



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년09월30일  
 (11) 등록번호 10-1661448  
 (24) 등록일자 2016년09월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 5/07* (2010.01) *C12N 5/071* (2010.01)  
*C12N 5/074* (2010.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 5/06* (2013.01)  
*C12N 5/0662* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0080788(분할)
- (22) 출원일자 2016년06월28일  
 심사청구일자 2016년06월28일
- (65) 공개번호 10-2016-0078946
- (43) 공개일자 2016년07월05일
- (62) 원출원 특허 10-2014-0179560  
 원출원일자 2014년12월12일  
 심사청구일자 2014년12월12일
- (30) 우선권주장  
 1020130154891 2013년12월12일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020090013425 A

- (73) 특허권자  
 사회복지법인 삼성생명공익재단  
 서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
- (72) 발명자  
 장윤실  
 서울특별시 송파구 양재대로 1218 317동 303호  
 (방이동, 올림픽선수촌아파트)  
 박원순  
 서울특별시 서초구 명달로4길 30 501동 903호 (서초동, 서초5차E-편한세상아파트)  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 방은희

전체 청구항 수 : 총 9 항

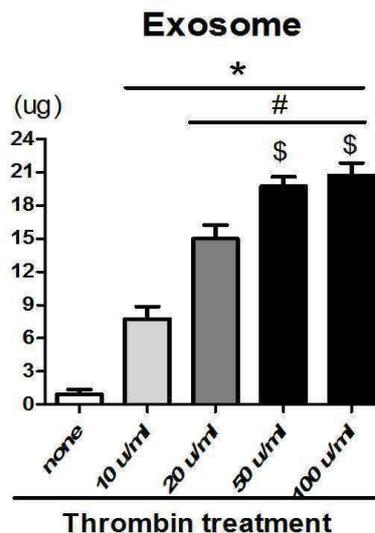
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 트롬빈을 이용한 줄기세포 효능강화방법

**(57) 요약**

본 발명은 트롬빈을 이용한 줄기세포의 효능 강화 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법은 줄기세포 유래 엑소좀의 생성을 촉진시키고 줄기세포의 효능을 강화하는 우수한 효과를 가지고 있어, 이를 통해 종래 알려진 방법에 비해 효율적으로 줄기세포 및 엑소좀을 수득할 수 있으며, 관련 연구에 유용하게 이용할 수 있다.

**대표도** - 도4



(52) CPC특허분류

*C12N 5/0671* (2013.01)

*C12N 5/0673* (2013.01)

*C12N 5/0696* (2013.01)

(72) 발명자

**성동경**

서울특별시 노원구 동일로227길 25 1110동 904호  
(상계동, 주공아파트)

**안소윤**

서울특별시 서대문구 연희로 38-20 103동 2201호  
(연희동, 대우아파트)

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

줄기세포를 트롬빈을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포 효능강화방법으로서, 상기 효능강화는 줄기세포내 성장인자의 발현이 증진되는 것이며, 상기 줄기세포는 배아줄기세포 또는 성체줄기세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 성장인자는 뇌 유래 신경 성장인자(brain-derived neurotropic factor, BDNF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF) 및 혈관상피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포, 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포, 및 다분화능 줄기세포로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10), DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12),  $\alpha$ -MEM( $\alpha$ -Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium), 및 KnockOut DMEM으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배지인 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 상기 트롬빈은 배지 내에 1 내지 1000 U/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 배양은 12시간 내지 48시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 10**

트롬빈을 포함하는, 줄기세포 효능강화용 배지 조성물로서, 상기 효능강화는 줄기세포내 성장인자의 발현이 증진되는 것임을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

제10항에 있어서, 상기 성장인자는 뇌 유래 신경 성장인자(brain-derived neurotropic factor, BDNF), 섬유아 세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF) 및 혈관상피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 트롬빈을 이용한 줄기세포의 효능 강화 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 엑소좀(exosome)은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭이다. 엑소좀의 직경은 대략 30-100 nm인 것으로 보고되어 있다. 엑소좀은 전자 현미경을 통한 연구에서 원형질막으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하며 세포 밖으로 방출, 분비되는 것으로 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 소낭들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라고 부른다.

[0003] 이러한 엑소좀이 어떤 분자적 기작에 의해 만들어지는지 확실히 밝혀진 바가 없으나, 적혈구 세포뿐만 아니라, B-림프구, T-림프구, 수지상 세포, 혈소판, 대식 세포 등을 포함한 다양한 종류의 면역 세포들과 종양 세포, 줄기세포 등도 살아 있는 상태에서 엑소좀을 생산하여 분비한다고 알려져있다.

[0004] 특히, 줄기세포에서 유래된 엑소좀은 수용체 및 단백질뿐 아니라 핵 성분을 함유하고 있어 세포 간 커뮤니케이션에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 엑소좀은 줄기세포에 비해 동물혈청을 상대적으로 적게 함유하고 있어 동물 혈청 감염에 의한 증상(zoonosis)의 위험성 역시 배제할 수 있다. 이러한 엑소좀의 특성을 고려할 때 엑소좀을 이용한 세포치료법은 기존의 줄기세포 치료법의 한계를 극복할 수 있는 새로운 패러다임이 될 것으로 기대된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 이에 본 발명자들은 상기와 같이 이용 가능성이 우수한 엑소좀의 생산 효율을 높이기 위한 방법에 대한 연구를 계속한 결과, 트롬빈을 이용할 경우 줄기세포 유래 엑소좀의 생성이 촉진됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서 본 발명의 목적은 트롬빈을 이용한 줄기세포 유래 엑소좀의 생성 촉진 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 트롬빈을 포함하는 줄기세포 유래 엑소좀의 생성 촉진용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 트롬빈을 이용한 줄기세포 유래 엑소좀 내 성장인자 발현 증진 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 트롬빈을 이용한 줄기세포의 효능을 강화시키는 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] 본 발명은, 줄기세포를 트롬빈을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포 효능강화방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 효능강화는 줄기세포내 성장인자의 발현이 증진되는 것임을 특징으로 한다.
- [0012] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 성장인자는 뇌 유래 신경 성장인자(brain-derived neurotropic factor, BDNF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF) 및 혈관상피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 한다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포, 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포, 및 다분화능 줄기세포로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 성체 줄기세포인 것을 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 및 태반으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 조직으로부터 유래된 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10), DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12),  $\alpha$ -MEM( $\alpha$ -Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium), 및 KnockOut DMEM으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 배지인 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 트롬빈은 배지 내에 1 내지 1000 U/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 배양은 12시간 내지 48시간 동안 수행되는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 또한, 본 발명은, 트롬빈을 포함하는, 줄기세포 효능강화용 배지 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 효능강화는 줄기세포내 성장인자의 발현이 증진되는 것임을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 성장인자는 뇌 유래 신경 성장인자(brain-derived neurotropic factor, BDNF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF) 및 혈관상피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0022] 또한, 본 발명은, 줄기세포를 트롬빈을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포내 성장인자 발현 증진 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 성장인자는 뇌 유래 신경 성장인자(brain-derived neurotropic factor, BDNF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF) 및 혈관상피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.

**발명의 효과**

- [0024] 본 발명에 따른 방법은 줄기세포 유래 엑소좀의 생성을 촉진시킬 뿐만 아니라, 줄기세포 자체 또는 엑소좀의 효능을 강화시킬 수 있는 우수한 효과를 가지고 있어, 이를 통해 종래 알려진 방법에 비해 효율적으로 줄기세포/엑소좀을 획득할 수 있으며, 관련 연구에 유용하게 이용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0025] 도 1은 본 발명에 따른 방법을 이용하여 수득한 줄기세포 유래 엑소좀의 형태를 SEM 이미지를 통해 관찰한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 방법을 이용하여 수득한 줄기세포 유래 엑소좀에서 엑소좀 마커인 CD63 및 CD9의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 방법을 이용하여 수득한 줄기세포 유래 엑소좀에서 성장인자인 VEGF 및 HGF의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 트롬빈 처리 농도에 따른 줄기세포 유래 엑소좀의 생성 정도를 나타낸 도이다.
- 도 5는 LPS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 트롬빈의 처리 농도에 따른 줄기세포 유래 엑소좀의 생성 정도를 나타낸 도이다.
- 도 6은 트롬빈 처리에 의한 줄기세포 내 소포체의 형성 정도를 관찰한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 트롬빈 처리에 의한 엑소좀 내 성장인자의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0026] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명은 줄기세포를 트롬빈을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포 효능강화 방법을 제공한다.
- [0028] 상기 트롬빈은 배지 내에 1 내지 1000 U/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 200 U/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0029] 상기 배양 시간은 제한이 없으나, 바람직하게는 12시간 내지 48시간 동안 수행될 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 "줄기세포"란 미분화된 세포로서 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 서로 다른 종류의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말한다.
- [0031] 본 발명의 줄기세포는 자가 또는 동종 유래 줄기세포일 수 있으며, 인간 및 비인간 포유류를 포함한 임의 유형의 동물 유래일 수 있고, 상기 줄기세포가 성체로부터 유래된 것이든 배아로부터 유래된 것이든 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 성체 줄기세포를 포함하며, 바람직하게는 성체 줄기세포이다. 상기 성체 줄기세포는 중간엽 줄기세포, 인간 조직 유래 중간엽 기질세포(mesenchymal stromal cell), 인간 조직 유래 중간엽 줄기세포, 다분화능 줄기세포일 수 있으며, 바람직하게는 중간엽 줄기세포이나, 이에 한정되지 않는다. 상기 중간엽 줄기세포는 제대, 제대혈, 골수, 지방, 근육, 신경, 피부, 양막 또는 태반 등으로부터 유래된 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 본 발명에서 "배지"는 생체 외(in vitro)에서 세포의 성장과 증식에 필요한 필수성분을 포함하는 조성물을 의미하는 것으로, 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 줄기세포 배양용 배지를 모두 포함하며, 예를 들어 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10), DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12),  $\alpha$ -MEM( $\alpha$ -Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium), KnockOut DMEM 등의 상업적으로 제조된 배지 또는 인위적으로 합성한 배지를 이용할 수 있고, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 배지는 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함하며, 아미노산, 항생제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 중간엽 줄기세포에 10 내지 100 U/ml의 트롬빈을 포함한 혈청프리-배양배지(MEM alpha media)를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.
- [0034] 또한, 본 발명은 트롬빈을 포함하는 줄기세포 효능강화용 배지 조성물을 제공한다.
- [0035] 상기 트롬빈은 배지 내에 1 내지 1000 U/ml의 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 200 U/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 배지 조성물은 트롬빈 외에 공지된 줄기세포 효능강화 물질을 1종 이상 더 포함할 수 있으며, 이에

한정되지 않는다.

[0037] 또한, 본 발명은 줄기세포를 트롬빈을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포내 성장인자 발현 증진 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명에서 "성장인자"는 세포 분열이나 성장, 분화를 촉진하는 단백질성의 생리활성물질을 의미하는 것으로, 예를 들어, 뇌 유래 신경 성장인자(brain-derived neurotropic factor, BDNF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF), 혈관상피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 유사인슐린 성장 인자(insulin-like growth factor, IGF), 형질전환 성장 인자(transforming growth factor, TGF), 혈소판 유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 뼈 유래 성장인자(bone-derived growth factor, BDF), 콜로니 자극 인자(colony stimulation factor, CSF), 포피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF), 각질세포 성장인자(Keratinocyte growth factor, KGF) 등을 포함한다.

[0039] 상기 성장인자는 바람직하게는 뇌 유래 신경 성장인자(brain-derived neurotropic factor, BDNF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF) 또는 혈관상피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)를 포함하며, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0043] **실시예 1. 줄기세포 유래 엑소솜의 분리**

[0044] 줄기세포 유래 엑소솜을 분리하기 위하여, 트롬빈 및 초원심분리기(Ultracentrifuge)를 이용하였다. 보다 구체적으로,  $1 \times 10^6$  개의 제대혈(umbilical cord blood) 유래 중간엽 줄기세포를 60 mm 배양접시(orange scientific cat# 4450200)에 분주 후 1주일간 배양하였다. 배양접시에 세포가 가득 증식된 것을 확인한 후, 농도별(10, 20, 50, 100 U/ml) 트롬빈(thrombin)이 희석되어있는 혈청프리-배양배지(MEM alpha media)로 교체하고, 다시 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 배양액을 원심 분리 튜브에 나누어 담아 4° C, 10000 rpm에서 30분간 원심분리하였으며, 상층액을 새 튜브에 옮겨 세포 부스러기(debris)를 제거하였다. 상기 상층액을 다시 4° C, 100,000 rpm에서 2시간 동안 초원심분리한 후, 상층액을 제거하고 엑소솜을 분리하였다(최종 농도: 15 µg/ml).

[0046] **실시예 2. 줄기세포 유래 엑소솜의 확인**

[0047] 상기 실시예 1의 과정을 통해 분리한 엑소솜이 종래 공지된 엑소솜 고유의 특성을 가지고 있는지를 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 먼저, 분리된 엑소솜을 SEM 이미지를 통해 관찰하였으며, 웨스턴 블랏을 이용하여 알려진 엑소솜 마커인 CD63 및 CD9(System Bioscience, Mountain View, CA, USA)의 발현을 확인하였다. 또한, 용해 완충액(lysis buffer)을 이용하여 엑소솜 막을 용해한 후, 엑소솜 내의 단백질을 분리하고, Procarta immunoassay kit(affymatrix, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 엑소솜 내 성장인자인 HGF와 VEGF의 양을 측정하였다. 그 결과를 각각 도 1 내지 도 3에 나타내었다.

[0048] 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1과 같은 방법을 통해 분리된 엑소솜은 약 100nm 지름의 구형을 나타내는 정상적인 형태를 보임을 확인하였다.

[0049] 또한, 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1과 같은 방법을 통해 분리된 엑소솜은 정상적으로 엑소솜 마커인 CD63 및 CD9을 발현하고 있으며, 엑소솜 내에 성장인자인 VEGF 및 HGF가 존재함을 확인하였다.

[0051] **실시예 3. 트롬빈 처리에 따른 엑소솜 생성 촉진 효과**

[0052] **3-1. 트롬빈 처리 농도에 따른 엑소솜 생성 정도 검증**

[0053] 트롬빈 처리 농도에 따른 줄기세포 유래 엑소솜의 생성 정도를 확인하기 위하여, 줄기세포 배양 시 트롬빈의 농도를 달리하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소솜을 분리하고 이를 정량하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

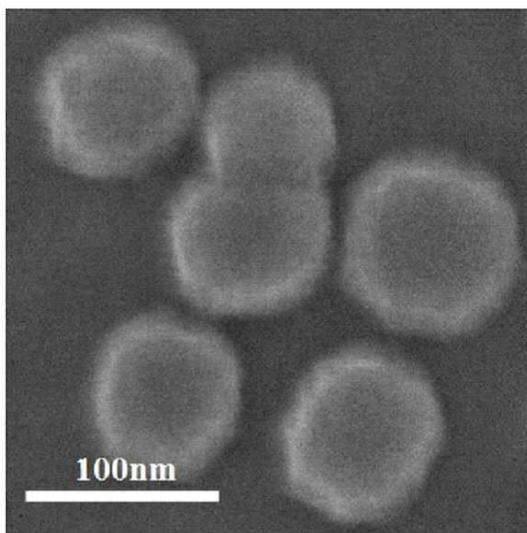
[0054] 도 4에 나타낸 바와 같이, 트롬빈의 처리 농도가 높아짐에 따라 줄기세포 유래 엑소솜의 생성이 유의하게 촉진됨을 확인하였다.

[0056] **3-2. 트롬빈을 이용한 엑소솜 생성 촉진 방법의 효율성 검증**

- [0057] 트롬빈을 이용한 엑소좀 생성 촉진 방법의 효율성을 검증하기 위하여, 트롬빈 대신 배양배지에 LPS 또는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소좀을 분리하고 이를 정량하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0058] 도 5에 나타난 바와 같이, 줄기세포 배양시 트롬빈을 처리할 경우, 다른 물질을 처리한 군에 비해 줄기세포 유래 엑소좀의 생성이 현저하게 증가함을 확인하였다.
- [0060] **3-3. 트롬빈 처리에 의한 줄기세포 내 소포체 형성 관찰**
- [0061] 트롬빈 처리가 줄기세포 내 소포체의 형성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 50 U/ml의 트롬빈이 희석되어있는 혈청프리-배양배지(MEM alpha media)에서 6 시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소좀을 분리하고 이를 전자현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0062] 도 6에 나타난 바와 같이, 트롬빈 처리에 의해 줄기세포 내 소포체의 형성이 증가되며, 엑소좀의 분비가 유도됨을 확인하였다.
- [0064] **3-4. 트롬빈 처리에 의한 엑소좀 내 성장인자 발현 관찰**
- [0065] 트롬빈 처리가 엑소좀 내 성장인자의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포를 50 U/ml의 트롬빈이 희석되어있는 혈청프리-배양배지(MEM alpha media)에서 6 시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 엑소좀을 분리하였다. 용해 완충액(lysis buffer)을 이용하여 엑소좀 막을 용해한 후, 엑소좀 내의 단백질을 분리하고, Procarta immunoassay kit(affymatrix, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 엑소좀 내 성장인자인 BDNF, FGF, HGF, NGF, IL-6 및 VEGF의 양을 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0066] 도 7에 나타난 바와 같이, 트롬빈 처리에 의해 엑소좀 내 성장인자인 BDNF, FGF, HGF, NGF, IL-6 및 VEGF의 발현이 증가됨을 확인하였다.
- [0068] 이상의 실험 결과를 통하여, 트롬빈을 이용하여 줄기세포 유래 엑소좀의 생성을 촉진시킬 수 있으며 엑소좀 내 성장인자의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

**도면**

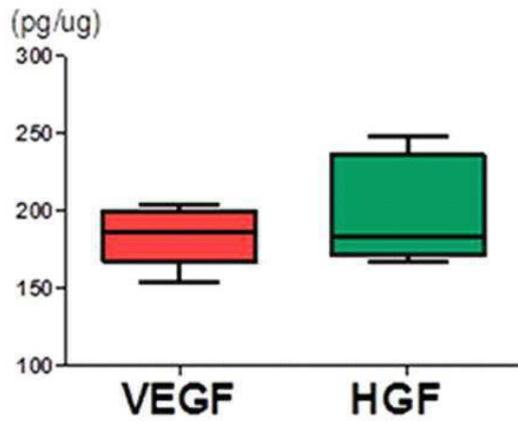
**도면1**



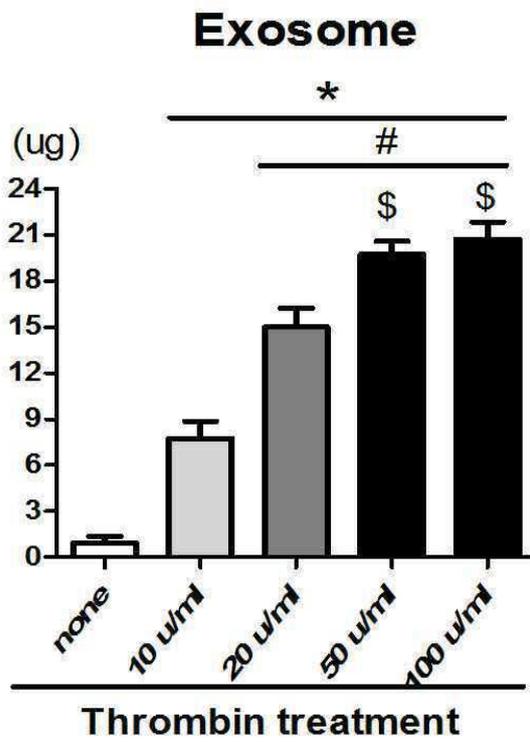
도면2



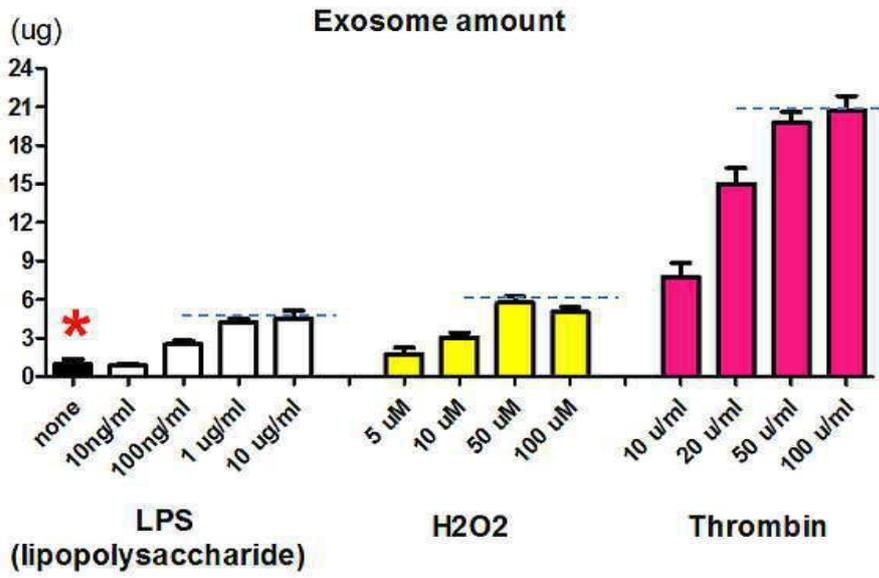
도면3



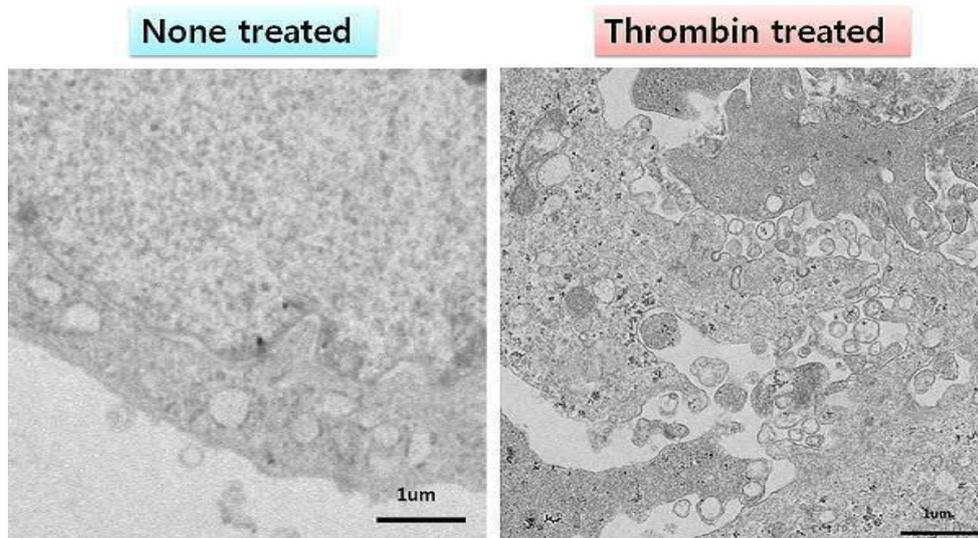
도면4



도면5



도면6



도면7

