

소리쟁이 뿌리 성분이 조골세포 분화에 미치는 영향

박혜진 · 정재훈 · 현한빛 · 황혜성 · 김하형[#]

중앙대학교 약학대학

(Received October 30, 2013; Revised December 3, 2013; Accepted December 3, 2013)

The Stimulatory Effects on the Osteoblast Cells of the Root Constituents from *Rumex crispus*

Heajin Park, Jaehoon Jeong, Hanbit Hyun, Hye Seong Hwang and HaHyung Kim[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — *Rumex crispus* (Curled Dock, Polygonaceae) is a perennial wild plant used in traditional medicine as a laxative, astringent, and to treat blood and skin disease. The ethanol extract of *R. crispus* was obtained and its carbohydrate contents were analyzed using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. The anabolic effects of *R. crispus* in human osteoblastic MG-63 cells were investigated using the WST-8 assay, alkalinephosphatase (ALP) assay, and mineralization assay. The ethanol extract increased the proliferation of MG-63 cells and stimulated ALP activity in a dose-dependent manner over a 72-hrs period. Additionally, the ethanol extract dose-dependently stimulated the formation of bone nodules in MG-63 cells treated for 12 days. The ethyl acetate fraction from the ethanol extract did not affect osteoblast viability but induced an increase in ALP activity. In conclusion, the ethanol extract of *R. crispus* increases the proliferation and bone-forming activity of osteoblasts, and hence it could be used in the development of bone-forming stimulatory nutraceuticals and osteoporosis-related medicines.

Keywords □ *Rumex crispus*, osteoblast cells, alkaline phosphatase, mineralization

소리쟁이(*Rumex crispus* L.)는 우리나라 전역에서 자라는 마디풀목 마디풀과의 여러해살이풀로서 개울이나 들 등의 습한 곳에서 자라고, 높이는 약 80 센티미터 정도로, 어린순과 어린잎은 식용으로 이용되며, 뿌리는 염료로도 사용되는데 통변, 지혈, 소종 등의 효능이 있다고 알려져 있어 민간에서는 즙을 내거나 찌어서 외용제로 사용하기도 한다.¹⁾ 또한, 소리쟁이는 우이대황이라 칭하며, 급성간염, 만성기관지염, 변비에 효력이 있고, 지혈작용이 있는 것으로 알려져 있다. 현재까지 보고된 소리쟁이의 생리 활성으로는 종자 추출물의 소염, 진통, 간 보호²⁾ 및 항산화 작용,³⁾ 뿌리 추출물의 항산화 작용,¹⁾ 항균 작용, 항말라리아 작용,⁴⁾ 항암 작용 및 carbohydrase 저해 작용,⁵⁾ 잎의 ether 추출물 또는 ethanol 추출물의 *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus subtilis*에 대한 항생능력 등이 있다.⁶⁾

골다공증은 뼈의 강도가 약화되어 골절의 위험도가 증가하는

골격계 질환으로 알려져 있으며,⁷⁾ 고령화에 따라 골다공증 유병률이 증가하고, 골절로 인한 삶의 질 저하와 막대한 의료 비용을 초래하므로 골다공증의 조기진단과 치료의 중요성이 대두되고 있다. 골다공증 치료제는 골소실률을 낮추는 골흡수억제제(antiresorptive drug)와 골량을 증가시키는 골형성자극제(formation stimulator)로 분류된다. 현재 임상에서 사용되고 있는 골다공증 치료제는 대부분 골흡수억제제로 calcitonin, estrogen, bisphosphonate 제제, vitamin D 등이 있다.⁸⁾ 그러나 골흡수억제제는 골량의 증가 또는 회복 효과는 미미하므로 새로운 골다공증의 치료제로서 뼈의 파괴되거나 변형된 미세구조를 채워주는 동화적 치료제인 골형성자극제의 필요성이 보고되고 있다. 이러한 골형성자극제로는 현재 부갑상선 호르몬이 유일한데 조골세포에 작용하여 세포사멸을 억제하고 생존을 증가시킨다고 알려져 있으나,^{9,10)} 매일 투여해야하고 보험이 적용되지 않아 고가이므로 질환이 심한 환자나 다른 약제가 듣지 않는 경우에만 사용되고 있다.¹¹⁾ 따라서, 골형성자극제로서 이용 가능한 새로운 의약품과 기능성 식품의 개발에 대한 관심이 고조되고 있고, 특히, 골형성자극제는 신생 골 형성을 자극하는 조골세포의 생성과 분화 과정을 촉진해야 하며 조골세포의 세포 생존율, 염

[#]Corresponding Author

HaHyung Kim

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Tel.: 02-820-5612 Fax.: 02-823-5612

E-mail: hahyung@cau.ac.kr

기성 인산 분해 효소(alkaline phosphatase, ALP) 활성, 석회화 결절 형성 관찰을 통해 확인할 수 있다.¹⁰⁾

이상과 같이 소리쟁이 추출물에 대해 많은 연구가 보고되고 있고, 참소리쟁이 뿌리 추출물과 소리쟁이 뿌리 추출물의 혼합물이 노화방지 및 당뇨에 효과가 있음이 국내특허로 등록된 바 있으며,¹²⁾ 또한 식용으로 사용하는 소리쟁이의 잎은 골다공증에 효과가 있다는 연구가 국내특허로 등록되어 있지만,¹³⁾ 약재로 사용되는 뿌리 부분은 골다공증에 관해 보고된 것이 없는 실정이다. 본 연구에서는 건조되지 않은 소리쟁이 뿌리로부터 ethanol 추출물을 얻은 후 계통적 추출방법에 의해 ethyl acetate, chloroform 분획물을 얻은 후 이를 시료로 하여 조골세포의 생존율과 분화 정도에 미치는 영향을 연구하였다.

실험방법

실험재료

본 실험에 사용한 소리쟁이는 제주도 소재 제주자연식물산업연구소에서 구입하여, 외부형태를 비교 조사 후 사용하였다.

추출 및 분획

추출 및 분획에는 3차 증류수, absolute ethanol(HPLC grade, Fisher), n-hexane, chloroform, ethylacetate, 1-butanol(extra pure, Samchun pure chemical), SmartPor PTFE syringe filter with 25 mm 0.45 μ m, SmartPor GHP syringe filter with 25 mm 0.45 μ m, rotary evaporator(N-1200A, EYELA), freeze drier(FD-1000, EYELA) 등을 사용하였다. 소리쟁이 뿌리를 3차 증류수로 수세하고 얇게 절단하여 3일간 음건 후 분쇄하였다. Ethanol 추출은 소리쟁이 뿌리 분쇄물 3g에 70% ethanol 30 ml를 가하고 실온에서 교반하며 18시간 추출하여 3회 반복 추출하였다. 이 추출액을 2000 rpm, 60분간 원심분리하고 상층액을 취하여 0.45 μ m syringe filter로 여과하였다. 여과된 추출액을 rotary evaporator로 감압, 농축하여 추출 농축액을 얻은 다음 동결 건조하여 ethanol 추출 분말을 얻었다. 이 추출 분말을 30 ml의 3차 증류수에 현탁시킨 후 n-hexane, chloroform, ethylacetate, 1-butanol 순으로 분액여두에서 진탕 추출 후 분획하였다.

단당 분석

추출물 중의 단당 분석을 위해 high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD)를 사용하였으며, 데이터는 Chromelon 6.80 소프트웨어(Dionex)를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 column은 AminoTrap(Dionex) column이 연결된 CarboPac-PA10(Dionex) column이며, 온도는 27°C를 유지하였다. 이동상은 20 mM

NaOH(Fischer)로 하고 0.5 ml/min의 유속을 유지하며 AgCl을 작용 전극으로 하였다. 표준용액은 Sigma에서 구입한 단당류 fucose(Fuc), arabinose(Ara), galactose(Gal), glucose(Glc), mannose(Man), xylose(Xyl), galactosamine(GalN), glucosamine(GlcN)), 이당류 fructose, sucrose, 당알코올류(mannitol)를 각각 800 pmole 씩 포함하도록 제조하고 단계적으로 희석하여 사용하였다. 표준용액과 소리쟁이 추출물은 0.2 μ m PVDF syringe filter를 이용하여 여과 후 분석을 실시하였다.

조골세포 배양

Human osteoblast-like MG-63 세포는 서울대학교 한국 세포주 은행에서 구입하였으며, 10%의 FBS(Gibco BRL)와 1%의 penicillin 및 streptomycin(Gibco BRL.)이 포함된 Dulbecco's modification of Eagle's medium(DMEM, Corning) 배지로 37°C, 5% CO₂의 환경을 유지시켜주며 배양하였고, 세포가 배양 flask에 70~80% 정도 증식되었을 때 계대하였다.

세포 생존율 측정

2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt(WST-8)은 Dojindo에서 구입하였으며, WST-8의 정량은 Tominaga 방법¹⁴⁾에 따라 실시하였다. MG-63 세포를 96-well plate에 2×10^3 cells/well의 농도로 분주하고 시료를 농도별로 희석하여 첨가한 DMEM 배지를 각 well에 투입하였으며, 아무 처리하지 않은 DMEM 배지에 배양한 세포군을 대조군으로 하여 72시간 동안 배양하였다. 배양된 세포 배양액에 WST-8 용액(10 μ l/well)을 첨가하고 3시간 동안 배양한 후 WST-8이 WST-8 formazan으로 환원된 정도를 450 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

ALP 활성 측정

ALP 활성도는 p-nitrophenyl phosphate(pNPP, Sigma-Aldrich)의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하여 생성되는 p-nitrophenol의 양을 405 nm 파장에서 microplate reader를 이용하여 측정함으로써 산출하였다.¹⁵⁾ 조골세포를 24-well plate에 2×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 시료를 첨가한 DMEM 배지로 교환하고 72시간 배양하였으며 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지를 대조군으로 하였다. 72시간 후, 각각의 well에서 배양액을 제거하고 0.1% Triton X-100을 처리한 후 -70°C에서 얼리고 37°C에서 녹이는 방법으로 세포막을 파괴하였다. 그 후, 4°C, 14,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 모아 ALP 활성도를 측정하였다. 세포수 차이에 따른 ALP 활성도 변화를 고려하기 위해 총단백질 양은 bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(iNtRON

Biotechnology)를 사용하여 측정하였으며 효소 활성은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

석회화 결절 형성 측정

조골세포를 24-well plate에 3×10^3 cells/well이 되도록 분주하고, 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid(Sigma-Aldrich), 10 mM β -glycerophosphate(Sigma-Aldrich), 10^{-7} M dexamethasone(Sigma-Aldrich)이 포함된 DMEM 배지에 시료를 첨가하여 각 well에 투여하였고, 3~4일마다 식물 추출물을 포함한 새 배지로 교환하면서 배양하였다.^{16,17)} 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 가볍게 세척한 후 70% ethanol을 가하고 4°C에서 1시간 동안 고정하였다. 세포를 증류수로 세척하고 40 mM Alizarin red solution(pH 4.2)(Sigma-Aldrich)으로 실온에서 10분간 염색하였다. 비특이적인 염색을 줄이기 위해 증류수로 5번 세척한 후 PBS를 가하고 15분 방치하였다. PBS를 제거한 후 10%(w/v) cetylpyridinium chloride(Sigma-Aldrich)를 첨가한 10 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액을 각 well에 첨가하고 실온에서 15분간 반응시켜서 얻은 alizarin red 추출액을 96-well plate로 옮기고 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁸⁾

통계 분석

실험의 정량적인 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 통계적인 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 p 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과 및 고찰

소리쟁이 추출 및 분획

소리쟁이 뿌리를 3차 증류수로 수세하고 얇게 절단하여 3일간 음건 후 분쇄하였으며, ethanol 추출은 소리쟁이 뿌리 분쇄물 3g에 70% ethanol 30 ml를 가하고 실온에서 교반하며 18시간 추출하여 3회 반복 추출하였다. 이 추출액을 2000 rpm에 60분간 원심분리하고 상층액을 취하여 0.45 μm syringe filter로 여과하였다. 여과된 추출액을 rotary evaporator로 감압, 농축하여 추출 농축액을 얻은 다음 동결 건조하여 365.2 mg(수득률 12.2%)의 ethanol 추출 분말을 얻었다. 추출 분말 101.3 mg을 30 ml의 3차 증류수에 현탁시킨 후 n-hexane, chloroform, ethylacetate, 1-butanol 순으로 분액여두에서 진탕 추출 후 분획하여 각각 2.3 mg, 8.8 mg, 14.7 mg, 60.6 mg을 얻었다. 상기 추출물과 분획은 4°C에서 냉장보관 하였다.

단당분석

단당류(Fuc, Ara, Gal, Glc, Man, Xyl, GalN, GlcN), 이당류(fructose, sucrose), 당알코올류(mannitol) 등 총 11종류의 표준

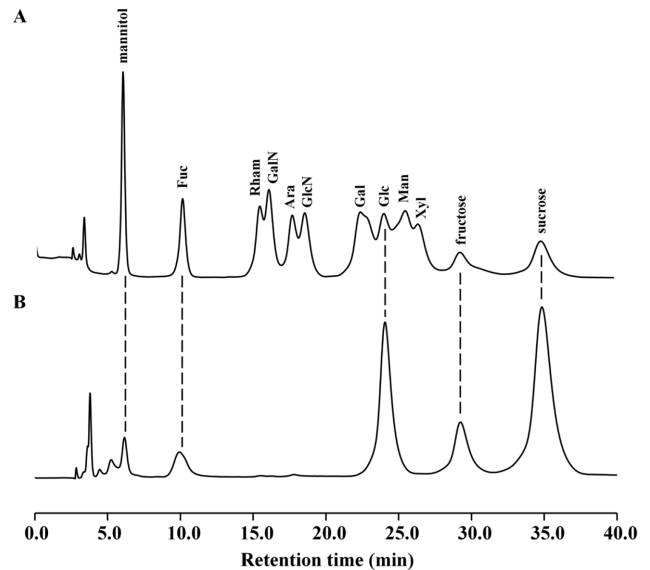


Fig. 1 – HPAEC-PAD chromatogram profiles of (A) a standard mono- and disaccharides mixture, and (B) the carbohydrates from the ethanol extract.

당을 포함하는 표준용액을 단계적으로 희석한 것을 CarboPac-PA10 column으로 분석함으로써 각 단당의 용출시간을 확인하였고(Fig. 1A), 성분당 정량을 위한 검량선을 도출하여 정량에 이용하였다. HPAEC-PAD를 이용하여 이동상은 20 mM NaOH, 유속은 0.5 ml/min의 조건으로 시료 0.01 mg을 주입하여 분석한 결과, 당알코올인 mannitol과 단당류인 Fuc, Glc 및 이당류인 fructose, sucrose가 검출되었다(Fig. 1B). 이를 검량선에 대입 후 환산한 결과, 소리쟁이 추출물의 주요 구성당은 sucrose 148.9 mg, Glc 45 mg, fructose 43.7 mg, mannitol 2.2 mg이 각각 존재하는 것을 확인하였다.

조골세포 생존율 및 증식률에 미치는 영향

소리쟁이 추출물이 뼈의 신생 및 재생에 관여하는 인체 조골세포인 MG-63 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 WST assay를 실시하였다. MG-63 세포의 생존율은 배양액만 처리한 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 daidzein은 대두에 풍부하게 함유된 isoflavone으로서 조골세포의 단백질량(protein content)과 ALP 활성을 증가시키고¹⁹⁾ 골다공증의 발병률을 감소시킨다고 보고되어 있다.²⁰⁾ Daidzein은 조골세포 생존율을 농도 의존적으로 증가시켜 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비해 129.4%의 세포생존율을 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 세포생존율을 저하시켰다(Fig. 2A). 소리쟁이 ethanol 추출물은 2 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 세포 독성을 나타내지 않았으며 특히 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 과 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 군에서는 각각 대조군에 비해 세포 생존율이 114.1%, 118.1%로 유의성있게 증가하였다(Fig. 2B). 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포의 생존율이 대조군에 비

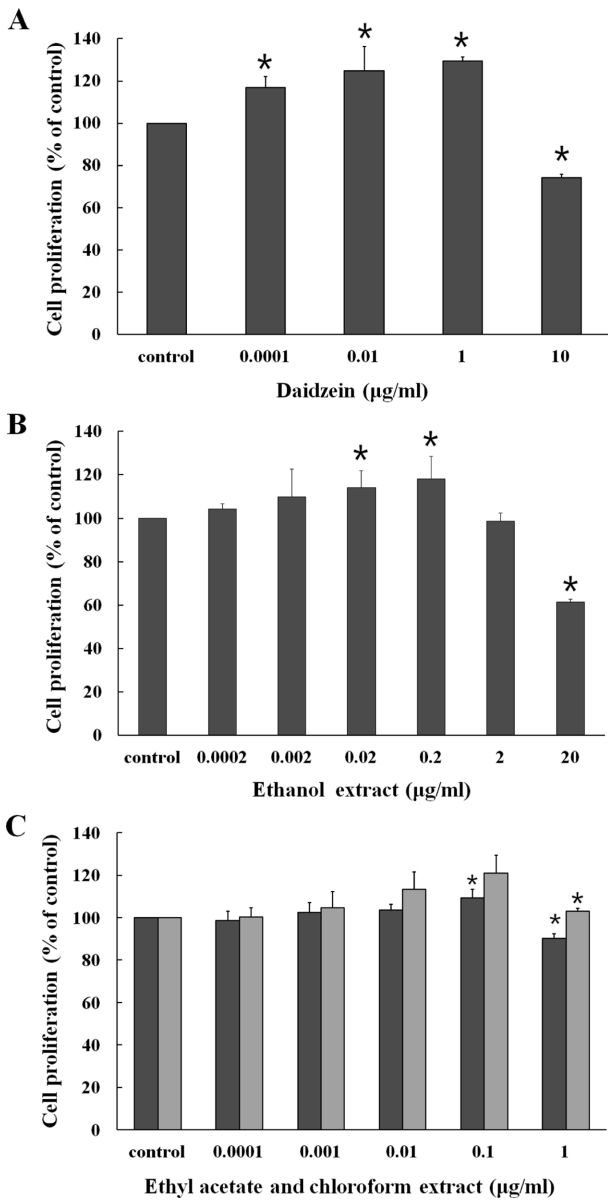


Fig. 2 – Effects of (A) daidzein, (B) ethanol extract, and (C) ethyl acetate (left) and chloroform (right) extracts on the proliferation of MG-63 cells. Cells were treated with the extract for 72 hrs in 96-well plates, and their viability was measured using the WST assay. Results represent the mean±SD values of three independent samples. *P<0.05, significantly different from the control group.

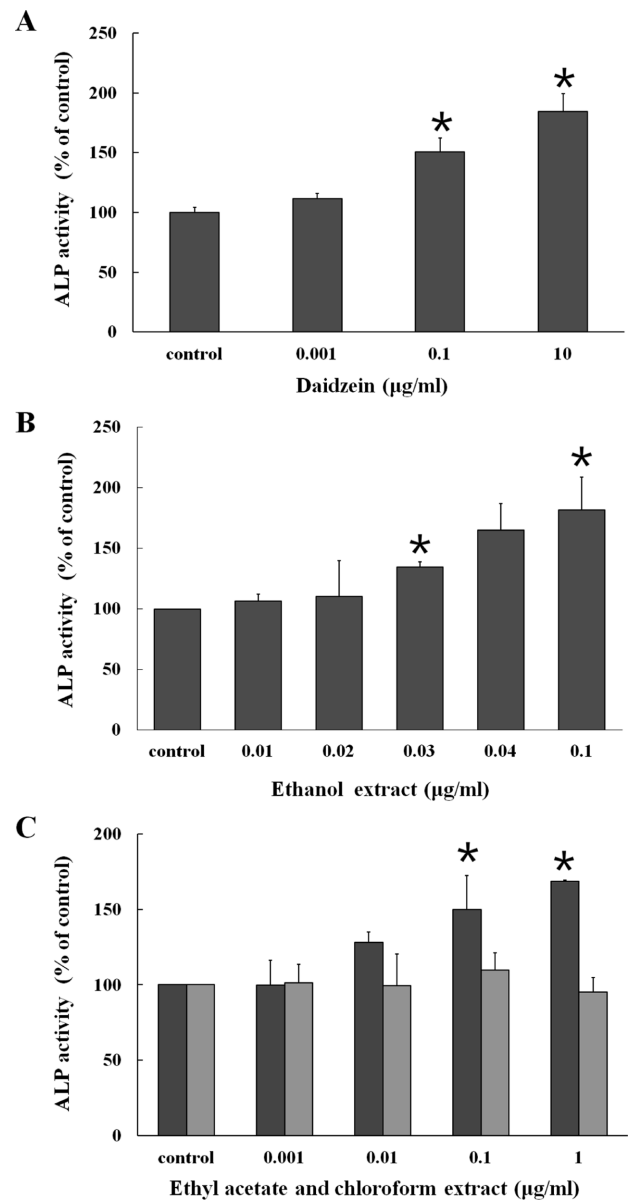


Fig. 3 – Effects of (A) daidzein, (B) ethanol extract, and (C) ethyl acetate (left) and chloroform (right) extracts on the alkaline phosphatase activities of MG-63 cells during differentiation. Cells were treated with the extract for 72 hrs in 24-well plates, and results represent the mean±SD values of three independent samples. *P<0.05, significantly different from the control group.

하여 61%로 감소하였으므로 소리쟁이 ethanol 추출물이 MG-63 세포의 ALP 활성화와 석회화 결절 형성에 미치는 영향을 관찰하는 실험에서는 소리쟁이 추출물을 2 µg/ml 이하의 농도로 사용하였다. 소리쟁이의 ethyl acetate 분획물은 0.1 µg/ml 이하의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았으며 특히 0.1 µg/ml에서는 세포 생존율이 유의하게 상승하였고 1 µg/ml에서는 세포 생존율이 다소 감소하였다. Chloroform 분획물은 1 µg/ml 이하의 농도에

서 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 2C).

조골세포의 ALP 활성화에 미치는 영향

조골세포의 세포막에 존재하는 ALP는 조골세포 활성화의 표지인자로 알려져 있으며 석회화 과정 동안 무기인산의 운반, 세포 분열이나 분화의 조절자 역할을 한다.²¹⁾ 그러므로 시료가 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보는 biomarker로서 ALP 활

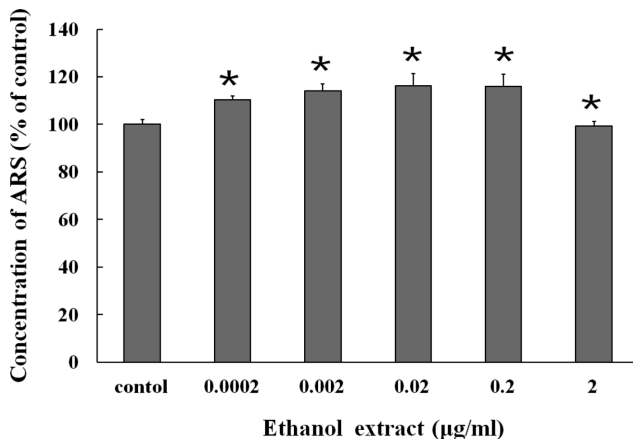


Fig. 4 – Effects of ethanol extract on calcified nodule formation in MG-63 cells. Cells were treated with the extract (at 0.0002, 0.002, and 0.02 µg/ml) for 12 days in 24-well plates, and results represent the mean±SD values of three independent samples. * $P < 0.05$, significantly different from the control group.

성을 측정하였다. 양성 대조군으로 사용한 daidzein은 0.001~10 µg/ml 사이에서 농도 의존적으로 MG-63 세포의 ALP 활성을 증가시켰고 10 µg/ml의 농도에서 184.6%의 ALP 활성 증가효과를 나타내었다(Fig. 3A). 소리쟁이 뿌리의 ethanol 추출물은 세포 독성을 나타내지 않는 농도 범위 내에서 MG-63 세포의 ALP 활성을 유의하게 증가시켰으며 0.01~0.1 µg/ml 농도 범위에서 농도 의존적인 경향을 보였다. 특히, 0.1 µg/ml의 농도에서는 181.7%의 ALP 활성 증가효과를 나타내어 양성 대조군인 daidzein과 유사한 활성을 가짐을 확인하였다(Fig. 3B). Ethly acetate 분획물은 0.001~0.1 µg/ml 농도에서 ALP 활성을 농도 의존적으로 증가시킨 반면 chloroform 분획물은 0.001~0.1 µg/ml 농도에서 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 3C).

조골세포의 골석회화 형성능에 미치는 영향

석회화 결절 형성은 조골세포의 후기 분화 단계의 biomarker로서 alizarin red S(ARS) 염색법을 이용하여 확인할 수 있으며, alizarin은 무기질화된 세포 기질의 칼슘을 염색하므로 석회화 결절을 형성한 정도와 염색 정도가 비례한다. MG-63 세포를 소리쟁이 ethanol 추출물을 포함하는 조골세포 분화용 배지에서 12일 간 배양하고 alizarin red S로 염색하여 석회화물의 형성 정도를 비교하였다. 소리쟁이 ethanol 추출물은 유의하게 농도 의존적으로 MG-63 세포의 석회화 형성능을 상승시켰고 특히 0.02 µg/ml 처리군은 116.2%로 가장 높은 상승을 보였다(Fig. 4).

결 론

본 연구에서는 소리쟁이 뿌리 ethanol 추출물과 그로부터 극

성에 따라 제조한 ethyl acetate 및 chloroform 분획을 대상으로 HPAEC-PAD를 이용하여 그 구성당 성분을 분석하고 인체 조골 세포주인 MG-63 세포를 이용하여 세포생존율과 ALP 활성, 석회화 형성 정도에 미치는 영향을 연구하였다. 소리쟁이 뿌리의 ethanol 추출물은 농도 의존적으로 세포의 증식을 증가시키는 경향을 나타냈으며 세포 독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 ALP 활성과 석회화 결절 형성 정도를 유의하게 농도 의존적으로 상승시켰다. 골다공증에 대한 효과가 있는 것으로 알려진 대두 isoflavone 성분의 daidzein과 비교시 ALP 활성 증가 효과는 유사하였으며 조골세포에 대한 증식 효과는 미약하였다. 소리쟁이의 ethly acetate 분획물은 세포 독성 없이 농도 의존적으로 ALP의 활성을 촉진하는 경향을 나타내었다.

조골세포의 분화는 골 전구세포의 증식, 세포외 기질 성숙, mineralization의 3단계에 걸쳐 일어난다. 먼저 골 전구세포의 증식을 통해 collagen matrix 합성과 골결절 형성을 위한 기반을 형성하고 collagen 합성과 ALP 발현이 증가하면서 matrix의 성숙을 거쳐 최종적으로 석회화 과정이 일어난다.²²⁾ 소리쟁이의 ethanol 추출물은 조골세포의 생존을 높이고 분화 과정 전반에 걸쳐 anabolic effect를 갖는 것으로 사료되며, ethly acetate 분획을 통해 얻은 성분은 세포 생존에는 영향을 미치지 않으나 초기 분화 단계를 촉진하는 것으로 판단된다. 이러한 결과를 고려하여 볼 때 소리쟁이 뿌리성분은 조골세포의 증식과 분화에 관여하는 우수한 소재로 골다공증 예방 및 치료제로서의 개발 가능성을 가진 천연물 소재로 평가되며, 현재는 소리쟁이 추출물을 column으로 분리 후 얻어진 개별 물질의 조골세포 분화에 대한 활성을 확인하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2013년도 농촌진흥청 연구개발비 지원(PJ009843)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Yun, Y. S. and Jeong, K. S. : Polyphenol contents of *Rumex crispus* root extract with hot water and its antioxidative effect. *Journal of the Environmental Sciences International*, **21**, 1265 (2012).
- 2) Lee, S. S., Kim, D. H., Yim, D. S. and Lee, S. K. : Anti-Inflammatory, analgesic and hepatoprotective effect of semen of *Rumex crispus*. *Korean J. Pharmacogn.*, **38**, 334 (2007).
- 3) Suh, H. J., Lee, K. S., Kim, S. R., Shin, M. H., Park, S. G. and Park, S. : Determination of singlet oxygen quenching and protection of biological systems by various extracts from seed of *Rumex crispus* L. *J. Photochem. Photobiol. B*, **102**, 102

- (2011).
- 4) Choi, G. J., Lee, S. W., Jang, K. S., Kim, J. S., Cho, K. Y. and Kim, J. C. : Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. *Crop Prot.*, **23**, 1215 (2004).
 - 5) Shiwani, S., Singh, N. K. and Wang, M. H. : Carbohydrase inhibition and anti-cancerous and free radical scavenging properties along with DNA and protein protection ability of methanolic root extracts of *Rumex crispus*. *Nutr. Res. Pract.*, **6**, 389 (2012).
 - 6) Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A. A. : Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4083 (2001).
 - 7) Goltzman, D. : Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 784 (2002).
 - 8) Rodan, G. A. and Martin, T. J. : Therapeutic approaches to bone Diseases. *Science*, **289**, 1307 (2000).
 - 9) Berg, C., Neumeyer, K. and Kirkpatrick, P. : Teriparatide. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 257 (2003).
 - 10) Ducy, P., Schinke, T. and Karsenty, G. : The osteoblast : a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, **289**, 1501 (2000).
 - 11) 대한골대사학회. "골다공증의 진단 및 치료 지침 2011".
 - 12) 대한민국, 특허등록 제100671793호.
 - 13) 대한민국, 특허공개 제1020130070901호.
 - 14) Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki K. and Watanabe, M. : A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.*, **36**, 47 (1999).
 - 15) Hawkins, D. H. and Abrahamse, H. : Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. *J. Photochem. Photobiol. B*, **88**, 147 (2007).
 - 16) Chiu, R., Ma, T., Smith, R. L. and Goodman, S. B. : Polymethylmethacrylate particles inhibit osteoblastic differentiation of bone marrow osteoprogenitor cells. *J. Biomed. Mater. Res.*, **77A**, 850 (2006).
 - 17) Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A. and Prockop, D. J. : An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.*, **329**, 77 (2004).
 - 18) Stanford, C. M., Jacobson, P. A., Eanes, E. D., Lembke, L. A. and Midura, R. J. : Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J. Biol. Chem.*, **270**, 9420 (1995).
 - 19) Sugimoto, E. and Yamaguchi, M. : Stimulatory effect of daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 471 (2000).
 - 20) Prouilleta, C., Mazièreb, J. C., Mazièreb, C., Wattela, A., Braziera, M. and Kamela, S. : Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 1307 (2004).
 - 21) Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen. T. A. : Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.*, **4**, 3111 (1990).
 - 22) Chiu, R., Ma, T., Smith, R. L. and Goodman, S. T. : Polymethylmethacrylate particles inhibit osteoblastic differentiation of bone marrow osteoprogenitor cells. *J. Biomed. Mater. Res.*, **77A**, 850 (2006).