파골세포의 분화와 뼈 흡수에 천남성의 억제 효과

이명수 · 이창훈 · 박기인[1] · 김하영[2]*

원광대학교 의과대학 류마티스내과학교실, 1 : 전북대학교 자연과학대학 생물학과 2 : 원광대학교 의과대학 내분비내과학교실

Inhibitory Effects of Rhizoma Arisaematis on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption

Myeung Su Lee, Chang Hoon Lee, Kie-In Park[1], Ha Young Kim[2]*

Department of Internal Medicine, Division of Rheumatology, University of Wonkwang College of Medicine,
1 : Division of Biological Science, School of Natural Science, Chonbuk National University,
2 : Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism, University of Wonkwang College of Medicine, Sanbon Medical Center

Osteoclasts play a critical role in bone-related diseases such as osteoporosis and rheumatoid arthritis by resorbing the bone. Recently, natural products from plants have been extensively studied as therapeutic drugs to treat and prevent various diseases. Here, we examined the effects of rhizoma arisaematis on ostoclast differentiation and bone resorption. We showed that rhizoma arisaematis significantly suppressed receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation in bone marrow-derived macrophages (BMMs) in a dose dependent manner but have little or no effect on the cytotoxicity of BMMs and RAW264.7 cells. We found that rhizoma arisaematis iarrow-ed the RANKL-induced c-Fos and nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1, which is a master regulator of osteoclast differentiation. Furthermore, rhizoma arisaematis suppressed the mRNA expression of tartrate resistant-acid phosphatase and cathepsin K iaduced by RANKL in BMMs. in y chanistic studies, rhizoma arisaematis considerably iarrow-ed I-κB degradation, which is a negative regulator of NF-κB, but iaduced the phosphderlation of p-38, ERK, and JNK.MMlso, we found that rhizoma arisaematis significantly iarrow-ed osteoclastic bone resorption. Taken tarether, our results suggest that rhizoma arisaematis suppresses osteoclast differentiation through down-regulatd the mRANKL-induced c-Fos and NFATc1 expression and iarrow-s bone resorption.

Key words : Rhizoma Arisaematis, Osteoclast, RANKL, NFATc1

서 론

골다공증(Osteoporosis)은 고령화 사회에 점진적으로 증가하는 추세에 있어 고령 인구의 삶의 질과 경제적인 문제점을 야기시킨다. 특히, 에스트로젠이 결핍된 폐경기 여성뿐만 아니라 식생활의 변화로 인하여 젊은 나이의 여성에서도 골다공증이 빈번히 발생되고 있다[1,2]. 골다공증의 큰 문제점은 고통이 수반되지 않아 일반적으로 골다공증 증상을 쉽게 지나치게 된다. 그러나 골다공증을 앓고 있는 고령의 환자의 경우 고관절 골절로 매년 24% 가량 사망하고 있어 골다공증의 예방 및 치료는 중요하다고 할 수 있다[3]. 뼈는 사람의 신체를 지지해주는 단단한 조직이지만, 태어나면서부터 사망 때 까지 양질의 뼈를 유지할 수 있게 흡수되고 생성되는 과정이 반복된다[4,5]. 그러나 에스트로젠 결핍 및 만성 염증 질환을 앓고 있는 환자는 쉽게 골다공증이 발생되는데, 뼈를 흡수하는 세포인 파골세포(Osteoclast)는 에스트로젠 뿐만 아니라 생체 내 호르몬과 염증 인자에 의해 형성과 활성이 조절 된다[2,6,7].

조혈모세포에서 유래된 파골세포는 전구세포인 대식세포가 분화되어 형성된 세포이다. 대식세포는 여러 수용체를 가지고 있는 세포로서, receptor activator of nuclear factor-κB (RANK) 수용체에 RANK ligand (RANKL)가 결합하면 다양한 신호 전달 물질을 활성화 시켜 파골세포의 분화에 중요한 전사인자 및 새로운 유전자 발현을 유도한다[8]. 특히, RANKL는 세포내 신호 전

* 교신저자 : 김하영, 군포시 산본동 원광대학교 의과대학 산본병원 내분비내과
· E-mail : hykimmd@hanmail.net, · Tel : 031-390-2202
· 접수 : 2010/11/16 · 수정 : 2011/01/07 · 채택 : 2011/01/28

달 단백질인 mitogen-activated protein kinases (MAPKs; p38, ERK, JNK)와 전사인자 NF-κB와 Mi transcription factor (MITF)를 활성화 시키고 c-Fos와 nuclear factor activated T cells (NFAT)c1의 발현을 유도한다[9,10]. 최근 연구에 의하면 NFATc1은 파골세포의 지표인 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), cathepsin K, osteoclast-associated receptor (OSCAR)등의 발현을 촉진하며[11,12], 대식세포에 NFATc1을 과 발현 시킨 경우 RANKL로 자극하지 않아도 파골세포로 분화된다고 보고되었다[13]. 이들의 결과로 RANKL은 MAPKs, NF-κB, c-Fos, NFATc1등의 단백질 활성을 유도하여 파골세포로 분화를 촉진한다고 할 수 있다.

현재 골다공증 및 뼈 질환 환자에게 사용되는 치료제는 bisphosphonate 계열의 약제가 사용되고 있지만, 최근 임상 연구에 의하면 bisphosphonate 약제는 식도 및 위장관에 부작용이 노출되었으며 하악골에 괴사를 야기하는 심각한 부작용이 대두되고 있다[14]. 따라서 최근 부작용이 없는 천연물질을 이용한 새로운 골다공증 치료제 개발이 시도되고 있다. 본 연구진은 여러 천연물질을 이용하여 뼈를 흡수하는 파골세포의 생성 및 활성을 억제 시킬 수 있는 천연물질을 스크리닝하였고 천남성(天南星, Rhizoma Arisaematis)이 파골세포의 형성을 억제한다는 것을 확인하였다. 천남성은 천남성과의 여러해살이풀로서 맹독성이 포함되어있는 것이 특징이지만, 안면 신경 마비, 외상에 의한 골절, 독사 및 벌레에 물린 상처에 사용되기도 한다[15,16]. 비록 천남성이 독성을 포함하고 있지만, 천남성에 포함된 생약 성분을 이용하면 골다공증 치료제 개발에 중요한 단서를 제공할 수 있을 것이다.

본 연구에서 연구진들은 여러 천연물질 중에서 천남성이 파골세포의 형성을 억제 하는 것과 파골세포의 뼈 흡수를 억제한다는 것을 확인하였다. 또한 천남성의 파골세포 억제 작용기전을 규명하였다.

재료 및 방법

1. 시료

천남성 추출물은 한국식물추출물은행에서 구입하였다. Human RANKL과 Human M-CSF는 Peprotech (London, UK)사의 제품을 사용하였다. TRAP 용액은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서 구입하였다. c-Fos와 NFATc1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다. Phospho (p)-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-p38, p38, I-κB 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였다.

2. 대식세포 획득 및 파골세포 분화

ICR 5주령 생쥐는 경추 탈골법으로 희생시키고 대퇴골과 경골을 분리하였다. 대퇴골과 경골의 끝을 제거하고 뼈속질을 1cc 주사기 (26 gauge)로 수세하여 골수세포를 획득하였다. 분리한 골수세포는 α-minimum essential medium (α-MEM, Gibco BRL) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), penicillin/streptomycin (Sigma), M-CSF (10 ng/ml)를 첨가하여 1일간 배양기에서 배양한다. 배양된 세포 중에서 부착되지 않은 세포에 M-CSF(30 ng/ml) 첨가하여 3일간 배양한다. 3일 후, 부착된 세포를 대식세포 (bone marrow-derived macrophage; BMMs)로 사용하였다. 대식세포는 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (50 ng/ml)를 투여하고 천남성을 농도별로 처리하여 배양기에서 4일간 배양하였다. 모든 배양이 끝난 후, 배양한 세포는 TRAP 용액을 이용하여 염색하고 염색된 세포는 파골세포로 간주하였다.

3. 세포 독성검사

천남성의 세포 독성 검사를 위해 2가지 방법을 사용하였다. 먼저 대식세포는 M-CSF(30 ng/ml)와 실험에 사용한 농도의 천남성을 투여하여 4일간 배양하였다. 4일 후, 배양액에 XTT 용액 50 μl를 첨가하여 4시간 배양하였다. 배양 후, ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 확인하였다. 두 번째로 RAW 264.7 세포에 천남성을 투여하고 4일간 배양하였다. 4일 후, 세포는 hematoxylin (Sigma) 용액으로 염색하고 50 개 이상의 세포 군체를 세어 확인하였다.

4. RT-PCR 분석

세포 내 RNA는 TRIzol(Invitrogen) 용액으로 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 분리한 RNA는 정량하고, RNA 1 μg을 oligo dT primer, dNTP, buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor, Superscript II reverse transcriptase를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 다음과 같은 primer를 이용하여 PCR 증폭을 하였다. c-Fos sense, 5′-CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3′; c-Fos antisense, 5′-CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3′; NFATc1 sense, 5′-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3′; NFATc1 antisense, 5′-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3′; Cathepsin K sense, 5′-AGGCGGCTATATGACCACTG-3′; Cathepsin K antisense, 5′-CCGAGCCAAGAGAGCATATC-3′; GAPDH sense, 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′; GAPDH antisense, 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′. PCR 후, 증폭된 결과물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 Et-Br로 염색하여 U.V. 상에서 관찰하였다.

5. Western blot 분석

세포에 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, and protease inhibitors)를 첨가하여 세포를 용해하고 scraper를 이용하여 세포를 획득하였다. 용해된 세포를 원심분리 (14,000 rpm)하여 상층액을 획득하여 단백질을 얻었다. 단백질은 DC Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하고 동량의 단백질은 10% SDS-polyacrilamide gel을 이용하여 전기영동 하였다. 전기영동

을 수행한 gel은 300 mA로 2시간 동안 전기영동하여 단백질을 PVDF 막 (Amersham Biosciences)으로 옮기고 실험에서 확인하고자 하는 항체를 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

6. 골 흡수 분석

파골세포의 뼈 흡수에 천남성의 효과를 확인하기 위해, 예전에 발표한 논문에서와 같이 성숙 파골세포를 얻어 파골세포의 뼈 흡수 활성에 천남성의 효과를 확인하였다[17]. 간략하며, Hydroxyapatite가 코팅된 plate에 성숙 파골세포를 첨가하고 천남성을 투여하여 24 시간 배양하였다. 24시간 후, 세포는 제거하고 hydroxyapatite의 흡수 정도 Image Pro-plus program, version 4.0으로 정량화 하였다.

7. 통계분석

각각의 실험군은 3개 이상 수행하였고 평균값과 표준편차를 계산하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 동일한 실험결과를 얻은 경우 실험 결과로 사용하였으며, 정량적인 결과의 통계는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 p 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 파골세포 분화에 대한 천남성의 효과

전구세포에서 파골세포로의 분화에 대한 천남성의 효과를 확인하기 위해 전구세포인 대식세포에 M-CSF와 RANKL를 처리하고 천남성을 농도별로 투여하여 4일간 배양하였다. 천남성을 처리하지 않은 대조군은 TRAP 용액에 염색된 파골세포로 분화되었지만, 천남성을 처리한 실험군에서는 천남성의 농도 증가에 비례하여 파골세포 형성이 급격히 억제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 본 연구진은 파골세포 분화에 천남성의 효과가 세포 독성 및 비특이적인 효과로 도출된 결과인지 확인하기 위해, 대식세포에 파골세포 억제 효과를 나타내는 농도로 처리하고 대식세포의 증식에 천남성의 효과를 검증하였다. XTT 실험 결과 대식세포의 증식에는 파골세포의 분화에 대한 효과는 나타나지 않았다(Fig. 1B). 또한 RAW264.7 세포의 군체 형성에도 천남성은 억제 효과를 나타내지 않았다 (Fig. 1C). 이들의 결과로 파골세포 분화에 천남성 추출물의 억제 효과는 세포 독성 및 비특이적인 영향이 아님을 알 수 있다.

2. 파골세포 분화에 관련된 중요 전사인자 및 파골세포 지표 발현에 천남성의 효과

RANKL은 파골세포의 분화에 필수적인 전사인자 및 파골세포 지표 유전자 발현을 촉진 한다[8]. 위의 결과는 천남성이 RANKL에 의한 파골세포 분화를 억제하였기 때문에 천남성의 억제 효과가 RANKL에 의한 유전자 발현에 관련되어있는지 확인하였다. 실험은 대식세포에 RANKL을 투여하고 천남성을 투여하지 않은 대조군과 천남성을 투여한 실험군을 비교하였다. RANKL은 파골세포 분화에 필수적인 전사인자 c-Fos와 NFATc1의 발현을 촉진하였다. 그러나 천남성을 투여한 실험군에서는 RANKL이 c-Fos와 NFATc1을 대조군과 같이 촉진하지 못하였다 (Fig. 2A). 다음으로 파골세포의 지표인 TRAP과 cathepsin K의 발현에 천남성의 효과를 검증하였는데, TRAP과 cathepsin K 역시 천남성에 의해 억제되었다(Fig. 2A). RANKL에 의해 유도되는 c-Fos는 Jun 계열의 단백질과 결합하여 AP-1 전사인자를 이루고 NFATc1 발현에 중요하게 작용한다[18]. 따라서 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현에 천남성의 효과를 확인하였다. c-Fos와 NFATc1을 단백질 발현을 확인하기 위해 Western blot 방법을 수행한 결과 천남성을 투여한 실험군에서 RANKL에 의해 증가되는 c-Fos와 NFATc1 단백질이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2B). 이 결과로 천남성이 RANKL에 의해 유도되는 c-Fos, NFATc1, TRAP등의 발현을 억제하여 파골세포의 분화가 억제된다고 사료된다.

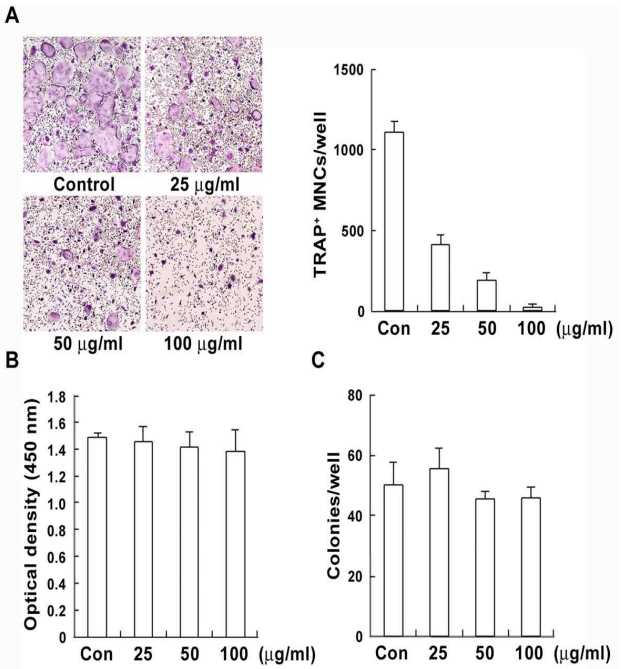

Fig. 1. Effect of RA on osteoclast differentiation. (A) Bone marrow-derived macrophages (BMMs) were cultured with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) for 4 days in the presence or absence of RA. Cultured cells were fixed and stained for TRAP (left). TRAP-positive multinuclear cells (TRAP+ MNCs) were counted (right). (B) BMMs were cultured with M-CSF (30 ng/ml) for 4 days in the presence or absence of RA. Then XTT reagents were added to each well and the absorbance was measured at 450 nm. (C) RAW264.7 cells were cultured for 3 days with or without RA. After 3 days, cultured cells were fixed and stained with hematoxylin. Colonies containing 50 or greater cells were counted.

3. RANKL 신호전달 경로에 천남성 효과

RANKL의 기능을 억제하는 천남성의 작용기전을 규명하기 위해, RANKL의 신호전달 경로에 천남성의 효과를 검증하였다. 대식세포는 천남성을 투여한 실험군과 투여하지 않은 대조군으로 나뉘고 RANKL를 동일하게 처리하였다. Western blot 실험 결과 천남성은 p-38, ERK, JNK의 활성을 촉진하였지만, NF-κB의 활성은 억제하였다(Fig. 3). 위 결과로 천남성의 파골세포 억제 효과는 NF-κB 활성의 억제와 관련되어 있으리라 사료된다.

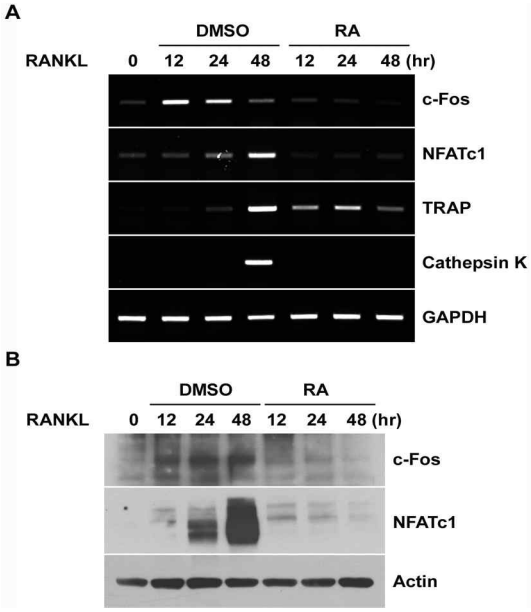

Fig. 2. Effect of RA on RANKL-mediated c-Fos, NFATc1, and osteoclast-related gene expression. (A) BMMs were treated with or without RA (100 μg/ml) for 1 h and then treated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. Total RNA was harvested from cultured cells using TRIzol, and mRNA expression for c-Fos, NFATc1, TRAP, cathepsin K, and GAPDH was analyzed by RT-PCR. (B) BMMs were treated as described above. Cell lysates were harvested from cultured cells using lysis buffer, and analyzed by Western blotting with anti-c-Fos, anti-NFATc1, and anti-actin antibodies.

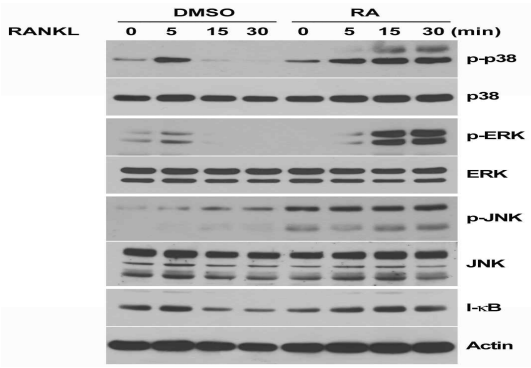

Fig. 3. Effect of RA on the phosphorylation of MAPKs and I-κB degradation. (A) BMMs were treated with or without RA (100 μg/ml) for 1 h and then treated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. Cell lysates were harvested from cultured cells using lysis buffer, and analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

4. 파골세포 뼈 흡수에 천남성의 효과

위 실험을 통해 천남성은 대식세포에서 파골세포로의 분화를 억제하여 천남성이 파골세포의 과도한 형성에 의한 골다공증 예방 효과의 가능성을 보였다. 따라서 본연구진은 이미 형성되어 뼈를 흡수하는 파골세포의 기능에 천남성의 효과를 확인하였다. 파골세포는 뼈의 주요 물질 중에 하나인 hydroxyapatite로 코팅된 plate에 첨가하고 천남성을 처리하였다. 대조군의 파골세포는 hydroxyapatite를 흡수하였지만, 천남성을 처리한 파골세포는 중대하게 억제되었다(Fig. 4). 이 결과로 천남성은 파골세포의 분화뿐만 아니라 파골세포의 기능도 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

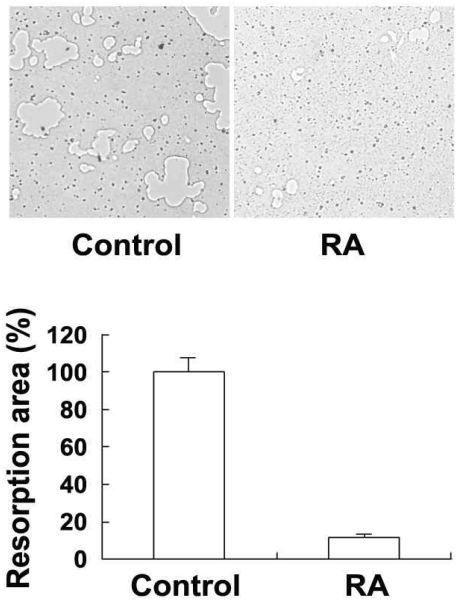

Fig. 4. Effect of RA on bone resorption. Mature osteoclasts were plated on hydroxyapatite plates and further treated for 24 h with RA. Cultured cells were removed from the plates and photographed under a light microscope (top). Pit area was quantified using Image Pro-plus program, version 4.0.

고 찰

골다공증의 가장 큰 원인은 뼈를 흡수하는 파골세포의 과도한 형성 및 활성으로 파골세포를 억제할 수 있는 신물질 개발은 최근 골다공증 환자의 급격한 증가로 인해 더욱 사회적으로 중요하게 인식되고 있다. 본 연구의 목적은 기존 치료제의 부작용을 배제할 수 있는 새로운 물질 도출에 있다.

본 연구에서, 연구진은 파골세포의 형성을 억제할 수 있는 천연물질을 찾고자 여러 천연물질을 이용해 스크리닝을 수행하여 천남성이 파골세포의 분화를 억제한다는 것을 검증하였다(Fig. 1). 그러나 천남성은 독성이 포함되어있어 세포 독성에 의한 파골세포 형성을 억제하는지 중요하였다. XTT 분석법을 통한 천남성 세포 독성 검사에서, 천남성은 독성을 나타내지 않았으며 RAW264.7 세포의 군체 형성에서도 영향이 없었다(Fig. 1). 이들의 결과로 천남성이 RANKL에 의한 파골세포의 분화를 억제한다고 할 수 있다. 그러나 본 연구로 천남성의 어떤 유효성분이 파골세포 억제 효과를 나타내는지 알 수 없어 천남성의 성분을 분석하여 파골세포의 분화에 억제 효과를 나타내는 성분을 분석해야 할 것이라 사료된다.

RANKL는 파골세포의 분화에 중요한 싸이토카인으로 여러 신호전달 단백질의 활성을 유도하여 파골세포 분화에 필수적인 단백질 발현을 유도한다[8]. 본 연구에서 천남성이 TRAP 양성 파골세포의 분화를 억제하였기 때문에 RANKL에 의한 TRAP 및 cathepsin K의 발현에 천남성의 효과를 검증하였다. 연구진의 예상대로 천남성은 TRAP과 cathepsin K의 발현을 억제하였다(Fig. 2). TRAP과 cathepsin K의 발현은 RANKL에 의해 유도되는 다양한 전사인자에 의해 촉진된다. c-Fos는 RANKL의 자극에 의해 30분 안에 발현되는 전사인자로 NF-κB와 MITF등과 함께 파골

세포의 분화에 중요한 단백질 발현을 촉진한다[19]. 최근에 NFATc1이 RANKL에 의해 증가되며 TNF receptor-associated factor (TRAF)6와 c-Fos에 의존적으로 발현된다고 보고되었고, NFATc1이 과발현된 대식세포는 RANKL이 없어도 파골세포로 분화된다[13,20]. 또한 NFATc1은 TRAP과 cathepsin K뿐만 아니라 OSCAR와 d2 isoform of vacuolar (H) ATPase v0 domain (Atp6v0d2)와 같은 파골세포에 특이적인 유전자 발현을 촉진한다[12,21,22]. 위의 결과에서 천남성에 의해 TRAP과 cathepsin K가 억제된 것은 RANKL에 의한 c-Fos와 NFATc1 발현을 천남성이 억제하는 것과 관련 있을 것이라 생각할 수 있었다. 결과적으로 연구진은 RANKL에 의한 c-Fos와 NFATc1 발현에 천남성의 억제효과를 확인하였다(Fig. 2 and 3).

천남성의 작용기전 연구를 위해 RANKL에 의해 유도되는 MAPKs 활성에 천남성의 효과를 검증하였는데, 예상 밖으로 천남성이 p38, ERK, JNK의 활성을 과도하게 촉진하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 파골세포의 분화에 p38과 JNK의 활성은 필수적으로 요구되지만 이들의 과도한 활성은 열충격, 자외선, 삼투압 등에 의해 증가된다고 보고되었다[23-25]. 특히 JNK와 p38의 활성은 세포사멸 신호에 의해 활성 된다고 보고되었다[26]. 이들의 결과로 천남성이 세포에 세포사멸과 같이 세포에 스트레스를 촉진하여 나타나는 결과로 사료된다.

파골세포의 기능인 뼈 흡수를 억제하는 약품의 개발은 골다공증 및 뼈 질환 환자를 위한 치료제 개발에 중요한 단서를 제공할 수 있다. 따라서 본 연구진은 파골세포의 뼈 흡수에 천남성의 효과를 검증하였다. Hydroxyapatite는 뼈 성분의 중요한 물질로 hydroxyapatite가 코팅된 plate에서 배양한 파골세포는 hydroxyapatite를 흡수 하였지만 천남성은 파골세포의 hydroxyapatite 흡수를 의미 있게 억제하였다(Fig. 6).

본 연구 결과로 저자는 천남성이 파골세포 형성 억제뿐만 아니라 뼈를 흡수할 수 있는 파골세포를 억제하여 뼈 질환에 중요한 약품 계발에 중요한 단서를 제공할 것이라 사료된다.

결 론

천남성은 농도 의존적으로 파골세포의 분화를 억제하였다. 파골세포 분화에 천남성의 효과는 RANKL에 의한 c-Fos와 NFATc1 발현의 억제를 통해 TRAP 및 cathepsin K 발현을 억제하는 것이라 사료된다. 또한 천남성은 파골세포의 중요 기능인 뼈 흡수의 기능을 억제하였다.

이들의 결과로 천남성은 파골세포의 형성을 억제하여 골다공증의 예방에 도움이 되는 물질이 될 수 있으며, 과도한 파골세포의 활성에 의한 골다공증의 치료제 개발에도 중요한 단서를 제공 할 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Becker, D.J., Kilgore, M.L., Morrisey, M.A. The societal burden of osteoporosis. Curr. Rheumatol. Rep. 12: 186-191, 2010.
2. Rodan, G.A., Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. Science 289: 1508-1514, 2000.
3. Melton, J.J. 3rd. Who has osteoporosis? A conflict between clinical and public health perspectives. J. Bone Miner. Res. 15: 2309-2314, 2000
4. Ballabriga, A. Morphological and physiological changes during growth: an update. Eur. J. Clin. Nutr. 54 Suppl 1: S1-6, 2000.
5. Seeman, E. Is a change in bone mineral density a sensitive and specific surrogate of anti-fracture efficacy?. Bone. 41: 308-317, 2007.
6. Clowes, J.A., Eghbali-Fatourechi, G.Z., McCready, L., Oursler, M.J., Khosla, S., Riggs, B.L.Estrogen action on bone marrow osteoclast lineage cells of postmenopausal women in vivo. Osteoporos. Int. 20: 761-769, 2009.
7. Mundy, G.R. Osteoporosis and inflammation. Nutr. Rev. 65: S147-151, 2007.
8. Boyle, W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation. Nature, 423: 337-342, 2003.
9. 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.
10. Asagiri, M, Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. Bone 40: 251-264, 2007.
11. Takayanagi, H. The role of NFAT in osteoclast formation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1116: 227-237, 2007.
12. Kim, K., Kim, J.H., Lee, J., Jin, H.M., Lee, S.H., Fisher, D.E., Kook, H., Kim, K.K., Choi, Y., Kim, N. Nuclear factor of activated T cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine-mediated osteoclastogenesis. J. Biol. Chem. 280: 35209-35216, 2005.
13. 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.
14. Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D.W., Ebeling, P.R. Felsenberg, D., Gagel, R.F., Gilsanz, V., Guise, T., Koka, S., McCauley, L.K., McGowan, J., McKee, M.D., Mohla, S., Pendrys, D.G., Raisz, L.G., Ruggiero, S.L., Shafer, D.M., Shum, L., Silverman, S.L., Van Poznak, C.H.,

Watts, N., Woo, S.B., Shane, E. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. J. Bone Miner. Res. 22: 1479-1491, 2007.

15. Qin, M.Z. Comparative studies of the histology of rhizoma Arisaematis and Pinelliae. Zhong. Yao. Tong. Bao. 13: 6-8, 1988.
16. Du, S.S., Lin, H.Y., Zhou, Y.X., Wei, L.X. Contents of total flavonoids in Rhizoma Arisaematis. Zhongguo. Zhong. Yao. Za. Zhi. 26: 411-412, 2001.
17. Kim, J.J., Kim, D.J., Lee, B.K., Kim, K.J., Lee, M.S., Lee, J.H., Kim, H.S., Lee, C.H., Byun, S.J., Jang, S.J., Song, J.H., Oh, J.M., Lee, J.S., Kim, K.M., Chun, C.H. Effects of Curcumin on osteoclasts. Korean J. Oriental Physiology & Pathology 22: 1566-1571, 2008.
18. Macián, F., García-Rodríguez, C., Rao, A. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. EMBO J. 19: 4783-4795, 2000.
19. Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. J. Mol. Med. 83: 170-179, 2005.
20. 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.
21. Kim, Y., Sato, K., Asagiri, M., Morita, I., Soma, K., Takayanagi, H. Contribution of nuclear factor of activated T cells c1 to the transcriptional control of immunoreceptor osteoclast-associated receptor but not triggering receptor expressed by myeloid cells-2 during osteoclastogenesis. J. Biol. Chem. 280: 32905-32913, 2005.
22. Kim, K., Lee, S.H., Kim H.J., Choi, Y., Kim, N. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). Mol. Endocrinol. 22: 176-185, 2008.
23. Murai, H., Hiragami, F., Kawamura, K., Motoda, H., Koike, Y., Inoue, S., Kumagishi, K., Ohtsuka, A., Kano, Y. Differential response of heat-shock-induced p38 MAPK and JNK activity in PC12 mutant and PC12 parental cells for differentiation and apoptosis. Acta. Med. Okayama. 64: 55-62, 2010.
24. Gupta, M., Gupta, S.K., Hoffman, B., Liebermann, D.A. Gadd45a and Gadd45b protect hematopoietic cells from UV-induced apoptosis via distinct signaling pathways, including p38 activation and JNK inhibition. J. Biol. Chem. 281: 17552-17558, 2006.
25. Watts, B.A. 3rd, Di., Mari. J.F., Davis, R.J., Good, D.W. Hypertonicity activates MAP kinases and inhibits HCO-3 absorption via distinct pathways in thick ascending limb. Am. J. Physiol. 275: F478-486, 1998.
26. Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P.B., Hagan, M.P., Grant, S. MAPK pathways in radiation responses. Oncogene 22: 5885-5896, 2003.