진교의 파골세포 분화 및 골 흡수 유전자 억제기전 연구

양규진^{ID} · 김재현^{ID} · 김민선^{ID} · 류광현^{ID} · 문진호^{ID} · 이혜인^{ID} · 정혁상^{ID} · 손영주^{ID}

경희대학교 한의과대학 해부학교실

Gentianae Macrophyllae Radix Water Extract Inhibits RANKL-Induced Osteoclastogenesis and Osteoclast Specific Genes

Kyujin Yang, Jae Hyun Kim, Minsun Kim, Gwang-hyun Ryu, Jin-Ho Moon, Hye-In Lee, Hyuk-Sang Jung, Youngjoo Sohn

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

Objectives : Osteoporosis is the most common bone disease and osteoporosis fracture is the leading cause of decreased life. Bisphosphonate and selective estrogen receptor modulators are the best choice of treatment for osteoporosis. However, when used for a long time, they increase the probability of side effect such as osteonecrosis of the jaw. Thus, it is crucial to develop alternative medicine to treat osteoporosis. *Gentianae Macrophyllae Radix*, a herbal medicine, is mainly to treat rheumatoid arthritis. However, the effect of the water extract of *Gentianae Macrophyllae Radix* (w-GM) on osteoporosis has not been investigated. Thus, we examine whether w-GM can inhibit osteoclast differentiation and bone resorption on receptor activator of nuclear factor kappa-B (NF- κ B) ligand (RANKL)-treated RAW 264.7 cells. In this study, RAW 264.7 cells were used as an osteoclast differentiation model by treating them with RANKL. **Methods :** RAW 264.7 cells were used to determine the effect of w-GM on osteoclast differentiation and bone resorption. The number of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive cells, TRAP activity and pit formation assay were examined. In addition, protein expressions were measured by western blot and mRNA expressions were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction. **Results :** Treatment with w-GM inhibited the number of TRAP-positive cells, TRAP activity and pit area. In addition, w-GM decreased protein expression such as mitogen-activated protein kinase, NF- κ B, c-Fos and nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1). It also inhibited the mRNA levels such as c-Fos, NFATc1, TRAP, NF- κ B, calcitonin receptor and cathepsin K in RANKL-treated RAW 264.7 cells. **Conclusions :** These results suggest that w-GM has inhibitory effects via osteoclast differentiation, thus it could be a new medication for osteoporosis.

Key words : *Gentianae Macrophyllae Radix*, osteoclast, RAW 264.7 cells, NFATc1, c-Fos

서론

골 재형성(bone remodeling)은 뼈를 흡수하는 파골세포와 뼈

를 생성하는 조골세포의 적절한 활성으로 진행된다. 골다공증은 “골밀도가 낮아지고 뼈 조직이 미세하게 약화되어 골절의 위험성이 높아지는 전신성 골격 질환”이다¹⁾. 전 세계적으로 2억 명 이상

Received February 10, 2020, Revised May 13, 2020, Accepted May 15, 2020

Corresponding author: **Youngjoo Sohn**

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26 Kyungheedaero-ro, Dodaemun-gu, Seoul 02447, Korea
Tel: +82-2-961-0327, Fax: +82-2-961-0327, E-mail: youngjoos@khu.ac.kr

© 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.

의 환자들이 앓고 있는 질환이며, 1천만 명의 미국인들이 골다공증을 앓고 있고, 3,400만 명이 골다공증 위험군에 속하며, 이로 인한 삶의 질 저하는 심각한 문제이다². 골다공증의 주요 발생 원인은 노화, 에스트로겐 결핍 등이 가장 일반적으로 알려져 있다^{3,4}. 특히 폐경기 이후에는 에스트로겐이 결핍되어 파골세포의 과도한 활성으로 골 흡수가 가속화되는데, 이는 골다공증의 주요 원인이라고 알려져 있다⁵. 최근, 골의 신진대사에 관한 이해가 늘어남에 따라 뼈에 영향을 미치는 여러 요인에 대한 인식이 높아졌고, 염증성 장 질환, 만성 폐색성 폐질환, 심혈관 질환 등의 만성 염증성 질환이 골다공증과 관련 있다고 밝혀졌다⁶. 또한, 전 세계적으로 고령화가 급속히 진행되고 있어⁷, 골다공증 예방 및 치료는 중요한 것으로 생각된다.

현재 일반적인 골다공증의 대표적인 치료제는 bisphosphonates와 selective estrogen receptor modulators이다^{8,9}. 골다공증 치료제 사용 시, 골다공증 성 골절 위험을 30~50% 감소시키는 것으로 밝혀졌다¹⁰. 하지만, 하악골 괴사, 유방암 그리고 안면홍조 등과 같은 부작용 위험이 커지고 있다¹¹. 이에 따라, 부작용이 적고 안전한 치료제 개발은 필요한 실정이다.

파골세포는 조혈모세포에서 유래되는 다핵세포이다. 파골세포 분화는 receptor activator of NF- κ B (RANK) ligand (RANKL)에 의해 조절된다¹². RANKL은 RANK와 결합하여 파골세포 분화에 필수적인 nuclear factor (NF)- κ B와 mitogen-activated protein kinase (MAPK), c-Fos 그리고 nuclear factor of activated T-cells (NFATc1)를 차례대로 자극하여, 파골세포의 골 재흡수, 활성화 및 분화를 유도한다^{13,14}.

秦艽 (*Gentianae Macrophyllae Radix*)는 용담과(龍膽科, Gentianaceae)에 속하는 진교(*Gentiana macrophylla* Pall.)와 마화진교(*G. straminea* Maxim), 조경진교(*G. crassicaulis* Duthie ex Burk.), 소진교(*G. dahurica* Fisch.)의 뿌리로써, 진규, 진조, 좌진구 등의 이명으로도 불린다. 성분으로는 gentiopicroside, gentianine, gentianidine 그리고 gentianin C 등의 alkaloid와 당류 등을 함유하고 있다. 진교의 주된 효능은 祛風濕, 止痺痛, 清虛熱, 清濕熱 등이며, 따라서 風濕痺痛, 筋脈拘攣, 骨節酸痛, 日晡潮熱, 小兒疳積發熱 등 치료에 적용된다¹⁵.

이전 연구에 따르면, 진교는 류마티스 관절염 억제효과와 염증성 사이토카인에 대한 억제 효과가 밝혀졌다^{16,17}. 특히 진교의 주요 성분인 gentiopicroside는 항염증 및 간 보호 작용 등 다양한 효과가 밝혀졌다¹⁸. gentiopicroside는 nitric oxide 그리고 cyclooxygenase-2 등의 염증성 사이토카인 및 염증 매개체의 생성을 억제함으로써 염증 반응과 관련한 신호 전달 경로를 억제했

고¹⁹, gentiopicroside은 관절 연골 세포에서 염증반응으로 나타난 interleukin-1 β 를 억제하는 것으로 밝혀졌다²⁰. 최근, 염증성 사이토카인의 발현이 파골세포, 조골세포 그리고 골다공증 발병에 기여한다는 결과가 밝혀졌다²¹. 진교와 그 성분인 gentiopicroside의 항염증 효과는 염증성 사이토카인으로 유발된 파골세포 분화 및 관련 유전자 발현에 적용 가능할 것으로 사료된다.

진교는 항염증 효과를 보였지만, 골다공증에 대한 진교의 효과는 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구는 清虛熱, 清濕熱 등의 효능을 지닌 진교가 골다공증에 있어 주요 발병 원인인 과도한 파골세포의 분화 억제에 효과가 있을 것이라 생각되어 진행하였고, 유의미한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

RANKL은 Peprotech (London, UK)에서 구매하였으며, 세포 배지인 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)은 Welgene (Daejeon, Korea)의 제품을 사용하였다. 그 외의 세포 배지인 α -minimum essential medium (α -MEM)과 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), fetal bovine serum (FBS) 그리고 penicillin/streptomycin (P/S)은 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)에서 구매하였다. CellTiter 96[®] aqueous one solution cell proliferation assay (MTS)는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구매하였다. Reverse transcription polymerase chain reaction primer는 Genotech (Daejeon, Korea)의 제품을 사용하였다. Bicinchoninic acid solution, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) Kit, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail 그리고 gentiopicroside는 Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI, USA)에서 구매하였다. c-Fos 그리고 β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)의 제품을 사용하였다. Osteo assay surface multiple well plate는 Corning Inc (New York, NY, USA)의 제품을 이용하였다. p-extracellular-signal-regulated kinase (ERK), p-c-Jun N-terminal kinase (JNK), p-p38, T-ERK, T-JNK, T-p38은 Cell signalling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구매하였으며, NFATc1는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)의 제품을 이용하였다. Super-script II reverse transcriptase kit는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)의 제품을 사용하였으며, Taq polymerase는 Kapa Biosystems (Woburn, MA, USA)에서 구매하였다. Peroxidase IgG

secondary antibody는 Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)에서 구매하였다.

2. 진교 물 추출물의 제조

중국 섬서에서 채취된 소진교(Omniherb, Seoul, Korea) 300 g에 증류수 3 L을 첨가하여 2시간 동안 열수 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman no.3, Maidstone, UK)로 여과한 후 동결건조하여 진교 물 추출물(water extract of *Gentianae Macrophyllae Radix*, 이하 w-GM)의 최종 파우더(94.4 g)를 얻었다. 최종 수득율은 31.5%였다. 그 후 냉동고(-20°C)에 보관하여 사용하였으며, 세포 실험에는 pore size 0.22 mm 필터를 이용하여 멸균 사용하였다.

3. High-performance liquid chromatography 분석

w-GM의 주요 성분인 gentiopicroside를 분석하기 위해 high performance liquid chromatography ; Waters Alliance 2695-Photodiode Array ; Waters2996 detector system을 이용하였다. 분석을 위한 칼럼은 XBridge™ C18 (5 mm×250 mm; Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고, 유속은 0.8 ml/min로 흘려주었으며 시료 주입량은 10 µl였다. 이동상은 acetonitrile (ACN)과 1% acetic acid가 포함된 물(H₂O)을 사용하였으며, chromatogram의 검출 파장은 254 nm로 하였다.

4. RAW 264.7 세포 배양

RAW 264.7 세포는 1% P/S 및 10% FBS를 첨가한 DMEM를 사용하였다. 세포는 세포 incubator (Sanyo, Oragun, Japan)에서 배양하였으며, 37°C에서 95% 습도와 5% CO₂를 유지하였다.

5. 세포 독성 측정

w-GM의 세포 독성은 RAW 264.7 세포에 MTS assay를 실시하여 측정하였다. 5×10³ cells/well의 밀도가 되도록 96-well plate에 분주하였다. 그 후 FBS와 P/S를 포함하지 않은 DMEM 배지에 w-GM을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 세포에 20 µl의 MTS 용액을 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 유지하였다. 반응 종료 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

6. TRAP 염색 및 활성화도 측정

RAW 264.7 세포를 파골세포로 유도하기 위해 10% FBS와 1%

P/S를 첨가한 α-MEM 배지를 사용하였다. 5×10³ cells/well의 밀도로 96-well plate에 분주하고, 24시간 배양한 후, RANKL (100 ng/ml)과 w-GM (62.5, 125, 250 µg/ml)이 포함된 배지로 교환하여 5일간 배양하였다. 배지는 2일 마다 동일한 배지로 교환하였으며, 파골세포 분화가 완료된 뒤에는 세포를 배양한 배지를 2,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 이후 분화된 세포는 DPBS로 수세하고, 10% formalin으로 세포를 10분간 고정하였다. 증류수로 세척한 뒤, TRAP staining kit을 사용하여 TRAP 염색을 시행하였다. 도립현미경(Olympus, CLX41SF, Japan)을 이용하여 붉은색의 TRAP 양성 반응을 보이는 세포와 핵이 3개 이상인 세포를 파골세포로 설정하여, 그 수를 세어 정량 분석하였다. 분화 배지는 새로운 96-well plate에 50 µl씩 분주하고 동량의 TRAP solution(4.93 mg Pnpp+850 µl 0.5 M acetate 용액+150 µl의 tartrate 용액)을 첨가하여 37°C에 1시간 반응시킨 뒤, 0.5 M의 NaOH 50 µl로 반응을 중지시켰다. 이후 ELISA reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Pit 형성 억제능 분석

RAW 264.7 세포를 5×10³ cells/well의 밀도로 osteo assay surface multiple well plate에 분주하고, 24시간 동안 안정화하였다. 그 후, RANKL (100 ng/ml)과 w-GM (62.5, 125, 250 µg/ml)이 포함된 배지로 교환하여 5일간 배양하였다. 배지는 2일마다 동일한 배지로 교환하였으며, 분화 종료 후 4% NaClO를 처리하여 세포를 떼어냈다. 이후 세포는 증류수로 수세하고 흡수된 면적은 도립현미경을 이용하여 관찰하였다. 총 Pit area면적은 Image J software Ver. 1.46 (National Institutes of Health, Washington D.C, USA)을 사용하여 측정하였다.

8. Western blot 분석

배양된 파골세포는 radioimmunoprecipitation assay buffer (50 mM TrisCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Nadeoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail)를 사용하여 전체 단백질을 추출하였다. 전체 단백질은 c-Fos, NFATc1 그리고 MAPK를 분석하는데 사용하였다. Nucleo protein과 cytosol protein은 NE-PER® nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo scientific, Pittsburgh, PA, USA)을 사용하여 분리하였다. 배양된 RAW 264.7 세포를 DPBS로 3회 수세한 뒤, protease inhibitor가 첨가된 lysis buffer를 넣고 ice에서 30분 동안 반응시킨 후 1300 rpm에서 20분 동안 원심분리 하여 상등액(cytosol protein)을 분리하였다. 이후, 세포

pallet에 lysis buffer을 사용하여(nucleo protein)을 분리하였다. cytosol protein은 I κ B 및 actin을 분석하는데 사용하였고, nucleo protein은 NF- κ B 그리고 Lamin B를 분석하는데 사용하였다. 단백질은 bicinchoninic acid solution 사용하여 정량하였으며, 동량의 단백질(30 μ g)은 10~15%의 SDS-PAGE에 전기영동한 뒤, nitrocellulose transfer membrane (Whatman Protran, Dassel, Germany)에 흡착시켰다. 5% skim milk를 이용하여 각각의 membrane을 1시간 동안 비 특이적 반응을 제거한 후, 1% bovine serum albumin에 녹인 1차 항체(c-Fos, NFATc1, p-ERK, T-ERK, p-JNK, T-JNK, p-p38, T-p38, NF- κ B, Lamin B, I κ B 그리고 β -actin)를 24시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 그 후 blocking buffer에 1:10000로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti-IgG 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 tris-buffered saline with Tween 20로 10분씩 6번씩 세척한 뒤, enhanced chemiluminescence kit (Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 x-ray 필름에 노출 시킨 후, 단백질 발현 양을 조사하였다.

9. Reverse transcription polymerase chain reaction 분석

RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well의 밀도로 6-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, RANKL (100 ng/ml)과 w-GM (62.5, 125, 250 μ g/ml)이 포함된 배지로 교환하여 4일간 배양하였다. 배지는 2일마다 동일한 배지로 교환하였으며, 분화가 완료된 파골세포 내의 총 RNA는 TRIzol을 사용하여 분리하였다. Nanodrop (Thermo scientific, Pittsburgh, PA, USA)을 이용하여 RNA 농도를 2 μ g로 정량하였으며, 그 후 superscript II reverse transcription kit를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 taq polymerase를 이용하여 증폭하였다. 본 연구에 사용된 primer는 Table 1에 기재하였으며, 합성된 결과물은 SYBR green (Invitrogen, CA, USA)으로 염색한 1.2% agarose gel에서 전기영동시킨 후, 발현 정도를 조사하였다.

10. 통계 분석

본 연구의 통계 분석은 Graph Pad PRISM Software (Ver. 5.01, Graphpad Software Inc, CA, USA)를 사용하였으며, 각 군간의 차이는 One-way ANOVA를 이용하여 비교 분석하였다. 통계 분석 결과 유의성을 나타낸 경우, Dunnett 방법으로 사후검정을 시행하였다. 데이터는 평균(mean) $\pm$ 표준오차(SE)로 표현하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 유의하다고 판단하였다.

Table 1. PCR Primer Sequences for RT-PCR Analysis

Gene	Sequence
<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>NFATc1</i>	Forward: 5'-TGC TCC TCC TCC TGC TGC TC-3' Reverse: 5'-CGT CTT CCA CCT CCA CGT CG-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>RANK</i>	Forward: 5'-CTC TCA GGA CAA TGC AGT GCT GA-3' Reverse: 5'-ATC CAG GTC ACA CAT TCC AGC A-3'
<i>CTR</i>	Forward: 5'-TGC ATT CCC GGG ATA CAC AG-3' Reverse: 5'-AGG AAC GCA GAC TTC ACT GG-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>CA2</i>	Forward: 5'-CTC TCA GGA CCA TGC AGT GCT GA-3' Reverse: 5'-ATC CAG GTC ACA CAT TCC AGC A-3'
<i>GAPDH</i>	Forward: 5'-ACT TTG TCA AGC TCA TTT CC-3' Reverse: 5'-TGC AGC GAA CTT TAT TGA TG-3'

CA2 : carbonic anhydrase 2, CTK : cathepsin K, CTR : calcitonin receptor, GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, MMP-9 : matrix metalloproteinase-9, NFATc1 : nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1, RANK : receptor activator of nuclear factor κ B, TRAP : tartrate-resistant acid phosphatase.

결 과

1. w-GM 내의 gentiopicroside의 동정

w-GM 내의 gentiopicroside의 동정은 표준품과 비교하여 15분대 peak로 확인하였으며, 각 peak의 PDA 스캔을 통해 표준품의 스펙트럼과 비교하여 최종적으로 gentiopicroside가 주성분임을 확인하였다(Fig. 1).

2. w-GM이 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향

w-GM을 처리한 62.5, 125, 250 μ g/ml 농도에서 RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성이 발견되지 않음을 나타내었다(Fig. 2).

3. w-GM이 RANKL에 의해 유도된 파골세포 분화 억제에 미치는 효능

w-GM의 파골세포 억제 효능을 TRAP 염색 및 활성도 그리고 pit formation assay를 사용하여 확인하였다. w-GM 62.5, 125, 250 μ g/ml 농도에서 TRAP 양성 파골세포의 수가 RANKL로 자극한 대조군에 비해 유의하게 억제되었고, Pit 형성 면적 또한 w-GM 62.5 μ g/ml ($p < 0.05$), 125 μ g/ml ($p < 0.05$), 250 μ g/ml ($p < 0.01$) μ 농도에서 유의하게 감소하였다(Fig. 3A, B). TRAP 활성도 또한 대조군에 비해 w-GM 62.5 μ g/ml ($p < 0.01$), 125 μ g/ml

(A)

(B)

Fig. 1. HPLC Chromatograms of the Gentiopicroside in w-GM.

(A) The Gentiopicroside was identified by HPLC Chromatograms analysis on the standard. (B) HPLC chromatograms were used to identify peaks at 15 min in w-GM and Gentiopicroside was confirmed by comparison with the standard.

Fig. 2. Effect of w-GM on RAW 264.7 cell viability.

Effect of w-GM on RAW 264.7 cell viability was determined by MTS assay. RAW 264.7 cells were cultured in 96-well plate (5×10^3 cells/well). After 24 h, cells were treated with w-GM (62.5, 125, 250 µg/ml) for 24 h. Cells were incubated with MTS reagent for 2 h in a 37°C incubator. After 2 h, 96-well plate was read at 490 nm with an ELISA reader. Columns and error bars represent the mean $\pm$ SE of three independent experiments.

($p < 0.01$), 250 µg/ml ($p < 0.01$) 농도에서 TRAP 활성도를 유의하게 감소시켰다(Fig. 3C). 파골세포가 형성한 pit의 면적을 측정한 결과에서는 w-GM 62.5 µg/ml ($p < 0.01$), 125 µg/ml ($p < 0.01$), 250 µg/ml ($p < 0.01$) 농도에서 대조군에 비해 pit 형성이 유의하게 억제되었다(Fig. 3D).

4. w-GM의 MAPK 및 NF- κ B 발현에 미치는 효능

RAW 264.7 세포에 RANKL로 유도한 파골세포에서 MAPK 및 NF- κ B 발현에 w-GM이 미치는 영향을 확인하였다. 파골세포 생존에 영향을 주는 p-ERK 발현은 대조군이 정상군에 비해 15분($p < 0.01$), 30분($p < 0.01$)에서 유의하게 증가하였으나, w-GM 250 µg/ml 처리군에서는 15분($p < 0.05$)에 p-ERK의 발현이 대조군에 비해 유의하게 억제되었다. 파골세포 분화 핵심 지표인 c-Fos 발현에 영향을 주는 p-JNK, p-p38 발현은 대조군에서 정상군에 비해 5분($p < 0.01$), 15분($p < 0.01$)에 유의하게 증가하였지만, w-GM 250 µg/ml 처리군에서는 15분에 p-JNK ($p < 0.05$)와 p-p38 ($p < 0.01$)의 발현이 유의하게 감소되었다(Fig. 4A, B). 또한 파골세포 분화 핵심 지표인 NFATc1 발현에 영향을 주는 핵 내 NF- κ B 발현은 대조군에서 정상군에 비해 5분($p < 0.05$), 15분($p < 0.05$)에 유의하게 증가하였으나, w-GM 250 µg/ml 처리군에서는 5분($p < 0.05$), 15분($p < 0.05$)에서 NF- κ B 발현이 대조군에 비해 유의하게 감소되었다. 반대로 세포질 내 I κ B 발현은 대조군에서 정상군에 비해 5분($p < 0.05$), 15분($p < 0.05$)에 유의하게 감소하였으나, w-GM 250 µg/ml 처리군에서는 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였지만 그 차이가 유의하지는 않았다(Fig. 4C, D).

Fig. 3. Effect of w-GM on osteoclast differentiation. RAW 264.7 cells were cultured for 5 days with RANKL (100 ng/ml) in the varying concentration of w-GM.

(A) TRAP-positive osteoclasts and pit area were identified with microscope (40×). (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclast. (C) Supernatants were collected, and the TRAP activity in the supernatants was determined in 405 nm by ELISA reader. (D) Pit area was measured using Image J. software. Values are expressed as means±SE of triplicate experiments. ## $p<0.01$ versus normal (RANKL-untreated cells). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ versus control (only RANKL-treated cells).

5. w-GM의 c-fos, NFATc1 단백질 및 유전자 발현 억제에 미치는 효능

파골세포의 분화 필수 지표인 c-Fos, NFATc1의 단백질 및 유전자 발현에 w-GM이 미치는 영향을 조사하였다. c-Fos 단백질 발현을 확인한 결과, 대조군은 정상군에 비해 유의하게($p<0.01$) 증가하였지만, w-GM 125 µg/ml ($p<0.01$), 250 µg/ml ($p<0.05$) 처리군에서는 대조군에 비해 유의하게 억제되었다.

NFATc1의 단백질 발현은 대조군에서 정상군에 비해 유의하게($p<0.01$) 증가하였으나, w-GM 125 µg/ml ($p<0.05$), 250 µg/ml ($p<0.05$) 처리군에서는 대조군에 비해 유의하게 감소되었다(Fig. 5A, B). c-Fos의 유전자 발현을 확인한 결과 대조군은 정상군에 비해 유의하게($p<0.01$) 증가하였지만, w-GM 250 µg/ml ($p<0.01$) 처리군에서는 대조군에 비해 유의하게 억제되었다. NFATc1 유전자 발현은 대조군에서 정상군에 비해 유의하게($p<0.01$) 증가

하였으나, w-GM 250 ($p<0.05$) µg/ml 처리군에서는 대조군에 비해 유의하게 감소되었다(Fig. 5C, D).

6. w-GM이 파골세포 분화 관련 유전자 발현에 미치는 영향

파골세포 분화 및 기능에 관여하는 유전자 발현에 w-GM이 미치는 영향을 조사하였다. 대조군은 정상군에 비해 파골세포의 특이표인 TRAP의 발현이 유의하게($p<0.01$) 증가하였다. 또한 w-GM 250 µg/ml ($p<0.05$) 처리군에서는 대조군에 비해 TRAP의 발현이 유의하게 감소하였다. 파골세포 분화에 필요한 RANK는 대조군에서 정상군에 비해 유의하게($p<0.01$) 증가하였지만, w-GM 250 µg/ml ($p<0.01$) 처리군에서는 대조군에 비해 유의하게 억제되었다. 또한 calcitonin receptor (CTR)의 발현을 조사한 결과, RANKL 유도 대조군에서 정상군에 비해 발현이 유의하게($p<$

Fig. 4. Effect of w-GM on MAPK and NF- κ B protein expressions in RANKL-stimulated RAW 264.7 cells.

(A) RAW 264.7 cells were co-cultured with RANKL (100 ng/ml) and w-GM (250 μg/ml). The expression of MAPK were measured in whole protein. (B) The each markers were measured using Image J. software. The histogram represents the protein levels of MAPK which were normalized to each total form. (C) RAW 264.7 cells were co-cultured with RANKL (100 ng/ml) and w-GM (250 μg/ml). The expression of NF- κ B were measured in nucleo protein and I κ B was detected in the cytosol protein. (D) The each markers were measured using Image J. software. The histogram represents the protein levels of NF- κ B and I κ B which were normalized to Lamin B and Actin. Values are expressed as means $\pm$ SE of triplicate experiments. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus normal (RANKL-untreated cells). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus control (only RANKL-treated cells).

0.01) 증가하였으나, w-GM 250 μg/ml ($p < 0.01$) 처리군에서는 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 파골세포의 골 흡수 기능에 중요한 역할을 하는 cathepsin k (CTK), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) 그리고 carbonic anhydrase 2 (CA2)의 발현을 확인한 결과, 대조군에서는 정상군에 비해 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. w-GM 250 μg/ml ($p < 0.01$) 처리군에서는 CTK의 발현이 유의하게 억제되었지만, MMP-9 그리고 CA2의 발현은 대조군에 비해 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig 6).

고 찰

파골세포는 다핵세포이며 골 흡수를 촉진하는 중추적 역할을

한다²²⁾. 파골세포의 분화와 기능에 관여하는 중요한 사이토카인 중 하나가 바로 RANKL인데, RANKL은 파골세포 전구체 및 성숙된 파골세포에서 발현되는 RANK와 결합하여 수용체 분자들 특히 tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6)의 활성화를 유도한다²³⁾. RANKL-RANK-TRAF6 복합체는 NF- κ B, MAPK, c-Fos 그리고 NFATc1을 활성화한다. 이러한 인자들이 모두 활성화되면, TRAP, RANK, CTR, CTK, MMP-9 그리고 CA2 등과 같은 파골세포 골 흡수와 관련된 유전자들이 발현된다²⁴⁾. 따라서 본 연구에서는 파골세포 활성화에 관여되는 주요 인자들의 단백질 및 유전자 발현에 대한 진교의 효과를 조사했다.

성숙한 파골세포의 골 흡수 활성화에 관여하는 TRAP은 파골세포의 조직화적인 표지자로 이용된다²⁵⁾. 따라서 이번 실험에서는 TRAP 염색과 활성도를 조사하여 w-GM의 파골세포 억제 효능을

Fig. 5. Effect of w-GM on c-Fos and NFATc1 protein and gene expressions of osteoclastic marker in RANKL-stimulated RAW 264.7 cells.

(A) RAW 264.7 cells were co-cultured with RANKL (100 ng/ml) and the varying concentration of w-GM. (B) The c-Fos and NFATc1 were measured using Image J. software. The histogram represents the protein levels of c-Fos and NFATc1 which were normalized to actin. (C) RAW 264.7 cells were co-cultured with RANKL (100 ng/ml) and the varying concentration of w-GM. (D) The c-Fos and NFATc1 were measured using Image J. software. The histogram represents the gene levels of c-Fos and NFATc1 which were normalized to GAPDH. Values are expressed as means $\pm$ SE of triplicate experiments. # p < 0.01 versus normal (RANKL-untreated cells). * p < 0.05 and ** p < 0.01 versus control (only RANKL-treated cells).

확인하였다. RANKL (100 ng/ml)을 이용하여 파골세포를 유도한 뒤, 다양한 농도(62.5, 125, 250 μ g/ml)의 w-GM을 처리한 결과, 대조군에 비해 w-GM 처리군에서 TRAP 양성 세포 수와 TRAP 활성도가 감소했다. 또한 pit formation assay는 대조군에서는 pit 형성 면적이 증가하였으나, w-GM의 농도를 증가하여 처리할수록 pit formation을 억제했다. 이러한 결과는 w-GM이 파골세포 분화 및 골 형성을 억제했음을 시사한다.

RANKL이 RANK와 결합하면 TRAF6가 결집되고, 이는 MAPK, NF- κ B 경로를 비롯한 다양한 신호 전달을 활성화시킨다. 파골세포 발달 과정에서 파골세포는 RANKL의 자극을 받아 p-ERK, p-JNK, p-p38에 의한 microphthalmia-associated transcription

factor(Mitf)의 활성화로 이어지는 일련의 과정을 일으킨다²⁶⁾. Mitf는 TRAF (TNF receptor-associated factor) 그리고 p38의 활성화 등 다양한 신호전달 과정을 거쳐 활성화되는 인자로 파골세포 분화를 촉진하며 파골세포 분화 시 증가되는 인자며, 파골세포 분화에 중요하다고 밝혀졌다. 또한, 파골세포가 분화하는 동안 CTK, acid Phosphatase 5 등 파골세포 관련 유전자 발현에 필요한 신호를 통합하는 것으로 밝혀졌다. 또한 Mitf는 파골세포가 분화하는 과정에서 acid Phosphatase 5, CTK, osteoclast-associated receptor promoter를 활성화시키는 PU-1, NFATc1과 작용한다²⁷⁾. 따라서 w-GM을 처리한 후, p-ERK, p-JNK, p-p38와 같은 MAPK 그리고 파골세포 분화 핵심 지표인 NFATc1 발현에 영향을 주는

Fig. 6. Effect of w-GM on mRNA expressions of osteoclastic marker genes in RANKL-stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were cultured for 4 days with RANKL (100 ng/ml) in the varying concentration of w-GM. (A) Each mRNA expressions were determined by RT-PCR. (B) The histogram represents the levels of mRNA expression compared with that GAPDH. Values are expressed as means $\pm$ SE of triplicate experiments. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ versus normal (RANKL-untreated cells). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control (only RANKL-treated cells).

핵 내 NF- κ B 발현 과정을 확인함으로써 w-GM의 효과를 알 수 있다. 실험 결과, w-GM 처리군이 대조군에 비해 p-ERK, p-JNK, p-p38, NF- κ B 발현을 유의하게 억제했다. 이는 w-GM이 파골세포 분화를 억제함을 시사한다. RANKL은 파골세포 형성 과정에서 c-Fos 발현을 유도하며, 발현된 c-Fos가 NFATc1 promoter와 결합하면 NFATc1 유전자 발현이 증가한다²⁸⁾. 본 실험결과, 파골세포 분화에 중요한 전사인자인 c-Fos의 단백질 및 유전자발현이

w-GM 처리군에서 대조군에 비해 유의하게 억제되었다. 또한 NFATc1의 단백질 및 유전자발현 역시 w-GM 처리군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였음을 나타냈다. 실험결과 w-GM이 c-Fos와 NFATc1의 발현을 억제시켜 파골세포 분화를 억제시키는 것으로 나타났다.

파골세포 생성을 위한 주요 전사인 NFATc1이 활성화되면 TRAP, RANK, CTR, CTK 그리고 MMP-9와 같은 파골세포 관련

유전자가 발현된다²⁹⁾. TRAP은 조직화화적인 표지자이며, 골 흡수에 관여한다²⁸⁾. 본 실험결과, TRAP의 발현이 w-GM 처리군에서 대조군에 비해 유의하게 억제되었다. 또한, RANK는 파골세포 분화과정에 중요 역할을 하는 인자인데³⁰⁾, 본 실험결과 w-GM 처리군에서 대조군에 비해 RANK의 발현을 유의하게 억제했다. 이는 w-GM이 성숙한 파골세포로의 분화억제 한다는 것을 나타낸다. CTR은 calcitonin의 활동성을 조절하며 파골세포 발현마커로 사용된다³¹⁾. 실험 결과 w-GM은 CTR의 발현을 조절하는 것으로 나타났다. CTK와 MMP-9는 파골세포 분화과정과 골 흡수에 직접적으로 관여하고 있는 인자이다^{32,33)}. 실험 결과, 대조군에 비해 w-GM 처리군에서 CTK 유전자 발현이 유의하게 억제되는 것을 나타냈다. 이는 w-GM이 골 흡수를 억제한다는 것을 나타낸다. CA2는 성숙한 파골세포가 골 흡수를 위해 골 표면을 산성화하기 위해 주로 발현되는 물질로, CA2의 산성화는 골 재흡수에 중요한 역할을 한다³⁴⁾. Pit formation assay 실험 결과에서 w-GM은 골 흡수능을 유의하게 억제하였고, 이와 관련하여 유전자 발현으로 골 흡수능과 연관된 CTK, MMP-9, CA2의 발현을 연구한 결과 w-GM은 CTK의 발현을 유의하게 억제하며, MMP-9와 CA2의 발현은 억제하지 않았다. 따라서 w-GM은 골 재흡수와 관련된 CTK의 발현을 감소시킨다는 것을 알 수 있었고, w-GM은 CTK의 발현을 억제하여 골 재흡수능을 억제시킴을 시사한다.

골다공증은 뼈의 강도가 약해져서 쉽게 골절되는 골격계 질환으로써, 한의학적으로 腎主骨이라 하여 骨과 腎이 밀접한 관계를 가지고 있고, 골다공증은 骨痺, 骨極, 骨痛, 骨枯 등으로 인식되었고 뼈의 생장 및 쇠약이 腎氣와 腎精의 많고 적음에 밀접한 관련이 있다고 보았기 때문에, 골다공증 발병 원인을 腎에 두었다³⁵⁾. 黃帝內經에 의하면 여자는 폐경 이후 뼈가 약해지며, 남자는 56세가 되면 뼈가 쇠하여지고, 이는 현대의학의 골다공증 개념과 일치한다고 보인다³⁶⁾. 이점에 착안하여, 최근 골다공증 논문은 腎氣 및 腎精의 부족을 보충하는 한약재가 연구되어 지고 있다³⁷⁾. 전통적으로 진교는 舒筋活絡 작용해 관절염 치료에 주로 사용되었지만, 祛風濕藥 중 특이하게 潤濟에 속해, 邪氣를 흠어지게 하여 관절을 潤하고 強하게함으로써 補肝腎, 強筋骨과 유사한 효과를 보유한 한약재이다³⁸⁾. 본 연구에서는 이러한 진교의 특이속성으로 補肝腎 및 強筋骨을 통한 효과와 항염증 효과가 복합적으로 관여되어 비정상적인 파골세포의 활성이 억제되었다고 추측 된다. 이상의 결과, 진교는 파골세포 분화 관련 유전자 및 단백질 발현을 감소시켜 파골세포 활성 및 골 흡수 기전을 억제하므로 골다공증 개선을 위한 임상 응용 가능성이 있을 것으로 기대된다.

본 연구의 결과는 이전의 연교의 파골세포 억제 연구와 동일하

게 항염증 효과를 보유한 한약재가 골다공증을 개선 할 수 있을 것이라는 연구가설에 의한 약물선정 과정에 대해 유사하게 접근하였다³⁹⁾. 두 연구 모두 골다공증의 주요 원인인 비정상적인 파골세포의 활성 및 골 흡수능을 억제하였지만, 그 억제기전 및 유효성에서 차이를 보였다. 파골세포의 골 흡수능에는 CA2, CTK 그리고 MMP-9와 같은 인자의 발현이 중요하게 작용하는데, 본 연구에 사용된 약물인 w-GM은 이 중 골 흡수초기에 주요 역할을 하며, 골 매트릭스의 주요 성분인 type I collagen을 빠르게 분해하는 CTK를 매우 강력하게 억제함을 통해 골 흡수능이 제어되는 것으로 보인다⁴⁰⁾. 하지만 연교는 CA2의 강력한 억제로 골 표면의 산성화를 억제해, CTK/MMP-9와 같은 골 흡수 enzyme이 일정이상 발현되더라도 강력하게 골 흡수를 강하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 각 지표를 제어하는 c-Fos와 NFATc1에 각 약물이 작용하는 차이라고 생각되며, w-GM은 NFATc1에 매개한 파골세포 억제효과를 보이며, 연교는 c-Fos에 매개한 파골세포 억제효과를 보인다고 사료된다.

이번 연구는 다음과 같은 한계점을 지닌다. w-GM의 항염증 효과를 기반으로 하여 파골세포의 분화 및 흡수 억제를 탐색하는데 그치고 있다. 이전의 많은 연구에서 염증성 장질환, 만성 폐쇄성 폐질환 등의 다양한 만성 염증성 질환에 의해 골다공증이 발생한다고 밝혔다⁸⁻¹⁰⁾. 이번 연구에서는 특정 질환을 대상으로 한정하지 않고, 연구 대상 범위를 파골세포의 분화 및 흡수 억제 효능에 국한하여 실험하였다. 따라서 염증성 질환에서 유발된 골다공증의 치료 효과를 파악하기는 어려웠으며, 이번 연구에서는 이를 나타내지 못하였지만, 염증성 골다공증 동물 모델에서의 골다공증 억제 효능과 관련 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

파골세포의 분화와 골 흡수 관련 단백질 및 유전자 발현에 진교가 미치는 영향을 조사하기 위해 RAW 264.7 세포를 이용하였다. RANKL에 의한 파골세포 분화 관련 인자들의 유전자 및 단백질 발현을 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 진교 물 추출물은 RANKL로 유도된 파골세포에서 다핵의 TRAP-positive 세포 수, TRAP activity 그리고 pit formation을 유의하게 감소시켰고, RANKL로 유도된 파골세포의 분화와 관련한 MAPK 및 NF- κ B 발현을 감소시켰다. 또한, 파골세포의 분화 주요인자인 c-Fos 및 NFATc1의 단백질 및 유전자 발현을 감소시켰다. 그 결과, 파골세

포의 분화 및 그 기능에 관여하는 TRAP, RANK, CTR 그리고 CTK의 유전자 발현을 감소시켰다. 이상을 종합하면, 진교는 파골세포 분화 관련 유전자 및 단백질의 발현 억제로 파골세포 분화 및 활성화 기전에 작용하며, 향후 염증성 골다공증 개선을 위한 치료 효능의 연구를 거쳐 임상 적용이 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

None.

Funding

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. NRF-2019R1H1A2101224).

Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

References

1. World Health Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1994 ; 843 : 1-129
2. Lin JT, Lane JM. Osteoporosis: a review. Clin Orthop Relat Res. 2004 ; 425 : 126-34. <https://doi.org/10.3329/birdem.v5i1.28371>
3. Majumdar SR, Lier DA, Beaupre LA, Hanley DA, Maksymowych WP, Juby AG, et al. Osteoporosis case manager for patients with hip fractures: results of a cost-effectiveness analysis conducted alongside a randomized trial. Arch Intern Med. 2009 ; 169(1) : 25-31. <https://doi.org/10.1001/archinte.169.1.25>
4. Hodgson SF, Watts NB, Bilezikian JP, Clarke BL, Gray TK, Harris DW, et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: 2001 edition, with selected updates for 2003. Endocr Pract. 2003 ; 9(6) : 544-64. <https://doi.org/10.4158/EP.9.6.544>
5. Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. Endocrinol Metab Clin North Am. 2005 ; 34(4) : 1015-30. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2005.07.009>
6. Larussa T, Suraci E, Nazionale I, Leone I, Montalcini T, Abenavoli L, et al. No evidence of circulating autoantibodies against osteoprotegerin in patients with celiac disease. World J Gastroenterol. 2012 ; 18(14) : 1622-27. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i14.1622>
7. Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. Osteoporos Int. 1992 ; 2(6) : 285-9. <https://doi.org/10.1007/BF01623184>
8. Kennel KA and Drake MT. Adverse Effects of Bisphosphonates: Implications for Osteoporosis Management. Mayo Clin Proc. 2009 ; 84(7) : 632-8. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(11\)60752-0](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(11)60752-0)
9. Watts NB, Bilezikian JP, Camacho PM, Greenspan SL, Harris ST, Hodgson SF, et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. Endocr Pract. 2010 ; 16 Suppl 3 : 1-37. <https://doi.org/10.4158/ep.16.s3.1>
10. McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison KS, Dian L, et al. Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday. Am J Med. 2013 ; 126(1) : 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2012.06.023>
11. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 update. J Oral Maxillofac Surg. 2014 ; 72(10) : 1938-56. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2014.04.031>
12. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. Bone. 2007 ; 40(2) : 251-64 <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.023>
13. 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)
14. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000 ; 289(5484) : 1504-8. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1504>
15. Shin MK. Clinical Traditional Herbology. *Younglimsa* 2002 ; 431-2
16. Yu F, Yu F, Li R, Wang R. Inhibitory effects of the gentiana macrophylla (gentianaceae) extract on rheumatoid arthritis of rats. *J Ethnopharmacol*. 2004 ; 95(1) : 77-81. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.025>
17. Kwak WJ, Kim JH, Ryu KH, Cho YB, Jeon SD, Moon CK. Effects of gentianine on the production of pro-inflammatory cytokines in male Sprague-Dawley rats treated with lipopolysaccharide (LPS). *Biol Pharm Bull*. 2005 ; 28(4) : 750-3. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.750>
18. Lv J, Gu WL, Chen CX. Effect of gentiopicroside on experimental acute pancreatitis induced by retrograde injection of sodium taurocholate into the biliopancreatic duct in rats. *Fitoterapia*. 2015 ; 102 : 127-33. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.03.002>
19. Wang S, Xu Y, Jiang W, Zhang Y. Isolation and identification of constituents with activity of inhibiting nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages from *Gentiana triflora*. *Planta Med*. 2013 ; 79(8) : 680-6. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328460>
20. Zhao L, Ye J, Wu GT, Peng XJ, Xia PF, Ren Y. Gentiopicroside prevents interleukin-1 beta induced inflammation response in rat articular chondrocyte. *J Ethnopharmacol*. 2015 ; 172 : 100-7. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.031>
21. Ginaldi L, Di Benedetto MC, De Martinis M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun Ageing*. 2005 ; 4 : 2 : 14. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-2-14>
22. Kikuta J, Ishii M. Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 ; 52(2) : 226-34. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes259>
23. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011 ; 17(10) : 1231-4. <https://doi.org/10.1038/nm.2452>
24. Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 ; 1116 : 227-37. <https://doi.org/10.1196/annals.1402.071>
25. Angel NZ, Walsh N, Forwood MR, Ostrowski MC, Cassady AI, Hume DA. Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. *J Bone Miner Res*. 2000 ; 15(1) : 103-10. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.1.103>
26. Mansky KC, Sankar U, Han J, Ostrowski MC. Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J Biol Chem*. 2002 ; 277(13) : 11077-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111696200>
27. Choi J, Choi SY, Lee SY, Lee JY, Kim HS, Lee SY, et al. Caffeine enhances osteoclast differentiation and maturation through p38 MAP kinase/Mitf and DC-STAMP/CtsK and TRAP pathway. *Cell Signal*. 2013 ; 25(5) : 1222-27. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.02.015>
28. Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med*. 2005 ; 202(9) : 1261-9. <https://doi.org/10.1084/jem.20051150>
29. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 ; 423(6937) : 337-42. <https://doi.org/10.1038/nature01658>
30. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 1999 ; 13(18) : 2412-24. <https://doi.org/10.1101/gad.13.18.2412>
31. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol*. 2000 ; 81(6) : 405-22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2000.00176.x>
32. Zhuo Y, Gauthier JY, Black WC, Percival MD, Duong LT. Inhibition of bone resorption by the cathepsin K inhibitor odanacatib is fully reversible. *Bone*. 2014 ; 67 : 269-80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.013>
33. Gu JH, Tong XS, Chen GH, Liu XZ, Bian JC, Yuan Y, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 protein expression by $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ during osteoclast differentiation. *J Vet Sci*. 2014 ; 15(1) : 133-40. <https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.1.133>

34. Lehenkari P, Hentunen TA, Laitala-Leinonen T, Tuukkanen J, Väänänen HK. Carbonic anhydrase II plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca²⁺. *Exp Cell Res.* 1998 ; 242(1) : 128-37. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4071>
35. Seo MS, Kim HC, Choo WG, Jeong SY, Kim SJ, Choi JU, et al. The Review on the Study of Osteoporosis in Korean Medicine Journals. *The Journal of Korea CHUNA Manual Medicine for Spine & Nerves.* 2013 ; 8(2) : 67-78.
36. Kim DH. *Hwangjenaegyeong Yeongchu.* Seoul : Uiseongdang. 2002 : 452.
37. Kim JH, Kim M, Jung HS, Sohn Y. *Leonurus sibiricus* L. ethanol extract promotes osteoblast differentiation and inhibits osteoclast formation. *Int J Mol Med.* 2019 ; 44(3) : 913-26. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4269>
38. Park WT, Jeong SH, Seo IB, Kim SJ. GCP Treatment on the Expression of NOS, C-fos, Serotonin and Substance-P in Central Nerve System of Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritic Pain Model. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 2007 ; 21(6) : 1483-90.
39. Eom JW, Kim JH, Kim MS, Kim SW, Shin HJ, Jung HS, et al. *Forsythiae Fructus* Extract Inhibits RANKL-Induced Osteoclast Differentiation and Prevent Bone Loss in OVX-Induced Osteoporosis Rat. *Korean J Acupunct.* 2019 ; 36(2) : 115-26. <https://doi.org/10.14406/acu.2019.008>
40. Costa AG, Cusano NE, Silva BC, Cremers S, Bilezikian JP. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 ; 7(8) : 447-56. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.77>