

白何首烏 물 추출물의 파골세포 분화에 미치는 영향

안용환 · 오재민 · 이명수¹ · 정종혁¹ · 채수욱² · 문서영³ · 전병훈⁴ · 최민규*

원광대학교 의과대학 해부학교실, 골격계질환연구소 및 환경과학연구소, 1: 류마티스내과학교실 및 원광의과학연구소,
2: 군산병원 정형외과, 3: 산본병원 마취통증의학과, 4: 한의과대학 병리학교실 및 한국전통의학연구소

Effect of Water Extract of *Cynanchi Wilfordii Radix* in RANKL-induced Osteoclast Differentiation

Yong Hwan Ahn, Jaemin Oh, Myeung Su Lee¹, Jong Hyuk Jung¹, Soo Uk Chae², Seo Young Moon³,
Byung Hoon Jeon⁴, Min-Kyu Choi*

Department of Anatomy, Institute for Skeletal Disease & Institute for Environmental Science,

1: Department of Internal Medicine, Division of Rheumatology & Institute of Wonkwang Medical Science, College of Medicine,

2: Department of Orthopedic Surgery, Gunsan Medical Center; 3: Division of Anesthesiology and Pain Medicine, Sanbon Medical Center;

4: Department of Pathology & Research Center of Traditional Korean Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Osteoporotic fracture became a serious social problem, which related with mortality and morbidity in old age population. Osteoclast which is responsible for bone resorption is originated from hematopoietic cell line and plays a key role osteoporotic bone loss. *Cynanchum wilfordii* (Asclepiadaceae) roots have been used in Korean folk medicine for the treatment of diabetes mellitus and aging progression. Also, recent studies have shown that the extract and fractions of *Cynanchi Wilfordii Radix* have various pharmacological actions including scavenging free radicals, enhancing immunity, reducing high serum cholesterol, and anti-tumor activity. However, the effect of extract of *Cynanchi Wilfordii Radix* in osteoclast differentiation had not been reported. Thus, we evaluated the effect of *Cynanchi Wilfordii Radix* on receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation. Through our study, we found that *Cynanchi Wilfordii Radix* significantly inhibited osteoclast differentiation induced by RANKL. *Cynanchi Wilfordii Radix* suppressed the activation of p38 pathway and NF κ B in bone marrow macrophages (BMMs) treated with RANKL. Also, *Cynanchi Wilfordii Radix* significantly inhibited the mRNA expression of c-Fos, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), osteoclast-associated receptor (OSCAR), nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 and cathepsin K in BMMs treated with RANKL. Particularly, *Cynanchi Wilfordii Radix* inhibited the protein expression of c-fos and NFATc1. Taken together, our results demonstrated that *Cynanchi Wilfordii Radix* may be useful treatment option of bone-related disease such as osteoporosis leads to fracture of bone and rheumatoid arthritis.

Key words : *Cynanchi Wilfordii Radix*, Osteoporosis, Osteoclast, RANKL

서 론

뼈는 인체의 골격을 유지하는 중요한 구조물이며 파골세포에 의한 파괴와 조골 세포에 의한 생성이 균형을 이루는 역동적인 기관이다. 특히 파골세포의 골 흡수 기능이 비정상적으로 증가할 경우 골다공증과 같은 질환이 발생하게 된다. 골다공증은

크게 여성에서 폐경과 연관된 폐경 후 골다공증과 나이가 들어가면서 발생하는 노인성 골다공증으로 나뉜다. 폐경기 골다공증의 주된 원인은 에스트로겐의 결핍에 의한 것인데¹⁾ 50세 이상의 폐경 후 여성에서 20% 가량이 골다공증이 발생하는 것으로 알려져 있다²⁾. 골다공증의 가장 중요한 합병증은 골절인데 노인의 경우 근육의 힘이 떨어지고 균형 감각이 약해져서 넘어지기 쉬운데 심한 골다공증이 동반된 환자는 척추나 고관절의 골절이 발생하기 쉽다. 최근에 국내에서 발표된 연구에 의하면 50세 이상의 연령에서 골다공증과 연관된 골절의 위험성이 남자에서 보다

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

· E-mail : hily1008@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6761

· 접수 : 2012/02/06 · 수정 : 2012/02/24 · 채택 : 2012/03/19

여자에서 3배가량 높고 향후 골다공증성 골절이 발생할 확률도 여성에서 59.5%, 남성에서 23.8% 로 조사되어 골다공증성 골절이 흔하게 발생하며, 여성에게서 더욱 위험이 증가하는 것으로 나타났다³⁾. 골다공증을 치료하기 위해 임상에서 흔하게 사용되는 약제는 비스포스포네이트 계열의 약물인데 파골세포의 기능을 억제하고 파골세포 분화를 억제하는 기능을 가진다⁴⁾. 비스포스포네이트 계열의 약물은 일반적인 부작용인 식도염 이외에 하악골의 괴사가 발생하여 주의가 요구되는데 이러한 심한 합병증은 약물을 고용량으로 복용하고 있던 환자, 전이성 암이 동반된 경우, 치과적인 시술을 받은 환자에서 주로 발생하는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 이뿐만이 아니라 5년 이상 장기간의 사용 시 오히려 뼈의 신축성을 떨어뜨려 골절의 위험을 증가시킨다는 연구가 발표되고 있다⁶⁾. 이러한 부작용 때문에 파골세포의 기능을 억제하면서도 안전하게 사용될 수 있는 약제 개발의 필요성이 대두되고 있다. 국내에서 천연물이나 그 추출물을 가지고 파골세포 분화 억제 실험을 통해 가능성이 제시된 여러 가지 물질이 있는데, 두충이나⁷⁾ 복분자 추출물⁸⁾에서 파골세포 분화를 억제하는 효과가 있음이 보고 되었다. 하수오(何首烏)는 적색과 백색 두 종류가 있는데 그 중 백색의 何首烏를 白何首烏라 하는데 우리나라, 중국, 일본에서 주로 관찰되며 햇빛이 잘 들고 토심이 깊고 물빠짐이 좋은 곳에서 잘 자란다. 맛은 쓴맛이 나고 주로 뿌리가 약용으로 많이 사용된다. 동의보감에는 何首烏가 염증을 삭이고 가래와 담을 없애고 종기, 치질, 만성피로로 몸이 마르는 것, 부인의 산후병, 대하 등을 치료하고 기(氣)와 혈(血)을 도우며 근골을 튼튼하게 하고 골수를 충실하게 하고 머리카락을 까맣게 할뿐 아니라 오래 먹으면 늙지 않는다고 기술되어 있다. 최근 연구에서는 白何首烏가 항산화 작용 및 면역 개선작용⁹⁾, 지질개선 작용이 있다고 보고되었다¹⁰⁾. 또한 혈관 신생과 항암 작용을 가지는 연구 경과도 보고되었다¹¹⁾. 민간에서 술을 담그거나 한약제로 오래 전부터 사용되어 왔던 白何首烏가 많은 효능을 가지고 있음이 알려져 있으나 아직 뼈에 대한 효과는 보고된바가 없다. 항산화 작용이 있는 물질들은 파골세포 분화를 억제하는 기능을 가질 수 있어 白何首烏의 본래 알려진 기능 이외 새로운 효능을 연구하기로 하였다.

이에 저자는 천연물 중에서 파골세포 분화 억제를 통한 골다공증의 치료와 예방에 효과가 있는 물질을 개발하기 위해 白何首烏의 추출물을 가지고 파골세포 분화의 과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 본 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

1. 시료

Human RANKL과 M-CSF는 Peprotech (London, UK)사에서 구입하였고, 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. c-Fos와 NFATc1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다.

白何首烏는 물로 추출하여 감압 농축한 후 72시간 동안 동결 건조하여 얻었다.

2. 파골세포 분화

5주령 ICR 생쥐를 경추 탈골법으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 분리하고 1ml 주사기를 이용하여 뼈의 속질을 수세하여 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포는 10% FBS, 항생제, M-CSF (30 ng/ml)가 포함된 α-minimum essential medium (α-MEM)배지 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 에서 3일간 배양하였다. 3일 후, plate에 부착된 세포를 대식세포 (bone marrow macrophage, BMM)로 사용하여 실험하였다. 대식세포는 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (50 ng/ml)을 처리하여 배양하면서 白何首烏 추출물을 대식세포에 농도별로 처리하였다. 배양 4일 후, 배양한 세포를 TRAP 용액 (Sigma Aldrich, USA)으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포를 성숙된 파골세포로 간주하고 숫자를 세었다.

3. 독성검사

대식세포는 1X10⁴/well의 밀도로 96-well plate에 첨가하고 M-CSF (30 ng/ml)와 白何首烏 추출물을 농도별로 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 분석

각각의 세포에서 TRIzol (Invitrogen) 용액으로 제조사의 방법에 따라 RNA를 분리한 후 분리한 RNA 1 μg은 oligo dT primer, dNTP, buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor와 Superscript II reverse transcriptase를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 다음과 같은 primer를 이용하여 PCR 증폭을 시행 하였다.

c-Fos sense, 5'- CTGGTGCAGCCACTCTGGTC-3';

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

NFATc1 sense, 5'- CAACGCCCTGACCACCGATAG-3';

NFATc1 antisense, 5'- GGCTGCCTCCGTCTCATAGT-3';

TRAP sense, 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3';

TRAP antisense, 5'-TCAGCACATAGCCCACACCG-3';

OSCAR sense,

5'-CTGCTGGTAACGGATCAGCTCCCCAGA-3';

OSCAR antisense,

5'-CCAAGGAGCCAGAACCTTCGAAACT-3';

Cathepsin K sense, 5'-CACTGCTCTCTCAGGGCTT3';

Cathepsin K antisense,

5'- ACGGAGGCATTGACTCTGAA-3';

5'-GAPDH sense, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';

GAPDH antisense, 5'-TCCACCACCCTGTGTGCTGTA-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, 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-polyacrilamide gel에서 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF 막 (Amersham Biosciences)으로 옮기고 PVDF 막은 5% non-fat dry milk를 처리하여 비 특이 단백질이 붙는 것을 방지하기 하였다. 그리고 1차 항체 및 2차 항체를 처리했다. TBS-T 완충용액으로 PVDF막을 세척하여 enhanced chemiluminescence를 이용해 단백질 발현을 관찰했다.

6. 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. 파골세포 분화에 미치는 白何首烏 추출물의 효과

파골세포 분화는 골 흡수 작용을 위해 필수적인 단계이며 분화를 억제하는 효과를 확인하는 것은 매우 중요하다. 본 저자는 白何首烏 추출물이 파골세포의 분화에 미치는 영향을 알아보고자 실험을 시행하였다. 白何首烏의 효과를 검증하기 위해 대식세포에 M-CSF와 RANKL을 첨가하여 파골세포로의 분화 조건을 만들고 白何首烏 물 추출물을 처리하거나 처리하지 않은 군을 비교하였다. 白何首烏 추출물을 처리하지 않은 군에서는 파골세포로 분화가 관찰 되었지만 白何首烏 추출물을 처리한 실험군은 白何首烏 추출물 농도가 증가함에 따라 TRAP 양성 다핵성 파골세포로의 분화가 억제되었다(Fig. 1A and 1B). 白何首烏 추출물에 의한 TRAP 양성 파골세포 분화의 억제가 세포독성과 관련 있는지 규명하기 위해 XTT 검사를 실시하였다. 다핵성 파골세포로의 분화를 억제하는 농도의 白何首烏 추출물은 세포의 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1C).

2. RANKL에 의한 유전자 발현에 白何首烏 추출물의 효과

RANKL은 RANK와 결합한 후 세포내 신호 전달 체계를 거쳐 전사인자 c-Fos 와 NFATc1의 발현을 촉진하고 이의 결과로 성숙한 파골세포의 지표인 TRAP과 OSCAR, Cathepsin K의 유전자 발현을 유도 한다. 본 저자는 RANKL에 의해 유도되는 여러 가지 유전자 발현에 白何首烏 추출물이 미치는 효과를 실험하였다. RANKL로 파골세포 분화를 자극한 파골세포에서 c-Fos, NFATc1 등의 주요 전사 인자의 발현이 증가하였고, 또한 TRAP, OSCAR, Cathepsin K의 발현도 증가하였으나, RANKL과 白何首烏 추출물을 동시에 처리한 실험군에서는 파골세포 분화에 중

요한 주요 유전자들의 발현이 억제 되었다(Fig. 2).

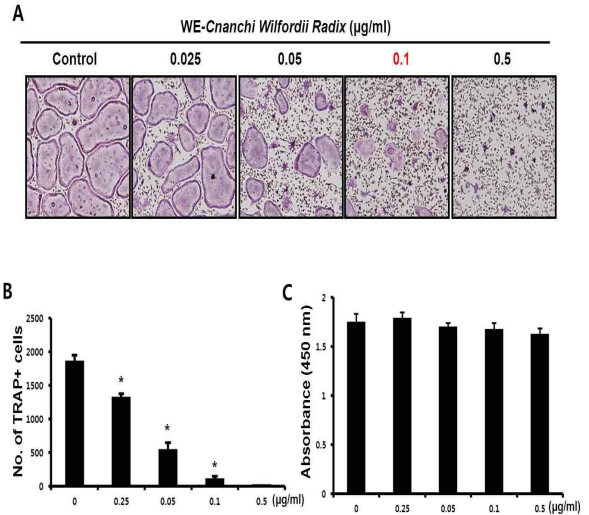


Fig. 1. Inhibition of RANKL-induced osteoclast differentiation by water extract (WE)-Cynanchi Wilfordii Radix. (A) Bone marrow macrophages (BMMs) were cultured for 4 d with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) in the presence of WE-Cynanchi Wilfordii Radix. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized 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-Cynanchi Wilfordii Radix. After 3 d, 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.

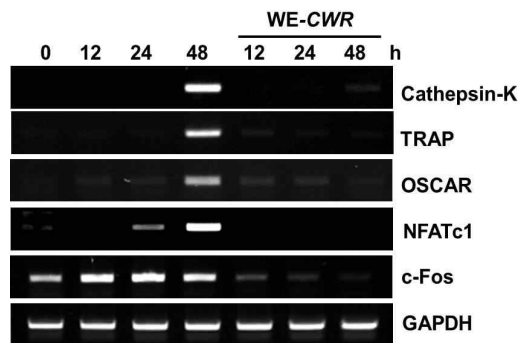


Fig. 2. WE-Cynanchi Wilfordii Radix inhibits RANKL-induced NFATc1 expression. BMMs were pretreated with WE-Cynanchi Wilfordii Radix for 1 h and then stimulated with RANKL for the indicated times. Total RNA of NFATc1, c-fos, OSCAR, TRAP and Cathepsin K were obtained at the indicated time points. The mRNA expression levels of the indicated genes were analyzed by RT-PCR.

3. c-Fos와 NFATc1 단백질 발현에 미치는 白何首烏 추출물의 효과

RANKL에 의해 발현되는 c-Fos는 NFATc1의 발현을 유도 한다. 이들의 단백질 발현은 실제 파골세포 분화에서 중요 기전의 작용을 의미한다. 따라서 본 저자는 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현에 白何首烏 추출물의 효과를 검증하기 위하여 western blotting을 시행하였다. RANKL을 처리한 후 12시간과 24시간에서 c-Fos의 단백질 발현이 유의하게 증가되었으며, NFATc1의 발현은 48시간에 증가되었다. 그러나 白何首烏 추출물을 처리한 실험

군에서는 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현이 현저히 억제 되었다 (Fig. 3).

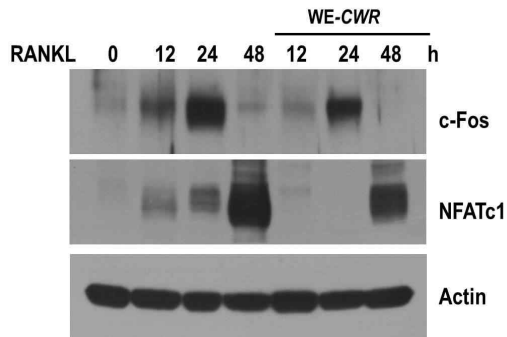


Fig. 3. Inhibition of RANKL-induced c-Fos and NFATc1 expression by WE-Cynanchi Wilfordii Radix. BMMs were pretreated with or without WE-Cynanchi Wilfordii Radix (1µg/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies for c-Fos, NFATc1, and actin.

4. 파골세포 분화의 신호전달 경로에 미치는 白何首烏 추출물의 효과

저자는 白何首烏 추출물에 의한 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위해 RANKL에 의해 전달되는 주요 신호전달체계에 白何首烏 추출물이 미치는 영향을 실험하였다. 대식세포를 白何首烏 추출물로 전 처리 하고 RANKL을 시간별로 처리한 다음 MAPKs의 인산화를 측정하였다. RANKL에 의해 자극된 파골세포에서 p38, JNK, ERK의 증가가 관찰되었으나 白何首烏 추출물 군에서 p38의 발현이 감소하였고 I-κB의 발현이 지속되었다(Fig. 4). 이러한 결과로 白何首烏 추출물에 의한 파골세포 억제 작용기전은 p38 활성의 억제와 I-κB의 지속 발현에 의한 것으로 생각된다.

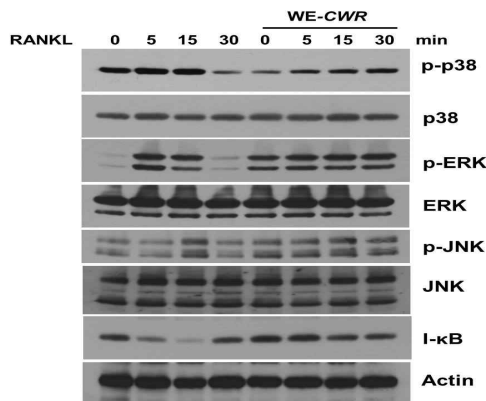


Fig. 4. Effect of WE-Cynanchi Wilfordii Radix inhibits the activation of p38 pathway and NF-κB. BMMs were pretreated with or without WE-Cynanchi Wilfordii Radix (1µg/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

고찰

골다공증은 사회적으로 고비용이 요구되는 질환으로서 척추

등의 골절이 발생하면 일정 기간 내에 또 다른 척추 부위 골절이 발생할 확률이 매우 높아 적극적인 예방과 치료가 중요하다. 더욱이 류마티스 관절염과 같은 만성 염증 질환이 있거나 당뇨, 만성 심장 질환, 갑상선 질환이 동반된 환자에서는¹²⁾ 조기 진단 및 치료가 필요한데 최근 생약이나 천연물과 같은 물질의 섭취를 통해 뼈를 튼튼히 하고자 하는 시도들이 늘어나고 있다. 본 실험에서 사용되었던 白何首烏는 고전적으로 흰 머리를 검게 한다고 알려져 있고 심혈관계 보호 작용이 있음이 알려져 있다¹¹⁾.

白何首烏는 이중탕으로 처방되기도 하였는데 白何首烏이중탕은 동의수세보원(東醫壽世保元)에 처음 등장하는 처방이며 본래는 소음인의 太陰病과 少陰病에 사용되며¹³⁾ 인삼이 없을 때 대신 처방되는 처방이기도 하였다. 白何首烏에는 많은 성분을 함유되어 있는데, 화학 구조가 알려진 것은 β-sitosterol, wilfoside C1N, wilfoside C3N, wilfoside K1N, methyleugenol, wilfoside C1G, cynanulcoside A, daucosterol, 2,4-dihydroxyacetophenone, cynandione A, 2,5-dihydroxyacetophenone, acetovanillone, p-hydroxyacetophenone, sucrose, conduritol F, geniposide, succinic acid, 3-(β-D-ribofuranosyl)-2,3-dihydro-6H-1,3-oxazine-2,6-dione, bungeiside A, cynanoneside B 등 대략 20가지 정도이다¹⁴⁾. 이 중 白何首烏에서 추출된 cynandione A이 독성 약물에 의해 유도되는 간세포 손상을 줄이고¹⁵⁾, H₂O₂에 의해 유도되는 신경 세포 손상을 줄여준다는 연구가 보고 되었다¹⁶⁾. 또한 白何首烏가 함유한 성분 중 Wilfoside K1N가 혈관 신생을 억제하고 항암 효과가 있다는 결과가 보고되었다¹¹⁾.

파골세포는 조혈모세포에서 기원하여 단핵구/대식세포의 과정을 거쳐 세포끼리 서로 융합하여 골 흡수 기능을 수행하는 성숙한 파골세포로 분화되며, 골 흡수를 억제하기 위해 성숙한 파골세포로의 분화를 억제하는 것이 골다공증 치료에 중요한 기전이 될 수 있다. 성숙한 파골세포로의 분화를 위해서는 세포 표면의 receptor activator of nuclear factor-κB (RANK)가 세포외의 receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)과 결합하는 과정이 필수적이다¹⁷⁾. 이 결합을 통해 분화의 중요한 유전자인 c-fos, nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1의 발현이 증가하게 되는데 본 실험을 통해 白何首烏의 물 추출물이 RANKL에 의해 진행되는 분화과정에서 핵심 유전자인 c-fos, NFATc1의 발현을 억제함을 확인 하였다. 이는 白何首烏 물 추출물이 파골세포 분화의 핵심 기전을 억제함을 의미한다. 특히 NFATc1의 발현은 매우 중요한데 NFATc1이 결핍된 배아줄기 세포는 파골세포로 분화가 되지 않는다¹⁸⁾. RANK와 RANKL과의 결합으로 RANK의 세포표질 부위로 TRAF 계열 단백질 결합이 촉진되고 RANKL의 신호가 전달되어 mitogen-activated protein kinase(MAPKs)인 JNK, p38, ERK와 같은 신호전달 단백질의 활성화를 통하여 파골세포 분화에 필수적인 NF-κB, NFATc1, AP-1과 같은 전사인자를 유도 한다¹⁹⁾.

본 실험을 통해 白何首烏의 물 추출물이 p38의 발현을 감소시키고, I-κB의 발현이 지속시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. I-κB의 지속 발현은 NF-κB의 작용 억제를 의미하는데 NF-κB 발현이나 활성을 억제하면 파골세포로의 분화가 억제 된다는 것이

보고되어 있다²⁰⁾. 白何首烏 물 추출물은 cathepsin K, TRAP과 OSCAR등의 발현에도 억제 효과를 가져 분화 뿐만이 아니라 성숙세포에서 발현되는 유전자의 발현에도 영향을 미치는 것이 확인 되었다. 白何首烏 물 추출물을 이용한 실험을 통해 파골세포 분화에 억제 효과가 있음을 알게 되었고 이러한 억제 효과는 p38과 NF-κB의 활성 억제를 통해 파골세포 분화에 핵심적인 c-fos, NFATc1의 발현을 억제하기 때문인 것으로 나타났다. 향후 白何首烏를 이용한 동물 실험이나 화학적인 성분 분석을 통한 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 이를 통해 그동안 여러 효능에 전통적인 약제로 사용되어 왔던 白何首烏가 또 다른 효능을 가짐을 밝혀내고, 부작용이 없이 뼈를 강화 시킬 수 있는 한약제로서의 가능성을 제시하여 기존 부작용이 많은 약물을 대체 할 수 있는 후보 물질로서의 가능성을 제시 할 수 있다고 생각된다.

결 론

본 연구진은 白何首烏 추출물을 이용한 실험을 통해 白何首烏가 p38과 NF-κB의 활성 억제하여 파골세포 분화에 핵심적인 유전자인 c-fos, NFATc1의 발현을 조절함으로써 파골세포 분화를 억제하는 기능을 가지고 있음을 밝혀내었다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Cummings, S.R., Browner, W.S., Bauer, D., Stone, K., Ensrud, K., Jamal, S., Ettinger, B: Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. N Engl J Med 339: 733-738, 1998.
- Looker, A., Johnston, C., Wahner, H., Dunn, W., Calvo, M., Harris, T., Heyse, S., Lindsay, R.J. Prevalence of low femoral bone density in older U.S. women from NHANES III. Bone Miner. Res. 10: 796-802, 1995.
- Park, C., Ha, Y.C., Jang, S., Jang, S., Yoon, H.K., Lee, Y.K. The incidence and residual lifetime risk of osteoporosis-related fractures in Korea. J Bone Miner Metab. Nov 29(6):744-751, 2011.
- 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.
- Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., et al. 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
- Park-Wyllie, L.Y., Mamdan, M.M., Juurlink, D.N., Hawker, G.A., Gunraj, N., Austin, P.C., Whelan, D.B., Weiler, P.J., Laupacis, A. Bisphosphonate use and the risk of subtrochanteric or femoral shaft fractures in older women. JAMA. Feb 23; 305(8):783-789, 2011.
- 정연태, 최윤희, 송정훈, 이창훈, 오재민: 두충의 물 추출물이 파골세포의 분화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 23(3):613-618, 2009.
- 오재민, 이명수, 김정중, 이정휴, 채수욱, 김하영, 전병훈, 박기인, 문서영, 조해중: 파골세포 분화에 미치는 복분자 물 추출물의 효과. 동의생리병리학회지 25(4):669-674, 2011.
- 한기선, 신길조, 이원철, 이종형. 白何首烏 항산화활성과 amino acid의 분포에 관한 실험적 연구. 대한 한방 내과학회지 19(2):411-430, 1998.
- Shan, L., Liu, R.H., Shen, Y.H., Zhang, W.D., Zhang, C., Wu, D.Z., Min, L., Su, J., Xu, X.K. Gastroprotective effect of a traditional Chinese herbal drug "Baishouwu" on experimental gastric lesions in rats. J. Ethnopharmacol. 107: 389-394, 2006.
- Kim, M.S., Baek, J.H., Park, J.A., Hwang, B.Y., Kim, S.E., Lee, J.J., Kim, K.W. Wilfosiide K1N isolated from *Cynanchum wilfordii* inhibits angiogenesis and tumor cell invasion. Int J Oncol. Jun;26(6):1533-1539, 2005.
- Korczywska, I., Olewicz-Gawlik, A. Does low-dose and short-term glucocorticoids treatment increase the risk of osteoporosis in rheumatoid arthritis female patients? Clin Rheumatol. May;27(5):565-572, 2008.
- 유주열. 동의사상의학강좌. 서울, 대성문화사, p 414, 1999.
- Jiang, Y., Choi, H.G., Li, Y., Park, Y.M., Lee, J.H., Kim, D.H., Lee, J.H., Son, J.K., Na, M., Lee, S.H. Chemical constituents of *Cynanchum wilfordii* and the chemotaxonomy of two species of the family Asclepiadaceae, *C. wilfordii* and *C. auriculatum*. Arch Pharm Res. Dec;34(12):2021-2027, 2011.
- Lee, M.K., Yeo, H., Kim, J., Kim, Y.C. Protection of rat hepatocytes exposed to CCl4 in-vitro by cynandione A, a biacetophenone from *Cynanchum wilfordii*. J Pharm Pharmacol. Mar;52(3):341-345, 2000.
- Lee, M.K., Yeo, H., Kim, J., Markelonis, G.J., Oh, T.H., Kim, Y.C. Cynandione A from *Cynanchum wilfordii* protects cultured cortical neurons from toxicity induced by H₂O₂, L-glutamate, and kainate. J Neurosci Res. Jan 15;59(2):259-264, 2000.
- 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 & Development* 13: 2412-2424, 1999.
18. 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. *Developmental Cell* 3: 889-901, 2002.
19. 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- κ B, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 273: 34120-34127, 1998.
20. Shimizu, H., Nakagami, H., Tsukamoto, I., Morita, S., Kunugiza, Y., Tomita, T., Yoshikawa, H., Kaneda, Y., Ogihara, T., Morishita, R. NFkappaB decoy oligodeoxynucleotides ameliorates osteoporosis through inhibition of activation and differentiation of osteoclasts. *Gene Ther. Jun*; 13(12):933-941, 2006.