

조골 세포의 신호전달 기전

김성진*

경희대학교 치과대학 약리학 교실

Signal Transduction in the Osteoblast Cells

Sung-Jin KIM

Department of Pharmacology, School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul, Korea

(Received December 1, 1999; accepted December 22, 1999)

Abstract – Recently, cellular signal transduction mechanisms are greatly understood. However, bone cell signaling is not completely characterized. Interestingly, bone cells synthesize a number of growth factors such as IGF-I PDGF, IGF-II etc., suggesting these growth factors play important roles in bone cell signaling. In the present study, potential roles of nitric oxide (NO) and protein kinases in osteoblast signal transduction are proposed.

Keywords □ Osteoblast, Signal transduction, Growth factor, Bone disease

서 론

골조직은 2/3가 무기물이고, 1/3이 유기물질로 구성되어 있고, 전자는 주로 Calcium Phosphate이고, 후자는 주로 collagen이 주성분이다. 골조직에는 조골세포 (Osteoblast), 파골세포 (Osteoclast), 골세포 (Osteocytes) 등이 골형성 및 resorption에 관여하고 있다. 이중 골을 재생하는데 결정적인 역할을 하는 것이 조골세포이다. 이 세포는 생성되는 골의 표면에 위치하며, 골 형성에 필요한 collagen fiber 등을 합성 분비한다. 또한 이 세포의 밖에는 neutral, alkaline phosphatase 등이 많이 분포하고 있어, 이들에 의하여 PO_4^{3-}/Ca^{++} 가 침착 되어 뼈의 calcification에 관여한다. 이러한 사실은 조골세포의 수가 많으면 뼈의 재생이 빨리 진행되고, 골다공증을 치료 및 예방할 수 있음을 의미한다.

실제로 많은 골형성을 촉진시키는 물질이 조골세포의 증식을 유도함이 알려지고 있다 (Verharr *et al.*, 1995). 예컨대 GH (growth hormon), IGF-I (insulin like growth factor I), TGF-beta (transforming growth factor beta) 등은 조골세포의 증식을 촉진하여 뼈의 성장을 촉진하는 성장인자이다 (Kassem *et al.*, 1994). 골다공증에 치료효과가 있는 Estrogen도 조골 세포의 증식을 촉진한다 (Verharr *et al.*, 1994). 또한 알콜 중독증 환자인 경우 뼈가 쉽게 부서지는 것도 알콜이 조골 세포의 증식을 억제하는 것 (Chavassieux *et al.*, 1993)일뿐만 아니라 노인에 있어서 뼈의 질량도 적어도 부분적으로는 조골 세포의 증식

이 감소하여 생기고 있다 (Pfeilschifter *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1995). Cushing's syndrome 환자에서 증가된 glucocorticoid hormone이나 천식 치료 시 투여하는 glucocorticoid hormone도 조골세포의 증식을 억제하여 골다공증을 유발한다 (Hughes-Fulford *et al.*, 1992).

골조직의 형성, 분해, 무기물의 항상성, 골세포의 재생 등의 다양한 작용을 수행하기 위하여, 조골세포 (osteoblast) 와 파골세포 (osteoclast)의 특징적인 기능이 필수적인 역할을 한다 (Matsumoto 1995). 조골 세포의 가장 현저한 기능은 뼈를 구성하는 organic matrix의 합성과 분비이며, 이들 세포는 또한 세포외액과 뼈액 (osseous fluid) 사이의 전해질의 이동에도 관여하며 뼈의 유기기질 성분의 합성과 기질소포 (matrix vesicle)의 생성에 의하여 뼈기질의 광화작용 (mineralization)에도 영향을 미친다. Steroid hormones, PTH (parathyroid hormone), glucocorticoids, growth factors (FGF, TGF-beta) 각종 cytokines (e.g., IL-1, IL-6, interferon- γ)들은 조골세포를 자극하여 파골세포를 활성화하는 매개체들을 분비한다 (Kaji *et al.*, 1993; Ohba *et al.*, 1994; Dedhar 1989; Yukihiro *et al.*, 1994). 파골 세포는 골기질을 파괴 하기위한 매우 효율적인 방법을 가지고 있다. 즉 뼈의 표면에 결합하여 세포와 골기질 사이에 봉합공간 (sealed space)을 형성한다. Proton pump를 포함하는 endosome이 뼈에 인접하여 존재하는 세포부위로 이동하여 세포막에 합입되어 봉합공간으로 proton을 이동시킴으로써 pH를 7에서 4로 감소시킨다. 이같은 산성 pH는 뼈의 mineral을 분해시킨다. 그리고 잔존하는 골기질을 분해시키기 위하여 파골세포는 acid

*To whom correspondence should be addressed.

phosphatase를 분비한다. 이에 부가하여 골세포는 matrix fragment를 식작용으로 흡수하여 세포질내에 존재하는 vacuole에서 분해된다.

성장인자에 의한 세포신호전달

Bone cell을 포함한 대부분의 세포의 증식에 중요한 역할을 하는 단백질로서 각종 growth factor들과 그에 상응하는 수용체(receptor)들이 존재한다 (Kahn *et al.*, 1993). 흥미롭게도 골기질 (bone matrix) 은 여러종류의 growth factor를 포함하여 골세포의 기능에 영향을 주고 있다. 골에서 발견되고 있는 growth factor들로서 TGF- β (transforming growth factor β), insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, bone morphogenic proteins, platelet-derived growth factors (PDGF), interleukin-1, interleukin-6와 colony-stimulating factor 등을 들 수 있다 (Takeuchi and Matsumoto, 1994). 이들 growth factor들이 골 내에 존재함은, 골세포의 기능에 이들의 역할이 중요함을 강력히 제시하고 있다. 이와 같은 growth factor들이 그 기능을 수행하기 위해서 각종 Protein Kinase에 의한 생체내 단백질들의 인산화 반응이 필수적이다 (Cohen 1992).

세포의 성장 및 분화에도 영향을 미치는 insulin을 포함한 대부분의 성장인자 (growth factor)의 신호전달기전은 각 성장인자의 수용체를 통하여 이루어 진다. 이들 성장인자 수용체의 공통적인 특징은 수용체자체가 내인성 효소활성, 즉 tyrosine kinase activity를 가지는 것이다. 세포막에 존재하고있는 수용체에 성장인자가 결합 하게되면 수용체 고유의 tyrosine kinase 활성을 증가시키게 되며, 따라서 세포내에 존재하는 target protein들의 tyrosine phosphorylation을 증가시키게 된다. 이 같은 현상들은 세포질내에 존재하는 일련의 protein serine/threonine kinase들 (MAP Kinase, S6 Kinase, Casein Kinase II 그리고 PI3-Kinase) 과 연계되어 있다 (Moodie *et al.*, 1993). 이들 성장 인자의 효과는 세포핵 내부까지 전달되어서 성장인자에 민감한 유전자들의 transcription을 조절하게 된다. 하지만 세포핵내로 신호전달이 매개되는 분자적기전에 대해서는 아직 알려지지 않은 상태이다. 최근의 보고에 의하면 이들 성장인자에 의해 수 개의 DNA 결합 단백질들의 phosphorylation 상태가 증가한다고 제시되고 있다. 그 예로써 CREB (cAMP response element-binding protein), AP-1 (c-Jun, c-Fos 그리고 Fos-related protein) 등과 같은 전사인자 (transcription factor)을 들 수 있다 (Hunter and Karin, 1992; Farley *et al.*, 1994; Kim and Kahn 1993). DNA 결합 단백질 그리고 Transcription factor 들의 조절기전으로서 protein phosphorylation (단백질의 인산화) 반응이 가장 중요한 기전으로 제시되고 있다. 이는 유전자 발현에 영향을 미치는 많은 수의 호르몬 또는 세포

성장 인자들이 protein kinase의 활성을 증가시키는 사실과 잘 부합하고 있다. Glycogen synthase kinase 3, casein kinase II, protein kinase C 그리고 MAP kinase 들은 c-Jun의 특별 부위에 serine phosphorylation을 증가시키며, 결과적으로 c-Jun의 DNA 결합과 transcription의 활성을 조절한다. c-Fos 또한 transcription 활성에 중요하다고 제시되는 여러 부위가 protein kinase A, protein kinase C, Fos kinase, 그리고 cdc2 kinase에 의해 인산화 된다. 흥미롭게도 Insulin 유사인자인 IGF-1 은 c-Jun을 포함한 세포핵에 존재하는 여러 단백질의 tyrosine phosphorylation을 증가시킨다는 사실이 밝혀졌다 (Oemer *et al.*, 1991).

조골세포의 신호전달

근육세포, 간세포 및 지방세포와 같은 인슐린 표적장기에서 인슐린의 작용은 인슐린 수용체와의 결합에 의해 개시된다. 인슐린 수용체의 β -subunit의 intrinsic tyrosine kinase 활성에 의해 β -subunit의 세부분 (juxtamembrane region, 조절부위의 YxxxYY motif, carboxy 말단)의 tyrosine기의 인산화가 일어난다. IRS (insulin receptor substrate)-1은 인슐린에 의해 tyrosine 기의 인산화가 일어나 인슐린이 세포내에 영향을 미치는데 있어 중요한 역할을 한다. 이후 신호전달계에는 p70 S6 Kinase, PI3-kinase, MAP kinase 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이중 PI3-kinase의 활성화는 인슐린의 작용에 있어 필수적인 것으로 알려져 있다(Okada *et al.*, 1994). 이는 PI3 kinase의 억제 시 인슐린에 의한 유전자 발현이 억제되고 포도당 유입이 감소되는 것을 통해 알 수 있다 (Cheatham, *et al.*, 1994).

골기질은 여러 종류의 성장인자들을 포함하여 골세포의 기능에 영향을 준다. 골세포에는 transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, bone morphogenic protein (BMP), platelet derived growth factor (PDGF) 등의 성장인자와 interleukin-1, Interleukin-6와 같은 cytokines들, 스테로이드 호르몬 (steroid hormones), 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone), 부신피질호르몬 (glucocorticoid)들이 결합하여 조골세포의 기능에 영향을 미친다(Ng *et al.*, 1983; Nicolas *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1992; Kaji *et al.*, 1997). 이들이 작용하는 기전은 각기 다르며 최근 자세한 경로에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

비타민 D의 활성형인 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃)는 조골세포와 반응하여 세 가지 경로로 세포의 형질과 기능에 영향을 미친다. 첫 번째 단시간 (millisecond to minutes)에 세포막의 전압민감성 Ca²⁺ channel을 활성화시켜 Ca²⁺의 세포내 유입을 늘리고 (Caffrey and Farach-Carson, 1989), 인지질과 sphin-

golipid의 turnover를 유도하여 세포내 망상체 등에 저장되어 있던 Ca^{2+} 를 방출하여 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 상승시키고 (Le Mellay *et al.*, 1997), Ca^{2+} 의존성 신호전달계를 구동한다. 둘째 몇 시간 후에는 조골세포에서 분비되는 단백질인 osteopontin의 인산화 상태를 변화시켜 등전점을 pH 4.6에서 pH 5.1로 변화시킨다. 이때 세포내 여러 kinase와 phosphatase들이 관여하는 것으로 여겨진다 (Safran *et al.*, 1994). 마지막으로 1, 25 (OH)₂ D₃가 핵수용체에 결합하여 기질 단백질인 osteopontin과 osteocalcin의 전사를 조절한다 (Pike, 1991; Darwish and DeLuca, 1993; Norman and Collins, 1996).

부갑상선 호르몬이 수용체에 결합하여 수용체의 구조를 변화시키면 GTP가 결합된 G 단백질과 상호작용하여 adenylate cyclase를 활성화시킨다. 활성화된 adenylate cyclase는 ATP로부터 cAMP를 형성한다. cAMP는 protein kinase A (cAMP-dependent Protein Kinase)를 매개체로 MAP kinase의 활성화를 억제한다 (Howe and Marshall, 1994; Faure *et al.*, 1994; Cresp *et al.*, 1994; Mark and Livert, 1995). 위의 과정에 의해 조골세포에서는 alkaline phosphatase의 활성이 감소하고 콜라겐 합성이 감소하는 등의 변화가 일어난다 (Davis, 1993).

Epidermal growth factor(EGF)나 IGF-I과 같은 성장인자들은 조골세포의 증식과 단백질 합성을 촉진한다 (Zhang, *et al.*, 1999). 이들이 조골세포의 수용체에 결합 후 tyrosine kinase에 의해 개시되는 신호전달기전에서도 MAP kinase는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들의 작용은 MAP kinase를 활성화시키는 MAP kinase kinase (MEK)의 선택적 억제제인 PD098059를 처치하면 감소된다 (Canalis, 1983; Webster *et al.*, 1994). 흥미롭게도, 조골세포에서도 인슐린 수용체와 glucose transporter가 발견되었으며 인슐린에 의하여 MAP kinase의 활성이 세포막, 세포질, 세포핵에서 증가됨으로서 조골세포 신호전달 기전에 인슐린이 중요한 역할을 함이 제시되고 있다 (Kim *et al.*, 1997).

그 외에도 아미노산인 아르기닌은 조골세포인 MC3T3-E1 세포에서 IGF-1의 생산을 증가시키고, 콜라겐 합성을 자극하며 alkaline phosphatase의 활성을 증가시킨다고 보고되고 있다 (Chevalley *et al.*, 1998). Skeletal alkaline phosphatase는 osteoblast cells의 plasma membrane에 proteoglycan-inositol linkage에 의해 결합되어 있다. 이 효소는 bone formation에 결정적인 역할을 한다고 알려져 있지만 bone cell에서 정확한 생화학적인 기전과 세포막으로부터 유리되는 과정은 아직 알려져 있지 않은 상태이다 (Farley *et al.*, 1991). 최근의 연구에 의하면 nitric oxide synthase (NOS)가 골세포에서 발현되며 NOS에 의하여 만들어진 nitric oxide (NO)가 bone metabolism에 중요한 역할을 함이 제시되고 있다 (Evans and Ralston, 1996).

또한 NO는 난소 절제된 실험동물에서 bone loss를 차단함이 제시됨으로서 NO가 osteoblast의 기능에 상당한 영향을 미치고 있음이 제시되고 있다 (Igarashi *et al.*, 1994).

Nitric oxide의 작용

NO는 생체내 여러 조직에서 중요한 생리적 역할을 하는 무기 자유 라디칼 가스(inorganic free radical gas)로서 $\cdot\cdot N=O$ 의 화학식으로 표현된다. 1987년 혈관내피세포로부터 NO를 세포간 연락물질(transcellular signal)로 합성할 수 있다는 것이 알려진 후 이제까지 많은 과학자들에 의해 NO의 생체내 역할이 연구되어지고 있다. 포유동물의 세포에서 NO의 합성은 NOS(EC 1.14.13.39; NOS)에 의해 이루어진다. NOS는 125-155 kDa의 endothelial NOS (eNOS, type III NOS), neuronal (nNOS, type I NOS), inducible (iNOS, type II NOS) 세가지 isoform으로 나뉜다 (Knowles and Moncada, 1994; Ralston *et al.*, 1994). eNOS는 vascular endothelial cell에서 acetylcholine에 대응하여 NO를 생성하여 주위의 smooth muscle cell에 영향을 미치고, cNOS는 뉴우런에서 glutamate에 대응하여 NO를 생성한다. eNOS와 nNOS는 Ca^{2+} 과 calmodulin에 의존적이며 세포내에서 일정하게 존재하여 constitutive NOS로 분류되기도 한다. iNOS는 macrophage에서 cytokines에 대응하여 NO생성을 유도하여 유전자의 발현을 전사단계에서 조절한다고 알려져 있다. 위의 세가지 NOS isoform은 위에 언급한 세포들뿐만 아니라 다른 세포에도 존재하여 세포내·세포간 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있다.

뼈에서 NO의 역할은 최근에 와서 주목받고 있다. 골조직에서도 다른 조직들과 마찬가지로 일정량의 eNOS, nNOS 및 cytokines에 의해 유도되는 iNOS에 의해 NO가 생성되어, 골세포의 기능을 조절하는 매개체의 역할을 한다고 알려져 있다 (Helfrich MH *et al.*, 1997). *In vitro* 실험 결과에 의하면 높은 농도의 NO는 조골세포(osteoblast)의 증식과 분화를 억제하지만, 낮은 농도의 NO는 오히려 osteoblast의 기능을 자극한다고 한다 (Ralston *et al.*, 1994; Riancho *et al.*, 1995). *In vitro* 실험에서 증가된 NO는 paracrine factor로 작용하여 골세포에서 bone resorption을 방해하여 bone loss를 막는다고 생각된다 (Lowik *et al.*, 1994). *In vivo*에서도 iNOS의 선택적 억제제인 aminoguanidine을 투여하면 성장중인 랫트의 경우 골중량의 감소가 일어나고(Rsukahara *et al.*, 1996), 난소가 절제된 쥐의 경우에는 골 손실이 증가하였다(Kasten *et al.*, 1994). NO 제공자인 nitroglycerine은 난소절제술 또는 glycocorticoid로 유도된 골 손실을 막아주는 효과가 있다. 또한 쥐에게 NOS 활성의 억제제인 L-NAME(NG-nitro-L-arginine methyl ester)와 iNOS의 선택적 억제제인 aminoguanidine의 투여효과를 비교한 결과, L-NAME

를 투여하였을 때에는 유의적인 변화가 없었으나 aminoguanidine을 투여하였을 때에는 경골의 골단에서 골형성이 20%가량 감소한다고 하였다. 따라서 iNOS에 의해 생성된 NO가 골재흡수를 조절하여 뼈 remodeling에 영향을 미친다고 보고있다(Turner, 1997).

박테리아의 endotoxin이나 cytokine들은 세포내에서 iNOS 활성을 증가시켜 NO 생성을 자극하여 세포에 여러 유해한 작용을 한다고 알려져 있다. 최근의 연구에 의해 밝혀진 바에 의하면 근육세포에서 LPS와 cytokine에 의해 유도된 iNOS는 인슐린에 의한 포도당 수송능의 결함과 관련이 있다고 한다(Bedard *et al.*, 1997). L-NAME (NOS inhibitor)를 이용하여 NOS를 억제하면 cytokine의 이런 영향을 정상화시킬 수 있다고 한다. 인슐린은 L6 myocytes에 0.6 μ M 투여시 NO 생성을 감소시키는 효과가 있다(Bedard and Marette, 1998). 하지만 이런 인슐린의 효과는 세포에 대한 특이성이 있어 간세포에서는 iNOS에 아무런 영향을 미치지 못한다고 한다.

결 론

최근 의학의 눈부신 발달로 인간의 수명이 연장됨에 따라 age-related diseases의 치료가 큰 사회적 문제가 되고 있다. 골다공증 (osteoporosis)은 노인층에서 흔히 발견되고, 대퇴골 골절, 척추골절 등의 골절원인이 되고 있다. 미국의 경우 1985년도의 골다공증에 의한 골절이 130만건이 발생하였고, 이에 70억 달러의 의료비가 지출되었다. 한국의 골다공증 치료제 시장은 매년 20% 이상의 고도성장을 유지하는 가운데 시장규모는 1999년도에 400억원대로 성장할 것으로 전망되고 있다. 이 질환은 총콜량이 감소하는 증상으로 폐경기, 노화, 갑상선이나 부갑상선 기능항진, 만성신부전, 부신피질 호르몬의 투여에 의하여 발생된다. 가장 흔한 것은 여성의 폐경기 후 estrogen의 감소이다. 여성 노인층의 경우 estrogen의 투여가 골다공증의 예방 및 치료에 사용되지만 호르몬의 여러 부작용 때문에 이를 보완 할 수 있는 방법이 요구되고 있다. 뿐만 아니라 당뇨병 환자의 합병증으로서 치주질환의 심각성이 대두되고 있으며, 우리나라 성인의 70%정도는 치주질환을 가지고 있으며 40대 이후 발치의 주원인이 되며, 부상에 의한 골절, 치과질환에서 골조직 재생방법에 관한 보다 효과적인 약물이 요구되고 있다. 따라서, 골세포의 신호전달기전을 정확히 규명하는것은 골 질환 치료제 개발을 위한 필수적인 과정이라 하겠다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 연구비

(HMP-98-M-0026) 지원에 의하여 이루어 졌기에 감사의 뜻을 포함합니다.

참고문헌

- Ackermann D. and Heinsen H. A. (1935). Uber die physiologische Wirkung des Asterubins und anderer zum Teil neu dargestellter, schwefelhaltiger Guanidinderivative. *Z. Physiol. Chem.* **235**, 115-121.
- Ballou L. M., Jenou P. and Thomas G. (1988). Protein phosphatase 2A inactivates the mitogen-stimulated S6 kinase from Swiss mouse 3T3 cell. *J. Biol. Chem.* **263**, 1188-1194.
- Backer J. M. and White M. F. (1994) Phosphatidylinositol 3'-kinase and insulin action. Molecular biology of diabetes, Part II'. Edited by Draznin, B. and LeRoith, D., Humana Press inc., Totowa, NJ. pp. 115-144.
- Bedard S., Marcotte B., and Marette A. (1997) Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem. J.* **325**, 487-493.
- Bedard, S., Marcotte, B. and Marette. A. (1998). Insulin inhibits inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle cells. *Diabetologia* **41**, 1523-1527.
- Caffrey, J. M. and Farach-Carson, M. C. (1989). Vitamin D₃ metabolites modulate dihydropyridine-sensitive calcium currents in clonal rat osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 20265-20274.
- Canalis, E. (1983). Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae. *Metabolism.* **32**, 14-20.
- Chavassieux, P., Serre, C. M., Vergnaud, P., Delmas, P. D. and Meunier, P. J. (1993). *In vitro* evaluation of dose-effects of ethanol on human osteoblastic cells. *Bone & Mineral* **22**, 95-103.
- Cheatham, B., Vlahos, C. J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J. and Kahn, C. R. (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of p. 70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol.* **14**(7), 4902-11.
- Chevalley, T. H., Rizzoli, R., Manen, D., Caverzasio, J. and Bonjour, J. P. (1998). Arginine increases insulin-like growth factor-I production and collagen synthesis in osteonblast-like cells. *Bone* **23**, 103-109.
- Cohen, P., (1992). Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends. Biochem. Sci.* **17**, 408-413.
- Darwish, H. and DeLuca, H. F. (1993). Vitamin D regulated gene expression. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression* **3**, 89-116.
- Davis, R. J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **268**(20), 14553-14556.
- Dedhar, S. (1989). Signal transduction via β 1-integrins is a required immediate in interleukin-1 β induction of alkaline

- phosphatase activity in human osteosarcoma cells. *Exp Cell Res* **183**, 207-214.
- Evans, D. M. and Ralston, S. H. (1996). Nitric Oxide and Bone. *J Bone Miner Res.* **11**, 300-305.
- Fang Ma, Kujubu, D. A. and Hahn, T. J. (1992). The effects of prostaglandin E2, parathyroid hormone, and epidermal growth factor on mitogenesis, signaling and primary response genes in UMR-106-01 osteoblast-like cells. *Endocrinol.* **131**, 2113-2119.
- Farley, J. R., Hall, S. L., Tanner, M. A. and Wergedal, J. E. (1994). Specific activity of skeletal alkaline phosphatase in human osteoblast-line cells regulated by phosphate, phosphate esters, and phosphatase analogs and release of alkaline phosphatase activity inversely regulated by calcium. *J. Bone Mineral Res.* **9**, 497-508.
- Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T. A. and Bourne, H. R. (1994). cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 7851-7854.
- Ferrell, J. E. and Martin, G. S. (1989). Thrombin stimulates the activities of multiple previously unidentified protein kinases in platelets. *J. Biol. Chem.* **264**, 20723-20729.
- Helfrich, M. H., Evans, D. E., Grabowski, P. S., Pollock, J. S., Ohshima, H. and Ralston, S. H. (1997). Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J. Bone. Mineral. Res.* **12**(7), 1108-1115.
- Howe, L. R. and Marshall, C. J. (1993) Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p. 21ras and p.74 raf-1. *J. Biol. Chem.* **268**, 20717-20720.
- Hughes-Fulford, M., Appel, R., Kumegawa, M. and Schmidt, J. (1992). Effect of dexamethasone on proliferating osteoblasts: inhibition of prostaglandin E2 synthesis, DNA synthesis, and alterations in actin cytoskeleton. *Experimental Cell Research* **203**, 150-156.
- Hunter, T. and Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**, 375-387.
- Igarashi, K., Hirafuji, M., Adachi, H., Shinoda, H. and Mitani, H. (1994). Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **50**, 169-172.
- Kahn, C. R. *et al.* (1993). The insulin receptor and its substrate: Molecular determinants of early events in insulin action. *Recent Progress in Hormone Research* **48**, 291-339.
- Kaji, H., Sugimoto, T., Fukase, M. and Chihara, K. (1993). Role of dual signal transduction systems in the stimulation of bone resorption by parathyroid hormone-related peptide. The direct involvement of cAMP-dependent protein kinase. *Horm Metab Res.* **25**, 421-424.
- Kaji, H., Sugimoto, T., Kanatani, M., Nishiyama, K., Nasu, M. and Chihara, K. (1997) Insulin-like growth factor-1 mediates osteoclast-like cell formation stimulated by parathyroid hormone. *J. Cell. Physiol.* **172**, 55-62.
- Kassem, M., Mosekilde, L. and Eriksen, E. F. (1994). Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells *in vitro*. *Growth Regulation* **4**, 131-135.
- Kasten, T. P., Collin-Osdoby, P., Patel, N., Osoby, P., Krukowski, M., Misko, T. P., Settle, S. L., Currie, M. G., and Nickols, G. A. (1994). Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3569-3573.
- Kato, H., Matsuo, R., Komiyama, O., Tanaka, T., Inazu, M., Kitagawa, H. and Yoneda, T. (1995). Decreased mitogenic and osteogenic responsiveness of calvarial osteoblasts isolated from aged rats to basic fibroblast growth factor. *Gerontology*, **41**, 20-27.
- Kim, S. J. and Kahn, C. R. (1993). Insulin induces rapid accumulation of insulin receptors and increases tyrosine kinase activity in the nucleus of cultured adipocytes. *J Cell. Physiol.* **157**, 217-228.
- Kim, S. J. and Kahn, C. R. (1994). Insulin stimulates phosphorylation of c-Jun, c-Fos, and Fos-related proteins in cultured adipocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 11887-11892.
- Kim, S. J. and Kim, K. H. (1997). Insulin rapidly stimulates ERK2 in the membrane of osteoblast-like UMR-106 cell. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**, 1023-1031.
- Knowles, R. G. and Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem.* **298**, 249-258.
- Le Mellay, V., Grossee, B. and Lieberherr, M. (1997). Phospholipase C β and membrane action of calcitriol and estradiol. *J. Biol. Chem.* **272**, 11902-11907.
- Lowik, CWGM, Nibbering, P. H., van de Ruit, M. and Papapoulos, S. E. (1994). Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants in associated with suppression of osteoblastic bone resorption. *J Clin Invest.* **93**, 1465-1472.
- Matsumoto, A. (1995). The effect of cell environment on osteoblast function. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* **105**, 273.
- Moodie Sa *et al.* (1993). Complex of ras-GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**, 1658-1661.
- Ng, K. W., Partridge, N. C., Niall, M. and Martin, T. J. (1983). Stimulation of DNA synthesis by epidermal growth factor in osteoblast-like cells. *Calcif. Tissue Int.* **35**, 624-628.
- Nicolas, V., Nefussi, J. R., Collin, P. and Forest, N. (1990). Effects of acidic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on subconfluent fetal rat calvaria cell cultures: DNA synthesis and alkaline phosphatase activity. *Bone Miner.* **8**, 145-156.
- Norman, A. W. and Collins, E. D. (1996). Vitamin D receptor structure, expression, and nongenomic effects, in 'Principles of bone biology' Chapter 30. Edited by Bilezikian, J. P., Raisz L. G., Rodan G. A. and San Diego, C. A., Academic Press, pp. 419-pp. 434.
- Oemer, B. S., Law, N. M. and Rosenzweig, S. A. (1991). Insulin-like growth factor-1 induces tyrosylp phosphorylation of nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 24241-24244.
- Ohba, M., Shibamura, M., Kuroki, T. and Nose, K. (1994). Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor- β 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. *J. Cell Biol.* **126**, 1079-1088.

- Pfeilschifter, J., Diel, I., Pilz, U., Brunotte, K., Neumann, A. and Ziegler, R. (1993). Mitogenic responsiveness of human bone cells *in vitro* to hormones and growth factors decreases with age. *Journal of Bone & Mineral Research* **8**, 707-717.
- Pike, J. W. (1991). Vitamin D₃ receptors: structure and function in transcription. *Ann. Rev. Nutr.* **11**, 189-216.
- Ralston, S. H., Todd, D., Helfrich, M., Benjamin, N. and Grabowski, P. S. (1994). Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinol.* **135**, 330-336.
- Riancho, J. A., Salas, E., Zarrabeitia, M. T., Olmos, J. M., Amado, J. A., Fernandez-Luna, J. L. and Gonzalez-Macias J. (1995). Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J. Bone Miner Res.* **10**, 439-446.
- Rosen, K. M., Lamperti, E. D. and Villa-Komaroff, L. (1990). Optimizing the northern blot procedure. *Biotechniques* **8**, 398-403.
- Safran, J. B., Wright, G. C., Khoury, R., Butler, W. T. and Farach-Carson, M. C. (1994). Alteration of charge state of the bone matrix protein osteopontin(OPN) induced by 1,25(OH)₂D₃ in 'A pluripotent steroid hormone: Structural studies, Molecular endocrinology and Clinical applications, 9th Workshop on Vitamin D, Berlin, Germany DeGruyter.' Edited Norman, A. W., Bouillon, R. and Thomasset, M. pp. 702-703.
- Salinivich O. and Montelaro, R. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by SDS-PAGE. *Anal. Biochem.* **156**, 341-347.
- Takeuchi, Y. and Matsumoto, T. (1994). Hormone and Cytokine receptors in bone cells. *Nippon Rinsho.* **52**, 2255-2261.
- Turner, C. H., Owan, I., Jacob, D. S., McClintock and Peacock M. (1997). Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone.* **21**(6), 487-490.
- Verhaar, H. J., Damen, C. A., Duursma, S. A. and Scheven, B. A. (1994). A comparison of the action of progestins and estrogen on the growth and differentiation of normal adult human osteoblast-like cells *in vitro*. *Bone.* **15**, 307-311.
- Verhaar, H. J., Damen, C. A., Duursma, S. A. and Scheven, B. A. (1995). Comparison of the action of 17beta-estradiol and progestins with insulin-like growth factors-I-II transforming growth factor-beta 1 on the growth of normal adult human bone-forming cells. *Maturitas.* **21**, 237-243.
- Yukihiko, S., Posner, G. H. and Guggino, S. E. (1994). Vitamin D₃ analogs stimulate calcium currents in rat osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 23889-23893.
- Zhang, W., Lee, J. C., Kumar, S. and Gowen, M. (1999). ERK pathway mediates the activation of Cdk2 in IGF-1 induced proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells. *J Bone Miner Res.* **14**, 528-535.