

## 녹제초 추출물이 파골세포 분화 및 골 흡수에 미치는 영향

박정식 · 임형호  
가천대학교 한의과대학

### Effects of *Pyrola japonica* Extracts on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption

Jung-Sik Park, K.M.D., Hyung-Ho Lim, K.M.D.  
College of Korean Medicine, Gachon University

RECEIVED March, 28, 2019  
REVISED April, 8, 2019  
ACCEPTED April, 12, 2019

CORRESPONDING TO  
Hyung-Ho Lim, College of Korean  
Medicine, Gachon University, 1342  
Seongnam-daero, Sujeong-gu,  
Seongnam 13120, Korea

TEL +82-31-750-8599  
FAX +82-31-750-5416  
E-mail omdlimhh@gachon.ac.kr

Copyright © 2019 The Society of  
Korean Medicine Rehabilitation

**Objectives** This study was performed to evaluate the effect of *Pyrola japonica* extract (NJ) and its principal constituent, homoarbutin (HA) on osteoclast differentiation and gene expression and bone resorption. The osteoclastogenesis and gene expression were determined in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)-stimulated RAW264.7 cell.

**Methods** In order to evaluate the effect of HA extracted from NJ on bone resorption, osteoclasts were used to be differentiated and formed by stimulating RAW264.7 cells with RANKL. Tartarate-resistant acid phosphatase (TRAP) (+) polynuclear osteoclast formation ability was evaluated, and differentiation control genes including cathepsin K, matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), and TRAP in osteoclast differentiation were analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR). Immunoblotting was performed to measure the effect of mitogen-activated protein kinase (MAPK) factors on bone resorption, and the effect of osteoclasts on osteoclast differentiation was measured.

**Results** Both NJ and high concentration of HA blocked RANKL-stimulated differentiation from RAW264.7 cell to TRAP-positive multinucleated cells. NJ reduced RANKL-induced expression of TRAP, cathepsin K. Both NJ and high concentration of HA inhibited RANKL-mediated expression of MMP-9, nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1, and cellular Jun-fos. NJ suppressed RANKL-stimulated expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase, tumor necrosis factor-alpha, and levels of interleukins. Both NJ and HA decreased bone resorption in osteoclast-induced bone pit formation model.

**Conclusions** These results suggest that NJ and HA blocked bone resorption by decreasing RANKL-mediated osteoclastogenesis through down-regulation of genes for osteoclast differentiation. (**J Korean Med Rehabil 2019;29(2):135-147**)

**Key words** Osteoclast, Poncirin, Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), Tartarate-resistant acid phosphatase (TRAP), Japonica extract, Homoarbutin

## 서론»»»»

골다공증은 미세구조 이상과 골량 감소를 특징으로 하며 골을 형성하는 조골세포보다 골을 파괴하는 파골세포의 기능이 우세하여 나타나는 전신적인 골격계 질병이다.

특히 여성 갱년기 이후에 에스트로겐 부족으로 많이 발생하고 있다. 골다공증의 치료는 조골세포의 기능을 활성화시켜 골 형성을 촉진하거나 파골세포의 활성을 억제하여 골 흡수를 방해하는 방법이 시도되고 있다<sup>1,2)</sup>.

골수에 존재하는 골세포 전구세포는 여러 분화 촉진 인

자들의 작용으로 파골세포로 분화될 수 있는데, 분화 촉진 인자로 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)나 receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)가 잘 알려져 있다<sup>2)</sup>. 이러한 분화 과정에는 RANKL 이 세포 표면에 존재하는 수용체에 결합하는 것을 시작으로 activator protein-1, cellular Jun-fos (c-fos), nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 (NFATc1), cellular-Jun (c-jun) 등의 활성화와 extracellular regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 등의 인산화 과정 등을 통해 진행된다<sup>3)</sup>. 궁극적으로 파골세포의 골 흡수는 분화한 파골세포에서 tartarate-resistant acid phosphatase (TRAP)이나, matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), cathepsin K 등의 작용을 통하여 나타나게 된다<sup>4)</sup>.

한의학적으로 골다공증은 임상적으로 骨萎, 骨痺, 骨枯, 虛勞 등에 해당하며 『素問痿論』에서 “腎氣熱, 即腰脊不舉, 骨枯而髓減, 發爲骨痿. 有遠行勞倦, 逢大熱而渴, 渴即陽氣內伐, 內伐即熱舍於腎, 腎者水臟也. 今水不勝火, 即骨枯而髓虛, 故足不任身, 發爲骨痿. 故下經曰, 骨痿者, 生於大熱也.”라 하여 발병 기전 및 坐不能起, 腰脊不舉, 肌膚削而形羸瘦, 腰膝疼痛 등의 골다공증과 유사한 증상에 대하여 설명하였다<sup>7)</sup>.

본 연구에 사용된 녹제초(*Pyrola japonica*)는 노루발풀로 불리며, 한국을 비롯하여 난온대 지방에 서식하는 여러해살이 풀로 꽃 피는 시기에 줄기와 잎을 채취해서 약재로 사용한다<sup>8)</sup>. 최근 녹제초는 지혈 촉진, 이뇨 촉진, 항염증 작용 및 면역 활성화에 대한 연구 결과가 보고되었다<sup>9,10)</sup>. 성분으로는 pirolatin, hyperin, monotropein and chimaphilin, arbutin과 homoarbutin (HA) 등이 보고되었다<sup>11)</sup>.

한의학적으로 녹제초(鹿蹄草)의 성미는 甘苦하고 溫하며 祛風濕, 健筋骨, 補肺腎, 止血하는 효능이 있다<sup>12)</sup>. 그러나 녹제초라는 본초가 널리 사용되지 않고 연구 또한 활발히 진행되지 않았기에 근골격계 질환과 관련된 연구를 하여 새로운 가능성을 넓히고자 健筋骨 하는 효능에 집중하여 본 연구를 시행하였다. 이에 녹제초 및 그 주성분의 골다공증 및 파골세포에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 본 연구는 녹제초 및 그 주성분인 HA가 골다공증에 미치는 유효성을 검증하기 위하여 RANKL 유도 파골세포 분화 및 관련 인자들의 발현을 측정하고 골편을 사용한 골 흡수에 미치는 영향을 측정하여 골다공증 억제 효능을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법》》》》

### 1. 재료

#### 1) 녹제초 추출 및 HA 분리

녹제초(*Pyrola japonica*) 100 g을 분말화하여 플라스크에 투입한 후, 30% 에탄올 500 mL를 가하고 6시간 이상 가열 과정을 거쳐 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 후, 여액을 evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 농축한 후, 동결 건조하여 녹제초 추출물(*Pyrola japonica* extract, NJ)로 실험에 사용하였다. 유효 성분을 분리하기 위하여 위에서 감압 농축한 추출물에 증류수를 넣어 현탁시켰다. 현탁시킨 액을 ethyl acetate (EtOAc)로 추출하고, 다시 나머지 액을 butanol (BuOH)을 이용하여 추출하여 각각의 추출액을 농축시키고 농축액을 silica gel column을 사용하여 분리 정제하였다.

#### 2) HA 분리 동정 및 시료 제조

실험에 사용한 HA는 기존의 보고된 방법을 사용하여 분리하였으며<sup>11)</sup>, 3 hydrogen-nuclear magnetic resonance를 사용하여 동정하여 확인하였다. 실험 시에는 dimethyl sulfoxide를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45  $\mu$ m의 여과지를 통과시킨 다음 사용하였다.

#### 3) 세포 구입

파골세포 전구세포, mouse myeloid 세포주인 RAW 264.7 세포에 RANKL을 처리하여 유도한 세포 모델을 실험에 사용하였다. 사용한 RAW 264.7은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였다.

### 2. 방법

#### 1) RAW 264.7 Cell 배양

RAW 264.7 세포는 Dulbecco's modified eagle medium/10% Fetal bovine serum (FBS)/PC-SM 배지를 사용하여 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였으며, 세포 수는 5×10<sup>3</sup> cells/well로 96 well plated에서 배양하였다. 24시간 배양 후 배양액을 버린 다음, 10% FBS, 100 ng/mL RANKL, 1 ng/mL transforming growth factor beta (TGF $\beta$ )를 첨가한  $\alpha$ -minimal essential media로 교환한 다음 세포배양하였다.

배양액에 여러 농도의 NJ 및 HA를 첨가해 주었다. 2일에 1회씩 동일 배지로 교체해 주면서 6일 동안 배양하였다.

## 2) 파골세포 생성 측정

RANKL로 RAW 264.7 cell을 파골세포로 유도한 후, TRAP을 염색하여 TRAP-positive 세포의 분화 정도를 평가하였다. phosphate buffered saline (PBS)로 분화시킨 세포를 2회에 걸쳐 세척하고, 3.7% formaldehyde-citrate-acetone 용액으로 10분 고정시키고 증류수로 2회 세척하였다. 2% TRAP fast garnet glucobrassicin base 용액과 NaNO<sub>3</sub> 용액을 1:1 비율로 섞은 용액과 4% acetic acid, 2% tartaric acid, 5% naphtha AS-BI phosphoric acid를 포함한 용액을 고정시킨 세포에 처리한 후 30분 이상 상온에 방치하였다. 광학현미경으로 관찰하여 3개 이상의 핵을 가진 TRAP-positive한 다핵세포(TRAP+) multinucleated cells [MNCs]를 계산하여 파골세포의 생성지표로 지정하였다.

## 3) 파골세포 유전자발현 측정

### (1) Total RNA 분리

RNA의 분리를 위해 배양세포 배지를 제거한 후, 4°C PBS로 3회 세척하였다. 세포를 모아 750×g에서 10분간 원심 분리하고 ice cold PBS로 2회 세척하였다. 침전된 세포에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 다음, 12,000×g에서 10분간 원심 분리하는 과정을 거쳐 상층을 취하였다. Trisamine (Tris) buffer에 1M sucrose를 함유하여 loading한 다음, 36,000 rpm에서 원심분리를 160분간 시행하였다. Polysome pellet을 취하여 sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer에 녹인 다음 30분간 37°C에서 incubation하였다. Sodium acetate buffer를 가한 후 phenol/CsCl<sub>3</sub> 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2 M이 되도록 추가하고 ethanol (EtOH)를 가한 후 12시간 동안 -20°C에 보관하였다. 75% EtOH로 침전물을 2회 washing한 후 건조하였다. 유전자 발현에 필요한 RNA 양을 대조군과 시험군에서 mRNA 양이 같아지도록 조정한 후 전기영동으로 확인하여 사용하였다.

### (2) cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각기 분리한 total RNA액 10 μL (10 μg RNA 함유)에 oligo dT 1 μL (2 μg/μL)을 넣어 혼합한 후 5분간 90°C에서 incubation하였다. Primer가 annealing하도록 약 10분간 실온에서 방치한 다음 4°C 온

도에서 다음과 같이 시약을 가하였다. 5 xycscript buffer 4 μL, deoxyuridine triphosphate (dUTP) nucleotide mix 1 μL, dUTP Cydye-labelled nucleotide 0.1 μL, 0.1M dithiothreitol 2 μL, Cyscript reverse transcriptase 1 μL, H<sub>2</sub>O 0.9 μL를 첨가, 20 μL로 한 다음 신중하게 수작업으로 tipping 혼합하였다. 그 다음 42°C에서 90분간 incubation하고 얼음에 방치하였다. 2.5M NaOH를 2 μL씩 가한 다음 15분간 37°C에서 incubation하였고 2M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffer (free acid)를 10 μL 가하여 중화시켰다. 각각의 시약은 Amersham Bioscience (Cambridge, UK)에서 구입하였다.

### (3) Real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Optical tube (MicroAmp<sup>®</sup> Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode and Optical Adhesive Films, Applied Biosystems, Cat.No. 4314320)에 각각에 3배의 SybrGreen Mix 2.5 μL (Sigma-Aldrich, Cat.No. S9430)위에서 합성한 10 pmol/μL primer pair mix 1 μL, cDNA 1 μL, 각각 2.5 mM의 dNTP 2 μL, Tag Polymerase 0.3 μL, 10× Tag polymerase buffer 2.5 μL와 14.7 μL H<sub>2</sub>O를 가한 후 95°C 5 min 1 cycle, 95°C 30 sec, 45°C 30 sec, 72°C 60 sec 40 cycles, 95°C 20 min 1 cycle로 증폭시켰다. Primer는 RT-PCR에 이용한 것을 사용하였다. PCR이 끝난 다음 tube를 꺼내 반응액 5 μL를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정한 다음 ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Cat.No. 4349157)를 이용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

## 4) Western Blotting

파골세포에 radioimmunoprecipitation assay buffer (pH8, 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 10 mM NaPO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, 100 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 M ammonium molybdate, 10% glycerol, 0.1% SDS, 1% NP-40) 1 mL를 첨가하여 초음파 파쇄기를 이용, 5초 동안 세포벽을 파괴시킨 후 균질액을 20분간 13,000 rpm에서 원심 분리한 상층액을 단백질 추출액으로 하였다. 10% polyacrylamide/SDS gel에서 정량된 단백질을 전기 영동시킨 다음, polyvinylidene difluoride membrane에 흡착시켰다. JNK, p-38 kinase, ERK의 1차 항체를 5% skim milk, 0.1% Tween-20을 함유한 PBS with

tween-20 (PBST)에 희석시켜서 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 다음 0.01% Tween-20을 함유한 PBST로 3차례에 걸쳐 15분씩 세척하였다. Blocking solution으로 1:10,000배로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti-immunoglobulin g 이차항체와 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 0.1% Tween-20을 함유한 PBS로 3차례에 걸쳐 세척하고 발색은 enhanced chemiluminescence system으로 확인하였다.

### 5) 골 흡수 억제 실험

NJ 및 HA의 골 흡수 억제 효능을 평가하기 위하여 골편에서 골 흡수에 미치는 영향을 관찰하는 방법을 사용하였다. 골 미네랄 흡수에 대한 연구는 Bone resorption assay kit (Gibco, Los Angeles, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 우선 calcium phosphate-coated 골편에 RAW264.7 cells를 옮겨 심고, ethanol extract of *Pyrola japonica*와 HA를 적절한 농도로 전처리한 다음 RANKL을 처리하였다. 위의 세포가 심어진 골편을 이산화탄소 배양기에서 12일간 배양하였다. 12일째에 배지를 제거하고 골 흡수측정용 배지를 첨가한 다음 이산화탄소 배양기에서 배양한 후

extension 485 nm and emission 535 nm 파장에서 현광광도를 측정하였다. 이후에 형성된 pit area를 측정하기 위하여 plate에 5% sodium hypochlorite solution을 처리하여 세포를 제거하고 건조한 다음 현미경으로 관찰하고 대조군과 비교하여 골 흡수 억제 정도를 평가하였다.

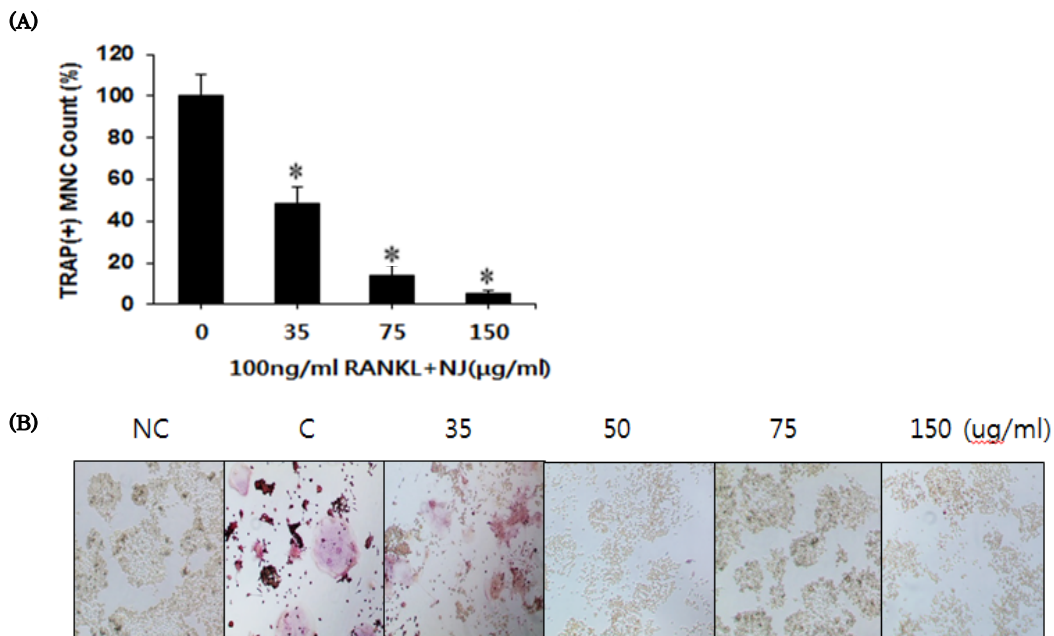
### 3. 통계학적 분석

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's *t*-test를 이용하였다. 모든 통계적 유의 수준은  $p < 0.05$ 로 설정하였다.

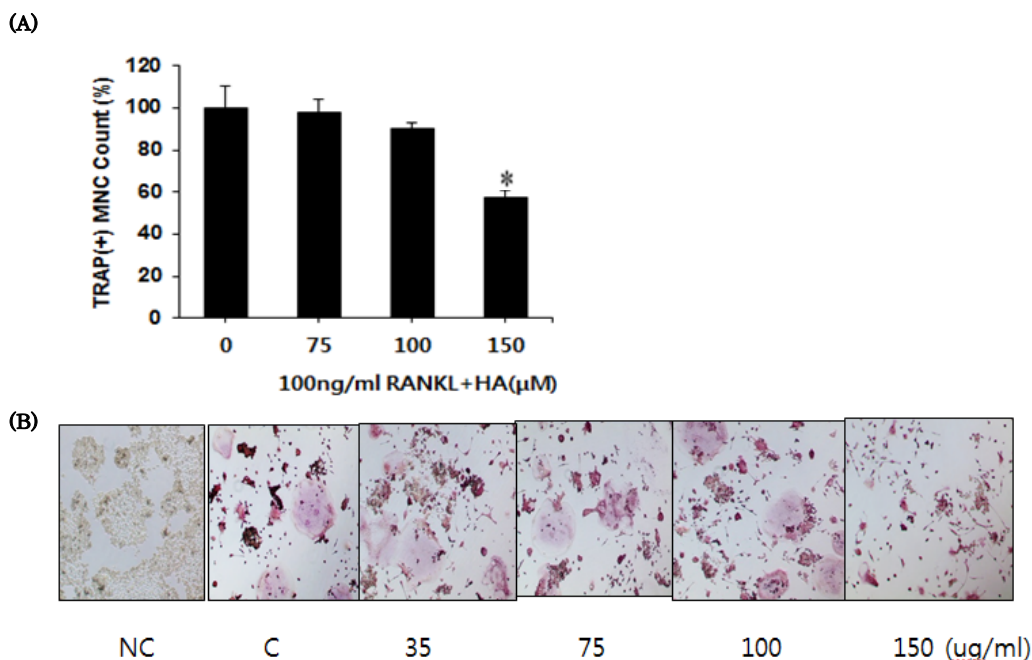
## 결과»»»»

### 1. 파골세포 분화에 미치는 영향

RAW 264.7 cell을 RANKL과 TGFβ를 첨가한 배지에 배양한 경우 다수의 TRAP(+) MNCs가 형성되었다. 이것을 파골세포로 한 다음 NJ 및 HA가 파골세포 분화에 미치는



**Fig. 1.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on the formation of tartarate-resistant acid phosphatase positive (TRAP+) multinucleated cells [MNCs]. (A) The histogram represents the number of TRAP(+) MNCs compared with receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) treated as a control. (B) RAW264.7 cells were cultured with 35 μg/mL, 75 μg/mL, 100 μg/mL and 150 μg/mL concentration of NJ in the presence of 100 ng/mL RANKL. Cells were fixed and stained for TRAP, and TRAP(+) MNCs were observed using inverted microscope(×100). Each bar represents mean±standard deviation of 5 tests, NC: negative control, C: control, \*Represents  $p < 0.01$  compared to the control group.



**Fig. 2.** Effects of homoarbutin (HA) on the formation of tartarate-resistant acid phosphatase (TRAP[+]) multinucleated cells [MNCs]. (A) The histogram represents the number of TRAP[+] MNCs compared with receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) treated as a control. (B) RAW264.7 cells were cultured with 35 μg/mL, 75 μg/mL, 100 μg/mL and 150 μg/mL concentration of HA in the presence of 100 ng/mL RANKL. Cells were fixed and stained for TRAP, and TRAP[+] MNCs were observed using inverted microscope(x100). Each bar represents mean±standard deviation of 5 tests. NC: negative control, C: control. \*Represents p<0.01 compared to the control group.

영향을 평가하였다. 측정 결과, NJ는 모든 군에서 파골세포 형성을 유의성 있게 억제하였고 HA는 150 μg/mL 처리 시 파골세포 형성을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 1, 2).

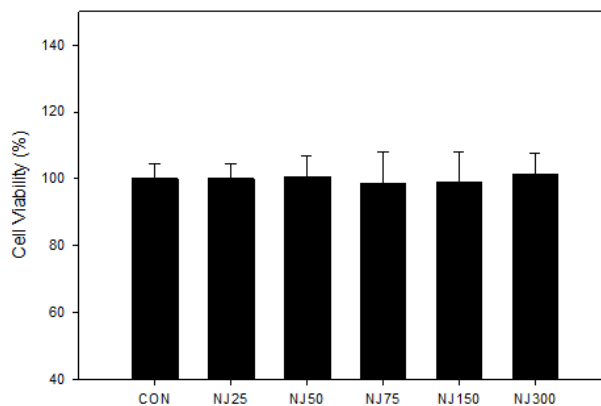
## 2. 파골세포 생존율에 미치는 영향

NJ 및 HA가 세포사멸을 통해 분화를 억제하는지 평가하기 위하여 미분화된 세포에 추출물을 첨가한 다음 3일간 배양하여 MTT 방법으로 세포 생존율을 평가하였다. 실험 결과, NJ 및 HA는 실험에 사용한 모든 군에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 3, 4).

## 3. 파골세포 유전자 발현에 미치는 영향

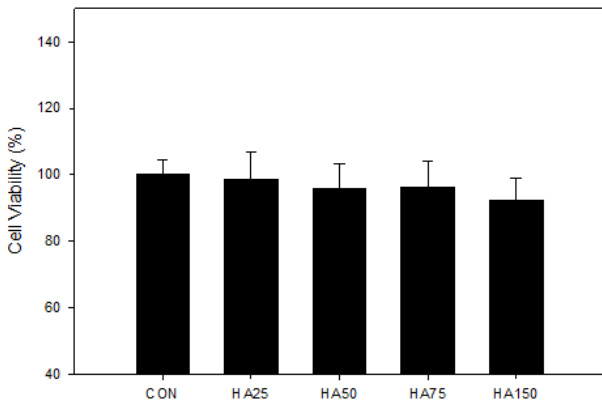
### 1) Cathepsin K 발현에 미치는 영향

Cathepsin K는 RANKL이나 M-CSF 등을 처리하면 TRAP, MMP-9 등과 같은 단백질이 발현되어 골 흡수에 관여하고 있다. 그러므로 cathepsin K는 MMP-9, TRAP과 함께 파

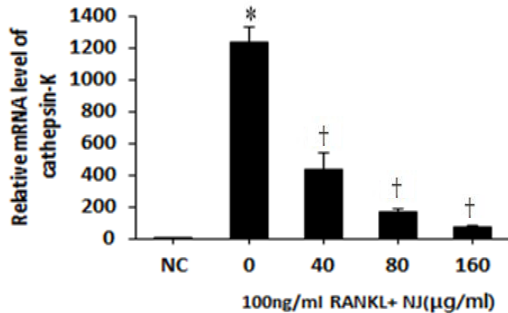


**Fig. 3.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on cell viability of osteoclast. CON: vehicle, NJ25: 25 μg/mL of NJ, NJ50: 50 μg/mL of NJ, NJ75: 75 μg/mL of NJ, NJ150: 150 μg/mL of NJ, NJ300: 300 μg/mL of NJ.

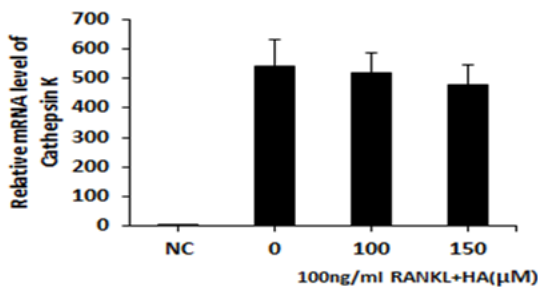
골세포 활성화 지표로 이용할 수 있다. 본 실험에서는 파골세포 기능과 관련된 유전자들에 NJ 및 HA가 미치는 영향을 평가하는 지표로 cathepsin K 발현에 주는 영향성을 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험 결과, NJ는 모든 군에서 cathepsin K 유전자 발현을 유의성 있



**Fig. 4.** Effects of homoarbutin (HA) on cell viability of osteoclast. CON: vehicle, HA25: 25  $\mu\text{g/mL}$  of HA, HA50: 50  $\mu\text{g/mL}$  of HA, HA75: 75  $\mu\text{g/mL}$  of HA, HA150: 150  $\mu\text{g/mL}$  of HA.



**Fig. 5.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on the expression of cathepsin K in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated Osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 40: RANKL (100 ng/mL)+40  $\mu\text{g/mL}$  of NJ, 80: RANKL (100 ng/mL)+80  $\mu\text{g/mL}$  of NJ, 160: RANKL (100 ng/mL)+160  $\mu\text{g/mL}$  of NJ. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents  $p < 0.01$  compared to NC group. †Represents  $p < 0.01$  compared to the control group.



**Fig. 6.** Effects of homoarbutin (HA) on the expression of cathepsin K in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 100: RANKL (100 ng/mL) +100  $\mu\text{g/mL}$  of HA, 150: RANKL (100 ng/mL)+150  $\mu\text{g/mL}$  of HA. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests.

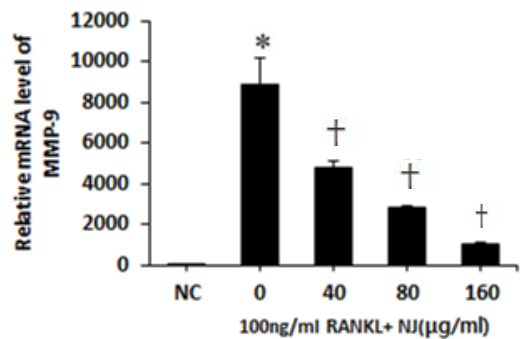
게 억제하였고 HA는 실험 결과 유의성 있는 감소 효과가 없었다(Fig. 5, 6).

## 2) MMP-9 발현에 미치는 영향

MMP-9는 파골세포에서 분비되는 collagen을 파괴하는 단백질 파괴물질이다. RANKL로 자극된 파골전구세포는 파골세포로 분화하여 발생하는 osteoprotegerin (OPG), TRAP 단백질 등과 더불어 MMP-9의 작용으로 골 흡수를 유도한다. MMP-9 활성을 NJ 및 HA를 처리한 파골세포로부터 측정할 결과, NJ는 모든 군에서, HA는 150  $\mu\text{g/mL}$  농도 처리 시 RANKL 처리된 파골세포에서 증가한 MMP-9 발현을 유의하게 억제하였다(Fig. 7, 8).

## 3) TRAP 발현에 미치는 영향

골수에서 유래된 전구세포들이 파골전구세포로 분화되면 파골세포 표식유전자인 TRAP 유전자를 발현하게 된다. 최종적으로 TRAP 양성 세포들은 다핵 파골세포(multinucleated osteoclasts)로 분화하여 골 흡수 작용을 한다. 실험 결과, NJ는 모든 군에서 RANKL 처리하여 증가된 분화된 파골세포의 TRAP 유전자 발현을 유의하게 억제하였고 HA는 실험 결과 유의성 있는 결과가 없었다(Fig. 9, 10).

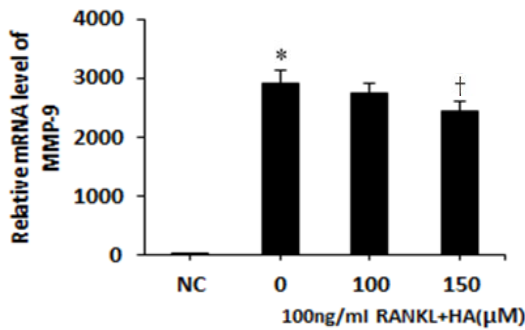


**Fig. 7.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on the expression of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 40: RANKL (100 ng/mL)+40  $\mu\text{g/mL}$  of NJ, 80: RANKL (100 ng/mL)+80  $\mu\text{g/mL}$  of NJ, 160: RANKL (100 ng/mL)+160  $\mu\text{g/mL}$  of NJ. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents  $p < 0.01$  compared to NC group. †Represents  $p < 0.01$  compared to the control group.

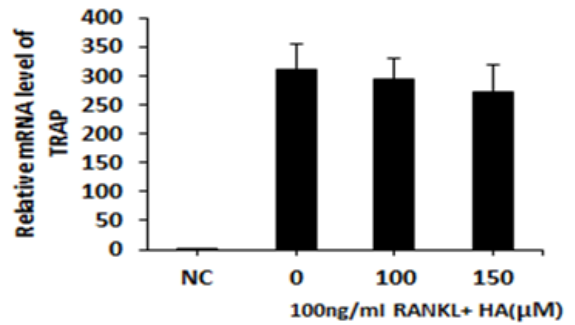
4) NFATc1 발현에 미치는 영향

NFATc1는 파구전골세포에서 파골세포로 분화를 촉진하는 단백질로 신호전달 과정은 RANKL/receptor activator of nuclear factor kappa (RANK) 복합체가 형성되면서 시작되어 tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)가 활성화되고 mitogen-activated protein kinase

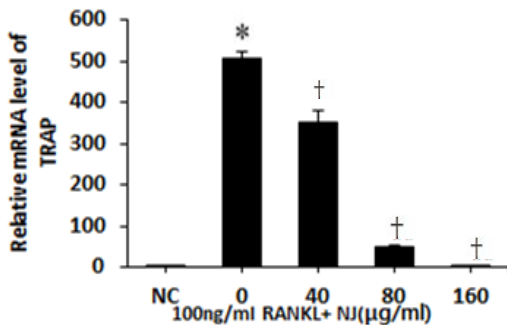
(MAPK)의 pathway 활성화(JNK, ERK, p38) 과정을 거쳐 transcription factor의 활성화에 NFATc1, nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells (NF-kB), Akt, Src 등이 포함되어 있다. 본 연구에서는 신호전달 과정의 일부인 NFATc1의 발현에 NJ 및 HA가 미치는 영향을 측정하였다. 실험 결과 NJ는 모든 군에서, HA는 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 처리 시에서, RANKL 처리된 파골세포 분화 과정에서 증가하는 NFATc1의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig.



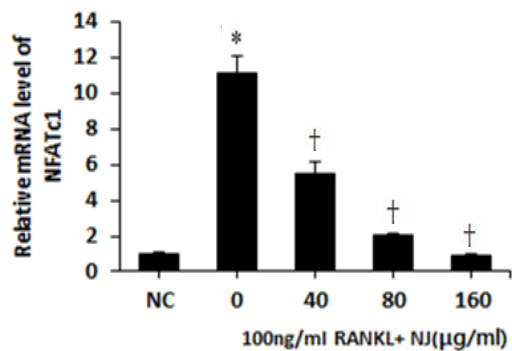
**Fig. 8.** Effects of homoarbutin (HA) on the expression of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 100: RANKL (100 ng/mL)+100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of HA, 150: RANKL (100 ng/mL)+150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of HA. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents  $p < 0.01$  compared to NC group. †Represents  $p < 0.05$  compared to the control group.



**Fig. 10.** Effects of homoarbutin (HA) on the expression of tartarate-resistant acid phosphatase (TRAP) in osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) (100 ng/mL), 100: RANKL (100 ng/mL)+100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of HA, 150: RANKL (100 ng/mL)+150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of HA. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests.



**Fig. 9.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on the expression of tartarate-resistant acid phosphatase (TRAP) in osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) (100 ng/mL), 40: RANKL (100 ng/mL)+40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of NJ, 80: RANKL (100 ng/mL)+80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of NJ, 160: RANKL (100 ng/mL)+160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of NJ. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents  $p < 0.01$  compared to NC group. †Represents  $p < 0.01$  compared to the control group.



**Fig. 11.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on the expression of nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 (NFATc1) in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 40: RANKL (100 ng/mL)+40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of NJ, 80: RANKL (100 ng/mL)+80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of NJ, 160: RANKL (100 ng/mL)+160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of NJ. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents  $p < 0.01$  compared to NC group. †Represents  $p < 0.01$  compared to the control group.

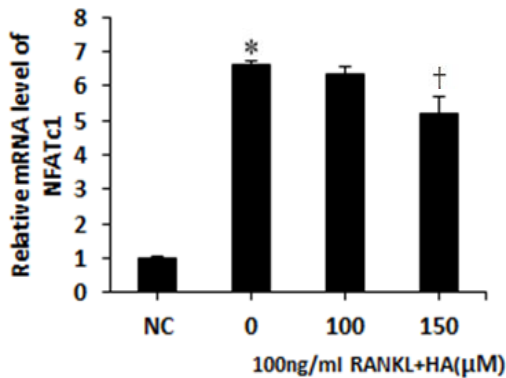
11, 12).

5) c-fos 발현에 미치는 영향

RANKL은 Rac1을 통해서 c-fos 발현을 촉진하고 그 결과 prostaglandinE2 (PGE2) 발현이 증가한다. Cyclooxygenase-2 (COX-2)가 활성화되면 생성된 PGE2는 RANKL과 RANK의 결합을 방해하는 OPG 유리를 조골세포로부터 분리되는 것을 방해한다. 즉 PGE2 생성이 증가하면 파골세포의 분화가 촉진된다. 따라서 c-fos 발현은 파골세포 분화를 촉진할 수 있다. 실험 결과, NJ는 모든 군에서, HA는 150  $\mu$ g/mL 농도 처리 후 RANKL 처리 시 증가되는 c-fos 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 13, 14).

6) Inducible neuronal nitric oxide synthase (iNOS) 발현에 미치는 영향

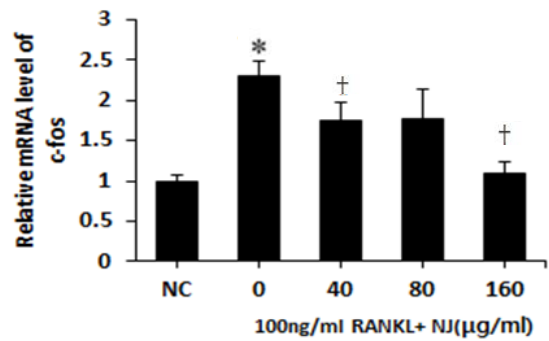
Nitric oxide (NO)는 endothelial 또는 neuronal nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성되거나 또는 inducible NOS (iNOS)에 의해 생성되는 물질로 NOS에 의해 생성된다. 파골구세포에서 파골세포로 분화하는 과정에서 iNO는 분화조절에 관여한다. 실험 결과, NJ는 모든 농도군의 분화한 파골세포에서 RANKL 처리로 증가된 iNOS 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 15).



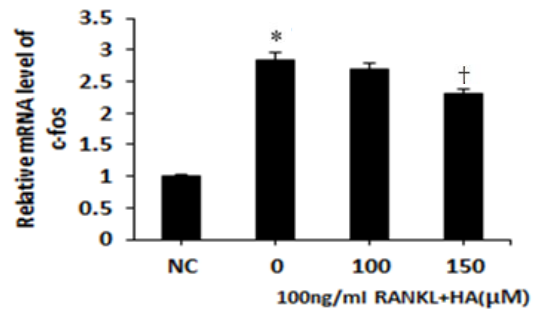
**Fig. 12.** Effects of homoarbutin (HA) on the expression of nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 (NFATc1) in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 100: RANKL (100 ng/mL)+100  $\mu$ g/mL of HA, 150: RANKL (100 ng/mL)+150  $\mu$ g/mL of HA. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents p<0.01 compared to NC group. †Represents p<0.01 compared to the control group.

7) TNF- $\alpha$  발현에 미치는 영향

TNF family 계열의 수용체는 RANK/OPG 등이 있다. 이들의 활성화는 파골세포의 분화를 촉진한다. RANKL과 OPG는 조골세포에서 유리되어 파골세포의 분화에 관여하는데, OPG는 주로 RANKL이 RANK에 결합하는 것을 방해하는 작용을 한다. 이들은 작용 시에 서로 결합되어 있어 밀접한 작용을 하는데 TNF- $\alpha$ 는 파골세포 분화를 촉진



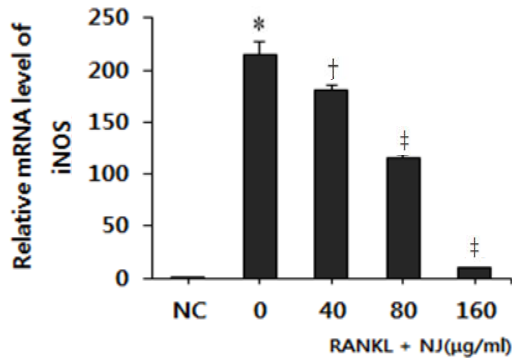
**Fig. 13.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on the expression of cellular Jun-fos (c-fos) in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 40: RANKL (100 ng/mL)+40  $\mu$ g/mL of NJ, 80: RANKL (100 ng/mL)+80  $\mu$ g/mL of NJ, 160: RANKL (100 ng/mL)+160  $\mu$ g/mL of NJ. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents p<0.01 compared to NC group. †Represents p<0.01 compared to the control group.



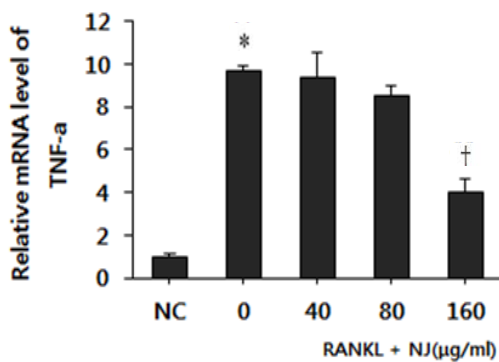
**Fig. 14.** Effects of homoarbutin (HA) on the expression of c-fos in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 100: RANKL (100 ng/mL)+100  $\mu$ g/mL of HA, 150: RANKL (100 ng/mL)+150  $\mu$ g/mL of HA. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents p<0.01 compared to NC group. †Represents p<0.01 compared to the control group.



하는 것으로 알려져 있다. 실험 결과, NJ는 160  $\mu\text{g/mL}$  농도 처리 시 분화된 파골세포에서 RANKL 처리에 의해 증가한 TNF- $\alpha$  발현을 유의하게 억제하였다(Fig. 16).



**Fig. 15.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on the expression of inducible neuronal nitric oxide synthase (iNOS) in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 40: RANKL (100 ng/mL) +40  $\mu\text{g/mL}$  of NJ, 80: RANKL (100 ng/mL)+80  $\mu\text{g/mL}$  of NJ, 160: RANKL (100 ng/mL)+160  $\mu\text{g/mL}$  of NJ. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents  $p < 0.01$  compared to NC group, †Represents  $p < 0.05$  compared to the control group, ‡Represents  $p < 0.01$  compared to the control group.



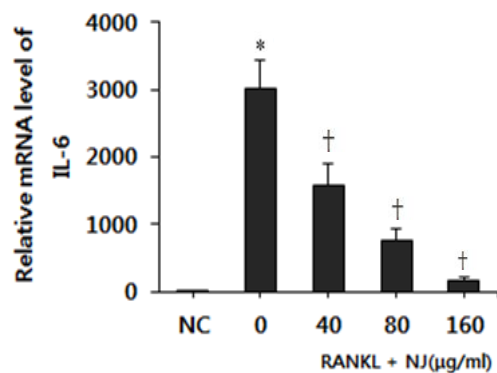
**Fig. 16.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on the expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 40: RANKL (100 ng/mL) +40  $\mu\text{g/mL}$  of NJ, 80: RANKL (100 ng/mL)+80  $\mu\text{g/mL}$  of NJ, 160: RANKL (100 ng/mL)+160  $\mu\text{g/mL}$  of NJ. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents  $p < 0.01$  compared to NC group, †Represents  $p < 0.01$  compared to the control group.

### 8) Interleukin 6 (IL-6) 발현에 미치는 영향

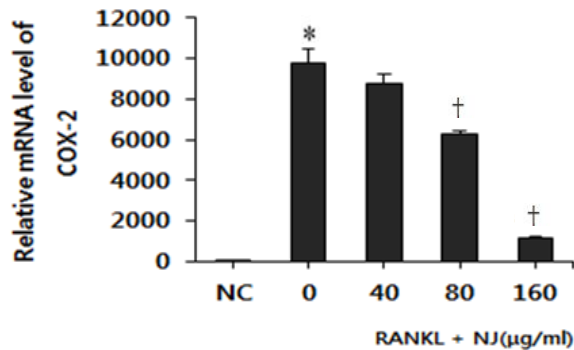
IL-6는 파골세포의 PGs 합성 과정을 촉진하는 사이토카인으로 알려져 있다. 이는 RANKL 처리된 파골세포에서 COX-2 발현과 PGE2 합성 증가로 나타난다. COX-2 발현으로 활성이 증가되는 PGE2는 RANK에 RANKL이 결합하는 작용을 억제하는 OPG 유리를 조골세포로부터 떨어지지 못하게 하는 작용을 통해 RANKL에 의한 파골세포 분화를 촉진할 수 있다. 따라서 IL-6의 발현 증가는 PGE2 생성을 증가시키는 COX-2 발현을 촉진할 수 있어 파골세포 분화를 촉진할 수 있다. 실험 결과 NJ는 모든 농도군의 분화된 파골세포에서 RANKL 처리에 의해 증가한 IL-6 발현을 유의하게 억제하였다(Fig. 17).

### 9) COX-2 발현에 미치는 영향

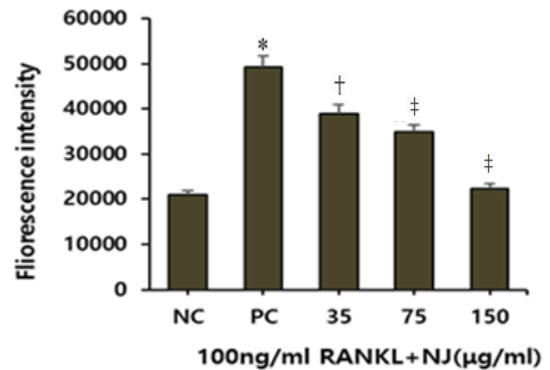
RANKL은 Rac1을 통해 COX-2 발현을 향상시키며 그 결과 PGE2 발현이 증가한다. COX-2가 활성화되어 생성된 PGE2는 RANK에 RANKL이 결합하지 못하도록 하는 OPG 유리를 조골세포로부터 떨어지는 것을 방해한다. 그러므로 PGE2 생성이 증가하면 파골세포의 분화가 촉진될 수 있다. 연구 결과, NJ는 80  $\mu\text{g/mL}$ , 160  $\mu\text{g/mL}$  농도 처리 시 분화된 파골세포에서 RANKL 처리로 증가된 COX-2 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 18).



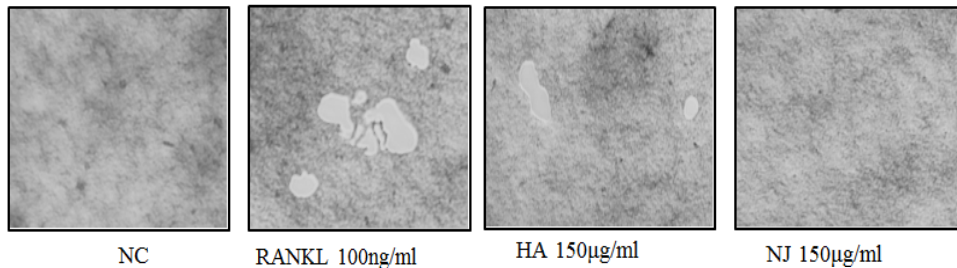
**Fig. 17.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on the expression of interleukin 6 (IL-6) in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 40: RANKL (100 ng/mL)+40  $\mu\text{g/mL}$  of NJ, 80: RANKL (100 ng/mL)+80  $\mu\text{g/mL}$  of NJ, 160: RANKL (100 ng/mL)+160  $\mu\text{g/mL}$  of NJ. Each bar represents mean $\pm$ standard deviation of 5 tests. \*Represents  $p < 0.01$  compared to NC group, †Represents  $p < 0.01$  compared to the control group.



**Fig. 18.** Effects of *Pyrola japonica* extract (NJ) on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) stimulated osteoclast. Negative control (NC): vehicle, 0 (control group): RANKL (100 ng/mL), 40: RANKL (100 ng/mL)+40 µg/mL of NJ, 80: RANKL (100 ng/mL)+80 µg/mL of NJ, 160: RANKL (100 ng/mL)+160 µg/mL of NJ. Each bar represents mean±standard deviation of 5 tests, \*Represents p<0,01 compared to NC group, †Represents p<0,01 compared to the control group.



**Fig. 20.** Effect of *Pyrola japonica* extract (NJ) on osteoclast-induced bone resorption. Negative control (NC): vehicle, Pit formation control (PC): receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) (100 ng/mL), 35: RANKL (100 ng/mL)+35 µg/mL of NJ, 75: RANKL (100 ng/mL)+75 µg/mL of NJ, 150: RANKL (100 ng/mL)+150 µg/mL of NJ. Each bar represents mean±standard deviation of 5 tests, \*Represents p<0,01 compared to NC group, †Represents p<0,05 compared to PC group.



**Fig. 19.** Microscopic image of *Pyrola japonica* extract (NJ) and homoarbutin (HA)-treated bone pit formation in osteoclast induced bone resorption model. NJ and HA treatment showed significant reduction of bone resorption in osteoclast-loaded bone slice. Pit area was subjected to visualization with inverted microscope(x100). RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, NC: negative control.

#### 4. 골 흡수에 미치는 영향

파골세포에 의한 골 흡수에 미치는 영향을 평가하기 위하여 파골세포를 loading한 골편에서 pit formation을 측정하였다. 현미경 관찰하여 사진을 관독하였으며, 형광측정기를 이용하여 측정하였다. 실험 결과, NJ 및 HA는 골편에서 파골세포에 의한 골 흡수를 억제하였다(Fig.19~21).

#### 5. 분자구조 결정

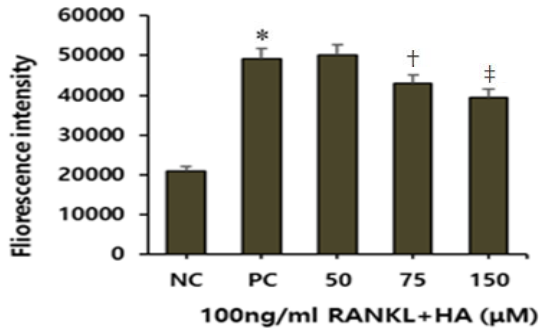
녹제초로 분리한 물질을 NMRh 분석한 결과는 다음과 같다.

1 H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):6.87 (d,J=2.8 Hz, 1 H), 6.78 (dd, J=2.8, 8.4 Hz, 1 H), 6.64 (d, J=8.8 Hz, 1 H), 4.72 (d, J=7.2 Hz, 1 H), 3.88 (d, J=11.2 Hz, 1 H), 3.70~3.66 (m, 1 H), 3.43~3.30 (m, 4 H), 2.15 (d, J=1.6 Hz, 3 H).

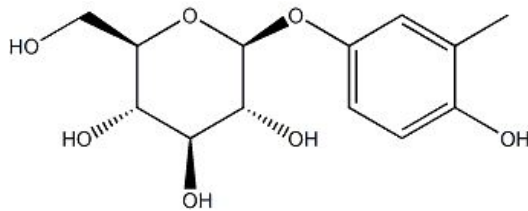
이상의 결과를 토대로 분리된 물질은 HA로 확인하였다(Fig. 22).

#### 고찰»»»»

뼈는 끊임없이 생성되는 흡수되는 과정을 거치는 조직



**Fig. 21.** Effect of homoarbutin (HA) on osteoclast-induced bone resorption. Negative control (NC): vehicle. Pit form control (PC): receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) (100 ng/mL). 50: RANKL (100 ng/mL)+50 µg/mL of HA. 75: RANKL (100 ng/mL)+75 µg/mL of HA. 150: RANKL (100 ng/mL)+150 µg/mL of HA. Each bar represents mean±standard deviation of 5 tests. \*Represents p<0.01 compared to PC group. †Represents p<0.05 compared to PC group. ‡Represents p<0.01 compared to NC group.



**Fig. 22.** Chemical Structure of homoarbutin, [4-Hydroxy-3-methylphenyl beta-D-glucopyranoside].

으로, 골 흡수를 유도하는 파골세포와 골 생성 작용을 하는 조골세포 간의 평형이 중요하다<sup>13)</sup>. 정상적인 상태에서는 조골세포와 파골세포의 기능이 균형을 유지하고 있지만, 병적인 상태가 되면 파골세포 기능이 우세하여 골다공증과 파켓 병, 골화석증, 류마티오이드 관절염 등 대부분의 대사성 골 질환을 유발한다<sup>14)</sup>.

대사성 골 질환 중 골다공증은 주로 폐경기 이후 여성에서 많이 발생하고 있으며 염증반응에 의해서나 스테로이드 계열의 약물 처치의 경우에 발생한다. 폐경기의 여성은 여성 호르몬인 에스트로겐이 감소되며 그 결과 칼시토닌 활성이 저하되어 parathyroid hormone (PTH)의 파골세포에 대한 활성이 높아져 골 흡수가 증가한다<sup>15)</sup>. 염증반응은 iNOS와 COX의 활성 증가로 인한 파골세포에서 MMP-9, cathepsin K 발현을 유도하며, 스테로이드 계열

약물은 조골세포의 기능을 저하시켜 골 형성을 방해함으로써 골다공증을 유발한다<sup>16)</sup>. 녹제초(*Pyrola japonica*)는 노루발풀로 불리며 보허, 익신, 거풍, 제습, 지혈 효능이 있어, 주로 폐허에 의한 해수, 피로 회복, 풍습관절통, 봉루, 백대하, 외상출혈, 용종창독 등에 응용이 가능하다고 알려져 있다<sup>8)</sup>.

본 연구에서는 녹제초 추출물(NJ) 및 그 성분인 HA를 사용하여, RANKL 자극에 의해 대식세포인 RAW 264.7이 TRAP 발현이 증가하는 세포로 분화 정도를 평가하여, NJ 및 HA가 강력한 파골세포 생성 과정 억제 물질인 것을 발견하였다. RAW 264.7 세포를 RANKL로 자극하여 분화시키는 방법은 파골세포 형성을 측정하는 모델로 널리 이용되는 연구 방법이다<sup>17)</sup>. TRAP은 성숙된 파골세포에서 발현되며 TRAP 양성세포는 파골세포로의 분화를 판단함에 사용될 수 있다. 연구 결과, NJ는 독성이 없는 농도에서 RANKL로 유도한 파골세포의 분화를 억제하였고 HA는 유의성 있는 결과가 없었다. 또한 NJ는 파골세포 특이적인 유전자인 TRAP, MMP-9, cathepsin K의 발현을 억제하였고, 파골세포 분화의 핵심적인 조절인자인 c-fos, NFATc1의 발현도 억제하였다. 특징적으로는 세포분화의 신호전달 인자인 JNK의 인산화를 억제하는 효과를 나타내었다. HA는 150 µg/mL 농도 처리 시 조절인자의 발현만 유의하게 억제하였다.

파골세포 표면에 존재하는 TNF receptor family 단백질인 RANK에 RANKL이 결합하면 파골전구세포의 분화가 촉진된다<sup>18)</sup>. RANKL로 자극된 파골전구세포로부터 분화된 파골세포는 골 흡수에 관여하는 cathepsin K, OPG, TRAP 등 단백질의 발현을 증가시킨다. NJ 및 HA를 처리한 파골세포로부터 TRAP 발현을 측정한 결과, NJ는 TRAP 유전자 발현을 모든 농도군에서 유의성 있게 억제시켰으므로, TRAP의 발현을 조절하는 전사조절인자들의 발현을 NJ가 저하시킬 것으로 예상하였다.

파골세포에서는 RANKL 자극으로 인한 TRAF 활성화, MAPK pathway 활성화 및 Src나 Akt 등의 활성화를 통해 transcription factor들인 NF-κB, NFATc1이 활성화된다<sup>19)</sup>. NFATc1은 파골전구세포에서 파골세포로 분화를 촉진하는 TRAP과 osteoclast-associated receptor (OSCAR)의 발현을 조절하는 중요한 전사인자이다. 따라서 TRAP의 발현이 억제되는 것은 NJ가 NFATc1의 발현을 억제시키기 때문인 것으로 추정되었고, 실험 결과에는 없지만 OSCAR

의 발현도 NJ 및 HA에 의해 억제될 것으로 예상되었다. NJ는 NFATc1의 발현을 억제시킴으로써, 하위 단계의 유전자들인 TRAP, OSCAR, cathepsin K 등의 발현을 모두 억제시키는 것으로 판단하였다.

Cathepsin K는 단백질 분해효소로서 RANKL을 처리하는 경우 리소솜에서 발현되어 파골세포의 중요한 역할을 담당한다<sup>20</sup>). 따라서 cathepsin K는 MMP-9, TRAP과 함께 파골세포의 유력한 지표로 사용되는데, 실험 결과 NJ는 cathepsin K 유전자 발현을 모든 농도군에서 유의성 있게 억제하였다. TRAP 발현 조절에는 NFATc1 전사인자가 관여하며, cathepsin K의 발현 조절은 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)가 관여하므로 NJ에 의한 cathepsin K의 발현억제는 NFATc1 또는 MITF 전사인자가 억제될 가능성을 나타낸다. 그러나 HA는 실험 결과 유의성 있는 결과가 없었다.

파골세포에서는 RANKL, TNF- $\alpha$ , IL-6 등으로 인해 활성화되는 inducible NOS에 의해 NO가 생성된다<sup>17</sup>). 파골세포에서 NO는 파골전구세포의 분화를 촉진시키는 인자로 작용하며, 파골세포 분화 후에는 세포의 사멸을 억제하는 생존인자로 작용한다<sup>21</sup>). 실험 결과, NJ는 iNOS 발현을 모든 농도군에서 유의성 있게 억제하였으며, 이는 NO 생성을 감소시켜 파골세포 분화를 억제하고, 분화된 파골세포의 사멸은 촉진할 것으로 추정되었다.

COX-2는 interleukin-1 $\beta$  등의 자극으로 파골세포에서 발현이 증가하며 결과적으로 PGE2의 합성을 증가시킨다. PGE2는 파골세포 내의 protein kinase C의 활성화와 MAPK의 활성화 증가를 촉진하는 한편, G-protein에 연계된 adenylate cyclase와 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent PKA의 활성을 증가시킨다. 또한 cAMP에 의존적인 RANKL과 OPG의 작용을 증폭시켜 MMP-9의 발현을 통한 collagen을 분해하여 골 흡수를 촉진하는 작용을 한다<sup>22</sup>). 실험 결과, NJ는 COX-2 유전자 발현을 억제하였다. 따라서 하위 단계 유전자인 MMP-9의 발현이 억제될 것으로 예상되었다. 실험 결과, MMP-9의 발현도 NJ 및 고농도의 HA에 의해 감소되는 것이 확인되었다. MMP-9은 파골세포 단백질인 TRAP, OPG 등과 더불어 골 흡수를 유발한다<sup>23</sup>).

TNF- $\alpha$ 는 조골세포 콜라겐 합성과 osteocalcin의 발현을 억제한다<sup>24</sup>). 더불어 IL-6와 M-CSF를 활성화하여 파골세포의 분화를 증가하고 골 흡수를 유도한다<sup>25</sup>). TNF- $\alpha$ 는 IL-1 $\beta$ 와 같이 작용하여 TNF- $\alpha$  자신의 합성을 유도

하고 IL-6의 합성을 유도한다<sup>26</sup>). IL-6는 염증반응을 촉진하고, 또한 파골세포의 분화와 활성화를 촉진한다고 보고되었다<sup>27</sup>). 실험 결과, NJ는 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 발현을 억제하였다.

이를 토대로 NJ 및 HA가 골 흡수를 억제할 것으로 판단되어 골편에 파골세포를 부착하여 골 흡수에 영향을 현미경하에서 관찰하고 형광을 측정하여 정량하였다. 실험 결과 NJ 및 HA는 파골세포 작용으로 촉발되는 골 흡수를 억제하였다.

이상의 연구 결과를 토대로 NJ 및 고농도의 HA는 파골세포 분화를 차단하고, 기능을 억제 할 수 있는 것으로 판명되었다. 또한 파골세포의 신호전달 과정에서 관련 유전자 발현을 억제하는 것으로 판단되었다. ex vivo 실험에서 골 손실이 억제되는 것으로 확인되어, NJ 및 고농도의 HA는 골다공증을 예방 또는 치료할 수 있을 것으로 판단되었다.

## 결론»»»»

본 연구에서 녹제초 추출물(NJ) 및 HA가 파골세포의 활성화와 분화를 저하시켜 골의 재흡수를 억제하는지를 알아보기 위해 RANKL로 유도된 TRAP(+) MNCs 형성에 미치는 영향성을 실험하였으며 골 흡수에 관련된 인자들의 유전자 발현과 이에 관련된 신호전달 과정에 끼치는 영향을 측정하였다. 또한 골편을 이용한 골 기질 물질의 손실에 미치는 영향을 측정하여 정리한 결과는 아래와 같다.

1. 녹제초 추출물 및 고농도의 HA는 RANKL 유도 TRAP(+) MNCs 형성을 차단하여 파골세포 분화를 억제하였다.
2. 녹제초 추출물은 RANKL 자극 파골세포에서 TRAP, Cathepsin K의 유전자 발현을 억제하였다.
3. 녹제초 추출물 및 고농도의 HA는 RANKL 자극 파골세포에서 MMP-9, NFATc1, c-fos 유전자 발현을 억제하였다.
4. 녹제초 추출물은 RANKL 자극 파골세포에서 COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현을 억제하였다.
5. 녹제초 추출물 및 HA는 파골세포를 부착시킨 골편에서 골 기질 물질의 파괴를 억제하였다.

## References>>>>

1. Thompson WR, Rubin CT, Rubin J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene*. 2012;503(2):179-93.
2. The Society of Korean Medicine Rehabilitation, Korean Medicine Rehabilitation, 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:133.
3. Michou L, Brown JP. Genetics of bone diseases: Paget's disease, fibrous dysplasia, osteopetrosis, and osteogenesis imperfecta. *Joint Bone Spine*. 2011;78(3):252-8.
4. Hiasa M, Abe M, Nakano A, Oda A, Amou H, Kido S, Takeuchi K, Kagawa K, Yata K, Hashimoto T, Ozaki S, Asaoka K, Tanaka E, Moriyama K, Matsumoto T. GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme(TACE). *Blood*. 2009;114(20):4517-26.
5. Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Kawato T, Takeichi O, Tsuzukibashi O, Makimura M, Ito K, Maeno M. Receptor activator of NF-kappa B ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. *Life Sciences*. 2007;80(14):1311-8.
6. Chang EJ, Ha J, Huang H, Kim HJ, Woo JH, Lee YK, Lee ZH, Kim JH, Kim HH. The JNK-dependent CaMK pathway restrains the reversion of committed cells during osteoclast differentiation. *Journal of Cell Science*. 2008;121(15):2555-64.
7. Kim DS, Kim YI. The Literatural study on the oriental cognizance and acupuncture-moxibustion therapy of osteoporosis. *Journal of Haehwa Medicine*. 2009;18(1):9-18.
8. Jung BS, Shin MK. Encyclopedia of herbal medicine, 1st ed. Seoul:Yoengrim Publishing. 1990:670.
9. Park JH, Do WI. Pharmacognostical Studies on the Nok Je Cho. *Kor J Pharmacognosy*. 2007;38(1):45-9.
10. Son IK, No BK, Byun JH, Song HJ, Shin MK. Effects of herba pyrolae extract on the immune inflammatory responses and the functions of immunocytes in the mouse. *Kor J Herbology*. 1998;13(1):95-117.
11. Kim JS, Shim SH, Xu YN, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP, Bae KH. Phenolic glycosides from *Pyrola japonica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2004; 52(6):714-7.
12. Ahn DK. Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs, 1st ed. Seoul:Kyohak Publishing. 2008:593.
13. Kim SY, Jeon JM, Cheon JH, Lee SH, Kong CS, Kim YY, Yu KH, Kim MH. Effects of *Eisenia bicyclis* extracts on the proliferation and activity of osteoblasts and osteoclasts. *J Life Sci*. 2014;24(3):297-303.
14. Goode A, Layfield R. Recent advances in understanding the molecular basis of Paget disease of bone. *J Clin Pathol*. 2010;63(3):199-203.
15. Liu BY, Wu PW, Bringham FR, Wang JT. Estrogen inhibition of PTH-stimulated osteoclast formation and attachment in vitro: involvement of both PKA and PKC. *Endocrinology*. 2002;143(2):627-35.
16. Almeida M, Han L, Ambrogini E, Weinstein RS, Manolagas SC. Glucocorticoids and tumor necrosis factor  $\alpha$  increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2011;286(52):44326-35.
17. Mabileau G, Pascaretti-Grizon F, Baslé MF, Chappard D. Depth and volume of resorption induced by osteoclasts generated in the presence of RANKL, TNF-alpha/IL-1 or LIGHT. *Cytokine*. 2012;57(2):294-9.
18. Ye S, Fowler TW, Pavlos NJ, Ying P, Liang K, Feng Y, Zheng M, Kurten R, Manolagas SC, Zhao H. LIS1 regulates osteoclast formation and function through its interactions with dynein/dynactin and Plekhm1. *PLoS One*. 2011;6(11):e27285.
19. Henriksen K, Karsdal MA, Taylor A, Tosh D, Coxon FP. Generation of human osteoclasts from peripheral blood. *Methods Mol Biol*. 2012;816:159-75.
20. Sung B, Oyajobi BO, Aggarwal BB. Plumbagin inhibits osteoclastogenesis and reduces human breast cancer-induced osteolytic bone metastasis in mice through suppression of RANKL signaling. *Mol Cancer Ther*. 2011;11(2):350-9.
21. Mukherjee A, Rotwein P. Selective signaling by Akt1 controls osteoblast differentiation and osteoblast-mediated osteoclast development. *Mol Cell Biol*. 2011;32(2):490-500.
22. Xu S, Wang Y, Lu J. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-induced osteoporosis. *Rheumatol Int*. 2011;32(11):3397-403.
23. Wisutthithiwong C, Buranaruk C, Pudhom K, Palaga T. The plant limonoid 7-oxo-deacetoxygedunin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by suppressing activation of the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways. *Biochem Bioph Res Co*. 2011;415(2):361-6.
24. Dougall WC. Osteoclast-dependent and-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis. *Clin Cancer Res*. 2012;18(2):326-35.
25. Dore RK. The RANKL pathway and denosumab. *Rheum Dis Clin N Am*. 2011;37(3):433-52.
26. Matsumor T. New extension and future trends in study of RANKL-RANK. *Clinical Calcium*. 2011;21(8):1119-20.
27. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One*. 2011;6(10):e25900.