



골개형(Bone Remodelling)의 분자생물학적 기전에 대한 노화, 에스트로젠 및 산화적 스트레스의 영향

박영철¹ · 고영도² · 한정호³ · 김미경⁴

¹대구가톨릭대학교 바이오안전성센터, ²이화여자대학교 의과대학 정형외과 (목동병원),
³서울대학교 의학연구원, ⁴영남대학교 해양과학연구소

Effects of Estrogen, Aging and Oxidative Stress on Bone Remodelling in a View of Molecular Mechanisms

Yeong-Chul Park¹, Young-Do Koh², Jung-Ho Han³ and Mi-Kyung Kim⁴

¹Center for Bio-Safety, Catholic University of Daegu, Hayang-Up, Keongsan-Si, Keongbuk, 712-702

²Department of Orthopaedic Surgery, Medical College, Ewha Women University, Seoul, 158-056

³Medical Research Center, Seoul National University, Yeonkundong 28, Chogno-Ku, 110-460

⁴Marine Science Research Center, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Received August 2, 2006; Accepted September 1, 2006

ABSTRACT. Bone is a dynamic tissue that is constantly being remodelled. Resorption of bone and formation of new bone are closely linked, so that bone mass remains constant. With age, this process becomes unlinked with an imbalance in bone resorption and formation that results in a net loss of bone. Especially, osteoporosis is a disease characterized by low bone mass with age. One form of aging-related primary osteoporosis is postulated with the reduction of circulating estrogen, rapid bone loss occurs as a result of enhanced bone remodelling with an excess of resorption over bone formation. The oxidative stress is also involved in the pathogenesis of osteoporosis. Oxidative stress by cytokines, such as IL-1 and TNF- α , inhibits osteoblast function in vitro and stimulates osteoblast apoptosis resulting in an imbalance in bone remodelling. The present article reviews the current perspectives on the interaction between bone remodelling and factors such as estrogen and oxidative stress, providing an interpretation of bone diseases in a view of molecular mechanisms.

Keywords: Bone remodelling, Signal transduction, Aging, Estrogen, Oxidative stress.

서 론

골(bone)은 일생을 통해 개형(remodelling)이라는 과정을 통해 지속적으로 교체된다. 정상적인 신체의 상태에서 골개형(bone remodelling)은 오래된 골을 제거하는 파골세포(osteoclast)에 의한 골흡수(bone resorption)와 제거된 위치에서 조골세포(osteoblast)에 의한 새로운 골형성(bone formation)으로 이루어진다. 이러한 두 과정 즉, 골흡수와 골형성은 서로 밀접히 연관되어 이루어지고 골의 정상적인 구조적 특성을 유지하는데 중요하다. 그러나

골개형에 있어서 두 세포간의 균형적인 역할에 있어서 부조화가 일어나면 골질환이 발생한다. 특히, 골다공증(osteoporosis)은 총골량(total bone mass)이 감소하는 골질환으로 파골세포에 의한 골흡수 증가에 의한 골상실(bone loss)이 그 원인으로 설명되고 있다(Troen, 2003; Lerner, 2006). 골다공증은 다양한 원인에 의해 유발되지만 노화와 에스트로젠 결핍을 유도하는 폐경에 의해 이환빈도가 증가되어 사회적 문제로 대두되고 있다. 폐경에 의한 에스트로젠 결핍은 골흡수를 억제시키는 에스트로젠의 직접적인 영향을 제거시킴으로써, 반면에 노화는 이차적인 부갑상선의 기능항진을 유도함으로써 골흡수의 증가를 통해 골다공증이 유발되는 것으로 이해되고 있다. 그러나 중요한 점은 둘 다 골개형에 있어서 골흡수와 골형

Correspondence to: Mi-Kyung Kim, Marine Science Research Center, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea
E-mail: mkkim@yu.ac.kr

성의 상호작용에 있어서 부조화를 통한 골상실이 골다공증의 주요한 원인이라는 점이다. 이러한 골개형의 부조화의 원인에 대해 지난 수년에 걸쳐 cytokine과 국소적 매개체(local mediator)인 유해활성산소를 비롯하여 nitric oxide(NO) 등과 관련한 산화적 스트레스(oxidative stress)에 대해 많은 연구가 이루어졌다(Raisz, 2005; van't Hof and Ralston, 2001). 따라서 골흡수와 골형성의 골개형과 관련하여 조골세포와 파골세포의 세포 생물학적 생성 기전과 이들 기전을 조절하는 요소들에 대한 이해는 골질환, 특히 골다공증의 기전에 대한 깊은 이해와 더불어 예방과 치료에 대한 새로운 방향을 제시해 줄 수 있다.

본 론

골세포의 발생 및 골개형의 기전

골질환과 관련하여 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 생성 기전에 대한 이해와 연구는 지난 20년여 동안 상당한 진전이 있었다. 이들 세포 간의 증식과 기능을 조절하는 요소들의 상호 작용에 대한 이해는 골다공증의 주요한 원인인 골형성과 골흡수의 불균형을 이해하는데 있어서 필수적이다(그림 1). 그러나 골세포의 생성 및 골개형(bone remodelling)은 그 기전이 아직 완벽히 밝혀지지 않았고 다양한 세포들이 다양한 과정을 거치는 복잡성 때문에 특징적 지표가 없어 연구에 어려움이 상당히 있다. 더욱이, 노화와 폐경에 의한 골의 변화는 수년에 걸쳐 천천히 발생하기 때문에 짧은 시간에 걸쳐 발견하기가 쉽지 않다. 다행히, 최근에 새롭게 개발된 세포 배양법과 동물 모델을 비롯하여 분자 생물학적 도구와 골밀도 측정 도구의 발달로 상당한 진전이 있었다.

골세포의 기원. 일반적으로 파골세포와 조골세포는 모두 골수에서 생성되는 전구체 세포(precursor cells)로부

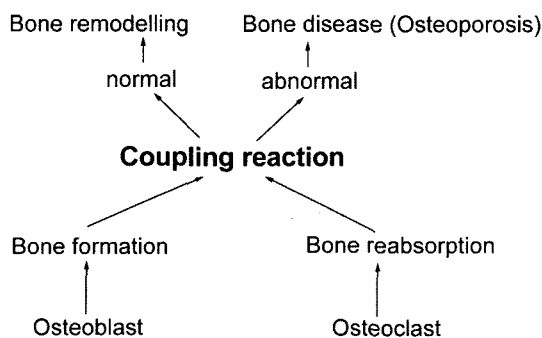


그림 1. 골개형(bone remodelling)과 골질환(골다공증)의 일반적인 기전: 골개형은 일반적으로 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)에 의한 골형성과 골흡수의 조화적인 작용(coupling reaction)을 통해 발생한다. 그러나 이러한 조화적인 작용의 이상으로 인해 골상실(bone loss)을 유도하여 골다공증을 유발하게 된다.

터 유래한다. 파골세포는 다기능성 조혈세포(multiple potential hematopoietic cells)인 CFU(colony forming unit)-GMM(granulocyte/megakaryocyte/macrophage) 과 CFU-GM(CFU-granulocyte/macrophage)에서 뿐만 아니라 다기능성 주세포(pluripotent stem cells)에서 유래한다고 알려졌다(Hagenaars *et al.*, 1989; Hattersley *et al.*, 1991; Kerby *et al.*, 1992; Kurihara *et al.*, 1990; Yamazaki *et al.*, 2001). 반면 골수에 존재하는 파골세포의 progenitor가 대식세포(macrophage) 계통에서 분기한다는 것은 확실치 않다. 그러나 기질세포(stroma cells; 골의 구조적 형태를 지지하는 세포)와 함께, 폐, 비장 및 혈액 등의 조직에서부터 분리된 단핵세포/대식세포(monocyte/macrophage)를 함유한 배양물이 파골세포를 생성한다고 알려졌다(Roodman, 2006; Udagawa *et al.*, 1990).

골수의 기질세포와 조골세포는 다기능성 주세포(pluripotent stem cells)에서 기원한다. 대부분의 조혈세포가 유동성을 가진 것과는 달리 기질세포와 조골세포는 휴지기(quiescent)상태로 지주표면(trabecular surface)에 부착되어 lining cell을 형성하게 된다. 이 시기의 조골세포는 골흡수 호르몬 등에 반응하여 파골세포에 의한 골흡수를 촉진시키는 cytokine을 분비하는 것으로 알려졌다(Horowitz *et al.*, 1989; Ishimi *et al.*, 1990; Libermann and Baltimore, 1990; Stulgren *et al.*, 2005). 골세포뿐만 아니라 섬유아세포, 연골세포, 지방세포 및 근육세포로 될 수 있는 잠재력을 가지고 있는 기질세포는 골수세포 배양에서 접착성(adherent) 군락(colony)을 형성한다. 이러한 colony를 형성하는 원조세포(progenitor)를 colony forming unit-fibroblast(CFU-F)라고 하며 CFU-F에 존재하는 세포들이 신장낭(kidney capsule)에 전이 되었을 때 골형성과 혈액형성(hematopoiesis)을 유도할 수 있다(Friedenstein *et al.*, 1974). 또한 골수세포 배양을 통해 얻어진 CFU-F를 함유한 배지에서 골이 생성되는 것이 확인되었다(Ashton *et al.*, 1980; Nagashima *et al.*, 2005). 더욱이, 기질세포는 적절한 조건하의 실험관내(*in vitro*)에서 석회화된 소절(nodule)을 형성한다(McCulloch *et al.*, 1991). 기질세포와 조골세포는 기능적인 특성에 있어서 상당히 유사하다. 실제로, 골수에서 유래된 기질세포 계통은 알카린 포스파타제(alkaline phosphatase)나 제1형 콜라겐(collagen type 1)과 유사한 조골세포에서의 특징을 나타낸다(Benayahu *et al.*, 1989). 또한, 조골세포는 기질세포에서 분비되는 interleukine-6(IL-6), IL-11, GM-CSF(granulocyte/macrophage-colony stimulating factor) 및 M-CSF(macrophage-colony stimulating factor)와 같은 CSF와 cytokine을 분비할 수 있다(Girasole *et al.*, 1992; Horowitz *et al.*, 1992; Kindle *et al.*, 2006). 그

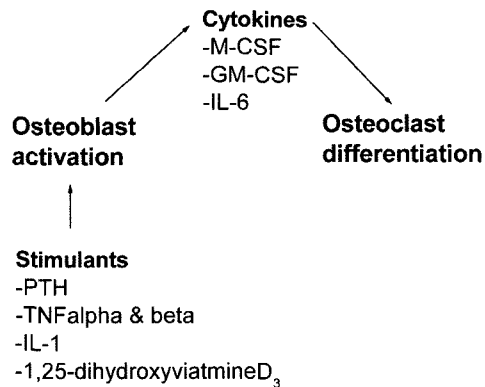


그림 2. 조골세포(Osteoblast)와 파골세포(Osteoclast)의 활성화와 분화: 파골세포의 분화와 생성은 조골세포의 cytokine 분비에 의존한다.

러나 혈액생성을 조절하는 기질세포와 조골세포를 생성하는 기질세포가 단일 직계세포에서 분화되어 각각 다른 성숙 단계를 거쳐 생성되는 것인지 아니면 서로 다른 직계세포에서 생성되는 것인지는 아직 확실하지 않다.

따라서 파골세포는 CFU-GM에서 유래하고, 반면에 조골세포는 골수의 간엽성(mesenchymal) 기질세포와 동일한 직계인 다기능성 주세포(pluripotent stem cell)에서 유래한다. 또한 파골세포의 생성은 전적으로 기질세포와 조골세포에 의존한다. 이와 더불어 파골세포의 분화 역시 조골세포의 활성화에 의존한다. 지금까지 대표적인 osteotropic factor는 부갑상선 호르몬(PTH; parathyroid hormone), TNF α (tumor necrosis factor α), IL-1(interleukin-1)와 1,25-dihydroxyvitamin D₃로서 이들은 파골세포의 분화를 위해 직접적으로 파골세포에 작용하는 것이 아니라 조골세포를 자극하여 cytokine의 분비를 유도하여 작용한다(Boyce *et al.*, 1989; Feyen *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1989; Kurihara, 1990; Robling *et al.*, 2006; Takata *et al.*, 1993). 활성화된 조골세포는 M-CSF, GM-CSF, IL-6을 분비하고 이들 cytokine이 파골세포의 progenitor 세포에 직접적으로 작용, 성숙된 분화를 유도하게 된다(Gowen *et al.*, 1990; Hughes *et al.*, 2006; Ishimi *et al.*, 1990; Libermann and Baltimore, 1990; Passeri *et al.*, 1993) (그림 2).

골개형의 생화학적 기전. 성인에 있어서 미세한 골손상에 대한 수복(repair)이나 물리적 스트레스에 대한 적응을 위해 골의 지속적인 교체가 골개형(bone remodeling)이라는 과정을 통해 이루어진다. 골개형은 파골세포가 골에 붙어 산성화(acidification) 및 단백질 분해작용(proteolytic digestion)에 의해 오래된 골을 제거하고 그 제거된 위치에 조골세포가 여러 종류의 단백질과 콜라겐으로 이루어진 골기질의 분비를 통해 유골(osteoid)을 형성하여 이루

어진다. 종국적으로 무기질 침착(mineralization)을 유도함으로써 새로운 골을 형성하는 것과 크게 구별되는 두 가지 과정에 의해서 이루어진다. 이 두 과정은 골흡수 후 즉각적으로 골형성이 일어나는 연속적인 coupling reaction으로 이루어진다. 그러나 다음과 같은 요인 즉, 질환, 식이, 호르몬과 물리적 스트레스 등에 의해 coupling reaction의 불균형이 초래된다. 따라서 골흡수와 골형성의 기전에 대한 이해는 골흡수의 증가로 유발되는 골다공증의 원인 기전을 이해하는데 중요하다고 할 수 있다.

골형성에 수반되는 필수적 요소는 전구세포로부터 조골세포의 지속적인 증식과 분화와 더불어 세포의 골기질의 합성이다. 조직 또는 세포 배양실험을 통해 프로스타글란딘(prostaglandin)이 전-조골세포(pre-osteoblast)의 증식을 유도하는 촉진제(promoter)라는 것이 확인되었다(Zhou *et al.*, 1991). 또한 레티노익 산(retinoic acid)이 조골세포 전구체(pre-osteoblast)의 분화에 관여한다는 사실이 조골세포에서 그 수용체의 존재를 통해 확인되었다. 레티노익 산은 병아리배(chick-embryo)의 발생에 있어서 형태 형성에 관여하는 morphogen으로서 그 역할이 알려졌다(Kitching *et al.*, 2002; Suva *et al.*, 1991). 즉, 레티노익 산의 조골세포 전구체에 대한 작용은 성장인자(growth factor) 및 cytokine과의 상호작용을 통해 유전자 발현에 영향을 주어, 조골세포의 분화를 유도하는 특수한 골 단백질(specific bone protein)을 조절함으로써 이루어진다. 특히 특수한 골 단백질로서 BMP(bone morphogenetic protein)와 transforming growth factor beta(TGF β)를 꼽을 수 있다. BMP은 생체에서 연골내 골화(enchondral ossification)를 자극한다는 것이 확인되었다(Higuchi and Nakase, 2005). TGF β 는 조골세포에 의해 잠재형(latent form)으로 합성되어 골기질에 저장된 후, 조골세포를 자극하여 수많은 골기질의 구성성분을 합성하는 주요한 골 성장 인자(growth factor)이다(Joyce *et al.*, 1990; Nakamura *et al.*, 2006; Robey *et al.*, 1987). TGF β 의 역할이 조절되는 중요한 경로는 TGF β 의 latent form이 활성화되는 국소적 과정(local processes)을 통해서이며 이러한 경로는 골흡수가 이루어지는 산성 pH에 의해서 또는 조골세포에 있는 plasminogen activator가 호르몬에 의해 활성화됨으로써 이루어진다(Allan *et al.*, 1990; Daci *et al.*, 2003; Grills *et al.*, 1990). IGF(insulin-like growth factor)-I과 II 역시 국소적으로 골에서 생성되며 조골세포에 작용하여 동화작용을 촉진시킨다(Canalis *et al.*^(a), 1989; Livshits, 2006). IGF-I은 조골세포에 직접적으로 작용하여 분화기능을 유도하며 IGF-II는 조골세포에서 그 수용체가 확인되었다(Cheng *et al.*, 2002; Minuto *et al.*, 2005). 또 다른 cytokine으로 근래에 발

견된 LIF(leukemia inhibitory factor)는 조골세포에서 생성되어 cytokine의 특정 수용체를 유도하는 것으로 알려졌다(Malaval *et al.*, 2005). 또한 LIF는 조골세포에서 DNA 합성을 자극하고 조골세포에 의한 osteopontin의 발현을 촉진시킨다(Allan *et al.*, 1990). 종양에 의해 상당한 양의 LIF를 생성하는 동물에서 골형성이 현저하게 증가하는 것으로 확인되었다(Reid *et al.*, 1990). 따라서 LIF는 조골세포에 의해 형성되어 골형성을 위해 기질내 저장되는 cytokine이다. 지금까지 골형성에 있어서 가장 큰 영향을 주는 호르몬은 에스트로젠으로써 정확한 기전은 잘 알려지지 않았지만 IGF-I, Type I procollagen과 collagenase에 의해 분해되는 단백질(collagenase-digestible protein) 합성의 증가를 통해 골형성을 유도하는 것으로 알려졌다(Briot *et al.*, 2005; Komm *et al.*, 1988). 그러나 에스트로젠은 골형성을 하는 조골세포 뿐만 아니라 골을 흡수하는 파골세포에도 영향을 통해 골형성을 조절하는 것보다 골흡수를 감소시킴으로써 골개형에 역할을 한다고 추측된다. 조골세포에 의한 골형성과는 달리, 골흡수 과정에는 파골세포의 활성을 위해 부속 세포(accessory cell), 즉 조골세포 또는 기질세포의 참여를 요하는 등 다소 복잡한 양상을 보인다. 이러한 측면은 다소 논란의 여지가 많지만 골다공증을 비롯하여 골질환의 중요한 요인으로 이해되고 있으며 골흡수를 저해하는 기전에 대한 연구가 근래에 활발히 진행되고 있다. 골흡수는 파골세포가 골기질을 용해시키는 단백질 분해효소(protease)와 골 무기질(bone mineral)을 세포외로 방출시키는 산(acid)을 분비함으로써 이루어진다. 특히, 파골세포에 의한 수소이온의 분비는 골흡수를 매개하는 여러 물질들에 의해 조절된다. 예를 들면, PTH(parathyroid hormone)와 프로스타글라딘 E (prostaglandin E)은 파골세포에 의한 산의 분비를 증가시키고 반면에 칼시토닌(calcitonin)은 산의 분비를 감소시킨다(Marshall *et al.*, 1996; Massicotte *et al.*, 2005; Matemba *et al.*, 2006; Togari *et al.*, 1993).

골흡수와 관련한 파골세포의 기능과 생성에 영향을 주는 물질은 PTH, calcitriol, prostaglandin과 calcitonin 등으로 요약할 수 있다. PTH는 in vitro 실험에서 골흡수를 촉진시킬 뿐만 아니라 파골세포의 생성도 촉진시킨다고 알려졌다(Su *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 1988). 그러나 PTH는 조골세포에 작용하여 M-CSF와 IL-6의 생성을 유도하는데 이는 PTH가 골흡수뿐만 아니라 골형성에도 관여함을 보여준다. 또한 PTH는 lining cell에 위치한 PTH/PTHrp(PTH-related protein) 수용체를 활성화시킴으로써 골흡수를 저해하는 역할을 하게 된다. 그러나 처음에는 단일한 수용체로 알려졌으나 여러 조직에서 PTH의 carboxy-terminal 부분(1-141)에 특징적으로 결합

하는 또 다른 수용체가 발견되었다. 합성된 펩티드 실험을 통해 PTHrp의 107-111 서열 부분이 파골세포에 의한 골흡수를 저해하는 강력한 활성을 가진 것으로 확인되었다(Bergmann *et al.*, 1990). Calcitriol은 vitamin D₃의 여러 대사물질들을 뜻하는 것으로써 골흡수와 파골세포의 형성을 촉진시킨다. 이들 대사물질중에서 가장 활성적인 것은 1,25-dihydroxyvitamin D₃로서 조골세포에 작용하여 골흡수를 촉진시키는 IL-1과 IL-6을 유도한다(Feyen *et al.*, 1989). 또한 1,25-dihydroxyvitamin D₃는 장관으로부터 칼슘 흡수를 촉진시켜 고칼슘혈증(hypercalcemia)을 유도하며 PTH에 의한 골흡수를 촉진시킨다(Abe, 2006; Yates *et al.*, 1988). Prostaglandin은 쥐의 골조직 배양에서 파골세포에 의한 골흡수를 촉진시키며 파골세포의 생성을 촉진시킨다고 알려졌다(Takahashi *et al.*, 1988). 그러나 PGE₂는 사람의 세포배양에서 파골세포에 의한 골흡수뿐만 아니라 골형성도 저해시킨다고 알려졌다(Chenu *et al.*, 1990). Calcitonin 또한 갑상선에서 분비되는 펩티드 호르몬으로써 파골세포에 의한 골흡수에 대한 강력한 저해제이다(Onuma *et al.*, 2005).

골형성과 골흡수의 coupling 작용 기전: 골흡수와 골형성 중 어느 한 과정에 있어서 변화가 일어나면 이는 다른 과정에도 영향을 주기 때문에 두 과정의 균형이 필수적이다(그림 1). 두 과정의 coupling 작용에 대한 기전의 하나로써 골을 흡수하는 과정에서 조골세포의 활성 정도에 영향을 주는 "coupling factor"가 생성된다는 것이 제시되었다(Howard *et al.*, 1981). 그러나 최근에 많은 연구에 의하면 이러한 과정들에 있어서 여러 요소들이 복잡하게 관여하므로 "coupling factor"을 구체적으로 지적할 수는 없다. 골형성과 골흡수의 coupling 기전은 또한 TGFβ의 활성과 관련하여 이해할 수 있다. PTH를 비롯하여 여러 골흡수 호르몬은 plasminogen activator의 활성을 증가시키고 생성된 plasmin은 조골세포에 의해 분비되어 골기질에 저장되어 있는 잠재형 TGFβ의 활성을 증가시킨다(Hamilton *et al.*, 1985; Allan *et al.*, 1986). 또한 골흡수 호르몬인 PTH는 조골세포에 의하여 IGF-I의 합성을 촉진시킨다는 것이 밝혀졌다(Canalis *et al.*, 1989^b); Poole and Reeve, 2005). IGF-I은 골의 중요한 성장인자이며 type-I 콜라겐뿐만 아니라 다른 단백질 구성성분의 합성을 촉진시킨다. 이러한 상호작용이 골흡수에 대해 골형성의 coupling 작용으로 이해된다. IGF의 중요한 생리적 특성의 하나는 IGF의 작용을 증가 또는 감소시킬 수 있는 특수한 결합 단백질(specific binding protein)에 높은 친화성을 가지고 있다는 것이다. 정상적인 쥐의 조골세포와 골육종세포에서 PTH가 IGF 결합 단백질의 활성과 분비를 증가시키며, IGF와 그 결합 단백질과의 상호 작용이

조골세포를 자극하는 IGF-I의 활성을 조절하는 주요 기전으로 이해된다(Cleazardin, 2000; Minuto *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 1990; Topping *et al.*, 1991).

골흡수와 골형성에 대한 에스트로젠과 노화의 영향

골질량(bone mass)이 특정 역치(threshold)이하로 떨어지면 미미한 외상에도 골절이 쉽게 발생한다. 이러한 현상에 대한 역치는 골다공증 초기 증상의 시발점으로서 대략적으로 폐경전 여성들의 정상치보다 낮은 골질량 수준이다. 골상실이 지속적으로 계속됨으로써 골절 위험은 점차 높아진다. 여성들은 전 생애를 통해 정상 해면골(peak cancellous bone)의 50%를, 정상 피질골(peak cortical bone)의 50%를 상실하게 된다(Riggs *et al.*, 1981). 이런 골상실이 노화, 생활습관 및 에스트로젠의 결핍에 의해 어떻게 영향을 받는지는 정확하게 알려져 있지 않다. 그러나 에스트로젠의 결핍에 의한 골상실이 여성의 골다공증의 가장 주요한 요인이다(Richelsson *et al.*, 1984; Rosen, 2000).

에스트로젠은 골세포에 의해 발현되는 여러 growth factor와 cytokine에 중요한 영향을 준다. 골에 대한 에스트로젠의 영향은 여러 조직에 있어서 에스트로젠-수용체(ER; estrogen receptor) 매개에 의한 조절 기전으로부터 많은 것이 응용, 연구되었다(Weusten *et al.*, 1986). ER은 포유동물에 있어서 조직마다 차이는 있지만 생식조직의 한 세포당 10,000~100,000 분자의 농도로 있다고 알려졌다(Turner *et al.*, 1978). 사람의 조골세포뿐만 아니라 파골세포에도 ER이 있는 것으로 확인되었다(Blair *et al.*, 2005; Ikegami *et al.*, 1994). 특히 ER 유전자의 돌연변이는 골상실의 직접적인 원인이며, 또한 ER 유전자의 다형성(polymorphism)이 골기질 밀도(bone mineral density; BMD)와 직접적으로 연관이 있다고 알려졌다(Kobayashi *et al.*, 1996; Kurabayashi *et al.*, 2004). 에스트로젠이 ER에 결합하면 ER의 활성이 촉진되는데 그 기전은 정확하게 알려져 있지 않다. 그러나 ER-에스트로젠의 결합체는 nuclear acceptor에 붙게 되어 전사인자(transcriptional factor)로서 에스트로젠 반응 유전자의 전사를 조절하는 것으로 알려졌다(Balash, 2003; Korach *et al.*, 1987). 최근 ER의 활성화와 불활성화를 통해 골상실을 촉진하는 IL-6의 발현을 조절함으로써 골다공증의 새로운 치료 방법으로 제안되고 있다(Stein and Yang, 1995; Kobayashi *et al.*, 1996; Carlsten, 2006). 따라서, 이러한 점은 여러 cytokine과 growth factor 등에 대해 에스트로젠이 영향을 미치거나 또는 이들과 상호작용함으로써 골개형의 두 과정인 골형성과 골흡수의 coupling reaction의 조절에 관여한다고 생각된다.

지금까지의 연구에 의하면 IL-1, IL-6, TNF α 및 β , M-CSF와 GM-CSF 등이 골개형에 영향을 주는 cytokine이다. 이들 중 IL-1 과 TNF는 골형성의 저해제(inhibitors)인 동시에 골흡수의 가장 강력한 자극제(stimulants)이다. 둘 모두 파골세포의 전구체 분화와 기질세포의 pro-osteoclastogenic 활성을 직접적으로 자극함으로써 파골세포의 생성을 증가시킨다(Pfeilschifter *et al.*, 1989; Seck *et al.*, 2001; Srivastava *et al.*, 1998). 또한 IL-1과 TNF는 파골세포의 전구체 분화를 촉진시키는 cytokine인 M-CSF, GM-CSF, IL-6 등의 강력한 유도물질이다(Felix *et al.*, 1989; Masi and Brandi, 2001; Lorenzo *et al.*, 1987; Park *et al.*, 2004). IL-1과 TNF에 의한 이들 물질의 증가는 파골세포의 생성을 증가시킴으로써 골흡수를 촉진시키게 된다. 특히 CSF 중에서 GM-CSF는 지금까지 알려진 가장 강력한 pro-osteoclastogenic factor로서 초기에 IL-3와 상호작용하여 파골세포의 생성을 증가시킨다고 알려졌다(Pacifici, 1993, 1995, 1998). 그러나 *in vivo*에서 IL-6의 불활성에 의해 골흡수가 감소되지 않았고 또한 폐경이 된 여자에 있어서 IL-6의 수준이 골교체(bone turnover) 지표와의 상관성을 보이지 않았다(Kania *et al.*, 1995; Kitazawa *et al.*, 1994; Kitazawa and Kitazawa, 2005). 이는 IL-6의 골흡수에 대한 역할에 있어서 논란이 되고 있다는 점을 보여주고 있다. 에스트로젠은 앞서 언급한 cytokine과 hematopoietic factor 등을 통해 골형성 및 골흡수에 영향을 주기 때문에 에스트로젠 존재와 관련이 있는 폐경, 에스트로젠 투여와 난소절제 등을 통해 많은 연구가 이루어졌다. 자연적 또는 수술적 폐경 후 monocyte에 의한 IL-1과 TNF- β 의 생성이 증가되었고 에스트로젠이나 프로제스트론 투여후 감소되었다(Pacifici *et al.*, 1990). 또한 정상 사람에게서 난소절제에 의한 골상실을 유도하는 과정에서 IL-1과 TNF뿐만 아니라 GM-CSF가 증가됨이 확인되었다(Pacifici *et al.*, 1991). 그러나, GM-CSF의 증가는 IL-1과 TNF보다 선행하여 일어나기도 하기 때문에 IL-1이나 TNF의 증가에 의한 것이기도 하지만 에스트로젠의 감소에 따른 또 다른 기전에 의한 직접적인 영향으로도 추측되기도 한다(Pacifici *et al.*, 1996). 에스트로젠이 이들 cytokine을 조절하는 기전은 잘 알려져 있지 않지만 monocyte 뿐만 아니라 macrophage에서 ER이 있음이 발견되었다(Bellosta and Bernini, 2005; Cutolo *et al.*, 1993; Rickard *et al.*, 1999; Zarrabeitia *et al.*, 1990). ER과 IL-1, TNF의 construct를 사람의 monocytes에 cotransfection시킨 결과, 에스트로젠이 IL-1 과 TNF promoter의 활성을 감소시켰다(Kimble *et al.*, 1996). 그러나 이러한 효과는 IL-1이나 TNF promoter가 estrogen responsive element를 가지고 있지 않지

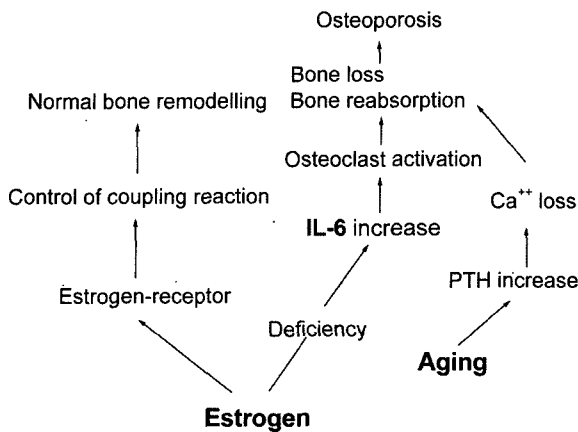


그림 3. Estrogen과 노화에 의한 골흡수 기전: 에스트로젠은 ER(estrogen receptor)과 NF-κB를 통해 IL-6의 발현을 억제하는데 결핍시 파골세포의 활성화를 통해 골상실을 유도한다. 노화는 에스트로젠에 의해 감소되는 PTH(Parathyroid hormone)를 증가시켜 골상실을 유도한다.

때문에 간접적으로 이루어지는 것은 것으로 추정되고 있다(Dinarelo, 1994).

파골세포의 분화를 촉진시키는 IL-6 또한 난소가 절제된 쥐의 골수(bone marrow)에서 증가되었다(Jilka *et al.*, 1992). 이는 에스트로젠이 골수세포나 조골세포에서 IL-6의 생성을 저해하여 골흡수를 감소시킨다는 사실과 연관이 있음을 보여준다. 그러나 IL-6 promoter는 ER에 대한 결합부위가 없다는 것이 확인되었다(Ray *et al.*, 1994). 이는 ER이 간접적으로 IL-6 promoter의 특정 부분에 영향을 주어, 전사(transcription)를 저해하는 것으로 또한 확인되었다(Pottratz *et al.*, 1994). 이러한 저해는 IL-6의 발현에 관련하는 transcription factor인 NF-κB와 C/EBPβ에 ER이 결합함으로써 이루어진다고 알려졌다(Stein and Yang, 1995). 또한, 에스트로젠이 조골세포에서 ER의 발현을 증가시킴으로써 IL-6을 저해시킨다고 확인되었다(Kassem *et al.*, 1996) (그림 3).

한편, 노화에 의한 골흡수 기전은 hyperparathyroidism과 관련하여 에스트로젠과의 상호관계에 대해 많은 연구가 이루어졌다. 에스트로젠 결핍과 노화는 골흡수를 촉진시킨다는 점에서 공통점이 있으나 그 기전에 있어서는 다르다. 이러한 다른 기전의 좋은 예로서 칼슘 결핍을 들 수 있는데, 노화 상태에서는 칼슘 섭취의 부족을 보정(compensation)하는 과정에서 소장과 vitamin D 내분비계 등에 의한 적응(adaptation)이 잘 이루어지지 않아 결과적으로 칼슘 결핍 현상이 나타난다. 반면에 에스트로젠의 결핍시에는 calcitropic hormone이 유도되는 등 일련의 adaptation 과정을 거치게 되지만 결국은 장에 의한 칼슘 섭취가 감소하고 신장에 의한 칼슘 상실이 증가된다. 그

러나 좀 더 흥미로운 점은 에스트로젠 결핍은 앞서 언급한, 골흡수를 억제시키는 cytokine등을 직접적으로 조절, 제거시킴으로써 골개형의 균형에 영향을 주지만 노화는 이차적인 hyperparathyroidism에 의해 골흡수를 촉진시킨다. 즉 노화는 PTH를 증가시키지만 에스트로젠 결핍은 PTH분비를 감소시킨다(Gallagher *et al.*, 1980; Kneissel *et al.*, 2001). 이러한 측면은 에스트로젠의 결핍을 유도하는 폐경 후 노화가 시작된 골다공증 여성에게 관찰되는 골흡수 증가에 대한 PTH의 영향을 파악하는데 있어서 어려움을 대변해준다. Cosman and Lindsay(1998)에 의하면 PTH 분비가 증가에도 불구하고 에스트로젠이 골흡수를 감소시키는 것으로 확인되었다. 이는 에스트로젠이 부족한 사람에서 PTH에 의한 골흡수가 에스트로젠을 보충한 사람보다 더 민감한 것으로 이해된다. 또한 에스트로젠과 PTH의 골흡수에 대한 상호관계는 수술적으로 hypoparathyroid를 유도한 26~63세 여성들을 대상으로 한 Sawicki(1990)에 의한 연구에서 좀더 명확하게 밝혀졌다. 이들 연구 결과에 의하면, PTH가 폐경 직후에는 감소되는 것으로 보아 폐경 후 초기의 골다공증은 에스트로젠 결핍 그 자체가 주요 원인이며 PTH의 영향은 미미하다고 알려졌다. 그러나 에스트로젠 결핍이 IL-1과 TNF의 생성을 유도하고 이들에 의해 PTH에 의한 골상실이 증가되므로 PTH의 영향을 배제할 수는 없다. 특히 폐경후 시간이 지나 노화가 어느 정도 진행된 상태에서 발생한 골상실은 노화에 의해 증가된 PTH에 의해 크게 기인한다고 추론할 수도 있다.

따라서 난소절제나 폐경 등에 의한 에스트로젠 결핍 유도성 골흡수는 조골세포에 의해 생성되는 IL-1, TNFα와 IL-6 등이 증가하여 골흡수가 촉진되는 것으로 이해할 수 있다. 이들 cytokine의 증가는 파골세포의 수의 증가와 활성화를 유도하게 되며 에스트로젠이 이들의 합성을 억제하게 된다. 따라서, 폐경의 시기에서 에스트로젠의 감소는 이들의 국소적인 분비(local secretion)을 유도, 골흡수를 촉진시킨다고 이해된다. 특히, 에스트로젠 감소는 노화에 따른 PTH 증가에 의한 골흡수를 더욱 촉진시킬 것으로 예상된다.

골흡수와 골형성에 있어서 free radical과 에스트로젠의 영향

활성화된 조골세포뿐만 아니라 파골세포에 의해 superoxide와 다른 reactive oxygen species(ROS)가 생성되는 등 골흡수와 ROS와의 관계는 비교적 최근에 많은 관심과 연구가 이루어졌다(Evans and Ralston, 1996; Greenwald and Rifkin, 1992; Reddy, 2004; Reddy *et al.*, 1991; Sontakke and Tare, 2002). 파골세포가 PTH,

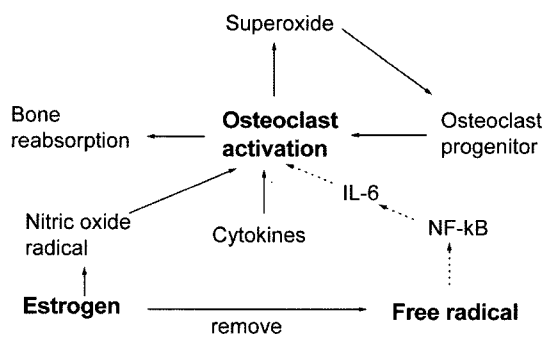


그림 4. Estrogen과 Free radical에 의한 골흡수 기전: Free radical은 골흡수를 증가시킨다. 에스트로젠은 NO를 통해 정상적인 골흡수를 통한 coupling reaction을 촉진시킬뿐만 아니라 free radical을 제거시켜 비정상적인 골흡수를 제어한다.

IL-1, TNF와 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 등에 반응하여 superoxide를 생성하고 이들은 다시 전구체 파골세포의 생성과 활성의 증가를 유도한다(Datta *et al.*, 1996; Garrett *et al.*, 1990; Halleen *et al.*, 2003; Suda *et al.*, 2003). 또한 파골세포에 투여된 hydrogen peroxide 역시 파골세포의 증가와 세포의 motility를 촉진시키는 등의 작용에 의해 골흡수를 촉진시킨다 (Bax *et al.*, 1992; Suda *et al.*, 1993). 특히 ROS의 기능적인 측면의 연구 즉, malignant osteoporosis를 가진 환자에서 비정상적인 파골세포의 기능이 superoxide의 부족에 기인한다는 것은(Beard *et al.*, 1986; Reeves *et al.*, 1979; Yalin *et al.*, 2005) ROS의 생성 또는 그 농도가 파골세포에 의한 골흡수에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 이러한 점은 ROS가 cytokine 등에 반응하여 파골세포의 생성에 직접적으로 관여하는 신호전달 체계에서의 역할을 보여주고 있다(그림 4).

NF-κB는 세포주기와 관련된 단백질뿐만 아니라 산화적 스트레스와 관련된 단백질의 발현을 유도한다(Schreck *et al.*, 1991; Schreck *et al.*, 1992). 이 뿐만 아니라 ROS에 의해 활성이 증가된 NF-κB가 파골세포 전구체에서의 IL-6와 그 receptor의 발현을 자극한다고 한다(Mee *et al.*, 1993). 이러한 사실들은 ROS가 osteoclastogenesis에 있어서 파골세포의 생성과 활성을 증가시킴으로써 골흡수를 촉진시키는 것으로 이해할 수 있다. 또한 파골세포에서 NF-κB 활성의 증가가 골흡수에 필요한 단백질인 carbonic anhydrase II와 V-ATPase 등의 발현뿐만 아니라 ROS에 의해 유도된 상해에 대한 방어와 관련된 glutathione synthase, superoxide dismutase와 catalase 등의 발현을 유도하는 것으로 알려졌다(Oursler *et al.*, 1991; Reddy, 2004; Vidal *et al.*, 2004). NF-κB 활성의 증가에 기인하는 것으로 확인 되지는 않았지만 파골세

포가 ROS를 생성하며 골흡수를 진행중인 파골세포가 NADPH oxidase의 발현을 유도하는 것으로 확인되었다(Darden *et al.*, 1996; Garrett *et al.*, 1990; Key *et al.*, 1990; Ries *et al.*, 1992; Steinbeck *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2004). 또한 이들에 의하면 NADPH oxidase에 의해 생성된 ROS가 콜라겐을 파괴하거나 파골세포에 의해 분비된 protease의 활성을 증가시키는 등 골흡수과정에 직접적으로 관여하는 것으로 제시하고 있다. 그러나 이러한 기전은 ROS가 protease에도 역시 상해를 줄 수 있다는 점을 고려하면 ROS의 골흡수 기전을 설명하는데 부족하다. 오히려 ROS의 생성을 매개로 NADPH oxidase가 여러 세포에서 신호전달과 활성에 있어서 중요한 기능을 한다는 점을 고려하면 ROS가 파골세포의 생성과 활성을 유도하는 신호전달의 체계에 관여한다는 것이 더 설득력이 있다. 최근 연구에 의하면 NF-κB의 활성 저해제와 ROS의 scavenger을 이용한 실험을 통해 ROS가 파골세포에 의한 골흡수 과정에 직접적으로 관여한다기 보다는 골흡수 과정에 앞서 NF-κB를 활성화시킴으로써 파골세포의 활성 또는 생성에 관여하는 것으로 확인되었다(Bai *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 1995; Reddy, 2004). 그러나 골흡수 후 파골세포는 프로그램화된 세포 죽음인 apoptosis 기전을 통해 죽게 된다(Boyce *et al.*, 2005; Filvaroff and Derynck, 1998; Oursler *et al.*, 2004). 이는 다른 세포에서 확인된 것처럼 골흡수동안에 NADPH에 의해 지속적으로 생성된 ROS가 결과적으로 oxidative stress-mediated apoptosis를 유도하는 것으로 추측된다(Buttke and Van Cleve, 1994). 따라서 골흡수에 대한 ROS의 영향에 있어서 NADPH oxidase의 활성은 대단히 중요하다고 생각할 수 있다. 골흡수를 유도하는 ROS의 생성 효소가 NADPH oxidase인지는 다소 논란이 있었지만 interferon(IFN)에 반응하여 파골세포에서 superoxide 생성을 유도한다고 확인되었다(Darden *et al.*, 1996; Oursler *et al.*, 1991).

골개형과 관련된 또 다른 radical로서는 nitric oxide(NO)를 고려할 수 있는데 NO는 면역 기능과 신경 전달 등에 있어서 그 매개체로 중요한 역할을 하며 많은 연구가 이루어지고 있다(Monaca *et al.*, 1991; Oktem *et al.*, 2006; van't Hof *et al.*, 2001; Zaidi *et al.*, 1993). 그러나 골에서 NO의 생성은 파골세포의 in vitro 실험에서 NADPH-diaphorase의 활성을 통해 그 생성이 간접적으로 확인되었지만 정확하게 알려지지 않았다(Schmidt *et al.*, 1992). 최근에 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 활성에 의해 파골세포에서 NO의 생성을 유도한다고 알려졌다(Brandi *et al.*, 1995; van't Hof and Ralston, 2001). 일반적으로 constitutive 효소인 NOS(cNOS)가 산소 분

자와 L-arginine의 guanidino nitrogen을 이용하여 골세포 등 여러 종류의 세포에서 NO를 합성한다(Monaca *et al.*, 1991). 또한 조골세포 역시 constitutive 및 inducible-type의 NOS를 발현하는 것으로 확인되었다(Riancho *et al.*, 1995^{ab}). 따라서, iNOS와 cNOS 모두 bone-derived cell에 의해 발현될 수 있다고 생각된다.

이들에 의한 NO의 생성은 cytokine 즉 IL-1, TNF와 INF- γ 등에 의해 조골세포나 파골세포 모두에서 이루어진다. 이들 cytokine에 의한 NO의 생성은 골흡수뿐만 아니라 세포 spreading 등을 저해한다(Boyce *et al.*, 2005; MacIntyre *et al.*, 1991). 특히, INF- γ 는 다른 cytokine과 함께 처리되었을 때 "superinducer"로서 많은 양의 NO를 유도하여 파골세포의 생성뿐만 아니라 활성을 억제한다고 알려졌다(Lowik *et al.*, 1994). 반면에 낮은 농도의 NO는 오히려 골흡수를 자극한다(Ralston *et al.*, 1995). 이는 NO가 농도에 따라서 골흡수에 서로 상반되는 영향을 주는 "biphasic effect"의 특성을 보여주며 그 농도의 조절은 이들 cytokine의 상호 작용에 의해 이루어지는 것으로 추측된다. 이들 cytokine에 의한 NO의 생성은 우선적으로 iNOS에 의해 매개되는 것으로 알려졌다(Riancho *et al.*, 1995^{ab}). 조골세포 또한 IL-1, TNF와 INF- γ 에 대한 반응을 통하여 NO를 생성하며 골형성을 저해한다(Ralston *et al.*, 1994; Damoulis and Hauschka, 1994). 그러나 파골세포에서처럼, NO의 농도가 조골세포의 생성과 활성화에 영향을 준다. NO의 낮은 농도에서는 조골세포의 활성화와 증식이 유도되는 반면에 높은 농도에서는 이들이 저해될 뿐 아니라 독성을 유발한다. 따라서, NO는 조골세포뿐만 아니라 파골세포에 영향을 주는 중요한 조절 물질이다. 이러한 점은 NO가 cytokine의 활성화와 관련된 대부분의 골질환과 연관이 있음을 보여준다. 예를 들면, rheumatoid arthritis(RA)에서 NO의 증가와 더불어 TNF와 IL-1이 증가하는 반면에 INF- γ 가 감소한다(Farrell *et al.*, 1992; Sorimachi *et al.*, 1999).

ROS와 관련하여 NO는 쉽게 그들과 반응하여 높은 반응성을 지닌 peroxynitrite anion과 hydroxyl radical을 생성한다. 이러한 free radical은 inflammatory response를 유도하는 조직 손상을 유도한다고 알려졌다(Beckman *et al.*, 1990). 또한 ROS가 파골세포의 형성과 기능을 비롯하여 골흡수와 밀접한 관계가 있기 때문에 NO와 ROS와의 상호 작용은 파골세포 기능에 영향을 주는 것으로 알려졌다(Silverton, 1994). 또한 이러한 상호 작용은 ROS와 NO의 생성과 관련된 두 주요 효소인 NADPH oxidase, NOS와 이들의 cofactor인 NADPH를 이용한 실험을 통해 확인되었다(Silverton *et al.*, 1995). 즉 두 효소가 NADPH에 대해 경쟁적으로 이용함으로써 ROS와 NO의 생성 정

도에 영향을 주고 상호 작용에도 영향을 줄 수 있다.

연구에 의하면 NO의 생성이 에스트로젠에 의해 증가하는 것으로 알려졌다(Weiner *et al.*, 1994). 이는 에스트로젠이 NOS의 유전자 발현을 증가시키거나 그 활성의 증가를 유도하는 것으로 확인되었다(Veille *et al.*, 1996; Venema *et al.*, 1994). 에스트로젠은 NO의 생성을 유도하는 반면에 또한 그 자체가 항산화적 효과를 가진 것으로 알려졌다(Subbiah *et al.*, 1993). 이러한 효과는 에스트로젠 자체의 phenolic hydroxyl group을 lipid peroxyradical에 전달, 프리라디칼에 의한 연쇄반응을 막는 것으로 그 기전을 설명하고 있다(Sugioka *et al.*, 1987). 따라서 에스트로젠은 NO의 생성을 유도하여 골개형에 중요한 역할을 한다. 특히 NO와 ROS의 높은 농도에 의한 세포독성을 고려하면 에스트로젠의 항산화적 효과는 NO와 ROS의 골세포에 대해 순간적인 영향 후, 이를 제거함으로써 세포 보호에 중요한 역할도 기대된다. 최근 폐경 후 골다공증의 예방과 치료의 한 방편으로 에스트로젠의 투여법이 많이 이용되고 있다(Bancroft and Cawood, 1996). 그러나 에스트로젠은 간에서 대사를 통해 semiquinone 대사체로 전환되고 동시에 free radical을 생성하게 되어 간독성을 유발한다고 알려졌다(Liehr and Roy, 1990). 따라서 투여 시 이에 대한 고려가 필요할 것 같다.

결 론

최근 수년에 걸쳐 조골세포와 파골세포의 생성과 활성화에 대한 세포 분자생물학적 접근은 골질환의 기전을 이해하는데 중요한 기초가 되었다. 골질환의 직접적인 원인은 파골세포의 catabolic effect인 골흡수와 조골세포에 의한 anabolic effect인 골형성의 부조화로 해석되고 있다. 이러한 부조화는 골세포의 분화와 생성을 조절하는 cytokine을 비롯하여 여러 osteotropic factor인 IL-1, IL-6, TNF, M-CSF와 GM-CSF 등의 영향에 크게 좌우된다. 특히 노화와 폐경에 의한 에스트로젠의 결핍은 이들 요소에 영향을 줌으로써 골개형의 불균형으로 인한 골다공증의 주요한 기전으로 설명될 수 있다. Free radicals 즉, ROS을 비롯하여 NO 또한 골세포의 골흡수와 골형성 과정에 있어서 osteotropic factor들과 상호 작용하여 중요한 역할을 하는 것으로 최근 밝혀졌다. 그러나 골다공증의 원인인 에스트로젠의 결핍 및 노화와 이들 free radical과의 관계에 대한 연구뿐만 아니라 골세포에 대한 상호작용에 대한 연구는 미미한 편이다. 따라서 이러한 사실을 고려한다면 노화와 에스트로젠과 이들과의 관계에 대한 연구는 골다공증을 비롯한 골질환의 기전과 예방을 위해 도움이 될 것이다.

참고문헌

- Abe, M. (2006): Bone disease in multiple myeloma and its mechanism. *Clin Calcium.*, **16**, 33-39.
- Allan, E.H., Hilton, D.J., Brown, M.A., Evely, R.S., Yumita, S., Metcalf, D., Gough, N.M., Ng, K.W., Nicola, N.A. and Martin, T.J. (1990): Osteoblasts display receptors for and responses to leukemia-inhibitory factor. *Cell Physiol.*, **145**, 110-119.
- Allan, E.H., Hamilton, J.A., Metcalf, R.L., Kubota, M. and Martin, T.J. (1986): Cyclic AMP-dependent and -independent effects on tissue-type plasminogen activator activity in osteogenic sarcoma cells; evidence from phosphodiesterase inhibition and parathyroid hormone antagonists. *Biochim. Biophys. Acta*, **888**, 199-207.
- Ashton, B.A., Allen, T.D., Howlett, C.R., Eaglesom, C.C., Hattori, A. and Owen, M. (1980): Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **151**, 294-307.
- Bai, X.C., Lu, D., Liu, A.L., Zhang, Z.M., Li, X.M., Zou, Z.P., Zeng, W.S., Cheng, B.L. and Luo, S.Q. (2005): Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblast. *J. Biol. Chem.*, **280**, 17497-17506.
- Balasz, J. (2003): Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum. Reprod. Update.*, **9**, 207-222.
- Bax, B.E., Alam, A.S.M.T. and Banerji, B. (1992): Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 1153-1158.
- Bancroft, J. and Cawood, E.H. (1996): Androgens and the menopause; a study of 40-60-year-old women. *Clin. Endocrinol.*, **45**, 577-587.
- Beard, C.J., Key, L., Newburger, P.E., Ezekowitz, R.A., Arceci, R., Miller, B., Proto, P., Ryan, T., Anast, C. and Simons, E.R. (1986): Neutrophil defect associated with malignant infantile osteopetrosis. *J. Lab. Clin. Med.*, **108**, 498-505.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990): Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **17**, 1620-1624.
- Bellosta, S. and Bernini, F. (2005): Modulation of macrophage function and metabolism. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **170**, 665-95.
- Benayahu, D., Kletter, Y., Zipori, D. and Wientroub, S. (1989): Bone marrow-derived stromal cell line expressing osteoblastic phenotype *in vitro* and osteogenic capacity *in vivo*. *J. Cell. Physiol.*, **140**, 1-7.
- Bergmann, P., Nijs-De Wolf, N., Pepersack, T. and Corvilain, J. (1990): Release of parathyroid hormone-like peptides by fetal rat long bones in culture. *J. Bone. Miner. Res.*, **5**, 741-753.
- Blair, H.C., Robinson, L.J. and Zaidi, M. (2005): Osteoclast signalling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **328**, 728-738.
- Boyce, B.F., Aufdemorte, T.B., Garrett, I.R., Yates, A.J. and Mundy, G.R. (1989): Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology*, **125**, 1142-1150.
- Boyce, B.F., Li, P., Yao, Z., Zhang, Q., Badell, I.R., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J. and Xing, L. (2005): TNF- α and pathologic bone resorption. *Keio. J. Med.*, **54**, 127-131.
- Brandi, M.L., Hukkanen, M., Umeda, T., et al., (1995): Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 2954-2958.
- Briot, K. and Roux, C. (2005): Epub 2005 Nov 28. Comment in: *Gynecol Obstet Fertil.*, **33**, 1009-1013.
- Buttke, T.M. and Van Cleave, S. (1994): Adaptation of a cholesterol deficient human T cell line to growth with lanosterol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 206-212.
- Canalis, E., Centrella, M., Burch, W. and McCarthy, T.L. (1989): Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J. Clin. Invest.*, **83**, 60-65.
- Canalis, E., McCarthy, T.L. and Centrella, M. (1989): Effects of platelet-derived growth factor on bone formation *in vitro*. *J. Cell. Physiol.*, **140**, 530-537.
- Carlsten, H. (2005): Immune responses and bone loss: the estrogen connection. *Immunol. Rev.*, **208**, 194-206.
- Chenu, C., Valentin-Opran, A., Chavassieux, P., Saez, S., Meunier, P.J. and Delmas, P.D. (1990): Insulin like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH) $_2$ D $_3$ and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone.*, **11**, 81-86.
- Cheng, M.Z., Rawlinson, S.C., Pitsillides, A.A., Zaman, G., Mohan, S., Baylink, D.J. and Lanyon, L.E. (2002): Human osteoblasts' proliferative responses to strain and 17 β -estradiol are mediated by the estrogen receptor and the receptor for insulin-like growth factor I. *J. Bone. Miner. Res.*, **17**, 593-602.
- Cleazardin, P. (2000): Bone hyperresorption in bone metastases. *Presse Med.*, **29**, 487-491.
- Cosman, F. and Lindsay, R. (1998): Is parathyroid hormone a therapeutic option for osteoporosis? A review of the clinical evidence. *Calcif. Tissue. Int.*, **62**, 475-480.
- Cutolo, M., Sulli, A., Barone, A., Seriola, B. and Accardo, S. (1993): Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **11**, 331-339.
- Daci, E., Everts, V., Torrekens, S., Van Herck, E., Tigchelaar-Gutter, W., Bouillon, R. and Carmeliet, G. (2003): Increased bone formation in mice lacking plasminogen activators. *J. Bone. Miner. Res.*, **18**, 1167-1176.
- Damoulis, P.D. and Hauschka, P.V. (1994): Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 924-931.
- Darden, A.G., Ries, W.L., Wolf, W.C., Rodriguiz, R.M. and Key, L.L. Jr. (1996): Osteoclastic superoxide production and bone resorption: stimulation and inhibition by modulators of NADPH oxidase. *J. Bone. Miner. Res.*, **11**, 671-675.
- Datta, H.K., Rathod, H., Manning, P., Turnbull, Y. and McNeil, C.J. (1996): Parathyroid hormone induces superoxide anion burst in the osteoclast: evidence for the direct instantaneous activation of the osteoclast by the hormone. *J. Endocrinol.*, **149**, 269-277.
- Dinarello, C.A. (1994) The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.*, **8**, 1314-1325.
- Farrell, A.J., Blake, D.R., Palmer, R.M. and Moncada, S. (1992): Increased concentrations of nitrite in synovial fluid

- and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, **51**, 1219-1222.
- Feyen, J.H., Elford, P., Di Padova, F.E. and Trechsel, U. (1989): Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J. Bone Miner. Res.*, **4**, 633-8.
- Felix, R., Fleisch, H. and Elford, P.R. (1989): Bone-resorbing cytokines enhance release of macrophage colony-stimulating activity by the osteoblastic cell MC3T3-E1. *Calcif. Tissue Int.*, **44**, 356-360.
- Filvaroff, E. and Derynck, R. (1998): Bone remodelling: a signalling system for osteoclast regulation. *Curr. Biol.*, **8**, R679-R682.
- Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F., Kulagina, N.N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S.F., Luria, E.A. and Ruadkow, I.A. (1974): Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp. Hematol.*, **2**, 83-92.
- Evans, D.M. and Ralston, S.H. (1996): Nitric oxide and bone. *J. Bone Miner. Res.*, **11**, 300-305.
- Gallagher, J.C., Riggs, B.L., Jerpbak, C.M. and Arnaud, C.D. (1980): The effect of age on serum immunoreactive parathyroid hormone in normal and osteoporotic women. *J. Lab. Clin. Med.*, **95**, 373-385.
- Garrett, I.R., Boyce, B.F., Oreffo, R.O.C., Bonewald, L., Poser, J. and Mundy, G.R. (1990): Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, **85**, 632-639.
- Girasole, G., Jilka, R.L., Passeri, G., Boswell, S., Boder, G., Williams, D.C. and Manolagas, S.C. (1992): beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts *in vitro*: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J. Clin. Invest.*, **89**, 883-891.
- Grills, B.L., Gallagher, J.A., Allan, E.H., Yumita, S. and Martin, T.J. (1990): Identification of plasminogen activator in osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.*, **5**, 499-505.
- Gowen, M., Chapman, K., Littlewood, A., Hughes, D., Evans, D. and Russell, G. (1990): Production of tumor necrosis factor by human osteoblasts is modulated by other cytokines, but not by osteotropic hormones. *Endocrinology*, **126**, 1250-1255.
- Greenwald, R.A. and Rifkin, B.R. (1992): Reactive oxygen species as potential mediators of osteoclast action. In: Rifkin, B.R. and Gay, C.V. (eds.), *Biology and physiology of the osteoclast*. CRC press., 315-336.
- Hagenaars, C.E., van der Kraan, A.A., Kawilarang-de Haas, E.W., Visser, J.W. and Nijweide, P.J. (1989): Osteoclast formation from cloned pluripotent hemopoietic stem cells. *Bone Miner.*, **6**, 179-189.
- Hall, T.J., Jeker, H. and Schaubelin, M. (1995): Taxol inhibits osteoclastic bone resorption. *Calcif. Tissue Int.*, **57**, 463-465.
- Halleen, J.M., Raisanen, S.R., Alatalo, S.L. and Vaananen, H.K. (2003): Potential function for the ROS-generating activity of TRACP. *J. Bone Miner. Res.*, **18**, 1908-1911.
- Hamilton, J.A., Lingelbach, S., Partridge, N.C. and Martin, T.J. (1985): Regulation of plasminogen activator production by bone-resorbing hormones in normal and malignant osteoblasts. *Endocrinology*, **116**, 2186-2191.
- Hattersley, G., Kerby, J.A. and Chambers, T.J. (1991): Identification of osteoclast precursors in multilineage hemopoietic colonies. *Endocrinology*, **128**, 259-262.
- Higuchi, C. and Nakase, T. (2005): Osteoporosis and bone morphogenetic protein (BMP). *Nippon. Rinsho.*, **63**, 439-443.
- Horowitz, M.C., Coleman, D.L., Ryaby, J.T. and Einhorn, T.A. (1989): Osteotropic agents induce the differential secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by the osteoblast cell line MC3T3-E1. *J. Bone Miner. Res.*, **4**, 911-921.
- Horowitz, M., Wishart, J.M., O'Loughlin, P.D., Morris, H.A., Need, A.G. and Nordin, B.E. (1992): Osteoporosis and Klinefelter's syndrome. *Clin. Endocrinol.*, **36**, 113-118.
- Howard, G.A., Bottemiller, B.L., Turner, R.T., Rader, J.I. and Baylink, D.J. (1981): Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 3204-3208.
- Hughes, F.J., Turner, W., Belibasakis, G. and Martuscelli, G. (2006): Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol.* **2000.**, **41**, 68-72.
- Ikegami, A., Inoue, S., Hosoi, T., Kaneki, M., Mizuno, Y., Akedo, Y., Ouchi, Y. and Orimo, H. (1994): Cell cycle-dependent expression of estrogen receptor and effect of estrogen on proliferation of synchronized human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology*, **135**, 782-789.
- Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C.H., Akatsu, T., Abe, E., Nakamura, Y., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Matsuda, T., Hirano, T., et al. (1990) IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol.*, **145**, 3297-3303.
- Jilka, R.L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D.C., Abrams, J.S., Boyce, B., Broxmeyer, H. and Manolagas, S.C. (1992): Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, **257**, 88-91.
- Johnson, R.A., Boyce, B.F., Mundy, G.R. and Roodman, G.D. (1989): Tumors producing human tumor necrosis factor induced hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice. *Endocrinology*, **124**, 1424-1427.
- Joyce, M.E., Roberts, A.B., Sporn, M.B. and Bolander, M.E. (1990): Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell. Biol.*, **110**, 2195-2207.
- Kania, D.M., Binkley, N., Checovich, M., Havighurst, T., Schilling, M. and Ershler, W.B. (1995): Elevated plasma levels of interleukin-6 in postmenopausal women do not correlate with bone density. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **43**, 236-239.
- Kassem, M., Okazaki, R., De Leon, D., Harris, S.A., Robinson, J.A., Spelsberg, T.C., Conover, C.A. and Riggs, B.L. (1996): Potential mechanism of estrogen-mediated decrease in bone formation: estrogen increases production of inhibitory insulin-like growth factor-binding protein-4. *Proc. Assoc. Am. Physicians.*, **108**, 155-164.
- Key, L.L. Jr., Ries, W.L., Taylor, R.G., Hays, B.D. and Pitzer, B.L. (1990): Oxygen derived free radicals in osteoclasts: the specificity and location of the nitroblue tetrazolium

- reaction. *Bone.*, **11**, 115-119.
- Kerby, J.A., Hattersley, G., Collins, D.A. and Chambers, T.J. (1992): Derivation of osteoclasts from hematopoietic colony-forming cells in culture. *J. Bone Miner. Res.*, **7**, 353-362.
- Kitching, R., Qi, S., Li, V., Raouf, A., Vary, C.P. and Seth, A. (2002): Coordinate gene expression patterns during osteoblast maturation and retinoic acid treatment of MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Metab.*, **20**, 269-280.
- Kindle, L., Rothe, L., Kriss, M., Osdoby, P. and Collin-Osdoby, P. (2006): Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14⁺ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.*, **21**, 193-206.
- Kitazawa, R., Kimble, R.B., Vannice, J.L., Kung, V.T. and Pacifici, R. (1994): Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. *J. Clin. Invest.*, **94**, 2397-2406.
- Kitazawa, S. and Kitazawa, R. (2005): Regulatory mechanism of bone morphogenetic protein gene expression. *Nippon Rinsho.*, **63**, 409-413.
- Kimble, R.B., Srivastava, S., Ross, F.P., Matayoshi, A. and Pacifici, R. (1996): Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28890-28897.
- Kneissel, M., Boyde, A. and Gasser, J.A. (2001): Bone tissue and its mineralization in aged estrogen-depleted rats after long-term intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) analog SDZ PTS893 or human PTH(1-34). *Bone.*, **28**, 237-250.
- Kobayashi, S., Inoue, S., Hosoi, T., Ouchi, Y., Shiraki, M. and Orimo, H. (1996): Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J. Bone Miner. Res.*, **11**, 306-311.
- Komm, B.S., Terpening, C.M., Benz, D.J., Graeme, K.A., Gallegos, A., Korc, M., Greene, G.L., O'Malley, B.W. and Haussler, M.R. (1988): Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science*, **241**, 81-84.
- Korach, K.S., Levy, L.A. and Sarver, P.J. (1987): Estrogen receptor stereochemistry: receptor binding and hormonal responses. *J. Steroid Biochem.*, **27**, 281-290.
- Kurabayashi, T., Matsushita, H., Tomita, M., Kato, N., Kikuchi, M., Nagata, H., Honda, A., Yahata, T. and Tanaka, K. (2004): Association of vitamin D and estrogen receptor gene polymorphism with the effects of long-term hormone replacement therapy on bone mineral density. *J. Bone Miner. Metab.*, **22**, 241-247.
- Kurihara, N. (1990): The origin of osteoclasts. *Bull Kana-gawa Dent Coll.*, **18**, 161-164.
- Lerner, U.H. (2006): Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *J. Dent. Res.*, **85**, 584-595.
- Libermann, T.A. and Baltimore, D. (1990): Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2327-2334.
- Liehr, J.G. and Roy, D. (1990): Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic. Biol. Med.*, **8**, 415-423.
- Livshits, G. (2006): Quantitative genetics of circulating molecules associated with bone metabolism: a review. *J. Musculoskelet Neuronal Interact.*, **6**, 47-61.
- Lorenzo, J.A., Sousa, S.L., Fonseca, J.M., Hock, J.M. and Medlock, E.S. (1987): Colony-stimulating factors regulate the development of multinucleated osteoclasts from recently replicated cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **80**, 160-164.
- Lowik, C.W.G.M., Nibbering, P.H., Van der Ruit, M. and Papanoulos, S.E. (1994): Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *J. Clin. Invest.*, **93**, 1465-1472.
- MacIntyre, I., Zaidi, M. and Alam, A.S. (1991): Osteoclastic inhibition: An action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 2936-2940.
- Malaval, L., Liu, F., Vernallis, A.B. and Aubin, J.E. (2005): GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J. Cell. Physiol.*, **204**, 585-593.
- Marshall, M.J., Holt, I. and Davie, M.W. (1996): Inhibition of prostaglandin synthesis leads to a change in adherence of mouse osteoclasts from bone to periosteum. *Calcif. Tissue Int.*, **59**, 207-213.
- Masi, L. and Brandi, M.L. (2001): Physiopathological basis of bone turnover. *J. Nucl. Med.*, **45**, 2-6.
- Massicotte, F., Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P. and Lajeunesse, D., (2006): Epub 2005 Oct 27. Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone.*, **38**, 333-341.
- Matemba, S.F., Lie, A. and Ransjo, M. (2006): Regulation of osteoclastogenesis by gap junction communication. *J. Cell. Biochem.*, **25**, [Epub ahead of print].
- McCulloch, C.A., Strugurescu, M., Hughes, F., Melcher, A.H. and Aubin, J.E. (1991): Osteogenic progenitor cells in rat bone marrow stromal populations exhibit self-renewal in culture. *Blood.*, **77**, 1906-1911.
- Mee, A.P., Gordon, M.T., May, C., Bennett, D., Anderson, D.C. and Sharpe, P.T. (1993): Canine distemper virus transcripts detected in the bone cells of dogs with metaphyseal osteopathy. *Bone.*, **14**, 59-67.
- Minuto, F., Palermo, C., Arvigo, M. and Barreca, A.M. (2005): The IGF system and bone. *J. Endocrinol. Invest.*, **28**, 8-10.
- Monaca, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. (1991): Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109-142.
- Nagashima, M., Sakai, A., Uchida, S., Tanaka, S., Tanaka, M. and Nakamura, T. (2005): Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. *Bone.*, **36**, 502-511.
- Nakamura, M., Udagawa, N., Yamamoto, Y. and Nakamura, H. (2006): BMP and osteoclastogenesis. *Clin. Calcium.*, **16**, 89-95.

- Oktem, G., Uslu, S., Vatanserver, S.H., Aktug, H., Yurtseven, M.E. and Uysal, A. (2006): Epub 2005 Dec 15. Evaluation of the relationship between inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity and effects of melatonin in experimental osteoporosis in the rat. *Surg. Radiol. Anat.*, **28**, 157-162.
- Onuma, E., Azuma, Y., Saito, H., Tsunenari, T., Watanabe, T., Hirabayashi, M., Sato, K., Yamada-Okabe, H. and Ogata, E. (2005): Increased renal calcium reabsorption by parathyroid hormone-related protein is a causative factor in the development of humoral hypercalcemia of malignancy refractory to osteoclastic bone resorption inhibitors. *Clin. Cancer Res.*, **11**, 4198-4203.
- Oursler, M.J., Collin-Osdoby, P., Li, L., Schmitt, E. and Osdoby, P. (1991): Evidence for an immunological and functional relationship between superoxide dismutase and a high molecular weight osteoclast plasma membrane glycoprotein. *J. Cell. Biochem.*, **46**, 331-344.
- Oursler, M.J., Bradley, E.W. and Elfering, S.L. (2005): Epub 2004 Sep 1. Native, not nitrated, cytochrome c and mitochondria-derived hydrogen peroxide drive osteoclast apoptosis. *J. Physiol. Cell. Physiol.*, **288**, C156-C168.
- Pacifici, R. (1993): Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**, 1135-1141.
- Pacifici, R. (1996): Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*, **11**, 1043-1451.
- Pacifici, R. (1998): Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis the second decade. *Endocrinology*, **139**, 2659-2661.
- Pacifici, R. (1995): Estrogen replacement therapy in osteoporosis: advances and controversies. *Endocr. Pract.*, **1**, 27-32.
- Pacifici, R., Brown, C., Puscheck, E., Friedrich, E., Slatopolsky, E., Maggio, D., McCracken, R. and Avioli, L.V. (1991): Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 5134-5138.
- Pacifici, R., Rifas, L., McCracken, R. and Avioli, L.V. (1990): The role of interleukin-1 in postmenopausal bone loss. *Exp. Gerontol.*, **25**, 309-316.
- Park, Y.G., Kang, S.K., Kim, W.J., Lee, Y.C. and Kim, C.H. (2004): Effects of TGF-beta, TNF-alpha, IL-beta and IL-6 alone or in combination, and tyrosine kinase inhibitor on cyclooxygenase expression, prostaglandin E2 production and bone resorption in mouse calvarial bone cells. *J. Biochem. Cell. Biol.*, **36**, 2270-2280.
- Passeri, M., Pedrazzoni, M., Pioli, G., Butturini, L., Ruys, A.H. and Cortenraad, M.G. (1993): Effects of nandrolone decanoate on bone mass in established osteoporosis. *Maturitas*, **17**, 211-219.
- Pfeilschifter, J., Chenu, C., Bird, A., Mundy, G.R. and Rodman, G.D. (1989): Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast like cells *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.*, **4**, 113-118.
- Poole, K.E. and Reeve, J. (2005): Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **5**, 612-617.
- Pottratz, S.T., Bellido, T., Mocharla, H., Crabb, D. and Manolagas, S.C. (1994): beta-Estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.*, **93**, 944-950.
- Raisz, L.G. (2005): Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.*, **115**, 3318-3325.
- Ralston, S.H., Ho, L.P., Helfrich, M., Grabowski, P.S., Johnston, P.W. and Benjamin, N. (1995) Nitric oxide: a cytokine induced regulator of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.*, **10**, 1040-1049.
- Ralston, S.H., Tood, D., Helfrich, M.H., Benjamin, N. and Grabowski, P. (1994): Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology*, **135**, 330-336.
- Ray, A., Prefontaine, K.E. and Ray, P. (1994): Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12940-12946.
- Reddy, S.V. and Crit, Rev. (2004): Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. *Eukaryot. Gene. Expr.*, **14**, 255-270.
- Reddy, V.B., Gattuso, P., Abraham, K.P., Moncada, R. and Castelli, M.J. (1991): Computed tomography-guided fine needle aspiration biopsy of deep-seated lesions. A four-year experience. *Acta Cytol.*, **35**, 753-756.
- Reid, L.R., Lowe, C., Cornish, J., Skinner, S.J., Hilton, D.J., Willson, T.A., Gearing, D.P. and Martin, T.J. (1990): Leukemia inhibitory factor: a novel bone-active cytokine. *Endocrinology*, **126**, 1416-1420.
- Reeves, J.D. and Hinzman, G.W. (1979): A benign cause of abnormal bone scan in Hodgkin's disease: case report. *Mil. Med.*, **144**, 825-826.
- 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.
- Riancho, J.A., Zarrabeitia, M.T., Fernandez-Luna, J.L. and Gonzalez-Macias, J. (1995): Mechanisms controlling nitric oxide synthesis in osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **107**, 87-92.
- Ries, W.L., Key, L.L. and Rodriguez, R.M. (1992): Nitroblue tetrazolium reduction and bone resorption by osteoclasts *in vitro* inhibited by a maganase-based superoxide dismutase mimic. *J. Bone Miner. Res.*, **7**, 931-939.
- Richelson, L.S., Wahner, H.W., Melton, L. and Riggs, B.L. (1984): Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N. Engl. J. Med.*, **311**, 1273-1275.
- Rickard, D.J., Subramaniam, M. and Spelsberg, T.C. (1999): Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. *J. Cell. Biochem.*, **Suppl 32-33**, 123-132.
- Riggs, B.L., Wahner, H.W., Dunn, W.L., Mazess, R.B., Offord, K.P. and Melton, L.J. (1981): Differential changes in bone mineral density of the appendicular and axial skeleton with aging: relationship to spinal osteoporosis. *Clin. Invest.*, **67**, 328-335.
- Robey, P.G., Young, M.F., Flanders, K.C., Roche, N.S., Kondiah, P., Reddi, A.H., Termine, J.D., Sporn, M.B. and

- Roberts, A.B. (1987): Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta(TGF-beta) *in vitro*. *J. Cell. Biol.*, **105**, 457-463.
- Robling, A.G., Castillo, A.B., Turner, C.H. and Annu, R. (2006): Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Biomed. Eng.*, **8**, 455-498.
- Rosen, C.J. (2000): Pathogenesis of osteoporosis. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **14**, 181-193.
- Roodman, G.D. and Ann, N.Y. (2006): Regulation of osteoclast differentiation. *Acad. Sci.*, **1068**, 100-109.
- Sawicki, A. (1990): Effect of hydrochlorothiazide on calcium metabolism in postoperative hypoparathyroidism. *Pol. Tyg. Lek.*, **45**, 501-503.
- Schreck, R. and Baeuerle, P.A. (1991): A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell. Biol.*, **1**, 39-42.
- Schreck, R.R. (1992): 9(2): ix-x. Comment on: *Pediatr Hematol Oncol. Tumor suppressor gene (Rb and p53) mutations in osteosarcoma. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **9**, 125-137.
- Schmid, T.M., Popp, R.G. and Linsenmayer, T.F. (1990): Hypertrophic cartilage matrix. Type X collagen, supramolecular assembly, and calcification. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **580**, 64-73.
- Schmidt, H.G., Wittek, F., Faschingbauer, M. and Fink, B. (1992): Treatment of chronic osteitis of the femur[Article in German. *Unfallchirurg.*, **95**, 562-565.
- Seck, T., Diel, I., Bismar, H., Ziegler, R., Pfeilschifter, J. and Eur, J. (2001): Serum V parathyroid hormone, but not menopausal status, is associated with the expression of osteoprotegerin and RANKL mRNA in human bone samples. *Endocrinol.*, **145**, 199-205.
- Silverton, S. (1994): Osteoclast radicals. *J. Cell. Biochem.*, **56**, 367-373.
- Silverton, S.F., Mesaros, S., Markham, G.D. and Malinski, T. (1995): Osteoclast radical interactions: NADPH causes pulsatile release of NO and stimulates superoxide production. *Endocrinology*, **136**, 5244-5247.
- Sontakke, A.N. and Tare, R.S. (2002): A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin. Chim. Acta.*, **318**, 145-148.
- Sorimachi, K., Akimoto, K., Hattori, Y., Ieiri, T. and Niwa, A. (1999): Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with polyanions, and involvement of interferon-gamma in the regulation of cytokine secretion. *Cytokine.*, **11**, 571-578.
- Srivastava, S., Weitzmann, M.N., Kimble, R.B., Rizzo, M., Zahner, M., Milbrandt, J., Ross, F.P. and Pacifici, R. (1998): Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J. Clin. Invest.*, **102**, 1850-1859.
- Stein, B. and Yang, M.X. (1995): Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4971-4979.
- Steinbeck, M.J., Appel, W.H., Jr., Verhoeven, A.J. and Karnovsky, M.J. (1994): NADPH-oxidase expression and in situ production of superoxide by osteoclasts actively resorbing bone. *Cell Biol.*, **126**, 765-772.
- Stilgren, L.S., Abrahamsen, B., Abdallah, B.M. and Jorgensen, N.R. (2005): The cytokine system of bone tissue[Article in Danish. *Ugeskr Laeger.*, **167**, 874-878.
- Su, X., Liao, E.Y., Peng, J., Liu, S.P., Dai, R.C., Zhong, N.D. (2004): Effects of parathyroid hormone on osteoprotegerin expression and osteoprotegerin ligand and their related cytokines in human osteoblasts. *Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*, **29**, 562-565.
- Subbiah, M.T., Kessel, B., Agrawal, M., Rajan, R., Abplanalp, W. and Rymaszewski, Z. (1993): Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **77**, 1095-1097.
- Suda, T., Ueno, Y., Fujii, K. and Shinki, T. (2003): Vitamin D and bone. *J. Cell. Biochem.*, **88**, 259-266.
- Suda, N., Morita, I., Kuroda, T. and Murota, S. (1993): Participation of oxidative stress in the process of osteoclast differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1157**, 318-323.
- Sugioka, K., Shimosegawa, Y. and Nakano, M. (1987): Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett.*, **210**, 37-39.
- Suva, L.J., Ernst, M. and Rodan, G.A. (1991): Retinoic acid increases zif268 early gene expression in rat preosteoblastic cells. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 2503-2510.
- Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Roodman, G.D., Mundy, G.R., Jones, S.J., Boyde, A. and Suda, T. (1988): Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology*, **122**, 1373-1382.
- Takata, S., Yamashita, Y., Masaki, K., Morimoto, K. and Nakano, M. (1993): Effects of bed rest on bone metabolism in patients with femoral neck fracture. *Ann. Physiol. Anthropol.*, **12**, 321-325.
- Togari, A., Arakawa, S., Arai, M. and Matsumoto, S. (1993): Alteration of in vitro bone metabolism and tooth formation by zinc. *Gen. Pharmacol.*, **24**, 1133-1140.
- Torrington, O., Firek, A.F. and Conover, C.A. (1991): Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide stimulate insulin-like growth factor-binding protein secretion by rat osteoblast-like cells through a adenosine 3',5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology*, **128**, 1006-1014.
- Troen, B.R. (2003): Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp. Gerontol.*, **38**, 605-614.
- Turner, R.T. and Eliel, L.P. (1978): Nuclear estrogen receptor in the reproductive tract of laying Japanese quail. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **34**, 141-148.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Sasaki, T., Nishihara, T., Koga, T., Martin, T.J. and Suda, T. (1990): Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 7260-7264.
- van't Hof, R.J. and Ralston, S.H. (2001): Nitric oxide and bone. *Immunology*, **103**, 255-261.
- Veille, J.C., Li, P., Eisenach, J.C., Massmann, A.G., Figueroa, J.P. and Am, J. (1996): Effects of estrogen on nitric oxide biosynthesis and vasorelaxant activity in sheep uterine and renal arteries *in vitro*. *Obstet Gynecol.*, **174**, 1043-

1049.

- Venema, R.C., Nishida, K., Alexander, R.W., Harrison, D.G. and Murphy, T.J. (1994): Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1218**, 413-420.
- Vidal, K., van den Broek, P., Lorget, F. and Donnet-Hughes, A. (2004) Osteoprotegerin in human milk: a potential role in the regulation of bone metabolism and immune development. *Pediatr. Res.*, **55**, 1001-1008.
- Weusten, J.J., Blankenstein, M.A., Gmelig-Meyling, F.H., Schuurman, H.J., Kater, L. and Thijssen, J.H. (1986): Presence of oestrogen receptors in human blood mononuclear cells and thymocytes. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, **112**, 409-414.
- Weiner, C.P., Lizasoain, I., Baylis, S.A., Knowles, R.G., Charles, I.G. and Moncada, S. (1994): Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 5212-5216.
- Yamazaki, H., Kunisada, T., Yamane, T. and Hayashi, S.I. (2001): Presence of osteoclast precursors in colonies cloned in the presence of hematopoietic colony-stimulating factors. *Exp. Hematol.*, **29**, 68-76.
- Yates, A.J., Gutierrez, G.E., Smolens, P., Travis, P.S., Katz, M.S., Aufdemorte, T.B., Boyce, B.F., Hymer, T.K., Poser, J.W. and Mundy, G.R. (1988): Effects of a synthetic peptide of a parathyroid hormone-related protein on calcium homeostasis, renal tubular calcium reabsorption, and bone metabolism *in vivo* and *in vitro* in rodents. *J. Clin. Invest.*, **81**, 932-938.
- Yalin, S., Bagis, S., Polat, G., Dogruer, N., Cenk, Aksit, S., Hatungil, R. and Erdogan, C. (2005): Is there a role of free oxygen radicals in primary male osteoporosis? *Clin. Exp. Rheumatol.*, **23**, 689-692
- Yang, S., Madyastha, P., Bingel, S., Ries, W. and Key, L.L. (2001): A new superoxide -generating oxidase in murine osteoclasts. *J. Biol. Chem.*, **276**, 5452-5458.
- Zaidi, M., Alam, A.S., Bax, B.E., Shankar, V.S., Bax, C.M., Gill, J.S., Pazianas, M., Huang, C.L., Sahinoglu, T. and Moonga, B.S. (1993): Role of the endothelial cell in osteoclast control: new perspectives. *Bone.*, **14**, 97-102
- Zarrabeitia, M.T., Riancho, J.A., Amado, J.A. and Gonzalez-Macias, J. (1991): Lack of effect of human parathyroid hormone and calcitonin on cytokine and prostaglandin secretion by blood mononuclear cells. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **13**, 541-544.
- Zhou, H., Hammonds, R.G., Jr, Findlay, D.M., Fuller, P.J., Martin, T.J. and Ng, K.J. (1991): Retinoic acid modulation of mRNA levels in malignant, nontransformed, and immortalized osteoblasts. *Bone Miner. Res.*, **6**, 767-777.