연교의 파골세포 분화 및 골 흡수 억제 기전 연구

엄지환^{ID} · 김재현^{ID} · 김민선^{ID} · 김상우^{ID} · 신화정^{ID} · 정혁상^{ID} · 손영주^{ID}

경희대학교 한의과대학 해부학교실

Forsythiae Fructus Extract Inhibits RANKL-Induced Osteoclast Differentiation and Prevent Bone Loss in OVX-Induced Osteoporosis Rat

Ji-Whan Eom, Jae-Hyun Kim, Minsun Kim, Sangwoo Kim,
Hwajeong Shin, Hyuk-Sang Jung, Youngjoo Sohn

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Objectives : Osteoporosis is a condition characterized by low bone mass and increased bone fragility. It has become a major problem of senior citizens. The purpose of this study is to experiment the effect of water extract of Forsythiae Fructus (wFF) on osteoclast differentiation; and the other purpose is to examine the effect of wFF on osteoporosis in ovariectomized rat. **Methods :** To investigate the effect of wFF on osteoclast differentiation and activity, RAW 264.7 cells were used. The number of TRAP positive cell, TRAP activity, pit area, mRNA expression of makers (RANK, TRAP, CA II, CTK, MMP-9, NFATc1, c-Fos), protein expression of makers (NFATc1, c-Fos) were investigated. For in vivo study, 40 female Sprague-Dawley (SD) rats were induced osteoporosis by ovariectomy (OVX) and then tested for anti-osteoporosis effect by administration of wFF. **Results :** wFF suppressed osteoclastogenesis, TRAP activity and pit area formation. Moreover, wFF decreased the expression of master differentiation factors (NFATc1, c-Fos) and also reduced the osteoclastogenesis-related markers (TRAP, CA II, CTK, MMP-9). These suggest that wFF inhibit osteoclasts differentiation and bone resorption. In the OVX rat model, wFF inhibited decreasing of BMD and trabecular area. **Conclusions :** Forsythiae Fructus should be effective for osteoporosis prevention and treatment.

Key words : Forsythiae Fructus, osteoporosis, osteoclastogenesis, RANKL, TRAP, ovariectomized-rat

서 론

인체에서 뼈의 역할은 인체 하중의 지탱, 기관의 보호, 조절작용 등을 수행하는 곳이며, 성인의 뼈 중에 약 10%는 매년 재형성되는 매우 역동적인 조직이다¹⁾. 조골세포와 파골세포는 뼈를 새롭게 형성하고, 오래된 것은 분해하는 동적인 대사조직으로 이 두 세포의

적절한 활성에 의해서 뼈의 재형성이 진행된다²⁾. 골다공증에 대하여 세계보건기구(WHO)은 전신성 골격계 질환으로 뼈의 미세구조의 이상과 골량의 감소가 일어나는 질환으로 정의하였다³⁾. 골다공증은 뼈의 화학적 조성에는 변화가 없고, 단위 용적당 골량이 감소하며, 골 기질(bone matrix)의 감소로 인해 골 질량(bone mass)의 전반적인 감소를 일으키는 질환이며, 무기질 조직의 감소로 인하여

Received March 21, 2019, Revised April 27, 2019, Accepted May 1, 2019

Corresponding author: Youngjoo Sohn

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26 Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Korea

Tel: +82-2-961-0327, Fax: +82-2-961-0327, E-mail: youngjoos@khu.ac.kr

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) [grant number: 2017R1A2B4010163].

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

피질골은 얇아지며 골 소주의 크기와 수량이 감소하게 한다⁴⁾. 골다공증은 대표적인 노인성 질환으로 인구의 고령화로 인하여 골다공증은 전 세계적으로 중요한 보건학적 문제로 인식되고 있어⁵⁾, 이에 대한 골다공증의 예방과 치료가 더욱 필요할 것으로 생각된다.

골다공증에 현재 상용되는 bisphosphonate 제제 치료요법은 약물 과사, 비전형적 골절 등과 같은 부작용을 동반시킬 수 있는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 한편 에스트로겐 대체 요법은 장기 복용할 시 유방의 충혈, 유방암 발병 위험성 증가와 같은 부작용을 일으킬 수 있다⁷⁾. 특히, 골다공증은 골절이 발생하기 전까지는 임상적 증상이 거의 발현되지 않아 적절한 시점에 치료개입이 어려우므로 현재의 골다공증 치료법을 보완할 수 있는 효과적인 예방, 치료법의 개발은 매우 중요하다고 생각된다. 골다공증에 대한 요인은 지금까지는 내분비, 대사 및 물리적 요인으로 보고 있다. 그러나 최근 광범위한 pro-inflammatory cytokines이 골아 세포와 파골 세포의 조절에 관여하며, 활성화된 면역 전구물질의 전환에 중요한 위험 인자로 주목받고 있다⁸⁾. 만성 염증과 노화된 면역체계는 다른 병리학적 요소들처럼 골다공증에 결정적인 병인이다⁹⁾. RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand)은 RANK를 통해 성숙한 파골세포에서 골 흡수 활성을 촉진한다. RANK가 활성화되면, TRAF6 (TNF receptor-associated factors 6)를 통해 세포에 신호를 보낸다. 이후 TRAF6는 c-Fos와 NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1)를 차례대로 자극하여, 파골세포의 골 재흡수, 활성화, 생존 및 분화를 조절한다¹⁰⁾.

한의학에서는 골의 위약한 상태를 나타내는 骨痿나 骨痺의 범주에서 골다공증과 유사한 개념을 찾아볼 수 있는데, 黃帝內經의 素問·痿論에 “腎主身之骨髓…腎氣熱則要脊不舉, 骨枯而髓減, 發爲骨痿…有所遠行勞倦, 逢大熱而渴, 渴則陽氣內伐, 內伐則熱舍於腎, 腎者, 水臟也, 今水不勝火則骨枯而髓減, 故足不任身發爲骨痿也, 故下經曰, 骨痿者, 生於大熱也¹¹⁾.”라고 하여 골량이 감소하여 발생하는 골다공증의 발병원인 및 그에 따른 임상 증상을 설명하고 있다. 골다공증에 대한 한의학적 처방의 유효성에 관한 기존의 연구를 살펴보면 안 등의 鹿茸이 골다공증에 미치는 영향¹²⁾, 주 등의 山茱萸가 골다공증에 미치는 영향¹³⁾, 최 등의 加味左歸散이 골다공증에 미치는 영향¹⁴⁾, 최의 鎖陽과 杜仲이 골다공증에 미치는 영향¹⁵⁾, 이 등의 熟地黃이 골다공증에 미치는 영향¹⁶⁾에 대한 연구 등과 같은 腎精의 회복과 관련된 약물들이 많은 연구가 진행되었다. 반면, 최근 골다공증 원인을 만성 염증과 노화된 면역체계에서 병인을 찾는 관점과는 차이가 있어 보인다.

連翹(Forsythiae Fructus)는 의성개나리 *Forsythia viridissima* Lindley 또는 연교(連翹) *Forsythia suspensa* Vahl (물푸레나무과

Oleaceae)의 열매이다¹⁷⁾. 連翹는 한의학에서 清熱解毒藥類에 속하며 清熱解毒, 消腫散結의 효능이 있어 임상에서 外感風熱, 溫病初起에 응용하고 內癰外癰, 痰核, 瘰癧를 다스리며 그 외 喉痺, 血熱發斑, 高熱煩渴, 神昏發斑, 熱淋尿閉 등의 증상에도 이용되어¹⁸⁾ 주로 염증성 질환을 치료한다. 또한, 連翹의 생리활성작용에 관한 연구로 Bao J 등은 連翹 물 추출물이 MAPKs 유도를 통한 항산화 지표를 상승시켜 그 결과 강력한 항염증 작용을 한다고 보고하였으며¹⁹⁾, You BJ 등은 連翹 물 추출물이 염증 지표인 iNOS와 COX-2의 발현을 강력하게 억제한다고 보고하였다²⁰⁾. Lim H 등은 連翹에서 추출한 phylogenin 또한 iNOS와 COX-2의 발현을 강력하게 억제한다고 보고하였다²¹⁾. 그 외 항균작용²²⁾, 혈압강화 작용²³⁾ 등의 보고가 있다. 최근, 항염증 효과²⁴⁾와 항산화 효과²⁵⁾가 파골세포 분화 억제와 관여한다는 내용의 연구가 보고되었고, 한의학 및 생리활성작용 연구에서 항염 및 항산화 효과를 증명한 連翹가 골다공증 치료에 효과를 보일 것이라고 예상하였다.

본 연구는 항염의 효능을 갖는 連翹가 골다공증 관련 기전에 미치는 영향을 알아보기 위해서 RAW 264.7 cell을 이용하여 파골세포 형성 및 활성 억제를 관찰하고, pit 형성억제를 실험하였다. 파골세포 관련 유전자인 NFATc1, c-Fos의 발현을 살펴보았다. 또한, 連翹의 골다공증 유발 동물모델에서의 영향을 탐색하기 위하여 흰쥐의 난소를 적출하여, 에스트로겐 결핍으로 인한 골다공증을 유발했다. 連翹를 투여한 후 체중의 변화 및 장기 무게의 변화를 관찰하고, 조직학적 검사를 통하여 흰쥐의 대퇴골 골 소주 면적의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

RANKL은 Peprotech (London, UK)에서 구매하였다. 세포 배지인 DMEM은 Welgene (Daejeon, Korea)에서 구매하였다. 또 다른 세포 배지인 Minimum Essential Medium alpha (alpha-MEM) 그리고 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco (Gaithersburg, USA)에서 구매하였다. Penicillin/Streptomycin은 Invitrogen (Carlsbad, USA)에서 구매하였다. Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)는 Gibco (Gaithersburg, USA)에서 구매하였다. Aqueous nonradioactive cell proliferation assay (MIS)은 Promega (Madison, USA)에서 구매하였다. Reverse transcription kit는 Invitrogen (Carlsbad, USA)에서 구매하였다. Taq polymerase는 Kapa Biosystems (Woburn, USA)에서 구매하였다. PCR primers는 Genotech

(Daejeon, Korea)에서 구매하였다. c-Fos, β -Actin은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)에서 구매하였다. 또한, NFATc1는 BD Pharmingen (San Diego, USA)에서 구매하였다. Peroxidase IgG는 Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)에서 구매하였다. Protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail, 그리고 17β -Estradiol은 Sigma Aldrich (Saint Louis, USA)에서 구매하였다.

2. 시료의 준비

본 연구에 사용된 連翹(Omniherb, Seoul, Korea)의 기원 식물은 연교(連翹) *Forsythia suspensa* Vahl (물푸레나무과 Oleaceae)의 열매이며, 경희대학교 본초학 교실의 자문을 통해 확인하였다. 連翹 350 g에 증류수 3.5 L를 첨가하여 끓여 2시간 동안 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman no.3, Maidstone, UK)로 여과한 다음 동결건조(81.7 g)하여 連翹 물 추출물(water extract of *Forsythiae Fructus*, 이하 wFF)을 얻었다. 추출률은 23.3%이며, 그 후 냉동고(-20°C)에 보관하며 실험에 사용하였다.

3. HPLC을 통한 wFF 분석

wFF의 acteoside (sigma, $\geq 99\%$, HPLC-grade) HPLC 분석을 위해 HPLC (High performance liquid chromatography; Waters Alliance 2695)-PDA (Photodiode Array; Waters 2996) detector system을 사용하였다. 분석을 위한 컬럼은 XBridgeTM C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm; Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였고, 유속은 1 ml/min로 흘려주었으며 시료 주입량은 10 μ l였다. 이동상은 acetonitrile (ACN) 과 1% acetic acid가 포함된 물(H₂O)를 사용하였으며, 검출 파장은 335 nm로 하였다.

4. RAW 264.7 세포 배양

RAW 264.7 세포는 1% P/S (penicillin/streptomycin) 및 10% FBS (fetal bovine serum)를 첨가한 DMEM을 사용하였다. 세포는 37°C, 95% 습도와 5% CO₂가 유지되는 세포 incubator (Sanyo Electric Biochemical Co., Sanyo, Oragun, Japan)에서 배양하였다.

5. 세포 독성 측정

wFF의 세포 독성 측정은 MTS assay로 실시하였다. RAW 264.7 세포를 5×10^3 cells/well의 밀도로 96-well plate에 분주하고, FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지에 wFF를 농도별로 처리하여 1 일 동안 배양했다. 배양 종료 후 세포에 20 μ l의 MTS 용액을 넣어 2시간 동안 37°C를 유지하고, 반응 종료 후 ELISA reader (Mole-

cular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 흡광도 490 nm에서 측정하였다. 세포의 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다. 대조군 대비 90% 이하의 세포 생존율을 보일시, 세포 독성이 있다고 판단하였다.

6. TRAP 염색 및 활성도 측정

RAW 264.7 세포를 파골세포로 유도하기 위하여, 10% FBS와 1% P/S가 포함된 alpha-MEM 배지를 사용하여, 5×10^3 cells/well의 밀도로 96-well plate에 분주하고, 24시간 안정화하였다. 그 후 RANKL (100 ng/ml) 및 wFF (50, 100, 200 μ g/ml)이 포함된 배지로 교환하여 5일간 배양하였다. 배지는 2일마다 동일한 배지로 교환해 주었다. 파골세포 분화가 완료되면, 배지를 제거한 후 DPBS로 세척하고 10% formalin을 통해 10분간 고정하였다. 이후, TRAP staining kit (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA)를 이용하여 TRAP 염색을 시행하였다. 염색 후 도립현미경(Olympus, CLX41SF, Japan)을 통하여 붉은색의 TRAP 양성 반응을 보이는 세포와 핵이 3개 이상인 세포를 파골세포로 인정하여, 그 수를 세어 정량 분석하였다. 세포를 배양한 배지를 원심분리(2,000 rpm, 5 min)하여 상층 액을 취했다. 그 상층 액을 새로운 96-well plate에 50 μ l씩 분주하고 동량의 TRAP solution (4.93 mg Pnpp+850 μ l 0.5 M acetate 용액+150 μ l의 tartrate 용액)을 넣어 37°C에서 1시간 반응시키고, 0.5 M의 NaOH 50 μ l로 반응을 중지시켰다. 이후 ELISA reader를 이용하여 흡광도 405 nm에서 측정하였다.

7. Pit 형성억제 측정

RAW 264.7 세포를 파골세포로 유도하기 위하여, 10% FBS와 1% P/S가 포함된 alpha-MEM 배지를 사용하여, 5×10^3 cells/well의 밀도로 osteo assay surface multiple well plate (Corning incorporated, New York, USA)에 분주하고, 24시간 안정화하였다. 그 후, RANKL (100 ng/ml) 및 wFF (50, 100, 200 μ g/ml)이 포함된 배지로 교환하여 5일간 배양하였다. 배지는 2일마다 같은 배지로 교환해 주었다. 분화 종료 후, 4% NaClO로 세포를 분해한 뒤 파골세포가 생성한 pit을 도립현미경을 촬영하고, 그 면적을 정량 분석하였다.

8. 역전사 중합 반응 분석

wFF의 파골세포 관련 유전자 발현을 측정하기 위해, 10% FBS와 1% P/S가 포함된 alpha-MEM 배지를 사용하여, 2×10^5 cells/well의 밀도로 6-well plate에 분주하고, 24시간 안정화하였다. 그 후 RANKL (100 ng/ml) 및 wFF (50, 100, 200 μ g/ml)이 포함된

배지로 교환하여 4일간 배양하였다. 배지는 2일마다 같은 배지로 교환해 주었다. 분화가 완료된 파골세포의 total RNA는 TRIzol을 이용하여 RNA를 분리하였다. Nanodrop (Thermo scientific, Pittsburgh, USA)을 사용하여 RNA의 농도를 2 μg 으로 정량한 뒤, reverse transcription kit를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 Taq polymerase를 사용하여 증폭하였다. 본 연구에 사용된 primer는 Table 1에 기재하였다. 반응을 끝마친 결과물은 SYBR green (Invitrogen, Carlsbad, USA)으로 염색한 1.2% agarose gel에서 전기영동 후 발현 정도를 확인하였다.

9. Western blot 분석

wFF의 파골세포 분화 필수 단백질 발현을 측정하기 위해, 10% FBS와 1% P/S가 포함된 alpha-MEM 배지를 사용하여, 5×10^5 cells/well의 밀도로 60 π dish에 분주하고, 24시간 안정화하였다. 그 후 RANKL (100 ng/ml) 및 wFF (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 포함된 배지로 교환하여 24시간 배양하였다. 반응이 종료된 세포에, RIPA buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail)를 사용하여 단백질을 추출하였다. 단백질은 BCA protein assay kit (Thermo scientific, Pittsburgh, USA)를 통해 정량하였다. 단백질 샘플(30 μg)은 10%의 SDS-PAGE에 전기영동하고, nitrocellulose transfer membrane (Whatman Protran, Dassel, Germany)에 흡착시켰다. 5% skim

milk를 통하여 membrane을 1시간 동안 blocking하고, 1% BSA에 녹인 1차 항체(NFATc1, c-Fos, actin)를 4°C에서 24시간 반응시켰다. 이후 blocking buffer에 1:10000로 희석한 peroxidase-conjugated anti-IgG 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST)로 10분씩 6번 세척했다. 그 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Santa Cruz, USA)을 사용하여, 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

10. 실험동물 사육 및 관리

SD-rat 12주령(240~250 g)은 나라바이오텍(Seoul, Korea)에서 구매하였으며, 규칙적인 광원 설비 및 일정한 온도와 습도가(12시간 light/dark cycle, 22~24°C, 55~60%)가 유지되는 동물실에서 사육하였다. 경희대학교 동물 실험 윤리 위원회의 가이드라인에 따라 동물 관리와 동물 실험은 수행되었다(KHUASP(SE)-15-101).

11. 난소절제술을 이용한 폐경기 골다공증 모델 제작 및 장기 무게 변화측정

동물실에서 1주일 적응 기간을 가진 SD-rat을, 아이소포란(2~2.5%)과 7:3비율의 NO₂/O₂의 흡입 마취 아래 난소 절제 수술을 진행하였고, 대조군에는 난소 절제와 같은 스트레스를 주고 다시 봉합하는 sham-operation을 진행하였다. 수술 후 감염 방지를 위해 3일 동안 gentamicine을 10 mg/kg 농도로 복강 주사하였으며, 수술 후 바로 다음 날부터 약물투여를 진행하였다. 투여군은 총 5가지로 모의 수술 군(Sham군, sham-operation), OVX군(OVX군, Ovariectomy), 양성대조군(E2군, 17 β -estradiol 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), wFF 저농도 투여군(wFF-L, 31 mg/kg), wFF 고농도 투여군(wFF-H, 310 mg/kg)이며, 군당 실험동물은 8마리로 하였다. 약물 및 양성대조군은 전부 증류수에 용해하였으며 매일 같은 시간에 1 ml씩 경구 투여하였다. Sham군과 OVX군은 증류수를 경구 투여하였다. 실험 동안 매주 2번 일정한 시간에 몸무게를 측정하였다. 실험 개시일로부터 8주가 지나 투여가 끝나고, 높은 농도의 pento-barbital sodium (80 mg/kg, 복강 투여)을 통해 희생시킨 뒤, 자궁을 적출하여 무게를 측정하였다. 또한, 양측 대퇴골을 채취하여 골 밀도와 무게도 측정하였고, 경골은 채취하여, 주위 근육을 제거한 후 완전히 건조했다. 이후 800°C의 화로에서 가열하여 완전히 연소시킨 뒤, 경골의 회분 함량을 측정하였다.

12. 대퇴골 무게 측정

투여가 끝난 후 오른쪽 대퇴골을 채취하고, 그 대퇴골을 병에

Table 1. PCR Primer Sequence

Gene	Sequence
<i>NFATc1</i>	Forward: 5'-TGC TCC TCC TCC TGC TGC TC-3' Reverse: 5'-CGT CTT CCA CCT CCA CGT CG-3'
<i>c-Fos</i>	Forward: 5'-ATG GGC TCT CCT GTC AAC AC-3' Reverse: 5'-GGC TGC CAA AAT AAA CTC CA-3'
<i>RANK</i>	Forward: 5'-AAA CCT TGG ACC AAC TGC AC-3' Reverse: 5'-ACC ATC TTC TCC TCC CHA GT-3'
<i>TRAP</i>	Forward: 5'-ACT TCC CCA GCC CTT ACT ACC G-3' Reverse: 5'-TCA GCA CAT AGC CCA CAC CG-3'
<i>CA II</i>	Forward: 5'-CTC TCA GGA CAA TGC AGT GCT GA-3' Reverse: 5'-ATC CAG GTC ACA CAT TCC AGC A-3'
<i>CTK</i>	Forward: 5'-AGG CGG CTA TAT GAC CAC TG-3' Reverse: 5'-CCG AGC CAA GAG AGC ATA TC-3'
<i>MMP-9</i>	Forward: 5'-CGA CTT TTG TGG TCT TCC CC-3' Reverse: 5'-TGA AGG TTT GGA ATC GAC CC-3'
<i>GAPDH</i>	Forward: 5'-ACT TTG TCA AGC TCA TTT CC-3' Reverse: 5'-TGC AGC GAA CTT TAT TGA TG-3'

NFATc1 : nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1, RANK : receptor activator of the nuclear factor kappa B, TRAP : tartrate-resistant acid phosphatase, CA II : carbonic anhydrase II, CTK : cathepsin K, MMP-9 : matrix metalloproteinase-9.

넣은 후 증류수를 가득 채워주었다. 90분 동안 감압을 진행하여 대퇴골 내부의 공기를 제거했다. 내부 공기가 완벽하게 제거된 대퇴골을 꺼내서 거즈를 사용하여 닦아내고, 무게를 측정한 뒤 새로운 증류수가 담겨있는 병에 넣은 뒤 물속에서의 무게를 측정했다. 이후 측정된 두 개의 무게를 아르키메데스 원리²⁶⁾ (g/cm^3 bone volume)를 통해 계산하였다.

13. 폐경기 골다공증 흰쥐 대퇴골의 조직학적 검사

투여가 끝난 후 왼쪽 대퇴골을 10% neutral buffered formalin (NBF)에 2일 동안 고정하였고, 10% ethylene diamine tetraacetate (EDTA)를 사용하여 3주 동안 탈회를 진행하였다. 탈회가 끝난 후에는 파라핀 포매를 진행하였고, 포매된 조직은 microtome을 이용하여 $5\ \mu\text{m}$ 의 두께로 절편 했다. 이후 조직학적 검사를 위해, 탈파라핀, 탈수를 진행한 뒤 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 진행하여 투여 후의 조직학적인 차이를 확인하였다. 모든 조직은 광학현미경(Olympus BX51, Japan)을 이용하여 100배의 비율에서 촬영하였다. 골 소주의 면적은 대퇴골의 몸 쪽에서 성장판 아래 가로면의 길이가 성장판 길이의 2/3가 되는 부위를 capture 하여 이미지 분석 프로그램(Image J, Ver. 1.46, National Institutes of Health)을 사용하여 측정하였다.

14. 통계분석

본 연구의 자료는 3번 이상 반복 수행하였고, 그 평균값과 표준편차를 계산하였다. Graph Pad PRISM Software (Version 5.01, Graphpad Software Inc, San Diego, USA)를 이용하여 그래프를 나타내었고, 각 군 간의 평균치와 표준오차 사이에 대한 유의성은 One-way ANOVA로 분석하고 Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 각 군의 평균 간의 유의성을 검정하였다. $p < 0.05$ 인 경우 유의성을 표기하였다.

결 과

1. wFF의 품질 평가

Acteoside는 wFF의 표준물질이다²⁷⁾. wFF 내 acteoside의 동정은 표준품과 비교하여 18분대 peak로 확인하였으며, 각 peak의 PDA 스캔을 통해 표준품의 스펙트럼과 비교하여 최종적으로 acteoside임을 확인하였다(Fig. 1A, 2B).

2. wFF가 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향

MTS assay를 통하여 세포 생존율을 측정한 결과, wFF 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Fig. 1. HPLC Chromatograms of the (A) wFF and (B) Acteoside. (C) Effect of wFF on RAW 264.7 cell viability was measured using MTS assay. (D) Forsythiae Fructus, the dry fruit of Forsythia suspensa Vahl. Columns and error bars represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

농도에서 독성을 보이는 것이 확인되었으며(83.4%), 파골세포 억제 실험은 독성을 보이지 않는 농도인 250 $\mu\text{g/ml}$ 이내로 진행되었다(Fig. 1C).

3. wFF가 파골세포 형성, 활성 및 pit 형성에 미치는 효능

wFF의 파골세포 억제효능을 TRAP 염색과 활성도 측정을 통하여 확인하였다. RANKL을 통하여 파골세포를 유도하면서 wFF를 처리한 결과, wFF 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군보다 TRAP-양성 다핵 세포 수가(44.4%) 감소하였고(Fig. 2A, 2C), TRAP 활성도를 측정한 결과 wFF 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군보다 TRAP 활성도가(44.8%) 감소하였다(Fig. 2D). 파골세포의 주요 능력인 뼈 흡수능 억제를 측정하기 위하여 pit formation assay를 진행하였다. wFF를 처리한 결과, wFF 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군보다 pit 형성이(14.7%) 억제되었다(Fig. 2B, 2E).

4. wFF의 파골세포 기능에 필요한 유전자 발현 억제에 미치는 효능

wFF가 RAW 264.7 세포에 RANKL로 유도한 파골세포의 분화 및 기능에 필요한 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 파골 세포 분화에 필요한 RANK의 발현은 대조군이 정상군보다 증가하였지만 유의하지는 않았으며, wFF 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군보다 유의하게($p<0.05$) 억제되었다. 파골세포의 특이표인인 TRAP의 발현은 대조군이 정상군보다 유의하게($p<0.01$) 증가하였으며, wFF 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군보다 유의하게($p<0.05$, $p<0.01$) 억제되었다. 또한, 파골세포 골 흡수 능에 필요한 CA II의 발현은 대조군이 정상군보다 유의하게($p<0.01$) 증가하였으며, wFF 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군보다 유의하게($p<0.01$) 억제되었다. 그리고 파골세포의 골 흡수에 필요한 CTK의 발현은 대조군이 정상군보다 유의하게($p<0.05$) 증가하였으며, wFF 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군보다 유의하게($p<0.05$) 억제되었다. 또한, 파골세포 골 흡수 능에 필요한 MMP-9의 발현은 대조군이

Fig. 2. Inhibitory effect of RANKL-induced osteoclastogenesis and pit formation by wFF in RAW 264.7 cells. (A) TRAP-positive cells and (B) pit area formed by osteoclasts were captured with inverted microscope. (C) Number of osteoclast was counted using Image J. (D) The cultured supernatant was measured for TRAP activity. (E) Pit area was measured using Image J. Columns and error bars represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ^{##} $p<0.01$ compared with normal and ^{**} $p<0.01$, ^{*} $p<0.05$ compared with control.

정상군보다 유의하게($p<0.01$) 증가하였으며, wFF 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군보다 유의하게($p<0.05$) 억제되었다(Fig. 3).

5. wFF의 NFATc1, c-Fos 유전자 및 단백질 발현 억제에 미치는 효능

wFF가 RAW 264.7 세포에 RANKL로 유도한 파골세포의 필수 지표인 NFATc1 그리고 c-Fos의 유전자 및 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 파골세포 분화에 있어 핵심전사인자인 NFATc1의 유전자 발현은 대조군이 정상군보다 유의하게($p<0.01$) 증가하였으며, wFF 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군보다 유의하게

($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 4A). 또한, 단백질 발현은 대조군이 정상군보다 유의하게($p<0.01$) 증가하였으며, wFF 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군보다 유의하게($p<0.05$, $p<0.01$) 억제되었다(Fig. 4C). NFATc1 발현 조절 상위 인자인 c-Fos의 유전자 발현은 대조군이 정상군보다 유의하게($p<0.01$) 증가하였으며, wFF 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군보다 유의하게($p<0.01$) 억제되었다(Fig. 4B). 또한, 단백질 발현은 대조군이 정상군보다 유의하게($p<0.01$) 증가하였으며, wFF 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군보다 유의하게($p<0.05$, $p<0.01$) 억제되었다(Fig. 4D).

Fig. 3. Inhibitory effect of wFF on the activation of osteoclastogenesis-related genes in RAW 264.7 cells.

(A) Expression of osteoclastogenesis-related genes were measured by RT-PCR. (B) The genes were measured using Image J software and has normalized to GAPDH. Columns and error bars represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ## $p<0.01$, # $p<0.05$ compared with normal and ** $p<0.01$, * $p<0.05$ compared with control.

Fig. 4. Inhibitory effect of wFF on the activation of NFATc1 and c-Fos in RAW 264.7 cells.

(A, B) Expression of NFATc1 and c-Fos genes were measured by RT-PCR, and (C, D) expression of NFATc1 and c-Fos protein were measured by western blot. NFATc1 and c-Fos were measured using Image J software and has normalized to house keeping genes. Columns and error bars represent the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. ^{##} $p < 0.01$ compared with normal and ^{**} $p < 0.01$, ^{*} $p < 0.05$ compared with control.

6. wFF의 동물 몸무게 및 장기 무게에 미치는 효과

난소적출을 통해 유사폐경기 모델이 완성되면, 자궁은 수축하여 무게가 감소하고, 몸무게가 증가하게 된다. 본 실험에서는 몸무게 및 자궁의 무게 측정을 통한 폐경기 유사 모델의 유발 여부를 판단하였다²⁸⁾. 난소적출 후 매주 같은 시각 몸무게를 측정한 결과, OVX 이후 2주부터 OVX군은 sham군보다 몸무게가 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 양성대조군(E₂)은 3주부터 OVX군에 비하여 몸무게의 증가가 유의하게($p < 0.05$) 억제되었다. wFF 저농도 군에서는 OVX군에 비해 몸무게 증가가 억제되었지만 유의하지 않았고, wFF 고농도 군에서는 6주부터 OVX 보다 몸무게의 증가가($p < 0.05$) 억제되었다(Fig. 5A). 또한, 자궁의 무게는 rat 희생 후 OVX군은 sham군보다 유의하게 자궁의 무게가 감소하였으며($p < 0.01$), E₂군은 OVX군에 비해 자궁 무게 감소가 유의하게($p < 0.01$) 억제되었다. 하지만 wFF 투약 군은 OVX군에 비하여 자궁 무게 감소에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 5B).

투여 종료 후, 좌측 대퇴골을 아르키메데스 원리를 이용해 BMD (Bone Mineral Density)를 측정하였다. OVX군은 sham군보다 BMD가 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). 그리고 E₂군은 OVX군에

비하여 BMD 감소가 억제되었지만 유의하지 않았고, wFF 고농도 군에서는 OVX군보다 BMD 감소가 유의하게($p < 0.05$) 억제되었다(Fig. 5C). 또한, 양측 대퇴골의 무게를 측정하였을 때, OVX군은 sham군보다 양측 대퇴골의 무게가 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). E₂군은 OVX군보다 양측 대퇴골의 무게 감소가 유의하게($p < 0.01$) 억제되었다. 또한, wFF 저농도 군에서는 OVX군보다 양측 대퇴골의 무게 감소가 유의하게($p < 0.01$) 억제되었고, wFF 고농도 군에서는 OVX군보다 양측 대퇴골의 무게 감소가 유의하게($p < 0.05$) 억제되었다(Fig. 5D). 그리고 추출된 경골의 회분 함량을 측정하였을 때, OVX군은 sham군보다 경골의 회분 함량이 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). E₂군은 OVX군에 비해 경골의 회분 함량의 감소가 유의하게($p < 0.01$) 억제되었다. 또한, wFF 투약 군은 OVX군보다 경골의 회분 함량의 감소가 유의하게($p < 0.05$) 억제되었다(Fig. 5E).

7. wFF의 대퇴골 골 소주 면적에 미치는 효과

조직학적 염색(H&E)를 통하여 wFF가 폐경기를 통한 rat의 대퇴골 골 소주 면적 감소에 미치는 영향에 관하여 연구하였다. 대퇴골의 면적은 폐경으로 인한 에스트로겐 결핍으로 OVX군은 sham군

Fig. 5. In vivo effect of wFF on OVX-induced osteoporosis rat-model.

(A) SD-rat of weekly body weight, the rats were sacrificed after weighted (B) uterus, (C) bone mineral density, (D) both side femur and (E) tibia ash. Columns and error bars represent the mean ± SEM of three independent experiments. ## p < 0.01 compared with Sham and ** p < 0.01, * p < 0.05 compared with OVX.

Fig. 6. Histological changes in post-menopausal osteoporosis rat-model.

(A) H&E staining of one representative femur from each group and captured with light microscope. Scale bars are 200 μm. (B) Trabecular area was measured using Image J software. Columns and error bars represent the mean ± SEM of three independent experiments ## p < 0.01 compared with Sham and ** p < 0.01, * p < 0.05 compared with OVX.

보다 유의하게(p < 0.01) 감소되었고, E₂군은 OVX군보다 골 소주 면적의 감소를 유의하게(p < 0.01) 억제되었다. wFF 저농도군에서는 OVX군보다 골 소주 면적의 감소를 유의하게(p < 0.05) 억제되었지만, wFF 고농도 군에서는 OVX군보다 골 소주 면적의 감소를 억제되는 경향을 보였지만 유의하지 않았다(Fig. 6).

고 찰

골다공증은 골의 화학적 구성에 변화는 없이 골량이 감소하는

상태로 골의 무기질과 단백질이 줄어드는 병적 현상이다. 골다공증의 원인에 대해서는 명확히 알려진 것은 없으나 최근에는 만성면역성 질환이나 염증성 질환에서 그 원인을 찾고 있다. 본 연구는 連翹물 추출물(wFF)이 파골세포 분화와 골다공증 동물모델에서의 실험과 연구를 한 것이다. 세포실험 방법으로는 먼저 RAW 264.7 cell을 이용하여 세포 생존율을 측정하였는데 모든 농도에서 세포 생존율에 영향이 없었다. 골다공증은 파골세포의 활성도와 매우 밀접한 관련성을 갖고 있는데, 파골세포는 다핵 세포로 TRAP이라는 효소를 생산한다²⁹⁾. 본 실험에서는 wFF군의 파골세포 억제효능을 TRAP 염색과 활성도 측정을 통하여 확인하였다. 실험 결과, wFF

는 파골세포 내 TRAP의 발현과 활성을 억제했다. Pit area는 파골 세포의 생성과 골 흡수 활성도와 관련이 있어 파골 세포 뼈 흡수능 력을 측정하기 위해서 관찰하는 실험이다³⁰⁾. 즉, pit area의 증가는 파골세포의 활성화를 뜻한다. 본 실험 결과 wFF는 농도에서 대조 군보다 pit 형성이 억제되었다. 이는 wFF가 파골세포의 분화 및 뼈 흡수 활성화를 억제한다는 것을 나타낸다.

RANK는 파골세포의 분화과정에 핵심적인 역할을 하는 신호 수 용기이다³¹⁾. RANK 수용체에 RANKL이 결합하면 파골세포를 형성 하고 골의 재흡수 과정을 촉진한다³²⁾. 실험 결과, 대조군이 정상군 보다 증가하였지만 유의하지는 않았고, wFF 처리는 대조군과 비교 하여 유의한 감소를 나타내었다. 이는 wFF가 파골세포의 성숙을 억제하는 것을 나타낸다. CA II는 파골세포가 골 흡수를 위해 부착 된 골 표면을 산성화하기 위해 발현되는 물질로, CA II의 활성화는 골의 재흡수에 중요하게 작용한다³³⁾. CTK와 MMP-9은 파골세포 의 분화과정에 관여하며, 파골세포의 전구체와 골의 재흡수에 중요 한 역할을 한다. MMP-9를 화학적으로 억제하면 파골세포의 분화 가 저하되어 골의 재흡수가 줄어든다^{34,35)}. 실험 결과, 골 흡수와 관련한 지표인 CAII, CTK 그리고 MMP-9은 대조군이 정상군보다 유의하게 증가하였으며, wFF가 발현을 억제했다. 이는 wFF가 파 골세포 분화 및 골 흡수 기능을 유의하게 억제한다는 것을 나타낸다.

NFATc1은 NFAT 계열 중 하나로, RANKL을 통한 파골세포의 분화에 중요한 역할을 한다³⁶⁾. TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)와 c-Fos에 의존하여 발현된다³⁷⁾. c-Fos는 파골세포 분 화 초기에 발현되는 전사인자로, c-Fos의 발현이 결핍되면 파골세 포의 분화가 억제된다. 실험 결과, wFF는 NFATc1과 c-Fos의 유전 자 및 단백질 발현을 유의하게 억제했다. 이는, wFF가 NFATc1과 c-Fos의 발현 억제를 통해 파골세포의 활동을 억제하는 것으로 나 타낸다.

난소적출 흰쥐 모델은 폐경기 이후 골 조직 감소와 관련된 문제 를 연구하는데 적합한 모델이다³⁸⁾. 따라서 wFF의 골다공증에 대한 억제 효과를 관찰하기 위해, 난소를 적출한 흰쥐를 골다공증 유발 동물모델로 선정하고, wFF를 투여한 후 그 효과를 관찰하였다. BMD는 뼈의 단단함과 질을 나타내는 지표로써, 골다공증이 유발 되면 감소하게 된다. 본 실험에서, 난소적출을 통한 골다공증을 유 도한 결과, 대퇴골 내 BMD는 OVX군이 sham군과 비교하여 유의 하게 감소했다. wFF의 투여는 OVX를 통한 골밀도 감소를 유의하 게 억제했다. 또한, 양측 대퇴골의 무게 및 회분 함량의 감소를 유 의하게 억제했다. 또한, 대퇴골 조직 내 골소주 면적을 측정한 결과, OVX군이 sham군과 비교하면 유의하게 감소하였고, E₂군과 wFF 저농도 군은 OVX군에 비해 골 소주 면적의 감소를 유의하게 억제

하였고, wFF 고농도 군에서는 OVX군에 비해 골 소주 면적의 감소를 억제하는 경향을 나타내었다. 이는, wFF는 난소적출을 통한 골 다공증의 골밀도 감소를 유의하게 억제한다는 것을 의미한다.

결론

본 연구는 連翹 물 추출물(wFF)의 파골세포 분화 및 골다공증 동물모델에 미치는 영향을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포와 난소 적출 흰쥐 모델을 사용한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. wFF는 RANKL로 유도된 TRAP-positive cell의 형성 및 TRAP activity를 유의하게 감소시켰고 이는 wFF가 파골세포 분화 를 억제함을 의미한다.

2. wFF는 RANKL로 유도된 파골세포에 의해 생성된 Pit area를 유의하게 감소시켰고 이는 wFF가 파골세포의 골 흡수 능을 억제함 을 의미한다.

3. wFF는 RANKL로 유도된 파골세포 분화 관련 TRAP, CA II, CTK, MMP-9 유전자의 발현을 억제함은 물론, 파골세포 분화 필 수 전사인자인 NFATc1과 c-Fos의 유전자 및 단백질 발현을 감소 시켰다. 이는 wFF의 파골세포 분화 및 골 흡수능 억제가 파골세포 필수 인자인 NFATc1의 발현 억제에 매개 된다는 것을 의미한다.

4. wFF는 난소적출로 유도된 흰쥐 모델에서 BMD의 감소와 대 퇴골 무게의 감소, 경골 회분의 감소를 유의하게 억제하였다. 또한, 골 소주 면적의 감소를 유의하게 억제하였다. 이는 wFF가 폐경기 골다공증 동물모델의 주요 병증을 억제함을 의미한다.

이상의 결과로, wFF는 파골세포 분화 및 골 흡수 관련 유전자의 발현을 억제하였고, 난소적출 흰쥐의 대퇴골 무게 감소 및 골 소주 면적 감소를 억제하였다. 이는 서론에서 언급한 항염증 효과를 가 지는 한약이 골다공증 치료에 효과를 보일 수 있다는 가설을 입증 한 것으로, wFF는 임상에서 골다공증의 치료 및 예방에 응용될 수 있을 것으로 생각된다. 향후, wFF의 항염효과와 골다공증 유발 억 제 효과 간의 연관성에 관한 심화 연구 및 염증성 골다공증 모델에 서 wFF의 항 골다공증 효과 검증은 연구적 가치가 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea

government (MSIT) [grant number: 2017R1A2B4010163].

References

1. Alliston T, Derynck R. Interfering with bone remodelling. *Nature*. 2002 ; 416(6882) : 686-7. <https://doi.org/10.1038/416686a>
2. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 2000 ; 289(5484) : 1501-4. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1501>
3. Consensus A. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*. 1993 ; 94(6) : 646-50. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(93\)90218-E](https://doi.org/10.1016/0002-9343(93)90218-E)
4. Sözen T, Öz ı ş ı k L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol*. 2017 ; 4(1) : 46-56. <https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2016.048>
5. Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int*. 1992 ; 2 : 285-9. <https://doi.org/10.1007/BF01623184>
6. Kennel KA and Drake MT. Adverse Effects of Bisphosphonates: Implications for Osteoporosis Management. *Mayo Clin Proc*. 2009 ; 84(7) : 632-8. <https://doi.org/10.4065/84.7.632>
7. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 1995 ; 332 : 1589-93. <https://doi.org/10.1056/NEJM199506153322401>
8. Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature*. 2000 ; 408 : 535-6. <https://doi.org/10.1038/35046196>
9. Lorenzo J. Interactions between immune and bone cells: new insights with many remaining questions. *J Clin Invest*. 2000 ; 106 : 749-52. <https://doi.org/10.1172/JCI11089>
10. Ginaldi L, Di Benedetto MC, De Martinis M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun Ageing*. 2005 ; 2(1) : 14. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-2-14>
11. Bae BC, The yellow emperor's classic. Seoul: Seongbosa 1994 ; 292-5, 383-7.
12. Shim SD, Ahn DK. Effects of the Cerbi Cornu on the Aged Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis. *Kor. J. Herbology*. 1998 ; 13(1) : 1-23.
13. Joo SJ, Park JH, Seo B. Effects of Korean Corni Fructus On treatment of Osteoporosis In Ovariectomized Rats. *Kor. J. Herbology*. 2007 ; 22(2) : 83-95.
14. Choi JK, Yoo DY. The effect of Kamijoaguem on Osteoporosis Induced by Ovariectomy in Rats, *J Orient Obstet Gynecol*. 2006 ; 19(2) : 107-26.
15. Choi HS. The Efficacy of Cynomorii Herba and Eucommiae Cortex on Treatment of Osteoporosis in Ovariectomized Rats. *Kor. J. Herbology*. 2008 ; 23(2) : 19-24.
16. Lee JA, Yang SJ, Cho SH, Jin CS, Ban HR. Effects of the rehmanniae radix preparat on osteoporotic rats induced by ovariectomy. *J Orient Obstet Gynecol*. 2004 ; 17(4) : 112-24.
17. Ministry of Food and Drug Safety. Korean Pharmacopoeia appendix #2. 2019 ; 11 : 72-3.
18. Lee JM, Choi SW, Cho SH, Rhee SJ. Effect of Forsythia Viridissima Extracts on Antioxidative System and Lipid Peroxidation of Liver in Rats Fed High-Cholesterol Diet. *J Nutr Health*. 2003 ; 36(10) : 990-6.
19. Bao J, Ding R, Zou L, Zhang C, Wang K, Liu F, et al. Forsythiae Fructus Inhibits B16 Melanoma Growth Involving MAPKs/Nrf2/HO-1 Mediated Anti-Oxidation and Anti-Inflammation. *Am J Chin Med*. 2016 ; 44(5) : 1043-61. <https://doi.org/10.1142/S0192415X16500580>
20. You BJ, Kim HT. Effect of Forsythiae Fructus Extract on the Release of Inflammatory Mediator induced by Lipopolysaccharide in RAW 264.7 Macrophage. *J Physiol & Pathol Korean Med*. 2007 ; 21(3) : 765-70.
21. Lim H, Lee JG, Lee SH, Kim YS, Kim HP. Anti-inflammatory activity of phylligenin, a lignan from the fruits of Forsythia koreana, and its cellular mechanism of action. *J Ethnopharmacol*. 2008 ; 118(1) : 113-7. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.03.016>
22. Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich D, Rios JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci*. 2002 ; 70(9) : 1023-33. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01482-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01482-5)
23. Lee EB, Keum HJ. Pharmacological studies on Forsythiae Fructus. *Kor J Pharmacogn*. 1998 ; 19(4) : 262-9.
24. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest*. 2011 ; 41(12) : 1361-6.

- <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02545.x>
25. Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2017 ; 14(2) : 209-16. <https://doi.org/10.11138/ccmbm/2017.14.1.209>
 26. Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, et al. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr.* 1996 ; 126 : 161-7. <https://doi.org/10.1093/jn/126.1.161>
 27. Dong Z, Lu X, Tong X, Dong Y, Tang L, Liu M. Forsythiae Fructus: A Review on its Phytochemistry, Quality Control, Pharmacology and Pharmacokinetics. *Molecules.* 2017 ; 22(9). <https://doi.org/10.3390/molecules22091466>
 28. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 ; 96(14) : 8156-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8156>
 29. Kirstein B, Chambers TJ, Fuller K. Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior. *J Cell Biochem.* 2006 ; 98(5) : 1085-94. <https://doi.org/10.1002/jcb.20835>
 30. Kim SN, Kim MH, Kim YS, Ryu SY, Min YK, Kim SH. Inhibitory effect of (-)-saucerneol on osteoclast differentiation and bone pit formation. *Phytother Res.* 2009 ; 23(2) : 185-91. <https://doi.org/10.1002/ptr.2581>
 31. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 ; 96(7) : 3540-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3540>
 32. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclast. *Science.* 2000 ; 289(5484) : 1504-8. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1504>
 33. Karhukorpi EK. Carbonic anhydrase II in rat acid secreting cells: comparison of osteoclasts with gastric parietal cells and kidney intercalated cells. *Acta Histochem.* 1991 ; 90(1) : 11-20. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(11\)80151-0](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(11)80151-0)
 34. Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, et al. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem.* 1996 ; 271(21) : 12511-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12511>
 35. Blavier L, Delaisse JM. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *J Cell Sci.* 1995 ; 108(12) : 3649-59.
 36. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 2003 ; 17(18) : 2205-32. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703>
 37. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell.* 2002 ; 3(6) : 889-901. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00369-6](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00369-6)
 38. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991 ; 15(3) : 175-191. [https://doi.org/10.1016/0169-6009\(91\)90124-I](https://doi.org/10.1016/0169-6009(91)90124-I)