

뼈조직과 세포에서의 칼슘이동기전에 대한 1,25 dihydroxycholecalciferol과 Ca Ionophore A23187의 영향

이 선 영

충남대학교 가정대학 식품영양학과

Effects of 1,25 Dihydroxycholecalciferol and Ca Ionophore A23187 on
Ca Transports in Bone and Bone Cells

Sun Young Ly

Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University

= ABSTRACT =

Various types of evidence suggest that some changes in cellular calcium may well signal the initiation of a chain of events leading to the physiological effects of the bone resorbing agents.

The effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Ca ionophore A23187 and calcium antagonist, diltiazem on bone resorption and the cellular transport of Ca were investigated.

Bone resorption was measured by a in vitro technique using ^{45}Ca prelabelled mouse calvaria and ^{45}Ca desaturation experiment was realized in isolated heterogenous rat bone cells after equilibrating the cells with ^{45}Ca .

Results of ^{45}Ca desaturation experiments were analysed by fitting the ^{45}Ca desaturation curve to a model of 2 exponential terms which indicated the presence of 2 exchangeable cellular calcium pools.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0.5ng/ml) induced significantly bone resorption which was decreased by the physiological dose of diltiazem (above 5nmol/ml) although it was ineffective alone. Ionophore A23187 (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) decreased Ca release from bone but no additivity of effect with diltiazem (20nmol/ml) was observed.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0.5ng/ 10^6 cells) had a moderate effect on the two kinetic phases of ^{45}Ca desaturation curve and these values were normalized when diltiazem (20nmol/ 10^6 cells) was added along with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Ionophore (0.05 $\mu\text{g}/10^6$ cells) alone increased specifically the value of the slow turnover rate which was not affected by addition of diltiazem.

The hypothesis concerning the involvement of calcium in bone resorption seems in fact to be verified in case of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ but more unsettled for Ca ionophore A23187.

서 론

Vitamin D₃ metabolite들의 주요표적기관은 소장 과 뼈로서 이중소장에서 작용기전은 비교적 잘 알려져 있는 반면, 뼈에 있어서의 직접적인 작용 기전에 대해서는 여러가지 측면에서 연구되어지고 있으나 아직 모호한 편이다. Vitamin D에 의해 뼈 대의 무기질화(mineralization)가 증가되는 것은 이 steroid계 물질들이 단순히 소장에서의 칼슘흡수를 증가시키기 때문이라는 연구보고¹⁾도 있었던 반면, 뼈대에 대한 직접적인 효과에 대한 보고서도 최근에는 많이 발표되고 있어, 간단히 vitamin D중 가장 bone resorption에 대한 활성이 큰 1,25-dihydroxycholecalciferol(1,25(OH)₂D₃)를 중점적으로 보면,

-여러 in vitro 실험에서는 vitamin D₃, 그 중 특히 1,25(OH)₂D₃가 생쥐의 두개골²⁾³⁾로부터 혹은 출생 직전 흰쥐의 사지뼈(long bones)⁴⁾⁵⁾로부터 bone resorption을 증가시킨다고 하였으나

-in vivo 실험에서는 투여된 vitamin D에 의한 다른 호르몬들의 분비나 생합성 기전에 줄 수 있는 이차적인 영향으로 인하여 그 결과를 설명하는데 문제점이 제기되고 있다.

-한편, 뼈 및 뼈세포에서 1,25-(OH)₂D₃에 특이성을 갖는 수용체를 발견하였다는 논문⁶⁾⁷⁾도 있으나 아직 확실한 확인방법이 없는 등 그 작용기전을 설명하기에는 미흡한 실정이다.

그러나 최근에 들어와 1,25(OH)₂D₃와 마찬가지로 in vitro에서 강한 bone resorbing agent로서 알려져 있는 parathyroid hormone(PTH)이 배양액 속에 첨가되었을 때는 매우 급격하고 빠르게 뼈 세포 내로의 칼슘 유입을 증가시킨다는 사실이 밝혀져 이로부터 뼈의 demineralization현상과 세포내 칼슘과의 관련성이 확실히 되었다. 이들 결과는 미리 표지된 뼈세포에서 직접 Ca의 이동을 측정함⁸⁾으로서 혹은 Ca antagonist인 verapamil을 PTH와 함께 작용시킴⁹⁾¹⁰⁾으로서 얻을 수 있다.

따라서 본 실험에서는 우선 조직 배양에서 vitamin D의 강력한 활성물질인 1,25-(OH)₂D₃의 작용

기전을 보고자하여 조직배양 및 분리된 뼈세포에서의 Ca이동기전에 이 vitamin자체가 갖는 영향과 이에 작용하는 Ca antagonist, diltiazem의 효과를 검토해보고자하였으며 또한 지금까지 세포내로 칼슘의 유입을 촉진하는 것으로 알려져 있으나 bone resorption에 대한 효과가 분명하지 않은 Ca ionophore A23187을 대상으로 실험하여 1,25(OH)₂D₃와 Ca ionophore의 작용과 세포에서의 칼슘이동 및 bone resorption의 연관성을 설명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 조직배양의 경우 2~3일 된 Swiss종 생쥐 새끼를 사용하였으며 뼈세포는 Wistar종의 3~4일된 흰쥐로부터 분리해내었다.

조직배양에 필요로 되는 배양액 Bigger's medium(BGJ₆)과 세포배양에 쓰인 배양액 Minimum Essential Medium(MEM)은 Flow Laboratories에서 구입하였으며 동위원소로서는 비활성(specific activity)이 8mCi/mg인 ⁴⁵CaCl₂를 사용하였다. Scintillation solution은 Packard의 Picofluor-15를 사용하였다.

Vitamin D₃(1,25(OH)₂D₃)는 Hoffman La Roche Laboratories에서, Ca ionophore A23187은 SIGMA에서, Ca antagonist인 diltiazem은 Dausse Laboratories에서 각각 구입하였다.

2. 실험방법

Bone resorption은 생쥐의 두개골을 미리 ⁴⁵CaCl₂로 표지한 후 조직배양하여 이 두개골부터 유출되는 동위원소의 양으로부터 측정하였으며 세포에 있어서의 ⁴⁵Ca desaturation 실험은 흰쥐의 사지뼈를 기계적으로 마쇄하여 얻어낸 세포균을 하룻밤 배양하여 사용하였다. Desaturation실험에서는 미리 표지된 뼈세포로부터 이동되는 동위원소의 양을 측정하여 분석하였다.

1) 조직배양

자세한 방법은 Reynolds¹¹⁾나 Stern 등¹²⁾에 의해

발표된 논문에 기술되어있다. 간단히 보면 실험시작 4일 전에 갓난 생쥐 새끼의 뼈대를 미리 동위원소 ^{45}Ca (1 $\mu\text{Ci}/\text{mouse}$)로 표지하였다. 실험 당일 생쥐의 두개골을 멸균 상태에서 추출하여 반분한 다음 5ml의 BGJ배양액을 함유한 플라스틱 배양기 속의 스텐 철망을 이용하여 5%의 CO_2 를 함유한 공기와 배양액의 접촉면에 반 쪽의 두개골이 놓이도록 하였다. 반분된 두개골의 한쪽은 대조군으로 사용하였으며 다른 한편의 배양액에는 시험하고자하는 물질(diltiazem 2-100nmol/ml, 1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 0.5ng/ml, ionophore 0.005~0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 넣어 비교군으로 하였다. 일정기간(24.48 혹은 72시간) 배양 후에 각각의 반분된 두개골로부터 배양액내로 유출된 동위원소의 양을 Pico Fluor-15 scintillation solution내에서 측정하였으며 뼈속에 잔존하는 동위원소의 양은 18시간동안 6N HCl 용액내에서 용출시킨 후 같은 방법으로 측정하였다.

2) ^{45}Ca desaturation 실험

조직배양에서 사용하였던 생쥐의 두개골로부터는 필요한 만큼의 세포를 분리해내기 불가능하였으므로 3~4일 된 흰쥐의 사지뼈로부터 세포군을 얻어내었다. 분리과정에서는 어떤 효소도 사용하지 않고 단지 해부용 칼날 만을 사용하여 뼈를 분쇄한 뒤 남아있는 조직이나 불필요한 골기질(bone matrix)을 제거하기 위하여 35 μm 의 나일론 막을 사용하여 걸러내었다. 여기서 얻은 세포를 1.25mM Ca^{++} 를 함유한 MEM 용액으로 옮겨 0.5 $\mu\text{Ci}/2\text{x}10^6$ cells의 비율로 ^{45}Ca 로 표지시킨 후 몇 군으로 나누어 하룻밤 37 $^\circ\text{C}$ 의 배양기에 두었다.

다음날 ^{45}Ca desaturation 실험 바로 전에 위의 표지된 세포용액에 일정비율로 시험하고자하는 1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 나 diltiazem, ionophore를 넣어 37 $^\circ\text{C}$ 배양기에서 두시간 동안 작용하도록 한 다음 세포를 0 $^\circ\text{C}$ 의 순수한 tris-buffered solution으로 두 번 재빨리 씻어내고 다시 새로운 용액으로 채워 일정한 농도의 세포+배양용액(이하 세포용액)으로 만든 뒤 37 $^\circ\text{C}$ 항온수조 내에서 ^{45}Ca desaturation을 시작하였다. Tris-buffered solution은 120mM NaCl, 3 mM K_2HPO_4 , 1.25mM CaCl_2 , 1mM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

20mM tris-HCl, 3mM mannitol, 2mg/ml glucose 와 1mg/ml bovine serum albumin의 조성¹³⁾으로 되어 있으며 37 $^\circ\text{C}$ 에서 pH7.1을 유지하는 등장 완충용액이었다.

항온수조기 내에서의 세포용액은 ^{45}Ca desaturation기간 내내 흔들여 가능한 배양액과 접촉하는 세포의 표면적을 넓게 하였으며 ^{45}Ca desaturation 시작 후 일정 기간 간격(5, 10, 15, 20, 30, 45, 90, 120분)마다 이 용액의 일부를 취해 4 $^\circ\text{C}$ 의 원심분리기에 3500rpm으로 원심분리 한 후 그 상청액 속의 동위원소(St)는 scintillation solution(Packard)에 넣어 측정하고 세포내에 남아 있는 동위원소(Ct)는 0.5% 개미산 용액에서 용출시켜 정량하였다. 매시각(t)에 취해진 일부의 세포용액내 총 ^{45}Ca 량은 St+Ct로서 볼 수 있었으며 이 값들의 평균을 잡아 실험 초기(t=0)에 세포내 존재하던 총 ^{45}Ca 량(Rt cpm/10 6 cell)으로 간주하였다. 또한 ^{45}Ca 로 세포를 표지할 때 미리 취해두었던 일부 용액의 방사능을 Ro(cpm/l)라하고 완충 용액내의 $^{40}\text{Ca}^{++}$ 량은 1.25mM임을 감안하면 세포내 총 exchangeable Ca량 ERt는 다음의 식을 사용하여 구할 수 있었으며 그 값은 pmol/10 6 cells의 단위를 갖게 되었다.

$$\text{ERt}(\text{pmo}/10^6 \text{ cells}) = \frac{\text{Rt}(\text{cpm}/10^6 \text{ cells}) \pm 1,250,000\text{pmol}/\text{ml}}{\text{Ro cpm}/\text{ml}}$$

Sem.log 방안에 시간에 대한 세포내 exchangeable Ca량을 기록하면 Fig. 1과 같은 곡선을 얻게 되었는데 이 그래프는 두개의 exponential phase로 나누어질 수 있었다. 즉, 각각 기울기가 p1, y축 절편이 b1인 첫과 기울기 p2, y축 절편 b2인 kinetic phases이다.

따라서 본 실험에서 얻어진 결과는 뼈세포내 서로 다른 빠르기를 갖는 두 Ca 이동 현상의 존재를 뜻하게 되며 그로부터 세포내 두개의 구분된 Ca pool이 존재함을 가정할 수 있었다. 즉, 그래프 상의 p1, b1의 값을 갖는 kinetic phase는 비교적 외부 환경의 변화에 대하여 빠르게 대처하는 세포질내의 Ca pool을, p2, b2로서 나타내지는 kinetic phase는

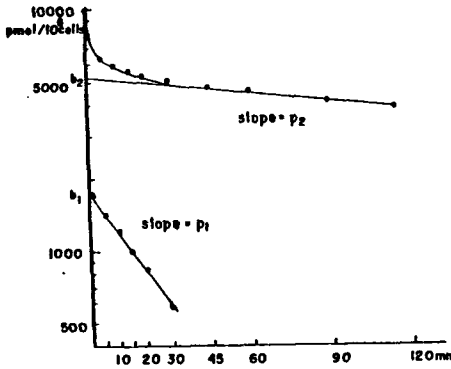


Fig. 1. A typical ⁴⁵Ca desaturation curve : the data expressed as ERT(pmol/10⁶ cells) is plotted versus the time. It is graphically resolved into two exponential components with their slopes, p1 and p2 and intercepts, b1 and b2. The curve follows the general equation $ERT = b_1 \exp(-p_1 \times t) + b_2 \exp(-p_2 \times t)$.

세포내 소기관등에 편재된 비교적 느린 Ca turnover rate를 갖는 Ca pool로부터의 ⁴⁵Ca desaturation을 반영한다고 볼 수 있었다.

실험결과 및 고찰

1) 조직배양

Ca antagonist, diltiazem은 생리적 농도(20nmol/ml)로 배양액에 첨가되었을 때 빠르게 유리되는 ⁴⁵Ca의 유출정도에 유의적인 영향을 갖지 못하였다. Diltiazem 존재하에 배양되었던 생쥐의 반쪽 두개골부터 유출된 ⁴⁵Ca의 양에 대한 대조군 값의 비율은 24, 48, 72시간 배양후에 각각 1.06 ± 0.21 (n=6), 1.04

± 0.14 (n=6), 1.03 ± 0.13 (n=6)이었다.

그러나 diltiazem은 강력한 bone resorbing agent인 1,25(OH)₂D₃에 의해 유도된 bone resorption(Table 1)을 억제하는 효과가 뚜렷하였다(Table 2). 이 실험은 생리적 농도인 0.5ng/ml의 1,25(OH)₂D₃와 함께 첨가된 여러 농도의 diltiazem에 대해 시행되었다. Diltiazem은 48시간의 배양후에 5 nmol/ml의 농도에서부터 1,25(OH)₂D₃의 효과에 대해 유효하였으나 농도(5-100nmol/ml)에 따른 비례적 억제효과는 보여주지 않았다.

본 실험에서 1,25(OH)₂D₃의 bone resorption에 대한 결과는 Reynolds²³⁾, Raisz⁵⁾등에 의해 발표된 것에 일치하였다. 그러나 Ca antagonist, diltiazem은 단독으로서는 어떤 효과도 보이지 않아 Lerner¹⁰⁾ 등에 의해 연구되었던 verapamil의 효과와는 일치하지 않았다. Lerner등은 한편 1-α-hydroxylated vitamin D₃에 의해 유도된 bone resorption에 대한 verapamil(20-1000nmol/ml)의 억제효과를 볼 수 있었는데 이 억제효과는 verapamil의 농도에 비례하였다. 심근세포에 대해서는 거의 같은 농도에서 비슷한 근 수축 억제효과를 갖는 것으로 알려져 있던 두 Ca inhibitor들이 뼈세포에서는 약간 다른 양상을 나타내었으며 diltiazem은 verapamil과 같이 농도에 비례하지는 않았으나 1,25(OH)₂D₃에 관한 효능이 충분히 큰것으로 사료되었다.

이상의 결과로부터 1,25(OH)₂D₃의 bone resorption에 대한 효과는 slow calcium channel을 통한 Ca movements와 관련성이 있을 것이란 가정을 확인할 수 있었으며 이에 영향을 갖는 diltiazem은 선택적으로 활성화된 bone resorbing cell(osteoc-

Table 1. Effects of 1,25(OH)₂D₃ on bone resorption. Bone resorption is expressed as percentage release of ⁴⁵Ca from bone during 48 hours in culture.

	1,25(OH) ₂ D ₃ concentration		
	0.1ng/ml	0.5ng/ml	1.0ng/ml
Control	12.86 ± 2.55 (n=7)	12.66 ± 2.73 (n=7)	13.48 ± 1.71 (n=6)
1,25(OH) ₂ D ₃	11.25 ± 2.56	18.56 ± 2.66 ***	17.18 ± 1.60 ***

Numbers of experimentation are in parenthesis.
Student's t-test : *** P<0.001.

last)에 영향을 미칠지도 모른다는 가능성을 부여 하였다.

한편, Ca agonist인 Ca ionophore A23187은 0.005 µg/ml, 0.02µg/ml의 농도에서 bone resorption에 아무런 영향도 미치지 못하였으나 0.2µg/ml의 비교적 고농도에서는 72시간의 배양동안 bone resorption을 현저히 감소시켰다(Table 3). 20nmol/ml의 diltiazem을 이 ionophore와 함께 작용하게 하였을 때

아무런 변화도 볼 수 없었으나 위의 1,25(OH)₂D₃의 결과와 비교하고자하여 diltiazem의 농도를 더 이상 증가시키지는 않았다.

Ca ionophore는 Ca과 결합하여 쉽게 세포막을 통과시킴으로 Ca의 세포내 유입을 촉진시킨다고 알려져왔으며 이 현상은 역시 PTH의 경우에서와 같이 Ca 이온과 관련된 생리적 활성(bone resorption)을 유도할 것이라는 의견이 일반적이었다. 그

Table 2. Effects of diltiazem on bone resorption induced by 1,25(OH)₂D₃(0.5ng/ml) during 48 hours in culture(resorption is expressed as percentage of bone isotope).

$$R = \frac{^{45}\text{Ca release by } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 \text{ alone}}{^{45}\text{Ca release by } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 + \text{diltiazem}}$$

Diltiazem concentration	R	
2nmol/ml	= 1.04±0.10	(n=6)
5nmol/ml	= 1.25±0.19*	(n=6)
20nmol/ml	= 1.39±0.29***	(n=7)
50nmol/ml	= 1.27±0.15**	(n=7)
100nmol/ml	= 1.23±0.24*	(n=7)

Results are mean±SD(Number of experimentation in parenthesis)

Significantly different from the percent release by 1,25(OH)₂D₃ alone(Student's t-test) ;

*p<0.01

**p<0.005

***p<0.001

Table 3. Effects of Ca ionophore A23187 and diltiazem(20nmol/ml) on bone resorption. Resorption is expressed as percentage release of ⁴⁵Ca from bone in the medium during the culture period

Culture period	48H		72H	
	0.005	0.02	0.02	0.2
concentration of ionophore(µg/ml)				
control	14.32±1.15 (n=7)	14.53±1.32 (n=7)	27.01±2.80 (n=7)	
ionophore	14.45±0.63	14.50±0.92	20.77±1.15***	
ionophore	14.08±1.11 (n=7)	15.29±0.92 (n=7)	20.63±2.26 (n=7)	
ionophore + diltiazem	14.23±1.07	14.73±0.58	19.40±0.55	

Number of experimentation are in parenthesis.

Results are mean±SD.

Student's t-test ; ***p<0.001 compared with control.

러나 Dziak, Stern¹⁴⁾과 Eilon, Raisz¹⁵⁾은 출생 전 흰쥐의 사지뼈에 대한 ionophore의 영향은 bi-phasic으로서 0.1-1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 농도에 비례하여 bone resorption을 증가시켰으나 그 이상에서는 오히려 억제효과를 가져왔다고 하였으며 Ivey¹⁶⁾은 이 Ca ionophore가 0.0005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 bone resorption을 증가시키지 않았으며 오히려 PTH에 의해 유도된 bone resorption을 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 가역적으로 감소시켰다고 발표하여 아직도 많은 논란이 제기되고 있는 실정이다. 본 연구 결과는 후자의 결과에 가까우며 ionophore의 bone resorption에 대한 유효농도는 10^{-7}M 의 수준이라고 할 수 있겠다.

2) 세포로부터의 ⁴⁵Ca desaturation

이 실험에서는 그 결과를 조직배양의 실험결과와 비교하고자하여 실험대상을 가능한 한 조직배양시와 가까운 상태로 얻기위해 세포의 분쇄과정에서 효소를 사용하지 않았다. 따라서 실험 대상이 되었던 세포군들은 osteoblast, osteoclast, 그 전구체 세포들, 조혈세포등등 여러종류의 세포군들의 집합체로서 이들로부터 얻어진 ⁴⁵Ca desaturation curve는 서로 반응성이 다른 각 세포군들에 의해 이루어진 결과의 총합이라 할 수 있으며 또 분리된 세포내 각 Ca pool의 크기가 실험조건에 따라 매우 민감하게 변화하였으므로 각 실험 결과를 종합하

는데는 적지않은 어려움이 있었다. 각 실험에서 얻어낸 세포군들에 대해 몇몇 실험에 앞서 alkaline phosphatase/acid phosphatase의 비를 측정하였으며 그 값은 $3.61 \pm 1.14 (n=5)$ 이었다.

이 실험을 통해 얻은 대표적인 ⁴⁵Ca desaturation curve는 Fig. 1에서 볼 수 있다.

Diltiazem은 조직배양 실험결과와 달리 뼈세포의 혼합체에서는 20nmol/10⁶ cells에서 빠른 Ca 유출 속도에만 영향을 미쳤다. Table 4에 의하면 이 Ca antagonist는 b1의 값을 26%, p1의 값을 20% 정도 저하시켰으나 b1의 값에 한해서는 실험오차로 인하여 그 유의성이 크지 않았다($p < 0.10$).

1,25(OH)₂D₃만 혹은 1,25(OH)₂D₃가 diltiazem과 함께 세포의 배양액에 가해졌을 때 측정된 ⁴⁵Ca desaturation curve로부터 얻어진 각 결과치는 Table 5에 나타난다. 1,25(OH)₂D₃는 b1, b2의 값에는 영향을 주지 않았으며 p1, p2의 값을 약간 증가시키는 경향이 있었으나(대조군에 비해 29.5%, 15.2%) 통계학적인 유의성은 적었다. 그러나 이 p1, p2의 값들은 diltiazem에 의해서 저하되어 p1의 평균값은 대조군의 값 이하로 감소됨을 볼 수 있었으며, 느린 Ca 이동경로에 관해서는 그 효과가 좀 더 뚜렷하여 유의성 있게 1,25(OH)₂D₃에 대한 억제효과를 나타내었다($p < 0.05$).

Bone resorption에 대한 1,25(OH)₂D₃의 영향은 거의 확고하나 steroid계 물질의 뼈세포내에서의

Table 4. Intercepts and slopes obtained from the experimental curve of ⁴⁵Ca desaturation in bone cells ; Effects of diltiazem. Cells were incubated overnight with ⁴⁵Ca and diltiazem(20nmol/10⁶ cells) was added along with ⁴⁵Ca for two additional hours. The efflux experiment was performed in a tri-buffered solution(PH 7.1 at 37°C 1,25mM Ca⁺⁺).

	b(pmol/10 ⁶ cells)		p(mn ⁻¹)	
	b1	b2	p1	p2
control	1969. 1 \pm	4646.0 \pm	0.0516 \pm	0.00167 \pm
(n=6)	431.0	871.6	0.0084	0.00095
diltiazem	1446.2 \pm	4026.4 \pm	0.0365 \pm	0.00150 \pm
(n=4)	304.2*	168.6	0.0035**	0.00034

Results are mean \pm SD(number of experimentation in parenthesis).

Statistical analysis was done using "Student's t-test".

*p<0.10

**p<0.005

Table 5. Effects of 1,25(OH)₂D₃(0.5ng/10⁶cells)alone or in the presence of diltiazem (20nmol/10⁶ cells) on ⁴⁵Ca desaturation in bone cells. Cells were incubated for 2 hours with 1,25(OH)₂D₃ or diltiazem.

	b(pmol/10 ⁶ cells)		p(mn ⁻¹)	
	b1	b2	p1	p2
control	1630.6±	5130.1±	0.0525±	0.00128±
(n=5)	416.8	353.1	0.0179	0.00019
1,25(OH) ₂ D ₃	1633.8±	5061.2±	0.0680±	0.00151±
(n=5)	136.0	384.6	0.0260	0.00013*
1,25(OH) ₂ D ₃ ±	1469.1±	4666.9±	0.0430±	0.00116±
diltiazem(n=6)	258.8	744.1	0.0108 ⁰	0.00032 ⁰⁰

Results are mean±SD.(The number of experimentation is indicated in parenthesis).

Statistical analysis was done using "Student's t-test".

*p<0.10 compared with control

⁰p<0.10, ⁰⁰p<0.05 compared with 1,25(OH)₂D₃ alone.

Table 6. Effects of calcium ionophore A23187 on ⁴⁵Ca desaturation in bone cells. Ionophore A23187(0.05µg/10⁶ cells) was added along with ⁴⁵Ca for two additional hours.

	b(pmol/10 ⁶ cells)		p(mn-1)	
	b1	b2	p1	p2
control	1959.1±	4646.0±	0.0516±	0.00167±
(n=6)	431.0	871.6	0.0084	0.00095
ionophore	1939.7±	5260.6±	0.0696±	0.00309±
(n=6)	580.3	814.6	0.0280	0.00099**
ionophore +	1660.7±	4792.6±	0.0400±	0.00262±
diltiazem(n=5)	245.7	369.4	0.0052 ⁰⁰	0.00026

Results are mean±SD.(number of experimentation in parenthesis).

Statistical analysis was done using "Student's t-test".

**p<0.05 compared with control.

⁰⁰p<0.05 compared with ionophore A23187 alone.

Ca 이동기전에 관련된 영향 및 작용기전에 대해서는 아직도 여러가지 결과가 서로 엇갈리고 있다. Dziak¹⁷⁾의 경우 흰쥐 새끼의 두개골로부터 얻어낸 세포를 대상으로 실험을 하였으나 1,25(OH)₂D₃에 의한 ⁴⁵Ca desaturation에 대한 영향은 없었다고 하였다. 반면, Eilam¹⁸⁾등은 출생 전 흰쥐(20일)의 두개골로부터 분리해낸 세포를 배양하여 Ca movements 실험을 한 결과 1,25(OH)₂D₃가 다른 vitamin D₃의 metabolite들과 마찬가지로 Ca 유출을 증가시켰다고 하여 본 실험결과와 비슷한 보고를 하였다. 이들 결과와

Dziak의 실험결과가 일치되지 않는 이유는 세포 분리 방법 및 ⁴⁵Ca 표지에 따른 방법상의 차이등 여러면에서 찾아볼 수 있으므로 각각의 실험결과를 서로 비교한다는데는 많은 문제점이 있게된다.

본 실험에서는 방법상의 문제로 Ca uptake 실험을 하지는 않았으나 Ca efflux 결과로 미루어 보아 비교적 장시간 동안 세포에 대해 갖는 1,25(OH)₂D₃의 효과는 세포내 Ca pool의 turnover를 증가시킴으로서 bone resorption을 유도하는 것으로 보이며 diltiazem은 이 과정을 방해하는 것으로 보였다.

Ca ionophore A23187($0.05\mu\text{g}/10^6$ cells)에 의한 실험결과는 Table 6에 수록되어있다. $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 와 비슷하게 ionophore 역시 두 칼슘이동 경로에 대해 Ca 유출을 증가시키는 경향이 있었으나 p1의 값은 유의성이 없었던 반면 세포내 소기관으로부터의 느린 Ca 이동속도(p2)에 대해서는 매우 유의적인 증가효과를 가져왔다. 한편, 함께 첨가된 diltiazem은 빠른 Ca 이동 속도(p1)에 있어서는 $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 와의 실험에서와 비슷한 결과를 초래하여 ionophore에 의해 유의적으로 증가되지 않았던 p1의 값을 control 값 이하로 감소시켰으나 느린 Ca 이동경로에 대해서는 확실한 영향을 주지 않았다.

이상과 같이 ionophore A23187은 세포에서는 $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 와 같이 Ca efflux를 촉진시킨 반면 bone resorption에서는 농도에 따라 그 효과가 $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에 비해 매우 복잡한 현상을 보여주었다. 출생 전의 닭으로부터 얻어낸 골막세포를 대상으로 한 Nijweide, van der Plas 등의 연구¹⁰⁾에서도 이 ionophore는 작용시간에 따라 그 효과가 달라져 짧은 시간동안 세포 배양액에 첨가되었을 때는 Ca uptake를 증가시킨 반면 배양시간이 길어지면 오히려 억제효과를 보인다고 하였다. 또한 Dziak과 Stern 등¹¹⁾은 Ca ionophore A23187이 뼈세포내로의 일시적인 Ca uptake는 증가시켰으나 Ca efflux나 총 세포내 Ca pool의 크기에는 아무런 영향도 미치지 못하였다고 하였다. 이들 사실들을 종합해 볼 때 ionophore는 그 농도, 배양시간 등에 따라 효과가 일정하지 않은 것으로 사료되었으며 또 본 실험실에서는 비교적 고농도로 세포 배양액에 첨가되었을 때 ($5\mu\text{g}/10^6$ cells; 본 실험에서 사용한 농도의 100배) 두 시간 배양후 세포의 1/2이상이 희생된 것을 볼 수 있었다. 위와 같이 일정한 효과를 보이지 않는 ionophore의 작용기전을 연구하기 위하여, 또 ionophore의 뼈세포에 대한 Ca efflux 유도효과와 bone resorption 억제효과간에 어떤 관련성이 있는지를 알아 보기 위하여서는 더 많은 연구가 필요로 된다고 생각되는 동시에 diltiazem도 ionophore에 대해 확실한 효과를 갖지 않았으므로 $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에서와는 달리 Ca antagonist에 의한 slow calcium channel

bolcking 현상은 위의 농도에서는 ionophore의 작용기전에 어떤 확실한 역할을 하는 것 같지 않았다.

요약 및 결론

몇몇 호르몬에 의한 세포내 칼슘 상태의 변화는 이 물질들이 갖는 생리 활성(bone resorption)을 유도하는 기전에 있어 그 신호로서 역할을 할 것 이란 가정이 정립된 지는 비교적 오래이다. 본 실험에 의하면 $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는 이 가정에 부합되는 듯이 보였으나 Ca ionophore A23187에 관한 한 아직 많은 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

bone resorption에 촉진 효과를 가져올 것이라고 알려져 왔던 두 물질 $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 와 Ca ionophore A23187이 미리 표지되어 조직배양된 두개골과 뼈 세포로부터 유출되는 exchangeable Ca에 대하여 갖는 영향을 측정하고 여기에 Ca antagonist diltiazem을 첨가해 이것이 어떤 변화를 일으키는 지 보고자하여 실행한 실험결과는 다음과 같다.

- $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는 bone resorption에 대하여 뚜렷한 촉진효과를 가져왔으며 diltiazem은 이 작용을 억제하였다. Ionophore A23187은 그 농도에 따라 bone resorption에 미치는 영향이 달라 비교적 고농도에서 억제효과를 보였으며 diltiazem은 여기에 영향을 주지 못하였다.

- $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는 뼈세포로부터 Ca의 turnover rate를 증가시키는 것으로 사료되며 Ca antagonist diltiazem은 이를 감소시켰다. Ionophore A23187은 특히 뼈세포의 소기관에 편재된 Ca pool로부터의 Ca 유출을 크게 증가시켰으며 diltiazem은 이를 변화시키지 못하였다.

지금까지 본 바와 같이 생체막에서 일어나는 탈분극 및 Ca이온의 이동등과 같은 현상들은 vitamin D의 hydroxylated metabolites 등 bone resorbing 물질들의 작용기전을 연구하기 위해서 뿐 아니라 기타 여러 생리적 혹은 병리적으로 변형된 bone resorption 촉진 현상을 설명하기 위해 이용될 수 있을 것이라 본다.

REFERENCES

- 1) Hausser MR, McCain TA. *Medical progress-basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action (first of two part)*. *N Engl J Med* 297 : 974-983, 1977
- 2) Reynolds JJ. *The role of 1,25-dihydroxycholecalciferol in bone metabolism*. *Biochem Soc Spec Publ* 3 : 91-102, 1974
- 3) Reynolds JJ, Holick MF, DeLuca HF. *The role of vitamin D metabolites in bone resorption*. *Calcif Tiss Res* 12 : 295-301, 1973
- 4) Raisz LG, Trummel CL, Holick MF, DeLuca HF. *Dihydroxycholecalciferol, a potent stimulator of bone resorption in tissue culture*. *Science* 175 : 768-769, 1972
- 5) Raisz LG. *Direct effects of vitamin D and its metabolites on skeletal tissue*. *Clin Endocrinol Metab* 9 : 27-41, 1980
- 6) Kream BE, Jose M, Yamada AS, DeLuca HF. *A specific high affinity binding macromolecule for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in fetal bone*. *Science* 197 : 1086-1088, 1977
- 7) Chen TL, Hirst MA, Feldman D. *Receptor-like binding macromolecule for 1,25-dihydroxycholecalciferol in cultured mouse bone cells*. *J Biol Chem* 254 : 7491-7494, 1979
- 8) Dziak R, Stern PH. *Calcium transport in isolated bone cells III. Effects of parathyroid hormone and cyclic 3', 5'-AMP*. *Endocrinology* 97 : 1281-1287, 1975
- 9) Herrman-Erlee MPM, Gaillard PJ, Hekkelman JW, Nijweide PJ. *The effect of verapamil on the action of parathyroid hormone on embryonic bone in vitro*. *Eur J Pharmacol* 46 : 51-58, 1977
- 10) Lerner L, Gustafson GT. *Inhibition of 1- α -hydroxyvitamin D₃ stimulated bone resorption in tissue culture by the calcium antagonist verapamil*. *Eur J Clin Invest* 12 : 185-190, 1982
- 11) Reynolds JJ. *Organ culture of bone ; studies on the physiology of resorption*. In : *Organ culture in biomedical research* Cambridge University Press, Cambridge 355-366, 1975
- 12) Stern PA, Raisz LG. *Organ culture of bone* In : *Skeletal Research Academic Press New York* 21-59, 1979
- 13) Dziak R, Brand JS. *Calcium transport in isolated bone cells ; bone cell isolation procedures*. *J Cell Physiol* 84 : 75-84, 1974
- 14) Dziak R, Stern PH. *Responses of fetal rat bone cells and bone organ culture to the ionophore A23187*. *Calcif Tiss Res* 22 : 137-147, 1976
- 15) Eilon G, Raisz LG. *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
- 16) Ivey JL, Wright DR, Tashjian AH. *Bone resorption in organ culture ; inhibition by the divalent cation ionophore A23187 and X-5374*. *J Clin Invest* 58 : 1327-1338, 1976
- 17) Dziak R. *Effects of vitamin D metabolites on bone cell calcium transport*. *Calcif Tiss Res* 26 : 65-70, 1978
- 18) Eilam Y, Szydel LN, Harell A. *Effects of vitamin D metabolites on cellular Ca and on Ca transport in primary cultures of bone cells*. *Mol Cell Endocrinol* 19 : 263-273, 1980
- 19) Nijweide PJ, Van der Plas A. *Regulation of calcium transport in isolated periosteal cells, effects of hormones and metabolic inhibitors*. *Calcif Tissae Int* 29 : 155-161, 1979