

파골세포 분화에서 토사자 물 추출물의 효과

조해중 · 최민규¹ · 김정중¹ · 리 연¹ · 송정훈² · 이명수³ · 이창훈³ · 장성조⁴ · 곽한복¹ · 오재민^{1*}

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

Effect of Water Extracts of *Cuscuta Japonica* Chois in RANKL-induced Osteoclast Differentiation

Hae Joong Cho, Min-Kyu Choi¹, Jeong-Joong Kim¹, Yan Le¹, Jeong Hoon Song², Myeong Su Lee³, Chang Hoon Lee³, Sung Jo Jang⁴, Han Bok Kwak¹, Jaemin Oh^{1*}

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

Osteoclasts are bone-resorbing multinucleated cells derived from the monocyte/macrophage lineage. The differentiation of osteoclasts are regulated by osteoblastic cells expressed RANKL, which is the most critical molecule for osteoclast differentiation. In this study, we found that water extracts of cuscuta inhibited RANKL-mediated osteoclast differentiation by direct action on bone marrow macrophages (BMMs) without cytotoxicity. In BMMs, water extracts of cuscuta inhibited the mRNA expression of c-Fos, NFATc1, TRAP, and OSCAR. Also, the protein expression of c-Fos and NFATc1 was inhibited by water extracts of cuscuta treatment. Water extracts of cuscuta inhibited the phosphorylation of p38, ERK, and JNK in BMMs treated with RANKL. However, water extracts of cuscuta did not inhibit RANKL-induced I- κ B activation. Water extract of cuscuta failed to inhibit bone resorption by osteoclasts cultured on hydroxyapatite plates. These results suggest that cuscuta may be a promising drug for use against bone disorders such as osteoporosis and rheumatoid arthritis.

Key words : cuscuta, osteoclast, RANKL, NFATc1

서 론

골의 유지는 파골세포가 오래된 골을 흡수하고 조골세포가 새로운 골을 꾸준히 생산함으로써 조절된다¹⁾. 파골세포와 조골세포의 비정상적인 조화는 여러 가지 골 질환 등을 유발하게 된다. 특히 파골세포는 골의 재형성에 중요한 역할을 하며 파골세포의 증가는 골다공증뿐만 아니라 류마티스 관절염, 치주염 같은 골 질환을 유발 한다^{2,3)}. 그러므로 파골세포로의 분화를 억제하는 것은 골 관련 질환을 치료하는 중요한 표적이 될 수 있다.

파골세포는 조혈모세포에서 유래된 대식세포가 두 가지 사이토카인인 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)에 의하여 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 양성 다핵형

세포로 분화된다. 이 두가지 사이토카인은 interleukin 1 (IL-1), prostaglandin E₂ (PGE₂)와 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 (VitD3) 등에 의해 자극된 조골세포에서 발현된다^{4,6)}. 조골세포에서 발현된 RANKL은 RANK와 결합하여 파골세포의 중요한 여러 신호 전달 물질을 활성화 시킨다고 보고되었다⁷⁾. RANKL과 RANK의 결합은 TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2), TRAF5, TRAF6등의 adaptor 단백질들에 의해 신호전달을 개시한다. 이 TRAF adaptor들을 통한 RANKL 신호전달은 파골세포의 중요한 여러 전사인자들을 활성화 시킨다⁸⁾. 여러 전사인자 중 NF- κ B, c-Fos, nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1, Mi transcription factor (MITF), PU.1은 파골세포의 분화에 중요하다. 특히, c-Fos는 분화 초기에 증가되는 전사인자로 NFATc1의 발현을 유도한다. 이 NFATc1은 파골세포의 분화에 매우 중요한 전사인자로 파골세포의 지표인 TRAP, calcitonin receptor, osteoclast-associated receptor (OSCAR) 등의 발현을 촉진 한다⁹⁻¹¹⁾. 또한 RANKL 신호전달은 대식세포에서 inhibitory kappa B

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

· E-mail : jmoh@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6761

· 접수 : 2009/05/07 · 수정 : 2009/07/21 · 채택 : 2009/08/04

(I-κB)의 활성을 야기함으로써 NF-κB를 핵으로 이동 시키고 활성을 증가 시킨다¹²⁾.

RANK가 자극된 파골세포는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun- N-terminal kinase (JNK), p38과 같은 mitogen-activated protein kinase (MAPKs)들을 활성화 시킨다¹³⁾. 이 MAPKs들은 직접적 인산화나 간접적 활성을 통해 파골세포에서 중요한 전사인자들을 조절한다. ERK는 파골세포의 생존에 필수적이고 p38과 JNK는 파골세포의 분화에 연관되어있다¹⁴⁾. p38의 과대활성을 나타내는 세포는 NFATc1의 발현이 증가되고 그 억제제인 SB203580이 c-fos와 NFATc1의 발현을 억제한다고 알려졌다¹⁵⁾. JNK의 활성 억제는 NFATc1과 calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)의 발현을 억제하여 뼈 파괴세포의 분화를 억제한다고 보고되었다¹⁶⁾. 활성화된 ERK는 c-fos의 활성을 증가시킨다. 또한 RANKL 의존적 NFATc1의 증가는 c-fos가 결핍된 세포에서는 나타나지 않았다¹²⁾. 이것으로 RANKL 자극으로 발현되는 c-fos는 NFATc1의 발현에 필수적인 것이다^{11,12)}. 결론으로 RANKL로 증가된 MAPKs의 활성 억제는 대식세포에서 파골세포로의 분화를 억제하는 중요한 단서가 될 수 있다.

자연에서 얻어진 천연물들은 인공적으로 합성한 물질보다 독성이 없고 부작용이 적다. 그래서 많은 나라에서 천연물에 관한 연구가 활발하다. 토사자는 매꽃과에 속한 1년생 기생성 식물인 갯실새삼, 새삼, 실새삼의 종자 및 동속 근원식물의 성숙한 종자를 건조한 것으로 7월과 9월 사이에 채취하여 건조한 것이다. 우리나라에서는 새삼의 잘 익은 씨앗을 말린 것을 토사자 (생약명: Cuscutae semen)로 사용하며, 새삼(*Cuscuta japonica* Choisy) 외에 실새삼(*C. australis* R. Brown), 실새삼(*C. chinensis* Lam)의 3종이 쓰이고 있다. 천연물인 토사자는 맛이 달고 매우며 성질은 평(平)하고 주로 간과 신장을 보호하며 눈을 밝게 해주고, 양기(陽氣)를 도우며 신장 기능과 뼈를 튼튼하게 해주는 약재로 알려져 있다. 또한 항암작용과 면역력 증진에 효과를 보인다고 보고되었다¹⁷⁾. 그리고 조골세포의 분화를 촉진한다고 알려졌다¹⁸⁾. 그러나 파골세포에서의 효과는 검증된 바가 없다. 우리의 연구에서는 천연물들을 검색하여 토사자를 찾아냈고 그 효과를 검증하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 토사자는 물로 추출하여 감압농축한 후 동결·건조하여 파우더 형태로 얻었다. Human M-CSF와 RANKL은 Peprotech (London, UK)에서 구입했다. Actin 항체, TRAP, VitD3, PGE₂는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입했다. Phospho (p)-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-P38, P38, I-κB에 대한 항체는 Cell signaling Technology (Beverly, MA, USA)의 제품을 사용했다. OAAS plate (Hydroxyapatite-coated plate)는 오스코텍 (Korea)의 제품을 사용했다. XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서 구입했다. c-Fos와 NFATc1에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사

에서 구입했다.

2. 파골세포 분화

5주령 ICR 생쥐의 넓다리뼈와 정강뼈를 분리하고 뼈 속질 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 (100 ng/ml)을 첨가하여 배양하고 토사자 물 추출물은 농도별로 처리하였다. 4일 후, 배양한 세포는 TRAP 용액 (Sigma Aldrich, USA)으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포는 파골세포로 간주하였다.

3. XTT 분석

대식세포는 1X10⁴/well의 밀도로 96-well plate에 첨가하고 토사자 물 추출물과 M-CSF (30 ng/ml)를 첨가하여 3일간 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. Bone resorption 분석

조골세포는 생후 1일령 생쥐의 calvaria를 떼어 0.1% collagenase와 0.2% dispase로 배양하여 추출된 세포를 10% FBS와 항생제 (penicillin/streptomycin)를 첨가한 α-MEM 배양액에서 3일간 배양해 얻었다. 골수세포와 조골세포는 collagen으로 코팅한 90-mm 배양접시에 첨가하고 VitD3 (10⁻⁸ M)와 PGE₂ (10⁻⁶ M)를 처리한 후 6일간 동조 배양하였다. 6일 후, collagenase를 이용하여 부착된 성숙 파골세포를 떼어낸 후 hydroxyapatite-coated 48-well plate에 넣고 1시간동안 배양했다. 1시간 배양 후, trypsin을 처리하여 조골세포를 제거하고 순수 파골세포에 RANKL (100ng/ml)을 처리하고 토사자 물 추출물을 농도별로 처리해 24시간 배양했다. 파골세포는 0.1% Triton X-100을 처리해 제거하고 광학 현미경으로 촬영했다. 골 흡수 영역의 정량화는 Image Pro-plus program version, version. 4.0 (Media Cybernetics)을 이용했다.

5. Western blot 분석

대식세포는 토사자 물 추출물 (300 μg/ml)을 1시간 전처리한 후 RANKL (100 ng/ml)을 처리하고 시간별로 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 이용해 용해했다. 용해된 세포는 원심분리 하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질을 정량하고 30 μg의 단백질은 10% SDS-polyacrilamide gel에서 전기영동한 후, PVDF 막 (Amersham Biosciences)으로 단백질을 옮겼다. 단백질이 옮겨진 PVDF 막은 비 특이 단백질이 붙는 것을 방지하기 위해 5% non-fat dry milk를 처리했다. 이후 적절한 1

차 항체를 처리하고 TBS-T 완충용액으로 세척한 후 2차 항체를 처리했다. TBS-T 완충용액으로 세척한 PVDF 막은 enhanced chemiluminescence를 이용해 단백질 발현을 관찰했다.

6. RT-PCR 분석

RNA는 배양된 각각의 세포에서 TRIzol (Invitrogen) 용액으로 제조사의 방법에 따라 분리했다. 분리한 RNA 1 µg은 oligo dT primer, dNTP, buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor와 Superscript II reverse transcriptase를 이용해 cDNA로 합성했다. 합성된 cDNA는 다음과 같은 primer를 이용하여 PCR 증폭을 했다. c-Fos sense, 5'- CTGGTGCAGCCACTCTGGTC-3'; c-Fos antisense, 5'- CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3'; NFATc1 sense, 5'- CAACGCCCTGACCACCGATAG-3'; NFATc1 antisense, 5'- GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3'; TRAP sense, 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3'; TRAP antisense, 5'-TCAGCACATAGCCCACACCG-3'; OSCAR sense, 5'-CTGCTGGTAACGGATCAGTCCCCAGA-3'; OSCAR antisense, 5'-CCAAGGAGCCAGAACCTTCGAAACT-3'; 5'-GAPDH sense, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; GAPDH antisense, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. PCR 후, 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에서 분리되고 Et-Br로 염색하여 U.V.상에서 관찰했다.

7. 통계분석

정량적인 결과들은 평균 ± 표준편차로 표시했으며 Student's t-test로 분석하여 p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 간주하여 별표 (*)표시하였다.

결 과

1. 파골세포의 분화에서 토사자의 효과.

파골세포의 분화는 골다공증 유발에 중요하게 작용한다. 우리는 파골세포의 분화에 토사자 물 추출물의 효과를 검증하기 위해 대식세포에 M-CSF와 RANKL를 처리하고 토사자 물 추출물을 농도별로 처리해 4일간 배양했다. 대조군에서는 TRAP 양성 다핵형 파골세포가 많이 생성되었으나 토사자 물 추출물을 처리한 실험군에서는 농도의 증가에 따라 TRAP 양성 파골세포의 형성이 억제되었다(Fig. 1A). TRAP 활성과 연관되어있는 TRAP-positive 세포 수 역시 토사자 물 추출물에 의해 감소되었다 (Fig. 1B). 또한 토사자 물 추출물의 효과가 세포 독성에 연관되어 있는지를 확인하기 위하여 XTT 실험을 수행하였으나 본 연구에서 사용한 토사자 물 추출물의 농도에서는 유의성은 없었다 (Fig. 1C). 이 결과로 토사자 물 추출물이 세포 독성 없이 파골세포의 분화를 억제한다고 할 수 있다.

2. 파골세포 분화에 연관되어 있는 유전자 발현의 효과.

RANKL과 RANK의 결합은 파골세포의 분화에 필수적인 유전자들을 발현한다. 특히 파골세포 분화에 중요한 지표인 c-Fos

와 NFATc1은 TRAP, OSCAR같은 파골세포의 분화에 필수적 단백질들의 발현을 조절한다. 본 연구에서는 RANKL에 의한 c-Fos와 NFATc1 단백질의 발현에 토사자 물 추출물의 효과를 검증했다. RANKL은 c-fos, NFATc1, TRAP, OSCAR의 mRNA 발현을 촉진하였지만, 토사자 물 추출물을 처리한 실험군에서는 이들 유전자의 발현을 강력하게 억제하였다(Fig. 2A). 또한 RANKL을 처리한 대조군은 시간에 의존적으로 c-Fos와 NFATc1 단백질의 발현을 증가시키지만 토사자 물 추출물을 같이 처리한 실험군의 c-Fos와 NFATc1 단백질의 발현은 대조군과 비교했을 때 억제되었다(Fig. 2B). 따라서 토사자 물 추출물에 의한 c-Fos, NFATc1 발현 억제효과가 파골세포 분화 억제와 관련되리라 사료된다.

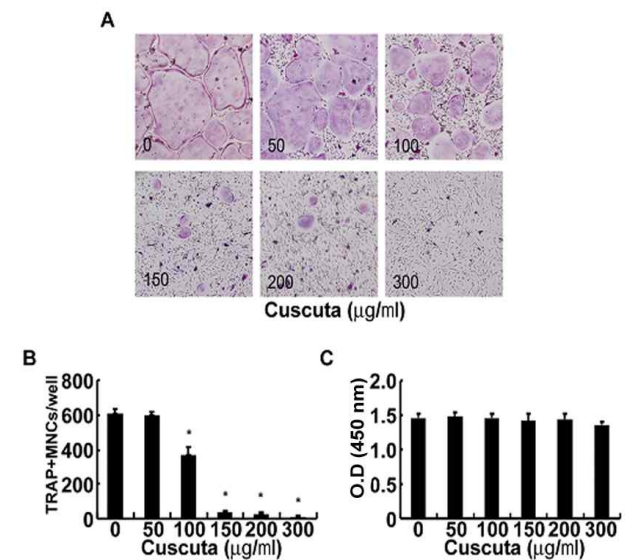


Fig. 1. Cuscuta suppresses RANKL-mediated osteoclast differentiation. (A) BMMs were cultured for 4 days with cuscuta at the indicated doses in the presence of M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml). After 4 days, cells were fixed with 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and osteoclasts were visualized by staining with TRAP. (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. *P<0.05, significant differences from no cuscuta treatment. (C) BMMs were cultured for 3 days with cuscuta at the indicated doses in the presence of M-CSF (20 ng/ml). After 3 days, XTT reagents were added to the culture medium and further incubated for 4 h. Absorbance was measured at 450 nm.

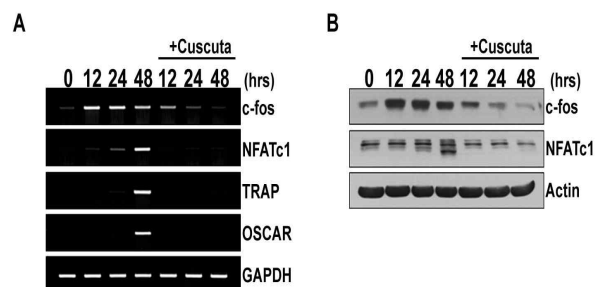


Fig. 2. Cuscuta inhibits RANKL-induced NFATc1 expression. (A) BMMs were pretreated with cuscuta for 1 h and then stimulated with RANKL for the indicated times. Total RNA was obtained at the indicated time points. The mRNA expression levels of the indicated genes were analyzed by RT-PCR. (B) BMMs treated as above were lysed, and the cell lysates were subjected to Western blotting with antibody against c-Fos, NFATc1, and actin.

3. 파골세포 분화에 중요한 신호 전달 물질 활성화에서 토사자 물 추출물의 효과

우리는 파골세포 분화를 억제하는 토사자 물 추출물의 작용 기전을 규명하기 위해 RANKL에 의한 MAPKs와 I- κ B의 활성화에 토사자 물 추출물의 효과를 검증하였다. 대식세포는 토사자 물 추출물로 전처리 후 RANKL에 의한 MAPKs와 I- κ B의 활성을 시간별로 확인했다. 대조군과 비교했을 때 토사자 물 추출물은 RANKL에 의한 p38, JNK, ERK의 인산화를 억제하는 것을 확인할 수 있다. 그러나 RANKL에 의해 유도되는 I- κ B의 활성화에는 영향이 없었다(Fig. 3). 이들 결과로 토사자 물 추출물의 파골세포 분화 억제 효과는 p38, JNK, ERK의 신호전달경로 활성의 억제와 관련되어있으리라 사료된다.

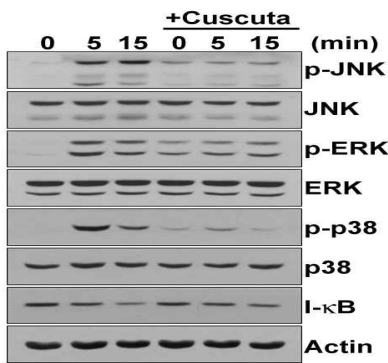


Fig. 3. Effect of cuscuta on phosphorylation of MAPK. BMMs were starved for 2 h, pretreated with cuscuta for 1 h, and then stimulated with RANKL for the indicated times. Cell lysates were subjected to Western blotting with the indicated antibodies.

4. 골 흡수에서 토사자 물 추출물의 효과

대식세포에서 유래된 성숙 파골세포는 골을 흡수하여 골다공증과 같은 골 질환을 유도 한다^{18,19}. 다음으로 우리는 성숙 파골세포의 골 흡수에 토사자 물 추출물의 효과를 검증하였다. 성숙 파골세포를 hydroxyapatite-coated plate에서 배양하고 토사자 물 추출물을 농도 별로 처리하였으나 RANKL에 의한 골 흡수를 억제하지 못하였다(Fig. 4). 이 결과로 토사자 물 추출물은 대식세포에서 파골세포로의 분화를 억제하지만 성숙된 파골세포의 골 흡수 작용에는 영향을 주지 못한다고 할 수 있다.

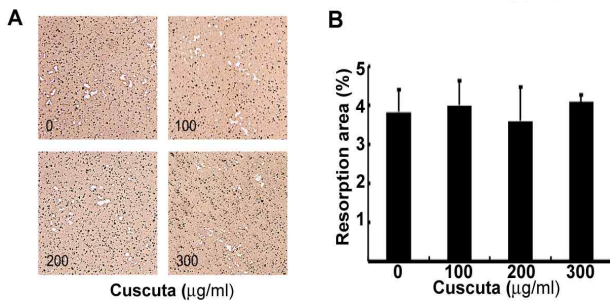


Fig. 4. Effect of cuscuta on bone resorption. (A) Mature osteoclasts were plated on hydroxyapatite plates and then treated with cuscuta for 24 h. Cells were removed and photographed under a light microscope. (B) Resorption area were quantified using the Image Pro-plus program, version 4.0.

고찰

골은 몸을 지지해 주며 칼슘(Ca)과 인(P)등의 무기물을 저장하고 중요 내부 장기를 보호하는 역할을 한다. 골은 동적인 조직으로서 조골세포와 파골세포의 연속적인 생성과 파괴를 통해 골의 항상성을 유지 시킨다^{2,3}. 이 항상성이 파괴 되면 많은 골 관련 질환이 유발된다. 파골세포에 의한 골 재흡수의 결핍은 골경화가 야기되지만, 과도한 골 재흡수는 골다공증, 관절염, 치주질환의 주요 원인이 된다^{1,3}. 이중 대표적인 질병은 골다공증을 꼽을 수 있으며 이것은 대표적인 대사질환의 하나로, 골밀도 감소 및 골조직의 파괴로 골 강도 저하와 골절의 위험성이 증가하는 근골격계 질환이다¹⁹. 골다공증은 양질의 골을 형성하지 못하므로 골절이나 고통을 수반하는 경우가 많다. 따라서 파골세포의 활성을 억제하는 약제의 개발은 골 질환 치료에 중요하다고 사료된다.

많은 천연물들과 유도체들은 골다공증을 포함한 많은 질병들을 치료하는 민간요법으로 사용되어왔다. 그 중에 토사자는 민간에서 신장의 기능과 뼈를 튼튼히 한다고 알려졌다. 또한 조골세포의 분화를 촉진하여 골을 생성한다고 알려졌다²⁰. 그러나 파골세포의 분화와 기능에 토사자의 효과는 보고되지 않았다. 이에 우리는 몇몇의 천연약제들의 검색을 통하여 파골세포의 분화를 억제하는 천연물인 토사자를 도출하였고 그 효과를 검증하였다. 본 연구에서 토사자 물 추출물은 농도 의존적으로 파골세포의 분화를 억제하였다(Fig. 1).

RANKL은 RANK와 결합하여 TRAF6의 활성을 촉진하고 다양한 전사인자를 유도한다. 최근 Takayanagi 등은 NFATc1이 결핍된 세포는 파골세포로 유도되지 않고 NFATc1을 과 발현시킨 대식세포는 RANKL을 투여하지 않아도 파골세포로 유도된다고 보고하였다^{12,23}. 이런 NFATc1은 c-Fos에 의해 발현된다. 우리는 파골세포 분화 억제 효과를 가지는 토사자가 c-Fos와 NFATc1의 발현에 관여하는지 연구하였다. RANKL에 의해 증가된 c-fos와 NFATc1의 단백질 발현이 토사자 물 추출물에 의해 효과적으로 억제되었다(Fig. 2B). 또한 파골세포의 분화와 밀접하게 연관되어 있는 유전자의 발현도 억제되었다(Fig. 2A). 이들 결과로 토사자 물 추출물은 RANKL에 의한 c-fos 발현을 억제하여 NFATc1 발현을 억제하고 파골세포의 분화 지표인 TRAP과 OSCAR의 발현을 억제한다고 할 수 있다.

전구세포에 RANKL의 자극으로 MAPKs와 NF- κ B와 같은 여러 신호 전달경로 단백질의 인산화가 촉진되며 MAPKs와 NF- κ B 활성의 억제는 파골세포의 분화의 억제로 골 질환을 치료할 수 있는 중요한 단서가 될 수 있다¹³. 최근 Rajotte 등은 GM-CSF가 전사인자인 STAT1, STAT3, ERK의 활성을 유도하여 c-Fos의 발현을 촉진한다고 보고하였다²⁶. 또한 p38 억제제인 SB203580과 JNK 신호전달체계의 억제로 c-Fos와 NFATc1 발현이 억제된다고 보고되었다. 본 연구에서 토사자 물 추출물이 ERK, p38, JNK의 활성을 억제하였는데, 이것은 토사자 물 추출물에 의한 c-Fos, NFATc1 발현의 억제와 깊은 관련이 있으리라 사료된다.

결 론

우리는 본 연구에서 파골세포의 분화에 토사자 물 추출물의 효과를 처음으로 검증했다. 토사자 물 추출물은 RANKL의 자극으로 증가된 p38과 JNK의 활성을 억제함으로써 파골세포의 분화를 감소시킨다. 이 p38과 JNK의 신호전달 경로의 억제는 파골세포의 분화에 필수적인 전사인자 c-fos와 NFATc1의 감소를 야기하였다. 이들 결과로 토사자는 조골세포의 활성을 유도할 뿐만 아니라 파골세포의 분화를 억제하여 골 질환 치료에 중요한 후보물질이 될 수 있다고 제안한다.

감사의 글

이 논문은 2007년 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423: 337-342, 2003.
- Wagner, E.F., Karsenty, G. Genetic control of skeletal development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 527-532, 2001.
- Karsenty, G., Wagner, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell*. 4: 389-406, 2002.
- Wei, S., Kitaura, H., Zhou, P., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 115: 282-290, 2005.
- Miyaura, C., Inada, M., Matsumoto, C., Ohshiba, T., Uozumi, N., Shimizu, T., Ito, A. An essential role of cytosolic phospholipase A2alpha in prostaglandin E2-mediated bone resorption associated with inflammation. *J. Exp. Med.* 197: 1303-1310, 2003.
- Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K. Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*. 140: 1005-1008, 1999.
- Darnay, B.G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P.A., Aggarwal, B.B. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 273(32):20551-20555, 1998.
- 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-kB, a member of the TNFR superfamily. *J. Biol. Chem.* 273: 34120-34127, 1998.
- Teitelbaum, S.L. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 289: 1504-1508, 2000.
- Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 292-304, 2007.
- 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.
- Matsuo, K., Galson, D.L., Zhao, C., Peng, L., Laplace, C., Wang, K.Z., Bachler, M.A., Amano, H., Aburatani, H., Ishikawa, H., Wagner, E.F. Nuclear factor of activated T-cell(NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-fos. *J. Biol. Chem.* 279: 26475-26480, 2004.
- Lee, S.E., Woo, K.M., Kim, S.Y., Kim, H.M., Kwack, K., Lee, Z.H., Kim, H.H. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone*. 1: 71-77, 2002.
- 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.
- Matsumoto, M., Sudo, T., Saito, T., Osada, H., Tsujimoto, M. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). *J. Biol. Chem.* 275: 31155-31161, 2000.
- Chang, E.J., Ha, J., Huang, H., Kim, H.J., Woo, J.H., Lee, Y., Lee, Z.H., Kim, J.H., Kim, H.H. The JNK-dependent CaMK pathway restrains the reversion of committed cells during osteoclast differentiation. *J. Cell. Sci.* 121: 2555-2564, 2008.
- 이재복, 이병렬. 토사자약침의 항암작용 및 면역효과에 대한 실험적 연구. *대한침구학회지* 18(3):94-104, 2001.
- May, M.J., D'Acquisto, F., Madge, L.A., Glockner, J., Pober, J.S., Ghosh, S. Selective inhibition of NF-kB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IκB kinase complex. *Science*. 289: 1550-1554.
- Jimi, E., Aoki, K., Saito, H., D'Acquisto, F., May, M.J., Nakamura, I., Sudo, T., Kojima, T., Okamoto, F., Fukushima, H., Okabe, K., Ohya, K., Ghosh, S. Selective inhibition of NF-kB blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nat. Med.* 10:

- 617-624.
20. Yang, H.M., Shin, H.K., Kang, Y.H., Kim, J.K. Cuscuta chinensis extract promotes osteoblast differentiation and mineralization in human osteoblast-like MG-63 cells. *J. Med. Food.* 12(1):85-92, 2009.
 21. Sambrook, P., Cooper, C. Osteoporosis. *Lancet.* 367: 2010-2018, 2006.
 22. Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P.J., Peschon, J.J., Schuh, J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 13: 2412-2424, 1999.
 23. Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J. Exp. Med.* 202: 1261-1269, 2005.
 24. Mansky, K.C., Sankar, U., Han, J., Ostrowski, M.C. Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J. Biol. Chem.* 277: 11077-11083, 2002.
 25. Ishida, N., Hayashi, K., Hoshijima, M., Ogawa, T., Koga, S., Miyatake, Y., Kumegawa, M., Kimura, T., Takeya, T. Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J. Biol. Chem.* 277: 41147-41156, 2002.
 26. Rajotte, D., Sadowski, H.B., Haman, A., Gopalbhai, K., Meloche, S., Liu, L., Krystal, G., Hoang, T. Contribution of both STAT and SRF/TCF to c-fos promoter activation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 88: 2906-2916, 1996.