

·综述·

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)的培养及其在诱导破骨细胞中的应用

许丹¹ 律颖¹ 朱小语¹ 陈晓文¹ 冯金秋¹ 范爱琴¹ 许雅君^{1,2*}

1. 北京大学医学部公共卫生学院,北京 100191

2. 食品安全毒理学研究与评价北京市重点实验室,北京 100191

中图分类号: R322 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 10-1355-06

摘要: 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)是通过 Abelson 鼠白血病病毒诱导 BALB/c 小鼠产生肿瘤后得到的细胞株。RAW264.7 细胞在医学研究中应用十分普遍;它是许多白血病相关研究模型的常用细胞株;在微生物学、免疫学等研究中也十分常用;同时也是小鼠源性破骨前体细胞,可通过特定细胞因子的诱导在体外获得成熟破骨细胞,因此也成为许多骨骼疾病研究的体外模型。但 RAW264.7 细胞形态和分化状态多变,在实际培养中较难把握,给科研工作带来了一定困难。科研工作者在 RAW264.7 细胞的培养方法、细胞的形态及分化状态等方面始终观点不一,对于用 RAW264.7 细胞在体外诱导获得破骨细胞的方法也有许多差别。本文结合文献资料及实践,探索了 RAW264.7 细胞的培养条件、冻存、复苏、传代方法,以及用核因子 κ B 受体活化因子配基(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)诱导其成为成熟破骨细胞的技术关键;旨在总结 RAW264.7 细胞的培养及诱导其分化为破骨细胞的经验教训,探讨 RAW264.7 细胞的培养和在体外用 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的方法、技巧,供广大科研工作者 借鉴。

关键词: RAW264.7;单核巨噬细胞;破骨细胞;RANKL;细胞分化

Culture skill of RAW264.7 and its application in osteoclastic differentiation

XU Dan¹, LV Ying¹, ZHU Xiaoyu¹, CHE Xiaowen¹, FENG Jinqiu¹, FAN Aiqing¹, XU Yajun^{1,2}

1. Faculty of Public Health, Beijing University Medical College

2. Beijing Key Laboratory of Food Safety and Toxicology Research and Evaluation

Corresponding author: XU Yajun, Email:xuyajun@bjmu.edu.cn

Abstract: The RAW264.7 cell line was obtained from a tumor of BALB/c mouse induced by Abelson murine leukemia virus. RAW264.7 cell was broadly applied in medical sciences; it is the mostly adopted cell line in many leukemia-related research. It is also commonly used in immunity and microbiology research. In addition, it is the murine source pre-osteoclast which could be stimulated with cytokines and differentiate into mature osteoclasts in vitro, thus becoming an in vitro model applied in many skeletal diseases. However, its cellular morphology and differentiation stage are variable and hard to handle and therefore brings some difficulties to practical work. As to the methods of induction of RAW264.7 cells to mature osteoclasts, researchers' opinions are also different. In this article, we explored the culture condition with combination of literature study, figured out the methods of cryopreservation, recovery and subculture of RAW264.7 cells, and stimulated it with the receptor activator for nuclear factor- κ B ligand (RANKL). The aims of this article are to summarize experience of culturing RAW264.7 cell and its differentiation into mature osteoclast, and to explore the related skills, thus providing reference to researchers.

Key words: RAW264.7; Monocyte/macrophage; Osteoclast; RANKL; Cell differentiation

小鼠单核巨噬细胞瘤 RAW264.7 细胞是用 Abelson 鼠白血病病毒诱导 BALB/c 小鼠产生肿瘤后,收集小鼠腹水单核样巨噬细胞得到的细胞株^[1]。它不仅是许多白血病相关研究模型的常用

细胞株,而且在微生物学、免疫学等研究中也十分常用。此外,RAW264.7 细胞也是小鼠源性破骨前体细胞,可通过诱导获得成熟破骨细胞,因此也在许多骨骼相关研究中广泛采用。尽管其应用十分普遍,但科研工作者在 RAW264.7 细胞的培养方法、细胞的形态及分化状态等方面却始终观点不一,对于用

*通讯作者: 许雅君,Email:xuyajun@bjmu.edu.cn

RAW264.7 细胞在体外诱导获得破骨细胞的方法也有许多差别^[2]。本文总结了在培养 RAW264.7 细胞及诱导破骨细胞过程中遇到的问题、教训,和一些相关技巧及经验,供广大科研工作者借鉴。

1 RAW264.7 细胞培养

1.1 RAW264.7 细胞的形态特征

根据美国模式培养物寄存库 (American type culture collection, ATCC) 的描述, RAW264.7 细胞的形态多样, 可有圆形、类圆形, 以及长出伪足的长梭形、多边形, 可单核或多核^[1]。有些研究者认为 RAW264.7 细胞是巨噬细胞, 有很强的吞噬抗原的能力, 各种刺激都有可能对其形态产生影响, 因此, 其形态多样化属正常现象。而更多研究者则认为, RAW264.7 细胞的最佳形态是圆形、透亮的单核细胞, 变成多形性或长出伪足则是细胞衰老、分化的表现, 若用此时的细胞来进行实验, 则会出现用药物刺激不敏感、贴壁过牢导致消化传代困难等一系列问题^[2]。我们在用 RAW264.7 细胞诱导破骨细胞时也发现, 细胞形态越接近圆形, 诱导出成熟破骨细胞的数目就越多。而用多次传代、伪足较多的多形性细胞诱导破骨细胞时, 几乎无成熟破骨细胞产生。因此认为, RAW264.7 细胞的所谓“最佳”形态应是较小的单核圆形细胞。

1.2 RAW264.7 细胞的培养条件

RAW264.7 细胞的培养环境与一般贴壁细胞并无差异。即培养箱温度为 37℃, CO₂ 浓度为 5%。ATCC 推荐的培养基为 dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 添加 10% 的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)。实际上, 文献中报道的用于 RAW264.7 细胞的培养基既有 α-MEM^[3], 又有高糖型或低糖型 DMEM^[4,5]。以上 3 种培养基, 作者在培养中均使用过。在实验过程中发现, 用 α-MEM 培养基培养细胞时, 会出现有些细胞贴壁不牢、出现悬浮细胞的现象, 而换用 DMEM 培养基时, 这种现象则没有出现。但与低糖型 DMEM 相比, 用高糖型 DMEM 培养的 RAW264.7 细胞传代后贴壁更快, 细胞生长速度更快。这可能是由于高糖型 DMEM 培养及含有更多的氨基酸、葡萄糖、维生素等营养物质, 细胞的生长状态更好, 且高糖型有利于细胞停泊在一个位置生长, 有利于细胞的贴壁。因此, 推荐使用高糖型 DMEM, FBS 浓度为 10% 作为 RAW264.7 细胞的培养基。

1.3 RAW264.7 细胞的传代

关于 RAW264.7 细胞的传代方法, ATCC 推荐使用细胞刮刀。采用 0.25% 的胰酶消化、或采用弯嘴吸管吹打等方法^[6]。采用 0.25% 胰酶消化时, 比较一致的观点是, RAW264.7 细胞贴壁较牢, 仅仅在 37% 消化 2~3 min, 不容易将所有细胞消化下来, 普遍认为延长消化时间, 5~10 min 则更易达到理想消化效果。但缺点是, 消化时间点不易把握, 容易消化过度, 对细胞生长造成抑制。采用 ATCC 推荐的细胞刮刀进行传代时, 细胞能最大限度被收集起来, 基本很少造成细胞的浪费。我们在实际培养中发现, 细胞刮刀会对细胞造成机械性损伤, 稍有不注意后续细胞的形态便会发生变化, 贴壁时间变长, 且多形性细胞增多, 造成实验结果不良。因此, 推荐采用弯嘴吸管吹打进行 RAW264.7 细胞的传代, 即当细胞达到传代密度时, 先弃去培养基, 用 PBS 洗涤两次, 用弯嘴吸管吸取培养液, 均匀、稍用力吹打瓶底, 即可将细胞吹打下来, 离心后重悬即可分瓶培养。分瓶后 2 h 即可见细胞已贴壁。

由于 RAW264.7 细胞生长速度较快, 普遍的看法是 1~2d 换液 1 次, 待培养瓶中细胞密度至 60%~70% 左右即可传代, 传代比例可为 1:3~1:6。若传代间隔太久, 细胞生长密度过大, 细胞也容易发生分化, 出现长伪足的多形细胞。

1.4 RAW264.7 细胞的冻存及复苏

RAW264.7 细胞的冻存及复苏方法与一般贴壁细胞并无较大差别。但由于 RAW264.7 细胞对外界刺激较敏感, 对营养条件要求较高, 许多研究者建议降低 DMSO 的浓度, 增加 FBS 血清的浓度。作者在实验中采用的冻存液是国家实验细胞资源共享平台的推荐配方^[7], 即含有 5% DMSO 和 20% FBS 的培养液。采用此配方的冻存液在进行复苏时, 细胞存活率较高, 生长状况良好。在进行复苏时, 将冻存的细胞加入新的培养液之后, 应注意充分吹打并静置, 以便细胞充分置换新的培养液。此外, 还应注意复苏密度不应过高, 否则容易缺乏营养, 造成细胞分化。

2 RAW264.7 细胞在体外培养破骨细胞中的应用

2.1 破骨细胞的来源

破骨细胞是具有骨吸收功能的多核破骨细胞, 它是一种由贴近骨表面的单核巨噬前体细胞分化而来的具有组织特异性的多核巨噬细胞^[8]。两种细胞因子对破骨细胞的成熟十分必要, 即巨噬细胞集

落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 和核因子 κ B 受体活化因子配基 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)^[9]。M-CSF 在破骨细胞的形成过程中的主要作用是促进破骨前体细胞 (即单核巨噬细胞) 的增殖和生存。而 RANKL 则是由成骨细胞分泌, 引发破骨前体细胞分化成破骨细胞的重要细胞因子^[10]。总的来说, 在骨髓中, 造血干细胞首先分化成骨髓细胞, 而后又在细胞因子的刺激下分化为粒细胞/巨噬细胞。然后, 在 M-CSF 的作用下, 粒细胞/巨噬细胞分化为单核巨噬细胞, 即破骨前体细胞, 而 RANKL 与破骨前体细胞表面受体的结合最终导致了破骨细胞的生成^[11]。

2.2 破骨细胞的体外培养方法

骨骼系统作为一个动态系统, 便不断经历着骨吸收和骨重塑的过程^[12]。破骨细胞和成骨细胞一起, 共同参与骨骼系统的重塑, 调节骨密度, 维持骨骼的健康、稳定^[13]。近年来, 随着对许多骨骼疾病研究的深入, 对破骨细胞及其对骨骼系统疾病影响的相关研究也越来越多。

由于目前并不存在稳定的永生化解破骨细胞系, 破骨细胞的体外培养方法大致可分为原代培养和诱导法两种^[14]。原代培养即在无菌环境下机械分离动物四肢长骨, 冲洗骨髓并收集细胞而后进行纯化得到破骨细胞。诱导法培养破骨细胞又可源自多种细胞, 既包括从动物四肢长骨骨髓中得到的单核细胞、从动物脾脏得到的脾细胞、以及外周血单核细胞等原代细胞; 又包括成熟的细胞系如 RAW264.7、FDCP、HL-60、C7 细胞等^[15]。

2.3 RAW264.7 细胞诱导分化为破骨细胞意义

RAW264.7 细胞是小鼠源性破骨前体细胞, 可表达破骨细胞的一些表型标志基因如金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)、降钙素受体 (calcitonin receptor, CTR) 等^[16], 因此采用适当的诱导剂可使其在体外分化得到成熟破骨细胞。早期的学者, 使用较多的诱导剂将 M-CSF 和 RANKL 联合, 诱导 RAW264.7 细胞分化成破骨细胞。尽管 M-CSF 和 RANKL 两种细胞因子对于破骨细胞的形成缺一不可, 但 Hsu 等^[17]发现, RAW264.7 细胞自身即可表达 M-CSF, 所以仅 RANKL 即可诱导 RAW264.7 细胞分化。因此, 使用 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞在体外分化为成熟破骨细胞也在骨骼系统疾病、骨代谢等研究中广泛应

用^[18-20]。

这种方法的优点显而易见: 首先, 大大降低了破骨细胞培养的技术难度。原代培养或用原代细胞进行诱导不仅操作繁琐, 而且难度较大, 对技术要求较高; 而 RAW264.7 细胞系则较容易得到且生长迅速容易培养。其次, 这种诱导方法得到的破骨细胞数目比其他分离、纯化等方法得到的破骨细胞数目得多, 且均一性好, 不含有其他诸如成骨细胞等杂质细胞, 因而更有利于针对破骨细胞研究的开展。最后, RAW264.7 细胞通过诱导得到破骨细胞的方法已在大量研究中得到验证, 它不仅对 RANKL 的刺激敏感^[21], 而且得到的破骨细胞具有吸收骨质、形成骨吸收陷窝的能力^[22,23], 因此可广泛使用。

3 诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞的技术要点

3.1 RAW264.7 细胞的传代次数

RAW264.7 细胞是与破骨细胞基因表达谱十分相似的破骨前体细胞, 它对 RANKL 的刺激反应敏感, 只要生长状态良好, 即可诱导出破骨细胞^[15]。也有文献报道传代超过 20 代的 RAW264.7 细胞将失去对 RANKL 的敏感性, 不能诱导产生破骨细胞^[24,25]。我们在研究中, 也遇到了与后者相似的问题, 即当 RAW264.7 细胞分化严重, 长出伪足的长梭形、多边形细胞比例较多时, 诱导产生的破骨细胞数目很少甚至观测不到。因此, 要保证成功诱导出破骨细胞, RAW264.7 细胞的传代次数不宜过多, 且细胞应保持在圆形单核细胞占优势的状态。

3.2 接种浓度

RAW264.7 细胞的接种浓度各不相同, 但是基本范围大致在 $10^3 \sim 10^4/\text{cm}^2$ 之间^[26-28]。为探索最佳接种浓度, 作者分别按 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$, $1 \times 10^4/\text{cm}^2$, $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 和 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 4 个浓度接种至 96 孔板中加入 50ng/mL 的 RANKL, 培养 5 天, 随后计数每孔中的成熟破骨细胞数目, 进行统计并分析。结果发现, 如图 1 所示, 生成的破骨细胞数目随接种浓度的增加有增加的趋势 (与最低接种浓度 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 相比有统计学差异, $P < 0.05$), 但是当接种浓度达到 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 之后, 生成的破骨细胞数目便不再增加 ($2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 浓度与 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 浓度相比每孔生成的成熟破骨细胞数目无显著性差异, $P > 0.05$)。因此, 作者认为, 在 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 这个浓度接种 RAW264.7 细胞, 达到的效果最好。

3.3 RANKL 浓度

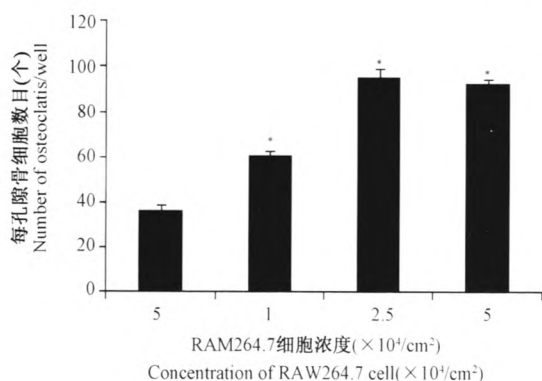


图1 不同浓度 RAW264.7 细胞诱导产生的破骨细胞数目

注: * 与 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 接种浓度组相比 $P < 0.05$

Fig. 1 Numbers of osteoclasts well seeded with different concentrations of RAW264.7 cells

* $P < 0.05$ compared with the $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ group

大部分研究者认为, RAW264.7 细胞对 RANKL 的刺激敏感, 只要 10 ng/mL 即可成功诱导产生。作者采用了 10 、 25 、 50 ng/mL 和 100 ng/mL 4 个浓度, 分别对 RAW264.7 细胞进行诱导。5 天后, 用 TRAP 法对细胞进行染色, 观察并比较生成的破骨细胞的数量, 同时拍照。结果如图 2 所示, 随着 RANKL 浓度的增加, 生成的成熟破骨细胞(细胞呈紫红色, 细胞核数目 ≥ 3) 的数目有逐渐增加的趋势。

但 100 ng/mL (图 2D) 和 50 ng/mL (图 2C) 组相比, 生成的破骨细胞数目差别不大。因此, 将 RANKL 的浓度设为 50 ng/mL 时, 可以高效地得到大量破骨细胞, 又避免了细胞因子的浪费。

3.4 诱导时间 由于破骨细胞形成后, 在体内存在时间短, 往往 $1 \sim 2 \text{ d}$ 即凋亡, 因此准确把握破骨细胞形成的时机是研究成功的关键。有研究表明, 在 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞的第三天, 便可观测到破骨细胞的产生^[29]。但大部分研究者采取的做法是诱导 $5 \sim 7 \text{ d}$ ^[30-32]。作者分别在诱导第 5 天、第 6 天和第 7 天时, 收集细胞用 Annexin V/PI 双染法对细胞进行染色, 然后用流式细胞仪进行检测。结果如图 3 所示, 右上(UR)和右下(LR)象限分别表示晚期和早期凋亡。在第 5 天, 仅少量细胞发生凋亡(图 3A); 早期和晚期细胞凋亡率都较低。在第六天, 早期和晚期细胞凋亡均有稍微增加, 但并不明显(图 3B); 在第 7 天, 凋亡细胞数目进一步增多(图 3C)。由此可推测, 破骨细胞形成的高峰期可能在第 5 天, 第 6 天已开始有少量发生凋亡, 第 7 天则凋亡进一步加剧。因此, 推荐用 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞 5 天来获得破骨细胞。

4 结论

RAW264.7 细胞由于具有粘附和吞噬能力, 以

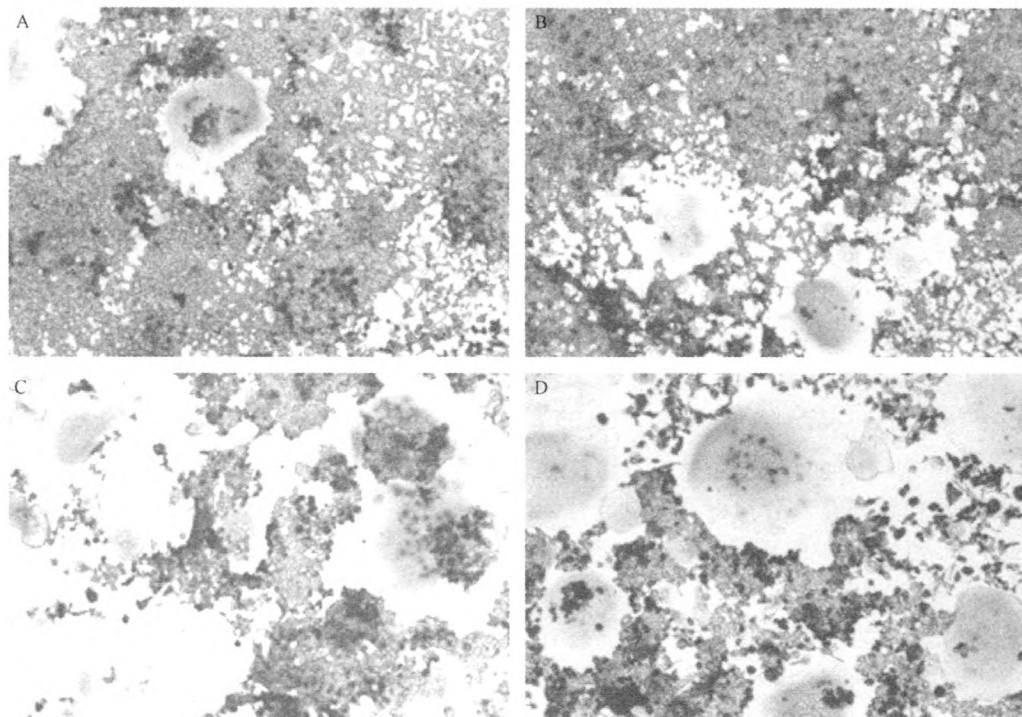


图2 不同浓度的 RANKL 诱导产生的破骨细胞($\times 20$)

A. RANKL: 10 ng/mL ; B. RANKL: 25 ng/mL ; C. RANKL: 50 ng/mL ; D. RANKL: 100 ng/mL

Fig. 2 Osteoclasts formed induced by different concentrations of RANKL($\times 20$)

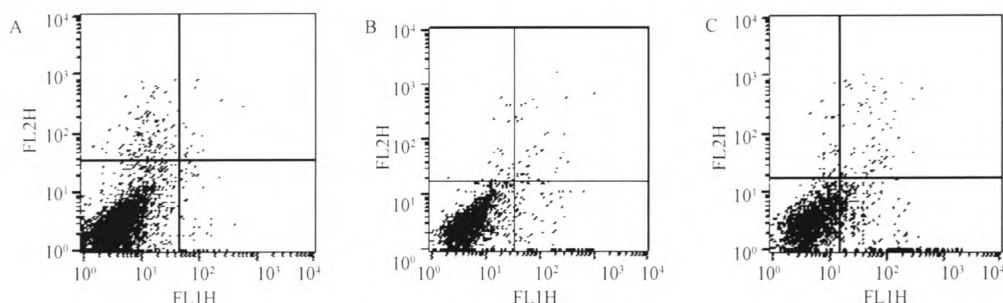


图 3 不同时间诱导产生的破骨细胞凋亡情况

A. 诱导 5 天; B. 诱导 6 天; C. 诱导 7 天

Fig. 3 Flow cytometry results of apoptosis in osteoclasts with different induction time

A induction time: 5 days; B induction time: 6 days; C induction time: 7 days

及又具有破骨前体细胞的多方面的特性,在免疫学、微生物学以及骨骼系统疾病、营养学等研究中被广泛应用。虽然它生长速度很快,但它同时又对环境反应敏感、对生长环境要求很高。作者认为,圆形的单核细胞是其较佳状态,在培养过程中培养基营养不够、细胞密度过高以致生长空间变小、以及操作不当等都会使其形态发生变化。细胞变成长出伪足的长梭形、多边形则会对后续试验结果产生不良影响。采用高糖型 DMEM 培养液 (FBS 浓度为 10%),当细胞生长密度为 60% 时用弯嘴吸管吹打细胞按比例 1:4 ~ 1:6 进行传代,可使细胞保持良好生长状态。

RAW264.7 细胞由 RANKL 诱导产生破骨细胞,作为一种公认的比较成熟的体外培养破骨细胞的方法,已在许多研究中得到应用。作者认为,诱导成功的关键需首先建立 RAW264.7 细胞状态良好的基础之上。其次,采用 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 这个浓度接种 RAW264.7 细胞,用 50 ng/mL RANKL 诱导 5d 即可产生大量破骨细胞供后续研究使用。

【参 考 文 献】

- [1] <http://www.atcc.org>.
- [2] <http://search.dxy.cn/?words=RAW264.7>.
- [3] Zhao Y, Huai Y. Quinoxaline derivative of oleanolic acid inhibits osteoclastic bone resorption and prevents ovariectomy-induced bone loss[J]. Menopause, 2011, 18(6): 690-697.
- [4] Yoon W, Kim K. Sargachromanol G inhibits osteoclastogenesis by suppressing the activation NF- κ B and MAPKs in RANKL-induced RAW 264.7 cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 434(4): 892-897.
- [5] Suh KS, Rhee SY. Xanthohumol modulates the expression of osteoclast-specific genes during osteoclastogenesis in RAW264.7 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 62: 99-106.
- [6] Fang Y, Mao XH. Culture skill and experience of RAW264.7 [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(22): 4358-4359. (in Chinese)
- [7] <http://www.cellresource.cn/fdetail.aspx?id=146>.
- [8] Udagawa N, Takahashi N. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(18): 7260-7264.
- [9] Blair JM, Zheng Y. RANK ligand [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(6): 1077-1081.
- [10] Yasuda H. RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases [J]. World Journal of Orthopedics, 2013, 4(4): 207.
- [11] Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts [J]. J Pathol, 2000, 192(1): 4-13.
- [12] Teitelbaum SL. Bone Resorption by Osteoclasts [J]. Science, 2000, 289(5484): 1504-1508.
- [13] Boyle WJ, Simonet WS. Osteoclast differentiation and activation [J]. Nature, 2003, 423(6937): 337-342.
- [14] Lv MB, Chen KM. Progress in culture of osteoclasts in vitro [J]. Int J Orthop, 2006, (05): 308-310. (in Chinese)
- [15] Dai M, Cheng M. Study of the differentiation of RAW264.7 cell to osteoclast in vitro [J]. Tianjin Med, 2010, 38(7): 596-598. (in Chinese)
- [16] Xiao XH, Liao EY. Biological Characteristics of Mice Monocyte Cell RAW264.7 [J]. Journal of Nanhua University (Medicine Edition), 2008, 36(3): 282-285. (in Chinese)
- [17] Hsu H, Lacey DL. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(7): 3540-3545.
- [18] Chen X, Zhu G. Cadmium Stimulates the Osteoclastic Differentiation of RAW264.7 Cells in Presence of Osteoblasts [J]. Biological Trace Element Research, 2012, 146(3): 349-353.
- [19] Rahman MM. Conjugated linoleic acid inhibits osteoclast differentiation of RAW264.7 cells by modulating RANKL signaling [J]. The Journal of Lipid Research, 2006, 47(8): 1461-1468.

- 1739-1748.
- [20] Lyu Y, Feng X. Fructus Ligustri Lucidi (FLL) ethanol extract increases bone mineral density and improves bone properties in growing female rats [J]. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2014, 32(6): 616-626.
- [21] Bai SB, Zhong JJ. RAW264.7 cell induced differentiation and identification [J]. *Science and Technology Review*, 2010, 28(1): 44-47. (in Chinese)
- [22] Li BB, Yu SF. Comparison of two methods of isolation and culture of osteoclasts and the dynamic observation of bone resorption [J]. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2005, (05): 536-541. (in Chinese)
- [23] Chen GX, Wang GR. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand-induced mature osteoclasts [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2013, (24): 4380-4385. (in Chinese)
- [24] Pan Y, Zhang W. Comparison of stability of RAW264.7 cells at different passages to osteoclast in vitro [J]. *Acta University Medicinalis Nanjing (Natural Science)*, 2011(05): 616-619. (in Chinese)
- [25] Koseki T, Gao Y. Role of TGF-beta family in osteoclastogenesis induced by RANKL [J]. *Cell Signal*, 2002, 14(1): 31-36.
- [26] Chen X, Zhu G. Cadmium Stimulates the Osteoclastic Differentiation of RAW264.7 Cells in Presence of Osteoblasts [J]. *Biological Trace Element Research*, 2012, 146(3): 349-353.
- [27] Lee EJ, Kim JL. Inhibition of osteoclast activation by phloretin through disturbing alphavbeta3 integrin-c-Src pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 680145.
- [28] Satu é M, Arriero MDM. Quercitrin and Taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2013, 86(10): 1476-1486.
- [29] Zhu WP, Shi W. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand induces osteoclast precursor culture and differentiation [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2013(46): 7981-7987. (in Chinese)
- [30] Chon JW, Kim H. Silk fibroin hydrolysate inhibits osteoclastogenesis and induces apoptosis of osteoclasts derived from RAW 264.7 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(5): 1203-1210.
- [31] Kim HS, Suh KS. The inhibitory effect and the molecular mechanism of glabridin on RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(2): 169-177.
- [32] Recchia I, Rucci N. Reduction of c-Src activity by substituted 5, 7-diphenyl-pyrrolo [2, 3-d]-pyrimidines induces osteoclast apoptosis in vivo and in vitro. Involvement of ERK1/2 pathway [J]. *Bone*, 2004, 34(1): 65-79.

(收稿日期: 2016-04-18, 修回日期: 2016-05-30)

(上接第 1344 页)

- [10] Herrmann M, Umanskaya N, Wildemann B, et al. Stimulation of osteoblast activity by homocysteine. *J Cell Mol Med*. 2008, 12: 1205-1210.
- [11] Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, et al. Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res*, 2005, 20: 921-929.
- [12] Huh YJ, Kim JM, Kim H, et al. Regulation of osteoclast differentiation by the redox-dependent modulation of nuclear import of transcription factors. *Cell Death Differ*, 2006, 13: 1138-1146.
- [13] Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, et al. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 1990, 85: 632-639.
- [14] Lean JM, Davies JT, Fuller K, et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen deficiency bone loss. *J Clin Invest*, 2003, 112: 915-923.
- [15] Grassi F, Malik Tyagi A, Calvert JW, et al. Hydrogen Sulfide Is a Novel Regulator of Bone Formation Implicated in the Bone Loss Induced by Estrogen Deficiency. *J Bone Miner Res*, 2015, 28(10): 1002-1007.
- [16] 欧琼, 黄余良, 张群峰. 外源性硫化氢对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢及护骨素/细胞核因子 κB 受体活化因子配体表达的影响 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(27): 26-30.
- Ou Q, Huang YL, Zhang QF. Exogenous hydrogen sulfide on ovariectomized rats with osteoporosis and bone metabolism osteoprotegerin / receptor activator of nuclear factor-κB ligand expression of Factor [J]. *Chinese Medicine Herald*, 2014, 11(27): 26-30.
- [17] Liu Y, Yang RL, Liu XB, et al. Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca²⁺ channel sulphydration. *J NIH Public Access*, 2014, 15(1): 66-78.
- [18] 周智, 刘开祥, 谢跃. 低浓度硫化氢对类风湿性关节炎的软骨保护 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(11): 1659-1664.
- Zhou Z, Liu KX, Xie Y. Low concentrations of hydrogen sulfide on rheumatoid joint disease cartilage protection [J]. *Journal of Chinese Tissue Engineering Research*, 2014, 18(11): 1659-1664.
- [19] Guo L, Tang K, Quan Z, et al. Association between seven common OPG genetic polymorphisms and osteoporosis risk: a meta-analysis [J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(1): 29-39.
- [20] Yasuda H. RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases [J]. *World J Orthop*, 2013, 4(4): 207-217.
- [21] Stuss M, Rieske P, Cegowska A, et al. Assessment of OPG/RANK/RANKL gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after treatment with strontium ranelate and ibandronate in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(5): 1007-1011.

(收稿日期: 2016-03-19, 修回日期: 2016-05-05)