

골아세포에서 pH 조절계에 미치는 부갑상선호르몬의 효과

동아대학교 의과대학 정형외과학교실, 생리학교실**
부산대학교 의과대학 정형외과학교실*

이정윤 · 유충일* · 배혜란** · 김경택 · 김병환

— Abstract —

Effect of Parathyroid Hormone on the Intracellular pH Regulation of Osteoblast-like Cells

Jung-Yoon Lee, M.D., Chong-Il Yoo, M.D.*, Hae-Rhan Bae, M.D.**,
Kyung-Taek Kim, M.D., Byeong-Hwan Kim, M.D.

*Department of Orthopaedic Surgery, Physiology**, College of Medicine,
Dong-A University, and Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine,
Pusan National University*, Pusan, Korea*

Intracellular pH regulation of osteoblasts is of a great importance in the process of bone formation and resorption, and has been suggested to be mediated via intracellular Ca^{2+} and cAMP messenger systems. To elucidate the mechanism of modulation of intracellular pH by parathyroid hormone and PMA(Phorbol-12-myristate-13-acetate), effects of these agonists on the individual transporter system, $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ antiporter and $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^- (-\text{OH}^-)$ exchanger, were investigated. Intracellular pH and Ca^{2+} were measured by using the fluorescent dye BCECF and fura-2, respectively, in UMR-106 cell monolayer grown on glass coverslip. Addition of tumor promotor, PMA($1\mu\text{M}$) caused 0.14 unit pH rise of resting intracellular pH(pHi) and 38% increase of the initial rate of pHi recovery after cytosolic acid load.

Perfusion of Cl^- -free solution resulted in rapid cytosolic alkalinization of which the rate was increased 26% by preincubation of PMA.

Ca^{2+} ionophore, ionomycin ($1\mu\text{M}$) decreased resting pHi by 0.17 unit, but had no effect on the initial rate of pHi recovery after cytosolic acid load. However, the addition of ionomycin augmented the

※ 통신저자 : 김 병 환

부산시 서구 동대신동 3가 1번지

동아대학교 의과대학 정형외과학교실

※ 본 논문의 요지는 제38차 추계학술대회에서 구연되었음.

initial rate of pH_i increase after Cl^- -depletion outside the cells by 34% over the control. Stimulation of cells with parathyroid hormone(10^{-8} M) caused an initial acidification (0.27 unit) followed by cytosolic alkalization, with inhibiting effect on the initial rate of pH_i recovery after acid load (42%). But parathyroid hormone did not have any significant effect on the rate of pH_i increase after Cl^- -depletion. PMA caused a sustained increase of intracellular Ca^{2+} , of which the peak depended on the concentration of Ca^{2+} in extracellular medium. Ionomycin caused a transient increase of Ca^{2+} but PTH had no significant increase of intracellular Ca^{2+} in the concentration range of 10^{-8} M to 10^{-12} M tested. 10^{-8} M PTH increased cAMP levels by about 10-fold and 10^{-10} M PTH did by 1.6-fold. PMA, which increased cytosolic Ca^{2+} concentration, also had an stimulatory effect on cAMP production in the concentration range of 10^{-8} M to 10^{-6} M by 2-fold.

These findings suggest that in UMR-106 cells Ca^{2+} and cAMP can influence pH_i by altering the activity of pH_i regulatory transporter system, and parathyroid hormones modulate pH_i by inhibiting Na^+-H^+ antiporter via intracellular increase of cAMP, which is probably accounts for the inhibitory effect of parathyroid hormone on the proliferation of osteoblasts.

Key Words : Parathyroid hormone, Intracellular pH regulation

서 론

골아세포(osteoblast)에서 세포내 pH 조절 및 이와 동반된 주변의 국소적 세포외액의 pH 변화는 골 조직의 형성 및 흡수에 있어서 아주 중요한 역할을 담당하고 있다⁶⁾. 골형성 과정에서 collagen chain의 cross-linking 및 연이어 일어나는 hydroxyapatite의 침착은 골형성 부위의 산도가 염기성이 되어야 일어나는 과정으로서 골형성 부위의 세포외액의 pH 증가시 골형성이 증가된다고 보고하였으며¹²⁾, 또한 세포외액의 산도가 증가되면 쥐의 calvaria로부터 Ca^{2+} 유출이 증가되며 동시에 골세포로의 수소이온의 유입이 증가된다는 보고도 있다²⁾. 이러한 골형성부위의 세포외액의 산도의 변화는 결국 골아세포의 세포내 pH 조절 결과를 반영하는 것이다.

골아세포의 세포내 pH 조절에 관여하는 이온 이동계로는 Na^+ 에 의존적인 Cl^- - HCO_3^- -(OH^-) exchanger와 Na^+ 에 의존해서 일어나는 Na^+-H^+ antiporter등이 증명된 바 있다^{7,8,10)}. 골아세포에 있는 Cl^- - HCO_3^- -(OH^-) exchanger는 다른 조직에서 증명된 것과 유사한 특성을 가지는 것으로서, electroneutral한 1:1 이동을 하며 stilbene 화합물에 의해 억제되며, 가토 신장의 근위세뇨관에 존재하는 이동계와 같이 HCO_3^- 뿐만 아니라 OH^- 도 Cl^- 와 교환되는 것으로 알려져 있다. 생리적 이온의 농

도경사하에서는 세포내 HCO_3^- 와 세포외의 Cl^- 가 교환되어 골아세포는 산성화되며, 골세포외액은 HCO_3^- 분비로 염기성화 된다. 또 다른 골아세포내 pH 조절제로 알려진 Na^+-H^+ antiporter는 이론적으로 Cl^- - HCO_3^- -(OH^-) exchanger의 활성화로 골아세포내 pH가 감소되었을 때, 세포내 산성화의 결과로 활성화되어 세포내 pH를 정상범위로 올려주는데 필수적인 역할을 한다. 한편 이러한 세포내 pH 조절에 관여하는 두 이온교환계의 활성화는 세포내 주된 이차전령인 cAMP 및 Ca^{2+} 농도에 의해 조절되고 있음이 보고된 바 있다^{7,8)}.

부갑상선호르몬의 주작용은 체액의 Ca^{2+} 농도를 정상으로 유지시켜 주는 것으로서, 골조직에서는 골흡수를 증가시키고 collagen 합성을 억제한다^{26,27)}. 이는 고농도에서는 골아세포의 증식을 억제하지만^{3,18,33)} 저농도에서는 골아세포의 증식을 촉진시킨다는 보고가 있다^{13,24,25)}. 이러한 부갑상선 호르몬의 작용은 주로 세포내 cAMP 증가에 의해 매개되어 지는 것으로 알려져 있으나^{15,16,29)}, 부갑상선호르몬의 이러한 작용중 그 일부는 세포내 Ca^{2+} 농도의 변화에 의해 매개된다는 보고가 있다^{17,31,37)}.

골아세포의 model로는 rat osteosarcoma cell line인 UMR-106 세포를 사용하였는데, 이 세포는 부갑상선호르몬에 대해 cAMP 증가의 반응이 나타나고²²⁾, alkaline phosphatase 활성도가 증가되어 있으며²³⁾, 골조직에 특이적인 type I collagen만을

생성하고¹⁹⁾, calcitonin에 대한 반응은 없어 골아세포의 특징을 발현하고 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 여러가지 agonist들에 대해 다양한 이차전령의 활성을 동반함으로써 이차전령에 의한 이온교환계의 활성도 변화를 관찰하고자 하는 본 실험의 model로는 적합하다고 사료되었다.

골조직에 작용하는 대부분의 calciotropic hormone들은 골아세포에서 세포내 Ca^{2+} 농도 및 cAMP 생성에 변화를 유발시킴으로써 그 작용을 발현시킨다는 점에서 볼 때, 이러한 이차전령에 의한 이온교환계의 활성도 변화 및 이로 인해 유발되는 세포내 pH의 변화가 bone remodeling 과정을 조절하는 여러 hormone의 작용을 매개할 수 있다고 추론해 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서는 골아세포에서 세포내 Ca^{2+} 농도 및 cAMP 변화를 유발시키는 것으로 알려진 부갑상선호르몬이 골아세포의 pH 조절에 관여하는 두 이온교환계에 어떤 영향을 미치는지 관찰하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 세포배양

UMR-106 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 구입하여 7세대에서 12세대 사이의 세포를 실험에 사용하였다. 세포는 2.5×10^4 cell/cm²의 농도로 분주하여 6-well culture plate(Corning)의 각각의 well안에 담겨있는 glass coverslip(11×22mm) 위에 자라게 하였으며, 배양액으로는 5% fetal calf serum, 100μg/ml streptomycin 및 100unit/ml penicillin을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 사용하였다. 배양조건은 humidified 95%, air/5% CO₂ 환경에서 항상 37℃가 유지되도록 하였다. 세포는 분주 후 3-4일경 90%이상의 confluency를 보였으며 이때 serum-free DMEM으로 바꾸어 하루 경과된 세포를 실험에 사용하였다.

2. 세포내 pH 측정

직사각형의 glass coverslip 위에 부착되어 자란 UMR-106 세포는 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 세척한 뒤 5μM의 pH-sensitive

fluorescent dye인 2'7'-bis(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein-tetraacetomethoxy ester(BCECF/AM)를 첨가하여 37℃ 30분간 CO₂배양기 내에서 배양시켜 형광색소를 세포내 부하시켰다. 세포막에 대해 투과성이 있는 BCECF/AM형은 세포안으로 투과해 들어간 뒤 세포질에 존재하는 esterase에 의해 AM형은 pH-sensitive 형태인 BCECF 유리형이 되어 세포막을 통과할 수 없으므로 세포안에서 축적되어진다. 배양 후 coverslip은 형광색소가 없는 HBSS로 3번 세척한 뒤 특별히 제작된 coverslip holder에 끼우고 spectrofluorimeter에 있는 acryl cuvette내에 삽입시켜 excitation beam에 대하여 30°를 유지하도록 coverslip의 각도를 조정 배열하였다. BCECF의 형광도는 SPEX cation measurement system(SPEX SP-CM)을 이용하여 excitation wavelength 450nm 및 500nm, emission wavelength 530nm에서 기록하였다. Cuvette에는 실험에 따라 적합한 용액을 2ml 넣었으며, cuvette 주위는 water-jacket으로 둘러 싸여져서 실험이 진행되는 동안에는 항상 37℃가 유지되게 하였으며, magnetic stirrer 장치가 부착되어 있어 용액내 물질을 주입할 경우 순간적으로 혼합이 잘 일어날 수 있다. 또한 coverslip holder에는 perfusion system이 장착되어 있어 cuvette내 용액이 자유롭게 바뀌어질 수 있게 하였다. 실험결과는 530nm의 emission wavelength에서 450nm의 excitation wavelength의 형광도에 대한 500nm의 excitation wavelength의 형광도의 비로써 calibration하였다. 이렇게 얻은 형광도의 비(F_{500nm}/F_{450nm})는 이미 pH를 알고 있는 고농도의 K⁺을 함유하는 용액과 K⁺-H⁺ ionophore인 nigericin(10μg)을 이용하여 얻은 calibration curve로부터 실제 세포내 pH(pHi)로 전환시켜 실험의 모든 결과는 pHi로 나타내었다. Calibration curve는 pH 6.0에서부터 8.0범위내에서는 직선의 상관관계를 보였다.

3. 세포질내 산의 부하

세포내 pH는 아래 두가지 방법을 이용하여 세포질내 산을 부하시켜 세포내 pH를 감소시켰다.

1) 세포막 투과성이 높은 약산인 Na-acetate 20mM을 NaCl과 등삼투적으로 바꾼 용액에 세포를 노출시켜 약산의 비이온형이 세포안으로 투과하여

들어가게 한 뒤 세포안에서 H^+ 을 유리시킴으로써 세포질내의 산성화를 유발시켰다.

2) 세포 외부용액의 낮은 농도의 K^+ 이 존재할 때 소량의 nigericin($1\mu g/ml$)을 첨가시켜 세포내부의 높은 K^+ 과 외부의 H^+ 이 서로 교환되게 함으로써 세포질의 산성화를 유발시켰다.

4. 세포내 Ca^{2+} 농도 측정

UMR-106 세포내 Ca^{2+} 농도는 Ca^{2+} -sensitive dye 인 fura-2를 세포내 부하시켜 그 형광도를 이용하여 측정하였다. Glass coverslip에 confluent하게 자란 세포가 붙어 있는 glass coverslip을 $2\mu M$ 의 fura-2/AM으로 $37^\circ C$ 15분간 배양하여 BCECF/AM과 같은 원리로 세포내 fura-2 유리형을 부하시킨 뒤 HBSS로 3번 세척한 후 coverslip holder에 걸어 cuvette내 고정하여 상기 방법과 같이 장착하였다. Fura-2 형광도는 excitation wavelength $340nm$ 및 $380nm$, emission wavelength $505nm$ 에서 SPEX spectrofluorimeter로 측정하였다. Cuvette내 환경은 항상 $37^\circ C$ 로 유지하였고, 외부에서 물질 첨가하는 신속한 혼합이 가능하게 하였다. Fura-2 signal의 calibration은 아래와 같은 방법으로 시행하였다. 모든 실험의 종료직전 용액내 Ca 농도를 $10mM$ 로 조정 한 뒤 digitonin($50\mu g/ml$)을 첨가하여 세포를 용해시켜 최대형광도값(R_{max})을 얻었으며, $10mM$ ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tearaacetic acid(EGTA)와 $10mM$ $MnCl_2$ 를 첨가하여 최소형광도값(R_{min})을 얻었다. 저온에서 Ca^{2+} 과 fura-2의 dissociation constant(K_d)를 $220nM$ 로 간주하고¹¹⁾ emission wavelength $505nm$ 에서 excitation wavelength $380nm$ 형광도에 대한 excitation wavelength $340nm$ 에서의 형광도의 비(R)를 이용하여 세포내 Ca^{2+} 농도는 아래 공식에서 얻었다.

$$[Ca^{2+}] = K_d \times b \times \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right)$$

(단, 여기서 b 는 $380nm$ 에서 최소형광도에 대한 최대형광도의 비를 의미한다.)

Spectrofluorimeter cuvette에 첨가된 여러가지 물질들이 비특이적으로 fura-2 형광도의 변화를 유발시키는지를 확인하기 위하여 세포가 없는 상황에서 fura-2/pentapotassium salt를 함유한 용액에

서 각 물질들의 첨가로 인해 형광도가 변하는지를 관찰하였으나, 실험에 사용한 어떤 물질도 fura-2의 형광도나 autofluorescence에 유의한 변화를 유발시키지 않았다.

5. 세포내 cAMP농도 측정

세포내 cAMP농도의 측정은 6 well culture plate에서 시행하였는데, confluent하게 배양된 세포는 HBSS로 세척하고, PTH, PMA, forskolin 및 vehicle(control)을 첨가하여 $37^\circ C$ 에서 15분간 배양시켰다. 배양종료 후 배양액을 제거하고 ice-cold HBSS로 세척하고 6% trichloroacetic acid를 첨가시켜 cell monolayer로 부터 cAMP를 추출하였다. Cell layer는 $4^\circ C$ 에서 2시간동안 보존하고³⁰⁾, ethanol extract는 glass tube로 옮겨 질소를 이용하여 수분을 증발시켜 얻은 건조된 extract는 assay이전까지 $-60^\circ C$ 에서 보관하였다. Assay직전 pH 6.2의 sodium acetate buffer로 extract를 용해시켰으며, cAMP assay는 cAMP의 ^{125}I -succinyltyrosine ester(ICN)을 이용한 radioimmunoassay방법을 사용하였다³²⁾. 실험결과는 well 당 cAMP의 picomole농도로 나타내었다.

6. 용액 및 시약

세포내 pH측정시 사용한 NaCl용액(solution A)의 조성은 다음과 같다(단위 mM) : NaCl 140, KCl 4, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 1.5, HEPES/Tris 10, glucose 5(pH 7.4). Na-gluconate용액(solution B)의 조성은 Na-gluconate 140, K-gluconate 4, $MgSO_4$ 1, $CaSO_4$ 1.5, HEPES/Tris 10, glucose 5(pH 7.4)이고, K-gluconate용액(solution C)은 Na-gluconate 대신 K-gluconate로 바뀐 위와 같은 조성의 용액을 사용하였다. 세포내 Ca^{2+} 농도 측정에 사용된 용액(solution D)은 solution A에 bovine serum albumin 0.1%를 첨가하여 사용하였다.

BCECF/AM, fura-2/AM, fura-2/pentapotassium salt 및 ethylisopropyl amiloride(EIPA)는 Molecular Probe사의 제품을 이용하였고, 기타 PTH(parathyroid hormone), PMA(phorbol-12-myristate-13-acetate), DIDS(4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene disulfonic acid),

TMA(tetramethyl ammonium), ionomycin, staurosporine 등 특수시약 및 기타 일반시약은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

실험 결과

1. 부갑상선호르몬이 안정상태의 세포내 pH에 미치는 영향

Glass coverslip에 자라게 하여 BCECF를 부하시킨 UMR-106 세포에서 안정상태의 세포내 pH를 1.5mM CaCl_2 를 함유한 용액(solution A)에서 측정된 결과 7.32 ± 0.10 unit였다. 정상 안정상태의 세포내 pH범위에서도 여러 촉진제들에 의해 세포내 pH조절계가 활성화되어 세포내 산도가 변화되는지를 알아보기 위해 여러가지 촉진제를 외부용액에 첨가시킨 후 세포내 pH변화 양상을 관찰하였던 바 그림 1에서와 같이 10^{-8} M 부갑상선호르몬 첨가시 세포내 pH는 초기에 0.27 ± 0.06 unit까지 감소를 보이다가 서서히 정상 pH로 회복되는 양상을 보였다(그림 1a). 반면 tumor promotor로서 protein kinase C를 활성화시키는 것으로 알려진 PMA $1\mu\text{M}$ 첨가한 경우 세포의 pH는 0.14 ± 0.03 unit 증가되었으며(그림 1b), Ca^{2+} ionophore인 ionomycin $1\mu\text{M}$ 첨가시 세포내 pH는 0.17 ± 0.02 unit 감소되었다(그림 1c).

여러 촉진제들의 첨가시 관찰된 안정상태의 세포내 pH변화가 세포내 pH조절계 중 어떤 이동계를 매개하여 유발된 것인지를 알아보기 위해 Na^+-H^+ antiporter억제제인 EIPA와 $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-(-\text{OH}^-)$ exchanger억제제인 DIDS가 위에서 사용한 촉진제에 의해 유발되는 세포내 pH변화에 미치는 효과를 관찰하였다. 부갑상선호르몬 첨가시 관찰되었던 초기의 산성화 현상은 $500\mu\text{M}$ 의 DIDS나 $100\mu\text{M}$ 의 EIPA에 의하여 억제되지 않았으나 초기 산성화에 연이어 나타나는 세포내 pH 회복반응은 EIPA에 의해 완전히 억제되었다(그림 2a). 더욱이 EIPA 존재시 초기의 산성화 현상은 더욱 증강되는 양상을 보였다. PMA에 의해 유발된 세포의 염기성화 현상은 EIPA에 의해 완전히 회복되었으며(그림 2b), ionomycin에 의한 세포내 산성화 현상은 DIDS에 의해 억제되었다(그림 2c). 이상의 결과는 PMA에 의한

세포의 염기성화 현상은 세포내 pH 조절계 중 Na^+-H^+ antiporter의 활성도 증가에 의한 것이며, ionomycin에 의한 산성화 현상은 $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-(-\text{OH}^-)$ exchanger 활성도 증가에 기인된 것임을 의미한다.

2. 부갑상선호르몬이 Na^+-H^+ antiporter의 활성에 미치는 영향

부갑상선호르몬에 의한 안정상태의 세포내 pH변화에 대한 기전을 규명하고자 골아세포내 pH조절계를 구분하여 각각에 대한 부갑상선호르몬의 영향을 관찰하였다. 세포내 pH가 감소되면 활성화되는 Na^+-H^+ antiporter에 대한 효과를 알아보기 위해 Na^+-H^+ ionophore인 nigericin을 이용하거나, 약산인 Na acetate를 이용하여 세포내 산을 부하시킨

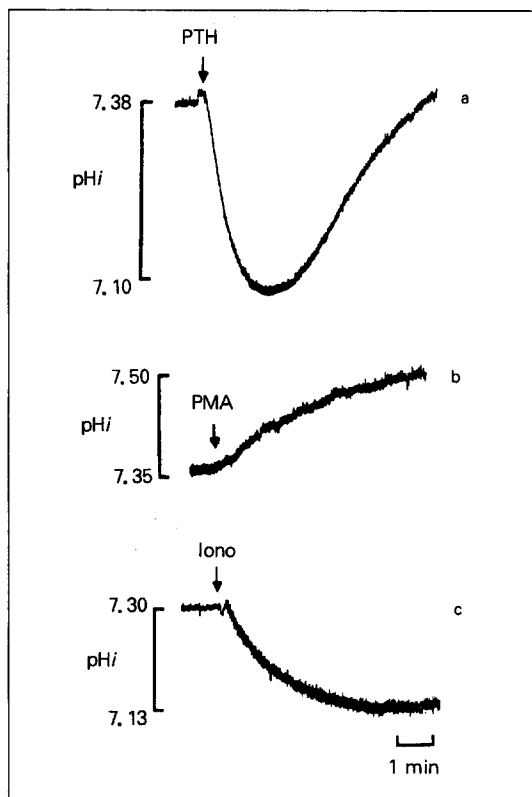


Fig. 1. Effects of PTH, PMA and ionomycin on resting pH_i in UMR-106 cells. Cells grown on glass coverslip were loaded with $5\mu\text{M}$ BCECF and incubated in solution A. After the addition of 10^{-8} M PTH (a), $1\mu\text{M}$ PMA (b) or $1\mu\text{M}$ ionomycin (c), changes of pH_i were recorded.

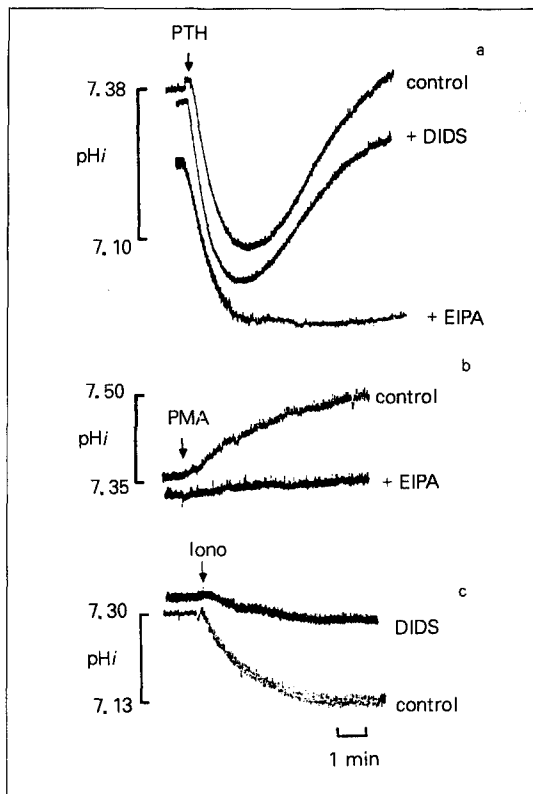


Fig. 2. Effects of DIDS and EIPA on the agonists induced pH_i change in UMR-106 cells. Cells grown on glass coverslip were loaded with 5 μM BCECF and incubated in solution A. 500 μM DIDS or 100 μM EIPA was added before the additions of $10^{-8} M$ PTH (a), 1 μM PMA (b) and 1 μM ionomycin (c).

뒤 상기 촉진제 존재시 산부하 후의 세포내 pH회복 속도를 비교 관찰하여 그림 3과 4에 나타내었다. 그림 3에서와 같이 nigericin(1 $\mu g/ml$) 첨가로 세포내 pH는 급격히 감소된 뒤 이전의 pH범위로 서서히 회복되는 양상을 보였다. Nigericin을 이용한 세포질내 산의 부하시 세포내 pH는 6.61 ± 0.09 unit로 감소되었다. 산부하 후 관찰되는 세포내 pH회복은 EIPA에 의해 억제됨으로써 pH회복에 관여하는 이온이동체는 Na^+-H^+ antiporter임을 확인하였다. 부갑상선호르몬으로 5분 전처치한 경우 산부하 후 pH회복속도는 42% 감소되었으며, PMA 전처치시 pH회복속도는 38% 증가되었다. PMA에 의해 증가된 Na^+-H^+ antiporter의 활성은 protein kinase C 억제제인 staurosporine에 의해 억제되었다. 한

편 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키는 Ca^{2+} ionophore인 ionomycin 처리는 Na^+-H^+ antiporter 활성화에 유의한 영향을 미치지 않았다(data not shown). 그림 4에서는 세포내 산부하의 또 다른 방법으로 20mM Na acetate를 함유한 용액으로 바꾼 뒤 세포내 pH가 회복되는 양상을 관찰한 것으로, Na acetate 첨가시 세포내 pH는 0.43 unit까지 감소된 후 서서히 정상 pH로 회복되었는데 이러한 산부하 후 pH회복은 외부용액의 Na를 TMA로 치환시켜 고갈시킨 경우 완전히 억제되었다. 부갑상선호르몬 전처치시 pH회복속도는 감소되었고, PMA 전처치시는 증가되었으며, 그 억제 및 증가 정도는 nigericin에 의한 산부하와 유사한 양상을 보였다.

3. 부갑상선호르몬이 $Cl^-HCO_3^-(-OH^-)$ exchanger에 미치는 영향

부갑상선호르몬이 골아세포에 존재하는 또 다른 pH조절계인 $Cl^-HCO_3^-(-OH^-)$ exchanger 활성화에는 어떤 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 세포 외부용액의 Cl^- 를 gluconate로 바꾸어 Cl^- 농도경사를 내부에서 외부로 향하게 하여 $Cl^-HCO_3^-(-OH^-)$ exchanger를 역방향으로 작용시키면 세포 내부의 Cl^- 가 세포 외부의 OH^- 혹은 HCO_3^- 와 교환되게 됨으로써 세포내부의 pH가 증가되는데 이때의 pH 증가속도를 비교 관찰하였다(그림 5). Cl^- 가 없는 용액(solution B, C)으로 관류시킨 후 관찰되는 세포내 pH 증가효과는 DIDS에 의해 억제되었으며, 용액내 HCO_3^- 존재시 pH 증가속도는 더욱 향진되었다. 부갑상선호르몬 전처치시 pH 증가속도는 유의한 변화가 관찰되지 않았으나(data not shown), PMA 및 ionomycin 처리시 pH 증가속도는 각각 26% 및 34%로 증가되었다.

4. 부갑상선호르몬이 세포내 Ca^{2+} 에 미치는 영향

이상의 실험에서 부갑상선호르몬은 Na^+-H^+ antiporter 활성을 억제시켰으며, ionomycin은 $Cl^-HCO_3^-(-OH^-)$ exchanger의 활성을 증가시켰으며 PMA는 이들의 활성도를 증가시켰다. 이러한 촉진제들의 pH조절계에 대한 효과는 어떤 이차전령을 매개로 하여 유발되는지를 알아보기 위하여 여러 촉진제 자극 후 주된 이차전령이 세포내 cAMP 농도와 Ca^{2+} 농도의 변화를 측정하였다. 그림 6은 여러 촉진

제 처리 후 관찰되는 세포내 Ca^{2+} 농도의 변화를 fura-2로 측정한 것이다. 안정상태에서 측정된 UMR-106 세포내 Ca^{2+} 농도는 $105 \pm 32 \text{ nM}$ 이었다

($n=10$). Ca^{2+} ionophore인 ionomycin($1 \mu\text{M}$)을 처리시 세포내 Ca^{2+} 농도는 일시적인 증가($592 \pm 54 \text{ nM}$, $n=5$) 서서히 감소되었는데, peak의 크기는 세포외

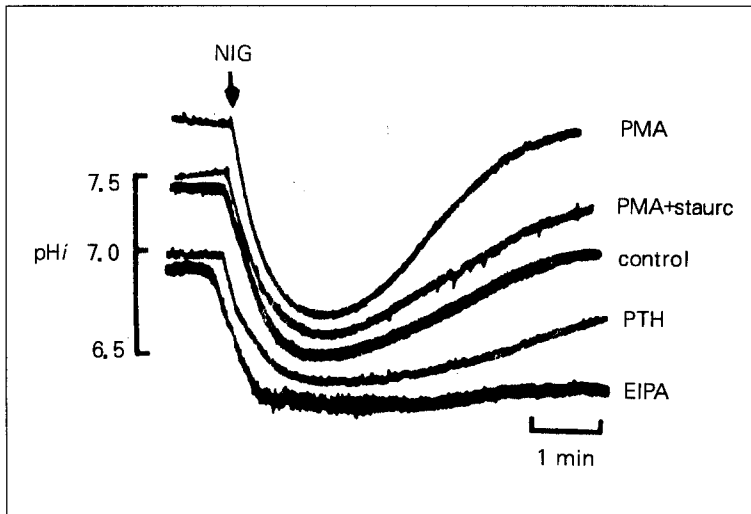


Fig. 3. Effects of PTH and PMA on nigericin induced cytosolic acidification in UMR-106 cells. Cells grown on glass coverslip were loaded with $5 \mu\text{M}$ BCECF and incubated in solution A. After cells were preincubated with 10^{-8} M PTH or $1 \mu\text{M}$ PMA, 1 mg/ml nigericin was added to load acid in cytosol. Staurosporine ($100 \mu\text{M}$) was added 5 min prior to PMA treatment.

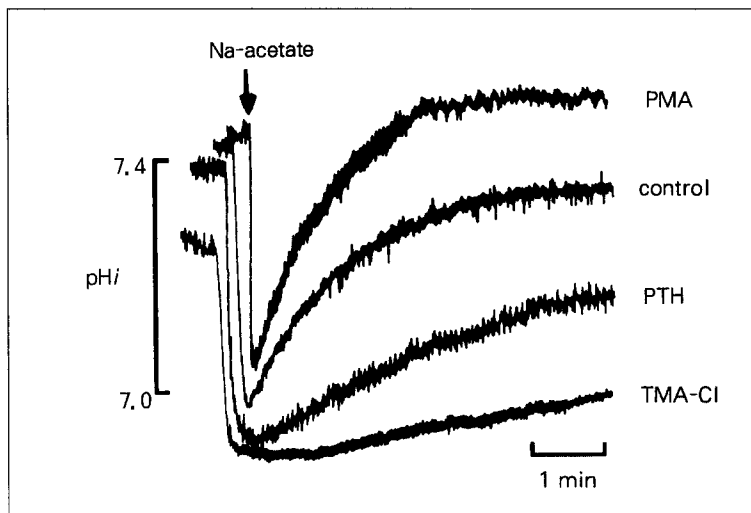


Fig. 4. Effects of PTH and PMA on Na-acetate induced cytosolic acidification in UMR-106 cells. Cells grown on glass coverslip were loaded with $5 \mu\text{M}$ BCECF and incubated in solution A. After cells were preincubated with 10^{-8} M PTH or $1 \mu\text{M}$ PMA, solution A was replaced with the same solution but containing 20 mM Na-acetate.

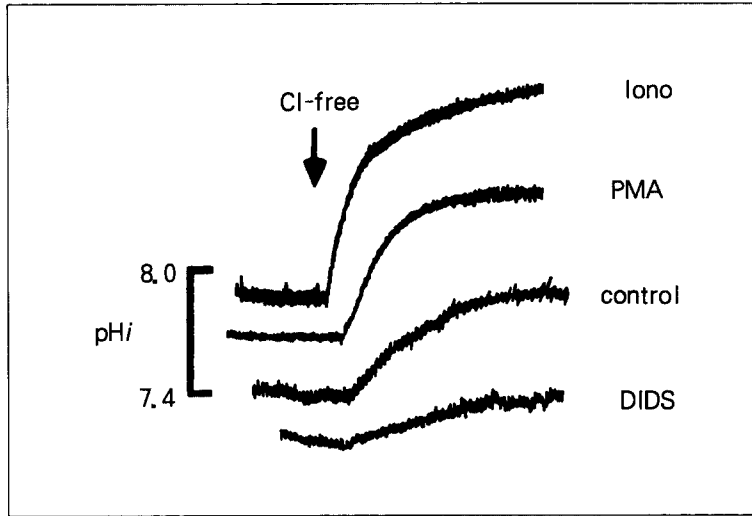


Fig. 5. Effects of PTH and PMA and ionomycin on the rate of cytosolic alkalization after extracellular Cl^- -depletion in UMR-106 cells. Cells grown on glass coverslip were loaded with $5\mu\text{M}$ BCECF and incubated in solution A. After cells were preincubated with 10^{-8}M PTH or $1\mu\text{M}$ PMA. Solution A was replaced with solution B.

Table 1. Effects of PTH and PMA on cAMP production

	cAMP(pmol/well)
Control	2.085 ± 0.086
PTH, 10^{-8}M	$20.062 \pm 0.265^*$
PTH, 10^{-10}M	$3.462 \pm 0.050^*$
PMA, 10^{-6}M	$4.178 \pm 0.088^*$
PMA, 10^{-5}M	$4.469 \pm 0.078^*$
Forskolin, 10^{-6}M	$5.011 \pm 0.099^*$

Data are mean \pm S.D. of e separte experiments.

* significantly different from the control value at 5% level

부의 Ca^{2+} 농도에 비례하여 증가되는 양상을 보였다 (그림 6b, c). 부갑상선호르몬의 농도를 10^{-12}M 에서부터 10^{-6}M 까지 증가시켜 보면 세포내 Ca^{2+} 농도 변화를 측정하였으나 시행한 어느 농도에서도 유의성 있는 세포내 Ca^{2+} 증가는 관찰되지 않았다(그림 6d, e)

5. 부갑상선호르몬이 세포내 cAMP농도에 미치는 효과

부갑상선호르몬 및 기타 촉진제들의 pH조절제에

대한 효과가 세포내 주된 이차전령이 cAMP 농도증가를 매개로 하여 나타나는지를 확인해 보기 위하여 여러 촉진제 처리 후 세포내 cAMP 농도 변화를 관찰하였다. 그 결과 표 1에서와 같이 부갑상선호르몬 10^{-8}M 농도에서 대조군에 비해 약 10배, 10^{-10}M 농도에서는 약 1.6배 cAMP 생성을 증가시켰다. 한편 세포내 Ca^{2+} 을 증가시켰던 PMA는 10^{-6}M 에서 10^{-5}M 농도 범위에서 cAMP 생성을 약 2배정도 증가시키는 것으로 나타났다.

고 찰

본 연구 결과 골아세포에서 세포내 Ca^{2+} , cAMP 및 protein kinase C 활성은 세포내 pH조절에 관여하는 Na^+-H^+ antiporter 및 $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-(-\text{OH}^-)$ exchanger의 활성을 조절함으로써 세포내 pH를 변화시킬 수 있었다. Na^+-H^+ antiporter의 활성은 PTH에 의해 억제되었으나, PMA에 의해 촉진되었으며, $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-(-\text{OH}^-)$ exchanger의 활성은 Ca^{2+} 증가시 촉진되는 효과를 가져왔다. 부갑상선호르몬은 세포내 cAMP증가를 매개로 하여 Na^+-H^+ antiporter를 억제시켜 세포내 pH를 감소시키는 작

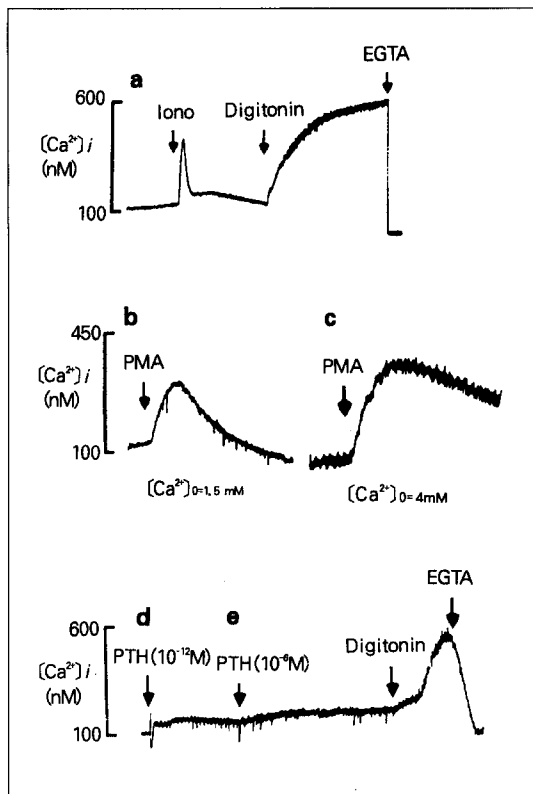


Fig. 6. Effects of ionomycin, PMA, and PTH on the $[Ca^{2+}]_i$ in UMR-106 cells. After cells grown on glass coverslip were loaded with $2\mu M$ fura-2 and transferred in cuvette containing solution D, $1\mu M$ PTH, $1\mu M$ PMA or $1\mu M$ ionomycin was added. In the end of each experiment, digitonin ($50\mu M/ml$) and $10mM$ EGTA with $10mM$ $MnCl_2$ were added sequentially.

용이 있었으며, PMA는 protein kinase C 활성화 및 세포내 Ca^{2+} 증가를 매개로 하여 Na^+-H^+ antiporter 및 $Cl^-HCO_3^-(-OH^-)$ exchanger를 활성화 시키는 효과가 있어, 전반적으로는 세포내 pH를 증가시키는 작용이 있었다. 한편, Ca^{2+} ionophore인 ionomycin 첨가시 나타나는 세포내 pH 감소 현상은 세포내 Ca^{2+} 증가로 인한 $Cl^-HCO_3^-(-OH^-)$ exchanger의 활성화에 의한 것으로 생각된다.

최근 몇몇의 보고에서 부갑상선호르몬은 골아세포에서 세포내 Ca^{2+} 을 동원시켜 그 작용을 발현시킨다고 주장하고 있으며^{4, 28, 31, 37}, 또 다른 보고에서는 부갑상선호르몬의 Ca^{2+} 증가효과는 osteoblast에서 관찰되지 않았다고 반박함으로써¹¹ 이 분야에 대해서는

아직 논란의 여지가 많다. 본 실험에서는 부갑상선호르몬의 Ca^{2+} 동원에 대한 효과를 $10^{-6}M$ 에서부터 $10^{-12}M$ 농도 범위에서 관찰하여 보았으나 유의성이 없는 미약한 증가만 관찰되었을 뿐 ionomycin 처리시 관찰되는 일시적인 Ca^{2+} peak나 PMA 처리시와 같은 지속적인 Ca^{2+} 증가는 관찰되지 않았다. 현재까지 보고된 연구에서의 Ca^{2+} 측정은 시료로 cell suspension 상태를 사용하였거나^{28, 36, 37}, coverslip에 부착된 세포를 사용한 경우는 single excitation wavelength에서 quin-2나 fura-2의 형광도를 측정하는 것이었다^{1, 31}. 세포를 suspension 상태로 만들기 위해서는 trypsin을 처리하여야만 dish에 붙은 세포를 떼 수 있기 때문에 trypsin 사용은 세포막의 단백질 성분인 receptor, channel 및 ion transporter 등의 변성을 초래할 수 있으므로 정확한 생리학적 상태에서의 성적을 기대할 수 없다. 그 뿐만 아니라 cell suspension시에는 magnetic stirring 등의 물리적 자극만으로도 세포내 Ca^{2+} 이 증가될 수 있다. 또한 Ca^{2+} signal 측정에 있어서 quin-2의 사용은 형광색소 자체의 여러 결함들로 인해 문제시될 수 있다. Quin-2의 excitation wavelength가 짧아서 세포로 인해 발생하는 autofluorescence가 문제시될 수 있으며, excitation coefficient와 quantum yield가 너무 적어서 상대적으로 다량의 색소의 사용이 요구되는데 다량의 색소는 그 자체가 세포내 Ca^{2+} 변화를 완충시킬 수 있으며, 또한 excitation wavelength와 emission wavelength의 차이가 적어 여러가지 실험조건에 따라 영향을 받을 수 있는 등의 정확한 세포내 Ca^{2+} 측정을 기대할 수 없었다. 이런 결점을 보완하여 개발된 fura-2는 $340nm$ 및 $380nm$ 의 dual excitation wavelength에서 측정하여야만 물질 주입으로 인한 비특이적 형광도의 변화등 많은 artifact를 보완할 수 있도록 고안되어 있으므로 fura-2의 형광도를 single excitation wavelength에 측정한 경우 그 성적에 있어서 신뢰도가 떨어지게 된다. 본 실험에서 trypsin을 처리하지 않는 coverslip 위에 자란 세포가 실험의 모든 과정동안 온전하게 붙어 있는 상태에서 fura-2 색소를 이용하여 dual excitation wavelength에서 측정하는 것이므로 상기 방법들에 있어서 문제점은 배제시킬 수 있다고 본다. 따라서 본 실험결과 UMR-106 세포에서 부갑상선호르몬은 세포내 cAMP 증

가만을 매개로 하여 그 작용이 나타나는 것으로 사료된다.

본 실험에서 세포내 cAMP 증가는 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter의 활성을 감소시켰는데 이와 유사한 효과가 여러 osteoblast cell line에서 보고된 바 있으며^{7,28)}, 이러한 효과는 다른 조직에서도 찾아 볼 수 있는데, 신장에 있는 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter에 대한 cAMP의 작용과 유사하다고 할 수 있다^{14,20)}. 신장근 위세뇨관에서 분리한 brush border vesicle 실험에서 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter는 PTH 및 dibutyryl cAMP에 의해 모두 억제되었으며¹⁰⁾, 이러한 cAMP의 작용은 cAMP-dependent kinase의 활성화로 plasma membrane protein을 인산화시킴으로써 발현된다고 보고하였다²⁴⁾.

Tumor promotor인 PMA는 protein kinase C를 활성화시키며 세포내 Ca^{2+} 을 동원시키는 작용이 있음이 알려져 있다¹⁰⁾. 골아세포에서 PMA 효과에 대한 실험에 있어서 Green등⁹⁾은 PMA가 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter에는 활성화시키는 효과가 없는 것으로 보고하였고, Graham과 Tashjian⁵⁾은 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter를 활성화시키는 효과를 관찰하였다는 상반된 보고를 한 바 있다. 본 실험에서 PMA는 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter를 활성화시켰는데 이러한 효과는 세포내 Ca^{2+} 을 매개하기 보다는 protein kinase C 활성을 매개로 하여 나타나는 것으로 보이는데, 그 이유는 세포내 Ca^{2+} 을 증가시키는 ionomycin에 의해서는 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter의 활성효과를 관찰할 수 없었고, 또한 PMA에 의한 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter의 활성화 효과는 protein kinase C 억제제인 staurosporine에 의해 억제되었기 때문이다. 한편, PMA는 세포내 Ca^{2+} 증가의 효과를 매개하여 $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-(-\text{OH}^-)$ exchanger를 활성화시켜 세포내 pH를 감소시키는 효과도 있는 것으로 보이나, 전반적으로는 protein kinase C 활성화로 인한 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter 활성화도 증가 효과가 더욱 우세함으로써 세포내 pH를 증가시키는 방향으로 작용하는 것으로 사료된다.

본 실험에서 부갑상선호르몬은 골아세포에서 세포내 cAMP를 증가시키며 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter의 활성을 억제시킴으로써 세포내 pH를 감소시키는 효과가 관찰되었다. 부갑상선호르몬이 골아세포의 증식에 미치는 효과에 대해서는 서로 상반된 보고들이

있다. Reid등²⁸⁾과 Partridge등²⁴⁾은 부갑상선호르몬이 골아세포에서 thymidine incorporation을 감소시킨다고 하였으나 태아쥐³⁾, 병아리³⁵⁾ 및 사람¹⁸⁾에서 분리한 골아세포에서는 부갑상선호르몬이 thymidine incorporation을 촉진시키는 효과가 있다고 하였다. 한편 Owen²¹⁾은 부갑상선호르몬이 골아세포의 증식을 억제하지만 파골세포의 증식은 촉진시킨다고 보고하였다. 현재까지 부갑상선호르몬에 의한 세포내 pH감소효과와 thymidine incorporation과의 관련성은 확실히 밝혀지지는 않았으나, 대부분의 growth factors들의 성장촉진 효과는 세포내 pH를 증가시킴으로써 DNA 및 protein 합성을 증가시킨다는 직접적인 연관성을 고려해 볼 때, 본 실험에서 관찰된 부갑상선호르몬의 세포내 pH감소효과는 결국 골아세포의 증식억제와 관련이 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서 골아세포에 있는 세포내 pH조절계는 세포내 cAMP와 Ca^{2+} 에 의해 그 활성이 조절됨이 관찰되었다. 향후 골조직에 작용하는 여러 calcitropic hormone들(PTH, prostaglandin, 1,25(OH)₂D₃등)은 세포내 어떤 이차전령을 통해 세포내 pH를 변화시켜 골아세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

골아세포에서 세포내 pH조절은 골형성 및 흡수 과정에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있으며, 이러한 pH조절은 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter와 $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-(-\text{OH}^-)$ exchanger에 의하여 수행된다. 본 실험은 골조직에 작용하는 주된 호르몬인 부갑상선호르몬이 세포내 pH조절에 미치는 효과와 이를 매개하는 이차전령을 밝히고자 부갑상선호르몬은 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter와 $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-(-\text{OH}^-)$ exchanger 활성화 및 세포내 cAMP와 Ca^{2+} 농도에 미치는 효과를 관찰하였다. Glass coverslip에 증식시킨 UMR-106 세포에서 세포내 pH 및 Ca^{2+} 농도는 BCECF와 fura-2의 형광도를 이용하여 측정하였다. Tumor promotor인 PMA 첨가시 (1 μM) 안정상태의 세포내 pH는 0.14unit 증가되었으며 산부하 후 pH회복속도($\text{Na}^+\text{-H}^+$ antiporter의 활성화도)를 38% 증가시켰으며, 외부 용액의 Cl^- 제거 후 pH 증가속도(Cl^-

$\text{HCO}_3^-(-\text{OH}^-)$ exchanger 활성도를 26% 증가시켰다. Ca^{2+} ionophore인 ionomycin 처리시($1\mu\text{M}$) 안정시 pH는 0.17unit 감소하였으며 $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-(-\text{OH}^-)$ exchanger 활성도를 34% 증가시켰으나 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ antiporter의 활성도에는 유의한 효과가 없었다. 부갑상선호르몬의 첨가시 (10^{-8}M) 초기의 산성화 현상(0.27unit)과 pH 회복효과를 관찰할 수 있었고, $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ antiporter 활성도를 42% 억제시켰으나 $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-(-\text{OH}^-)$ exchanger의 활성에는 유의한 효과가 없었다. 여러 촉진제 처리 후 세포내 Ca^{2+} 농도를 측정한 결과 PMA는 외부 용액의 Ca^{2+} 농도는 비례하여 지속적으로 증가되는 세포내 Ca^{2+} 농도를 유발시켰고, ionomycin 첨가시는 세포내 Ca^{2+} 농도의 일시적 증가가 관찰되었다. 그러나 부갑상선호르몬은 10^{-12}M 에서 10^{-6}M 농도 범위에서 유의한 세포내 Ca^{2+} 농도 변화를 유발시키지 못하였다. 여러 촉진제 처리 후 세포내 cAMP 농도 변화를 관찰한 결과, 부갑상선호르몬 10^{-8}M 농도에서 대조군에 비해 약 10배, 10^{-10}M 농도에서 약 1.6배 cAMP 생성을 증가시켰으며, 세포내 Ca^{2+} 를 증가시켰던 PMA는 $1\mu\text{M}$ 부터 $10\mu\text{M}$ 농도 범위까지 cAMP 생성을 약 2배 정도 증가시키는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하면, UMR-106 세포에서 세포내 Ca^{2+} , cAMP 및 protein kinase C의 활성은 세포내 pH조절에 관여하는 이온교환계를 조절함으로써 pH를 조절할 수 있으며, 부갑상선호르몬은 세포내 cAMP를 매개로 하여 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ antiporter의 활성을 감소시킴으로써 골아세포의 증식 억제효과를 초래할 수 있음을 시사한다.

REFERENCES

- 1) Boland CJ, Fried RM and Tashjian AH : Measurement of cytosolic free Ca^{2+} concentration in human and rat osteosarcoma cells : Action of bone resorption-stimulating hormones. *Endocrinology*, 118:980-989, 1986.
- 2) Bushinsky DA, Krieger NS, Geisser DI, Grossman EB and Coc FL : Effects of pH on bone calcium and proton fluxes in vitro. *Am J Physiol*, 245:F204-F209, 1983.
- 3) Debartolo TF, Pegg LE, Shasserre C and Hahn TJ : Comparison of parathyroid hormone and calci-

- um ionophore A23187 effects on bone resorption and nucleic acid synthesis in cultured fetal rat bone. *Calcif Tissue Int*, 34:495-500, 1982.
- 4) Donahue HJ, Fryer MJ, Eriksen EF and Heath H : Differential effects of parathyroid hormone and its analogues on cytosolic calcium ion and cAMP levels in cultured rat osteoblast-like cells. *J Biol Chem*, 263:13522-13527, 1988.
- 5) Graham CS and Tashjian AH : Mechanisms of activation of Na^+/H^+ exchange in human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Biochem J*, 288:137-143, 1992.
- 6) Green J and Kleeman CR : Role of bone in regulation of systemic acid-base balance. *Kidney Intl*, 39:9-26, 1991.
- 7) Green J and Kleeman CR : Role of calcium and cAMP messenger systems in intracellular pH regulation of osteoblastic cells. *Am J Physiol*, 262:111-121, 1992.
- 8) Green J, Kleeman CR, Schotland S and Ye LH : $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ blunts hormone-elevated cytosolic Ca^{2+} in osteoblast-like cells. *Am J Physiol*, 263:1070-1076, 1992.
- 9) Green J, Yamaguchi DT, Kleeman CR and Muallem S : Cytosolic pH regulation in osteoblasts. Interaction of Na^+ and H^+ with the extracellular and intracellular faces of the Na^+/H^+ exchanger. *J Gen Physiol*, 95:121-145, 1988.
- 10) Green J, Yamaguchi DT, Kleeman CR and Muallem S : Regulation of anion exchange by intracellular pH and Ca^{2+} ions. *J Gen Physiol*, 95:121-145, 1990.
- 11) Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY : A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260:3440-3460, 1986.
- 12) Harris ED, Gonnerman WA, Savage JE, and O'Dell BL : connective tissues amine oxidase. II. Purification and partial characterization of lysyl oxidase from chick aorta. *Biochim Biophys Acta*, 341:332-335, 1974.
- 13) Jones SJ and Boyde A : Experimental study of changes in osteoblastic shape induced by calcitonin and parathyroid extract in an organ culture system. *Cell Tissue Res*, 169:449-465, 1976.
- 14) Kahn AH, Dolson GM, Hise MK, Bennett SC and Weinman EJ : Parathyroid hormone and dibutyryl cAMP inhibit Na^+/H^+ exchange in renal brush border vesicles. *Am J Physiol*, 248:F212-F218, 1985.

- 15) **Kano J, Sugimoto T, Fukase M and Fujita T** : The activation of cAMP-dependent protein kinase is directly to the regulation of osteoblast proliferation(UMR_106) by parathyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun*, 177:365-369, 1991a.
- 16) **Kano J, Sugimoto T, Fukase M and Fujita T** : The activation of cAMP-dependent protein kinase is directly linked to the inhibition of osteoblast proliferation(UMR-106) by parathyroid hormone-related protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 179:97-101, 1991b.
- 17) **Lowik CWGM, van Leeuwen JPTM, van der Meer JM, van Zeeland JK, Scheven BAA, and Herrmann-Erless MPM** : A two-receptor model for the action of parathyroid hormone on osteoblast ; a role for intracellular free calcium and cAMP. *Cell calcium*, 6:311-326, 1985.
- 18) **MacDonald BR, Gallagher JA and Russel RGG** : Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone. *Endocrinology*, 118:2445-2449, 1986.
- 19) **Martin TJ, Ingleton PM, Unerwood JCE, Michelangeli VP and Hunt HH** : Parathyroid hormone responsive adenylate cyclase in induced transplantable osteogenic rat sarcoma. *Nature*, 260:436-438, 1976.
- 20) **Miller RT, and Pollock AS** : Modification of the internal pH sensitivity of the Na⁺/H⁺ antiporter by parathyroid hormone in a cultured renal cell line. *J Biol Chem*, 262:9115-9120, 1987.
- 21) **Owen M** : Cellular dynamics of bone. In : The biochemistry and Physiology of Bone, edited by Bourne GH. New York : Academic press pp. 271-298, 1971.
- 22) **Partridge NC, Alcon D, Michelangeli VP, Kemp BE, Ryan GB and Martin TJ** : Functional properties of hormonally responsive cultured normal and malignant rat osteoblastic cells. *Endocrinology*, 108: 213-219, 1981.
- 23) **Partridge NC, Alcon D, Michelangeli VP, Ryan GB and Martin TJ** : Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. *Cancer Research*, 43: 4308-4312, 1983.
- 24) **Partridge NC, Dickson CA, Kopp K, Teitelbaum SL, Crouch EC and Kahn AJ** : Parathyroid hormone inhibits collagen synthesis at both ribonucleic acid and protein levels in rat osteogenic sarcoma cells. *Molecular Endocrinology*, 3:232-239, 1989.
- 25) **Partridge NC, Opie AL, Opie RT and Martin TJ** : Inhibitory effects of parathyroid hormone on growth of osteogenic sarcoma cells. *Calcif Tissue Int*, 37:519-525, 1985.
- 26) **Pun KK** : The importance of parathyroid hormone in inhibition of collagen synthesis and mitogenesis of osteoblastic cell. *J Biochem*, 106:1090-1093, 1989.
- 27) **Raisz LG, Lorenzo JG, Gworek S, Cream B and Rosenblatt M** : Comparison of the effects of a potent synthetic analog of bovine parathyroid hormone with native bPTH-(1-84) and synthetic bPTH-(1-34) on bone resorption and collagen synthesis. *Calcif Tissue Int*, 29:215-218, 1979.
- 28) **Reid IR, Civitelli R, Avioli LV and Hruska KA** : Parathyroid hormone depresses cytosolic pH and DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Am J Physiol*, 255:E9-E15, 1987.
- 29) **Rosen DM and Luben RA** : Multiple hormonal mechanisms for the control of collagen synthesis in an osteoblast-like cell line, MMB-1. *Endocrinology*, 112:992-999, 1983.
- 30) **Rovey PG and Termine JD** : Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int*, 37:453-460, 1985.
- 31) **Schöfl C, Roy Cuthbertson KS, Gallagher Pennington SR, Cobbold PH, Brabant G, Hesch RD and von zur Muhlen A** : Measurement of intracellular Ca²⁺ in single aequorin-injected and suspensions of fura-2 loaded ROS 17/2.8 cells and normal human osteoblasts. *Biochem J*, 274:15-20, 1991.
- 32) **Torikai S, Wang MS, Klein KL and Kurokawa K** : Adenylate cyclase and cell cyclic AMP of rat cortical thick ascending limb of Henle. *Kidney Int*, 20: 649-654, 1981.
- 33) **Van der Plas AJ, Feyen HM and Nijweide PJ** : Direct effect of parathyroid hormone on the proliferation of osteoblast-like cells : a possible involvement of cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 129:918-925, 1985.
- 34) **Weinman EJ and Hise M** : cAMP-protein kinase and Na⁺/H⁺ exchange in rabbit apical membrane vesicle (Abstract). *Kidney Int*, 29:378, 1986.
- 35) **Wharton WE, Leof B, Olashaw N, Earp HS and Pledger WJ** : increase in cyclic AMP potentiate competence formation in BALB/c-373 cells. *J Cell Physiol*, 111:201-206, 1982.
- 36) **Yamaguchi DT, Hahn TJ, Becker TG, Kleeman CR and Muallem S** : Relationship of cAMP and

calcium messenger systems in prostaglandin-stimulated UMR-106 cells. *J Biol Chem*, 263:10745-10753, 1988.

37) **Yamaguchi DT, Hahn TJ, Iida-Klein A, Kleeman**

CR and Muallem S : Parathyroid hormone-activated calcium channels in an osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line. *J Biol Chem*, 262:7711-7718, 1987.