

간헐적 또는 지속적 부갑상선호르몬 처리가 백서 조골세포의 증식과 알칼리성인산분해효소 활성화에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 치과약리학교실 및 치학연구소 전임강사 백정화

*본 연구는 "서울대학교 발전기금 일반학술비" 지원에 의해 이루어졌음

ABSTRACT

Effects of Intermittent or Continuous PTH Treatment on Cell Proliferation and Alkaline Phosphatase Activity in Rat Osteoblastic Cells

Department of Pharmacology and Dental Therapeutics, Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University

Jeong-Hwa Baik, D.D.S., M.S., Ph.D.

The effects of intermittent or continuous parathyroid hormone (PTH) treatment on osteoblast proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity were investigated using primary osteoblast-like cells isolated from fetal rat calvaria. When osteoblastic cells were plated at low cell density (0.5×10^4 cells/well for cell proliferation and 2.4×10^4 cells/well for ALP activity) in 24-well tissue culture plates, both intermittent and continuous PTH treatment suppressed cell proliferation and ALP activity. In contrast, when osteoblastic cells were plated at high cell density (1.2×10^4 cells/well for cell proliferation and 5.0×10^4 cells/well for ALP activity), PTH exerted disparate effects on cell proliferation and ALP activity depending on exposure time. When cells were intermittently exposed to PTH for the first 6 h of 48h incubation cycle, PTH stimulated cell proliferation and suppressed ALP activity. On the contrary, continuous exposure to PTH during the 48h incubation cycle inhibited cell proliferation and stimulated ALP activity. Although cAMP/protein kinase A (PKA) pathway has been reported to role as a major signaling pathway in various PTH actions, Rp-cAMPS, an inhibitor of PKA, induced no significant change in stimulatory or inhibitory effect of PTH. In contrast, NPC-15437, a protein kinase C (PKC) inhibitor, and SKF-7171A, a calcium-calmodulin dependent kinase (CCPK) inhibitor, completely blocked the inhibitory effects of PTH on cell proliferation and ALP activity and furthermore converted the inhibitory PTH effects to stimulatory. These results suggest that PTH has diverse effects on osteoblast proliferation and differentiation depending on differentiation status of target cells and the PTH exposure time. In addition, calcium/PKC and calcium/CCPK pathway seems to be the major signal transduction system in the inhibitory action of PTH.

Key words : Alkaline phosphatase activity, Calcium/CCPK, Calcium/PKC, cAMP/PKA, Osteoblast proliferation, Parathyroid hormone

I. 서론

골조직은 성장이후에도 반복되는 골흡수와 골형성에 의해 계속적으로 개조가 이루어지는 동적인 조직이므로 이러한 골개조 과정중 골흡수와 골형성간의 균형이 깨어지면 골화석증이나 골다공증의 위험이 야기될 수 있다. 특히 최근 많은 관심의 대상이 되고 있는 폐경기 후 여성 및 노인에서의 골다공증은 과도한 골조직의 소실로 인하여 골과절을 빈번하게 일으키므로 이의 치료방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 현재 골다공증의 치료를 위해 사용되고 있거나 임상시험중에 있는 약물들로는 estrogen, calcitonin, sodium fluoride, selective estrogen receptor modulators, bisphosphonates 와 부갑상선호르몬 (parathyroid hormone, PTH) 등이 있다¹⁾. PTH는 골조직대사를 조절하는 대표적인 osteotropic hormone으로 hyperparathyroidism 등에 의해 PTH의 생산이 과도하게 증가되거나 외부에서 지속적으로 PTH를 투여하게 되면 골형성보다 골흡수가 더욱 촉진되어 골소실이 야기되지만 간헐적으로 PTH를 투여하면 오히려 골형성을 촉진하여 골량의 증가를 야기하는 것으로 알려져²⁻⁷⁾ 이러한 상반된 효과가 나타나는 기전을 설명하기 위해 많은 연구들이 진행되어 왔다. 생체 내에 간헐적으로 투여된 PTH에 의해 골형성이 촉진된 경우 골조직내에 활성화된 조골세포의 수가 증가되거나 조골세포 분화의 표지인 알칼리성인산분해효소 (alkaline phosphatase, ALP), type I collagen, osteocalcin 등의 발현이 증가되어 골형성이 촉진되는 것으로 보고되었으나⁷⁻⁹⁾, 조골세포나 골조직의 배양을 이용한 대부분의 시험관내실험들은 PTH가 조골세포의 증식과 분화를 촉진 또는 억제하는 상반된 결과들을 보고하여¹⁰⁻¹⁷⁾ PTH의 조골세포 조절작용은

아직 잘 설명되지 않고 있다.

PTH가 조골세포 등과 같은 표적세포의 PTH/PTHrP 수용체에 결합하게 되면 adenylate cyclase를 활성화시켜 cAMP의 생성을 촉진함으로써 cAMP-dependent protein kinase (PKA)를 활성화시킬 뿐 아니라, phospholipase C를 활성화 시켜 inositol 1,4,5-trisphosphate와 diacylglycerol의 생성을 촉진함으로써 세포내 calcium의 농도를 증가시키며 protein kinase C (PKC)를 활성화시키는 것으로 알려져 있다¹⁸⁻²³. PTH가 조골세포의 증식과 기능을 조절하는 데 있어서 많은 경우 calcium/PKC보다는 cAMP/PKA가 주요한 역할을 한다고 보고되었으나²³, 최근 Kim 등²⁴은 PTH의 조골세포를 통한 파골세포생성 촉진작용은 calcium/PKC와 calcium-calmodulin dependent protein kinase (CCPK) 경로에 상당히 의존하는 것으로 보고하였고, Ishizuya 등²⁵과 Kondo 등²⁶은 조골세포의 증식, 분화와 골형성과정에서 PTH를 처리한 시간에 따라 주요한 작용을 하는 신호전달경로가 다른 것으로 보고하여, 세포내에서 어떤 신호전달체계가 주요한 역할을 하느냐에 따라 조골세포에 대한 PTH의 조절작용이 다르게 나타날 수 있음을 시사하였다.

이에 본 연구에서는 백서태자두개관에서 분리한 조골세포에서 PTH를 간헐적 또는 지속적으로 처리한 후 그에 따른 조골세포증식과 ALP활성에 대한 조절작용을 관찰하고, 각각의 경우 주요하게 이용되는 세포내 신호전달체계가 다른지를 알아보하고자 cAMP의존성 경로와 calcium의존성 경로를 각기 차단하여 그 효과를 관찰하였다.

II. 실험 재료 및 방법

실험 재료 : Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), collagenase, trypsin-EDTA 등은 Gibco laboratories (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 plastic tissue culture wares는 Corning Inc. (Corning, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. ³H-Thymidine은 Amersham Life Science Ltd. (Little Chalfont, Buckinghamshire, England), Rp-cAMPS는 Biolog Life Science Institute (Bremen, Germany), NPC-15437은 RBI (Natick, MA, USA), SKF-7171A는 BIOMOL

Research Labs., Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하였다. hPTH(1-84)는 목암생명과학연구소에서 얻어 사용하였으며 나머지 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

조골세포의 분리 및 배양 : 태생 19일째 백서 (Sprague-Dawley)의 두개관에서 전두골과 두정골을 적출한 다음 0.1% collagenase, 0.05% trypsin 및 0.5 mM EDTA로 구성된 효소용액으로 37°C에서 각각 10분, 10분, 10분, 20분, 20분간씩 연속적으로 처리하여 I - V군의 세포를 분리하였다. 이중 조골세포의 특성을 가진 세포가 주로 존재하는 IV - V군의 세포를 혼합하여 10% FBS가 함유된 DMEM에서 일차 배양한 후 trypsin-EDTA 용액으로 세포를 수집하고 세포수를 측정하여 각 실험에 이용하였다.

세포증식의 측정 : 조골세포를 24-well plate에 well당 0.5 x 10⁴개 (low seeding density군) 또는 1.2 x 10⁴개 (high seeding density군)가 되도록 분주하고, 다음날 1% FBS가 함유된 DMEM으로 교체하였다. 다음날부터 48시간마다 1% FBS가 함유된 DMEM에 0.01 - 100 nM의 PTH를 첨가하여 1시간, 6시간 또는 48시간 배양을 2회 반복하였다. 마지막 4시간 동안 5 μCi/well의 ³H-thymidine을 첨가하여 배양한 후 세포를 phosphate buffered saline으로 세척하고 5% ice cold trichloroacetic acid로 처리한 다음 0.1 M NaOH로 세포를 용해하였다. 이중 일정 분획을 취하여 liquid scintillation counter에서 radioactivity를 측정함으로써 ³H-thymidine 유입도를 측정하였다.

알칼리성인산분해효소 (ALP) 활성 측정 : 조골세포를 24-well plate에 well당 2.4 x 10⁴ (low seeding density군) 또는 5 x 10⁴개 (high seeding density군)가 되도록 분주하고 세포증식의 측정에서와 같이 PTH 처리를 시행하였다. Trypsin-EDTA로 세포를 수집한 다음 0.25 ml의 증류수를 첨가하고 sonic dismembrater를 이용하여 cell homogenate를 준비하고 일부는 효소 활성 측정에, 일부는 단백질 정량에 사용하였다. ALP 활성 측정을 위한 완충액으로는 0.1 M glycine-NaOH 완충용액 (pH 10.3)을 사용하였으며, 기질로써 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate를 첨가하여 37°C에서

30분간 반응시킨 후, 반응산물인 p-nitrophenol의 양은 410 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 하였다. 단백질은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하고 BCA 단백질정량 시약을 이용하여 정량 하였다.

PTH의 작용에서 세포내 cAMP와 calcium 신호전달 체계의 역할 관찰 : 위와 동일하게 조골세포의 증식과 ALP 활성에 미치는 영향을 관찰하면서, PKA억제제인 Rp-cAMPS (1 - 100 μ M), PKC억제제인 NPC-15437 (1 μ M), 또는 calcium-calmodulin dependent protein kinase (CCPK) 억제제인 SKF-7171A (1 μ M)를 PTH 첨가전 1시간부터 배양에 첨가한 후 PTH 처리기간동안 복합 첨가하여 그 차이를 관찰하였다.

III. 실험 결과

조골세포의 seeding density에 따라 PTH의 조절작용 정도가 다르게 나타나는 것²⁷⁾으로 보고되었으므로, 세포증식측정과 ALP활성측정실험에서 각각 배양 시작시 세포의 seeding density를 2가지로 조절하고 일정기간 배양후 세포증식과 ALP 활성정도를 관찰하였다. 세포내로 유입된 ³H-thymidine의 양은 low seeding density군과 high seeding density군에서 비슷한 정도로 나타났으나(그림 1A), ALP 활성은 high seeding density 군에서 2-3배 가량 높게 나타나 그 군에서는 조골세포들의 분화정도가 좀더 높아진 것으로 생각되었다(그림 1B). 이들 조골세포에 대한 PTH의 조절작용을 관찰한 결과 세포의 seeding density와 PTH 처리 시간에 따라 세포 반응이 다르게 나타났다.

먼저 low seeding density 군에서는 0.01 nM과 100 nM PTH는 간헐적 (1, 6시간) 또는 지속적 처리시 모두 세포증식을 유의하게 억제하였다(그림 2A). 한편 high seeding density 군에서는 1 nM과 100 nM PTH를 간헐적 (6시간)으로 처리한 경우에는 세포증식을 촉진한 반면, 지속적 처리 시에는 오히려 세포증식을 억제하였다(그림 2B).

ALP 활성에 대해서는, low seeding density 군에서는 0.01 nM PTH를 간헐적 또는 지속적으로 처리한 모든 경우 유의한 억제작용을 나타내었다(그림 3A). 반면 high seeding density 군에서는, 간헐적 처리의 경

우 0.01 nM PTH에 의해 ALP 활성이 유의하게 감소되었으나 좀더 높은 농도에서는 유의한 차이를 나타내지 않았고, 지속적 처리의 경우에는 사용된 모든 농도의 PTH에 의해 농도 의존적으로 ALP 활성이 증가되었다(그림 3B).

PTH 처리기간 (간헐적 또는 지속적)에 따라 서로 상반된 세포 반응이 나타난 high seeding density 군에서 PTH의 세포내 신호전달체계가 다르게 작용하는지를 알아보기 위해 PKA, PKC 또는 CCPK 억제제를 첨가하여 그 효과를 관찰하였다. 먼저 PKA 억제제인 Rp-cAMPS를 1 μ M의 농도로 첨가한 경우에는 0.01 nM PTH에 의한 세포증식 억제 또는 촉진효과를 상쇄시켰으나 다른 농도의 PTH 작용이나 ALP 활성에 대한 조절작용에 별다른 효과를 나타내지 않았다(그림 4, 5). 한편 100 μ M Rp-cAMPS를 첨가한 경우 대조군에 비해 세포증식은 촉진하고 ALP 활성은 억제하는 효과를 나타내었지만, PTH의 효과를 상쇄시키지는 못하였다(그림 6A, 6B).

PKC 억제제인 NPC-15437이나 CCPK 억제제인 SKF-7171A를 첨가하여 배양한 경우 대조군에 비해 세포증식이 40-50% 정도 감소되었다. 이들은 PTH의 간헐적 처리 (6시간)에 의한 세포증식 촉진효과에는 별다른 영향을 나타내지 않았으나(그림 4A), 지속적 PTH 처리에 의한 세포증식 억제효과는 상쇄시키거나 오히려 세포증식 촉진효과를 나타내기도 하였다(그림 4B). 한편 ALP 활성에 대해서는 간헐적 PTH 처리 (0.01 nM)에 의한 ALP 활성 억제효과는 NPC-15437이나 SKF-7171A에 의해 상쇄되었고 1, 100 nM PTH 처리 시에는 ALP 활성을 상당히 촉진하였다(그림 5A). 지속적 PTH 처리에 의한 ALP활성 촉진효과에 대해서는 NPC-15437은 촉진효과를 감소시켰으나 SKF-7171A는 별다른 영향을 미치지 않았다(그림 5B). 이러한 결과들로 보아 PTH에 의한 세포증식 억제나 ALP 활성 억제작용에는 calcium을 통한 신호전달 체계들이 관여할 것으로 생각되었다.

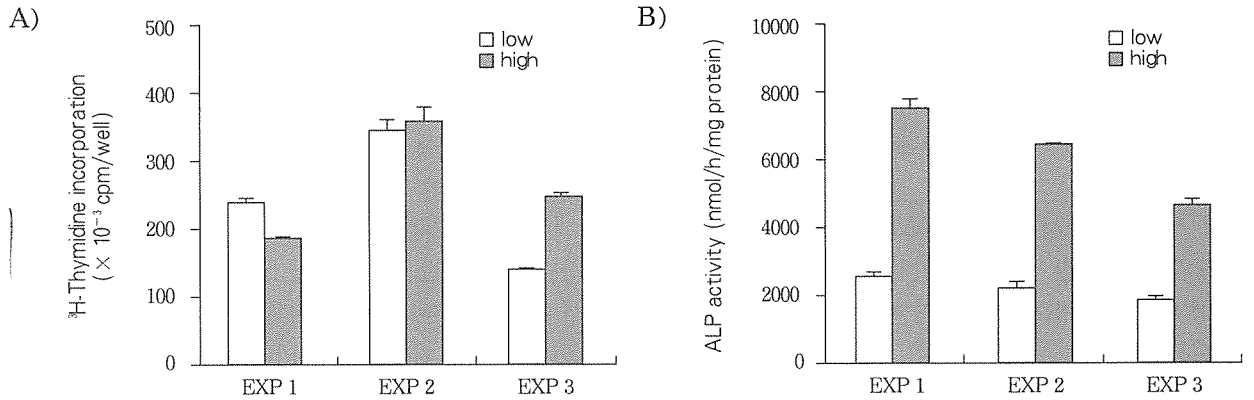


그림 1. Effect of cell seeding density on cell proliferation (A) and ALP activity (B). Rat calvarial osteoblastic cells were inoculated at low [in (A) 0.5×10^4 /well, in (B) 2.4×10^4 /well] or high [in (A) 1.2×10^4 /well, in (B) 5.0×10^4 /well] cell density in 24-well tissue culture plates. After preculture for 1 day, the cells were further cultivated in 1% FBS containing medium for 5 days. Then ³H-thymidine incorporation amounts and ALP activity were measured as described in Materials and Methods. These data were obtained from three independent experiments.

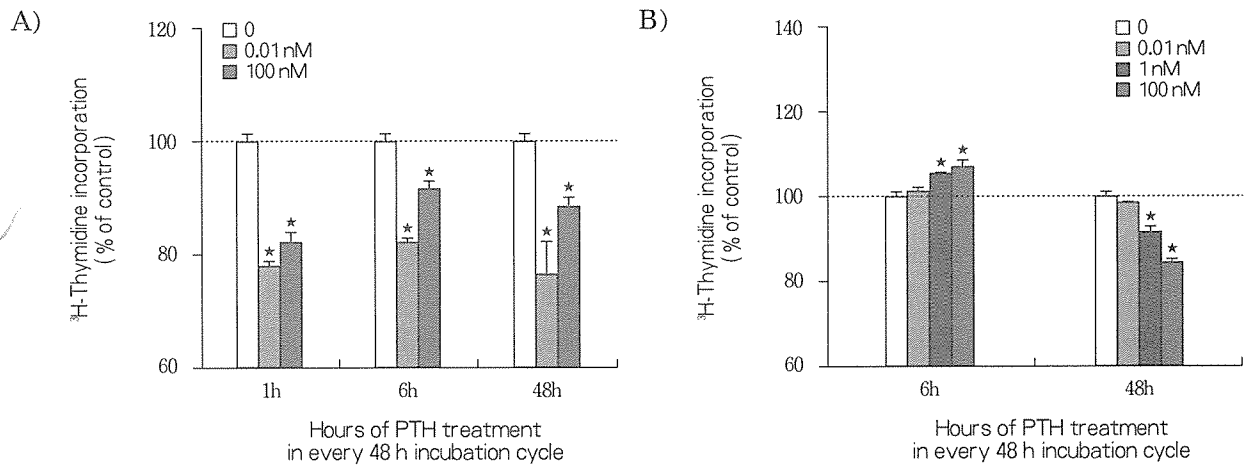


그림 2. Effects of PTH on the osteoblastic cell proliferation. Rat calvarial osteoblastic cells were inoculated at low (A) or high (B) cell density in 24-well tissue culture plates. After preculture for 1 day, culture medium was replaced with 1% FBS containing medium. Twenty-four hours later, cells were exposed to 0.01 - 100 nM PTH for the first 1 h, 6 h, or 48 h in 48h incubation cycle. After repeating this cycle, ³H-thymidine incorporation amounts were measured as described in Materials and Methods. Data represent mean \pm S.E. (N=4) and expressed as the ratio to the mean of control, which is the culture without PTH exposure. * $p < 0.05$, compared to control

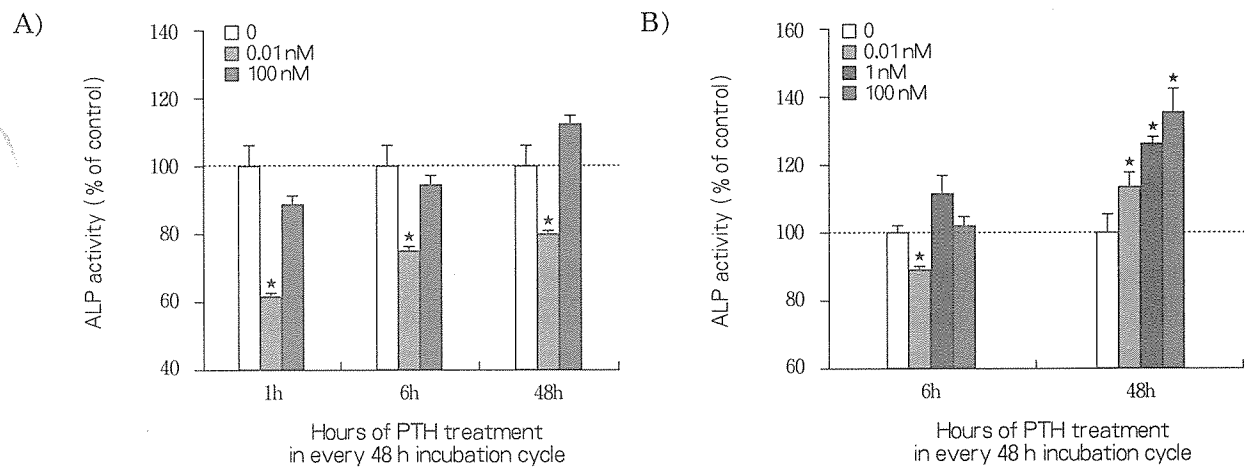


그림 3. Effects of PTH on ALP activity. Rat calvarial osteoblastic cells were inoculated at low (A) or high (B) cell density in 24-well tissue culture plates. After preculture for 1 day, culture medium was replaced with 1% FBS containing medium. Twenty-four hours later, cells were exposed to 0.01 - 100 nM PTH for the first 1 h, 6 h, or 48 h in 48h incubation cycle. After repeating this cycle, ALP activity was measured as described in Materials and Methods. ALP activity means the amount of p-nitrophenol liberated in nmole/h/mg protein. Data represent mean \pm S.E. (N=4) and expressed as the ratio to the mean of control, which is the culture without PTH exposure. * $p < 0.05$, compared to control

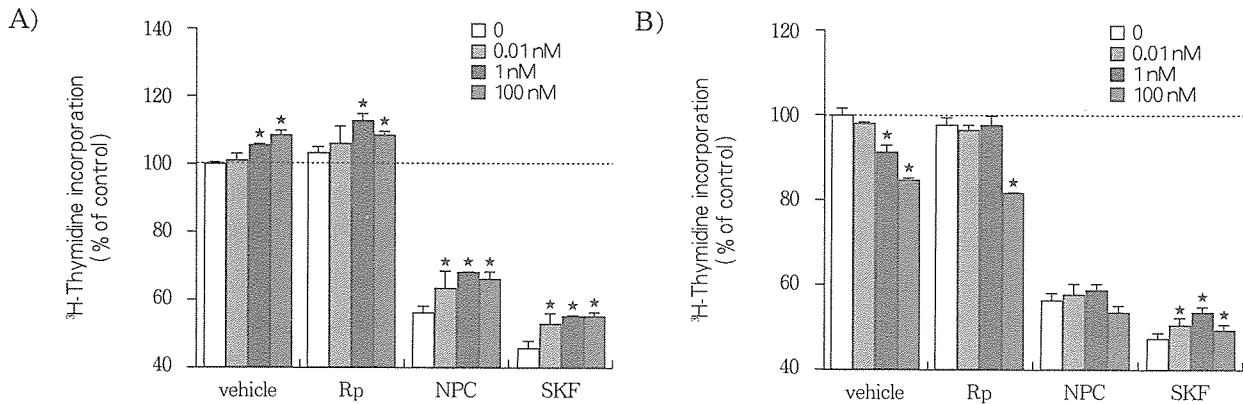


그림 4. Effects of Rp-cAMPS, NPC-15437, and SKF-7171A on PTH-induced changes in osteoblastic cell proliferation. Rat calvarial osteoblastic cells were inoculated at high cell density in 24-well tissue culture plates. After preculture for 1 day, culture medium was replaced with 1% FBS containing medium. Twenty-four hours later, indicated reagents were added 1 h before PTH addition and then cells were incubated for 6 h (A) or 48h (B) in 48h incubation cycle. After repeating this cycle, ³H-thymidine incorporation amounts were measured as described in Materials and Methods.
Data represent mean ± S.E. (N=4) and expressed as the ratio to the mean of control, which is the culture without any additional reagents.
★ p<0.05, compared to the culture exposed to an indicated inhibitor alone
Rp, 1 μM Rp-cAMPS; NPC, 1 μM NPC-15437; SKF, 1 μM SKF-7171A

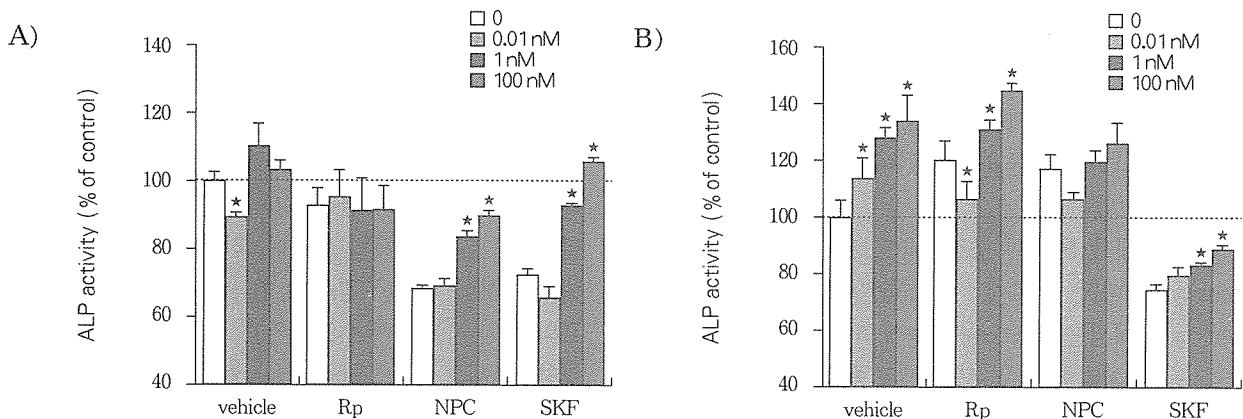


그림 5. Effects of Rp-cAMPS, NPC-15437, and SKF-7171A on PTH-induced changes in ALP activity. Rat calvarial osteoblastic cells were inoculated at high cell density in 24-well tissue culture plates. After preculture for 1 day, culture medium was replaced with 1% FBS containing medium. Twenty-four hours later, indicated reagents were added 1 h before PTH addition and then cells were incubated for 6 h (A) or 48h (B) in 48h incubation cycle. After repeating this cycle, ALP activity was measured as described in Materials and Methods.
Data represent mean ± S.E. (N=4) and expressed as the ratio to the mean of control, which is the culture without any additional reagents.
★ p<0.05, compared to the culture exposed to an indicated inhibitor alone
Rp, 1 μM Rp-cAMPS; NPC, 1 μM NPC-15437; SKF, 1 μM SKF-7171A

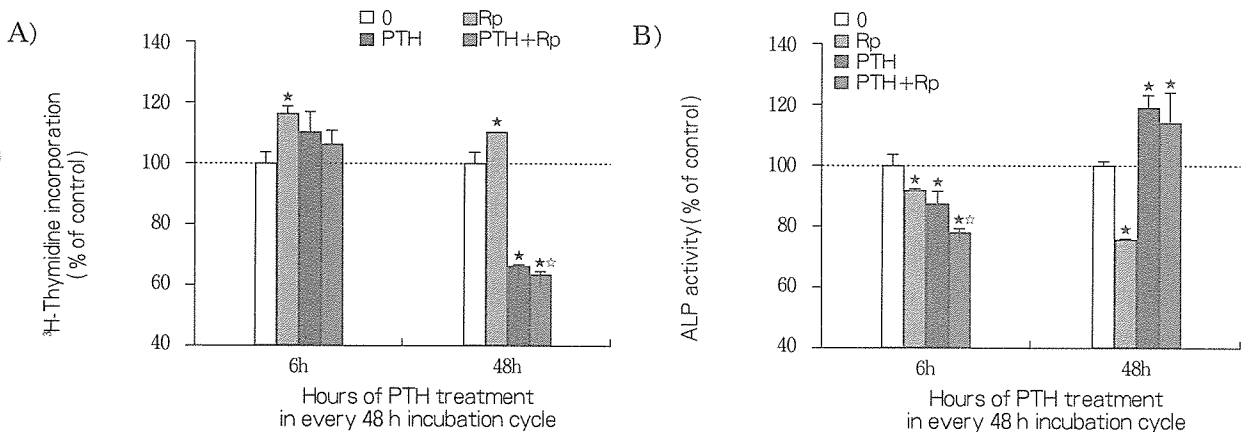


그림 6. Effects of Rp-cAMPS on PTH-induced changes in osteoblastic cell proliferation (A) and ALP activity (B). Rp-cAMPS was added 1 h before PTH addition and then cells were incubated for 6 h or 48h in 48h incubation cycle. After repeating this cycle, ³H-thymidine incorporation amounts (A) and ALP activity (B) were measured as described in Materials and Methods.
Data represent mean ± S.E. (N=4) and expressed as the ratio to the mean of control, which is the culture without any additional reagents.
★ p<0.05, compared to the culture exposed to Rp-cAMPS alone for an indicated incubation time
☆ p<0.05, compared to the culture exposed to PTH alone for an indicated incubation time
Rp, 100 μM Rp-cAMPS; PTH, 10 nM parathyroid hormone

IV. 고 찰

PTH의 조골세포 조절작용을 설명하기 위해 여러 종류의 조골세포들을 이용하여 많은 시험관내 실험이 행하여져 왔으나 사용된 조골세포의 종류나 PTH의 처리양상에 따라 상반된 결과들이 보고되어 왔다¹⁰⁻¹⁷. 이들 시험관내 실험을 위하여 세포주로 확립된 조골세포들이나, 골조직에서 직접 분리하여 일차 배양한 세포들이 많이 사용되어왔는데, 전자의 경우 비교적 균일한 세포들로 구성되는 장점은 있으나 세포주에 따라 세포 분화도가 다양하며 정상 조골세포에서의 표현형 발현조절과는 차이를 나타내는 단점이 있다²⁸. 반면 일차 배양한 세포들은 세포조성이 균일하지는 못하지만 시험관내 배양중 여러 분화단계를 진행하여 석회화결절을 형성하는 등 정상적인 조골세포와 유사한 반응을 나타내므로²⁸, 본 연구에서는 백서태자두개골을 연속효소처리하여 분리한 세포들을 이용하여 PTH의 조절작용을 관찰하여 보았다.

본 실험에서 PTH의 조절작용은 조골세포의 seeding density에 따라 다르게 관찰되었는데, low seeding density 군에서는 저농도나 고농도의 PTH를 간헐적 또는 지속적 처리한 경우 모두 세포증식과 ALP 활성을 억제한 반면, high seeding density에서는 PTH를 간헐적으로 처리하느냐, 또는 지속적으로 처리하느냐에 따라 상반된 조절작용을 나타내었다(그림 2, 3). PTH의 효과가 조골세포의 seeding density에 따라 다르게 나타나는 이유는 명확하지 않으나, Jongen 등²⁷이 세포 밀도가 낮은 군에서는 세포분열이 좀더 우세하며 조골세포 분화의 초기표지인 ALP의 활성이 낮아서 세포밀도가 높은 군에 비해 분화정도가 낮으므로 PTH에 대한 반응이 적게 나타난다고 하였고, Isogai 등²⁹은 조골세포의 분화단계에 따라 PTH에 대한 반응성이 변화한다고 보고하였으며, 본 실험에서 low seeding density 군에서 high seeding density 군보다 ALP활성이 낮게 나타나(그림 1B) 이들 두 군간에 조골세포의 분화정도가 달라 PTH의 효과가 다르게 나타났을 가능성이 있는 것으로 생각되었다. Low seeding density 군에서 PTH에 의한 세포증식 억제효과는 Isogai 등²⁹의 결과와 유사하였고, ALP 활성 억제효과는 PTH가 조골세포전구세포에서 조골세포로 분화되는 과정을 가역적으로

로 억제한다는 Bellows 등³⁰의 보고와 유사하였다.

한편 high seeding density 군에서는 1 nM과 100 nM PTH를 간헐적 (6시간)으로 처리한 경우에는 세포증식을 촉진한 반면 지속적 처리 시에는 오히려 세포증식을 억제하였고, ALP 활성에 대해서는, 간헐적 처리의 경우 0.01 nM PTH에 의해 ALP 활성이 유의하게 감소되었으나 좀더 높은 농도에서는 유의한 차이를 나타내지 않았고 지속적 처리의 경우에는 사용된 모든 농도의 PTH에 의해 농도 의존적으로 ALP 활성이 증가됨이 관찰되었다(그림 2B, 3B). 이러한 결과는 6시간씩 간헐적으로 PTH를 처리한 경우에는 ALP 활성이 증가되었고, 48시간씩 지속적으로 처리한 경우에는 ALP 활성이 억제되었다는 Ishizuya 등²⁵의 보고와 상. 이하였으나 UMR-106 세포에서 PTH를 24시간동안 지속적으로 처리한 경우 세포증식이 억제되고 ALP활성이 촉진되었다는 Verheijen과 Defize³¹와 Kano 등³²의 보고와는 유사하였다. 이러한 실험결과는 생체 내에 간헐적으로 투여된 PTH에 의해 골형성이 촉진되거나 지속적으로 투여되면 골흡수가 촉진된다는 보고들과는 일치하지 않는 것처럼 보이나, 간헐적 PTH 투여에 의해 골형성이 촉진된 경우 골조직내에 활성화된 조골세포의 수가 증가되거나 조골세포 분화의 표지인 알칼리성인산분해효소 (alkaline phosphatase, ALP), type I collagen, osteocalcin 등의 발현이 증가되는 것으로 보고되어⁷⁻⁹, PTH의 효과는 조골세포 증식과 분화에 대한 작용이 복합된 결과로 생각된다. 또한 생체 내에는 분화의 정도가 다양한 세포들이 존재하므로, PTH가 어떤 세포들에 주로 작용하는지에 따라서도 반응이 다를 것으로 생각된다.

PTH가 조골세포의 활성을 조절하는 데 있어서 많은 경우 calcium/PKC 경로보다는 cAMP/PKA 경로가 주요한 역할을 한다고 보고되었으나²³, 최근 Ishizuya 등²⁵과 Kondo 등²⁶은 조골세포의 증식, 분화와 골형성과정에서 PTH를 처리한 시간에 따라 주요한 작용을 하는 신호전달경로가 다른 것으로 보고하여, 본 실험에서는 PTH 처리기간 (간헐적 또는 지속적)에 따라 서로 상반된 세포 반응이 나타난 high seeding density 군에서 PTH의 세포내 신호전달체계가 다르게 작용하는 지를 알아보기 위해 PKA, PKC 또는 CCPK 억제제를 첨가하여 그 효과를 관찰하였다. PKA 억제제인 Rp-cAMPS를 100 μ M 농도로 첨가한 경우, 그 자체로 세

포증식은 촉진하고 ALP 활성은 억제하는 효과를 나타내었지만, PTH의 작용에 대하여는 별다른 영향을 미치지 않았다(그림 6A, 6B). 반면 PKC 억제제인 NPC-15437이나 CCPK 억제제인 SKF-7171A를 첨가하여 배양한 경우 PTH의 세포증식 및 ALP활성 촉진작용에 대해서는 별다른 영향을 미치지 못하였으나, PTH의 세포증식 및 ALP활성 억제작용에 대해서는 이들 약물에 의해 PTH의 억제효과가 차단되고 오히려 PTH에 의한 세포증식과 ALP활성 촉진작용이 관찰되었다(그림 4, 5). 이는 PKA 경로가 PTH의 조골세포 증식의 촉진작용³³⁾, 억제작용³¹⁾, 또는 분화의 촉진 및 억제작용 모두²⁹⁾에 주요한 역할을 한다는 보고들과, 또한 간헐적 PTH 처리에 의한 조골세포분화 촉진작용은 PKA와 PKC 경로가 협조적으로 작용하여 insulin-like growth factor의 분비 촉진함으로 나타나며, 지속적인 PTH에 의한 억제효과는 두 가지 경로가 서로 독립적으로 역할을 담당한다고 한 Ishizuya 등²⁵⁾의 보고와도 상이하였다. 그러나 이러한 결과는 PTH의 조골세포를 통한 파골세포생성 촉진작용은 PKC와 CCPK 경로에 주로 의존함을 보고한 Kim 등²⁵⁾과 PTH의 조골세포증식 억제작용과 파골세포생성 촉진작용에서 PKC 경로가 중요한 역할을 한다는 Kano 등³²⁾의 보고와 유사하며, 이들과 본 실험의 결과들은 PTH에 의한 세포증식 및 ALP 활성 억제작용에는 calcium을 통한 신호전달 체계들이 주로 관여할 것을 시사하는 것으로 보여진다. 본 실험에서 PKA 경로 차단 시 PTH의 작용에 별다른 영향을 미치지 못한 이유는 확실하지 않으나 PTH 처리에 의한 cAMP 생성 촉진작용은 쉽게 탈감작 (desensitization)된다는 보고들³⁴⁻³⁶⁾과 관련이 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 PTH는 작용하는 조골세포의 분화도와 처리시간 등에 따라 촉진작용 또는 억제작용 등을 다양하게 나타내며, 특히 세포증식 억제와 ALP 활성 억제작용에는 세포내 calcium/PKC, calcium/CCPK 경로가 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 그러나 세포분화 단계와 PTH 작용과의 상호관계 및 PTH의 조골세포 활성 촉진작용의 기전에 대하여는 더욱 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

PTH의 조골세포 조절작용을 알아보려고 백서태자두 개관에서 분리한 조골세포를 이용하여 PTH를 간헐적 또는 지속적으로 처리한 후 조골세포증식과 ALP활성에 미치는 영향을 관찰하고, 각각의 경우 주요하게 이용되는 세포내 신호전달체계가 다른지를 알아보려고 cAMP의존성 경로와 calcium의존성 경로를 각기 차단하고 그 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 조골세포를 low seeding density로 배양을 시작한 경우에는 간헐적 또는 지속적 PTH처리에 의해 세포증식과 ALP활성이 모두 억제되었다.

2. 조골세포를 high seeding density로 배양을 시작한 경우 간헐적 PTH처리 시에는 세포증식이 촉진되었으나 지속적 처리 시에는 오히려 억제되었다. 또한 ALP 활성에 대하여는 간헐적 처리시 저농도의 PTH에 의해 ALP 활성이 억제되었으나 지속적 처리 시에는 사용된 모든 농도의 PTH에 의해 농도 의존적으로 ALP 활성이 증가되었다.

3. PKA 억제제인 Rp-cAMPS를 PTH와 복합 첨가한 경우 high seeding density 군에서 간헐적 또는 지속적인 PTH처리에 따른 조절작용 모두에 별다른 영향을 미치지 못하였다.

4. PKC 억제제인 NPC-15437이나 CCPK 억제제인 SKF-7171A를 PTH와 복합 첨가한 경우 high seeding density 군에 대한 PTH의 세포증식과 ALP활성 촉진작용에 대해서는 별다른 영향을 미치지 못하였으나, PTH의 세포증식과 ALP활성 억제작용에 대해서는 이들 약물에 의해 PTH의 억제효과가 차단되고 오히려 PTH에 의한 세포증식과 ALP활성 촉진작용이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 PTH의 조골세포 조절작용은 조골세포의 분화도에 따라, PTH의 처리 양태에 따라 다르게 나타나며, PTH의 조골세포활성에 대한 억제작용에는 calcium/PKC나 calcium/CCPK를 통한 신호전달 체계들이 주로 관여할 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Kleerekoper M, Avioli LV. Evaluation and treatment of postmenopausal osteoporosis, *In Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (3rd ed.), edited by Favus MJ, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996;264-271
2. Bilizekian JP. Primary hyperparathyroidism, *In Internal medicine* (2nd ed.), edited by Stein JH, Boston, Little, Brown & Co, 1987;2123-2128
3. Hock JM, Gera I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to PTH, *J Bone Miner Res* 1992;7:65-72
4. Tam CS, Heersche JNM, Murray TM, Parsons JA. Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration, *Endocrinology* 1982;110:506-512
5. Liu CC, Kalu DN, Salerno E, et al. Preexisting bone loss associated with ovariectomy in rats is reversed by PTH, *J Bone Miner Res* 1991;6:1071-1080
6. Oxlund H, Ejersted C, Andreassen TT, Torring O, Nilsson MHL. Parathyroid hormone (1-34) and (1-84) stimulate cortical bone formation both from periosteum and endosteum, *Calcif Tissue Int* 1993;53:392-399
7. Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone, *Endocrine Rev* 1993;14:690-708
8. Schmidt IU, Dobnig H, Turner RT. Intermittent parathyroid hormone treatment increases osteoblast number, steady state messenger ribonucleic acid levels for osteocalcin, and bone formation in tibial metaphysis of hypophysectomized female rats, *Endocrinology* 1995;136:5127-5134
9. Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells, *Endocrinology* 1995;136:3632-3638
10. Kream BE, Rowe D, Gworek SC, Raisz LG. Parathyroid hormone alters collagen synthesis and procollagen mRNA levels in fetal rat calvaria, *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5654-5658
11. Kream BE, Rowe D, Smith MD, Maher V, Majeska R. Hormonal regulation of collagen synthesis in a clonal rat osteosarcoma cell line, *Endocrinology* 1986;119: 1922-1928
12. Majeska RJ, Rodan GA. Alkaline phosphatase inhibition by parathyroid hormone and isoproterenol in a clonal rat osteosarcoma cell line: Possible mediation by cyclic AMP, *Calcif Tissue Int* 1982;34:59-66
13. Partridge NC, Opie AL, Opie RT, Martin TJ. Inhibitory effects of parathyroid hormone on growth of osteogenic sarcoma cells, *Calcif Tissue Int* 1985;37:519-525
14. Partridge NC, Dickson CA, Kopp K, et al. Parathyroid hormone inhibits collagen synthesis at both ribonucleic acid and protein levels in rat osteogenic sarcoma cells, *Mol Endocrinol* 1989;3:232-239
15. MacDonald BR, Gallagher JA, Russell RGG. Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone, *Endocrinology* 1986;118:2445-2449
16. Nakatani Y, Tsunoi M, Hakeda Y, et al. Effects of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells, *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:894-898
17. Yee JA. Stimulation of alkaline phosphatase activity in cultured neonatal mouse calvarial bone cells by parathyroid hormone, *Calcif Tissue Int* 1985;37:530-538
18. Chase LR, Aurbach GD. The effect of parathyroid hormone on the concentration of 3'5'-monophosphate in skeletal tissue in vitro, *J Biol Chem* 1970;245:1520-1526
19. Partridge NC, Kemp BE, Veroni MC, Martin TJ. Activation of adenosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase in normal and malignant bone cells by parathyroid hormone, prostaglandin E₂, and prostacyclin, *Endocrinology* 1981;108:220-225
20. Civitelli R, Reid IR, Westbrook S, Avioli LV, Hruska KA. PTH elevates inositol polyphosphates and diacylglycerol in a rat osteoblast-like cell line, *Am J Physiol* 1988;225:E660-E667
21. Reid IR, Civitelli R, Halstea LR, Avioli LV, Hruska KA. Parathyroid hormone acutely elevates intracellular calcium in osteoblastlike cells, *Am J Physiol* 1987;252:E45-E51
22. Fujimori A, Cheng S, Avioli LV, Civitelli R. Structure-function relationship of parathyroid hormone: activation of phospholipase-C, protein kinase-A and -C in osteosarcoma cells, *Endocrinology* 1992;130:29-36
23. Partridge NC, Bloch SR, Pearman AT. Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression, *J Cell Biochem* 1994;55:321-327
24. Kim KS, Baek JH, Kim GS. Effect of intracellular Ca²⁺ modulators on the osteoclast formation, *J College Dent SNU* 1997;21:301-318
25. Ishizuya T, Yokose S, Hori M, et al. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells, *J Clin Invest* 1997;99:2961-2970
26. Kondo H, Kasugai S, Miyamoto K, et al. Identification of the signal transduction pathway mediating stimulatory and inhibitory effects of PTH on bone formation, *J Bone Miner Res* 1997;12 (suppl 1):320
27. Jongen JW, Bos MP, van der Meer JM, Herrmann-Erlee MPM. Parathyroid hormone-induced changes in alkaline phosphatase expression in fetal calvarial osteoblasts: differences between rat and mouse, *J Cell Physiol* 1993;155:36-43
28. Aubin JE, Turksen K, Heersche JNM. Osteoblastic cell lineage, *In Cellular and molecular biology of bone*, edited by Noda M, San Diego, Academic Press, Inc., 1993;1-45
29. Isogai Y, Akatsu T, Ishizuya T, et al. Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation positively or negatively depending on the differentiation stages, *J Bone Miner*

Res 1996;11:1384-1393

30. Bellows CG, Ishida H, Aubin JE, Heersche. Parathyroid hormone reversibly suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells into functional osteoblasts, *Endocrinology* 1990;127:3111-3116

31. Verheijen MH, Defize LHK. Parathyroid hormone inhibits mitogen-activated protein kinase activation in osteosarcoma cells via a protein kinase A-dependent pathway, *Endocrinology* 1995;136:3331-3337

32. Kano J, Sugimoto T, Kanatani M, et al. Second messenger signaling of c-fos gene induction by parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide in osteoblastic osteosarcoma cells: Its role in osteoblast proliferation and osteoclast-like cell formation, *J Cell Physiol* 1994;161:358-366

33. Savatini M, Lesur C, Pacherie M, et al. Effect of parathyroid hormone and agonists of the adenylyl cyclase and protein kinase C pathways on bone cell proliferation, *Bone* 1996;18:59-65

34. Civitelli R, Martin TJ, Fausto A, et al. Parathyroid hormone-related peptide transiently increases cytosolic calcium in osteoblast-like cells; comparison with parathyroid hormone, *Endocrinology* 1989;125:1204-1210

35. Bidwell JP, Fryer MJ, Firek AF, Donahue HJ, Heath III H. Desensitization of rat osteoblast-like cells (ROS 17/2.8) to parathyroid hormone uncouples the adenosine 3'5'-monophosphate and cytosolic ionized calcium response limbs, *Endocrinology* 1990;128:1021-1028

36. Bidwell JP, Carter WB, Fryer MJ, Heath III H. Parathyroid hormone (PTH)-induced intracellular Ca^{2+} signalling in naive and PTH-desensitized osteoblast-like cells (ROS 17/2.8): pharmacological characterization and evidence for synchronous oscillation of intracellular Ca^{2+} , *Endocrinology* 1991;129:2993-3000