

천연물 추출물의 파골세포 분화억제 효과 검색

이효정 · 유미희 · 이승욱 · 김현정¹ · 이인선^{1,*}

계명대학교 식품가공학과, ¹계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구(TMR)센터

Inhibition Effects of Natural Products on Osteoclast Differentiation

Hyo Jung Lee, Mi Hee Yu, Syng-Ook Lee, Hyun Jeong Kim, and In-Seon Lee^{1,*}

Department of Food Science & Technology, Keimyung University

¹The Center for Traditional Microorganism Resources center, Keimyung University

In bone remodeling, imbalances that are caused by increased bone resorption over bone formation lead to adult skeletal diseases. Thus, we have screened various natural products for their ability to regulate the differentiation of osteoclasts to propose candidates for the prevention or treatment of osteoporosis. *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Zizyphus Jujuba* Miller var. extracts of 140 natural products inhibited the differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast, as showed by the reduced number of tartrate resistant acid phosphatase(TRAP)-positive multinucleated cells and decreased TRAP activity.

Key words: RAW264.7 cells, osteoclast, differentiation, natural products

서 론

골(bone)은 세포와 물라겐성 기질 그리고 무기질 성분으로 구성되어진 매우 복잡한 조직이다. 이들은 기계적인 지지, 중요한 장기의 보호, 조혈화에 필요한 미세 환경 제공 그리고 칼슘과 다른 미네랄의 저장 장소와 같은 기본적인 다량 기능을 제공하여 준다. 골조직은 일생을 두고 지속적으로 재형성되는 활발한 대사 조직이다. 골개형(bone remodeling)은 파골세포(osteoclast)가 골에 붙어 산성화(acidification) 및 단백질 분해 작용(proteolytic digestion)에 의해 오래된 골을 제거하고 그 제거된 위치에 조골세포(osteoblast)가 여러 종류의 단백질과 콜라겐으로 이루어진 골기질을 분비하여 유골(osteoid)형성과 무기질 침착(mineralization)을 유도하여 새로운 골을 형성함으로써 이루어진다. 이러한 두 과정 즉, 골흡수와 골형성은 서로 밀접히 연결되어 이루어지고 골의 정상적인 구조를 유지하는데 중요하다(1,2).

이 두 과정은 골흡수 후 즉시 골형성이 일어나는 연속적인 상호작용인데 질환이나 식이, 호르몬과 물리적인 스트레스 등의 요인들에 의해 상호작용의 불균형이 초래되어 골질환이 발생하게 된다. 특히, 노인들의 골질환이나, 여성들의 폐경기로 인해 발생하는 골 질환은 조골세포에 의한 골형성 보다는 골을 흡수하는 파골세포 활성 증가가 주된 원인이다(3).

이러한 파골세포는 단핵-탐식세포(monocyte-macrophage) 계통의 조혈전구세포(hematopoietic precursor)에서 분화되며, 골내막에 위치하며 골조직에 존재하는 유일한 다핵세포이다. 또한 파골세포는 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)와 풍부한 calcitonin(CT) 수용체를 가지는 특징이 있으며 실제적으로 뼈의 흡수작용을 할 때는 산 생성이 활발하고 actin ring을 형성하여 골기질을 흡수한다(4).

고령화 사회에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증(osteoporosis)은 가장 흔한 대사성 질환으로 골형성과 골 흡수의 불균형에 의하여 골의 화학적 조성에는 변화가 없으나 단위용적내의 골량을 감소시켜 척추, 요골 및 대퇴부의 골절을 쉽게 일으키는 질환이다. 평균 수명이 70세를 넘어서서 선진국 수준에 도달하고 있는 우리나라도 골다공증에 대한 사회적, 의학적 관심이 증가하고 있다(5).

골다공증의 치료방법으로서 완전하게 확립된 것은 없으며 일단 손실된 뼈 조직을 원상으로 재생시키는 것은 어렵다. 따라서 가급적 초기에 발견하고 뼈손실이 더 이상 증가되지 않도록 또는 진행속도가 지연될 수 있도록 하는 데 그 치료목표를 두고 있다(6). 현재 골다공증에 대해 임상으로 사용되는 것에는 골 흡수 억제제로서 주로 사용되는 에스트로겐, 알렌드로네이트(7), 칼시토닌, 그리고 비스포스포네이트 제제 등이 있다. 현재 미국 식약청에서 골다공증 치료 및 예방약제로 승인한 것은 에스트로겐과 라록시펜, 알렌드로네이트 및 비스포스포네이트 제제 등이며 이들 약제들은 모두 골 흡수 억제 약제로서 최근 meta analysis 결과 척추부의 골절은 35-50% 내외로 감소시키지만, 대퇴부의 골절 예방효과는 비스포스포네이트 제제만 보이는 것으로 밝혀졌다(6,7). 따라서 골다공증의 근본적인 치료제는 아직 없다고 해도 과언이 아니며, 기존의 치료제는 부

*Corresponding author: In-Seon Lee, The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
Tel: 82-53-580-5538
Fax: 82-53-580-5538
E-mail: inseon@kmu.ac.kr

작용이 심해서 입상의 의사나 환자에 만족을 주지 못하고 있으므로 폐경기 골다공증의 치료법으로 호르몬 대체요법인 에스트로겐 보충이 시도되어 왔으며 골량 유지에 효과적인 것으로 보고되고 있다(8). 그러나 이 치료는 60세 이상의 고령층에서는 골량 감소 억제효과가 폐경 초기에 비하여 낮으며, 최소 5년 이상의 장기 치료를 요하고 불규칙한 자궁 출혈, 유방암, 자궁 내막암 및 고혈압 발생 빈도 증가 등의 합병증 위험이 있는 것으로 지적되고 있다(8,9).

이에 최근에는 quercetin과 kaempferol의 파골세포의 골 흡수 억제 효과(10)나, 대두를 이용한 조골세포 활성 검색(11), 두충의 골다공증 효과(12)에 대한 연구 등 부작용이 적고 쉽게 접할 수 있는 천연소재를 이용한 골다공증 개선제 검색이 활발히 이루어지고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 일상생활에서 식용 또는 약용으로 이용되고 있는 천연물에 대한 생리활성 물질을 규명하기 위해

RAW264.7 cell을 이용한 파골세포 분화 과정 중 여러 천연물 추출물을 처리하여 TRAP활성을 측정함으로써 파골세포의 분화를 억제능을 검색하였다.

재료 및 방법

시료조제

본 실험에 사용한 여러 한약재, 과일류, 채소류 등 천연물 140종은 대구의 약령시장이나 백화점 및 대형 마트에서 구입하여 사용하였다. 먼저 시료를 10배량의 80% 메탄올이나 증류수를 혼합(w/v)하여 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No.3, England)를 사용하여 2회 여과하고 회전감압농축기(R-3000, Buchi Switzerland)로 농축하여 동결 건조한 후 분말화하여 시료로 사용하였다(Table 1).

본 실험에서는 많은 천연물 추출물을 농도별로 검색하였기

Table 1. List of natural products

Name of tradition herbal medicines			Name of tradition herbal medicines		
Botanical name	Korean name	Extracts	Botanical name	Korean name	Extracts
1. <i>Carthamus tinctorius</i> Linne	홍화인	M.E*	36. <i>Phaseolus radiatus</i> Linne	녹두	M.E
2. <i>Carthamus tinctorius</i> Linne	홍화인	W.E*	37. <i>Phlomis umbrosa</i> Turcz.	속단	M.E
3. <i>Psoralea corylifolia</i> Linne	파고지	M.E	38. <i>Prunus mandshurica</i> var.	개살구	M.E
4. <i>Brassica oleracea</i> var.	뉴그린	M.E	39. <i>Reynoutria elliptica</i> Migo.	호장근	M.E
5. <i>Schizandra chinensis</i> Baillon.	오미자	M.E	40. <i>Phlomis umbrosa</i> Turcz.	속단	W.E
6. <i>Melia azedarach</i> Linne	금령자	M.E	41. <i>Solidago virgaurea</i> Linne var.	비역취	W.E
7. <i>Corchorus olitorius</i>	물로키아	M.E	42. <i>Dimocarpus longan</i> Lour	용안육씨	M.E
8. <i>Chrysanthemum coronarium</i>	쑥갓	M.E	43. <i>Scutellaria baicalensis</i> Geogri.	황금	M.E
9. <i>Bupleurum falcaum</i> Linne	시호	M.E	44. <i>Brassica oleracea</i> L. var.	꽃양배추	M.E
10. <i>Oryza sativa</i>	안계미	W.E	45. <i>Lactuca sativa</i> var.	적로메인 상추	M.E
11. <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn	연근	M.E	46. <i>Chicorium intylosus</i> Linne	레드 치커리	M.E
12. <i>Musa pavaoliaciaca</i> Linne var.	스위티	M.E	47. <i>Rosa hybrida</i> Hort.	적로즈	M.E
13. <i>Citrus aurantium</i> Linne	지각	M.E	48. <i>Angelica keiskei</i>	신선초	M.E
14. <i>Pueraria thunbergiana</i> Bentham.	갈화	M.E	49. <i>Geranium nepalense</i> Hara	현초	M.E
15. <i>Mangifera indica</i> Linne	망고	M.E	50. <i>Leonurus sibiricus</i>	익모초	M.E
16. <i>Agaricus blazei</i> Murril	아가리쿠스	M.E	51. <i>Petroselinum sativum</i> Hoffm	파슬리	M.E
17. <i>Zizyphus jujuba</i> Miller var.	생대추과육	M.E	52. <i>Brassia oleracea</i> Linne var.	케일	M.E
18. <i>Dendropolyporus umbellatus</i>	저령	M.E	53. <i>Aster scaber</i>	참취	M.E
19. <i>Rosa laevigata</i> Michx.	금앵자	M.E	54. <i>Malva verticillata</i>	아욱	M.E
20. <i>Artemisia princeps</i>	쑥	M.E	55. <i>Kalopanax pictus</i>	읍나무	M.E
21. <i>Juglans regia</i> Linne var.	호두	M.E	56. <i>Capsicum frutescens</i> L.	파프리카	M.E
22. <i>Cuscuta japonica</i> Choisy	토사자	M.E	57. <i>Agaricus blazei</i> Murrill	신령버섯	M.E
23. <i>Lonicera japonica</i>	인동초잎	M.E	58. <i>Pellinus Linteus</i>	상황	M.E
24. <i>Allium sativum</i> Linne	마늘	M.E	59. <i>Citrus unshiu</i>	청귤	M.E
25. <i>Citrus paradisi</i> Macf.	자몽	M.E	60. <i>Achyranthes japonica</i> Nakai.	쇠무릎뿌리	M.E
26. <i>Dianthus chinensis</i> Linne	구맥	M.E	61. <i>Portulaca oleraceae</i> Linne var.	쇠비름	W.E
27. <i>Rubus Coreanus</i> Miquel	복분자	W.E	62. <i>Portulaca oleraceae</i> Linne var.	쇠비름	M.E
28. <i>Drynaria fortunei</i> Kunze	골쇄보	M.E	63. <i>Panax schinseng</i> Nees	배양인삼	M.E
29. <i>Perilla frutescens</i> Linne var.	차조기	M.E	64. <i>Dimocarpus longan</i> Lour	용안육	M.E
30. <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	감초	M.E	65. <i>Achyranthes japonica</i> Nakai.	쇠무릎잎	M.E
31. <i>Sacciarum Granorum</i>	교이	M.E	66. <i>Cirsium nipponicum</i> Makine	물엉겅퀴잎	M.E
32. <i>Sophora flavescens</i> Aitton	고삼	M.E	67. <i>Cirsium nipponicum</i> Makine	불엉겅퀴씨	M.E
33. <i>Pimpinella brachycarpa</i> Nakai	참나물	M.E	68. <i>Platycodon grandiflorum</i>	길경	M.E
34. <i>Phaseolus radiatus</i> Linne var.	팥	M.E	69. <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	단삼	M.E
35. <i>Plantago asiatica</i> Linne	차전자	M.E	70. <i>Prunus salicina</i> Lindley	포도사	M.E

*M.E: methanol extracts, W.E: water extracts.

Table 1. Continued

Name of tradition herbal medicines				Name of tradition herbal medicines			
Botanical name		Korean name	Extracts	Botanical name		Korean name	Extracts
71.	<i>Monascus pigment</i> Oryza	홍국쌀	W.E*	106.	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> var.	형개	M.E
72.	<i>Sorbaria sorbifolia</i> Braum	정공등	M.E*	107.	<i>Amaranthus mangostanus</i>	비름나물	M.E
73.	<i>Lespedeza tomentosa</i> Sieb	싸리	W.E	108.	<i>Poria cocos</i> Wolf	복령	M.E
74.	<i>Ulmus davidiana</i> var	느릅나무뿌리	M.E	109.	<i>Codonopsis lanceolata</i> Trautv.	더덕	M.E
75.	<i>Beta vulgaris</i> var.	근대	M.E	110.	<i>Fatoua villosa</i> Nakai	뽕잎	M.E
76.	<i>Cudrania tricuspidata</i>	구찌뽕	M.E	111.	<i>Prunus salicina</i> Lindl. cv.	피자두	M.E
77.	<i>Citrus junos</i>	당유자	W.E	112.	<i>Raphanus sativus</i>	무순	M.E
78.	<i>Allium monanthum</i> MAXIM	달래	M.E	113.	<i>Zanthoxyl Pericarpium</i>	산초나무물	M.E
79.	<i>capsicum annuum</i> Linne	고추가루	M.E	114.	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	두충나무	M.E
80.	<i>Aralia elata</i> (Miq.) Seem.	두릅피	M.E	115.	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	관채	M.E
81.	<i>Cryptomeria japonica</i>	삼나무줄기잎	M.E	116.	<i>Achyranthes japonica</i> Nakai.	쇠무릎씨	M.E
82.	<i>Diospyros kaki</i> Thunb. var.	감향	M.E	117.	<i>Pinus densiflora</i> Sieb.	솔잎	M.E
83.	<i>Sarcodon aspratus</i> S.	능이	M.E	118.	<i>Phellodendron amurense</i> Rupr.	황백	M.E
84.	<i>Citrus junos</i>	당유자	M.E	119.	<i>Sedum sarmentosum</i> BUNGE	돈나물	M.E
85.	<i>Citrus limon</i> BURN	레몬	M.E	120.	<i>Santali Albi</i> Lignum	백단향	M.E
86.	<i>Dilophus okamurai</i>	그라운드매이스	M.E	121.	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	비름어성초	M.E
87.P	<i>runus salicina</i> Lindl. cv.	피자두	M.E	122.	<i>Polymnia sonchifolia</i>	야콘	M.E
88.	<i>Selaginella involvens</i> Spring	권백	M.E	123.	<i>Actinidia chinensis</i> YANGGAO	참다래	M.E
89.	<i>Persea americana</i>	아보가도	M.E	124.	<i>Acanthopanax senticosus</i>	가시오가피	M.E
90.	<i>Alpinia officinarum</i>	양강	M.E	125.	<i>Saxostrea echinata</i>	모려분	M.E
91.	<i>Dendropanax morbifera</i> Nakai	황칠나무	M.E	126.	<i>Hordei Fructus</i>	쌀기울	M.E
92.	<i>Albizia coreana</i> NAKAI	합환피	M.E	127.	<i>Diospyros kaki</i> Thunb. var.	단감	M.E
93.	<i>Solidago virgaurea</i> Linne var.	미역취씨	M.E	128.	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller var.	생대추과육	W.E
94.	<i>Panax schinseng</i> Nees	배양인삼	W.E	129.	<i>Terminaliae fructus</i>	가자	M.E
95.	<i>Saururus chinensis</i> Baill	삼백초뿌리	W.E	130.	<i>Fortunella japonica</i> var.	금귤	M.E
96.	<i>Brassica juncea</i>	청겨자	M.E	131.	<i>Citrus aurantium</i>	산귤	W.E
97.	<i>Zanthoxylum schinifolium</i>	산초씨앗	M.E	132.	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	방울토마토	M.E
98.	<i>Coriandrum sativum</i>	고수	M.E	133.	<i>Brassica oleracea italica</i>	브로커리	M.E
99.	<i>Cortinarius largus</i> Fr.	버섯	M.E	134.	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck	오렌지(수입)	M.E
100.	<i>Agaricus blazei</i> urril	아가리쿠스	M.E	135.	<i>Sasa coreana</i> Nakai	신약	M.E
101.	<i>Origanum vulgare</i> L.	오레가노	M.E	136.	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	냉이	M.E
102.	<i>Phellimus linteus</i>	상황자실체	M.E	137.	<i>Sepia esculenta</i>	오적골	M.E
103.	<i>Asiasarum heterotropoides</i> var.	세신	M.E	138.	<i>Citrus aurantium</i>	산귤	M.E
104.	<i>Chinese pistachio.</i>	황연	M.E	139.	<i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai	관중	M.E
105.	<i>Glycine Semen erminatum</i>	콩나물	W.E	140.	<i>Agave americana</i> L.	백년초	M.E

*M.E: methanol extracts, W.E: water extracts.

때문에 결과 나열시 천연물 이름 우측에 윗첨자로 고유번호를 표기하였다.

세포주 배양

본 실험에 사용된 마우스 대식 세포주 유래인 RAW264.7 cell 은 한국 세포주 은행으로부터 분양 받았으며, 10% fetal bovine serum(FBS)와 1% antibiotics(penicillin/ streptomycin)를 첨가한 alpha-minimum essential medium(α -MEM) 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37°C incubator에서 1주일에 2-3회 계대 배양 하였다. 파골 세포 분화를 유도하기 위해 96-well plate에 RAW264.7 cell이 4×10³ cells/well이 되도록 분주한 후 α -MEM 배지에 RANKL 50 ng/mL과 PD98059 10 μ M되도록 첨가하여 5% CO₂가 존재하는 37°C incubator에서 4일간 배양하였다.

세포독성 측정

시료의 세포독성을 측정하기 위해 Green 등(13)의 방법에 준

한 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay를 실시하여 측정하였다. 먼저 배양한 cell을 0.4% trypan blue 염색법으로 세포수를 측정한 후 96-well plate에 각 well당 1×10⁴ cells/200 μ L 농도로 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거한다. 여기에 새로운 MEM 배지 200 μ L에 녹인 농도 별 시료를 각 well에 첨가한다. 시료가 첨가된 배양액에서 48 시간 배양한 후, MTT(5 mg/mL) 용액 10 μ L를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

TRAP 활성 측정과 TRAP 염색

파골분화 정도를 Hotokezaka 등(14)의 방법에 따라 TRAP 효소 활성 측정과 TRAP 염색으로 확인하였다. 96-well에 4×10³

Table 2. Survival rate of RAW264.7 cells treated with 140 extracts from natural products

(Unit: µg/mL)

Survival rate (%)*				Survival rate (%)				Survival rate (%)				Survival rate (%)			
Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations		
	1000	300	100		1000	300	100		1000	300	100		1000	300	100
1	-3	-2	-3	36	0	0	0	71	0	0	0	106	-3	-3	-2
2	-1	-1	-2	37	-2	0	0	72	-3	-3	0	107	-3	-3	-1
3	-2	-2	-2	38	+1	+1	+1	73	-2	2	-1	108	0	0	0
4	-2	0	0	39	-3	-3	-3	74	-3	+1	-2	109	-3	-3	-1
5	-3	0	0	40	-2	-2	-2	75	-3	2	0	110	-3	0	0
6	-3	-3	-3	41	-3	-2	-2	76	-3	-3	0	111	-3	+1	+2
7	-3	0	0	42	-3	-3	-1	77	-2	-1	0	112	-2	-2	-2
8	-3	0	0	43	-3	-2	0	78	-3	-2	0	113	-3	-2	-2
9	-3	-3	-3	44	-2	-1	-1	79	-3	0	0	114	-3	-3	+1
10	-2	-1	0	45	-2	-2	-1	80	0	+1	+2	115	-2	0	0
11	-2	-2	-1	46	-3	-2	0	81	-3	0	0	116	0	+1	0
12	-1	0	0	47	-3	-2	0	82	-3	-3	-3	117	0	0	0
13	-3	-1	-1	48	-3	-3	-1	83	-3	-3	-3	118	-3	-3	-2
14	-3	-2	0	49	3	-3	-3	84	-1	-1	0	119	-3	-2	0
15	+1	0	0	50	-3	-2	-2	85	-2	0	0	120	-2	0	0
16	-3	0	-1	51	-3	0	0	86	-2	-1	-1	121	-3	-2	-1
17	+2	+1	0	52	-3	0	0	87	0	1	+1	122	0	0	0
18	-2	0	0	53	-1	+1	0	88	3	-3	-1	123	-1	0	0
19	+2	+1	0	54	-3	-2	-2	89	-3	-3	-3	124	-3	-3	-3
20	0	0	0	55	-3	-2	0	90	-3	-3	-3	125	-2	-1	-1
21	-3	0	+1	56	0	0	0	91	-3	-3	-2	126	0	0	0
22	-2	-2	-1	57	-2	-2	-2	92	-3	-3	-3	127	0	0	0
23	-3	0	0	58	-1	0	0	93	-3	-2	-2	128	-2	-2	-2
24	-1	0	0	59	-3	0	0	94	-3	-2	-21	29	-3	-3	-3
25	-1	0	0	60	-2	-1	0	95	-3	-2	-2	130		0	0
26	-3	-2	-2	61	-2	-1	-1	96	-3	0	0	131	-2	-2	0
27	-3	0	-1	62	-2	0	0	97	-3	-1	0	132	0	0	0
28	-1	0	0	63	-3	-3	-3	98	-3	-2	0	133	-2	-1	-1
29	-3	-1	0	64	-3	-1	-1	99	-2	-2	0	134	-1	0	0
30	-3	0	+2	65	-3	-1	0	100	-1	-1	0	135	-1	0	0
31	0	0	0	66	-3	-3	-2	101	-3	-1	+1	136	-2	-3	-3
32	-1	+1	+1	67	-3	+1	0	102	-2	-1	0	137	-2	-1	0
33	-3	0	0	68	-3	-3	-2	103	-3	-3	-3	138	-2	-1	0
34	-2	0	0	69	-3	0	0	104	-3	-3	-2	139	+1	+2	+2
35	-2	-3	-1	70	0	+1	0	105	-3	-3	-3	140	-2	0	0

* +2 > 110%, +1 > 100%, 100% ≥ 0 > 80%, 80% ≤ -1, 70% ≤ -2, 60% ≤ -3.

cells/well이 되게 cell을 접종하고 분화인자와 sample을 처리하여 4일간 배양하였다. 배지를 제거하여 dulbecco's phosphate buffer saline(PBS)로 세척한 다음 10% formaldehyde로 고정된 cell에 substrate solution(1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50 mM citrate buffer(pH 4.6))을 100 µL씩 분주하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 효소 반응액을 새로운 plate에 옮기고 0.1 N-NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP 활성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다. 그리고 TRAP 염색은 먼저 50 mM tartaric acid를 포함하는 50 mM sodium acetate buffer 10 mL에 1 mg/mL naphthol AS-MX phosphate와 N,N-dimethylformamide 100 µL를 첨가하여 염색액을 제조한 후 10% formaldehyde로 고정된 cell에 염색액을 45 µL씩 분주하고 dry oven에서 30분 동안 방치하여 현미경으로 관찰하였다.

Actin ring 염색

TRAP 염색법과 동일하게 96-well에 4×10^5 cells/well이 되게 세포를 접종하고 분화인자와 sample을 처리하여 4일간 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 10% formaldehyde로 세포를 고정시킨 후 PBS로 세척하여 hoechst solution의 최종농도가 10 µM이 되도록 세포에 첨가하여 암실에서 30분 정도 반응시켰다. 형광 현미경의 blue 파장을 이용하여 분화된 파골세포의 actin ring 형태 변화를 관찰하였다.

결과 및 고찰

천연물 추출물 140종의 TRAP 활성

파골세포가 골 흡수작용을 할 때 TRAP 효소의 분비가 증가되고 ATP, nitrophenyl phosphate 존재할 때 높은 활성을 가지는

Table 3. TRAP activity of 140 extracts from various natural products on osteoclast differentiation of RAW264.7 cells (Unit: µg/mL)

TRAP activity (%)*				TRAP activity (%)				TRAP activity (%)				TRAP activity (%)			
Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations		
	1000	300	100		1000	300	100		1000	300	100		1000	300	100
1	+3	+3	+3	36	0	-2	0	71	+1	-1	-2	106	+3	+3	+3
2	+3	+3	+3	37	+3	+2	+1	72	+3	+3	+3	107	+3	+3	+2
3	+3	+3	+3	38	+3	0	-1	73	+3	+3	0	108	+2	-1	-1
4	+3	0	-2	39	+3	+3	+3	74	+3	+3	+2	109	+3	+3	0
5	+3	0	0	40	+3	+3	+3	75	+3	+3	+2	110	+3	+2	0
6	+3	+3	+3	41	+3	+3	+3	76	+3	+3	+1	111	+3	+3	+3
7	+3	+3	+2	42	+3	+3	+3	77	+2	0	-2	112	+3	+1	0
8	+3	+2	+2	43	+3	+3	+3	78	+3	+3	0	113	+3	+3	+2
9	+3	+3	+3	44	+3	0	-1	79	+3	+3	+3	114	+3	+3	+3
10	+3	0	0	45	0	-1	-1	80	+3	+2	0	115	+3	0	0
11	+3	+1	0	46	+3	+3	+1	81	+3	+2	0	116	+3	+1	-1
12	+1	-1	-2	47	+3	+2	+1	82	+3	+3	+3	117	0	-1	-1
13	+3	+3	+3	48	+3	+3	+2	83	+3	+3	+3	118	+3	+3	+2
14	+3	+2	0	49	+3	+3	+3	84	-1	-2	-1	119	+3	0	-1
15	+2	+2	+1	50	+3	+3	+3	85	-2	-1	-1	120	+3	+2	-1
16	+3	+3	+3	51	+3	+2	+2	86	+3	+3	+2	121	+3	+2	+1
17	+3	0	0	52	+3	+3	+2	87	+3	+3	0	122	0	-1	0
18	+3	+2	+1	53	+3	+2	0	88	+3	+3	+3	123	0	-1	0
19	+3	+3	+1	54	+3	+3	+2	89	+3	+3	+3	124	+3	+3	+3
20	+3	+3	+2	55	+3	+3	+1	90	+3	+3	+3	125	+3	0	0
21	+3	+3	+3	56	+3	+3	+2	91	+3	+3	+3	126	+2	0	-1
22	+3	+3	+1	57	+2	+2	+1	92	+3	+3	+3	127	-1	-1	-1
23	+3	+3	+1	58	+2	-1	-2	93	+3	+3	+3	128	+3	+3	+3
24	+3	0	-2	59	+3	-1	-2	94	+3	+3	+3	129	+3	+3	+3
25	-1	-2	-2	60	+3	+1	-2	95	+3	+3	+3	130	-1	-1	0
26	+3	+3	+3	61	+3	+2	0	96	+3	+2	+1	131	+3	+3	+2
27	+3	+3	+3	62	+3	+2	0	97	+3	+2	-1	132	0	-1	-1
28	+3	+3	+3	63	+3	+3	+3	98	+3	+3	0	133	+3	0	-1
29	+3	+3	+3	64	+3	+2	0	99	0	-1	-1	134	-1	-1	-1
30	+3	+3	+1	65	+3	+2	0	100	+2	0	-1	135	+2	0	-1
31	-2	-2	-2	66	+3	+3	+1	101	+3	+3	+1	136	+3	+3	+3
32	0	0	0	67	+3	+3	+1	102	+3	0	0	137	+1	0	0
33	+3	+1	-2	68	+3	+3	0	103	+3	+3	+3	138	+2	0	0
34	+2	-2	-2	69	+3	0	-1	104	+3	+3	+3	139	+3	+3	0
35	+3	+3	+2	70	0	-1	-2	105	+3	+3	+3	140	+2	0	0

* -2 > 120%, -1 > 100%, 100% ≥ 0 > 60%, 60% ≤ +1, 30% ≤ +2, 10% ≤ +3.

효소로 파골분화 정도를 측정 할 수 있는 파골세포의 세포 화학적 표지효소(marker enzyme)이다(4). 천연물 추출물 140종으로 TRAP 활성(Table 3)과 RAW264.7 cell에 대한 세포 독성(Table 2)을 측정하여 비교하였다. 물로키야⁷, 쑥갓⁸, 쑥²⁰, 호두²¹, 차조기²⁹, 황금⁷⁸, 고춧가루³⁴, 근대⁴⁰, 피자두⁵², 익모초⁸⁵, 미역취씨⁵⁸ 메탄을 추출물과 복분자²⁷, 배양인삼⁵⁹, 삼백초뿌리⁶⁰ 열수 추출물들을 100 µg/mL 농도로 처리하였을 경우 RAW264.7 cell에서 70% 이상의 생존율을 나타내었고 TRAP 활성도 20% 이하로 감소됨을 보여 파골 분화 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 꿀 질환에 효과 있다고 알려진 홍화인¹²추출물과 비교하여 보았을 때 비슷한 효과를 나타내었다. 그 외 파고지³, 지각¹³, 금령자⁶, 시호⁹, 황연⁶⁹, 배양인삼⁵⁸, 구맥²⁶, 등 대부분의 추출물이 100 µg/mL 농도에서도 높은 세포 독성을 보여서 파골분화 억제 정도를 확인 할 수 없었다. 오미자⁵, 자몽²⁵, 당유자⁴⁹, 레

몬⁵⁰, 청귤⁹⁴, 용안육⁹⁹, 단감¹²⁷, 생대추과육¹⁷, 산귤¹³⁸, 스위티¹², 망고¹⁵, 방울토마토¹³², 오렌지(수입)¹³⁵, 개살구⁷³, 참다래¹²³ 등 여러 과일 메탄을 추출물들은 300 µg/mL의 비교적 높은 농도를 처리 하였을 때도 RAW264.7 cell에 대한 세포독성은 없었으나 90% 이상의 TRAP 활성을 보였고, 그 중 자몽²⁵, 당유자⁴⁹, 레몬⁵⁰, 청귤⁹⁴, 단감¹²⁷, 생대추과육¹⁷, 방울토마토¹³², 오렌지(수입)¹³⁵ 메탄을 추출물 등은 오히려 파골세포 분화를 촉진시켰다.

천연물 추출물 38종의 TRAP 활성

천연물 추출물 140종 중 파골분화를 촉진 시킨 대부분의 과일류와 그 외 파골분화 억제 효과를 보이지 않았던 천연물 추출물을 제외한 38종을 이용하여 파골 분화억제 효과를 검색해 본 결과, Table 4와 같이 금령자⁶, 능이⁴⁸, 황연⁶⁹, 차전자³⁵ 추출물을 제외한 나머지 추출물에서는 대부분 RAW264.7 cell에 독

Table 4. Survival rate of RAW264.7 cells treated with selected 38 extracts from natural products

(Unit: $\mu\text{g/mL}$)

Survival rate (%)*				Survival rate (%)				Survival rate (%)				Survival rate (%)				Survival rate (%)*			
Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations		
	10	3	1		100	30	10		100	30	10		100	30	10				
1	-3	-3	-3	50	0	0	0	95	0	0	0	3	0	0	0	72	-3	-1	+1
2	-1	-0	0	88	+1	+2	0	103	+1	+1	+1	6	-1	-2	-3	79	+1	+1	+2
25	0	0	0	89	0	+1	+1	104	-2	0	0	9	0	0	0	82	+1	+2	0
27	0	0	0	90	+1	+1	0	105	-2	-1	0	13	0	+2	+2	83	-3	-1	0
35	-2	-2	-2	92	-1	0	+1	106	+1	+1	0	20	+2	+2	+2	111	+2	+2	+2
39	0	0	0	93	+1	+2	+1	124	0	0	0	21	+1	+2	+2	114	0	+2	+2
40	0	0	0	94	+1	0	0	129	0	0	0	42	+2	+2	+2	128	-1	0	-1
49	0	+1	0					136	0	0	0	43	+1	+1	+2				

* +2 > 110%, +1 > 100%, 100% \geq 0 > 80%, 80% \leq -1, 70% \leq -2, 60% \leq -3.

Table 5. TRAP activity of selected 38 extracts from various natural products on osteoclast differentiation of RAW264.7 cells

(Unit: $\mu\text{g/mL}$)

TRAP activity (%)*				TRAP activity (%)				TRAP activity (%)				TRAP activity (%)				TRAP activity (%)*			
Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations			Sample No.	Concentrations		
	10	3	1		100	30	10		100	30	10		100	30	10		100	30	10
1	-2	-2	-2	50	-2	-2	-2	95	+3	+2	+2	3	+3	+3	+3	72	+3	+3	-1
2	+3	+2	+1	88	-2	-2	-2	103	-2	-2	-2	6	+3	0	-2	79	+3	0	0
25	-2	-2	-2	89	0	-2	-2	104	-2	-2	-2	9	-2	-2	-2	82	0	0	-2
27	-2	-2	-2	90	-2	-2	-2	105	+3	+3	+3	13	+2	0	-2	83	+3	0	-2
35	-2	-2	-2	92	+3	0	-2	106	-1	-1	0	20	-2	-2	-2	111	+1	0	-2
39	-1	-2	-2	93	-1	-2	-2	124	-2	0	-1	21	+3	+2	+1	114	+2	-2	-2
10	-2	-2	-2	94	-2	-2	-2	129	0	-1	-1	42	+3	+3	0	128	+3	+3	+2
49	-1	0	-2					136	-2	-1	-2	43	+3	+3	+2				

* -2 > 120%, -1 > 100%, 100% \geq 0 > 60%, 60% \leq +1, 30% \leq +2, 10% \leq +3.

성을 보이지 않았다. 천연물 추출물 38종 중 파고지³, 호두²¹, 용안육⁷⁷, 황금⁷⁸, 정공등³⁷ 배탄을 추출물과 생대추과육¹²⁸, 콩나물⁷⁰ 열수 추출물은 비교적 낮은 농도에서도 30% 이하의 TRAP 활성을 보여 파골분화 억제 효과가 우수하게 나타났다 (Table 5). 이 중 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 파골분화 억제 효과가 가장 좋았던 천연물은 전통 한약재인 황금⁷⁸ 배탄을 추출물과 과일류인 생대추과육¹²⁸ 열수 추출물임을 확인하였고, 파골분화 억제 효과가 우수하다고 알려진 홍화인²의 열수 추출물 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서의 21% TRAP 활성과 비교하여 보았을 때도 그 활성이 크게 차이하지 않았다. 이러한 결과는 Kim 등(15)이 단삼 추출물에서 분리 정제한 Tanshinone IIA의 20, 10, 5 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 0, 7, 21%의 TRAP 활성을 나타낸 보고와, Park 등(16)이 등대풀 추출물에서 분리 정제한 Furosin이 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 20.8% TRAP 활성을 보인 결과와 비슷한 경향이었다.

파골세포의 형태학적 변화

파골세포는 골 내막에 위치하며 골 조직에 존재하는 유일한 다핵세포로, RANKL에 의해 분화 초기에는 다핵의 전 파골세포를 형성하지만 세포가 융합되어 다핵의 성숙 파골세포로 분화되면 골 표면에 흡착하여 주름막을 형성하는 특징을 가진다 (4). TRAP 염색은 기질인 naphthol AS-MX phosphate와의 반응 산물을 fast red violet LB로 염색하여 확인하는 방법으로 다핵의 파골세포를 관찰하고 hoechst 염색으로 성숙한 파골세포의 actin ring을 관찰함으로써 파골세포의 분화정도를 알 수 있다.

파골세포 분화인자와 함께 천연물 추출물 중 가장 효과가 좋았던 황금⁷⁸ 배탄을 추출물과 생대추과육¹²⁸ 열수 추출물을 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 파골세포 분화 정도를 TRAP과 hoechst 염색으로 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군에 비해 천연물 추출물을 처리한 경우에 다핵의 actin ring들이 많이 형성되지 않아 파골분화가 억제되었음을 관찰 할 수 있었다.

이처럼 파골분화 억제 효과가 우수하게 나타난 황금⁷⁸과 생대추과육¹²⁸는 예로부터 여러 가지 약리 효과가 보고되어 왔다. 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi.)은 고지혈증과 동맥경화증의 예방 및 항염증 작용, 항균작용, 이노작용이나 항바이러스 효과 등이 밝혀졌다(17-18). 이러한 약리작용을 나타내는 황금의 주요 성분은 플라보노이드류인 baicaline, baicalein wogonin, ascorbic acid 등이고 이들 물질들에 의한 항염증작용 및 항산화 작용에 대한 보고들이 있다(17-20). 또한 대추(*Zizyphus Jujuba* Miller var.)는 소화완화, 강장, 항 알레르기, 간 보호 작용이 있으며(22) 그 밖에 대장암과 같은 성인병예방, 결핵, 기관지염 및 신경쇠약 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다(23-25). 대추에는 당질과 ascorbic acid가 다량 함유되어 있고, 약용성분으로는 과일 중 각종 sterols, alkaloids, saponins, vitamins, 유기산류, amino산류 등이 보고되어 있다(26-28). 폴리페놀류들이 파골분화 및 기능에 미치는 영향에 대한 연구들은 많이 알려져 있는데, 콩으로부터 분리한 genistein 및 daidzein과 같은 flavonoid류의 골다공증 치료와 파골세포 분화 억제효과(29-31), 그리고 quercetin, kaempferol 뿐만 아니라 야채나 와인,

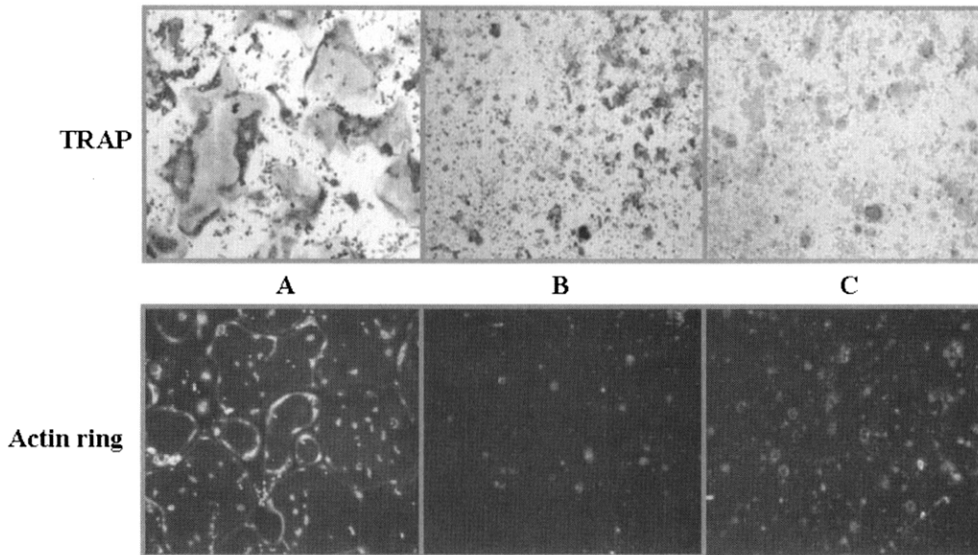


Fig. 1. Inhibition effects of natural products (20 $\mu\text{g/mL}$) on osteoclast differentiation.

A: Control, B: *Scutellaria baicalensis* Georgi., C: *Zizyphus jujuba* Miller var.

녹차에서 분리한(-)epigallocatechin-gallate(EGCG)와 같은 tannin 류 등이 성숙 파골세포의 apoptosis를 유도한다는 보고(10,32) 등이 밝혀지고 있어 본 실험에서 사용된 황금이나 대추의 추출물에 함유되어 있는 폴리페놀성 물질이 파골세포의 분화를 억제시킨 것으로 생각된다. Woo 등(33)은 파골분화 및 기능에 있어서 free radical, 즉 ROS를 비롯하여 NO는 골흡수와 골형성 과정에 있어서 osteotropic factor들과 상호작용을 한다고 보고하였고, Hall 등(34)은 ROS가 파골세포에 의한 골 흡수 과정에 직접적으로 관여하지는 않지만, 골 흡수 과정에 앞서 파골세포의 활성화 또는 생성에 관여하는 것으로 보고하였다. 이러한 결과들로 미루어 보아 파골세포의 분화 및 기능 억제능은 항산화능과 깊은 상관관계가 있으며, 따라서 천연물 중에 존재하는 폴리페놀 물질과도 깊은 상관관계가 있는 것으로 사료된다.

그러므로 폴리페놀이나 플라보노이드가 많이 함유된 황금⁷⁸과 생대추과육¹²⁸ 추출물은 파골세포의 분화억제 뿐만 아니라 성숙파골세포의 기능도 억제 할 것이라 판단된다. 이에 황금⁷⁸과 생대추과육¹²⁸의 성분분석을 통한 파골세포의 분화 및 성숙 파골세포의 기능 억제에 관한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

여러 천연물 추출물 140종의 파골세포 분화억제효과 검색은 파골세포의 마커 enzyme인 TRAP활성으로 확인하였다. 그 결과 파고지³, 지각¹³, 금령자⁶, 시호⁹, 황연⁶⁹, 배양인삼⁹⁸, 구맥²⁶, 등 대부분의 추출물이 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도 이상에서는 높은 세포 독성을 보여서 파골분화 억제 정도를 확인 할 수 없었고 세포독성이 없는 농도를 선정하여 파골세포 분화억제 정도를 재검색한 결과는 천연물 중 파고지³, 호두²¹, 용안육씨⁷⁷, 황금⁷⁸, 정공등³⁷ 메탄올 추출물과 생대추과육¹²⁸, 콩나물⁷⁰ 열수 추출물은 비교적 낮은 농도에서도 30% 이하의 TRAP 활성을 보여 파골분화 억제 효과가 우수하게 나타났다. 이 중 전통 한약제인 황금⁷⁸ 메탄올 추출물과 과일류인 생대추과육¹²⁸ 열수 추출물이 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서도 가장 좋은 파골분화 억제 효과가 나타났다.

감사의 글

본 연구는 한국산업기술재단 지역혁신인력양성사업 및 산업자원부 지정 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

- Hwang KK, Huh NK, Lee JH. Studies on the signaling molecules in RANK, an osteoclast differentiation receptor. *Oral Biol. Res.* 24: 245-254 (2000)
- Grigoriades AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266: 443-448 (1994)
- Togari A, Arakawa S, Arai M, Matsumoto S. Alteration of in vitro bone metabolism and tooth formation by zinc. *Gene Pharmacol.* 24: 1133-1140 (1993)
- Mok SK, Shin HS. The effects of prostaglandine and dibutyryl cAMP on osteoblastic cell activity and osteoclast generation. *J. Wonkwang Dental Res. Int.* 6: 43-62 (1996)
- Parfitt AM. Bone remodeling: relationship to the amount and structure of bone the pathogenesis and prevention of fractures. In: Riggs LB.: L.J Melton eds. *Osteoporosis, cetiology, diagnosis and management.* Reven press, New York, NY, USA. pp. 45-93 (1988)
- Oh HJ. Therapy of osteoporosis in climacteric. *J. Korean Acad. Fam. Med.* 21: 20-27
- Pole HA, Felsenberg D, Hanley DA, Stenpan J, Munoz-Torres M, Wolkins TJ, Qui-sheng G, Galich M, Vandormael K, Yates AJ. Multinational placebo-controlled, randomised trial of the effects of Alendronate on Bone density and fracture risk in postmenopausal women with low bone mass: Results of the FOSIT. *Osteoporosis Int.* 9: 461-468 (1999)
- Aldercreutz H, Mazur W. Phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Nutr. Soc.* 55: 399-417 (1996)
- Boonen A, Broos P, Dequeker J. The prevention of treatment of age-related osteoporosis in the elderly by systemic recombinant growth factor therapy (rhIGF-I or rhRGF- β): a perspective. *J. Intl. Med.* 242: 285-290 (1997)
- Wattel A, Kamel S, Mentaverri R, Lorget F, Prouillet C, Petit JP, Fardelonne P, Brazier M. Potent inhibitory effect of naturally

- occurring cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292: 94-101 (2002)
11. Lee YS. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoclast-like cells. *Korean Soybean Digest* 18: 35-42 (2001)
 12. Lee DS, Byun SY. Effects of the dietary mixture of *eucommia ulmoides* oliver on osteoporosis. *Korean J. Biotechnol. Biol.* 16: 614-619 (2001)
 13. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colometric assay for cell viability : Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Meth.* 70: 257 (1984)
 14. Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo KI, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW 264.7 cells into Osteoclast-like cells. *J. Biol. Chem.* 277: 47366-47372 (2002)
 15. Kim HH, Kim JH, Kwak HB, Huang H, Han SH, Ha HI, Lee SW, Woo ER, Lee ZH. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by transhinone IIA isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Biochem. Pharmacol.* 67: 1647-1656 (2004)
 16. Park EK, Kim MS, Lee SH, Kim KH, Park JY, Kim TH, Lee IS, Woo JT, Jung JC, Shin HI, Choi JY, Kim SY. Furosin, an ellagitannin, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and function through inhibition of MAP kinase activation and actin ring formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325: 1472-1480 (2004)
 17. Bochorakova H, Paulova H, Slanina J, Musil P, Taborska E. Main flavonoids in the root of *Scutellaria baicalensis* cultivated in Europe and their comparative antiradical properties. *Phytother. Res.* 17: 640-644 (2003)
 18. Huang Y, Tsang SY, Tao X, Lau CW, Su YL, Chen ZY. Baicalin-induced vascular response in rat mesenteric artery: role of endothelial nitric oxide. *Clin. Exp. Pharmacol.* 29: 721-724 (2002)
 19. Chi TS, Lim H, Park H, Kim HP. Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: *in vivo* regulation of inflammation-associated gene expression. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1271-1278 (2003)
 20. Ciesielska E, Gwardys A, Metodiewa D. Anticancer, antiradical and antioxidative actions of novel Antoksyd S and its major components, baicalin and baicalein. *Anticancer Res.* 22: 2885-2891 (2002)
 21. Ye F, Xui L, Zhang W, Zhang DY. Anticancer activity of *Scutellaria baicalensis* and its potential mechanism. *J. Altern. Complement Med.* 8: 567-572 (2002)
 22. Yuk CS, Sim JL, Lu GO, Kim HG, Nam JY. *Oriental medicine II*. Kwang-myung publishing Co., Seoul, Korea. p. 394 (1992)
 23. Rhee YK, Kim DH, Han MJ. Inhibitory effect of *Zizyphi fructus* on β -glucuronidase and tryptophanase of human interestinal bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 199-205 (1998)
 24. Na HS, Kim KS, Lee MY. Effect of jujube methanol extract on the hepatotoxicity in CCl₄-treated rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 839-845 (1996)
 25. Lee YG, Cho SY. Effect of jujube methanol extract on benzo(a)pyrene induced hepatotoxicity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 24: 127-132 (1995)
 26. Yook CS. Screening test on the components of the genus *Zizyphus* in Korea (in Korean). *Korean J. Pharmacog.* 3: 27-29 (1972)
 27. Lee SK. Studies on the constituents of the leaves of *Zizyphus jujuba* Mill. Ph. d. Thesis, Pusan National Univ., Seoul, Korea. (1989)
 28. Park MK, Park JH, Shin YG, Cho KII, Han BH, Park MH. Analysis of alkaloids in the seeds of *Zizyphus jujuba* by high performance liquid chromatography. *Arch. Pharm. Res.* 14: 99-102 (1991)
 29. Blair HC, Jordan SE, Peterson TG, Barnes S. Variable effects of tyrosine kinase inhibition on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss on ovariectomized rats. *J. Cell Biochem.* 61: 629-637 (1996)
 30. Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H. Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. *Endocrinol.* 142: 3632-3637 (2001)
 31. Rassi CM, Lieberherr M, Chaumaz G, Pointillart A, Cournot G. Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. *J. Bone Mineral Res.* 17: 630-638 (2002)
 32. Nakagawa H, Wachi M, Woo JT, Kato M, Kasai S, Takahashi F, Lee IS, Nagai K. Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292: 94-101 (2002)
 33. Woo JT, Nakagawa H, Notoya M, Yonezawa T, Udagawa N, Lee IS, Ohnishi M, Hagiwara H, Nagai K. Quercetin suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation and activation of osteoclasts. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 504-509 (2004)
 34. Hall TJ, Achaeublin M, Jeker H, Fuller K, Chambers TJ. The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207: 280-287 (1995)

(2005년 10월 7일 접수; 2005년 11월 17일 채택)