

성장재생 약침 제제의 줄기세포 보호효과 연구: 산화적 및 염증성 스트레스에 대한 *in vitro* 연구

배준상* · 김용수[†] · 하창우[†] · 이경섭[†] · 이재석[†] · 정택근[†] · 하원배[†] · 전서재[§] · 전수현^{||,**} · 이정환^{†,§}

원광대학교 한의과대학 병리학교실*, 동서의학 중앙연구소[†], 원광대학교 한의과대학 한방재활의학교실[†], 원광대학교 전북바이오융합전문대학원[§], 고려대학교 생명자원연구소^{||}, 주식회사 프로비^{**}

Protective Effects of Growth-Regeneration Pharmacopuncture Formulation on Stem Cells Against Oxidative and Inflammatory Stress: An *In Vitro* Study

Jun Sang Bae, Ph.D.*, Yong Soo Kim, K.M.D., Ph.D.[†], Changwoo Ha, Ph.D.[†], Kyeong-seob Lee, Ph.D.[†], Jaeseok Lee, K.M.D.[†], Taekgeun Jung, K.M.D., Ph.D.[†], Wonbae Ha, K.M.D., Ph.D.[†], Seojae Jeon, Ph.D.[§], Su-Hyun Chun, Ph.D.^{||,**}, Junghan Lee, K.M.D. Ph.D.^{†,§}

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Wonkwang University*, Dong Seo Medical Research Institute[†], Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Wonkwang University[†], Jeonbuk Advanced Bio-Convergence Academy, Wonkwang University[§], Institute of Life Science and Natural Resources, Korea University^{||}, Pro_B Co., Ltd.^{**}

This paper was supported by Wonkwang University in 2025.

RECEIVED December 23, 2025
REVISED December 24, 2025
ACCEPTED December 26, 2025

CORRESPONDING TO

Su-Hyun Chun, Institute of Life Science and Natural Resources, Korea University, 145 Anam-Ro, Seongbuk-Gu, Seoul 02841, Korea

TEL (031) 528-1067
FAX (031) 528-1068
E-mail pro_b_rnd@naver.com

Junghan Lee, Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 895 Muwang-ro, Iksan 54538, Korea

TEL (063) 859-2807
FAX (063) 859-0033
E-mail milpaso@wku.ac.kr

Copyright © 2026 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Objectives Stem cells are key therapeutic materials for regenerative medicine due to their high regenerative capacity. However, oxidative stress- and inflammation-induced cell death after transplantation remains a major limitation to their clinical application. This study aimed to evaluate whether a herbal medicine-based growth-regeneration pharmacopuncture formulation (GRPF) could exert cytoprotective effects under oxidative and inflammatory conditions.

Methods A GRPF was prepared using enzymatic hydrolysis and ultra-high-pressure homogenization of *Plastrum Testudinis*, horse bone, polydeoxyribonucleotide, and lactoferrin hydrolysate. Cell viability was assessed in human mesenchymal stem cells (hMSCs), human adipose-derived stem cells (hADSCs), SH-SY5Y neuroblastoma cells, and RAW264.7 macrophages. The cell counting kit-8 assay was used to determine non-cytotoxic concentrations, and the neutral red uptake assay was performed to evaluate cytoprotective effects against hydrogen peroxide (H₂O₂)- or lipopolysaccharide (LPS)-induced cellular damage.

Results The GRPF showed no cytotoxicity in any cell line at concentrations up to 4 mg/mL. Under H₂O₂-induced oxidative stress, cell viability was restored by 8.0% in hMSCs, 18.4% in hADSCs, 14.6% in SH-SY5Y cells, and 11.1% in RAW264.7 cells. In an LPS-induced inflammatory model, RAW264.7 cell viability was restored by 16.4%.

Conclusions This herbal-based GRPF demonstrated consistent cytoprotective effects against oxidative and inflammatory stress in stem cells, as well as neural and immune cells. These findings suggest its potential as an adjuvant approach for stem cell-based regenerative therapies, warranting further mechanistic and *in vivo* studies. (*J Korean Med Rehabil* 2026;36(1):1-9)

Key words Pharmacopuncture, Stem cells, Oxidative stress, Inflammation, Cytoprotection

서론»»»»

현대 재생의학 분야에서 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)와 지방유래 줄기세포(adipose-derived stem cells, ADSCs)는 자기 재생 능력(self-renewal capacity)과 다분화능을 바탕으로 난치성 질환 치료의 핵심 소재로 주목받고 있다^{1,2)}. 이들 줄기세포는 뇌혈관 질환, 퇴행성 질환, 피부 및 모낭 재생 등 다양한 분야에서 새로운 치료 대안으로 활용 가능성이 제시되어 왔다^{1,2)}. 그러나 실제 임상 적용 과정에서 이식된 줄기세포는 여러 한계에 직면한다. 이식된 세포는 허혈, 저산소 환경, 염증 반응 및 과도한 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성으로 특징지어지는 병리적 미세환경에 노출되며, 이로 인해 빠른 세포 사멸이나 생착률 저하가 발생한다^{1,4)}. 이러한 문제는 이식 후 기능 회복의 가변성과 재현성을 저하시켜 줄기세포 치료의 전반적인 효율을 제한하는 주요 요인으로 작용한다^{1,2)}.

이러한 한계를 극복하기 위해 최근에는 줄기세포의 생존율과 기능을 향상시키기 위한 기능성 물질 전처리 또는 병용 투여 전략에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{1,2)}. 줄기세포 전처리(preconditioning)는 임상 이식 전에 세포를 특정 자극이나 물질에 노출시켜 생존 능력, 회복력 및 재생 잠재력을 강화하는 전략이다^{2,5)}. 선행 연구에 따르면, 한방 소재 유래 성분이나 특정 약리 활성 물질은 줄기세포의 항산화 방어 기전을 활성화하고 염증성 환경에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 보고되었다^{3,6)}. 예를 들어 감초 유래 성분인 isoliquiritin은 산화 스트레스에 의한 세포사멸을 억제하고, 뇌졸중 동물모델에서 줄기세포 생존 증가 및 brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 발현을 통한 신경 보호 효과를 나타낸 바 있다^{7,8)}.

약침(pharmacopuncture)은 한약 소재 추출물을 주입 방식으로 조직 인근에 전달하는 한방 치료법으로, 약물 전달 효율과 복합 작용 측면에서 장점을 가진다⁹⁾. 특히 약침 제형은 성분 조성의 표준화와 전달 효율을 동시에 확보할 수 있으며, 전달된 약침 성분이 줄기세포의 생존율을 높이고 병리적 미세환경을 개선할 수 있다^{9,10)}. 또한 복합 처방을 통해 다양한 활성 성분이 다중 표적에 작용함으로써 시너지 효과를 나타낼 가능성이 높다⁹⁾.

본 연구에서 개발한 성장재생 약침의 주요 구성 성분들은 각각 독립적인 약리학적 특성을 가진다. 한의학에서 구판(龜板)과 마골(馬骨)은 전통적으로 신장(腎)을 보하고 뼈와 근육을 강화하는 효능이 있어 퇴행성 근골격계 질환 및 성장 발육 부전의 치료에 활용되어 왔다¹¹⁻¹⁴⁾. 최근 연구에 따르면 구판 유래 추출물은 노인성 골다공증 및 추간판 퇴행과 같은 골 관련 질환에서 보호 효과를 나타내는 것으로 보고되었다^{12,15)}. 특히 마골은 콜라겐이 풍부하여 인체 콜라겐과 유사한 조성을 가지며, 생체 이용성이 높은 콜라겐 펩타이드 형태로 활용될 수 있다¹⁴⁾. 연어이리 유래 polydeoxyribonucleotide (PDRN)는 천연 유래의 저분자 DNA 분자로, 세포 이동과 증식을 촉진하고 세포외기질(extracellular matrix) 단백질 생성을 증가시키며 염증 반응을 감소시킨다^{16,17)}. PDRN은 아데노신 A_{2A} 수용체 활성화를 통해 골, 연골, 힘줄 등 근골격계 조직 재생을 촉진하고, 상처 치유 과정에서 혈관신생, 콜라겐 합성 및 세포외기질 재구성을 유도한다¹⁶⁻¹⁸⁾. 락토페린은 철 이온 결합 당단백질로서 항산화, 항염증, 항미생물 및 면역조절 효과를 가진다^{19,20)}. 특히 산화 스트레스 조건에서 철 이온을 킬레이팅하여 ROS 생성을 억제하고 미토콘드리아 기능을 보존함으로써 세포 보호 효과를 나타낸다²¹⁾. 또한 락토페린은 lipopolysaccharide (LPS) 유도 산화 손상을 용량 의존적으로 감소시키고 미토콘드리아 ROS 생성을 거의 소멸시키며 산화적 DNA 손상을 방지한다^{20,21)}.

기존의 단순 열수 추출 방식은 유효 성분의 분자량이 커 세포 내 흡수율과 생체 이용률이 낮다는 한계가 있다²²⁾. 이를 보완하기 위해 단백질 분해 효소(예: Alcalase)를 이용한 효소 가수분해 공정은 고분자 단백질을 생리 활성 펩타이드(저분자 펩타이드화)로 전환하여 세포 흡수를 용이하게 한다^{22,23)}. 여기에 초고압 균질화 기술을 적용한 나노화 공정은 입자 크기를 감소시켜 생체 이용성을 더욱 향상시킬 수 있다^{23,24)}.

본 연구의 목적은 구판, 마골, 연어이리 유래 PDRN 및 락토페린을 주성분으로 하여 효소 가수분해 및 나노화 공정을 통해 조제된 성장재생 약침 제제(growth-regeneration pharmacopuncture formulation, GRPF)를 개발하고, 이 약침 제제가 인체 유래 줄기세포(hMSC, hADSC)와 신경 세포(SH-SY5Y), 면역 세포(RAW264.7)에 미치는 안전성과 세포 보호 효과를 평가하는 데 있다. 본

연구의 가설은 GRPF가 산화 및 염증성 스트레스 조건에서 줄기세포의 생존을 향상시킨다는 것이며, 유효 농도와 세포 보호 효과를 탐색적으로 검증하는 것을 1차 목표로 한다.

재료 및 방법»»»

1. 성장재생 약침 제조

성장재생 약침 원액은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 간략하게 구판 85 g, 마골 85 g, 연어이리(러시아산) 85 g 및 락토펜(뉴질랜드산) 가수분해물 28.3 g을 에그 레시틴(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 28.3 g과 함께 증류수 1 L에 혼합하였다. 이후 직경 2 mm의 지르코니아 볼(한국세라텍, 대전) 300 g을 첨가한 뒤 85 °C에서 1시간 동안 볼밀(ball mill)을 이용하여 교반, 혼합하였다. 혼합 현탁액을 45 °C까지 냉각한 후, 알칼라아제(Alcalase; Sigma-Aldrich) 1.83 g을 첨가하여 45 °C에서 48시간 동안 효소 반응을 진행하였다. 본 공정은 고분자 단백질을 생리활성 펩타이드로 전환하기 위한 과정이다^{22,23}). 효소 반응 종료 후, 현탁액 중량의 2배에 해당하는 주정 에탄올을 첨가한 뒤 여과망을 이용하여 지르코니아 볼을 제거하였다. 여과액은 45 °C에서 회전 증발농축기를 이용하여 감압 농축하였으며, 에탄올 첨가 전 중량의 1/2 수준까지 농축하였다. 이후 농축액을 정성 여과지(현대마이크로, 서울)로 여과하여 성장재생 약침 원액을 제조하였다.

약침 최종액은 다음과 같이 제조하였다. 원액을 초고압 균질화기(Panda 200 plus, BOB Korea, 서울)로 1,000 bar에서 2회 통과시켜 나노 입자화한 후, 증류수를 사용하여 적정 농도로 희석하였다. 이어서 글루콘산 칼슘(Sigma-Aldrich) 6.7 mM을 첨가하여 16시간 동안 침전시켜 안정화하였다. 이후 pH를 7.4, 염도를 0.09%로 조정하고, 0.45 µm 멤브레인 필터로 1차 여과한 뒤 0.2 µm 멤브레인 필터로 2차 여과하였다. 마지막으로 고압 증기멸균을 시행하여 약침 최종액을 완성하였다.

2. 세포 배양

인간 중간엽 줄기세포(hMSCs)는 PromoCell (Heidelberg, Germany)에서, 인간 지방 유래 중간엽 줄기세포(hADSCs)는 Lonza (Basel, Switzerland)에서 구입하였고, 신경모세포(SH-SY5Y)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, 서울)에서, 마우스 종양 조직 유래 대식세포(RAW264.7)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. hMSCs와 hADSCs 세포주는 minimum essential medium-α 배지(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), SH-SY5Y 세포주는 Roswell Park Memorial Institute 1640 배지(Gibco), 그리고 RAW264.7 세포는 Dulbecco's modified eagle medium 배지(Gibco)에서 각각 배양하였다. 모든 세포는 10% fetal bovine serum (Gibco)와 penicillin 및 streptomycin (100 U/ml; Gibco)이 함유된 배지에서 37 °C와 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3. 세포 생존률 검사

성장재생 약침 제제(GRPF)의 무독성 농도를 결정하기 위해 cell counting kit-8 (CCK-8) 검사(Dojindo, Tokyo, Japan)를 수행하였다. 각 세포는 96 well plate에 1×10⁴ cells/well로 분주한 후 24시간 동안 안정화하였다. 이후 GRPF를 농도별(0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 각 well에 CCK-8 시약 10 µL를 첨가한 뒤 4시간 동안 처리하고 microplate reader (Tecan Trading AG, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군 대비 흡광도의 백분율로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{OD}_{450} \text{ of treated cells} / \text{OD}_{450} \text{ of control cells}) \times 100$$

4. Neutral red uptake (NRU) 검사

GRPF의 세포 보호 효과를 평가하기 위해 산화적 및 염증성 손상 모델을 구축하고 NRU 검사를 수행하였다. 산화적 손상을 유도하기 위해, 각 세포주를 2×10⁵ cells를 분주하여 24시간 동안 부착시켰고, 이후 GRPF (4

mg/mL)를 6시간 동안 전처리한 후, 과산화수소(H_2O_2)를 24시간 동안 처리하였다. 세포별 H_2O_2 처리 농도는 hMSC 및 hADSC에서 100 μ M, SH-SY5Y에서 50 μ M, RAW264.7에서 500 μ M로 설정하였으며, 이는 각 세포주에서 적절한 수준의 산화적 손상을 유발하는 농도이다²⁵⁻²⁸). 염증성 손상 모델에서는 RAW264.7 세포(2×10^5 cells)에 GRPF (4 mg/mL)를 6시간 동안 전처리한 후 LPS (50 μ g/mL)를 24시간 동안 처리하여 염증 반응 및 세포 사멸을 유도하였다. LPS는 그람음성 세균의 주요 구성 성분으로, 대식세포 활성화 및 염증 반응 유도에 널리 사용되는 물질이다²⁹). 세포 분주 24시간 후 배지를 제거한 뒤, neutral red 용액(40 μ g/mL; Sigma-Aldrich)을 각 well에 첨가하고 3시간 동안 반응시켰다. 이후 phosphate-buffered saline로 2회 세척한 후, 1% 초산이 포함된 50% 에탄올 용액 500 μ L를 첨가하여 상온에서 10분간 염료를 용출시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 현미경 관찰

세포 수 및 형태 변화는 도립 현미경(Digiretina 16 Camera, Scientific Instrument & Optical Sales, Kelvin Grove, Australia)을 이용하여 관찰하였으며, $\times 100$ 배율에서 촬영하였다.

6. 통계 분석

모든 실험은 3회 이상 반복 수행하였으며, 결과는 평균치 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. 통계 분석은 SAS ver. 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 사용하여 one-way analysis of variance를 실시한 후 Tukey honestly significant difference 다중비교 검정을 통해 각 군 간 차이를 분석하였다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결과»»»»

1. GRPF의 세포 생존율 효과

hADSC, hMSC, SH-SY5Y, RAW264.7 세포에서 성장 재생 약침 제제(GRPF)의 세포독성을 평가하기 위해 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL 농도로 처리한 후 CCK-8 검사를 수행하였다. 그 결과, 줄기세포주인 hADSC와 hMSC에서는 GRPF의 최고 농도인 5 mg/mL까지 처리하여도 대조군 대비 세포 생존율의 유의한 감소가 관찰되지 않고 다소 증가하는 경향을 보였으며, 각각 $106.4 \pm 7.2\%$ 및 $108.3 \pm 4.4\%$ 의 생존율을 나타냈다(Fig. 1A, B). SH-SY5Y 세포에서는 4 mg/mL 처리 시 대조군 대비 $105.8 \pm 3.3\%$ 의 생존율을 보였으나, 5 mg/mL에서는 $84.6 \pm 6.1\%$ 로

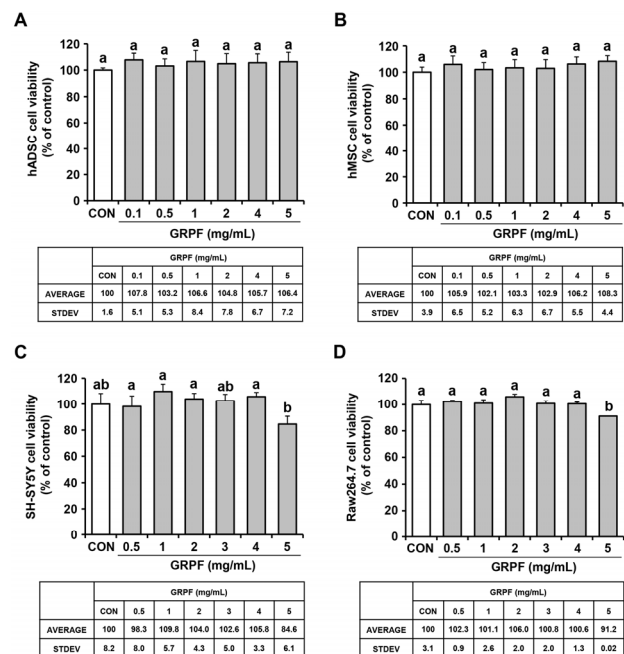


Fig. 1. Evaluation of the cytotoxicity of GRPF in human-derived stem cells (hADSC, hMSC), neuroblastoma cells (SH-SY5Y), and macrophage (RAW264.7). (A) hADSC, (B) hMSC, (C) SH-SY5Y, and (D) RAW264.7 cells. Cells were treated with GRPF at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 mg/mL for 24 h, and cell viability was assessed by the CCK-8 assay. Bars labeled with different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$). Data are presented as mean $\pm$ SD ($n=3$). GRPF: growth-regeneration pharmacopuncture formulation, hADSC: human adipose-derived stem cells, hMSC: human mesenchymal stem cells, CCK-8: cell counting kit-8, SD: standard deviation.

감소하였다(Fig. 1C). RAW264.7 세포의 경우, 4 mg/mL 에서 $100.6 \pm 1.3\%$ 의 생존율을 보였으며, 5 mg/mL 처리 시에는 $91.2 \pm 0.02\%$ 로 감소하였다(Fig. 1D). 이러한 결과를 바탕으로, GRPF가 4 mg/mL 이하에서 세포독성이 없는 것을 확인하였으며, 후속 실험에 사용할 농도로 설정하였다.

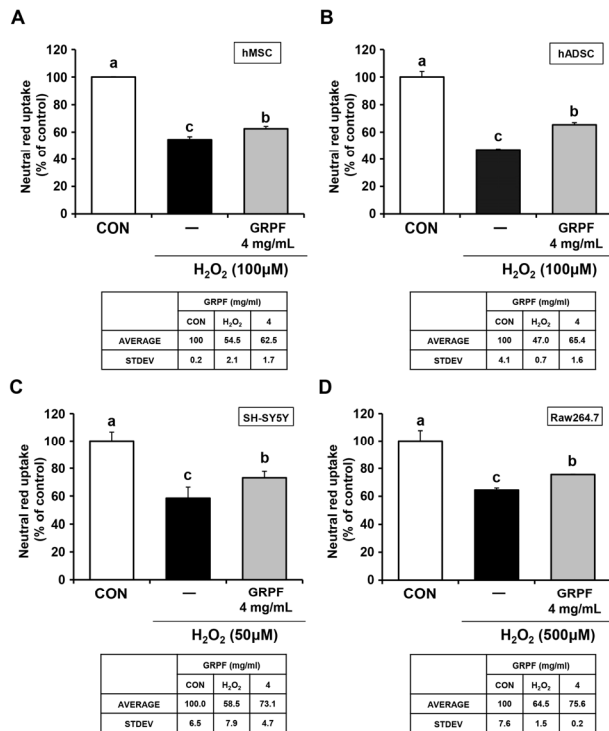


Fig. 2. Cytoprotective effects of GRPF against H₂O₂-induced oxidative stress. (A) hMSC treated with 100 μ M H₂O₂, (B) hADSC treated with 100 μ M H₂O₂, (C) SH-SY5Y cells treated with 50 μ M H₂O₂, and (D) RAW264.7 macrophages treated with 500 μ M H₂O₂. hMSCs, hADSCs, SH-SY5Y, and RAW264.7 were pretreated with GRPF (4 mg/mL) for 6 h and subsequently exposed to H₂O₂ to induce oxidative stress. Cell viability was evaluated using the NRU assay. GRPF pretreatment significantly restored cell viability in all cell lines compared with the H₂O₂-treated groups. Bars labeled with different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$). Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 3$). GRPF: growth-regeneration pharmacopuncture formulation, hMSC: human mesenchymal stem cells, hADSC: human adipose-derived stem cells, NRU: neutral red uptake, SD: standard deviation.

2. 산화 스트레스 유도 모델에서 GRPF의 세포 보호 효과

산화적 스트레스 상태에서 GRPF의 세포 보호 효과를 평가하기 위해 NRU 검사를 수행하였다. H₂O₂로 산화적 손상을 유도한 결과, GRPF (4 mg/mL) 전처리하는 모든 세포주에서 세포 생존율을 유의하게 회복시켰다. hMSC에서는 H₂O₂ 100 μ M 처리 시 생존율이 54.5%로 감소하였으나, GRPF 전처리군에서는 62.5%로 회복되어 8.0%의 유의한 증가를 보였다(Fig. 2A). hADSC의 경우, H₂O₂ 100 μ M 처리군에서 47.0%의 생존율을 나타냈으나 GRPF 전처리 후 65.4%로 회복되어 18.4%의 유의한 증가가 관찰되었다(Fig. 2B). 신경세포주인 SH-SY5Y에서는 H₂O₂ 50 μ M 처리로 생존율이 58.5%까지 감소하였으나, GRPF 전처리 시 73.1%로 회복되어 14.6%의 유의한 보호 효과가 확인되었다(Fig. 2C). 또한 RAW264.7 대식세포에서 H₂O₂ 500 μ M 처리군은 64.5%의 생존율을 보였으며, GRPF 전처리군에서는 75.6%로 회복되어 11.1%의 유의한 보호 효과가 나타났다(Fig. 2D). 또한, 현미경 관찰 결과, GRPF 전처리군에서 대조군에 비해

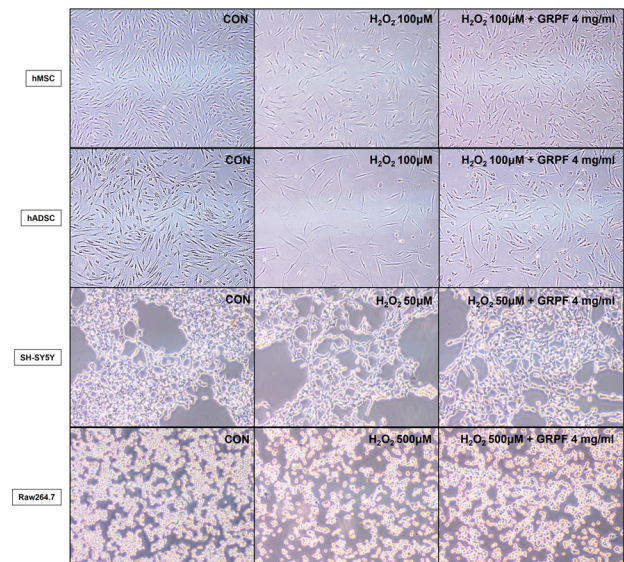


Fig. 3. Representative microscopic images showing the cytoprotective effects of GRPF under oxidative stress conditions (magnification $\times 100$). Representative phase-contrast images of cells pretreated with GRPF (4 mg/mL) followed by H₂O₂ exposure. GRPF pretreatment resulted in increased cell density and reduced morphological damage compared with the H₂O₂-treated group. GRPF: growth-regeneration pharmacopuncture formulation.

세포 밀도가 상대적으로 증가하는 경향이 관찰되었으며, 세포 형태의 손상은 감소하는 양상을 보였다(Fig. 3). 이러한 결과는 GRPF가 산화적 스트레스 조건에서 줄기세포, 신경세포 및 대식세포를 보호하는 효과를 나타냄을 시사한다.

3. 염증성 스트레스 유도 모델에서 GRPF의 대식세포 보호 효과

추가적으로 우리는 염증성 스트레스 상태에서 GRPF의 세포 보호 효과를 평가하기 위해 NRU 검사를 수행하였다. RAW264.7 대식세포에 LPS (50 µg/mL)를 처리한 결과, 세포 생존율은 54.3%로 유의하게 감소하였다. 반면, GRPF 4 mg/mL를 전처리한 군에서는 생존율이 70.7%로 회복되어 16.4%의 유의한 증가를 보였다(Fig. 4A). 또한, 현미경 관찰 결과, GRPF 전처리군에서 대조군에 비해 세포 밀도가 상대적으로 증가하는 경향

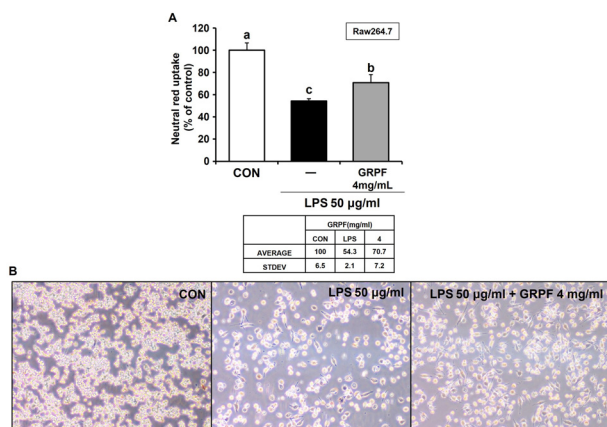


Fig. 4. Cytoprotective effect of GRPF against LPS-induced inflammatory damage in RAW264.7 macrophages. (A) Cell viability was evaluated using the NRU assay. (B) Representative phase-contrast microscopic images showing cell morphology and density (magnification ×100). RAW264.7 cells were pretreated with GRPF (4 mg/mL) for 6 h and subsequently exposed to LPS (50 µg/mL) for 24 h. LPS treatment significantly reduced cell viability, whereas GRPF pretreatment significantly restored cell viability. GRPF-pretreated cells exhibited increased cell density and reduced morphological damage compared with the LPS-treated group. Bars labeled with different superscripts indicate significant differences ($p < 0.05$). Data are presented as mean ± SD ($n = 3$). GRPF: growth-regeneration pharmacopuncture formulation, LPS: lipopolysaccharide, NRU: neutral red uptake, SD: standard deviation.

이 관찰되었으며, 세포 형태의 손상은 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4B). 이는 GRPF가 LPS 유도 염증성 손상 조건에서 대식세포의 생존을 효과적으로 보호함을 시사한다.

고찰»»»

본 연구는 성장재생 약침 제제(GRPF)가 산화적 및 염증성 스트레스 조건에서 줄기세포, 신경세포 및 대식세포의 세포 보호 효과를 탐색한 스크리닝 연구이다. 이번 연구에서 GRPF는 4 mg/mL 농도까지 줄기세포, 신경세포 및 대식세포에서 세포독성을 나타내지 않았다. 또한 줄기세포에서는 5 mg/mL 농도 조건에서 대조군 대비 세포 생존율이 소폭 증가하는 경향이 관찰되었다. 이러한 결과는 효소 가수분해 및 초고압 균질화 공정을 포함한 제조 공정이 생체 적합성을 확보하는 데 기여하였을 가능성을 시사한다²²⁻²⁴). 알칼라아제를 이용한 효소 가수분해는 고분자 단백질을 저분자 펩타이드로 전환함으로써 세포 흡수성을 향상시키는 것으로 알려져 있으며, 생성된 펩타이드는 분자량 1~3 kDa 범위에서 세포 수용체와 상호작용할 수 있는 특성을 가진다^{23,30}). 또한 초고압 균질화 공정은 입자 크기를 감소시켜 생체 이용성을 높이는 데 기여하는 것으로 보고되어 있다²⁴).

약침 제형은 생체 친화적인 제형으로서 pH 7.4, 염도 0.09%의 물성을 가지며, 효소 가수분해-에탄올 분획-초고압 균질화-글루콘산 칼슘 침전-멸균 공정으로 구성된 일련의 제조 과정은 품질의 재현성과 일관성을 확보할 수 있는 표준화된 절차로 평가된다^{9,10}).

이번 연구 결과에서 H_2O_2 로 유도된 줄기세포주에서 GRPF는 유의한 세포 보호 효과를 나타냈다. 이러한 산화적 손상 방어 효과는 GRPF에 포함된 여러 성분들의 복합적인 작용에 기인한 것으로 해석될 수 있다⁹). 이전 연구에 따르면 구판 및 마골 유래 펩타이드는 세포 대사에 필요한 영양적 기질을 제공하고 결합조직 및 골조직 재생을 보조하는 역할을 수행하는 것으로 보고되어 있다¹¹⁻¹⁵). PDRN은 adenosine A_{2A} 수용체를 활성화하여 항염증 및 세포 생존 신호를 유도하고, 미토콘드리아 기능 유지 및 ATP 생성을 촉진하는 효과를 가진다¹⁶⁻¹⁸).

또한 락토페린은 철 이온을 킬레이팅하여 ROS 생성을 억제하는 대표적인 항산화 물질로 알려져 있으며, 내재적 항산화 효소인 superoxide dismutase 및 glutathione peroxidase의 활성을 증강시키는 것으로 보고된 바 있다¹⁹⁻²¹⁾. 산화 스트레스에 의한 세포 사멸은 H₂O₂에 의해 미토콘드리아 내 칼슘 농도가 증가하고, Bcl-2 계열 단백질의 발현 변화로 미토콘드리아 막 전위가 감소하면서 사이토크롬 c가 방출되는 경로를 통해 유도되는 것으로 알려져 있다^{31,32)}. 본 연구에서는 미토콘드리아 의존적 세포 사멸 경로에 대한 직접적인 분석은 수행하지 않았으나, H₂O₂에 의해 손상된 세포들의 세포 생존을 회복 효과는 이전 연구에서 보고된 해당 경로 억제 기전과 연관될 가능성을 배제할 수 없다.

한편, LPS 및 H₂O₂로 유도된 산화적 및 염증성 손상 모델에서 확인된 GRPF의 세포 보호 효과는 프로그래밍된 세포 사멸 경로의 억제와 연관될 수 있으며, 특히 caspase-3 활성 억제를 통해 미토콘드리아 경로의 후기 단계를 차단했을 가능성이 있다³²⁾. 이번 연구에서 SH-SY5Y 신경세포 및 RAW264.7 대식세포에서 관찰된 세포 보호 효과는 GRPF가 줄기세포뿐 아니라 산화 스트레스와 염증 반응이 주요 병태 기전으로 작용하는 신경퇴행성 및 만성 염증성 질환에도 적용 가능성이 있음을 시사한다^{27-29,33)}. 실제로, H₂O₂로 유도된 SH-SY5Y 세포에서 산화적 스트레스로 감소된 세포 생존율은 GRPF 처리에 의해 유의하게 회복되었다. 또한, LPS 유도된 RAW264.7 대식세포에서 염증 자극에 의해 감소된 세포 생존율이 GRPF 처리 후 16% 이상 회복되는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 GRPF가 항산화 및 항염증 잠재력을 동시에 보유하고 있음을 뒷받침하는 근거로 해석될 수 있다.

그러나 본 연구는 스크리닝 연구로서 보이는 몇 가지 한계를 가지고 있다. 먼저, 세포 수준에서의 보호 효과만을 평가하여 체내 약동학, 면역 반응 및 조직 미세환경과의 상호작용을 반영하지 못하였다. 둘째, ROS 생성, 미토콘드리아 막 전위, caspase-3 활성, extracellular signal-regulated kinase 신호 및 성장인자 발현 등 주요 기전 지표를 직접 측정하지 못하였다. 셋째, 단일 유효농도(4 mg/mL)에 집중하여 용량-반응 관계 및 처리 시점에 따른 차이를 충분히 분석하지 못하였다. 또한 장시간 배양 조건에서의 지속적 보호 효과 역시 확인되지

않았다.

이러한 문제점은 향후 연구에서는 ROS (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), 미토콘드리아 막 전위, caspase-3 활성 분석을 통한 항산화-항세포사멸 측의 정량적 평가와 함께 줄기세포 마커, 항산화, 항세포사멸 및 염증인자 관련 분자들의 발현을 포함한 기전 연구가 필요하다. 또한, 본 연구에서 확인된 GRPF의 세포 보호 효과가 생체 내 환경에서도 재현될 수 있는지를 검증하기 위한 *in vivo* 연구가 필요하다. 특히 줄기세포 치료의 한계로 지적되는 이식 후 생존율 저하, 산화적 스트레스 및 염증성 미세환경에 의한 기능 소실을 고려할 때, GRPF를 줄기세포 보조 제형으로 활용하는 전략은 의미 있는 접근이 될 수 있다. 이를 위해 허혈성 손상, 피부 창상 또는 모낭 재생과 같이 산화 스트레스와 염증 반응이 주요 병태 기전으로 작용하는 동물 모델에서, GRPF 단독 투여군과 줄기세포 병용 투여군을 비교하는 연구 설계가 고려될 수 있다. 이러한 모델에서 이식된 줄기세포의 생존율, 조직 내 정착 정도, 염증 반응 조절 및 재생 관련 지표를 평가함으로써 GRPF의 보조적 효용성을 검증할 수 있을 것으로 판단된다. 추가적으로 투여 경로, 투여 시점 및 반복 투여 여부에 따른 효과 차이를 분석함으로써 약침 제형으로서의 임상 적용 가능성을 구체화할 필요가 있다. 마지막으로 분획 및 성분 동정을 통해 활성 핵심 성분을 규명함으로써 제형 표준화 및 안정성 등 과학적 근거를 마련할 필요가 있다.

종합적으로, GRPF는 산화 및 염증 스트레스 환경에서 줄기세포 및 신경세포, 대식세포의 생존과 활성을 보호할 수 있는 후보 제제로서, 향후 기전 검증과 *in vivo* 연구를 통해 재생의학 분야에서 보조 제형으로서의 적용 가능성을 추가적으로 평가할 필요가 있다.

결론»»»

본 연구를 통해 조제된 성장재생 약침 제제(GRPF)는 인체 유래 줄기세포(hMSC, hADSC)와 신경세포 및 대식세포(SH-SY5Y, RAW264.7)에서 시험된 농도 범위 내에서 뚜렷한 세포독성을 나타내지 않았으며, 기초적인

안전성 평가 결과를 제시하였다. 특히 병리적 환경 모델로 H_2O_2 유도 산화 스트레스 및 LPS 유도 염증 스트레스 조건에서 GRPF 처리 시 세포 생존율이 유의하게 증가하였으며, 그 중 지방유래줄기세포(hADSC)에서 가장 뚜렷한 세포 보호 효과가 관찰되었다. 또한 효소 가수분해 공정과 초고압 균질화 기술을 통해 조제된 저분자 펩타이드 복합제는 산화 및 염증 스트레스가 존재하는 병리적 미세환경에서 줄기세포, 신경세포 및 면역세포의 생존을 보호하는 효과를 보였다. 이러한 결과를 종합하면, GRPF는 줄기세포 치료의 병행 전략으로서 세포 보호 및 미세환경 조절에 기여할 가능성을 시사하며, 향후 기전 규명, 용량-반응 관계 분석 및 *in vivo* 연구를 통해 재생의학 분야에서 보조 제형으로서의 활용 가능성을 추가적으로 검증할 필요가 있다.

References»»»»

- Huang D, Yin L, Liu X, Lv B, Xie Z, Wang X, Yu B, Zhang Y. Geraniin protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced cellular oxidative stress *in vitro*. *International Journal of Molecular Medicine*. 2018;41(2):739-48.
- Yu SP, Wei Z, Wei L. Preconditioning strategy in stem cell transplantation therapy. *Translational Stroke Research*. 2013;4(1):76-88.
- Liu Z, Xu Y, Wan Y, Gao J, Chu Y, Li J. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells prevent cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Death Discovery*. 2019;5:79.
- Miceli V, Zito G, Bulati M, Gallo A, Busà R, Iannolo G, Conaldi PG. Different priming strategies improve distinct therapeutic capabilities of mesenchymal stromal/stem cells: potential implications for their clinical use. *World Journal of Stem Cells*. 2023;15(5):400-20.
- Lu L, Zhang Z, Liu J, Xu Y, Zhang Q, Kantawong F, Hu Q. Mesenchymal stem cells preconditioned with herbal bioactive components: exosome-mediated microRNA mechanisms and therapeutic potential for chronic kidney disease. *DNA and Cell Biology*. 2025.
- Yu SR, Shin SM. Effects of *Carthamus tinctorius* extract on adipogenic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal stem cells. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2017;38(1):1-9.
- Lin Y, Sun H, Dang Y, Li Z. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the differentiation of human glioma stem cells. *Oncology Reports*. 2018;39(2):687-94.
- Ahn SM. Neuroprotective effects of stem cells primed with traditional herbal medicines [Internet]. National Research Foundation of Korea; 2020 [cited 2025 Dec 21]. Available from: URL: <https://scienceon.kisti.re.kr/commons/util/originalView.do?cn=TRKO202100012503&dbt=TRKO&rn=&keyword=Neuroprotective%20effects%20of%20stem%20cells%20primed%20with%20traditional%20herbal%20medicines>.
- Kim MR, Lee SM, Lee YJ, Ha IH. Clinical research on pharmacopuncture in Korea: a scoping review. *Perspectives on Integrative Medicine*. 2023;2(1):8-23.
- Kim JH, Kim TY, Goo B, Park Y. Bee venom stimulates growth factor release from adipose-derived stem cells to promote hair growth. *Toxins*. 2024;16(2):84.
- Li X, Cui Y, Lin Q, Wang P, Chen R, Zhu X, Yang L, Zhang R. miR-330-5p in small extracellular vesicles derived from *Plastrum testudinis*-preconditioned bone mesenchymal stem cells attenuates osteogenesis by modulating Wnt/ β -catenin signaling. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021;8:679345.
- Chen H, Shen G, Shang Q, Zhang P, Yu D, Yu X, Zhang Z, Zhao W, Wu Z, Tang F, Liang D, Jiang X, Ren H. *Plastrum testudinis* extract suppresses osteoclast differentiation via the NF- κ B signaling pathway and ameliorates senile osteoporosis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;276:114195.
- Xin M, Ping Y, Zhang Y, Zhang W, Zhang L, Zhang Y, Sheng W, Wang L, Mao W, Xiao L, Guo S, Hu H. Metabolomic and lipidomic profiling of traditional Chinese medicine *Testudinis Carapax et Plastrum* and its substitutes. *Frontiers in Pharmacology*. 2025;16:1549834.
- Wu J, Na H, Bai F, Li S, Gao H, Sha R. Preparation and tissue structure analysis of horse bone collagen peptide. *Scientific Reports*. 2024;14(1):25687.
- Zhang P, Chen H, Shen G, Zhang Z, Yu X, Shang Q, Zhao W, Li D, Li P, Chen G, Liang D, Jiang X, Ren H. Network pharmacology integrated with experimental validation reveals the regulatory mechanism of *plastrum testudinis* in treating senile osteoporosis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;276:114198.
- Veronesi F, Dallari D, Sabbioni G, Carubbi C, Martini L, Fini M. Polydeoxyribonucleotides (PDRNs) from skin to musculoskeletal tissue regeneration via adenosine A2A receptor involvement. *Journal of Cellular Physiology*. 2017;232(9):2299-307.
- Oh N, Hwang J, Kang MS, Yoo CY, Kwak M, Han DW. Versatile and marvelous potentials of poly-

- deoxyribonucleotide for tissue engineering and regeneration. *Biomaterials Research*. 2025;29:0183.
18. Squadrito F, Bitto A, Irrera N, Pizzino G, Pallio G, Minutoli L, Altavilla D. Pharmacological activity and clinical use of PDRN. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8:224.
19. Rizzi M, Manzoni P, Germano C, Quevedo MF, Sainaghi PP. Lactoferrin, a natural protein with multiple functions in health and disease. *Nutrients*. 2025;17(21):3403.
20. Kruzel ML, Actor JK, Radak Z, Bacsı A, Saavedra-Molina A, Boldogh I. Lactoferrin decreases LPS-induced mitochondrial dysfunction in cultured cells and in animal endotoxemia model. *Innate Immunity*. 2010;16(2):67-79.
21. Burrow H, Kanwar RK, Kanwar JR. Antioxidant enzyme activities of iron-saturated bovine lactoferrin (Fe-bLf) in human gut epithelial cells under oxidative stress. *Medicinal Chemistry*. 2011;7(3):224-30.
22. Villanueva A, Rivero-Pino F, Martin ME, Gonzalez-de la Rosa T, Montserrat-de la Paz S, Millan-Linares MC. Identification of the bioavailable peptidome of chia protein hydrolysate and the *in silico* evaluation of its antioxidant and ACE inhibitory potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2024;72(6):3189-99.
23. Pei J, Gao X, Pan D, Hua Y, He J, Liu Z, Dang Y. Advances in the stability challenges of bioactive peptides and improvement strategies. *Current Research in Food Science*. 2022;5:2162-70.
24. Patrignani F, Lanciotti R. Applications of high and ultra high pressure homogenization for food safety. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1132.
25. Yoon YM, Kim HJ, Lee JH, Lee SH. Melatonin enhances mitophagy by upregulating expression of heat shock 70 kDa protein 1L in human mesenchymal stem cells under oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(18):4545.
26. Qian L, Li B, Pi L, Fang B, Meng X. Hypoxic adipose stem cell-derived exosomes carrying high-abundant USP22 facilitate cutaneous wound healing through stabilizing HIF-1 α and upregulating lncRNA H19. *FASEB Journal*. 2024;38(10):e23653.
27. González-Sarrias A, Núñez-Sánchez MÁ, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Neuroprotective effects of bioavailable polyphenol-derived metabolites against oxidative stress-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(4):752-8.
28. Liu R, Zhou B, Che K, Gao W, Luo H, Yang J, Chen Z, Hu W. *Torreya grandis* seed polyphenols protect RAW264.7 macrophages by inhibiting oxidative stress and inflammation. *Food Science & Nutrition*. 2025;13(8):e70682.
29. Yan W, Yan Y, Luo X, Dong Y, Liang G, Miao H, Huang Z, Jiang H. Lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in RAW264.7 cells is inhibited by microRNA-494-3p via targeting lipoprotein-associated phospholipase A2. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2024;50(6):3289-98.
30. Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, Wang X, Wang R, Fu C. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):48.
31. Chen YS, Tian HX, Rong DC, Wang L, Chen S, Zeng J, Xu H, Mei J, Wang LY, Liou YL, Zhou HH. ROS homeostasis in cell fate, pathophysiology, and therapeutic interventions. *Molecular Biomedicine*. 2025;6(1):89.
32. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000;7(3):153-63.
33. Hu Q, Khanna P, Ee Wong BS, Lin Heng ZS, Subhramanyam CS, Thanga LZ, Sing Tan SW, Baeg GH. Oxidative stress promotes exit from the stem cell state and spontaneous neuronal differentiation. *Oncotarget*. 2017;9(3):4223-38.