

활성 산소가 Adenosine Triphosphate에 의한 조골 세포내 Ca^{2+} 활성화도 변화에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 마취통증의과학교실, *인하대학교 의과대학 생리학교실

김진호 · 권태동 · 남순호 · 서창국* · 홍용우

= Abstract =

Effects of Reactive Oxygen Species on ATP-Induced Intracellular Ca^{2+} Activity in Osteoblasts

Jin-Ho Kim, M.D., Tae-Dong Kwon, M.D., Soon-Ho Nam, M.D.,
Chang-Kook Suh, M.D.*, and Yong-Woo Hong, M.D.

Department of Anesthesiology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

* Department of Physiology and Biophysics, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

Background: The physiological activity of osteoblasts is known to be closely related to increased intracellular Ca^{2+} activity ($[Ca^{2+}]_i$) in osteoblasts. The cellular regulation of ($[Ca^{2+}]_i$) in osteoblasts is mediated by Ca^{2+} movements associated with Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores, and transmembrane Ca^{2+} influx via Na^+-Ca^{2+} exchanger, and Ca^{2+} ATPase. Reactive oxygen species, such as H_2O_2 , play an important role in the regulation of cellular functions, and act as signaling molecules or as toxins in cells.

Methods: Osteoblasts were isolated from the femurs and tibias of neonatal Sprague-Dawley rats, and cultured for 7 days. The cultured osteoblasts were loaded with a Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye, Fura-2 AM ester, and fluorescence images were monitored using a cooled CCD camera. Ca -spike changes upon ATP application were checked for (1) osteoblasts in Ca^{2+} -free and 2.5 mM $CaCl_2$ normal Tyrode solution, (2) osteoblasts in which the Ca^{2+} of the endoplasmic reticulum had been depleted with ryanodine, thapsigargin or caffeine, and (3) osteoblasts pretreated with H_2O_2 , in which the expression of IP_3 receptor was checked by Western blotting.

Results: ATP increased intracellular free Ca^{2+} regardless of extracellular Ca^{2+} concentration. When the intracellular Ca^{2+} store was depleted, the level of increased Ca^{2+} activity by ATP was suppressed. H_2O_2 sustained the Ca^{2+} increase induced by ATP. The expression of IP_3 receptor was enhanced by H_2O_2 .

Conclusions: H_2O_2 modulates intracellular Ca^{2+} activity in osteoblasts by increasing Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} stores. (Korean J Anesthesiol 2003; 44: 544~554)

Key Words: ATP; Ca^{2+} activity; H_2O_2 ; IP_3 receptor; osteoblast.

논문접수일 : 2003년 1월 9일

책임저자 : 남순호, 서울시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 마취통증의과학교실, 우편번호: 120-752

Tel: 02-361-5855, 6428, Fax: 02-312-7185, E-mail: nsh66@yumc.yonsei.ac.kr

박사학위 논문임.

서 론

Adenosine triphosphate (ATP)는 세포 밖의 신호 전달 물질로 세포표면에 있는 수용체와 결합하여, 기도 섬유 세포, 신경 세포, 평활근 세포, 비만 세포, 도 세포종 세포, 연골 세포, 파골 세포,¹⁾ 조골 세포²⁾ 및 조골 세포계와³⁾ 같이 흥분성 세포 및 비흥분성 세포에서 세포 내 Ca^{2+} 활성화도의 증가 및 신경 전달물질의 이동, 분비 촉진, 세포증식의 조절 및 세포의 죽음 등 인체내의 다양한 기능에 관여한다고 알려져 있다. 골 조직은 조골 세포, 골 세포, 파골 세포 및 세포 외 기질로 구성되어 있으며, 물리적인 자극이 가해지면, 조골 세포 내 Ca^{2+} , inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3), prostaglandin E_2 , cAMP 농도 등을 증가시킴으로써 일련의 신호 전달 과정을 통해서 골 세포를 증식시킨다.⁴⁾ ATP는 외상이나 감염 등에 의해 손상받은 세포에서 분비되며 응집된 혈소판의 과립으로부터도 분비된다. ATP 수용체는 작용물질인 adenosine 혹은 adenine과의 친화도에 따라 P_1 수용체와 P_2 수용체로 구분된다.⁵⁾ 조골세포의 경우는 P_2 수용체로 발현되며,⁶⁾ 이 P_2 수용체에는 ligand-gated 이온 통로인 metabotropic P_2X 수용체와 G-protein 이 관련된 이온 통로인 metabotropic P_2Y 수용체가 존재한다고 밝혀졌다.⁷⁾ P_2X 수용체에 nucleotide가 결합하여, 세포막 전위를 탈분극시켜 이온 통로를 통한 Ca^{2+} 의 유입을 유발시키며,⁸⁾ P_2Y 수용체에 의해 phospholipase C β 가 활성화 되면, IP_3 와 diacylglycerol가 세포막으로부터 세포 내로 확산되어 IP_3 수용체가 존재하는 세포 내 저장소인 내형질세망이나 근형질세망으로부터 Ca^{2+} 이 유리되어 세포 내 Ca^{2+} 을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 세포 내 Ca^{2+} 신호는 세포 내 Ca^{2+} 저장소로부터의 유리 및 세포막에 존재하는 Ca^{2+} 유입으로 형성된다. 조골 세포와 같은 비흥분성의 세포의 경우, 세포의 외부로부터의 Ca^{2+} 유입보다는 세포 내 Ca^{2+} 저장소로부터 유리되는 Ca^{2+} 이 Ca^{2+} 신호를 발생시키며, 저장소로부터의 Ca^{2+} 의 유리는 저장소막에 존재하는 IP_3 수용체와 ryanodine 수용체에 의해 이루어진다. 최근에는 ATP는 간극 결합(gap junction)과 함께 조골세포에서 세포 내 Ca^{2+} 조절과 세포간 신호 전달에 관여한다고 발표되었다.⁹⁾ 활성 산소의 일종인 H_2O_2 는 조골 세포의 early growth res-

ponse-1유전자 발현을 유도하는 transforming growth factor- β 매개체로 작용한다고 보고되었다.¹⁰⁾ 활성 산소는 생체 내 여러 세포 및 조직들에 손상을 주는 산화침습 작용 및 항 종양제로서 면역 기능작용, 세포막을 통한 이온 이동 현상에도 신호전달의 역할을 한다.¹¹⁾ 또한 세포막 및 근형질내세망의 Ca^{2+} -pump,¹²⁾ 근형질내세망으로의 Ca^{2+} 유리기전의 활성도를 조절한다고 보고되었다.¹³⁾ 그러나 ATP가 조골 세포 내 Ca^{2+} 활성화도에 미치는 영향에 관한 연구는 세포 간극 결합 내지 골절 후 치유 과정에 국한되어 있으며, 활성산소의 역할에 대한 연구는 심근, 골격근 및 간세포에서 많이 이루어진 반면,¹⁴⁾ 체내에서 Ca^{2+} 을 가장 많이 함유한 골 조직 내에서의 Ca^{2+} 활성도를 조절하는 기전은 연구되어 있지 않으며, 쥐에서 1차 배양한 단위 조골 세포에서의 ATP의 역할 및 ATP에 의한 세포 내 Ca^{2+} 활성화도 변화에 미치는 H_2O_2 의 영향에 대해서 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 신생아 쥐의 경골과 대퇴골에서 분리된 조골 세포에 ATP가 미치는 $[Ca^{2+}]_i$ 변화와 H_2O_2 의 역할을 조사하기 위해 조골 세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 변화를 Ca^{2+} -imaging 기법을 통해 실시간으로 측정하고, 분자 생물학적 방법으로 세포 내 Ca^{2+} 활성화도 변화에 미치는 H_2O_2 의 작용기전을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

생후 일주일 이하의 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 암수 구별 없이 1회에 10마리에서 대퇴골과 경골을 적출하여 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} -free phosphate buffered saline (PBS)에 여러번 세척한 후 미세한 골편으로, 이 골편들을 15 ml의 분해 용액(0.137% collagenase type I (Sigma USA), 0.05% trypsin type III, 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 동일한 과정을 거친 2차 세포 부유액을 제거하였다. 남아있는 침전물에 다시 15 ml의 분해 용액을 넣어 약 60분간 분해시켜 상층 부유액을 회수하였으며, 이 과정을 2회 반복하였다. 위 방법으로 얻어진 상층액에 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 20 ml를 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 살아있는 세포 수를 세어 세포수가 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 되게 조정하였으며, 여기에 penicillin (100 unit/ml), streptomycin (100 unit/ml)을 첨가한 후 조직 배양 플라스크에 5 ml씩 분주하여 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ 배양기에서 1주일간 배양하였다. 배양된 조골 세포를 분리하기 위해 플라스크내 DMEM을 제거하고 PBS로 세척한 후 그 용액을 제거하였다. 그 후 2-3 ml의 trypsin-EDTA (Gibco, USA)를 넣고 37°C에서 5분간 배양하여 조골 세포를 분리시킨 후, 분리된 골아 세포에 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM을 넣어 1200 × g로 5분간 원심 분리시켜 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 조골 세포를 140 mM Na⁺, 2.5 mM Ca²⁺, 5 mM K⁺가 함유된 정상 Tyrode 용액으로 1200 × g에서 2분간 원심분리시켜 세척한 후, 4°C 정상 Tyrode용액에 넣어 세포 부유액 상태로 보관하였다. 세포 내에 Ca²⁺ 감성제 형광 염료인 Fura-2를 주입하기 위해, 배양 후 분리시켜 정상 Tyrode 용액에 보관중인 조골 세포를 5 μm Fura-2 AM ester (Molecular Probe, USA)와 2 μm cremophor (Sigma, USA)가 포함된 정상 Tyrode 용액에 넣고 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 1200 × g로 2분간 원심분리시켜 상층액에 제거한 후, 다시 정상 Tyrode용액에 보관하여 실험에 사용하였다. 본 실험에서는 polycarboxylate anion group을 가지고 있어 세포 내 유입이 어려운 Fura-2 대신 acetoxymethyl ester가 붙어있는 Fura-2 AM ester를 Ca²⁺ 감성제로 이용하였다. AM ester는 Fura-2의 음전하를 중화하여 이중 지질 막에 대한 투과도를 높이지만, 세포 내에서 Ca²⁺과 반응하는 Carboxylate group을 방해하기 때문에 세포 내 esterase에 의해 쉽게 제거된다. Fura-2 AM ester의 세포 내 주입을 쉽게 하기 위해 cremophor를 Fura-2 AM ester와 섞어 미포를 형성하여 사용하였다. Fura-2가 주입된 골아 세포 부유액 200 μl 을 형광도립 현미경실험대 위에 chamber에 올린 후 유리판을 덮고 5분간 방치하여 고정시켰다. 그리고 140 mM Na⁺, 2.5 mM Ca²⁺, 5 mM K⁺ 정상 Tyrode 용액을 관류시켜 위에 떠있는 조골 세포를 흘러 보낸 후 각 실험용액을 관류시키면서, Xenon UV lamp로 조성된 빛을 filter changer (Sutter, USA)에 정착된 340 nm와 380 nm filter (band width = 10 nm)를 통해 10초 간격으로 번갈아 여과시켜 300 msec 동안 세포에 조사하였다. 이때 발생

하는 형광 영상을 510 nm로 여과한 후 CCD digital camera (Photometrics PXL37, USA)로 수집하였다(Fig. 1, 2). Filter changer와 CCD digital camera의 제어 및 영상자료 처리를 위해 PC에 설치된 Axon Imaging Workbench 소프트웨어 Version 2.0 (Axon Instruments, USA)을 이용하였다. 위 방법에 의해 수집된 영상 자료로부터 세포 내의 Ca²⁺ 농도는 380 nm대 340 nm에 의한 형광 비율(R340/380)로 표시하였다. 본 실험에 사용된 용액은 Table 1에 나타내었다. 이어서 IP₃ 수용체 단백질을 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 조골 세포를 75 cm³ 세포배양기에 80% 자라게 한 뒤 H₂O₂에 5분, 10분, 20분 노출시킨 후 단백질 분해 효소 억제제 및 0.53 mM EDTA가 포함된 PBS (4°C 보관)로 두 세 번 세척하였다. 동일한 용액에 세포를 모두 모았으며, 2-4°C를 유지하여 보관하였다. 분리한 조골 세포를 5분간 500 × g로 원심 분리하고 상층을 제거하였으며, 세포 용해 완충액 2 ml에 넣어 액체 질소에서 freezing-thawing을 두 번 반복하여 세포를 용해시켰다. 용해된 세포는 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid), 10 mM EDTA, 5 mM DTT (dithiothre-

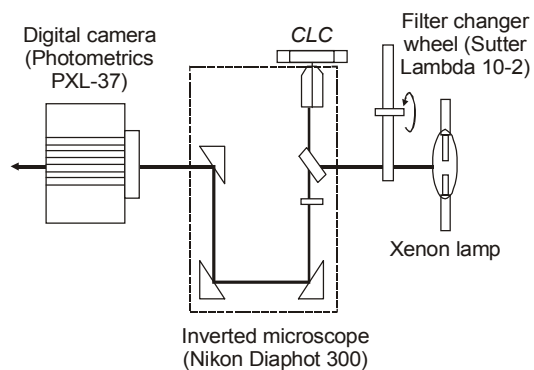


Fig. 1. A block diagram of Ca²⁺ imaging system. Light from Xenon lamp is filtered through filter changer and divided into light with wavelength of 340 nm and of 380 nm. Osteoblast on the inverted microscope is exposed by these lights alternatively. After then, fluorescence from osteoblast is filtered by the light with wavelength of 510 nm through dichroic mirror and is collected as fluorescent images by digital camera.

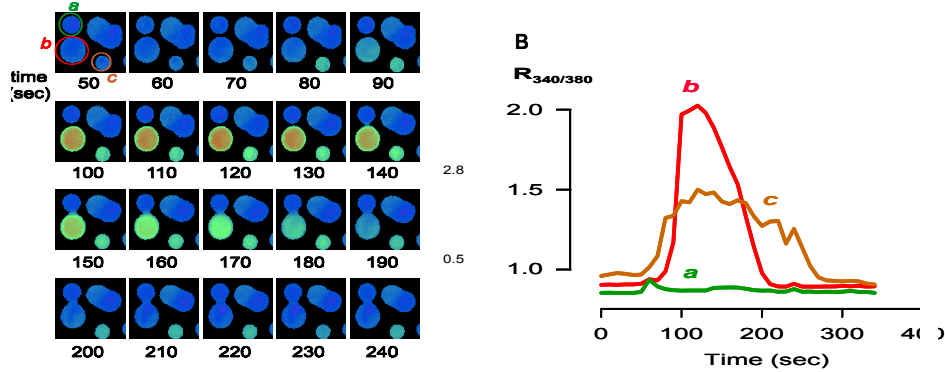


Fig. 2. Calcium imaging of osteoblasts. (A) 20 consecutive ratio images of Fura-2 loaded rat osteoblasts (ROS) are shown. The scale bar on the right represents pseudo coloring based on the ratio value. In this particular view, five different ROSs can be observed. At $t = 50$, the extracellular $[\text{Na}^+]$ was lowered from 140 mM to 0 mM. The three circles in the first image represent three zones within which the ratio is averaged at each frame. (B) The average ratios of the three zones are plotted as a function of time.

Table 1. Composition of Solutions Used in Calcium Imaging

Solutions	NaCl	CaCl ₂	KCl	MgCl ₂	NaH ₂ PO ₄	HEPES	Glucose	EGTA
Normal Tyrode	140	2	4	1	1	5	5.5	0
0 Ca	140	0	4	1	1	5	5.5	0
0 Ca / EGTA	140	0	4	1	1	5	5.5	1
Culture Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium							
Ca ²⁺ -sensitive dye loading solution	Normal Tyrode solution + 0.5 μ M Fura-2, AM + 0.02% Cremophor EL							
ER Ca ²⁺ -ATPase blocker	1 μ M Thapsigargin 5 mM Caffeine							
ER Ca ²⁺ release channel agonist	1 μ M Ryanodine							

EGTA: ethyleneglycol-bis- $[\beta$ -aminoethyl ether] N, N, N', N'-tetraacetic acid), HEPES: N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'[2-ethanesulfonic acid], ER: endoplasmic reticulum.

itol), 250 mM sucrose 및 단백질 분해효소 억제제 [protease inhibitors (0.5 g/ml leupeptin, 5 g/ml pepstatin, 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride), 1 mM benzamide, 2 mM iodoacetamide, 1 g/ml aprotinin)]가 포함된 용액에 넣어서 동질 분쇄기로 50회 분쇄하였다. 세포 균질액은 다시 10,000 × g로 15분간 원심분리하고, 이때 상층액을 모아서 10,000 × g

로 90분간 원심분리하여, 상층액을 제거한 후 동일 용액에 넣어서 -70°C에 보관하였다. 단백질 농도는 Lowry method로 측정하였다. 조골 세포로부터 추출된 균질액을 다시 녹여 2-4°C로 유지하고, SDS용액 [SDS loading buffer (100 mM tris-HCl, pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS [electrophoresis grade], 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)]을 첨가한 뒤 100°C

에 10분간 방치하였다. 조골 세포의 단백질 균질액은 SDS/PAGE [8-16% gradient gel]에서 125 V의 전압으로 3시간 전기영동 한 후 PVDF membrane으로 25 V의 전압으로 3시간 동안 전사하였다. 1차 항체 [rabbit anti-mouse anti-IP₃ receptor polyclonal antibody (calbiocam)]로 처리한 후 peroxidase가 결합된 2차 항체 [horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Transduction laboratory)]로 다시 반응을 시킨 후 enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham international)로 발색하여 X-ray film으로 현상하였다. 두 군간의 비교는 paired Student's t-test로 하였으며 모든 수치는 mean ± SEM 으로 표시하였다. P 값이 0.05미만인 경우를 통계적으로 유의 있는 것으로 간주하였다.

결 과

ATP가 조골 세포 내 Ca²⁺ 활성도에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포 밖의 Ca²⁺ 농도를 2.5 mM Ca²⁺ 정상 Tyrode용액으로 조절하고, 1 mM 농도의 ATP를 주입하여 R340/380의 변화를 측정하였다. R340/380은 세포 밖 용액을 2.5 mM Ca²⁺ 정상 Tyrode 용액으로 하고 1 mM ATP를 주입하였을 때 R340/380 값이 0.76 ± 0.02에서 1.23 ± 0.02로 급격히 증가하는 spike형의 변화 후 안정상태로 회복되는 양상을 보이는 세포 및 spike형의 변화 후 반복적인 작은 Ca²⁺-spike가 형성되는 세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 56개의 세포 중 39%인 22세포에서 1 mM ATP에 반응하였다. ATP에 의한 조골 세포 내 [Ca²⁺]_i 변화의 세포 밖 Ca²⁺ 농도 의존성을 알아보기 위해 2.5 mM Ca²⁺ 정상 Tyrode용액을 처치한 후 0 mM Ca²⁺ Tyrode 용액을 관류시켜 [Ca²⁺]_i의 변화를 측정하였다. 관류 용액의 Ca²⁺농도가 2.5 mM에서 0 mM 감소되었을 때 조골 세포의 [Ca²⁺]_i는 약간 감소하였으며, 1 mM ATP를 주입하였을 때 R340/380이 급격히 증가하는 spike양상을 보였다(Fig. 3B). 세포 밖 Ca²⁺-free 상태를 유지하기 위한 Ca²⁺ buffer로 1 mM EGTA를 주입한 후 1 mM ATP를 주입하였을 때도 역시 R340/380이 급격히 증가하는 spike양상을 보였다(Fig. 3C). 이러한 결과는 ATP 투여시 세포 내 Ca²⁺이 급격하게 증가하며, 또한 세포 밖의 Ca²⁺ 의존성이 없음을 간접적으로 알 수 있다.

ATP에 의한 조골 세포 내 Ca²⁺ 활성도의 Ca²⁺의

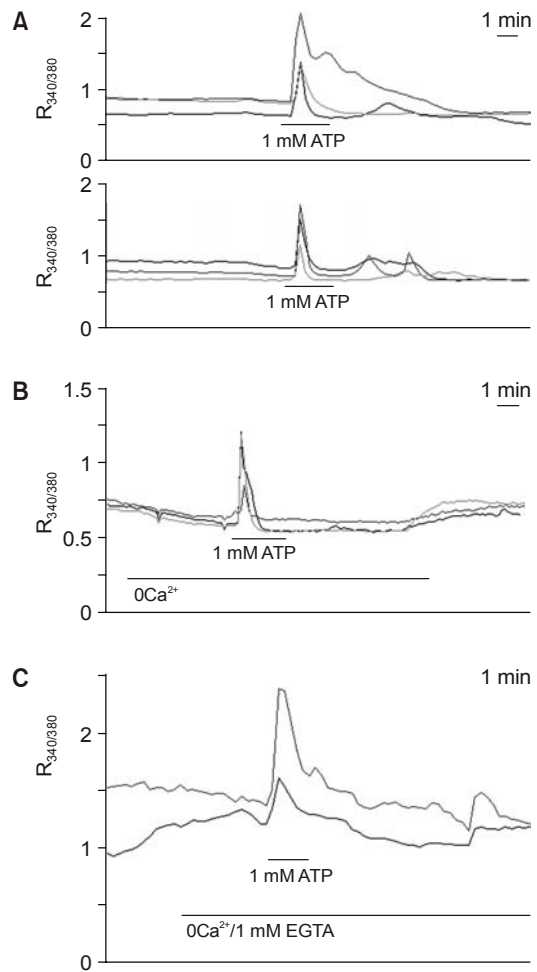


Fig. 3. (A) Effects of ATP on intracellular Ca²⁺ of primary cultured osteoblasts in normal Tyrode solution. Black bar indicate superfused with 1 mM ATP. (B) Effects of ATP on intracellular Ca²⁺ of primary cultured osteoblasts in Ca²⁺-free Tyrode solution. To examine Ca²⁺ source, Ca²⁺-free Tyrode solution condition was made by 1 mM ATP. (C) Effects of ATP on intracellular Ca²⁺ of primary cultured osteoblasts in Ca²⁺-free state, EGTA. To maintain extracellular Ca²⁺-free state, EGTA as Ca²⁺ buffer was made by 1 mM ATP.

존성을 알아보기로, 세포 밖의 Ca²⁺ 농도를 2.5 mM Ca²⁺ 정상 Tyrode 용액으로 조절하고, 3분 간격으로 1 mM ATP를 주입하였다. 그 결과 처음 ATP를 처치하여 형성된 Ca²⁺-spike의 크기 1.66 ± 0.22에 비해 두 번째 및 세 번째의 spike의 크기는 1.17 ±

0.12 및 1.10 ± 0.15 로 각각 대조군의 70%, 66%로 작게 형성되었다(Fig. 4A, B). 세포 밖의 Ca²⁺ 농도를 0 mM Ca²⁺ 정상 Tyrode 용액으로 조절하고, 3분 간격으로 반복해서 1 mM ATP를 처치한 결과 Fig. 4A의 경우와 마찬가지로 두 번째 및 세 번째 spike의

크기가 첫 번째 보다는 작은 spike가 형성되었다(Fig. 4C). 관류 용액의 Ca²⁺ 농도를 2.5 mM에서 0 mM로 감소시키고 1 mM ATP를 처치한 이 실험의 결과는

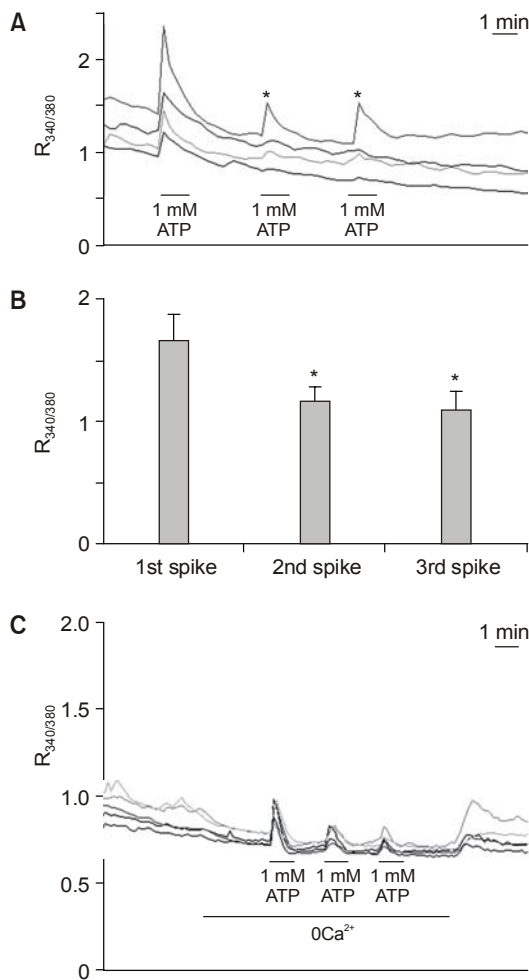


Fig. 4. (A) Dependency of the ATP induced Ca²⁺-spike generation in extracellular normal Tyrode solution. Normal Tyrode solution (2.5 mM [Ca²⁺]_e) was superfused with 1 mM ATP every 3 min period. *: P < 0.05 compared to first spike. (B) Comparison of the ATP induced Ca²⁺-spike generation in normal Tyrode solution. *: P < 0.05 compared to first spike. Values are mean ± SEM. (C) Dependency of the ATP induced Ca²⁺-spike generation in extracellular Ca²⁺-free condition. 1 mM ATP was added to the Ca²⁺-free solution every 3 min.

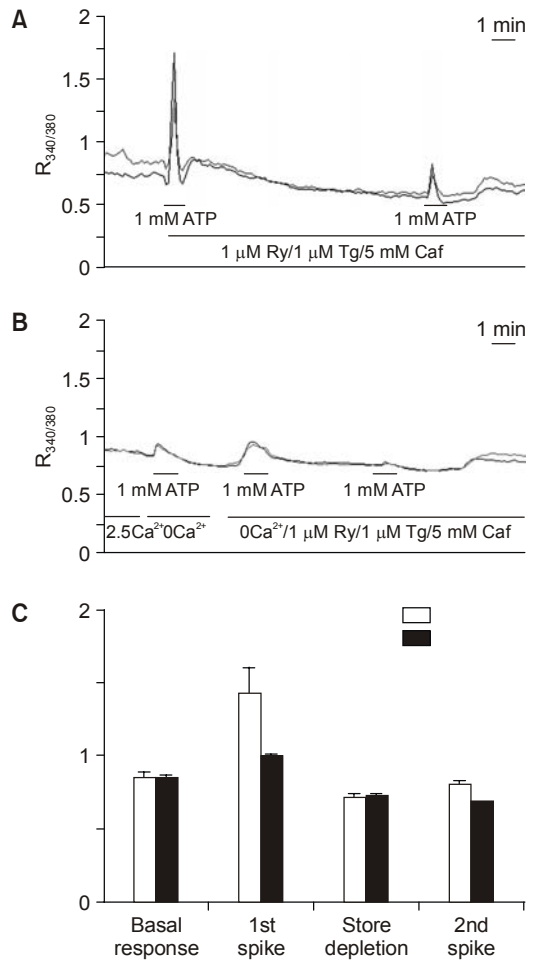


Fig. 5. (A) Dependency of the ATP induced Ca²⁺-spike generation after depletion of Ca²⁺ in endoplasmic reticulum with normal Tyrode solution. To deplete [Ca²⁺]_i stores, 1 μM ryanodine (Ry), 1 μM thapsigargin (Tg) and 5 mM caffeine (Caf) were added to the normal Tyrode solution. (B) Dependency of the ATP induced Ca²⁺-spike generation after depletion of Ca²⁺ in endoplasmic reticulum with Ca²⁺-free Tyrode solution. To deplete [Ca²⁺]_i stores, 1 μM ryanodine (Ry), 1 μM thapsigargin (Tg) and 5 mM caffeine (Caf) were added to the Ca²⁺-free Tyrode solution. (C) Comparison of the ATP induced Ca²⁺-spike generation after depletion of Ca²⁺ in endoplasmic reticulum with normal and Ca²⁺-free Tyrode solution. *: P < 0.05 compared to 0 mM [Ca²⁺]_e in first spike. Values are mean ± SEM.

Table 2. Dependency on Extracellular Ca^{2+}

Response to ATP	Basal response $R_{340/380}$	1st spike $R_{340/380}$	Store depletion $R_{340/380}$	2nd spike $R_{340/380}$
Ca^{2+} -spikes [Ca^{2+}] _e = 2.5 mM	0.85 ± 0.04	1.43 ± 0.17*	0.72 ± 0.02	0.80 ± 0.02
Ca^{2+} -spikes [Ca^{2+}] _e = 0 mM	0.85 ± 0.01	1.00 ± 0.01	0.73 ± 0.01	0.69 ± 0.00

Values are mean ± SEM. *P < 0.05 compared to 0 mM [Ca^{2+}]_e in first spike.

ATP에 의한 조골 세포의 [Ca^{2+}]_i 변화가 세포 밖 Ca^{2+} 의존성이 적다는 것을 의미하며, Ca^{2+} 저장고에 Ca^{2+} 저장에 완전히 이루어지지 않음을 의미한다.

ATP에 의한 조골 세포내 [Ca^{2+}]_i 변화가 Ca^{2+} 저장소를 통한 Ca^{2+} 유리 때문인가를 알아보기 위해 Fura-2가 주입된 조골 세포에 2.5 mM Ca^{2+} 정상 Tyrode 용액으로 관류시킨 상태에서 1 mM ATP를 주입하여 $R_{340/380}$ 의 급격한 증가를 확인한 후 1 μ M ryanodine, 1 μ M thapsigargin, 5 mM caffeine 등으로 처치하여 내형질세망을 고갈시킨 상태에서 1 mM ATP를 주입하였을 때 $R_{340/380}$ 의 크기는 크게 감소하였다(Fig. 5A). 2.5 mM Ca^{2+} 정상 Tyrode 용액에 1 mM ATP를 주입하여 $R_{340/380}$ 의 급격한 증가를 확인하고 0 mM Ca^{2+} Tyrode 용액으로 교체 후 1 μ M ryanodine, 1 μ M thapsigargin, 5 mM caffeine 등을 처치하여 내형질세망을 고갈시키고, 1 mM ATP를 주입하여 조골 세포 내 Ca^{2+} 활성도를 관찰한 결과 $R_{340/380}$ 의 크기 역시 크게 감소하였다(Fig. 5B). Fig. 5A 및 5B에서 나타나는 ATP에 의한 response를 비교한 결과 store depletion 및 두 번째 spike시의 $R_{340/380}$ 는 2.5 mM Ca^{2+} Tyrode 용액과 0 mM Ca^{2+} Tyrode 용액의 경우가 비슷하였으나, 첫 번째 spike의 $R_{340/380}$ 는 2.5 mM Ca^{2+} Tyrode 용액인 경우가 0 mM Ca^{2+} Tyrode 용액의 경우보다 의의있게 높았다(Fig. 5C, Table 2). 이상의 결과는 ATP가 조골 세포의 Ca^{2+} 저장소로부터 Ca^{2+} 을 유리시키는 것을 의미한다.

활성산소가 ATP에 의한 조골 세포의 [Ca^{2+}]_i-spike에 미치는 영향을 알아보기 위해, 1 mM ATP를 주입하기 전에 0.5 mM H_2O_2 로 5분간 전 처리하여 조골 세포의 [Ca^{2+}]_i 변화를 조사하고자 세포 내 Ca^{2+} 을 고갈시킨 상태에서 1 mM ATP를 처치하여 두 인자의 효과를 관찰하였다(Fig. 6) 세포 내 Ca^{2+} 저장소

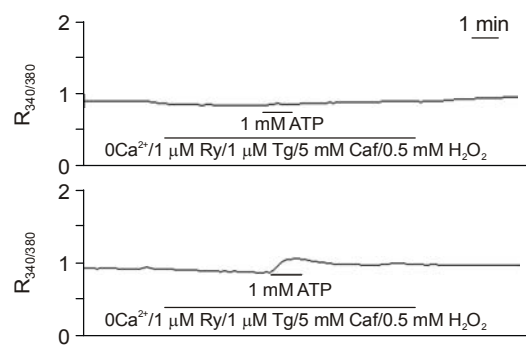


Fig. 6. Effects of H_2O_2 on ATP responses in osteoblast. To deplete intracellular Ca^{2+} store, Ca^{2+} -free solution was superfused with 1 μ M ryanodine (Ry), 1 μ M thapsigargin (Tg), 5 mM caffeine (Caf) and 5 mM H_2O_2 and then 1 mM ATP was superfused after 5 min.

를 고갈시키면서 동시에 0.5 mM H_2O_2 를 처치하고 5분 경과 후 1 mM ATP를 처치한 결과 Ca^{2+} -spike의 형성은 관찰되었으나 안정 상태로 회복하지 못하였으며, 또한 Ca^{2+} -spike의 형성이 억제되었다. 이는 ATP와 H_2O_2 가 세포내 Ca^{2+} 활성도를 증가시켜 H_2O_2 로 인하여 Ca^{2+} 제거가 이루어지지 않음을 의미한다. 또한 Ca^{2+} -spike 형성의 억제는 세포 내 내형질세망으로부터 Ca^{2+} 유리를 억제시킨다기보다는 세포막에 영향을 주어 ATP 수용체 및 세포막 단백질에 영향을 미친다는 것을 의미한다. 조골 세포 내 Ca^{2+} 유리에 관여하는 IP_3 수용체의 단백질 발현을 알아보기 위하여 western blot을 시행하였다(Fig. 7). 대조군의 측정 후 H_2O_2 를 5, 10, 20분씩 전 처리한 후 조골 세포를 세포배양기에서 분리하여 단백질을 추출하였다. 세포 내 저장소로부터 Ca^{2+} 을 유리하는 IP_3 수용체의 발현정도 및 IP_3 수용체에 H_2O_2 가 미치는

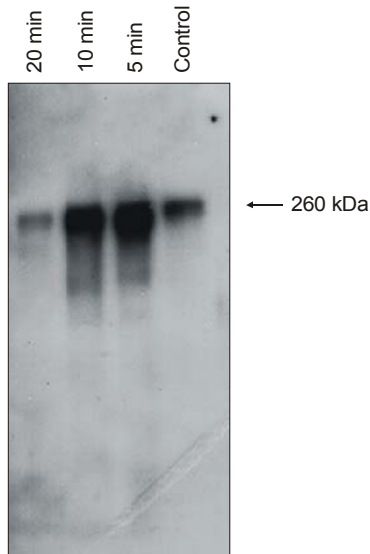


Fig. 7. The localization of IP₃ receptor in primary cultured osteoblasts and the effects of H₂O₂ on IP₃ receptor in osteoblasts. Western blot of protein from control and cells exposed to 0.5 mM H₂O₂ for 5, 10, 20 min, respectively. Bands were stained with rabbit anti-mouse IP₃R antibodies and were developed with ECL (enhanced chemiluminescence) by using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG and ECL. Each lane was loaded with 84µg total protein. The result shows that IP₃R was expressed about 260 kDa and the expression of IP₃R was increased in cells exposed to 0.5 mM H₂O₂ for 5 or 10 min.

영향은 H₂O₂를 5분 및 10분간 처리하였을 때 증가하였고, 20분간 처리한 군에서는 급격히 감소하였다. 260 kDa의 크기에서 발색을 확인하였으며, H₂O₂를 처리한 군에서 IP₃ 수용체의 발현이 증가함을 관찰하였다(Fig. 7) 이는 H₂O₂에 의해서 IP₃ 수용체가 활성화됨을 의미한다.

고 찰

골 조직은 다른 조직과는 달리 상당한 내구성과 탄력성을 지닌 역동적인 기관으로, 골에 가해지는 기계적 자극에 의해 골 세포 내 Ca, IP₃, cAMP 등의 농도가 증가되면서 일련의 생화학적 반응을 유발한다.^{4,15,16} 특히 Ca²⁺은 세포내에서 여러 가지 생화학적 반응들을 유도하여 세포의 기능을 변화시키는 2차 매개체로서 다양한 경로 및 기전을 통해 세포막

을 경계로 이동함으로써 [Ca²⁺]_i의 변화를 유발한다. 세포질 내로의 Ca²⁺이동은 세포막에 존재하는 Ca²⁺이온통로를 포함한 Ca²⁺유입통로와 IP₃수용체와 ryanodine수용체 등 세포 내 Ca²⁺유리통로를 통해 이루어진다. 또한 저장소내의 Ca²⁺이 유리되어 세포 내 저장소가 고갈되면 세포 밖의 Ca²⁺이 유입되는 store operated calcium influx (SOCl)와 같은 복합적으로 발생하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁻²⁰ 특히, 세포 내 저장소에서의 Ca²⁺유리 작용 기전은 세포 밖에 존재하는 신경전달물질, 호르몬 및 물리적인 자극 등에 의해서 유발된다고 알려진 이후 IP₃가 외부 자극에 의해서 발생하는 Ca²⁺ 유리의 매개체로 이용된다고 보고되었다.^{21,22} 골 조직에서 ATP의 작용기전이 존재한다는 보고는 골절 후 치유과정 및 조골세포 간극을 통하여 신호가 전달되어 주변 세포에 나타나는 변화에 관한 연구를 통해 밝혀졌다.^{9,23} 골 조직 주위의 물리적 환경은 골절 생성 및 구조에 중요한 요소이며, 이러한 물리적인 자극이 제거되면 골형성을 및 골 기질 단백질 생성률이 저하된다. 즉 효과적인 골 재형성에는 조골 세포가 전달 물질 및 직접적인 신호 전달을 통하여 유기적인 골 기질의 침착이 필요하다. ATP분비로 조골 세포들의 P₂수용체가 활성화되면 PLC는 세포막에 존재하는 Inositol-4, 5-bisphosphate (PIP₂)를 DAG와 IP₃로 분해시키며, IP₃는 세포 내 Ca²⁺저장소 막에 IP₃ 수용체와 결합하여 Ca²⁺저장소로부터 세포 내로 Ca²⁺을 유리한다.^{24,25} 이러한 연구 결과는 조골 세포에서 IP₃수용체를 통한 Ca²⁺이동 기전이 정상적인 골 조직의 유지 및 골절 후 치유과정에 중요한 역할을 담당하고 있음을 제시하였다. ATP는 다양한 생물학적인 영향을 주는 세포 밖 전달물질로 세포막에 존재하는 ATP 수용체와 결합하여 그 기능을 수행한다.^{3,26} 이러한 ATP의 연구는 그간 수용체, extoenzyme 등에 의해 분해, 세포 밖으로 분비기전 등으로 나뉘어져 연구되어 왔다. 세포 밖 nucleotide는 세포의 용해, nucleotide가 농축되어 있는 포상의 세포 외 유출, 세포막 단백질에 의한 유출 등을 통해 세포 외액에 존재하며 paracrine 및 autocrine 전달 물질의 역할을 한다. 이러한 ATP는 중추 신경계 및 말초 신경계에서 catecholamine 및 acetylcholine 등과 같은 신경 전달 물질과 동일한 국소 부위에 분비되며, 부신 수질의 크롬친화성 포상의 경우, ATP의 농도가 안정 시 3-5 mM에서 외

부 자극 시 100 mM로 증가하며, 응집된 혈소판의 파립으로부터 분비되는 ATP의 농도는 1M까지 증가하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 또한 ATP는 전단응력, 신장, 삼투압 팽창, 세포 배양액의 교환 등 기계적인 자극으로도 분비된다. 혈류의 변화는 혈관 내피 세포로부터 ATP를 분비하며, 골 조직에서 골절 후 치유 과정은 손상 입은 세포로부터 ATP가 분비되어 골 조직 내 조골 세포의 여러 기능에 관여함이 알려져 있다. 소포 밖의 영향으로 분비된 ATP는 세포막의 P₂Y 수용체에 결합하여 세포 내에 신호를 전달하게 된다. 그러므로 본 연구에서는 ATP가 조골세포 내 Ca²⁺활성도에 미치는 영향을 조사하기 위해 조골세포의 [Ca²⁺]_i의 변화를 Ca²⁺ 영상기법을 통하여 단위 세포에서 ATP와 [Ca²⁺]_i의 반응을 조사하고자 하였다.

첫째, 세포 외 ATP가 조골 세포의 [Ca²⁺]_i에 미치는 영향을 측정하고 또한 [Ca²⁺]_i 변화를 조사하였다 (Fig. 3A). ATP는 세포 외 2.5 mM Ca²⁺농도에서 조골세포의 [Ca²⁺]_i의 변화를 증대시켰는데 이는 ATP가 세포 내 Ca²⁺이동에 영향을 주고 있음을 의미한다. 즉 세포 외에 1 mM ATP를 주입하면 [Ca²⁺]_i이 평형상태에서 급격히 증가하는 상태에 도달하게 되고, 이미 알려진 대로 Na-Ca²⁺ 교환 이동 및 Ca²⁺ pump 등에 의해 [Ca²⁺]_i은 빠르게 세포 밖으로 제거되어 Ca²⁺ wave를 형성한다고 할 수 있다. 이 때 세포 밖의 Ca²⁺농도를 0 mM로 하여도 [Ca²⁺]_i의 증가를 확인할 수 있다(Fig. 3B, C).

둘째, 세포 외 1 mM ATP의 주입을 3분 간격으로 주어 조골 세포의 [Ca²⁺]_i에 대한 영향을 조사하고, 세포 외 Ca²⁺를 제거하여 유발되는 Ca²⁺-spike를 관찰하였다(Fig. 4A, B). 이는 Ca²⁺-spike가 세포 내에서 유리되는 Ca²⁺에 의해 유발되므로 ATP에 의해 세포 내에서 Ca²⁺유리가 처음보다 두 번째, 세 번째 주입하였을 때 Ca²⁺-spike 크기가 작게 형성되어 세포 외 Ca²⁺ 농도와 무관함을 관찰하였다.

셋째, 세포 내 Ca²⁺을 고갈시키고자 1 μ M ryanodine, 1 μ M thapsigargin, 5 mM caffeine으로 처리한 후 mM ATP를 처리하여 조골 세포의 [Ca²⁺]_i변화를 측정하였다(Fig. 5A, B). 세포 외에 1 mM ATP를 주입하면 [Ca²⁺]_i이 평형상태에서 급격히 증가하는 상태에 도달하게 됨을 관찰 할 수 있었다. 이것은 세포 밖으로부터가 아니라 세포 내에서 유리됨을 의미

한다고 할 수 있다.

이상의 결과는 다른 연구 결과와^{24,28)} 동일한 결과로 ATP가 세포 내 Ca²⁺저장소로부터 Ca²⁺유리하는 생리화학적 작용 물질임을 나타내는 것이라 하겠다. 또한 ATP가 조골 세포의 Ca²⁺활성도에 미치는 생리학적 영향은 조골세포에 가해지는 기계적인 자극과 더불어 골 형성 및 골 재형성을 촉진하는 인자로 알려져 있다. 활성산소가 세포나 조직에 손상을 유발되는 현상을 산화-침습이라 하며,²⁹⁾ 체내에서는 이러한 산화-침습에 대항하는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase를 포함한 효소들과 α -tocopherol, ascorbic acid와 같은 항산화제가 존재하여 활성산소의 중화를 담당하는 방어 기전을 갖고 있다.³⁰⁾ 활성산소가 세포나 조직에 손상을 주는 것과는 달리, 생체의 여러 세포들의 기능을 조절하는 세포 내 신호 전달 물질로서 최근 연구가 진행되고 있다.³¹⁾ 거대세포나 호중구에 의해 생성된 NO를 포함한 활성질소와 활성산소는 생체 조직에 다량 존재하는 박테리아나 바이러스에 대항하는 항종양제로서 면역기능을 수행하는 것으로 보고되었다.^{32,33)} 또한 cytokines, growth factors의 분비 및 활성도에도 영향을 미치며^{34,35)} hypoxia-inducible factor 1의 DNA 결합기능과 유전자 발현에 관여하기도 하며³⁶⁾ 신경 세포의 apoptosis현상 신호 체계로 작용하기도 하는 것으로 알려져 있다.^{37,38)} 또한 H₂O₂는 골아 세포의 early growth response-1 유전자 발현을 유도하는 transforming growth factor- β 의 매개체로 작용한다고 보고되었다.¹⁰⁾ 활성산소는 세포막을 통한 이온 이동 현상에서 신호전달 역할을 한다.¹¹⁾ 활성산소는 세포막 및 근형질내세망의 Ca²⁺-ATPase의 활성도를 억제하며¹²⁾ 근형질세망의 Ca²⁺유리기전을 변조시켜 근형질세망으로부터 Ca²⁺ 유리를 증가시키고¹³⁾ 또한 세포막의 Na⁺-Ca²⁺교환 이동에 의한 Ca²⁺ 유입을 증가시키는 것으로 보고되었다.³⁹⁾ 그러므로 본 연구에서는 H₂O₂가 ATP에 의한 조골세포의 [Ca²⁺]_i활성도에 미치는 영향을 알아보기로 1 mM ATP를 주입하기 전에 0.5 mM H₂O₂로 5분간 전 처리하여 조골세포의 [Ca²⁺]_i변화를 조사하고자 세포 내 Ca²⁺이 고갈된 후 1 mM ATP를 처리하여 두 인자의 효과를 관찰하였다 (Fig. 6). 세포 내 Ca²⁺저장소를 고갈시키면서 동시에 0.5 mM H₂O₂를 처리하고 5분간 경과 후 1 mM ATP 처리한 결과 Ca²⁺-spike의 형성은 관찰되었으나 안정

상태로 회복하지 못하였다. 이는 ATP와 H₂O₂의 영향으로 세포 내 Ca²⁺이 지속적으로 유지되어 세포 내 활성도를 증가시키고 H₂O₂로 인하여 Ca²⁺제거가 이루어지지않음을 의미하는 것이라 하겠다. 위의 결과와 같이 Ca²⁺유리가 IP₃수용체를 통하여 이루어짐을 관찰하고 IP₃ 수용체의 발현을 알아보기 위해 세포의 단백질을 추출하여 IP₃ 수용체의 발현을 확인한 결과 260 kDa에서 관찰되었다(Fig. 7). 이러한 결과는 다른 세포와 동일한 크기의 IP₃ 수용체의 발현을 뜻하며 H₂O₂에 의해서 IP₃ 수용체의 발현이 증가함은 세포의 Ca²⁺ 활성도를 증가시킴을 의미한다.

이상의 연구 결과는 조골 세포의 세포 내 Ca²⁺ 활성도 조절에 ATP가 생리학적으로 중요한 역할을 하고 있는 실험적 근거를 제시함과 더불어 분자생물학적 실험을 통한 IP₃ 수용체 단백질의 존재와 H₂O₂에 의한 발현 증가를 확인함으로써 조골 세포의 생리적 기능과 Ca²⁺ 활성도에 대한 이해를 증진할 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Wiebe SH, Sims SM, Dixon SJ: Calcium signalling via multiple P₂ purinoceptor subtypes in rat osteoblasts. *Cell Physio Biochem* 1999; 9: 323-7.
2. Xia SL, Ferrier J: Propagation of a calcium pulse between osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Co* 1992; 186: 1212-9.
3. Shimegi S: ATP and adenosine act as a mitogen for osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Calcified Tissue Int* 1996; 58: 109-13.
4. Sandy JR, Meghji S, Farndale RW, Meikle MC: Dual elevation of cyclic AMP and inositol phosphates in response to mechanical deformation of murine osteoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1989; 9: 1010: 265-9.
5. Abbracchio MP, Burnstock G: Purinoceptors: are there families of P₂X and P₂Y purinoceptors? *Pharmacol Therapeut* 1994; 64: 445-75.
6. Bowler WB, Birch MA, Gallagher JA, Bilbe G: Identification and cloning of human P₂Y purinoceptor present in osteoclastoma, bone and osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1137-45.
7. Harden TK, Boyer JL, Nicholas RA: P₂-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol* 1995; 35: 541-79.
8. Ralevic V, Burnstock G: REceptors for purines and

- pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 413-92.
9. Joergensen NR, Geist ST, Civitelli R, Steinberg TH: ATP and gap junction-dependent intercellular calcium signalling in osteoblastic cells *J Cell Biol* 1997; 139: 497-506.
10. Ohba M, Shibamura M, Kuroki T, Nose K: Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. *J Cell Biol* 1994; 126: 1079-88.
11. Kourie JI: Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechani. *Am J Physiol* 1998; 275: C1-24.
12. Kaneko M, Beamish RE, Dhalla NS: Depression of heart sarcolemmal Ca²⁺-pump activity by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 1989; 256: H368-74.
13. Oba T, Ishikawa T, Murayama T, Ogawa Y, Yamaguchi M: H₂O₂ and ethanol act synergistically to gate ryanodine receptor/calcium-release channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C1366-74.
14. Rooney TA, Sass EJ, Thomas AP: Agonist-induced cytosolic calcium oscillations originate from a specific locus in single hepatocytes. *J Biol Chem* 1990; 265: 10792-6.
15. Reich KM, Frangos JA: Effect of flow on prostaglandine E2 and inositol trisphosphate levels in osteoblasts. *Am J Physiol* 1991; 261: C428-32.
16. Lanuon LE: Skeletal responses to physical loading in handbook of experimental pharmacology of Bone. Edited by Mundt-Drosophiltin TJ. Springer-Verlag Berlin. 1993, pp 485-505.
17. Berridge MJ: Capacitative calcium entry. *Biochem J* 1995; 312: 1-11.
18. Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalie A, Flockerzi V: A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* 1998; 17: 4274-82.
19. Putney JW Jr: TRP, inositol 1,4,5-triphosphate receptors and capacitative calcium entry. *P Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14669-71.
20. Putney JW Jr, McKay RR: Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* 1999; 21: 38-46.
21. Streb H, Heslop JP, Irvine RF, Schulz I, Berridge MJ: Relationship between secretagogue-induced Ca²⁺ release and inositol polyphosphate production in permeabilized pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 1985; 260: 7309-15.
22. Thevenod F, Streb H, Ulrich KJ, Schulz I: Inositol 1,4,5-triphosphate releases Ca²⁺ from a nonmitochondrial store site in permeabilized rat cortical kidney cells. *Kidney Int* 1986; 29: 695-702.

23. Jones SJ, Gray C, Boyde A, Burnstock G: Purinergic transmitters inhibit bone formation by cultured osteoblasts. *Bone* 1997; 21: 393-9.
 24. Jorgensen NR, Geist ST, Civitelli R, Steinberg TH: ATP and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblasts cells. *J Cell Biol* 1997; 139: 497-506.
 25. Dubyak GR, El-Moatassim C: Signal trasduction via P₂-purinergic receptors for extracellular ATP and othe nucleotides. *Am J Physio* 1993; 265: C577-606.
 26. Nakamura E, Uezono Y, Narusawa K, Shibuya I, Oishi Y, Tanaka M, Yanagihara N, Nakamura T, Izumi F: ATP activates DNA synthesis by acting on P₂X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells. *Am J Physiol* 2000; 279: C510-9.
 27. Hakeda Y, Kumegawa M: Prostaglandins and bone cell activity *J Bone Miner Res* 1988; 6: 55-70.
 28. Sauer H, Hescheler J, Wartenberg: Mechanical strain-induced Ca waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C295-307.
 29. Kehrer JP: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23: 21-48.
 30. Borg DC: Oxygen radicals and tissue damage. Oxygen free radicals and tissue damage. edited by M tarr adn F samson. Boston. Birkhauser. 1993, pp 12-53.
 31. Lander HM: An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11: 118-24.
 32. Chaudhri G, Clark IA, Hunt NH, Cowden WB, Ceredig R: Effect of anioxidants on primary allo-antigen-induced T cell activation and proliferation. *J Immunol* 1986; 137: 2646-52.
 33. Shi MM, Godleski JJ, Paulauskis JD: Regulation of macrophage inflammatory protein-1 alpha mRNA by oxidative stress. *J Biol Chem* 1996; 271: 5878-83.
 34. Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM: Role of nitric oxide in the control of luteinzing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *P Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10130-4.
 35. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T: Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270: 296-9.
 36. Wang GL, Jiang BH, Semenza GL: Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212: 550-6.
 37. Buttke TM, Sandstrom PA: Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15:7-10.
 38. Jacobson MD: Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 83-6.
 39. Reeves JP, Bailey CA, Hale CC: Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem* 1986; 261: 4948-55.
-