

G292 세포에서 세포막 신장으로 활성화되는 K^+ 통로의 특성

이상국¹⁾ · 정동근²⁾ · 서덕준³⁾ · 박수병⁴⁾

본 연구에서는 인체 골종양에서 유래한 G292 세포를 이용하여 압력으로 세포막을 신장(stretch)시켰을 때 K^+ 통로의 전기적 활성 변화를 연구하였다. 배양된 세포에서 유리전극을 이용하여 세포막 내측이 유리전극의 외부로 향하도록 inside-out patch를 얻어 단일이온통로전류를 막전압고정법(patch clamp recording)으로 기록하였다.

G292 세포의 세포막 내측에 140 mM KCl 용액이 있는 상태에서 유리전극내 전압을 -80 mV로 고정했을 때 전도성이 270 ± 27 pS, 113 ± 12 pS, 48 ± 8 pS인 3가지 종류의 K^+ 통로를 관찰하였다. 전도성이 낮은 48 pS의 K^+ 통로는 모든 세포막에서 관찰하였으며 270 pS 및 113 pS의 K^+ 통로는 일부 세포에서만 관찰하였다. 48 pS의 K^+ 통로는 세포막 외측에 음의 전압을 가하면 활성화되고 양의 전압을 가하면 활성화되지 않는 외향성 정류특성을 보였다. 세포막 외측에 음압을 가하면 48 pS의 K^+ 통로는 활성화되었으며 이온 통로가 열리는 확률(P_{open})이 가하는 압력에 비례하여 증가하였다.

이러한 결과는 G292 세포주에 3가지 종류의 K^+ 통로가 존재하며 전도성이 낮은 48 pS의 K^+ 통로만이 세포막 신장에 의하여 직접적으로 활성화되는 특성을 보였다. 이러한 K^+ 통로의 활성화는 세포가 기계적 자극을 받아 세포막이 신장되면 세포막전압을 과분극시키며 조골세포에서 기계적 감수기로서의 기능을 수행하여 조골세포의 골개조에 관여할 것으로 추측된다.

주요단어: G292 세포, 세포막 신장, K^+ 통로

서 론

생체의 골조직에 기계적인 힘을 가하면 뼈의 변형이 야기된다.¹⁾ 쥐나 조류의 뼈에 기계적인 자극을 가하면 조골세포의 증식 반응이 증가하여 새로운 골형성을 촉진한다.^{2,3)} 기계적인 자극과 세포 반응에 대한 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 조골세포 세포막에 존재하는 이온 통로의 활동도 변화에 의하여 조골세포가 활성화되는 것으로 추측하고 있다.⁴⁾ 조직배양에서 얻은 조골세포에서 골흡수를 촉진시키는 부갑상선호르몬은 조골세포의 형태⁵⁾ 및 콜라겐 합성,^{6,7)} Ca^{2+} 대사⁸⁾ 등에 변화를 야기하며 세포막전압을 과분

극^{9,10)} 또는 탈분극^{11,12)} 시킨다는 보고가 있다. 또한 cAMP, prostaglandin E_2 , hydrocortisone 및 calcitonin 등도 조골세포의 세포막전압에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{9,13)} 이러한 보고는 조골세포의 세포막에 여러 종류의 이온 통로가 존재하며 세포의 활동이 세포막전압의 조절과 관련되어 있음을 시사한다.

시험관내에서 조골세포의 기계적자극은 세포의 대사를 항진시키는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 조골세포에서 세포막 신장은 여러 종류의 이온 통로를 활성화시키는 것으로 보고되어있다.^{4,17,18)} 기계적 자극은 조골세포막에서 직접적으로 전도성의 변화를 야기시키거나, 기계적 감수기전이 세포 내에 존재하여 세포막전압을 조절하고 있음을 보여준다. 그러나 세포막에 존재하는 이온 통로는 세포내 Ca^{2+} 농도, 막전압, 세포막 장력 등에 따라 다른 결과를 보일 수 있다.

¹⁾ 부산대학교 치과대학 교정학교실, 대학원생

²⁾ 동아대학교 의과대학 생리학교실, 교수

³⁾ 동아대학교 의과대학 생리학교실, 교수

⁴⁾ 부산대학교 치과대학 교정학교실, 교수

치아교정력은 치아 및 주위의 조직에 일정한 힘을 가하며, 이들 힘은 주위조직의 세포막에 변형을 가한다. 세포막에 작용하는 힘은 세포막을 신장시키게 되며 부분적으로는 세포막에 존재하는 이온 통로 단백질에 기계적 힘을 가한다. 이온 통로가 활성화되거나 억제되면 세포막의 전기적 특성이 변하고 세포의 자극에 따른 반응성의 변화를 야기한다.

G292 세포주는 조골세포의 특성을 가지고 있으며, 기계적 자극에 민감한 여러 종류의 이온 통로가 존재함이 알려져 있다.^{19,20)} 그중 하나는 K⁺ 통로이며 1가 양이온의 주된 통로로 작용하고 있다.

본 연구에서는 G292 세포주에서 세포막에 존재하는 이온 통로의 세포막 신장에 대한 반응을 연구하기 위하여 Ca²⁺을 제거한 용액에서 세포막의 내측이 유리전극의 외부로 향하는 기록방식 (excised inside-out patch) 으로 단일이온통로 (single channel) 를 기록하여 세포막의 K⁺ 통로의 세포막 신장 (stretch) 에 따른 전기적 특성의 변화를 관찰하고자 하였다. 특히 본 연구에서는 세포 전체가 아닌 세포막을 이용하여 K⁺ 전류를 관찰하였으며 이는 세포막의 장력변화가 이온 통로의 변화에 미치는 직접적인 효과를 제시한다.

재료 및 방법

1. 세포 배양 (Cell Culture)

인체 골종양에서 유래한 G292 세포주는 한국세포주은행 (KCLB) 에서 분양받아 사용하였다. 37°C에서 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 10% fetal calf serum을 첨가하여 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 세포를 35 mm petri dish에 직경 10 mm의 원형 커버글라스를 아래에 두고 5 x 10⁴ cells/ml로 뿌려 4 - 6일간 배양 후 실험에 사용하였다. 실험을 시작하기 20분 전에 petri dish 내의 배양액을 세포외액으로 교체하였으며, 막전압 기록은 시작으로 부터 2시간 이내에 수행하였다. 세포외액의 조성은 (단위 : mM) 150 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES (pH 7.4) 이다.

2. 세포막전압 기록 (Patch Clamp Recording)

실험용 유리전극은 외경 1.5 mm의 유리관을 사용하여 전극제작기 (Microelectrode Puller PB-7 : Narishige, Japan)를 이용하여 이중으로 뽑아 저항이

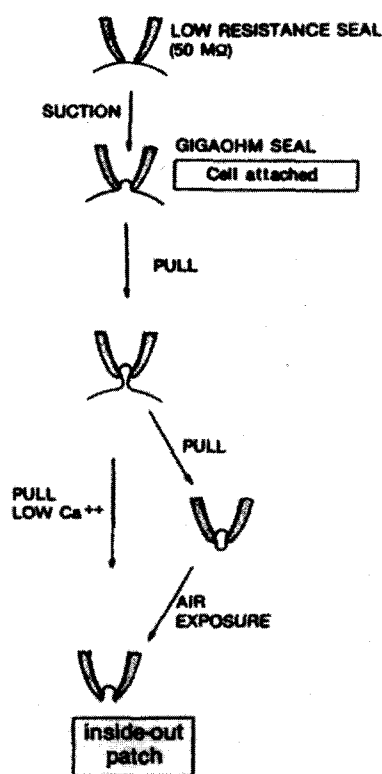


Fig. 1. Experimental method of inside-out patch clamp.

5 - 10 MΩ인 것을 사용하였다. 유리전극 내부용액은 전극내액을 사용하였으며 조성은 (단위 mM) 140 KCl, 2 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES (pH 7.4) 이다.

도립현미경에 설치되어 있는 실험용기 (Organ chamber) 에 세포를 배양시킨 원형 cover glass를 두고 세포외액을 관류시켜 부유물을 세척 후 온도를 실온으로 평형시키고 실험을 시작하였다.

세포막전압 기록은 Hamil등의 방법²¹⁾으로 하였다. 미세조정기 (micromanipulator)를 이용하여 유리전극의 끝을 세포막에 접근시킨 후 5 mV, 60 Hz의 구형파 신호를 가하여 유리전극의 저항을 관찰하며 세포막에 접근시킨다. 유리전극 저항이 증가하면 음압을 가하여 저항이 GΩ이상이 될 때까지 기다린다. 세포막과 유리전극이 충분히 결합하고 나면 유리전극을 재빨리 뒤로 당겨 세포막 내측이 유리전극 외부로 향하는 inside-out patch를 만든다 (Fig. 1). inside-out patch가 성공적으로 형성된 후 실험용기 내의 모든 용액을 전극내액으로 대체한 후 막전압을 고정하고

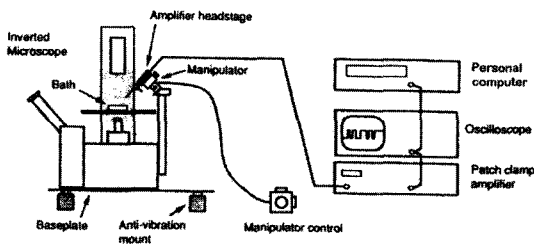


Fig. 2. Experimental arrangement of patch clamp recording set-up.

전류를 기록하였으며 유리전극내 압력을 변화시키고 막전류의 변화를 관찰하였다. 본 실험에 사용한 모든 기록은 inside-out patch에서 막전압을 기록하였다.

막전압고정은 Axopatch 200B (AXON, USA)를 이용하여 Bessel filter를 2 kHz에 두고 신호를 분리했으며 기록된 전류는 개인용컴퓨터에 저장하여 분석하였다. 컴퓨터에 내장된 아날로그-디지털 변환기는 Digidata 1200B (AXON, USA)이며 샘플링 주파수를 10 kHz로 하였다. 막전류를 응용소프트웨어인 Axoscope 1.1 (AXON, USA)로 관찰 및 기록하고 하드디스크에 자료를 저장 후 자료 분석용 소프트웨어인 pClamp 6.0 (AXON, USA)으로 분석하였다. 막전압고정법의 개괄적인 모식도를 Fig. 2에 제시하였다.

3. 압력 조절 (Pressure Control)

Inside-out patch 상에서 유리전극내에 음압을 가하여 세포막을 신장시켰다. 세포막의 절대적 신장 정도는 알 수 없으며 압력의 변화로 상대적인 신장을 변화시켰다. 진공펌프를 이용하여 음압을 발생시켰으며 진공조절 노브(Knob)로 음압의 세기를 조절하고 음압의 크기는 물기둥을 이용하여 cmH₂O 단위로 측정하였다.

이온 통로의 열린 확률 (open probability) 계산

전류의 닫힌시간 및 열린시간의 분포를 나타내는 이온 통로가 열린확률 (P_{open})을 계산하여 표현하였으며 단일 통로의 열린확률 계산은 아래의 식을 이용하였다.

$$P_{open} = 1 - P_{closed}^{1/n}$$

여기서 P_{closed}는 기록중 열리지 않은 부분의 확률이며, n은 patch상의 채널 숫자를 의미하며 최대전류가 포함하는 단일전류의 개수와 같다.

결 과

G292 세포에서 140 mM K⁺을 주된 양이온으로 하는 용액에서 세포막에 압력을 가하지않고 단일 이온통로 기록 (single channel recording)을 한 결과 -80 mV의 막고정전압에서 3가지 종류의 단일 이온통로 전류를 관찰하였으며 전도성의 크기는 270±27 pS, 113±12 pS, 48±8 pS등이었다 (Fig. 3). 이들 3가지 종류의 이온 전류를 전도성의 크기에 따라 분류하고 기술하고자 한다. 3가지 종류의 단일 이온통로 전류는 한 종류의 세포막에서 기록된 것이며 상호 연관성이 없는 독립된 작용을 하였다. 실험에 사용한 모든 세포에서 3가지 종류의 이온 전류가 관찰되지는 않았으며 한 종류 또는 두 종류만 기록되는 경우도 있었다. 그러나 48 pS의 K⁺통로는 모든 실험에서 공통적으로 기록되었다.

막전압에 따른 단일 이온통로 전류의 양상은 Fig. 4와 같다. 유리전극 내부에 음의 전압을 가할 때 단일 이온통로 전류들이 기록되며 양의 전압을 가했을 때는 나타나지 않았다. 유리전극의 내부는 세포막의 바깥부분이 접하고 있으므로 세포막내부에 상대적인 양의 전압이 가해질 때 채널이 열리므로 외향성 정류 특성을 보였다. 세포막 전압에 따른 48 pS의 K⁺ 통로의 전류크기를 전압변화에 따라 분석한 것을 Fig. 5A에 제시하였다. 막전압을 양의 방향으로 했을 때 전류가 나타나지 않는 것은 단일 이온통로 전류의 크기와는 무관하게 이온 통로의 활동이 없기 때문이다. 막전압에 따른 이온 통로의 열리는 확률(P_{open})을 구한 결과를 Fig. 5B에 제시하였다. 막전압의 변화에 따라 이온 통로의 열리는 확률이 변하며 막전압을 음의 방향으로 할수록 P_{open}이 증가되는 양상을 보였다. Inside-out patch 상태에서 유리전극 내부에 음의 전압을 가하는 것은 상대적으로 세포막 내부에 양의 전압을 가하는 결과이므로 세포막에서는 탈분극 방향이다. 이러한 결과는 K⁺ 통로가 막전압에 따라 전기적 특성이 변하는 것을 의미한다.

세포막 신장에 따른 이온 통로의 변화를 관찰하기 위하여 -30 cmH₂O의 음압을 유리전극내에 가했을 때 K⁺통로의 변화를 Fig. 6에 제시하였다. Fig. 6의 A는 막전압을 -80 mV로 고정하고 유리전극내 압력을

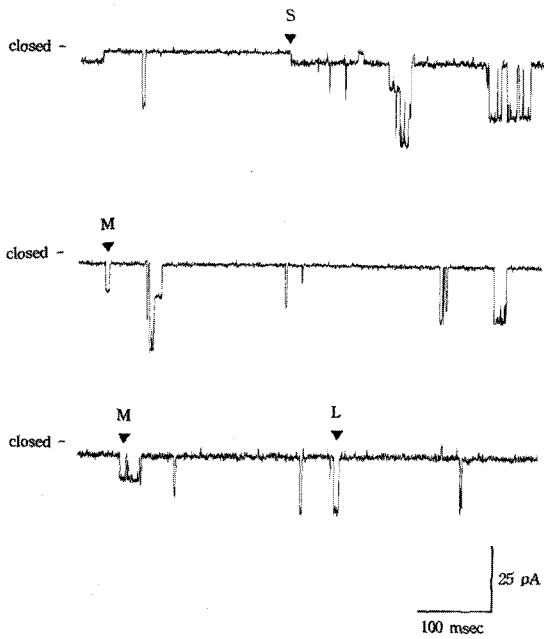


Fig. 3. Single channel currents in an excised inside-out patch of G292 cell at the holding potential of -80 mV. Arrows mark conductances of K^+ channels. L, 270 ± 27 pS ; M, 113 ± 12 pS ; S, 48 ± 8 pS.

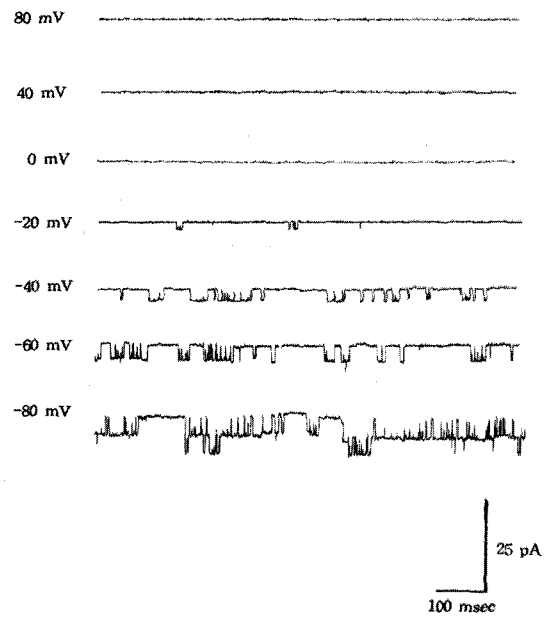


Fig. 4. Tracings of K^+ channel currents of 48 pS at the each holding potentials. Membrane potential is indicated to the left of each trace.

가지지 않은 상태의 막전류 기록이며, Fig. 6의 B는 -30 cmH₂O의 압력을 가한 조건에서 기록한 막전류이다. -30 cmH₂O의 압력을 가했을 때 이온통로의 열리는 확률이 증가함을 보여준다. 이 결과에서 제시되어 있는 이온 통로는 전도성이 낮은 48 pS의 K^+ 통로이며 이보다 전도성이 큰 K^+ 통로들은 본 실험에서 세포막 장력 변화에 대한 이온 통로 활동도의 변화를

관찰하지 못하였다.

세포막 장력 변화와 이온 통로 활동도의 관계를 보기 위하여 G292 세포막에 막전압을 -80 mV로 고정하고 10 cmH₂O의 단계로 음압을 가하면서 이온 통로의 변화를 관찰하였다. Fig. 7에 제시된 바와 같이 음압을 증가시키에 따라 P_{open} 이 증가하였다. 실험에 사용한 20개의 세포에서 세포막의 장력변화에 대한 이

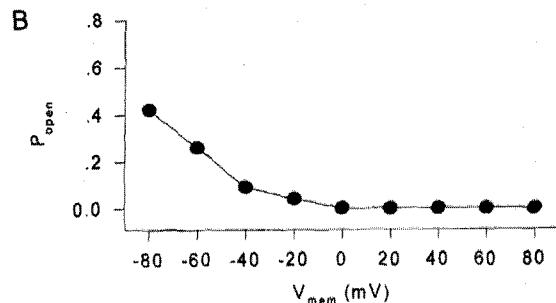
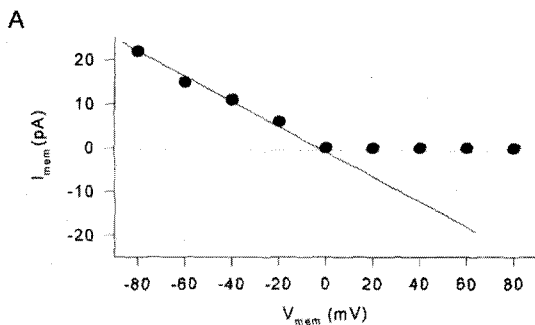


Fig. 5. Voltage dependence of 48 pS K^+ channels activation. Current-voltage relationship (A) and P_{open} -voltage relationship (B).

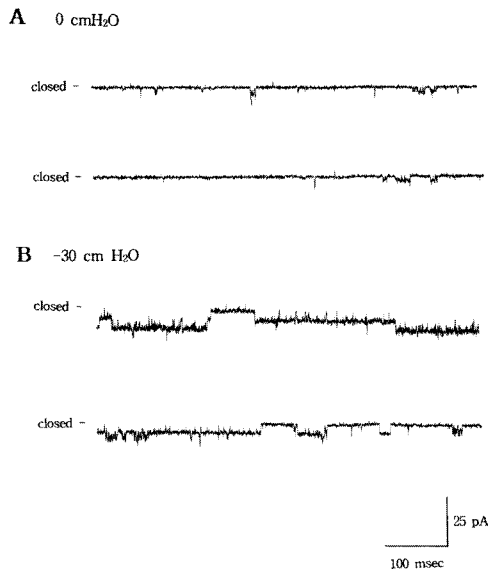


Fig. 6. Tracings of single channel currents in an inside-out patch of G292 cell at holding pressure of 0 (A) and -30 cmH₂O (B). Holding potential is -80 mV.

은 통로의 변화는 분산정도가 높았으며 어떤 세포에서는 변화가 관찰되지 않았다. Fig. 7에서 표시된 자료는 장력 변화에 반응하는 세포의 결과만을 제시한 것이다.

고 찰

조골세포(osteoblast)는 골기질의 표면에서 골재형성에 중요한 역할을 수행한다. 조골세포의 기능 조절은 복합적으로 이루어지고 있으며, 조절 인자로는 국소적이거나 전신적인 호르몬 (PTH, vitamin D3, prostaglandins), 국소적 전기장, 기계적 스트레스 등이 있다.

기계적 자극에 반응하는 이온통로는 여러 조직에서 발견되었으며^{22,23)}, 이들 이온통로들은 다양한 기능을 수행하고 있다. 청각자극의 감수기²⁴⁾, 혈관 압력의 변화²⁵⁾, 평활근 세포의 수축력²⁶⁾, 세포 파괴 조절²⁷⁻²⁹⁾ 등에 관여하고 있다.

기계적 자극은 조골세포를 활성화시키며²⁾, 조골세포의 대사에 있어 초기 변화는 이온 통로의 활동도와 관계가 있다^{8,11,30)}. 기계적 자극이 조골세포에 가해지면 세포막의 특성이 변하며 특히 세포막 이온 투과성

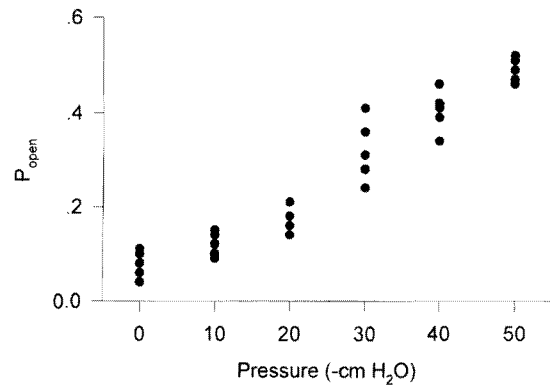


Fig. 7. Pressure dependence of the 48 pS K⁺ channel open probability.

에 변화가 있는 것으로 알려져 있다. Duncan등¹⁷⁾은 조골세포에서 세포막 신장에 의해 Ca²⁺ 통로가 활성화되는 것을 보고하였다.

일반적인 세포막의 안장막전압은 K⁺의 전도성에 의존적이며 K⁺통로의 활성화는 세포막 전압을 K⁺ 평형전압으로 유지시키는 특성이 있다. 따라서 K⁺ 통로의 활성화는 전압의존성 Ca²⁺ 통로의 활성을 조절할 수 있으며 세포의 기능을 조절하게 된다. Davidson등⁴⁾은 G292 세포막을 신장시키면 K⁺ 통로가 활성화되며 3가지 종류의 전도성을 갖는 단일 이온통로를 분리하였다. Cell attached mode에서 160 pS, 60 pS, 20 pS 등의 단일 이온통로가 압력의존적으로 활성화되며 160 pS의 이온통로가 K⁺선택성이 높은 것으로 보고하였다.

본 연구에서는 G292 세포에서 세포막에 존재하는 K⁺ 통로의 존재 및 세포막 신장에 따른 K⁺ 통로의 전기적 특성 변화를 관찰하고자 하였다. 실험에 사용한 세포막 내외의 용액은 주된 양이온으로 K⁺만을 가지고 있으며 Na⁺은 배제하였다. 또한 Ca²⁺을 첨가하지 않았으므로 Ca²⁺에 의해 활성화되는 K⁺전류는 기록되지 않았다.

Fig. 3에서 제시한 결과는 G292에 3가지 종류의 K⁺ 전류가 분포하고 있으며 Davidson등⁴⁾이 보고한 K⁺ 전류와 유사한 특성을 보였다. 그러나 본 실험조건에서는 excised inside-out patch를 사용한 결과이며 Davidson등⁴⁾은 cell attached mode에서 기록하였으므로 동일한 조건이 아니다. 전도성이 큰 270 pS의 K⁺전류는 조골세포이외의 흥분성 또는 비흥분성 조직에서 관찰되는 Maxi-K⁺ 통로와 유사한 전도성을

보였다^{31,32}). 그러나 본 실험결과 270 pS의 K⁺ 통로는 모든 세포에서 관찰되지는 않았으며 세포막 신장에 의해 활성화되는 특성이 없다. 반면 48 pS의 K⁺ 통로는 세포막 신장에 따라 민감한 반응 특성을 보였으며 (Fig. 6과 7) Davidson³³)이 G292에서 보고한 K⁺ 통로의 세포막 신장에 대한 특성과 유사하였다. 이러한 차이는 세포막 내외의 조건이 다르기 때문에 나타나는 결과로 해석된다.

Fig. 4와 5에서 제시한 결과는 48 pS의 K⁺ 통로에서 막전압에 따른 활성도와 P_{open}의 관계이며 G292 세포주에서 Ca²⁺이 없는 조건에서 낮은 전도성의 K⁺ 통로가 활동하고 있음을 보여준다. Davidson⁴)은 20 pS의 K⁺ 통로를 보고하였지만 본 실험에서는 47 pS이 관찰되었다. 여러 세포의 G292에서 막전류를 기록한 결과 48 pS의 K⁺ 통로는 모든 세포에서 기록 가능하였다. 따라서 48 pS의 K⁺ 통로는 Ca²⁺에 비의존적이며 G292세포막의 신장에 대해 직접적으로 반응하는 K⁺ 통로로 추측된다.

세포막 장력 변화에 대한 K⁺ 통로의 활동도 변화를 관찰한 결과 48 pS의 K⁺ 통로는 세포막 장력 변화에 민감하게 나타났으며 세포막 장력 변화에 비례하여 P_{open}의 변화를 관찰하였다. Davidson⁴)은 3가지 종류의 K⁺ 통로가 모두 세포막 신장에 따라 활성화된다고 하였으나 본 실험의 결과는 전도성이 낮은 48 pS의 K⁺ 통로에서만 결과가 동일하였다. 이러한 결과의 차이는 실험 용액내 Ca²⁺ 농도에 따른 Ca²⁺ 의존성과 관계가 있는 것으로 추측되며 Ca²⁺ 자체가 세포막 신장에 따른 K⁺ 통로 활동도 변화에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

G292 세포에서 세포막 장력의 변화는 세포내부의 Ca²⁺을 증가시키는 기전이 있으므로¹⁸) 세포막 장력의 변화가 직접적으로 이온 통로를 활성화시키는 것인지 아니면 세포 내 Ca²⁺ 농도 변화가 이온 통로의 활성도를 변화시키는지는 알 수 없다. 또한 두 가지 기전 모두에 의하여 나타날 수 있다. 본 실험 결과에서는 전도성이 낮은 48 pS의 K⁺ 통로가 세포막 신장에 의하여 반응하며 Ca²⁺의 작용과는 무관하게 세포막 신장의 직접적인 효과로 이온 통로를 조절하는 특성을 보였다.

세포막의 신장에 의해 활성화되는 통로를 차단하는 이온 통로 봉쇄제를 처리하면 세포막 신장으로 증가하는 osteocalcin의 유전 발현이 억제된다는 보고가 있다³⁴). 이러한 보고는 세포막 신장에 따른 이온통로 활성의 변화가 세포막 신장에 따른 세포의 반응에 작

용하고 있음을 시사한다.

그러나 조골세포에서 세포막 신장에 대한 반응의 일부로 K⁺ 통로의 활성도가 변하여 세포막전압을 변화시키는 것은 확인되었지만 세포의 기능 조절에 있어 어떤 역할을 하는지는 알 수 없다. 생리적 조건에서 조골세포의 세포막 신장에 대한 반응은 Ca²⁺, K⁺ 통로의 복합적인 활성화 과정을 통하여 막전압에 영향을 미치며 다른 생화학적 과정과 결합되어 골개조에 기여할 것으로 추측된다.

결 론

본 연구에서는 G292 세포를 이용하여 K⁺ 통로의 세포막 신장에 따른 전기적 활성 변화를 연구하였다. Inside-out patch에서 막전압을 고정하고 막전류를 측정된 결과, G292 세포에서 전도성이 다른 3가지 종류 단일 K⁺ 통로전류가 기록되었다.

막내외에 140 mM KCl 용액에서 막전압을 -80 mV로 고정했을 때 각 전류의 전도성은 270±27 pS, 113±12 pS, 48±8 pS이었다. 48 pS의 K⁺ 통로는 전압의 존재를 보였으며 세포막 외부에 음전압을 가하면 활성화되는 외향성 정류특성을 보였다. 유리전극 내부에 음압을 가함에 따라 전도성이 낮은 48 pS의 K⁺ 통로만이 활성화되며 이온통로가 열리는 확률 (P_{open})은 압력에 비례하여 증가하였다.

이러한 결과는 G292 세포에 3가지 종류의 K⁺ 통로가 존재하며 전도성이 낮은 48 pS의 K⁺ 통로가 세포막 신장에 의해 직접적으로 활성화되어 세포막전압을 변화시키며 조골세포의 기계적 자극에 대한 감수기로 작용하여 조골세포의 골개조에 관여할 것으로 추측된다.

참 고 문 헌

1. Lanyon LE. Functional strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 1984 ; 36 : S56-S61.
2. Pead MJ, Skerry TM, Lanton LE. Direct transformation from quiescence to bone formation in the adult periosteum following a single brief period of bone loading. *J Bone Miner Res* 1988 ; 3 : 647-656.
3. Miyawaki S, Forbes DP. The morphologic and biochemical effects of tensile force application to the interparietal suture of the Sprague-Dawley rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1987 ; 92 : 123-133.
4. Davidson RM, Tatakis DW & Auerbach AL. Multiple forms of mechanosensitive ion channels in

- osteoblast-like cells. *Pflugers Arch* 1990 : 416 : 646-651.
5. Gaillard PJ, Hermann-Erlee MPM, Hekkelman JW, Burger EH, Nijweide PJ. Skeletal tissue in culture: hormone regulation of metabolism and development. *Clin Orthop* 1979 : 142 : 176-214.
 6. Kream BE, Rowe D, Gworek SC, Raisz L. Parathyroid alters collagen synthesis and procollagen RNA levels in fetal rat calvaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 : 77 : 5654-5658.
 7. Kream BE, Rowe D, Smith MD, Majeska R. Hormonal regulation of a collagen synthesis in a rat clonal osteosarcoma cell line. *Endocrinology* 1986 : 199 : 1922-1928.
 8. Yamaguchi DT, Hahn TJ, Iida-Klein A, Kleeman CR, Muallem S. Parathyroid hormone-activated calcium channels in an osteoblast-like clonal osteosarcoma cell lines. *J Biol Chem* 1987 : 262 : 7711-7718.
 9. Chow SY, Chow YC, Jee WSS, Woodbury DM. Electrophysiological properties of osteoblastlike cells from the cortical endosteal surface of rabbit long bones. *Calcif Tissue Int* 1984 : 36 : 401-408.
 10. Ferrier J, Ward A. Electrophysiological differences between bone cell clones: Membrane potential responses to parathyroid hormone and correlation with the cAMP response. *J Cell Physiol* 1986 : 126 : 237-242.
 11. Edelman A, Fritsch J, Balsan S. Short-term effects of PTH on cultured rat osteoblasts: changes in membrane potential. *Am J Physiol* 1986 : 251 : C483-490.
 12. Fritsch J, Edelman A, Balsan S. Early effects of parathyroid hormone on membrane potential of rat osteoblasts in culture: Role of cAMP and Ca^{2+} . *J Bone Mineral Res* 1988 : 3 : 547-554.
 13. Ferrier J, Illeman A, Zakshek E. Transient and sustained effects of hormones and calcium on membrane potential in a bone cell clone. *J Cell Physiol* 1985 : 122 : 53-58.
 14. Heath JC, Meikle MC, Atkinson SJ, Reynolds JJ. A factor synthesized by rabbit periosteal fibroblasts stimulates bone resorption and collagenase production by connective tissue cell in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1984a : 800 : 301-305.
 15. Heath JC, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynolds JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta* 1984b : 802 : 151-154.
 16. Ngan PW, Crock B, Varghese J, Lanese R, Shanfield J, Davidovitch Z. Immunohistochemical assessment of the effect of chemical and mechanical stimuli on cAMP and prostaglandin E levels in human gingival fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 1988 : 33 : 163-174.
 17. Duncan R, Misler S. Voltage-activated and stretch-activated Ba^{2+} conducting channels in an osteoblast-like cell line (UMR 106). *FEBS Lett* 1989 : 251 : 17-21.
 18. Yamaguchi DT, Green J, Kleeman CR, Muallem S. Characterization of volume-sensitive, calcium-permeating pathways in the osteosarcoma cell line UMR-106-01. *J Biol Chem* 1989 : 264 : 4383-4390.
 19. Peebles PT, Trisch T, Papageorge AG. Isolation of four unusual pediatric solid tumor cell lines. *Pediatr Res* 1978 : 12 : 485-489.
 20. Shupnik MA, Tashjian AH Jr. Epidermal growth factor and phorbol ester actions on human osteosarcoma cells: characterization of responsive and nonresponsive cell lines. *J Biol Chem* 1982 : 257 : 12161-12164.
 21. Hamil OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981 : 391 : 85-100.
 22. Sachs F. Mechanical transduction in biological systems. *CRC Crit Rev Biomed Eng* 1988 : 16 : 141-169.
 23. Morris CE. Mechanosensitive ion channels. *J Membr Biol* 1989 : 113 : 93-107.
 24. Ohmori H. Mechano-electrical transducer has discrete conductances in the chick vestibular hair cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 : 81 : 1888-1891.
 25. Lansman JB, Hallam J, Rink TJ. Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers ? *Nature* 1987 : 327 : 524-526
 26. Kirber MT, Walsh JV, Singer JJ. Stretch-activated ion channels in smooth muscle : A mechanism for the initiation of stretch-induced contraction. *Pflugers Arch* 1988 : 412 : 339-345.
 27. Sackin H. A stretch-activated K^+ channel sensitive to cell volume. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 : 86 : 1731-1735.
 28. Uhl J, Murer H, Kolb HA. Ion channels activated by osmotic and mechanical stress in membranes of opossum kidney cells. *J Membr Biol* 1988 : 104 : 223-232.
 29. Christensen O. Mediation of cell volume regulation by

- Ca²⁺ influx through stretch-activated channels. Nature 1987 : 330 : 66-69.
30. Guggino SE, Wagner JA, Snowman AM, Hester LD, Sacktor B, Snyder SH. Phenylalkylamine- sensitive calcium channels in osteoblast-like osteosarcoma cells. J Biol Chem 1988 : 263 : 10155-10161.
31. Gallin E. Calcium- and voltage-activated potassium channels in human macrophages. Biophys J 1984 : 46 : 821-825.
32. Bolivar JJ, Cerejido M. Voltage and Ca²⁺- activated K⁺ channel in cultured epithelial cells (MDCK). J Membr Biol 1987 : 97 : 43-51.
33. Davidson RM. Membrane stretch activates a high-conductance K⁺ channel in G292 osteoblastic-like cells. J Membr Biol 1993 : 131 : 81-92.
34. Mikuni-Takagaki Y. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. J Bone Miner Metab 1999 : 17 : 57-60.

- ABSTRACT -

Properties of stretch-activated K⁺ channels in an G292 osteoblast-like cell

Sang-Gook Lee, Dong-Keun Jung*, Duk-Joon Suh*, Soo-Byung Park

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Pusan National University

**Department of Physiology, College of Medicine, Dong-A University*

K⁺-selective ion channels were studied in excised inside-out membrane patches from human osteoblast-like cells (G292). Three classes of K⁺ channels were present and could be distinguished on the basis of conductance. Conductances were 270±27 pS, 113±12 pS, 48±8 pS according to their approximate conductances in symmetrical 140 mM KCl saline at holding potential of -80 mV. It was found that the small conductance (48 pS) K⁺ channel activation was dependent on membrane voltage. In current-voltage relationship, small conductance K⁺ channel showed outward rectification, and it was activated by the positive potential inside the membrane. In recordings, single channel currents were activated by a negative pressure outside the membrane. The membrane pressure increased P_{open} of the K⁺ channel in a pressure-dependent manner.

In the excised-patch clamp recordings, G292 osteoblast-like cells have been shown to contain three types of K⁺ channels. Only the small conductance (48 pS) K⁺ channel is sensitive to the membrane stretch. These findings suggest that a hyperpolarizing current, mediated in part by this channel, may be associated with early events during the mechanical loading of the osteoblast. In G292 osteoblast-like cells, K⁺ channel is sensitive to membrane tension, and may represent a unique adaptation of the bone cell membrane to mechanical stress.

KOREA. J. ORTHOD. 2000 ; 30 : 197-204

※ **Key words** : G292 osteoblast-like cell, Stretch-activated K⁺ channel