

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.002
View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.002>

· 论著 ·

异槲皮苷对成骨细胞分化及 HDAC1 和 Runx2 表达的影响

季泽娟，张春旭，郭占豪，刘方娜，刘鑫

(郑州儿童医院骨科，郑州 450000)

[摘要] 目的：探讨异槲皮苷对成骨细胞分化及对HDAC1和Runx2表达情况的影响。方法：不同浓度梯度异槲皮苷(1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L)连续处理MC3T3-E1细胞系，在作用第3天，借助qRT-PCR技术对MC3T3-E1细胞系中I型胶原蛋白(type 1 collagen, Col 1)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)及骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的表达进行检测，并对骨细胞分化关键酶ALP的活性和骨钙的形成进行检测，以评估成骨细胞的分化程度。通过qRT-PCR技术检测MC3T3-E1细胞中HDAC1及Runx2的表达水平。结果：异槲皮苷能促进成骨细胞MC3T3-E1中Col 1, ALP及OPN的上调表达，且差异具有统计学意义($P<0.05$)，并且呈现出一定的剂量效应。异槲皮苷诱导时，成骨细胞分化过程中ALP活性显著增强，骨钙形成明显增加。在 1×10^{-6} mol/L异槲皮苷作用下，成骨细胞系中HDAC1 mRNA和蛋白水平均显著下调($P<0.05$)，而Runx2 mRNA和蛋白水平均明显上调($P<0.05$)。结论：异槲皮苷可能通过下调HDAC1表达、促进Runx2表达，有效地促进成骨细胞分化，为异槲皮苷应用于治疗骨质损伤类疾病提供新的依据。

[关键词] 异槲皮苷；成骨细胞分化；I型胶原蛋白；碱性磷酸酶；HDAC1；Runx2

Effect of isoquercetin on osteoblast differentiation and expression level of HDAC1 and Runx2

JI Zejuan, ZHANG Chunxu, GUO Zhanhao, LIU Fangna, LIU Xin

(Department of Orthopedics, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

Abstract **Objective:** To explore effect of the isoquercetin on osteoblast differentiation and expression level of HDAC1 and Runx2. **Methods:** The type 1 collagen (Col1), alkaline phosphatase (ALP) and osteopontin (OPN) expression level in MC3T3-E1 cells was detected by using qRT-PCR after treated with 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L isoquercetin. The ALP activity was assayed using ALP detection kit. Mineralization of MC3T3-E1 was evaluated by Alizarin red staining. What's more, the mRNA levels of HDAC1 and Runx2 in MC3T3-E1 cells were observed by using qRT-PCR post-treatment by 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L isoquercetin. **Results:** The Col 1, ALP and OPN expression level turned significantly higher after treated with 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L isoquercetin ($P<0.05$). There was a certain dose effect between them. As the same, the ALP activity and mineralization of

收稿日期 (Date of reception): 2017-08-13

通信作者 (Corresponding author): 季泽娟, Email: jizejuan1982@126.com

基金项目 (Foundation item): 河南省医学科技攻关计划项目 (201503048)。This work was supported by Henan Province Medical Science and Technology Research Project, China (201503048)。

MC3T3-E1 was higher post-exposure to the isoquercetin. HDAC1 in the MC3T3-E1 cells had lower expression level after treated with the isoquercetin ($P<0.05$). However, Runx2 in the MC3T3-E1 cells had higher expression level after exposed to the isoquercetin ($P<0.05$). **Conclusion:** The isoquercetin can promote the expression of Runx2 through inhibiting the expression of HDAC1, in order to improve the differentiation of osteoblast. The results provide a new theoretical basis for the application of isoquercetin in the treatment of osteoporosis.

Keywords isoquercetin; osteoblast differentiation; type 1 collagen; alkaline phosphatase; HDAC1; Runx2

骨质疏松症是近年来严重威胁人类健康的疾病之一，是一种以单位体积内骨组织量减少为特点的代谢性骨质病变^[1]。成骨细胞是负责参与骨形成过程的重要功能细胞，对于维持骨组织中代谢平衡和修复骨组织损伤发挥重要作用。已有报道^[2-3]发现：异槲皮苷是杜仲叶等中药治疗骨质疾病的关键成分，能够有效促进成骨细胞增殖、分化，但是对于具体的作用机制少有报道。研究^[4-5]发现：Runx2作为成骨细胞分化的一种特异性转录因子，已被证明能促进成骨细胞的分化，在成骨细胞分化和骨基质蛋白的产生过程中具有重要的作用。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)通过催化组蛋白去乙酰化，影响组蛋白与DNA序列的亲和性，从而影响基因表达^[6-7]。研究^[8]发现机械刺激通过HDAC1调节人骨髓基质细胞的成骨分化。抑制组蛋白脱乙酰酶活性能增强人牙周膜细胞的成骨分化^[9]。有研究^[10-11]发现HDAC1和Runx2共同参与调节成骨细胞分化过程中关键基因的表达。本研究拟利用不同浓度梯度的异槲皮苷作用于MC3T3-E1细胞系，对骨细胞分化过程中特异表达的相关基因的表达水平及关键酶的活性进行检测，同时检测两种成骨细胞分化相关因子HDAC1和Runx2的表达水平，从而试图揭示异槲皮苷对成骨细胞分化的影响及具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

MC3T3-E1细胞系购自中国协和细胞库；异槲皮苷购自上海麦克林生化科技有限公司， α -MEM培养基、青霉素、链霉素和标准胎牛血清购自美国Hyclone公司；0.25%胰蛋白酶、DMSO、 β -甘油磷酸、L-抗坏血酸、茜西红试剂、抗体等购自美国Sigma公司；碱性磷酸酶试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自碧云天公司；反转录试剂盒、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis试剂盒购自Roche公司；AceQ qPCR SYBR[®] Green Master Mix

购自南京Vazyme生物科技有限公司；引物均在上海生工生物股份有限公司合成。 CO_2 细胞培养箱购自德国Heraeus公司；核酸蛋白检测仪购自德国Eppendorf公司；荧光定量定量PCR仪、Elx800酶标仪购自美国Bio-Rad公司；超纯水仪购自法国MILLI-Q公司；KS-600超声细胞破碎机购自宁波科生仪器厂等。

1.2 药物溶液配制

1)异槲皮苷溶液：首先用DMSO溶解异槲皮苷，配成10 g/L的溶液作为母液，之后用 α -MEM培养基梯度稀释得到 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L的异槲皮苷溶液。2)成骨细胞诱导液：分别称取5 mg/L抗坏血酸和108.2 mg的 β -磷酸甘油，溶于100 mL α -MEM培养基配制成50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-抗坏血酸和 10^{-8} mol β -磷酸甘油，用0.22 μm 滤膜过滤灭菌，4 °C保存。

1.3 细胞系的培养及诱导

1)细胞的培养：小鼠MC3T3-E1细胞系在含有10%胎牛血清的 α -MEM培养基中进行培养，加入100 mg/mL链霉素和100 U/mL青霉素避免细菌污染，置于 CO_2 培养箱中(5% CO_2 , 37 °C)进行培养。2 d换一次培养液，3~4 d传代一次，无菌操作，避免污染。2)细胞的诱导：用 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L的异槲皮苷溶液处理细胞，用成骨细胞诱导液处理细胞作为阳性对照组(OS)，DMSO处理细胞作为空白对照组(Cont)。

1.4 RNA 提取和 qRT-PCR 引物设计

首先在不同浓度的异槲皮苷溶液诱导处理3 d后，收集MC3T3-E1细胞用胰蛋白酶消化，然后按照TRIzol试剂盒提供的方法提取组织中的总RNA；并检测所取RNA样品的OD_{260/280}均在1.8~2.0之间。按照RNA反转试剂盒操作说明以所得RNA作模板反转录合成cDNA并检测其浓度，以作为后续qRT-PCR反应体系的模板。根据I型胶原蛋白(type 1 collagen, Col1)，碱性磷酸酶(alkaline

phosphatase, *ALP*), 骨桥蛋白(osteopontin, *OPN*), *HDAC1*及*Runx2*及内参基因*GAPDH*的序列, 利用Primer Premier设计引物, 如表1所示。

1.5 qRT-PCR 检测 *Col 1*, *ALP*, *OPN*, *HDAC1* 及 *Runx2* mRNA 水平

对*Col 1*, *ALP*, *OPN*, *HDAC1*及*Runx2* mRNA 水平的检测均在Bio-Rad荧光定量PCR仪上操作, 按照AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix的使用说明, 选择推荐的体系进行扩增, 反应体积(总体积 $10\ \mu\text{L}$)如下: 50 ng/ μL 的cDNA 1 μL , 正反向引物($10\ \mu\text{mol/L}$)各0.4 μL , AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix 5 μL , RNase-free水补足 $10\ \mu\text{L}$ 。反应条件设置如下: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性10 s; 60 °C退火20 s; 72 °C延伸20 s; 循环设置40个。构建扩增标准曲线, 结果显示扩增效率在0.95~1.1, $R^2 \geq 0.98$, 表明扩增效率符合标准, 且引物特异性高。每个样品做3次重复。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法, 对qRT-PCR的结果进行表达差异性分析。

1.6 ALP 酶活性检测

将处于对数生长期的MC3T3-E1细胞用胰蛋白酶(0.25%)进行处理, 用α-MEM培养基稀释成单细胞悬液, 细胞计数后稀释至 1×10^5 个/ mL , 按每孔900 μL 接种在96孔培养板中, 培养至细胞贴壁(24 h)后, 吸出α-MEM培养基加入 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5}\ \text{mol/L}$ 的异槲皮苷溶液进行培养, 每个梯度重复

3次, 并用成骨细胞诱导液处理细胞作为阳性对照组(OS), DMSO处理细胞作为空白对照组(Cont)。分别在异槲皮苷诱导培养第3, 5天时, 收集细胞进行破碎, 先按照BCA蛋白浓度测定试剂盒使用说明测定蛋白总浓度, 然后按照碱性磷酸酶试剂盒使用说明对MC3T3-E1细胞ALP活性进行检测。

1.7 茜茜红染色

在 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5}\ \text{mol/L}$ 异槲皮苷溶液诱导培养18 h时, 收集MC3T3-E1细胞, 70%冰乙醇固定1 h, 之后用蒸馏水冲洗。加入40 mmol/L的茜茜红试剂, pH4.0, 染色15 min, 用蒸馏水洗去多余试剂, 观察成骨细胞的骨钙形成情况, 采用Image J对骨钙节形成量进行半定量分析。

1.8 Western 印迹检测 *HDAC1* 及 *Runx2* 蛋白表达水平

分别提取各组细胞总蛋白并测定总蛋白含量, 以*GAPDH*为内参, 检测各组细胞中*HDAC1*及*Runx2*蛋白表达水平。采用Tanon系统拍照并对*HDAC1*及*Runx2*蛋白相对表达量进行分析。

1.9 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析, 计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 基因表达的差异采用单因素方差分析, 两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表 1 *Col 1*, *ALP*, *OPN*, *HDAC1*, *Runx2* 及 *GAPDH* 的引物序列

Table 1 Primers of *Col 1*, *ALP*, *OPN*, *HDAC1*, *Runx2* and *GAPDH* for qRT-PCR

基因	正向引物 5' → 3'	反向引物 5' → 3'
<i>Col 1</i>	GCGAAGGCAACAGTCGCT	CTTGGTGGTTGTATTGATGAC
<i>ALP</i>	GCAGGATTGACCACGGACA	TTCTGCTCATGGACGCCGTG
<i>OPN</i>	GACCATGAGATGGCAGTGATTG	TGATGTTCCAGGCTGGCTTTG
<i>HDAC1</i>	GCAGATCTGCCACCATGAGCTCCAAGGCC	GCGAATT CCTACAGGGCGGCTCT
<i>Runx2</i>	GATGCTCTGTTCTTCAGG	CTCCAGCATTTCATGGCTAGT
<i>GAPDH</i>	GGGCATCTGGGCTACAC	GGTCCAGGGTTCTACTCC

2 结果

2.1 异槲皮苷能够促进成骨细胞的分化

1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , $1 \times 10^{-5}\ \text{mol/L}$ 浓度的

异槲皮苷都能够诱导成骨细胞分化特异基因*Col 1*, *ALP*及*OPN*的上调表达($P < 0.05$)。表明异槲皮苷能促进成骨细胞的分化过程, 且在 $1 \times 10^{-5}\ \text{mol/L}$ 时达到最大的促进作用(图1)。进一步研究发现异槲皮

昔对成骨细胞的诱导作用与异槲皮昔的浓度呈现一定的剂量效应，且在 1×10^{-5} mol/L时作用最大。

2.2 异槲皮昔对ALP活性的影响

异槲皮昔溶液处理细胞3, 5 d后，收集细胞破碎处理后，检测ALP酶活。结果显示：诱导3 d后，与空白对照组相比，各浓度异槲皮昔对MC3T3细胞ALP活性无明显影响($P>0.05$)；诱导5 d后， 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L的异槲

皮昔处理引起MC3T3细胞中ALP活性显著增加($P<0.05$)。当异槲皮昔浓度为 1×10^{-5} mol/L时，对ALP活性的促进作用极为显著($P<0.01$ ，表2)。

2.3 异槲皮昔对骨钙形成的影响

与对照组比较， 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L异槲皮昔诱导细胞中骨钙形成增加(图2)，且异槲皮昔浓度越大，对成骨细胞中骨钙形成越多。

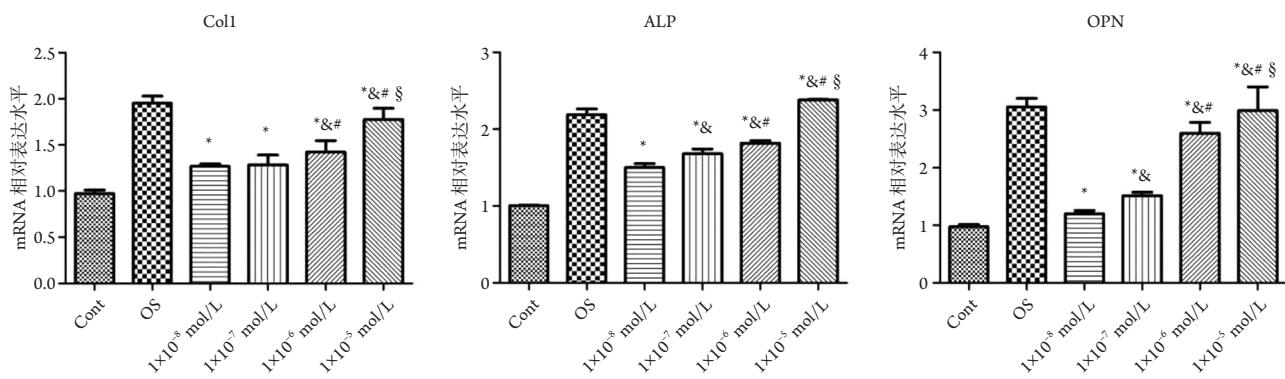


图1 异槲皮昔对成骨细胞分化特异基因Col1, ALP及OPN表达水平的影响($n=3$)

Figure 1 Effects of isoquercetin on expression of Col1, ALP and OPN in MC3T3 cells ($n=3$)

与空白对照组相比，* $P<0.05$ ；与 1×10^{-8} mol/L组比较，^a $P<0.05$ ；与 1×10^{-7} mol/L组比较，^b $P<0.05$ ；与 1×10^{-6} mol/L组比较，^c $P<0.05$ 。

Compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the 1×10^{-8} mol/L group, ^a $P<0.05$; compared with the 1×10^{-7} mol/L group, ^b $P<0.05$; compared with the 1×10^{-6} mol/L group, ^c $P<0.05$.

表2 异槲皮昔对ALP活性的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of isoquercetin on ALP activity ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	$D_{405 \text{ nm}}$	
	诱导 3 d 后	诱导 5 d 后
异槲皮昔 /($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		
1×10^{-8}	3.512 ± 0.662	5.937 ± 0.197
1×10^{-7}	3.532 ± 0.345	$5.987 \pm 0.307^{*\&}$
1×10^{-6}	3.438 ± 0.857	$6.553 \pm 0.161^{*\&}$
1×10^{-5}	3.463 ± 1.126	$6.889 \pm 0.123^{*\&}$
空白对照	3.629 ± 0.217	5.326 ± 0.218
阳性对照	3.582 ± 0.327	$6.483 \pm 0.251^*$

与空白对照组相比，* $P<0.05$ ；与 1×10^{-8} mol/L组比较，^a $P<0.05$ ；与 1×10^{-7} mol/L组比较，^b $P<0.05$ ；与 1×10^{-6} mol/L组比较，^c $P<0.05$ 。

Compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the 1×10^{-8} mol/L group, ^a $P<0.05$; compared with the 1×10^{-7} mol/L group, ^b $P<0.05$; compared with the 1×10^{-6} mol/L group, ^c $P<0.05$.

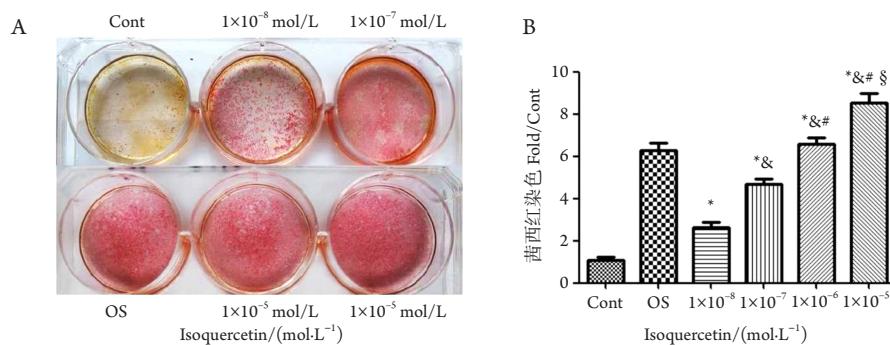


图2 异槲皮苷对骨钙形成的影响($n=3$)

Figure 2 Effects of isoquercitrin on bone calcium formation ($n=3$)

(A)茜茜红染色观察钙结节形成; (B)骨钙形成半定量分析。与空白对照组相比, * $P<0.05$; 与 1×10^{-8} mol/L组比较, ** $P<0.05$; 与 1×10^{-7} mol/L组比较, *** $P<0.05$; 与 1×10^{-6} mol/L组比较, **** $P<0.05$ 。

(A) Mineralization nodes were detected by Alizarin Red S staining; (B) quantitative analysis of bone mineralization nodes. Compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the 1×10^{-8} mol/L group, ** $P<0.05$; compared with the 1×10^{-7} mol/L group, *** $P<0.05$; compared with the 1×10^{-6} mol/L group, **** $P<0.05$.

2.4 异槲皮苷能够促进成骨细胞分化过程中 Runx2 表达

与空白对照组比较, 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L异槲皮苷处理MC3T3细胞系, 均使得Runx2 mRNA和蛋白的表达水平显著上调, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图3), 且随着异槲皮苷的浓度的增加, Runx2表达呈现增加趋势。

2.5 异槲皮苷能够抑制成骨细胞分化过程中 HDAC1 表达

与对照组比较, 1×10^{-6} , 1×10^{-5} mol/L异槲皮苷处理MC3T3细胞使得细胞中HDAC1 mRNA和蛋白的表达水平均显著下调, 且差异具有统计学意义($P<0.05$, 图4)。

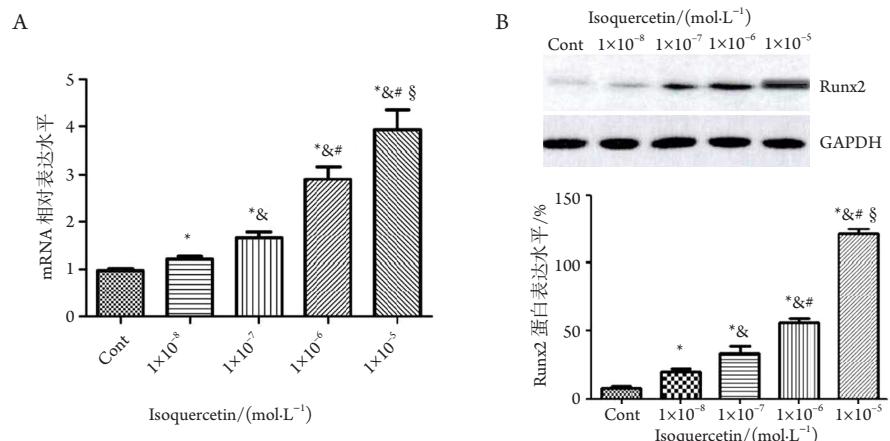


图3 异槲皮苷对成骨细胞分化特异基因Runx2表达水平的影响($n=3$)

Figure 3 Effects of isoquercitrin on expression of Runx2 ($n=3$)

(A)异槲皮苷对成骨细胞Runx2 mRNA水平的影响; (B)异槲皮苷对成骨细胞Runx2蛋白水平的影响。与空白对照组相比, * $P<0.05$; 与 1×10^{-8} mol/L组比较, ** $P<0.05$; 与 1×10^{-7} mol/L组比较, *** $P<0.05$; 与 1×10^{-6} mol/L组比较, **** $P<0.05$ 。

(A) Effect of isoquercitrin on Runx2 mRNA level in osteoblasts; (B) Effects of isoquercitrin on Runx2 protein levels in osteoblasts.

Compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the 1×10^{-8} mol/L group, ** $P<0.05$; compared with the 1×10^{-7} mol/L group, *** $P<0.05$; compared with the 1×10^{-6} mol/L group, **** $P<0.05$.

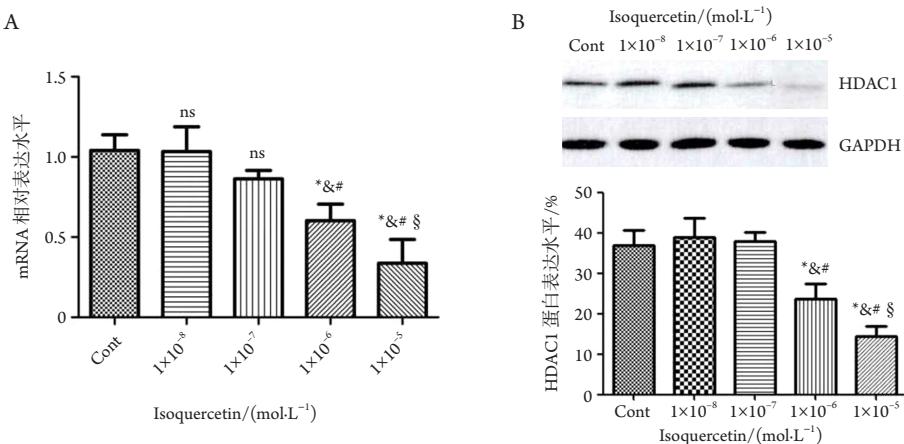


图4 异槲皮苷对成骨细胞分化特异基因HDAC1表达水平的影响(n=3)

Figure 4 Effects of isoquercitrin on expression of HDAC1 (n=3)

(A)异槲皮苷对成骨细胞HDAC1 mRNA水平的影响；(B)异槲皮苷对成骨细胞HDAC1蛋白水平的影响。与空白对照组相比，^{*}P<0.05；与1×10⁻⁸ mol/L组比较，^{§P<0.05}；与1×10⁻⁷ mol/L组比较，^{*P<0.05}；与1×10⁻⁶ mol/L组比较，^{§P<0.05}。

(A) Effect of isoquercitrin on HDAC1 mRNA level in osteoblasts; (B) Effect of isoquercitrin on HDAC1 protein levels in osteoblasts. Compared with the control group, ^{*}P<0.05; compared with the 1×10⁻⁸ mol/L group, ^{§P<0.05}; compared with the 1×10⁻⁷ mol/L group, ^{*P<0.05}; compared with the 1×10⁻⁶ mol/L group, ^{§P<0.05}.

3 讨论

骨质疏松症是由多种原因引起的一组骨组织病，多数骨质疏松是由于骨质吸收增多所引起，临床表现为骨骼疼痛、易发生骨折^[12-13]。成骨细胞分化成熟过程中会逐步表达ALP，OPN及Col1等特异性标志物^[14-16]。到目前为止，已发现多种中药具有促进成骨细胞分化的功效，在治疗骨质疏松症中效果显著^[17]。异槲皮苷是许多治疗骨质疏松中成药的主要功效成分，已有研究^[2]表明：异槲皮苷能够促进成骨相关基因ALP和Col1等的表达，从而促进成骨细胞分化。本研究证实：异槲皮苷处理成骨细胞后，成骨细胞分化相关基因Col1，ALP及OPN表达水平显著上调，表明异槲皮苷能促进成骨细胞的分化过程，且异槲皮苷对成骨细胞的诱导作用和异槲皮苷的浓度呈现一定的剂量效应。

ALP活性是衡量成骨细胞分化程度的一个重要指标^[18]。本研究发现：诱导3 d后，与空白对照组相比，各浓度异槲皮苷处理后，MC3T3细胞系ALP活性无明显变化；1×10⁻⁷，1×10⁻⁶，1×10⁻⁵ mol/L异槲皮苷诱导5 d后，MC3T3细胞系ALP活性显著增加。成骨细胞中骨钙的形成也是反映成骨细胞的成骨能力的一个重要指标^[19-20]。本研究结果发现：异槲皮苷能促进成骨细胞分化过程中骨钙的形成，表明异槲皮苷能够促进成骨细胞MC3T3的分化。

同时，一系列转录因子，如Runx相关转录因子等，也参与调控成骨细胞分化成熟过程^[21]。Runx2通常依赖染色质的结构变化及相关辅助因子共同调节Runx2转录活性，影响成骨细胞分化过程^[22-23]。本研究发现，1×10⁻⁸，1×10⁻⁷，1×10⁻⁶，1×10⁻⁵ mol/L异槲皮苷处理MC3T3细胞系，均使得Runx2的表达水平显著上调。HDACs在成骨细胞分化中能够通过调控Runx2等转录因子影响成骨细胞的分化^[24]。Vishal等^[25]发现HDAC通过抑制Runx2的活性影响成骨细胞分化成熟。本研究发现：1×10⁻⁶，1×10⁻⁵ mol/L异槲皮苷处理后，成骨细胞中HDAC1表达水平显著降低，表明异槲皮苷抑制HDAC1表达，促进Runx2表达，促进成骨细胞的分化。

综上所述，异槲皮苷处理细胞后，细胞系中HDAC1表达水平显著下调，Runx2表达水平显著上调，表明异槲皮苷通过下调HDAC1、上调Runx2发挥对成骨细胞分化的促进作用。然而在异槲皮苷促进成骨分化过程中，HDAC1与Runx2如何相互作用，以及二者如何影响成骨细胞分化相关基因表达的机制尚不清楚，还需进一步研究。

参考文献

- 牟丽秋, 杜俊, 胡旖耘, 等. 杜仲中槲皮素、京尼平苷及桃叶珊瑚苷对小鼠成骨样细胞系MC3T3-E1增殖和分化的影响[J]. 药物

- 评价研究, 2015, 38(2): 165-169.
- MOU Liqiu, DU Jun, HU Yiyun, et al. Effect of quercetin, geniposide, and aucubin in Eucommia ulmoides on proliferation and differentiation of osteoblast MC3T3-E1 in mice[J]. Drug Evaluation Research, 2015, 38(2): 165-169.
2. 段爱竹, 邓旭亮, 李蓉涛. 金叶子异槲皮苷对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3836-3840.
DUAN Aizhu, DENG Xuliang, LI Rongtao. Effects of golden leaf isoquercitrin on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells[J]. Chinese Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(19): 3836-3840.
3. 胡少男, 郑琢, 萧伟, 等. 异槲皮苷对MC3 T3-E1成骨细胞增殖与分化的影响作用[J]. 海峡药学, 2015, 27(2): 223-225.
HU Shaonian, ZHENG Zhuo, XIAO Wei, et al. Influence of isoquercitrin on proliferation and differentiation of mice's os-teobiast MC3 T3-E1[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2015, 27(2): 223-225.
4. 关键, 程宗生, 王健平, 等. 成骨细胞中Runx2对机械离心力刺激的响应[J]. 华西口腔医学杂志, 2010, 28(1): 38-40.
GUAN Jian, CHENG Zongsheng, WANG Jianping, et al. Bone morphogenetic protein signal transduction pathway regulates Runx2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts in vitro induced by centrifugation[J]. West China Journal of Stomatology, 28(1): 38-40.
5. 余炜, 朱超, 茅伟伟, 等. 神经肽P物质通过诱导RUNX2表达对小鼠成骨细胞增殖能力的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(1): 15-20.
YU Wei, ZHU Chao, MAO Weiwei, et al. Effect of neuropeptide substance P on proliferation of murine osteoblasts through induction of RUNX2 expression[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University. Medical Science, 2017, 37(1): 15-20.
6. Bradley EW, Carpio LR, van Wijnen AJ, et al. Histone deacetylases in bone development and skeletal disorders[J]. Physiol Rev, 2015, 95(4): 1359-1381.
7. 姜晴. 组蛋白去乙酰化酶4在成骨细胞分化中作用的初步探究[D]. 长春: 东北师范大学, 2011.
JIANG Qing. A preliminary study on the role of histone deacetylase 4 in osteoblast differentiation [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2011.
8. Wang J, Wang CD, Zhang N, et al. Mechanical stimulation orchestrates the osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells by regulating HDAC1[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(5): e2221.
9. Huynh NC, Everts V, Pavasant P, et al. Inhibition of histone deacetylases enhances the osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells[J]. J Cell Biol, 2016, 117(6): 1384-1395.
10. Lamour V, Detry C, Sanchez C, et al. Runx2- and histone deacetylase 3-mediated repression is relieved in differentiating human osteoblast cells to allow high bone sialoprotein expression[J]. J Biol Chem, 2007, 282(50): 36240-36249.
11. 张忠丽. HDAC1特异性抑制Runx2介导的OPN的转录活性[D]. 长春: 东北师范大学, 2011.
ZHANG Zhongli. HDAC1 specifically inhibits Runx2-mediated transcriptional activity of OPN[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2011.
12. 张智海, 刘忠厚, 李娜, 等. 中国人骨质疏松症诊断标准专家共识(第三稿•2014版)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(9): 1007-1010.
ZHANG Zhihai, LIU Zhonghou, LI Na, et al. Expert consensus on diagnostic criteria for osteoporosis in China (third draft•2014)[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2014, 20(9): 1007-1010.
13. 陈晓, 苏佳灿. 骨质疏松研究热点: 骨髓间充质干细胞分化命运[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(4): 397-404.
CHEN Xiao, SU Jiakan. New focus on osteoporosis: differentiation fate of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2017, 38(4): 397-404.
14. 徐练, 孔清泉. 调控成骨细胞分化及骨形成关键信号通路的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(12): 1484-1489.
XU Lian, KONG Qingquan. Research progress of key signaling pathways in osteoblast differentiation and bone formation regulation[J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2014, 28(12): 1484-1489.
15. Liu T, Hou L, Zhao Y, et al. Epigenetic silencing of HDAC1 by miR-449a upregulates Runx2 and promotes osteoblast differentiation[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(1): 238-246.
16. Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction[J]. J Cell Physiol, 2015, 184(2): 207-213.
17. 严红梅, 张振海, 孙娥, 等. 中药治疗骨质疏松症的研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(8): 1174-1178.
YAN Hongmei, ZHANG Zhenhai, SUN E, et al. Research progress on treatment of osteoporosis using Chinese materia medica[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(8): 1174-1178.
18. 张英, 袁月, 孙富丽. 成骨细胞胞内胞外碱性磷酸酶含量比较[J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(10): 874-876.
ZHANG Ying, YUAN Yue, SUN Fuli. Comparison between the extracellular and intracellular alkaline phosphatase level of the primary cultured osteoblast cells[J]. Journal of China Medical University, 2011, 40(10): 874-876.
19. Choi JY, Lee BH, Song KB, et al. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells[J]. J Cell Biochem, 2015, 61(4): 609-618.
20. 魏双平, 李蒙, 李瑞玉, 等. 传统中药对成骨细胞及骨钙素合成的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 35(11): 2083-2090.
WEI Shuangping, LI Meng, LI Ruiyu, et al. Traditional Chinese medicine promotes the osteocalcin synthesis of osteoblasts[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2013, 35(11): 2083-2090.

21. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 658(5/6):43-49.
22. Min L, Huang P, Islam S, et al. Epigenetic regulation of Runx2 transcription and osteoblast differentiation by nicotinamide phosphoribosyltransferase[J]. *Cell Biosci*, 2017, 7(1):27.
23. Bruderer M, Richards RG, Alini M, et al. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis[J]. *Eur Cells Mater*, 2014, 28(28): 269-286.
24. Adamik J, Jin S, Sun Q, et al. EZH2 or HDAC1 inhibition reverses multiple myeloma-induced epigenetic suppression of osteoblast differentiation[J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(4): 405-417.
25. Vishal M, Ajeetha R, Keerthana R, et al. Regulation of Runx2 by Histone Deacetylases in Bone[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2016, 17(4): 343-351.

本文引用: 季泽娟, 张春旭, 郭占豪, 刘方娜, 刘鑫. 异槲皮苷对成骨细胞分化及HDAC1和Runx2表达的影响[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(11): 2291-2298. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.002

Cite this article as: JI Zejuan, ZHANG Chunxu, GUO Zhanhao, LIU Fangna, LIU Xin. Effect of isoquercetin on osteoblast differentiation and expression level of HDAC1 and Runx2[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(11): 2291-2298. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.002