

网络出版时间: 2020/5/29 13:02 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1642.002.html

# 铁皮石斛多糖对 RANKL 诱导的小鼠骨髓单核细胞向破骨细胞分化影响的体外研究

李汉青<sup>1,2</sup>, 王芳<sup>1,2</sup>, 何家才<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 体外探讨铁皮石斛多糖对核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (RANKL) 诱导骨髓巨噬细胞 (BMMs) 向破骨细胞分化的影响。方法 使用水提醇沉法从铁皮石斛研磨物提取石斛多糖; 通过巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 诱导培养 C57BL/6 小鼠 BMMs; 用 CCK-8 法检测不同浓度石斛多糖对小鼠 BMMs 的增殖和细胞活力的影响; 通过 Western blot 检测 p65 蛋白 (p65)、磷酸化 p65 蛋白 (p-p65)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38)、磷酸化 p38 (p-p38)、活化 T 细胞核因子 1 (NFATc1)、转录因子 c-Fos (c-Fos) 的表达; 通过 qRT-PCR 检测抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRACP)、活化 T 细胞核因子 1 (NFATc1)、组织蛋白 K (CTSK)、金属基质蛋白酶 9 (MMP9) 基因的表达; 通过 RANKL 与不同浓度石斛多糖作用 BMMs 进行 TRACP 染色。结果 铁皮石斛多糖浓度达到 400  $\mu$ g/ml 时, 其对 BMMs 的增殖产生明显抑制作用 ( $P < 0.05$ ); Western blot 结果显示: 铁皮石斛多糖降低了 NFATc1、c-Fos 蛋白的表达, 降低了 p65 和 p38 的磷酸化水平, 而且表现出了一定的剂量依赖性 ( $P < 0.05$ ); qRT-PCR 结果显示: 相较于 RANKL 诱导组, 石斛多糖组下调 NFATc1、MMP9、CTSK、TRACP 基因的表达 ( $P < 0.05$ ); TRACP 染色显示, RANKL 诱导组可见体积相对较大, 细胞核数目  $> 10$  的破骨细胞形成, 浓度为 200  $\mu$ g/ml 石斛多糖组破骨细胞形成受到抑制, 仅形成少数体积相对较小的不成熟破骨细胞。结论 体外铁皮石斛多糖抑制破骨细胞相关基因的表达和相关通路蛋白的合成, 抑制 RANKL 诱导的 BMMs 的破骨细胞分化。

**关键词** 铁皮石斛; 骨髓单核细胞; 核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体; 破骨细胞分化

中图分类号 R 318

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0825-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.002

2019-05-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81771117); 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1604a0802082); 2016 高校学科(专业)拔尖人才学术资助重点项目(编号: gxhjZD2016028)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

<sup>2</sup> 安徽医科大学附属口腔医学院, 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

作者简介: 李汉青, 男, 硕士研究生;

何家才, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hejiacai@163.com

探索能有效抑制过度破骨细胞形成和功能的药物对于预防和治疗炎症引起的种植体周围骨吸收至关重要<sup>[1-2]</sup>。核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL) 是肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 超家族的成员, 来源包括巨噬细胞、成纤维细胞、成骨细胞和 T 细胞<sup>[3]</sup>。RANKL 可以通过与破骨前体细胞表面的 RANK 特异性的结合, 激活下游信号通路, 诱导调节破骨细胞形成。石斛为兰科石斛属多种植物的新鲜或干燥茎的统称。在石斛属植物中, 铁皮石斛被认为具有最佳的中药药用特性, 特别是富含多糖的茎和叶, 近来的一些研究<sup>[4]</sup>表明石斛多糖具有抗癌、抗感染、免疫增强等生物活性。该研究旨在探讨铁皮石斛多糖对 RANKL 诱导 BMMs 向破骨细胞分化的影响, 以期对种植体周围骨吸收的治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** MEM $\alpha$  培养基(美国赛默飞公司); PBS 缓冲剂(美国 Solarbio 公司); BI 胎牛血清(以色列生物工业公司); RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司); 重组小鼠 RANKL(美国 R&D 公司); 重组小鼠 M-CSF(美国 R&D 公司); 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); CCK-8 试剂(日本同仁化学研究所); PCR 引物逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司); c-Fos 鼠单克隆抗体(武汉谷歌生物科技有限公司); p65 兔单克隆抗体(美国 ABCAM 公司); NFATc1 兔单克隆抗体、phospho-p65 (p-p65) 兔单克隆抗体、P38 兔单克隆抗体、phospho-p38 (p-p38) 兔单克隆抗体(美国 CST 公司); Actin 鼠单克隆抗体(北京中杉金桥公司); 山羊抗鼠/兔二抗(北京中杉金桥公司); 牛血清白蛋白 (BSA) (德国 BioFROXX 公司); 恒温 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国赛默飞公司); 全自动酶标仪(美国 Bio-Red 公司); 荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司); 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene 公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMMs 体外分离培养 选取 4 周龄的 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,使用脱颈法处死,75% 乙醇溶液中消毒,剥除小鼠腿部的皮肤,自股骨头处将腿部分离,去除肌肉骨髓,保留股骨、胫骨,PBS 清洗 2 遍,注射器吸取含 10% FBS 的 MEMα 培养基冲洗骨髓腔冲出骨髓,过 70 μm 细胞筛,加 4 倍于骨髓悬液体积的红细胞裂解液,混匀,作用 3 min,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 MEMα 完全培养基重悬,培养 24 h,次日收集上清液中未贴壁细胞,用含 50 ng/ml 巨噬细胞集落刺激因子( macrophage colony stimulating factor ,M-CSF) 的 MEMα 完全培养基培养,每 3 d 换液,直至细胞达到目标数量。

1.2.2 铁皮石斛多糖制备 铁皮石斛原球茎 60 °C 烘干,粉碎,90 °C 水浴,震荡,室温静置 30 min,2 000 r/min 离心 10 min,收取上清液,加质量体积分数 3% 三氯乙酸脱蛋白,4 °C 静置 24 h,4 000 r/min 离心 15 min,收上清液,加入无水乙醇配制成 75% 乙醇溶液,4 °C 静置 12 h,4 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,收集沉淀物,冻干处理,称重,去离子水充分溶解制成石斛粗多糖溶液,过滤除菌,-80 °C 保存。

1.2.3 CCK-8 法检测 BMMs 增殖能力与细胞活力 收获 BMMs 在 96 孔板中以 1 000/孔的密度铺板,每组设置 5 复孔,待过夜细胞贴壁稳定后,对照组添加含有 50 ng/ml M-CSF 的 MEMα 完全培养基,实验组石斛多糖浓度分别为 25、50、100、200、400 μg/ml,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养,分别在 12、24、48、72 h 进行 CCK-8 检测,吸去上清液,每孔加入 100 μl 含有 10 μl CCK-8 试剂的纯 MEMα 培养基,吹去气泡,37 °C 孵育 2 h,通过酶标仪测定 450 nm 处的吸光度( optical density ,OD) 值。

1.2.4 Western blot 检测 ① 状态良好的 BMMs,在 6 孔板中以 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞/孔的密度铺板,阴性对照组添加含有 50 ng/ml M-CSF 及 10% FBS 的 MEMα 培养基,实验组在此基础上添加 100 ng/ml RANKL 以及不同浓度的石斛多糖( 0、25、50、100、200 μg/ml) 3 d 换液,第 5 天提取总蛋白。② 在 6 孔板中以 3 × 10<sup>5</sup> 个细胞/孔的密度铺板,待细胞过夜稳定,阴性对照组添加含有 50 ng/ml M-CSF 及 MEMα 完全培养基,实验组用浓度分别为 0、25、50、100、200 μg/ml 铁皮石斛多糖预处理 2 h,加入 100 ng/ml 的浓度 RANKL 刺激 30 min,提取蛋白。使用 Bradford 法进行蛋白定量,配制 SDS-PAGE 凝胶,

6% 和 10% 分离胶,5% 浓缩胶,电泳后将蛋白转至 0.45 μm PVDF 膜上,5% BSA 封闭 45 min,一抗稀释液稀释抗体,抗 p65( 1 : 800)、抗 phospho-p65( 1 : 500)、抗 c-Fos( 1 : 500)、抗 p38( 1 : 1 000)、抗 phospho-p38( 1 : 500) 4 °C 孵育过夜,TBST 洗涤膜,以 1 : 5 000 浓度室温孵育二抗 1 h,曝光显影。通过 Image J 进行灰度分析。

1.2.5 qRT-PCR 检测 在 6 孔板中以 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞/孔的密度铺板,实验分组设置阴性对照组添加含有 50 ng/ml M-CSF 及 10% FBS 的 MEMα 培养基,实验组在对照组的基础上添加 100 ng/ml RANKL 以及不同浓度的石斛多糖,浓度分别为 0、25、50、100、200 μg/ml,于 1、3、5 d 收细胞提取 RNA 检测活化 T 细胞核因子 c1( nuclear factor of activated T-cells ,cytoplasmic 1 ,NFATc1)、组织蛋白 K( cathepsin K ,CTSK)、金属基质蛋白酶 9( matrix metalloproteinase 9 ,MMP9) 和抗酒石酸酸性磷酸酶( tartrate resistant acid phosphatase ,TRACP) 基因的表达。相关引物序列见表 1,引物由上海生工设计合成。

1.2.6 TRACP 染色 收获 BMMs,在 24 孔板中以 1 × 10<sup>4</sup> /孔的密度铺板,每组设置 4 复孔,待过夜细胞贴壁稳定后,实验分组如下: 阴性对照组添加含有 50 ng/ml M-CSF 及 10% FBS 的 MEMα 培养基,实验组在对照组的基础上添加 100 ng/ml RANKL 以及不同浓度的石斛多糖,浓度分别为 0、25、200 μg/ml,每 3 d 全换液,在第 7 天吸去上清液,PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 20 min,TRACP 染色试剂盒实验步骤进行染色,倒置显微镜拍照。

表 1 相关基因引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
TRACP	F: GGACGAGGCAAGAGTTTCAC
	R: TTCCCGAGGTCCATCTACTG
MMP9	F: CGTGTCTGGAGATTCCGACTTGA
	R: TTGAAACTCACACGCCAGA
CTSK	F: GGCCAGTGTGTTCTCTGTTGG
	R: CCGCTCCACAGCCATAATTCTC
NFATc1	F: GGCTGCTCTTCCGAGTTCACATC
	R: GCTGTCTGTCTGTCTCTCTCC
GAPDH	F: ACCCAGAAGACTGTGGATGG
	R: TTCAGCTCAGGGATGACCTT

1.3 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析处理,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较运用方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 石斛多糖对 BMMs 细胞增殖活力的影响

CCK-8 实验显示: 25 ~ 200  $\mu\text{g/ml}$  浓度范围内, 细胞增殖活力与对照组 (0  $\mu\text{g/ml}$ ) 相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 在 24、48、72 h 400  $\mu\text{g/ml}$  组细胞增殖受到抑制, OD 值显著低于对照组, 差异有统计学意义 ( $F = 202.664, F = 103.908, F = 38.942, P < 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 Western blot 检测铁皮石斛多糖对 RANKL 诱导的 BMMs 向破骨细胞分化相关蛋白表达的影响

通过不同浓度的石斛多糖作用于 RANKL 诱导的破骨细胞分化, 检测破骨细胞活化中的核因子  $\kappa\text{B}$  (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa\text{B}$ ) 通路和 p38 通路的相关蛋白, NFATc1 转录因子 c-Fos (transcription factor c-Fos, c-Fos), p38、p-p38、p65、p-p65, 以 Actin 作为内参, 结果显示铁皮石斛多糖抑制了 c-Fos, NFATc1 蛋白的表达 ( $F = 106.011, F = 119.529, P < 0.05$ ) 降低了 p65 和 p38 的磷酸化水平 ( $F =$

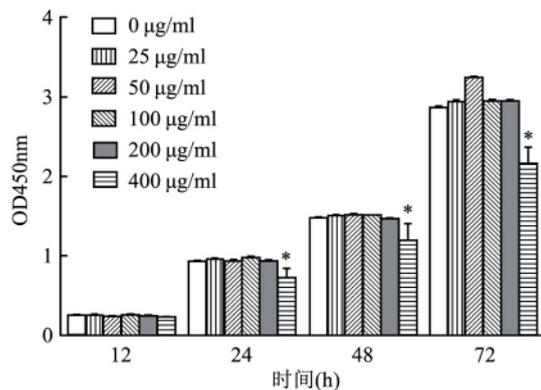


图 1 CCK-8 法检测石斛多糖对 BMMs 细胞增殖活力的影响  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$

896.024,  $F = 843.935, P < 0.05$ ) 而对于 p65 和 p38 总蛋白含量无明显影响 ( $F = 8.125, F = 0.668, P > 0.05$ )。见图 2。

### 2.3 石斛多糖对 RANKL 诱导的 BMMs 破骨分化相关基因表达的影响

不同浓度的石斛多糖处理 BMMs 1、3、5 d 后, 在 RANKL 诱导的条件下, 通过

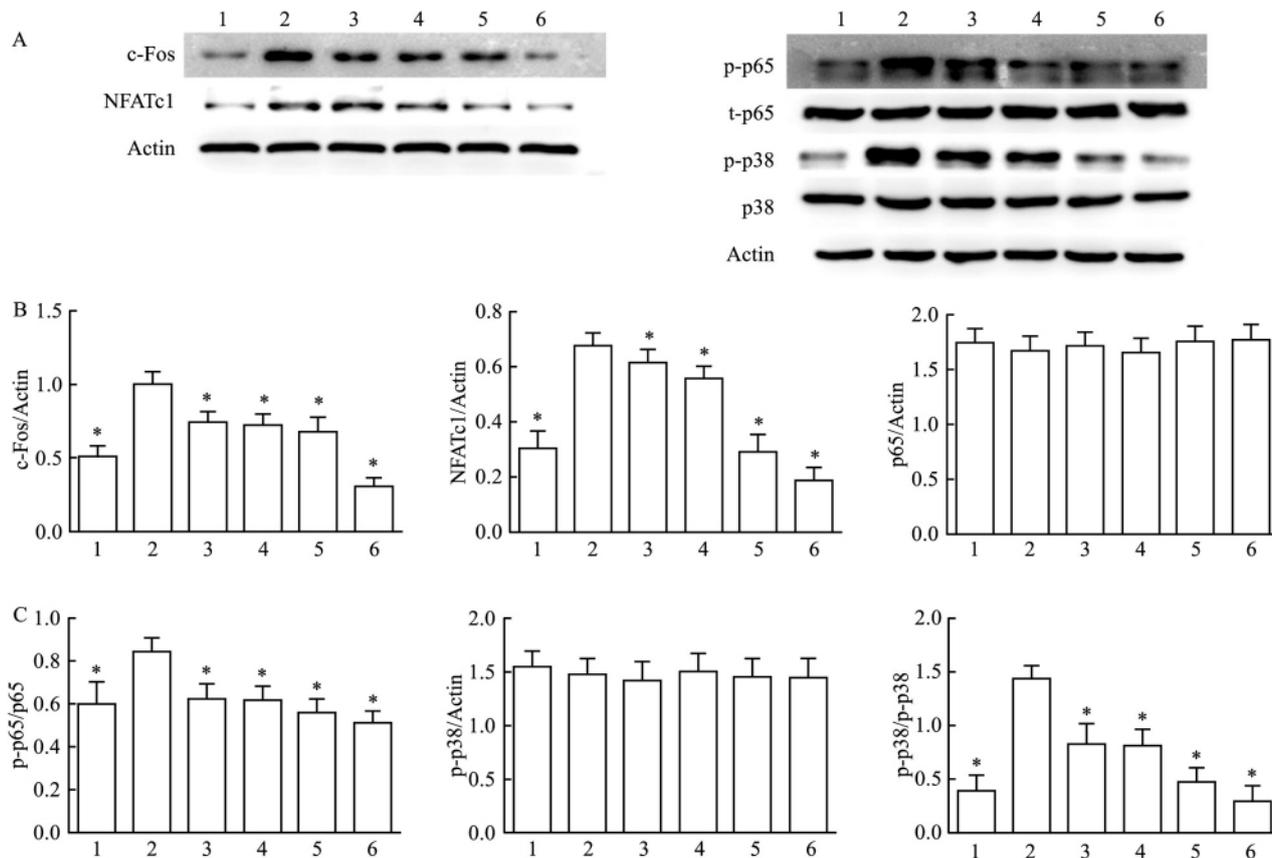


图 2 Western blot 检测破骨细胞蛋白水平的表达

A: Western blot 法检测 c-Fos、NFATc1、p-p65、p65、p-p38、p38 蛋白的表达; B: Western blot 灰度统计分析; 1: 对照组; 2: 0  $\mu\text{g/ml}$  组; 3: 25  $\mu\text{g/ml}$  组; 4: 50  $\mu\text{g/ml}$  组; 5: 100  $\mu\text{g/ml}$  组; 6: 200  $\mu\text{g/ml}$  组; 与 0  $\mu\text{g/ml}$  组比较: \*  $P < 0.05$

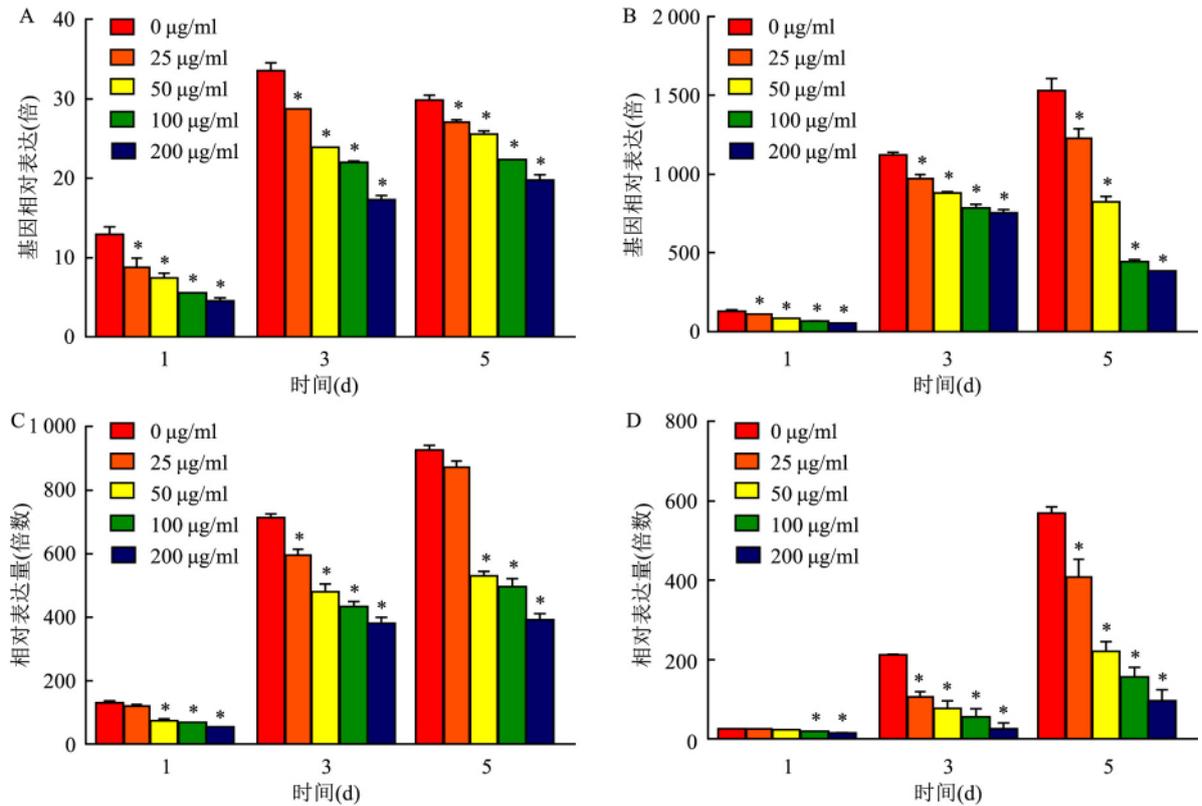


图3 qRT-PCR 检测破骨分化相关基因表达

A: NFATc1; B: MMP9; C: CTSK; D: TRACP; 与 0 µg/ml 组比较: \* P < 0.05

qRT-PCR 法检测破骨细胞相关基因的表达。qRT-PCR 的检测结果显示: 1、3、5 d, CTSK 的表达持续上调 ( $F = 104.894, F = 122.260, F = 780.135, P < 0.05$ ); 1、3、5 d 50、100、200 µg/ml 组 NFATc1 的表达表现出上升趋势 ( $F = 36.736, F = 283.965, F = 124.576, P < 0.05$ ); TRACP 前期表达水平较低, 随着时间其表达量明显上升 ( $F = 399.484, F = 5110.477, F = 1398.642, P < 0.05$ ); MMP9 基因表达总体表现出上升 ( $F = 284.939, F = 114.198, F = 255.071, P < 0.05$ ), 100 µg/ml 及 200 µg/ml 组 MMP9 的表达量在 5 d 时出现下降 ( $F = 194.290, F = 559.875, P < 0.05$ ); 同时间段, 石斛多糖组相关基因表达始终低于 0 µg/ml 即单纯 RANKL 诱导组, 且表现出剂量依赖 ( $P < 0.05$ ), 第 5 天时, 0 µg/ml 组相对于 200 µg/ml 组 CTSK 的表达为:  $537.23 \pm 17.08$  ( $F = 780.135, P < 0.05$ ), NFATc1 的表达为  $10.11 \pm 1.46$  ( $F = 124.576, P < 0.05$ ), MMP9 的表达为  $911.93 \pm 42.45$  ( $F = 255.071, P < 0.05$ ), TRACP 的表达为  $471.69 \pm 6.71$  ( $F = 13.98.642, P < 0.05$ )。见图 3。

**2.4 破骨细胞 TRACP 染色** 结果显示: 单纯 RANKL 诱导有体积相对较大, 包含有超过 10 个细

胞核的破骨细胞形成, 高浓度铁皮石斛多糖组的破骨细胞形成明显受到抑制, 仅形成了少量体积相对较小的不成熟破骨细胞。见图 4。

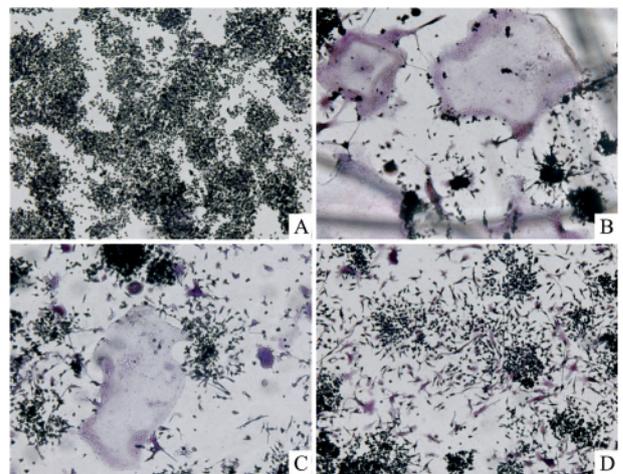


图4 破骨细胞 TRACP 染色 ×100

A: 对照组; B: RANKL + 0 µg/ml 石斛多糖; C: RANKL + 25 µg/ml 石斛多糖; D: RANKL + 200 µg/ml 石斛多糖

### 3 讨论

本研究观察到石斛多糖在体外抑制 RANKL 诱

导的破骨细胞形成,表明其在治疗种植体周围炎骨吸收的潜力。鉴于先前证实的石斛多糖的免疫调节活性<sup>[5-6]</sup>和抗癌活性<sup>[7]</sup>,石斛多糖可能也是治疗伴随肿瘤的骨破坏性疾病的候选药物。故如能揭示石斛多糖对于破骨细胞作用的分子和细胞机制,对于探索其骨溶解的治疗潜力将是非常有价值的。

骨再生和重塑中受控的量的吸收是正常骨生理学的一部分。骨形成与再吸收的平衡是不稳定的,诸如慢性炎症或癌症中的骨转移等病理情况下,破骨细胞生成因子与破骨细胞抑制因子的比例上调导致骨的净吸收发生。破骨细胞分化由间充质细胞通过细胞间接触和旁分泌作用所支持,其受 M-CSF 和 RANK, RANKL 和骨保护素(osteoprotegerin, OPG) 信号通路轴的调控。M-CSF 和 RANKL 对于破骨细胞形成是必需的, M-CSF 主要通过上调 Bcl- $\kappa$ L 来刺激破骨细胞祖细胞的存活和增殖,而 RANKL 刺激破骨细胞的分化<sup>[8]</sup>。本实验中使用原代培养的 C57BL/6 小鼠的骨髓单核细胞,通过 M-CSF 和 RANKL 进行诱导,相较于使用巨噬细胞系诱导破骨细胞更符合体内破骨细胞的来源。RANK 属于 TNF 超家族受体,最初在 T 淋巴细胞和成骨细胞中被鉴定, RANKL 与 RANK 的结合导致受体的三聚化并募集衔接蛋白肿瘤坏死受体相关因子 6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6) 募集。随后启动细胞内信号的级联,包括 NF- $\kappa$ B、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、活化蛋白-1(activator protein 1, AP-1)、NFATc1。在这些信号传导途径中,具有共刺激免疫受体的 RANKL / RANK / TRAF6 轴导致转录因子 c-Fos 和 NFATc1 的强烈诱导,其在破骨细胞分化中起着不可或缺的作用。c-Fos 是 AP-1 转录因子复合物的组成部分,参与破骨细胞形成的调节。NFATc1 作为破骨细胞分化中的主要转录因子,在 RANKL 介导的 NF- $\kappa$ B、AP-1 和 MAPK 信号传导途径的下游发挥作用<sup>[9]</sup>。c-Fos 信号的传导可以触发 NFATc1 的自动扩增,这是 NFATc1 依赖性转录过程和 RANKL 诱导的破骨细胞生成所必需的, NFATc1 的活化会上调下游破骨细胞特异性基因的表达,例如 CTSK、TRACP、MMP9 等<sup>[10]</sup>。本研究中,石斛多糖显示出显著下调了 c-Fos 的蛋白质水平。且降低 NFATc1 的基因转录和蛋白表达水平,随后以剂量依赖性的方式降低破骨细胞标记基因 CTSK 和 TRACP 的基因表达水平, MMP9 为破骨细胞重要的功能酶,本实验显示铁皮石斛多糖同时下调了 MMP9 的基因表达水平,表明

其铁皮石斛多糖可能同时会抑制破骨细胞吸收功能。RANKL / RANK 也激活 NF- $\kappa$ B 途径, NF- $\kappa$ B 为调节破骨细胞分化重要的转录因子。I $\kappa$ B 的降解使得 NF- $\kappa$ B 复合物(包括 NF- $\kappa$ Bp65 / Rel A) 磷酸化易位至细胞核并启动靶基因的转录<sup>[11]</sup>。本实验显示石斛多糖抑制 NF- $\kappa$ B 活性,其抑制了 p65 的磷酸化,而对于总 p65 含量无明显影响,故可能影响 p65 的核迁移,从而降低了后续相关基因的表达。p38 MAPK 途径在 RANKL 介导的破骨细胞分化中起重要作用<sup>[12]</sup>。本实验检测了铁皮石斛多糖对于 P38 通路的作用,发现石斛多糖减弱了 p38 的磷酸化,而对于总 p38 蛋白含量无明显作用。此外,细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)<sup>[13]</sup>、c-Jun N-末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)<sup>[14]</sup>等也对于破骨细胞的形成、存活、功能有着重要作用。对于这些信号通路分子,石斛多糖是否发挥作用,从而影响破骨细胞的形成、存活和功能,需要后续实验进一步研究探索。

#### 参考文献

- [1] Wong R L, Hiyari S, Yaghsezi A, et al. Early intervention of peri-implantitis and periodontitis using a mouse model[J]. *J Periodontol*, 2018, 89(6): 669-79.
- [2] Eger M, Hiram-Bab S, Liron T, et al. Mechanism and prevention of titanium particle-induced inflammation and osteolysis[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2963.
- [3] Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, et al. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis[J]. *EMBO J*, 2001, 20(6): 1271-80.
- [4] da Silva J A, Cardoso J C, Dobróznski J, et al. Dendrobium micropropagation: a review[J]. *Plant Cell Rep*, 2015, 34(5): 671-704.
- [5] 戴玮, 罗建平. 霍山石斛多糖的半仿生提取工艺优化与抗炎活性评价[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(23): 151-4, 183.
- [6] 黄杰, 章莹, 严婧, 等. 铁皮石斛多糖对脂多糖诱导的巨噬细胞免疫调节作用[J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(7): 548-52.
- [7] 鲍丽娟. 四种石斛抗肿瘤活性的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.
- [8] Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. Osteoclast differentiation and activation[J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 337-42.
- [9] Nakashima T, Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1240: E13-8.
- [10] Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2005, 83(3): 170-9.

- [11] 宋才渊,彭冰,沈佳怡,等. 破骨细胞分化调节机制的研究进展[J]. 中国骨伤, 2015, 28(6): 580-4.
- [12] Koga Y, Tsurumaki H, Aoki-Saito H, et al. Roles of cyclic AMP response element binding activation in the ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway in central nervous system, cardiovascular system, osteoclast differentiation and mucin and cytokine production[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): E1346.
- [13] Wu Z, Wu H, Li C, et al. Daphnetin attenuates LPS-induced osteolysis and RANKL mediated osteoclastogenesis through suppression of ERK and NFATc1 pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17812-23.
- [14] Lee K M, Lee C Y, Zhang G, et al. Methylglyoxal activates osteoclasts through JNK pathway leading to osteoporosis[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 308: 147-54.

## Effect of *Dendrobium candidum* polysaccharide on RANKL-induced differentiation of mouse bone marrow macrophages into osteoclasts

Li Hanqing<sup>1,2</sup>, Wang Fang<sup>1,2</sup>, He Jiakai<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Stomatologic College of Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup>The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab of Oral Disease Research of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the effects of *Dendrobium candidum* polysaccharide on the differentiation of bone marrow-derived macrophages cells (BMMs) into osteoclasts induced by receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) *in vitro*. **Methods** Water extraction and alcohol precipitation method was used to extract the *Dendrobium* polysaccharide from *Dendrobium candidum*. C57BL/6 mouse BMMs were induced by macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). The effects of different concentrations of *Dendrobium* polysaccharide on the proliferation and cell viability of mouse BMMs were detected by CCK-8 method. The expressions of p65, phospho-p65 (p-p65), p38, phospho-p38 (p-p38), nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1) and c-Fos was detected by Western blot. The expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP), NFATc1, Cathepsin K (CTSK) and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) gene were detected by qRT-PCR. The BMMs were induced by RANKL and different concentrations of *Dendrobium* polysaccharide to carry out TRACP staining. **Results** When the polysaccharide concentration of *Dendrobium candidum* reached 400  $\mu$ g/ml, it significantly inhibited the proliferation of BMMs ( $P < 0.05$ ). Western blot showed that *Dendrobium candidum* polysaccharide reduced the expression of NFATc1, c-Fos protein, decreased the phosphorylation levels of p65 and p38, which showed a dose-dependent effect ( $P < 0.05$ ). qRT-PCR showed that compared with the RANKL-induced group, the expression of NFATc1, MMP9, CTSK and TRACP genes of *Dendrobium* polysaccharide group were down-regulated ( $P < 0.05$ ). The TRACP staining showed that the formation of osteoclasts with relatively large volume and >10 nucleus was observed in the RANKL-induced group. The formation of osteoclasts in the concentration of 200  $\mu$ g/ml was inhibited and only a small number of immature osteoclasts with relatively small volume were formed. **Conclusion** *In vitro*, *Dendrobium candidum* polysaccharide inhibits the expression of osteoclast-associated genes and the synthesis of related pathway proteins, inhibiting RANKL-induced osteoclast differentiation of BMMs.

**Key words** *dendrobium candidum*; bone marrow-derived macrophages cells; receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand; osteoclast differentiation