

세포내 Sodium 농도가 배양골조직 흡수에 미치는 영향에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과교정학교실

이태준 · 양원식

EFFECTS OF INTRACELLULAR SODIUM CONCENTRATION ON THE BONE RESORPTION IN ORGAN CULTURE

Tai-Joon Lee, D.D.S., M.S.D., and Won-Sik Yang, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Seoul National University.

- Abstract -

Recently, indirect evidences suggest that Na-Ca exchange mechanism is involved in bone resorption. To study this suggestion, effects of several drugs which increase the intracellular sodium concentration by different mechanisms on the PTH-induced bone resorption were analysed employing organ culture. Ulnae and radii were removed from 19-day fetal rats, prelabelled by subcutaneous injection of 200 μ Ci 45 CaCl₂ on the 17th day of gestation, and then explanted on the membrane filters in organ culture dishes. For studying the effects of amiloride, ouabain, monensin, and veratridine on the PTH-induced bone resorption, control group was cultured in BGJb media containing PTH (0.4U/ml) while experimental group was cultured in BGJb media containing PTH and drugs. The effects of drugs on the PTH-induced bone resorption were observed by the ratios of %release of 45 Ca between paired control and experimental groups.

The results were as follows:

1. 45 Ca release was significantly increased by PTH (0.4U/ml) at 48 and 72 hours of culture.
2. Amiloride, at concentration of 500 μ M, significantly inhibited the PTH-induced bone resorption after 48 and 72 hours of culture.
3. Ouabain, at concentration of 0.1mM, presented significant inhibition of PTH-induced bone resorption after 48 and 72 hours of culture, and at 0.5mM and 1mM, presented significant

inhibition of PTH-induced bone resorption after 72 hours of culture.

4. Monensin, at concentration of 500nM, significantly inhibited PTH-induced bone resorption after 72 hours of culture.
5. Veratridine, at concentration of 0.5mM, presented significant inhibition of PTH-induced bone resorption after 48 and 72 hours of culture, and at 1mM, presented significant inhibition of PTH-induced bone resorption after 72 hours of culture.

Taken altogether, these results suggest that Na-Ca exchange mechanism play a role in PTH-induced bone resorption.

- 목 차 -

- I. 서 론
 - II. 실험재료 및 방법
 - III. 실험결과
 - IV. 고 찰
 - V. 결 론
- 참고문헌
영문초록

I. 서 론

골흡수는 이에 관여하는 골조직세포들로부터 유리된 여러종류의 분해효소와 유기산등에 의한 골조직의 유기성분 및 무기성분의 분해과정이다.

골흡수 기구에 관하여는 생체내 실험^{1,2)}, 골조직 장기배양³⁻⁷⁾, 골세포 배양⁸⁻¹⁴⁾ 등 여러 방법을 이용하여 많은 연구가 진행되어 왔으나 아직까지 정확한 골흡수 기구는 밝혀지지 않고있다.

골흡수를 촉진하는 대표적인 물질인 부갑상선 호르몬(Parathyroid Hormone, PTH)에 의한 골흡수는 주로 파골세포에 의하여 이루어지는바 PTH는 파골세포의 수와 활성도를 증가시킴으로써 생체내 또는 골조직 장기배양시 골조직으로부터 Ca이온의 유리를 증가시킨다.^{1,3,6,7,15,16)}

그러나 최근의 연구결과 조골세포가 골생성 뿐만 아니라 골흡수에도 관여하는 것으로 알려졌다. 즉 PTH의 표적세포는 파골세포가 아니라 조골세포이며^{9,10,17-19)}, 조골세포로부터 유리된 연결인자에 의해 파골세포가 활성화되

며^{9,11,13)}, 또한 조골세포가 골기질 분해효소(collagenase)를 분비함으로써^{15,20,21)} 조골세포가 골흡수에 간접적 또는 직접적으로 관여한다.

이러한 PTH의 골흡수 촉진작용에는 cAMP(adenosin-3', 5'-mono phosphate)^{4,5,14,22)}와 Ca이온^{1,7,16)}이 중개물질로 작용하는 것으로 알려져 있는바 세포의 정보를 세포내 정보로 전달하는 plasma membrane에는 두개의 수용체, 즉 adeny cyclase를 활성화 시키는 수용체와 Ca이온의 세포내로의 유입을 증가시키는 수용체가 존재하며²²⁻²⁴⁾, PTH 처리시에 cAMP와 Ca이온이 2차 messenger로 상호 연관된 작용을 하는 것으로 추측된다.^{25,26)}

골흡수시 골조직으로부터 Ca이온이 유리되는 기구는 아직까지 확실하지 않으나, 파골세포가 골표면에 부착하여 외부와 격리된 산성환경이 유지되고 파골세포로부터 유리된 여러가지 용해소체효소 및 유기산의 작용에 의하여 골조직의 유기성분 및 무기성분의 분해가 일어나며 부분적으로 용해된 골파편은 파골세포내로 함입되는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 또한 유리된 Ca이온의 혈장으로의 이동에는 조골세포를 포함한 골표면의 이장세포(lining cell)와 골세포가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁻²⁹⁾

Krieger와 Tashjian은³⁰⁾ 골조직 배양시 세포내의 Na이온의 농도를 증가시킬 수 있는 여러가지 약물들에 의하여 PTH에 의한 골흡수가 억제됨을 관찰하여 골흡수시 Ca이온의 유리는 Na-Ca 교환기구에 의해 일어난다고 처음으로 주장하였다. 또한 ouabain에 의한 골흡수의 억제효과는 골조직에 존재하는 Na-K-ATPase(Na

Pump)의 억제작용에 기인하며³¹⁾, 2가 양이온 ionophore 보다 1가 양이온 ionophore가 PTH에 의한 골흡수를 더욱 쉽게 억제하는³²⁾ 등 세포내의 Na이온 농도의 변화가 골조직으로부터의 Ca이온의 유리에 중요한 역할을 할 것이라고 시사하였다.

본 실험은 상이한 작용기구에 의하여 세포내의 Na이온의 농도를 증가시키는 ouabain, monensin, veratridine과 다른 조직에서 Na-Ca 교환기구를 비교적 선택적으로 억제한다고 알려진 amiloride^{33,34)}가 PTH에 의한 골흡수에 미치는 영향을 관찰함으로써 골흡수시 골조직으로부터 Ca이온의 유리에 Na-Ca 교환기구가 중요한 역할을 하는지를 알아보려고 시행되었다.

II. 실험재료 및 방법

1. 골조직의 적출 및 배양

임신 17일 쯤의 백서(Sprague-Dawley rat)에 200 μ Ci의 $^{45}\text{CaCl}_2$ (Amersham, specific activity 10-40 m Ci/mg calcium)를 피하주사함으로써 골조직을 표지시킨 다음 2일 후 sodium pentobarbital(Pitman-Moore)을 체중 kg당 32mg 투여하여 마취시킨 후 태생 19일 쯤의 백서 태자에서 척골(ulnae)과 요골(radii)을 무균적으로 적출하여 60mm organ culture dish(Falcon)내의 pore size 0.45 μ m인 membrane filter(Gelman)위에 옮긴후 장기배양을 시행하였다.

적출한 골조직은 1mg/ml의 bovine serum albumin(BSA, fraction V, Sigma)과 50 μ g/ml의 gentamicin(Gibco)이 첨가된 BGJb 배양액(Sigma)에서 24시간 전배양(preculture)한 다음 배양액을 제거하고 신선한 배양액 또는 각각의 약물이 일정한 농도로 첨가된 배양액으로 교환하였다.

동일 백서 태자에서 분리한 좌우의 골조직중에서 한쪽 척골과 요골은 대조군으로 다른 한쪽은 실험군으로 사용하였으며, 골조직 대사에 미치는 부갑상선 호르몬의 효과를 알아보기 위하

여 대조군은 전배양시와 동일한 배양액으로, 실험군은 부갑상선 호르몬(Parathyroid Hormone fragment, bovine 1-34, Sigma)이 0.4U/ml 첨가된 배양액으로 교환하였다. PTH에 의한 골흡수 촉진작용에 미치는 수중약물의 효과를 알아보기 위하여 대조군은 PTH가 0.4 U/ml 첨가된 배양액으로 실험군은 PTH(0.4 U/ml)와 ouabain(Sigma), monensin(Sigma), veratridine(Sigma) 또는 amiloride(Sigma)가 복합 첨가된 배양액으로 교환하였으며 사용된 약물의 농도는 ouabain은 0.1mM, 0.5mM, 1mM, monensin은 5×10^{-8} M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, veratridine은 0.1mM, 0.5mM, 1mM, amiloride의 경우 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M이었다.

각각의 배양액으로 교환하여 준 다음 일정시간 마다 배양액내로 유리된 ^{45}Ca 의 양을 측정하면서 72시간 동안 배양을 하였으며 배양시 습도는 95%, 온도는 37 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO_2 를 계속 공급하였다.

2. ^{45}Ca 유리율 측정

골흡수 정도는 배양기간 동안 미리 표지된 골조직으로부터 배양액내로 유리된 ^{45}Ca 의 양을 측정함으로써 평가하였다.

72시간 동안 배양하면서 배양액내로 유리된 ^{45}Ca 의 양은 배양후 24시간, 48시간 및 72시간에 50 μ l의 배양액을 채취하여 liquid scintillation counter(Beckman LS 8800)로 방사선 동위원소의 양을 측정하였고, 72시간 배양후 골조직에 남아있는 ^{45}Ca 의 양은 EDTA로 24시간 처리한 다음 액체만을 채취하여 동일한 방법으로 측정하였다. 72시간 까지 배양액내로 유리된 ^{45}Ca 의 양과 배양후 골조직에 남아있는 ^{45}Ca 의 양을 합하여 골조직에 표지된 ^{45}Ca 의 총량을 산출한 후 각각의 시간별 유리율을 총량에 대한 백분율로 관찰하였으며 각 약물의 영향은 대조군의 ^{45}Ca 유리율에 대한 실험군의 유리율의 비(ratio)로써 분석하였다. 각 실험군 사이의 측정치의 차이는 student t-검정으로 통계적 유의성을 평가하였다.

III. 실험결과

PTH(0.4 U/ml)에 의한 골흡수의 촉진효과에 대한 실험에서 48시간 및 72시간 배양 후에 ^{45}Ca 유리의 증가를 보였으며 특히 72시간 후에 유의한 골흡수 촉진효과를 나타냈다.(Table 1, 3, 5, 7)

배양액내에 amiloride를 단독 투여한 경우 500 μM 에서 48시간 및 72시간 배양 후에 유의한 ^{45}Ca 유리의 억제효과를 나타냈으며 그 억제효과는 72시간 후에 더욱 현저하였다(Table 1). Ouabain은 1mM에서 72시간 배양 후에 유의한 ^{45}Ca 유리의 억제효과를 나타냈으며(Table 3), monensin은 유의한 ^{45}Ca 유리의 억제효과가 나타나지 않았다(Table 5) Veratridine은 0.5 mM에서 48시간 및 72시간 배양 후에, 1mM에서

72시간 배양 후에 유의한 ^{45}Ca 유리의 억제효과를 나타냈다(Table 7)

PTH에 의한 ^{45}Ca 유리는 500 μM amiloride에 의해서 48시간 및 72시간 배양 후에 유의하게 억제되었다.(Table 2, Fig.1) Ouabain은 0.1mM에서 48시간 및 72시간 배양 후에, 0.5mM과 1mM에서 72시간 배양 후에 PTH에 의한 ^{45}Ca 유리를 유의하게 억제하였으며(Table 4, Fig. 2), monensin은 500nM에서 72시간 배양 후에 PTH에 의한 ^{45}Ca 유리를 유의하게 억제하였다.(Table 6, Fig.3) Veratridine은 0.5mM에서 48시간 및 72시간 배양 후에, 1mM은 72시간 배양 후에 PTH에 의한 ^{45}Ca 유리에 대한 유의한 억제효과가 있었다.(Table 8, Fig.4)

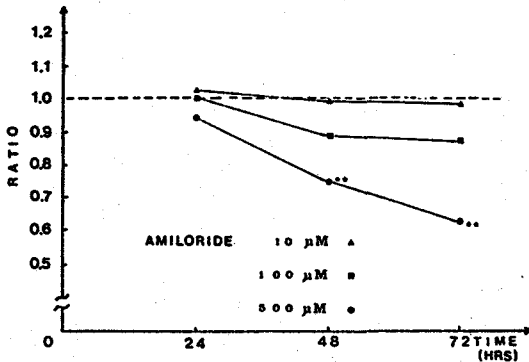


Fig. 1.

Effects of amiloride on the PTH-induced ^{45}Ca release from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture. Effects of amiloride were expressed by the ratio of experimental group to paired control.

**P < 0.01

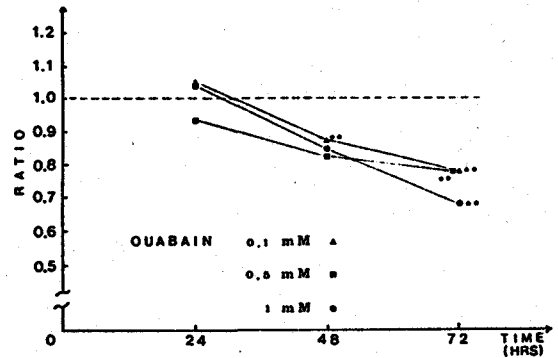


Fig. 2.

Effects of ouabain on the PTH-induced ^{45}Ca release from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture. Effects of ouabain were expressed by the ratio of experimental group to paired control.

**P < 0.01

Table 1. Effects of PTH and amiloride (AR) on the basal release of ^{45}Ca from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture

Group	Treatment	N	% release of ^{45}Ca		
			24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	None	5	18.5 ± 0.33	26.0 ± 1.26	31.5 ± 0.63
	PTH (0.4U/ml)		20.1 ± 1.17	34.6 ± 1.40**	45.7 ± 2.36**
2	None	5	13.3 ± 1.03	19.0 ± 0.57	29.5 ± 0.73
	AR (10 μM)		13.4 ± 2.33	19.4 ± 1.15	28.7 ± 0.86
3	None	4	17.8 ± 0.35	26.7 ± 0.95	31.3 ± 1.07
	AR (100 μM)		17.9 ± 0.35	26.8 ± 0.55	29.1 ± 0.27
4	None	4	19.1 ± 0.40	25.4 ± 0.87	30.4 ± 0.75
	AR (500 μM)		17.5 ± 0.61	22.6 ± 0.35*	25.6 ± 0.75**

Values are Mean ± S.E.

* P < 0.05, compared to paired control.

** P < 0.01, compared to paired control.

Table 2. Effects of amiloride (AR) on the PTH-induced ^{45}Ca -release from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture

Group	Treatment	N	% release of ^{45}Ca		
			24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	PTH	4	22.0 ± 2.14	29.3 ± 1.59	38.0 ± 2.18
	PTH + AR (10 μM)		22.0 ± 1.27	28.9 ± 1.47	36.7 ± 1.18
2	PTH	8	21.0 ± 0.68	34.6 ± 0.84	44.8 ± 1.64
	PTH + AR (100 μM)		20.7 ± 0.55	30.4 ± 1.09	38.1 ± 2.69
3	PTH	5	21.3 ± 0.95	33.3 ± 1.82	45.5 ± 2.12
	PTH + AR (500 μM)		20.0 ± 0.86	24.5 ± 0.39**	28.5 ± 0.78**

Values are Mean ± S.E.

** P < 0.01, compared to paired control.

Table 3. Effects of PTH and ouabain (OB) on the basal release of ^{45}Ca from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture

Group	Treatment	N	% release of ^{45}Ca		
			24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	None	4	19.9 ± 0.59	28.2 ± 1.65	34.5 ± 2.09
	PTH (0.4U/ml)		18.8 ± 1.49	30.2 ± 1.09	45.5 ± 3.92*
2	None	3	21.5 ± 1.02	28.2 ± 1.66	31.0 ± 1.59
	OB (0.1 mM)		23.1 ± 1.86	29.7 ± 2.12	32.7 ± 3.38
3	None	3	21.1 ± 2.30	26.6 ± 0.15	39.2 ± 1.30
	OB (0.5 mM)		17.3 ± 0.90	26.6 ± 1.75	36.3 ± 2.65
4	None	3	20.2 ± 0.85	31.6 ± 1.85	40.8 ± 1.40
	OB (1 mM)		16.8 ± 1.95	24.2 ± 3.15	33.9 ± 0.45*

Values are Mean ± S.E.

* P < 0.05, compared to paired control.

Table 4. Effects of ouabain (OB) on the PTH-induced ^{45}Ca -release from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture

Group	Treatment	N	% release of ^{45}Ca		
			24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	PTH	4	21.9 ± 0.94	34.3 ± 0.74	43.0 ± 1.82
	PTH + OB (0.1 mM)		22.9 ± 1.39	29.3 ± 0.77**	33.2 ± 1.53**
2	PTH	4	18.8 ± 1.22	30.9 ± 2.58	49.2 ± 1.50
	PTH + OB (0.5 mM)		17.4 ± 0.66	25.2 ± 1.02	38.4 ± 1.04**
3	PTH	3	18.1 ± 1.85	30.6 ± 2.01	49.8 ± 0.85
	PTH + OB (1 mM)		18.8 ± 1.47	25.4 ± 0.59	34.2 ± 1.95**

Values are Mean ± S.E.

** P < 0.01, compared to paired control.

Table 5. Effects of PTH and monensin (MN) on the basal release of ^{45}Ca from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture

Group	Treatment	N	% release of ^{45}Ca		
			24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	None	3	15.4 ± 0.40	30.9 ± 1.80	35.7 ± 1.25
	PTH (0.4U/ml)		15.2 ± 0.80	36.3 ± 0.20	48.4 ± 2.55**
2	None	3	15.0 ± 0.58	26.9 ± 0.85	36.7 ± 1.76
	MN (50 nM)		15.3 ± 1.07	30.2 ± 0.98	39.5 ± 1.44
3	None	3	15.2 ± 1.07	27.2 ± 0.10	33.3 ± 0.61
	MN (100 nM)		15.4 ± 0.92	29.3 ± 0.84	36.1 ± 1.50
4	None	3	21.5 ± 1.02	28.2 ± 1.66	31.0 ± 1.59
	MN (500 nM)		23.1 ± 1.86	29.7 ± 2.12	32.7 ± 3.38

Values are Mean ± S.E.

** P < 0.01, compared to paired control.

Table 6. Effects of monensin (MN) on the PTH-induced ^{45}Ca -release from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture

Group	Treatment	N	% release of ^{45}Ca		
			24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	PTH	5	14.7 ± 1.09	35.9 ± 2.22	47.1 ± 2.64
	PTH + MN (50 nM)		15.3 ± 0.61	33.4 ± 1.29	43.6 ± 2.03
2	PTH	5	16.1 ± 0.93	32.1 ± 1.16	45.0 ± 0.94
	PTH + MN (100 nM)		16.2 ± 0.53	34.5 ± 0.64	44.3 ± 1.63
3	PTH	4	21.2 ± 0.71	31.1 ± 1.51	44.1 ± 2.35
	PTH + MN (500 nM)		22.3 ± 1.27	30.7 ± 0.94	34.9 ± 0.68**

Values are Mean ± S.E.

** P < 0.01, compared to paired control.

Table 7. Effects of PTH and veratridine (VD) on the basal release of ^{45}Ca from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture

Group	Treatment	N	% release of ^{45}Ca		
			24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	None	3	21.7 ± 1.55	33.7 ± 1.26	42.7 ± 0.63
	PTH (0.4U/ml)		26.2 ± 1.17	38.9 ± 1.40	49.5 ± 1.20**
2	None	3	20.9 ± 1.11	30.7 ± 2.40	36.3 ± 1.80
	VD (0.1 mM)		19.4 ± 1.02	25.3 ± 1.02	34.4 ± 2.18
3	None	3	21.4 ± 1.35	29.6 ± 1.40	39.8 ± 3.56
	VD (0.5 mM)		20.5 ± 0.42	24.7 ± 0.39*	26.3 ± 0.38**
4	None	3	21.6 ± 2.55	28.3 ± 2.32	34.9 ± 0.99
	VD (1 mM)		23.4 ± 1.88	27.7 ± 2.33	29.6 ± 1.59**

Values are Mean ± S.E.

* P < 0.05, compared to paired control.

** P < 0.01, compared to paired control.

Table 8. Effects of veratridien (VD) on the PTH-induced ^{45}Ca -release from the fetal rat ulnae and radii and radii in the organ culture

Group	Treatment	N	% release of ^{45}Ca		
			24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	PTH	4	25.7 ± 0.23	37.6 ± 0.62	45.3 ± 0.56
	PTH + VD (0.1 mM)		23.9 ± 0.65	36.5 ± 0.75	42.3 ± 1.39
2	PTH	5	24.7 ± 0.33	35.8 ± 0.80	45.6 ± 1.40
	PTH + VD (0.5 mM)		27.2 ± 1.19	31.4 ± 1.13*	35.0 ± 0.93**
3	PTH	4	24.6 ± 1.91	36.5 ± 2.44	49.3 ± 1.92
	PTH + VD (1 mM)		26.3 ± 0.84	31.2 ± 0.35	34.6 ± 1.30**

Values are Mean ± S.E.

* P < 0.05, compared to paired control.

** P < 0.01, compared to paired control.

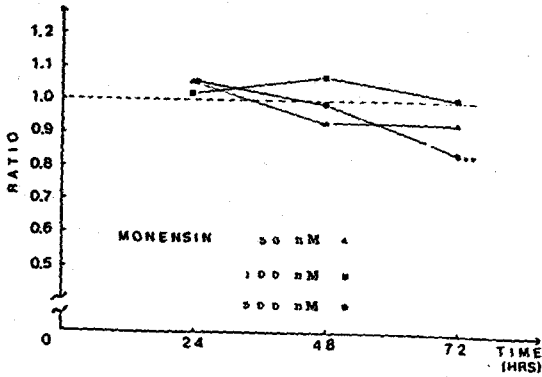


Fig. 3.

Effects of monensin on the PTH-induced ⁴⁵Ca release from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture. Effects of monensin were expressed by the ratio of experimental group to paired control.

**P < 0.01

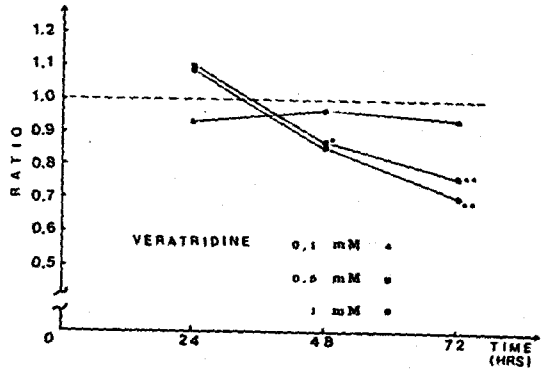


Fig. 4.

Effects of veratridine on the PTH-induced ⁴⁵Ca release from the fetal rat ulnae and radii in the organ culture. Effects of veratridine were expressed by the ratio of experimental group to paired control.

*P < 0.05

**P < 0.01

IV. 고 찰

골흡수는 골조직으로부터 무기성분의 유리 및 유기성분의 소실을 의미하며 골조직 세포중 주로 파골세포에 의해 일어나며, 대표적인 골흡수 호르몬인 부갑상선 호르몬은 파골세포의 수와 활성도를 증가시킴으로써 골조직으로부터 Ca 이온과 PO₄ 이온의 유리를 증가시킨다.^{1,3,6,7,15,16)}

파골세포의 기원에 관하여는 아직까지 확실하게 밝혀져 있지 않으나 Chambers¹⁷⁾, Sminia와 Dijkstra³⁵⁾는 혈류를 통하여 온 단핵세포들이 융합하여 파골세포를 형성한다고 보고하였다. 이러한 파골세포는 clear zone에 의하여 골표면에 단단히 부착하여 파골세포의 ruffled border와 골조직 사이에 외부와 격리된 골흡수에 용이한 미세환경이 유지된다. 즉 파골세포로부터 유기산의 분비가 증가하여 골조직으로부터 무기질이 분해될 뿐만 아니라 유기성분의 분해에 관여하는 여러 용해소체효소들이 가장 활발히 작용할 수 있는 산성조건을 유지시켜주게 된다.

이러한 유기산과 용해소체효소들의 작용에 의하여 골조직은 일부 분해되어 골파편을 형성하게 되고 이들은 파골세포내로 함입되어 용해가 더욱 진행된다고 알려져 있다.¹⁵⁾ 그러나 지금까지의 많은 연구결과에도 불구하고 파골세포의 작용에 의한 골조직으로부터 Ca 이온의 유리기구는 아직까지 확실하게 밝혀져 있지 않다. 한편 골흡수 결과 유리된 Ca 이온의 혈장으로서의 이동에 조골세포를 포함한 골표면의 이장세포와 골세포가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁻²⁹⁾

세포막을 통한 일반적인 Ca 이온의 유리는 주로 Ca Pump (Ca-ATPase) 또는 Na-Ca 교환기구를 통해 일어나는 것으로 알려져 있으며^{34,36,37)}, 막전위차를 이용한 최근의 McGrath 등의 연구결과³⁸⁾ bone fluid로부터 혈장으로 Ca 이온 유리에 Ca Pump가 직접 관여하지 않는 것으로 나타났다. 이 중 Na-Ca 교환기구는 세포내 Ca 이온의 유리와 세포내 Ca 이온의 농도 조절에 중요한 역할을 한다고 Blaustein³⁹⁾은 시사하였으며, Philipson⁴⁰⁾은 특히 심장에서 Ca에 의

존하는 반응을 증대하는데 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 또한 이 기구는 뇌³⁴⁾, 신장³⁷⁾ 등 다른 조직에서도 Ca이온의 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

Hahn등⁴¹⁾은 호르몬에 의해 촉진된 골조직으로부터 Ca이온의 유리에 Na이온이 어떤 역할을 할 가능성을 시사하였으며, Krieger와 Tashjian³⁰⁾은 세포내 Na이온의 농도를 증가시키는 여러 약물들에 의하여 PTH에 의한 골흡수가 억제됨을 관찰하여 골조직으로부터 Ca이온의 유리는 심장에서와 유사한 Na-Ca 교환기구에 의한 것이라고 처음으로 보고하였으며 이후 이를 뒷받침 해주는 여러 보고들^{31,32,42,44)}이 있다.

Ouabain은 심근의 수축력을 증가시키는 강심배당체로 Na-K-ATPase를 억제한다고 Akera⁴⁵⁾는 보고하였으며, 심장에 대한 작용은 세포외로 Na이온의 이동을 차단하여 세포내외의 Na이온의 농도경사차를 감소시킴으로써 Ca이온의 유리와 연결되어 나타나는 Na이온의 유입을 억제하여 결과적으로 세포내 Ca이온의 농도를 증가시켜 심근의 수축력을 증가시킨다고 Sweadner와 Goldin⁴⁶⁾은 시사하였다. Krieger와 Tashjian³¹⁾은 골조직 배양시 ouabain이 PTH에 의한 골흡수를 억제함을 관찰하였고 골조직에도 심장에서와 유사한 Na-K-ATPase가 존재함을 확인하여 ouabain에 의한 골흡수의 억제효과는 Na-K-ATPase를 억제함으로써 Na-Ca 교환기구가 차단된 결과라고 주장하였다. 본 실험에서도 ouabain은 72시간 배양 후에 PTH에 의한 ⁴⁵Ca 유리를 0.1mM과 0.5mM에서 각각 22%, 1mM에서 31%의 유의한 억제효과를 나타내어(Fig.2) 그들의 보고와 일치하였다.

Ionophore는 극성을 띄고 있는 여러 양이온과 결합하여 lipid soluble complex를 형성함으로써 세포막을 통한 이온의 이동을 촉진시킬 수 있는 물질로 세포내외의 이온의 농도를 변화시킬 목적으로 많은 연구에 사용되고 있다. Monensin은 카복실 1가 양이온 ionophore의 하나로 전기화학적 경사를 따라 1가 양이온의 이동을 촉진시킬 수 있으며 1가 양이온중에서 Na이온을 좀 더 선택적으로 이동시킨다고

Pressman⁴⁷⁾은 보고하였다. 본 실험의 경우 monensin은 500nM에서 72시간 배양 후에 PTH에 의한 ⁴⁵Ca 유리를 11% 유의하게 억제하였다(Fig.3). 또한 본 실험에 사용된 BGJb 배양액은 Na이온의 농도가 150mM, K이온의 농도가 5mM로써 Na이온이 K이온보다 약 30배 높은 농도로 존재하여 이러한 monensin에 의한 골흡수의 억제효과는 주로 Na이온의 세포내로의 이동을 증가시켜서 나타나는 결과라고 사료된다.

Veratridine은 Na channel에 결합하여 channel이 열린 상태, 즉 지속적인 활성화 상태를 유지시킴으로써 지속적인 Na이온의 세포내 유입을 가능하게 한다고 Catterall과 Nirenberg⁴⁸⁾, Catterall⁴⁹⁾은 보고하였다. 본 실험의 경우 veratridine은 72시간 배양 후에 PTH에 의한 ⁴⁶Ca 유리를 0.5mM에서 23%, 1mM에서 29% 유의하게 억제하여(Fig.4) Krieger와 Tashjian의 보고³⁰⁾와 일치하였다.

이상의 ouabain, monensin 및 veratridine은 작용기구는 서로 다르지만 공통적으로 세포내 Na이온의 농도를 증가시킬 수 있으며 이들에 의하여 나타나는 골흡수의 억제효과는 골조직으로부터 Ca이온의 유리가 Na이온의 유입과 연결되어 있음을 시사하는 결과라고 사료된다. 즉 골조직으로부터 Ca이온의 유리에 Na-Ca 교환기구가 관여하고 있으며, 세포내외의 Na이온의 농도경사차를 줄여줌으로써 골흡수가 억제된다는 Krieger와 Tashjian의 보고³⁰⁾와 일치하는 결과이다. 한편 세포내외의 Na이온의 농도 증가는 골조직 대사기구의 다른 중요한 단계에 변화를 일으킴으로써 골흡수를 억제시킬 수 있는 가능성도 있으나, Krieger와 Tashjian은 이러한 약물들에 의한 세포내 Na이온의 증가 뿐만 아니라 단순히 배양액내의 Na이온의 농도를 감소시킴에 의해서도 PTH에 의한 골흡수가 억제됨을 관찰하여 이러한 약물들에 의하여 영향을 받는 것은 Na-Ca 교환기구일 것이라고 추측하였다. 또한 이러한 약물들은 PTH에 의한 골흡수 뿐만 아니라 1,25-dihydroxy vitamine D₃, prostaglandin E₂, epidermal growth factor 등에 의한 골흡수도 억제하고 PTH에 의한 골조직내의 cAMP의 증가에는 아무런 영향을 미치지

못하는 것으로 나타나^{31,32)} 호르몬과 수용체간의 상호작용에는 아무런 영향이 없는 것으로 사료된다.

Amiloride는 Smith등의 보고³³⁾에 의하면 murine erythroleukemia 세포에서, Schellenberg등의 보고³⁴⁾에 의하면 백서의 뇌에서 Na-Ca 교환기구를 비교적 선택적으로 억제하는 것으로 나타났다. 본 실험에서 amiloride는 500 μ M에서 PTH에 의한 ⁴⁵Ca 유리율 48시간 배양 후에 25%, 72시간 배양 후에 37% 유의하게 억제하여 (Fig.1) PTH에 의한 골흡수시 Ca 이온의 유리에 Na-Ca 교환기구가 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

또한 본 실험에서 ouabain, veratridine 및 amiloride는 72시간 배양 후에 자연적인 ⁴⁵Ca 유리도 억제하는 것으로 나타나 (Table 1, 3, 7) PTH에 의해 촉진된 골흡수 뿐만 아니라 자연적인 골흡수도 억제시킴이 관찰되었다. 따라서 Na-Ca 교환기구는 모든 골흡수시 골조직으로부터 Ca이온의 유리에 관여하는 것으로 사료된다.

현재까지 Na-Ca 교환기구를 선택적으로 억제하는 약물은 알려져 있지 않다. Amrinone은 ouabain과 유사한 강심작용을 나타내지만 ouabain과는 달리 Na-K-ATPase 억제작용이 없으며 개의 적혈구의 이온 이동에 관한 Parker와 Harper의 보고⁵⁰⁾에 의하면 Na-Ca 교환기구를 직접 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 amiloride의 유사체인 dichlorobenzamil도 Siegl등의 보고⁵¹⁾에 의하면 cardiac membrane vesicle과 papillary muscle에서, Schellenberg등의 보고⁵²⁾에 의하면 rat brain synaptosomal membrane에서 비교적 선택적으로 Na-Ca 교환기구를 억제하는 것으로 나타났다. Krieger와 Stern⁴²⁾, Krieger와 Kim⁴⁴⁾은 amrinone과 dichlorobenzamil이 PTH에 의한 골흡수를 억제함을 관찰하여 이들의 골흡수의 억제작용이 Na-Ca 교환기구를 차단하여 나타나는 결과일 것이라고 시사하였다. 그러나 Kim과 Smith의 연구결과⁵³⁾ dichlorobenzamil이 slow Ca channel, Ca Pump등에 대한 억제작용도 나타내며, Krieger등⁴³⁾은 배양액내의 Na이온과 Ca이온의

농도를 변화시키면서 amrinone의 골흡수 억제 효과를 관찰한 결과 배양액내의 Na이온과 Ca이온의 농도가 감소함에 따라 amrinone의 골흡수 억제효과가 모두 감소하였다고 보고하여 Na-Ca 교환기구 이외의 다른 기구를 억제함으로써 골흡수 억제효과가 나타날 수 있는 가능성도 없지 않다. 또한 여러 약물들에 의한 이온의 이동이 골조직을 구성하고 있는 다양한 세포중 어떤 세포수준에서 일어나는가를 확인하기 어렵다. 그러기 위해서는 순수한 골세포를 분리하여 배양함으로써 Ca이온의 유리기구에 관한 계속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

골흡수시 골조직으로부터 Ca이온의 유리에 Na-Ca 교환기구가 관여하는지를 알아보기 위하여 상이한 작용기구에 의하여 세포내 Na이온의 농도를 증가시키는 여러 약물들을 사용하여 골조직의 장기배양을 시행하였다.

임신 17일 췌의 백서에 200 μ Ci의 ⁴⁵CaCl²를 피하주사하여 골조직을 표지 시킨 후에 임신 19일째의 백서 태자에서 척골과 요골을 적출하여 BGJb 배양액에서 24시간 전배양하였다. 그후 정상군은 BGJb 배양액에서, 대조군은 0.4U/ml의 PTH가 첨가된 배양액에서, 그리고 실험군은 amiloride(10 μ M, 100 μ M, 500 μ M), ouabain(0.1mM, 0.5mM, 1mM), monensin(50nM, 100nM, 500nM) 및 veratridine(0.1mM, 0.5mM, 1mM)이 단독 또는 0.4U/ml의 PTH와 복합 첨가된 배양액에서 72시간 배양하였다.

PTH가 골흡수에 미치는 영향과 각 약물이 PTH에 의한 골흡수에 미치는 영향을 24시간, 48시간 및 72시간 배양 후에 ⁴⁵Ca 유리율과 ⁴⁵Ca 유리율의 대조군에 대한 실험군의 비로써 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 배양액내에 0.4U/ml의 PTH를 첨가한 경우 48시간과 72시간 배양 후에 골흡수 촉진효과가 나타났다.

2. Amiloride는 500 μ M에서 48시간 및 72시간 배양 후에 PTH에 의한 골흡수를 유의하게 억제하였다.

3. Ouabain은 0.1mM에서 48시간 및 72시간 배양 후에, 0.5mM과 1mM에서 72시간 배양 후에 PTH에 의한 골흡수를 유의하게 억제하였다.

4. Monensin은 500nM에서 72시간 배양 후에 PTH에 의한 골흡수를 유의하게 억제하였다.

5. Veratridine은 0.5mM에서 48시간 및 72시간 배양 후에, 1mM에서 72시간 배양 후에 PTH에 의한 골흡수를 유의하게 억제하였다.

이상의 실험결과로 보아 골조직으로부터 Ca 이온의 유리에 Na-Ca 교환기구가 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Parsons, J.A. and C.J. Robinson: Calcium shift into bone causing transient hypocalcemia after injection of parathyroid hormone. *Nature* 230:581-582, 1971.
2. Vanderwiel, C.J. and R.V. Talmage: Comparison of the effects of prostaglandin E₂ and parathyroid hormone on plasma calcium concentration and osteoclast formation and osteoclast function. *Endocrinology* 105:588-594, 1979.
3. Vaes, G.: On the mechanism of bone resorption. The action of parathyroid hormone on the excretion and synthesis of lysosomal enzymes on the extracellular release of acid by bone cells. *J. Cell Biol.* 39:676-697, 1968.
4. Chase, L.R., S.A. Fedak and G.D. Aurbach: Activation of skeletal adenyl cyclase by parathyroid hormone in vitro. *Endocrinology* 84:761-768, 1969.
5. Klein, D.C. and L.G. Raisz: Role of adenosine-3', 5'-monophosphate in the hormonal regulation of bone resorption: Studies with cultured fetal bone. *Endocrinology* 89: 818-826, 1971.
6. Eilon, G. and L.G. Raisz: Comparison of the effects of stimulators and inhibitors of resorption on the release of lysosomal enzymes and radioactive calcium from fetal bone in organ culture. *Endocrinology* 103:1969-1975, 1978.
7. 고재승, 김중수, 김관식, 백대일, 오귀옥, 김형찬, 김현만, : PTH, OAF 및 PGE₂가 골흡수에 미치는 영향에 관한 연구. I. Parathyroid hormone, osteoclast-activating factor 및 prostaglandin E₂가 실험관에서 파골세포에 미치는 영향에 관한 형태학적 연구. *대한구강해부학회지* 7: 43-50, 1983.
8. Luben, R.A., G.L. Wong and D.V. Cohn: Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated bone cells: Provisional identification of osteoclasts and osteoblasts. *Endocrinology* 99: 526-534, 1976.
9. Rodan, S.B., G.A. Rodan, H.A. Simmons, R.W. Walenga, M.B. Feinstein and L.G. Raisz: Bone resorptive factor produced by osteosarcoma cells with osteoblastic features is PGE₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:1358-1365, 1981.
10. Wong, G.L.: A comparison of the PTH-dependent cAMP responses in osteoclastic and osteoblastic bone cells. *Miner. Electro.*

- Metab. 10:77-83, 1984.
11. Chambers, T.J., P.M.J. McSheehy, B.M. Thomson and K. Fuller: The effect of calcium regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones. *Endocrinology* 116:234-239, 1985.
 12. McSheehy, P.M.J. and T.J. Chambers: Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118:824-828, 1986a.
 13. McSheehy, P.M.J. and T.J. Chambers: Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 119:1654-1659, 1986b.
 14. 김세원, 김관식, 정동균 : Dibutyryl cAMP 와 theophyllin이 조골세포군의 alkaline phosphatase에 미치는 영향에 관한 연구. *대한구강생물학회지* 11 : 117-128, 1987.
 15. Sakamoto, S. and M. Sakamoto: Bone collagenase, osteoblasts and cell-mediated bone resorption. In *Bone and Mineral Research*. Vol. 4. edited by Peck, W.A., pp. 49-102, Elsevier, Amsterdam, 1986.
 16. Wong, G. L. : Skletal effects of parathyroid hormone. In *Bone and Mineral Research*. Vol. 4. edited by Peck, W.A., pp. 103-129. Elsevier, Amsterdam, 1986.
 17. Chambers, T.J.: The cellular basis of bone resorption. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 151: 283-293, 1980.
 18. Rodan, G.A. and T.J. Martin: Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - A Hypothesis. *Calcif. Tissue Int.* 33:349-351, 1981.
 19. Silve, C.M., G.T. Hradek, A.L. Jones and C.D. Arnaud: Parathyroid hormone receptor in intact embryonic chicken bone: Characterization and cellular localization. *J. Cell Biol.* 94:379-386, 1982.
 20. Sakamoto, S. and M. Sakamoto: Biochemical and immunohistochemical studies on collagenase in resorbing bone in tissue culture. *J. Perio. Res.* 17:523-526, 1982.
 21. Heath, J.K., S.J. Atkinson, M.C. Meikle and J.J. Reynolds: Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim. Biophys. Acta.* 802:151-154, 1984.
 22. Dziak, R. and P.H. Stern: Calcium transport in isolated bone cells. III. Effects of parathyroid hormone and cyclic 3', 5'-AMP. *Endocrinology* 97:1281-1287, 1975.
 23. Herrmann-Erlee, M.P.M., P.J. Nijweide, J.M. van der Meer and M.A.C. Ooms: Action of bPTH and bPTH fragments on embryonic bone in vitro.: dissociation of the cyclic AMP and bone resorbing response. *Calcif. Tissue Int.* 35:70-77, 1983.
 24. Löwik, C.W.G.M., J.P.T.M. van Leeuwen, J.M. van der Meer, J.K. van Zeeland, B.A.A. Scheren and M.P.M. Herrmann Erlee: A two receptor model for the action of parathyroid hormone on osteoblasts: A role for intracellular free calcium on cAMP. *Cell Calcium* 6:311-326, 1985.
 25. Rasmussen, H. and D.B.P. Goodman: Relationships between calcium and cyclic nucleotides in cell activation. *Physiol. Review* 57: 421-441, 1977.
 26. Peck, W.A., G. Kohler and S. Barr: Calcium-mediated enhancement of cyclic AMP response in cultured bone cells. *Calcif. Tissue Int.* 33:409-416, 1981.
 27. Talmage, R.V. and R.A. Meyer: Physiological role of parathyroid hormone. In *Handbook of Physiology*, Volume 7, Section 7, Chapter 14, pp. 343-352, Editor: G.D. Aurbach. American Physiological Society,

- Williams and Wilkins, Baltimore. 1976.
28. Matthews, J.L. and R.V. Talmage: Influence of parathyroid hormone on bone cell ultrastructure. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 156: 27-38, 1981.
 29. Peterson, D.R., W.J. Heideger and K.W. Beach: Calcium homeostasis: The effect of parathyroid hormone on bone membrane electrical potential difference. *Calcif. Tissue Int.* 37:307-311, 1985.
 30. Krieger, N.S. and A.H. Tashjian, Jr.: Parathyroid hormone stimulates bone resorption via a Na-Ca exchange mechanism. *Nature* 287:843-845, 1980.
 31. Krieger, N.S. and A.H. Tashjian, Jr.: Inhibition by ouabain of parathyroid hormone-stimulated bone resorption. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217:586-591, 1981.
 32. Krieger, N.S. and A.H. Tashjian, Jr.: Inhibition of parathyroid hormone-stimulated bone resorption by monovalent cation ionophores. *Calcif. Tissue Int.* 34:239-244, 1982.
 33. Smith, R.L., I.G. Macara, R. Levenson, D. Housman and L. Cantly: Evidence that a $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$ antiport system regulates murine erythroleukemia cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 257:773-780, 1982.
 34. Schellenberg, G.D., L. Anderson and P.D. Swanson: Inhibition of $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange in rat brain by amiloride. *Mol. Pharmacol.* 24:251-258, 1983.
 35. Sminia, T. and C.D. Dijkstra: The origin of osteoclasts: An immunohistochemical study on macrophages and osteoclasts in embryonic rat bone. *Calcif. Tissue Int.* 39:263-266, 1986.
 36. Triggle, D.J.: Calcium antagonists: Basic chemical and pharmacological aspects. In *New perspectives on calcium antagonists.* pp. 1-18. Editor: G.B. Weiss. American physiological society, Williams and Wilkins, Baltimore. 1981.
 37. Hanai, H., M. Ishida, C.T. Liang and B. Sackor: Parathyroid hormone increases Na-Ca exchange activity in renal cells and blunting of the response in aging. *J. Biol. Chem.* 261:5419-5425, 1986.
 38. McGrath, K.J., W.J. Heideger and K.W. Beach: Calcium homeostasis III: The bone membrane potential and mineral dissolution. *Calcif. Tissue Int.* 39:279-283, 1986.
 39. Blaustein, M.P.: The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev. Physiol. Pharmacol. Biochem.* 70:33-82, 1974.
 40. Philipson, K.D.: Na-Ca exchange in plasma membrane vesicles. *Ann. Rev. Physiol.* 47:561-571, 1985.
 41. Hahn, T.J., C.R. Scharp and C.A. Richardson: Interaction of diphenylhydantoin (Phenytoin) and phenobarbital with hormonal mediation of fetal rat bone resorption in vitro. *J. Clin. Invest.* 62:406-414, 1978.
 42. Krieger, N.S. and P.H. Stern: Interaction between amrinone and parathyroid hormone on bone in culture. *Am. J. Physiol.* 243: E499-E504, 1982.
 43. Krieger, N.S., V.M. Stathopoulos and P.H. Stern: Does amrinone inhibition of stimulated bone resorption involve $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$ exchange? *Circulation* 73 (suppl III): 59-64, 1986.
 44. Krieger, N.S. and S.G. Kim: Dichlorobenzamil inhibits stimulated bone resorption in vitro. *Endocrinology* 122:415-420, 1988.
 45. Akera, T.: Membrane adenosinetriphosphatase: A digitalis receptor? *Science* 198: 569-574, 1977.

46. Sweadner, K.J. and S.M. Goldin: Active transport of sodium and potassium ions. *New. Engl. J. Med.* 302:777-783, 1980.
47. Pressman, B.C.: Biological applications of ionophore. *Ann. Rev. Biochem.* 45:501-530, 1976.
48. Catterall, W.A. and M. Nirenberg: Sodium uptake associated with activation of action potential ionophores of cultured neuroblastoma and muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3759-3763, 1973.
49. Catterall, W.A.: Activation of the action potential Na^+ ionophore of cultured neuroblastoma cells by veratridine and batrachotoxin. *J. Biol. Chem.* 250:4053-4059, 1975.
50. Parker, J.C. and J.R. Harper, Jr.: Effects of amrinone, a cardiotonic drug, on calcium movements in dog erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 66:254-259, 1980.
51. Siegl, P.K.S., E.J. Cragoe, Jr., M.J. Trumble and G.J. Kaczorowski: Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ exchange in membrane vesicle and papillary muscle preparations from guinea pig heart by analogs of amiloride. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3238-3242, 1984.
52. Schellenberg, G.D., L. Anderson, E.J. Cragoe and P.D. Swanson: Inhibition of synaptosomal membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchange transport by amiloride and amiloride analog. *Mol. Pharmacol.* 27:537-543, 1985.
53. Kim, D. and T.W. Smith: Inhibition of multiple transsarcolemal cation flux pathways by dichlorobenzamil in cultured chick heart cells. *Mol. Pharmacol.* 30:164-170, 1986.