

# 白藜蘆醇合併輻射對破骨細胞生成之抑制作用

林群智<sup>1</sup> 林尚謙<sup>2</sup> 洪茂欽<sup>3</sup> 丁健益<sup>4</sup> \*劉威忠<sup>3</sup>

<sup>1</sup>南華大學自然生物科技系 自然醫學研究所

<sup>2</sup>醫療財團法人羅許基金會羅東博愛醫院 放射診斷科

<sup>3</sup>慈濟科技大學醫學影像暨放射科學系 農業生醫研究中心

<sup>4</sup>樹人醫護管理專科學校 醫學影像暨放射技術科

## 摘要

白藜蘆醇為一種植物性酚類化合物，有減少骨量流失的潛能。白藜蘆醇與輻射可應用於骨質疏鬆的緩和處理。然而白藜蘆醇對於破骨細胞生成之相關生物效應則較少被觀察。本研究以 MTT 分析法分析白藜蘆醇對 RAW264.7 細胞之細胞毒性與增生作用，並探討白藜蘆醇與輻射對破骨細胞生成的效應及其可能相關機制。在實驗中，細胞被分成下列組別：對照組、輻射處理組(5 Gy)、白藜蘆醇處理組及輻射線合併白藜蘆醇處理組，所有組別進行破骨細胞與其細胞核數目之計數、抗酒石酸酸性磷酸酶活性表現之分析以及細胞凋亡狀況之評估。實驗結果顯示，經白藜蘆醇或輻射線處理後，實驗組之破骨細胞數量與破骨細胞之細胞核數目皆小於對照組，且輻射線處理會增加破骨細胞凋亡率，但白藜蘆醇對破骨細胞凋亡並無影響。由結果推論，白藜蘆醇可抑制破骨細胞活性，此現象可能是藉由抑制單核球分化成破骨細胞所造成。

**關鍵字：**輻射，骨質疏鬆，破骨細胞，白藜蘆醇，破骨細胞生成

## 前言

骨量的多寡受造骨細胞(osteoblast)的骨生成(bone formation)與破骨細胞(osteoclast)的骨吸收(bone resorption)兩種作用的影響，過量的骨吸收作用常導致骨骼疾病的產生，例如骨質疏鬆(osteoporosis)。破骨細胞為衍生自單核球之多核細胞，抗酒石酸酸性磷酸酶則為破骨細胞的活性指標[1]，此酵素可協助破骨細胞進行骨吸收作用。破骨細胞生成(osteoclastogenesis)受許多細胞激素與發炎因子調控，例如：receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) [2]、介白質素-6 (interleukin-6: IL-6) [3]、巨噬細胞趨化因子(macrophage colony stimulating factor: M-CSF)[4]等。RANKL 是腫瘤壞死因子家族(tumor necrosis factor family)的一員，對破骨細胞生成有重要的影響，此激素可與單核球-巨噬細胞上之受器接合，而誘發破骨細胞生成[5]與減少破骨

細胞的凋亡(apoptosis)[6]。白藜蘆醇(resveratrol)是常見於莓果類、葡萄或花生等植物內的一種多酚類化合物，具有很強的抗氧化力，可清除自由基。研究顯示，白藜蘆醇能減少輻射誘發之染色體變異，具有成為輻射保護劑之潛力[7]。此外，白藜蘆醇可促進造骨細胞分化及預防破骨細胞生成的效應[8]，目前臨床上常用雙磷酸鹽或輻射抑制破骨細胞過度分化[9]，但可能衍生顎骨壞死或輻射損傷等副作用，故本研究旨在探討白藜蘆醇以及其合併輻射處理對於抑制破骨細胞分化之效應，以作為臨床上開發處理破骨細胞之方法的參考。

## 材料與方法

### RAW264.7 細胞株培養

小鼠單核巨噬細胞株(Mouse leukemic monocyte macrophage cell line, RAW264.7)，培養於細胞培養瓶

內,使用 DMEM 細胞培養液(Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO), 包含 1% Penicillin-streptomycin (Biosource)、10% Fetal bovine serum (Biosource), 4 mM L-glutamine (GIBCO)、4.5 g/L glucose (Amresco)、培養條件:培養溫度 37°C, 二氧化碳濃度 5%, 濕度 95%, 每隔 3 天更換細胞培養液。

### 白藜蘆醇的細胞毒性與增生測試

為選取白藜蘆醇的安全劑量, 利用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)法分析, 活細胞會將 MTT 的 tetrazolium 代謝成藍紫色 formazan 結晶, 此產物與細胞存活成正比, 可做為細胞存活指標。取 RAW264.7 細胞, 細胞密度為  $1 \times 10^4$  cell/mL, 放入 24 well 中, 分別加入 0、1、3、5、7  $\mu$ M/mL 白藜蘆醇, 培養 1 或 3 天。去除培養液, 以 PBS(磷酸鹽緩衝液)沖洗, 並以 DMSO (Sigma) 溶解 tetrazolium, 再利用酵素免疫分析儀(ELISA reader)選用 570 nm 波長, 讀取其溶液吸光值, 若吸光值表現越高即代表細胞越多; 反之, 若吸光值越低則表示細胞存活量越少。

### 破骨細胞培養

RAW264.7 使用 DMEM 培養液, 內含有 2 ng/mL Recombinant Mouse TRANCE (RANKL)。細胞培養於 24 well 中, 放置溫度攝氏 37°C, 二氧化碳濃度 5%, 濕度為 95%的細胞培養箱, 培養 4 天後, 使用顯微鏡觀察破骨細胞生長情形。

### RAW264.7 細胞密度對破骨細胞生成量的影響

取 RAW264.7 細胞 ( $1 \times 10^4$  cell/mL) 給予 RANKL(2 ng/mL), 使用 5 種不同細胞密度( $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ ), 培養 4 天後, 統計每個 well 之破骨細胞數目。

### 細胞處理

上述細胞分成下列組別:對照組、輻射線處理組(5Gy)、白藜蘆醇處理組及輻射線合併白藜蘆醇處理組。輻射照射, 以 X 光機(Rad Source Technologies

RS2000, USA; 150 kV, 25 mV)照射, 總照射劑量為 5 Gy, 對照組則將細胞置於相同環境, 不經輻射照射處理。

### 破骨細胞染色與計數

破骨細胞為多核細胞, 會分泌破骨細胞活性酵素 TRAP, 故可使用 TRAP 染劑進行染色, 細胞核數  $\geq 3$  者被計數為破骨細胞。將各組細胞培養於 24 well 培養盤中, 細胞密度  $1 \times 10^4$  cell/mL, 共培養 4 天。細胞染色前先去細胞培養液, 利用 PBS 沖洗, 加入 70%酒精固定細胞, 再利用去離子水沖掉固定液, 取 Acid Phosphatase Leukocyte 試劑內含之 0.25 mL Fast Garnet GBC Base solution 和 0.25 mL 的 Sodium Nitrite solution 混和後, 取 500  $\mu$ L 的 TRAP 染劑加入培養盤中進行染色。

此外, 加入 DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚; 4',6-diamidino-2-phenylindole) 染劑染色觀察細胞核。DAPI 為是一種能夠與 DNA 強力結合的螢光染料, 在螢光顯微鏡下觀察可見發散藍色螢光之細胞核。

### 破骨細胞活性測試

藉由 TRAP 酵素表現量, 評估破骨細胞活性。將各組細胞培養於 24 well 培養盤, 細胞密度  $1 \times 10^4$  cell/mL, 細胞培養 4 天後。去除細胞培養液, 使用 PBS 沖洗 1 次, 加入 100  $\mu$ L 0.01% Triton 溶解細胞, 釋放出 TRAP 酵素, 再加入至 96 well 培養盤中, 以 Acid phosphatase assay kit (Sigma Co., Ltd.)配合酵素免疫分析儀(ELISA reader)讀取 405 nm 波長處之吸光值, 分析 TRAP 酵素含量。

### 細胞凋亡分析

將各組細胞培養 3 天後, 以 70%的酒精將細胞固定, 並以 PBS 清洗細胞, 再加入細胞凋亡染劑 Annexin-V-FITC (Strong Biotech Corporation). 內含標示螢光(FITC)之 Annexin-V ( $2 \mu$ L/mL)細胞染色試劑。細胞染色後再以螢光顯微鏡分析細胞凋亡狀況。

## 統計分析

利用 GraphPad Prism 5 軟體製作統計圖表，數據皆以平均值±標準誤差表示，以 Student's t-test 來進行統計分析，判斷是否具有統計上的意義，以 \* $p < 0.05$ ；\*\* $p < 0.01$  表示。

## 結果與討論

### 白藜蘆醇的細胞毒性與增生測試

為了解白藜蘆醇對於 RAW264.7 細胞是否具有毒性或增生作用，本研究以不同濃度之白藜蘆醇培養 RAW264.7 細胞 1 或 3 天後，利用 MTT 分析法來測試細胞毒性與增生作用，如圖 1 所示，不同濃度的白藜蘆醇和對照組相比皆無明顯統計差異，顯示白藜蘆醇對於 RAW264.7 無細胞毒性，亦無細胞增生效應，不會影響 RAW264.7 細胞的密度。

### RAW264.7 細胞密度對破骨細胞生成量的影響

本實驗使用 RANKL (2 ng/mL)，選擇 5 種不同細胞密度，探討在不同細胞密度下，對於破骨細胞分化的影響。結果顯示 RAW264.7 細胞密度在  $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>，其誘發破骨細胞數目分別為  $95.0 \pm 9.3$ 、 $117.5 \pm 9.9$ 、 $92.8 \pm 13.9$ 、 $44.2 \pm 8.5$ 、 $1.2 \pm 0.4$ ，顯示 RAW264.7 細胞在 RANKL 刺激後，在  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 細胞密度下，可誘發出數目最多的破骨細胞。故本實驗以使用  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 之細胞密度誘發 RAW264.7 細胞分化成破骨細胞。

### 白藜蘆醇與輻射對破骨細胞分化的影響

為探討白藜蘆醇與輻射照射處理對於破骨細胞分化的影響，各組細胞經處理培養 4 天後，測量破骨細胞數目。圖 3 顯示，輻射線處理組(5Gy)、白藜蘆醇(5  $\mu$ M/mL)處理組、輻射線合併白藜蘆醇處理組與對照組比較皆可以抑制破骨細胞生成的數目。

### 白藜蘆醇與輻射對破骨細胞核數目的影響

破骨細胞為多核的細胞，此細胞核數目多寡與細胞本身的活性有關，為分析各組織破骨細胞之平均細胞核

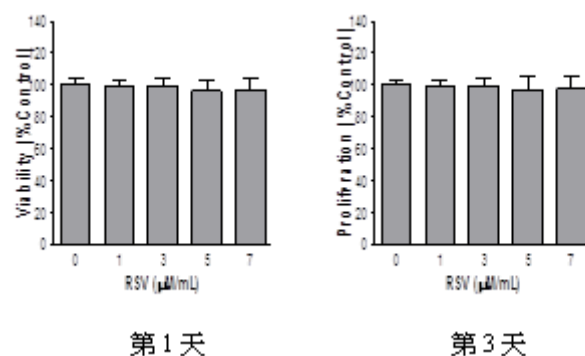


圖 1. 白藜蘆醇的細胞毒性或增生測試。細胞分別給予不同濃度白藜蘆醇培養 1 或 3 天，測試細胞生長狀況。柱狀圖表示法為平均值±標準誤(n=6)。

註:RSV 白藜蘆醇

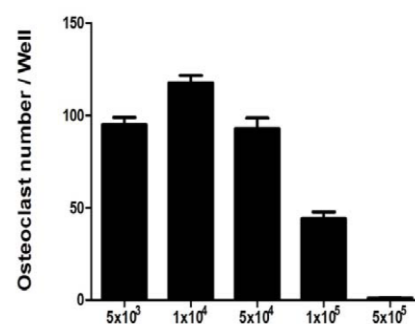


圖 2. RAW264.7 細胞密度對於破骨細胞分化的影響。

RAW264.7 細胞給予 RANKL，使用 5 種不同細胞密度，培養 4 天後。利用 TRAP 染劑染色，若破骨細胞細胞核 $\geq 3$ 核，其定義為 1 個噬骨細胞，並統計每個 well 其噬骨細胞數目。結果以平均值±標準誤差表示(n=6)。註:osteoclast 破骨細胞

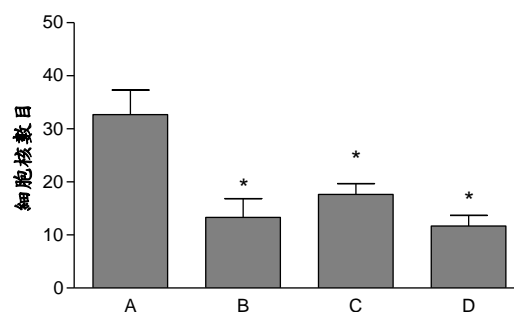


圖 3. 不同處理方式對破骨細胞數目的影響。細胞試驗分成下列組別:A 對照組、B 輻射線處理組(5Gy)、C 白藜蘆醇處理組(5  $\mu$ M/mL)、D 輻射線合併白藜蘆醇處理組。柱狀圖表示法為平均值±標準誤(n=3)，\*: $P < 0.05$ 。

數目，將細胞核加入 DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)細胞核染劑染色。圖 4 顯示，被染上螢光的細胞核，各處理組其細胞核平均數目與對照組比較皆有減少之趨勢。

### 白藜蘆醇與輻射對破骨細胞活性的影響

TRAP 可促進破骨細胞進行骨吸收，被列為破骨細胞活性的參考指標。由實驗結果圖 5 發現，輻射處理組(5 Gy)、白藜蘆醇處理組及輻射合併白藜蘆醇處理組相較於對照組均可減少 TRAP 生成量，亦即可抑制破骨細胞活性，此結果與破骨細胞分化之抑制有關。

### 白藜蘆醇與輻射對破骨細胞凋亡的影響

部分癌症會誘發破骨細胞過度分化，目前臨床治療是透過雙磷酸鹽與輻射照射抑制破骨細胞分化，以降低病患骨疼痛及減少骨轉移所產生的骨質疏鬆症，藉此達到治療之效果。當細胞初期凋亡時，細胞膜的磷脂絲氨酸(phosphatidylethanolamine)外露，易與 Annexin V 結合，若將 Annexin V 標示上 FITC(一種螢光物質)，當細胞凋亡之磷脂質與 Annexin V-FITC 結合後，在顯微鏡下，即可觀察到凋亡細胞發出螢光，反之，非凋亡之細胞，則無螢光顯現。由結果圖 6 可見，經輻射處理或白藜蘆醇合併輻射處理後與對照組比較呈現明顯差異，單獨以白藜蘆醇處理者與對照組比較則無明顯差異，此現象顯示白藜蘆醇雖然會抑制破骨細胞分化或降低 TRAP 酵素產量，但對於破骨細胞凋亡則無直接作用。

本研究利用 RANKL 誘發不同密度之 RAW264.7 細胞分化成破骨細胞。結果發現，當使用  $1 \times 10^4$  細胞密度時，破骨細胞分化數目最高，如圖 2，顯示細胞密度會影響破骨細胞的生成量。此外，使用 MTT 分析法測試白藜蘆醇對於 RAW264.7 細胞之毒性，顯示本研究所使用之濃度並不會對 RAW264.7 細胞產生毒性(圖 1)，且在此劑量範圍(0  $\mu$ M - 7  $\mu$ M)對細胞增生沒有影響，由於在本研究中所使用之細胞密度是相同的，故可排除破骨細胞分化受 RAW264.7 細胞密度差異之影響。

破骨細胞的分化受許多因子(如：細胞激素或由癌細胞)誘發或調控。某些癌症(例如：乳癌[10-12])誘發破骨細胞過度分化並導致進行骨轉移。目前臨床治療是透

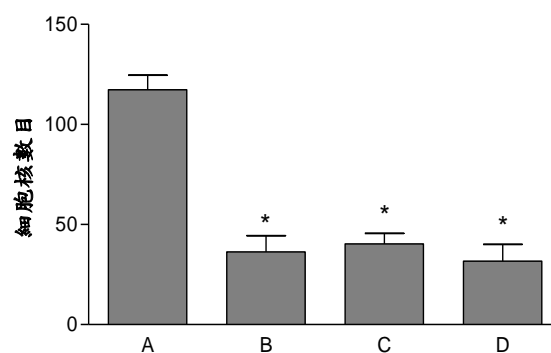
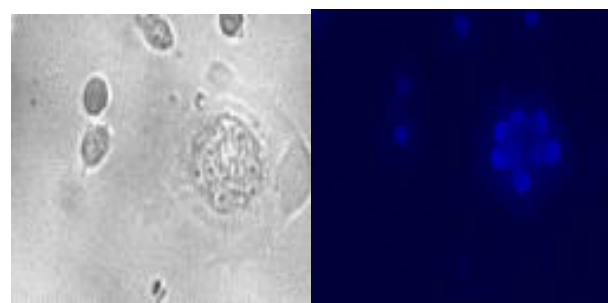


圖 4. 白藜蘆醇與輻射對破骨細胞核數目的影響。上圖破骨細胞型態(左:未染色,右:細胞核染上螢光)。下圖細胞試驗分成:A 對照組、B 輻射線處理組(5Gy)、C 白藜蘆醇處理組(5 $\mu$ M/mL)、D 輻射線合併白藜蘆醇處理組。虛線標示範圍為破骨細胞，箭頭標示處為該細胞之群聚細胞核。柱狀圖表示法為平均值 $\pm$ 標準誤(n=3)，\*:P<0.05。

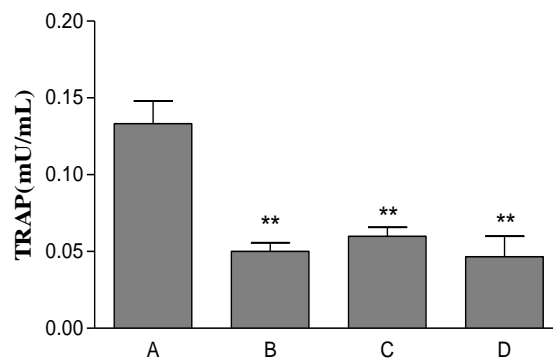


圖 5. 白藜蘆醇與輻射對破骨細胞活性的影響。細胞試驗分成下列組別:A 對照組、B 輻射線處理組(5Gy)、C 白藜蘆醇處理組(5  $\mu$ M/mL)、D 輻射線合併白藜蘆醇處理組。柱狀圖表示法為平均值 $\pm$ 標準誤(n=3)，\*\*:P<0.01。

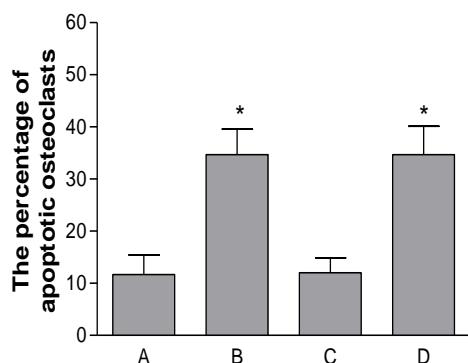


圖 6. 白藜蘆醇與輻射對破骨細胞凋亡的影響。細胞試驗分成下列組別:A 對照組、B 輻射線處理組(5 Gy)、C 白藜蘆醇處理組(5  $\mu$ M/mL)、D 輻射線合併白藜蘆醇處理組。柱狀圖表示法為平均值 $\pm$ 標準誤(n=3), \*:P<0.05。註:apoptosis 細胞凋亡。

過雙磷酸鹽與輻射照射來減緩破骨細胞過度分化,降低病患骨疼痛。

白藜蘆醇屬於強抗氧化力之多酚類化合物,可降低因游離輻射產生氧化張力的傷害,具輻射防護作用[7]。此種多酚類化合物可刺激骨肉瘤細胞凋亡,抑制此種細胞增生[13]。RAW264.7 細胞經白藜蘆醇處理、輻射處理、白藜蘆醇合併輻射處理皆有抑制細胞分化成破骨細胞的能力,且白藜蘆醇與輻射線合併使用抑制破骨細胞數目效應較明顯(圖 3),其可能作用機制與白藜蘆醇有異,但須進一步探討。由圖 4 與圖 5 所示,白藜蘆醇、輻射、白藜蘆醇合併輻射處理相較於對照組具有減少破骨細胞核數目與 TRAP 酵素產量的功效,證明具有抑制破骨細胞活性之特性。

根據文獻,白藜蘆醇可能是因具清除自由基的能力,透過清除活性氧化物質(Reactive oxygen species;ROS)的途徑抑制破骨細胞分化[14]。另有研究指出白藜蘆醇能有效降低破骨細胞的生成與增加造骨細胞的數目[15],因骨量的維持與造骨細胞的骨生成作用和破骨細胞的骨吸收作用平衡有關,而白藜蘆醇有調節此兩種細胞的生長,顯示對於骨量是有助益的。考量安全劑量與有效劑量,本研究使用的白藜蘆醇劑量為 5  $\mu$ M。施予 RANKL 刺激後,RAW264.7 細胞主要是以

Alternative 路徑形成 NF-kappaB 轉錄因子,刺激破骨細胞分化與增加其活性 [16],上述細胞經白藜蘆醇、輻射或兩者合併處理,皆可抑制破骨細胞分化並降低該細胞之活性,推測白藜蘆醇可能與抑制由 RANKL 誘發之 Alternative 路徑有關。

## 結論

白藜蘆醇可抑制破骨細胞數目、減少該細胞 TRAP 酵素活性與細胞核數目,然而,白藜蘆醇對破骨細胞凋亡之影響較不明顯,故推論白藜蘆醇對於抑制破骨細胞數的作用機制可能透過抑制破骨細胞分化而非增加破骨細胞凋亡的路徑。

## 致謝

感謝慈濟科技大學由研究計畫 TCCT-1012A03 提供本研究經費。

## 參考文獻

1. Habermann, B., C. Eberhardt, M. Feld, L. Zichner, A. A. Kurth. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. *Acta Orthop* 2007;78(2):221-225.
2. Motiur Rahman, M., S. Takeshita, K. Matsuoka, et al. Proliferation-coupled osteoclast differentiation by RANKL: Cell density as a determinant of osteoclast formation. *Bone* 2015;81:392-399.
3. Kurihara, N., D. Bertolini, T. Suda, Y. Akiyama, G. D. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* 1990;144(11):4226-4230.
4. Kreja, L., A. Liedert, C. Schmidt, L. Claes A. Influence of receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) and fetal calf serum on

- human osteoclast formation and activity. *J Mol Histol* 2007;38(5):341-345.
5. Udagawa, N., N. Takahashi, E. Jimi, et al. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 1999;25(5):517-523.
6. Canon, J. R., M. Roudier, R. Bryant, S. Morony, M. Stolina, P. J. Kostenuik, W. C. Dougall. Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(2):119-129.
7. Carsten, R. E., A. M. Bachand, S. M. Bailey, R. L. Ullrich. Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 2008;169(6):633-638.
8. Boissy, P., T. L. Andersen, B. M. Abdallah, M. Kassem, T. Plesner, J. M. Delaisse. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res* 2005;65(21): 9943-9952.
9. Hoskin, P. J. Bisphosphonates and radiation therapy for palliation of metastatic bone disease. *Cancer Treat Rev* 2003;29(4): 321-327.
10. Grano, M., G. Mori, V. Minielli, F. P. Cantatore, S. Colucci, A. Z. Zallone. Breast cancer cell line MDA-231 stimulates osteoclastogenesis and bone resorption in human osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270(3):1097-1100.
11. Gallet, M., N. Sevenet, C. Dupont, M. Brazier, S. Kamel. Breast cancer cell line MDA-MB 231 exerts a potent and direct anti-apoptotic effect on mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319(2): 690-696.
12. Nicolin, V., R. Bortul, R. Bareggi, G. Baldini, B. Martinelli, P. Narducci. Breast adenocarcinoma MCF-7 cell line induces spontaneous osteoclastogenesis via a RANK-ligand-dependent pathway. *Acta Histochem* 2008;110(5):388-396.
13. Boissy, P., T. L. Andersen, B. M. Abdallah, M. Kassem, T. Plesner, J. M. Delaisse. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res* 2005;65(21):9943-9952.
14. He, X., G. Andersson, U. Lindgren, Y. Li. Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264.7 cells through inhibition of ROS production. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;401(3): 356-362.
15. Kupisiewicz, K., P. Boissy, B. M. Abdallah, et al. Potential of resveratrol analogues as antagonists of osteoclasts and promoters of osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 2010;87(5): 437-449.
16. Novack, D. V. Role of NF-kappaB in the skeleton. *Cell Res* 2011;21(1):169-182.



# Inhibition Effect of Resveratrol Combined with Radiation Treatment on Osteoclastogenesis

Chun-Chih Lin<sup>1</sup> Shang-Chien Lin<sup>2</sup> Mao-Chin Hung<sup>3</sup> Chien-Yi Ting<sup>4</sup> \*Wei-Chung Liu<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Natural Biotechnology Institute of Natural Healing Sciences, Nanhua University

<sup>2</sup> Department of Diagnostic Radiology, Lo-Hsu Medical Foundation, Lotung Poh-Ai Hospital

<sup>3</sup> Department of Medical Imaging and Radiological Sciences Research Center for Agricultural Biomedicine, Tzu Chi University of Science and Technology

<sup>4</sup> Department of Medical Imaging and Radiological Technology, Shu-Zen College of Medicine and Management

## Abstract

Resveratrol, a plant polyphenol compound, may have the potential to decrease bone loss. Resveratrol or radiation is applied in osteoporosis treatment. However, the bioeffects have not always been observed in osteoclastogenesis. In this study, we examined the relevant bioeffects of resveratrol or radiation on osteoclast differentiation. RAW264.7 cells were treated with radiation, resveratrol or radiation combined with resveratrol. The toxicity and proliferation of resveratrol on RAW264.7 cells were evaluated by MTT assay. RAW264.7 cells were treated with safe dose of resveratrol to investigate the osteoclastogenesis. Cells were assigned to the following groups: the control, radiation treatment (5 Gy), resveratrol treatment and a combinative treatment of radiation and resveratrol were divided in this experiment. The number of cell and nucleus of osteoclast was counted. Analysis the enzyme expression of Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) was then carried out. The apoptosis cells of osteoclast were stained by Annexin V labeling detected kit. The results showed that after treatment with resveratrol or radiation, the number of osteoclast was decreased. In addition, the number of nucleus and TRAP concentration were lower than control group. Radiation can increase the apoptosis rate of osteoclast; however, the resveratrol group had no effect compare with control group. Our results suggest that resveratrol might decrease the number of osteoclasts and inhibit osteoclast activation possibly via suppressing monocytes to differentiate osteoclasts.

**Keywords:** Radiation, Osteoporosis, Osteoclast, Resveratrol, Osteoclastogenesis

