

복분자 미성숙과와 황기 추출물 혼합비율에 의한 조골세포의 활성화연구

구현정, 손은화¹, 강세찬*

가천대학교 생명과학과, ¹강원대학교 생약자원개발학과

The Optimal Combination of the Mixture of Unripe *Rubus coreanus* and *Astragalus membranaceus* in the Activation and Differentiation of Osteoblastic Cells

Hyun Jung Koo, Eun-Hwa Sohn¹ and Se-Chan Kang*

Department of Life Science, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea

¹Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea

Abstract - *Rubus coreanus* and *Astragalus membranaceus* Bunge have been used as a traditional medicine with various pharmacological properties for a long time in Asia. We investigated the proliferative and differentiative effects on osteoblastic cells, MG-63 in various mixture ratios of immature fructus extracts of *R. coreanus* and root extracts of *A. membranaceus*. With preliminary *in vivo* ovariectomized mice, we confirmed the effects of the supplementation of various mixture on alkaline phosphatase (ALP) activity in serum. The ratio of 7:3 is considered as the most effective ratio for the proliferation of osteoblastic cells as they increased by 56.8% similar to estradiol. ALP activity in osteoblast increased by the combination of *R. coreanus* and *A. membranaceus* and peaked in the ratio of 72:28 and 68:32 respectively. These results indicate that the optimal combination of *R. coreanus* and *A. membranaceus* in 7:3 has the most beneficial effects on the activation of osteoblast cells, and give further possibilities that it can be used clinically in the treatment of osteoporosis.

Key words - Alkaline phosphatase, *Astragalus membranaceus*, MG-63, Osteocalcin, *Rubus coreanus*

서 언

골조직은 골흡수 작용과 골형성이 끊임없이 일어나는 동적인 작용인 골재형성(bone remodeling)에 의해 골량(bone mass) 및 골격의 항상성(skeletal homeostasis)을 유지하고 있다(Kang *et al.*, 2010; Karsenty, 2003). 이와 같은 골재형성 과정에는 조골세포와 파골세포의 상호 작용이 매우 중요하는데, 파골세포는 골수의 monocyte-macrophage 계통인 조혈모세포(hematopoietic precursor)로부터 분화하여 활성화되어 뼈를 파괴하고 흡수하는 역할을 하고, 조골세포는 뼈기질을 합성하고 채우는 역할을 한다. 이 두 종류 세포간의 밀접한 연관성으로 뼈의 항상성이 유지되게 되며, 파골세포에 의해 골 흡수가 이뤄진 만큼 조골세포에 의한 골 형성이 이루어짐으로써 항상 일정한 양의 골조직이 유지되게 된다. 따라서 골량은 이러한 세포들

의 상대적인 기능에 의존하게 되며, 조골세포와 파골세포 활성화간의 불균형은 전체적인 뼈의 감소나 증가로 인한 골격의 이상 및 질환으로 나타나게 된다(Manolagas, 2000; Seibel, 2005).

골다사 질환 중 고령사회에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증은 노화, 폐경, 흡연, 만성적 알코올 섭취, 생활태도 등과 같은 내인성 및 외인성 인자들에 의해 쉽게 발병된다고 알려져 있는데, 주로 골관련 면역세포의 만성적인 염증 반응과 단위 용적내 골량의 감소로 인하여 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으키는 비가역적인 반응을 동반하게 된다(Ilich and Kerstetter, 2000). 현재, 골다공증의 치료방법으로 완전하게 확립된 것은 없으며, 골다공증에 대해 임상적으로 사용되는 물질로는 골 흡수 억제제로 주로 사용되는 에스트로겐, 알렌드로네이트, 칼시토닌 및 비스포스포네이트 제제 등이 있으며(Pertynski and Stachowiak, 2006), 이들 약제들은 모두 골 흡수 억제제로서 골절 위험을 감소시키지만 치료를 위한 골형성 효과는 미미하다.

*교신저자(E-mail) : sckang73@gachon.ac.kr

본 연구에서는 천연물 및 약용식물, 특히 한국에 분포하는 천연소재로부터 골대사에 관련하는 세포들의 분화나 기능을 조절하는 물질을 탐색함으로써, 부작용이 적은 골다공증 예방 및 치료 소재를 개발하고자 하였다. 이러한 과정에서 본 연구소재로 선택된 복분자 딸기(*Rubus coreanus* Miquel)의 미성숙 과일은 장미과(Rosaceae), 산딸기속(Rubus)으로 주로 한국과 중국, 일본 등의 아시아에 많이 분포하고, 우리나라에서는 우리나라 전역에 분포되어 있으며, 열매는 6-7월경에 적색으로 익은 후 나중에는 검게 변한다. 복분자에는 여러 가지 유기산과 비타민류, 여러 가지 무기성분, 탄닌을 포함한 플라보노이드류 성분이 풍부한 것으로 알려져 있으며, 항암활성 및 면역증진 효과, 항산화 및 항균효과, anaphylaxis 억제효과, 혈관신생억제(anti-angiogenesis) 효과 및 알레르기 관련 질병에 치료 효과, 고지혈증 효과 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되어 있다(Jeon *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2007).

또 다른 연구 소재인 황기(*Astragali Radix*)는 콩과(Legumiosae)에 속하는 다년생초본인 단너삼(*Astragalus membranaceus* Bunge)의 뿌리로써, 뿌리의 주피를 벗겨 건조한 것을 기원으로 한다. 황기는 한국, 중국 등 아시아 지역과 러시아, 불가리아 등 널리 유럽까지 분포하고 있다. 황기의 주요성분은 isoflavonoid와 triterpene saponin이며, 그 외에도 canavanine, phenol glycoside류, γ -aminobutyric acid 등이 함유되어 있어 이미 강장제, 보양제로 음식에 첨가하여 쓰고 있으며, 부작용이 거의 보고되지 않은 세포성 및 체액성 면역증강작용 및 항염증 작용이 보고되어 있다(Lu *et al.*, 2011). 이들 생약에 대하여 최근 발표된 골질환관련 자료에 의하면 복분자 추출물은 MC3T3-E1 세포 작용에 의해 조골세포의 활성화와 분화에 효과가 있다고 보고하였고(Lee and Choi, 2006), Choi *et al.* (2012)은 복분자 추출물이 당뇨병 골다공증에서 조골세포증식을 유도하여 항골다공증 효과가 있음을 보고하였다. 최근 저자는 황기추출물이 면역증강작용에 의한 골흡수 억제활성이 있음을 확인함으로써 이들의 혼합물이 조골세포의 활성화 증가와 파골세포의 활성화 억제 기전을 동시에 갖는 임상적으로 매우 강력한 골다공증 예방 및 치료제로서 활용될 수 있을 것으로 예측하였다. 이에 본 연구에서는 복분자 추출물과 황기추출물의 다양한 혼합 비율에서 골다공증 예방 및 치료제 개발로 이어질 수 있는 혼합물의 최적 조건을 보고함으로써, 향후 복분자와 황기추출물의 혼합물이 임상적으로 쉽게 적용 되고 제품개발로 이어질 수 있도록 하고자 하였다.

재료 및 방법

시료추출 및 복분자, 황기 혼합물 조제

복분자(*Rubus coreanus* Miquel)의 미숙과 열매를 전라남도 고창 농가에서 구입하여 수세하고, 10 kg의 복분자에 30% 알코올 용액 15 L에 담근 후 72시간 동안 침출한 후, 총 추출액을 감압농축하였다. 농축액을 동결건조(PVTF 200K:Ilshin Lab Co, Korea)하여 고흥 분말로 만들어 -20°C 에 보관하였다.

황기(*Astragalus membranaceus*)는 제천산 2년근을 구입하여 수세하고, 황기 10 kg을 30% 알코올 용액 15 L에 담근 후 72시간 동안 침출한 후, 총 추출액을 감압농축하였다. 농축액은 동결건조하여 분말로 만들어 -20°C 에 보관하였다.

상기 30% 알코올로 추출한 복분자와 황기의 건조물을 복분자:황기의 중량비율로 0:100부터 100:0까지 혼합하여 실험에 사용하였다.

세포주

MG-63(human osteoblastic cell line) 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)에서 구입하여 10% FBS, 2% penicillin-streptomycin(10,000 U pen/ml, 10,000 μg strep/ml)을 첨가한 DMEM(GIBCO BRL, Grand Island, NY) 성장배지에 부착 배양하였으며, 37°C , 5% CO_2 조건을 유지하였다. 사용된 시약들은 특별한 언급이 없으면 모두 Sigma사(St Louis, MO)에서 구입하였다.

Osteoblastic cell proliferation

MG-63 세포를 96-well plate에 1×10^5 /well이 되도록 분주하고 각 추출물을 농도별로 처리하여 각각 24, 48, 72시간 동안 배양한 후 MTT assay를 이용하여 세포 증식능을 측정하였다.

Alkaline phosphatase(ALP) 및 Osterocalcin 의 측정

ALP 활성은 alkaline phosphatase assay kit(SensoLyte[®] pNPP, Anaspec) 이용하여 측정하였으며, *p*-Nitrophenyl phosphate (*p*-NPP)의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 원리를 이용하여 가수분해 산물인 *p*-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP의 농도를 간접적으로 측정하였다. 이때 단백질 양을 측정하여 보정해 줌으로써 단위세포 수 당 ALP 활성도를 계산하였다. Osteocalcin은 샌드위치 ELISA분석 Kit(Amersham Life Science, England)를 사용하여 배지에 유리된 함량을 측정하였다. MG-63 세포를 6 well plate에 2×10^4 cells/well 이 되도록

하여 시료를 처리하거나 처리하지 않고 0일부터 4일 까지 배양 하였고 배지는 2일에 한번 교체하였다. 배지를 제거하고 1x assay buffer로 세포를 2번 세척 후 tritonX-100을 1x assay buffer로 2배 희석하여 세포에 처리한 후 세포를 수확하였다. 4°C 냉장고에서 10분간 배양한 뒤 4°C, 2500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 ALP 활성도 측정에 사용하였다. 96 well plate의 각 well당 세포 용해액을 50 µL 분주하고 p-nitrophenyl phosphate liquid substrate solution 50 µL을 첨가하여 30초간 shaking 후 37°C, 1시간 동안 배양 하였다. Stop solution을 50 µL첨가하고 1분간 shaking 하여 반응시킨 뒤 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 효소 활성은 p-nitrophenol을 기준으로 정량하였다. Osteocalcin에 대한 항체가 코팅된 microtitre plate에 biotinylated antibody 50 µL를 넣은 다음 세포배양 상층액을 50 µL 넣은 후 실온에서 2시간 방치한 다음 세척하였다. 이어 streptavidine-HRP 용액 100 µL를 넣고 실온에서 30분간 방치한 다음 TMB substrate 용액 100 µL를 추가하여 반응시킨 후 반응 정지 용액을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 작성하여 분비된 osteocalcin 농도를 산출하였으며, 세 번 반복실험을 실시하였다.

통계분석

실험 결과는 3회 반복하였으며, 모든 데이터는 평균 ± 표준 편차로 나타내었다. 대조군과 처리군의 통계학적인 차이는 ANOVA 분석법을 이용하여 유의성을 결정하였으며, P 값이 0.01, 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

Osteoblastic cell의 세포증식효과

현재 골다공증 예방 및 치료에 사용되고 있는 약제는 비스포스포네이트, 여성호르몬, 칼슘 및 비타민 D, 칼시토닌 등으로 대부분 파골세포의 골흡수를 억제하는 작용 기전을 가지고 있다(Kennel and Drake, 2009). 그러나 이와 같은 항파골효과 물질은 골절을 예방하는 효과가 있기는 하나 이미 골밀도가 감소된 골다공증에 있어서는 골량의 많은 증가를 기대할 수 없고 단지 골소실률만을 감소하게 하는 한계점이 드러남으로써, 최근에는 골형성을 증가시키는 조골세포의 증식과 분화 및 조골세포의 조절 작용에 대한 관심이 집중되고 있다(Komori, 2010). 따라서 복분자 추출물과 황기추출물의 다양한 혼합비율(1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1)이 조골세포의 세포 증식

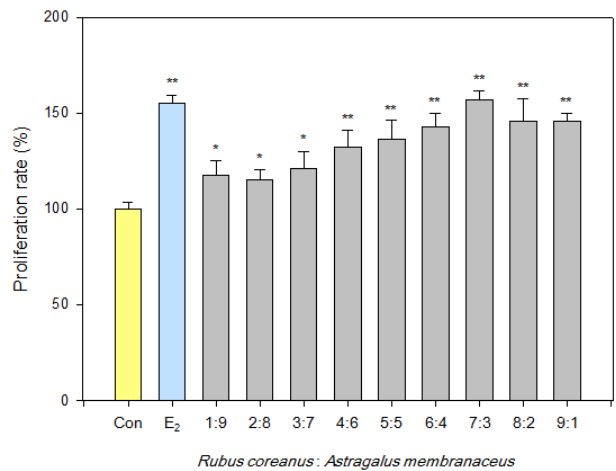


Fig. 1. Effects of different ratio mixture of *Rubus coreanus* and *Astragalus membranaceus* on proliferation rates of MG-63 cells.

에 영향을 주는지를 알아보기 위하여 MG-63 세포를 이용하여 세포증식능을 측정하였다. 실험결과 복분자와 황기의 혼합비율 7:3 혼합물에서 대조군에 비해 가장 우수한 56.8%의 세포증식율을 나타냈으며, 이러한 결과는 양성대조군으로 사용한 estradiol 처리의 군과 유사한 효능임을 보여주었다(Fig. 1).

세포내 ALP의 활성 효과

정상적인 골 조직에서는 파골세포에 의한 골 흡수 과정과 그에 따른 조골세포에 의한 새로운 골 형성 과정, 그리고 무기질화 과정 중 골 형성에 관여하는 효소인 alkaline phosphatase(ALP)가 활성화 되면서 무기질화(mineralization) 과정이 끊임없이 반복적으로 일어난다. MG-63 세포는 인간 유래 조골세포로 세포막에 당단백질인 ALP를 가지고 있다. ALP는 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로서, 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가되어, 골 형성의 지표로써 가장 흔하게 사용된다(Ochiuto et al., 2007). 복분자와 황기의 혼합물이 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 ALP 활성을 측정 한 결과 72:28 30% 복합추출물 100 µg/ml에서 가장 유의적인 활성 증가를 보였다 (Table 1).

세포내 Osteocalcin의 효과

골형성 표지자인 osteocalcin은 분자량이 작은(4.9 kDa) 단백질로서 비콜라겐 뼈기질단백질(non-collagenous bone matrix proteins)의 약 15%를 구성하고 있다. 유일하게 칼슘과 결합할 수 있는 17, 21 및 24에 위치한 3개의 α-carboxyglutamic acid(Gla)

Table 1. Effects of different ratio mixture of unripe *Rubus coreanus* and *Astragalus membranaceus* on the ALP activity and osteocalcin release

| 복분자:황기 | ALP (%) | Osteocalcin (ng/ml) | 복분자:황기 | ALP (%) | Osteocalcin (ng/ml) |
|--------|---------------|---------------------|------------|---------------|---------------------|
| 0:100 | 125.0 ± 5.06 | 215.4 ± 6.05 | 52:48 | 184.8 ± 7.51 | 319.8 ± 3.04 |
| 2:98 | 141.5 ± 8.22 | 211.7 ± 3.10 | 54:46 | 199.5 ± 0.28 | 355.5 ± 23.91 |
| 4:96 | 138.3 ± 1.80 | 196.4 ± 10.10 | 56:44 | 172.0 ± 21.60 | 351.5 ± 4.17 |
| 6:94 | 126.7 ± 3.38 | 230.3 ± 1.29 | 58:42 | 188.6 ± 8.90 | 349.6 ± 11.46 |
| 8:92 | 143.8 ± 3.89 | 236.9 ± 3.80 | 60:40 | 202.2 ± 9.02 | 370.3 ± 1.25 |
| 10:90 | 146.2 ± 7.93 | 240.5 ± 10.57 | 62:38 | 200.4 ± 3.00 | 361.0 ± 10.34 |
| 12:88 | 154.8 ± 9.86 | 247.7 ± 3.31 | 64:36 | 215.7 ± 23.58 | 361.8 ± 6.08 |
| 14:86 | 138.7 ± 6.01 | 239.8 ± 7.86 | 66:34 | 206.3 ± 7.64 | 369.7 ± 7.78 |
| 16:84 | 147.6 ± 2.70 | 267.5 ± 20.67 | 68:32 | 222.9 ± 7.93 | 404.8 ± 13.72 |
| 18:82 | 171.0 ± 1.47 | 249.6 ± 1.45 | 70:30 | 221.7 ± 4.03 | 389.7 ± 9.60 |
| 20:80 | 149.5 ± 14.21 | 268.9 ± 1.53 | 72:28 | 223.2 ± 11.95 | 375.1 ± 13.53 |
| 22:78 | 160.0 ± 3.07 | 266.0 ± 14.02 | 74:26 | 212.1 ± 2.77 | 348.7 ± 6.96 |
| 24:76 | 165.5 ± 3.70 | 288.0 ± 11.18 | 76:24 | 207.3 ± 7.20 | 368.8 ± 4.04 |
| 26:74 | 154.4 ± 12.47 | 290.8 ± 10.69 | 78:22 | 197.5 ± 7.90 | 373.9 ± 25.61 |
| 28:72 | 172.2 ± 4.12 | 295.8 ± 1.29 | 80:20 | 200.9 ± 5.80 | 353.0 ± 8.22 |
| 30:70 | 168.6 ± 1.28 | 287.9 ± 3.14 | 82:18 | 186.1 ± 2.63 | 346.9 ± 4.87 |
| 32:68 | 153.5 ± 7.55 | 303.9 ± 1.91 | 84:16 | 194.0 ± 2.54 | 370.9 ± 10.88 |
| 34:66 | 175.0 ± 4.41 | 310.4 ± 5.63 | 86:14 | 186.5 ± 14.31 | 343.7 ± 3.59 |
| 36:64 | 158.6 ± 10.84 | 306.3 ± 5.18 | 88:12 | 199.8 ± 9.44 | 324.8 ± 9.19 |
| 38:62 | 175.1 ± 0.32 | 312.5 ± 5.54 | 90:10 | 204.6 ± 5.66 | 326.6 ± 1.91 |
| 40:60 | 170.9 ± 2.03 | 313.5 ± 4.74 | 92:8 | 186.4 ± 6.71 | 305.8 ± 4.00 |
| 42:58 | 163.3 ± 5.20 | 311.3 ± 3.85 | 94:6 | 170.5 ± 9.42 | 319.3 ± 2.76 |
| 44:56 | 170.3 ± 6.41 | 327.1 ± 10.31 | 96:4 | 169.2 ± 10.19 | 305.8 ± 1.09 |
| 46:54 | 178.0 ± 4.17 | 312.9 ± 4.79 | 98:2 | 171.5 ± 3.01 | 298.8 ± 0.45 |
| 48:52 | 167.6 ± 10.61 | 323.8 ± 5.93 | 100:0 | 157.4 ± 7.44 | 311.4 ± 7.18 |
| 50:50 | 176.6 ± 5.92 | 325.1 ± 6.41 | E2 (10-8M) | 240.7 ± 4.97 | 377.8 ± 8.62 |
| | | | Control | 100.0 ± 5.94 | 228.4 ± 9.77 |

잔기들을 포함하고 있고, 뼈의 상아질에 특이하게 존재하며 조골세포와 치아의 상아아세포 odontoblasts에서만 발현된다. Osteocalcin의 조직 특이적 발현은 골형성 작용에 대한 세포의 중요한 활성 지표가 되며, 새롭게 형성된 osteocalcin의 일부가 혈액으로 유리된다.

복분자 추출물과 황기추출물의 다양한 혼합비율이 조골세포의 골형성 기능에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MG-63세포가 합성하여 분비하는 osteocalcin의 양을 측정하였다. 실험결과 복분자와 황기의 혼합비율 68:32~72:28 범위의 혼합비율에서 가장 높은 osteocalcin의 분비가 이루어졌다. 이러한 결과는 양성대조군으로 사용한 estradiol 처리의 군과 유사한 효능임을

보여주었다(Table 1).

적 요

본 연구는 복분자 미숙과 추출물과 황기 뿌리 추출물로 이루어진 혼합물의 다양한 혼합비율을 이용하여 조골세포의 증식과 활성변화를 확인하고, ALP 활성 및 osteocalcin의 분리량 측정을 통하여 복분자 추출물과 황기추출물의 최적혼합비율을 결정한 것이다. 구체적으로는 각 혼합비율(복분자:황기=1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1)에 따른 혼합물을 MG-63 조골세포에 처리하여 세포의 증식과, 분화마커 ALP의 활성 및

osteocalcin 분비량을 측정함으로써 골다공증 치료에 유용한 복분자 추출물과 황기추출물의 혼합비율을 7:3으로 최적화하였다. 혼합비율 0:0에서 조골세포증식이, 혼합비율 72:28이 세포 내 ALP 활성 증가를, 68:32이 세포 내 osteocalcin의 분비가 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 7:3의 혼합물이 항골다공증 효과에 우수한 결과가 있을 가능성을 나타내며, 특히 조골세포의 활성화 촉진으로 인해 골파괴 진행을 억제하는 효과, 즉 병의 진행을 지연시키는 작용기전이 아니라 골을 다시 형성해줄 수 있는 긍정적 효능에 대한 가능성을 제공한다. 이에 본 연구결과를 바탕으로 본 연구결과에 의해서 제공되는 최적혼합비율의 혼합물에 대한 골다공증 예방 및 치료에 대한 임상실험과 작용기전에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 보인다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린 21사업(과제번호: PJ009049)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Choi, C., H. Lee, H. Lim, S. Park, J. Lee and S. Do. 2012. Effect of *Rubus coreanus* extracts on diabetic osteoporosis by simultaneous regulation of osteoblasts and osteoclasts. *Menopause* 19:1043-1051.
- Ilich, J.Z. and J.E. Kerstetter. 2000. Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. *J. Am. Coll. Nutr.* 19:715-737.
- Jeon, Y.H., S.W. Choi and M.R. Kim. 2009. Antimutagenic and cytotoxic activity of ethanol and water extracts from *Rubus coreanus*. *Korean J. Food Cookery Sci.* 25:379-386.
- Kang, S.C., J.D. Lim, J.C. Lee, H.J. Park, N.S. Kang and E.H. Sohn. 2010. Effects of fructus and semen from *Rosa rugosa* on Osteoimmune cells. *Korean J. Plant Res.* 4:157-164.
- Karsenty, G. 2003. The complexities of skeletal biology. *Nature* 423:316-318.
- Kennel, K.A. and M.T. Drake. 2009. Adverse effects of bisphosphonates: Implications for Osteoporosis management. *Mayo. Clin. Proc.* 84:632-638.
- Kim, S., C.K. Kim, K.S. Lee, J.H. Kim, H. Hwang, D. Jeoung, J. Choe, M.H. Won, H. Lee, K.S. Ha, Y.G. Kwon and Y.M. Kim. 2013. Aqueous extract of unripe *Rubus coreanus* fruit attenuates atherosclerosis by improving blood lipid profile and inhibiting NF- κ B activation via phase II gene expression. *J. Ethnopharmacol.* 146:515-524.
- Komori, T. 2010. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv. Exp. Med. Biol.* 658:43-49.
- Lee, K.H. and E.M. Choi. 2006. *Rubus coreanus* Miq. extract promotes osteoblast differentiation and inhibits bone-resorbing mediators in MC3T3-E1 cells. *Am. J. Chin. Med.* 34:643-654.
- Lu, S., K.J. Chen, Q.Y. Yang and H.R. Sun. 2011. Progress in the research of Radix Astragali in treating chronic heart failure: effective ingredients, dose-effect relationship and adverse reaction. *Chin. J. Int. Med.* 17:473-477.
- Manglagas, S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 21:115-137
- Ochiuto, F., R.D. Pasquale, G. Gualielmo, D.R. Palumbo, G. Zangla, S. Samperi, A. Renzo and C. Circosta. 2007. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pretense* L.) on experimental osteoporosis. *Phytother. Res.* 21:130-134.
- Park, M.C., K.J. Kim, H.S. Lee and E.H. Jo. 2007. Attenuation of airway hyperreactivity (AHR) and inflammation by water extract of *Rubus coreanus* Miq. (WRCM). *J. Korean Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* 20:177-194.
- Pertynski, T. and G. Stachowiak. 2006. Menopause-facts and controversies. *Endokrynol. Pol.* 57:525-534.
- Seibel, M.J. 2005. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin. Biochem. Rev.* 26:97-122.

(Received 17 October 2013 ; Revised 22 October 2013 ; Accepted 24 October 2013)