

골아세포내 Ca^{2+} 활성도의 조절기전*

박 미 정**

- Abstract -

Key concept : Osteoblast-like cell, Ca^{2+} activity, Na^+-Ca^{2+} exchange, Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, store-operated Ca^{2+} influx

Mechanism of Ca^{2+} Regulation in Osteoblast-like Cells*

Park, Mi Jung**

Physiological activity of osteoblast including bone formation is known to be closely related to the increase of intracellular Ca^{2+} activity ($[Ca^{2+}]_i$) in osteoblast. Ca^{2+} is an important intracellular messenger in diverse cellular functions, and regulation of its level is mediated by the transmembrane Ca^{2+} movement via Ca^{2+} channels, Na^+-Ca^{2+} exchange, and by intracellular Ca^{2+} movement through the intracellular stores.

The purpose of this study is to investigate how the intracellular Ca^{2+} is regulated in osteoblast-like cells(OLCs) by measuring Ca^{2+} activity with cell imaging technique. OLCs were isolated from femur and tibia of neonatal rats, and cultured for 7 days. Cultured OLCs were loaded with a Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye, Fura-2, and fluorescence images were monitored with a cooled CCD camera. The images were processed and analyzed with an image analyzing software. The results were as follows.

(1) $[Ca^{2+}]_i$ of OLC decreased as the Ca^{2+} concentration in the superfusing Tyrode solution was lowered. When Na^+ concentration in the superfusing solution was decreased, $[Ca^{2+}]_i$ increased. These suggest that Ca^{2+} flux occurs via the Na^+-Ca^{2+} exchange mechanism. (2) When Na^+ in the superfusing solution was removed, a transient Ca^{2+} increase(Ca^{2+} spike) was

* Doctoral dissertation of Medicine, Inha University

** Department of Nursing, Deabul University

occasionally observed. However, Ca^{2+} spike was not observed after adding 1 μ M thapsigargin. This implies that the generation of Ca^{2+} spike is mediated by the release of Ca^{2+} from endoplasmic reticulum(ER). (3) As the Ca^{2+} concentration in the superfusing solution was raised, the frequency of 0mM Na^+ -induced Ca^{2+} spike increased, suggesting that Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release(CICR) mechanism exists. (4) After $[Ca^{2+}]_i$ was decreased with the superfusion of Ca^{2+} -free solution containing thapsigargin, the recovery of $[Ca^{2+}]_i$ with reperfusion of 2.5mM Ca^{2+} solution transiently exceeded the control level, suggesting that the depletion of Ca^{2+} in ER induces Ca^{2+} influx from extracellular medium via store-operated Ca^{2+} influx(SOCl) mechanism. (5) $[Ca^{2+}]_i$ was not affected by the superfusion of 25mM K^+ Tyrode solution.

These results suggest that intracellular Ca^{2+} activity in osteoblast is regulated by transmembrane Ca^{2+} flux via Na^+ - Ca^{2+} exchange, Ca^{2+} release from the internal store (ER) via Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, and store-operated Ca^{2+} influx across the cell membrane.

1. 서론

골에 가해지는 기계적 자극은 세포의 기질(extracellular matrix)을 통해 골피질(cortical skeleton)과 골세포막으로 전달된다(Wang 등, 1993). 골세포막에 전달된 기계적 자극은 골세포내 Ca^{2+} , inositol 1,4,5-trisphosphate($InsP_3$), prostaglandin E_2 (PGE_2), cyclic adenosine monophosphate(cAMP) 농도 등을 증가시킴으로써 일련의 생화학적 과정을 유도해 내어 골세포를 증식시킨다(Sandy 등, 1989; Reich 등, 1991; Jones 등, 1991; Lanuon, 1993). 특히 세포내 Ca^{2+} 은 여러 종류의 세포에서 2차 매개체(second messenger)로써 중요한 역할을 하여(Berridge, 1987; Rink 및 Merritt, 1990) 세포의 활성도를 조절한다.

이와 같이 세포 기능 조절에 있어 중요한 작용을 하는 Ca^{2+} 은 세포막의 Ca^{2+} 이온통로(Beau, 1987), 세포내 Ca^{2+} 이온통로(Rink, 1990; Berridge, 1993; Taylor 및 Traynor, 1995), Ca^{2+} -ATPase(Carafoli 등, 1990), 세포막의 Na^+ - Ca^{2+} 교환이동(Carafoli, 1987) 등의 기전을 통해 세포

막과 내형질세망(endoplasmic reticular membrane)/근형질세망(sarcoplasmic reticular membrane)을 경계로 유입, 유출되면서 Ca^{2+} 신호(Ca^{2+} signal)를 형성한다. $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화에 의해 발생하는 Ca^{2+} 신호의 형성 기전은 매우 다양하여, 국소적인 짧은 burst에서부터 반복적인 Ca^{2+} wave를 형성하는 지속적인 global Ca^{2+} 증가 상태까지 여러 현상을 나타낸다(Berridge 및 Dupont, 1994).

Ca^{2+} 신호의 형성 원인인 세포내 Ca^{2+} 농도를 조절하는 기전 중 세포막의 Ca^{2+} 이온통로와 세포내 Ca^{2+} 이온통로는 1차적으로 세포질 내로의 Ca^{2+} 이동을 조절하며, Ca^{2+} -ATPase와 Na^+ - Ca^{2+} 교환 이동은 Ca^{2+} 유출과 관련이 있다(Carafoli, 1987). 세포막의 Ca^{2+} 이온통로는 조절 기전에 따라 voltage-operated channels(VOCs), receptor-operated channels(ROCs), store-operated channels(SOCs)들로 분류되는데, VOCs와 ROCs는 단기간에 다량의 Ca^{2+} 유입에 관여하며 SOCs는 지속적인 소량의 Ca^{2+} 유입과 관련이 있다(Berridge, 1987). 특히 SOCs는 내형질세망이나 근형질세망과 같은 세포내 Ca^{2+} 저장고가 고갈되었을 때 세포막의 Ca^{2+} 유입을 활성화시켜(Takemura 등,

1989 : Fasolato 등, 1994) Ca^{2+} 저장고를 보충시키는데, 이런 현상을 'capacitative' Ca^{2+} influx (Putney, 1986) 또는 'store-dependent' Ca^{2+} influx (SDCI), 'store-operated' Ca^{2+} influx (SOCl) (Fasolato 등, 1994)라고 한다. 세포내 Ca^{2+} 저장고로부터 세포질로 Ca^{2+} 유리에 관여하는 세포내 Ca^{2+} 이온통로는 $InsP_3$ 수용체 (inositol trisphosphate receptors, $InsP_3Rs$)와 ryanodine 수용체 (ryanodine receptors, $RyRs$)이다. 골격근 (Meissner 및 Lu, 1995 : Suda, 1995 : Klein 등, 1996)과 심근의 근형질세망 (Cannel 등, 1994, 1995)에는 $RyRs$ 가 존재하는 반면, 비흥분성세포의 내형질세망에는 $InsP_3Rs$ 가 존재하는데 $InsP_3$ 에 의해 흥분 정도가 결정되어 Ca^{2+} 유리량이 변화된다 (Streb 등, 1993 : Berridge 및 Irvine, 1984). 세포가 생리적 용량 내의 작용물질 (agonist)로부터 자극을 받으면, $[Ca^{2+}]_i$ 은 안정시 낮은 Ca^{2+} 상태에서부터 자발적으로 증가되어 반복적인 Ca^{2+} spike를 형성하는 단계적 위상 (hierarchical organization)을 나타낸다 (Bootman, 1996 : Lipp 및 Niggli, 1996 : Parker 및 Yao, 1996 : Bootman 등, 1997). 즉 낮은 자극에서는 한 개의 $InsP_3R$ 이 활성화되어 내형질세망의 Ca^{2+} 을 유리시키는 초보적 현상 (fundamental events, blip)이 일어나고, 다음 단계에서는 소그룹의 $InsP_3Rs$ 이 활성화되어 Ca^{2+} 유리가 증가되는 기초적 현상 (elementary events, puff)이 발생한다. 이때 유리된 Ca^{2+} 은 인접해 있는 $InsP_3Rs$ 를 자극하여 더욱 많은 Ca^{2+} 을 유리시키는 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) 과정을 통해 재생성되는 Ca^{2+} wave를 형성하여 Ca^{2+} 신호가 나타나게 된다.

세포질 내의 free Ca^{2+} 농도는 매우 낮지만 ($<10^{-7}$ M) 세포외액 ($\sim 10^{-3}$ M)과 내형질세망 안은 매우 높아 큰 농도 경사가 형성되므로 Ca^{2+} 은 세포외액이나 내형질세망에서부터 세포질내로 이동하려고 한다. 이때 Ca^{2+} 신호에 의해 내형질세망과 세포막의 Ca^{2+} 이온통로가 열렸을 때 Ca^{2+} 은 세포질 내로 이동하여 국소적인 Ca^{2+} 농도가 높아지게 된다. 이러한 Ca^{2+} 신호 기전이 작용하

기 위해서는 안정 상태에서 세포질 내의 Ca^{2+} 농도가 반드시 낮게 유지되어야 하며, 이것은 Ca^{2+} -ATPase와 Na^+ - Ca^{2+} 교환이동 작용에 의해 가능하다. 세포막과 내형질세망에서 작용하는 Ca^{2+} -ATPase는 ATP를 이용해 농도 경사에 역행하여 세포질 내에 있는 Ca^{2+} 을 세포밖과 내형질세망안으로 이동시키는 기능을 한다. 또한 세포막에서 Ca^{2+} 이동에 관여하고 있는 Na^+ - Ca^{2+} 교환 이동은 모든 동물세포에서 광범위하게 발견되는 현상으로 (Reuter 및 Seitz, 1968 : Baker 등, 1969 : Blaustein 등, 1991), Na^+ - K^+ ATPase 활성도와 관련하여 세포내 Ca^{2+} 을 유출시켜 Ca^{2+} 농도를 조절한다 (Mullins, 1981 : Blaustein 등, 1986). (Kaczorowske 등, 1984 : Blaustein 등, 1991). Na^+ - Ca^{2+} 교환이동 단백질은 포유류의 심근과 squid giant axon에서 최초로 발견되었으며 (Reuter 및 Seitz, 1968 : Baker 등, 1969 : Blaustein 등, 1991) 성상세포 (Blaustein 등, 1991), 췌장의 β -cell (Herchuelz 및 Plasman, 1991 : Kofuji 등, 1992), 폐 (Kofuji 등, 1992), 간 (Kofuji 등, 1992) 및 골격근 (Hidalgo 등, 1991 : Castillo 등, 1991 : Kofuji 등, 1992) 등에서도 발견되어 활발히 연구되어 왔다. 그러나 체내 대부분의 Ca^{2+} 이 저장되어 있는 골에서 Na^+ - Ca^{2+} 교환이동 작용에 관한 연구는 근래에 와서야 일부 이루어졌다 (Krieger, 1992). Calcitropic hormone의 자극에 의한 골흡수가 Na^+ - Ca^{2+} 교환이동 기전을 필요로 한다는 것이 실험을 통하여 밝혀졌지만 (Krieger 및 Tashjian, 1980), 장기배양 실험에서는 골아세포에 대한 calcitropic hormone 작용의 초기단계나 마지막 단계에서 골아세포가 관여하는 Ca^{2+} 유리 (osteoblast-mediated Ca^{2+} release) 등에 Na^+ - Ca^{2+} 교환이동 기전이 관여하는지에 대해서 확실한 연구 결과가 없는 상태이다. 뿐만 아니라 골세포내 Ca^{2+} 활성도를 조절하는 기전에 대한 전반적인 연구는 더욱 이루어지지 않았다. 아직까지 골조직이나 골세포에서 직접 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화를 측정하기에는 어려움이 있으므로 여러 연구에서 신생쥐 (neonatal rat)의 두개골이나 대퇴골에

서 분리시켜 배양한 1차세포나 골육종세포 등을 많이 이용하고 있는 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 신생쥐의 대퇴골과 경골에서 분리시켜 배양한 1차 세포에 Ca^{2+} 감성제 형광염료(Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye)인 Fura-2를 주입시킨 후 세포외 관류액의 성분을 변화시켜 처치했을 때, 골아세포(osteoblast-like cell, OLC)의 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화 및 그 기전을 Ca^{2+} -영상 (Ca^{2+} -imaging) 기법을 통해 알아보고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 골아세포의 분리 및 배양

생후 1주일 이하된 흰 쥐를 암수 구별없이 1회에 10마리 정도 희생하여 대퇴골과 경골을 적출하여 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free phosphate buffered saline (PBS)에 여러번 세척한 후 미세한 골편으로 분쇄하였다. 이 골편들을 15mL의 분해용액 [0.137% collagenase type I(Sigma, USA), 0.05% trypsin type III(Sigma, USA), 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.05% $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$]이 함유된 병에 옮긴 후 실온에서 90분간 반응시킨 1차 세포 부유액과 그 동일한 과정을 거친 2차 세포 부유액을 제거하였다. 남아 있는 침전물에 다시 15mL의 분해용액을 넣어 약 60분간 분해시켜 상층 부유액을 회수하였으며, 이 과정을 2회 반복하였다. 위 방법으로 얻어진 상층액에 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(Gibco, USA) 20mL를 가하고 혼합한 후 $1500 \times g$ 로 10분간 원심분리하여 세포 침전물을 얻었다. 이 침전물을 10% 우태아 혈청이 함유된 DMEM 용액에 부유시키고 trypan blue dye exclusion test로 살아 있는 세포 수를 세어 세포수가 $5 \times 10^5/mL$ 되게 조정하였으며, 여기에 penicillin(100 unit/mL), streptomycin(100 unit/mL)을 첨가한 후 조직배양 플라스크에 5mL씩 분주하여 37°C, 5% CO_2 에서 1주일간 배양하였다.

2. fluorescent dye 주입

배양된 골아세포를 분리하기 위해, 플라스크내 DMEM을 제거하고 PBS로 세척한 후 그 용액을 제거하였다. 그 후 trypsin-EDTA(Gibco, USA)를 넣고 37°C에서 5분간 배양하여 골아세포를 분리시킨 후, 분리된 골아세포에 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM을 넣어 $1200 \times g$ 로 5분간 원심분리시켜 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 골아세포를 140mM Na^+ , 2.5mM Ca^{2+} , 5mM K^+ 정상 Tyrode 용액으로 $1,200 \times g$ 로 2분간 원심분리시켜 세척한 후, 4°C 정상 Tyrode 용액에 넣어 세포 부유액 상태로 보관하였다.

세포내에 Ca^{2+} 감성제 형광염료인 Fura-2를 주입하기 위해, 배양 후 분리시켜 정상 Tyrode 용액에 보관 중인 골아세포를 5 μ M Fura-2 AM ester(Molecular Probe, USA)와 2 μ M cremophore(Sigma, USA)가 포함된 정상 Tyrode 용액에 넣고 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 $1,200 \times g$ 로 2분간 원심분리시켜 상층액을 제거한 후, 다시 정상 Tyrode 용액을 넣어 $1,200 \times g$ 로 2분간 원심분리시켜 세척한 후 4°C 정상 Tyrode 용액에 보관하여 실험에 사용하였다.

3. 세포내 Ca^{2+} 활성화도 변화의 영상화

Fura-2가 주입된 골아세포 부유액 200 μ L을 형광도립현미경(Nikon Diaphot 300, Japan) 실험대위의 chamber에 올린 후 유리판을 덮고 5분 동안 방치하여 고정시켰다. 그리고 140mM Na^+ , 2.5mM Ca^{2+} , 5mM K^+ 정상 Tyrode 용액을 관류시켜 위에 떠 있는 골아세포를 흘려 보낸 후 각 실험용액을 관류시키면서, Xenon UV lamp로 조성된 빛을 filter changer(Sutter, USA)에 장착된 340nm와 380nm filter(band width = 10nm)를 통해 10초 간격으로 번갈아 여과시켜 300msec 동안 세포에 조사하였다. 이때 발생하는 형광영상을 510nm(band width=10nm)로 여과한 후 CCD digital camera (Photometrics PXL37, USA)로 수집하였다. Filter

changer와 CCD digital camera의 제어 및 영상자료 처리를 위해 PC에 설치된 Axon Imaging Workbench 소프트웨어 V.2(Axon Instruments, USA)를 이용하였다.

위 방법에 의해 수집된 영상 자료로부터 세포 내의 Ca^{2+} 농도는 380nm에 의한 형광에 대한 340nm에 의한 형광 비율, R340/380으로 표시하였다.

4. 실험 용액

실험에 사용한 용액들은 140mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 5mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM NaH_2PO_4 , 5mM N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'[2-ethanosulfonic acid](HEPES), 5.5mM glucose로 조성되고 pH 7.4로 보정된 정상 Tyrode 용액과, Na^+ 농도를 각각 75%(105mM), 50%(70mM), 0%(0mM)로 감소시킨 Tyrode 용액, 그리고 Ca^{2+} 농도를 2.5mM에서 1.0mM, 0mM로 감소시킨 Tyrode 용액, thapsigargin 용액 등이다.

III. 결과

1. 세포외 Ca^{2+} 농도가 골아세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 변화에 미치는 영향

골아세포내 $[Ca^{2+}]_i$ 변화에 대한 세포외 Ca^{2+}

농도의 의존성을 알아보기 위해 2.5mM Ca^{2+} 정상 Tyrode 용액, 1.07mM Ca^{2+} Tyrode 용액, 0mM Ca^{2+} Tyrode 용액에 모두 1 μ M thapsigargin을 섞어 차례로 관류시켰다(Fig. 1). 실험 결과 세포 밖의 Ca^{2+} 농도가 2.5mM, 1.0mM, 0mM로 낮아질수록 골아세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 는 차츰 감소하여 0mM Ca^{2+} Tyrode 용액을 관류시켰을 때의 골아세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 는 2.5mM Ca^{2+} 정상 Tyrode 용액 관류때와 비교해 볼 때 현저히 떨어졌다. 그러므로 골아세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 는 세포외 Ca^{2+} 농도에 의존적임을 알 수 있었다.

그러나 세포 밖 0mM Ca^{2+} 을 정상적인 2.5 mM Ca^{2+} 으로 증가시켰을 때 골아세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 는 원래의 기준치보다 상당히 증가된 흥미로운 현상을 나타냈다.

2. 세포외 Na^+ 농도가 골아세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 변화에 미치는 영향

골아세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 변화에 대한 세포외 Na^+ 농도의 의존성을 알아보기 위해 다음과 같이 Na^+ 농도를 변화시킨 용액을 관류시켰다. 140mM Na^+ 정상 Tyrode 용액, 70mM Na^+ Tyrode 용액, 0mM Na^+ Tyrode 용액을 차례로 관류시켜 140 mM Na^+ 정상 Tyrode 용액 관류시 나타나는 골아세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 의 기준치와 비교하였을 때, 70

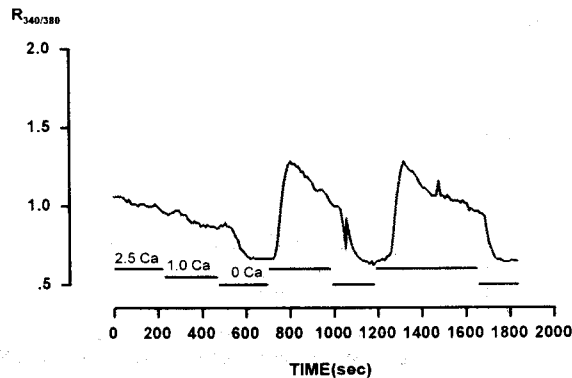


Fig. 1. Change of $[Ca^{2+}]_i$ by $[Ca^{2+}]_e$.

$[Ca^{2+}]_e$ was lowered to 2.5 mM, 1.0 mM and 0 mM. All the solutions contained 1 μ M thapsigargin.

mM Na⁺ Tyrode 용액 관류시 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 약간 증가하였으며 0mM Na⁺ Tyrode 용액 관류시에는 골아세포의 [Ca²⁺]_i가 더욱 증가하는 단계적인 증가 양상을 나타냈다(Fig. 2).

그러나 위 실험과 유사한 실험을 하였을 때, 때로는 (Fig. 2)와 같은 [Ca²⁺]_i의 단계적인 증가 결과 이외에도 골아세포의 [Ca²⁺]_i가 일시적으로 크게 증가하여 나타나는 Ca²⁺ spike가 형성되기도 하였다(Fig. 3). 즉 140 mM Na⁺ 정상 Tyrode 용액, 105mM Na⁺ Tyrode 용액, 70mM Na⁺ Tyrode 용액, 0mM Na⁺ Tyrode 용액을 관류시

켰을 때, 105mM Na⁺ Tyrode 용액 관류시에는 골아세포의 [Ca²⁺]_i가 140mM Na⁺ 정상 Tyrode 용액 관류시의 [Ca²⁺]_i의 기준치보다 약간 증가한 반면 70mM Na⁺ Tyrode 용액과 0mM Na⁺ Tyrode 용액 관류시에는 골아세포의 [Ca²⁺]_i가 급격히 증가하여 형성되는 Ca²⁺ spike가 나타났다. 이때 Ca²⁺ spike peak의 크기는 70mM Na⁺ Tyrode 용액 관류시보다 0mM Na⁺ Tyrode 용액 관류시때 더 크게 나타났다. 이러한 0mM Na⁺ 상태에서 형성되는 Ca²⁺ spike의 원인이 세포의 Na⁺ 농도의 감소로 인한 것인지 아니면 다른 이

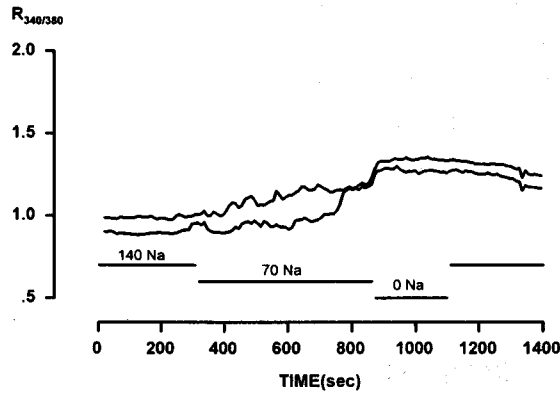


Fig. 2. Change of [Ca²⁺]_i by [Na⁺]_e

Na⁺ was replaced with NMG to make 70mM Na⁺ and 0mM Na⁺ solution.

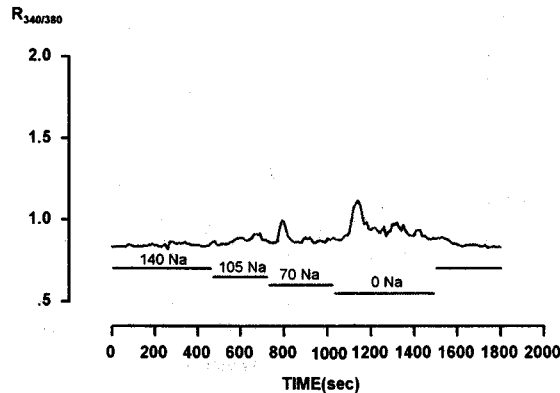


Fig. 3. Generation of Ca²⁺ spike with decreasing of [Na⁺]_e

[Ca²⁺]_i increased as [Na⁺]_e was lowered, and Ca²⁺ spikes were occasionally observed on top of step increase.

유에 의한 것인지를 알아보기 위해, 골아세포의 세포외 Na⁺ 농도를 0mM로 감소시킨 상태에서 세포외 Ca²⁺ 농도를 변화시키는 실험을 하였다.

3. 세포외 Ca²⁺ 농도가 Ca²⁺ spike 형성에 미치는 영향

0mM Na⁺ 상태에서 형성되었던 Ca²⁺ spike의 형성 기전을 알아보기 위해, 세포 밖을 0mM Na⁺ 상태로 유지시키면서 골아세포에 0mM Ca²⁺ Tyrode 용액, 1.0mM Ca²⁺ Tyrode 용액, 2.5mM Ca²⁺ Tyrode 용액을 관류시켜 보았다.

먼저 2.5mM Ca²⁺ Tyrode 용액을 관류시켜 골아세포의 [Ca²⁺]_i의 기준치를 측정 한 후 위의 Tyrode 용액을 각각 관류시켰을 때 모든 용액에서 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 갑작스럽게 증가하여 Ca²⁺ spike를 형성하였다. 이때 Ca²⁺ spike의 안정치와 형성 빈도는 세포외 Ca²⁺ 농도가 높아질수록 증가하였지만 Ca²⁺ spike의 peak는 감소하였다(Fig. 4). 즉 0mM Ca²⁺ Tyrode 용액을 관류시켰을 때에도 1.0mM Ca²⁺ Tyrode 용액이나 2.5mM Ca²⁺ Tyrode 용액을 관류시켰을 때와 마찬

가지로 골아세포의 [Ca²⁺]_i가 급격히 증가하여 Ca²⁺ spike를 형성하였으며, Ca²⁺ spike의 peak의 크기는 0mM Ca²⁺ Tyrode > 1.0mM Ca²⁺ Tyrode > 2.5mM Ca²⁺ Tyrode 순으로 나타났지만, Ca²⁺ spike의 형성 빈도는 2.5mM Ca²⁺ Tyrode > 1.0mM Ca²⁺ Tyrode > 0mM Ca²⁺ Tyrode 순으로 Ca²⁺ spike의 peak와는 반대 현상을 보이고 있다. 이러한 결과를 놓고 볼 때, 0mM Na⁺ 상태에서 생성되는 골아세포의 Ca²⁺ spike 형성에는 세포외 Ca²⁺이 관여하고 있음을 알 수 있었다.

그러나 세포외 Ca²⁺ 농도가 0mM일 때도 골아세포에서 Ca²⁺ spike가 형성되었기 때문에, Ca²⁺ spike 형성에 세포외 Ca²⁺이 절대적으로 필요한 것인지 확인해 볼 필요가 있었다. 따라서 세포외 Ca²⁺을 완전히 제거하기 위해 Ca²⁺-chelator로 작용하는 EGTA 1mM을 첨가한 후 Na⁺ 농도를 140mM에서 0mM로 변화시키면서 위와 동일한 실험을 하였다. 1mM EGTA를 첨가한 140mM Na⁺, 0mM Ca²⁺ Tyrode 용액, 1mM EGTA를 첨가한 0mM Na⁺, 0mM Ca²⁺ Tyrode 용액, 0mM Na⁺, 1.0mM Ca²⁺ Tyrode 용액을 차례로 관류시키면서 형광비율을 수집한 결과는 다음과 같다(Fig. 5).

Ca²⁺-free solution was made by adding 1mM EGTA.

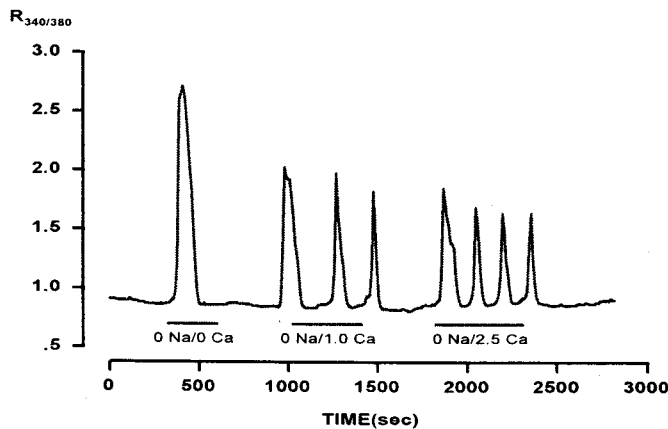


Fig. 4. Dependency of the Ca²⁺ spike generation on [Ca²⁺]_o.

Na⁺-free solution was superfused with different [Ca²⁺]_o as indicated. Resting level and frequency of Ca²⁺ spike increased as [Ca²⁺]_o was raised.

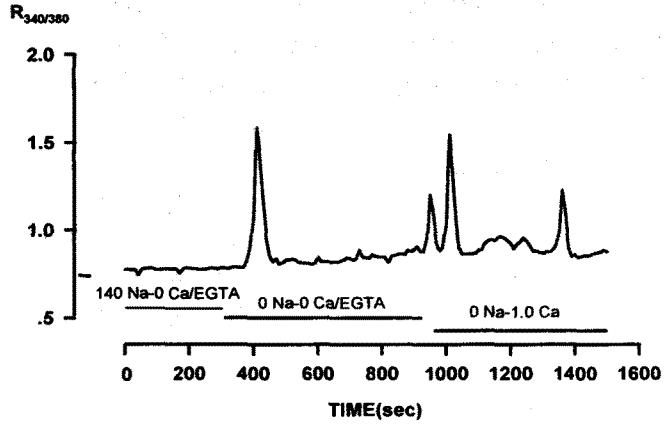


Fig. 5. Generation of Ca^{2+} spike in extracellular Ca^{2+} -free condition

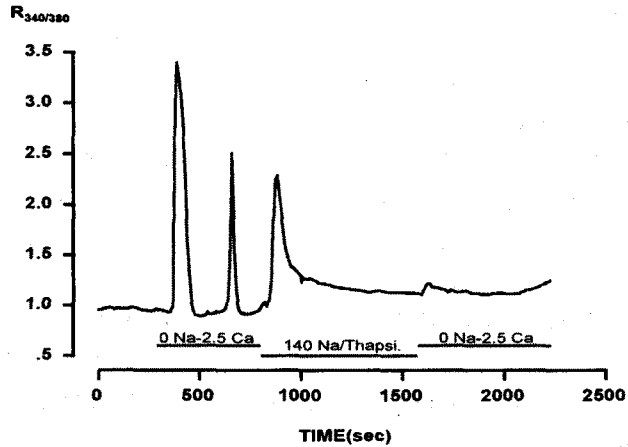


Fig. 6. Ca^{2+} spike Block by thapsigargin

Na^+ -free solution was superfused after superfusion of 140mM Na^+ solution with $1\mu\text{M}$ thapsigargin.

먼저 1mM EGTA를 첨가한 140mM Na^+ , 0mM Ca^{2+} Tyrode 용액을 관류시킴으로써 세포 내로 Ca^{2+} 유입이 전혀 없는 상태에서 골아세포의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 기준치를 측정하였다. 그 후 1mM EGTA를 첨가한 0mM Na^+ , 0mM Ca^{2+} Tyrode 용액을 관류시키자 골아세포의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 는 급격히 증가하여 Ca^{2+} spike를 형성하였다. 이와 같이 세포밖 Ca^{2+} 이 완전히 제거된 상태에서 Ca^{2+} spike가 형성되었다는 것은 0mM Na^+ 상태에서 형성되는 Ca^{2+} spike의 원인이 세포의 Ca^{2+} 으로 인한 것이 아님을 알려주고 있다. 따라서 골아세포의

Ca^{2+} spike 형성에는 세포밖 Ca^{2+} 이 절대적으로 필요한 것은 아니기 때문에, 세포 내에서 Ca^{2+} 저장고의 역할을 하는 내형질세망으로부터 세포질로 유리되는 Ca^{2+} 에 의한 것일 수 있다고 생각할 수 있다.

위와 같은 Ca^{2+} spike가 내형질세망에서 세포질로 유리되는 Ca^{2+} 으로 인해 형성되는 것인지를 확인하기 위해 thapsigargin을 이용하여 다음과 같은 실험을 하였다. 140mM Na^+ 정상 Tyrode 용액, 0mM Na^+ Tyrode 용액, $1\mu\text{M}$ Thapsigargin을 첨가한 140mM Na^+ 정상 Tyrode 용액, 그 후

0mM Na⁺ Tyrode 용액을 차례로 관류시킨 후 골아세포의 [Ca²⁺]_i를 측정하였다(Fig. 6). 그 결과, 140mM Na⁺ 정상 Tyrode 용액 관류시의 기준치와 비교하여 0mM Na⁺ Tyrode 용액을 관류시켰을 때 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 급격히 증가하여(Fig. 4)과 같은 반복적인 Ca²⁺ spike를 형성하였다. 다음에 140mM Na⁺ 정상 Tyrode 용액에 1μM thapsigargin을 첨가한 후 골아세포에 관류시켰을 때 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 증가하여 Ca²⁺ spike를 형성하였으며, 안정 상태로 되돌아왔을 때도 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 정상 Tyrode 용액 관류 시의 기준치보다 높은 측정치를 나타냈다. 그러나 다시 0mM Na⁺ Tyrode 용액을 관류시켰을 때는 처음 0mM Na⁺ Tyrode 용액 관류시 형성되었던 Ca²⁺ spike는 형성되지 않았다. 이러한 결과는 0mM Na⁺ 상태에서 생성되는 Ca²⁺ spike가 세포밖에서 유입된 Ca²⁺에 의해 형성되는 것이 아니라, 세포내 Ca²⁺ 저장고인 내형질세망에서 Ca²⁺이 세포질내로 유출됨으로써 [Ca²⁺]_i가 급격히 증가하여 형성되는 것임을 알려주는 것이다.

4. 내형질세망내 Ca²⁺ 저장량이 골아세포의 [Ca²⁺]_i 변화에 미치는 영향

첫번 째 실험결과에서 매우 흥미로웠던 점은 1 μM thapsigargin이 포함된 0mM Ca²⁺ Tyrode 용액 관류 후 동량의 thapsigargin이 포함된 2.5 mM Ca²⁺ 정상 Tyrode 용액을 재관류시켰을 때 골아세포의 [Ca²⁺]_i가 처음 정상 Tyrode 용액을 관류시켰을 때의 기준치보다 훨씬 높게 나타난 것이다. 1μM thapsigargin을 포함한 0mM Ca²⁺ Tyrode 용액 관류 후 2.5mM Ca²⁺ Tyrode 용액 재관류 때 나타나는 골아세포의 [Ca²⁺]_i의 이러한 증가는 세포 밖에서 정상적으로 유입되는 Ca²⁺ 양보다 더 많은 Ca²⁺이 유입되기 때문이라고 생각되며, 이 현상은 thapsigargin에 의한 내형질세망의 Ca²⁺ 고갈과 관련이 있을 것이라고 생각되어 다음과 같은 실험을 실시하였다.

2.5mM Ca²⁺ 정상 Tyrode 용액을 관류시켜 골

아세포의 [Ca²⁺]_i의 기준치를 측정 한 후 0mM Ca²⁺ Tyrode 용액을 관류시키면 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 감소하였다. 그 후 다시 2.5mM Ca²⁺ 정상 Tyrode 용액을 재관류시키면 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 원래의 기준치 정도로 회복되었다. 그 후 1 μM thapsigargin이 첨가된 0mM Ca²⁺ Tyrode 용액을 관류시키면 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 감소하였는데 0mM Ca²⁺ Tyrode 용액을 관류시켰을 때의 [Ca²⁺]_i와 비교해서 차이가 거의 없었다. 그 후 thapsigargin에 의해 내형질세망내 Ca²⁺이 고갈된 상태에서 다시 2.5mM Ca²⁺ 정상 Tyrode 용액을 재관류시켰을 때 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 원래의 기준치 이상으로 현저히 증가하였다(Fig. 7). 이러한 결과는 2.5mM Ca²⁺ 정상 Tyrode 용액을 재관류하기 전, 0mM Ca²⁺ Tyrode 관류 용액에 1μM thapsigargin의 처치 유무에 따른 차이이므로 세포내 Ca²⁺ 저장고인 내형질세망의 Ca²⁺ 고갈과 밀접한 관련이 있음을 알려주고 있다.

5. 세포막 전압이 골아세포의 [Ca²⁺]_i 변화에 미치는 영향

골아세포의 [Ca²⁺]_i의 변화에 대한 세포막전압의 의존성을 알아보기 위해, 5mM K⁺ Tyrode 용액을 관류시킨 후 25mM 고농도 K⁺ Tyrode 용액을 관류시켜 보았지만 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 변화를 보이지 않았다 (Fig. 8). 이러한 결과를 통해 골아세포의 [Ca²⁺]_i 변화는 고농도의 [K⁺]_e으로 인한 막전압의 탈분극 현상에 의존하고 있지 않음을 알 수 있었다.

IV. 고찰

일반적으로 세포질 내로 Ca²⁺ 이동을 조절하는 기전은 세포막에 존재하는 VOCs, ROCs, SOCs 등 3종류의 Ca²⁺ 이온 통로와 InSpaRs, RyRs 등의 세포내 Ca²⁺ 이온 통로들로 이루어진다. 세포질로 이동한 Ca²⁺을 세포외나 내형질세망/근형질

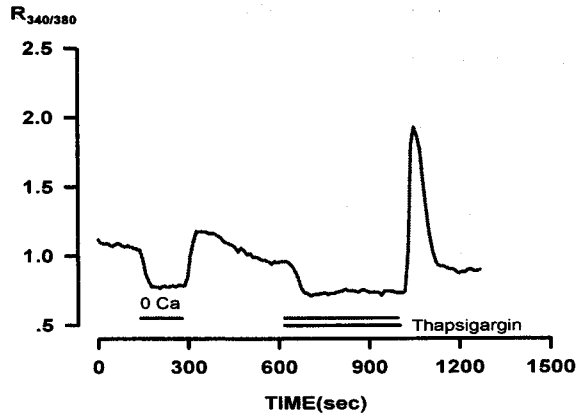


Fig. 7. Change of $[Ca^{2+}]_i$ by the Ca^{2+} depletion in ER

Ca^{2+} solution(2.5 mM) was superfused after superfusion of 0mM Ca^{2+} solution with 1 μ M thapsigargin

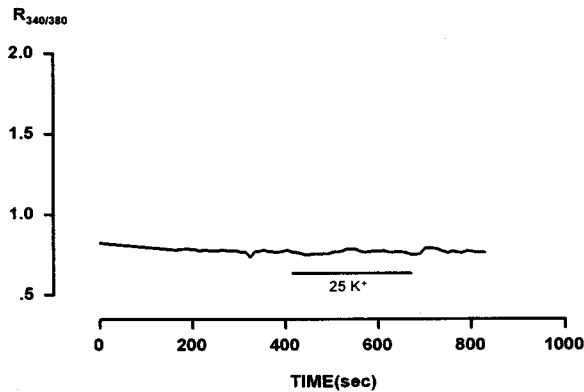


Fig. 8. Change of $[Ca^{2+}]_i$ by $[K^+]_e$

High K^+ solution(25mM) was superfused as indicated.

세망으로 이동시키는 기전은 Na^+-Ca^{2+} 교환이동과 Ca^{2+} -ATPase에 의해 이루어진다. $[Ca^{2+}]_i$ 는 1차적으로 ATP-driven Ca^{2+} pump에 의해 조절되지만(Garrahan 등, 1990) Na^+-Ca^{2+} 교환이동 또한 세포질내 Ca^{2+} 농도를 조절하는데 중요한 역할을 하고 있다(Blaustein 등, 1991). 골조직에서 Na^+-Ca^{2+} 교환이동 기전은 골흡수 및 골형성과 관계되는 호르몬을 골세포에 처치했을 때 나타나는 변화에 대한 연구를 통해 밝혀지게 되었다. 부갑상선 호르몬은 골세포막에 직접 작용하여 골에서 Ca^{2+} 을 유리시켜 골흡수 작용을 나타내는데

이때 세포내 Na^+ 농도가 정상보다 높거나 세포외 Na^+ 농도가 정상보다 낮으면 부갑상선 호르몬에 의한 Ca^{2+} 유리가 억제되는 것으로 보아, 골세포에서 Na^+-Ca^{2+} 교환이동 기전이 존재하고 있음을 알려준다(Krieger 등, 1980; Krieger, 1992; Krieger, 1996).

본 연구에서 세포의 Na^+ 농도를 140mM, 105mM, 70mM, 0mM로 감소시켰을 때 유사골아 세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 는 점차 증가하는 것으로 보아 Na^+-Ca^{2+} 교환이동 기전이 작용하고 있음을 알 수 있다. 본 실험에서와 같이 세포의 Na^+ 농도가

낮아지게 되면 Na^+ - Ca^{2+} 교환이동은 억제되어 여러 경로를 통해 세포 내로 유입된 Ca^{2+} 을 세포외로 유출시킬 수 없으므로 유사 골아세포의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 는 증가하게 된다. 이것은 세포외 Na^+ 농도를 생리적 농도인 140mM에서 1.9mM로 감소시키고 choline chloride로 삼투압을 맞춰 세포내 Na^+ 농도를 증가시킨 것과 같은 상태의 UMR-106 골육종 세포에서 Ca^{2+} 유입이 유의하게 증가되었다는 연구 결과와 일치하는 것이다(Krieger, 1992).

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 를 1차적으로 조절하는 기전인 Ca^{2+} -ATPase는 세포내 Ca^{2+} 저장고에서 세포질로 유리된 Ca^{2+} 을 다시 저장고로 유입시키는 역할을 하는데, thapsigargin에 민감하게 반응한다.

본 연구 결과에서, 0mM Na^+ 상태에서 내형질세망내 Ca^{2+} 유리에 의해 형성되는 Ca^{2+} spike가 thapsigargin이 포함된 140mM Na^+ Tyrode 용액을 관류시킨 후 동일한 0mM Na^+ 상태를 조성했을 때는 형성되지 않았다. 이것은 thapsigargin에 의해 Ca^{2+} -ATPase 작용이 억제됨으로써 내형질세망에서 세포질로 유리된 Ca^{2+} 이 다시 내형질세망으로 유입되지 못하고 세포 밖으로 계속 유출되어 내형질세망내 Ca^{2+} 이 고갈되었기 때문이라고 생각된다. 이와 같은 결과를 통해 골아세포에는 thapsigargin에 민감하게 반응하는 Ca^{2+} -ATPase가 작용하고 있음을 알 수 있다.

일반적으로 진핵세포 (eukaryotic cell)에서 세포내 Ca^{2+} 을 증가시키는 방법은 세포내 Ca^{2+} 저장고로부터 Ca^{2+} 을 세포질로 유리시키거나, 세포밖으로부터 세포 내로 Ca^{2+} 을 유입시키는 것이다. Ca^{2+} 저장고에서의 Ca^{2+} 유리 기간은 수초에서 수십초 내에 사라지는 일시적인 것으로 여러 생리적인 현상들을 유발시키기에는 불충분하다. 따라서 정상적인 생리 작용들을 일으키기 위해서는 세포내 Ca^{2+} 증가가 유지되어야 하므로 세포 내로의 Ca^{2+} 유입은 매우 중요하다. 세포 내 Ca^{2+} 저장고에서 Ca^{2+} 유리에 관여하는 두 종류의 세포내 이온통로는 InsP_3 수용체(inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, InsP_3Rs I, II, III, IV)와 ryanodine 수용체(ryanodine receptors, RyRs I,

II, III)로, 이 두 통로는 구조적, 생리적 유사성 때문에 동일 선조로부터 진화되었다고 알려져 있다(Berridge, 1993; Taylor 및 Traynor, 1995). Ca^{2+} signal 형성의 시공간적(spatiotemporal) 측면에서 볼 때, InsP_3Rs 과 RyRs는 Ca^{2+} spike와 Ca^{2+} wave를 형성하는 CICR 현상을 나타낸다. 두 수용체는 Ca^{2+} 에 민감하여, 한 개의 수용체에서 유리된 Ca^{2+} 은 이웃하고 있는 수용체를 흥분시켜 다시 세포내 저장고의 Ca^{2+} 을 유리시키기 때문에 재생성되는 Ca^{2+} wave가 전체 세포질에 퍼지게 된다. Ca^{2+} spike가 시작되는 일정한 지점은 InsP_3 에 민감하게 반응하는 소그룹의 InsP_3Rs 로서(Parker 및 Yao, 1991), 이곳은 InsP_3 와 결합하여 Ca^{2+} 을 유리시키는 기초적 현상이 최초로 일어나는 지점일 뿐 아니라 global wave를 형성하는 촉발지점으로도 기능하는 것처럼 보인다(Bootman 등, 1997). InsP_3Rs 는 비흥분성 세포에 존재하며, 특히 $\text{InsP}_3\text{R1s}$ 는 Ca^{2+} 유리를 조절하는 주된 이성체(isomer)로 알려져 있다. 이때 InsP_3Rs 의 흥분 정도를 결정하는 요소는 InsP_3 로, 세포내 저장고의 Ca^{2+} 을 유리시키는 2차 매개체로 작용한다(Streb 등, 1983; Berridge 및 Irvine, 1984). 안정 상태의 세포질은 흥분성을 나타내지 않지만, 자극을 받게 되면 InsP_3 와 같은 2차 매개체의 작용으로 세포질이 흥분성을 가진 환경(excitable medium)으로 변하게 되어(Lechleiter 및 Claphan, 1992) InsP_3Rs 의 Ca^{2+} 민감도를 증가시켜 반복적인 Ca^{2+} wave가 형성된다. 이러한 기전은 강한 자극이 들어와 갑작스러운 InsP_3 의 증가가 있을 때 나타나지만, 일반적인 자극시의 InsP_3 의 증가는 Ca^{2+} 을 직접 유리시키는데는 불충분하여 단지 InsP_3Rs 을 감작시킴으로써 자발적인 Ca^{2+} oscillation을 유발시킨다. 그러나 Ca^{2+} 을 유리시키는 세포질내 조절 인자인 InsP_3 이외에 내형질세망 내의 Ca^{2+} 양도 InsP_3Rs 민감도에 영향을 미친다고 알려져 있다(Irvine, 1990; Missiaen 등, 1992; Parys 등, 1993; Horne 및 Meyer, 1995; Tanimura 및 Turner, 1993). 뿐만 아니라 세포질내 Ca^{2+} 의 양도 관련이 있어, 세포질 Ca^{2+}

이 저농도일 경우 내형질세망으로부터 InsP_3 가 증대하는 Ca^{2+} 유리(InsP_3 -mediated Ca^{2+} release)가 촉진되고 고농도에서는 억제되는 2중 작용이 이루어진다고 한다(Parekh 및 Penner, 1997).

본 연구에서 골아세포의 Ca^{2+} spike는 세포 밖의 Ca^{2+} 이 완전히 제거된 상태에서도 형성되며 thapsigargin이 포함된 140mM Na^+ 용액을 관류시킨 후 0mM Na^+ 상태에서는 억제되는 것으로 보아, 내형질세망에서 세포질로 유리되는 Ca^{2+} 으로 인한 것임을 알 수 있다. 이때 thapsigargin이 포함된 140mM Na^+ 상태에서 Ca^{2+} spike가 형성된 후 안정상태로 돌아왔을 때 골아세포의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 는 기준치보다 높게 나타났다. 그 이유는 thapsigargin에 의해 세포질에서 내형질세망으로 유입되지 못하고 세포 외로 유출될 때까지 세포질내에 남아 있는 Ca^{2+} 때문이라고 생각된다. 또한 Ca^{2+} spike의 형성 빈도와 peak 및 Ca^{2+} spike의 안정치는 내형질세망의 Ca^{2+} 유리 이외에도 세포 밖 Ca^{2+} 농도에 의해 영향을 받고 있다. 세포 밖 Ca^{2+} 농도가 증가할수록 Ca^{2+} spike 형성 후 안정상태에서의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 는 원래의 기준치보다 상승되어 있는데, 안정 상태에서의 이러한 상승된 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 내형질세망으로부터의 Ca^{2+} 유리를 촉발시켜 용이하게 Ca^{2+} spike를 형성하도록 기능하는 것처럼 생각된다. 따라서 세포 밖 Ca^{2+} 농도가 증가할수록 세포내 유입이 증가된 Ca^{2+} 에 의해 내형질세망이 계속적으로 자극되어 Ca^{2+} 유리가 유발됨으로써 Ca^{2+} spike의 형성 빈도는 증가하게 된다. 반면 계속적인 내형질세망의 자극은 세포질로 유리된 Ca^{2+} 이 내형질세망으로 충분히 유입되지 못한 상태에서 다시 내형질세망의 Ca^{2+} 을 유리시키게 되므로 Ca^{2+} spike의 peak는 감소하게 된다고 생각한다. 본 연구에서 얻어진 이와 같은 결과를 통해, 골아세포의 Ca^{2+} spike 형성에는 세포 내로 유입된 Ca^{2+} 에 의해 촉발되는 CICR 기전이 작용하고 있다고 생각할 수 있다.

신경, 근육과 같은 흥분세포에서의 Ca^{2+} 유입은 VOCs에 의해 이루어진다는 것이 밝혀졌지만 (Tsein 등, 1995), 혈관 내피세포나 호흡기, 소화

기의 상피세포 등의 비흥분성 세포에서는 VOCs가 존재하지 않으므로 비흥분성 세포의 Ca^{2+} 유입 경로는 최근까지 많은 논란이 되고 있다. 그러나 현재는 제기된 여러 Ca^{2+} 유입기전들 중에서 세포내 Ca^{2+} 저장고의 충전 상태에 의해 Ca^{2+} 유입이 조절되는 SOCI가 가장 높은 가능성이 입증되어 주목을 받고 있다(Berridge, 1995; Clapham, 1995; Fasolato, 1994; Penner 등, 1993).

Ca^{2+} 이 제거된 용액에서 수용체의 반복적인 자극은 세포내 Ca^{2+} 저장고를 고갈시킬 수 있으며, 이때 저장고의 Ca^{2+} 고갈은 느리게 일어나는 반면 저장고의 재충만은 세포 밖에 Ca^{2+} 이 존재하는 상태에서 매우 빠르게 일어난다고 한다(Putney, 1977). 또한 Casteels 및 Droogmans(1981)는 토끼 귀동맥의 평활근세포에 존재하는 norepinephrine에 민감한 Ca^{2+} 저장고(norepinephrine-sensitive Ca^{2+} store)에 Ca^{2+} 이 제거된 상태로 norepinephrine을 처리하였을 때 저장고를 고갈시킨 근섬유가 대조군의 근섬유보다 더 많은 Ca^{2+} 이 유입되는 것을 발견하고, 작용 물질에 민감한 저장고(agonist-sensitive store)내 Ca^{2+} 양이 세포막에 있는 Ca^{2+} 유입 경로를 조절할 수 있다고 하였다. 초기에는 Ca^{2+} 유입이 세포외액과 저장고 사이의 Ca^{2+} 농도차에 의한 직접적인 정보전달에 의해 유발된다고 생각되어, Ca^{2+} 유입의 자동적 원인이 되는 저장고 고갈 이외의 다른 신호는 필요하지 않으며 유입된 Ca^{2+} 은 저장고로 직접 들어간다고 하였다(Putney, 1986). 그러나 Fura-2를 이용한 실험에서 Ca^{2+} 유입은 세포질내 Ca^{2+} 의 증가로 관찰되기 때문에, Ca^{2+} 유입은 저장고로 직접 들어가기 보다는 세포질을 먼저 거친 후 저장고로 들어감이 밝혀졌다(Takemura 등, 1989). 이러한 사실은 저장고의 Ca^{2+} 양과 세포막의 Ca^{2+} 이온통로를 연결시키는 미확인된 활성화 신호(activating signal)가 존재한다는 것을 의미하며, 활성화 신호의 특성이 아직까지 밝혀지지 않았으므로 Putney (1986)가 기술한 'capacitative' Ca^{2+} influx라는 용어보다 'store-operated' Ca^{2+} influx 라는 용어를 많이 사용하게 되었다. SOCI를 유발하는 SOC의 작동은

InsP₃ 생산을 자극하는 lysophosphatidic acid (LPA)를 세포에 처치하거나, 또는 InsP₃를 직접 주입시키거나 Ca²⁺ pump를 억제하는 thapsigargin을 처치하여 저장고를 고갈시킨 이후 세포 밖으로부터 Ca²⁺ 유입이 증가한 실험 결과를 통해 관찰할 수 있다(Yao 및 Parker, 1993; Lupu-Meiri 등, 1993; Petersen 및 Berridge, 1994). SOC는 특히 Ca²⁺에 민감하며, 저장고내 저농도의 Ca²⁺ 상태에서는 활성화되지만, 고농도의 Ca²⁺ 상태에서는 억제되는 이중 효과를 보인다(Berridge, 1995).

이와 같이 저장고의 Ca²⁺ 고갈과 SOC의 개구사이에는 밀접한 연관성이 있지만 이러한 연결 기전에 대해서 확실하게 밝혀진 것은 없으며, 몇 가지 제안만이 이루어진 상태이다. 하나의 가설은 Ca²⁺이 고갈된 저장고가 Ca²⁺ influx factor (CIF)를 생산한 후 SOC를 열기 위해 CIF를 세포막 쪽으로 확산시킨다는 것으로(Parekh 등, 1993; Randriamampita 및 Tsien, 1993; Davies 및 Hallett, 1995), 현재 CIF를 분리해냈지만 그 구조는 밝혀지지 않았다(Randriamampita 및 Tsien, 1993; Thomas 및 Hanley, 1995). 또 하나의 가설은 구조적 결합 모형(conformational coupling model)으로 저장고내 Ca²⁺의 고갈 정보가 InsP₃Rs의 cytoplasmic head를 통해 SOC에 직접 전달된다는 것이다(Irvine, 1990; Berridge, 1990, 1995).

본 연구에서 thapsigargin을 처치하지 않은 상태로 세포밖 Ca²⁺을 2.5mM에서 0mM로 감소시킨 후 다시 2.5mM로 환원시켰을 때 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 처음의 기준치와 비슷한 반면, thapsigargin을 처치한 후 동일한 실험을 하였을 때는 상당히 증가된 양상을 보였다. 이것은 thapsigargin에 의해 고갈된 내형질세망 내의 Ca²⁺을 보충하기 위해 세포 밖으로부터 Ca²⁺의 유입이 증가되었기 때문이라고 생각된다. 이러한 결과는 골아세포에 SOCI 기전이 작용하고 있음을 간접적으로 알려주는 것이다. 골아세포에 존재하는 SOCI 기전은 세포 고유의 생리적 기능을 수행하기 위해 필요한 세포내 Ca²⁺ 농도를 지속

적으로 유지시켜 줄 수 있으므로 매우 중요한 의미를 가지고 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구 결과를 통해 골아세포에서 [Ca²⁺]_i를 조절하는 기전으로는 세포막을 통해 세포질 내의 Ca²⁺을 세포 밖으로 이동시키는 Na⁺-Ca²⁺ 교환이동 기전, 세포내 Ca²⁺ 저장고인 내형질세망에서 세포질로 Ca²⁺을 유리시키는 CICR 기전, 내형질세망의 Ca²⁺ 고갈에 따라 세포밖 Ca²⁺의 세포질내 유입을 증가시키는 SOCI 기전 등이 작용하고 있다고 생각된다(Fig. 9).

V. 결론

세포내에서 중요한 매개체 역할을 함으로써 골아세포의 생리적 활성도를 변화시키는 Ca²⁺ 농도의 조절기전을 알아보고자, 쥐의 대퇴골과 경골을 분리시켜 배양한 1차세포에 Fura-2를 주입시킨 후 Ca²⁺-영상 기법을 이용하여 세포내 Ca²⁺의 농도 변화를 관찰한 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) 관류용액의 Ca²⁺ 농도를 감소시켰을 때 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 감소하였으며, 관류용액의 Na⁺ 농도를 감소시켰을 때 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 증가하였다.

(2) 관류용액의 Na⁺를 제거하였을 때, 골아세포의 [Ca²⁺]_i가 급격히 증가하였다가 감소하는 Ca²⁺ spike를 형성하였으며, 내형질세망의 Ca²⁺-ATPase는 thapsigargin 처치로 차단되었다.

(3) 관류용액의 Ca²⁺ 농도가 증가할수록 Ca²⁺ spike의 형성빈도가 증가하였다.

(4) Thapsigargin이 포함되고 Ca²⁺이 제거된 관류용액으로 관류하였을 때 [Ca²⁺]_i는 감소하였으며, 2.5mM Ca²⁺이 포함된 정상 용액으로 관류하였을 때 [Ca²⁺]_i는 증가된 양상을 보였다.

(5) 관류용액의 K⁺ 농도를 5mM에서 25mM로 증가시켰을 때 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 증가하지 않았다.

이상의 실험 결과를 통해 골아세포의 [Ca²⁺]_i는 (1) Na⁺-Ca²⁺ 교환이동을 통한 Ca²⁺ 이동과 (2)

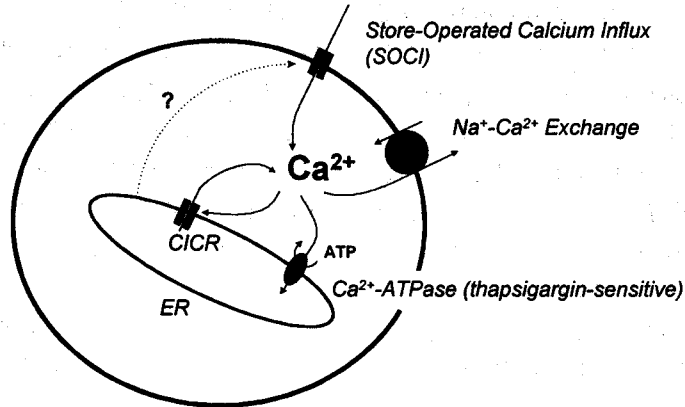


Fig. 9. Mechanism of Ca^{2+} regulation in osteoblast-like cell

While Na^+ - Ca^{2+} exchange and SOCI function at the OLC's plasma membrane, CICR functions at the ER membrane.

→; a direction of Ca^{2+} movement

→→; an unknown Ca^{2+} signal transferred from ER to SOCs.

내형질세망으로부터 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 기전에 의한 Ca^{2+} 의 유리, 그리고 (3) 내형질세망의 Ca^{2+} 고갈로 유도되는 store-operated Ca^{2+} influx 기전에 의한 Ca^{2+} 유입에 의해 조절되고 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

- Baker PF, Blaustein MP, Hodgkin AL, Steinhardt RA : The influence of Ca^{2+} on Na^+ efflux in squid axons. *J Physiol* 200 : 431-458, 1969
- Bean BP : Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Ann Rev Physiol* 51 : 367-384, 1987
- Berridge MJ, Irvine RF : Inositol trisphosphate : A novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312 : 315-321, 1984
- Berridge MJ : Inositol phosphates and cell signaling. *Nature* 341 : 197-205, 1987
- Berridge MJ : Calcium oscillations. *J Biol Chem* 265 : 9583-9586, 1990
- Berridge MJ : Inositol trisphosphate and Ca signaling. *Nature* 361 : 315-325, 1993
- Berridge MJ : Capacitative calcium entry. *Biochem J* 312 : 1-11, 1995
- Berridge MJ, Dupont G : Spatial and temporal signalling by calcium. *Cur Opin Cell Biol* 6 : 267-274, 1994
- Blaustein MP, Ashida T, Goldman WF, Wier WG, Hamlyn JM : Na/Ca exchanger in vascular smooth muscle : A link between sodium metabolism and hypertension. *Ann NY Acad Sci* 488 : 199-216, 1986
- Bootman MD, Berridge MJ : The elemental principles of calcium signalling. *Cell* 83 : 675-678, 1995
- Casteels RG, Droogmans G : Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *J Physiol* 317 :

- 263-279, 1981
- Carafoli E, James P, Strehler EE : Structure-function relationships in the Ca pump of plasma membranes. *Prog Clin Biol Res* 332 : 181-193, 1990
- Castillo E, Gonzalez-Serratos H, Rasgado-Flores H, Rozycka M : Na⁺-Ca²⁺ exchange studies in frog phasic muscle cells. *Ann NY Acad Sci* 639 : 554-557, 1991
- Clapham DE : Calcium signaling. *Cell* 80 : 259-268, 1995
- Davies EV, Hallett MB : A soluble cellular factor directly stimulates Ca²⁺ entry in neutrophils. *Biochemical and Biophys Res Comm* 206 : 348-354, 1995
- Doty SB, Schofield BM : Enzyme histochemistry of bone and cartilage cells. *Prog Histochem Cytochem* 8 : 1-38, 1976
- Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T : Receptor-activated Ca²⁺ influx : How many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol Sci* 15 : 77-83, 1994
- Garrahan PJ, Rega AF : Plasma membrane calcium pump. In : Bronner F(ed.) *Intracellular calcium Regulation*. Alan R, Liss, NY 271-303, 1990
- Herchuelz A, Plasman P : Na⁺/Ca²⁺ exchange in pancreatic islet cells. *Ann NY Acad Sci* 639 : 642-656, 1991
- Hidalgo C, Cifuentes F, Donoso P : Na⁺-Ca²⁺ exchange in transverse tubule vesicles isolated from amphibian skeletal muscle. *Ann NY Acad Sci* 639 : 483-497, 1991
- Horne JH, Meyer T : Luminal calcium regulates the inositol trisphosphate receptor of rat basophilic leukemia cells at a cytosolic site. *Biochem* 34 : 12738-12746, 1995
- Irvine RF : Quantal Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates—a possible mechanism. *GEBS Lett* 263 : 5-9, 1990
- Jande SS, Belanger LF : The life cycle of the osteocyte. *Clin Orthop* 94 : 281-305, 1973
- Jones DB, Nolte H, Scholubbers JG, Turner E, Veltel D : Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* 12 : 101-110, 1991
- Kaczorowski GJ, Costellom L, Dethmers J, Trumble MJ, Vandlen RL : Mechanism of Ca transport in plasma membrane vesicles prepared from cultured pituitary cells. *J Biol Chem* 259 : 9395-9403, 1984
- Kofuji P, Hadley RW, Kieval RS, Lederer WJ, Scholze DH : Expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diverse tissues : a study using the cloned human cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Am J Physiol* 263 : c1241-1249, 1992
- Kruger NS, Tashjian AH : Evidence that PTH-stimulated bone resorption occurs via a Na⁺-Ca²⁺ exchange mechanism. *Nature* 287 : 843-845, 1980
- Kruger NS : Demonstration of Na/Ca exchange in Rodent Osteoblast. *J Bone & Min Res* Vol.7, No.9. 1105-1111, 1992
- Krieger NS : Calcemic hormones regulate the level of Na⁺-Ca²⁺ exchange protein in osteoblastic cells. *Ann. NY. Acad. Sci.* 293-294, 1996
- Lanuon LE : Skeletal responses to physical loading. in *handbook of experimental pharmacology*, vol. 107, *Physiol and Pharmacol of Bone*, ed. Mundy GR, Martin TJ 485-505, Springer-Verlag Berlin 1993
- Lechleiter JK, Clapham DE : Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *X. laevis* oocytes. *Cell* 69 : 283-294, 1992

- Lipp P, Niggli E : Submicroscopic calcium signals as fundamental events of excitation-contraction coupling in guineapig cardiac myocytes. *J Physiol* 492 : 31-38, 1996
- Lupu-Meiri M, Beit-Or A, Christensen SB, Oron Y : Calcium entry in *Xenopus* oocytes-effect of inositol trisphosphate, thapsigargin and DMSO. *Cell Calcium* 14 : 101-110, 1993
- Menton DN, Simmons DJ, Chang SL, Orr B Y : From bone lining cell to osteocyte-An SEM study. *Anat Rec* 209 : 29-39, 1984
- Missiaen L, Taylor CW, Berridge MF : Luminal Ca^{2+} promoting spontaneous Ca^{2+} release from inositol trisphosphate-sensitive stores in rat hepatocytes. *J Physiol* 455 : 623-640, 1992
- Mullins LJ : Interactins between Na/K and Na/Ca pump in Mullins, ed. ion transport in Heart. NY. Raven Press 61-94, 1981
- Parekh AB, Terlau H, Stuhner W : Depletion of $insP_3$ stores activates a Ca^{2+} and K^+ current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* 364 : 814-818, 1993
- Parekh AB, Penner R : Store Depletion and Calcium Influx. *Physiol Rev* Vol. 77, No. 4. Oct. 901-930, 1997
- Parker I, Yao Y : Ca^{2+} transients associated with openings of inositol trisphosphate-gated channels in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 491 : 663-668, 1996
- Parys JB, Missiaen L, De Smedt H, Casteels R : Loading dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in the clonal cell line A7r5. Implications for the mechanism of quantal Ca^{2+} release. *J Biol Chem* 268 : 25206-25212, 1993
- Penner RC, Fasolato MH : Calcium influx and its control by calcium release. *Curr Opin Neurobiol* 3 : 368-374, 1993
- Petersen CH, Berridge MJ : The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 269 : 32246-32253, 1994
- Putney JW Jr. : Biphasic modulation of potassium release rat parotid gland by carbachol and phenylephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 198 : 375-384, 1976
- Putney JW Jr. : Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulates the same calcium influx sites in the parotid gland. *J Physiol(Lond)* 268 : 139-149, 1977
- Putney JW Jr. : A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 11 : 611-624, 1990
- Randriamampita C, Tsien RY : Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* 364 : 809-814, 1993
- Reich KM, Frabgos JA : Effect of flow on prostaglandin E2 and inositol trisphosphate levels in osteoblasts. *Am J Physiol* 261 : 428-432, 1991
- Reuter H, Seitz N : The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 195 : 451-470, 1968
- Rink TJ, Merritt JE : Ca^{2+} signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2 : 198-205, 1990
- Rink TJ : Receptor-mediated Ca^{2+} entry. *FEBS Lett* 268 : 381-385, 1990
- Sandy JR, Meghji S, Farndale RW, Meikle M C : Dual elevation of cyclic AMP and inositol phosphates in response to mechanical deformation of murine osteoblasts. *Biochemica et Biophysica Acta* 1010 : 265-269, 1989
- Streb H, Irvine RF, Berridge JJ, Schusz I :

- Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5,-trisphosphate. *Nature* 306 : 67-69, 1983
- Takemura H, Huges AR, Thastrup O, Putney JW Jr. : Activation of Ca^{2+} entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. *J Biol Chem* 264 : 12266-12272, 1989
- Tanimura A, Turner RJ : Calcium release in HSY cells conforms to a steady-state mechanism involving regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca^{2+} channel by luminal $[\text{Ca}^{2+}]$. *J Cell Biol* 132 : 607-616, 1996
- Taylor CW, Traynor D : Ca and inositol trisphosphate receptors. *J Memb Biol* 145 : 109-118, 1995
- Thastrup O, Cullen PJ, Droback BK, Hanley MR, Dawson AP : Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proceedings Nat Aca Sci* 87 : 2466-2470, 1990
- Thomas D, Hanley MR : Evaluation of calcium influx factors from stimulated Jurkat T-lymphocytes by microinjection into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 270 : 6429-6432, 1995
- Tsien RW, Lipscombe D, Bley K, Fox A : Reflections on Ca^{2+} channels diversity. *Trends Neurosci* 18 : 52-54, 1995
- Wang N, Butler JP, Ingber DE : Mechano-transduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260 : 1124-1127, 1993
- Yao Y, Parker I : Inositol trisphosphate-mediated Ca^{2+} influx into *Xenopus* oocytes triggers Ca^{2+} liberation from intracellular stores. *J Physiol* 468 : 275-296, 1993