

Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/02 C12N 5/074 C12N 5/0775
Application No.	1020130052558
Application Date	20130509
Unexamined Publication No.	1020140133040
Unexamined Publication Date	20141119
Requested Date of Examination	20140417
Agent.	LEECHEOYOUNG
Inventor	RA,JUNG-CHAN Kang, Sung Keun Jo, Jung Youn

발명의 명칭

줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법

Title of Invention

The culture method of the culture composition for the play performance improvement of the stem cell and stem cell using the same.

요약

본 발명은 줄기세포의 재생능 향상을 위한 아펠린을 함유하는 배지 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

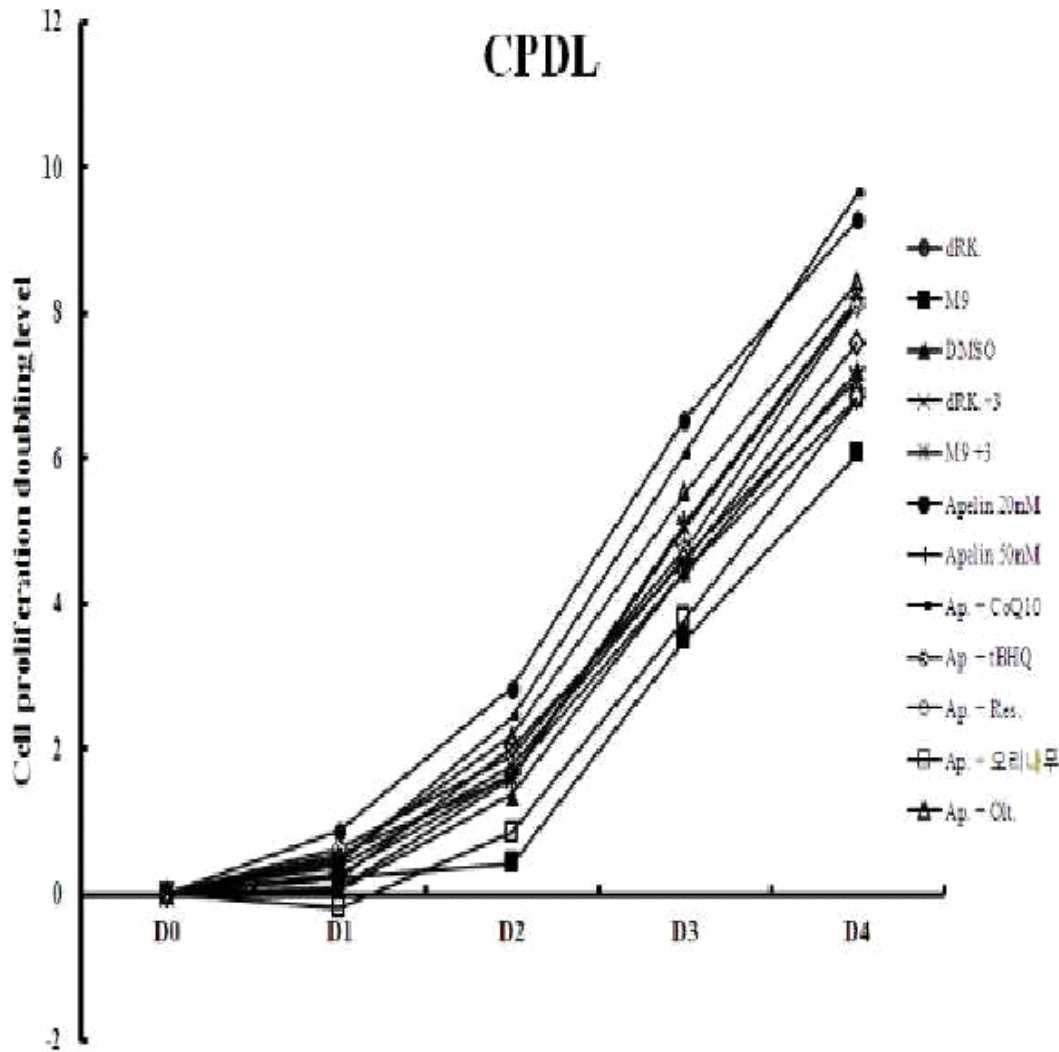
본 발명에 따르면, 줄기세포를 세포 특성의 변화 없이 효과적으로 증식 및 배양할 수 있고 활성을 증가시킬 수 있으므로 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

Abstract

The invention relates to the culture method of the culture composition containing the apelin for the play performance improvement of the stem cell and the stem cell using the same.

According to the invention, the cytotherapy effect using the stem cell it effectively can increase without the change of the cell property and the trunk cell can be cultivated and the activity can be increased can be conspicuously made promoted.

대표도면 (Representative drawing)



청구의 범위

청구 1항:

1 내지 100 nM의 아펠린 (apelin)을 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

청구 2항:

제1항에 있어서, 상기 배지는 셀레늄(selenium), 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10 (CoQ-10), 레스베라톨 (resveratol), T-BHQ, oltipraz, 오리나무 추출물, EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

청구 3항:

제2항에 있어서, 상기 추가되는 성분은 코엔자임 Q-10 (CoQ-10) 또는 oltipraz인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

Scope of Claims

Claim 1:

The culture composition for the play performance improvement of the stem cell containing the apelin of 1 to 100nM.

Claim 2:

As for claim 1, the culture composition for the play performance improvement of the stem cell containing at least one kind selected from group comprised of the culture medium is the selenium, ascorbic acid, vitamin E, catechin, lycopene, beta-carotene, coenzyme Q-10 (CoQ-10), resveratol, T-BHQ, oltipraz, alnus japonica extract, EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexanoic acid).

Claim 3:

As for claim 2, the added component as described above is the culture composition for the play performance improvement of the stem cell called the coenzyme

Q-10 (CoQ-10) or the oltipraz.

청구 4항:

제1항에 있어서, 상기 배지는 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, 덱사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-메르캅토에탄올 (2-mercaptoethanol) 및 EGF (epidermal growth factor)로 구성된 군에서 선택되는 1가지 이상의 성분을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

Claim 4:

As for claim 1, the culture composition for the play performance improvement of the stem cell containing the component selected from group comprised of the culture medium is the NAC (N-acetyl-L-cysteine), and insulin or the insulin pseudo element, hydrocortisone, dexamethasone, the bFGF (basic fibroblast growth factor), the heparan sulfate, 2-mercaptoethanol (2-mercaptoethanol) and EGF (epidermal growth factor) more than 1 kinds.

청구 5항:

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

Claim 5:

As for claim 1, the culture composition for the play performance improvement of the stem cell called the stem cell is the adult stem cell.

청구 6항:

제5항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

Claim 6:

As for claim 5, the culture composition for the play performance improvement of the stem cell called the stem cell is the fat origin of organization mesenchyme stem cell.

청구 7항:

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 재생능을 향상시키는 방법.

Claim 7:

The method improving the play performance of the stem cell including the step of cultivating the stem cell in the culture composition of any one claim among claim 1 to claim 6.

청구 8항:

제7항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능을 향상시키는 방법.

Claim 8:

As for claim 7, the method improving play performance of the stem cell called the stem cell is the adult stem cell.

청구 9항:

제8항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능을 향상시키는 방법.

Claim 9:

As for claim 8, the method improving play performance of the stem cell called the stem cell is the fat origin of organization mesenchyme stem cell.

기술분야

본 발명은 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 노령인의 줄기세포가 젊은 사람의 줄기세포 수준의 재생능을 가지도록, 크기와 활성의 변화 없이 줄기세포의 재생능을 효과적으로 향상시킬 수 있는 줄기세포의 배지 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

Technical Field

The invention relates to the culture method of the culture composition for the play performance improvement of the stem cell and the stem cell using the same, more specifically to the culture method of the culture composition of the stem cell which in order that old age humanity and justice stem cell have the play performance of the stem cell level of the young human effectively can improve the play performance of the stem cell without the change of the activity and size and the stem cell using the same.

줄기세포(stem cell)는 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다. 만능 줄기세포(totipotent stem cell)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4~5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아 줄기 세포라 하며 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못한다. 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직 손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있으며 조직 특이적 다능성 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라 한다.

성체 줄기세포는 인체의 각종 장기에 이미 존재하는 세포를 채취, 줄기세포를 발전시킨 것으로 특정 조직으로만 분화되는 특징이 있다. 그러나 최근에는 성체 줄기세포를 이용, 간세포 등 각종 여러 조직으로 분화시키는 실험이 성공을 거두고 있어 주목된다. 특히, 병이나 사고에 의한 기능 장애나 부조화에 빠진 생체 조직 및 장기의 재생 및 기능 회복을 위해 세포를 적극적으로 활용하여 실시하는 치료법인 재생 의료에 있어서, 환자 본인으로부터 줄기세포, 혈액 유래 단핵세포 혹은 골수 유래 단핵세포를 수집하는 단계, 시험관 배양으로 세포 증식 및/또는 분화를 유도하는 단계, 및 선택된 미분화(줄기세포 및/또는 전구세포) 및/또는 분화세포를 착상에 의해 환자 자신의 몸에 도입하는 단계를 포함하는 방법이 많이 이용되고 있다. 이처럼, 기존의 고전적인 약물치거나 수술적 방법을 통한 질병치료가 손상된 세포#183#조직#183#장기를 건강한 것으로 바꾸는 세포#183#조직대체치료법으로 대체될 것으로 예측됨으로써, 줄기세포의 활용도는 더욱 높아지게 될 것이다.

따라서, 현재 줄기세포의 다양한 기능이 연구되고 있는 실정이며, 그 중에서도 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)를 이용한 세포치료기술이 각광을 받기 시작하면서, 인체로부터 분리된 중간엽 줄기세포를 치료에 적합하도록 개선하기 위한 기술이 개발되고 있다 (WO 2006/019357, 대한민국 등록특허 제0795708호, 대한민국 등록특허 제0818214호).

The stem cell refers to the cell having the capability specializing to two or more cells while having the self copy ability. And it can classify into the pluripotent stem cell (totipotent stem cell), the pluripotent stem cell, and the Multipotent stem cell. The pluripotent stem cell (totipotent stem cell) has the property thereafter that the cell to 8 cell group is like that with the correction of one complete entity the cell having the property of the pluripotent which can be generated the ovum and correct letter. And if this cell is separated and it transplants to the womb it can be generated as one complete entity. The pluripotent stem cell is that the new life it is derived from the positioned inner cell mass it is this specialized to various other histiocytes is formed in the inside of the blastocyst which is the cell which can be generated by the ectoderm, the mesoderm, and the various cells and organization of the endoderm layer originated and shows up after the correction 4~5. The fetal life, and the regeneration in the maintenance of homeostasis of the adult tissue as well as the growth of each organization of the new-born baby and adult phase and long-term and development and tissue injury it is the stem cell specializing in the cell specific for the organization containing the Multipotent stem cell is this cell and boiler may be referred to the adult stem cell while engaging in the function of inducing tissue specific pluripotent cells are called collectively.

There can be the specialized characteristic as the specific tissue the stem cell is developed the cell in which the adult stem cell already exists in all kinds of the long-terms of the human body is picked. But recently, the adult stem cell is used. The experiment let differentiate as all kinds of different organization including the interstitial cell etc. gets the success and the experiment is watched. Particularly, as to the regeneration medical called the therapy which actively utilizes the cell for the regeneration of the biological tissue falling into malfunction by bottle or accident or the incompatibility and long-term and function recovery and performed, the method for including the step of collecting the stem cell from the patient oneself, and the blood originated monocyte or the bone marrow originated monocyte, and the step of inducing the tube culture the cell proliferation and/or the differentiation and step of introducing to the condition of the patient oneself with the implantation the pulverization (the stem cell and/or the precursor cell) and/or the selected differentiated cell is very much used. Like this, it is predicted to be replaced with the cell · organization substitution value cure which with being fine changes the cell · organization · long-term when the treatment of illness through the classical drug treatment or the surgical method is damaged. In that way the availability of the stem cell is more enhanced.

Therefore, presently, while the cell therapy technique using the mesenchyme stem cell (mesenchymal stem cells) it is studied of the various functions of the stem cell begins to receive the foot light it develops the technology for improving the mesenchyme stem cell separated from the human body in order to be suitable for the treatment (WO 2006/019357, KR0795708 B, and KR081

한편, 인간의 연령이 증가하면 몸속 장기의 기능이나 세포의 재생 능력이 감소하듯이, *in vitro* 상에서 줄기세포를 거듭 배양하거나 외부 인자의 자극이 있는 경우, 세포의 기능 및 모양이 변할 수 있다. 즉, *in vitro* 상에서 세포의 배양이 시작되는 순간 거의 감지할 수 없을 정도이지만 세포가 기능을 잃기 시작하며 노화 (senescence)의 상태로 들어간다. 이러한 세포 특성 때문에 유전자 치료에 이용할 세포로는 초기 세포를 사용하는 것이 좋으며, 또는 오랜 기간 배양을 진행하여도 증식능, 분화능, 표현형, 형태, 활성 (telomere 길이)과 같은 줄기세포의 특성에 큰 변화가 없는 줄기세포를 사용하는 것이 좋으므로 이와 관련된 연구들이 진행 중에 있다 (BMC Cell Biology 2006, 7: 14, Ageing Research Reviews 5, 2006, 91116).

In the meantime, the reproduction capacity of the function of the interior of the body long-term or the cell reduces if the age of human increases as if the trunk cell is again cultivated on *in vitro* or the case where there are the stimulation of the external factors, and the function and shape of the cell can be changed. That is, at the moment when the cultivation of the cell is initiated on *in vitro* it is the extent which it nearly cannot sense but while losing the skill the cell enters to the state of the aging (senescence). It is good to the cell which therefore uses this cell property for the gene therapy to use the early cell. And even if the long period cultivation is progressed since being good the cell has the research associated with this in the property of the stem cell like the reproductive integrity, blastogenesis, expression type, form, the activity (telomere length) to use the stem cell without the large change among the progressing (BMC Cell Biology 2006, 7: 14, Ageing Research Reviews 5, 2006, 91116).

이에, 본 발명자들은 줄기세포를 거듭 배양하여도 세포의 모양이나 활성 등의 세포 특성에 변화가 없으면서 세포의 재생능을 개선할 수 있는 배지 성분을 탐색하고자 예의 노력한 결과, 아펠린을 함유하는 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 경우, 세포의 재생능을 향상시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

Thus, it made many efforts so that the inventors search the medium component which could improve the play performance of the cell even if it again cultivated the trunk cell while the change was not in the cell property including the shape or the activity of the cell etc. Then it confirmed to could improve the case of cultivating the trunk cell in the culture composition containing the apelin, and the play performance of the cell and the invention was completed.

발명의 내용

Summary of Invention

해결하고자 하는 과제

Problem to be solved

본 발명의 목적은 노령인의 줄기세포로부터 젊은 사람의 줄기세포 수준의 재생능을 갖도록 줄기세포의 재생능을 향상시키기 위한 배지 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법을 제공하는데 있다.

The culture method of the culture composition for improving the play performance of the stem cell so that this Purpose of the invention have the play performance of the stem cell level of the young human from old age humanity and justice stem cell and stem cell using the same is to be provided.

과제해결 수단

Means to solve the problem

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아펠린을 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 배양용 배지 조성물을 제공한다.

To accomplish the above objects, the present invention is to provide the stem cell culture badge composition containing the apelin.

본 발명은 또한, 아펠린을 함유하는 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 재생능을 향상시키는 방법을 제공한다.

The invention provides the method improving the play performance of the stem cell including the step of in the culture composition which containing, the trunk cell is cultivated moreover, the apelin.

발명의 효과

Effects of the Invention

본 발명에 따르면, 줄기세포를 거듭 배양하여도 세포의 활성이나 크기 등의 세포의 특성에는 변화가 없으면서 세포의 재생능은 향상시킬 수 있으므로 단기간에 다량의 줄기세포를 수득할 수 있어 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

According to the invention, even if the trunk cell is again cultivated since the play performance of the cell can improve in the property of the cell including the activity or the size of the cell etc. while there is no change a large amount of stem cell the cytotherapy effect using the stem cell it can obtain can be conspicuously made promoted in the short-term.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에서 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

본 발명에서, #34#줄기세포(stem cell)#34#란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, #34#성체 줄기세포#34#는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포를 의미한다.

본 발명에서, #34#중간엽 줄기세포#34#는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 줄기세포로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 특히, 제대 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 근육 유래 중간엽 줄기세포, 신경 유래 중간엽 줄기세포, 피부 유래 중간엽 줄기세포, 양막 유래 중간엽 줄기세포 및 태반 유래 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 각 조직에서 줄기세포를 분리하는 기술은 당해 업계에 이미 공지되어 있다.

본 발명에서, #34#지방 조직 유래 중간엽 줄기세포#34#란 지방조직에서 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포로서, 본 명세서에 축약하여 "지방 유래 성체 줄기세포", "지방 줄기세포" 또는 "지방 유래 줄기세포"라고 지칭하기도 한다. 이는 당업계에 공지된 통상의 방법을 통하여 수득할 수 있는데, 그 분리 방법은 예를 들어 다음과 같을 수 있다. 즉, 지방흡입술로부터 얻어지는 생리 식염수에 부유된 지방 함유 suspension을 배양한 다음, 플라스크 등 배양용기에 부착된 줄기세포 층을 트립신으로 처리한 다음 회수하거나, 스크래퍼로 긁어서 소량의 생리 식염수에 부유되는 것을 직접 회수하거나 하는 방법 등을 통해 지방 유래 중간엽 줄기세포를 분리할 수 있다.

본 발명에서, "줄기세포의 크기의(가) 변화 없이"는 줄기세포의 형태 (morphology)나 크기 (size)가 배지 조성물에서 배양되기 전의 상태와 거의 유사하게 그 형태를 유지하는 것을 의미하는 것이다.

본 발명에서, "배지 (culture media)#34#는 체외배양 조건에서 줄기세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배양액을 의미하고, 줄기세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 또한, 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다.

Description of Embodiments

Differently, technical scientific terminologies which defined are used in this specification has the meaning it is understood in the technical field in which the invention belongs with the unskilled expert of being identical. Generally, hereinafter the experimental method is well known with the glossology used in this specification in this technical field and generally it is used.

In the present invention, while having the self copy ability the " stem cell " means the step that each long-term of the embryo bud it is progressed it is formed or the stem cell showing up in the adult step the cell having the capability specializing to two or more cells.

In the present invention, as the divided stem cell which the " mesenchyme stem cell " separates from the organization of human or the mammal, it can be derived from various organizations. Particularly, it can be the umbilical cord originated mesenchyme stem cell, the umbilical cord blood originated mesenchyme stem cell, the bone marrow originated mesenchyme stem cell, the fat originated mesenchyme stem cell, the muscle originated mesenchyme stem cell, the nerve originated mesenchyme stem cell, the skin derivation mesenchyme stem cell, the amnion originated mesenchyme stem cell and placenta originated mesenchyme stem cell. And the technology separating the stem cell from each organization experiences and the technology is known to have in the business field.

In the present invention, as the divided adult stem cell which the " fat origin of organization mesenchyme stem cell " separates from the adipose tissue, it reduces in this specification "fat originated adult stem cell". It names as "adipose stem cell" or "adipose derived stem cell". It can obtain through the normal method in which this is known in the relevant industry. The separation method can be the same as that of for example, the next. That is, it collects after processing the stem cell layer adhered to the culture vessel including the flask etc. the saturated fat suspension floated in the saline solution obtained from the liposuction is cultivated as trypsin or the fat originated mesenchyme stem cell can be separated through the method etc. It directly collects to scratch by the scraper and be floated in a small amount of saline solution or it does.

In the present invention, it means similarly that "without the change of the size (a) of the stem cell" nearly maintains the form with the state before the form (morphology) or the size of the stem cell is cultivated in the culture composition.

In the present invention, the normal culture medium which is the culture fluid supporting the " culture medium (culture media) " is the growth of the stem cell and alive in the culture in vitro condition used in the relevant field suitable for the cultivation of the stem cell it means is altogether included. Moreover, according to the kind of the cell, the culture medium and condition of culture can be selected.

본 발명에서, "증식(proliferation)#34#이란, 세포 수의 증가를 의미하는 것으로 성장(growth)과 동일한 의미로 사용된다.

In the present invention, it is used as the meaning such as the growth " proliferation " means the increase of the cell number.

본 발명에서, "재생능 (renewal ability)#34#이란, 세포가 자신과 똑같은 복사본을 만들어낼 수 있는 능력을 의미하는 것으로, 재생능이 개선되는 경우 세포의 증식능이 우수하다.

In the present invention, the cell means the capability making the hard copy equaling with the oneself. The reproductive integrity of the cell in which the play performance is improved is excellent.

본 발명에서, "계대 배양"이란, 세포를 건강한 상태로 지속적으로 장기간 배양하기 위해 주기적으로 세포의 일부를 새로운 배양용기에 옮긴 후 배양배지를 갈아주면서 세포의 대(代)를 계속 이어서 배양하는 방법을 의미한다. 한정된 공간을 가진 배양용기 내에서 세포의 수가 늘어나면서 일정시간이 지나면 증식 영양분이 소비되거나 오염 물질이 쌓여 세포가 자연히 죽게 되므로, 건강한 세포의 수를 늘리기 위한 방법으로 사용되며, 통상적으로 한 차례 배지 (배양용기)를 교체하는 것 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 1 계대 (1 passage)라고 한다. 계대 배양의 방법은 당업계에서 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 기계적 분리 또는 효소적 분리로 수행될 수 있다.

In the present invention, in order to continuously cultivate the cell to the healthy state for a long term it periodically means the method of subsequently continuously cultivating the large of the cell it changes the part of the cell in the new culture vessel. If the preset time passes by while the cellular number increases in the culture vessel having the restricted space the proliferation nutrient is consumed or the contaminant is piled up and the cell naturally dies. Therefore the cell is used in the method for being increased the healthy cellular number. And generally about one times the culture medium (the culture vessel) is replaced or it is called 1 passage to divide and cultivate the cell aggregates. The method in which the method of the subculture is known to have in the relevant industry can be used without the limit. But the method can be performed to the mechanical separation or the enzyme separation.

줄기세포는 배양을 거듭하거나, 외부로부터 자극을 받을수록 세포의 형태나 크기 등이 미세하게 변형되거나 달라지며, 세포의 재생능과 활성 (telomerase activity)이 낮아진다는 문제점, 즉 세포 노화가 진행된다는 문제점이 있다. 세포의 재생능과 활성 등의 특징은 세포를 어떤 배지에서 배양하는지에 따라 차이가 있으므로, 거듭되는 배양에도 불구하고 형태 등의 세포 특성에 큰 변화없이 재생능이나 활성도가 낮아지지 않도록 하는 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 것이 중요하다. 즉, 세포의 노화를 지연 또는 개선시키거나 초기 세포상태를 유지시키는 배지 조성물에서 줄기 세포를 배양하는 것이 중요하다.

The stem cell repeats cultivation or as excitation is received from the outside the form or the size of the cell etc. is minute the form is changed or the form is changed. And the cell has the problem that the play performance and activity (telomerase activity) of the cell are decreased, and the problem that in other words, the cell senescence is progressed. The characteristic including the play performance and activity of the cell etc. follows about cultivating the cell in any kind of culture medium and it has the difference. Therefore the difference is important to cultivate the trunk cell in spite of the repeated cultivation in the cell property including the form etc. in the culture composition in which the play performance or the activity is not decreased without the large change. That is, important to cultivate the trunk cell the aging of the cell in the delay or the culture composition improving or maintains the early cell state.

그러나 종래의 배지 조성물에서의 줄기세포 배양에 의하면, 높은 수율의 줄기세포를 얻기 위하여 계대 배양을 여러 차례 수행하여야 하므로 인력 및 시간이 많이 소요되며, 특히 계대 배양에 필요한 배지 성분 중 일부는 대단히 고가여서 경제적으로도 장점이 존재하지 않았다. 또한, 거듭되는 계대 배양에 의하여 세포의 재생능이 낮아진다는 문제점이 있었다. 본 발명은 세포의 형태나 활성에 변화가 없으면서 세포의 재생능을 향상시킬 수 있는 배지 조성물을 제공하는 것이 가능하다.

But very part was the high price among the medium component necessary for the subculture the stem cell of the high yield is obtained and the advantage was economically nonexistent. Moreover, it had the problem that the play performance of the cell was decreased with the repeated subculture. It is possible that the invention provides the culture composition improving the play performance of the cell the change is not in the form or the activity of the cell.

따라서, 본 발명은 일 관점에서, 아펠린을 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 배지 조성물을 제공한다.

Therefore, the present invention is to provide the stem cell culture composition containing the apelin in consistency.

"아펠린(apelin)"은, 1998년 Fujino M 팀에서 rat와 bovin의 우유에서 발견된 것으로, 특히 초유에 많은 신규한 펩타이드로

(Tatemoto K et al., and (1998). "Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand f

APLN 유전자에 암호화되는 인체 내에 있는 단백질이며 (Tate moto K et al., (1998). #34#Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor#34#. Biochem. Biophys. Res. Commun. 251 (2): 4716. doi:10.1006/bbrc.1998.9489. PMID9792798), 몇몇 세포 표면에 발현하는 G-단백질에 결합되어 있는 APJ 수용체에 대한 내재적인 리간드이다 (Lee DK et al., (2000). #34#Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor#34#, J. Neurochem. 74 (1): 3441. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x. PMID10617103. Szokodi I et al., (2002). #34#Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility#34#. Circ. Res. 91 (5): 43440. doi:10.1161/01.RES.0000033522.37861.69. PMID12215493, Kleinz MJ, Davenport AP (2005).#34#Emerging roles of apelin in biology and medicine#34#. Pharmacol. Ther. 107 (2): 198211. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.001. PMID15907343, O#39#Dowd BF et al., (December 1993). #34#A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11#34#. Gene 136 (12): 35560. doi:10.1016/0378-1119(93)90495-O. PMID8294032, Devic E et al., (October 1996). #34#Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*#34#. Mech. Dev. 59 (2): 12940. doi:10.1016/0925-4773(96)00585-0. PMID8951791). 아펠린은 폭넓게 심장, 간, 폐, 신장, 지방 조직, 위장관, 뇌, 부신 땀샘, 내피, 그리고 사람의 혈장 등 다양한 기간에서 발현되며, 이 중 혈관 내피조직에서 높은 발현을 나타낸다.

아펠린 유전자는 N-terminal 부분에서 신호 단백질인 77개의 아미노산의 pre-proprotein을 암호화한다. 아펠린의 몇 가지 활성적인 fragment (apelin-36, apelin-19, apelin-17, apelin-16, apelin-13 및 apelin-12)는 비교적 유사한 생물학적 활성을 공유한다 (Invited Review Article, Targeting the ACE2 and Apelin Pathways are Novel Therapies for Heart Failure: Opportunities and Challenges). 더 자세히 기술하면 endoplasmic reticulum (세포 망상질)안에서 translocation과 신호 단백질을 절단한 후 55개의 아미노산의 proprotein은 여러 가지 활성적인 fragment을 생성할 수 있는데 이는 42-77 (apelin 36) sequence에 연결되는 36 개 아미노 펩타이드, 61-77 (apelin 17) sequence에 연결되는 17개 아미노 펩타이드, 65-77 (apelin 13) sequence에 연결되는 13 개 아미노 펩타이드이다. 이 다음 fragment는 N-terminal 글루타민 잔기의 수준에서 pyroglutamylation (N-terminal에 있는 글루타민에서 pyroglutamic acid의 에스테르 (ester)를 형성하는 과정)을 겪는다. 그러나 사람의 혈장내의 이들 펩타이드의 농도에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지는 않다 (Mesmin C, Dubois M, Becher F, Fenaille F, Ezan E (2010). #34#Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the absolute quantification of the expected circulating apelin peptides in human plasma#34#. Rapid Commun Mass Spectrom 24 (19): 287584. doi:10.1002/rcm.4718. PMID20857448). 아펠린은 2006년 Audigier에 의해 G protein-coupled receptors의 family인 막 수용체 (membrane receptor) 또는 몇몇의 포텐셜 리간드 (pote

or the human APJ receptor". Biochem. Biophys. Res. Commun. it is protein within the human body in which "apelin" is discovered in 1998 year Fujino M team in the milk of the bovin and rat and which is encrypted by the novel peptide which there is many in especially, the first milk in the APLN gene 251 (2): 4716. doi: (Lee DK et al., (2000). "Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor", and the J. Neurochem. it is the immanent ligand about APJ receptor bonded to the G-protein expressed in 10.1006 / bbrc.1998.9489. PMID9792798), and the some cell surface 74 (1): 3441. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x. PMID10617103. Szokodi I et al., (2002). "Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility". Circ. Res. 91 (5): 43440. doi: 10.1161/01 RES. 0000033522.37861.69. PMID12215493, and the Kleinz MJ. Davenport AP (2005)."Emerging roles of apelin in biology and medicine". Pharmacol. Ther. 107 (2): 198211. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.04.001. PMID15907343, O'Dowd BF et al., (December 1993). "A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11". Gene 136 (12): 35560. doi: 10.1016/0378-1119(93)90495-O. PMID8294032, Devic E et al., (October 1996). "Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*". Mech. Dev. 59 (2): 12940. doi: 10.1016/0925-4773 (96) 00585-0. PMID8951791). apelin in the various periods including brain between the heart, the liver, the lungs, the extension, the adipose tissue, between the stomach, glaring ***, the plasma of human and the inner skin etc. wide exhibit the high expression in the vascular endothelium organization among this it is revealed.

The pre-proprotein of the amino acid of 77 called the apelin gene is the signal protein in the N-terminal part is encoded. The fragments (the apelin-36, apelin-19, apelin-17, apelin-16, apelin-13 and apelin-12) which are active the some kind of the apelin are similar biological activity is shared (Invited Review Article, Targeting the ACE2 and Apelin Pathways are Novel Therapies for Heart Failure: Opportunities and Challenges). More, the translocation in the endoplasmic reticulum (cell reticulum) and signal protein it describes detail may be referred to 13 the amino peptide connected to 17 the amino peptide, connected to 36 the amino peptide, in which the proprotein of the amino acid of 55 can create the fragment which is active the various after doing the cut but this is connected to 42-77 (apelin 36) sequence 61-77 (apelin 17) sequence 65-77 (apelin 13) sequence. In the next fragment is the level of the N-terminal glutamine residue, the pyroglutamylation (the process forming the ester of the pyroglutamic acid in the glutamine which is in the N-terminal) is undergone. But (Mesmin C, the Dubois M, the Becher F, the Fenaille F, the Ezan E (2010). "Liquid chromatography / tandem mass spectrometry assay for the absolute quantification of the expected circulating apelin peptides in human plasma" it is so far well known about the concentration of these peptides within the plasma of human Rapid Commun Mass Spectrom 24 (19): 287584. doi: the signal path (signal pathw

ntial ligands)와 작용하는 시그널 경로 (signal pathway)가 밝혀졌다. Receptor 발현의 sites는 organism 내에서 아펠린에 의해 작동한 다른 기능으로 연결된다 (wikipedia 발췌). 아펠린 수용체의 활성화는 아펠린 펩타이드에 결합하여 세포 활성 변화를 개시한다. 아펠린은 심장 부전의 biomarker로써 적용될 가능성이 있고 혈관 수축 및 확장을 포함한 생물학적 효과에 직접적으로 관여한다고 한다. 최근 연구에서도 아펠린과 아펠린 수용체 시스템이 혈관 발생과 관련이 있다는 보고들이 있으며, 혈관 계통의 질병에서도 밀접한 관계가 있다는 보고가 있다. 아펠린과 수용체의 기능은 사람의 생리학과 병리생리학에 중요하며, 그 예로 아펠린이 혈관확장에서 산화질소(nitric oxide)를 생산하여 L-아르기닌/산화질소 합성효소 (nitric oxide synthase ; NOS) / 산화질소를 활성화한다고 하며 이는 혈관 확장과 수축의 역할과도 관계가 있다고 한다. 아펠린 수용체와 Angiotensin II 수용체는 상당한 homology를 가지는데 혈관 병리생리학의 관점에서 아펠린 시그널링이 잠재적 역할을 할 것으로 생각된다. 혈관 기능 (Vascular fuction)의 관점에서 아펠린 시그널링의 기능은 내피 세포에 의한 아펠린 수용체의 활성화에 의해서 발현 되는데 혈관생성과 혈관의 가소성에 도움을 주며, 그리고 휴지상태의 내피 세포에 저혈압을 유도하는 기능을 한다. 2008년 Eyies에 의해 연구된 내용에서도 저 산소 상황에서 아펠린의 발현이 내피세포의 분열과 혈관형성 재생을 조절한다고 기술되어 있다. 이는 저산소증으로 아펠린 유전자의 상향조절 (upregulation)에 의해 유도되거나 내피세포에서 아펠린의 mitogenic activity에 관여된다. 반면에 Akt의 Activation에 의한 혈압강하 작용도 일어난다. 또한 혈관에서는 혈압을 조절하며 신생혈관의 생성을촉진하며 NO 생성은 증가시키고 동맥경화증과 대동맥류를 유발하는 안지오텐신 II에 의해 유발되는 신호전달은 차단시켜 안지오텐신 II의 작용을 억제시킨다. 아펠린 시그널링의 혈관과 내피세포에서의 기능은 리간드와 수용체 유전자를 무효화 시킴으로 그에 따라 나타나는 표현형 (phenotype)으로 증명되었다. 아펠린 수용체에 결핍이 있는 쥐에 실험한 결과 혈관 수축제에 대하여 Angiotensin II가 증가하는 반면 아펠린 결핍이 있는 쥐에서는 망막의 혈관 발달이 감소되는 것을 보였다. 또한 다른 기관에서도 영향을 미치는데 심장에서는 초기 배아형성 단계에서 발현되며 혈압과 혈류조절에 관여, 뇌에서는 수분과 식이 섭취를 담당하는 부위의 뉴런에서 발현하며 호르몬과 채액을 조절에 관여한다. 소화기관의 몇몇 창자천크롬세포에서도 아펠린 수용체가 발현 되는데, 히스타민 분비를 억제시키거나 위산 분비 억제, 글루코스에 의해 증가된 인슐린 분비 억제, 혈액 내 글루코스를 일정하게 조절하는데 관여한다. 또한 골아세포의 표면에서 발현되며 뼈 형성에 관여한다. 따라서 아펠린 / APJ system에 의한 아펠린 시그널링은 이 시그널링의 조절장애로 인한 허혈성 질환이나 심혈관 질환 관한 질환과 같은 혈관기능 장애, 그 밖의 질병으로 인한 환자들에게 높은 치료 효능이 있을 것이라고 생각된다 (Dr Yves AUDIGIER. Institute of Molecular Medecine of Ranguell. Archived topic page last updated on 22 September 2008. http://www.scitopics.com/AP#956#ELIN_SIGNALLING.html).

ay) acting with the membrane receptor called 10.1002 / rcm.4718. PMID20857448). apelin is the family of G protein-coupled receptors by 2006 year Audigier or the several potential ligand (potential ligands) was clarified. It is connected to the other function in which the sites of the Receptor expression operates in the organism with the apelin (the wikipedia excerpt). The cell activating change the activity of the apelin receptor unites with the apelin peptide is disclosed. It directly engages in the biological effect in which the apelin is possible to be applied to as the biomarker of the hard feces and including the vasoconstriction and expansion. In the recent research, it has with the report. And that the related has as the apelin receptor system with the apelin with the vascular development it has the report that the report has the intimate relation in the disease of the blood circulatory system. There can be this is the role of the vasodilation and contraction and relation the apelin produces the nitrogen oxide (nitric oxide) in the vasodilation and the L-arginine / nitric oxide synthetase (nitric oxide synthase :NOS) / nitrogen oxide is activated as the example the function of the receptor and apelin is important in the physiology and pathophysiology of human. It has the apelin receptor and the it is considerable homology but the apelin signaling is considered to the possible role in the point of view of the blood vessel pathophysiology. In the point of view of the vascular function (Vascular fuction), the function of the apelin signaling is revealed with the activity of the apelin receptor by the endotheliocyte but the help is decreased in the plasticity of the blood vessel and angiogenesis. And hypotension functions to be induced in and, the endotheliocyte of the dormant state. In the content studied by 2008 year Eyies, the expression of the apelin is described in the low oxygen concentration situation to control the fusion and angiogenesis regeneration of the endotheliocyte. This is induced to hypoxia with the upregulation of the apelin gene or it is engaged in the mitogenic activity of the apelin in the endotheliocyte. On the other hand, the blood pressure drop activity by the Activation of the Akt occurs. Moreover, in the blood vessel, the signal transduction caused by the angiotensin II which the NO production increases and causes the artery scleroma and aortic aneurysm while doing with the production promotion of the new vessels while controlling the blood pressure cuts off and the action of the angiotensin II is suppressed. Since the function at the blood vessel of the apelin signaling and endotheliocyte invalidated the ligand and receptor gene it was proved to the expression type (phenotype) showing up according to that. It was seen that as a result of experimenting in the rat in which the rat had the lack in the apelin receptor the Angiotensin II increased about the vasoconstrictor on the other hands the vascular development of the retina was reduced in the rat in which the rat had the apelin lack. Moreover, while revealing in the neuron of the site which manages moisture and dietary intake at the blood pressure and blood flow modulation in the concerning, and brain while being revealed in the heart in the initial embryo bud formation step to affect in the other boiler the hormone and humoral are engaged in the modulation. In the some window one's mother chrome cell of the digestive organ, the apelin receptor is revealed. The histamine secretion is suppressed or the insulin secretion suppression increased with the inhibition of gastric acid secretion, and glucose, and the glucose inside blood

are regularly controlled but the glucose inside blood engage. Moreover, it engages in the osteogenesis while being revealed on the surface of the osteoblast. Therefore, it is regarded that it has the high therapeutic efficacy to the vascular insufficiency like the disease in which the apelin signaling by the apelin / APJ system relates with the ischemic disease due to the deregulation of this signaling or the cardiovascular disease, and the patient due to the other disease (Dr Yves AUDIGIER. Institute of Molecular Medicine of Ranguueil. Archived topic page last updated on 22 September 2008. http://www.scitopics.com/APPELIN_SIGNALLING.html).

그러나, 아펠린은 줄기세포의 증식과 관련하여서는 그 기능이나 활성이 전혀 알려진 바 없다. 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 아펠린을 함유하는 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양시키면 3 계대 이상에서도 줄기세포의 형태 등의 세포의 특성에는 변화가 없으면서 세포의 활성이 유지되며, 그 증식능은 효율적으로 증가한다는 것을 알 수 있었다.

But the apelin relates with the proliferation of the stem cell and because of being known there is no function or the activity at all. According to the detailed embodiment of the present invention., in the culture medium containing the apelin, if the mesenchyme stem cell was cultured while there was no change the activity of the cell was maintained in 3 more than succeeding in the property of the cell including the form of the stem cell etc. And the activity could know that the reproductive integrity efficiently increased.

본 발명에서 "아펠린 (apelin)"은 시중에서 판매하는 것을 구입하여 사용할 수 있는데, 이에 제한되지 않으며 직접 합성한 것을 사용할 수도 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 1 내지 100 nM의 농도로 아펠린이 배지 조성물 내에 함유될 수 있도록, 바람직하게는 20 내지 50 nM의 농도로 아펠린이 함유되도록 하였으며, 아펠린은 Bachem사의 catalog no H-4566 (powder 형태)을 구입한 것을 용해물질 (예컨대, DMSO (dimethyl sulfoxide) 등)에 용해시켜 사용하였다.

The invention "apelin" may be formed of the direct thing synthesized it is not thus limited it buys to sell in on the market and it can use. In the detailed embodiment of the present invention, in order that the apelin was contained to the concentration of 1 to 100nM within the culture composition preferably the apelin was contained to the concentration of 20 through 50 nM. And it dissolved in the soluble material (for example, the DMSO (dimethyl sulfoxide) etc) that the apelin bought and used the Bachem catalogue no H-4566 (the powder form).

아펠린을 함유하는 본 발명의 배지 조성물에서 배양되는 줄기세포는 형태나 활성의 변화 없이 세포의 재생능은 개선되므로 세포의 특성의 변화없이 단기간에 다량의 줄기세포를 수득하는 것이 가능하다 (실시예 2 참조).

Since the stem cell cultivated in the culture composition of the present invention containing the apelin the play performance of the cell is improved without the change of the form or the activity the change is possible without the change of the property of the cell in the short-term to obtain a large amount of stem cell (embodiment 2 reference).

상기 본 발명의 배지 조성물은 아펠린 이외에, 셀레늄 (selenium), 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10 (CoQ-10), 레스베라톨 (resveratrol), T-BHQ, oltipraz, 오리나무 추출물, EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid) 중에서 선택된 1종 이상의 항산화제를 추가로 함유할 수 있다. 아펠린과 상기 항산화제를 함유하는 배지 조성물에서 배양된 줄기세포도 형태나 활성의 변화 없이 세포의 증식능이 우수함을 확인할 수 있었다. 이때, 상기 항산화제는 아펠린 20nM에 대하여 1uM 내지 20uM의 양으로 포함될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 아펠린과 코엔자임 Q-10을 함유하는 배지에서 배양된 줄기세포의 세포 증식능이 우수함을 알 수 있었다 (실시예 2 참조).

The culture composition of the present invention additionally can contain the antioxidant more than one kind selected from the selenium, ascorbic acid, vitamin E, catechin, lycopen, beta-carotene, coenzyme Q-10 (CoQ-10), resveratol, T-BHQ, oltipraz, alnus japonica extract, EPA (eicosapentaenoic acid) besides the apelin and the DHA (docosahexanoic acid). The stem cell cultivated in culture composition containing apelin and antioxidant could confirm without the change of the form or the activity that the reproductive integrity of the cell was excellent. At this time, the antioxidant can be included about the apelin 20nM in an amount of 1uM to 20 uM. It could know that the cell proliferating activity of the stem cell cultivated in culture medium containing the apelin in a preferred embodiment of the present invention and coenzyme Q-10 was excellent (embodiment 2 reference).

한편, 본 발명의 배지 조성물은 아펠린; 또는 아펠린과 셀레늄 (selenium), 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10 (CoQ-10), 레스베라톨 (resveratrol)

In the meantime, in the culture composition of the present invention the antioxidant more than one kind selected from the selenium, ascorbic acid, vitamin E, cat

ol), T-BHQ, oltipraz, 오리나무 추출물, EPA(eicosapentae noic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid) 중에서 선택된 1 종 이상의 항산화제는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져 있는 간단한 조성을 가지는 통상적인 배지 (basal medium)를 함께 함유할 수 있다. 일반적으로 배양에 이용되는 기본 배지로는 MEM (Minimal Essential Medium), DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에도 당해 업계에서 이용되는 배지 이면 족하다. 바람직하게는, M199/F12(mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지(GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배 지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), K-SFM, DMEM/F12 배지, PCM 배지 및 MSC 확장배지 (Chemicon)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 특히, 이 중에서도 바람직하게는 K-SFM 배지를 사용할 수 있다.

상기 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 기본 배지는 당 업계에 공지된, 중간엽 줄기세포의 미분화된 표현형의 증식을 촉진하면서 분화는 억제하는 첨가제로 보충될 수 있다. 또한, 배지는 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고 농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, FCS (fetal calf serum), horse serum, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민, L-글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 트랜스페린, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 영인 당원, 예컨대 글루코스, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β -메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.

또한, 배지는 세포가 서로 유착하거나, 용기벽에 유착하거나, 너무 큰 다발을 형성하는 것을 방지할 목적으로, 항응집제 (anti-clumping agent), 예컨대 Invitrogen이 판매하는 것들(Cat # 0010057AE)을 포함하는 것이 유익할 수 있다.

그 중에서도, 하기의 10이상의 추가의 첨가제를 사용하는 것이 유리할 수 있다:

- 줄기 세포 인자(SCF, Steel 인자), c-키트를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성화제
- 다른 티로신 키나아제 관련 수용체, 예컨대 혈소판-유도된 성장 인자(Platelet-Derived Growth Factor; PDGF), 대식 세포 콜로니-자극 인자, Flt-3 리간드 및 혈관 내피 성장 인자(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)의 수용체를

echin, lycopene, beta-carotene, coenzyme Q-10 (CoQ-10), resveratol, T-BHQ, oltipraz, alnus japonica extract, EPA (eicosapentaenoic acid) and the DHA (docosahexanoic acid) is the relevant industry, the conventional culture medium (basal medium) having the known because use of being suitable for the stem cell cultivation simple composition can be together contained. Generally, it is sufficient if it is the culture medium used in the business field besides it experiences it has the MEM (Minimal Essential Medium), the DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), the RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), the K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium) to the basal medium used in cultivation. Preferably, it can be selected in group comprised of the M199 / F 12 (mixture) (GIBCO), the MEM-alpha culture medium (GIBCO), and the lightly doped is the glucose compound DMEM medium (Welgene), the MCDB 131 culture medium (Welgene), the IMEM culture medium (GIBCO), the K-SFM, the DMEM / F12 culture medium, the PCM culture medium and MSC expansion culture medium (Chemicon) than. Particularly, among these, preferably, the K-SFM culture medium can be used.

While promoting the proliferation of the divided expression type in which the basal medium used in the acquisition of the mesenchyme stem cell culture material is known in the relevant industry of the mesenchyme stem cell it can be supplemented as the additive which the differentiation controls. Moreover, the culture medium can contain the neutral buffer agent (for example, the phosphate and/or the high concentration bicarbonate) among the iso-osmotic solution and protein nutrient (for example, the blood serum, for example, the FBS, the FCS (fetal calf serum), horse serum, serum replacement, albumin or the essential amino acid and non essential amino acid, for example, glutamine, and the L-glutamine). Furthermore, etc component (member of a part y called for example, the transferrin, the nucleoside or the nucleotide, the pyruvate, and the arbitrary ionic shape or salt, for example, glucose, and the glucocorticoid, for example, the hydrocortisone and/or the reducing agent, for example, β - mercaptoethanol) discovered in the most of conservative solution culture media of this kind and lipid (the fatty acid, cholesterol, and HDL or the LDL extract of the blood serum) can be contained.

Moreover, the culture medium can be profitable to include the purpose, the cell being thick and loud or being thick and loud in the container wall or of preventing to so form the large bunch. The anti-caking agent (anti-clumping agent), and the Invitrogen sells for example the field (Cat # 0010057AE).

Among them, it can be advantageous to use the additional additive more than below 1 :

- The other activator of the other ligand dimerizing stem cell factor (SCF, and the Steel factor), and the c- kit or the signal transmission path such as antibody.
- The growth factor (Platelet-Derived Growth Factor: PDGF), induced with the other tyrosine kinase related receptor, for example, platelet - the macrophage colony stimulating factor, and the ligand for the receptor of th

위한 리간드

e Flt-3 ligand and blood vessel epidermal growth factor (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF).

· 환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포르스콜린

The factor that increases · circular AMP concentration, for example, the forskolin.

· gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M

The factor, inducing · gp130 for example, LIF or the Oncostatin-M.

· 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)

· hematopoiesis young rice plant growth factor, for example, the thrombopoietin (TPO)

· 변형성 성장 인자, 예컨대 TGFβ1

· deformability growth factor, for example, the TGF β 1.

· 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF

· neurotrophin, for example, CNTF.

· 항생제, 예컨대 겐타마이신 (gentamicin), 페니실린, 스트렙토마이신

· antibiotic, for example, the Gentamicin, penicillin, and the streptomycin

본 발명의 배지 조성물은 상기 성분 이외에, NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, 덱사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-메르카프토에탄올 (2-mercaptoethanol) 및 EGF (epidermal growth factor)로 구성된 군에서 선택되는 1가지 이상의 성분을 추가로 함유할 수도 있다.

The component in which the culture composition of the present invention is selected in group comprised of the NAC (N-acetyl-L-cysteine) besides the component, and insulin or the insulin pseudo element, hydrocortisone, dexamethasone, the bFGF (basic fibroblast growth factor), the heparan sulfate, 2-mercaptoethanol (2-mercaptoethanol) and EGF (epidermal growth factor) more than 1 kinds can be additionally contained.

구체적으로, 인슐린을 대체하는 성분으로 인슐린 유사인자를 함유할 수 있는데, 이는 포도당 대사와 단백질 대사를 향상시켜 세포성장을 촉진하는 역할을 한다. 특히 재조합 IGF-1(Insulin-like growth factor-1)을 사용하는 것이 바람직하다. 인슐린 유사인자의 바람직한 함량은 10 내지 50 ng/ml이며, 이의 성분이 10ng/ml 미만일 경우에는 세포자살(Apoptosis)을 초래하며, 50 ng/ml을 초과할 경우에는 세포독성 및 비용증가의 문제점이 있다.

Specifically, the insulin pseudo element can be contained to the component replacing insulin. This improves the glucose metabolism and protein metabolism and the cell growth serves to be promoted. Particularly, it is desirable to use the recombinant IGF-1 (Insulin-like growth factor-1). The content done with the desirable of the insulin pseudo element is 10 through 50 ng / ml. And the apoptosis is caused in case its component is 10ng / ml under. And it has the problem of the cost increment and cytotoxin in case of exceeding 50 ng / ml.

섬유아세포 증식인자 (bFGF)를 함유할 수 있는데, 이는 in vivo 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수 있으며, 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 섬유아세포 증식인자의 바람직한 함량은 1 내지 100 ng/ml이다.

This the fibroblast growth factor (bFGF) can be contained may be formed of the be desirable turning point is the recombinant protein the various types of cell proliferation can be caused in vivo state. The content done with the desirable of the fibroblast growth factor may be 1 through 100 ng / ml.

본 발명에서 사용되는 배지는 FBS (fetal bovin serum), 칼슘 및 EGF로 구성된 군에서 선택되는 성분을 추가로 함유할 수 있다. 상피세포 성장인자(Epidermal growth factor; EGF)는 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 상피세포 성장인자의 바람직한 함량은 10 내지 50 ng/ml이며, 이의 함량이 10 ng/ml 미만이면 특별한 효과가 없으며, 50ng/ml을 초과하면 세포에 독성을 가진다.

In the present invention, the component selected from group comprised of the used culture medium is the FBS (fetal bovin serum), and calcium and EGF can be additionally contained. The epidermal growth factor (Epidermal growth factor: EGF) may be formed of the be desirable turning point is the recombinant protein. The content done with the desirable of the epidermal growth factor has the toxicity in the cell 50ng / ml is exceeded it is 10 through 50 ng / ml and there is no effect that 10 ng / ml U.S. its content is particular.

본 발명에서 사용되는 줄기세포는 바람직하게는 성체 줄기세포, 그 중에서도 지방조직, 또는 모낭#183#양막 등 상피조직

In the present invention, the used stem cell may be formed of preferably, the adult stem cell, and the adult

에서 얻어지는 성체 줄기세포를 이용할 수 있다. 가장 바람직하게는 지방 조직 유래 성체 줄기세포를 사용할 수 있다. 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)를 사용할 수 있고, 특히 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)일 수 있다.

상기 지방 또는 상피조직은 포유류 유래인 것이 바람직하고, 그 중에서도 인간 유래인 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)를 사용하였다.

본 발명의 줄기세포 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 경우, 줄기세포의 특성에는 변화가 없으면서 증식능이 향상된 줄기세포를 수득하는 것이 가능하다.

따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 아펠린을 함유하는 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 증식능을 향상시키는 방법을 제공한다.

본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 배지에서 지방 유래 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 지방 유래 중간엽 줄기세포는 다음과 같은 방법으로 획득할 수 있다. 우선, 지방흡입술(Liposuction) 등에 의해 복부로부터 얻어진 인간 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 콜라겐 분해 효소를 첨가한 DMEM배지를 사용하여 분해 후, PBS로 세척하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리 한다. 상층액은 제거하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리 한다. 100 μ m 매쉬를 사용하여 부유물을 제거한 다음, PBS로 다시 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산)배지에서 배양하고, 하룻밤 지난 후 배양용기 바닥에 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, NAC, 아스코르브산, 칼슘, rEGF, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유한 K-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 그러나 이 외에도 당업계에서 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

stem cell among them obtained in the epithelial tissue including the adipose tissue or the hair follicle · amnion etc. More preferably, the fat origin of organization adult stem cell can be used. The mesenchyme stem cell (mesenchymal stem cells, MSCs) can be used. It may be especially, the adipose tissue originated mesenchyme stem cell (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs).

The fat or the epithelial tissue may be more, the be desirable it is among them the human origin what is the mammal origin is the be desirable. In a preferred embodiment of the present invention, the human adipose tissue originated mesenchyme stem cell (Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs) was used.

In the stem cell culture composition of the present invention, it is possible to obtain stem cell with improved reproductive integrity there is no change in the case of cultivating the trunk cell, and the property of the stem cell.

Therefore, the invention provides the method improving the reproductive integrity of the stem cell including the step of in the culture composition which containing, the trunk cell is cultivated the apelin in the other point of view.

In a preferred embodiment of the present invention, the fat originated mesenchyme stem cell was cultivated in the culture medium according to the present invention. The fat originated mesenchyme stem cell can obtain to the method as follows. Firstly, it is indignant and it washes using the DMEM medium with the collagenase the organization is small pieces cut the human adipose tissue obtained with the liposuction etc. from the abdomen is separated and it washes to PBS to after, and PBS and it centrifuges for 5 minutes in 1000 rpm. The pellet which the supernatant removes and which is left in the bottom surface centrifuges for 5 minutes at 1000 rpm to PBS after doing washing. After the suspended material was removed using 100 μ m mesh it again washed to PBS. The mesenchyme stem cell while replacing the K-SFM culture medium containing the NAC, the ascorbic acid, calcium, the rEGF, insulin it cultivates in the DMEM (10% FBS, 2 mM NAC, 0.2 mM ascorbic acid) culture medium and the head computerized axial tomography at 2 it cultivates and the mesenchyme stem cell is separated and it subcultures may be obtained. But besides, the method which is known to have in the relevant industry the mesenchyme stem cell may be obtained.

Hereinafter, the invention tries to be more particularly explained through the embodiment. These embodiments only exemplify the invention. Therefore it has to a person skilled in the art and it will be obvious in the relevant industry not to be interpreted that the scope of the present invention is limited by these embodiments.

embodiment 1: human adipose tissue originated lobus medius stem cell separation .

지방흡입술(Liposuction)에 의해 40대 (n=1), 50대 (n=1) 및 60대 (n=1)의 복부 피하에서 지방조직을 각각 분리한 후, PBS로 세척하였다. 세척된 지방조직을 잘게 자른 후 콜라게나아제 타입 1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM media를 이용해 37℃에서 2시간 동안 조직을 분해시켰다. 콜라게나아제 처리된 조직을 PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리 하여, 상층액을 제거하고, 펠렛을 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100µm mesh에 필터링하여 부유물을 제거한 후 PBS로 세척하고, 10% FBS, 2mM NAC(N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM 아스코르브산이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

In 40 large (n=1) by the liposuction, and the abdomen subcutaneousness of 60 large (n=1) and 50 large (n=1), after the adipose tissue was separated it washed to PBS. The organization the using the DMEM media with the collagenase type 1 (1mg/ml) the washed adipose tissue is small pieces cut off was dissolved in 37℃ for 2 hours. The organization handled with collagenase for 5 minutes was centrifuged at PBS after washing in 1000rpm. The supernatant was removed. The pellet for 5 minutes was centrifuged at 1000rpm to PBS after doing washing. It cultivated in 10% FBS, 2mM NAC (N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM ascorbic acid it filters in 100µm mesh-added DMEM medium.

하룻밤 지난 후 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM 아스코르브산, 0.09mM 칼슘, 5ng/ml rEGF, 5µg/ml 인슐린, 10 ng bFGF 및 74ng/ml 하이드로코르티손 및 1ng/ml의 셀레늄(selenium)을 함유한 K-SFM을 2일마다 교체하면서 계대배양하였으며, 3계대까지 배양하여 지방 유래 중간엽 줄기세포를 얻었다.

The fat originated mesenchyme stem cell it cultivates to 3 passage cells which were not adhered after passing one night washed to PBS and while replacing the K-SFM at 2 containing 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid, 0.09mM calcium, 5ng / ml rEGF, 5µg / ml insulin, 10 ng bFGF, 74ng / ml hydrocortisone and selenium of 1 ng / ml it subcultured may be obtained.

실시예 2: 줄기세포의 재생능에 영향을 미치는 배지성분의 탐색

embodiment 2: the search of the medium component affecting in play performance of the stem cell .

실시예 1에서 3 계대까지 배양하여 얻은 연령별 1명씩, 총 3명의 지방유래 중간엽 줄기세포를 하기의 각 배지에 seeding하고 4일에 걸쳐 배양하였다. 4일의 배양 동안, 세포의 형태(morphology)를 관찰하였다. 또한, 세포의 크기, 생존률 및 CDPL(Cell population doubling level)을 측정하여 평균값을 표시하였다.

In the embodiment 1, the age bracket 1 people, and the fat originated mesenchyme stem cell of the total 3 people were cultivated in below leg culture medium over seeding and 4 which cultivated to 3 passage and which it obtained. The form (morphology) of the cell was observed for the cultivation of 4. Moreover, the size of the cell, and the existence rate and CDPL (Cell population doubling level) were measured and the average value was represented.

배지 1 :dRK 배지

Culture medium 1: DRK culture medium.

* dRK 배지는, #34#K-SFM (Keratinocyte-SFM) 배지 + 2mM NAC + 0.2 mM 아스코르브산 + 0.09 mM 칼슘 + 5 #956#g/ml 인슐린 + 74 ng/ml 하이드로코르티손 + 항산화제 (셀레늄)#34#이다.

* The dRK culture medium may be the "K-SFM (Keratinocyte-SFM) culture medium + 2mM NAC + 0.2 mM ascorbic acid + 0.09 mM calcium + 5 µg / ml insulin + 74 ng / ml hydrocortisone + antioxidant (selenium) " .

배지 2: : M9 배지 (대조군)

Culture medium 2::m9 culture medium(control group)

* M9 배지는, dRK 배지에서 항산화제(셀레늄)을 제외시킨 배지임.

* The M9 culture medium, is the antioxidant (selenium) in the dRK culture medium may be referred to the culture medium excepted.

배지 3: M9배지 + 0.07 % DMSO (대조군)

Culture medium 3:m9 culture medium + 0.07 % DMSO(control group)

배지 4: dRK 배지 + 3 factors

Culture medium 4: DRK culture medium + 3 factors.

* 3 factors는, 20 nM 아펠린 + 5#956#M CoQ10 + 20#956#M T-BHQ

* 3 factors, is 20 nM apelin + 5µM CoQ10 + 20µM T-BHQ.

배지 5: M9 배지 + 3 factors

Culture medium 5: m9 culture medium + 3 factors.

배지 6: M9 배지 + 20 nM 아펠린	Culture medium 6: m9 culture medium + 20 nM apelin.
배지 7: M9 배지 + 50 nM 아펠린	Culture medium 7: m9 culture medium + 50 nM apelin.
배지 8: M9 배지 + 20 nM 아펠린 + 5#956#M CoQ10	Culture medium 8: m9 culture medium + 20 nM apelin + 5μM CoQ10.
배지 9: M9 배지 + 20 nM 아펠린 + 20#956#M T-BHQ	Culture medium 9: m9 culture medium + 20 nM apelin + 20μM T-BHQ.
배지 10: M9 배지 + 20 nM 아펠린 + 1#956#M Resveratol	Culture medium 10: m9 culture medium + 20 nM apelin + 1μM Resveratol.
배지 11: M9 배지 + 20 nM 아펠린 + 5#956#g/ml 오리나무 추출물	Culture medium 11: m9 culture medium + 20 nM apelin + 5μg / ml Alnus japonica extract.
배지 12: M9 배지 + 20 nM 아펠린 + 10 #956#M oltipraz	Culture medium 12: m9 culture medium + 20 nM apelin + 10 μM oltipraz

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 각 배지에서 배양하면서 각 배양일수별로 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 분리하여 세포의 생존률, 세포크기, CPDL를 측정하였으며, telomerase activity는 3세대 상태에서 측정하였다. 배지 11의 오리나무 추출물은 다음과 같은 방법으로 제조한 것을 사용하였다. 오리나무 수피(중국산)를 세척한 후, 80%로 희석한 주정으로 침전하여 60℃에서 1차 추출하였다. 1차 추출액을 여과한 후, 농축 탱크로 이송하고 60℃에서 진공 농축하여 주정을 완전히 회수하였다. 1차 농축액(고형분 25%)은 회수하고, 탱크 내벽에 부착되어 미 회수 정유성분은 주정을 소량 첨가하고 60℃에서 20~40분간 가열, 용출하여 재 회수하였다. 재 회수한 용출액은 1차 농축액과 혼합하였다 (1). 1차 추출한 오리나무수피에 회수한 80% 주정을 이용하여 침전시켜 60℃에서 10~16시간 2차 추출하였다. 2차 추출액을 여과 후 농축탱크에서 진공 농축하여 주정을 완전히 회수하였다. 2차 농축액(고형분 25%)은 회수하고, 탱크 내벽에 부착되어 미 회수 정유성분은 주정(95%)을 농축 탱크에 소량 첨가하고 60℃에서 가열, 용출하여 재 회수하였다. 재 회수한 용출액은 2차 농축액과 혼합하였다 (2). (1)과 (2) 혼합 농축액(고형분 함량 25%)을 함께 혼합하고, 부형제(덱스트린) 20% (오리나무수피 추출물 고형분 대비 20%) 혼합하여 분무건조 후 합성되지 않는 조건 하에서 가급적 빠르게 포장하는 방법으로 제조하였다.

While cultivating the adipose tissue originated mesenchyme stem cell separated from the embodiment 1 in each culture medium the adipose tissue originated mesenchyme stem cell was separated according to each cultivation days and the existence rate of the cell, the cell size, and CPDL was measured. And the telomerase activity measured in 3 passage state. The Alnus japonica extract of the culture medium 11 may be formed of the thing manufactured with the method as follows. It precipitated after doing washing to the alcohol diluted to 80% and the alder bark (the Chinese product) was extracted from 60℃ with the first. After the first extract was filtered it transferred to the concentration tank and it concentrated in 60℃ the vacuum and alcohol completely collected. The first concentrate (the solid content 25%) collected. It was adhered to the inside wall of tank and the unrecovery essential oil added a small quantity alcohol and it gushed out and it measured 20~40 discrimination heating in 60℃ and it collected. The effluent which small it collected mixed with the first concentrate (1). It precipitated into the alder bark extracted with the first using 80% alcohol collected and it extracted from 60℃ with 10~16 hours second. In the concentration tank after the filtering the second extract, it concentrated the vacuum and alcohol was completely collected. The second concentrate (the solid content 25%) collected. It was adhered to the inside wall of tank and it added a small quantity and it gushed out and the unrecovery essential oil measured the alcohol (95%) the heating in the concentration tank in 60℃ and it collected. The effluent which small it collected mixed with the second concentrate (2). (1) (2) mixing concentrate (the solid content 25%) was together mixed. It mixed with the diluting agent (dextrin) 20% (the alder bark extract solid content comparison 20%) and it manufactured with the method under the above described conditions, for if possible rapidly packing which was not i

mmersed after the spray drying.

(1) 줄기세포의 형태 (morphology)

(1) The form (morphology) of the stem cell.

줄기세포의 형태는 위상차현미경하에서 관찰 후 촬영하였다 (도 1 참조). 관찰 결과 세포의 morphology에 있어서는 큰 차이가 없었다. 즉, 아펠린 또는 본 발명에서 사용된 CoQ10 등의 항산화제가 세포의 형태에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

The form of the stem cell took a picture under the phase contrast microscope after the observation (refer to Figure 1). It was in the morphology of the observation result cell and there was no large difference. That is, it could know that the antioxidant including the apelin or the CoQ10 etc. did not give the large influence to the form of the cell in the present invention, was used.

(2) 줄기세포의 생존력(viability)

(2) The viability of the stem cell.

실험 결과, 첨가되는 성분에 따른 줄기세포의 생존력에는 큰 차이가 없었다. 즉, 아펠린 또는 본 발명에서 사용된 CoQ10 등의 항산화제가 세포의 크기에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다 (도 2 참조). Luna™ automated cell counter를 이용하여 줄기세포의 생존률을 측정하였다 (n=3).

In the experimental result, and the viability of the stem cell according to the added component, there was no large difference. That is, it could know that the antioxidant including the apelin or the CoQ10 etc. did not give the large influence to the size of the cell in the present invention, was used (refer to Figure 2). The existence rate of the stem cell was measured using the Luna™ automated cell counter (n=3).

(3) 줄기세포의 크기(size)

(3) The size (size) of the stem cell.

실시에 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 각 배지에서 seeding 한 후, 배양일별로 트립신을 처리한 후 지방조직유래 중간엽 줄기세포를 분리한 후, Luna™ automated cell counter를 이용하여 줄기세포의 입도(μm)를 측정하였다 (n=3). 측정 결과, 첨가되는 성분에 따른 세포의 크기에는 큰 차이가 없었다 (도 3 참조). 즉, 아펠린 또는 본 발명에서 사용된 CoQ10 등의 항산화제가 세포의 크기에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

After processing trypsin according to the culture date the adipose tissue originated mesenchyme stem cell separated from the embodiment 1 the adipose tissue originated mesenchyme stem cell was separated from each culture medium after doing seeding the granularity (μm) of the stem cell was measured using the Luna™ automated cell counter (n=3). In the measurement result, and the size of the cell according to the added component, there was no large difference (refer to Figure 3). That is, it could know that the antioxidant including the apelin or the CoQ10 etc. did not give the large influence to the size of the cell in the present invention, was used.

(4) 줄기세포의 세포성장률 (CPDL : cell population doubling level)

(4) The cell growth rate (CPDL : cell population doubling level) of the stem cell.

줄기세포의 세포성장률인 Cell population doubling level (CPDL)은 다음의 계산법으로 계산하였다.

The cell population doubling level (CPDL) called the cell growth rate of the stem cell calculated as the following calculation method.

$CPDL = \text{Log} (N_{\text{final}} - N_{\text{initial}}) / \text{Log} 2 (N_{\text{final}} : \text{최종적으로 얻은 세포수}; N_{\text{initial}} : \text{처음 seeding 세포수})$

$CPDL = \text{Log} (N_{\text{final}} - N_{\text{initial}}) / \text{Log} 2 (n_{\text{final}} : \text{finally, the cell number}; N_{\text{initial}} : \text{obtained: first time, seeding cell number})$

실험 결과, 아펠린을 첨가한 배지에서 줄기세포를 배양한 경우, 아펠린과 기타의 항산화제를 함께 첨가한 배지에서 줄기세포를 배양한 경우, 세포의 CPDL 값이 증가하였음,

In culture medium with the experimental result, and the apelin, in case the trunk cell was cultivated in case the trunk cell was cultivated in the cultur

즉 재생능이 개선됨을 확인할 수 있었다 (도 4 참조). 아펠린과 기타 항산화제가 함께 첨가된 경우와 관련하여, CoQ10 또는 oltipraz를 아펠린과 함께 사용한 경우 CPDL 값이 높았다. 또한, 동종 계열이 제거된 dRK 배지, M9 배지의 mix 된 3 factor (3 factor= apelin+ coQ10 + T-BHQ)군이 dRK 배지이나 M9 단독 군보다는 CPDL 값이 높았으나 다른 2가지 mix 군에 비하면 좋지 않았다. 오히려 dRK 배지에 들어있는 항산화제가 3 factor의 효과를 감소 시킨다는 결과를 얻었다.

e medium which together added the apelin and miscellaneous antioxidant the CPDL value of the cell increased. The CPDL value could confirm that in other words, the play performance was improved (refer to Figure 4). In case of using the CoQ10 or the oltipraz with the apelin the CPDL value was high in connection with the case in which the apelin and the other antioxidant were together added. Moreover, if 3 factor (3 factor= apelin+ coQ10 + T-BHQ) group which became with the dRK culture medium in which the homo series is removed, and the mix of the M9 culture medium was the dRK culture medium but the CPDL value was higher than the M9 single group but it compared to the other 2 kinds mix group it was not poor. Rather, the result that the antioxidant painted on the dRK culture medium reduces the effect of 3 factor may be obtained.

(5) 줄기세포의 telomerase activity 측정

(5) telomerase activity measurement of the stem cell.

실시에 1의 방법으로 분리된 40대, 50대 및 60대 유래 지방줄기세포를 상기 표 4에 나타난 배지에서 3계대까지 계대한 후, 줄기세포의 텔로머라아제 활성을 확인하였다. telomerase activity의 활성은 Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA kit (Roche)을 이용하여 측정하였다. 확인 결과, 아펠린을 20 nM의 농도로 첨가한 배지에서 배양한 줄기세포의 telomerase activity가 가장 높다는 것을 확인할 수 있었다.

In culture medium shown in 40 part separated into the method of the embodiment 1, and the table 4 5 0 part and 60 large originated adipose stem cell, the telomerase activity of the stem cell was confirmed to 3 passage after the group coldest day of the year. The activity of the telomerase activity measured using the Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA kit (Roche). It could confirm that the telomerase activity of the stem cell cultivated in the culture medium adding the confirmation result, and the apelin to the concentration of 20 nM was the highest.

이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

The content of the present invention was particularly described to the or more. And the or more has to a person skilled in the art of the relevant industry. It is the embodiment which this concrete technology only does with desirable. And it will be clear the scope of the present invention is not limited by this. Therefore, it is defined with claims and their equivalent in which the substantial range of the present invention is attached.

도면에 대한 간단한 설명

도 1은 40대, 50대 및 60대 유래의 지방줄기세포를 실시에 1에 제시한 배양배지로 3계대 (passage)까지 계대한 후, 각각의 배지에서 4일차까지의 현미경 상에서 형태를 확인한 사진이다.

Brief explanation of the drawing

Figure 1 is a photograph confirming the form as the culture medium presenting the adipose stem cell to the embodiment 1 to 3 passage after the group coldest day of the year at each culture medium on the microscope to 4 primary of 40 part, 50 part and 60 large originated.

도 2는 40대, 50대 및 60대 유래의 지방줄기세포를 실시에 1에 제시한 배양배지로 3계대 (passage)까지 계대한 후, 각각의 배지에서 4일차까지의 세포의 생존력 (viability)을 나타낸 그래프이다.

Figure 2 is graph showing the viability of the cell to 4 primary in each culture medium after the group coldest day of the year, till the culture medium presenting 40 part, and the adipose stem cell of 60 large originated and 50 part to the embodiment 1 3 passage.

도 3은 40대, 50대 및 60대 유래의 지방줄기세포를 실시에 1에 제시한 배양배지로 3계대 (passage)까지 계대한 후, 각각의 배지에서 4일차까지의 세포의 크기를 나타낸 그래프이다.

Figure 3 is graph showing the size of the cell to 4 primary in each culture medium after the group coldest day of the year, till the culture medium presenting 40 part, and the adipose stem cell of 60 large o

도 4은 40대, 50대 및 60대 유래의 지방줄기세포를 실시에 1에 제시한 배양배지로 3계대 (passage)까지 계대한

후, 각각의 배지에서 4일차까지의 CPDL(cell population doubling level)을 나타낸 그래프이다.

originated and 50 part to the embodiment 1 3 passage.

Figure 4 is graph showing the CPDL (cell population doubling level) to 4 primary in each culture medium after the group coldest day of the year, till the culture medium presenting 40 part, and the adipose stem cell of 60 large originated and 50 part to the embodiment 1 3 passage.

면책안내

본 문서는 특허 및 과학기술문헌 전용의 첨단 자동번역 시스템을 이용해 생성되었습니다. 따라서 부분적으로 오역의 가능성이 있으며, 본 문서를 자격을 갖춘 전문 번역가에 의한 번역물을 대신하는 것으로 이용되어서는 안 됩니다. 시스템 및 네트워크의 특성때문에 발생한 오역과 부분 누락, 데이터의 불일치등에 대하여 본원은 법적 책임을 지지 않습니다. 본 문서는 당사의 사전 동의 없이 권한이 없는 일반 대중을 위해 DB 및 시스템에 저장되어 재생, 복사, 배포될 수 없음을 알려드립니다.

(The document produced by using the high-tech machine translation system for the patent and science & technology literature. Therefore, the document can include the mistranslation, and it should not be used as a translation by a professional translator. We hold no legal liability for inconsistency of mistranslation, partial omission, and data generated by feature of system and network. We would like to inform you that the document cannot be regenerated, copied, and distributed by being stored in DB and system for unauthorized general public without our consent.)