ORIGINAL ARTICLE

1

Zoledronate가 UMR-106 세포의 증식과 조골세포 형성에 미치는 영향

경희대학교 일반대학원 치의학과 구강악안면외과학[1]
경희대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실[2]
경희대학교 치의학전문대학원 치과약리학교실[3]

정기훈[1], 교수 류동목[2], 조교수 지유진[2], 임상강사 이덕원[1], 레지던트 이현우[3]

ABSTRACT

Zoledronate(Zometa®) inhibits the formation of osteoblast in rat osteoblastic cell line UMR-106

[1]Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Dentistry, Kyunghee University
[2]Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Professional Graduate School of Dentistry, Kyunghee University
[3]Dept. of Dental Pharmacology, Professional Graduate School of Dentistry, Kyunghee University
Ki-Hoon Jeong[1], Dong-Mok Ryu[2], Yu-Jin Jee[2], Deok-Won Lee[1], Hyun-Woo Lee[3]

Purpose : The purpose of this study is to identify the effect of zoledronate(Zometa®), which is most common nitrogen containing bisphosphonate, on survival, proliferation, and differentiation of osteoblast.

Material & Methods: Twenty four cell culture plates containing essential medium were seeded with UMR-106 cell lines, at density of 5 x 10^4 cells per plates. Each plates were incubated with 5% CO^2 incubator at 37℃. Starting from 2 days after incubation, cell culture medias were replaced, and added with osteogenesis induction media and 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 3μM of zoledronate(Zometa®), every 2 days, for 12 days. "Control group" was plates not added with zoledronate(0μM), and "experiment group" were plates added with different concentration of zoledronates(0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 3μM). Mature osteoblasts were identified with Alizarine Red staining, and protein samples were collected. Optical density was determined at wavelength of 405nm with ELISA reader. For viability analysis, cells were harvested and incubated with propidium iodide, and analysed with flow cytometry. Western blot technique was used to analyse Runx2 protein of osteoblast.

Results : Secretion of bone matrix decreased as zoledronate concentration increased, and zoledronate did not effect survival rate of UMR-106 cells when measured with flow cytometer. Expression of Runx2 protein was inhibited as zoledronate concentration increased.

Conclusion : From the results, we were able to identify that increase of zoledronate concentration inhibited differentiation of UMR-106 cell to osteoblast, without effecting quantity or survival rate.

Key Words : Zoledronate, UMR-106, Osteoblast, Runx2

Ⅰ. 서 론

Bisphosphonates(BPs)는 무기 피로인산염(inorganic pyrophosphate)의 유도체로 1865년 Menschutkin[1]에 의해 처음 합성되었으며, 1968년 Fleisch등[2]이 골 흡수를 억제하고 다량 투여 시 생체 내의 비정상적인 석회화 뿐 아니라 정상적인 석회화도 억제 한다는 생물학적 효과에 대해 보고한 이래, 1973년부터는 Russell등[3,4]이 Paget's disease에 투여하기 시작하였고, 초기 약제의 부작용을 줄이면서 골 흡수 억제 효능이 개선된 여러 유도체가 개발되어 현재는 악성종양과 동반된 고칼슘혈증, 전이성 골질환, 다발성 골수종 및, 골다공증등과 같이 골 흡수가 증가되는 질환에 광범위하게 사용되고 있다[5]. BPs는 크게 아미노기가 포함된 BPs와 아미노기를 포함하지 않는 BPs로 구분되며, 작용 강도는 아미노기가 부착되는 측쇄 구조에 따라 좌우되고 아미노기를 포함한 경우 긴 반감기를 가짐으로써 강한 효능을 나타내며 그에 따라 부작용의 빈도도 높은 것으로 알려져 있다[6]. Zoledronate는 아미노기를 함유한 BPs의 일종으로 강력한 골 흡수 억제 효과를 가지고 있으며, 2002년 Reid등[7]은 폐경 후 골다공증의 치료에 1년에 1회 주사하는 방법의 유용성에 대하여 보고하였고, 2006년 Paget's disease치료에서의 유용성에 대하여도 보고하였다[8].

한편, 최근 들어 BPs로 인한 구강악안면영역의 합병증이 보고되고 있다. 2003년 Marx와 Stern[9]에 의해 Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws(BRONJ)가 처음으로 보고된 이래로 BRONJ와 관련한 많은 연구보고가 있으며[10~14], 2005년 미국 FDA는 모든 BPs 제제에 대해 악골괴사의 위험성을 알리는 문구를 삽입하도록 하는 등 치의학 분야에서 새로운 관심영역으로 대두되고 있으나 아직까지 이러한 문제점들에 대한 원인에 대해서는 정확하게 알려져 있지 않다[15]. Mashiba등[16]은 BPs의 장기간 투여가 정상적인 골 흡수와 골 형성의 상호보완적인 골 대사를 억제시켜 골조직에 작은 손상이 계속 축적되게 되어 결국에는 골이 약해지고 골절의 위험성이 증대될 가능성이 있다고 발표하였으며, Goodship등[17]은 BPs를 장기간 사용한 경우 골절부위의 가골 형성이 늦어져서 치유가 지연되더라도 골의 광화작용이나 기계적인 성질에는 영향을 미치지 않는다는 반론도 제기되었다. BPs는 주로 석회화를 억제하거나 피로인산염과 결합하여 파골 세포에 의한 골조직 흡수를 억제하는 작용을 갖는 것으로 알려져 있으며, Serrano등[18]은 정상적인 인간 조골세포 배양 시 alendronate의 영향에 대해 보고하였고, Fischer등[19,20]은 alendronate가 mevalonate pathway에 미치는 영향에 대하여 보고하였으며, Coxon등[21]은 BPs에 의한 파골 세포의 형성, 기능과 생존이 억제된다고 하였다. 또한, Roger등[22]은 파골 세포의 생성, 생존과 기능을 효과적으로 감소시킨다고 보고되었으며, Coxon등[23]은 아미노기를 함유한 BPs가 조골세포의 분화, 기능 생존에도 영향을 미칠 것 같다고 보고하였으나 그에 대한 정확한 기전은 확실하지 않다. 이와 같이 BPs가 파골 세포에 미치는 영향에 대하여는 많은 연구가 이루어져 있으나, 조골세포에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 부족한 상태이다.

본 연구의 목적은 UMR-106 세포를 아미노기가 포함 된 BPs 중 대표적인 약물인 zoledronate로 처리할 경우 조골세포로 분화될 때 세포의 생존, 증식 및 분화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보는 것으로서 이를 위하여 UMR-106 세포를 다양한 농도의 zoledronate를 첨가한 osteogenesis induction media에 배양하여 조골세포의 성숙 정도와 세포 수, 생존율을 조사하고 조골세포의 분화에 관여하는 Runx2의 발현 정도를 검사하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. UMR-106 세포 및 세포배양

UMR-106세포는 방사선 동위원소를 주입한 쥐에서 유래된 골육종세포줄기이다. 이들 세포들은 종양 형태로 조골세포로 분화되어 골 기질을 형성시킬 수 있는 능력이 있다[24,25]. UMR-106 세포를 Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 100unit/ml penicillin, 100㎍/ml streptomycin(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 첨가한 complete media에 배양한다.

DMEM complete media 9.88㎖, ascorbic acid 2-phosphate 20㎕, glycerol 2-phosphate solution 100㎕의 비율로 osteogenesis media를 제작한 후, zoledronate (Zometa®, Novartis) 0㎛M, 0.01㎛M, 0.1㎛M, 0.5㎛M, 1㎛M, 3㎛M을 첨가하여 각각의 배양액을 24개의 배양접시에 담고, 1개의 접시 당 5×10^4개의 UMR-106 세포를 집어넣은 후에 37℃, 5% CO_2가 함유된 배양기에서 배양시킨다.

배양접시에 담긴 배양액은 48시간마다 교환하였으며12일간 배양 후에 70% 에탄올로 세포를 고정시키고 Alizarin Red 시약으로 염색하여 조골세포의 성숙 정도를 평가하였다. 염색된 조골세포를 405nm 파장을 가진 ELISA 판독기로 흡광도를 측정하였다.

2. 세포 수 계측

UMR-106세포를 96개의 human IgG Fc와 rCD137-Fc가 포함된 배양접시에 1개의 접시 당 2,000개의 숫자로 배양시킨다. 배양 4일, 6일, 8일째에 CellTiter96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit(Promega, Madison, WI)를 이용하여 세포 수를 계측하였다.

3. 유세포 분석법

세포의 생존율을 측정하기 위해 세포를 Propidium Iodide(PI)로 염색하여 20℃ 실온에서 배양하여 유세포 측정기(Cell Lab Quanta(tm) SC, Beckman Coulter, USA)로 FL2 파장에서 형광을 측정하여 분석하였다. PI(-) 생존 군과 PI(+) 사멸 군으로 구분하였다.

4. Western blot technique

조골세포의 Runx2를 분석하기 위해 Western blot 테크닉을 사용하였다. Zoledronate 0.5㎛M을 첨가한 배양액에서 2일, 4일, 6일, 8일, 10일간 배양한 후 각각의 35-mm dish로부터 분리한 세포의 pellet을 얻고 여기에 세포 용해액(20mM Tris-HCl(pH7.5), 150mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% Igapel 630, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM PMSF, 5㎛m/ml aprotinin, 1㎛m leupeptin) 100㎕를 넣고 얼음에서 40분간 둔 후 4℃, 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 protein lysate를 얻고, 30㎍ 단백질을 12% SDS-PAGE로 전기영동 시켰다. PVDF membrane으로 gel을 옮긴 후 5% fat-free dry milk-TBS-T(Tris buffered saline with 0.05% Tween-20)로 1시간 동안 비특이적 반응을 차단하였다. 동일한 용액에 1차 항체(Runx2, 1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; GAPDH, 1:2,000, Sigma)를 희석하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시키고 세척 한 후 2차 항체(HRP conjugated rabbit antimouse IgG, Santa Cruz)는 1:3,000으로 사용하였다. Band의 확인은 ECL kit(Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 사용하였다.

III. 연구 결과

1. Alizarin Red staining

골기질의 형성 정도를 관찰 하기 위하여 12일간 배양한 후 Alizarin Red 염색을 시행하였다. 육안적 소견에서 Zoledronate의 농도가 증가할 수록 Alizarin Red의 염색이 감소되었음이 관찰되었으며, 0.5㎛ 이상의 농도에서는 염색 정도가 현저히 감소 되었다(Fig. 1).

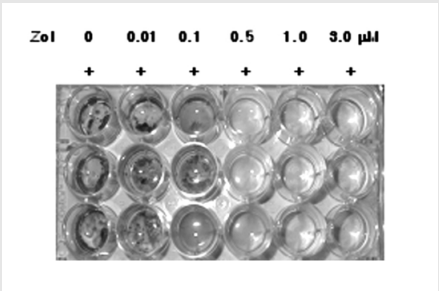

Fig 1. Dosage effect of zoledronate on the formation of bone matrix as indicated by Alizarin Red staining.(12 days later)
Zol:zoledronate, OM:osteogenic media

ELISA 판독기로 측정한 흡광도 역시 zoledronate의 농도가 증가 할수록 흡광도 수치가 점점 감소되었으며, 0.5㎛ 이상의 농도에서 현저히 감소되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2).

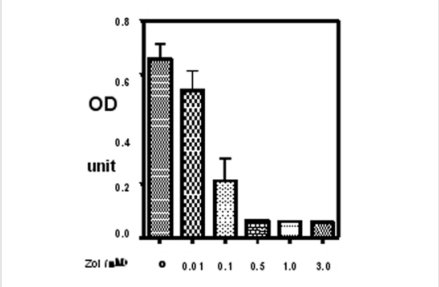

Fig 2. Optical density of Alizarin Red staining.
OD:Optical Density

세포의 생존 여부를 판독하기 위하여 현미경으로 관찰하였으며 zoledronate의 농도가 증가할수록 Alizarin Red에 의한 골기질의 염색량은 확연한 차이를 볼 수 있었다(Fig. 3).

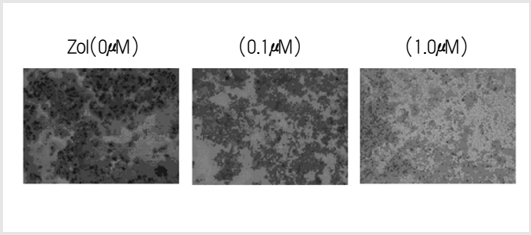

Fig 3. Dosage effect of Zoledronate on the maturation of osteoblastic lineage as indicated by Alizarin Red staining. (X 40) Zol:Zoledronate

2. 세포 수 계측

CellTiter96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit(Promega, Madison, WI)를 이용하여 계측된 세포 수는 세포배양 4일, 6일, 8일 모두 큰 변화가 없는 것이 관찰되었다(Fig. 4).

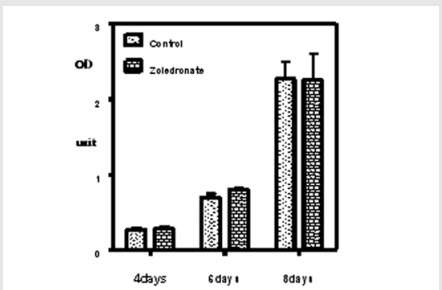

Fig 4. Cell number by Non-Radioactive Proliferation Assay(tm) kit.
OD:Optical Density

3. 유세포 분석법

유세포 분석법으로 계측된 zoledronate의 농도에 따른 세포 생존율은 2일, 4일, 6일, 8일 모두 큰 변화

가 없는 것이 관찰되었다(Table 1)

Table 1. Survival rate of UMR-106 cell

Time(days)	Control(%)	Zoledronate(%)
2	61.69	63.77
4	67.83	65.06
6	60.01	60.82
8	81.85	85.79

4. Western blot for Runx2

배양기간 경과에 따른 Runx2 단백질의 발현 량은 zoledronate를 첨가 한 군에서 기간이 경과 함에 따라 점차 감소하였으며 6일째부터 현저히 감소하였다(Fig. 5).

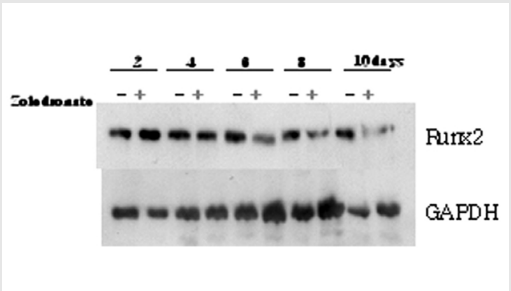

Fig 5. Zoledronate down-regulates Runx2 protein expression

IV. 총괄 및 고찰

Zoledronate는 아미노기를 포함하는 Bisphosphonate(BPs) 의 일종으로 정맥주사로 사용할 수 있으며 가장 강력한 효과를 지니고 있는 BPs의 일종이다.

BPs는 뼈의 무기질에 잘 침착할 뿐 아니라 파골 세포를 억제하는 효과를 가져 여러 가지 골 흡수를 야기하는 질병에 사용되고 있다. 이러한 효과를 이용하여 Paget's disease[3,4,26]의 치료에 이용되었으며, 1995년에 처음으로 악성 종양의 골 전이 환자들에게 BPs의 정맥 주사요법이 소개된 이후 다발성골수염, 유방암, 전립선암에서 골 전이에 의한 골 흡수와 관련된 증상의 완화, 암세포에서 유래된 고칼슘혈증을 치료하는데 표준적인 치료가 되어왔다.

Major등[27]은 경구용 BPs는 다발성 골수종과 전립선 암의 골 전이를 방지하는 효과가 떨어져 정맥 주사용 제제의 사용이 필요하다고 하였으며, Berenson 등28 은 zoledronate 정맥주사 요법이 골 전이의 억제에 효과가 있다고 하였다. Hillner등[29]은 유방암에서 BPs의 보조적 사용에 대하여 언급하였으며, Fulfaro등[30]과 Melisi등[31]은 zoledronate의 전립선암에 의한 골 전이 감소에 대하여 보고하였다. Reid등[7]은 폐경 후 골다공증의 치료에 zoledronate의 사용에 대하여 보고하였다.

이와 같이, BPs는 파골 세포와 관련된 골 흡수를 억제할 뿐만 아니라 신생혈관 형성을 억제하는 효과가 있어 항암치료의 보조적 요법으로도 사용되어 왔다.

Wood등[32]은 zoledronate의 사용이 악성 골 질환에서 혈관신생 억제 효과를 나타내어 항암효과가 있을 것이라고 하였고, Santini[33]는 혈관신생억제 외에도 악성종양 세포의 부착, 침윤, 활성도 등에 영향을 미치며 악성종양 세포자살 가능성도 있다고 보고하였다.

한편, BPs의 작용기전에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. Rodan등[34]은 아미노기가 포함되지 않은 BPs는 ATP의 일부분과 교체되어 파골 세포의 ATP 기능을 방해하여 세포 내 대사를 억제시켜 골 흡수를 감소시키게 된다고 하였다.

또한, Fleisch[6]는 아미노기가 함유된 BPs는 파골 세포 기능에 중요한 farnesyl pyrophosphate synsthase(FPPS) 합성효소를 차단시켜 HMG-CoA reductase pathway(mevalonate pathway)를 방해하며, 이 기전의 중단으로 세포막에 필수적으로 부착되는 작은 단백질인 farnesol과

geranylgeraniol같은 대사 산물의 형성이 억제되고, 단백질의 prenylation이 억제되는 동안 세포조절에 필수적인 small GTPases 를 만들지 못해 세포 활동력 감소, 세포 효능이 떨어지고, 파골 세포의 세포자살을 유도하게 된다고 하였으며, BPs의 작용기전에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다[35].

한편, BPs의 강력한 골 흡수 억제작용은 장기간 투여 시 골의 탄성이 떨어져 오히려 골의 강도에 좋지 않은 영향을 미칠 것이 우려되어 왔다. etidronate의 장기 투여 후 골무기질화에 결함이 발생하여 골절이 더욱 증가하는 소견이 관찰되었고[36], Whyte 등[37]은 6년간 pamidronate를 투여한 후 유발된 골화석증에 대하여 보고하였으며, 3~8년 동안 alendronate를 투여 받았던 9명의 환자들에서 자발적인 골절이 발생된 후 골유합이 지연되었으며 조직 검사상 골 형성 지표가 심하게 억제되어 있는 소견이 보고되었다.

Odvina 등[38]은 BPs의 장기 투여 시 골치환(bone turnover)의 과도한 억제에 대하여 언급하였고, Visekruna 등[39]은 BPs에 의한 과도한 골치환의 억제에 의해 비정상적으로 골절이 되기 쉽다고 하였으며, 이러한 골치환의 억제 정도는 개인에 따라 차이가 있다고 하였으며 장기간의 bisphosphonate 투여의 안전성에 의문이 제기되었다.

BPs의 사용에 따른 가장 흔한 합병증은 신독성과 위장관 독성이며[40] 최근 악골의 골괴사에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔다. 2003년에 처음으로 BPs와 연관한 악골 괴사가 보고된 후[9], Ruggiero 등[11]은 BPs를 사용한 후 악골괴사증이 발생한 63증례를 보고 하였으며, 많은 연구에서 악성종양의 보조적인 치료로 BPs를 정맥투여 하였을 때 악골괴사증의 발생빈도는 1~10%라고 보고 하였다41. Migliorati 등 [13], Pazianas 등[42], Cafro[43], Hoff 등[44]은 악골괴사증이 생기기 쉬운 위험요소로는 BPs의 정맥투여, 60세 이상의 고령의 여성, 발치 및 침습적인 외과적 치료, 불량한 구강 위생 등이라고 언급하였다. Khann 등[45]은 악골괴사증의 예방을 위하여 고 용량의 BPs를 정맥투여하기 전에 침습적인 치과 치료를 완료하도록 권유하였다.

이와 같이 BPs는 주로 파골 세포 억제 효과가 골 흡수를 차단하고 골의 치환을 억제하여 골의 강도를 높이는 것으로 밝혀지고 있으나, 골 개조는 항상 파골 세포와 조골세포의 상호작용에 의하여 이루어지므로 BPs가 조골세포에 미치는 영향도 있을 것으로 생각되었으나 이에 대한 연구는 드물었다. 저자는 이점에 착안하여 방사선 동위원소를 주입한 쥐에서 유래된 골육종 세포 줄기인 UMR-106세포를 이용하여 zoledronate 적용 시 조골세포로 분화되는 과정을 관찰하였다. UMR-106 세포는 조골세포로 분화되면 광화가 되는 골 기질을 형성하는 세포이다[25]. 저자의 실험에서 UMR-106세포를 zoledronate가 첨가된 osteogenic media에 12일간 배양한 후 zoledronate의 농도가 0.5㎛이상 일 때 Alizarin Red의 염색도가 현저히 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 zoledronate에 의해 조골세포의 골 기질 형성이 감소 되었다는 것을 의미하며, 골 기질 감소는 UMR-106세포의 사멸과 증식 억제, 또는 조골세포로의 분화 억제로 생각 할 수 있었다. 이를 구분하기 위하여 현미경으로 관찰하였을 때 세포의 분포도는 zoledronate의 농도에 따라 큰 차이가 없었으며 Non-Radioactive Proliferation Assay(tm) kit를 이용한 세포수의 계측에서도 배양기간에 따른 세포수의 변화는 zoledronate의 농도와 무관함을 알 수 있었다. 유세포 분석법을 이용한 세포 생존율에 대한 계측에서도 zoledronate의 농도 차이에 따른 변화는 관찰할 수 없었으며 이러한 소견은 zoledronate가 세포독성을 나타내지는 않으나 UMR-106세포가 조골세포로 분화되는 과정을 억제하는 것으로 판단할 수 있는 결과로 생각되었다.

한편, Garcia-Moreno등[18]이 정상적인 인간 조골세포에 alendronate가 조골세포의 생활력, 세포증

식, mineral deposit capacity에 영향을 미치지 않는다고 보고하였으며, Reinholz 등[46]은 인간 조골세포를 대상으로 한 실험에서 zoledronate가 조골세포의 분화와 골 형성 능력을 증가시킨다고 하였고, Chaplet 등[47]은 zoledronate가 조골세포의 분화와 조골 능력을 증가시킨다고 보고하였으나, Naidu 등[48]은 조골세포의 생활력과 기능에 alendronate와 zoledronate가 미치는 영향을 연구한 결과 약물의 농도가 증가되면 세포의 활성이 현저히 감소한다고 보고하여 서로 상반된 결과를 보이고 있다. 저자의 실험결과는 Naidu등의 실험결과와 유사한 소견으로 볼 수 있으며, 각 실험에 따른 이러한 차이는 실험재료로 사용된 배양세포의 차이 및, 약물의 농도와도 관련이 있는 것으로 생각되었다. 또한, 저자의 실험에서 Non-Radioactive Proliferation Assay(tm) kit를 이용한 세포 수 측정과 유세포 분석법을 이용한 세포 생존율의 측정 시 zoledronate의 농도에 따른 차이는 큰 변화가 없는 것으로 관찰되었으며, 이러한 결과는 저 농도 BPs를 이용한 실험에서는 세포독성이 나타나지 않는다는 Naidu등의 연구결과와 일치하는 것으로 생각되었다.

저자의 실험에서 세포 기질의 형성을 확인하기 위하여 조골세포의 분화 조절에 필수적인 Runx2발현을 Western blot 테크닉으로 검증하였으며 Runx2 단백질 수치는 zoledronate로 처리된 조절 군에서 확연히 감소되었다.

Runx2 단백질은 중간엽 세포로부터 조골세포로 분화하는데 관여되는 주요한 전사인자로 Komori[49]에 의해서 골의 석회화에 중요한 인자라는 것이 밝혀졌다. Runx2는 조골세포에서 특이하게 표현되는 osteocalcin의 promoter 부위에 결합하는 핵기질 단백질로 첫 분화단계에 결정적으로 관여하는 전사인자인 동시에, 일부 분화가 끝난 조골세포의 활성화 과정에도 관여하는 것으로도 알려져 있다.

이와 같이 저자의 실험에서 UMR-106세포를 6일 이상 배양하였을 때 Runx2 발현이 현저히 감소한 것은 zoledronate가 조골세포로 분화되는 과정을 억제하는 것을 확인시켜주는 결과라고 생각되었다.

이러한 저자의 실험결과는 zoledronate가 UMR-106 세포의 증식과 생존율에는 큰 영향을 미치지는 않으나, 조골세포로 분화되는 과정을 차단하여 골 기질 형성이 감소되는 소견을 나타낸 것으로 판단되었으며 zoledronate로 인한 골괴사증과의 관련성 여부에 대하여는 향후 다양한 세포를 이용한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

아미노기가 포함된 bisphosphonate(Zoledronate)가 골 형성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 다양한 농도의 zoledronate를 첨가한 osteogenic media에 UMR-106세포를 배양하여 Alizarin Red staining을 이용한 골 형성 정도를 평가하고, Non-Radioactive Proliferation Assay(tm) kit를 이용하여 세포 수, 유세포 분석기를 이용하여 세포 생존율을 측정하였으며, Western blot테크닉을 이용하여 조골세포의 분화에 결정적인 기능을 하는 Runx2의 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Zoledronate의 농도가 높아질수록 Alizarin Red에 의한 염색 정도는 감소되었다.
2. Zoledronate의 농도는 Non-Radioactive Proliferation Assay(tm) kit를 이용하여 계측된 세포 수에는 영향을 미치지 않았다.
3. Zoledronate의 농도는 유세포 분석기로 측정한 UMR-106의 생존율에는 영향을 미치지 않았다.
4. Zoledronate의 농도가 높아질수록 Runx2 단

백질의 발현이 억제되었다.

이상의 실험결과로 볼 때, Zoledronate는 UMR-106 세포의 개수나 생존율에는 영향을 미치지 않았으나, Zoledronate의 농도가 높아질수록 UMR-106이 조골세포로 분화되는 과정을 억제하는 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Menschutkin M. Ueber die Einwirkung des Chloracetyls auf phophorige Saure. Ann Chem Pharm 1865:133:317-320. cited from 2.
2. Fleisch H, Russell RGG, Bisaz S, Casey PA, Muhlbauer RC. The influence of pyrophosphate analogues(diphosphates) on the precipitation and dissolution. Calcif Tissue Res 1968:suppl:10-10a.
3. Smith R, Russell RGG, Bishop MC, Woods CG, Bishop M. Paget's disease of bone, Experience with a disphosphonate(disodium etidronate) in treatment. Q J Med 1973:42:235-256.
4. Russell RGG, Preston C, Walton J, et al. Disphosphonates in Paget's disease. Lancet 1974:1(7863):894-898.
5. Fleisch H. Bisphosphonates in Bone Disease. From the Laboratory to the Patient. 4th ed. San Diego, CA: Academic Press: 2000.
6. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. Endocr Rev 1998:19:80-100.
7. Reid IR, Brown JP, Burkhardt P, Horowitz Z, Richardson P, Trechsel U, Widmer A, Stat D, Devogelaer JP, Kaufman JM, Jaeger P, Body JJ, Meunier PJ. Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. N Engl J Med 2002:346:653-661.
8. Reid IR. Zoledronate: efficacy and safe. J Bone Miner Res 2006:21:83-87.
9. Marx RE. Pamidronate(Aredia) and zoledronate(Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg 2003:61(9):1115-1117.
10. Dimitrakopoulos I, Magopoulos C, Karakasis D. Bisphosphonate-induced avascular osteonecrosis of the jaws: a clinical report of 11 cases. Int J Oral Maxillofac Surg 2006:35(7):588-593.
11. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. J Oral Maxillofac Surg 2004:62(5):527-534.
12. Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE, et al. Bisphophonate-assosiated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy. Cancer 2005:104:83-93.
13. Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. Lancet Oncol 2006:7(6):508-514.
14. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. Ann Intern Med 2006:144:753-761.
15. 권용대, 윤병욱, Christian W. Bisphosphonate, 구강악안면외과 영역의 새로운 위험 요소인가? 대한악안면성형재건외과학회지 2007:29(5):456-462.
16. Mashiba T, Mori S, Burr DB, Komatsubara S, Cao Y, Manabe T, Norimatsu H. The effects of suppressed bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. J Bone Miner Metab 2005:23 Suppl:36-42.
17. Goodship AE, Wallker PC, McNally D, Chambers T, Green JR. Use of a bisphosphonate(pamidronate) to modulate fracture repair in ovine bone. Ann Oncol 1994:5 Suppl 7:S53-55.
18. Garcia-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farre, M, Diez A, Marinoso ML, Carbonell J, Mellibovsky

참 고 문 헌

L, Nogues X, Ballester J, Aubia J. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. Bone 1998; 22(3): 233-239.

19. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, Wesolowski G, Russell RGG, Rodan GA, Reszka AA. Alendronate mechanism of action: geranygeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1999:96(1):133-138.
20. Fisher JE, Rodan GA, Reszka AA. In vivo effects of bisphosphonates on the osteoclast mevalonate pathway. Endocrinology 2000:141:4793-4796.
21. Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, Sebti S, Ralston SH, Hamilton A, Rogers MJ. Protein geranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. J Bone Miner Res 2000:15(8):1467-1476.
22. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Cancer 2000:88(12 Suppl):2961-2978.
23. Coxon FP, Rogers MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function, Calcif Tissue Int 2003:72(1):80-84.
24. Martin TJ, Ingleton PM, Couton LA, Melick RA. Metabolic properties of hormonally responsive osteogenic sarcoma cells. Clin Orthop Relat Res 1979:(140):247-254.
25. Preston SJ, Laurent MR, Clifton-Blidgh P, Laurent MR, Jackson C, Mason RS. Effect of methotrexate and sulphasalazine on UMR-106 rat osteosarcoma cells. Br J Rheumatol 1997:36(2):178-184.
26. Body JJ, Sternon J. Treatment of Paget's disease of bone with zoledronic acid. Rev Med Brux 2005:26(6):513-517.
27. Major PP, Lipton A, Berenson J, Hortobagyi G. Oral bisphosphonates: A review of clinical use in patients with bone metastases. Cancer 2000:88(1):6-14.
28. Brenson JR, Rosen LS, Howell A, Porter L, Coleman RE, Morley W, Dreicer R, Kuross SA, Lipton A, Seaman JJ. Zoledronic acid reduces skeletal-related events in patients with osteolytic metastases. Cancer 2001:91(10):1956.
29. Hillner BE, Ingle JN, Chlebowski RT, Gralow J, Yee GC, Janjan NA, Cauley JA, Blumenstein BA, Albain KS, Lipton A, Brown S. American Society of Clinical Oncology 2003 Update on the Role of Bisphosphonates and Bone Health Issue in Women With Breast Cancer. J Clin Oncol 2003:21(21):4042-4057.
30. Fulfaro F, Leto G, Badalamenti G, Arcara C, Cicero G, Valerio MR, Di Fede G, Russo A, Vitale A, Rini GB, Casuccio A, Intrivici C, Gebbia N. The use of zoledronic acid in patients with bone metastases from prostate carcinoma: effect on analgesic response and bone metabolism biomarkers. J Chemother 2005:17(5):555-559.
31. Melisi D, Caputo R, Damiano V, Bianco R, Veneziani BM, Bianco AR, De Placido S, Ciardiello F, Tortora G. Zoledronic acid cooperates with a cyclooxygenase-2 inhibitor and gefitinib in inhibiting breast and prostate cancer. Endocr Relat Cancer. 2005:12(4)1051-1058.
32. Wood J, Bonjean K, Stephan R, Bellahcene A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. J Pharmacol Exp Ther 2002:302(3):1055-1061.
33. Santini D, Gentilucci UV, Vincenzi B, Picardi A, Vasaturo F, La Cesa A, Onori N, Scarpa S, Tonini G. The antineoplastic role of bisphosphonates: from basic research to clinical evidence. Ann Oncol 2003:14:1468-1476.
34. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates mechanisms of action. J Clin Invest 1996:97(12):2692-2696.
35. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing

참 고 문 헌

bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. J Bone Miner Res 1998:13(4):581-589.

36. Mashiba T, Turner CH, Hirano T, Forwood MR, Jacob DS, Johnston CC, Burr DB. Effects of high-dose etidronate treatment on microdamage accumulation and biomechanical properties in beagle bone before occurrence of spontaneous fracture. Bone 2001:29(3):271-278.
37. Whyte MP, Wenkert D, Clements KL, McAlister WH, Mumm S. Bisphosphonate-induced osteopetrosis. N Engl J Med 2003:349(5):457-463.
38. Odvina CV, Zwewekh JE, Rao DS, Maalouf N, Gottschalk FA, Pak CY. Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. J Clin Endocrinol Metab 2005:90(3):1294-1301.
39. Visekruna M, Wilson D, McKiernan FE. Severely suppressed bone turnover and atypical skeletal fragility. J Clin Endocrinol Metab 2008:Jun(3):[Epub ahead of print].
40. Diel IJ, Bergner R, Grotz KA. Adverse effects of bisphosphonates: current issues. J Support Oncol 2007:5(10)475-482.
41. Van Poznak C, Estilo C. Osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving IV bisphosphonates. Oncology 2006:20(9):1053-1062.
42. Pazianas M, Miller P, Blumentals WA, Bernal M, kothawala P. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. Clin Ther 2007:29(8):1548-1558.
43. Cafro AM. Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with bisphosphonates: definition and management of the risk related to zoledronic acid. Clin Lymphoma Myeloma 2008:8(2):111-116.
44. Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, Nooka A, Sayegh G, Guarneri V, Desrouleaux K, Cui J, Adamus A, Gagel RF, Hortobagyi GN. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. J Bone Miner Res 2008:23(6):826-836.
45. Khan AA, Sandor GK, Dore E, Morrison AD, Alsahli M, Amin F, Peters E, Hanley DA, Chaudry SR, Dempster DW, Glorieux FH, Neville AJ, Talwar RM, Clokie CM, Al Mardini M, Paul T, Khosla S, Josse RG, Sutherland S, Lam DK, Carmichael RP, Blanas N, Kendler D, Petak S, St-Marie LG, Brown J, Evans AW, Rios L, Compston JE. Canadian Consensus Practice Guidelines for Bisphosphonate Associated Osteonecrosis of the Jaw. J Rhematol 2008:Jun(1):[Epub ahead of print].
46. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC. Bisphosphonates Directly Regulate Cell Proliferation, Differentiation, & Gene Expression in Human Osteobasts. Cancer Res 2000:60(21):6001-6007.
47. Chaplet M, Detry C, Deroanne C, Fisher LW, Castronovo V, Bellahcene A. Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition. Biochem J 2004:384(3):591-598.
48. Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008:May(24):[Epub ahead of print].
49. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. J Cell Biochem 2006:99(5):1233-1239.