

発表番号 61 (0530)

骨代謝における亜鉛の役割の解析

小澤 修¹、高井 信治¹、花井 淑晃^{1,2}、徳田 治彦^{1,2}

¹岐阜大学大学院医学系研究科

²国立長寿医療センター臨床検査部

私共は既に、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: FGF-2) による血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の遊離には、MAP キナーゼスーパーファミリーの内、SAPK/JNK および p44/p42 MAP キナーゼが関与することを報告している。本研究では亜鉛 (Zn) が MC3T3-E1 細胞における FGF-2 による VEGF 遊離に及ぼす作用およびその機序について検討した。FGF-2 による VEGF の遊離は ZnSO₄ により増強されたが、Na₂SO₄ では何ら増強されなかった。ZnSO₄ によ

る増強作用は 1 - 100 μM の間で用量依存的であった。ZnSO₄ は FGF-2 による p44/p42 MAP キナーゼのリン酸化を増強したが、一方、SAPK/JNK のリン酸化には何ら影響しなかった。FGF-2 による VEGF 遊離に対する ZnSO₄ の増強作用は、MEK1/2 阻害剤である PD98059 により抑制された。以上の結果より、骨芽細胞において、亜鉛は p44/p42 MAP キナーゼ活性の増強を介して FGF-2 による VEGF 遊離を増強する作用を有することが強く示唆された。

助成番号 0530

骨代謝における亜鉛の役割の解析

小澤 修¹、高井 信治¹、花井 淑晃^{1,2}、徳田 治彦^{1,2}¹岐阜大学大学院医学系研究科分子・構造学講座薬理病態学分野²国立長寿医療センター臨床検査部

研究目的

亜鉛は、ヒトおよび他の多くの動物種における生理学的機能の重要な調節因子である⁽¹⁾。亜鉛の不足により成長および創傷の治癒の遅滞が生じる⁽¹⁾。骨代謝においては、亜鉛は骨形成および石灰化に関与し、亜鉛の不足は骨量が減少することが *in vivo* および *in vitro* で報告されている^(2,3)。骨代謝は骨芽細胞と破骨細胞の二つの細胞によって調節され、前者は骨形成を、一方、後者は骨吸収を主として担っている⁽⁴⁾。骨芽細胞において、亜鉛はアルカリホスファターゼ活性を増強させることが報告されている⁽⁵⁾。加えて、1,25-dihydroxyvitamin D3 依存性プロモーター活性およびインスリン様成長因子-1 (insulin-like growth factor-1: IGF-1)の同化作用も亜鉛により増強される^(6,7)。最近、私共は骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、亜鉛が phosphoinositide-hydrolyzing phospholipase C および phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D を抑制することにより、プロスタグランジン F₂α (prostaglandin F₂α: PGF₂α) によるインターロイキン-6 (interleukin-6: IL-6) の産生を抑制することを報告している⁽⁸⁾。しかし、骨芽細胞における亜鉛の役割の詳細については未だ十分に明らかにされてはいない。

血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) は血管内皮細胞に特異的なヘパリン結合性血管増殖因子である⁽⁹⁾。VEGF は種々の細胞において産生・遊離され、毛細血管の浸透性を増加し、血管内皮細胞の増殖を刺激する⁽⁹⁾。骨代謝においては、VEGF の不活性化により、血管の発達が抑制され、骨化の抑制および軟骨の増殖帯の拡大が惹起されることが報告されている⁽¹⁰⁾。骨代謝を担う細胞の内、特に骨芽細胞において、種々の液性因子によって VEGF が産生・遊離されることが示されている^(9,11-13)。骨リモデリングにおいて、血管内皮細胞は毛細血管を供給し、骨芽細胞および骨芽細胞の前駆細胞は骨吸収窩に遊走する。近年、骨芽細胞、破骨細胞および血管内皮細胞の細胞機能は、液性因子や cell-to-cell contact により密接に協調して骨代謝を調節していると考えられている⁽¹⁴⁾。従って、骨芽細胞

より産生・遊離される VEGF は骨代謝において極めて重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、骨芽細胞における VEGF 合成の調節機構については未だ判然としていない。

塩基性線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor-2: FGF-2) は骨マトリックスに存在し、骨芽細胞は FGF-2 を産生する^(15,16)。骨芽細胞における FGF-2 の発現は骨修復時に認められる⁽¹⁷⁾。従って、FGF-2 は骨修復、骨リモデリングおよび骨新生において重要な役割を担うと考えられている⁽¹⁸⁾。私共は既に、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、FGF-2 が VEGF 遊離を促進し、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼスーパーファミリーのうち、p44/p42 MAP キナーゼおよび stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) が関与していることを報告している^(19,20)。本研究では私共は骨芽細胞の細胞機能に対する亜鉛の影響を検討するため、MC3T3-E1 細胞を用い塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) による血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 遊離に及ぼす作用およびその機序について解析を行った。

研究方法

1. 細胞培養

新生マウス頭蓋冠よりクローン化された MC3T3-E1 細胞を用いて検討を行なった^(21,22)。培養には直径 35 mm、もしくは直径 90 mm の培養ディッシュを使用し、10%の牛胎児血清 (FCS) を含む α-minimum essential medium (α-MEM) 中で、37°C、5% CO₂ の条件下にて細胞を培養した。5 日後、培養液を 0.3% FCS を含む α-MEM に置換し、その 48 時間後に実験に供した。

2. VEGF アッセイ

MC3T3-E1 細胞を FGF-2 により 24 時間刺激した。ZnSO₄ および Na₂SO₄ による前処理は、FGF-2 による刺激前に 20 分間行った。PD98059 による処理は、ZnSO₄ 処理前に 60 分間行った。刺激終了後、溶液を回収し、溶液中の VEGF 濃度を VEGF ELISA キットを用いて測定した。ELISA プレート上のサンプルの吸光度は EL

340 Bio Kinetic Reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)を用いて測定した。

3. p44/p42 MAP キナーゼおよび SAPK/JNK の解析

MC3T3-E1 細胞を FGF-2 により刺激した。ZnSO₄ および Na₂SO₄ による前処理は、FGF-2 による刺激前に 20 分間行った。Laemmli らの方法⁽²³⁾により、10%アクリルアミドのゲルを用いて SDS-PAGE を行った。Western blotting は、リン酸化 p44/p42 MAPK 抗体、p44/p42 MAPK 抗体、リン酸化 SAPK/JNK 抗体 SAPK/JNK 抗体を用いて行った⁽²⁴⁾。PVDF 膜上のペルオキシダーゼ活性を ECL ウェスタンブロットング検出システムを用いて X 線フィルム上に露光した。フィルム上の光学的密度は Molecular Analyst/Macintosh (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて定量化した。

研究結果

1. MC3T3-E1 細胞における FGF-2 による VEGF 遊離に対する亜鉛の効果

私共は既に、FGF-2 が骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞からの VEGF 遊離を促進することを明らかにしている⁽¹⁹⁾。亜鉛が MC3T3-E1 細胞における FGF-2 による VEGF 遊離に影響を与えるのか否かを明らかにするために、はじめに、ZnSO₄ の VEGF 遊離に対する効果について検討した。ZnSO₄ は、それ単独では VEGF レベルに何ら影響しなかったが、FGF-2 による VEGF 遊離を有意に増強した (Fig. 1)。ZnSO₄ の増強作用は 1 - 100 μM の範囲で用量依存的であった。100 μM の ZnSO₄ は FGF-2 の作用を約 110% 増強した。Na₂SO₄ は FGF-2 による VEGF 遊離に何ら影響を及ぼさなかった (Fig. 1)。

2. FGF-2 による p44/p42 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化に対する ZnSO₄ の効果

私共は既に、FGF-2 による VEGF 遊離には MAP キナーゼスーパーファミリーの内、p44/p42 MAP キナーゼおよび SAPK/JNK の活性化を介することを報告している^(19,20)。FGF-2 による VEGF 産生に対する ZnSO₄ の作用が p44/p42 MAP キナーゼおよび SAPK/JNK の活性化を介するの否かを明らかにするために、次に、FGF-2 による SAPK/JNK のリン酸化に対する亜鉛の作用について検討した。しかし、ZnSO₄ は FGF-2 による SAPK/JNK のリン酸化に対して何ら影響を及ぼさなかった (Fig. 2)。一方、FGF-2 による p44/p42 MAP キナーゼのリン酸化は ZnSO₄ によって有意に増強された (Fig. 3)。200 μM の ZnSO₄ は FGF-2 による p44/p42 MAP キナーゼのリン酸化を約 50% 増強した。ZnSO₄ による p44/p42 MAPK のリン酸化の増強は用量依存的であった。

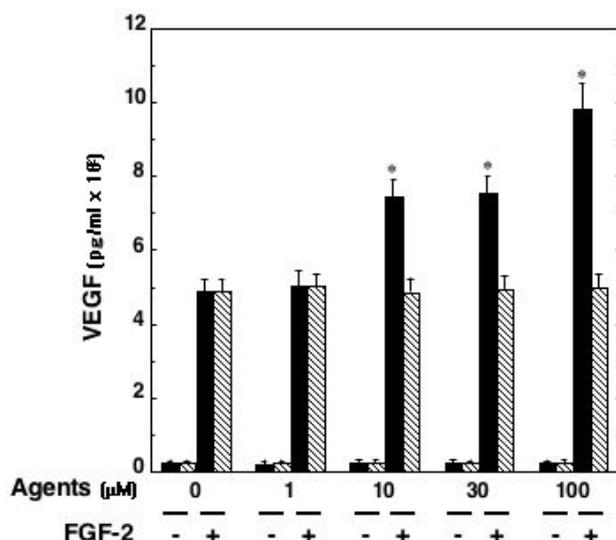


Fig. 1 Effects of ZnSO₄ or Na₂SO₄ on FGF-2-stimulated VEGF release in MC3T3-E1 cells.

The cultured cells were pretreated with various doses of ZnSO₄ (closed bar) or Na₂SO₄ (hatched bar) for 20 min, and then stimulated by 70 ng/ml FGF-2 or vehicle for 24 h. Each value represents the mean ± SEM of triplicate determinations. **p*<0.05, compared to the value of FGF-2 alone.

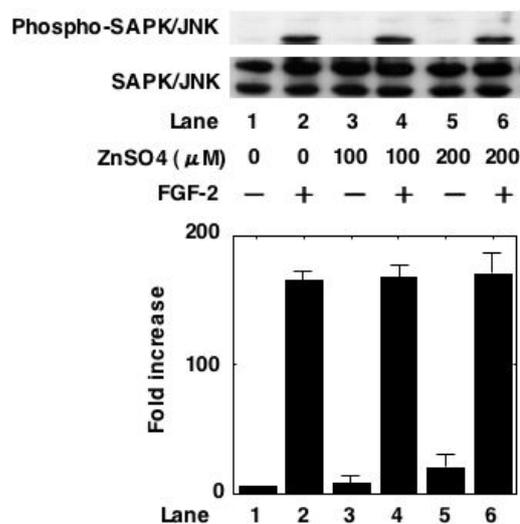


Fig. 2 Effect of ZnSO₄ on the phosphorylation of SAPK/JNK induced by FGF-2 in MC3T3-E1 cells.

The cultured cells were pretreated with the indicated doses of ZnSO₄ or vehicle for 20 min, and then stimulated by 70 ng/ml FGF-2 or vehicle for 20 min. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against phospho-specific SAPK/JNK or SAPK/JNK. The histogram shows quantitative representations of the levels of FGF-2-induced phosphorylation obtained from laser densitometric analysis of three independent experiments. Each value represents the mean ± SEM of triplicate determinations.

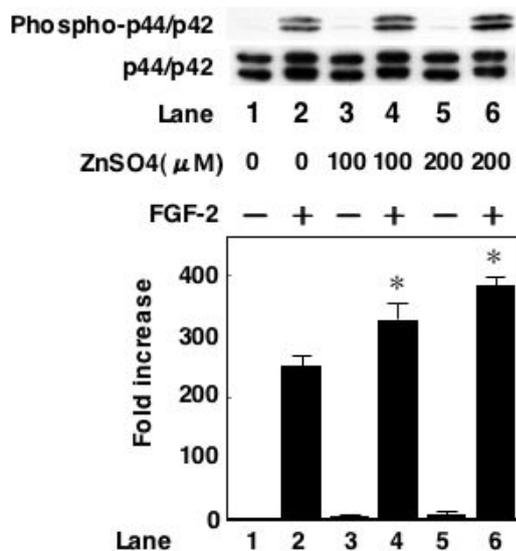


Fig. 3 Effect of ZnSO₄ on the phosphorylation of p44/p42 MAPK induced by FGF-2 in MC3T3-E1 cells.

The cultured cells were pretreated with the indicated doses of ZnSO₄ or vehicle for 20 min, and then stimulated by 70 ng/ml FGF-2 or vehicle for 20 min. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against phospho-specific p44/p42 MAPK or p44/p42 MAPK. The histogram shows quantitative representations of the levels of FGF-2-induced phosphorylation obtained from laser densitometric analysis of three independent experiments. Each value represents the mean ± SEM of triplicate determinations. **p*<0.05, compared to the value of FGF-2 alone.

Table 1 Effect of PD98059 on the enhancement by ZnSO₄ of the FGF-2-stimulated VEGF release in MC3T3-E1 cells

			VEGF (pg/ml)
PD98059	ZnSO ₄	FGF-2	
-	-	-	23 ± 10
-	-	+	502 ± 45*
-	+	-	21 ± 10
-	+	+	955 ± 65**
+	-	-	25 ± 10
+	-	+	263 ± 25**
+	+	-	20 ± 10
+	+	+	272 ± 25***

The cultured cells were pretreated with 10 μM PD98059 or vehicle for 60 min, and then incubated by 100 μM ZnSO₄ for 20 min. The cells were stimulated by 70 ng/ml FGF-2 or vehicle for 24 h. Each value represents the mean ± SEM of triplicate determinations. **p*<0.05, compared to the control. ***p*<0.05, compared to the value of FGF-2 alone. ****p*<0.05, compared to the value of FGF-2 with ZnSO₄ pretreatment.

3. FGF-2によるVEGF遊離に対するZnSO₄の増強作用におけるPD98059の効果

FGF-2によるVEGF産生のZnSO₄による増強作用がp44/p42 MAPキナーゼの活性化の増強によるものであることをさらに確認するために、p44/p42 MAPキナーゼの上流のキナーゼであるMAPキナーゼキナーゼ、MEK1/2に対する特異的な抑制剤であるPD98059⁽²⁵⁾のZnSO₄による増強作用に対する効果を検討した。PD98059単独ではVEGFレベルに何ら影響しなかったが、FGF-2によるVEGF遊離に対するZnSO₄による増強作用を、FGF-2単独のレベルにまで抑制した(Table 1)。

考察・今後の課題

本研究で私共は、骨芽細胞様MC3T3-E1細胞において、ZnSO₄単独ではVEGFレベルに対して何ら作用を示さないが、FGF-2によるVEGF遊離を有意に増強させることを明らかにした。コントロールとして使用したNa₂SO₄はVEGF遊離に何ら影響しなかった。従って、亜鉛(Zn)がFGF-2によるVEGF遊離を有意に増強させることが明らかとなった。

私共は次に、亜鉛(Zn)によるVEGF遊離増強作用の機序について検討した。MAPキナーゼスーパーファミリーは細胞外からの刺激に対する細胞内情報伝達に関与し、種々の細胞において細胞増殖、分化およびアポトーシスに極めて重要な役割を果たすことがよく知られている⁽²⁶⁾。哺乳動物細胞においてはp44/p42 MAPキナーゼ、p38 MAPキナーゼおよびSAPK/JNKの三つが主要なMAPキナーゼであり、様々な情報の伝達に中心的役割を担っている⁽²⁶⁾。私共は既に、骨芽細胞様MC3T3-E1細胞においてFGF-2はp44/p42 MAPキナーゼおよびSAPK/JNKを活性化し、これら二つのMAPキナーゼがFGF-2によるVEGF遊離に促進的に作用していることを報告している^(19,20)。本研究では私共は、ZnSO₄がSAPK/JNKに対しては何ら作用を示さないことを明らかとした。従って、亜鉛(Zn)によるFGF-2によるVEGF遊離の増強作用は、SAPK/JNK活性の増強を介するものではないと考えられた。一方、FGF-2によるp44/p42 MAPキナーゼのリン酸化は、ZnSO₄によって有意にかつ用量依存的に増強された。この結果から、亜鉛(Zn)はp44/p42 MAPキナーゼの活性を増強するを介して、FGF-2によるVEGFの産生を増強することが示唆された。さらに、私共はMEK1/2阻害剤であるPD98059⁽²⁵⁾がZnSO₄によるFGF-2によるVEGF遊離の増強作用を、ほぼFGF-2単独による程度まで抑制することを明らかとした。従って、FGF-2によるVEGF産生に対する亜鉛(Zn)の増強作用

は、SAPK/JNK ではなく p44/p42 MAP キナーゼの活性化の増強を介するものと考えられた。

血管の発達は骨リモデリングにおいて重要な過程であることはよく知られている⁽⁴¹⁾。VEGF は血管内皮細胞の特異的な細胞増殖因子であることから⁽⁹⁾、骨代謝において、骨芽細胞より遊離される VEGF は骨芽細胞と血管内皮細胞との間の重要な細胞間情報伝達物質であると考えられている。一方、骨代謝において、亜鉛(Zn)は骨形成と石灰化刺激の重要な調節因子であると報告されている^(2,3)。さらに亜鉛(Zn)は活性化ビタミン D₃-依存性プロモーターおよび、IGF-1 の同化作用を増強することが報告されている^(6,7)。加えて、亜鉛(Zn)は骨芽細胞において、マクロファージコロニー刺激因子の遺伝子発現を刺激する⁽²⁷⁾。従って、亜鉛(Zn)による骨芽細胞からの VEGF 遊離の増強効果は、血管内皮細胞の増殖を介して、骨リモデリングにおいて重要な役割を果たしている可能性が考えられる。私共は既に、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、亜鉛(Zn)が PGF₂αによる IL-6 の産生を抑制することを報告している⁽⁸⁾。IL-6 は破骨細胞形成と破骨細胞の骨吸収能を促進させる強力な骨吸収因子であることは良く知られている⁽²⁸⁾。これらの事実から、骨代謝において、亜鉛(Zn)は VEGF レベルの増加を介し骨形成を刺激し、一方、IL-6 レベルの減少を介し骨吸収を抑制していると考えられる。骨代謝における亜鉛(Zn)の役割の詳細を明らかにするにはさらなる細胞レベルの研究が必要である。

以上の結果より、骨芽細胞において、亜鉛は p44/p42 MAP キナーゼ活性の増強を介して FGF-2 による VEGF 遊離を増強する作用を有することが強く示唆された。

文 献

- Vallee, B.L. and Falchuk, K.H. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 73, 79-118.
- Yamaguchi, M. and Yamaguchi, R. 1986. Action of zinc on bone metabolism in rats. Increases in alkaline phosphatase activity and DNA content. *Biochem. Pharmacol.* 35, 773-777.
- Hall, S.L., Dimai, H.P. and Farley, J.R. 1999. Effects of zinc on human skeletal alkaline phosphatase activity in vitro. *Calcif. Tissue. Int.* 64, 163-172.
- Nijweide, P.J., Burger, E.H. and Feyen, J.H. 1986. Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 66, 855-886.
- Hashizume, M. and Yamaguchi, M. 1994. Effect of beta-alanyl-L-histidinato zinc on differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells: increases in alkaline phosphatase activity and protein concentration. *Mol. Cell. Biochem.* 131, 19-24.
- Matsui, T. and Yamaguchi, M. 1995. Zinc modulation of insulin-like growth factor's effect in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Peptides* 16, 1063-1068.
- Lutz, W., Burritt, M.F., Nixon, D.E., Kao, P.C. and Kumar, R. 2000. Zinc increases the activity of vitamin D-dependent promoters in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 1-7.
- Hatakeyama, D., Kozawa, O., Otsuka, T., Shibata, T. and Uematsu, T. 2002. Zinc suppresses IL-6 synthesis by prostaglandin F₂α in osteoblasts: inhibition of phospholipase C and phospholipase D. *J. Cell. Biochem.* 85, 621-628.
- Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18, 4-25.
- Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z. and Ferrara, N. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* 5, 623-628.
- Goad, D.L., Rubin, J., Wang, H., Tashjian, A.H., Jr. and Patterson, C. 1996. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 137, 2262-2268.
- Wang, D.S., Yamazaki, K., Nohtomi, K., Shizume, K., Ohsumi, K., Shibuya, M., Demura, H. and Sato, K. 1996. Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human osteoblast-like cells. *J. Bone. Miner. Res.* 11, 472-479.
- Schlaeppli, J.M., Gutzwiller, S., Finkenzeller, G. and Fournier, B. 1997. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces the expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Endocr. Res.* 23, 213-229.
- Erlebacher, A., Filvaroff, E.H., Gitelman, S.E. and Derynck, R. 1995. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80, 371-378.
- Baylink, D.J., Finkelman, R.D. and Mohan, S. 1993. Growth factors to stimulate bone formation. *J. Bone. Miner. Res.* 8 Suppl 2, S565-S572.

16. Hurley, M.M., Abreu, C., Harrison, J.R., Lichtler, A.C., Raisz, L.G. and Kream, B.E. 1993. Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* 268, 5588-5593.
17. Bolander, M.E. 1992. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200, 165-170.
18. Marie, P.J. 2003. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 316, 23-32.
19. Tokuda, H., Kozawa, O. and Uematsu, T. 2000. Basic fibroblast growth factor stimulates vascular endothelial growth factor release in osteoblasts: divergent regulation by p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Bone. Miner. Res.* 15, 2371-2379.
20. Tokuda, H., Hirade, K., Wang, X., Oiso, Y. and Kozawa, O. 2003. Involvement of SAPK/JNK in basic fibroblast growth factor-induced vascular endothelial growth factor release in osteoblasts. *J. Endocrinol.* 177, 101-107.
21. Sudo, H., Kodama, H.A., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S. 1983. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell. Biol.* 96, 191-198.
22. Kozawa, O., Tokuda, H., Miwa, M., Kotoyori, J. and Oiso, Y. 1992. Cross-talk regulation between cyclic AMP production and phosphoinositide hydrolysis induced by prostaglandin E₂ in osteoblast-like cells. *Exp. Cell. Res.* 198, 130-134.
23. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
24. Kato, K., Ito, H., Hasegawa, K., Inaguma, Y., Kozawa, O. and Asano, T. 1996. Modulation of the stress-induced synthesis of hsp27 and alpha B-crystallin by cyclic AMP in C6 rat glioma cells. *J. Neurochem.* 66, 946-950.
25. Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T. and Saltiel, A.R. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 27489-27494.
26. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. and Johnson, G.L. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79, 143-180.
27. Kanekiyo, M., Itoh, N., Kawasaki, A., Matsuda, K., Nakanishi, T. and Tanaka, K. 2002. Metallothionein is required for zinc-induced expression of the macrophage colony stimulating factor gene. *J. Cell. Biochem.* 86, 145-153.
28. Rifas, L. 1999. Bone and cytokines: beyond IL-1, IL-6 and TNF-alpha. *Calcif. Tissue. Int.* 64, 1-7.

0530

Role of zinc in bone metabolism

Osamu Kozawa,^a Shinji Takai,^a Yoshiteru Hanai,^{a,b} and Haruhiko Tokuda,^{a,b}

^a Department of Pharmacology, Gifu University Graduate School of Medicine,
Gifu 501-1194, Japan;

^b Department of Clinical Laboratory, National Hospital for Geriatric Medicine, National Center
for Geriatrics and Gerontology, Obu, Aichi 474-8511, Japan

Summary

We previously reported that basic fibroblast growth factor (FGF-2) activates stress-activated protein kinase/*c-Jun* N-terminal kinase (SAPK/JNK) and p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase resulting in the stimulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) release in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. In the present study, we investigated whether zinc affects the VEGF release by FGF-2 in MC3T3-E1 cells. The FGF-2-induced VEGF release was significantly enhanced by ZnSO₄ but not Na₂SO₄. The enhancing effect of ZnSO₄ was dose-dependent between 1 and 100 μM. ZnSO₄ markedly enhanced the FGF-2-induced phosphorylation of p44/p42 MAP kinase while having little effect on the SAPK/JNK phosphorylation. PD98059 significantly reduced the amplification by ZnSO₄ of the bFGF-stimulated VEGF release. Taken together, our findings strongly suggest that zinc enhances FGF-2-stimulated VEGF release resulting from up-regulating activation of p44/p42 MAP kinase in osteoblasts.