

# 두충의 물 추출물이 파골세포의 분화에 미치는 영향

정연태 · 최윤홍 · 송정훈<sup>1</sup> · 이창훈<sup>2</sup> · 이명수<sup>2</sup> · 장성조<sup>3</sup> · 조해중<sup>4</sup> · 곽한복 · 오재민\*

원광대학교 의과대학 해부학교실, 1:성형외과학교실, 2:류마티스내과학교실, 3:신경외과학교실, 4:산부인과학교실

## Effect of Water Extract of *Eucommiae* cortex in RANKL-induced Osteoclast Differentiation

Yeon Tae Jung, Yun Hong Choi, Jeong Hoon Song<sup>1</sup>, Chang Hoon Lee<sup>2</sup>, Myeung Su Lee<sup>2</sup>, Sung Jo Jang<sup>3</sup>, Hae Joong Cho<sup>4</sup>, Han Bok Kwak, Jaemin Oh\*

Department of Anatomy, 1:Department of Plastic Surgery, 2:Department of Rheumatology, 3:Department of Neurosurgery, 4:Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Wonkwang University

Although the effect of *Eucommia ulmoides* oliver in osteoporosis has been studied, direct action of *Eucommia ulmoides* Oliver on osteoclasts remains unknown. Here we examined whether *Eucommiae* cortex inhibits osteoclast differentiation and bone resorption, a process known to be involved in bone diseases such as osteoporosis. Water extract from *Eucommiae* cortex (WE-EC) inhibited differentiation of bone marrow macrophages (BMMs) into osteoclasts without causing cytotoxicity. WE-EC suppressed the phosphorylation of p38, ERK, and JNK in BMMs treated with RANKL. WE-EC specifically suppressed the mRNA expression of NFATc1 induced by RANKL. However, WE-EC inhibited stability of c-Fos protein induced by RANKL. Furthermore, WE-EC inhibited osteoclast survival induced by RANKL and in turn suppressed bone resorption. Taken together, our results suggest that WE-EC may be better agents for therapeutic use in bone diseases.

Key words : *eucommia ulmoides* oliver, *eucommiae* cortex, bone, osteoclast, RANKL

### 서 론

골의 항상성은 골을 흡수하는 파골세포와 골을 형성하는 조골세포의 활성에 따라 골재형성(bone remodeling)과정에 의해 유지된다. 그러나 폐경기 여성의 경우 에스트로젠 결핍으로 파골세포 증식이 증가되어 골 형성보다는 골 흡수가 증가되어 골 항상성은 파괴되고 골다공증이 유발된다. 따라서 파골세포와 조골세포의 균형은 양질의 골 유지를 위해 중요하다<sup>1)</sup>. 체내에서 파골세포의 증식은 에스트로젠 결핍뿐만 아니라 만성적인 염증에 의해 증가되는데, 류마티스 관절염, 치주염 같은 골질환은 파골세포의 과증식과 활성의 증가에 의해 유도 된다<sup>2)</sup>.

파골세포는 조혈모세포에서 유래된 대식세포가 분화되어 형성되며 여러 가지 사이토카인에 의해 다핵성 세포로 분화되어 골을 흡수한다. 조골세포는 골 형성에 중요한 세포이며, 1

$\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 (VitD3), prostaglandin E2(PGE2), interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , parathyroid hormone(PTH), interleukin-6(IL-6)등의 자극에 의해 사이토카인인 receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand(RANKL)과 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)를 분비한다<sup>3)</sup>.

RANKL은 TNF계열의 사이토카인으로 M-CSF와 함께 파골세포의 분화, 성장, 활성을 유도한다<sup>4,6)</sup>. 사이토카인 RANKL과 수용체인 RANK의 결합에 의한 신호전달 과정에서 NF- $\kappa$ B, M1 transcription factor (MITF), PU1을 활성화 시키며 파골세포의 분화에 중요한 인자인 c-Fos, nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1등을 활성화 시킨다<sup>1,7)</sup>. RANKL은 분화 초기에 전사인자인 c-Fos의 발현을 촉진하여 AP-1 형성을 유도하며, AP-1은 NFATc1의 발현에 중요한 역할을 한다<sup>8)</sup>. NFATc1은 파골세포의 분화에 매우 중요한 전사인자로 파골세포 지표인 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), cathepsin K, osteoclast-associated receptor (OSCAR), calcitonin receptor(CTR)등의 발현을 촉진 한다<sup>9)</sup>. 특히, TRAP은 파골세포

\* 교신저자 : 오재민, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

· E-mail : Jmoh@wku.ac.kr, · Tel : 850-6761

· 접수 : 2009/05/07 · 수정 : 2009/05/21 · 채택 : 2009/06/04

분화의 지표로 TRAP 결핍 마우스는 심각한 골석화증 증세가 나타난다<sup>10</sup>.

천연물질에 대한 관심이 높아지면서 동양에서 뿐만 아니라 세계 각지에서 오랫동안 민간요법으로 쓰이고 있는 식물 추출물에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 따라서 파골세포를 조절하는 기능성 천연 물질에 관한 연구를 진행하였고 본 연구에서 두충 물 추출물(WE-EC: Water extract from *Eucommiae cortex*)이 파골세포의 분화를 억제하는 것을 관찰하였다. 두충(*Eucommia ulmoides* Oliver)은 두충나무(*Eucommia ulmoides* Oliver, Eucommiaceae)의 수피를 지칭하는 생약이며 유통과 고흡압에 대한 처방 및 진통제로 사용되어 왔고 관절통과 관절염에 효능이 알려져 있다<sup>11,12</sup>. 두충의 활성에 대한 연구 보고는 pinorensinol di-O-β-D-glucopyranoside의 혈압 강하 작용, geniposidic acid와 aucubin의 collagen 합성 증진 작용, geniposide의 저 혈당 작용이 알려져 있다<sup>13,14</sup>. 또 최근 연구에서 두충 조성물이 골다공증의 억제에 관한 영향이 보고되었다<sup>15</sup>.

본 연구에서 우리는 RANKL에 의한 파골세포의 분화 및 활성에 두충 물 추출물의 영향을 검증하였고, 두충 물 추출물의 파골세포 억제 작용기전을 규명하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료

두충은 물로 추출하여 감압농축한 후 72시간 동안 동결·건조하여 분말 형태를 얻었다. XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서 구입하였다. phospho (p)-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-p38, p38, I-κB 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였다. Human RANKL과 Human M-CSF는 Peprotech (London, UK)사에서 구입하였다. c-Fos 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다.

### 2. 파골세포 분화

ICR 5주령 생쥐의 대퇴골과 경골을 분리하고 뼈속질 공간을 1cc 주사기로 수세하여 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포는 10% FBS, 항생제, M-CSF (30 ng/ml)가 포함된 α-minimum essential medium (α-MEM)배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 세포를 대식세포 (bone marrow macrophage, BMM)로 사용하였다. 대식세포는 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (50 ng/ml)을 첨가하여 배양하고 두충 물 추출물을 농도별로 처리하였다. 4일 후, 배양한 세포는 TRAP 용액 (Sigma Aldrich, USA)으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포를 파골세포로 간주하였다.

### 3. 독성검사

대식세포는 M-CSF (30 ng/ml)과 두충 물 추출물을 첨가하고  $1 \times 10^4$ /well로 배양하였다. 3일 후, XTT 용액 50 μl를 각각의 well에 첨가하고 4시간 배양 후 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 확인하였다.

### 4. RT-PCR 분석

RT-PCR분석을 위한 RNA는 배양된 각각의 세포에서 TRIzol (Invitrogen) 용액으로 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 분리한 RNA 1 μg은 oligo dT primer, dNTP, buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor와 Superscript II reverse transcriptase를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 다음과 같은 primer를 이용하여 PCR 증폭을 하였다. c-Fos sense, 5'-CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3'; c-Fos antisense, 5'-CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3'; NFATc1 sense, 5'-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3'; NFATc1 antisense, 5'-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3'; 5'-GAPDH sense, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; GAPDH antisense, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. PCR 후, 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에서 분리하였고 Et-Br로 염색하여 U.V.상에서 관찰하였다.

### 5. Western blot 분석

배양된 세포는 lysis buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% deoxycholate, and protease inhibitors)를 이용하여 용해하고 원심분리 (14,000 rpm)를 수행하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 DC Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하고 동량의 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF 막 (Amersham Biosciences)으로 옮기고 여러 항체를 이용하여 단백질의 발현을 확인하였다.

### 6. 골 흡수 분석 (Resorption pit assay)

성숙 파골세포를 얻기 위해, 생후 1일령 마우스의 두개골을 적출하고 0.1% collagenase와 0.2% dispase를 이용하여 두개골에서 조골세포를 추출하였다. 조골세포와 골수세포는 collagen으로 코팅한 90-mm 배양접시에 첨가하고 VitD3(10<sup>-8</sup> M)와 PGE2(10<sup>-8</sup> M)를 첨가하여 6일간 배양하였다. 6일 배양 후, 0.1% collagenase를 이용하여 성숙 파골세포를 얻고 dentine slice를 첨가한 48-well plate에 성숙 파골세포를 첨가하였다. 두충 물 추출물을 처리하고 24 시간 배양 후, dentine slice는 TRAP 용액으로 염색하고 세포를 제거한 후 hematoxylin 용액으로 dentine slice를 염색하여 골 흡수 정도를 분석하였다.

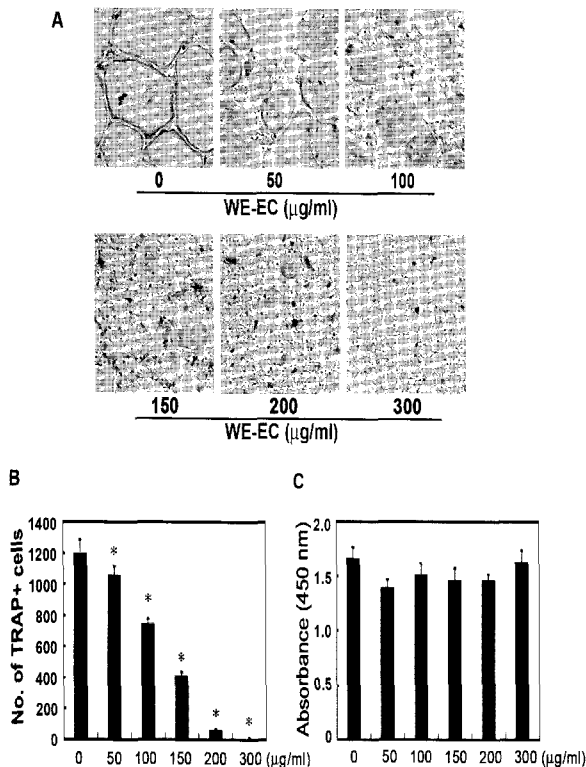
### 7. 통계분석

정량적인 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 통계적인 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 p 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하여 별표(\*)로 표시하였다.

## 결 과

### 1. 두충 물 추출물의 파골세포 분화억제 효과

골은 생성과 흡수의 반복적인 과정을 통하여 끊임없이 이루어지므로 파골세포의 분화는 골의 항상성을 유지하는데 필수적이며 파골세포의 증가는 골 질환에 있어서 대단히 중요하게 작용한다<sup>2)</sup>. 따라서 파골세포의 분화에 두충 물 추출물의 영향을 조사하기 위해서 대식세포에 M-CSF와 RANKL을 첨가하여 4일간 배양하였고 두충 물 추출물을 농도별로 처리하였다. 두충 물 추출물을 처리하지 않은 대조군은 TRAP 양성 다핵성 파골세포로 분화되었지만 두충 물 추출물을 처리한 실험군에서는 TRAP 양성 다핵성 파골세포가 관찰되지 않았다(Fig. 1A). TRAP 양성 다핵성 파골세포의 수도 두충 물 추출물 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 1B). 세포독성에 의하여 양성 다핵세포로의 분화가 억제되었는지를 확인하기 위해서 XTT 실험을 수행하였다. 다핵성 파골세포로의 분화를 억제하는 두충 추출물의 농도에서는 세포 독성이 확인되지 않았다(Fig. 1C).

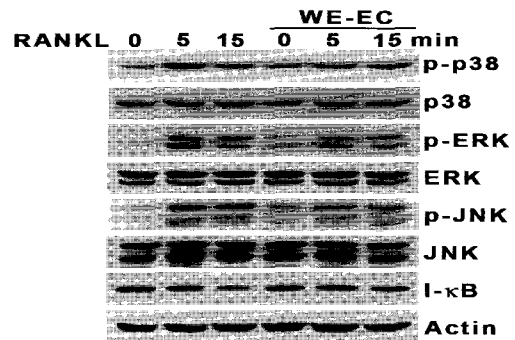


**Fig. 1. Inhibition of RANKL-induced osteoclast differentiation by WE-EC.** (A) Bone marrow macrophages (BMMs) were cultured for 4 days with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) in the presence of WE-EC (Water extract from *Eucommiae* cortex). Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. TRAP-positive cells were photographed under a light microscope. (Magnification: x100) (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. Asterisks (\*) indicate statistical differences from the control ( $p < 0.05$ ). (C) BMMs were cultured for 3 days with M-CSF (30 ng/ml) in the presence of WE-EC. After 3 days, 50 µl of XTT reagents were added to each well, and the cells were incubated for 4 h. The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader.

**2. 파골세포를 유도하는 RANKL의 신호전달 경로에 대한 두충 물 추출물의 영향**

RANKL에 의한 파골세포 유도는 수용체인 RANK와 결합하여 TNF receptor associated factor (TRAF6)를 통해 많은 신호전

달 물질의 활성화로 촉진된다. 특히 NF-κB, p38, JNK는 파골세포의 분화에 중요한 신호전달 단백질이다<sup>16)</sup>. 우리는 두충 물 추출물에 의한 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위해 이들 신호전달 단백질의 활성화에 대한 억제효과를 실험하였다. I-κB, p38, JNK 등은 RANKL에 의해 15분 안에 인산화 된다. 따라서 대식세포는 두충 물 추출물로 전 처리 후 RANKL을 5분과 15분 동안 처리하였다. RANKL에 의한 p38, ERK, JNK 인산화는 두충 물 추출물에 의해 억제되었다. 또한 NF-κB의 억제제인 I-κB가 RANKL의 처리에 의해서 분해되었지만, 두충 물 추출물을 처리한 실험군에서는 RANKL이 I-κB의 분해를 유도하지 못하였다 (Fig. 2).



**Fig. 2. Inhibition of MAPK activity by WE-EC.** BMMs were pretreated with or without WE-EC (300 µg/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

**3. RANKL에 의한 유전자 발현에 두충 물 추출물의 효과**

우리는 RANKL에 의해 유도되는 유전자 발현에 두충 물 추출물의 억제효과를 실험하였다. c-Fos 유전자의 mRNA는 RANKL에 의해 12시간과 24시간에 발현되었고 NFATc1 유전자의 mRNA는 24시간에 발현되었지만 두충 물 추출물을 처리한 실험군에서는 c-Fos 유전자 mRNA의 발현은 거의 변화가 없으나 NFATc1 유전자 mRNA의 발현이 억제되었다(Fig. 3A). RANKL에 의해 발현되는 c-Fos는 AP-1의 주요 구성 단백질로 NFATc1 단백질 발현에 중요한 역할을 하며 c-Fos에 의해 증가되는 NFATc1은 파골세포의 표지인 TRAP, OSCAR, DC-STAMP 등의 발현을 유도한다<sup>9)</sup>. 두충 물 추출물이 c-Fos 유전자 mRNA 발현에는 영향이 없고 NFATc1 유전자 mRNA 발현을 억제하기 때문에 c-Fos 단백질 발현에 두충 물 추출물의 영향을 더 정확하게 규명하기 위해 Western blot을 수행하였다. RANKL은 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현을 유도하였지만 두충 물 추출물은 c-Fos와 NFATc1의 단백질 양을 감소시켰다(Fig. 3B).

**4. 두충 물 추출물에 의한 파골세포 골 흡수기능 억제효과**

두충 물 추출물은 RANKL에 의한 NFATc1의 발현 억제를 통해 파골세포 분화를 억제하였다. 따라서 우리는 파골세포에 의한 골 흡수에 두충 물 추출물의 억제효과를 조사하였다. 성숙 파골세포는 dentine slice에서 배양하고 두충 물 추출물을 처리하여 24 시간 배양하였다. 두충 물 추출물은 대조군과 비교하여 파골

세포의 수를 억제하였다(Fig. 4A). 이 결과로 두충 물 추출물이 파골세포의 생존을 억제한다고 할 수 있다. 다음으로 세포를 제거하고 dentine slice를 hematoxylin으로 염색하여 골흡수에 두충 물 추출물의 억제효과를 검사하였다. 대조군은 dentine slice를 흡수하였지만, 두충 물 추출물을 처리한 dentine slice는 골 흡수가 억제되었다(Fig. 4B). 이 결과로 두충 물 추출물은 파골세포의 분화뿐만 아니라 골 흡수도 억제하는 것을 알 수 있다.

## 고찰

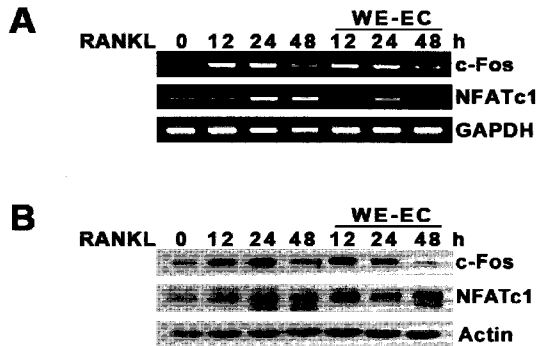
골의 질환에 가장 큰 원인은 노화, 흡연, 에스트로겐의 결핍, 만성적인 염증 등으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 에스트로겐은 파골세포 분화에 중요한 억제 호르몬으로 폐경기 이후 에스트로겐 결핍 여성에서 골다공증이 자주 나타나며, 류마티스 관절염과 치주염과 같은 골질환 환자에서 파골세포의 과증식과 함께 높은 활성이 발견된다<sup>2,17,18)</sup>. 따라서 파골세포를 억제하고 조절하는 치료제 개발은 중요하게 인식되고 있다.

본 연구에서 RANKL과 M-CSF에 의한 파골세포 분화에 두충 물 추출물의 억제효과를 검증하였다. 파골세포의 분화에 중요한 사이토카인 M-CSF와 RANKL은 대식세포를 다핵 파골세포로의 분화를 유도하지만 두충 물 추출물을 처리한 실험군에서는 농도의존적으로 파골세포의 분화를 억제 되었다. 그리고 XTT assay로 대식세포에 대한 두충 물 추출물의 독성 효과는 없는 것으로 확인 되었다(Fig. 1). 따라서 두충 물 추출물이 RANKL과 M-CSF에 의한 파골세포 분화를 직접적으로 억제한다고 할 수 있다.

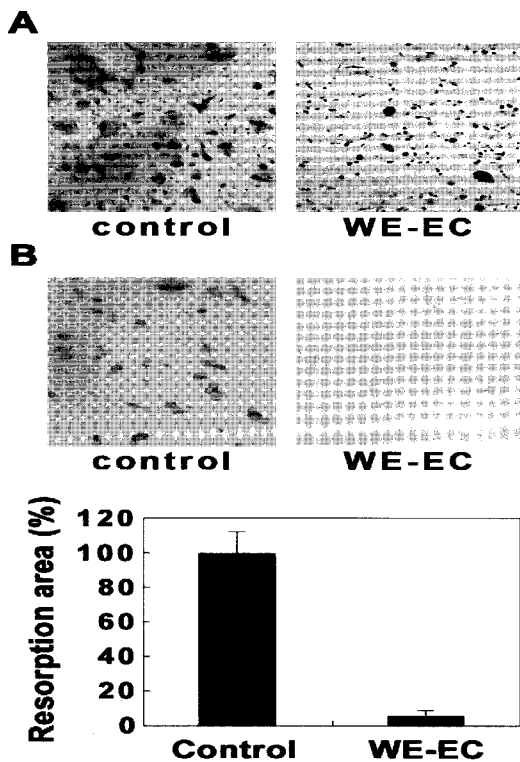
사이토카인 수용체인 RANK와 RANKL과의 결합은 TRAF6의 결합을 촉진하여 MAPK인 p38, JNK, ERK와 전사인자 NF- $\kappa$ B의 활성을 촉진 한다고 알려져 있다<sup>2)</sup>. 또한 p38과 JNK는 파골세포 분화에 중요한 신호전달 단백질로 알려졌고 ERK는 파골세포의 성장에 중요하다고 보고되어 있다<sup>19)</sup>. 따라서 본 연구에서 두충 물 추출물의 파골세포 억제 작용기전을 규명하기 위해 RANKL에 의한 신호전달체계에 두충 물 추출물의 활성을 검증하였다. RANKL은 p38, ERK, JNK의 인산화를 촉진하였지만, 두충 물 추출물을 전 처리한 실험군에서는 인산화가 억제되었다. 또한 RANKL에 의한 I- $\kappa$ B 분해를 억제하였다(Fig. 2). 이 결과로 두충 물 추출물의 억제효과는 MAPK와 NF- $\kappa$ B의 활성 억제와 관련이 있을 것으로 사료 된다.

최근 Huang 등은 p38 MAPK의 억제는 파골세포의 분화에 중요한 전사인자 c-Fos와 NFATc1의 발현이 억제된다고 보고하였고<sup>20)</sup>, NF- $\kappa$ B가 결합된 세포에서도 c-Fos와 NFATc1의 발현이 억제되었다<sup>21)</sup>. 이들의 결과로 p38 MAPK와 NF- $\kappa$ B가 c-Fos와 NFATc1의 발현에 중요한 신호 전달 단백질이라 할 수 있다. 따라서 두충 물 추출물은 p38 MAPK와 NF- $\kappa$ B의 신호전달체계를 억제하여 파골세포 분화에 중요한 c-Fos와 NFATc1의 발현을 억제할 것으로 예상하였다. 실험 결과 비록 두충 물 추출물은 c-Fos mRNA 발현에는 상관없이 NFATc1 mRNA의 발현을 억제하였지만 c-Fos 단백질의 양을 감소시켰다(Fig. 3). 이 결과로 두충 물 추출물이 c-Fos 유전자 mRNA의 발현에는 관여하지 않고 단백질의 안전성을 억제하여 c-Fos 단백질의 양이 억제되는 것으로 사료된다(Fig. 3). NFATc1은 파골세포의 지표인 TRAP, CTR, OSCAR의 발현을 유도하는 전사인자로 c-Fos와 calcium의 증가로 발현이 조절된다<sup>8)</sup>. 따라서 c-Fos 단백질 안전성의 억제로 NFATc1 발현이 억제되는 것이라 사료된다.

두충 물 추출물은 파골세포의 분화뿐만 아니라 골 흡수도 억제하였다(Fig. 4). 비록 두충 물 추출물이 골다공증에 억제효과가 있다고 알려졌지만<sup>16)</sup>, 본 연구에서 두충 물 추출물이 RANKL



**Fig. 3. WE-EC inhibits NFATc1 expression induced by RANKL.** (A) BMMs were pretreated with or without WE-EC (300 $\mu$ g/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. Total RNA was isolated, and 1  $\mu$ l of cDNA was used as template for RT-PCR. The mRNA expression of the indicated genes was analyzed by RT-PCR. (B) BMMs were pretreated with or without WE-EC (300  $\mu$ g/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies for c-Fos and actin.



**Fig. 4. WE-EC suppresses osteoclast survival and bone resorption.** (A) Mature osteoclasts were seeded on dentine slices and incubated for 24 h in the presence or absence of WE-EC. After 24 h, dentine slices were stained for TRAP. (B) Cells on dentine slices were removed and stained with hematoxylin (top). Resorption area on dentine slices were quantified using the Image Pro-plus program, version 4.0 (bottom).

에 의한 p38, JNK, ERK, NF- $\kappa$ B의 활성 억제로 NFATc1의 발현을 억제 한다는 것을 처음으로 규명하였다. 따라서 우리의 연구는 천연물질인 두충이 파골세포의 분화 및 활성의 억제로 골질환 치료제로의 발전 가능성이 높다고 사료된다.

## 결 론

천연물인 두충 물 추출물은 독성 없이 농도 의존적으로 파골세포 분화를 억제 하였다. 또한 두충 물 추출물의 파골세포의 분화억제 작용기전을 처음으로 규명하였다. 우리는 본 실험적 규명을 통하여 천연물인 두충추출물이 관절염과 골다공증 같은 골질환에 관련된 치료제로의 발전 가능성이 있음을 제안한다.

## 감사의 글

이 논문은 2007년도 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423: 337-342, 2003.
- Teitelbaum, S.L., Ross, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 4: 638-649, 2003.
- Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J. Mol. Med.* 83: 170-179, 2005.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 3597-3602, 1998.
- Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., Boyle, W.J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 93: 165-176, 1998.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., Martin, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* 20: 345-357, 1999.
- Rao, A., Luo, C., Hogan, P.G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 707-747, 1997.
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E.F., Mak, T.W., Kodama, T., Taniguchi, T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell.* 3: 889-901, 2002.
- Takayanagi, H. shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 292-304, 2007.
- Hayman, A.R., Jones, S.J., Boyde, A., Foster, D., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Cox, T.M. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development.* 122: 3151-3162, 1996.
- Chung, M.H. and Park, C.W. studies on the development of antihypertensive agents from Korean crude drug I, II, III. *Kor. J. Pharmacog.* 6: 29, 1975.
- Ko, Y.O., Sung, H.G. A study on the cutting of *Eucommia ulmoides* oliv, *Kor. J. Pharmcog.* 7: 59, 1976.
- Shi, O., Ravikumar, P., Hung, F., Buckner, C., Whitlock, H. Isolation and synthesis of Pinoresinol diglucoside, a major antihypertensive principle of *Tu-chong* (*Eucommia ulmoides* Oliver). *J. AM. Chem. Soc.* 98: 5412-5413, 1976.
- Yanmei, L., Takahiro, S., Koichi, M., Katwuya, K., Qing-ming, C. and Shushichi, T. The Promoting effect of geniposide acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* Oliver leaves on collagen synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 1306-1310, 1998.
- 이동선, 변상요. 두충(*Eucommia ulmoides* oliver) 조성물이 골다공증에 미치는 효과. *한국생물공학회지* 16: 614-619, 2001.
- Galibert, L., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D., Dougall, W.C. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF- $\kappa$ B, a member of the TNFR superfamily. *J. Biol. Chem.* 273: 34120-34127, 1998.
- Christiansen, P. The skeleton in primary hyperparathyroidism: a review focusing on bone remodeling, structure, mass, and fracture. *APMIS. Suppl.* 102: 1-52, 2001.
- Takayanagi, H., Iizuka, H., Juji, T., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Miyazaki, T., Koshihara, Y., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S. Involvement of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid

- arthritis. *Arthritis Rheum.* 43: 259-269, 2000.
19. Tanaka, S., Miyazaki, T., Fukuda, A., Akiyama, T., Kadono, Y., Wakeyama, H., Kono, S., Hoshikawa, S., Nakamura, M., Ohshima, Y., Hikita, A., Nakamura, I., Nakamura, K. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1068: 180-186, 2006.
20. Huang, H., Chang, E.J., Ryu, J., Lee, Z.H., Lee, Y., Kim, H.H. Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351: 99-105, 2006.
21. Yamashita, T., Yao, Z., Li, F., Zhang, Q., Badell, I.R., Schwarz, E.M., Takeshita, S., Wagner, E.F., Noda, M., Matsuo, K., Xing, L., Boyce, B.F. NF-kappaB p50 and p52 regulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1. *J. Biol. Chem.* 282: 18245-18253, 2007.