

## 双醋瑞因对破骨细胞性骨破坏的抑制作用及机制

王霖, 毛昱嘉, 王文杰\*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 目的 考察双醋瑞因对破骨细胞生成及骨破坏功能是否具有抑制作用, 以及双醋瑞因抑制破骨细胞的作用是否与影响成骨细胞中 OPG 及 RANKL 的表达有关。方法 MC3T3-E1 细胞与骨髓前体细胞共培养生成破骨细胞, 将 TRAP 染色阳性, 细胞核数目  $\geq 3$  个的细胞作为破骨细胞, 计数生成的破骨细胞。计数 IL-1 $\beta$  作用前后典型的骨吸收陷窝以观察破骨细胞的活性。应用 Western blotting 法、流式细胞术及 RT-PCR 法在蛋白水平及基因水平观察 MC3T3-E1 细胞中 RANKL 及 OPG 的表达。结果 双醋瑞因可显著抑制 IL-1 $\beta$  作用下破骨细胞的生成及其骨陷窝形成功能, sRANKL 的加入可逆转双醋瑞因的上述作用。双醋瑞因可在基因及蛋白水平上调 MC3T3-E1 细胞中 OPG/RANKL 的比例。结论 双醋瑞因具有抑制 IL-1 $\beta$  诱导的破骨细胞性骨破坏的作用, 这一作用可能与其抑制 MC3T3-E1 细胞中 RANKL 表达同时促进 OPG 表达有关。

**关键词:** 破骨细胞; 核刺激因子受体配体; 骨保护蛋白; 双醋瑞因

中图分类号: R963; R976 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)06 - 0555 - 06

## Inhibitory effect of diacerein on osteoclastic bone destruction and its possible mechanism of action

WANG Lin, MAO Yu-jia, WANG Wen-jie\*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** **Aim** To study the inhibitory action of diacerein on the formation of osteoclasts (OCLs) and their activity in bone resorption as well as the relationship between this action and the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) in MC3T3-E1 cells. **Methods** A coculture system constituted with MC3T3-E1 cells and bone marrow cells for osteoclasts formation was established *in vitro*. TRAP-positive and multinucleated cells with three or more nuclei in each cell were counted as osteoclasts and the number of pits formed on the dentine slices was determined to judge the activity of osteoclasts. Western blotting, RT-PCR and flow cytometer were used to detect the expression of OPG and RANKL in MC3T3-E1 cells. **Results** Diacerein significantly inhibited the formation and function of the cultured osteoclasts stimulated by IL-1 $\beta$ . sRANKL could reverse the effect of diacerein. Diacerein inhibited protein and mRNA expression of RANKL but enhanced those of OPG in MC3T3-E1 cells. **Conclusion** Diacerein may inhibit osteoclastic bone destruction through the inhibition of RANKL expression and the increase of OPG expression in MC3T3-E1 cells.

**Key words:** osteoclast; receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand; osteoprotegerin; diacerein

骨关节炎、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎等多种炎症性疾病中, 关节均会出现不同程度的破坏, 破骨

细胞是这种病理性骨吸收的主要执行者。研究证明, 破骨细胞的分化、融合、活化受多种调控因子的影响。成骨细胞表达的核刺激因子受体配体 (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL) 与骨保护蛋白 (osteoprotegerin, OPG) 是调控破骨细胞的重要细胞因子体系, RANKL 促进破骨细胞活化, 而

收稿日期: 2005-09-29.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472033).

\* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 63165192, Fax: 86 - 10 - 63017757,

E-mail: wwenj@imm.ac.cn

OPG抑制破骨细胞活化,生理状态下两者保持动态平衡。当 OPG表达降低时,破骨细胞活化增加,出现骨质破坏<sup>[1]</sup>。

IL-1 $\beta$ 是一种很强的骨吸收刺激剂,不仅可以刺激破骨细胞增殖、分化,还可以活化破骨细胞,抑制破骨细胞的凋亡<sup>[2,3]</sup>。双醋瑞因是一种新型的 IL-1 $\beta$ 抑制剂,可以抑制 IL-1 的活性及滑膜组织中 IL-1 的合成,很可能对类风湿关节炎亦有治疗作用,但尚在试验阶段。已有报道双醋瑞因具有软骨保护作用<sup>[4]</sup>,其对破骨细胞的作用及机制则未见报道。本研究主要观察了双醋瑞因是否可以抑制破骨细胞性骨破坏,并在此基础上考察双醋瑞因骨保护作用的可能作用机制。

## 材料和方法

**试剂与药品** Rh IL-1 $\beta$ , Rh M-CSF和 Rh sRANKL 购自 Peprotech,胰酶、双醋瑞因和 1, 25-(OH)<sub>2</sub> VD<sub>3</sub> 均购自 Sigma。 $\alpha$ MEM和进口特级胎牛血清(FCS) 购自 Hyclon,淋巴细胞分离液购自 L&Y Bio. Co. Ltd, TRAP染色试剂盒购自中国医学科学院血液病研究所,HRP标记的羊抗兔 IgG, HRP标记的兔抗羊 IgG,羊抗鼠 OPG抗体及浓缩型 DAB显色试剂盒均购自 Santa Cruz Biotech. Purified anti-mouse TRANCE 与 FITC Rat IgG2a 均购自 Biologend. FITC Rabbit Anti-Rat IgG(H+L)购自 SouthernBiotech. 其他试剂均为国产分析纯。

**动物** 新生 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠(1~5 d),中国医学科学院实验动物中心提供。

**MC3T3-E1 小鼠源性前成骨细胞株的培养** MC3T3-E1 用含 10% FCS 的  $\alpha$ MEM 培养基,于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。细胞长满后,消化离心,以 1:3 接种于新培养瓶中,补足培养液,放入 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。

**小鼠骨髓前体细胞的获取<sup>[5]</sup>** 取 6~9 周的雄性 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠,颈椎脱臼法处死,无菌操作取出股骨及胫,反复冲洗骨髓腔,直至骨质变白。用淋巴细胞分离液分离骨髓细胞悬液,收集乳白色细胞层,用冰冷  $\alpha$ MEM 洗涤 2 次,种入塑料培养皿中,加 FCS 培养 6 h,收集悬浮细胞,得到骨髓前体细胞。

**MC3T3-E1 与骨髓前体细胞共培养诱导生成破骨细胞模型的建立** 参考文献[6]方法,在预置载玻片和骨磨片的 24 孔培养板中,种入细胞数为  $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$  的 MC3T3-E1,待其贴壁后,加入细胞数为  $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  的骨髓前体细胞。同时加入 50

ng  $\cdot \text{mL}^{-1}$  M-CSF 及  $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  1, 25-(OH)<sub>2</sub> VD<sub>3</sub>, 诱导类破骨细胞生成。在含有 10% FCS 的  $\alpha$ MEM 中培养 6 d, 每 3 d 换 1 次液, 并加入新的诱导剂。培养 d 3~5 可见多核类破骨细胞出现。破骨细胞形成鉴定包括倒置光学显微镜形态学观察, TRAP 染色试剂盒染色, 骨吸收陷窝观察。

**化合物对共培养模型破骨细胞的影响及对不同细胞因子作用下共培养破骨细胞的影响** 加入  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  双醋瑞因, 培养 6 d 后显微镜下计数破骨细胞数目(计数 TRAP 染色阳性, 细胞核数目  $\geq 3$  个的细胞)及骨吸收陷窝数目。在共培养模型中加入 IL-1 $\beta$ , 观察 IL-1 $\beta$  对共培养破骨细胞的影响。在 IL-1 $\beta$  处理的共培养模型中, 加入不同浓度的双醋瑞因, 每 3 d 换液 1 次, 包括诱导剂及各浓度的药物。培养 d 6, 计数破骨细胞(OCL)及骨吸收陷窝。在另一实验中, 同时加入 IL-1 $\beta$  sRANKL, 加入不同浓度的双醋瑞因, 培养 d 10, 计数 OCL 及骨吸收陷窝。

**Western blotting 法检测 MC3T3-E1 中 OPG 表达** MC3T3-E1 细胞以细胞数  $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  种于 60 mm<sup>2</sup> 的塑料培养皿, 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱, 培养至长满培养皿底面 70%~80% 时, 换新鲜含血清培养液, 除空白对照组外, 各组均加入  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  IL-1 $\beta$  及不同浓度的化合物, 孵育结束后, 消化细胞,  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 收集上清液, 得到样品, 于垂直电泳槽中电泳。半干法转膜, 加一抗、二抗孵育, DAB 染色试剂盒染色, 拍照进行灰度扫描。

**流式细胞术测定 MC3T3-E1 中 RANKL 的表达** MC3T3-E1 细胞以细胞数  $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  种于 60 mm<sup>2</sup> 的塑料培养皿, 于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱, 培养至 70%~80% 融合时, 换新鲜含血清培养液, 除空白对照组外, 各组均加入  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  IL-1 $\beta$  及不同浓度的化合物, 继续培养 6 h, 弃上清液, 消化细胞,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 收集细胞沉淀, 用洗涤液洗 2 次。用小鼠血清封闭非特异性结合, FACS 洗液洗涤 1 次。加入一抗,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min, 洗涤液洗 1 次, 加入饱和剂量的 FITC 标记抗体及 FITC 标记的 IgG 同型对照, 冰上避光染色 45 min, FACS 洗液洗涤 2 次。加适量固定液,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  避光保存, 待上机检测。检测前过 300 目尼龙网筛, 流式细胞仪记录 10 000 个细胞, 通过比较细胞平均荧光强度(MFI)分析细胞表面分子表达的强弱<sup>[7]</sup>。

**RT-PCR 测定 MC3T3-E1 中 RANKL 和 OPG mRNA 的表达** 细胞接种于 6 孔板, 加入化合物和刺激剂孵育相应时间后, 弃去培养液, 每孔加入

Trizol试剂 1 mL,按照文献 [8]方法提取细胞总 RNA。取总 RNA 2  $\mu\text{g}$ ,加入 Random Primer (50 ng  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , dNTPs (10 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,去 DEPC水加至总体积 13  $\mu\text{L}$ 。65  $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 静置 5 min,将随机引物与总 RNA退火。加入 5  $\times$  buffer 4  $\mu\text{L}$ , DTT (0.1 mol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , M-MLV 1  $\mu\text{L}$ ,于 PCR仪中 25  $^{\circ}\text{C}$  10 min,37  $^{\circ}\text{C}$  60 min合成 cDNA第 1链。70  $^{\circ}\text{C}$  15 min灭活 M-MLV。取逆转录产物 2~4  $\mu\text{L}$ 进行 PCR反应扩增 cDNA。反应体系为:RT产物 2~4  $\mu\text{L}$ ,10  $\times$  buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,dNTPs (10 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,Antisense Primer (25 pmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ,Sense Primer (25 pmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ,Taq酶 0.5  $\mu\text{L}$ ,去 DEPC水补足体积至 25  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, $T_m$  45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,28~31循环;72  $^{\circ}\text{C}$  8 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 保持。 $T_m$ 表示反应最适退火温度,详见表 1,其中 GAPDH为内参,目的条带以 DNA marker辨别。将 PCR产物 10  $\mu\text{L}$ 点样于含有 0.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  EB的 2%琼脂糖凝胶上,80 V电泳 40 min,用紫外凝胶成像系统照相,计算机灰度扫描进行半定量分析。

统计学处理 所得数据用  $\bar{x} \pm s$ 表示,使用

SPSS11.0的 one way ANOVA分析和 Dunnett检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 结果

### 1 共培养模型中类破骨细胞的鉴定

按方法所述建立模型,用 TRAP染色试剂盒染色后,显微镜下可见 TRAP染色阳性,体积大而具有多个核的类破骨细胞,如图 1。将骨磨片取出,用 PBS冲洗,超声清洁,去除黏附细胞碎片,显微镜下可观察到典型的骨吸收陷窝,如图 2。证明这一体外培养破骨细胞的模型建立成功。

### 2 双醋瑞因对 IL-1 $\beta$ 作用前后共培养模型中破骨细胞形成的影响

预置盖玻片和骨磨片的 24孔培养板中,骨髓前体细胞和 MC3T3-E1按上述方法共培养。实验结果证实,双醋瑞因可显著减少 IL-1 $\beta$ 诱导的 OCLs生成及骨吸收陷窝的形成,并缩小骨陷窝的面积。5,1和 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的双醋瑞因对 OCLs形成的抑制率分别为 74.1%,50%和 24.1%;对骨吸收陷窝形成的抑制率分别为 67.7%,52.5%和 40.4%。如图 3所示。

Table 1 The PCR amplification reaction

Gene	Primer	Cycle	$T_m / ^{\circ}\text{C}$	Product/bp
RANKL	Sense 5'-GAC TCG ACT CTG GAG AGT-3'	30	53	235
	Anti-sense 5'-GAG AAC TTG GGA TTT TGA TGC-3'			
OPG	Sense 5'-GCT TCG TGC CTT GAT GG-3'	30	54	305
	Anti-sense 5'-CAG ATT GAA CCT GAT TCC CTA-3'			
GAPDH	Sense 5-ACA GTC AGC CGC ATC TTC TT-3	30	55	325
	Anti-sense 5-TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG-3			

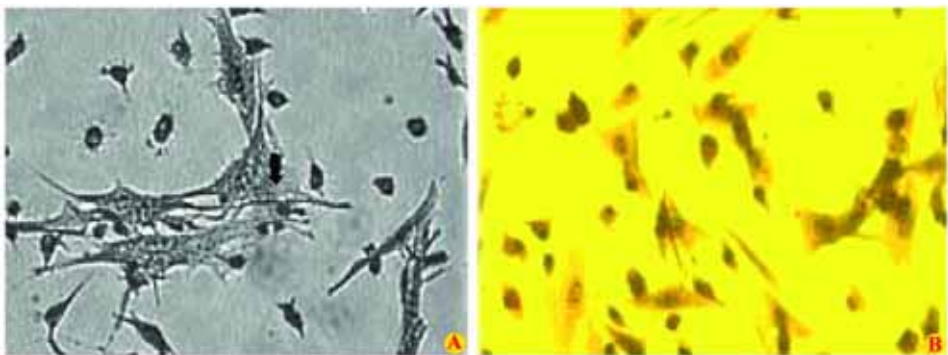
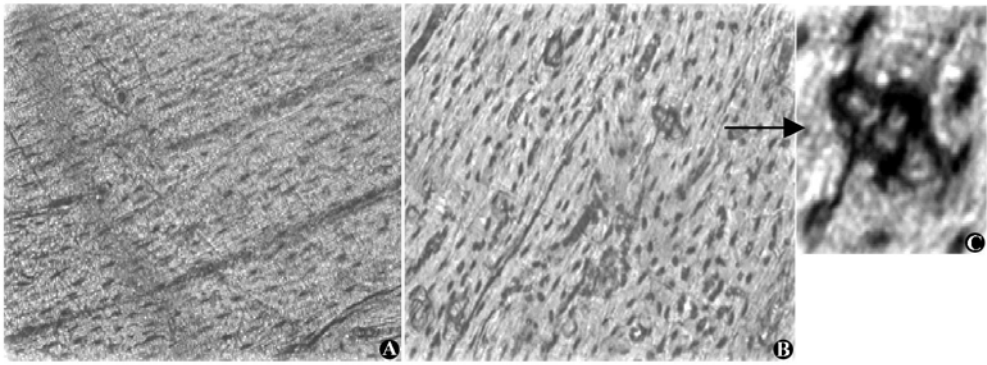
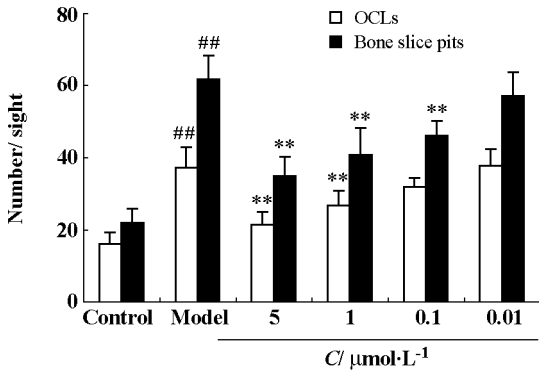


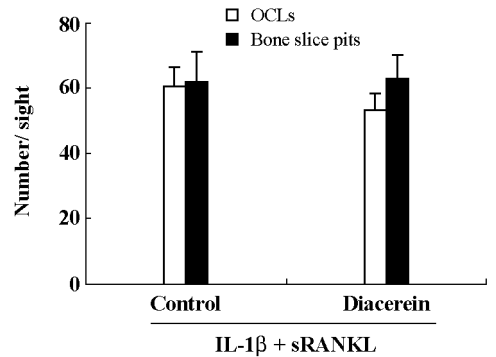
Figure 1 The photomicrographs of tartrate-resistant acid phosphatase-positive multinucleated cells formed in the coculture system containing primary bone marrow cells and MC3T3-E1 cells in the presence of 1,25-(OH) $_2$ VD $_3$  ( $1 \times 10^{-8}$  mol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) and M-CSF (50 ng  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ). Black arrow showed typical osteoclasts (OCLs). A: OCLs unstained ( $\times 200$ ); B: OCLs stained with TRAP kits ( $\times 200$ )



**Figure 2** The resorption pits on bone slices formed in the coculture system containing primary bone marrow cells and MC3T3-E1 cells in the presence of  $1,25-(OH)_2VD_3$  ( $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and M-CSF ( $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Black arrow showed typical resorption pits. A: Bone slice of control group ( $\times 200$ ), B: Bone slice of model group ( $\times 200$ ); C: Amplified morphology of a typical resorption pit in B



**Figure 3** The inhibitory effect of diacerein on the numbers of OCLs and the bone slice pits in the presence of  $IL-1\beta$ . The number of TRAP-positive multinucleated cells with three or more nuclei was counted as osteoclasts and the number of pits formed on the dentine slices was determined to judge the activity of osteoclasts.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*  $P < 0.01$  vs model, ##  $P < 0.01$  vs control



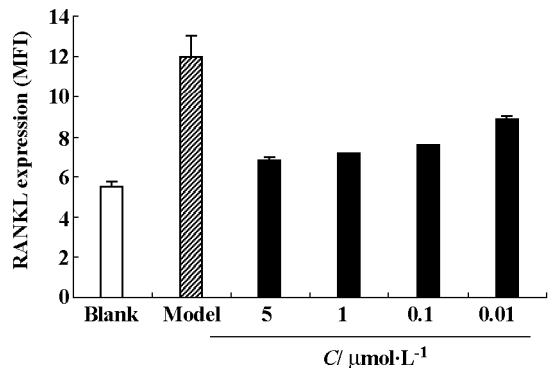
**Figure 4** The counteraction of sRANKL ( $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) on the inhibitory effect of diacerein on the formation and activity of the OCLs. The number of TRAP-positive multinucleated cells with three or more nuclei was counted as osteoclasts and the number of pits formed on the dentine slices was determined to judge the activity of osteoclasts.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 可溶性核刺激因子受体配体 (soluble RANKL, sRANKL)对双醋瑞因抑制共培养模型中骨吸收作用的影响

在  $IL-1\beta$  和  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  双醋瑞因处理的共培养模型中,加入  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  sRANKL,培养 10 d 后,计数 OCL 和骨吸收陷窝。实验结果发现  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  sRANKL 几乎完全拮抗双醋瑞因对 OCL 及骨吸收陷窝形成的抑制作用,见图 4。

### 4 双醋瑞因对 MC3T3-E1 细胞中膜结合型 RANKL 表达的影响

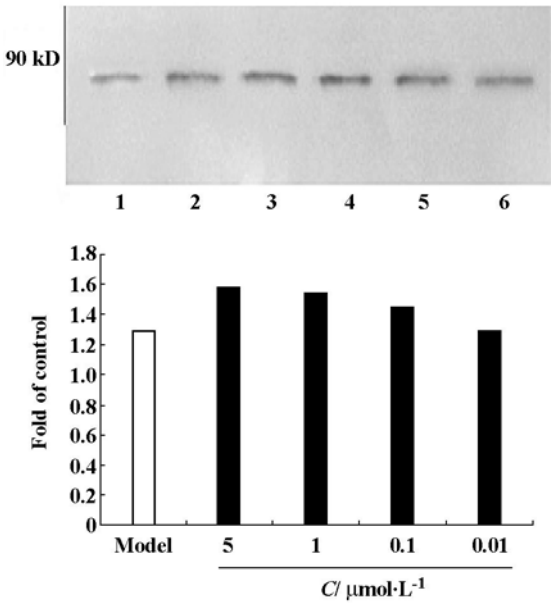
流式细胞术检测结果显示,双醋瑞因具有剂量依赖性抑制 RANKL 表达的作用,5, 1, 0.1 和 0.01  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时的抑制率分别为 75.5%, 62.3%, 42.3% 和 35.1%。如图 5 所示。



**Figure 5** The inhibitory effect of diacerein on RANKL expression in MC3T3-E1 cells in the presence of  $IL-1\beta$ . Mean fluorescent intensity (MFI) was measured to calculate the relative RANKL content. The experiment was repeated two times and showed similar results. A typical result was shown in the figure

### 5 双醋瑞因对 MC3T3-E1 细胞中 OPG 分泌的影响

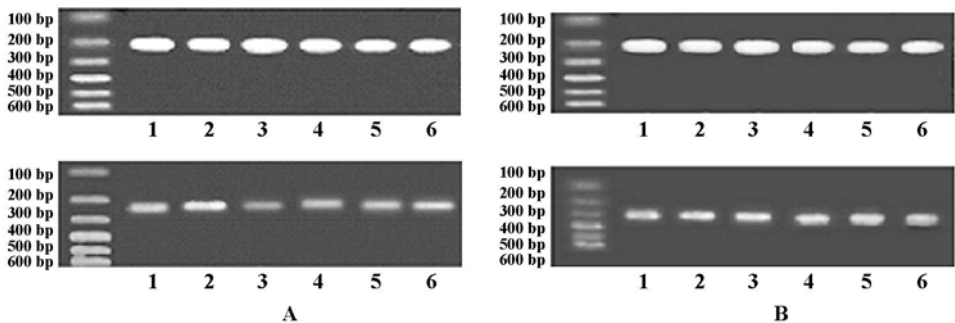
Western blotting法检测化合物对 MC3T3-E1 细胞中 OPG分泌的影响。双醋瑞因在  $0.1 \sim 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  可以促进 MC3T3-E1 中 OPG的分泌。运用 Kodak 1D软件灰度扫描进行半定量分析,结果如图 6所示。



**Figure 6** The stimulatory effect of diacerein on OPG expression in MC3T3-E1 cells in the presence of IL-1 $\beta$  ( $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Line 1: Blank; 2: IL-1 $\beta$ ; 3: Diacerein ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + IL-1 $\beta$ ; 4: Diacerein ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + IL-1 $\beta$ ; 5: Diacerein ( $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + IL-1 $\beta$ ; 6: Diacerein ( $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + IL-1 $\beta$ . The experiment was repeated three times and showed similar results. A typical result was shown in the figure

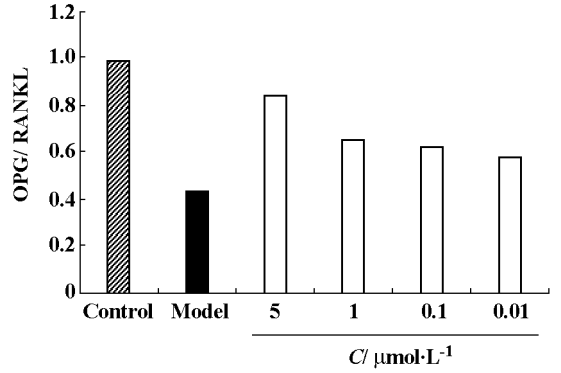
### 6 双醋瑞因对 MC3T3-E1 细胞中 RANKL 和 OPG mRNA 表达的影响

双醋瑞因在  $0.1 \sim 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  抑制细胞中



**Figure 7** The effect of diacerein on RANKL and OPG mRNA expression in MC3T3-E1 cells in presence of IL-1 $\beta$  ( $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). A: RANKL mRNA; B: OPG mRNA. Line 1: Blank; 2: IL-1 $\beta$ ; 3: IL-1 $\beta$  + diacerein ( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 4: IL-1 $\beta$  + diacerein ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 5: IL-1 $\beta$  + diacerein ( $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 6: IL-1 $\beta$  + diacerein ( $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

RANKL mRNA的表达,促进 OPG的表达,如图 7所示。Kodak 1D软件灰度扫描分析显示,5, 1, 0.1 和  $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的双醋瑞因可使 OPG 与 RANKL mRNA的比例分别增加 1.94 倍,1.51 倍,1.44 倍和 1.34 倍。如图 8 所示。



**Figure 8** The effect of diacerein on the ratio of OPG to RANKL mRNA expressed in MC3T3-E1 cells in the presence of IL-1 $\beta$ . Signals of RANKL and OPG mRNAs were normalized with the respective GAPDH mRNA expression levels and converted to be the relative intensity and the ratio of OPG to RANKL was calculated

### 讨论

破骨细胞是破骨细胞性骨吸收的主要执行者,其分化、融合、活化受多种细胞及多种调控因子的影响。已证明成骨细胞或骨髓干细胞的存在是破骨细胞分化成熟的必要条件,它们可以通过细胞间相互作用或分泌细胞因子作用于破骨细胞。炎症性骨破坏中,巨噬细胞、活化的 T 细胞等释放大量炎症因子,包括 IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, sRANKL 等,这些炎症因子不仅可以直接作用于破骨细胞,还可作用于成骨细胞,促进成骨细胞中破骨细胞调控因子的表达及破骨细胞活化<sup>[9]</sup>。

双醋瑞因对软骨细胞的抑制作用已经报道很多,但对其是否可以影响成骨细胞及破骨细胞的报道却很少。作者研究了双醋瑞因对 IL-1 $\beta$ 处理前后 M-CSF和 1, 25-(OH) $_2$  VD $_3$ 诱导生成的破骨细胞的影响。实验结果显示, 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 双醋瑞因对未经 IL-1 $\beta$ 处理的共培养破骨细胞的数量及活性均无明显影响。在共培养体系中加入 IL-1 $\beta$ 后,破骨细胞生成增加,骨吸收陷窝数目增多,骨陷窝吸收面积增大,此结果与文献<sup>[10]</sup>报道一致。0.01 ~ 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 双醋瑞因显著抑制破骨细胞生成,同时显著抑制骨吸收陷窝形成,因此作者推测双醋瑞因抑制骨吸收至少部分通过抑制 IL-1 $\beta$ 的作用而实现。为了考察化合物抑制 IL-1 $\beta$ 刺激的骨吸收的作用是否与抑制 RANKL表达有关,作者加入 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  sRANKL于 IL-1 $\beta$ 处理的共培养体系中,同时加入 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 双醋瑞因。实验结果显示,100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  sRANKL几乎可完全拮抗双醋瑞因对破骨细胞生成及活性的抑制作用。因此,双醋瑞因抑制 IL-1 $\beta$ 刺激的骨吸收可能是通过抑制其培养系统中成骨性细胞 RANKL的表达或抑制其上游调控因子而实现的。RANKL和 OPG是成骨细胞分泌的最为重要的两种骨代谢调控因子。

RANKL-RANK-OPG体系对骨代谢具有重要的意义<sup>[11,12]</sup>。RANKL与 OPG的比例决定了骨代谢的方向,当 RANKL比例增加时,动物表现出骨质溶解,而 OPG比例上升时,动物表现出骨质增生及骨质硬化。为了检测双醋瑞因是否通过影响 OPG/RANKL体系而调控破骨细胞,作者考察了双醋瑞因对 IL-1 $\beta$ 作用下 MC3T3-E1 细胞 RANKL与 OPG表达的影响。实验数据显示双醋瑞因可以抑制 MC3T3-E1 细胞中 RANKL表达并同时促进 OPG的表达,上调 OPG/RANKL比例,这很有可能是双醋瑞因抑制 IL-1 $\beta$ 诱导的破骨细胞性骨破坏的机制之一。

## References

[ 1 ] Stenbeck G, Horton MA. A new specialized cell-matrix

interaction in actively resorbing osteoclasts [ J ]. Cell Sci, 2000, 113: 1577 - 1587.

- [ 2 ] Nakamura I, Kadono Y, Takayanagi H, et al. IL-1 regulates cytoskeletal organization in osteoclasts via TNF receptor-associated factor 6/c-Src complex [ J ]. J Immunol, 2002, 168: 5103 - 5109.
- [ 3 ] Jimi E, Nakamura I, Ikebe T, et al. Activation of NF- $\kappa$ B is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1 [ J ]. Biol Chem, 1998, 273: 8799 - 8805.
- [ 4 ] Tamura T, Shirai T, Kosaka N, et al. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation. Arthritis and bone resorption [ J ]. Eur J Pharmacol, 2002, 498: 81 - 87.
- [ 5 ] Li TS, Hamano K, Suzuki K. Improved angiogenic potency by implantation of *ex vivo* hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats [ J ]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283: H468 - 473.
- [ 6 ] Lai FP, Cole-Sinclair M, Cheng WJ. Myeloma cells can directly contribute to the pool of RANKL in bone by passing the classic stromal and osteoblast pathway of osteoclast stimulation [ J ]. Br J Haematol, 2004, 126: 192 - 201.
- [ 7 ] Lai FP, Cole-Sinclair M, Cheng WJ, et al. Myeloma cells can directly contribute to the pool of RANKL in bone bypassing the classic stromal and osteoblast pathway of osteoclast stimulation [ J ]. Br J Haematol, 2004, 126: 192 - 201.
- [ 8 ] Yu JL, Dou DQ, Chen XH. Ginsenoside-Ro enhances cell proliferation and modulates Th1/Th2 cytokines production in murine splenocytes [ J ]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 332 - 336.
- [ 9 ] Ivashkiv LB. Cytokine expression and cell activation in inflammatory arthritis [ J ]. Adv Immunol, 1996, 156: 3952 - 3960.
- [ 10 ] Wong BR, Josien R, Lee SY, et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappa B activation by the TRANCE receptor [ J ]. J Biol Chem, 1998, 273: 28355 - 28359.
- [ 11 ] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis [ J ]. Nature, 1999, 397: 315 - 323.
- [ 12 ] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [ J ]. Cell, 1997, 89: 309 - 319.