

실크피브로인을 처리한 MC3T3-E1 조골세포 조건배양액의 파골세포 분화억제효과

여주홍^{2*} · 박경호^{1*} · 주원철¹ · 이진아¹ · 이광길² · 우순옥² · 한상미² · 권해용² · 김성수³ · 조윤희^{1†}

¹경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과

²농촌진흥청 농업생물부

³중앙대학교 의과대학 해부학교실

Inhibitory Effect of Conditioned Medium of Silk Fibroin-Treated Osteoblasts in Osteoclast Differentiation

Joo-Hong Yeo^{2*}, Kyung-Ho Park^{1*}, Won-Chul Ju¹, Jinah Lee¹, Kwang-Gill Lee²,
Soon-Ok Woo², Sang-Mi Han², HaeYong Kweon², Sung-Su Kim³, and Yunhi Cho^{1†}

¹Dept. of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science,
Kyung Hee University, Yong-in 446-701, Korea

²Dept. of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology,
Suwon 441-100, Korea

³Dept. of Anatomy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract

In this study, we investigated the indirect effect of silk-fibroin on osteoclastic differentiation of RAW264.7 cells. The conditioned medium were collected from MC3T3-E1 osbeoblasts treated with 0.001 mg/mL~0.1 mg/mL silk fibroin for 6 days, mixed in 1:1 ratio with osteoclast medium, and then added into RAW264.7 cells with receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), a differentiation inducer for 3 days. Of osteoclastic cytokines in the conditioned medium, the protein expression of osteoprotegerin (OPG) with silk-fibroin was not significantly different. However, the protein expression of interleukin (IL)-1 β was specifically lower in a dose dependent manner. In RAW264.7 cells, the conditioned medium with silk-fibroin inhibited RANKL induced osteoclastic differentiation as total number of multinucleated tartrate-resistant alkaline phosphatase (TRAP)-positive osteoclasts in a dose dependent manner. Taken together, we demonstrated that the conditioned medium of silk-fibroin treated osteoblasts inhibits RANKL induced differentiation of osteoclasts with inhibiting selective expression of IL-1 β .

Key words: silk-fibroin, conditioned medium, osteoprotegerin, interleukin-1 β , osteoclastic differentiation

서 론

일생을 두고 지속적으로 일어나는 골 재형성(bone remodeling) 과정은 골 형성에 관여하는 조골세포(osteoblast)와 골 흡수에 관여하는 파골세포(osteoclast)가 관여한다(1). 최근 여러 사전연구에서 조골세포가 파골세포의 분화 및 성숙을 조절할 수 있다고 보고하였다(2). 조골세포에서 발현되는 tumor necrosis factor(TNF) superfamily member인 receptor activator of nuclear factor κ B ligand(RANKL)는 파골세포로의 분화 및 성숙을 조절하는 주요인자이다(3,4). 조골세포에서 파골세포로의 분화는 RANKL과 파골전구세포에서 발현되는 RANKL의 수용체인 receptor activator of nuclear factor κ B(RANK)와 결합 후 일어난다. 이 과정에는

조골세포에서 생성되어 분비되는 다양한 국소인자(interleukin(IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor(TNF)- α , macrophage colony stimulating factor(MCS-F))가 관여한다(5-8). 특히, IL-1 β 는 파골세포를 자극하여 골 흡수에 관여하는 강력한 인자로 알려져 있다(9). 최근 조골세포에서 분비되는 새로운 국소인자로서 osteoprotegerin(OPG)이 발견되었는데, 이는 RANKL과 직접 결합함으로써 RANKL과 RANK의 결합을 억제하여 파골세포로의 분화를 저해할 수 있는 것으로 보고되었다(10). 이는 조골세포에서 분비되는 OPG를 비롯한 여러 국소인자의 발현조절을 통해 파골세포로의 분화를 조절할 수 있는 것으로 간주되고 있다.

조골세포에 의한 골 형성이 감소하고 파골세포로 인한 골 흡수 증가 시 골다공증이 유발되는데, 특히 폐경기 여성에게

*J. Y. and K. P. contributed equally to this study.

†Corresponding author. E-mail: choyunhi@khu.ac.kr
Phone: 82-31-201-3819, Fax: 82-31-201-3819

서 그 위험성이 보고되었다(11). 그 치료법은 에스트로겐 투여가 기본적으로 사용되고 있다(12). 이 치료법은 폐경기간이나 나이에 관계없이 골량 증가의 효과가 있고 척추 및 고관절 골절의 예방효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다. 그러나 장기적인 에스트로겐의 사용은 오심, 두통, 체중증가, 유방통, 자궁출혈 등의 부작용을 비롯한 자궁 내막 암 및 유방암 발생을 초래함이 보고되어 장기적인 사용은 기피하는 실정이다(13-15). 최근 이러한 부작용을 보완할 수 있는 식품 및 천연물의 활성 성분을 이용한 대체요법이 필요한 실정이다. 특히, 골 재형성 과정 중에 조골세포에서 분비되어 파골세포 분화에 영향을 미치는 국소인자를 조절할 수 있는 기능성 소재개발이 중요할 것으로 여겨진다.

골 형성촉진 및 골 흡수 억제를 위한 여러 기능성 소재 중 누에고치에서 만들어지는 다양한 형태의 실크 단백질이 일부 이용되고 있다(16). 이 실크단백질은 성질이 전혀 다른 단백질인 세리신과 피브로인이 각각 25%와 75%로 구성되어 있으며 물을 포함한 대부분의 용매에 쉽게 녹는 특성이 있고, 인체 친화적 소재로 알려져 있다. 이런 실크단백질을 이용하여 콜라겐을 생성 촉진(17), 상처치유(18), 유해 활성산소를 억제효과(19)와 더불어 최근에는 인지 및 기억력 향상에 관여(20)한다는 연구가 보고되었다. 또한 다양한 형태의 실크피브로인의 처리가 조골세포에서 integrin의 발현증가를 비롯한 일부 기전연구가 보고되어있다(21). 그러나 골 다공증의 위험은 조골세포에 의한 골 형성보다는 파골세포에 의한 골 흡수증가에 더욱 기인하며, 조골세포에서 분비되는 여러 국소인자가 파골세포로의 분화를 조절한다는 보고에 근거하여 파골세포로의 분화에 있어 조골세포에 의한 간접적인 효과를 살펴보는 것은 매우 중요하다고 여겨진다.

이에 본 연구에서는 실크피브로인을 처리한 MC3T3-E1 조골세포 조건배양액에서 파골세포분화관련 국소인자 중 IL-1 β 및 OPG의 발현 변화를 살펴보고, 조골세포 조건배양액을 RAW264.7 파골전구세포에 처리 시 파골세포로의 분화를 억제하는지를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에 사용한 RAW264.7 세포와 MC3T3-E1 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 분양받아 본 연구실에서 계대 배양하여 사용하였다. α -Minimal essential medium(α -MEM), penicillin-streptomycin(5000 U/mL penicillin; 5000 μ g/mL streptomycin) 및 fetal bovine serum(FBS)는 Gibco@사(CA, USA)에서 구입하였다. Recombinant murine sRANKL은 Peprotech Asia Inc.(NJ, USA)로부터 구입하였고, 비타민 C(ascorbic acid)와 β -glycerophosphate는 Sigma Chemical Co.(MO, USA)로부터 구입하였다. 그리고 1차 항체(anti-rabbit IL-1 β , anti-

goat OPG)는 Abcam(MA, USA)에서 구입하였다. 그 외 다른 시약은 (주)KDR에서 구입하여 별다른 정제과정 없이 그대로 사용하였다.

실크피브로인 시료 준비

누에고치는 가잠(*Bombyx mori*)을 상업으로 사육하여 얻은 누에고치를 정련하여 준비하였다. 실크피브로인은 정련 과정에 의해 추출되었는데, 먼저 누에고치에 30배량의 물을 첨가하고 110°C에서 5시간 가열한 후 필터링(Whatman No. 2 paper)을 하여 잔유물을 제거하였다. 이후 Madyarov 등(22)의 방법에 따라 제조하였다. 이 용액을 Sephadex G-25 gel filtration chromatography(Pharmacia, GradiFrac, UV-1 detection, Sweden) 장치를 이용하여 피브로인과 염을 완전히 분리하였으며, 분리된 피브로인용액에 3%(v/v)의 단백질분해효소(Nove, Denmark)를 첨가하여 질소가스 충전 조건 및 55°C에서 24시간 가수분해하고, 100°C에서 5분간 효소의 불활성 처리를 한 후, 필터링(0.45 μ m, Sartorius, Germany)을 하여 잔유물을 제거한 후 평균분자량(Mw)이 1500 내외인 실크피브로인을 얻었다. 분자량은 gel permeation chromatography(GPC) 장치(Viskotec, USA)를 이용하였으며, 0.2 N NaOH를 완충용액으로 사용하여 refractive index(RI)로 환산하였다. 이러한 과정을 거쳐 얻어진 피브로인은 -5°C 내외를 유지하는 감압건조장치(삼원냉열사, model: Vacuum Freeze Dryer)를 이용하여 수용성 분말의 형태로 얻었다(22).

조골세포와 파골세포 기본배양 및 분화

MC3T3-E1 조골전구세포와 RAW264.7 파골전구세포는 polystyrene 세포배양접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution(Gibco, USA)과 10% FBS(Gibco, USA)를 첨가한 α -MEM(Gibco, USA) 및 DMEM(ATCC, USA)을 각각 사용하여 5% CO₂와 95% 습도가 유지되는 37°C incubator에서 기본배양하였다(23). MC3T3-E1 세포의 조골세포로의 분화는 이들 세포가 단층을 형성한 후 50 μ g/mL 비타민 C(ascorbic acid)와 10 mM β -glycerophosphate처리에 의해 유도하였으며(24), RAW264.7 세포의 파골세포로의 분화는 30 ng/mL recombinant murine RANKL 처리에 의해 유도하였다(25).

파골세포 분화정도 확인

파골세포의 분화정도를 Hotokezaka 등(26)의 방법에 따라 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 염색으로 확인하였다. RAW264.7 파골전구세포를 1 \times 10⁴ cell/well 분주하고 30 ng/mL recombinant murine RANKL 및 실크피브로인을 처리한 조골세포 조건배양액을 처리하여 3일간 배양하였다. 이후, 배지를 제거하여 citrate-acetone 및 formaldehyde 혼합 용액으로 고정한 세포에 기질용액(1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50 mM citrate 완충용액(PH 4.6))을 100 μ L/well 분주

하여 37°C에서 30분 반응시킨 후 현미경으로 분화된 파골세포를 관찰하였다.

파골세포 분화관련 국소인자의 단백질 발현

조골세포에서 합성된 후 분비되어 파골세포에 영향을 미치는 국소인자(IL-1 β , OPG)의 단백질수준의 발현을 조골세포 조건배양액에서 western blotting에 의해 확인하였다. 실크피브로인을 처리한 조골세포 조건배양액을 3일간 처리한 파골세포에 1 mL의 RIPA buffer(20 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM NaPO₄, 10% glycerol, 100 M Na₃VO₄, 100 M ammonium molybdate, 1% NP-40, 0.1% SDS)를 첨가한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 5초 동안 세포벽을 파괴시킨 다음 16시간 동안 -20°C에서 보관하였다. 해동 후 그 균질액을 1500 \times g에서 20분간 원심분리 하여 상층액을 단백질을 추출액으로 준비하였다. 정량된 단백질을 10% polyacrylamide/SDS gel에서 전기영동 시킨 후 Hybond ECL nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. 각각의 1차 항체는 5% skim milk, 0.1% Tween 20을 함유한 PBST에 희석시켜서 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후, 0.01% Tween-20을 함유한 PBS로 3차례 세척하였다. Blocking solution으로 1:10000배로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti-IgG 이차항체와 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.1% Tween-20을 함유한 PBS로 3차례 세척하고 발색은 ECL heperfilm으로 확인하였고(27) imaging densitometer (model GS-700, BIO-RAD, USA)를 사용하여 정량하였다.

통계분석

실험 결과의 자료는 SPSS(Ver 12.0 program Statistical package for social science)을 이용하여 통계처리 하였다. 결과는 각 군별 평균과 표준오차로 나타내었고 각 실험군

간의 비교는 one way ANOVA로 분석한 후 general linear model(GLM) test로 p<0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

파골세포 분화정도 확인(Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Staining: TRAP 염색)

RAW264.7 파골전구세포에 기존의 분화유도인자(28)인 RANKL 및 실크피브로인을 처리한 조골세포 조건배양액(conditioned medium: CM)이 파골세포 분화에 미치는 효과를 TRAP염색을 통해 확인하여 Fig. 1에 나타내었다. TRAP 효소의 활성은 파골세포가 골 흡수 작용을 할 때 증가되는 것으로 보고(29)되었는데, 파골세포는 골 내막에 위치하며 골 조직에 존재하는 유일한 다핵세포로서 RANKL에 의한 분화초기에는 단핵의 전구세포를 형성하지만 세포가 융합되어 다핵의 성숙 파골세포로 분화되면 골 표면에 부착하여 주름막을 형성하여 TRAP 염색 시 보라색으로 염색되는 특징을 가진다(30). 본 연구에서 30 ng/mL 농도의 RANKL 처리에 의해 파골세포로 분화된 RAW264.7세포(양성대조군: +RANKL, Fig. 1A)에서는 파골세포의 특징인 다핵이 관찰되었으며, 주름막을 형성하여 파골세포의 화학적 표지효소(marker enzyme)인 TRAP 염색 시 보라색으로 염색되었다. 그러나 RANKL처리를 하지 않은 일반 RAW264.7 세포(음성대조군: -RANKL, Fig. 1B)는 파골세포의 특징인 다핵과 주름막을 형성하지 않았다. 이는 여러 사전연구(31,32)와 일치하는 결과로서 RANKL은 파골세포 분화에 필수물질임을 확인하였다. RANKL처리에 의한 파골세포 분화와 함께 농도별(0.001 mg/mL~0.1 mg/mL) 실크피브로인을 처리한 조골세포 조건배양액(CM) 처리 시 파골세포 분화는 농도

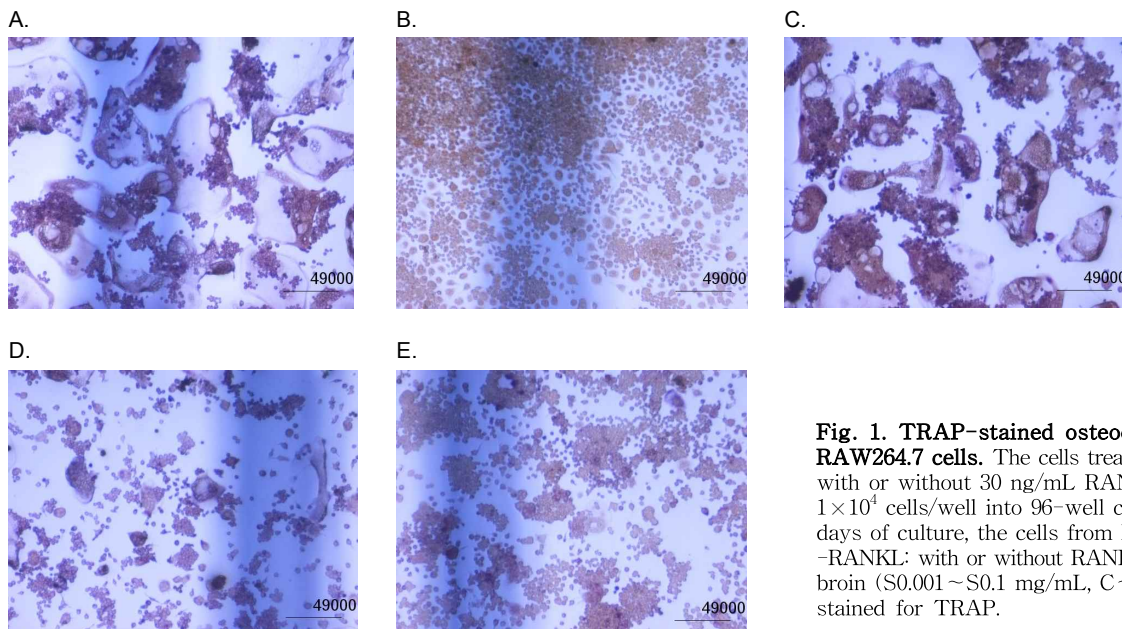


Fig. 1. TRAP-stained osteoclast-like cells in RAW264.7 cells. The cells treated with silk-fibroin with or without 30 ng/mL RANKL were plated at 1×10^4 cells/well into 96-well culture dish. After 3 days of culture, the cells from RANKL (+RANKL, -RANKL: with or without RANKL, A, B) or silk-fibroin (S0.001~S0.1 mg/mL, C~E) were fixed and stained for TRAP.

의존적으로 현저히 억제되었다. 즉, 0.001 mg/mL 실크피브로인을 처리한 CM처리 시 +RANKL(양성대조군) 수준의 TRAP 염색된 세포가 관찰되었으나(Fig. 1C), 0.1 mg/mL 실크피브로인 처리한 CM처리 시에는 파골세포의 특징인 주름막 형성 및 TRAP에 의해 보라색으로 염색되는 세포가 음성대조군(-RANKL) 수준이었다(Fig. 1E). 그러나, 0.01 mg/mL 실크피브로인을 처리한 CM처리 시 양성대조군(+RANKL)에 비해서 TRAP 염색된 파골세포수가 감소하였으나, 주름막을 형성하고 다수의 TRAP 염색된 세포가 관찰되어 파골세포분화 억제 효과가 실크피브로인 0.1 mg/mL 처리에 비해서는 미비하였다(Fig. 1D). 이는 세포독성을 나타내지 않는 농도 내에서 특히, 실크피브로인 0.1 mg/mL 처리 시 파골세포로의 분화를 현저히 억제 할 수 있음을 의미한다.

조골세포 조건배양액에서 osteoprotegerin(OPG)의 단백질 발현

조골세포 조건배양액에서 osteoprotegerin(OPG)의 단백질 수준 발현을 조골세포로 분화 유도된 양성대조군(positive control: +C)을 기준으로 % control로 나타내어 Fig. 2에 나타내었다. 조골세포로 분화하지 않은 음성대조군(negative control: -C)의 OPG 발현은 vitamin C와 β -glycerophosphate 처리에 의해 조골세포로 분화 유도된 양성대조군(+C)의 9.8% 수준으로 현저히 낮았다. 조골세포로의 분화 유도와 함께 실크피브로인 0.001 mg/mL, 0.01 mg/mL 및 0.1 mg/mL 처리 시 OPG 발현은 각각 86%, 76%, 100%로 +C와 유의적 차이가 없었다. OPG는 조골세포에서 생성, 분비되는

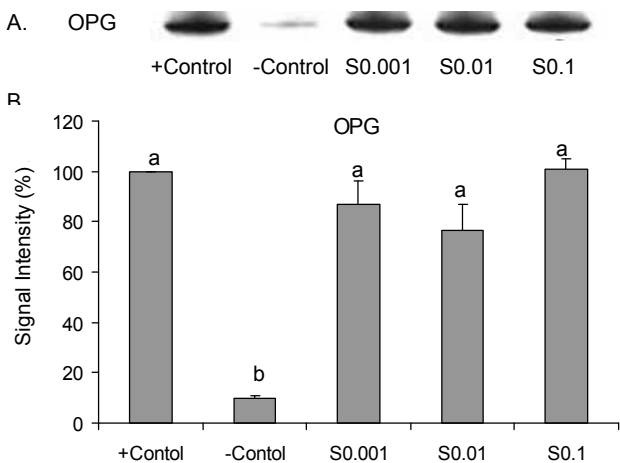


Fig. 2. Representative expression of osteoprotegerin in conditioned medium of MC3T3-E1 cells treated with silk-fibroin. A: Protein extracts (25 μ g/lane) from positive control (+C), negative control (-C), silk-fibroin (0.001~0.1 mg/mL) treated MC3T3-E1 cells were subjected to 10~12% SDS-PAGE and immunoblotting with OPG (abcam Inc.). The region of each gel shown was 48 kDa (OPG) prestained molecular markers. B: The signal intensities from multiple experiments of A were quantified and the integrated areas were normalized to the signal observed in positive control cells (100%). Values are mean \pm SD. Means with different letters differ p <0.05.

RANKL의 수용성 유도인자로서, RANKL과 RANK의 결합을 저해하여 조골세포에서 파골세포로의 분화를 억제하는 주요 인자로 알려져 있다(10). 그러나 본 연구에서 농도별 실크피브로인 처리 시 OPG의 발현 증가에 영향을 미치지 않는 것으로 생각되어진다.

조골세포 조건배양액에서 interleukin(IL)-1 β 의 단백질 발현

조골세포에서 생성, 분비되어 파골세포 분화억제에 관여하는 IL-1 β 의 단백질수준의 발현을 양성대조군(+C)을 기준하여 % control로 나타내어 Fig. 3에 나타내었다. IL-1 β 는 조골세포에서 생성, 분비되어 파골세포분화를 촉진하는 주요 인자로 알려져 있다(33). 조골세포로 분화되지 않은 MC3T3-E1세포(음성대조군, -C)의 IL-1 β 발현은 조골세포로 분화된 MC3T3-E1세포(+C)에 비해 유의적으로 낮았다. 조골세포의 분화 유도와 함께 실크피브로인 0.001 mg/mL 및 0.01 mg/mL 처리 시 그 발현은 각각 191%, 127% 증가한 반면, 0.1 mg/mL 처리 시 양성대조군(+C)의 1.8% 수준으로 그 발현을 현저히 억제하였다. 실크피브로인 0.001 mg/mL~0.01 mg/mL 처리 시 파골세포 분화억제에 관여하는 OPG의 발현은 양성대조군(+C) 및 실크피브로인 0.1 mg/mL 처리 시와 유사한 수준이나, 파골세포 분화를 강력히 유도하는 IL-1 β 의 발현이 현저히 높아 파골세포로의 분화를 억제하지 못한 것으로 사료된다. 그러나 실크피브로인 0.1 mg/mL 처리 시 파골세포분화 억제에 관여하는 OPG의 발현은 양성대조군(+C) 수준이상으로 그 발현 증가를 나타

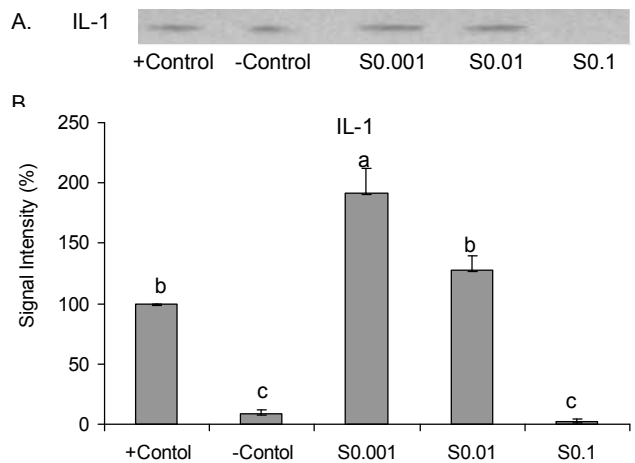


Fig. 3. Representative expression of IL-1 β in conditioned medium of MC3T3-E1 cells treated with silk-fibroin. A: Protein extracts (25 μ g/lane) from positive control (+control), negative control (-control), silk-fibroin (0.001~0.1 mg/mL) treated MC3T3-E1 cells were subjected to 10~12% SDS-PAGE and immunoblotting with IL-1 β (abcam Inc.). The region of each gel shown was 31 kDa (IL-1 β) prestained molecular markers. B: The signal intensities from multiple experiments of A were quantified and the integrated areas were normalized to the signal observed in positive control cells (100%). Values are mean \pm SD. Means with different letters differ p <0.05.

내지 않았지만, IL-1 β 의 발현을 음성대조군(-C) 수준으로 현저히 억제하여 파골세포로의 분화를 억제한 것으로 생각되어진다. 이는 OPG 발현증가에 의한 효과가 아닌 IL-1 β 의 발현 억제에 기인함을 의미한다. 최근 사전연구에서 nitric oxide synthase(NOS)가 조골세포에서 발현되며 NOS에 의해 생성된 nitric oxide(NO)가 골 대사에 중요한 역할을 할 수 있음을 보고하였다(34). NOS는 endothelial NOS(eNOS), neuronal NOS(nNOS) 및 inducible NOS(iNOS) 등의 세 가지 형태로 구분된다. 이중 특히, iNOS는 macrophage에서 IL-1 β 를 포함한 cytokines에 대응한 NO생성을 유도하여 골세포 관련 유전자 발현을 전사단계에서 조절한다고 알려져 있다(35). 이는 본 연구에서 실크피브로인 처리에 의해 야기된 IL-1 β 의 발현 변화가 iNOS 및 NO 생성에 의해 파골세포 분화 억제에 관여하였는지는 알 수 없으나, 그 가능성을 제시하고 추후 연구에서 관련 기전연구가 필요할 것으로 생각되어진다.

요 약

본 연구는 MC3T3-E1 조골전구세포에 실크피브로인 처리 시 파골세포분화 관련 국소인자 중 파골세포로의 분화를 강력히 유도하는 IL-1 β 의 발현 및 파골세포로의 분화억제에 관여하는 국소인자인 OPG의 발현변화를 조골세포 조건배양액에서 살펴보고, 이 조골세포 조건배양액을 RAW264.7 파골전구세포에 처리 시 파골세포로의 분화를 억제하는지를 알아보았다. 조골세포 조건배양액에서 OPG의 발현은 농도별(0.001 mg/mL~0.1 mg/mL) 실크피브로인 처리 시 86%~100%로 양성대조군(+C)과 유의적 차이가 없었다. 그러나 IL-1 β 의 발현은 0.1 mg/mL 실크피브로인 처리 시 양성대조군(+C)의 1.8% 수준으로 그 발현을 현저히 억제 하였다. 조골세포조건배양액을 처리한 RAW264.7 세포의 파골세포로의 분화정도는 농도 의존적으로 현저히 감소하였다. 특히, 0.1 mg/mL의 실크피브로인을 처리한 조골세포 조건배양액 처리 시 파골세포로 분화하지 않은 음성대조군(-RANKL) 수준으로 파골세포 분화를 현저히 억제한 것은 OPG의 발현 증가가 아닌 IL-1 β 의 발현 억제에 의한 것으로 사료되며, 추후 연구를 통해 관련 기전의 연구가 필요할 것으로 생각되어진다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업의 지원(과제번호: 20080401034034)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Parfitt AM. 1994. Osteonal and hemi-osteonal remodeling:

- The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55: 273-286.
2. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. 1998. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 13: 793-802.
 3. Udagawa N, Takakashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T. 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7260-7264.
 4. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. 2001. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κ B ligand in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44: 253-259.
 5. Kuroiuchi K, Kambe F, Yasukawa K, Izumi R, Ishiguro N, Iwata H. 1998. TNF- α increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NK- κ B in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *J Bone Miner Res* 13: 1290-1299.
 6. Chaudhary LR, Spelsber TC, Riffs BL. 1992. Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : lack of regulation by 17 β -estradiol. *Endocrinology* 130: 2528-2534.
 7. Smith DD, Gowen M, Mundy GR. 1987. Effects of interferon- γ and other cytokines in collagen synthesis in fetal rat bone cultures. *Endocrinology* 120: 2494-2499.
 8. Jilka RL. 1998. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 23: 75-81.
 9. Keeting PE, Rifas L, Harris SA, Colvard DS, Spelsberg TC, Peck WA. 1991. Evidence for interleukin-1 production by cultured normal human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 6: 827-833.
 10. Lorenz CH, Armin EH. 1997. Osteoprotegerin: a novel local player in bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 137: 345-346.
 11. Tobias JH, Compston JE. 1999. Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women? *Bone* 24: 121-124.
 12. Rogers J. 1967. Estrogens in the menopause and post-menopause. *N Engl J Med* 280: 364-367.
 13. Baker VL, Leitman D, Jaffe RB. 2000. Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology. *Obstet Gynecol Surv* 55: 21-47.
 14. Gray TK, Frynn TC, Gray KM, Nabell LM. 1987. 17 β -estradiol acts directly on the clonal osteoblast cell line UMR106. *Proc Natl Acad Sci* 84: 6267-6271.
 15. Aldercreutz H, Mazur W. 1996. Phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc Nutr Soc* 55: 399-417.
 16. Gregory HA, Frank D, Caroline J, Tara C, Rebecca LH, Jingsong C, Helen L, John R, David LK. 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24: 401-416.
 17. Li C, Vepari C, Jin HJ, Kim HJ, Kaplan DL. 2006. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27: 3115-3124.
 18. Yeo JH, Lee KG, Kim HC, Oh YL, Kim AJ, Kim SY. 2000. The effect of PVA/chitosan/fibroin (PCF)-blended sponge on wound healing in rats. *Biol Pharm Bull* 23: 1220-1223.
 19. Yeo JH, Lee KG, Kweon HY, Woo SO, Han SM, Kim SS, Demura M. 2006. Fractionation of a silk fibroin hydrolysate and its protective function of hydrogen peroxide toxicity. *J Appl Polym Sci* 102: 772-776.
 20. Kim DK, Kang YK, Lee MY, Lee KG, Yeo JH, Lee WB,

- Kim YS, Kim SS. 2005. Neuroprotection and enhancement of learning and memory by BF-7. *J Health Sci* 51: 317-324.
21. Susan S, Mary BM, Gloria G, David LK. 2001. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 54: 139-148.
 22. Madyarov S, Lee KG, Yeo JH, Nam J, Lee YW. 2000. Improved method for the preparation of silk fibroin hydrolysates. *Korean J Seric Sci* 41: 102-110.
 23. Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH. 1998. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporosis Int* 8: 274-281.
 24. Sugimoto E, Yamaguchi M. 2000. Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med* 5: 515-520.
 25. Chambers TJ. 2000. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol* 192: 4-13.
 26. Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo KI, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. 2002. U0126 and PD98059, specific inhibition of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J Biol Chem* 277: 47366-47372.
 27. Kang SA, Jang KH, Cho YH, Hong KH, Kong SH, Choue RW. 2001. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in soybean and blackbean. *J Arahe* 8: 44-48.
 28. Arnett TR. 1990. Update on bone cell biology. *Eur J Orthod* 12: 81-90.
 29. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M. 1997. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 186: 489-495.
 30. Mok SK, Shin LLS. 1996. The effects of prostaglandine and dibutylryl cAMP on osteoblastic cell activity and osteoclast generation. *J Wonkwang Dental Res Int* 6: 43-62.
 31. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3597-3602.
 32. Khosla S. 2001. The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5050-5055.
 33. Thomas C, Spelsberg M, Subramaniam B, Lawrence R, Sundeep K. 2005. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endo* 13: 819-828.
 34. Evans DM, Ralston SH. 1996. Nitric oxide and bone. *J Bone Miner Res* 11: 300-305.
 35. Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H, Ralston SH. 1997. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res* 12: 1108-1115.

(2008년 6월 10일 접수; 2008년 7월 14일 채택)