

# SMOC1-유래 펩타이드가 골수줄기세포의 조골세포 분화에 미치는 영향

최영애, 신희인, 박익균\*

경북대학교 치의학전문대학원 구강병리학교실

〈Abstract〉

## Effect of SMOC1-Derived Peptide on Osteoblast Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Young Ae Choi, Hong In Shin, Eui Kyun Park\*

Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Institute for Hard Tissue and Biotooth Regeneration, Kyungpook National University

Bioactive peptides function effectively with a minimal amount compared to proteins. Recently SPARC related modular calcium binding 1 (SMOC1) has been implicated in regulating osteoblast differentiation and limb and eye development. In this study we synthesized a peptide covering 16 amino acids derived from the extracellular calcium binding (EC) domain of SMOC1, and its effects on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells were examined. Treatment of SMOC1 peptide did not modulate proliferation of BMSCs. However, mineralization of BMSCs was significantly increased with a dose dependent manner. Consistently expression of osteoblast differentiation marker genes including type 1 collagen and osteocalcin was also dose dependently increased. Taken together, these results suggest that peptide derived from the EC domain of SMOC1 recapitulates at least partially osteogenic function of SMOC1.

Key words : SMOC1, Bioactive peptide, Osteoblast differentiation, BMSCs

### I . INTRODUCTION

생리활성 펩타이드(biological active peptide)는 생체 내 효소 작용에 의해 가수분해되어 자연적으로 유도된 단백질보다 훨씬 짧은 아미노산 서열로서 단백질과는 다른 다양한 생리 기능을 나타낼 수 있다<sup>1,2)</sup>. 생리활성 펩타이드는 단백질 혹은 화학물질에 비해 그 안정성이 우수하고, 극히 짧은 서열만으로도 유효한

활성을 나타내며 소량으로도 우수한 기능적 효능을 가지는 것이 특징이다. 최근에는 생체내 자연적인 생리활성 펩타이드 뿐만 아니라 특정 단백질의 활성을 가지는 영역을 기반으로 합성 생리활성 펩타이드를 제작하여 그 효과를 제시하고 있다. 현재까지 뼈 생성 및 조골세포 분화를 조절하는 효과적인 다양한 생리활성 펩타이드들이 보고되고 있는데, 대표적인 펩타이드로는 arginine-glycine-aspartic acid (RGD) 아미노산 서열을 포함하는 다양한 펩타이드들을 들 수 있다. RGD 서열은 fibronectin, laminin, collagen, vitronectin 같은 세포외 기질(ECM) 단백질의 수용체인 integrin이 결합하는 아미노산 서열이다. 이 아미노산 서열을 포함하는 합성 펩타이드들은 골수 간엽줄기세포의 부착이나 spreading, 분화를 조절할 수 있음이 알려져 있다<sup>3,6)</sup>. 최근 골 발생에 필수적인 단백질인 bone morphogenic protein-2 (BMP-2) 단백질의 활성 서열 내에 두 개의 lysine 잔기를 포함하

\* Correspondence: Eui Kyun Park

Department of Oral Pathology and Regenerative Medicine, School of Dentistry, Kyungpook National University 2177 Dalgubeol-daero, Jung-gu Daegu 700-412 Korea.

Tel: +82-53-420-4995, Fax: +82-53-428-4995, E-mail: epark@knu.ac.kr

\* Acknowledgements: This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIP) (NRF-2011-0014444)

Received: Jan 21, 2014; Revised: Jan 27, 2014; Accepted: Feb 3, 2014

는 “knuckle epitope (KASSVPTELSAISTLYL)”을 기반으로한 cg-BMP-2 knuckle epitope 펩타이드가 2D 표면과 3D alginate hydrogel에 적용되었을 때 골수줄기세포의 조골세포로의 분화를 촉진함이 보고되었다<sup>7)</sup>. 이와 더불어, 조골세포 분화의 표지자인 osteonectin (ON)에서 유래된 glutamic acid-rich peptide (6개의 glutamic acid; Ac-Glu6)가 수용액상에서 apatite nanoparticle의 확산을 증가시킨다는 것이 보고되었다<sup>8)</sup> (Sarvestani AS, 2008). 또 다른 분화 표지자인 osteocalcin (OC)으로부터 유래된 펩타이드(OSC)의 C-말단 amidation은 수산화인회석 결정화(hydroxyapatite crystallization)를 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>.

최근 본 연구진은 SMOC1이 골수줄기세포의 조골세포 분화를 촉진한다는 보고를 한 바 있다<sup>10)</sup>. 이에 SMOC1의 기능적 domain의 하나인 extracellular calcium-binding (EC) domain의 아미노산 서열을 기초로 펩타이드를 합성하였으며, 이들 펩타이드가 조골세포분화에 미치는 유효한 효과를 분석하였다.

## II. MATERIALS AND METHODS

### 1. 펩타이드 서열 선택과 합성

SMOC1 유래 펩타이드의 결정을 위하여 EC domain의 서열을 분석하여 펩타이드의 순도와 용해도가 최적화되도록 선택하였다(Fig. 1). 선택된 펩타이드는 SMOC1 전체 펩타이드 서열 중 399-414까지의 서열로서 Lys - Cys - Ala - Arg - Arg - Phe - Thr - Asp - Tyr - Cys - Asp - Leu - Asn - Lys - Asp - Lys (KCARRFTDYCDLNKDK) 순서로 구성되어 있다. 합성된 SMOC1 펩타이드는 1976.27 g/mol의 분자량을 가지며 친수성이다. 펩타이드는 (주)펩트론에 의뢰하여 합성하였고, HPLC를 통해 >95% 순도로 정제되었다.

### 2. 인간 골수 줄기세포의 분리와 세포 배양

인간 골수 줄기세포는 고관절 치환술을 위해 수술하는 환자로부터 동의를 받아 채취한 골수에서 분리하였다. 골수 줄기세포의 분리 방법은 이전보고를 따랐다<sup>1)</sup>. 즉, 골수를 phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4로 희석하고

histopaque (Sigma-Aldrich; St Louis, MO)를 이용하여 밀도 구배 원심분리를 수행하였다. 원심분리 후 단핵 세포들(mononuclear cells)을 수집하여 PBS로 씻고, 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)을 포함하는 α-MEM (α-Minimum Essential medium eagle, alpha) 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. 배양 후 12시간째 비부착 세포들은 제거하고 부착된 세포만을 키워 실험에 사용하였다. 성장배지는 이틀에 한 번씩 갈아주며 모든 실험에는 4-5회 계대배양된 세포를 사용하였다.

### 3. 역전사 종합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Calsbad CA)를 이용하여 배양된 골수간엽 줄기세포로부터 total RNA를 추출하였다. 1 µg의 total RNA를 superscript II (Invitrogen)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 종합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 recombinant Taq polymerase (Takara, Japan)를 이용하여 다음과 같은 조건에서 시행하였다. 95°C에서 2분간 denaturation 한 후, 95°C에서 45초, 각 primer별로 해당하는 온도로 45초간 annealing, 72°C에서 60초간 extension하고 final extension을 72°C에서 10분간 수행하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 모든 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 Wisedoc (Daihan Scientific, Korea)을 이용하여 확인하였다.

### 4. MTT Assay

골수 간엽줄기세포는 96 well plate에 700 cells/well의 밀도로 심고 12시간가량 안정화 시켰다. 세포들은 조골세포 분화 유도 배지에서 0, 1, 3, 5, 7일간 배양되었다. 각 지정된 시간에 최종농도가 50 µg/mL되도록 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 3시간 동안 배양하였다. 세포 내에 형성된 formazan을 DMSO를 이용하여 용해시키고, ELISA plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(Epoch, VT).

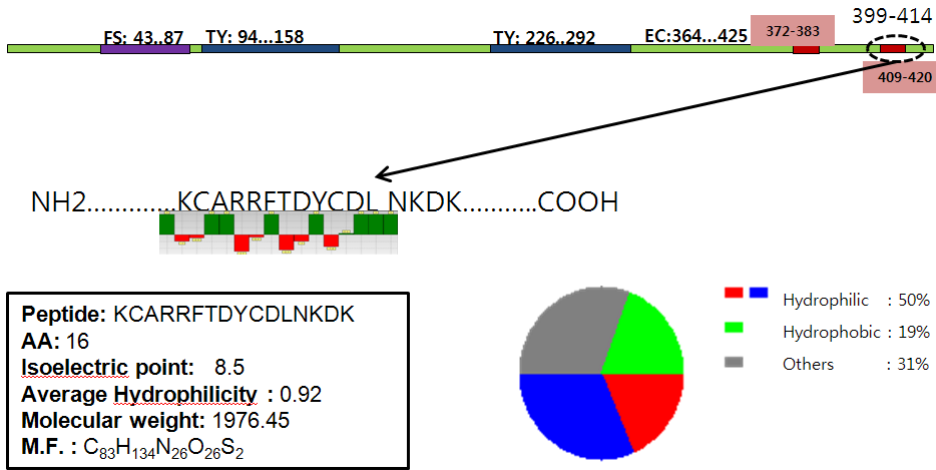


Fig. 1. Properties of SMOC1peptide

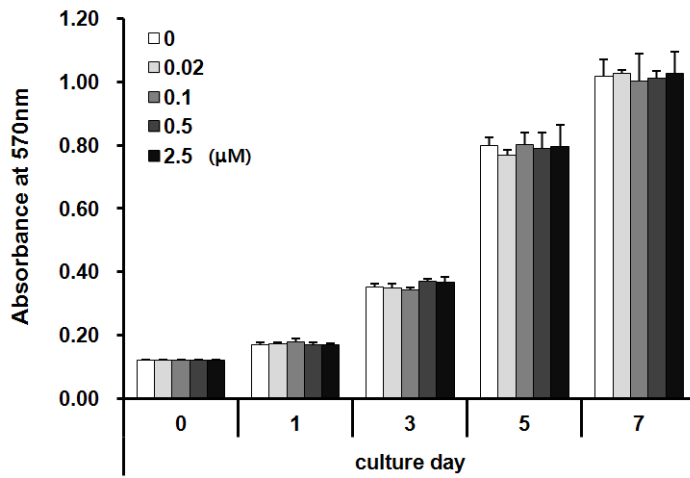


Fig. 2. Proliferation of human BMSCs by SMOC1peptide

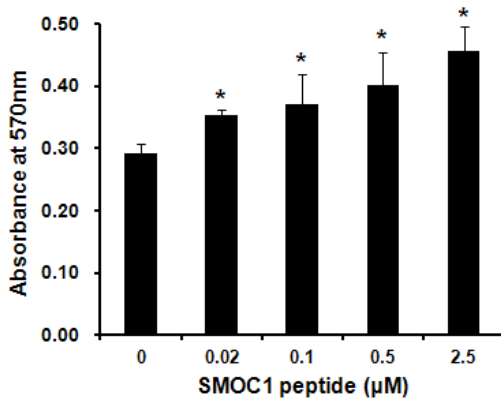
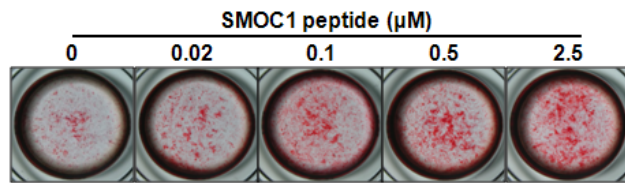


Fig. 3. Effect of SMOC1peptide on mineral deposition

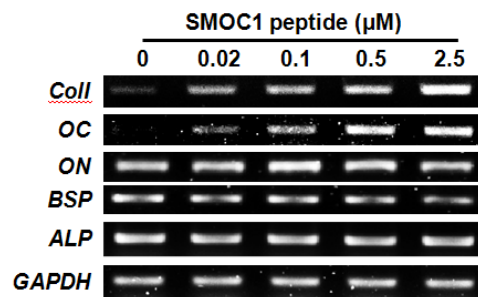


Fig. 4. Effect of SMOC1peptide on osteoblast marker gene expression

## 5. 조골세포 분화유도와 Alizarin red 염색

조골세포 분화 유도 실험에는 10,000개의 세포가 사용되었으며, 세포는 계대 후 12시간 동안 안정화되었다. 그 후 조골세포 분화 유도를 위해서는 10 nM dexamethasone, 50  $\mu$ g/mL ascorbic-acid-2-phosphate and 10 mM  $\beta$ - glycerophosphate (Sigma-Aldrich)를 포함하는 조골세포 분화 유도배지(OSM)를 사용하였다.

분화 유도 3주 후, 배양된 세포의 배지를 제거하고, PBS로 2회 수세한 후, 70% EtOH로 10분간 고정하였다. 고정된 세포를 증류수로 세척 후 alizarin red S (pH4.2, sigma) 용액으로 10분간 염색하였다. 염색 수준의 정량화를 위하여 10% cetylpyridinium chloride (CPC) (Sigma-Aldrich)를 이용하여 염색된 미네랄 입자를 용출시켰다. 흡광도는 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 측정하였다(Epoch, VT).

## 6. 통계처리

MTT assay와 alizarin red S 추출의 정량은 반복 시행되었으며, 대조군과의 유의성은 two sided t-test를 이용하여 통계 처리하였다. 본 논문의 수치는 평균과 표준편차로 나타내었고  $P < 0.05$  에서 유의성을 결정하였다.

# III. RESULTS

## 1. 세포증식에 미치는 영향 분석

합성된 SMOC1 펩타이드가 골수줄기세포의 증식에 미치는 영향을 MTT assay를 이용하여 분석하였다(Fig. 2). SMOC1 펩타이드를 0, 0.02, 0.1, 0.5, 2.5  $\mu$ M 농도로 골수 간엽줄기세포에 처리하여 0, 1, 3, 5 그리고 7일째 그 증식 정도를 관찰하였다. SMOC1 펩타이드는 배양된 날짜와 상관없이 모든 농도에서 대조군 (SMOC1 펩타이드가 처리되지 않은 군)과 비교하였을 때 세포의 성장에는 영향을 미치지 않음을 볼 수 있었다.

## 2. 미네랄 침착에 미치는 영향 분석

SMOC1 펩타이드의 미네랄 형성 유도능을 알아보기 위하여, 골수 간엽줄기세포를 분화유도 배지와 함께 농도 별로 처리하여 Alizarin Red 염색을 통하여 그 염색 수준을 확인하였다(Fig. 3). 대조군에 비하여 SMOC1 펩타이드 농도 의존적으로 미네랄 형성 정도가 증가되었다. 이를 정량화하기 위하여 10% CPC로 염색된 미네랄을 녹여내어 흡광도를 측정한 결과, 염색사진과 유사하게 유의적으로 증가하였고, 통계처리 결과 모두 유의적임을 알 수 있었다.

## 3. 조골세포 분화 표지자 발현에 미치는 영향 분석

농도 의존적으로 증가된 미네랄 침착 정도와 더불어, SMOC1 펩타이드가 분화 표지자 분자들의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 분화 유도 후 14일 째 세포로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다(Fig. 4). 조골세포 분화의 초기 표지자인 type I collagen의 발현은 SMOC1 펩타이드 농도 의존적으로 현저히 증가함을 보였다. 그러나 또 다른 조골세포 초기 분화 표지자인 alkaline phosphatase (ALP)의 발현은 변화가 없었다. 후기 분화 표지자 중 osteocalcin (OC)의 발현은 농도 의존적으로 증가하다가 0.5  $\mu$ M에서 최대의 발현을 보이고 2.5  $\mu$ M 농도에서는 0.5  $\mu$ M에서 비슷한 수준을 유지하였다. 그러나 또 분화 표지 유전자인 bone sialoprotein (BSP)는 농도의존적으로 다소 감소함을 보였다. 특히적으로 Osteonectin (ON)의 발현은 SMOC1 펩타이드 0.1  $\mu$ M 까지는 저농도에서는 다소 증가하다가 농도가 높아질수록 다시 감소하는 양상을 보였다.

# IV. DISCUSSION

본 연구는, 골수간엽줄기세포가 조골세포로 분화 시 분비가 증가하는 분비단백질인 SMOC1의 기능적 도메인인 EC 도메인을 기반으로 하여 새로운 생리활성 합성 펩타이드인 SMOC1 펩타이드를 제작하고 실제 골수 간엽줄기세포가 조골세포로 분화하는데 미치는 영향을 평가하였다.

SMOC1은 SPARC 혹은 osteonectin으로도 알려진 BM-40와 상당한 homology를 가지는 기저막 단백질로서 처음 동정되었

다<sup>11</sup>). SMOC1에 대한 자세한 기작 혹은 기능에 대하여 광범위하게 연구되고 있지는 않지만, 최근 골수간엽 줄기세포의 조골세포로의 분화 촉진작용과 성장인자인 BMP-2 신호전달계의 조절, 그리고 선천성 유전질환인 Ophthalmic-acromelic syndrome (OAS) 및 뇌종양과의 연계성에 대하여 보고되고 있다<sup>10,12,13</sup>).

SMOC1 단백질은 다섯 개의 domain으로 구성되어 있는데, follistatin-like (FS) domain 한 개와 extracellular calcium-binding (EC) domain 한 개, 그리고 두 domain 사이에 두 개의 thyroglobulin-like (TY) domain과 어떠한 상동성도 알려져 있지 않는 새로운 하나의 domain이 있다. 기본적으로 BM-40 단백질들은 하나의 follistatin-like (FS) domain과 두개의 EF-handed calcium binding motif를 포함하는 EC domain으로 구성되어 있는데, 이 두 domain의 상호작용은 BM-40 단백질이 collagen에 결합하는데 필요한 calcium 이온의 결합에 영향을 미친다<sup>14,15</sup>. 그러나 BM-40 단백질의 EC domain은 FS domain과의 상호작용과는 별개로 독립적인 기능을 수행할 수 있다. 예를 들어, SPARC의 EC domain은 독립적으로 TGF signaling system에 작용하여 세포증식에 영향을 미칠 수 있음이 보고된 바 있다<sup>16</sup>. 또한 EC domain을 포함하는 펩타이드는 또 다른 세포의 당단백질인 myocilin과 강하게 상호작용할 수 있다<sup>17</sup>. SMOC1의 EC domain은 SPARC의 EC와 34% 서열 일치성을 보이며, SPARC와 마찬가지로 EC domain 특이적으로 heparin과 결합하거나, integrin  $\beta 6$  수용체와도 결합할 수 있음이 보고된 바 있다<sup>18</sup>. 더불어 SMOC1이 세포부착, spreading, 증식 및 분화에 관여하는 것으로 알려진 fibulin-1, vitronectin 과도 결합할 수 있음이 보고된 바 있으나<sup>19</sup> 이들과의 결합이 EC domain 의존적인지는 알려져 있지 않다.

본 실험에서 우리는 SMOC1 펩타이드는 여타 보고에서 보여준 EC domain의 독립된 기능에서 착안하여 제작된 것으로서, EC domain 내에서도 두 번째 EF-handed calcium binding motif 서열의 일부만을 포함함으로써 칼슘 결합을 위한 위치의 불안정성을 부여하여 calcium 독립적으로 작용하는 펩타이드의 기능을 알아보려고 하였다. 결과에는 보여주지 않았지만, 합성 SMOC1 펩타이드의 광범위한 농도(0-25 $\mu$ M)에서 세포독성을 확인한 결과 유의적인 세포 독성 효과는 나타나지 않았다. 더불어 골수간엽줄기세포의 세포증식에도 유의적인 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Fig. 2). 우리는 이전

보고에서 골수 간엽줄기세포에 야생형 SMOC1의 과발현이 조골세포로의 분화를 촉진함을 보여준 바 있다<sup>10</sup>. 본 실험의 결과에서 SMOC1 펩타이드는 농도 의존적으로 미네랄의 침착을 증가시켰으므로 SMOC1 단백질이 골수줄기세포의 조골세포 분화에 미치는 영향 일부를 모방해 낼 수 있음을 발견하였다(Fig. 3). 또한 SMOC1 펩타이드에 의한 골수 간엽줄기세포의 조골세포로의 분화 시 ALP 발현과 활성변화 없이 type I collagen (COL1)과 OC의 발현이 특이적으로 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 세포에 의해 매개된 미네랄화 과정에는 phosphate (Pi)와 calcium ion, matrix vesicle, apoptotic bodies, nucleating proteins, collagenous and non collagenous proteins 등 여러 가지 인자가 수반된다<sup>20</sup>. Type I collagen은 골기질의 90%를 이루는 단백질로서 미네랄결정의 저장소로서 작용한다<sup>21</sup>. 이와 더불어 비콜라겐성 단백질인 OC 또한 콜라겐 단백질과 더불어 무기질화 과정에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 따라서 SMOC1 펩타이드에 의해 유도된 미네랄화의 증가는 matrix 성숙에 관여하는 유전자 발현의 촉진에 기인할 것으로 여겨진다.

## V. CONCLUSION

종합해보면, SMOC1 단백질의 EC domain으로부터 유래된 합성 펩타이드는 골수줄기세포에 처리되었을 때 세포의 증식에는 영향을 미치지 않았으나, 분화 유도 시 미네랄의 침착을 농도 의존적으로 증가시켰고, 일부 분화 표지자의 발현도 증가시켰다. 이들 결과로 SMOC1 펩타이드는 골수줄기세포의 분화를 유도하는 SMOC1 단백질 작용을 모방할 수 있음을 알았다. 따라서, 이 결과는 SMOC1 펩타이드를 이용한 뼈 재생을 위한 조직공학적 적용이 가능할 것으로 본다.

## VI. REFERENCES

1. Nagpal R, Behare P, Rana R, et al: Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. Food Funct 2011;2:18-27.

2. Danquah MK, Agyei D: Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnology* 2012;29:1:5.
3. Villard V, Kalyuzhnyi O, Riccio O, et al: Synthetic RGD-containing alpha-helical coiled coil peptides promote integrin-dependent cell adhesion. *J Pept Sci* 2006;12:206-212.
4. Frith JE, Mills RJ, Cooper-White JJ: Lateral spacing of adhesion peptides influences human mesenchymal stem cell behaviour. *J Cell Sci* 2012;125:317-327.
5. Secchi AG, Grigoriou V, Shapiro IM, et al: RGDs peptides immobilized on titanium alloy stimulate bone cell attachment, differentiation and confer resistance to apoptosis. *J Biomed Mater Res A* 2007;83:577-584.
6. Tosatti S, Schwartz Z, Campbell C, et al: RGD- containing peptide GCRGYGRGDSPG reduces enhancement of osteoblast differentiation by poly (L-lysine)- graft-poly (ethylene glycol)-coated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2004;68:458-472.
7. Madl CM, Mehta M, Duda GN, Heilshorn SC, Mooney DJ: Presentation of BMP-2 Mimicking Peptides in 3D Hydrogels Directs Cell Fate Commitment in Osteoblasts and Mesenchymal Stem Cells. *Biomacromolecules* 2014;15:445-455.
8. Sarvestani AS, He X, Jabbari E: Osteonectin-derived peptide increases the modulus of a bone-mimetic nanocomposite. *Eur Biophys J* 2008;37:229-234.
9. Hosseini S, Naderi-Manesh H, Mountassif D, Cerruti M, Vali H, Faghihi S: C-terminal amidation of an osteocalcin-derived peptide promotes hydroxyapatite crystallization. *J Biol Chem* 2013;288:7885-7893.
10. Choi YA, Lim J, Kim KM, et al: Secretome analysis of human BMSCs and identification of SMOC1 as an important ECM protein in osteoblast differentiation. *J Proteome Res* 2010;9:2946-2956.
11. Vannahme C, Smyth N, Miosge N, et al: Characterization of SMOC-1, a novel modular calcium-binding protein in basement membranes. *J Biol Chem* 2002;277:37977-37986.
12. Dreieicher E, Beck KF, Lazaroski S, et al: Nitric oxide inhibits glomerular TGF-beta signaling via SMOC-1. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1963-1974.
13. Rainger J, van Beusekom E, Ramsay JK, et al: Loss of the BMP antagonist, SMOC-1, causes Ophthalmocromelic (Waardenburg anophthalmia) syndrome in humans and mice. *PLoS Genet* 2011;7:e1002114.
14. Sasaki T, Hohenester E, Göhring W, Timpl R: Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J* 1998;17:1625-1634.
15. Busch E, Hohenester E, Timpl R, Paulsson M, Maurer P: Calcium affinity, cooperativity, and domain interactions of extracellular EF-hands present in BM-40. *J Biol Chem* 2000;275:25508-25515.
16. Schiemann BJ, Neil JR, Schiemann WP: SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system. *Mol Biol Cell* 2003;14:3977-3988.
17. Aroca-Aguilar JD, Sánchez-Sánchez F, Ghosh S, Fernández-Navarro A, Coca-Prados M, Escribano J: Interaction of recombinant myocilin with the matricellular protein SPARC: functional implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:179-189.
18. Klemenčič M, Novinec M, Maier S, Hartmann U, Lenarčič B: The heparin-binding activity of secreted modular calcium-binding protein 1 (SMOC-1) modulates its cell adhesion properties. *PLoS One* 2013;8:e56839.
19. Novinec M, Kovacic L, Skrlj N, Turk V, Lenarčič B: Recombinant human SMOCs produced by in vitro refolding: calcium-binding properties and interactions with serum proteins. *Protein Expr Purif* 2008;62:75-82.
20. Huitema LF, Vaandrager AB: What triggers cell-mediated mineralization? *Front Biosci* 2007;12:2631-2645.
21. Glimcher MJ: Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Rec* 1989;224:139-153.