

발생계배 연골세포의 분화기구에 대한 연구 II. 분화에 미치는 칼슘이온의 영향

김수동 · 손종경* · 박대규 · 강신성

강릉대학교 자연과학대학 생물학과, *사범대학 생물교육과

계배 limb bud 간충직 연골원성 세포로부터 연골원세포로의 분화과정에서 Ca^{2+} 의 역할을 추구해 보기 위하여 Hamburger-Hamilton stage 23/24의 계배 limb bud 간충직세포들을 미세배양법으로 배양하면서, Ca^{2+} , calcium ionophore인 A23187, calcium channel blocker인 D600을 각각 농도 및 처리시간을 변화시켜 처리하면서 연골화의 정도를 검정하여, 연골세포 분화에 미치는 Ca^{2+} 의 작용양상을 분석하였다. 그 결과 Ca^{2+} 은 3 mM의 농도로 배양초기에 처리하였을 때 가장 효과적으로 연골화를 촉진하였으며, A23187(0.05 μ M) 처리는 세포내로 Ca^{2+} 유입을 증가시켜 연골화를 촉진시킨 반면, D600(30 μ M)이하 처리는 세포내로 Ca^{2+} 유입을 차단시킴으로서 연골화를 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과에 따른 세포내로의 칼슘 유입 변화는 ^{45}Ca 로 확인하였다. 그러므로 Ca^{2+} 에 의한 간충직세포의 연골세포로의 분화촉진 작용은 Ca^{2+} 이 연골화의 응집시기에 세포간의 접촉을 유도할 뿐만 아니라 배양 초기에 Ca^{2+} 이 세포 내로 들어감으로써 수반되는 일련의 기작에 의한 것임을 알았다.

KEY WORDS: Chick embryo, Lim bud, Chondrogenesis, Calcium ion, Micromass culture

척추동물 embryonic limb의 분화과정에 있어서 제일 먼저 일어나는 세포분화의 하나가 연골세포의 분화이다. Limb bud에는 미분화 상태인 2종류의 전구세포가 존재하는데, 이들 중 근원성세포는 중배엽성 체절에서, 연골원성세포는 중배엽층에서 유래된다고 알려져 있다(Chevallier *et al.*, 1977; Christ *et al.*, 1977). 또한 이들 두 세포계는 limb bud의 간충직세포로부터 분화되어 나오는 과정 중 서로 제한을 받으며(Newman, 1977; Rutz *et al.*, 1982), 각각 막향위에 차이가 있을 것으로 추론되고 있다(Sasse *et al.*, 1984; Horwitz *et al.*, 1985; George-Weinstein *et al.*, 1988).

발생 중인 계배는 Hamilton-Hamburger(III) stage 22-24에 limb bud의 간충직세포로부터 우선적으로 같은 분화 운명을 가진 연골원성 세포들끼리 모여 세포응집이 일어나면서 세포밀도가 증가된 뒤, 이 응축 중심부로부터 연골세포로의 분화가 일어난다(Ede, 1983; Solursh, 1983). 이

과정 중에 collagen의 합성이 type I에서 type II로 전환되면서 type II collagen의 유전자발현이 급증하며, 연골특이 glycosaminoglycan의 core protein의 유전자 발현이 시작되고(Kosher *et al.*, 1986; Mallein-Gerin *et al.*, 1988), $^{35}SO_4$ 가 연골의 chondroitin sulfate로 incorporation되는 속도가 증가하는 것으로 보고되어 있다(Kosher and Rodgers, 1987; Nah *et al.*, 1988; Swalla *et al.*, 1988). 한편, 이 발생시기를 전후하여 그 발현 양상이 변화하는 hyaluronate, laminin, fibronectin, proteoglycan 등의 세포외기질(ECM) 성분들이 연골원성 세포의 응집, 세포간의 상호작용 등을 통하여 세포의 성숙이나 분화 및 이동 등의 조절에 관여함이 보고되어 있으나 그 상세한 기작에 대해서는 밝혀져 있지 않다(Solursh, 1989).

이와같이 연골세포의 분화에는 세포간의 상호작용이 매우 중요한데 세포간의 결합에 관여하는 물질 중의 하나인 Ca^{2+} 는 여러 세포형에서 세포결합에 관여하며 이면 종류의 세포에서는 칼슘 의존성 세포 결합 분자가 규명되기도 하였다(Damsky *et al.*, 1983). 또한 세포내 Ca^{2+} 은 세포

본 연구는 1989년도 문교부 기초과학 육성연구비의 지원에 의한 것임

대사, 세포분화 및 유전자의 발현 등 여러가지 필수적인 기능에서 매우 중요한 조절 인자로 작용한다. 특히 세포내 Ca^{2+} 의 증가는 세포반응에 있어서 중요한 조절신호로 작용하며, Ca^{2+} 에 의한 세포기능의 조절기구는 세포형에 따라 달라진다 (Tsien and Tsien, 1990).

연골화에 있어서 Ca^{2+} 이 연골화의 응집시기에 세포간의 접촉을 유도함으로써 연골세포의 분화를 촉진하며, 세포내 Ca^{2+} 농도가 연골원세포의 분화단계에 따라 달라지는 것으로 보고되어 있다 (Bee and Jeffries, 1987; San Antonio and Tuan, 1986). 따라서 Ca^{2+} 은 세포외에서 뿐만 아니라 세포내에서도 연골화에 중요한 역할을 할 것으로 추정되지만, Ca^{2+} 에 의한 상세한 분화 조절기작에 대한 것은 거의 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 HH-stage 23/24의 계배 limb bud 간충직세포들을 미세배양법으로 배양하면서, Ca^{2+} , calcium ionophore인 A23187, calcium channel blocker인 D600 등을 농도를 변화시키거나, 처리기간을 변화시켜 처리하면서 연골화의 정도를 검정하여, 계배 limb bud 간충직 연골원성 세포로부터 연골세포로의 분화에 미치는 Ca^{2+} 의 영향을 추적해 보았으며, 그 결과 Ca^{2+} 에 의한 간충직세포의 연골세포로의 분화촉진 작용은 Ca^{2+} 이 연골화의 응집시기에 세포간의 접촉을 유도할 뿐만 아니라 배양 초기에 Ca^{2+} 이 세포 내로 들어감으로써 수반되는 일련의 기작에 의한 것임을 알았다.

재료 및 방법

재료

계배 간충직세포의 분리는 Leghorn 종의 수정란을 38°C, 상대습도 60%의 조건으로 부란시킨 계배를 사용하였다 (Park *et al.*, 1990).

본 실험에 사용한 시약 중 cetylpyridine chloride, Triton X-100, alcian blue(8GX), guanidine-HCl, A23187 (calcium ionophore), methoxyverapamil(D600), $CaCl_2$, collagenase 및 FITC-conjugated mouse anti-rabbit IgG는 Sigma(St. Louis, USA)에서, trypsin은 Fluka

(Buchs, Switzerland)에서, 그리고 $^{45}CaCl_2$ 와 $Na_2^{35}SO_4$ 은 Amersham(Arlington, USA)에서 구입하였다. 세포 배양용 시약과 배양기구들은 Flow Lab(Worth Lyde, Australia) 또는 GIBCO(Grand Island, USA)의 제품들을 사용하였다.

연골원 세포의 배양

Hamburger-Hamilton(HH) stage 23/24의 계배 limb bud로부터 간충조직세포를 절취한 다음, Park 등(1990)의 방법에 따라 35 mm 배양조를 이용한 micromass culture를 실시하였다. 즉, HH-stage 23/24의 계배를 절취한 다음, Ca^{2+} - Mg^{2+} -free Hank's balanced salt solution(CMF-HBSS; KCl:400.5 mg, KH_2PO_4 :60 mg, NaCl:8,000 mg, $NaHCO_3$:350 mg, Na_2HPO_4 :47.5 mg, D-glucose:1,000 mg, Phenol red:17.0 mg/L)에 담그고 계배의 limb bud 용기 하부(bud 정단부에서 약 0.3-0.4 mm 크기)를 탱스텐 바늘로 떼내어 CMF-HBSS로 수세하였다. 이 조직편에서 외배엽 부위를 제거한 다음, 0.2% trypsin, 0.1% collagenase를 함유한 CMF-HBSS를 가하여 흔들어 주면서 37°C에서 20분간 반응시킨 후, lens paper(7-8장)로 걸러내고, 원심분리하여 세포를 모았다. 침전된 세포에 CMF-HBSS를 소량 가하여 헹궈낸 후 세포수를 헤아리고 원심분리한 다음, 세포밀도가 5×10^6 cells/ml이 되도록 F-12 배양액(10% FCS, 1% antibiotic-antimycotic solution 함유)에 현탁하여 각 20 μ l씩 직경 35 mm 배양조에 5 spot을 심었다. 이어 37°C, 5% CO_2 -95% air하에서 1시간 배양하여 세포를 바닥에 붙인 다음, 10% FCS-F-12 배양액 2 ml씩을 가하여 배양하였으며, 배양액은 24시간 간격으로 갈아 주었다.

연골세포 분화의 검정

계배 간충직 세포를 배양하면서 매 24시간 간격으로 연골 분화의 정도를 다음의 방법들로 검정하였다.

1) Nodule 수의 산정

각 배양세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 수세 후 Kahle's fixative로 5분간

고정시킨 다음, 다시 PBS로 2회 수세하고 alcian blue(pH 1.0)로 3시간 동안 염색하였다. 염색 후 0.1 N HCl로 2회 수세하여 역위현미경 하에서 sulfated glycosaminoglycan이 푸르게 염색된 cartilage nodule의 수를 세었다(Lev and Spicer, 1983).

2) 결합된 alcian blue 염색량의 정량

앞의 nodule 수 산정 후 6 M guanidine-HCl을 8시간 실온에서 처리하여 sulfated glycosaminoglycan에 결합된 alcian blue를 추출하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다(Pennypacker, 1983).

3) 세포수의 산정

각 배양일 별로 배양조를 F-12로 2회 수세 후 0.01% collagenase와 0.5% trypsin을 함유한 F-12를 배양조당 1 ml 씩, 30분간 처리하여 세포를 분리한 후 0.4% trypan blue로 염색한 다음 살아있는 세포수를 세었다.

4) Proteoglycan 합성량의 측정

배양 단계별 세포들의 proteoglycan 합성량의 변화는 Goldberg와 Toole(1984)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 5-10 μ Ci $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 를 배양 세포에 첨가하여 6시간 동안 표지한 다음, PBS로 4회 수세하여 유리 [^{35}S] sulfate를 제거한 후 초음파로 균질화시키고 균질물 1 ml당 20% TCA-0.1% FCS를 가하여 냉소에서 하루동안 반응시켜 기대분자들을 침전시켰다. 이 반응물을 원심분리(10,000 \times g, 10분)한 후, 10% TCA/0.1 M MgSO_4 로 4회 수세하고 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 7.8, 0.1% pronase 함유) 1 ml를 가하여 55°C에서 24시간 반응시켜서 기대분자들을 가수분해시킨 다음, 끓여서 반응을 중단시켰다. 이어서 1% cetylpyridium chloride와 Tris-HCl buffer(pH 7.8)를 각각 1 ml씩 가하여 glycosaminoglycan을 침전시킨 다음, 실온에서 1시간 동안 방지한 후 다시 원심분리하여 모인 침전물에 2 ml의 scintillation cocktail을 첨가하여 liquid scintillation counter(Packard, Model Tricarb 1500)로 방사능을 측정하였다.

5) 분화 특이 항원의 검정

배양세포의 연골세포로의 분화 유무는 anti-type II collagen 항체와 anti-myosin light chain 항체를 이용하여 면역조직화학적으로도 검정하였다. 이를 위해서 배양세포에 70% methanol을 가하여 5분간 고정시킨 후, PBS로 수세하고 rabbit anti-type II myosin light chain과 rabbit anti-collagen에 대한 항혈청으로 45분간 반응시켰다. 이어서 PBS로 5분 간격으로 2회 수세하고, FITC-conjugated mouse-anti rabbit IgG로 30분간을 실온에서 반응시킨 후 염색하여 형광현미경(Nikon, Model Labophot)으로 관찰하였다.

연골세포 분화에 미치는 Ca^{2+} 의 영향 분석

HH stage 23/24제배 limb bud 간충직세포를 여러 농도(0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 10 mM 등)의 Ca^{2+} 을 가한 배양액으로 배양하면서 연골세포로의 분화정도를 검정하여 가장 효과적인 Ca^{2+} 농도를 구하였다. 연골 분화에 Ca^{2+} 이 영향을 미치는 시기를 결정하기 위하여 처리기간을 달리하여 Ca^{2+} 을 처리한 다음, 3일째에 배양세포의 연골화 정도를 검정하였다.

제배 limb bud 간충직 세포의 연골화에 미치는 Ca^{2+} 의 작용양상을 알아보기 위하여 우선 HH stage 23/24 제배 limb bud의 연골원세포에 Ca^{2+} ionophore인 A23187을 0.01 μM ~0.5 μM 까지 농도를 달리하여 처리한 다음 배양하면서 연골 세포분화에 가장 효과적인 농도를 검정하였다. 위에서 가장 효과적인 A23187의 농도가 결정되면, 3 mM Ca^{2+} 과 함께 처리하여 연골화에 미치는 영향을 검정하였고, 또한 칼슘 channel blocker인 D600(10~50 μM)도 같은 방법으로 처리하여 연골세포 분화에의 영향을 분석하였다.

칼슘 유입량의 측정

칼슘의 유입 양상의 추적은 Bee와 Jeffries(1987)의 방법을 일부 보완하여 다음과 같은 방법으로 실시하였다. HH-stage 23/24 제배 limb bud의 연골원세포에 10 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 $^{45}\text{CaCl}_2$ 를 처리하여 18시간 동안 세포에 incorporation 시킨

후, 0.9 M Ca²⁺과 0.5 M Mg²⁺을 함유한 PBS (CM-PBS)로 3회, ice-cold 10 mM HEPES buffer, pH 7.4(0.9% NaCl, 5 mM CaCl₂ 함유)로 3회 수세한 다음, 1 ml의 동일 buffer에 세포를 긁어 모은 후, 230 × g에서 1분간 원심분리하는 방법으로 세포를 2회 더 수세하였다. 이를 다시 HEPES buffer에 현탁한 후 원심분리하여 세포를 모으고, 200 μl의 6 M guanidine-HCl을 첨가하여 8시간 방치 후 분해된 세포내의 ⁴⁵Ca²⁺의 방사능을 측정하였다. 또 ⁴⁵CaCl₂를 각각 15분, 30분, 1시간, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간 동안 처리하여 각 시간대 별의 ⁴⁵Ca²⁺유입 정도를 검정하였다

다. 한편, 0.5 μM의 A23187을 배양액에 첨가한 후, 같은 방법으로 ⁴⁵Ca²⁺ 유입량을 측정하였다.

결 과

Hamburger-Hamilton(HH) stage 23/24의 계배 limb bud 간충조직세포를 5 × 10⁶ cells/ml의 밀도로 5일간 micromass culture하면서 연골세포로의 분화정도를 분석한 결과는 Fig. 1A와 같다. 이때 alcian blue로 염색된 cartilage nodule의 수와 추출한 alcian blue 양 또는 [³⁵S]sulfate가 배양 세포들의 proteoglycan에 결합되는 속도와와의 상관관계를 분석해 본 결과 유의성이 있는 것으로 판정되었다(Fig. 1B). 그러므로 이후의 실험에서는 배양세포들의 연골화의 검정은 nodule의 수로 판정하였다. 면역형광 분석법으로 검정한 이들 분화세포들은 type II collagen의 발현이 뚜렷하였다(data 생략). 한편, 위의 실험 결과에서 알 수 있는 바와 같이 배양세포들의 연골화는 배양 2일에서 3일 사이에 왕성하게 일어나므로 Ca²⁺ 등에 의한 분화에의 영향을 보기위한 배양기간은 72 시간으로 한정하였다.

여러 농도(0.5 mM~10 mM)의 Ca²⁺을 함유한 배양액으로 HH-stage 18/19의 계배 limb bud 간충조직 세포를 배양하면서 연골화를 검정한 결과 세포밀도를 높힌 경우에서도 연골화가 이루어지지 않았다. 그러나 HH-stage 23/24의 계배의 경우 Fig. 3에 나타난 바와 같이 Ca²⁺이 0.5 mM로부터 3 mM로 증가 할수록 분화는 촉진되었으며 4 mM 이상의 농도에서는 배양 2-3일째부터 세포들이 자라지 못하고 모두 배양조 바닥으로부터 떨어졌다. 그러므로 배양액 내 Ca²⁺의 농도가 3 mM 일 때 연골화가 가장 촉진됨을 알 수 있었다(Fig. 2A & Fig. 5B). Ca²⁺에 의한 연골화 촉진작용을 하는 시기를 알아보기 위하여 Ca²⁺의 처리기간과 처리 시기를 달리하여 연골화를 검정한 결과(Fig. 2B), 배양 1일째부터 처리한 경우에 가장 효과가 큰 것으로 나타났으며, 배양 2일이나 배양 3일 연속 처리시 1일 처리군에서의 경우보다 약간의 증가된 분화 촉진작용을 보였으나, 그 효과면에서는 1일 처리군에 비하여 아주 약했다. 반면에, 배

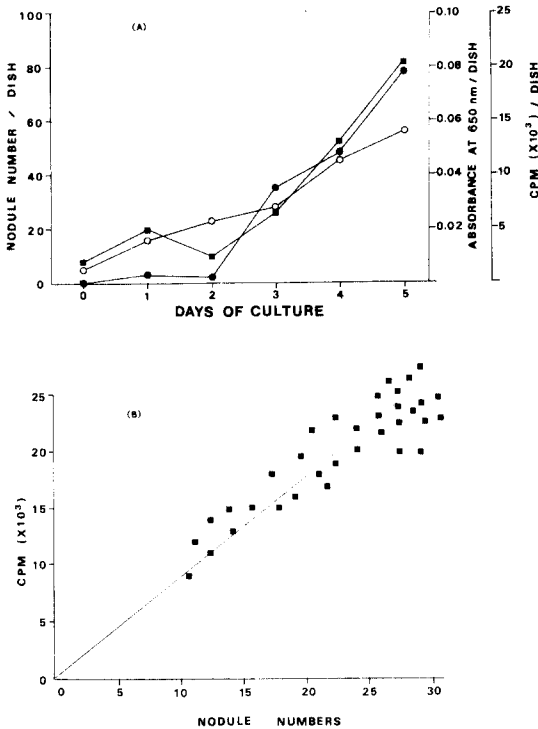


Fig. 1. (A) Quantitation of chondrogenesis of HH-stage 23/24 limb bud mesenchymal cell cultures (5 × 10⁶ cells/ml). ●··●, the number of cartilage nodules stained with alcian blue; ○··○, the amount of dye bound to sulfated glycosaminoglycans; ■··■, the rate of [³⁵S] sulfate incorporation into cell layer macromolecules. Each point of the above data represents the mean of five determinations. (B) Relationship between cartilage nodule number and the rate of [³⁵S]sulfate incorporation into cell layer macromolecules in 72 hr cultures (5 × 10⁶ cells/ml). The linear correlation coefficient is 0.81.

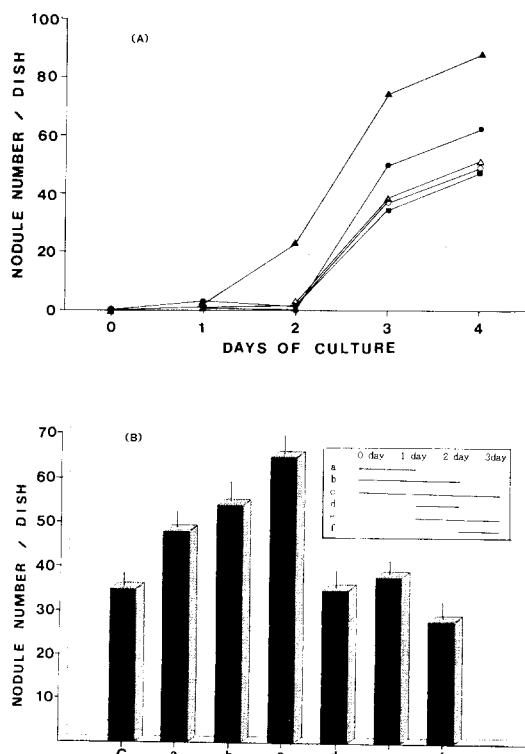


Fig. 2. (A) Dose dependence of calcium ion on the chondrogenesis *in vitro*. Cultures (5×10^6 cell/ml) were supplemented with various concentrations of calcium ion throughout culture period and assayed for every 24 hr. ■...■, control; ()... (), 0.5 mM; △...△, 1 mM; ●...●, 2 mM; ▲...▲, 3 mM. Each point of the above data represents the mean of five determinations. (B) Time dependence of Ca²⁺ effect. Each culture (a~f) except control (C) was treated with 3 mM of Ca²⁺ in various intervals as indicated in the box.

양 1일 후나 배양 2일 후 처리군에서는 Ca²⁺에 의한 분화 촉진 효과가 나타나지 않았다.

간중직 세포에 A23187을 여러가지 농도로 처리하여 배양해 본 결과 0.2 μM 이상의 농도에서는 세포가 배양 3일째 모두 배양조로부터 떨어졌고 0.2 μM 이하에서만 cartilage nodule의 수가 증가되었으며, 0.05 μM에서 가장 효과가 크게 나타났다(Fig. 3 & Fig. 5C). 또한 A23187과 Ca²⁺을 함께 처리한 경우 A23187만 처리하였을 때보다 nodule의 수가 약간 증가됨이 관찰되었다(Fig. 3 & Fig. 5D).

Calcium channel blocker인 D600도 35 μM 이

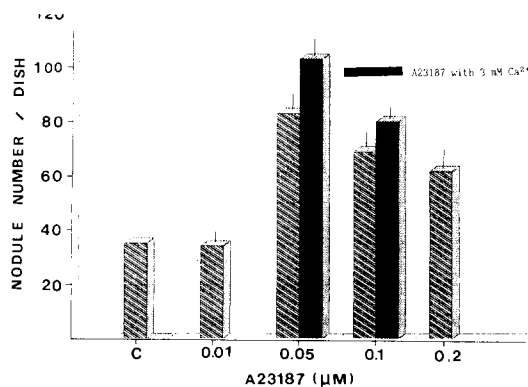


Fig. 3. Effect of A23187 in the absence and the presence of calcium ion (3 mM) on the chondrogenesis *in vitro*. Cultures (5×10^6 cells/ml) were supplemented with either various concentration of A23187 only (□) or 3 mM of Ca²⁺ in addition to A23187 (■) for 72 hr and fixed and stained as described in 'Materials and Methods'. C, control.

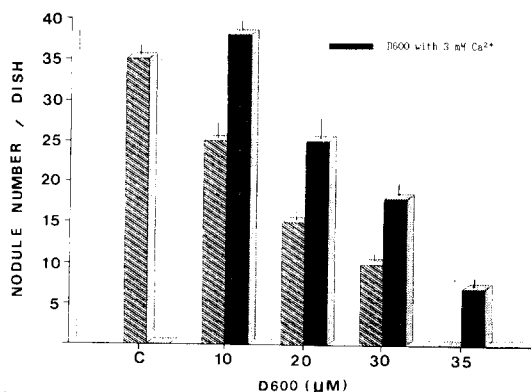


Fig. 4. Effect of D600 on the chondrogenesis *in vitro*. Cultures (5×10^6 cells/ml) were supplemented with various concentrations of D600 (□) or 3 mM of Ca²⁺ in addition to D600 (■) for 72 hr and fixed and stained as described in 'Materials and Methods'. C, control.

상 처리한 경우 세포들이 배양조로 부터 떨어지거나 분화가 일어나지 못하는 반면에, 30 μM 이하의 농도로 처리한 경우에만 nodule이 나타났으나 그 수는 대조군에 비해 적었다(Fig. 4 & Fig. 5E). 한편, D600의 처리 농도를 30 μM로 하고 Ca²⁺ 3 mM을 동시에 처리한 경우에는 D600만 단독 처리시 보다는 nodule 수가 약간 증가하였지만 그 수는 대조군보다는 적었다. 그러나 D600 10 μM과 3 mM의 Ca²⁺을 동시에 처리한 경우에는 nodule의 수가 대조군과 유사하였다(Fig. 4 &

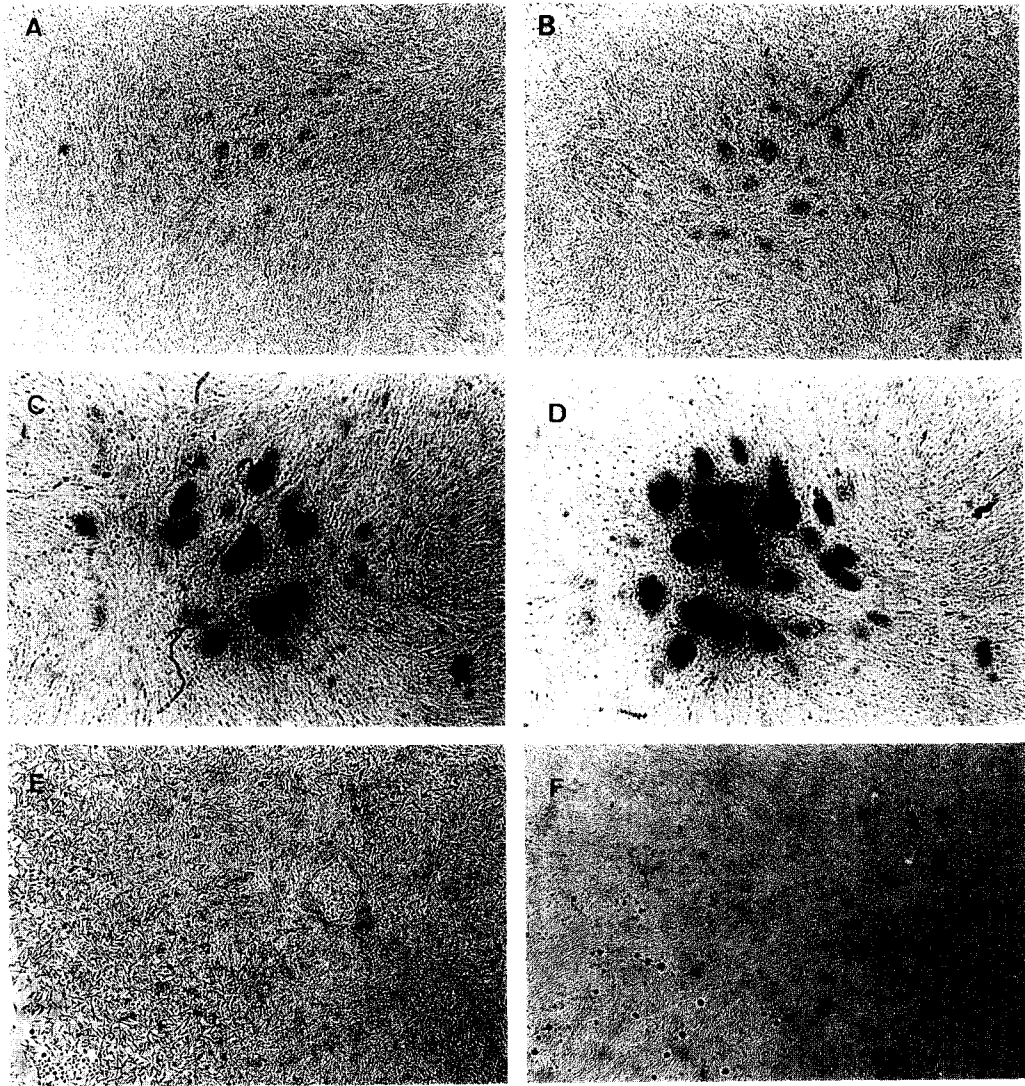


Fig. 5. Photomicrograph of mesenchymal cells cultured under various conditions. A, control; B, 3 mM of Ca^{2+} -treated; C, 0.05 μ M of A23187-treated; D, 0.05 μ M of A23187 with 3 mM of Ca^{2+} -treated; E, 35 μ M of D600-treated; F, 35 μ M of D600 with 3 mM of Ca^{2+} -treated. All the cultures (5×10^6 cells/ml) were treated throughout the culture periods (72 hr), and were fixed and stained with alcian blue. Photomicrography was taken at $\times 25$.

Fig. 5F).

한편, 배양일 별로 $^{45}CaCl_2$ 로 18시간 표지한 후 세포내로의 유입량을 측정할 결과(Fig. 6), 배양 1일째에 비교적 작게 늘어가다가 2일째 약간 증가

하였으며 3일째에는 감소하였다. 그러나 4일과 5일째에는 급진적으로 증가하는 양상을 보였다. 또 배양액에 A23187 0.05 μ M을 첨가한 경우에는 같은 양의 유입량은 배양 1일째 대조군에 비해 2

배 이상 증가한 후 2일째에 약 1/2로 감소한 상태로 3일까지 지속되다가 4일째 이후부터는 증가하기 시작하여 5일째에는 급속히 증가하는 양상을 보였다. 그러나 시간별 칼슘 유입량을 측정할 결과에서는 처리 1시간 때부터 급격히 유입되기 시작한 후 6시간을 기점으로 점차 유입량이 감소하는 양상을 보였다.

고 찰

Limb bud 간중식세포가 연골세포로 분화되어 가는 과정에서 세포응집 현상이 일어나며 이 세포응집은 부분적인 세포분도의 증가를 의미한다. 지사들은 이미 간중식세포를 미세대량 배양하면서 연골화가 세포분도에 의존적이며, 세포응축이 선행되어야 함을 보고한 바 있다(Park *et al.*, 1990).

Limb bud에서 분리한 간중식세포의 응집단계는 칼슘 의존성 세포라면 단백질의 상호작용에 의한 것으로 알려져 있으며(Bee and von der Mark, 1984), 특히 연골세포 분화에 선행되어야 하는 세포의 응축과정은 일종의 Ca^{2+} 의존성 세포결합 기작에 의해 이루어지는 것으로 제시된 바 있다(San Antonio and Tuan, 1986; Bee and von der Mark, 1987).

본 연구에서도 연골세포 분화에 있어서 칼슘의 역할을 알아보기 위하여 연골원세포를 0.5 mM~3 mM의 Ca^{2+} 을 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 세포의 Ca^{2+} 의 농도가 증가할 수록 cartilage nodule의 수가 증가하였고 특히 배양 첫날부터 24시간 동안 처리한 것이 가장 효과적이었으며 배양 2일째와 3일째에 Ca^{2+} 을 처리하였을 때는 연골화 촉진효과가 적거나 거의 없었다(Fig. 2B). 그리고 3일 동안 칼슘을 지속적으로 처리하였을 경우에도 nodule의 증가율은 크게 변하지 않았다. 이와같이 배양 초기에 칼슘농도증가에 의한 연골화 촉진은 간중식세포의 세포간 응집을 촉진하여 일어나는 것이다.

세포외부의 Ca^{2+} 처리에 의한 연골분화촉진 효과가 단순히 세포응축 촉진에 의한 것 외에 다른 요인에 의한 것인지를 알아보기 위하여 Ca^{2+}

ionophore인 A23187을 연골원세포에 처리해 본 결과, 0.05~0.1 μM 의 범위에서 A23187은 연골화를 촉진시켰으며, 외부 Ca^{2+} 을 첨가하였을 경우에는 촉진 효과가 증가하였을 뿐만 아니라(Fig. 3), Ca^{2+} channel blocker인 D600을 처리하였을 때 농도 의존적으로 분화율 억제하였으며 35 μM 에서는 분화가 완전히 억제되었으므로(Fig. 4), 세포외부의 Ca^{2+} 이 세포내로 유입되어 들어가서도 연골화에 관여하는 것으로 추정되었다.

이와같은 사실을 확인하기 위하여 실시한 배양 세포내로의 $^{45}Ca^{2+}$ 유입량 분석에서는, $^{45}Ca^{2+}$ 이 배양 초기에는 비교적 적게 유입되다가 배양 4일째에는 유입량이 증가하여 연골발생이 진행되는 동안 지속되었다. 세포내 칼슘 수준의 이러한 변화는 연골원세포가 연골세포로 되는 시기인 5일째에 가장 뚜렷하였다(Fig. 6). 따라서 세포내 칼슘의 정도는 연골원세포일 때에는 낮고 분화가 진행되는 데 따라 증가함을 알 수 있겠다.

A23187을 처리한 경우에 세포내 $^{45}Ca^{2+}$ 의 수준은 A23187에 의해 연골발생이 앞당겨짐에 따라 증가하고 연골화가 계속되면서 감소했다가 4일째에 다시 증가하였다. 그러므로 A23187의 유부는 nodules의 형성시기와 연관되며, 대조군에서 초기에 세포내 칼슘이 증가하는 것도 이러한 연골세포 분화의 발현과 연관되는 것으로 추정된다.

위와같은 연구결과는 초기에 세포외부의 칼슘

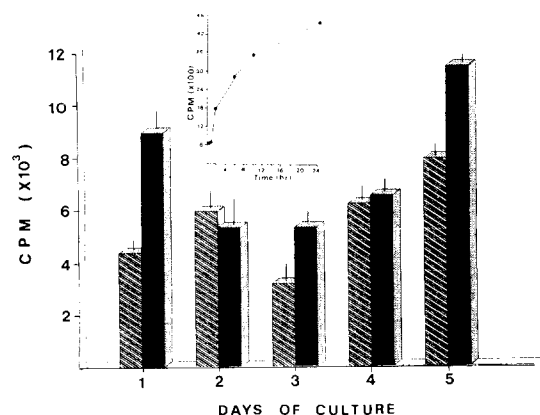


Fig. 6. Intracellular $^{45}Ca^{2+}$ levels in control micromass culture (□) and the effect of continuous exposure to 0.05 μM A23187 on intracellular $^{45}Ca^{2+}$ levels (■). Inset: Time dependence of $^{45}Ca^{2+}$ incorporation rate. See the text for details.

이 일시적으로 세포응집을 유발시켜 연골분화를 촉진하지만 궁극적으로 세포내 칼슘 수준의 변화가 연골분화 단계와 직접적인 연관성을 갖는다는 것을 알 수 있으며 이와 유사하게 연골화의 지해 및 촉진은 세포내 칼슘 pool의 조절에 의해서도 영향을 받을 것으로 생각된다(Kang, 1991).

Ca^{2+} 의 세포내 작용기작에 대해서는 잘 밝혀지지 않으나 Ca^{2+} 은 세포내에서 다양하게 작용하여 calcium binding protein(특히 calmodulin)과 결합하거나 protein kinase C의 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다(William and Samuel, 1989). 또한 세포내 칼슘과 cAMP의 수준은 서로 연계되어 있어 세포내 cAMP증가가 연골분화를 촉진하기도 한다(Solursh *et al.*, 1981). 따라서 이러한 세포내 칼슘의 농도와 관련된 연골화 기작을 추적하기 위해서는 우선적으로 세포내 칼슘 농도의 정확한 측정이 이루어져야 하고, Ca^{2+} 과 연관된 cAMP, PKC, IP₃ 등의 세포내 양적 변화 및 그에 따른 세포내 조절기작들이 규명되어야 할 것이며, 현재 본 연구실에서는 이에 대한 실험들을 수행 중에 있다.

인용문헌

- Bee, J. A. and R. Jeffries, 1987. The relationship between intracellular calcium levels and limb bud chondrogenesis *in vitro*. *Development* **100**: 73-81.
- Bee, J. A. and K. von der Mark, 1984. A molecular approach to analysis of pre-chondrogenic condensation in the avian limb. *J. Embryol. Exp. Morphol.* (Suppl.) **82**: 80-88.
- Bee, J. A. and K. von der Mark, 1987. Limb bud cell aggregation: Identification of the calcium-dependent mechanism. *Devel. Biol.* **121**: 376-388.
- Chevallier, A., M. Kinney, and A. Mauger, 1977. Limb-somite relationship, origin of the limb musculature. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **41**: 245-258.
- Christ, B., H. J. Jacob, and M. Jacob, 1977. Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat. Embryol.* **150**: 170-186.
- Damsky, C. H., J. Richa, D. Solter, K. Knudson, and C. A. Buck, 1983. Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* **34**: 455-466.
- Ede, D. A. 1983. Cellular condensation and chondrogenesis. *In: Cartilage* (B. K. Hall, ed.). Academic Press, New York. Vol. 2, pp. 143-185.
- George-Weinstein, M., C. Decker, and A. Horwitz, 1988. Combination of monoclonal antibodies distinguish mesenchymal, myogenic, and chondrogenic precursors of the developing chick embryo. *Dev. Biol.* **125**: 34-50.
- Goldberg, G. L. and B. P. Toole, 1984. Hyaluronate containing pericellular coats of chondrocytes. *J. Cell Biol.* **101**: 2134-2144.
- Kang, S. S., 1991. Calcium signaling system. *News Lett. Kor. Soc. Zool.* **8**: 19-26.
- Kosher, R. A., W. M. Kulyk, and S. W. Gau, 1986. Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J. Cell Biol.* **102**: 1151-1156.
- Koher, R. A. and B. J. Rodgers, 1987. Separation of the myogenic and chondrogenic progenitor cells of undifferentiated limb mesenchyme. *Dev. Biol.* **121**: 376-388.
- Lev, R. and S. S. Spicer, 1964. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* **12**: 309-314.
- Mallein-Gerin, F., R. A. Kosher, W. B. Upholt, and M. L. Tanzer, 1988. Temporal and spatial analysis of cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb development by *in situ* hybridization. *Dev. Biol.* **126**: 337-345.
- Nah, H. D., B. J. Rodgers, W. M. Kulyk, B. E. Cream, R. A. Kosher, and W. B. Upholt, 1988. *In situ* hybridization analysis of the expression of the type II collagen gene in the developing chicken limb bud. *Collagen Rel. Res.* **8**: 277-294.
- Newman, S. A., 1977. Lineage and pattern in the developing wing bud. *In: Vertebrate limb and somite morphogenesis* (D. A. Ede and J. R. Hinchliffe, eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 181-197.
- Park, T. K., J. K. Sonn, J. A. Yoo, B. J. Yoo, and S. S. Kang, 1990. Studies on the differentiation of chondrogenic cells in developing chick embryo I. Cellular condensation and chondrogenesis. *Kor. J. Zool.* **33**: 310-321.
- Pennypacker, J. P., 1983. The growth of embryonic chick limb mesenchyme cells in serum-free medium. *In: Limb Development and Regeneration, Part B* (R. O. Kelly, P. F. Goetinck, and J. A. MacCabe, eds.). Liss, New York, pp. 167-174.
- Rutz, R., C. Haney, and S. Hauschka, 1982. Spatial analysis of limb bud myogenesis, an proximodistal gradient of muscle colony-forming cells in chick embryo leg buds. *Dev. Biol.* **90**: 399-411.
- San Antonio, J. D. and R. S. Tuan, 1986. Chondrogenesis of limb bud mesenchyme *in vitro*, stimulation by cations. *Dev. Biol.* **115**: 313-324.

- Sasse, J., A. Horwitz, M. Pacifici, and H. Holtzer, 1984. Separation of precursor myogenic and chondrogenic cells in early limb bud mesenchyme by a monoclonal antibody. *J. Cell Biol.* **99**: 1856-1866.
- Solursh, M., 1983. Cell-cell interactions and chondrogenesis. *In*: Cartilage (B. K. Hall ed.). Academic Press Inc., New York, Vol. 2, pp. 121-141.
- Solursh, M., 1989. Differentiation of cartilage and bone. *In*: Current Opinion in Cell Biol. (N. B. Gilula and L. Wolpert eds.). Vol. 1, pp. 889-998.
- Solursh, M., R. S. Reiter, P. B. Ahrens, and B. M. Vertel, 1981. Stage- and position-related changes in chondrogenic response of chick embryonic wing mesenchyme to treatment with dibutyryl cyclic AMP. *Dev. Biol.* **83**: 9-19.
- Swalla, B. J., W. B. Upholt, and M. Solursh, 1988. Analysis of type II collagen localization in chick wing buds by *in situ* hybridization. *Dev. Biol.* **125**: 51-58.
- Tsien, R. W. and R. Y. Tsien, 1990. Calcium channels, stores, and oscillations. *Ann. Rev. Cell Biol.* **6**: 715-760.
- William, L. D. and E. A. Samuel, 1989. Effects of cAMP-dependent, calmodulin-dependent and C-type protein kinase on platelet calcium transport. *In*: Cell Calcium Metabolism (G. Fiskum ed.). pp. 83-91.

(Accepted June 24, 1991)

Studies on the Differentiation of Chondrogenic Cells in Developing Chick Embryo

II. Effect of Calcium Ion on the Chondrogenesis

Soo Dong Kim, Jong Kyung Sonn, Tae Kyu Park, and Shin-Sung Kang (Department of Biology, Kyungpook National University, Taegu, Korea)

To investigate the effect of Ca^{2+} on the chondrogenesis of chick limb bud mesenchyme cells, chondroblasts (5×10^6 cells/ml) of HH-stage 23/24 were micromass cultured in the presence of various concentrations of Ca^{2+} and/or A23187 or D600 with various interval and *in vitro* chondrogenesis was assayed. Also intracellular Ca^{2+} levels were measured throughout cultures by using $^{45}CaCl_2$ with or without A23187. From the experimental results obtained, it was found that Ca^{2+} stimulates cellular aggregation which leads to promote the chondrogenesis. It was also found that Ca^{2+} enters the cell during the early step in chondrogenesis and acts as an intracellular enhancer on the chondrogenesis.