

• 药理与临床 •

升麻三萜皂苷对破骨细胞形成分化的影响及机制研究

宋子乐¹, 张 奇¹, 胡思婧¹, 张泉龙¹, 徐金龙², 邱明华³, 张巧艳¹, 韩 婷^{4*}, 秦路平^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 中国人民解放军联勤保障部队第九六九医院, 内蒙古 呼和浩特 010051

3. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650201

4. 中国人民解放军海军军医大学药学院, 上海 200433

摘要:目的 探究升麻三萜皂苷 (*Cimicifuga* triterpene saponins) 对破骨细胞形成分化和骨吸收功能的影响, 并基于网络药理学探讨其作用机制。方法 采用 CCK-8 法测定升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇对骨髓巨噬细胞 (bone marrow macrophages, BMMs) 增殖活性的影响; 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色测定破骨细胞数目; 磷酸苯二钠法测定破骨细胞的 TRAP 活性; 鬼笔环肽染色观察破骨细胞 F-actin 环的形成; 甲苯胺蓝染色检测破骨细胞在牛皮质骨骨片上形成的骨吸收陷窝; Western blotting 分析破骨细胞标志基因和蛋白的表达。采用 GeneCards 和 DisGeNET 数据库获取破骨细胞功能的靶点, 应用 Cytoscape 3.7.1 软件, 采用蛋白互作的方式, 筛选升麻三萜皂苷调控破骨细胞功能的核心靶点, 并采用 DAVID 6.8 对核心靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。结果 升麻三萜皂苷对 BMMs 增殖无显著影响, 升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇均可减少破骨细胞的数目, 抑制破骨细胞 TRAP 活性和 F-actin 环的形成, 显著抑制破骨细胞活化 T 细胞核因子 1 (nuclear factor of activated T cells 1, NFATc1)、原癌蛋白 Fos (oncogene Fos, c-Fos)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 和组织蛋白酶 (cathepsin K, CTSK) 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 减少破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝的面积 ($P < 0.01$)。网络药理学分析表明升麻三萜皂苷主要通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路调控破骨细胞的骨吸收功能。结论 升麻三萜皂苷通过 MAPK 通路抑制 BMMs 诱导的破骨细胞的形成分化和骨吸收, 可为抗骨质疏松新药的研发提供先导化合物。

关键词: 升麻; 三萜皂苷; 阿克特素; 升麻环氧醇苷; 升麻醇; 破骨细胞; 网络药理学; 丝裂原活化蛋白激酶通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)12-4032-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.011

Effect and mechanism of *Cimicifuga* triterpene saponins on formation and differentiation of osteoclast

SONG Zile¹, ZHANG Qi¹, HU Sijing¹, ZHANG Quanlong¹, XU Jinlong², QIU Minghua³, ZHANG Qiaoyan¹, HAN Ting⁴, QIN Luping¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. 969 Hospital of PLA Joint Logistics Support Forces, Hohhot 010051, China

3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Kunming 650201, China

4. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To explore the effects of *Cimicifuga* triterpene saponins on osteoclast (OC) formation, differentiation and bone resorption, and explore the mechanism based on network pharmacology. **Methods** The effects of *C.* triterpene saponins actein,

收稿日期: 2023-12-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82374098); 上海市科委科技支撑计划项目 (22S21901600)

作者简介: 宋子乐, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分及其作用研究。E-mail: sszll2022@163.com

*通信作者: 韩 婷, 教授, 主要从事中药活性成分及资源开发利用研究。E-mail: hanting@smmu.edu.cn

秦路平, 教授, 主要从事中药资源及品质评价研究。E-mail: lpqin@zcmu.edu.cn

cimigenoside and cimigenol on proliferation of bone marrow macrophages (BMMs) were determined by CCK-8 assay; The number of OC was measured by tartrateresistant acid phosphatase (TRAP) staining; The TRAP activity of OC was determined by phenylene disodium phosphate method; The formation of F-actin ring of OC was observed by phalloidin staining; The formation of bone resorption lacunae of OC in bovine cortical bone slices was detected by toluidine blue staining; The expressions of OC marker gene and protein were detected by Western blotting. The targets involved into the regulation of osteoclast function were obtained through GeneCards and DisGeNET database, and the core targets of *C. triterpene saponins* in regulation of osteoclast function were screened by Cytoscape 3.7.1 software and protein-protein interaction. DAVID 6.8 was used to perform gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of core targets. **Results** *C. triterpene saponins* had no significant effect on the proliferation of BMMs. *C. triterpene saponins* actein, cimigenoside and cimigenol reduced the number of OC, inhibited the activity of TRAP and the formation of F-actin ring of OC, and significantly decreased the expressions of nuclear factor of activated T cells 1 (NFATc1), oncogene Fos (c-Fos), matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and cathepsin K (CTSK) ($P < 0.05, 0.01$), and decreased the area of bone absorption lacunae on bone slices of OC ($P < 0.01$). Network pharmacology analysis showed that *C. triterpene saponins* regulated the bone resorption function of OC mainly through mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. **Conclusion** *C. triterpene saponins* inhibited formation, differentiation and bone resorption activities of OC derived from BMMs through MAPK pathway, which provides lead compounds for the development of new anti-osteoporotic drugs.

Key words: *Cimicifugae Rhizoma*; triterpene saponins; actein; cimigenoside; cimigenol; osteoclast; network pharmacology; mitogen-activated protein kinase pathway

骨质疏松症是由于成骨细胞和破骨细胞参与的骨代谢失衡, 导致骨量减少而发生的骨骼疾病^[1]。破骨细胞是唯一具有骨吸收功能的细胞, 由骨髓巨噬细胞在核因子- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 和巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 的诱导下分化而成, 其活性受活化 T 细胞核因子 1 (nuclear factor of activated T cells 1, NFATc1) 和原癌蛋白 Fos (oncogene Fos, c-Fos) 的调控^[2], 并通过分泌抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)、组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK) 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 降解骨基质进行骨吸收^[3]。破骨细胞过度激活是骨量减少和骨质疏松症发生的重要因素, 抑制破骨细胞的形成分化及骨吸收作用是减少骨丢失及防治骨质疏松症的策略之一。

升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom.、兴安升麻 *C. dahurica* (Turcz.) Maxim.或升麻 *C. foetida* L.的干燥根茎, 含有三萜皂苷、黄酮、生物碱和色酮等化学成分, 具有缓解潮热、抗骨质疏松、抗人类免疫缺陷病毒、抗炎、抗糖尿病、抗疟疾和保护血管等多种生物活性^[4]。同属植物黑升麻 *C. racemosa* L.在欧洲广泛应用于防治更年期综合征和骨质疏松症^[5]。有研究表明升麻具有与黑升麻相似的缓解去卵巢大鼠更年期综合征和抗骨质疏松作用, 其有效成分为三萜皂苷^[6-7]。升

麻三萜皂苷能够增加成骨细胞的骨形成^[8], 但其对破骨细胞形成分化和骨吸收的影响及机制尚不清楚。本研究以骨髓巨噬细胞 (bone marrow macrophages, BMMs) 诱导的破骨细胞为模型, 研究升麻三萜皂苷对破骨细胞形成分化和骨吸收的影响, 并基于网络药理学探索其作用机制, 以期将为升麻应用于骨质疏松症的防治提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 生产许可 SCXK (沪) 2017-0005。小鼠饲养在浙江中医药大学动物实验中心, 在 12 h 光照和 12 h 黑暗条件下自由饮水和摄食。动物实验严格遵守浙江中医药大学伦理规定, 伦理批准号 IACUC-20230731-08。

1.2 药品与试剂

升麻三萜皂苷类成分为从升麻 *C. foetida* L.的干燥根茎分离纯化的化合物, 经 MS 和 HNMR 鉴定, 确定其结构分别为阿克特素 (actein)、升麻环氧醇苷 (cimigenoside) 和升麻醇 (cimigenol), 其化学结构见图 1, 质量分数均大于 98.0%。磷酸酶蛋白酶抑制剂 (批号 P1045)、Western 及 IP 裂解液 (批号 P0013J)、5×上样缓冲液 (批号 P0015)、Western 一抗稀释液 (批号 P0023A)、牛血清白蛋白 (批号 ST023)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 P0010)、1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8, 批号 ST788)、1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8, 批号 ST768)、过硫酸铵 (批号 ST005)、

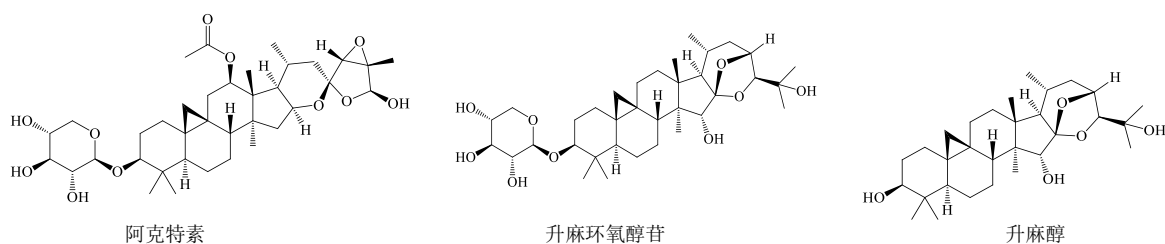


图 1 升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷和升麻醇的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of *C. triterpene saponins* actein, cimigenoside and cimigenol

TEMED (批号 ST728)、DAPI 染色液 (批号 061819191015)、红细胞裂解液 (批号 C3702)、CCK-8 增殖检测试剂盒 (批号 C0042) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 青霉素-链霉素 (批号 15140-122)、胎牛血清 (批号 10091-148)、 α -MEM 培养基 (批号 812306) 购自美国 Gibco 公司; M-CSF (批号 96-315-02-10)、sRANKL (批号 96-315-11-10) 购自杭州联科生物技术股份有限公司; 胰蛋白酶 (批号 BL512A)、PBS (批号 BL302A) 购自合肥 Biosharp 公司; 甲苯胺蓝染色液 (批号 DA0057)、2.5% 戊二醛固定液 (批号 DF0156) 购自北京雷根生物技术有限公司; TRAP 染色试剂盒 (批号 SKK0946) 购自日本 Wako 公司; 鬼笔环肽 (批号 SLBX3286) 购自美国 Sigma 公司; 对硝基苯磷酸二钠 (批号 M11J9L52688)、酒石酸钾钠 (批号 L15D9A77662) 购自上海源叶生物科技有限公司; CTSK 抗体 (批号 19027)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK) 抗体 (批号 ab76299) 购自英国 Abcam 公司; NFATc1 抗体 (批号 8032S)、c-Fos 抗体 (批号 8032S)、p-p38 抗体 (批号 4511S)、p38 抗体 (批号 8690S)、Janus 激酶 (Janus kinase, JNK) 抗体 (批号 9252S)、p-JNK (批号 4668T)、p-ERK 抗体 (4370S)、抗兔 IgG-HRP 抗体 (批号 7074S) 购自美国 CST 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 AF7021) 购自美国 Affinity 公司; MMP9 抗体 (批号 BA2202) 购自武汉博士德生物工程有限公司; β -actin 抗体 (批号 81115-1-RR) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 仪器

ST16R 型低温高速离心机、Steri-Cycle i160 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Synergy H1 型多功能酶标仪 (美国 Bio-Tec 公司); Trans-Blot 型双垂直电泳仪、Trans-Blot 型湿法转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); GD50202 型凝胶成像

系统 (莫纳生物科技有限公司); SW-CJ-1FD 型超净台 (苏州净化设备有限公司); LSM880 型激光共聚焦显微镜、SteREO Discovery.V20 型体式显微镜 (德国蔡司公司)。

2 方法

2.1 破骨细胞的诱导和培养

取 6~8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠, 脱颈椎处死后浸泡于 75% 乙醇中消毒 10 min, 取出, 无菌纱布包裹放入生物安全柜中, 取其股骨及胫骨, 浸泡于无菌 PBS 溶液中, 剔除附着的肌肉, 用 5 mL 注射器吸取 α -MEM 培养基, 冲洗股骨及胫骨髓腔中的骨髓细胞, 收集骨髓冲洗液, 1 000 r/min 离心 10 min, PBS 冲洗细胞 1 次, 加入 1 mL 红细胞裂解液, 随后用 PBS 冲洗细胞 2 次, 即为新鲜的骨髓细胞。将骨髓细胞用含 5 ng/mL M-CSF 的完全培养基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 未贴壁细胞转移至无菌离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞, 用含 30 ng/mL M-CSF 的完全培养基培养 3 d, 即得 BMMs。BMMs 在 30 ng/mL M-CSF 和 50 ng/mL sRANKL 诱导下, 分化为多核破骨细胞。

2.2 升麻三萜皂苷的配制

将适量的阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇分别溶于 100 μ L 的二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 中, 使其浓度为 100 mmol/L, 分装于无菌的离心管中, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 待用。

2.3 BMMs 活性测定

将生长状态良好的 BMMs 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 于 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 以含 30 ng/mL M-CSF 和 0.1、1.0、10.0 μ mol/L 的升麻三萜皂苷 (阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇) 的完全培养基继续培养 48 h, 另设置对照组 (加入含 30 ng/mL M-CSF 的完全培养基), 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂和 100 μ L 无血清 α -MEM 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 30 min, 在 450 nm 波长处测定吸光度 (*A*) 值。

2.4 破骨细胞 TRAP 活性测定

将生长状态良好的 BMMs 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中培养 24 h, 用含 30 ng/mL M-CSF、50 ng/mL sRANKL 以及 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的升麻三萜皂苷(阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇)的完全培养基培养 6 d, 每 3 天换液 1 次, 另设置对照组(加入含 30 ng/mL M-CSF、50 ng/mL sRANKL 的完全培养基), 应用 TRAP 染色试剂盒对破骨细胞进行染色, 镜下计数破骨细胞数目, 并测定 TRAP 活性。

2.5 破骨细胞 F-actin 环染色及观察

将生长状态良好的 BMMs 以 1×10^5 个/孔接种于激光共聚焦皿中培养 24 h, 用含 30 ng/mL M-CSF、50 ng/mL sRANKL 以及 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 升麻三萜皂苷(阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇)的完全培养基, 另设置对照组(加入含 30 ng/mL M-CSF、50 ng/mL sRANKL 的完全培养基), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境下继续培养 6 d, 每 3 天换液 1 次, 培养结束后, PBS 洗涤细胞 2 次, 4%多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 2 次, 加入 100 μL 0.2% Triton X-100, 室温下透化细胞 5 min, PBS 洗涤细胞 2 次。加入 5 $\mu\text{g/mL}$ 鬼笔环肽染色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 吸弃染色液, PBS 洗涤 2 次以去除残留的染液, 加入 DAPI 染色 5 min, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 200 μL PBS, 激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

2.6 破骨细胞在骨片上形成的吸收陷窝的染色与观察

将生长状态良好的 BMMs 以 1×10^4 个/孔接种于放置有无菌牛皮质骨骨片的 96 孔板中, 培养 24 h, 用含 30 ng/mL M-CSF、50 ng/mL sRANKL 以及 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 升麻三萜皂苷(阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇)的完全培养基培养 9 d, 另设置对照组(加入含 30 ng/mL M-CSF、50 ng/mL sRANKL 的完全培养基), 收集骨片, 用 PBS 洗涤 2 次, 2.5% 戊二醛固定 7 min, 0.25 mol/L 氨水超声清洗 3 次, 每次 5 min, 自然晾干。1%甲苯胺蓝染液染色 10 min, 蒸馏水漂洗至骨片不再掉色, 显微镜下观察并拍照, 用 Image J 软件计算骨吸收面积。

2.7 破骨细胞骨吸收相关蛋白表达的分析

将生长状态良好的 BMMs 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 细胞贴壁后用含 30 ng/mL M-CSF、50 ng/mL sRANKL 以及 10 $\mu\text{mol/L}$ 升麻三萜皂苷(阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境下预处理细胞 0、5、15、30、60 h, 另设置对照组

(加入含 30 ng/mL M-CSF、50 ng/mL sRANKL 的完全培养基)。弃去培养基, PBS 洗涤 2 次, 用细胞裂解液冰上裂解 30 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5%胎牛血清封闭后, 分别加入 GAPDH 抗体和破骨细胞相关蛋白抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加入相应二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 用 MONAD Quick Chemi 5100 化学发光成像系统分析条带。

2.8 基于网络药理学的升麻三萜皂苷抑制破骨细胞活性的机制预测

将在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中收集得到的升麻三萜皂苷类成分阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇的化学结构式, 导入 pharmpmapper (<http://lilabecust.cn/pharmpmapper/index.html>) (Norm Fit > 0.7) 及 swisstargetprediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) (Probability > 0) 中, 收集得到相关靶基因。以“osteoclast”为关键词在 Genecards (<https://www.genecards.org/>) 数据库中以 Relevance > 2 为阈值, 得到 326 个相关靶点, 在 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库中收集得到 10 个破骨细胞相关靶点。将升麻三萜皂苷相关靶点和上述破骨细胞相关靶点取交集, 获得升麻三萜皂苷调控破骨细胞形成分化的潜在靶点。将上述交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://www.string-db.org/>) Version 12.0, 设置参数“multiple protein”, 物种“Homo sapiens”, 分析蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI), 并运用 Cytoscape 3.7.1 软件将结果可视化。基于 DAVID 6.8 数据库对升麻三萜皂苷-破骨细胞交集靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。以基因数排序, 获得升麻三萜皂苷调控破骨细胞形成分化的关键生物功能及信号通路。

2.9 升麻三萜皂苷调控破骨细胞形成分化关键靶点验证

2.9.1 分子对接分析 从 PDB 蛋白质数据库中获得丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路关键靶点的 3D 结构, MAPK8 (JNK, PDB ID: 3PZE)、MAPK14 (p38, PDB ID: 1OUY)、MAPK1 (ERK2, PDB ID: 1PME) 和 MAPK3 (ERK1, PDB ID: 2ZOQ)。应用 AutoDockTools (AutoDockTools, version 1.5.7, Scripps Research, San

Diego, CA, USA) 对蛋白质进行预处理, 去除配合物中的溶剂和原始配体。从 PubChem 平台获取化合物分子结构, 通过 PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) 分析阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇与配体的相互作用。

2.9.2 破骨细胞关键信号通路蛋白表达的分析
将生长状态良好的 BMMs 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 细胞贴壁后用 30 ng/mL M-CSF 和 50 ng/mL sRANKL 诱导 48 h, 再以 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的阿克特素于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境下预处理细胞 48 h, 另设置对照组 (加入含 30 ng/mL M-CSF、50 ng/mL sRANKL 的完全培养基)。弃去培养基, PBS 洗涤 2 次, 细胞裂解液冰上裂解 30 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min。吸取上清, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5% 胎牛血

清封闭后, 分别加入 β -actin 抗体和 MAPK 信号通路相关蛋白抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加入相应二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 用 MONAD Quick Chemi 5100 化学发光成像系统分析条带。

2.10 统计学分析

使用 Graphpad Prism 8.0.2 软件进行数据处理并分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 选用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 以及 Student's test 进行分析。

3 结果

3.1 升麻三萜皂苷对 BMMs 活性的影响

如图 2 所示, 3 种升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇在 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 均对 BMMs 的增殖没有明显的影响。因此, 后续研究选择 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇处理破骨细胞, 观察其对破骨细胞形成分化和骨吸收作用的影响。

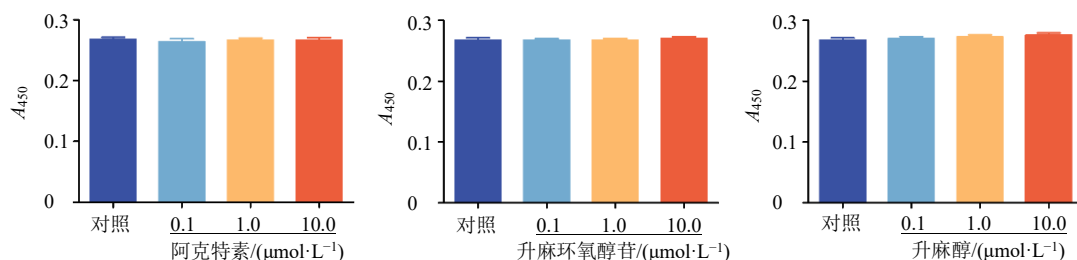


图 2 升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇对 BMMs 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of *C. triterpene* saponins actein, cimigenoside and cimigenol on viability of BMMs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 升麻三萜皂苷对破骨细胞形成分化和 TRAP 活性的影响

BMMs 为骨髓巨噬细胞, 在 M-CSF 和 RANKL 的诱导下分化为破骨细胞, 细胞呈梭形、三角形及煎蛋样, 具有伪足、多个细胞核, TRAP 染色为阳性。如图 3 所示, 升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇在 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下使破骨细胞的伪足缺失, TRAP 染色阳性细胞的数目显著减少, 破骨细胞 TRAP 活性显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇能够显著抑制破骨细胞的形成和分化。

3.3 升麻三萜皂苷对破骨细胞 F-actin 环的影响

F-actin 环是破骨细胞进行骨吸收重要结构, 其完整性和厚度可表征破骨细胞的骨吸收活性。如图 4 所示, 在 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇处理下, 破骨细胞 F-actin 环的厚度变薄, 缺损, 连续性缺失, 表明阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇均可抑制破骨细胞 F-actin 环的

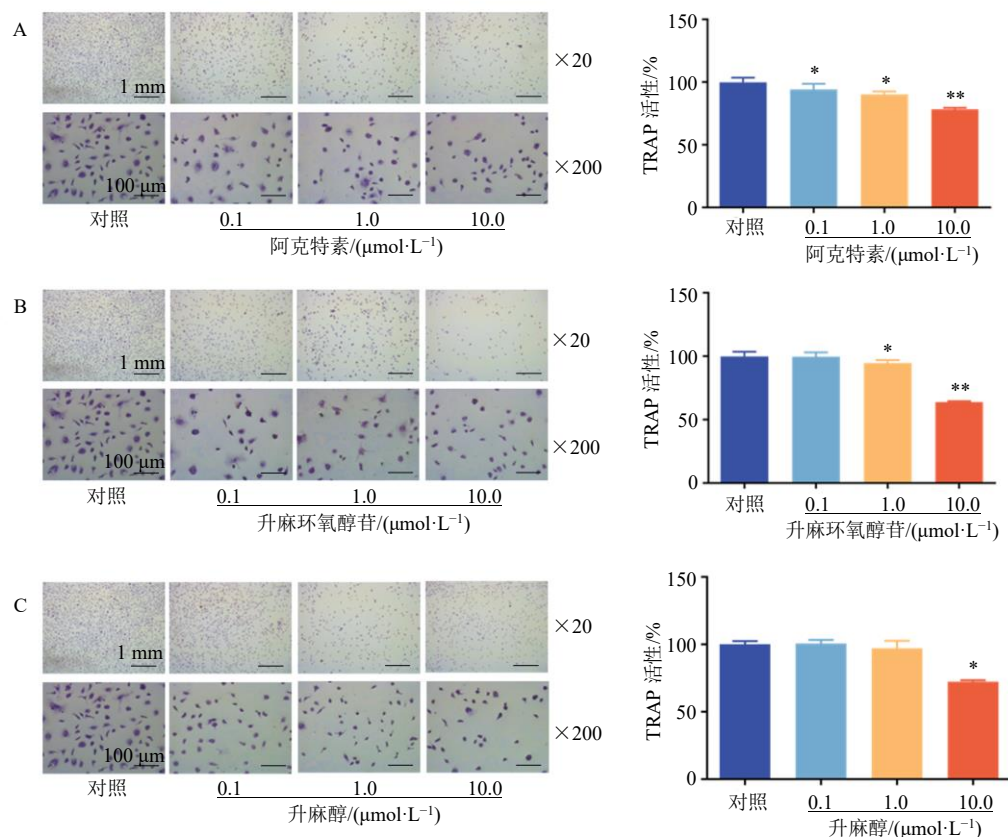
形成。

3.4 升麻三萜皂苷对破骨细胞骨吸收功能的影响

破骨细胞通过分泌基质降解酶, 降解骨基质, 在共培养的骨片上形成吸收陷窝, 吸收陷窝的数目和面积可反映破骨细胞的骨吸收能力。如图 5 所示, 阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇在 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下均能减少破骨细胞在骨片上形成的吸收陷窝的数目和面积 ($P < 0.01$), 显示出确切的抑制骨吸收作用。

3.5 升麻三萜皂苷对破骨细胞骨吸收相关蛋白表达的影响

破骨细胞在转录因子 NFATc1 及 c-Fos 的调控下产生 MMP9 及 CTSK 进行骨吸收。如图 6 所示, 阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下显著抑制 NFATc1、MMP9、c-Fos 以及 CTSK 的表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 进一步明确了升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇对破骨细胞形成分化的抑制作用。



与对照组 (RANKL) 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group (RANKL), same as below figures.

图 3 升麻三萜皂苷阿克特素 (A)、升麻环氧醇苷 (B)、升麻醇 (C) 对 BMMs 诱导的破骨细胞形成分化和 TRAP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of *C. triterpene saponins* actein (A), cimigenoside (B) and cimigenol (C) on formation and differentiation and activities of TRAP in osteoclasts derived from BMMs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

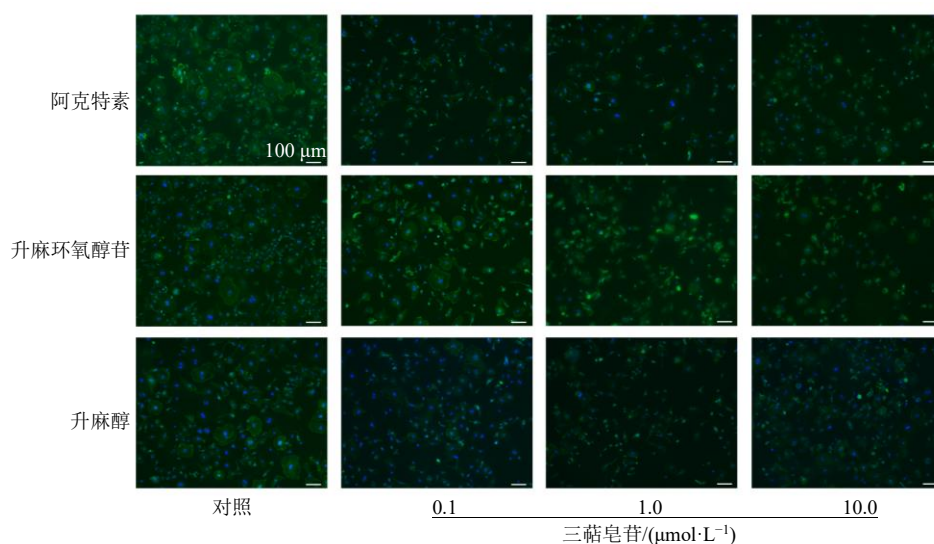
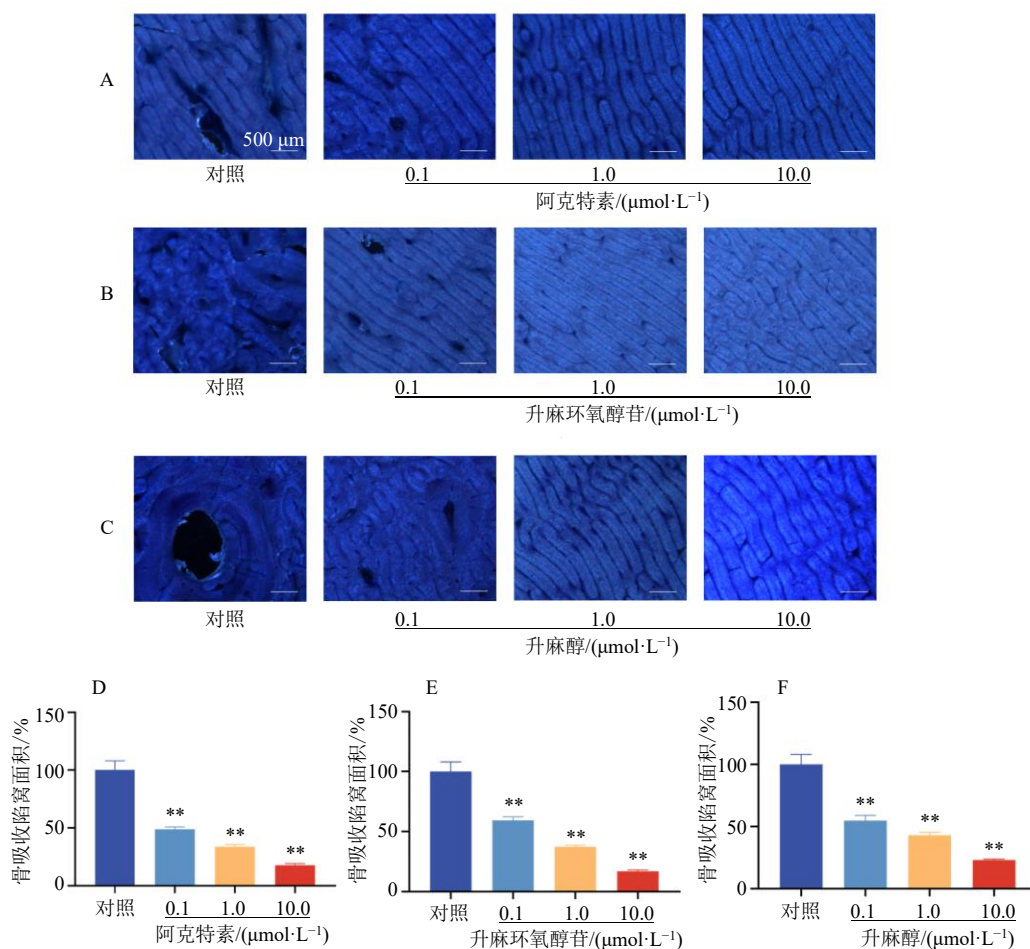


图 4 升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇对 BMMs 诱导的破骨细胞 F-actin 环形成的影响 ($\times 100$)

Fig. 4 Effects of *C. triterpene saponins* actein, cimigenoside and cimigenol on formation of F-actin ring in osteoclasts derived from BMMs ($\times 100$)



A~C-代表性的骨吸收陷窝染色图 ($\times 100$); D~F-定量分析骨吸收陷窝面积。

A~C-representative images of bone resorption lacunae ($\times 100$); D~F-quantification of bone resorption lacunae area.

图 5 升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇对 BMMs 诱导的破骨细胞骨吸收功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of *C. triterpene saponins* actein, cimigenoside and cimigenol on bone resorption function in osteoclasts derived from BMMs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 网络药理学研究

应用网络药理学研究策略, 收集得到升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇的相关靶点 146 个, 破骨细胞相关靶点 332 个, 最终得到升麻三萜皂苷调控破骨细胞形成分化的潜在靶点 22 个 (图 7-A)。通过 PPI 分析, 筛选得到度值、接近中心度和介度中心度 3 个值均大于中位数的升麻三萜皂苷调控破骨细胞功能的重要靶点为表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、非受体酪氨酸激酶 SRC、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, CASP3)、MAPK1、CTSK、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPARG)、雌激素受体 α (estrogen receptor 1, ESR1)、成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2)、MAPK8、

MAPK14、MMP3 (图 7-B)。运用 DAVID6.8 数据库对 22 个交集基因进行 GO 和 KEGG 分析, 其中 GO 分析发现升麻三萜皂苷在抑制破骨细胞活性中涉及凋亡过程的正调控、蛋白水解、胶原蛋白分解代谢、基因表达的正向调控、细胞对活性氧的反应等生物过程; 细胞成分涉及细胞外区域、胞质、溶酶体等; 分子功能涉及蛋白磷酸酶结合、丝裂原活化蛋白激酶和丝裂原活化蛋白激酶激酶活性等 (图 7-C)。以基因数 > 6 为阈值筛选 KEGG 通路富集分析结果, 得到 9 条潜在信号通路, 涉及白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 信号通路、脂质与动脉粥样硬化信号通路、MAPK 信号通路 (图 7-D), 并与 PPI 分析得到的重要靶点构建“潜在信号通路-重要靶点”网络, 分析得到升麻三萜皂

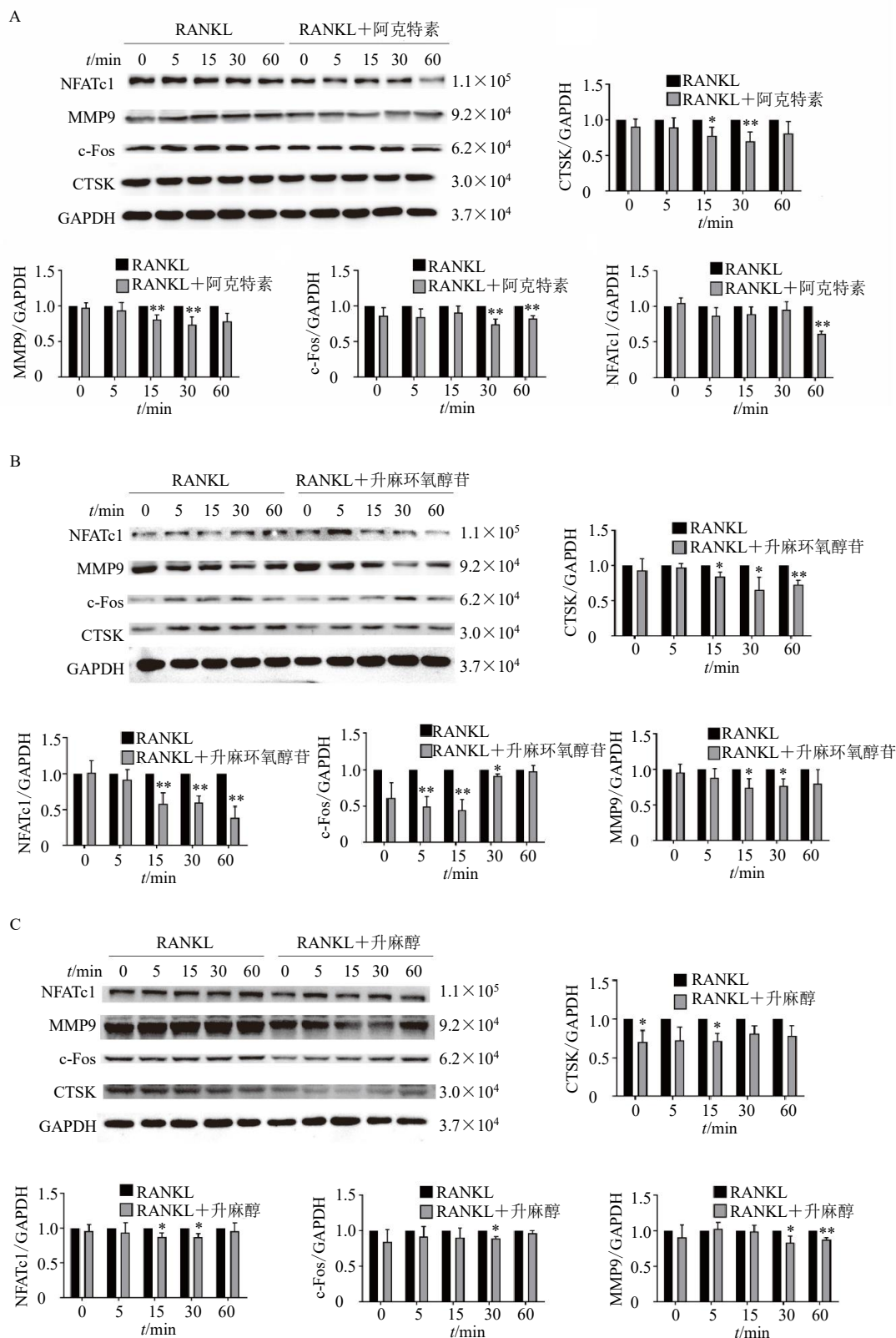
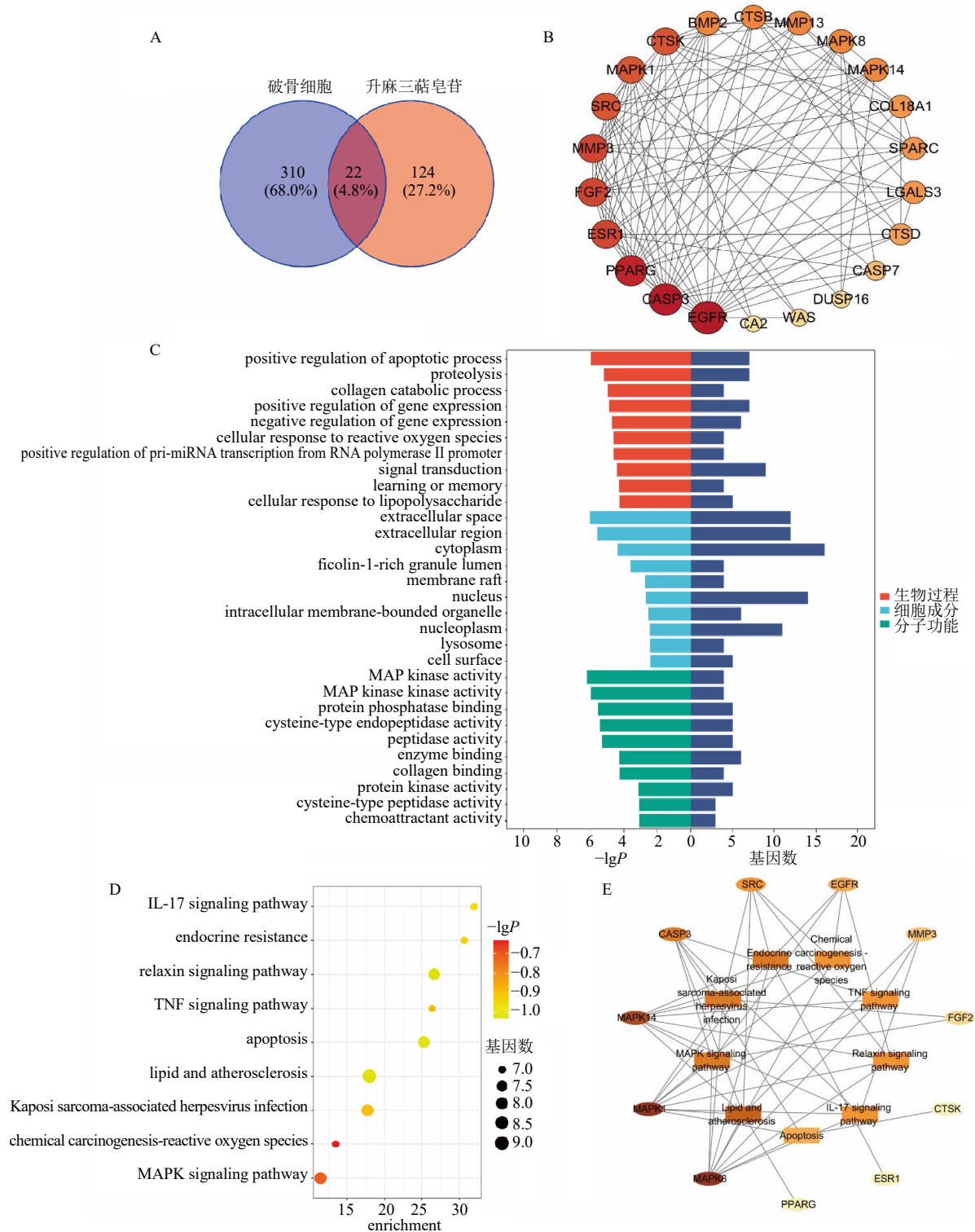


图 6 升麻三萜皂苷阿克特素 (A)、升麻环乙醇苷 (B)、升麻醇 (C) 对 BMMs 诱导的破骨细胞骨吸收蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of *C. triterpene saponins* actein (A), cimigenoside (B) and cimigenol (C) on expressions of bone resorption-associated proteins in osteoclasts derived from BMMs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-升麻三萜皂苷-破骨细胞交集靶点的韦恩图; B-升麻三萜皂苷-破骨细胞交集靶点的 PPI 网络; C-升麻三萜皂苷-破骨细胞交集靶点的 GO 功能富集分析; D-升麻三萜皂苷-破骨细胞交集靶点的 KEGG 通路富集分析; E-“潜在信号通路-重要靶点”网络。

A-Venn diagram of *C. triterpene saponins*-osteoclast intersection targets; B-PPI network of *C. triterpene saponins*-osteoclast intersection target; C-GO function enrichment analysis of *C. triterpene saponins*-osteoclast intersection targets; D-KEGG pathway enrichment analysis of *C. triterpene saponins*-osteoclast intersection targets; E-“potential signaling pathways-important targets” network.

图 7 网络药理学预测升麻三萜皂苷调控破骨细胞形成分化的机制与靶点

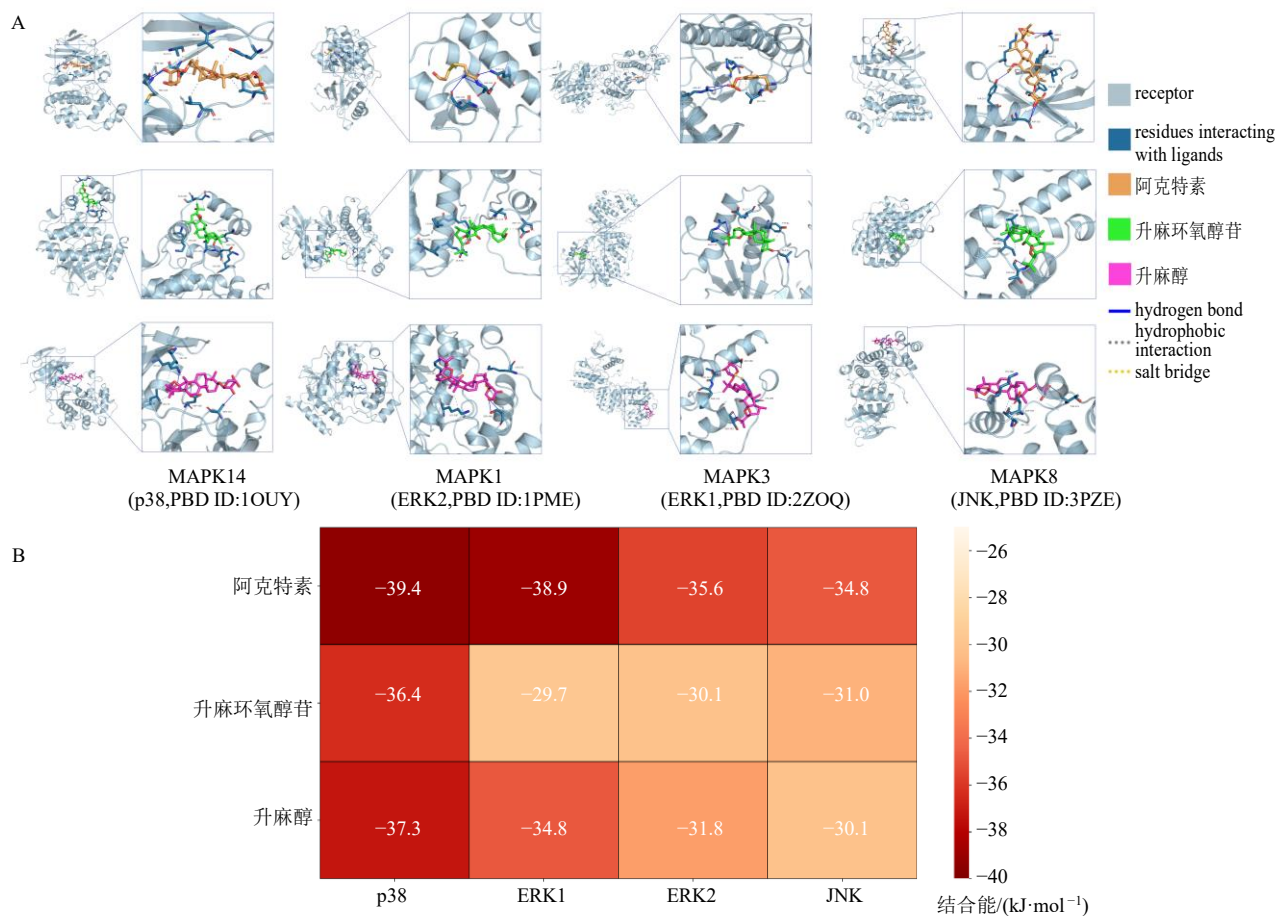
Fig. 7 Prediction of mechanism and target of *C. triterpene saponins* on regulating osteoclast formation and differentiation by network pharmacology

昔调控破骨细胞形成分化的关键靶点为 MAPK1、MAPK8、MAPK14，关键通路为 MAPK 信号通路（图 7-E）。

3.7 分子对接及对 MAPK 关键蛋白表达的分析

3.7.1 分子对接分析 将升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇与“3.6”项下得到的关键靶点 MAPK14、MAPK1、MAPK3 和 MAPK8 进行分子对接分析，可视化后发现升麻三萜皂苷主要通过

氢键和疏水作用与 MAPK 通路关键蛋白结合（图 8-A）。阿克特素与关键靶点的结合能为 $-39.4 \sim -34.8$ kJ/mol，升麻醇与关键靶点的结合能为 $-36.4 \sim -29.7$ kJ/mol，升麻环氧醇苷与关键靶点的结合能为 $-37.3 \sim -30.1$ kJ/mol，表明升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇均与 MAPK14、MAPK1、MAPK3 和 MAPK8 靶点具有良好的结合特性（图 8-B）。



A-升麻三萜皂苷与 MAPK 信号通路关键蛋白的对接模拟；B-升麻三萜皂苷与 MAPK 信号通路关键蛋白的对接分数矩阵热图。

A-simulation of docking between C. triterpene saponins and key proteins in MAPK signaling pathway; B-docking fraction matrix heat map of C. triterpene saponins and key proteins in MAPK signaling pathway.

图 8 升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇与 MAPK 信号通路关键蛋白的分子对接结果

Fig. 8 Results of molecular docking between C. triterpene saponins actein, cimigenoside and cimigenol and key proteins of MAPK signaling pathway

3.7.2 对破骨细胞 MAPK 通路关键蛋白表达的影响 MAPK 信号通路相关的蛋白激酶如 ERK、JNK 和 p38 在破骨细胞形成中发挥重要作用。如图 9 所示，升麻三萜皂苷阿克特素在 10 μ mol/L 浓度下可显著抑制 p-p38、p-ERK、p-JNK 的蛋白表达 ($P < 0.01$)，进一步明确了升麻三萜皂苷阿克特素通过 MAPK 信号通路抑制破骨细胞形成分化的作用

机制。

4 讨论

破骨细胞为从骨髓巨噬细胞分化的，唯一具有骨吸收功能的细胞。破骨细胞活性增强，骨吸收大于骨形成，骨重建的平衡破坏，导致骨量减少和骨质疏松症的发生^[9-10]。破骨细胞的典型特征为分泌 TRAP 和形成 F-actin 进行骨吸收。TRAP 是由破骨

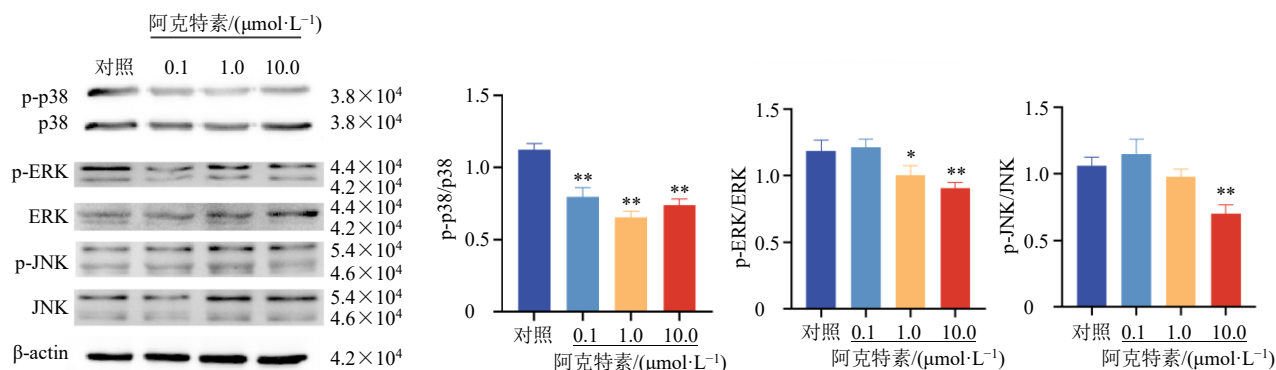


图 9 升麻三萜皂苷阿克特素对 BMMs 诱导的破骨细胞 MAPK 信号通路的调控作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Regulatory effects of *C. triterpene saponins* actein on MAPK signaling pathway of osteoclast derived from BMMs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞分泌的酸性磷酸酶，具有溶解骨矿化基质的作用，是破骨细胞分化成熟的特异性标志酶^[11]。F-actin 环是破骨细胞特有的进行骨吸收的细胞骨架蛋白，是破骨细胞附着于骨基质表面的重要结构^[12]。培养的破骨细胞通过骨吸收，可在共培养的骨片上形成骨吸收陷窝，其数目和面积常用于表征破骨细胞的骨吸收活性。本研究以 RANKL 及 M-CSF 诱导 BMMs 形成的破骨细胞为模型，观察升麻三萜皂苷对破骨细胞形成、分化和骨吸收的作用，结果表明升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇可显著抑制 RANKL 诱导的破骨细胞 TRAP 活性，减少 TRAP 染色阳性的破骨细胞的数目，抑制 F-actin 环的构建，降低破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝的数目和面积，显示出了确切的抑制破骨细胞骨吸收的作用。

破骨细胞由骨髓巨噬细胞分化形成的过程中，受 c-Fos 和 NFATc1 的调控^[13]。c-Fos 是破骨细胞分化早期所必需的激活蛋白-1 家族的关键转录因子，可诱导破骨细胞 NFATc1 的表达，调控前破骨细胞最终分化为成熟破骨细胞^[14]。NFATc1 参与调控破骨细胞特异性基因 *TRAP*、*CTSK*、树突状细胞特异性跨膜蛋白（dendritic cell-specific transmembrane protein, *DC-STAMP*）和降钙素受体（calcitonin receptor, *CTR*）等的表达，刺激破骨细胞的形成、分化和骨吸收^[15-16]。升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇能够抑制破骨细胞转录因子 NFATc1 和 C-fos 的表达，抑制破骨细胞的形成分化。CTSK 是破骨细胞分泌的胶原降解酶，可降解骨基质中的胶原纤维^[17]。MMP9 也是破骨细胞产生的参与骨基质胶原降解的蛋白酶^[18]。升麻三萜皂苷

阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇可显著抑制破骨细胞 MMP9 和 CTSK 的表达，进一步明确了其对破骨细胞骨吸收的抑制作用。

网络药理学是预测中药活性成分作用靶点及机制的重要手段^[19-20]。本研究应用网络药理学预测了升麻三萜皂苷抑制破骨细胞骨吸收的潜在靶点和机制。KEGG 分析显示升麻三萜皂苷可能通过调控 IL-17、TNF- α 、脂质和动脉粥样硬化、MAPK 信号通路发挥抑制破骨细胞功能的作用。IL-17 和 TNF- α 通路是机体调节炎症的重要机制^[21]。衰老和雌激素缺失导致炎症细胞因子水平升高，抑制成骨细胞的骨形成，增加破骨细胞的骨吸收，导致骨量减少和骨质疏松症的发生^[22]。升麻三萜皂苷参与 IL-17 和 TNF- α 通路的调控，表明其可能通过抑制炎症发挥抗骨质疏松的作用。

升麻三萜皂苷也可能参与脂质和动脉粥样硬化通路的调控。骨髓间充质干细胞在向成骨细胞分化的过程中，成脂和成骨分化程序具有竞争性平衡，促进脂肪生成的机制会主动抑制成骨细胞的形成与分化^[23]。骨髓脂肪细胞可通过分泌破骨细胞活化因子促进破骨细胞的形成、分化和骨吸收作用^[24]。绝经后骨质疏松患者存在骨量减少、成骨细胞的数量和功能下降、骨髓脂肪增加等现象，表明脂肪细胞的分化可能会影响成骨细胞或破骨细胞的形成分化^[25]。因此，升麻三萜皂苷也可能通过抑制骨髓基质干细胞向脂肪细胞的分化，增加成骨细胞的骨形成、抑制破骨细胞的骨吸收，发挥抗骨质疏松的作用。

MAPK 是 RANKL/RANK/TRAF6 信号传导下游的一条通路^[26]，RANKL 与 RANK 的结合导致 MAPK 的 p38、JNK 和 ERK 磷酸化，诱导破骨细胞

的形成分化^[27]。p38 MAPK-环磷腺苷效应元件结合蛋白 (adenosine cyclophosphate-response element binding protein, CREB) 通路在 RANKL 介导的破骨细胞分化中发挥重要作用, p38 MAPK 抑制剂可抑制 TNF- α 或 RANKL, 通过 CREB 磷酸化调节 c-Fos 和 NFATc1 的表达, 抑制破骨细胞的形成分化^[28]。p38 可刺激破骨细胞成熟所必需的小眼相关转录因子 (microphthalmia-associated transcription factor, MITF) 的下游激活, 调控破骨细胞 TRAP 和 CTSK 的基因表达^[29]和骨吸收。ERK 激活是成熟破骨细胞存活的关键^[30], M-CSF 刺激的 ERK1 和 ERK2 激活, 直接磷酸化 MITF^[31], 影响破骨细胞的骨吸收活性。RANKL 诱导破骨前细胞 ERK 的激活, 通过 TRAF6 诱导 MMP9 的表达和活性, 调节破骨细胞迁移和骨吸收^[32]。JNK 的激活参与破骨细胞的分化、融合和骨吸收的调节, 也通过 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 通路调节破骨细胞的凋亡和自噬^[33]。在破骨细胞融合前阶段阻断 JNK 活性会导致 TRAP 阳性细胞 (代表融合前阶段的破骨细胞) 逆转为 TRAP 阴性细胞 (代表破骨细胞前体)^[34]。本研究发现升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇与 ERK1/ERK2、JNK、p38 均有较好的结合特性, 可显著抑制 RANKL 和 M-CSF 诱导 BMMs 分化的破骨细胞 p38、JNK 和 ERK 的磷酸化和激活, 进一步明确了升麻三萜皂苷通过 MAPK 通路抑制破骨细胞的形成分化和骨吸收的作用机制。

三萜皂苷是升麻属植物的特征性化学成分, 目前已从升麻属多种植物中分离鉴定了 400 余个三萜皂苷类成分, 其中 44 个化合物显示出抗骨质疏松、抗肿瘤、抗炎、抗氧化及免疫调节等多种生物活性^[35]。本研究考察了升麻三萜皂苷阿克特素、升麻环氧醇苷、升麻醇抑制破骨细胞骨吸收的作用, 并通过网络药理学预测了其作用机制。后续还应该深入研究这些化合物抑制破骨细胞活性的靶点及对成骨细胞的作用及机制, 为其临床用于骨质疏松症的防治奠定基础。另外, 鉴于升麻属植物含有结构多样的三萜皂苷类成分, 应采用现代化学生物学的思路和方法, 研究升麻三萜皂苷抗骨质疏松的作用靶点、构效关系及深入的机制, 为抗骨质疏松新药的研发提供先导化合物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Suzuki A, Minamide M, Iwaya C, et al. Role of

metabolism in bone development and homeostasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 8992.

[2] Takegahara N, Kim H, Choi Y. Unraveling the intricacies of osteoclast differentiation and maturation: Insight into novel therapeutic strategies for bone-destructive diseases [J]. *Exp Mol Med*, 2024, 56(2): 264-272.

[3] Zhang Y N, Nong H B, Bai Y G, et al. Conditional knockout of PDK1 in osteoclasts suppressed osteoclastogenesis and ameliorated prostate cancer-induced osteolysis in murine model [J]. *Eur J Med Res*, 2023, 28(1): 433.

[4] Miao L Y, Chu T T H, Li P, et al. *Cimicifuga heracleifolia* is therapeutically similar to black cohosh in relieving menopausal symptoms: Evidence from pharmacological and metabolomics studies [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(6): 435-445.

[5] Qin Z Y, Dong Z Y, Liu J L, et al. A preliminary study on the effects of black cohosh preparations on bone metabolism of rat models with GnRH-a-induced perimenopausal symptoms [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 854345.

[6] Fatima S, Verma M, Ansari I A. Phytochemistry and ethnopharmacological studies of genus *Cimicifuga*: A systematic and comprehensive review [J]. *Fitoterapia*, 2024, 172: 105767.

[7] 赵子慧, 胡思婧, 陈高策, 等. 基于大麻素 2 型受体和雌激素受体 α 研究升麻和黑升麻含药血清对成骨细胞功能的影响 [J]. *中草药*, 2023, 54(18): 5941-5951.

[8] Li J X, Liu J, He C C, et al. Triterpenoids from *Cimicifugae Rhizoma*, a novel class of inhibitors on bone resorption and ovariectomy-induced bone loss [J]. *Maturitas*, 2007, 58(1): 59-69.

[9] Ledesma-Colunga M G, Passin V, Lademann F, et al. Novel insights into osteoclast energy metabolism [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2023, 21(6): 660-669.

[10] 王龙飞, 高玉海, 谢高倩, 等. 槲皮素改善骨质疏松的作用机制研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(3): 714-718.

[11] Kim J M, Erkhembatar M, Lee G S, et al. *Peucedanum japonicum* Thunb. ethanol extract suppresses RANKL-mediated osteoclastogenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 410-416.

[12] Chen H L, Shen G Y, Shang Q, et al. *Plastrum testudinis* extract suppresses osteoclast differentiation via the NF- κ B signaling pathway and ameliorates senile osteoporosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276: 114195.

[13] Jiang T, Xia T S, Qiao F L, et al. Role and regulation of transcription factors in osteoclastogenesis [J]. *Int J Mol*

- Sci, 2023, 24(22): 16175.
- [14] Jang H Y, Lee H S, Noh E M, *et al.* Aqueous extract of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation by suppressing the c-fos/NFATc1 pathway [J]. *Arch Oral Biol*, 2021, 122: 105029.
- [15] Chen C M, Xiao L X, Luo X W, *et al.* Identifying marine-derived tanzawaic acid derivatives as novel inhibitors against osteoclastogenesis and osteoporosis via downregulation of NF- κ B and NFATc1 activation [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(4): 2602-2618.
- [16] Xu Q, Cao Z Y, Xu J Q, *et al.* Effects and mechanisms of natural plant active compounds for the treatment of osteoclast-mediated bone destructive diseases [J]. *J Drug Target*, 2022, 30(4): 394-412.
- [17] Zhu G C, Chen W, Tang C Y, *et al.* Knockout and double knockout of cathepsin K and Mmp9 reveals a novel function of cathepsin K as a regulator of osteoclast gene expression and bone homeostasis [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(14): 5522-5538.
- [18] He Y Q, Zhang Q, Shen Y, *et al.* Rubiadin-1-methyl ether from *Morinda officinalis* How. inhibits osteoclastogenesis through blocking RANKL-induced NF- κ B pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(4): 927-931.
- [19] Lv S, Wang Q, Zhang X L, *et al.* Mechanisms of multi-omics and network pharmacology to explain traditional Chinese medicine for vascular cognitive impairment: A narrative review [J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155231.
- [20] 赵少磊, 原震, 朱艳茹, 等. 基于网络药理学和分子对接探究地骨皮调血脂的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1487-1497.
- [21] Richter P, Macovei L A, Mihai I R, *et al.* Cytokines in systemic lupus erythematosus-focus on TNF- α and IL-17 [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 14413.
- [22] Zhivodernikov I V, Kirichenko T V, Markina Y V, *et al.* Molecular and cellular mechanisms of osteoporosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(21): 15772.
- [23] Kim J M, Lin C J, Stavre Z, *et al.* Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis [J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2073.
- [24] Li J, Lu L Y, Liu L, *et al.* The unique role of bone marrow adipose tissue in ovariectomy-induced bone loss in mice [J]. *Endocrine*, 2024, 83(1): 77-91.
- [25] Hu L F, Yin C, Zhao F, *et al.* Mesenchymal stem cells: Cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 360.
- [26] Iantomasi T, Romagnoli C, Palmini G, *et al.* Oxidative stress and inflammation in osteoporosis: Molecular mechanisms involved and the relationship with microRNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3772.
- [27] Fang C H, He M L, Li D, *et al.* YTHDF2 mediates LPS-induced osteoclastogenesis and inflammatory response via the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Cell Signal*, 2021, 85: 110060.
- [28] Lv W T, Du D H, Gao R J, *et al.* Regulation of hedgehog signaling offers A novel perspective for bone homeostasis disorder treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16): 3981.
- [29] Jie Z W, Wang S Y, Ma Q L, *et al.* Pexmetinib suppresses osteoclast formation and breast cancer induced osteolysis via P38/STAT3 signal pathway [J]. *J Bone Oncol*, 2022, 35: 100439.
- [30] Lee K, Seo I, Choi M H, *et al.* Roles of mitogen-activated protein kinases in osteoclast biology [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 3004.
- [31] Weilbaecher K N, Motyckova G, Huber W E, *et al.* Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice [J]. *Mol Cell*, 2001, 8(4): 749-758.
- [32] Engsig M T, Chen Q J, Vu T H, *et al.* Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(4): 879-889.
- [33] Zhu C Y, Shen S W, Zhang S H, *et al.* Autophagy in bone remodeling: A regulator of oxidative stress [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 898634.
- [34] Chang E J, Ha J, Huang H, *et al.* The JNK-dependent CaMK pathway restrains the reversion of committed cells during osteoclast differentiation [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 15): 2555-2564.
- [35] Guo Y, Yin T, Wang X, *et al.* Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of the genus *Cimicifuga*: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 209: 264-282.

[责任编辑 李亚楠]