

약콩 (*Rhynchosia volubilis*: 鼠目太) 및 대두 처리에 의한 MG-63 조골세포 증식 증가에서 ER α 의 역할에 대한 연구*

엄소정** · 강인숙*** · 조윤희**§

경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과, ** 경희대학교 의과대학 생화학교실***

Study on the Role of Estrogen Receptor-Alpha in Yak-Kong and Soybean Induced Proliferation of MG-63 Human Osteoblastic Cells*

Um, So Jung** · Kang, In Sook*** · Cho, Yunhi**§

Department of Medical Nutrition, ** Graduate School of East-West Medical Science, Seoul 130-701, Korea
Department of Biochemistry and Molecular Biology, *** School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

Phytoestrogens, especially Yak-kong or soybean-derived isoflavones have been traditionally used as a supplement of estrogen for preventing postmenopausal osteoporosis in oriental folk medicine. In a previous study, we demonstrated that as Yak-kong and soybean increased MG-63 human osteoblastic cell proliferation, the expression of estrogen receptor α and β (ER α : ER β) both were increased. However, the increased level of ER α is much higher than that of ER β . To determine whether the altered level of ER α expression affects Yak-kong or soybean induced MG-63 cell proliferation, we established cell lines stably expressing either ER α or antisense ER α RNAs. Increased expression of ER α in MG-63 cells (ER α -MG63) enhanced Yak-kong or soybean induced proliferation which paralleled with the enhanced expression of IGF-I. Inhibition of ER α expression by antisense ER α RNAs (As-ER α -MG63) caused these cells to insensitize Yak-kong or soybean induced proliferation and IGF-I expression. Furthermore, the comparable effects between Yak-kong and the combined treatment of genistein and daidzein at 0.5×10^{-8} M, which is a concentration of these two isoflavones similar to Yak-kong at 0.001 mg/ml, on cell proliferation and IGF-I expression in ER α -MG63 or As-ER α -MG63 cells demonstrate that ER α plays an important, active role in MG-63 cell proliferation induced by phytoestrogens, especially Yak-kong or soybean derived isoflavones. (*Korean J Nutrition* 38(7) : 512~520, 2005)

KEY WORDS : Yak-kong, soybean, isoflavone, ER α , MG-63 cell proliferation.

서론

폐경 후 골다공증은 여성 호르몬인 에스트로겐의 분비 감소에 따라 조골세포 (osteoblast)에서의 골 형성 (bone formation) 관련 국소인자의 발현 저하¹⁾ 및 파골세포 (osteoclast)의 골 흡수 (bone resorption) 작용의 상대적인 증가에 의해 골밀도가 낮아지는 질환이다.²⁾ 이에 치료법으로 에스트로겐 보충요법이 사용되어 왔으나, 이는 60세 이상의 고령층에서 골량 감소 억제 효과가 폐경 초기에 비하여 낮

으며, 최소 5년 이상의 장기 치료를 요하고,²⁾ 불규칙한 자궁 출혈, 유방암, 자궁 내막 암 및 고혈압 발생 빈도 증가 등의 부작용이 보고되어 있다.³⁾

최근에는 에스트로겐 보충 요법의 위험성을 보완하기 위해 한약재 및 식품 등 천연물의 활성 성분을 이용한 대체요법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고,⁴⁻⁹⁾ 특히 폐경기 골다공증의 예방 및 치료를 위한 대표적인 대체요법으로 식물성 에스트로겐 (phytoestrogen)의 경우 투여 또는 이를 다량으로 함유하고 있는 식품의 섭취가 시도되고 있다.^{4,5)} 식물성 에스트로겐은 isoflavones, coumestans, lignans의 3 계열이 있으며 이 중 isoflavone은 골대사와 관련하여 활발히 연구가 진행 중인 대표적인 phytoestrogen이다.^{4,5)} Isoflavone은 aglycone인 genistein, daidzein, glycitin과 이들이 당이 결합된 배당체 등 지금까지 12종류가 밝혀져 있는데^{4,5)} 이들 중 daidzein과 genistein은 에스트로겐과 유사

접수일 : 2005년 7월 7일

채택일 : 2005년 8월 1일

*This research was supported by the Kyung Hee University Research Fund in 2004 (KHU-20040207).

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : choyunhi@khu.ac.kr

구조를 가지고 있어 세포내에서 에스트로겐 수용체 (estrogen receptor: ER)와 결합하여¹⁰⁾ 에스트로겐 효과 뿐 아니라 항에스트로겐 효과를 동시에 나타내며 에스트로겐 보충 요법에 의한 여러 가지 부작용을 유발하지 않는 장점이 있어 골다공증 예방을 위한 대체물질로 각광을 받고 있다.^{4,5)}

식물성 에스트로젠은 알파파 (alfafa), 완두콩, 오토밀, 팥, 쌀 및 대두 등에 다량 함유되어 있으며 특히 isoflavone (isoflavone)계 식물성 에스트로젠은 콩류에 많이 함유되어 있다.¹¹⁾ Isoflavone을 다량 함유한 콩류로 서양을 비롯한 우리나라에서도 대두가 널리 사용되고 있는 반면,⁴⁾ 한의학이나 민간요법에서는 약콩 (*Rhynchosia volubilis*, 鼠目太)이 주로 사용되어 왔다.¹²⁾ Isoflavone의 함유량을 분석한 선행 연구에서 약콩 추출물의 daidzein과 genistein의 함유량이 대두에 비해 높았으며^{11,13,14)} MG-63 조골세포에 처리시 약콩 추출물 및 대두 추출물 모두 세포의 증식 및 증식 관련 인자인 IGF- I의 선택적인 발현을 증가시켰으나 약콩 추출물에 의한 효과가 대두 추출물에 비해 현저히 높았다.^{15,16)} 또한 MG-63 조골세포에서 약콩 추출물 및 대두 추출물 처리는 ER α (estrogen receptor α)와 ER β (estrogen receptor β)의 발현을 모두 증가시켰으나, ~157%에 머무는 ER β 의 미약한 발현 증가에 비해 ER α 의 발현 증가는 ~527%에 이르러 약콩 및 대두 추출물 처리에 의한 조골세포의 증식 증가는 ER α 의 발현과 상관성이 높은 것으로 제안되었다.^{15,16)} 이에 본 연구에서는 ER α 의 발현이 증가된 MG-63 조골세포주 (ER α -MG63 cell line)와 ER α 의 발현이 극히 억제된 MG-63 조골세포주 (As-ER α -MG63 cell line)를 분자생물학적인 방법으로 제조하고 각각의 세포주에 약콩 및 대두 추출물 처리 후 증식 및 에스트로겐 수용체와 IGF- I 발현의 변화 정도를 측정하여 약콩 및 대두 처리에 의한 MG-63 조골세포 증식 증가에서 ER α 의 역할을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

MG-63 human osteoblastic cell은 한국 세포주 은행 (서울대학교 의과대학)에서 분양받아 본 연구실에서 계대 배양하여 사용하였다. 표준 물질인 17-estradiol (E₂), genistein, daidzein 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MI, USA); 추출용 메탄올은 Merck사 (Damstandt, Germany); FBS는 United Biotechnology (Saranac Lake, NY, USA)사; 세포 배양에 사용한 항생제, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 및 phe-

nol red-free minimum essential media (MEM)은 Gibco BRL사 (Grand Island, NY, USA); ER α , ER β 및 IGF- I 항체는 Santa Cruz Biotech사 (SantaCruz, CA, USA); 여과 filter는 Millipore사 (Billerica, MA, USA)의 제품을 사용하였다.

2. 약콩 및 대두의 주출 및 시료조제

약콩은 2002년에 재배한 정선산을 경동시장에서 구입하였고, 대두는 2002년에 재배한 경기도 양주산으로 한살 식품 (주)에서 구입하여 사용하였다. 약콩 및 대두는 1 kg을 5배 가량의 70% 메탄올로 추출하여 여과하고, 여액을 감압 농축한 후 72시간 동결 건조한 것을 약콩 메탄올 추출물 (1.12% isoflavone 함유) 및 대두 메탄올 추출물 (0.69% isoflavone 함유)로 하였다. 약콩 및 대두 메탄올 추출물은 dimethylsulfoxide (DMSO, 최종 농도 < 0.05%, v/v)에 녹이고 filter (0.22 m pore size)로 여과 멸균하여 사용하였다.

3. 조골 세포의 배양

MG-63 human osteoblastic cell을 polystyrene 세포 배양 접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution과 10% FBS를 첨가한 DMEM을 사용하여 유지하였다.¹⁷⁾ 배양시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 5% CO₂를 계속 공급하였다.

FBS와 DMEM 배양액에 함유된 에스트로겐 유사 물질에 의한 영향을 배제하기 위해,¹⁸⁾ 약콩 추출물 및 대두 추출물 처리는 10% charcoal-stripped FBS가 함유된 phenol red-free MEM에서 60% confluency로 배양된 MG-63 human osteoblastic cell에 가하여 이루어졌으며, 양성대조군으로 E₂, daidzein과 genistein 단일 표준 물질 및 daidzein과 genistein 복합 표준 물질의 처리 또한 동일한 배양 조건에서 이루어졌다. 선행 연구를 통하여^{15,16)} 양성 대조군으로 10⁻⁹M과 10⁻⁶M 농도의 E₂, daidzein과 genistein 단일 표준 물질 및 0.5 × 10⁻⁶M과 0.1 × 10⁻⁶M의 daidzein과 genistein 복합 표준물질을 dimethylsulfoxide (DMSO, 최종농도 < 0.05%, v/v)에 녹여 사용하였다. 약콩 및 대두 추출물의 농도는 선행 연구에서 사용한 0.001, 0.01, 0.1 mg/ml로 하여 실험하였다.^{15,16)}

각 표준 단일 물질의 농도는 하루에 isoflavone 50 mg을 함유하고 있는 식품을 섭취하고 있는 성인의 혈중 isoflavone 농도인 50~800 ng/ml (0.2~3 × 10⁻⁶M)과 성인 여성의 혈중 에스트로겐 농도인 40~80 pg/ml (0.15~0.3 × 10⁻⁹M)을 기준으로 하였다.⁵⁾ Daidzein과 genistein 복합 표준 물질의 농도는 선행 연구를 통하여 파악된 0.001 mg/ml의 약콩 추출물 및 대두 추출물에 함유된 daidzein과 ge-

nistein의 농도 (약콩 추출물: daidzein 0.35×10^{-8} M과 genistein 0.4×10^{-8} M 함유; 대두 추출물: daidzein 0.2×10^{-8} M과 genistein 0.04×10^{-8} M 함유)를 기준으로^{11,13,14}) 0.5×10^{-8} M/each 및 0.1×10^{-8} M/each로 하였다.

4. ER α plasmid 및 antisense ER α plasmid

1.8 kb의 human ER α cDNA의 *Hind*III fragment를¹⁹) pcDNA3 vector에 subcloning한 후 sense와 antisense orientation을 *Bam*H I 제한 효소로 확인하여 sense 및 antisense pcDNA3-ER α plasmid (pcDNA3-ER α : pcDNA3-As-ER α)를 제조하였다.

5. Sense and antisense ER α 의 stable transfection

MG-63 세포를 2×10^5 cells/35 mm plate의 농도로 분주하고 pcDNA3-ER α plasmid (1 μ g) 또는 pcDNA3-As-ER α plasmid (1 μ g)를 2.5M CaCl₂, 2 \times HEPES와 혼합하여 DNA-Calcium phosphate coprecipitation 방법으로 반응시켰다.²⁰ 대조군 control 세포주는 pcDNA3 vector (1 μ g) 만을 2.5M CaCl₂, 2 \times HEPES와 혼합하여 동일한 방법으로 반응시켰다.²⁰ 16시간 후 세포를 15% glycerol이 함유된 PBS로 세척하고 G418 (250 μ g/ml) 항생제가 첨가된 배양액으로 4주간 처리하여 pcDNA3 (vector only: control), pcDNA3-ER α 또는 pcDNA3-As-ER α 가 transfection된 세포만을 선택하고 각각의 세포주에서의 ER α 발현을 western blotting으로 확인하였다.

6. 조골세포의 증식 측정

조골세포의 증식 측정은 단기간에 대량 검색이 가능한 MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] colorimetric assay 방법 (Cell Titer 96 Aqueous One solution Cell Proliferation Assay: Promega)을 사용하여 측정하였다.¹⁵ 96 well plate에 control MG-63 세포, ER α -MG63 세포 또는 As-ER α -MG63 세포를 0.5×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 24시간 후에 약콩 메탄을 추출물, 대두 메탄을 추출물, E₂, daidzein, genistein의 단일 표준 물질 및 daidzein과 genistein 복합 표준물질을 농도별로 투여하여 5일간 배양하였다. 5일째 되는 날 MTS (20 μ l/well) 시약을 첨가하고 4시간 동안 37°C에서 배양한 후 MTS가 formazan으로 분해되는 양을 Elisa Reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 각각의 처리군을 10 well씩 준비하고 실험을 3회 반복하였으며 각 약제에 대한 세포 증식 증가 효과는 3번 반복 실험의 평균값을 취한 후 DMSO만을 처리한 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

7. Western blotting

에스트로겐 수용체 α 와 β (ER α : ER β) 및 IGF-1의 발현을 western blotting으로 측정하였다.^{15,16} 약콩 메탄을 추출물, 대두 메탄을 추출물 및 각각의 표준물질을 5일간 처리한 control MG-63 세포, ER α -MG63 세포 또는 As-ER α -MG63 세포를 1 ml의 RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM NaPO₄, 10% glycerol, 100 M Na₃VO₄, 100 M ammonium molybdate, 1% NP-40, 0.1% SDS)에 4°C 상태로 세포를 풀어놓고, 초음파 파쇄기를 이용해 낮은 강도로 5초 동안 세포벽을 파괴시킨 다음 16시간 동안 -20°C에서 보관하였다. 해동 후 그 균질액을 1500 \times g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 단백질 추출액으로 준비하였다. 단백질 양은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Bio-Rad protein assay를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

준비된 단백질을 2 \times sample buffer에 혼합하고 95°C에서 5분간 끓인 다음 10% polyacrylamide/SDS gel에서 전기 영동시킨 후 Hybond ECL nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. 1차 항체 (ER α , ER β , IGF-1: Santa Cruz Biotech, Inc, USA)는 5% skim milk, 0.1% Tween 20을 함유한 PBS에 희석시켜서 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후, 0.01% Tween-20을 함유한 PBS로 15분씩 3차례 세척하였다. Blocking solution으로 1 : 5000배로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti-IgG 이차 항체와 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.1% Tween-20을 함유한 PBS로 3차례 세척하고 발색은 ECL hyperfilm으로 확인하였고 signal intensity는 imaging densitometer (model GS-700, BIO-RAD, USA)를 사용하여 정량하였다.

8. 통계분석

실험 결과는 SAS 통계 프로그램 (SAS institute, 1987)을 이용하여 분석하였으며 그 결과는 평균 \pm 표준 오차로 표시하였다. 대조군과 처리군 간의 조골 세포의 증식, ER α 와 ER β 및 IGF-1의 발현 변화에 대한 유의성은 general linear model (GLM)의 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. Stable transfection에 의한 ER α 와 ER β 의 발현 변화 검증

pcDNA3-ER α 및 pcDNA3-As-ER α plasmid를 각각 MG-63 세포에 transfection하고 G418 항생제를 4주간 처리한 후 내성이 있는 세포들만을 pooling하여 ER α 의 발현

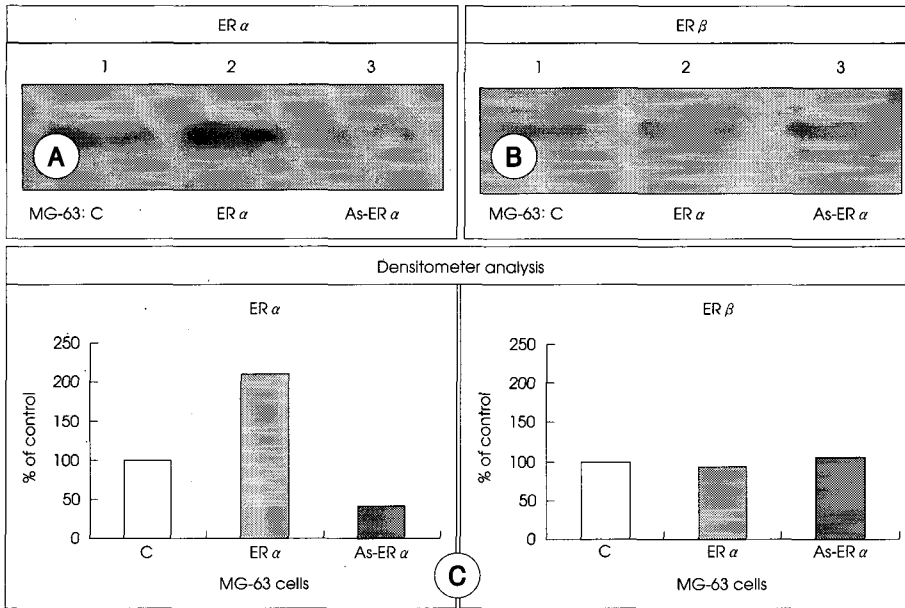


Fig. 1. ER α and ER β expression in transfected MG-63 cells. A and B: Protein extracts (10 μ g/lane) from control (vector pcDNA3 only: lane 1), pcDNA3-ER α (lane 2) or pcDNA3-As-ER α (lane 3) transfected MG-63 cells were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with ER α (A) or ER β (B) specific antibodies. C: Films from A and B were scanned with a densitometer and the area of the resulting peaks were integrated. The % induction was calculated over the area value of control MG-63 cell (100%).

변화를 western blot으로 검증하였다 (Fig. 1). pcDNA3 vector만을 transfection한 control MG-63 세포에 비해 (100%) (Fig. 1A, C, lane 1) pcDNA-ER α transfection은 ER α 의 발현을 211.2%로 증가시켰고, pcDNA3-As-ER α 의 transfection에 의해서는 ER α 의 발현이 42.1%로 억제되었다 (Fig. 1A, C, lane 2, 3). 한편으로 control 및 ER α -MG63과 As-ER α -MG63세포에서 ER β 의 발현 정도는 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 1B, C). 이는 MG-63세포에 pcDNA-ER α 및 pcDNA3-As-ER α plasmid의 transfection은 ER β 의 발현에는 영향을 미치지 않았음을 의미한다.

2. ER α -MG63/As-ER α -MG63 조골 세포에서 약콩 및 대두 처리에 의한 증식 변화

MG-63 세포에서 pcDNA3-ER α /pcDNA3-As-ER α plasmid의 gene transfection에 의한 ER α 의 발현 변화 유도 및 에스트로겐, daidzein, genistein 표준물질을 비롯한 약콩 또는 대두 추출물 처리가 MG-63 세포의 증식에 미치는 효과를 살펴보았다 (Table 1). pcDNA3 vector만을 transfection한 control MG-63 세포에 10⁻⁸M의 estrogen 및 genistein은 ~141.5%까지 증식을 증가시켰으나, 10⁻⁶M의 daidzein 처리에 의한 증식 증가치는 ~122.8%에 머물러 저농도의 estrogen 및 genistein 처리에 의한 증식 증가 효과에는 못 미쳤다. 또한 약콩 추출물은 0.001 mg/ml과 0.01 mg/ml 농도에서 control MG-63 세포의 증식을 ~176.4%까지 증가시켰고 0.1 mg/ml 농도에서는 증식을 억제하였는데 이는 저농도의 약콩 추출물에 함유되어 있는

isoflavone은 에스트로겐 효과를 나타내는 반면 고농도의 약콩 추출물의 isoflavone은 항에스트로겐 효과를 나타냄을 보고한 사전 연구 보고와 일치하였다.^{15,16} 대두 추출물은 0.001~0.1 mg/ml 농도에서 모두 유의적으로 증식을 증가시켰으며 증가 최대치는 158.3%였다. 0.001 mg/ml 농도의 약콩 추출물 처리에 의한 증식의 증가 수준은 10⁻⁹M의 genistein이나 10⁻⁶M의 daidzein 단일 표준 물질 처리에 의한 효과보다 더욱 현저한 반면, 흥미롭게도 0.001 mg/ml 농도의 약콩 추출물의 daidzein 및 genistein 함유량을 (daidzein: 887 mg/kg extract, 0.35 \times 10⁻⁸M in 0.001 mg/ml; genistein: 1219 mg/kg extract, 0.45 \times 10⁻⁸M in 0.001 mg/ml) 기준으로 한 0.5 \times 10⁻⁸M/each의 daidzein과 genistein 복합 표준 물질 처리에 의한 증식 증가와 유사하였는데, 이는 약콩에 함유되어 있는 저 농도의 isoflavone 혼합물은 혼합체들 간의 시너지 효과를 나타내어 10⁻⁶~10⁻⁹M 농도의 isoflavone 단일 처리보다 더욱 현저한 MG-63 조골세포의 증식 증가를 초래하였음을 의미한다. 0.001 mg/ml 농도의 대두 추출물 처리에 의한 증식 증가 또한 대두 추출물의 daidzein 및 genistein 함유량을 (daidzein: 534 mg/kg extract, 0.2 \times 10⁻⁸M in 0.001 mg/ml; genistein: 98 mg/kg extract, 0.04 \times 10⁻⁸M in 0.001 mg/ml) 기준으로 한 0.1 \times 10⁻⁸M/each의 daidzein과 genistein 복합 표준 물질 처리에 의한 증식 증가와 유사하였으나 증가 최대치는 ~158.3%로 약콩 추출물에 의한 증가 최대치에는 미치지 못하였다. 이와 같이 pcDNA3 vector만을 transfection한 control MG-63 세포에서 에스트로겐, daidzein, genistein 표준물질을 비롯한 약콩 또는 대두 추출물 처리에 의한 증식

Table 1. Proliferation of transfected MG-63 cells¹⁾

Cells	Treatment ²⁾						
	Vehicle (DMSO)	E2 (10 ⁻⁹ M)	D (10 ⁻⁶ M)	G (10 ⁻⁹ M)	D+G (M) 0.5 × 10 ⁻⁹ /each 0.1 × 10 ⁻⁹ /each	Yak-kong (mg/ml) 0.001 0.01 0.1	Soybean (mg/ml) 0.001 0.01 0.1
Control	100 ± 6.7	141.5 ± 9.9 ^e	122.8 ± 8.3 ^e	139.1 ± 8.3 ^e	157.3 ± 7.9 ^e	181.0 ± 7.9 ^e	151.8 ± 9.2 ^e
ER α	136.8 ± 6.1 ^f	164.9 ± 12.6 ^f	155.2 ± 7.9 ^e	168.6 ± 13.5 ^{cd}	218.8 ± 8.2 ^e	210.4 ± 8.2 ^e	176.8 ± 11.7 ^e
As-ER α	70.3 ± 6.3 ^g	82.3 ± 11.7 ^g	80.1 ± 11.4 ^{bc}	83.1 ± 7.5 ^b	101.1 ± 7.2 ^e	103.8 ± 11.7 ^e	99.1 ± 15.8 ^g

¹⁾ Values are mean ± SD (%) from three independent experiments done in 10 samples/treatments. Different letters in the same row indicate significant differences (p < 0.05). ²⁾ Control (vector only), pcDNA3-ER α (ER α) or pcDNA3-As-ER α (As-ER α) transfected MG-63 cells were plated at 0.5 × 10⁴ cells/well. After 24 hrs, estrogen (E2: 10⁻⁹M), daidzein (D: 10⁻⁶M), genistein (G: 10⁻⁹M), daidzein + genistein (D + G: 0.5 × 10⁻⁹M/each, 0.1 × 10⁻⁹M/each), yak-kong (0.001, 0.01 and 0.1 mg/ml) or soybean (0.001, 0.01 and 0.1 mg/ml) was added at an indicated concentration. After 5 days, MTS solution was added and absorbance was measured at 490 nm

증가 수치는 parental MG-63 세포에 이들 표준 물질의 처리에 의한 절대적인 증가 수치와는 상이하나 상대적인 증가 효과와는 일치하여,^{15,16)} pcDNA3 vector만이 transfection된 control MG-63 세포에서의 에스트로젠, daidzein, genistein 표준물질을 비롯한 약콩 또는 대두 추출물 처리가 증식에 미치는 효과는 parental MG-63 세포와 유사함을 확인하였다.

Control MG-63 세포에 비해 (100%) sense ER α 의 발현 증가는 (ER α -MG63 세포) 증식을 136.8%로 증가시켰으며, ER α -MG63 세포에 10⁻⁹M의 estrogen과 genistein 및 10⁻⁶M의 daidzein의 첨가 처리는 ~168.6%까지 증식을 더욱 증가시켰는데, 이 증가 최대치는 control MG-63 세포에 대한 이들 표준 물질의 처리에 의한 증식 증가치에 비해 ~27.1%가 더 높았다. ER α -MG63 세포에 0.001 mg/ml -0.1 mg/ml 농도 범위의 약콩과 대두 추출물의 첨가 처리는 처리 농도와 역의 상관 관계로 ~210.4%까지 증식을 증가시켜 이 또한 control MG-63 세포에서 이들 추출물 처리에 의한 증식 증가치에 비해 ~42.4%가 더 높았다. ER α -MG63 세포에서도 0.001 mg/ml의 약콩 추출물 및 대두 추출물 처리에 의한 증식 증가 효과는 각 추출물에 상응하는 농도의 daidzein과 genistein 복합 표준 물질 처리에 의한 증식 증가와 유사하였다.

Antisense ER α 의 항시 발현에 의한 ER α 의 발현 억제 (As-ER α -MG63 세포) 증식을 70.3%로 억제시켰다. As-ER α -MG63 세포에 10⁻⁹M의 estrogen과 genistein 및 10⁻⁶M의 daidzein의 첨가 처리는 ~83.1%의 증식 증가 효과를 나타내었고 0.001 mg/ml과 0.01 mg/ml 농도의 약콩과 대두 추출물의 첨가 처리는 ~103.8%의 증식 증가 효과를 나타내었으나 이는 control 세포의 증가 수치에 비해서는 (100%) 여전히 억제 또는 유사한 수준이었다. 또한 As-ER α -MG63 세포에서 0.001 mg/ml의 약콩 추출물 및 대두 추출물 처리에 의한 증식 증가 효과는 유사하였고 각 추출물에 상응하는 농도의 daidzein과 genistein 복합 표준 물질 처리에 의한 증식 증가와도 유사하여 ER α 의 발현이 억제된 경우 대두 추출물에 비해 약콩 추출물에 함유된 isoflavone의 MG-63 조골 세포의 증식에 대한 우월한 시너지 효과가 나타나지 않았다. 이 결과는 estrogen, daidzein, genistein 표준물질에 의한 조골 세포에 증식 증가 및 약콩 또는 대두 추출물에 함유된 저 농도 isoflavone의 조골 세포 증식 증가를 위한 시너지 효과는 ER α 에 의해 매개됨을 제안한다.

3. ER α -MG63/As-ER α -MG63 조골 세포에서 약콩 및 대두 처리에 의한 에스트로겐 수용체의 발현 변화

MG-63 세포에서 ER α 의 발현 변화 유도 및 에스트로젠,

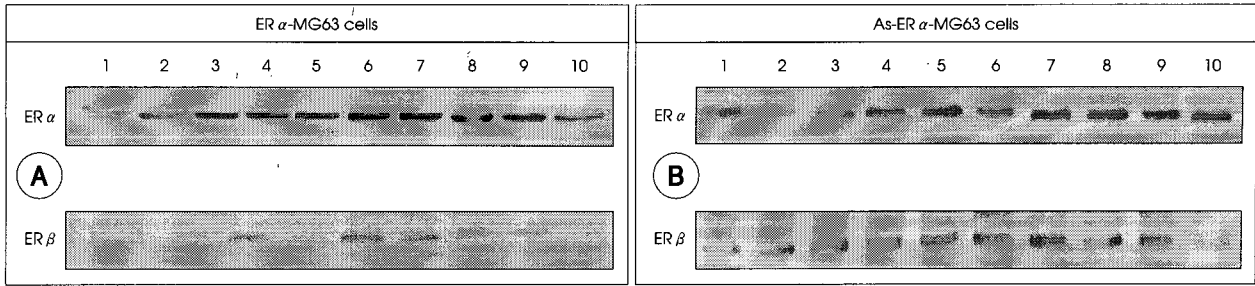


Fig. 2. Representative expression of ER α and ER β in transfected MG-63 cells. Protein extract (10 μ g/lane) from pcDNA3-ER α (ER α -MG63 cells: A) or pcDNA3-As-ER α (As-ER α -MG63 cells: B) transfected MG-63 cells treated with vehicle (DMSO only, lane 2), E2 (10⁻⁹M, lane 3), daidzein (10⁻⁶M, lane 4), genistein (10⁻⁶M, lane 5), genistein + daidzein (0.5 \times 10⁻⁶M/each, lane 6), Yak-kong (0.001, 0.1 mg/ml, lanes 7-8) or soybean (0.001, 0.1 mg/ml, lanes 9-10) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with ER α or ER β specific antibodies. Protein extract (10 μ g/lane) from control MG-63 cells (vector only transfected) was loaded in lane 1 in each western blotting.

Table 2. Relative levels of ER α and ER β protein expression in transfected MG-63 cells¹⁾

A. ER α										
Cells	Lanes/treatment ²⁾									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	C	V	E ₂	D	G	0.5D/G	Y (0.001 mg/ml)	Y (0.1 mg/ml)	S (0.001 mg/ml)	S (0.1 mg/ml)
ER α	100	211.2	275.3	261.3	272.6	401.4	410.7	327.8	389.3	241.6
As-ER α	100	42.1	83.7	97.3	89.3	91.6	96.4	86.9	94.3	103.7

B. ER β										
Cells	Lanes/treatment ²⁾									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	C	V	E ₂	D	G	0.5D/G	Y (0.001 mg/ml)	Y (0.1 mg/ml)	S (0.001 mg/ml)	S (0.1 mg/ml)
ER β	100	96	146	151	147	210	200	184	171.2	82
As-ER β	100	105	150	143	153	158	160	118	153	105

¹⁾ Films from Fig. 2 were scanned with a densitometer and the integrated area of the resulting peaks were normalized to the integrated area of actin band (not shown). For ER α (A) and ER β (B) protein levels, the fold induction of each treated cells was calculated over the area value in control MG-63 cells (C: vector only transfected, lane 1). ²⁾ C: control (vector only transfected) MG-63 cells, V: vehicle, E₂: estrogen 10⁻⁹M, D: daidzein 10⁻⁶M, G: genistein 10⁻⁶M, 0.5 D/G: genistein + daidzein, 0.5 \times 10⁻⁶M/each, Y: Yak-kong, S: soybean

daidzein, genistein 표준물질을 비롯한 약콩 또는 대두 추출물 처리가 에스트로겐 수용체인 ER α 와 ER β 의 발현에 미치는 효과를 살펴보았다 (Fig. 2, Table 2). pcDNA3 vector만을 transfection한 control MG-63 세포에 비해 (lane 1: 100%) pcDNA-ER α transfection은 ER α 의 발현을 211.2%로 증가시켰다 (ER α -MG63: lane 2). ER α -MG63 세포에 10⁻⁹M의 estrogen과 genistein 및 10⁻⁶M의 daidzein의 첨가 처리는 ER α 의 발현을 ~275.3% 증가시켰고 약콩과 대두 추출물 처리는 농도와 역의 관계로 ER α 의 발현을 ~410.7%까지 더욱 현저히 증가시켰다. 0.001 mg/ml 약콩 추출물 처리에 의해 ER α 의 발현은 410.7% 증가한 반면 (ER α -MG63: lane 7) 0.001 mg/ml 대두 추출물 처리에 의해서는 389.3% 증가하였으며 (ER α -MG63: lane 9), 0.001 mg/ml 약콩 추출물 처리에 의한 ER α 의 발현은 0.001 mg/ml 농도의 약콩 추출물의 daidzein 및 genistein의 함유량에 상응하는 0.5 \times 10⁻⁶M/each 농도의

daidzein과 genistein 복합 표준 물질 처리에 의한 ER α 의 발현 증가와 (ER α -MG63: lane 6; 401.4%) 유사하였다. pcDNA-As-ER α transfection은 ER α 의 발현을 현저히 억제시켰으며 (As-ER α -MG63: lane 2, 42.1%), 10⁻⁹M의 estrogen과 genistein 및 10⁻⁶M의 daidzein의 첨가 처리에 의해서도 ER α 의 발현의 정도는 83.7~97.3% 수준에 머물렀다 (As-ER α -MG63: lanes 3-5). 또한 약콩 및 대두 추출물과 0.5 \times 10⁻⁶M/each 농도의 daidzein과 genistein 복합 표준 물질 처리는 antisense ER α 의 gene transfection에 의해 감소된 ER α 의 발현을 다소 증가시켰으나 (As-ER α -MG63: lanes 6-10) ER α 의 발현의 정도는 control MG-63 세포 또는 estrogen, daidzein 및 genistein 단일 표준 물질 처리와 유사한 수준이었다.

ER β 의 발현은 pcDNA3-ER α /pcDNA3-As-ER α plasmid의 gene transfection에 의한 ER α 의 발현 변화 유도에 의해 크게 변화되지 않았다. ER α -MG63 세포 및 As-

ER α -MG63 세포에 10^{-9} M의 estrogen과 genistein 및 10^{-6} M의 daidzein의 첨가 처리는 ~153%까지 ER β 의 발현을 증가시켰고 (ER α -MG63/As-ER α -MG63: lanes 3-5) 약콩과 대두 추출물 처리는 농도와 역의 관계로 ER β 의 발현을 증가시켰다 (ER α -MG63/As-ER α -MG63: lanes 7-10). 그러나 As-ER α -MG63 세포에서 0.001 mg/ml 약콩 및 대두 추출물 처리에 의한 ER β 의 발현 증가가 유사한 반면 (160.0%: 153%), ER α -MG63 세포에서 0.001 mg/ml 약콩 추출물 처리에 의한 ER β 의 발현 증가는 (200.0%) 0.001 mg/ml 대두 추출물 처리에 의한 ER β 의 발현 증가에 (171.20%) 비해 더욱 현저히 높았다. 이 결과는 pcDNA-ER α transfection에 의한 ER α 의 발현 증가 유도는 ER β 의 발현 변화를 야기하지 않음에도 불구하고 에스트로겐, daidzein, genistein 표준물질을 비롯한 약콩 또는 대두 추출물의 첨가 처리는 ER α 뿐 아니라 ER β 의 발현 증가를 가중시켰음을 의미한다. 일반적으로 에스트로겐과 유사 구조를 가지고 있는 isoflavone은 ER α 보다는 ER β 에 대한 친화력이 5배 이상 높아서, ER β 가 isoflavone의 체내 여러 생리화학적 효과를 주관하는 주요 에스트로겐 수용체로 인식되고 있고,²¹⁾ control MG-63 조골 세포 및 ER α -MG63 세포에서 에스트로겐, daidzein, genistein 표준물질을 비롯한 약콩 또는 대두 추출물 처리는 증식 증가와 더불어 ER α 와 ER β 의 발현 증가를 유도하였는데 이는

ER α 와 ER β 가 isoflavone에 의한 MG-63 조골 세포의 증식 증가를 위한 역할에 중복성이 있음을 제안한다. 그러나 에스트로겐, daidzein, genistein 표준물질을 비롯한 약콩 또는 대두 추출물 처리에 의해 증식이 증가된 control 조골세포에서 ER β 보다는 ER α 의 발현이 현저히 증가하였으며, 약콩 또는 대두 추출물의 첨가 처리에 의한 ER β 의 발현 증가 효과는 ER α 의 발현을 억제한 As-ER α -MG63세포보다 ER α 발현의 증가를 유도한 ER α -MG63 세포에서 더욱 현저하였다. Fig. 2와 Table 2의 결과는 Table 1의 결과와 함께 종합적으로 estrogen, daidzein, genistein 표준물질을 비롯한 약콩 또는 대두 추출물에 함유된 isoflavone의 조골 세포에 대한 증식 증가 효과는 ER β 보다는 ER α 수용체의 발현 증가와 함께 이루어지는 것을 의미한다.

4. ER α -MG63/As-ER α -MG63 조골 세포에서 약콩 및 대두 처리에 의한 IGF-I의 발현 변화

MG-63 조골세포의 증식 유도인자로 IGF- I, IGF- II 그리고 PDGF가 알려져 있으며,²²⁾ 이 중 IGF- I이 에스트로겐을 비롯하여 isoflavone, 약콩 및 대두 추출물에 의한 MG-63 세포의 주요 증식 유도 인자임이 사전 연구에서 보고되었다.^{15,16)} 이에 MG-63 세포에서 ER α 의 발현 변화 유도 및 에스트로겐, daidzein, genistein 표준물질을 비롯한 약콩 또는 대두 추출물 처리가 IGF- I의 발현에 미치는 효과를 살펴보았다 (Fig. 3, Table 3). Control MG-63 세포에 비

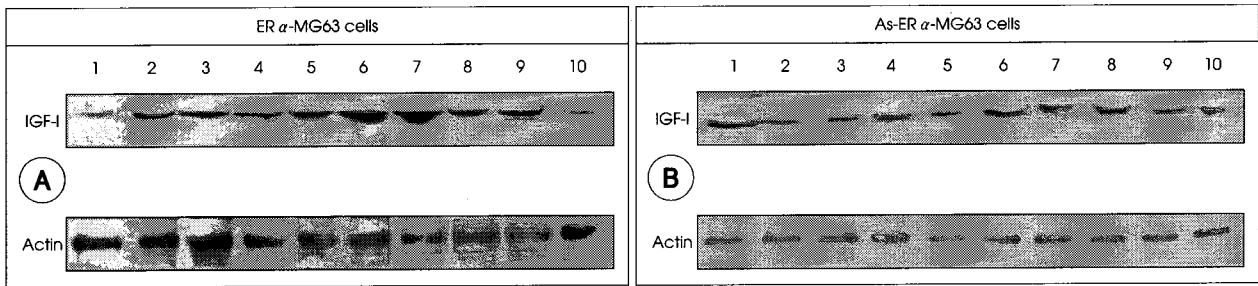


Fig. 3. Representative expression of IGF-I in transfected MG-63 cells. Protein extract (10 μ g/lane) from pcDNA3-ER α (ER α -MG63 cells: A) or pcDNA3-As-ER α (As-ER α -MG63 cells: B) transfected MG-63 cells treated with vehicle (DMSO only, lane 2), E2 (10^{-9} M, lane 3), daidzein (10^{-6} M, lane 4), genistein (10^{-6} M, lane 5), genistein + daidzein (0.5×10^{-6} M/each, lane 6), Yak-kong (0.001, 0.1 mg/ml, lanes 7-8) or soybean (0.001, 0.1 mg/ml, lanes 9-10) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with IGF-I specific antibody. Protein extract (10 μ g/lane) from control MG-63 cells (vector only transfected) was loaded in lane 1 in each western blotting.

Table 3. Relative levels of IGF-I protein expression in transfected MG-63 cells¹⁾

Cells	Lanes/treatment ²⁾									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	C	V	E ₂	D	G	0.5D/G	Y (0.001 mg/ml)	Y (0.1 mg/ml)	S (0.001 mg/ml)	S (0.1 mg/ml)
ER α	100	246.1	265.0	231.3	264.2	389.7	402.0	273.0	291.3	98.1
As-ER α	100	51.8	81.2	84.3	82.4	103.5	96.1	106.1	90.5	82.3

¹⁾ Films from Fig. 3 were scanned with a densitometer and the integrated area of the resulting peaks were normalized to the integrated area of actin band. For IGF-I protein levels, the fold induction of each treated cells was calculated over the area value in control MG-63 cells (C: vector only transfected, lane 1). ²⁾ C: control (vector only transfected) MG-63 cells, V: vehicle, E₂: estrogen 10^{-9} M, D: daidzein 10^{-6} M, G: genistein 10^{-6} M, 0.5 D/G: genistein + daidzein, 0.5×10^{-6} M/each, Y: Yak-kong, S: soybean

해 (lane 1: 100%) ER α 의 발현 증가 유도는 IGF-I의 발현을 246.1%로 증가시켰다 (ER α -MG63: lane 2). ER α -MG63 세포에 10⁻⁸M 에스트로겐 및 genistein의 첨가 처리는 ~265.0%까지 IGF-I의 발현을 증가시켰고 약콩과 대두 추출물 처리는 농도와 역의 관계로 IGF-I의 발현을 더욱 현저히 증가시켰다. 0.001 mg/ml 대두 추출물에 비해 0.001 mg/ml 약콩 추출물에 의한 IGF-I의 발현이 더욱 현저하였으며 (ER α -MG63: lane 7, 402.0%; lane 9, 291.3%), 이 또한 0.001 mg/ml 약콩 추출물의 daidzein 및 genistein의 함유량에 상응하는 0.5 × 10⁻⁸M/each 농도의 daidzein과 genistein 복합 표준 물질 처리에 의한 IGF-I의 발현 증가와 (ER α -MG63: lane 6; 389.7%) 유사하였다. Control MG-63 세포에 비해 (100%) anti-sense ER α gene transfection은 IGF-I의 발현을 억제시켰으며 (As-ER α -MG63: lane 2, 51.8%), 10⁻⁹M의 estrogen과 genistein 및 10⁻⁶M의 daidzein의 첨가 처리는 antisense ER α 의 gene transfection에 의해 감소된 IGF-I의 발현을 다소 증가시켰으나 발현의 정도는 ~84.3% 수준에 머물렀다 (As-ER α -MG63: lanes 3-5). 약콩 및 대두 추출물과 0.5 × 10⁻⁸M/each 농도의 daidzein과 genistein 복합 표준 물질 처리는 antisense ER α 의 gene transfection에 의해 감소된 IGF-I의 발현을 다소 증가시켰으나 (As-ER α -MG63: lanes 6-10) 이는 control MG-63 세포 또는 estrogen, daidzein 및 genistein 단일 표준 물질 처리와 유사한 수준이었다.

Isolflavone 단일 표준물질이나 약콩 및 대두에 함유된 여러 isoflavone들의 시너지 효과에 의한 MG-63 조골 세포의 증식 증가는 이들 isoflavone의 estrogenic response의 증가 또는 에스트로겐 수용체와 growth factor signaling과의 상호 교류 (cross talk)에 기인하는 것으로 알려져 있다.^{22,23)} 사전 연구 결과를 비롯하여^{15,16)} Fig. 3, Table 3의 결과는 IGF-I이 isoflavone에 의한 MG-63 조골세포의 주요 증식인자임을 제안하나, IGF-I 유전자의 promoter에는 ERE (estrogenic response element)가 존재하지 않아^{24,25)} IGF-I 유전자의 발현은 estrogen이나 isoflavone에 의해 직접적으로 조절되지 않는 것으로 여겨진다. 그러나 IGF-I의 promoter에 AP-1 site가 존재하고 ER α 와 ER β 모두 AP-1 site에 결합하여 유전자의 발현을 조절할 수 있음이 알려져 있어,²⁶⁾ 이 보고들은 isoflavone에 의한 MG-63 세포의 증식 증가가 에스트로겐 수용체와 IGF-I promoter의 AP-1 site의 상호 작용에서 기인한 IGF-I의 발현 증가를 통하여 이루어짐을 제안한다. ER α 또는 ER β 와 AP-1 site의 상호 작용은 서로 상반되는 에스트로겐 효과

를 초래하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 즉 ER α 와 AP-1 site의 상호 작용의 경우, isoflavone은 에스트로겐 효과를 나타내어 궁극적으로 세포의 증식 증가를 초래하는 반면, ER β 와 AP-1 site와의 상호 작용을 통하는 경우는 isoflavone이 항에스트로겐 효과를 초래하여 세포의 증식 억제를 초래하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 본 실험의 결과는 약콩 처리에 의한 현저한 MG-63 세포의 증식 증가는 ER β 보다는 ER α 와 약콩 추출물에 함유된 isoflavone 혼합체간의 상호 작용을 통한 IGF-I의 선택적인 발현 증가에 의해 초래되었음을 나타낸다.

요약 및 결론

본 연구에서는 ER α 의 발현이 증가된 MG-63 조골세포주 (ER α -MG63 cell line)와 ER α 의 발현이 극히 억제된 MG-63 조골세포주 (As-ER α -MG63 cell line)를 분자생물학적인 방법으로 제조하고 각각의 세포주에 약콩 및 대두 추출물 처리 후 증식 및 에스트로겐 수용체와 IGF-I 발현의 변화 정도를 측정하여 약콩 및 대두 처리에 의한 MG-63 조골세포 증식 증가에서 ER α 의 역할을 규명하고자 하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) Control MG-63 세포에 비해 ER α 의 발현 증가는 (ER α -MG 63 세포) 증식을 136.8%로 증가시켰다. 에스트로겐, daidzein, genistein 표준물질을 비롯한 약콩 또는 대두 추출물의 첨가 처리는 증식을 더욱 현저히 증가시켰는데, 이 중 약콩 추출물에 의한 증식 증가 효과가 가장 높았으며 이는 이 추출물에 상응하는 농도의 daidzein과 genistein 복합 표준 물질 처리에 의한 증식 증가 효과와 유사하였다.

2) pcDNA3-As-ER α plasmid의 gene transfection은 ER α 의 발현을 현저히 억제하였으며 이와 병행하여 증식이 70.3%로 (of control: 100%) 억제되었고 약콩 및 대두 추출물의 첨가 처리에 의해서도 미비한 증식 증가 효과를 나타내었다.

3) ER α -MG 63 세포에 0.001 mg/ml의 약콩과 대두 추출물 처리는 ER α 및 ER β 의 발현을 모두 증가시켰는데 ER α 의 발현을 더욱 현저히 증가시켰다.

4) As-ER α -MG 63 세포에 약콩과 대두 추출물 처리는 ER α 의 발현을 control MG-63 세포 수준으로 미비하게 증가시켰고, ER β 의 발현은 다소 증가시켰다.

5) ER α -MG 63 세포와 As-ER α -MG 63 세포에서 약콩과 대두 추출물 처리에 의한 IGF-I의 발현 변화를 살펴본 결과 ER α -MG 63 세포에서는 약콩과 대두 처리에

의해 모두 증가한 반면, As-ER α -MG 63 세포에서 그 효과가 미비하였다.

이상의 결과를 종합해보면 약콩 및 대두 추출물 처리에 의한 MG-63 조골세포의 증식 및 IGF- I 발현 증가는 ER β 수용체보다는 ER α 수용체에 의해 유도되었다. ER α -MG63 조골세포에 isoflavone 혼합체인 약콩 추출물의 처리는 에스트로겐 및 isoflavone 단일 표준물질보다 더욱 현저히 증식을 증가시켰는데 이는 저 농도의 isoflavone 혼합물이 혼합체들 간의 시너지 효과를 나타내어 고농도의 isoflavone 단일 처리보다 더욱 현저한 ER α -MG-63 조골세포의 증식 및 IGF- I 발현 증가 효과를 나타냄을 의미하며 isoflavone이 ER α 보다 ER β 에 대한 결합력이 큰 것으로 알려져 있음에도 불구하고 약콩과 대두 추출물의 MG-63 조골 세포에 대한 증식 증가 효과는 ER β 보다는 ER α 수용체의 발현 증가와 함께 이루어지는 것을 제안한다.

Literature cited

- 1) Kim KS, Min BK, Lee SP, Kim IS, Kim HY, Sim JR. Evaluation of biochemical markers of bone turnover in postmenopausal osteoporotic women to Alendronate treatment *J Korean Soc Menopause* 6 (1) : 36-42, 2000
- 2) Kim KS. Osteoporosis. The Women's News. Seoul, pp10-11, 1998
- 3) Rogers J. Estrogens in the menopause and postmenopause. *N Engl J Med* 280: 364-367, 1967
- 4) Anderson JJB, Garner SC. Phytoestrogens and bone. *Baillieres Best Tract Res Clin Endocrinol Metab* 12(4) : 543-557, 1998
- 5) Setchell KDR, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129: 758S-767S, 1999
- 6) Lee HK. Effect of blackbean and sam-ryung-bak-chul-san on ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. Doctoral Thesis. The Graduated School of Khyung Hee University, 1998
- 7) Ryu IC, Lee YM, Koo Y, Bae KW, Chung CP. Effect of safflower extracts on activity of PDL cells and MG-63 cells. *J Korean Acad Periodontol* 27(4) : 867-882, 1997
- 8) Ho JY. Cell proliferation effects of eucommiae cortex and acanthopanacis cortex methanol extracts on the osteoblast-like cell lines, MG-63 and Saos-2. Master thesis. The Graduate School of Kyung Hee University, 2001
- 9) Kim MR, Yang CH, Seo BI. Effects of safflower seeds on bone mineral density in ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. *Korean J Herbology* 13(2) : 37-43, 1998
- 10) Milsicek RJ. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49: 153-160, 1994
- 11) Kim CS, Lee YS, Kim JS, Hahn YH. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in soybean foods. *Korean J Food Sci Technol* 32(1) : 25-30, 2000
- 12) Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 83(2) : 297-303, 1998
- 13) Kang SA, Jang KH, Cho Y, Hong KH, Kong SH, Choue RW. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in soybean and blackbean. *J ARAHE* 8(1) : 44-48, 2001
- 14) Kang SA, Jang KH, Cho Y, Hong KH, Suh JH, Choue RW. Effects of artificial stomach fluid and digestive enzymes on the aglycone isoflavone contents of soybean and black bean (*Rhynchosia volubilis*: Yak-kong). *Korean J Nutrition* 36(1) : 32-33, 2003
- 15) Cho Y, Park S, Shin H, Jang KH, Kang SA, Choue RW. Comparative estrogenic effects of yak-kong and soy bean on the proliferation of human osteoblastic cell line, MG-63. *Korean J Nutrition* 34(8) : 905-911, 2001
- 16) Kim J, Um SJ, Woo J, Kim JY, Kim HA, Jang KH, Kang SA, Lim BO, Kang I, Choue RW, Cho Y. Comparative effect of seeds of *Rhynchosia volubilis* and soybean on MG-63 human osteoblastic cell proliferation and estrogenicity *Life Sci*, 2005 (In press)
- 17) Vidal O, Kindbolom LG, Ohlsson C. Expression and localization of estrogen receptor- β in murine and human bone *J Bone Miner Res* 14(6) : 923-929, 1999
- 18) Lambertini E, Penolazzi L, Aguiari G, del Senno L, Pezzetti F, Sollazzo V, Piva R. Osteoblastic differentiation induced by transcription factor decoy against estrogen receptor α gene. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 761-770, 2002
- 19) Su LF, Knoblauch R, Garabedian MJ. Rho GTPases as modulators of the estrogen receptor transcriptional response. *J Biol Chem* 276: 3231-3237, 2001
- 20) Graham FI, Van der AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467, 1973
- 21) Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JÅ. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138: 863-870, 1997
- 22) Sandy J, Davies M, Prime S, Farndale R. Signal pathways that transduce growth factor-stimulated mitogenesis in bone cells. *Bone* 23: 17-26, 1998
- 23) Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res* 263: 30-48, 1991
- 24) Kim SW, Lajara R, Rotwein P. Structure and function of a human insulin-like growth factor-I gene promoter. *Mol Endocrinol* 5: 1964-197, 1991
- 25) Hall LJ, Kajimoto Y, Bichell D, Kim SW, James PL, Counts D, Nixon LJ, Tobin G, Rotwein P. Functional analysis of the rat insulin-like growth factor I gene and identification of an IGF-I gene promoter. *DNA Cell Biol* 11: 301-313, 1992
- 26) Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, Imano E, Iwama N, Morishima T, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Kamada T. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem* 269: 16433-16442, 1994
- 27) Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, Mc Inerney E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JÅ, Nilsson S, Kushner PJ. The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 13: 1672-168, 1999