

# 인간 부갑상선 호르몬의 골 형성 촉진 작용과 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 전달체계와의 관련성 규명

관동대학교 의과대학 내과학교실<sup>1</sup>, 연세대학교 의과대학 내분비연구소<sup>2</sup>, 연세대학교 의과대학 내과학교실<sup>3</sup>

김세화<sup>1</sup> · 안연희<sup>2</sup> · 이유미<sup>2,3</sup> · 임승길<sup>2,3</sup>

## Identification and Validation of the Relationship of the Anabolic Effect of Parathyroid Hormone with the Wnt/ $\beta$ -catenin Canonical Pathway

Se Hwa Kim<sup>1</sup>, Juan Ji An<sup>2</sup>, Yumie Rhee<sup>2,3</sup>, Sung-Kil Lim<sup>2,3</sup>

Department of Internal Medicine, Kwandong University College of Medicine<sup>1</sup>, Institute of Endocrine Research<sup>2</sup>, Department of Internal Medicine<sup>3</sup>, Yonsei University College of Medicine

### ABSTRACT

**Background:** It has been well established that daily injections of low dose parathyroid hormone (PTH) increase bone mass in animals and humans. However, the precise mechanisms by which PTH exerts its anabolic action on bone are incompletely understood. The canonical Wnt- $\beta$ -catenin signaling pathway has recently been demonstrated to have an important role in bone cell function. In the present study, we have examined the interaction between the PTH and Wnt signaling pathways in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells.

**Methods & Results:** MC3T3-E1 cells were treated with 0.01 - 0.84  $\mu$ M recombinant PTH.  $\beta$ -catenin expression was significantly increased after 30 minutes of exposure to PTH and reached a maximum 2.7 fold increase at 1 hr and expression then faded at 6 hrs. In addition, treatment with PTH increased nuclear accumulation of activated  $\beta$ -catenin; the ratio between the nuclear to cytoplasmic protein was more than three fold at 30 minutes and beyond. Moreover, PTH stimulated T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) reporter gene activity in MC3T3-E1 cells. Confocal microscopy revealed nuclear translocation of  $\beta$ -catenin by PTH as compared with a glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) inhibitor.

**Conclusion:** These results suggest that the anabolic mechanism of PTH might be partially associated with the Wnt-canonical pathway. The appropriate target of another anabolic agent should be determined through further studies of this pathway. (J Kor Endocr Soc 22:411-418, 2007)

**Key Words:**  $\beta$ -catenin, Bone, Parathyroid hormone, TCF/LEF, Wnt-canonical pathway

### 서 론

골다공증에 대한 치료는 현재까지 주로 골흡수 억제제가 쓰이고 있다. 그러나, 골흡수 억제제는 근본적인 골 형성을

촉진시키지는 않으므로 그 한계가 뚜렷하다. 부갑상선호르몬은 저용량으로 매일 투여 시 동물과 사람에서 모두 골량을 증가시키는 것이 입증되었고[1], 최근 미국 식약청에서 골다공증 치료제로 승인된 유일한 골형성 촉진제이다. 부갑상선 호르몬이 골형성을 증가시키는 기전으로는 조골세포 활성 증가, 조골 전구세포들의 분화촉진, lining cell의 recruitment, 그리고 조골세포사멸의 억제 등이 제시되고 있으나 아직까지도 정확한 기전은 정립되지 않았다[2-4].

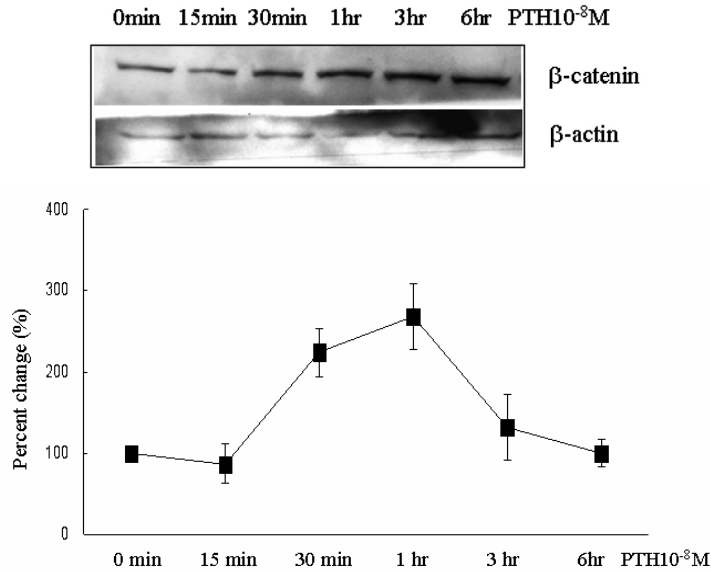
한편, low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5)는 조골세포에서 Wnt- $\beta$ -catenin 시스템을 통해서 조

접수일자: 2007년 7월 3일

통과일자: 2007년 9월 22일

책임저자: 이유미, 연세대학교 의과대학 내과학교실

\* 본 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-003-E00152)



**Fig. 1.** Effect of PTH on levels of  $\beta$ -catenin in mouse osteoblastic cells.  $\beta$ -catenin expression was significantly increased after 30 minutes of exposure to PTH ( $10^{-8}$  M) and maximized to 2.7 folds at 1 hr then faded at 6 hrs.

골세포의 기능을 증진시키는 것으로 잘 알려져 있다[5,6]. 이 Wnt- $\beta$ -catenin 신호전달 체계에 의해서 촉진되는 대표적인 전사인자들이 cyclin D 등의 세포 증식과 관련된 인자들과 세포고사 억제를 담당하는 인자들이 대부분이다. 따라서, 이번 연구에서는 부갑상선호르몬의 골형성 촉진의 기전으로서 Wnt- $\beta$ -catenin 시스템과의 연관성을 규명하여, 부갑상선호르몬의 작용에 대한 하나의 기전을 제시하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포 배양

마우스 조골세포 주인 MC3T3-E1 세포를  $\alpha$ -minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM), 10% fetal bovine serum (FBS), 및 1% penicillin/streptomycin을 혼합한 배지에서 배양하였다. 배지는 3일에 한 번씩 교환하였으며, 세포가 50~80% confluent 할 때 실험을 진행하였다.

### 2. Western Blotting

MC3T3-E1 세포에서 부갑상선호르몬 [PTH(1-84)]  $10^{-8}$  M을 처리 전, 후 15분, 30분, 1시간, 3시간, 및 6시간 후에 세포 전체 단백질을 추출하였고, 세포질 단백질과 핵 내 단백질을 따로 추출하였다. 추출된 단백질은 Bradford assay법으로 농도를 결정하였고, 98°C에서 5분간 가열하여 denature시켰다. 각각의 검체를 SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기영동 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 이동시키고 항체와 단백질 간의 비 특이적인 결합을 차단하기 위하

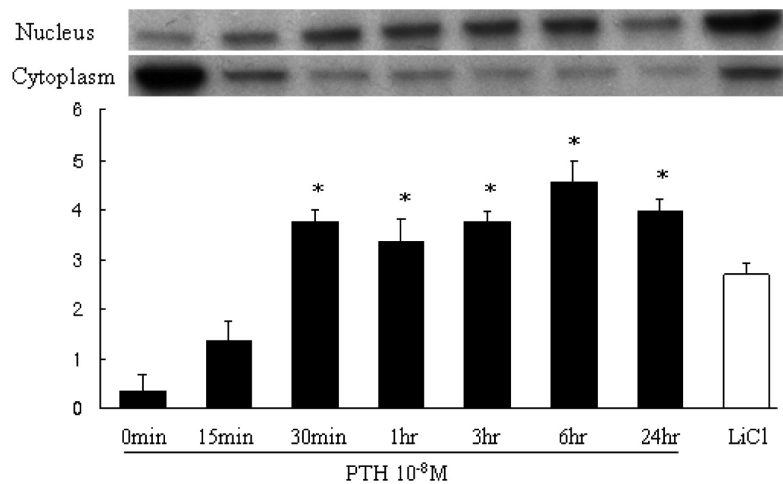
여 TBS-T (20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 125 mM, 0.1% Tween 20) 용액에서 1시간 반응시켰다.  $\beta$ -catenin (#610157, BD Biosciences, 92kDa), Active- $\beta$ -catenin (#05-665, Upstate Biotechnology, 92kDa),  $\beta$ -Actin (Santa Cruz, 43kDa)에 대한 항체로 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T 용액으로 세척한 후 anti-mouse 이차 항체를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. TBS-T 용액으로 세척 후 ECL solution kit (Santa Cruz)를 이용해 X-ray 필름에 감광시켜 발현 정도를 측정하였다.

### 3. Confocal Laser Scanning Microscopy

Gelatin 코팅을 한 슬라이드 위에 MC3T3-E1 세포를 놓고 4% Para formaldehyde 로 실온에서 10분간 고정하였다. 고정된 세포를 인산 완충용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 세척한 후 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 10분간 처리하였다. 다시 PBS로 세척 후 0.1% Triton X 100을 처리한 후 1% BSA가 함유된 PBS로 블록 시켰다.  $\beta$ -catenin: FITC (#6610155, BD Biosciences)를 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 형광이 표지 된 2차 항체를 1:100로 희석하여 암실에서 실온 상태로 1시간 반응시켰다. SYTO®59 (Molecular Probes)로 대조염색을 시행하였고 공초점 레이저 현미경 (confocal microscopy, LSM Invert 410; Karl Zeiss)으로 관찰하였다.

### 4. TCF/LEF Luciferase 활성도 평가

T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) 유전자 결합부위와 luciferase reporter 유전자를 fusion시킨 TOPflash



**Fig. 2.** Effects of PTH on nuclear or cytoplasmic active  $\beta$ -catenin expression. PTH ( $10^{-8}$  M) increased nuclear accumulation of activated  $\beta$ -catenin; the ratio between nuclear to cytoplasmic protein were more than 3 folds at 30 minutes and thereafter

reporter plasmid (Upstate biotechnology)와 FOP luciferase reporter plasmid를 사용하였다. MC3T3-E1 세포를 6-well plate에  $1.5 \times 10^5$ 개/well로 분주 한 후 24시간 후에 Fugene<sup>TM</sup> 6 reagent (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)를 이용하여 TOPflash (1 $\mu$ g)이나 FOP (1 $\mu$ g)를 3시간 동안 transfection 시켰다. 10시간 후 0.1% FBS를 함유한  $\alpha$ -MEM으로 바꾼 후 12시간 동안 incubation시킨 후 부갑상선호르몬 PTH(1-84]  $10^{-8}$  M을 6시간 동안 처리하였다. Luciferase assay system kit (Promega, Madison, WI)와 Luminometer (Dynatech MLX)을 이용하여 luciferase 활성도를 측정하였다.

## 5. 통계학적 분석

모든 실험결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였고, 통계분석은 SPSS 11.0 프로그램(SPSS Inc, Chicago, IL)을 사용하였다. 실험결과의 통계는 경우에 따라 Student's t-test와 ANOVA test를 적용하여 분석하였고  $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 조골세포 주에서 부갑상선 호르몬이 $\beta$ -catenin 발현에 미치는 영향

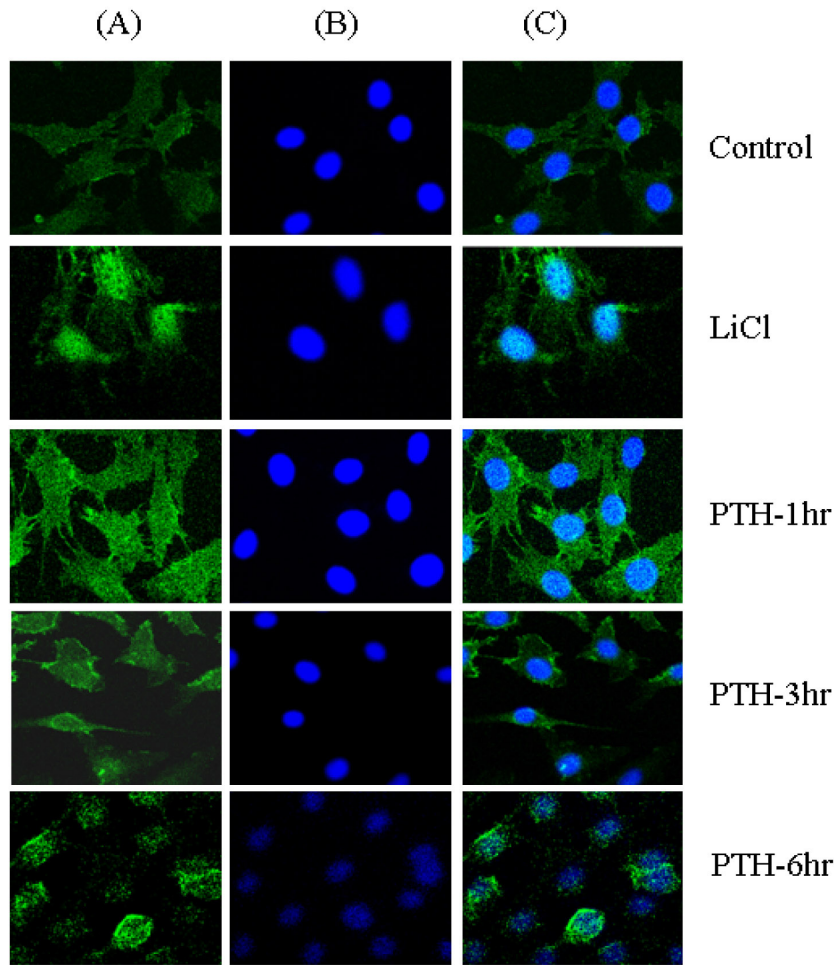
조골세포주인 MC3T3-E1 세포를 이용하여 부갑상선호르몬을 처리하여 조골세포에서의 Wnt canonical 전달체계의 가장 중요한 매개체인  $\beta$ -catenin에 어떠한 영향을 주는지 정량적 평가를 하였다. 부갑상선호르몬(PTH  $10^{-8}$  M) 처리 후  $\beta$ -catenin의 양이 시간에 따라 의미 있게 증가함을 관찰하였다. 부갑상선호르몬 처리 후 30분부터 증가하기 시작하여 1

시간째 약 2.7배 정도 증가하였다가 6시간 후에는 기저 농도로 감소하였다(Fig. 1).

이러한  $\beta$ -catenin의 양적 증가가 과연 실제 유전자 전사인자의 유도에 영향을 미쳤는지를 확인하기 위하여서 활성화 형태의 비인산화된  $\beta$ -catenin을 세포질과 핵 단백질로 분리하여 분석을 해보았다. 부갑상선호르몬(PTH  $10^{-8}$  M) 처리 30분 후부터 핵 내에서 활성화된  $\beta$ -catenin이 점차 증가하였고, 세포질 내의 활성화 형태의  $\beta$ -catenin은 감소하는 경향을 보였다. 핵 단백질/세포질 단백질의 비를 보면 30분 이후부터 3배 이상으로 의미있게 증가하였고 24시간 동안 지속됨을 관찰하였다(Fig. 2).

### 2. 부갑상선 호르몬이 $\beta$ -catenin의 세포 내 이동에 미치는 영향

부갑상선호르몬에 반응하여 증가된  $\beta$ -catenin의 세포 내 이동을 관찰하기 위해 공초점 레이저 현미경을 이용하여 실험을 진행하였다. 기저상태에서는  $\beta$ -catenin이 세포질과 핵 내에서 모두 약하게 발현되었다. glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) 저해제로써 Wnt- $\beta$ -catenin 신호전달을 활성화시키는 리튬(LiCl)을 양성 대조군으로 사용하였으며, LiCl에 의해서  $\beta$ -catenin이 세포질에 존재하다가 핵 내로 이동하여 주로 핵 내에서만 표현되었다. 부갑상선호르몬(PTH  $10^{-8}$  M) 투여 1시간 후에는  $\beta$ -catenin의 발현이 세포 전체에서 뚜렷하게 증가하였고, 6시간 후에는 핵 내에서만 주로 발현됨을 관찰하였다(Fig. 3). 이상의 결과로 부갑상선호르몬에 의해서  $\beta$ -catenin 발현이 증가하고 유전자 활성화의 작용을 하기 위해 핵 안으로 이동함을 알 수 있었다.



**Fig. 3.** Effects of PTH on intracellular translocation of  $\beta$ -catenin in MC3T3-E1 cells. (A)  $\beta$ -catenin expression (green) was weak without PTH. PTH ( $10^{-8}$  M) treatment increases  $\beta$ -catenin expression in the cytoplasm as well as nuclei at 1 hr.  $\beta$ -catenin was mainly expressed in the nuclei after 6 hrs of PTH. LiCl (60 mM) increases  $\beta$ -catenin expression in the nuclei. (B) Hoechst staining of the same cells showing the nuclei (blue). (C) Confocal microscope images of the same field were taken and merged.

### 3. 부갑상선 호르몬의 TCF/LEF Reporter 유전자 활성도에 대한 효과

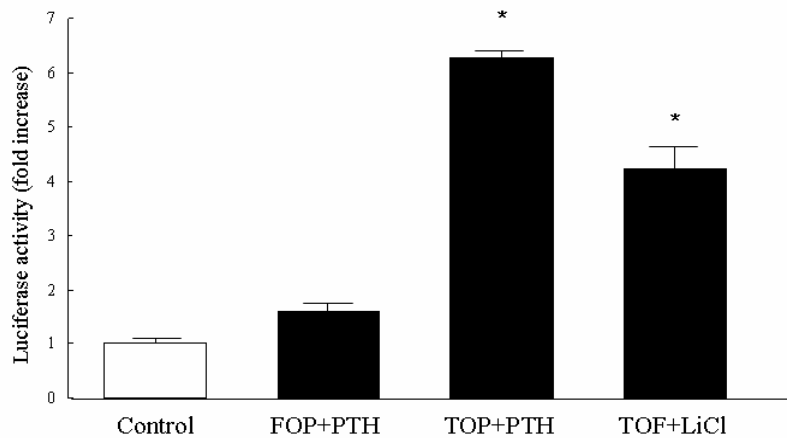
부갑상선호르몬에 의해서 증가되고 활성화된  $\beta$ -catenin이 실제 전사인자를 조절하는지 알아보기 위해 TOPflash reporter 플라스미드 또는 FOPflash reporter 플라스미드를 이용하여 조골세포 주에 transfection시킨 후 6시간 후에 luciferase 활성도를 측정하였다. LiCl을 투여하였을 때 대조군에 비해 luciferase 활성도가 4배 증가하였고, 부갑상선호르몬을 투여한 경우 luciferase 활성도가 6배 증가함을 확인하였다(Fig. 4).

#### 고찰

본 연구에서는 인간부갑상선호르몬은 조골세포 주에서

Wnt 신호전달체계의 중요한 구성요소인  $\beta$ -catenin의 발현, 특히 활성화 형태의 발현을 의미있게 증가시켰으며,  $\beta$ -catenin 표적 유전자인 TCF/LEF 유전자를 활성화시킴을 관찰하였다.

부갑상선호르몬은 저용량으로 매일 투여 시 뼈에 동화작용을 나타내어서 골 양을 증가시킨다는 것은 잘 알려져 있다. 현재까지의 연구결과 부갑상선 호르몬은 조골세포에 세포사멸을 억제할 뿐 아니라[3] IGF-1 및 TGF-와 같은 성장인자 표현을 증가시키고[7,8] 조골세포의 분화에 필수적인 Runx2를 증가시킴으로써 작용할 것으로 생각되고 있으나[9] 명확한 작용기전은 아직까지 밝혀지지 않았다. 부갑상선호르몬은 부갑상선호르몬 수용체에 결합한 후 adenylyl cyclase와 cAMP증가를 경유하여 protein kinase A (PKA)를 활성화시켜서 작용하며 cAMP/PKA 신호전달이 조골세포에서의 중



**Fig. 4.** Effects of PTH on the TCF/LEF reporter gene activity in mouse osteoblastic cells. PTH stimulates T-cell factor/ lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) reporter gene activity in MC3T3-E1 cells. The changes in TCF/LEF reporter gene activity are expressed as fold change over control activity (no PTH treatment).

요한 신호전달체계에 알려져 있고[10], phospholipase C (PLC)을 경유하여 protein kinase C (PKC)를 활성화 시키기도 하며[11] 일부 다른 경로가 있을 가능성도 제기되고 있다[12].

Wnt 단백질들은 Frizzled 수용체와 LRP5 혹은 LRP6 수용체에 결합해서 GSK3- $\beta$ 를 억제함으로써  $\beta$ -catenin을 활성화시켜서  $\beta$ -catenin가 핵 안으로 이동하여 TCF/LEF와 결합하여 Wnt 표적 유전자를 조절하게 된다[13,14]. 이러한 Wnt 신호전달은 많은 기관과 조직의 발달 및 유지에 중요한 역할을 하지만, 특히 뼈 조직에서 골량을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 인간 LRP5 유전자의 loss-of-function 돌연변이가 일어나면 골밀도가 낮고 뼈가 부러지기 쉬운 특징을 나타내는 osteoporosis-pseudoglioma syndrome이 발생하고[15], 반대로 LRP5 유전자의 다른 돌연변이에서는(예, G171V) 골밀도가 매우 높은 특징을 나타내고 LRP5와 Dickkopf-1 (DKK1)의 결합력이 약해지는 것이 일부 원인이 될 수 있다고 보고 되었다[16,17]. 마찬가지로 LRP5 결핍 마우스에서도 조골세포 증식이 감소하고 골량이 감소된 특징을 나타낸다[5]. Wnt 신호전달이 골 형성을 증가시키는 경로는 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호전달체계가 중요한 역할을 하는데, 활성화된  $\beta$ -catenin은 C3H10T1/2 세포에서 조골세포로의 분화를 유도한다는 것이 보고되었[18], 동물 모델에서의 연구결과에서도  $\beta$ -catenin이 조골세포분화의 초기단계에 필요하며  $\beta$ -catenin이 결핍된 경우 중간엽 줄기세포가 조골세포로 분화하지 않고 연골세포로의 분화를 촉진하는 것으로 보고되었다[19,20].

골 형성에 중요한 부갑상선호르몬과 Wnt 경로 사이에 cross-talk이 있을 가능성이 충분히 존재하며, 이전의 연구에서 Kulkarni 등[21]은 부갑상선을 제거시킨 랫트에서 부갑상선호르몬 투여 후 Wnt 신호전달체계와 연관이 있는 여러

구성 요소 중 LRP6와 frizzled-1 (FZD-1) 표현은 증가하고, LRP5와 DKK-1은 감소함을 보고하였다. 또한 부갑상선호르몬이 랫트 조골세포주인 UMR-106 세포에서  $\beta$ -catenin을 증가시키고 TBE6-luciferase reporter 유전자 활성도를 증가시킴을 보고하여 부갑상선호르몬의 골형성을 촉진시키는 기전에 Wnt 신호전달이 연관되어 있을 가능성을 제시하였다. 본 연구에서는 부갑상선호르몬을 처리 하였을 때  $\beta$ -catenin 발현이 30분부터 빠르게 증가하여 1시간째 약 3배로 증가하였다가 6시간 후에는 기저농도로 감소하였다. 그러나 Kulkarni 등의 연구에서는 동일 농도의 부갑상선호르몬에 의해  $\beta$ -catenin이 20-50% 정도로 약하게 증가하였고 24시간 동안 지속되었다는 것이 본 연구에서와 약간의 차이를 보였다. 이들 결과의 차이는 실험에 사용한 세포와 부갑상선호르몬의 차이(PTH 1-84 vs. PTH 1-38)가 영향을 미쳤을 가능성이 있다.

본 연구에서는 전사인자를 조절하는 작용을 나타내는 활성화된 형태의  $\beta$ -catenin을 핵 내와 세포질로 구분하여 각각 측정하였는데 활성화 형태의  $\beta$ -catenin이 24시간 동안 핵 내에서 뚜렷하게 증가해 있음을 보여 다른 보고에서와 비슷한 결과를 나타낸다고 생각하였다. 최근 Tobimatsu 등[22]에 의하면 부갑상선호르몬이 마우스 조골세포에서 Smad3를 통하여  $\beta$ -catenin을 증가시킴을 보고하여 Wnt- $\beta$ -catenin 신호 전달경로가 부갑상선호르몬의 세포사멸 억제 기전에 관여함을 제시하였다. 이들 저자들은 부갑상선호르몬을 처리하였을 때  $\beta$ -catenin 단백질 발현이 증가하고 불활성화 형태의 인산화된  $\beta$ -catenin의 양이 감소함을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 다른 연구에서와 달리 실제로 부갑상선호르몬 자극에 의한  $\beta$ -catenin의 세포 내 이동을 입증하였는데, 자극이 없을 때에는 세포전체에서 매우 약하게 발현되었던  $\beta$

-catenin이 부갑상선호르몬 투여 1시간 후에 전반적으로 증가되었고, 6시간 후에는 주로 핵 안에서 뚜렷하게 발현하는 것을 직접 관찰하였다. 이것은 부갑상선호르몬에 의해 실제로  $\beta$ -catenin이 작용을 하기 위해 활성화된 형태로 핵 내로 이동함을 의미한다고 하겠다.

세포사멸은 태생기 근골격계 발달과 성숙, 골 전환, 골절 치유 및 골의 퇴행성 변화 동안 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 조골세포 증식, 분화, 세포사멸간의 균형이 조골세포 전체 규모를 결정한다[23]. Hunter 등[24]은 인간 조골세포 주에서  $\beta$ -catenin의 proteolytic cleavage가 caspase-3 활성화와 연관되어 있으면서 조골세포사멸을 유도함을 보고하여  $\beta$ -catenin 신호의 활성화가 조골세포 생존을 촉진한다고 하였다. 최근의 다른 보고에서는 Wnt- $\beta$ -catenin 신호전달이 uncommitted 조골 전구세포와 분화된 조골세포의 세포사멸을 억제한다고 하였다[25]. 이상의 여러 보고들을 종합하여 볼 때 명확한 기전은 아직까지 밝혀지지 않았지만  $\beta$ -catenin이 조골세포에서 부갑상선호르몬의 세포사멸 억제 기전에 중요한 것으로 생각된다.

본 연구에서는 부갑상선호르몬에 의한 세포사멸 억제에  $\beta$ -catenin이 어떤 역할을 하는지에 대해서 직접적으로 규명하지는 못했지만, 여러 보고들을 종합하여 볼 때 부갑상선호르몬에 의해서 활성화된  $\beta$ -catenin이 증가하고 표적유전자인 TCF/LEF 유전자를 활성화시켰다는 것은 위와 같은 맥락에서 일치하는 결과라고 하겠다.

본 연구에서는 마우스 조골세포인 MC3T3-E1 세포에서만 실험을 진행하였고 다른 세포주를 포함한 일차 배양한 조골세포 등에서는 실험을 하지 못하였으나, 다른 연구에서 랫트 조골세포 주에서 비슷한 결과를 보고하여 부갑상선호르몬에 의한  $\beta$ -catenin 발현의 증가 및 표적유전자 활성화 등의 결과가 MC3T3-E1 세포에만 특이적으로 보이는 사실은 아닐 것으로 사료된다.

결론적으로 부갑상선호르몬은 마우스 조골세포에서 Wnt 신호전달체계의 중요한 구성요소인  $\beta$ -catenin 발현을 증가시켰고, 증가된  $\beta$ -catenin은 핵 내로 이동하여 TCF/LEF 유전자를 활성화시킴을 입증하였다. 따라서 부갑상선호르몬의 골 형성 촉진이 Wnt- $\beta$ -catenin 신호전달체계와 연관성이 있음을 제시한다고 하겠다.

## 요 약

**연구배경:** 부갑상선 호르몬을 저용량으로 매일 투여 시 골량을 증가시킨다는 것은 잘 알려져 있으나 아직까지 골형성 촉진효과에 대한 기전은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 부갑상선호르몬과 Wnt/ $\beta$ -catenin 체계와의 연관성을 규명하여 부갑상선 호르몬 작용에 대한 하나의 기전을 제시하고자 하였다.

**방법:** 조골세포 주인 MC3T3-E1 세포를 이용하여 부갑상선호르몬(PTH  $10^{-8}$  M)을 처리한 후 활성화 형태의  $\beta$ -catenin 발현을 세포질과 핵 내로 구분하여 조사하였고, 공초점 레이저 현미경을 이용하여 부갑상선호르몬 처리에 의한  $\beta$ -catenin의 세포 내 위치 이동을 관찰하였다. 또한 부갑상선호르몬이 TCF/LEF reporter 유전자 활성화도에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

**결과:** 부갑상선호르몬 [PTH (1-84)]  $10^{-8}$  M을 처리한 후  $\beta$ -catenin의 양이 30분부터 증가하기 시작하여 1시간째 약 3배 정도 증가하였다가 6시간 후에는 기저 농도로 감소하였다. 활성화 형태의  $\beta$ -catenin 발현을 세포질과 핵으로 분리하여 분석하였는데 핵 내  $\beta$ -catenin이 부갑상선호르몬 처리 30분 후부터 의미있게 증가하여 24시간까지 지속함을 관찰하였다. 또한 기저상태에서는  $\beta$ -catenin이 세포 전체에서 약하게 발현되었던 것이 부갑상선호르몬 투여 1시간 후에는 전체적으로 뚜렷하게 증가하고 6시간 후에는 주로 핵 안에서 뚜렷하게 발현됨을 관찰하였다. 또한 부갑상선호르몬에 의해 활성화된  $\beta$ -catenin이 실제 전사인자를 조절하는지 luciferase 분석을 통해 실험하였는데 부갑상선호르몬은 TCF/LEF reporter 유전자 활성도를 6배 정도 증가시킴을 확인하였다.

**결론:** 부갑상선호르몬은 마우스 조골세포에서 Wnt 신호전달의 중요한 구성요소인  $\beta$ -catenin 발현, 특히 활성화 형태의  $\beta$ -catenin을 증가시켰고 증가된  $\beta$ -catenin은 핵 내로 이동하여 TCF/LEF 유전자를 활성화 시킴을 입증하였다. 따라서 부갑상선호르몬의 골형성 촉진작용에 일부 Wnt- $\beta$ -catenin 신호전달체계가 연관되어 있음을 제시한다고 하겠다.

## 참 고 문 헌

1. Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R: Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev* 14:690-709, 1993
2. Dobnig H, Turner RT: Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 136:3632-3638, 1995
3. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC: Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 104:439-446, 1999
4. Onyia JE, Bidwell J, Herring J, Hullman J, Hock JM: In vivo, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1-34) transiently stimulates immediate early response gene expression, but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats. *Bone* 17:479-484, 1995

5. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L: Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157:303-314, 2002
6. Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, Reddy PS, Bodine PV, Robinson JA, Bhat B, Marzolf J, Moran RA, Bex F: High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res* 18: 960-974, 2003
7. Pfeilschifter J, Laukhuf F, Müller-Beckmann B, Blum WF, Pfister T, Ziegler R: Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *J Clin Invest* 96:767-774, 1995
8. Linkhart TA, Mohan S: Parathyroid hormone stimulates release of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II from neonatal mouse calvaria in organ culture. *Endocrinology* 125:1484-1491, 1989
9. Selvamurugan N, Pulumati MR, Tyson DR, Partridge NC: Parathyroid hormone regulation of the rat collagenase-3 promoter by protein kinase A-dependent transactivation of core binding factor alpha 1. *J Biol Chem* 275:5037-5042, 2000
10. Scott DK, Brakenhoff KD, Clohisy JC, Quinn CO, Partridge NC: Parathyroid hormone induces transcription of collagenase in rat osteoblastic cells by a mechanism utilizing cAMP and requiring protein synthesis. *Mol Endocrinol* 6:2153-2159, 1992
11. Potts JT, Bringham FR, Gardella T, Nussbaum S, Segre G, Kronenberg H: Parathyroid hormone: Physiology, chemistry, biosynthesis, secretion, metabolism and mode of action. In; DeGroot LJ, ed. *Endocrinology*. 5th ed. pp.920-966, Philadelphia: WB Saunders Co, 2006
12. Radeff JM, Singh ATK, Stern PH: Role of protein kinase A, phospholipase C and phospholipase D in parathyroid hormone receptor regulation of protein kinase C alpha and interleukin-6 in UMR-106 osteoblastic cells. *Cell Signal* 16:105-114, 2004
13. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W: Functional interaction of  $\beta$ -catenin with the transcriptional factor LEF-1. *Nature* 382:638-642, 1996
14. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA: Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 116: 1202-1209, 2006
15. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Kepler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML: LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107:513-523, 2001
16. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP: High bone density due to a mutation in LDL-receptor related protein 5. *N Engl J Med* 346:1513-1521, 2002
17. Ai M, Holmen SL, Van Hul W, Williams BO, Warman ML: Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol* 25: 4946-4955, 2005
18. Bain G, Müller T, Wang X, Papkoff J: Activated  $\beta$ -catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 301:84-91, 2003
19. Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F: Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132:49-60, 2005
20. Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C: Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8:727-738, 2005
21. Kulkarni NH, Halladay DL, Miles RR, Gilbert LM, Frolik CA, Galvin RJS, Martin TJ, Gillespie MT, Onyia JE: Effects of parathyroid hormone on Wnt

- signaling pathway in bone. *J Cell Biochem* 95:1178-1190, 2005
22. Tobimatsu T, Kaji H, Sowa H, Naito J, Canaff L, Hendy GN, Sugimoto T, Chihara K: Parathyroid hormone increases  $\beta$ -catenin levels through smad3 in mouse osteoblastic cells. *Endocrinology* 147:2583-2590, 2006
23. Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D: Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res* 16:975-984, 2001
24. Hunter I, McGregor D, Robins SP: Caspase-dependent cleavage of cadherins and catenins during osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res* 16:466-477, 2001
25. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S: Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by  $\beta$ -catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem* 280:41342-41351, 2005