

뼈 세포의 효소 및 무기질대사에 미치는 PTH와 Calcitonin 호르몬의 효과와 인산화 반응*

정 차 권 · 하 경 선

한림대학교 식품영양학과

Effect of Parathyroid Hormone and Calcitonin on the Enzyme and Mineral Metabolism of Bone Cells and Phosphorylation

Chung, Cha Kwon · Ha, Kyung Sun

Department of Food and Nutrition, Hallym University, Chunchon, Korea

ABSTRACT

Osteoblast(OBL) cells were isolated from ICR Swiss neonatal mouse calvarial tissues and cultured in a CO₂ incubator with minimum essential medium(MEM) containing 0.25 % BSA. The cells were cultured for 7 days and were treated with bovine parathyroid hormone(bPTH, 1-34) and calcitonin(CT). Enzyme activities related to mineral metabolism and other biochemical actions within the bone cells including protein phosphorylation were investigated.

In other experiments using cultured calvarial bone tissues, hormones were treated for 24, 48, 72 or 96 hours. The activities of β -glucuronidase enzymes involved in bone collagen synthesis and mineral deposits were increased by 8 % with bPTH and were inhibited with CT treatment, while those were 67 % increase when treated with bPTH and CT together.

On the other hand, alkaline phosphatase(AP) activities were inhibited by PTH hormone at all the time courses observed. Protein phosphorylation reaction in OBL was mediated by bPTH, cAMP and ionized Ca. Phosphorylation was observed in different cell fractions including homogenate, membrane and cytosol. The number of proteins phosphorylated by PTH, cAMP, and Ca were 10, 5, and 9, respectively. Most of the protein kinases(PKs) were existed in cytosolic compartment. In membrane fractions, two bPTH-dependent-PKs(70K, 50K Da) were observed of which 70K Da protein was also Ca-dependent. Most of the cAMP-dependent PKs were regulated via bPTH. 70K, 50K, 5K, 19K, 16K, 10.5K phosphoproteins regulated by Ca share the same pathways as those by bPTH-dependent proteins. Ca seems to regulate PK activities differently from cAMP.

KEY WORDS : β -glucuronidase · alkaline phosphatase · osteoblast bone cells · parathyroid hormone · calcitonin.

서 론

뼈는 무기물의 침착과 흡수가 계속적으로 일어나고 있는 곳이며, 어린이에 있어서는 아골세포(osteoblast, OBL)의 활동이 왕성하여, 무기물 침착이 일어나는 반면, 노년기에는 파골세포(osteoclast, OCL)의 활동이 왕성하여 뼈의 흡수가 지배적으로 나타난다. 노인들에게는 계속된 뼈의 흡수작용과 Ca 섭취부족, 운동부족, 호르몬 작용, 단백질 및 무기물을 비롯한 전체적인 영양소의 섭취 부족, 기타 생체대사 기능의 저하 등으로 인하여 뼈구성 미네랄의 절대량이 감소하여 골다공증(osteoporosis) 현상이 나타나게 된다.

많은 임상 연구에서 골다공증 환자들의 Ca 섭취는 대조군보다 낮은 것으로 보고되고 있으며¹⁻⁵⁾, 식이적 Ca 섭취는 노년기의 골다공증 예방에 있어서 타 요인보다도 가장 중요한 요인으로 간주되고 있다. 또한 여성의 hip 부위 골절율은 Ca 섭취가 높은 지역에서는 일반 대조군에 비해 50%의 감소현상을 보임이 조사 결과 보고된 바 있다⁶⁾. 건강한 성인에게 있어서 무기질 석회화 작용과 무기물 흡수 작용의 비율은 균형을 이루고 있다. 이 균형은 직접적으로는 혈액과 세포외액의 Ca와 P의 수준에 의존하고 있다.

인체에는 매일 약 600~700 mg의 Ca이 뼈에 유입되고 또 뼈로부터 유출되어 이동한다. 이러한 유출 Ca의 양은 약 5 mmol 정도로 추측되며, 이와 대등한 양이 뼈의 생성과 더불어 뼈에 침착되게 된다. 약 10-15%의 뼈조직 표면이 재생 과정을 거치는데 대부분 주골(trabecular bone)이며, 피골(cortical bone)은 전체 뼈의 거의 3/4를 차지하고 있으나, 대사활동은 주골에 비해 1/10 정도로 미약하다. 이 이동의 조절기능은 PTH와 1,25(OH)₂ vit D₃가 뼈의 흡수기능을 그리고 cacitonin(CT)이 흡수 억제 기능을 함으로써 상호조절되고 있다고 알려져 왔다.

Ca의 섭취와 유즙의 성분에 대한 연구에서 식이칼슘의 수준에 관계없이 유즙에 포함된 칼슘 함량은 거의 변화하지 않는다는 보고가 있으나^{7,8)}, 비타민 D의 투여에 의한 Ca와 P의 조성 변화에 대해서는 구체적인 연구가 미흡한 실정이다. 특히 현재 우리나라의 영아 칼슘 섭취량은 1일 권장량⁹⁾인 500 mg의 절반 정도에 불과한 실

정이며 성인의 섭취량도 1992년 평균 538 mg으로¹⁰⁾ 권장량 700 mg을 훨씬 밑돌고 있는 실정임을 감안하면 Ca영양에 대해 실용적인 연구의 필요성을 절감하게 된다. 인유로부터의 Ca 섭취량도 권장량에 미달됨이 보고되고 있다^{11,12)}. Ca은 그 섭취량, 성장율, 기타 무기물의 섭취량, 질병상태 등에 따라 호르몬이 그 대사활동을 조절함으로써 인체내 균형을 유지해 주고 있으나 Ca 저장량이 빈약한 뼈는 골질이 쉽게 나타난다. PTH는 노를 통한 Ca 배출을 억제하며 phosphate의 배출을 증가시켜, 결과적으로 혈장 P의 수준 상승을 억제시키고 Ca 수준이 정상적으로 회복될 때까지 지속적인 효과를 나타낸다.

뼈의 생성과 흡수에 대한 PTH 호르몬의 역할에 대해서 여러가지 상반된 고찰들이 보고되고 있다. Ca의 주요 조절 호르몬인 PTH가 종래에는 뼈의 흡수에만 관여하는 것으로 알려져 왔으나^{13,14)}, PTH가 collagen 생성을 촉진하며^{15,16)}, 형태학적인 고찰에 의하면 새로운 뼈 조직의 생성이 촉진된다는 Tam¹⁷⁾ 등의 보고에 이어 PTH의 기능이 뼈의 생성에도 관여함이 밝혀지고 있다¹⁸⁾. PTH의 target cell인 OBL이 OCL의 뼈 흡수작용에 필요한 것으로 밝혀지면서 PTH에 대한 이들 뼈세포들 간의 상호작용에 대한 구체적인 규명이 필요하게 되었다. PTH는 생체내 Ca와 phosphate 균형 유지에 중요한 역할을 수행하고 있다. 이 역할은 주로 뼈와 신장을 통한 Ca와 phosphate의 조절 작용을 통해 이루어진다. PTH는 OCL의 작용을 통하여 Ca을 뼈의 기질로부터 유출시켜 혈액내의 Ca 농도를 유지한다¹⁹⁾. 이 작용의 유지를 위해 PTH는 adenylate cyclase 작용을 촉진함으로써 신장에서의 phosphate와 bicarbonate의 배출을 증가시키고 Ca의 재흡수를 증가시킨다.

PTH의 작용은 단일 펩타이드로 된 세포막 수용체와 결합하여 나타나는데, adenylate cyclase와 더불어 cAMP가 증가되는 연속반응이 나타나고 세포내 Ca농도의 증가, kinase에 의한 세포내 효소 및 단백질의 인산화 등 일련의 반응이 나타나게 된다. cAMP는 2개의 조절 소단위와 촉매 소단위로 이루어진 protein kinase (PK)와 결합하며 (4 cAMP+R₂C₂→R₂(cAMP)₄+C₂). 이 때 생성된 C는 활성화된 형태로 각종 단백질에 존재하는 serine, threonine의 ATP의 gamma phos-

phate를 제공하여 단백질을 인산화 시킨다²⁰⁻²²). PTH에 의한 세포내의 cAMP증가가 cAMP-dependent protein kinase의 활성을 촉진하고 특수한 단백질의 인산화를 촉진시키는 것이 보고된 바 있는데²³⁾²⁴⁾, 인산화된 단백질을 규명함으로써 PTH에 의한 생리적 중요성을 확인할 수 있는 방법이 될 수 있다. 세포내에서 일어나는 인산화 반응은 생명체의 기능 유지에 필수적인 작용이다. 이 반응은 탄수화물, 지방대사, 효소의 활성, 이온 운반, 스테로이드의 합성, 유전자 기능, 세포 성장과 증식 등에 관여하고 있다. 그러나 이런 반응들은 대개 연속적인 반응에 의해 나타나게 되며, 매개체를 수반하는 것이 특징이다.

본 연구에서는 뼈세포 내에서의 인산화 기작이 부갑상선 호르몬에 의해 일어나며 그 후속 반응이 cAMP와 Ca에 의해서도 매개되고 있다는 점을 규명하고자 시도하였다. 또한 본 연구에서는 생쥐의 뼈세포 및 조직 배양을 통하여 무기물대사에 관여하는 β -glucuronidase와 alkaline phosphatase(AP) 효소 및 collagen의 합성, 그리고 PTH 호르몬, cAMP, Ca에 의한 인산화 반응 등을 고찰하였다.

재료 및 방법

1. 뼈세포의 배양

생후 3일된 ICR Swiss mouse의 두개관(calvariae)으로 부터 collagenase(type I, 1.25mg/dl) digestion 방법으로 아골세포를 추출하였다. 이때 최초 15분간 추출한 것은 fibroblast에 속한 것이므로 버리고, 그 후 매 20분간 추출한 것은 모아서 10 % fetal calf serum을 포함한 Minimum Essential Medium (MEM)에 배양하고 매 48 시간마다 배양액을 교환하였다. 이때 배양 조건은 5% CO₂, 37°C, 습도 90~95 %를 유지하였다.

2. 뼈조직의 배양

생후 3일된 half-calvariae를 0.25 % BSA를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)에 배양하였고 호르몬 처리군은 25 nM/ml의 bovine PTH (bPTH, 1-34)로 처리하고 일정 시간이 경과한

후의 반응을 조사하였다. 뼈 조직은 얼음같이 찬 Dulbecco's phosphate buffer saline(DPBS)로 씻은 후 균질화 하였고, 배양액은 투석 및 냉동건조하여 조직 단백질과 동일한 방법으로 전기영동하였다.

3. 뼈 단백질의 측정

조직 배양에서 얻은 뼈 단백질은 Wheaton glass homogenizer로 100번 정도의 stroke로 균질화하고 이때 10mM Tris buffer로 희석시킨 후 3000 RPM에 10분간 원심분리 하였다. 단백질은 Sigma Coomassie Brilliant Blue G-250을 사용한 Bradford 방법²⁵⁾으로 측정하였고 이때 흡광도는 595 nm에서 측정하였다.

4. β -glucuronidase의 측정

0.05 % BSA를 포함한 0.08 M sodium acetate(pH 3.75) assay buffer에 1.0 mM 4-methylumbelliferone- β -D-glucuronide를 substrate로 첨가 사용하였고 37°C에서 1시간 인큐베이션 시켰다. 이 반응은 0.02 M 2-amino-2-Methyl-1-propanol HCl(pH 10.4)로 중지시켰으며 Farrand A4 (Farrand Optical Co., Inc. New York, NY, USA) fluorometer로 측정하였다.

5. Alkaline Phosphatase(AP)의 측정

100 μ l의 sample을 1275mm test tube에 넣고 100 μ l의 9 mM pNPP(para-Nitrophenyl phosphate)를 포함한 Sigma 221 alkaline buffer를 10초 간격으로 첨가한 후 섞고 37°C에서 10분간 인큐베이션시켰다. 반응을 중지시키기 위해 1.8 ml의 0.1 N NaOH를 각각 가하고, 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 조직의 AP 측정과는 달리 배양액에 유출된 AP를 측정하기 위해서는 phenol red의 탈색이 필요하였다. 탈색을 위해 200 μ l의 배양액과 100 μ l의 charcoal 용액을 섞어 15분간 3000 RPM에서 원심분리하고 이중 100 μ l의 상등액과 100 μ l의 buffer를 사용하였다.

6. Endogenous Protein Phosphorylation

초기 배양 후 7일 경과한 바닥에 가라 앉은 210⁶ Cells을 0.25 % bovine serum albumin(BSA, fraction V)을 포함한 MEM에 최소한 2시간 배양시켰다.

뼈 세포와 무기물 대사에 미치는 호르몬과 인산화 반응

그 후 다시 0.5 mM isobutyl methylxanthine (IBMX)와 0.25 % BSA를 포함한 신선한 MEM으로 교체하고 10분간 배양하였다. 뼈 세포들은 100 ng/ml의 PTH 호르몬으로 2분간 처리시킨 후 즉시 10 mM Tris buffer(pH 7.4, 0.15 M NaCl 포함)로 3번 세척하고 10 mM MES buffer (pH 6.8, 150 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM IBMX, 20 mM NaF 포함)로 Wheaton homogenizer를 사용하여 균질화 시켰다. Bradford 방법에 의하여 35 μ g의 homogenate protein을 정량하고, 나머지는 15,000 \times g에서 15분간 원심 분리하여 20~35 μ g의 protein을 포함한 세포질 분획과 세포막 분획을 25 mM MES, pH 6.8, 1 mM theophylline, 10 mM MgCl₂ 용액을 포함한 10 \times 75 mm test tube에 각각 따로 옮겨 사용하였다. 또한 다른 실험에서는 이 용액 속에 0.5 mM CaCl₂, 10 μ M cAMP, 0.25 μ g phosphatidyl serine 또는 protein kinase에 의한 반응을 검증하기 위하여 50 μ g의 protein kinase inhibitor(PKI)/tube를 추가로 사용하였다.

인산화 반응은 20 μ M(³²P)-ATP(5.5 μ l/tube) 10 μ l을 첨가함으로써 시작시키고 30°C 수조에서 2분간 gentle shaking하며 배양하였다. 반응은 0.05 % pyronin G를 포함한 20 μ l의 SDS-PAGE sample buffer를 첨가함으로써 중지시키고, 즉시 100°C 에서 4~7분간 가열시켰다. Homogenate protein, 세포질 그리고 세포막 분획 등은 각각 동일한 방법에 의해 반응 처리하였다.

7. Intact cell phosphorylation에 관한 실험

Cell culture 상태는 위와 동일한 방법으로 유지되었으나, cell은 phosphate가 전혀 들어 있지 않은 Earl's Balanced Salt용액(pH 7.4)에 gamma ³²P-PO₄ (50 μ Ci/ml)와 함께 50분간 intracellular ATP의 labeling을 위해 배양시켰다. 이 배양 기간중 최종 5분간은 100 ng/ml의 bPTH, 1.0 mM Bt₂ cAMP (dibutyryl cAMP), 또는 100 ng/ml의 PGE₂ 등으로 처리하였다. 배양액을 흡인한 후 남은 cell들은 즉시 얼음같이 찬 10 mM TES, pH 7.4, 20 mM sucrose, 100 mM NaF, 15 mM EDTA 용액으로 3회 세척시켰다. 시료의 기타 처리 방법은 위와 동일한 방법을 사용하

였으며, Noland 등²⁶⁾의 변경된 방법을 대체로 적용하였다.

8. PAGE

Phosphorylation된 protein이 ³²P로 label된 것을 확인하기 위해 slab gel을 이용한 PAGE를 하였다. 10~18 %의 gradient gel을 사용하여 separation gel로 하고, 5 %의 polyacrylamide stacking gel을 사용하였고 20 mamp에서 10시간 동안 분리시켰다. Tracking dye로는 bromophenol blue 를 사용하였고, 단백질의 착색을 위해 0.2 % Coomassie Blue, 7 % glacial acetic acid, 50 % methanol 용액으로 2~5시간 처리하고, 탈색은 20 % methanol과 7 % acetic acid를 사용하였다. 이 때 섬유나 모(virgin wool)를 사용하여 탈색을 가속시켰다.

9. Autoradiography 및 데이터 처리

Gel을 Ampholite로 약 5-10 분간 처리 후 slab 젤 건조기로 진공 흡입 건조시켰다. Kodak X-0 Mat 필름을 5-7 일간 암실에서 젤에 노출시켰다. 데이터 통계 처리는 Student T-test에 의해 5 % 수준에서 (2 tailed) 각 group 간의 통계적 차이를 규명하여 얻고, 데이터는 Mean \pm SEM(Standard Error of Mean)으로 처리하였다.

결 과

뼈의 흡수에 관여하는 것으로 알려진 PTH 호르몬과 이 호르몬에 길항적으로 작용하여 뼈의 흡수를 억제하는 CT의 β -glucuronidase 효소에 대한 효과를 측정하였다. β -glucuronidase는 collagen 등의 골격의 주요 결합조직 형성을 촉매하는 역할을 수행하고 있다. 즉 glucuronic acid의 단백질과의 결합에 의해 연골부위를 형성하는 생화학 반응을 증진시킨다. PTH 호르몬은 Table 1 에서와 같이 β -glucuronidase 효소의 활성을 호르몬처리 96시간 경과후 뼈조직 배양을 통하여 측정된 결과 현저히 증가함(P < 0.02)을 나타냈다. CT 역시 약간의 증가 효과를 나타냈으며(29 %), PTH와 CT를 동시에 투여했을 때는 108 %의 증가를(P < 0.001) 보였다. Specific activity에서 주목할 만한 현상은 조직단

Table 1. β -glucuronidase enzyme activity in the calvarial bone tissue

		PTH	CT	PTH & CT
Control Group	Total	0.30 $\mu\text{M} \pm 0.03$	0.29 $\mu\text{M} \pm 0.04$	0.26 $\mu\text{M} \pm 0.04$
	Specific Activity	14.5 $\mu\text{M} \pm 2.61$	12.30 $\mu\text{M} \pm 2.38$	8.80 $\mu\text{M} \pm 0.53$
Hormone Treated Group	Total	0.43 $\mu\text{M} \pm 0.03$ (*)	0.36 $\mu\text{M} \pm 0.04$	0.52 $\mu\text{M} \pm 0.06$ (**)
	Specific Activity	15.03 $\mu\text{M} \pm 1.72$	12.65 $\mu\text{M} \pm 0.87$	15.20 $\mu\text{M} \pm 0.58$ (**)
T/C Ratio	Total	1.43	1.29	2.08
	Specific Activity	1.04	1.03	1.73

- 1) Half calvariaes were cultured for 96 hours (n=5) in DMEM
- 2) 100 ng/ml PTH and 50 mU/ml CT were used for the hormone treatment
- 3) T/C Ratio indicates total tissue enzyme activity of the hormone treated / hormone untreated control
- 4) 0.5 μl of supernatant was used for the enzyme assay
- 5) * : Significantly different from the control at $P < 0.02$
** : Significantly different from the control at $P < 0.001$
- 6) Data are mean \pm SEM

Table 2. β -glucuronidase enzymes released into the culture medium

		PTH	CT	PTH & CT
Control		1.19 $\mu\text{M} \pm 0.23$	1.20 $\mu\text{M} \pm 0.32$	1.36 $\mu\text{M} \pm 0.17$
Hormone Treated		1.91 $\mu\text{M} \pm 0.04$	1.01 $\mu\text{M} \pm 0.19$	1.81 $\mu\text{M} \pm 0.21$
T/C Ratio		1.58	0.94	1.37

- 1) Half calvariaes were cultured for 96 hours (n=5) in DMEM
- 2) 100 ng/ml PTH and 50 mU/ml CT were used
- 3) T/C Ratio indicates the total medium enzyme activity of the hormone treated / hormone untreated control
- 4) 10 μl of medium was used for the enzyme assay
- 5) No statistical significance was found in the data by Student t-test (2 tailed)
- 6) Data are mean \pm SEM

백질의 생성이 증가하였음에도 불구하고 PTH와 CT를 동시에 투여한 군에서는 대조군에 비해 73%의 증가($P < 0.001$)를 나타내었다는 점이다. 이것은 PTH와 CT호르몬의 상호 작용이 존재하면서 결체조직형성을 촉진하여 뼈의 생성과 흡수의 연속적인 반응을 보이면서 최종적으로는 골격성장에 기여하고 있다는 사실을 증명해 주는 것이라고 사료된다.

Table 2는 뼈조직 배양액(DMEM)에 유출되는 β -glucuronidase를 측정된 결과를 나타낸 것이다. PTH는 이 효소의 생성과 더불어 유출 또한 58%나 증가시켰으나, CT는 효소의 유출을 강력히 억제하는 효과를

나타내었다. 그러나 PTH와 CT를 동시에 투여했을 때는 각각의 중간치에 해당하는 효과 즉, 촉진과 억제효과를 동시에 보였다고 간주되어진다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 조직과 배양액의 전체 효소량은 PTH호르몬 처리시 약간의 증가 현상을 나타내었고, CT는 억제효과를, 그러나 PTH와 CT 동시투여시 현저한 67%의 증가현상이 있음을 보였다. PTH호르몬의 target enzyme에 속하는 alkaline phosphatase를 PTH 호르몬 처리 시간별로 측정하였다(Table 3). 호르몬 처리후 24, 48, 72, 96, 시간대의 T/C 비율(호르몬 처리군의 수치/대조군의 수치)은 각각 0.81, 0.95, 0.96,

뼈 세포와 무기물 대사에 미치는 호르몬과 인산화 반응

Table 3. Alkaline phosphatase enzyme activity in the calvarial tissues

Duration of Hormone Treatment		24 HRS	48 HRS	72 HRS	96 HRS
Total Activity(mM)	Control	0.79±0.25	0.58±0.07	0.78±0.03	0.87±0.05
	PTH Treated	0.64±0.06	0.55±0.04	0.75±0.07	0.67±0.05
T/C Ratio		0.81	0.95	0.96	0.77
Specific Activity (mmol/μg prot.)	Control	0.57±0.05	0.69±0.07	0.82±0.15	0.58±0.06
	PTH Treated	1.41±0.07	0.37±0.03	0.38±0.03	0.38±0.04

(* p<0.05)

- 1) 20 μl of tissue homogenate supernatant was taken to measure AP activity after different durations of PTH hormone treatment
- 2) pNPP was used as a substrate for this enzyme and the enzyme was measured at 410nm
- 3) * Significantly different from the control at p<0.05
- 4) Data are mean ± SEM

Table 4. Alkaline phosphatase enzyme activity in the medium

Duration of Hormone Treatment	A(24HRS)	B(48HRS)	C(72HRS)	D(96HRS)
Control (mM)	0.58 ±0.05	1.31 ±0.17	2.39 ±0.13	3.80 ±0.21
PTH Treated (mM)	0.68 ±0.07	1.58 ±0.14	2.90 ±0.21	3.63 ±0.25
T/C Ratio	1.17	1.21	1.21	0.96

- 1) Enzyme activity was measured in 1 ml of the medium
- 2) Charcoal was used to remove the medium phenol red so as not to interfere with the absorbance of the enzyme
- 3) The sample cocktail was incubated at 37 °C for 20 minutes before measuring at 410nm.
- 4) Data are mean ± SEM

0.77로서 호르몬 처리후 72 시간이 호르몬의 AP합성이 가장 증가하였으나 그후 시간이 경과함에 따라 감소되는 경향을 보였다. 전체 시간대에서 공통적으로 PTH가 AP의 활성을 감소시킨다는 것이었다. Table 4의 대조군에서 보는 바와 같이 뼈조직 배양시간이 경과함에 따라 AP효소의 유출이 급격한 속도로 증가하였고, PTH 처리군에서도 증가의 폭이 72시간까지는 컸다. 그러나 PTH 처리후 96 시간에는 거의 대조군과 비슷한 양상을 나타냈다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 조직과 배양액의 전체 AP 효소량을 분석했을 때 조직속의 AP가 거의 대부분을 차지하고 있는 것에 비해 배양액의 AP는 매우 낮은 비율을 나타내었다. 역시 전체 효소는 시간경과에 따라 증가 현상을 보였으나 72시간대에 PTH 호르몬의

효과가 가장 극대치를 보였고 그 후 감소하였다. PTH 호르몬에 의해 인산화 반응을 나타낸 단백질을 SDS-PAGE에 의해 규명하였다. 이때 생쥐의 아골세포 추출, 배양하여 PTH로 처리후 그 효과가 가장 극대치로 보이는 72시간동안 배양추출한 단백질을 사용하였다. Table 5는 PTH에 의해 인산화되는 각각 다른 10가지 단백질(95K, 70K, 50K, 42K, 35K, 23K, 19K, 16K, 11.5K, 10.5K)이 아골세포속에 존재함을 나타내었다. cAMP에 의해 인산화되는 단백질은 5 가지였으며 50K, 35K, 23K, 19K, 16K Da 단백질중 35K Da 단백질은 세포막과 세포질에 이중으로 존재하였다(Table 6).

이온화 Ca에 의해 매개되는 인산화 단백질은 9개였으

Table 5. Proteins phosphorylated by bovine(1-34) parathyroid hormone

Homogenate	Cytosol	Membrane
95K Da	95K Da	
70K Da		70K Da
50K Da	50K Da	50K Da
42K Da	42K Da	
35K Da	35K Da	
23K Da	23K Da	
19K Da	19K Da	
16K Da	16K Da	
11.5K Da	11.5K Da	
10.5K Da	10.5K Da	

- 1) Osteoblast cells were isolated from mouse calvariae by collagenase digestion method
- 2) PTH was treated for 72 hours after isolation of osteoblast cells
- 3) ^{32}P -ATP and ^{32}P -PO₄ were used to label proteins from endogenous source and from intact cells, respectively

Table 6. Proteins phosphorylated by cyclic adenine mono phosphate(cAMP)

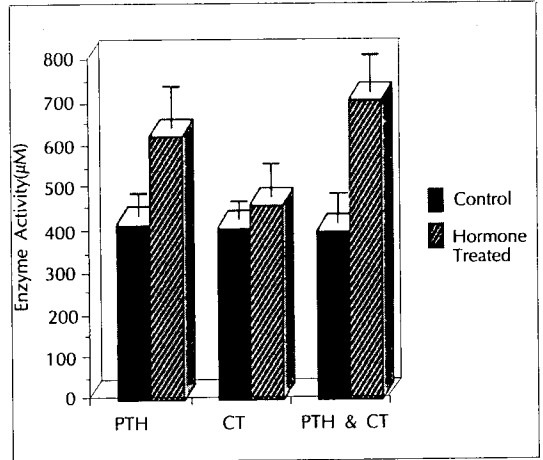
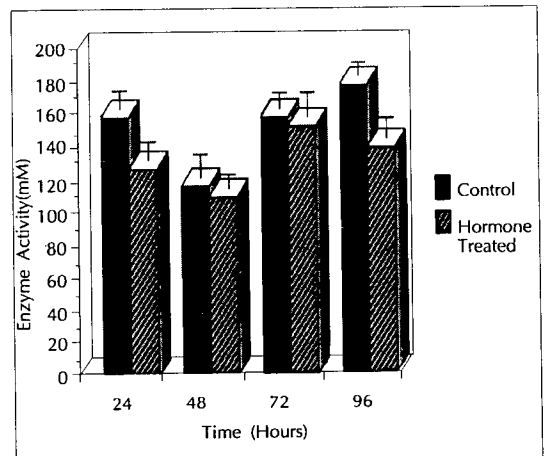
Homogenate	Cytosol	Membrane
50K Da	50K Da	
35K Da	35K Da	35K Da
23K Da	23K Da	
19K Da	19K Da	
16K Da	16K Da	

- 1) 20 μM [^{32}P] ATP was used to label endogenous proteins and gamma ^{32}P -PO₄ was used to label intracellular ATPs
- 2) dibutyl cAMP was treated for 5 minutes for the phosphorylation reaction after ^{32}P labeling

Table 7. Proteins phosphorylated by ionized calcium(Ca⁺⁺)

Homogenate	Cytosol	Membrane
70K Da	70K Da	70K Da
50K Da	50K Da	
35K Da	35K Da	35K Da
31K Da	31K Da	
26K Da	26K Da	
20K Da	20K Da	
19K Da	19K Da	
16K Da	16K Da	
10.5K Da	10.5K Da	

- 1) CaCl₂ was added to test the phosphorylation reaction along with 20 μM (^{32}P) ATP. Ca was acting as a messenger for phosphorylation reaction of the cellular cytosolic and membrane protein
- 2) OBL cells were isolated by type I collagenase and reacted for phosphorylation for 2 minutes at 30°C.

**Fig. 1.** Total β -glucuronidase enzyme activity both in the whole calvariae tissues and medium. The calvarial bone tissue was cultured for 96 hours in a CO₂ incubator after the hormone treatment. The enzyme was measured by Farrand A4 fluorometer after incubation at 37°C for 1 hour and stopping the reaction with 0.02 M 2-amino-2-methyl-1-propanol HCl. PTH and PTH & CT group were significantly different from the control at $P < 0.05$. PTH increased the enzyme activity by 48 %, while PTH & CT combined increased it by 77 %. Vertical bars represent mean \pm SEM.**Fig. 2.** Total Alkaline phosphatase enzyme activity both in the tissue and medium after PTH hormone treatment. Tissue alkaline phosphatase was measured in the total 4ml of tissue homogenate and the medium alkaline phosphatase was measured in 1ml volume of DMEM. Vertical bars represent mean \pm SEM.

며(Table 7), 70K Da 단백질은 세포막과 세포질에 동시에 존재하였다. 기타 단백질은 세포질에만 존재하였고 그들은 50K, 35K, 31K, 26K, 20K, 19K, 16K, 10, 5K Da 단백질이었다.

위에서 발견된 전체 인산화 단백질의 종류는 모두 13 가지였다. 대부분이 세포질 단백질이었고 세포막 단백질은 35K, 50K, 70K의 3종류가 발견되었는데 70K와 35K는 또한 Ca-의존성을 나타냈다.

70K, 50K, 35K, 19K, 16K, 10.5K Da 단백질들은 Ca에 의해 조절되며, PTH 의존 인산화 단백질과 동일한 대사경로를 거치는 것으로 고찰되었다. 50K, 35K, 19K, 16K 등 Ca에 의해 조절되는 세포질 단백질은 cAMP 의존 인산화 단백질과 동일한 대사경로를 거치는 것으로 간주된다.

고 찰

PTH는 adenylate cyclase (AC)의 활성을 촉진하며 cAMP를 자극하고 cAMP-dependent PK를 활성화시키고 그 결과 특수한 단백질의 인산화를 촉진시킨다^{19) 20)}.

닭의 kidney cell을 이용한 연구²⁶⁾에서 Ca와 cAMP-dependent-PK의 substrate가 대부분이 세포질에 존재하며 PTH에 의해 자극되는 대부분의 단백질의 인산화 반응과 연관성이 있다는 보고는 본 연구의 결과와 일치하는 점이다.

토끼의 신장 피질 세관의 배양시 PTH 또는 dibutyryl cAMP를 처리했을 때 intact cell내의 특수한 단백질의 ³²P의 결합을 선택적으로 촉진시킨다는 사실이 보고되면서²⁷⁾ 이러한 인산화 반응은 무기물 운반에 관여하는 PTH의 세포내의 생리적 작용을 매개 조절하는데²⁸⁾ 관여할 것으로 생각되고 있다. 신장 세포를 포함한 많은 인산화 반응 연구에서²⁹⁻³²⁾ PTH가 신장에서의 Ca 재흡수를 증가시키고 phospholipid 대사에 영향을 준다³³⁻³⁵⁾는 사실은 PTH의 어떤 작용은 Ca-phospholipid 의존성 인산화 기작에 의해 일어날 가능성도 배제할 수 없다는 사실을 시사한다. [³²P]-PO₄를 사용하여 세포내 ATP를 label하고 [gamma-³²P]-ATP를 균질화한 단백질에 적용한 실험에서 특히 35K Da 단백질

은 ³²P의 결합이 가장 높은 것으로 보고되었다²⁶⁾. 본 연구에서는 35K 뿐 아니라 50K, 35K, 19K, 16K Da의 단백질이 세포질에 존재하는 것으로 조사되었고 Ca, cAMP 및 PTH에 의해 동시에 인산화되는 반응을 나타내었다. 그러나 50K Da 세포막 단백질은 단지 PTH에 의해서만 인산화되는 것으로 조사되었다. 간세포와 신장 세포 등의 여러 종류의 세포에서 조사된 대부분의 PK활성은 세포질에 존재하는 것으로 알려져 있고 뼈세포에서도 역시 세포질의 용해성 분획에 많이 존재하는 것으로 보인다. 70K, 50K, 35K Da의 세포막 단백질은 전해질의 세포내외 운반기능에 관여하며 인산화 기작에 의해 이 전해질들이 Brush-border 세포막 통과 여부를 조절하는 기능을 수행할 것으로 짐작된다.

본 연구에서 밝혀진 바 OBL내의 Ca 조절에 관여하는 세포질 PK는 대부분 cAMP의존 PK와 유사한 대사경로를 가지는 것으로 보인다. 그러나 Ca은 PK의 활성화 조절에 있어 cAMP와는 다른 채널을 통하는 것으로 사료된다. 대부분의 cAMP 의존 PK들은 PTH와 유사한 조절 채널을 공유하는 것으로 보인다. 이러한 메커니즘을 검증하기 위해 PK 억제제를 사용한 *in vivo* 및 *in vitro* 실험들이 행해졌는데³⁶⁻³⁹⁾, 본 연구에서도 PK 억제제를 사용하여 각각의 인산화 반응경로를 검증한바 있다.

Parathyroid를 수술에 의해 제거한 쥐의 혈청 Ca이 dibutyryl cAMP에 의해 증가하는 것 또는 조직배양 실험에서 dibutyryl cAMP가 뼈의 흡수를 유도하는 것 등은 뼈에 있어서의 PTH 호르몬의 작용이 cAMP에 의해 매개된다⁴⁰⁾는 것을 보여주는 증거라고 간주할 수 있다.

그러나 위의 고찰과는 달리 본 연구에서는 cAMP 의존 인산화 단백질 보다 Ca 의존 인산화 단백질이 다수였다는 점을 특별히 지적할 수 있다. 이것은 뼈세포내의 생리적 생화학적 반응이 뼈의 풍부한 Ca에 의해 쉽게 매개되어질 수 있는 특수성으로 간주될 수 있다.

Ca은 Ca⁺⁺/calmodulin 의존 PK를 통해 phosphodiesterase를 활성화시키거나 adenylate cyclase를 억제하여 cAMP를 저하시킨다는 보고도 있다⁴¹⁾. 이온화된 Ca은 혈액응고, 효소의 활성유지, 근육수축, 세포막 흥분 등의 세포반응을 조절하는 중요인자로서 홀몬작용에 있어서 messenger로서의 기능을 수행한다.

요약 및 결론

뼈의 성장에 대한 soluble factor 중 epidermal growth factor(EGF)와 insulin-like growth factor(IGF) 등의 성장인자들이 관여하며⁴²⁾, 이들이 어떤 기작을 통해 골격기능과 대사에 관여하는 지에 대해 관심이 고조되고 있다. 포유동물에 존재하는 대부분의 성장인자들은 분자량이 25K Da 이하이나 인체의 뼈로부터는 분자량이 그보다 훨씬 큰 성장인자가 보고된 바도 있다⁴³⁾. OBL은 IGF-I 및 IGF-II의 합성을 촉진하는데 이 두가지 성장인자는 모두 세포 분화와 collagen 생산에 기여한다. PTH는 아골세포에서 second mediator인 cAMP를 급격히 증가시키는데⁴⁴⁾ 결국 cAMP의 증가가 PTH의 IGF-I합성 촉진효과를 가져오기 때문에 국소적으로 생성된 IGF가 골밀도 유지와 Ca대사에 중요한 기능을 수행할 것으로 사료된다.

PTH의 collagen 합성작용은 anti-IGF-I antibody에 의해 억제되는 점으로 미루어 보아 PTH는 IGF-I과의 연결요인이 존재함을 알 수 있다. 특히 국소적으로 생성된 IGF-I의 조절작용이 정상적인 골밀도 유지와 칼슘 대사에 아주 중요한 요인이 될 수 있을 것이다.

최근, Chen 등⁴⁵⁾에 의하면 1, 25 (OH)₂ Vit D3는 IGF-I을 증가시키는 것으로 보고되었으며, PDGF, TGF-β 등도 뼈의 기질 무기물 침착을 증가시키는 것으로 보고되었다⁴⁶⁾. 그러나, 구체적인 뼈단백질의 증가에 대해서는 고찰하지 않았으며, ³H-Proline의 증가를 영상 분석법으로 분석한 것에 불과하다. PTH에 의한 뼈의 성장효과가 PK substrate의 환경적 조건, 타 성장인자와의 복합적인 작용 등을 통하여 뼈의 흡수 혹은 생성에 관해 어떤 상승작용이 나타날 수 있는지는 문제는 앞으로 더 연구해야 될 과제이다. 연어의 CT를 폐경기 후의 골다공증 환자에 투여하여 골질을 감소와 골밀도 증가 효과를 검증한 결과 등을⁴⁷⁻⁵²⁾ 본 연구결과와 종합해 보면 PTH와 CT 및 기타 생리 활성 물질들을 적절한 비율로 배합하여 연령별로 투여하는 방안이 골다공증 치료와 예방에 기여할 수 있으리라 본다. 나아가 PTH에 의한 뼈의 성장, 흡수 효과 및 대사기능과 관련한 제반연구가 종합적으로 진행되면 골다공증과 골격성장관련 왜소증 치료에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

PTH 호르몬은 OCL의 작용을 통하여 Ca를 뼈의 기질로부터 유출시켜 혈액 내의 Ca농도를 유지하고 있는 것으로 알려져 있으나 OBL의 작용을 통해서도 PTH의 제반 기능이 매개되고 있는 것으로 사료된다. 특히 뼈의 흡수 뿐 아니라 생성에도 기여하고 있다고 보여지며 또한, PTH는 인산화 반응에 관여하여 뼈세포의 성장, 증식 및 활성 대사반응에 관여하고 있는 것으로 생각된다. 또한 뼈세포내에서 일어나는 인산화 기작들이 각각 어떤 특수한 PK에 의해 일어나며, 이러한 반응들이 뼈세포의 무기물대사에 어떤 영향을 주는지에 대해서는 구체적인 규명이 필요하다. 그러나, 파골 세포와 아골 세포간의 정확한 상호관계에 대해서는 아직 연구가 필요하며, hypercalcemia 치료에 쓰이는 calcitonin과 함께 PTH는 폐경기 이후의 골밀도 감소 방지와 골다공증의 치료에도 이용될 수 있으리라고 본다. 본 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

- 1) AP 효소는 시간의 경과에 따라 점차 증가하는 경향이 있으나, PTH 처리는 대조군보다 감소하였다. 이 현상은 뼈조직과 배양액에서 비슷한 경향을 보였다.
- 2) 뼈 collagen의 합성과 무기질 대사에 관여하는 β-glucuronidase 효소는 PTH 처리에 의해 현저히 증가하였고, 이 효소는 배양액에 유출되는 경향이 있었다. CT 역시 이 효소의 합성을 다소 억제하는 경향이 있으나 배양액의 유출은 방지하는 효과가 있었다.
- 3) PTH와 CT를 같이 투여했을 때는 PTH 단독 투여시(48%)보다 대조군에 비해 훨씬 더 β-glucuronidase 증가 효과(75%)를 보였다.
- 4) PTH가 AP 효소 억제 효과와 β-glucuronidase의 증진효과를 동시에 나타내는 것은 PTH가 collagen 합성에 기여하고 있으며 뼈의 성장에 관여하고 있다는 증거가 된다.
- 5) bPTH, cAMP, Ca에 의해 인산화되는 단백질은 각각 10, 5, 9 개로 나타났으며, 모두 13가지의 단백질이 인산화 반응을 나타내는 것으로 조사되었다.
- 6) 대부분의 인산화 반응은 세포질에 존재하는 pro-

tein kinase에 의존하였으며, 세포막 분획에는 50K와 70K의 2종류가 발견되었는데 70K는 또한 Ca 의존성이었다.

7) 70K, 50K, 35K, 19K, 16K, 10.5K protein kinase 들은 Ca에 의해 조절되며, PTH 의존 PK와 동일한 대사경로를 거치는 것으로 고찰되었다.

8) 50K, 35K, 19K, 16K 등 Ca에 의해 조절되는 세포질 PK는 cAMP 의존 PK와 동일한 대사경로를 가지는 것으로 간주되었다.

Literature cited

- 1) Paulsen NV. Calcium and phosphorus intake in senile osteoporosis. *Geriatrics* 8 : 76-79, 1953
- 2) Wardlaw G. The effect of diet and life style on bone mass in women. *JADA* 88 : 17-25, 1988
- 3) Alan D. Martin C. Osteoporosis : calcium and physical activity. *CMAJ* 136 : 587-593, 1987
- 4) 김혜경 · 윤진숙. 한국 노년기 여성의 골격 상태에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. *한국영양학회지* 24 : 30-39, 1991
- 5) 홍희옥 · 유춘희. Ca과 Vitamin D의 보충이 폐경기 이후 여성의 뼈 대사에 미치는 영향. *한국영양학회지* 27 : 1025-1036, 1994
- 6) Matokovic V, Kostial K, Simonovic I, Buzin R, Brodarec A, Nordin BEC. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. *Am J Clin Nutr* 32 : 540-549, 1979
- 7) Karra MV, Kirksev A, Galal O, Bassilv N, Harrison GG, Jerone NW. Zinc, calcium and magnesium concentration in milk from American and Egyptian women throughout the first 6 months of lactation. *Am J Clin Nutr* 47 : 642-648, 1988
- 8) Kirksev A, Ernst JA, Roepke JL, Tsai TL. Influence of mineral intake and use of oral contraceptives before pregnancy on the mineral content of human colostrum and of more mature milk. *Am J Clin Nutr* 32 : 30-39, 1979
- 9) 한국영양학회, 한국인 영양권장량, 제 6 차 개정 pp75-99, 중앙문화진수출판사, 서울 1995
- 10) 보건사회부. 1992년 국민 영양조사보고서, 1994
- 11) Butte NF, Garza C, Smith EO, Nichols BL. Milk and mineral intake of 45 exclusively breast-fed infants. *Fed Proc* 43 : 667, 1984
- 12) Vaughan LA, Weber CW, Kemberling SR. Longitudinal changes in the mineral content of human milk. *Am J Clin Nutr* 32 : 2301-2306, 1979
- 13) Raisz LG. Bone resorption in tissue culture : Factors insfluencing the response to parathyroid hormone. *J Clin Invest* 44 : 102-115, 1965
- 14) Chambers TJ. The cellular basis of bone resorption. *Clin Orthop* 151 : 283-288, 1980
- 15) 정차권. 생쥐의 조직배양에서 뼈의 생성과 흡수에 미치는 PTH 호르몬의 효과. *대한내분비학회지* 4(2) : 126-131, 1989
- 16) 정차권. *In vitro* stimulation of Bone formation and protein synthesis by parathyroid hormone in cultured neonatal mouse calvarial tissue, *Hallym Univ, J (Natural Sciences & Medicine)* 5 : 115-126, 1987
- 17) Tam CS, Hersche NM, Murray TM, Parsons JA. Parathyroid Hormone Stimulates the Bone Apposition Rate Independently of Its Resorptive Action; Differential Effects of Intermittent and Continuous Administration. *Endocrinology* 110 : 506-512, 1982
- 18) Gaillard PJ, Wassenaar AM, Wheeler MZ. Effects of parathyroid hormone and a synthetic fragment (PTH 1-34) on bone *in vitro*. *Proc K Ned Akad Wet (Biol Med)* c80 : 267-271, 1977
- 19) Raisz LG. Bone resorption in tissue culture. Factors influencing the response to parathyroid hormone. *J Clinical Investigation* 44 : 103-109, 1965
- 20) Beebe SJ, Carlson JD. Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. *Enzymes* 17 : 43-46, 1986
- 21) Taylor SS, Buechler JA, Knighton DR. Cyclic AMP-dependent protein kinase : mechanism for ATP : protein phosphotransfer, in peptides and protein phosphorylation, Kemp BE ed., CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 1990. Chap. 1
- 22) Hoffman F. Apparent constants for the interaction of regulatory and catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase I and II. *J Biol Chem* 255 : 1559-1562, 1989
- 23) Hofmann F, Beavo JA, Bechtel PJ, Krebs EG. Comparison of adenosine 3'5'-mono-phosphate-

- dependent protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart muscle. *J Biol Chem* 250 : 7795-7802, 1975
- 24) Beavo JA, Bechtel PJ, Krebs EG. Mechanisms of control for cAMP-dependent protein kinase from skeletal muscle. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 5 : 241-246, 1974
- 25) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72 : 248-254, 1976
- 26) Noland TA, Henry HL. Protein phosphorylation in chick kidney. *J Biol Chem* 258(1) : 538-546, 1983
- 27) Beavo JA, Bechtel PJ, Krebs EG. Activation of protein kinase by physiological concentrations of cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 71 : 3580-3587, 1974
- 28) Demaille JG, Peters KA, Fischer EH. Isolation and properties of the rabbit skeletal muscle protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinases. *Biochemistry* 16 : 3080-3086, 1977
- 29) Beale EG, Dedman JR, Means AR. Isolation and regulation of the protein kinase inhibitor and the calcium-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase regulator in the sertoli cell-enriched testis. *Endocrinology* 101 : 1621-1627, 1977
- 30) Tash JS, Dedman JR, Means AR. Protein kinase inhibitor in sertoli cell-enriched rat testis: Specific regulation by follicle-stimulating hormone. *J Biol Chem* 254 : 1241-1247, 1979
- 31) Kuo JF, Andersson RGG, Wise BC, Mackerlova L, Salmonsson I, Brackett NL, Katoh N, Shoji M, Wrenn RW. Ca-dependent protein kinase: Widespread occurrence in tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 7039-7049, 1980
- 32) Malencik DA, Scott JD, Fischer EH, Krebs EG, Anderson SR. Association of calmodulin with peptide analogues of the inhibitory region of the heat-stable protein inhibitor of adenosine 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* 25 : 3502-3508, 1980
- 33) Molitoris BA, Hruska KA, Fishmann, Daughaday WR. Effect of glucose and parathyroid hormone on the renal handling of myoinositol by isoiated perfused dog kidneys. *J Clin Invest* 63 : 1110-1118, 1979
- 34) Stahl ML, Ferez CR, Kelleher KL, Kriz RW, Knopf JL. Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature (London)* 332 : 269-273, 1988
- 35) Mayer BJ, Hamaguchi M, Hanafusa H. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature (London)* 32 : 272-276, 1988
- 36) Bkaily G, Sperelakis N. Injection of protein kinase inhibitor into cultured cells blocks calcium slow channels. *Am J Physiol* 246 : H630-636, 1984
- 37) Browne CL, Bird ML, Bower W. Effect of inhibition of the catalytic activity of cyclic AMP-dependent protein kinase on mitosis in PtK1 cells. *Cell Motility Cytoskeleton* 7 : 248-255, 1987
- 38) Bittar EE, Nwoga J. Sensitivity to injected cholera toxin of the sodium efflux in single barnacle muscle fibers. *Comp Biochem Physiol* 78C : 89-94, 1984
- 39) Saez JC, Spray DC, Nairn AC, Hertzberg E, Greengard P, Bennett MVL. cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27K Da principal gap junction polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 2473-2475, 1986
- 40) Rasmussen H, Pechet M, Fast D. Effect of dibutyrylcyclic adenosine 3',5'-monophosphate, theophylline, and other nucleotides upon calcium and phosphate metabolism. *J Clin Invest* 47 : 1843-1848, 1968
- 41) Huchon D, Ozon R, Fischer EH, Demaille JG. The pure inhibitor of cAMP-dependent protein kinase initiates *Xenopus laevis* mitotic maturation. *Mol Cell Endocrinol* 22 : 211-216, 1981
- 42) Patten V, Heisermann SM, Cheng GJ, Walsh DA. Tyrosine kinase catalyzed phosphorylation and inactivation of the inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 262 : 3398-3405, 1987
- 43) Farley JR, Baylink DJ. Purification of a skeletal growth factor from human bone. *Biochemistry*

21 : 3502-3507, 1982

- 44) Nestler EJ, Greengard P. Dopamine and depolarizing agent regulate the state of phosphorylation of protein I in the mammalian superior cervical sympathetic ganglion. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:79-7483, 1980
- 45) Chen TL, Mallory JB, Hintz RL. Dexamethasone and $1, 25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 modulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in osteoblast-like cells. *Calc Tissue Intl* 48 : 278-282, 1991
- 46) Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A. Stimulation of bone matrix apposition in Vitro by local growth factors: A comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor β . *Endocrinology* 127 : 69-75, 1990
- 47) Morita I, Sakagushi K, Kurachi T, Murota S. Ipriflavone inhibits murine osteoclast formation *in vitro*. *Calcif Tissue Intl* 51 : S7-S10, 1992
- 48) Mazzuoli GF, Passeri M, Gennari C, Minisola S, Antonelli R, Valtorta C, Palummeri E, Cervellin GF, Francini G. Effects of salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis: a controlled double-blind study. *Calcif Tissue Intl* 38 : 3-8, 1986
- 49) Kleerekoper M, Nelson DA, Peterson EL, Tilley BC. Outcome variables in osteoporosis trials. *Bone (suppl 1)* : S29-34, 1992
- 50) Ninomiya JT, Tracy RP, Calore JD, Gendreau MA, Kelm RJ, Mann KG. Heterogeneity of human bone. *J Bone Miner Res* 5 : 933-938, 1990
- 51) Civitelli R, Abbasi-Jarhomi SH, Halstead LR, Dimarogonas A, Ipriflavone Improves bone density and biomechanical properties of adult male rat bones. *Calcif Tissue Intl* 56 : 215-219, 1995