

1, 25(OH)₂-23ene-D₃ : *in vitro*에서 U937 세포의 증식과 분화 및 *in vivo*에서 쥐의 칼슘대사에 미치는 영향

정수자[†] · 서명자*

부산여자전문대학 식품영양과

*부산대학교 식품영양학과

1,25(OH)₂-23ene-D₃ : Effects on Proliferation and Differentiation of U937 Cells *in vitro* and on Calcium Metabolism of Rat *in vivo*

Soo-Ja Jung[†] and Myung-Ja Suh*

Dept. of Food and Nutrition, Pusan Women's Junior College, Pusan 614-734, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

1,25(OH)₂-23ene-D₃ is a novel vitamin D₃ analog which has a double bond between C-23 and C-24. We describe the effects of this analog on cell differentiation and cell proliferation *in vitro* using the human histiocytic lymphoma cell line U937, and on calcium metabolism in rats *in vivo*. In the present investigation 1,25(OH)₂-23ene-D₃ was compared to the natural metabolite of vitamin D₃, 1 α , 25-dihydroxycholecalciferol [1,25(OH)₂-D₃]. 1,25(OH)₂-23ene-D₃ was more potent than 1,25(OH)₂-D₃ for inhibition of proliferation and induction of differentiation of U937 cells. Especially, its effect on induction of differentiation, as measured by superoxide production and nonspecific esterase (NSE) activity, was about 20-fold more potent than 1,25(OH)₂-D₃. This analog morphologically and functionally differentiated U937 cells to monocyte-macrophage phenotype showing a decrease of N/C ratio in Giemsa staining and the increase of adherence ability to surface. Intraperitoneal administration of 1,25(OH)₂-23ene-D₃ to rats showed that the compound had at least 50 times less activity than 1, 25(OH)₂-D₃ in causing hypercalcemia and hypercalciuria. The strong direct effects of 1,25(OH)₂-23ene-D₃ on cell proliferation and cell differentiation, coupled with its decreased activity of calcium metabolism make this compound an interesting candidate for clinical studies including patients with leukemia, as well as several skin disorders, such as psoriasis.

Key words : 1,25(OH)₂-23ene-D₃, U937 leukemia cell differentiation, calcium metabolism

서 론

Secosteroid 호르몬인 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂-D₃, calcitriol]는 비타민 D₃의 활성형으로 모체인 비타민 D₃로부터 간과 콩팥에서 연속적인 수산화반응에 의해 생성되어지며, 세포내의 수용체와 결합하여 소장에서 칼슘흡수 촉진이나 뼈로부터 칼슘흡수에 의한 제거 등을 통해 칼슘의 항상성(homeostasis) 유지에 중요한 역할을 한다¹⁾. 이 호르몬 본래의 작용기관은 소장, 뼈 및 콩팥 등이나 뼈와 무기질 대사에 관

여하는 이들 조직 이외에도 정상세포와 악성조직의 세포질에서 1,25(OH)₂-D₃ 수용체가 확인됨에 따라^{2,3)} 지금까지 알려진 이 호르몬의 생물학적 기능 이상으로 세포성장과 분화조절을 포함한 광범위한 생리적 기능을 가진 면역계의 조절물질로 알려지고 있다.

조혈세포의 증식과 분화조절에 대한 1,25(OH)₂-D₃ 영향에 관한 연구로는 유사분열 물질로 활성화된 T림파구에 작용하여 T림파구에서의 interleukin 2(IL-2)의 생성을 우선 억제시켜 G₁A에서 G₁B로의 세포전이를 방해함으로써 T세포의 증식을 억제한다고 한다^{4,5)}. 또한 이 호르몬은 lectin으로 활성화된 T림파구에서 생성되어지며 neutrophils, eosinophils 및 macrophages 등

[†]To whom all correspondence should be addressed

의 성숙세포의 세포기능을 증가시키는 GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) 생성을 post-transcriptional level에서 저해하기도 하며⁶⁾, B림파구에 직접 작용하거나⁷⁾ T helper-cell 활성을 조절함으로써⁸⁾ B림파구에서의 항체생성을 억제한다. 이외에 monocyte를 macrophage로 분화시키는 데도 관여하는⁹⁾ 등이 호르몬은 조혈세포의 증식과 분화를 조절하는 다양한 면역기능을 갖는다. 한편 암세포에 대한 이 호르몬의 영향에 관한 연구로는 백혈병 세포분화에 관한 연구가 비교적 많이 진행되었다. *in vitro*의 연구에서 1, 25(OH)₂D₃는 HL-60 cells (human promyelocytic leukemia cell line)과 U937 cells (human monoblastic leukemia cell line)의 증식억제 및 monocyte/macrophage 동종형(phenotype)으로의 분화촉진 효과가 있음이 확인되었고¹⁰⁻¹²⁾, 쥐에 골수성 백혈병 세포를 접종시킨 뒤 1, 25(OH)₂D₃를 투여한 결과 쥐의 생명기간이 연장되었다는 *in vivo*에서의 연구보고도 있다¹³⁾. 또한 대장암, 폐암 및 유방암에 대한 이 호르몬의 효과에 관한 연구도 다양하다. 대장암세포¹⁴⁾와 폐암세포¹⁵⁾로 접종된 쥐의 암세포 성장을 저해하기도 하며 일부 유방암 환자의 피부전이성 유방암의 크기를 50% 까지 감소시킨 보고도 있다¹⁶⁾.

이와 같은 조혈세포의 면역조절 기능과 항악성 효과에 관한 비타민 D₃ 유도체의 연구결과는 다양하나, 현재로는 이들 화합물을 악성질환 치료제로서 임상적 직접 사용가능성은 희박하다. 불행하게도 *in vitro* 연구에서 얻는 효과에 상당하는 농도의 1,25(OH)₂D₃와 이의 유도체를 preleukemia 환자에게 구강투여한 결과 항악성 효과는 상당하였으나 환자가 hypercalcemia를 유발하여 지속적인 투여는 불가능하였다^{17,18)}. 또한 건선질환 (psoriasis)자에게도 이들 화합물을 투여한 결과 건선피부의 일부가 정상세포로 분화되긴 하였으나 hypercalcemia를 유발시켜 역시 지속적인 투여는 불가능하였다¹⁹⁾. 따라서 이러한 임상적 이용 한계성을 극복하기 위하여 지금은 비타민 D₃ 화합물과 관련되어 나타나는 hypercalcemia, hypercalciuria 및 bone resorption과 같은 부작용이 낮으면서 항악성 효과의 특이성이 큰 새로운 비타민 D₃ 유도체의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다²⁰⁻²²⁾.

본 연구는 이러한 목적으로 개발한 몇 가지 종류의 새로운 비타민 D₃ 유도체의 항악성 효과를 검토하기 위하여 *in vitro*에서 U937 세포 (human histiocytic lymphoma cell line)에 대한 이들 화합물의 증식억제 효과를 먼저 검토한 다음, 대조군으로 이용된 1,25(OH)₂D₃에 비

해 증식억제 효과가 훨씬 크게 나타난 1,25(OH)₂-23ene-D₃의 U937 세포에 대한 분화촉진 효과 및 쥐에 복강투여 후 *in vivo*에서 칼슘대사에 미치는 영향을 검토하였으며 모든 실험에서 대조군인 1,25(OH)₂D₃와 비교 검토되었다.

재료 및 방법

세포배양

U937 세포를 ATCC (Rockville, MD)에서 구입하여 10% fetal calf serum (FCS), 1% penicillin/streptomycin이 포함된 RPMI 1640배지 (Gibco, Co.)에서 부유 배양하였으며, 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하였다. 건강한 성인의 골수로부터 Ficoll-Hypaque gradients를 이용한 원심분리에 의해 mononuclear cells을 분리한 후 1× phosphate buffered saline (PBS)에 2번 씻은 다음 10% FCS가 포함된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 colony 실험에 사용하였다.

비타민 D₃ 화합물

본 실험에 사용한 5가지의 비타민 D₃ 화합물은 Fig. 1과 같다. 모든 화합물은 10⁻³M 농도로 무수에탄올에 녹여서 -20°C에 보관한 후 실험시작 직전에 FCS가 함유되지 않은 RPMI 1640배지에 희석시켜 사용하였다. 배양액에 함유된 에탄올의 농도는 0.1%가 넘지 않았으며 이 농도는 세포의 성장과 분화에 영향을 주지 않았다. 사용한 화합물 중 1,24(OH)₂-22ene-24-cyclopropyl-D₃, 1,25(OH)₂-24-homo-D₃, 1,25(OH)₂-24-dihomo-D₃는 Leo Pharmaceutical (Copenhagen, Denmark)로부터, 기증받아서 사용하였고, 1,25(OH)₂-23ene-D₃는 Dr. Uskokovic (Hoffman La Roche Inc., Nutley, NJ) 연구실에서 합성된 것으로 역시 기증받아서 사용하였다.

세포성장 관찰

10%의 FCS와 여러 가지 농도의 비타민 D₃ 화합물이 함유된 RPMI 1640배지에 1×10⁵ cells/ml의 U937 세포를 넣은 다음 37°C, 5% CO₂ 조건에서 4일간 부유 배양한 후 살아있는 세포수를 trypan blue로 측정하였다. 대조군과 실험군 모두에서 세포 생존율은 90% 이상이었다. 실험결과는 한번 실험에서 3개의 plates에 동시에 세포를 배양하였으며 이를 세번 반복한 결과를 평균하였다.

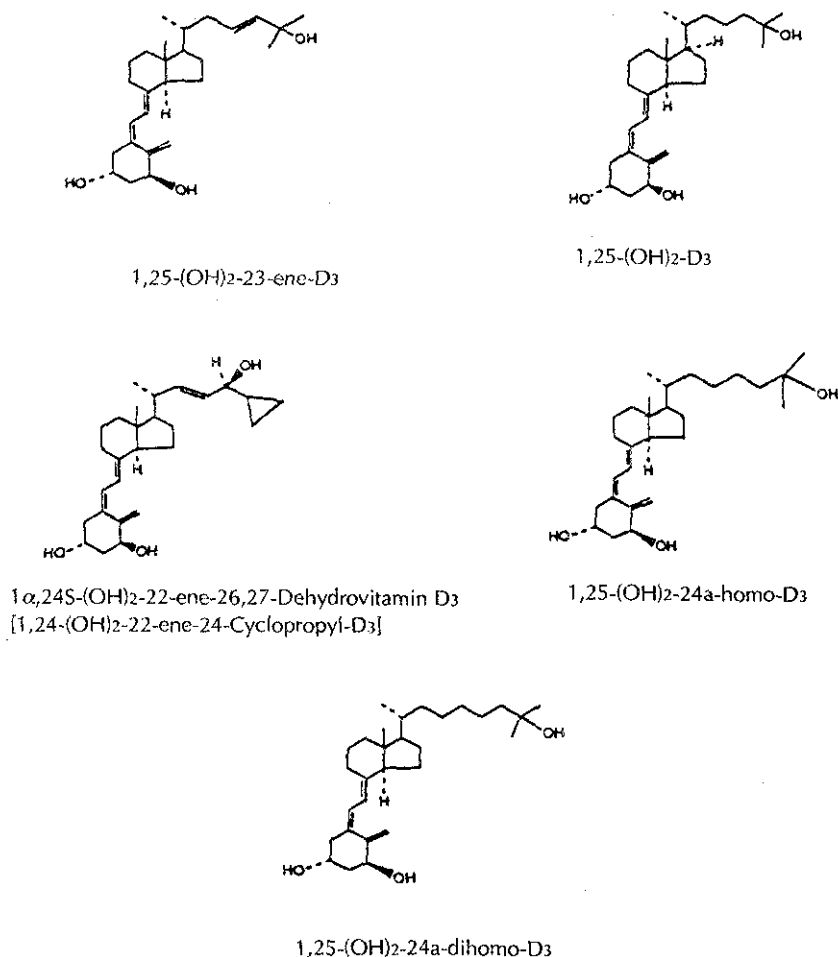


Fig. 1. Structure and chemical name of the novel vitamin D₃ analogs evaluated in this investigation (Throughout this study "ene" refers to a double bond).

Soft agar 배지에서 colony 형성 관찰

정상인의 골수에서 분리한 mononuclear cells의 colony 형성 관찰은 underlayer에는 0.5%, upper layer에는 0.3% agar가 함유된 two-layer soft agar 방법²³⁾을 이용하여 six-well의 배양접시에서 관찰하였다. 비타민 D₃ 화합물은 underlayer에 세포는 upper layer에 넣어 혼합하였고 세포농도는 2×10^5 cells/plate로 조절하였다. 200pM의 recombinant granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)를 정상 골수세포의 성장을 위한 CSF원으로 underlayer에 넣어 37°C, 5% CO₂ 조건에서 12일간 배양한 후 세포수가 40개 이상인 colony 수만 역상현미경으로 관찰하였으며 대조군은 CSF만 넣어 배양하였다.

세포분화 관찰

U937 세포분화는 nitroblue tetrazolium (NBT)을 환원시키는 superoxide 생성능, α -naphthyl acetate esterase [nonspecific esterase (NSE)] 활성유무의 세포화학적 분석 및 morphology 변화 등으로 관찰하였다. 세포를 10% FCS와 농도를 달리한 비타민 D₃ 화합물 (10^{-10} M ~ 10^{-7} M)이 함유된 RPMI 1640배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 5일간 배양한 후 NBT 환원능 검사는 세포배양액 (2×10^5 cells/ml)에 12.5mg/ml NBT, 17mg/ml BSA와 1 μ g/ml 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate가 혼합된 용액을 동량 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 씻고 cytocentrifuge에 의해 만들어진 슬라이드상의 세포를 매탄올에서 고정시킨 후 safranin

으로 염색한 다음 현미경으로 관찰하였다. 한편 배양한 세포를 PBS로 씻은 후 다시 cytocentrifuge에 의해 슬라이드를 만든 다음 일부는 Wright/Giemsa 염색을 하여 morphology 변화를 관찰하였고 일부는 NSE 활성 확인에 이용하였다. 즉 NSE 활성 확인을 위해서 슬라이드를 citrate-acetone-formaldehyde-용액 (25 : 65 : 8)에 넣어서 상온에서 30초간 세포를 고정시킨 다음 1ml fast blue BB 염기용액, 1ml sodium nitrite-용액, 37°C의 40ml 증류수, 5ml trizmal-용액, pH 7.6, 1ml α -naphthyl acetate-용액의 혼합액에 슬라이드를 넣어 37°C에서 30분간 빛을 차단하여 반응시킨 후 hematoxilin-용액에서 2분간 염색하여 관찰하였다.

혈청 · 소변 중의 칼슘함량 측정

실험동물은 140~150g인 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 선정하여 대사장에 2마리씩 넣어 각 실험군당 4~6마리로 하여 기본식으로 사육하였다. 실험군에는 PBS로 희석된 0.5% murine albumin에 vitamin D₃ 화합물을 희석시켜 1,25(OH)₂D₃는 0.25 μ g/kg, 1,25(OH)₂-23ene-D₃는 0.5, 2.5, 12.5 μ g/kg씩 매일, 7일 동안 복강주사하였고 대조군에는 0.5% murine albumin만을 복강주사하였다. 식이섭취량은 매일, 체중은 실험기간 동안 3번을 일정한 시간에 측정하였다. 소변은 매일 채취하여 냉동(-40°C) 보관하였고 혈액은 실험기간 종료후 12시간을 굶긴 뒤 diethylether로 마취시킨 뒤 원심분리하여 얻은 혈청을 냉동(-40°C) 보관하여 사용하였다. 혈청과 소변의 총 칼슘 함량은 Sarkar와 Chauhan의 방법에 따라²⁴⁾ o-cresolphthalein과 결합하여 생성되는 복합체의 색을 spectrophotometer (Gilfold 2600)를 사용하여 565nm에서 측정하였다. 실험결과는 통계처리하여 실험군당 평균치와 표준편차를 구하였고 t-test로 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

U937 세포성장에 대한 비타민 D₃ 유도체의 저해 효과

여러 종류의 malignant cell line²⁵⁾, 정상적인 monocyte와 macrophage²⁶⁾, 활성화된 T임파구²⁵⁾ 등에서 1,2(OH)₂D₃ 수용체의 발견과 더불어서 이들 세포의 증식과 분화에 관련된 연구는 1,25(OH)₂D₃가 칼슘과 인의 대사 조절 이외에도 다양한 생물학적 기능을 조절하는 데 관여되어 있음이 밝혀졌다. 따라서 1,25(OH)₂D₃는 여러 가지 증식성 질병 (proliferative disease)의 치료에 강

한 효과가 있을 것으로 생각되었으나, hypercalcemia, hypercalciuria 및 신장, 심장, 정맥 등에 석회침착을 야기시키는 부작용으로 임상연구에서의 이용 연구가 제한되었다.

따라서 지금은 세포의 증식과 분화조절 기능을 가지면서 칼슘대사에 미치는 활성이 낮은 새로운 1,25(OH)₂D₃ 유도체의 개발에 관심이 집중되고 있다. 본 연구는 이러한 목적으로 개발한 새로운 1,25(OH)₂D₃ 유도체인 1,25(OH)₂-23ene-D₃를 이용하여 조혈세포의 분화에 대한 1,25(OH)₂D₃ 효과를 연구하는 데 모델로서 많이 이용된 U937 세포 (human monoblastic leukemia cell line)의 증식억제와 분화촉진 효과 및 쥐의 칼슘대사에 미치는 영향을 1,25(OH)₂D₃와 비교 검토하였다.

U937 세포에 대한 5가지 비타민 D₃ 유도체의 성장저해 효과에 대한 실험결과는 Fig. 2와 같다. 사용된 5가지 비타민 D₃ 유도체 중에서 23번 탄소와 24번 탄소 사이에 2중결합을 가진 1,25(OH)₂-23ene-D₃는 실험 전 농도구간 (10⁻¹¹M~10⁻⁷M)에서 control culture (배양액에 비타민 D₃ 화합물을 넣지 않은 경우)에 비해 상당한 저해효과를 나타내고 있으며, 특히 10⁻¹⁰M과 10⁻⁷M의 농도에서 control culture에 비해 각각 80%, 95%의 성장저해 효과를 나타내고 있다. 또한 대조군인 1,25(OH)₂D₃도 전 농도구간 (10⁻¹¹M~10⁻⁷M)에서 저해효과를 보여 주고 있으며, 이는 1,25(OH)₂D₃가 U937 세포성장에 저해효과가 있음을 밝힌 Olsson 등²⁷⁾의 연구결과와 일

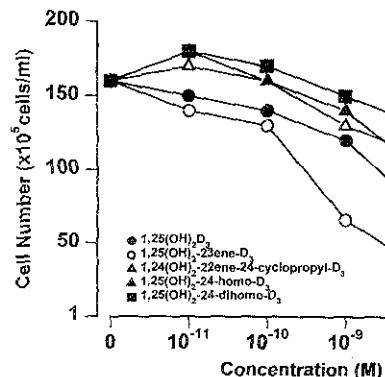


Fig. 2. Dose-response of vitamin D₃ analogs on cellular proliferation of U937 cells.

U937 cells were seeded at 1×10^5 cells/ml and incubated for 4 days with various concentration (10⁻¹¹M~10⁻⁷M) of vitamin D₃ analogs. Each point represents the mean of three experiments with triplicate dishes. 1,25(OH)₂D₃ (●); 1,25(OH)₂-23ene-D₃ (○); 1,24(OH)₂-22ene-24-cyclopropyl-D₃ (△); 1,25(OH)₂-24a-homo-D₃ (▲); 1,25(OH)₂-24a-dihomo-D₃ (■). Control culture contained $1.6 \times 10^5 \pm 3.6 \times 10^4$ (±SD) cells/ml.

Table 1. Effect of 1,25(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂-23ene-D₃ on cellular proliferation and differentiation of U937 cells

Analog	Inhibition of cellular proliferation		
	ED ₅₀ (×10 ⁻¹⁰ mol/L)		
1,25(OH) ₂ D ₃	6.3	25	12
1,25(OH) ₂ -23ene-D ₃	0.5	0.53	0.6

ED₅₀ represents effective dose achieving 50% response (ED₅₀) calculated from dose-response curve shown on Figs. 2 and 4 ; NBT, nitroblue tetrazolium ; NSE, nonspecific esterase.

치한다. 1,25(OH)₂-23ene-D₃는 50%의 저해효과를 얻는 데에 필요한 농도 (ED₅₀)가 6.3 × 10⁻¹⁰ M이며 (Table 1), 이는 1,25(OH)₂D₃의 0.5 × 10⁻¹⁰ M에 비해 12배 이상의 저해효과가 있음을 나타낸다. 반면에 22번 탄소와 23번 탄소 사이에 이중 결합이 있고 side-chain에 cyclopropyl(기를 가지면서 25번 위치의 수산기가 24번 위치로 바뀐 1,24(OH)₂-22ene-24-cyclopropyl-D₃와 side-chain에 탄소가 1개 추가된 1,25(OH)₂-24-homo-D₃ 및 역시 side-chain에 탄소가 2개 추가된 1,25(OH)₂-24-dihomo-D₃는 1,25(OH)₂D₃에 비해 U937 세포성장 저해활성이 낮음을 보여주고 있다. 따라서 다음 단계의 실험에서는 U937 세포 성장에 대한 저해효과가 큰 1,25(OH)₂-23ene-D₃만을 이용하여 대조군인 1,25(OH)₂D₃와 비교 검토하였다.

정상 myeloid colony-forming cells의 clonal 성장에 대한 1,25(OH)₂-23ene-D₃ 영향

비타민 D₃ 화합물을 임상에 직접 이용하기 위해서는 정상 골수성 간세포 (normal myeloid stem cell) 성장에 대한 이들 화합물의 영향을 먼저 검토해야 한다. 정상 전구세포에 유해한 화합물은 임상에 이용할 수 없기 때문이다. 따라서 본 실험에서는 granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)의 존재 하에서 granulocyte macrophage-colony forming cell (GM-CFC)로 자라는 것으로 알려진 사람의 골수성 간세포의 clonal growth에 대한 1,25(OH)₂-23ene-D₃의 영향을 soft agar 배지에서 관찰하였다 (Fig. 3). 1,25(OH)₂-23ene-D₃와 1,25(OH)₂D₃는 정상인의 골수 중의 GM-CFC의 clonal growth를 저해하지 않았으며 오히려 control culture (배양액에 비타민 D₃ 화합물을 넣지 않은 경우)에 비해 GM-CFC의 clonal growth를 약간 증가시켰다.

세포분화에 대한 1,25(OH)₂-23ene-D₃ 영향

사람의 골수성 간세포 (human myeloid stem cell)가 macrophage로 분화할 때와 마찬가지로 U937 세포가

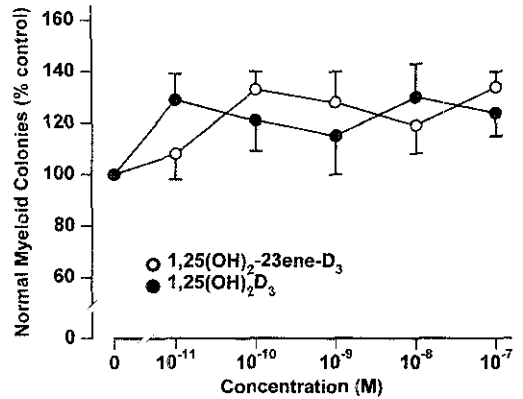


Fig. 3. Effect of 1,25(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂-23ene-D₃ on clonal proliferation of normal human myeloid colony-forming cells.

Each point represents the mean of two experiments with triplicate dishes. Results are expressed as percentage of control cells not exposed to vitamin D₃ analog. 1,25(OH)₂D₃(●) ; 1,25(OH)₂-23ene-D₃(○). All cultures were grown in the presence of maximally stimulating concentration of recombinant GM-CSF (200pm/L). Control culture contained a mean 163 ± 22 (±SD) colonies.

monocyte/macrophage로 분화할 때도 세포형태 변화와 함께 non-specific esterase (NSE) 발현 및 nitroblue tetrazolium (NBT)를 환원시키는 superoxide를 생성하게 된다. 본 연구에서는 U937 세포 분화에 대한 1,25(OH)₂-23ene-D₃의 영향을 검토하기 위해 세포형태 변화 확인, NSE 활성 및 NBT 환원능 검사를 하였으며 그 결과는 Fig. 4A, Fig. 4B 및 Table 1과 같다. 1,25(OH)₂-23ene-D₃는 전 실험 농도구간 (10⁻¹¹M~10⁻⁷M)에서 control culture (배양액에 비타민 D₃ 화합물을 넣지 않은 경우)에 비해 상당한 분화효과가 있음을 보여주며, 10⁻¹¹M에서는 70% 이상 10⁻⁷M에서는 90% 이상의 분화효과를 나타내고 있다. 1,25(OH)₂D₃도 전 농도구간 (10⁻¹¹M~10⁻⁷M)에서 농도에 따른 분화효과를 나타내며, 이는 U937 세포가 1,25(OH)₂D₃에 의해 mono-cyte/macrophage와 유사한 세포로 분화한다는 Olsson 등¹²⁾의 연구와 일치한다. 또한 두 화합물의 분화효과를 비교하

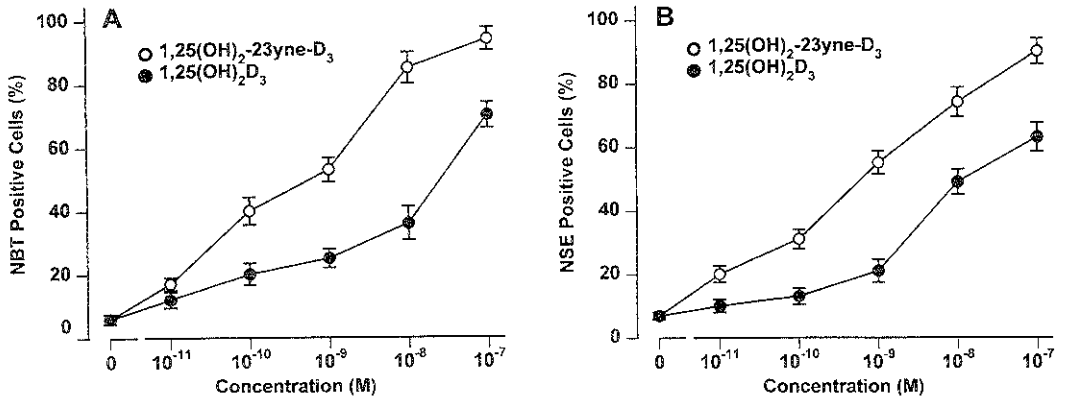


Fig. 4. Dose-response of 1,25(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂-23ene-D₃ on differentiation of U937 cells.

U937 cells (10⁶ cells/ml) in RPMI 1640 with 10% FCS were incubated for 5 days in the presence of vitamin D₃ analog. At the end of culture, cells were stained for ability of NBT reduction (A) and NSE activity (B). Results are expressed as a percentage of U937 cells differentiated by 1,25(OH)₂D₃ (●) and 1,25(OH)₂-23ene-D₃ (○). Each point represents the mean of three experiments. Control cells had less than 5% of NBT and NSE-positive cells.

면 50%의 분화효과를 얻는 데에 필요한 농도 (ED₅₀)가 1,25(OH)₂-23ene-D₃는 NBT 환원능 검사와 NSE 활성 검사에서 각각 25×10^{-10} M, 12×10^{-10} M로 나타났으며 1,25(OH)₂D₃는 각각 0.53×10^{-10} M, 0.6×10^{-10} M로서 1,25(OH)₂-23ene-D₃는 1,25(OH)₂D₃에 비해 20배 이상의 U937 세포분화 효과가 있음을 알 수 있다 (Table 1). 한편 분화에 따른 세포형태 변화는 Fig. 5와 같다. 배양 5일 후 cytospin한 세포의 Giemsa 염색결과는 세포 원형 질막의 ruffling 현상이 나타나며 N/C비 (nuclear-cytoplasmic ratio)가 감소하면서 비분화세포에 비해 세포의 크기가 커진 것을 알 수 있다 (Fig. 5). 분화에 따른 세포형태의 변화와 더불어서 배양 말기에는 위족 (pseudopodia)를 만들어서 배양집시에 부착하는 현상을 나타내기도 하였으며, 농도에 따라 부착세포수가 점차 많아지는 것을 확인할 수 있었다 (결과는 나타내지 않았음). 분화에 따른 이러한 세포형태 변화는 1,25(OH)₂D₃ 보다는 1,25(OH)₂-23ene-D₃를 첨가한 배양액의 세포에서 더욱 뚜렷하게 나타나고 있으며, 따라서 이러한 결과로 미루어 보아서 1,25(OH)₂-23ene-D₃는 U937 세포를 monocyte/macrophage로 분화시킴을 알 수 있다.

칼슘대사에 미치는 영향

칼슘대사에 미치는 1,25(OH)₂-23ene-D₃의 영향을 *in vivo*에서 쥐를 이용하여 검토하였다 (Table 2). 1,25(OH)₂-23ene-D₃는 0.5 μg/kg/day, 2.5 μg/kg/day, 12.5 μg/kg/day씩 1,25(OH)₂D₃는 0.25 μg/kg/day씩 7일 동안 복용 투여하였으며 소변 중의 칼슘배설량은 매일 측정

하였고 혈청 칼슘농도는 실험 마지막에 측정하였다. 1,25(OH)₂D₃ 투여량 (0.25 μg/kg/day)은 투여한 후 2~3일 뒤에 나타나는 hypercalcemia, hypercalciuria에 견딜 수 있는 최대량이다. Table 2에서 보는 바와 같이 1,25(OH)₂D₃ 0.25 μg/kg/day 투여군은 비투여군에 비해 소변 중 칼슘배설량이 6배 이상 증가한 반면에 1,25(OH)₂-23ene-D₃ 0.5 μg/kg/day, 2.5 μg/kg/day 투여군은 소변 중 칼슘배설량에 거의 영향을 끼치지 않음을 알 수 있으며, 12.5 μg/kg/day 투여군에서는 배설량이 증가하였으나 1,25(OH)₂D₃ 0.25 μg/kg/day 투여군의 배설량에는 훨씬 미치지 못하였다. 비슷한 유형의 결과가 혈청 칼슘농도에서도 나타나고 있다. 1,25(OH)₂D₃ 0.25 μg/kg/day 투여군은 혈청 칼슘농도가 비투여군에 비해 33% 증가한 반면에 1,25(OH)₂-23ene-D₃ 0.5 μg/kg/day, 2.5 μg/kg/day 투여군은 영향을 끼치지 않고 있으나, 12.5 μg/kg/day 투여군에서만 14%의 혈청 칼슘농도 증가를 보이고 있다. 2가지 화합물을 투여한 후에도 식이섭취량이나 체중증가량에는 변화가 없었다 (결과는 나타내지 않았음).

이와 같은 결과로 미루어 보아서 소변 중 증가한 칼슘배설량이나 혈청 중 증가한 칼슘농도로 측정할 칼슘대사에 미치는 1,25(OH)₂-23ene-D₃ 영향은 1,25(OH)₂D₃에 비해 50배 이상 활성이 낮음을 알 수 있다.

1,25(OH)₂-23ene-D₃가 1,25(OH)₂D₃에 비해 U937 세포 증식억제와 분화촉진에 대한 효과는 훨씬 크면서 칼슘대사에 미치는 영향이 낮은 이유를 밝히기 위해 현재 몇 가지의 연구가 진행 중이다. 첫째, U937 세포와 소장상피 세포내의 1,25(OH)₂D₃ 수용체에 대한 1,25

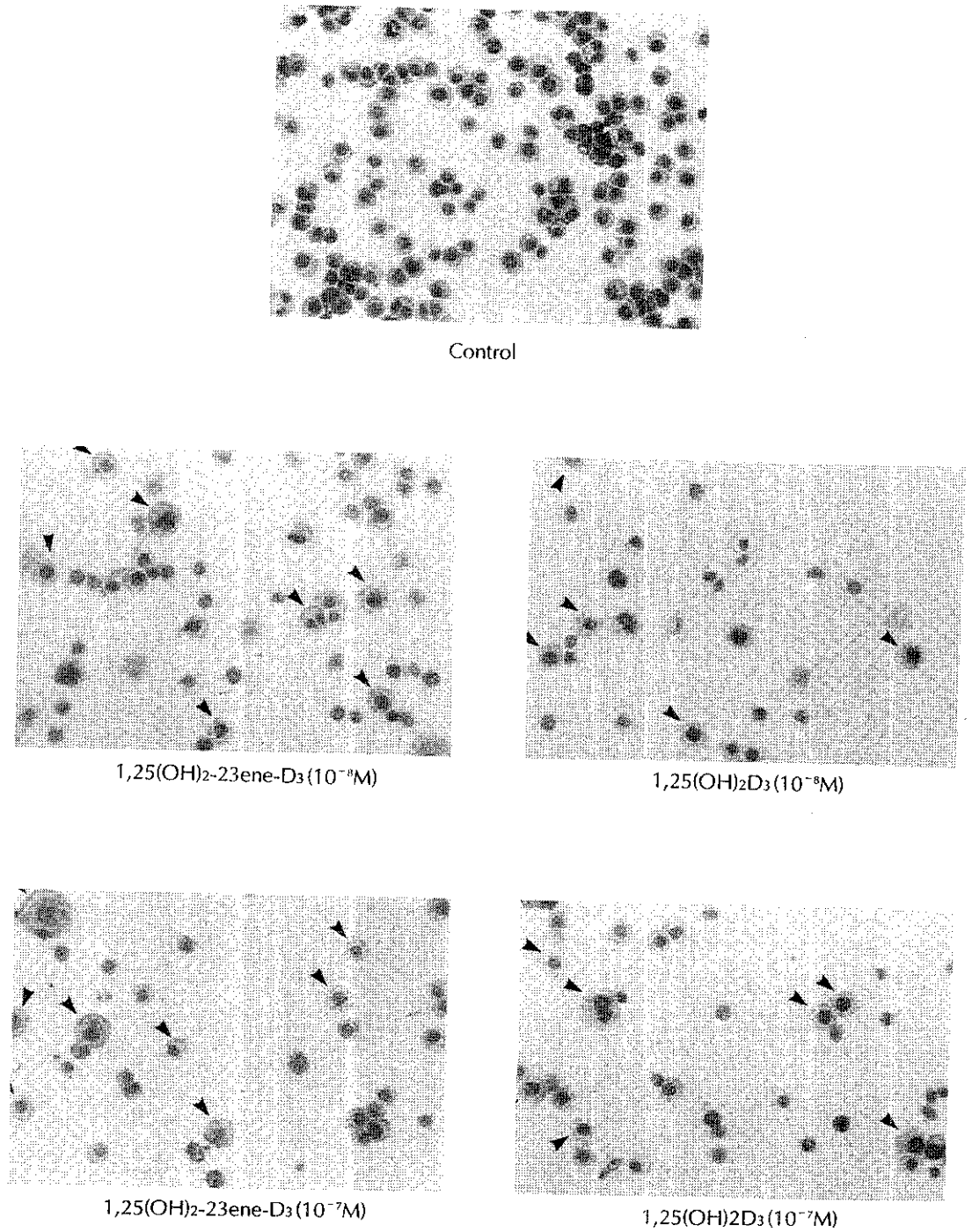


Fig. 5. Morphologic change of the U937 cells induced by 1,25(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂-23ene-D₃. Cells (10⁵cells/ml) in RPMi 1640 with 10% FCS were incubated for 5days in the presence of 1,25(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂-23ene-D₃. Cells were washed in PBS, cytocentrifuged and fixed in methanol and stained with Giemsa for 10min. The smooth and small form of undifferentiated cells were transformed to the ruffled large form(indicated by arrow), and showed decreased N/C ratio in Giemsa staining (× 200).

Table 2. Calcium level in urine and serum after I.P. administration of 1,25(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂-23ene-D₃

Treatment of rats	Dose μg/kg/day i.p. 7×	Calcium in urine μmol/day Mean±SD	P-value	Calcium in serum mmol/l Mean±SD	P-value
Control	—	36.3±7.5		4.94±0.42	
1, 25(OH) ₂ D ₃	0.25	218.3±75.7	<0.001	6.56±0.59	<0.005
1, 25(OH) ₂ -23ene-D ₃	0.5	33.2±9.7	NS	5.04±0.34	NS
1, 25(OH) ₂ -23ene-D ₃	2.5	39.7±10.8	NS	5.14±0.53	NS
1, 25(OH) ₂ -23ene-D ₃	12.5	150.3±38.5	<0.001	5.65±0.51	<0.05

Rats were treated with 1, 25(OH)₂D₃(0.25μg/kg/day) and 1,25(OH)₂-23ene-D₃(0.5, 2.5, 12.5μg/kg/day) intraperitoneally for 7days. Urine was collected daily and serum was obtained at the end of the experiment for the determination of calcium. Calcium concentrations were expressed as μmol/day in urine (N=10-14) or as mmol/L in serum (N=4-6). All treated groups were compared to the group of untreated control rats. NS=not significant.

(OH)₂-23ene-D₃의 결합력을 1,25(OH)₂D₃와 비교하는 것이다. 체내에서 칼슘의 동적 평형은 주로 소장에서 칼슘흡수를 통해 이루어지며, 이때 1,25(OH)₂-D₃가 세포내의 수용체와 결합하여 칼슘흡수를 조절하게 된다²⁶. 수용체에 대한 상대적인 친화력을 밝히는 이 연구에서 1,25(OH)₂-23ene-D₃의 친화력이 크게 나타나길 기대하는 바이다. 둘째, 혈장내의 비타민 D 결합단백질(vitamin D binding protein, DBP)에 대한 결합력을 1,25(OH)₂D₃와 비교하는 것이다. 혈액내에서 비타민 D 운반은 DBP에 의해 이루어지며²⁷, 이 단백질의 역할은 불안정한 비타민 D 대사물의 보호, 용해성이 낮은 물질의 운반과 조직으로 수송 등이다.

현재 진행 중인 이러한 연구결과는 백혈병, 건선 등의 질병과 류마티스성 관절염과 같은 자가면역 질환의 치료에 부분적인 치료제로서의 사용가능성을 결정하게 될 것이며, 또한 비타민 D₃ 화합물의 작용기전을 이해하는 데도 도움이 되리라 생각한다. 한편 hypercalcemia를 유발하지 않으면서 항악성 효과의 특이성이 큰 새로운 비타민 D₃ 유도체의 개발을 위한 지속적인 노력이 필요하다고 생각된다.

요 약

1,25(OH)₂-23ene-D₃는 23번과 24번 탄소 사이에 이중결합을 가진 새로운 비타민 D₃ 유도체로서 이 화합물의 항악성 효과를 검토하기 위하여 *in vitro*에서 U937 세포(human histiocytic lymphoma cell line)의 증식과 분화에 대한 효과 및 *in vivo*에서 쥐의 칼슘대사에 미치는 영향을 관찰하였다. 본 연구에서 1,25(OH)₂-23ene-D₃의 효과는 비타민 D₃의 자연 대사물인 1α, 25-dihydroxycholecalciferol [1,25(OH)₂D₃]과 비교 검토하였다. 1,25(OH)₂-23ene-D₃는 1,25(OH)₂D₃에 비해 U937 세

포 증식억제 및 분화촉진에 강한 효과가 있음이 확인되었고, 특히 superoxide 생성과 nonspecific esterase (NSE) 활성으로 측정된 세포의 분화촉진 효과는 1,25(OH)₂D₃에 비해 20배 이상 높은 것으로 나타났다. 또한 1,25(OH)₂-23ene-D₃로 처리된 U937 세포는 N/C 비 감소, 배양말기에 부착세포수 증가 등의 현상을 나타내면서 분화에 따른 세포형태 변화를 더욱 뚜렷히 보였다. 쥐에 이들 비타민 D₃ 유도체를 투여한 결과 1, 25(OH)₂-23ene-D₃는 hypercalcemia와 hypercalciuria를 야기시키는 활성이 1,25(OH)₂D₃에 비해 50배 이상 낮음이 확인되었다. 1,25(OH)₂-23ene-D₃가 칼슘대사에 미치는 활성이 낮으면서 U937 세포의 증식과 분화에 직접적인 강한 효과를 가지고 있음이 밝혀짐에 따라 앞으로 백혈병 환자나 건선(psoriasis)등의 피부성 질환을 가진 환자의 임상연구에 이용이 가능한 화합물이라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공보과제 연구비에 의하여 수행되었음.

문 헌

1. Norman, A. W., Roth, J. and Orch, L. : The vitamin endocrine system : steroid metabolism, hormone receptors, and biological response. *Endocrine Rev.*, **3**, 331 (1982)
2. Frampton, R. J., Suva, L. J., Eisman, J. A., Findlay, D. M., Moore, G. E., Moseley, J. M. and Martin, T. J. : Presence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in established human cancer cell lines in culture. *Cancer Res.*, **42**, 1116 (1982)
3. Provvedini, D. M., Manolagas, S. C. and Deftos, L. J. : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human

- leukocyte. *Science*, **221**, 1181 (1983)
4. Tsoukas, C. D., Provvedini, D. M. and Manolagas, S. C. : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ : a novel immunoregulatory hormone. *Science*, **224**, 1438 (1984)
 5. Rigby, W. F. C., Noelle, R. J., Kraus, K. and Fanger, M. W. : The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human T lymphocytes activation : a cell cycle analysis. *J. Immunol.*, **135**, 2279 (1985)
 6. Tobler, A., Miller, C. W., Norman, A. W. and Koeffler, H. P. : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ modulate the expression of a lymphokine posttranscriptionally. *J. Clin. Invest.*, **81**, 1819 (1988)
 7. Iho, S., Takahashi, T., Kura, F., Sugiyama, H. and Hoshino, T. : The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on *in vitro* immunoglobulin production in human B cells. *J. Immunol.*, **236**, 4427 (1986)
 8. Lemire, J. M., Adams, J. S., Kermani-Arab, V., Bakke, A. C., Sakai, R. and Jordan, S. C. : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppress human T helper/inducer lymphocyte activity *in vitro*. *J. Immunol.*, **134**, 3032 (1985)
 9. Provvedini, D. M., Deffos, L. T. and Manolagas, S. C. : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promotes *in vitro* morphological and enzymatic changes in normal human monocytes consistent with their differentiation into macrophage. *Bone*, **7**, 23 (1986)
 10. Mangelsdorf, D. J., Koeffler, H. P., Donaldson, C. A., Pike, J. W. and Haussler, M. R. : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) : receptor-mediated maturation to macrophage-like cells. *J. Cell Biol.*, **98**, 391 (1984)
 11. Tanaka, H., Abe, E., Miyaura, C., Kuribayashi, T., Konno, K., Nishii, Y. and Suda, T. : Alpha,25-dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukemia cell line (HL-60). The presence of a cytosol receptor and induction of differentiation. *Biochem. J.*, **204**, 713 (1984)
 12. Olsson, I., Gullberg, U., Ivhed, I. and Nilsson, K. : Induction of differentiation of the human histiolytic lymphoma cell line, U-937 by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res.*, **43**, 5862 (1983)
 13. Honma, Y., Hozumi, M., Abe, E., Konno, K. and Fukushima, M. : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and alpha-hydroxyvitamin D₃ prolong survival time of mice inoculated with myeloid leukemia cells. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 201 (1983)
 14. Eisman, J. A., Barkla, D. H. and Tutton, P. J. : Suppression of *in vivo* growth of human cancer solid tumor xenografts by 1 α ,25-dihydroxyvitamin-D₃. *Cancer Res.*, **47**, 21 (1987)
 15. Sato, T., Takusagawa, K., Asoo, N. and Konno, K. : Antitumor effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Exp. Med.*, **138**, 445 (1982)
 16. Bower, M., Colston, K. W., Stein, R. C., Hedldy, A., Gazet, J. C., Ford, H. T. and Coombes, R. C. : Topical calcitriol treatment in advanced breast cancer. *Lancet*, **337**, 701 (1991)
 17. Mehta, A. B., Kumaran, T. D. and Marsh, G. W. : Treatment of advanced myelodysplastic syndrome with alfalciferol. *Lancet*, **2**, 761 (1984)
 18. Richard, C., Mazo, E., Cuadrado, M. A. and Zubizarreta, A. : Treatment of myelodysplastic syndrome with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Am. J. Hemat.*, **23**, 175 (1986)
 19. Morimoto, K., Yoshikawa, Y., Kozuka, Y., Kitano, S., Imanaka, K., Fukuo, E. K. and Kumahara, Y. : An open study of vitamin D₃ treatment in psoriasis vulgaris. *Br. J. Derm.*, **115**, 421 (1986)
 20. Koizumi, T., Nakao, Y., Ishizuka, S., Oshida, J., Hara, N., Ikekawa, N. and Fijita, T. : Novel vitamin D₃ derivatives, 26-home- Δ^{22} -dehydro-1 α ,25 (S)-dihydroxyvitamin D₃ and 26-homo- Δ^{22} -dehydro-1 α ,25 (R)-dihydroxyvitamin D₃. *Archs. Biochem. Biophys.*, **276**, 310 (1990)
 21. Tanaka, Y., Bush, K. K., Eguchi, T., Ikekawa, N., Taguchi, T., Kobayashi, Y. and Higgins, P. J. : Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analog on butyrate-induced differentiation of HT-29 human colonic carcinoma cells and on the reversal of the differentiated phenotype. *Archs. Biochem. Biophys.*, **276**, 415 (1990)
 22. Brown, A. J., Finch, J. L., Lopez-Hilker, S., Dusso, A., Ritter, C., Pernalet, N. and Slatopolsky, E. : New active analogues of vitamin D with low calcemic activity. *Kidney Int. Suppl.*, **29**, 22 (1990)
 23. Munker, R., Norman, A. W. and Koeffler, H. P. : Vitamin D compounds : effect on clonal proliferation and differentiation of human myeloid cell. *J. Clin. Invest.*, **78**, 424 (1986)
 24. Sarkar, B. C. and Chauhan, U. P. S. : A multiple-wavelength selector for a continuous spectrophotometric column monitoring system. *Anal. Biochem.*, **20**, 155 (1967)
 25. Bhalla, A. K., Amento, E. P., Clemens, T. L., Holick, M. F. and Krane, S. M. : Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells : presence in monocyte and induction in T lymphocyte following activation. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **57**, 1308 (1983)
 26. Haddad, J. G. : Transport of vitamin D metabolites. *Clin. Orth. Rel. Res.*, **142**, 249 (1979)
 27. Haussler, M. R. : Vitamin D receptors : nature and function. *A. Rev. Nutr.*, **6**, 527 (1986)

(1994년 10월 27일 접수)