



공개특허 10-2022-0102203

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0102203
(43) 공개일자 2022년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0654 (2013.01)
C12N 2500/82 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0003914
(22) 출원일자 2021년01월12일
심사청구일자 2021년01월12일

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(72) 발명자
임기택
강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트
112동 2308호
조성준
강원도 춘천시 남춘천새길 11 휴먼시아 남춘천1단
지아파트 110-1504
장글리 케야
강원대학교 농업생명과학대학 1호관 307동 206호
(74) 대리인
구현서

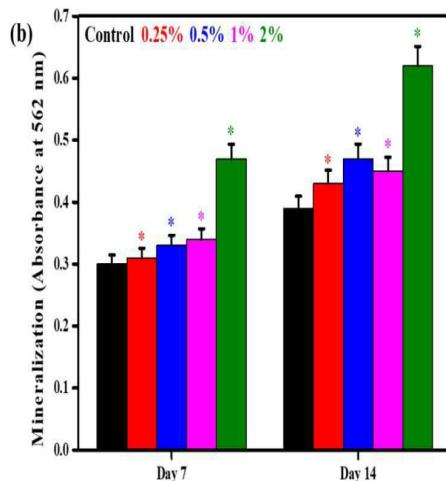
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 형성 유도용 조성물

(57) 요약

본 발명은 쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 형성 유도용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 단백질 추출물은 hBMSC의 골 형성 유도에 적합한 생체 물질이며, 또한 뼈 재생을 위한 스캐폴드 제작을 위한 전구체로 사용될 수 있으며, 골 형성 분화를 위한 비용 효율적인 단백질 보충제 공급원으로도 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도6b



(52) CPC특허분류

*C12N 2501/998 (2013.01)**C12N 2506/1353 (2013.01)*

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415169897
과제번호	20012439
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가원
연구사업명	산업기술 알키미스트 프로젝트
연구과제명	배양육의 혁신적 원가절감을 위한 곤충 및 식물성기반 배양배지 및 자기장 복합 배
양시스템 개발	
기여율	1/1
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.04.30

명세서**청구범위****청구항 1**

쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 형성 유도용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질 추출물은 126kDa의 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 골 형성 유도용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질 추출물은 56, 160, 62, 52 및 162 kDa 분자량의 단백질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 골 형성 유도용 조성물.

청구항 4

쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 인 비트로에서 세포에 처리하여 상기 세포에서 골형성 관련 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 증대하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 단백질 추출물은 0.5 내지 2%(w/v) 처리하는 것을 특징으로 하는 골형성 관련 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 증대하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 골형성 관련 유전자는 Runt-관련 전사인자 -x2(Runx2), 오스테리克斯(Osterix;OSX), 알칼라인 포스파테이즈(ALP), BSP; 골 사아로프로테인(Bone sialoprotein), 오스테오칼신(Osteocalcin), 및 오스테오플린(Osteopontin)으로 구성된 군으로부터 선택된 유전자인 것을 특징으로 하는 골형성 관련 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 증대하는 방법.

청구항 7

쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 세포 생존력 증대용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 단백질 추출물은 126kDa의 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 생존력 증대용 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 단백질 추출물의 유효량은 2%(w/v)인 것을 특징으로 하는 세포 생존력 증대용 조성물.

청구항 10

쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 뼈 재생용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 단백질 추출물은 126kDa의 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 뼈 재생용 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 단백질 추출물의 유효량은 2%(w/v)인 것을 특징으로 하는 뼈 재생용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 형성 유도용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수백만 명의 환자가 골다공증, 골육종, 뼈 대체 및 외과 적 개입이 필요한 연골 육종을 포함하여 전 세계적으로 뼈 관련 질환을 앓고 있다.

[0003] 자가 및 동종골 대체 기술은 정형 외과 약물에 유용한 임상 절차이다. 그러나 뼈 조직 공학은 이러한 기존 의료 절차에 대한 새로운 대안이다. 체외 및 생체 내에서 뼈 조직 재생의 효율성은 조직 재생 과정에 적합한 골 전도성, 골유도성 생체 물질 및 생체 활성 분자를 사용하여 증대된다. 조직 재생 과정은 변형 성장 인자- β (TGF- β) 수퍼 패밀리 단백질, 섬유 아세포 성장 인자(FGF), 인슐린 유사 성장 인자(IGF), 혈소판 유래 성장 인자(PDGF)와 같은 단백질에 의해 광범위하게 지원된다.

[0004] 그러나 생체 활성 단백질 분자의 적용은 치유 과정에서 뼈 형성 속도를 추가로 증가시킬 수 있다. 따라서 임상 조건에서 복잡한 뼈 형성 과정을 촉진할 수 있는 생리 활성 단백질을 찾는 것이 중요하다.

[0005] [선행 특허 문헌]

[0006] 대한민국특허공개번호 제10-2020-0040330호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 골형성을 유도하는 신규한 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 형성 유도용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단백질 추출물은 126kDa의 단백질을 포함하는 것이 바람직하고, 상기 단백질 추출물은 56, 160, 62, 52 및 162 kDa 분자량의 단백질을 추가로 포함하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0010] 또 본 발명은 쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 인 비트로에서 세포에 처리하여 상기 세포에서 골형성 관련 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 증대하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단백질 추출물은 0.5 내지 2%(w/v) 처리하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0012] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 골형성 관련 유전자는 Runt-관련 전사인자 -x2(Runx2), 오스테리스(Osterix;OSX), 알칼라인 포스파테이즈(ALP), BSP; 골 사아로프로테인(Bone sialoprotein), 오스테오칼신(Osteocalcin), 및 오스테오폰틴(Osteopontin)으로 구성된 군으로부터 선택된 유전자는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013] 또 본 발명은 쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 세포 생존력 증대용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단백질 추출물은 126kDa의 단백질을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 단백질 추출물의 유효량은 2%(w/v)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0016] 또한 본 발명은 쌍별 귀뚜라미 유래 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 뼈 재생용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 단백질 추출물은 126kDa의 단백질을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 단백질 추출물의 유효량은 2%(w/v)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0020] 본 발명에서 본 발명자들은 쌍별 귀뚜라미 (*Gryllus bimaculatus*)에서 분리된 단백질의 ~ 90 %를 추출하고 체외 조건에서 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포 (hBMSC)에 대한 골 유도 잠재력을 평가했다. 추출된 단백질 분리물은 아미노산 조성과 구성 펩티드 분획의 질량 분포에 대해 분석되었다. 푸리에 변환 적외선 (FTIR) 분광법을 사용하여 생물학적으로 중요한 작용기의 존재를 확인했다. 크리켓 단백질 분리물 (CPI)은 FTIR 스펙트럼에서 특정적인 단백질 피크를 나타냈다. 특히, 추출된 단백질의 존재 하에서 향상된 세포 생존력이 관찰되어 생체 적합성을 보여주었다. CPI는 또한 높은 의존적으로 항산화 특성을 나타냈다. 대조군보다 CPI 처리 군에서 더 중요한 무기화가 관찰되어 골 유도 가능성을 시사한다. CPI 처리 배지에서 골 형성 마커 유전자 (Runx2, ALP, OCN 및 BSP)의 상향 조절은 그 골 유도 특성을 지원한다. 따라서 귀뚜라미 유래 단백질 분리물은 조직 공학 응용, 특히 뼈 재생을 위한 기능성 단백질 생체 재료로 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에서 본 발명자들은 쌍별 귀뚜라미에서 ~ 90 % 단백질 추출물의 성공적인 추출을 보고하고 hBMSC에 대한 골 유도 특성을 조사했다. 본 발명에서 추출된 귀뚜라미 단백질 분리물 (CPI)은 β -시트 확인을 가장 많이 나타냈다. 영양 성분은 CPI에서 필수 아미노산의 풍부함을 보여주었다. 분자량으로 표시된 바와 같이 CPI에 광범위한 펩티드가 존재한다는 것은 줄기 세포 운명 결정에서 이들의 가능한 결합 효과를 반영한다. 특히, 대조군보다 CPI 처리된 hBMSC에서 더 나은 세포 생존력이 관찰되어 우수한 생체 적합성을 보여주었다. CPI는 또한 대조군보다 향상된 항산화 잠재력을 나타냈다. ARS 염색에 의해 명백한 바와 같이, 증가된 광물화는 CPI의 골 유도 특성을 확인하는 Runx2, ALP 및 BSP 유전자 발현의 증가와 관련이 있다. 따라서, 귀뚜라미 유래 단백질 분리물은 hBMSC의 골 형성 유도에 적합한 생체 물질이며, CPI는 또한 뼈 재생을 위한 스캐폴드 제작을 위한 전구체로 사용될 수 있는 잠재적인 생체 재료이다. CPI는 골 형성 분화를 위한 비용 효율적인 단백질 보충제 공급원으로도 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 CPI의 분자량 결정을 나타낸 그림, (a) 총 CPI의 SDS-PAGE 분석, (b) 총 CPI의 SDS-PAGE 밴드 강도 프로파일.
- 도 2는 CPI의 화학적 특성을 나타낸 그림, (a) 곤충에서 추출한 CPI의 FTIR 스펙트럼 및 (b) 동결 건조 된 CPI의 FE-SEM 형태.
- 도 3은 항산화 특성 측정한 그림으로, (a) 아스 코르 베이트의 등가 농도에 대한 CPI의 DPPH 소거 활성. (b) 다양한 농도의 CPI로 배양 된 플레이트의 디지털 사진. 데이터는 삼중 실험의 평균 OD ± SD이며, * p <0.001에서 통계적 유의성,
- 도 4는 표시된 시간 간격으로 hBMSC에 대한 CPI의 시험관 내 세포 독성 평가를 나타낸 그림으로 (a) CPI-처리된 hBMSCs의 WST-1 어세이, b) 3일 간격으로 2% CPI-처리된 hBMSC의 라이브/사멸 분석.
- 도 5는 배양 3일 후 hBMSC에 대한 CPI의 시험관 내 세포 독성 평가를 나타낸 그림으로, (a) Giemsa 염색 후 광학 현미경 이미지 (b) F-액틴의 형광 현미경 이미지.

도 6은 CPI의 존재 하에서 체외 조골 세포 분화 평가를 나타낸 그림으로, (a) 배양 7일 및 14일 후 CPI 처리된 hBMSC의 ARS 염색. (b) 표시된 시간 간격에서 hBMSC의 광물화 잠재력. 데이터는 삼중 실험의 평균 ± SD, p * <0.05에서 통계적 유의성. 뺀간색 화살표는 hBMSC 표면에 염색된 CPI의 존재를 나타냄.

도 7은 (a) 7일 및 (b) 14일 배양 후 CPI 처리된 hBMSC의 실시간 중합 효소 연쇄 반응 (qRT-PCR) 분석을 나타낸 그림으로, 데이터는 삼중 실험의 평균 ± SD, * p <0.05에서 통계적 유의성,

도 8은 표시된 시간 간격에서 CPI 처리된 hBMSC의 조골 세포 특이적 단백질 마커 발현을 나타낸 그림으로, (a)

각 단백질 마커의 형광 현미경 이미지 (스케일 막대 : 100 μm) 및 (b) 해당 형광 강도. 데이터는 삼중 실험의 평균 ± SD, 각각 * p <0.05 및 ** p <0.01에서 통계적 유의성. 흰색 화살표는 hBMSC 표면에 CPI가 있음을 나타냄.

도 9는 6kDa 미만의 캡타이드 분자량 측정을 위한 CPI의 MALDI TOF MS 스펙트럼,

도 10은 대조군 및 CPI 2 %의 세포 사멸률,

도 11은 (a) 대조군 및 (b) 2 % CPI의 ROI 강도 프로파일.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

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.

[0024]

본 발명의 귀뚜라미는 원주 자연 생태 공원 (대한민국 원주)에서 채집했다. Laemmli 완충액 (5x)과 단백질 래더는 대한민국 성남에 있는 Dyne Bio Inc.에서 구입했다. Coomassie Brilliant Blue 및 SYBR Green Master 믹스는 미국 Bio-Rad Laboratories에서 공급했다. 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), 10 % 소 태아 혈청 (FBS), 둘베코 인산 완충 식염수 (DPBS), 항생제는 대한민국 웰진사에서 구입했다. 트립신-에틸렌디아민테트라아세트산(트립신-EDTA)은 미국 Gibco에서 제공했다. 골 유도 배지, 4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 및 alizarin red (ARS) 염색 키트는 미국 Sigma-Aldrich에서 구입했다. WST-1 염료와 Alexa Fluor 접합 단일 클론 항체는 각각 대한민국 DoGenBio와 미국 Santa Cruz Biotechnology에서 구입했다. TRIzol® 시약, Acridine orange 및 Ethidium bromide 염료는 Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA에서 구입했다. cDNA 합성 키트는 Gaithersburg의 Invitrogen에서 구입했다. 유전자 프라이머는 대한민국 대전에 소재한 바이오니아(주)에서 공급했다.

[0025]

실시예 1: 탈지 및 단백질 추출

[0026]

귀뚜라미는 옥수수와 양배추를 먹였고 부화 후 42 일에 수확했다. 귀뚜라미의 희생은 CO₂ 처리로 이루어졌으며 추가 실험을 위해 -80 °C에 보관되었다. 보관 된 귀뚜라미는 분쇄기(RT-N08, Rong Tsong Precision Technology, Taichung, Taiwan)에 의해 분쇄되고 동결 건조되었다. 탈지 과정은 앞에서 설명한대로 수행되었다 [Choi, B.D., N.A. Wong, and J.-H. Auh, *Defatting and sonication enhances protein extraction from edible insects*. Korean journal for food science of animal resources, 2017. 37(6): p. 955].

[0027]

요약하면, 필요한 양의 크리켓 분말을 에탄올 용액 (99.5 %)에 분산시키고 4 시간 동안 교반하고 용매를 2 시간 간격으로 교체하였다. 여과 액을 실온에서 건조시키고 필요한 양의 물을 첨가하고 30 분 동안 교반하였다. 2.5 M 수산화 나트륨 (NaOH)을 첨가하여 혼탁액의 pH를 11로 유지하고 실온 (RT)에서 60 분 동안 교반 하였다. 혼합물을 3200g에서 20 분 동안 원심분리하고 Whatman 등급 41 여과지 (Whatman plc, Maidstone, UK)로 여과하였다. CPI (pH 4.0)의 등전점은 상등액에 2.5M HCl 용액을 첨가하여 달성 한 다음 RT에서 30 분 동안 교반했다. 그 후 산성화된 혼합물을 3200g에서 20 분 동안 원심 분리한 후 동결 건조하였다. 건조된 샘플은 추가 사용까지 보관되었다.

[0028]

실시예 2: CPI 화학적 특성 연구

[0029]

영양 성분의 결정

[0030]

CPI의 아미노산 함량은 닌히드린 방법으로 아미노산 분석기 (HITACHI L-8900, Hitachi High-Technologies Corporation, Japan)를 사용하여 분석되었다. CPI의 균사 구성은 AOAC 방법[AOAC, C.P., *Official Methods of Analysis of AOAC International. 5th Revision*. 1999, Maryland: AOAC International]에 따라 분석되었다. CPI의 단백질 함량은 6.25의 단백질-질소 전환 계수를 갖는 킬달 방법을 사용하여 결정되었다. 희분 함량은 샘플을 용광로에서 태워 측정했다. 조지방은 에테르로 추출한 조지방을 측정하는 속슬 렛법에 따라 분석하였다. 샘플의 탄수화물 함량은 다음과 같이 계산되었다.

[0031]

탄수화물 함량 (%) = 100 - [조단백질 (% DM) + 조지방 (% DM) + 조회 분], 여기서 DM은 건조 물질을 나타냄.

[0032]

분자량 결정

[0033]

CPI의 분자량 분포는 앞서 설명한대로 변형된 소듐도데실설페이트-폴리 아크릴아미드 겔 전기 영동 (SDS-

PAGE)에 의해 분석되었다 [Bu BS., et al., *Heliyon*, 2016. 2(12): p. e00218].

[0034] 요약하면, 샘플을 8M 요소 용액에 용해시키고 25 °C에서 30 분 동안 교반한 다음 3200g에서 20 분 동안 원심 분리하였다. 62.5mM β-메르캅토에탄올, 10 % SDS 및 0.1 % 브로모페놀블루를 함유하는 5x 샘플 완충액에 상청액의 분취량을 첨가하였다. 단백질을 95 °C에서 4 분간 변성시킨 후 4 μL의 단백질 래더(12-160 kDa)와 10 μL의 변성된 시료를 전기 영동하여 10 % Tris-Glycine gel로 분리하였다. 전기 영동 후 젤을 0.05 % 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하고 탈색 용액(아세트산:메탄올:탈 이온수 = 2 : 5 : 5)으로 탈색시켰다.

[0035] MALDI-TOF 스펙트럼 분석은 1000-6000 m / z 분해능 내에서 질량 분광계 (Bruker AutoFlex TOF / TOF, Bruker, Germany)를 사용하여 밤새 37 °C에서 CPI의 트립신 분해 후 CPI의 수용성 분획에 대해 수행되었다.

화학 성분 및 형태 학적 분석

[0037] Perkin Elmer FTIR 분석기(Frontier, Perkin Elmer, UK)를 적용하여 4cm⁻¹의 분해능으로 4000-1000 cm⁻¹의 파수 범위에서 전송 모드에서 샘플에 존재하는 기능 그룹을 평가했다. 샘플의 형태는 고해상도 전계 방출 주사 전자 현미경 (FE-SEM) (S-4800, Tokyo, Japan)으로 모니터링되었다.

DPPH 분석

[0039] 라디칼 소거 활성을 DPPH 분석에 의해 결정되었다.

[0040] 요약하면, 0.4 mM DPPH 용액에서 다른 CPI 농도 (0.25, 0.5, 1 및 2 %)를 준비했다. 혼합물을 RT에서 어두운 조건에서 30 분 동안 배양하였다. 아스코르베이트 용액 (0.25, 0.5, 1 및 2 %)도 참조용으로 준비되었다. 광학 밀도(OD)는 분광 광도계 (Infinite® M Nano 200 Pro; TECAN, 스위스)를 사용하여 517 nm에서 기록되었다. OD 값은 아스코르베이트의 등가 농도와 관련하여 CPI의 DPPH 소거 활성을 비교하기 위해 플롯되었다.

세포 배양

[0042] hBMSC는 한국 세포주 은행 (KCLB, 서울, 대한민국)으로부터 받아 이전에 보고 된대로 배양되었다[Dutta, S.D., et al., *Journal of Nanomaterials*, 2019. 2019]. 10 % FBS와 페니실린(10,000 Unit / mL), 스트렙토 마이신 (10,000 μg / mL), 암포테리신 B (25 μg / mL)가 포함된 1 % 항생제가 첨가된 DMEM을 사용하여 37 °C에서 5 % CO2 대기의 가습된 상태로 세포 배양을 수행했다 (Steri-Cycle 370 Incubator; Thermo Fisher Scientific, 미국). 실험 중 3 일마다 기준 배지를 새 배지로 교체했다. 70-80 % confluence 후, hBMSC는 원하는 기간 동안 다른 농도의 CPI로 처리되었다. 본 발명에서는 계대 5 세포를 사용했다. 골 형성 유도를 위해 세포는 50 μg / mL L-ascorbic acid, 10 mM β-glycerophosphate 및 100 nM dexamethasone이 보충된 DMEM이 포함된 골 형성 유도 배지에서 배양되었다.

세포 생존력 분석

[0044] hBMSC (1×10^4 세포/100 μL 배지)를 96 웰 플레이트에 시드하고 컨푸루언시 70-80 % 후, 선택한 기간 (1, 3 및 5 일) 동안 37 °C에서 0.25, 0.5, 1 및 2 % CPI와 함께 5 % CO2로 배양했다. 처리되지 않은 배지는 대조군으로 간주되었다. WST-1 분석 (EZ-Cytotoxicity Cell Viability Assay Kit®)을 사용하여 세포 생존력을 분석했다. 처리 후 10 μL의 WST-1 염료를 첨가하고 2 시간 동안 더 배양하였다. 생성된 포르마잔은 450nm (참고 값으로 625nm)에서 흡광도를 측정하여 정량화되었다. 모든 실험은 세 번 수행되었으며 데이터는 평균 OD ± 표준 편차로 표시된다. 통계적 유의성은 p * <0.05에서 고려되었다.

Live-Dead 분석

[0046] 이를 위해 hBMSCs (4×10^4 cells/100 μL 배지)를 37 °C에서 5 % CO2로 4-well plate에서 배양한 후 70-80 % confluence 후 2 % CPI 처리를 하였다. DMEM 단독으로 성장한 세포를 대조군으로 하였다. 세포를 1x PBS로 세척한 후 1 μL의 아크리딘 오렌지 및 에티듐브로마이드 염료 용액을 1 : 1 비율로 처리하였다. 이미지는 도립 형광 현미경 (DMI8 시리즈, Leica Microsystems, 독일)의 Leica Microsystems Suite X 소프트웨어 (Leica Microsystems, 독일)를 사용하여 적절한 필터 채널에서 즉시 캡쳐되었다. CPI 처리된 세포의 생존율은 3 일 배양 후 살아있는 죽은 형광 이미징을 사용하여 정량화되었다.

세포 형태

[0048] hBMSC의 형태에 대한 CPI의 효과는 Giemsa 염색 및 형광 현미경을 사용하여 조사되었다.

[0049] 4 웰 플레이트에서 3 일 동안 배양한 후 다양한 농도의 CPI (4×10^4 세포 / 100 μL 배지)의 존재 하에서 hBMSC의 콜로니 형태를 시각화하기 위해 Giemsa 염색 공정을 적용했다. 80 % 합류 후, 세포를 PBS로 세척하였다. 세척된 세포를 실온에서 3.7 % PFA로 고정시켰다. 처리되지 않은 배지와 젤라틴은 음성 및 양성 대조군으로 간주되었다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고 100 % 메탄올로 20 분 동안 투과시켰다. 투과된 세포를 PBS로 추가로 세척하고 Giemsa 염색으로 10 분 동안 배양 하였다. 과잉 염료는 PBS로 세척하여 제거하고 광학 현미경 (Zeiss Optical Microscope, USA) 하에서 5 배 배율로 이미지를 캡처했다.

[0050] F- 액틴의 배열은 세포 세포 골격에 대한 2 % CPI의 효과를 시각화하기 위해 형광 이미징을 통해 연구되었다. hBMSC (2×10^4 세포/100 μL 배지)를 60mm 바닥 웰 플레이트에서 배양하고 3 일 동안 2 % CPI로 처리했다. CPI 가 없는 배지를 대조군으로 사용되었다. 세포의 염색은 기존 문헌을 약간의 수정을 가하여 수행되었다 [Patel, D.K., et al., International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: p. 1429-1441].

[0051] 요약하면, 세포를 PBS로 세척하고 실온에서 15 분 동안 3.7 % 파라포름알데히드(PFA)로 고정한 다음 0.1 % Triton X-100을 첨가하여 실온에서 10 분 동안 세포를 투과시켰다. 세포를 PBS 완충액으로 두 번 헹구고 1 % BSA로 1 시간 동안 차단했다. 투과된 세포를 PBS로 세척한 다음 200 μL Alexa Fluor (AF) 488 F-액틴 프로브 (ex / em = 488 / 518)로 30 분 동안 배양하여 F- 액틴을 시각화했다. 핵 염색은 암실에서 2 분 동안 1mg / mL DAPI 용액 20 μL 를 첨가하여 수행되었습니다. 염색 된 세포를 헹구고 장착 배지와 유리 커버 슬립으로 덮었다. 형광 이미지는 형광 현미경으로 40 배 배율로 촬영되었다. 이미지의 ROI 강도는 ImageJ 소프트웨어 (ImageJ v1.8, NIH Lab., USA, www.imagej.nih.gov)를 사용하여 정량화되었다.

광물화(mineralization) 연구

[0053] hBMSC의 광물화에 대한 CPI의 효과는 치료 7 일 및 14 일 후 ARS 절차에 의해 평가되었다. 사용한 배지는 3 일마다 새 배지로 교체되었다. 배양된 세포를 PBS로 헹구었다. 세포를 고정하고 실온에서 15 분 동안 70 % 절대 얼음처럼 차가운 에탄올 1mL로 투과화시켰다. 투과된 세포를 500 μL 의 40mM ARS (pH 4.2) 염색으로 10 분간 염색한 후 탈 이온수로 세척하여 과잉 염색을 제거했다. 광물화는 광학 현미경을 사용하여 문서화되었다. 미네랄 정량화는 형성된 미네랄을 500 μL 탈지 용액 (10 % 세틸피리디늄 클로라이드 및 10mM 인산 나트륨)에 용해시켜 추정했다. 용액의 흡광도는 분광 광도계를 사용하여 562 nm에서 측정되었다. 모든 샘플은 삼중으로 준비되었으며 데이터는 평균 OD ± 표준 편차로 표시된다. 통계적 유의성은 p * <0.05에서 고려되었다.

RNA 분리 및 실시간 PCR (qRT-PCR) 분석

[0055] CPI 처리 및 대조군 세포에서 골 형성 마커 유전자의 발현은 qRT-PCR 기술로 평가되었다.

[0056] 요약하면, 세포 (4×10^4 세포/100 μL 배지)를 골 형성 유도 배지의 24 웰 플레이트에서 7 일 및 14 일 동안 배양한 후 TRIzol® 시약 (Thermo Fisher Scientific, USA)으로 RNA를 추출했다. 제조업체의 지침에 따라. 추출된 RNA의 순도와 농도는 분광 광도계로 평가되었다. cDNA는 reverse transcriptase와 SYBR Green Master mix 를 사용하여 RNA 2 μg 에서 합성되었다. mRNA 발현은 Bio-Rad Real-Time PCR (CFX96TM Maestro Real-Time System, Bio-Rad, USA)으로 정량화되었다. 반응 조건에는 95 ° C에서 15 초 동안 43 사이클의 변성 및 60 ° C에서 1 분 증폭이 포함되었다. 모든 실험은 삼중으로 수행되었고 하우스 키핑 유전자 β - 액틴으로 정규화되었다. CPI 및 대조군의 존재하에 hBMSC로부터의 상대적 mRNA 발현을 히스토그램에서 비교하였다. 모든 샘플은 실험 중에 3 종으로 준비되었다. qRT-PCR 분석에 사용되는 특정 유전자 프라이머는 표 1에 나열되어 있다.

표 1

Genes	GenBank Accession No.	Sequences (5→3'')
베타-actin	NM_031144	ACCCGCGAGTACAACCTTCT CTTCTGACCCATACCCACCA
Runx2	NM_001146038	CGCACGACAACCGCACCAT CAGCACGGAGCACAGGAAGTT
OSX	NM_001300837	TGCTTGAGGAGGAAGTTCACAGTCACTGCCACAGAGTA
ALP	NM_007431	CCAACTCTTTGTGCCAGAGAGGCTACATTGGTGTGAGCTTT
BSP	L09555	AACTTTATGCCCCGTTGATGGACTGGAAACCGTTCAAGA
OCN	AL135927	TGAGAGCCCTCACACTCCTCACCTTGCTGGACTCTGCAC
OPN	J04765	TGAAACGAGTCAGCTGGATGTGAAATTCATGGCTGTGGAA

COL1	NM007742	GCTCCTCTTAGGGGCCACT CCACGTCTCACCATTTGGGG
------	----------	---

[0058] 표 1은 qRT-PCR 분석에 사용된 특정 유전자 프라이머 서열.

[0059] 상기 표에서 약어: 베타-actin; Actin beta, Runx2; Runt-related transcription factor-x2, OSX; Osterix, ALP; Alkaline phosphatase, BSP; Bone sialoprotein, OCN; Osteocalcin, OPN; Osteopontin, and COL1; Collagen type-1.

단백질 마커 발현 분석

[0061] 골 형성 마커 단백질의 발현은 형광 이미징을 통해 연구되었다. hBMSC (4×10^4 세포/100 μ L 배지)를 60mm 바 닥 웰 플레이트에서 배양하고 7 일 및 14 일 동안 2 % CPI로 처리했다. CPI가 없는 배지를 대조군으로 사용되었다. 세포 염색은 PBS로 세척한 후 3.7 % 파라포름알데히드(PFA)로 15 분 동안 RT에서 고정하여 수행하였다. 다음으로, 실온에서 10 분 동안 0.1 % Triton X-100을 추가하여 세포를 투과시켰다. 그 후, 세포를 PBS로 두 번 행구고, 1 % BSA로 차단하고, Runx2, ALP, OCN 및 OPN에 대한 250 μ L의 마우스 단클론 항체와 함께 배양했다.

[0062] 핵은 어둠 속에서 2 분 동안 1mg/mL DAPI 용액 20 μ L로 카운터염색되었다. 염색된 세포를 행구고 장착 배지와 유리 커버 슬립으로 덮었다. 형광 이미지는 형광 현미경으로 40 배 배율로 촬영되었다. 이미지의 평균 형광 강도는 ImageJ 소프트웨어 (ImageJ v1.8, NIH Lab., USA, www.imagej.nih.gov)를 사용하여 정량화되었다.

[0063] 본 발명의 상기 실시예의 데이터는 OriginPro 9.0 소프트웨어를 사용하여 통계 분석을 수행했다. 대조군과 치료군 간의 통계적 유의성은 일원 분산 분석을 사용하여 결정되었다. 모든 데이터는 평균 \pm SD로 표시된다. 차이는 $p < 0.05$ 에서 중요한 것으로 간주되었다.

[0064] 상기 실시예의 결과는 하기에서 설명한다.

영양 성분

[0066] CPI의 영양 성분이 결정되었고 그 값은 표 2에 나와 있다. 얻어진 데이터는 추출된 물질이 단백질 함량이 풍부하다는 것을 나타낸다(~ 90.91 %). 탄수화물, 회분 및 지방 함량은 무시할 만했다. CPI의 총 아미노산 양은 Kjeldahl 방법에 의해 결정되었고 표 3에 나열되었다. 단리물의 총 아미노산 양은 시료 당 69.70g/100g이었다. 데이터는 CPI가 필수 아미노산의 30.68 %와 비필수 아미노산의 39.02 %임을 보여주었다. 류신은 가장 많은 필수 아미노산(6.40g)이고, 그 다음은 각각 CPI 100g 당 라이신과 발린(5.02 및 4.27g)이다. 비필수 아미노산 중 글루탐산(9.15g)과 아스파르트산(8.44g)은 CPI 100g 당 상대적으로 농도가 높았다.

표 2

샘플	Crude protein (%, DM)	Crude fat (% DM)	Crude ash (%, DM)	Carbohydrate* (%, DM)
Cricket protein isolate	90.91 \pm 0.36 ^a	0.46 \pm 0.10 ^a	3.67 \pm 0.25 ^a	4.96

[0068] 표 2는 *Gryllus bimaculatus* 단백질 분리물의 조성(g/100g)(mean \pm S.D., n=3). 각 컬럼에서 다른 문자들은 평균들간의 유의 차이를 보여줌($p < 0.05$). *Carbohydrate (%): 100 - crude protein - crude fat - crude ash. DM: dry matter.

표 3

필수 아미노산	Contents (g/100g sample)	Non-essential Amino acid	Contents (g/100g sample)
Isoleucine	3.89	Aspartic acid	8.44
Leucine	6.40	Serine	4.15
Lysine	5.02	Glutamic acid	9.15
Methionine	1.24	Proline	3.58
Phenylalanine	3.60	Glycine	3.34

Tyrosine	3.81	Alanine	4.03
Threonine	3.56	Cysteine	1.00
Valine	4.27	Arginine	5.32
Histidine	1.72	Non-essential A.A	39.02
Tryptophan	1.06		
Essential A.A	30.68		

[0070] 표 3은 *G. bimaculatus*의 단백질 분리물에 대한 아미노산 조성 (g/100 g 샘플)

분자량 분석

[0072] CPI의 단백질 함량의 분자량을 알기 위해 SDS-PAGE 분석을 수행했으며 그 결과는 도 1a에 나와 있다. 레인 1은 12 ~ 160kDa 범위의 단백질 래더를 나타내고 레인 2는 6 개의 두드러진 단백질 밴드와 여러 다른 희미한 밴드의 얼룩을 포함하는 CPI 단백질 구성을 보여준다. 단백질 밴드 강도 프로파일은 도 1b에 나와 있다. 126kDa의 단백질 분획은 가장 높은 밴드 강도를 보였고 그 다음으로 56, 160, 62, 52 및 162 kDa 분자량을 나타냈다. MALDI-TOF MS는 6 kDa 범위 이하의 단백질의 분자량을 결정하기 위해 수행되었으며 질량 스펙트럼은 도 9에 나와 있다. 질량 스펙트럼에서 약 26 개의 피크가 관찰되었는데, 이는 6kDa 범위의 CPI에서 다양한 종류의 웨티드를 나타낸다.

CPI의 FTIR 및 형태

[0074] FTIR 스펙트럼은 4000~400 cm⁻¹ 범위에서 전형적인 단백질 흡수 피크를 보여준다. CPI의 FTIR 스펙트럼은 도 2a에 나와 있다. 1635 및 1517 cm⁻¹에서 흡수 피크의 출현은 단백질의 β- 시트 구조의 -C = O (카르 보닐) 및 -N-H (아미드 II) 그룹의 존재를 나타낸다. 3277 cm⁻¹에서 FTIR 흡수 피크는 단백질의 -OH (하이드 롤실) 또는 -NH₂ (아민) 그룹의 존재를 나타낸다.

[0075] 재료의 표면 패턴과 거칠기를 포함한 표면 지형적 특징은 세포 생존성과 골 형성 분화에 중요한 역할을 한다. 동결 건조된 CPI의 표면 형태는 FE-SEM으로 분석되었으며 현미경 사진은 도 2b에 나와 있다. CPI는 형태에서 거칠고 매끄러운 플레이크 층의 조합을 나타내어 구조의 결정성을 시사한다. 그러나 표면 형태는 추출 과정과 그 조건에 크게 영향을 받는다. 제타 전위 측정은 수중 CPI의 표면 전위를 측정하기 위해 수행되었다. 콜로이드 용액은 -23.2 mV ± 3.72의 제타 전위 값을 나타내어 CPI 혼탁액이 전기적으로 안정화되었음을 나타낸다.

CPI의 항산화 활성

[0077] CPI의 항산화 잠재력은 다양한 농도의 CPI가 존재할 때 DPPH 분석을 사용하여 결정되었으며 그 결과는 도 3a에 나와 있다. 대조군과 비교하여 CPI 처리 조건에서 517 nm에서 흡광도의 감소가 관찰되어 소거 특성을 보여준다. 이 속성은 CPI 농도의 영향을 많이 받았으며 그(0.25, 0.5, 1 및 2 %) 중 2 %가 더 나은 스캐빈저 가능성을 보여주었다. 다양한 농도의 CPI와 아스코르베이트가 존재할 때 DPPH 감소 사진이 도 3b에 나와 있다. CPI의 농도가 증가함에 따라 더 투명한 용액이 관찰되어 더 나은 스캐빈저 가능성을 보여주었다. 더 높은 농도(2 %)에서 CPI 용액의 투명성은 아스코르베이트와 거의 비슷했다.

세포 생존력 및 형태

[0079] CPI의 세포 독성은 hBMS의 존재하에 WST-1 분석을 통해 모니터링되었으며 그 결과는 도 4a에 제시되어 있다. CPI 처리 그룹에서는 부작용이 관찰되지 않았으며 생체 적합성을 나타냈다. 그러나 CPI 농도가 세포 생존력을 크게 변화시켰고, 2 % CPI 처리된 배지가 치료 5 일 후 더 높은 세포 생존력을 나타내어 세포 활성에 적합한 용량을 나타내는 것은 흥미로웠다. 2 % CPI의 존재 하에서 hBMS 및 처리 5 일 후 대조군에 대한 생사 분석은 (%) 세포 사멸과 함께 각각 도 4b 및 도 10에 나와 있다. 기질에 부착된 세포의 수는 핵의 수를 세어 추정했다. (%) 세포 사멸은 대조군보다 CPI 처리 배지에서 현저히 낮았으며, 더 큰 생체 적합성을 보여주었다.

[0080] CPI의 존재 하에서 hBMS의 형태는 배양 3 일 후 Giemsa 염색을 사용하여 모니터링되었으며 이미지는 도 5a에 표시된다. CPI가 없는 배지와 젤라틴이 있는 배지는 각각 음성 및 양성 대조군으로 간주되었다. CPI 처리 배지에서 대조군과 유사한 콜로니 형성 패턴이 관찰되어 생체 적합성을 나타냈다. CPI 존재 하에 hBMS의 세포 골격 및 핵 형태는 배양 3 일 후 액틴 필라멘트의 형광 염색을 사용하여 결정되었으며 형태는 도 5b에 나와 있다. CPI가 없는 배지를 대조군으로 하였다. hBMS의 액틴 및 핵 형태는 CPI 처리 된 세포와 대조군 세포에서 비슷했으며, CPI 처리된 세포에서 눈에 띄는 세포 골격 또는 핵 손상을 보이지 않았다. 두 조건에서 hBMS의 강도 프로파일

은 도 11에 나와 있다.

[0081] 글 형성 분화

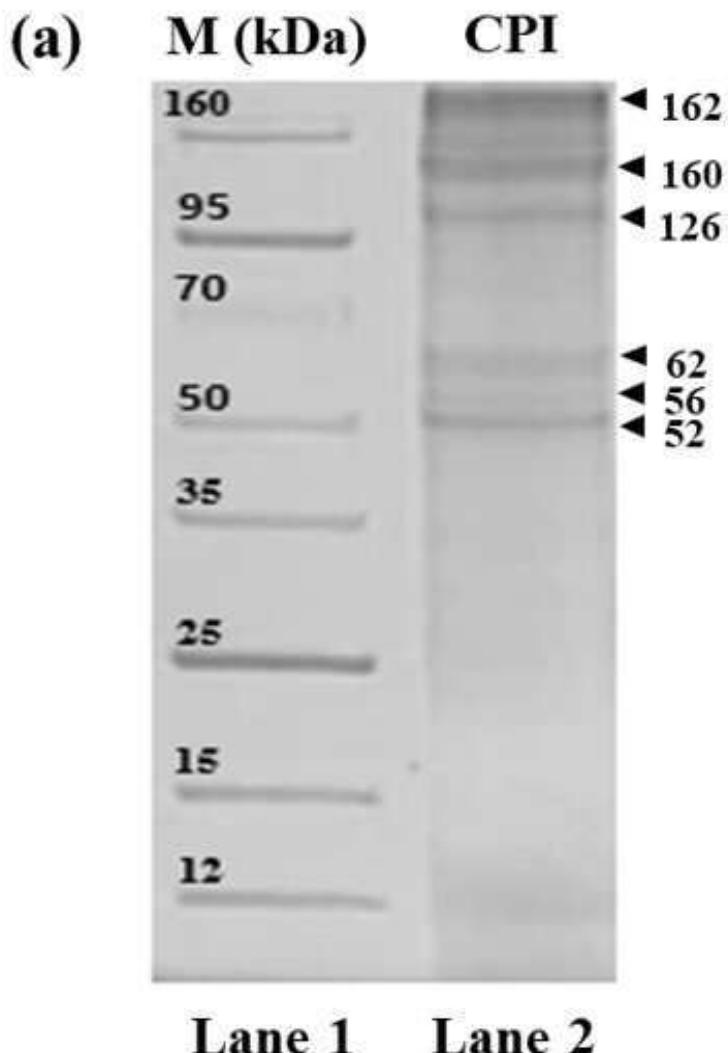
CPI 존재 하에서 hBMSCs의 광물화 가능성은 처리 7 일 및 14 일 후 ARS 염색 절차를 사용하여 결정되었으며 결과는 도 6a에 나와 있다. 처리 7 일 후에 대조군보다 CPI 처리 된 세포에서 증가된 광물화가 관찰되었으며, 이는 광물화 가능성을 나타낸다. 이 잠재력은 치료 14 일 후에 더욱 증가한다. 광물화 잠재력은 배지의 CPI 농도에 의해 집중적으로 영향을 받았으며 이들(0.25, 0.5, 1, 2 %) 중 2 % CPI가 더 나은 광물 증착 잠재력을 나타냈다는 점이 흥미로웠다. 광물화의 정량적 값은 도 6b에 나와 있다. 더 높은 정량적 값은 CPI의 우수한 광물화 잠재력을 확인한다.

[0083] 조골 세포 특이 유전자 및 단백질 마커 발현

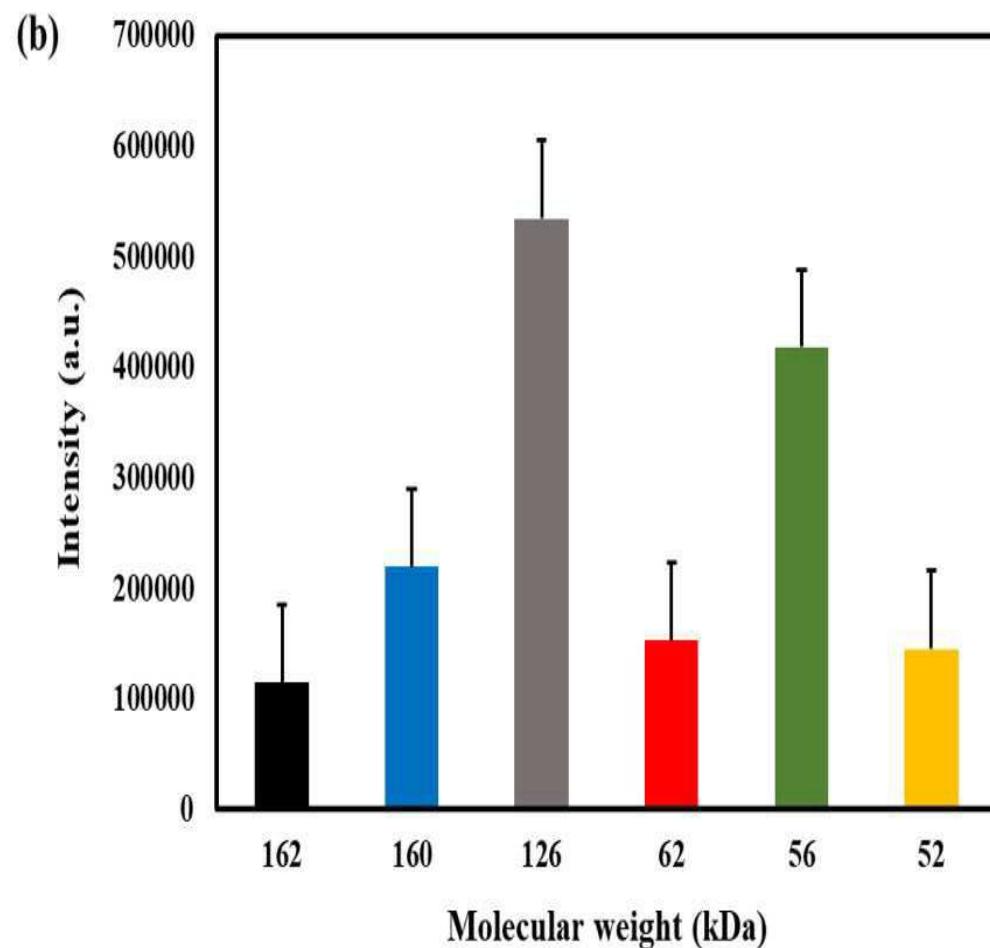
처리 7 일 및 14 일 후 대조군 및 2 % CPI의 존재 하에서 hBMSC의 글 형성 마커 유전자 (Runx2, OSX, ALP, BSP, OCN, OPN 및 COL1)의 발현은 도 7a 및 7b에 나와 있다. Runx2, BSP 및 OCN 발현은 처리 후 14 일까지 더 높았다. 반대로 OSX, ALP 및 OPN의 발현은 CPI 처리 14 일 후에 감소했다. COL1의 발현은 CPI 처리 7 일 및 14 일에 일관되었다. Runx2, ALP, OCN 및 OPN에 해당하는 단백질 발현은 도 8a에 나와 있다. 평균 형광 강도에 의해 측정된 바와 같이, 각각의 단백질은 처리 7 일 및 14 일 후에 대조군과 처리된 세포 모두에서 동일하게 발현되는 것으로 관찰되었다(도 8b). 그러나 대조군과 CPI 처리된 세포 사이의 평균 강도에서는 유의한 차이가 없었다.

도면

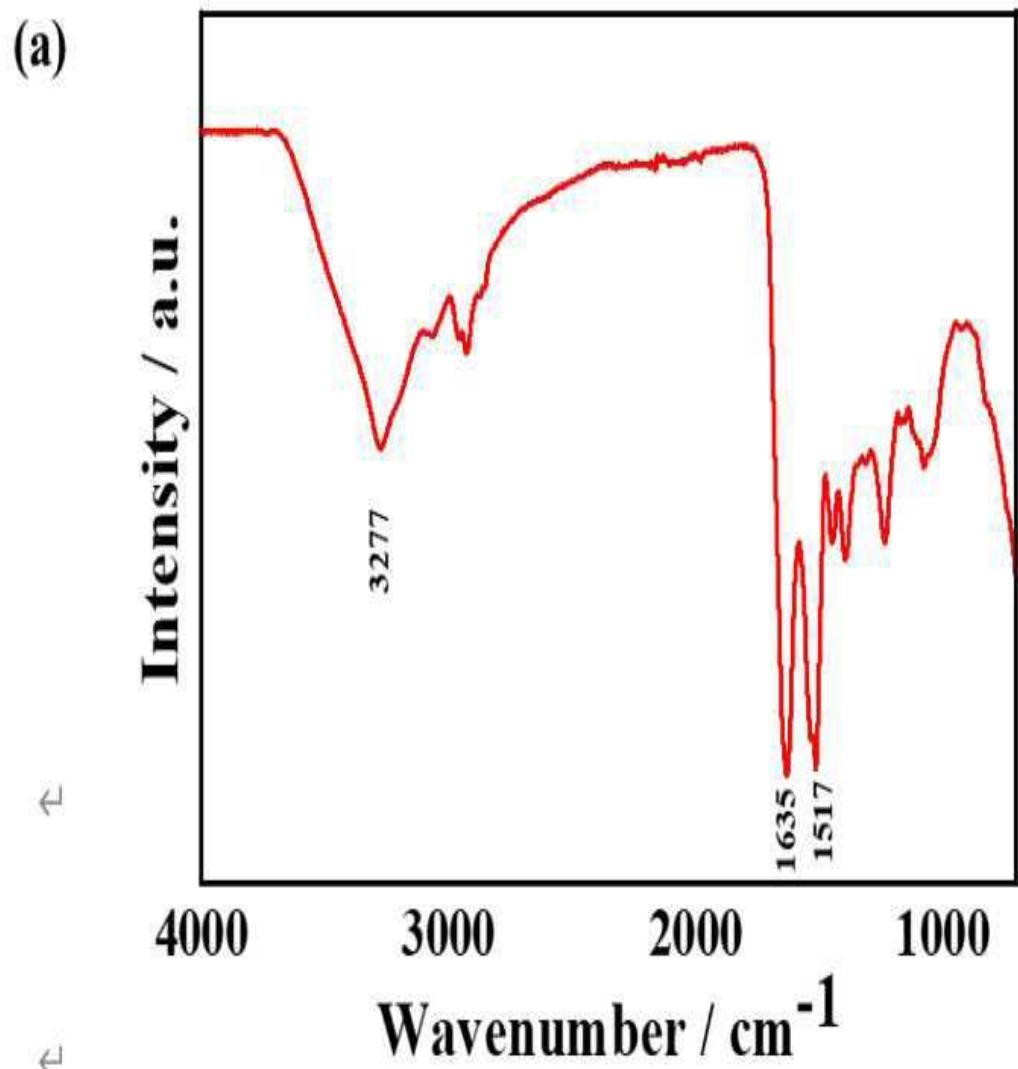
도면 1a



도면 1b

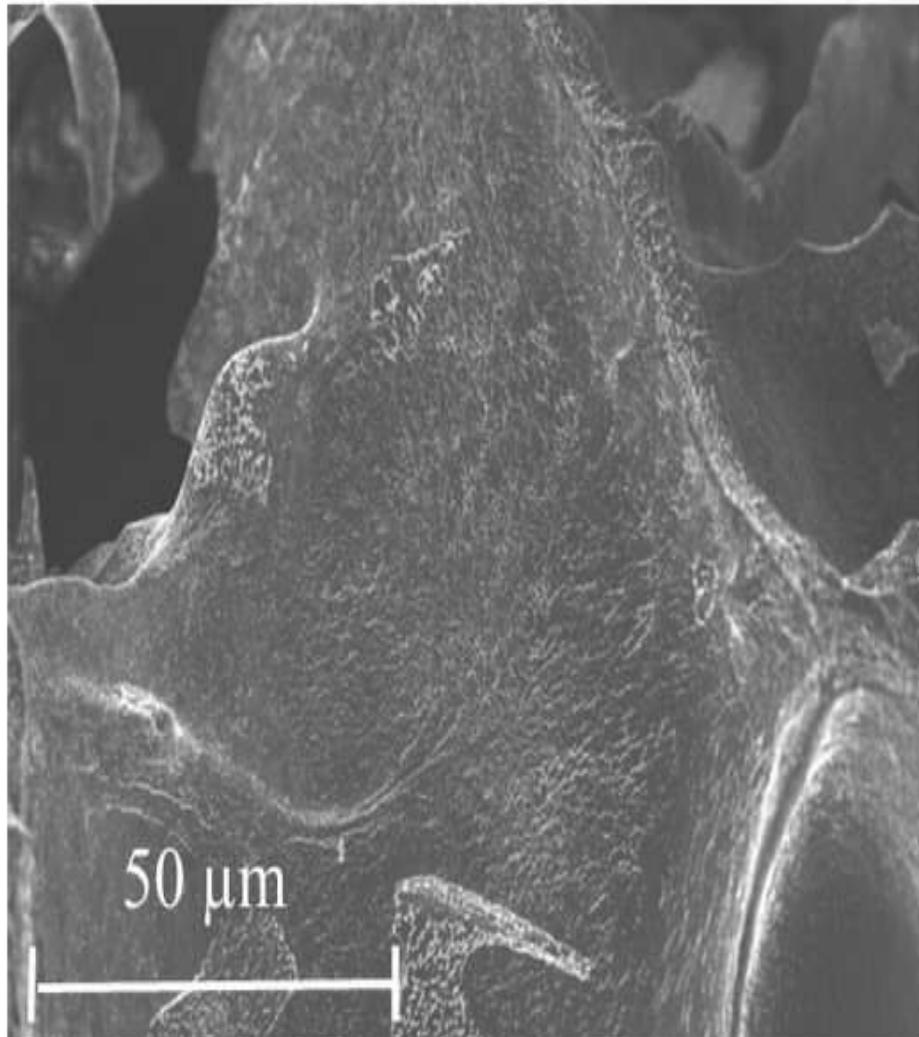


도면2a

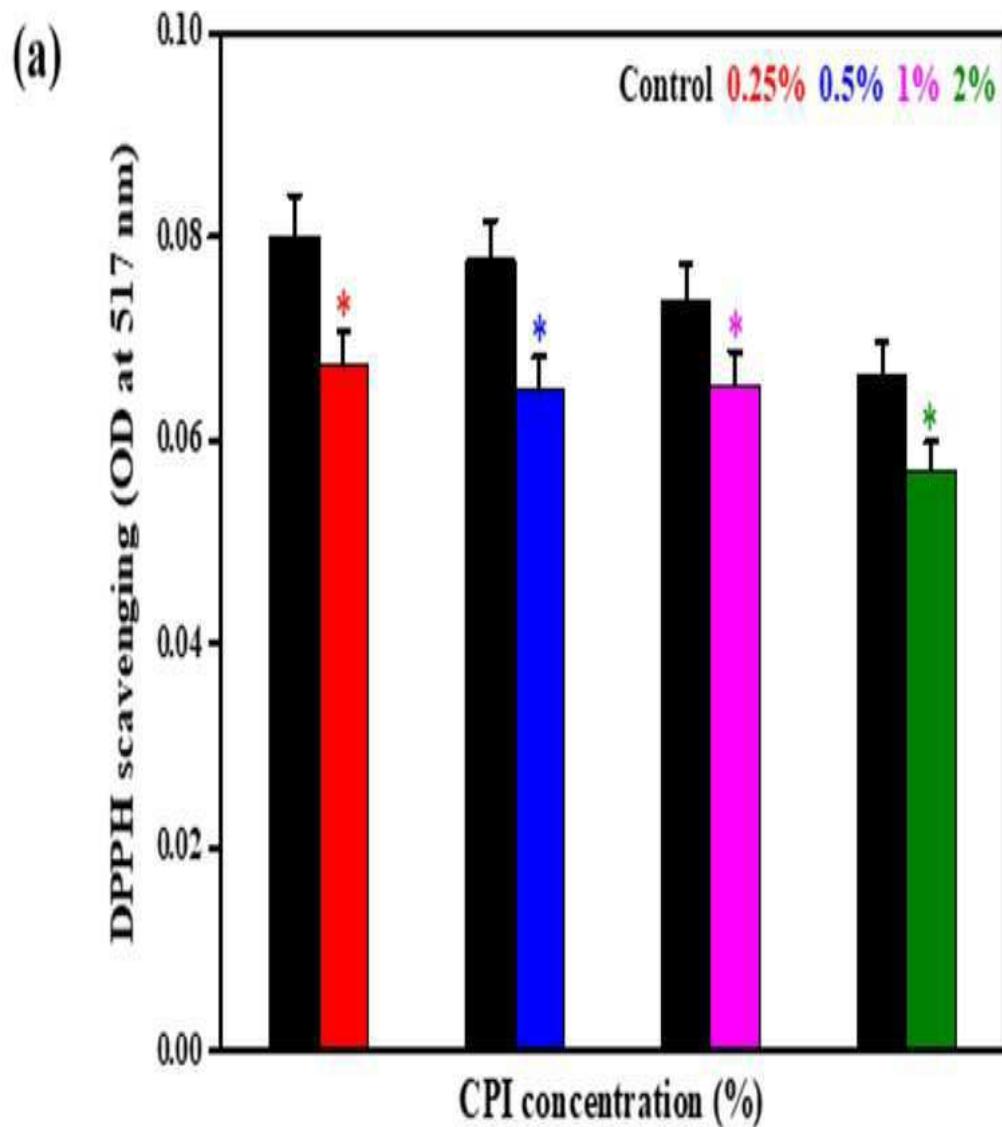


도면2b

(b)



도면3a

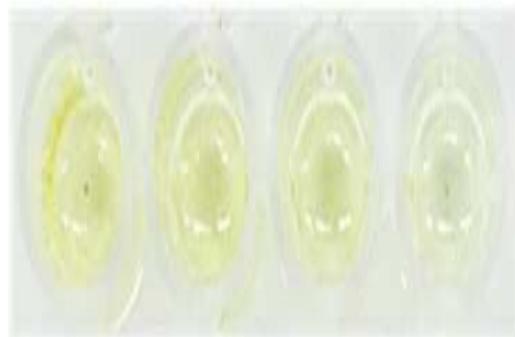


도면3b

(b)

0.25% 0.5% 1% 2%

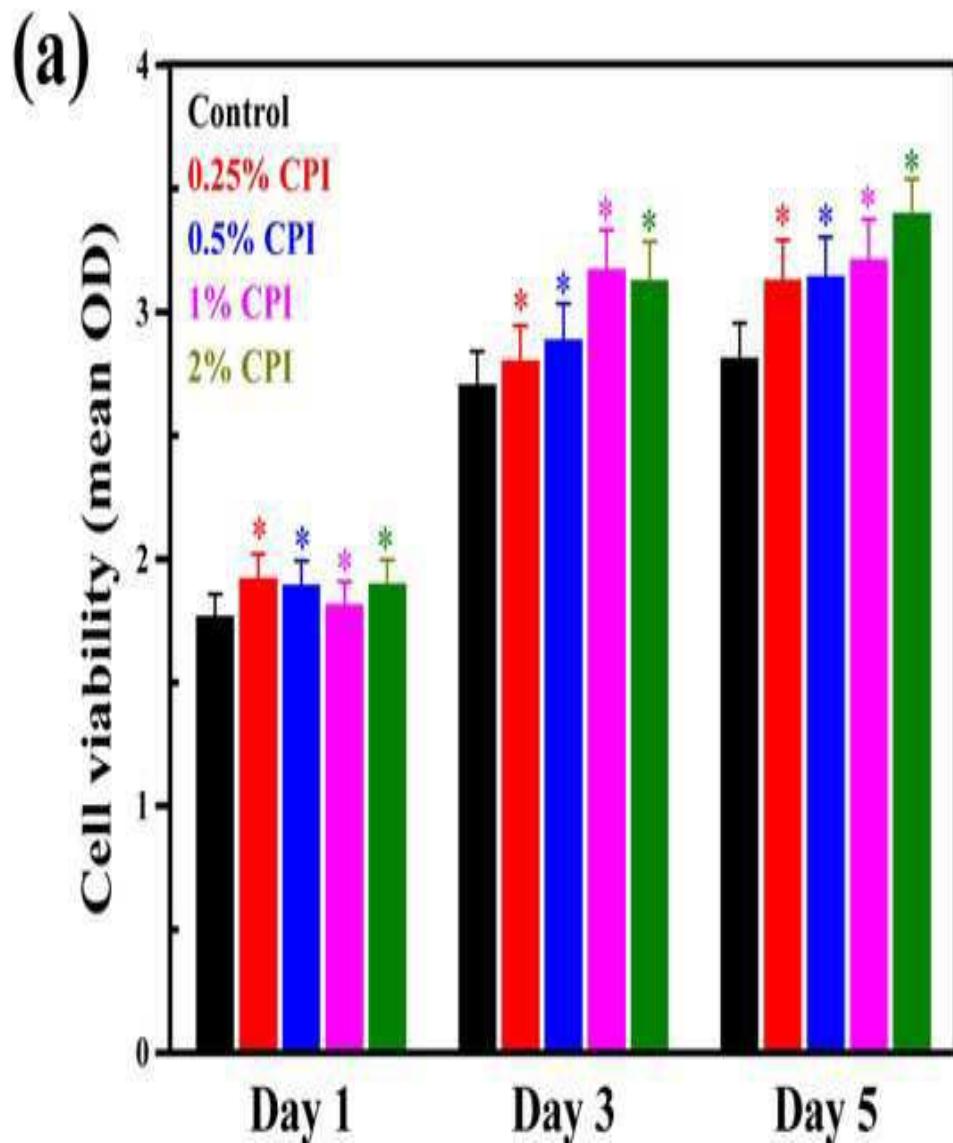
Ascorbate



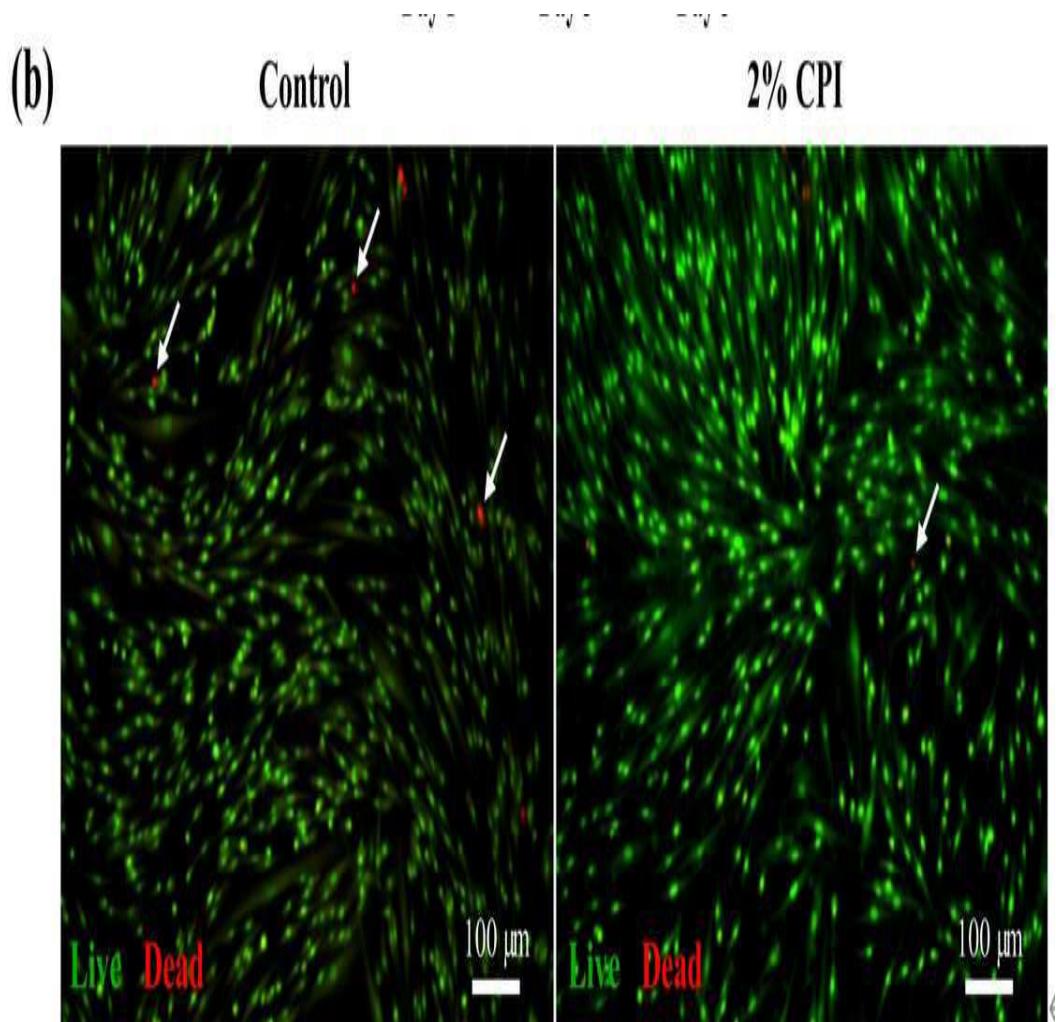
CPI



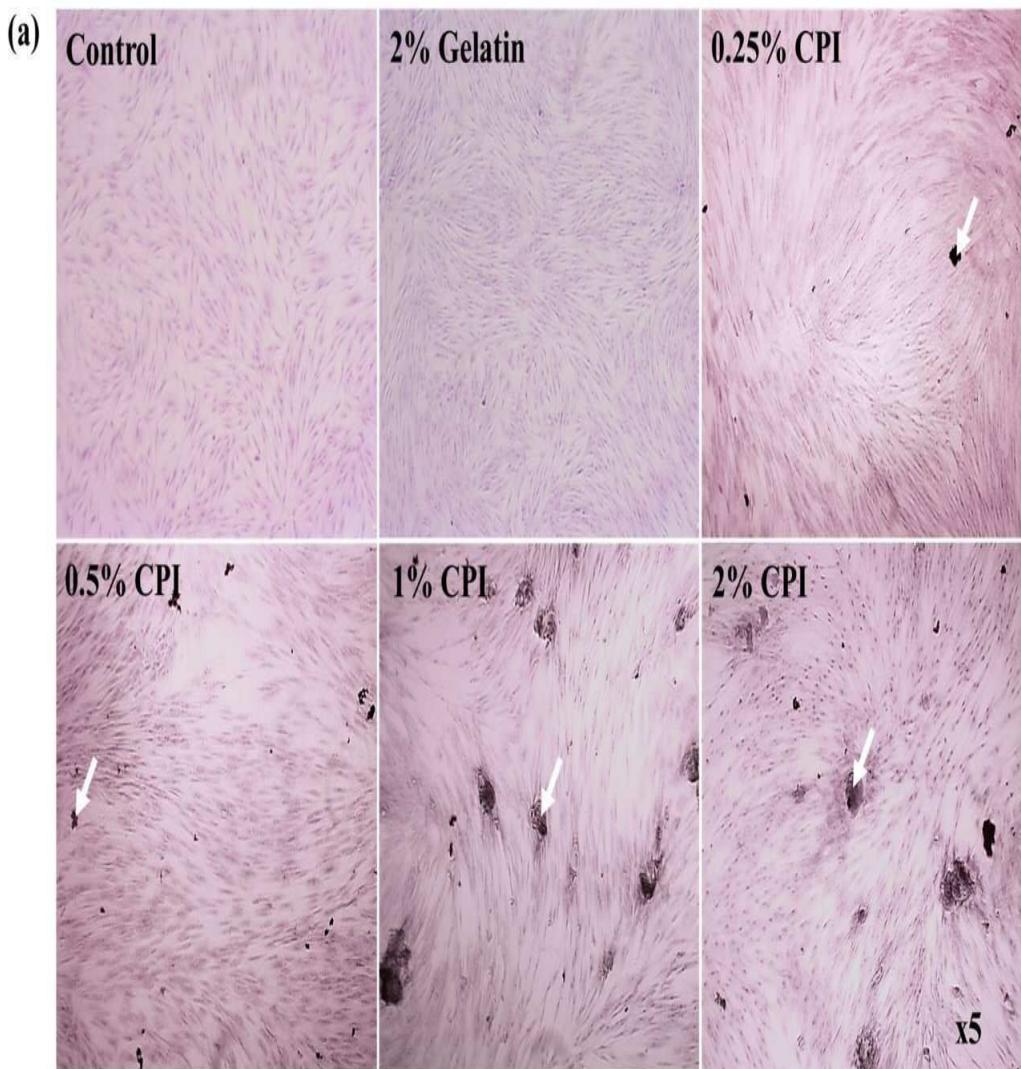
도면4a



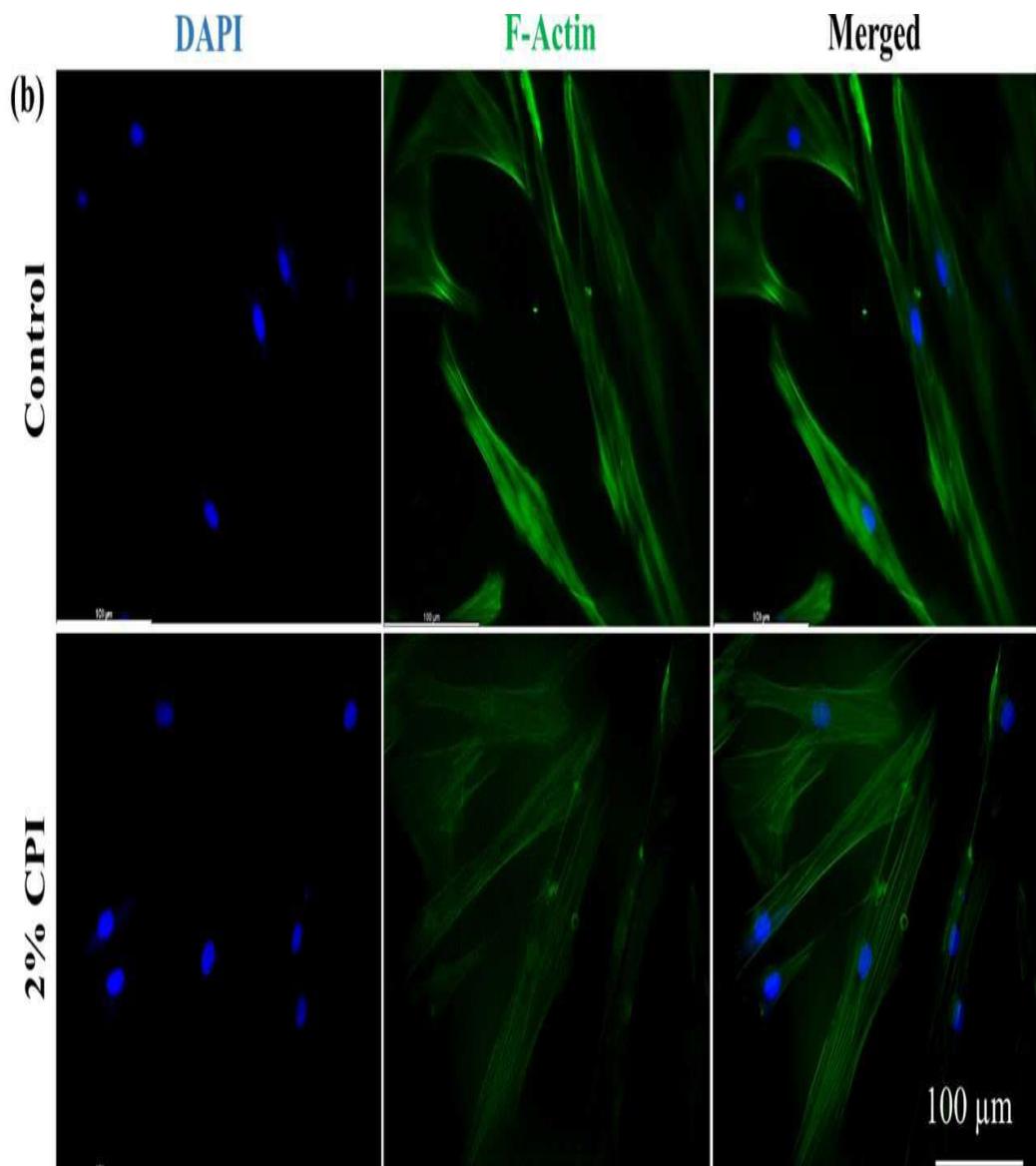
도면4b



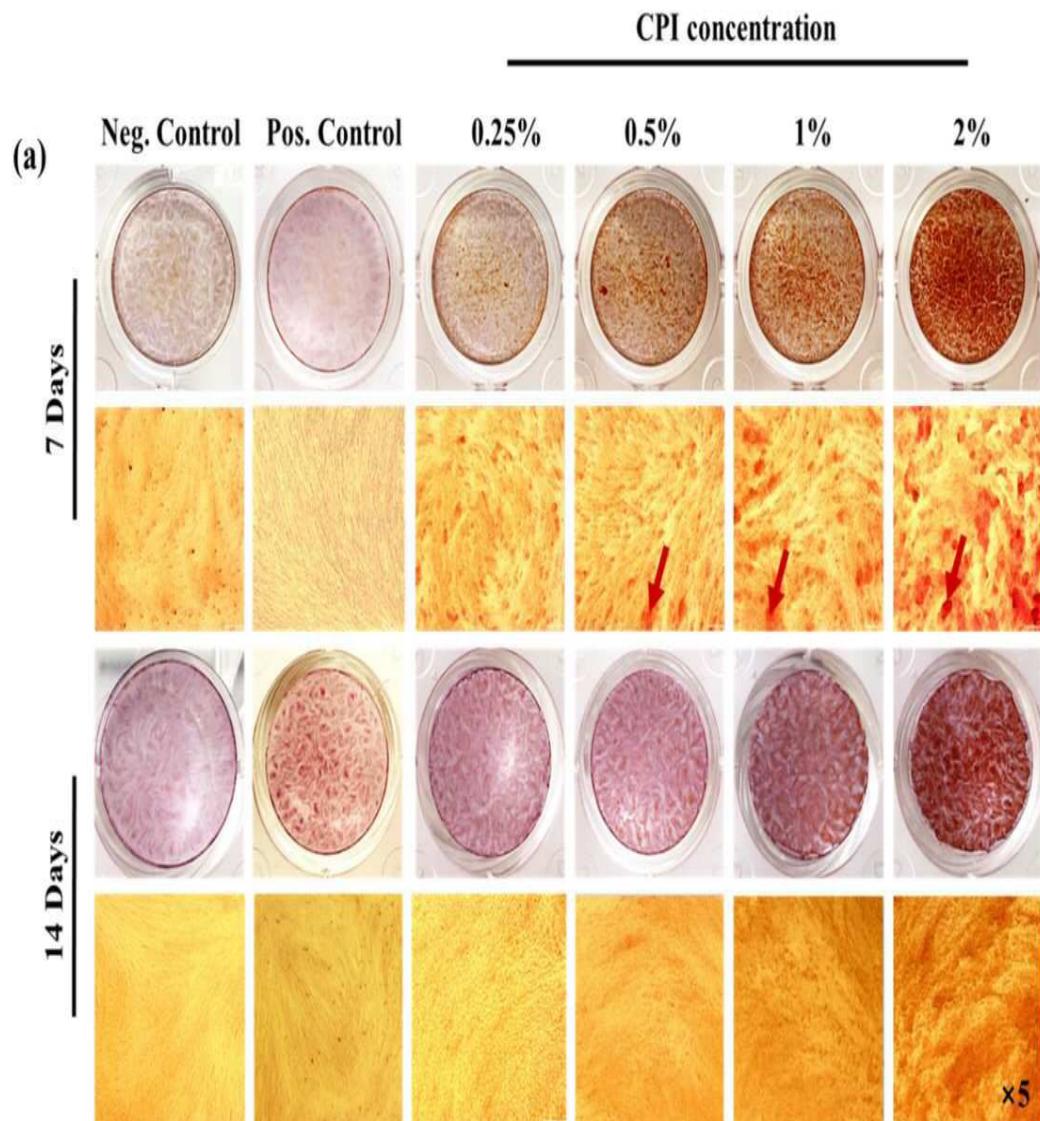
도면5a



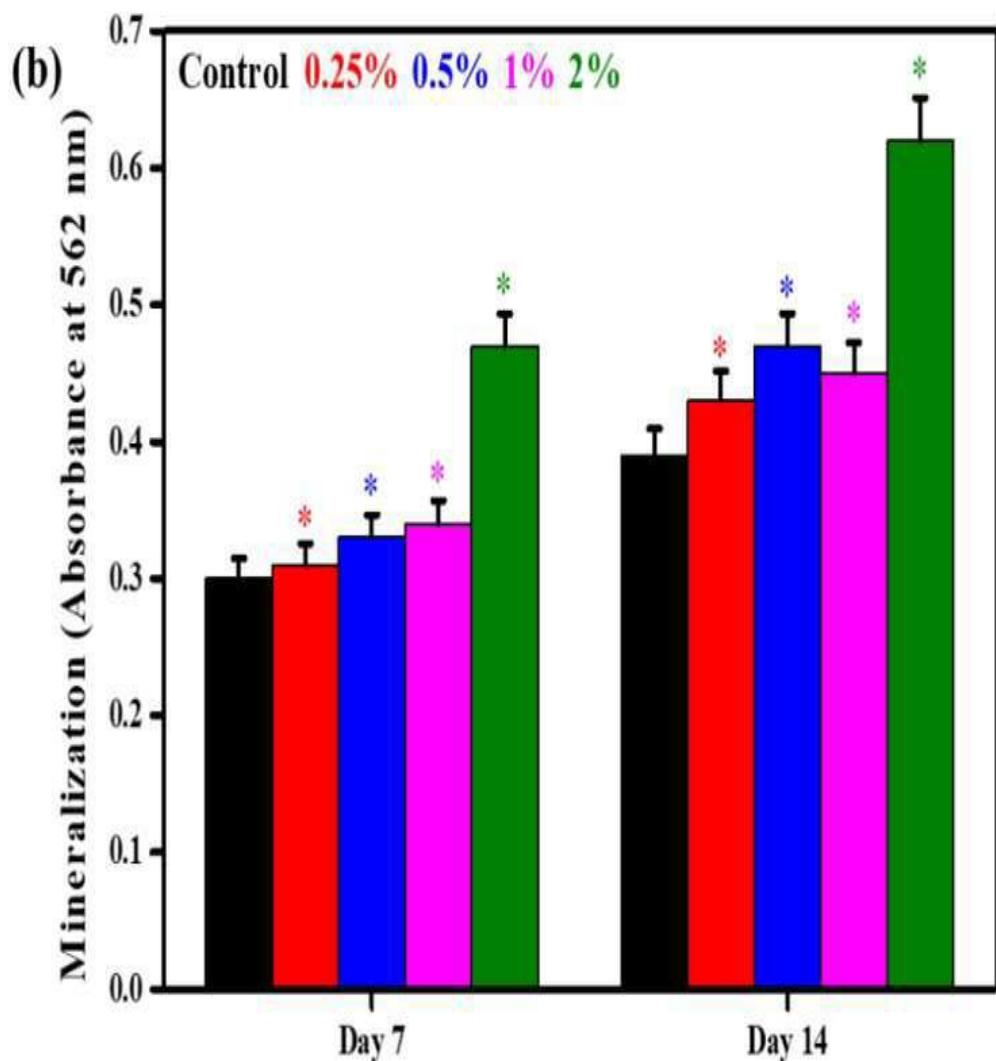
도면5b



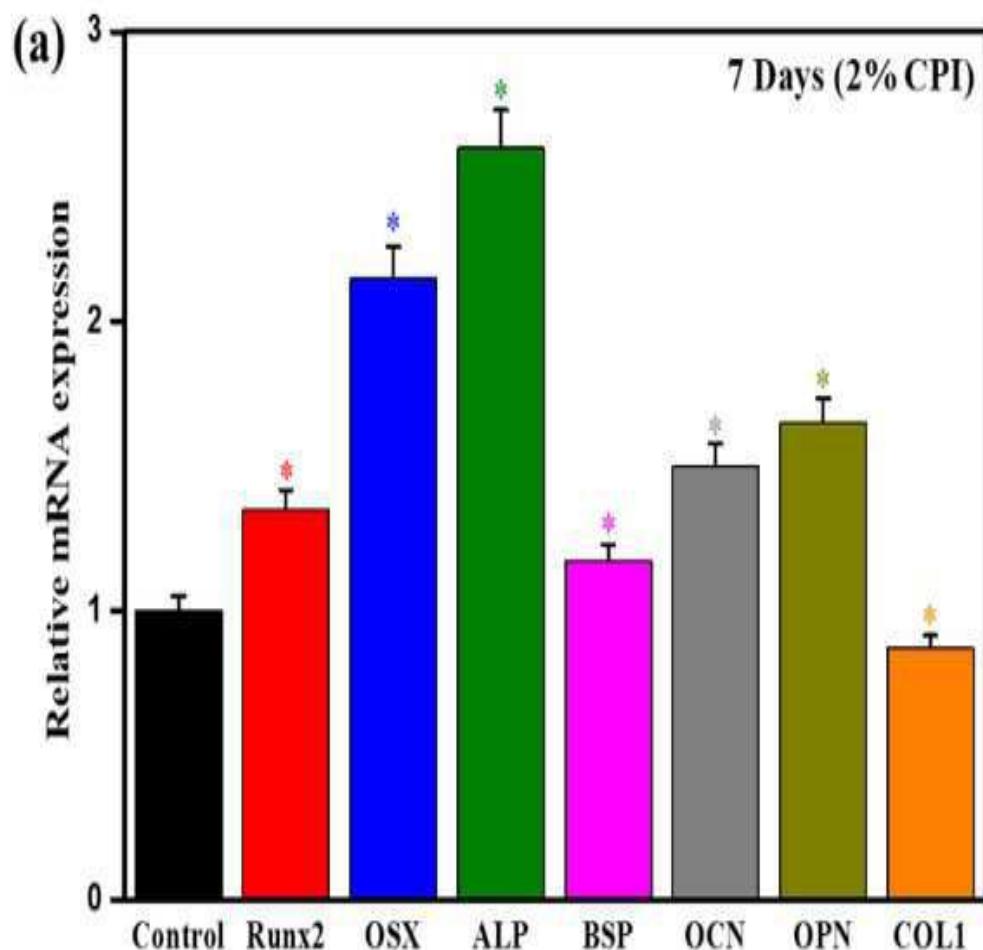
도면6a



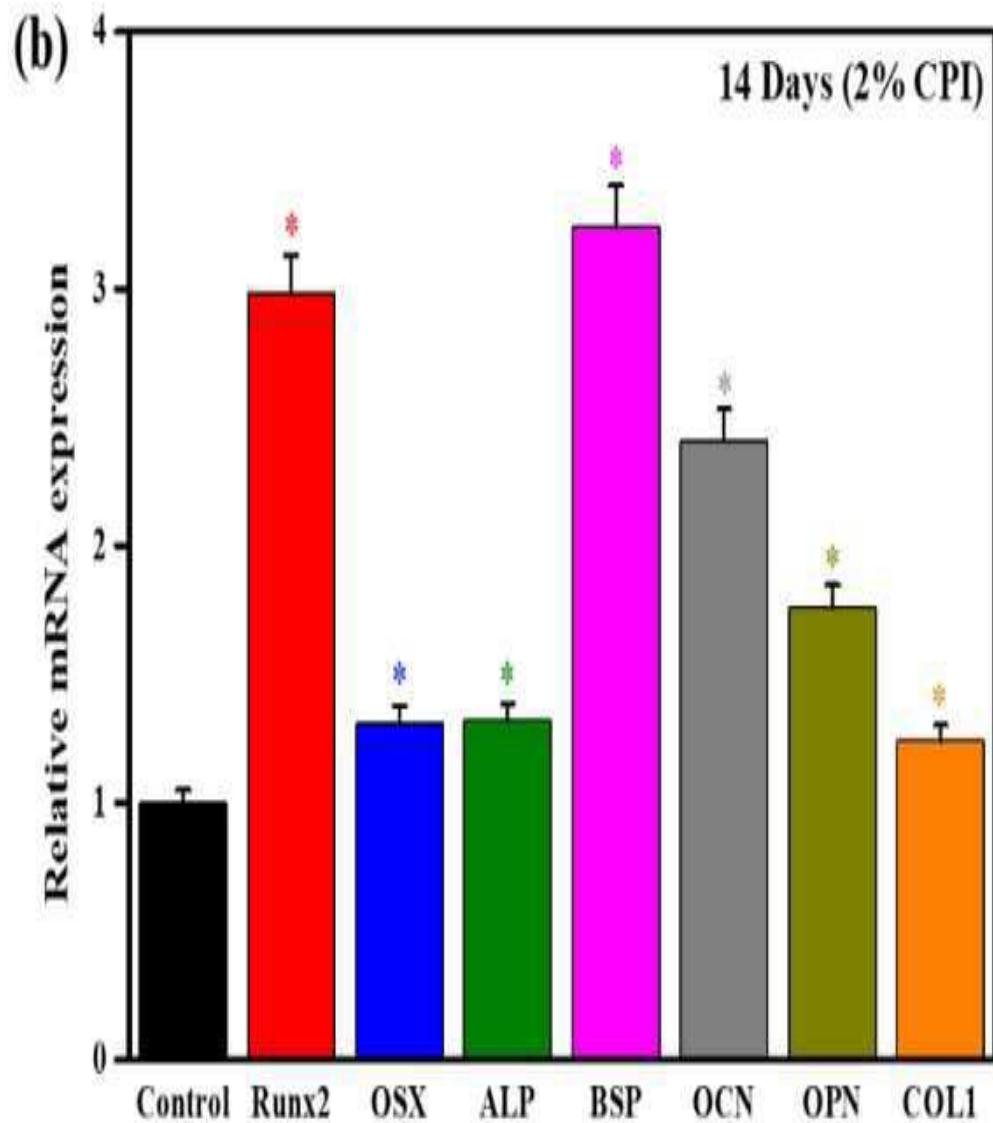
도면6b



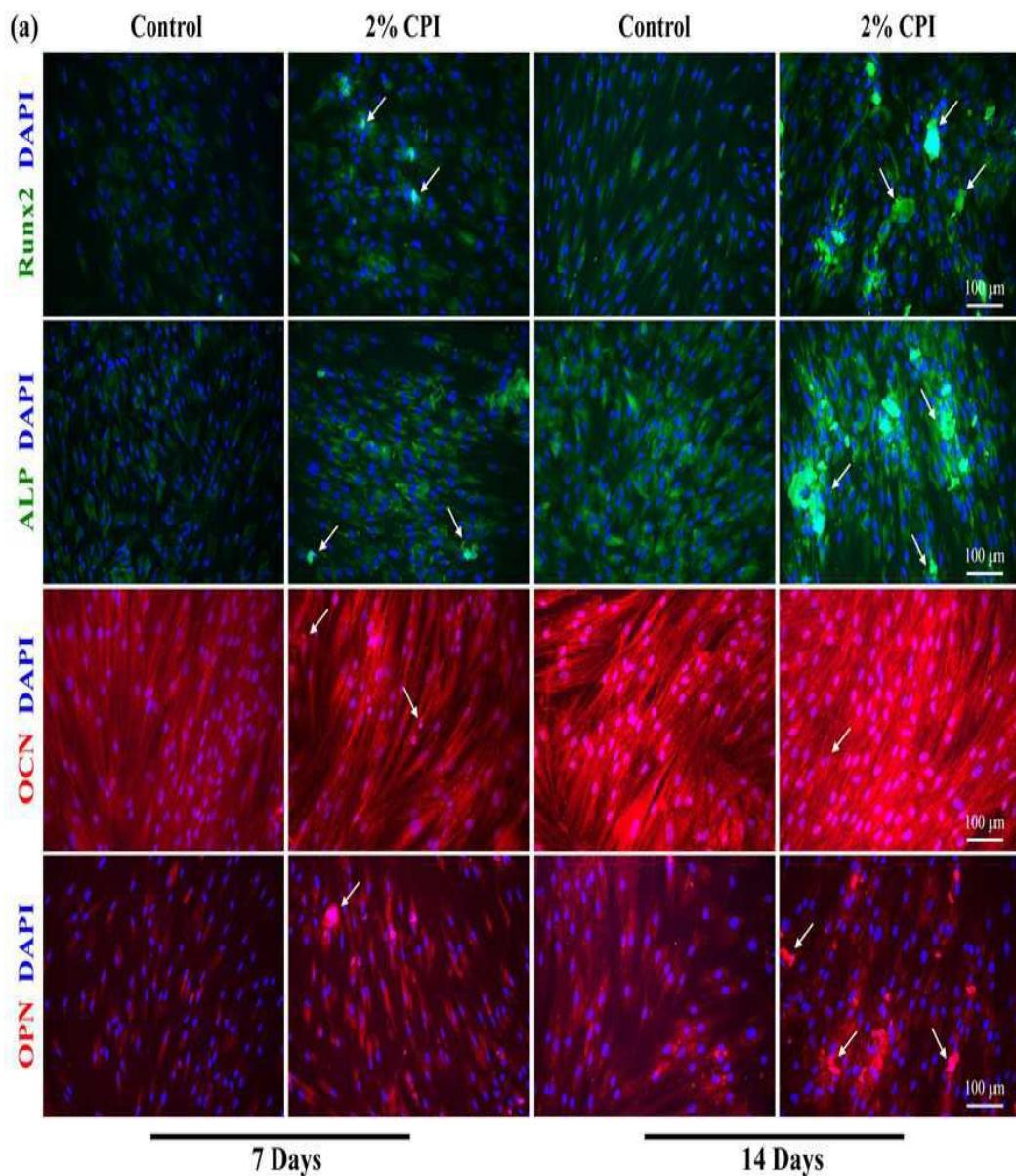
도면7a



도면7b

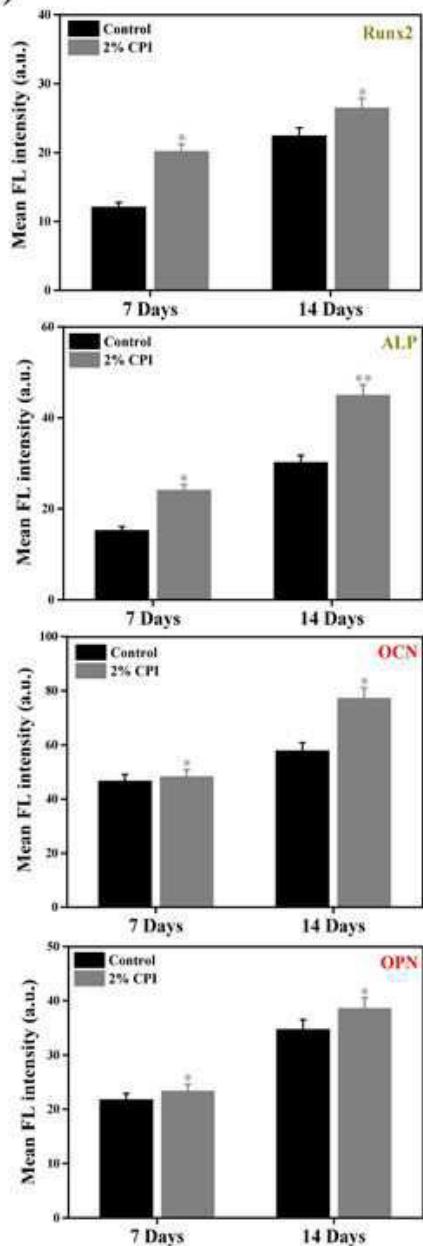


도면 8a

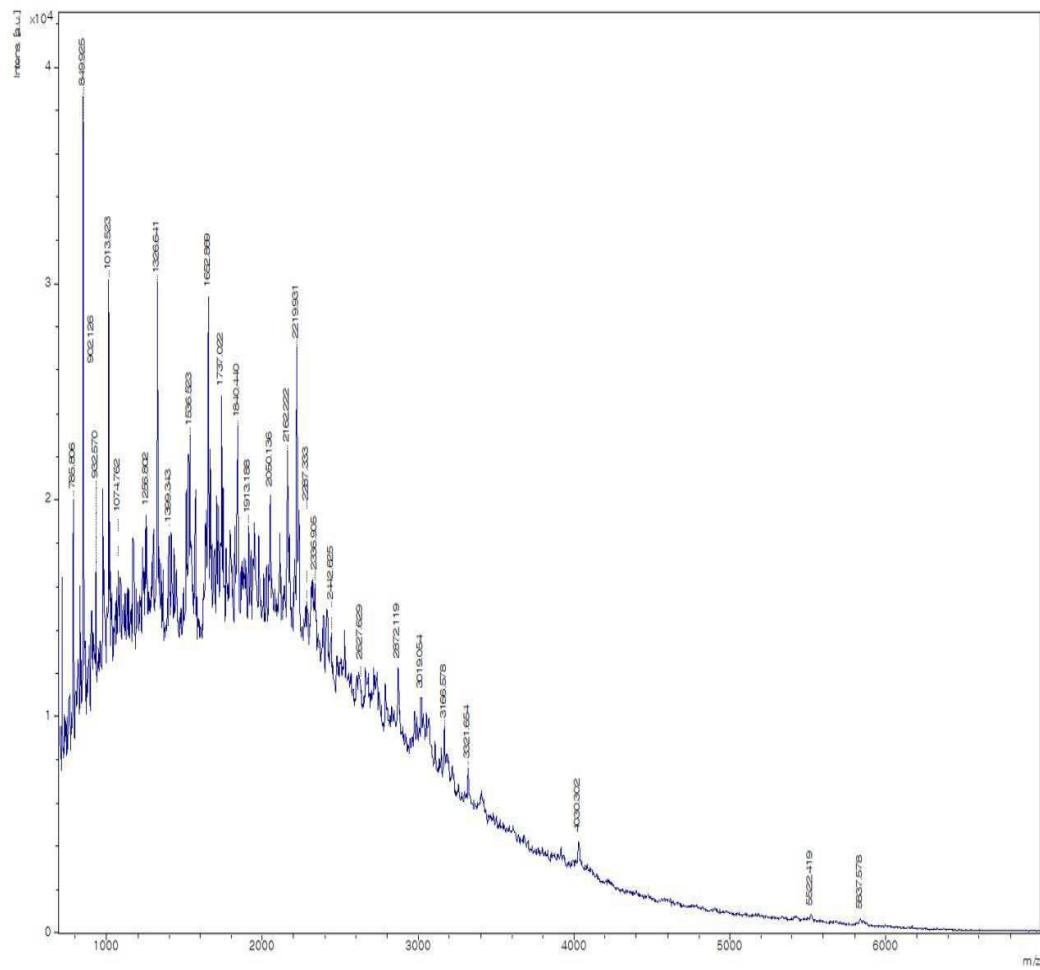


도면8b

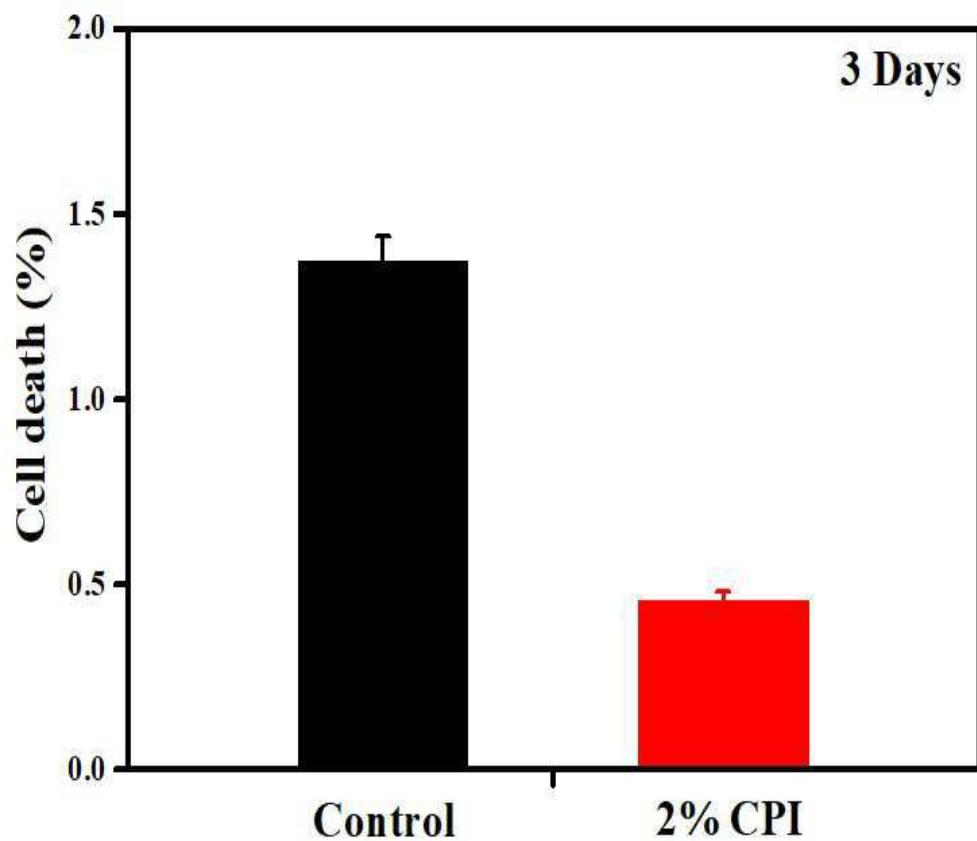
(b)



도면9



도면10



도면11

