

과골세포 분화에 미치는 복분자 물 추출물의 효과

오재민 · 이명수¹ · 김정중 · 이정휴 · 채수욱² · 김하영³ · 전병훈⁴ · 박기인⁵ · 문서영⁶ · 조해중^{7,*}

원광대학교 의과대학 해부학교실, 1: 류마티스내과학교실 및 원광의과학 연구소, 2: 정형외과학교실,
3: 원광대학교 산본병원 내분비내과학교실, 4: 한의과대학 병리학교실, 5: 전북대학교 자연과학대학 생물학과,
6: 원광대학교 산본병원 마취통증의학과, 7: 산부인과학교실

Effect of Water Extract of Rubi Fructus in RANKL-induced Osteoclast Differentiation

Jae Min Oh, Myeung Su Lee¹, Jeong Joong Kim, Jeong Hugh Lee, Soo Uk Chae², Ha Young Kim³,
Byung Hoon Jeon⁴, Kie In Park⁵, Seo Young Moon⁶, Hae Joong Cho^{7,*}

Department of Anatomy, 1: Department of Internal Medicine, Division of Rheumatology and Institute of Wonkwang Medical Science, 2: Department of Orthopedic Surgery, 3: Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism, University of Wonkwang College of Medicine, Sanbon Medical Center, 4: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, 5: Division of Biological Science, School of Natural Science, Chonbuk National University, 6: Department of Anesthesiology and Pain Medicine, University of Wonkwang College of Medicine, Sanbon Medical Center, 7: Department of Obstetrics and Gynecology, University of Wonkwang College of Medicine

To prevent and treat the osteoporotic fracture, more attention should be paid in old age patients. Osteoclast which has ability to bone resorption is originated from hematopoietic cell line and plays a key role osteoporotic bone loss. Rubi Fructus has been widely used in Oriental medicine. Extracts of the leaves and fruit of Rubus species have been used in various countries as natural remedies to treat diabetes, infections, colic, and burns. However, the effect of extract of Rubi Fructus (fruit of Rubus coreanus Miq.) in osteoclast differentiation remains unknown. Thus, we evaluated the effect of Rubi Fructus on receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation. Here we found that Rubi Fructus significantly inhibited osteoclast differentiation induced by RANKL. Rubi Fructus suppressed the activation of p38 pathway and NF κ B in bone marrow macrophages (BMMs) treated with RANKL. Also, Rubi Fructus significantly inhibited the mRNA expression of c-Fos, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), osteoclast-associated receptor (OSCAR), nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 and cathepsin K in BMMs treated with RANKL. Particularly, Rubi Fructus greatly inhibited the protein expression of c-fos and NFATc1. especially in the case of NFATc1 expression, a master transcription factor of the differentiation of osteoclasts is very important step for osteoclastogenesis. Taken together, our results demonstrated that Rubi Fructus may be useful treatment option of bone-related disease such as osteoporosis and rheumatoid arthritis.

Key words : rubi fructus, osteoporosis, osteoclast, RANKL

서 론

골다공증에 의한 골절은 인구의 고령화가 진행 되면서 사회 문제화 되고 있다. 골다공증성 골절은 통증뿐만이 아니라 운동의 제한을 가져와 삶의 질을 현저히 저하시키므로 예방이 중요하며

* 교신저자 : 조해중, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

· E-mail : chojh69@wku.ac.kr, · Tel : 063-83-1544,

· 접수 : 2011/07/14 · 수정 : 2011/08/05 · 채택 : 2011/08/09

폐경이후 여성에서 골다공증이 있을 경우 골절을 경험하는 확률이 높다¹⁾. 특히 고관절의 골절은 골절이후 사망률이 증가하므로 고령의 환자에서는 미끄러지거나 넘어지지 않도록 주의하여야 한다²⁾.

최근 골다공증의 위험 인자 중 스테로이드의 사용이 화두가 되고 있는데 류마티스 관절염이나 만성 호흡기 질환, 알러지 질환으로 인하여 스테로이드를 장기 복용하는 환자에게서 골다공증의 위험이 증가하는 것으로 알려져 있다³⁾. 이러한 스테로이드

유도성 골다공증은 스테로이드의 종류와는 무관하게, 복용 용량과 복용 기간에 비례 하며 고령에서 더 흔하게 발생하는 것으로 알려져 있다. 최근 칼슘이 포함된 영양제를 복용하는 폐경 후 환자가 많으나 칼슘의 복용만으로는 저하된 골밀도의 증가를 기대하기는 어렵다⁴⁾. 그러므로 골다공증이 생겨 골절의 위험이 높은 환자들에게 골밀도를 올릴 수 있는 전문적인 약물 치료가 필요하며 이 중 가장 많이 임상에서 사용되고 있는 약제가 Bisphosphonate 계열의 약물이다.

10년 이상 사용되어 오고 있는 Bisphosphonate 계열의 약물은 파골세포와 골 연접부위에 작용하여 파골세포의 골 흡수 작용을 억제하는 작용과 파골세포의 세포 사멸을 유도하여 골 흡수를 억제하는 작용이 있다⁵⁾. Bisphosphonate 계열의 약물은 주로 골다공증을 가지는 고령의 환자에서 치과적인 문제를 야기하는 것으로 알려져 최근 주의가 요구되는데 하악골의 괴사가 가장 심각한 약물과 연관된 부작용이다⁶⁾. 최근 들어 부작용이 없고 효과적인 골다공증의 치료제의 개발 필요성이 증가하고 있다. 이러한 맥락에서 부작용이 없는 한약제 중에서 골다공증의 치료에 응용될 수 있는 후보 물질을 찾는 연구가 진행되고 있다.

기존에 국내에서 발표된 연구에서 두충 추출물이나⁷⁾ 녹용 추출물이나⁸⁾ 파골세포의 분화를 억제함으로써 골다공증의 치료에 응용될 수 있는 가능성이 있음이 보고되었다. 복분자는 주로 국내 전라북도에서 많이 재배되며 문헌에 의하면 남성의 성기능을 향상시키고 여성에서 불임치료를 도움이 되며 눈을 밝게 한다고 알려져 있다. 또한 최근 많은 연구들이 시행되면서 복분자의 여러 가지 실험적인 효과들에 대한 연구가 보고되고 있다. 복분자의 항산화 작용이 있음이 보고되었고⁹⁾ 비만 세포에서 히스타민의 분비를 억제함으로써 알러지 억제 효과가 있음이 보고되었다¹⁰⁾.

골 관련 연구에서 복분자 성분이 조골세포의 기능을 증가시키고 파골세포의 세포 사멸을 유도한다는 보고가 있어 복분자가 골다공증에 유익한 역할을 할 수 있는 가능성을 확인하였다¹¹⁾. 세포 사멸 유도 작용과는 별개로 파골세포 분화 억제 작용은 골다공증 연구에 매우 중요한데, 이러한 여러 가지 효과를 가지고 있는 복분자의 추출물을 골다공증의 치료에 응용할 수 있는지의 여부 및 관련 기전을 알기 위해 저자 등은 파골세포의 분화에 미치는 복분자의 영향을 실험하였다.

국내에서나 해외에서 복분자를 이용한 파골세포 분화에 관한 연구는 아직까지 보고된 바가 없으며 기존에 보고된 조골세포의 기능을 향상시키는 작용보다 파골세포 분화 억제 기능이 골다공증의 치료에 효과적일 수 있기 때문에 본 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

1. 시료

복분자를 물로 추출하여 감압 농축한 후 72시간 동안 동결 건조하여 얻었다. Human RANKL과 M-CSF는 Peprotech (London, UK)사에서 구입하였고, XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, 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. c-Fos와 NFATc1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다.

2. 파골세포 분화

5주령 ICR 생쥐를 경추 탈골법으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 분리하고 1 ml 주사기를 이용하여 뼈의 속질을 수세하여 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포는 10% FBS, 항생제, M-CSF (30 ng/ml)가 포함된 α-minimum essential medium (α-MEM)배지 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 세포를 대식세포 (bone marrow macrophage, BMM)로 사용하여 실험하였다. 대식세포는 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (50 ng/ml)을 처리하여 배양하면서 복분자 추출물을 대식세포에 농도별로 각각 0.5, 1, 10 micro-liter 처리하였다. 배양 4일 후, 배양한 세포를 TRAP 용액 (Sigma Aldrich, USA)으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포를 성숙된 파골세포로 간주하고 숫자를 세었다.

3. 독성검사

대식세포는 1X10⁴/well의 밀도로 96-well plate에 첨가하고 M-CSF (30 ng/ml)와 복분자 추출물을 농도별로 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 후, XTT 용액 50 μl를 각각의 well에 첨가하고 4시간 배양 후 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 확인하였다.

4. RT-PCR 분석

각각의 세포에서 TRIzol (Invitrogen) 용액으로 제조사의 방법에 따라 RNA를 분리한 후 분리한 RNA 1 μg은 oligo dT primer, dNTP, buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor와 Superscript II reverse transcriptase를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 다음과 같은 primer를 이용하여 PCR 증폭을 시행 하였다.

c-Fos sense, 5'- CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3';
 c-Fos antisense, 5'- CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3';
 NFATc1 sense, 5'- CAACGCCCTGACCACCGATAG-3';
 NFATc1 antisense, 5'- GGCTGCCTCCGTCTCATAGT-3';
 TRAP sense, 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3';
 TRAP antisense, 5'-TCAGCACATAGCCCCACCCG-3';
 OSCAR sense,
 5'-CTGCTGGTAACGGATCAGCTCCCCAGA-3';
 OSCAR antisense,
 5'-CCAAGGAGCCAGAACCTTCGAAACT-3';
 Cathepsin K sense, 5'-CACTGCTCTCTCAGGGCTT-3';
 Cathepsin K antisense,
 5'- ACGGAGGCATTGACTCTGAA-3';
 5'-GAPDH sense, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';
 GAPDH antisense, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

PCR 후, 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에서 분리하였고 Et-Br로 염색하여 U.V.상에서 관찰하였다.

5. Western blot 분석

배양된 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 이용하여 용해하고 원심분리 (14,000 rpm)를 수행하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 DC Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하고 동량의 단백질은 10% SDS-polyacrilamide gel에서 분리하였다.

분리된 단백질은 PVDF 막 (Amersham Biosciences)으로 옮기고 PVDF 막은 5% non-fat dry milk를 처리하여 비 특이 단백질이 붙는 것을 방지하기 하였다. 그리고 1차 항체 및 2차 항체를 처리했다. TBS-T 완충용액으로 PVDF막을 세척하여 enhanced chemiluminescence를 이용해 단백질 발현을 관찰했다.

6. 통계분석

정량적인 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 통계적인 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 p 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하여 별표(*)로 표시하였다.

결 과

1. 과골세포 분화에 미치는 복분자 추출물의 효과

과골세포는 골 흡수 작용을 하는 세포로서 과골세포 분화의 억제제는 골 흡수 억제를 나타낸다. 본 저자는 복분자 추출물이 과골세포의 분화에 미치는 영향을 알아보려고 실험을 시행하였다. 복분자의 효과를 검증하기 위해 대식세포에 M-CSF와 RANKL을 첨가하고 복분자 추출물을 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다. 복분자 추출물을 처리하지 않은 대조군은 TRAP 양성 다핵성 과골세포로 분화 되었지만 복분자 추출물을 처리한 실험군은 복분자 추출물 농도가 증가함에 따라 TRAP 양성 다핵성 과골세포로의 분화가 억제되었고(Fig. 1A), 성숙한 과골세포의 숫자도 의미있게 억제 되었다(Fig. 1B). 복분자 추출물에 의한 TRAP 양성 과골세포 분화의 억제가 세포독성과 관련 있는지 규명하기 위해 MTT 검사를 실시하였다. 다핵성 과골세포로의 분화를 억제하는 농도의 복분자 추출물은 세포의 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1C).

2. RANKL에 의한 유전자 발현에 복분자 추출물의 효과

RANKL은 RANK와 결합한 후 신호 전달 체계를 거쳐 전사 인자 c-Fos 와 NFATc1의 발현을 촉진하고 성숙한 과골세포의 지표인 TRAP과 OSCAR, Cathepsin K의 유전자 발현을 유도한다¹²⁾. 본 저자는 RANKL에 의해 유도되는 여러 가지 유전자 발현에 복분자 추출물이 미치는 효과를 실험하였다. RANKL로 과골세포 분화를 자극한 과골세포에서 c-Fos, NFATc1등의 주요 전사 인자의 발현이 증가하였고, 또한 TRAP, OSCAR, Cathepsin

K의 발현도 증가하였으나, RANKL과 복분자 추출물을 동시에 처리한 실험군에서는 과골세포 분화에 중요한 주요 유전자 등의 발현이 억제 되었다(Fig. 2).

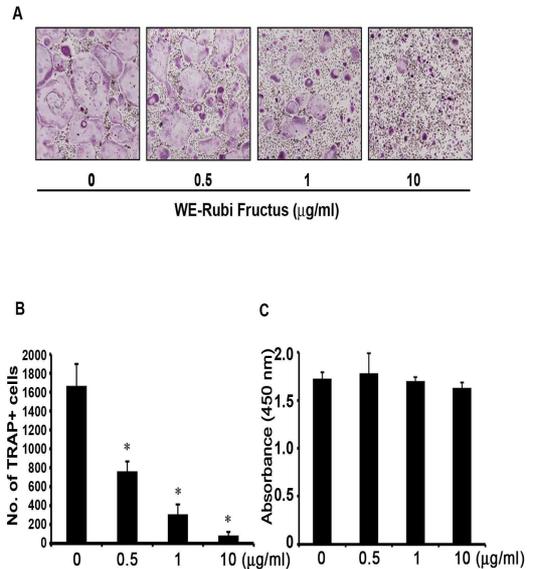


Fig. 1. Inhibition of RANKL-induced osteoclast differentiation by water extract (WE)-Rubi Fructus. (A) Bone marrow macrophages (BMMs) were cultured for 4 d with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) in the presence of WE-Rubi Fructus. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. TRAP-positive cells were photographed under a light microscope (Magnification: x100) (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. Asterisks (*) indicate statistical differences from the control (p < 0.05). (C) BMMs were cultured for 3 days with M-CSF (30 ng/ml) in the presence of WE-Rubi Fructus. After 3 d, 50 µl of XTT reagents were added to each well, and the cells were incubated for 4 h. The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader.

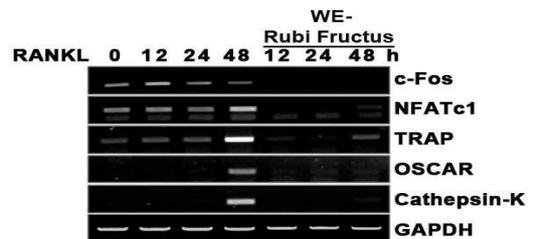


Fig. 2. WE-Rubi Fructus inhibits RANKL-induced NFATc1 expression. BMMs were pretreated with WE- Rubi Fructus for 1 h and then stimulated with RANKL for the indicated times. Total RNA was obtained at the indicated time points. The mRNA expression levels of the indicated genes were analyzed by RT-PCR.

3. c-Fos와 NFATc1 단백질 발현에 미치는 복분자 추출물의 효과

RANKL에 의해 발현되는 c-Fos는 NFATc1의 발현을 유도한다. 따라서 본 저자는 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현에 복분자 추출물의 효과를 검증하기 위하여 western blotting을 시행하였다. RANKL을 처리한 후 12시간과 24시간에서 c-Fos의 단백질 발현이 유의하게 증가되었으며, NFATc1의 발현은 48시간에 증가되었다. 그러나 복분자 추출물을 처리한 실험군에서는 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현이 현저히 억제 되었다(Fig. 3).

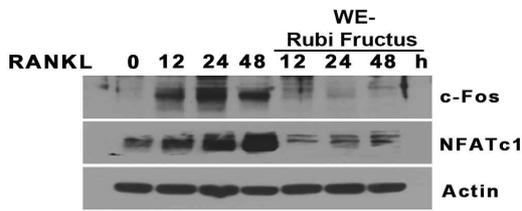


Fig. 3. Inhibition of RANKL-induced c-Fos and NFATc1 expression by WE-Rubi Fructus. BMMs were pretreated with or without WE- Rubi Fructus (10µg/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies for c-Fos, NFATc1, and actin.

4. 파골세포 분화의 신호전달 경로에 미치는 복분자 추출물의 효과

저자는 복분자 추출물에 의한 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위해 RANKL에 의해 전달되는 주요 신호전달체계에 복분자 추출물이 미치는 영향을 실험하였다. 대식세포를 복분자 추출물로 전 처리 하고 RANKL을 시간별로 처리한 다음 MAPKs의 인산화를 측정하였다. RANKL에 의해 자극된 파골세포에서 p38, JNK, ERK의 증가가 관찰되었으나 복분자 추출물군에서 p38의 발현이 감소하였고 I-κB의 발현이 지속되었다. (Fig. 4). 이러한 결과로 복분자 추출물에 의한 파골세포 억제 작용기전은 p38 활성의 억제와 I-κB의 지속 발현에 의한 것으로 생각된다.

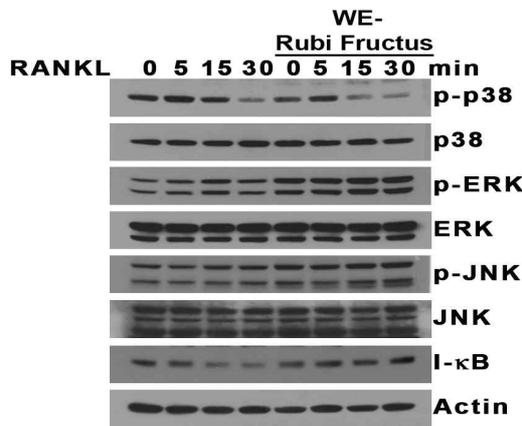


Fig. 4. Effect of WE-Rubi Fructus inhibits the activation of p38 pathway and NF-κB. BMMs were pretreated with or without WE- Rubi Fructus (10µg/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

고찰

골다공증은 고령의 인구에서 골절의 위험을 증가시켜 삶의 질을 저하시키므로 예방과 치료가 중요한데 골다공증 자체로는 통증이 없어 국내에서는 아직 적극적인 치료의 대상으로 인식되지 않고 있지만 점차 치료 및 예방에 대한 중요성이 인식되고 있다. 특히 폐경과 무관하게 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환이 있을 때 골다공증의 위험이 증가하고 만성 질환의 치료에 사

용되고 있는 스테로이드성 약물도 골다공증을 야기하는 원인이 된다¹³⁾.

스테로이드 유도성 골다공증이나 남성 골다공증에 가장 많이 추천되는 약물이 Bisphosphonate 계열의 약물이며 적극적인 사용이 요구되고 있다. 그러나 하악골 피사나 식도염과 같은 부작용과 더불어 장기 사용시 오히려 골절을 야기한다는 보고가¹⁴⁾ 있어 향후 이러한 약물을 대체 할 수 있는 부작용이 없는 약물의 개발이 필요한 시점이다.

복분자는 국내에서 흔하게 접하는 물질로서 주로 술로 빚어 저서 약제의 개념으로 사용되어 왔다. 예전부터 복분자는 당을 낮춰주고 복통을 호전시키고 감염 치료에도 효능이 있다고 알려져 있다¹⁵⁾. 또한 항산화 작용과⁹⁾ 항염 작용도 보고되었다¹⁶⁾. 기존에 복분자 성분을 이용한 골에 대한 효과 연구에서 골 생성을 담당하는 조골세포의 기능을 항진 시키고 파골세포의 세포 사멸을 증가시킨다는 보고가 있어 복분자가 골 보호 효과를 가지고 있음을 유추할 수 있었고¹¹⁾ 본 연구를 통하여 파골세포 분화에 억제 효과가 있음을 처음으로 확인하게 되었다.

파골세포는 조혈모세포에서 기원하여 단핵구/대식세포의 과정을 거쳐 세포 끼리 융합을 통해 성숙한 파골세포로 분화되어 골 흡수 기능을 수행하는데, 본 연구 결과에서 복분자가 파골세포 분화 억제 작용을 통해 골 흡수를 억제하여 골다공증의 예방 및 치료에 응용될 수 있는 물질로서의 가능성을 보여주었다. 특히 파골세포 분화에는 receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)에 의한 세포 자극이 필수적으로 알려져 있다. RANKL의 골 흡수에서의 중요성 때문에 RANKL에 대한 인간 단일 클론성 항체인 Denosumab이 사람에게서 골다공증의 치료 효과가 있어 임상적인 사용을 바라보고 있다¹⁷⁾. 하지만 부작용에 대한 결과가 축적되지 않았고 사용시 비용이 문제점으로 남아있다. 복분자 추출물이 RANKL 자극에 의한 파골세포 분화의 신호 전달에 c-fos, nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1의 전사인자의 발현이 억제 하였는데 이는 복분자가 파골세포 분화의 핵심 기전을 억제하는 작용이 있음을 의미한다. 또한 이러한 c-fos, NFATc1 등 전사인자의 발현 이전에 신호 전달 체계인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성을 실험하여 복분자 추출물이 p38의 발현이 감소시키고, I-κB의 발현이 지속 시킴을 확인하였다. 복분자 추출물에 의한 파골세포 억제 작용기전은 신호전달 체계 중에서 p38 활성의 억제와 I-κB의 지속 발현에 의한 것으로 생각된다. I-κB의 지속 발현은 NF-κB의 작용 억제를 의미하는데 이미 여러 가지 연구에서 NF-κB 발현이나 활성을 억제하면 파골세포로의 분화가 억제 된다는 것이 보고되어 있다¹⁸⁾. 이전에 보고되었던 목향 추출물은 p38 경로는 억제하지 않고 NF-κB 만을 억제 하여 파골세포 분화를 억제하였는데¹⁹⁾ 복분자는 p38 경로의 억제와 더불어 NF-κB 활성도 억제하는 파골세포 분화 억제 기전을 통하여 cathepsin K, TRAP과 OSCAR 등의 발현도 감소시켰다. 특히 cathepsin K는 성숙한 파골세포에서 분비되는 효소로서 골 기질의 흡수 작용을 하는데 최근 cathepsin K 를 억제하는 odanacatib의 효과가 연구되고 있다²⁰⁾. 종합적으로 본 실험을 통해 복분자가 골 흡수 역할을 담당

하는 파골세포의 분화를 억제하는데 p38 경로와 I- κ B의 지속 발현을 통하여 파골세포 분화에 핵심적인 NFATc1의 발현을 억제하고 골 흡수 기능을 억제함을 알 수 있었다. 본 실험과 더불어서 향후 파골세포의 분화뿐 아니라 파골세포의 생존과 전구 세포의 융합에 미치는 복분자의 역할을 명확히 규명하기 위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

천연물인 복분자 추출물은 세포의 독성 없이 파골세포의 분화를 억제시켰다. 이는 파골세포 분화의 주요 경로를 억제하여 나타나는 것으로 부작용 없는 골다공증 치료제가 필요한 상황에서 복분자가 좋은 후보 물질이 될 수 있는 가능성을 제시하였다. 특히 복분자는 국내에서 흔하게 접하는 후보 물질로서 유용성을 더욱 입증하여 산업화 하는 데에도 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Melton, L.J.3rd, Atkinson, E.J., O'Connor, M.K., et al. Bone density and fracture risk in men. *J Bone Miner Res* 13: 1915, 1998.
- Kanis, J.A., Oden, A., Johnell, O., De Laet, C., Jonsson, B., Oglesby, A.K. The components of excess mortality after hip fracture. *Bone* 32: 468, 2003.
- Silverman, S.L., Lane, N.E. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 7(1):23-26, 2009.
- Lata, P.F., Elliott, M.E. Patient assessment in the diagnosis, prevention, and treatment of osteoporosis. *Nutr Clin Pract* 22(3):261-275, 2007.
- Nishikawa, M., Akatsu, T., Katayama, Y., Yasutomo, Y., Kado, S., Kugal, N., Yamamoto, M., Nagata, N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 18: 9-14, 1996.
- Abrahamsen, B. Bisphosphonate adverse effects, lessons from large databases. *Curr Opin Rheumatol* 22(4):404-409, 2010.
- 정연태, 최윤홍, 송정훈, 이창훈, 오재민. 두충의 물 추출물이 파골세포의 분화에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 23(3):613-618, 2009.
- Kwak, H.B., Kim, J.H., Kim, D.J., Kwon, Y.M., Oh, J., Kim, Y.K. Effect of water extract of deer antler in osteoclast differentiation. *Korean J Oriental Physiology & pathology*. 22: 891-895, 2008.
- Ju, H.K., Cho, E.J., Jang, M.H., Lee, Y.Y., Hong, S.S., Park, J.H., Kwon, S.W. Characterization of increased phenolic compounds from fermented Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) and related antioxidant activity. *J Pharm Biomed Anal*. 49(3):820-827, 2009.
- Shin, T.Y., Kim, S.H., Lee, E.S., Eom, D.O., Kim, H.M. Action of *Rubus coreanus* extract on systemic and local anaphylaxis. *Phytother Res*. 16(6):508-513, 2002.
- Do, S.H., Lee, J.W., Jeong, W.I., Chung, J.Y., Park, S.J., Hong, I.H., Jeon, S.K., Lee, I.S., Jeong, K.S. Bone-protecting effect of *Rubus coreanus* by dual regulation of osteoblasts and osteoclasts. *Menopause*. 15(1):676-683, 2008.
- Galibert, L., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D., Dougall, W.C. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF- κ B, a member of the TNFR superfamily. *J. Biol. Chem*. 273: 34120-34127, 1998.
- Korczywska, I., Olewicz-Gawlik, A. Does low-dose and short-term glucocorticoids treatment increase the risk of osteoporosis in rheumatoid arthritis female patients *Clin Rheumatol*. 27(5):565-572, 2008 .
- Abrahamsen, B. Adverse effects of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int*. 86(6):421-435, 2010.
- Wang, B., Shin, X., Li, Y., Jia, Z. Pentacyclic triterpenoid glycosyl esters from *Rubus pileatus*. *Phytochemistry* 46: 559-563, 1997.
- Park, J.H., Oh, S.M., Lim, S.S., et al. Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus coreanus* in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 351: 146-152, 2006.
- Saylor, P.J. Targeted therapies: Denosumab-a new option for solid tumors metastatic to bone. *Nat Rev Clin Oncol*. 8(6):322-334, 2011.
- Shimizu, H., Nakagami, H., Tsukamoto, I., Morita, S., Kunugiza, Y., Tomita, T., Yoshikawa, H., Kaneda, Y., Ogihara, T., Morishita, R. NF κ B decoy oligodeoxynucleotides ameliorates osteoporosis through inhibition of activation and differentiation of osteoclasts. *Gene Ther*. 13(12):933-941, 2006.
- 이명수, 김정중, 오재민, 최민규, 송미진, 안용환, 이정휴, 전병훈, 박기인, 장성조. 파골세포 분화에 목향 물 추출물의 효과. *동의생리병리학회지* 25(3):516-520, 2011.
- Erratum in. Potential new drug targets for osteoporosis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 5(3):174, 2009.