



Bisphosphonate가 인간 골수유래 간엽줄기세포의 증식과 알칼리성 인산분해효소 활성에 미치는 영향

정준호 · 이백수 · 권용대 · 오주영 · 김영란

경희대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Abstract

Effects of Bisphosphonates on the Proliferation and the Alkaline Phosphatase Activity of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells

Junho Jung, Baeksoo Lee, Yong-Dae Kwon, Joo-Young Ohe, Young-Ran Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Kyung-Hee University

Purpose: The purpose of this study is to find out the effects of bisphosphonates (BPs) on the proliferation and the alkaline phosphatase (ALP) activity of human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hMSCs), and thus state its correlation with bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ).

Methods: hMSCs was obtained by collecting and culturing cancellous bone fragments from a patient undergoing iliac bone graft. Alendronate (Aln) and Pamidronate (Pam), Ibandronate (Ibn) were added to the culture media in the concentration from 10^{-3} M to 10^{-11} M and cell toxicity, viability were measured. For ALP activity evaluation, Aln and Pam were added to the culture media in the concentration from 5×10^{-7} M to 1×10^{-8} M and were cultured for 1 week, 2 weeks and 3 weeks. ALP activity data were standardized using protein assay. Control groups were prepared for each examination.

Results: Aln, Pam and Ibn all failed to increase the proliferation of hMSCs. With 1 week, 2 weeks of 5×10^{-8} M of Aln treatment, the ALP activity increased. Pam treatment increased the ALP activity with 2 weeks of 5×10^{-8} M and 1×10^{-8} M. Also Ibn treatment increased the ALP activity with 2 weeks of 5×10^{-8} M and 1×10^{-8} M.

Conclusion: It is considered that BPs are not capable of improving the proliferation of hMSCs. Also, after a transient increase in the ALP activity with the lower concentration of BPs, the activity decreased again. Therefore, in patients on long-term medication of BPs, the proliferation and osteoblast differentiation of hMSCs are restrained, and thus delayed wound healing and increase in BRONJ complications may occur.

Key words: Bisphosphonates, Alkaline phosphatase, Human mesenchymal stem cell, Osteoblast differentiation

원고 접수일 2010년 10월 27일, 게재 확정일 2010년 11월 11일

책임저자 이백수

(130-702) 서울시 동대문구 회기동 1번지, 경희대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Tel: 02-958-9440, Fax: 02-966-4572, E-mail: leebs@khu.ac.kr

RECEIVED October 27, 2010, ACCEPTED November 11, 2010

Correspondence to Baeksoo Lee

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Kyung-Hee University

1, Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-702, Korea

Tel: 82-2-958-9440, Fax: 82-2-966-4572, E-mail: leebs@khu.ac.kr

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

Bisphosphonate (BPs)는 파골세포의 활성 억제자로 잘 알려져 있으며[1], 골 개조를 감소시킴으로써 골 밀도의 증가를 이루어내 [2-4], Paget's disease, 악성 골갈슘혈증, 섬유이형성증, 골형성 부전증, 관절염, 폐경기 이후 골다공증 등과 같은 전신 대사성 골 질환의 치료제로 널리 사용되고 있다[5-11]. 그러나 골과 세포에 대한 활동 기전을 완전하게 알지 못한 실정이며, 2003년 Marx와 Stem이 BPs의 합병증으로 인한 BPs 유도 악골괴사(bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw, BRONJ)를 보고한 이후 이는 구강악안면외과의 새로운 치료 영역이 되었다[12-15]. BRONJ란 BPs 장기 복용 환자에서 악골 괴사와 그에 따른 조직 열개, 감염 등이 나타남을 말한다.

BPs는 phosphates에 연결된 산소가 탄소로 대체된 pyrophosphate analogue 계열의 약물이며, Hydroxyapatite에 친화력이 크고, 효소에 의한 가수분해, 열에 저항성을 지녀 장기간 대사되지 않은 채로 골 속에 남아 있다[16,17]. BPs의 구조는 탄소와 연결된 두 측쇄의 변화, 또는 phosphates의 에스테르화에 의하여 다양하게 합성될 수 있으며, 이러한 analogue의 차이에 따라 골 흡수 억제 능력에 차이가 있다[16,18]. Etodronate 등과 같은 질소 미함유 BPs는 골 흡수 억제 능력이 약하며, 질소가 함유된 Ibandronate (Ibn, 1-Hydroxy-3-(methylpentylamino)propylidene bisphosphonic acid), Alendronate (Aln, 4-amino-1-hydroxy-1-phosphonobutyl phosphonic acid), Pamidronate (Pam, 3-amino-1-hydroxy-1-phosphonopropyl phosphonic acid)는 그 순서대로 그 효과가 높고 또한 부작용의 빈도도 높다[19,20]. 질소 함유 BPs는 farnesyl pyrophosphate (FPP) 합성을 억제함으로써 파골세포의 활성을 저해하고, hydroxyapatite에 대한 친화력이 커 임상적으로 큰 흡수 억제 능력을 가지고, 장기간 작용한다[21].

세포 수준에서 BPs는 파골세포의 ruffled border를 불안정하게 하고[20], 파골세포 전구체의 증식과 모충을 억제하며[22,23], 대식세포와 성숙된 파골세포의 세포 자살을 유도함으로써 파골세포의 수를 감소시킨다[24]. 이것은 직접적인 FPP 합성 억제에 의하여 mevalonate pathway가 방해받기 때문으로, 파골 세포의 자살로 인하여 결과적으로 골 흡수능이 저해된다[21].

이와는 다르게 골모세포에 대한 연구에서 Mathov 등과 Giuliani 등은 골모 세포 전구체의 형성을 자극하고, 광화를 촉진한다고 보고하였으며[25,26], Plotkin 등은 골세포와 골모세포의 자살을 방지한다고 보고하였다[27]. 이후에도 골모세포의 증식과 분화를 향상시킴을 확인하는 연구가 있었으나 그 정도는 연구 모델과 BPs의 종류, 농도에 따라 다양하였다[28-30].

골모세포와 골수 기질세포에 대한 BPs의 영향 연구는 다양하게 이루어졌으나, 인간 간엽 줄기세포에 대한 골모세포로의 분화

연구는 10^{-7} M, 10^{-8} M의 Aln 농도에서 분화가 촉진됨이 보고된 바 있지만[31] 그 수가 적다. 인간 골수 유래 간엽세포는 중배엽계의 세포(골아세포, 연골세포, 지방세포, 골격근, 심근, 인대, 건 등)로 분화할 수 있는 능력을 가진 미분화 세포로[32] 골 형성을 일으킬 수 있는 세포로 분화 가능하여 골 대사에 대한 영향을 클 것으로 여겨진다. 간엽 줄기세포가 골모세포 또는 지방모세포로 분화가 이루어지는지에 따라 골 형성능에 차이가 발생하므로 다양한 종류와 농도의 BPs가 미치는 영향에 대한 연구가 중요할 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 골다공증과 다양한 골 대사성 질환의 억제제로 사용되는 Alendronate, Pamidronate, Ibandronate를 이용하여 다양한 농도에서 세포 독성과 생존능에 대한 평가, 골모세포로의 분화 정도를 측정하였다. 골모세포로의 분화 정도는 골 형성 전구세포에서 골모세포로 분화되는 초기 과정에서 분비되는 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 측정함으로써 평가하였다.

연구방법

1. 간엽세포의 분리 및 배양

구강 내 병소 제거 후 장골이식이 예정된 전신 질환이 없는 환자에서 서면 동의를 얻은 후, 수술실에서 장골 부위를 소파하여 얻은 해면골 중 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ 크기의 골편을 선택하였다. 선택된 골편은 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS: Gibco, Invitrogen, USA)를 이용하여 상층액이 투명해질 때까지 세척하였다. 10 cm^2 의 petri dish에 이동 후 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco, Invitrogen, USA)와 1% antibiotics/antimycotics (100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 0.25 mg/ml amphotericin B: Gibco, Invitrogen, USA)가 함유된 α -modified minimum essential medium (α -MEM: Gibco, Invitrogen, USA)에 초대 배양하였다. 배양 조건은 37°C , 5% CO_2 , 95% 습도를 유지하였으며, 매 2일마다 배양액을 교체하였다. 골편을 새로운 petri dish로 이동시킨 후 0.25% trypsin-10% ethylene diaminetetracetic acid (trypsin-EDTA: Gibco, Invitrogen, USA)를 이용하여 trypsinize 후 계대 배양을 실시하였다. 3~4대의 hMSCs를 획득한 후 유세포 분석(flow cytometry)을 시행하여 hMSCs임을 확인하였다. 유세포 분석(flow cytometry)은 획득된 세포를 anti-CD105-phycoerythrin (PE), anti-CD95, anti-CD34 항체와 반응시킨 후, Cell-Lab QuantaTM SC (Beckham coulter, USA)기기를 통하여 시행하였다. 그 결과 CD105, CD95와 같은 표면항원은 발견되었으나 hematopoietic lineage marker인 CD34 표면항원은 발견되지 않았으며, 약 94% 이상이 MSCs로 확인되었다.

2. 세포 독성 평가

hMSCs는 96-well plate에 $10^4/100 \mu\text{l/well}$ 의 밀도가 되도록 sample을 형성하였고, 배양 환경을 유지하면서 24시간 후 다음의 실험군과 같이 배양액을 교체하여, 세포에 대한 BPs의 독성 영향을 평가하였다.

대조군: α -MEM+10% FBS+1% antibiotics/antimycotics

실험군 1: 대조군 배양액+ 10^{-11} M Aln or Pam or Ibn

실험군 2: 대조군 배양액+ 10^{-9} M Aln or Pam or Ibn

실험군 3: 대조군 배양액+ 10^{-7} M Aln or Pam or Ibn

실험군 4: 대조군 배양액+ 10^{-5} M Aln or Pam or Ibn

실험군 5: 대조군 배양액+ 10^{-3} M Aln or Pam or Ibn

BPs의 종류로 Aln, Pam, Ibn를 이용하여 각각의 실험군을 형성하였으며, 각 BPs의 종류와 농도에 따라 24시간, 48시간을 배양한 뒤, Cell counting kit (CCK-8, Dojindo, Japan)를 이용하여 ELISA microplate reader (Bio-Rad, Australia)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 세포 독성을 평가하였다. 결과 비교는 대조군의 중앙값을 기준으로 각 측정치의 상대적인 OD (optical density)값으로 환산하여 측정하였다(One-Way ANOVA with Tukey-Kramer Posthoc, $P<0.05$).

3. 세포 생존능 평가

hMSCs는 96-well plate에 $10^4/100 \mu\text{l/well}$ 의 밀도가 되도록 sample을 형성하였고, 배양 환경을 유지하면서 24시간 후 다음의 실험군으로 배양액을 교체하여, BPs의 세포 증식에 대한 영향을 평가하였다. 세포 독성 평가 결과에 따라 BPs 농도와 처치 기간을 다시 설정하였다.

대조군: α -MEM+10% FBS+1% antibiotics/antimycotics

실험군 1: 대조군 배양액+ 10^{-9} M Aln or Pam or Ibn

실험군 2: 대조군 배양액+ 10^{-7} M Aln or Pam or Ibn

실험군 3: 대조군 배양액+ 10^{-5} M Aln or Pam or Ibn

BPs의 종류로 Aln, Pam, Ibn를 이용하여 실험군을 형성하였으며, 각 BPs와 농도에 따라 1일, 3일, 7일을 배양한 뒤, Cell counting kit (CCK-8, Dojindo, Japan)를 이용하여 ELISA microplate reader (Bio-Rad, Australia)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정함으로써 세포 생존능을 평가하였다. 결과 비교는 대조군의 중앙값을 기준으로 각 측정치의 상대적인 OD (optical density)값으로 환산하여 측정하였다(One-Way ANOVA with Tukey-Kramer Posthoc, $P<0.05$).

4. 알칼리성 인산분해효소 평가

hMSCs는 12-well plate에 $3 \times 10^4/\text{ml/well}$ 의 밀도가 되도록 sample을 형성하였고, 배양 환경을 유지하면서 24시간 후 대조군과 실험군으로 배양액을 교체하였다. 대조군은 골모세포형성을

유도하기 위하여 100 nM dexamethasone (Sigma, St.Louis, MO, USA), 10 mM β -glycerophosphate (Sigma, St.Louis, MO, USA), 300 μM L-ascorbic acid (Sigma, St.Louis, MO, USA)을 첨가하여 형성하였고, 실험군은 다음과 같이 대조군의 배양액에 다양한 농도의 Aln, Pam, Ibn를 첨가하여 형성하였다. 실험군의 농도는 세포 생존능 평가에 따라 증식능을 크게 억제하지 않는 수준으로 결정하였다.

대조군: α -MEM+10% FBS+1% antibiotics/antimycotics +100 nm dexamethasone+10 mM β -glycerophosphate + 300 μM L-ascorbic acid

실험군 1: 대조군 배양액+ 5×10^{-7} M Aln or 5×10^{-7} M Pam or 1×10^{-5} M Ibn

실험군 2: 대조군 배양액+ 1×10^{-7} M Aln or 1×10^{-7} M Pam or 1×10^{-6} M Ibn

실험군 3: 대조군 배양액+ 5×10^{-8} M Aln or 5×10^{-8} M Pam or 1×10^{-7} M Ibn

실험군 4: 대조군 배양액+ 1×10^{-8} M Aln or 1×10^{-8} M Pam or 1×10^{-8} M Ibn

BPs의 종류는 Aln, Pam, Ibn를 이용하여 실험군을 형성하였으며, 각 BPs의 종류와 농도마다 주 3회 배양액 교체하여 1주, 2주, 3주군을 형성하였다. 이후 세포 채취하고 lysis하여 ALP의 활성을 측정하였고(Sigma, St.Louis, MO, USA), 2번씩 반복 시행한 단백질 정량을 통해(Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo, USA) 그 정도를 표준화하여 각 실험군과 대조군을 비교하였다. ALP 활성 측정은 무색의 p-nitrophenyl phosphate가 유색의 p-nitrophenyl로 변환한 정도를 ELISA microplate reader (Bio-Rad, Australia)로 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 평가하였으며, 결과 비교는 대조군의 평균값을 기준으로 환산하여 측정하였다(Wilcoxon's rank-sum test, $P<0.05$).

결 과

1. 세포 독성 평가

1) BPs 첨가 24시간 후 세포 독성 평가

Aln의 첨가 시 10^9 M 이상의 농도에서는 모두 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 세포 증식능이 감소하였다. 10^{-3} M 농도에서는 다른 농도에 비하여 유의성 있게 세포 독성이 높게 나타났다. Pam는 10^7 M 이상의 농도에서 대조군에 비하여 세포 독성이 유의성 있게 증가한 것을 알 수 있으며, Aln과 마찬가지로 10^{-3} M에서는 세포 증식능이 크게 감소하였다.

Ibn은 Aln, Pam에 비하여 10^3 M의 고농도에서도 독성이 크게 증가하지 않았으며, 10^{-7} M 농도까지는 대조군과 유의한 차이가 없었다. 10^{-5} M, 10^{-3} M의 Ibn만이 대조군과 통계학적으로 유의성

있는 차이를 보였다.

2) BPs 첨가 48시간 후 세포 독성 평가

Aln로 처리한 경우 48시간 배양군의 세포 독성은 10⁻⁷ M 이상의

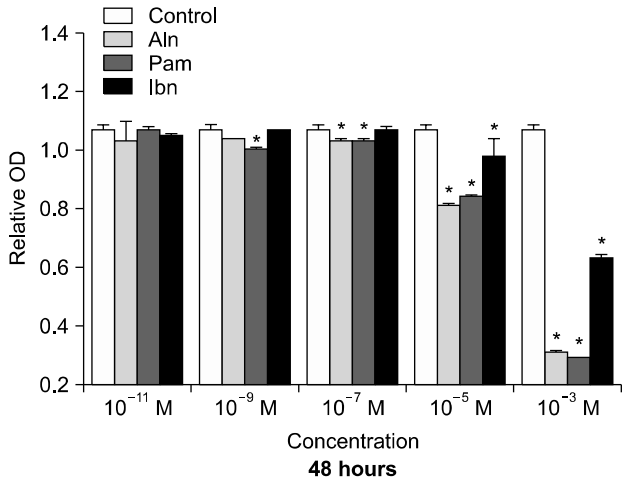


Fig. 1. Cellular toxicity test of hMSCs according to the concentration of bisphosphonates after 48 hours of incubation (Mean±SD).

농도에서 대조군과 차이가 있었으며, 10⁻³ M에서 독성이 크게 증가함을 알 수 있었다. Pam은 10⁻⁹ M의 농도부터 유의성 있는 차이를 보이며, Aln과 마찬가지로 10⁻³ M에서 대조군과 큰 차이를 보인다. Ibn은 24시간 배양군과 마찬가지로 10⁻³ M, 10⁻⁵ M 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있게 세포 독성이 증가하였다(Fig. 1, Table 1).

2. 세포 생존능 평가

1) BPs 첨가 1일 후 세포 생존능 평가

Aln 첨가 시 모든 농도에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다. 그러나 처리 농도에 따른 차이는 없었다. Pam을 첨가한 경우 10⁻⁵ M 이상의 농도로 첨가시 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 생존능이 감소하였고, 전반적으로 고농도를 첨가할수록 감소하였다. Ibn 또한 10⁻⁵ M 이상의 농도로 첨가 시 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 생존능이 감소하였다.

2) BPs 첨가 3일 후 세포 생존능 평가

Aln 첨가 시 고농도로 처리 할수록 생존능이 유의하게 감소하였으나, 10⁻⁹ M 농도에서는 대조군과 차이가 없었다. Pam과 Ibn 모두 10⁻⁵ M에서만 유의하게 생존능이 감소하였다.

Table 1. Cellular toxicity test of hMSCs according to the concentration of bisphosphonates after 24, 48 hours of incubation (Mean±SD)

Time	Concentration	Alendronate	Pamidronate	Ibandronate
24 h	Control	1.06±0.02 ^a	1.06±0.02 ^a	1.06±0.02 ^a
	10 ⁻¹¹ M	1.06±0.02 ^a	0.97±0.04 ^b	1.07±0.07 ^a
	10 ⁻⁹ M	0.96±0.03 ^b	1.01±0.00 ^{a,b}	1.07±0.06 ^a
	10 ⁻⁷ M	0.94±0.03 ^b	1.00±0.04 ^b	1.03±0.01 ^a
	10 ⁻⁵ M	0.92±0.03 ^b	0.88±0.03 ^c	0.95±0.01 ^b
	10 ⁻³ M	0.36±0.01 ^c	0.29±0.01 ^d	0.91±0.01 ^b
48 h	Control	1.07±0.02 ^a	1.07±0.02 ^a	1.07±0.02 ^a
	10 ⁻¹¹ M	1.03±0.07 ^{a,b}	1.07±0.01 ^a	1.05±0.01 ^a
	10 ⁻⁹ M	1.04±0.00 ^a	1.00±0.01 ^b	1.07±0.00 ^a
	10 ⁻⁷ M	1.03±0.01 ^b	1.03±0.01 ^c	1.07±0.01 ^a
	10 ⁻⁵ M	0.81±0.01 ^c	0.84±0.01 ^d	0.98±0.06 ^b
	10 ⁻³ M	0.31±0.01 ^d	0.29±0.00 ^e	0.63±0.01 ^c

Data analysis was by One-way ANOVA. The same letters indicate non-significant difference between groups based on Tukey-Kramer posthoc test.

Table 2. Cellular viability test of hMSCs according to the concentration of bisphosphonates after 1,3,7 days of incubation (Mean±SD)

Time	Concentration	Alendronate	Pamidronate	Ibandronate
1 days	Control	1.39±0.04 ^a	1.39±0.04 ^a	1.39±0.04 ^a
	10 ⁻⁹ M	1.32±0.01 ^b	1.34±0.02 ^{a,b}	1.38±0.04 ^a
	10 ⁻⁷ M	1.31±0.02 ^b	1.33±0.03 ^b	1.28±0.02 ^b
	10 ⁻⁵ M	1.29±0.02 ^b	1.15±0.01 ^c	1.23±0.02 ^b
3 days	Control	1.43±0.03 ^a	1.43±0.03 ^a	1.43±0.03 ^a
	10 ⁻⁹ M	1.41±0.02 ^a	1.42±0.02 ^a	1.42±0.03 ^a
	10 ⁻⁷ M	1.36±0.02 ^b	1.39±0.01 ^a	1.42±0.03 ^a
	10 ⁻⁵ M	0.89±0.03 ^c	1.14±0.01 ^b	1.28±0.02 ^b
7 days	Control	2.41±0.00 ^a	2.41±0.00 ^a	2.41±0.00 ^a
	10 ⁻⁹ M	2.34±0.05 ^a	2.22±0.05 ^b	2.20±0.04 ^b
	10 ⁻⁷ M	1.96±0.09 ^b	2.15±0.06 ^b	2.20±0.03 ^b
	10 ⁻⁵ M	0.46±0.03 ^c	1.36±0.03 ^c	2.15±0.03 ^{b,c}

3) BPs 첨가 7일 후 세포 생존능 평가

Aln과 Pam, Ibn 모두 첨가 농도가 커질수록 통계적으로 유의하게 세포 생존능이 감소하였으나 Pam과 Ibn의 10^{-9} M, 10^{-7} M 간에는 통계적 차이가 없었다. Aln과 Pam에서 10^{-5} M의 농도로 첨가 시 생존능이 저농도군에 비하여 큰 폭으로 감소하였다 (Table 2, Fig. 2).

Aln과 Pam의 첨가 시 배양 3일과 7일 이후에 10^{-5} M 농도에서 저농도군에 비하여 유의성 있게 생존능이 감소하였으며, Ibn의 경우 배양시간이 증가하더라도 첨가 농도에 따른 증식능의 차이가 크지 않았다.

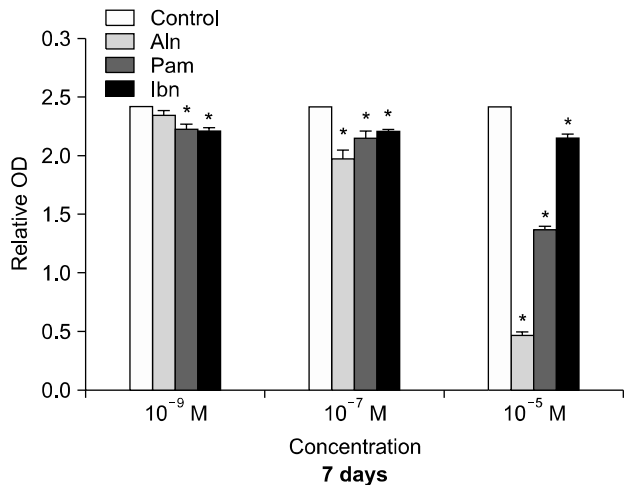


Fig. 2. Cellular viability test of hMSCs according to the concentration of bisphosphonates after 7 days of incubation (Mean±SD).

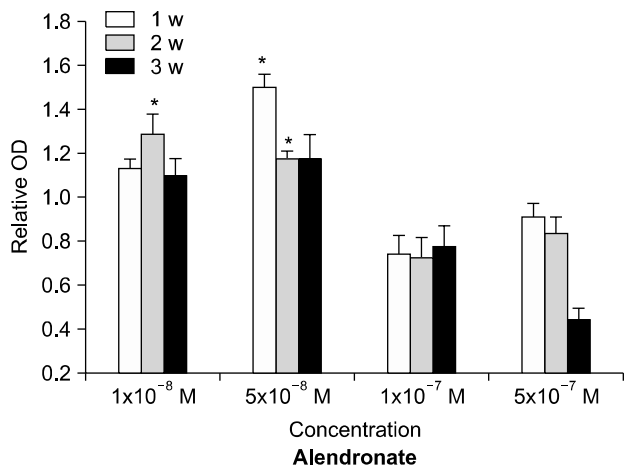


Fig. 3. Alkaline phosphatase activity test of hMSCs according to the concentration of Alendronate (Mean±SD). * $P < 0.05$ significantly greater than control.

3. 알칼리성 인산분해 효소 평가

Aln로 처리한 결과 5×10^{-8} M의 농도에서 1주, 2주 내에 유의성 있게 ALP의 활성이 증가하였으나, 1주군에서 가장 활성이 높았다. 1×10^{-8} M의 Aln 처리 시에는 2주 내에 활성이 증가하였다. Pam로 처리한 경우에는 5×10^{-8} M과 1×10^{-8} M에서 2주 내에 활성이 유의성 있게 증가하였다. 또한 10^{-7} M과 10^{-8} M의 Ibn에서 ALP의 활성이 대조군에 비하여 2주 내에 유의한 증가를 나타냈다. 10^{-5} M의 Ibn으로 처리한 경우에 2주 이후에는 세포 생존률이 낮아 실험에 필요한 세포의 양을 얻지 못하였다. 1×10^{-7} M과 5×10^{-7} M으로 처리한 경우에는 모든 실험군에서 ALP의 활성을 증가시키지 못하였다(Fig. 3~5, Table 3).

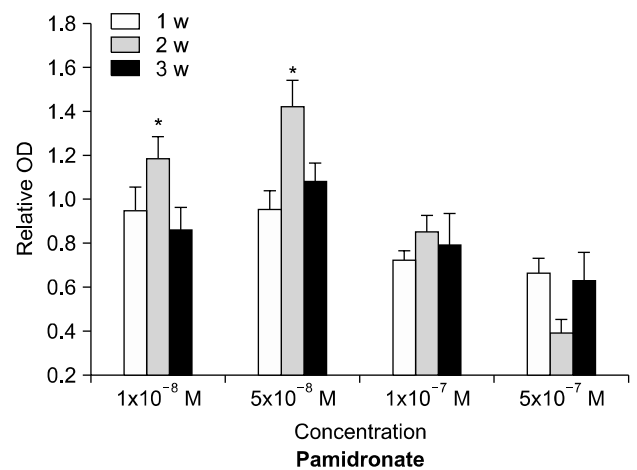


Fig. 4. Alkaline phosphatase activity test of hMSCs according to the concentration of Pamidronate (Mean±SD). * $P < 0.05$ significantly greater than control.

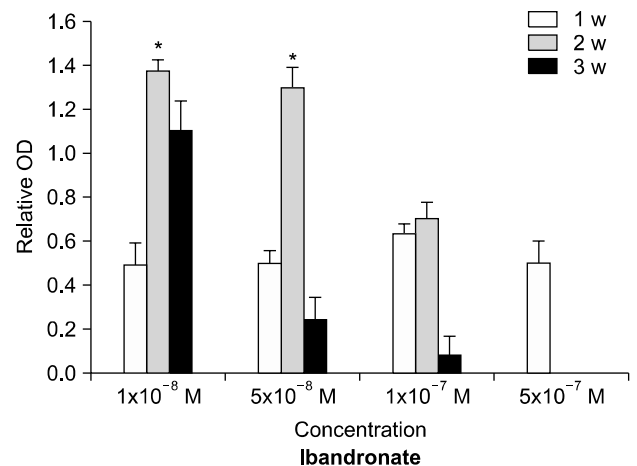


Fig. 5. Alkaline phosphatase activity test of hMSCs according to the concentration of Ibandronate (Mean±SD). * $P < 0.05$ significantly greater than control.

Table 3. Alkaline phosphatase activity test of hMSCs according to the concentration of bisphosphonates (Mean±SD)

Time	Concentration	Alendronate	Pamidronate	Concentration	Ibandronate
1 weeks	1×10 ⁻⁸ M	1.13±0.05	0.94±0.12	10 ⁻⁸ M	0.49±0.10
	5×10 ⁻⁸ M	1.50±0.06*	0.95±0.09	10 ⁻⁷ M	0.56±0.06
	1×10 ⁻⁷ M	0.74±0.09	0.72±0.05	10 ⁻⁶ M	0.63±0.05
2 weeks	5×10 ⁻⁷ M	0.91±0.06	0.66±0.07	10 ⁻⁵ M	0.50±0.10
	1×10 ⁻⁸ M	1.28±0.10*	1.18±0.11*	10 ⁻⁸ M	1.37±0.06*
	5×10 ⁻⁸ M	1.17±0.04*	1.42±0.12*	10 ⁻⁷ M	1.30±0.09*
3 weeks	1×10 ⁻⁷ M	0.72±0.10	0.85±0.08	10 ⁻⁶ M	0.70±0.08
	5×10 ⁻⁷ M	0.83±0.08	0.39±0.06	10 ⁻⁵ M	
	1×10 ⁻⁸ M	1.10±0.08	0.86±0.10	10 ⁻⁸ M	1.10±0.14
	5×10 ⁻⁸ M	1.17±0.12	1.08±0.09	10 ⁻⁷ M	0.24±0.11
	1×10 ⁻⁷ M	0.77±0.10	0.79±0.15	10 ⁻⁶ M	0.08±0.09
	5×10 ⁻⁷ M	0.44±0.06	0.63±0.13	10 ⁻⁵ M	

Data analysis was by Wilcoxon's rank-sum test. * $P < 0.05$ significantly greater than control.

고찰

파골 세포의 활성을 억제하는 BPs는 전신적인 골 소실을 일으키는 질환에 있어서 매우 효율적이고 편리하게 사용될 수 있으며, 또한 널리 쓰이는 치료제이다. 이러한 골 질환의 치료에 사용되는 BPs는 2003년 BRONJ가 처음 보고된 이후 구강악안면외과 영역의 새로운 연구 과제가 되었다[12-15]. BPs는 파골세포의 골표면 actin 부착부를 방해하고, ruffled border를 불안정하게 하며 [20,33], 파골세포 전구체의 증식과 보충을 억제하고[22,23], 대식 세포와 성숙된 파골세포의 세포자살을 유도함으로써 전신적으로 골 흡수를 억제하는 기전으로 작동하게 되는데, 이 때문에 두꺼운 연조직 피개가 부족하고, 골의 전환율이 매우 빠른 악골과 치조골에 더 큰 영향을 미쳐 BRONJ가 발생하는 것으로 생각된다. 이에 따라 골모세포와 골기질세포, 미분화 간엽세포에 대한 영향도 다양하게 연구되고 있으며, 그 종류와 농도, 처리 기간에 따라 파골세포의 그것과 다른 양상의 결과도 다양하게 보고되고 있다.

골모세포에 대한 다양한 연구에서 대부분 10⁻⁴ M에서 10⁻⁵ M까지의 농도에서 대조군에 비하여 세포 증식능이 감소됨을 보고하였으며, 그 이하의 다양한 농도에서는 증식능이 증가됨이 관찰되었다. Reinholz 등[29]은 인간 골모세포에 대한 Pam의 영향 연구에서 10⁻⁵ M 이상의 농도에서 증식능은 6일째부터 대조군에 비해 유의성 있게 감소되며, 10⁻⁴ M 농도에서는 6일째 대조군에 비해 살아있는 세포가 95% 감소되었고, 4×10⁻⁵ M 이상의 농도에서는 세포가 둥글게 되며, 떨어지고, 세포사가 일어남을 보고하였다. Im 등[28]은 다양한 농도의 Aln, risedronate을 MG-63 cell에 첨가한 연구에서 direct cell counting을 이용하여 증식능을 평가한 경우에는 10⁻⁴ M의 농도에서는 대조군에 비하여 억제되며 10⁻⁷ M에서 10⁻⁹ M 사이에서는 증식능이 증가되며, 10⁻¹² M에서는 차이가 없음을 보고하였고, MTT assay 평가 방법에서는 10⁻⁸ M에서 48시간 배양한 경우 최고의 세포 증식능을 보였다고 하였다. Fromigue와 Body[34]는 Pam 첨가군에서 어떤 농도에서도 증식능이 증가하지 않았고, 10⁻⁴ M에서는 증식능이 감소하였다고

하였다. Garcia-Moreno 등[35]의 실험 결과에서는 10⁻⁵ M의 농도 이하에서 증식능에 영향이 없었으며, 10⁻⁴ M에서는 증식능의 감소, 10⁻³ M 이상의 농도에서는 살아 있는 세포가 없었음을 보고하였다.

인간 골수기질세포(human bone marrow stromal cells)에 대한 BPs의 연구 또한 다양하였다. Klein 등[30]은 10⁻⁴ M과 10⁻⁵ M에서 대조군에 비하여 골수기질세포의 증식이 증가됨을 보고하였으며, 10⁻³ M에서는 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않는다고 하였다. von Knoch 등[36]의 연구에서는 10⁻⁸ M의 Aln 첨가군에서 7일과 14일째 14%, risedronate 첨가군에서는 7일과 14일째 16%, zolendronate 첨가군에서는 7일째 15%, 14일째 14% 대조군에 비하여 세포수가 증가되었음을 보고되었다. Still 등[37]은 쥐의 골수기질세포에 BPs를 첨가한 실험에서 Aln, risedronate 첨가군 모두 10⁻⁴ M에서 거의 대부분의 군집이 억제됨이 관찰되었고, 10⁻⁷ M에서 10⁻⁹ M 사이에서는 군집이 유의성 있게 증가됨이 관찰되었다. 이에 반해 etidronate 첨가군에서는 대조군과 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. Stefanik 등[38]은 Pam 첨가 시 10⁻⁵ M 이상에서 세포 증식능이 장골농과 하악골 골수기질세포 모두에서 감소함을 보고하였다.

인간 골수유래 간엽줄기세포에 대하여 2007년 Duque와 Rivas[31]이 발표한 연구에 따르면 10⁻⁷ M에서 10⁻⁹ M 사이에서는 세포 증식능에 대한 Aln의 영향이 없음을 보고하였다.

본 연구의 결과 10⁻¹¹ M에서는 Aln, Pam, Ibn 모두 대조군에 비하여 세포 독성에 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 Aln와 Pam는 10⁻⁹ M에서부터 대조군에 비하여 세포 독성이 증가하는 것으로 나타났으며, Ibn은 10⁻⁵ M부터 유의하게 독성이 증가하였다. 48시간 배양군에서 10⁻⁵ M과 그 이하의 농도 비교에서 유의한 증식능의 감소를 보였으며, 10⁻³ M의 농도에서는 대조군에 비하여 71%, 74%, 41% 세포 증식능이 감소한 것으로 나타나 독성이 크게 증가됨이 관찰되었다. Ibn의 경우 Aln과 Pam에 비하여 같은 농도에서 독성 효과가 크지 않음을 알 수 있었다. 세포 생존능 평가 결과에서도 마찬가지로 어떠한 농도에서도 대조군에

비해 증식능이 증가되지 않았으며, 10^9 M에서는 대조군과 통계적 유의성이 없었다. 10^5 M은 3일 배양군부터 그 이하 농도에 비하여 생존능이 감소하였으며, 7일 배양 시 대조군에 비하여 Aln의 경우 81%, Pam은 44%, Ibn는 11% 감소하여 Aln, Pam, Ibn 순으로 세포 증식능을 감소시키는 것으로 나타났다.

세 가지의 BPs 모두 가장 낮은 농도에서도 세포 증식능을 증가시키지 못하며, 10^7 M 이상에서 hMSCs에 독성을 가지는 것으로 관찰되었다. BPs는 저농도에서 골모세포와 골수기질세포의 증식능을 높이는 결과를 다수 연구에서 보여주고 있으나, hMSCs에서는 증식능 향상 효과는 없는 것으로 사료된다. 2×10^9 M과 3×10^9 M 부근이 Aln 및 Pam의 골흡수 억제 50% 유효량 (effective dose 50, ED₅₀)으로 알려져 있으며[38], 이 농도에서 hMSCs에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 보인다. 그러나 *in vivo*에서는 BPs 장기간 복용 시 발치 및 임플란트, 구강 내 소수술 시 창상 치유가 지연되거나, BRONJ가 유발되기도 하는데[12,19], 이것은 BPs의 hydroxyapatite에 대한 친화력이 크고, 장기간 대사되지 않는 특성에 의하여 지속적으로 골 내에 잔존하게 되므로[12], 파골세포의 활성이 지속적으로 억제되고, 골모세포, 골수기질세포, 미분화간엽세포 등에 독성을 나타내기 때문으로 생각된다. 개체의 특성, 개체 내의 세포 Clone, 실험 요건 등이 다르므로 여러 연구간에 증식 억제 효과가 나타나는 농도에 차이가 존재하며, BPs의 골 내 잔존 농도를 알기 어려우므로 세포 증식에 영향을 없는 BPs 투여 기간 및 투여 농도를 설정하기는 아직 어려울 것으로 생각된다.

hMSCs에서 골모세포로의 분화에 BPs가 미치는 영향에 대한 실험에서 Reinolz 등[29]은 골모세포의 증식능에 관계없이 Pam 첨가군에서 4일째 1×10^5 M에서부터 유의성 있게 활성이 증가하며, 4×10^5 M에서는 대조군에 비하여 38%가량 ALP 활성이 증가됨을 보였다. 4×10^5 M의 Pam를 첨가하여 배양 시간에 따른 변화를 분석한 결과, 2일째부터 활성이 증가되기 시작해서 5일째에는 대조군에 비하여 82% 증가됨을 보였다. 5일 이후에는 다시 ALP 활성이 감소되기 시작하였다. 인간 골소주 세포에 대한 실험에서 Im 등[28]은 10^8 M의 Aln을 첨가한 경우 24시간 이내에 ALP의 활성이 증가하였으며, 48시간과 72시간 배양 결과, 대조군에 비하여 ALP 활성이 증가하지 못하였음을 보고하였다. 인간 골수기질세포에 대한 BPs 첨가 실험에서 Stefanik 등[39]은 장골능 골수기질세포의 ALP 활성이 10^5 M에서 증가된다고 하였다. von Knoch 등[36]은 공여자에 따라 골수기질세포를 구분하여 ALP 활성에 대한 10^8 M의 BPs 영향을 실험하였다. Aln으로 처리한 경우 7일 내에 14%가량 활성이 증가한 공여자 세포군이 있었으며, Zoledronate로 처리한 경우 14일 내에 20% 증가한 공여자 세포군이 있었다. 이 실험 결과 개체에 따라 BPs의 효과가 매우 다양하게 나타남을 알 수 있다. Kim 등[40]의 hMSCs에 대한 BPs 처치 실험에서는 Aln 첨가군에서 24시간 내에 10^8

M에서, 72시간 내에 10^8 M에서 유의하게 ALP의 활성이 증가됨을 보고하였다. Fu 등[41]은 쥐의 골수기질세포 실험에서 Aln의 첨가량이 0.01 μ M에서 10 μ M로 높아질 수록 ALP활성도가 증가한다는 결과를 보고하였다.

본 실험에서는 골모세포로의 분화 정도를 평가하기 위하여 골형성 전구세포에서 골모세포로 분화되는 초기 과정에서 분비하는 알칼리성 인산분해 효소의 활성을 측정하였다. 실험 결과 BPs는 특정 농도와 시기에 인간 골수유래 간엽줄기세포의 골모세포로의 분화를 촉진하는 것으로 나타났다. Aln 첨가군에서 5×10^8 M에서 1주, 2주 이내에 대조군에 비하여 ALP의 활성을 증가시켰으며, 1주군이 가장 높은 활성을 보였다. 같은 농도에서 Pam 첨가 시 1주 이내에는 활성이 증가하지 못하였으나 2주 처치 시 통계적으로 유의하게 증가하였다. 3주 경과 시 다시 활성이 감소하는 추세를 보여 대조군과 유의한 차이가 없었다. ALP활성 증가 이후 저농도군에서 대조군에 비하여 ALP활성이 감소하는데 반해 고농도군에서는 시간에 따른 실험군 간의 차이는 크지 않았고 Ibn 첨가군에서는 1주 이내에는 모든 농도에서 ALP 활성을 증가시키지 못하였으나, 2주 이내에 10^7 M과 10^8 M에서 활성이 유의하게 증가하였고, 3주 경과 시 모든 농도에서 대조군에 비해 활성이 증가하지 못하였다. BPs간의 약물학적 효능의 차이로 인하여 Aln이 Pam에 비하여 ALP활성 증가가 더 이른 시기에 나타나는 것으로 생각되며, 시간이 경과할수록 활성이 증가하였다가 다시 감소하는 추세를 보여 BPs의 장기간 투여는 골모세포로의 분화에 악영향을 미칠 것으로 판단된다.

본 연구 결과 BPs는 10^7 M 이상의 고농도에서는 세포독성을 가지는 것을 알 수 있으며, 어떠한 농도에서도 세포의 증식능을 증가시키지 못하였다. 10^9 M의 BPs 첨가 시에도 7일 경과 후에는 대조군에 비하여 유의하게 생존능이 감소한 것으로 보아 저농도일 지라도 BPs 노출이 지속적으로 일어나게 되면 증식능의 억제가 나타날 수 있을 것으로 생각된다. 또한 5×10^8 M 이하의 농도에서 특정 시기에 ALP의 활성을 증가시키기도 하나 시간이 경과함에 따라 다시 감소하는 양상을 보인다. 이처럼 반감기가 10년 이상인[41] BPs가 임상적으로 사용되었을 때는 장기간 골 내에 축적 됨으로써 골형성능과 골개조능이 억제될 가능성이 있을 것으로 생각된다. 그러나 세포증식능과 ALP 활성이 골형성능을 평가하는 유일한 방법이 아니므로 추가적인 연구가 필요하다.

결론

본 연구는 전신 대사성 골 질환의 치료제로써 널리 사용되는 Aln, Pam, Ibn가 hMSCs에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다양한 농도와 배양 시간을 이용하여 세포 독성, 생존능, ALP활성을 평가하였다. Cell counting kit를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 10^3 M에서 10^{11} M의 BPs 첨가 후 세포 독성을 평가하고,

10^{-5} M에서 10^{-9} M의 BPs 첨가 후 생존능을 평가하였다. 이후 농도를 재설정하여 단위 단백질 당 ALP의 활성을 측정함으로써 hMSCs의 골모세포 분화에 미치는 영향을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- Aln와 Pam는 48시간 내에 10^{-7} M 이상에서 hMSCs에 대한 독성을 보였으며, Ibn은 10^{-5} M 이상의 고농도에서 독성을 보였다.

- Pam와 Ibn는 7일 내에 10^{-9} M 이상의 농도에서 모두 생존능을 감소시켰으며, Aln은 10^{-7} M 이상의 농도에서 생존능이 감소되었다.

- Aln, Pam, Ibn 모두 hMSCs의 증식능을 증가시키지 못하였다.

- Aln는 1주, 2주 내에 5×10^{-8} M에서 ALP의 활성이 증가하였으며, Pam은 5×10^{-8} M과 1×10^{-8} M에서 Ibn는 10^{-7} M, 10^{-8} M에서 2주 내에 활성이 증가하였다.

- Aln, Pam, Ibn 모두 ALP 활성이 대조군에 비하여 유의하게 증가한 이후에 다시 감소하였다.

상기의 결과로 BPs 계열의 약물은 hMSCs의 증식능을 향상시키지 못하며, 저농도로 첨가하여도 장기간 노출 시 증식능을 감소시킬 위험이 있다고 사료된다. 또한 일시적인 ALP 활성 증가가 나타났지만 시간이 지남에 따라 다시 활성이 감소되는 것으로 보아 BPs의 장기 투여 환자의 경우, 약물의 대사되지 않는 특성으로 인하여 hMSCs의 증식과 골모세포로의 분화가 억제되어 창상 치유 지연 및 BRONJ와 같은 합병증 발생 가능성이 높아질 것으로 판단된다. 하지만 BRONJ와 같은 합병증은 다양한 발생 원인을 가지고 있으며, 여러 종류의 세포에 대한 영향으로 나타나므로 hMSCs에 대한 효과만으로 판단하기는 어렵다. 또한 ALP 활성 평가뿐만 아니라 골모세포로의 분화를 평가하기 위하여, Alizarin Red S staining을 이용한 광화능 평가, osteocalcin과 같은 관련 유전자 발현 평가, 동물 실험 등 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Acknowledgements

이 연구는 경희대학교 연구비 지원에 의한 결과임(KHU-20071611).

References

1. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000;289:1508-14.
2. Pataki A, Müller K, Green JR, Ma YF, Li QN, Jee WS. 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. *Anat Rec* 1997;249:458-68.
3. Gasser AB, Morgan DB, Fleisch HA, Richelle LJ. The influence of two diphosphonates on calcium metabolism in the rat. *Clin Sci* 1972;43:31-45.
4. Balena R, Toolan BC, Shea M, et al. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J Clin Invest* 1993;92:2577-86.
5. Walsh JP, Ward LC, Stewart GO, et al. A randomized clinical trial comparing oral alendronate and intravenous pamidronate for the treatment of Paget's disease of bone. *Bone* 2004;34:747-54.
6. Wellington K, Goa KL. Zoledronic acid: a review of its use in the management of bone metastases and hypercalcaemia of malignancy. *Drugs* 2003;63:417-37.
7. Lane JM, Khan SN, O'Connor WJ, et al. Bisphosphonate therapy in fibrous dysplasia. *Clin Orthop Relat Res* 2001; (382):6-12.
8. Devogelaer JP. New uses of bisphosphonates: osteogenesis imperfecta. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:748-53.
9. 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.
10. Cremers S, Sparidans R, den HJ, Hamdy N, Vermeij P, Papapoulos S. A pharmacokinetic and pharmacodynamic model for intravenous bisphosphonate (pamidronate) in osteoporosis. *Eur J Clin Pharmacol* 2002;57:883-90.
11. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004;350:1189-99.
12. 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;62:527-34.
13. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1567-75.
14. Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol* 2006;7:508-14.
15. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1115-7.
16. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998;19:80-100.
17. Schenk R, Merz WA, Mühlbauer R, Russell RG, Fleisch H. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl 2 MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Res* 1973;11:196-214.
18. Jung A, Bisaz S, Fleisch H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calcif Tissue Res* 1973;11:269-80.
19. Marx RE. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: a challenge, a responsibility, and an opportunity. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008;28:5-6.

20. Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 2003;9:2643-58.
21. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:133-8.
22. Hughes DE, MacDonald BR, Russell RG, Gowen M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest* 1989;83:1930-5.
23. Löwik CW, van der Pluijm G, van der Wee-Pals LJ, van Trelong-De Groot HB, Bijvoet OL. Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: the effect of a bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 1988;3:185-92.
24. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995;10:1478-87.
25. Mathov I, Plotkin LI, Sgarlata CL, Leoni J, Bellido T. Extracellular signal-regulated kinases and calcium channels are involved in the proliferative effect of bisphosphonates on osteoblastic cells in vitro. *J Bone Miner Res* 2001;16:2050-6.
26. Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. 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;22:455-61.
27. 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;104:1363-74.
28. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25:4105-15.
29. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 2000;60:6001-7.
30. 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.
31. Duque G, Rivas D. Alendronate has an anabolic effect on bone through the differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 2007;22:1603-11.
32. Qiao C, Xu W, Zhu W, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int* 2008;32:8-15.
33. Sato M, Grasser W, Endo N, et al. Bisphosphonate action, Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991;88:2095-105.
34. Fromigue O, Body JJ. Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *J Endocrinol Invest* 2002;25:539-46.
35. Garcia-Moreno C, Serrano S, Nacher M, et al. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 1998;22:233-9.
36. von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005;26:6941-9.
37. Still K, Phipps RJ, 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;72:143-50.
38. Sahni M, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993;91:2004-11.
39. Stefanik D, Sarin J, Lam T, Levin L, Leboy PS, Akintoye SO. Disparate osteogenic response of mandible and iliac crest bone marrow stromal cells to pamidronate. *Oral Dis* 2008;14:465-71.
40. Kim YR, Ryu DM, Kwon YD, Yun YP. Effects of alendronate and pamidronate on the proliferation and the alkaline phosphatase activity of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Korean Oral Maxillofac Surg* 2009;35:397-402.
41. Fu L, Tang T, Miao Y, Zhang S, Qu Z, Dai K. Stimulation of osteogenic differentiation and inhibition of adipogenic differentiation in bone marrow stromal cells by alendronate via ERK and JNK activation. *Bone* 2008;43:40-7.
42. Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Porras AG. Clinical pharmacology of alendronate sodium. *Osteoporos Int* 1993;3(Suppl 3):S13-6.