

Alendronate에 의한 MC3T3-E1 골모세포주의 분화와 Id-1과 Id-2의 발현 증가

좋은문화병원 불임의학연구소¹, 산부인과²

박민정¹ · 주보선¹ · 이지은¹ · 김현정² · 문성은² · 문화숙²

Alendronate enhances osteoblastic differentiation with increased expression of Id-1 and Id-2 in pre-osteoblast cell line, MC3T3-E1

Min Jung Park, Ph.D.¹, Bo Sun Joo, Ph.D.¹, Ji Eun Lee, B.S.¹, Hyun Jung Kim, M.D.²,
Sung Eun Moon, M.D.², Hwa Sook Moon, M.D. Ph.D.²

¹Center for Reproductive Medicine, ²Department of Obstetrics and Gynecology,
Good Moonhwa hospital, Busan, Korea

Objective: Alendronate, a widely used bisphosphonates, acts to inhibit bone resorption by interfering with the activity of osteoclasts. Recently, it has been reported that alendronate also may increase bone proliferation and osteoblastic differentiation. However, little is known about mechanism of the action of alendronate on osteoblast differentiation, especially in transcription level. Inhibitors of DNA binding/differentiation (Ids) are helix-loop-helix (HLH) transcription factors and play an important role in BMP-induced osteoblast lineage-specific differentiation. Therefore, this study was aimed to investigate the effect of alendronate on osteoblast differentiation and expression of Id-1 and Id-2.

Methods: MC3T3-E1, pre-osteoblast cell line, were treated with alendronate of various concentrations (10^{-9} M- 10^{-4} M) and time periods (24, 48 and 72 hours). And then, the effect of alendronate on osteoblast differentiation was examined by alkaline phosphatase (ALP) activity and RT-PCR for osteoblast differentiation markers such as ALP, type 1 collagen (Col 1), and osteocalcin (OCN). The expressions of Id-1 and Id-2 were measured by RT-PCR.

Results: Alendronate treatment increased not only ALP activity, but also expressions of ALP, Col 1, and OCN. Also, alendronate treatment up-regulated the mRNA levels of Id-1 and Id-2 genes. This alendronate-induced osteoblastic differentiation is more effective in lower doses rather than high doses.

Conclusion: This study shows that the expression of transcription factor Id-1 and Id-2 was increased in a dose-dependent manner during alendronate-induced osteoblast differentiation.

Key Words: Alendronate, Osteoblasts, Cell differentiation, Alkaline phosphatase, Inhibitors of DNA binding/differentiation

골의 재형성 과정은 오래된 뼈가 주기적으로 새로운 뼈로 전환되는 과정으로, 이러한 과정은 증식, 분화, 및 세포

외 기질의 석회화유도 등의 단계를 거쳐 진행된다.¹ 일반적으로 성인의 골 형성과 흡수 과정은 중간엽 줄기세포 유래의 조골세포와 조혈모세포 유래의 파골세포의 상호작용에 의해 균형을 이루면서 뼈의 건강을 유지한다. 그러나 이러한 조골세포와 파골세포의 불균형이 생기면 골다공증과 같은 대사성 골질환이 유발될 수 있다.²

접 수 일 : 2009. 9. 2.
채 택 일 : 2010. 2. 9.
교신저자 : 문화숙
E-mail : moonhwas@moonhwa.or.kr

골세포 분화는 다양한 성장요인과 사이토카인 및 유전자의 발현에 의해 조절되며, 분화과정동안 alkaline phosphatase (ALP), type I collagen (Col 1) 및 osteocalcin (OCN) 등의 형질표현 유전자가 발현된다.³

비스포스포네이트 (bisphosphonate)는 파골세포의 세포 사멸을 유도하고 파골세포의 활성을 감소시켜 과도한 골 흡수를 억제하는 약제로, 파렛병에 처음 사용된 이후, 현재 악성 종양으로 인한 고칼슘혈증과 폐경기 이후 골다공증 등에서 비교적 안전하게 널리 사용되고 있다.⁴ 또한, 골이형성증⁵, 골형성부진⁶, 골관절염⁷ 및 류마티스성 관절염⁸ 등의 치료제로도 사용되고 있다. Alendronate는 질소를 포함한 대표적인 아미노-비스포스포네이트로서, 최근 조골세포의 분화와 증식을 증가시켜 골 형성을 증가시킨다는 보고가 증가되고 있다.^{9,10} 그러나 그 기전에 대한 연구는 미비한 실정이다.

골세포의 분화 및 골 형성에 관여하는 중요한 신호전달 체계는 대표적으로 transforming growth factor- β (TGF- β)와 bone morphogenetic protein (BMP), Wnt/ β -catenin, fibroblast growth factor (FGF), Hedgehog, Notch 등이 알려져 있다.¹¹ 이러한 신호전달체계는 골세포 분화과정동안 Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Osterix, Msh homeobox (Mshx) 및 Distalless-related homeobox (Dlx) 등과 같이 골형성과 관련한 다양한 전사인자의 발현과 활성화를 야기시킨다.¹²⁻¹⁴ Inhibitors of DNA binding/differentiation (Ids)은 BMP의 표적유전자 중 여러 형태의 세포에서 관찰되는 가장 중요한 전사인자로 알려져 있다.¹⁵

본 연구는 조골세포주인 MC3T3-E1 세포를 이용하여 alendronate가 조골세포의 분화 및 Id-1과 Id-2 유전자 발현에 미치는 효과를 조사하고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. Alendronate 처리

Alendronate (Sigma, St. Louis, MO, USA)는 멸균증류수에 녹여 1 mM 고정용액 (stock solution)을 만든 다음, 세포 생존도를 위해서는 최종농도가 10^{-3} M에서 10^{-9} M 되도록, ALP 활성도 조사를 위해서는 최종농도가 10^{-4}

M에서 10^{-9} M 되도록, 조골세포 분화 표지인자 및 Id 발현 조사에서는 최종농도가 10^{-6} M에서 10^{-8} M 되도록 배지에 첨가하였다.

2. 세포배양

MC3T3-E1 세포를 24-well plate에서 2×10^4 개의 세포 수가 되도록 분주한 후, 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)와 1% (v/v) penicillin-streptomycin (PS) (GIBCO BRL)가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; WelGene, Daejeon, Korea) 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배양액을 제거하고 실험군은 주어진 농도의 alendronate가 첨가된 무혈청 DMEM 배지에서, 대조군은 alendronate가 첨가되지 않은 배지에서 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 주어진 배양 기간 동안 동일 농도의 alendronate가 첨가된 신선한 배지로 매일 교환하였다.

3. MTT 분석

배양 후 지정된 시간에 5 mg/mL 농도의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma, USA)용액 100 μ L씩을 각각의 well에 첨가하여 1시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 배지를 제거하고 100 μ L DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma, USA)를 첨가하여 결정을 용해시킨 후 용해된 용액을 96-well plate로 옮겨서 ELISA 분석기 (Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)로 540 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 세포 활성도를 대조군에 대한 백분율로 산출하였고, 각각의 실험은 3회 반복 시행하였다.

4. Alkaline phosphatase (ALP) 활성도 분석

Alendronate에 의해 골세포로 분화하였는지 조사하기 위하여 ALP 활성도를 측정하였다. MC3T3-E1 세포에 10^{-4} M에서 10^{-9} M의 alendronate를 처리한 후 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 지정된 배양시간에 배지를 제거하고 PBS로 세척 한 후 0.1%의 Triton-X를 각각 100 μ L

씩 넣고 3번 반복된 동결-용해과정을 통하여 세포를 용해시켰다. 용해된 세포 파쇄물 20 μ L씩을 96-well plate로 옮기고, pNPP (*p*-nitrophenyl phosphate) 용액 60 μ L씩을 넣은 다음, 1시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 노란색으로 발색한 것을 확인한 다음, ELISA 분석기에서 405 nm 파장으로 흡광도를 분석 하였다. 매 실험마다 ALP 활성도는 대조군에 대한 백분율로 산출하였고, 각각의 실험은 3회 반복 시행하였다.

5. RNA 분리 및 RT-PCR

10^{-6} M에서 10^{-8} M 농도의 alendronate를 처리하고 48 시간 동안 배양 후, 조골세포 생성 표지인자인 ALP, Col 1 및 OCN과 파골세포의 생성 표지인자인 Cathepsin K (CTSK) mRNA 발현을 조사하였다.

전체 RNA를 Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분리하였다. 추출한 5 μ g 전체 RNA를 random hexamer (Bioneer, Korea), M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)와 2.5 mM dNTP mixture (G&P Life science, Korea)를 첨가하여 42°C에서 60분, 95°C에서 5분 동안 열을 가하고 4°C로 냉각시켜 cDNA로 합성하였다. cDNA를 Pro-Taq DNA polymerase (G&P Life science, Korea), 10x PCR buffer (G&P Life science, Korea), 2.5 mM dNTP mixture와 10 pM의 specific primer (Cosmo GENETECH, Seoul, Korea)를 첨가하여 PCR을 시행하였으며, β -actin은 RT-PCR의 양성 대조군으로 사용하였다 (Table 1). PCR 결과물은 2.0% agarose gel에 30분 동안 전기영동을 시행한 후, UV trans-illuminator로 mRNA band를 관찰하였다. 밴드의 수치화는 Image J 프로그램 (NCB/NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하였다.

Table 1. Primers sequences used for PCR amplification

GENE	Primer sequence
Alkaline phosphatase (ALP)	
Forward	5'- TCATGTTCTCCTGGGAGATTGGGTATG -3'
Reverse	5'- GCATTAGCTGATAGGCGATGTCC -3'
Type 1 Collagen (Col 1)	
Forward	5'- CAAGGGTGAGACAGGGCAAC -3'
Reverse	5'- CTCGAACTGGAATCCATCGGT -3'
Osteocalcin (OCN)	
Forward	5'- CTGAGTCTGACAAAGCCTTC -3'
Reverse	5'- GCTGCTGTGACATCCATACTTGC -3'
Cathepsin K (CTSK)	
Forward	5'- GGGCCAGGATGAAAGTTGTA -3'
Reverse	5'- CCGAGCCAAGAGAGCATATC - 3'
Inhibitor of differentiation-1 (Id1)	
Forward	5'- CTGCTCTACGACATGAACGGCTG -3'
Reverse	5'- CGGATTCCGAGTTCAGCTCCAAC - 3'
Inhibitor of differentiation-2 (Id2)	
Forward	5'- GGGCCAGGATGAAAGTTGTA -3'
Reverse	5'- CCGAGCCAAGAGAGCATATC - 3'
β -actin	
Forward	5'- GACTACCTCATGAAGATC -3'
Reverse	5'- GATCCACATCTGCTGGAA - 3'

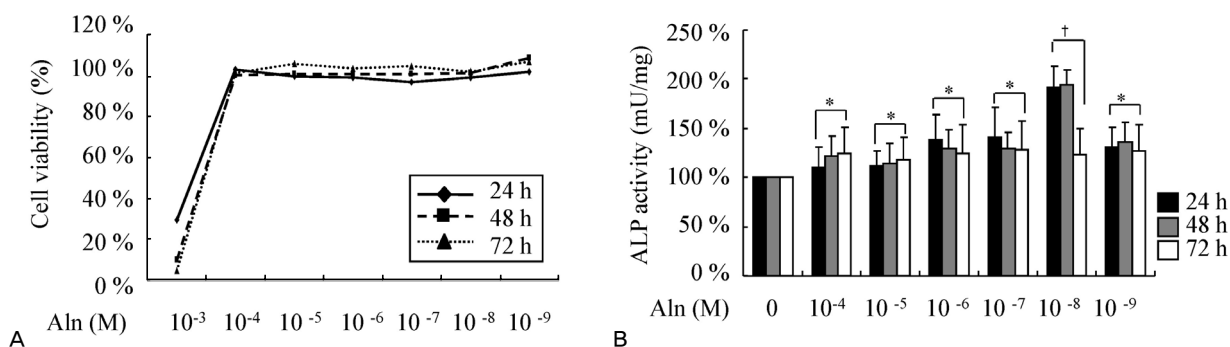


Fig. 1. Effects of alendronate (Aln) on osteoblastic cell viability and differentiation. Alendronate were treated with various concentrations (10^{-9} M- 10^{-4} M) for various duration (24, 48, and 72 hours) in MC3T3-E1 cells. (A) Cell viability was determined by MTT assay. (B) For evaluation of osteoblast differentiation, ALP activity was measured at 405 nm. The experiment was repeated three times and each performed with triple samples. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$ (vs control).

6. 통계

Alendronate 처리에 따른 분화 표지인자 및 Ids 유전자의 발현량은 평균±표준편차 (means±SD)로 표시하였다. 유의성은 Microsoft사의 excel 프로그램을 사용하여 two-sample *t*-test로 검증하였으며, 통계학적 유의수준은 *P*값이 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. Alendronate가 세포 생존율과 ALP활성도에 미치는 효과

MC3T3-E1 세포에 다양한 농도 (10^{-9} M- 10^{-3} M)의 alendronate가 첨가된 배지에서 24, 48, 72시간 동안 배양한 후, 세포 생존도를 측정하였다. 10^{-3} M 이상의 고농도에서는 세포활성도가 크게 감소하였으나, 그 외 alendronate 농도와 시간 경과에 따른 세포 독성은 나타나지 않았다 (Fig. 1A). 세포 활성도가 나타나지 않은 10^{-3} M alendronate를 제외한 10^{-9} M- 10^{-4} M에서 ALP 활성도를 측정하였다. ALP 활성도는 alendronate 처리 후 모든 농도에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 특히 10^{-8} M 농도에서는 48시간까지는 다른 농도군에 비해 보다 유의한 증가를 보였으며, 다른 농도에서는 시간 경과에 따른 ALP 활성도의 차이는 없었다 (Fig. 1B).

2. Alendronate 농도와 처리시간에 따른 골세포 분화 관련 유전자 발현 비교

10^{-8} M 농도에서 ALP 활성이 최고치를 보이면서 다른 농도 군에 비해 보다 유의하게 증가하였기에 10^{-8} M의 농도를 기준으로 100배 높은 10^{-6} M 농도까지 alendronate를 처리하고 48시간동안 배양 후, ALP, Col 1, OCN, CTSK의 mRNA 발현을 조사하였다. Alendronate 처리 후 농도에 관계없이 조골세포 생성 표지인자의 발현은 대조군에 비해 유의하게 증가하며, 파골세포의 표지인자의 발현은 유의하게 감소하였다. ALP 발현은 10^{-7} M alendronate 농도부터 급격히 증가하였으며, Col 1의 발현은 10^{-6} M부터 점차적으로 증가하는 양상을 보인 반면, OCN의 발현은 대조군에 비하여 10^{-6} M부터 증가되는 경향을 보이거나 농도에 따른 발현의 차이는 보이지 않았다. CTSK 발현은 대조군에 비해 alendronate 처리 후 유의하게 감소하였다 ($P < 0.01$) (Fig. 2A).

Alendronate 처리 후 배양시간에 따른 골세포 분화 관련 유전자의 발현을 조사하기 위하여, 10^{-8} M의 alendronate를 MC3T3-E1 세포에 처리하고, 72시간 동안 배양하였다. Alendronate 처리는 배양시간에 관계없이 ALP, Col 1, OCN의 발현을 대조군에 비하여 유의하게 증가시켰으나, 각 표지인자는 시간에 따라 다른 발현 양상을 보였다. ALP의 발현은 24시간에 최고치를 보인 후 48시간 이후부터 점차적으로 감소하는 양상을 보였다. Col 1 발현은 배양 시간에 따라 지속적으로 증가하여 72시간째 최고치

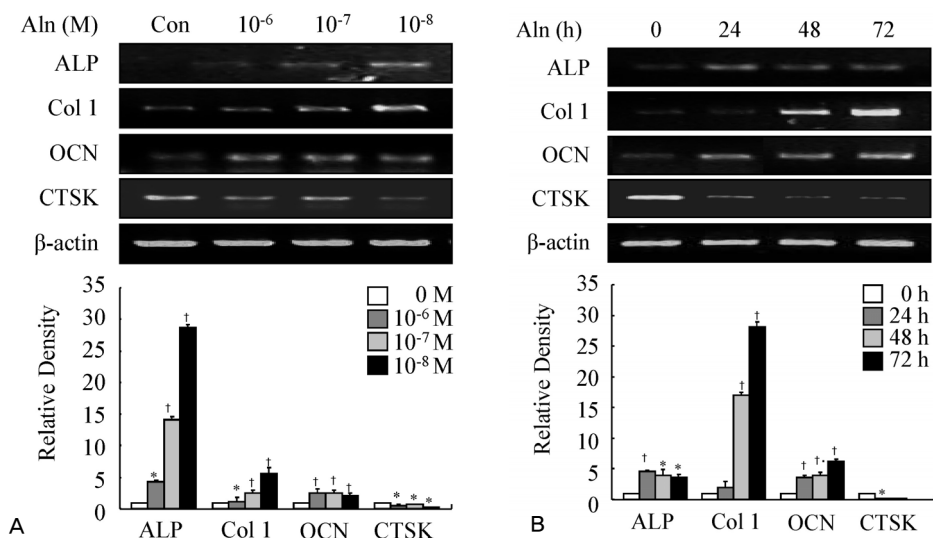


Fig. 2. Effect of alendronate (Aln) of different concentrations and times on osteogenic gene marker expression. (A) MC3T3-E1 cells were treated with increasing concentrations (10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} M) for 48 hours. (B) MC3T3-E1 cells were treated with different time periods (24, 48, and 72 hours) at 10^{-8} M. ALP, Col 1, OCN, and CTSK mRNA levels were detected by RT-PCR with β -actin as loading control. Data shown are representative of three independent experiments. The relative density of each gene was quantitated and statistically analyzed by ImageJ version 1.35d (NIH Image). * $P<0.01$, † $P<0.005$ (vs control).

를 보였으며, OCN 또한 72시간까지 점차적으로 발현이 증가하였으나, 그 발현양은 Col 1에 비해 상대적으로 매우 낮았다 ($P<0.01$) (Fig. 2B).

3. Alendronate에 의한 골세포 분화 과정 중의 Id-1과 Id-2 mRNA 발현

Alendronate 처리 후 Id-1과 Id-2 mRNA 발현 모두 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나, 발현정도는 농도에 역관계를 보였다 ($P<0.05$) (Fig. 3A). 그러나, Id-1 mRNA 발현의 경우는 alendronate 처리 후 24시간에 증가하여, 48시간에 최대치에 이른 다음 시간 경과에 따라 감소하는 경향을 보인 반면, Id-2 mRNA 발현은 alendronate 처리 후 24시간에 최고치를 보인 후 배양 시간이 증가함에 따라 점차적으로 감소하기 시작하여, 72시간에는 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되었다 ($P<0.05$) (Fig. 3B).

고 찰

본 연구는 alendronate가 조골세포로의 분화를 촉진하

고 있음을 재확인함과 동시에 Id 유전자의 발현 또한 증가시키고 있음을 보여준다. 이러한 결과는 본 연구가 처음 보고하는 것으로 alendronate에 의한 조골세포로의 분화 과정동안 Id 유전자가 관계함을 시사하고 있다.

비스포스포네이트가 조골세포의 증식과 분화에 작용하는 기전에 대해서는 명확하지 않으나 크게 2가지 경로를 통해 작용하는 것으로 추론되고 있다. 하나는 비스포스포네이트가 b-FGF를 촉진함으로써 조골세포의 동화작용에 영향을 미친다는 것이다.¹⁶ 또 다른 하나는 강력한 조골세포 유도제의 하나인 BMP-2의 발현을 촉진하는 것이다.¹⁰ Id-1, Id-2 및 Id-3는 이러한 BMP의 자극에 의해 초기에 발현이 가장 유의하게 증가되는 유전자이다.^{15,17} 이런 점에서 본 연구에서 흥미로운 발견 중의 하나는 alendronate 처리 후 Id 유전자의 발현이 증가한다는 것이다. 이러한 결과는 alendronate가 BMP-2 발현을 매개로 하여 조골세포의 분화에 작용하고 있음을 시사하고 있어 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

그러나 alendronate 처리 후 Id-1과 Id-2의 mRNA 발현이 모두 증가하기는 하였으나 그 발현 양상은 다르게 나타났다. 이러한 발현 양상의 차이에 대한 정확한 이유에

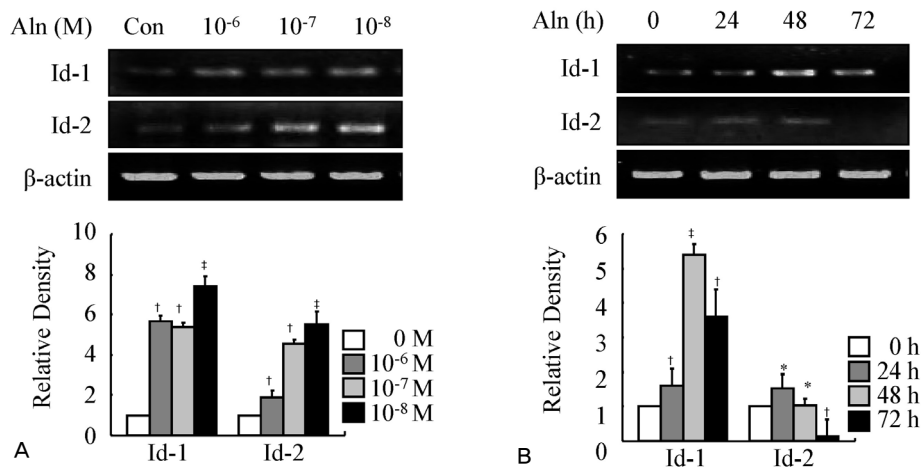


Fig. 3. Expression of Id-1 and Id-2 genes during alendronate (Aln)-induced osteoblast differentiation. MC3T3-E1 cells were treated with increasing concentrations (10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} M) for 48 hours (A) and different time periods (24, 48, and 72 hours) at 10^{-8} M (B). Total RNA was prepared and analyzed for the expression of the Id-1 and Id-2 mRNA by RT-PCR as described. Data shown are representative of four independent experiments. The relative density of each gene was quantitated and statistically analyzed by ImageJ version 1.35d (NIH Image). * $P < 0.05$, $^{\dagger}P < 0.01$, $^{\ddagger}P < 0.005$ (vs control).

대해서는 추가적인 연구를 통해 규명되어야 할 과제이나 이는 포유류에서 Id-1과 Id-2의 발현 양상 자체가 차이가 있음을 고려할 때 alendronate 처리에 따른 Id-1과 Id-2의 발현 양상이 다르게 나타날 수 있을 것으로 사료된다. 일반적으로 Id-1은 상시적으로 발현되는데 반해, Id-2는 더욱 제한된 양상으로 발현된다.^{18,19}

생체 내에서 조골세포가 비스포스포네이트에 노출되는 약리적 농도 범위는 확실하지 않아 생리적 상태와 흡사한 *in vitro* 농도를 결정하기는 쉽지 않다. 그러나 alendronate 투여 후 흡수 공간에서 높게는 10^{-3} M 농도로 축적되는 것으로 보고되고 있고,²⁰ 본 연구의 MTT assay에서 나타난 바와 같이 10^{-3} M의 높은 alendronate 농도에서 세포의 생존성이 없었다. 이런 이유로 본 연구에서는 alendronate를 생리적 상태와 흡사한 것으로 판단되는 10^{-9} M에서 10^{-4} M 농도까지 측정하였다. Garcia 등²¹도 정상 사람의 조골세포에서 10^{-3} M 이상의 높은 alendronate 농도에서는 생존 세포가 관찰되지 않았다고 보고하였다.

본 연구에 앞서 진행된 예비실험에서 alendronate 10^{-10} M 농도 이하에서는 세포 증식이 전반적으로 감소하였다. 그러나 Im 등¹⁰은 10^{-12} M까지 alendronate의 농도를 설정하였고 이 농도에서도 조골세포가 증식된다고 보고하였다.

이러한 결과의 차이는 세포 배양 시 미세 환경의 차이와 서로 다른 조직에서 유래한 세포주의 특성에 따른 차이로 해석될 수 있다. 본 연구에서는 생쥐 유래의 전조골세포 (preosteoblast) 세포주인 MC3T3-E1 세포를 DMEM 배양액에서 배양한 반면, Im 등은 human osteoblast-like 세포주인 MG-63 세포를 α -MEM 배양액에서 배양하였다.

본 연구에서 조골세포의 분화는 저농도의 alendronate에서 효과적임을 보여주고 있다. 이러한 연구 결과는 Sama 등²²의 결과와 유사한데, 그들은 실험쥐를 모델로 한 위관결염 연구에서 alendronate의 효과가 농도에 매우 의존적이며 즉, 고농도의 alendronate는 조골세포의 기능에 유해한 효과를 미친다고 보고하였다. 이러한 alendronate의 농도 의존적 효과는 비스포스포네이트가 낮은 농도에서 골수 유래의 조골세포의 증식을 유발하고, 조골세포와 골세포의 세포고사를 억제한다는 기존의 보고에 의해서도 뒷받침 되고 있다.^{23,24} 또한, 본 연구에서 alendronate는 조골세포의 각 분화 표지인자의 발현에 대해 처리 시간에 따라 다른 양상을 보였다. 이러한 결과는 각 표지인자들이 분화 과정 동안 서로 다른 시기에서 활성을 보이기 때문인 것으로 사료된다. ALP와 Col 1은 골기질이 성숙되는 초기에 발현이 증가되며, OCN은 그 이후인 무기질화가 진행되면서 발현이 증가하였다.^{3,25-27} 이러한 연구결과는 alend-

ronate가 각 분화표지인자의 발현 조절에 적절한 농도가 있음을 시사하는 것으로 Im 등¹⁰도 사람의 골육암 세포에서 alendronate에 의한 조골세포 분화 시 10^{-8} M 농도에서 24시간 이내에 ALP 활성화가 증가한다고 보고한 바 있다.

ALP의 발현은 조골세포 및 골형성의 중요한 표지자로서 조골세포의 분화 정도를 평가하는 기준이 되고 있다.²⁷ Fromique 등⁹은 ALP 활성도가 배양 4일 후까지도 증가하는 양상을 보인다고 보고하였으며, Cheng 등²⁸은 BMP-2, 6, 9에 의해 ALP 농도가 7~9일까지 증가한다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 ALP 발현이 배양 72시간 이후에는 대조군에 비하여 변화가 없었다. 이런 이유로 본 연구는 ALP 활성도 및 조골세포 분화 표지인자 조사를 위해 최대 3일간 배양하였다. 앞선 두 연구^{9, 28}와 본 연구 결과의 차이는 사용한 세포와 분화 표지인자의 발현을 측정하는 방법이 다르기 때문인 것으로 사료된다. 본 연구가 alendronate를 처리하여 ALP의 mRNA 발현을 조사한데 반해, Fromique 등⁹은 정상적인 사람의 bone trabecular osteoblastic 세포에서 단백질 발현을 조사하였으며, Cheng 등²⁸은 중간엽 전구세포인 C3H10T1/2 세포, 전조골세포인 C2C12 세포, 조골세포주인 TE-85 세포의 3가지 세포주에 대해 14종의 BMP를 처리하였다.

본 실험에서 사용된 전조골세포 (preosteoblast) 세포주인 MC3T3-E1 세포는 골 조직에 존재하는 조골세포와 유사하다.²⁹ 또한, MC3T3-E1 세포는 전사수준에서 골 표지자의 활성화 및 세포 화학적 연구에 적합한 세포주로 널리 이용되고 있다. 따라서, MC3T3-E1 세포를 이용한 본 연구결과는 *in vivo*상의 골조직에서 alendronate가 골세포

에 미치는 효과와 골세포 분화에 관련되는 유전자를 유추하는데 유용할 것으로 사료된다. 그러나 정상 사람의 조골세포를 이용한 Garcia-Moreno 등²¹의 연구결과와 세포주를 이용한 본 연구 결과와는 alendronate가 세포의 생존과 증식에 미치는 효과에 있어서 달랐다. Garcia-Moreno 등²¹은 체외 alendronate가 $\geq 10^{-4}$ mol/L 농도에서는 정상 사람의 조골세포의 생존과 증식에 영향을 미치나, $\leq 10^{-5}$ mol/L 농도에서는 영향을 미치지 않는다고 보고한 반면, 본 연구에서는 세포의 생존력이 10^{-9} M에서 10^{-4} M까지 alendronate 농도에 영향을 받지 않았다. 따라서 MC3T3-E1 세포를 이용하여 얻어진 alendronate가 조골세포의 분화에 미치는 적정 농도를 *in vivo*에 적용할 수 없다는 것이 세포주를 이용한 연구의 제한점이 될 수 있다.

결론적으로 본 연구는 저농도의 alendronate가 조골모세포의 분화를 촉진시키고 있음을 보여주고 있으며, 이러한 alendronate에 의한 분화촉진 효과는 직접적으로 Id 유전자 발현의 증가를 유도하거나, 혹은 BMP signaling을 매개로 하여 Id 발현을 유도하여 골세포 분화를 유도함을 시사하고 있다. 현재까지 alendronate에 의한 골세포분화의 분자적 기전은 많이 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 골형성 및 분화 과정에서 alendronate에 의해 활성화되는 신호전달인자와 그 신호를 받아 표적유전자의 발현에 관여하는 전사조절인자를 분석함으로써 세포분화조절의 분자적 기전을 이해하는데 기여할 수 있을 것으로 기대되나, 정확한 기전을 규명하기 위해서는 alendronate와 전사인자의 상호관계에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002; 8: 147-59.
2. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003; 423: 349-55.
3. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992; 13: 66-80.
4. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000; 289: 1508-14.
5. Lane JM, Khan SN, O'Connor WJ, Nydick M, Hommen JP, Schneider R, et al. Bisphosphonate therapy in fibrous dysplasia. *Clin Orthop* 2001; 382: 6-12.
6. Devogelaer JP. New uses of bisphosphonates: osteogenesis imperfecta. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 748-53.
7. Lehmann HJ, Mouritzen U, Christgau S, Cloos PA, Christiansen C. Effect of bisphosphonates on cartilage turnover assessed with a newly developed assay for collagen type II degradation products. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 530-3.
8. Maksymowych WP. Bisphosphonates for arthritis - a confusing rationale. *J Rheumatol* 2003; 30: 430-4.
9. Fromigué O, Body JJ. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 539-46.
10. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004; 25: 4105-15.
11. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 98-105.

12. Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 1999; 74: 616-27.
13. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 1995; 17 (2 Suppl): 77S-83S.
14. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000; 21: 393-411.
15. Peng Y, Kang Q, Luo Q, Jiang W, Si W, Liu BA, et al. Inhibitor of DNA binding /differentiation helix-loop-helix proteins mediate bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 32941-9.
16. Giuliani N, Girasole G, Pedrazzoni M, Passeri G, Gatti C, Passeri M. Alendronate stimulates b-FGF productin and mineralized nodule formation in hman osteoblastic cells and osteoblastogenesis in human bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* 1995; 10 Suppl: S171.
17. Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 2003; 11: 915-26.
18. Kreider BL, Benezra R, Rovera G, Kadesch T. Inhibition of myeloid differentiation by the helix-loop-helix protein Id. *Science* 1992; 255 :1700-2.
19. Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 410-8.
20. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991; 88: 2095-105.
21. García-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farré M, Díez A, Mariño ML, et al. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 1998; 22: 233-9.
22. Sama AA, Khan SN, Myers ER, Huang RC, Cammisa FP, Sandhu HS, et al. High-dose alendronate uncouples osteoclast and osteoblast function: a study in a rat spine pseudarthrosis model. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 425: 135-42.
23. Klein BY, Ben-Bassat H, Breuer E, Solomon V, Golomb G. Structurally different bisphosphonates exert opposing effects on alkaline phosphatase and mineralization in marrow osteoprogenitors. *J Cell Biochem* 1998; 68: 186-94.
24. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 2000; 60: 6001-7.
25. 김경아, 고광준. 저선량 방사선이 MC3T3-E1 골모세포주의 석회화결절 형성에 미치는 영향. *대한구강악안면방사선학회지* 2004; 34: 137-44.
26. Einhorn TA. The cell and fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1988; (355 Suppl): S7-21.
27. Torii Y, Hitomi K, Yamagishi Y, Tsukagoshi N. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol Int* 1996; 20: 459-64.
28. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A: 1544-52.
29. 최선영, 고광준. 방사선조사가 MC3T3-E1 조골세포주의 type I collagen과 alkaline phosphatase mRNA 발현에 미치는 영향. *대한구강악안면방사선학회지* 2003; 33: 51-7.

= 국문초록 =

목적: Alendronate는 대표적인 비스포스네이트로서 파골세포의 활성을 떨어뜨려서 과도한 골흡수를 억제하는 약제로 알려져 왔으나, 최근에는 골세포 증식 및 분화를 증가시킨다고 보고되었다. 그러나 alendronate가 조골세포 분화에 미치는 기전에 대한 연구는 매우 부족하다. Id (Inhibitors of DNA binding/differentiation)은 helix-loop-helix (HLH) 계열에 속하는 전사인자이며, BMP에 의해 유도되는 골세포 분화과정동안 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 연구는 alendronate가 골세포 분화와 Id-1 및 Id-2 유전자의 발현에 미치는 효과를 조사하고자 한다.

연구 방법: 조골모세포인 MC3T3-E1 세포주에 alendronate를 다양한 농도 (10^{-9} M- 10^{-4} M)와 시간 (24, 48 및 72시간)으로 처리한 후 조골세포로의 분화 정도를 ALP 활성도와 조골세포 분화표지자인 ALP, Col 1, OCN에 대한 발현을 역전사-중합효소반응 (RT-PCR) 방법으로 조사하였다. 또한, alendronate을 처리 후 Id-1 및 Id-2의 유전자 발현을 RT-PCR 방법으로 조사하였다.

결과: Alendronate는 ALP 활성도뿐만 아니라 ALP, Col 1 및 OCN의 mRNA 발현을 증가시키며, Id-1 및 Id-2의 발현도 증가시켰다. 이러한 alendronate에 의한 골세포 분화는 고농도보다 저농도에서 골세포 분화에 효과적이었다.

결론: 본 연구는 골형성과 관련된 전사인자 Id-1과 Id-2의 발현이 alendronate에 의한 조골세포 분화 과정동안 촉진됨을 보여주고 있으며, 이러한 alendronate 효과는 농도 의존적으로 골세포 분화에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

중심단어: Alendronate, 골모세포, 세포분화, Alkaline phosphatase, Inhibitors of DNA binding/differentiation