

G292 세포에서 K^+ 통로에 대한 phorbol ester의 효과

김 미 경¹⁾ · 박 수 병²⁾

본 연구는 조골세포의 특성을 가지고 있는 G292 세포주를 이용하여 세포막 이온통로에 대한 phorbol ester의 효과를 조사하여 protein kinase C (PKC)의 이온통로에 대한 작용기전을 밝히고자 하였다. Patch clamp 기법을 이용하여 G292 세포에서 cell-attached configuration으로 단일이온통로의 활동을 관찰하고 Phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)의 효과를 관찰하였다.

안정상태 G292 세포에서 cell-attached 모드로 세포막의 단일이온통로 활동을 관찰한 결과 45pS의 K^+ 통로가 특징적으로 우세하였다. 유리전극 내부에 세포내액과 세포외액을 사용하여 전류-전압의 관계를 조사한 결과, 세포내액을 사용하는 경우에는 역전전압이 5.5mV이었으며 세포외액을 사용하는 경우에는 -27mV이었다. PDBu는 45pS의 이온통로를 10nM 이상의 농도에서 이온통로의 열릴 확률을 증가시켰으며 PKC 억제제인 staurosporine 10nM에 의하여 차단되는 특성을 보였다. PDBu는 45pS의 이온통로에 작용하여 전류-전압의 관계에서 역전전압을 음의 방향으로 이동시켰으며 동일한 막전압에서 단일이온통로의 전류 크기를 증가시켰다. G292세포에서 PDBu에 의하여 PKC가 활성화되는 것을 western blot으로 확인한 결과 PDBu 0.1 μ M은 세포질에서 세포막으로 PKC translocation을 유의하게 증가시키는 것을 확인하였다.

이상의 결과는 G292 세포에서 phorbol ester의 일종인 PDBu가 세포내 PKC를 활성화시켜 45 pS의 이온통로를 활성화시키며 이러한 작용의 결과로 세포막전압의 변화가 세포의 기능을 조절할 것으로 사료된다.

(주요 단어 : 골개조, K^+ 통로, 세포막 전압, Protein kinase C)

1. 서 론

교정력은 치아 주위 골조직과 연조직의 개조현상을 일으키며, 교정력을 치아에 가할 경우 치조골의 압박측 영역에서는 골의 흡수가 일어나고, 인장력을 받은 부위에서는 골의 생성이 일어난다. 이러한 골의 흡수와 생성은 교정력이라는 기계적 자극에 의해 골을 흡수하는 파골세포와 골을 형성하는 조골세포가 분화됨으로써 이루어진다. 골조직의 성장과 개조는 조

골세포, 파골세포 및 그 전구세포의 증식, 분화 및 활성화에 영향을 미치는 호르몬 등의 전신적 인자와 cytokine, TGF(transforming growth factor) 등과 같은 국소적 인자에 의해 조절되고 있다.

치아 이동에 관한 연구는 과거에는 치아 주위 조직의 조직학적 반응에 대한 연구가 주류를 이루어 왔으나¹⁾ 세포생물학의 발달과 더불어 치아 이동에 영향을 미치는 이차 전령 물질들의 연구가 활발히 진행되었다. 즉 교정력을 가한 치아 주위 조직에 cAMP 및 PGE₂ 등의 증가가 있었으며 cAMP를 경유한 골 개조현상이 주장되었다.²⁻⁴⁾ 기계적인 자극에 의한 세포 반응의 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 조골세포 세포막에 존재하는 이온통로의 활동도 변화에 의하여 조골세포가 활성화되는 것으로 추측하고 있다⁵⁾.

시험관내에서 조골세포의 기계적자극은 세포의 대

¹⁾ 부산대학교 치과대학 교정학교실, 대학원생.

²⁾ 부산대학교 치과대학 교정학교실, 부교수.

교신저자 : 박수병

부산광역시 서구 아미동 1가 10

부산대학교 치과대학 교정학교실 / 051-240-7447

Sbypark@pusan.ac.kr

사를 항진시키며 세포막전압에도 영향을 미친다⁶⁻⁸⁾. 그러나 기계적 자극이 조골세포의 막전위에 미치는 효과에 대한 기전은 밝혀져 있지 않다. 이러한 기계적 자극이외에 cAMP, PGE₂, hydrocortisone 및 calcitonin 등도 조골세포의 세포막전압에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{6,9)}. Davidson 등, Duncan, Mislter와 Yamaguchi 등은 조골세포에서 세포막 신장에 의해 활성화되는 여러 종류의 이온통로를 보고하고 있다^{5,10,11)}.

G292 세포는 osteoblastic phenotype을 가지고 있으며^{12,13)}, PTH¹⁴⁾, 1,25 dihydroxy-vitamin D₃¹⁵⁾ 그리고 PGE₂¹⁶⁾ 등의 osteotropic factor들에 반응하는 대표적인 osteoblast-like cell이다. G292 세포주에 존재하는 이온통로들이 보고되어 있으며^{5,17)}, 그중 하나가 K⁺통로이며 1가 양이온의 주된 통로로 작용한다.

Phorbol ester는 세포내 단백질을 인산화시키는 protein kinase C (PKC)를 활성화시키는 물질이다. 세포막 투과성이 높으며 세포내의 diacylglycerol과 동일한 작용을 하지만 대사가 되지 않아 PKC를 활성화시킬 때 널리 사용되는 약물이다. PKC가 활성화되면 세포의 기능에 많은 영향을 끼친다. 주된 작용으로는 세포 증식^{18,19)}, 호르몬 분비 조절^{20,21)} 및 prostaglandin의 생성 증가작용^{22,23)} 등이 있다. Phorbol ester의 일종인 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)는 PGE₂의 합성을 촉진하며 결과적으로 골 흡수를 증가시켜 혈장 칼슘 항상성 조절에 중요한 생리적 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾.

본 연구에서는 가장 대표적인 osteoblast-like cell인 G292 세포주에서 세포막에 존재하는 K⁺통로에 대한 PKC의 작용을 조사하기 위하여 배양된 G292 세포주에서 단일이온통로의 활동에 대한 phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)의 효과를 관찰하여 PKC가 조골세포의 막전압에 미치는 효과를 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

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 35mm petri dish에 직경 8 mm의 원형 커버글라스를 아래에 두고 5 x 10⁴

cells/ml로 뿌려 4 - 6일간 배양 후 실험에 사용하였다. 실험을 시작하기 전에 petri dish 내의 배양액을 세포외액으로 교체하여 사용하였다. 세포외액의 조성은 (단위 : mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES (pH 7.4) 이다.

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 5 - 10 MΩ인 것을 사용하였다. 독립현미경에 설치되어 있는 실험용기(Organ chamber)에 세포를 배양시킨 원형 커버글라스를 두고 세포외액을 관류시켜 부유물을 세척 후 온도를 실온으로 평형시키고 실험을 시작하였다.

세포막전압 기록은 Hamil 등의 방법으로 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 GΩ 이상이 될 때까지 기다린다. 세포막과 유리전극이 충분히 결합하여 GΩ 이상이 되면 유리전극내 압력을 제거하고 세포막부착상태(cell attached mode)에서 막전류를 기록하였다. 유리전극 내부의 용액은 세포외액 또는 세포내액을 사용하였으며, 세포내액의 조성은 (단위 : mM) 140 KCl, 2 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES (pH 7.4)이다.

막전압 고정은 Axopatch 200 B (AXON, USA)를 이용하여 Bessel filter를 1 kHz에 두고 신호를 분리했으며 기록된 전류는 개인용 컴퓨터에 저장하여 분석하였다. 컴퓨터에 내장된 아날로그-디지털 변환기는 Digidata 1200 B (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.

단백질 분리 및 확인

G292 세포주에서 phorbol ester에 의하여 PKC가 활성화되는 것을 확인하기 위하여 PKC α의 세포내 translocation을 western blot으로 확인하였다. 25 cm² 플라스크에 4일간 배양된 세포에 PDBu 0.1 μM을

첨가하고 10분 후 차가운 단백질 분리용 완충용액을 1 ml 넣어 세포 활동을 중지시켰다. 플라스크내 세포를 기계적으로 제거 후 균질액을 만들었다. 10⁵g으로 원심분리하여 상층액을 세포질 분획으로 하고, 침전물은 계면활성제가 첨가된 완충용액으로 부유 후 1시간 동안 섞고 나서 다시 10⁵g으로 원심분리하여 상층액을 세포막 분획으로 시료를 준비하였다.

7.5% polyacrylamide gel (0.38 M Tris · HCl, pH 8.3) 위에 4.5% polyacrylamide (0.13 M Tris · HCl, pH 6.8)이 놓이는 불연속 gel을 만들어 위에서 추출한 단백질을 gel-loading 완충액 (50 mM Tris · HCl, pH 6.8; 5% mercaptoethanol; 2% SDS; 0.1% bromophenol blue; 10% glycerol)에 처리하여 100 °C에서 3분간 가열한 후 급냉시켜 각 lane당 50 µg씩 gel에 부하시켰다. 이것을 Tris-glycine 완충액 (0.025 M Tris · HCl, pH 8.3; 190 mM glycine; 1% SDS)을 사용하여 100V에서 2시간 동안 전기영동을 시행하였다.

SDS-PAGE에 의하여 분획된 단백질을 nitrocellulose membrane(Biorad)으로 전기적 전이를 4°C에서 100 V 전압을 사용하여 90분간 시행하였다. 전이된 nitrocellulose membrane에 일차 항체 (PKC α; Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1 : 2000으로 희석하여 첨가시키고 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 5분간 5회 세척 후 horse radish peroxidase가 결합된 이차 항체 (anti-rabbit IgG)를 다시 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. PBS로 일차 항체 반응시와 동일한 방법으로 세척 후 ECL reagent (Amersham, USA)를 1분간 nitrocellulose membrane에 반응시킨 후 wrap으로 감싸고 암실에서 시간 간격에 따라 필름에 현상시켜 결과를 검출하였다.

시약 및 자료분석

DMEM, PDBu 및 staurosporine은 SIGMA(USA)사의 제품을 사용하였으며, 8 mm 원형 커버글라스는 Warner(USA)사의 제품을 이용하였다. 기타 일반시약 및 western blot 관련 시약은 1급 시약을 사용하였다. 실험결과의 평균치 비교는 Student's *t*-test를 하여 *p* 값이 0.05 미만을 유의한 것으로 해석하였다.

III. 결 과

G292 세포에서 유리전극내 세포내액을 넣고 접근시켜 GigaOhm으로 부착한 상태에서 Cell attached

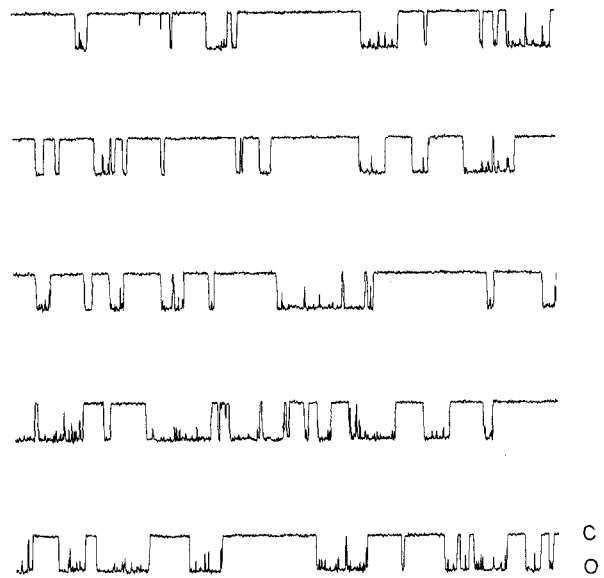


Fig. 1. Single channel currents of a G292 cell-attached patch containing at least one ion channel of same amplitude. Outward currents are shown as downward deflections, and the closed state (C) and the opened state (O). Mean amplitudes were 2.7pA. The patch was held at 60mV, and the pipette contained a potassium-enriched solution. The cell was from a 5-day culture. Time scale is 300ms per one tracing.

mode로 막전류를 기록한 결과를 그림 1에 제시하였다. 막전압은 피펫 내부를 60 mV로 고정하였다. 단일 이온통로의 활동을 연속적으로 나타내며 전류 크기의 평균치는 2.7pA이었다. 이들 활동을 보이는 단일 이온통로의 전기적 전도성은 45pS이었다. 본 실험에서 관찰한 세포 중 이온통로 전류가 2개 이상 겹쳐서 나타나는 경우와 여러 크기의 전도성을 갖는 전류가 관찰되기도 하였으나 45pS의 전류가 특징적으로 많이 나타났다.

그림 2는 단일이온통로 전류의 전류-전압 관계를 그래프로 제시한 것이다. 원형 기호의 전류는 유리전극 내부용액을 세포내액의 조건인 140 mM K⁺를 사용한 것이며 사각형 기호는 세포외액의 조건인 140 mM Na⁺ 및 5 mM K⁺를 사용한 것이다. 두 조건에서 전류의 크기 및 역전전압이 다르게 나타났다. 유리전극 내부에 세포내액을 사용한 경우 역전전압이 5.5 mV이었으며, 세포외액의 조건에서는 역전전압이 -27 mV이었다. 이러한 차이는 유리전극 내부용액의

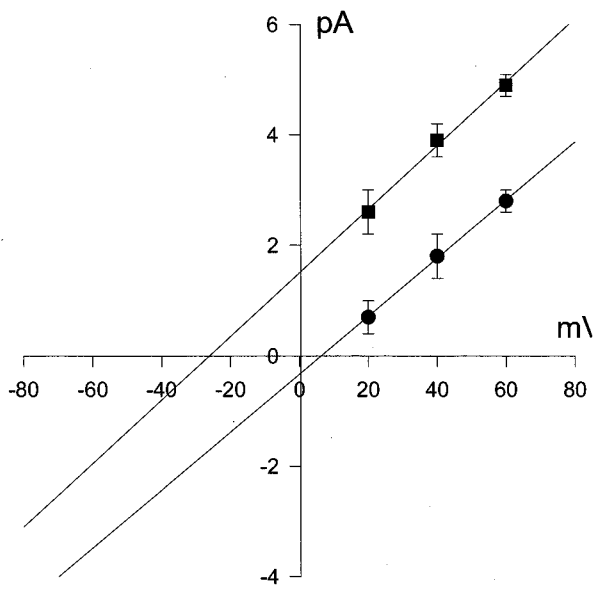


Fig. 2. Conductance of the K^+ channel. Current-voltage relations for the channel with potassium-enriched (filled circle) or extracellular saline (filled square) in the pipette. Each data point represents the mean amplitude. Lines represent the least-squares fit to the data points, and reversal potential and conductance were obtained by extrapolation of the fitted points.

K^+ 농도 차이로 나타나는 결과이다. 비록 동일한 막 전압에서 전류의 크기는 다르지만 회귀직선의 기울기에는 변화가 적으므로 전기적 전도성의 차이는 없는 것으로 추측된다.

유리전극 내부를 세포내액으로 하고 cell-attached 모드에서 PDBu의 작용을 관찰한 결과를 그림 3에 제시하였다. 막전압은 60 mV로 고정하였으며 단일이온통로 전류를 기록하면서 실험용기내의 용액에 약물을 단계적으로 첨가하여 이온통로 전류의 변화를 관찰하였다. 그림 3은 PDBu농도에 따른 이온통로의 열릴 확률을 그래프로 제시한 것이며 PDBu를 첨가하지 않은 대조군에 비하여 10 nM 이상의 PDBu를 처리한 조건에서 이온통로의 열릴 확률이 유의하게 증가하는 것을 관찰하였다.

그림 4는 PDBu에 의하여 이온통로가 활성화되는 것이 PKC를 경유하여 나타나는 결과인지를 확인하기 위하여 PKC 억제제인 staurosporine을 사용하여 PDBu의 작용을 관찰하였다. PDBu 단독에 의한 작용이 staurosporine 10 nM 전처리에 의하여 억제되었음

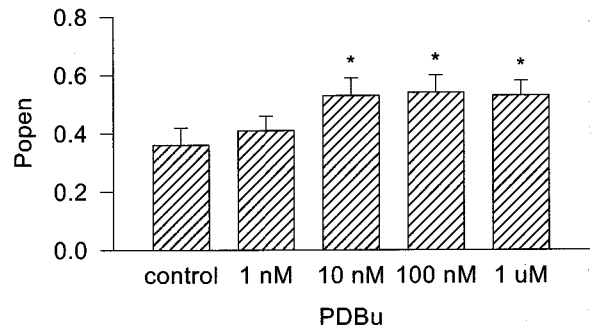


Fig. 3. Effect of PDBu on the open probability of 45pS ion channel ($n = 4$).

*: $p < 0.05$

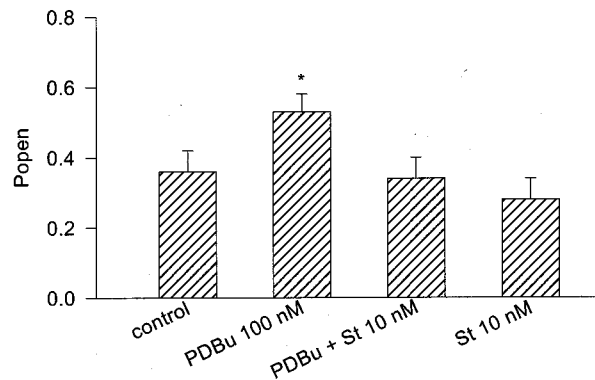


Fig. 4. Effects of PDBu and staurosporine on the open probability of 45pS ion channel. St, staurosporine ($n = 4$).

*: $p < 0.05$

을 나타내며, staurosporine 단독으로는 유의한 변화가 없었다.

그림 5는 PDBu 100 nM에 의한 단일이온통로의 전류-전압 특성 변화를 관찰한 것이다. PDBu처리에 의하여 역전전압이 음의 방향으로 이동하였으나 전기적 전도성에는 변화가 없음을 보여준다.

그림 6은 G292 세포주에서 PDBu에 의하여 PKC가 활성화되는 것을 확인하기 위하여 PDBu를 처리한 세포에서 PKC α 를 western blot한 결과이다. 80kDa 근처에서 PKC α 가 나타나며 PDBu를 처리한 세포에서 대조군에 비하여 membrane 분획이 증가된 것을 확인할 수 있다.

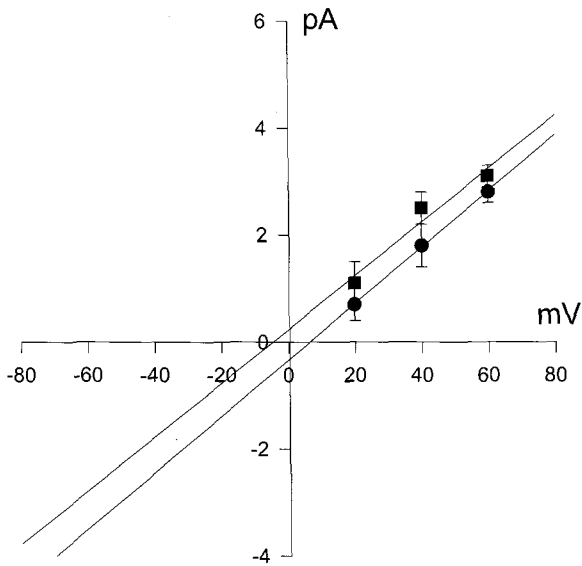


Fig. 5. Current-voltage relations for the γ 45 channel after PDBu 100nM addition to the bath (n = 6).

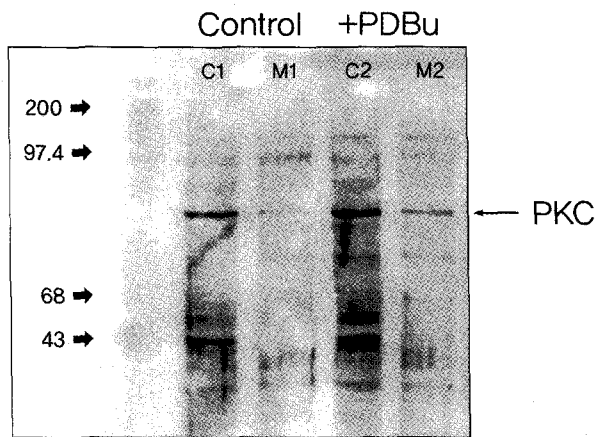


Fig. 6. Photography of electrophoresis gel result. The molecular weight of PKC α is about 80kDa. C1 and M1 are the fraction of cytosol and membrane of control. C2 and M2 are the fraction of cell pretreated by PDBu 0.1 μ M for 10 minutes.

IV. 고 찰

골 생성과 흡수로 대표되는 교정적 치아 이동시의 골개조 현상은 골조직의 대표적인 대사 활동이라 할 수 있다. 이는 조골세포, 파골세포에 의한 것으로 여겨지고 있으며 이에 대한 이해가 필수적이다. 하지만

이런 골개조 현상에 대한 추적이 여러 방향으로 시도되고 있으나 골 생성과 흡수과정을 활성화시키고 조절하는데 관여하는 세포기구에 관해서는 아직 논란이 많은 실정이다.

본 연구는 phorbol ester의 일종인 PDBu가 G292 세포에서 이온통로를 활성화시키는 것을 확인하였다. PDBu는 일정농도 이상에서 단일이온통로의 열릴 확률을 증가시켰으며(그림 3), PKC 억제제인 staurosporine 전처치에 의하여 PDBu의 작용이 억제되는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 G292 세포에서 이온통로에 대한 PDBu의 작용이 세포내 PKC 활성화를 통하여 나타나는 결과임을 나타내며 세포내 PKC 활성화를 시키는 다른 약물에 의해서도 이온통로의 활성화가 예상된다. PDBu에 의한 PKC 활성화는 세포막의 K⁺ 통로에 대한 역전전압을 음의 방향으로 이동시켰는데(그림 5) 이러한 결과는 K⁺ 통로 또는 다른 통로에 작용하여 이온통로의 이온 선택성에 영향을 미친 것으로 판단된다.

G292 세포에서 PDBu가 PKC를 활성화시키는 것을 western blot으로 확인한 결과 PDBu에 의하여 세포질에서 세포막으로 PKC가 이동하는 것을 확인하였다(그림 6). 이러한 결과만으로 PKC가 G292 세포에서 이온통로에 영향을 미쳤다고 판단할 수는 없지만, PDBu의 작용이 staurosporine에 의하여 효과가 상쇄되는 특성을 고려하면 PKC가 G292 세포에서 45 pS의 이온통로에 작용하고 있음을 알 수 있다. 본 실험에서 단일이온통로의 활동 기록은 모두 cell-attached 모드로 하였다. PDBu는 지용성 물질이며 세포막 투과도가 높으므로 세포질내로 투과하여 간접적으로 세포내 신호전달기전을 통하여 작용하였을 것이다.

PKC는 세포내 대사활동을 조절하는 작용이 있음은 알려져 있으나 직접 이온통로에 작용한 것인지 아니면 세포내 다른 기전을 통하여 이온통로에 영향을 미치는지는 확인할 수 없었다.

조골세포의 대사작용은 골흡수와 밀접한 관련이 있으며 이러한 작용은 예를 들어 골 흡수 촉진제인 parathyroid hormone(PTH)의 작용과 일치한다. PTH는 조골세포에서 세포의 형태²⁵⁾, collagen 합성²⁶⁾, calcium 대사²⁷⁾ 등을 조절하며, 세포막 전위에 영향을 미친다^{6-8,28)}. 그 외 많은 종류의 osteotropic agent들인 cAMP, PGE₂, hydrocortisone, 그리고 calcitonin 등이 모두 조골세포에서 세포막 전위에 영향을 미친다^{6,9)}. 조골세포의 세포막에는 다양한 이온통로

가 존재하고 있으며 막전위 조절에 관여하고 있음이 밝혀져 있다²⁹⁾.

최근 Swarthatout 등³³⁾은 조골세포 세포주인 UMR 106-01에서 PTH가 adenylate cyclase 뿐만 아니라 phospholipase C를 활성화시키며 PKC를 활성화시켜 세포내 DNA 합성을 증가시키는 것을 보고하였다. 저농도의 PTH에 의한 세포의 증식에 extracellular single-regulated kinases(ERKs)가 관여되며 이러한 효과가 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)에 의하여 나타나고 PKC 억제제에 의하여 ERKs 활성이 차단되는 것을 보고하였다. 이것은 PTH에 의한 조골세포의 증식 작용이 PKC를 경유하는 것이며 조골세포의 골개조에 대한 PKC의 작용에 대하여 향후 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

일반적인 세포막의 안정막전압은 K⁺통로의 전도성에 의존적이며 K⁺통로의 활성화는 세포막전압을 K⁺평형전압으로 유지시키는 특성이 있다. 따라서 K⁺통로의 활성화는 전압의존성 Ca²⁺통로의 활성을 조절할 수 있으며 세포의 기능을 조절하게 된다. 이러한 K⁺통로는 세포분열에도 관여할 수 있다. 여러 가지 mitogen들이 세포내 K⁺ 농도를 증가 또는 감소시키는 작용을 한다고 알려져 있다^{30,31)}. Mitogen을 투여했을 때 수초 또는 수분 내에 K⁺통로의 활성이 증가한다는 보고가 있으며 이러한 작용은 세포내 이차 전령을 통하여 나타나는 결과들로 보고되어 있다³²⁾. PDBu는 mitogen의 일종이며 비교적 선택적으로 PKC를 활성화시키는 작용을 가지고 있다.

따라서 PDBu의 효과는 세포내 PKC를 활성화시켜 세포내 신호전달기전에 의하여 K⁺ 이온통로를 활성화시키는 이차 전령의 생성을 증가시켜 이온통로를 활성화시키는 것으로 추측된다.

V. 결 론

본 연구는 G292 세포를 이용하여 PKC를 활성화시키는 물질인 phorbol ester의 일종인 PDBu가 K⁺ 단일이온통로의 활동에 미치는 효과를 관찰하기 위해 시행되었다.

안정상태에서는 G292 세포에서 cell-attached 모드로 단일이온통로의 활동을 관찰한 결과 45 pS의 통로가 특징적으로 나타났다. 유리전극 내부에 세포내액과 세포외액을 사용한 전류-전압의 관계는 세포내액을 사용한 경우에는 역전전압이 5.5 mV이었으며 세포외액을 사용한 경우에는 -27 mV이었다. PDBu는

10 nM 이상의 농도에서 45 pS의 이온통로를 활성화시켰으며 PKC 억제제인 staurosporine 10 nM에 의하여 차단되는 특성을 보였다. PDBu는 45 pS의 이온통로에 작용하여 전류-전압의 관계에서 역전전압을 음의 방향으로 이동시켰으며 동일한 막전압에서 전류의 크기를 증가시켰다. G292 세포에서 PDBu에 의하여 PKC가 활성화되는 것을 western blot으로 확인한 결과 PDBu 0.1 uM은 세포질에서 세포막으로 PKC의 translocation을 증가시키는 것을 확인하였다. 이상의 결과는 G292 세포에서 PDBu가 PKC를 활성화시켜 45 pS의 이온통로를 활성화시키는 것을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Reitan K. The initial tissue reaction incident to orthodontic tooth movement as related to the influence of function. *Acta Odontol Scand* 1951 ; 9 : 1-239.
2. Martin TJ, NG Kw, Suda T. Bone cell physiology. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1989 ; 18 : 833-58.
3. Davidovitch Z, Nicolay O, Ngan PW, Shanfeld J. Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am* 1988 ; 32 : 411-35.
4. Ngan P, Saito S, Saito M. The interactive effects of mechanical stress and interleukin-1 β on prostaglandin E and cyclic AMP production in human periodontal ligament fibroblasts in vitro : comparison with cloned osteoblastic cells of mouse(MC3T3-E1). *Arch Oral Biol* 1990 ; 35 : 717-25.
5. Davidson RM, Tatakis D, Auerbach AL. Multiple forms of mechanosensitive ion channels in osteoblast-like cells. *Pflugers Arch* 1990 ; 416 : 646-51.
6. Chow SY, Chow YC, Jee WS, Woodbury DM. Electrophysiological properties of osteoblastlike cells from the cortical endosteal surface of rabbit long bones. *Calcif Tissue Int* 1984 ; 36 : 401-8.
7. 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 : 237-42.
8. Fritsch J, Edelman A, Balsan S. Early effects of parathyroid hormone on membrane potential of rat osteoblasts in culture: Role of cAMP and Ca²⁺. *J Bone Miner Res* 1988 ; 3 : 547-54.
9. 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 : 53-8.
10. Duncan R, Mislser S. Voltage-activated and stretch-activated Ba²⁺ conducting channels in an osteoblast-like cell line (UMR 106). *FEBS Lett* 1989 ; 251 : 17-21.
11. 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 : 4383-90.
12. Peebles PT, Trisch T, Papageorge AG. Isolation of four unusual pediatric solid tumor cell lines. *Pediatric Res* 1978 ; 12 : 485.
13. Shupnik MA, Tashjian AH Jr. Epidermal growth factor and phorbol ester actions on human osteosarcoma cells : characterization of res-

- ponsive and nonresponsive cell lines. *J Biol Chem* 1982 : 257 : 12161-4.
14. Medda S, Dolce C, Dziak R. Parathyroid hormone stimulated inositol 1,4,5 triphosphate production in osteoblastic cells. *J Dent Res* 1989 : 68 : 353.
 15. Paschalis EP, Tatakis DN, Zawzcki SJ, et al. Vitamin D modulation of mineralization by human osteoblastic cells. *J Dent Res* 1990 : 69 : 272.
 16. Tatakis DN, Dziak R. Prostaglandin E₂ increases cytosolic calcium in osteoblastic osteosarcoma cells. *J Dent Res* 1989 : 68 : 258-63.
 17. Davidson RM. Membrane stretch activates a high-conductance K⁺ channel in G292 osteoblast-like cells. *J Memb Biol* 1993 : 131 : 81-92.
 18. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 1979 : 48 : 193-216.
 19. Blumberg PM. In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters : part 1. *Crit Rev Toxicol*. 1980 : 8 : 153-97.
 20. Chinkers M, McKanna JA, Cohen S. Rapid rounding of human epidermoid carcinoma cells A-431 induced by epidermal growth factor. *J Cell Biol* 1981 : 88 : 422-9.
 21. Schonbrunn A, Krasnoff M, Westendorf JM, Tashjian AH Jr. Epidermal growth factor and thyrotropin-releasing hormone act similarly on a clonal pituitary cell strain. Modulation of hormone production and inhibition of cell proliferation. *J Cell Biol* 1980 : 85 : 786-97.
 22. Levine L, Hassid A. Effects of phorbol-12,13-diester on prostaglandin production and phospholipase activity in canine kidney (MDCK) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1977 : 79 : 477-84.
 23. Levine L, Ohuchi K. Retinoids as well as tumour promoters enhance deacylation of cellular lipids and prostaglandin production in MDCK cells. *Nature* 1978 : 276 : 274-5.
 24. Tashjian AH Jr, Ivey JL, Delclos B, Levine L. Stimulation of prostaglandin production in bone by phorbol diesters and melittin. *Prostaglandins* 1978 : 16 : 221-32.
 25. Gaillard PJ, Herrman-Erlee MP, Hekkelman JW, et al. Skeletal tissue in culture: Hormonal regulation of metabolism and development. *Clin Orthop* 1979 : 142 : 196-214.
 26. Kream BE, Rowe D, Smith MD, Majeska R. Hormonal regulation of collagen synthesis in a clonal rat osteosarcoma cell line. *Endocrinology* 1986 : 119 : 1922-8.
 27. Yamaguchi DT, Hahn TJ, Iida-Klein A, et al. Parathyroid hormone-activated calcium channels in an osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line : cAMP dependent and cAMP-independent calcium channels. *J Biol Chem* 1987 : 262 : 7711-8.
 28. Edelman A, Fritsch J, Balsan S. Short-term effects of PTH on cultured rat osteoblasts: changes in membrane potential. *Am J Physiol* 1986 : 251 : 483-90.
 29. Ypey DL, Weidema AF, Hold KM, et al. Voltage, calcium, and stretch activated ionic channels and intracellular calcium in bone cells. *J Bone Miner Res* 1992 : 7 : S377-87.
 30. Gelfand EW, Cheung RK, Grinstein S. Mitogen-induced changes in Ca²⁺ permeability are not mediated by voltage-gated K⁺ channels. *J Biol Chem* 1986 : 261 : 11520-3.
 31. Prasad KV, Severini A, Kaplan JG. Sodium ion influx in proliferating lymphocytes: an early component of the mitogenic signal. *Arch Biochem Biophys* 1987 : 252 : 515-25.
 32. Dubois JM, Rouzaire-Dubois B. Role of potassium channels in mitogenesis. *Prog Biophys Molec Biol* 1993 : 59 : 1-21.
 33. Swarthout JT, Doggett TA, Lemker JL, Partridge NC. Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in rat osteoblastic cells by parathyroid hormone is protein kinase C-dependent. *J Biol Cell* 2001 : 276 : 7586-92.

- ABSTRACT -

Effect of phorbol ester on K⁺ channel in an G292 osteoblast-like cell

Mi-Kyung Kim, Su-Byung Park

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Pusan National University

In order to investigate the action mechanism of protein kinase C on K⁺ channel in osteoblastic cell, effects of phorbol 12,13-dibutyrate on human osteoblast-like cells (G292) were studied by patch clamp technique with cell-attached configuration.

In this experiment, 45pS ion channel was dominant in G292 cell line according to their approximate conductances in symmetrical 140mM KCl saline at holding potential of 60mV. In current-voltage relationship, reversal potential was 5.5mV at the condition of potassium enriched saline in the pipette and -27 mV at the condition of standard extracellular saline in the pipette. Phorbol 12, 13-dibutyrate 10 nM increased the open probability of 45 pS channel and staurosporine, an

inhibitor of protein kinase C, suppressed this effect. Phorbol 12,13-dibutyrate moved the reversal potential of 45pS channel to more negative potential and increased the single channel current at the same membrane potential. In order to check the activation of protein kinase C in G292 cell by phorbol 12,13-dibutyrate, western blot of protein kinase C was performed. Phorbol 12,13-dibutyrate 0.1 μ M translocated protein kinase C from cellular compartment to membrane compartment of the cell.

These findings suggest that phorbol 12,13-dibutyrate, one of phorbol esters, activate 45pS channel in G292 cell and affect cell membrane potential, that regulate cellular function.

KOREA. J. ORTHOD. 2002 : 32(2) : 227-34

※ **Key words** : K^+ channel, Cell membrane potential, Protein kinase C