

## 인간 추간판 세포에서 파미드로네이트의 기질 생성 및 세포 사멸 효과

연세대학교 의학대학 정형외과학교실, 연세대학교 BK21 의과학사업단<sup>1</sup>

전지애<sup>1</sup> · 김 향<sup>1</sup> · 권언혜<sup>1</sup> · 이광일<sup>1</sup> · 박시영 · 김학선  
이환모 · 신규호 · 윤성환 · 문성환

- Abstract -

### Anabolic and Anti-apoptotic Effects of Pamidronate on Human Intervertebral Disc Cells in Vitro

Ji-Ae Jun<sup>1</sup>, Hyang Kim<sup>1</sup>, Un-Hye Kwon<sup>1</sup>, Kwang-Il Lee<sup>1</sup>, Si-Young Park, Hak-Sun Kim,  
Hwan-Mo Lee, Kyoo-Ho Shin, Seong-Hwan Yoon, Seong-Hwan Moon

<sup>1</sup>Brain Korea 21 Project for Medical Science Department of Orthopaedic Surgery,  
Yonsei University college of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** As potent inhibitors of bone resorption, bisphosphonates (BPs) are widely used for the treatment of bone disorders that are due to increased osteoclast activity i.e. postmenopausal osteoporosis, Paget's disease, tumoral bone disease. BPs are also broad-spectrum matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors which involves cation chelation. Apoptosis appears to provide an important mechanism that contributes to the death of disc cells and thus disc degeneration. In articular chondrocytes, BPs appear to prevent dexamethasone induced growth retardation and apoptosis. Accordingly, the objective of this study is to investigate the effect of pamidronate, N-containing BP, on human intervertebral disc cells in terms of cellular proliferation, matrix synthesis, mRNA expression of matrix components, apoptosis, and mRNA expression of MMP.

**Methods:** Human disc tissues were obtained from three patients with degenerative disc disease. Intervertebral disc cells were isolated by sequential enzymatic method. Apoptosis was induced by using serum starvation method with 1% FBS. Each culture was allocated to 1) control cultures with 10% FBS; 2) experimental cultures in 1% FBS without pamidronate; 3) experimental cultures with 1% FBS with various dose of pamidronate ( $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  M). [<sup>3</sup>H]-Thymidine for DNA synthesis and [<sup>35</sup>S]-Sulfate incorporation for proteoglycan synthesis were performed. The cells were stained Propidium Iodide Buffer to detect apoptotic cells and then analyzed by flow cytometry. Reverse transcription polymerase chain reaction for mRNA of beta-actin, collagen type I, collagen type II, aggrecan, MMP-1, MMP-3, and MMP-13 was performed.

**Results:** Disc cell cultures with various concentrations of pamidronate ( $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  M) showed no significant increase in DNA synthesis compared to control culture. However disc cell cultures

with pamidronate showed significant increase in proteoglycan synthesis, 40% increase with  $10^{-9}$  M pamidronate ( $p < 0.05$ ), compared to control culture. Disc cells with various dose of pamidronate showed similar patterns of mRNA expression of collagen type I, II, aggrecan compared to culture without pamidronate. In serum starved condition (1% FBS), pamidronate with concentration of  $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  M demonstrated anti-apoptotic effect. Cultures with 1% FBS showed upregulation of MMP-1, MMP-3, MMP-13 mRNA expression, while cultures with given dose of pamidronate showed no change in the expression of MMPs mRNA.

**Conclusion:** Pamidronate, N-containing BP has anabolic and anti-apoptotic, effects on intervertebral disc cells and their matrix.

**Key Words:** Intervertebral disc cells, Apoptosis, Bisphosphonate, Proteoglycan

## 서 론

세포 사멸 (apoptosis)은 조직의 항상성 유지를 위한 생리적 기능을 수행할 뿐만 아니라 비정상적인 억제 혹은 촉진으로 인한 세포의 증식성 질환 내지는 해당 세포의 소실로 인한 각종 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>1-7</sup>. 또한, 세포 사멸은 척추 추간판 (Intervertebral disc)의 퇴행에도 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>8-11</sup>.

척추 추간판의 퇴행성 변화와 이에 연관된 척추의 질환들이 환자에게 많은 고통을 끼치며 이로 인한 의료비용도 나날이 증가하고 있다. 척추 추간판의 퇴행성 변화는 부분적으로 점차적인 당단백 (proteoglycan)과 제2형 교원질 (type II collagen)의 감소에 의한 수핵 내의 수분 분압 감소에 기인하며, 이로 인하여 다양한 임상증상 즉, 추간판 내장증, 추간판 탈출증, 척수증, 신경근 병변, 척추관 협착증 등을 야기 시킨다<sup>8-10,12</sup>.

비스포스포네이트 (bisphosphonate)는 골기질의 수산화 인회석 (hydroxyapatite)에 높은 친화력을 갖는 약제로서 파골세포에 직접적인 효과로 세포 활성을 저해하고 세포 사멸을 촉진하며 골세포를 경유한 간접 효과 등으로 강력한 골흡수 억제 효과를 나타낸다. 이와 같은 약리 작용으로 비스포스포네이트는 파골세포 활성이 증가 되어 있는 파켓씨병, 골종양에 의한 골파괴, 골다공증과 같은 질환에 광범위하게 사용되고 있고<sup>2,13-17</sup>, 비스포스포네이트 제제의 골에 대한 효과는 잘 알려져 있는 반면 척추 추간

판에 미치는 영향에 대해서는 연구된 적이 없다. 척추 추간판은 척추체 사이에 위치한 섬유성 연골로 이루어진 구조로서 척추의 가동성과 안정성에 중요한 역할을 한다. 특히 추간판과 척추체 사이에는 연골판이 존재하며 이를 통하여 추간판에 영양 공급 및 대사산물의 확산이 일어난다. 최근 보고에 의하면 비스포스포네이트 제제가 연골에 대해 보호 효과를 발휘한다고 한다<sup>11</sup>. 같은 맥락으로 비스포스포네이트 제제가 척추 추간판에 어떠한 영향을 끼치는지 다각도로 분석할 필요가 있다.

그러하여 본 연구에서는 척추 추간판 세포에 2세대 비스포스포네이트 제제인 파미드로네이트를 투여하고, 세포 증식, 기질 합성 반응을 알아보고 역시 추간판 세포 배양에서 세포 사멸을 유도시킨 후 파미드로네이트를 투여하여 세포 사멸 정도, 기질 분해 효소 발현 등을 알아보고자 한다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 재료 및 시약

추간판 조직은 추간판 수술을 시행한 3명의 환자로부터 채취하였다. F-12, DMEM, 우태아 혈청 (fetal bovine serum), Trypsin/EDTA, D-PBS, 항생제 등은 Gibco BRL (Gibco-BRL, Grand island, NY)사의 시약을 사용하였고, Oligo d(T)<sub>16</sub> primer는 Invitrogen (Invitrogen, Groningen, Netherland), AccuPower RT Premix는 Bioneer (Bioneer, 대전, 한국), Sapphire PCR-premix는 Sapphire (Sapphire, USA)사의 시약을 사용하였다. 각종 collagenase 등은 Sigma (Sigma, St.

Louis, MO, Germany)사의 시약을 사용하였고 T-25 flask는 Nunc (NUNC, Rockilde, Denmark), 6well plate 와 nylon 여과지는 Falcon (Falcon, Franklin Lakes, NJ), [<sup>35</sup>S]-sulfur, [methyl-<sup>3</sup>H]Thymidine, PD-10 column 은 Pharmacia (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) 사, Liquid scintillation cocktail 용액은 Beckman (Beckman, Fullerton, CA), scintillation counter는 Packard (Packard, Downers Grove, IL), Glass microfiber filter는 Whatman (Whatman, Maidstone, England), Annexin-V FITC apoptosis kit는 BioSource (BioSource, California, USA), QIAGEN RNeasy mini kit은 Qiagen (QIAGEN, Maryland, USA)을 사용하였다. 파미드로네이트는 한림제약에서 제공받았다.

## 2. 세포 배양

추간관 술식을 시행한 환자에게서 수술 중 추간관 조직을 채취하고, 채취된 추간관 조직은 순차적 효소 소화법으로 세포를 분리하였다. 먼저 세척된 추간관 조직을 잘게 썰고, Hams F-12 medium과 1% v/v penicillin/streptomycin에 0.4%w/v pronase와 0.004% w/v DNase를 첨가하여 37도에서 60분간 소화시켰다. Hams F-12 medium으로 세척 후 상기의 효소 용액을 0.025% w/v collagenase type II와 0.004% w/v DNase로 바꿔 37도에서 3시간 소화시켰다. 분리된 추간관 세포는 10% 우태아 혈청, 1% v/v penicillin/streptomycin, 25 µg/ml ascorbate이 포함된 Dulbeccos Modified Eagle Medium and Hams F-12 medium (DMEM/F-12)로 세척 후 Nylon 여과지 (pore size 70 µm)를 사용하여 부유 조직을 제거하였다. T-25 flask에서 10일 동안 37도, 5%의 CO<sub>2</sub> 하에서 배양하였다. 세포 생존성 검사 및 세포 밀도를 계산하여, 세포 증식 반응 및 당단백 생성 측정 실험을 하기 위하여 6×10<sup>4</sup> 세포/ml의 밀도로 24 well plate에, 또한 세포 생존성 반응, 기질 생성 및 기질 성분 mRNA 발현을 측정하기 위하여 2×10<sup>5</sup> 세포/ml의 밀도로 6 well plate에서 같은 조건하에 배양하였다.

## 3. 세포 증식 반응 측정

배양 후 배양 배지를 [methyl-<sup>3</sup>H]Thymidine 5 µCi/ml이 첨가된 기본 배지로 교체하여 24시간 동안 배

양하였다. 24시간 배양 후 세포를 D-PBS로 씻어내고, trypsin/EDTA 효소처리법으로 세포를 분리, cell harvester를 이용하여 Glass microfiber filter에 세포를 흡착시켰다. 이 membrane을 scintillation vials에 담아, liquid scintillation cocktail 용액을 3 ml 첨가하여 섞은 후, 16시간 상온에서 방치하였다. Scintillation counter을 이용하여 DNA의 양을 측정하였다.

## 4. 당단백 생성 측정

실험군 배양에서 기저 상태 및 조작 후 방사선 동위원소 [<sup>35</sup>S]-sulfur 20 µCi/ml를 포함한 배양액으로 교체하고 4시간 동안 추가 배양하였다. 상층액은 -70도에 분리 보관하고, 세포에는 8 M guanidine hydrochloride, 20 mM EDTA, proteinase inhibitors 혼합액을 첨가, 4도에서 48시간 동안 당단백을 추출하였다. 방사선 동위원소로 표식되는 당단백의 정량적인 분석을 위해 Sephadex G-25M을 포함한 PD-10 column에 세포를 통과시켜 순차적으로 용출하였다. Liquid scintillation cocktail 용액을 6 ml 첨가하여 섞은 후, 16시간 상온에서 방치하였다. 제 2, 3, 4번재의 용출 용액만을 Scintillation counter를 통해 측정하였다.

## 5. 세포 사멸 측정

추간관 세포에서의 세포 사멸은 1% 우태아 혈청으로 24시간 동안 37도, 5%의 CO<sub>2</sub> 하에서 배양함으로써 유도하였다<sup>3)</sup>. 세포를 D-PBS로 두 번 씻어 주고, Annexin-V FITC apoptosis kit를 이용하여 2×10<sup>6</sup> 세포/ml이 되도록 1X Annexin-V Binding Buffer로 섞었다. 그 후 세포를 Propidium Iodide Buffer로 15분간 염색한 후 flow cytometry로 분석하였다.

## 6. 실험군

파미드로네이트를 세포 사멸이 일으키는 추간관 세포 배양에 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-12</sup> M의 농도로 각각 첨가하여 일주일간 배양하였다. 이때 배양액은 이틀에 한 번 씩 각 농도별의 파미드로네이트와 같이 교체하였다. 각 배양군에서 당단백 생성, 세포 증식 반응, 세포 생존성 반응 및 matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3과 MMP-13의 mRNA 발현을 측정하였다. 파미드로네이트를 처리하지 않고 DMEM/

**Table 1.** Sequences of primers used for PCR amplification of cDNA

Gene	Direction	Sequence (5' → 3')	Product size
MMP-1	Forward	GGT GAG GAA TAA CCA AGT GA	389 bp
	Reverse	CTT CAT CGC TGC CCA TGA AT	
MMP-3	Forward	GAA AAT CGA TGC AGC CAT TT	370 bp
	Reverse	AGG AGA AAA CGA ACA TTT CA	
MMP-13	Forward	TCT TCT TGA GCT GGA CTC AT	459 bp
	Reverse	GAA CTC ATG CGC AGC AAC AA	
beta-actin	Forward	GGC GGA CTA TGA CTT AGT TG	238 bp
	Reverse	AAA CAA CAA TGT GCA ATC AA	

F12 (10% FBS, 1% v/v penicillin/streptomycin, 25 µg/ml ascorbate)으로 만 배양한 중간관 세포 배양을 양성 대조군으로 삼았으며, 세포 사멸만을 유도한 중간관 세포 배양을 음성 대조군으로 삼았다.

7. 제 I, II형 교원질, aggrecan, MMP-1, MMP-3, MMP-13의 mRNA 발현 검사

Total RNA는 QIAGEN RNeasy mini kit를 이용하여 분리하였다. 중간관 세포의 total RNA 1 µg와 oligo-d(T) 1 µl (Invitrogen, USA, 0.5 µg/µl)에 증류수를 50 µl까지 채운 후, AccuPower RT-premix (Bioneer, 대전, 한국)에 넣어 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 반응시켰다. 70도에서 5분, 4도에서 5분, 42도에서 60분, 94도에서 5분, 4도에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하여, 각각의 cDNA 1 µl, 각각의 sense primer와 antisense primer 10 pmole에 증류수를 10 µl까지 채워 Sapphire PCR-premix에 넣고, 각각의 유전자에 대한 PCR 반응을 시행하였다 (Table 1). RT-PCR에 대한 대조군으로 beta-actin을 사용하였으며 TINA program을 통해 각 유전자의 발현 정도를 비교 분석하였다.

8. 통계처리

자료는 SPSS (SPSS, Chicago, IL)를 이용하여 정리하였으며, One way ANOVA 및 t-test로 실험군 간을 비교하였다. 통계적 유의 수준은 p<0.05로 정하였다.

결 과

1. 세포 증식 및 신생 당단백 생성

시험관 내에서 파미드로네이트를 중간관 세포에 농도별로 처리한 결과 대조군과 비교하여 세포 증식에 있어서 의미 있는 변화는 관찰되지 않았으나, DNA 증식으로 정상화한 당단백의 합성은 대조군과 비교하여 저농도인  $10^{-9}$  M의 파미드로네이트 투여군에서 40% (p<0.05) 증가했다.

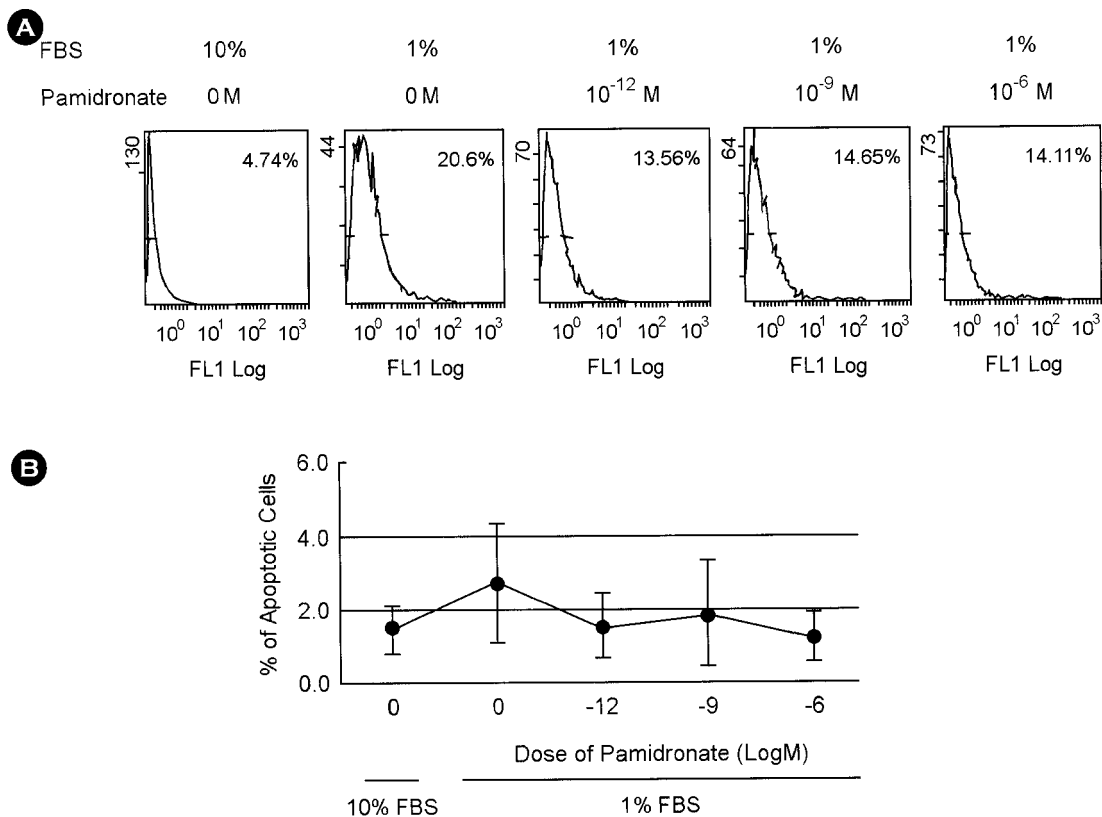
2. 파미드로네이트의 anti-apoptosis 효과

중간관 세포에  $10^{-12}$ ~ $10^{-6}$  M의 파미드로네이트를 처리한 결과 세포 사멸에 대해 보호 효과를 관찰할 수 있었다. Annexin V 방법을 이용하여 flow cytometry를 실시한 결과 양성 대조군 (10% FBS)에서는 1.41±0.32%의 세포 사멸이 일어난 반면, 세포 사멸을 유도시킨 음성 대조군 (1% FBS)에서는 2.80±1.45%의 세포 사멸이 일어났다.

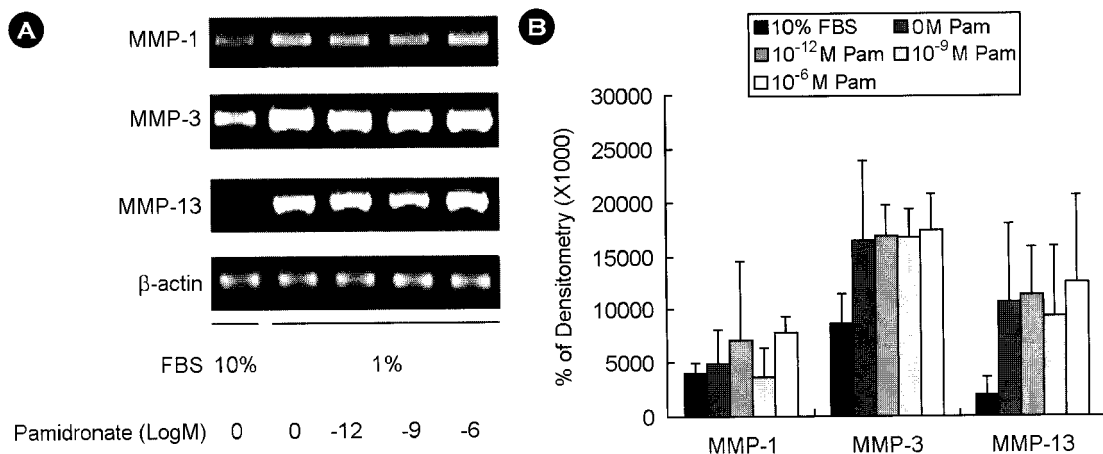
중간관 세포에서 1%의 serum으로 세포 사멸을 유도시킨 후,  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  M의 농도 별로 파미드로네이트를 처리한 결과 파미드로네이트를 처리하지 않은 음성대조군에 비해 각각 32%, 26%, 46% (p<0.05)의 세포 사멸이 감소했음을 알 수 있었다 (Figure 1).

3. 제I, II형 교원질, aggrecan mRNA 발현

RT-PCR에 대한 densitometric assay 결과, 대조군



**Figure 1.** Disc cell cultures with 10% or 1% FBS under the various concentrations of pamidronate (0,  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  M). **A:** Flow cytometric analysis. **B:** Percentage of apoptotic cells analyzed by flow cytometry (Mean  $\pm$  standard deviation, \* $p < 0.05$ ).



**Figure 2.** Disc cell cultures with 10% or 1% FBS under the various concentrations of pamidronate (Pam) (0,  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  M) **A:** Patterns of mRNA expression of MMPs. **B:** Densitometry of RT-PCR products of MMP-1, MMP-3, MMP-13. (Mean  $\pm$  standard deviation, \*  $p < 0.05$ )

과 비교했을 때 실험군에서 제II형 교원질, 제II형 교원질, 그리고 aggrecan의 mRNA 발현의 차이는 없었다.

#### 4. MMP-1, MMP-3, MMP-13 mRNA 발현 정도

세포 사멸을 유도시킨 추간관 세포에서 MMP-1, MMP-3, MMP-13 mRNA의 발현은 증가하였으나 파미드로네이트를 처리했을 경우 유의 있는 각 MMP의 발현 변화는 없었다 (Figure 2).

## 고 찰

비스포스포네이트는 파골세포의 세포 사멸을 유도하여 파골세포의 활성 및 숫자를 감소시키는 기능으로 골흡수가 증가된 폐경 후 생기는 골다공증, 파렛씨병, 골종양, 그리고 금속 이식체를 사용하였을 때 발생하는 골용해 (osteolysis) 등의 파골세포 기능 항진으로 인한 여러 질환에 널리 이용되고 있다.<sup>2,13~17)</sup> 또한 관절염에 있어서, 제2형 교원질의 분해를 억제하고, 부분적으로 연골을 보호하는 기능 등 다양한 생물학적 효과를 가지고 있다고 보고되고 있다<sup>18)</sup>. 최근 연구에 의하면, 부신피질호르몬에 의한 관절 연골세포의 성장 저하와 세포 사멸이 비스포스포네이트에 의해 억제 된다는 보고가 있었다<sup>1)</sup>.

본 연구에서는 관절 연골세포와 유사한 성질을 가진 척추 추간관 세포에 파미드로네이트를 투여하고 세포 증식, 기질 생성, 기질 성분 mRNA 발현 등을 조사하였는데, 결과를 보면 세포 증식에는 영향이 없었고 연골성 표현형인 제II형 교원질, aggrecan, mRNA의 발현은 대조군에 비해 차이가 없었으나 기질 생성은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 이는 파미드로네이트가 추간관 변성 혹은 퇴행에서 기질 재생을 위한 치료적 의미로 사용될 수도 있음을 제시하는 결과이다. 이어 세포 사멸을 유도하고 파미드로네이트를 투여해 보면, 세포 사멸만 유도한 군보다 유의 있게 세포 사멸을 감소시켰다. 특히 이런 결과는 중요한데 추간관 퇴행의 주요 기전 중의 하나로 노화, 생역학적, 생화학적 변화로 추간관 세포가 세포 사멸이 조장 되면서 추간관 퇴행이 가속화되는 파미드로네이트의 투여로 세포 사

멸을 부분적으로 막을 수 있는 기전을 제공함으로써 추간관 퇴행의 예방에도 치료적 의미가 있을 것으로 생각한다. 그리고 연골성 기질 분해효소인 MMPs mRNA 발현을 알아보았는데 파미드로네이트 투여 농도 범위에서 의미 있는 변화는 없었다. MMP mRNA 발현만으로는 MMP 효소 활성을 예측할 수 없고 MMP mRNA 발현이 증가해도 효소 활성이 감소하면 기질 분해능력이 감소할 수 있기 때문에 향후 MMP 효소 활성 측정을 병행해야 최종적인 결론을 얻을 수 있을 것이다. 골다공증 치료 목적으로 투여하는 비스포스포네이트가 척추 추간관에 기질 생성 자극, 세포 사멸에 대한 보호 효과, 연골성 표현형 유지 등 총체적으로 보면 추간관의 재생에 영향을 끼침을 알 수 있다.

추간관의 재생 및 퇴행 방지를 위해 여러 가지의 생물학적 방법이 동원되고 있는데 이는 성장인자 주입, 유전자 치료, 세포 이식 등이 있다<sup>21~24)</sup>. 이러한 방법은 우수한 생물학적 효과가 있지만 주사를 한다든지, 바이러스나 세포를 체내에 주입한다던지 하는 침습적 술식이 필요하며 더구나 생물학적 안전성도 아직 확립된 것은 아니다. 그러한 이유로 경구 투여에 의한 약제로 추간관 뿐만 아니라, 관절 연골, 그리고 골격계에 보호 효과를 발휘할 수 있다면 가장 이상적인 치료 방법이라고 생각된다.

본 연구의 제한점은 실험관내 연구이므로 향후 생체 내 효과를 검증해야 할 것이다. 더구나 파미드로네이트의 작용 기전도 세포내 신호전달 수준에서 증명해야 할 것이다.

## 결 론

척추 추간관 세포에서 파미드로네이트는 기질 생성 자극, 연골성 표현형 유지, 세포 사멸에 보호 효과 등의 효과를 나타내어 추간관 변성에 치료적 수단으로 이용될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

- 1) Van Offel JF, Schuerwegh AJ, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. *Effect of bisphosphonates on viability, proliferation, and dexamethasone-induced*

- apoptosis of articular chondrocytes. Ann Rheum Dis* 61: 925-928, 2002
- 2) Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. *Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. J Clin Invest* 104: 1363-1374, 1999
  - 3) Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN. *Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. Spine* 25: 2153-2157, 2000
  - 4) Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. *Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. J Bone Miner Res* 13: 793-802, 1998
  - 5) Wolbers F, Buijtenhuijs P, Haanen C, Vermes I. *Apoptotic cell death kinetics in vitro depend on the cell types and the inducers used. Apoptosis* 9: 385-392, 2004
  - 6) Shigekazu N. *Apoptosis by death factor. Cell* 88: 355-365, 1997
  - 7) Fischer BA, Mundle S, Cole AA. *Tumor necrosis factor-alpha induced DNA cleavage in human articular chondrocytes may involve multiple endonucleolytic activities during apoptosis. Microsc Res Tech* 50: 236-242, 2000
  - 8) Lipson SJ, Muir H. *Proteoglycan in experimental intervertebral disc degeneration. Spine* 6: 194-210, 1981
  - 9) Butler D, Trafimow JH, Anderson GB, McNeill TW, Huckman MS. *Discs degenerate before facets. Spine* 15: 111-113, 1990
  - 10) Buckwalter JA, Pedrini-Mille A, Pedrini V, Tudisco C. *Proteoglycan of human infant intervertebral disc: electron microscopic and biochemical studies. J Bone Joint Surg* 67-A: 284-294, 1985
  - 11) Doita M, Kanatani T, Ozaki T, Matsui N, Kurosaka M, Yoshiya S. *Influence of macrophage infiltration of herniated disc tissue on the production of matrix metalloproteinases. Spine* 26: 1522-1527, 2001
  - 12) Buckwalter JA. *Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine* 20: 1307-1314, 1995
  - 13) Heikkilä P, Teronen O, Moilanen M, Kontinen YT, Hanemaaijer R, Laitinen M, Maisi P, van der Pluijm G, Bartlett JD, Salo T, Sorsa T. *Bisphosphonates inhibit stromelysin-a (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type plasminogen activator, and diminish invasion and migration of human malignant and endothelial cell lines. Anti-Cancer Drugs* 13: 245-254, 2002
  - 14) Teronen O, Kontinen YT, Lindqvist C, Salo T, Ingman T, Lauhio A, Ding Y, Santavirta S, Valleala H, Sorsa T. *Inhibition of matrix metalloproteinase-1 by dichloromethylene bisphosphonate (Clodronate). Calcif Tissue Int* 61: 59-61, 1997
  - 15) Adolfo D. *Bisphosphonates. Maturitas* 43 Suppl. 1: S19-S26, 2002
  - 16) Ylitalo R. *Bisphosphonates and atherosclerosis. Gen Pharmacol* 35: 287-296, 2002
  - 17) Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaisse JM, Clezardin P. *Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. Cancer Res* 60: 2949-2954, 2000
  - 18) Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, Magolda R, Newton RC, Trzaskos JM, Arner EC. *Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. J Biol Chem* 46: 45539-45545, 2003
  - 19) Moon SH, Gilbertson LG, Nishida K, Knaub MA, Muzzonigro T, Robbins PD, Evans CH, Kang JD. *Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer. Spine* 25: 2573-2579, 2000
  - 20) Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, Moon S-H, Suh J-K, Vogt MT, Robbins PD, Evans CH. *Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: An in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor  $\beta$ 1 encoding gene. Spine* 24: 2419-2425, 1999
  - 21) Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS. *Stimu-*

*lation of mature canine intervertebral disc by growth factors. Spine 16: 253-260, 1991*

22) Gruber HE, Fisher EC, Desani B, Stasky AA, Hoelscher G, Hanley EN. *Human intervertebral disc*

*cells from the annulus: three dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF- $\beta$ 1.*

*Exp Cell Res 235s: 13-21, 1997*

---