

사람 간엽 줄기세포의 골 형성
유도에서 pamidronate의 역할

연세대학교 대학원

의 과학과

류 주 경

사람 간엽 줄기세포의 골 형성
유도에서 pamidronate의 역할

연세대학교 대학원

의 과학과

류 주 경

사람 간엽 줄기세포의 골 형성
유도에서 pamidronate의 역할

지도교수 김 진

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

류 주 경

류 주 경의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2003년 12월 일

감사의 글

2001년 대학 4학년 2학기... 석사과정에 대한 막연한 생각만으로 고민하던 저에게 연세대학교 치과대학 구강병리학교실은 행운이었습니다. 꼭 채운 2년 동안 머리로, 가슴으로 성숙하게 해준 구강병리학교실을 사랑합니다.

논문을 쓰기까지 도움을 주신 많은 분들께 감사의 말씀 전하고 싶습니다. 먼저, 저를 구강병리학교실에서 공부할 수 있게 이끌어 주신 김진 교수님께 깊은 감사드립니다. 시행착오 많았던 저를 늘 믿어주시고 인정해주셔서 웃으면서 공부할 수 있었습니다. 또한 부족한 저의 논문을 꼼꼼히 챙겨주신 정형외과학교실 김현우 교수님과 의학공학교실 박종철 교수님께도 감사드립니다.

늘 걱정하지 말라고 하시며 방향을 제시해 주신 육종인 교수님과 다른 교실임에도 불구하고 찬양대회를 열심히 할 수 있게 적극 도와주신 치과생체재료공학교실 김경남 교수님, 격려 많이 해주신 김광만 교수님께 감사드리며 마음속으로 큰 힘이 되었습니다. 또한 바쁘신 중에도 저의 실험을 항상 도와주신 김현실 선생님께 특별히 감사드리며, 일하시는 가운데 틈틈이 도와주시고 관심 가져주신 홍준철 선생님, 아침마다 반겨주며 마음 많이 써준 지원주 선생님, 석사기간동안 함께 즐거웠던 구강병리학교실 이은주 교수님, 조교 김은정, 김태규 선생님, 대학원 후배 광영은 선생님, 늘 열심히 하는 유학생 차충민 선생님, 멀리서 실험 가르쳐 주느라 고생한 고마운 선배 주소연 선생님께 깊은 감사드립니다. 그리고...영원히 잊지 못할 내 인생의 아름다운 두 사람 조교 최정희 선생님과 선배 BK짱 김남희 선생님... 이 논문의 숨은 공로자로서, 힘들다면 힘든 석사 생활을 늘 함께 지켜주어서 행복했고, 발표부터 논문에 이르기 까지 저의 본이 되느라 수고 많이 하셨습니다.

어린시절부터 함께한 친구들인 best 신혜진, 나이팅게일 박선은과 건조할 뻔한 대학원 생활동안 활력소가 되었던 얼짱 아티스트 김용희, 형제 김태운, 호산나찬양대 우리학년 윤희, 현승, 현영, 영아, 기송, 재훈, 정현, 대학동기 승남, 수련, 재선, 은미와 BK 동기이면서 주치의였던 최인복 선생님에게 감사드립니다.

끝으로, 착함과 성실과 부지런함으로 몽친 상록수 같은 남자친구와 새벽을 밝히며 기도해준 우리 엄마 이영자 권사님, 미녀 violinist 동생 류주현, 특히 매사에 용감하라고 하신 아버지 류창희 집사님께 감사드립니다. 아버지께 자랑스러운 딸이 되고자 노력했던 것이 지금의 저를 있게 했습니다. 매우 감사하고 사랑합니다. 마지막으로 나의 삶에 주최이신 하나님께 영광 돌립니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례	
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 연구재료	5
가. 사람 간엽 줄기세포	5
나. Bisphosphonate : Pamidronate	5
2. 연구방법	6
가. 사람 골수 간엽 줄기세포의 일차 배양	6
나. Pamidronate에 의한 증식률 측정	6
다. ALPase 활성화도 측정	7
라. 실험군	7
마. mRNA 추출과 역전사-중합효소 연쇄반응	7
바. Western blot analysis	8
사. Von Kossa's silver stain	9
아. 통계처리	9
III. 결과	10
1. 사람 간엽 줄기세포의 일차 배양	10
2. Pamidronate의 농도 설정	11
가. Pamidronate에 대한 사람 간엽 줄기세포의 증식률 측정	11
나. Pamidronate의 농도에 따른 ALPase 활성화도 측정	12
3. 사람 간엽 줄기세포의 골아세포 분화 확인	13
가. 각 군별 ALPase 활성화도 측정	13
나. Pamidronate에 의한 제 1형 교원질 mRNA 발현 분석	14
다. Pamidronate에 의한 제 1형 교원질 단백질 발현 분석	15

라. Pamidronate에 의한 osteocalcin의 mRNA 발현 분석	16
마. 석회화 관찰	16
IV. 총괄 및 고찰	18
V. 결론	22
참고문헌	24
영문요약	30

그림 및 표 차례

그림 1. Pamidronate의 구조식	5
그림 2. 사람 간엽 줄기세포의 일차 배양	10
그림 3. Pamidronate 농도에 따른 사람 간엽 줄기세포의 생존율	11
그림 4. Pamidronate 농도에 따른 ALPase 활성도	12
그림 5. 각 군별 ALPase 활성도	13
그림 6. Pamidronate에 의한 제 1형 교원질 mRNA 발현	14
그림 7. Pamidronate에 의한 제 1형 교원질 단백질 발현	15
그림 8. Pamidronate에 의한 osteocalcin의 mRNA 발현.....	16
그림 9. 사람 간엽 줄기세포의 석회화 관찰	17
표 1. Primer 염기 서열	8

국문요약

사람 간엽 줄기세포의 골 형성 유도에서 pamidronate의 역할

골수 내에 존재하는 간엽 줄기세포는 골아세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포, 신경세포 등의 다양한 결체 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가진 것으로 알려져 있으며 실험실에서의 연구와 동물실험으로부터 그 가능성이 증명되었다. Bisphosphonates는 골 흡수가 야기되는 질환의 치료제로 임상에서 폭 넓게 사용되고 있는 물질로, 파골세포의 활성을 저해시킨다. 그러나 파골세포의 활성은 골아세포에서 분비되는 인자들에 의한 비중이 크기 때문에 골아세포와 관련된 pamidronate에 대한 연구가 필요하며, 이 연구에서는 사람 간엽 줄기세포의 배양을 통하여 pamidronate가 골 형성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

이 연구에서는 고관절 질환으로 인해 골반 절골술을 시행 받은 환자의 수술시 자연히 삼출되는 골수에서 간엽 줄기세포를 분리하여, 실험군으로 osteogenic supplement(OS)와 pamidronate 동시처리군, OS 1주 처리 후 pamidronate 처리한 군, pamidronate 단독처리한군, pamidronate 1주 처리 후 OS 처리한군으로 나뉘고, 대조군으로는 media에 배양한군과 OS를 처리한군을 정하여 pamidronate의 역할을 확인하였다. Pamidronate에 대한 간엽 줄기세포의 성장률 확인과 alkaline phosphatase(ALPase) 활성도 측정을 통해 처리 농도를 정하였고, 골아세포로의 분화를 관찰하기 위하여 ALPase 활성도를 측정하였다. RT-PCR을 이용하여 제 1형 교원질과 osteocalcin의 mRNA 발현을 관찰하였고, 제 1형 교원질의 단백질 발현을 western blot analysis로 관찰하였다. Pamidronate 처리에 따른 석회화 정도를 관찰하기 위하여 von Kossa's 염색을 시행하였다.

결과는 다음과 같다.

1. Pamidronate에 대한 사람 간엽 줄기세포의 성장률을 측정한 결과, 1ug/ml 이하의 농도에서 90%의 성장률을 보였고, 그 중 100ng/ml의 농도에서 ALPase 활성도가 가장 높았다.
2. 각 군별로 ALPase 활성도를 측정한 결과, 배양 3주째에 대조군과 OS와 pamidronate 동시처리군, OS에 pamidronate 후처리군, pamidronate 전처리군에 비해 pamidronate 단독처리군에서 활성이 가장 높았다.
3. Pamidronate 단독처리군에서 제 1형 교원질의 mRNA 발현양은 대조군, OS와 pamidronate 동시처리군, OS에 pamidronate 후처리군, pamidronate 전처리군에 비교하였을 때 가장 높았으며, pamidronate 단독처리군에서 제 1형 교원질 단백질 발현도 대조군에 비교하여 증가하였다. 또한 OS처리군을 제외한 모든 군에서 osteocalcin의 mRNA 발현은 확인할 수 없었다.
4. 석회화를 관찰한 결과, OS처리군에서는 강한 염색상을 보인 반면, pamidronate 단독처리군, OS에 pamidronate 전처리군과 후처리군에서는 석회화를 볼 수 없었고, OS와 pamidronate 동시처리군에서는 pamidronate의 농도가 높아짐에 따라 석회화 침착은 감소하였다.

이상의 연구 결과로 골 흡수 억제제인 pamidronate는 사람 간엽 줄기세포의 증식과 초기 분화과정인 세포외기질 증가에 영향을 미치나 골 기질과 석회화 형성은 저해하는 것으로 나타났다.

핵심되는 말 : pamidronate, 사람 간엽 줄기세포, 골아세포 분화, 제 1형 교원질

사람 간엽 줄기세포의 골 형성 유도에서 pamidronate의 역할

(지도교수 김 진)

연세대학교 대학원 의과학과

류 주 경

I. 서 론

골수 내에 존재하는 줄기세포는 크게 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell)와 간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)로 나눌 수 있다. 조혈 줄기세포는 여러 가지 혈구세포를 생산하는 세포인 반면에, 간엽 줄기세포는 자가 재생뿐만 아니라 다양한 결체 조직으로의 분화가 가능하여 골아세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포, 신경세포 등을 만들 수 있는 것으로 알려져 있으며 실험실상에서의 연구와 동물 실험으로부터 그 가능성이 증명되었다^{1,2,3}. 이 중 골아세포는 dexamethasone, β -glycerol phosphate, ascorbic acid의 osteogenic supplement(OS)를 통해 간엽 줄기세포로부터 분화가 가능하고, 이 과정에서 alkaline phosphatase(ALPase)의 발현증가와 칼슘 축적의 확인으로써 골아세포로의 분화가 규명되었다^{4,5}.

Bisphosphonate는 pyrophosphate의 유도체로 골 흡수억제제로 잘 알려져 있으며, 골 흡수과정을 야기하는 질병에 폭 넓게 사용되고 있는 물질이다. 유사화합물로는 etidronate, clodronate, tildronate, pamidronate, alendronate, incadronate, zoledronate, ibandronate가 있다^{6,7,8}. 이 중 pamidronate[Disodium-3-amino-1-hy-

-droxy-propylidene-1,1-biphosphonate]는 제 2세대 amino-bisphosphonate 제제로서, 특히 bone turnover가 활발한 부위에서 hydroxyapatite 결정에 재빨리 흡수되어 석회화된 기질의 용해성을 낮추고 파골세포의 골 흡수 작용에 저항할 수 있게 해줌으로써 파젯씨 병(Paget's disease), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 골용해성 골전이(osteolytic bone metastasis), 골다공증의 치료에 사용되고, 그 효과는 다른 화합물에 비해 뛰어나다고 알려져 있다^{9,10,11,12}.

Bisphosphonate 제제의 역할에 관한 연구는 파골세포에 관한 연구에 집중되어 있다. Bisphosphonate는 골 흡수가 일어나는 부위의 파골세포 및 무기질 부위에 강력한 친화력을 갖고 결합한다. 이렇게 축적된 bisphosphonate는 새로운 파골세포를 생성하기 위해 모이는 파골세포의 전구세포를 억제하고, 파상연(ruffled border)의 소실을 일으켜 파골세포의 수적감소를 일으킨다. 또한 파골세포에서 수소 ATPase에 의한 수소수송에 작용하여 산(acid)의 생성을 억제하며, tyrosine phosphatase의 이상을 일으켜 파골세포의 기능적 장애를 초래하여 골 흡수 능력을 저해한다는 보고가 있다^{13,14,15}. 그러나 Viereck 등 및 Evans의 연구^{16,17}에 의하면 파골세포의 활성이 골아세포에서 분비되는 인자들에 의해 조절되기 때문에 bisphosphonate가 골아세포의 기능에도 영향을 미칠 것이라는 새로운 연구방향이 제시되고 있다. 그러나 bisphosphonate 제제가 임상적으로 골 질환 치료에 사용되고 있지만 그 작용기전은 아직 분명하지 않은 상태이기 때문에 골 형성과정에서 중요한 골아세포에 미치는 역할에 대한 연구가 필요하다.

따라서 이 연구에서는 pamidronate가 사람 간엽 줄기세포에서 골아세포로의 분화에 미치는 영향을 알아보기로 본 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구재료

가. 사람 간엽 줄기세포

고관절 질환으로 인하여 골반 절골술을 시행 받은 환자(연령, 4-10세)에서 수술시 자연히 삼출되는 골수에서 분리한 간엽 줄기세포를 실험에 이용하였다.

나. Bisphosphonate : Pamidronate

Pamidronate(한림제약, Korea)는 Gador(Argentina)에서 개발한 것으로 disodium-3-amino-1-hydroxy-propylidene-1,1-bisphosphonate의 구조이다(그림 1).

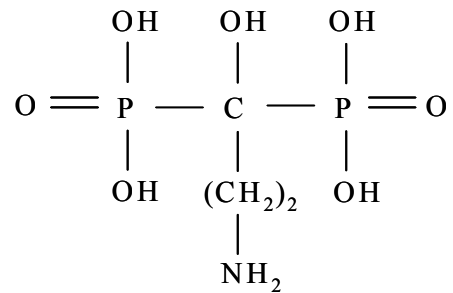


그림 1. Pamidronate의 구조식

2. 연구방법

가. 사람 골수 간엽 줄기세포의 일차 배양

일차 배양배지인 low-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium(lg-DMEM; glucose 1g/L, Gibco BRL, NY, USA)과 골수를 섞은 후 1500rpm에서 3분간 일차 원심분리를 시행하여 세포를 원심분리하고 Percoll용액(SIGMA, MO, USA)을 이용한 초원심 분리를 시행하여 유핵세포만을 분리하였다. 5% CO₂, 37°C 배양기내에서 배양하며 새 배지(10% 우태아 혈청이 포함된 lg-DMEM)로 3일마다 교환하면서 사람 골수 간엽 줄기세포만의 분리 배양을 시도하였으며 70-80% 정도 자라면 계대배양하며 3-5차 계대 배양한 세포를 실험에 이용하였다.

골아세포로의 분화를 유도하기 위하여 100nM dexamethasone(dex.; SIGMA), 0.05mM L-ascorbicacid-2-phosphate(A.A; Wako), 10mM β-glycerophosphate(β-GP; SIGMA)를 배지에 첨가 하였다.

나. Pamidronate에 의한 세포 증식률 측정

Pamidronate가 간엽 줄기세포의 세포성장에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 96 well plate에 well당 1x10⁴개의 사람 간엽 줄기세포를 넣어 24시간동안 배양한 후, pamidronate를 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000ng/ml 농도로 처리하여 37°C에서 3일, 7일 반응시킨 후 3,4,5-dimethyl N-methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromid(MTT; SIGMA) 검사로 사람 간엽 줄기세포의 세포성장률을 측정하였다. MTT검사는 각각의 농도로 처리한 사람 간엽 줄기세포를 phosphate-buffered saline(PBS)로 두 번 세척하고 MTT용액을 37°C에서 3시간 처리한 후, 배양액을 버리고 dimethyl sulfoxide(DMSO; SIGMA)로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. ALPase 활성도 측정

Pamidronate의 농도에 따른 ALPase의 활성도를 측정하기 위하여 6 well plate에 well당 3×10^4 개의 세포를 분주하여 pamidronate를 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000ng/ml 농도로 처리하여 각각 1, 2, 3주간 배양한 후 PBS buffer로 세척하고 0.1% triton x-100 $200 \mu\text{l}$ 로 처리된 세포 용해물(cell lysates)을 p-nitrophenyl phosphate(SIGMA)와 1분 30초간 반응시켜 분광측정계(spectrophotometer; Armersham Pharmacia, NJ, USA)로 405nm에서 효소에 의해 생성된 p-nitrophenol의 흡광도를 측정하여 유출액내의 ALPase 활성도를 측정하였다. ALPase 활성도가 가장 높은 pamidronate 농도를 선정한 후, 실험군별로 같은 방법으로 ALPase 활성도를 측정하였다.

라. 실험군

이 연구의 실험군으로는 사람 간엽 줄기세포에 OS와 pamidronate를 동시처리한군(OSP), OS 1주 처리 후 pamidronate를 처리한군(OS/P), pamidronate 단독처리군(P), pamidronate 1주 처리 후 OS를 처리한군(P/OS)으로 나누었고, 대조군으로는 lg-DMEM으로 배양한군(media)과 OS를 처리한군(OS)으로 정하였다.

마. mRNA 추출과 역전사-중합효소 연쇄반응(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR)

각 군별로 분화시킨 세포로부터 RNeasy mini kit(QIAGEN, CA, USA)를 이용하여, cDNA 합성에 사용될 총 RNA를 분리한 후, 자외선 분광기(UV spectrophotometer; Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 260nm/280nm에서의 흡광도를 측정하여 RNA의 양을 계산하여 추출한 RNA를 정량하고 순도를 검증하였다. cDNA 합성을 위하여 $0.5 \mu\text{g}$ 의 RNA를 reverse transcriptase(Promega, WI, USA)와 oligo d(T) primer를 이용하여 42°C 에서 1시간 95°C 에서 5분간 반응

시키고 4℃에서 반응을 중지시켰다. 합성된 cDNA를 대상으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)와 제 1형 교원질, osteocalcin primer로 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응은 94℃에서 5분간 둔 후, 변성반응을 94℃에서 30초, 결합반응을 58℃에서 30초 중합 반응은 72℃에서 30초간 30주를 반복하고 마지막 중합반응은 72℃에서 10분간 연장하여 반응시켰다. 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였다(표 1).

표 1. Primer 염기 서열

Primer Name	Sequence(5'→3')	PCR product(bp)
Type I collagen - sense	GACGAGACCAAGAACTG	599
- antisense	CCATCCAAACCACTGAAACC	
Osteocalcin - sense	CATGAGAGCCCTCACA	310
- antisense	AGAGCGACACCCTAGAC	
GAPDH - sense	GGCAGCTGGAATTAAATGA	261
- antisense	TGCTCGAAGCAACACATG	

바. Western blot analysis

Pamidronate 처리에 따른 제 1형 교원질의 발현양을 비교하기 위하여 western blot analysis를 시행하였다. 각각의 sample 동량에 5배의 SDS sample buffer(60mM Tris-HCL pH6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.1mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 넣어 8% SDS-acrylamide gel에 2시간 전기 영동한 다음, 전기 영동한 gel을 semi-dry transfer(Bio-Rad, CA, USA)에서 30분간

nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 5% fat-free dry milk-PBST buffer(PBS, 0.1% Tween-20)에서 2시간 동안 blocking을 한 후에 PBST buffer로 3번씩 5분간 세척하였다. 제 1형 교원질 단일클론항체(Abcam, Cambridge, UK)를 3% fat-free dry milk-PBS buffer에 각각 1000배 희석한 농도로 넣고 이 용액에 transfer 된 nitrocellulose membrane을 넣어 2시간 동안 흔들고, 다시 5분 간격으로 PBST buffer에서 3회 세척하였다. Membrane을 각각 anti-rabbit-horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody가 PBS buffer에 2000배 희석된 용액에 넣고 상온에서 1시간동안 반응시켰다. PBST buffer로 5분간 3회 세척하고 enhanced chemiluminescence(ECL) detection kit(Amersham)를 사용하여 x-ray 필름에 감광하여 현상하여 결과를 관찰하였다.

사. Von Kossa's 염색

6 well plate에 well당 3×10^4 개의 세포를 분주하여 군별 supplement를 이용하여 3주간 배양한 후 배지를 제거하고 10% formalin으로 세포층을 고정시킨 후 증류수로 한 차례 세척하여 10분 간 어두운 곳에서 5%(w/v) silver nitrate solution과 반응시켰다. 이어 증류수로 헹구어 내고 직사광선을 비추어 석회화된 기질을 가시화 하였다.

아. 통계처리

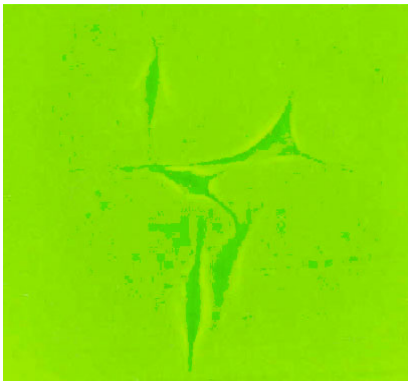
MTT assay와 ALPase 활성도 측정은 반복 시행되었으며, 대조군 내 차이에 대한 유의성은 two sided t-test 방법을 이용하여 통계처리 하였다. 이 논문의 수치는 평균과 표준편차로 나타내었으며, $p < 0.05$ 에서 유의성을 결정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 사람 간엽 줄기세포의 일차 배양

사람 간엽 줄기세포는 일차 배양한 시기로부터 약 3일 후 단일세포로 분리되어 배양 접시의 바닥에 붙어있는 것이 관찰되며(그림 2-1), 7일 후 이들 세포로부터 증식된 많은 세포가 관찰되고, 세포의 모양은 섬유모세포와 유사한 길쭉한 형태로 관찰되었다(그림 2-2).

2-1)



2-2)

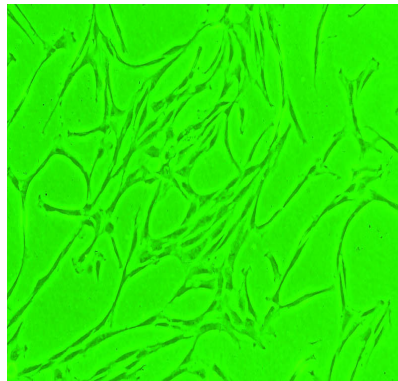


그림 2. 사람 간엽 줄기세포의 일차 배양. 2-1) 간엽 줄기세포를 일차배양 하였을 때, 3일 후 단일세포로 분리되어 배양접시에 붙어있는 것이 관찰된다. 2-2) 7일 후 이들 세포로부터 증식된 많은 세포들이 보인다.

2. Pamidronate의 농도 설정

가. Pamidronate에 대한 사람 간엽 줄기세포의 증식률 측정

Pamidronate의 처리 농도를 정하기 위하여 배양된 간엽 줄기세포에 pamidronate를 농도별로 처리하여 3일후와 7일후에 MTT assay로 관찰하였다. 1ug/ml 농도까지는 3일과 7일 후에 각각 90% 이상 세포 생존율이 유지 되어 생존율에 차이가 없었으며($p>0.05$), 2ug/ml 농도에서 세포성장이 현저히 감소되어 ($p<0.05$) 통계학적 유의성을 확인하였다(그림 3).

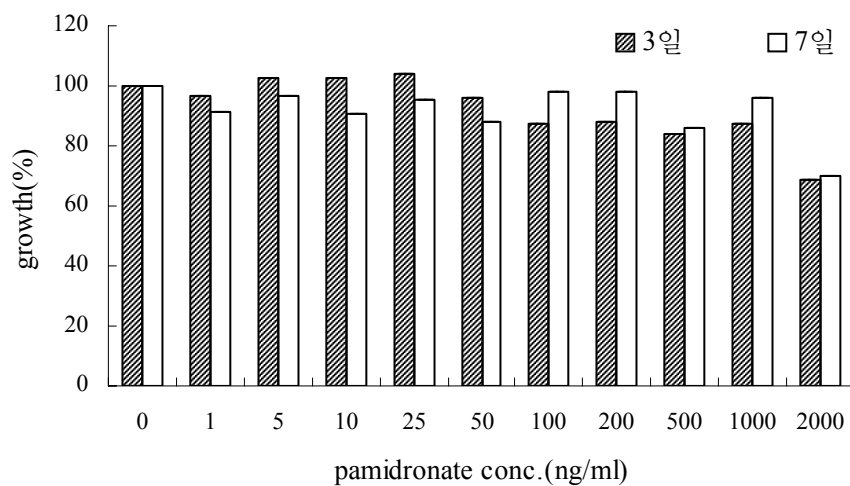


그림 3. Pamidronate 농도에 따른 사람 간엽 줄기세포의 생존율 측정. Pamidronate의 농도에 따른 사람 간엽 줄기세포의 생존율을 MTT assay로 측정하였다. 1ug/ml 이하의 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 보였다.

나. Pamidronate의 농도에 따른 ALPase의 활성화 측정

Dex., A.A, β -GP가 첨가된 배지에 pamidronate를 농도별로 첨가 하였을 때 간엽 줄기세포의 ALPase 활성도를 측정하였다. 시기별로는 배양 2주 후에 가장 높은 ALPase 활성도를 보였고, 농도별로는 100ng/ml에서 가장 높은 활성도를 확인하였다(그림 4).

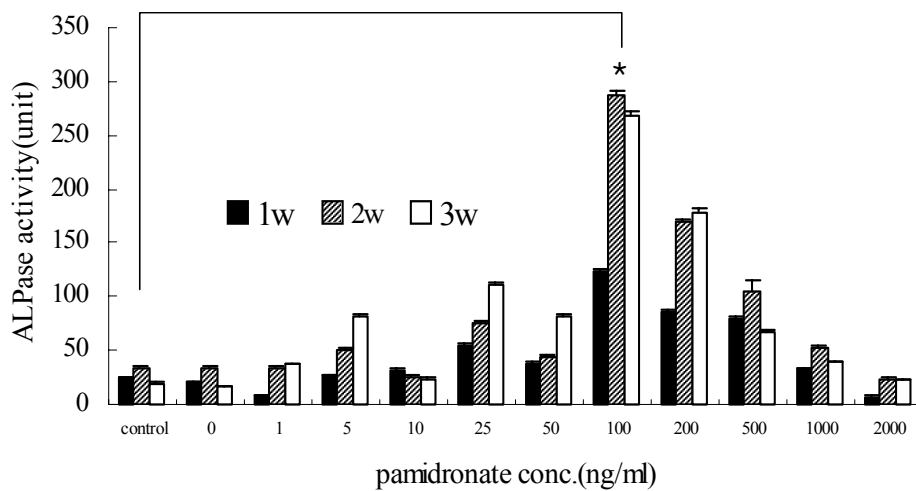


그림 4. Pamidronate 농도에 따른 ALPase 활성화도. 사람 간엽 줄기세포에 pamidronate를 농도별로 처리하였을 때, 100ng/ml 농도에서 가장 높은 활성도를 나타내었다. *p=0.02

세포 생존율이 90% 이상 유지되는 농도에서 ALPase 활성도가 pamidronate 100ng/ml 농도에서 가장 높았고 통계학적 유의성이 있었으므로(p=0.02), 이 연구에서는 실험군에 100ng/ml 농도를 적용하였다.

3. 사람 간엽 줄기세포의 골아세포 분화 확인

가. 각 군별 ALPase 활성도 측정

Pamidronate 100ng/ml 농도로 처리하여 각 군별로 ALPase 활성도 변화를 측정하였다. Media군은 배양기간 동안 점차 증가 하였으나 전체 배양기간 동안 다른군과 비교하였을 때 낮은 값을 확인하였다. OS군의 ALPase 활성도는 배양 2주 까지 증가를 보이다가 3주엔 감소하였고, 배양 2주에는 같은 시기의 다른군보다 높았다. OSP군에서는 배양 1주에 다른군과 비교하였을 때 높은 활성도를 확인하였지만 2주까지 값을 유지하다가 3주에 감소하는 것을 확인하였다. 반면, OS/P군은 전체 배양기간 동안 가장 낮은 값을 보였고, 배양기간 동안 활성도의 변화가 없었다. P군에서는 시간이 지남에 따라 활성도의 증가를 확인할 수 있었고, 전체 배양기간 중 배양 3주째에 다른군들과 비교하였을 때 가장 높은 활성도를 나타내었다(p=0.02). 또한 P/OS군에서는 점차 증가하는 값을 나타내었으나 그 값은 다른군과 비교하였을 때 낮은 수치를 보였다(그림 5).

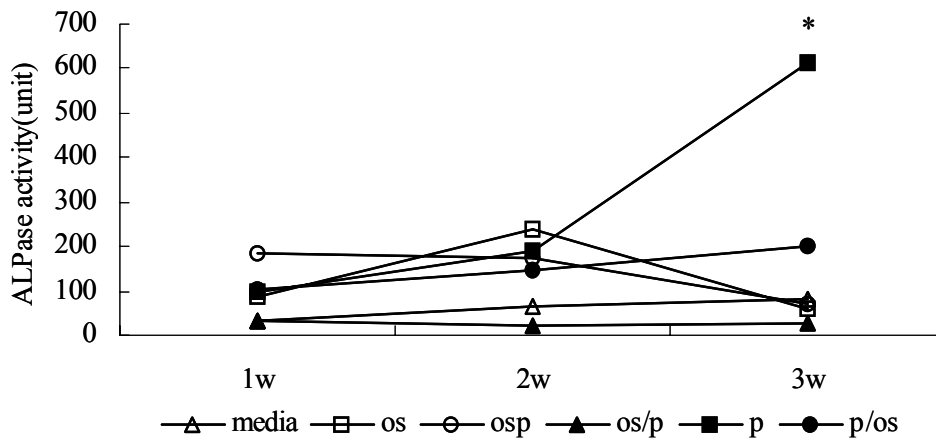


그림 5. 각 군별 ALPase 활성도. Pamidronate 단독처리군에서 3주째 활성도가 가장 높았다. *p=0.02

나. Pamidronate에 의한 제 1형 교원질 mRNA 발현 분석

각 군별로 골아세포 초기 분화단계의 표지자인 제 1형 교원질의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR로 비교한 결과, media군은 시간이 지남에 따라 제 1형 교원질의 mRNA 발현이 점차 증가하였고, OS군과 OSP군은 초기 1주에 발현의 증가를 보였다가 2, 3주에는 감소하였다. 반면에 OS/P군은 1, 2주에 약한 발현을 보이다가 배양 3주에 발현이 증가하였다. P군에서는 전체 배양기간 동안 제 1형 교원질의 mRNA 발현을 확인하였고, 다른군들에 비해 강하게 발현되었다. 또한 P/OS군에서는 1주에 강한 발현을 보이다가 2, 3주에서 그 발현이 감소하였다. 각 군은 GAPDH를 통해 발현정도를 보정하였다(그림 6).

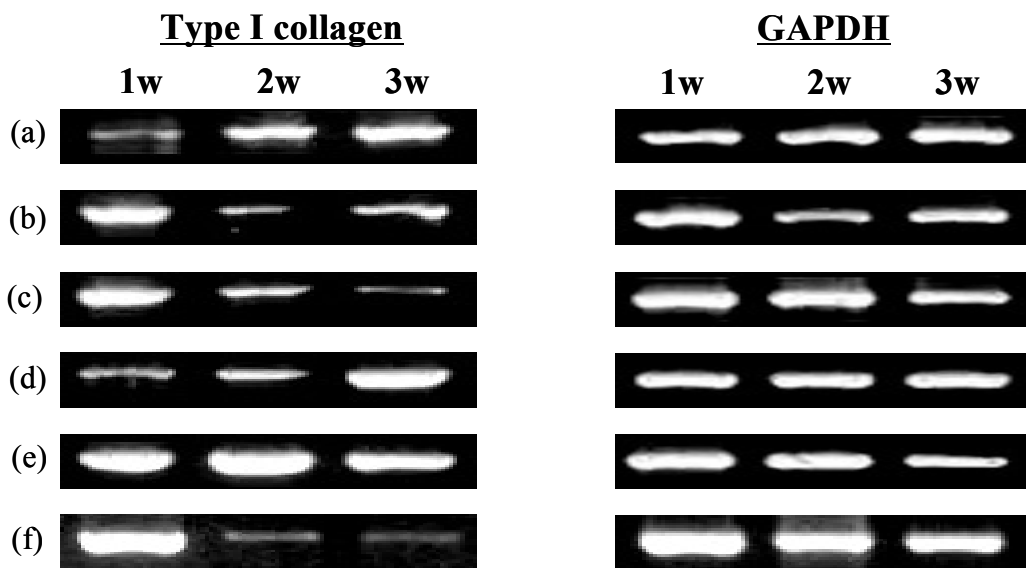


그림 6. Pamidronate에 의한 제 1형 교원질 mRNA 발현. 각 군별로 제 1형 교원질의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. Media군을 기준으로 제 1형교원질의 mRNA의 발현을 파악한 결과, pamidronate 처리군에서 전체 배양기간동안 제1형 교원질의 mRNA 발현이 강하게 나타났다. (a) media (b) OS (c) OSP (d) OS/P (e) P (f) P/OS

다. Pamidronate에 의한 제 1형 교원질 단백질 발현 분석

Pamidronate에 의한 제 1형 교원질 단백질 발현을 확인하기 위하여 western blot analysis를 시행하였다. 대조군과 비교하였을 때 P군에서 제 1형 교원질의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(그림 7).

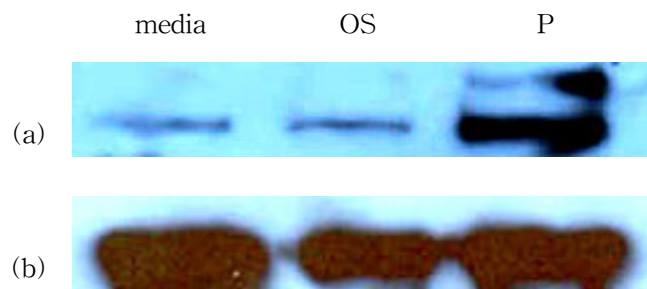


그림 7. Pamidronate에 의한 제 1형 교원질 단백질 발현. Pamidronate 처리에 따른 제 1형 교원질 단백질 발현정도를 파악하기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. Media군을 기준으로 제 1형 교원질 단백질을 비교한 결과, pamidronate 처리군에서 제 1형 교원질 단백질의 양이 증가하였다. (a) 제 1형 교원질, (b) actin

라. Pamidronate에 의한 osteocalcin mRNA 발현 분석

각 군별로 처리 하였을 때 골아세포 분화 후기 표지자인 osteocalcin의 발현을 RT-PCR로 관찰한 결과, 분화유도물질인 OS를 3주 처리한 OS군에서 osteocalcin의 발현을 확인할 수 있었고, media군을 비롯한 다른 실험군에서는 모든 시점에서 osteocalcin의 발현을 확인할 수 없었다(그림 8).

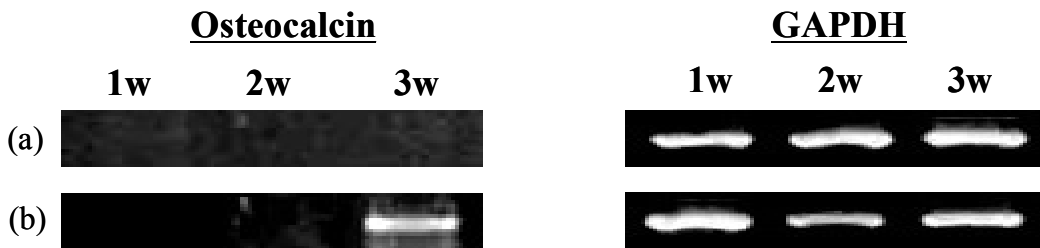


그림 8. Pamidronate에 의한 osteocalcin mRNA 발현. Media군을 기준으로 osteocalcin mRNA의 발현을 관찰한 결과, 배양 3주째에 OS군에서 osteocalcin mRNA 발현을 확인하였다. (a) media (b) OS

마. 석회화 관찰

석회화 관찰을 위하여 von Kossa's 염색을 하였다. 각 군별로 배양 3주후 5% silver nitrate로 반응하여 관찰한 결과 OS군에서 강한 석회화를 관찰할 수 있었으나 P군에서는 석회화를 관찰할 수 없었다. OSP군에서는 100ng/ml의 농도에서 약한 석회화를 관찰 하였으나, pamidronate의 농도가 높아질수록 석회화는 감소되었다. P/OS군에서 염색이 된 것으로 보아 pamidronate는 석회화과정을 저해하는 것으로 생각된다(그림 9).

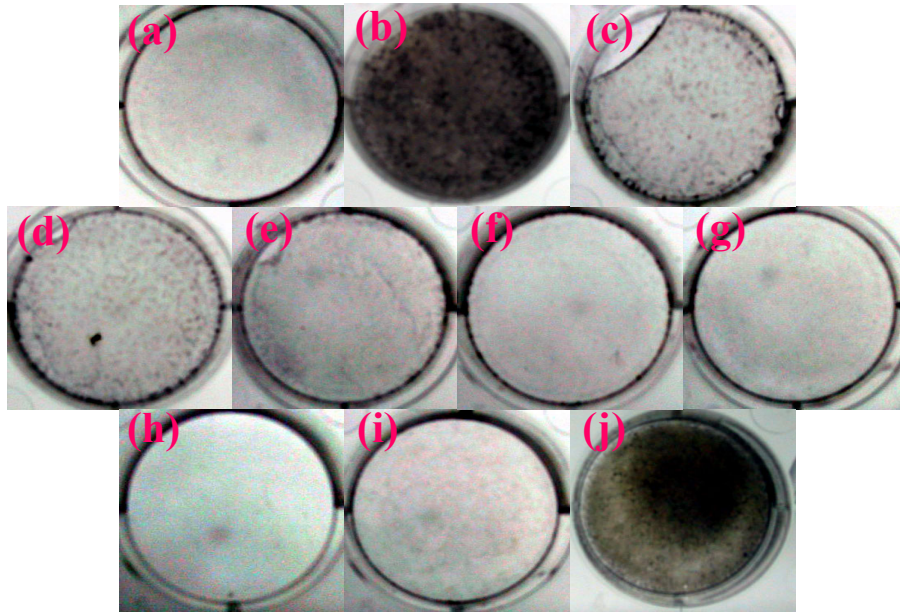


그림 9. 사람 간엽 줄기세포의 석회화 관찰. Pamidronate 처리에 따른 사람 간엽 줄기세포의 석회화 관찰을 위하여 von Kossa's 염색을 수행한 결과, OS군에서 강한 석회화 침착이 나타났고, OSP군에서는 pamidronate의 농도가 높아질수록 석회화 침착은 감소하였다. P군에서는 석회화 침착을 확인할 수 없었다. (a) media, (b) OS, (c) OSP(100ng/ml), (d) OSP(200ng/ml), (e) OSP(500ng/ml), (f) OSP(1ug/ml), (g) OSP(2ug/ml), (h) OS/P, (i) P, (j) P/OS

IV. 총괄 및 고찰

이 연구는 사람 간엽 줄기세포의 골 형성 과정에서 pamidronate의 역할에 대한 연구로서, 지금까지 pamidronate에 관한 연구는 파골세포에 의한 골 흡수 억제 효과에 집중 되어왔다¹⁸. 그러나 골 흡수에 관여하는 파골세포의 활성화는 골아세포에서 분비되는 인자들에 의한 비중이 크기 때문에 pamidronate에 의한 골아세포와 관련된 연구의 필요성이 제기 되었다^{19,20}.

사람 간엽 줄기세포는 여러 단계의 분화과정을 거쳐 골아세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포, 인대세포 등으로 다양하게 분화할 수 있는 능력을 가진다²¹. 골수에서 채취된 사람의 간엽 줄기세포는 자가 재생 뿐 아니라 다양한 결체 조직으로의 분화가 가능하여 실험실에서의 골 형성과정에 이상적인 세포이다. 이 중 골아세포는 dexamethasone 등의 골 형성배지(OS)를 이용하여 비교적 쉽게 분화 유도될 수 있어 골 형성을 위한 연구에 활발히 사용되고 있다^{22,23}.

Pamidronate는 인체 내 골아세포 및 다른 종류의 세포들에 적용되는 약리학적 조건이 미흡하기 때문에 농도설정에서 실험실의 연구결과와 일치시키기에는 어려움이 있다²⁴. Reinholz 등²⁵ 은 임상에서 적용하는 농도(7.5mg/kg/year)에 기초하여 골아세포에 pamidronate를 처리하여 농도별 세포의 성장률을 확인한 결과 농도 의존적으로 성장률의 감소를 보였다고 보고하였다. 그러나 Klein 등²⁶ 은 bisphosphonate 제제가 골수 유래 조골세포의 성장을 유도한다고 보고하였는데, 이러한 상반되는 연구결과는 세포의 종류에 따라 bisphosphonate 제제의 처리 농도와 기간이 다르기 때문이다. 본 연구에서는 0ng/ml 에서 2ug/ml 농도 사이에서 pamidronate가 사람 간엽 줄기세포의 성장에 직접적으로 미치는 영향을 관찰하였고, 1ug/ml 농도까지는 90% 이상의 세포성장률을 확인하였으나 그 이상의 농도에서는 세포의 성장이 저해됨을 관찰하였다.

골아세포의 초기 분화와 관련되어 있는 ALPase의 활성도를 이용하여 간엽 줄

기세포의 골세포 분화 표지자로 사용, 관찰한 연구에 따르면²⁷ OS 처리 7일 만에 ALPase 활성도가 유도되기 시작하였으며, 14일 후 그 활성도가 가장 높아지다가 점차 감소하는 것으로 나타났다. 이는 ALPase가 석회화 물질의 형성에 앞서 작용한다는 것을 의미하는 것으로서²⁸, 이 연구에서는 OS처리군에서 14일 이후에 활성도가 감소하는 것을 보였지만 pamidronate 단독처리군에서는 14일 후에도 활성도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 pamidronate가 지속적으로 ALPase를 증가시켜 골아세포 분화에 영향을 미치는 것으로 생각된다. Goziotes 등²⁹ 은 bisphosphonate가 ALPase 활성도에 영향을 준다고 보고하였고, Igarashi 등³⁰ 의 연구에서는 bisphosphonate 제제가 ALPase 활성을 증가시키며, 골 흡수를 증가시키는 프로스타글란딘-E₂를 저해시킨다는 것을 확인하고 골아세포에서 분비되는 프로스타글란딘-E₂를 저해하는 것이 부분적 골 재생에 도움을 주며 ALPase 활성도와 같은 골아세포의 기능도 이러한 기전을 통해 증가하였을 것이라 추측하였다.

사람 간엽 줄기세포의 분화과정에서 세포 외기질의 분비와 침착은 골 형성을 촉진하는 역할을 하기 때문에 분화과정에서 제 1형 교원질 발현증가는 중요한 의미를 가진다³¹. 임상보고에 따르면 William³² 은 골형성부전증(Osteogenesis Imperfecta: OI) 환자의 80-90%에서 교원질의 합성과정에서 아미노펩타이드 사슬의 소실로 인하여 제 1형 교원질의 돌연변이가 나타난다고 보고하였다. 이에 대한 실험실에서의 연구는 미흡한 편이나 Guenther 등³³ 및 Gallagher 등³⁴ 의 연구에서 bisphosphonate를 토끼의 연골세포와 백서의 골수에서 채취한 세포에 처리하였을 때 제 1형 교원질이 증가한다고 보고하였다. 또한 Tsushimoto 등³⁵ 은 bisphosphonate 제제를 처리하였을 때 원 α1 교원질(pro-α1 collagen)의 mRNA 단계의 증가를 확인함으로써 bisphosphonate 제제가 교원질 전사과정(transcriptional process)에 변화를 준다고 제시하였다. 따라서 본 연구에서는 pamidronate 처리에 의한 제 1형 교원질의 발현 및 그 과정을 파악하기 위하여 mRNA 단계와 단백질단계에서의 발현정도를 확인하였다. mRNA 단계에서 각 군별로 발현정도를 비교하였을 때 pamidronate 단독처리군에서는 1주부터 제 1형 교원질의 발현이 증가하였고, 3주까지도 그 발현양이 증가하는 것으로 나타났다.

Pamidronate가 제 1형 교원질의 발현을 증가시키는 것을 확인하기 위하여 pamidronate 처리 후 OS처리군을 비교 하였을 때 1주 후에는 발현이 증가하였으나 2주에서 그 발현양은 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 단백질 발현에서도 pamidronate 단독처리군에서 제 1형 교원질의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 pamidronate는 제 1형 교원질의 합성에 있어서 전사단계 뿐만 아니라 단백질 합성단계에도 작용해 발현을 증가시키는 것으로 관찰되었다.

Osteocalcin은 골 조직의 비교원질 단백질에서 가장 풍부한 물질 중 하나이다. 일부 조건에 따라 osteocalcin이 골 형성의 방해인자로 작용한다는 보고가 있지만³¹, 흔히 골 조직 형성에 있어서 osteocalcin은 골아세포에 의해 특이적으로 발현된다고 알려져 있다. 그래서 간엽 줄기세포의 골아세포 분화에 대한 연구에서 osteocalcin은 골 조직의 석회화 시기와 관련되어 골아세포 분화의 표지자로서 사용되고 있다³⁶. 이 연구에서는 pamidronate 처리에 의하여 사람 간엽 줄기세포의 골화 정도를 파악하기 위하여 osteocalcin mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 확인하려 하였으나, OS처리군을 제외한 다른 군에서는 발현되지 않았다.

Bisphosphonate 제제에 관한 임상적 연구결과, 처리 시 골의 흡수를 방해하는 것 외에 골의 석회화가 억제된다고 보고 되었다³². 예로 bisphosphonate 제제들 중 etidronate를 백서에 투여하였을 때, 석회화를 저해하여 구루병이 유발되는 것으로 설명된다. 그러나 다른 bisphosphonate 제제인 clodronate의 연구에서는 이와 같은 석회화 억제 과정을 관찰할 수 없었다고 하였다^{37,38}. 이는 산에 저항성을 갖게 하여 골에서 칼슘을 유리하는 기전에 따라 석회화 결정의 생성이 억제된다는 것, 골아세포에 직접적으로 작용하여 석회화 형성을 저해한다는 것과 골의 형성 및 흡수과정에서의 항상성 유지에 따른 세 가지 기전이 복합되어 설명 되고 있다³⁵. 이 연구에서 사용된 pamidronate는 각 군별로 배양 3주 후 von Kossa's 염색을 시행한 결과 OS처리군에서만 석회화침착을 확인하였다. OS와 pamidronate 동시처리군에서는 다소 약한 석회화침착을 확인하였지만 pamidronate를 농도별로 처리하였을 때 고농도로 진행 할수록 석회화가 저해되는 것으로 나타났다. 또한

pamidronate처리 후 OS처리군 에서도 석회화 침착은 관찰되었으나 이것은 pamidronate를 처리한 후 3주 동안의 OS처리에 의한 것이라는 것을 나타내며 이것 또한 pamidronate가 석회화를 억제하는 것을 뒷받침 하는 소견으로 생각되었다.

이 연구에서 pamidronate는 사람 간엽 줄기세포 성장을 저해하지 않는 농도 (100ng/ml)에서 ALPase 활성도 증가와 제 1형 교원질의 발현증가를 통해 사람 간엽 줄기세포의 골아세포 분화의 초기 과정에 관여함을 알 수 있었다. 그러나 석회화 과정을 억제하는 점으로 보아 pamidronate의 임상적용에 신중해야 함을 알 수 있었다.

V. 결 론

이 연구에서는 사람 간엽 줄기세포의 골 형성에서 pamidronate의 역할에 대하여 연구하였다. 골수로부터 사람 간엽 줄기세포를 분리하여 이용하였고, pamidronate가 영향을 미치는 시기를 알아보기 위하여 네 군- OS와 pamidronate 동시처리군(OSP), OS처리 후 pamidronate처리한군(OS/P), pamidronate 단독처리군(P), pamidronate처리 후 OS처리한군(P/OS) -의 실험군으로 나누었으며 세포 성장을 저해하지 않는 pamidronate의 농도를 정하여 처리하였다. 골아세포로의 분화를 확인하기 위하여 ALPase 활성도를 측정하였고, 골 분화 표지자인 제 1형 교원질과 osteocalcin의 발현을 mRNA 단계에서 측정하였고, 제 1형 교원질 발현을 western blot analysis를 통해 관찰하였다. 또한 석회화 기질의 확인을 위하여 von Kossa's 염색을 시행함으로써 골 형성에 있어서 pamidronate의 역할을 알아보고자 하였다.

결과는 다음과 같다.

1. Pamidronate에 대한 사람 간엽 줄기세포의 성장률을 측정한 결과, 1ug/ml 이하의 농도에서 90%의 성장률을 보였고, 그 중 100ng/ml의 농도에서 ALPase 활성도가 가장 증가 하였다.
2. 각 군별로 ALPase 활성도를 측정한 결과, 대조군과 다른 실험군에 비해 pamidronate만 3주 처리한 군에서 활성이 증가되었다.
3. 골 분화 표지자인 제 1형 교원질과 osteocalcin의 mRNA 발현을 확인한 결과, 대조군과 다른 실험군에 비해 pamidronate 단독처리군에서 제 1형 교원질 mRNA 발현양이 증가하였으며, OS처리군을 제외한 모든 실험군에서 osteocalcin mRNA 발현은 확인하지 못하였다. 또한 제 1형 교원질 단백질 발

현을 관찰한 결과 대조군에 비교하여 pamidronate 단독처리군에서 제 1형 교원질 단백질 발현이 증가함을 확인하였다.

4. 석회화 기질의 확인을 위하여 von Kossa's 염색을 시행한 결과, OS처리군과 pamidronate처리 후 OS처리군에 반해 pamidronate 단독처리군 및 다른 실험군에서는 석회화를 확인할 수 없었고, OS첨가 배지에 pamidronate를 농도별로 처리 하였을 때에는 농도가 높아질수록 석회화는 감소되었다.

이상의 연구 결과로 골 흡수 억제제인 pamidronate를 사람 간엽 줄기세포의 배양에 첨가 하였을 때 ALPase 활성도를 증가시키고 제 1형 교원질의 발현을 증가시킴으로서 사람 간엽 줄기세포의 증식과 초기 분화과정을 자극하나, 골 기질 생성과 석회화 과정은 억제하는 것으로 생각되었다.

참고 문헌

1. Jaiswal N., Stephen E., Arnold I. and Scott P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell. Biochem.* 1997; 64: 295-312.
2. Richard O. C., Ferdinand C. M., Josep A., and Jamis T. Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. *Biomaterial* 1998; 19: 1845-1854.
3. Yochikawa T. Bone reconstruction by cultured bone graft. *Materials Sci. Eng.* 2000; C13: 29-37.
4. Rickard D. J., Kassem M., and Hefferan T. E., Sarkar gobinda. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner. Res.* 1996; 11(3): 312-324.
5. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., and Marshak D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
6. Fleisch H. Bisphosphonate: Mechanisms of action. *Endocrine Reviews* 1998; 19(1): 80-100.
7. Rodan G. A. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *J Clin. Invest.* 1996; 97(12): 2692-2696.

8. Kellihan M. J. and Mangino P. D. Pamidronate. *The Ann. Pharmacotherapy* 1992; 26: 1262-1269.
9. Fleisch H. Bisphosphonates : Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs* 1991; 42(6): 914-944.
10. Cundy T., Wattie D., and King A. R. High-dose pamidronate in the management of resistant paget's disease. *Calcif. Tissue Int.* 1996; 58: 6-8.
11. Rauch F., Travers R., Plotkin H., and Glorieux F. H. The effects of intravenous pamidronate on the bone tissue of children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *J Clin. Invest.* 2002; 110: 1293-1299.
12. Lindsay R. Modeling the benefits of pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. *J Clin. Invest.* 2002; 110: 1239-1241.
13. Nishikawa M., Akatsu T., Katayama Y., Yasutomo Y., Kado S., Kugai N., Yamamoto M., and Nagata N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 1996; 18(1): 9-14.
14. Still K., Phipps R. J., and Scutt A. Effects of risedronate, alendronate, and etidronate on the viability and activity of rat bone marrow stromal cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 2003; 72: 143-150.
15. Russell R. G. G. and Rogers M. J. Bisphosphonates: From the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999; 25(1): 97-106.

16. Viereck V., Emons G., Lauck V., Frosch K. H., Blaschke S., Grundker C., and Hofbauer L. C. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem. and Biophysic. Res. Communication* 2002; 291: 680-686.
17. Evans C. E. Bisphosphonates modulate the effect of macrophage-like cells on osteoblast. *The International J Biochem. & Cell Biol.* 2002; 34: 554-563.
18. Pataki A., Muller K., Green J. R., Yan fei ma, Qing nan li, and Jee W. S. S. Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *The Anatomical Record* 1997; 249: 458-468.
19. Myoung H, Park J-Y, and Choung P-H. Effects of a bisphosphonate on the expression of bone specific genes after autogenous free bone grafting in rats. *J Periodont. Res.* 2001; 36: 244-251.
20. Giuliani N., Pedrazzoni M., Negri G., Passeri G., and Impicciatore M. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone* 1998; 22(5): 455-461.
21. Boo J. S., Yamada Y., Okasaki Y., Hibino Y., Okada K., Hata K. I., Yoshikawa T., Sugiura Y., and Ueda M. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofacial Sur.* 2002; 13(2): 231-239.

22. Martin I., Muraglia A., Campanile G., Cancedda R. and Quarto R. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinol.* 1997; 138: 4456-4462.
23. Arnold U., Lindenhayn K., and Perka C. In vitro-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites. *Biomaterials* 2002; 23: 2303-2310.
24. Fromiguet O., and Body J. J. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblast. *J Endocrinol. Invest.* 2002; 25: 539-546.
25. Reinholz G. G., Getz B., Pederson L., Sanders E. S., Subramaniam M., Ingle J. N., and Spelsberg T. C. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res.* 2000; 60(1): 6001-6007.
26. Klein B. Y., Hannah B. B., Breuer E., Solomon V., and Glomb G. Structurally different bisphosphonates exert opposing effects on alkaline phosphatase and mineralization in marrow osteoprogenitors. *J Cell. Biochem.* 1998; 68: 186-194.
27. Frank O., Heim M., Jakob M., Barbero A., Schafer D., Bendik I., Dick W., Heberer M., and Martin I. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell. Biochem.* 2002; 85: 737-746.
28. Ehara A., Ogata K., Imazoto S., Ebisu S., Nakano T., and Umakoshi Y. Effects of α -TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization. *Biomaterials* 2003; 24: 831-836.

29. Gozities A., Sukhu B., Torontali M., Dowhaniuk M., and Tenenbaum H. C. Effects of bisphosphonates APD and HEBP on bone metabolism in vitro. *Bone*; 16(4): 317S-327S.
30. Igarashi K., Hirafuji M., Adachi H., Shinoda H., and Mitani H. Effects of bisphosphonates on alkaline phosphatase activity, mineralization, and prostaglandin-E₂ synthesis in the clonal osteoblast-like cell line MC3T3-E1. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1997; 56(2): 121-125.
31. Young M. F. Bone matrix proteins: More than markers. *Calcif. Tissue Int.* 2003; 72: 2-4.
32. William G. Advances in osteogenesis imperfecta. *Clinical Orthopaedics and Related Res.* 2002; 401: 6-16.
33. Guenther H. L., Guenther H. E., and Fleisch H., The effects of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate and dichloromethanediphosphonate on collagen synthesis by rabbit articular chondrocytes and rat bone cells. *Biochem. J.* 1981; 196: 293-301.
34. Gallagher J. A., Guenther H. L., and Fleisch H. Rapid intracellular degradation of newly synthesized collagen by bone cells. *Biochem. et Biophysica. Acta.* 1982; 719: 349-355.
35. Tsuchimoto M., Azuma Y., Higuchi O., Sugimoto II, Hirata N., Kiyoki M and Yamamoto I. Alendronate modulates osteogenesis of human osteoblastic cells in vitro. *Jpn. J Pharmacol.* 1994; 66: 25-33.
36. Fromigie O., Marie P. J., and Lomri A. Bone morphogenic protein-2 and transforming growth factor- β_2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell. biochem.* 1998; 68: 411-426.

37. Zeitlin L., Fassier F., and Francis H. Modern approach to children with osteogenesis imperfecta. *J Pediatric Orthopaedics B* 2003; 10: 77-87.
38. Tenenbaum H. C., Torontali M., and Sukhu B. Effects of bisphosphonates and inorganic pyrophosphate on osteogenesis in vitro. *Bone* 1992; 13: 249-255.
39. Itoh F., Aoyagi S., Furihata-Komatsu H., Aoki M., Kusama H., Kojima M., and Kogo H. Clodronate stimulates osteoblast differentiation in ST2 and MC3T3-E1 cells and rat organ cultures. *European J Pharmacol.* 2003; 477: 9-16.

Abstract

The role of pamidronate in osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cell

Ju Kyoung Ryu

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jin Kim, D.D.S., Ph. D.)

Mesenchymal stem cell(MSCs) are pluripotent progenitor cells that are differentiated into a variety of cells such as osteoblasts, chondroblasts, adipocytes and myoblasts under their appropriate microenvironment.

Bisphosphonates have been widely used to treat bone diseases exerting excessive bone resorption. However, the mechanism of bisphosphonate action on bone has not been fully understood. Studies of direct action of bisphosphonates on bone resorption have been limited to their effects on bone-resorbing osteoclastic cells, little known about the direct effects of bisphosphonates on osteoblasts.

In this study, we aimed to examine the direct action of pamidronate on cell proliferation and differentiation by cultured human mesenchymal stem cells.

Four experimental groups and two control groups were designed; Experimental groups included both osteogenic supplement(OS) and

pamidronate-treated group, pamidronate-treated group after 1 week OS treatment, only pamidronate-treated group, OS-treated group after 1 week pamidronate treatment. Control groups included DMEM-treated group and OS-treated group. Human MSCs were isolated from bone marrow, and cultured for 7, 14, 21 days in monolayer. ALPase activity was measured by using p-nitrophenyl phosphate. mRNA expression of type I collagen and osteocalcin were evaluated by RT-PCR. Western blot analysis was performed for proteins expression of type I collagen. Von Kossa's silver stain was performed for the examination of calcification. The results were on follows:

1. The proliferation rate of hMSC was maintained to be more than 90% by 1 μ g/ml of pamidronate. ALPase activity showed the highest value at the concentration of 100ng/ml of pamidronate.
2. In pamidronate-treated group, ALPase activity reached a peak at the third week.
3. In pamidronate-treated group, mRNA and protein expression of type I collagen was enhanced compared to other experimental and control groups, whereas osteocalcin expression was found only in OS-treated group.
4. OS-treated group showed the strong positive reactions by von Kossa's silver stain, however, calcification was decreased by a dose dependent manner in both OS and pamidronate-treated group. Further, no calcification was shown in the pamidronate-treated group.

This study suggests that pamidronate treatment may be able to enhance

the osteoblastic differentiation of hMSC at the early stage. On the other hand, calcification appeared to be inhibited by pamidronate treatment.

Key Words : pamidronate, human mesenchymal stem cell, osteoblastic differentiation, type I collagen