

오미자 물 추출물이 파골세포 분화에 미치는 영향

리 연 · 이호섭¹ · 장성조² · 송정훈^{3,*}

원광대학교 의과대학 해부학교실, 1: 한의과대학 한방체액연구센터, 2: 신경외과학교실, 3: 성형외과학교실

Effect of Water Extract of *Schisandra Chinensis* on Osteoclast Differentiation

Yan Lee, Ho Sub Lee¹, Sung-Jo Jang², Jeong Hoon Song^{3,*}

Department of Anatomy, School of Medicine, 1: Hanbang Body-fluid Research Center, College of Oriental Medicine, 2: Department of Neurosurgery, School of Medicine, 3: Plastic & Reconstructive Surgery, School of Medicine, Wonkwang University

Bone maintains its homeostasis through balance between bone resorbing osteoclasts and bone forming osteoblasts. Thus, unusual balance between osteoclasts and osteoblasts leads to pathological bone diseases, such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, autoimmune arthritis, periodontitis. *Schisandra chinensis* well known traditional herbal has been used for treatment of diseases in China, Korea, Japan, and others. Recently, research studies have demonstrated that the lignans found in *Schisandra chinensis* stimulate osteoblasts and suggest that it may be helpful against osteoporosis. However, the inhibitory effect of water extract of *Schisandra chinensis* on osteoclast differentiation remains largely unknown. In this study, Water extract of *Schisandra chinensis* markedly suppressed RANKL-induced osteoclast differentiation in cultures of BMMs without cytotoxicity. The mRNA expression of c-Fos, NFATc1, and TRAP induced by RANKL was inhibited by water extract of *Schisandra chinensis*. It also suppressed c-Fos and NFATc1 protein expression. Taken together, these results suggest that water extract of *Schisandra chinensis* has the potential to serve as a treatment of bone disease such as osteoporosis.

Key words : *Schisandra Chinensis*, Osteoclast, bone

서 론

전 세계적으로 평균 생존 기간이 늘어나면서 삶의 질이 중요한 화두로 제기되고 있다. 특히 고령에서 삶의 질을 좌우하는 인자 중 대표적인 것이 심혈관계 질환 및 골다공증으로 인한 골절이다. 골다공증은 나이가 들면서 진행되는 양상을 보이며 척추와 대퇴골의 골다공증은 골절과 매우 연관이 깊다. 뼈는 지속적으로 흡수되고 새롭게 생성되는 재 조합 과정을 거치는 조직으로 골 흡수를 야기하는 파골세포와 골 생성 기능을 가진 조골세포 간의 균형이 중요하다¹⁾. 특히 파골세포의 기능이 비정상적으로 항진된 경우 골 파괴가 증가되어 골다공증이 야기되며 이런 현상은 류마티스 관절염 같은 염증성 질환의 골 소실과 밀접한 연관이 있다²⁾.

파골세포는 조혈모세포에서 유래되는 다형핵 세포이며 대식세포계의 세포이다. 파골세포로의 분화는 실제적인 골 흡수에 매우 중요한 과정이며 파골세포로의 분화를 매개하는 주된 신호 물질은 receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)이다³⁾. RANKL은 파골 전구세포의 표면에 발현된 RANK와 결합하여 파골세포 분화에 필수적인 역할을 하는 NF-κB, c-Fos, Nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1)과 같은 물질의 발현을 유도한다⁴⁾. c-Fos는 RANKL에 의해 유도되어 파골세포에 특이적인 유전물질인 Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)의 발현을 유도하는 중요한 NFATc1의 발현을 유도한다⁵⁾. 기존 골다공증 약물 천연물로서 골다공증을 치료하는 후보군들에 대한 관심이 증가하고 있는 상황에서 기존에 녹용이 파골세포 분화를 억제하여 골다공증의 치료 후보 천연물이 될 수 있다는 연구 결과가 보고되었다⁶⁾. 오미자는 전통적으로 천 년 전부터 잘 알려진, 우리나라에서 많이 사용되고 있는 천연물로서 목련과에 속한 낙엽 목질 등본으로 열매가 붉게 맺히며 주로 열매를 이용하여

* 교신저자 : 송정훈, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

· E-mail : jhsong71@wku.ac.kr, · Tel : 063-859-1582

· 접수 : 2010/09/14 · 수정 : 2010/09/30 · 채택 : 2010/10/11

사용한다. 오미자는 성질이 따뜻하고 독이 없으며 신맛, 쓴맛, 매운맛, 짠맛, 단맛 등 다섯 가지의 맛을 가지고 있다 하여 오미자라고 불린다. 예로부터 기침이나 호흡 곤란 등의 호흡기 증상과 만성 간질환, 저혈압, 중추 신경계의 흥분 억제 등에 효능이 있다 하여 차나 분말 등이 주로 사용되어 왔다. 또한 RAW 264.7 세포를 이용한 실험에서 오미자의 성분이 nitric oxide의 생성, prostaglandin E2, cyclooxygenase-2의 생성을 억제함으로써 nuclear factor-kB (NF-kB), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성을 억제하여 항염증 작용이 있다는 결과가 보고되었다⁷⁾. 이러한 결과는 류마티스 관절염이나 치주염과 같은 염증성 질환으로 인한 골 소실을 방지할 수 있는 가능성을 제시해준다^{8,9)}. Lignan은 오미자가 함유한 성분으로 주된 약물의 효과를 발휘하는 화합물로 알려져 있다^{10,11)}. 최근에 연구를 통해 오미자가 함유한 lignan이 조골세포를 활성화에 기여한다는 결과가 보고되어¹²⁾ 골다공증에 오미자의 역할이 중요할 것으로 추정되고 있는데 파골세포 분화에 대해서는 아직 연구된 바가 없는 실정이다. 이에 본 저자는 우리나라에서 흔하게 접할 수 있는 천연물인 오미자가 파골세포 분화에 미치는 영향을 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. Reagents and antibodies

본 연구에는 오미자를 물로 추출하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 파우더 형태로 얻은 것을 사용하였다. Human M-CSF와 RANKL은 Peprotech (London, UK)에서 구입했다. Actin 항체와 TRAP 용액은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입했다. Phospho (p)-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-P38, P38, I-κB에 대한 항체는 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)의 제품을 사용했다. XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서 구입했다. c-Fos와 NFATc1에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하여 사용하였다.

2. Osteoclast differentiation

5주령 ICR 생쥐의 넓적다리 뼈와 정강이 뼈를 분리하고 뼈속질 공간을 1cc 주사기로 수세하여 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포는 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 항생제, M-CSF (30 ng/ml)가 포함된 α-minimum essential medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) (α-MEM) 배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 세포를 대식세포 (bone marrow macrophage, BMM)로 사용하였고, 대식세포는 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (100 ng/ml)을 첨가하여 배양하고 오미자 물 추출물을 각각 농도 별로 처리하였다. 4일 후, 배양한 세포는 TRAP 용액 (Sigma Aldrich, USA)으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포는 파골 세포로 간주하였다.

3. Cytotoxicity assay

대식세포는 1×10^4 /well의 밀도로 96-well plate에 첨가하고 오미자 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. RT-PCR assay

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 transcriptase (Invitrogen)를 이용해 cDNA로 합성했다. 합성된 cDNA는 다음과 같은 primer를 이용하여 PCR 증폭을 했다.

c-Fos sense, 5'-CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3'

c-Fos antisense, 5'-CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3'

NFATc1sense, 5'-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3'

NFATc1 antisense, 5'-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3'

TRAP sense, 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3'

TRAP antisense, 5'-TCAGCACATAGCCACACCG-3'

GAPDH sense, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

GAPDH antisense, 5'-TCCACCACCCTGTGCTGTA-3'

PCR 후, 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에서 분리하고 Et-Br로 염색하여 U.V.상에서 관찰했다.

5. Western blot assay

오미자 물 추출물 (500 μg/ml)을 1시간 전 처리하거나 처리하지 않은 대식세포를 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 20분 동안 원심분리 하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질을 정량하고 30 μg의 단백질은 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 에서 전기 영동 한 후, PVDF 막 (Amersham Biosciences)으로 단백질을 옮겼다. 단백질이 옮겨진 PVDF 막은 비 특이 단백질을 붙는 것을 방지하기 위해 5% non-fat dry milk를 처리했다. 이후 적절한 1차 항체를 처리하고 TBS-T 완충용액으로 세척한 후 2차 항체를 처리했다. TBS-T 완충용액으로 세척한 PVDF 막은 enhanced chemiluminescence를 이용해 단백질 발현을 관찰했다.

6. Statistical analysis

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

결 과

1. 파골세포 분화에 미치는 오미자의 영향

골 흡수에 직접적인 영향을 미치는 세포가 파골세포이므로 파골세포의 분화는 골다공증 유발에 중요하게 작용한다. 저자는 파골세포의 분화에 오미자 물 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해서 대식세포에 파골세포 분화에 필수적인 M-CSF와 RANKL을 처리하고 오미자 물 추출물을 농도 별로 처리한 후 4일간 배양했다. M-CSF와 RANKL만을 처리한 대조군에서는 TRAP 양성 다핵 형 파골 세포가 많이 생성되었으나 오미자 물 추출물을 같이 처리한 실험군에서는 농도의 증가에 따라 TRAP 양성 파골 세포의 형성이 억제되었다(Fig. 1A). TRAP 활성화와 연관되어 있는 TRAP-positive 세포 수 역시 오미자 물 추출물에 의해 감소되었다(Fig. 1B). 이를 통해 오미자의 추출물에서 파골세포 분화를 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

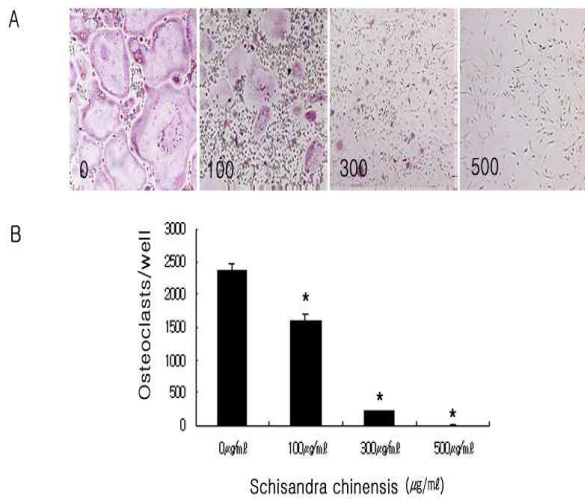


Fig. 1. Effect on osteoclast differentiation by water extract of *Schisandra chinensis*. (A) BMMs were cultured for 4 days with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (50 ng/ml) in the presence of water extract of *Schisandra chinensis*. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. TRAP-positive cells were photographed under a light microscope (Magnification: x100). (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. * p < 0.05 vs control.

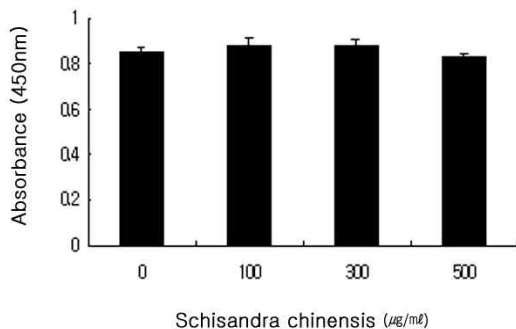


Fig. 2. Effect of water extract of *Schisandra chinensis* on cytotoxicity. BMMs were seeded into a 96 well plate and cultured for 3 days in the presence of M-CSF (30 ng/ml) with the indicated concentrations of water extract of *Schisandra chinensis*. After 3 days, the absorbance was measured at 450 nm using an ELISA reader.

2. 오미자 추출물의 세포 독성 시험

또한 오미자 물 추출물의 효과가 세포 독성에 연관되어 있

는지를 확인하기 위하여 XTT 실험을 수행하였으나 본 연구에서 사용한 오미자 물 추출물의 농도에서는 유의성은 없었다(Fig. 2). 이 결과로 오미자 물 추출물이 세포 독성 없이 파골세포의 분화를 억제한다고 할 수 있다.

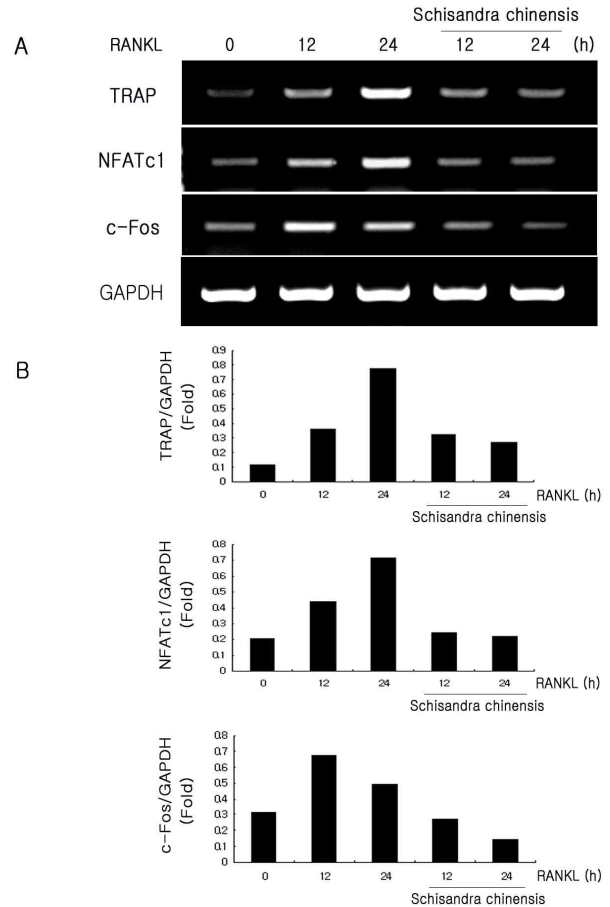


Fig. 3. Effect of water extract of *Schisandra chinensis* on gene expression that are associated with osteoclast differentiation. (A) BMMs were pretreated with or without water extract of *Schisandra chinensis* (500 µg/ml) for 1h and then treated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. Total RNA from the cells was obtained and the level of expression of the mRNA of the indicated genes was analyzed by RT-PCR. (B) Relative levels of the indicated genes were quantified by densitometric analysis and were normalized to GAPDH.

3. 오미자 추출물이 파골세포 분화와 연관된 유전자 발현에 미치는 영향

RANKL과 RANK의 결합은 파골세포 분화에 필수적인 유전자 발현을 가능하게 한다. 특히 파골세포 분화에 중요한 유전자인 c-Fos와 NFATc1, TRAP 같은 물질이 파골세포의 분화에 필수적이므로 c-Fos와 NFATc1, TRAP의 mRNA 발현을 살펴보았다. 또한 RANKL에 의한 c-Fos와 NFATc1 단백질의 발현에 오미자 물 추출물이 미치는 영향을 실험하였다. RANKL은 c-Fos, NFATc1, TRAP의 mRNA 발현을 촉진하였지만, 오미자 물 추출물을 처리한 실험군에서는 이들 유전자의 발현을 강력하게 억제하였다(Fig. 3). 또한 RANKL을 처리한 대조군은 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현이 증가되었지만 오미자 물 추출물을 같이

처리한 실험군의 c-Fos와 NFATc1 단백질의 발현은 대조군과 비교했을 때 억제되었다(Fig. 4). 그리고 이러한 오미자 추출물의 c-Fos와 NFATc1 단백질의 억제 효과는 오미자 추출물의 농도와 비례하였다(Fig. 5). 따라서 오미자 물 추출물에 의한 파골세포 분화 억제 효과는 c-Fos, NFATc1 발현 억제효과 때문일 것으로 생각된다.

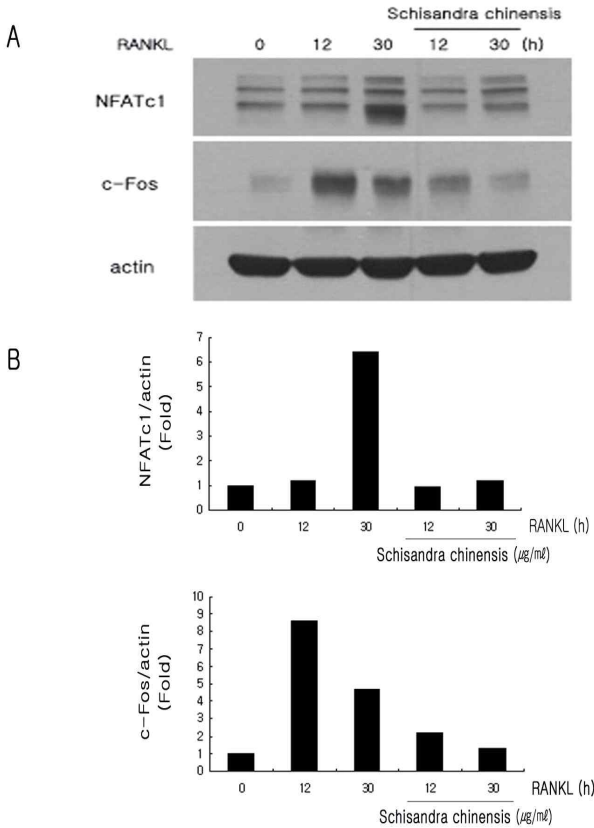


Fig. 4. Effect of water extract of Schisandra chinensis on the expression of c-Fos and NFATc1. (A) BMMs were pretreated with or without water extract of Schisandra chinensis (500 μg/ml) for 1h and then treated with (100 ng/ml) RANKL for the indicated time. The cells were lysed in lysis buffer, then resolved by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against c-Fos, NFATc1 and actin. (B) The intensity of protein band was analyzed by image Pro-plus program and was normalized to actin.

4. 파골세포 분화에 중요한 신호 전달 물질 활성화에 미치는 오미자 물 추출물의 효과.

파골세포 분화를 억제하는 오미자 물 추출물의 작용기전을 규명하기 위해 RANKL에 의한 MAPKs와 I-κB의 활성화에 미치는 오미자 물 추출물의 효과를 검증하였다. 대식세포를 오미자 물 추출물로 전처리 후 RANKL에 의한 MAPKs와 I-κB의 활성을 시간별로 확인했다. RANKL로 자극한 대조군과 비교했을 때, 오미자 물 추출물을 같이 처리한 군에서는 RANKL에 의한 p38, JNK, ERK의 인산화의 억제는 관찰 할 수 없었다. 또한 RANKL에 의해 유도되는 I-κB의 분해에도 영향이 없었다(Fig. 6). 이를 통해 오미자 추출물의 파골세포 분화 억제 효과는 p38, JNK, ERK의 신호전달경로 활성화와는 별다른 연관성이 없을 것으로 판단된다.

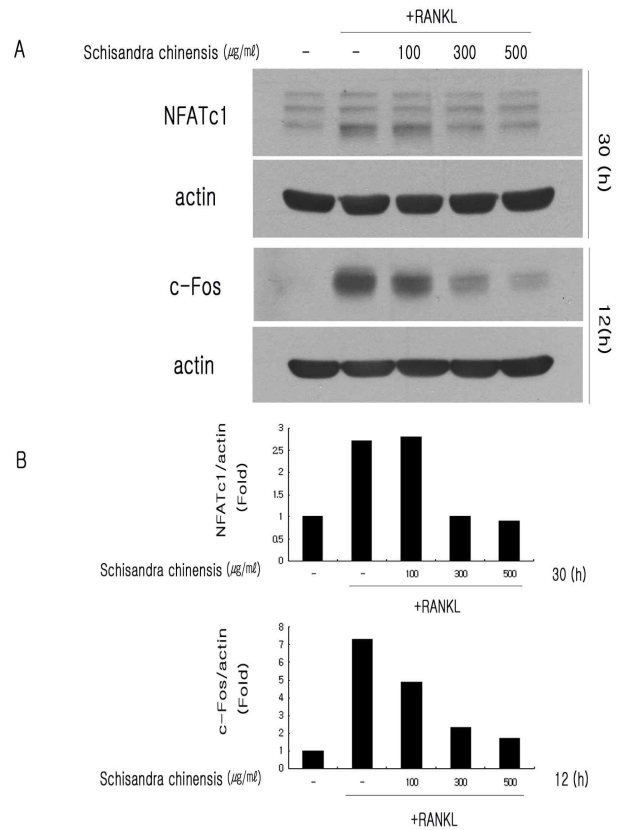


Fig. 5. Water extract of Schisandra chinensis suppresses expression of c-Fos and NFATc1 induced by RANKL. (A) BMMs were treated with increasing concentrations of water extract of Schisandra chinensis and RANKL (100 ng/ml), except control. NFATc1 was incubated for 30 h and c-Fos for 12 h. (B) The intensity of protein band was analyzed by image Pro-plus program and was normalized to actin.

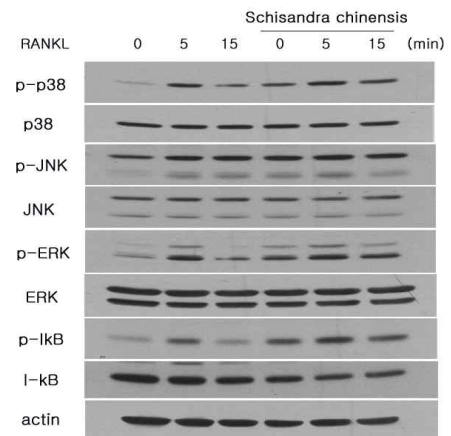


Fig. 6. Effect of water extract of Schisandra chinensis on phosphorylation of MAPK. BMMs were starved for 2 h, pretreated with water extract of Schisandra chinensis (500 μg/ml) for 1h, and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western blotting with antibody against p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-IκB, I-κB and actin.

고찰

임상적으로 골다공증을 치료하는 약물인 Bisphosphonate계

열의 약물은 주로 파골세포로의 분화를 억제하고 이미 성숙한 파골 세포의 기능을 억제하는 작용을 한다¹³⁾. 환자의 치료에 가장 많이 사용되는 약물임에도 불구하고 식도염이나 하악골의 무혈성 괴사로 인한 부작용 등이 있어 사용에 제한이 있다¹⁴⁾. 이로 인해 골다공증 치료에 효과 있는 천연물 발견의 필요성이 대두되고 있는데 이전 연구에 국내에서 여러 가지 용도로 사용되고 있는 오미자가 조골세포를 활성화 시킨다는 결과가 보고되고 있어¹¹⁾ 골다공증 치료에 응용될 수 있는 가능성을 발견하고 골 흡수를 일으키는 파골세포 분화에 미치는 영향을 연구하였다. 파골 세포의 분화를 억제하는 것은 병적인 골 소실을 억제하는 주된 전략이 될 수 있다. 오미자는 그 동안의 연구를 통해서 간염이나 만성 간질환에 효과가 있고¹⁵⁾, 항 증식 효과를 통한 항암 효과가 있다고도 보고되었다¹⁶⁾. 증식하는 세포에 작용하지만 정상적인 세포에는 어떠한 부작용도 보고되지 않아 안전한 천연물로 알려져 있는데 본 실험에 사용된 용량의 오미자에서는 XTT결과에서 세포 독성은 확인되지 않았다. 파골세포 분화 및 활성화에 RANKL과 RANK의 결합이 필수적이며¹⁷⁾, 이를 통해 c-Fos와 NFATc1의 발현이 증가하게 되는 경로가 파골 세포로의 분화에 주된 기전이다^{18,19)}. c-Fos는 AP-1 이합체의 주요한 인자로 RANKL에 의해 발현이 증가되며 c-Fos와 knock-out 생쥐의 세포는 파골세포의 형성이 억제된다고 보고되어 c-Fos의 발현의 중요성을 증명해 주고 있다²⁰⁾. 본 실험을 통하여 오미자 추출물이 세포 독성이 없는 용량에서 파골세포로의 분화를 현저하게 억제하는 결과를 확인하였고, 또한 이러한 파골세포 분화 억제 효과는 주된 경로인 c-Fos와 NFATc1 의 발현 억제를 통해 이루어짐을 확인하였다. NFATc1은 c-Fos와 Ca²⁺/calmodulin activated kinases (CaMKs) 신호전달 체계에 의해 활성화 되지만 RANKL의 자극이 없어도 NFATc1을 과도하게 발현시킨 전구세포는 TRAP 양성 세포로 분화 되어 파골세포 분화에 NFATc1이 핵심 물질임이 증명되었다²¹⁾. 오미자 추출물이 파골세포 분화에 필수적인 c-Fos와 NFATc1 발현을 억제하는 결과는 오미자 추출물이 파골세포 분화 억제 작용에 부가적인 효과를 나타내는 것이 아니라 주요 경로를 억제함으로써 치료 물질로서의 가능성이 높다고 할 수 있겠다. RANKL과 RANK가 결합한 후 TNF receptor associated factor (TRAF) 6와 같은 TRAF family 단백질 등의 집합을 유도하고 NF- κ B, Akt와 JNK and p38 등을 포함한 MAPK 경로를 활성화 시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다²²⁾. 특히 p38 인산화는 파골세포 분화 초기에 매우 중요하게 작용하며 MITF의 활성을 촉진하여 TRAP의 발현을 유도한다고 보고되었고²³⁾ p38 MAPK 억제제인 SB203580이 RANKL에 의한 파골 세포 형성과 TRAP 발현을 억제한다는 연구 결과가 보고되어²⁴⁾ p38 활성화가 파골세포 분화에 중요한 중간 단계임이 알려져 있다. p38 이외에 JNK 등도 파골세포의 분화와 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다²⁵⁾. 본 연구 결과를 살펴보면 p38, JNK, ERK 등의 MAPK 경로에 오미자 추출물이 영향을 미치지 않았다. 오미자 추출물이 c-Fos와 NFATc1의 현저한 발현 억제 작용을 하면서 MAPK 경로에 영향을 주지 않았다는 결과는 일반적으로 알려져 있지 않은 사실이다. 이 점에서 오미자의 파골

세포 분화에 미치는 영향이 RANKL과 RANK의 결합 이후 중요 전사인자인 c-Fos와 NFATc1를 MAPK 경로와 무관하게 나타나는 근거로 오미자 추출물의 파골세포 분화 억제 작용에 대한 중요한 다른 기전이 있을 가능성이 있을 것으로 추정되며 좀 더 심도 깊은 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

국내에서 여러 가지 효능을 위해 사용되어 왔던 오미자를 가지고 실험한 결과 파골세포 분화의 중요 경로인 c-Fos와 NFATc1의 발현을 억제함을 밝혀내었고 이로 인해 염증성 골 소실이나 폐경 이후 골다공증의 예방과 치료에 도움이 될 것으로 판단된다. 특히 화학적인 물질이 아닌 천연물로서 효과적인 골다공증 치료에 효과적이라면 향후 지속적인 연구와 임상적인 적용이 필요할 것으로 여겨진다. 또한 이전에 보고된 조골세포 활성화 기능과 본 저자의 파골세포 분화 억제 작용은 골다공증의 치료에 상호 보완적 효과가 있어 기존에 알려진 어떤 후보 물질보다 가능성이 있는 물질이라 하겠다.

감사의 글

이 논문은 2008학년도 원광대학교 교비지원에 의해서 수행되었습니다.

참고문헌

- Rodan, G.A., Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289(5484):1508-1541, 2000.
- Delmas, P.D. The use of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 17(4):462-466, 2005.
- Roodman, G.D. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 100-109, 2006.
- Teitelbaum, S.L., Ross, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4(8):638-649, 2003.
- Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7(4):292-304, 2007.
- Kwak, H.B., Kim, J.H., Kim, D.J., Kwon, Y.M., Oh, J.M., Kim, Y.K. Effect of water extract of deer antler in osteoclast differentiation. *Korean J Oriental Physiology & pathology* 22: 891-895, 2008.
- Guo, L.Y., Hung, T.M., Bae, K.H., Shin, E.M., Zhou, H.Y., Hong, Y.N., Kang, S.S., Kim, H.P., Kim, Y.S. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *Eur J Pharmacol* 591(1-3):293-299, 2008.
- Wagner, E.F., Karsenty, G. Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet* 11: 527-532, 2001.

9. Wagner, E.F., Karsenty, G. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Cell* 4: 389-406, 2002.
10. Hancke, J.L., Brugos, R.A., Ahumada, F. *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Fitoterapia* 70: 451-471, 1999.
11. Wagner, H., Bauer, R. Chinese drug monographs and analysis: *Fructus Schisandrae*. *Wuweizi* 1: 1-8, 1996.
12. Caichompoo, W., Zhang, Q.Y., Hou, T.T., Gao, H.J., Qin, L.P., Zhou, X.J. Optimization of extraction and purification of active fractions from *Schisandra chinensis* (Turcz.) and its osteoblastic proliferation stimulating activity. *Phytother Res* 23(2):289-292, 2009.
13. Nishikawa, M., Akatsu, T., Katayama, Y., Yasutomo, Y., Kado, S., Kugal, N., Yamamoto, M., Nagata, N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone* 18: 9-14, 1996.
14. Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D.W., Ebeling, P.R., Felsenberg, D., Gagel, R.F., Gilsanz, V., Guise, T., Koka, S., McCauley, L.K., McGowan, J., McKee, M.D., Mohla, S., Pendry, D.G., Raisz, L.G., Ruggiero, S.L., Shafer, D.M., Shum, L., Silverman, S.L., Van Poznak, C.H., Watts, N., Woo, S.B., Shane, E. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 22: 1479-1491, 2007.
15. Stacchiotti, A., Li Volti, G., Lavazza, A., Rezzani, R., Rodella, L.F. Schisandrin B stimulates a cytoprotective response in rat liver exposed to mercuric chloride. *Food Chem Toxicol* 47(11):2834-2840, 2009.
16. Min, H.Y., Park, E.J., Hong, J.Y., Kang, Y.J., Kim, S.J., Chung, H.J., Woo, E.R., Hung, T.M., Youn, U.J., Kim, Y.S., Kang, S.S., Bae, K., Lee, S.K. Antiproliferative effects of dibenzocyclooctadiene lignans isolated from *Schisandra chinensis* in human cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 18(2):523-526, 2008.
17. Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342, 2003.
18. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7(4):292-304, 2007.
19. 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.
20. Fleischmann, A., Hafezi, F., Elliott, C., Reme, C.E., Ruther, U., Wagner, E.F. Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice. *Genes Dev* 14: 2695-2700, 2000.
21. 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.
22. 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: 20551-20555, 1998.
23. Wong, B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Vologodskaya, M., Steinman, R.M., Choi, Y. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 273: 28355-28359, 1998.
24. 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.
25. Partington, G.A., Fuller, K., Chambers, T.J., Pondel, M. Mitf-PU. 1 interactions with the tartrate-resistant acid phosphatase gene promoter during osteoclast differentiation. *Bone* 34: 237-245, 2004.