

Tangeretin Regulates the Autophagic Activity of Osteoclast Precursors through RANKL-JNK1 Signalling Osteoclastogenesis *In Vitro*

Jun LIU¹, Zhonghua YANG¹, Dan CAI² & Song GUO^{1*}

¹ Wuhan Fourth Hospital; Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430033, China

² Operating Room, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, 430010, China

SUMMARY. The root cause of bone destructive diseases such as osteoporosis, and arthritis is characterized by bone resorption and autophagic activity. Autophagy is linked with cell growth and survival, supply of nutrients under starvation, and regulation of defence line. The investigation was carried out to reveal the possible effect of Tangeretin (TGT) in osteoclastogenic and autophagic process, by studying activity in RANKL treated RAW 264.7 cells. Effect of TGT on *in vitro* osteoclastogenesis, cell viability and osteoclast pit formation were studied. Isolation of RNA and real-time PCR were conducted for investigation of messengers, namely TRAF3, NFATc1, c-Fos and JNK. Staining for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), assay for pit formation, and real-time PCR had advocated potential of TGT in inhibition of osteoclastogenesis and autophagy. Western blot and real-time PCR indicated that TGT had a strong inhibitory effect on RANKL-JNK1 induced osteoclastogenesis and autophagy in RAW 264.7 cells.

RESUMEN. La causa principal de las enfermedades destructivas de los huesos, como la osteoporosis y la artritis, se caracteriza por la reabsorción ósea y la actividad autofágica. La autofagia está relacionada con el crecimiento y la supervivencia celular, el suministro de nutrientes en situación de inanición y la regulación de la línea de defensa. La investigación se llevó a cabo para revelar el posible efecto de Tangeretin (TGT) en el proceso osteoclastogénico y autofágico, mediante el estudio de la actividad en células RAW 264.7 tratadas con RANKL. Se estudió el efecto del TGT en la osteoclastogénesis *in vitro*, la viabilidad celular y la formación de fosas de osteoclastos. El aislamiento del ARN y la PCR en tiempo real se realizaron para la investigación de mensajeros, a saber, TRAF3, NFATc1, c-Fos y JNK. La tinción para la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), el ensayo para la formación de fosas y la PCR en tiempo real habían promovido el potencial de TGT en la inhibición de la osteoclastogénesis y la autofagia. La transferencia Western y la PCR en tiempo real indicaron que el TGT tenía un fuerte efecto inhibitorio sobre la osteoclastogénesis inducida por RANKL-JNK1 y la autofagia en células RAW 264.7.

KEY WORDS: autophagy, flavonoid, osteoclastogenesis, osteoporosis, tangeretin

* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* StephaniRiweik@yahoo.com