

## The Molecular Mechanism of Baicalin on RANKL-induced Osteoclastogenesis in RAW264.7 Cells

Seon-Yle Ko

Department of Oral biochemistry and Institute of Dental Science, Dankook University, Korea

(received April 3, 2013; revised April 22, 2013; accepted April 25, 2013)

This study examined the anti-osteoclastogenic effects of baicalin on receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced RAW264.7 cells. Baicalin is a flavonoid that is produced by *Scutellaria baicalensis* and is known to have multiple biological properties, including antibacterial, anti-inflammatory and analgesic effects. The effects of baicalin on osteoclasts were examined by measuring 1) cell viability; 2) the formation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) (+) multinucleated cells; 3) RANK/RANKL signaling pathways and 4) mRNA levels of osteoclast-associated genes. Baicalin inhibited the formation of RANKL-stimulated TRAP (+) multinucleated cells and also suppressed the RANKL-stimulated activation of p-38, ERK, cSrc and AKT signaling. Baicalin also inhibited the RANKL-stimulated degradation of I $\kappa$ B in RAW264.7 cells. In addition, the RANKL-stimulated induction of NFATc1 transcription factors was found to be abrogated by this flavonoid. Baicalin was further found to decrease the mRNA expression of osteoclast-associated genes, including carbonic anhydrase II, TRAP and cathepsin K in the RAW264.7 cells. Our data thus demonstrate that baicalin inhibits osteoclastogenesis by inhibiting the RANKL-induced activation of signaling molecules and transcription factors in osteoclast precursors.

\*Correspondence to: Seon-Yle Ko, Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Dankook University, San 29-1, Anseo-dong, Cheonan, Choongnam, 330-716, Korea.  
Tel.: +82-41-550-1934, E-mail: seonyleko@dankook.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Key words:** Baicalin, Osteoclastogenesis, MAPK, NFATc1

### 서 론

성인에서 골개조 (bone remodeling)는 파골세포에 의해 오래된 뼈를 제거하고, 조골세포에 의해 새로운 뼈를 형성하는 과정으로 이러한 과정은 일생 동안 일어나며, 손상된 뼈를 제거함으로써 뼈의 강도와 완결성을 유지하는데 필요한 과정이다[1,2].

단핵구/대식세포계통의 세포에서 유래한 파골세포 전구 세포는 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)의 존재하에 파골세포로 분화된다. 이들 두 cytokine은 염증성 자극을 포함하는 여러 자극에 의해 조골세포가 활성화 되었을 때 세포막에 결합된 형태이거나 분비된 형태로 생성이 촉진된다[3,4]. 따라서 여러 자극에 의해 파골세포의 분화가 촉진되는 경우 뼈파괴와 뼈형성의 불균형의 결과로 골조직파괴가 일어난다.

골다공증은 골개조의 불균형으로 일어나는 가장 흔한 질환이며, 폐경 후 여성에서 가장 흔히 발견된다. 폐경 후 일어나는 골다공증의 주원인은 에스트로젠의 결핍으로[5], 골다공증을 완화하기 위해 에스트로젠 대체요법이 사용되기도 하지만 오랜 기간 사용하면 유방암과 심혈관질환 등의 부작용이 나타나기도 한다[6]. 민간요법으로 골다공증의 치료나 예방의 목적으로 다양한 식물과 약초가 사용되어 오고 있으며, 최근에 골개조에 영향을 미치는 물질을 여러 생리활성물질을 포함하는 천연물로부터 검사와 있다[7].

여러 종류의 flavonoid들이 골조직에 존재하는 세포의

분화 및 기능에 영향을 미치는 등의 골조직 대사에 관여함이 밝혀졌다[8-10]. Phytoestrogen 중 8-prenylflavonoids가 조골세포의 분화 및 활성을 촉진하며 파골세포의 생성을 억제한다는 보고[11]가 있으며, 또 다른 천연물인 *Panax Notoginseng* 추출액의 경우 LPS에 의해 유도된 파골세포의 생성을 억제한다는 보고가 있다[12].

이전 연구에서 flavonoid의 하나인 baicalin (7-glucuronic acid, 5,6-dihydroxy-flavone)이 파골세포의 생성을 억제함을 보고[13]하였으며, 본 연구에서는 다양한 지표를 확인하여 baicalin이 파골세포의 생성억제에 미치는 기전을 연구하였다. Baicalin은 꿀꿀과에 속하는 다년생초인 *Scutellaria baicalensis* 등에서 분리되며, 이 식물은 중국 북부지방이 원산지이며 한국에서도 자생하고 있고, 한약제로도 사용되고 있다. Baicalin은 다양한 생물학적 활성을 나타내는 물질로, 항염증, 진통, 항균작용을 나타낸다고 알려져 있다[14]. 또한 최근 baicalin이 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호를 통해 조골세포의 분화를 촉진함이 보고되었다[8].

본 연구에서는 baicalin이 골조직의 주요세포인 파골세포의 분화과정 동안 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 즉 RANKL을 처리하여 파골세포 분화에 중요한 전사인자인 NFATc1의 변화를 관찰하고, RANKL 신호의 하위단계인 주요한 세가지 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 변화를 관찰하였다. 또한 carbonic anhydrase II (CA II), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)와 cathepsin K와 같은 파골세포 내의 효소의 변화를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 연구재료

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM),  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA 및 배양에 필요한 시약들은 Hyclone laboratories (Logan, Utah, USA)로부터 구입하였다. 재조합 사람 RANKL은 PeproTech EC Ltd (Peprrotech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) 으로부터 구입하였으며, baicalin은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. p-38, JNK, ERK, I $\kappa$ B $\alpha$ , cSrc, phospho-cSrc과 actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, phospho-p38, phospho-JNK와 phospho-ERK에 대한 항체는 Cell Signaling (Danvers, MA, USA) 으로부터 구입하였다. NFATc1에 대한 항체는 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) 으로부터 구입하였다. Customized primer는 Bioneer (Daejeon, Korea)로부터 구입하였고, 그 외 시약은 Sigma Aldrich로부터 구입하였다.

### 세포 배양

흰쥐 단핵구/대식세포인 RAW264.7 세포 (ATCC, Manassas, VA, USA)를 10% FBS가 포함된 DMEM에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 환경하에 배양하였으며, 배양액은 3일마다 교환하였다.

### 세포 생존율 검사

천연물의 독성을 간접적으로 평가하고, RAW264.7 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 방법을 이용하였다. RAW264.7 세포를 96-well plate에 well당  $5 \times 10^3$ 개가 되도록 분주하고 10% FBS가 포함된 DMEM을 배양액으로 사용하여 24시간 배양한 후, 일정 농도로 연속적으로 희석한 baicalin을 첨가한 새 배양액으로 교환하였다. 시료 첨가 후 5일간 배양한 후 세포배양액에 MTT 용액을 0.5 mg/ml 첨가하였다. 3-4시간 추가 배양한 후 생성된 formazan crystals을 용해하여 염색된 정도를 흡광도계 (SLT 400 SFC, SLT Labinstruments, Austria)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

### 파골세포의 생성 측정

RAW264.7 세포를 파골세포로 분화시키기 위하여 96-well plate에서 well당  $10^4$ 개가 되도록 분주하고 10% FBS가 포함된  $\alpha$ -MEM을 배양액으로 사용하여 24시간 배양한 후, 100 ng/ml의 RANKL과 일정 농도로 연속적으로 희석한 baicalin을 첨가한 배양액으로 교환하고, 분화의 상태를 확인하면서 5내지 7일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 citrate-acetone-formaldehyde 용액으로 고정하고 TRAP 염색을 시행하여 파골세포의 생성정도를 평가하였다. TRAP 염색은 제조사 (TRAP 염색용 kit, Sigma Aldrich)의 지시에 따라 시행하였으며, 기질로 naphthol AS-BI phosphate를 이용하였고, 염색제로는 fast Garnet GBC 용액을 사용하였다. 염색이 끝난 후 광학현미경을 이용하여 핵이 3개 이상인 TRAP 양성 다핵세포를 계수하여 파골세포의 생성지표로 삼았다.

### TRAP 활성 측정

RAW264.7 세포를 96-well plate에서 well당  $10^4$ 개가 되도록 분주하고 10% FBS가 포함된  $\alpha$ -MEM을 배양액으로 사용하여 24시간 배양한 후, 100 ng/ml의 RANKL과 일정 농도로 연속적으로 희석한 baicalin을 첨가한 배양액으로 교환하고, 4일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.05% Triton X-100/saline로 처리하여 세포 추출액을 만들어 TRAP 효소의 활성을 측정하였다.

효소활성의 측정은 세포추출액을 기질인 100 mM *p*-nitrophenyl phosphate와 10 mM sodium tartrate가 포함된 50 mM citrate 완충액 (pH 4.7)에서 30분간 반응시킨 후 pNPP

에서 분해된 *p*-nitrophenol의 양을 흡광광도계 (SLT 400 SFC, SLT Labinstruments, Austria)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다. 단백질은 BCA 단백질 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) 정량법으로 측정하고, 효소활성을 nmole substrate cleaved/min/mg protein으로 측정하였으며 대조군에 대한 백분율로 나타냈다.

### RT-PCR 분석

NFATc1, CA II, TRAP, cathepsin K의 발현을 관찰하기 위해 RAW264.7 세포를 6-well plate에 well 당  $5 \times 10^5$  개가 되도록 분주하고 10% FBS가 포함된  $\alpha$ -MEM 을 배양액으로 사용하여 24시간 배양한 후, 100 ng/ml의 RANKL과 일정 농도로 연속적으로 희석한 baicalin을 24시간 처리하였다. 배양이 끝난 후 easy-spin™ Total RNA Extraction Kit (Intron Biotechnology, Sungnam, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 mRNA를 분리하였다. One-step RT-PCR premix kit (Intron Biotechnology, Sungnam, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 특정 primer를 이용하여 cDNA를 증폭하였다. PCR primer 순서는 다음과 같다. : NFATc1, 5'-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3'과 5'-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3', CA II, 5'-CTCTCAGGACAATGCAGTGCTGA-3'과 5'-ATCCAGGTCACACATTCAGCA-3'; TRAP, 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTACCG-3'과 5'-TCAGCACATAGCCACACCG-3'; Cathepsin K, 5'-CTGAAGATGCTTTCCCATATGTGGG-3'과 5'-GCAGGCGTTGTTCTTATTCGAGC-3'; GAPDH, 5'-ACTTTGTCAAGCTCATTCC-3'과 5'-TGCAGCGAAGCTTTATTGATG-3'. DNA 풀림 온도는 각각 56°C, 55°C, 57°C, 56°C 및 57°C 였다.

### Western blot 측정

RANKL에 의한 신호전달과정을 관찰하기 위해 RAW-264.7 세포를 6-well plate에 well 당  $5 \times 10^5$  개가 되도록 분주하고 10% FBS가 포함된  $\alpha$ -MEM을 배양액으로 사용하여 24시간 배양한 후, 6시간 동안 혈청이 없는 배지로 교환하여 배양하였다. 그 후 일정 농도로 연속적으로 희석한 baicalin을 2시간 처리하고 100 ng/ml의 RANKL을 15분 또는 24시간 처리하였다. 배양이 끝난 후 RIPA 완충액으로 용해하여 단백질 시료를 준비하고, 30  $\mu$ g의 시료를 SDS-PAGE로 분리한 후 PDVF 막에 옮긴 후 특정 항체를 이용하여 반응시키고 chemiluminescence system (Amersham Biosciences, England, UK)과 X-ray 필름(FUJI Photo Film Co., Ltd)의 노출을 통해 단백질 밴드를 관찰하였다.

### 통계처리방법

본 실험의 통계처리는 Student's *t* test 방법을 사용하

였으며, 값은 평균과 표준 오차로 나타냈다.

## 결 과

파골세포의 분화단계에 필수적인 신호물질인 RANKL을 처리하여 RAW264.7세포의 분화를 유도하면서 baicalin을 처리하여 전사인자인 NFATc1과 신호과정 중의 MAPK, cSrc 및 AKT의 변화를 관찰하였다. 또한 CA II, TRAP과 cathepsin K와 같은 파골세포 내의 효소의 변화를 관찰하였다.

파골세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 TRAP 염색을 시행하여 TRAP 양성 다핵세포의 생성을 확인한 결과 대조군에 비해 baicalin 1 및 10  $\mu$ g/ml의 농도를 처리한 경우 파골세포의 생성이 현저히 억제되었으며 (Fig 1A, C), 세포추출액을 만들어 TRAP 효소의 활성을 측정된 결과 TRAP 효소의 활성이 현저히 억제되었다 (Fig 1D).

파골세포 생성 및 TRAP 효소활성의 억제효과가 세포독성에 의한 것인지 확인하기 위하여 RAW264.7 세포를 배양하면서 0.4에서 50  $\mu$ g/ml의 농도까지 처리하였으나, 실험에 사용한 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다 (Fig 1B).

파골세포가 분화되는 동안 baicalin이 신호전달과정에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MAPK, cSrc, AKT 및 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 활성 등을 검사하였다. Baicalin을 처리 후 RANKL로 15분 활성화하고 세 종류의 MAPK 분자, 즉 p38, JNK와 ERK1/2 MAPK를 western blot 방법으로 확인하였다. RANKL에 의해 세 종류의 MAPK 모두 즉, p38, JNK와 ERK1/2의 인산화가 유도되었으며 (Fig. 2A), baicalin은 RANKL에 의해 활성화된 p38와 ERK1/2분자의 인산화를 억제한 반면 JNK의 인산화에는 영향을 미치지 않았다 (Fig. 2A).

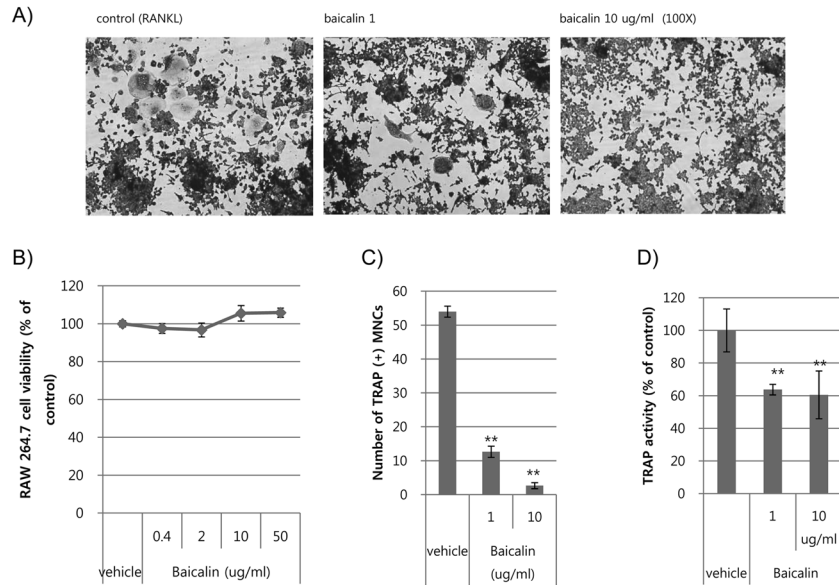
Baicalin은 인산화되지 않은 모든 MAPK 분자에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 2A).

RANKL에 의해 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 유도되었으며, baicalin은 RANKL에 의해 유도된 I $\kappa$ B $\alpha$  분해를 억제하였다 (Fig. 2B).

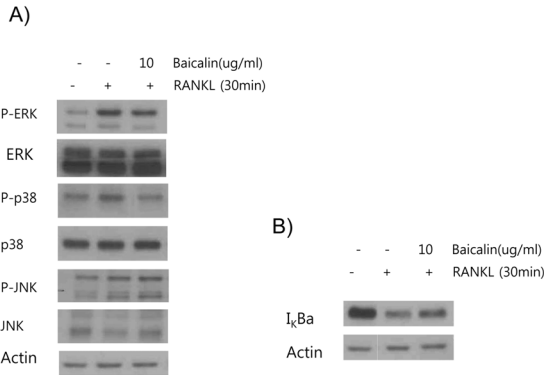
파골세포의 기능과 관련된 신호경로인 cSrc에 대한 영향을 알아보기 위하여 RANKL로 활성화 한 후 cSrc의 인산화가 유도됨을 확인하였으며, baicalin에 의해 cSrc의 인산화가 억제되었다(Fig. 3A).

파골세포의 분화 및 생존과 관련된 신호경로인 AKT에 대한 영향을 알아보기 위하여 RANKL로 활성화 한 후 AKT의 인산화가 유도됨을 확인하였으며, baicalin에 의해 AKT의 인산화가 억제되었다 (Fig. 3B).

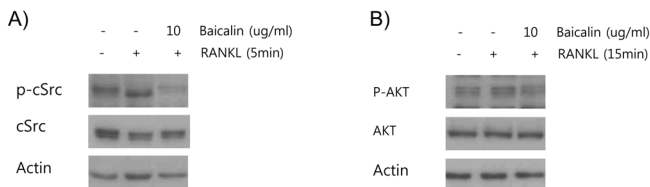
RANKL은 파골세포 분화단계의 주요 전사인자인



**Fig. 1.** Inhibition of osteoclast generation in RAW264.7 cells by baicalin. RAW264.7 cells were seeded in 96-well plates, cultured for 5 to 7 days in the presence of 100 ng/ml of RANKL and various concentrations of baicalin. A) After culture, the cells were fixed and stained for TRAP expression and photographed at 100x. B) The cell viability was assessed using an MTT assay. The cell viability was expressed as the absorbance ratio (absorbance of the treated cells/absorbance of control cells x 100). C) The TRAP(+) multinucleated cells that contained three or more nuclei were counted. The values are expressed as the mean  $\pm$  S.E. (n=3). \*\*p < 0.01. D) The TRAP activity was assessed. After culture, the enzyme activity was measured by spectrophotometry using *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate in tartrate buffer. The total protein content was determined using BCA protein assay reagent.



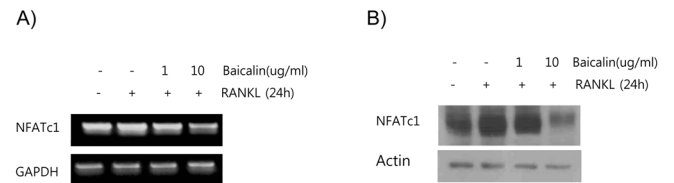
**Fig. 2.** (A) Effect of baicalin on the activation of MAPKs by RANKL. (B) Effect of baicalin on the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  by RANKL. RAW264.7 cells were serum-starved for 30 min, pretreated with baicalin for 2h and then stimulated with 100 ng/ml RANKL for 15 min.



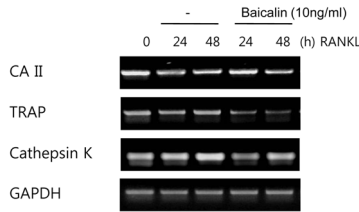
**Fig. 3.** Effect of baicalin on the activation of cSrc and AKT by RANKL. RAW264.7 cells were serum-starved for 30 min, pretreated with baicalin for 2h and then stimulated with 100 ng/ml RANKL for 5 or 15 min.

NFATc1의 분화를 유도하므로, baicalin이 RANKL에 의해 유도된 NFATc1에 미치는 영향을 RT-PCR과 western blot 방법으로 관찰하였다. 그 결과 RAW264.7 세포는 RANKL에 의해 NFATc1의 mRNA발현 및 단백질의 합성을 증가시키며, baicalin은 RANKL에 의한 증가를 억제하였다 (Figure 4A, B).

과골세포가 기능을 할 때 발현되는 효소인 CA II, TRAP과 cathepsin K의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 관찰한 결과 RANKL 처리 후 시간이 흐름에 따라 세 종류의 효소의 발현이 증가되었으며, baicalin을 처리한 경우 억제되었다 (Fig. 5).



**Fig. 4.** Effect of baicalin on the expression of NFATc1 by RANKL. RAW264.7 cells were cultured with 100 ng/ml RANKL for 24 hours. A) The mRNA expression levels of the NFATc1 genes were determined by RT-PCR. B) Protein levels of the NFATc1 were determined by Western blot.



**Fig. 5.** Suppression of RANKL-induced gene expression by baicalin. RAW264.7 cells were cultured with 100 ng/ml RANKL for 24 hr. The levels of mRNA expression were determined using RT-PCR. CA II : carbonic anhydrase II

## 고찰

Flavonoid는 여러 식물에서 발견되는 물질로, 현재 4000여종 이상의 flavonoid들이 확인되었으며[15] 항산화, 항균 및 항염 작용과 같은 다양한 생물학적 활성을 나타낸다고 알려져 있다[15-17]. 예를 들어 과일이나 채소에서 발견되는 Kaempferol은 암세포의 세포사멸을 유도함으로써 암세포의 성장을 억제하고, 신생혈관형성을 억제한다고 알려져 있다[18]. 또한 녹차의 catechin 및 cranberry의 polyphenol과 같은 천연물질이 염증성 골과괴 질환인 치주질환에 효과가 있음이 보고된 바 있다[19,20].

염증성 cytokine과 prostaglandin등은 조골세포, 활액 섬유아세포나 활성화된 T 세포에서 RANKL의 발현을 촉진하며, 증가된 RANKL은 파골세포의 분화, 기능 및 생존을 촉진한다[21]. 따라서 염증성 골과괴 질환의 치료를 위해 파골세포의 분화 및 기능을 억제하는 물질을 찾는 것이 도움이 될 수 있다.

Flavonoid가 파골세포의 분화에 미치는 영향 및 기전을 확인하기 위하여 본 연구에서는 RANKL의 처리에 의해 파골세포로 분화되는 RAW264.7 세포를 사용했다. RAW-264.7 세포는 골수세포로부터 분리하여 분화시킨 세포보다 작고 얇은 흡수위를 생성하는 등 RAW264.7 세포와 골수세포로부터 분리하여 배양한 세포와는 세포특성이 차이가 있다. 그러나 RAW264.7 세포도 파골세포의 분화의 기전을 설명하기 위한 실험에 유용하게 사용되고 있다[22].

본 연구에서 baicalin이 파골세포의 생성을 억제하는 동안 분자수준에서의 변화를 확인하기 위하여 파골세포의 분화, 활성 및 생존과 연관된 신호전달과정에 있는 분자의 변화를 확인하였다.

그 결과 RANKL에 의해 활성화된 ERK1/2, p38, cSrc 및 AKT분자의 인산화를 억제하였다. MAPK 중 ERK와 p38은 파골세포의 분화에 관여하며, 그 중 ERK는 분화뿐만 아니라 파골세포의 생존에도 관여함이 알려져 있다[23,24]. 따라서 baicalin의 파골세포 생성 억제 기전은 ERK와 p38

신호과정을 억제함으로써 기인하는 것으로 보인다.

cSrc은  $\alpha\beta 3$  integrin에 의한 신호과정에 주요한 반응 단계에 있고 파골세포의 골흡수 기능에 관여하는 것으로 알려져 있으며[25,26], AKT는 파골세포의 분화와 생존을 촉진하는 신호물질로 알려져 있다[27]. 따라서 baicalin이 cSrc와 AKT의 신호전달 억제를 통해 파골세포의 기능 및 생존을 억제할 것으로 여겨진다.

NF $\kappa$ B 전사인자의 활성화는 파골세포의 분화과정에 필수요소로, NF $\kappa$ B 유전자 제거 흰쥐에서 골화석증의 특징이 보고된 바 있다[28]. NF $\kappa$ B의 활성을 위해서는 NF $\kappa$ B 이합체와 결합되어 있는 억제단백질인 I $\kappa$ B의 분해가 요구된다[29]. 본 연구에서는 baicalin이 RANKL에 의해 유도된 I $\kappa$ B $\alpha$  분해를 억제하였으므로 baicalin이 I $\kappa$ B $\alpha$  분해를 억제함으로써 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 NF $\kappa$ B와 결합한 상태로 존재하여 NF $\kappa$ B의 활성을 억제하는데 관여할 것으로 여겨진다.

파골세포의 분화단계에서 RANKL에 의해 활성화된 MAPK들은 핵으로 들어가 NFATc1과 같은 전사인자의 활성을 촉진하며[30,31], 파골세포의 분화를 유도한다. 본 실험에서 baicalin은 파골세포의 필수 전사인자인 NFATc1의 mRNA의 발현과 단백질의 합성을 억제하였다. 따라서 baicalin이 RANKL의 신호에 따른 파골세포의 분화과정 중 MAPK와 NF $\kappa$ B의 활성억제와 함께 NFATc1의 발현을 억제함으로써 파골세포의 분화를 억제하는데 관여하는 것으로 생각된다.

또한 분화하는 동안 파골세포에서는 CA II, TRAP과 cathepsin K 등과 같은 효소들의 발현이 증가된다. CA II에 의해 생성된 H<sup>+</sup>은 proton pump에 의해 흡수되어 배출되어 무기질의 용해에 관여하고[32], cathepsin K와 같은 분해효소는 교원섬유와 같은 유기기질의 분해에 사용된다[33]. 연구결과 baicalin은 RANKL에 의해 항진된 CA II, TRAP과 cathepsin K의 발현을 억제하였다. 따라서 baicalin이 파골세포의 분화를 억제하기도 하지만, 분화하는 동안 유도되는 유전자의 조절에도 관여하여 파골세포에 의한 골흡수의 억제에 관여할 것으로 여겨진다.

## 감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2010-0023679)

## 참고문헌

1. Parfitt AM. Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling: Implications for the understanding of osteopo-

- rosis. Marcus R, Feldman D, Kelsey J. Osteoporosis. San Diego, CA, Academic, 1996;315-339.
2. Parfitt AM. Targeted and non-targeted bone remodeling: Relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002;30:5-7.
  3. Findlay DM, Haynes DR. Mechanisms of bone loss in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2005;15:232-240.
  4. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*. 2005;11:76-81.
  5. Gass M, Dawson-Hughers B. Preventing osteoporosis-related fractures: an overview. *Am J Med*. 2006;119: S3-S11.
  6. Howell A, Evans GD. Hormone replacement therapy and breast cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2011;188:115-124.
  7. Wu YW, Chen SC, Lai WF, Chen YC, Tsai YH. Screening of flavonoids for effective osteoclastogenesis suppression. *Anal Biochem*. 2013;433:48-55.
  8. Guo AJ, Choi RC, Cheung AW, Chen VP, Xu SL, Dong TT, Chen JJ, Tsim KW. Baicalin, a flavone, induces the differentiation of cultured osteoblasts: an action via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Biol Chem*. 2011; 286:27882-27893.
  9. Kimura M, Arai Y, Shimoi K, Watanabe S. Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J Epidemiol* 1998;8:168-175.
  10. Weaver CM, Alekel DL, Ward WE, Ronis MJ. Flavonoid intake and bone health. *J Nutr Gerontol Geriatr*. 2012;31: 239-253.
  11. Ming LG, Lv X, Ma XN, Ge BF, Zhen P, Song P, Zhou J, Ma HP, Xian CJ, Chen KM. The prenyl group contributes to activities of phytoestrogen 8-prenynaringenin in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption in vitro. *Endocrinology*. 2013;154:1202-1214.
  12. Jang YJ, Kim ME, Ko SY. n-Butanol extracts of *Panax notoginseng* suppress LPS-induced MMP-2 expression in periodontal ligament fibroblasts and inhibit osteoclastogenesis by suppressing MAPK in LPS-activated RAW264.7 cells. *Arch Oral Biol*. 2011;56:1319-1327.
  13. Ko SY. Effects of Baicalin on the differentiation and activity of preosteoclasts. *Int J Oral Biol*. 2009;34:81-86.
  14. Wang GF, Wu ZF, Wan L, Wang QT, Chen FM. Influence of baicalin on the expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in cultured human periodontal ligament cells. *Pharmacology*. 2006;77:71-77.
  15. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52:673-751
  16. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:19-34.
  17. Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Figueiredo MS, Folador P, Damazio RG, Pizzolatti MG, Silva FR. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev Med Chem*. 2008;8:1429-1440.
  18. Chen AY, Chen YC. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem*. 2013;138:2099-2107.
  19. Makimura M, Hirasawa M, Kobayashi K, Indo J, Sakanaka S, Taguchi T, Otake S. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol*. 1993;64:630 - 636.
  20. Bodet C, Grenier D, Chandad F, Ofek I, Steinberg D, Weiss EI. Potential oral health benefits of cranberry. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008;48:672-680.
  21. Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, Simmen BR, Gay RE, Gay S. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2523-2530.
  22. Hotokezaka H, Sakai, E, Ohara N, Hotokezaka Y, Gonzales C, Matsuo K-I, Fujimura Y, Yoshida N, Nakayama K. Molecular analysis of RANKL-independent cell fusion of osteoclast-like cells induced by TNF- $\alpha$ , lipopolysaccharide, or peptidoglycan. *J Cell Biochem* 2007;101:122-134.
  23. Lee SE, Woo KM, Kim SY, Kim HM, Kwack K, Lee ZH, Kim HH. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone*. 2002;30:71-77.
  24. Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, Suda T, Takahashi N. p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology*. 2002;143:3105-3113.
  25. Lowe C, Yoneda T, Boyce BF, Chen H, Mundy GR, Soriano P. Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:4485-4489.
  26. Miyazaki T, Sanjay A, Neff L, Tanaka S, Horne WC, Baron R. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem*. 2004;279:17660-17666.
  27. Lee SE, Chung WJ, Kwak HB, Chung CH, Kwack KB, Lee ZH, Kim HH. Tumor necrosis factor-alpha supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK. *J Biol Chem*. 2001;276:49343-49349.
  28. Iotsova V, Caamaño J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R. Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappa B2. *Nat Med*. 1997;3:1285-1289.
  29. Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996; 14:649-683.
  30. Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, Morita I, Wagner EF, Mak TW, Serfling E, Takayanagi H. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med*. 2005; 202:1261-1269.
  31. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002;3:889-901.
  32. Laitala T, Väänänen K. Proton channel part of vacuolar H(+)-ATPase and carbonic anhydrase II expression is stimulated in resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 1993;8:119-126.
  33. Troen BR. The regulation of cathepsin K gene expression. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1068:165-172.