

식이성 우유 유전소재를 이용한 골다공증 예방 기능성 유제품 개발

Development of Functional Dairy Foods for Prevention of Osteoporosis using Dietary Genetic Materials Isolated from Bovine Milk

오상남, 김영훈 (Sangnam Oh and Younghoon Kim)

전북대학교 동물자원과학과, 우유유전체연구소

Department of Animal Science and Institute of Milk Genomics, Chonbuk National University

I. 서론: 고령화시대와 기능성 동물소재 연구의 필요성

건강에 대한 관심증대 및 사회적·환경적 변화로 인하여 세계 인구 수명이 늘어나고 있다. 노인인구는 세계 인구 73억 명 중 8.5%(6억 1700만 명)를 차지하고 있으며, 이 중 65세 인구는 2050년에 약 16억 명으로 늘어나 세계 총 인구 중 약 17%에 이를 것으로 전망하고 있다. 특히 우리나라는 급격한 출산율 저하와 기대수명의 연장으로 OECD국가 중 가장 빠른 속도로 고령화가 진행되고 있음에 따라 65세 이상 노인인구 비중이 2000년 7.2%로 이미 “고령화 사회”에 진입한 상태이다. 불과 10년 뒤인 2026년에는 고령인구가 20%에 도달하여 선진국 중에서 가장 빠른 속도로 초고령 사회가 될 것이라 예측된다(표 1).

이러한 빠른 고령화로 인해 고령사회의 문제에 대처하기 위하여 빠른 대응이 필요하며, 노인성 만성질환으로 인한 신체적 기능저하와 장애 등에 의해 새로운 보건의료 수요가 증가할 것으로 보인다. 이러한 시대요구에 부응하여 전 세계적으로도 노화 관련 시장은 2022년 500조 원 대 규모로 성장할 것으로 전망되고 있고, 국내의 경우 2002년 약 6.4조 원 이상이었던 노화 관련 산업이 노인인구 급증에 따른 수요증가로 2010년에는 31조 원, 2020년에는 116조 원 이상으로 성장할 것으로 예상하는데,

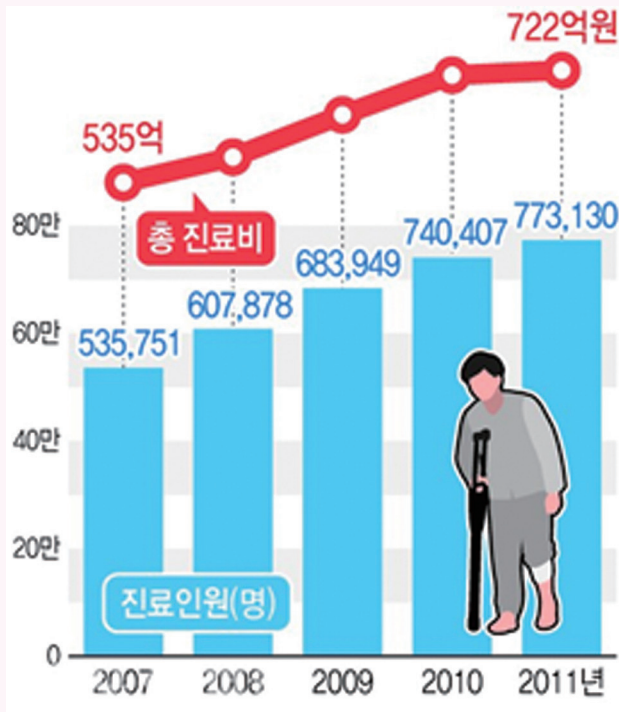
표 1. 주요 국가별 인구 고령화 진전 현황 (통계청, 「장래인구추계」 2006)

국 가	도달년도			증가 소요연수	
	고령화(7%)	고령(14%)	초고령(20%)	7%→14%	14%→20%
한 국	2000	2018	2026	18	8
일 본	1970	1994	2006	24	12
프랑스	1864	1979	2018	115	39
이태리	1927	1988	2006	61	18
미 국	1942	2015	2036	73	21
스웨덴	1887	1972	2014	85	42

*Corresponding author: Younghoon Kim
Department of Animal Science and Institute of Milk Genomics, Chonbuk National University

Tel: +82-63-270-2606
Fax: +82-63-270-2612
E-mail: ykeys2854@jbnu.ac.kr

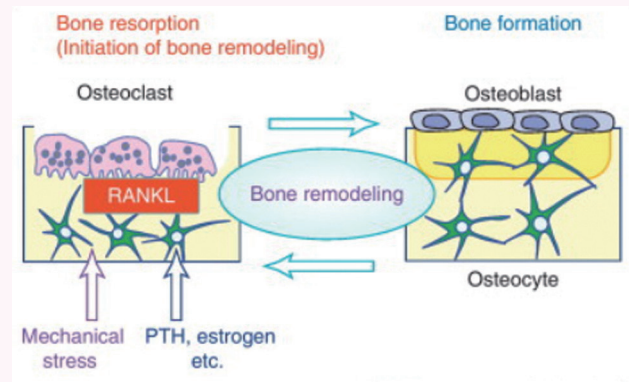
그림 1. 골다공증환자 증가추이 (건강보험심사평가원, 2012)



최근 국내외 학계 및 산업계에서는 ‘건강한 노화’를 위한 실버산업에 주목하고 있다. 고령자에게 가장 필요한 제품은 건강기능식품과 건강의료기기로 나타나는 등 고령자의 관심사인 건강기능 및 질병예방 관련 고령친화제품에 대한 수요증가가 예상되고 있다(한국보건산업진흥원, 2011). 한국건강기능식품협회의 ‘향후 소비자의 기능성 선호경향’ 조사 자료에 따르면 고령인구의 증가를 반영하듯이 소비자 기능성 선호경향에서도 고령에 따른 대사성 질환에 대한 기능성제품에 대한 선호도가 전체의 85% 이상을 차지 높게 나타나는 있는 추세이다. 이러한 소비자 성향의 변화에 따라 국내에서도 개별 인정형 기능성 소재의 내용이 간건강, 면역기능, 뼈/관절건강, 갱년기 여성건강 등 고령인구의 건강관심 분야로 빠르게 변화하고 있다.

이중 골다공증은 가장 흔한 노인성 질환의 하나로 노령 인구가 증가함에 따라 우리나라에서 뿐만 아니라 전 세계적으로 중요한 보건학적 문제가 되고 있으며, 50세 이상 여성의 35%가 골다공증 치료를 받고 있는 것으로 조사되고 있다. 또한 각종 인스턴트 식품의 범람과 환경호르몬

그림 2. 조골세포와 파골세포간의 상호작용에 의한 Bone remodeling 모식도 (Nakashima et al., 2012)



및 중금속등에의 노출로 폐경기 이후의 여성뿐만 아니라 남성들에게서도 골다공증 환자가 증가하는 추세를 보인다. 골다공증의 발병 시 빈번하게 발생하는 골절, 특히 고관절 골절로 인해 사망으로 이어질 수 있기 때문에 개인적 피해는 물론 의료비 지출로 인한 국가적 손실은 사회적 문제로 대두되고 있다(그림 1).

기본적으로 뼈는 지속적으로 조골세포(osteoblast)에 의한 골형성(bone formation)과 파골세포(osteoclast)에 의한 골흡수 과정(bone resorption)으로 구분할 수 있으며, 한 단계가 다른 단계를 자극하도록 고도로 연계되어 조골세포와 파골세포 활성의 균형을 통하여 항상성이 유지된다(그림 2). 골다공증은 골의 화학적 조성에는 큰 변화가 나타나지 않지만 골밀도가 감소하여 약한 충격에도 쉽게 골절을 일으키게 되는 질환으로써 사람이 노화됨에 따라 조골세포와 파골세포 작용의 동기성에 차이를 나타냄으로 야기되는 것으로 알려져 있다(Parfitt, 1994). 골다공증을 발생시키는 원인은 다양하지만 특히 폐경기 이후에 일어나는 estrogen의 감소는 조골세포에서 국소인자의 발현저하를 유도하고 결과적으로 골흡수 속도를 증가시킴으로써 골다공증을 유발하는 것으로 보고되어 있으며(Christenson, 1997). 식이적 요인으로는 칼슘과 비타민 D 부족, 과다한 동물성 단백질, 소금, 카페인, 섬유질 섭취와 음주 등이 보고되고 있으며, 골의 대사에 관여하는 호르몬 결핍이나 장애에서의 흡수 능력 저하 등도 골다공증의 원인으로 작용할 수 있는 것으로 보고되고 있다.

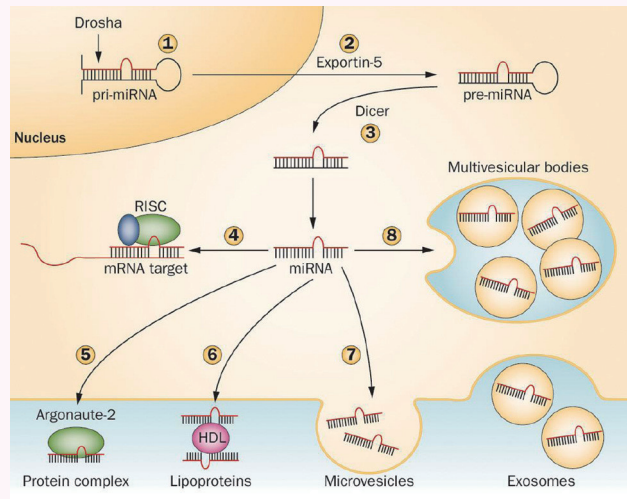
골다공증의 예방과 치료를 위해서는 적절한 칼슘과 비타민 D의 섭취가 필요하며, 이는 골다공증의 예방과 치료에 사용되는 다른 약제와 함께 투여되어야 한다. 비스포스포네이트(bisphosphonate)는 가장 널리 처방되는 일차 골다공증 치료제로써 알렌드로네이트(alendronate)와 리제드로네이트(risedronate)가 대표적이며, 이는 파골세포의 기능을 약화시키고, 세포사멸을 유도하여 골흡수를 억제하는 기능을 하고 또한 질소기를 포함하고 있어서 반감기가 다른 약물에 비해 길다는 장점을 가지고 있다. 특히 폐경성 골다공증의 경우 주로 호르몬 요법인 에스트로겐을 투여하거나 유사기능을 나타내는 식물성 에스트로젠인 phytoestrogen을 보충하는 방법이 사용되고 있으나, 장기간의 치료가 필요하고, 불규칙한 자궁출혈이나, 자궁내막염, 고혈압 등의 부작용이 나타날 수 있는 것으로 보고되고 있다. 대부분의 약물 치료는 수년간의 장기간 복용에 따른 부작용이 보고되어, 그에 따른 합병증이 우려되기 때문에 이미 감소된 골밀도를 회복하기에는 효과가 미흡한 것으로 나타나고 있다. 최근 골밀도 감소 억제 효과 및 그에 따른 부작용을 개선한 새로운 약제들이 개발 중이나, 발병 후의 치료보다는 예방적 차원의 접근이 심각해져가는 고령화사회에서는 더욱 중요하다. 특히 고기능성 동물소재 개발 연구를 통해 소비자 맞춤형/밀착형으로 골밀도 감소와 관련된 퇴행성질환을 예방하기 위한 목적으로 소비자들의 수요를 충족시킬 뿐만 아니라 고령사회에서의 골다공증으로 인한 개인의 육체적, 정신적, 경제적 문제를 일부 해결하여 이로 인해 소비되는 사회적인 비용까지 감축시킬 수 있을 것으로 전망되고 있다.

II. 본 론

1. 새로운 조절유전자 small RNA 연구의 중요성

Small RNA는 1993년 victor Ambros 연구팀(메사추세츠 의과대학, 미국)에 의해 C. elegans의 발생시기를 조절하는 유전자를 찾던 중에 발견한 것으로 기존의 생물학 패러다임을 바꾼 새로운 유전자 발현조절 인자이다. 단백질

그림 3. miRNA 생성 및 분비(Guay and Regazzi, 2013)



을 암호화 하지 않기 때문에 정크 DNA서열로 여겨지던 부위에서 생성이 된 non-coding RNA가 RNA간섭 기작에 의해 서열 특이적으로 타겟 유전자의 발현을 억제하는 것으로 알려지면서 cell 논문에 처음 소개되었다(Lee et al., 1993). 가장 잘 알려진 small RNA는 마이크로 RNA (micro RNA 또는 miRNA)로써 21-25 nt의 극히 작은 RNA 분자 및 관련 단백질 형태로 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 새로운 조절인자로서 재생의학을 포함하여 의생명과학 전 분야에 걸쳐 다양한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다.

마이크로RNA는 일련의 효소절단에 의해 형성되는데, 핵 내에서 RNA 중합효소 II (RNA polymerase II)에 의해 합성된 하나 이상의 특이한 헤어핀 (hairpin)구조를 가진 초기 miRNA (pri-miRNA)이라고 하며, 리보뉴클레아제 III형인 Drosha에 의해 절단되어 작은 hairpin구조인 miRNA 전구체(pre-miRNA)가 만들어진다. miRNA전구체는 엑손(exon)끼리 이어 맞춰지는 splicing 과정에서 인트론(intron) 유래의 mirtron 형태로도 생산된다. 이러한 전구체들은 세포질로 이동하여 Dicer에 의해 절단되면서 21-23 nt 길이의 이중가닥 mature miRNA가 형성이 되고, RNA-induced silencing complex (RISC)와 AGO protein 계열의 작용으로 인해 한 가닥의 miRNA만이 조절목표가 되는 mRNA의 3'UTR(3' untranslated region)의 상보적인 서열에 붙어 전

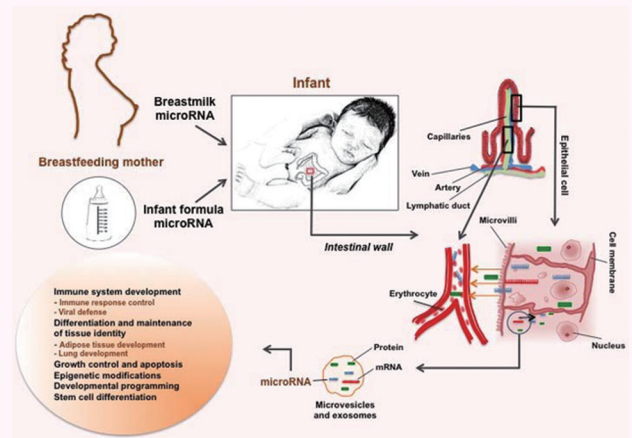
사역제작용을 일으키는 것이 일반적인 miRNA의 세포내 기전으로 알려져 있다(그림 3). 최근에는 Argonaute-2, lipoprotein같은 RNA 결합단백질을 통해, 혹은 vesicle을 통해 마이크로RNA가 세포외로 분비되어 타액을 비롯한 소변, 혈액 그리고 모유 등 다양한 체액에서 발견되고, 분비된 miRNA는 포유동물에서 다양한 생리기능에 관여하기도 하며, 최근에는 당뇨병 및 다양한 암 지표로서 보고되고 있다 (Boon et al., 2013).

흥미롭게도 인간 유전체의 1-5% 가량을 차지하는 miRNA 유전자가 유전체 발현의 최소한 30% 이상을 조절하고 있는 것으로 알려지고 있어 노화 과정 및 질병 발생에 관한 이들의 역할에 대한 이해를 통해 획기적인 예방, 치료 전략 및 생체표지 개발을 가능케 하는 것으로 여겨지고 있다.

2. 우유 및 유제품 내 존재하는 유전체(genomics) 연구의 중요성

일반적으로 우유는 신생 포유동물의 유일한 영양원으로 포유동물의 종류 및 포유/비유시기, 그리고 모체의 특성에 따라 영양성분의 차이가 있다. 우유는 단백질, 지방, 탄수화물의 영양균형이 우수하며 인간의 생존에 필요한 미네랄, 비타민, 리보플라민 등 필요 영양성분도 다량 함유된 건강식품으로 현재까지 인류가 발견한 다양한 생리적 기능성 성분을 가장 풍부하게 함유하고 있는 기능성 성분의 원천으로써 전 세계적으로 우유에 존재하는 기능성 성분들에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다. 우유에서 발견된 기능성 성분 중 대표적인 생리활성물질은 단백질질 펩타이드로서 체내에서 일어나는 우유단백질의 소화과정에 의해 면역증강 활성 등이 나타날 수 있다. 하지만 이러한 단백질 계열의 면역조절 물질은 다양한 인체 내 환경 인자에 의해 안정성이 유지되지 않으며 크기가 다른 기능성 물질에 비해 커서 장관에서의 소화흡수가 떨어지는 단점을 가지고 있다. 우유에는 이러한 일반 영양 성분 이외에 미량으로 존재하지만 신생동물의 성장 및 발달에 핵심적인 역할을 하는 특정 성장인자(growth factor)

그림 4. 모유를 통한 miRNA 및 영양소의 전달 및 흡수 과정(Alsaweed et al., 2015)



가 존재하는데 여기에 포함되는 대표적인 성장인자는 인슐린유사성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 상피세포성장인자(epidermal growth factor, EGF), 신경세포성장인자(nerve growth factor, NGF)가 있으며, 사이토카인, 면역 글로불린, 락토페린, 라이소자임, 일부 시알산 등 면역역과 관련된 중요한 성분들은 신생동물의 초기 발달에서 다양한 병원균의 감염으로부터 보호해주는 중요한 역할을 하는 것으로 알려짐에 따라 우유 내 존재하는 기능성 성분에 대한 중요성이 계속해서 강조되고 있다.

포유동물의 경우 엑소좀(exosome)은 RNA 및 단백질 운반물질이 들어있는 작은 크기(30-150 nm)의 소포로서 배양시 모든 세포 유형에서 분비되며 혈액, 타액, 소변, CSF에서 자연적으로 발생하는 것으로 밝혀지고 있다. 엑소좀의 분비 및 흡수, 조성, '운반물질'의 정확한 분자적 기전과 이에 따른 기능은 최근에야 밝혀지기 시작하였는데, 현재 엑소좀은 세포간 신호 전달 목적으로 특별히 분비되는 것으로 이해되고 있다(EI-Andaloussi et al., 2013). 흥미롭게도 최근 5년간 모유 내에 면역증진과 관련되는 엑소좀의 존재가 보고되면서 모유 내 존재하는 중요 식이성 small RNA를 분석하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 모유에 존재하는 small RNA들이 엑소좀으로 피복되어 있어 인체 소화기관에 통과 시 RNase와 낮은 pH 등의 다양한 환경에서도 저항성을 가지고 있으며, 안정적으로 영유아의 장내에 도달하게 되어 특이적인 면역 증강활성

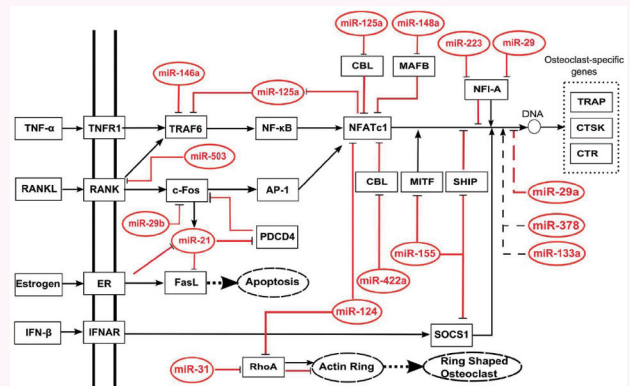
이 나타날 것으로 보고되고 있다(그림 4). 최근 모유 뿐만 아니라 다양한 낙농유제품 제조에 광범위하게 사용되고 있는 우유 안에서 small RNA가 존재한다는 것이 밝혀지면서(Chen et al., 2010) 이들의 특성을 연구하고자 하는 시도가 일부 연구자들에 의해 이루어지고 있다. 하지만 아직까지 관련연구의 자료부족으로 축산 가공분야에서 중요하게 다뤄지는 우유를 대상으로 새로운 유전물질소재로 인식하여 식이성 신소재로 이를 분리하고 이들의 기능성, 특히 골다공증과 연계하여 비교, 분석한 보고는 국내외적으로 전무한 실정이다.

3. 골다공증 예방을 위한 국내외 우유 유전소재 연구 현황

현재 골다공증 예방을 위한 식품소재는 국내의 경우 기능성 식품소재인 대두이소플라본과 또는 추출물의 골다공증 예방효과에 대한 연구가 주류를 이루고 있으며(Choi et al., 2001), 한방에서 전통적으로 생약재로 사용되어 오던 홍화씨(홍화씨 추출물)나 칩의 골다공증 예방 또는 치료효과를 검증하기 위한 연구가 수행된 바 있다(Kim et al., 2002). 또한 국내 다양한 자생천연 식용자원의 추출물들을 이용하여 조골세포의 증식과 분화에 미치는 효과를 조사한 결과 미역취 뿌리 추출물이 조골세포의 활성을 향상시켰다고 보고하였다. 외국의 경우에도 유사하게 식물성 유래 식품소재로써 대두단백질 또는 대두 추출물에 국한되어 있는 실정이며 그 작용기전은 phytoestrogen 효과로 설명되고 있다(Arjmandi et al., 1996). 최근 홍차추출물이 난소절제 된 골다공증 모델에서 효과가 있었다는 보고가 발표되었으나 그 작용기전은 기존 보고와 동일하였다(Das et al., 2005).

흥미롭게도 미국과 유럽, 일본 등 낙농선진국의 경우 축산식품 유래 골다공증 예방소재에 대한 연구가 보다 활발하게 진행되어 왔다. 축산식품의 경우, 유청단백질의 급여가 난소절제 된 쥐의 골강도와 골세포 대사 및 미네랄화를 조절하는데 관여하는 골기질 단백질 collagen의 구성성분인 hydroxyproline의 함량을 증가시킬 수 있음이 보

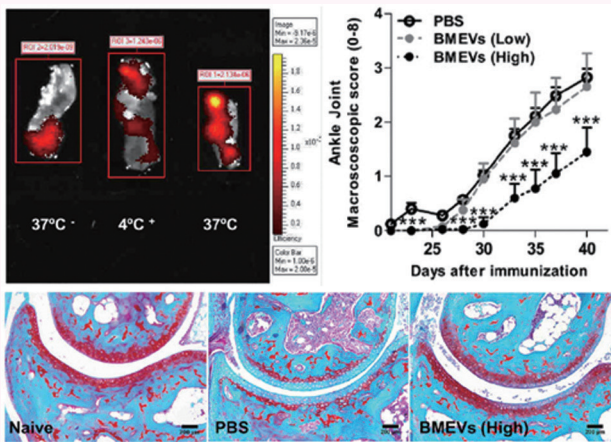
그림 5. 골다공증에 관여하는 miRNA의 조절 네트워크(Tang et al., 2014)



고되었다(Toba et al., 2000). 또한 유청단백질이 세포배양 실험에서 조골전구세포주의 증식을 향상시키는 반면, 파골세포의 골흡수를 감소시킬 수 있는 능력이 확인됨에 따라 유청단백질에 존재하는 활성성분을 구명하려는 연구가 지속적으로 수행되었다(Toba et al., 2000). Yamamura et al. (1999)은 조골전구세포의 증식을 촉진하는 유청단백질 성분은 분자량이 약 10 Kda에 해당하는 HMG1(high mobility group protein)일 것으로 추정하였으며 이 단백질은 양이온크로마토그래피의 정제과정에서 결합하였으므로 염기성단백질(milk basic protein fraction; MBP)이라고 보고하였다. 최근 임상실험 결과 MBP는 건강한 성인여성에서 골밀도와 골흡수를 저해하는 효과가 관찰되었으며(Aoe et al., 2001; Yamamura et al., 2002) 골흡수를 감소시키는 원인은 파골세포가 cystein protease를 분비하여 bone matrix의 collagen을 분해하는 기작을 저해하기 때문이라고 하였다(Matsuoka et al., 2002). 하지만 이러한 MBP는 우유에 매우 적은 양만이 존재하는 단점 등 제한적인 적용 가능성만을 가질 뿐 보다 효율적으로 골다공증에 효능을 가지는 새로운 우유성분, 특히 유전소재에 대한 보고는 없는 실정이다.

마이크로RNA를 포함하는 small RNA는 다양한 생물학적인 기능을 조절하는 중요한 인자로서 생물학, 의학 분야에서 활발한 연구가 진행되면서 골세포분화와 기능, 뼈의 발달과 질병에도 관여할 수 있다는 연구가 국외연구자들에 의해 연구되고 있다(그림 5). 미성숙 파골세포가 성

그림 6. 우유유래 exosome을 이용한 류마티스 치료적 접근(Artz et al., 2015)



속 파골세포로 분화하는 동안에 44개의 마이크로RNA들이 2배 이상증가 하였으며(Kagiya et al., 2012), 골흡수를 조절하는데 있어 Dicer가 관여하고 있어서 파골세포 생성 과정의 새로운 조절인자로서의 가능성이 보고되었다(Mizoguchi et al., 2010). 특히, miR-29b가 조골전구세포의 분화의 억제역할을 하는 단백질들인, HDAC4, TGFβ3, ACVR2A, CTNNBIP1, DUSP2의 mRNA에 붙어 직접 방해함으로써 골형성을 촉진하는 인자인, Runx2의 기능을 증진시킨다고 보고되었다(Li et al., 2009). miR-21, miR-155, miR-223등이 파골세포분화에 중요한 조절인자로서 잘 알려져 있으나(Xia et al., 2011) 우유 유래의 식이성 small RNA와 관련된 직접적인 골다공증 조절인자는 연구된 바 없는 실정이다. Kosaka 등 (2010)은 포유시기별 (0-6개월 vs. 6개월 이상) 모유를 대상으로 miRNA의 분포를 분석하고 miR-181a, miR-17, miR-155, miR-92같은 모유에 존재하는 특이적인 면역 관련 miRNA를 선별하여 유성분에서의 면역관련 miRNA의 적용가능성을 최초로 보고하였으나, 그 이후로 현재까지도 세포 및 동물 실험에서의 정확한 면역기능을 검증하는 연구는 보고되지 않았을 뿐 아니라, 섭취가 가능한 유성분 miRNA 관한 대부분의 연구는 고령화 사회에서의 문제가 되는 노인성 질환에 대한 예방 및 치료적인 접근은 등한시 되어 있는 실정이다.

최근 Chen 등(2010)은 최초로 원유를 대상으로 다양한 비유별, 계절별로 miRNA의 발현변화를 프로파일링 하여 최종적으로 일곱 개의 milk-specific miRNA를 최초로 선 발하였다. 하지만 유성분의 source가 우유로 한정되어 있어 현재 축산환경에서 사용되고 있는 경제형 모계동물의 유성분을 대표하기 어려우며 또한, 유성분의 small RNA를 이동시키는 exosome의 분리 최적화를 생략한 추출방법을 사용하여 검출의 효율성이 현저히 떨어지는 등 산업적인 적용은 미흡한 것으로 보고되었다. 흥미롭게도 Izumi 등(2012)은 최근 우유에서 분리한 miRNA를 대상으로 열처리, 농축 등 다양한 시유 가공단계에서의 발현 변화와 안정성을 탐색하였는데 이는 processing단계에서 miRNA의 안정성 및 기능성 식품 소재로서의 가능성을 탐색한 최초의 보고였으나 이들의 보고 또한 시유가공만을 대상으로 안정성을 탐색하였을 뿐 치즈나 발효유와 같은 발효환경에서의 miRNA 안정성은 검토되지 않았다.

흥미롭게도 최근 Artz 등(2015)은 우유 유래의 exosome등을 포함한 vesicles을 추출하여 절제된 마우스의 소장에 24시간동안 분해되지 않고 비교적 안정하게 존재하는 것을 확인하였고, 류마티스를 유발하는 마우스에게 경구 투여로 섭취시켜 류마티스 발병 시기가 늦춰지고, 골수조직의 염증이 감소되는 것이 보고되었다(그림 6). 우유 exosome을 이용하여 노인성질환인 류마티스에 대한 치료적인 접근을 시도한 최초의 연구로서 매우 고무적인 결과를 내놓았으나, 이후의 치료효과에 대한 검증과 small RNA관련한 정확한 분자기작 연구가 보고되지 않았고, 매우 소수의 연구팀에 의해 수행되고 있는 상황이라 관련 연구의 진행이 매우 느리게 진행되고 있는 실정이다.

III. 결론

현재까지의 골다공증과 같은 고령층을 대상으로 한 고부가가치 식품시장은 대부분 식물성 유래의 식품을 대상으로 연구가 주로 이루어져 왔다. 하지만 최근 소비자들의 탄수화물과 지방과 같은 식품영양성분에 대한 인식이 급변하고 있는 현 상황에서 동물성 유래 축산식품의 가능

성 발골 요구도는 어느 때보다 높은 시점인 것으로 판단된다. 프로바이오틱스 발효유에 대한 건강기능성 관심 증대와 함께 고부가가치 건강식품으로 발전 가능성이 높은 유제품의 경우 우유, 특히 초유에 많이 존재하는 식이성 유전소재의 경우 조골세포 및 파골세포의 증식/분화를 적절하게 제어함으로써 골밀도를 강화시킬 수 있는 새로운 기능성 소재로 활용도가 매우 높을 것으로 판단됨과 동시에 기존의 우유 내 존재하는 영양성분에 의해 뼈에 필요한 칼슘, 단백질을 공급하는 기능 이외에 골대사(bone

matabolism)의 조절에 직접적으로 관여함으로써 효과적으로 골다공증을 예방하는 데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2014R1A1A2008481).

참고문헌

1. Alsaweed M, Hepworth AR, Lefèvre C, Hartmann PE, Geddes DT, Hassiotou F. 2015. Human Milk MicroRNA and Total RNA Differ Depending on Milk Fractionation. *J Cell Biochem*, 116(10): 2397–407
2. Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. 1996. Dietary soybean protein prevents bone loss in ovariectomized rat model of osteoporosis. *J. Nutr*, 126: 161–167
3. Arntz OJ, Pieters BC, Oliveira MC, Broeren MG, Bennink MB, de Vries M, van Lent PL, Koenders MI, van den Berg WB, van der Kraan PM, van de Loo FA. 2015. Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models. *Mol Nutr Food Res*, 59(9): 1701–12
4. Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluza D, Tréguer K, Carmona G, Bonauer A, Horrevoets AJ, Didier N, Girmatsion Z, Biliczki P, Ehrlich JR, Katus HA, Müller OJ, Potente M, Zeiher AM, Hermeking H, Dimmeler S. 2013. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature*, 495(7439): 107–110
5. Chen X, Gao C, Li H, Huang L, Sun Q, Dong Y, Tian C, Gao S, Dong H, Guan D, Hu X, Zhao S, Li L, Zhu L, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. 2010. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res*, 20(10): 1128–37
6. Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo S. J. 2001. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 56: 733–739
7. Christenson RH. 1997. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem*, 30(8): 573–593
8. Das AS, Das D, Mukherjee M, Mukherjee S, Mitra C. 2005. Phytoestrogenic effect of black tea extract (*Camellia sinensis*) in an oophorectomized rat (*Rattus norvegicus*) model of osteoporosis. *Life Sci*, 77: 3049–3057
9. El-Andaloussi S, Lakhel S, Mäger I, Wood MJ. 2013. Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(3): 391–397
10. Guay C, Regazzi R. 2013. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 9(9): 513–521
11. Izumi H, Kosaka N, Shimizu T, Sekine K, Ochiya T, Takase M. 2012. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J Dairy Sci*, 95(9): 4831–41
12. Kagiya T, Nakamura S. 2013. Expression profiling of microRNAs in RAW264.7 cells treated with a combination of tumor necrosis factor alpha and RANKL during osteoclast differentiation. *J Periodontal Res*, 48(3): 373–85
13. Kim C, Ha H, Kim H, Lee JH, Song KY. 2002. Pueraria lobata Ohwi as an osteoporosis therapeutics. *Korean J. Food Sci. Technol*, 34: 710–718

14. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. 2010. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk, *Silence*, 1(1): 7
15. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, 75(5): 843–854
16. Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, Aqeilan RI, Garzon R, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. 2009. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation, *J Biol Chem*, 284(23): 15676–15684
17. Matsuoka Y, Serizawa A, Yoshioka T, Yamamura J, Morita Y, Kawakami H, Toba Y, Takada Y, Kumegawa M. 2002. Cystatin C in milk basic protein (MBP) and its inhibitory effect on bone resorption in vitro, *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(12): 2531–2536
18. Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H, Nakashima K, Nakamura T, Kato S, Miyasaka N, Ezura Y, Noda M. 2010. Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption, *J Cell Biochem*, 109(5): 866–75
19. Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. 2012. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms, *Trends Endocrinol Metab*, 23(11): 582–590
20. Parfitt AM. 1994. Vitamin D receptor genotypes in osteoporosis, *Lancet*, 344(8936): 1580
21. Toba Y, Takada Y, Yamamura J, Tanaka M, Matsuoka Y, Kawakami H, Itabashi A, Aoe S, Kumegawa M. 2000. Milk basic protein: a novel protective function of milk against osteoporosis., *Bone*, 27(3): 403–408
22. Xia JH, He XP, Bai ZY, Yue GH. 2011. Identification and characterization of 63 MicroRNAs in the Asian seabass *Lates calcarifer*, *PLoS One*, 6(3): e17537
23. Yamamura J, Aoe S, Toba Y, Motouri M, Kawakami H, Kumegawa M, Itabashi A, Takada Y. 2002. Milk basic protein (MBP) increases radial bone mineral density in healthy adult women, *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 66: 702–704
24. Yamamura J, Takada Y, Goto M, Kumegawa M, Aoe S. 1999. High mobility group-like protein in bovine milk stimulates the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cell, *Biochem, Biophys, Res, Commun*, 261: 113–117