

Bisphosphonate가 조골세포 분화에 미치는 영향

이인순 · 김현정 · 류현모* · 김영진 · 남순현

경북대학교 치과대학 소아치과학교실, 구강생화학교실*

국문초록

본 실험은 bisphosphonate가 조골세포 분화 및 파골세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, etidronate와 alendronate를 조골세포에 투여하여 조골세포 전사인자인 Cbfa1, 조골세포 표지인자의 발현, 석회화된 골결절 형성을 평가하였다.

Bisphosphonate가 조골세포의 석회화된 골결절 형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 배양액에 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M의 etidronate 및 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M의 alendronate를 첨가하였으며, 배양 15일 후에 alizarin red로 염색하여 관찰하였다. 또 조골세포의 분화에 미치는 bisphosphonate의 영향을 평가하고자 백서 두개관에서 얻은 조골세포에 etidronate 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M 및 alendronate 10^{-6} M을 투여하고 배양 8일 후 총RNA를 수집하였고, 전기영동 및 Northern blot hybridization하여 Cbfa1, alkaline phosphatase, type I collagen, osteopontin, osteocalcin의 발현을 조사하였다.

이상의 실험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Etidronate는 농도 의존적으로 골결절 석회화를 억제하였으나, alendronate는 골석회화를 억제하지 않았다.
2. Etidronate는 Cbfa1의 발현을 농도 의존적으로 억제하였으나, alendronate는 오히려 촉진하였다.
3. Etidronate는 type I collagen, osteocalcin 및 osteopontin의 발현을 농도 의존적으로 억제하였으나, alendronate는 오히려 증가시켰다.
4. Alkaline phosphatase의 발현은 사용된 etidronate와 alendronate에 의해 영향 받지 않았다.

이상의 결과에서 etidronate는 조골세포의 전사인자인 Cbfa1의 발현을 억제하며, 이에 의하여 조골세포의 분화표지인자인 type I collagen, osteopontin 및 osteocalcin의 합성이 억제되고, 결과적으로 석회화된 골결절의 형성을 억제하는 것으로 사료된다.

주요어 : bisphosphonate, 조골세포, Cbfa1, Type I 교원질, alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, 석회화된 골결절

I. 서 론

골조직은 항상 골흡수와 골형성의 과정을 통해 개조가 일어나며, 건강한 인간에서는 성장기를 제외하고 골흡수와 골형성 양이 조화를 이루어 항상 일정한 골량을 유지한다. 그러나 골대사성 질환 및 중년에 의한 골파괴와, 노령화 또는 폐경기 이후에 흔히 나타나는 골다공증 등에 의해 유발되는 골량감소를 방지하기 위해 골흡수, 골형성 또는 양자를 조절할 필요성이 대두되었다.

파골세포에 의해 발생하는 골흡수를 억제하고자 개발된 bisphosphonate는 화학적으로 inorganic pyrophosphate와 유사한 약제로서, 열 및 화학제에 안정성이 있으며, 효소에 의해

파괴되지 않고, hydroxyapatite와 친화성이 높으며 특히 신생골 형성이 되는 부위에 많이 침착된다^{1,2)}.

Bisphosphonate에 의한 골흡수 억제기전은 정확히 알려져 있지 않으나, 파골세포의 전구세포에 직접 또는 간접적으로 작용하여 성숙한 파골세포의 형성을 억제시키거나, 파골세포의 apoptosis를 유도 또는 파골세포의 효소작용 및 대사 억제, 형태변화, 독작용 등에 의해 골흡수를 억제하는 것으로 알려져 있다³⁻¹⁷⁾.

그러나 bisphosphonate는 이와같은 파골세포에 대한 직접적인 작용뿐만 아니라, 또한 조골세포에도 영향을 미칠 수 있는데, bisphosphonate가 조골세포에 미치는 영향에 대하여 Tenenbaum 등¹⁸⁾은 HEBP (bisphosphonate ethane-1-hy-

droy-1, 1-diphosphate)는 가역적으로 골석회화를 억제하지만, APD (disodium -1-hydroxy- 1-aminopropylidene)는 저용량에서 골의 석회화를 촉진시킨다고 하여, bisphosphonate가 조골세포의 골결절 석회화에 직접적인 영향을 미친다고 하였다. 또 Sahni 등¹⁹⁾, Nishikawa 등²⁰⁾은 bisphosphonate가 조골세포에 대한 작용을 통하여 파골세포에 영향을 미친다고 하여, bisphosphonate에 의한 골흡수 억제작용에 조골세포가 중요한 역할을 한다고 하였다.

이와같이 bisphosphonate는 파골세포에 직접 작용할 뿐 아니라 조골세포에도 영향을 미칠것으로 생각되지만, 지금까지의 대부분의 bisphosphonate에 관한 연구는 파골세포에 미치는 영향에 관한 것이었고, 조골세포에 미치는 영향에 관한 연구는 희소하다.

이에 본 연구는 백서태자 두개관에서 얻은 조골세포를 대상으로 bisphosphonate가 조골세포 분화표시인자 발현, 골결절 형성에 미치는 영향을 관찰하여 bisphosphonate의 작용기전을 규명하여 보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 실험방법

1. 재 료

배양액은 α -MEM을 사용하였고, fetal bovine serum (이하 FBS, Gibco사, 미국) 및 항생제로 streptomycin (동아제약, 한국) penicillin (근화제약, 한국)을 첨가 하였다. RNA를 분리하기 위해 TRI reagent (Molecular research center, 미국)를 구입하였으며, bisphosphonate 약제로서 etidronate disodium (초당약품, 한국)와 alendronate(유유제약, 한국)를 사용하였다. Trypsin, alizarin red, ascorbic acid, Na- β -glycerophosphate, dexamethasone은 Sigma사 제품을, 기타 시약은 시판되는 일급 시약들을 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

백서 두개관으로 부터의 조골세포 분리는 김 등²¹⁾의 방법으로 시행하였다. Bisphosphonate가 골결절 형성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 12 well 세포배양접시(Corning사, 미국)에 각 well당 1×10^5 의 세포를 접종하여, 배양액으로 10% FBS 및 100U/ml penicillin, 100g/ml streptomycin, 10^{-8} M dexamethasone, 10mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid가 포함된 배양액(이하 표준배양액)을 사용하고, etidronate를 각 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M 및 alendronate를 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M이 되게 각각 첨가하여 배양하였다. 매 3일마다 배양액을 교환하였으며, 배양 15일 후 alizarin red staining하여 광화된 골결절 형성을 관찰하였다.

조골세포의 표지인자인 Collagen type I (Col-I), alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OP), osteocalcin (OC)

및 전사인자인 Cbfa1 (core binding factor a1)의 발현은 Lee 등²²⁾의 방법으로 관찰하였다. 약술하면, 100mm 배양접시에 1×10^6 cells를 접종한 후, 매 3일 간격으로 배양액을 교환하였으며 배양액 교환시에 etidronate를 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M 및 alendronate를 10^{-6} M 농도가 되게 첨가하였으며, 약제를 첨가하지 않은군을 대조군으로 하였다. 배양 8일 후에 세포를 TRI Reagent kit을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 총 RNA를 10 μ g/well씩 사용하여 formaldehyde agarose gel 전기영동을 통법에 따라 시행하였고, nylon membrane으로 transfer하여 ExpressHyb™용액 (Clontech사, 미국)에서 hybridization 하였다. 사용된 probe는 Megaprime DNA labelling system (Amersham사, 미국)를 이용하여 ³²PdCTP를 부착하였다. Hybridization 후 nylon membrane은 Whatmen 3MM 종이위에서 건조시켜 랩으로 싨 후 intensifying screen이 있는 X-ray film cassette에 넣고 암실에서 X-omat film을 얹어 -70 °C에서 24시간 동안 노출시킨 후 현상 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 골결절 형성에 미치는 영향

Bisphosphonate가 골결절 형성 및 골결절 석회화에 미치는 영향을 관찰한 결과, bisphosphonate의 투여에 관계없이 모든 군에서 골결절 형성이 관찰되었고, 골결절의 석회화는 배양 7일부터 관찰되었다. 배양 15일 후 석회화된 골결절을 관찰하기 위하여 alizarin staining한 결과, etidronate를 10^{-6} M 투여한 경우 석회화된 골결절이 대조군에 비해 감소되었으며, 10^{-5} , 10^{-4} M에서는 석회화된 골결절이 관찰되지 않아 etidronate는 골결절 석회화를 억제하는 것으로 나타났으나, alendronate는 모든 농도에서 골결절의 석회화를 억제하지 않았다 (Fig. 1).

2. Cbfa1, type I collagen, alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin의 발현

Etidronate는 골전사 인자인 Cbfa1의 발현을 대조군에 비하여 농도 의존적으로 억제하였으나, 10^{-6} M의 alendronate를 투여한 경우 대조군에 비하여 오히려 발현이 증가 되었다 (Fig. 2). 또 etidronate는 type I collagen, osteocalcin 및 osteopontin의 발현을 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제시켰으나, alendronate는 오히려 증가시켰다. 그러나 alkaline phosphatase의 발현은 사용된 etidronate와 alendronate의 투여에 영향받지 않았으며, 대조군과 유사한 발현을 나타내었다 (Fig. 3).

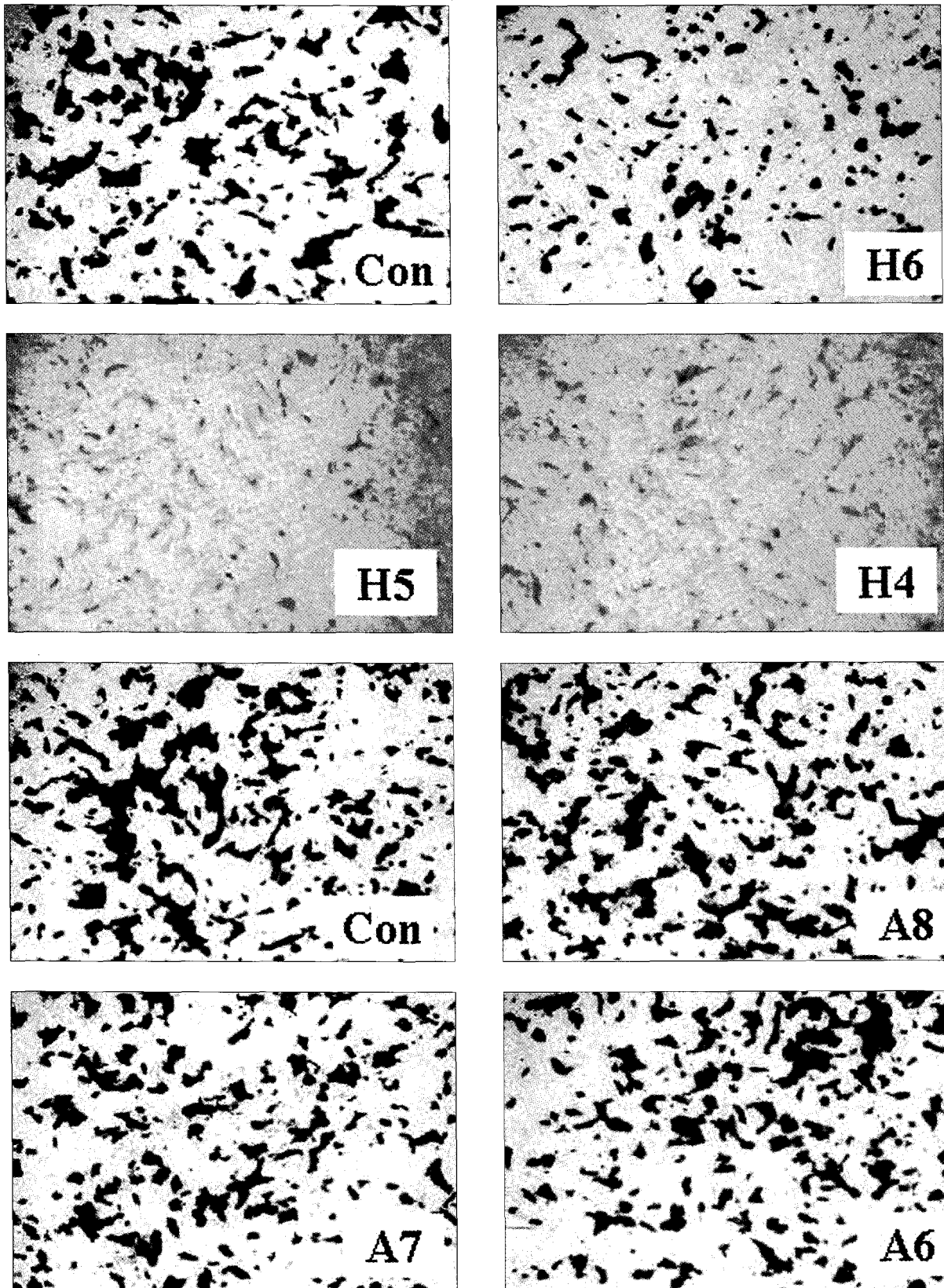


Fig. 1. Effect of bisphosphonate on calcified nodule formation in mouse calvaria osteoblast cell culture. Osteoblast cell were cultured for 15 days in the presence of 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M etidronate and 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-9} M of alendronate and then alizarin red staining was done. No calcified nodule was seen in H5, H4 group, but note the presence of unmineralized bone nodules.
 (Con : Control, H6 : 10^{-6} M of etidronate, H5 : 10^{-5} M of etidronate, H4 : 10^{-4} M of etidronate, A8 : 10^{-8} M of alendronate, A7 : 10^{-7} M of alendronate, A6 : 10^{-9} M of alendronate)

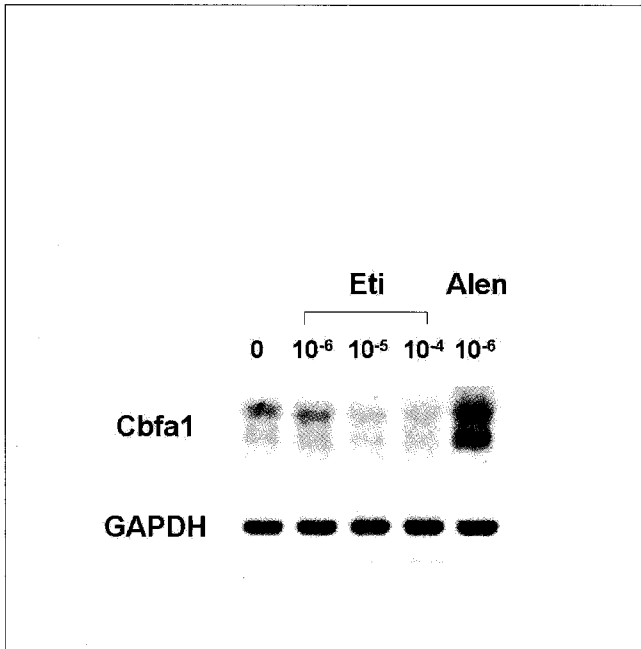


Fig. 2. Effect of bisphosphonate on Cbfa1 expression in mouse calvaria osteoblast cell culture. Osteoblast cell were cultured for 8 days in the presence of 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M etidronate and 10^{-6} M alendronate. Northern hybridization was conducted as described in Material and Methods. (Eti : etidronate, Alen : alendronate)

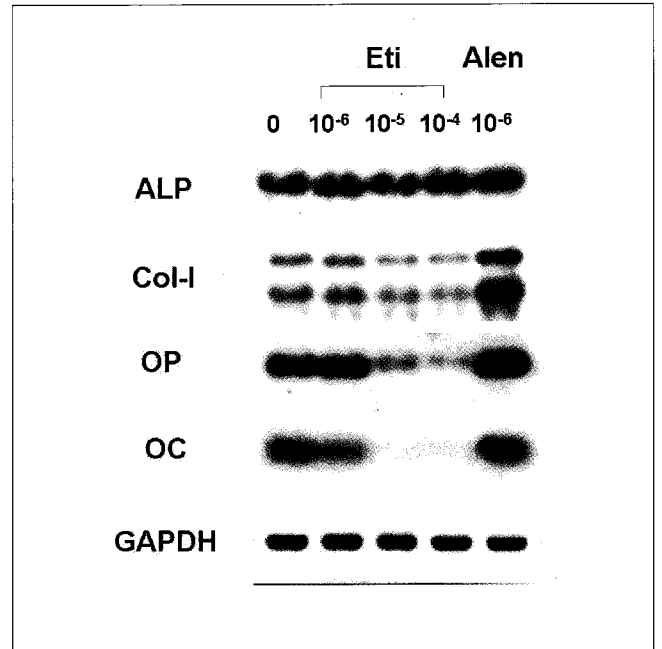


Fig. 3. Effect of bisphosphonate on type I collagen, alkaline phosphatase, osteopontin and osteocalcin expression in mouse calvaria osteoblast cell culture. (ALP : alkaline phosphatase, Col-I : type I collagen, OP : osteopontin, OC : osteocalcin, Eti : etidronate, Alen : alendronate)

IV. 고 찰

골개조에 영향을 줄 수 있는 약제의 하나로서 1968년 Fleisch 등²³⁾에 의해 소개된 bisphosphonate는 파골세포에 의한 골흡수를 억제하는 작용이 있으며, 지속적인 개발에 의해 더욱 강력한 효과를 가진 제제가 소개되고 있다. 현재 이들 약제는 골대사성 골파괴 질환인 Paget's disease²⁴⁾, 악성 종양에 의한 hypercalcemia²⁵⁾, 부갑상선기능항진증²⁶⁾, 골다공증²⁷⁾ 등의 치료에 사용되고 있으며, 치과분야에서도 치주질환에 의한 치조골 흡수억제²⁸⁾와 교정치료시 고정원으로 사용되는 치아의 이동방지 및 교정후 재발방지^{29,30)} 등 임상적 적용 가능성에 대한 연구가 되고 있다.

Bisphosphonate에 의해 나타나는 골흡수 억제효과에 관한 기전은 여러 가지로 추정되고 있는데, Hughes 등^{3,4)}, Cocchini와 Fleisch⁵⁾, Nishikawa 등²⁰⁾은 조혈전구세포(hematopoietic precursors)로부터 파골세포로의 분화를 억제하기 때문이라 하였고, Flanagan과 Chambers⁶⁾, Carano 등⁷⁾, Sato와 Grasser⁸⁾, Sato 등⁹⁾은 성숙한 파골세포의 활성을 억제하여 골흡수를 억제한다고 하였다. 또 Hughes 등¹¹⁾, Selander 등³¹⁾은 파골세포의 apoptosis를 유도하기 때문이라 하였고, Endo 등³²⁾, Murakami 등³³⁾은 bisphosphonate는 파골세포에서 PTP (protein tyrosine phosphatase)를 억제함으로써 골흡수 작용을 억제한다고 하였다. 또한 Luckman 등^{15,16)}, Beek 등¹⁷⁾은 질소기를 가진 bisphosphonate는 파골세포의 mevalonate pathway 과정에서 geranylgeranyl pyrophosphate의 합성

을 저해하므로서 파골세포의 기능억제 및 apoptosis를 유도하지만, 질소기가 없는 bisphosphonate는 geranylgeranyl pyrophosphate 합성에 영향이 없어 bisphosphonate 간에도 작용 기전이 다를 수 있음을 시사하였다. 이 외에도 파골세포에서 lactic acid 생산의 감소³⁴⁾, proton의 축적을 감소시키며³⁵⁾, lysosomal enzyme의 활성억제³⁶⁾ 등을 초래한다는 보고도 있다.

그러나 bisphosphonate에 의한 골흡수 억제효과는, 이들 약제가 파골세포에 직접 영향을 주어 나타나기도 하지만, 반면 조골세포에 대한 작용을 통하여 파골세포에 간접적으로 작용하여 나타난다는 보고도 있다.

조골세포에 대한 작용을 통해 파골세포에 영향을 미친다는 연구로서 Sahni 등¹⁹⁾은 골흡수를 억제하는 bisphosphonate의 효과는 파골세포를 직접 억제하기 보다는 조골세포에 대한 영향으로 인하여 간접적으로 나타나는 효과라고 하였으며, Nishikawa 등²⁰⁾은 YM 175가 조골세포에 작용하여 파골세포 형성의 후반기에 장애를 초래한다고 하였다. 또 Vitte 등³⁷⁾은 조골세포로부터 osteoclast inhibitory factor의 합성을 자극함으로써 골흡수를 억제한다고 하였다.

또 bisphosphonate는 조골세포 자체의 분화 및 기능에도 영향을 줄 수 있는 바, Schenk 등³⁸⁾은 쥐에 HEBP를 장기간 투여시 골조직의 골석회화를 억제한다고 하였고, Tenenbaum 등²⁸⁾은 HEBP는 가역적으로 골석회화를 억제한 반면 APD는 저용량에서 골석회화를 촉진할 수 있다고 하였으며, Khokher와 Dandona³⁹⁾은 diphosphonate는 조골세포를 직접적으로 억제하여 alkaline phosphatase 발현 및 세포분열을 억제한다고 하였다.

이와 같은 bisphosphonate의 골흡수 억제작용 기전을 밝히기 위하여 많은 선학의 연구가 있었으나, 지금까지의 bisphosphonate의 작용에 관한 대부분의 연구는 파골세포에 관한 연구이었고, 조골세포에 미치는 작용에 대한 연구는 희소할 뿐만 아니라 분자생물학적인 관점에서의 기전연구는 되지 않았다. 이에 본 실험에서는 bisphosphonate 구조내에 질소의 포함 유무에 따라 작용기전이 다를 수 있음을 시사한 Luckman 등^{15,16)}, Beek 등¹⁷⁾의 연구를 참조하여 질소가 없는 etidronate와 질소기를 가진 alendronate를 사용하였으며, 이들이 조골세포의 분화에 미치는 영향을 골분화 표지인자의 발현과 석회화된 골결절을 통하여 평가하고자 하였다.

골결절 형성 및 골석회화에 미치는 영향을 관찰하기 위한 실험에서, 전체 배양기간동안 대조군, etidronate, alendronate 투여군 사이에 세포 형태학적 차이를 발견할 수 없었으며 투여 농도에 따른 비정상적 세포형태도 관찰되지 않아, 본 실험에 사용된 농도의 bisphosphonate는 세포의 독성이 크지 않았다고 사료된다.

조골세포 배양 7일 후 모든 군에서 골결절 형성이 관찰되었으며, etidronate 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M과 alendronate 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M을 계속적으로 첨가한 결과, etidronate 투여군의 석회화된 골결절 형성은 농도 의존적으로 억제되었으나, 이와 대조적으로 alendronate는 투여농도에 관계없이 석회화된 골결절 형성 억제효과가 나타나지 않았다. 이것은 쥐에 etidronate를 투여한 경우 치조골의 골량은 증가되었으나 석회화가 되지 않은 유골형태로 존재한다는 Wesselink와 Beersten⁴⁰⁾의 보고와, etidronate는 골석회화를 억제할 수 있다는 Tenenbaum 등¹⁸⁾ Schenk 등³⁹⁾의 보고와 일치한 결과이었다. 본 실험의 이러한 결과는 etidronate는 농도 의존적으로 Cbfa1의 발현을 억제하며, 이에 따라 석회화와 관련된 osteopontin 및 osteocalcin도 억제되어 골결절 형성이 억제된 것으로 생각된다. 그러나 etidronate와 alendronate에서 골결절 석회화에 미치는 영향이 다르게 나타난 바, 이는 bisphosphonate의 구성성분에 따라 조골세포에 미치는 영향이 다르다고 생각되며, 향후 정확한 기전이 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

조골세포는 pluri-potent mesenchymal stem cell에서 분화되며, 이 과정에는 조골세포의 분화인자인 Cbfa1이 관련된다. Cbfa1 (core binding factor a1)은 조골세포 분화와 골형성에 있어 필수적인 전사인자로서 runt domain gene family에 속하며, 이들은 골세포의 분화를 촉진시키고 type I collagen, osteonectin, osteopontin, osteocalcin 합성을 조절한다⁴¹⁾. Cbfa1에 관하여 Ducy 등⁴²⁾은 초기 골격 발육단계의 mesenchymal condensation이 시작될 때 발현되기 시작하며, 이들은 조골세포계통의 세포에만 한정되어 발현되고, BMP7, Vit D3에 의해 발현이 조절 받는다고 하였다. Komori 등⁴³⁾은 Cbfa1의 유전자를 homozygous mutation시킨 쥐에서는 조골세포 분화가 유도되지 않으며, endochondral bone 과 intramembranous bone 모두에서 골화가 결손 된다고 하였고, Otto 등⁴⁴⁾, Mundlos 등⁴⁵⁾은 Cbfa1을 발현하는 유전자의 mu-

tation이 cleidocranial dysplasia (CCD)의 원인이라고 하였다. 또한 Cbfa1은 조골세포의 분화 및 기능뿐만 아니라, 조골세포의 ODF/OPGL 발현조절을 통하여 파골세포의 분화에 관계될 수도 있음이 보고되고 있다⁴⁶⁾.

Bisphosphonate가 골분화 전사인자인 Cbfa1에 미치는 영향을 관찰한 결과 etidronate는 대조군에 비해 농도 의존적으로 Cbfa1의 발현을 억제하였으나, 10^{-6} M alendronate는 대조군에 비하여 오히려 이들의 발현을 증가시켰다. Cbfa1은 조골세포 분화와 osteonectin, osteocalcin의 발현, 기타 OPG/OPGL의 발현을 조절할 수 있다는 점을 고려할 때, bisphosphonate가 조골세포에 작용하는 중요 작용인자는 Cbfa1이라고 생각되며, etidronate와는 달리 alendronate에서 증가된 Cbfa1의 발현 증가는 골결절의 석회화를 촉진시킬 것으로 생각된다.

조골세포를 배양시 나타나는 조골세포 분화 표지인자들은 세포의 증식 및 분화의 정도에 따라 달리 발현되며, 일반적으로 증식기, 기질 성숙기, 석회화단계의 3단계 과정을 거쳐 골을 형성한다. 증식기 초기에는 세포의 주기와 세포성장과 관련되는 H4 gene, 세포의 기질 형성과 관련된 fibronectin, type I collagen 합성이 최대로 합성되며, 이들은 기질성숙기 단계에서 현저히 감소된다. Alkaline phosphatase (ALP) 활성은 기질성숙기에서 나타나기 시작하여 기질 성숙기 후반기에서 최대로 발현되지만, osteocalcin은 기질 성숙기 후반기부터 나타나며 석회화 단계에서 최대로 발현된다. 그러나 osteopontin은 세포 증식기 초기에서 다소 발현되다가 기질 성숙기에서는 발현되지 않으며, 그 후 석회화 단계에서 현저하게 높게 나타나는 특이한 발현 양상을 나타낸다⁴⁷⁾.

이와 같이 조골세포의 분화정도에 따라 각기 달리 발현되는 조골세포 표지단백에 대해 살펴보면, 골조직에서는 type I 교원질이 90% 이상을 차지하며, 골세포 증식동안 높은 수준으로 발현된다. 이것은 일정한 배열을 가진 석회화 물질이 침착될 수 있는 공간이 증가되어 골결절 형성을 증가시킬 수 있을 뿐 아니라 osteocalcin합성을 증가시켜 골결절의 석회화를 촉진시키는 역할을 한다^{1,2)}. 또한 조골세포에 의해 합성되는 교원질의 양은 세포증식의 down-regulation에 관여하며, 조골세포로의 완전 분화를 유도한다^{47,48)}.

골조직중에 많이 존재하는 ALP는 tissue-nonspecific ALP (TNSALP)로서 골조직의 석회화와 관계된다. 이들은 phosphate ester를 가수분해하며, 인산의 대사를 조절하고, phosphoryl metabolites의 수준을 일정하게 유지시키며, phosphoprotein phosphatase의 역할을 한다. 이들은 골석회화 과정에 있어 hydroxyapatite의 성장을 저해하는 고농도의 inorganic pyrophosphate(PPI)가 존재시 PPI-ase역할을 수행하기도 하며, 인산의 plasma membrane transport역할 또는 extracellular Ca-binding protein의 역할을 수행하여 osteoid 내로 calcium phosphate의 침착을 돕는다^{1,49)}.

Osteopontin은 44 kDa bone sialoprotein으로서 주로 조골세포, 연골세포, 치주인대세포 및 치은섬유세포에 의해 합성

되며, 약 317개의 아미노산으로 구성된 사슬로 구성되어 있고, glycosylation을 위한 13 sites가 있다. 이들은 잠재적으로 석회화 물질과 결합되는 능력이 있으며, 세포 배양시 osteopontin을 첨가하면 세포부착과 치은섬유의 전개를 증가시킨다. Osteopontin의 발현은 Vit D3, TGF- 등에 의해 증가되며^{1,2)}. 조골세포 배양시 석회화 단계에서 최대로 나타나고, 세포 증식 기동안은 석회화단계의 약 25% 수준으로 발현되지만, 기질 성숙기에서는 나타나지 않는다^{47,49)}. 또 osteocalcin은 골분화의 후반기에 발현되는 단백질로 hydroxyapatite, Ca⁺²와 결합하여 골조직의 석회화를 유도한다¹⁾.

본 실험에서 type I collagen의 유전자 발현은 전반적으로 미약하게 발현되었는데, 이는 RNA 수거시기가 세포배양 8일 후로서 기질석회화 시기로 전환되는 시점이기 때문이라고 사료된다. Type I collagen의 발현은 대조군에 비하여 etidronate를 투여한 경우 농도 의존적으로 미약한 감소경향을 나타내었으나, alendronate를 투여한 경우 대조군에 비하여 그 발현이 증가되었다. 또한 osteopontin과 osteocalcin의 발현도 거의 유사한 양상으로서, 대조군에 비하여 etidronate를 투여하였을 때 심하게 감소되는 경향을 나타내었으며, 특히 10⁻⁶ M 투여한 경우에 비해 10⁻⁴, 10⁻⁵ M 투여하였을 시에는 더욱 현저하게 감소하였다. 이러한 발현 양상은 Cbfa1의 발현양상과 유사한 양상이었으며, 이로서 Cbfa1은 type I collagen과 osteopontin, osteocalcin의 발현을 조절할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었고, etidronate를 투여시 Cbfa1의 발현을 감소시킴으로서 osteopontin과 osteocalcin의 발현이 억제되고 결국 골결절의 석회화를 억제한다고 사료된다. 그러나 alkaline phosphatase는 특이하게도 bisphosphonate의 투여에 의해 그 발현에 변화가 나타나지 않았다. 이러한 현상에 대해 Wang 등⁵⁰⁾은 alkaline phosphatase는 osteocalcin, osteopontin과는 달리 다른 인자에 의해 조절을 받을 것이라 보고한 바 있고, Miyama등⁵¹⁾은 Dlx5가 alkaline phosphatase의 발현을 증가시켰다고 보고한 것을 참조할 때, alkaline phosphatase의 발현은 Type I collagen, osteopontin, osteocalcin의 발현과는 달리 Cbfa1에 의해서 조절받지 않고 다른 인자에 의해 조절 받기 때문으로 생각된다.

이상의 실험에서 etidronate는 이는 골전사인자 Cbfa1의 발현을 억제시켜 조골세포의 분화를 억제하며, 이에 따라 성숙한 골세포에서 합성되는 조골세포 분화 표지인자인 type I collagen, osteopontin, osteocalcin의 발현이 억제되고, 결국 석회화된 골결절의 수를 감소시킨 것으로 사료된다. 그러나 alendronate는 오히려 조골세포의 Cbfa1 및 골단백 표지인자의 발현을 촉진시킬 뿐 아니라 석회화된 골결절의 형성을 저해하지 않았는데, 이러한 결과는 etidronate와 alendronate는 서로 다른 기전으로 작용하여 골흡수를 억제할 수 있다는 것을 시사한다. 그러나 조골세포의 분화에 미치는 영향을 좀 더 확인하기 위해서는, 향후 다양한 약제 및 농도의 적용에 따른 분화 표지인자의 발현등이 더 연구되었으면 좋을 것으로 사료된다.

V. 요약

임상에서 골흡수를 억제시킬 목적으로 사용되는 bisphosphonate의 작용기전은, 이들 약제가 파골세포에 직접 작용하거나 또는 조골세포에 대한 작용을 통하여 파골세포에 영향을 주기 때문에 나타나는 것으로 알려져 있다.

이에 본 실험은 bisphosphonate가 조골세포 분화 및 파골세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, etidronate와 alendronate를 조골세포에 투여하여 조골세포 전사인자인 Cbfa1, 조골세포 표지인자의 발현, 석회화된 골결절 형성을 평가하였다.

Bisphosphonate가 조골세포의 석회화된 골결절 형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 배양액에 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M의 etidronate 및 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁶ M의 alendronate를 첨가하였으며, 배양 15일 후에 alizarin red로 염색하여 관찰하였다. 또 조골세포의 분화에 미치는 bisphosphonate의 영향을 평가하고자 백서 두개관에서 얻은 조골세포에 etidronate 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M 및 alendronate 10⁻⁶ M을 투여하고 배양 8일 후 총 RNA를 수집하였고, 전기영동 및 Northern blot hybridization하여 Cbfa1, alkaline phosphatase, type I collagen, osteopontin, osteocalcin의 발현을 조사하였다.

이상의 실험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Etidronate는 농도 의존적으로 골결절 석회화를 억제하였으나, alendronate는 골석회화를 억제하지 않았다.
2. Etidronate는 Cbfa1의 발현을 농도 의존적으로 억제하였으나, alendronate는 오히려 촉진하였다.
3. Etidronate는 type I collagen, osteocalcin 및 osteopontin의 발현을 농도 의존적으로 억제하였으나, alendronate는 오히려 증가시켰다.
4. Alkaline phosphatase의 발현은 사용된 etidronate와 alendronate에 의해 영향 받지 않았다.

이상의 결과에서 etidronate는 조골세포의 전사인자인 Cbfa1의 발현을 억제하며, 이에 의하여 조골세포의 분화표지인자인 type I collagen, osteopontin 및 osteocalcin의 합성이 억제되고, 결과적으로 석회화된 골결절의 형성을 억제하는 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Mundy GR, Martin TJ : Physiology and Pharmacology of bone, 1st ed, Springer-Verlag, New York, pp 397-418, 1993.
2. Belezikian JP, Raisz LG, Rodan GA : Principles of bone biology . 1st ed, Academic press, California, pp:1037-1052, 1996.
3. Hughes DW, MacDonald BR, Russel RGG et al. : Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonate in long-term cultures of human bone marrow, J Clin Invest, 83: 1930-1935, 1989.

4. Hughes DE, Wright KR, Sasake A et al.: Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo, *J Bone Miner Res.* 10:1478-1487, 1995.
5. Cocchini MG, Fleisch H : Bisphosphonate in vitro specifically inhibit, among the hematopoietic series, the development of the mouse mononuclear phagocyte lineage, *J Bone Miner Res.* 5:1019-1027, 1990.
6. Flanagan AM, Chambers TJ : Dichloromethylene-bisphosphonate (Cl₂MBP) inhibits bone resorption through injury to osteoclasts that resorb Cl₂MBP coated bone, *Bone Miner.* 6:33-43, 1989.
7. Carano A, Teitelbaum SA, Konsek JD et al. : Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro, *J Clin Invest.* 85: 456-461, 1990.
8. Sato M, Grasser W : Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy, *J Bone Miner Res.* 5:31-40, 1990.
9. Sato M, Grasser G, Endo N et al. : Bisphosphonate action . Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure, *J Clin Invest.* 88 : 2095-2105, 1991.
10. Vitte C, Fleisch H, Guenther HL : Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption, *Endocrinology.* 137 : 2324-2333, 1996.
11. Hughes DE, Wright KR, Uy HL et al. : Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo, *J Bone Miner Res.* 10:1478-1487, 1995.
12. Selander KS, Monkkonen J, Karhukorpi EK et al. : Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages, *Mol Pharmacol.* 50: 1227-1138, 1996.
13. Murakami H, Takahashi N, Tanaka S et al. : Tiludronate inhibits protein tyrosine phosphatase activity in osteoclasts, *Bone.* 20 : 399-404, 1997.
14. Endo N, Rutledge SJ, Opas EE et al. : Human protein tyrosine phosphatase : alternative splicing and inhibition by bisphosphonate, *J Bone Miner Res.* 11: 535-543, 1996.
15. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, et al. : Nitrogen containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras, *J Bone Miner Res.* 13:581-589, 1998.
16. Lukeman SP, Coxon FP, Ebetino FH et al. : Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by prevent protein prenylation : evidence form structure-activity relationships in J774 macrophages, *J Bone Miner Res.* 13:1668-1678, 1998.
17. Beek EV, Lowik C, Pluum GV et al. : The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro : a clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates, *J Bone Miner Res.* 14 : 722-729, 1999.
18. Tenenbaum HC, Torontali M, Sukhu : Effect of Bisphosphonates and Inorganic Pyrophosphate on osteogenesis in vitro, *Bone.* 13:249-255, 1992.
19. Sahni M, Grunther HL, Fleisch H et al.: Bisphosphonates act on Rat bone resorption through the mediation of osteoblasts, *J Clin Invest.* 91: 2004-2011, 1993.
20. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y et al.: Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures, *Bone.* 18:9-14, 1996.
21. 김시형, 남순현, 신흥인 : 백서태자 두 개관에서 유래된 조골세포의 증식 및 골결절 형성양상. *대한소아치과학회지* 24:1-17, 1997.
22. 이미혜, 최제용, 류현모 : Dlx-5의 과발현에 의한 osteocalcin 발현의 억제 대한골대사학회지, 5 : 1-10, 1998.
23. Fleisch H, Russel RGG, Bisaz S et al. : The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate in vitro and in vivo, *Calcif Tissue Res, Supple* 2: 10-10A, 1968.
24. Audran M, Clochon P, Etghen D et al. : Treatment of Paget's disease of bone with (4-chlorophenyl)thiomethylene bisphosphonate, *Clin Rheumatol.* 8: 71-79, 1989.
25. Adami S, Bolzicco GP, Rizzo A et al.: The use dichloromethylene bisphosphonate and aminobutane bisphosphonate in hypercalcemia of malignancy, *Bone Miner.* 2 : 395-404, 1987.
26. Schmidli RS, Wilson I, Espiner EA et al.: Amino-propylidene bisphosphonate (APD) in mild primary hyperparathyroidism : effect on clinical status, *Clin. Endocrinol.*, 32:293-300, 1990.
27. Passeri M, Baroni MC, Pedrazzoni M et al. : Intermittent treatment with intravenous 4-amino-1-hydroxybutylidene-1, 1-bisphosphonate (AHBuBP) in the therapy of postmenopausal osteoporosis, *Bone Miner.* 15 :237-248, 1991.
28. Shoji K, Horiuch H, Shinoda, H. : Inhibitory effects

- of a bisphosphonate (residronate) on experimental periodontitis in rats, *J Periodontol Res*, 30:277-284, 1995.
29. Adachi H, Igarashi K, Mitani H et al. : Effects of topical administration of a bisphosphonate (rise-dronate) on orthodontic tooth movements in rats, *J Dent Res*, 73: 1478-1484, 1994.
 30. Igarashi K, Mitani H, Adachi H et al. : Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats, *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 106: 279-289, 1994.
 31. Selander KS, Monkkonen J, Karhukorpi EK et al. : Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages, *Mol Pharmacol*, 50: 1227-1138, 1996.
 32. Endo N, Rutledge SJ, Opas EE et al. : Human protein tyrosine phosphatase -a : alternative splicing and inhibition by bisphosphonate, *J Bone Miner Res*, 11: 535-543, 1996.
 33. Murakami H, Takahashi N, Tanaka S et al. : Tiludronate inhibits protein tyrosine phosphatase activity in osteoclasts, *Bone*, 20:399-404, 1997.
 34. Morgan DB, Monod A, Russel RG et al. : Influence of dichloromethylene diphosphonate (Cl2MDP) and calcitonin on bone resorption, lactate production and phosphatase and pyrophosphatase content of mouse calvaria treated with parathyroid hormone in vitro, *Calcif Tissue Res*, 13 : 287-294, 1973.
 35. Carano A, Teitelbaum SL, Konsek JD et al. : Bisphosphonate directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro, *J Clin Invest*, 85 : 456-461, 1990.
 36. Goziotis A, Sukhu B, Torontali M et al. : Effects of bisphosphonates APD and HEBP on bone metabolism in vitro, *Bone*, 16:371s-327s, 1995.
 37. Vitte C, Fleisch H, Guenther HL : Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption *Endocrinology* 137:2324-2333, 1996.
 38. Schenk R, Merz WA, Muhlbauer R et al. : Effect of ethane-1-hydroxy-1,1- diphosphonate(EHDP) and dichloromethylene bisphosphonate (Cl2MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysics of rat, *Calcif Tissue Res*, 11:196-214, 1973.
 39. Khokher MA, Dandona P: Diphosphonate inhibit human osteoblast secretion and proliferation, *Metabolism*, 38:184-187, 1989.
 40. Wesselink PR, Beertsen W : Ankylosis of the mouse molar after systemic administration of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP), *J Clin Periodontol*, 21:465-471, 1994.
 41. Rodan GA, Harada SI : The missing bone, *Cell* 89:677-680, 1997.
 42. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V et al. : *Osf2/Cbfa* : A transcriptional activator of osteoblast differentiation, *Cell*, 89:747-754, 1997.
 43. Komori T, Yagi H, Nomura S et al. : Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts, *Cell*, 89:755-764, 1997.
 44. Otto F, Thornell AP, Crompton, T et al. : *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development, *Cell*, 89:765-771, 1997.
 45. Mundlos S, Otto F, Mundlos C et al. : Mutations involving the transcription factor *Cbfa1* cause cleidocranial dysplasia, *Cell*, 89:773-779, 1997.
 46. Gao YH, Shinii T, Yuasa T et al. : Potential role of *Cbfa1*, and essential transcriptional factor for osteoblast differentiation in osteoclastogenesis : regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF), *Biochem Biophysic Res Communi*, 252: 697-702, 1998.
 47. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V et al. : Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro : Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix, *J Cell Physiol*, 143:420-430, 1990.
 48. Lian JB, Stein GS : Concepts of osteoblast growth and differentiation : basis for modulation of bone cell development and tissue formation, *Crit Rev Oral Biol Med*, 3:269-305, 1992.
 49. deBernard B, Bianco P, Bonucci E et al. : Biochemical and immunohistochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a Ca^{+2} -binding glycoprotein, *J Cell Biol*, 103:1615-1623, 1986.
 50. Wang D, Christensen K, Chawla K et al. : Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential, *J Bone Miner Res*, 14 : 893-903, 1999.
 51. Miyama K, Yamada G, Yamamoto TS et al. : A BMP-inducible gene, *dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction, *Dev Biol*, 208 : 123-33, 1999.

Abstract

EFFECT OF BISPHOSPHONATE ON OSTEOBLAST DIFFERENTIATION

In-Soon Lee, Hyun-Jung Kim, Hyun-Mo Ryoo*, Young-Jin Kim, Soon-Hyeun Nam

Department of Pediatric Dentistry and Oral Biochemistry,
College of Dentistry, Kyungpook National University*

Bisphosphonates inhibit bone resorption in vivo and in vitro. Currently proposed mechanism of action of bisphosphonates involves both direct effect on osteoclasts and indirect effect through the mediation of osteoblasts. Recent understanding of molecular mechanism of osteoclastogenesis indicates that osteoclast differentiation is quite tightly regulated by signaling molecules from differentiating osteoblasts. Therefore this investigation was designed to elucidate the effect of bisphosphonate on osteoblast differentiation. For this purpose, in vitro effects of etidronate and alendronate on the expression of Cbfa1, a master control gene of osteoblast differentiation, several bone marker genes, and formation of calcified nodules were evaluated.

To evaluate the effect of bisphosphonate on calcified nodule formation, osteoblasts isolated from rat calvaria were cultured in α -MEM containing 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M of etidronate or 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M of alendronate for 15 days, and then stained by alizarin red to determine mineralization. To evaluate the effect of bisphosphonate on osteoblast differentiation, osteoblast cells were cultured in α -MEM containing 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M of etidronate or 10^{-6} M of alendronate for 8 days. And then total RNA was extracted and northern blot analysis was done to examine the expression of Cbfa1, type I collagen, alkaline phosphatase, osteopontin and osteocalcin.

The results were as follows:

1. Etidronate suppressed the calcification of bone nodule in dose dependent manner, while alendronate didn't.
2. The expression of Cbfa1 was decreased dose dependently by etidronate, but increased by alendronate
3. Etidronate suppressed the expression of type I collagen, osteopontin and osteocalcin in dose dependent manner, however alendronate promote the expression of osteoblast marker gene
4. The expression of alkaline phosphatase was not affected either etidronate nor alendronate

These results suggest that etidronate suppressed the expression of Cbfa1 in dose dependent manner, and consequently the expression of osteoblast marker genes, such as type I collagen, osteopontin and osteocalcin were also suppressed in similar manner. And finally this decreased expression of osteoblastic marker gene prevent calcified bone nodule formation.

Key words : Bisphosphonate, osteoblast, Cbfa1, Type I collagen, Alkaline phosphatase, Osteopontin, Osteocalcin, Calcified bone nodule