



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의학석사 학위논문

헤파린 결합 기능성 합성  
펩타이드에 의한 항종양 효과 연구

The anti-cancer effect of synthetic  
heparin-binding domain peptide

2013년 2월

서울대학교 치의학대학원

치 의 학 과

이 영 빈

헤파린 결합 기능성 합성  
펩타이드에 의한 항종양 효과 연구

The anti-cancer effect of synthetic  
heparin-binding domain peptide

지도교수 박 윤 정

이 논문을 치의학 석사 학위논문으로 제출함  
2012 년 10 월

서울대학교 치의학대학원  
치 의 학 과  
이 영 빈

이영빈의 석사 학위논문을 인준함  
2013 년 2 월

위 원 장 \_\_\_\_\_ 이            진            (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ 박    윤    정            (인)

위        원 \_\_\_\_\_ 조    재    진            (인)

## 초 록

# 헤파린 결합 기능성 합성 펩타이드에 의한 항종양 효과 연구

### 1. 목 적

Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)는 Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily의 하위 그룹에 포함되는 다기능적 성장 인자이다. BMP-4의 주된 기능은 골형성 촉진 효과이지만, 그 외에도 근육 발생, 인간 배아의 발생, 골의 무기질화 등의 다양한 기능을 나타내므로 다양한 질환들의 임상적 치료에 활용 가치가 높을 것으로 기대된다. 최근에는 BMP-4가 다양한 종양 세포에 항종양 효과를 가진다는 연구들이 보고되었고, BMP-4를 종양 치료에 이용하려는 노력들이 시도되고 있다. 최근 연구에서 BMP-4의 heparin binding domain (HBD) peptide는 heparin과 결합하여 BMP-4의 골형성 촉진 효과에 기여한다는 것이 밝혀졌다. 또한, 다른 기능으로서 헤파린과 결합함으로써 HBD peptide는 BMP-4의 생리적 기능에 중요한 역할을 담당하는 부위로 BMP-4의 항종양 효과에도 작용할 것으로 기대된다. 본 연구에서는 BMP-4에서 도출한 HBD peptide에 의한 항종양 효과를 평가하고자 하였다.

### 2. 방 법

BMP-4에서 도출한 heparin binding domain (HBD)가 종양 세포 내부로 투과하여 internalization이 되는지를 확인하기 위해서 형광 염색한 펩타이드를 종양 세포에 처리 후, 공초점 주사 전자 현미경

(confocal scanning microscopy)으로 관찰하였다. HBD peptide의 종양 세포의 apoptosis에 대한 효과를 측정하기 위해서 펩타이드를 각각 0, 25, 50, 100, 200  $\mu$ M의 농도로 처리하였다. 펩타이드 처리 48 시간 후, western blot assay를 시행하여 apoptosis 관련 단백질들 (Bcl-x1, PARP, Cas-3)의 발현 여부를 관찰하였다. 마지막으로, Slot blot 분석을 이용하여 HBD peptide가 heparin과의 결합 친화성 및 종양 세포의 증식에 필수적인 VEGF (Vascular endothelial growth factor)와 결합 친화성을 관찰하였다.

### 3. 결 과

BMP-4에서 도출한 Heparin Binding Domain (HBD) peptide의 농도가 증가함에 따라서 종양 세포 내부로 투과되는 펩타이드의 양이 증가하는 경향을 나타내었다. 즉, HBD peptide의 세포 투과 능력을 확인할 수 있었다. HBD peptide를 처리한 종양 세포에서 Bcl-x1은 감소하는 경향을 보였고, PARP cleaved form 및 Caspase-3의 cleaved form이 증가하는 경향을 보였다. 이것은 HBD peptide가 종양 세포의 apoptosis에 영향을 줄 수 있음을 의미한다. HBD peptide의 농도가 증가할수록 heparin 및 VEGF와의 결합이 증가하는 경향을 관찰하였다. 이러한 결과를 통하여 HBD peptide의 heparin 과의 결합 친화성을 확인하였고, HBD peptide가 VEGF와 결합을 통해 종양 세포 증식 억제에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다.

주요어 : Heparin binding domain (HBD) peptide, Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4),

---

Vascular endothelial growth factor (VEGF), 항종양 효과, 세포자멸사

학 번 : 2009-22704

# 목 차

I. 서론	1
II. 실험 재료 및 방법	4
1. 실험 재료	4
2. Peptide의 합성	5
3. 세포 배양	5
4. HBD peptide의 형광영상학적 세포 투과 능력 측정	5
5. Western blot assay를 이용한 HBD peptide의 apoptosis에 대한 효과 측정	6
6. Slot-blot을 이용한 HBD peptide의 결합력 측정	7
III. 실험 결과	9
1. HBD peptide의 형광영상학적 세포 투과 능력 측정	9
2. Western blot assay를 이용한 HBD peptide의 apoptosis에 대한 효과 측정	11
3. Slot-blot을 이용한 HBD peptide의 결합력 측정	12
IV. 고찰 및 결론	13
V. 참고 문헌	15
Abstract	18

# I. 서론

세포막은 선택적 투과 장벽의 역할을 수행하여 세포의 생존 및 기능 유지에 필수적인 역할을 하지만, 동시에 거대 분자나 친수성 약물의 세포 내 투과를 방해하는 장애물의 역할을 한다.<sup>1)</sup> 기대하는 약물의 세포 내 생리적 효과를 얻기 위해서는 종종 많은 양의 약물을 투여해야 하고, 이로 인한 부작용을 피할 수 없는 경우가 많다.<sup>2)</sup> 약물을 세포 내로 효율적으로 운송하기 위한 방법을 찾기 위한 많은 연구들이 이루어져 왔고, 그 중에서 세포 투과성 펩타이드 (Cell-penetrating peptide, 이하 CPP 약칭)를 이용한 방법이 가장 잘 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> CPP는 9-35개의 짧은 아미노산 서열을 가진 양전하 또는 양쪽성 성질의 펩타이드로 CPP에 결합된 약물을 세포막을 가로질러 세포 내로 이동시키는 것을 매개한다. CPP는 상대적으로 독성이 적고, 효과적으로 약물을 세포 내로 운반하는 장점들이 있어서 다양한 약물 운반에 이용될 수 있다.<sup>3)</sup> 또한, CPP는 종양 치료 약물의 운반에도 매우 효과적으로 이용될 수 있다. CPP는 doxorubicin과 같이 거대 분자로 이루어진 항종양 약물들을 세포 내로 운반하는 역할을 수행한다.<sup>4)</sup> 그러나, 일반적인 CPP는 종양 세포에 대한 특이성이 없어 건강한 세포에도 해를 줄 수 있는 단점이 있기 때문에 CPP에 tumor homing domain이나 종양 세포에 특이적인 수용체 등을 결합시켜 종양 세포에 선택적인 항암 치료제들을 개발하려는 연구들이 이루어지고 있다.<sup>1)</sup>

골형성단백질 (Bone Morphogenetic Proteins, 이하 BMPs로 약칭)은 20종류 이상의 성장 인자로 구성되어 있는 거대한 그룹으로, Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) superfamily의 하위 그룹에 속한다.<sup>5)</sup> BMPs는 원래 골과 연골의 형성을 유도하는 분자로 밝혀졌으나, 이러한 작용 외에도 단핵구, 상피 세포, 신경 세포, 중배엽 세포 등의 다양한 세포에 광범위한 생리적인 활성을 갖는 단백질임을 보여왔다. BMPs는 상기 세포들의 성장, 분화, 화학주성 및 세포 사멸 등을 조절하고, 다양한 조직과 기관들의 형태 형성에 중요한 역할을 담당한다.<sup>6)</sup> 임상적으로는, BMPs family가 비만, 당뇨, 혈관 질환, 종양 및 그와 관련된 합병증 등의 다양한 질환들과 관련이 있다는 연구들이 있고, BMPs

의 임상적인 치료 가치를 대사질환, 혈관 질환 및 종양 치료 등에 이용하고자 하는 관심들이 증가하고 있다.<sup>7)</sup>

BMPs의 구성원 중 하나인 BMP-4는 연골 내골화를 통해 골 형성을 촉진하고, 줄기세포 (Mesenchymal stem cell)의 연골모세포 (chondroblast)와 연골세포 (chondrocyte)로의 분화를 유도하여 연골 형성을 촉진하는 작용을 하며, 이는 골과 연골의 재생과 골절 치유, 관절염 등의 치료에 이용될 수 있다.<sup>8)</sup> 또한, BMP-4는 발생 과정에서 중요한 역할을 수행한다. Bmp4 유전자가 결손된 쥐를 이용한 실험을 통해서 BMP4는 원장 형성과 중배엽 형성 등 쥐의 초기 발생 과정에 기여하며, 초기 조혈작용, 폐, 사지, 장, 신장과 요도 등의 조직 및 기관계의 발생을 조절한다는 것이 밝혀졌다.<sup>9)</sup> 최근의 연구에서는 BMP-4는 종양의 성장과 억제에도 관여 한다는 것이 밝혀졌다. 많은 종류의 종양에서 BMP-4의 암 세포 성장에 대한 상반되는 효과가 보고되었다. BMP-4처리 후, 골수종, 유방암, 위암 등에서 유래된 종양세포에서 세포 성장의 억제가 관찰되었으나, 흑색종, 간세포암, 난소암 등에서는 성장 억제 효과가 없었다.<sup>9-11)</sup> 또한, 암 세포에 대한 BMP-4의 apoptosis 유도 효과를 평가하였을 때, BMP4는 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 발현을 증가시켰고, anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2와 Bcl-xL의 발현을 감소시켰다.<sup>12)</sup> 이러한 결과를 통해 BMP-4가 종양 세포의 apoptosis를 유도하여 항종양 효과를 나타낼 수 있는 가능성을 알 수 있다. BMP-4의 항종양 효과에 대한 상반되는 결과들이 있지만, 많은 연구 결과들이 BMP-4가 종양 세포의 성장을 억제하는 효과가 있다는 것을 보여주고 있고, 이것은 BMP-4를 종양 치료에 이용할 수 있는 가능성이 있음을 의미한다.<sup>9-12)</sup>

크기가 큰 종양 세포들은 산소와 영양분 공급이 불충분해져서 종양 세포들이 괴사된 부위가 나타난다. 이러한 이유에서 종양의 성장은 신생혈관형성 (angiogenesis)에 의존하며, 신생혈관형성은 종양의 악성도, 생존, 그리고 전이에 강한 상관관계가 있다.<sup>13)</sup> 종양은 Tumor Angiogenesis Factor (TAF)를 분비하여 신생혈관형성을 유도하는데, 그 중에서 Vascular endothelial Growth Factor (VEGF)가 가장 중요한 TAF로 여겨진다. VEGF는 혈관 내피 세포의 혈관 투과성을 증가시키고, 장기적으로 내피 세포의 증식과 이동 및 새로운 혈관의 형성을 유도한다.<sup>14,15)</sup> 이



와 같이 종양의 성장과 전파에 angiogenesis가 매우 중요한 역할을 하기 때문에 VEGF와 같은 TAF들의 신생혈관형성 작용을 억제하여 종양을 치료하고자 하는 연구들이 진행되어 왔다.<sup>13-18)</sup>

헤파린 (heparin)은 고도로 황산화된 glycosaminoglycan (GAG) family의 구성원으로 길이가 길고, 이당류가 반복된 구조의 분자이다. 헤파린은 주로 세포막과 세포외 기질(ECM)에 국소적으로 분포하며, 혈관과 점막 조직에 분포하는 비만세포의 과립에도 풍부하게 존재한다. 상처에 대한 반응으로 헤파린이 과립에서 방출되어 혈류에 들어가서 혈액 응고를 억제하는 작용을 한다.<sup>19)</sup> 이러한 응고 억제 작용을 이용하여 헤파린을 정맥 혈전색전증이나 심장 및 혈관 수술 동안 혈액 응고를 저해하기 위한 항응고제로 주로 사용한다.<sup>19-21)</sup>

헤파린은 또한 200가지 이상의 heparin-binding proteins (HBPs) 들과 결합하여 상호 작용한다.<sup>22)</sup> TGF- $\beta$  superfamily, fibroblast growth factor (FGF) 등의 성장 인자들은 세포 표면과 세포외 기질(ECM)에서 heparin 및 heparan sulphate (HS)와의 결합을 통해 안정화되어 국소화되며, 그 결과 성장 인자들이 확산되어 분해되는 것으로부터 보호된다.<sup>23-25)</sup> 최근에는 헤파린과 결합하는 성장 인자들의 heparin-binding domain (이하 HBD 약칭)의 생리적 작용에 대한 많은 연구가 이뤄져 왔다.<sup>25-29)</sup> VEGF-A의 HBD는 헤파린과 결합하여 혈관과 신경의 성장을 매개하고,<sup>25)</sup> fibronectin의 HBD는 heparan sulphate (HS)와 결합하여 세포 부착과 신호 전달에 관여하는 것으로 나타났다.<sup>26)</sup> 또 다른 연구에서는, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF)는 헤파린과 결합하여 항염 작용을 나타냄을 보였다.<sup>27)</sup> Fibroblast growth factor (FGF)과 Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)의 heparin binding domain (HBD)의 아미노산 서열을 도출하여 합성한 펩타이드를 이용한 연구에서는 HBD가 각각 그들의 모체인 FGF와 BMP-4의 주요 생리 작용인 골 형성 촉진 효과를 나타내었다.<sup>28,29)</sup> 이러한 연구 결과들은 성장 인자들의 heparin binding domain (HBD)이 그들 모체의 주요 생리적 활성 작용을 나타내는데 중요한 역할을 할 것이라는 것을 암시한다. 따라서, BMP-4의 heparin binding domain (HBD)은 BMP-4의 주요 생리 작용인 골 형성 촉진 효과 외에

도 최근 주목 받고 있는 BMP-4의 항종양 효과에도 어느 정도 기여할 것으로 기대되었다.

본 연구에서는 BMP-4로부터 유래된 peptide를 합성하여 종양 세포에 대해 활성을 제어하는지 시험하였다. 본 연구에서는 HBD peptide의 세포 투과 능력, 종양 세포의 apoptosis에 대한 효과, 그리고 heparin 및 vascular endothelial growth factor (VEGF)와의 결합력을 평가하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

Fmoc-amino acid, Rink amide resin 및 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU)는 Advanced Chemtech (Louisville, Kentucky, USA)에서 구입하였다. Phosphate-buffered saline (PBS), Fetal bovine serum (FBS), 0.25% (w/v) trypsin-EDTA, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)는 Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)와 sodium heparin은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였다. trifluoroacetic acid (TFA)과 Tetrahydrofuran (THF) acetonitrile은 Burdick & Jackson (New Jersey, USA)에서 구입하였다. 1,2-ethanedithiol (EDT)는 Fluka (USA)에서 구입하였다. Phenol, piperidine, thioanisole, diisopropylethylamine (DIPEA), triisopropylsilane (TIS)는 Aldrich Co. (St. Louis, USA)에서 구입하였다. Hoechst 33342 dye는 Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다. Bone morphogenetic protein (BMP)-4는 R&D Systems (Abingdon, UK)에서 구입하였다.

## 2.2. Peptide의 합성

헤파타이드 (heparin binding domain peptide)를 standard fluorenylmetoxycarbonyl (F-moc) chemistry에 기반한 헤파타이드 합성기 (APEX 396, AAPPTEC, Louisville, KY, USA)로 합성하였다. Rink amide resin에 아미노산을 DMF, 10 당량의 DIPEA, 5당량의 HBTU를 이용하여 coupling을 진행하고, 20 % piperidine을 사용하여 F-moc을 제거하였다. 헤파타이드-레진은 THF에서 건조하였다. 3시간 동안 TFA/EDT/TIS/H<sub>2</sub>O를 사용하여 헤파타이드-레진을 분리하였다. 합성된 헤파타이드는 reverse-phase high-performance liquid chromatography (Shimadzu AutoPrep system, Japan)로 정제하였다.

## 2.3. 세포 배양

모델 종양 세포주로서 MDA-MB 231 세포를 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다. MDA-MB 231 세포는 100 mm dish에  $1 \times 10^5$  개씩 분주하여 10% FBS (Fetal Bovine Serum)과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 배양하였다. 세포는 trypsin-EDTA로 떼어내어 새로운 culture flask에 분주하여 배양하였고, 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다.

## 2.4. HBD peptide의 형광영상학적 세포 투과 능력 측정

세포 투과 능력을 확인하기 위해 HBD peptide를 형광 염색하여 공초점 현미경으로 관찰하였다. 4-well chamber plate에 종양 세포를 각각  $1.0 \times 10^5$  개/well 씩 분주한 다음, 일반 배지에서 24 시간 배양하였다. 배양 시간 경과 후에, 배지를 0.5% FBS와 1% antibiotics가 포함된 DMEM 배지 (serum free medium)로 바꾸어 준 다음 형광염료 (FITC: Sigma,

USA)를 결합시킨 HBD peptide를 각각 NT, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ 씩 1시간 동안 처리하였다. 배지를 제거하고, PBS로 2회 세척하였다. 10% NBF (Neutral Buffered Formalin)를 500  $\mu\text{l}$  첨가하고 상온에서 10분 동안 세포를 고정하였다. 다시 PBS 500  $\mu\text{l}$ 로 세척한 다음, PBS 200  $\mu\text{l}$ 에 100 mg/ml 농도의 Hoechst 33342 dye를 2  $\mu\text{l}$  넣고, 상온에서 20분 동안 염색하였다. 다시 PBS 500  $\mu\text{l}$ 로 세척한 다음에 Dako Faramount Aqueous Mounting Medium를 가하고 커버글라스를 덮고 건조시켰다. 표본화 작업을 마친 후, FLUOVIEW software (Olympus, Tokyo, Japan)를 이용하여 confocal laser scanning microscopy (FV-300, Olympus, Tokyo, Japan)로 세포를 관찰하였다.

## 2.5. Western blot assay를 이용한 HBD peptide의 apoptosis에 대한 효과 측정

HBD peptide가 종양 세포의 apoptosis에 영향을 줄 수 있는지를 확인하기 위해 western blot 실험으로 apoptosis 관련 단백질인 Bcl-xL, PARP, Caspase-3의 발현을 관찰하였다. 60 mm dish에 MDA-MB 231 세포를  $3 \times 10^6$  개/dish 씩 분주하고, 10% FBS와 1% antibiotics가 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후, 배지를 제거하고 HBD peptide를 각각 NT, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ 씩 처리하여 0.5% FBS와 1% antibiotics가 포함된 DMEM 배지 (serum free medium)에서 추가로 48 시간 동안 배양하였다. 48시간 배양 후에, 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 60 mm dish에 배양된 세포를 scraper로 긁어 모으고, 4°C, 13,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 cell pellet을 취하였다. 세포들을 30 분 동안 얼음 속에서 lysis buffer (20 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100)에 protease inhibitor cocktail (Roche, Penzberg, Germany)와 phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma, St. Louis, MO)를 첨가한 용액으로 용해시킨 뒤, 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취하였다. 단백질 용액을 Bradford protein assay kit (BioRad, Hercules, CA)를 이용해 단백질 정량하였다. 시료는 5X loading buffer

로 5분 동안 열처리한 다음 분석하였다. 8% polyacrylamide gel에서 1시간 동안 130 V에서 전기 영동하였다. 전기 영동 완료 후, 단백질을 transfer buffer (12.5 mM Tris, 0.1 M glycine, pH 8.3)에서 310 mA로 100분 동안 니트로 셀룰로오스 막 (nitrocellulose membrane)에 전이시켰다. 막을 1X T-TBS (20mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 세척하고, 1X T-TBS에 녹인 5% skim milk로 상온에서 1시간 동안 막을 블록 (block)하였다. 막을 3회 세척하고, 상기 블로킹 용액에 각각 1:300의 농도로 PARP, Bcl-xL, Caspase-3의 1차 항체를 넣은 용액에서 4°C, 24 시간 동안 반응시켰다. 막을 3회 세척한 후, 상온에서 1시간 동안 1:1000 농도로 2차 항체인 Horseradish peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)를 반응시킨 뒤 다시 T-TBS로 5분씩 3회 세척하였다. ECL (Enhanced Chemo-Luminescence Detection Kit)을 사용하여 밴드를 검출하고, Luminescent image analyzer로 분석하였다. 단백질 loading 양이 일정한지 비교하기 위해  $\beta$ -Actin을 동일한 방법을 이용하여 검출하였다.

## 2.6. Slot-blot을 이용한 HBD peptide의 결합력 측정

HBD peptide에 의한 heparin 및 VEGF와의 결합 능력을 slot blot으로 측정하였다. 니트로 셀룰로오스 막 (Nitrocellulose membrane)에 heparin과 반응할 그룹은 각각 NT, 25, 50, 100, 200  $\mu$ M 농도의 HBD peptide를 loading하였고, 양성 대조군인 20 mg/ml 농도의 heparin 20  $\mu$ l을 loading하였다. VEGF와 반응할 그룹은 각각 NT, 25, 50, 100, 200  $\mu$ M 농도의 HBD peptide를 loading하였고, 양성 대조군인 10  $\mu$ g/ml 농도의 VEGF 20  $\mu$ l을 loading하였다. 펩타이드가 loading된 막에 2시간 동안 진공을 걸어 준 뒤, 각 well을 T-TBS를 이용하여 세척하였다. Heparin과 반응할 그룹은 각 well 당 20 mg/ml 농도의 heparin을 40  $\mu$ l씩 분주하였고, VEGF와 반응할 그룹은 각 well 당 10  $\mu$ g/ml 농도의 VEGF를 20  $\mu$ l씩 분주하였다. 분주 후, 막을 shaker위에서 2시간 동안 incubation하였다. 막을 다시 T-TBS로 3회 세척한 후, 5% skim milk가 포함된 T-TBS 용액에서 1시간 동안 blocking하였다. 막에 각 그룹에 heparin과

VEGF의 1차 항체를 각각 1:300의 농도로 첨가하여 4℃에서 24 시간 동안 반응시켰다. T-TBS로 3회 세척한 다음, 각 1차 항체에 대한 2차 항체로 Horseradish peroxidase가 결합된 goat anti- mouse IgG 또는 goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)를 각각 1:2000의 농도로 첨가하여 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 이후, 다시 막을 T-TBS로 3회 세척하고, ECL (Enhanced Chemo-Luminescence Detection Kit)을 사용하여 밴드를 검출하고, Luminescent image analyzer로 분석하였다.

### III. 실험 결과

#### 3.1. HBD peptide의 형광영상학적 세포 투과 능력 측정

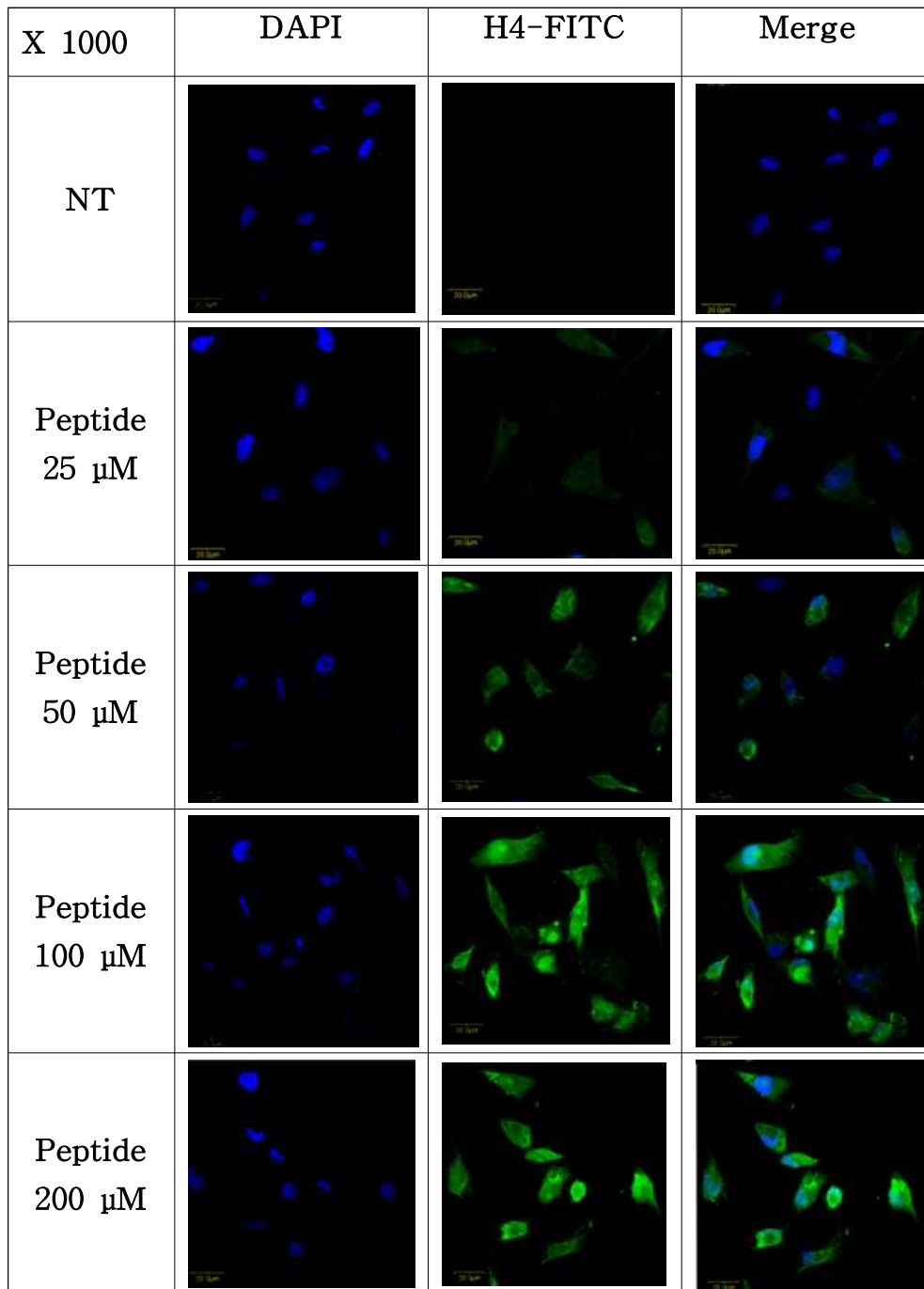


그림 1. 모델 종양 세포주 (MDA-MB 231)에 형광염료 (FITC)를 표지한 HBD peptide를 농도별 (NT, 25, 50, 100, 200  $\mu$ M)로 1시간 동안 처리한 후, 펩타이드의 세포 내 투과 정도를 공초점 현미경을 이용하여 1000 배로 관찰한 영상. Blue: nuclei, Green: FITC-conjugated peptide.

HBD peptide의 세포 투과 능력을 시험하기 위해 형광염료(FITC)로 표지한 펩타이드를 각각 NT, 25, 50, 100, 200  $\mu$ M 씩 처리하고, 공초점 현미경으로 관찰하였다. 1000배의 공초점 현미경 영상을 관찰한 결과, 펩타이드를 처리하지 않은 경우 (No treatment)에는 세포 내부에서 펩타이드 (FITC conjugated HBD peptide)가 나타내는 녹색 형광이 관찰되지 않았으나, 처리한 펩타이드의 농도가 각각 25, 50, 100, 200  $\mu$ M 로 증가할수록, 세포 내부에서 펩타이드가 나타내는 녹색 형광이 더욱 진하게 관찰되었다. (그림 1.) 이것은 종양 세포에 처리한 HBD peptide의 농도가 증가함에 따라 종양 세포 내부로 침투한 펩타이드의 양이 증가한 것을 나타낸다.



### 3.2. Western blot assay를 이용한 HBD peptide의 apoptosis 에 대한 효과 측정

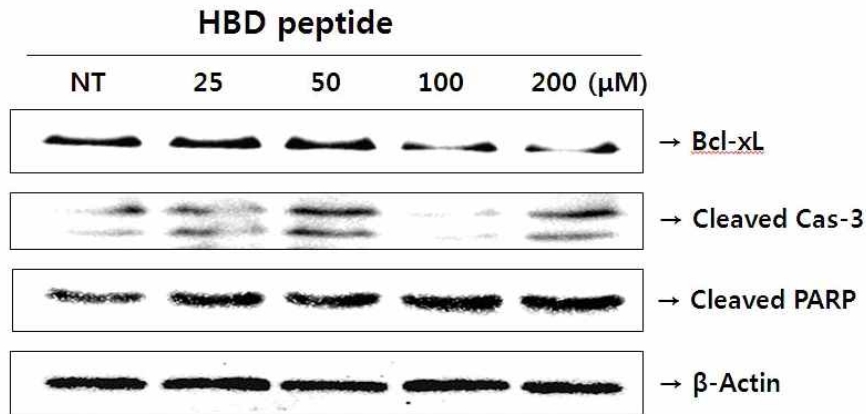


그림 2. 모델 종양 세포주 (MDA-MB 231)에 HBD peptide를 농도별 (NT, 25, 50, 100, 200 μM)로 48시간 동안 처리한 후, 웨스턴 블랏법 (western blot)을 통해 apoptosis 관련 단백질 (Bcl-xL, Caspase-3, 분해된 PARP)의 발현 정도를 확인한 결과.

HBD peptide가 종양 세포 (MDA-MB 231 cell)의 apoptosis를 유도하는 능력이 있는지 확인하기 위해 HBD peptide를 농도별로 각각 NT, 25, 50, 100, 200 μM 씩 처리하고, 48시간 경과 후에 apoptosis와 관련된 단백질 (Bcl-xL, Caspase-3, PARP)들의 발현 정도를 웨스턴 블랏법 (western blot)을 이용해 관찰하였다. 그림 2. 에 나타난 것과 같이 HBD peptide의 농도가 증가할수록 종양 세포에서 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-xL의 밴드는 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 pro-apoptotic 단백질인 Caspase-3의 cleaved form과 PARP의 inactive form인 cleaved PARP는 control에 비해 200 μM 의 펩타이드 처리에 의해 증가하는 경향을 나타내었다.

### 3.3. Slot-blot을 이용한 HBD peptide의 결합력 측정

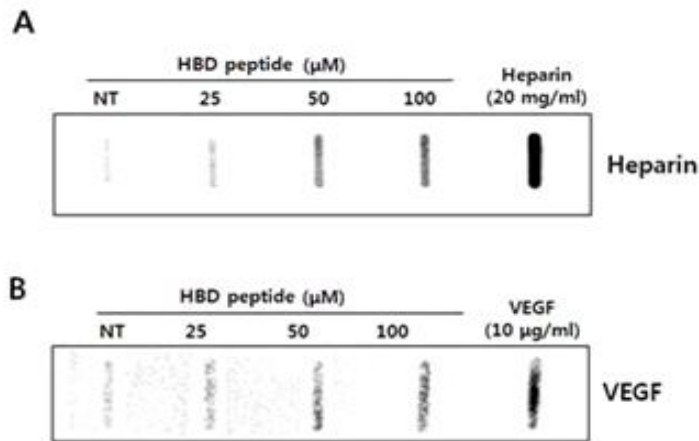


그림 3. (A) HBD peptide (각각 NT, 25, 50, 100, μM의 농도)와 양성 대조군에 각각 heparin을 처리하고, HBD peptide의 결합 정도를 관찰한 결과. (B) 상기 농도의 HBD peptide와 양성 대조군에 각각 VEGF를 처리하고, HBD peptide의 결합 정도를 관찰한 결과.

HBD peptide가 heparin 및 VEGF와 결합 능력이 있는지를 확인하기 위해서 slot-blot 실험을 통하여 확인하였다. 먼저, 펩타이드의 heparin과의 결합 능력을 확인하기 위해서 각각 NT, 25, 50, 100 μM 농도의 HBD peptide에 각각 heparin을 처리하였다. Heparin이 결합한 정도를 비교하기 위해서 양성 대조군으로 같은 농도의 heparin을 사용하였다. 실험을 통해 나타난 결과에서 HBD peptide의 농도가 증가할수록 heparin과의 결합이 증가한 것으로 관찰되었다. (그림 3. (A)) 펩타이드의 VEGF와의 결합 능력을 확인하기 위한 실험에서는 상기 농도의 HBD peptide에 각각 VEGF를 처리하였고, 처리한 VEGF가 결합한 정도의 비교를 위해 같은 농도의 VEGF를 양성 대조군으로 사용하였다. 실험 결과를 통해서 HBD peptide 농도가 증가함에 따라서 VEGF와의 결합이 증가한 것을 관찰할 수 있었다. (그림 3. (B)) 두 실험에서 각각 HBD peptide의 농도가 증가할수록 heparin 및 VEGF와의 결합이 증가한 것으로 나타났고, 이러한 실험 결과들은 HBD peptide가 heparin 및 VEGF와 결합 친화성이 있는 것으로 보인다.

## IV. 고찰 및 결론

세포 투과성 펩타이드 (Cell penetrating peptide)는 거대분자인 chemotherapeutic drug나 pro-apoptotic protein을 적은 독성과 높은 효율로 종양 세포 내에 투과시킬 수 있는 운반체이다. 이러한 장점들 때문에 CPP를 종양 치료에 이용하려는 관심이 높아지고 있다.<sup>a)</sup> 본 연구에서는 BMP-4의 heparin binding domain(HBD) peptide가 세포 투과 능력을 가진 잠재적인 CPP로서, 종양 치료에 이용될 수 있을 것으로 기대하고 HBD peptide의 세포 투과 능력을 시험하였다. 모델 종양 세포에 HBD peptide를 각각 NT, 25, 50, 100, 200 $\mu$ M 씩 처리한 후, 공초점 현미경으로 관찰하였을 때, 처리한 HBD peptide의 농도가 증가할수록 세포질에 염색된 형광 물질(FITC)의 양이 증가한 것으로 관찰되었고, 일부는 핵 내부에서도 관찰되었다. 이것은 형광 염색된 HBD peptide의 세포 내로의 투과가 증가했음을 의미한다. 즉, HBD peptide의 세포 내 투과 농도 의존적으로 증가했음을 나타내는 것으로 HBD peptide의 세포 투과 능력이 있을 것으로 보인다. 이러한 실험 결과를 통하여 HBD peptide가 항종양 약물을 종양 세포 내로 운반할 수 있는 CPP의 역할을 수행할 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다.

Bcl-2 family는 Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 등의 anti-apoptotic protein들과 Bax, Bak 등의 pro-apoptotic protein들로 구성된다. 만약, pro-apoptotic protein들이 우세할 경우, 미토콘드리아에서 cytochrome c를 세포질로 방출하여 caspase 활성을 자극하여 apoptosis를 일으킨다.<sup>30,31)</sup> Apoptosis의 기전은 매우 복잡하지만, 서로 다른 apoptotic pathway는 같은 종착역으로 수렴한다. 이러한 과정은 caspase-3의 분해로 시작되어 DNA의 분절화, 세포 골격과 세포핵 단백질의 분해를 일으켜 결국 세포의 죽음을 초래한다.<sup>32)</sup> 또한, poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP)는 DNA repair 과정에 중요한 역할을 하며, PARP 효소의 억제는 유전적 불안정화, cell cycle arrest, 그리고 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>33)</sup> Paclitaxel, Gingerol, siRNA 등의 억제들은 종양 세포의 apoptosis를 유도하여 종양을 치료하는 약물들이다.<sup>32-34)</sup>

본 연구에서는 apoptosis에 관련된 단백질들 중, Bcl-xL, cleaved

Caspase-3, cleaved PARP의 발현 증가나 감소를 통해 HBD peptide가 종양 세포의 apoptosis에 영향을 줄 수 있는지를 평가하였다. 실험 결과, pro-apoptotic protein인 Caspase-3의 cleaved form의 발현은 펩타이드의 농도가 증가함에 따라서 증가하는 경향을 보였고, PARP의 cleaved form도 펩타이드의 농도 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 반대로, 펩타이드 농도 증가에 따라 anti-apoptotic protein인 Bcl-xL의 발현은 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과들은 HBD peptide가 종양 세포의 apoptosis에 영향을 줄 수 있다는 것을 의미한다.

마지막으로 HBD peptide가 VEGF와의 결합하여 신생혈관형성 작용을 억제하는 VEGF inhibitor의 역할을 수행할 수 있는지 slot blot을 통해 확인해 보았다. 실험 결과, HBD peptide의 농도가 증가할수록 VEGF와의 결합이 증가하는 경향을 보였다. 이상의 실험 결과는 HBD peptide가 VEGF와의 결합 친화성이 있음을 나타낸다. 이것은 HBD peptide가 VEGF와 결합하여 혈관신생을 억제할 수 있는 가능성이 있음을 의미한다. 또한, slot blot을 통해 HBD peptide와 heparin의 결합 친화성을 확인한 결과에서도 농도가 증가함에 따라 HBD peptide와 heparin의 결합이 증가하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과로 HBD peptide가 heparin과의 결합 친화성이 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, BMP 등의 성장 인자가 조직 성장이라는 효과와 더불어 종양의 발생이라는 부작용을 초래하는 것이 많은 사례에서 보고된 만큼, 본 연구에서의 특정 domain이 항종양 효과가 있다고 하는 것은 향후 많은 검증이 필요할 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 요약하자면 다음과 같다. HBD peptide는 종양 세포 내부로 투과가 가능하다. 즉, HBD peptide는 항종양 약물을 종양 세포 내부로 운반하는 세포 투과성 펩타이드 (CPP)의 역할을 수행할 수 있는 가능성이 있다. 또한, 자체적으로도 HBD peptide는 종양 세포의 apoptosis에 영향을 줄 수 있는 가능성이 있다. 마지막으로, HBD peptide는 heparin 및 VEGF와의 결합 친화성이 있으므로 혈관 신생을 억제함으로써 향후 다양한 연구 방법을 통해 항종양 효과에 기여할 가능성이 있다.

## V. 참고 문헌

1. Fonseca, S. B., et al. (2009). Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(11): 953-964.
2. Vives, E., et al. (2008). Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1786(2): 126-138.
3. Bolhassani, A. (2011). Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1816(2): 232-246.
4. Aroui, S., et al. (2009). Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB 231. *Cancer Lett* 285(1): 28-38.
5. Bragdon, B., et al. (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* 23(4): 609-620.
6. Kawabata, M., et al. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9(1): 49-61.
7. Kim, M. and S. Choe (2011). BMPs and their clinical potentials. *Bmb Reports* 44(10): 619-634.
8. Miljkovic, N. D., G. M. Cooper, et al. (2008). Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 16(10): 1121-1130.
9. Kallioniemi, A. (2012). Bone morphogenetic protein 4—a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genet* 205(6): 267-277.
10. Alarmo, E. L. and A. Kallioniemi (2010). Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumorigenesis? *Endocr Relat Cancer* 17(2): R123-139.
11. Hjertner, O., et al. (2001). Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood* 97(2): 516-522.
12. Lombardo Y, Scopelliti A, Cammareri P, et al. Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice. *Gastroenterology* 2011;140:297-309.
13. Fokas, E., W. G. McKenna, et al. (2012). The impact of tumor microenvironment on cancer treatment and its modulation by direct and indirect anti-vascular strategies. *Cancer Metastasis Rev.*

14. Sitohy, B., J. A. Nagy, et al. (2012). Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target. *Cancer Res* 72(8): 1909–1914.
15. Eng, L., A.K. Azad, et al. (2012). Vascular endothelial growth factor pathway polymorphisms as prognostic and pharmacogenetic factors in cancer: A systematic and meta-analysis. *Clin Cancer Res*; 18(17); 4526–37.
16. Shojaei, F. (2012). Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives. *Cancer Lett* 320(2): 130–137.
17. He, K. F., et al. (2012). The effect of anti-VEGF drugs (bevacizumab and aflibercept) on the survival of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *Oncotargets and Therapy* 5: 59–65.
18. Park, J. W., et al. (2010). High antiangiogenic and low anticoagulant efficacy of orally active low molecular weight heparin derivatives. *J Control Release* 148(3): 317–326.
19. Niers, T. M., C. P. Klerk, et al. (2007). Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol* 61(3): 195–207.
20. Kakkar, A. K. (2004). Low- and ultra-low-molecular-weight heparins. *Best Pract Res Clin Haematol* 17(1): 77–87.
21. Kumar, N., et al. (2005). Structure and biological activity of heparinoid. *Mini Rev Med Chem* 5(5): 441–447.
22. Ori, A., P. Free, et al. (2009). Identification of heparin-binding sites in proteins by selective labeling. *Mol Cell Proteomics* 8(10): 2256–2265.
23. Rider, C. C. (2006). Heparin/heparan sulphate binding in the TGF-beta cytokine superfamily. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 3): 458–460.
24. Park, J. W., O. C. Jeon, et al. (2010). High antiangiogenic and low anticoagulant efficacy of orally active low molecular weight heparin derivatives. *J Control Release* 148(3): 317–326.
25. Krilleke, D., Y. S. Ng, et al. (2009). The heparin-binding domain confers diverse functions of VEGF-A in development and disease: a structure-function study. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 6): 1201–1206.
26. Mahalingam, Y., et al. (2007). Cellular adhesion responses to the heparin-binding (HepII) domain of fibronectin require heparan sulfate with specific properties. *J Biol Chem* 282(5): 3221–3230.
27. Lee, J. Y., et al. (2012). The cell-penetrating peptide domain from human heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) has anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419(4): 597–604.
28. Lee, J. Y., J. E. Choo, et al. (2007). Characterization of the surface immobilized synthetic heparin binding domain derived from human fibroblast

growth factor-2 and its effect on osteoblast differentiation. *J Biomed Mater Res A* 83(4): 970-979.

29. Choi, Y. J., J. Y. Lee, et al. (2010). The identification of a heparin binding domain peptide from bone morphogenetic protein-4 and its role on osteogenesis. *Biomaterials* 31(28): 7226-7238.

30. Hardwick, J. M., Y. B. Chen, et al. (2012). Multipolar functions of BCL-2 proteins link energetics to apoptosis. *Trends Cell Biol* 22(6): 318-328.

31. Garcia-Saez, A. J. (2012). The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ*.

32. Chakraborty, D., K. Bishayee, et al. (2012). [6]-Gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in cancer cells: Drug-DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells. *Eur J Pharmacol*.

33. Stec, E., L. Locco, et al. (2012). A Multiplexed siRNA Screening Strategy to Identify Genes in the PARP Pathway. *J Biomol Screen*.

34. Flores, M. L., et al. (2012). Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. *Breast Cancer Res Treat* 133(3): 917-928.

al trial using research diagnostic criteria for temporo-mandibular disorders-axis II to target clinic cases for a tailored self-care TMD treatment program. *J Orofac Pain* 2002;16:48 - 63.

## Abstract

# The anti-cancer effect of synthetic heparin-binding domain peptide

Lee, Yung-Bin

Department of Dentistry, School of Dentistry  
Seoul National University

### 1. Objectives

Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) is a multifunctional growth factor, which belongs to the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily. Although its major function is bone formation, it has various biological activities such as muscle development, human embryonic development and bone mineralization. Thus, BMP-4 is expected to have high clinical potential for the treatment of various diseases. Recently, some studies demonstrate that BMP-4 has anti-cancer effect on various cancer cells and it is suggested as a possible therapeutic agent for cancers.

In recent study, heparin-binding domain (HBD) peptide from BMP-4 promoted osteogenic differentiation and bone formation. This result suggested that HBD peptide may have another biological activity of



BMP-4 such as anti-cancer effect. In this study, we observe anti-cancer effect of HBD peptide.

## 2. Methods

Heparin binding domain (HBD) peptides were prepared by peptide synthesizer. MDA-MB 231 cells were used to evaluate anti-cancer activity of HBD peptide. Cancer cells were treated with HBD peptide at different concentrations. (NT, 25, 50, 100, 200  $\mu$ M). Then, the cell penetration of HBD peptide was observed by confocal microscopy. The effect of HBD peptide on apoptosis was evaluated by western blot assay. The slot blot assay was used to test binding affinity of HBD peptide to heparin and vascular endothelial growth factor (VEGF).

## 3. Results

The synthetic heparin binding domain (HBD) peptides from BMP-4 were internalized into cancer cells. The HBD peptide increased the cleaved Caspase-3 and cleaved PARP level but decreased Bcl-xL level. These result suggest that HBD peptide may regulate the apoptosis of cancer cells. Finally, the binding of heparin and VEGF to HBD peptide increased in a concentration-dependent manner. These results revealed that HBD peptide has a binding affinity to heparin and VEGF. this results suggest that HBD peptide may affect the growth of cancer cells.

---

**keywords : Heparin binding domain (HBD) peptide, Bone morphogenetic protien-4 (BMP-4), Vascular endothelial growth factor (VEGF), anti-cancer effect, apoptosis**

***Student Number : 2009-22704***