

퇴행된 인간 추간판 세포에서
파미드로네이트의 생물학적 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

윤 성 환

퇴행된 인간 추간판 세포에서
파미드로네이트의 생물학적 효과

지도 이 환 모 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

윤 성 환

윤성환의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

오늘 이 한편의 논문이 완성되기까지 아낌없는 격려와 도움을 주셨던 많은 분들이 계셨기에 이런 결과가 있었습니다. 부족한 저에게 많은 가르침을 주시고 항상 지도를 아끼지 않으신 이환모 교수님께 진심으로 감사의 뜻을 전합니다. 또한 이 논문이 있기까지 수많은 조언과 지도를 해주신 정형외과 문성환 교수님과 생화학-분자생물학교실 김건홍 교수님께도 감사를 전합니다.

그리고 제가 정형외과를 택하게 해주시고 오늘의 저를 있게 많은 가르침을 주신 한대용 교수님, 강응식 교수님, 한수봉 교수님 그 외 정형외과 교실 모든 교수님들께도 감사를 드립니다.

끝으로 저에게 항상 헌신적인 사랑과 보살핌을 주신 부모님과 제 옆에서 항상 든든한 후원자가 되는 사랑스런 아내에게도 진심어린 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	5
1. 재료 및 시약	5
2. 세포 배양	6
3. 세포 증식 측정	7
4. 신생 당단백 생성 측정	7
5. 세포 사멸 측정	7
6. 세포 생존성 측정	8
7. 실험군	8
8. 제 I, II형 교원질, aggrecan, MMP-1, 2, 3, 9, 13의 mRNA 발현 검사	9
9. ELISA에 의한 MMP-1, 13의 protein 정량	10
10. 통계처리	10
III. 결과	11
1. 세포 증식 및 신생 당단백 생성	11
2. 파미드로네이트의 anti-apoptosis 효과	12
3. 인간 추간판 세포의 생존성 측정	14
4. 제 I, II형 교원질, aggrecan mRNA 발현	15
5. MMP-1, 2, 3, 9, 13 mRNA 발현 정도	16
6. MMP-1과 MMP-13의 단백질 발현 정도	17
IV. 고찰	19
V. 결론	21
참고문헌	22
영문요약	25

그림 차례

- 그림 1. 파미드로네이트에 의한 추간판 세포의 세포 증식 및 신생 당단백 생성 효과 11
- 그림 2. 파미드로네이트의 anti-apoptosis 효과 13
- 그림 3. 파미드로네이트가 인간 추간판 세포의 생존성에 미치는 효과 15
- 그림 4. 파미드로네이트 처리에 대한 제I 및 II형 교원질, aggrecan mRNA 발현 16
- 그림 5. 파미드로네이트 처리에 대한 MMP-1,2,3,9,13 mRNA 발현 17
- 그림 5. 파미드로네이트 처리에 대한 MMP-1,13의 단백질 발현 18

표 차례

- 표 1. Sequences of primers used for PCR amplification of cDNA 9

퇴행된 인간추간판세포에서 파미드로네이트의 생물학적 효과

목적 : 척추 추간판 세포에 2세대 비스포스포네이트 제제인 파미드로네이트를 투여하고, 세포 증식, 기질 합성 반응을 알아보고 역시 추간판 세포배양에서 세포 생존성을 떨어뜨린 후 파미드로네이트를 투여하여 세포 생존성, 기질 분해 효소 발현 등을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 추간판 조직은 추간판 술식을 시행한 10명의 환자로부터 채취하였고 채취된 추간판 조직은 순차적 효소 소화법으로 세포를 분리하였다. 추간판 세포에 TNF- α 를 이용하여 세포의 생존성을 떨어뜨렸다. 추간판 세포 배양에 파미드로네이트 0, 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M의 농도로 각각 첨가하여 24시간과 48시간동안 배양하였다. 각 배양군에서 당단백 생성, 세포 증식 반응, 세포 생존성 반응 및 matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9과 MMP-13의 mRNA 발현, MMP-1, MMP-13의 단백질 발현량을 측정하였다.

파미드로네이트를 처리하지 않고 DMEM/F12 (10% FBS, 1% v/v penicillin/streptomycin, 25 μ g/ml ascorbate)으로만 배양한 추간판 세포 배양을 양성 대조군으로 삼았으며, DMEM/F12 (1% FBS, 1% v/v penicillin/streptomycin, 25 μ g/ml ascorbate)으로 배양한 추간판 세포 배양을 음성 대조군으로 삼았다.

결과 : 파미드로네이트를 추간관 세포에 농도별로 처리한 결과 대조군과 비교하여 세포 증식의 의미 있는 변화는 관찰되지 않았으나, DNA 증식으로 정상화한 당단백의 합성은 대조군과 비교하여 저농도인 10^{-9} M 의 파미드로네이트 투여군에서 20.1 % ($p < 0.05$) 증가했다.

추간관 세포에 10^{-12} ~ 10^{-6} M의 파미드로네이트를 처리한 결과 세포 사멸에 대해 보호 효과를 관찰 할 수 있었다. Hemocytometer를 이용하여 세포의 생존성 반응을 24 시간과 48 시간 동안 분석한 결과 양성 대조군 (10% FBS)에 비해 음성대조군 (1% FBS)에서 각각 24.4 %와 30.1 %의 생존능이 떨어졌고, 음성 대조군 (1% FBS)에 비해 TNF-alpha로 세포 생존능력을 떨어뜨린 세포에서는 각각 6.9 %와 30 %의 생존능이 떨어졌다.

추간관 세포에서 TNF-alpha (10 ng/ml)로 24시간 동안 세포 생존능력을 떨어뜨린 후, 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M의 파미드로네이트를 처리한 결과 파미드로네이트를 처리하지 않은 음성대조군에 비해 각각 23.5 %, 11.3 %, 26.4 %, 9.9 % ($p < 0.05$)의 생존성이 증가했고, 세포 생존 능력을 48 시간 동안 떨어뜨린 결과 음성대조군에 비해 각각 7 %, 15.5 %, 19.6 %, 7.8 % ($p < 0.05$)의 생존성이 증가했음을 알 수 있었다.

RT-PCR 후 densitometry를 시행한 결과, 대조군과 비교했을 때 실험군에서 제I형 교원질, 제II형 교원질, 그리고 aggrecan의 mRNA 발현이 차이는 없었다. 1% FBS와 TNF-alpha로 세포 생존능력을 떨어뜨린 추간관 세포에서 MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 mRNA의 발현과 MMP-1의 단백질 발현량은 증가하였으나, 파미드로네이트를 처리했을 경우, MMPs mRNA의 발현에 의의 있는 변화는 없었으나, MMP-1과 MMP-13 단백질의 발현량은 감소했다.

결론 : 척추 추간판 세포에서 파미드로네이트는 기질 생성 자극, 연골 성 표현형 유지, 세포 생존성에 자극 등의 효과를 나타내어 추간판 변성의 치료적 수단으로 이용될 수 있을 것이다.

핵심되는 말 : 인간 추간판 세포, 비스포스포네이트, 당단백

퇴행된 인간 추간판 세포에서 파미드로네이트의 생물학적 효과

<지도교수 이환모>

연세대학교 대학원 의학과

윤 성 환

I. 서론

세포사멸 (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 있다¹⁻⁷. 또한, 세포사멸은 척추 추간판 (Intervertebral disc)의 퇴행에도 중요한 역할을 담당하고 있다⁸⁻¹¹.

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^{8-10,12}.

비스포스포네이트 (bisphosphonate)는 골기질의 수산화 인회석 (hydroxyapatite)에 높은 친화력을 갖는 약제로서 파골세포에 직접적인 효과로 세포 활성을 저해하고 세포 사멸을 촉진하며 골세포를 경유한 간접효과 등으로 강력한 골흡수 억제 효과를 나타낸다. 이와 같은 약리 작용으로 비스포스포네이트는 파골세포 활성이 증가 되어 있는 파젯씨병, 골종양에 의한 골파괴, 골다공증과 같은 질환에 광범위하게 사용되고 있다^{2,13-17}. 비스포스포네이트 제제의 골에 대한 효과는 잘

알려져 있는 반면^{2,17}, 척추 추간판에 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. 비스포스포네이트 제제는 연골에 대해 보호 효과를 발휘하므로¹, 비스포스포네이트 제제가 척추 추간판에 어떠한 영향을 끼치는지 다각도로 분석할 필요가 있다.

본 연구에서는 척추 추간판 세포에 2세대 비스포스포네이트 제제인 파미드로네이트를 투여하고, 세포 증식, 기질 합성 반응을 알아보고 역시 세포 생존성을 떨어뜨린 추간판 세포에 파미드로네이트를 투여하여 세포 생존성, 기질 분해 효소 발현 등을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

추간판 조직은 추간판 술식을 시행한 10명의 환자로부터 채취하였다. F-12, DMEM, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS), Trypsin/EDTA, D-PBS, 항생제 등은 Gibco BRL (Gibco-BRL, Grand island, NY, USA)사의 시약을 사용하였고, Oligo-d(T)₁₆ primer는 Invitrogen (Invitrogen, Groningen, Netherland), AccuPower RT Premix는 Bioneer (Bioneer, 대전, 대한민국), PCR-premix는 Genet Bio (Genet Bio, 대전, 대한민국)사의 시약을 사용하였다. 각종 collagenase 등은 Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA)사의 시약을 사용하였고 T-25 flask는 Nunc (NUNC, Rockilde, Denmark), 12well plate, 24well plate와 nylon 여과지는 Falcon (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA), [³⁵S]-sulfur, [³H]-Thymidine, PD-10 column은 Pharmacia

(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)사, Liquid scintillation cocktail 용액은 Beckman (Beckman, Fullerton, CA, USA), scintillation counter는 Packard (Packard, Downers Grove, IL, USA), Glass microfiber filter는 Whatman (Whatman, Maidstone, England), QIAGEN RNeasy mini kit은 Qiagen (QIAGEN, Hilden, Germany), ELISA kits는 R&D (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다. 파미드로네이트는 한림제약 (서울, 대한민국)에서 제공받았다.

2. 세포 배양

추간판 술식을 시행한 환자에게서 수술 중 추간판 조직을 채취하고, 채취된 추간판 조직은 순차적 효소 소화법으로 세포를 분리하였다. 먼저 세척된 추간판 조직을 잘게 썰고, Ham's F-12 medium과 1 % (v/v) penicillin/streptomycin에 0.4 % (w/v) pronase와 0.004 % (w/v) DNase를 첨가하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. Ham's F-12 medium으로 세척 후 상기의 효소 용액을 0.025 % (w/v) collagenase type II와 0.004 % (w/v) DNase로 바꿔 37°C에서 3시간 반응시켰다. 분리된 추간판 세포는 10 % FBS, 1 % (v/v) penicillin/streptomycin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbate이 포함된 Dulbeccos Modified Eagle Medium and Ham's 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 37°C, 5%의 CO₂하에서 배양하였다. 세포 생존성 검사 및 세포 밀도를 계산하여, 세포 증식반응 및 당단백 생성 측정 실험을 하기 위하여 6×10^4 세포/ml의 밀도로 24 well plate에서 각각의 파미드로네이트 (0, 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} M) 농도별로 일주간 37°C, 5%의 CO₂하에서 3차 배양하였고, 또한 세포 생존성 반응을 측정하기 위하여 8×10^4 세포/ml의 밀도로 12 well plate에서 24 시간과 48 시간 동안, 기질 생

성 및 기질 성분 mRNA와 단백질 발현량을 측정하기 위하여 2×10^4 세포/ml의 밀도로 24 well plate에서 48 시간 동안 파미드로네이트 ($0, 10^{-12}, 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-6}$ M) 농도별로 37°C, 5%의 CO₂하에서 배양하였다.

3. 세포 증식 반응 측정

배양 후 배양 배지를 [³H]-Thymidine 5 µCi/ml이 첨가된 기본 배지로 교체하여 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 배양 후 세포를 D-PBS로 씻어내고, trypsin/EDTA 호소처리법으로 세포를 분리, cell harvester를 이용하여 Glass microfiber filter에 세포를 흡착시켰다. 이 membrane을 scintillation vials에 담아, liquid scintillation cocktail 용액을 3ml 첨가하여 섞은 후, 16 시간 상온에서 방치하였다. Scintillation counter를 이용하여 DNA의 양을 측정하였다.

4. 신생 당단백 생성 측정

배양 후 배양배지를 방사선 동위원소 [³⁵S]-sulfur 20 µCi/ml를 포함한 배양액으로 교체하고 4 시간 동안 추가 배양하였다. 상층액은 -70°C에 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, 4 번째의 용출 용액만을 scintillation counter를 통해 측정하였다.

5. 세포 사멸 측정

추간관 세포에서의 세포 사멸은 1 % FBS로 24시간 동안 37℃, 5 %의 CO₂하에서 배양함으로 유도하였다²³. 세포를 D-PBS로 두 번 씻어주고, Annexin-V FITC apoptosis kit를 이용하여 2 x 10⁶ 세포/ml 이 되도록 1X Annexin-V Binding Buffer로 섞었다. 그 후 세포를 Propidium Iodide Buffer로 10분간 염색한 후 flow cytometry로 분석하였다.

6. 세포 생존성 측정

추간관 세포에서의 생존성은 Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α) 10 ng/ml의 농도로 24 시간과 48 시간 동안 37℃, 5 %의 CO₂하에서 떨어뜨렸다^{18,19}. 세포를 D-PBS로 두 번 씻어주고, 트리판 블루 염색을 통해 hemocytometer를 이용하여 세포의 생존성을 분석하였다.

7. 실험군

1% FBS 만으로 세포 사멸을 유도하거나 1% FBS 에 TNF-α (10 ng/ml)를 추가로 처리하여 세포의 생존성을 떨어뜨린 인간 추간관 세포 배양에 파미드로네이트를 0, 10⁻¹², 10⁻¹⁰, 10⁻⁸, 10⁻⁶ M의 농도로 각각 첨가하여 24 시간과 48 시간 동안 배양하였다. 각 배양 군에서 당단백 생성, 세포 증식, 세포 생존성 및 matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9과 MMP-13의 mRNA 발현, MMP-1과 MMP-13의 발현량을 측정하였다.

파미드로네이트를 처리하지 않고 DMEM/F12 [10% FBS, 1% (v/v) penicillin/streptomycin, 25 μg/ml ascorbate] 으로만 배양한 추간관 세포 배양을 양성 대조군으로 삼았으며, DMEM/F12 [1% FBS, 1% (v/v) penicillin/streptomycin, 25 μg/ml ascorbate] 으로 배양한 추간관 세포 배양을 음성 대조군으로 삼았다.

8. 제 I 및 II형 교원질, aggrecan, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13의 mRNA 발현 검사

Total RNA는 QIAGEN RNeasy mini kit를 이용하여 분리하였다. 중간판 세포의 total RNA 1 μg 과 oligo-d(T)₁₂₋₁₈ primer 1 μl (Invitrogen, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)에 증류수를 50 μl 까지 채운 후, AccuPower RT-premix (Bioneer)를 첨가하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하였다. 70°C에서 5분, 4°C에서 5분, 42°C에서 60분, 94°C에서 5분, 4°C에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성하여, 각각의 cDNA 1 μl , 각각의 sense primer와 antisense primer 10 pmole에 증류수를 10 μl 까지 채워 Genet Bio PCR-premix에 넣고, 각각의 유전자에 대한 PCR 반응을 시행하였다(Table 1).

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

Gene	Direction	Sequence (5'→ 3')	Product size	cycles
MMP-1	Forward	GGT GAG GAA TAA CCA AGT GA	389bp	27
	Reverse	CTT CAT CGC TGC CCA TGA AT		
MMP-2	Forward	CTC AGA TCC GTG GTG AGA TCT	496bp	26
	Reverse	CTT TGG TTC TCC AGC TTC AGG		
MMP-3	Forward	GAA AAT CGA TGC AGC CAT TT	370bp	27
	Reverse	AGG AGA AAA CGA ACA TTT CA		
MMP-9	Forward	ATC CAG TTT GGT GTC GCG GAG C	540bp	35
	Reverse	GAA GGG GAA GAC GCA CAG CT		
MMP-13	Forward	TCT TCT TGA GCT GGA CTC AT	459bp	35
	Reverse	GAA CTC ATG CGC AGC AAC AA		
beta-actin	Forward	GGC GGA CTA TGA CTT AGT TG	238bp	26
	Reverse	AAA CAA CAA TGT GCA ATC AA		

RT-PCR에 대한 대조군으로 beta-actin을 사용하였으며 TINA program을 통해 각 유전자의 발현 정도를 비교 분석하였다.

9. ELISA에 의한 MMP-1과 MMP-13의 단백질 정량

R&D사의 ELISA kits을 사용하여 MMP-1과 MMP-13 단백질을 정량하였다. 24well plate에서 48시간 동안 배양한 세포에서 배지를 걷어, 단클론항체가 코팅 되어있는 microplate 각각의 well에 standard와 함께 100 μ l씩 넣고, 2시간 동안 실온에서 반응을 시킨 후, wash buffer로 4번 세척 후, pro-MMP-1-conjugate와 pro-MMP-13-conjugate를 각각의 well에 200 μ l씩 넣어 두 시간 동안 실온에서 반응하였다. 반응 후 wash beffer로 4번 세척하고, 기질 용액 200 μ l를 각각을 well에 넣어 20분~30분간 반응 시킨 후, 정지 용액을 넣고, ELISA plate reader를 이용하여, 450 nm에서 측정하였다.

10. 통계처리

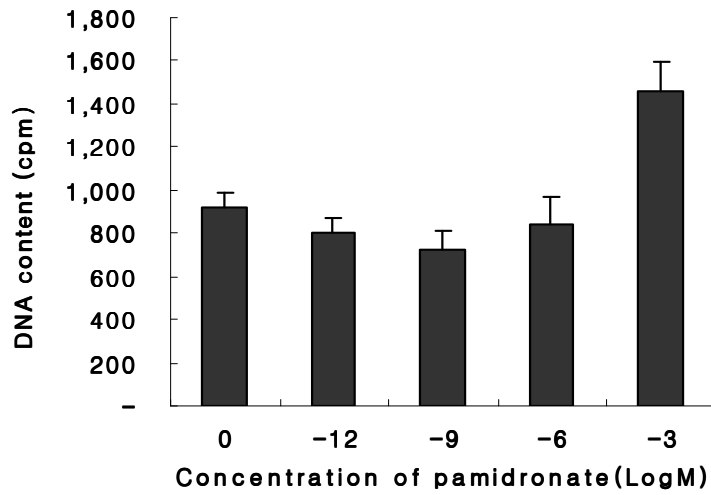
자료는 SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하여 정리하였으며, One way ANOVA 및 t-test로 실험군 간을 비교하였다. 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 정하였다.

III. 결과

1. 세포 증식 및 신생 당단백 생성

시험관 내에서 파미드로네이트를 추간관 세포에 농도별로 처리한 결과 대조군과 비교하여 세포 증식에 있어서 의미 있는 변화는 관찰되지 않았으나(Figure 1-A), DNA 양으로 정상화한 당단백의 합성은 대조군과 비교하여 저농도인 10^{-9} M 의 파미드로네이트 투여군에서 20.1% ($p < 0.05$) 높은 수치를 보였다(Figure 1-B).

A



B

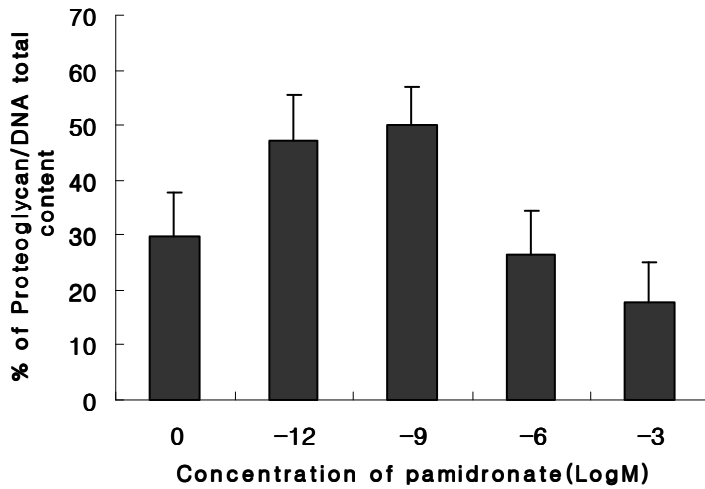


Figure 1. Human intervertebral disc cell cultures with 1% FBS under the various concentrations of pamidronate (0, 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} M). **A:** Change in the DNA content after pamidronate **B:** Change of the amount of de novo synthesized proteoglycan. The amount was standardized with total DNA content. All data were represented as the mean of duplicate samples from three different experiments (Mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$).

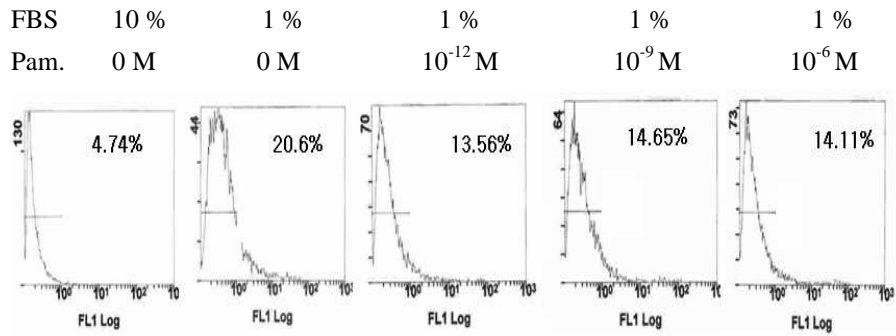
2. 파미드로네이트의 anti-apoptosis 효과

추간관 세포에 $10^{-12} \sim 10^{-6}$ M의 파미드로네이트를 처리한 결과 세포사멸에 대해 보호 효과를 관찰 할 수 있었다. Annexin V 방법을 이용하여 flow cytometry를 실시한 결과 양성 대조군 (10% FBS)에서는 5.7 ± 1.4 %의 세포사멸이 일어난 반면, 세포사멸을 유도시킨 음성 대조군 (1% FBS)에서는 18.1 ± 3.6 %의 세포사멸이 일어났다.

추간관 세포에서 1 %의 serum으로 세포사멸을 유도시킨 후, 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} M의 농도 별로 파미드로네이트를 처리한 결과 파미드로네

이트를 처리하지 않은 음성대조군에 비해 각각 26.5 %, 23.8 %, 29.3 % ($p < 0.05$)의 세포사멸이 감소했음을 알 수 있었다(Figure 2).

A



B

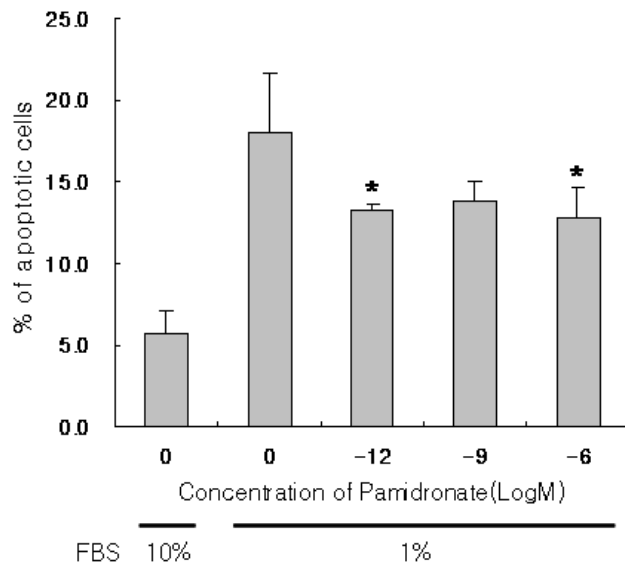


Figure 2. Human intervertebral disc cell cultures with 10% or 1% FBS under the various concentrations of pamidronate (0, 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} M). **A:** Flow cytometric analysis. Values in the squares represent the percentage of total apoptotic cells **B:** Percentage of apoptotic cells analyzed by flow cytometry. All data were represented as the mean of five different experiments (Mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$).

3. 인간 추간판 세포의 생존성 측정

세포에 트리판 블루 염색을 통해 hemocytometer를 이용하여 세포의 생존성을 24 시간과 48 시간 후 분석한 결과 양성 대조군 (10% FBS)에 비해 음성대조군 (1% FBS)에서 각각 24.4 %와 30.1 %의 세포 생존성이 떨어졌고, 음성 대조군 (1% FBS)에 비해 TNF- α 를 추가로 세포 생존능력을 떨어뜨린 세포에서는 각각 6.9 %와 30 %의 생존성이 감소했다.

추간판 세포에서 TNF- α (10 ng/ml)를 이용하여 24시간동안 세포 생존능력을 떨어뜨린 후 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M의 농도별로 파미드로네이트를 처리한 결과 파미드로네이트를 처리하지 않은 군에 비해 각각 23.5 %, 11.3 %, 26.4 %, 9.9 % ($p < 0.05$)의 세포 생존능력이 증가했고, 48 시간 동안 세포 생존능력을 떨어뜨린 결과 각각 7 %, 15.5 %, 19.6 %, 7.8 % ($p < 0.05$)의 세포 생존능이 증가했음을 알 수 있었다(Figure 3).

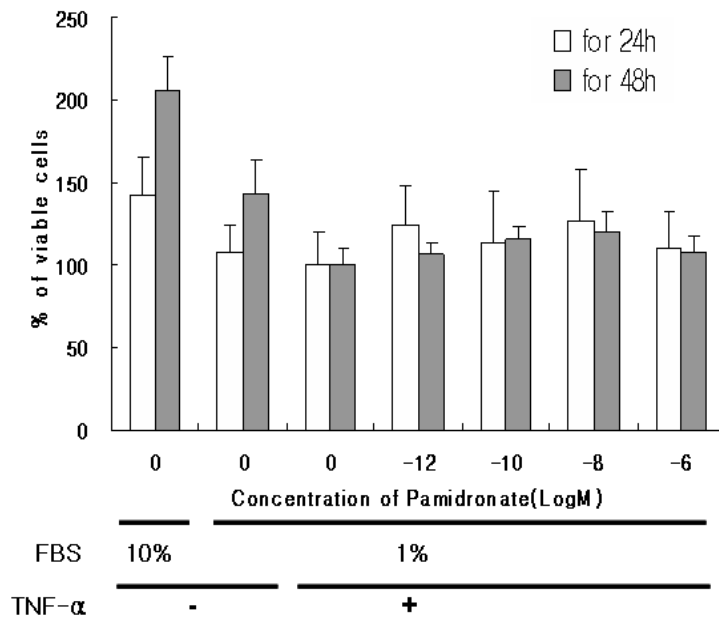


Figure 3. Human intervertebral disc cell cultures with 10% or 1% FBS or 1% with TNF-alpha (10ng/ml) under the various concentrations of pamidronate (0, 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M). The cells were counted on a hemocytometer using trypan-blue exclusion to assess cellular viability. All data were represented as the mean of duplicate samples from seven different experiments(Mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$).

4. 제I 및 II형 교원질, aggrecan mRNA 발현

RT-PCR에 대한 densitometric assay 결과, 대조군과 비교했을 때 실험군에서 제I형 교원질, 제II형 교원질, 그리고 aggrecan의 mRNA 발현의 차이는 없었다(Figure 4).

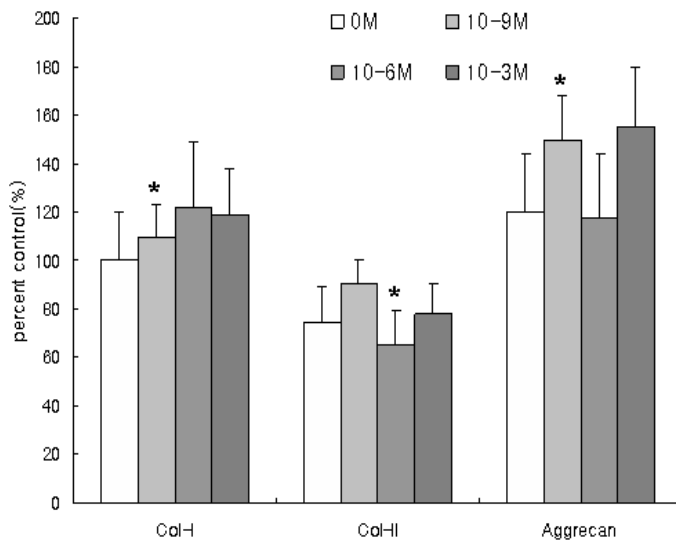


Figure 4. In densitometric assay of reverse transcription-polymerase chain reaction, human intervertebral disc cell cultures with various dose of pamidronate (10^{-9} , 10^{-6} , 10^{-3} M) showed no statistically significant changes in mRNA expression of type I collagen, type II collagen and aggrecan compared to control. mRNA expression was normalized by β -actin mRNA expression. All data were represented as the mean of three different experiments (Mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$).

5. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 mRNA 발현 정도

1% FBS 에 $TNF-\alpha$ (10 ng/ml) 처리로 세포 생존능력을 떨어뜨린 인간 추간관 세포에서 MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 mRNA 의 발현은 각각 45.5 %, 47.1 %, 67.1 %, 11.3 % ($p < 0.05$) 증가하였으나 파미드로네이트를 처리했을 경우, 유의 있는 각각의 MMPs 발현 변화는 관찰 할 수 없었다 (Figure 5).

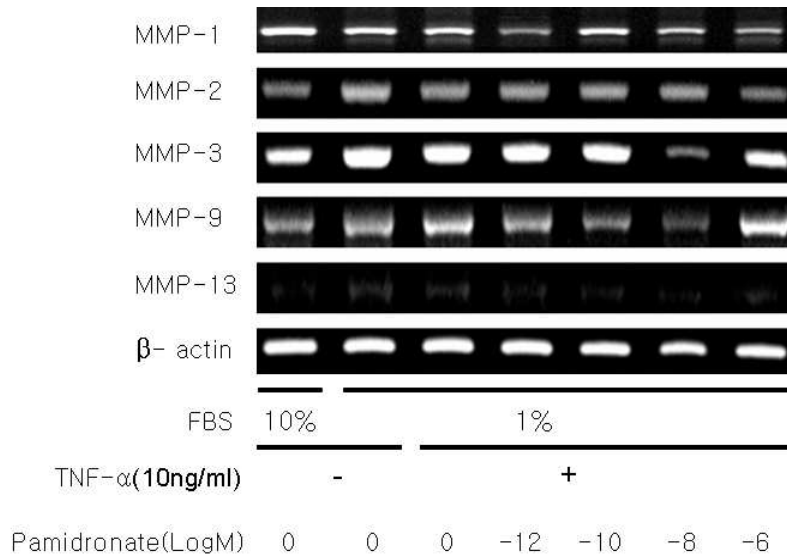
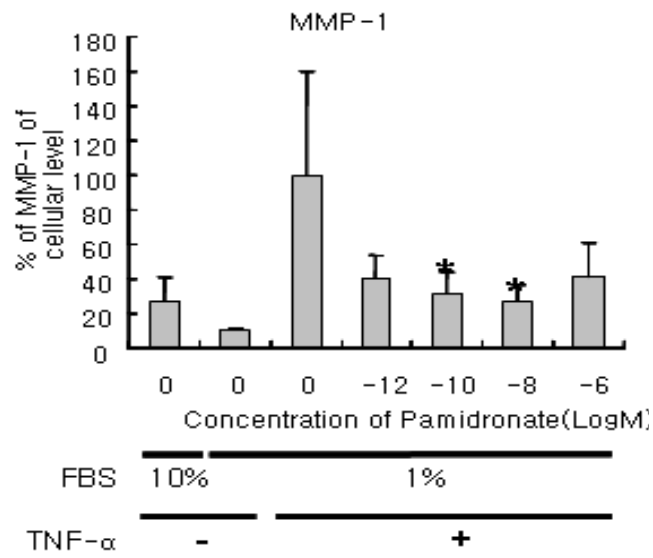


Figure 5. Human intervertebral disc cell cultures with 10% or 1% FBS or 1% FBS with TNF- α (10ng/ml) under the various concentrations of pamidronate(0, 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M)

6. MMP-1과 MMP-13의 단백질 발현 정도

추간관 세포에 10^{-12} ~ 10^{-6} M의 파미드로네이트를 처리한 결과 MMP-1의 경우, TNF- α 만 처리한 군에 비해 단백질 양이 59.3 % ~ 72.7 % ($p < 0.05$) 감소하였고, MMP-13은 25 % ~ 33.9 % 감소했음을 알 수 있었다(Figure 6).

A



B

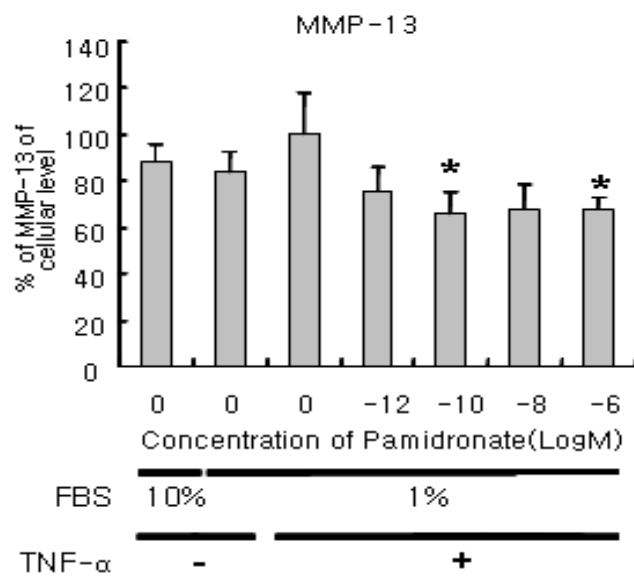


Figure 6. Human intervertebral disc cell cultures with 10% or 1% FBS or 1% FBS with TNF-a (10 ng/ml) under the various concentrations of pamidronate (0, 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M) : ELISA kits were used to analyze the cellular level of MMP-1 and MMP-13 and they were read in a 450nm using a microplate reader. All data were represented as the mean of duplicate samples from three different experiments **A:** MMP-1 **B:** MMP-13(Mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$)

IV. 고찰

비스포스포네이트는 파골세포의 세포사멸을 유도하여 파골세포의 활성 및 숫자를 감소시키는 기능으로 골 흡수가 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^{2,13-17}. 또한 관절염에 있어서, 제2형 교원질의 분해를 억제하고, 부분적으로 연골을 보호하는 기능 등 다양한 생물학적 효과를 가지고 있다고 보고되고 있다¹⁸. 최근 연구에 의하면, 부신피질호르몬에 의한 관절 연골세포의 성장 저하와 세포사멸이 비스포스포네이트에 의해 억제 된다는 보고가 있었다¹.

이제까지 추간판 세포의 기질 생성을 자극 할 수 있는 성장 인자들로 transforming growth factor-beta, insulin like growth factor-1, osteogenic protein-1, fibroblast growth factor, epidermal growth factor, bone morphogenetic protein-2(BMP-2) 등이 있으며 기질 생성 반응에 영향을 끼친다고 알려져 있다¹⁹⁻²².

본 연구에서는 관절 연골 세포와 유사한 성질을 가진 척추 추간판 세포에 파미드로네이트를 투여하고 세포 증식, 기질 생성, 기질 성분 mRNA와 단백질 발현 등을 조사하였는데, 결과를 보면 세포 증식에는 영향이 없었고 연골성 표현형인 제II형 교원질, aggrecan, mRNA

의 발현은 대조군에 비해 차이가 없었으나 기질 생성은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 이는 파미드로네이트가 추간판 변성 혹은 퇴행에서 기질 재생을 위한 치료적 의미로 사용될 수도 있음을 제시하는 결과이다. 이어 세포 사멸을 유도하고 파미드로네이트를 투여해보면, 세포 사멸만 유도한 군보다 유의 있게 세포 사멸을 감소시켰다. 특히 이런 결과는 퇴행이 가속화되는 과정에서 파미드로네이트의 투여로 세포 사멸을 부분적으로 막을 수 있는 가능성을 제시함으로써 추간판 퇴행의 예방에도 효과가 있을 것으로 생각한다. 그리고 연골성 기질 분해효소인 MMPs mRNA 발현을 알아보았는데 파미드로네이트 투여 농도 범위에서 의미 있는 변화는 없었다. MMPs mRNA 발현만으로는 MMPs 효소 활성을 예측할 수 없고 MMPs mRNA 발현이 증가해도 효소 활성이 감소하면 기질 분해 능력이 감소할 수 있기 때문에 향후 MMPs 효소 활성 측정을 병행해야 최종적인 결론을 얻을 수 있다. 그리고, mRNA 가 세포 내에서 발현되어도 단백질 발현에는 여러 cytokine이나 enzyme 의 영향을 받으므로 mRNA 발현과 단백질 발현에 차이가 있을 것으로 사료된다. 골다공증 치료 목적으로 투여하는 비스포스포네이트가 척추 추간판의 기질 생성과 세포 생존능력 자극, 연골성 표현형 유지에 끼치는 영향을 보면, 추간판의 재생에 긍정적 효과가 있음을 알 수 있다.

퇴행성 추간판 질환의 병인론은 아직 완전히 밝혀진 것은 아니지만 대체적으로는 추간판내 당단백의 점진적인 감소에 의한 수분압 감소에 기인한다고 알려져 있다^{8-9,11-12}. 생물학적으로 중요한 단백질 유전자의 염기서열이 밝혀지고 이러한 유전자의 조작 및 바이러스 재조합 기술, 성장인자 주입 등의 치료법이 대두되고 있지만, 이러한 방법은 우수한 생물학적 효과는 있지만 주사를 한다든지, 바이러스나 세포를 체내에 주입한다든지 하는 침습적 술식이 필요하며 더구나 생물학적

안전성도 아직 확립된 것은 아니다. 그러한 이유로 경구 투여에 의한 약제로 추간판 뿐만 아니라, 관절 연골, 그리고 골격계에 보호효과를 발휘할 수 있다면 가장 이상적인 치료방법이라고 생각된다.

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

V. 결론

척추 추간판 세포에서 파미드로네이트는 기질 생성 자극, 연골성 표현형 유지, 세포 생존능력 자극 등의 효과를 나타내어 추간판 변성에 치료적 수단으로 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

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* 2002;61:925-928.
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* 1999;104:1363-1374.
3. Schuerwegh AJ, Dombrecht EJ, Stevens WJ, Van Offel JF, Bredts CH, De Clerck LS. Influence of pro-inflammatory(IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis and Cartilage* 2003;11:681-687.
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* 1998;13:793-802.
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* 2004;9:385-392.
6. Shigekazu N. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
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* 2000;50:236-242.
8. Lipson SJ, Muir H. Proteoglycan in experimental intervertebral disc degeneration. *Spine* 1981;6:194-210.

9. Butler D, Trafimow JH, Anderson GB, McNeill TW, Huckman MS. Discs degenerate before facets. *Spine* 1990;15:111-113.
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* 1985;67-A:284-294.
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* 2001;26:1522-1527.
12. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine* 1995;20:1307-1314.
13. Heikkila P, Teronen O, Moilanen M, Konttinen YT, Hanemaaijer R, Laitinen M, et al. 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. *Anticancer Drugs* 2002;13:245-254.
14. Teronen O, Konttinen YT, Lindqvist C, Salo T, Ingman T, Lauhio A, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 by dichloromethylene bisphosphonate(Clodronate). *Calcif Tissue Int* 1997;61:59-61.
15. Adolfo D. Bisphosphonates. *Maturitas* 2002;43:19-26.
16. Ylitalo R. Bisphosphonates and atherosclerosis. *Gen Pharmacol* 2002;35:287-296.

17. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magonetto S, Ebetino FH, Colombel M, et al. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 2000;60:2949-2954.
18. Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, et al. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 2003;46:539-545.
19. Moon SH, Gilbertson LG, Nishida K, Knaub MA, Muzzonigro T, Robbins PD, et al. Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer. *Spine* 2000;25:2573-2579.
20. Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, Moon SH, Suh JK, Vogt MT, et al. 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 β 1 encoding gene. *Spine* 1999;24:2419-2425.
21. Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine* 1991;16:253-260.
22. Gruber HE, Fisher EC, Desai B, Stasky AA, Hoelscher G, Hanley EN Jr. Human intervertebral disc cells from the annulus: three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF- β 1. *Exp Cell Res* 1997;235:13-21.
23. Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine* 2000;25:2153-2157.

Abstract

Biologic Effect of Pamidronate on Degenerated Human Intervertebral Disc Cells

Sung Hwan Yoon

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Hwan Mo Lee)

As potent inhibitors of bone resorption, bisphosphonates(BPs) are widely used for the treatment of bone disorders because of increased osteoclast activity. 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.

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 TNF-alpha. Each culture was allocated to 1) positive control cultures with 10% FBS; 2) negative control cultures with 1 % FBS; 3) experimental cultures in 1 % FBS with TNF-alpha (10 ng/ml); 4) experimental cultures in 1 % FBS and TNF-alpha (10 ng/ml) with a various dose of pamidronate (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-6} M). [^3H]-Thymidine for DNA synthesis and [^{35}S]-Sulfate incorporation for proteoglycan synthesis were performed. The cells were counted on a hemocytometer using trypan-blue

exclusion to assess cellular viability. Reverse transcription polymerase chain reaction for mRNA of beta-actin, collagen type I, collagen type II, aggrecan, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 was performed.

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, 20.1% 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) with TNF-alpha(10ng/ml), pamidronate with concentration of 10^{-12} to 10^{-6} M demonstrated a stimulation effect of cell viability. Cultures with 1 % FBS showed upregulation of MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 mRNA expression and MMP-1 protein expression, while cultures with given dose of pamidronate showed no change in the expression of MMPs mRNA. However, cultures with given dose of pamidronate showed down-regulation of MMP-1 and MMP-13 protein expression.

Pamidronate, N-containing BP has anabolic and anti-resorptive effect and stimulation of cell viability on intervertebral disc cells and their matrix.

Key Words : intervertebral disc cells, bisphosphonate, proteoglycan