

파골세포 분화에 복령 추출물이 미치는 영향

천윤희 · 광성철 · 오재민 · 최민규 · 김정중 · 광한복 · 이명수¹ · 전병훈² · 문서영^{3*}

원광대학교 의과대학 해부학교실 & 골격계질환연구소 및 환경과학연구소, 1: 류마티스내과학교실 및 골격계질환연구소,
2: 원광대학교 한의과대학 병리학교실 & 한국전통의학연구소, 3: 산본병원 마취통증의학과

Effect of Hoelen in RANKL-induced Osteoclast Differentiation

Yoon Hee Cheon, Seong Cheoul Kwack, Jaemin Oh, Min-Kyu Choi, Jeong Joong Kim, Han Bok Kwak,
Myeung Su Lee¹, Byung Hoon Jeon², Seo Young Moon^{3*}

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

1: Department of Rheumatology & Institute for Skeletal Disease,

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

3: Division of Anesthesiology and Pain Medicine, Sanbon Medical Center

Osteoporosis is an important public health issue in postmenopausal women. It is a major public health concern and is widely believed that osteoporosis results from imbalance between bone resorption and bone formation. Recently natural products from plants have been extensively studied as therapeutic drugs to treat and prevent various diseases. Hoelen (scientific name, *Poria cocos*) is a mushroom that is used in traditional Chinese medicine. Hoelen exhibits anti-inflammatory activity and has a protective effect on tumor progression. However, the effect of hoelen in osteoclast differentiation remains unknown. Thus, we examined the effect of hoelen in receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation. Hoelen significantly inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation in bone marrow-derived macrophages (BMMs) in dose dependent manner without toxicity. Also, we showed that hoelen significantly inhibited the mRNA expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and nuclear factor of activated T cells 1 (NFATc1) in BMMs treated with RANKL. In Particular, hoelen greatly inhibited the protein expression of NFATc1. Ectopic expression of NFATc1 partially reverses hoelen-mediated inhibition of osteoclast differentiation. Taken together, our results demonstrated that hoelen may be useful treatment option of bone-related disease such as osteoporosis, reumatoid arthritis, and periodontitis.

Key words : hoelen, osteoporosis, osteoclast, RANKL

서 론

뼈는 사람의 골격을 이루는 가장 단단한 조직으로 구조적으로 뼈는 몸의 형태를 유지하고, 내부 장기를 보호하며, 칼슘과 인 등 무기질의 저장고로서 이들의 혈중 농도 유지에 중요한 역할을 한다. 이러한 뼈는 태어나면서부터 사망할 때 까지 양질의 뼈를 유지할 수 있도록 생성과 흡수 과정을 반복하는데, 조골세포에 의한 뼈의 생성과 파골세포에 의한 뼈의 흡수가 균형을 이루어 항상성을 유지한다. 특히, 이 과정에서 뼈 파괴를 담당하는 파골세포의 역할이 매우 중요하고 파골세포의 골 흡수 기능이 비정

상적으로 증가할 경우 골다공증과 같은 질환이 발생하게 된다¹⁻³⁾. 골다공증은 폐경기와 관련이 있을 뿐만 아니라 난소적제술, 흡연, 운동부족, 식생활등의 변화로 인하여 최근에는 젊은 여성에서도 빈번히 발생되고 있는 추세여서 경제적인 문제와 더불어 삶의 질에도 큰 문제점을 야기 시키고 있다^{4,6)}.

파골세포는 조혈모세포에서 유래하여 단핵구/대식세포의 융합에 의해 다핵형세포로 분화되어 골 흡수 기능을 한다. 파골세포의 분화는 조골세포에 의해 조절된다. 조골세포는 receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)를 발현하고, 1, α -25-dihydroxyvitamin D₃ (VitD₃), prostaglandin E₂ (PEG₂), interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF)- α , parathyroid hormone (PTH), IL-6의 자극으로 RANKL의 발현이 촉진된다^{7,8)}. 대식세포는 다양한 수용체를 가지고 있는 세포로서, RANK와

* 교신저자 : 문서영, 군포시 산본동 1126-1, 원광대학교 의과대학 산본병원

· E-mail : gaemiya0@wku.ac.kr, · Tel : 031-390-2337

· 접수 : 2012/05/17 · 수정 : 2012/05/23 · 채택 : 2012/06/14

RANKL의 결합은 다양한 신호 전달 물질을 활성화 시켜 파골세포의 분화에 중요한 전사인자 NF- κ B, c-Fos, NFATc1의 발현을 촉진한다⁹⁾. NFATc1은 파골세포의 지표인 TRAP, osteoclast-associated receptor (OSCAR)등의 발현을 촉진한다¹⁰⁾.

임상에서 흔히 쓰여 왔던 bisphosphonate 계열의 약물은 파골세포 기능 및 분화를 억제하는 효과가 있기는 하지만 장기 복용 시 식도 및 위장관에 부작용과 하악골에 괴사를 야기하는 심각한 부작용이 수반될 수 있다¹¹⁾. 이런 시점에서 천연물은 기존 약물이 갖는 부작용은 없으면서 치료에는 도움을 주는 치료제 개발의 맥락에서 한약재 중 골다공증의 치료에 응용될 수 있는 후보로 연구가 진행되고 있다. 본 연구진은 파골세포의 생성 및 활성을 억제시킬 수 있는 천연물질을 찾고자 하였고 복령(茯苓, Hoelen)이 파골세포의 형성을 억제한다는 것을 확인하였다. 복령은 소나무를 벌목하지 3-4년 지난 소나무 뿌리에 기생하며 흑처럼 크게 자란 균핵이다. 흰색인 것을 백복령(白茯苓), 붉은색인 것을 적복령(赤茯苓)이라 한다. 본 연구진은 그 중 백복령 추출물을 선택하여 사용하였다. 복령은 예로부터 전통의학에서 진정, 이뇨, 강장 등의 목적으로 십전대보탕, 오적산, 오령산, 소풍산 등의 많은 처방에 사용되고 있는 한약재로^{12,13)}, 현재는 항암활성, 항염증활성 등이 보고되어 있는 중요 생약이다. 이에 뼈 흡수에 주된 기능을 하는 파골세포 분화에 복령 추출물이 어떤 영향을 미치는지 연구하였다.

재료 및 방법

1. 시료

복령 추출물은 한국생명공학연구원에서 구입하였다. Human RANKL과 M-CSF는 Peprotech (London, UK)사에서 구입하였고, XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서 구입하였다. p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-p38, p38, I- κ B 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였다. c-Fos와 NFATc1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다.

2. 파골세포 분화

5주령 ICR 생쥐를 경추 탈골법으로 희생시킨 후 분리한 대퇴골과 경골을 1 ml 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(100 ng/ml)을 처리하고, 복령 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 복령 추출물을 농도별로 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 후, XTT 용액 50 μ l를 각각의 well에 첨가하고 4시간 배양 후 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 확인하였다.

4. RT-PCR 분석

각각의 세포에서 QIAzol (QIAzen)용액으로 제조사의 방법에 따라 RNA를 분리한 후 RNA 1 μ g은 oligo dT primer, dNTP, buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor와 Superscript II reverse transcriptase를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 다음과 같은 primer를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다.

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'-ACTTCCCAGCCCTTACTAC-3';

TRAP antisense, 5'-TCAGCACATAGCCACACCG-3';

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, 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 PVDF 막은 5% non-fat dry milk를 처리하여 비 특이 단백질이 붙는 것을 방지하였다. 그리고 1차 항체 및 2차 항체를 처리했다. TBS-T 완충용액으로 PVDF막을 세척하여 enhanced chemiluminescence를 이용해 단백질 발현을 관찰했다.

6. 레트로 바이러스 정제 및 감염법

레트로 바이러스 정제를 위해 pMX와 constitutively active (CA)-NFATc1 이 포함된 벡터를 FuGENE 6 (Roche Applied Sciences)를 사용해 plat E cell에 transfection하였다. 48시간 배양 후 polybrene (10 μ g/ml)을 첨가한 상등액을 BMM에 infection시킨 후 6h 배양한 뒤 M-CSF (30 ng/ml), RANKL (100 ng/ml) 그리고 복령 추출물을 처리하여 4일간 배양하였다.

7. 통계분석

각각의 실험군은 3개 이상 수행하였고 평균값과 표준편차를 계산하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 동일한 실험결과를

은은 경우 실험결과로 사용하였으며, 정량적인 결과의 통계는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 p 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 파골세포 분화에 미치는 복령 추출물의 효과

파골세포는 뼈 흡수 작용을 하는 세포로서, 본 연구진은 복령 추출물이 파골세포 분화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 BMM에 M-CSF와 RANKL을 첨가하여 파골세포 분화를 유도하는 실험 조건에서 복령 추출물을 처리하였다. 그 결과 M-CSF와 RANKL만을 처리한 대조군에 비해 복령 추출물을 같이 처리한 경우, 농도 의존적으로 TRAP 양성 파골세포의 형성이 의미 있게 억제되었고(Fig. 1A) 다핵성 파골세포를 가지고 있는 성숙한 파골세포의 수도 의미 있게 복령 추출물에 의해 감소됨을 확인 수 있었다(Fig. 1B). 다음으로 복령 추출물에 의한 TRAP 양성 파골세포 분화의 억제가 세포독성과 관련 있는지 규명하기 위해 XTT 검사를 실시하였다. 그 결과 파골세포 억제 효과를 나타내는 복령 추출물의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1C). 이를 통해 복령 추출물의 파골세포 억제 효과가 세포 독성에 대한 것이 아니라 약물 자체의 효과임을 알 수 있었다.

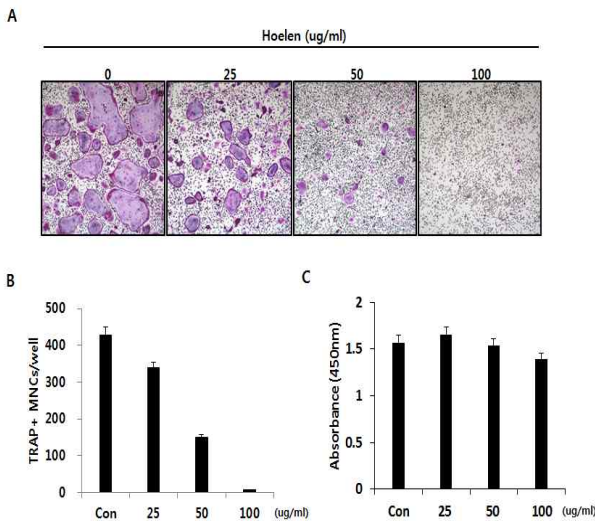


Fig. 1. Hoelen inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation. (A) Bone marrow-derived macrophages (BMMs) were cultured for 4 days with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) in the presence of hoelen. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. (B) TRAP-positive cells were counted. (C) BMMs were cultured for 3 days with M-CSF (30 ng/ml) in the presence of hoelen. After 3 days, 50 μ l 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. RANKL에 의한 유전자 발현에 복령 추출물의 효과

RANKL은 RANK와 결합한 후 세포내 신호 전달 체계를 거쳐 전사인자 c-Fos와 NFATc1의 발현을 촉진하여 파골세포의 지표인 TRAP 유전자 발현을 유도한다. 본 연구진은 RANKL에 의해 유도되는 여러 가지 유전자 발현에 복령 추출물의 영향을 실험하였다. RANKL로 자극한 BMM에서 c-Fos, NFATc1 등의 주

요 전사 인자의 발현이 증가하였고 TRAP의 발현도 증가하였으나, RANKL과 복령 추출물을 동시에 처리한 실험군에서는 c-Fos의 발현에는 영향이 없었지만 NFATc1과 TRAP의 발현이 억제되었다(Fig. 2).

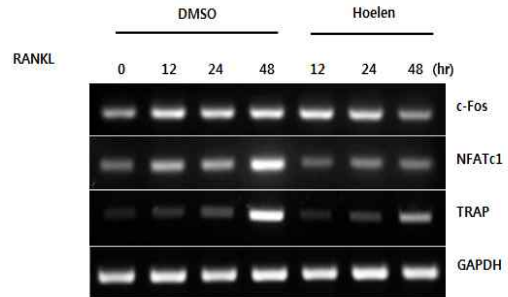


Fig. 2. Hoelen inhibits RANKL-induced NFATc1 expression. BMMs were pretreated with hoelen for 1 hour and then stimulated with RANKL for the indicated times. Total RNA of c-fos, NFATc1, and TRAP were obtained at the indicated time points. The mRNA expression levels of the indicated genes were analyzed by RT-PCR.

3. c-Fos와 NFATc1 단백질 발현에 미치는 복령 추출물의 효과

RANKL에 의해 발현되는 c-Fos는 NFATc1의 발현을 유도하고 이들 단백질의 발현은 실제 파골세포 분화에서 핵심적인 역할을 한다. 따라서 본 연구진은 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현에 복령 추출물의 효과를 검증하기 위하여 western blotting을 시행하였다. RANKL에 의해서 유도되는 NFATc1은 파골세포 분화에 중요한 전사인자로 c-Fos에 의해 조절된다(8). RANKL에 의한 c-Fos의 발현에는 복령 추출물의 영향이 없었다. 그러나 RANKL을 처리한 후 24시간과 48시간에 NFATc1의 발현은 증가되었으나 복령 추출을 처리한 실험군에서는 단백질 발현이 현저히 억제되었다(Fig. 3).

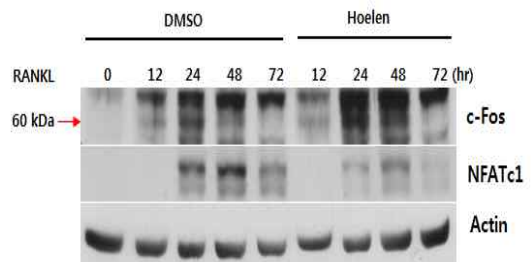


Fig. 3. Hoelen suppresses RANKL-induced NFATc1 expression. BMMs were pretreated with or without Hoelen (100 μ g/ml) for 1 hour and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated times. The cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies for c-Fos, NFATc1, and actin.

4. 파골세포 분화의 신호전달 경로에 미치는 복령 추출물의 효과

복령 추출물에 의한 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위해 RANKL의 신호전달체계에 복령 추출물이 미치는 영향을 실험하였다. BMM을 복령 추출물로 전 처리 하고 RANKL을 시간별로 처리한 다음 MAPK (mitogen-activated protein kinase)의 인산화를 측정하였다. 그 결과 RANKL에 의해 유도되는 MAPK의 인산화에 복령 추출물의 의미 있는 차이는 없었다(Fig. 4).

고찰

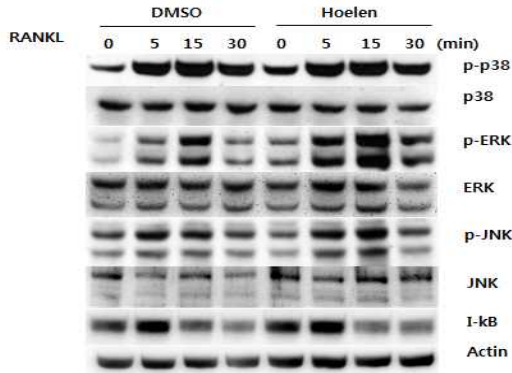


Fig. 4. Effect of hoelen on signal transduction induced by RANKL. BMMs were pretreated with or without hoelen (100 µg/ml) for 1 hour and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated times. The cell lysates were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

5. NFATc1의 이소성 발현에 따른 파골세포 분화에 복령 추출물이 미치는 효과

다음으로 본 연구진은 복령 추출물의 파골세포 분화 억제 작용기전이 NFATc1 발현 억제와 관련 있는지 확인하기 위해 CA-NFATc1 레트로 바이러스를 사용하였다. BMM에 CA-NFATc1을 감염시키고 복령추출물을 처리하여 파골세포 분화에 복령 추출물의 영향을 확인하였다. 그 결과 CA-NFATc1을 과 발현 시킨 대조군에서 생성된 TRAP 양성파골세포와 비교해 볼 때 NFATc1을 과발현 시킨 BMM은 복령 추출물을 처리하여도 파골세포로 분화되었다(Fig. 5). 위 결과는 복령 추출물의 파골세포 분화 억제 작용 기전이 NFATc1과 관련 있음을 시사한다.

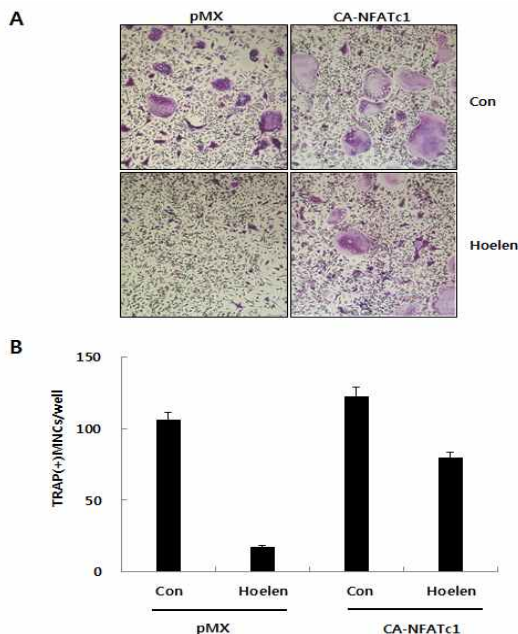


Fig. 5. Hoelen-induced inhibition of osteoclast differentiation was rescued by inducing NFATc1. (A) BMMs were infected with pMX (control vector) or CA-NFATc1 retrovirus before M-CSF and RANKL treatment. The infected cells were cultured with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) for 4 days in the presence or absence of hoelen. After 4 days of culture, cells were fixed, permeabilized, and stained for TRAP. (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts.

골다공증은 일반적인 뼈 질환으로 뼈 구조의 약화로 골질의 위험성이 증가되어 최근 노령인구의 증가로 골다공증에 대한 관심이 증가되고 있다. 또한 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 환자에서는¹⁴⁾ 조기 진단 및 치료가 필요한데 최근 생약이나 천연물과 같은 물질의 섭취를 통해 뼈를 강화하고자 하는 시도들이 늘어나고 있다.

동의학사전에 의하면 복령의 주성분은 β-pachyman으로 약 93%에 이르고, triterpenes류 화합물인 pachymic acid, tumulosic acid, 3-β-hydroxylanosta-7,9¹¹⁾, 24-trien-21-oil acid 등이 함유되었고, 복령에서 분리, 정제한 triterpenoids 분획물의 항균활성은 우수하다고 보고되었으며, 조사된 폐암, 난소암, 피부암, 중추 신경암, 직장암에 대하여 높은 성장 저해 활성을 나타내는 등 항암, 항염증 효능이 있다는 결과가 보고되었다¹⁵⁾. 파골세포는 조혈모세포에서 기원하여 단핵구/대식세포의 과정을 거쳐 세포끼리 서로 융합하여 골 흡수 기능을 수행하는 성숙한 파골세포로 분화된다. 뼈 흡수를 억제하기 위해 성숙한 파골세포로의 분화를 억제하는 것이 골다공증 치료에 중요한 방법이 될 수 있다. 성숙한 파골세포로의 분화를 위해서는 세포 표면의 RANK가 세포외의 RANKL과 결합하는 과정이 필수적이다¹⁶⁾. 이 결합을 통해 분화의 중요한 유전자인 c-Fos와 NFATc1의 발현이 증가하게 된다. 파골세포 분화과정 동안 RANKL은 c-Fos를 자극하고, c-Fos는 다시 NFATc1 프로모터 부위에 결합하여 NFATc1 발현을 조절한다. 특히 NFATc1은 파골세포 분화의 중요 전사인자로 파골세포 표지 유전자인 TRAP과 OSCAR의 발현을 촉진한다^{17,18)}. 본 연구진은 복령 추출물이 RANKL에 의해 진행되는 분화과정에서 핵심 유전자인 NFATc1의 발현을 억제함을 확인 하였다. 이는 복령 추출물이 파골세포 분화의 핵심 기전을 억제함을 의미한다. 복령 추출물이 NFATc1의 발현을 억제함과 관련하여 NFATc1을 과 발현 시킨 상태에서의 복령 추출물이 미치는 영향은 TRAP 양성파골세포 분화가 부분적으로 회복됨을 확인하였고, 다시 한번 파골세포 분화과정에서 핵심 역할을 하는 NFATc1의 발현과 관련하여 복령이 중요한 억제 역할을 하고 있음을 확인 하였다. c-Fos는 RANKL의 자극에 의해 30분 안에 발현되는 전사인자로 NF-κB와 MITF등과 함께 NFATc1과 같은 파골세포 분화에 중요한 단백질 발현을 촉진한다⁹⁾. 하지만 복령 추출물이 c-fos 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인 되어 복령 추출물에 의한 파골세포로의 분화 억제는 NFATc1 발현을 억제하는 것으로 사료된다. RANKL과 RANK의 결합으로 RANK의 세포질 부위로 TRAF 계열 단백질 결합이 촉진되고 RANKL의 신호가 전달되어 MAPKs인 JNK, p38, ERK와 같은 신호전달 단백질의 활성화를 통하여 파골세포 분화에 필수적인 NF-κB, NFATc1, c-Fos를 유도한다¹⁹⁾. 하지만 복령 추출물은 파골세포 분화과정 중 초기단계에 해당하는 신호전달단계에는 별다른 영향을 미치지 않은 것

로 확인되었다. 이 결과는 복령이 c-Fos 발현에 영향이 없는 것과 일치 한다고 할 수 있다. 복령 추출물을 이용한 실험을 통해 파골세포 분화에 억제 효과가 있음을 알게 되었고 이러한 억제 효과는 파골세포 분화에 핵심적인 NFATc1의 발현을 억제하기 때문인 것으로 나타났다. 향후 복령 추출물을 이용한 동물 실험이나 화학적인 성분 분석을 통한 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

결 론

천연물인 복령 추출물은 골 흡수 역할을 담당하는 파골세포의 분화를 세포의 독성 없이 억제시켰다. 이를 통해 그 동안 전통적인 약제로 사용되어 왔던 복령의 또 다른 효능을 밝혀냈고, 부작용 없이 뼈를 강화 시킬 수 있는 한약제로서의 가능성을 제시하여 기존 부작용이 많은 약물을 대체 할 수 있는 후보 물질로 제시 할 수 있다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Goltzman, D. Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov* 10: 784-796, 2002.
- Ballabriga, A. Morphological and physiological changes during growth: an update. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54 Suppl 1: S1-6, 2000.
- Seeman, E. Is a change in bone mineral density a sensitive and specific surrogate of anti-fracture efficacy. *Bone.* 41: 308-317, 2007.
- Becker, D.J., Kilgore, M.L., Morrissey, M.A. The societal burden of osteoporosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 12: 186-191, 2010.
- Rodan, G.A., Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289: 1508-1514, 2000.
- Ilich, J.Z., Kerstetter, J.E. Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. *J Am Coll Nutr* 19: 715-737, 2000.
- Teitelbaum, S.L. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289: 1504-1508, 2000.
- Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in psteoimmunology. *J. Mol. Med.* 83: 170-179, 2005.
- 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. Osteoimmunology: shared mechanisms and cross talk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.*, 7: 292-304, 2007.
- Abrahamsen, B. Bisphosphonate adverse effects, lessons from large databases. *Curr Opin Rheumatol* 22(4):404-409, 2010.
- 소학관. 상해과학기술출판사, 중약대사전. 상해, 4: 2312, 1975.
- Zhu, Y.P. Harwood Academic Publisher, Amsterdam. *Chinese Materia Medica.* 311, 1998.
- Korcowska, 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.
- 권미선, 정신교, 최종욱, 송경식, 이인선, 최종욱. Antimicrobial and Antitumor Activity of Triterpenoids Fraction from *Poria cocos* Wolf. *Journal of Food Science and Nutrition* 28(5):1029-1033, 1999.
- 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.
- H. Takayanagi, S. Kim, T. Koga, H. Nishina, M. Isshiki, H. Yoshida, A. Saiura, M. Isobe, T. Yokochi, J. Inoue, E.F. Wagner, T.W. Mak, T. Kodama, T. Taniguchi *Developmental Cell*, 3: 889, 2002.
- M. Matsumoto, M. Kogawa, S. Wada, H. Takayanagi, M. Tsujimoto, S. Katayama, K. Hisatake, Y. Nogi, *The Journal of Biological Chemistry* 279: 45969, 2004.
- 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 mechanism of receptor activator of NF- κ B, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 273: 34120-34127, 1998.