



등록특허 10-2362160



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년02월11일

(11) 등록번호 10-2362160

(24) 등록일자 2022년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 13/00 (2017.01) C12N 5/0775 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 13/00 (2013.01)
C12N 5/0662 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0106965

(22) 출원일자 2020년08월25일

심사청구일자 2020년08월25일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180066918 A

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

강원대학교 산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자

임기택

강원도 춘천시 후석로 325 포스코더샵아파트 112동 2308호

사안 템 두타

강원도 춘천시 강원대학길 1, 농업생명과학대학1호관동 307동 207호

(74) 대리인

구현서

전체 청구항 수 : 총 2 항

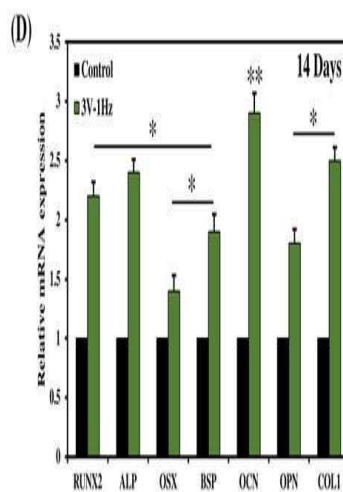
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 전자기장 마이크로칩 플랫폼 기반 중간엽 줄기 세포의 조골 세포 분화 방법 및 그 응용

(57) 요약

본 발명은 사인곡선적 EMF(SEMF)에 따른 hMSC 분화 및 분비 분석의 효과에 대한 특성화 및 적용에 관한 것으로 조골 세포 분화를 겪는 hMSC는 특정 전압, 헤르츠, 지속 시간 및 용량의 잘 정의된 SEMF 자극에 반응한다는 것을 나타낸다.

대표도 - 도3d



(52) CPC특허분류
C12N 2529/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020180026416 A
Electromagn Biol Med.,26(3):167-177(2007.)
J Biomed Nanotechnol.,15(2):301-310(2019.2.1.)
Stem Cell Research &
Therapy.,9(143):1-10(2018.5.21.)*
Cell Biochem Biophys.,69:47-54(2013.9.26.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345314415
과제번호	2019R1D1A3A03103828
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	줄기세포 다분화 증진용 3D 나노하이드브리드-멀티채널 자동화 바이오리액터 기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	강원대학교
연구기간	2019.11.01 ~ 2022.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

인 비트로에서 중간엽 줄기세포에 3볼트, 1Hz의 사인곡선적 전자기장을 7일 내지 14일 처리하여 상기 중간엽 줄기세포의 RUNX2(runt-관련 전사 인자-2), ALP(alkaline phosphatase), OSX(osterix), BSP(bone sialoprotein), OCN(Osteocalcin), OPN(Osteopontin) 및 COL1(collagen type-1) 유전자 중에서 오스테오칼신 유전자의 상대적 mRNA 발현을 향상시키는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 방법은 상기 사인곡선적 전자기장을 1일 20분간 처리하는 것을 특징으로 하는 상기 중간엽 줄기세포의 오스테오칼신 유전자의 mRNA 발현을 향상시키는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전자기장 마이크로칩 플랫폼 기반 중간엽 줄기 세포의 조골 세포 분화 방법 및 그 응용에 관한 것으

로, 더욱 상세하게는 인간 중간엽 줄기 세포의 분화 및 분비물 모니터링을 위한 전자기장 지향 뼈 마이크로 칩 시스템에서 얻은 데이터에 기반한 인간 중간엽 줄기 세포의 조골 세포 분화 특성화 방법 및 그 응용에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 지난 수십 년 동안 생체 적합성 나노 물질의 사용은 자기 분해성과 낮은 세포 독성으로 인해 조직 및 장기 재생에서 엄청난 중요성을 얻었다.
- [0003] 그러나 기존의 동물 모델에서 독성 평가 중 잘못된 예측의 결과로 모델 유기체에서 부위 별 독성을 예측하기 위한 새로운 체외 조직 공학 플랫폼을 생성하려는 노력이 빠르게 증가하고 있다.
- [0004] 대부분의 경우, 신약 시험은 종종 개별 모델 유기체에서 높은 독성을 보였으며 이러한 약물은 비싸고 의료계에 상당한 사회 경제적 영향을 미치기 때문에 인간 시험에 직접 적용되지 않았다. 결과적으로, 현재 임상 및 전임상 in vitro 및 in vivo 모델에서 효능 감소와 높은 독성으로 인해 신약 또는 생체 재료의 제형이 방해받는다.
- [0005] 따라서 새로운 생체 물질의 효능을 평가하기 위한 동물 모델의 사용은 윤리적 우려로 인해 인간 실험에 대해 제한되어 있다. 조직 공학에서 골수 유래 중간 엽 줄기세포 (BMSC), 배아 줄기 세포 (ESC) 또는 인간 또는 무린 기원의 유도 만능 줄기 세포 (iPSC)는 광범위하게 사용되며 생체 적합성을 테스트하기 위해 스캐폴딩 재료에 통합된다.
- [0006] 연구에 따르면 무린 모델에서 세포 캡슐화된 스캐폴드의 이식은 종종 생체 내 시스템 내부의 세포 및 그 역학에 대한 잘못된 예측 및 이해를 초래했다. 인간 및 무린 대리자 모두의 조혈/골수(H/BM) 간격은 유사해야 하며 이러한 발견을 뒷받침하는 몇 가지 문헌이 있다. 그러나 이러한 가정이 항상 인간에게 생산적인 결과를 입증하는 것은 아니다.
- [0007] 이러한 단점을 해결하기 위해 새롭고 생리학적으로 관련된 BioMicroElectroChemical 플랫폼 (BioMEMs)의 개발은 인간과 무린 모델 사이의 중요한 격차를 메울 것이며 골수와 관련된 여러 질병을 추적하기 위한 H/BM 간격을 이해하는데 중요하다. 이러한 시스템은 또한 다양한 물질 및/또는 나노 입자의 새로운 표적화 전략과 조직 재생에 미치는 영향을 개발하는 데 도움이 될 것이다.
- [0008] 따라서 새로운 전략은 세포 간 의사 소통, 세포 간 상호 작용, 전단 스트레스 등과 같은 생리적 및 병리학적 조건을 되풀이 해야 할 필요성이 있다.
- [0009] 게다가 전통적인 2D 배양 방법은 2D 표면 토폴로지, 표면 강성, 정적 이동, 정적 셀 간 상호 작용 및 기타 여러 이벤트를 포함하여 많은 이벤트를 경험한다. 이러한 2D 배양 시스템은 3D 토폴로지 변화가 없기 때문에 동물 모델에 이식하는 동안 3D 생체 내 미세 환경 내부를 재현하지 못한다.
- [0010] 최근 전이성 대장암 세포가 3D 간 오르가노이드 환경으로 성장하면서 상피 세포와 유사한 형태와 발현 프로파일을 나타냄이 입증되었다. 새로운 온칩 시스템은 간편하고 다재다능하며 기존 생체 내 모델의 모든 기능을 통합하여 예측을 향상시킬 수 있지만 세포 생존력 및 발현 프로파일에 의존하지 않는다. 이 새로운 기술은 H/BM 간격을 모니터링 할뿐만 아니라 임상의 개인 맞춤형 의약품 개발에도 사용된다.
- [0011] 만성 상처 반응은 일반적으로 electrotaxis (ET)로 알려진 과정에 의해 골수에서 상처 부위로의 활성 세포 이동에 중요한 역할을 하는 자연 발생 내인성 전기장 (EF)을 생성한다. 후에 내인성 EF의 역할 in vivo 및 in vitro 모델 모두에서 평가되었다.
- [0012] 그러나 내인성 EF보다 훨씬 더 높은 외인성 EMF의 적용은 BMSC의 직접 이동으로 인해 뼈 조직 재생 및 상처 치유를 가속화하는 것으로 나타났다. 골다공증 치료를 위한 펄스 EMF의 사용이 보고되었다. 또한, 외부 EMF의 적용은 체세포에 대한 후성 유전적 변화(약간의 DNA 메틸화)를 유도하여 염색질 리모델링 및 암과 같은 치명적인 질병의 검출을 위한 탁월한 도구를 제공할 수 있다.
- [0013] 또한 펄스 EMF 노출 동안 알칼리성 포스파타제 (ALP) 및 런트 관련 전사 인자 -2(RUNX2)와 같은 초기 조골 세포 동일성 유전자의 향상된 발현이 보고되었다. EMF의 독성과 효능은 자극의 저용량 (단기 노출) 또는 고용량 (장기 노출)에서 연구된다.
- [0014] 이를 위해 인 비트로 모델은 일반적으로 분자 메커니즘(경로 분석) 및 단백질 발현 (블로팅 기술)의 검증에 사용된다.

[0015] EMF 노출로 인해 생성된 독성은 시험관 내 실험으로 평가할 수 없으므로 독성학자는 여전히 전통적인 생체 내 동물 모델에 의존하여 작업을 검증한다. 점진적인 복잡성(장기-장기 인터페이스)이 부족하고 때로는 전신 기능을 보여주지 못하기 때문에 현재 온칩 기술의 한계 중 하나이다. 3 세대 미세 유체 칩 기반 기술은 고도로 발전되어 위에서 언급한 한계를 극복하여 실제 생체 내 적용 전에 여러 약물 및 나노 물질의 부위 별 독성을 효과적으로 제거할 수 있다.

[0016] [선행 특허 문헌]

[0017] 대한민국특허공개번호 10-2012-0091256

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 엔지니어링된 마이크로 칩에 대한 사인곡선적 EMF (SEMF) 지향 hMSC 분화 및 분비 분석의 효과에 대한 여러 특성을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 인 비트로에서 중간엽 줄기세포에 3볼트, 1Hz의 사인곡선적 전자기장을 처리하여 상기 중간엽 줄기세포의 생존력을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 사인곡선적 전자기장을 1일 20에서 30분간 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0021] 또 본 발명은 인 비트로에서 중간엽 줄기세포에 3볼트, 1Hz의 사인곡선적 전자기장을 처리하여 상기 중간엽 줄기세포의 이동 능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 사인곡선적 전자기장을 1일 20분간 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0023] 또 본 발명은 인 비트로에서 중간엽 줄기세포에 3볼트, 1Hz의 사인곡선적 전자기장을 처리하여 상기 중간엽 줄기세포의 광물화 효율을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 사인곡선적 전자기장을 1일 20분간 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0025] 또한 본 발명은 인 비트로에서 중간엽 줄기세포에 3볼트, 1Hz의 사인곡선적 전자기장을 처리하여 상기 중간엽 줄기세포의 알카리 포스파타제의 활성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 사인곡선적 전자기장을 1일 20분간 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0027] 또한 본 발명은 인 비트로에서 중간엽 줄기세포에 3볼트, 1Hz의 사인곡선적 전자기장을 처리하여 상기 중간엽 줄기세포의 오스테오칼신 유전자의 mRNA 발현을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 사인곡선적 전자기장을 1일 20분간 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0029] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 사인곡선적 전자기장을 1일 20분간 7일에서 14일간 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0030] 또한 본 발명은 인 비트로에서 중간엽 줄기세포에 3볼트, 1Hz의 사인곡선적 전자기장을 처리하여 상기 중간엽 줄기세포의 코넥신 43(Connexin 43) 발현을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0031] 이하 본 발명을 설명한다.

[0032] 사인곡선적 전자기장 (SEMF)에 대한 노출은 오랫동안 뼈 치유를 개선하는 것으로 나타났다. 그러나 가용성이 낮고 이식에 잘 맞는 단계까지 차별화하는 데 필요한 시간으로 인해 광범위한 임상 적용이 방해받는다. 현재 대부분의 뼈 조직 공학 모델은 살아있는 뼈의 복잡한 세포 기능을 입증하지 못하므로 대부분의 트랜스레이션 연구는 라이브 모델에서 수행된다.

- [0033] 본 발명에서 본 발명자들은 치료 적용을 위한 hMSCs의 분비 단백질 및 골 형성을 모니터링하기 위한 자극된 마이크로 칩 시스템을 보고한다.
- [0034] 본 발명자들의 연구 결과는 3V-1Hz SEMF 노출이 ERK-1/2 및 SAPK 신호 경로를 활성화하여 생물 물리적으로 골 형성을 자극한다는 것을 보여준다.
- [0035] 본 발명자들은 3V-1Hz 노출 시스템이 골 형성 관련 유전자 (RUNX2, ALP, BSP, OCN, OPN 및 COL1)의 발현을 상향 조절하고 주요 골 조절 단백질 (Runx2, OCN, OPN 및 BSP)의 발현을 향상시키는 것을 발견했다.
- [0036] 질량 분광기 분석은 자극된 hMSC 세크리토스에서 차별적으로 발현되는 23 개의 단백질이 대조군에 없는 것으로 밝혀졌다.
- [0037] 더욱이, 면역 세포 화학 분석은 SEMF의 효과가 주로 칼모듈린 단백질의 초기 향상과 관련이 있음을 나타내었으며, 이는 3V-1Hz 노출이 세포 내 칼슘 상승에 충분하고 따라서 골 유도 동안 Ca^{2+} /칼모듈린 복합체의 결합을 촉진함을 시사한다.
- [0038] 본 마이크로엔지니어링 플랫폼은 간편하고 다재다능하며 중단이 없으며 재생 의학 및 세포 기반 치료에 광범위한 적용이 가능하다.

발명의 효과

- [0039] 요약하면, 본 발명자들은 엔지니어링된 마이크로 칩에 대한 사인곡선적 EMF (SEMF) 지향 hMSC 분화 및 분비 분석의 효과에 대한 포괄적인 특성화 및 적용을 입증했다. 조골 세포 분화를 겪는 hMSC는 특정 전압(3V), 헤르츠(1Hz), 자기장 (0.1mT), 지속 시간 (20 분) 및 용량 (하루에 한 번)의 잘 정의된 SEMF 자극에 반응한다. 본 발명자들의 연구 결과는 저전압 주파수 SEMF 유도 조골 세포 분화가 노출 시간이나 용량에 의해 유발되었을 뿐만 아니라 다양한 물리 화학적 요인에 의해 영향을 받았음을 시사한다.
- [0040] 더욱이 ERK1/2 및 SAPK/JNK 신호 전달 경로의 활성화는 뼈 발달 전반에 걸쳐 우세한 오스테오칼신(OCN)의 유전자 및 단백질 발현에 영향을 미칠 수 있는 골 형성 분화도 조절한다. 외인성 Ca^{2+} 는 줄기 세포의 분화 가능성을 높인다. 도 7은 hMSC의 골 형성 분화 및 분비를 SEMF가 지시하는 가능한 메커니즘을 묘사한다. 마이크로 칩 플랫폼에서 hMSC 골 형성에 대한 저전압 주파수 SEMF 노출 프로토콜의 전례없는 효능은 줄기 세포 기반 뼈 조직 재생을 위한 관련 SEMF 기반 치료 전략의 궁극적인 트랜스레이션에 대한 광범위한 임상적 및 실제적 의미를 가지고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 엔지니어링된 마이크로 칩 시스템의 제작 (a & b) 및 애플리케이션 (c) (스케일 바 : 100 μm).
- 도 2(A) 분화를 모니터링하고 분비된 단백질을 수집하기위한 통합 마이크로 칩 시스템의 디지털 사진. (B-D) 표시된 시간 간격으로 SEMF의 존재하에 hMSC의 온칩 세포 독성 평가. (E) 배양 7 일 후 배양 세포의 DAPI 염색의 대표적인 이미지. (F) SEMF 유도 14 일 후 DNA 분리/정량 키트에 의해 측정된 이니셜의 백분율로서의 DNA 대사. 데이터는 평균 \pm S.D (n = 3), * p <0.05 및 ** p <0.01 (일원 분산 분석 테스트)에서 통계적 유의성.
- 도 3은 표시된 시간 간격에서 SEMF 처리 (1V-1Hz, 3V-1Hz 및 5V-1Hz, 0.1mT, 20 분/일) hMSC의 조골 세포 특정 유전자 마커 및 단백질 발현. (A-F) qRT-PCR 분석은 조골 세포 분화 특이적 유전자 마커를 사용하여 수행되었다. (G-H) 골 유도 후 14 일 후 SEMF 자극(3V-1Hz; 0.1mT, 20 분/일) 동안 조골 세포 및 파골 세포 신호 전달 경로 유전자 마커 (NF- κ B 및 RANKL)의 qRT-PCR 분석. I. 자극된 hMSC의 RUNX2, OPN, OCN 및 BSP 단백질에 대한 웨스턴 블롯 분석, 데이터는 평균 \pm SD (n = 3)이고 통계적 유의성은 * p <0.05 및 ** p <0.01로 간주 (일원 분산 분석 테스트).
- 도 4는 자극된 hMSC에서 Connexin-43 (Conx-43) 및 Osteocalcin (OCN) 발현 조사. (A) 1V-20 분/일 (2b-2d), 3V-20 분/일 (3a-3d) 및 5V-20 분/일 (4a-4d)에서 SEMF로 7 일 동안 배양 된 hMSC의 CLSM 이미지, 각각 (배율 \times 200). SEMF 처리가없는 hMSC는 대조군으로 간주(1a-1d). (B) 표시된 노출 조건에서 OCN을 표현하는 hMSC의 공초점 이미지(배율 \times 200). 화살촉은 각 단백질의 위치를 나타냄. 이미지는 적어도 두 번의 독립적인 실험에서 캡처(n = 2). (C-D) Conx43 및 OCN 발현의 정량화 데이터. (E)SEMF 자극 하에서 PDMS 칩에서 성장하는 세포의 CLSM 이미지 (3V-1Hz, 0.1mT; 20 분/일). 이미지는 20 분/일 자극이 OCN 및 OPN 발현 동안 ERK-1/2 및 SAPK 신호 관련 단백질의 활성을 향상 시켰음을 명확하게 나타냄.

도 5는 hMSC의 인 비트로 분화에 대한 Ca^{2+} -SEMF 자극의 효과. (A) Osteocalcin (OCN) 발현에 대한 면역 형광 염색. SEMF/ CaCl_2 처리가 없는 hMSC는 대조군 (1a-1d)으로 간주. 화살촉은 각 단백질의 위치를 나타냄. (B) 골 유도 동안 칼모둘린(CaM) 단백질의 상대적 발현(배율 $\times 200$). 이미지는 적어도 두 번의 독립적인 실험에서 캡처(n = 2).

도 6은 자극된 hMSC에서 주로 분비되는 23 개의 단백질과 관련된 단백질-단백질 상호 작용 및 생물학적 과정을 나타냄. (A) 단백질-단백질 상호 작용 네트워크의 STRING 분석. (B) 생물학적 과정(GO 용어)과 관련된 23 개의 차별적으로 분비 된 단백질의 유전자 온톨로지(GO) 분석.

도 7은 사인곡선적 전자기장 지향 hMSC 분화 및 생체 광물화의 가상 그림.

도 8은 마이크로 칩 시스템에서 hMSC의 제작 및 시험관 내 자극. (A) 마이크로채널 (반경 : 100 μm)로 연결된 세포 배양 챔버(반경 : 1mm)의 세부 정보를 보여주는 유리 코팅 PDMS 미세 유체 장치의 개요. (B) 제작된 칩의 원본 사진. (C) 각각 메인 챔버, 서브 챔버 및 채널의 정렬을 나타내는 미세 유체 칩의 그림. (D) EMF 기반 세포 배양 시스템의 개략도. PASCO® 장치는 전력 증폭기가 있는 파형 발생기(15W), 증폭기에 연결된 외부 자기장(MF) 센서 및 20cm 간격으로 분리된 2 개의 헬름홀츠 코일로 구성됨. MF 센서를 코일 사이에 수직으로 배치하여 BOD 인큐베이터 내부에서 지속적으로 자기장의 흐름을 측정함.

도 9는 PASCO Capstone DataStudio 소프트웨어에서 예측한 SEMF의 그래픽을 나타냄. 각 조건에서 축 방향 자기장(mT)에 대한 전류(A) 및 전압(V) 임계 값이 관찰됨. mT; 밀리 테슬라.

도 10은 hMSC의 특성화를 나타낸 그림. (A) 세포 표면 항원 CD34- (11 %), CD13+ (99 %), CD90+ (99 %) 및 CD146+ (90 %)의 발현을 보여주는 hMSC의 유세포 분석. (B) 3 계대에서 hMSC의 형태, 최대 7 일 배양(a1-a4)(배율 $\times 10$). 3 번과 4 번 계대에서 배양된 hMSC의 Stro-1 (녹색) 및 CD146 (녹색)의 면역 형광 라벨링. 핵과 세포 골격은 DAPI(파란색) 및 Phalloidin(빨간색)으로 염색됨. 흰색 화살표는 Stro-1 (b1-b4) 및 CD146 (c1-c4)의 존재를 나타냄.(배율 $\times 400$). (C) hMSC의 다중 계통 분화 잠재력 (배율 $\times 10$ 및 $\times 40$). 화살촉은 각각 광물화된 결정, 프로테오글리칸, 지질 방울 및 Nissl 신체 형성의 형성을 나타냄.

도 11은 세포-매트릭스 상호 작용 및 hMSC를 엔지니어링된 마이크로 칩으로 마이그레이션하는 연구를 나타냄. (A) 24 시간 후 TCPS 및 PDMS에서 세포 접착력 비교 ($\times 10$). (B) SEMF 자극 48 및 72 시간 후 hMSC의 형태 (분해능 : 100 μm). 처리하지 않은 세포는 대조군 (a1-a3)으로 간주됨. FE-SEM 형태는 다른 처리 그룹 (c1-c3)에 비해 20 분/일에 3V-1Hz (0.1mT) 노출시 세포 질량의 증가를 나타냄. (C-D) 특정 시간 간격 (24 시간, 36 시간, 48 시간 및 72 시간)에서 SEMF(3V-1Hz, 0.1mT, 20 분/일) 노출에서 마이크로 채널을 통한 세포 이동 평가(분해능 : 20 μm).

도 12는 hMSC의 온칩 골 형성 유도. (A-B) Alizarin Red-S (ARS) 및 알칼리성 포스파타제 (ALP) 염색은 해당 광학 현미경 사진(배율 $\times 5$ 및 $\times 10$)으로 배양 21 일 후 골 형성 (c1-c3)의 상당한 증가를 보여줌. (B-C) 광물화된 결정 형성 및 ALP 활성은 각각 562 nm 및 405 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화됨. 데이터는 평균 \pm S.D(n = 3)이며, 통계적 유의성은 * $p < 0.05$ (일원 분산 분석 테스트)에서 고려됨.

도 13은 웨스턴 블로팅으로 SEMF(3V-1Hz; 0.1mT, 20 분/일)로 처리한 후 BSP, OCN, OPN 및 RUNX2 단백질의 상대적 정량화. β - 액틴은 대조군으로 사용. 데이터는 평균 \pm S.D(n = 3)이고, 통계적 유의성은 * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$ (일원 분산 분석 테스트)로 간주.

도 14는 칩 상의 면역세포화학을 나타냄. 골 유도 동안 OPN 발현을 조사. 각각 1V-20 분/일 (2a-2d), 3V-20 분/일 (3a-3d) 및 5V-20 분/일 (4a-4d)에서 SEMF로 7 일 동안 배양된 hMSC의 ICC 이미지 (배율 $\times 200$). SEMF 처리가 없는 hMSC는 대조군으로 간주(1a-1d). 이미지는 적어도 두 번의 독립적인 실험에서 캡처(n = 2).

도 15는 hMSC의 시험관 내 분화에 대한 Ca^{2+} -SEMF의 효과. (A) 표시된 시간 간격으로 CaCl_2 (0mM, 5mM 및 10mM)로 처리한 후 세포 대사 활성. (B-C) Ca^{2+} -SEMF 유도 세포의 ARS 및 ALP 활성. (D) hMSC의 골 형성 잠재력을 보여주는 해당 광학 이미지와 함께 광물화 플레이트의 사진. (E) 7 일 동안 Ca^{2+} 유도 골 형성 배지에서 성장하는 세포의 형광 현미경 이미지(배율 $\times 200$). (F) 2 주 골 유도 후 ALP, OCN 및 COL1 유전자 마커의 높은 발현을 나타내는 qRT-PCR의 결과.

도 16은 SEMF-directed secretome 분석 조사. (A-D) 표시된 시간 간격에서 IL-6, MCP-1, MCP-2 및 HGF의 상대적 발현 수준. (E) 확인된 단백질의 항체 어레이. (F) hMSC의 분비 수프의 SDS-PAGE 분석. 데이터는 평균 \pm S.D(n = 3)이며, 통계적 유의성은 * $p < 0.05$ (일원 분산 분석 테스트)로 간주.

도 17은 표시된 시간 간격으로 세크리톤 추출물로 전처리된 hMSC의 시험관 내 미네랄 유도. (A) 유도 14 일 후 대표적인 Alizarin Red-S 및 von-Kossa 염색. (B) 562 nm에서 OD를 측정하여 광물화 효율을 평가. 데이터는 평균±S.D (n = 3)이고, 통계적 유의성은 * p <0.05 및 ** p <0.01 (일원 분산 분석 테스트)로 간주.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 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.
- [0043] 실시예 1: PDMS 칩 제작:
- [0044] 폴리디메틸실록산 (PDMS) 기반 마이크로 칩은 이전 문헌 Chung, B. G. 등 Lab on a Chip 2005, 5 (4), 401-406; Anderson, J. R. 등 Analytical chemistry 2000, 72 (14), 3158-3164에 설명 된대로 제작되었다.
- [0045] 요약하면, 이 장치는 포토 리소그래피에 의해 100 μ m 두께의 네거티브 포토 레지스트 SU8-50 (Kayaku Advanced Materials, Inc., MA, USA)을 패터닝하여 제작되었다. 405 nm UV 경화 광 (Cellink +, Cellink Corp., Sweden)을 사용한다. 마이크로 채널 레이아웃은 CorelDraw X8 소프트웨어 (Corel Corp., Ottawa, Canada)를 사용하여 설계되었다. 마지막으로 PDMS와 유리 슬라이드의 표면을 활성 산소 플라즈마(Plasma Etch., 미국 네바다)에 의해 2 분 동안 활성화하고 즉시 결합하여 비가역적인 밀봉을 형성했다. PDMS는 유리가 장치의 바닥을 형성하고 PDMS를 표면층으로 형성하여 세포 접착 및 성장을 촉진하는 방식으로 유리 슬라이드에 코팅되었다(그림 1).
- [0046] 세포 배양 용기(입구 영역 및 마이크로 채널)는 결합을 피하기 위해 플라즈마 처리 중에 유리 슬라이드로 덮였다. 입구 및 출구 챔버의 직경은 각각 1mm 및 18mm로 유지되었다. 전체 미세 유체 장치는 길이 70mm, 폭 25mm, 두께 2.5mm로 추정되었다. 세포 배양 실험 전에 PDMS 칩을 UV 조사로 멸균하고 1x PBS (pH 7.4; Welgene, 대한민국)로 철저히 세척하였다. 세포 부착을 가속화하기 위해 세포 배양 실험 전에 마이크로 칩을 0.5 % 콜라겐 1형 (Sigma-Aldrich, USA)으로 코팅했다.
- [0047] 실시예2: hMSC 배양:
- [0048] hMSC는 한국 세포주 은행 (KCLB, 서울 대학교)에서 수집되었다. hMSC는 Dutta, S. D. 등 *Journal of Nanomaterials* 2019, 2019.; Patel, D. K. 등 *RSC Advances* 2019, 9 (62), 36040-36049; 및 Lim, K. 등 *BioMed research international* 2013에 기술된 과정에 따라 배양되었다.
- [0049] 요약하면, hMSC는 10 % 소 태아 혈청 (FBS; Welgene Inc., 대한민국) 및 페니실린 (10000 unit/ mL), 스트렙토마이신 (10000 μ g / mL), 암포테리신 B (25 μ g /mL)을 함유하는 1 % 항생제 항진균제 (Anti-Anti; 100 \times , Gibco-BRL, Grand Island, USA)를 함유하는 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지 (DMEM; Welgene Inc., 대한민국)에서 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂(Steri-Cycle 370 Incubator; Thermo-Fischer Scientific, 미국)에서 유지되었다.
- [0050] 분화 실험을 위해 세포를 50 μ g/mL L- 아스코르브산 (순도 99 % 이상), 10 mM β - 글리세로포스페이트 다이소듐(순도 99 % 이상) 및 100 nM 텍사메타손(\geq 99 % 순도)이 보충된 DMEM 함유 골 형성 유도 배지에서 배양했다. 모든 화학 물질은 미국 Sigma-Aldrich에서 구입했다.
- [0051] 실시예 3: hMSC의 특성화:
- [0052] 3 번 계대에서 hMSC와 관련된 면역 표현형 마커는 유세포 분석 및 면역 세포 화학 (ICC)에 의해 특성화되었다. 요약하면, 세 번째 계대 (Gibco BRL, Grand Island, USA)의 세포 (1 \times 10⁶ 개 세포)를 0.25 % 트립신-EDTA (0.2g/L; Gibco-BRL, Grand Island, USA)로 분해하고 1x로 행구었다.
- [0053] PBS, 3.7 % 파라포름알데히드(PFA; \geq 95 %; Sigma-Aldrich, USA)에서 10 분 동안 고정되었다. 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위해 세포를 1 % 소 혈청 알부민(BSA; Sigma-Aldrich, USA)을 함유하는 1x PBS에 실온에서 30 분 동안 재현탁시켰다. 다음으로, 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 CD34, CD13, CD90 및 CD146에 대한 100 μ L 마우스 항-인간 단일 클론 항체 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)와 함께 배양한 후 FITC- 접합된 배양 2 차 항체 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 실온에서 1 시간 동안. 그 후, 세포를 PBS로 완전히 행구고 400 μ L PBS에 재현탁시켰다.
- [0054] CD34-, CD13+, CD90+ 및 CD146+ 세포의 백분율은 FACS Caliber 유세포 분석기 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA)로 측정하고 데이터는 Cell-Quest Pro 소프트웨어 (Becton Dickinson, CA, USA)로 분석했다. .

- [0055] 면역 염색을 위해, 세포를 4 % 파라포름알데히드로 20 분 동안 고정하고, 0.1 % Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, USA)으로 5 분 동안 투과시키고, 1 % BSA로 실온에서 20 분 동안 차단했다. 다음으로, 플레이트를 PBS로 행우고 단일 클론 마우스 항-인간 STRO-1 + (1:200) (미국 텍사스 주 산타 크루즈 바이오 테크놀로지) 및 CD146+ (1:100) (미국 캘리포니아 주 샌디에고 소재 eBioscience)와 함께 1 시간 동안 배양했다. 그리고 FITC-접합된 이차 항체와 함께 1 시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 450 μ L PBS로 3 회 세척하고 300 μ L의 DAPI 용액 (Invitrogen, Thermo-Fischer Scientific, USA)으로 5 분 동안 대조 염색 하였다. 마지막으로, 세척 및 염색된 세포에 Prolong® Gold Antifade 장착 시약 (Thermo-Fischer Scientific, 미국) 1 방울을 장착하고 공 초점 레 이저 스캐닝 현미경 (LSM 880 Airscan-2, Zeiss, 독일)으로 시각화했다.
- [0056] 실시예 4: hMSC의 다 계통 분화 가능성:
- [0057] hMSC의 다중 계통 분화 가능성을 조사하기 위해 세포를 골 형성, 연골 형성, 지방 형성 및 신경 형성 배지 (StemPro, Thermo-Fischer Scientific, USA)에서 최소 21 일 동안 배양했다. 그 후 배양된 세포를 각각 골 형 성, 연골 형성, 지방 형성 및 신경성 분화의 지표로서 광물화된 기질, 프로테오글리칸, 지방 액포 및 Nissl 체 를 검출하기 위하여 40mM 알리자린 레드 -S (pH 4.2; Sigma-Aldrich, USA), 1 % 알시안 블루(Sigma-Aldrich, USA), 0.2 % 오일 Red-O (Sigma-Aldrich, USA) 및 1 % cresyl violet (Sigma-Aldrich, USA)와 같은 적절한 염 색 용액으로 처리하였다. 염색 후 플레이트를 PBS 식염수로 세척하고 광학 현미경으로 이미지를 캡처했다.
- [0058] 실시예 5: SEMF 자극:
- [0059] EMF 자극을 위해 PASCO® 850 Universal Interface를 PASCO®(미국 캘리포니아)에서 구입 한 후 EMF 생성에 사 용했다. 이 장치에는 0.001Hz ~ 100kHz의 주파수 범위를 가진 사인곡선적, 삼각, 정사각형 및 램프(DC 오프셋 포함)를 포함한 파형이 있다.
- [0060] 요약하면, 이 장치는 전력 증폭기가 있는 파형 함수 발생기 (15W), 증폭기에 연결된 외부 자기장 센서(MF 센 서), 20cm 떨어진 곳에 위치한 2 개의 Helmholtz 코일로 구성되었다. MF 센서는 두 코일 사이에 수직으로 배치 되었다 (그림 S1). 신호는 파형 발생기에 의해 능동적으로 방출되었다. 증폭기의 도움으로 신호가 코일로 전송 되었다. EMF를 생성하는 코일과 MF 센서는 5 % CO2 인큐베이터 안에 배치되었다. 실험은 SEMF (sinusoidal EMF)를 이용하여 수행하였으며, 처리 조건은 1V-1Hz, 3V-1Hz, 5V-1Hz, 일정한 자기장 0.1mT, 10 분, 20 분, 30 분/일 (그림 S2). 인큐베이터 내부 온도는 EMF 장치 유무에 관계없이 정기적으로 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 지속적으로 유지 되었다. 노출하는 동안 PDMS 칩에 로드된 hMSC가 코일 중앙에 정확하게 배치되었다. 반면에 대조군 샘플은 전자 기장에 노출되지 않고 CO2 인큐베이터에 별도로 보관되었다.
- [0061] 실시예 6: 세포 생존력 분석
- [0062] 4 계대의 hMSC (1×10^4 세포)를 입구 챔버에 주입하고 5 일 동안 SEMF에 노출시켰다. 세포 생존율은 WST-1 분 석 (EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit®; DoGenBio Co., Ltd., Republic of Korea)으로 평가하였다. 특정 처 리 후 10 μ L의 WST-1 염료를 주 입실을 통해 주입하고 2 시간 동안 배양했다. 마지막으로, 반응 된 포르마잔을 수집하여 96 웰 플레이트에 삽입하고 분광 광도법으로 측정했다 (Infinite® M Nano 200 Pro; TECAN, 스위스). 전체 DNA는 제조업체의 지시에 따라 DNA 분리 키트 (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 수집했으며 농도는 분광 광도계로 측정했다. 게다가, 생존력은 DAPI (Invitrogen, Thermo-Fischer Scientific, USA) 염색으로도 측정되 었다. 살아있는 세포의 수는 도립 형광 현미경 (Leica DMI8, Leica Microsystems, Germany)으로 캡처하고 ImageJ 소프트웨어 (ImageJ v1.8, Bethesda, MD, USA)로 계산했다.
- [0063] 실시예 7: 세포 형태 및 이동 연구
- [0064] 세포를 연구하기 위해 조직 배양 폴리스티렌 플레이트(TCPS)와 PDMS 칩을 모두 사용했다. TCPS 플레이트는 PDMS 세포 배양 플레이트에 대한 대조군으로 사용되었다. 3 계대의 hMSC (1×10^4 / well)를 TCPS 및 PDMS 칩에 시드하 고 48 시간까지 성장할 수 있었다. 배양 48 시간 후, 제조업체가 설명하는 AlexaFluor 488 접합 액틴-그린 시약 (Invitrogen, Thermo-Fischer Scientific, USA)을 사용하여 세포 형태를 평가했다. Nucleus는 DAPI로 염색하고 이미지는 도립 형광 현미경으로 캡처했다. 세포 형태는 각각 filamentous actin (F-actin) 방향으로 표현되었다. 형광 염색을 위해 두 개의 독립적인 실험(n = 2)이 수행되었다. 또한, 24 시간 및 48 시간 후 SEMF 존재 하의 세포 형태도 FE-SEM에 의해 평가되었다. SEM 분석을 위해 세포를 1x PBS로 두 번 세척하고 4 % 파라 포름알데히드에 30 분 동안 고정한 다음 일련의 에탄올 농도 (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % 및 100 %)로 순차 적으로 15 분 동안 그리고 5 분 동안 100 %로 두 번 탈수했다.

- [0065] 이어서 헥사메틸디실라잔 (HDMS, Sigma-Aldrich, USA) 및 에탄올 (Molecular Grade, Merck, Germany)을 사용하여 15 분 동안 50:50 비율로 탈수한 후 100 % HDMS로 10 분 동안 세척했다. 연속 탈수 후, 모든 샘플을 24 시간 동안 냉장 건조하고 백금으로 스퍼터 코팅하고 가속 전압 15.0 kV/cm의 초 고해상도 SEM (UR-SEM, Hitachi-S4800, California, USA)으로 관찰했다. 모든 이미지는 100 및 20 μm 치수로 촬영되었으며 대조군과 비교되었다. 마이그레이션 연구를 위해 hMSC를 입구 챔버에 시드하고 SEMF(1V-1Hz, 3V-1Hz 및 5V-1Hz / 0.1mT)에 72 시간까지 노출했다. 세포 이동은 특정 시간 간격 (24h, 36h, 48h 및 72h)에서 광학 현미경 (AXIO Vert. A1, Zeiss, Germany)으로 캡처되었다. 게다가, SEMF에 의해 유도된 세포 이동은 TCPS 플레이트에서도 평가되었다.
- [0066] 실시예 8: hMSC의 시험 관내 분화
- [0067] hMSC의 시험관 내 분화 가능성은 알리자린 레드-S (ARS) 및 알칼리성 포스파타제 (ALP) 염색 방법에 의해 결정되었다. ARS 염색의 경우, 4 계대의 hMSC (2×10^4 세포)를 입구 챔버에 시드하고 SEMF (1V-1Hz, 3V-1Hz 및 5V-1Hz / 0.1mT)로 4-5 일 동안 처리했다. 이후 골 형성 유도 배지와 함께 세포를 배양하고 14 일 동안 EMF 처리를 수행하였다. 광물화된 결절 형성은 앞서 설명한 바와 같이 ARS 염색에 의해 관찰되었다.
- [0068] 요약하면, 입구 챔버를 1x PBS로 헹구고 4 % 파라포름알데히드로 실온에서 15 분 동안 고정하고 증류수로 세척하고 500 μL 의 40mM 알리자린 레드-S (미국 시그마-알드리치, pH 4.2)로 염색하였다. 마지막으로 세포를 증류수로 세척하고 현미경 (AXIO Vert. A1, Zeiss, Germany)을 사용하여 광물화 이미지를 캡처했다. 대조군의 경우, 세포는 EMF 노출 없이 동일한 조건에서 유지되었다. 이미징 후, 웰을 10 %의 세틸피리 늄 클로라이드 (Sigma-Aldrich, USA) 및 10 nM의 인산 나트륨 (Sigma-Aldrich, USA)을 함유하는 탈염 용액 (pH 7.0)으로 세척했다. 탈색된 액체를 96 웰 플레이트에 보관하고 562 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화했다. 모든 샘플은 삼중화 실험되었고 데이터는 평균 OD \pm 표준 편차로 표시된다. 통계적 유의성은 * $p < 0.05$ 로 간주되었다.
- [0069] ALP 활성을 위해, hMSCs(2×10^4 세포/웰)는 14 일 동안 골 유도 배지에서 배양되었다. 염색 전 세포를 10 % 포르말린(경기도 덕산 화학)에 고정하고 1X PBS로 2 회 헹구고 0.1 % Triton X-100과 함께 5 분간 배양한 후 최종적으로 백혈구 알칼리 포스파타제 키트 (미국 시그마-알드리치)로 제조업체의 프로토콜에 따라 염색하였다. 요약 하면, 5mM 염화 마그네슘 (MgCl_2) 및 탄산나트륨 (Na_2CO_3)을 함유하는 분석 완충액에서 기질로서 p-니트로페닐 포스페이트(pNPP)를 사용하여 세포 용해물의 ALP 활성을 측정했다. 표준 곡선 준비를 위해 샘플을 마이크로 플레이트 리더에 로드하고 405 nm에서 흡광도를 측정했다.
- [0070] 실시예 9: 유전자 발현 및 웨스턴 블롯 분석
- [0071] osteoblast 및 osteoclast 신호 관련 유전자 발현을 조사하기 위해 qRT-PCR 실험을 수행했다. 요약하면, 전체 RNA는 제조업체의 지침에 따라 TRIzol® 시약 (미국 Thermo-Fischer Scientific)으로 추출되었다. RNA 샘플 순도와 농도는 분광 광도계 (Infinite® M Nano 200 Pro; TECAN, Switzerland)로 측정했다. 역전사 효소 (Superscript II RTase; Invitrogen, Gaithersburg, MD) 및 SYBR Green Master Mix (Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하는데 총 RNA 4 μg 을 사용했다. cDNA 합성은 급속 가열-냉각 시스템 (대한 과학(주))을 이용하여 수행하였다. mRNA 발현은 CFX96TM Maestro Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, USA)을 사용하여 qRT-PCR로 정량화되었다. 반응 조건에는 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15 초 동안 43 사이클의 변성 및 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 분 증폭이 포함되었다. 모든 반응은 삼중화되었고 하우스 키핑 유전자 베타-액틴 (β -액틴)으로 정규화되었다. 대조군과 SEMF 처리군 모두에서 유전자 발현 수준을 연구하기 위해 주기 임계 값을 계산하고 ΔCT 방법으로 비교했다. qRT-PCR 분석에 사용되는 특정 프라이머 서열은 표 3에 나열되어 있다. 모든 프라이머는 대한민국 대전에 소재한 바이오니아(주)에서 합성했다.
- [0072] 웨스턴 블롯팅을 위해, 4 계대의 hMSC(1×10^6 세포)를 배양하고, 수확하고, 1mM 페닐메틸설포닐플루오라이드를 함유하는 Pro-Prep 단백질 추출 용액 (대한민국 인트론 바이오 테크놀로지)에 의해 용해시켰다. 단백질 농도는 BSA Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, USA)로 측정되었다. 35mg의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 폴리비닐리덴디플루오라이드 막(GE Healthcare, Chicago, USA)으로 옮겼다. Runx2, OCN, OPN 및 BSP에 대한 1 차 항체는 영국 케임브리지의 Abcam에서 구입했다. 마지막으로, 그 블롯은 양고추냉이 과산화효소(HRP)-접합된 2 차 항체 (Cell Signal Technology, 미국 매사추세츠)를 사용하여 개발되었으며 향상된 화학 발광 키트(GE Healthcare, Chicago, USA)로 시각화되었다. 상대적인 단백질 발현 및 배수 변화는 ImageJ 소프트웨어 (ImageJ v1.8, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 계산되었다. 대조군과 처리군 간의 통계적 유의성을 평가하고 * $p < 0.05$ 로 간주했다.

- [0073] 실시예 10: 시험관 내 Connexin-43 (Conx-43) 및 Osteocalcin (OCN) 발현 :
- [0074] 겹 접합 단백질(Connexin-43) 및 Osteocalcin (OCN) 발현은 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 연구되었다.
- [0075] 요약하면, 세포를 PBS로 2 회 세척하고, 4 % PFA에서 10 분 동안 고정하고, 0.1 % Triton X-100으로 15 분 동안 투과시키고, 실온에서 20 분 동안 1 % BAS로 차단하였다. 다음으로 고정 및 투과 세포를 TRITC가 결합된 Phalloidin, anti-Vinculin (2 차 항체) 및 DAPI가 포함된 Actin Cytoskeleton / Focal Adhesion Staining Kit (Sigma-Aldrich, USA)로 1 시간 동안 처리했다. Conx-43 및 OCN 발현은 모노클로날 마우스 항-인간 Conx-43(1 : 100) (Invitrogen, Thermo-Fischer Scientific, USA) 및 OCN (1 : 500) (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 측정되었다. 마지막으로, 세척 및 염색된 플레이트를 Prolong® Gold Antifade 장착 시약 (Thermo-Fischer Scientific, USA)으로 장착하고 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (LSM 880 Airscan-2, Zeiss, 독일)으로 시각화했다. 음성 대조군은 1 차 항체를 감소시켜 면역 염색 동안 사용되었고, 적어도 두 번의 독립적 염색이 수행되었다(n = 2).
- [0076] 실시예 11: 외인성 칼슘 유도
- [0077] 외인성 칼슘이 조골 세포 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 hMSC를 0mM, 5mM 및 10mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich, USA) 용액을 포함하는 골 형성 유도 배지에서 배양하고 7 일 및 14 일 동안 SEMF에 노출시켰다. 그 후, 앞서 언급한 바와 같이 광물화 효율, 유전자 발현 및 단백질 발현 수준을 분석하였다. 더욱이, CaCl₂가 Ca²⁺ + 칼모듈린 (CaM) 신호 전달에 미치는 영향도 면역세포화학에 의해 평가되었다. 대조군과 처리군 간의 통계적 유의성을 평가하고 * p < 0.05로 간주했다.
- [0078] 실시예 12: 항체 어레이
- [0079] 세크리토 분석을 위해, hMSC의 계대 3을 DMEM 배지에서 배양하고 14 일 동안 SEMF에 노출시켰다. 이 연구에서는 최소 5 회의 독립적인 실험(n = 5)이 수행되었다. 배지에서 가용성 인자를 분리하기 위하여 세포를 PBS로 2 회 세척하고 24 시간 및 48 시간 동안 무 혈청 DMEM 배지로 옮겼다. 특정 처리 후 배양액을 수집하고 Centriprep 필터 장치(Amicon® Ultra-15, 3kDa, Merck, New Jersey, USA)를 사용하여 4000rpm에서 30 분 동안 원심 분리하여 농축했다. 다음으로, 농축된 무 세포 상층액을 수집하여 사용할 때까지 2-4 ° C에서 보관했다. 인간 사이토카인 항체 어레이 및 인간 성장 인자 (HGF)항체 어레이(Raybiotech Inc., Norcross, GA, USA)는 제조업체가 설명하는 프로토콜에 따라 수행되었다.
- [0080] 요약하면, 코팅된 니트로 셀룰로오스 막을 30 분 동안 차단하고, 샘플과 함께 2 시간 동안 배양하고, 세척하고, 비오틴화된 항체 카테일로 2 시간 동안 처리했다. 다음으로, 막을 세척하고 HRP-접합 스트렙타비딘과 함께 실온에서 2 시간 동안 배양하였다. 마지막으로, 막을 세 번 세척하고 특정 검출 용액으로 2 분 동안 처리 한 후 화학 발광 검출 키트(ChemiDoc XRS + System, Bio-Rad Laboratories, USA)로 시각화했다.
- [0081] 실시예 13: 질량 분광분석법 및 생물 정보학 분석
- [0082] hMSCs secretome은 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 비행 시간 질량 분광법(MALDI-TOF / MS)을 사용하여 추가로 분석되었다. 이 연구를 위해 5 개의 독립적인 생물학적 실험(n = 5)이 수행되었다. 분리된 배양 수프를 수집, 환원, 알킬화하였고, 트립신 (Bio-Xtra, Sigma-Aldrich, USA; 2ng / 10 µL 샘플)에 의해 처리했다. 펩티드를 세척하고, 용출하고, 시아노-4-하이드록시신남산의 포화 용액 (CHCA; Sigma-Aldrich, USA)와 혼합하였다. MALDI-TOF/MS는 각각 700-65,000 m/z 분해능 내에서 질량 분광기(Bruker Autoflex TOF/TOF, Bruker, Germany)를 사용하여 수행되었다.
- [0083] 절편화된 질량 스펙트럼은 MASCOT 검색 엔진(MASCOT, Matrix Science, London, UK, [www. .matrixscience.com](http://www.matrixscience.com))을 사용한 펩타이드 질량 지문 (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)에 대해 검색하였다. 검색 매개 변수에는 데이터베이스(NCBIprot), 분류(Homo sapiens) 및 최대 하나의 누락된 절단이 있는 트립신 절단이 포함된다. MASCOT 검색을 위한 default.mgf 파일을 생성하기 위해 해당 강도와 다른 질량 범위(m/z)를 나타내는 원시 데이터가 플롯되었다. STRING (www.string-db.org) 소프트웨어는 단백질-단백질 상호 작용을 연구하는 데 사용되었다. SEMF 유도 골 형성 분화와 관련하여 차별적으로 발현되는 유전자를 분석하고 기능적 관계를 이해하기 위해 막대 히스토그램으로 표시했다. 수정된 Fisher Exact 테스트 및 <0.05의 p- 값 임계 값에 의해 생성된 강화된 GO 항을 선택했다.
- [0084] 상기 실시예의 모든 통계 분석은 Origin Pro 9.0 소프트웨어 (Origin Pro v9.0, Origin Lab Corp., Massachusetts, USA)를 사용하여 대조군과 치료군 간의 유의 한 차이를 결정하기 위해 일원 ANOVA에 의해 수행

되었다. 모든 실험은 생물학적 반복(n = 3)으로 수행되었으며 결과는 평균 ± 표준 편차(SD)로 보고되었다. 통계적 유의성은 * p < 0.05로 간주되었다.

[0085] 상기 실시예의 결과를 하기에 상술한다.

[0086] hMSC의 표현형 특성화 :

[0087] 줄기 세포는 다양한 표면 마커의 존재를 특징으로 한다. 3 번 계대에서 골수 유래 MSC와 관련된 면역 표현형 마커는 그림 10A에 표시된다. 골수에서 추출한 hMSC는 플라스틱 판에 부착할 수 있는 높은 능력을 나타냈다. 부착 세포의 형태는 광학 현미경으로 캡처되었다. 유세포 분석 결과는 CD13+, CD90+ 및 CD146+와 같은 세포 표면 마커가 고도로 발현되고(> 90 %) MSC의 일관된 특성을 보여주고 있음을 보여주었다. 게다가, CD34- 마커의 낮은 발현(~ 10%)도 관찰되었다. CD13+, CD73+, CD44+, CD90+, CD34-, CD146+와 같은 MSC 특이적 표면 마커의 존재는 골수 유래 MSC에서 보고되었다. 골수에서 파생된 hMSC는 심근 세포, 연골 세포, 지방 세포, 뉴런 및 간세포와 같은 광범위한 중배엽 및 비 중배엽성인 표현형으로 분화할 수 있다. 우리의 결과는 MSS 군의 90 % 이상이 CD13, CD90 및 CD146에 대해 양성인 반면 10 % 미만이 CD34에 대해 음성임을 시사했다. 따라서 분리된 MSC는 골수에서 유래된 MSC와 유사하다.

[0088] hMSC의 표현형 정체성을 확인하기 위해 면역 염색이 수행되었다. 요약하면, 계대 3의 세포를 마우스 항-인간 Stro-1 및 CD146 항체 (녹색)와 함께 배양하고 공초점 레이저 스캐닝 현미경(×400)으로 분석했다. 핵은 DAPI (파란색)에 의해 반염색되었다. 특히, 모든 세포는 마커에 양성이었으며 Stro-1+ 및 CD146+ 단백질의 축적은 관찰되었다. CD146+의 축적은 Stro-1+ (<10 %)보다 훨씬 높으며(> 60 %), hMSC의 표현형 특징을 나타낸다(정량 데이터는 도시 않음). Stro-1+는 주로 골수의 혈관 주위 영역에서 발현되며 콜로니 형성 단위 섬유 아세포(CFU-F)와 관련이 있다. 또한 줄기 세포의 다능성의 핵심 조절자이다. Stro-1+-다능성 전구세포 (Stro-1 +MPC)는 향상된 면역 조절 특성, 세포 이동, 향상된 조혈 및 파라크린 인자(예 : IL-2, IL6, TNF-γ)의 분비로 인식되었다. 그러나 CD146+는 주로 세포 주변에 위치하며 전체 인구의 70 % 모두에서 발현된다. 따라서 우리의 결과는 CD13+, CD90+ 및 CD146+가 3 계대 hMSC에서 높게 발현되었음을 시사했다.

[0089] hMSC의 다 계통 분화:

[0090] hMSC의 다 전위 분화 잠재력을 조사하기 위해, 3-4 계대의 세포를 24 웰 플레이트에 시드하고 골 형성, 연골 형성, 지방 형성 및 신경 형성 배지에서 21 일 동안 배양했다. 1 차 배양 5 일 후, 세포를 50 μg/mL L- 아스코르브 산, 10mM β- 글리세로포스페이트 이나트륨 및 100nM 텍사메타손(골 형성), 2 ng/mL 형질 전환 성장 인자-β (TGF-β) (연골 형성); 1 μM 텍사메타손, 0.5mM 인도메타신, 10 μg/mL 인슐린, 10mm 3-이소부틸-1-메틸크산틴 (지방 생성); 2 % 디메틸설폭사이드 (DMSO), 100 μM 포스콜린, 2mm 발프로산, 10mm KCL, 5nM K252a, N2 보충제 (신경 원성)를 포함하는 DMEM 배지로 옮겼다. 다음으로, 세포를 적절한 염색 용액으로 염색하고 도 10C에 나타낸 바와 같이 도립 광학 현미경(×10 및 ×40)으로 시각화하였다.

[0091] 골 형성 배지에서 성장하는 세포는 콜로니를 형성하고 DMEM 배지에서 성장하는 세포와 비교하여 모양이 입방형으로 변했다. 알리자린 레드-S로 염색한 후 광물화된 결절 형성이 관찰되었다. 또한, alcian blue 및 oil Red-O 염색은 연골 형성 및 지방 형성의 지표로서 프로테오글리칸 및 지방 액포의 존재를 확인했다. Cresyl violet으로 염색된 세포는 신경 세포와 유사한 세포와 매우 유사한 원형 또는 타원형 세포 (Nissl body)를 보였으며 이는 신경 발생을 나타낸다.

[0092] hMSC의 다중 분화 잠재력은 치료 응용 분야에서 주요 관심사이다. hMSC는 osteo-, chondo-, adipo- 및 neurogenic 계통으로 분화할 수 있기 때문에; 급성 손상 또는 특정 질병 관리 중에 hMSC를 적용하는 것이 도움이 될 것이다. 그러나 trans-differentiation의 표현형 가소성은 여러 저자에 의해 시간 소모적인 과정으로 보고되었다. hMSC가 뉴런 유사 세포로 분화하는 능력은 성인 뉴런에 비해 수명이 짧다. 우리의 결과는 성인 인간 골수에서 분리된 hMSC의 3 계대가 다른 혈통으로 분화할 수 있음을 시사했다.

[0093] 변경된 대사 활동 :

[0094] 실험 흐름의 개요는 그림 2(A)에 나와 있다. SEMF (1V-1Hz, 3V-1Hz 및 5V-1Hz; 0.1mT)의 존재 하에서 세포 대사 활성은 시간 의존적 방식으로 WST-1 분석에 의해 평가되었다 (그림 2B-D). hMSC의 세포 생존력은 표시된 시간 간격으로 생산된 포르마잔 염료의 상대적 광학 밀도(O.D.)로 표시되었다.

[0095] 특히 대조군(* p < 0.05) 및 다른 처리군(* p < 0.05)과 비교하여 20 분/일 SEMF 처리의 존재에서 증가된 세포 생존력이 관찰되었다. 그러나 대조군과 비교하여 치료군의 생존력에는 유의한 감소(* p < 0.05)가 없었다. 흥미롭

게도, 3V-1Hz (0.1mT/일) SEMF 처리 플레이트는 다른 그룹과 비교하여 최대 생존 세포 수(> 11 %)를 나타냈다. WST-1 데이터를 검증하기 위해 최대 7 일까지 3V-1Hz 처리 그룹에 대해 Live/Dead 염색을 수행했다. 결과는 3V-1Hz (0.1mT) 처리된 그룹이 7 일 배양 후 DAPI+ 세포의 수가 증가함을 나타낸다(그림 2E).

[0096] 또한 SEMF 노출 하의 DNA 농도도 DNA 분리/정량 키트로 평가했다. 증가된 SEMF 노출(3V-1Hz 및 5V-1Hz)이 세포 대사를 변경하는 것으로 나타났다(그림 2F). 따라서 3V-1Hz(20분/일) 노출이 hMSCs 증식을 위한 최적 노출 조건으로 제안되었다. 자극 반응 분화는 조직 공학에 대한 새로운 접근 방식이다. 따라서 살아있는 세포나 조직에 대한 특정 전기장, 자기장 또는 전자기장의 영향을 평가하는 것이 중요하다. 우리의 결과는 낮은 전압 주파수 SEMF가 시험관 내 PDMS 칩에서 세포 증식을 향상시킬 수 있음을 시사했다.

[0097] PDMS 칩은 hMSC의 부착을 촉진

[0098] 네이티브 ECM에 대한 세포의 접착은 세포 증식과 분화를 조절하는 핵심 요소 중 하나이다. 따라서 네이티브 ECM의 변형은 세포의 접착과 증식에 큰 영향을 미친다. 여기에서 두 TCPS 및 PDMS에서 hMSC의 접착 특성을 평가했다. hMSC의 형태는 공초점 레이저 현미경 (CLSM)으로 평가되었다. TCPS 및 PDMS에서 성장하는 세포의 위상차 이미지는 형태에 큰 변화가 없다. TCPS와 PDMS 모두에서 성장하는 세포는 건강 해 보였고 PDMS 플레이트에서 부착된 세포의 수가 증가한 것을 제외하고는 매트릭스에 적절하게 부착되어 PDMS의 생물 공학에 대한 생체 적합성을 나타낸다. 또한, CLSM 연구는 PDMS 플레이트에서 F-액틴 필라멘트의 적절한 정렬을 밝혀 냈고, 조직 공학 응용 분야에서 PDMS의 생체 적합성을 추가로 확인했다. 또한, 72 시간 배양 후 FE-SEM에 의해 SEMF(1V-1Hz, 3V-1Hz 및 5V-1Hz; 0.1mT)의 존재 하에서 배양된 세포의 형태를 조사했다. SEM 현미경 사진은 대조군 (a1-a3) 및 다른 실험군 (d1-d3)과 비교하여 3V-1Hz SEMF 처리(c1-c3) 후 세포 질량의 증가를 나타냈다. 이 연구는 저전압 주파수 SEMF (3V-1Hz, 0.1mT; 20 분/일)가 세포 형태를 바꾸지 않는다고 규정한다. 대신 PDMS 칩에 배양할 때 세포 질량을 증가시킨다.

[0099] 사인과 EMF는 인 비트로에서 이동 가능성을 유도

[0100] 조골 세포 이동은 골 형성에 중요한 요소 중 하나이다. hMSC는 조골 세포 형성에 중요한 전구 세포이다. 골절 또는 부상 동안 골아 세포 집단은 염증 또는 골절 부위로 이동한다. 따라서 치료 적용을 위한 hMSC의 이동 잠재력을 이해하는 것이 필수적이다. hMSC의 이동 잠재력은 20 분/일에 3V-1Hz SEMF를 도입하여 유도되었다. 36 시간 배양 후, 세포는 PDMS 칩의 마이크로 채널을 통해 이동할 수 있었다. 그러나 세포는 유도 후 72 시간 이내에 입구 챔버에서 상호 연결 챔버로 완전히 이동하여 전자기장이 있을 때 세포가 매우 잘 이동할 수 있음을 시사한다(도 11C, b4). SEM 이미지는 또한 채널의 끝 또는 시작 지점 또는 그 근처에서 축적 된 세포를 나타냈다(도 11D). 결과는 3V-1Hz EMF 처리가 칩의 마이크로 채널을 통해 세포를 이동하기에 충분하다는 것을 나타낸다.

[0101] SEMF로 전처리된 hMSC는 시험관 내 분화 잠재력을 강화

[0102] 뼈는 골아세포, 뼈 내막 세포, 골 세포, 파골 세포의 네 가지 유형의 세포를 나타내는 광물화된 조직이다. 골아 세포와 파골 세포는 성숙한 뼈 형성에 대한 미네랄 재흡수에 중요한 역할을 한다. 반면에 골 세포는 조골 세포와 파골 세포 사이에서 기계 센서 역할을 한다. 인과 칼슘은 생체 광물화 과정을 촉진할 수 있는 뼈 세포의 두 가지 핵심 미네랄 성분이다. 뼈 재 형성은 칼슘 항상성을 유지하기 위해 골절 치유 및 급성 염증에 필수적이다. 부적절한 뼈 흡수 또는 미네랄 결핍은 심각한 질병을 초래한다. 그러나 과도한 재흡수와 골 발달 장애는 골밀도의 손실과 골다공증으로 이어질 수 있다. 따라서 새로운 뼈 형성과 재 흡수 사이의 일정한 균형은 뼈 재 형성에 중요하다. hMSC는 조골 세포 분화의 모 전구 세포이다. 이 발명에서 우리는 PDMS 칩에서 hMSC의 SEMF 유도 골 형성 분화를 평가했다. SEMF(1V-1Hz, 3V-1Hz, 5V-1Hz; 0.1mT, 20 분/일) 전처리된 세포를 50 µg/mL L- 아스코르브 산, 10mM β- 글리세로 포스페이트 이 나트륨 및 100nM dexamethasone을 포함하는 유도 배지에서 배양했고, 21 일 동안 배양하였다. 자극없는 hMSC를 대조군으로 간주하였다.

[0103] 21 일 후, 분화 잠재력은 알리자린 Rad-S(ARS) 염색에 의해 조사되었으며 해당 광학 이미지가 있는 플레이트는 그림 12(a1-d4)에 제공된다. 초기 분화 가능성을 조사하기 위해 그림 12A (c1-c4)에 표시된 대로 알칼리성 포스파타제(ALP) 염색을 수행했다. 특히, 대조군에 비해 골 형성 향상이 유의하게 증가하였다(* p < 0.05). 유사하게, 광물화 효율은 골 유도 21 일 후에도 대조군(* p < 0.05)에 비해 3V 처리 그룹에서 더 높은 것으로 나타났다(* p < 0.05) (그림 12B).

[0104] ALP는 일반적으로 광물화의 초기 지표로 인식된다. 처리된 세포의 상대적 ALP 활성은 0.09 ± 1 (대조군), 0.13 ± 1 (1V-1Hz), 0.16 ± 1 (3V-1Hz) 및 0.15로 제공됩니다. ± 1 (5V-1Hz), 각각 (그림 12C)에 나타났다. 흥미롭게도 3V 처리 된 세포의 ALP 활성은 대조군(* p < 0.05)보다 유의하게 높았다 (* p < 0.05). 두 그룹의 해당 양

성 염색 영역을 분석하고 유사한 패턴이 그림 12A (c1-c4)에서 관찰되었습니다. 종합하면, 우리의 결과는 20 분 / 일에서 3V-1Hz (0.1mT) 처리가 PDMS 칩에서 배양된 hMSC의 골 형성 잠재력을 향상시킬 수 있음을 시사했다.

[0105] SEMF 처리는 골 형성 관련 전사 인자의 발현을 높힌

[0106] 골화는 골아 세포로 알려진 특수 세포에 의해 수행되는 복잡한 과정이다. 이 과정의 기능 장애는 뼈의 부적절하거나 과도한 광물화 또는 이소성 석회화로 이어질 수 있다. 석회화 및 석회화 제거는 뼈의 무기질 항상성을 유지하는 중요한 과정 중 하나이다. 따라서 마이크로스케일 플랫폼에서 골아 세포 생물학에 대한 적절한 이해는 골다공증, 골 형성 불완전성 및 기타 여러 질병과 같은 여러 질병을 치료하는 데 도움이 될 수 있다. 골아 세포-골 세포 발달에 중요한 조절 분자는 주로 런트 관련 전사 인자 x2 (RUNX-2), 알칼리성 인산 가수 분해 효소 (ALP), osterix (OSX), 뼈 시알로단백질 (BSP), Osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), 콜라겐 1 형 (COL-1) 및 기타 여러 전사인자이다. OSX는 RUNX-2 전사 인자의 보조 인자 역할을 한다. 저전압 주파수 SEMF가 조골 세포-골 세포 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 qRT-PCR 분석을 수행했다 (그림 3). 3 세대 세포의 합류 통로는 골 형성 유도 배지의 존재 하에서 최대 14 일까지 SEMF에 의해 유도되었고 상대적 mRNA 발현 수준은 ΔCT 방법으로 계산되었다. 1V-1Hz (0.1mT, 20 분/일) 처리된 샘플에서 RUNX2, ALP, OSX, BSP, OCN, OPN 전사 인자의 유의한 증가 (* $p < 0.05$)가 없었다 (그림 3A). 그러나, COL1의 발현(0.5 배)은 도 3B에 나타난 바와 같이 처리 후 14 일 후에 유의하게 증가(* $p < 0.05$)하였다.

[0107] 특히, ALP (1.0 배)와 OCN (2.8 배)의 유전자 발현은 3V-1Hz (0.1mT, 20분 / 일) 자극에서 대조군 샘플에 비해 유의하게 더 높은 것으로 나타났다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)(그림 3C-D). 또한 비자극 세포와 비교하여 1.5 (RUNX2), 0.5 (OSX), 0.5 (BSP), 0.5 (OPN), 및 2.0 (COL1)-배의 증가가 관찰되었다(* $p < 0.05$).

[0108] 5V-1Hz (0.1mT, 20 분/일) 처리된 샘플에서 OSX 발현의 현저한 감소가 관찰되었습니다.

[0109] 조골 세포 발달 중 신호 메커니즘을 이해하기 위해 그림 3G-H에 표시된 대로 핵 인자 카파- β (NF- κ B) 및 수용체 관련 NF- κ B 리간드(RANKL)의 유전자 발현 프로파일을 분석했다. 흥미롭게도 NF- κ B (1.0 배) 및 RANKL (1.5 배)의 발현은 3V-1Hz 처리에서 대조군 샘플(그림 3G)에 비해 현저하게 증가했다(* $p < 0.05$). qRT-PCR 산물은 또한 아가로스 겔 전기 영동으로 분석되었다(그림 3H). 이들 두 전사 인자의 상승된 수준은 저주파 SEMF가 NF- κ B-RANKL 신호에 의해 조골 세포 성숙을 유도할 수 있음을 나타낸다.

[0110] 또한 대조군 및 SEMF 유도 샘플 모두에서 유전자 발현을 검증하기 위해 웨스턴 블롯팅으로 단백질 발현을 연구했으며 그림 3I에 나와 있다. 상대적인 단백질 발현은 β -액틴으로 정규화되었고, 블롯은 ImageJ 소프트웨어로 분석되었다. SEMF 유도 14 일 후 대조군 샘플에 비해 OCN(5.2 배) 및 OPN(4 배)의 발현이 유의하게 더 높았다(** $p < 0.01$) (그림 13). 또한 RUNX2의 단백질 발현 (2.0 배)도 유의하게 증가 (* $p < 0.05$)하여 저주파 SEMF 노출시 RUNX2 유전자 발현이 지속적으로 유지되었음을 나타낸다. BSP에 대한 단백질 발현의 상대적 배 변화는 2.0으로 계산되었다. 우리의 결과는 3V-1Hz (0.1mT) SEMF를 하루 20 분에 처리하면 시험관 내에서 RUNX2 및 OCN의 초기 전사를 유도할 수 있음을 시사한다.

[0111] ERK-1/2 및 SAPK는 갭 접합 단백질을 통한 골 유도 동안 촉발됨

[0112] Connexin-43 (Conx-43)은 지금까지 보고된 잘 알려진 갭 접합 단백질 중 하나이다. 특정 자극이 있는 경우 인접 세포의 Conx-43은 활성 이온 전달을 촉진하여 과도한 이온 누출로 인한 세포 손상을 제공한다. Conx-43 및 OCN 발현에 대한 사인파 EMF의 효과를 조사하기 위해 공 초점 레이저 스캐닝 현미경법을 수행했다. 그림 4A는 정적 조건(1a-1d), 1V-20분/일(2a-2d), 3V-20분/일 (3a-3d) 및 5V-20 분/일 (4a-4d)에서 7 일 동안 배양 된 SEMF 자극 hMSC의 대표적인 공 초점 이미지를 보여준다. 세포핵, 세포 골격 및 갭 접합 단백질은 DAPI (1a-4a), phalloidin (1b-4b) 및 connexin-43 (1c-1c)에 해당하는 병합 이미지 (1d-4d)로 염색되었다.

[0113] 형광 강도는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정되었다. Conx-43은 3V-1Hz (0.1mT, 20 분/일) 처리 그룹에서 더 강렬한 색상을 나타냈다(그림 4A, 3d). Conx-43-양성 세포의 수는 대조군 샘플에 비해 3V 처리 그룹에서 유의하게 증가했다(* $p < 0.05$) (* $p < 0.05$) (그림 4C). 각 이미지의 흰색 화살촉은 Conx-43 양성 부위를 나타낸다. 우리의 결과는 저주파 SEMF가 갭 접합 단백질 발현을 유도하여 광물화를 촉진할 수 있음을 보여주었다. OCN의 표현은 또한 그림 4B에 표시된다. 세포핵 (DAPI), OCN 및 세포 골격 (팔로이딘)에 대한 형광 염색은 자극되지 않은 조건 (1a-1d), 1V-1Hz (2a-2d), 3V-1Hz (3a-3d) 및 5V-1Hz (4a-4d) SEMF 처리 그룹각각에서 배양된 hMSC에서 양성 반응 부위를 나타냈다. 형광 강도의 증가는 세포에서 OCN의 더 높은 발현을 나타내는 3V-1Hz (0.1mT, 20 분/일) 처리 그룹에서 관찰되었다(그림 4D). OPN 발현 중에 유사한 경향이 발견되었다(그림 14).

[0114] 우리는 공 초점 현미경으로 7 일 후 SEMF 처리 후 OCN/OPN 단백질 발현 동안 ERK1/2 및 SAPK 신호 단백질의 발

현을 연구했으며 그림 4E에 표시된다. SEMF 처리 (3V-1Hz, 0.1mT; 20 분/일) 세포는 SEMF 유도 골 형성 동안 처리되지 않은 세포에 비해 ERK1/2 및 SAPK의 더 강한 신호를 나타냄이 관찰되었다. ERK1/2 및 SAPK에 대한 처리된 그룹과 처리되지 않은 그룹 모두의 평균 형광 강도(* p <0.05)는 각각 28 ± 2 , 24 ± 2 , 21 ± 2 및 19.8 ± 2 로 계산되었다. 따라서 OCN/OPN 발현 중에 ERK-1/2 및 SAPK 단백질을 모두 공동 발현하는 경향이 있을 수 있으며 외부 EMF에 의해 자극되는 Connexin-43과 같은 갭 접합 단백질에 의해 유발되는 것으로 생각된다.

[0115] 칼슘 처리는 Calmodulin (CaM) 단백질을 상향 조절하여 골 유도를 촉진

[0116] 우리는 hMSC의 조골 세포 분화에 대한 Ca^{2+} -SEMF의 시너지 효과를 평가했다. Ca^{2+} -SEMF의 존재 하에서 OCN 및 CaM의 상대적 발현은 면역 형광 염색 (n = 2)에 의해 평가되었으며 그림 5에 나와있다. 특히 3V-1Hz (0.1mT) 동안 OCN 및 CaM 단백질의 향상된 발현이 대조군 또는 다른 치료군과 비교하여 하루 20 분 노출시 SEMF 처리 동안 관찰되었다. 녹색 스팟은 CaM 단백질의 발현을 나타내는 막 또는 그 근처에서 관찰되었다. 더욱이, 대사 활성 및 분화 가능성은 그림 S8에 표시된 바와 같이 Ca^{2+} -SEMF의 존재 하에서 결정되었다. 골 형성 유도 배지는 0mM, 5mM 및 10mM CaCl₂(w/v)가 보충된 본 연구에 사용되었다. 시너지 효과를 조사하기 위해 CaCl₂ 처리된 세포를 7 일과 14 일 동안 SEMF(3V-1Hz; 0.1mT, 20 분/일)에 노출시켰다. hMSC의 증식 및 분화에 상당한 증가(* p <0.05)가 있었고, 10mM CaCl₂는 배양 14 일 후 광물화를 향상시켰다(그림 15A-D). 마찬가지로 10mM CaCl₂ 처리된 세포에서도 ALP의 강렬한 색상이 관찰되었다. ALP 활성은 대조군 샘플과 비교하여 각각 1.0 배 증가했다(그림 15C).

[0117] 흥미롭게도, CaCl₂ 농도 (0mM-10mM) 중 어느 것도 세포 대사 및 형태를 변경하는 것으로 밝혀지지 않았다. 대조군과 CaCl₂ 유도 세포는 모두 매우 규칙적인 F- 액틴 배열을 나타냈다(그림 15E). 이러한 결과는 CaCl₂의 외인성 적용이 신진 대사 및 형태를 변경하지 않고 hMSC의 무기화 가능성을 유도했음을 나타낸다. 또한 세포 외 Ca^{2+} 존재 하에서 유전자 발현 프로파일을 조사하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다. qRT-PCR 분석은 처리된 샘플과 처리되지 않은 샘플 모두에서 골 형성 유전자 발현의 향상을 보여 주었다. 그러나, 상승된 세포 외 Ca^{2+} (10mM CaCl₂)로 분화 배지를 일시적으로 보충하면 OCN 및 COL1의 mRNA 발현이 강조되었다(그림 15F). 더욱이, ALP 유전자 발현의 현저한 감소는 없었으며, 이는 또한 Ca^{2+} -SEMF가 OCN의 발현을 향상시켰음을 나타낸다. 이러한 결과는 CaCl₂에 의한 분화 매체를 일시적으로 보충하면 Ca^{2+} /CaM 결합을 촉진하고 OCN, COL1 전사 인자의 발현을 상승시켜 골아 세포 분화를 유발할 수 있음을 나타낸다.

[0118] 종합하면, 우리의 결과는 칼슘 유도가 저전압 주파수 SEMF (3V-1Hz, 0.1mT; 20 분/일)의 존재 하에서 hMSCs의 온칩 조골 세포 분화와 OCN 및 CaM 단백질의 높은 축적을 긍정적으로 유발한다고 제안한다.

[0119] 증가된 사이토카인 및 성장 인자의 분비

[0120] SEMF로 유도된 hMSC의 분비를 조사하기 위해 hMSC를 골 유도 배지에서 배양하고 SEMF(3V-1Hz, 0.1mT, 20 분/일)로 14 일 동안 자극했다. 그 후 분비된 가용성 단백질은 Raybiotech Human Cytokine Antibody Array 및 Human Growth Factor Array Kit에 의해 확인되었다. 염증성 사이토카인 및 케모카인의 발현 프로파일은 기아 후 48 시간 후에 대조군 샘플(* p <0.05)과 비교하여 유의하게 더 높았다(* p <0.05) (도 16A-C). 단백질 스팟은 항체 어레이 지도에 따라 확인되었으며 표 1에 나열되어 있다. 24 시간 기아 후 IL-6 발현에서 초기 감소 (* p <0.05)가 있었다. 그러나 48 시간 기아 샘플에서 즉각적인 증가 (1.0 배)가 확인되었다(그림 S9A). 이 결과는 장기간의 기아가 무 혈청 배지에서 IL-6의 축적을 초래 함을 나타낸다. 유사하게, MCP-1 (1.0 배), MCP-2 (2.0 배), HGF (0.5 배)의 발현이 대조군 샘플 (* p <0.05)보다 더 높았다 (* p <0.05) (그림 16B-D). 다른 요인은 화학 발광에 의해 검출되지 않았다.

[0121] 우리의 결과는 차등적으로 발현된 사이토 카인 (IL-6), 케모카인(MCP) 및 성장 인자 (HGF)가 사인곡선적 SEMF 자극 동안 뼈 발달에 기여할 수 있음을 시사했다(그림 16E).

[0122] 또한, 우리는 또한 자극된 hMSC에서 수집된 세크리토미가 그림 17(A)에 표시된대로 세포를 탈분화하고 광물화 잠재력을 유도할 수 있는 잠재력을 가지고 있음을 입증했다. 세크리토미 추출물의 10 %가 미네랄 유도에 충분하다는 것이 관찰되었으며 (그림 17B), 분비된 단백질이 자가 분비 및 파라크린 신호에 의한 분화를 조절함을 시사한다.

[0123] SEMF 유도 하에서 hMSCs secretome을 프로파일링하면 골 형성 관련 단백질 및 유전자가 밝혀짐

[0124] 질량 분석 데이터를 기반으로 MASCOT-PMF 검색을 수행하여 분비된 단백질 (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)을 식별하고 단백질은 표 2에 표시된대로 질량 범위 비율 및 유의성 값 (p- 값 0.05 미만)에 따라 선택된다. 다음 단계는 PDMS 칩에서 자극된 hMSC 후 2 주 동안 48 시간 기

아 상태에 있는 동안 단백질 발현의 정량적 차이를 평가하는 것이 목표였다. hMSC는 분화 과정에서 다양한 사이토카인과 성장 인자를 분비하며, 이는 치료 효율과 직접적으로 관련이 있다. 확인된 모든 단백질에 대한 통계적 분석을 통해 총 6 개의 단백질이 세크리토솜에서 자극되지 않은 hMSC와 비교하여 자극된 hMSC에서 과발현된 것으로 나타났다(p-값 <0.05, 1 % 순열 기반 거짓 발견 비율에서 컷오프).

[0125] 전체적으로, 23 개의 확인된 단백질은 PPI 농축 p-값을 기반으로 유도 48 시간 동안 상향 조절되거나 하향 조절된다. 표 2에 나열된 모든 단백질은 'Swissport' 또는 'Uniport' 또는 'Gene Ontology (GO)'의 주석에 따라 또는 수동 데이터 마이닝에서 잠재적으로 분비되거나 분비 소포에 포함될 것으로 예측된다. SEMF 자극 hMSC에서 상향 조절된 단백질의 36 % 또는 50 %는 각각 '면역 반응' 또는 '세포 외 기질 기능'에 관여한다. 그림 6A는 STRING 소프트웨어에 의해 예측된 면역과 ECM 단백질 사이의 단백질-단백질 상호 작용 네트워크를 묘사한다. 상호 작용 지도는 여러 ECM 단백질 (COL1A2, COL5A2, COL11A1, COL21A1 및 COL4A1), 성장 인자 또는 사이토카인 (IL-6, CCL2, CCL8, IGFBP4 및 IGFBP6)이 48 시간 기아 후 hMSC-세크레토솜에서 상향 조절되는 것으로 나타났다. 그러나 세포 외 스트레스 또는 막 수송과 관련된 몇 가지 단백질 (RBBP7, MED1, CD68, PGRMC2 및 TMEM14B)이 자극 중에 상향 조절되어 이러한 신호 전달 단백질이 주로 hMSC의 전자기장 유도 중에 발현됨을 시사한다. 유전자 온톨로지 (GO)는 그림 6B에 간략하게 표시되었다.

표 1

[0126]

Name	Nature	Full identity	Spot intensity	NCBI Accession No. [§]
IL-6	Inflammatory cytokine	Interleukin 6	1.84	NM_000600
MCP-1	Chemokine	Monocyte chemoattractant protein 1 (CCL2)	150	NM_002982
MCP-2	Chemokine	Monocyte chemoattractant protein 2 (CCL8)	1442	NM_005623
HGF	Growth factor	Hepatocyte growth factor	74	NC_000007

[0127] 표 1은 Raybiotech Antibody Array에 의해 hMSC 세크리토솜에서 확인된 사이토카인 및 성장 인자 목록

[0128] [§] NCBI Database Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

표 2

[0129]

Swissport /Uniport ID	Entry	Name	Monoisotopic mass (M _r)	pI	Coverage	Biological Significance
P02462	COL4A1	Human collagen α-1(IV) chain	160510	8.55	66%	Extracellular matrix function, growth factor binding
A1L0T0	ILVBL	Acetolactate synthase-like protein	67825	8.43	64%	Transferase activity, protein co-factor
Q96P44	COL21A1	Human collagen α-1(XI) chain	110485	6.81	62%	Extracellular matrix function
P08123	COL1A2	Human collagen α-2 (I) chain	129235	9.18	57%	Extracellular matrix function, growth factor binding
O14787	TNPO2	Transportin-2	100343	4.85	57%	Protein transport to nucleus
P05997	COL5A2	Human collagen α-2 (V) chain	144821	6.08	51%	Extracellular matrix function
Q13950	RUNX2	Runt-related transcription factor 2 isoform	11508	6.41	51%	Osteoblastic differentiation and skeletal morphogenesis
P22692	IGFBP4	Insulin like growth factor-binding protein 4	27900	6.81	49%	Immune response, regulation of cell growth
P12107	COL11A1	Human collagen α-1(XI) chain	180954	5.06	46%	Extracellular matrix function

P09012	SNRPA	U1 small nuclear ribonucleoprotein	31259	9.83	46%	mRNA splicing, protein binding
Q9NUH8	TMEM14B	Transmembrane protein 14B	12070	9.57	42%	Developmental protein
P34810	CD68	Macrosialin/CD68 antigen	37385	9.10	32%	Autocrine signaling, extracellular stress, inflammatory response
P80075	CCL8	C-C motif chemokine 8	46162	6.87	33%	Calcium ion transport, signaling, inflammatory response
Q9H8M7	FAM188A	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY3	49693	4.69	30%	Apoptosis
O15173	PGRMC2	Membrane-associated progesterone receptor component 2	23804	4.76	29%	Lipid binding
P13500	CCL2	C-C chemokine receptor CCR2	40974	5.11	28%	Chemokine activity, inflammatory response
Q9C0J1	UBNX4	UBX domain-containing protein-4	56743	6.10	28%	Protein folding and modification
Q96GM1	LPFR2	Phospholipid phosphatase-related protein type-2	36856	9.64	24%	Signal transduction
Q9H8M7	ZIC5	Zinc finger protein ZIC 5	68404	9.01	22%	Cell differentiation
P24592	IGFBP6	Insulin like growth factor-binding protein 6	25316	8.15	20%	Growth promoting, metabolism
Q16576	RBBP7	Histone-binding protein RBBP7	47790	4.89	12%	Stress response, signal transduction
Q15648	MED1	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1	168373	8.88	7%	Cell differentiation, ERK1/2 signaling, cell proliferation

[0130] 표 2는 질량 분광법에 의해 hMSC 세크리토스에서 확인된 23 개의 차별적으로 분비된 단백질 목록.

표 3

[0131]

Gene	Sequences (5' to 3')
베타-actin	5'-GCGCAAGTACTCTGTGTGGA-3' 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'
RUNX2	5'-GGACATGCAGTACGAGCTGA-3' 5'-GCAGTGAAGGGCTTCTTGTC-3'
ALP	5'-GGACATGCAGTACGAGCTGA-3' 5'-GCAGTGAAGGGCTTCTTGTC-3'
OSX	5'-TGCTTGAGGAGGAAGTTCAC -3' 5'-AGGTCAGTCCACAGAGTA -3'
BSP	5'-CAACAGCACAGAGGVAGAAA-3' 5'-CGTACTCCCCCTCGTATTCA-3'
OCN	5'-GTGCAGAGTCCAGCAAAGGT-3' 5'-TCAGCCAACTCGTCACAGTC-3'
COL1	5'-CTGACCTTCTGCGCCTGATGTCC-3' 5'-GTCTGGGGCACCACGTCCAAGGG-3'
NF-kB	5'-GCAAAGGGAACATTCGATAT-3' 5'-GCGACATCATGGAAATCTA-3'
RANKL	5'-CGTTGGATCACAGCACATCAG-3' 5'-GCTCCTCTGGCCAGATCTAAC-3'

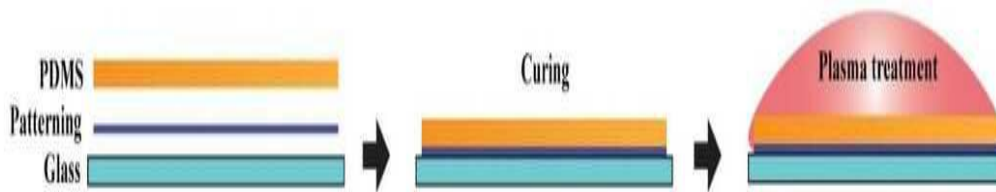
[0132] 표 3은 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)에 사용된 프라이머 서열.

[0133] 약어: 베타-actin; cytoskeletal actin type-베타; *RUNX2*; runt-related transcription factor-2; *ALP*; alkaline phosphatase; *OSX*; osterix; *BSP*; bone sialoprotein; *OCN*; Osteocalcin; *COL1*; collagen type-1; *NF-κB*; nuclear factor Kappa-B; *RANKL*; receptor activator nuclear factor Kappa-B ligand.

도면

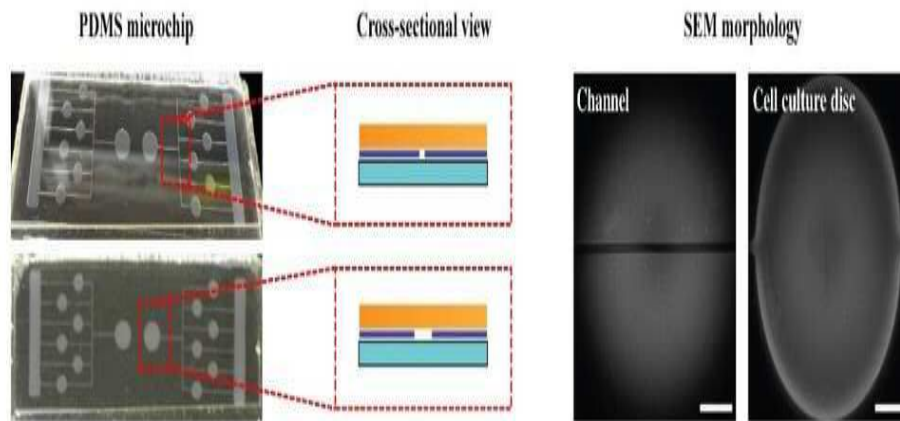
도면1a

(a) Microchip fabrication



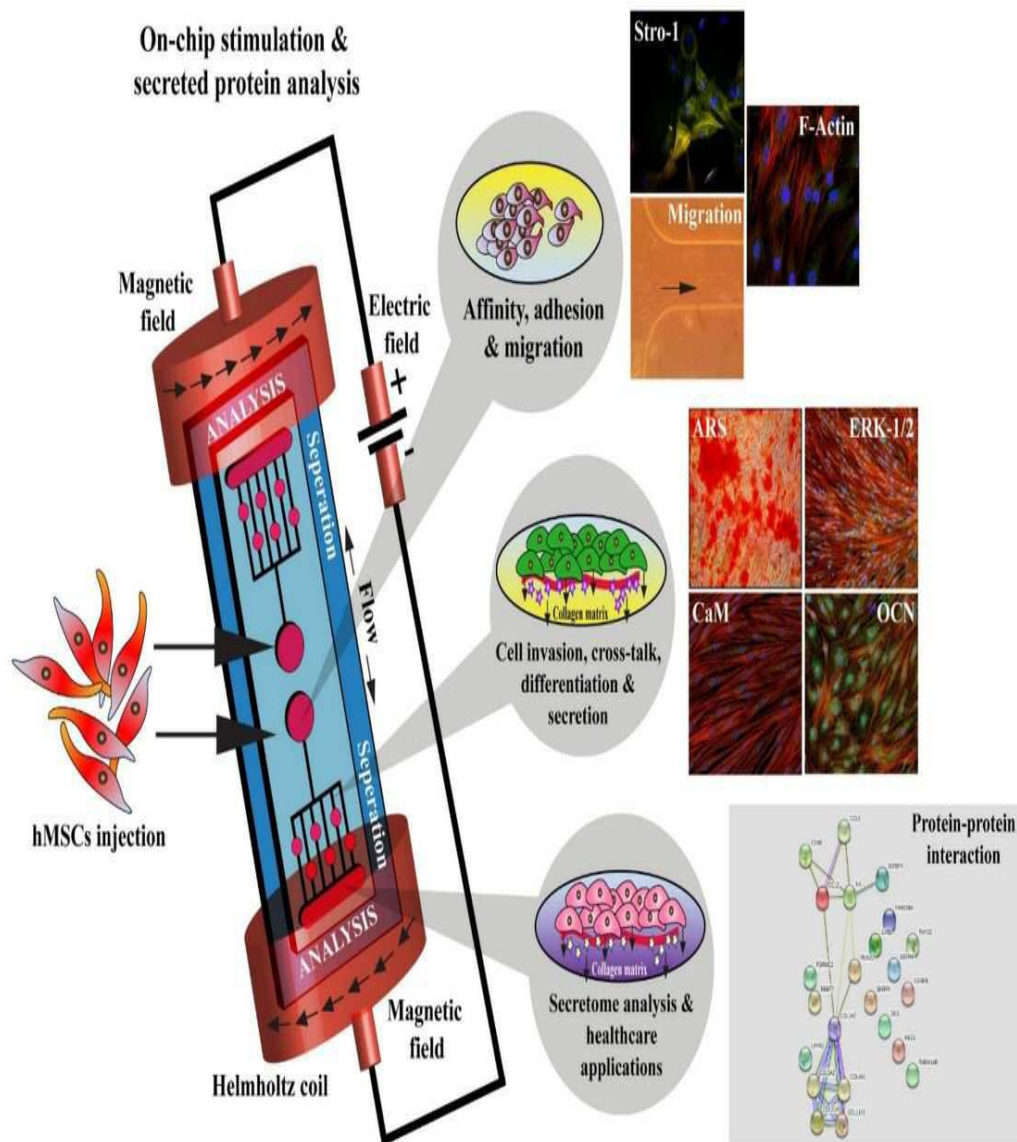
도면1b

(b) Microchip structure

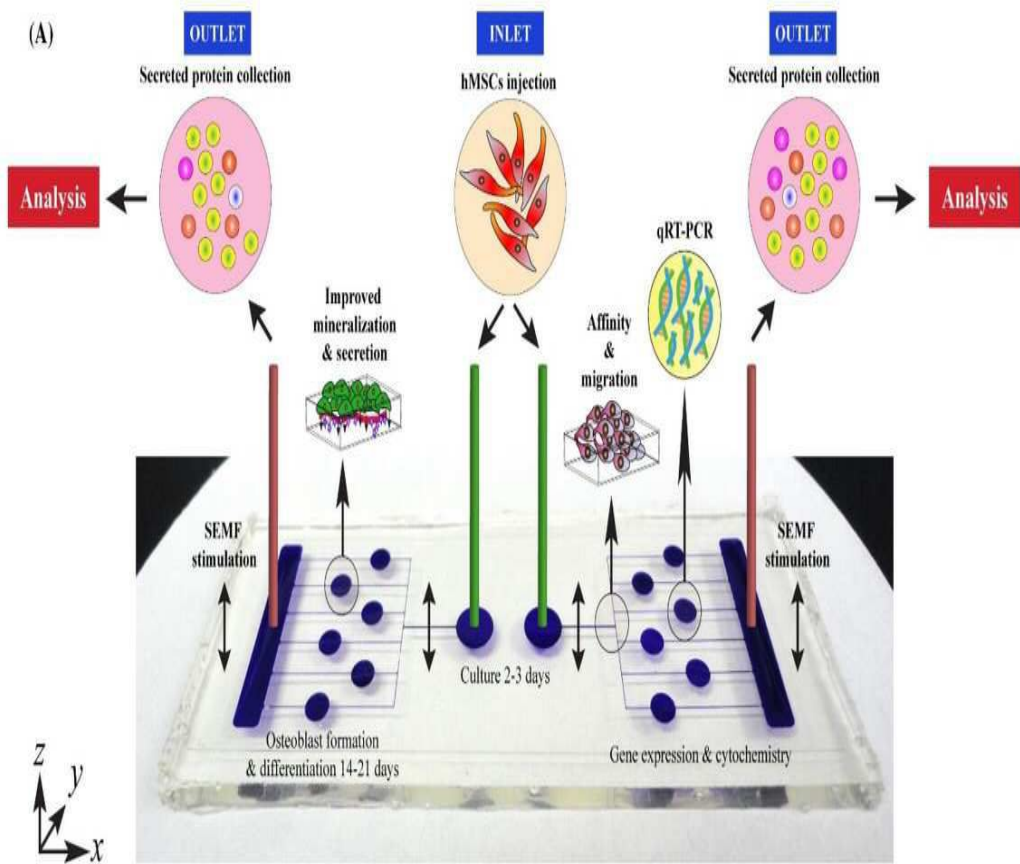


도면1c

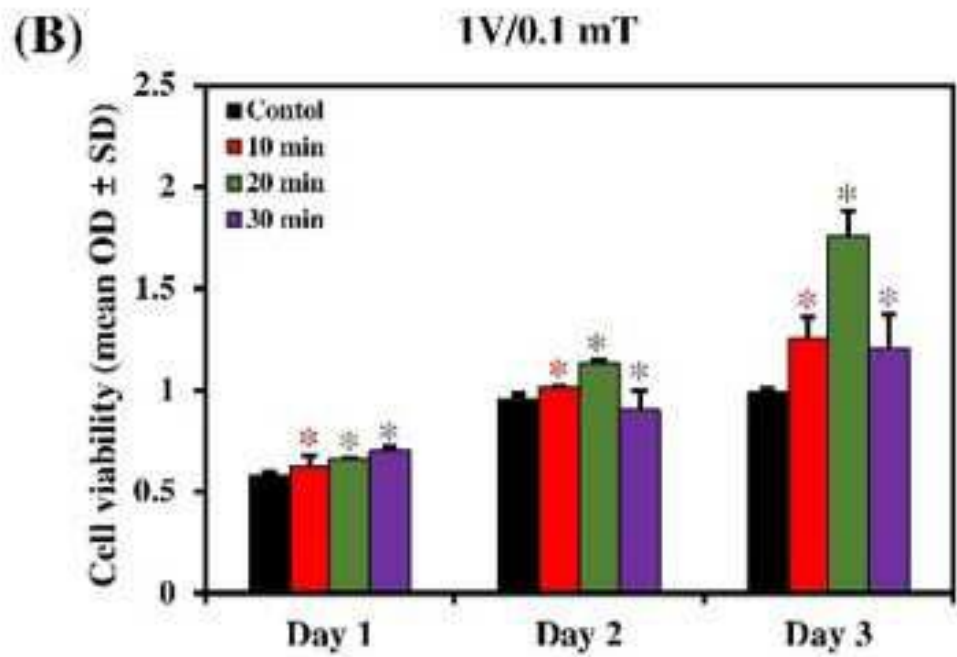
(c) Application



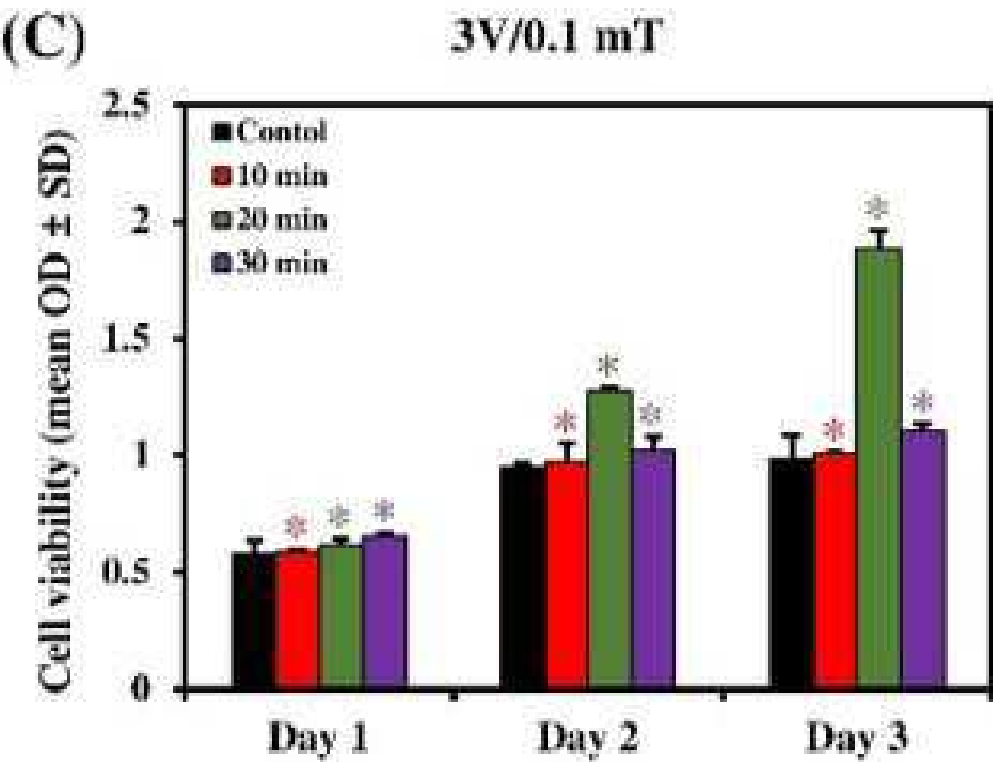
도면2a



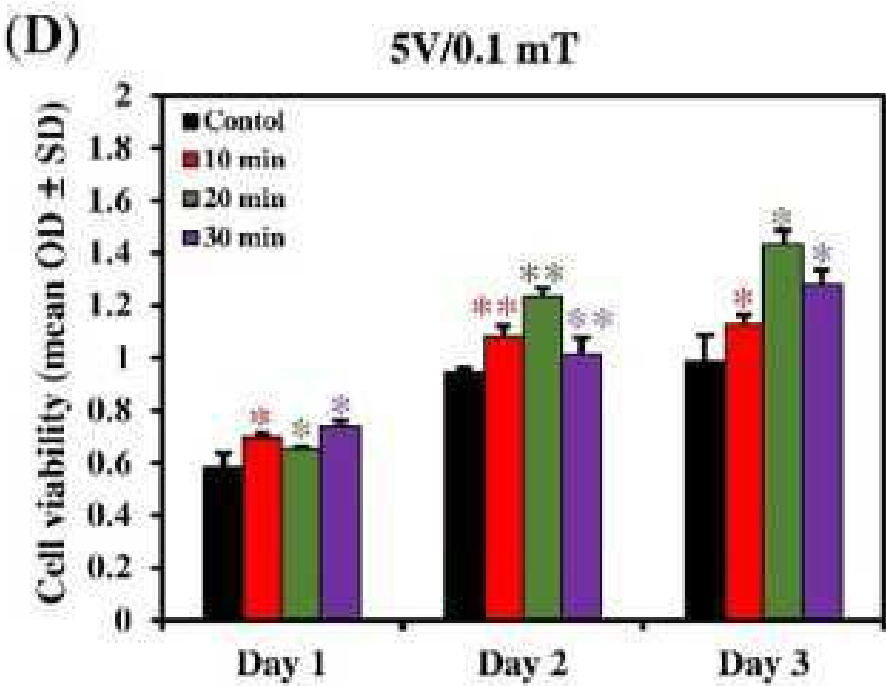
도면2b



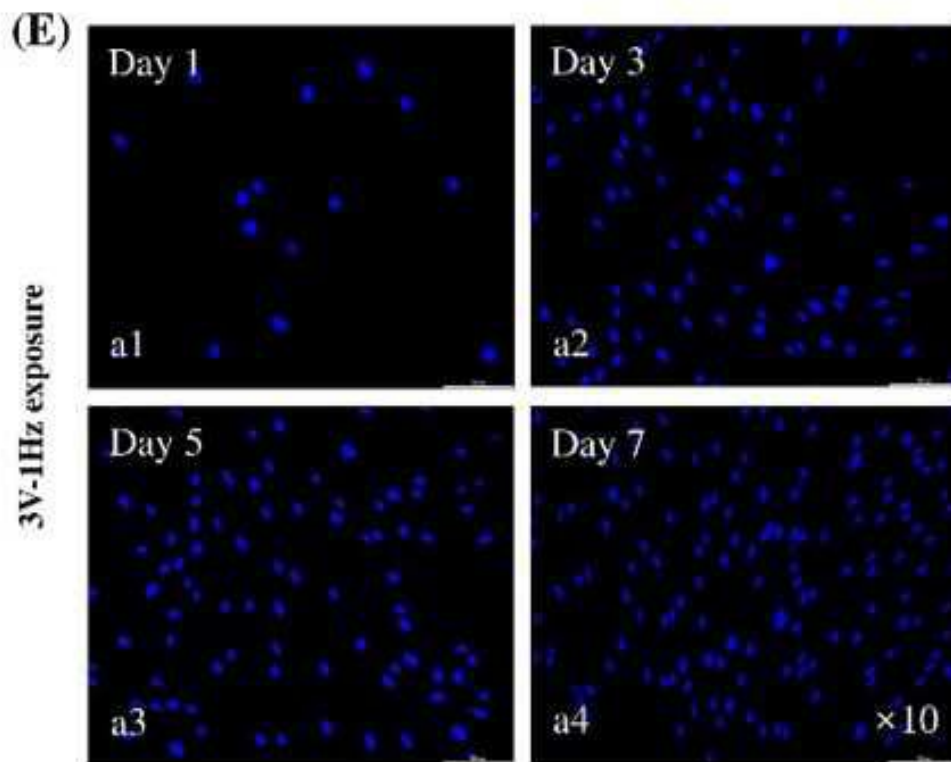
도면2c



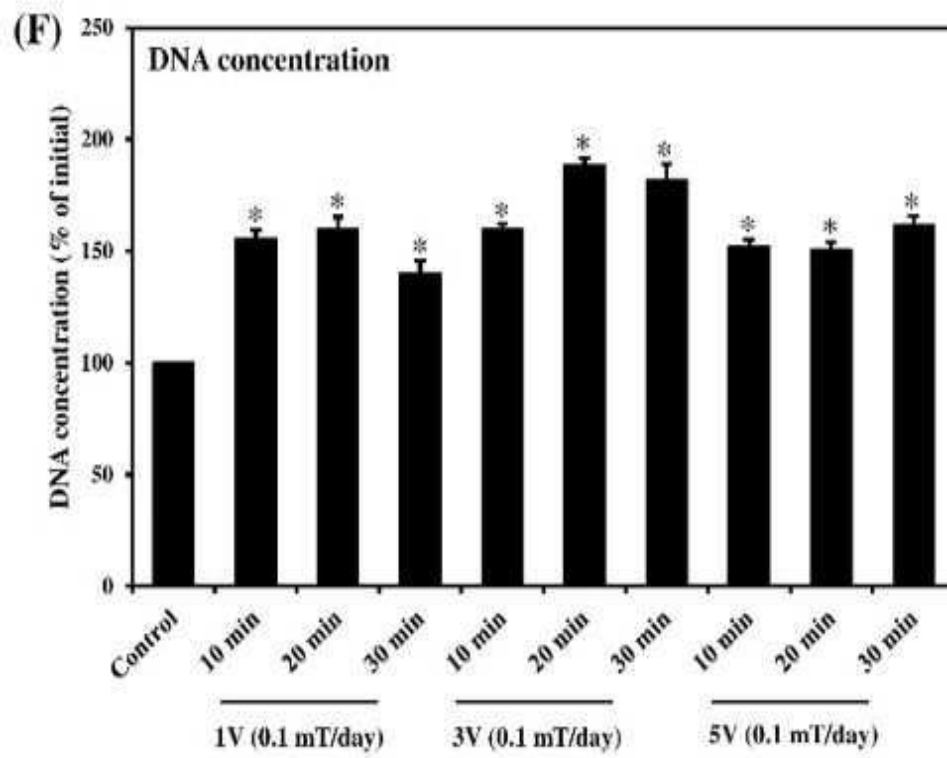
도면2d



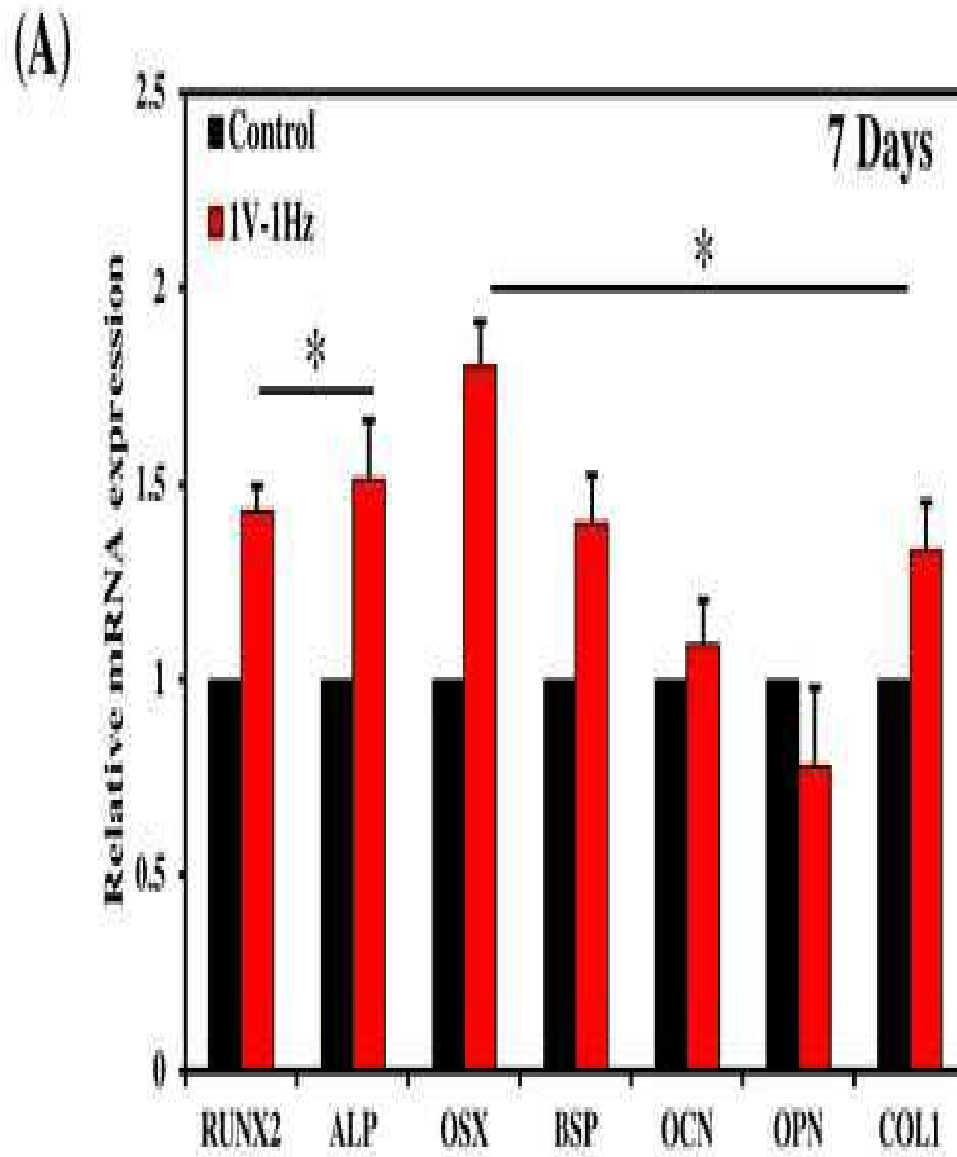
도면2e



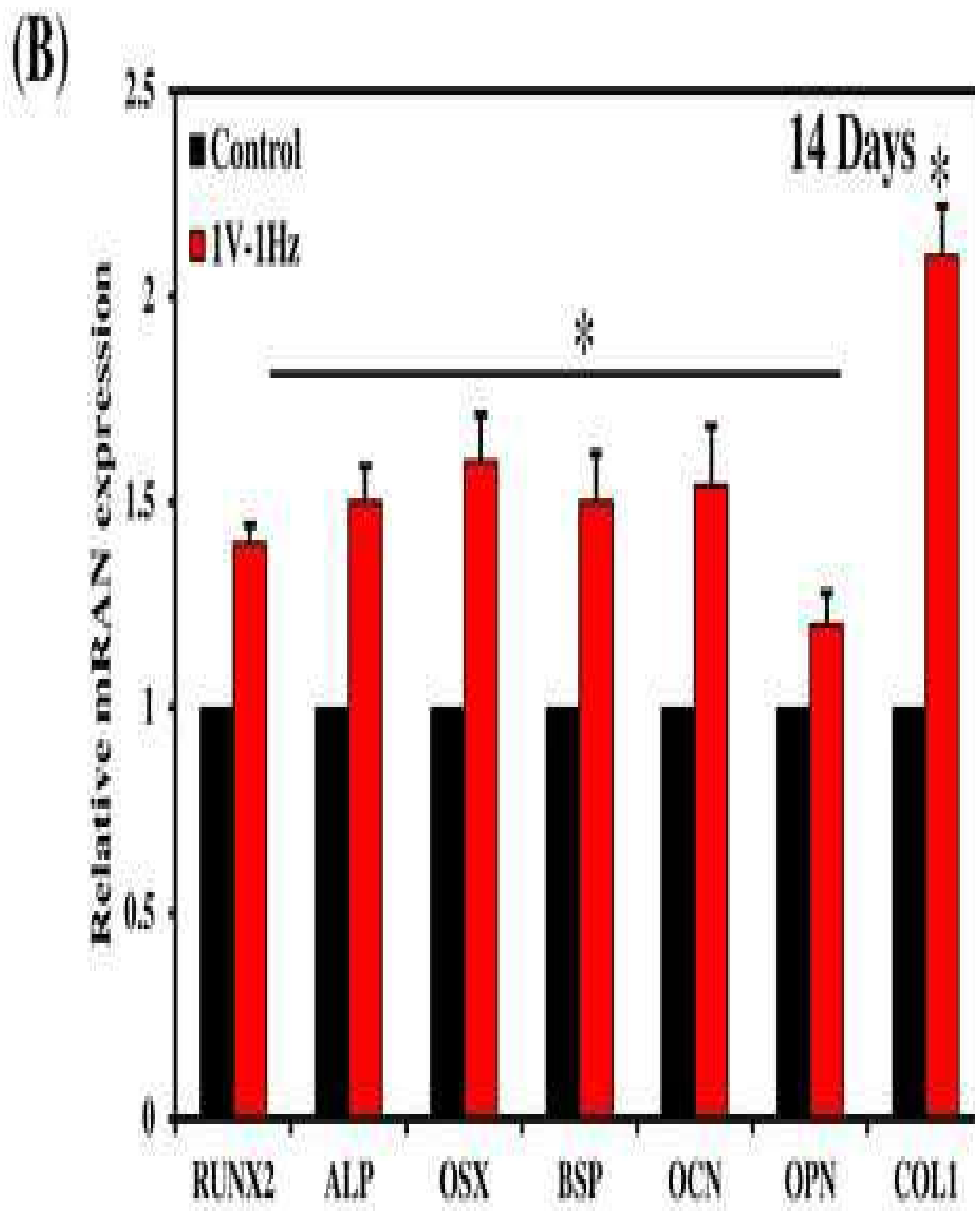
도면2f



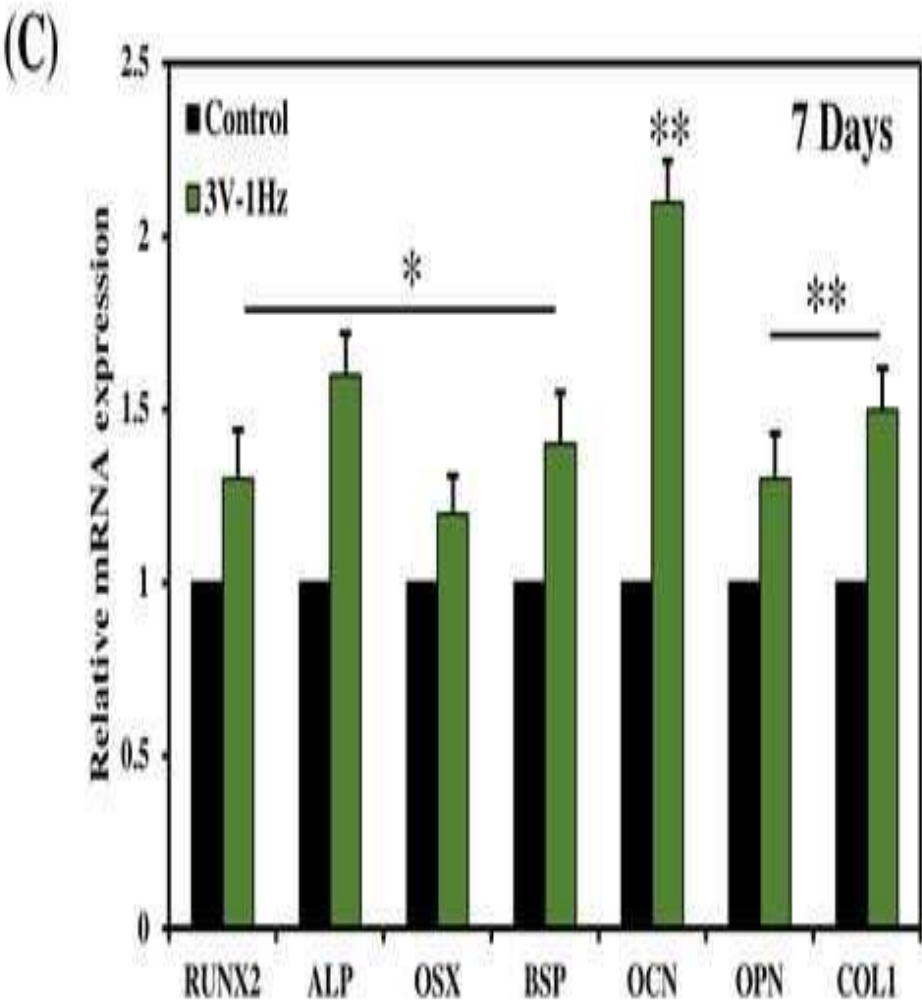
도면3a



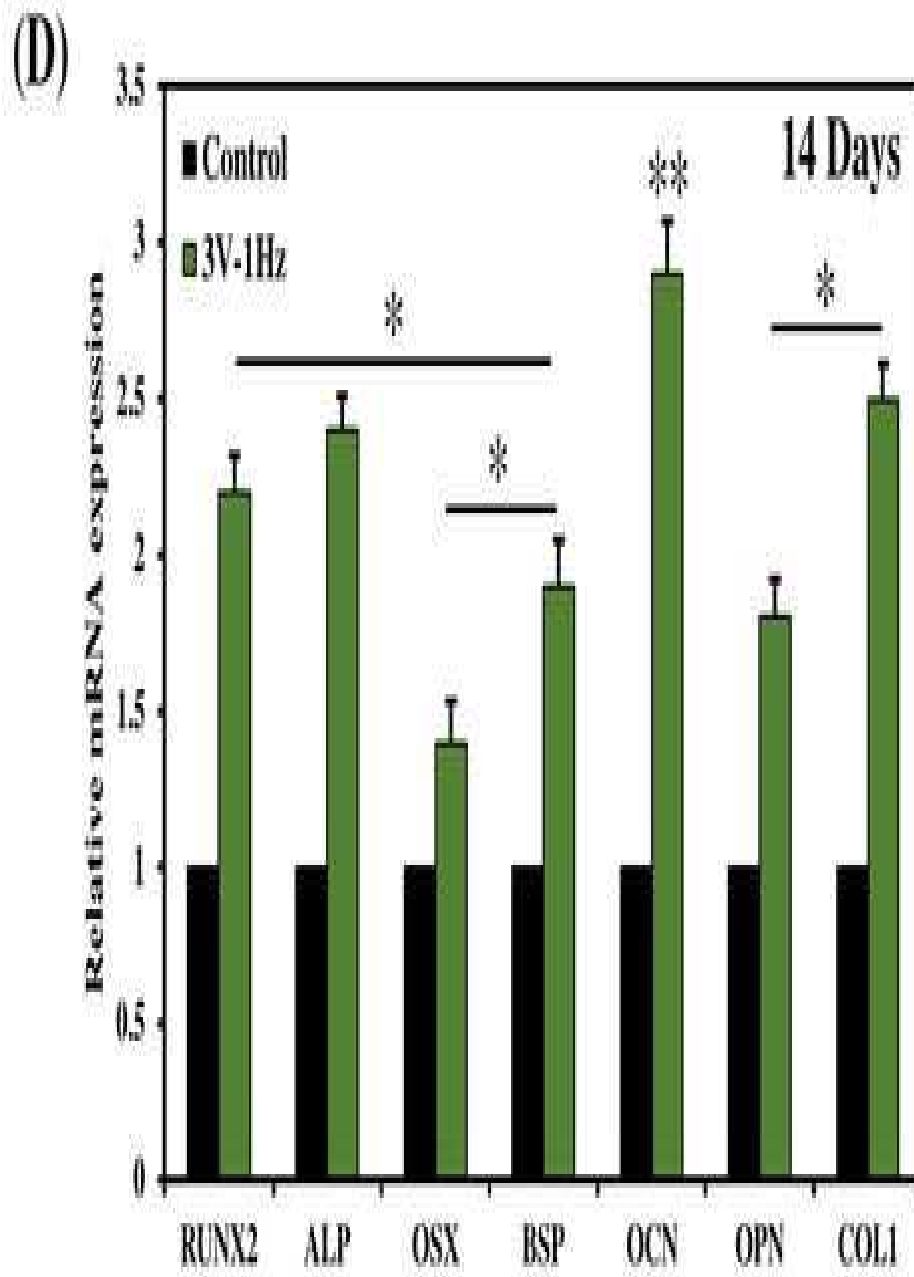
도면3b



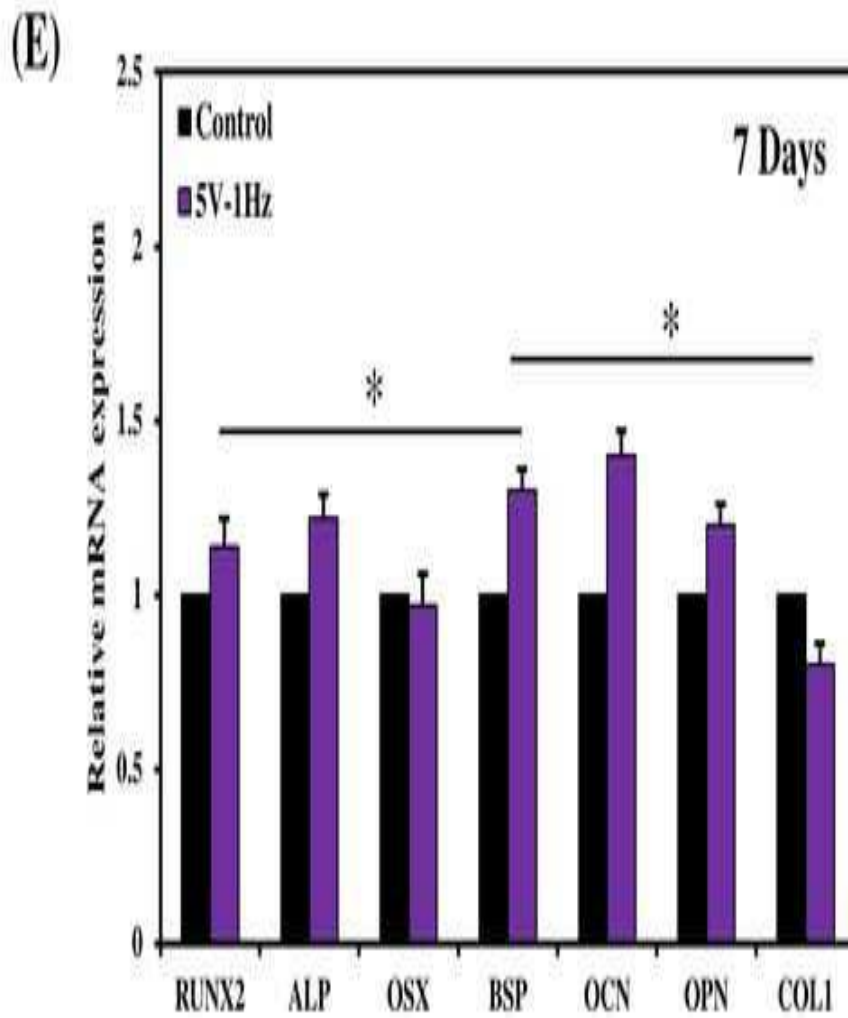
도면3c



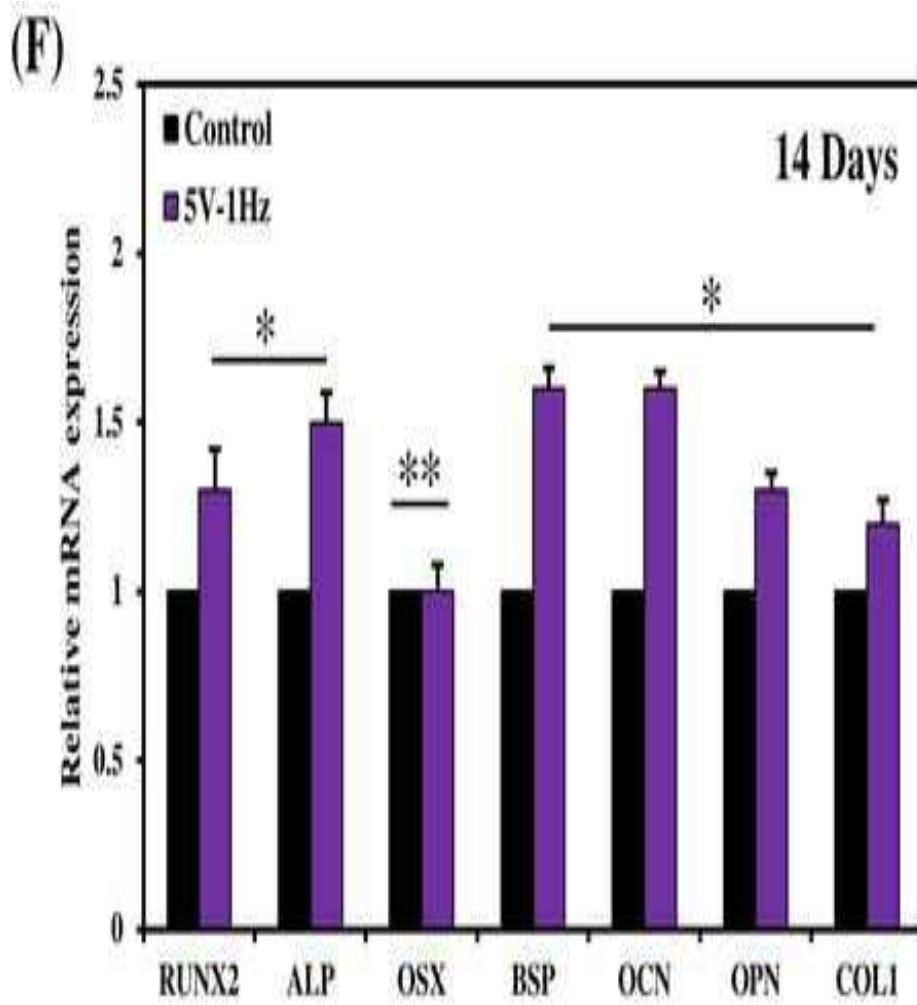
도면3d



도면3e

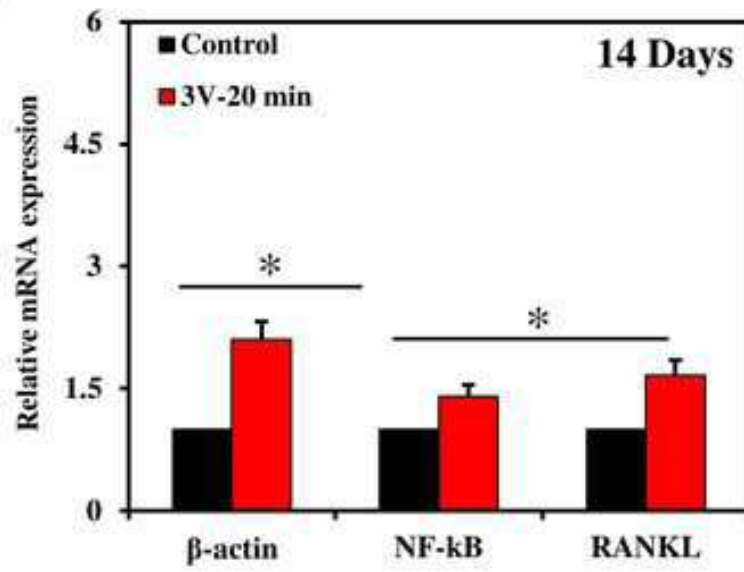


도면3f



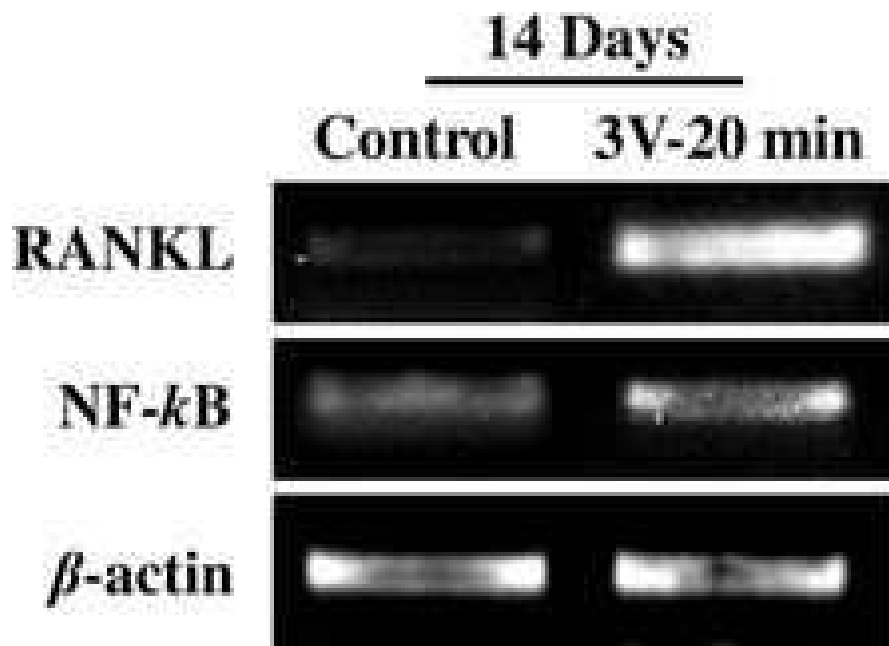
도면3g

(G)

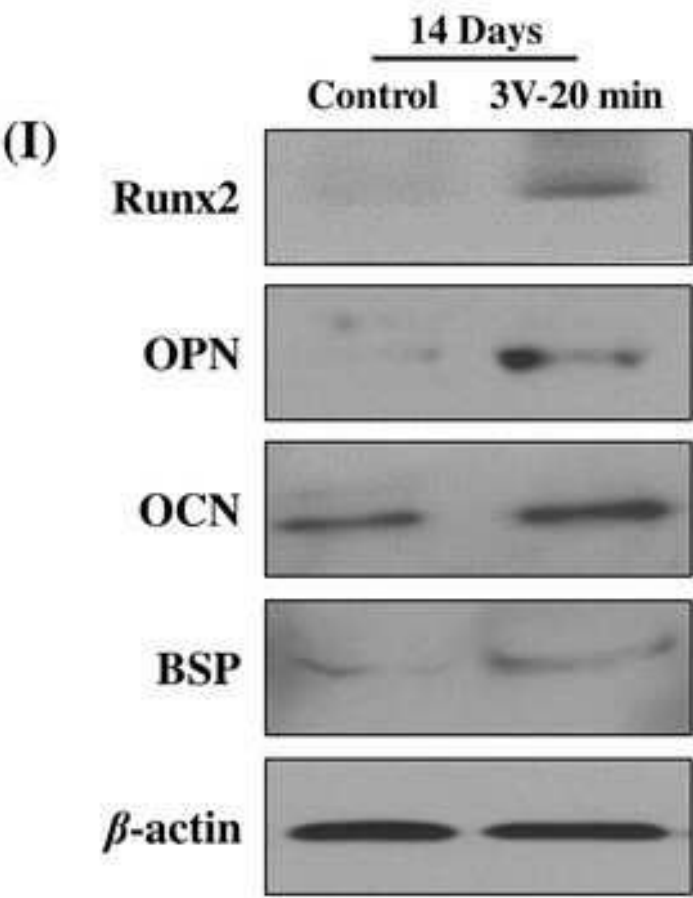


도면3h

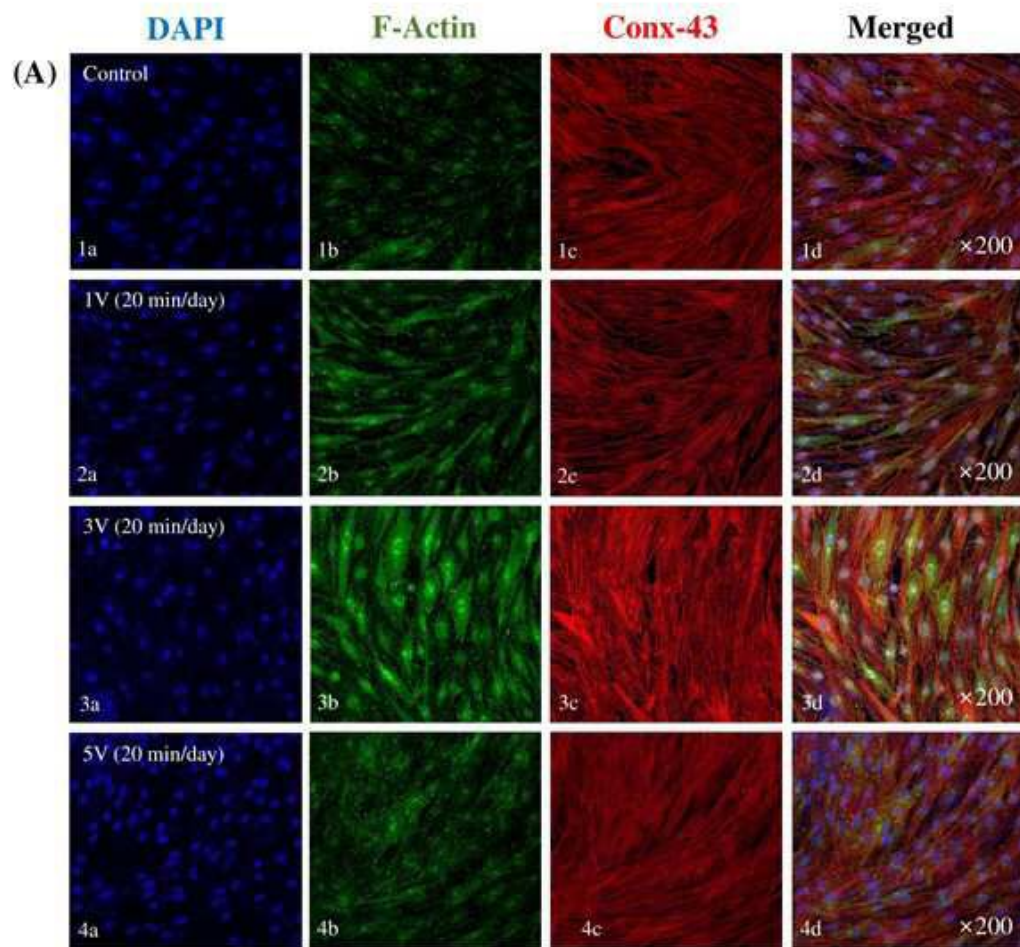
(H)



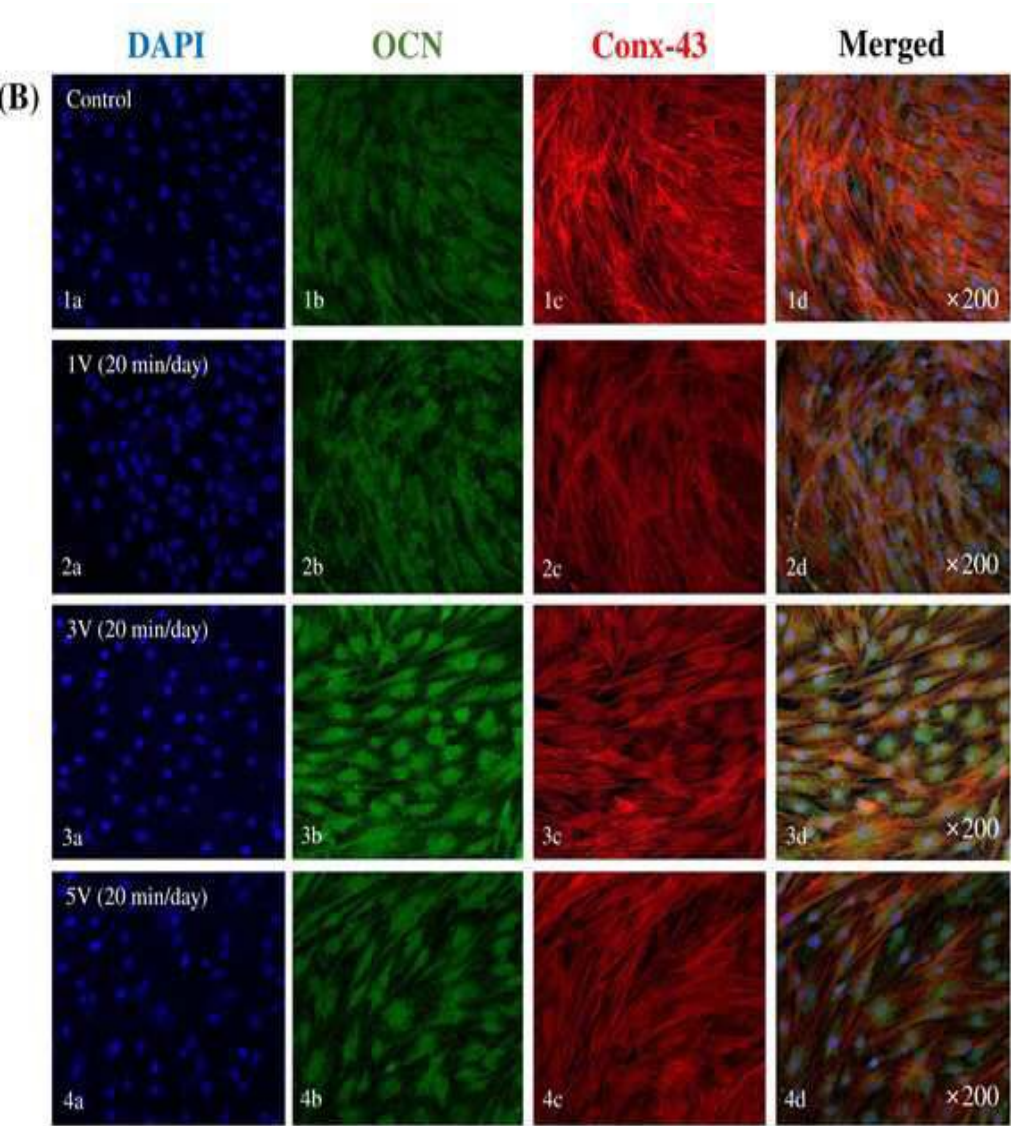
도면3i



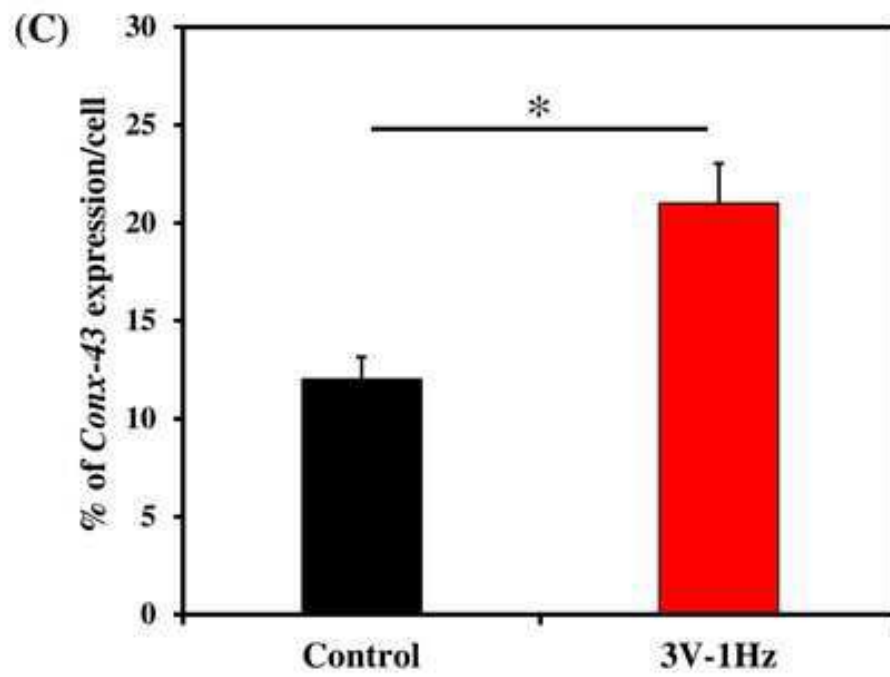
도면4a



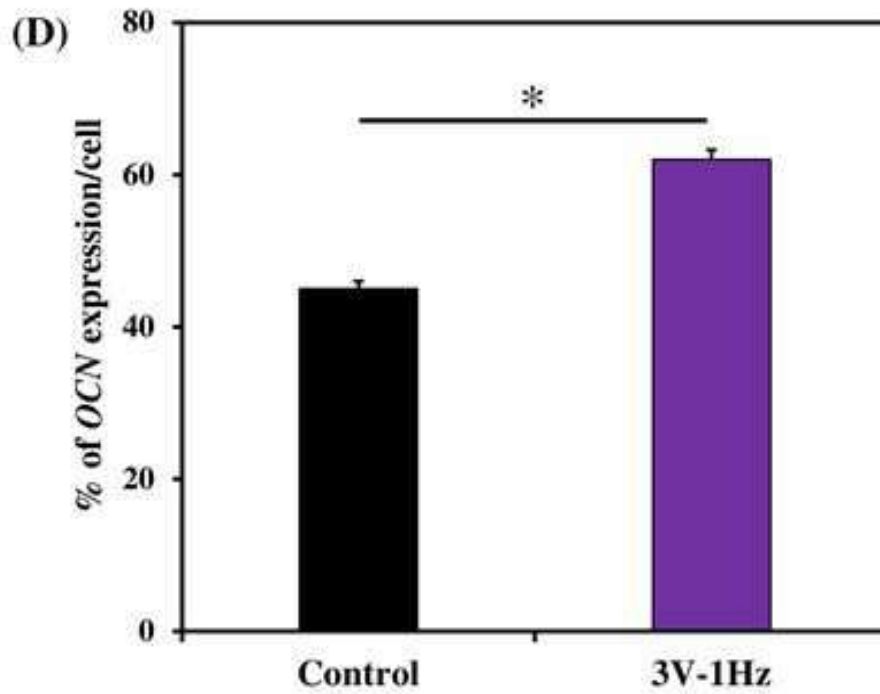
도면4b



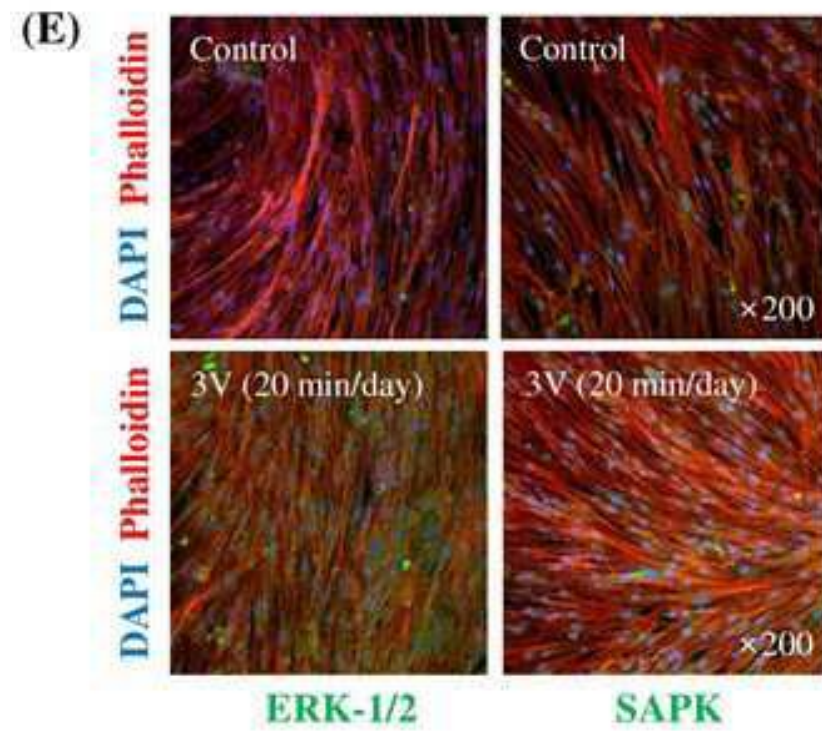
도면4c



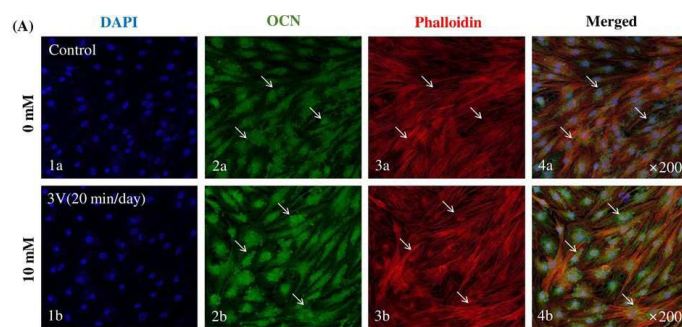
도면4d



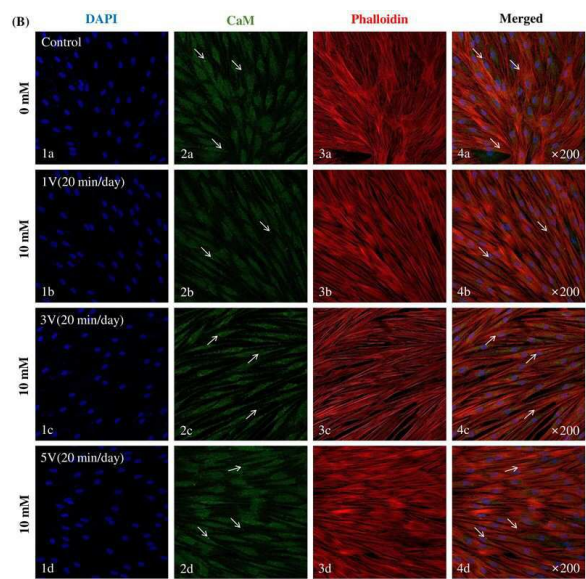
도면4e



도면5a

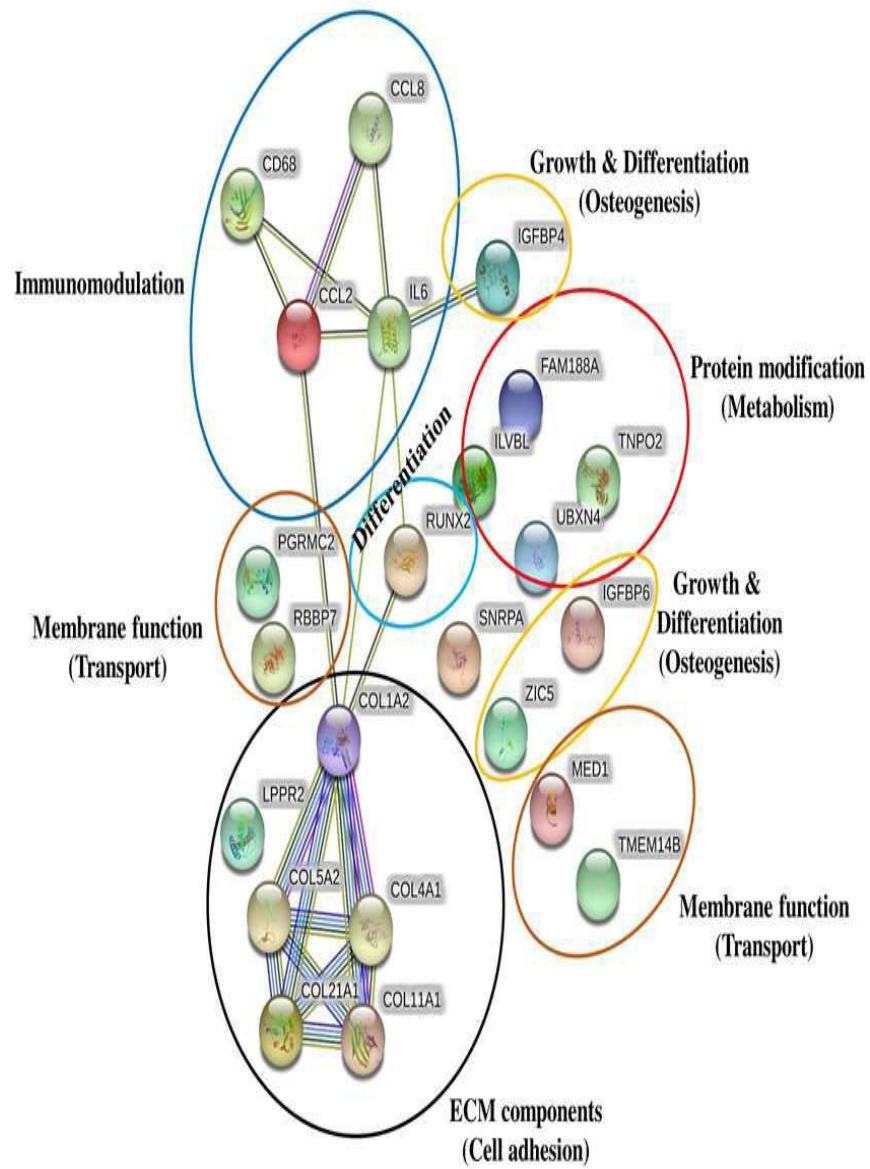


도면5b

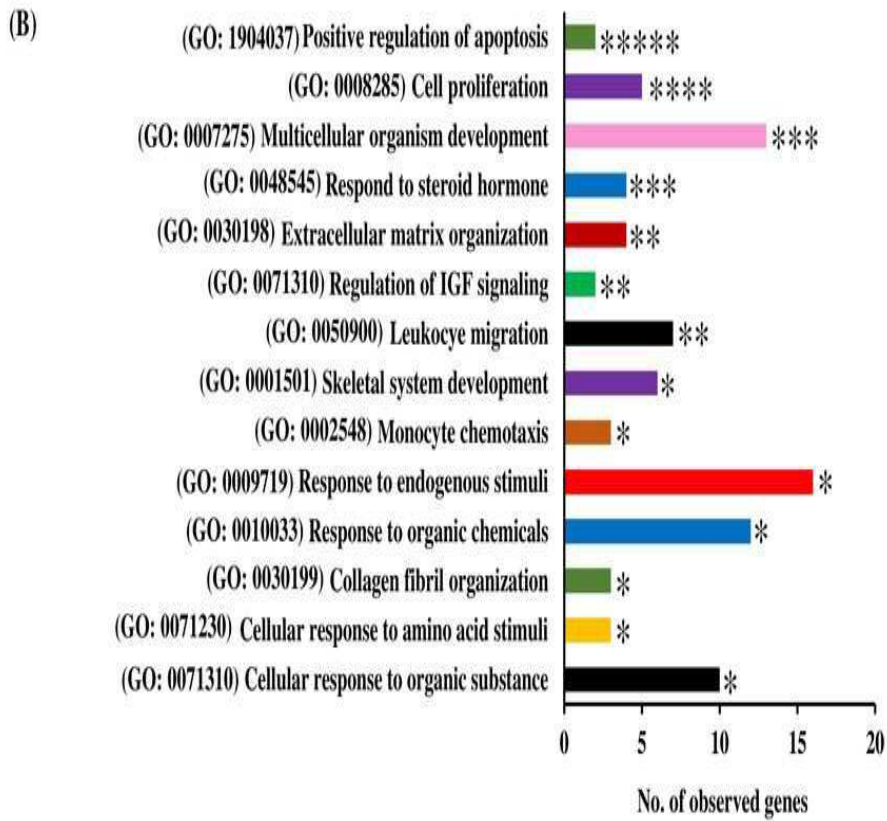


도면6a

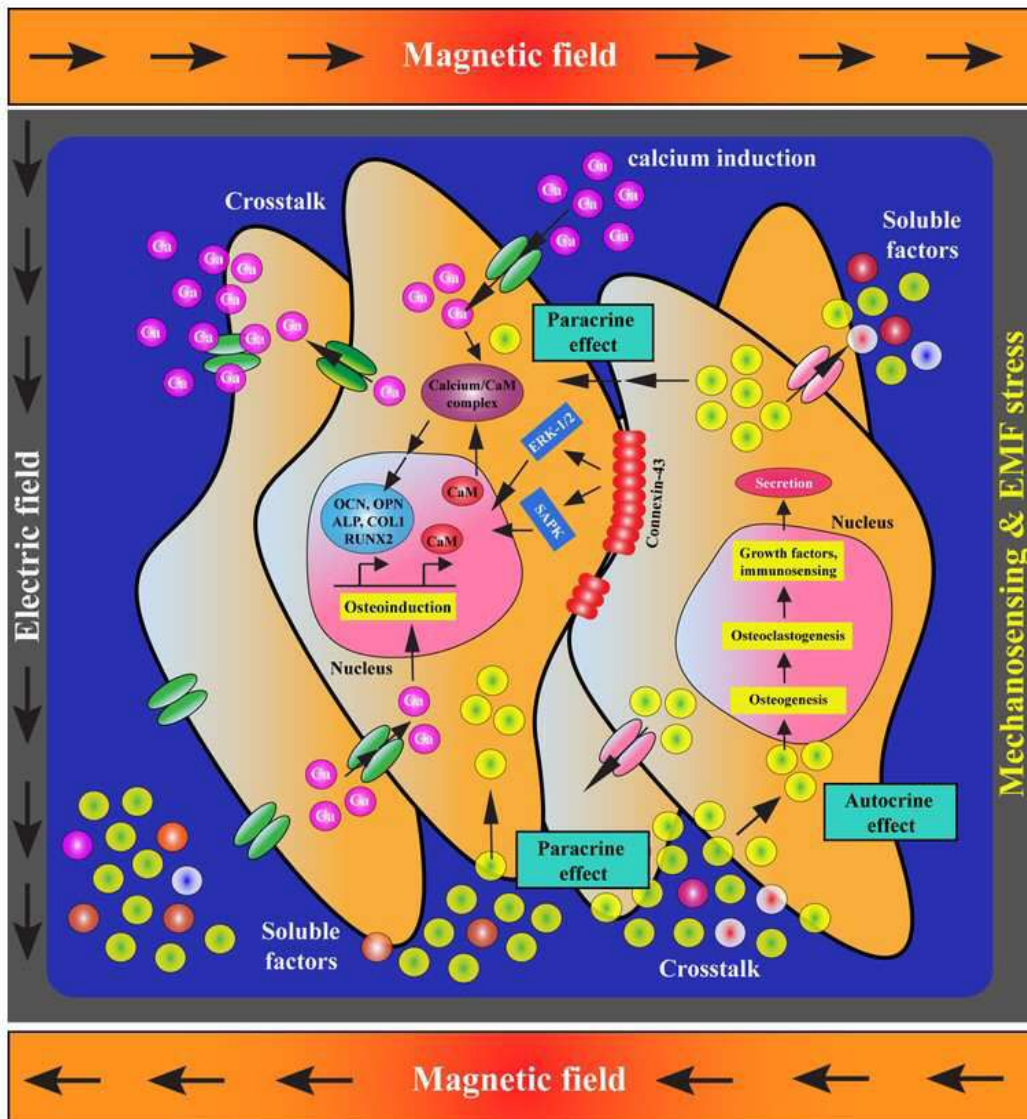
(A)



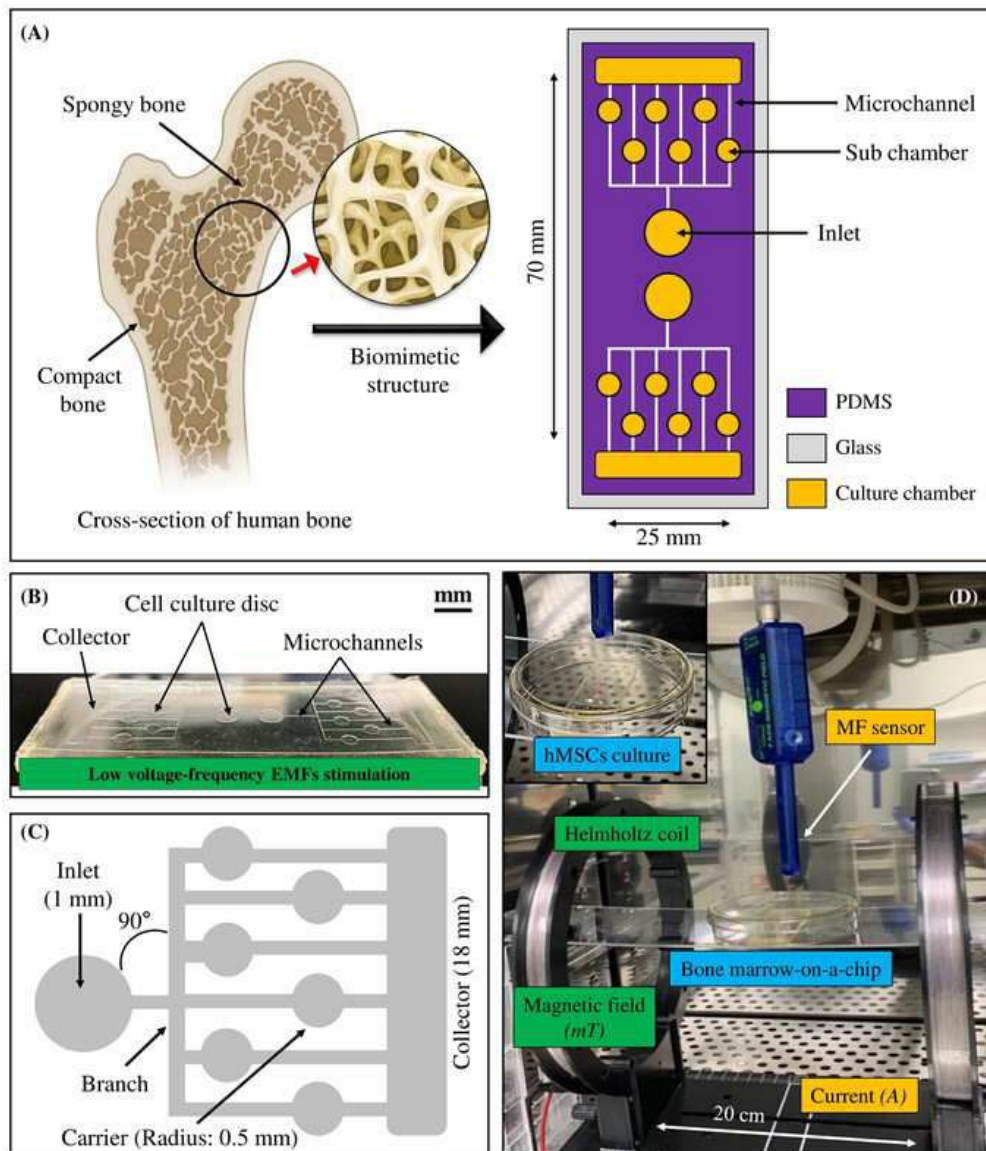
도면6b



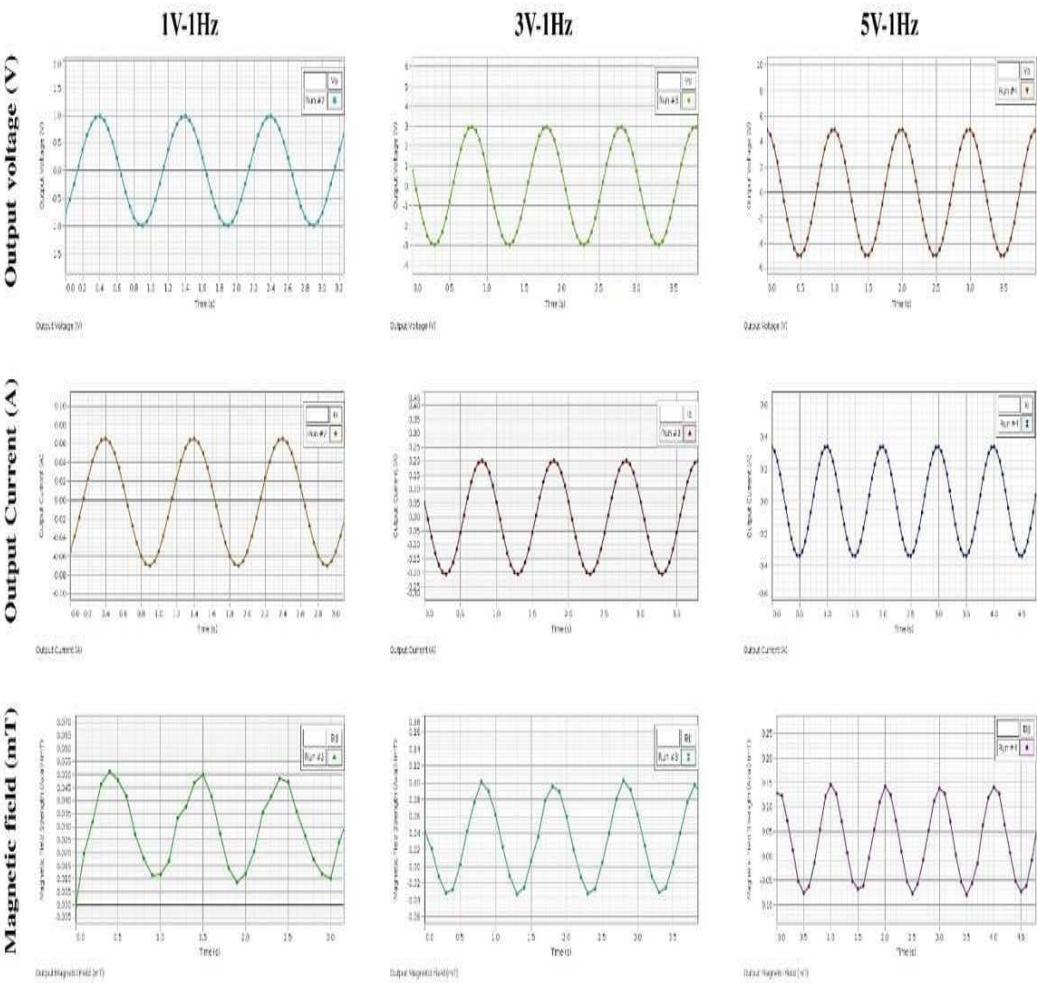
도면7



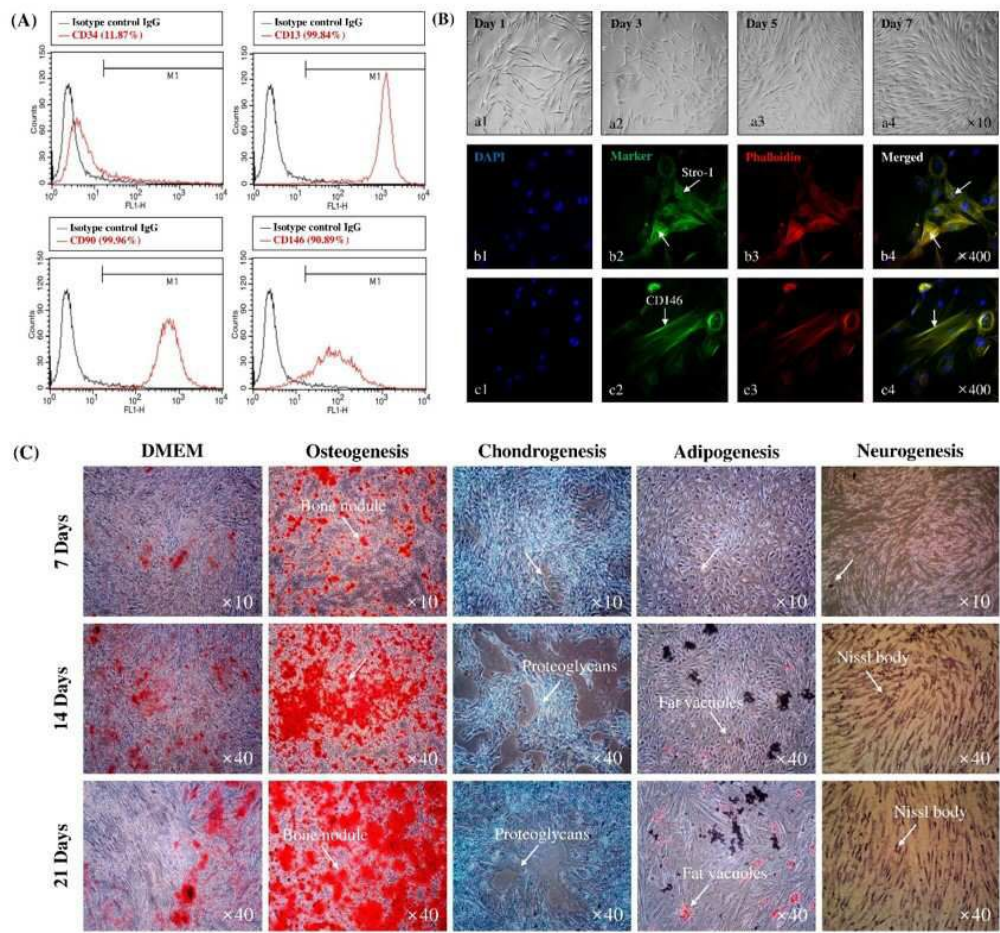
도면8



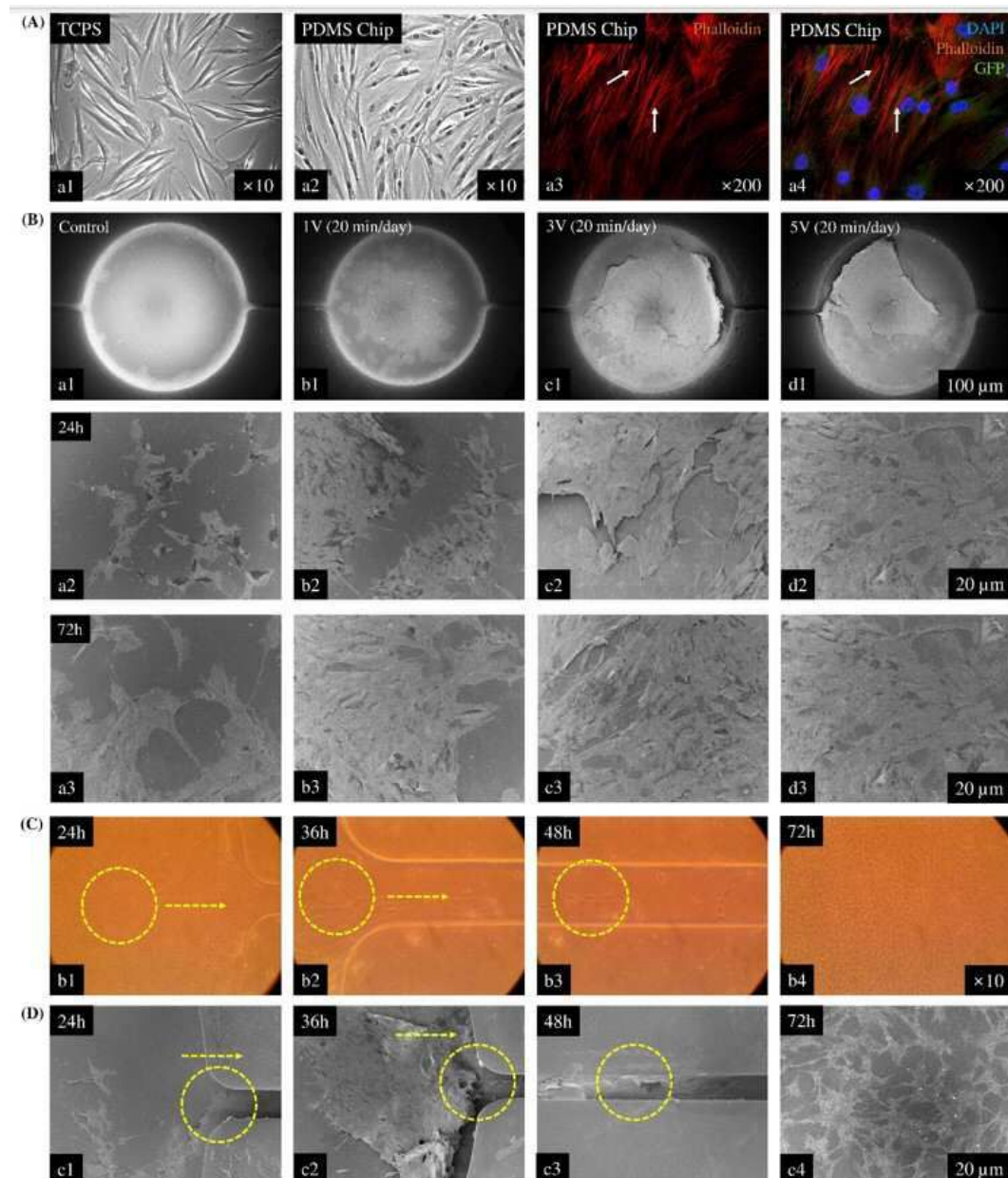
도면9



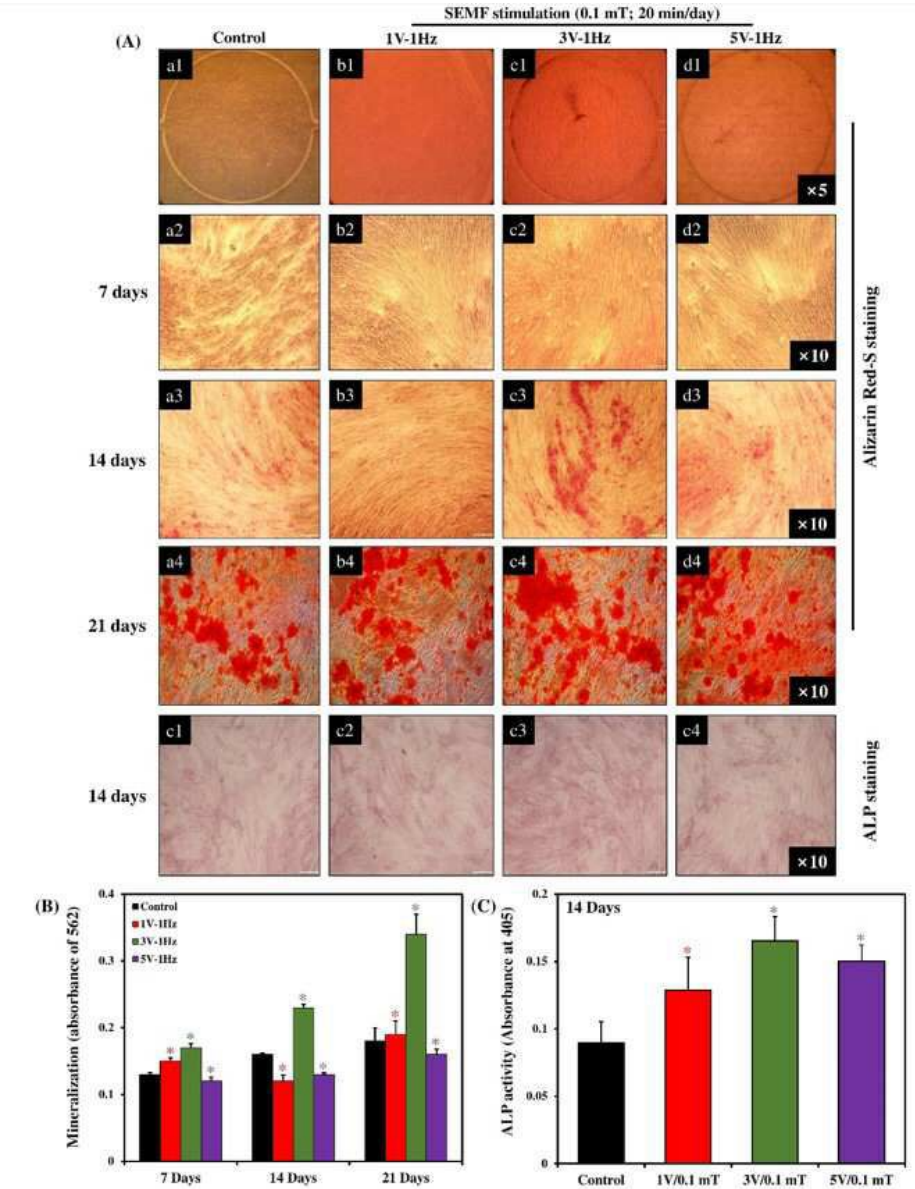
도면10



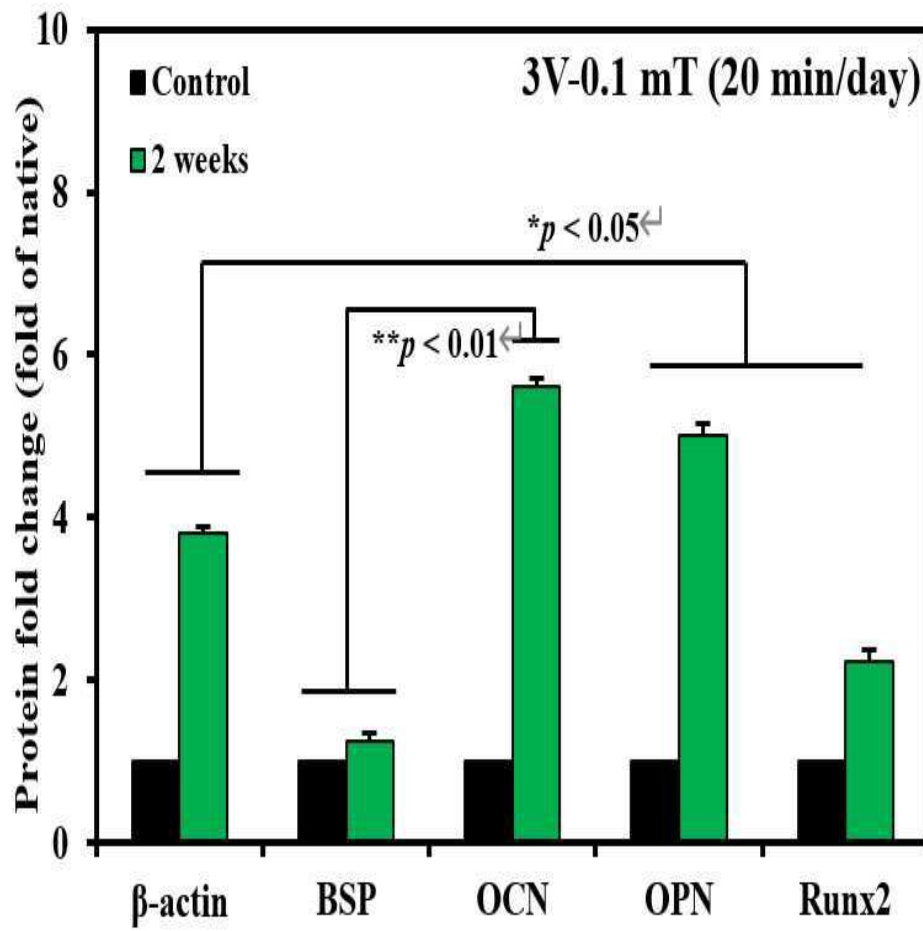
도면11



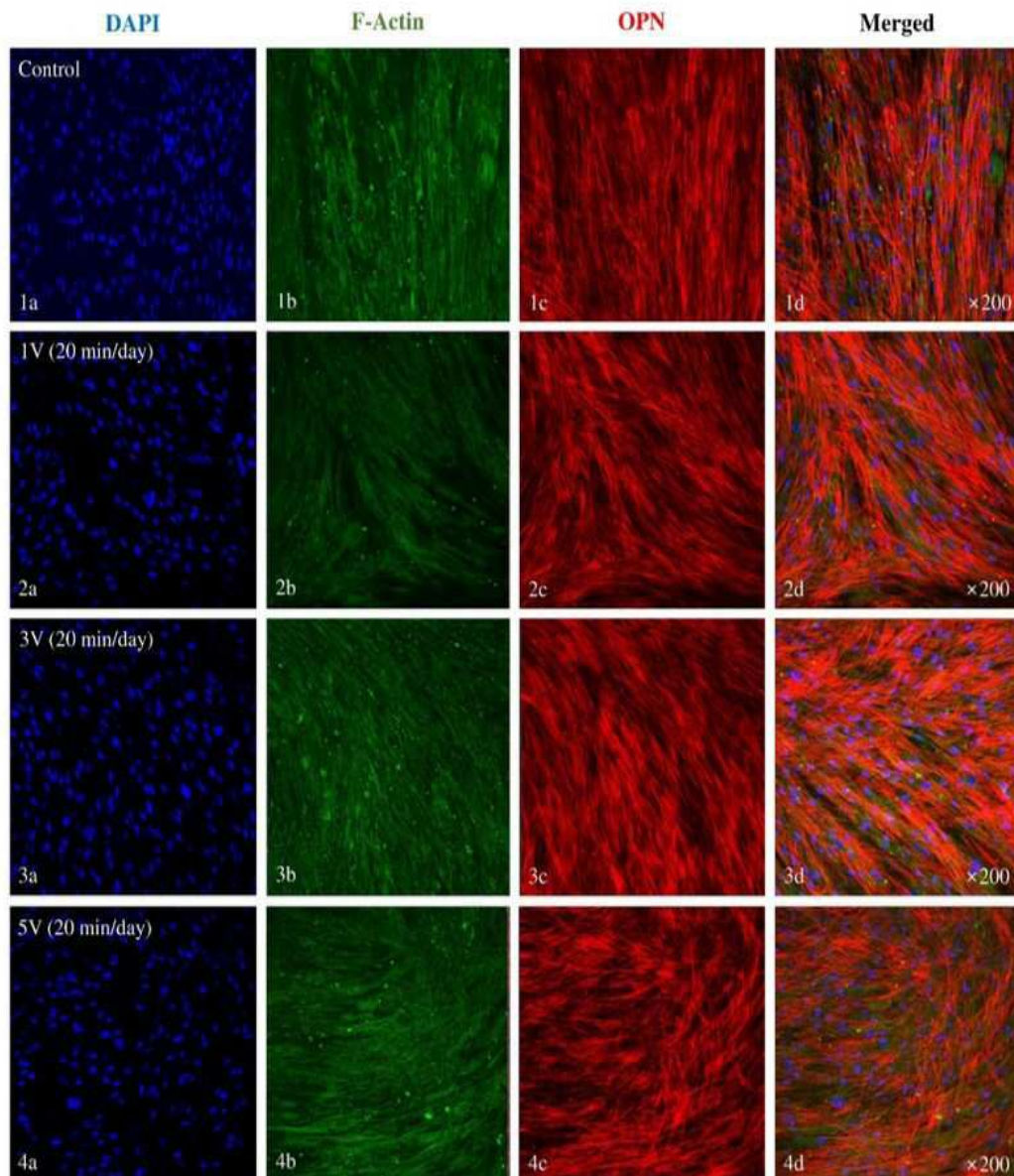
도면12



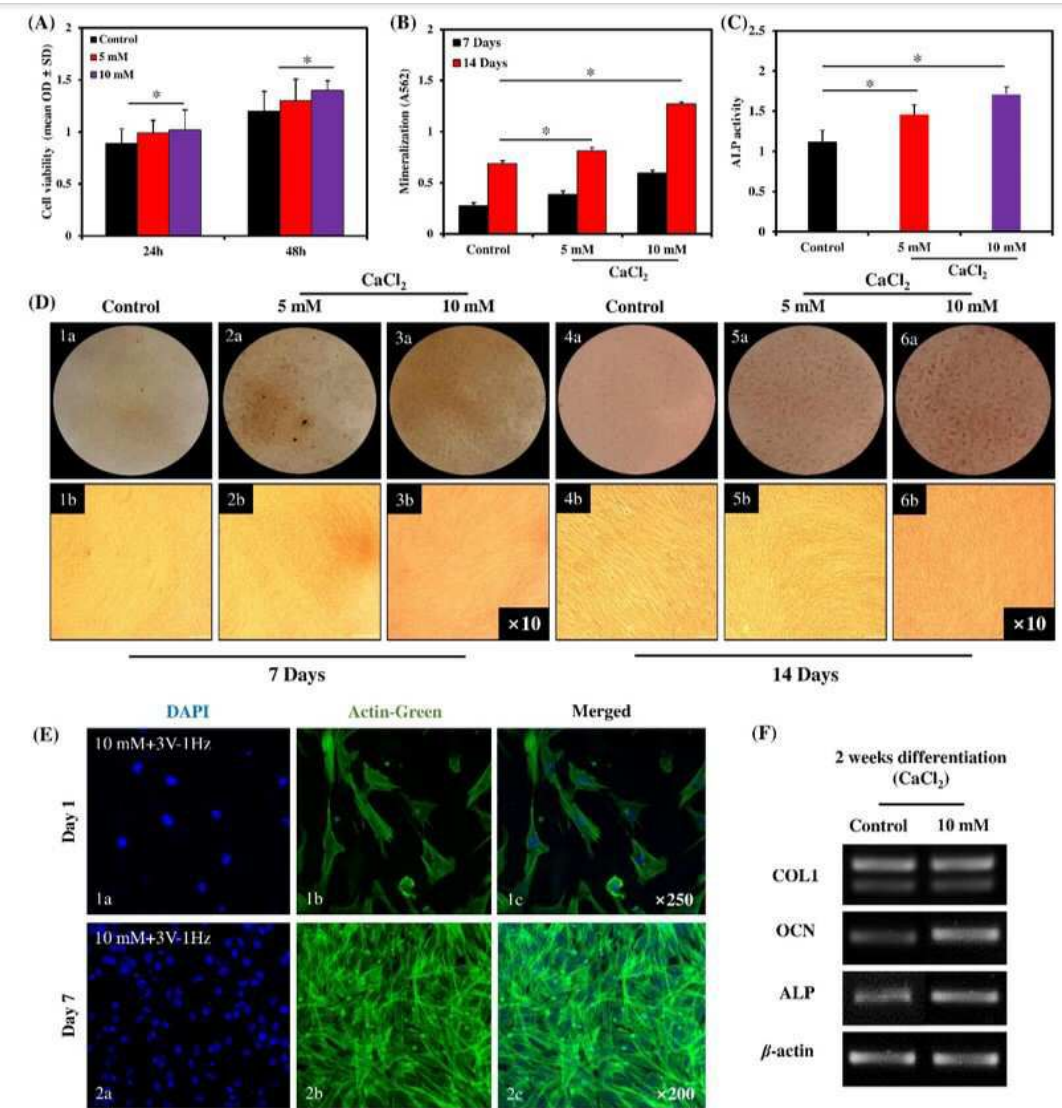
도면13



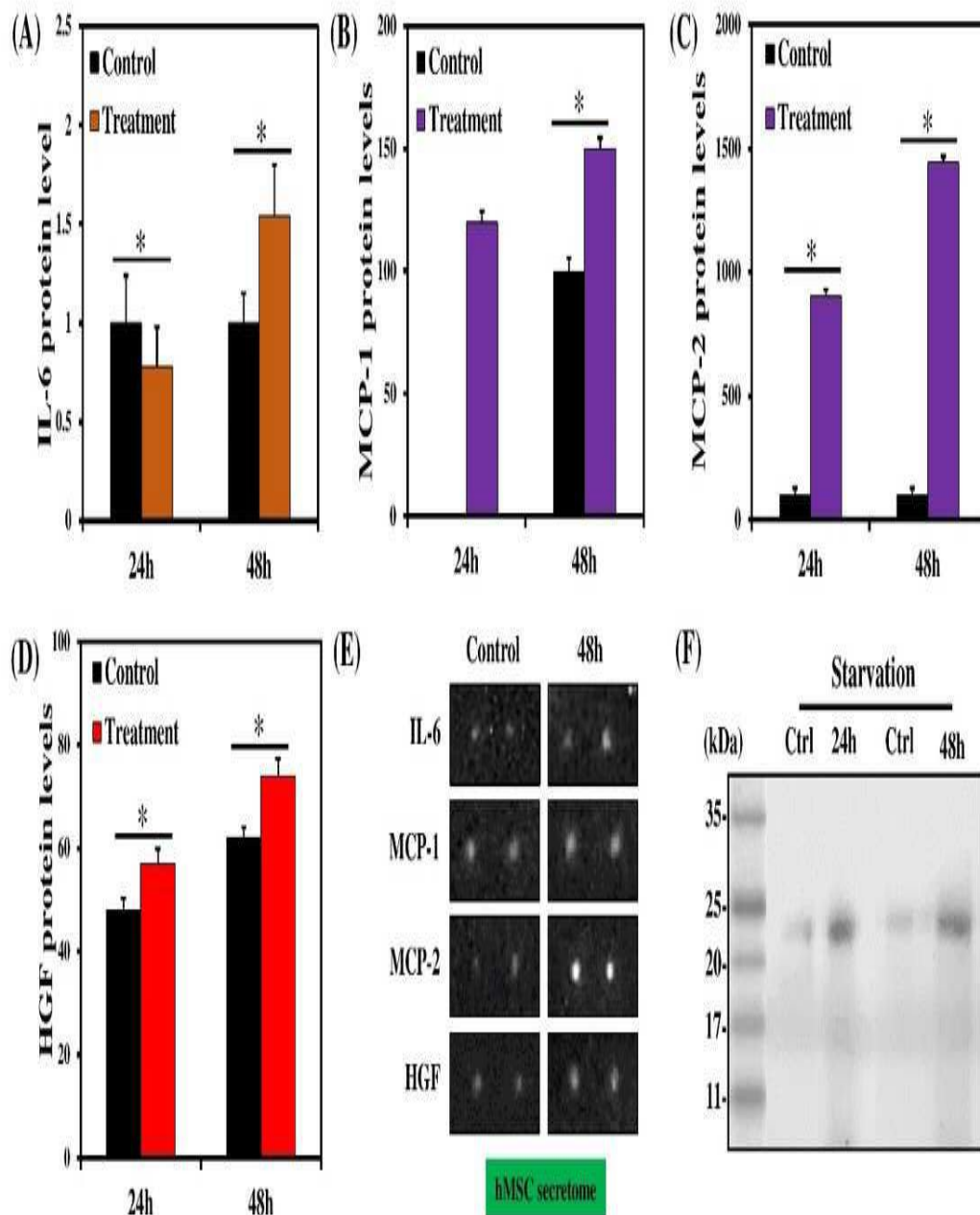
도면14



도면15



도면16



도면17

