

九十九學年度中國醫藥大學專題研究計畫報告 書

Kinsenoside 對於 RANKL 刺激 RAW264.7 細胞釋放 MMP-9 的影響

計畫編號：CMU99-S-15

執行單位：醫學系藥理學科

主持人：林文川

中華民國 100 年 10 月 9 日

Kinsenoside 對於 RANKL 刺激 RAW264.7 細胞釋放 MMP-9 的影響

林文川

中國醫藥大學醫學系藥理學科

摘要

本研究主要探討金線連糖苷抑制 RANKL 刺激 Raw 264.7 細胞誘發 MMP-9 表現的分子作用機轉。在骨片的實驗，金線連糖苷減少骨質再吸收的面積。在細胞移動的實驗，金線連糖苷抑制了 Raw 264.7 細胞的移動。RT-PCR 和 Western blot 的分析，金線連糖苷明顯抑制 RANKL 刺激 Raw 264.7 細胞所誘發的 MMP-9 基因和蛋白表現。RANKL 能活化 Raw 264.7 細胞的 ERK1/2、JNK1/2、p38、AP-1、NF- κ B 的表現和 ROS 的產生。金線連糖苷可以抑制 ERK1/2、p38 的磷酸化、AP-1、NF- κ B 轉錄因子的活化及 ROS 產生，但對 JNK1/2 的磷酸化沒有影響。另外，SB203580 (p38 抑制劑)，PDTC (NF- κ B 抑制劑)，丹參酮 (AP-1 抑制劑) 和 NAC (ROS 清除劑) 也能抑制 MMP-9 表現，但是 PD98059 (ERK1/2 抑制劑) 及 SP600125 (JNK1/2 抑制劑) 對於 MMP-9 的表現沒有影響。冷光酵素報導基因的檢測，發現金線連糖苷可以明顯減少 MMP-9 的啟動子活性。這些結果證明在 RANKL 刺激下的 Raw 264.7 細胞，金線連糖苷能夠經由抑制 p38/AP-1 和 NF- κ B 的訊息傳遞途徑和 ROS 的產生，有效地抑制 MMP-9 的表現。

前言

本實驗室之前的研究發現，金線連糖苷(kinsenoside)除了抑制巨噬細胞的活化外，在風濕性關節炎和骨質疏鬆動物模式的實驗，以 RT-PCR 及免疫組織染色分析，確認金線連糖苷可以抑制金屬蛋白酶-9 (MMP-9) 的基因及蛋白質表現。MMP-9 與多種發炎疾病的病理機轉有關，能抑制 MMP-9 的表現，可能對相關疾病會有改善作用 (Parks et al., 2004)。金線連糖苷抑制 MMP-9 表現的分子作用機轉尚未清楚，本實驗，使用 Raw 264.7 細胞，探討金線連糖苷抑制 MMP-9 的分子

作用機轉。

材料與方法

一、細胞爬行試驗

事先將0.01% collagen I被覆在96孔上面，4°C下隔夜靜置，隔天後再將0.01% collagen移除，使96孔照UV乾燥，再用PBS清洗數次，先將stopper 固定在96孔上面，再將Raw 264.7細胞種植在stopper四週，隔夜之後，移除stopper，用PBS清洗多餘且懸浮的Raw 264.7細胞，更換分化用培養液，再各別加入金線連糖苷 (10、25、50 μ M)，在顯微鏡下觀察並照相，24小時之後用顯微鏡觀察並照相，利用Image J軟體計算細胞前後相隔24小時爬行的距離，用相同的一個圓圈範圍計數圓圈裡的爬行進去的細胞數目。

二、RANKL 刺激 Raw 264.7 細胞分泌 MMP-9

將Raw 264.7細胞分別種植 6×10^5 /孔在24孔盤當中，隔夜之後，加入分化用培養液，再依照不同時間點收取培養液利用gelatin zymography分析，底層細胞則用來萃取mRNA分析MMP-9的表現。

1. Gelatin zymography assay

將上述收集的培養液，於1000 \times g、4°C條件下離心10分鐘，取其上清液進行分析。取培養液中30 μ g加上4倍的loading dye反應10分鐘後，故以10%之SDS-PAGE進行電泳，其中resolving gel含gelatin (0.1%)。之後將電泳膠片以Washing Buffer (3% Triton X-100)，30分鐘、2次。然後加入Developing Buffer (50 mM Tris base、40 mM HCl、200 mM NaCl、5 mM CaCl₂、0.2% (w/v) NaN₃)，搖晃30分鐘後，洗掉再加入Developing Buffer，在37°C中反應16小時。最後反應完之膠片以Coomassie blue (0.2% Coomassie blue R-250、50% methanol、10% acetic acid)，染色30分鐘。再以褪色液 (10% acetic acid 和30% methanol)退染，每15

分鐘換一次褪色液。待退染完成後，先將膠片浸至於乾膠液 (50 % 去離子水、50 % methanol 和0.33 % glycerol) 中30分鐘，再用玻璃紙和壓克力板將膠片製成乾膠觀察。

2. RT-PCR分析

將上述底層細胞則是萃取mRNA看MMP-9表現。萃取方式如第二章的方法與材料所述，所用的引子如下表。

	序列	bp	°C	cycle
GAPDH	F: CTTCATTGACCTCAACTACATGGTCTA	99	57	35
	R: GATGA CAAGC TTCCC ATTCT CAG			
MMP-9	F:GGTCTAGGCCAGAGGTA	310	57	35
	R:GGTCGTAGGTCACGTAGC			

3. Western blot分析

上述之底層細胞利用RIPA buffer將細胞打破，取固定量之蛋白質 (60 µg) 於10% SDS-PAGE中展開後，轉漬於PVDF膜上，以anti-MMP-9 (1:1000)及 β -tubulin (1:1000)之專一性抗體偵測細胞內MMP-9及 β -tubulin蛋白質量。

三、檢測細胞中 p38、pp38、ERK1/2、pERK1/2、JNK1/2、pJNK1/2、c-Jun、c-Fos 跟 MMP-9 的蛋白質量

利用抽取細胞核、模蛋白方式，方法如第二章的方法與材料所述，取固定量之蛋白質 (60 µg) 於10% SDS-PAGE中展開後，轉漬於PVDF膜上，以 anti-p38、anti-pp38、anti-ERK1/2、anti-pERK1/2、anti-JNK1/2、anti-pJNK1/2及 β -tubulin蛋白質量。

四、測量 MMP-9 promoter 的活性

先將Raw 264.7細胞種植 5×10^4 /孔1在24孔盤當中，隔夜後將pGL3.0-MMP-9 promoter轉染方式送進去細胞內，16小時之後先加入金線連糖苷 (10、25、50 μ M)，再加入RANKL (50 ng/ml)刺激24小時後。檢測 reporter 基因表現方式。方法如第四章的方法與材料所述。

五、測量 ROS

先將Raw 264.7細胞種植 5×10^4 /孔盤在96孔盤當中，隔夜靜置後，細胞先用金線連糖苷處理1小時，再加入RANKL (50 ng/ml)刺激1小時，之後加入DCFH-DA避光反應30分鐘之後，吸掉上清液，用PBS清洗之後，加入PBS，使用激發光波長504 nm 和發散光524 nm螢光偵測。

六、統計方法

細胞實驗進行三次以上獨立實驗，動物實驗數值皆以 $\text{meas} \pm \text{S.D.}$ 表示。以SPSS中One-Way ANOVA 統計分析，並進行Dunnett test，以 $P < 0.05$ 表示在統計學上有顯著性差異。

結果

一、金線連糖苷對於骨質再吸收的影響

將Raw 264.7細胞種植在在骨片上面進行分化，單純給分化劑的溶媒組有明顯骨質再吸收的作用 (Fig. 1)，金線連糖苷 (10、25、50 μ M)處理組能減緩骨質再吸收的作用。

二、金線連糖苷對於 Raw 264.7 細胞爬行試驗的探討

在96孔盤中，先被覆著0.01% collagen I，接著置入stopper，再把細胞種植下去促進爬行，結果發現了經過RANKL的刺激與沒有刺激的組別相比，有明顯的

促進爬行的比例 (Fig. 2)。相反的在加入了金線連糖苷 (25、50 μ M)則會有顯著的減少Raw 264.7細胞爬行的比例。

三、RANKL 刺激 MMP-9 的表現

以RANKL刺激Raw 264.7細胞，分別在刺激後4、8、12、24及48小時收集上清液及底盤細胞，使用gelatin zymography及RT-PCR分析MMP-9的蛋白質及mRNA的表現。gelatin zymography的分析，MMP-9的表現會隨著RANKL處理的時間增加而表現增加，在RANKL處理12小時後開始表現，在24小時跟48小時的表現沒有明顯差異 (Fig. 3A)。MMP-2在細胞裡面會穩定的表現出來，因此以MMP-2當作內標。RT-PCR的分析，MMP-9的表現也是隨著RANKL處理的時間增加而增加，在RANKL處理12小時後開始表現，在24小時和48小時的表現沒有明顯差異 (Fig. 3B)。

由於gelatin zymography及RT-PCR分析，MMP-9的表現皆在RANKL刺激後24小時達最高，因此後續的實驗固定在RANKL處理後24小時收集上清液及底盤細胞來進行。

四、金線連糖苷抑制 RANKL 誘發的 MMP-9 的表現

Raw 264.7細胞率先用金線連糖苷處理過後，再利用RANKL刺激24小時後，收集上清液及底盤細胞，分別以Western blot及RT-PCR 的方法分析MMP-9的表現。金線連糖苷 (10、25、50 μ M)及的處理，能減弱RANKL促使Raw 264.7細胞的MMP-9蛋白產生及mRNA的表現 (Fig.4)。

五、金線連糖苷調控 MMP-9 啓動子 (promoter)活性

以轉染方式測定細胞內的螢光表現，先轉染進去MMP-9 promoter，用金線連糖苷處理過後，再利用RANKL刺激24小時後，發現金線連糖苷 (10、25、50 μ M)可以有效抑制MMP-9 promoter活性 (Fig. 5)。

六、金線連糖苷透過 MAPK 跟 AP-1 調控 MMP-9 活性

在Fig. 6 A 跟Fig. 6 B Western blot跟RT-PCR的結果可以看到，我們利用了MAPK跟AP-1的抑制劑當中，SB203580 (10 μ M; p38抑制劑)跟tanshinone (10 μ M; AP-1抑制劑)都可以抑制了MMP-9的表現。PD98059 (10 μ M; ERK1/2抑制劑)及SP60925 (10 μ M; JNK1/2抑制劑)則沒有影響。所以RANKL是透過了MAPK當中p38的調控路徑去活化了MMP-9的表現。AP-1則為MAPK的下游所活化的轉錄因子，而我們也從tanshinone可以得知AP-1可以抑制了MMP-9的表現。

我們進一步利用Western blot分析了金線連糖苷與MAPK及AP-1的關係。發現了金線連糖苷可以抑制了ERK1/2跟p38的磷酸化，但是卻對於JNK1/2沒有影響 (Fig. 6C)。而對於細胞核內AP-1的蛋白質，金線連糖苷 (50 μ M)的處理能降低c-Fos的表現 (Fig. 6D)。

七、金線連糖苷透過 ROS 跟 NF- κ B 調控 MMP-9 的活性

在Fig. 7A 跟Fig. 5-7B Western blot跟RT-PCR的結果可以看到，我們利用了ROS跟NF- κ B的抑制劑當中，NAC (50 μ M; ROS清除劑)跟PDTC (10 μ M; NF- κ B抑制劑)都可以抑制了MMP-9的表現。由此可以知道RANKL可以透過ROS跟NF- κ B的活化去增加了MMP-9的表現。

我們利用DCFH-DA的螢光分析方法，先將Raw 264.7細胞先用金線連糖苷處理過後再用RANKL刺激後，加入DCFH-DA之後，Raw 264.7細胞受到RANKL刺激就會產生ROS，會使DCFH-DA氧化產生螢光，ROS產生越多則螢光表現量就越強。我們發現了金線連糖苷處理過後所產生的螢光明顯低於單獨用RANKL刺激 (Fig. 5-7C)。接下來我們利用Western blot分析PDTC、SB-203580、tanshinone及NAC對RANKL活化p38磷酸化表現的影響，NAC可以減少p38的磷酸化，而PDTC及tanshinones不會影響p38的磷酸化 (Fig. 7D)。

討論

RANKL可以經由多種的調控路徑，如經由NF- κ B、MAPKs及ROS等促使MMP-9的表現 (Suda et al., 1999; O'toole et al., 2009; Rajashekhar et al., 2010)。本章實驗確認金線連糖苷抑制RANKL活化RAW 264.7細胞產生MMP-9的作用機轉與NF- κ B、p38/AP-1及ROS的調控路徑有關。

MMP-9的主要作用是分解細胞基質當中的gelatin、collagen跟lammin，可以促進細胞的移動 (Opdenakker et al., 2001; Chakrabarti and Patel 2005)。因此MMP-9表現的增加也會造成癌症的轉移 (Liabakk et al., 1996)或者是血管的新生 (Cho et al., 2007)。在本實驗，先以RAW 264.7細胞的移動分析，發現金線連糖苷可以減緩RAW 264.7細胞的移動速度。由此推測金線連糖苷可能抑制MMP-9的產生。

骨頭是特化的結締組織包含兩種最主要的細胞，即造骨細胞和蝕骨細胞，這兩種細胞和細胞外基質連結，形成骨骼系統。細胞外基質包括有機性及無機性兩種，有機性的細胞基質有fibronectin、gelatin或collagen等，無機性的細胞外介質，如氫氧磷灰質結晶 (hydroxyapatite crystals)。在前驅蝕骨細胞跟成熟的蝕骨細胞MMP-9有高度的表現，MMP-9是分解骨質的關鍵酵素之一 (Engsig et al., 2000; Maes et al., 2006)。蝕骨細胞經由MMP-9的作用可以有效的產生骨質再吸收作用。在本實驗，以RAW 264.7誘發成蝕骨細胞對骨片進行再吸收作用，確認金線連糖苷能抑制骨質的再吸收作用。由RAW 264.7細胞的移動及骨片再吸收實驗結果，推測金線連糖苷可能抑制MMP-9的產生。

基於上述的假說，以RT-PCR及西方墨點法分別分析細胞內基因及蛋白質的表，此兩種分析方法確認金線連糖苷能抑制RANKL活化RAW 264.7細胞MMP-9的基因表現及蛋白質產生。MMP-9在細胞內產生後要分泌到細胞外才能產生作用，因此進一步以Zymography assay分析細胞培養上清液中MMP-9的含量

(Chung et al., 2004)。Zymography assay分析的結果更確認金線連糖苷能抑制RANKL活化RAW 264.7細胞分泌MMP-9蛋白質。

AP-1轉錄因子可以促進許多的基因表現，包含了MMP-9 (Benbow and Brinckerhoff 1997)，MAPK能促使AP-1的活化 (Surh et al., 2000; Wang et al., 2009)。RANKL可以經由MAPK的活化來調控蝕骨細胞的蝕骨活性 (Miyazaki et al., 2000; Hotokezaka et al., 2002)。因此在本實驗探討ERK1/2、p38、JNK1/2及AP-1抑制劑對MMP-9表現的影響，結果顯示p38及AP-1抑制劑能夠抑制MMP-9的表現，但ERK1/2及JNK1/2的抑制劑對MMP-9的表現沒有影響。此結果與其他學者的報告相同 (Benbow and Brinckerhoff 1997; Woo et al., 2004)。

探討金線連糖苷對RANKL所活化RAW 264.7細胞的細胞質中MAPK磷酸化的表現，及細胞核內AP-1 (c-Fos)的表現。金線連糖苷可以抑制ERK1/2、p38的磷酸化，但對JNK1/2的磷酸化沒有影響。金線連糖苷能抑制RANKL所活化細胞核內AP-1 (c-Fos)的表現。由這些結果推測，對RANKL活化RAW 264.7細胞，金線連糖苷可以經由減少p38的磷酸化，進而抑制AP-1的活化導致MMP-9的表現減少。

在第四章的研究證實了金線連糖苷可以抑制NF- κ B的活化，在本研究，也確認NF- κ B的抑制劑能抑制RANKL所誘發的MMP-9表現。由此推測金線連糖苷可以藉由抑制NF- κ B的活化而減少MMP-9的表現。

金線連糖苷抑制NF- κ B及AP-1的訊息傳遞途徑，在免疫螢光染色的實驗得到進一步的證實。金線連糖苷明顯減少RANKL活化RAW 264.7細胞細胞核內p65及c-fos的螢光表現。

RANKL刺激蝕骨細胞的分化也會使細胞內ROS的表現增加，進而促進蝕骨細胞分化 (Kim et al., 2010)。不論內生性或者是外生性的ROS產生都會造成蝕骨細胞分化增加 (Kim et al., 2010)，所以過量的ROS同時也會造成MMP-9的表現增加 (O'toole et al., 2009)。在本實驗，確認ROS清除劑NAC可以抑制MMP-9的表現，此與Kim等人(2010)的文獻一致。金線連糖苷可以抑制ROS產生，因此推測金

線連糖苷可以經由抑制ROS的產生進而減少MMP-9的表現。在西方墨點法的分析也發現NAC可以抑制p38的磷酸化，所以ROS可以直接或間接透過p38的磷酸化促進MMP-9的表現。

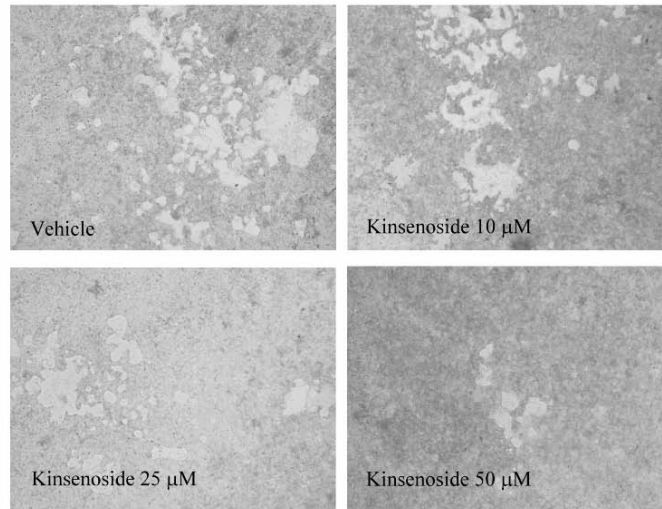
綜合上面結果，金線連糖苷能夠多方面的抑制MMP-9的表現，減少細胞的移動及骨質再吸收作用，是透過細胞內部的調控，一方面是經由抑制NF- κ B、p38/AP-1的訊息傳遞途徑，及減少ROS的產生，進而抑制MMP-9的表現。

參考文獻

- Benbow U. and Brinckerhoff C.E. (1997). "The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?" Matrix Biol **15**(8-9): 519-26.
- Chakrabarti S. and Patel K.D. (2005). "Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology." Exp Lung Res **31**(6): 599-621.
- Cho H.J., et al., (2007). "Ascofuranone suppresses PMA-mediated matrix metalloproteinase-9 gene activation through the Ras/Raf/MEK/ERK- and Ap1-dependent mechanisms." Carcinogenesis **28**(5): 1104-10.
- Chung T.W., et al., (2004). "Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential." FASEB J **18**(10): 1123-5.
- Engsig M.T., et al., (2000). "Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones." J Cell Biol **151**(4): 879-89.
- Hotokezaka H., et al., (2002). "U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells." J Biol Chem **277**(49): 47366-72.
- Kim M.S., et al., (2010). "RANKL-mediated reactive oxygen species pathway that induces long lasting Ca²⁺ oscillations essential for osteoclastogenesis." J Biol Chem **285**(10): 6913-21.
- Liabakk N.B., et al., (1996). "Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer." Cancer Res **56**(1): 190-6.
- Maes C., et al., (2006). "Placental growth factor mediates mesenchymal cell development, cartilage turnover, and bone remodeling during fracture repair." J Clin Invest **116**(5): 1230-42.

- Miyazaki T., et al., (2000). "Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts." J Cell Biol **148**(2): 333-42.
- Opdenakker G., et al., (2001). "Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology." J Leukoc Biol **69**(6): 851-9.
- O'toole T.E., et al., (2009). "Acrolein activates matrix metalloproteinases by increasing reactive oxygen species in macrophages." Toxicol Appl Pharmacol **236**(2): 194-201.
- Parks W.C., et al., (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." Nat Rev Immunol **4**(8): 617-29.
- Rajashekhar G., et al., (2010). "Pro-inflammatory angiogenesis is mediated by p38 MAP kinase." J Cell Physiol **226**(3): 800-8.
- Suda T., et al., (1999). "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families." Endocr Rev **20**(3): 345-57.
- Surh Y.J., et al., (2000). "Inhibitory effects of curcumin and capsaicin on phorbol ester-induced activation of eukaryotic transcription factors, NF-kappaB and AP-1." Biofactors **12**(1-4): 107-12.
- Wang H.H., et al., (2009). "Oxidized low-density lipoprotein induces matrix metalloproteinase-9 expression via a p42/p44 and JNK-dependent AP-1 pathway in brain astrocytes." Glia **57**(1): 24-38.
- Woo C.H., et al., (2004). "Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells." J Immunol **173**(11): 6973-80.

A



B

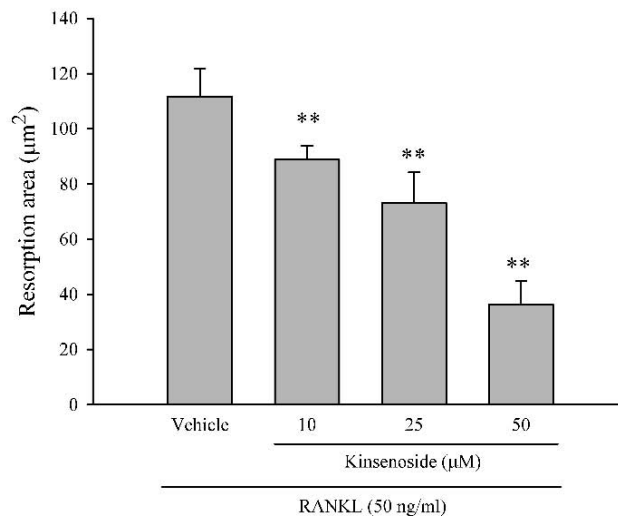


Fig. 1. Effect of kinsenoside on bone resorption by osteoclasts.

(A). Raw 264.7 cells were stimulated with kinsenoside (10, 25 and 50 μM) in the presence of RANKL (50 ng/ml). The cells were cultured for 7 days on Bio CoatTM OsteologicTM plate. To observe resorption pits, the cells on Bio CoatTM OsteologicTM plate were removed. (B). Pit areas on the plates were quantified using the Image J program, are marked by an asterisk. Values were mean \pm SD (n = 3). ** $P < 0.01$ as compared with the RANKL + vehicle group.

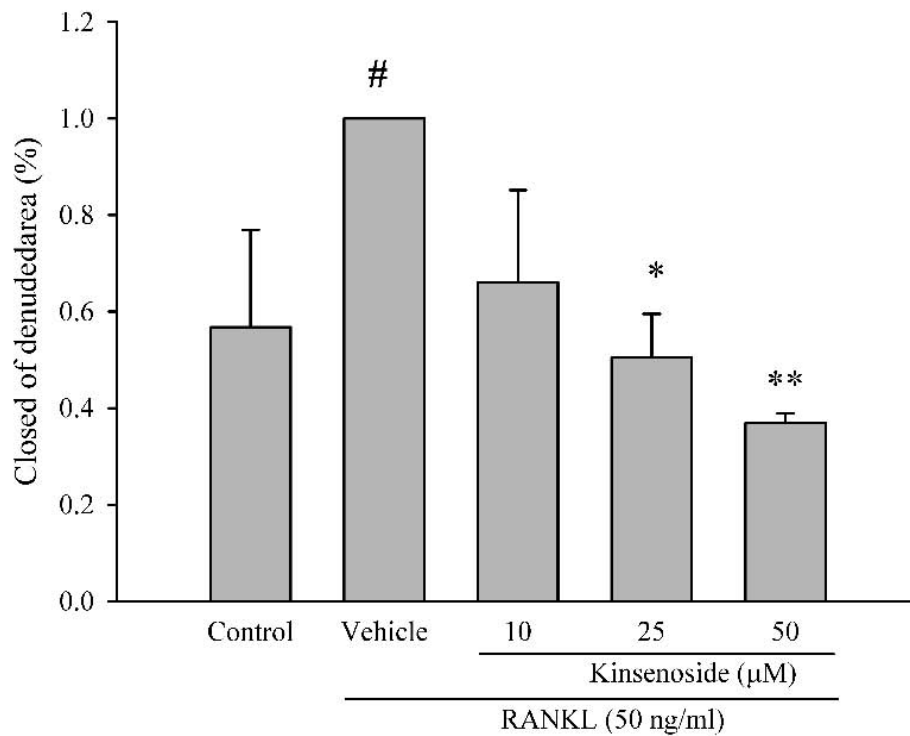
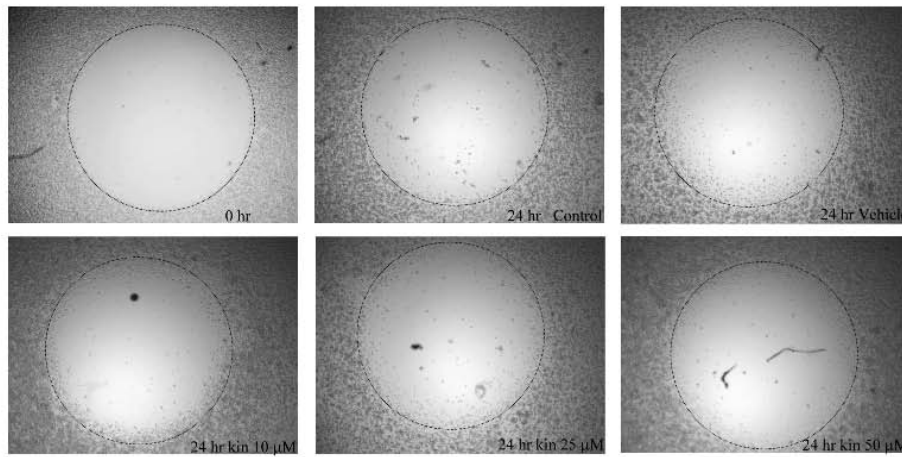


Fig. 2. Kinsenoside suppresses the migration Raw 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were incubated with varying concentrations of kinsenoside in the presence of RANKL (50 ng/ml) for 24 h. Migrating cells were photographed under phase contrast microscopy. Values were mean \pm SD (n = 3). ** P < 0.01 as compared with the RANKL + vehicle group.

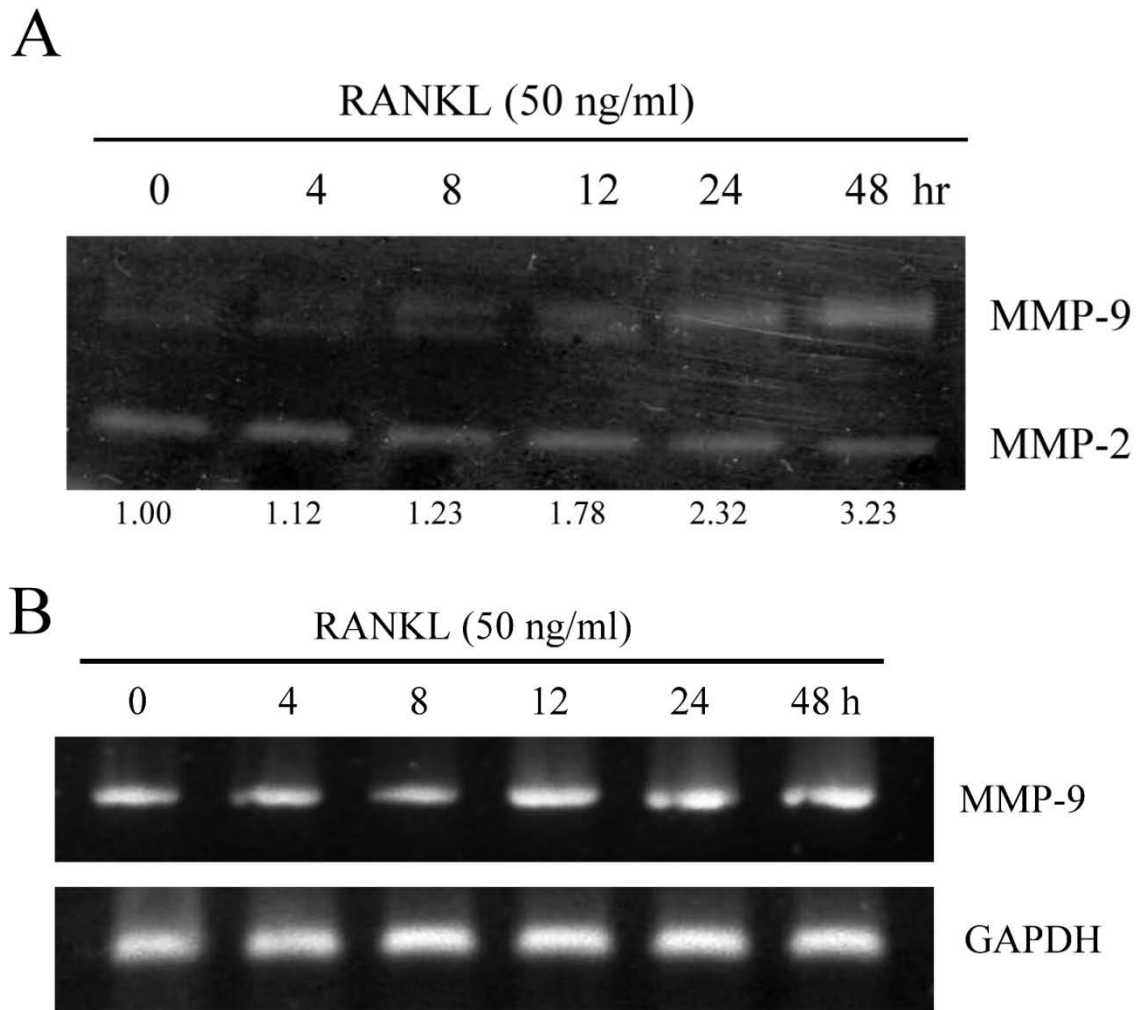


Fig. 3. RANKL induces MMP-9 expression in Raw 264.7 cells.

(A). Time dependence of RANKL increase of MMP-9 expression, the cells were cultured in 1% serum medium at 37 °C for the indicated times. Conditioned media were collected and analyzed by gelatin zymography. (B). Time dependence of RANKL-induced MMP-9 mRNA expression, the cells were grown to confluence on 24 well plate and incubated with RANKL for the indicated time. The isolated RNA samples were analyzed by RT-PCR, using the primer specific for *MMP-9* and *GAPDH*. Values were mean \pm SD (n = 3). ^{###} $P < 0.01$ as compared with the control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with the RANKL + vehicle group.

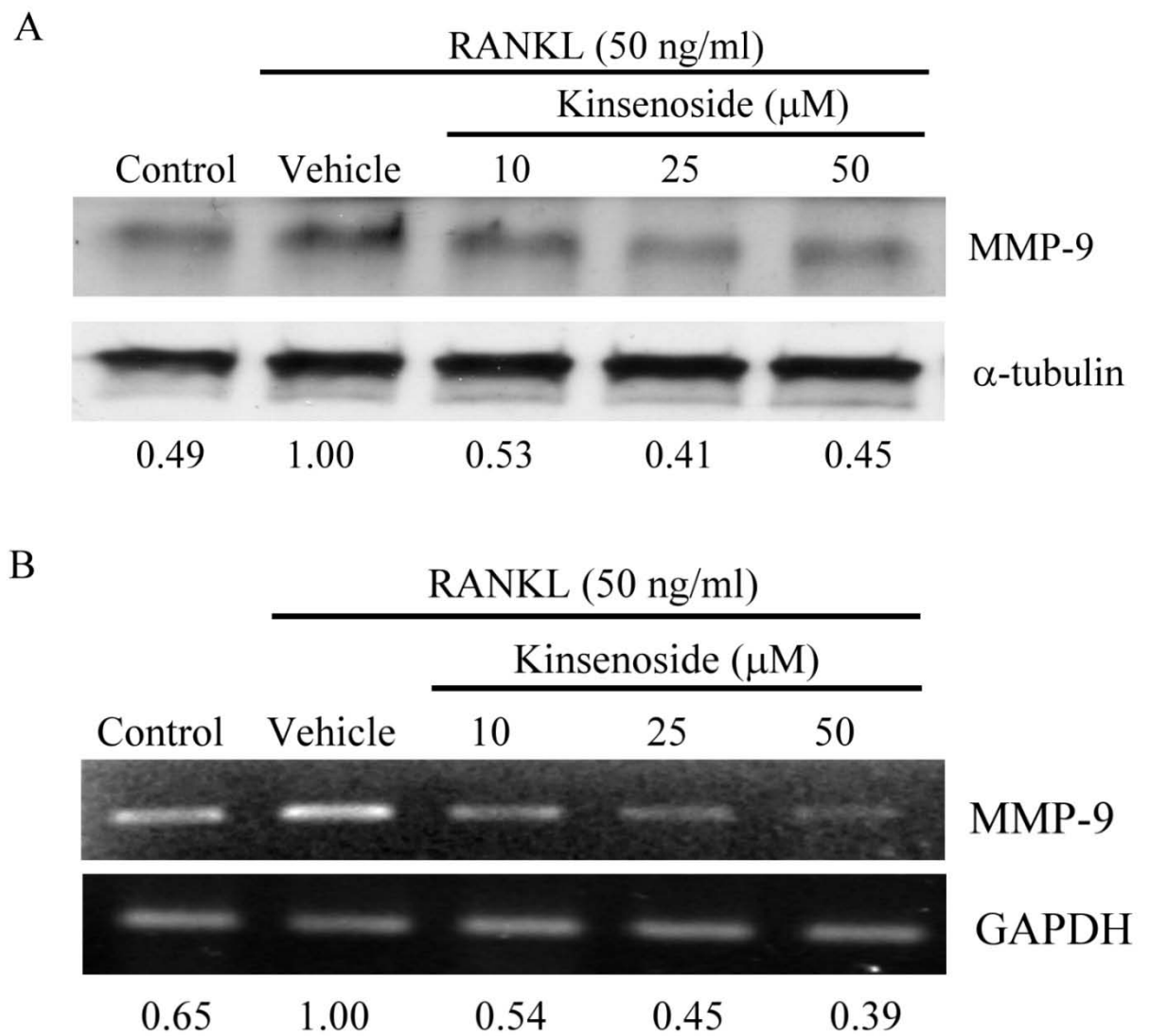


Fig. 4. Kinsenoside inhibits RANKL-induced MMP-9 expression.

Cells were treated with RANKL for 24 h in the absence or presence of kinsenoside.

(A). Conditioned media were collected after 24 h and then Western blot was

performed. (B). The MMP-9 mRNA expression in the cells was analyzed by RT-PCR.

Values were mean \pm SD (n = 3). ^{##}*P* < 0.01 as compared with the control group. **P* <

0.05, ***P* < 0.01 as compared with the RANKL + vehicle group. Con: control.

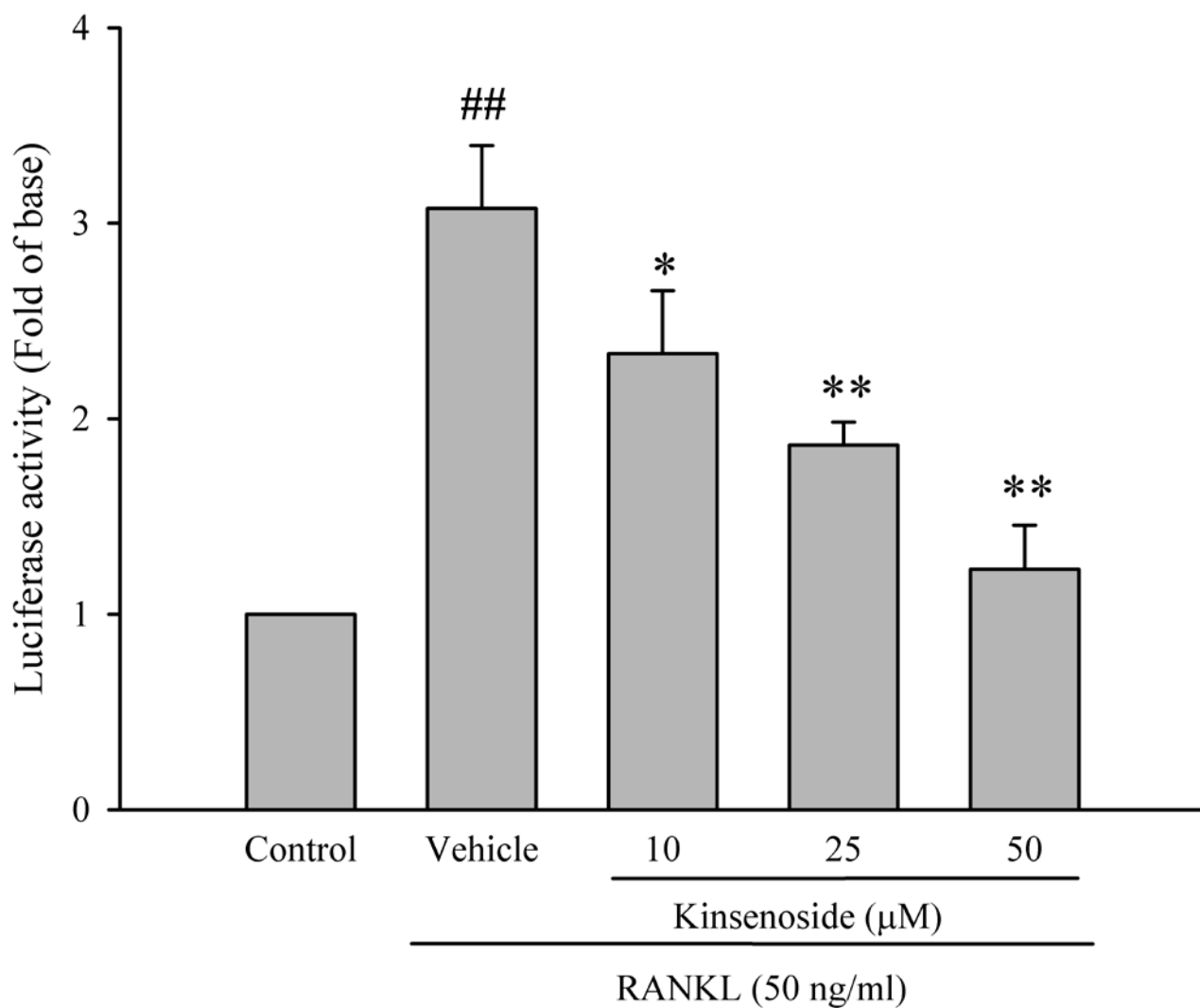


Fig. 5 Kinsenoside inhibits in RANKL-induced MMP-9 promoter.

Raw 264.7 cells were transiently transfected with a pMMP-9-Luc reporter plasmid and incubated for 24 h. They were then incubated for 60 min with kinsenoside before stimulation with RANKL or control buffer for 24 h. Values were mean \pm SD (n = 3).

$P < 0.01$ as compared with the control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with the RANKL + vehicle group. Con: Control.

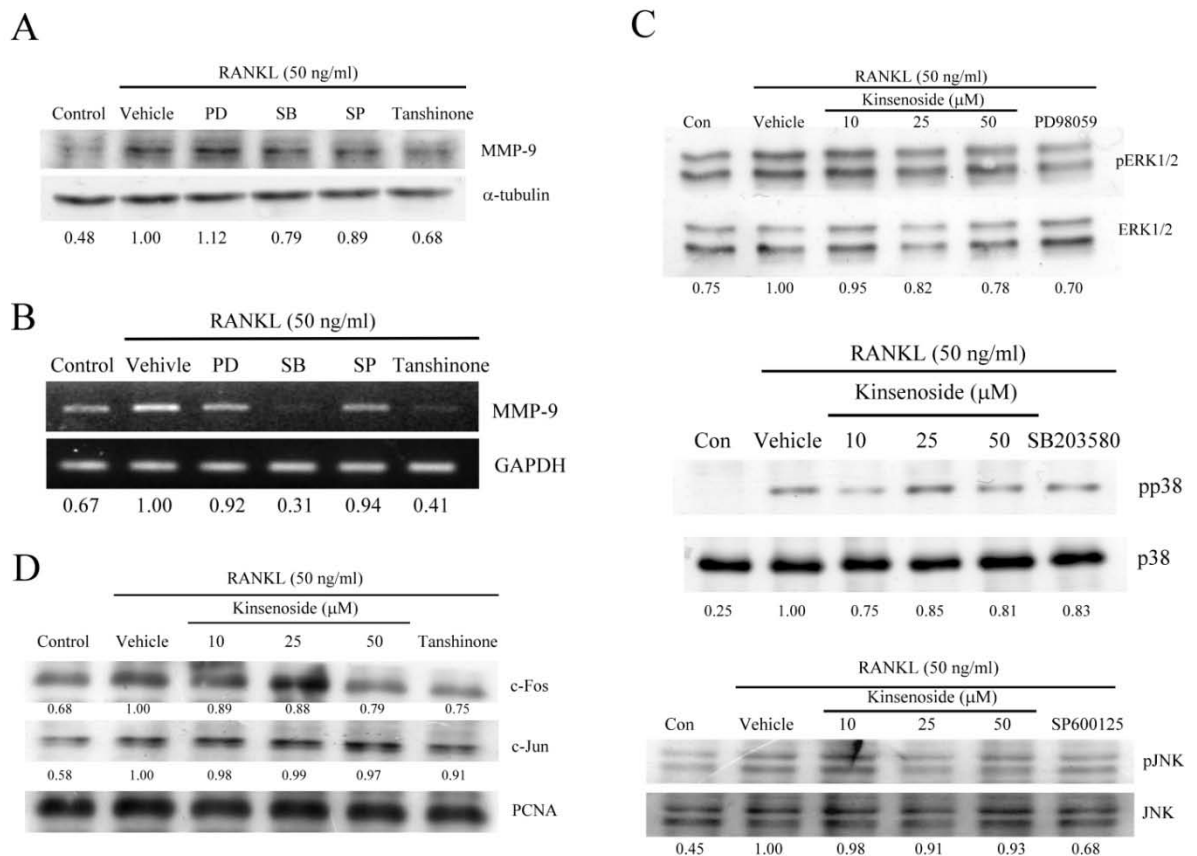


Fig. 6. Kinsenoside inhibits the expression of the MMP-9 through suppression of RANKL-stimulated MAPK and AP-1 activity.

Cells were treated with RANKL for 24 h in the absence or presence of kinsenoside, PD98059, SB203580, SP600125 and tanshinone. (A). Conditioned media were collected after 24 h and then Western blot was performed. (B). The *MMP-9* mRNA expression in the cells was analyzed by RT-PCR. (C). Effects of kinsenoside on RANKL-induced phosphorylation of three MAPKs signaling pathways. (D). Effects of kinsenoside on RANKL-induced c-fos nuclear translocation. Values were mean \pm SD (n = 3). $^{##}P < 0.01$ as compared with the control group. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ as compared with the RANKL + vehicle group. Con: Control, PD : PD98059, SB : SB203580, SP : SP600125

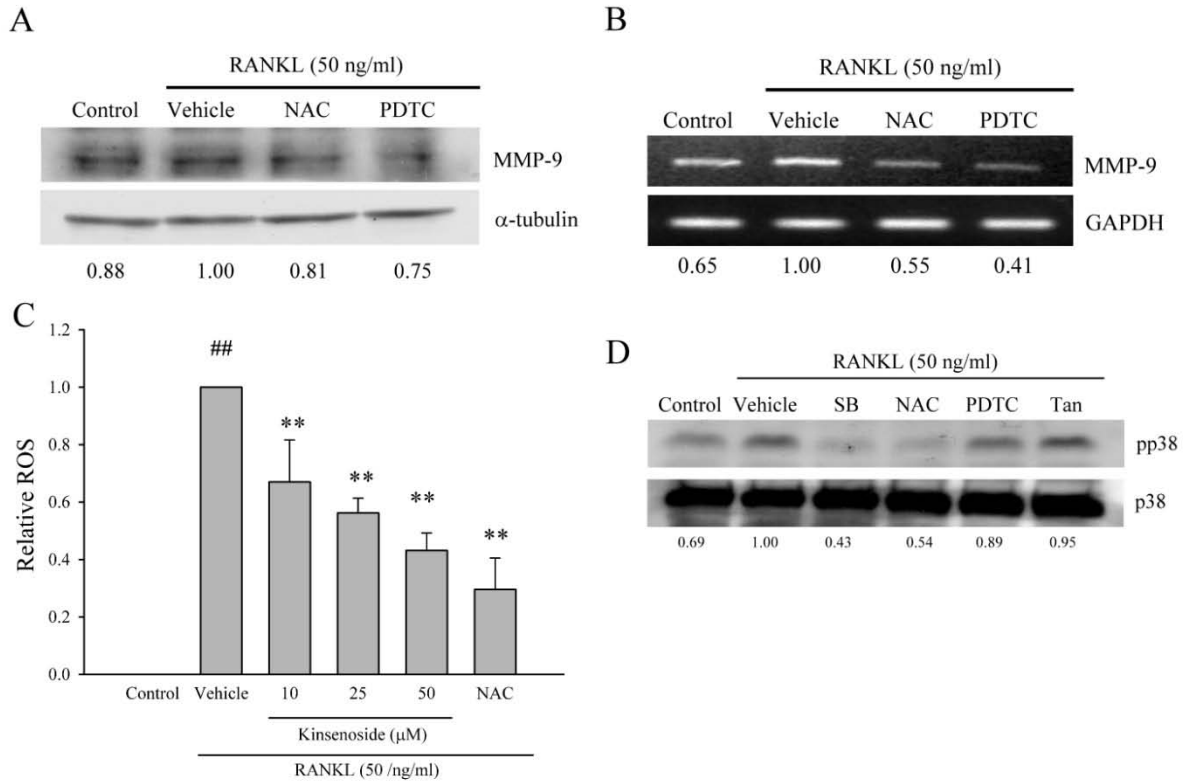


Fig. 7. Kinsenoside inhibits the expression of the MMP-9 through suppression of RANKL-stimulated ROS and $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activity.

Cells were treated with RANKL for 24 h in the absence or presence of kinsenoside and tanshinone. (A). Conditioned media were collected after 24 h and then Western blot was performed. (B). The MMP-9 mRNA expression in the cells was analyzed by RT-PCR. (C). Effects of kinsenoside on RANKL-induced ROS. DCF fluorescence was quantified. (D). Raw 264.7 cells were pretreated with NAC, SB203580, PDTC and tanshinone exposed to RANKL to analyzed the phosphorylation of p38 kinase. Values were mean \pm SD (n = 3). $##P < 0.01$ as compared with the control group. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ as compared with the RANKL + vehicle group. Con: Control, Tan:tanshinone.