

난소 적출 흰쥐 골다공증 모델에서 金銀花가 골밀도 증가에 미치는 효과

이성엽[#], 김민선, 홍수연, 김재현, 김홍식, 이충호, 정혁상, 손영주^{*}

경희대학교 한의과대학 해부학교실

Effect of Lonicerae Japonicae Flos on Bone Density in Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis

SungYub Lee[#], Minsun Kim, SooYeon Hong, Jae-Hyun Kim, Hongsik Kim
Chungho Lee, Hyuk-Sang Jung, Youngjoo Sohn^{*}

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul, 02447, Korea

ABSTRACT

Objectives : Osteoporosis is a systemic skeletal disease that decreases bone density and increases the risk of fractures. Bisphosphonates and SERMs are mainly used to treat osteoporosis, but, long-term use increases the risk of side effects such as jaw bone necrosis and breast cancer. Therefore, it is necessary to develop a therapeutic agent for a natural product with few side effects. Water extract of Lonicerae Japonicae Flos (wLF) was mainly found to have anti-cancer and anti-inflammatory effects. However, the effect of wLF on osteoporosis has not been elucidated. Therefore, this experiment investigated the effect of wLF on osteoclasts, osteoblasts and osteoporosis models.

Methods : In order to study the effect of wLF on osteoporosis, the OVX-induced rat model was used for *in vivo* study. After 8 weeks, we measured body weight, uterine weight, liver weight, femur weight, bone density, trabecular area and tibia ash weight. To determine the effect of wLF on osteoclast differentiation, we measured the number of TRAP-positive cells and TRAP activity. To examine the effect of wLF on the expression of osteoblast-related genes, we measured the mRNA expression of alkaline phosphatase (ALP, *Alpl*) and osteocalcin (OCN, *Bglap2*).

Results : *In vivo* experiment, wLF inhibited the reduction of femur weight, trabecular area, bone density and tibia ash weight. *In vitro* experiment, wLF had no significant effect on osteoclast differentiation. However, wLF increased the mRNA expression of *Alpl* and *Bglap2* in MC3T3-E1 cell.

Conclusions : This result suggested that wLF may be used for the treatment and prevention of postmenopausal osteoporosis.

Key words : Water extract of Lonicerae Japonicae Flos, osteoporosis, osteoclast, osteoblast, ovariectomized

*Corresponding author : Youngjoo Sohn, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-961-9202 · E-mail : youngjoos@khu.ac.kr

#First author : SungYub Lee, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-961-0327 · E-mail : raphael819@naver.com

· Received : 10 August 2021 · Revised : 30 August 2021 · Accepted : 25 September 2021

I. 서론

세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 골다공증을 골량의 감소, 골조직 미세구조의 악화를 특징이며, 골절의 위험을 증가시키는 질환으로 정의하고 있다¹⁾. 또한 골다공증으로 인해 골밀도가 감소하면 작은 충격에도 골절 발생률이 높아진다²⁾. 골다공증으로 인해 발생하는 대퇴골 골절의 경우 20~30%가 1년 이내에 관련 합병증으로 사망하기 때문에, 골다공증에 대한 예방 및 치료는 매우 중요하다고 볼 수 있다³⁾.

기존의 골다공증 치료제 중 bisphosphonate는 강력한 골흡수억제제로 골다공증 치료제의 약 80%를 차지하며, 골다공증 치료에 가장 많이 사용되는 치료제이다. 하지만, bisphosphonate 장기 투여 시, 턱뼈 괴사 그리고 비전형 대퇴골 골절과 같은 부작용이 보고되고 있다^{3,4)}. 또한 bisphosphonate는 위장장애, 식도염 그리고 위궤양 등의 부작용이 생길 수 있고, 복용이 까다로운 단점이 있다⁵⁾. 이 밖에 골다공증 치료제로 사용되는 선택적 selective estrogen receptor modulators (SERMs)의 경우 척추골절 예방에는 효과가 있지만, 하지 부종, 안면홍조 그리고 경련 등과 같은 부작용이 나타날 수 있어 주의가 필요하다⁶⁾. 따라서 기존의 골다공증 치료제의 부작용이 적고, 안전한 치료제 개발은 매우 중요하다.

한의학적 관점에서의 골다공증은 黃帝內經 素問⁷⁾에서 찾아볼 수 있다. 『素問·宣明五氣論』에서 “腎主骨”이라 하였고, 『素問·痿論』에서 “腎氣熱則 腰脊不舉骨枯而髓減 發爲骨痿”라고 하여腎이 骨 및 骨髓의 生化를 주관하는 臟이며, 腎氣가 熱하여 발생하는 骨痿가 골다공증과 유사한 개념으로 볼 수 있다. 또한, 면역체계가 어떻게 면역과 골격계의 접점을 통해 뼈 재형성에 영향을 주고 조절하는지를 밝히는 과정에서, 골다공증이 만성 면역 매개 질환의 한 종류라는 새로운 개념이 밝혀지게 되었다^{8,9)}. 노화로 인해 말단소체의 단축, 내장 비만, 골수 지방과다증이 야기되면 이로 인해 염증성 cytokine의 발현이 증가하여 조골세포의 증식과 분화는 감소 되고, 파골세포의 활성은 증가하게 되면서 골다공증이 발생한다고 보고 있다. 골다공증이 없는 여성과 비교했을 때, 골다공증이 있는 여성의 골수세포에서 염증성 cytokine들이 더 많이 밀집되어 있으며¹⁰⁾, 염증성 cytokine들이 증가하게 되면 특정 경로를 통해 조골세포의 증식과 분화를 감소시킬 수 있다고 알려져 있다⁸⁾. 최근의 연구 동향으로 볼 때 여성의 골다공증과 염증과의 관련성이 많이 대두되고 있는 바^{10,11)}, 항염증 효과를 가진 한약물에서의 골다공증 치료 효능에 대한 연구 또한 필요할 것으로 사료된다.

金銀花 (Lonicerae Japonicae Flos)는 忍冬科에 속한 다년생 半常綠纏繞性의 木質藤本植物인 忍冬 (*Lonicera Japonica* Thunb)의 花蕾이다. 性味는 甘, 寒하고 肺, 胃, 大腸에 歸經하고, 淸熱解毒과 약한 疏散의 효능이 있다¹²⁾. 이전 연구에 따르면, 金銀花는 항암효과 및 면역반응에 대한 억제 효과가 밝혀졌고¹³⁾, 金銀花는 손상된 간 조직 세포를 복구하는 효과가 밝혀졌다¹⁴⁾. 또한, LPS로 유도된 염증성 cytokine의 생성을 억제한다고 밝혀졌다¹⁵⁾. 金銀花는 항염증 및 항암 효과를 보였지만, 골다공증에 대한 金銀花의 효과는 밝혀지지 않은 상태이다.

이에 저자는 金銀花가 골다공증의 예방 및 치료에 미치는

효과를 살펴보고자 하였다. *In vivo* 연구로 폐경기 성 골다공증을 유발한 뒤, 金銀花를 8주간 구강 투여하였다. 이후, 몸무게와 장기 무게의 변화, 대퇴골의 골밀도, 경골의 회분함량 그리고 대퇴골 조직에서의 골소주 면적을 관찰하였다. *In vitro* 연구로 RAW 264.7 세포에서의 파골세포의 분화 억제 및 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 활성도 측정, MC3T3-E1 세포에서의 조골세포 분화 관련 alkaline phosphatase (ALP, *Alpl*), osteocalcin (OCN, *Bglap2*)의 mRNA 발현을 통해 골 형성 지표 분석을 시행하여, 이에 대해 유의한 결과들을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)은 Peprotech (London, UK)에서 구매하였으며, 세포 배지인 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)은 Welgene (Daejeon, Korea)에서 구매했다. Alpha-minimum essential medium (α -MEM)과 penicillin/streptomycin (P/S)은 Gibco (Grand Island, NY)에서 구매하였다. Fetal bovine serum (FBS)는 Atlas Biologicals (Fort Collins, Colo)에서 구매하였다. Ascorbic acid와 beta-glycophosphate disodium은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구매하였고, CellTiter 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation kit (MTS)는 Promega (Madison, WI), TRAP Kit는 Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI)에서 구매하였다. Reverse transcription kit는 Invitrogen (Carlsbad, CA), Taq polymerase는 Kapa Biosystems (Wilmington, MA)에서 구매하였다. PCR primer는 Genotech (Daejeon, Korea)에서 구매하였다.

2. 시료의 준비

본 실험에서 사용한 金銀花는 옴니허브에서 구매하였으며, 金銀花 약재의 표본은 경희대학교 한의과대학 해부학교실에 보관되어 있다. 10 L의 등근 플라스크에 건조된 金銀花 700 g과 7 L의 증류수를 넣고, 전탕기를 이용하여 2시간 동안 열수 추출하였다. 추출액은 실온에서 충분히 식혀 준 후 Whatman filter paper no. 3 (Whatman, Maidstone, Kent, UK)를 사용하여 여과하였다. 여과액은 rotary vacuum evaporator (N-1200, EYELA, Tokyo, Japan)을 이용하여 감압 농축한 후 동결건조 하여 金銀花 물 추출물 (water extract of *Lonicerae Japonicae* Flos, 이하 wLF) 194.53g을 얻었고, 수득율은 27.8%였다. 실험에 사용되기 전까지, 냉동고 (-20°C)에 보관하여 사용하였다. 세포 실험 시, pore size 0.22 μ m 필터를 이용하여 여과하여 사용하였다.

3. 난소절제 유사 폐경기 골다공증 모델 유발

실험동물은 평균 체중 250 g, 12주령의 암컷 Sprague-Dawley rat (SD-rat)을 나라바이오텍(서울, 한국)에서 구매

하였다. 이후, 실험실 환경에서 1주간 적응시킨 후 사용하였다. 모든 동물은 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 55~60%, 낮과 밤 주기는 각각 12시간으로 상시 유지되는 동물 사육실에서 사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 했다. 동물 실험은 경희대학교 동물 실험 윤리 위원회의 지침에 따라 수행되었다 (KHUASP (SE)-15-101). 유사 폐경기 골다공증 모델에서 wLF가 미치는 영향을 조사하기 위해, 난소절제술 (ovariectomy; OVX)을 시행하였다. 모든 동물은 가스 마취기 (SurgiVet, Norwell, MA, USA)를 이용하여 5% isoflurane 와 100% O₂를 이용해 깊게 호흡 마취한 후, 수술을 진행했다. OVX 그룹은 양측 옆구리 및 등 쪽을 제모한 후 난소 위치의 피부 및 근육을 절개하여 난관과 난소를 드러냈다. 노출된 난관은 실로 결착한 후 난소를 절제하고, 근육과 피부를 봉합한 다음 8주간 골다공증을 유발했다. 수술 중 isoflurane은 2~3%로 조절되었다. Sham 그룹은 난소 및 난관을 노출한 후 난소를 절제하지 않고, 같은 스트레스만 주었다. 수술 후 감염 방지를 위해 gentamicin 4 mg/kg을 3일간 복강 투여하였다. 실험군의 분류는 다음과 같이 하였다.

- 1) Sham 그룹: 모의 수술 후 증류수 구강투여
- 2) OVX 그룹: 난소 적출 후 증류수 구강투여
- 3) 17β-estradiol (E₂)그룹: 난소 적출 후 17β-estradiol (100 μg/kg) 구강투여
- 4) wLF-L그룹: 난소 적출 후 wLF (37 mg/kg) 저농도 구강투여
- 5) wLF-H그룹: 난소 적출 후 wLF (370 mg/kg) 고농도 구강투여

실험동물의 체중은 매주 1회씩 동일한 시간에 측정되었다. 실험에 사용한 동물은 각 군당 8마리로 진행하였으며, 실험하는 동안 약물은 같은 시간에 매일 1회 투여했다. 동물 투여 용량은 다음과 같이 결정했다. 한의학에서 일반적으로 성인 (60kg 기준)의 1일 투여량은 8g이다. 따라서 wLF (수율: 27.8%)에 8g을 대입하면, wLF-L은 37 mg/kg이 투여되었다. 또한 쥐의 대사는 사람과 비교해 6.4배 높다고 알려져 있다¹⁶⁾. 따라서 wLF-H군은 236.8 mg/kg이 투여되었다. 유발 8주 후, 모든 동물은 5% isoflurane와 100% O₂를 이용해 깊게 마취하고 치사량의 심장 천자를 통해 혈액을 채취했다. 이후, 심장이 완전히 멈춘 것을 확인하고 경추 탈골 하여 희생시켰다. 그 후, 대퇴골과 자궁을 채취하여 무게를 측정하였다.

4. 골밀도 측정

골밀도는 아르키메데스의 원리¹⁷⁾를 이용하여 측정하였다. 무게를 측정된 오른쪽 대퇴골은 중간 골간을 절단하여 골수를 세척 한 후, 대퇴골 내의 공기를 제거하기 위해 증류수가 채워진 유리병에 넣은 후 90분 동안 감압하였다. 감압이 끝난 대퇴골은 거즈를 사용하여 물기를 제거하고 무게를 측정했다. 이후, 대퇴골을 다시 증류수가 채워진 유리병에 넣고, 물속에서의 무게를 재측정하였다. 밀도는 g/cm³ bone volume으로 계산하였다.

5. 경골의 회분함량 측정

회분 함량 측정을 위해, 마취 후 희생한 흰쥐의 경골을 분리하여 전기 회화로 (Electric Muffle Furnace, JISICO, Korea, J-FM3)를 이용하여 900℃에서 24시간 동안 회화했다. 충분히 식힌 후 ash의 무게를 측정하였다.

6. 조직학적 검사

왼쪽 대퇴골은 neutral buffered formalin (NBF)에 고정 한 후, 흐르는 물에 24시간 동안 수세 하였다. 이후 ethylenediaminetetracetic acid disodium (EDTA)로 3주간 탈회했다. 에탄올을 이용하여 탈지, 탈수과정을 거쳐 파라핀 포매 하였다. 조직은 microtome (Carl Zeiss AG)을 이용하여 5 μm로 절편 했다. 이후, hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였으며, 염색한 조직은 광학현미경을 이용하여 40배, 100배 시야에서 관찰하였다. 골 소주 면적은 대퇴골 근위부에서 성장판 아래 부분 중 가로 길이가 성장판 길이의 2/3가 되는 부위를 100배율로 capture 하여 이미지 분석 프로그램 (Image J, Ver. 1.46, National Institutes of Health)를 사용하여 측정하였다.

7. RAW 264.7 세포와 MC3T3-E1 세포의 배양 및 세포 생존율 측정

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (서울, 한국)에서 구매하였고, 생쥐 두개관 유래 세포인 MC3T3-E1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 구매했다. RAW 264.7 세포와 MC3T3-E1 세포는 10% FBS와 1% P/S를 함유한 α-MEM에서 37℃ 그리고 5% CO₂ 세포 배양기에서 2일마다 계대 배양하였다. 각 세포에서 wLF의 독성을 측정하기 위해 MTS 용액을 사용하였으며, 방법은 다음과 같다. MC3T3-E1 세포를 1×10^4 cell/well 밀도로 96-well plate에 분주하고 24시간 안정화했다. 이후, wLF를 다양한 농도로 처리하였다. 72시간 후 각 well에 MTS 용액을 20 μL 첨가하여 2시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후, RAW 264.7 세포를 5×10^3 cell/well 밀도로 96-well plate에 분주하고 24시간 안정화하고, wLF를 다양한 농도로 처리하였다. 24시간 후 각 well에 MTS solution을 20 μL 첨가하여 2시간 동안 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 약물을 처리하지 않은 세포의 생존율을 백분율로 계산했다. ISO 10993-5기준에 따라, 약물 처리한 군의 세포 생존율이 80% 이하일 때, 세포 독성을 갖는다고 판단하였다^{18,19)}.

8. 파골세포의 분화 억제 및 TRAP 활성도 측정

wLF의 파골세포 분화 능을 분석하기 위해, RAW 264.7 세포를 5×10^3 cell/well 밀도로 96-well plate에 분주하였다. 24시간 후 배지를 제거하고, RANKL 100 ng/mL과 wLF를

농도별 (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하여 5일 동안 배양하였다. 실험 기간 동안, 2일마다 배지를 교환하였다. 배양이 끝난 후 세포를 DPBS로 3번 세척 한 뒤, 10% formalin을 사용하여 10분간 고정하였다. 이후 TRAP staining kit을 이용하여 TRAP 염색을 시행하였다. 이후 분화된 배지는 새로운 96-well plate에 50 μL 씩 분주하고, TRAP solution (4.93 mg Pnpp+850 μL 0.5 M+acetate 용액+150 μL 의 tartrate 용액)을 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 0.5 M NaOH로 반응을 종료시킨 후, ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통한 골 형성 지표 분석

골 형성 지표인 ALP와 OCN의 유전자 발현을 분석하기 위해 RAW 264.7 세포를 5×10^4 cell/well 밀도로 6-well plate에 분주하여 24시간 동안 안정화했다. 이후, wLF를 농도별 (10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리하여 3일, 7일 동안 배양하고 2일마다 배지를 교환하였다. 3일과 7일째에 배지를 제거한 후

DPBS를 이용하여 세포를 세척했다. 이후 TriZol Reagent (TaKaRa Bio, Otsu, Japan) 1 mL와 chloroform 0.2 mL 첨가한 후 13,200 rpm 그리고 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 이후 상층액 400 μL 에 isopropanol을 400 μL 첨가한 후 13,200 rpm 그리고 4°C에서 20분간 원심분리하여 RNA를 추출했다. 추출한 RNA는 75% Et-OH로 세척한 후 7,500 rpm 그리고 4°C에서 5분간 원심분리하여 침전된 RNA를 RNase free water로 녹여 Nano drop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)을 이용하여 정량하였다. 2 μg 의 RNA를 primer (Genotech, Daejeon, Korea)와 SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 이용하여 Gapdh (*Gapdh*) ALP (*Alpl*)와 OCN (*Bglap2*)을 PCR 방법으로 증폭시킨 후 증폭된 산물은 SYBR green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 포함한 1,2% agarose를 이용하여 전기영동 한 후 Gel doc NIC001 (Insun science, korea)을 이용하여 확인하였으며, 각 primer의 염기 서열은 Table 1에 표기하였다.

Table 1. PCR primer sequence for RT-PCR analysis.

Target genes	Primers (forward, reverse)	Annealing Tm (°C)	PCR cycle	Product size (bp)
GAPDH	5'-ACTTTGTCAAGCTCATTTCC-3'	57°C	30	250
	5'-TGCAGCGAACTTTATGATG-3'			
ALP	5'-CGGGACTGGTACTCGGATAA-3'	55°C	45	209
	5'-TGAGATCCAGGCCATCTAGC-3'			
Osteocalcin	5'-CTTGGTGCACACCTAGCAGA-3'	57°C	45	208
	5'-TTCTGTTCCTCCCTGCTGT-3'			

10. 통계처리

결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm S.E.M.)로 표기하였으며, 통계 프로그램은 Graph Pad Prism software (Ver. 5.01, Graph Pad Software Inc, CA, USA)를 사용하였다. 각 군 간의 차이를 검증하기 위해 one-way ANOVA test를 사용하여 비교하였으며, $P < 0.05$ 이하면 유의성이 있다고 평가하였다. 사후 검증은 Dunnett's multiple comparison test로 진행하였다.

III. 결 과

1. wLF가 체중 변화 및 장기 무게에 미치는 영향

난소 적출 후 8주간 실험동물의 체중을 측정한 결과, 수술 2주 후 OVX군이 sham군에 비해 유의하게 증가하기 시작하여, 실험 종료까지 유의하게 증가하였으며, E₂군은 수술 2주 후부터 8주까지 OVX군에 비해 유의하게 감소하였다 ($P < 0.01$). 그러나 wLF-L, wLF-H를 처리한 군은 무게 변화에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 1A, and Fig. 1B). 희생 후 적출한 자궁 무

게를 측정한 결과, OVX군이 Sham군에 비해 유의하게 감소하였으며 (OVX; 0.048 ± 0.003 g, Sham; 0.256 ± 0.047 g, $P < 0.01$), E₂군은 OVX군에 비해 유의하게 증가하였다 (E₂; 0.145 ± 0.011 g, OVX; 0.048 ± 0.003 g, $P < 0.01$). 그러나 wLF를 처리한 군은 OVX군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다 (wLF-L; 0.047 ± 0.001 g, wLF-H; 0.048 ± 0.003 g, OVX; 0.048 ± 0.003 g) (Figure 1C). wLF의 간독성 여부를 확인하기 위해 간의 무게 측정한 결과, wLF를 처리한 모든 군이 OVX에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다 (wLF-L; 3.007 ± 0.040 g, wLF-H; 2.862 ± 0.075 g, OVX; 2.869 ± 0.138 g) (Figure 1D). 대퇴골의 무게는 OVX군이 Sham군에 비해 유의하게 감소하였으며 (OVX; 0.489 ± 0.007 g, Sham; 0.596 ± 0.022 g, $P < 0.01$), E₂군은 OVX군에 비해 유의하게 증가하였으며 (E₂; 0.553 ± 0.010 g, OVX; 0.489 ± 0.007 g, $P < 0.01$), wLF-L군과 wLF-H군도 OVX군에 비해 유의하게 증가하였다 (wLF-L; 0.536 ± 0.007 g, wLF-H; 0.528 ± 0.010 g, OVX; 0.489 ± 0.007 g, $P < 0.01$) (Figure 1E).

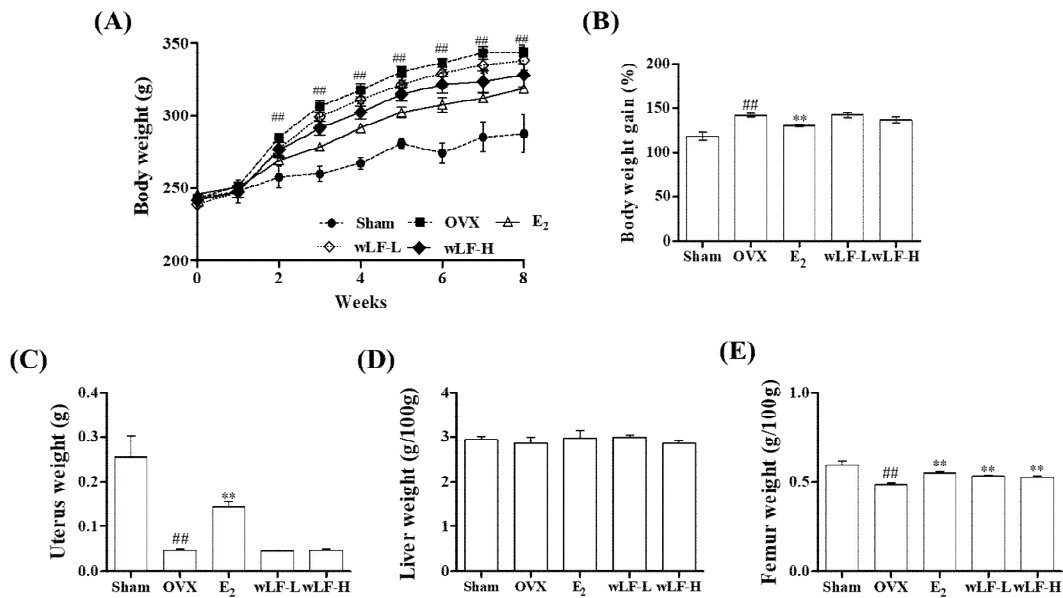


Fig. 1. The change of body, uterus, liver and Femur weight in OVX-induced rats. (A) Weekly change of body weight after OVX surgery. (B) Body weight gain after OVX-induced surgery. The uterus, liver and femurs were collected and weighed after all animals were sacrificed. (C) Uterus weight and (D) liver (E) femur weights per 100 g body weight. Each data value represents the mean \pm standard error of mean (SEM, n=8). ##p<0.01 compared with Sham-group, **p<0.01 compared with OVX-group.

2. wLF가 골밀도 및 경골 회분에 미치는 영향

골밀도의 차이를 분석한 결과, OVX군은 Sham군에 비해 유의하게 감소하였으며 (OVX; $1.456 \pm 0.005 \text{ g/cm}^3$, Sham; $1.507 \pm 0.019 \text{ g/cm}^3$, $P<0.01$), E₂군은 OVX군에 비해 유의하게 증가하였으며 (E₂; $1.487 \pm 0.013 \text{ g/cm}^3$, OVX; $1.456 \pm 0.005 \text{ g/cm}^3$, $P<0.05$), wLF-L군은 OVX군에 비해 차이가 없었으며 (wLF-L; $1.461 \pm 0.010 \text{ g/cm}^3$, OVX; $1.456 \pm 0.005 \text{ g/cm}^3$), wLF-H군은 OVX군에 비해 유의하게 증가하였다 (wLF-H; $1.481 \pm 0.006 \text{ g/cm}^3$, OVX;

$1.456 \pm 0.005 \text{ g/cm}^3$, $P<0.01$) (Figure 2A). 체중 대비 경골의 회분 함량은 OVX군이 Sham군에 비해 유의하게 감소하였으며 (OVX; $0.089 \pm 0.002 \text{ g}$, Sham; $0.109 \pm 0.007 \text{ g}$, $P<0.01$), E₂군은 OVX군에 비해 유의하게 증가하였다 (E₂; $0.100 \pm 0.001 \text{ g}$, OVX; $0.089 \pm 0.002 \text{ g}$, $P<0.01$). wLF-L군과 wLF-H군은 OVX군에 비해 유의하게 증가하였다 (wLF-L; $0.094 \pm 0.002 \text{ g}$, wLF-H; $0.094 \pm 0.002 \text{ g}$, OVX; $0.089 \pm 0.002 \text{ g}$, 각각 $P<0.05$) (Figure 2B).

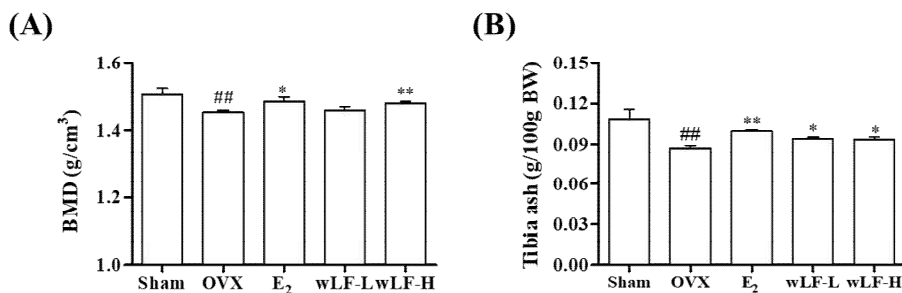


Fig. 2. Effect of wLF on BMD and tibia ash weight in OVX-induced rats. (A) BMD was measured by Archimedes' principle. (B) Tibia ash was weighed after all animals were sacrificed. Each data value represents the mean \pm standard error of mean (SEM, n=8). ##p <0.01 compared with sham group and *p<0.05, **p<0.01 compared with OVX-induced group.

3. wLF가 골소주 면적의 변화에 미치는 영향

골소주 면적은 OVX군이 Sham군에 비해 유의하게 감소하였으며 (OVX; $53.12 \pm 1.46\%$, Sham; $61.97 \pm 1.32\%$, $P<0.01$), E₂군은 OVX군에 비해 유의하게 증가하였고 (E₂;

$60.12 \pm 1.65\%$, OVX; $53.12 \pm 1.46\%$, $P<0.05$), wLF-L과 wLF-H군은 OVX군에 비해 유의하게 증가하였다 (wLF-L; $62.25 \pm 3.12\%$, wLF-H; $59.23 \pm 1.46\%$, OVX; $53.12 \pm 1.46\%$, 각각 $P<0.05$) (Figure 3A and 3B).

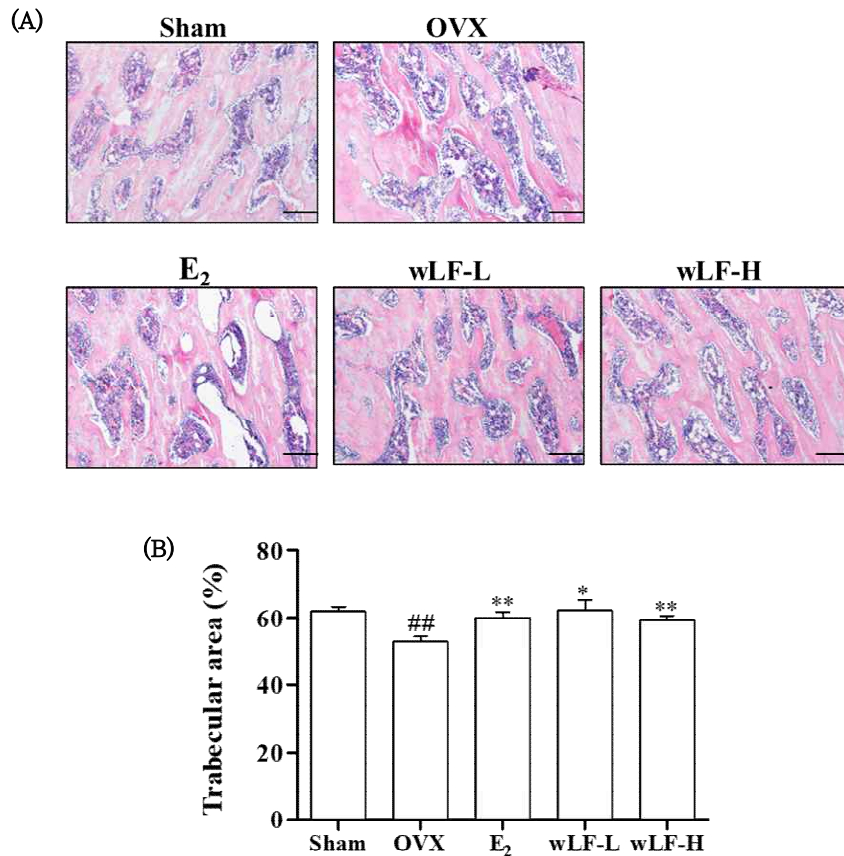


Fig. 3. Effect of wLF on trabecular area in OVX-induced rats. Femur sections (A) were stained with H&E staining and trabecular area (B) was measured by Image J software. Each data value represents the mean \pm standard error of mean (SEM, n=8). ##p<0.01 compared with Sham group and *p<0.05, **p<0.01 compared with OVX-induced group.

4. wLF가 RAW 264.7 세포에 미치는 독성 평가

wLF가 RAW 264.7 세포에 미치는 세포 독성을 알아보기 위해 다양한 농도의 wLF (10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 24시간 동안 반응 시킨 후 MTS assay를 이용해 분석했다. 실험 결과, wLF는 RAW 264.7 세포에서 독성을 보이지 않았다. (Figure 4).

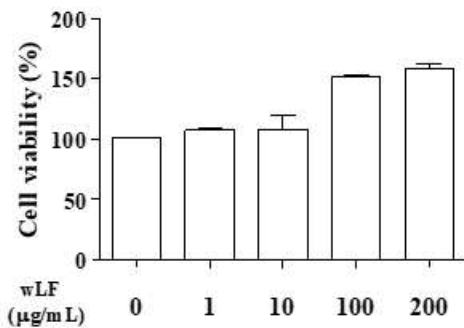


Fig. 4. Effect of wLF on RAW 264.7 cell viability. Cell viability was measured by MTS assay. RAW 264.7 cells were seeded into 96 well plate. After 24 h, cells were treated with various concentrations of wLF (1, 10, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h and then the cells were treated with MTS solution 20 μl . After 2 h, optical density was measured at 490 nm with an ELISA reader. Data represent the mean \pm standard error of mean (SEM) of three independent experiments.

5. wLF가 파골세포의 분화 억제 및 TRAP 활성도에 미치는 영향

wLF가 RAW 264.7 세포의 파골세포 분화 및 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 RANKL 100 ng/mL과 wLF 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 RAW 264.7 세포에 처리한 후 5일간 배양했다. TRAP에 양성을 보이는 다핵세포의 형성 및 TRAP의 활성도를 관찰 분석하였다. 그 결과, wLF는 RAW 264.7 세포의 파골세포로의 분화 억제 및 TRAP 활성도 억제에 영향을 미치지 않았다. (Figure 5A and 5B).

6. wLF가 MC3T3-E1 세포에 미치는 독성 평가

wLF가 MC3T3-E1 세포에 미치는 세포 독성을 알아보기 위해 다양한 농도의 wLF (10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 72시간 동안 반응 시킨 후 MTS assay를 이용해 분석했다. 실험 결과 wLF는 MC3T3-E1 세포 독성에 영향을 미치지 않았다 (Figure 6).

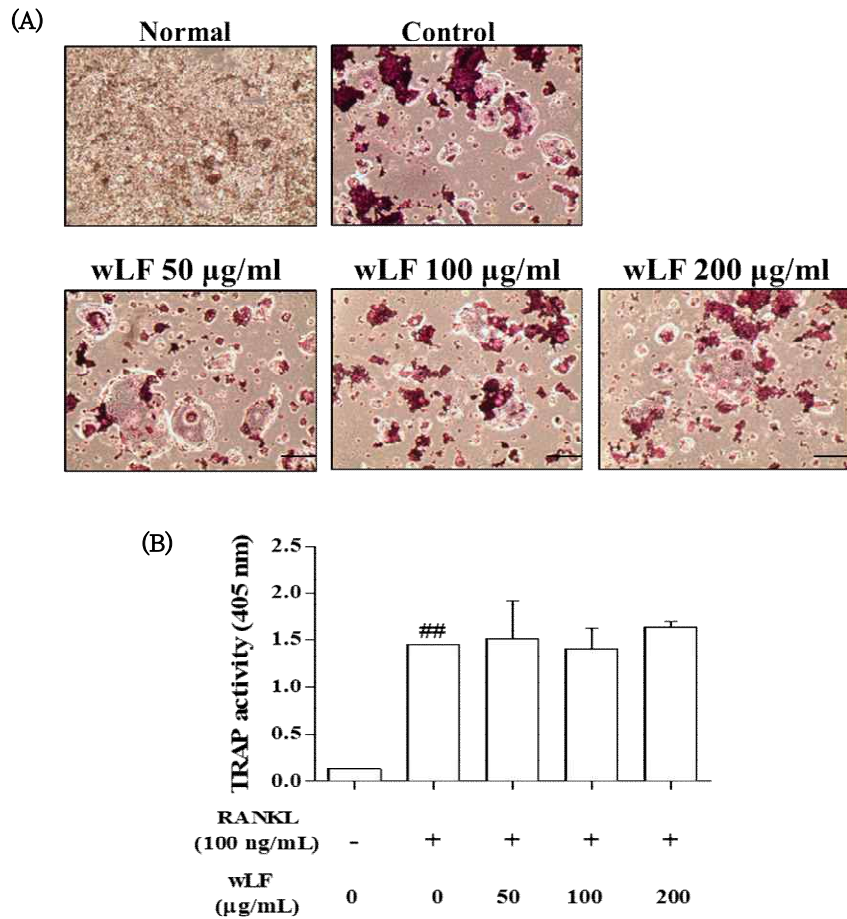


Fig. 5. The effect of wLF on RANKL-induced osteoclast formation in RAW 264.7 cells. (A) TRAP-positive cells were stained with TRAP staining kit, and captured using inverted microscope ($\times 100$). (B) TRAP activity were analyzed with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader. Data represent the mean \pm standard error of mean (SEM) of three independent experiments.

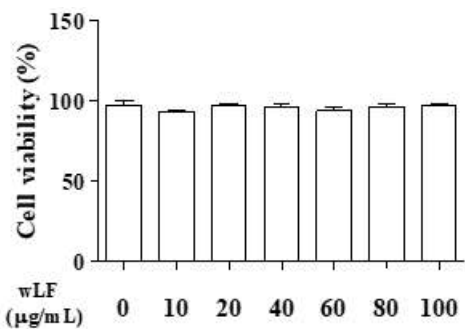


Fig. 6. Effect of wLF on MC3T3-E1 cell viability. Cell viability was measured by MTS assay. MC3T3-E1 cells were seeded into 96 well plate. After 24 h, cells were treated with various concentrations of wLF (10, 20, 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h, and then the cells were treated with MTS solution 20 μL . After 2 h, optical density was measured at 490 nm with an ELISA reader. Data represent the mean \pm standard error of mean (SEM) of three independent experiments.

7. wLF가 골형성 지표인 ALP와 OCN의 mRNA 발현에 미치는 영향

wLF가 조골세포의 골형성 지표의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 wLF 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 MC3T3-E1 세포에 처리한 후 3일 그리고 7일간 배양 후 ALP (*Alp*)와 OCN (*Bglap2*)의 mRNA 발현을 관찰하였다. wLF 처리 3일 후 *Alp*의 발현을 분석해 본 결과, 약물을 처리하지 않은 실험 대조군에 비해 wLF를 처리한 실험군의 *Alp*가 증가하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았다 (Figure 7A). wLF 처리 7일 후 *Bglap2*의 발현을 분석해 본 결과, 아무것도 처리하지 않은 실험 대조군에 비해 wLF를 처리한 군은 실험 대조군에 비해 농도 의존적으로 *Bglap2*의 발현이 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$) (Figure 7B).

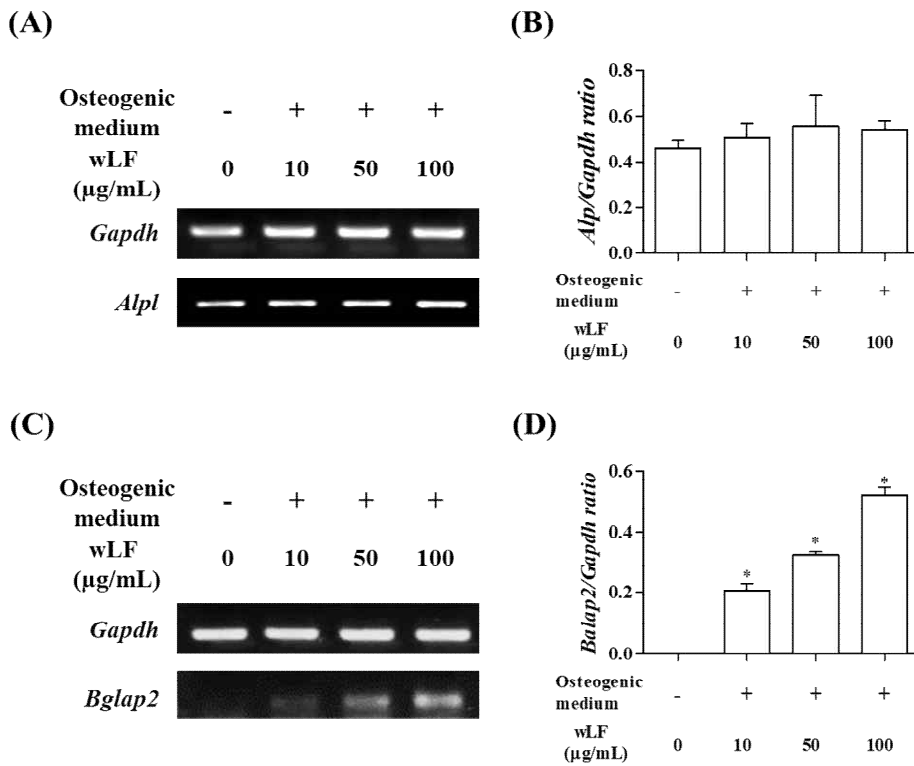


Fig. 7. Effect of wLF on mRNA expression of ALP and osteocalcin in MC3T3-E1 cells. (A) ALP (*Alpl*) was measured by RT-PCR. *Alpl* normalized to *Gapdh* (*Gapdh*). (C) OCN (*Bglap2*) was measured by RT-PCR. *Alpl* normalized *Gapdh*. Data represent the mean \pm standard error of mean (SEM) of three independent experiments. *p<0.05 compared with Normal group (non-treated group).

IV. 고찰

wLF가 골다공증에 미치는 영향을 살펴보기 위해 본 연구에서는 *in vivo* 및 *in vitro* 골다공증 모델을 활용하여 wLF 물 추출물의 골다공증 억제 효과 연구를 진행하였다. 난소 적출로 골다공증을 유발한 흰쥐를 통한 *in vivo* 실험에서 wLF를 처리하여 관찰한 결과, 체중 증가 및 자궁과 간 무게의 변화 없이 대퇴골 무게와 경골의 회분 함량, 대퇴골의 골 소주 면적이 OVX군에 비해 유의하게 증가하였고, wLF를 고농도로 투여한 wLF-H군에서는 골밀도 또한 유의하게 증가했다. 이에 세부 기전을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포를 이용한 *in vitro* 실험에서 RANKL과 wLF를 처리하여 파골세포의 분화 및 활성화에 미치는 영향을 알아본 결과, wLF는 파골세포 분화 및 TRAP 활성화에는 효과가 없었다. MC3T3-E1 세포에 wLF를 처리하여 조골세포의 골 형성 지표인 ALP 및 OCN의 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, wLF군에서 세포 독성을 유발하지 않으면서 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교해 농도 의존적으로 OCN의 mRNA 발현이 유의하게 증가하였음을 확인할 수 있었고, ALP의 경우 wLF를 처리한 실험군이 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 ALP의 mRNA 발현이 통계적으로 유의하지는 않았지만 증가하는 경향을 보였다.

폐경기 여성은 에스트로겐 결핍으로 인해 과도한 파골세포의 활성이 증가하여 골다공증의 발병 위험이 증가한다^{1,2)}. 이에 wLF가 폐경기 이후의 골다공증에 미치는 영향을 알아보기

위해 난소 적출로 유발한 유사 폐경기 골다공증 모델에서 wLF가 미치는 영향에 대해 확인하였다.

흰쥐에서 난소를 절제하게 되면 에스트로겐 결핍으로 인하여 과도한 지방 축적으로 체중이 증가하게 된다²⁰⁾. 이는 난소절제 후 지방세포로 지방을 축적하는 효소인 lipoprotein lipase가 늘어나서 지방세포 내 지방이 축적된다. 따라서 체중은 증가하고, 자궁 무게는 감소한다. 반면에, 에스트로겐의 활성형인 E₂를 투여하게 되면 이러한 지방 축적이 줄어든다²¹⁾. 본 실험에서 실험동물의 체중 및 자궁 무게를 측정된 결과 Sham군 대비 OVX군에서 유의하게 체중이 증가했고, 자궁 무게는 감소했다. 이러한 결과는 유사 폐경기 성 골다공증 모델이 성공적으로 확립되었음을 나타낸다. OVX군 대비 E₂군에서 체중이 유의하게 감소했고, 자궁 무게 또한 증가했다. OVX군 대비 wLF군에서 체중 감소와 자궁 무게는 유의하지 않았다. 이러한 결과는 wLF이 에스트로겐 유사 활성을 나타내지 않는 것을 나타낸다. wLF의 간독성 여부를 확인하기 위해 간의 무게를 측정된 결과, wLF를 처리한 모든 군이 OVX군에 비해 유의한 차이를 보이지 않아 우려할 만한 간독성은 없었던 것으로 보인다. 난소 절제로 유도한 유사 폐경기 성 골다공증 모델의 대퇴골의 무게는 감소하며, 대퇴골의 무게 증가는 간접적으로 골 형성을 촉진한 것으로 볼 수 있다^{2,22)}. 본 실험에서 Sham군에 비해 OVX군의 대퇴골 무게가 유의하게 감소하였고,

OVX군에 비해 E₂군과 wLF군의 대퇴골 무게가 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 wLF 투여가 OVX로 유도한 골다공증 모델에서 대퇴골의 무게 감소를 억제하는 효과가 있음을 나타낸다.

골밀도는 단위 면적당 무기질의 평균 농도로 정의되는데, 골질을 유발하는데 필요한 최소의 힘과 관련이 있어 골질의 위험도를 예측할 수 있는 지표가 되며, 따라서 골다공증의 최적 표준 검사 (gold standard)가 된다²³⁾. 본 실험에서 대퇴골의 골밀도 변화는 OVX군이 Sham군에 비해 유의하게 감소하였으며, OVX군 대비 E₂군과 wLF-H군은 유의하게 증가하였으나 wLF-L군은 OVX군에 대비 유의하지 않았다. 골밀도 변화와 관련해서는 wLF 고농도 투여군에서 유의한 효과를 보여 난소절제 골다공증 동물 모델에서 효과가 있음이 확인되었다. 골의 회복함량 측정은 OVX로 유도된 골 손실 보호 효과를 평가하는 지표가 된다²⁴⁾. 본 실험에서 wLF가 난소절제로 유도된 골다공증에 미치는 영향을 알아보기 위해 체중 대비 경골의 회복함량을 측정할 결과 Sham군 대비 OVX군에서 유의하게 감소하였으며, OVX군 대비 E₂군과 wLF군 모두 유의하게 증가하였다. 골다공증이 발생하면 골 소주의 두께를 얇게 하고 구조적 연결성을 약하게 만들기 때문에 중요한 지표가 된다²⁵⁾. 난소 절제 유사 폐경기 성 골다공증 모델에서는 골 소주의 두께와 수는 감소한다고 밝혀졌다²⁶⁾. 본 실험에서 wLF가 난소절제로 유도된 골다공증에 미치는 영향을 알아보기 위해 대퇴골 골 소주의 면적을 측정할 결과 Sham군에 비해 OVX군에서 유의하게 감소하였으며, OVX군에 비해 E₂군과 wLF군 모두 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 이는 wLF의 투여가 골소주 면적의 감소를 억제함으로써 골 손실이 발생하는 것을 보호하는 효과가 있음을 의미한다.

골 항상성 (bone homeostasis)은 파골세포에 의한 골의 재흡수와 조골세포에 의한 골의 형성으로 유지되는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 이전 연구에 따르면, 조골세포는 특정 신호를 통해 파골세포의 세포예정사를 유도하는데, 난소절제 골다공증 모델 흰쥐에서 유래된 조골세포는 이 신호의 발현이 감소되고 파골세포의 세포예정사 또한 감소 되어 골의 재흡수가 증가한다는 연구 결과가 밝혀졌다²⁸⁾. 파골세포와 조골세포의 상호작용의 불균형은 골 재흡수가 골 형성보다 증가함으로써, 골다공증과 같은 골 질환을 유발한다. 따라서 난소절제로 유도된 골다공증에 대한 wLF의 효과 기전을 알아보기 위해 *in vitro* 연구로 파골세포와 조골세포를 함께 살펴보았다.

RAW 264.7 세포는 마우스 대식세포에서 유래하며 파골세포 형성 및 기능에 대한 연구에 적합한 것으로 밝혀졌다²⁹⁾. wLF가 RAW 264.7 세포에 미치는 세포 독성을 알아보기 위해 MTS assay로 세포 독성을 평가했다. 실험결과, wLF는 RAW 264.7 세포 독성에 영향을 미치지 않았다. wLF는 파골세포 분화 억제 및 TRAP 활성화도 억제에는 효과가 없었다. 이에 wLF의 골다공증에 대한 효과 기전을 확인하기 위해 추가적으로 골 형성과 관련된 조골세포의 지표들을 분석하였다.

MC3T3-E1 세포는 생쥐 두개관 유래 세포로 골 형성 과정에서 증식, 분화, 석회화 등 조골세포와 유사한 대사적 특징이 있어 골다공증 연구 중 골 형성과 관련된 연구에 많이 이용되는 세포이다³⁰⁾. 실험 결과, wLF는 MC3T3-E1 세포에 영향을 미치지 않았다.

ALP는 조골세포 분화에 있어 초기 단계의 분자적 사건들과 관련이 있으며, 뼈의 무기 질화의 촉진, 파골세포의 조절과 관련이 있다고 알려져 있다^{31,32)}. 또한 통제조건 하에서 배양된 사람의 정상적인 조골세포들에서 유의한 양의 ALP의 mRNA가 발현되었음이 보고된바 있다³³⁾. ALP는 잠재적 Ca²⁺ 운반체로, 무기질 침착 억제제를 가수분해 함으로써 골 형성 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 생각 된다³⁴⁾. ALP와 반대로 OCN은 조골세포 분화에 있어 후기단계의 분자적 사건들과 관련이 있으며³⁵⁾, 조골세포에서만 분비되는 non-collagenous protein으로 3개의 glutamic acid residue를 가지고 있다³⁶⁾. 이들이 Ca²⁺와 만나서 킬레이팅 결합을 하게 되면 뼈를 이루는 구성성분으로 자리 잡게 된다. OCN은 뼈의 무기질 침착에 관여하는 것으로 보고 있다³⁷⁾. wLF 처리 3일 후 ALP의 mRNA 발현을 분석한 결과 약물을 처리하지 않은 대조군에 비해 wLF를 처리한 모든 군에서 ALP의 mRNA 발현이 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 또한, wLF 처리 7일 후 약물을 처리하지 않은 대조군에 비해 wLF를 처리한 군에서 농도 의존적으로 OCN의 mRNA 발현이 유의하게 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 wLF가 OCN의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 증가시켜 조골세포의 골 형성을 촉진하는 효과가 있음을 알 수 있다.

이상을 종합해보면, wLF의 폐경기 성 골다공증 모델에 대한 억제 기전은 파골세포의 분화를 억제하여 골의 재흡수를 조절함으로써 나타나기보다는 조골세포의 분화를 증가시켜 골의 형성을 촉진 시키는 것으로 보인다. 본 논문의 한계는 다음과 같다. 이전 연구에 따르면, 골다공증이 발생하면, 염증성 cytokine들이 증가하여 조골세포의 증식과 분화를 감소시킬 수 있다고 밝혀졌다⁸⁾. 하지만, 본 연구에서는 wLF의 파골세포 및 조골세포와 관련된 지표들을 대상으로만 분석을 진행하였다. wLF가 염증성 cytokine에 미치는 영향에 대해 추후 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

V. 결 론

wLF가 난소절제로 유도된 흰쥐의 골다공증과 RANKL에 의한 파골세포 분화와 TRAP 활성화, 조골세포의 골 형성 관련 유전자에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. wLF는 난소절제로 유도된 흰쥐의 골다공증에 있어 체중 증가율과 자궁 무게에는 영향을 미치지 않고 체중대비 대퇴골의 무게와 경골의 회복 함량, 대퇴골의 골 소주 면적을 유의하게 증가시켰다. 이는 골다공증을 억제하는 효과가 있음을 의미한다.
2. wLF는 난소절제로 유도된 흰쥐의 골다공증에 있어 고농도 투여군에서 골밀도를 유의하게 증가시켰다.
3. wLF는 RANKL로 유도된 파골세포의 분화 관련 TRAP 양성 세포 수와 TRAP 활성을 감소시키는 효과는 없었다.
4. wLF는 조골세포의 골형성 관련지표인 ALP의 mRNA

발현과 관련하여 실험대조군에 비해 유의하지는 않았으나 발현을 증가시키는 경향성을 보였다.

5. wLF는 조골세포의 골형성 관련지표인 osteocalcin의 mRNA 발현과 관련하여 실험대조군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 발현을 증가시키는 경향을 보였다. 이는 조골세포의 분화와 골 형성을 촉진한다는 것을 의미한다.

이상을 종합해보면, wLF의 폐경기 성 골다공증 모델에 대한 억제기전은 파골세포의 분화를 억제하여 골의 재흡수를 조절함으로써 나타나기보다는 조골세포의 분화를 증가시켜 골의 형성을 촉진 시키는 것으로 보인다. 골다공증이 발생하면, 염증성 cytokine들이 증가하여 조골세포의 증식과 분화를 감소시킬 수 있다. 하지만, 본 연구에서는 wLF의 파골세포 및 조골세포와 관련된 지표들을 대상으로만 분석을 진행하였다. wLF가 염증성 cytokine에 미치는 영향에 대해 추후 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2020년도 정부 (과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2020R1A2C1007836).

References

1. Consensus A. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1993 ; 94(6) : 646-50.
2. Sözen T, Öz i ş i k L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis, *Eur J Rheumatol.* 2017 ; 4(1) : 46-56.
3. Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int.* 1992 ; 2 : 285-9.
4. Kennel KA and Drake MT: Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management. *Mayo Clin Proc.* 2009 ; 84(7) : 632-637.
5. J W Hong, W Nam, I-H Cha, S-W Chung, H S Choi, K M Kim, K J Kim, Y Rhee, S-K Lim. Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the first report in Asia. *Osteoporos Int.* 2010 ; 21(5) : 847-53.
6. Joan S Lewis 1, V Craig Jordan, Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat Res.* 2005; 591(1-2): 247-63.
7. 金達鎬, 李鍾馨. 黃帝內經 素問. 서울:醫聖堂. 2001 ; 552-553, 908-909.
8. Rauner M, Sipos W, Thiele S, Pietschmann P. *Advances in osteoimmunology: pathophysiologic concepts and treatment opportunities.* *Int Arch Allergy Immunol.* 2013 ; 160 : 114-125.
9. Charles JF, Nakamura MC. Bone and the innate immune system. *Curr Osteoporos Rep.* 2014 ; 12:1-8.
10. L. Ginaldi, M. C. Di Benedetto, and M. De Martinis, "Osteoporosis, inflammation and ageing," *Immunity and Ageing.* 2005 ; 2 : 14.
11. G. R. Mundy, "Osteoporosis and inflammation," *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010; 54(2): 123-32.
12. 凌一揆. 中藥本草學. 서울:保健新聞社. 1998.
13. Han JS, Park HS. The Effects of Anti-cancer and Immune Response of Lonicerae Flos Herbal-acupuncture. *J Acupunct Res.* 2006 ; 23(4) : 205-218.
14. Ohta S, Sato N, Tu SH, Shinoda M. Yakugaku Zasshil. Protective effects of Taiwan crude drugs on experimental liver injuries. 1993 ; 113 : 870-880.
15. Tie K, Wang H, Wang X, Chen L. Measurement of Bone Mineral Density in the Tunnel Regions for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry, Computed Tomography Scan, and the Immersion Technique Based on Archimedes' Principle. *Arthroscopy.* 2012 ; 28(10) : 1464-1471.
16. M. H. Tsch`op, J. R. Speakman, J. R. S. Arch et al., "A guide to analysis of mouse energy metabolism," *Nature Methods.* 2011; 9(1): 57-63.
17. Tie K, Wang H, Wang X, Chen L. Measurement of Bone Mineral Density in the Tunnel Regions for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry, Computed Tomography Scan, and the Immersion Technique Based on Archimedes' Principle. *Arthroscopy: Arthroscopy.* 2012 ; 28(10) : 1464-1471.
18. ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization; Geneva, Switzerland: 2009.
19. Lopez-Garcia J, Lehocky M, Humpolicek P, Saha P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *J Funct Biomater.* 2014 ; 5(2) : 43-57
20. Notomi T, Okimoto N, Okazaki Y, Nakamura T, Suzuki M. Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. *J Bone Miner Res.* 2003 ; 18 : 140-149.
21. Yamamoto M, Fisher JE, Gentile M, Seedor JG, Leu CT, Rodan SB, Rodan GA. The integrin ligand

- echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats. *Endocrinology*. 1998 ; 139(3) : 1411-1419.
22. I Yamazaki, H Yamaguchi. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *J Bone Miner Res*. 1989 ; 4(1) : 13-22.
 23. Cummings SR, Bates D, Black DM. Clinical use of bone densitometry: scientific review. *JAMA*. 2002 ; 288 : 1889-1897.
 24. Yamamoto M, Fisher JE, Gentile M, Sedor JG, Leu CT, Rodan SB, Rodan GA. The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats. *Endocrinology*. 1998 ; 139(3) : 1411-1419.
 25. Kazakia GJ, Majumdar S. New imaging technologies in the diagnosis of osteoporosis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2006 ; 7 : 67-74.
 26. Yamamoto M, Fisher JE, Gentile M, Sedor JG, Leu CT, Rodan SB, Rodan GA. The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats. *Endocrinology*. 1998 ; 139(3) : 1411-1419.
 27. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connective Tissue Research*. 2018 ; 2017 : 1-9.
 28. Wang L, Liu S, Zhao Y, Liu D, Liu Y, Chen C, Karray S, Jin Y. Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/FAS pathway is required for maintenance of bone mass. *Cell Death & Differentiation*. 2015; 22(10) : 1654-1664,26
 29. Collin-Osdoby P and Osdoby P: RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods in molecular biology* 2012 ; 816: 187-202.
 30. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R and Wenstrup RJ: Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1992 ; 7: 683-692.
 31. Kuo TR and Chen CH: Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: Recent developments and future perspectives *Biomark Res*. 2017 ; 5: 18.
 32. Wu X, Xie CQ, Zhu QQ, Wang MY, Sun B, Huang YP, Shen C, An MF, Zhao YL, Wang XJ and Sheng J: Green tea (*Camellia sinensis*) aqueous extract alleviates postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rats and prevents RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro. *Food Nutr Res*. 2018 ; 62.
 33. Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, Kato Y, Sato S, Kubota E, Hata RI. Both direct and collagen-mediated signals are required for active vitamin D 3-elicited differentiation of human osteoblastic cells: Roles of osterix, an osteoblast-related transcription factor. *Matrix biology*. 2006 ; 25(1) : 47-58.
 34. Jeong Y, Yang W, Ko H, Kim M. The effects of bone morphogenetic protein-2 and enamel matrix derivative on the bioactivity of mineral trioxide aggregate in MC3T3-E1 cells. *Restorative dentistry & endodontics*. 2014 ; 39(3) : 187-194.
 35. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by Skeleton. *Cell*. 2007 ; 130(3) : 456-469.
 36. Guo C, Yuan L, Wang JG, Wang F, Yang XK, Zhang FH, Song JL, Ma XY, Cheng Q, Song GH. Lipopolysaccharide (LPS) induces the apoptosis and inhibits osteoblast differentiation through JNK pathway in MC3T3-E1 cells. *Inflammation*. 2014 ; 37(2) : 621-631.
 37. Plantalech L, Guillaumont M, Vergnaud P, Leclercq M, Delmas PD. Impairment of gamma carboxylation of circulating osteocalcin (bone gla protein) in elderly women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1991 ; 6(11) : 1211-1216.