[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.03.004

· 基础研究 ·

银杏叶中异鼠李素对RAW264.7细胞向破骨细胞分化的影响及其分子机制

李婧[1]，程梁[1]，郭吕华[2]，李彤[1]，杨沫扬[2]，王俊妹[1]，吴哲[1,2]
1.吉林大学口腔医学院修复科，吉林 长春（130021）；2.广州医科大学口腔医学院修复科，广东 广州（510500）

【摘要】 目的 探讨银杏叶中异鼠李素（isorhamnetin，ISO）对RAW264.7细胞向破骨细胞分化的影响及其可能的相关分子机制。**方法** 在核因子κB受体活化因子配基（receptor activator of NF-κB ligand，RANKL）诱导RAW264.7细胞分化为破骨细胞的同时，加入不同浓度的ISO（1～10 μM），研究其对RAW264.7细胞向破骨细胞分化的影响，通过CCK8法检测及评估各作用浓度ISO的细胞毒性，通过抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate-resistant acid phosphatase staining，TRAP）染色及骨片吸收效果判定其对RAW264.7细胞向破骨细胞分化的影响。实时定量PCR检测破骨细胞分化过程的标志性基因：TRAP、组织蛋白酶K（cathepsin K，Ctsk）、金属基质蛋白酶9（matrix metallo protein，MMP-9）；分化相关转录因子：原癌基因c-Fos（proto-oncogene protein，c-Fos）、核转录因子激活的T细胞1（nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1，NFATc1）的表达及破骨细胞分化下游因子NF-κB p65信号通路的磷酸化水平。**结果** 不同浓度的ISO（1～10 μM）对RAW264.7细胞无细胞毒性，并且能抑制TRAP活性，减少骨吸收陷窝数量，在浓度为10 μM时最为显著；ISO能显著降低TRAP、Ctsk、MMP-9、c-Fos、NFATc1及NF-κB p65的mRNA表达。**结论** ISO对RAW264.7细胞向破骨细胞的分化具有抑制作用，其机制可能与经典NF-κB通路的抑制有关。

【关键词】 银杏叶提取物；黄酮类化合物；异鼠李素；破骨细胞；破骨分化；核因子κB受体活化因子配基；核因子κB受体活化因子
【中图分类号】 R783.4　**【文献标志码】** A　**【文章编号】** 2096-1456（2018）03-0158-08
【引用著录格式】 李婧，程梁，郭吕华，等. 银杏叶中异鼠李素对RAW264.7细胞向破骨细胞分化的影响及其分子机制[J]. 口腔疾病防治，2018，26(3)：158-165.

Effect and molecular mechanism of isorhamnetin extracted from Ginkgo biloba on the differentiation of RAW264.7 cells into osteoclasts

LI Jing[1], CHENG Liang[1], GUO Lühua[2], LI Tong[1], YANG Moyang[2], WANG Junmei[1], WU Zhe[1,2]. 1. Department of Prothodontics, School and Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Prothodontics, Stomatology School of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510500, China
Corresponding author: LI Jing, Email: miaoli198@outlook.com, Tel: 0086-20-17576085007

【Abstract】 Objective To investigate the effect and potential molecular mechanisms of isorhamnetin (ISO) extracted from Ginkgo biloba on the differentiation of osteoclasts. **Methods** Osteoclast precursor RAW264.7 cells were induced with RANKL to differentiate into mature osteoclasts. Different concentrations of ISO were added to RAW264.7 cells to determine its effect on osteoclast differentiation. CCK8 was used to evaluate the effect of ISO on cytotoxicity. The impact of ISO on the osteoclast differentiation process was investigated by analyzing tartrate resistance and bone resorption lacuna. Real-time PCR was performed to analyze the levels of differentiation marker genes, including tartrate resistant acid phosphatase (Trap), cathepsin K (Ctsk), and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9); differentiation-related transcription

【收稿日期】 2017-12-06；**【修回日期】** 2017-12-24
【基金项目】 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目（吉教科合字[2015]第530号）；广东省科技计划国际合作项目（2017A050501041）
【作者简介】 李婧，医师，硕士，Email：miaoli198@outlook.com
【通信作者】 吴哲，教授，博士，Email：1378725107@qq.com

factors, including the proto-oncogene protein c-Fos, nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1(NFATc1); and the levels of downstream NF-κB p65 signaling pathway phosphorylation. Using the above-described method, we verified that ISO exerted an inhibitory effect on osteoclast differentiation and explored related molecular mechanisms. **Results** Different concentrations of ISO (1-10 μM) had no cytotoxic effects on RAW264.7 cells, inhibited TRAP activity and decreased the number of bone resorption lacuna during osteoclast differentiation. When applied at a concentration of 10 μM, its inhibitory effect was significant. In addition, ISO significantly reduced the expression levels of Trap, Ctsk, MMP-9, c-Fos, NFATc1 and NF-κB p65 mRNA. **Conclusion** ISO extracted from Ginkgo biloba extract exerted an inhibitory effect on osteoclast differentiation, and the mechanism underlying its activity may involve the inhibition of the classical NF-κB pathway.

【Key words】 Ginkgo biloba extract; Flavonoids; Isorhamnetin; Osteoclast; Osteoclast differentiation; RANKL; NF-κB

骨质疏松症(osteoporosis,OP)是由骨形成及骨吸收活动不平衡所致骨含量降低,以骨小梁变细、断裂、数量减少、皮质骨多孔变薄为特征,致使骨的脆性增加并提高骨折危险性的一种全身疾病[1]。目前学者们已经达成共识,骨质疏松症加速牙槽嵴骨吸收,导致剩余牙槽骨的高度和宽度降低,影响义齿的固位和稳定,给后期的修复和预后带来很大困扰。因此,如何预防剩余牙槽嵴骨吸收和防治骨质疏松一直是学者们研究的重要问题。破骨细胞主导的骨吸收及成骨细胞主导的骨形成之间的平衡对维持骨代谢具有重要作用,骨吸收程度大于骨形成就会引起骨质疏松[2]。目前,发掘用于治疗骨质疏松症且毒副作用小的药物成为研究热点。银杏叶属植物性雌激素,本实验组前期研究表明,银杏叶提取物(ginkgobilobaextract,GBE)在调节骨质疏松过程中具有双向作用,既促成骨分化也可抑制破骨分化[3-5],为进一步了解其主要黄酮成分对骨代谢方面的作用,为防治骨质疏松症提供新的方法,本文主要探究银杏叶黄酮中的异鼠李素(isorhamnetin,ISO)在核因子κB受体活化因子配基(receptor activator of NF-κB ligand,RANKL)诱导形成破骨细胞过程中的作用效果。本实验将以RANKL诱导小鼠源性破骨前体细胞RAW264.7作为研究对象,观察ISO对其分化成为破骨细胞过程中的影响,探讨ISO对RAW264.7细胞向破骨细胞破骨分化的分子机制,为ISO防治骨质疏松提供一定的实验基础。

1　材料和方法

1.1　主要试剂和仪器

ISO(徐州恒凯银杏制品有限公司)、α-MEM培养基(Gibco,美国)、胎牛血清(Gibco,美国)、TRAP试剂盒(天津血研所)、RANKL(Peprotech,美国)、低温高速离心机(Eppendorf,德国)、二氧化碳孵箱(Sanyo,日本)、CCK-8试剂盒(Dojindo,日本)、PCR试剂盒(Takara,美国)等。RAW264.7细胞(中国科学院上海生命科学研究院)。

1.2　ISO的配制

称取5 mg的ISO溶于100 μL二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO)溶液中,置于-20 ℃保存。用α-MEM梯度稀释,混匀后过滤配置成母液浓度为500 μM的异鼠李素,实验药物浓度经梯度稀释获得。

1.3　RANKL浓度梯度筛选

将RAW264.7细胞以每孔1.0 × 10^3个细胞的浓度接种于96孔板中,培养7 d,观察并计算浓度10、20、50、100、200 ng/mL的RANKL作用产生的成熟破骨细胞个数。TRAP染色计数标准:5组分别在100倍视野下随机选取10个视野进行计数,取平均值,细胞核≥3个,上述实验重复3次。

1.4　细胞培养方式及分组

小鼠源RAW264.7培养于10%完全培养基(含10% Gibco胎牛血清,100 IU/mL双抗,DMEM基础培养基),置37 ℃,5% CO_2孵育箱中常规培养,每48 h换液1次,待细胞长至铺满皿底80%后用0.25%胰酶消化传代。RAW264.7细胞80%融合后,用ISO干预RANKL诱导RAW264.7细胞分化过程时,根据实验不同需求分组干预。

①空白对照组,0 μM ISO + 0 ng/mL RANKL;②阳性对照组,0 μM ISO + 50 ng/mL RANKL;③4个实验组:1 μM ISO组、2 μM ISO组、5 μM ISO组、10 μM ISO组,即分别用1、2、5、10 μM的ISO及50 ng/mL RANKL进行干预,每个组均设3个平行孔。为检

测药物作用后破骨细胞特异性基因表达做PCR检测，因空白对照组未经RANKL诱导，RAW264.7细胞不具有破骨细胞活性，未能表达特异性基因，所以PCR检测时未纳入空白对照组。

1.5　ISO对RAW264.7增殖的影响

用CCK-8法检测ISO对RAW264.7细胞增殖的影响。按上述ISO（0～10 μM）组，每组设置3个复孔，以每孔1.0×10^3个细胞的浓度接种于96孔板，分别在培养1、3、5 d时，使用酶标仪450 nm波长下检测数据进行定量分析。

1.6　破骨细胞TRAP染色

按照上述诱导方法及分组进行诱导，7 d后进行TRAP染色，具体方法参照说明书进行操作。计数标准：TRAP染色的6组细胞分别在100倍视野下随机选取10个视野进行计数，取平均值；细胞呈现玫瑰红色或粉红色，细胞核≥3个，上述实验重复3次。

1.7　骨片的制备及骨吸收陷窝的电镜观察

取新鲜牛股骨，沿长轴方向切开，去松质骨及骨髓，硬组织切片机切片切成大约100 μM厚的牛骨片。将灭菌的牛骨片放入96孔板中，每组3个复孔，将RAW264.7以每孔8.0×10^3个接种于骨片上，震荡均匀，培养液为α-MEM培养液。24 h后，细胞贴壁，然后根据上述分组及情况，每2 d更换1次液至对照组出现大量的破骨细胞，取出经氢氧化铵超声震荡10 min将细胞从骨片上处理掉，经漂洗，脱水、干燥后置于扫描电镜观察拍照。

1.8　实时定量PCR检测

将RAW264.7细胞按上述分组诱导培养7 d，按照细胞RNA提取试剂盒提取总mRNA，按照RT-PCR Kit说明书逆转录为cDNA，RT-PCR以GAPDH为内参，检测抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate-resistant acid phosphatase staining，TRAP）、组织蛋白酶K（cathepsin K，Ctsk）、金属基质蛋白酶9（matrix metallo protein，MMP-9）、核转录因子激活的T细胞1（nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1，NFATc1）及NF-κB p65基因的表达。

TRAP引物序列：上游引物5′-GGGCTCTGTCTTGGCTCATCT-3′；下游引物5′-CCTGGTCTGAACCCTGGAAC-3′，产物大小115 bp。Ctsk引物序列：上游引物5′-GAACTTGAACACCCACATCC-3′；下游引物5′-GTGACTTCCGCAATCCCTTAC-3′，产物大小129 bp。MMP-9引物序列：上游引物5′-CTGCTGGGCCTACAAATCAT-3′；下游引物5′-GGTAGTAAGGGCTGGGGAAG-3′；产物大小169 bp。c-Fos：上游引物5′-CTGTCACCGTGGGGATAAAG-3′；下游引物5′-GACATGATGTTCTCGGGTTT-3′，产物大小200 bp。NFATc1引物序列：上游引物5′-GTGAAGAGGCTACAGGTATG-3′；下游引物5′-CCGTCCAAGTCAGTTTCTATG-3′；产物大小217 bp。p65引物序列：上游引物5′-TGTTTGGAGTCCGAGACATC-3′；下游引物5′-CAAGGCTACTCCCCCTACCA-3′；产物大小94 bp。GAPDH引物序列：上游引物5′-ATCCCATCACCATCTTCC-3′；下游引物5′-TGACCCTTTTGGCTCCCC-3′，产物大小111 bp。

1.9　统计学分析

数据采用SPSS 20.0统计学软件进行分析处理，CCK8检测结果使用双因素方差分析，实时定量PCR结果采用独立样本t检验，$P<0.05$为有统计学意义。

2　结　果

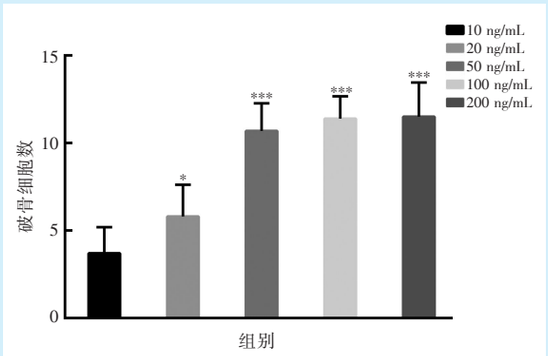
2.1　RANKL的浓度筛选

加入不同浓度的RANKL作用3 d可见细胞间隙变小模糊，细胞伸出伪足，聚集成团。第5天细胞融合现象显著，细胞形态多样，体积增大，胞浆伸展，并空泡化，有成长条形、椭圆形及圆形细胞。细胞核清晰可见，数目在3～20个不等，细胞体积大。浓度为10 ng/mL RANKL时，破骨细胞数目为（3.70±0.47），相对于10 ng/mL RANKL诱导条件，20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL及200 ng/mL RANKL成熟破骨细胞数目显著增多（图1），分别为5.80±0.57（$t=2.826$，$P=0.011$）、10.70±0.50（$t=10.22$，$P<0.001$）、11.40±0.40（$t=12.44$，$P<0.001$）、11.50±0.62（$t=10.01$，$P<0.001$），破骨细胞数目依次增加，而50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL组间差异均无统计学意义（$P>0.05$）。综上，用50 ng/mL可成功诱导出破骨细胞。在后续实验中，均运用50 ng/mL的RANKL诱导破骨细胞。

2.2　ISO对RAW264.7细胞增殖的影响

利用CCK8法测试ISO（0～10 μM）作用1、3、5 d对RAW264.7细胞增殖的影响。通过多变量分析方差的结果给出统计量显示，检验结果一致，时间因素$P<0.001$，说明各个时间点数据的差异有统计学意义，浓度与时间二者存在交互作用，$P<0.05$，说明时间因素（即1 d、3 d和5 d）的作用随着浓度分组（0、1 μM、2 μM、5 μM和10 μM）的不同而不同。

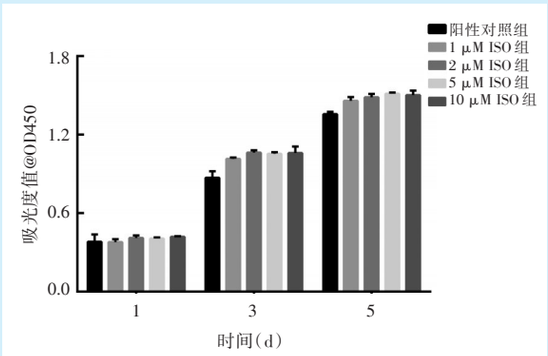
1 d时，各组CCK8测量值的总体差异无统计学意义（$F=1.204$，$P=0.368$）；3 d（$F=18.138$，$P<0.000\ 1$）和5 d（$F=18.664$，$P<0.000\ 1$）时，各组CCK8测量值的总体差异均有统计学意义。3 d、5 d时，（1～10 μM）各浓度实验组与空白对照组（0 μM）相比，CCK8测量值均明显增高，差异有统计学意义（$P<0.001$）；而实验组间差异无统计学意义，即不超过5 d，ISO浓度不超过10 μM，可排除药物对RAW264.7的细胞毒性（图2）。



*为与10 ng/mL RANKL诱导条件时比较$P<0.05$，***为与10 ng/mL RANKL诱导条件时比较$P<0.001$。

图1　不同浓度RANKL诱导RAW264.7细胞5 d的破骨细胞数目

Figure 1　Different concentrations of RANKL induced different numbers of osteoclasts in RAW264.7 cells cultured for 5 days



3 d、5 d时，（1～10 μM）不同浓度实验组与阳性对照组比较，差异有统计学意义；3 d、5 d时，各浓度实验组组间差异无统计学意义。

图2　ISO对RAW264.7增殖的影响

Figure 2　The effect of ISO on the proliferation of RAW264.7 cells

2.3　不同浓度ISO作用后对RAW264.7向破骨细胞分化的影响

浓度为1～10 μM的实验组在培养7 d TRAP染色量明显低于只加50 ng/mL RANKL的阳性对照组，阳性对照组50 ng/mL RANKL诱导的RAW264.7细胞分化成为了典型的TRAP染色阳性的多个核的破骨细胞；而实验组中这种典型的TRAP染色阳性的多核细胞破骨细胞数量明显减少，在5 μM ISO组有近50%的破骨细胞未能分化成熟，而在10 μM ISO组为向破骨细胞分化几乎完全受到抑制。

通过破骨细胞TRAP阳性计数，与阳性对照组TRAP阳性破骨细胞数目比较，加入1 μM（$t=3.187$，$P=0.033$）、2 μM（$t=4.685$，$P=0.009$）、5 μM（$t=6.204$，$P=0.003$）、10 μM（$t=10.309$，$P<0.001$）的ISO均有明显抑制作用，且呈浓度依赖趋势，差异具有统计学意义。

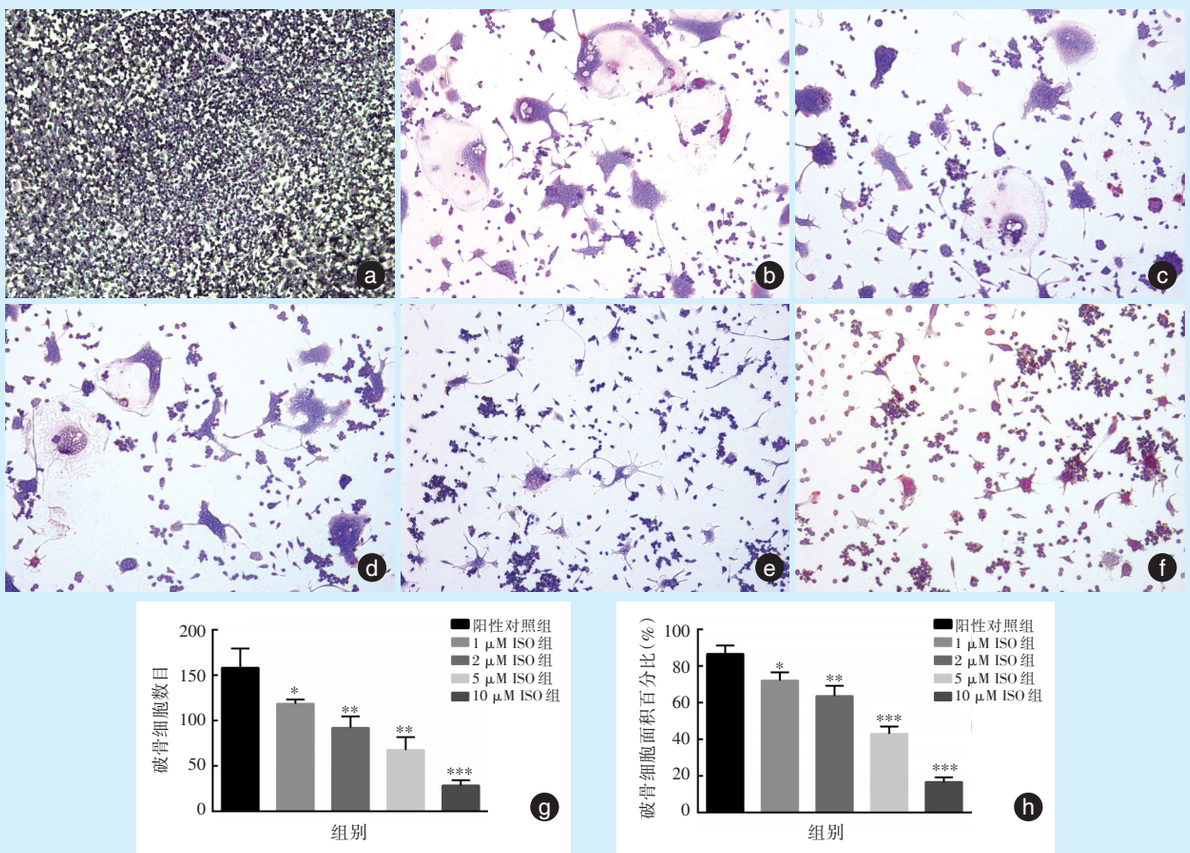
通过Image J分析成熟破骨细胞面积，与阳性对照组成熟破骨细胞面积比较，加入1 μM（$t=3.951$，$P=0.017$）、2 μM（$t=5.597$，$P=0.005$）、5 μM（$t=12.548$，$P<0.001$）、10 μM（$t=23.479$，$P<0.001$）的ISO均有明显抑制作用，且呈浓度依赖趋势，差异具有统计学意义（图3）。

2.4　实时定量PCR检测结果

RAW264.7细胞培养7 d后，用RT-PCR分别对各组TRAP、Ctsk、MMP-9及NFATc-1等的基因表达水平进行检测，结果如图4所示。

2.4.1　TRAP基因　与阳性对照组相比，当加入1、2、5、10 μM ISO时，TRAP的基因表达量随ISO作用浓度依次降低了9.40%（$t=1.264$，$P=0.275$）、24.26%（$t=4.568$，$P=0.010$）、50.77%（$t=33.426$，$P<0.001$）、62.79%（$t=65.143$，$P<0.001$），其中加入2、5、10 μM ISO后，差异有统计学意义。

2.4.2　Ctsk基因　与阳性对照组相比，当加入1、2、5、10 μM ISO时，经不同浓度ISO处理的Ctsk基因表达量分别降低了47.71%（$t=14.686$，$P<0.001$）、57.73%（$t=12.247$，$P<0.001$）、63.67%（$t=15.698$，$P<0.001$）、75.07%（$t=390.754$，$P<0.001$），差异有统计学意义。



a：空白对照组（0 μM ISO + 0 ng/mL RANKL）；b：阳性对照组（0 μM ISO + 50 ng/mL RANKL）；c：1 μM ISO 组（1 μM ISO + 50 ng/mL RANKL）；d：2 μM ISO 组（2 μM ISO + 50 ng/mL RANKL）；e：5 μM ISO 组（5 μM ISO + 50 ng/mL RANKL）；f：10 μM ISO 组（10 μM ISO + 50 ng/mL RANKL）；g：阳性对照组及实验组 TRAP 染色阳性细胞数量；h：阳性对照组和实验组 TRAP 阳性的破骨细胞相对于空白对照组所占的面积百分比。*为与阳性对照组比较 $P < 0.05$；**为与阳性对照组比较 $P < 0.01$；***为与阳性对照组比较 $P < 0.001$。ISO：异鼠李素；RANKL：核因子 κB 受体活化因子配基；TRAP：抗酒石酸酸性磷酸酶染色。

图 3　不同浓度 ISO 作用后 TRAP 染色结果　× 100

Figure 3　The results of TRAP staining were affected by differences in the concentrations of ISO　× 100

2.4.3　MMP-9 基因　与阳性对照组相比，当加入 1、2、5、10 μM ISO 时，MMP-9 基因表达量分别降低了 20.46%（$t = 9.718$，$P = 0.001$）、33.30%（$t = 13.779$，$P < 0.001$）、62.54%（$t = 32.540$，$P < 0.001$）、70.81%（$t = 32.130$，$P < 0.001$），差异有统计学意义。

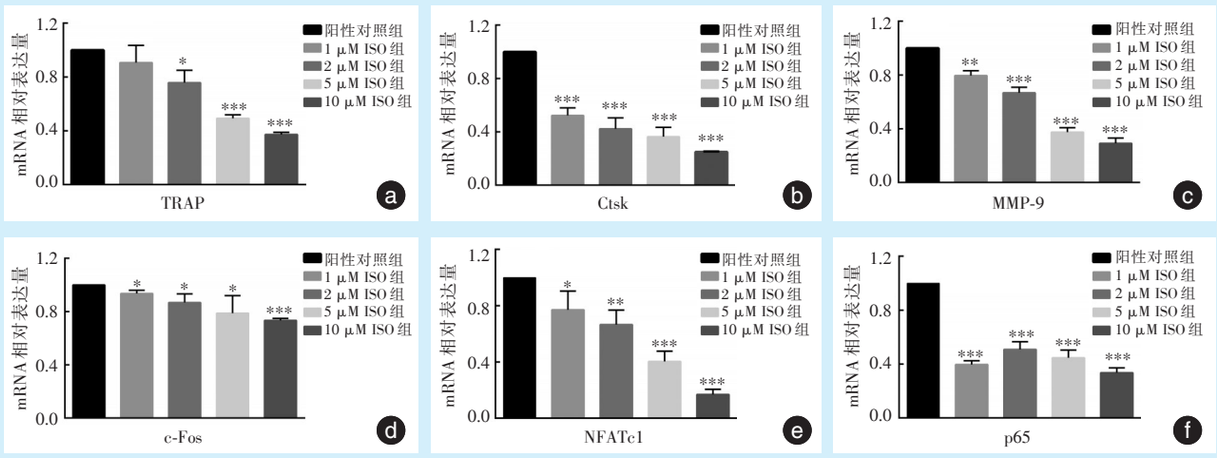
2.4.4　c-Fos 基因　与阳性对照组相比，当加入 1、2、5、10 μM ISO 时，c-Fos 基因表达分别下降了 6.47%（$t = 4.631$，$P = 0.010$）、13.21%（$t = 3.525$，$P = 0.024$）、21.20%（$t = 2.788$，$P = 0.049$）、26.62%（$t = 31.783$，$P < 0.001$），差异具有统计学意义。

2.4.5　NFATc1 基因　与阳性对照组相比，当加入 1、2、5、10 μM ISO 时，NFATc1 基因表达分别下降了 22.92%（$t = 2.986$，$P = 0.041$）、33.42%（$t = 5.615$，$P = 0.005$）、59.69%（$t = 14.007$，$P < 0.001$）、83.18%（$t = 38.236$，$P < 0.001$），差异具有统计学意义。

2.4.6　p65 基因　与阳性对照组相比，当加入 1、2、5、10 μM ISO 时，p65mRNA 表达水平明显下降，分别下降了 60.32%（$t = 38.316$，$P < 0.001$）、49.19%（$t = 14.8407$，$P < 0.001$）、55.32%（$t = 17.006$，$P < 0.001$）、66.46%（$t = 31.659$，$P < 0.001$），差异有统计学意义。

2.5　扫描电镜观察骨吸收陷窝结果

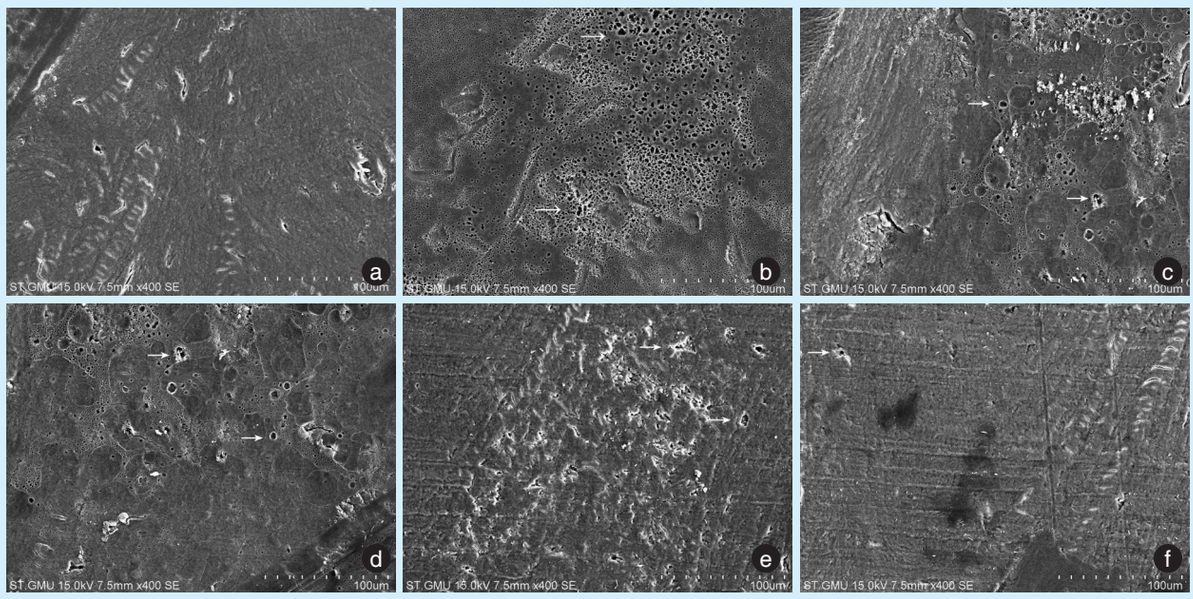
利用扫描电镜观察 ISO 作用骨髓来源的巨噬细胞 RAW264.71 处理过的牛股骨片，ISO 明显抑制破骨分化过程中的骨吸收陷窝形成，通过 Image J 进行吸收面积分析，与阳性对照组分析比较可知 ISO 作用后骨片吸收面积分别减少了 26.00%（$t = 2.310$，$P = 0.082$）、35.93%（$t = 3.996$，$P = 0.016$）、52.67%（$t = 4.996$，$P = 0.008$）、78.67%（$t = 8.494$，$P = 0.001$），差异具有统计学意义，并呈浓度依赖趋势（图 5）。

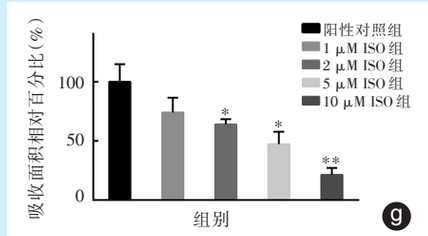


a：TRAP 基因变化；b：Ctsk 基因变化；c：MMP-9 基因变化；d：c-Fos 基因变化；e：NFATc1 基因变化；f：p65 基因变化；*为与阳性对照组比较，$P < 0.05$；**为与阳性对照组比较，$P < 0.01$；***为与阳性对照组比较，$P < 0.001$。TRAP：抗酒石酸酸性磷酸酶；Ctsk：组织蛋白酶 K；MMP-9：金属基质蛋白酶 9；NFATc1：核转录因子激活的 T 细胞 1。

图 4　PCR 检测 ISO 作用 RAW264.7 细胞后破骨细胞分化标志性基因相对表达情况

Figure 4　The relative expression levels of osteoclast differentiation marker genes in RAW264.7 cells were affected by ISO treatment as detected by PCR





a：空白对照组（0 μM ISO + 0 ng/mL RANKL）；b：阳性对照组（0 μM ISO + 50 ng/mL RANKL）；c：1 μM ISO 组（1 μM ISO + 50 ng/mL RANKL）；d：2 μM ISO 组（2 μM ISO + 50 ng/mL RANKL）；e：5 μM ISO 组（5 μM ISO + 50 ng/mL RANKL）；f：10 μM ISO 组（10 μM ISO + 50 ng/mL RANKL）；g：阳性对照组和实验组相对于空白对照组的骨吸收面积百分比；*为与阳性对照组比较 $P < 0.05$；**为与阳性对照组比较 $P < 0.01$。ISO：异鼠李素；RANKL：核因子 κB 受体活化因子配基。

图 5　ISO 作用后各组骨片骨吸收陷窝形成情况　扫描电镜　× 400

Figure 5　SEM images of bone resorption lacuna　× 400

3　讨　论

3.1　银杏叶提取物可调节骨代谢

骨质疏松的发生主要与骨重建过程中成骨细胞骨形成功能和破骨细胞骨吸收功能失衡有关。目前，国际上通用的银杏叶提取物标准品的组成为：24%的银杏叶黄酮、6%的银杏叶内酯以及≤5 ppm的银杏叶酸，其组成的成分中起主要药理作用的是黄酮类以及萜内酯类化合物[6]，本课题组前期以银杏叶提取物为研究对象，探讨其在体外对骨髓间充质干细胞增殖和分化方面的影响；体内不同给药方式对骨质疏松大鼠成骨的影响。研究发现：①不同浓度的银杏叶提取物对骨髓间充质干细胞的增殖无明显影响，但对成骨分化的相关基因BMP-2、Runx2 mRNA的表达也相对增高，对骨髓间充质干细胞的成骨分化具有积极意义；②银杏叶提取物可有效抑制大鼠骨髓间充质干细胞向脂肪细胞的分化，且抑制作用呈明显的药物依赖性；③银杏叶提取物可通过上调P38信号通路促进大鼠骨髓间充质干细胞向成骨分化及促进成骨细胞成骨的功能；④银杏叶提取物灌胃给药与腹腔注射给药对骨质疏松大鼠的成骨均有促进作用，促进成骨细胞分泌骨钙素，抑制破骨细胞的分泌TRAP，可以促进骨小梁的形成，增强骨的致密度，作用效果与给药方式和剂量有直接关系。但目前其主要黄酮单体与破骨的关系研究少，其中ISO对破骨细胞分化作用亦未明确，因此本实验选择ISO及破骨细胞的前体细胞作为研究对象。

3.2　50 ng/mL RANKL可诱导RAW264.7细胞为破骨细胞

破骨细胞（osteoclast，OC）是机体内唯一的溶骨细胞，起源于造血干细胞，其在集落刺激因子、肿瘤坏死因子等作用下，逐步分化融合形成多核巨细胞，破骨细胞能单独发挥吸收骨的功能，也能形成细胞群而发挥作用。因此，抑制破骨细胞分化是研究抗骨质疏松作用的重要途径之一[7-8]。

RAW264.7细胞是小鼠源性破骨前体细胞，源于Abelson小鼠白血病病毒所致的肿瘤，被认为代表早期分化阶段的破骨前体细胞。本实验研究发现仅用RANKL而不需要巨噬细胞集落刺激因子即可诱导出具有成熟破骨吸收功能的细胞，此结果与Battaglino等[9-10]研究一致。此外，本实验利用50 ng/mL的RANKL即可诱导出成熟破骨细胞，便于破骨样细胞形态及功能的研究。

3.3　ISO对RAW264.7细胞向破骨细胞分化具有抑制作用

RANKL是由成骨细胞或骨髓干细胞所分泌，可与破骨细胞或破骨细胞前体的表面的核因子κB受体活化因子（receptor activator of NF-κB，RANK）结合。继而激活RANK信号通路，这条信号通路对破骨细胞的进一步分化、成熟和生存起决定性作用。RANK胞浆内部结合肿瘤坏死因子受体相关因子（tumor necrosis factor receptor-associated factor，TRAF），将信号传递至下游信号通路如MAPK信号通路、NFAT信号通路、NF-κB信号通路、Src/PI3K/AKT信号通路。这些信号通路激活后，与破骨细胞的分化和成熟相关的一系列特异性基因如MMP-9、c-Fos、Ctsk、NFATc1、TRAP等表达上调，使破骨细胞前体进一步分化、相互融合为成熟的破骨细胞。Ctsk因可降解作为骨基质中最主要的Ⅰ型胶原，它在破骨细胞中选择性高表达是破骨细胞作用中最主要的酶，体内外抑制试验也证明了抑制Ctsk活性是治疗骨质疏松的可行途径[11-12]。MMP-9的主要作用是招募间质中破骨细胞前体进入骨，Sundaram等[13-14]的研究显示RANKL可诱导破骨前体细胞MMP-9基因的表达。c-Fos基因合成的fos蛋白是一种转录因子，fos蛋白和Jun蛋白可以合成AP-1复合物，其可调节NFATc1的表达[15]。NFATc1是一种重要的转录因子，尤其是RANKL诱导的破骨细胞分化的主调控因子，通过上调各种破骨细胞粘附、迁移、酸化无机和有机骨基质降解的基因，在调控破骨细胞融合及活化过程中起着举足轻重的作用[16-18]。p65是NF-κB核转录因子的核心亚基，只有p60与p65复合体转入到细胞核后NF-κB才能活化发挥功能[19-20]。

本实验检测了不同浓度的ISO对RANKL诱导的RAW264.7细胞分化功能的影响。CCK8检测结果表明：浓度在1～10 μM的ISO作用于RAW264.7细胞属安全浓度范围。TRAP染色及骨吸收陷窝观察实验表明：7 d时，各实验组与阳性对照组比较TRAP活性及骨吸收陷窝数目均减小，且在10 μM时测量值最低。RT-PCR结果表明10 μM ISO组Trap、Ctsk、MMP-9、c-Fos以及NFATc1的mRNA表达量明显降低。上述结果提示，ISO在RANKL诱导RAW264.7细胞过程中抑制其向破骨细胞的分化，有一定的抑制破骨活性作用，具备开发为抗骨质疏松新药的潜力。本实验提示ISO可抑制核内p65，提示其有阻断p65入核的潜能，但胞

浆内及核内p65表达定量蛋白检测有待进一步验证。本实验结果初步表明，银杏叶中ISO对RAW264.7细胞向破骨细胞的分化具有抑制作用的机制可能与经典NF-κB通路的抑制有关。

参考文献

[1] Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. Modulating bone resorption and bone formation in osteoporosisposite directions in the treatment of postmenosteoporosisausal osteosteoporosisorosis[J]. Drugs, 2015, 75(10): 1049-1058.

[2] Black DM, Rose CJ. Clinical practice. postmenosteoporosisausal osteosteoporosisorosis[J]. N Engl J Med, 2016, 374(3):254-262.

[3] 张慧彦, 秦娇娇, 齐晓爽, 等. 银杏叶提取物不同给药方式对骨质疏松大鼠成骨的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(9): 1154-1158.

[4] Wu Z, Zhang JD, Gu X, et al. Effects of the extract of ginkgo biloba on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(7): 3032-3040.

[5] 谷旭, 方鸿满, 时舒曼, 等. 银杏叶提取物对大鼠骨髓间充质干细胞成脂分化能力的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(2): 343-346.

[6] Yan JP, Mao D, Liu XM, et al. Isolation and functional characterization of a circadian-regulated CONSTANS homolog (GbCO) from ginkgo biloba[J]. Plant Cell Rep, 2017, 36(9): 1387-1399.

[7] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL, et al. Osteoclast differentiation and activation[J]. Nature, 2003, 423(6937): 337-342.

[8] Pokhrel NK, Kim YG, Kim JY, et al. Fluvastatin inhibits osteoclast differentiation and porphyromonas gingivalis liposteoporosisolysaccharide-induced alveolar bone erosion in mice[J]. J Periodontol, 2017, 88(4): 390-398.

[9] Battaglino R, Kim D, Fu J, et al. C-myc is required for osteoclast differentiation[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(5): 763-773.

[10] Bae S, Lee MJ, Mun SH, et al. MYC-dependent oxidative metabolism regulates osteoclastogenesis via nuclear receptor ERR alpha [J]. J Clin Investig, 2017, 127(7): 2555-2568.

[11] Brömme D, Lecaille F. Cathepsin K inhibitors for osteosteoporosisorosis and potential off-target effects[J]. Expert Osteoporosisin Investig Drugs, 2009, 18(5): 585-600.

[12] Law S, Panwar P, Li J, et al. A composite docking approach for the identification and characterization of ectosteric inhibitors of cathepsin K[J]. PLoS One, 2017, 12(10): 179-184.

[13] Sundaram K, Nishimura R, Senn J, et al. RANK ligand signaling modulates the matrix metallosteoporosisroteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(1): 168-178.

[14] Soh Y, Li L, Sapkota M. Macrolactin F inhibits RANKL-mediated osteoclastogenesis by suppressing Akt, MAPK and NFATc1 pathways and promotes osteoblastogenesis through a BMP-2/smad/Akt/Runx2 signaling pathway[J]. Mol Biol Cell, 2016, 27(15): 202-209.

[15] Yamashita T, Yao Z, Li F, et al. NF-kappaB p50 and p52 regulate receptor activator of RANKL and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(25): 18245-18253.

[16] Zhao Q, Wang X, Liu Y, et al. NFATc1: functions in osteoclasts [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(5): 576-579.

[17] Nishioku T, Terasawa M, Baba M, et al. CD147 promotes the formation of functional osteoclasts through NFATc1 signalling[J]. Biochem Biosteoporosishys Res Commun, 2016, 473(2): 620-624.

[18] Liu FL, Chen CL, Lee CC, et al. The simultaneous inhibitory effect of niclosamide on RANKL-Induced osteoclast formation and osteoblast differentiation[J]. Int J Med Sci, 2017, 14(9): 840-852.

[19] Jimi E, Fukushima H. NF-κB signaling pathways and the future perspectives of bone disease therapy using selective inhibitors of NF-κB[J]. Clin Calcium, 2016, 26(2): 298-304.

[20] Zhang YE, Xu S, Li K, et al. mTORC1 inhibits NF-kappa B/NFATc1 signaling and prevents osteoclast precursor differentiation, *in vitro* and in mice[J]. J Bone Mineral Res, 2017, 32(9): 1829-1840.

（编辑　张琳，曾曙光）