

난소 절제 백서에서 유전자 재조합 인간부갑상선 호르몬[hrPTH(1-84)]의 동화작용 효과

연세대학교 의과대학 내과학교실, 연세대학교 치과대학 병리학교실¹, 목암연구소²

원영준¹ · 박두홍² · 남재현 · 육종인¹ · 김 진¹ · 김경래 · 이현철 · 허갑범 · 임승길

Anabolic Effects of Recombinant Human Parathyroid Hormone (1-84) on Bone Histomorphometry in Ovariectomized Rats

Young Jun Won M.D., Du Hong Park Ph.D.², Jae Hyun Nam M.D., Jong In Yook D.D.S.¹, Jin Kim M.D.¹, Kyung Rae Kim M.D., Hyun Chul Lee M.D., Kap Bum Huh M.D. and Sung Kil Lim M.D.

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Department of Dental Pathology¹, Yonsei University Dental College, Mogam Biotechnology Research Institute², Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: To evaluate the anabolic effects of human recombinant parathyroid hormone [hrPTH(1-84)], we examined effect of low-dose and high-dose of [hrPTH(1-84)] and estradiol on bone histomorphometry in ovariectomized rats.

Methods: Sixty Sprague-Dawley female rats aged 8~10 weeks were used. Eight weeks after ovariectomy, or sham operation, rats were given daily sc injection of hrPTH (1-84), 30 µg/kg (OVX+L group), 150 µg/kg (OVX+H group), 17-estradiol (30 µg/kg, OVX+E group) or vehicle (OVX+V group) for 4 weeks. After double tetracycline labeling, all rats were killed at day 84. We completed the histomorphometric analysis of distal femoral metaphyseal cancellous bone for trabecular bone volume (TBV), mean trabecular plate thickness (MTPT), mean trabecular plate density (MTPD), mean trabecular plate separation (MTPS), mean osteoid seam width (OSW) and appositional rate (AR).

Results: The histomorphometric parameters (TBV, MTPT, OSW and AR) of trabecular bone mass in (OVX+E) group were higher than those in (OVX+V) group. The TBV of trabecular bone in PTH treated groups were higher than that in sham operated, (OVX+V) and (OVX+E) group. The histomorphometric parameters (TBV, MTPD, OSW and AR) of trabecular bone mass in (OVX+H) group showed a tendency to be higher than those in (OVX+L) group, but statistically not significant.

Conclusion: Low dose (30 µg/kg) hrPTH (1-84) also shows a sufficient anabolic effect on trabecular bone (J Kor Soc Endocrinol 14:81~90, 1999).

Key words: Human recombinant parathyroid hormone(1-84), Histomorphometry

접수일자: 1998년 7월 22일

통과일자: 1999년 3월 18일

책임저자: 임승길, 연세대학교 의과대학 내과학교실

서 론

부갑상선 호르몬은 골대사에 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉 골흡수를 자극할 뿐 아니라 골형성에도 자극과 억제 작용을 모두 가지고 있다 [1]. 부갑상선 호르몬을 저용량으로 매일 주사하였을 때 골에 동화작용을 나타내는데, 이런 동화작용은 부갑상선 호르몬 주사 후 골량의 증가로 신속히 나타난다. 이러한 효과는 백서[2,3]와 개[4]에서 뿐 아니라 사람에서도 같은 결과를 보인다 [5,6]. 또한 부갑상선 호르몬은 난소절제 백서에서 감소된 골량의 회복에 있어서 여성호르몬과 비스포스포네이트 보다 효과가 큰 것으로 보고되고있다[7]. 인간 부갑상선 호르몬은 84 개의 아미노산기를 갖는데 34개의 아미노 터미널만 갖고도 충분한 생물학적 활성도를 보여, 이전의 연구들에서는 hPTH (1-34)를 이용하였으며, 최근에는 hPTH (1-84)를 사용하여 골대사에 미치는 영향을 연구하였던 바, 이 둘 모두 골막과 골내막으로부터 섬유골 및 피질골의 형성을 자극하는 것으로 알려졌으며[8], 똑 같은 양으로 투여되었을 때 백서에서 척추의 골량 증가에 차이를 거의 보이지 않는 것으로 보고되었다[9].

부갑상선 호르몬을 생산해 내는 방법으로 실험실에서 화학적으로 생합성을 하는 방법과 유전자 재조합을 이용하여 대량 생합성하는 방법이 있다. 화학적으로 부갑상선 호르몬을 생산해 내는 방법은 기술적인 문제는 물론 고 비용으로 인하여 대량의 펩타이드를 생산해 내기 어려워 임상에 이용하는 것이 거의 불가능하여 유전자 재조합법을 이용하여 생산을 시도 하고 있다. 다행스럽게도 부갑상선호르몬은 posttranslational modification을 하지 않는 펩타이드이므로 대장균을 이용하여 대량 생산이 가능하다. 그러나 부갑상선 호르몬의 생물학적 활성도를 나타내기 위해서는 아미노 터미널에 첫 번째 아미노산인 Serine 기가 반드시 보존되어야만 한다. 만일 serine 기가 소실되거나 그 앞에 다른 아미노산이 결합할 경우에는 생물학적 활성을 소실하게 된다. 따라서 대장균에서 direct expression 법을 이용하여 표현할 경우에 첫번째 아미노산기는 methionin 기가 되므로 methionin 기가 더

블은 부갑상선 호르몬을 생성하게 되므로써 생물학적 활성도를 소실하는 것은 물론 오히려 길항제로 작용하는 펩타이드를 생합성하게 된다. 이에 본 연구진은 인간 부갑상선 호르몬을 fusion protein strategy법으로 표현시키고 분리하여 fusion protein을 생산한 후 endopeptidase로 절제함으로써 인간 부갑상선호르몬을 첫 번째 아미노산의 손상 없이 대량 얻는데 성공할 수 있었다.

이에 본 연구진은 이렇게 생산된 인간 부갑상선호르몬의 생물학적 활성도를 뼈에서 직접 평가하고자, 부갑상선 호르몬을 피하로 용량에 따라 주사하여 골조직에 미치는 효과를 평가해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 인간 부갑상선호르몬의 발현벡터 제작

대장균에서의 단독발현이 어려우며 아미노 말단 아미노산 서열의 serine 기가 온전하게 유지되는 것이 생합성에 필수적인 인간 부갑상선호르몬(PTH)을 대장균 내에서 고 효율로 발현시키기 위하여 대장균 내에서 높은 발현 양을 보이는 것으로 알려진 광합성세균 *Rhodobacter sphaeroides* 유래의 phosphoribulokinase (PRK)를 이용한 융합단백질 발현벡터 pm153PTH를 구축하였다[10](Fig. 1). 이 벡터는 L-arabinose 첨가에 의하여 외래유전자 발현이 유도되는 벡터로서 융합단백질 발현 cassette는 융합파트너 부위, 융합단백질로부터 PTH를 회수하는데 필요한 단백질 분해효소 절단 부위, 그리고 목적 단백질인 PTH 부위의 세 부분으로 이루어져 있다. 융합파트너의 경우 상대적인 목적단백질의 발현율을 높이기 위하여 PRK의 아미노말단 153개 아미노산에 해당하는 절편만을 사용하였으며 동시에 아미노단백질분해효소 절단 시 내부 절단을 최소화하기 위하여 일부 arginine 잔기를 다른 아미노산으로 치환하여 사용하였다. 단백질분해효소 절단부위로는 혈전용해 과정에 관여하는 플라스미노겐 활성화효소인 urokinase에 의하여 효율적으로 절단되는 아미노산 서열을 실험적으로 결정하여 사용하였다[11]. 목적 단백질인 PTH에 대해 높은 발현율을 달성하기 위하여 대장균에서 높은 빈도로 사용되는 번역부호를 갖는 oligonucleotide들을

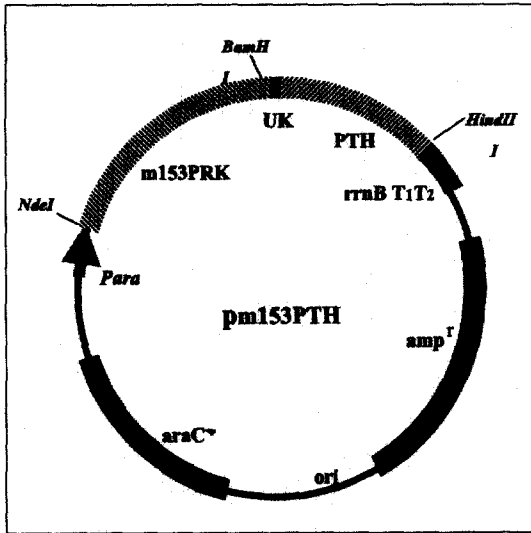


Fig. 1. The map of plasmid, pm153PTH, is expression vector of human recombinant parathyroid hormone using *Escherichia Coli*.

연결한 합성 유전자를 사용하였다[12].

2. 재조합 인간 부갑상선호르몬의 발현 및 정제

pm153PTH로 *E. coli* MC1061 (F-*araD139* Δ (*ara-leu*)7696 *galE15 galK16* Δ (*lac*)X74 *rpsL* (*Strr*) *hsdR2* (*rk-mk*+) *mcrA mcrB1*)을 형질전환시킨 후, 형질전환체를 선별하였다(MC1061/pm153PTH). Ampicillin이 포함된 LB 배양액에서 진탕 배양한 seed culture를 최종 발효배양액에 접종하고 DO-stat 유기식 발효방법을 이용하여 고농도 세포배양을 수행하였다. 세포 농도가 적정 농도에 도달하였을 때 L-arabinose를 첨가하여 융합단백질 발현을 유도하였다. 발현이 완료된 대장균체를 수거하여 파쇄한 후, 세포 추출액으로부터 융합단백질 봉입체(inclusion body)를 회수, 세척하였다. 융합단백질 봉입체를 8 M urea 용액에 용해시킨 후 천천히 urea를 제거하여 융합단백질을 재구성(refolding)시켰다. 재구성된 융합단백질에 적정량의 urokinase를 첨가한 후 서서히 교반하며 반응시켜 융합단백질로부터 PTH를 절단하였다. 절단반응액의 pH를 낮추어 절단되지 않은 융합단백질과 융합파트너 단백질을 침전시키고 상층액에 남아 있는 PTH를 회수한

후, 이온 교환 및 역상 칼럼 크로마토그래피를 거쳐 고순도의 PTH를 최종 정제하였다. 순수 정제된 PTH에 대하여는 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 전기영동, isoelectric focusing gel 전기영동, western blot 분석, 질량분석, peptide mapping, 역상 및 gel permeation HPLC, 아미노산 조성 및 서열 분석, 숙주 유래 단백질 및 핵산 분석, 이상독성시험, endotoxin 분석, cAMP 촉진 생활성 분석 등을 수행하여 동질성과 고순도를 확인하였다[13]. 최종 정제된 재조합 PTH는 안정제와 혼합, 동결건조하여 제제화하였다.

3. 백서와 약제 용량

몸무게 200~230 g의 8~10주 된 Sprague-Dawley 암컷 백서를 이용하였으며 백서들은 12시간 light-dark cycle을 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 유지시켰다. 식사는 0.6% 칼슘과 물이 함유된 표준 실험실 식사로 하였다. 모두 60 마리의 백서를 5군으로 나누어 실험하였으며 제1군은 sham-operation과 부갑상선 호르몬을 주사제로 만들 때 사용한 solvent vehicle를 주사 한 군으로(대조군)하였으며 나머지 4군에서는 모두 양측 난소 절제술을 시행하였다. 제2군은 난소제거 후 solvent만을 피하 주사 하였으며(group OVX+V), 제3군은 17 β -estradiol, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 를 피하 주사하였다(group OVX+E). 제4군과 제5군은 유전자 재조합 인간 부갑상선 호르몬(hrPTH, 1-84)를 피하로 각각 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (group OVX+L) 및 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (group OVX+H) 씩 주사 하였다. 모든 약은 난소 절제 후 8주에 시작하였다. 모든 동물은 4 주 동안 매주 마다 월요일부터 금요일까지 주 5회 주사하였다.

모든 백서는 회생시키기 10일 및 3일 전에 tetracycline 20 mg/kg을 주사하였다. 백서는 마취 후 경추부 탈골로 회생시켰으며 양쪽 대퇴골을 조직형태학 검사를 위해 제거되었다.

4. 골조직형태학

대퇴골은 70% ethanol로 고정되었으며, ethanol series로 탈수되어 methymethacrylate로 봉매하였다. Jung K microtome (Reichert, Germany)을 사용하여 5 mm 두께로 대퇴골 장축과 평행하게 두정 축으로 절

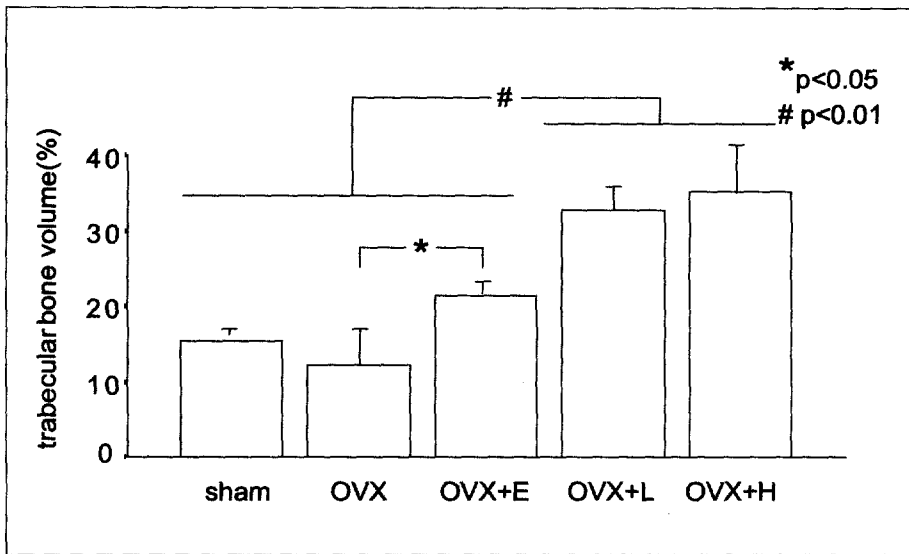


Fig. 2. Comparison of trabecular bone volume among the study groups(OVX: ovariectomy, OVX+E: ovariectomy with estrogen, OVX+L: ovariectomy with low dose of parathyroid hormone, OVX+H: ovariectomy with high dose of parathyroid hormone).

단하였다. 절단면은 Von Kossa 방법으로 tetrachrome counterstain (Polysciences Inc., Warrington, PA)을 가지고 염색하였다. 골의 측정은 일차적인 해면 부위를 배제하기 위하여 성장판-골간단 접합 부위로부터 1mm 떨어진 원위부 대퇴 골간단의 망상 골조직에서 수행되었다. 조직형태학적 변수는 표준 추출 부위에서 American Society for Bone and Mineral Research Histomorphometry Nomenclature Committee의 표준화에 따라서 기록되었다[14]. 소주골량, 소주골판 두께, 유골 열극 폭과 소주골판 분리 간격은 사진용 현미경과 영상 분석기와 연결된 마이크로소프트 컴퓨터로 구성된 semiautomatic image analyzer system(Image-Pro plus, Media Cybernetics, USA)을 이용하여 측정하였다. 이 현미경에는 고 해상도의 비디오가 부착되어 있어 비디오 모니터에 검체의 영상이 비춰졌다. 그래픽 테이블 위의 펜의 움직임은 비디오 화면 위의 검체 영상에서의 궤적을 이중 인화했다. 이러한 방법에 의거해서 관심 있는 부위는 그려지고 그려진 선의 길이와 면적은 컴퓨터에 의해서 자동으로 계산되었다.

무기질 침착률(표시 기간 사이의 시간으로 표시 기

간 사이의 평균 두께를 나눈 평균값, 예를 들면 7일로 나누는 것)은 반자동 영상 분석기를 가지고 동일한 부위를 자외선 아래서 검사하여 10mm 두께의 비 염색 부위에서 측정하였다.

5. 통계 분석

결과는 평균±SD(standard deviation), 또는 평균±SEM(standard error of the mean) 으로 표시하였다. 각각의 그룹간의 차이는 non-parametric method with Kruskal-Wallis test를 사용하여 평가하였다. p<0.05를 유의한 통계 수치로 선택하였다.

결 과

1. 소주골량 (Trabecular bone volume, TBV)

가장수술(sham operation)군과 OVX+V 군간에 소주골량에는 아무런 차이가 없었다. OVX+E 군의 소주골량은 OVX+V 군 보다 높았고, 부갑상선 호르몬(hrPTH) 치료군에서의 소주골량은 타 군 즉, 가장수술

Fig 3. Photographs show cancellous bone in distal femur metaphyses from five groups of rats. (A) sham-operated, (b) ovariectomized, (C) ovariectomized with estrogen treated, (D) ovariectomized with low dose PTH(30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) treated, (E) ovariectomized with high dose PTH(150 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) treated group. Photographs visualize the increase in trabecular bone volume with increasing dose levels of hrPTH(1-84).

군, OVX+V군 그리고 OVX+E 군 보다 의미 있게 높았다(Table 1, Fig. 2). 광학 현미경으로부터 얻어진 시각적 소견도 hrPTH의 투여 시 소주골의 두께가 현저하게 증가하는 양상이었다(Fig. 3).

Table 2. Comparison of Meanosteoid Seam Width(MOSW) and Mineral Apposition Rate(AR) Among the Study Groups

Groups(n)	MOSW (μm)	AR ($\mu\text{m}/\text{day}$)
A(sham, 10)	4.89 \pm 1.66	0.96 \pm 0.62
B(OVX, 10)	3.66 \pm 2.63	0.41 \pm 0.50
C(estradiol, 10)	6.29 \pm 1.54 ^{ab}	1.45 \pm 0.62 ^b
D(low PTH, 7)	5.27 \pm 1.15	1.50 \pm 0.32 ^b
E(high PTH, 7)	5.87 \pm 1.19 ^b	2.22 \pm 0.35 ^b

Values are mean \pm SD

OVX; ovariectomy, PTH: Parathyroid hormone.

a: p<0.05 compared with shamoperation(group A)

b: p<0.05 compared with ovariectomized(group B)

Table 1. Comparison of Trabecular Bone Volume(TBV), Mean Trabecular Plate Density(MTPD), Mean Trabecular Plate Thickneaa(MTPT) and Mean Trabecular Plate Separation(MTPS) Among the Study Groups.

Groups (n)	TBV (%)	MTPD (/mm)	MTPT (μm)	MTPS (μm)
A (sham, 10)	15.32 \pm 5.33	2.18 \pm 0.54	69.38 \pm 14.75 ^b	426.33 \pm 191.21
B (OVX, 10)	12.32 \pm 2.62	2.47 \pm 0.46	50.00 \pm 6.58	372.06 \pm 110.81
C (estradiol, 10)	21.43 \pm 3.33 ^b	2.26 \pm 0.31	95.97 \pm 17.71 ^{ab}	354.54 \pm 66.08
D (low PTH, 7)	32.23 \pm 6.09 ^{def}	2.91 \pm 0.38	110.34 \pm 11.12 ^{ab}	238.38 \pm 50.51
E (high PTH, 7)	35.37 \pm 6.02 ^{def}	3.38 \pm 0.59 ^{abc}	105.81 \pm 18.91 ^{ab}	196.55 \pm 40.49 ^{ab}

Values are mean \pm SD, OVX; ovariectomy, PTH: Parathyroid hormone.

a: p<0.05 compared with shamoperation (group A)

b: p<0.05 compared with ovariectomized (group B)

c: p<0.05 compared with 17b-estradiol (group C)

d: p<0.05 compared with shamoperation (group A)

e: p<0.05 compared with ovariectomized (group B)

f: p<0.05 compared with 17b-estradiol (group C)

2. Mean Trabecular Plate Thickness (MTPT)

OVX+E군, OVX+L군 그리고 OVX+H 군에서의 MTPT는 가장수술군과 OVX+V 군 보다 높았다. 물론 가장수술 군에서의 MTPT는 OVX+V 군보다 높았다(Table 1).

3. Mean Trabecular Plate Density (MTPD)

OVX+H 군에서의 MTPD는 가장수술군, OVX+V 군 그리고 OVX+E군에서보다 높았다. 그러나 OVX+H군 과 OVX+L 군 사이에서는 차이가 발견되지 않았다(Table 1).

4. Mean Trabecular Plate Separation (MTPS)

가장수술군과 OVX+V군에서의 MTPS는 OVX+H 군에서보다 높았다. 그러나 OVX+H군 과 OVX+L군 사이에서는 차이가 없었다(Table 1).

5. Osteoid seam width (OSW)

OVX+E 군에서의 OSW은 가장수술군과 OVX+V 군에서보다 높았다. 역시 OVX+H군에서의 OSW은 OVX+V군 보다 높았다. 17-estradiol 치료군(OVX+E 군) 과 PTH 치료군 사이에서는 차이가 발견되지 않았다(Table 2.).

6. Appositional rate (AR)

17-estradiol 치료군(OVX+E군) 또는 PTH 치료군에서의 AR은 OVX+V 군 백서보다 높았다. 또한 AR은 OVH+H군에서 가장수술군보다 높았다. 그러나 17-estradiol 치료군(OVX+E군)과 PTH 치료군 사이에서는 차이가 없었다(Table 2.).

요약하여 본다면 부갑상선 호르몬 주입 후 소주골의 조직형태학적 변수(TBV, MPTP 그리고 MTPD)는 증가하였으며 MTPS는 감소하였다. 즉 부갑상선 호르몬 주입 후 골 형성에 대한 동화작용을 볼 수 있었다.

고 찰

난소 절제된 백서에서 본 연구진이 생산한 인간 부갑상선호르몬(hrPTH(1-84))이 원위부 대퇴골에 대하여 동화작용 효과를 나타내었다.

부갑상선호르몬의 동화작용 효과는 투여 방법에 따라 다르게 나타난다. Tam 등은 그들이 개발한 백서모델에서 부갑상선 호르몬을 지속적으로 주입을 할 때와 간헐적으로 주입을 할 때 그 효과가 다름을 발견하였고 동시에 부갑상선호르몬의 투여 용량에 따라 그 효과도 다르다고 보고하였다[15]. 그 후 여러 연구진에 의해 간헐적으로 부갑상선호르몬을 투여할 경우에만 골에 대한 동화작용 효과가 있고, 부갑상선호르몬을 지속적으로 투여할 경우에는 오히려 골 흡수를 항진시키고 골 형성은 증가시키지 못한다는 것을 재확인할 수 있었다[16].

이번 연구에서도 예상한 바와 같이 17 β -estradiol 치료군의 소주 골량이 난소절제 백서군보다 높았다. 그러나 가장 수술군(sham operation 군)과 난소 절제후 1 β -estradiol을 투여한 군 사이에서는 소주 골량의 차이를 관찰할 수는 없었다. 이러한 결과는 여성들에서

17 β -estradiol을 투여시 뼈의 흡수만을 억제하며 뼈에 동화작용을 나타내어 골량을 증가시키지는 못한다는 것을 재 확인할 수 있는 소견이라고 할 수 있다. 반면에 부갑상선호르몬 투여는 mean trabecular plate thickness와 mean trabecular plate density를 의미있게 증가시켰고 소주골의 연결(connectivity) 정도도 의미있게 증가시키는 것을 알 수 있었다. Gunness-Hey와 Hock 등도 합성 PTH(1-34)가 백서에서 원위부 대퇴골에서 소주골량을 증가시킨다고 보고하였으며[2], Mosekilde 등도 PTH(1-34) 치료가 척추 골량을 증가시키면서 소주골의 연결성(connectivity)을 유지시킨다고 보고한 바 있다[9]. 따라서 현재 대부분의 골다공증 약제들은 골흡수 억제제들이어서 이미 골다공증이 심하게 진행된 환자들에서는 지속적인 치료에도 불구하고 골밀도의 팽목할 만한 증가를 기대하기 어렵고 골질량을 줄이는데 역부족이란 점을 감안하여 볼 때, 진행된 골다공증 환자들에게 부갑상선 호르몬의 투여는 골량 증가 유도와 함께 소주골간의 연결도 증가시키는 매우 유용한 약제로 사용될 것으로 사료되었다.

한편 PTH(1-34)와 PTH(1-84)간에 척추골량 변화에 미치는 효과는 차이가 없는 것으로 보고되고 있으며, PTH(1-34)와 (1-84) 모두 골막과 골내막으로 부터 피질골의 형성을 자극하는 것으로 알려졌다[8,17]. Gunness-Hey과 Hock 등도 PTH(1-34)를 주사하였을 때 원위부 대퇴골의 소주골량이 용량에 비례해서 증가한다고 보고하였다[2]. 수컷 백서를 이용한 동일 실험에서는 용량에 비례해서 척추의 골량, 크기 그리고 생화학적 지표의 개선이 관찰되었으며, 용량에 비례하여 피질골의 강도 증가와 골막과 골내막에서의 피질골 형성 또한 증가함이 보고되었다[8,15,18]. 그러나 이번 연구에서는 일일 일회씩 일주에 총 5회의 간헐적인 주사로 소주골량의 증가를 관찰하였으나 용량에 따른 효과의 차이를 발견할 수는 없었다. 이번 연구에서 용량 증가에 따른 골형성 및 흡수를 반영하는 지표들의 차이가 관찰되지 않은 것은, 본 연구진이 저 농도라고 선택한 농도가 타 연구에 비하여 약 2 배 정도 더 높았고, 생산해 낸 부갑상선 호르몬의 생물학적 활성도가 다소 더 높았을 가능성 등을 고려해 볼 수 있겠으나, 이를 확인하기 위해서는 향후 다양한 농도의 부갑상선 호르몬이 뼈에

직접 미치는 영향에 대한 조사는 물론 다른 동물 및 타 제재와의 비교 연구가 더 필요할 것으로 보였다.

부갑상선호르몬의 작용기전에 대하여 그간 많은 연구들이 진행되어 왔다. 부갑상선호르몬은 골에 대한 생화학적 작용의 대부분을 PTH-related protein (PTHrP)과 공유하고 있는 제1형 수용체 (PTH/PTHrP receptor)를 활성화 시켜서 나타낸다. 제1형 부갑상선 호르몬 수용체는 골아세포에는 발견되지만 파골세포에서는 발견되지 않고, 성장판과 조골세포 계통의 세포를 만들어내는 몇몇의 기질세포에서 풍부하게 발견된다[19]. 흥미로운 것은 골 조직에 부갑상선 호르몬을 투여할 경우 부갑상선 호르몬에 의한 수용체가 전혀 없는 파골세포들이 어떻게 숫적인 증가와 더불어 골의 흡수를 증가 시키게 하는지에 대해서는 오랜 동안 밝혀지지 못했다. 그러나 최근에는 부갑상선 호르몬은 부갑상선 호르몬에 대한 제1형 수용체가 있는 다른 세포 예를 들면 골아세포 및 섬유모세포를 부갑상선 호르몬이 우선적으로 자극하고 이들 세포로부터 이차적으로 어떤 특이 신호전달 물질을 분비하게 하거나 또는 조골세포와 파골세포간의 직접적인 접촉을 유도하여 파골세포를 활성화시킨다는 것이 밝혀졌다. Chambers 등은 상기와 같이 전신 인자 또는 국소 인자들에 의하여 자극 받은 주위 세포들에 의하여 이차적으로 파골세포를 활성화시키는 활성도를 파골세포-재흡수 자극활성도 (osteoclast resorption-stimulating) 또는 기질 파골세포 형성 활성도 (stromal osteoclast-forming activities) 라고 명명 하였다[20]. 최근 Lacey 등은 기질세포(stromal cell)에 흔히 표현되면서 파골세포와의 직접 접촉에 의하여 파골세포의 분화를 유도하는 물질을 마침내 찾아내는 켈저를 거두고 osteoprogenin ligand (OPG)라고 명명한 바 있다[21]. 그러나 많은 연구자들은 상기 작용을 갖는 OPG 외에도 또 다른 물질들이 더 관여할 것이라고 보는데, 이러한 물질들에 대한 연구들은 향후 부갑상선호르몬을 투여 시 관찰되는 뼈에 대한 다양한 효과들을 적절하게 설명해 줄 수 있을 뿐만 아니라 골다공증 치료제 개발의 표적 물질이 될 것으로 생각된다.

한편 많은 연구진들에 의해 부갑상선호르몬이 수용체를 활성화 시킨 이후 어떠한 신호 전달이 관여하고 최종 발현 물질들이 무엇인가에 관해 지속적으로 연구

하여 왔지만 부갑상선호르몬이 어떻게 뼈에 동화작용을 나타내지는 아직 명확하지 못하다. 그간 연구되어 온 결과들을 일부 소개하면 Canalis 등은 부갑상선 호르몬을 주기적으로 (intermittent treatment) 투여하면 콜라겐의 합성을 자극하는데 이러한 효과는 insulin-like growth factor-1 (IGF-1)의 국소적인 생산 증가에 따른 결과라고 하였다[22]. 또 Watson 등도 부갑상선 호르몬을 투여 받은 소주골의 조골 세포들은 대조군에 비하여 약 2배 이상의 IGF-1 mRNA를 표현하고 유리 IGF-1의 분비 또한 증가시키는데 이때 증가된 유리 IGF-1은 다시 조골 세포에 작용하여 새로운 골 형성을 더욱 증강시킨다고 하였다[23]. 흥미로운 것은 부갑상선 호르몬에 의하여 증가된 국소 유리 IGF-1이 apoptosis의 억제인자로도 작용하기 때문에 부갑상선 호르몬은 결국 IGF-1을 매개로 조골세포들이 새롭게 태어나는 것은 증가시키면서 죽는 것을 감소시켜 조골세포의 숫적인 증가를 유도할 것으로 본다 [24]. 부갑상선호르몬은 IGF-1을 매개로한 동화작용 이외에도 골 흡수를 증가시켜 골 기질로부터 TGF beta 1 을 포함한 수 많은 국소인자들을 유리시키는데, 이때 분비된 TGF beta 1은 뼈에 동화작용 효과는 물론 파골세포의 apoptosis를 유발시키는 효과가 있다 [25]. 그 외에도 부갑상선 호르몬은 조골세포에 작용하여 TGF beta 1의 수용체에 대한 친화도를 증가시키며, prostaglandins을 생성케 하는데 이때 형성된 prostaglandins의 일부는 골의 형성을 자극하는 효과가 있다[26]. 그러나 아직도 어떻게 부갑상선호르몬을 투여 하는 방법이 뼈에 동화작용을 나타내는데 최적의 조건이며, 각각의 치료 방법에 따른 동화작용 또는 이화작용을 나타내는 기전에 대해서 명확하게 규명되지 못한 실정이라고 하겠다.

결론적으로 본 연구진에 의하여 생합성한 부갑상선 호르몬은 뼈에 대한 활성도가 매우 높고 효율적으로 대퇴부의 골 형성을 증가시켰다. 부갑상선 호르몬은 백에서 소주골 및 피질골 그리고 골막에서 골량을 증가시킬 수 있었으나 향후 사람에서도 동일한 반응을 보이는지에 관해서 더 연구되어야 할 것으로 사료되었으며, 부갑상선호르몬에 의한 동화작용을 나타내는 기전에 관한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

요 약

연구배경: 부갑상선호르몬은 골대사에 다양한 효과를 나타내는데 골흡수를 촉진시키며, 동시에 골형성을 촉진시킨다. 본 연구진에 의해 만들어진 부갑상선호르몬(1-84)의 골형성에 미치는 영향을 알아보고자 난소 절제 백서에서 저용량과 고용량의 부갑상선호르몬과 에스트로젠을 이용하였다.

방법: 실험동물로 8~10주 된 60마리의 암컷 백서(Sprague-Dawley female rats)를 이용하였다. 실험군은 가장수술군(sham operation) 과 난소절제 8주후 부갑상선호르몬을 30 µg/kg을 주 5회 피하 주사한 저용량군과 150 µg/kg을 투여한 고용량군, 17-estradiol을 30 µg/kg 투여한 에스트로젠군과 vehicle을 투여한 군으로 하였다. 모든 백서는 84일후 희생을 하였으며 희생 전 double tetracycline labeling을 시행하였다. 희생된 백서에서 대퇴골을 적출후 원위부 골단을 이용하여 소주골에 대한 골 형태학적인 분석(측정인자: trabecular bone volume(TBV), mean trabecular plate thickness (MTP), mean trabecular plate density(MTPD), mean trabecular plate separation(MTPS), mean osteoid seam width(OSW) and appositional rate(AR))을 시행하였다.

결과: 에스트로젠 투여군의 골 형태학적인 측정인자(TBV, MTP, OSW 및 AR)는 난소절제군에 비해 높았다. 저용량 및 고용량의 부갑상선호르몬을 투여한 군의 소주골골량(TBV)은 난소절제군이나 에스트로젠 투여군에 비해 높았다. 고용량의 부갑상선호르몬을 투여한 군의 골 형태학적인 측정인자(TBV, MTPD, OSW and AR)는 저용량의 부갑상선호르몬 투여군에 비해 높은 경향을 보였으나 통계학적인 차이는 없었다.

결론: 저용량의 부갑상선호르몬의 투여로도 소주골의 골형성을 촉진하는 것을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Raisz LG: *Kream BE Regulation of bone formation. N Engl J Med* 309:29, 1983
2. Gunness-Hey M: *Hock JM Increased trabecular bone mass in rats treated with human synthetic*

parathyroid hormone. Metab Dis Relat Res 5:177-181, 1984

3. Kalu D, Penneck J, Doyl FH, Foster GV: *Parathyroid hormone and experimental osteosclerosis Lancet* 1:1363-1366, 1970
4. Malluche HH, Sherman D, Meyer W, Ritz E, Norman AW, Massry SG *Effects of long-term infusion of physiologic doses of 1-34 PTH on bone Am J Physiol* 242:F197-201, 1982
5. Reeve J, Davies Um, Hesp R, McNally E, Katz D: *treatment of osteoporosis with human parathyroid peptide and observations on effect of sodium fluoride Br Med J* 301:314-318, 1990
6. Slovik DM, Rosenthal DI, Doppelt SH, Potts JT Jr., Daly MA, Campell JA, Neer RM: *Restoration of spinal bone in osteoporotic men by treatment with human parathyroid hormone (1-34) and 1,25-dihydroxyvitamin. J Bone Miner Res* 1:377-381, 1986
7. Wronski TJ, Yen C-F, Qi H, Dann LM: *Parathyroid hormone is more effective than estrogen or bisphosphonates for restoration of lost bone mass in ovariectomized rats. Endocrinology* 132:823-831, 1993
8. Oxlund H, Ejersted C, Andreassen T, Topping O, Nilsson MHL: *Parathyroid hormone (1-34) and (1-84) stimulate cortical bone formation both from periosteum and endosteum Calcif Tissue Int* 53:394-399, 1993
9. Mosekilde L, Danielsen CC, Gasser J: *The effect on vertebral bone mass and strength of long term treatment with antiresorptive agents (estrogen and calcitonin), human parathyroid hormone (1-38), and combination therapy, assessed in aged ovariectomized rats. Endocrinology* 134: 2126-2134, 1994
10. Hallenbeck PL, Kaplan S: *Cloning of the gene for phosphoribulokinase activity from Rhodobacter sphaeroides and its expression in Escherichia coli. J Bacteriology* 169:3669-3678, 1987

11. Collen D and Lijnen H R: *Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. Blood* 78:3114-3124, 1991
12. Zhang S, Zubay G, Goldman E: *Low-usage codons in Escherichia coli, yeast, fruit fly and primates. Gene* 105:61-72, 1991
13. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman M W, Kong X-F, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre J V, Potts Jr: J T, Kronenberg HM, and Segre GV. *Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: A single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. Proc Natl Acad Sci USA* 89:2732-2736, 1992
14. Parfitt MM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR: *Bone histomorphometry standardization of nomenclature, symbols and units. J Bone Miner Res* 2:595-610, 1987
15. Tam CS, Heersche JNM, Murray TM, Parsons JA: *Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorption action : Differential effect of intermittent and continuous administration. Endocrinology* 110:506-512, 1982
16. Hock JM, Gera I: *Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone J Bone Miner Res* 7: 65-72, 1992
17. Mosekilde L, Sogaard CH, Danielsen CC, Torring O: *The anabolic effects of human parathyroid hormone(hPTH) on rat vertebral body mass are also reflected in the quality of bone, assessed by biomechanical testing: A comparison study between hPTH-(1-34) and HPTH-(1-84). Endocrinology* 129:524-428, 1991
18. Ejersted C, Andreassen TT, Oxulund H, Jurgensen PH, Bak B, Heggblad J, Torring O, Nilsson MHL: *Human parathyroid hormone (1-34) and (1-84) increase the mechanical strength and thickness of cortical bone in rats. J Bone Miner Res* 9:1097-1101, 1993
19. Urena P, Kong XF, Abou-Samura AB et al: *Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor mRNA is widely distributed in rat tissue. Endocrinology* 133:617-623, 1993
20. Chambers TJ, Owens J, Hattersley G, Jat PS, Noble MD: *Generation of osteoclast-inductive and osteoclastogenic cell lines from the H2KbtsA58 transgenic mouse. Proc Nat Acad Sci USA* 90:5578-5582, 1993
21. Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelley MJ, Dunstan CR, Elliot G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Elli A, Quian Y-X, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senal G, Guo J, Delnaey J, Boyle WJ: *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell* 93:165-176, 1998
22. Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy T: *Insulin-like growth factor 1 mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. J Clin Invest* 83:60-65, 1989
23. Watson P, Lazowski D, Han V, Fraher L, Steer B, Hodsmom A: *Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. Bone* 16:357-365, 1995
24. Harrington EA, Fanidi A, Evan GI: *Oncogenes and cell death. Genet Dev* 4:120-129, 1994
25. Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, Spelsberg TC: *Modulation of transforming growth factor-production in normal human osteoblast-like cells by 17-estradiol and parathyroid hormone. Endocrinology* 129:3313-3320, 1991
26. Mori S, Jee WSS, Li XJ: *Production of new trabecular bone in osteopenic ovariectomized rats by prostaglandin E2. Calcif Tissue Int* 50:80-87, 1992