



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0026416
(43) 공개일자 2018년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 13/00 (2017.01) C01B 32/182 (2017.01)
C12N 5/077 (2010.01) C12N 5/0793 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 13/00 (2013.01)
C01B 32/182 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2018-0017387(분할)
(22) 출원일자 2018년02월13일
심사청구일자 2018년02월13일
(62) 원출원 특허 10-2016-0113362
원출원일자 2016년09월02일
심사청구일자 2016년09월02일

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(72) 발명자
임기택
강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명
과학대학 바이오시스템공학과 307동 207호
선우훈
서울시 관악구 관악로1 서울대학교 농업생명과학
대학 바이오시스템공학전공 200동 2205호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
구현서

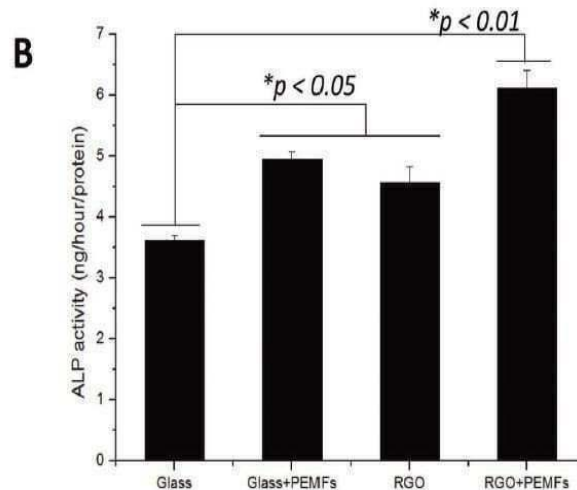
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 맥동 전자기장과 환원 그래핀 산화물을 이용한 중간엽 줄기세포의 다분화방법

(57) 요약

본 발명은 맥동 전자기장과 환원 그래핀 산화물을 이용한 중간엽 줄기세포의 다분화방법에 관한 것으로, 줄기 세포 생존률, 세포 부착, 세포의 매트릭스(extracellular matrix;ECM) 형성은 RGO 및 PEMFs에 의하여 증가하였고, 또 RGO 및 PEMFs의 조합은 골형성 분화를 증가시키고, RGO 및 PEMFs의 조합은 hABMSCs의 신경형성 및 지방형성 분화를 증가시켰으며, DNA 마이크로어레이 분석에서 RGO 및 PEMFs의 조합은 ECM 형성, 막 단백질 및 대사를 상승적으로 증가시켜서, 본 발명의 RGO 및 PEMFs의 조합은 조직 공학 및 줄기세포를 위한 효과적인 플랫폼으로 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도3b



(52) CPC특허분류

C12N 5/0619 (2013.01)

C12N 5/0653 (2013.01)

C12N 5/0654 (2013.01)

C12N 2500/05 (2013.01)

C12N 2506/1346 (2013.01)

(72) 발명자

김장호

광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 농업생명과학대학1호관

정종훈

서울시 관악구 관악로1 서울대학교 농업생명과학대학 바이오시스템공학전공 200동 2216호

명세서

청구범위

청구항 1

환원 그래핀 산화물 지지체 상에 중간엽 줄기세포를 배양하고, 맥동 전자기장을 조사하여,

유리 지지체 상에서 상기 세포를 배양하는 것과 비교하여,

상기 중간엽 줄기세포에서 Ca^{2+} 신호전달, 증식 및 신경형성 분화와 관련된 유전자들 중에서 JAG2(jagged 2) 및 타이로신 포스파테이즈 수용체 타입 Q (PTPRQ) 유전자 발현 레벨을 다른 상기 관련 유전자 대비 업레귤레이션시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조사는 1일에 30분인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 치조골 유래 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 맥동 전자기장과 환원 그래핀 산화물을 이용한 중간엽 줄기세포의 다분화방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전자기장(electromagnetic field)을 이용하여 줄기세포의 분화를 촉진시키는 다양한 연구들이 보고되고 있다. Fregni 등 (비특허문헌 1)은 다양한 전기 및 전자기장 자극이 척추 손상으로 인한 만성신경통의 통증을 완화 시킴을 보고하였고, Ahmadian S 등(비특허문헌 2)은 쥐의 피부에 25 Hz 및 2 mT 하루에 2.5시간을 조사하였을때 피부의 콜라겐이 증가됨을 보고하였다.

[0003] 또한 전자기장을 이용한 골 재생 관련 연구들도 보고되고 있다. Ceccarelli 등(비특허문헌 3)은 75Hz 및 2 mT의 전자기장으로 다양한 중간엽 줄기세포의 골 분화를 촉진시켰고, Sun 등은 15 Hz, 1.8 mT의 전자기장에서 골수유래 중간엽 줄기세포를 배양하여, 알카라이니포스파테이즈(ALP)와 골형성단백질(BMP-2) 등의 발현이 촉진되어 골 세포로의 분화가 촉진됨을 보고하였고, Schwartz등은 15Hz, 1.6 mT의 전자기장으로 중간엽 줄기세포의 골분화를 촉진시켰다. 이러한 전자기장을 이용한 골분화 촉진 연구는 7.5~15 Hz, 0.1~5mT의 전자기장을 이용하였다 (비특허문헌 4).

[0004] 최근에는 알츠하이머병, 우울증, 파킨슨병, 뇌경색, 뇌출혈, 척추손상 등의 신경질환치료에 줄기세포를 이용한 치료 방법이 부각됨에 따라 신경세포분화촉진을 위한 연구에 전기자극을 이용한 방법들이 보고되고 있다. 기존에 알려진 신경치료 기술로는 뇌조직에 약 10 Hz이하의 저주파 에너지를 적용시키기 위한 장치로 환자의 뇌안에 전극을 이식후 직접 전기자극을 부여하여 전기흐름에 의한 자기장을 야기하는 장치 (특허문헌 1)가 있으며, Zheng은 중추신경계에 자기자극을 주는 방법으로 고주파 또는 복수의 주파수 성분을 조합하여 뇌기능 개선에 사용하려는 기술 (특허문헌 2)을 개발하였으며 Riken은 배아줄기세포에 전기펄스 처리하여 신경세포를 제조하는 기술 (특허문헌 3)을 개발하였다. Gliner 등은 세포에 전기펄스를 처리하여 신경세포를 제조하는 기술을 개발하였다 (특허문헌 4). 위의 기술들은 전극을 직접 이식하는 방식으로 전극을 이식하는 수술이 추가되어 환자에게 고통이 수반되며 배아줄기세포의 경우 종양형성의 가능성이 문제가 되어 임상에 적용하는 데 한계가 있다.

[0005] 한편 그래핀(Graphene)은 sp^2 -hybridized 탄소 원자의 2차원 결정으로 six-membered 링으로 구성되었다.[L. Feng, L. Wu, X. Qu, *Adv. Mater.* **2013**, 25, 168]

- [0006] [선행 기술 문헌]
- [0007] [비특허문헌]
- [0008] 1. Fregni. et al., Cranial electrotherapy stimulation and transcranial pulsed current stimulation: A computer based high-resolution modeling study, NeuroImage, Volume 65, Pages 280-287, 15 January 2013.
- [0009] 2. Ahmadian S et al., Effects of extremely-low-frequency pulsed electromagnetic fields on collagen synthesis in rat skin, Biotechnol. Appl. Biochem. 2006, 43, 71-75.
- [0010] 3. Ceccarelli et al., A Comparative Analysis of the In Vitro Effects of Pulsed Electromagnetic Field Treatment on Osteogenic Differentiation of Two Different Mesenchymal Cell Lineages, BioResearch Open Access, 2013, 2(4): 283-294.
- [0011] 4. Schwartz Z, Simon BJ, Duran MA, Barabino G, Chaudhri R, Boyan BD. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Orthop Res.2008; 26(9):1250-1255.
- [0012] [특허문헌]
- [0013] 1. 미국공개특허 US20060205993
- [0014] 2. 일본공개특허 JP2008543388
- [0015] 3. 미국공개특허 US20070065941
- [0016] 4. 미국공개특허 US20050075679

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0017] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 인간 중간엽 줄기세포의 골형성, 신경형성, 및 지방형성 등 다분화(Multidifferentiation)를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 환원 그래핀 산화물 지지체 상에 중간엽 줄기세포를 배양하고, 맥동 전자기장을 조사하는 단계를 포함하는 중간엽 줄기세포의 골형성 분화를 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조사는 1일에 30분인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 또 본 발명은 환원 그래핀 산화물 지지체 상에 중간엽 줄기세포를 배양하고, 맥동 전자기장을 조사하는 단계를 포함하는 중간엽 줄기세포의 신경형성 분화를 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0021] 또 본 발명은 환원 그래핀 산화물 지지체 상에 중간엽 줄기세포를 배양하고, 맥동 전자기장을 조사하는 단계를 포함하는 중간엽 줄기세포의 지방형성 분화를 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0022] 또 본 발명은 환원 그래핀 산화물 지지체 상에 중간엽 줄기세포를 배양하고, 맥동 전자기장을 조사하는 단계를 포함하는 중간엽 줄기세포의 생존률을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0023] 또 본 발명은 환원 그래핀 산화물 지지체 상에 중간엽 줄기세포를 배양하고, 맥동 전자기장을 조사하는 단계를 포함하는 중간엽 줄기세포의 증식을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0024] 또 본 발명은 환원 그래핀 산화물 지지체 상에 중간엽 줄기세포를 배양하고, 맥동 전자기장을 조사하는 단계를 포함하는 중간엽 줄기세포의 칼슘 신호 전달을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0026] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0027] 본 발명에서는 환원된 그래핀 옥사이드(reduced graphene oxide, 이하, 'RGO'라 함) 및 pulsed EMFs (PEMFs)

조합의 MSCs의 골형성 및 신경형성 등에 대한 효과를 살펴 보았다 . 먼저 RGO의 화학적 특성을 측정하고, 평가 후, 그 RGO를 유리 위에 흡착시키고 그것의 형태 및 전기적 특성을 조사한 다음, 인간 폐포 골수 줄기세포 (human alveolar bone marrow stem cells, hABMSCs)를 사용하여 인 비트로 연구를 수행하였다.

[0028] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0029] RGO 기질의 특성

[0030] 먼저, RGO 기질의 특성을 규명하였고 RGO를 graphene oxide (GO)와 비교하였다. XPS 연구는 본 발명에서 사용된 RGO가 높은 비율의 C C 결합으로 구성되어 있다는 것을 나타낸다. (도 1B) XRD 결과에서, RGO는 약 24° 에서 독특한 그래핀 피크를 나타내었다.(도 1C)

[0031] Raman 스펙트럼은 RGO의 G/D 비율이 GO의 비율보다 더 높다는 것을 나타내었다. (도 1D) 이 결과들은 RGO가 GO 보다 더 높은 sp²-hybridized C-C 결합을 가지며, 이것은 본 발명에서 사용된 좋은 품질을 가진다는 것을 확인 하였다.

[0032] GO 및 RGO 샘플에서 탄소 비율은 각각 51.50 및 71.53%이고, GO 및 RGO 샘플에서 산소 비율은 각각 44.34 및 18.30%이었다. 단일 층을 가진 RGO를 본 발명에서 사용하였다. RGO의 자기적 특성을 물리적 특성 측정 시스템을 사용하여 평가하였다. (도 1E) RGO는 자기장이 조사(irradiate)된 경우에 큰 마그네틱 모멘트 웰을 나타냈지만 GO는 네가티브 마그네틱 모멘트를 나타내었다. RGO의 최대 마그네틱 모멘트는 1.39×10.5 EMU이었다. 다음, qualified RGO를 유리 기질에 흡착시켜서 RGO 기질을 제조하였다. 제조된 RGO 기질을 광학 현미경과 SEM으로 관찰하였다. 형태학적 연구들은 RGO가 유리 기질에 성공적으로 흡착되었다는 것을 나타내었고, (도 2A) 이것은 AFM로 평가하였다. 기질 상에서 RGO의 저항은 661.8 k Ω 이었고, 반면 GO의 저항은 62.5 G Ω 이었다.

[0033] RGO 기질 및 PEMFs를 이용한 인 비트로 연구

[0034] hABMSCs의 특성은 FACS(fluorescence-activated cell sorter)를 사용하여 조사하였다. 본 발명에서 hABMSCs는 MSC 마커, 즉 CD13 (97.3 \pm 0.4%), CD90 (99.9 \pm 0.1%), 및 CD146 (97.3 \pm 0.2%)를 높게 나타낸 반면, hemopoietic 줄기세포 마커인 CD34는 약하게 발현(5.6 \pm 0.2%)하였다. 이러한 결과에 기초하여 본 발명에서 사용된 hABMSCs는 높은 순도를 가지는 MSCs로 확인되었다.

[0035] 인 비트로 연구를 위해서, 4 그룹을 선택하여 하기와 같이 레이블하였다: 1) Glass, 즉 대조군으로 유리 기질 상에서 배양된 군; 2) Glass+PEMFs, 즉 유리 기질에서 배양하고 PEMFs로 조사된 그룹;3) RGO, RGO 기질 상에서 배양된 군; 및 4) RGO+PEMFs, RGO 기질 상에서 배양되고 PEMFs로 조사된 군.

[0036] PEMFs 자극 조건은 K. Lim, J. Hexiu, J. Kim, H. Seonwoo, W. J. Cho, P.-H. Choung, J. H. Chung, *BioMed Res. Int.* **2013**, 2013, 14와 동일하였다. 요약하면 PEMFs를 솔레노이드를 사용하여 조사하고, 구형과 전기 신호 (± 5 V, 50 Hz-frequency, 및 50% duty cycle)는 함수 발생기를 사용하여 생성하였다. 그 PEMFs 결과물은 0.6 \pm 0.05 mT 및 50 Hz이었고, 그 샘플 상 노출 시간은 30 min/d이었다.

[0037] 먼저, 그들의 세포 생존률을 7일 후 비교하였고, 도 2D에서 알 수 있는 바와 같이, RGO+PEMFs 상 세포들은 다른 그룹 군에 비하여 더 풍부하였다. 이 관찰을 정량하기 위하여 본 발명자들은 세포 생존률 테스트 및 DNA 정량화 테스트를 수행하였다. 세포 생존률 테스트 및 유전자 정량 테스트에서 모든 실험군들은 대조군에 비하여 현저하게 더 높은 세포 생존률을 가졌다. (도 2B 및 C) RGO+PEMFs는 가장 높은 DNA 농도 비율을 나타내었다. 또한 면역조직화학(ICC)을 세포 생존률 및 분화와 관련된 특정 단백질들의 경향을 평가하기 위하여 수행하였다(도 2E 및 F) 세포들을 7일 동안 배양하였고, vinculin(focal adhesion와 관련), 및 fibronectin(ECM과 관련)이 염색 되고 관찰되었다. 그 결과들은 vinculin 및 fibronectin이 각각 RGO 및 RGO+PEMFs 상에서 높게 발현되었다는 것을 나타내었다. (도 2E 및 F) RGO 및 PEMFs의 Ca²⁺ 신호전달에 대한 영향을 평가하기 위해, ICC를 calmodulin (CaM), Ca²⁺ 신호전달의 조절자 염색에 의하여 수행하였다. 그 결과는 CaM 발현은 glass+PEMFs 및 RGO+PEMFs 상에서 유리 및 RGO보다 더 높다는 것을 나타내었다.

[0038] 분화 연구

[0039] RGO 기질 및 PEMFs의 상승 효과를 hABMSCs의 골형성에 대해 조사하였다. (도 3) 모든 그룹들은 골형성 배지를 사용하여 배양하였고, 1주 및 2주에서 조사하였다. ALP 활성을 1 주에 측정하였고, ICC, RT-PCR, ARS 및 VKS를 2 주에 수행하였다.

[0040] ALP 활성 연구는 ALP가 1 주에 RGO+PEMFs 상에서 높게 배출되었다. (도 3B) The ICC 결과는 골형성 후기 마커인

osteopontin (OPN)이 2주에 RGO+PEMFs 상에서 가장 높게 발현되었다는 것을 나타내었다. (도 3A) RT-PCR 결과는 골형성 분화와 관련 있는 유전자 예를 들어, RUNX-2, OPN, OCN, BSP, 및 SMAD-1은 유리보다 RGO+PEMFs 군 상에서 더 높게 발현되었다는 것을 나타내었다. (도 3C) 특히, RGO+PEMFs는 OPN의 발현이 유리 보다 10배 높게 촉진하였다. 역으로 ALP의 유전자 발현이 감소되었고 이것은 RGO+PEMFs 그룹이 유리 그룹에 비하여 더 빠르게 후기 골형성 단계로 들어간다는 것을 시사한다. RGO 또는 PEMFs에 의한 미네랄화도 평가하였다. ARS 및 VKS 결과에 따르면, RGO+PEMFs 그룹은 가장 높은 미네랄화를 나타내었다.(도 3D 및 E) 또한 RGO+PEMFs의 신경형성 능력을 연구하였다. (도 4) 유리 및 RGO+PEMFs 그룹을 7일간 신경형성 배지로 배양하고 그들의 특성을 ICC 및 RT-PCR로 평가하였다.

[0041] 도 4A에 따르면, 신경 분화 초기 마커인 Tuj-1은 모든 군들에서 잘 발현되었다. 그러나, 신경형성 분화의 후기 마커인 NeuN은 RGO+PEMFs 그룹 상에서 더 잘 발현되었다. (도 4A) RT-PCR 결과에 따르면, RGO+PEMFs는 신경형성 분화의 두 주요 마커인 nestin 및 MAP2 발현이 유리보다 더 증가하였다. 또한, RGO+PEMFs의 연골형성 및 지방형성 능력을 조사하였다.

[0042] 유리 및 RGO+PEMFs 그룹을 연골형성 및 지방형성 배지를 사용하여 7일간 배양하였다. RT-PCR 결과에 따르면, ALBP, AP-9, 및 LPL의 유전자 발현은 RGO+PEMFs 그룹 상에서 증가하였고 이것은 RGO+PEMFs가 지방형성을 증가한다는 것을 시사한다.

[0043] 그러나 RGO+PEMFs 그룹의 Sox9, ACAN 및 COL II의 유전자 발현은 다운레귤레이션되었고 이것은 RGO+PEMFs가 hABMSCs의 연골형성을 감소시킨다.

[0045] DNA 마이크로어레이 분석

[0046] DNA 마이크로어레이 연구를 RGO 및 PEMFs의 hABMSCs 분화의 기작을 간략하게 입증하기 위하여 사용하였다.

[0047] 본 발명에서, 34 127 프로브들을 각 샘플에 대해 분석하였다. ($n = 3$) Glass+PEMFs, RGO, 및 RGO+PEMFs 그룹의 유전자들을 유리 그룹과 비교하였다.

[0048] 또한 RGO+PEMFs 그룹의 유전자들을 RGO와 비교하였다. RGO 및 유리 그룹의 비교에서, 137 유전자들이 현저한 차이를 나타내었다.

[0049] DAVID(database for annotation, visualization and integrated discovery) 분석을 사용하여, 현저한 차이를 나타내는 유전자들을 ECM, 대사, 호르몬, 항상성 및 골형성으로 크러스트화하였다 (도 5A). Glass+PEMFs 대 Glass 결과에서, 56 유전자들은 현저한 차이를 나타내었다. DAVID 분석은 이온 전달 및 전사와 관련된 유전자들은 현저한 차이를 나타내었다는 것을 보였다(도 5B)

[0050] RGO+PEMFs 대 Glass 결과에서, 122 유전자들이 현저한 차이를 나타내었고, DAVID 결과는 Ca^{2+} 신호전달 및 세포-세포 커뮤니케이션과 관련된 유전자들이 현저하게 차이가 있었다는 것을 보였다. (도 5C) RGO+PEMFs 대 RGO 결과에서, 109 유전자들이 현저한 차이를 나타내었다.

[0051] DAVID 결과는 ECM 및 원형질 막과 관련된 유전자들은 현저하게 차이가 있다는 것을 보였다. (도 5D)

[0052] 크러스트화된 유전자뿐 아니라 대표적인 유전자들을 비교하였다. 도 5E에서, 유리와 비교하여, RGO는 분화, 대사 및 혈관신생 관련된 유전자들이 업레귤레이션된 반면에 볼테이지 게이트된 채널 관련 유전자들은 다운레귤레이션되었다. 특히 신경형성 분화와 관련된 CALB2(calbindin 2) 및 STC1(stanniocalcin 1)은 크게 증가하였다. 지방형성 분화와 관련된 INHBB(Inhibin beta B) 및 SLC2A5(solute carrier family 2 member 5)는 현저하게 증가하였다. 도 5F에서, 유리와 비교하여, Glass+PEMFs는 Ca^{2+} 신호전달, 증식 및 신경형성 분화와 관련된 유전자들이 업레귤레이션되었다. 도 5G에서, 유리와 비교하여, RGO+PEMFs는 Ca^{2+} 신호전달, 증식, 전사 및 분화와 관련된 유전자들을 업레귤레이션하였다. 특히 notch 신호전달 및 Ca^{2+} 신호전달과 관련된 JAG2(jagged 2)는 약 100배 증가하였고, cochlear 기능과 관련된 단백질 타이로신 포스파테이즈, receptor type, Q (PTPRQ)는 약 1000배 업레귤레이션되었다.또한 RGO+PEMFs의 유전자 발현을 RGO와 비교하였다. (도 5H) 그 결과는 RGO+PEMFs는 Ca^{2+} 신호전달, 증식 및 신경형성과 관련된 유전자들을 증가시켰다는 것을 보였다. 특히, JAG2는 약 100 배 증가하였다.

발명의 효과

[0053] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 줄기 세포 생존률, 세포 부착, 세포외 매트릭스(extracellular

matrix;ECM) 형성은 RGO 및 PEMFs에 의하여 증가하였다. RGO 및 PEMFs의 조합은 골형성 분화를 증가시키고, RGO 및 PEMFs의 조합은 hABMSCs의 신경형성 및 지방형성 분화를 증가시켰다. 또 DNA 마이크로어레이 분석에서 RGO 및 PEMFs의 조합은 ECM 형성, 막 단백질 및 대사를 상승적으로 증가시켰다. 따라서 RGO 및 PEMFs의 조합은 조직 공학 및 줄기 세포를 위한 효과적인 플랫폼으로 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0054]

도 1은 RGO 및 RGO 기질의 특성. A) 본 발명의 모식도. 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells)를 RGO 기질 상에 시딩한 후, PEMFs를 RGO 기질 상에 노출하였다. PEMFs뿐 아니라 RGO도 PEMFs에 의하여 유도된 미세전류가 MSCs의 분화를 유도하였다. B) XPS 결과는 RGO가 주로 C-C 결합으로 구성되었다고 확인하였다. C) XRD 결과. RGO는 약 25° 에서 특정 피크를 나타내었다. D) Raman 스펙트럼 결과. RGO 및 GO는 D 및 G 피크 모두를 나타내었다. RGO의 G/D 피크 비율은 GO의 것보다 더 높았고, 이것은 RGO가 GO보다 더 많은 sp²-hybridized C-C 결합을 가진다는 것을 시사한다. E) RGO 및 GO의 자기측정(Magnetometry) 결과. RGO는 포지티브하게 마그네틱 모멘트를 유도하고 이것은 전류로 될 수 있으나, GO는 네가티브하게 마그네틱 모멘트를 유도하였다.

도 2는 RGO 및 PEMFs의 세포 생존률 결과. A) RGO 기질의 표면 형태. 삽도: RGO 기질의 field-effect 스캐닝 전자 현미경 이미지. RGO는 성공적으로 유리 기질에 흡착되었다. B) WST-1 (water-soluble tetrazolium salt) 및 C) DNA 정량 결과로 모든 실험군에서 유리 보다 더 높은 세포 생존률을 기록하였다. RGO+PEMFs는 최고의 생존률을 나타내었다. D) 현미경 이미지는 모든 실험군이 유리에 비하여 더 높은 세포 수를 가진다는 것을 나타냄. hABMSCs가 가장 높은 수를 가지고 이것은 세포 생존률 결과를 지지함. E) vinculin 및 F) fibronectin의 면역조직화학 결과는 RGO 및 PEMFs도 그들의 발현을 증가시켰다는 것을 나타냄. RGO+PEMFs는 상승적으로 그들의 발현을 증가시키는 것 같다.

도 3은 RGO 및 PEMFs의 골형성(Osteogenic) 분화. A) OPN 염색의 ICC 결과, RGO+PEMFs 군에서 가장 크게 발현됨. B) 1 주에서 ALP 활성 결과. RGO+PEMFs 그룹은 가장 높은 활성을 나타냄. C) Glass 및 RGO+PEMFs 그룹의 RT-PCR 결과. RGO+PEMFs는 모두 골형성 분화에 중요한 RUNX2, OPN, OCN, 및 BSP의 발현을 증가시켰다. D) ARS(Alizarin red staining) 및 von Kossa 염색 결과. RGO+PEMFs 그룹이 가장 강한 염색을 나타내었고, E) ARS의 탈염에 의하여 정량적으로 증명됨.

도 4는 RGO+PEMFs에 의한 신경성(Neurogenic) 분화. A) glass 및 RGO+PEMFs 그룹의 ICC 이미지와 광학 이미지. 샘플들은 균등하게 hABMSCs의 모양 및 Tuj-1의 발현을 변화하였다. 흥미롭게도, RGO+PEMFs는 신경형성의 후발 마커인 NeuN의 발현을 증가하였다. B) glass 및 RGO+PEMFs 그룹의 RT-PCR 결과. RGO+PEMFs는 신경성 분화의 주요한 마커인 nestin 및 MAP2의 발현을 촉진하였다. (n = 1).

도 5는 DNA 마이크로어레이 결과. A) RGO 그룹의 DAVID 결과를 Glass 그룹과 비교. ECM, 대사, 호르몬, 항상성, 및 골형성과 관련된 유전자들이 현저한 차이를 나타내었다. B) Glass+PEMFs 그룹의 DAVID 결과를 Glass 그룹과 비교. 이온 전달 및 전사 관련된 유전자들이 현저하게 차이가 남. C) RGO+PEMFs 그룹의 DAVID 결과를 Glass 그룹과 비교. RGO+PEMFs는 Ca²⁺ 신호전달 및 세포-세포 커뮤니케이션에 관련된 유전자들에서 현저한 차이를 유도함. D) RGO+PEMFs 그룹의 DAVID 결과를 RGO 그룹과 비교. RGO+PEMFs는 Golgi 체, ECM, 세포 막 및 대사와 관련된 유전자들에서 현저한 차이를 유도함.

E) 유리 그룹과 비교하여 현저한 차이를 나타내는 RGO 그룹의 대표적인 유전자들. RGO 업레귤레이트된 유전자들은 분화, 대사 및 혈관신생과 관련되고, 다운레귤레이션된 유전자들은 유리과 비교할 때 볼테이지-게이티드 채널과 관련된다. Glass+PEMFs는 Ca²⁺ 신호전달, 증식 및 신경성 분화와 관련된 유전자들을 증가시킴. G) 유리 그룹과 비교하여 현저한 차이를 나타내는 RGO+PEMFs 그룹의 대표적인 유전자들. RGO+PEMFs는 Ca²⁺ 신호전달, 증식, 전사 및 분화와 관련된 유전자들을 증가시킴. H) RGO 그룹과 비교하여 현저한 차이를 나타내는 RGO+PEMFs 그룹의 대표적인 유전자들. RGO+PEMFs는 Ca²⁺ 신호전달, 증식 및 신경형성과 관련된 유전자들을 증가시킴. DAVID(database for annotation, visualization, and integrated discovery).

도 6은 hABMSCs의 분화에 대한 RGO 및 PEMFs의 간략한 기작. PEMFs는 이온 전달 및 전사를 증가시키고, RGO는 세포 부착, 호르몬 배출 및 분화능을 증가시킴. RGO 및 PEMFs를 hABMSCs에 동시에 적용시켰을 때, 그들은 ECM 형성, 세포막 단백질, 대사, 증식 및 세포-세포 커뮤니케이션을 상승적으로 증가시킴. 이 상승적 효과는 PEMFs에 의한 RGO에서 유도된 전류에 기인함. 결론적으로 RGO 및 PEMFs의 동시 적용은 hABMSCs의 분화, 특히 골형성, 신경형성 및 지방형성을 촉진함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 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.
- [0056] 실시예 1: RGO 기질의 제조 및 특성:
- [0057] Graphene oxide는 Hummers 방법[Y.-J. Lee, W. Jang, H. Im, J.-S. Sung, *Curr. Appl. Phys.* **2015**, *15*, S9 5.]을 일부 변형하여 제조하였다. 요약하면, graphite 분말(Alfa Aesar graphite powder, universal grade, 200 mesh, 99.9995%, Thermo Fisher Scientific, USA)을 NaNO₃ 및 H₂SO₄에 교반하면서 4시간 동안 냉수로 냉각된 수조에서 진행하였다. KMnO₄를 점차적으로 첨가하고 그 혼합물을 높은 점성액을 얻을 때까지 25 ° C에서 교반하였다. 탈이온수를 첨가하고 그 현탁액을 98 ° C에서 15분간 수조에서 가열하였다. 그 현탁액을 온수 및 H₂O₂로 순차적으로 더 처리하였다. 그 혼합물을 4000 rpm에서 최소 5회 원심분리하고 HCl 및 물로 세척하였다. 그 후, 그 GO를 50 ° C에서 24시간 동안 건조하였다. 그 균질화된 분산 결과물(100 mL)을 1 mL의 hydrazine 용액(35 wt% in water) 및 7 mL의 암모니아 용액(28 wt% in water)으로 혼합하였다. 다음 RGO 분말은 진공 하에서 여과 및 건조로 얻었다. RGO에서 결정 상의 존재를 XRD 및 Raman 분광기로 검출하였다. XRD에서, 40 kV 및 40 mA에서 구리 K α radiation을 가지는 X-ray 회절계(New D8 advanced XRD, Bruker, Germany)를 사용하였다. Raman 스펙트럼은 514.54 nm의 여기 파장에서 T64000 (Horiba Jobin Yvon)로 얻었다. The XPS는 멀티채널 검출기 및 1486.6 eV에서 비단색화된 Al K α 라인, 180° 구형 섹터 분석기, 275 mm의 평균 직경, 15에서 400 μ m의 분석 면적을 가지는 300 K에서 5×10^{-10} mbar의 기본 압력에서 작동하는 Sigma Probe (ThermoVG, UK) 상에서 수행하였다. RGO의 자기 측정은 물리적 특성 측정 시스템 (PPMS, Quantum Design Inc., San Diego, CA, USA)에 의하여 측정하였다. 그 측정된 온도는 289.7 K이고, 자기장의 범위는 ± 0.15 μ T이었다.
- [0058] 전체적으로 12- 또는 24-웰 크기 유리 기질을 아세톤 및 이소프로판올로 3분간 초음파 조에서 세척하고 탈이온수로 세척하였다. 기질을 또 잔류 오물을 제거하기 위하여 piranha 용액을 처리하였다. 기질을 2시간 동안 10×10^{-3} M
- [0059] 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)을 포함하는 톨루엔 용액에서 처리하였다. 그 후 그 기질들을 톨루엔과 에탄올로 세척한 후 탈이온수로 세척한 후 질소가스 하에서 건조하였다. GO 박막을 제조하기 위하여, 기질을 2 mg/mL GO 수용성 현탁액에서 2시간 동안 침지하고, 에탄올과 탈이온수로 세척한 후 질소 가스 하에서 건조하였다. 그 기질 결과물을 1 mL의 hydrazine 용액(35 wt% in water) 및 7 mL의 암모니아 용액(28 wt% in water)에 침지하였다. 그 제조된 RGO 기질을 광학 현미경(Ti-E, Nikon, Japan) 및 field-emission 스캐닝 전자 현미경(FESEM; SUPRA 55VP, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.
- [0060] 실시예 2: 세포 배양과 PEMFs의 유도:
- [0061] hABMSCs를 서울대 치대 치과 연구소 Intellectual Biointerface Engineering Center에서 수집하였다. 10% 우태아 혈청(FBS, Welgene Inc., Republic of Korea), 10×10^{-3} M ascorbic acid (L-ascorbic acid), 항생물질, 및 sodium bicarbonate를 포함하는 MEM(α -minimum essential medium)에서 37 ° C, 5% CO₂ 조건 (Steri-Cycle 370 Incubator, Thermo Fisher Scientific, USA)에서 세포들을 배양하였다. 그 배지는 2일마다 교환하였다. 세포가 컨플루언트하게 되면, 그들을 1 mL trypsin-EDTA로 떼어내서 카운트하고 계대하였다. 그 세포들을 컨플루언시에 도달하기 전에 계대하고 5에서 6 계대 사이를 사용하였다. 인 비트로 연구를 위해서, 4 그룹을 선택하여 하기와 같이 레이블하였다: 1) Glass, 즉 대조군으로 유리 기질 상에서 배양된 군; 2) Glass+PEMFs, 즉 유리 기질에서 배양하고 PEMFs로 조사된 그룹; 3) RGO, RGO 기질 상에서 배양된 군; 및 4) RGO+PEMFs, RGO 기질 상에서 배양되고 PEMFs로 조사된 군. PEMFs 자극 조건은 K. Lim, J. Hexiu, J. Kim, H. Seonwoo, W. J. Cho, P.-H. Choung, J. H. Chung, *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 14와 동일하였다. 요약하면 PEMFs를 슐레노이드를 사용하여 조사하고(도. 2A) 구형과 전기 신호(± 5 V, 50 Hz-frequency, 및 50% duty cycle)는 함수 발생기를 사용하여 생성하였다. 그 PEMFs 결과물은 0.6 ± 0.05 mT 및 50 Hz이었고, 그 샘플 상 노출 시간은 30 min/d이었다.
- [0062] 실시예 3: 세포 증식 및 생존률 테스트:
- [0063] 세포 생존률을 WST-1 어세이(EZ-Cytox cell viability assay kit, Daeillab Service Co., LTD)를 사용하여 측정하였다. 수용성 formazan을 멀티웰 분광기(Victor 3, Perkin Elmer, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하여 정량화하였다. DNA 농도를 제조업자의 프로토콜에 따라서 CyQUANT 세포 증식 어세이 키트(Invitrogen) 및 λ

DNA standard (Invitrogen)에 의하여 정량화하였다. ICC를 위해, hAMBSCs (1×10^4 세포 샘플/1)를 기질 상에 시딩하고 37°C , 5% CO_2 조건에서 배양 배지에서 7일간 스프리드하게 하였다. 부착된 세포들을 4% paraformaldehyde 용액(Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI)으로 20분간 고정화하고, 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, WI, Milwaukee)으로 15분간 투과시키고 TRITC-conjugated phalloidin (Millipore, Billerica, MA)과 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Millipore, Billerica, MA)으로 1시간 동안 염색하였다. Focal adhesions (FAs)을 단클론 anti-vinculin 항체(1:100; Millipore, Billerica, MA) 및 FITC-conjugated goat anti-mouse 2차 항체(1:500; Millipore, Billerica, MA)로 염색하였다. fibronectin을 단클론 anti-fibronectin 항체(1:100; Millipore, Billerica, MA) 및 FITC-결합된 goat antirabbit 2차 항체(1:500; Millipore, Billerica, MA)로 염색하였다. 이미지를 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM710, Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 얻었다.

[0064] 실시예 4: 골형성 분화:

[0065] hABMSCs를 1.0×10^4 cells cm^2 의 밀도로 배치하고 10×10.6 M dexamethasone (Sigma-Aldrich, WI, Milwaukee), 50×10^{-3} M β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich, WI, Milwaukee) 및 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ascorbic acid (Sigma-Aldrich, WI, Milwaukee)를 포함하는 알파-MEM에서 약 1에서 2주간 배양하였다. 유도 배양 배지를 2일 또는 3일마다 교체하였다. ALP 활성을 SensoLyte ALP Assay 키트(AnaApec, USA)를 사용하여 제조업자의 안내에 따라서 1주에 정량화하고 RT-PCR을 2 주에 수행하였다. 전체 RNA를 제조업자의 지시에 따라 TRIzol reagent (Invitrogen, USA)을 사용하여 분리하고 cDNA를 첫번째 가닥 cDNA 합성 키트(Invitrogen, USA)를 사용하여 합성하였다. 그 산물을 1% agarose gel 상에서 전기영동에 의하여 분리하고 자외선 유도된 형광으로 확인하였다.

[0066] 또한, ICC를 OPN의 발현을 연구하기 위하여 2 주에 수행하였다. 그 배양된 세포들을 PBS(Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA)에서 세척하고, 4% paraformaldehyde 용액으로 20분간 고정하고 15분간 0.2% Triton X-100으로 투과시켰다. 세포들을 TRITC-부착된 phalloidin, 그것의 2차 항체 anti-OPN (Millipore Cat. no. AP124F), 및 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Millipore, Billerica, MA, USA)으로 1시간 배양하여 각각 액틴 필라민트, focal contracts, 및 핵을 염색하였다. 미네랄화된 nodules (칼슘 축적)의 존재를 ARS 및 VKS로 염색하여 결정하였다. 에탄올 고정화된 세포 및 매트릭스를 40×10^{-3} M alizarinred-S(pH 4.2)로 30분간 염색하고 3회 물로 린스하였다. 사진 촬영 후, 결합된 염료를 10%(wt vol.1) cetylpyridinium chloride로 용출하고, 샘플 내 ARS를 560nm에서 흡광도를 측정하여 정량화하였다(Victor 3, Perkin Elmer, USA). VKS를 위해, 샘플을 냉각 에탄올로 고정하고 5% silver nitrate 용액(Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA)에서 자외선 노출 하에 30분간 배양하였다. 그 후 그 샘플을 증류수로 몇번 린스하고 그 슬라이드를 sodium hiosulfate 용액(5%)에서 2-3분간 배양하였다. 마지막으로 그 샘플을 수도물로 2분간 행구고 증류수로 두 번 갈아주었다.

[0067] 실시예 5: 신경형성 분화:

[0068] hABMSCs를 1.0×10^4 cells/ cm^2 밀도로 배치하고 Mesenchymal Stem Cell Neurogenic Differentiation Medium (C-28015, PromoCell, Germany)에서 1주일 배양하였다. 그 다음, ICC를 Tuj-1 및 NeuN의 발현을 보기 위해 2 주에 수행하였다.

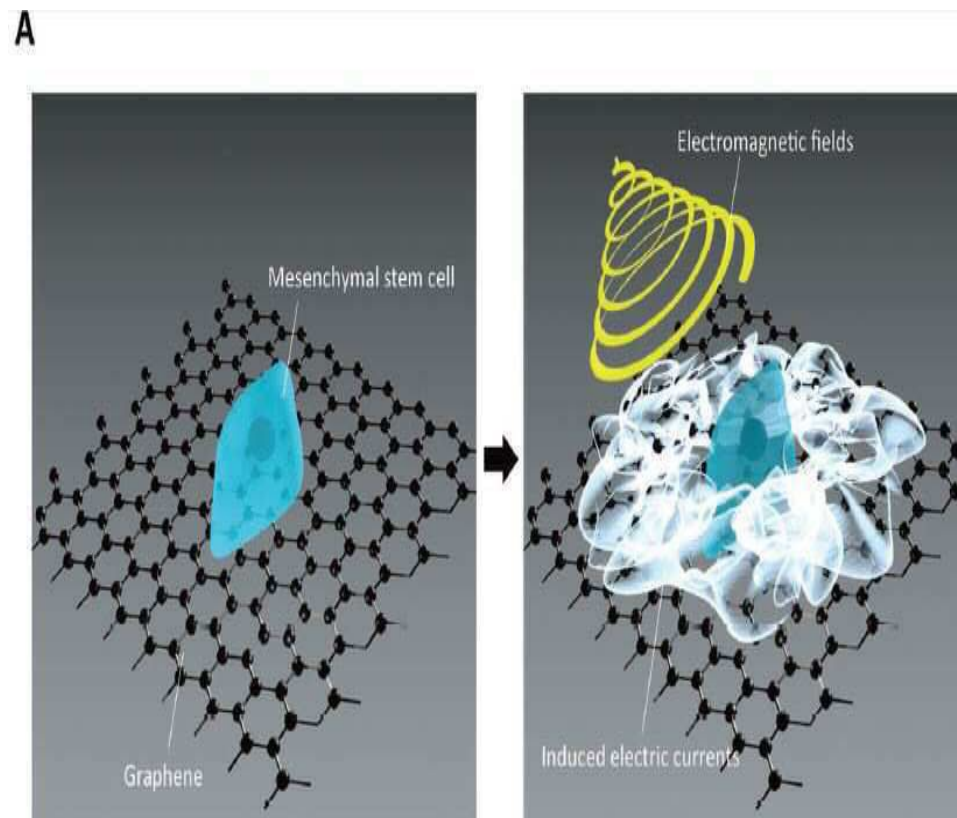
[0069] 그 배양된 세포들을 PBS(Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA)에서 세척하고, 4% paraformaldehyde 용액으로 20분간 고정하고 15분간 0.2% Triton X-100으로 투과시켰다. 세포들을 TRITC-conjugated phalloidin, anti-Tuj1, anti-NeuN, 및 그것의 2차 항체(Millipore Cat. no. AP124F), 및 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Millipore, Billerica, MA, USA)으로 1시간 배양하여 각각 액틴 필라민트, focal contracts, 및 핵을 염색하였다. 미네랄화된 nodules (칼슘 축적)의 존재를 ARS 및 VKS로 염색하여 결정하였다. 에탄올 고정화된 세포 및 매트릭스를 40×10^{-3} M alizarinred-S(pH 4.2)로 30분간 염색하고 3회 물로 린스하였다.

[0070] 사진 촬영 후, 결합된 염료를 10%(wt vol.1) cetylpyridinium chloride로 용출하고, 샘플 내 ARS를 560nm에서 흡광도를 측정하여 정량화하였다(Victor 3, Perkin Elmer, USA). VKS를 위해, 샘플을 냉각 에탄올로 고정하고 5% silver nitrate 용액(Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA)에서 자외선 노출 하에 30분간 배양하였다. 그 후 그 샘플을 증류수로 몇번 린스하고 그 슬라이드를 sodium hiosulfate 용액(5%)에서 2-3분간 배양하였다. 마지막으로 그 샘플을 수도물로 2분간 행구고 증류수로 두 번 갈아주었다.

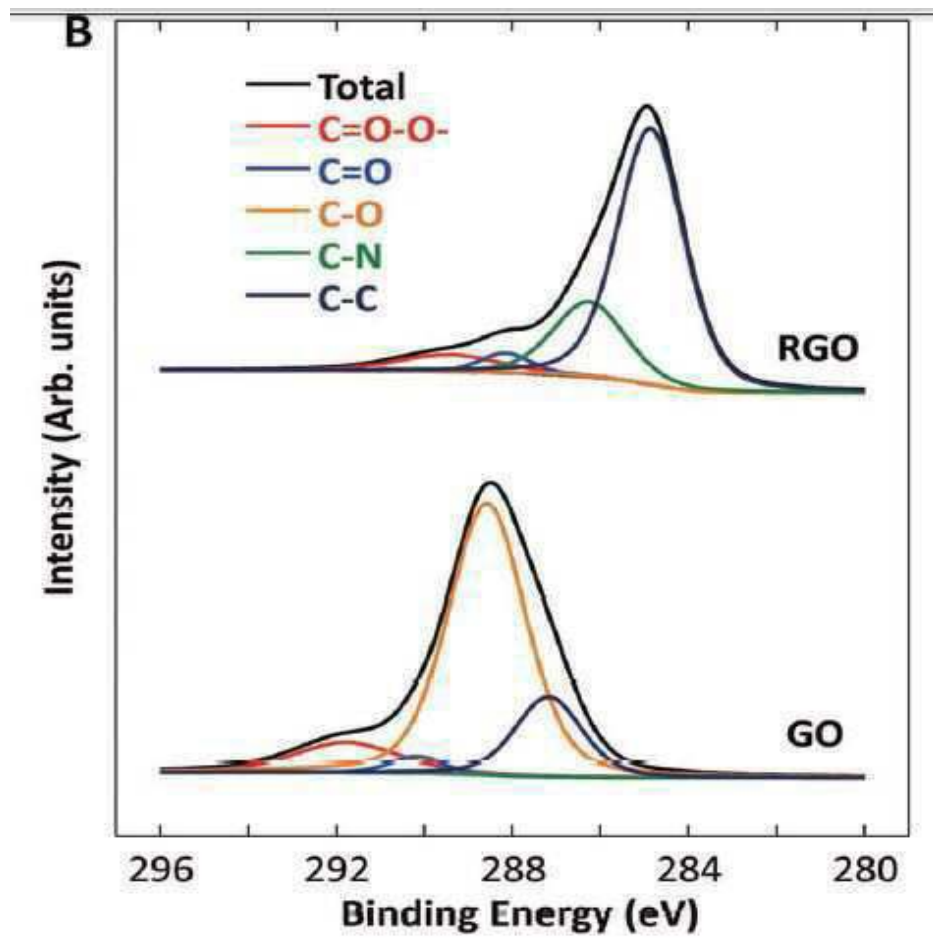
- [0071] 또한, RT-PCR을 2 주에 수행하였다. 전체 RNA를 제조업자의 지시에 따라 TRIzol reagent (Invitrogen, USA)을 사용하여 분리하고 cDNA를 첫번째 가닥 cDNA 합성 키트(Invitrogen, USA)를 사용하여 합성하였다. 그 산물을 1% agarose gel 상에서 전기영동에 의하여 분리하고 자외선 유도된 형광으로 확인하였다.
- [0072] 실시예 6: DNA 마이크로어레이 분석:
- [0073] 모든 샘플을 증식 배지에서 1주간 배양하였다. 전체 RNA를 전체 샘플의 컨프루언트 배양액으로부터 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA)를 사용하여 분리하였다. DNA 마이크로어레이 분석을 38 500 유전자/47 000 전사체 variants/54 000 프로브(Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA)를 포함하는 Human Genome U133 Plus 2.0 칩을 가지는 KURABO Gene-Chip Custom Analysis Service로 수행하였다.
- [0074] 원 데이터(Microarray Suite version 5.0, SF = 1;Affymetrix Inc.)를 GeneSpring (Silicon Genetics, Redwood City, CA)을 사용한 글로벌 평균 노말라이제이션으로 표준화하였다. 배수 변화(2배 이상)에 의해 수반된 표준화된 밀도에 대한 걸러진 유전자를 분화 전후 발현 프로파일에 대한 유전자 목록을 생성하는데 사용하였다. 원 데이터는 GEO(GSE9451)에 저장하였다.
- [0075] 본 발명에서 사용된 통계분석은 Windows Ver. 9.4 (SAS Institute)용 통계 분석 시스템(SAS)을 사용하여 수행하였다.
- [0076] 최소 유의 차(LSD) 방법 및 unpaired Student' s *t*-tests를 RGOCPs의 특성의 평균을 비교하기 위하여 사용하였다. 유의성의 레벨은 $p < 0.05$.

도면

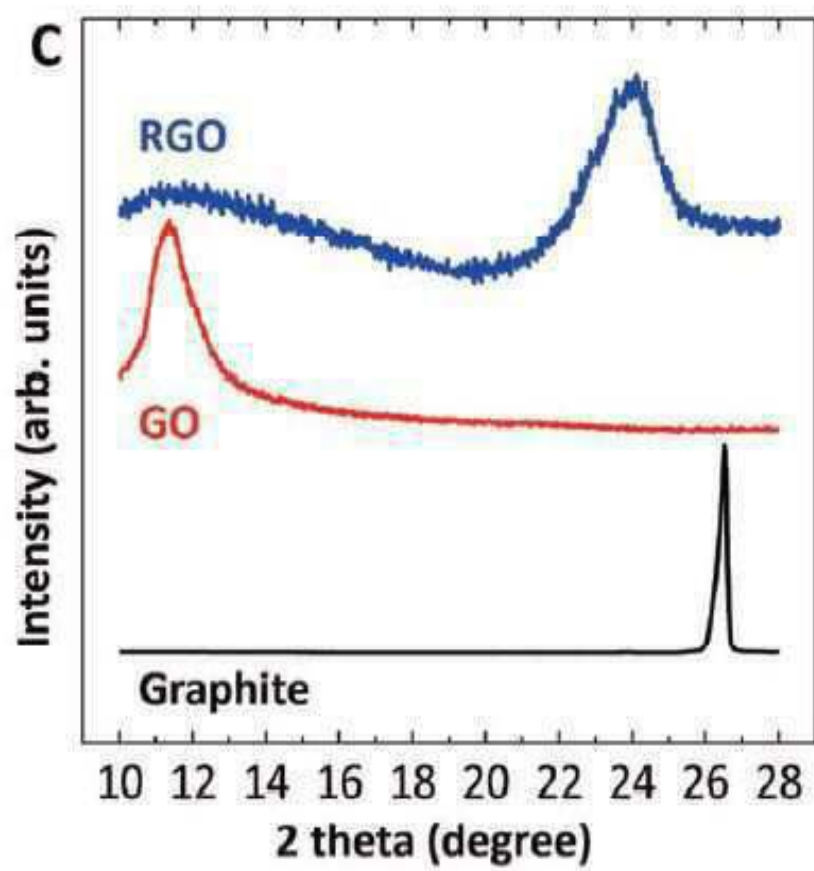
도면1a



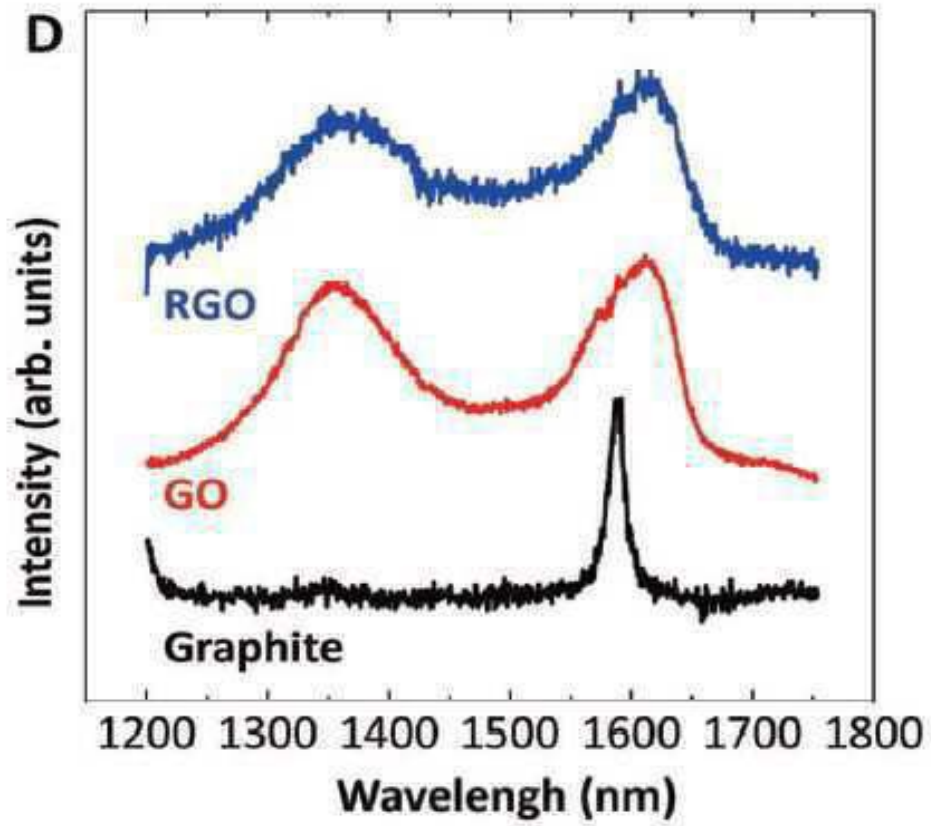
도면1b



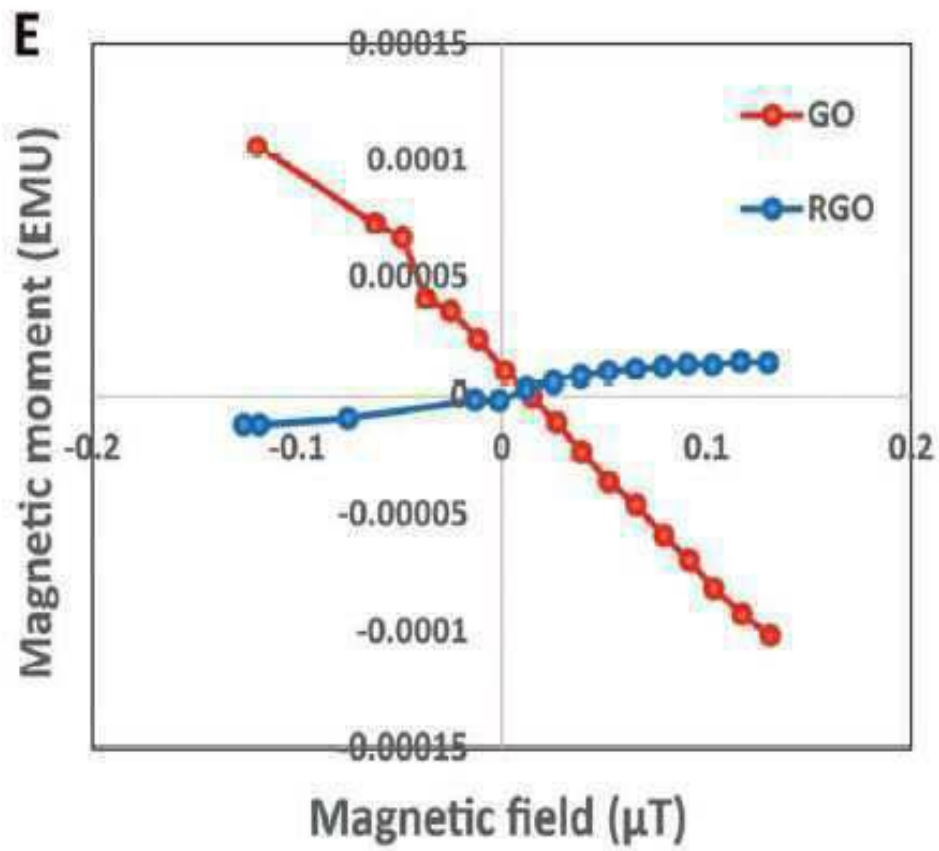
도면1c



도면1d

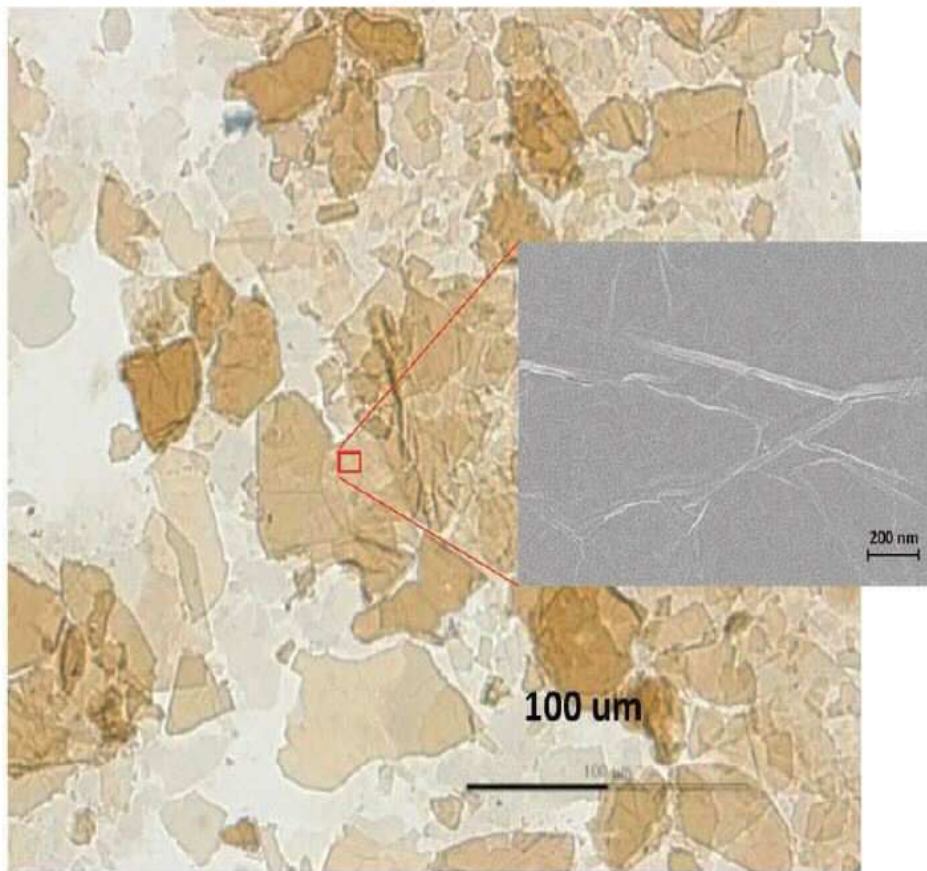


도면1e

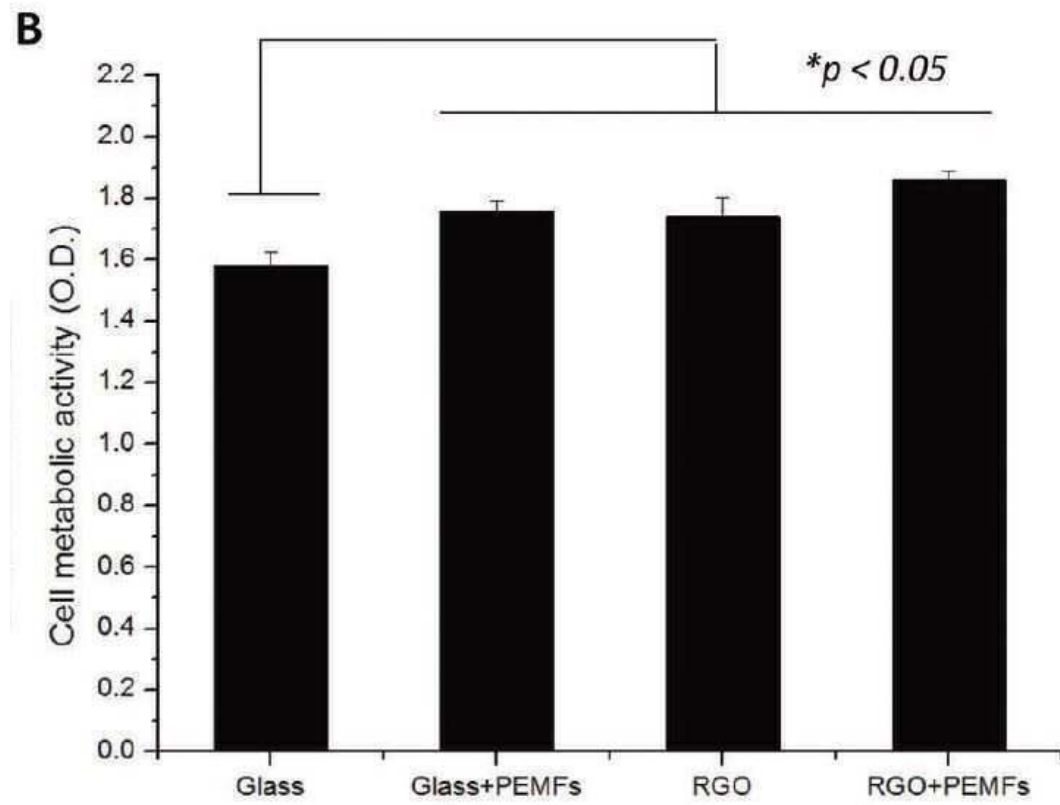


도면2a

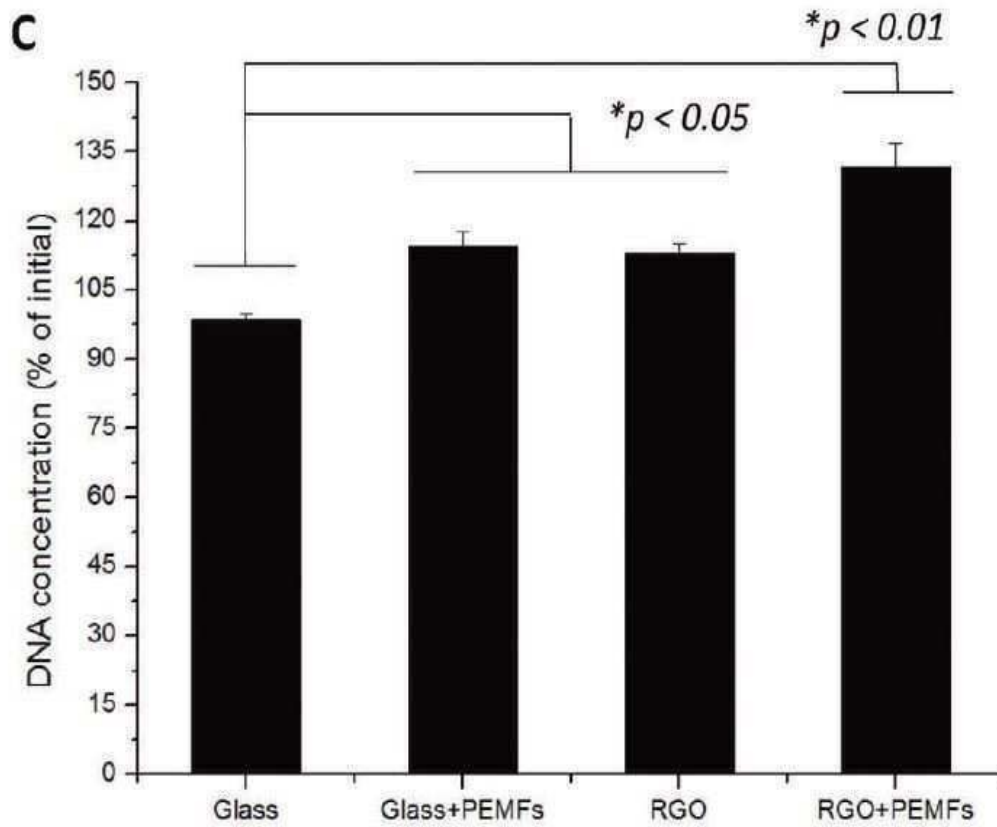
A



도면2b

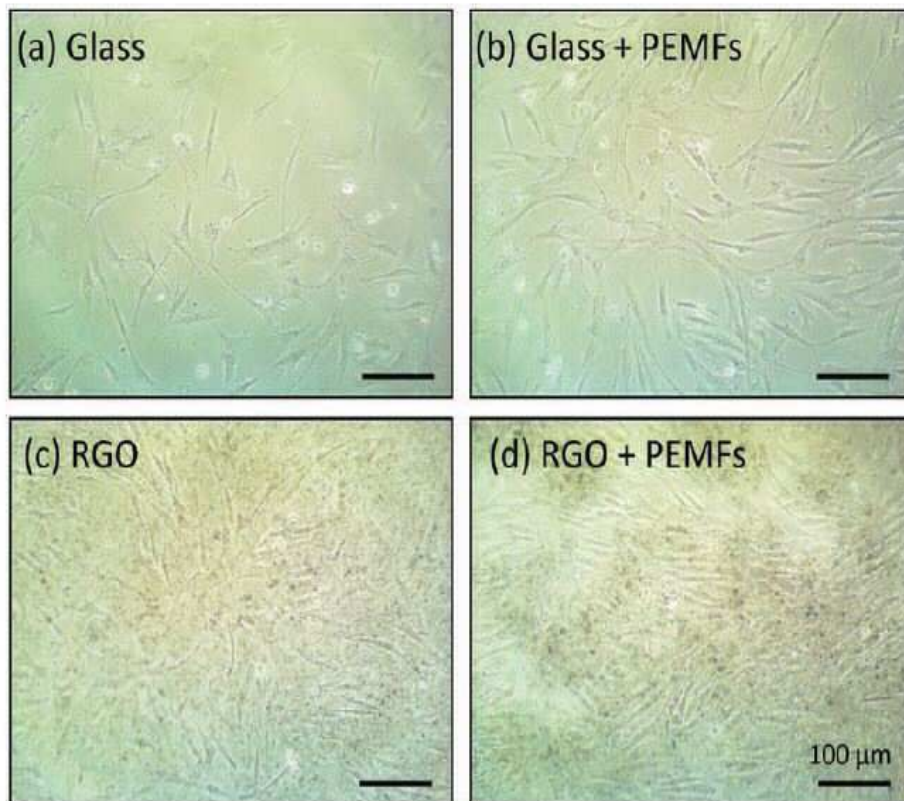


도면2c

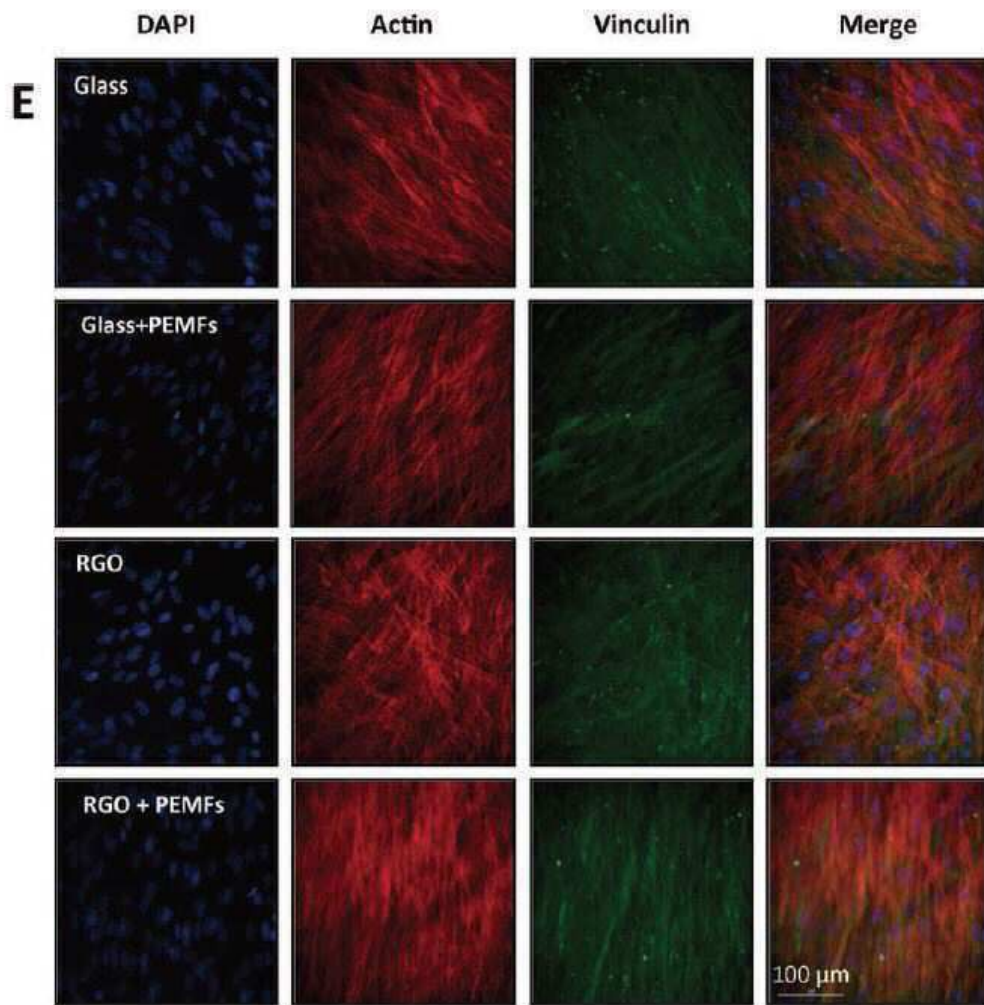


도면2d

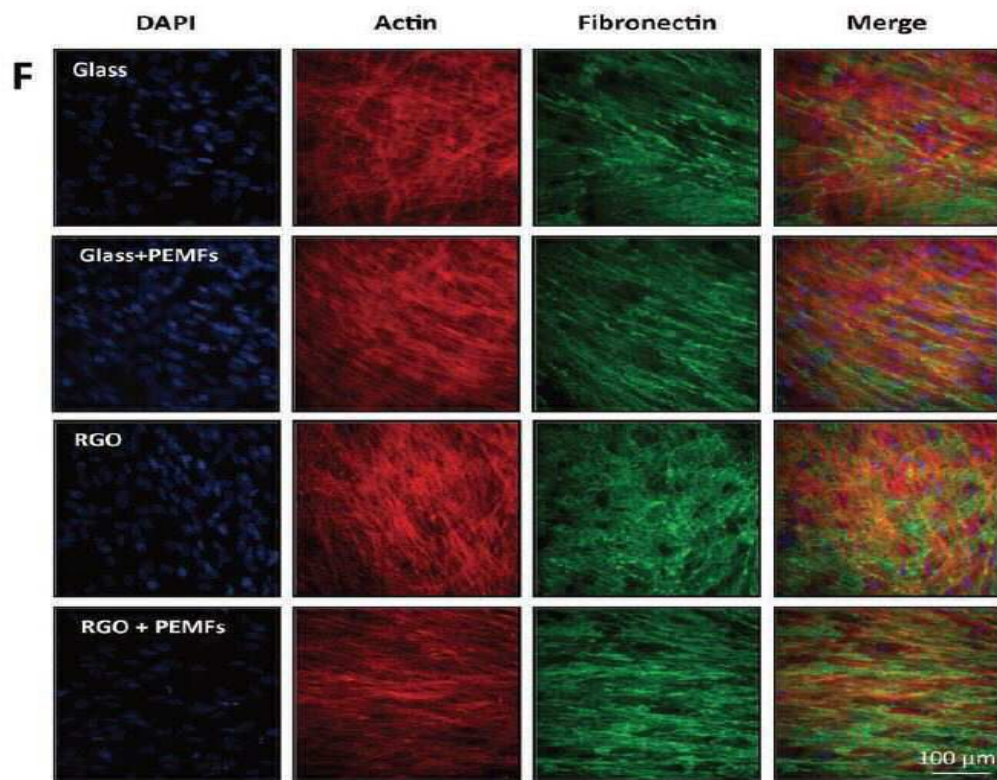
D



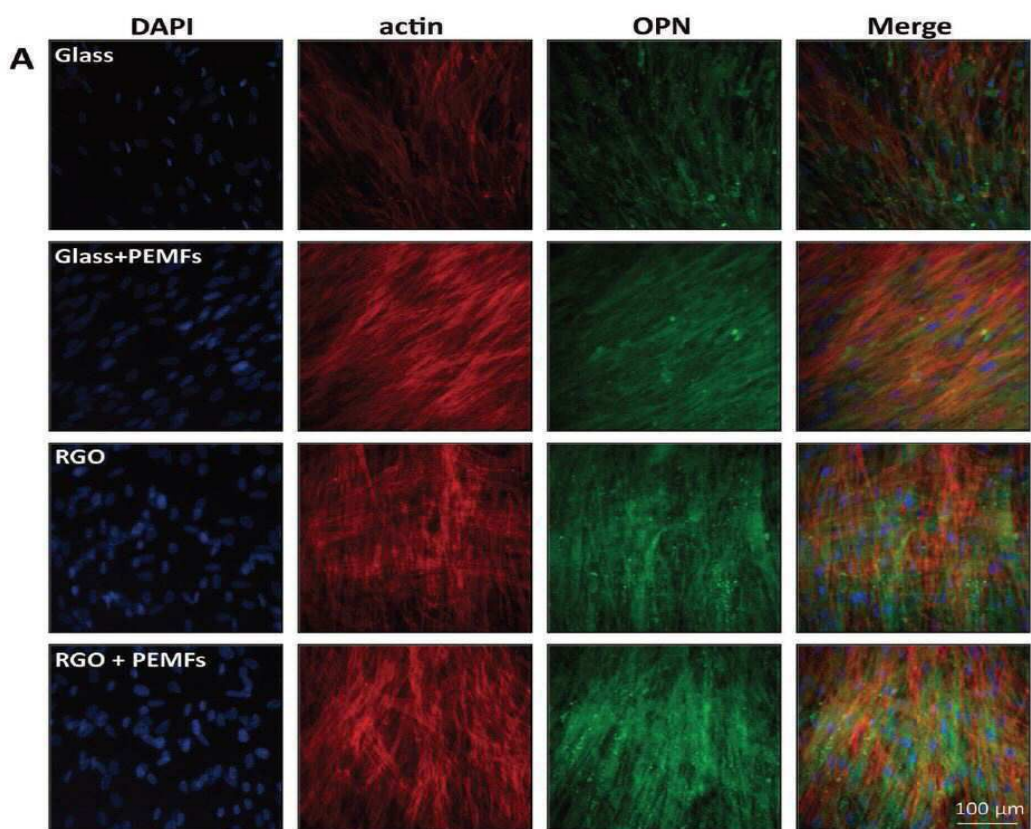
도면2e



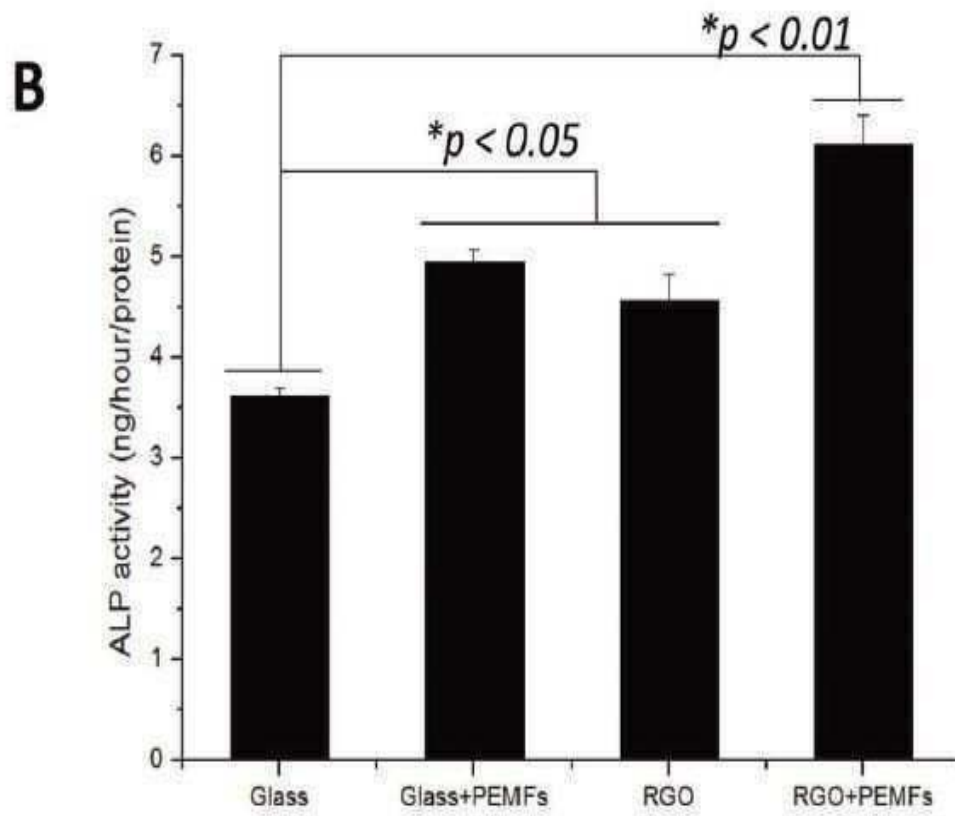
도면2f



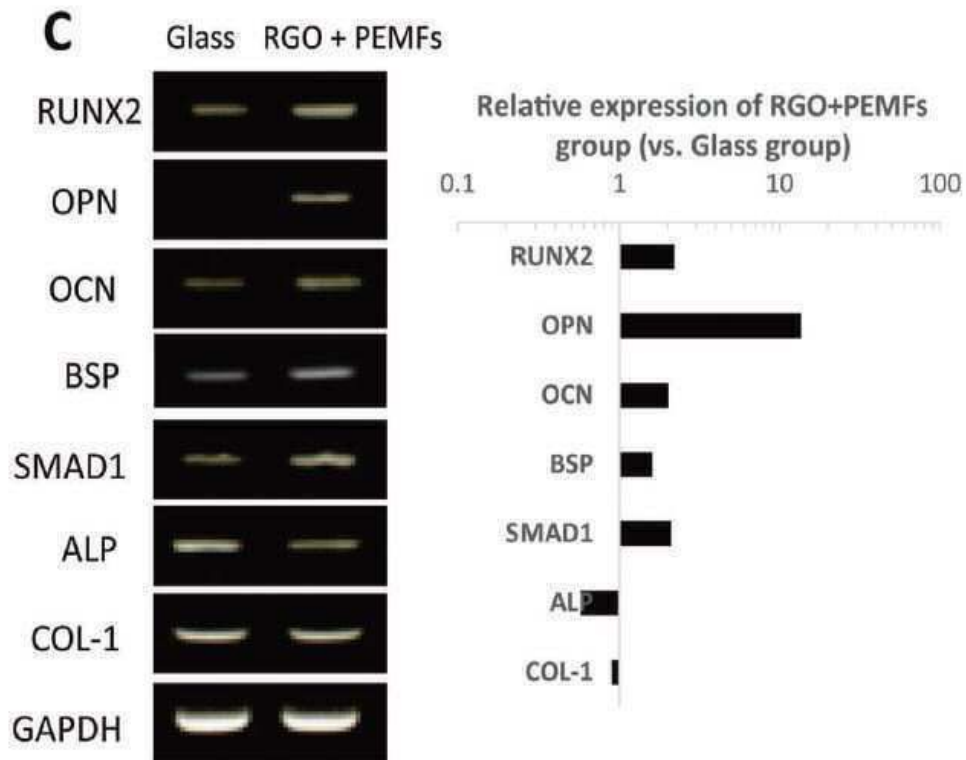
도면3a



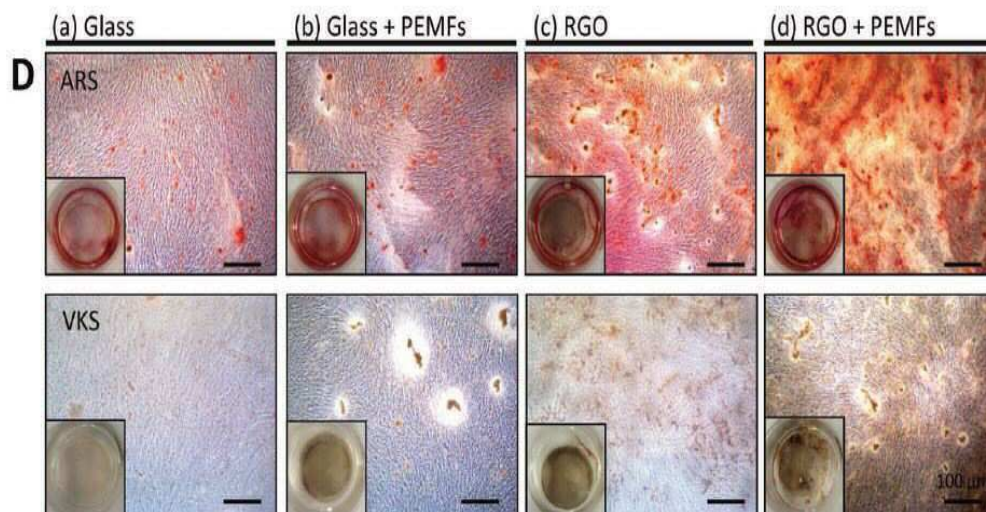
도면3b



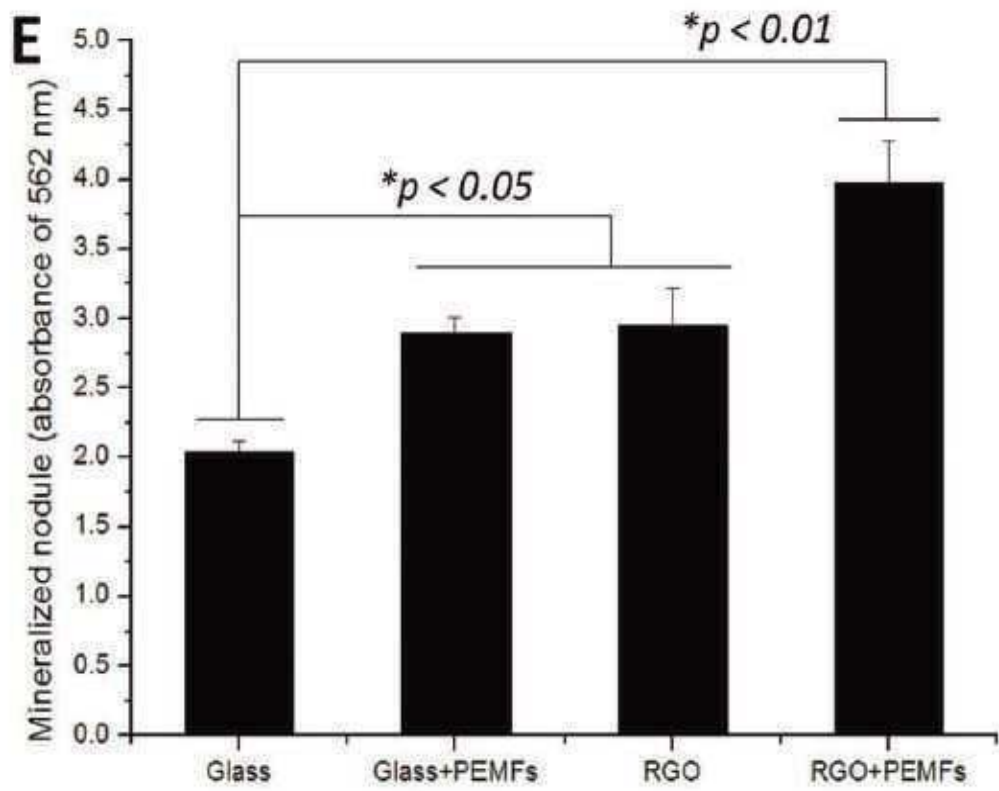
도면3c



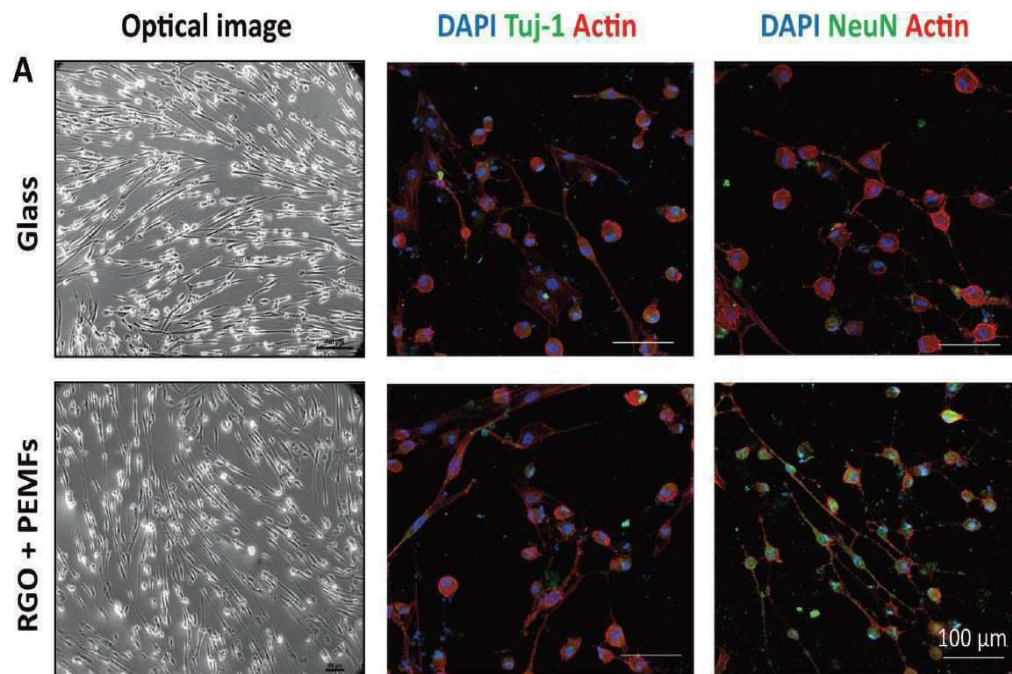
도면3d



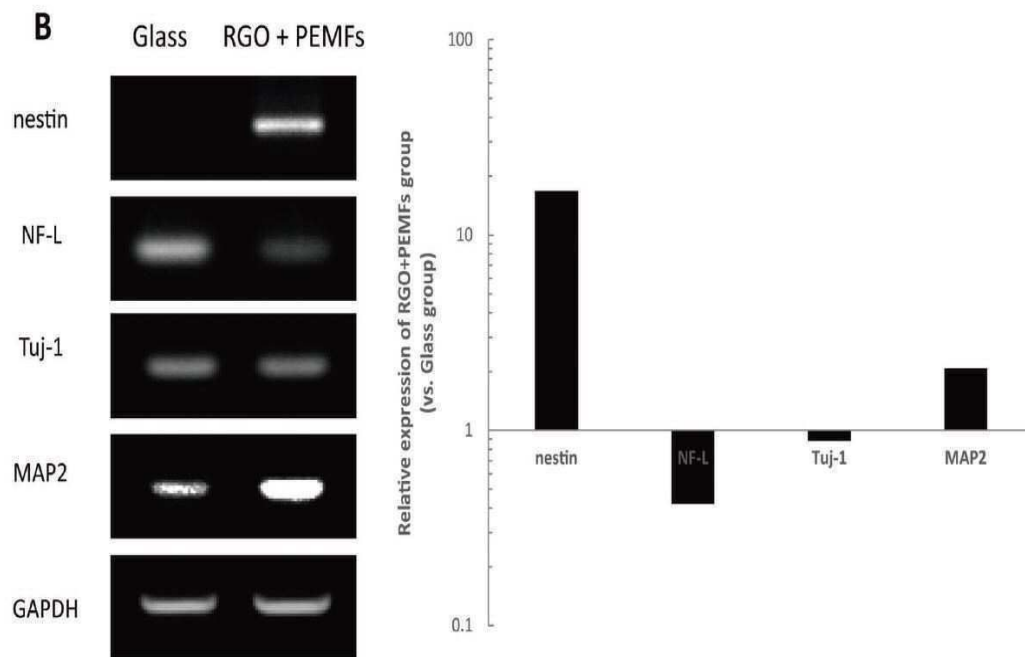
도면3e



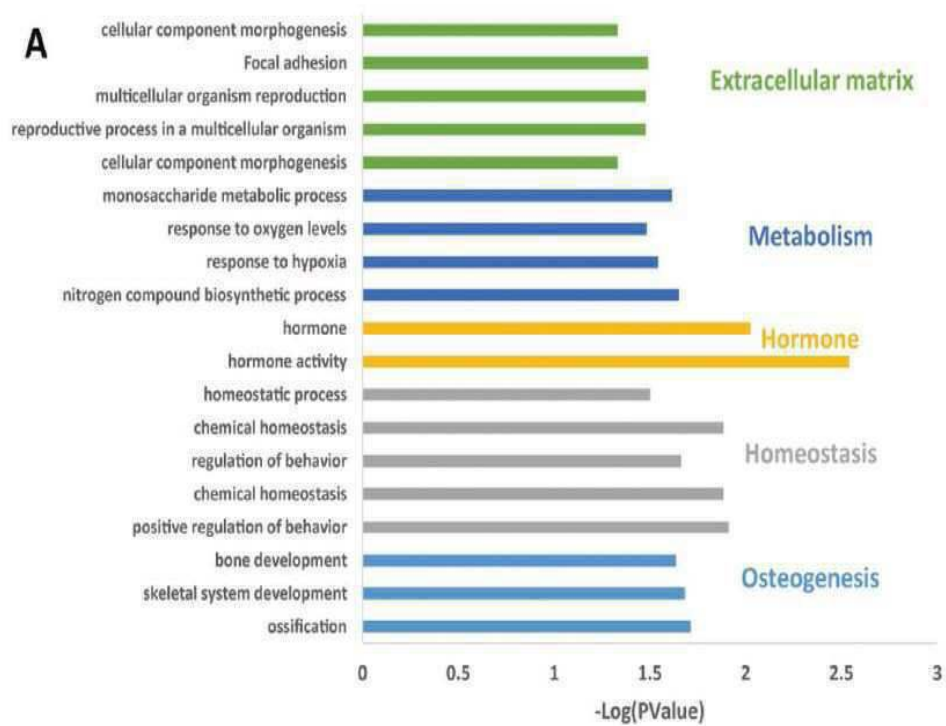
도면4a



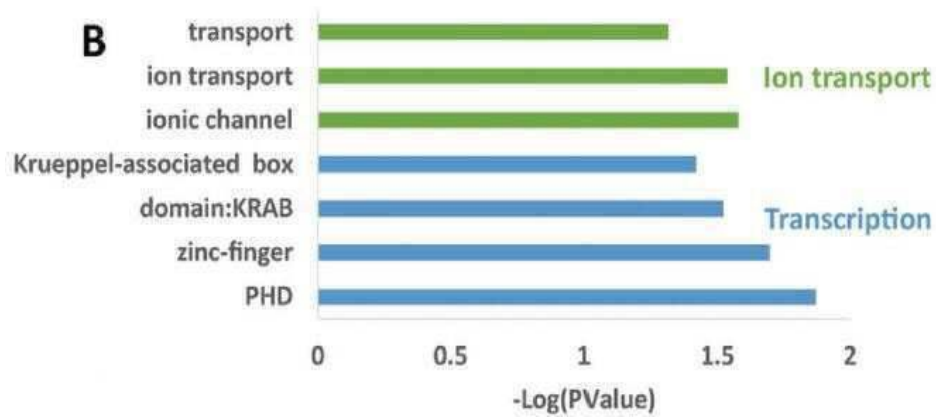
도면4b



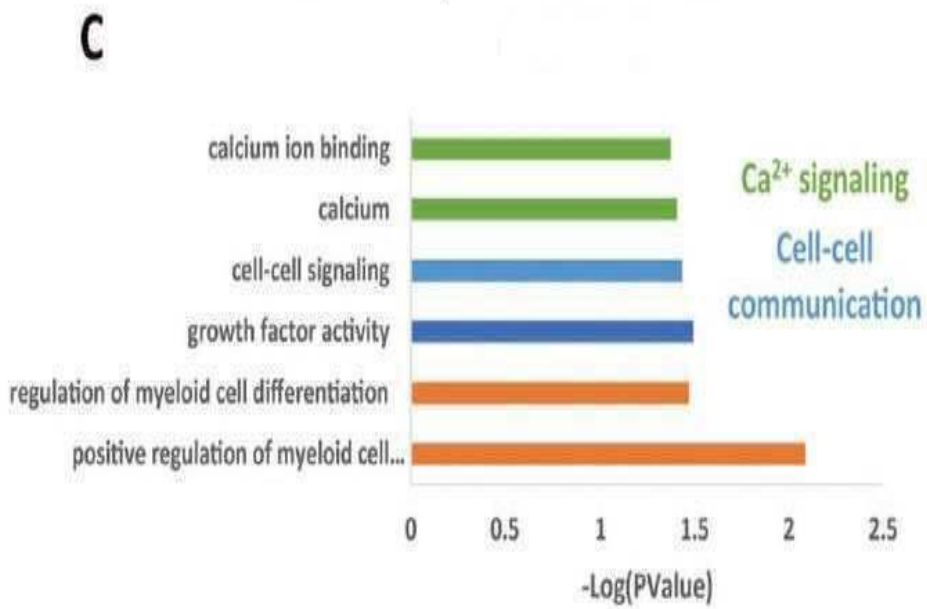
도면5a



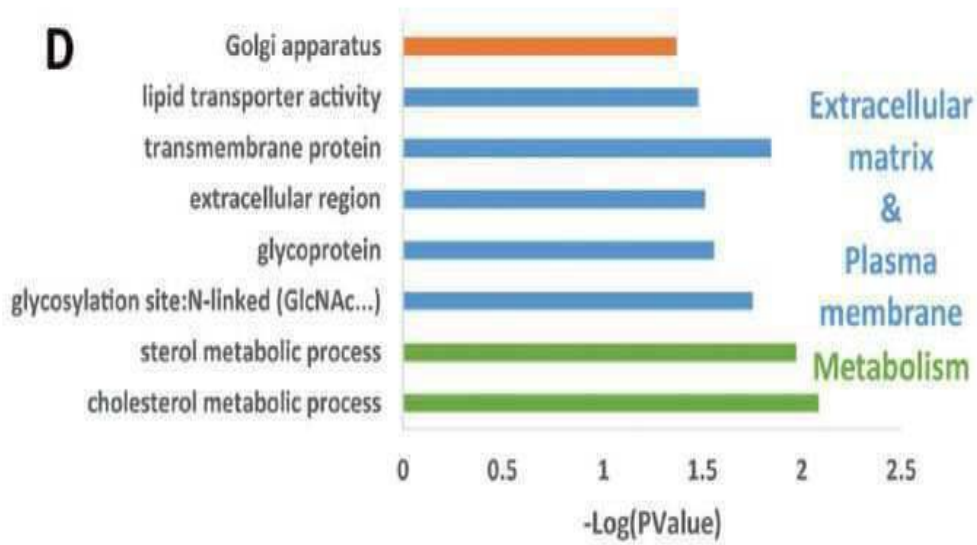
도면5b



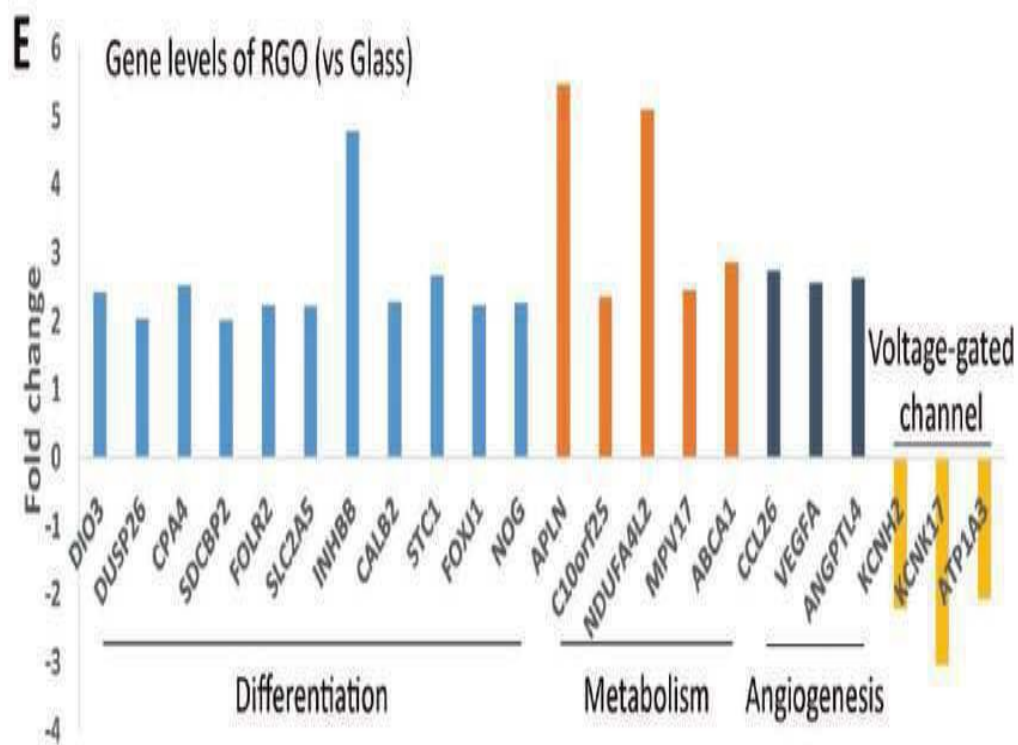
도면5c



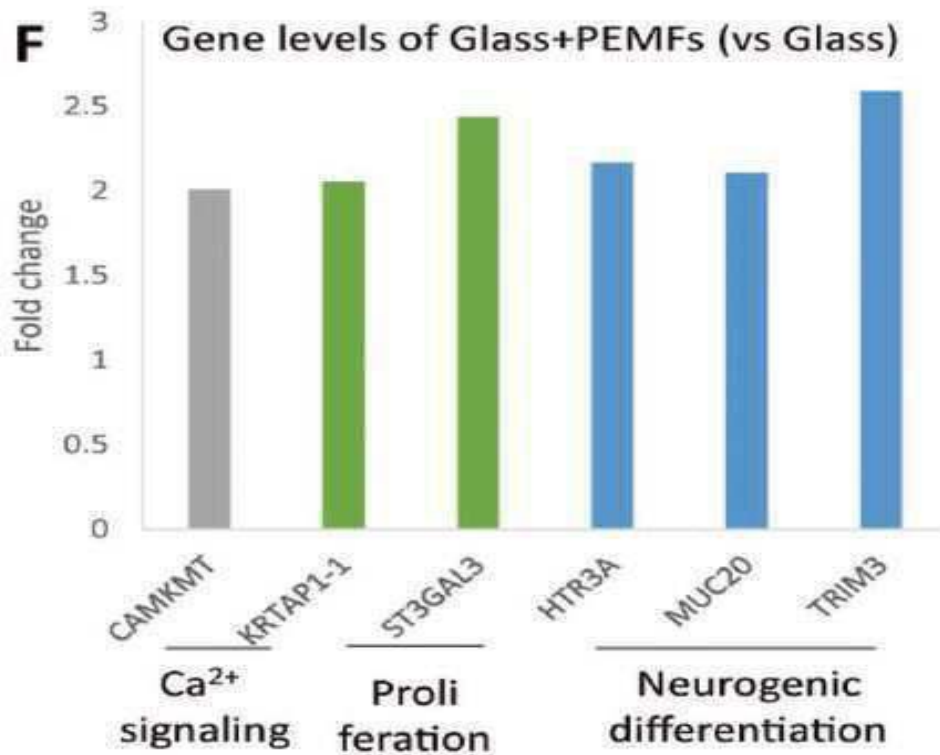
도면5d



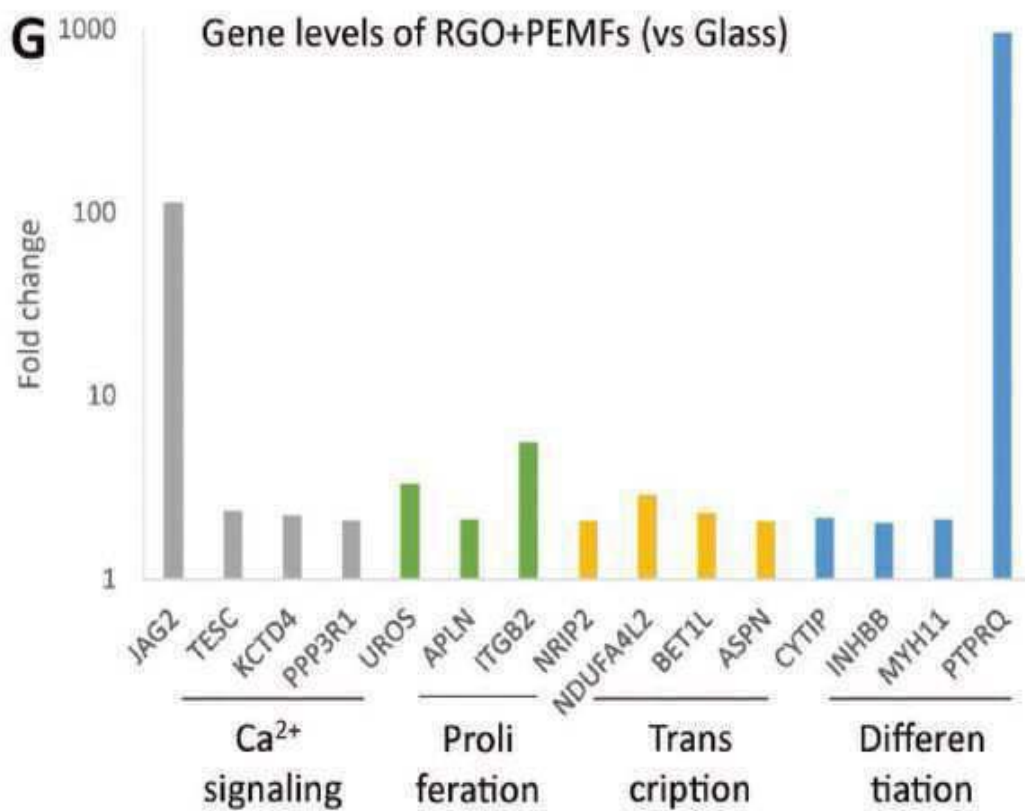
도면5e



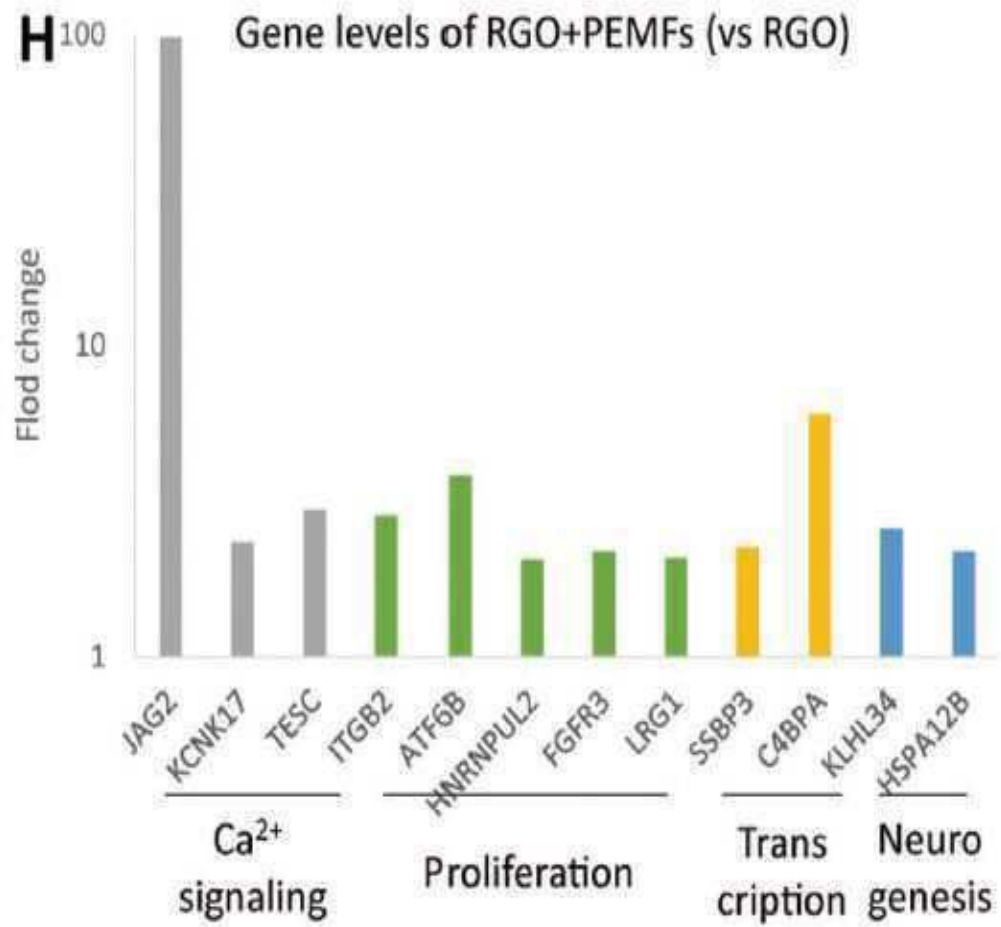
도면5f



도면5g



도면5h



도면6

