

Simvastatin이 UMR-106 세포의 조골세포 형성에 미치는 영향

경희대학교 일반대학원 치의학과 구강악안면외과학¹⁾
경희대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실²⁾
경희대학교 치의학전문대학원 치과약리학교실³⁾

황의관¹⁾, 교수 류동목²⁾, 조교수 지유진²⁾, 이덕원¹⁾, 부교수이현우³⁾

ABSTRACT

Effects of Simvastatin on osteogenesis of rat osteoblast-like cells, 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
Eui-Kwan Hwang¹⁾, Dong-Mok Ryu²⁾, Yu-Jin Jee²⁾, Deok-Won Lee¹⁾, Hyun-Woo Lee³⁾

Purpose : The purpose of this study is to investigate the effects of Simvastatin, which is HMG-CoA reductase inhibitor, on proliferation and differentiation of osteoblast.

Materials & Methods : Twenty-four cell culture plates containing essential medium were seeded with UMR-106 cell lines, at density of 5×10^4 cells per plate. Each plates were incubated with 5% CO₂ incubator at 37°C. Starting from 2 days after incubation, cell culture medias were replaced with Osteogenesis induction media every 2 days, for 12 days. In some plates, 0.01, 0.1, 1, 10, 100μM of Simvastatin were added with Osteogenesis induction media, and classified as "test group". Those not added with Simvastatin were classified as "control group".

Results :

1. When Alrizarin Red staining was observed with naked eye, control group showed normal deep red color, but test group show rapid decrease of red color as Simvastatin concentration increased more than 0.1μM.
2. When observed with microscope, compared to control group, amount of osteo matrix stained with Alrizarin Red decreased rapidly in Simvastatin concentration more than 0.1μM.
3. In optical density analysis, regarding control group as a basis, mineral deposition decreased rapidly when Simvastatin concentration increased more than 0.1μM.
4. In flow cytometry analysis, survival rate of UMR-106 cell showed no changes in both control group and test group.

Conclusion : From the above results, we were able to identify that Simvastatin inhibited osteogenesis without effecting survival or cell number of osteoblasts.

Key Words : Osteogenesis, Simvastatin, UMR-106.

1. 서론

Simvastatin은 statins의 일종으로 *Aspergillus terreus*라는 진균류의 발효물질을 화학적으로 변형시킨 약물이며 경구 투여 후 비활성 락톤형이 β -hydroxyacid form으로 가수분해 되는 약물이다. 또한 실험식으로는 $C_{25}H_{38}O_5$ 이며 분자량은 418.57로 물에는 녹지 않고 클로르포름, 메탄올과 에탄올에는 쉽게 용해되는 성질을 갖고 있으며 현재 임상적으로 가장 많이 사용되는 statins 약물중 하나로 알려져 있다¹⁾. statins은 콜레스테롤 합성에 있어서 HMG-CoA(3-hydroxyl 3-methylglutaryl coenzyme A)를 mevalonate로 전환시키는 HMG-CoA reductase를 억제하여 혈중 콜레스테롤을 낮추는 효과가 있어 고지혈증 및 동맥경화 치료에 널리 사용되어져 온 약물이다²⁾.

statins의 고지혈증 및 동맥경화 치료효과 외에 골형성등에 미치는 영향에 대하여도 다양한 연구가 이루어져 왔다³⁾. 1999년 Mundy 등⁴⁾이 statins이 골형성을 촉진하는 효과가 있다고 보고한 이래 Maeda 등⁵⁾은 statins이 조골세포의 혈관내피성장인자에 미치는 영향에 대하여 연구하였고 황란주 등⁶⁾은 Simvastatin이 골의 동화작용에 미치는 영향에 대하여 연구하였으며 Edwards 등⁷⁾도 statins이 골형성 증가에 효과가 있다고 발표하였으나 이와는 반대로 Parhami 등⁸⁾은 statins이 골수간엽세포의 콜레스테롤 생합성과정에서 조골세포의 분화를 억제한다고 하였고 Nuckolls 등⁹⁾은 Lovastatin이 연골 증식은 촉진시키나 연골내골화는 억제시킨다고 하였다. Stechow 등¹⁰⁾은 동물실험에서 Simvastatin이 골형성을 촉진하는지는 의심스럽다고 하였으며, Staa 등¹¹⁾은 statins이 골절위험을 감소시키는 효과는 없다고 하였고, Rejnmark 등¹²⁾은 폐경 후 골다공증환자에서 Simvastatin이 골밀도 및 골치환에 미치는 영향에 대한 연구에서 골형성을 억제하거나 임상적으

로 효과가 없다고 보고하였다.

한편 Wu 등¹³⁾은 statins이 myofibroblast에서는 분화를 억제시키는 효과를 나타내는 반면 osteoblast에서는 분화를 촉진하는 효과가 있다고 하였고, 백기현 등¹⁴⁾은 인간 골수간엽세포의 분화는 촉진시키나 성장은 억제시킨다고 하였고, Maritz 등¹⁵⁾은 statins이 농도에 따라 골밀도 및 조직형태에 미치는 영향이 다르다고 하였다.

statins이 조골세포에 어떻게 영향을 미치는가에 대하여 Mundy 등⁴⁾, Garrett 등¹⁶⁾, Choudhury 등¹⁷⁾은 BMP-2 발현유도를 통해 분화를 촉진시킨다고 하였으며, Maeda 등⁵⁾, Midy 등¹⁸⁾은 VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발현을 증가시키는 것이 더 중요하다고 하였으나, Parhami 등⁸⁾은 Alkaline Phosphatase의 활성과 발현을 직접적으로 방해하여 조골세포의 분화와 미네랄 침착을 억제한다고 발표하는 등 statins이 조골세포에 영향을 미치는 그 기전에 대하여는 연구가 부족한 상황이다.

또한 statins이 골세포에 영향을 미치는 농도에 관해서도 다양한 의견이 존재하는데 Mundy 등⁴⁾은 가장 효과적인 statins의 농도로 $5\mu\text{M}$ 를 제시하였고, Maeda 등⁵⁾은 $1\mu\text{M}$ 과 $10\mu\text{M}$ 를 그리고 황란주 등⁶⁾, 백기현 등¹⁴⁾은 $1\mu\text{M}$ 를, 다른 문헌¹⁹⁾에서는 $0.01\mu\text{M}$ 과 $0.1\mu\text{M}$ 로 보고하는 등 다양한 양상으로 나타나고 있다.

본 연구에서는 statins이 조골세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 UMR-106 세포를 사용하였다. 이 세포주는 rat의 고도로 분화된 골육종세포이면서 조골세포의 분화되는 양상을 잘 나타내 주는 세포로 두개골에서 얻은 일반적인 조골세포보다 APA(Alkaline Phosphatase Activity)가 높고 골기질 형성 능력이 커서 조골세포의 호르몬과 약물의 생화학적 그리고 형태학적 연구에 사용되고 성장 조절의 영향을 연구하는데 알맞은 모델로 알려져 있다²⁰⁾.

본 연구에서는 선학들의 연구를 토대로 하여 실제로 statins이 조골세포에 긍정적인 영향을 미쳐 골형성

을 촉진하는지의 여부를 알아보기 위하여 다양한 농도의 Simvastatin을 첨가한 Osteogenesis induction media에 UMR-106 세포를 배양하여 조골세포의 분화 과정에 대하여 연구하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구 재료

1) cell line

UMR-106 세포는 방사선 동위원소를 주입한 쥐에서 유래된 골육종세포주로, 이들 세포들은 종양형태를 가지고 있으며 조골세포로 분화되어 골기질을 형성시킬 수 있는 능력이 있다²⁰⁾.

2) Simvastatin

실험의 공정성을 위해 여러 회사의 기성약품을 배제하고 의약품 조제용으로 기준에 부합하고 CERTIFICATE OF ANALYSIS를 갖는 백색의 결정 분말의 Simvastatin(Zhejiang Kangyu Pharm, China)을 연구에 사용하였다.

2. 연구 방법

1) UMR-106 세포의 분화과정 확인

UMR-106 세포가 실제 분화 과정을 일으키는 지 확인하기 위하여 UMR-106 세포를 2mmol/L glutamine, 100U/mL 페니실린, 100mg/mL 스트렙토마이신 그리고 10% FBS(fetal bovine serum, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 포함한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 기본 배지로 한 24-well plates에 well당 1x10⁵개로 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 상태를 유지하는 배양기에서 2일간 배양하였다.

UMR-106 세포의 조골세포로의 분화과정을 확인

하기 위하여 기본 배지 9.88ml, ascorbic acid 2-phosphate 20 μ l, glycerol 2-phosphate solution 100 μ l 의 비율로 Osteogenesis induction media를 제작하고 Osteogenesis induction media를 2일마다 교환하여 20일간 배양하였다. 기본배지에 배양한 군과 Osteogenesis induction media에 배양한 군을 각각 냉동고에 보관된 70%의 에탄올로 실온에서 1시간동안 고정시키고 5~10분 동안 2~3번 증류수로 세척한 후 Alizarin Red solution으로 약 30분 동안 실온에서 염색을 시행한 다음 육안 관찰하였다.

2) Simvastatin의 UMR-106 세포 분화에 대한 영향.

기본배지에 2일간 배양한 UMR-106 세포를 24-well plates에 well당 5x10⁴개로 분주한 후 Osteogenesis induction media로 교환한 후 대조군은 Osteogenesis induction media로만 배양하였고 실험군은 100% 알코올에 용해시킨 지용성 Simvastatin을 각각 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M로 첨가한 배양액을 사용하여 2일마다 교환하면서 12일째까지 배양하였다.

3) 육안적 검사

배양된 UMR-106 세포를 냉동고에 보관된 70%의 에탄올로 실온에서 1시간동안 고정시키고 5~10분 동안 2~3번 증류수로 세척한 후 Alizarin Red solution으로 약 30분 동안 실온에서 염색을 시행한다. UMR-106 세포가 조골세포로 분화하여 골화가 진행된 정도를 육안적으로 관찰하였다.

4) 현미경적 검사

광학현미경적 검사를 통하여 대조군과 비교하여 Simvastatin이 농도가 증가함에 따라 Alizarin Red 염색에 따른 세포 수 변화가 일어나는지를 확

인하였다.

5) 흡광도 검사

Simvastatin의 농도에 따라 분화된 UMR-106 세포가 어느 정도의 골기질 침착을 보이는지를 평가하기 위해 우선 24-well plates의 각 well당 10% 아세트산 400 μ L를 넣고 섞이도록 흔들면서 30분간 배양시키면 한 층으로 느슨하게 부착되어 있게 되는데 이 때 cell scraper를 이용해 세포들을 부드럽게 긁어낸 후 아세트산과 함께 1.5mL 마이크로 원심분리기용 tube로 옮겨놓고 진동기에 30초간 혼합시킨다. 그 후 10분 동안 85 $^{\circ}$ C로 가열시킨 다음 tube를 5분 동안 얼음 속에 넣어 완전히 식힌 후 15분 동안 20,000xg로 원심분리시킨다. 원심분리가 끝난 후 표면에 뜬 물질 중 400 μ L를 새로운 1.5mL 마이크로 원심분리기용 tube로 옮겨놓고 10% 수산화암모늄을 섞어 pH 4.1~4.5 정도로 중화시킨 후 150 μ L를 불투명한 벽과 투명한 바닥 형태의 96-well plates에 넣는다. 그 후 405nm파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

6) 유세포 분석 검사

실험 결과로 얻어진 세포의 생존율을 측정하기 위해 살아있는 세포에는 침투하지 못하고 죽은 세포의 핵의 DNA와 결합하는 성질을 갖는 propidium iodide

형광물질로 염색하여 20 $^{\circ}$ C 실온에서 배양시켜 flow cytometer(Cell Lab QuantaTM SC, Beckman Coulter, USA)를 사용하여 FL2 파장에서 형광을 측정하여 대조군과 1 μ M Simvastatin에서의 결과를 비교, 분석하였다.

III. 연구 결과

1. 육안적 소견

1) Osteogenesis induction media(OM)의 영향.

기본 배지만을 교환하면서 배양한 군과는 달리 Osteogenesis induction media를 첨가한 군에서 Alizarin Red solution 염색의 전형적인 특징인 밝은 적색을 나타내는 것을 알 수 있는데, 이것으로 볼 때 UMR-106 세포는 분화 과정을 거치면서 조골세포의 성격을 띠며 골기질 침착을 일으킬 수 있는 것을 알 수 있었다(Fig 1).

2) Simvastatin의 UMR-106 세포분화에 대한 영향.

Osteogenesis induction media만을 첨가한 대조군과 비교했을 때, Simvastatin 농도가 0.01에서 100 μ M로 증가하면서 Alizarin Red solution 염색

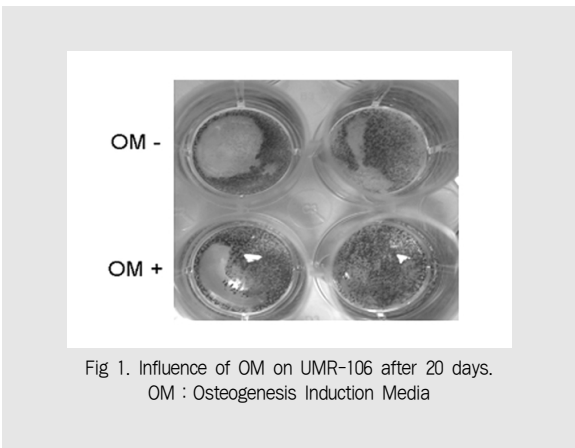


Fig 1. Influence of OM on UMR-106 after 20 days.
OM : Osteogenesis Induction Media

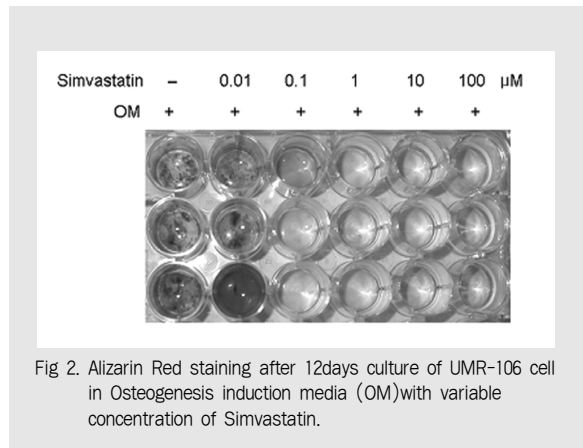


Fig 2. Alizarin Red staining after 12 days culture of UMR-106 cell in Osteogenesis induction media (OM) with variable concentration of Simvastatin.

양상이 점점 감소하며 0.1 μ M을 지나면서는 급격히 감소하는 양상을 띠는 것으로 보아 UMR-106 세포가 분화 과정을 거치면서 Simvastatin의 영향으로 분화가 억제되면서 골기질 침착이 감소되는 것을 알 수 있었다 (Fig 2).

2. 현미경적 소견

좌측의 대조군과 비교해 보면 진한 적색으로 표현되는 Alizarin Red solution 염색 양상이 Simvastatin을 처리한 0.1 μ M와 10 μ M로 진행되면서 세포 수에는 큰 변화 없이 옅은 적색으로 그리고 거의 적색을 띠지 않는 양상으로 변하고 있음을 알 수 있는데, 이 역시 Simvastatin의 영향으로 분화가 억제되면서 골기질 침착이 감소되는 것을 알 수 있다 (Fig 3).

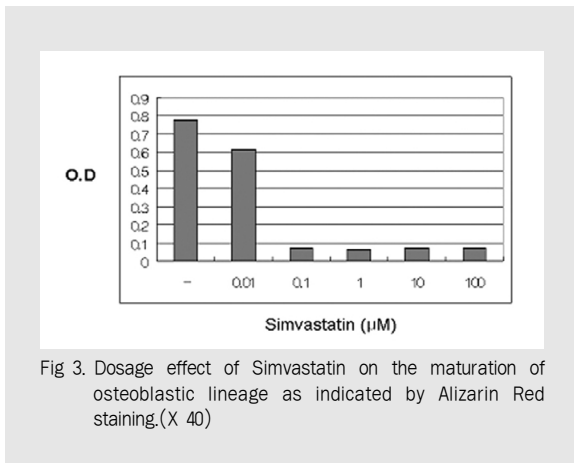


Fig 3. Dosage effect of Simvastatin on the maturation of osteoblastic lineage as indicated by Alizarin Red staining.(X 40)

3. 흡광도 소견

골기질 침착의 양적 분석을 알 수 있는 흡광도 측정에서 좌측의 대조군과 비교해 보면 Simvastatin 0.01 μ M을 첨가한 군에서는 흡광도가 소폭 감소하였으며 0.1 μ M 이상의 농도를 첨가하였을 때에는 급격히 감소하였다 (Fig 4).

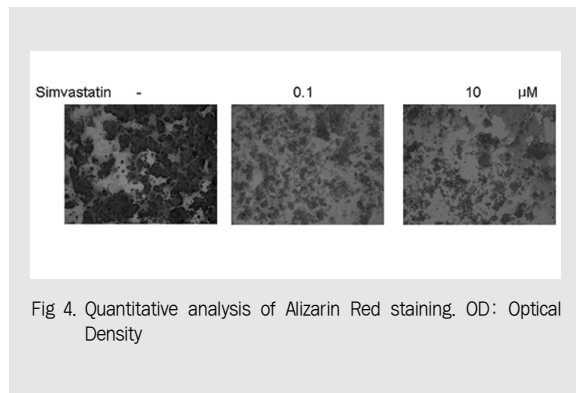


Fig 4. Quantitative analysis of Alizarin Red staining. OD: Optical Density

4. 유세포 분석 소견

대조군과 1 μ M Simvastatin에서 propidium iodide와 염색된 세포의 비율이 둘 다 전체의 약 60% 정도를 보여 세포의 생존률은 변화가 없었다 (Fig 5).

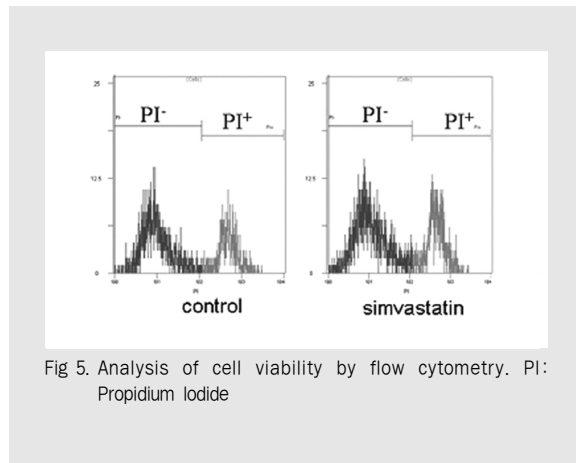


Fig 5. Analysis of cell viability by flow cytometry. PI: Propidium iodide

IV. 총괄 및 고찰

선천적인 결손이나 외상, 감염, 종양 그리고 대사 장애 등으로 인해 발생한 후천적인 골결손부를 수복하고 골형성이나 골치유를 촉진시키기 위해 수많은 수술 법과 약물 요법 등의 연구가 진행되어 왔으며, 최근 10년 동안 statins이 골형성에 긍정적인 영향을 미친다고 하여 상당한 연구와 관심이 대두되고 있다.

statins은 본래 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추는 효과가 있어 고지혈증 환자에게 사용되고 있으며 최근 항염 작용과 그 밖의 혈관벽에서 다양한 효과를 일으켜 당뇨병성 혈관질환과 말초동맥질환 예방, 항고혈압 작용 그리고 동맥경화를 방지하고 관상동맥질환의 위험과 심근경색 위험도 낮출 수 있다고 보고 되고 있다^{21,22,23)}.

Mundy 등⁴⁾이 최초로 lovastatin과 simvastatin은 골세포에서 BMP-2(Bone Morphologic Protein-2)의 발현증가와 관련되어 마우스 두개 하방에 피하로 주입되었을 때 골형성 증가와 두개골 폭을 30-50% 증가시켰으며, rats에 복용시켰을 때도 해면골 volume의 증가를 가져왔으며 따라서 적절한 농도의 statins은 골다공증 치료에 적용될 수 있을 것이라 발표한 이래로 이에 대해 비슷한 결과를 보이는 다양한 연구들이 발표되고 있다.

Maeda 등⁵⁾은 simvastatin, atorvastatin 그리고 cerivastatin 같은 지용성 statins이 마우스 두개에서 추출한 MC3T3-E1 cell, 마우스 stromal cell인 ST2 Cell, UMR-106 cell에서 동일하게 골 동화작용 요소인 VEGF(vascular endothelial growth factor)와 BMP-2를 증가시켜 골형성을 촉진한다고 보고 하였고, 황란주 등⁶⁾은 MC3T3-E1 cell에서 calcyclin이 중요한 중계 단백질로 작용해 simvastatin의 동화작용을 유도하여 골형성을 증가시킨다고 보고 하였으며, Edwards 등⁷⁾은 statins이 염증반응을 억제하거나 연골내 골화과정에서 내피세포 전구체의 분화와 성장을 증가시켜 신생혈관형성을 통해 골형성 증가에 간접적으로 영향을 미친다고 하였다.

그러나, Parhami 등⁸⁾은 lovastatin과 mevastatin이 M2-10B4 murine MSCs(marrow stromal cells)상에 전사 과정에서 APA(Alkaline Phosphatase Activity)을 억제하였고, mevastatin은 인간의 MSCs에서도 같은 양상을 보

이고 골기질 침착에 있어서도 상당한 억제를 보여 murine에서나 인간에서도 같은 효과를 나타낸다고 하였으며 세포의 생존률 분석을 위한 MTT assay에서는 statins이 어떠한 독성 효과 없이 진행되었다고 하였으며, Nuckolls 등⁹⁾은 lovastatin이 두개저 조직배양에서 연골내 골화를 억제했다고 보고하였고, Stechow 등¹⁰⁾은 난소가 절제된 골다공증 마우스모델에서 부갑상선 호르몬은 전반적인 골밀도와 피질골 두께, 혈장 내 평균 osteocalcin 또한 증가하였으나 이와 대조적으로 simvastatin은 그 어느 것도 유의할 만한 증가를 보이지 않았으므로 simvastatin은 골형성 유도에 실패했다고 하였다. Yao 등²⁴⁾은 골다공증을 유발한 rats에서 PGE2와 simvastatin을 복용시켰을 때, PGE2는 해면골과 피질골을 회복하는데 성공하였으나, simvastatin은 해면골과 피질골의 형성과 흡수에 어떠한 영향을 미치지나 회복하는데 실패했다고 했으며, Staa 등¹¹⁾은 총 81880명의 50세 이상의 골절환자의 통계 분석한 결과 statins의 사용이 오랜 기간 동안 사용했건, 고농도를 사용했건간에 관계없이 골절의 위험을 감소시키지 못한다고 하였고, Rejnmark 등¹²⁾은 82명의 폐경기 골다공증을 가진 여성의 randomized controlled trial의 1년간의 simvastatin 복용 치료에서 요추, 대퇴골 경부, 전신의 BMD(Bone Mineral Density)에 영향을 미치지 못했으며, 골형성과 흡수의 골치환에 변화를 일으키지 못했기 때문에 simvastatin은 골대사에 긍정적인 역할을 했다고 볼 수 없다고 주장했다.

위의 두 상반된 주장과는 달리 혼합된 결과를 보이기도 하는데, Wu 등¹³⁾은 simvastatin과 pravastatin이 조골모세포의 분화에서는 APA(Alkaline Phosphatase Activity)와 석회화 결절 형성을 증가시키지만 조골양세포로 분화되는 대동맥판막 근섬유모세포 AVMFs(aortic valve myofibroblasts)의 석회화과정을 억제시키기 때문에 “statin paradox”라 하였으며, 백기현 등¹⁴⁾은 골전구세포인

인간 골수 간엽세포에서 simvastatin은 APA와 osteocalcin 발현 수준, 그리고 골기질 침착을 증가시켜 조골세포의 분화는 증가시키나, 새로운 골형성은 방해함으로써 골세포 성장에는 억제한다고 하였고, Maritz 등¹⁵⁾은 rodents에서 simvastatin이 고농도에서는 골형성과 골흡수 모두를 증가시키지만, 저농도에서는 골형성을 감소시키고 골흡수를 증가시킨다고 하였다.

본 연구의 육안적 소견에서 Osteogenesis induction media(OM)만을 첨가한 대조군과는 달리 Simvastatin 농도가 증가하면서 Alizarin Red solution 염색 양상이 진한 적색에서 점점 감소하며 특히 $0.1\mu\text{M}$ 을 지나면서는 적색이 급격히 사라지는 양상을 띠는 것으로 보아 골기질의 형성이 감소되는 것을 알 수 있는데, 이것은 Parhami⁸⁾, Nuckolls⁹⁾, Yao²⁴⁾ 등이 주장하는 바와 같이 Simvastatin의 영향으로 UMR-106 세포가 분화 과정을 거치면서 분화가 억제되는 부정적인 영향을 미치는 것으로 사료되며 실제로 골기질 침착정도를 양적으로 측정된 흡광도 측정에서 볼 때도 대조군과는 다르게 저농도인 $0.01\mu\text{M}$ 에서는 약간 감소한데 비해 그 이후의 농도에서는 급격히 감소한 양적 변화를 확인할 수 있었다. 또한 본 연구의 flow cytometry 분석에서 세포의 생존률이 대조군에 비해 거의 변화가 없었기 때문에 Simvastatin이 독성효과를 나타내지 않았음을 알 수 있었는데, 이것은 특히 Parhami 등이 주장한 바와 일치한다고 할 수 있겠다.

statins은 콜레스테롤 합성과정에서 주로 HMG-CoA가 mevalonate로 전환되는 촉매 역할을 하는 HMG-CoA reductase를 억제하는 초반부에 관여하기도 하지만, mevalonate가 이후에 geranylgeranyl pyrophosphate(GGPP)와 farnesyl pyrophosphate(FPP)의 protein prenylation을 방해할 수 있다는 의견이 제시되고 있고 이 결과 산물인 Ras 와 Ras-like

proteins(Rho, Rap, Rab, Rap)같은 small GTP-protein을 함유한 지질이 세포막에서 cell adhesion, 세포성장과 생존을 조절하도록 하는데 필수적인 과정을 억제하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾.

statins이 protein prenylation을 방해함으로써 다양한 역할이 제시되고 있는데, 이것은 파골세포의 mevalonate pathway에서 대부분의 GTP-binding protein의 prenylation의 기질로 작용하는 GGPP형성을 억제하는 bisphosphonates와 그 역할을 공유하게 되는 것이다. prenylation은 파골세포 기능에 중요하며 이것이 억제되면 파골세포도 정상적인 기능을 할 수 없는 것으로 알려져 있는데²⁶⁾ statins이 bisphosphonates와 비슷하게 골에 영향을 미친다고 볼 수 있으므로 statins이 골형성을 증가시켰다면 그것은 조골세포만을 활성화시켰다고도 할 수 있지만 조골세포와 파골세포에 각각 다르게 반응하여 조골세포에 보다 많은 영향을 미친 것이며 반대로 골흡수를 증가시켰다면 파골세포에 보다 많은 영향을 미친 것으로 해석할 수 있을 것이다.

이런 관점에서 보면 statins과 bisphosphonates는 그 역할이 공유되어 조골세포와 파골세포 모두에게 영향을 미친다고 할 수 있는데, 실제로 Fisher 등²⁷⁾은 murine뿐 아니라 rabbit의 파골세포형성을 lovastatin과 alendronate 모두가 억제하며 lovastatin에 의한 활성화는 mevalonate와 geranylgeraniol에 의해 차단되는 반면, alendronate 활성화는 geranylgeraniol에 의해 차단된다고 하였고, Plotkin 등²⁸⁾은 in vitro에서 bisphosphonates는 $1\mu\text{M}$ 이하의 낮은 농도에서 조골세포의 성장을 자극할 뿐 아니라 심지어 조골세포사멸도 억제한다고 보고 하였다.

이렇듯 조골세포를 활성화시킬 뿐 아니라 파골세포를 억제시키는 statins과 파골세포를 억제시킬 뿐 아니라 조골세포를 활성화시킬 수 있는 bisphosphonates를 개발하는 것이 향후 골대사약물 개발의 방향이라고

도 할 수 있을 것이다.

statins이 protein prenylation을 방해함으로써 갖는 중요한 역할로 대두되는 것이 바로 여러 암종 세포의 발현을 억제하거나 사멸하는 것이다. Thunyakitpibal 등²⁹⁾은 simvastatin이 Ras와 Ras-like protein 활성을 억제하여 rat의 primary calvaria, 인간 골육종세포인 U2-OS cell, 그리고 HT1080 섬유육종세포에서 관절염, 골육종, 편평세포암에서 병적인 골파괴에 중요한 역할을 한다고 알려진 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9, gelatinase B)의 발현을 감소시켰다고 하였으며, Fromigué 등³⁰⁾은 지용성 statins인 simvastatin, atorvastatin, cerivastatin이 BMP-2발현이나 signaling 그리고 세포의 분화와 별개의 과정으로 RhoA prenylation을 방해하여 RhoA의 relocation과 RhoA의 활성을 억제하여 골육종세포의 세포사멸을 유도하였다고 주장하였으며, Zhong 등³¹⁾은 lovastatin이 Rho family의 protein geranylgeranylation을 방해해 새로운 단백질을 합성하면서 미분화 갑상선암세포의 세포사멸을 유도했다고 발표했고, Cafforio 등³²⁾은 여러 지용성 statins이 Ras 또는 RhoA의 prenylation을 방해해 인간 골수종세포에서 세포사멸을 유도했다고 주장했다.

본 연구에 사용된 UMR-106 세포는 조골양세포이기도 하지만 골육종세포로서의 성질도 가지고 있기 때문에, simvastatin이 조골세포에 영향을 미치는 관점에서 뿐 아니라 암종세포의 발현에 미치는 영향의 관점에서도 그 기전의 가능성을 생각해 볼 수도 있을 것이다. simvastatin이 statins의 또 다른 역할로 제시되고 있는 protein prenylation을 억제하는 역할로 영향을 미친 것이라면 본 연구의 결과를 Thunyakitpibal 등²⁹⁾이 주장하는 바와 같이 암종세포인 UMR-106 세포의 발현을 억제시킨 것으로 설명될 수 있을 것이다. 위의 선행들이 발표한 in vitro

에서 statins이 유도한 암종세포의 발현을 억제하거나 사멸하는 것은 임상에서 암종의 발현과 진행에 statins이 효과가 있을 가능성을 제시할 수 있는데, statins으로 유도되는 암종세포의 사멸에 필요한 농도가 임상에서 치료할 정도에는 상당한 과량이 필요하겠지만 화학 치료제와 statins을 병용하게 된다면 고농도의 화학치료제의 독성으로 인한 기존 정상세포까지 영향을 미치는 부작용을 줄일 수 있고 상대적으로 부작용이 적은 statins의 그 농도도 상당히 줄일 수 있게 되어 임상에서도 사용할 수 있을 것으로 사료되는데 실제로 Fromigué 등³⁰⁾은 통상적인 항암치료제와 지용성 statins의 혼합이 3~15배 정도의 골육종 세포 사멸을 가져왔다는 것은 statins이 치료제로서의 활용 가능성을 제시하고 있다는 것이며 더욱 많은 연구를 통해 화학치료제와 statins의 치료 용량을 조절하는 병용법으로 암종의 발현과 진행을 막는데 도움이 될 수 있을 지에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

statins이 조골세포 기능에 영향을 미치는 정확한 기전은 현재 상당한 논란이 되고 있는데, Mundy 등⁴⁾은 statins이 조골세포에서 growth factor인 BMP-2의 발현을 증가시켜 분화를 이끌어 골형성을 유도한다고 주장하였고, Garrett 등⁶⁾은 이에 동조하면서 neonatal murine calvaria에서 statins이 BMP-2의 형성증가의 원인이 되어 골형성을 기시한 것으로 사료되나 수용성인 pravastatin은 BMP-2 promoter를 자극할 수 없었기 때문에 새로운 골형성을 자극할 수 없었다고 하였으며, 더 나아가 Choudhury 등¹⁷⁾은 이러한 statins의 BMP-2 발현유도로 인한 조골세포 분화의 신호전달 체계를 증명하였는데 여기에는 Ras단백질과 PI(Phosphatidylinositol)-3 Kinase의 결합이 중요한 역할을 한다고 하였다. 그러나 Maeda 등⁵⁾은 MC3T3-E1 cell에서 simvastatin이 조골세포 분화에 있어서 BMP-2발현과는 별개로

VEGF(vascular endothelial growth factor) mRNA 발현을 증가시키는 것이 더욱 중요하다고 하였으며, Midy 등¹⁸⁾도 VEGF가 BMP-2보다 조골세포 분화에 훨씬 더 잠재적인 유도물질이라고 보고했으며, Parhami 등⁸⁾은 이와는 또 다른 기전으로 조골세포의 분화와 미네랄 침착에 있어서 key enzyme인 ALP의 활성과 발현을 직접적으로 억제한다고 하였다.

본 연구의 현미경적 소견에서는 진한 적색을 띠는 대조군과 비교하여 Simvastatin을 0.1 μ M와 10 μ M 농도로 처리한 비교군으로 진행되면서 옅은 적색으로 그리고 거의 적색을 띠지 않는 양상으로 변화하는데, 이것은 Simvastatin의 농도가 증가할수록 UMR-106 세포가 조골세포로 분화하는 것을 억제하여 골기질의 형성이 저하된 소견을 확인할 수 있었다. 이러한 소견은 Mundy등과 Midy 등의 연구 결과와는 상반된 결과이나 Parhami 등⁹⁾의 연구와는 거의 같은 결과를 보이므로 이것에 가장 부합된다고 할 수 있다.

statins이 골세포에 영향을 미치는 농도에 관해서도 다양한 의견이 존재하는데, Mundy 등⁴⁾이 제시한 조골세포의 분화 촉진에 가장 효과적인 statins의 농도는 5 μ M이고 1 μ M 이하의 농도에서는 효과가 없었다고 하였으며, Maeda 등⁵⁾은 simvastatin 농도가 1 μ M과 10 μ M에서는 VEGF mRNA 발현의 최대상승을 보였으나 고농도인 100 μ M에서는 감소되고 조골세포의 세포사멸을 유도한다고 하였고, 황란주 등⁶⁾은 simvastatin의 조골세포 성장이 최대로 발생하는 농도는 1 μ M 이라고 했으며, 백기현 등¹⁴⁾은 1 μ M에서만 조골세포 분화를 자극하였고, 또 다른 연구¹⁶⁾에서는 MC3T3-E1 cell에서 분화를 일으키는 simvastatin 최적의 농도는 0.01 μ M 과 0.1 μ M로 알려져 있는 등 다양한 양상으로 나타나고 있으며, Maritz 등¹⁵⁾은 저농도에서는 파골세포가 조골세포보다 statins에 민감하여 골흡수가 증가하고 보다 고농도에서 조골세포가 파골세포보다 더 민감하여 골형성

이 증가한다는 이론을 제시하였다.

본 연구에서는 위의 선행들의 연구에서 조골세포의 영향을 주는 비교적 공통적인 농도인 1 μ M을 중심으로 0.01 μ M 에서부터 100 μ M에 이르는 농도를 실험군으로 하였으며, 0.1 μ M 이상의 농도에서 조골세포의 분화가 현저히 억제되는 소견을 보였다. 이러한 실험 결과의 차이는 실험대상 세포의 차이와도 관련이 있는 것으로 생각되었다.

본 연구에서는 대표적인 혈중 콜레스테롤 강하제인 Simvastatin이 조골세포에 성장에는 큰 영향력 없이 분화를 억제시키는 결과로 나타났고, 분화 억제 기전을 밝히지 못한 한계가 있었으나 이러한 결과의 원인으로 추론할 수 있는 protein prenylation과 이를 공유하는 bisphosphonate와의 상호 역할에 관한 연관성 그리고 암종세포에 미치는 영향과 항암제와의 상호작용에 관한 연구가 더욱 필요하다고 생각된다.

V. 결 론

Simvastatin이 조골세포 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 UMR-106 세포에 Osteogenesis induction media를 이용하여 분화를 확인한 후 Simvastatin을 차례로 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M로 첨가시킨 다음 고정 하고 염색한 후 육안적, 현미경적, 흡광도 측정검사 및 유세포 분석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Alrizarin Red solution 염색의 육안적 소견에서 대조군에서는 정상적인 진한적색을 띠는 반면, Simvastatin의 농도가 0.1 μ M 이상으로 증가될수록 적색이 급격히 감소하였다.
2. 현미경적 소견에서 Simvastatin의 농도가 0.1 μ M 이상일 때에는 대조군에 비하여 Alrizarin

Red solution 염색되는 골기질의 양이 현저히 감소되는 소견을 관찰할 수 있었다.

3. 흡광도 소견에서 대조군을 기준으로 볼 때 Simvastatin의 농도가 0.1 μ M 이상으로 증가되었을 때 침착된 미네랄 양이 급격히 감소하였다.
4. 유세포 분석에서 대조군과 Simvastatin이 처리된 비교군 모두에서 UMR-106 세포의 생존

률은 변화가 없었다.

이상의 결과로 Simvastatin이 조골세포의 생존이나 수에는 영향을 미치지 않고 분화를 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었으며, 향후 조골세포의 종류에 따른 차이 및 분화억제 기전을 연구하기 위한 분자 생물학적인 연구가 추가로 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. MERCK & CO., INC. ZORCO[®](SIMVASTATIN); DISCRPTION.
2. Hunninghake DB. Therapeutic efficacy of the lipid-lowering armamentarium: the clinical benefits of aggressive lipid-lowering therapy. *Am J Med* 1998;104:9-13.
3. Rogers MJ. Statins: lower lipids and better bones? *Nature Medicine* 2000;6:21-23.
4. Mundy G, Garrett R, Harris S et al. Stimulation of Bone Formation in Vitro and Rodents by Statins. *Science* 1999;286:1946-1949.
5. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins Augment Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Osteoblastic Cells via Inhibition of Protein Prenylation. *Endocrinology* 2003;144:681-692.
6. Hwang RJ, Lee EJ, Kim MH et al. Calcyclin, a Ca²⁺ Ion-binding Protein, Contributes to the Anabolic Effects of Simvastatin on Bone. *J Biological Chemistry* 2004;279:21239-21247.
7. Edwards CJ, Spector TD. Statin as modulators of bone formation. *Arthritis Res* 2002;1:151-153.
8. Parhami F, Mody N, Gharavi N et al. Role of Cholesterol Biosynthetic Pathway in Osteoblastic Differentiation of Marrow Stromal Cells. *J bone Miner Res* 2002;17:1997-2003.
9. Nuckolls GH, Kane A, Shum L, Slavkin HC. Lovastatin promotes cartilage growth but inhibits endochondral ossification of cranial base in organ culture. *J Bone Miner Res* 2000;15:1(abstract)
10. von Stechow D, Fish S, Yahalom D et al. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? *BMC Musculoskeletal Disorder* 2003;4:8-17.
11. van Staa TP, Wegman S, de Vries F et al. Use of Statins and Risk of Fractures. *JAMA* 2001;285:1850-1855.
12. Rejnmark L, Buus NH, Vestergaard P et al. Effects of Simvastatin on Bone Turnover and BMD: A 1-Year Randomized Controlled Trial in Postmenopausal Osteopenic Women. *J Bone Miner Res* 2004;19:737-744.
13. Wu B, Elmariah S, Kalplan FS et al. Paradoxical Effects of Statins on Aortic Valve Myofibroblasts and Osteoblasts Implication for End-stage Vascular Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:592-597.
14. Beak KH, Lee WY, Oh KW et al. The Effect of Simvastatin on the Proliferation and Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells. *J Korean Med Sci* 2005;20:438-444.
15. Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA et al. Effect of statin on Bone Mineral Density and Bone Histomorphometry in Rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1636-1641.
16. Garrett R, Mundy GR. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis Res* 2002;4:237-240.
17. Choudhury NG, Mandal CC, Choudhury GG. Statin-induced Ras Activation Integrates the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signal to Akt and

참고 문헌

- MAPK for Bone Morphogenetic Protein-2 Expression in Osteoblast Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 2007;282:4938-4993.
18. Midy V, Plouet J. Vasculotropin/ vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:380-386.
 19. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:874-877.
 20. Partridge NC, Alcom D et al. Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. *Cancer Research* 1983;43:4308-4314.
 21. Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M et al. Atorvastatin Inhibits Hypercholesterolemia-Induced Cellular Proliferation and Bone Matrix Production in the Rabbit. *Aortic Valve Circulation* 2002;105:2660-2665.
 22. Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL et al. Effect of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors on the Progression of Calcific Aortic Stenosis. *Circulation* 2001;104:2205-2209.
 23. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic Effects of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-1719.
 24. Yao W, Farmer R, Cooper R et al. Simvastatin did not prevent nor restore ovariectomy-induced bone loss in adult rats. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 2006;6(3):277-283.
 25. Casey PJ, Seabra MC. Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* 1996;271:5289-5292.
 26. Fisher JE, Halasy JM, Masarachia PJ et al. Alendronate mechanism of action: inhibition of osteoclastogenesis and bone resorption are mimicked by lovastatin and blocked by geranylgeraniol. *Bone* 1998;23:S339.
 27. 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. *Cell Biology* 1999;96:133-138.
 28. Plotkin LI. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999;104:1363-1374.
 29. Thunyakitpisal PD, Chaisuparat R. Simvastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, reduced the Expression of Matrix Metalloproteinase-9 (Gelatinase B) in Osteoblastic Cell and HT1080 Fibrosarcoma Cells. *J Pharmacol Sci* 2004;94:403-409.
 30. Fromigué O, Haÿ E, Modrowski D et al. RhoA GTPase inactivation by statins induces osteosarcoma cell apoptosis by inhibiting p42/p44-MAPKs-Bcl signaling independently of BMP-2 and cell differentiation. *Cell Death and Differentiation* 2006;13:1845-1856.
 31. Zhong WB, Wang CY, Chang TC, Lee WS. Lovastatin Induces Apoptosis of Anaplastic Thyroid Cancer Cell via Inhibition of Protein Geranylgeranylation and de novo Protein Synthesis. *Endocrinology* 2003;144:3852-3859.
 32. Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 2003;26:883-891.