

银杏双黄酮抑制 NF- κ B 信号通路影响骨髓巨噬细胞向破骨细胞分化

吴 锋[#] 曾艳平 覃万安 林舟丹 程昌志 梁雄波 陈子阳 韦葛董^{*#}

中国人民解放军联勤保障部队第九二三医院 广西南宁 530027

【摘要】目的本研究基于 NF- κ B 通路探讨银杏双黄酮(ginkgetin, GK)对 RANKL 诱导的破骨细胞分化的影响及其作用机制。方法 采用不同浓度的 GK(0、0.1、1、10 和 100 μ M)作用小鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMMs)并分组,通过 CCK8 试剂检测各组的细胞增殖,TRAP 染色检测破骨细胞生成能力,通过 Western-blot 检测 I κ B α 蛋白表达。结果高浓度 GK (大于 12.5 μ M)可显著抑制 BMMs 增殖,TRAP 染色显示高浓度 GK 抑制破骨细胞形成,Western-blot 结果显示, GK (50 μ M)组 I κ B α 表达明显高于对照组。结论 在小鼠 BMMs 中, GK 可抑制 NF- κ B 信号通路进而影响 RANKL 诱导的破骨细胞分化。

【关键词】银杏双黄酮, NF- κ B。骨质疏松症,破骨细胞, RANKL

缩略词

BBMs: 骨髓来源巨噬细胞

BDM: 骨密度

CCK8: 细胞计数试剂盒

CTSK: 组织蛋白酶 K

FBS: 胎牛血清

GK: 银杏双黄酮

IKKa: I κ B 激酶 a

IKKb: I κ B 激酶 b

M-CSF: 巨噬细胞集落刺激因子

MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶

NFATc1: 活化 T 细胞核因子 c1

OPG: 骨保护素

PBS: 磷酸盐缓冲液

PVDF: 聚偏氟乙烯膜

RANK: 转录因子 NF- κ B 受体激活剂

SDS-PAGE: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

TRAF: TNF 受体相关因子

介绍

我国老年人骨质疏松症患病率为 37.7%,而绝经女性患病率为 38.8%,且随着年龄的增长逐渐上升¹。治疗骨质疏松症的药物有很多,目前美国 FDA 批准用于治疗骨质疏松症的药物包括双膦酸盐【阿仑膦酸盐、利塞膦酸盐和唑来膦酸等】、雌激素相关疗法【雌激素、雷洛昔芬和巴多昔芬等】、甲状旁腺激素类似物【特利帕肽等】、RANKL 抑制剂【地舒单抗等】、骨硬化素抑制剂【罗莫昔单抗等】和鲑鱼降钙素²。这些药物在治疗骨质疏松症时存在潜在的并发症,如胃肠道炎症、眼部炎症、肾功能损害、心肌梗死、中风、肺栓塞、乳腺癌、子宫出血、骨坏死、骨肉瘤、低钙血症、直立性低血压、鼻炎、过敏、静脉血栓形成和严重皮肤感染等,限制了该类药物的正常使用³⁻⁷。因此,许多研究人员转而探索中成药天然成分的抗骨质疏松活性。

银杏双黄酮(ginkgetin, GK)是从银杏叶中提取的天然双黄酮。Zhang 等⁸在脂多糖(LPS)诱导的急性肾损伤小鼠模型中发现 GK 可以抑制 NF- κ B 信号通路激活 SIRT1,发挥肾保护作用。Cao 等⁹报道 GK 通过 MAPK 通路发挥抗乳腺癌作用。此外,其他大量体内外实验证实, GK 还具有抑制骨肉瘤细胞生长、神经保护、抗癌活性、抑制脂肪细胞生成、抗动脉粥样硬化、抗炎、抗氧化¹⁰⁻¹³等多种药理活性。然而,关于 GK 在骨质疏松中的效应及作用机制研究较少。因此,本研究旨在研究 GK 对 RANKL 诱导的小鼠 BMMs 向破骨细胞分化的影响及其潜在机制。研究结果可能为治疗骨质疏松症提供一种新的方法,或为设计治疗骨质疏松症的药物提供新的靶点。

材料与方

试剂与仪器

GK (HY-N0889) 购自美国 Master of Bioactive Molecules, M-CSF(315-02)购自美国 Peprotech, RANKL(462-TR/CF)购自美国 R&D, SYBRGreen PCR 试剂盒 (F-415XL) 购自美国 Thermo, TRAP 染色试剂盒 (JD005) 购自浙江 CTCC, 破骨诱导培养基 (Y004) 购自浙江 CTCC, 逆转录试剂盒(#K1622)购自美国 Thermo, Real-time 检测仪 (7500)购自美国 ABI。

骨髓巨噬细胞的制备

取 6 周龄(约 20 g)雌性 C57BL/6 小鼠(n=5)股骨和胫骨冲洗。分离骨髓巨噬细胞(BMMs)。用红细胞裂解液处理后,弃红色上清液,用无血清 MEM Alpha 培养基洗涤两次,进行再悬浮和沉淀。然后加入含有 10%胎牛血清的 MEM Alpha 培养基 3ml,重悬骨髓细胞,接种在 6 厘米培养皿,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜。

BMMs 的增殖和破骨细胞分化

按实验分组加入不同浓度的 GK(0、0.1、1、10、100 μ M),在 5% CO₂ 培养箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 然后进行 CCK-8 检测。以 0 μ M 组为对照,在 450 nm 波长下用酶标仪测定相同时间点的 OD 值,用于分析细胞增殖能力。经过 CCK-8 的初步筛选,确定 12.5、25 和 50 μ M GK 为低、中、高浓度,并用于诱导破骨细胞。各组均加入含 20 ng/ml 巨噬细胞集落刺激

因子(M-CSF)和 50 ng/ml RANKL 的破骨细胞诱导培养基。将细胞置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 7 天。破骨细胞诱导培养基每 2-3 天更换一次。在破骨细胞诱导第 7 天结束时, 进行 TRAP 染色, 观察并在显微镜下拍照。

TRAP 染色

分离的 BMMs 用含 10% 胎牛血清的 MEM Alpha 培养基重悬。调整细胞密度为 1×10^5 细胞/孔, 将细胞接种在 48 孔细胞培养板上。各组均加入含 20 ng/ml M-CSF 和 50 ng/ml RANKL 的破骨细胞诱导培养基。将细胞置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 7 天。破骨细胞诱导培养基每 2-3 天更换一次。24 h 组在破骨细胞诱导第 6 天加入 GK, 最终浓度分别为 12.5、25 和 50 μ M。48 小时组和 72 小时组, 分别在第 5 天和第 4 天添加相同浓度。破骨细胞诱导第 7 天结束时, 弃掉培养液, 加入 PBS 冲洗 1 次, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 15 min。加入 TRAP 染液 10 min。丢弃染液, 加入 PBS 冲洗 2 次, 显微镜下拍照。

Western-blot 检测

将 BMMs 培养在 6 孔板中, 用 RANKL 和 M-CSF 诱导 7 天。每 2-3 天更换一次破骨细胞诱导介质。将预冷的含 PMSF 的 RIPA 裂解缓冲液加入样品中, 并在 12000 转下离心 10 分钟。用 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质, 并转移到聚偏氟乙烯膜 (PVDF) 上。在 4℃ 下用 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (CST, 4812S, 1:1000) 和 GAPDH (Proteintech, 60004-1-Ig, 1:5000) 的第一抗体孵育前, 用 Tris-缓冲液水中的脱脂牛奶 (5%) 来阻断膜。用 TBST 清洗膜三次。用兔二抗或辣根酶 (HRP) 标记的小鼠二抗溶液 (1:5000) 在 37℃ 下孵育 1 小时, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 分钟。用 ECL 电致发光溶液读取条带。用 Image J 2.0 软件对膜进行拍照和分析。

统计分析

采用统计软件 SPSS22.0 处理实验数据, 计量资料均以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间统计分析采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

高浓度 GK 抑制小鼠骨髓巨噬细胞增殖

为研究 GK 对 BMMs 增殖的影响, 采用 CCK8 检测 BMMs 的活性。结果表明, 1、10 和 100 μ M 的 GK 对细胞生长有显著影响(图 1A-B)。为了缩小 GK 的有效浓度范围, 将 GK 的浓度细分为 6.25、12.5、25、50 和 100 μ M, 每组培养 24、48 和 72 h。结果表明, 12.5-100 μ M 的 GK 在 24、48 和 72 h 时对小鼠骨髓巨噬细胞的增殖有显著的抑制作用, 且呈浓度依赖性(图 1C-F)。因此, 我们选择 12.5、25 和 50 μ M GK 作为低、中、高浓度, 用于诱导破骨细胞。

表 1 GK 对 BMMs 增殖的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 GK's influence on the BMMs proliferation ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别 (初筛)	细胞生长抑制率%	P 值
BMMs	0.000 \pm 0.476	-
BMMs+GK (0.1 μ M)	0.675 \pm 0.324	0.112
BMMs+GK (1 μ M)	0.987 \pm 0.324	0.041

BMMs+GK (10 μ M)	2.753 \pm 0.623	0.003
BMMs+GK (100 μ M)	28.156 \pm 0.935	<0.001

与对照组比较, GK 浓度大于 1 μ M 时, $P < 0.05$ 。

Compared with the control group, when the concentration of GK was greater than 1 μ M, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

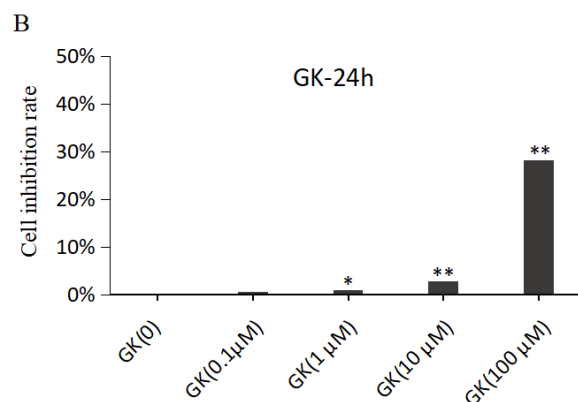
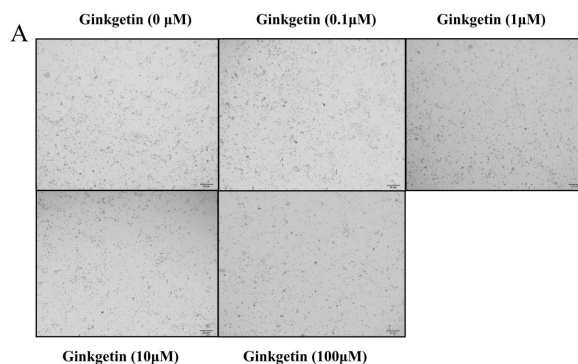


表 2 GK 对 BMMs 增殖的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 GK's influence on the BMMs proliferation ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别 (细筛, 24h)	细胞生长抑制率%	P 值
BMMs	0.000 \pm 0.576	-
BMMs+GK (6.25 μ M)	0.876 \pm 0.413	0.099
BMMs+GK (12.5 μ M)	4.491 \pm 0.577	0.001
BMMs+GK (25 μ M)	9.255 \pm 0.577	<0.001

表 2-续表 GK 对 BMMs 增殖的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 continued GK's influence on the BMMs proliferation ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别 (细筛, 24h)	细胞生长抑制率%	P 值
BMMs+GK (50 μ M)	29.409 \pm 0.346	<0.001
BMMs+GK (100 μ M)	37.471 \pm 0.962	<0.001

与对照组比较, GK 浓度为 6.25 μ M 时, $P > 0.05$, GK 浓度大于 12.5 μ M 时, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

Compared with the control group, when the concentration of GK was 6.25 μ M, $P > 0.05$, when the concentration of GK is greater than 12.5 μ M, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

表3 GK对BMMs增殖的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 GK's influence on the BMMs proliferation (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别 (细筛, 48h)	细胞生长抑制率%	P 值
BMMs	0.000 ± 0.380	-
BMMs+GK (6.25 μ M)	1.159 ± 0.413	0.022
BMMs+GK (12.5 μ M)	5.239 ± 0.453	<0.001
BMMs+GK (25 μ M)	10.579 ± 0.462	<0.001
BMMs+GK (50 μ M)	26.751 ± 0.462	<0.001
BMMs+GK (100 μ M)	33.048 ± 0.399	<0.001

与对照组比较, GK 浓度大于 6.25 μ M 时, *P<0.05, **P<0.01。

Compared with the control group, when the concentration of GK was greater than 6.25 μ M, *P<0.05, **P<0.01.

表4 GK对BMMs增殖的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Table 4 GK's influence on the BMMs proliferation (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别 (细筛, 72h)	细胞生长抑制率%	P 值
BMMs	0.000 ± 0.346	-
BMMs+GK (6.25 μ M)	2.153 ± 0.549	0.004
BMMs+GK (12.5 μ M)	6.963 ± 0.495	<0.001
BMMs+GK (25 μ M)	12.277 ± 0.572	<0.001
BMMs+GK (50 μ M)	29.409 ± 0.346	<0.001
BMMs+GK (100 μ M)	37.471 ± 0.962	<0.001

与对照组比较, GK 浓度大于 6.25 μ M 时, *P<0.05, **P<0.01。

Compared with the control group, when the concentration of GK was greater than 6.25 μ M, *P<0.05, **P<0.01.

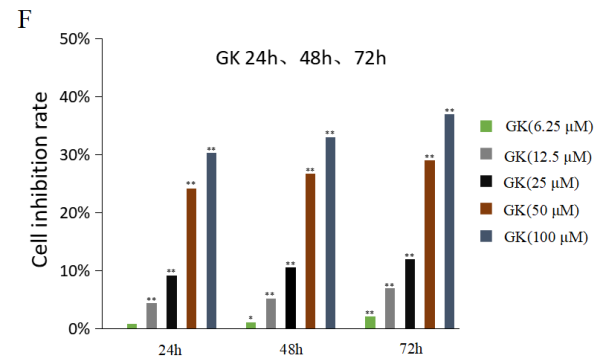
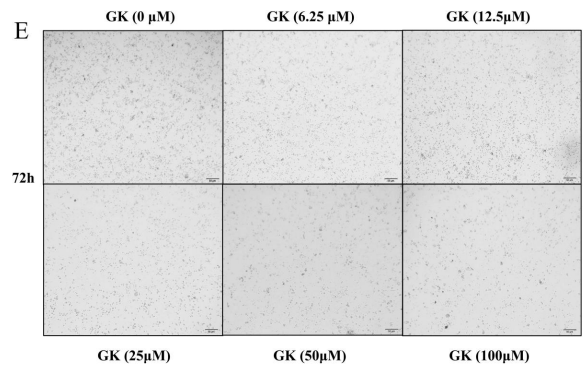
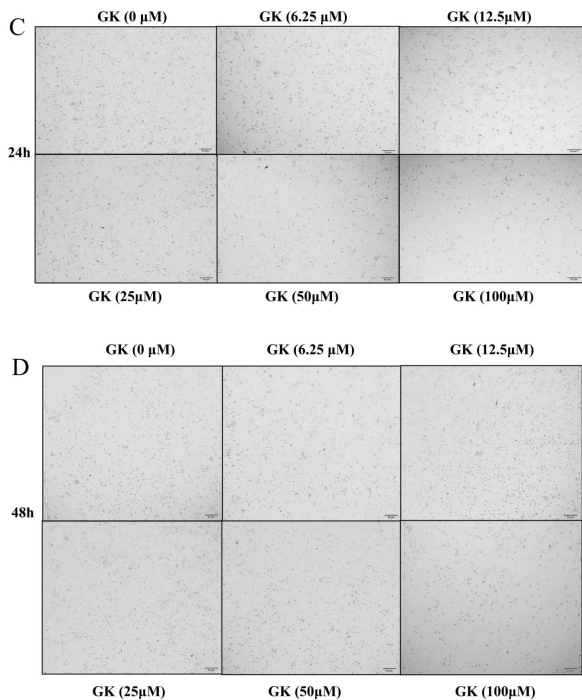


图1. GK抑制BMMs的增殖。(a-b)与对照组相比, 0~0.1 μ M GK对BMMs增殖无显著抑制作用, 而1、10和100 μ M GK对BMMs增殖有显著抑制作用, 且呈浓度依赖性, *P<0.05, **P<0.01。(c-f)为了缩小GK有效浓度范围, 将GK浓度细分为6.25、12.5、25、50和100 μ M, 每组培养24(C)、48(D)和72(E)h, GK浓度大于12.5 μ M对BMMs增殖有显著抑制作用, *P<0.05, **P<0.01。所有组别均重复实验三次。比例尺:50μm。

GK抑制骨髓来源巨噬向破骨细胞分化

为了进一步探索 GK 对体外破骨细胞形成的影响, 我们采用 BMMs+RANKL+M-CSF 诱导破骨细胞生成。以不同浓度的 GK 加入破骨细胞诱导实验, 在破骨细胞诱导结束时进行 TRAP 染色。研究发现, 12.5、25 和 50 μ M GK 以浓度和时间依赖的方式抑制破骨细胞的形成(图 2A)。在显微镜下观察细胞形态。破骨细胞以浓度依赖的方式被抑制(图 2B)。

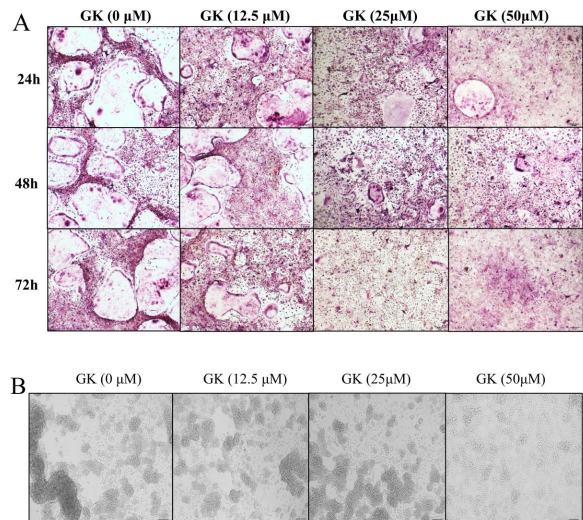


图 2. GK 抑制 BMMs 向破骨细胞分化。(A)在含有 M-CSF 和 RANKL 的破骨细胞诱导培养基中加入浓度分别为 12.5、25、50 μM 的 GK。在破骨细胞诱导第 7 天结束时进行 TRAP 染色, 观察 TRAP 阳性多核细胞 (MNCs) 的数量。与单一的 RANKL 处理相比, GK 和 RANKL 联合使用可减少 TRAP 染色阳性的数量。浓度为 12.5、25 和 50 μM 的 GK 对破骨细胞的形成有抑制作用, 且呈浓度依赖性。相同浓度的 GK 抑制破骨细胞形成的时间越长, 其抑制破骨细胞形成的能力越强。(B)与对照组相比, 12.5、25 和 50 μM 的 GK 对破骨细胞的形成具有剂量依赖性。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。所有实验组别均重复实验三次, 比例尺: 50 μm 。

GK 通过提高 I κ B α 表达抑制破骨细胞形成

为研究 GK 对 NF- κ B 信号通路的影响, 采用 I κ B α 蛋白印迹分析。I κ B α 是 NF- κ B 信号通路的关键成分, 主要控制 NF- κ B 的激活和转录。我们选择 50 μM 的 GK 进行 western blotting 实验。结果显示, GK 组 I κ B α 表达高于对照组(图 3)。这一结果支持 GK 通过增加 I κ B α 表达来减弱 RANKL 诱导的 NF- κ B 信号通路, 抑制 BMMs 向破骨细胞分化。

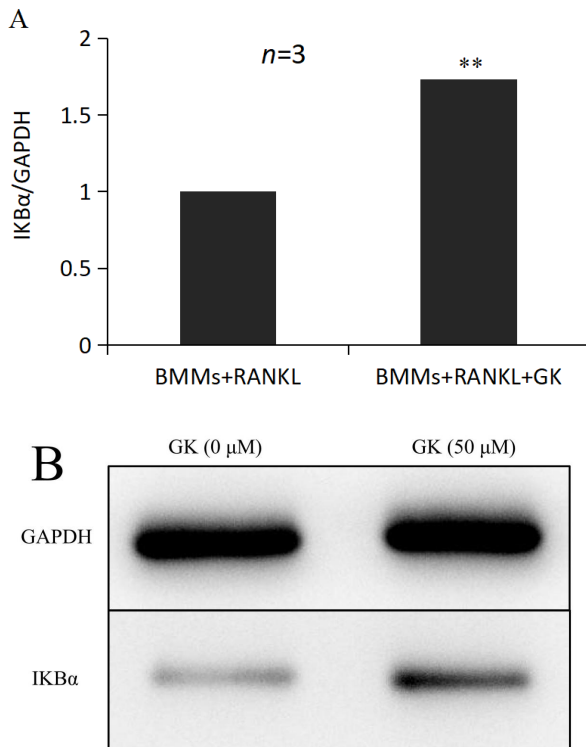


图 3. GK 促进 RANKL 诱导的破骨细胞 I κ B α 表达。RANKL 诱导破骨细胞分化, 用 50 μM GK 进行干扰。在诱导第 7 天结束时进行蛋白印迹分析。结果显示 GK 可显著提高 I κ B α 蛋白水平, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

讨论

骨质疏松症是影响全球老龄化人口的常见病, 其对全球医疗保健系统造成了沉重负担, 已成为一个重要的公共卫生问题。目前骨质疏松症的常用治疗药物主要有双膦酸盐和雌激素等², 但其治疗效果并不理想, 且存在很多副作用, 因此, 有必要寻找一种副作用小的治疗骨质疏松症的新药。雌激素通过增加 OPG 的分泌和降低 RANK 的分泌来抑制破骨细

胞的生成和活性。没有雌激素, 会发生异常骨重塑¹⁴, 因此, 骨质疏松症更常见于绝经后女性。破骨细胞的异常激活在疾病的发病机制中起着关键作用¹⁵, 靶向调控破骨细胞的活性是抗骨质疏松症治疗的关键。破骨细胞是关键的骨代谢细胞, 在骨发育、骨吸收和骨量调节中发挥作用, 破骨细胞通常在 M-CSF 和 RANKL 刺激下从单核/巨噬细胞谱系分化¹⁶。破骨细胞可引起骨微环境的改变, 进而引发一系列与骨相关的疾病, 如骨质疏松症和类风湿性关节炎。因此, 靶向抑制巨噬细胞分化为破骨细胞可能是一种治疗骨质疏松症的方法。

GK 是从银杏叶中提取的天然化合物, 其具有多种生物活性, 如抗癌、抗骨肉瘤、抗炎、神经保护、抗脂肪细胞和抗动脉粥样硬化等¹⁰⁻¹³。Xiong 等¹⁷证实 GK 在骨肉瘤细胞中抑制 p-STAT3 蛋白的表达, 并通过抑制 PARP20 诱导骨肉瘤细胞凋亡。Cheng 等¹¹报道 GK 可下调 p-p38 和 p-NF- κ B 的表达, 提示 GK 可能通过磷酸化作用激活 p38/NF- κ B 信号通路。Park 等¹⁸发现银杏叶提取物可通过下调雌激素受体诱导细胞凋亡。在本研究中, GK 的细胞毒性首次在 BMMs 中进行了评估。低浓度 GK (<1 μM) 对 BMMs 的生存无显著影响, 高浓度 (12.5 ~ 100 μM) GK 抑制 BMMs 的生存。TRAP 染色结果显示, GK 可减少体外 TRAP 阳性多核破骨细胞的数量, 显著抑制破骨细胞的形成。基于这些结果, GK 可能对破骨细胞相关的骨病有重要的治疗潜力。

RANKL 诱导的信号级联反应在调节破骨细胞活性中发挥重要作用。RANKL 与其受体 RANK 结合, 吸引 TRAF6, 并激活 NF- κ B 信号通路¹⁹。NF- κ B 信号转导主要被 I κ B 和 IKK 通过经典和非经典 NF- κ B 通路抑制。在经典的 NF- κ B 通路中, I κ B α 附着在 NF- κ B 上, 阻止其向细胞核迁移并与特定的 DNA 序列结合, 从而触发破骨细胞分化相关的特定基因的转录。在破骨细胞分化过程中, I κ B α 被活化的 IKK 磷酸化降解, 导致 NF- κ B/I κ B α 复合物解离, 释放 NF- κ B, 并激活其下游信号通路。NF- κ B 迅速转移到细胞核并与相应的靶基因启动子结合²⁰。激活 NF- κ B 信号可增加转录因子 c-Fos 和 NFATc146 的表达。C-Fos 和 NFATc1 是终端破骨细胞分化和活性的关键调节因子, 它们共同刺激下游破骨细胞特异性基因的表达, 包括 CTSK、TRAcP、DC-STAMP 和 V-ATPase d2²¹⁻²²。在本研究中, 大于 12.5 μM 的 GK 显著抑制 BMMs 增殖, 抑制破骨细胞形成, 增加 I κ B α 的表达, 表明 GK 可能抑制 NF- κ B 信号通路进而影响破骨细胞的分化。

综上所述, GK 在体外可抑制 BMMs 细胞增殖以及向破骨细胞分化。不过, 这项研究也有一些局限性。破骨细胞分化的其他信号通路指标, 如 MAPK 和 PI3K 等, 未被纳入本研究, 本研究检测了 NF- κ B 信号通路关键节点上的抑制因子, 结果可能存在偏差。今后应扩大检测范围, 检测其他信号通路的关键因子。本研究探索了 GK 对破骨细胞分化的影响, 但未研究 GK 对成骨细胞的影响。此外, 确切的药物靶点还有待进一步研究。

本研究表明, 在小鼠的 BMMs 中, GK 可提高 I κ B α 的表达水平, 进而抑制 NF- κ B 信号通路, 影响 RANKL 诱导的破骨细胞的分化。这也表明 GK 可能是一种潜在有效的治疗破骨细胞相关疾病的有效药物。

参考文献:

- [1]吴惠一,刘颖,兰亚佳,等.中国绝经女性骨质疏松症患病率的Meta分析[J].中国循证医学杂志,2022,22(08):882-890.
- [2]LeBoff MS, Greenspan SL, Insogna KL, Lewiecki EM, Saag KG, Singer AJ, et al. The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int* 2022;33:2049-102.
- [3]Kobayakawa T, Miyazaki A, Saito M, Suzuki T, Takahashi J, Nakamura Y. Denosumab versus romosozumab for postmenopausal osteoporosis treatment. *Sci Rep* 2021;11:11801.
- [4]Anagnostis P, Kenanidis E, Potoupnis M, Tsiridis E, Goulis DG. Letter to the Editor: "Pharmacological Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline". *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105.
- [5]Patel DV, Bolland M, Nisa Z, Al-Abuwsji F, Singh M, Horne A, et al. Incidence of ocular side effects with intravenous zoledronate: secondary analysis of a randomized controlled trial. *Osteoporos Int* 2015;26:499-503.
- [6]Langdahl B. Treatment of postmenopausal osteoporosis with bone-forming and antiresorptive treatments: Combined and sequential approaches. *Bone* 2020;139:115516.
- [7]Baron R, Ferrari S, Russell RG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone* 2011;48:677-92.
- [8]Zhang J, Yang S, Chen F, Li H, Chen B. Ginkgetin aglycone ameliorates LPS-induced acute kidney injury by activating SIRT1 via inhibiting the NF-kappaB signaling pathway. *Cell Biosci* 2017;7:44.
- [9]Cao J, Tong C, Liu Y, Wang J, Ni X, Xiong MM. Ginkgetin inhibits growth of breast carcinoma via regulating MAPKs pathway. *Biomed Pharmacother* 2017;96:450-58.
- [10]Xu B, He X, Sui Y, Wang X, Wang X, Ren L, et al. Ginkgetin in aglycone attenuates neuroinflammation and neuronal injury in the rats with ischemic stroke by modulating STAT3/JAK2/SIRT1. *Folia Neuropathol* 2019;57:16-23.
- [11]Cheng J, Li Y, Kong J. Ginkgetin inhibits proliferation of HeLa cells via activation of p38/NF-kappaB pathway. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2019;65:79-82.
- [12]Cho YL, Park JG, Kang HJ, Kim W, Cho MJ, Jang JH, et al. Ginkgetin, a biflavone from Ginkgo biloba leaves, prevents adipogenesis through STAT5-mediated PPARgamma and C/EBPalpha regulation. *Pharmacol Res* 2019;139:325-36.
- [13]Li Q, Ye T, Long T, Peng X. Ginkgetin exerts anti-inflammatory effects on cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in a rat model via the TLR4/NF-kappaB signaling pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* 2019;83:675-83.
- [14]Lu J, Ye C, Huang Y, Huang D, Tang L, Hou W, et al. Coriagin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and inhibits oestrogen deficiency-induced bone loss via the NF-kappaB and PI3K/AKT signaling pathways. *J Cell Mol Med* 2020;24:10444-57.
- [15]Liu N, Qi B, Zhang Y, Fang S, Sun C, Li Q, et al. Bu-Gu-Sui decoction promotes osteogenesis via activating the ERK/Smad signaling pathways. *Front Pharmacol* 2022;13:976121.
- [16]Hu R, Chen L, Chen X, Xie Z, Xia C, Chen Y. Aloperine improves osteoporosis in ovariectomized mice by inhibiting RANKL-induced NF-kappaB, ERK and JNK approaches. *Int Immunopharmacol* 2021;97:107720.
- [17]Xiong M, Wang L, Yu HL, Han H, Mao D, Chen J, et al. Ginkgetin exerts growth inhibitory and apoptotic effects on osteosarcoma cells through inhibition of STAT3 and activation of caspase-3/9. *Oncol Rep* 2016;35:1034-40.
- [18]Park Y, Woo SH, Seo SK, Kim H, Noh WC, Lee JK, et al. Ginkgetin induces cell death in breast cancer cells via downregulation of the estrogen receptor. *Oncol Lett* 2017;14:5027-33.
- [19]Xiao L, Zhong M, Huang Y, Zhu J, Tang W, Li D, et al. Puerarin alleviates osteoporosis in the ovariectomy-induced mice by suppressing osteoclastogenesis via inhibition of TRAF6/ROS-dependent MAPK/NF-kappaB signaling pathways. *Aging (Albany NY)* 2020;12:21706-29.
- [20]Chen J, Song D, Xu Y, Wu L, Tang L, Su Y, et al. Anti-Osteoclast Effect of Exportin-1 Inhibitor Eltanexor on Osteoporosis Depends on Nuclear Accumulation of IkappaBalpha-NF-kappaB p65 Complex. *Front Pharmacol* 2022;13:896108.
- [21]Phromnoi K, Suttajit M, Saenjum C, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Inhibitory Effect of a Rosmarinic Acid-Enriched Fraction Prepared from Nga-Mon (*Perilla frutescens*) Seed Meal on Osteoclastogenesis through the RANK Signaling Pathway. *Antioxidants (Basel)* 2021;10.
- [22]Zhu M, Shan J, Xu H, Xia G, Xu Q, Quan K, et al. Glaucoxylin A suppresses osteoclastogenesis induced by RANKL and osteoporosis induced by ovariectomy by inhibiting the NF-kappaB and Akt pathways. *J Ethnopharmacol* 2021;276:114176.

基金: 广西壮族自治区自然科学基金资助 (No.2018JJA140721).

利益冲突: 所有作者都宣称没有竞争利益。

作者贡献: 韦葛堇和吴锋是这项工作的共同第一作者。韦葛堇和吴锋参与了资料收集, 并起草了手稿。曾艳平、覃万安、梁雄波进行统计分析并参与设计。陈子阳、林舟丹、程昌志参与了数据的获取、分析和解释, 并参与了稿件的起草。所有作者都阅读并批准了最终的手稿。

通讯作者: 韦葛堇。