발명의 곤드레의 메탄올 추출물은 주로 펙톨리나린 화학적 부위로 구성되었다.
- [0097] hPDLSC의 특성화:
- [0098] 인간 어금니에서 치주 인대 세포의 존재와 일차 세포 배양을 위한 분리의 개략도를 그림 3a에 나타내었다.
- [0099] 여러 시간 간격 후 배양된 세포 형태는 그림 3b에 나타내었다.
- [0100] 줄기 세포는 다능성과 다른 표면 마커의 발현을 특징으로 하며, 그 운명은 성장 인자, 사이토카인 및 주변 미세 환경의 영향을 많이 받는다. 이러한 요인은 줄기 세포의 자기 재생 및 탈분화를 촉진할 수 있다. 이 능력을 줄기 잠재력이라고 한다.
- [0101] 그림 3c에서 볼 수 있듯이 FACS 분석을 통해 hPDLSC의 줄기성(stemness) 가능성을 평가했다. hPDLSC는

cementoblast, 조골 세포, 지방 세포 및 연골 세포로 분화될 수 있을뿐만 아니라, 그들은 인간 치아 치수 줄기 세포 및 인간 치근단 모낭 줄기 세포에 비해 우수한 골 세포 형성 특성을 나타낸다). FACS 결과는 CD13, CD90 및 CD146과 같은 줄기 세포 관련 표면 마커의 향상된 발현(~ 90 %)을 보여 주어 배양된 hPDLSC의 줄기성 가능성을 나타낸다. hPDLSC에서 CD34 표면 마커의 낮은 발현 (~ 10 %)은 줄기성 가능성도 지지한다.

[0102] 그림 3d는 특정 마커의 발현을 모니터링하여 결정된 다양한 유도 배지에서 21 일 배양한 후 hPDLSC의 다중 계통 분화 잠재력을 보여준다. ARS, alcian blue, oil red O 염료 및 Nissl 염색으로 검출된 무기질화 매트릭스, 프로테오글리칸, 지방 액포 및 Nissl 바디의 존재는 각각 hPDLSC의 골 형성, 연골 생성, 지방 생성 및 신경 생성 잠재력을 나타낸다.

[0104] 세포 생존력 및 이동:

[0105] 생물 의학 분야에서 사용될 수 있는 물질은 무독성이고 생분해성이어야하므로 세포 독성은 물질이 생물 의학 분야에서 사용될 수 있는지 여부를 결정하는 중요한 기준 중 하나이다.

[0106] hPDLSC에 대한 콘드레 분말의 세포 독성 효과는 그림 4a에 제시된 바와 같이 MTT 분석을 사용하여 평가되었다. 콘드레가 없는 배지에서 배양된 세포를 대조군으로 사용하였다. 대조군에 비해 콘드레 처리된 hPDLSC에서 세포 생존력의 증가가 24 시간 배양 후 입증되어 생체 적합성이 있음을 시사한다. 또한, 48 시간의 배양 후 세포 생존력의 현저한 개선이 관찰되었으며, 이는 향상된 생체 적합성을 나타낸다.

[0107] 이것은 콘드레가 hPDLSC에 부작용이 없음을 보여준다. 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.25 % 콘드레 농도 중에서 0.05 %가 가장 높은 세포 생존력을 이끌어내어 생체 적합성 개선에 적합한 농도임을 입증했다.

[0108] 이동은 건강한 발달과 면역 반응뿐만 아니라 암 전이 및 염증과 같은 질병 과정에 기여하기 때문에 살아있는 세포에 필수적이다. 줄기 세포 이동은 배아 발달 동안 뿐만 아니라 성인 조직에서도 발생하여 항상성을 유지하고 손상을 복구한다. 줄기 세포의 이동 능력은 재생 조직 응용 분야에서 엄청난 치료적 중요성을 가지고 있다. 그림 4b-c는 표시된 시간 간격에서 서로 다른 농도의 콘드레가 존재할 때 hPDLSC의 이동 잠재력을 보여준다. 상처 부위로의 세포 이동은 처음에는 대조군 조건에 비해 콘드레의 존재에서 느렸지만, 24 시간 후이 경향이 증가하고 대조군에 비해 콘드레 처리된 조건에서 더 높은 세포 축적이 관찰되었다. 또한, 0.05 % 농도의 콘드레는 상처 부위로 이동하는 많은 수의 세포를 나타냈다. 세포 생존력 및 이동 경향 결과는 0.05 % 콘드레 농도가 세포 활동을 개선하기 위한 최적의 농도임을 나타낸다.

[0110] 광물화 및 ALP 활성:

[0111] 줄기 세포는 분화 잠재력으로 인해 조직 공학 응용 분야에서 가장 두드러진 세포이다. 조골 세포, 연골 세포, 지방 세포 및 기타 세포로 분화할 수 있지만, 분화 능력은 국소적인 생물학적 조건의 영향을 많이 받는다.

[0112] 콘드레에 의해 유도된 hPDLSC의 광물화는 7 일 및 14 일 배양 후 ARS 염색 과정을 통해 조사되었으며 그 결과는 그림 5a에 나타내었다. 콘드레 처리된 세포는 대조군 조건에 비해 더 강렬한 색상이 관찰되었으며, 이는 더 나은 무기화 가능성을 보여주었다. 이 매개 변수는 분화 매체에서 생체 물질의 농도에 의해 광범위하게 영향을 받는다. 실험 조건 (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.25 %) 중 콘드레 농도가 0.05 %이면 처리 7 일 후 광물화 가능성이 더 큰 것으로 나타났다. 치료 14 일 후에도 유사한 경향이 관찰되어 0.05 %가 광물 화를위한 최적 농도임을 나타낸다.

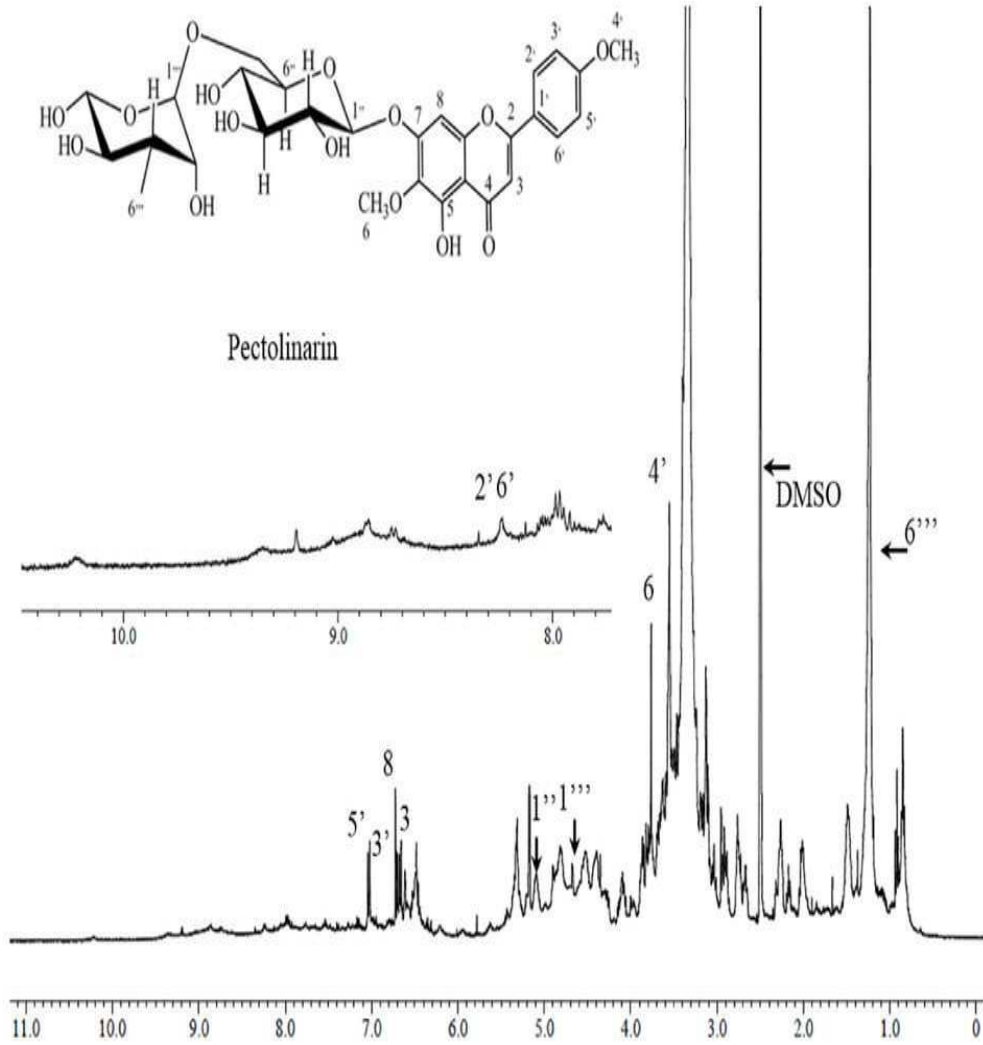
[0113] 그림 5b는 치료 14 일 후 콘드레의 존재하에 hPDLSC의 ALP 활성을 보여준다. ALP 활성은 대조군보다 콘드레 처리 군에서 더 높았으며, 이 차이는 0.05 % 콘드레 처리된 세포에서 유의미했다. ALP는 분화시 골 미네랄 생산을 위한 전골 아세포와 골아 세포의 존재를 시사하는 중요한 유전자 마커이기 때문에, 콘드레가 있는 상태에서 더 강하게 염색된 세포는 콘드레의 더 높은 골 형성 잠재력을 확인한다. 대조군 세포에 비해 처리된 세포. 파골 세포 재흡수와 조골 세포 형성은 전반적인 뼈 대사 활동에 영향을 미치는 두 가지 중요한 과정이라는 것은 잘 알려져 있다.

[0115] 골 형성 유전자 및 단백질 발현:

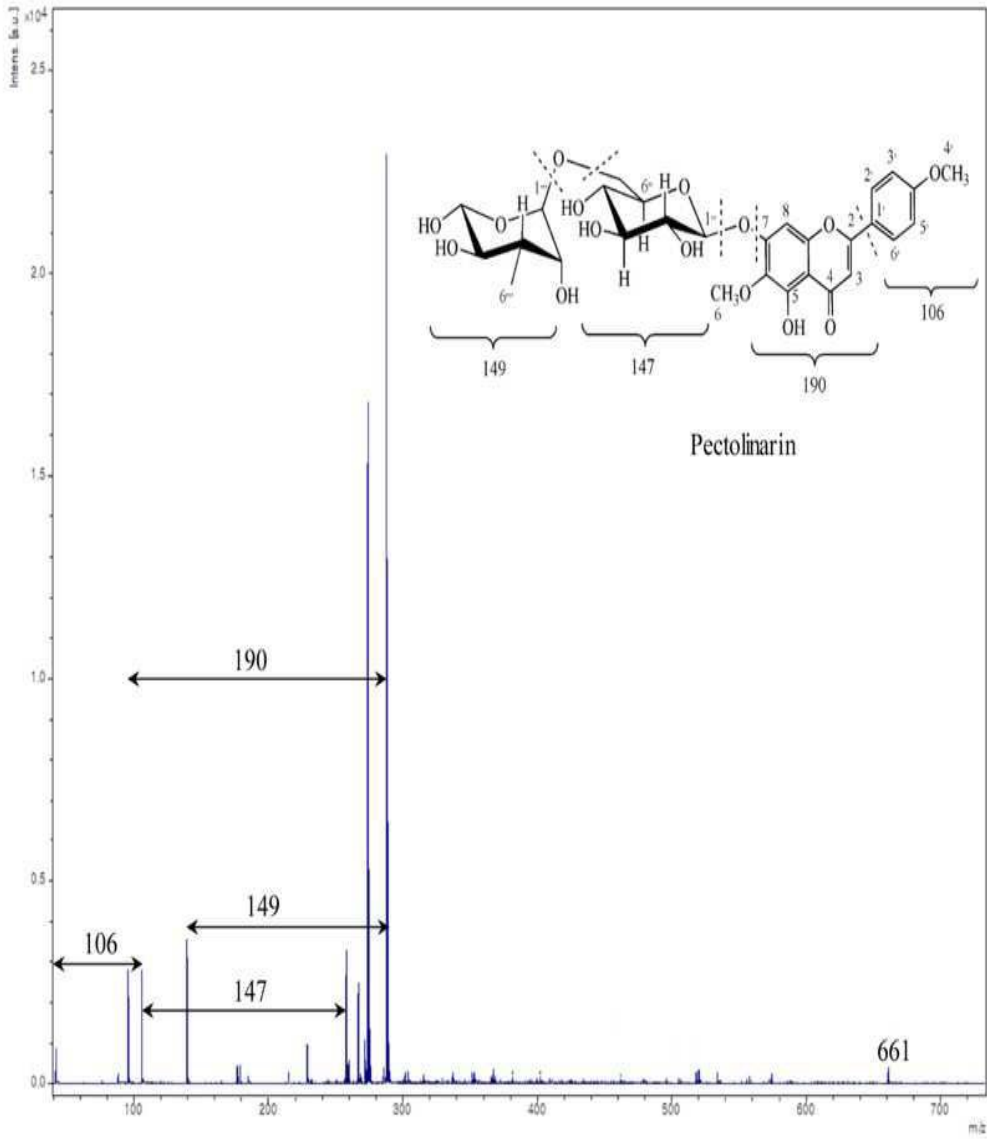
- [0116] 뼈 형성은 여러 골 형성 관련 유전자를 포함하는 복잡한 생물학적 과정이다. 치료 7 일 및 14 일 후 콘드레의 존재 하에서 골 형성 관련 유전자 (Col1, Runx2, BSP 및 ALP)의 발현이 그림 6a-b에 나와 있다.
- [0117] 처리되지 않은 세포 (콘드레 없음)는 대조군으로 간주되었다. 골기질에서 발견되는 가장 풍부한 단백질인 Col1은 조골 세포의 증식에 필수적이다. 콘드레의 존재하에 hPDLSC로부터 Col1 바이오 마커의 발현은 뼈 세포 형성을 입증한다. 더욱이, 그 발현은 콘드레 처리된 세포에서 대조군에 비해 14 일 치료 후 더 큰 골 형성 가능성을 시사한다.
- [0118] Runx2는 골 형성 중에 발현되는 또 다른 골 형성 마커이다. 그것은 초기 전사 마커이기 때문에 골 형성이 없는 발생할 수 없다. 결과는 그 발현이 대조군 세포보다 콘드레 처리 된 세포에서 더 높음을 보여 주었다. 또한, Runx2 발현은 0.05 % 콘드레로 처리한 지 14 일 후에 높았다. Runx2의 발현과 활성화는 다른 전사 인자와 단백질-단백질 또는 단백질 -DNA 상호 작용에 의해 심각한 영향을 받는다. 그러나 Runx2 인자의 과발현은 골 흡수를 촉진한다.
- [0119] BSP는 뼈와 상아질에서 발생하는 "작은 인테그린 결합 리간드 N- 연결 당 단백질"(SIBLING) 계열에서 비롯된다. SIBLING은 뼈 발달, 치유, 재 형성 및 광물 화에 중요한 역할을 한다. 대조군 조건에 비해 콘드레의 존재 하에서 BSP의 더 높은 발현 수준은 더 높은 골 형성 효율을 나타냈다.
- [0120] 골 형성은 골 형성 매체에 존재하는 생체 물질의 특성, 농도 및 크기에 의해 광범위하게 영향을 받는다. hMSC의 존재 하에서 표면 전하가 다른 표면 기능화된 금 나노 입자 (Au NP)의 골 형성 가능성을 테스트했다. 그들은 하이드록실기를 가진 Au NP가 골 형성과 성장을 촉진하는 하이드록실 모이어티의 존재로 인해 다른 것보다 더 높은 골 형성 특성을 나타내어 골 형성을 유도한다는 것을 관찰했다.
- [0121] 하이드록실 그룹은 또한 ECM 성장을 촉진하여 골 형성에 기여한다.
- [0122] 본 발명에서 펙톨리나린의 풍부한 하이드록실 그룹은 ALP 활성화 및 광물화 테스트에서 관찰된 바와 같이 매트릭스에서 인회석 침착을 촉진하여 더 큰 골 형성을 유발한다. 세포 활성화는 다른 것에 비해 0.05 % 농도에서 더 높았다. 따라서 이 농도에서 더 많은 인회석 침착이 발생하여 우수한 골 형성을 유도한다.
- [0123] 세포 및 분자 수준에서 hPDLSC와 콘드레 사이의 상호 작용 메커니즘을 이해하면 조직 공학 응용 분야에서 세포의 골 형성 분화를 위해 허브 유래 물질을 활용하는 데 도움이 될 것이다.
- [0124] 따라서 콘드레에 풍부한 하이드록실 그룹은 표면 화학을 통해 hPDLSC의 골 형성 분화를 개선한다. 도 6c-d에 제시된 바와 같이, 콘드레의 존재하에 hPDLSC의 단백질 발현 변화를 웨스턴 블롯팅으로 평가하였다. 결과는 Runx2의 단백질 발현이 대조군 세포보다 콘드레 처리된 세포에서 더 높았으며, 더욱 우수한 골 형성 잠재력을 확인했다. 특히, 0.05 % 콘드레 처리된 세포는 다른 그룹에 비해 가장 높은 수준을 나타냈다. Cbfa1 또는 AML3 전사 인자로도 알려진 Runx2는 줄기 세포의 골 형성 분화를 조절하는 필수 전사 인자이다. 콘드레의 존재 하에서 개선된 골 형성 활성화 및 단백질 발현에 기초하여, 가상 경로가 그림 7에 제시되어 있다. Runx2 인산화 및 전사 활동을 가속화하여 골 형성 분화 및 뼈 세포 발달에 중요한 역할을 한다.

도면

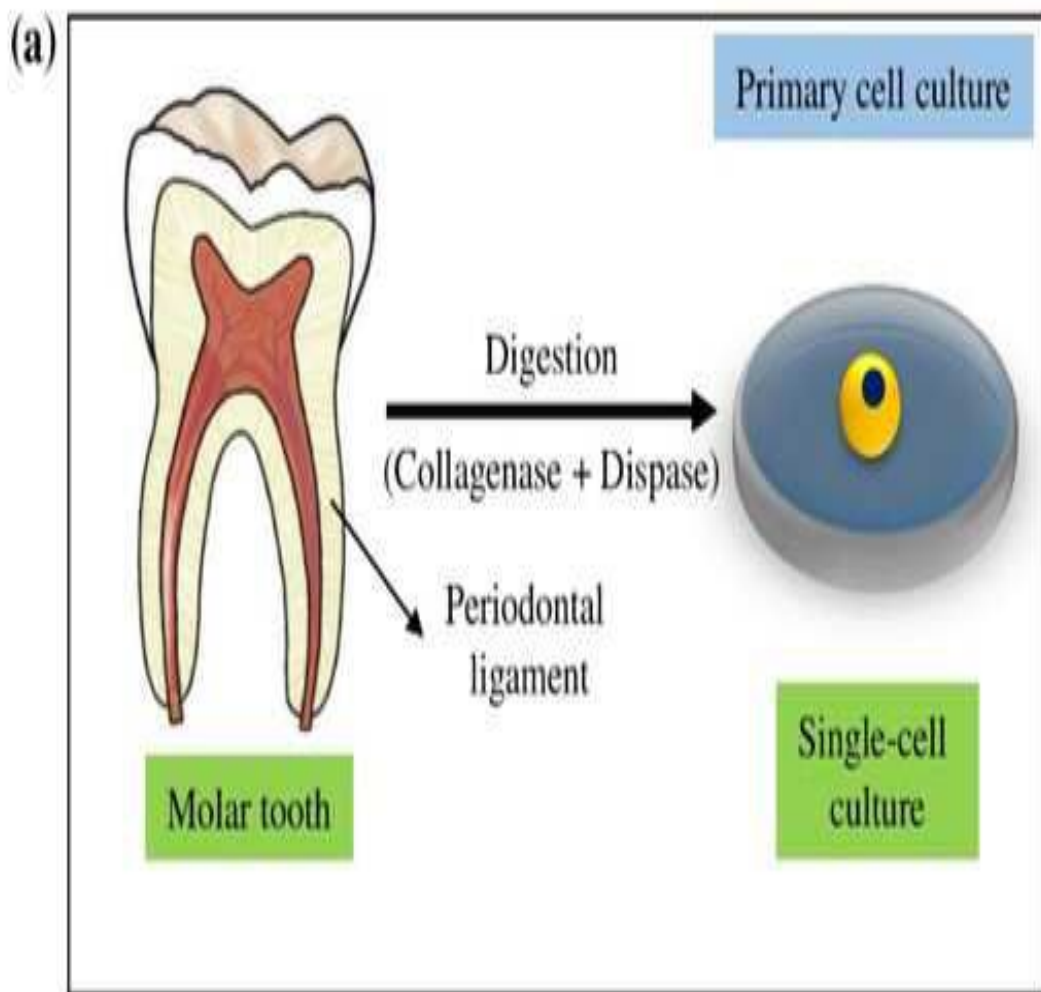
도면1



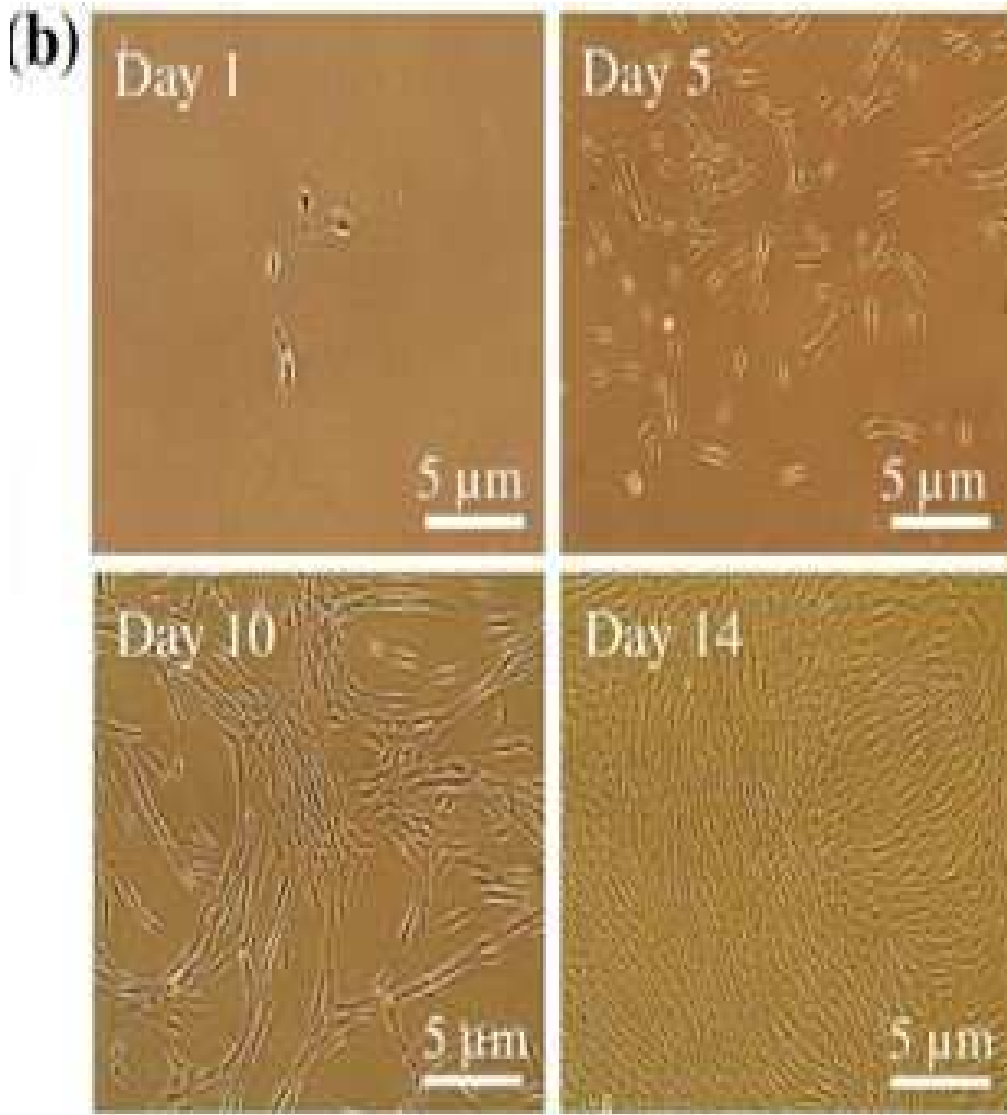
도면2



도면3a

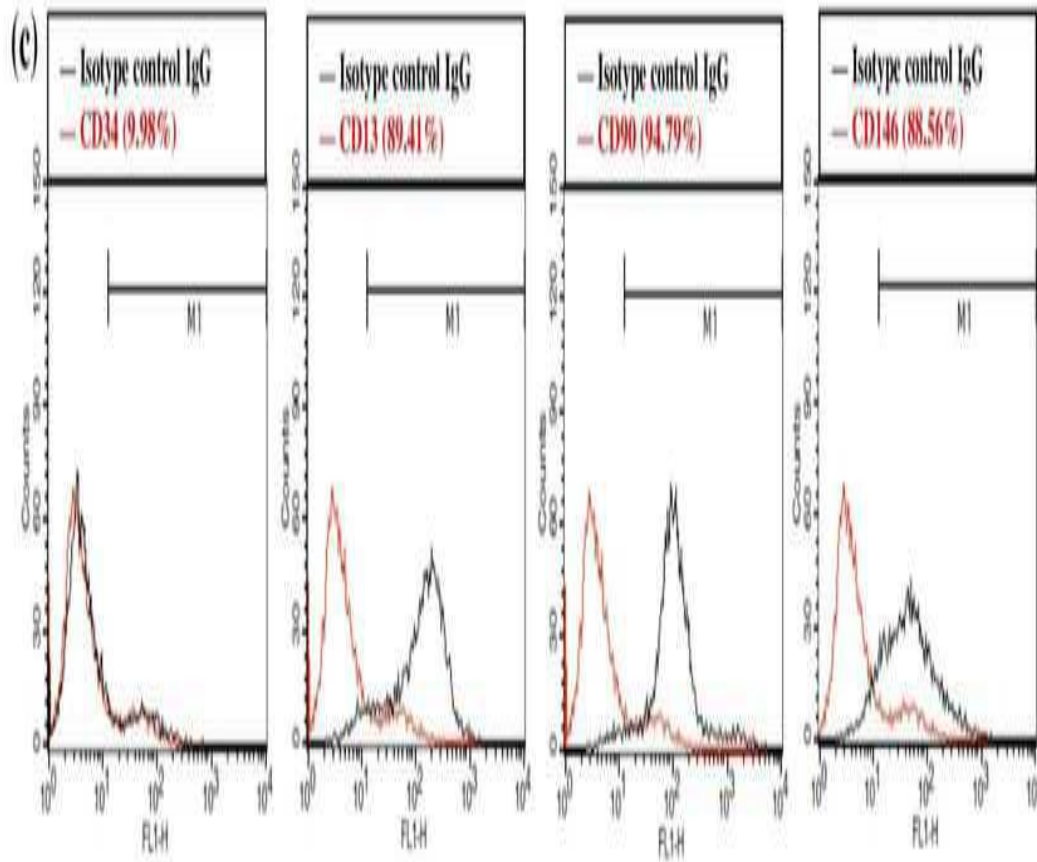


도면3b

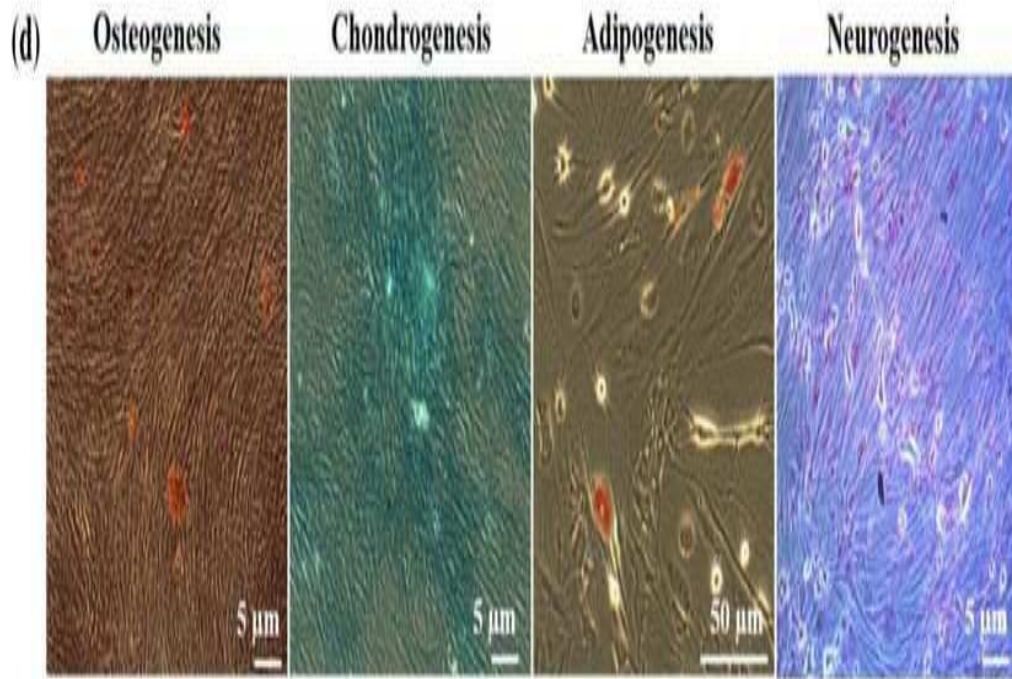




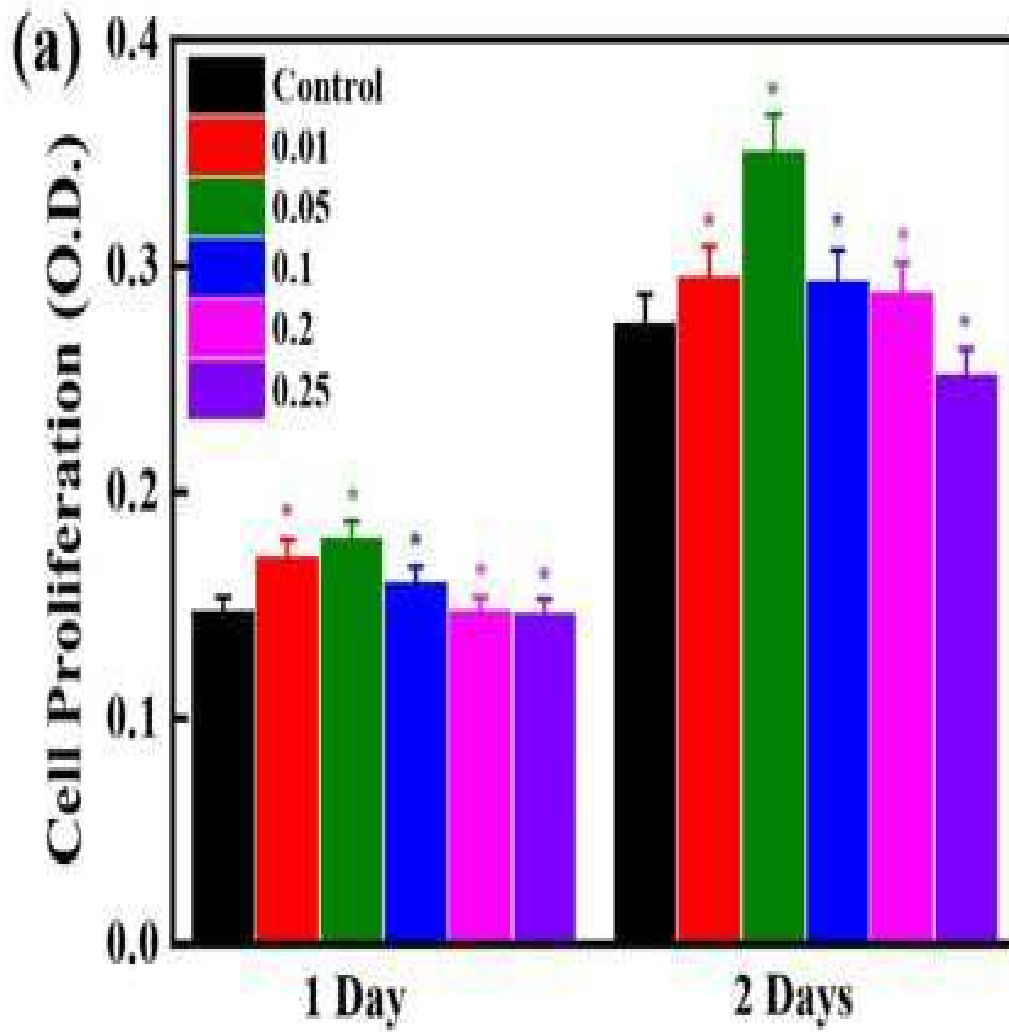
도면3c



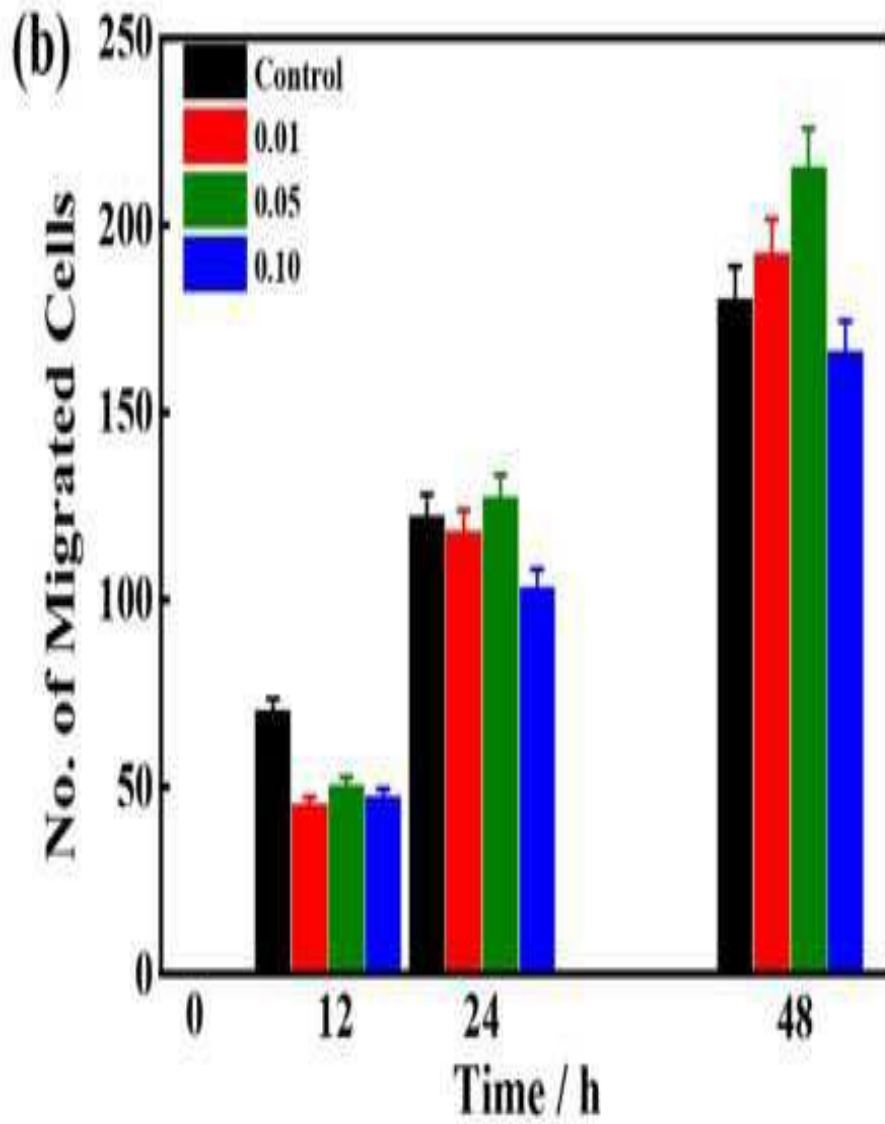
도면3d



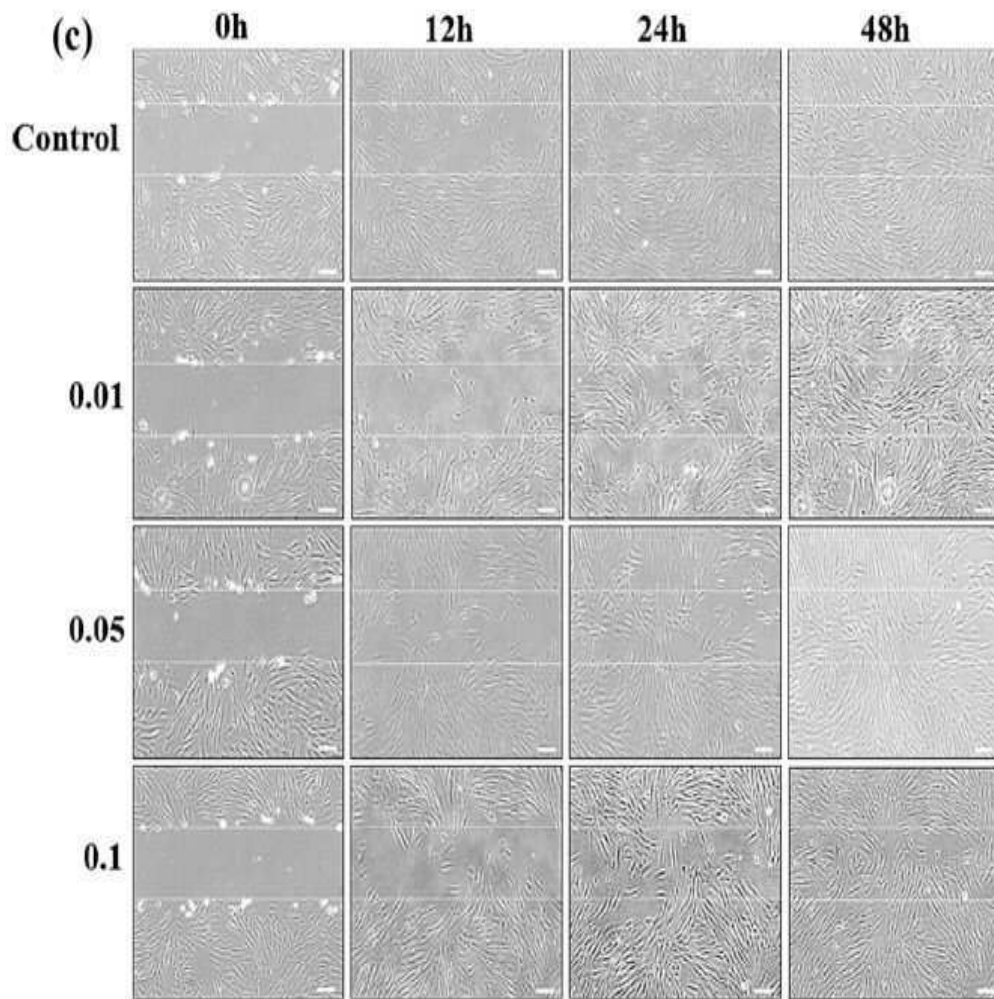
도면4a



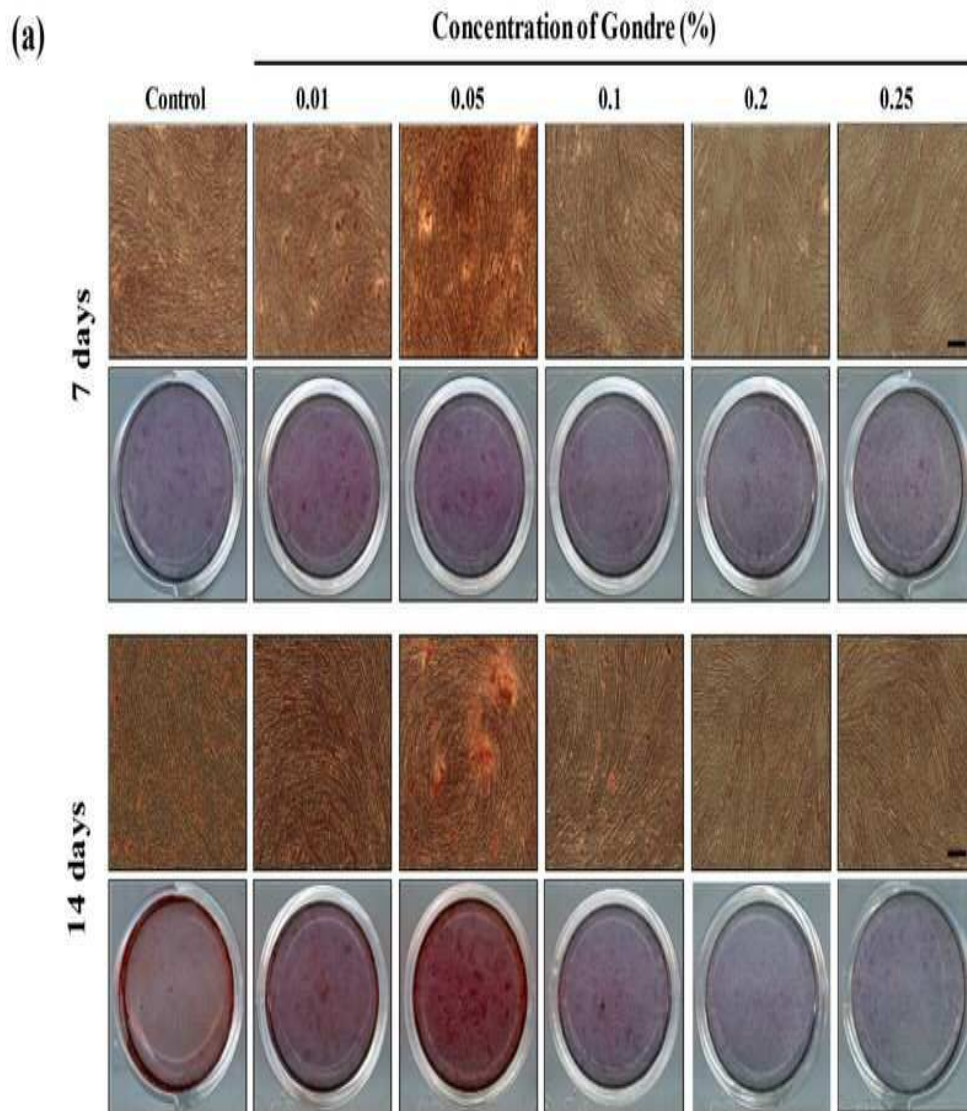
도면4b



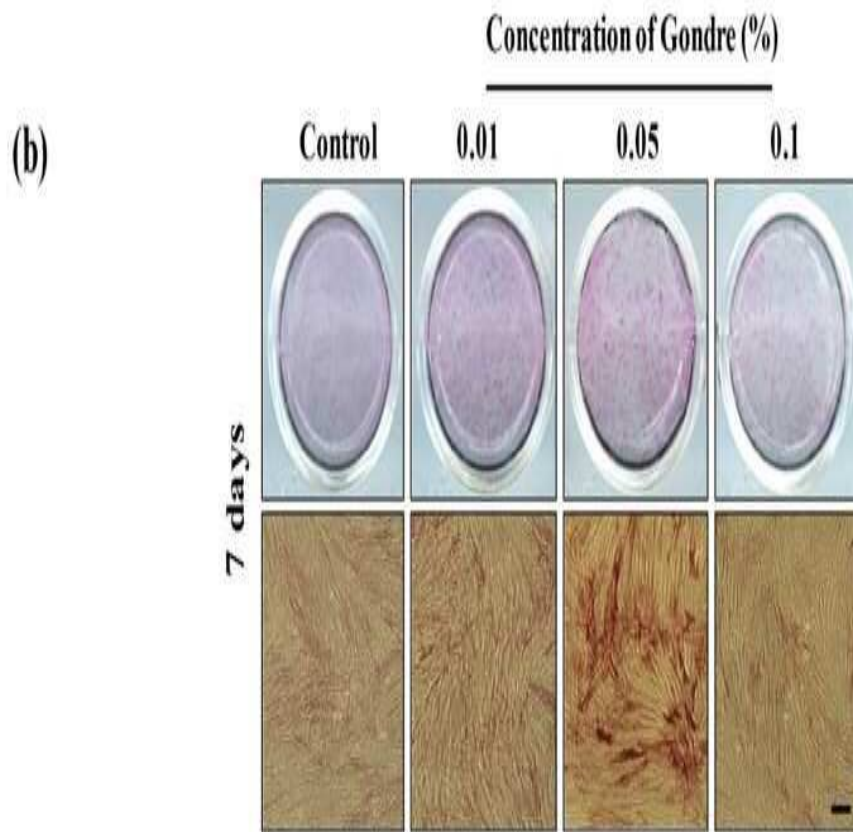
도면4c



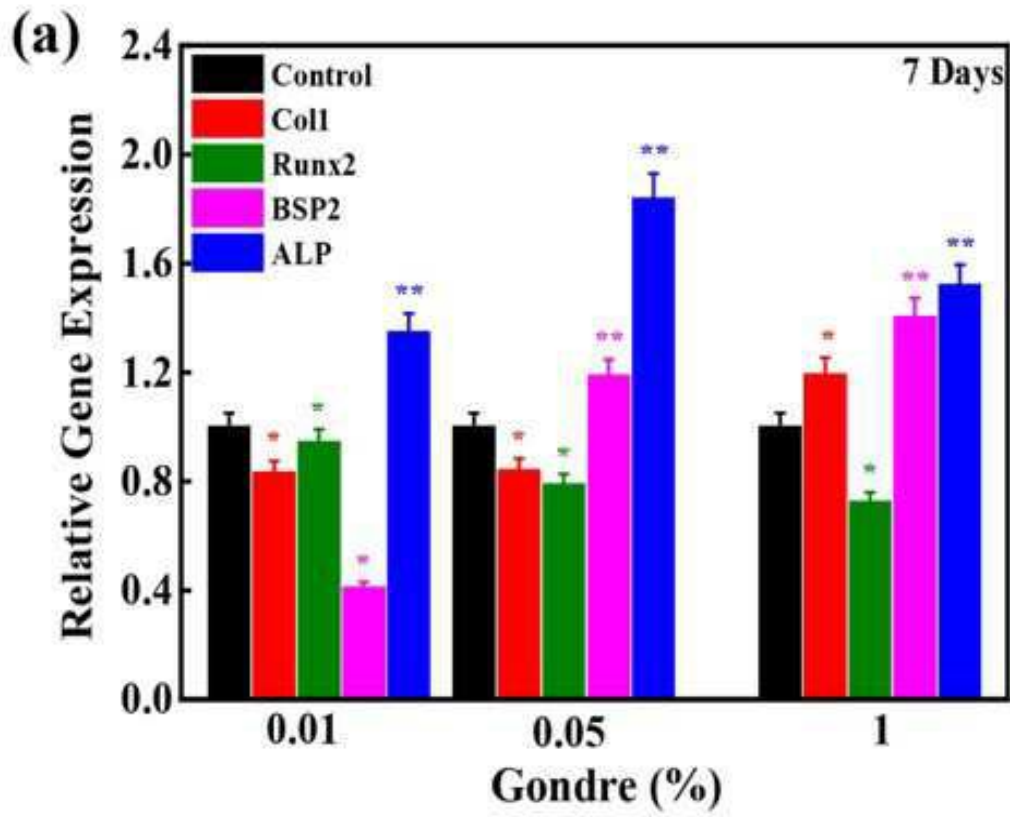
도면5a



도면5b

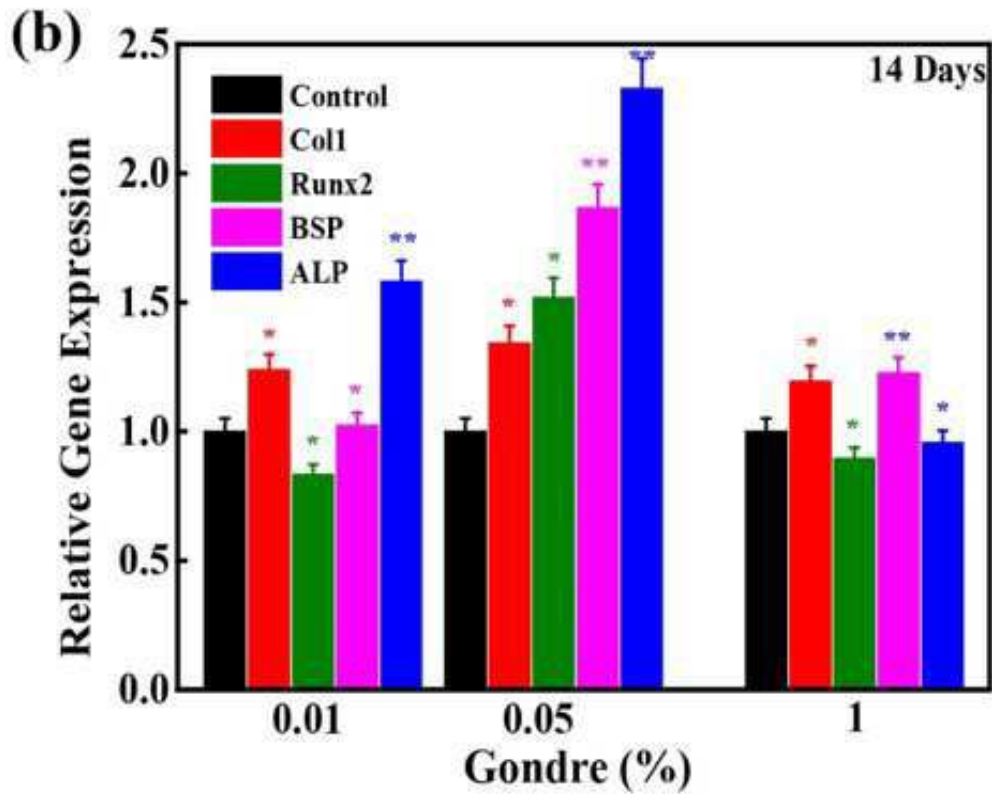


도면6a

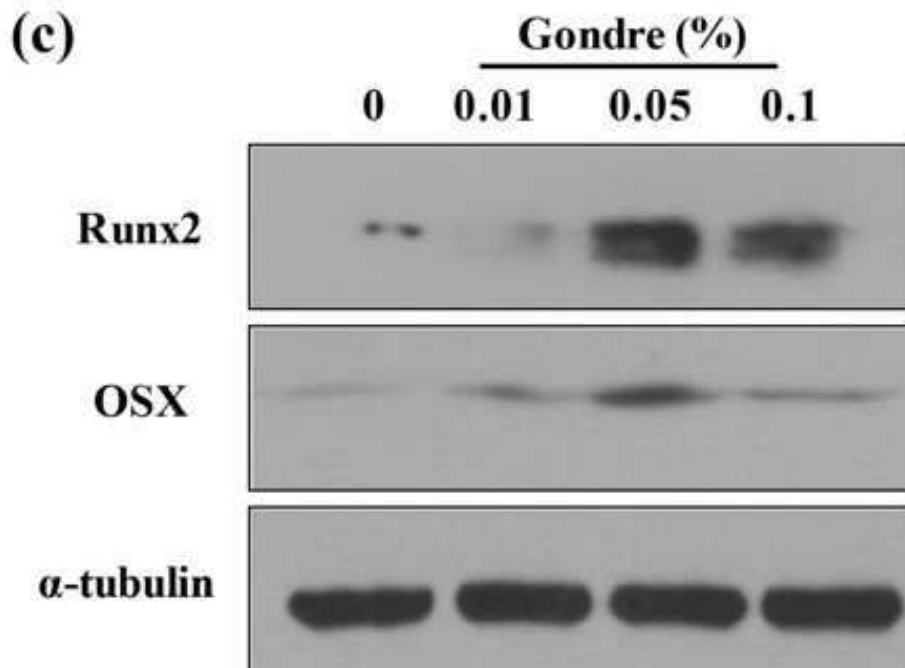




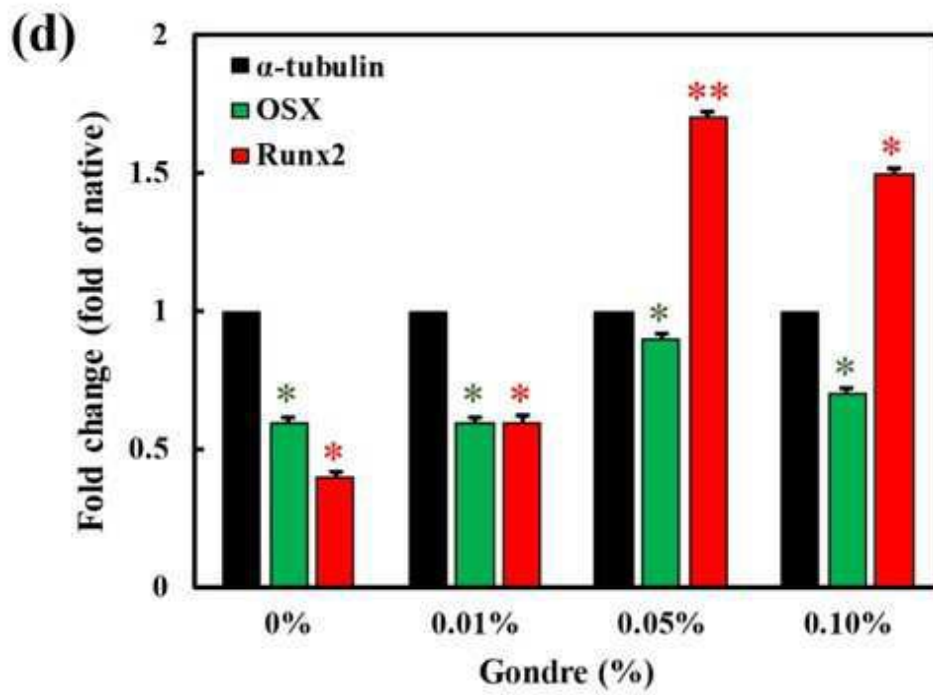
도면6b



도면6c



도면6d



도면7

