

밀기울 부탄올 분획물이 파골세포의 분화억제에 미치는 효과

문정선¹ · 문성희^{3,4} · 심보원¹ · 강태진¹ · 이숙연² · 임동술^{1,2*}

¹삼육대학교 약학대학 약학과, ²삼육대학교 약학대학 한국약식동원연구소
³한국화학연구원 신약연구본부, ⁴충남대학교 생명과학과

Inhibition of Osteoclast Differentiation by Wheat Bran Butanol Fraction

Jung Sun Moon¹, Seung-Hee Moon^{3,4}, Bo Won Shim¹, Tae Jin Kang¹,
Sookyoon Lee² and Dongsool Yim^{1,2*}

¹ Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Sahm Yook University, Seoul 139-742, Korea.

² Korea Re-Creation Institute of Phytochemicals, College of Pharmacy, Sahm Yook University, Seoul 139-742, Korea.

³ Laboratory of Translational Therapeutics, Pharmacology Research Center, Division of Drug Discovery Research,
Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea

⁴ Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstracts – Osteoporosis is a disease of bones that leads to an increased risk of fracture. In osteoporosis, the bone mineral density is reduced, bone microarchitecture deteriorates, and the amount and variety of proteins in bone are altered. It^oOs caused by the 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. Wheat bran is the hard outer layers of wheat grain and produced as a by-product of milling in the production of refined grains. In oriental medicines, Bu So Maek (Tritici Immaturi Semen) with wheat bran has been used as bronchitis, sedatives and anti-sweating effects. However effects of wheat bran butanol fraction (WBB, 50 µg/ml) in osteoclast differentiation remains unknown yet. Thus we investigated the effects of WBB on RANKL induced osteoclast differentiation. WBB inhibited osteoclast differentiation by downregulating the RANKL-induced activations of MAP kinases. Moreover mRNA expression of osteoclast-mediating molecules such as c-Fos, NFATc1 and DC-STAMP were attenuated by WBB during osteoclast differentiation. The finding of this study show that WBB and its components might prevent osteoclast-related bone loss.

Key words – wheat bran butanol fraction(WBB), osteoclast differentiation, MAP kinase, NFATc1

뼈는 인체의 골격을 이루는 가장 단단한 조직으로 몸의 형태를 유지하고, 각종 내부 장기를 보호하며, 칼슘과 인 등을 비롯한 무기질 저장고로서 각종 무기물질의 혈중농도 유지에 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 사람이 살아가면서 조골세포에 의한 뼈 조직의 생성과 파골세포에 의한 뼈의 파괴와 흡수가 균형을 이루어 항상성을 유지하고 있다. 이때 뼈조직의 생성과 흡수가 균형을 잃어 파골세포의 골 흡수기능이 비정상적으로 증가할 경우에 골다공증(Osteoporosis)을 유발하게 된다.¹⁻³⁾ 골다공증은 골밀도 감소로 인한 골 미세구조의 변화와 골질(bone quality)저하로 인하여 골강도

(bone strength)가 손상되어 가벼운 충격에도 쉽게 골절이 발생하는 질환으로⁴⁾ 인구의 고령화가 진행될수록 발병률이 상승되는 대표적 질환이므로 관심이 증가되는 추세이다. 아울러 이 질환은 여성의 폐경기와 난소적제술 등 여성호르몬 변화와 관련이 있을 뿐 아니라 흡연, 식생활의 서구화, 운동부족 등 좋지 못한 생활습관이 대표적 원인으로 알려져 있고 최근에는 무리한 다이어트 등으로 인해 젊은 여성에게도 빈발되는 등 여러모로 문제점을 야기 시키고 있다.^{5,6)}

그러나 골다공증의 치료법으로 완전하게 확립된 방법은 아직 없으며 일단 손상된 골조직을 원상회복시키는 것도 쉬운 일이 아니다. 따라서 골다공증이 발생하는 것을 미리 예방하는 방법이 가장 좋으며 또한 발생된 골다공증이 더 이상 진행되지 않도록 지연시키는데 치료목표를 두고 있다.

*교신저자(E-mail): yimds@syu.ac.kr
(Tel): +82-2-3399-1604

임상에서 가장 많이 사용되는 골다공증 치료제로는 bisphosphonate 계열의 약물로 파골세포의 기능 및 분화를 억제하는 효과가 있지만 복용시 위, 장관에 대한 부작용과 하악골의 괴사와 대퇴부의 골절을 야기하는 등의 여러 가지 부작용이 있는 것으로 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ 따라서 부작용이 적은 천연물에서 골다공증 치료약물을 개발하는 것이 바람직한 것으로 생각하는 경향이 많아서 몇가지 약물이 등장하고 있다.¹⁰⁻¹²⁾

이에 본 연구자들은 이러한 골다공증의 치료제를 개발함에 있어 부작용을 더욱 최소화하고 장기간에 걸쳐 복용해야 하는 골다공증 치료제의 특성에 착안하여 ‘약식동원(藥食同源)’ 개념에서 갱미(粳米 쌀겨, rice bran)와 밀기울(wheat bran)을 선택하였다. 옛 부터 속껍질을 벗기지 않은 쌀을 갱미라 하여 약으로 사용하였고 지금은 현미(玄米)라 하여 식용을 하고 있는데 이러한 쌀겨 추출물이 파골세포의 분화를 억제하여 골다공증의 예방과 치료에 유의성이 있음을 연구자들은 이미 확인하였다.¹³⁾ 또한 밀(*Triticum aestivum*)은 벼과(Gramineae)에 속하는 1년생 초본이며 밀가루를 만들 때 생성되는 밀기울은 밀종자의 외피가 대부분이지만 소량의 배유부와 배아부를 포함하고 있다. 옛 부터 한방에서는 밀을 수확하여 물에 뜨는 것을 구별하여 부소맥이라 하였고, 이것을 효천, 기관지염을 치료하는데 사용하였으며 또한 지한작용과 진정작용 등의 효과를 얻기 위해 사용하여 왔다.¹⁴⁾ 또 빵을 주식으로 하는 외국에서는 최근에 wheat bran으로 다양한 종류의 항암실험을 통하여 유의성 있는 효과들을 발표하였다.^{15,16)} 이와 같이 인류가 주식으로 먹는 곡식 종자의 속껍질 속에 많은 영양소와 약효물질이 있음을 알고 예부터 약으로 사용해 왔음에 유의하여, 연구자들은 본 실험에서 밀기울 부탄을 분획물(WBB)이 파골세포 분화에 미치는 영향을 연구하여 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 밀기울은 경남 양산에서 구입한 5 kg을 90% ethanol(v/v) 용매를 사용하여 3시간씩 3회 추출하여 ethanol extract 337 g을 얻었고 이를 n-hexane, ethyl acetate와 butanol을 이용하여 연속 분획, 농축하여 이중 butanol 분획물 16 g을 얻어 본 실험에 사용하였다. 검체는 농축된 분획물을 DMSO용매에 녹여 phosphate buffered saline(PBS) 용액을 사용하여 6.25, 12.5, 25, 그리고 50 µg/ml로 희석하여 사용하였다.

파골세포의 분화 - 5~8주령의 ICR 생쥐의 대퇴골과 경골을 이용하여 골수세포를 얻었다. 얻어진 골수세포를 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, paisley, UK), 항생제(100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin; Hyclone, UT) 그리고 대식세포 성장인자인 M-CSF(10 ng/ml; Peprotech,

NJ)를 포함한 α -minimum essential medium(α -MEM)배지(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)에서 1일간 배양한 후 미부착된 골수세포를 모아 M-CSF(30 ng/ml)포함한 배지에서 3일간 배양하였다. 이때 배양된 미부착세포는 세척하여 버리고 plate에 부착된 대식세포(born marrow-derived macrophage, BMMs)를 실험에 사용하였다. 얻어진 대식세포는 M-CSF(30 ng/ml)와 RANKL(5 ng/ml; R&D System, MN)로 처리하고 WBB을 농도별로 각각 6.25, 12.5, 25 그리고 50 µg/ml로 처리하였다. 4일간 배양 후 분화된 배양세포를 TRAP 용액으로 염색하여 붉은색으로 염색된 세포를 파골세포로 간주하여 분석하였다.

TRAP 염색법 - 성숙한 파골세포를 확인하고자 tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) 염색하였다. 세포를 10% formalin과 0.1% Triton X-100 용액으로 각각 10분간 처리하고 Leukocyte Acid Phosphatase Kit 387-A(Sigma, MO) 염색하였다. DP Controller를 갖춘 현미경(Olympus Optical, Tokyo)을 이용하여 확인하였다.

세포독성 검사 - 대식세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 10% FBS 함유한 α -MEM 배지에 현탁시키고 M-CSF(30 ng/ml)과 함께 농도별 WBB을 처리하여 3일 배양하였다. Cell viability는 Cell-Counting Kit-8(Dojindo Molecular Technologies, MD)를 이용하여 측정하였다. 측정된 흡광도는 standard curve를 이용하여 환산하였다.

Western Blot 분석 - 배양된 세포는 배지를 제거하고 lysis buffer 용액(10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05%(v/v) Tween 20, 1 mM PMSF, 그리고 protease inhibitor(Roche, Germany)를 이용하여 용해하고 4°C, 10,000 × g에서 15분간 원심분리하여 상등액의 순수단백질을 얻었다. 단백질은 BCA-protein assay kit(Pierce, IL)를 사용하여 정량하고 동량(20 µg)의 단백질을 SDS-PAGE gel에서 분리하였다. 분리되어진 단백질은 PVDF 막(Millipore, CA)으로 옮기고 5% skim milk액을 처리하여 항체와 비특이적 결합을 방지하였다. 그리고 1차 항체처리 및 2차 항체를 처리하여 막을 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate(Pierce, IL)과 LAS-3000 luminescent image analyzer(Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)를 이용하여 전개하였다. 본 실험에 사용한 모든 항체는 Santa Crus(CA)에서 구입하였다.

Real-Time PCR - Table I에 제시된 Primer(Rozen and Skaletsky, 2000)를 이용하여 실험을 하였다. 각각의 세포에서 TRIzol용액으로 제조사의 방법대로 RNA를 분리하여 RNA 1 µg, 1 µ Moligo-dT₁₈, 10 units의 RNasin(RNase inhibitor; Promega, WI)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. QPCR은 Stratagene Mx3000P Real-Time PCR과 Brilliant SYBR Green Mater Mix(Stratagene, CA)를 이용하였다. 대략적으로 1차표준 cDNA는 1:10으로 희석하여 primers(10

Table I. Primer sequences used in this study

Taget gene	Forward(5'-3')	Reverse (5'-3')
c-Fos	CCAGTCAAGAGCATCAGCAA	AAGTAGTGCAGCCCGGAGTA
NFATc1	GGGTCAAGTGTGACCGAAGAT	GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA
Cathepsin K	GGCCAACCTCAAGAAGAAAAC	GTGCTTGCTTCCCTTCTGG
DC-STAMP	CCAAGGAGTCGTCCATGATT	GGCTGCTTTGATCGTTTCTC
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA

pmol)을 가해주고 제조자 방식대로 실험하였다. 모든 실험은 3회 반복 실시하였고 데이터 분석법은 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 방법을 사용하였다. 표준물질로는 GAPDH를 사용하였다.

통계분석 - 각각의 실험은 3회 이상 반복 수행하였으며 평균값(M)과 표준편차(SD)를 계산하였다. 정량적인 결과의 통계는 Student's t-test를 이용하여 분석하였으며 $p < 0.05$ 이 하인 경우 통계적 유의성을 평가하였다.

결 과

WBB의 RANKL에 의해 유도된 파골세포분화 억제 효과 - RANKL에 의해서 유도되어진 전구세포에서 파골세포

로 분화되는데 WBB의 효과를 측정하기 위해 생쥐골수에서 얻은 대식세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 실험하였다. 그 결과 WBB을 처리하지 않은 대조군은 붉은색으로 염색된 TRAP 양성 다핵성 파골세포로 분화가 진행되었음을 확인하였고 WBB을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 파골세포의 분화가 억제됨을 형태학적으로 또 흡광분석으로 각각 확인할 수 있었다(Fig. 1A와 1B). 아울러 다핵성 파골세포를 가지고 있는 성숙한 파골세포의 수가 WBB의 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 1-C). 또한 WBB에 의한 TRAP 양성 파골세포 분화의 억제가 세포독성과 관련 있는지 Cell viability를 Cell-Counting Kit-8를 이용하여 측정하였을 때 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 2).

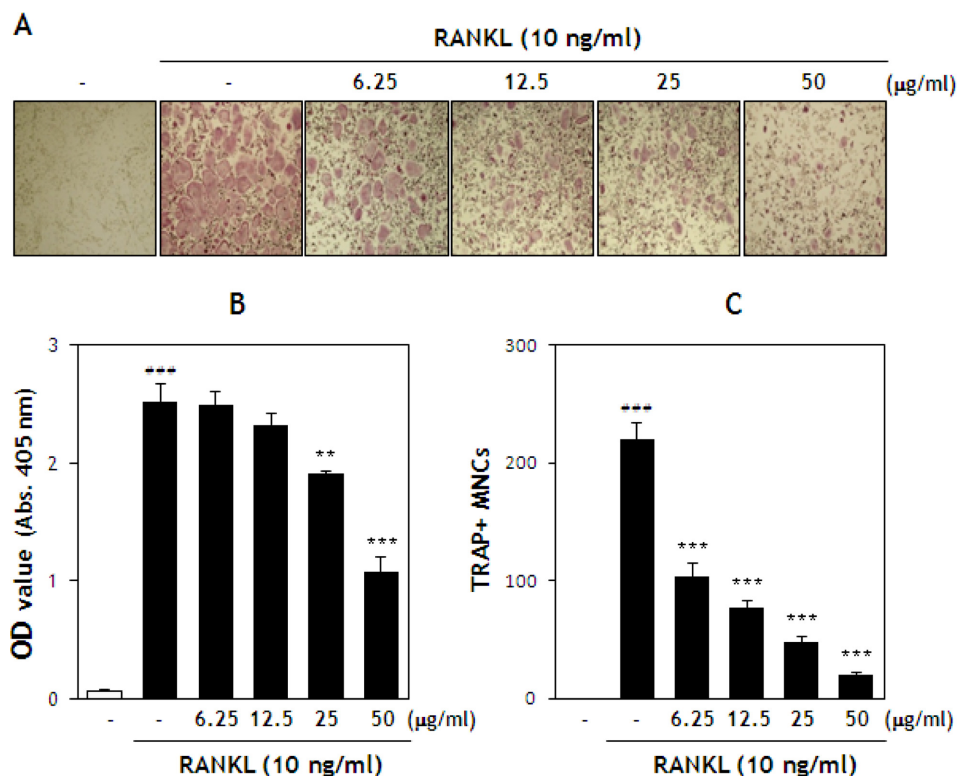


Fig. 1. Wheat Bran butanol fraction (WBB) inhibit RANKL-induced osteoclast differentiation. (A) WBB inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation at dose dependent manner. (B) WBB inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation by Absorption at dose dependent manner (405 nm). (C) WBB dose-dependently inhibited RANKL-induced formation of TRAP positive-multinucleated osteoclasts (TRAP+MNCs). TRAP+MNCs were counted. ###, $p < 0.001$ (versus the negative control); ***, $p < 0.001$ (versus the RANKL-induced group); **, $p < 0.005$ (versus the RANKL-induced group).

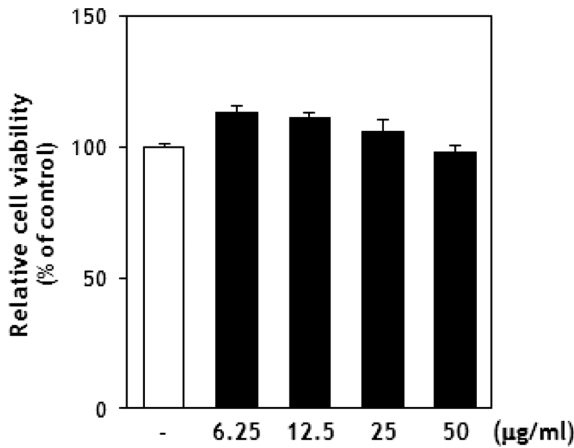


Fig. 2. The effects of WBB on the viability of BMMs was evaluated by CCK-8 assay.

이 결과를 통해서 WBB의 파골세포 억제효과가 세포독성이 아니라 WBB 자체의 효과임을 확인할 수 있었다.

RANKL에 의한 유전자 발현에 미치는 WBB의 효과 - RANKL에 의해 발현되는 특정한 유전자들은 파골세포의 분화를 조절하는 중요한 기능이 있다. RANKL은 RANK와 결합한 후 세포내 신호 전달 체계를 거쳐 전사인자인 c-Fos와 NFATc1의 발현을 조절하여 파골세포의 분화를 조절한다. 파골세포의 분화와 관련된 유전자 발현에 WBB의 영향을 확인하기 위하여 RANKL로 유도되는 c-FOS, NFATc1, TRAP, DC-STAMP, Cathepsin K와 ATP6v0d2의 mRNA 발현의 변화를 측정하였다. 그 결과 c-FOS, NFATc1, TRAP, DC-STAMP 발현이 현저하게 모두 감소되는 것을 확인하였다(Table II).

RANKL에 의한 신호전달체계에 미치는 WBB의 효과 - RANKL과 RANK의 상호작용에 의한 파골세포로의 분화는 다양한 신호전달체계를 통해서 조절되어진다. 특별히 p38, JNK, ERK 등의 MAP kinase가 파골세포로의 분화에 핵심적인 역할을 담당하는 NFATc1과 c-Fos를 조절하는 중요한

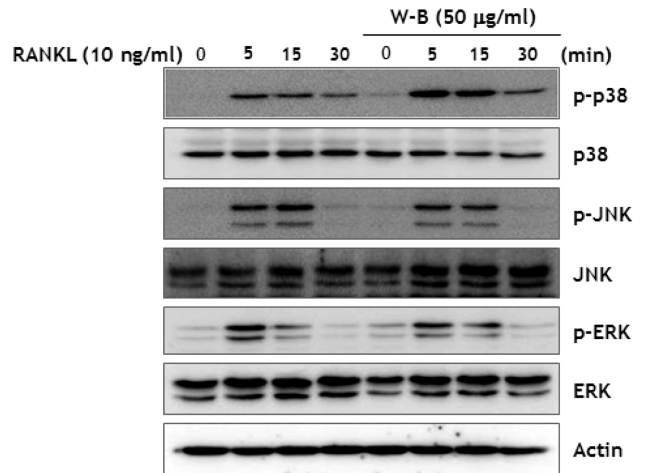


Fig. 3. WBB-inhibits RANKL-induced MAP kinase activity. BMMs were pretreated with or without WBB (50 µg/ml) for 1h prior to RANKL stimulation (5 ng/ml) at the indicated times. Protein expressions evaluated by western blot analysis.

신호전달 단백질로 알려져 있다. RANKL로 처리한 대조군과 비교했을 때 WBB을 같이 처리한 군에서 JNK의 인산화에서는 변화의 차이를 확인할 수 없었지만, p38, ERK의 인산화는 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 따라서 파골세포의 분화에 필수적인 c-Fos와 NFATc1의 발현에 WBB의 억제 효과는 p38, ERK 활성화에 의한 것을 확인하였다.

고 찰

골다공증은 이미 선진국에서는 인간의 삶의 질을 가장 위협하는 질병군 중의 하나로 부상하였고 매해 50대 환자가 급증하는 심각한 상황으로 치닫고 있다. 우리나라도 생활습관이 지금처럼 서구식으로 계속 이어지면 머지않아 유사한 상황이 올 것을 전문가들은 예측하고 있다. 또한 인간의 평균수명이 길어져 노령인구가 늘어남에 따라 자연노화의 과

Table II. Effect of WBB on RANKL-induced mRNA expression levels of osteoclast-related genes in BMMs. Cells were treated with RANKL for 4days and then the mRNA levels were evaluated by quantitative real-time PCR

RANKL	-	+	+
WB-BuOH (50 µg/ml)	-	-	+
TRAP	1.00±0.11	41.91±2.98 ^a	17.04±0.53 ^b
c-Fos	1.00±0.02	2.94±0.29 ^a	0.59±0.01 ^b
NFATc1	1.00±0.03	40.26±2.11 ^a	12.27±0.52 ^b
DC-STAMP	1.00±0.09	4.10±0.33 ^a	2.11±0.03 ^b
Cathepsin K	1.02±0.25	7637.18±1444.77 ^a	2201.41±501.27 ^c
ATP6v0d2	1.01±0.18	49.04±5.36 ^a	33.84±1.15 ^c

^ap<0.001 (compared to negative control group)

^bp<0.001 (compared to positive control group)

^cp<0.01 (compared to positive control group)

정이기도 한 골다공증에 대한 관심도 증대되고 있다. 골다공증의 원인으로는 노화 이외에도 에스트로겐의 결핍으로 인한 폐경과¹⁷⁾ 스테로이드 약물의 장기 복용이나 류마티스 관절염 등과 같은 만성 염증성 질환과¹⁸⁾ 음주와 흡연 등 다양한 것으로 알려져 있다. 또한 최근 당뇨, 만성심장질환, 갑상선 질환 등이 수반된 환자에서 조기진단 및 치료가 필요하다고 알려져 있다.¹⁹⁾ 파골세포는 조혈모세포에서 유도되어 증식과 분화, 다핵화 등 과정을 거쳐 형성되는데 위에서 언급된 여러가지 원인에 의해 골 생성보다 골 흡수작용이 더 많이 일어나게 되면 골다공증을 유발하게 된다. 그러므로 파골세포로 분화되는 과정을 억제하는 것이 골다공증 치료의 한 방법이 될 수 있다. 본 실험에서 사용한 WBB은 농도 의존적으로 RANKL에 의해 파골세포로 분화유도과정 중에서 TRAP양성인 파골세포의 수를 통계적으로 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 1-C). 또한 파골세포의 분화억제 효과가 투여약물의 독성효과가 아니라 WBB의 효과라는 사실을 확인하였다. 결과적으로 WBB가 직접적으로 파골세포로의 분화 억제효과를 나타냄으로써 골다공증 치료에 사용 가능한 후보물질로 기대된다.

파골세포는 조혈모세포에서 유래되어 여러 단계를 거쳐 골을 흡수하는 파골세포로 분화되어 골 흡수기능을 수행하게 된다. 파골세포는 RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)를 발현시키고 Vitamin D3, prostaglandin E2(PEG2), interleukin-1(IL-1), TNF- α (tumor necrosis factor α), PTH(parathyroid hormone), IL-6(interleukin-6) 등의 자극으로 말미암아 RANKL의 발현이 촉진된다.^{20,21)} 단핵구나 대식세포에서 발현되는 RANK에 RANKL가 결합하면 다양한 신호전달물질을 활성화하여 파골세포로 분화하는데 중요한 전사인자인 c-Fos와 NFATc1가 증가하게 된다.²²⁾ 그러나 RANKL에 의해 유도된 NFATc1, TRAP, c-Fos, DC-STAMP 등의 발현이 감소됨을 확인하였다(Table II). 특별히 NFATc1의 발현은 파골세포로의 분화에 매우 중요한 인자로 결핍 시에는 배아줄기세포가 파골세포로 분화되지 않는다고 보고되었다.²³⁾ RANK와 RANKL과의 결합으로 RANK의 세포질 부위로 TRAF계열 단백질 결합이 촉진되고 RANKL의 신호가 전달되어 MAPKs(mitogen-activated protein kinase)인 p38, ERK 등과 같은 신호전달 단백질의 활성화를 통하여 파골세포의 분화에 필수적인 c-Fos, NFATc1과 같은 전사인자를 유도한다.²⁴⁾ WBB은 파골세포의 분화과정 중에서 초기단계에 해당하는 신호전달단계에서 c-Fos, NFATc1 등을 억제하여 파골세포로 분화를 억제하는 것으로 확인하였다.

Wheat bran에 함유된 성분으로 linoleic acid를 비롯한 여러 지방산들과 ferulic acid를 포함한 phenolic acid류와 polyphenol류가 알려져 있으나²⁵⁾ 이 가운데 극성이 큰 polyphenol류가 파골세포의 분화를 억제하는 성분으로 추정되어진다. 추가적으로 WBB의 성분분석을 통하여 유효물질

확인을 위한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

또한 밀의 미성숙 종자를 부소맥이라 하여 한약으로 사용하고 있어 밀기울과 부소맥의 관계를 확인하고자 시중에서 부소맥을 구입, 비교하였을 때, 미성숙 종자는 거의 찾아볼 수 없었고 대부분이 통밀이라고 말하는 성숙한 밀종자임을 확인하였다. 그러므로 흰 밀가루를 만들면서 부산물로 생성되는 밀기울과 시중에 유통되고 있는 부소맥을 동일한 소재로 간주 할 때 이러한 실험결과를 부소맥의 새로운 약효로 추가할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

밀기울은 흰 밀가루를 만들 때 생성되는 부산물로 사료 등으로 사용하는 이외에는 의약적 용도로 알려져 있지 않았으나 본 실험을 통하여 WBB의 50 μ g/ml농도에서 파골세포의 분화가 억제됨을 확인함으로써 이 분획물이 골다공증의 치료나 예방의 목적으로 사용될 수 있음을 입증하였다. 이는 또한 기존의 전통약재인 한약의 사용범위를 벗어나 새로운 효능을 밝혀냄으로써 부작용 없이 장기간 투여할 수 있는 약식동원(藥食同源)의 개념에 맞는 이상적인 소재로 확인된 셈이다. 아울러 추후 밀기울 부탄을 분획물의 유효 지표성분을 분리하여 파골세포에 미치는 영향을 비교 분석하는 연구가 이어져야 할 것이다.

인용문헌

1. Ballabriga, A. (2000) Morphological and physiological changes during growth: an update. *Eur. J. Clin. Nutr.* **54** Suppl 1: S1-6.
2. Goltzman, D. (2002) Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**: 784-796.
3. Seeman, E. (2007) Is a change in bone mineral density a sensitive and specific surrogate of anti-fracture efficacy. *Bone* **41**: 308-317.
4. Kanis J. A. (2002) Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* **359**: 1929-36.
5. Rodan, G. A. and Martin, T. J. (2000) Therapeutic approaches to bone disease. *Science* **289**: 1508-1514.
6. Becker, D. J., Kilgore, M. L. and Morrisey, M. A. (2010) The societal burden of osteoporosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **12**: 186-191
7. Dannemann, C., Gratz, K. W., Riener, M. O. and Zwahlen, R. A. (2007) Jaw osteonecrosis related to bisphosphonate therapy: A severe secondary disorder. *Bone* **40**: 828-834.
8. Meier, R. P. H., Perneger, T. V., Stern, R., Rizzoli, R. and Peter, R. E. (2012) Increasing occurrence of atypical femoral fractures associated with bisphosphonate use. *Arch. Intern. Med.* **172**: 930-936.
9. Abrahamsen, B. (2010) Bisphosphonate adverse effects, les-

- sons from large databases. *Curr. Opin. Rheumatol.* **22**: 404-409.
10. Miura, H., Nishida, H. and Linuma, M. (1996) Effect of crude fractions of *Psoralea corylifolia* seed extract on bone calcification *Planta Med.* **62**: 150-153.
 11. Oh, K. O., Kim, S. W., Kim, J. Y., Ko, S. Y., Kim, H. M., Baek, J. H., Ryoo, H. M. and Kim, J. K. (2003) Effect of *Rehmannia glutinosa* Libosch extracts on bone metabolism. *Clin. Chim. Acta* **334**: 185-195.
 12. Kim, H. H., Kim, J. H., Kwak, H. B., Huang, H., Han, S. H., Ha, H., Lee, S. W., Woo, E. R. and Lee, Z. H. (2004) Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by tanshinone IIA isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Biochem. Pharmacol.* **67**: 1647-1656.
 13. Moon, J. S., Moon, S. H., Choi, S. W., Lee, S. Y., Kim, S. H. and Yim, D. S. (2013) Anti-osteoclastogenic activity of butanol fraction of rice bran extract via downregulation of MAP kinase activity and expression. *International Journal of Medicine and Medical Sciences.* **5**: 348-355.
 14. 생약학교재 편찬위원회 (2013) 생약학, 404, 동명사, 파주.
 15. Coleman, H. G., Murray, L. J., Hicks, B., Bhat, S. K., Kubo, A., Corley, D. A., Cardwell, C. R. and Cantwell, M. M. (2013) Dietary fiber and the risk of precancerous lesions and cancer of the esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Nutr. Rev.* **71**: 474-482.
 16. Pesarini, J. R., Zaninetti, P. T., Mauro, M. O., Carreira, C. M., Dichi, J. B., Ribeiro, L. R., Mantovani, M. S. and Oliveira, R. J. (2013) Antimutagenic and anticarcinogenic effects of wheat bran in vivo. *Genet Mol. Res.* **12**: 1646-1659.
 17. Cummings, S. R., Browner, W. S., Bauer, D., Stone, K., Ensrud, K., Jamal, S. and Ettinger, B. (1998) 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.
 18. Korczowaska, I. and Olewicz-Gawlik, A. (2008) Does low-dose and short-term glucocorticoids treatment increase the risk of osteoporosis in rheumatoid arthritis female patients? *Clin. Rheumatol.* **27**: 565-572.
 19. Teitelbaum, S. L. (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**: 1504-1508.
 20. Suda, T., Takahashi N., Udagawa N, Jimi E., Gillespie M. T. and Martin, T. J. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* **20**: 345-357.
 21. Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**: 337-342.
 22. Rao, A., Luo, C. and Hogan, P. G. (1997) Transcription factor of the NAFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 707-747.
 23. 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. and Taniguchi, T. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFATc2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclast. *Developmental Cell* **3**: 889-901.
 24. Gilbert, L., Tometsko, M. E., Anderson, D. M., Cosman, D. and Dougall, W. C. (1998) 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**: 34120-3412.
 25. Fardet, A. (2010) New hypotheses for the health protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutr. Res. Rev.* **23**: 65-134.

(2013. 8. 1 접수; 2013. 8. 30 심사; 2013. 9. 10 게재확정)