



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0077661
(43) 공개일자 2023년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/258 (2006.01) A61L 27/36 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/258 (2013.01)
A61L 27/3637 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0153675
(22) 출원일자 2022년11월16일
심사청구일자 2022년11월16일
(30) 우선권주장
1020210164919 2021년11월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
권일근
서울특별시 성북구 월계로36길 27, 104동 1705호 (장위동, 꿈의숲대명투첸아파트)
문호진
인천광역시 서구 이음5로 65, 2410동 2301호(원당동, 검단금호어울림 센트럴)
(74) 대리인
특허법인 천지

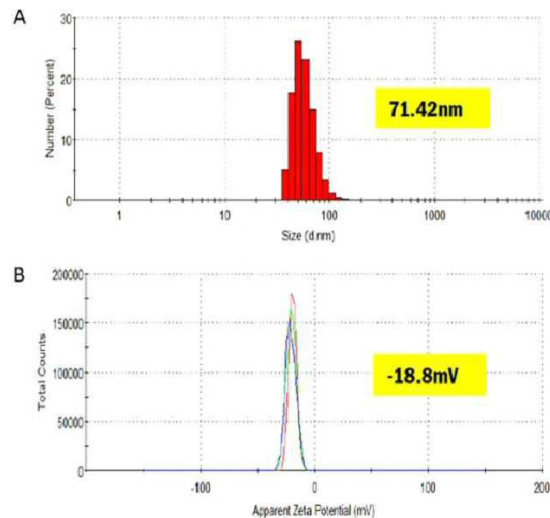
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 인삼 유래 세포외소포를 포함하는 골형성 촉진용 조성물

(57) 요약

인삼으로부터 유래한 세포외소포는 파골세포의 분화를 억제함과 동시에 조골세포의 분화를 촉진할 수 있으며, 골 질환 예방 또는 치료 뿐만 아니라 임플란트를 위한 치조골 형성 등 골형성 촉진을 위한 용도로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 27/365 (2013.01)

A61P 19/08 (2018.01)

A61L 2430/02 (2013.01)

(72) 발명자

허동녕

서울특별시 성북구 한천로 713, 506동 2101호(장위동, 래미안장위퍼스트하이)

이연희

서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 25동 1306호(압구정동, 현대아파트)

민성준

서울특별시 동대문구 회기로23가길 37-1, 305호(회기동)

김지수

경기도 수원시 장안구 경수대로1073번길 38-5, 101호(과장동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129714
과제번호	2017M3A9E4048170
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	치아조직재생을 위한 기능성 바이오소재 기술 개발 및 실용화 기반 구축
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2022.05.24

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711135209
과제번호	2020R1A4A1019456
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	악골 재생 네트워크 제어 연구실
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

인삼(*Panax ginseng*) 뿌리 유래 세포외소포를 포함하는 골형성 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 조골세포 분화를 향상시키고 파골세포 분화를 억제함으로써 골흡수 억제 및 골형성 촉진 효과를 모두 나타내는 것인,

골형성 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포외소포의 함량은 세포외소포의 단백질 농도 기준으로 0.5 내지 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인,

골형성 촉진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 인삼 뿌리 유래 세포외소포는 수크로스에서의 부유 밀도가 1.13 내지 1.19 g/ml 인,

골형성 촉진용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인삼 유래 세포외소포의 평균 직경은 50 내지 200 nm 인,

골형성 촉진용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 인삼 유래 세포외소포의 제타전위는 -30.0 내지 -15.0 mV 인,

골형성 촉진용 조성물.

청구항 7

제1항의 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 골형성 이식재.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 골형성 이식재는 성장인자로서 BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 또는 이들의 조합을 더 포함하는,

골형성 이식재.

청구항 9

제7항에 있어서,
상기 골형성 이식재는 치조골을 형성하기 위한 것인,
골형성 이식재.

청구항 10

제1항의 골형성 촉진용 조성물 및 생체적합성 고분자를 포함하는 하이드로겔 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인삼 유래 세포외소포를 포함하는 골형성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 골 유지 및 재생은 크게 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 균형과 조절에 의해 이루어진다. 조골 세포는 골 재생을 담당하며, 파골세포는 골 흡수를 담당한다. 효과적인 골 재생을 위해서는 조골세포를 활성화 하고 파골세포를 억제하는 것이 중요하다.

[0003] 골질환 치료제는 작용기전에 따라 골흡수 억제제와 골형성 촉진제로 구별된다. 골흡수 억제제는 파골세포를 억제하고, 골형성 촉진제는 조골세포의 분화를 촉진하거나 활성화시키는 점에서 차이가 있다. 골흡수 억제제는 골 절 예방에는 효과적이지만, 골 소실이 상당히 진행된 경우 골흡수 억제만으로는 회복이 어렵고, 나아가 골형성 또는 골재생이 필요한 용도로 사용하기에는 적합하지 않다. 반면 골형성 촉진제는 골 소실을 지연시키는 것이 아니라 골 생성을 촉진하는 특성을 갖고 있으므로 골질환 예방 뿐만 아니라 임플란트를 위한 골형성 등의 용도로 사용할 수 있어 응용범위가 더욱 넓다.

[0004] 한편, 인삼 추출물의 골흡수 억제 효과 및 인삼 유래 나노베지클을 분리하는 방법이 알려져 있다. 그러나, 인삼 유래 나노베지클의 골형성 촉진 효과에 대해서는 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개공보 제10-2014-0058436호 (2014.05.14)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 구체예에 따르면 조골세포의 분화 및 활성을 증가시킴으로써 골형성을 촉진할 수 있는 인삼 유래 세포외소포 및 이를 포함하는 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은 인삼(Panax ginseng) 뿌리 유래 세포외소포(extracellular vesicle)를 포함하는 골형성(osteogenesis) 촉진용 조성물을 제공한다.

[0008] 상기 조성물은 조골세포 분화를 향상시키고 파골세포 분화를 억제함으로써 골흡수 억제 및 골형성 촉진 효과를 모두 나타내는 것일 수 있다. 기존에 알려진 골형성 촉진제는 조골세포를 활성화할 뿐만 아니라 파골세포도 활성화하여 골흡수도 증가하는 경우가 많다. 그러나 본 발명의 골형성 촉진용 조성물은 조골세포를 활성화하면서 파골세포를 억제하므로 우수한 골형성 촉진 효과를 가질 수 있다.

[0009] 상기 세포외소포는 엑소좀(exosome) 또는 엑소좀 유사체(exosome mimetic)일 수 있다. 엑소좀은 세포막의 구조와 동일한 이중인지질막으로 이루어진 세포외소포이다. 일 실시예에 따르면, 상기 세포외소포의 평균 직경과 제타전위를 분석한 결과 엑소좀의 특징을 갖는 것으로 확인되었다.

- [0010] 상기 세포외소포는 인삼 뿌리에서 유래한 단백질, 진세노사이드 등의 성분이 포함되어 있다. 일 실시예에 따르면, 상기 세포외소포에는 Rg3, Rg1, R1, Rb1이 포함되어 있으며, Rg5는 농도를 확인할 수 없을 정도로 극미량이 포함된 것으로 확인되었다.
- [0011] 상기 세포외소포는 인삼 뿌리 추출물로부터 얻을 수 있으며, 예를 들면 초원심분리(ultracentrifugation), 밀도 구배 원심분리(density gradient centrifugation), 초미세여과법(ultrafiltration), 사이즈 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography), 면역친화성 분리법 (immunoaffinity capture), 미세유체기술 분리법(microfluidics-based isolation), 침전법(exosome precipitation), 총엑소좀 추출 키트(total exosome isolation kit), 또는 폴리머 기반 침전법(polymer based precipitation) 등의 방법으로 얻을 수 있다.
- [0012] 일 구체예에 따르면, 상기 인삼 뿌리 유래 세포외소포는 수크로스에서의 부유 밀도가 1.13 내지 1.19 g/ml인 것일 수 있다. 일 실시예에 따르면, 인삼 뿌리 추출물로부터 분리한 세포외물질을 수크로스 밀도 구배 초원심분리하여 상기 밀도의 세포외소포를 수득하였다.
- [0013] 일 구체예에 따르면, 상기 인삼 유래 세포외소포의 평균 직경은 50 내지 200 nm, 50 내지 150 nm, 50 내지 100 nm, 65 내지 75nm, 68 내지 75nm, 또는 70 내지 72nm일 수 있다.
- [0014] 일 구체예에 따르면, 상기 인삼 유래 세포외소포의 제타전위는 -30.0 내지 -15mV, -25.0 내지 -15mV, -20.0 내지 -16.0 mV, -19.0 내지 -17.0 mV, 또는 -19.0 내지 -18.0 mV일 수 있다.
- [0015] 일 구체예에 따르면, 상기 세포외소포는 함량은 세포외소포의 단백질 농도 기준으로 0.5 내지 10 $\mu\text{g/ml}$, 0.7 내지 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 내지 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 내지 7 $\mu\text{g/ml}$, 1 내지 6 $\mu\text{g/ml}$, 1 내지 5 $\mu\text{g/ml}$, 3 내지 10 $\mu\text{g/ml}$, 3 내지 7 $\mu\text{g/ml}$, 3 내지 6 $\mu\text{g/ml}$, 3 내지 5 $\mu\text{g/ml}$, 4 내지 10 $\mu\text{g/ml}$, 4 내지 7 $\mu\text{g/ml}$, 4 내지 6 $\mu\text{g/ml}$, 4 내지 5 $\mu\text{g/ml}$, 또는 5 $\mu\text{g/ml}$ 일 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 따르면, 파골세포 분화 억제 및 조골세포 분화 촉진에 최적인 세포외소포의 농도가 다른 것으로 확인되었다. 파골세포 분화 억제에 최적인 세포외소포의 함량은 단백질 농도 기준으로 1 $\mu\text{g/ml}$ 이었고, 조골세포 분화 촉진에 최적인 세포외소포의 함량은 단백질 농도 기준으로 5 $\mu\text{g/ml}$ 였다.
- [0018] 다른 양상은 상기 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 골형성 이식재(bone grafting material)를 제공한다.
- [0019] 골형성 이식재는 골 결손부위의 재생 및 수복을 위해 사용되며, 예를 들면 치과 및 정형외과 분야에서 사용되고 있다. 상기 골형성 이식재는 초기에는 결손부의 대체골 역할을 하고 시간이 경과함에 따라 이식재의 성분은 흡수되고 재생된 신생골로 치환됨으로써 골 재생 및 수복을 수행할 수 있다.
- [0020] 상기 골이식재는 동종골; 포유류 유래의 이종골; 세라믹, 석고, 칼슘 또는 카보네이트 유래의 합성골; 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 합성골은 히드록시아파타이트(hydroxylapatite), 인산일칼슘, 인산이칼슘, 인산삼칼슘(tricalcium phosphate), 인산사칼슘, 칼슘 메타포스페이트, 바이오글래스 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 골형성 이식재는 입자로 구성된 분말 형태일 수 있다. 상기 입자의 크기는 0.05 내지 1mm일 수 있으나 이에 특별히 한정되는 것은 아니며, 골손실이 일어난 부위 또는 골형성이 필요한 부위에 충전하기에 적절한 크기를 선택할 수 있다.
- [0022] 상기 골형성 이식재는 상기 골형성 촉진용 조성물을 포함하는 것 외에는 일반적으로 골이식재를 제조하는 방법으로 제조할 수 있다.
- [0023] 일 구체예에 따르면, 상기 이식재는 성장인자로서 BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 또는 이들의 조합을 더 포함할 수 있다.
- [0024] 일 구체예에 따르면, 상기 이식재는 골형성 촉진용 조성물을 담지한 담지체를 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 담지체는 콜라겐, 젤라틴, 피브린, 히알루론산, 알기네이트, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0026] 상기 이식재는 콜라겐, 젤라틴, 피브린, 히알루론산, 알기네이트, 세포외기질, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

- [0027] 일 구체예에 따르면, 상기 골형성 이식재는 치조골(alveolar bone)을 형성하기 위한 것일 수 있다.
- [0029] 또 다른 양상은, 상기 골형성 촉진용 조성물 및 생체적합성 고분자를 포함하는 하이드로겔 조성물을 제공한다.
- [0030] 상기 하이드로겔은 생체적합성 고분자를 포함하며 점착성을 가지는 것일 수 있다. 상기 생체적합성 고분자는 천연고분자 또는 합성고분자를 사용할 수 있다.
- [0031] 상기 천연고분자는 예를 들면 히알루론산, 젤라틴, 콜라겐, 알긴산, 키토산, 셀룰로오스, 피브린 글루, 엘라스틴, 콘드로이틴 황산염, 펙틴 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0032] 상기 합성고분자는 예를 들면 PCL, PLA, PGA, PLGA, PEG, 2-히드록시에틸 메타아크릴레이트 유도체, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리비닐 알코올, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0034] 또 다른 양상은, 인삼(Panax ginseng) 뿌리 유래 세포외소포를 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0035] 일 구체예에 따르면, 상기 인삼 뿌리 유래 세포외소포는 수크로스에서의 부유 밀도가 1.13 내지 1.19 g/ml일 수 있다.
- [0036] 상기 골질환은 예를 들면 골다공증(osteoporosis), 골연화증(osteomalacosis), 골감소증(osteopenia), 골형성 부전증(osteogenesis imperfecta), 골형성 장애(osteodystrophy), 골관절염(osteoarthritis), 골괴사(osteonecrosis), 퇴행성 관절염(degenerative arthritis), 전이성 골종양(metastatic bone tumor), 골종양(osteomatoid), 치주질환(periodontal disease), 골절(fracture) 또는 파제트병(Paget's disease)일 수 있다.
- [0037] 상기 치주질환은 예를 들면 치은염(gingivitis), 치주염(periodontitis), 치주낭(periodontal pocket) 또는 치주농양(periodontal abscess)일 수 있다.
- [0038] 상기 약학적 조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 담체, 부형제, 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유일 수 있으나 특별히 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 상기 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0040] 일 구체예에 따른 인삼 유래 세포외소포는 조골세포의 분화 및 활성을 증가시켜 골재생 또는 골형성을 촉진할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 일 실시예에 따른 세포외소포의 직경 및 제타전위를 나타낸 것이다.
- 도 2는 일 실시예에 따른 세포외소포의 10% FBS 환경 하에서의 안정성을 나타낸 것이다.
- 도 3은 일 실시예에 따른 세포외소포의 나노파티클 농도를 확인한 결과이다.
- 도 4는 일 실시예에 따른 세포외소포의 단백질 함량을 확인한 결과이다.
- 도 5는 일 실시예에 따른 세포외소포의 동결건조 전후의 형태를 TEM으로 확인한 결과이다.
- 도 6은 일 실시예에 따른 세포외소포가 1차 배양 대식세포, HUVEC, MSC, ADSC 세포에 대해 세포 독성을 나타내는 농도를 확인한 결과이다.
- 도 7은 일 실시예에 따른 세포외소포가 M1 대식세포의 IL-1 β 및 M2 대식세포의 IL-10 발현에 미치는 영향을 나

타낸 것이다.

도 8은 일 실시예에 따른 세포외소포가 파골세포 분화를 억제시키는 효과를 TRAP 염색으로 확인한 결과이다. 도 8의 A에서 TRAP⁺ MNC number는 TRAP positive Multinucleated cells (MNCs)로서 TRAP 염색된 다핵성 세포를 의미한다.

도 9는 일 실시예에 따른 세포외소포가 파골세포 분화를 억제시키는 효과를 F-actin 염색으로 확인한 결과이다.

도 10은 일 실시예에 따른 세포외소포가 파골세포 분화를 억제시키는 효과를 TRAP 및 OSCAR 발현량 변화로 확인한 결과이다.

도 11은 일 실시예에 따른 세포외소포가 조골세포의 ALP 활성을 증가시키는 효과를 확인한 결과이다.

도 12는 일 실시예에 따른 세포외소포가 조골세포의 분화에 미치는 영향을 Alizarin red S 염색을 통해 확인한 결과이다. 1w, 2w, 및 3w는 1주, 2주, 및 3주를 나타낸다.

도 13은 상기 도 12의 염색 정도를 수치화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 14는 일 실시예에 따른 세포외소포의 진세노사이드 함량을 분석하여 나타낸 것이다.

도 15는 진세노사이드 Rb1과 Rg1을 각각 단독/혼합(7:3, 5:5) 처리한 것과, 일 실시예에 따른 세포외소포가 파골세포 분화를 억제시키는 효과를 TRAP 염색으로 확인한 결과이다. 도 15의 A에서 TRAP⁺ MNC number는 TRAP positive Multinucleated cells (MNCs)로서 TRAP 염색된 다핵성 세포를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 실시예 1: 인삼 뿌리 유래 세포외소포(Extracellular Vesicle, EV) 분리

[0045] 인삼(Panax ginseng)의 뿌리를 고속 블렌더(high-speed blender)로 4℃에서 10분간 분쇄하여 인삼 뿌리 슬러리를 준비하였다. 인삼 뿌리 슬러리를 2,000g로 20분간 원심분리하여 상층액을 분리하고, 분리된 상층액을 다시 10,000g로 1시간동안 원심분리하여 debris가 제거된 상층액을 얻었다.

[0046] Debris가 제거된 상층액을 0.2 μm filter (Acrodisc 0.2um 25mm)를 이용하여 정제하고 수크로스 쿠션 초원심분리를 수행하였다. 35ml 용량의 초원심분리용 튜브에 2ml의 68% 수크로스(2M)와 2ml의 27% 수크로스(0.8M)를 차례대로 적층시키고, debris가 제거된 31ml의 상층액을 27% 수크로스 위에 올린 후 4℃에서 100,000g로 1.5hr간 원심분리하였다. 27% 수크로스와 68% 수크로스 사이에 위치한 농축된 세포외물질 층을 분리하였다.

[0047] 상기 분리된 농축된 세포외물질 층으로 밀도 구배 초원심분리(density gradient ultracentrifugation)를 수행하였다. 초원심분리용 튜브에 2ml의 60% (1.8M), 45%(1.3M), 30%(0.9M), 및 8%(0.2M)의 수크로스 용액을 높은 농도부터 낮은 농도 순서로 농도가 다른 수크로스끼리 섞이지 않도록 주의하여 넣고, 상기 분리된 농축된 세포외물질 층을 수크로스 용액 위에 섞이지 않게 올린 후 4℃, 200,000g로 1.5hr로 원심분리하였다. 원심분리 후 8% 수크로스와 30% 수크로스 사이에 (밀도 1.13 내지 1.19 g/mL) 위치한 분획물(밴드 1)을 얻었다.

[0048] 이하 시료의 농도는 Bio-Rad Bradford protein quantification assay kit를 이용하여 단백질 농도를 기준으로 나타내었다.

[0050] 실시예 2: 밴드 1 분획물에 포함된 세포외소포의 특성

[0051] 상기 실시예 1에서 얻은 밴드 1 분획물에 포함된 세포외소포(Extracellular Vesicle, EV)의 직경, 제타전위, 안정성, 농도, 단백질 농도 등의 특징을 분석하였다.

[0052] 2-1. 세포외소포의 직경 및 제타전위

[0053] 세포외소포를 diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 사용하여 1/100 희석하였다. 1mL의 희석된 세포외소포를 zen0040 cuvette에 옮겨담고 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK)을 사용한 동적 광산란법(Dynamic

Light Scattering)으로 입자 크기를 측정하였다. 상세 측정 조건은 37℃에서 3회 측정하였다. 동일한 조건에서 DTS1070 cuvette을 사용하여 제타전위를 확인하였다.

[0054] 도 1에 따르면 밴드 1 분획물에 포함된 세포외소포의 평균 직경은 71.42nm이고, 제타전위(Zeta potential)은 -18.8mV로 나타났으며, 엑소좀의 특징을 갖는 것으로 확인되었다.

[0055] 2-2. 안정성 시험

[0056] 1mL의 10% FBS(fatal bovine serum), 1mL의 세포외소포, 그리고 8mL의 1X PBS를 혼합한 10mL의 세포외소포 샘플을 1mL 씩 소분하여 37℃에 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후 0 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간에서 각각 세포외소포의 사이즈를 측정하였다.

[0057] 도 2에 따르면, 무혈청배지와 10% FBS(fatal bovine serum) 포함 배지에서 시간에 따른 세포외소포의 직경 변화를 확인한 결과 밴드 1 분획물에 포함된 세포외소포는 10% FBS 환경에서도 24시간까지 비교적 일정한 직경을 유지하여 안정성이 우수한 것으로 확인되었다.

[0058] 2-3. Nanoparticle Tracking Analysis(NTA) 분석

[0059] 세포외소포를 1X PBS를 사용하여 1:10,000 비율로 희석하였다. 1mL의 희석된 세포외소포를 NanoSight LM10 (Malvern Instrument, UK)을 사용하여 상온에서 60초 간 측정하였다.

[0060] 도 3에 따르면 밴드 1 분획물에 포함된 세포외소포의 농도는 밴드 1 분획물의 동결건조 샘플 100mg을 기준으로 평균 4.18×10^{11} particles/ml인 것으로 확인되었다.

[0061] 2-4. 세포외소포의 단백질 농도 분석

[0062] 1X PBS를 사용하여 5배 희석한 세포외소포를 준비하였다. 단백질 정량을 위해 기준 BSA 단백질 농도를 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0125 mg/mL로 설정하고 5μL의 BSA 기준 단백질과 희석한 세포외소포를 적용하였다. 250μL의 Coomassie blue dye를 주입하고 595nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0063] 도 4에 따르면, 밴드 1 분획물의 세포외소포 100mg당 단백질의 양은 평균 0.94 mg/ml인 것으로 나타났다.

[0064] 2-5. 동결건조 전후의 형태 분석

[0065] 세포외소포를 추출 한 뒤 세포외소포를 소분하고 측정할 때까지 -80℃에 보관하였다. 동결건조를 위해서 액체 상태인 세포외소포를 실험용 튜브에 옮겨담고 -80℃에 한 시간 보관하였다. 파라필름으로 튜브를 밀봉하고 파라필름에 미세구멍을 뚫어 -90℃, 0.05mbar 조건으로 세팅된 동결건조기로 옮겨 72시간 동안 동결건조하였다.

[0066] 형태 분석을 위하여 희석한 액체 상태인 세포외소포를 해동하여 1X PBS를 사용하여 1/1,000으로 희석하였고, 30mg의 동결건조 후 세포외소포를 1mL의 1X PBS에 용해하였다.

[0067] 도 5에 따르면, 동결건조 전후에도 세포외소포의 형태가 유지되므로 동결건조에 대한 안정성이 높은 것으로 나타났다.

[0068] 2-6. 세포외소포에 포함된 진세노사이드 함량비 분석

[0069] 0.1g의 세포외소포를 1mL의 1X PBS에 용해하였다. DEPC와 1-butanol을 준비하고 2:1 비율의 최종 1.5mL의 용액을 제조하고 볼텍싱(Vortexing) 하였다. 원심분리 후 상층부의 맑은 층을 수득하여 세포외소포와 혼합하였다. 볼텍싱 후에 5,000 rpm, 4℃, 3분간 centrifugation을 진행하였다. 상층액을 수거하여 water bath에서 80℃, 10분간 인큐베이션 함과 동시에 배큘뎀프를 적용하여 유기용매를 제거하였다. 최종적으로 100μL의 메탄올을 첨가하여 세포외소포의 진세노사이드를 용해하였다.

[0070] 세포외소포의 진세노사이드 및 기준 진세노사이드는 0.22μm filter에 통과시켜 불순물을 제거하였다. 이동상으로는 물에 0.1mM ammonium acetate를 용해한 것(A) 과 Acetonitrile(B)을 준비하였다. LC/MS의 상세 조건으로 써 Acquity BEH C18, 1.7μm, 2.1 X 100mm 컬럼을 사용하여 컬럼온도 40℃, 1μL 샘플 주입, 0.4mL/min, 이동상 B 주입 조건 0-3분:20-30%, 3-5분:30-33%, 5-6분:33-35%, 6-8분:35-42%, 8-16분:42-47%, 16-17분:47-52%, 17-19분:52-80%, 19-20분:80-95%, 20-21분:95-20%, 21-24분:20-20%, 25분;종료로 진행하였다.

[0071] 밴드 1 분획물에 포함된 세포외소포의 진세노사이드의 종류별 함량을 측정한 결과, 1mL의 세포외소포에서 2.96ng의 Rg3, 41.24ng의 Rg1, 2.6ng의 R1과 85.7ng의 Rb1이 포함되어 있었으며, Rg5의 존재는 확인되었으나 그 함량이 지나치게 낮아 농도를 확인할 수 없었다.

[0073] **실시예 3: 밴드 1 분획물 세포외소포의 독성 확인**

[0074] 밴드 1 분획물에 포함된 세포외소포에 대한 생체 적합성 평가시험을 수행하였다. 생체 적합성 평가는 1차 배양 대식세포(primary macrophage)와 혈관내피세포(HUVEC), 중간엽줄기세포(MSC) 및 지방줄기세포(hADSC)에 대하여 수행되었다. 구체적으로, 각각의 세포들을 5×10^3 세포수/웰의 농도로 96-well plate에 분주한 후 2시간 동안 배양하였다. 2시간 후, 1차 배양 대식세포(macrophage)의 성장배지에는 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포를 3, 5, 7, 10, 30, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도(단백질 농도 기준)로 첨가하였고, 혈관내피세포(HUVEC) 성장배지에는 0.01, 0.1, 0.5, 1, 10, 30, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도(단백질 농도 기준)로 첨가하였으며, 중간엽줄기세포(MSC)에서는 0.01, 0.1, 0.5, 1, 10, 30 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도(단백질 농도 기준)로 첨가하였으며, 지방줄기세포(hADSC)의 성장배지에는 0.01, 0.1, 0.5, 1, 3, 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도(단백질 농도 기준)로 첨가하여 37°C에서 5% CO_2 를 계속 공급하면서 1일, 4일 및 7일간 배양하였다. 경과 시점의 시료에 100 μL 의 CCK 용액을 각 well에 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후, 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0075] 도 6에 따르면, 밴드 1 분획물의 세포외소포는 1차 배양 대식세포(macrophage) 및 혈관내피세포(HUVEC)에 대해 10 $\mu\text{g/mL}$ 까지 세포 독성을 나타내지 않았으나 30 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 증식이 크게 억제되었다. 다만 중간엽줄기세포(MSC)에 대해서는 30 $\mu\text{g/mL}$ 에서 독성을 나타내지 않았고, 지방줄기세포(ADSC)에 대해서는 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 독성을 나타내지 않았다.

[0076] 상기 실험결과를 기초로 이하 실험에서는 밴드 1 분획물의 세포외소포의 농도를 10 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 사용하였다.

[0078] **실시예 4: 밴드 1 분획물 세포외소포의 M2 대식세포 활성화**

[0079] 인삼 유래 세포외소포 농도에 따른 싸이토카인 방출량을 확인하기 위하여 IL-1 β 와 IL-10 분비량을 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)을 통하여 분석하였다. 48-well plate에 bone marrow-derived macrophages (BMMs)이 2×10^4 cell/mL/well이 되도록 파종하고(seeding), 파골세포로의 분화를 유도하기 위해 인삼 유래 세포외소포를 농도별(단백질 농도 기준)로 처리와 동시에 30 ng/mL MCSF(R&D Systems)를 첨가하고 6일간 배양하였다. 그룹 별로 배양액을 수집하고 DuoSet ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 450nm에서 방출량을 측정하였다. 농도는 표준화하여 나타내었다. 실험은 그룹별로 3개 이상의 샘플을 사용하여 평균을 계산하여 그래프를 작성하였으며, 통계는 two way analysis of variance (ANOVA)을 사용하여 유의성을 평가하였다.

[0080] 도 7에 따르면, 실시예 1의 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포는 M1 대식세포의 활성화 마커인 IL-1 β 의 분비량에 영향을 미치지 않았으나, M2 대식세포의 활성화 마커인 IL-10 분비량을 농도의존적으로 증가시켰다.

[0081] 골형성을 위해서는 M1 대식세포에 의한 염증반응을 감소시키고, M2 대식세포에 의한 골형성 효과를 증가시키는 것이 중요하다. 밴드 1 분획물에 포함된 세포외소포는 M1 대식세포에 대해서는 영향이 없는 반면 M2 대식세포는 활성화시키므로 우수한 골형성 촉진 효과를 발휘할 것으로 예상할 수 있다.

[0083] **실시예 5: 밴드 1 분획물 세포외소포의 파골세포 분화 억제**

[0084] 5-1. TRAP 염색 분석

[0085] 48-well plate에 bone marrow-derived macrophages (BMMs)이 2×10^4 cell/mL/well이 되도록 파종하고, 파골세포로의 분화를 유도하기 위해 인삼 유래 세포외소포 농도별(단백질 농도 기준)로 처리와 동시에 100ng/mL RANKL(R&D Systems, MN), 30 ng/mL MCSF(R&D Systems)를 첨가하고 4일간 배양하였다. 세포의 배지를 제거하고, 3.7%의 포르말데하이드로 20분 동안 세포를 고정시켰다. TRACP & ALP double-stain Kit을 이용하여 고정된 세포를 1시간 동안 염색하였다. 염색 후에 핵이 3개 이상인 다핵 파골세포(MNC, Multinucleated cell)의 숫자를 카운팅하여 TRAP⁺ MNCs 그래프를 작성하였다.

[0086] 도 8의 TRAP 염색 결과에 따르면, 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포가 처리된 실험군은 MNC의 숫자가 감소하였으며, 1,000 ng/mL의 농도부터 TRAP 양성 다핵성 세포의 숫자가 현저히 감소하였다. 그리고 1,000 ng/mL 이상

의 농도(3 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$)에서의 파골세포 분화 억제 효과는 차이가 없었다. 따라서 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포는 파골세포 분화 억제 효과가 우수하며, 파골세포 분화 억제에 최적의 농도는 세포외소포의 농도는 단백질 농도 기준으로 1,000 ng/ml(1 $\mu\text{g/ml}$)임을 알 수 있다.

[0087] 이하 파골세포 분화 억제 실험에서는 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포의 농도를 최대 1,000ng/ml(1 $\mu\text{g/ml}$)로 설정하였다.

[0088] 5-2. Filamentous-actin (F-actin) assay

[0089] 48-well plate에 bone marrow-derived macrophages(BMMs)를 2×10^4 cell/mL/well로 파종하고, 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 파골세포 분화를 유도하였다. 4 일간 인큐베이션 후에 3.7%의 포르말데하이드로 20분 동안 세포를 고정시켰다. PBS로 3번 세척을 한 후에 rhodamine-conjugated phalloidin 용액을 30분 동안 처리하였다. 그 후에 핵 염색을 위한 DAPI를 처리한 후 형광현미경으로 F-actin ring 형성을 관찰하였다.

[0090] 도 9에 따르면, 대조군에서는 파골세포의 크기가 커지고 다핵형 세포로 변화하였으며, 세포 외부에 actin ring 이 관찰되었다. 그러나, 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포를 처리한 그룹은 파골세포의 분화가 효과적으로 억제되었다.

[0091] 5-3. TRAP 및 OSCAR 발현 분석

[0092] 48-well plate에 bone marrow-derived macrophages (BMMs)을 2×10^4 cell/mL/well로 파종하고, 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 파골세포 분화를 유도하였다. 4 일간 인큐베이션 후에 trizol를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA의 1 μg 을 accupower cyclescript rt premix(dt20) (Bioneer, DaeJeon, Korea)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 RbTaq™ Fast qPCR 2X PreMIX (Enzynomics, DaeJeon, Korea)에 10 pM의 프라이머(Bioneer, DaeJeon, Korea)를 첨가하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 프라이머는 파골세포 분화의 지표로 사용된 Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), Osteoclast-associated receptor (OSCAR) 유전자 부분을 주형으로 제작하였으며, 서열은 TRAP, 5'-CTG GAG TGC ACG ATG CCA GCG ACA-3' (sense) 과 5'-TCC GTG CTC GGC GAT GGA CCA GA-3' (antisense); osteoclast-associated receptor (OSCAR), 5'-CTG CTG GTA ACG GAT CAG CTC CCC AGA-3' (sense) and 5'-CCA AGG AGC CAG AAC CTT CGA AAC T-3' (antisense) 이다. 증폭 조건은 95°C 10초, 60°C 15초, 72°C 15초를 45 사이클 진행하였다. 아무것도 처리하지 않은 그룹을 상대적으로 1로 고정하여 다른 그룹과 상대적인 수치를 비교하였다. Comparative cycle threshold(CT) 방법을 사용하여 그래프를 도출하였으며 모든 결과는 GAPDH에 의해서 표준화되었다. 모든 실험은 3번의 결과의 평균을 통해 그래프를 나타내었으며, 통계는 two way analysis of variance (ANOVA)을 사용하여 유의성을 평가하였다.

[0093] 도 10에 따르면, 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포는 파골세포의 분화에 대한 마커인 TRAP(Tartrate-Resistant Acid Phosphates) 및 OSCAR(osteoclast-associated receptor)의 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다.

[0095] 실시예 6: 밴드 1 분획물 세포외소포의 조골세포 분화 촉진

[0096] 6-1. ALP 활성 확인

[0097] 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포가 조골세포 활성화의 표지인자로 알려진 ALP 활성에 미치는 영향을 확인하였다. 세포외소포의 농도는 상기 실시예 3에서 MSC 세포에 대해 독성을 나타내지 않았던 농도 범위로 설정하였다.

[0098] 구체적으로 중간엽줄기세포(MSC)를 5×10^4 세포수/웰의 농도로 24-well plate에 분주한 후 24시간 배양하였다. 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco, USA), 1% 항생제(Penicillin Streptomycin), 300 μM 아스코르빈산(ascorbic acid), 10mM 베타-글리세로인산나트륨 수화물(β -glycerophosphate disodium salt hydrate), 0.1 μM 텍사메타손이 첨가된 골형성 유도배지 D-MEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, USA)에 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포를 농도별(단백질 농도 기준 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$)로 첨가한 후 37°C에서 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였다. 골형성 유도배지는 3일마다 교체하였으며, 교체된 배지에는 동일한 농도의 세포외소포가 첨가되었다.

[0099] 골분화 유도 7일과 14일 경과 시점의 시료를 PBS 완충액으로 세척한 뒤 세포막 분해 용액(cell lysis buffer)을

170 μ L 첨가하여 30분 동안 용해시켰다. 용해된 세포를 4℃, 13,000rpm 조건에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 회수하여 브래드포드법(Bradford assay)으로 정량하고, pNPP(p-Nitrophenyl phosphate, sigma, USA)을 50 μ L 첨가하여 37℃에서 30분간 배양한 후, 0.1N NaOH를 50 μ L 첨가하여 이들의 반응을 중지시켰다. 96-well plate에 200 μ L씩 넣은 후 405nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0100] 도 11에 따르면, 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포는 조골세포의 ALP 활성을 농도의존적으로 증가시켰고, 특히 5 μ g/ml 의 농도를 처리한 그룹에서 ALP 활성이 가장 높았다. 그러나, 10 μ g/ml의 농도로 투여한 군에서는 ALP 활성이 감소하였는데, 이는 배지를 교체할 때마다 세포외소포가 고농도로 첨가되어 독성을 나타냈기 때문인 것으로 생각된다.

[0101] 6-2. Alizarin red S 염색

[0102] 세포외소포를 0, 0.5, 1, 5 μ g/ml 농도(단백질 기준)로 처리한 것을 제외하면, 상기 실시예 6-1의 ALP assay와 동일한 방법으로 조골세포에 세포외소포를 처리하고 Alizarin red S 염색을 실시하였다.

[0103] 구체적으로, 골분화 유도 1w(1주), 2w(2주) 및 3w(3주) 경과 시점의 시료를 PBS 완충액으로 2회 세척한 후, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 20분 동안 세포를 고정시켰다. 고정 용액을 제거하고 PBS 완충액으로 세척한 뒤 Alizarin Red S (ARS) 염색액을 500 μ L 을 넣고 30분 동안 실온에서 반응시켰다. 염색이 완료된 후 증류수로 세척하여 염색된 세포를 관찰하였으며, 정량적인 분석을 위해 10% 세틸피리디늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride)를 이용하여 염색된 세포를 1시간 동안 탈색 시킨 후에 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0104] 도 12에 따르면, 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포는 조골세포에 의한 골 재생에 필수적인 칼슘 침착을 농도의존적으로 향상시키는 것을 확인하였다. 특히, 1w(1주) 및 2w(2주) 사이에는 염색의 정도에 큰 변화가 없었으나, 2w(2주) 및 3w(3주)사이에는 염색의 강도가 크게 증가하였다. 또한 ARS 염색 정도를 수치화한 결과, 칼슘 침착은 세포외소포를 5 μ g/ml로 처리한 군에서 가장 높은 것으로 확인되었다.(도 13 참고) 따라서 골 형성을 위한 세포외소포의 최적의 농도는 단백질 농도 기준으로 5 μ g/ml인 것으로 생각된다.

[0105] 상기 실험결과에 따르면 인삼 뿌리에서 유래한 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포는 조골세포 분화를 향상시키고 파골세포 분화를 억제함으로써 골흡수 억제 또는 골형성 촉진 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0106] 또한 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포의 목적하는 기능별 최적의 농도에 대해서, 골형성에 최적인 세포외소포의 농도는 단백질 기준 5 μ g/ml이고, 골흡수 억제에 최적인 세포외소포의 농도는 단백질 기준 1 μ g/ml인 것을 알 수 있다.

[0108] 실시예 7: 밴드 1 분획물 세포외소포의 진세노사이드 함량 조사

[0109] LC-MS(Liquid chromatography-mass spectrometry)를 통해 성분 분석을 진행하였다. 구체적으로, 인삼 유래 세포외소포에서 진세노사이드를 분리하기 위해 1mL의 인삼 유래 세포외소포와, 1mL의 증류수와 Butanol을 2:1로 혼합한 액체의 상층액을 혼합한다. 5,000g에서 10분의 원심분리 후 상층액을 수득하였다. 용매를 제거하기 위해 Rotary Vacuum Evaporator Water Bath를 사용하여 80℃에서 10분간 용매를 증발시켜 주었다. 100 μ L의 메탄올을 첨가하여 샘플을 준비하였다.

[0110] 이동상 A는 증류수와 0.1mM ammonium acetate를 혼합하여 준비하였고, 이동상 B는 acetonitrile을 사용하였다. 컬럼은 Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 X 100 mm(Waters Corporation, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 샘플 유속은 0.4 ml/min이다. 분석 시간은 총 25분이며 이동상 B는 0min 20%, 3min 30%, 5min 33%, 6min 35%, 8min 42%, 16min 47%, 17min 52%, 19min 80%, 20min 95%, 21min 20%, 24min 20%로 조절되었다. LCMS-8060(SHIMADZU) 기기를 사용하여 성분을 분석하였다.

표 1

[0111]

Ginsenoside	Concentration(unit: ng/ml)
Ginsenoside Rb1	85.7 (64.6%)
Ginsenoside Rg1	41.2 (31.1%)
Ginsenoside Rg3	2.9 (2.2%)
Ginsenoside R1	2.6 (2.0%)
Ginsenoside Rg5	0.1 (0.1%)

[0112] 상기 표 1과 도 14를 참조하면, 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포를 골재생에 관련되어 있는 5개의 진세노사이드 지표성분을 통하여 LC-MS로 성분 분석을 한 결과, Rb1은 85.7ng/ml, Rg1은 41.24ng/ml, Rg3은 2.96ng/ml, R1은 2.6ng/ml, Rg5은 0.1ng/ml의 농도로 나타났으며, 5가지 성분의 농도를 백분율로 계산해보면, 차례대로 64.6%, 31.1%, 2.2%, 2.0%, 0.1%로 나타났다. 따라서, 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포 내부에는 조사한 5가지 성분 중에 95.7%나 되는 대부분 성분이 Rb1과 Rg1으로 이루어져 있다는 것을 확인하였다.

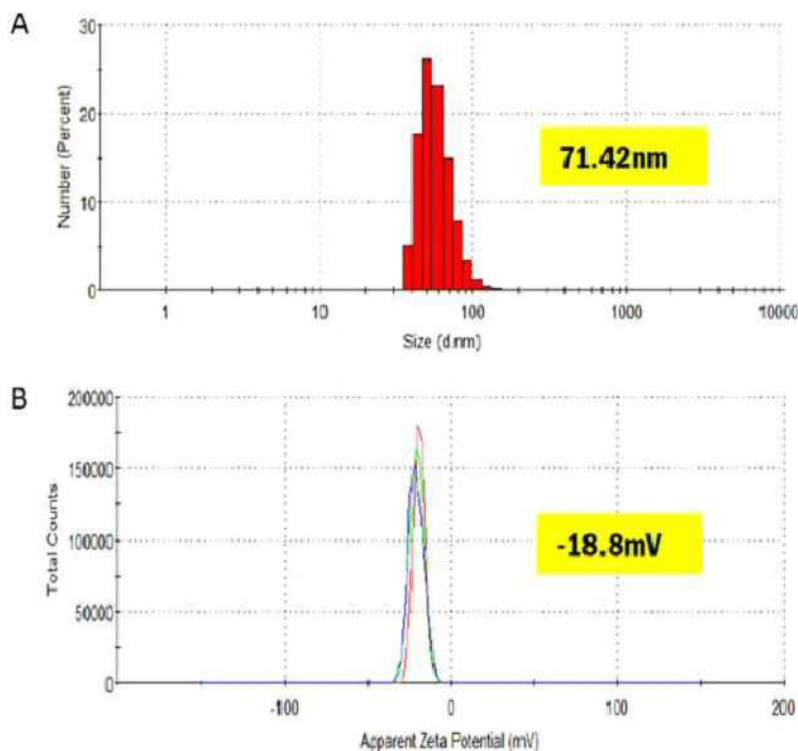
[0114] 실시예 8: 밴드 1 분획물 세포외소포와 주요 진세노사이드 성분간의 파골세포 분화 억제 비교

[0115] TRAP 염색 분석을 통해 밴드 1 분획물 세포외소포와 주요 진세노사이드 성분간의 파골세포 분화 억제 정도를 비교하였다. 구체적으로, 48-well plate에 bone marrow-derived macrophages (BMMs)이 2×10^4 cell/mL/well이 되도록 파종하고, 파골세포로의 분화를 유도하기 위해 진세노사이드 Rb1($1 \mu\text{g/ml}$)과 Rg1($100 \mu\text{g/ml}$)을 각각 단독/혼합(7:3, 5:5) 처리한 그룹과, 인삼 유래 세포외소포 ($1 \mu\text{g/ml}$)로 처리함과 동시에 100 ng/mL RANKL(R&D Systems, MN), 30 ng/mL MCSF(R&D Systems)를 첨가하고 4일간 배양하였다. 세포의 배지를 제거하고, 3.7%의 폼알데하이드로 20분 동안 세포를 고정시켰다. TRACP &ALP double-stain Kit을 이용하여 고정된 세포를 1시간 동안 염색하였다. 염색 후에 핵이 3개 이상인 다핵 파골세포(MNC, Multinucleated cell)의 숫자를 카운팅하여 TRAP+ MNCs 그래프를 작성하였다.

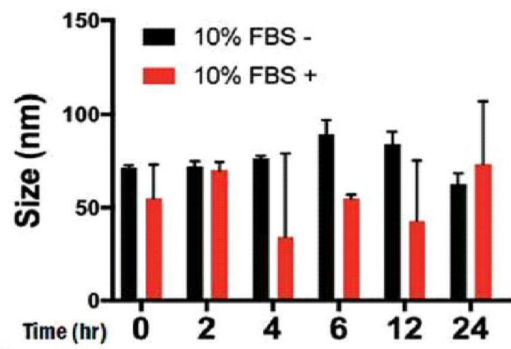
[0116] 도 15의 TRAP 염색 결과에 따르면, 진세노사이드를 단독/혼합 처리한 그룹과 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포가 처리된 실험군은 MNC의 숫자가 감소하였으며, 특히 진세노사이드 성분을 처리한 그룹보다 세포외소포가 처리된 실험군에서 TRAP 양성 다핵성 세포의 숫자가 현저히 감소하였다. 그리고 진세노사이드 Rb1과 Rg1 두 성분 단독과 혼합 실험군에서의 파골세포 분화 억제 효과는 차이가 없었다. 따라서 밴드 1 분획물에 함유된 세포외소포의 파골세포 분화 억제 효과가 단독 유효성분 보다 월등히 우수하며, 기존의 물이나 에탄올을 이용한 인삼추출물에 비해서 다양한 성분이 잘 보존되어 있기 때문에 뛰어난 효과를 보인 것으로 판단된다.

도면

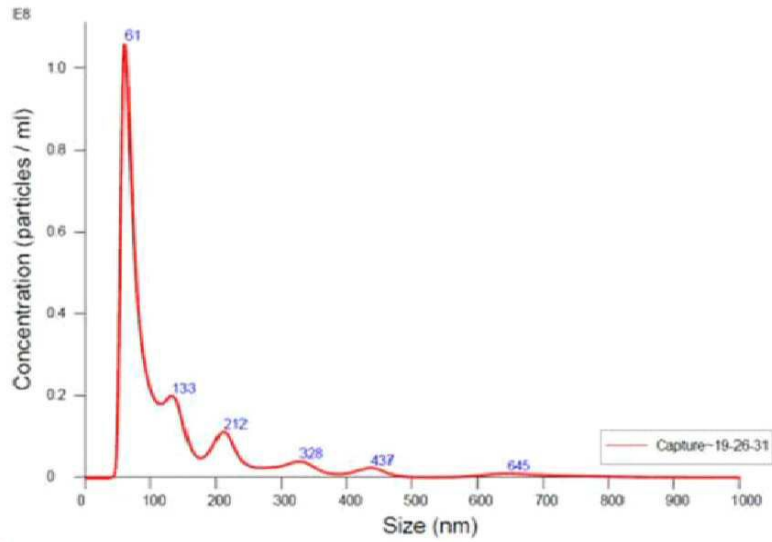
도면1



도면2

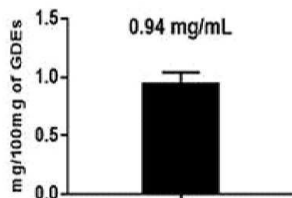


도면3

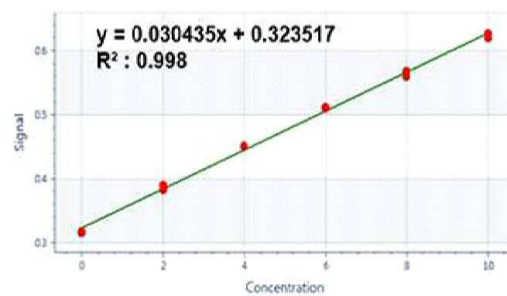


도면4

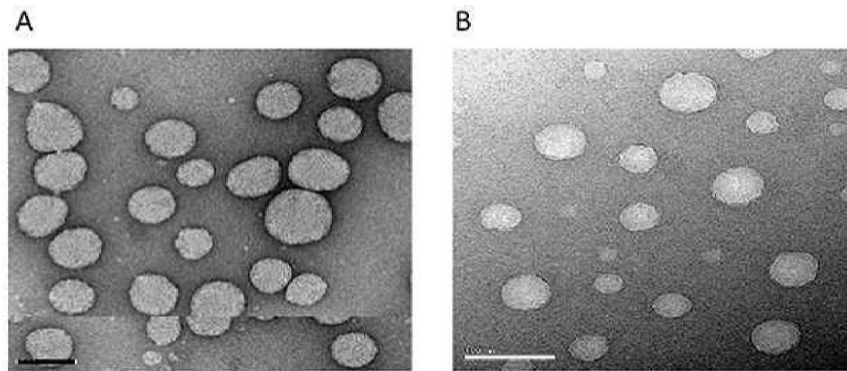
A



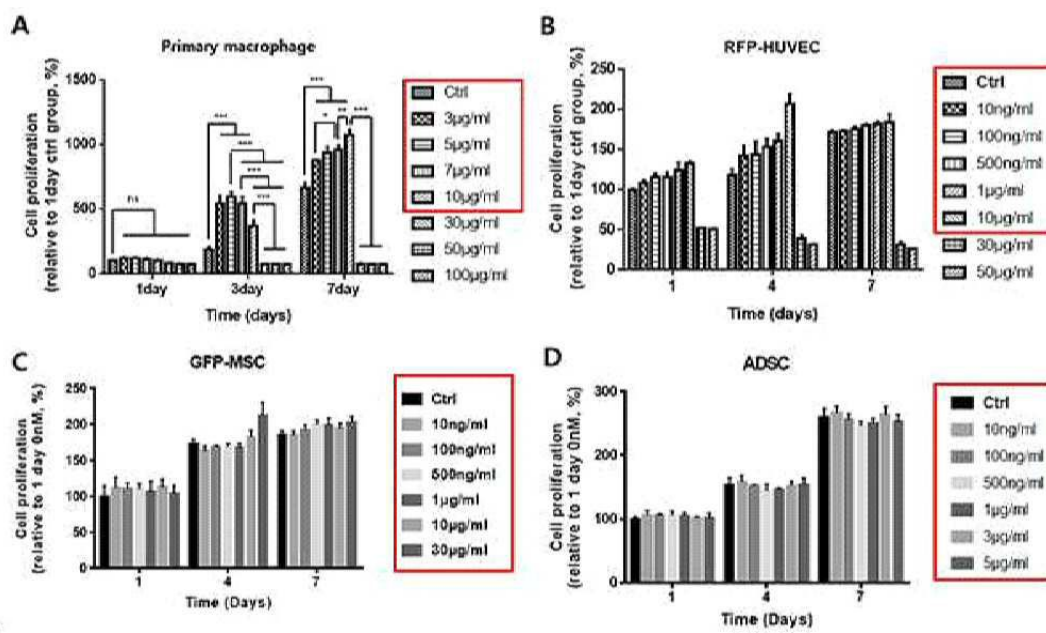
B



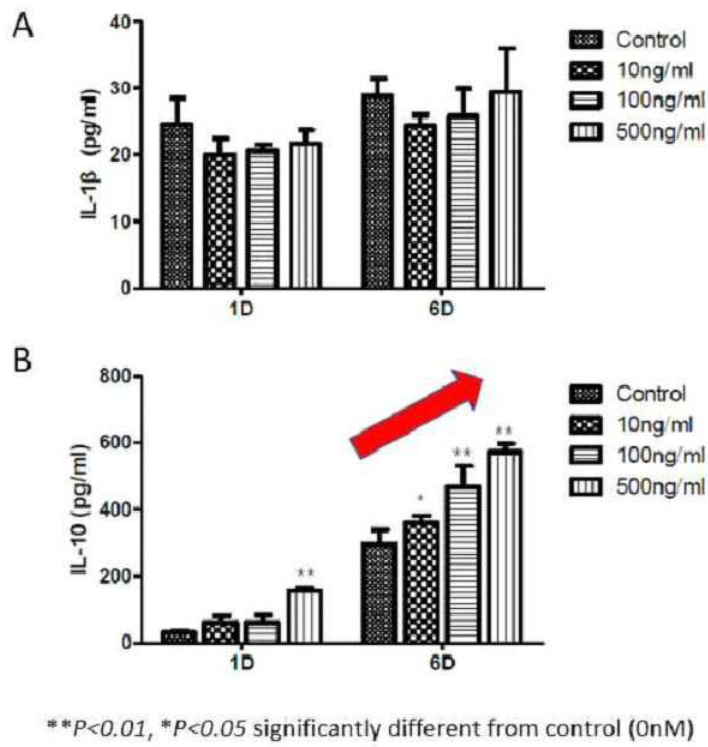
도면5



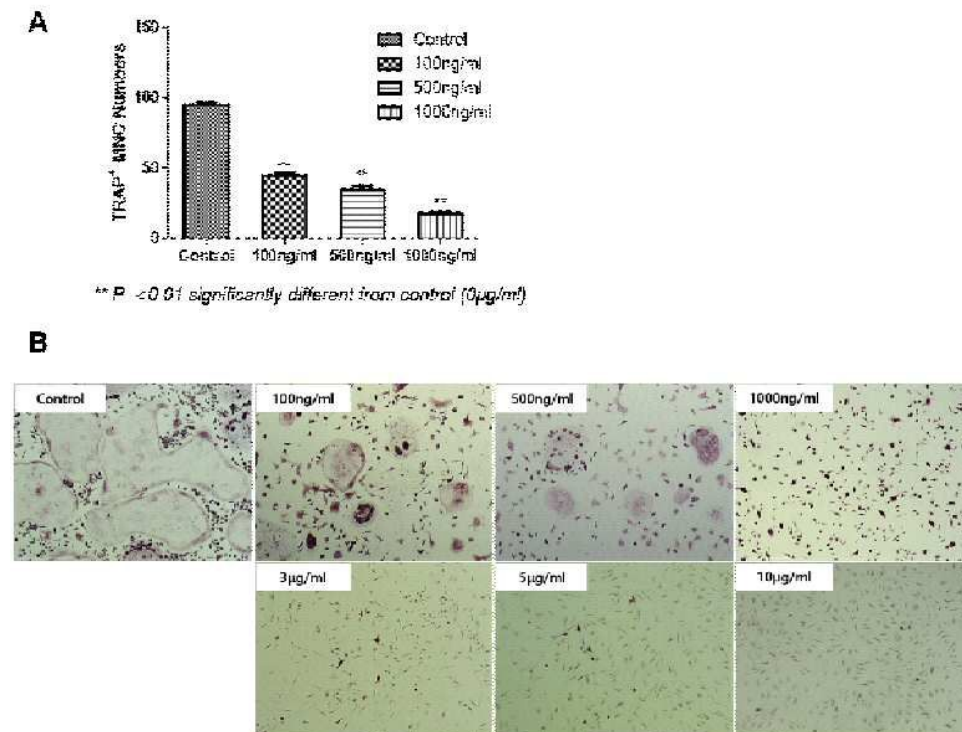
도면6



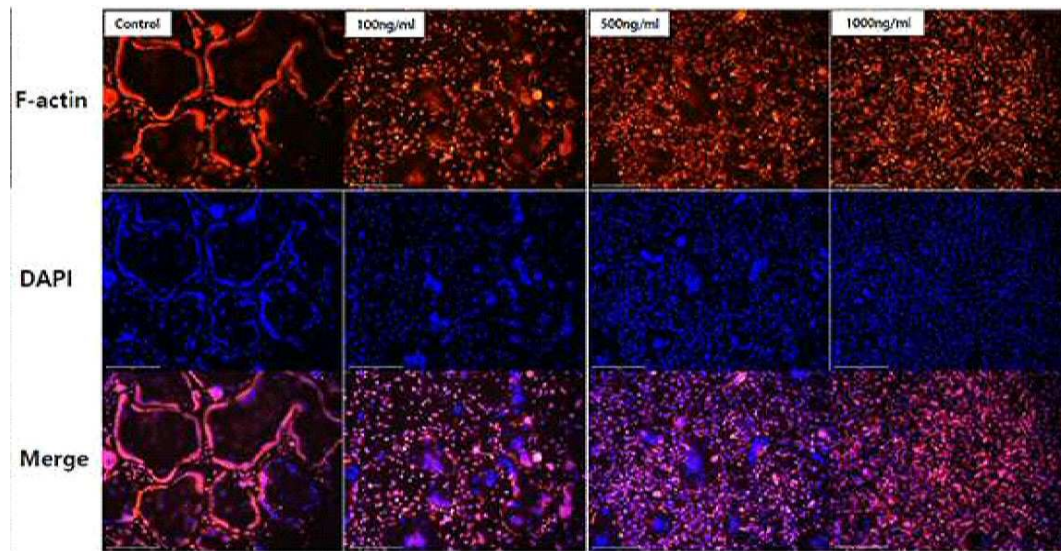
도면7



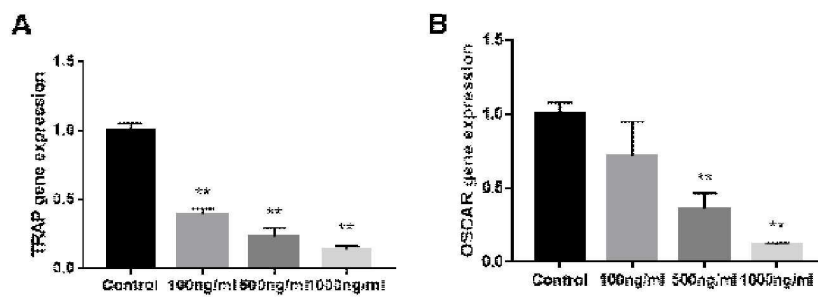
도면8



도면9

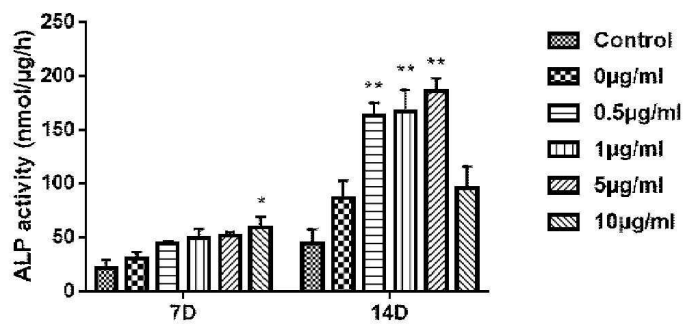


도면10



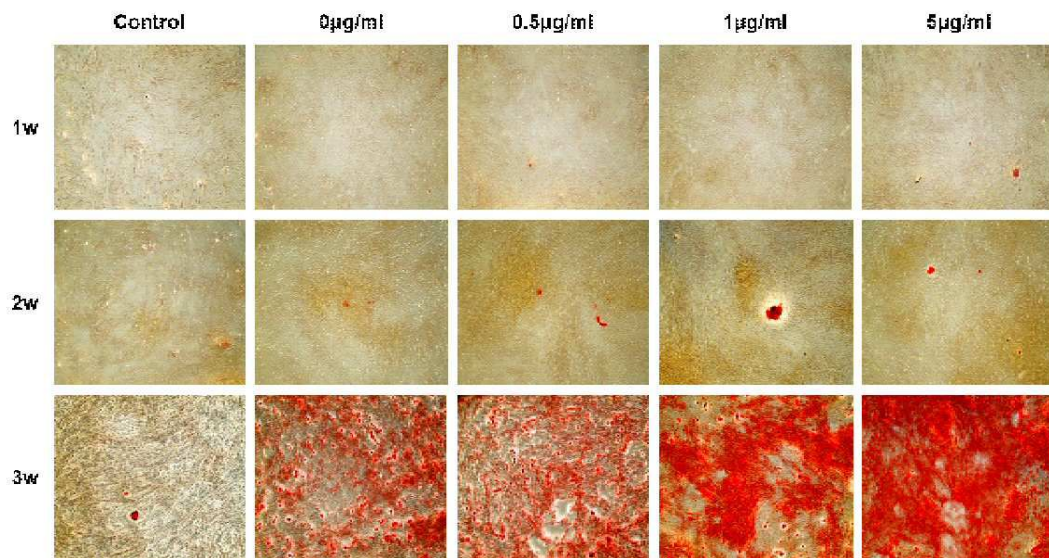
** $P < 0.01$ significantly different from control (0 μ g/ml)

도면11

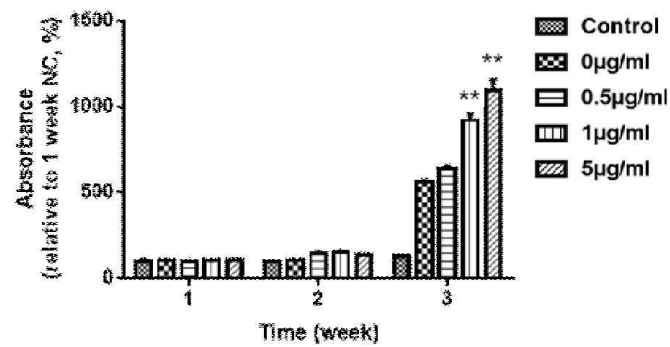


** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ significantly different from control (0 μ g/ml)

도면12

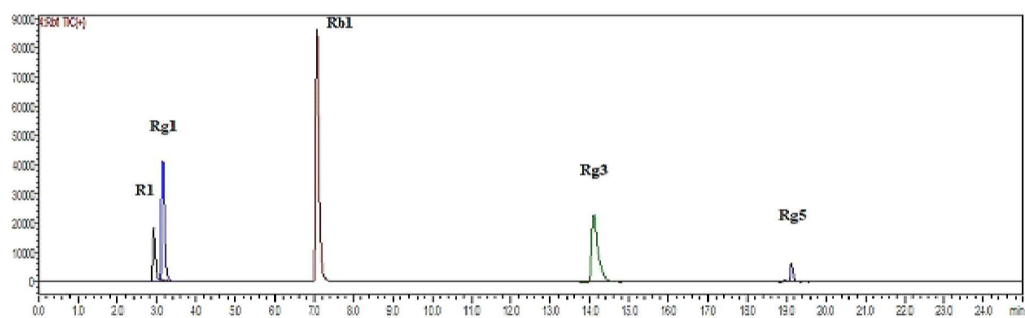


도면13



** $P < 0.01$ significantly different from control (0µg/ml)

도면14



도면15

