

歸脾湯이 파골세포 분화와 조골세포 활성화에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실
최경희, 유동열

ABSTRACT

The Effect of *Guibi-tang* Water Extract on Osteoclast Differentiation and Osteoblast Proliferation

Kyung-Hee Choi, Dong-Youl Yoo

Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objectives: This study was performed to evaluate the effect of *Guibi-tang* water extract (GB) on osteoporosis.

Methods: We examined the effect of GB on osteoclast differentiation using murine pre-osteoclastic RAW 264.7 cells treated with receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL). The effect of GB on osteoclast was measured by counting TRAP (+) multinucleated cells and measuring TRAP activity. The mRNA expressions of osteoclastogenesis-related genes (Cathepsin K, MMP-9, TRAP, NFATc1, MITF, TNF- α , IL-6, COX-2) were measured by real-time PCR. We examined the effect of GB on osteoblast proliferation, ALP activity, bone matrix protein synthesis and collagen synthesis using murine calvarial cell.

Results: GB decreased the number of TRAP (+) multinucleated cells and inhibited TRAP activity in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell. GB decreased the expression of genes related osteoclastogenesis such as Cathepsin K, MMP-9, TRAP, NFATc1, MITF, COX-2 in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell. But GB did not decrease the expression of iNOS and increased the expression of TNF- α , IL-6 in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell. These genes (iNOS, TNF- α , IL-6) are thought to be related with the inflammatory bone destruction. GB increased cell proliferation of rat calvarial cell and also increased ALP activity in rat calvarial cell. GB did not increase bone matrix protein synthesis but increased collagen synthesis in rat calvarial cell.

Conclusions: This study suggests that GB may be effective in treating osteoporosis by inhibiting osteoclast differentiation and its related gene expression and by increasing osteoblast proliferation.

Key Words: *Guibi-tang* Water Extract (GB), Osteoclast, Osteoblast, Osteoporosis, Bone Resorption

I. 서 론

골다공증은 골량의 감소와 골의 미세 구조 악화를 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환으로 골강도의 감소로 인해 골절의 위험이 증가되는 상태이다¹⁾. 정상적인 상태에서 골 흡수가 일어난 뼈는 동량의 새로운 골 조직으로 대체되지만 30~45세 이후에는 골 흡수와 골 형성 과정에 불균형이 발생하여 골 흡수가 골 형성을 능가하게 된다. 과도한 골 소실은 골 흡수 작용을 하는 파골세포의 활성화 증가나 골 형성에 관여하는 조골세포의 활성화 감소에 의해 발생될 수 있다²⁾. 따라서 골다공증의 치료에 있어서 파골세포의 분화를 억제하거나 조골세포의 활성을 증가시키는 것이 중요할 것으로 사료된다.

한의학에서는 골다공증이라는 병명이 직접적으로 언급되어 있지 않지만, 임상 증상 상 ‘骨痿’, ‘骨痺’의 범주로 볼 수 있으며³⁾ 뼈의 위약한 상태를 나타내는 ‘骨枯’라는 병명과도 유사하다⁴⁾. 골다공증의 변증 유형은 腎陰不足, 腎陽不足, 氣血兩虛, 風邪偏勝³⁾으로 風邪偏勝 외에는 기본적으로 腎虛, 氣血虛를 주요 병인으로 보고, 치료는 이러한 虛證 상태를 개선하고자 하였다⁵⁾.

歸脾湯은 宋代 嚴用和의 《濟生方》⁶⁾에 최초로 수록된 처방으로 心脾를 傷하여 발생한 健忘, 怔忡, 肢體作痛, 血虛發熱 등을 치료하기 위해 立方되었다. 歸脾湯의 ‘歸脾’는 心·腎·肝·肺의 神·志·魂·魄을 조화시켜 모두 脾로 귀향시킨다는 뜻으로⁷⁾, 脾는 水穀의 精微로운 물질을 運化하여 血을 생성하고 統血 기능을 하여 臟腑經絡으로 영양을 공급한

다⁸⁾. 皮毛, 筋骨, 經絡, 臟腑의 조직 기관은 모두 血에 의해 영양 공급을 받아 생리 활동을 유지하므로⁸⁾ 歸脾湯의 益氣補血하는 효능이 골다공증에 유효할 것으로 사료된다. 또한 歸脾湯의 골다공증 관련 연구로 난소 적출로 에스트로겐 결핍성 골다공증이 유발된 쥐에 歸脾湯 및 歸脾湯加紫河車를 투여하여 골밀도를 증가시켰다는 보고가 있다⁹⁾.

이에 저자는 益氣補血의 효능이 있으며, 상기의 연구 보고에 따라 골다공증에 유효할 것으로 추측되는 歸脾湯의 골다공증에 대한 구체적인 작용 기전을 밝히고자 본 연구를 시행하였다. 歸脾湯의 골 흡수 억제에 대한 효과를 알아보기 위하여 歸脾湯 추출물을 Receptor activator of nuclear factor kappa-B(RANKL)유도 RAW 264.7 세포에 처리하여 Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 생성능을 측정하고, 관련 유전자인 TRAP, Cathepsin K, MMP-9, MITF, NFATc1, iNOS, TNF- α , IL-6, COX-2의 발현을 측정하였다. 또한 골 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 rat의 두개골 세포에 歸脾湯 추출물을 처리하여 조골세포의 분열능, ALP 활성, 골기질 단백질과 collagen 합성에 미치는 영향을 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 약 물

歸脾湯은 《方藥合編》¹⁰⁾을 근거로 하여 1첩 분량을 사용하였다(Table 1).

본 실험에 사용한 약물은 대전대학교

둔산한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of *Guibi-tang*

韓藥名	生藥名	用量 (g)
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
龍眼肉	<i>Longanae Arillus</i>	4
酸棗仁炒	<i>Zizyphi Spinosae Semen</i>	4
遠志	<i>Polygalae Radix</i>	4
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	4
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma White</i>	4
白茯苓	<i>Poria</i>	4
木香	<i>Aucklandiae Radix</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1.2
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	4
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	2
Total		41.2

2) 한약재 추출 및 검액 제조

歸脾湯 41.2 g을 분말로 만들어 플라스크에 넣은 후, 증류수 1 l를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 후 여액을 evaporator (EYELA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음, 동결 건조하여 실험 시까지 냉동 보관 하였다. 실험 시에는 歸脾湯 추출물 (*Guibi-tang* water extract, 이하 GB라 함) 4.9 g(수득율 12%)을 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 이용하여 배지에 녹인 후 pore size 0.45 μm의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

3) 동 물

동물은 출산 예정 2일 전인 체중 약 250 g 정도의 임신한 Sprague-Dawley(SD)系 rat를 대한바이오링크에서 공급받아 실험실에서 출산 때까지 사육하였다. 실험에 사용하는 조골세포를 얻기 위하여

생후 1일 된 rat의 두개골을 적출하고 세포를 분리하여 사용하였다.

4) 세 포

실험에 사용된 파골세포 전구세포는 mouse macrophage 세포주인 RAW 264.7 세포에 RANKL을 처리하여 유도된 세포 모델을 사용하였다. 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 구입하였다.

2. 방 법

1) RAW 264.7 세포 배양 및 파골세포 형성 측정

(1) RAW 264.7 세포 배양

RAW 264.7 세포는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)/10% fetal bovine serum(FBS)/PC-SM 배지를 이용하여 CO₂ 세포 배양기에서 배양하였으며, 세포 수는 5×10³ cells/well로 96 well plate를 이용하여 배양하였다. 24시간 배양 후 배양액을 버린 다음 10% FBS, 50 ng/ml RANKL, 1 ng/ml TGF-β가 첨가된 minimum essential medium Eagle-alpha modification(α-MEM)으로 교환하여 세포를 배양하였다. 배양액에 여러 농도의 GB를 첨가하였다. 2일에 한번 씩 동일한 배지로 교환해 주면서 6일간 배양하였다. 모든 실험은 5회를 반복하였다.

(2) 파골세포 형성 측정

RANKL로 RAW 264.7 세포를 파골세포로 유도한 후 TRAP을 염색하여 TRAP (+)세포를 확인하였다. 분화시킨 세포를 phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척하고, 3.7% formaldehyde-citrate-acetone 용액으로 10분 고정시키고 증류수로 2회 세척하였다. 2% TRAP fast garnet GBC base 용액과 NaNO₃ 용액을 같은 비율로 섞어 만든 용액과 5% naphtha AS-BI

phosphoric acid, 4% acetic acid, 2% tartaric acid를 포함한 용액을 고정시킨 세포에 처리하고 상온에 30분 이상 방치하였다. 광학현미경으로 관찰하여 핵이 3개 이상인 TRAP(+) 다핵세포를 계수하여 파골세포의 생성지표로 하였다.

2) 파골세포 유전자 발현 측정

(1) 총 RNA 분리

Rat에서 취한 조직을 PBS를 넣고 균질화한 다음 1 ml TRIzol reagent(Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 용액에 200 μ l의 chloroform : isoamyl alcohol(24 : 1)을 넣고 강하게 섞은 후 14,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액 500 μ l를 분리하였다. 여기에 0.5 ml isopropyl alcohol을 가하여 -20°C 에서 하룻밤 RNA를 침전시킨 후 1,400 rpm으로 20분간 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후 70% 에탄올로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70°C 에서 저장하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 실험군에서 각각 분리한 total RNA액 1 μ l에(1 μ g RNA 함유)에 oligo dT(농도 100 pmol) 1 μ l, RNase free water 3 μ l을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 65°C 에서 10분간 incubation 하였다. Primer가 annealing 하도록 4°C 에서 약 5분간 방치한 다음, reverse transcriptase buffer, dNTP(각 2.5 mM),

RNase inhibitor, DTT(100 nM), reverse transcriptase(M-MLV 200 U/ μ l)을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이후 42°C 에서 90 분간 incubation 한 후, 95°C 에서 5분간 처리한 후 사용하였다.

(3) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

Oligo(dT) primer(Promega, Cat.No. C1101), reaction buffer(50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3)(Promega, Cat.No. M1705), 1 mM dNTP(Promega, Cat.No. U1515)과 200 unit Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(M-MLV-RT)(Promega, Cat.No. M1705)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 25 μ l에 10 \times PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmol의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25 unit의 Taq polymerase(Promega, Cat.No. M8295)을 넣어 PCR을 시행하였다. PCR 조건은 94°C 4분, 30 cycles의 [94°C (20초), 54°C (20초), 72°C (30초)], 72°C 10분이었다(Perkin Elmer, USA). 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구했다. RT-PCR에 사용한 primer는 아래에 표시하였다(Table 2).

Table 2. Primers

Target gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
TRAP	5'-ACACAGTGATGCTGTGTGGC AACTC-3'	5'-CCAGAGGCTTCCACATATATG ATGG-3'
Cathepsin K	5'-AGGCGGCTATATGACCACTG-3'	5'-CCGAGCCAAGAGAGCATATC-3'
MMP-9	5'-CGTCGTGATCCCCACTTACT-3'	5'-AGAGTACTGCTTGCCAGGA-3'
MITF	5'-GGAACAGCAACGAGCTAAGG-3'	5'-TGATGATCCGATTACCAGA-3'
NFATc1	5'-GGGTCAGTGTGACCGAAGAT-3'	5'-GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA-3'
iNOS	5'-CCTTGTTTCAGCTACGCCTTC-3'	5'-AAGGCCAAACACAGCATACC-3'
TNF- α	5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'	5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
IL-6	5'-TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC-3'	5'-GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG-3'
COX-2	5'-AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3'	5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'

(4) Real time RT-PCR

각각의 optical tube(MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode and Optical Adhesive Films, Applied Biosystems, Cat.No. 4314320)에 3배의 SybrGreen Mix 2.5 μ l(Sigma-Aldrich, Cat.No. S9430), 위에서 합성한 cDNA 1 μ l, 10 pmol/ μ l primer pair mix 1 μ l, 각각 2.5 mM의 dNTP 2 μ l, 10 \times Tag polymerase buffer 2.5 μ l, Tag Polymerase 0.3 μ l와 14.7 μ l H₂O를 넣고, 95 $^{\circ}$ C 5 min 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 30 sec, 45 $^{\circ}$ C 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 60 sec 40 cycles, 95 $^{\circ}$ C 20 min 1 cycle로 증폭시켰다. Primer는 RT-PCR에 사용한 것을 이용하였다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μ l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정하고, ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Cat.No. 4349157)를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

3) 조골세포 기능 측정

(1) Calvarial Cell의 분리 및 배양(Fetal calvarial cell culture, FCS)

생후 1일 된 쥐의 후두부를 절개하고 calvariae를 적출하였다. calvariae에 붙어

있는 결체조직 등을 깨끗이 제거하고 Hank's balanced salt solution(HBSS)로 세척했다. calvariae를 2 ml의 collagenase, trypsin, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 용액에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 상등액을 취하여 1500 rpm에서 원심 분리하여 침전된 calvarial cell을 얻었다. PBS에 재현탁하여 1500 rpm에서 원심 분리하여 washing한 후, 이를 DMEM 배지 (10% FBS, 100 IU/Penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 50 μ g/ml L-ascorbic acid, 10 nM dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate, 300 ng/ml Fungizone)에 넣어 현탁한 후 37 $^{\circ}$ C, 5%, CO₂ incubator에서 배양하였다. 상등액을 제거하고 남은 calvariae에 다시 2 ml의 호소를 넣고, 위 반응을 수회 반복하였다. 세포의 배지는 3일에 한번씩 교환하였다. 배양한 세포는 2주 후 trypsin 처리하여 세포 수를 측정 한 후 이후 실험에 이용하였다.

(2) 조골세포의 분열능 측정

Subculture를 통하여 두개골 세포가 1~3 \times 10⁵ cells/well이 되도록 24 well plate에 seeding하였다. 세포가 plate에 부착하는 것을 확인하고 24시간 후 GB를 첨가

하고 8일간 배양하였으며 배지는 2일마다 교환해 주었다. 8일 째에 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA를 가하여 세포를 culture plate로부터 분리하였으며, Isoton-II solution을 이용하여 20배 희석한 후 세포 계수기(Sysmax F-820)로 세포의 수를 측정하였다.

(3) Alkaline phosphatase 활성 측정

Alkaline phosphatase(ALP) 활성은 ALP-K Kit를 이용하여 측정하였다. cell을 배양한 plate를 냉각한 PBS로 세척한 후 cell을 scraper로 긁어내어 5 mM dithiothreitol (DTT)이 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각 상태에서 ultrasonicator로 sonication하였다. 이 현탁액을 취하여 기질액과 37°C에서 15분간 반응시킨 후 발색액을 넣어주었다. 10분 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Bone matrix protein 합성 측정

Cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내어 5 mM dithiothreitol(DTT)이 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각 상태에서 ultrasonicator로 sonication하였다. 현탁액을 취하여 뷰렛트 시약과 37°C에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) Bone collagen 합성 측정

Cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내었다. 5,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 PBS로 현탁했다. 0.3% collagenase를 넣은 후 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 11.14 N HCl을 첨가한 후 100°C에서 24시간 동안 가수분해한 다음 11.14 N HCl을 넣었다. Isopropanol을 넣은 다음 oxidant solution을 첨가한 후 상온에서 4분 동안

두었다. 이후 Ehrlich's reagent solution을 첨가한 다음 60°C에서 25분간 heating한 후 2~3분간 cooling 했다. 17시간 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계 분석

각 군과의 유의성 검증을 위하여 Student's t-test를 이용해 통계처리 하였고 p값이 0.01 및 0.05보다 작은 경우(p<0.01 및 p<0.05) 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

III. 결 과

1. 파골세포 분화 및 유전자 발현에 미치는 영향

1) RAW 264.7 세포 생존율

미분화된 RAW 264.7 세포에 GB를 첨가한 후, 3일간 배양하여 세포 생존율을 MTT 방법으로 평가하였다. 실험 결과 GB는 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1).

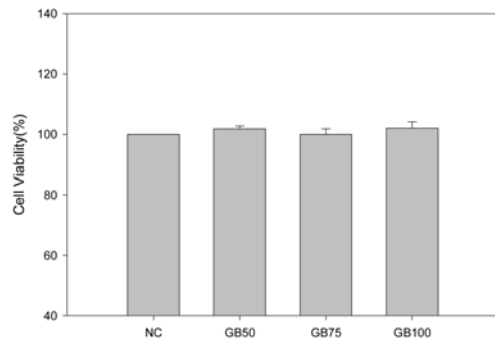


Fig. 1. Effect of GB on Cell Viability of RAW 264.7 Cells.

NC : vehicle

GB50 : RANKL (50 µg/ml)+50 µg/ml of GB

GB75 : RANKL (50 µg/ml)+75 µg/ml of GB

GB100 : RANKL (50 µg/ml)+100 µg/ml of GB

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

2) 파골세포 형성

실험 결과 GB는 25 µg/ml의 농도에서는 파골세포로 분화한 TRAP(+) 다핵세포 숫자를 유의성 있게 억제시키지 못하였으나 50 µg/ml의 농도에서는 대조군에 비해 약 31% 감소시켰고, 75 µg/ml의 농도에서는 약 53% 감소, 100 µg/ml의 농도에서는 약 72% 감소, 150 µg/ml의 농도에서는 TRAP(+) 다핵세포의 형성을 거의 100% 감소시켜 25 µg/ml의 농도를 제외한 다른 모든 농도에서 유의성 있게(p<0.01) 파골세포의 형성을 억제하였다(Fig. 2).

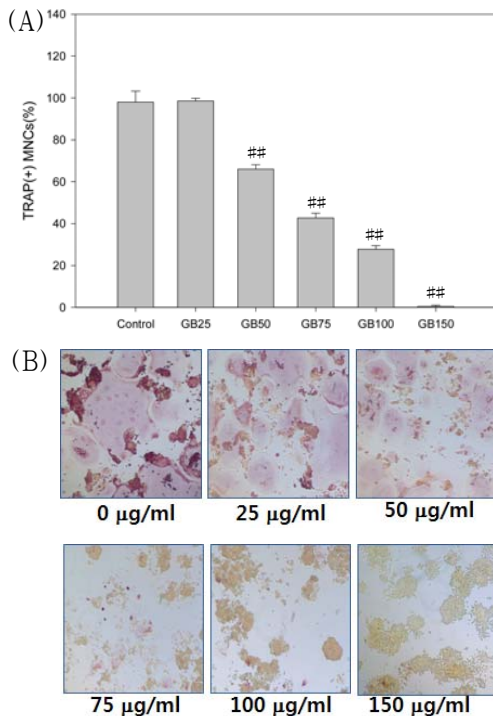


Fig. 2. Effect of GB on the Formation of TRAP(+) Multinucleated Cells (MNCs) in RANKL Stimulated Osteoclast.

control : RANKL (50 µg/ml)
 GB 25 : RANKL (50 µg/ml)+25 µg/ml of GB
 GB 50 : RANKL (50 µg/ml)+50 µg/ml of GB
 GB 75 : RANKL (50 µg/ml)+75 µg/ml of GB
 GB 100 : RANKL (50 µg/ml)+100 µg/ml of GB

GB 150 : RANKL (50 µg/ml)+150 µg/ml of GB
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

: p<0.01 vs Control

3) TRAP 활성

GB를 처리한 파골세포로부터 1일 후 TRAP 활성을 측정된 결과, 모든 농도에서 유의성 있게(p<0.01) TRAP의 활성을 억제하였다. 4일 후 TRAP의 활성을 측정된 결과, 모든 농도에서 유의성 있게(p<0.01) TRAP의 활성을 억제하는 효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of GB on the TRAP Activity in RANKL Stimulated Osteoclast

	1st day (%)	4th day (%)
Control	100	183.5±4.50
GB50	78.4±5.46**	122.1±6.01##
GB75	52.5±4.23**	94.5±2.31##
GB100	31.6±5.122**	47.2±4.64##

Control : RANKL (50 µg/ml)

GB50 : RANKL (50 µg/ml)+50 µg/ml of GB

GB75 : RANKL (50 µg/ml)+75 µg/ml of GB

GB100: RANKL (50µg/ml)+100 µg/ml of GB

** : p<0.01 vs Control of 1st day

: p<0.01 vs Control of 4th day

4) Cathepsin K 발현

실험 결과 RANKL 처리 시 cathepsin K의 발현이 증가하였으며 GB는 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml 농도에서 Cathepsin K 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 억제하였다(Fig. 3).

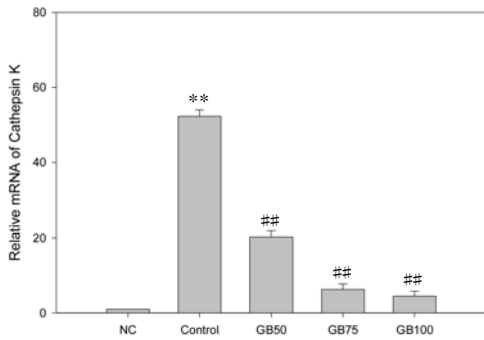


Fig. 3. Effect of GB on the Expression of Cathepsin K in RANKL Stimulated Osteoclast.

NC : vehicle

Control : RANKL (50 µg/ml)

GB50 : RANKL (50 µg/ml)+50 µg/ml of GB

GB75 : RANKL (50 µg/ml)+75 µg/ml of GB

GB100 : RANKL (50 µg/ml)+100 µg/ml of GB

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : p<0.01 vs NC

: p<0.01 vs Control

5) MMP-9 발현

실험 결과 RANKL 처리 시 MMP-9의 발현이 증가하였으며 GB는 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml의 농도에서 모두 MMP-9의 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 억제하였다(Fig. 4).

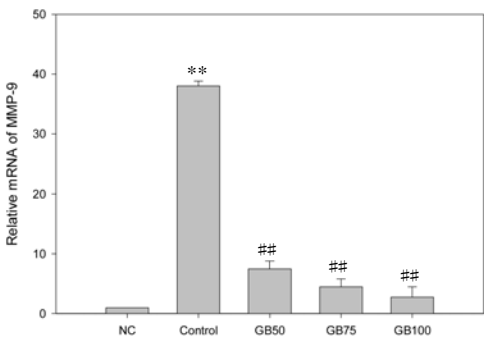


Fig. 4. Effect of GB on the Expression of MMP-9 in RANKL Stimulated Osteoclast.

NC : Vehicle

Control : RANKL (50 µg/ml)

GB50 : RANKL (50 µg/ml)+50 µg/ml of GB

GB75 : RANKL (50 µg/ml)+75 µg/ml of GB

GB100 : RANKL (50 µg/ml)+100 µg/ml of GB

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : p<0.01 vs NC

: p<0.01 vs Control

6) TRAP 발현

실험 결과 RANKL 처리 시 TRAP 유전자의 발현이 증가하였으며 GB는 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml의 농도에서 모두 TRAP 유전자의 발현을 유의성 있게(p<0.01) 억제하였다(Fig. 5).

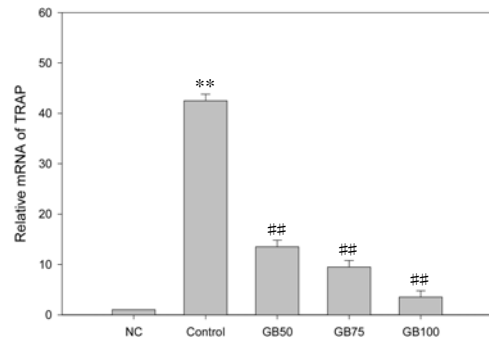


Fig. 5. Effect of GB on the Expression of TRAP in RANKL Stimulated Osteoclast.

NC : vehicle

Control : RANKL (50 µg/ml)

GB50 : RANKL (50 µg/ml)+50 µg/ml of GB

GB75 : RANKL (50 µg/ml)+75 µg/ml of GB

GB100 : RANKL (50 µg/ml)+100 µg/ml of GB

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : p<0.01 vs NC

: p<0.01 vs Control

7) MITF 발현

실험 결과 RANKL 처리 시 MITF 발현이 증가되었으며 GB는 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml 농도에서 모두 MITF 발현을 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 억제하였다(Fig. 6).

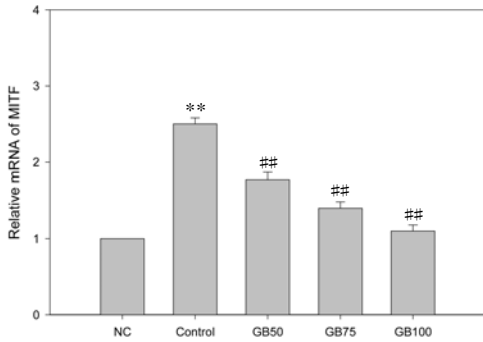


Fig. 6. Effect of GB on the Expression of MITF in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 µg/ml)
 GB50 : RANKL (50 µg/ml)+50 µg/ml of GB
 GB75 : RANKL (50 µg/ml)+75 µg/ml of GB
 GB100 : RANKL (50 µg/ml)+100 µg/ml of GB
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : p<0.01 vs NC
 ## : p<0.01 vs Control

8) NFATc1 발현

실험 결과 RANKL 처리 시 NFATc1의 발현이 증가되었으며 GB는 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml 농도에서 모두 NFATc1의 발현을 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 억제하였다(Fig. 7).

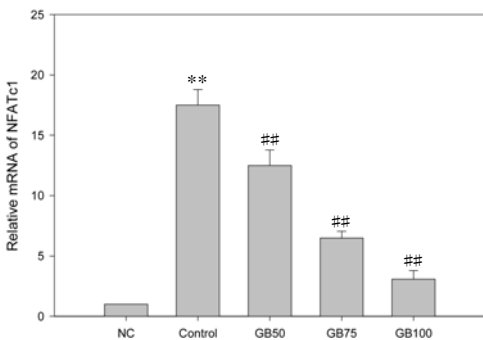


Fig. 7. Effect of GB on the Expression of NFATc1 in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 µg/ml)
 GB50 : RANKL (50 µg/ml)+50 µg/ml of GB
 GB75 : RANKL (50 µg/ml)+75 µg/ml of GB
 GB100 : RANKL (50 µg/ml)+100 µg/ml of GB
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : p<0.01 vs NC

: p<0.01 vs Control

9) iNOS 발현

실험 결과 RANKL 처리 시 iNOS 발현이 증가되었으며 GB는 50 µg/ml의 농도에서만 iNOS 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.05) 억제하였으며 75 µg/ml, 100 µg/ml의 농도에서는 대조군에 비해 iNOS의 발현을 증가시켰으나 유의성은 없었다(Fig. 8).

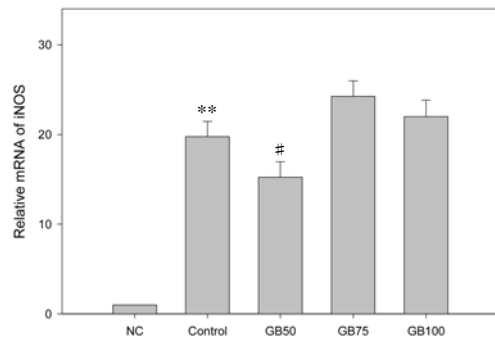


Fig. 8. Effect of GB on the Expression of iNOS in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 µg/ml)
 GB50 : RANKL (50 µg/ml)+50 µg/ml of GB
 GB75 : RANKL (50 µg/ml)+75 µg/ml of GB
 GB100 : RANKL (50 µg/ml)+100 µg/ml of GB
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : p<0.01 vs NC

: p<0.05 vs Control

10) TNF-α 발현

실험 결과 RANKL 처리 시 TNF-α의 발현이 증가하였으며 GB는 50 µg/ml의 농도에서 TNF-α의 발현을 유의성 있게(p<0.05) 증가시켰으며 75 µg/ml, 100 µg/ml의 농도에서는 TNF-α의 발현에 영향을 끼치지 못하였다(Fig. 9).

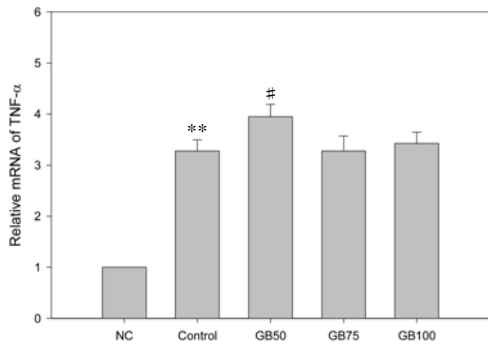


Fig. 9. Effect of GB on the Expression of TNF- α in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 μ g/ml)
 GB50 : RANKL (50 μ g/ml)+50 μ g/ml of GB
 GB75 : RANKL (50 μ g/ml)+75 μ g/ml of GB
 GB100 : RANKL (50 μ g/ml)+100 μ g/ml of GB
 Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.
 ** : p<0.01 vs NC
 # : p<0.05 vs Control

11) IL-6 발현

실험 결과 RANKL 처리 시 IL-6 발현이 증가되었으며 GB는 50 μ g/ml, 75 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도에서 모두 IL-6 발현을 유의성 있게 (p<0.05) 증가시켰다(Fig. 10).

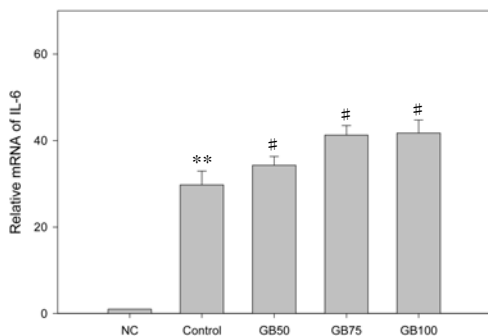


Fig. 10. Effect of GB on the Expression of IL-6 in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 μ g/ml)
 GB50 : RANKL (50 μ g/ml)+50 μ g/ml of GB
 GB75 : RANKL (50 μ g/ml)+75 μ g/ml of GB
 GB100 : RANKL (50 μ g/ml)+100 μ g/ml of GB
 Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.
 ** : p<0.01 vs NC
 # : p<0.05 vs Control

12) COX-2 발현

실험 결과 RANKL에 의해 분화된 파골세포에서 COX-2 발현이 증가하였으며, GB는 50 μ g/ml, 75 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도에서 COX-2의 발현을 유의성 있게 (p<0.01) 억제하였다(Fig. 11).

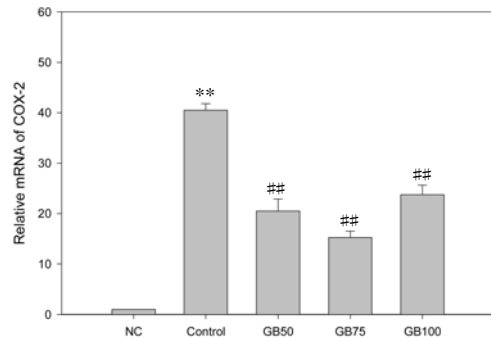


Fig. 11. Effect of GB on the Expression of COX-2 in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 μ g/ml)
 GB50 : RANKL (50 μ g/ml)+50 μ g/ml of GB
 GB75 : RANKL (50 μ g/ml)+75 μ g/ml of GB
 GB100 : RANKL (50 μ g/ml)+100 μ g/ml of GB
 Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.
 ** : p<0.01 vs NC
 ## : p<0.01 vs Control

2. 조골세포 기능에 미치는 영향

1) 조골세포의 분열능

실험 결과 GB는 1 μ g/ml, 5 μ g/ml의 농도에서는 유의성 있는 변화가 없었으나 10 μ g/ml의 농도에서 정상 대조군에 비해 유의성 있게 (p<0.01) 골세포의 분열을 증가시켰다(Fig. 12).

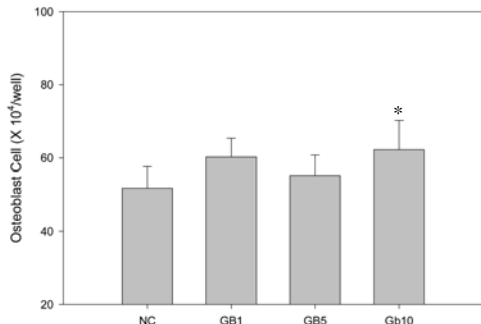


Fig. 12. Effect of GB on Cell Proliferation in Rat Calvarial Cell.

NC : Vehicle

GB1 : 1 µg/ml GB

GB5 : 5 µg/ml GB

GB10 : 10 µg/ml GB

DMSO (0.01%) was administered to NC (Normal Control) group.

Each bar represents Mean±SD of 6 cultured well.

* : p<0.05 vs NC by Student's t-test

2) Alkaline phosphatase 활성화

실험 결과 10 µg/ml의 GB를 처리한 경우 ALP 활성이 정상 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.05) 증가하였다(Fig. 13).

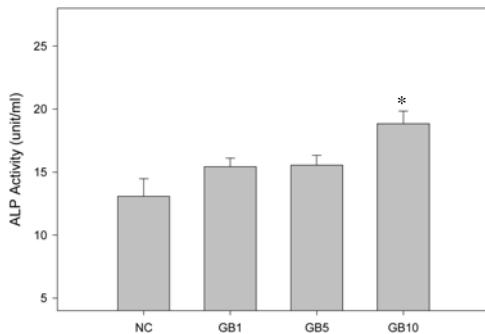


Fig. 13. Effect of GB on Alkaline Phosphatase Activity in Rat Calvarial Cell.

NC : Vehicle

GB1 : 1 µg/ml GB

GB5 : 5 µg/ml GB

GB10 : 10 µg/ml GB

DMSO (0.01%) was administered to NC (Normal Control) group.

Each bar represents Mean±SD of 6 cultured well.

* : p<0.05 vs NC by Student's t-test

3) Bone matrix protein 합성

실험 결과 GB는 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml

의 농도에서 모두 골 기질 단백질 합성에 유의성 있는 변화를 주지 못하였다(Fig. 14).

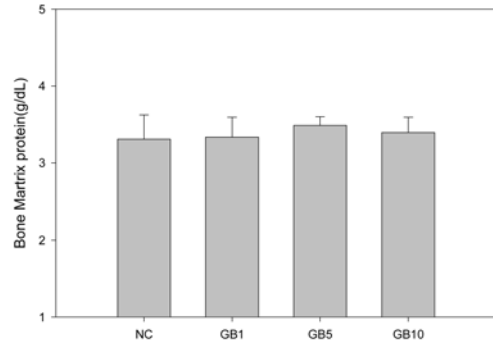


Fig. 14. Effect of GB on Bone Matrix Protein Synthesis in Rat Calvarial Cell.

NC : Vehicle

GB1 : 1 µg/ml GB

GB5 : 5 µg/ml GB

GB10 : 10 µg/ml GB

DMSO (0.01%) was administered to NC (Normal Control) group.

Each bar represents Mean±SD of 6 cultured well.

4) Bone collagen 합성

실험 결과 10 µg/ml의 GB를 처리한 경우 collagen 합성이 정상 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.05) 증가하였다(Fig. 15).

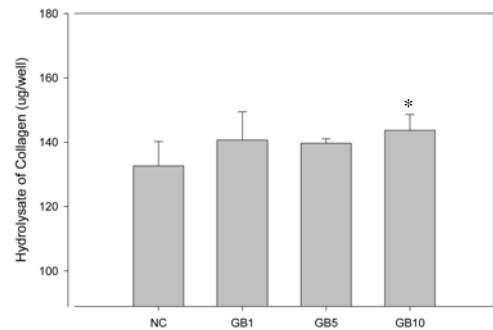


Fig. 15. Effect of GB on Collagen Synthesis in Rat Calvarial Cell.

NC : Vehicle

GB1 : 1 µg/ml GB

GB5 : 5 µg/ml GB

GB10 : 10 µg/ml GB

DMSO (0.01%) was administered to NC (Normal Control) group.

Each bar represents Mean±SD of 6 cultured well.

* : p<0.05 vs NC by Student's t-test

IV. 고찰

골다공증은 골량의 감소와 골의 미세구조 악화를 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환¹⁾으로 세계보건기구(WHO)는 골밀도가 같은 성별에서 건강한 젊은 성인의 평균치의 2.5 표준편차 이하를 골다공증으로 정의하였다¹¹⁾. 여성의 경우 폐경 이후 골의 교체 속도가 증가하고 골 흡수와 형성 사이의 불균형이 커져 급격한 골 소실이 진행되고 골다공증에 대한 위험도가 증가한다¹²⁾. 최근 조사에 따르면 골다공증 유병률은 50세 이상에서 여자 37.5%, 남자 7.5%로 여자가 남자보다 5배 정도 높았다¹³⁾.

과도한 골 소실은 골 흡수 작용을 하는 파골세포의 활성화 증가나 골 형성에 관여하는 조골세포의 활성화 감소에 의해 발생할 수 있다²⁾. 조골세포는 간엽 조직(mesenchyme)에서 유래하는 세포로¹⁴⁾ 골 조직의 세포의 기질을 합성하고 기질의 침착과 석회화를 조절하는 골격계의 주된 세포이다¹⁵⁾. 활성화된 조골세포는 골 기질을 합성하며 여러 cytokine 분비를 통해 파골세포의 활성을 조절한다¹⁶⁾. 체내의 조골세포와 파골세포는 상호 작용을 하는 관계로 파골세포의 분화는 조골세포에 의해 엄격하게 조절된다¹⁷⁾. 이러한 파골세포의 골 흡수 작용과 조골세포의 골 형성 과정의 균형이 깨지면 과도한 골 손실이 일어나게 된다²⁾. 따라서 골다공증의 치료에 있어서 파골세포의 분화를 억제하거나 조골세포의 활성을 증가시키는 것이 중요할 것으로 사료된다.

歸脾湯은宋代嚴用和의《濟生方》⁶⁾에 최초로 수록된 처방으로人蔘, 黃芪는補氣健脾하고當歸, 龍眼肉은養血和營하며白朮과木香으로健脾理氣하고茯神, 遠

志, 酸棗仁은養心安神하며炙甘草, 生薑, 大棗는和胃健脾하여生化를 돕는다. 따라서氣는旺盛해지고血은充盈하여心脾를補益하게 되고氣旺生血하게 된다¹⁸⁾. 血이 조화로우면筋骨이 굳세어지고關節이 원활해진다¹⁹⁾. 歸脾湯의 이러한益氣補血하는 효능은血을滋養하여筋骨을 강화하게 하고關節을 이롭게 하여 골다공증 치료에 효과적일 것으로 판단된다.

GB가 파골세포에 미치는 영향을 평가하기 위해 RANKL로 유도된 RAW 264.7 세포에 GB를 처리하여 TRAP(+) 다핵세포를 측정하고, 세포 기능에 관련된 유전자 발현을 측정하였다. TRAP는 성숙한 파골세포에서 발현되는 표지자로 알려져 있다²⁰⁾.

GB의 세포 독성 유무를 확인하기 위하여 실험한 결과 GB는 세포 생존율에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 1). Osteoclastogenesis를 측정하는데 이용되는 RAW 264.7 세포에 RANKL을 가하여 분화시켜 GB가 TRAP(+) 다핵세포 형성을 억제하는지 측정하였다. 실험 결과 GB는 TRAP(+) 다핵세포의 형성을 억제하여(Fig. 2) 파골세포의 분화를 억제하는 것으로 판단되었다.

GB의 TRAP 활성 억제 효과를 확인하기 위하여 GB를 처리한 파골세포로부터 TRAP의 활성을 측정한 결과 모든 농도에서 활성도를 유의성 있게 억제하였다(Table 3).

이상의 결과로 GB가 파골세포의 분화와 활성을 억제함을 알 수 있으며 이를 바탕으로 GB가 파골세포의 기능에 관여하는 유전자들의 발현에 미치는 영향을 측정하여 GB의 구체적인 작용 기전을 밝히고자 하였다.

Cathepsin K는 RANKL이나 M-CSF

등을 처리하는 경우 발현되는 단백질로 파골세포 활성화의 유력한 지표로 사용할 수 있다²¹⁾. 실험 결과 GB를 처리한 파골세포에서 Cathepsin K의 유전자 발현이 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다(Fig. 3).

MMP-9은 파골세포의 골 흡수 과정 중 나타나는 효소로²²⁾ GB를 처리한 파골세포에서 MMP-9의 발현이 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다(Fig. 4).

TRAP는 파골세포 포식 유전자로 TRAP (+) 세포들은 세포융합 과정을 거쳐 다핵 파골세포로 분화하여 골 흡수 기능을 하게 된다²⁰⁾. 실험 결과 GB는 RANKL 처리로 증가된 TRAP 유전자의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 5).

MITF는 파골세포의 분화를 촉진하는 전사 인자 중 하나로²³⁾ 실험 결과 GB는 RANKL 처리로 증가된 MITF의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 6).

NFATc1은 파골전구세포에서 파골세포로의 분화를 촉진하는 신호전달 단백질로 파골세포의 분화를 유도하는 핵심 전사인자 중 하나이다²⁴⁾. 실험 결과 GB는 RANKL 처리로 증가된 NFATc1의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 7).

조골세포의 RANKL을 촉진시키는 여러 인자 중 TNF- α , IL-6 등의 발현은 염증 반응의 일환으로 볼 수 있으며^{25,26)} 일반적으로 활성화된 대식세포의 염증 반응에는 iNOS, COX-2 등의 염증 물질이 매개된다²⁷⁾. 실험 결과 RANKL 처리 파골세포는 분화되기 전의 전구세포에 비해 iNOS 발현이 증가되었으며 GB는 50 μ g/ml의 농도에서 iNOS 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였으나 75 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도에서는 억제하지 못하여(Fig. 8) iNOS의 발현에는 영향을 미치지 못한

것으로 판단되었다.

TNF- α 는 염증성 골 파괴의 매개자로 알려져 있다²⁸⁾. 실험 결과 GB는 50 μ g/ml의 농도에서는 TNF- α 를 대조군에 비해 오히려 증가시켰으며 75 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도에서는 대조군에 비해 억제하지 못하였다(Fig. 9).

IL-6는 염증 매개 물질로 작용하는 cytokine으로 파골세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있어 염증성 골 파괴를 유발할 수 있다²⁹⁾. GB는 RANKL 처리로 증가된 IL-6의 발현을 억제하지 못하고 오히려 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 10).

COX-2의 발현으로 활성이 증가되는 PGE₂는 파골세포의 분화를 촉진한다³⁰⁾. 따라서 COX-2의 발현을 억제하면 파골세포의 분화를 억제할 수 있다. 실험 결과 GB는 COX-2의 발현을 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 11).

GB가 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위해서 rat의 태자로부터 분리한 두개골 세포를 이용한 연구를 수행하였다. 연구 결과 GB는 10 μ g/ml의 농도에서 조골세포의 분열을 유의성 있게 촉진하였다(Fig. 12).

조골세포 세포막에는 당단백 효소인 ALP가 존재하며 이는 특히 골 형성이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가하여 조골세포 분화의 표지인자로 사용된다³¹⁾. 실험 결과 GB는 10 μ g/ml의 농도에서 ALP 생성을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 13).

Collagen이 대부분을 차지하는 뼈의 기질 단백질들은 뼈의 탄성과 유연성을 유지시키며 구조적으로 지지 역할을 한다³²⁾. 실험 결과 GB는 골기질 단백질의 합성을 증가시키지 못하였으나(Fig. 14), 10 μ g/ml

의 농도에서 Collagen의 합성을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 15).

실험 결과, GB는 파골세포의 분화와 활성을 억제하였으며 파골세포의 분화를 촉진시키는 Cathepsin K, MMP-9, TRAP, MITF, NFATc1 유전자의 발현을 억제함을 확인하였다. 그러나 COX-2를 제외한 그 외의 염증성 골 파괴를 유발하는 인자들인 iNOS, TNF- α , IL-6의 발현은 억제하지 못하여 염증 반응을 매개로 발생하는 골 소실에는 GB가 효과 없는 것으로 판단된다. 또한 GB는 조골세포의 분열능 및 ALP 생성을 촉진시켰으며 골 기질 단백질 합성은 증가시키지 못했으나 collagen의 합성을 증가시켜 조골세포의 활성을 촉진시켰다.

이상으로 보아 GB는 조골세포의 활성을 촉진시키며 파골세포의 분화 및 이와 관련된 유전자의 발현을 억제하여 골다공증의 치료에 유효할 것으로 사료된다. 그러나 염증 환경을 유발하여 파골세포의 분화를 촉진하는 인자들에는 유효성을 나타내지 못하였는데 이는 GB가 골다공증의 虛證性 병리 기전에 더 유효함을 시사하며 補劑로써 GB의 한의학적 약리 기전을 명확히 보여준 결과로 사료된다. 향후 GB가 골 대사의 어느 기전에 가장 유효한 지에 대한 심화 연구가 필요할 것으로 생각된다.

폐경 후 골다공증은 노인성 골다공증과 함께 퇴행성 골다공증 중 하나로 만성 갱년기 장애의 대표적 질환이다³³⁾. 歸脾湯은 갱년기증후군의 상용 처방으로³³⁾ 임상에서 만성 갱년기 장애 환자의 골다공증 예방 및 치료제로써 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

歸脾湯이 파골세포의 분화와 조골세포의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 GB를 처리한 RANKL 유도 RAW 264.7 세포의 TRAP(+) 세포 형성과 골 흡수 관련 인자들의 유전자 발현을 측정하였으며, rat의 두개골로부터 분리한 조골세포의 분열능 및 ALP 활성, 골 기질 단백질 합성, Collagen 합성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. GB는 RANKL에 의해 분화되는 파골세포의 형성 지표인 TRAP(+) 다핵세포의 형성을 억제하였으며 분화된 파골세포에서 TRAP 활성을 억제하였다.
2. GB는 파골세포 분화 관련 유전자인 Cathepsin K, MMP-9, TRAP, MITF, NFATc1의 발현을 억제하였다.
3. GB는 분화된 파골세포에서 COX-2의 발현을 억제하였으나 iNOS의 발현을 억제하지 못하였고 TNF- α 와 IL-6의 발현은 오히려 증가시켰다.
5. GB는 rat의 두개골 조골세포의 분열능, ALP 활성을 증가시켰다.
6. GB는 rat의 두개골 조골세포의 골 기질 단백질의 합성에는 영향을 미치지 못하였으나 collagen 합성을 증가시켰다.

이상으로 보아 GB는 파골세포의 분화와 활성을 억제하고 파골세포 분화를 촉진시키는 인자들을 억제하였으며 조골세포의 활성을 촉진하여 향후 골다공증에 유효한 치료제로써 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

- 투 고 일 : 2014년 7월 17일
- 심 사 일 : 2014년 7월 28일
- 게재확정일 : 2014년 8월 4일

참고문헌

1. National Institute of Health. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. National Institute of Health Consensus Statement. 17th. 2000:1-45.
2. 정호연. 골다공증 진단 및 치료지침 2007. 대한내분비학회지. 2008;23(2):76-108.
3. 한방재활의학과학회. 한방재활의학. 서울:군자출판사. 2005:110-2, 165-70.
4. 강성길, 박영배, 안현석. 골다공증의 침구치료에 대한 문헌적 고찰. 대한침구학회지. 1995;15(2):171-89.
5. 김민범, 김성수, 정석희. 골다공증 연구에 사용되는 처방 및 본초에 관한 문헌 연구-2000년 이후 발표된 논문을 중심으로. 한방재활의학과학회지. 2010;20(1):91-107.
6. 嚴用和. 嚴氏濟生方. 北京:人民衛生出版社. 1980:117.
7. 王子接. 絳雪園古方選注(文淵閣本) 卷7. 서울:여강출판사. 1986:9-10.
8. 대한동의생리학회. 동의생리학. 서울:일중사. 2005:105, 337-8.
9. 조성희, 유동열. 歸脾湯 및 歸脾湯加紫河車가 卵巢摘出로 유발된 흰쥐의 骨多孔症에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2007;20(4):24-40.
10. 황도연. 方藥合編. 서울:남산당. 2005:197-8.
11. Kanis JA, et al. The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res. 1994;9(8):1137-41.
12. 대한산부인과학회 교과서 편찬위원회. 부인과학. 서울:고려의학. 2008:567-70.
13. 보건복지부 질병관리본부 질병예방센터 건강영양조사과. 골다공증 유병률 및 관리현황: 국민건강영양조사 2008-2011. Available from: URL: <http://www.cdc.go.kr/CDC/notice/CdcKrInfo0301.jsp?menuIds=HOME001-MNU0004-MNU0036-MNU0037&cid=21375>.
14. Fauci AS, et al. 해리슨 내과학. 17판. 서울:도서출판 MIP. 2010:2845.
15. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH. Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. Physiol Rev. 1986;66(4):855-86.
16. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. Nat Med. 2007;13(7):791-801.
17. Suda T, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev. 1999;20(3):345-57.
18. 한의과대학 방제학 교수 공편저. 방제학. 서울:영림사. 2006:290-1.
19. 이경우 번역. 編注譯解 黃帝內經靈樞 2. 서울:여강출판사. 2003:491-2.
20. Angel NZ, et al. Transgenic mice overexpressing Tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. J Bone Miner Res. 2000;15(1):103-10.
21. Manhui P, et al. AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells. Gene. 2007;403(1-2):151-8.
22. 유미연 등. 파골세포 분화에 관여하는 RAW 264.7 세포내 활성물질 연구. Cancer

- Prevention Research. 2007;12:310-8.
23. Hershey CL, Fisher DE. Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. *Bone*. 2004; 34(4):689-96.
 24. Takayanagi H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1(NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Development Cell*. 2002;3 :889-901.
 25. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews Genetics*. 2003;4(8):638-49.
 26. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med*. 2005;83(3):170-9.
 27. Posadas I, et al. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000; 361(1):98-106.
 28. Bertolini DR, et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*. 1986;319(6053):516-8.
 29. Kudo O, et al. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*. 2003;32(1):1-7.
 30. Coon D, et al. The Role of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. *Journal of Endodontics*. 2007;33(4):432-6.
 31. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *The FASEB Journal*. 1999;4(13):3111-23.
 32. 신찬수, 조화영. 뼈의 재형성 및 무기 질화. *대한내분비학회지*. 2005;20(6):543-55.
 33. 대한한방부인과학회. *한방여성의학*. 서울:의성당. 2012:276-9, 286-9.