

# 파골세포 분화와 골 흡수에 myricetin의 효과

이안생 · 장성조<sup>1\*</sup>

원광대학교 병원, 1: 원광대학교 의과대학 신경외과학교실

## Effect of Myricetin in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption

An-Saeng Lee, Sung Jo Jang<sup>1\*</sup>

Wonkwang University Hospital, 1: Department of Neurosurgery, School of Medicine, Wonkwang University

Osteoclasts are bone-resorbing giant cells that differentiate from hematopoietic cells of the monocyte/macrophages. Excessive osteoclast differentiation leads to gradual loss of bone mass causing fracture of the skeleton. The aim of this study was to develop a drug candidates for the treatment of osteoporosis. RANKL-induced osteoclast differentiation was dose-dependently inhibited by myricetin. Myricetin inhibited the expression of c-Fos, NFATc1, and TRAP in BMMs treated with RANKL. Myricetin disrupted the structure of actin ring and suppressed osteoclastic bone resorption. Also, myricetin induced apoptosis in mature osteoclasts. Myricetin inhibited the phosphorylation of ERK in mature osteoclasts treated with M-CSF. The activation of caspase-9 and caspase-3 was increased by myricetin treatment. Our results suggest that myricetin may be an effective agent to prevent bone diseases such as osteoporosis.

Key words : bone, osteoclast, myricetin

### 서 론

파골세포(Osteoclast)는 골을 흡수하는 유일한 세포로 생체 내 다양한 요소에 의해 활성화되며 조골세포에 의한 골 형성과의 균형으로 양질의 골이 유지 된다<sup>1)</sup>. 그러나 파골세포와 조골세포 사이의 균형은 폐경기 여성들의 특징인 에스트로젠 결핍에 의해 쉽게 파괴되는데 이 결과로 인해 골다공증이 유도된다<sup>2)</sup>.

파골세포는 조혈모세포에서 유래된 단핵구/대식세포에서 유래되며 receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)에 의해 파골세포로 분화된다<sup>3)</sup>. 파골세포의 분화는 여러 단계를 거쳐 골을 흡수하는 파골세포로 분화되는데, 단핵구/대식세포에서 발현하는 RANK에 RANKL가 결합하면 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 양성 세포로 분화된다. TRAP 양성 세포에 RANKL, interleukin-1, tumor necrosis factor-α (TNF-α)와 같은 염증인자로 자극하면 세포끼리 융합되어 다핵형 TRAP 양성 세포로 분화된다. 따라서 다핵형 TRAP 양성 세포는 골 흡수를 돕는 여러 인자들에 의해서 골을 흡수하게 된다<sup>4)</sup>.

RANKL는 TNF 계열의 라이건드로 파골세포의 분화에 필수적인 사이토카인이다. RANKL가 수용체인 RANK와 결합하면 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)이 RANK의 세포질 부위와 결합하고 수많은 신호전달체계를 활성화 시킨다. 특히 NF-κB, p38, JNK는 파골세포 분화 초반기에 중요한 전사인자 c-Fos의 발현에 중요하게 작용 한다<sup>5)</sup>. 또한 활성화된 RANK는 DNAX-activating protein (DAP) 12, Fc receptor common γ chain (FcRγ)와 같은 수용체의 세포질 말단에 포함되어 있는 immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)을 활성화 시킨다. 이로 인해 세포질 내에 Ca<sup>2+</sup>이 증가되어 c-Fos와 함께 nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1의 발현을 촉진 한다<sup>6,7)</sup>. NFATc1은 파골세포의 분화 및 활성화에 중요한 전사인자로 파골세포의 지표인 TRAP, calcitonin receptor, osteoclast-associated receptor (OSCAR)등의 발현을 유도한다<sup>8)</sup>.

최근 저자는 약용식물에서 추출한 물질들을 이용하여 파골세포의 분화 및 기능에서의 효과를 보고하였다<sup>9-11)</sup>. 본 연구에서 저자는 파골세포의 분화, 생존, 기능에 myricetin의 효과를 검증하고자 하였다. Myricetin은 플라보노이드 계열로 과일에 주로 많이 함유되어있으며, 특히 포도와 꿀에 많이 포함되어있어 항산화 효과를 나타낸다고 보고되었다<sup>12-14)</sup>. 또한 강력한 항산화 효과

\* 교신저자 : 장성조, 익산시 신용동 원광대학교 의과대학 신경외과학교실  
 · E-mail : jang-4025@daum.net, · Tel : 063-472-5081  
 · 접수 : 2010/01/15 · 수정 : 2010/01/31 · 채택 : 2010/02/08

로 피부암을 억제한다고 보고되었다<sup>15)</sup>. 항암 효과가 있는 포도주의 주요한 플라보노이드는 quercetin과 myricetin으로 구성되어 있는데<sup>16)</sup>, 최근 quercetin이 parathyroid hormone에 의한 파골세포 분화를 억제한다고 보고되었다<sup>17)</sup>. 특히 quercetin은 NF- $\kappa$ B와 AP-1을 조절하여 파골세포의 분화를 억제하고 골다공증 마우스 모델에서 골 손실을 억제한다고 보고되었다<sup>18,19)</sup>. 그러나 파골세포의 분화 및 골 흡수에 myricetin의 효과는 알려지지 않았다. 따라서 저자는 파골세포의 분화, 생존, 골 흡수에 myricetin의 효과를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료와 생쥐

Myricetin, 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (VitD<sub>3</sub>), prostaglandin E<sub>2</sub>는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

### 2. 파골세포의 분화에 미치는 myricetin의 효과

ICR 5주령을 경추탈골법으로 희생하고 대퇴골과 경골을 분리하였다. 분리된 대퇴골과 경골의 속질 공간을 1 cc 주사기로 수세하여 골수세포를 얻었다. 골수세포는 3일간 M-CSF (30 ng/ml)를 처리하여 대식세포로 배양하였다. 대식세포는 결과에서 설명하는 것과 같이 myricetin을 농도별로 처리하고 M-CSF (20 ng/ml)과 RANKL (50 ng/ml)을 같이 처리하여 4일간 배양하였다. 배양된 세포는 고정 후 TRAP 용액 (Sigma Aldrich, USA)으로 염색하여 붉은색으로 염색된 세포를 파골세포로 간주하였다.

### 3. 유전자 발현에 myricetin의 효과

세포는 Qiazol 시약 (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용해 제조사의 방법에 따라 RNA를 분리하였다. RNA 1  $\mu$ g은 oligo dT primer, dNTP, buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor와 Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용해 cDNA로 합성했다. cDNA 1  $\mu$ l는 아래와 같은 각각의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. c-Fos sense, 5'-CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3'; c-Fos antisense, 5'-CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3'; NFATc1 sense, 5'-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3'; NFATc1 antisense, 5'-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3'; TRAP sense, 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3'; TRAP antisense, 5'-TCAGCACATAGCCACACCG-3'; GAPDH sense, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; GAPDH antisense, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. PCR 산물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 Et-Br로 염색하여 자외선파장에서 관찰하였다.

### 4. Western blot 분석

세포는 lysis buffer (50 mM tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM

EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% deoxycholate, protease inhibitors)를 이용해 용해하고 원심분리를 20분 수행하여 순수 단백질을 얻었다. 동량의 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후 PVDF 막 (Amersham biosciences)로 옮기고 항체를 이용하여 단백질 발현을 관찰하였다. p-ERK, p-Akt, active-caspase-9, active-caspase-3 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였다. Actin 항체는 Sigma사의 제품을 이용하였다.

### 5. 성숙 파골세포의 분리

성숙 파골세포를 분리하기 위해 조골세포는 예전에 보고한 바와 같이 분리하였다<sup>10)</sup>. 골수세포와 조골세포는 collagen으로 코팅한 90-mm 배양접시에 첨가하고 VitD<sub>3</sub>와 PGE<sub>2</sub>를 처리하여 공배양 하였다. 배양 6일 후, collagenase로 분리한 성숙 파골세포는 48-well plate에 첨가하고 4시간 배양하였다. 순수한 파골세포를 얻기 위해 4시간 후, 조골세포는 trypsin으로 제거하여 순수한 파골세포를 얻어 실험에 사용하였다.

### 6. 골 흡수에 대한 myricetin의 효과

위와 같이 공배양으로 성숙 파골세포로 유도한 후 collagenase로 분리한 성숙 파골세포는 dentine slice에 첨가하고 myricetin을 12시간 처리하였다. 배양 후 세포는 제거하고 dentine slice는 hematoxylin으로 염색하여 골 흡수 정도를 분석하였다.

### 7. 액틴과 핵 염색

성숙 파골세포는 RANKL (100 ng/ml)와 myricetin (20  $\mu$ M)을 처리하고 12 시간 배양하였다. 배양 후, 세포는 3.7% formalin과 0.1% Triton X-100으로 처리하여 고정하였다. 고정된 세포는 액틴과 핵을 염색하기 위해 각각 rhodamine-conjugated phalloidin과 DAPI로 5분간 염색하였다. 염색된 세포는 형광현미경을 이용하여 확인하였다.

### 8. 통계분석

대조군과 실험군의 통계적인 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 p 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 파골세포의 분화에 대한 myricetin의 효과

파골세포의 분화에 myricetin(Fig. 1A)의 효과를 검증하기 위해 골수세포에서 유래된 대식세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하고 myricetin을 첨가하였다. M-CSF와 RANKL를 처리했을 때 TRAP 양성인 파골세포로 분화되었다. 그러나 myricetin을 농도별로 처리했을 경우 myricetin의 농도 증감에 따라 TRAP 양성 파골세포로의 분화가 억제되었다(Fig. 1B). 또한 myricetin의 1  $\mu$

M 농도에서도 유의하게 파골세포의 수가 감소되었고 10 μM의 농도에서는 파골세포의 형성이 완전히 억제되었다(Fig. 1C).

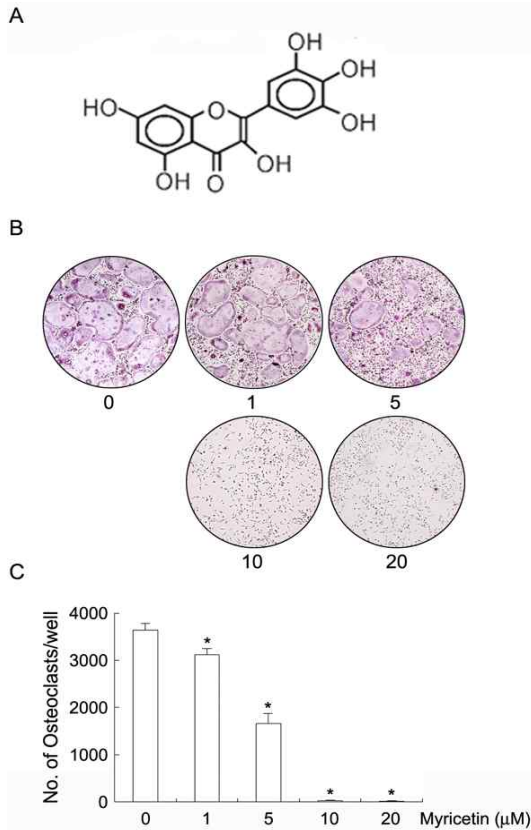


Fig. 1. Effect of myricetin on osteoclast differentiation. (A) Chemical structure of myricetin. (B) BMMs were cultured for 4 days with M-CSF (20 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) in the presence of increasing concentrations of myricetin. After 4 days, cells were fixed with 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained for TRAP. (C) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts.

### 2. RANKL에 의해 유도되는 유전자 발현에 myricetin의 효과

RANKL에 의해 유도되는 많은 유전자 중에서 c-Fos와 NFATc1은 파골세포의 분화에 필수적인 유전자로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 따라서 파골세포의 분화에 myricetin의 억제효과가 이들의 발현에 관련 있는지 확인하였다. 대조군은 시간별로 RANKL를 처리하여 RNA를 얻고 RT-PCR을 수행하였다. RANKL는 c-Fos의 발현을 12시간부터 증가시키고 48시간에는 다시 감소하는 경향을 나타냈으며 NFATc1은 12시간부터 발현을 증가되고 48시간까지 증가되었다. 그러나 RANKL과 myricetin을 같이 처리한 실험군에서는 c-Fos와 NFATc1 발현이 유의하게 감소되는 것을 알 수 있다(Fig. 2). 이 결과로 파골세포의 분화에 myricetin의 효과는 RANKL에 의해 유도되는 c-Fos와 NFATc1의 발현억제와 관련되어있음을 추측할 수 있다.

### 3. 골 흡수에 대한 myricetin의 효과

파골세포의 골 흡수에 myricetin의 효과를 검증하기 위해 성숙 파골세포로 배양하여 dentine slice에서 myricetin을 12 시간 처리하였다. Myricetin을 처리했을 때 파골세포에 의한 골 흡수

가 억제되었다(Fig. 3A). 다음으로 파골세포의 액틴 형성에 myricetin의 효과를 확인하였다. 파골세포는 myricetin으로 처리하고 액틴 염색을 하였다. 대조군의 액틴은 둥글고 매끄러운 전형적인 파골세포 형태를 유지하였지만 myricetin을 처리한 파골세포는 액틴이 파괴되었다(Fig. 3B).

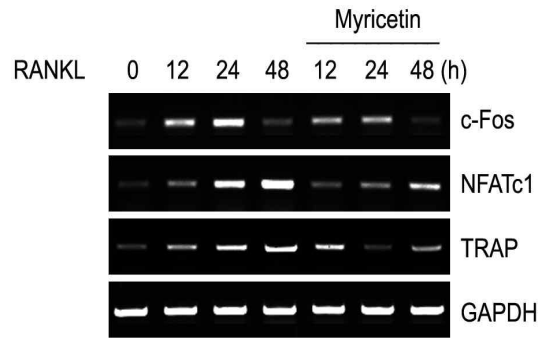


Fig. 2. Effect of myricetin in RANKL-induced mRNA expression. BMMs were pretreated with myricetin (20 μM) for 1 hour and further stimulated with RANKL for the indicated time. Total RNA was isolated from each time point and analyzed by RT-PCR using primers for c-Fos, NFATc1, TRAP, and GAPDH.

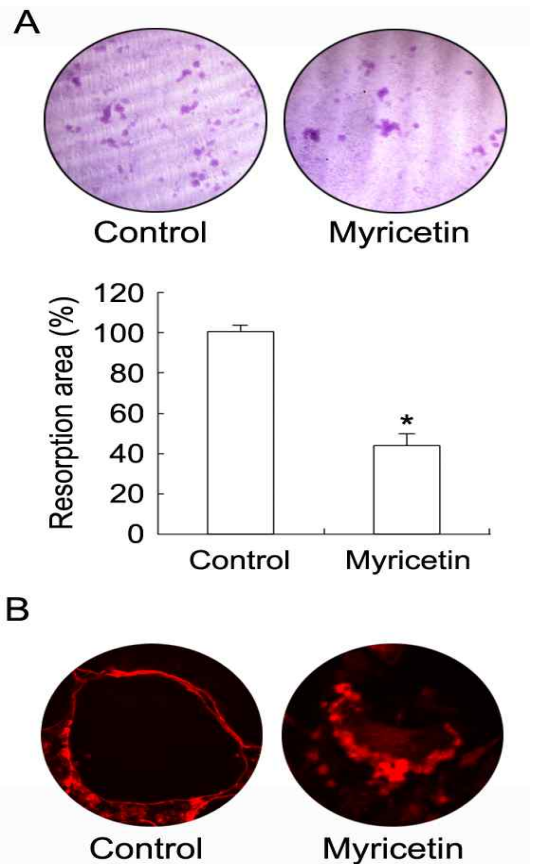


Fig. 3. Effect of myricetin on osteoclastic bone resorption. Mature osteoclasts were generated by co-cultures of bone marrow cells and osteoblasts. (A) Mature osteoclasts were seeded on dentine slices and then treated with or without myricetin (20 μM) for 12 hours. Cells on dentine slices were removed and then stained with hematoxylin (Top). Resorption areas were quantified using the Image-Pro Plus program, version 4.0. (Bottom). (B) Mature osteoclasts were cultured for 12 hours with RANKL (100 ng/ml) in the presence or absence of myricetin (10 μM). The cells were stained with rhodamine-conjugated phalloidin.

4. 파골세포 생존에 myricetin의 효과

대식세포에서 분화된 다핵형 파골세포는 빠른 시간 안에 세포사멸 과정을 거친다<sup>20</sup>). 따라서 파골세포의 생존에 myricetin의 효과를 DAPI 염색으로 확인하였다. 대조군은 핵이 둥글고 정상적인 형태를 유지하였지만 myricetin을 처리한 파골세포의 핵은 대부분 파괴되었다(Fig. 4A). M-CSF는 Akt와 ERK 활성을 통해 caspase의 활성을 억제하여 파골세포의 생존을 유지한다고 보고되었다<sup>21</sup>). 다음으로 파골세포 세포사멸에 myricetin의 작용기전을 규명하기 위해 세포의 생존과 사멸에 중요한 역할을 하는 Akt와 ERK의 활성에 myricetin의 효과를 확인하였다. M-CSF는 Akt와 ERK의 인산화를 촉진하였지만 myricetin을 같이 처리했을 때 ERK의 인산화가 억제되었다(Fig. 4B). Myricetin은 M-CSF에 의한 ERK 활성을 억제했기 때문에 세포사멸을 유도하는 caspase 활성에 myricetin의 효과를 검증하였다. Myricetin은 대조군과 비교했을 때 caspase-9와 caspase-3의 활성을 촉진하였다. 또한 M-CSF를 처리해도 myricetin은 caspase-9와 caspase-3의 활성을 유도하였다(Fig. 4B). 이들의 결과로 myricetin은 ERK의 신호전달을 억제하여 caspase의 활성을 촉진한다고 할 수 있다.

고찰

파골세포는 새로운 골 형성을 위해 기존의 골 조직을 제거하는 필수적인 세포로 골 항상성에 매우 중요한 세포이다. 그러나 에스트로겐의 결핍, 자가 면역 질환, 만성 염증에 의해 파골세포가 과도로 활성화되어 골 손실이 유도되고 결국 골절이 유발된다<sup>2)</sup>. 본 연구의 목적은 기존에 상용화되어있는 약제를 이용해 파골세포의 분화 및 활성을 억제하는 약제를 도출하고 이용하기 위함이다. Myricetin은 과일 및 채소에 많이 함유되어있고 항산화 약제로 시판되어 널리 사용되고 있다. 따라서 저자는 파골세포의 분화에 myricetin의 효과를 검증하였다. 전구세포인 대식세포에 M-CSF와 RANKL을 처리했을 때 파골세포로의 분화를 유도했지만, myricetin은 파골세포의 분화를 억제한다는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이 결과로 비록 myricetin이 항산화 약제로 사용되지만 골다공증 환자에 유용하게 사용될 수 있으리라 기대된다.

RANKL은 여러 신호전달 물질과 전사인자의 증가를 유도해 파골세포로의 분화를 촉진한다<sup>8)</sup>. RANKL은 파골세포의 분화 초기 단계에 c-Fos의 유도를 하는데, c-Fos가 결핍된 세포는 RANKL에 의해 파골세포로 분화가 유도되지 않는다고 보고되었다<sup>22)</sup>. 또한 c-Fos는 NFATc1의 발현에 중요한 역할을 한다고 알려졌고<sup>23)</sup> RANKL 없이 NFATc1의 유도만으로 파골세포로 분화된다고 보고되었다<sup>24)</sup>. 이 결과로 c-Fos와 NFATc1의 발현은 파골세포의 분화에 매우 중요한 인자라 할 수 있다. 저자는 파골세포의 분화에 myricetin의 작용 기전을 확인하기 위해 c-Fos와 NFATc1의 발현에 myricetin의 효과를 확인하였다. Myricetin은 RANKL에 의해 유도되는 c-Fos와 NFATc1의 발현을 유의하게 억제하였다(Fig. 2). 이 결과로 myricetin이 c-Fos와 NFATc1 발현의 억제로 파골세포의 분화를 억제한다고 제안한다.

파골세포의 골 흡수 억제는 치료제 개발에 중요한 요인이 될 수 있다. 파골세포의 분화를 억제하는 myricetin이 골 흡수에 효과가 있는지 확인하였다. 파골세포는  $\alpha\beta3$  integrin과 골 기질이 단단하게 결합되어 골을 흡수하는데 세포 가장 자리에 둥근 모양의 액틴 형성이 매우 중요하다<sup>25)</sup>. 이때 파골세포는  $H^+$ , cathepsin K, metalloproteinase 등을 분비하여 골 조직을 파괴 한다<sup>26,27)</sup>. 본 연구에서 myricetin은 파골세포의 골 흡수를 억제하였고 액틴 형성을 파괴하였다(Fig. 3). 이 결과로 myricetin이 파골세포의 액틴 형성을 파괴하여 골 흡수를 억제한다고 할 수 있다.

세포사멸의 형태학적 특징은 세포가 수축되며 핵이 압축되고 생화학적 특징으로는 caspase가 활성화 된다<sup>28)</sup>. 특히 대식세포에서 분화된 파골세포는 RANKL과 M-CSF와 같은 생존 인자가 없을 때 mitochondria로부터 세포질로 cytochrome c의 발현을 촉진하는 bim 단백질이 빠르게 증가되어 세포사멸 된다. 그러나 bim 단백질은 ERK의 활성에 의해 억제된다고 보고되었다<sup>21)</sup>. 저자는 액틴 염색 결과 myricetin에 의해 액틴이 파괴되면서 세포가 수축되었으며 DAPI 염색으로 핵이 압축되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3, 4). 저자는 세포사멸에 myricetin의 효과가 caspase의 활성과 관련 있는지 확인하였다. M-CSF에 의해 활성화 되는 Akt와 ERK는 파골세포의 분화에 중요하다고 알려져 있

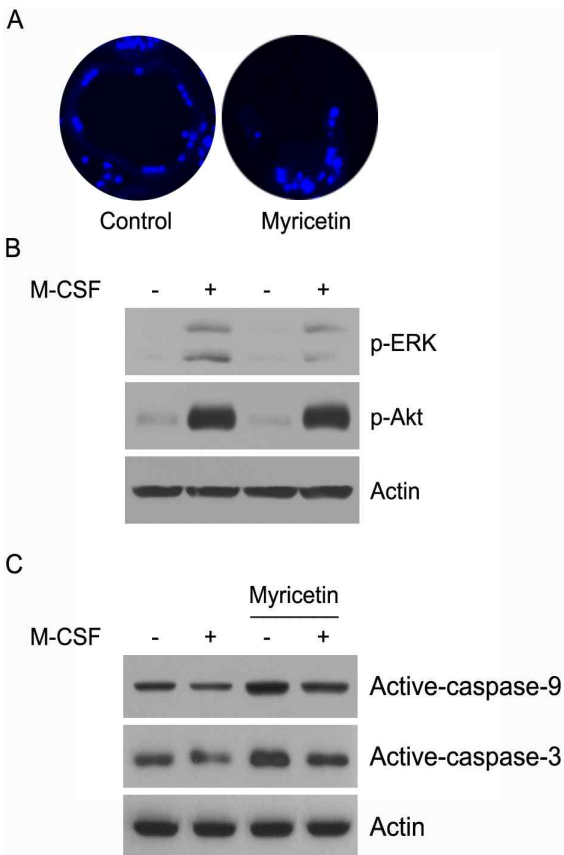


Fig. 4. Effect of myricetin on osteoclast survival. Mature osteoclasts were generated by co-cultures of bone marrow cells and osteoblasts. (A) Mature osteoclasts were cultured for 12 hours with M-CSF (50 ng/ml) in the presence or absence of myricetin (20  $\mu$ M). The cells were stained with DAPI. (B) Mature osteoclasts were pretreated with myricetin (10  $\mu$ M) for 1 hour and further stimulated with M-CSF for 10 min. Cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies for p-ERK, p-Akt, and actin. (C) Mature osteoclast were treated as above and analyzed by Western blotting with antibodies for active-caspase-9, active-caspase-3, and actin.

으며 caspase 활성을 억제한다고 보고되었다<sup>29,30</sup>. 본 연구에서 myricetin은 ERK의 활성을 억제하고 caspase-9과 caspase-3의 활성을 촉진하였다(Fig. 4). 이 결과로 myricetin이 ERK 신호 전달을 억제하여 caspase의 활성을 촉진하고 세포사멸을 유도한다고 할 수 있다.

## 결 론

약제로 시판되고 있는 myricetin이 RANKL에 의해 유도되는 c-Fos와 NFATc1의 발현을 억제 하여 파골세포의 분화를 억제하고 세포사멸을 유도하였다. 또한 액틴의 파괴를 통해 골 흡수를 억제하였다. 이들의 결과로 myricetin이 골다공증 치료제 및 골 질환 예방을 위해 좋은 약제가 될 수 있으리라 기대한다.

## 감사의 글

이 논문은 2008년 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Teitelbaum, S.L., Ross, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 4: 638-649, 2003.
- Karsenty, G., Wagner, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell.* 4: 389-406, 2002.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., Martin, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* 20: 345-357, 1999.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 423: 337-342, 2003.
- Lee, Z.H., Kim, H.H. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 211-214, 2003.
- Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matozaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H., Takai T. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature.* 428: 758-763, 2004.
- Takayanagi, H., Sato, K., Takaoka, A., Taniguchi, T. Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunol. Rev.* 208: 181-193, 2005.
- Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 292-304, 2007.
- Jung, Y.T., Choi, Y.H., Song, J.H., Lee, C.H., Lee, M.S., Jang, S.J., Cho, H.J., Kwak, H.B., Oh, J. Effect of Water Extract of *Eucommia ulmoides* in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 23: 613-618, 2009.
- Cho, H.J., Choi, M.K., Le, Y., Song, J.H., Lee, M.S., Lee, C.H., Jang, S.J., Kwak, H.B., Oh, J. Effect of water extracts of *Cuscuta japonica* Cho in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 23: 860-865, 2009.
- Kim, Y.K., Choi, Y.H., Song, J.H., Jang, S.J. Kim, H.J., Lee, C.H., Ahn, S.H., Lee, J.E., Kim, J.J., Choi, M.K. Inhibitory Effect of Deer Antler on Osteoclastic Bone Resorption. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 23: 613-618, 2009.
- German, J.B., Walzem, R.L. The health benefits of wine. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 561-593, 2000.
- Hakkinen, S.H., Karenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkanen, H.M., Torronen, A.R. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2274-2279, 1999.
- Sellappan, S., Akoh, C.C. Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia-grown *Vidalia* onions. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5338-5342, 2002.
- Chang, R.L., Huang, M.T., Wood, A.W., Wong, C.Q., Newmark, H.L., Yagi, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Conney, A.H. Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the tumorigenicity of benzo[a]pyrene and (+/-)-7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene on mouse skin and in the newborn mouse. *Carcinogenesis.* 6: 1127-1133, 1985.
- Waterhouse, A.L. Wine phenolics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 957: 21-36, 2002.
- Yamaguchi, M., Hamamoto, R., Uchiyama, S., Ishiyama, K. Effect of flavonoid on calcium content in femoral tissue culture and parathyroid hormone-stimulated osteoclastogenesis in bone marrow culture in vitro. *Mol. Cell Biochem.* 303: 83-88, 2007.
- Wattel, A., Kamel, S., Prouillet, C., Petit, J.P., Lorget, F., Offord, E., Brazier, M. Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via a mechanism involving NF kappa B and AP-1. *J. Cell Biochem.* 92: 285-295, 2004.
- Tsuji, M., Yamamoto, H., Sato, T., Mizuha, Y., Kawai, Y., Taketani, Y., Kato, S., Terao, J., Inakuma, T., Takeda, E. Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the

- uterus in ovariectomized mice. *J. Bone Miner. Metab.* 27: 673-681, 2009.
20. Wakeyama, H., Akiyama, T., Kadono, Y., Nakamura, M., Oshima, Y., Nakamura, K., Tanaka, S. Posttranslational regulation of Bim by caspase-3. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1116: 271-280, 2007.
  21. Akiyama, T., Bouillet, P., Miyazaki, T., Kadono, Y., Chikuda, H., Chung, U.I., Fukuda, A., Hikita, A., Seto, H., Okada, T., Inaba, T., Sanjay, A., Baron, R., Kawaguchi, H., Oda, H., Nakamura, K., Strasser, A., Tanaka, S. Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO J.* 22: 6653-6664, 2003.
  22. Fleischmann, A., Hafezi, F., Elliott, C., Reme, C.E., Ruther, U., Wagner, E.F. Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice. *Genes Dev.* 14: 2695-2700, 2000.
  23. Matsuo, K., Galson, D.L., Zhao, C., Peng, L., Laplace, C., Wang, K.Z., Bachler, M.A., Amano, H., Aburatani, H., Ishikawa, H., Wagner, E.F. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J. Biol. Chem.* 279: 26475-26480, 2004.
  24. Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E.F., Mak, T.W., Kodama, T., Taniguchi, T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell.* 3: 889-901, 2002.
  25. Ross, F.P., Teitelbaum, S.L.  $\alpha$ v $\beta$ 3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol. Rev.* 208: 88-105, 2005.
  26. Delaisse, J.M., Andersen, T.L., Engsig, M.T., Henriksen, K., Troen, T., Blavier, L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc. Res. Tech.* 61: 504-513, 2003.
  27. Zhao, H., Ross F.P. Mechanisms of osteoclastic secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1116: 238-244, 2007.
  28. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 269-290, 1999.
  29. Plas, D.R., Talapatra, S., Edinger, A.L., Rathmell, J.C., Thompson, C.B. Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. *J. Biol. Chem.* 276: 12041-12048, 2001.
  30. Lee, S.E., Chung, W.J., Kwak, H.B., Chung, C.H., Kwack, K.B., Lee, Z.H., Kim, H.H. Tumor necrosis factor- $\alpha$  supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK. *J. Biol. Chem.* 276: 49343-49349, 2001.