

A Study about the Mechanism of Ca^{2+} and Pi Homeostasis by Estradiol 17 β in Proximal Tubule Cells in the Osteoporosis

Ho-jae Han and Soo-hyun Park[†]

Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

It has been reported that osteoporosis induced by the deficiency of estrogens in menopause is associated with the unbalance of Ca^{2+} and Pi levels. Proximal tubule is very important organ to regulate Ca^{2+} and Pi level in the body. However, the effect of estrogens on Ca^{2+} and Pi regulation was not elucidated. Thus, we examined the effect of 17- β estradiol (E_2) on Ca^{2+} and Pi uptake in the primary cultured rabbit renal proximal tubule cells. In the present study, E_2 ($> 10^{-9}$ M) decreases Ca^{2+} uptake and stimulates Pi uptake over 3 days. E_2 -induced decrease of Ca^{2+} uptake and stimulation of Pi uptake were blocked by actinomycin D (a gene transcription inhibitor), cycloheximide (a protein synthesis inhibitor), tamoxifen, and progesterone (estrogen receptor antagonists). E_2 -induced decrease of Ca^{2+} uptake and stimulation of Pi uptake were blocked by SQ22536 (an adenylate cyclase inhibitor), Rp-cAMP (a cAMP antagonist), and PKI (a protein kinase A inhibitor). Indeed, E_2 increased cAMP formation. In addition, E_2 -induced decrease of Ca^{2+} uptake and stimulation of Pi uptake were blocked by staurosporine, H-7, and bisindolylmaleimide I (protein kinase C inhibitors) and E_2 translocated PKC from cytosolic fraction to membrane fraction. In conclusion, E_2 decreased Ca^{2+} uptake and stimulated Pi uptake via cAMP and PKC pathway in the PTCs.

Key Words: Osteoporosis, Estradiol-17 β , Proximal tubule cells, Ca^{2+} , Pi

서 론

골다공증의 예방 및 조절에 관한 전향적 연구결과들은 골내에서 뼈 침착 조절에 관련에 대한 중요한 해답을 주었지만 아직도 그와 관련된 여러 질문들이 남아 있다. 최근 신장이식 환자에게서 골다공증이 다발 하는 것으로 보고되어 신장이 골다공증의 발병에 중요한 기관으로 인식되어오고 있다 (Mikuls et al., 2003). 신장의 여러 부위 중 신체에서 무기물의 재흡수에 중추적인 역할을 하는 신장의 근위세뇨관세포의 기능 및 그와 관련된 기전들이 골다공증의 발생 및 치료에 중요한 역할을 할 것이라고 몇몇 연구자들에 의해서 제안되고 있다 (Dick & Prince, 1997; Legroux-Gerot et al., 1999).

Ca^{2+} 결핍은 골다공증의 직접적인 병인으로 인식되고 있으며 (De Sevaux et al., 2002; Seeman, 2002), 생체내에서 Ca^{2+} 재흡수의 대부분은 신장 근위세뇨관에서 paracellular 경로

에 의해서 이루어지며 원위세뇨관세포에서는 일부분 (약 15~20%)이 이루어지고 있다 (Wright & Bomsztyk, 1984). 한편, Ca^{2+} 이외에도 체내에서 phosphate의 조절이 골다공증과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료되고 있다 (Prie et al., 2002; Scheinman & Tenenhouse, 2003). 생체내에서 Pi 흡수는 신장의 근위세뇨관에서 주로 이루어지며, 솔변연에 위치한 두 가지 형태의 Na^+/Pi cotransporter 중 주로 type II형의 Na^+/Pi cotransporter에 의해서 매개되는 것으로 보고되고 있다 (Murer et al., 1998; 2000; 2003). 이러한 보고들은 생체내 여러 무기이온 중에서 Ca^{2+} 과 Pi가 골다공증의 발병에 관여할 수 있음을 시사해 주고 있다. Navarro 등 (1994)도 Ca^{2+} 과 phosphate 치가 골다공증과 관련된다고 보고하였다. 이처럼 신장의 근위세뇨관 세포는 Ca^{2+} 및 phosphate 같은 무기이온의 주요한 흡수 부위로서 중요한 역할을 담당한다 (Dennis et al., 1979).

생체내에서 estradiol-17 β (E_2)는 체내의 항상성 유지에서 다양한 기능을 담당하고 있다. 골다공증시에 체내의 Ca^{2+} 조절 작용에 E_2 는 직·간접적으로 골다공증의 발병에 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 이를 살펴보면, estrogen 결핍시에 여성 및 남성에게서 골다공증이 유발되는 것으로 보고되고 있다 (Gallagher, 2001; Murata et al., 2002; Rodriguez-Martinez & Garcia-Cohen, 2002). 따라서 본 연구에서는 초대

* 논문 접수: 2004년 11월 1일

수정재접수: 2004년 12월 10일

[†] 교신저자: 박수현, (우) 500-757 광주광역시 북구 용봉동 300, 전남대학교 수의과대학 생리학교실
Tel: 062-530-2832, Fax: 062-530-2899
e-mail: parksh@chonnam.ac.kr

배양한 신장 근위세뇨관세포에서 E₂의 Ca²⁺ uptake 및 Pi uptake에 대한 효과를 알아보고 이들이 어떠한 신호전달계를 통해 작용하는지를 알아보았다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에선 New Zealand White 수컷 토끼 (1.3~1.8 kg)를 사용하였다. 기본배지는 phenol red-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium과 F-12 Nutrient Mixture의 1:1 혼합체를 사용하였다. Class IV collagenase 및 soybean trypsin inhibitor는 Life Technology에서 구입하였다. Estradiol-17β (E₂), SQ 22536, Rp-cAMP, staurosporine, H-7 및 TPA는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 주문하였다. Protein kinase A inhibitor amide (PKI) 및 bisindolylmaleimide I은 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다. ³²P 및 ⁴⁵Ca²⁺은 Dupont/NEN (NEN, Boston, MA, USA) 에서 각각 구입하였다.

2. 토끼 신장 근위세뇨관세포의 초대배양

토끼 신장 근위세뇨관세포의 초대배양은 Chung 등 (1982)의 방법을 변형한 것으로 수컷 토끼 (1.3~1.8 kg)를 경추 타격으로 안락사 시킨 후 신동맥과 정맥을 그대로 유지한 채 즉시 신장을 적출해 지방과 주위조직을 제거한 다음 기본배지에 penicillin G 192 IU/ml와 streptomycin 200 µg/ml을 첨가하여 얼음으로 차게한 배지에 보관하였다. 적출된 신장은 신동맥에 끝이 무딘 18호 주사바늘을 삽입하여 외과용 실로 고정 한 후 혈액이 완전히 제거될 때까지 멸균된 PBS로 관류시켰다. 이어서 0.5% iron oxide 용액으로 피질이 암회색으로 될 때까지 관류시킨 후 항생제가 첨가된 기본배지로 관류시켰다. 피막을 박리시킨 후 외과용 가위를 사용하여 피질부분을 약 0.5 cm 정도의 조각으로 잘라내어, 멸균된 조직 균질기로 3~4회 갈아 두 층 (254 µm와 85 µm)의 나일론망을 통과시킨 후 85 µm 나일론망에 걸린 세포만을 수집하여, DMEM/F-12 배지가 채워진 시험관으로 옮긴다. 이들 중 산화철을 포함하고 있는 사구체 세포는 멸균된 막대자석을 이용하여 제거하고, 근위세뇨관은 60 µg/ml collagenase class IV와 60 µg/ml soybean trypsin inhibitor로 상온에서 각각 3분씩 처리한 후 원심분리하여 3회 (1,000 rpm, 5분) 세척하였다. 이렇게 준비된 근위세뇨관을 2가지 성장인자 (insulin 5 µg/ml, transferrin 5 µg/ml)가 첨가된 기본배지에 희석하여 35 mm 플라스크 배양접시에 접종하였다. 배양은 95% air와 5% CO₂를 함유한 배양기에서 37°C를 유지하였고 배지는 접종 후 첫날 교체하고 그 이후는 3~4일 마다 교환하였다. 단, 세포의 활성 및 생화학적 측정을 위해서는 매 실험 24시간 전에 배지를 교환하였다.

3. Uptake 실험

초대배양된 근위세뇨관 세포의 물질이동계에 대한 estradiol-17β의 효과를 관찰하기 위하여 솔변연의 Na⁺/phosphate 공동운반체 (³²P) 및 Ca²⁺ uptake에 대하여 실험을 실시하였다. ³²Phosphate uptake는 Rabito (1985)의 방법을 변형하여 측정하였다. 세포단층을 uptake buffer [(150 mM NaCl, 1.2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, BSA (0.5 mg/ml), pH 6.5)]로 3회 세척한 후 ³²Phosphate (0.5 µCi/ml)와 phosphate 1 mM을 첨가하여 배양하였다. 배양이 끝나면 얼음으로 차게한 uptake buffer로 3회 세척하고 그 다음 단계는 ¹⁴C-α-MG uptake와 같이 실시하였다. ⁴⁵Ca²⁺ uptake는 Chiayrah 등 (1998)의 방법으로 측정 하였다. 세포 단층을 uptake buffer (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM KH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 5 mM L-alanine, 5 µM indomethacin, 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4)로 3회 세척한 후 동일 buffer에 1 µCi/ml ⁴⁵Ca²⁺를 첨가하여 배양하였다. 배양이 끝나면 얼음을 차게 한 uptake buffer로 3회 세척하고 0.1% SDS 1 ml로 세포를 용해시킨 후 세포를 수확하고, 950 µ씩을 각각 취하여 방사선량 측정용 병에 분주하였다. 여기에 scintillation solution을 2 ml 넣은 다음 교반기로 혼합시켜 β-counter로 방사선량을 측정하고 결과는 zero time uptake로 교정하였다. 단백질량은 Bradford (1976) 방법에 의해서 측정하였고, 모든 실험은 triplicate로 실시하였다.

4. cAMP 측정

세포 내에서 cAMP의 분해를 억제하고자 IBMX (100 µM)로 30분간 37°C에서 전 배양 하였다. EDTA (4 mM) 용액으로 세포를 균질화 시킨 후 5분간 끊어 3,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상층액만을 수거하여 냉장 보관하였다. cAMP 측정은 Amersham에서 구입한 cAMP assay system (TRK 432)을 이용하였다. 이 방법을 간단히 설명하면 EDTA (4 mM) 용액만을 이용하여 영점을 잡은 후 cAMP를 이용하여 표준 곡선을 잡았다. 준비된 시료와 ³H-cAMP를 100 µ씩 동량을 섞고 곧바로 binding protein 100 µ를 첨가한 후 3초간 섞었다. 1,000 rpm으로 20 초간 원심분리 시켜 시험관 벽에 붙은 시료들을 모은 다음 차가운 곳에 (4°C) 2시간 정도 방치한 후 cold charcoal 200 µ를 첨가하였다. 이후 2,000 rpm으로 3분간 원심분리 시킨 후 상층액만 200 µ씩 취하여 scintillation vial에 담아 scintillation solution 4 ml을 첨가한 후 방사선량을 측정하였다. 이후 단백질량을 정량하여 cAMP pmole/mg protein으로 나타내었다.

5. Western immunoblotting

E₂를 5일 동안 처리하고 나서 배지를 제거한 후 얼음으로 차갑게 한 PBS로 3번 세척한 후 수확하여 buffer A [137

Table 1. Effects of E₂, testosterone, and progesterone on Ca²⁺ uptake and Pi uptake

	⁴⁵ Ca ²⁺ uptake (pmol/mg protein/min)	³² Pi uptake (pmol/mg protein/min)
control	370.4±12.9	234.5±14.80
estradiol-17β	240.9±20.3*	310.9±17.8*
testosterone	355.8±14.8	240.8±13.0
progesterone	387.6±11.1	225.9±12.9

PTCs were treated with estradiol-17β (E₂), testosterone, and progesterone (10⁻⁹ M) for 5 days before Ca²⁺ uptake and Pi uptake. Then Ca²⁺ uptake and Pi uptake were conducted. Values are the means±S.E. of three independent experiments with triplicate dishes. *P<0.05 vs. control

mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM PMSF, 10 μg/ml leupeptin (pH 7.5)]에 부유시켰다. 부유된 세포들은 다시 21 gauge 바늘을 이용하여 용해를 시켰다. 이후 이들 용해물은 1,000 g에 10분 동안 4°C에서 원심분리 시켰다. 윗 상층액은 세포 질과 특이 부분을 만들기 위하여 100,000 g에서 1시간 원심분리 시켰으며 5배의 분량의 acetone으로 5분간 침전하여 얼음에서 5분간 방치 후 20,000 g에서 20분 동안 원심분리시켜 세포질 부분을 수확하였다. 이후 하층 부분은 1% (v/v) Triton X-100를 함유하는 buffer A에 부유시킨 후 두번 세척 후 세포막부분으로 사용하였다.

Bradford 단백질 정량법을 이용하여 각각 60 μg의 sample 들을 8% SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, polyvinylidene difluoride membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk에 1시간 동안 차단을 시켰고, 항체 (pan-PKC 항체)를 1% skim milk에 5,000배 희석하여 4°C에서 18시간 이상 배양하였다. 그 후, membrane을 0.1% Tween-20/1×TBS에 10분 간격으로 3번 세척 하였고, membrane을 1% skim milk에 5,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled 2차 항체에 1시간 동안 배양한 후, 3번 세척을 거쳐서 ECL 시약을 1분간 처리한 다음 X-ray 필름에 30초간 노출시켜 현상하였다.

6. 통계처리

실험 결과의 통계적 처리는 Student's t test 및 Analysis of Variance (ANOVA)로 하였으며, P-value<0.05을 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과와 표현은 means±S.E로 하였다.

결 과

1. E₂의 Ca²⁺ uptake 및 Pi uptake에 대한 시간 및 농도 효과

E₂가 신장 근위세뇨관세포의 Ca²⁺ 및 Pi 흡수 작용에 어떠한 작용이 있는지를 알아보기 위하여 다른 농도의 E₂ (10⁻⁹ M,

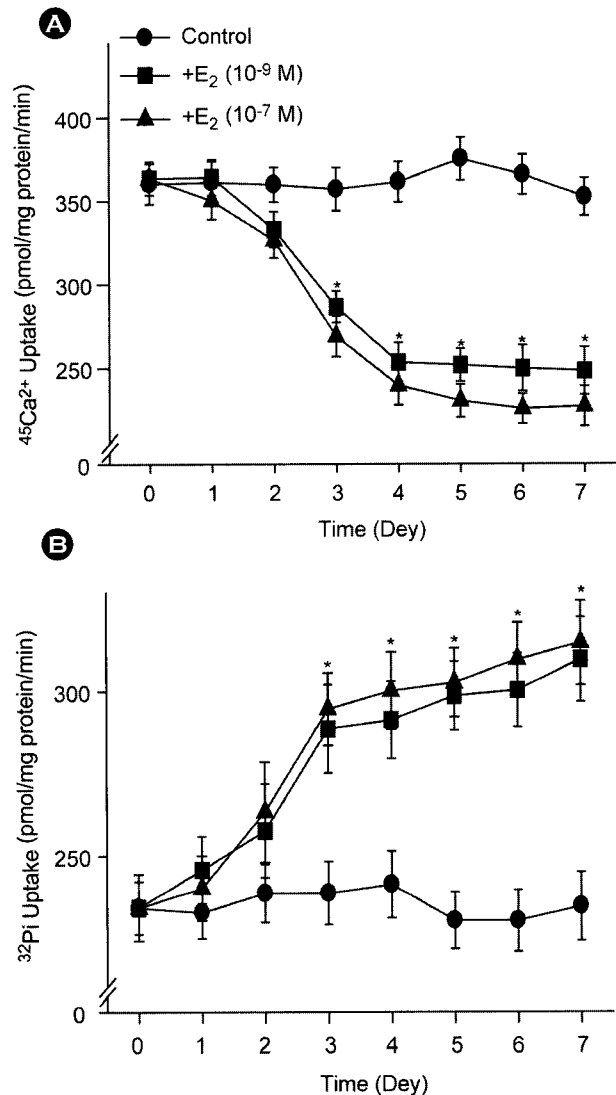


Fig. 1. Time course of E₂ on Ca²⁺ uptake (A) and Pi uptake (B). PTCs were incubated with E₂ (10⁻⁹ M or 10⁻⁷ M) for various times (0 to 7 days). Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. *P<0.05 vs. control.

10⁻⁷ M)를 일별로 처리하여 Ca²⁺ uptake 및 Pi uptake를 실시하였다. 실험결과 E₂ 처리시 3일이 지나면서 대조군에 비해 유의성있는 Ca²⁺ uptake 감소작용을 보였다. 이러한 작용은 5일에서 현저하게 나타났다. 한편, Pi uptake의 경우에는 Ca²⁺ uptake와 전혀 상반된 결과를 볼 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 10⁻⁹ M의 E₂를 5일간 처리하여 실험을 실시하였다 (Fig. 1).

E₂의 작용이 estrogen 특이성인지를 알아보기 위하여 성호르몬들인 E₂, progesterone 및 testosterone (10⁻⁹ M)을 5일 동안 근위세뇨관세포에 처리하였다. 실험결과 E₂의 경우는 대조군에 비해 현저한 Ca²⁺ uptake 감소 효과 및 Pi uptake 증가작용을 보였으나 progesterone 및 testosterone을 처리하였을 때

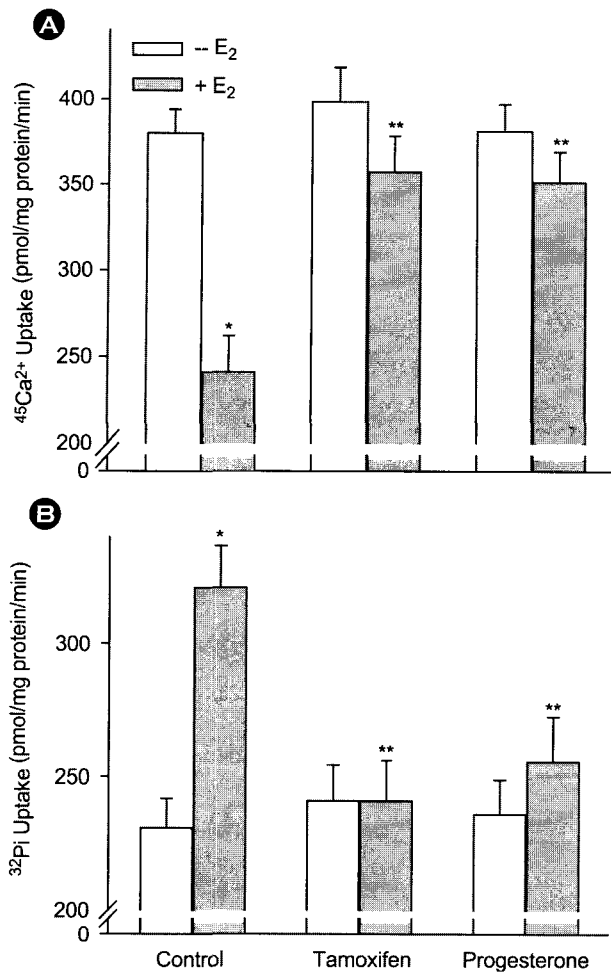


Fig. 2. Effects of tamoxifen and progesterone on E_2 -induced Ca^{2+} uptake (A) and Pi uptake (B). PTCs were incubated with tamoxifen (10^{-7} M) or progesterone (10^{-9} M) (E_2 receptor antagonist) for 30 min prior to incubation with 10^{-9} M E_2 . Ca^{2+} uptake and Pi uptake were performed 5 days later. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.05$ vs. E_2 alone.

는 대조군과 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다 (Table 1). 이들 estrogen의 작용이 estrogen 수용체를 통해 작용하는지를 알아보기 위하여 estrogen 수용체 길항제인 tamoxifen 및 progesterone을 전처리하여 Ca^{2+} uptake 및 Pi uptake를 실시하였다. 실험결과 estrogen에 의한 Ca^{2+} uptake 억제작용 및 Pi uptake 증가작용은 tamoxifen 및 progesterone에 의해서 선택적으로 차단되었다 (Fig. 2). 이러한 E_2 에 의한 Ca^{2+} uptake 억제작용 및 Pi uptake 증가 작용이 새로운 유전자의 합성 또는 단백질의 합성과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 actinomycin D (10^{-7} M, 유전자 전사 억제제) 및 cycloheximide (10^{-6} M, 단백질 합성 억제제)를 30분 전처리 후 E_2 를 처리하였다. Fig. 3에서 보이듯이 E_2 에 의한 Ca^{2+} uptake 억제 작용 및 Pi uptake 증가 작용은 이들 억제제들 사용시 차단되는 것으로 나타났

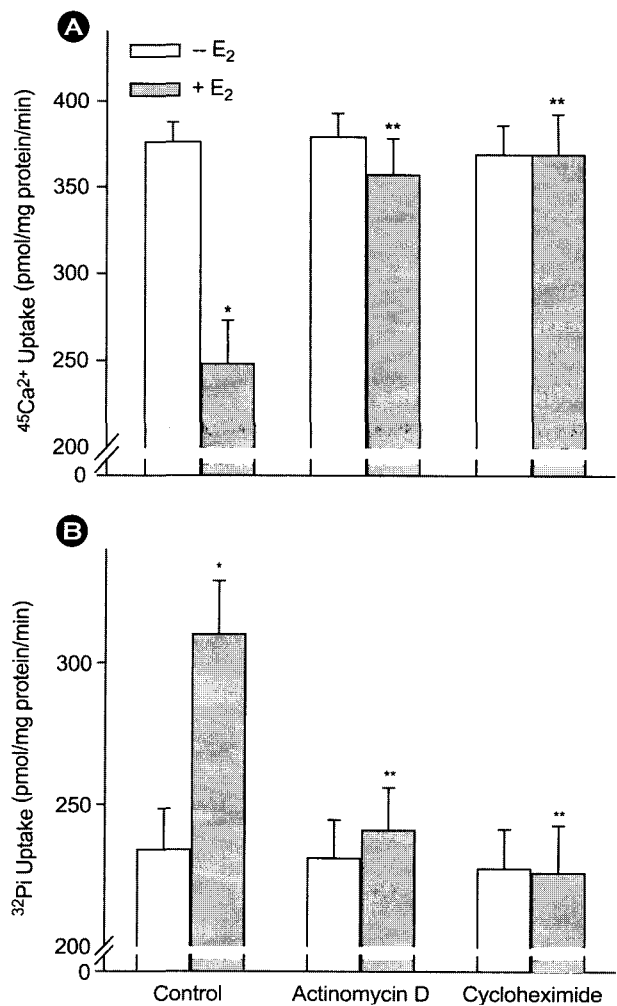


Fig. 3. Effects of actinomycin D and cycloheximide on E_2 -induced Ca^{2+} uptake (A) and Pi uptake (B). PTCs were preincubated with actinomycin D (10^{-7} M) or cycloheximide (10^{-6} M) for 30 min prior to the treatment of E_2 (10^{-9} M). Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.05$ vs. E_2 alone.

다. 이 결과는 E_2 에 의한 Ca^{2+} uptake 억제 작용 및 Pi uptake 증가 작용에는 새로운 유전자 및 새로운 단백질 합성이 관여하는 것으로 사료된다.

2. E_2 에 의한 Ca^{2+} uptake 및 Pi uptake 효과에 대한 cAMP의 관련성

E_2 에 의한 Ca^{2+} 및 Pi uptake 작용에 있어서 cAMP와의 관련성을 알아보기 위하여 cAMP 유사체인 8-Br-cAMP (10^{-7} M)를 근위세뇨관세포에 5일간 처리하였다. 실험결과 8-Br-cAMP를 처리하였을 때 E_2 의 효과와 유사한 Ca^{2+} uptake 억제작용 및 Pi uptake 증가작용을 나타냈다 (Fig. 4A, B). 이 결과는 E_2 에 의한 Ca^{2+} uptake 및 Pi uptake 작용에 cAMP가 관련될 수 있다는 것을 시사해 주고 있다. cAMP/protein kinase A 신호

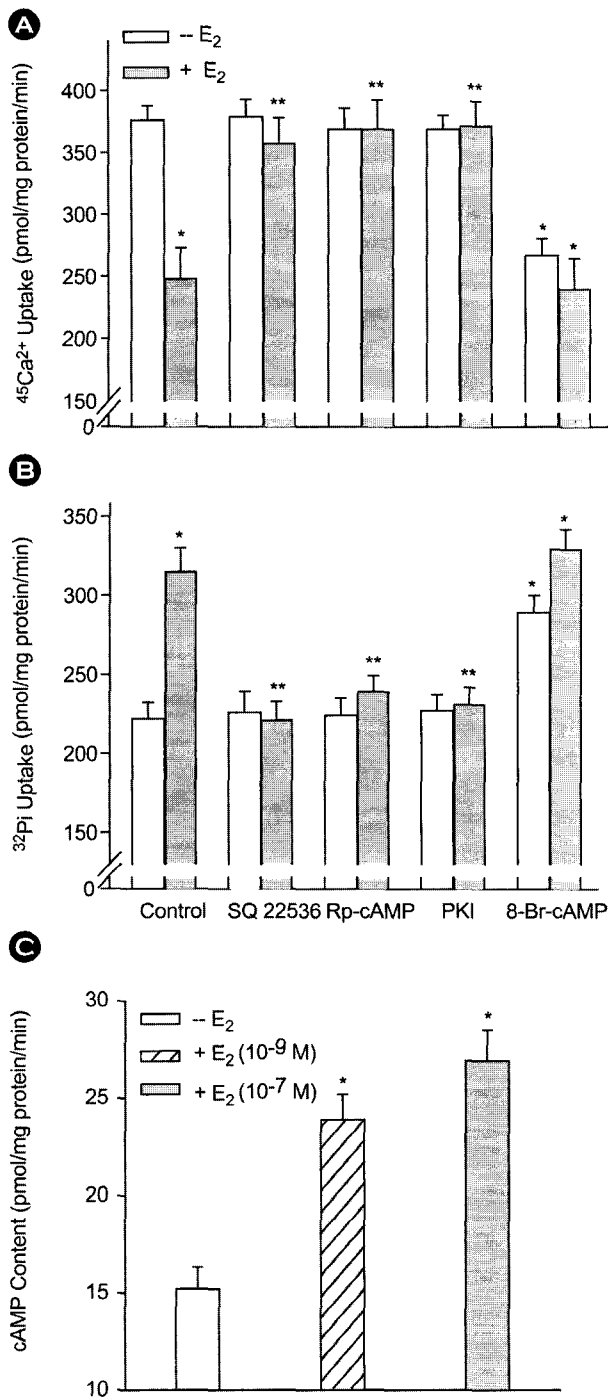


Fig. 4. Effect of SQ 22536, Rp-cAMP and PKI on E₂-induced Ca²⁺ uptake (A) and Pi uptake (B). PTCs were treated with 8-Br-cAMP (10⁻⁷ M) for 5 days or SQ 22536 (10⁻⁶ M, adenylate cyclase inhibitor), Rp-cAMP (10⁻⁷ M, cAMP antagonist) and myristoylated protein kinase A inhibitor amide 14~22 (PKI, 10⁻⁶ M, protein kinase A inhibitor) for 30 min prior to the treatment of E₂. Effect on E₂ on intracellular cAMP production (C). PTCs were incubated with IBMX (500 μM) for 30 mins prior to the addition of E₂ (10⁻⁹ M). cAMP assay was performed 1 hr later. Values are means ± S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. *P < 0.05 vs. control, **P < 0.05 vs. E₂ alone.

전달억제제들을 이용하여 이들의 관련성을 알아보았다. 신장 근위세뇨관세포에 선택적 cAMP 억제제인 Rp-cAMP (10⁻⁵ M), adenylate cyclase 억제제 (SQ 22536, 10⁻⁶ M) 및 protein kinase A 억제제인 protein kinase A inhibitor amide 14~22 (PKI, 10⁻⁶ M)를 E₂ 처리하기 30분 전에 처리하였다. 실험결과 E₂에 의한 Ca²⁺ uptake 억제작용 및 Pi uptake 증가작용은 이들 억제제들에 의해 유의성 있게 차단되었다 (Fig. 4A, B). 실제로 E₂ 처리시 cAMP 양을 측정된 결과 E₂ (10⁻⁹ M, 10⁻⁷ M) 처리 시 대조군에 비해 현저한 증가 작용을 볼 수 있었다 (Fig. 4C).

3. E₂에 의한 Ca²⁺ uptake 및 Pi uptake 효과에 대한 PKC와의 관련성

E₂에 의한 Ca²⁺ uptake 억제 작용 및 Pi uptake uptake 증가 작용에 PKC가 관련하는지를 알아보기 위하여 PKC 활성화제인 TPA (1 ng/ml)를 5일간 처리하였을 때 Ca²⁺ uptake는 억제 되었으며 Pi uptake는 증가하였다 (Fig. 5A, B). 다음 단계로서 E₂에 의한 Ca²⁺ 및 Pi uptake 작용에 PKC가 직접 관련하는 지를 알아보기 위하여 PKC 억제제인 staurosporine (10⁻⁹ M), H-7 (10⁻⁵ M) 및 bisindolylmaleimide I (10⁻⁶ M)을 E₂ 처리하기 30분 전에 전처리하였다. 실험 결과 PKC 억제제들은 E₂에 의한 Ca²⁺ uptake 억제작용 및 Pi uptake 촉진작용을 유의성 있게 차단하였다 (Fig. 5A, B). Western immunoblotting을 실시한 결과 E₂ 처리군에서 cytosol에서 membrane fraction으로의 translocation을 볼 수 있었다 (Fig. 5C).

고 찰

Estrogen 결핍은 신장에서 calcium 이동계를 촉진하는 estrogen의 효과를 감소시켜 세포의 Ca²⁺ 조절을 손상시키는 것으로 알려져 있으며 (Dick et al., 1996; Gallagher et al., 1980), 이러한 estrogen은 신장의 Ca²⁺ 흡수를 증가시켜 폐경기의 여성에게서 일어나는 신장의 Ca²⁺ 손실을 차단하는 것으로 보고되고 있다 (Prince et al., 1991; Adami et al., 1992). Dick & Prince (1997) 역시 관류 랫트에서 난소적출시 Ca²⁺ 손실이 야기 되는데 이는 신장 근위세뇨관의 estrogen의 효과라고 하여 신장 근위세뇨관에서 estrogen의 Ca²⁺조절 작용 중요성을 피력하였다. 본 실험실의 이전 보고에서 E₂-BSA를 처리하였을 때 Ca²⁺ uptake가 증가하는 것으로 나타났다 (Han et al., 2000). 하지만 이러한 Ca²⁺ uptake 증가 작용은 E₂의 nongenomic한 작용으로 genomic한 작용에 대한 고찰은 이루어 지지 않았다. 본 실험에서 E₂를 장기간 처리하였을 때 (5일간) Ca²⁺ uptake는 억제 되었다. 이러한 결과는 E₂ 처리시 Ca²⁺ uptake가 증가할 것이라는 당초 예상과 상반되었다. 최근에 Brunette & Leclerc (2001)는 토끼의 신장 근위세뇨관에 estrogen을 처리 하였을 때 Ca²⁺ uptake는 대조군과 차이가 없었으나, 원위세

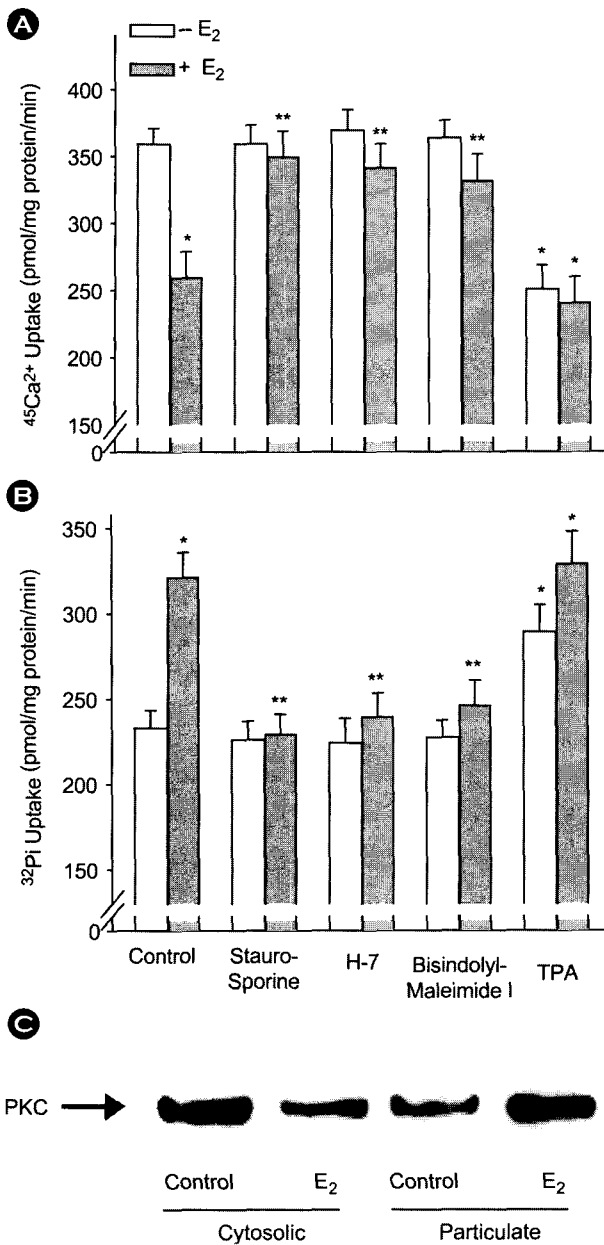


Fig. 5. Effect of staurosporine, H-7, bisindolylmaleimide I on E₂-induced Ca²⁺ uptake (A) and Pi uptake (B). PTCs were treated with TPA (1 ng/ml) for 5 days or staurosporine (10⁻⁹ M), H-7 (10⁻⁵ M), or bisindolylmaleimide I (10⁻⁶ M) (PKC inhibitors) for 30 min prior to the treatment of E₂. Values are means ± S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. *P < 0.05 vs. control, **P < 0.05 vs. E₂ alone. Effect on E₂ on PKC translocation (C). PTCs were treated with E₂ for 5 days. Then, PKC translocation was conducted as described in 'Methods'.

노관에 estrogen 처리시에는 Ca²⁺는 본 실험 결과와 같은 억제 효과를 보인다고 하였다. 하지만 이들은 신장 세뇨관 세포를 이용하여 실험 하였으며 장기간의 효과가 아닌 단기간 (1분~30분)의 효과에 대한 면이었다. 본 실험에서도 이들

연구자들에 의한 결과와 일치하게 짧은 시간에는 대조군과 차이성은 없었다. 하지만 장기간의 처리시 즉 3일 이상 처리시 Ca²⁺ uptake는 억제 되었다. 이는 E₂가 신장 근위세뇨관 세포에서 Ca²⁺ uptake를 억제할 수 있다는 가능성을 제시한 하나의 보고라고 생각한다. 몇몇 연구자들도 (Ohta et al., 1992; Kim et al., 2003)도 난소 적출시에 혈청의 Ca²⁺ 치가 상승한다고 하였는데 이는 직접적인 증거는 될 수 없지만 E₂가 신장의 근위세뇨관에서 Ca²⁺ 흡수를 억제하기 때문에 난소적출시에 estrogen이 결핍되어 Ca²⁺이 증가하지 않나 생각하게 한다.

한편, 생체내 Pi 역시 뼈를 구성하는 중요한 인자로 알려져 있다. 이러한 Pi 치는 여러 인자들에 의해서 조절되지만 신장 근위세뇨관세포의 Na⁺/Pi cotransporter가 그 중요한 일을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Murer & Biber, 1996; Murer et al., 2003). Borowitz & Granrud (1992)는 골다공증의 발병에 장관의 Pi 치의 흡수 감소가 관여한다고 하였고, 골다공증 환자는 저인산혈증을 보이는 것으로 보고되고 있다 (Ushakov et al., 1983). 최근에는 신장의 Type 2a Na⁺/Pi cotransporter의 변화가 저인산혈증을 야기 하며 이들이 골다공증의 발병에 강력히 관여하고 있음이 발표 되었다 (Prie et al., 2002; Scheinman & Tenenhouse, 2003). 본 실험에서는 estrogen의 작용이 Pi 치의 증가를 나타내는 것으로 estrogen의 결핍시에 Pi 치의 감소가 신장의 근위세뇨관에서도 일어날 수 있다는 가능성을 말해주고 있다. 위의 보고들을 본 실험 결과와 연결시켜 보면 골다공증 환자는 estrogen의 결핍을 나타내기 때문에 E₂는 신장 근위세뇨관 세포에서 Na⁺/Pi cotransporter 활성을 증가 시켜서 Pi uptake를 증가 시킨 결과와는 일맥 상통하는 것으로 사료된다. 하지만, 본 결과와 반대로, Beers 등 (1996)은 부갑상선 및 난소적출술을 실시한 암컷 랫트에서 E₂을 처리시 신장 솔변연 세포의 Na⁺/Pi 공동운반체가 억제되었다고 하였다. 본 실험 결과와 다른 이유는 아마도 실험 모델의 차이 (초대 배양 대 세포), 사용된 실험 동물종의 차이 (토끼 대 랫트), 또는 Pi uptake 에 측정에 사용된 방법의 차이인 것 같다.

최근 보고에서 생체에서 estrogen의 최고 농도는 최고 사구체 여과액 L당 5 μM까지 가능할 수 있다고 하여 (Dick et al., 2004), 본 실험에서 사용된 E₂의 농도는 생리학적으로 의의 를 갖는다고 하겠다. 이러한 E₂의 Ca²⁺ uptake 작용 및 Pi uptake 작용은 다른 성호르몬들에 의해서 유사 작용이 인정 되지 않는 것으로 보아 E₂가 신장 내의 근위세뇨관 세포에 Ca²⁺ 대사 및 Pi 대사에 관여하여 골다공증과 관련될 수 있음을 시사해주고 있다. Estrogen 수용체는 다양한 종의 신장 및 신장 세뇨관에서 존재하는 것으로 알려지고 있다 (Davidoff et al., 1980; Pertschuk et al., 1980; Isomoa et al., 1982; Hangenfeldt et al., 1988). 지금까지 신장에서 E₂의 주작용 부위는 원위세뇨관이 주를 이루는 것으로 알려졌으나 (Verlander, 1998; Dick et

al., 2003), 최근에 신장 근위세뇨관 세포도 E₂ 수용체를 함유하고 있는 것으로 나타났으며 생체내의 다양한 기능에 관여하고 있음이 보고되었다 (Han et al., 1999; Brunette & Leclerc, 2001). Tamoxifen은 estrogen 수용체 길항제로 일반적으로 알려져 있고 (Elkak & Mokbel, 2001), progesterone도 역시 estrogen에 의한 수용체 매개성 작용에 차단작용을 갖는 것으로 보고 (Han et al., 1999; Bellido et al., 2003)되고 있다. 본 실험에서도 estrogen에 의한 Ca²⁺ uptake 억제 작용 및 Pi uptake 증가작용이 progesterone 및 tamoxifen 전처리에 의해서 차단되는 것으로 보아 estrogen 수용체가 관여하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 작용은 유전자 전사 억제제인 actinomycin D 및 단백질 합성 억제제인 cycloheximide에 의해서 차단되는 것으로 보아 새로운 유전자 및 단백질의 합성이 주요한 영향을 하지 않나 사료된다. 이러한 결과는 본 결과와 상반된 결과이긴 하지만, 난소가 적출된 랫트에서 estrogen이 calcium 이동 channel의 mRNA 및 단백질의 합성을 증가시켜 반응을 나타낸다는 보고에서도 E₂의 새로운 유전자 및 단백질의 합성에 대한 보고가 있다 (Van Abel et al., 2002).

본 실험에서 흥미로운 것은 E₂에 의한 Ca²⁺ uptake 억제 작용 시점에서는 Pi uptake는 오히려 증가한다는 것이다. 지금까지 골다공증과 Ca²⁺ 및 Pi 치를 동시에 불려고 하는 노력은 몇몇 논문에서 인정이 되지만 이에 대한 보고는 실험자들마다 상이한 보고를 하고 있다. Ohta 등 (1992) 및 Kim 등 (2003)은 난소 적출시에 혈청의 Ca²⁺ 치 및 Pi 치가 모두 증가한다고 하였다. 난소 적출시에 estrogen의 수치가 현격하게 떨어지기 때문에 estrogen 결핍에 의한 혈 중 Ca²⁺ 치의 증가는 신장 근위세뇨관세포에서 estrogen의 감소에 따른 Ca²⁺ 흡수의 감소와 일맥 상통하는 것으로 사료되지만, Pi의 경우는 반대의 경우로 상치 된다. Nyda 등 (1948)은 빈성 albino 랫트에서 난소적출술시에 혈청의 Ca²⁺ 치는 떨어진 반면 Pi 치는 증가한다고 하여 본 실험결과 해석과 정반대를 나타낸다. 이에 대한 정확한 원인은 현재로서는 알 수 없기 때문에 향후 이루어져야 할 것으로 사료된다. 본 연구 결과를 넓게 해석해보자면, 최근 보고처럼 Na⁺/Pi cotransporter의 변이가 골다공증을 발병시킨다는 것에 기초를 하면 본 실험은 그 역할을 estrogen이 Pi uptake 조절을 통해 골다공증의 발병에 관여할 수 있는 가능성을 갖는다고 하겠다.

골다공증에 cAMP를 증가시키는 adenylate cyclase가 관련된다고 보고되고 있다 (Rude et al., 1993). 골다공증 환자에게서 노중의 cAMP가 증가한다는 보고역시 cAMP의 관련성을 뒷받침해주고 있다 (Lindsay et al., 1993). Estrogen은 표적 장기인 자궁조직 및 자궁내세포에서 cAMP를 증가시키며 (Fleming et al., 1983; Aronica et al., 1994), 신장에서도 estrogen의 작용에 cAMP가 관련되고 있음이 보고되었다 (Koh et al., 1996). Duarte 등 (1988)은 estrogen이 cAMP의 증가를 통해 PTH 분비

를 증가시켜 Ca²⁺ 조절에 관여하고 있다고 보고 하였다. 본 실험에서도 cAMP/protein kinase A (PKA) 신호전달계의 각종 억제제들에 의해 estrogen에 의한 Ca²⁺ uptake 작용 및 Pi uptake작용이 차단되었고 estrogen 처리시 1시간에 측정하였을 때 cAMP 양을 증가시키는 것으로 나타나 estrogen에 의한 작용에 있어 cAMP 경로가 관여하는 것으로 나타났다. 이러한 estrogen에 의한 cAMP의 증가가 아마 cAMP 반응인자들에 영향을 미쳐 Ca²⁺ 및 Pi uptake 반응에 관여하지 않나 사료된다.

한편, 표적장기인 생식세포에서 estrogen의 작용에 있어 PKC의 관련성이 여러 문헌에 의해서 보고되고 있다 (Rosner, 1998; Peters et al., 2000; Lahn et al., 2004). Estrogen 수용체가 PKC 신호 전달계와 상호 연관된다는 보고 역시 이러한 가설을 뒷받침 해주고 있다 (Migliaccio, 1998; Papaconstantinou et al., 2003). Ruzycy & Kulick (1996) 역시 estrogen 처리시 자궁의 PKC isozymes의 발현을 증가시킨다고 하였다. 본 실험 결과에서도 estrogen에 의한 Ca²⁺ uptake 및 Pi uptake 작용이 PKC 억제제들에 의해 차단되었고 PKC 발현을 측정할 결과 세포막에서 발현이 증가하는 것으로 나타나 PKC 신호전달계도 관여하고 있음을 알 수 있었다. 일반적으로 cAMP 및 PKC활성의 경우는 짧은 시간에 반응이 유도되는 것으로 알려져 있기 때문에 steroid 호르몬의 작용과는 멀게 느껴지지만 본 실험에서는 이들이 관여하는 것으로 나타났다. 아마 estrogen에 의한 초기의 cAMP 및 PKC의 활성이 어떠한 유전자 나 단백질의 합성에 관여하여 본 실험결과와 같은 작용이 나오지 않나 사료된다. 이에 대한 연구는 향후 필요 할 것으로 사료된다. 결론적으로 17-β estradiol은 cAMP 및 PKC 경로를 통하여 Ca²⁺ uptake는 억제 작용을 Pi uptake는 촉진 작용을 하는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 깊이 감사 드립니다 (KRF-2003-002-C00222).

REFERENCES

- Adami S, Gatti D, Bertoldo F, Rossini M, Fratta-Pasini A, Zamberlan N, Facci E, Lo Cascio V. The effects of menopause and estrogen replacement therapy on the renal handling of calcium. *Osteoporosis Int.* 1992; 2: 180-185.
- Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: Stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 8517-8521.
- Beers KW, Thompson MA, Chini EN, Dousa TP. β-estradiol inhi-

- bits Na⁺-Pi cotransport across renal brush border membrane from ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996. 221: 442-445.
- Bellido C, Martin de las Mulas J, Tena-Sempere M, Aguilar R, Alonso R, Sanchez-Criado JE. Tamoxifen induces gonadotropin-releasing hormone self-priming through an estrogen-dependent progesterone receptor expression in the gonadotrope of the rat. *Neuroendocrinology.* 2003. 77: 425-435.
- Bomsztyk K, George JP, Wright FS. Effects of luminal fluid anions on calcium transport by proximal tubule. *Am J Physiol.* 1984. 246: F600-F608.
- Borowitz SM, Granrud GS. Ontogeny of intestinal phosphate absorption in rabbits. *Am J Physiol.* 1992. 262: G847-G853.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. *Anal Biochem.* 1976. 72: 248-254.
- Brunette MG, Leclerc M. Effect of estrogen on calcium and sodium transport by the nephron luminal membranes. *J Endocrinol.* 2001. 170: 441-450.
- Chirayath MV, Gajdzik L, Hulla W, Graf J, Cross HS, Peterlik M. Vitamin D increase tight-junction conductance and paracellular Ca²⁺ transport in Caco-2 cell cultures. *Am J Physiol.* 1998. 274: G389-G396.
- Chung SD, Alavi N, Livingston D, Hiller S, Taub M. Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. *J Cell Biol.* 1982. 95: 118-126.
- Davidoff M, Caffier H, Schiebler TH. Steroid hormone binding receptors in the rat kidney. *Histochemistry.* 1980. 69: 39-48.
- De Sevaux RG, Hoitsma AJ, Corstens FH, Wetzels JF. Treatment with vitamin D and calcium reduces bone loss after renal transplantation: A randomized study. *J Am Soc Nephrol.* 2002. 13: 1608-1614.
- Dennis VW, Stead WW, Myers JL. Renal handling of phosphate and calcium. *Annu Rev Physiol.* 1979. 41: 257-271.
- Dick IM, Devine A, Beilby J, Prince RL. Effects of endogenous estrogen on renal calcium and phosphate handling in elderly women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004. Oct 5.
- Dick IM, Liu J, Glendenning P, Prince RL. Estrogen and androgen regulation of plasma membrane calcium pump activity in immortalized distal tubule kidney cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2003. 212: 11-18.
- Dick IM, Prince RL. Estrogen effects on the renal handling of calcium in the ovariectomized perfused rat. *Kidney Int.* 1997. 51: 1719-1728.
- Dick IM, St John A, Heal S, Prince RL. The effect of estrogen deficiency on bone mineral density, renal calcium and phosphorus handling and calcitropic hormones in the rat. *Calcif Tissue Int.* 1996. 59: 174-178.
- Duarte B, Hargis GK, Kukreja SC. Effects of estradiol and progesterone on parathyroid hormone secretion from human parathyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988. 66: 584-587.
- Elkak AE, Mokbel K. Pure antiestrogens and breast cancer. *Curr Med Res Opin.* 2001. 17: 282-289.
- Fleming H, Blumenthal R, Gurdip E. Rapid changes in specific estrogen binding elicited by cGMP or cAMP in cytosol from human endometrial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983. 80: 2486-2490.
- Gallagher JC, Riggs BL, Deluca HF. Effect of estrogen of calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980. 51: 1359-1364.
- Gallagher JC. Role of estrogens in the management of postmenopausal bone loss. *Rheum Dis Clin North Am.* 2001. 27: 143-162.
- Hagenfeldt Y, Eriksson HA. The estrogen receptor in the rat kidney. Ontogeny, properties and effects of gonadectomy on its concentration. *J Steroid Biochem.* 1988. 31: 49-56.
- Han HJ, Jung JC, Taub M. Response of primary rabbit kidney proximal tubule cells to estrogens. *J Cell Physiol.* 1999. 178: 35-43.
- Han HJ, Lee YH, Park SH. Estradiol-17beta-BSA stimulates Ca²⁺ uptake through nongenomic pathways in primary rabbit kidney proximal tubule cells: Involvement of cAMP and PKC. *J Cell Physiol.* 2000. 183: 37-44.
- Isomoa V, Pajunen AEI, Bardin CW, Janne OA. Nuclear androgen receptors in the mouse kidney. Validation of a new assay. *Endocrinology.* 1982. 111: 833-843.
- Kim SK, Lee MH, Rhee MH. Studies on the effects of biomedical agents on serum concentration of Ca²⁺, P and ALP activity in osteoporosis-induced rats. *J Vet Sci.* 2003. 4: 151-154.
- Koh ET, Owen WL, Om AS. Exogenous oestrogen affects calcium metabolism differently from exogenous testosterone in ovariectomized or orchietomized rats fed a high fructose diet severely deficient in magnesium. *Magnes Res.* 1996. 9: 23-31.
- Lahn M, Kohler G, Sundell K, Su C, Li S, Paterson BM, Bumol TF. Protein kinase C alpha expression in breast and ovarian cancer. *Oncology.* 2004. 67: 1-10.
- Legroux-Gerot I, Blanckaert F, Solau-Gervais E, Negahban M, Duquesnoy B, Delcambre B, Cortet B. Causes of osteoporosis

- sis in males. A review of 160 cases. *Rev Rhum Engl Ed*. 1999. 66: 404-409.
- Lindsay R, Nieves J, Henneman E, Shen V, Cosman F. Subcutaneous administration of the amino-terminal fragment of human parathyroid hormone- (1-34): Kinetics and biochemical response in estrogenized osteoporotic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993. 77: 1535-1539.
- Migliaccio S, Washburn TF, Fillo S, Rivera H, Teti A, Korach KS, Wetsel WC. Modulation of estrogen receptor levels in mouse uterus by protein kinase C isoenzymes. *Endocrinology*. 1998. 139: 4598-4606.
- Mikuls TR, Julian BA, Bartolucci A, Saag KG. Bone mineral density changes within six months of renal transplantation. *Transplantation*. 2003. 75: 49-54.
- Murer H, Biber J. Molecular mechanisms of renal apical Na⁺/phosphate cotransport. *Ann Rev Physiol*. 1996. 58: 607-618.
- Murer H, Forster I, Hilfiker H, Pfister M, Kaissling B, Lotscher M, Biber J. Cellular/molecular control of renal Na/Pi-cotransport. *Kidney Int Suppl*. 1998. 65: S2-S10.
- Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Proximal tubular phosphate reabsorption: Molecular mechanisms. *Physiol Rev*. 2000. 80: 1373-1409.
- Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J. Regulation of Na⁺/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol*. 2003. 65: 531-542.
- Navarro JF, Teruel JL, Montalban C, Gallego N, Ortuno J. Hypercalciuria secondary to chronic hypophosphatemia. *Miner Electrolyte Metab*. 1994. 20: 255-258.
- Nyda MJ, de Majo SF, Lewis RA. The effects of ovariectomy and physiological doses of estradiol upon body weight, linear growth and fat content of female albino rat. *Bull. Johns Hopkins Hosp*. 1948. 83: 279-287.
- Ohta H, Masuzawa T, Ikeda T, Suda Y, Makita K, Nozawa S. Which is more osteoporosis-inducing, menopause or oophorectomy? *Bone Miner*. 1992. 19: 273-285.
- Papaconstantinou AD, Goering PL, Umbreit TH, Brown KM. Regulation of uterine hsp90alpha, hsp72 and HSF-1 transcription in B6C3F1 mice by beta-estradiol and bisphenol A: Involvement of the estrogen receptor and protein kinase C. *Toxicol Lett*. 2003. 144: 257-270.
- Pertschuk LP, Carvounis EE, Tobin EH, Gaetjens E. Renal glomerular steroid hormone binding. Detection by fluorescent microscopy. *J Steroid Biochem*. 1980. 13: 1115-1120.
- Peters CA, Cutler RE, Maizels ET, Robertson MC, Shiu RP, Fields P, Hunzicker-Dunn M. Regulation of PKC delta expression by estrogen and rat placental lactogen-1 in luteinized rat ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2000. 162: 181-191.
- Prie D, Huart V, Bakouh N, Planelles G, Dellis O, Gerard B, Hulin P, Benque-Blanchet F, Silve C, Grandchamp B, Friedlander G. Nephrolithiasis and osteoporosis associated with hypophosphatemia caused by mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter. *N Engl J Med*. 2002. 347: 983-991.
- Rabito CA. Phosphate uptake by a kidney cell line (LLC-PK). *Am J Physiol*. 1985. 245: F22-F31.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. Androgens, estrogens, and second messengers. *Steroids*. 1998. 63: 278-281.
- Rude RK, Gruber HE, Oldham SB. Cortisone-induced osteoporosis: Effects on bone adenylate cyclase. *Miner Electrolyte Metab*. 1993. 19: 71-77.
- Ruzycky AL, Kulick A. Estrogen increases the expression of uterine protein kinase C isozymes in a tissue specific manner. *Eur J Pharmacol*. 1996. 313: 257-263.
- Scheinman SJ, Tenenhouse HS. Nephrolithiasis, osteoporosis, and mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter. *N Engl J Med*. 2003. 348: 264-265.
- Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet*. 2002. 359: 1841-1850.
- Ushakov AS, Spirichev VB, Sergeev IN, Belakovsky MS, Blazhevich NV, Bogoslovsky NA. Bone tissue of hypokinetic rats: Effects of 24, 25-dihydroxycholecalciferol and varying phosphorous content in the diet. *Aviat Space Environ Med*. 1983. 54: 447-451.
- Van Abel M, Hoenderop JG, Dardenne O, St Arnaud R, Van Os CH, Van Leeuwen HJ, Bindels RJ. 1, 25-dihydroxyvitamin D (3)-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaC1 in the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2002. 13: 2102-2109.
- Verlander JW, Tran TM, Zhang L, Kaplan MR, Hebert SC. Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats. *J Clin Invest*. 1998. 101: 1661-1669.