

# 川陈皮素对创伤性骨折大鼠骨折愈合的影响

黄拯 邓明涛\* 叶丹丹

(成都八一骨科医院骨科, 成都 610000)

**摘要** 该文旨在探究川陈皮素是否通过调节缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )/基质细胞衍生因子-1(SDF-1)/C-X-C趋化因子受体4(CXCR4)影响大鼠创伤性骨折的骨愈合。建立大鼠创伤性骨折模型,造模后将大鼠随机分为模型组、川陈皮素低剂量(10 mg/kg)组、川陈皮素高剂量(30 mg/kg)组、川陈皮素高剂量+PX-478(30 mg/kg NOB+5 mg/kg PX-478)组,另取12只大鼠为对照组。药物干预后取材,微计算机断层扫描检测大鼠骨小梁密度和厚度及骨体积分数;番红O固绿染色观察大鼠周围软骨组织病理学变化;ELISA法检测大鼠血清中骨钙素(BGP)、碱性磷酸酶(ALP)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平;qPCR检测大鼠股骨组织HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA水平;Western blot和免疫组化检测大鼠股骨组织HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4蛋白表达水平。分离大鼠成骨细胞,将其分为空白组、川陈皮素低(10  $\mu$ mol/L)、高浓度组(20  $\mu$ mol/L)和川陈皮素高浓度+PX-478组(20  $\mu$ mol/L 川陈皮素+25  $\mu$ mol/L PX-478),使用BCIP/NBT ALP染色试剂盒检测成骨细胞ALP活性,采用ELISA法检测成骨细胞I型胶原(COL-I)、增殖细胞核抗原(PCNA)水平,采用qPCR和Western blot检测成骨细胞HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4表达水平。结果显示,对照组大鼠周围软骨组织无异常变化,模型组大鼠周围软骨组织严重受损,骨小梁密度和厚度及骨体积分数、血清中BGP、ALP水平显著降低( $P<0.05$ ),IL-6、TNF- $\alpha$ 水平显著升高( $P<0.05$ ),股骨组织中HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA水平和蛋白水平均显著降低( $P<0.05$ );与模型组相比,川陈皮素处理组大鼠周围软骨组织病理损伤有所改善,骨小梁密度和厚度及骨体积分数、血清中BGP、ALP水平均显著升高( $P<0.05$ ),血清IL-6、TNF- $\alpha$ 水平显著降低( $P<0.05$ ),骨组织中HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA水平和蛋白水平均显著升高( $P<0.05$ ),且高剂量组作用更强( $P<0.05$ );HIF-1 $\alpha$ 抑制剂PX-478可逆转川陈皮素对创伤性骨折大鼠的治疗作用( $P<0.05$ )。与空白组相比,川陈皮素低、高浓度组成骨细胞PCNA、ALP、COL-I水平,及HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA水平和蛋白水平均显著增高( $P<0.05$ );与川陈皮素高浓度组相比,川陈皮素高浓度+PX-478组成骨细胞PCNA、ALP、COL-I水平及HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA水平和蛋白水平均显著下降( $P<0.05$ )。以上结果表明,川陈皮素可能通过激活HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4信号通路,促进成骨细胞增殖和分化,减轻创伤性骨折大鼠的病理损伤和炎症反应,促进大鼠骨折愈合。

**关键词** 川陈皮素; 创伤性骨折; 骨愈合; HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4信号通路

## Effect of Nobiletin on Fracture Healing in Traumatic Fracture Rats

HUANG Zheng, DENG Mingtao\*, YE Dandan

(Orthopedics, Chengdu Bayi Orthopedic Hospital, Chengdu 610000, China)

**Abstract** This article aims to investigate whether nobiletin affects bone healing in traumatic fractures in rats by regulating HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ )/SDF-1 (stromal cell derived factor 1)/CXCR4 (C-X-C che-

收稿日期: 2025-01-13

接受日期: 2025-03-10

四川省卫生健康委员会科研项目(批准号: 19PJ035)资助的课题

\*通信作者。Tel: 15884476537, E-mail: 1019932502@qq.com

Received: January 13, 2025

Accepted: March 10, 2025

This work was supported by the Research Project of Sichuan Provincial Health Commission (Grant No.19PJ035)

\*Corresponding author. Tel: +86-15884476537, E-mail: 1019932502@qq.com

mokine receptor 4). The model of traumatic fracture in rats was established. After modeling, the rats were randomly divided into model group, a low-dose nobiletin (10 mg/kg) group, a high-dose nobiletin (30 mg/kg) group, and a high-dose nobiletin+PX-478 (30 mg/kg NOB+5 mg/kg PX-478) group. Additionally, 12 rats were included as the control group. After drug intervention, samples were taken and microcomputed tomography was used to detect the density and thickness of rat bone trabeculae and bone volume fraction. Saffron O-green staining was applied to observe the pathological changes in the surrounding cartilage tissue of rats. ELISA method was applied to detect the levels of BGP (osteocalcin), ALP (alkaline phosphatase), IL-6 (interleukin-6), and TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) in rat serum. QPCR was applied to detect the mRNA levels of *HIF-1 $\alpha$* , *SDF-1*, and *CXCR4* in rat femoral tissue. Western blot was applied to detect the expression levels of HIF-1 $\alpha$ , SDF-1, and CXCR4 proteins in rat femoral tissue. Rat osteoblasts were separated and divided into blank group, low and high concentration nobiletin groups (10, 20  $\mu$ mol/L) and high concentration nobiletin+PQ-478 group (20  $\mu$ mol/L+25  $\mu$ mol/L PQ-478). BCIP/NBT ALP staining kit was used to detect the ALP activity of osteoblasts, and ELISA was used to detect the levels of COL-I and PCNA (proliferating cell nuclear antigen) of osteoblasts. The expression levels of HIF-1 $\alpha$ , SDF-1 and CXCR4 in osteoblasts were detected by qPCR and Western blot. Results show that there were no abnormal changes in the peripheral cartilage tissue of rats in the control group, while the peripheral cartilage tissue of the model group rats was severely damaged, the density and thickness of bone trabeculae, bone volume fraction, and the levels of BGP and ALP in serum were greatly lower ( $P<0.05$ ), the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  were greatly higher ( $P<0.05$ ), the mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , SDF-1, and CXCR4 in femoral tissue were greatly lower ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the nobiletin groups showed improvement in the pathological damage of peripheral cartilage tissue in rats, the density and thickness of bone trabeculae, bone volume fraction, and the levels of BGP and ALP in serum were greatly higher ( $P<0.05$ ), the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  were greatly lower ( $P<0.05$ ), the mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , SDF-1, and CXCR4 in femoral tissue were greatly higher ( $P<0.05$ ), and the high-dose nobiletin group had a stronger effect ( $P<0.05$ ). HIF-1 $\alpha$  inhibitor PX-478 could reverse the therapeutic effect of nobiletin on traumatic fracture rats ( $P<0.05$ ). Compared with blank group, PCNA, ALP and COL-I levels, HIF-1 $\alpha$ , SDF-1 and CXCR4 mRNA levels and protein levels of bone cells with low and high concentration of cephalin were significantly increased ( $P<0.05$ ). The levels of PCNA, ALP, COL-I, HIF-1 $\alpha$ , SDF-1 and CXCR4 mRNA and protein in bone cells composed of high concentration of cedrin+PX-478 were significantly decreased compared with cedrin high concentration group ( $P<0.05$ ). The above results indicate that nobiletin may alleviate pathological damage and inflammatory response in rats with traumatic fractures and promote fracture healing by activating the HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4 signaling pathway.

**Keywords** Nobiletin; traumatic fracture; fracture healing; HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4 signaling pathway

创伤性骨折, 作为外科领域中常见且日益增多的疾病, 其发病率紧密关联于交通、建筑及工业领域的快速发展。此类骨折不仅导致患者皮肤组织遭受严重损伤, 还常常引发肢体功能障碍, 显著降低患者生活质量。当前针对创伤性骨折的主要治疗方式是通过手术恢复骨折部位功能、缩短愈合时间及优化患者预后。然而, 术后康复过程往往漫长且伴随风险, 如骨不连等并发症时有发生<sup>[1-2]</sup>。幸运的是, 中药在促进骨折愈合领域展现出了独特的医学价值, 其合理应用能够显著改善患者骨密度, 加速骨折愈合进程, 并有效降低术后并发症的发生概率, 从而为

创伤性骨折的综合治疗策略提供创新思路与科学依据<sup>[3]</sup>。川陈皮素是一种具有多种药理作用的天然化合物, 主要存在于柑橘类水果[如川橘(*Citrus nobilis* Lour.)、酸橙(*C. aurantium* L.)和柑橘(*C. reticulata* Blanco)等]的果皮中, 通常以无色晶体或白色至浅黄色结晶性粉末的形式存在, 具有抗炎、抗氧化等多种生理活性<sup>[4]</sup>。已有研究显示, 川陈皮素可促进骨质疏松大鼠的骨折愈合<sup>[5]</sup>。另外, 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )可诱导血管和骨组织的形成, 成为治疗骨缺损等多种类型疾病的潜在候选者<sup>[6]</sup>。骨缺损区域组织基质细胞衍生

因子-1(stromal cell derived factor 1, SDF-1)高表达可激活C-X-C趋化因子受体4(C-X-C chemokine receptor 4, CXCR4), 促进PDSCSs的成骨分化<sup>[7]</sup>。但川陈皮素能否通过作用于HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4信号通路促进创伤性大鼠骨折愈合尚不明确。本实验旨在探究川陈皮素在促进创伤性骨折大鼠骨折愈合过程中的作用及其潜在的作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

72只7~8周龄, 体质量250~280 g的雄性SD大鼠购自上海吉辉实验动物饲养有限公司, 生产许可证号为SCXK(沪)2022-0009。于动物中心分笼适应饲养, 以国家标准啮齿类动物饲料饲养, 给予标准饮食、自由饮水, 分笼喂养, 室温(22.5~25.4) °C, 相对湿度50%~60%。本研究获得成都八一骨科医院动物伦理委员会批准(批准号: 202311023)。

### 1.2 试剂

川陈皮素(批号: SN8160, 纯度 $\geq$ 98%)和BCA蛋白定量试剂盒(货号: PC0020)购自北京索莱宝科技有限公司; HIF-1 $\alpha$ 抑制剂PX-478(货号: HY-10231)购自美国MCE公司; 骨钙素(BGP)检测试剂盒(货号: H152-1-2)、碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(货号: A059-2-2)、白细胞介素6(IL-6)检测试剂盒(货号: H007-1-1)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )检测试剂盒(货号: H052-1-2)均购自南京建成生物工程研究所; 番红O和固绿染料购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 抗体HIF-1 $\alpha$ (货号: ab1)、SDF-1(货号: ab155090)、CXCR4(货号: ab181020)、GAPDH(货号: ab9485)、羊抗鼠二抗(ab150113)均购自美国Abcam公司。CCK-8试剂盒(货号: 40203ES60)、Trizol试剂(货号: 19203ES)、cDNA逆转录试剂盒(货号: 11156ES10)和SYBR Premix EX Taq<sup>TM</sup>试剂盒(货号: 11211ES03)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; BCIP/NBT ALP染色试剂盒(货号: C3206)购自上海碧云天生物技术有限公司; I型胶原(COL-I) ELISA检测试剂盒(货号: E-EL-R3008)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 增殖细胞核抗原(PCNA) ELISA检测试剂盒(货号: ml003181)购自上海酶联生物技术有限公司。

### 1.3 仪器

SuPerMax3000FL多功能酶标仪购自上海闪谱

生物科技有限公司; RX50型光学显微镜均购自思科诺思生物科技(北京)有限公司; ChemiDocXRS+型凝胶成像系统购自美国ThermoFisher Scientific公司。

### 1.4 方法

1.4.1 构建创伤性骨折大鼠模型及分组 随机选取60只大鼠构建创伤性骨折大鼠模型<sup>[8]</sup>。利用闭合式股骨干骨折术构建创伤性骨折大鼠模型。方法: 大鼠腹腔注射40 mg/kg戊巴比妥钠麻醉, 随后对手术区域进行脱毛和彻底的消毒处理。接下来, 使用直径为1.0 mm的医用克氏针, 在左股骨的髁间窝位置垂直穿入髓腔, 并适当扩大针点以便插入。完成首次穿针后, 从对侧再次将克氏针插入髓腔中。之后, 拔出克氏针, 并在股骨中段以拇指为支撑点, 轻而缓慢地施加力量以造成骨折, 当感受到骨折发生时立即停止施力, 以避免骨折部位发生移位。随后, 将克氏针从最初的穿针点重新穿入, 直至其穿过骨折远端, 并剪去体外多余的部分, 确保针尾被妥善埋于皮下。最后, 对手术区域进行再次消毒, 并将大鼠安全地放回其笼中。将建模大鼠随机分为模型组、川陈皮素低剂量组、川陈皮素高剂量组、川陈皮素高剂量+PX-478组, 每组12只, 另外取12只未经任何处理的大鼠作为对照组。川陈皮素低、高剂量组分别灌胃10 mg/kg、30 mg/kg川陈皮素, 川陈皮素高剂量+PX-478组灌胃30 mg/kg川陈皮素和5 mg/kg PX-478, 模型组和对照组以同体积生理盐水灌胃, 给药均持续30天, 每天一次。

1.4.2 取材 大鼠给药30天后, 将各组大鼠进行麻醉处理, 通过主动脉采血的方式收集血清样本, 随后将这些样本放置于-80 °C的冰箱中进行冷冻保存, 以备后续实验使用。之后, 对大鼠实施安乐死处理, 并仔细分离出骨折周围的软骨组织, 将这些组织浸泡在4%的多聚甲醛溶液中进行室温固定, 以备后续制作成石蜡切片。同时, 另取部分骨折的股骨组织, 用于进一步的检测, 以评估大鼠的骨小梁密度和厚度。

1.4.3 大鼠骨小梁密度和厚度及骨体积分数检测 利用微计算机断层扫描仪扫描计算大鼠骨小梁密度和厚度及骨体积分数。

1.4.4 番红O固绿染色 利用番红O固绿染色法, 观察创伤性骨折大鼠周围软骨组织病理学变化。将1.4.2中固定的软骨组织, 在由低到高浓度(70% $\rightarrow$ 80% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 95% $\rightarrow$ 100%)的乙醇中进行脱水, 二甲苯中透明, 浸蜡后包埋成蜡

块进行切片,石蜡切片脱蜡后在由高到低浓度(100%→95%→80%→70%)的乙醇中复水,铁苏木素室温染色10 min,流水冲洗,固绿液室温染色5 min,醋酸液快速漂洗后用番红O室温染色5 min,蒸馏水冲洗,经过脱水、透明后封片。于光学显微镜下观察并随机选取5个视野进行拍照。

1.4.5 血清生化指标检测 取1.4.2中收集的血清,按照试剂盒说明书操作,利用酶标仪检测450 nm处的吸光度(D)值,依次测定BGP、ALP、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平。

1.4.6 细胞培养 1日龄大鼠颅骨无菌切开,胰酶处理后切碎,用0.2% I型胶原酶溶液消化。成骨细胞以 $2 \times 10^5$ 个细胞/25 cm<sup>2</sup>的密度接种于含有高葡萄糖、1%青霉素/链霉素和10%胎牛血清的完全培养基的培养瓶中。细胞培养条件为5% CO<sub>2</sub>、37 °C。每3天更换一次细胞培养基,去除未贴壁细胞。使用第3代的成骨细胞进行接下来的实验。

1.4.7 CCK-8实验 使用CCK-8确定实验给药剂量。将成骨细胞以 $5 \times 10^4$ 个/孔的密度接种于96孔板中,37 °C孵育24 h。试验组成骨细胞分别加入0、2.5、5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ 的川陈皮素<sup>[9]</sup>。药物干预后1、2、3天,将每孔中的培养基完全抽吸,每孔中加入培养基和CCK-8。孵育1 h后,在450 nm处用多功能酶标仪检测D值。

1.4.8 细胞分组及处理 将成骨细胞以 $2 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板中,37 °C孵育24 h,分为空白组、川陈皮素低(10  $\mu\text{mol/L}$ )、高浓度组(20  $\mu\text{mol/L}$ )和川陈皮素高浓度+PX-478组(20  $\mu\text{mol/L}$ 川陈皮素+25  $\mu\text{mol/L}$  PX-478<sup>[10]</sup>)。

1.4.9 ALP活性/染色实验 将成骨细胞以 $2 \times 10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板中,37 °C孵育24 h,并在含有不同浓度川陈皮素(30、60和90  $\mu\text{L/mL}$ )的培养基中培养。1、2、3、5天后,去除培养成骨细胞的6孔板培养基,洗涤并破坏成骨细胞。根据说明书使用BCIP/NBT ALP染色试剂盒检测ALP活性。在孔中加入ALP染色缓

冲液,用显微镜拍照并观察ALP染色情况。

1.4.10 细胞上清的生化评价 药物干预成骨细胞1、2、3、5天,抽吸上清,在4 °C下4 000 r/min离心5 min。将细胞上清小心收集到两根EP管中,避免反复冻融,-20 °C保存待检测。采用ELISA法检测体外培养成骨细胞上清液中PCNA和COL-I的含量。

1.4.11 qPCR检测大鼠股骨组织和成骨细胞HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA水平 取1.4.2中保存的股骨组织,研磨均浆后加入Trizol提取总RNA,逆转录为cDNA后使用SYBR Premix EX Taq<sup>TM</sup>试剂盒进行PCR扩增。PCR反应条件为95 °C预变性30 s;95 °C变性30 s,60 °C退火5 s,72 °C延伸15 s,循环39次。以GAPDH为内参,2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup> 法计算分析数据,结果以对照组作为参照进行归一化处理。PCR引物序列见表1。

1.4.12 Western blot检测大鼠股骨组织和成骨细胞HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4信号通路蛋白表达水平 取1.4.2中保存的股骨组织,用液氮研磨后加入细胞裂解液提取组织中的总蛋白,同时提取1.4.8细胞总蛋白,使用BCA蛋白测定试剂盒进行蛋白质定量分析,将蛋白样品置于12% SDS-PAGE凝胶电泳中分离蛋白,转膜后置于含5%脱脂奶粉的TBST溶液中室温封闭2 h,加入一抗HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4(1:1 000)于4 °C孵育过夜。TBST洗膜后加入含有辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)室温孵育2 h。利用ECL进行避光显影。ImageJ软件定量各蛋白灰度并计算其与内参GAPDH的比值,统计学分析可得各组蛋白相对表达。

1.4.13 免疫组化检测大鼠股骨组织HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4表达水平 取石蜡包埋切片装在载玻片上,脱蜡脱水。洗净后,将载玻片分别与HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4一抗在4 °C下孵育过夜。PBS洗涤后,载玻片与辣根过氧化物酶偶联二抗在37 °C下孵育60 min。然后用DAB染色,苏木精反染色。最后,使用显微镜捕获图像。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
Gene	Upstream sequence (5'→3')	Downstream sequence (5'→3')
HIF-1 $\alpha$	CUG AUA ACG UGA ACA AAU ATT	UAU UUG UUC ACG UUA UCA GTT
SDF-1	GCA TCA GTG ACG GTA AAC CA	TCT TCA GCC GTG CAA CAA TC
CXCR4	CTA AGG AGC ATG ACG GAC AA	ATT TCC CAA AGT ACC AGT CAG C
GAPDH	TGA CCT CAA CTA CAT GGT CTA CA	CTT CCC ATT CTC GGC CTT G

## 1.5 统计学分析

SPSS 19.0分析数据, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 描述, One-Way ANOVA评估多组间差异。P<0.05表示具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 川陈皮素对创伤性骨折大鼠骨小梁密度和厚度的影响

各组大鼠骨小梁密度、厚度检测结果如表2所示, 与对照组相比, 模型组大鼠骨小梁密度和厚度及骨体积分数降低(P<0.05); 与模型组比较, 川陈皮素低、高剂量组大鼠骨小梁密度和厚度及骨体积分数显著升高(P<0.05); 但川陈皮素高剂量+PX-478组大鼠骨小梁密度和厚度及骨体积分数显著低于川陈皮素高剂量组(P<0.05)。

### 2.2 川陈皮素对创伤性骨折大鼠骨折周围软骨组织病理学变化的影响

如图2所示, 胞质呈绿色, 红色或橘红色部位为软骨组织。在对照组中, 大鼠的软骨组织无变化, 结

构完好无损。相较之下, 模型组大鼠的软骨组织遭受了显著损伤。然而, 当大鼠接受不同剂量的川陈皮素干预后, 其软骨组织的损伤出现了不同程度的改善。其中川陈皮素高剂量组大鼠软骨组织恢复情况最佳, 而川陈皮素高剂量+PX-478组大鼠软骨组织损伤程度较川陈皮素高剂量组加重。

### 2.3 川陈皮素对创伤性骨折大鼠血清BGP、ALP、IL-6、TNF- $\alpha$ 水平的影响

如表3所示, 与对照组相比, 模型组大鼠血清中BGP、ALP水平均显著降低(P<0.05), 炎症因子IL-6、TNF- $\alpha$ 水平显著升高(P<0.05); 与模型组相比, 川陈皮素低、高剂量组大鼠血清中BGP、ALP水平均显著升高(P<0.05), IL-6、TNF- $\alpha$ 水平显著降低(P<0.05), 但川陈皮素高剂量+PX-478组大鼠血清中BGP、ALP水平显著低于川陈皮素高剂量组(P<0.05), IL-6、TNF- $\alpha$ 水平显著高于川陈皮素高剂量组(P<0.05)。

### 2.4 川陈皮素对创伤性骨折大鼠股骨组织HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA水平的影响

利用qPCR检测大鼠股骨组织HIF-1 $\alpha$ 、SDF-

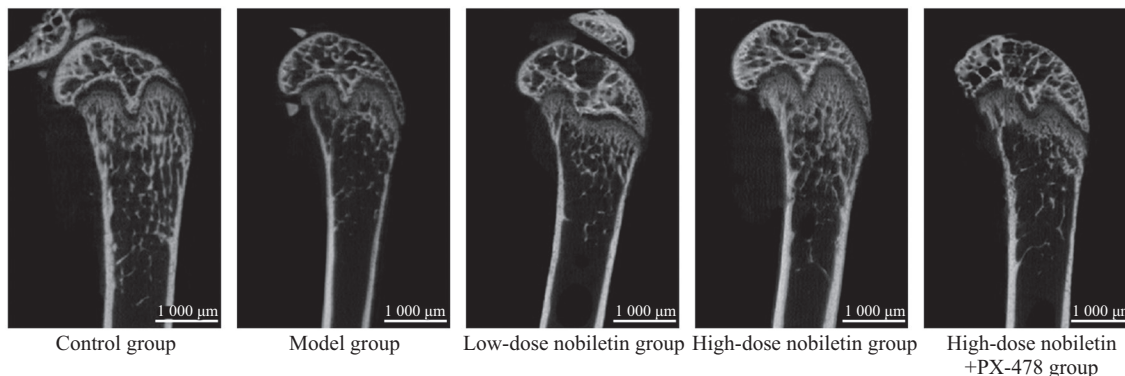


图1 各组大鼠计算机断层扫描图像

Fig.1 Computed tomography images of rats in each group

表2 各组大鼠骨小梁密度和厚度及骨体积分数

Table 2 Trabecular bone density, thickness and bone volume fraction of rats in each group

分组 Groups	骨小梁密度/mg·mm <sup>-3</sup> Trabecular bone density /mg·mm <sup>-3</sup>	骨小梁厚度/mm Trabecular bone thickness /mm	骨体积分数/% Bone volume fraction /%
Control group	810.74±82.43	0.15±0.03	34.11±6.12
Model group	531.44±54.31*	0.04±0.01*	13.15±2.63*
Low-dose nobiletin group	610.64±65.71*	0.08±0.01**	22.34±3.78**
High-dose nobiletin group	765.83±75.35* <sup>△</sup>	0.12±0.02* <sup>△</sup>	29.41±4.96* <sup>△</sup>
High-dose nobiletin+PX-478 group	582.41±59.28 <sup>▲</sup>	0.06±0.01 <sup>▲</sup>	16.74±3.45 <sup>▲</sup>

$\bar{x}\pm s$ , n=12; \*P<0.05, 与对照组比较; \*\*P<0.05, 与模型组比较; <sup>△</sup>P<0.05, 与川陈皮素低剂量组比较; <sup>▲</sup>P<0.05, 与川陈皮素高剂量组比较。

$\bar{x}\pm s$ , n=12; \*P<0.05 compared with the control group; \*\*P<0.05 compared with the model group; <sup>△</sup>P<0.05 compared with the low-dose nobiletin group;

<sup>▲</sup>P<0.05 compared with the high-dose nobiletin group.

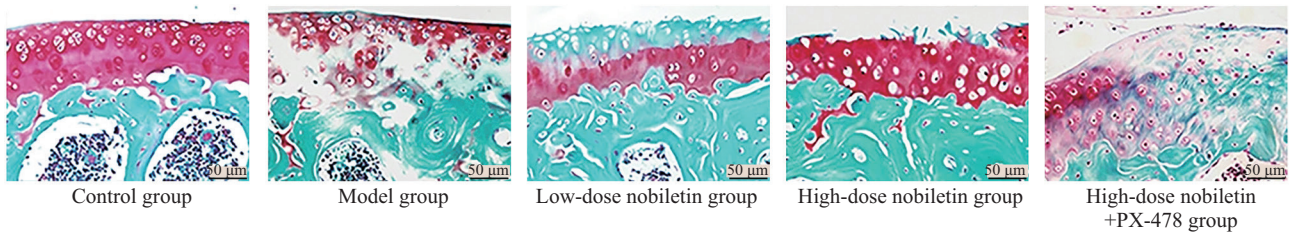


图2 番红O固绿染色检测创伤性骨折大鼠周围软骨组织损伤

Fig.2 Safranin O-solid green staining was used to detect the injury of the surrounding cartilage tissue in rats with traumatic fractures

表3 各组大鼠血清BGP、ALP、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量比较

Table 3 Comparison of serum BGP, ALP, IL-6 and TNF- $\alpha$  contents in each group of rats

分组 Groups	BGP / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ALP / $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-6 / $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$	TNF- $\alpha$ / $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$
Control group	2.35 $\pm$ 0.26	241.65 $\pm$ 25.59	40.13 $\pm$ 4.57	40.62 $\pm$ 4.57
Model group	0.41 $\pm$ 0.05*	82.62 $\pm$ 9.38*	152.62 $\pm$ 16.81*	102.51 $\pm$ 11.62*
Low-dose nobiletin group	0.85 $\pm$ 0.09*#	165.48 $\pm$ 18.61*#	92.53 $\pm$ 9.62*#	68.53 $\pm$ 7.06*#
High-dose nobiletin group	1.37 $\pm$ 0.15*# $\Delta$	198.24 $\pm$ 20.35*# $\Delta$	50.07 $\pm$ 5.87*# $\Delta$	49.31 $\pm$ 5.46*# $\Delta$
High-dose nobiletin+PX-478 group	0.52 $\pm$ 0.07 $\Delta$	92.64 $\pm$ 10.31 $\Delta$	146.59 $\pm$ 15.23 $\Delta$	93.54 $\pm$ 9.65 $\Delta$

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ ; \* $P<0.05$ , 与对照组比较; # $P<0.05$ , 与模型组比较;  $\Delta P<0.05$ , 与川陈皮素低剂量组比较;  $\Delta P<0.05$ , 与川陈皮素高剂量组比较。

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ ; \* $P<0.05$  compared with the control group; # $P<0.05$  compared with the model group;  $\Delta P<0.05$  compared with the low-dose nobiletin group;  $\Delta P<0.05$  compared with the high-dose nobiletin group.

1、*CXCR4* mRNA水平, 结果如表4所示。与对照组相比, 模型组大鼠股骨组织中*HIF-1 $\alpha$* 、*SDF-1*、*CXCR4* mRNA水平均显著降低( $P<0.05$ ); 与模型组相比, NOB各处理组大鼠股骨组织中*HIF-1 $\alpha$* 、*SDF-1*、*CXCR4* mRNA水平均显著升高( $P<0.05$ ), 且随着NOB剂量的增加*HIF-1 $\alpha$* 、*SDF-1*、*CXCR4* mRNA水平升高越显著( $P<0.05$ ); 川陈皮素高剂量+PX-478组大鼠股骨组织中*HIF-1 $\alpha$* 、*SDF-1*、*CXCR4* mRNA水平显著低于川陈皮素高剂量组( $P<0.05$ )。

## 2.5 川陈皮素对创伤性骨折大鼠股骨组织HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4蛋白水平的影响

利用Western blot法和免疫组化法检测大鼠股骨组织中HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4蛋白表达水平。结果如表5、表6、图3、图4所示。与对照组相比, 模型组大鼠股骨组织中HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4蛋白水平及阳性细胞率均显著降低( $P<0.05$ ); 与模型组相比, 川陈皮素低、高剂量组大鼠股骨组织中HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4蛋白水平及阳性细胞率均显著升高( $P<0.05$ ), 且川陈皮素高剂量组升高趋势更显著( $P<0.05$ ); 川陈皮素高剂量+PX-478组大鼠股骨组织中HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4蛋白水平及阳性细胞率显著低于川陈皮素高剂量组( $P<0.05$ )。

## 2.6 川陈皮素对大鼠成骨细胞增殖的影响

表7显示, 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ 川陈皮素在药物干预1、2和3天后均能促进增殖( $P<0.05$ ), 10、20  $\mu\text{mol/L}$ 川陈皮素的作用更显著, 而40  $\mu\text{mol/L}$ 川陈皮素在药物干预1、2天后虽能促进增殖( $P<0.05$ ), 但相比20  $\mu\text{mol/L}$ 增殖活性降低, 故后续选择10、20  $\mu\text{mol/L}$ 川陈皮素进行功能验证。表8显示, 与空白组相比, 川陈皮素低、高浓度组成骨细胞PCNA水平增高( $P<0.05$ ); 与川陈皮素高浓度组相比, 川陈皮素高浓度+PX-478组成骨细胞PCNA水平下降( $P<0.05$ )。

## 2.7 川陈皮素对大鼠成骨细胞分化的影响

表9、表10、图5显示, 与空白组相比, 川陈皮素低、高浓度组成骨细胞ALP、COL-I水平增高( $P<0.05$ ); 与川陈皮素高浓度组相比, 川陈皮素高浓度+PX-478组成骨细胞ALP、COL-I水平下降( $P<0.05$ )。

## 2.8 川陈皮素对大鼠成骨细胞HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA和蛋白水平的影响

表11、图6显示, 与空白组相比, 川陈皮素低、高浓度组成骨细胞HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA和蛋白水平增高( $P<0.05$ ); 与川陈皮素高浓度组相比, 川陈皮素高浓度+PX-478组成骨细胞HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA和蛋白水平下降( $P<0.05$ )。

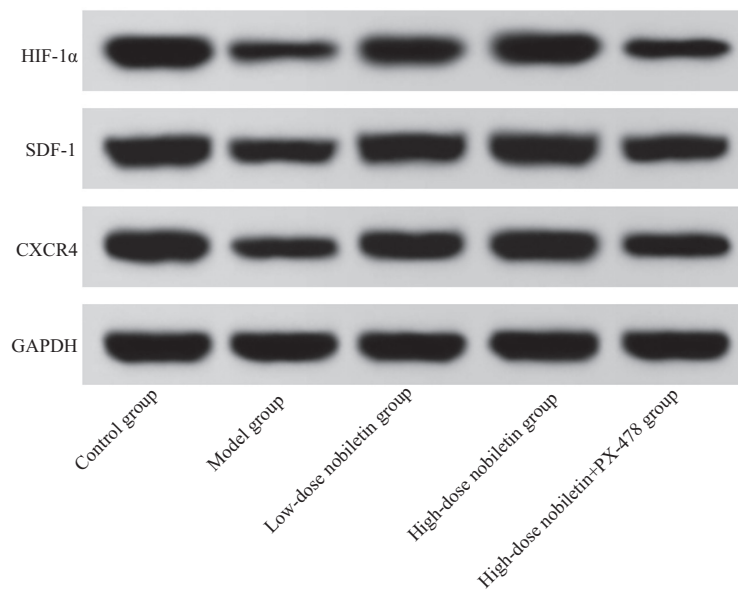
表4 各组大鼠股骨组织HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA表达水平Table 4 Expression levels of HIF-1 $\alpha$ , SDF-1 and CXCR4 mRNA in femoral tissues of rats in each group

分组 Groups	HIF-1 $\alpha$	SDF-1	CXCR4
Control group	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Model group	0.35±0.04*	0.32±0.04*	0.28±0.03*
Low-dose nobiletin group	0.69±0.08* <sup>#</sup>	0.74±0.08* <sup>#</sup>	0.72±0.08* <sup>#</sup>
High-dose nobiletin group	0.84±0.09* <sup>#</sup> $\Delta$	0.86±0.09* <sup>#</sup> $\Delta$	0.91±0.10* <sup>#</sup> $\Delta$
High-dose nobiletin+PX-478 group	0.41±0.05 $\Delta$	0.40±0.05 $\Delta$	0.39±0.04 $\Delta$

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ ; \* $P<0.05$ , 与对照组比较; <sup>#</sup> $P<0.05$ , 与模型组比较;  $\Delta P<0.05$ , 与川陈皮素低剂量组比较;  $\Delta P<0.05$ , 与川陈皮素高剂量组比较。

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ ; \* $P<0.05$  compared with the control group; <sup>#</sup> $P<0.05$  compared with the model group;  $\Delta P<0.05$  compared with the low-dose nobiletin group;

$\Delta P<0.05$  compared with the high-dose nobiletin group.

图3 各组大鼠股骨组织HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4蛋白表达水平Fig.3 The protein expression levels of HIF-1 $\alpha$ , SDF-1 and CXCR4 in the femoral tissues of rats in each group表5 各组大鼠股骨组织HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4蛋白相对表达水平Table 5 Relative expression levels of HIF-1 $\alpha$ , SDF-1 and CXCR4 proteins in femoral tissues of rats in each group

分组 Groups	HIF-1 $\alpha$	SDF-1	CXCR4
Control group	1.32±0.15	1.01±0.12	1.02±0.12
Model group	0.35±0.05*	0.43±0.05*	0.37±0.04*
Low-dose nobiletin group	0.83±0.09 <sup>#</sup>	0.79±0.08 <sup>#</sup>	0.75±0.08 <sup>#</sup>
High-dose nobiletin group	1.12±0.15* <sup>#</sup> $\Delta$	0.92±0.13* <sup>#</sup> $\Delta$	0.87±0.09* <sup>#</sup> $\Delta$
High-dose nobiletin+PX-478 group	0.42±0.05 $\Delta$	0.51±0.06 $\Delta$	0.45±0.05 $\Delta$

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ ; \* $P<0.05$ , 与对照组比较; <sup>#</sup> $P<0.05$ , 与模型组比较;  $\Delta P<0.05$ , 与川陈皮素低剂量组比较;  $\Delta P<0.05$ , 与川陈皮素高剂量组比较。

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ ; \* $P<0.05$  compared with the control group; <sup>#</sup> $P<0.05$  compared with the model group;  $\Delta P<0.05$  compared with the low-dose nobiletin group;

$\Delta P<0.05$  compared with the high-dose nobiletin group.

### 3 讨论

创伤性骨折是指由于外力直接作用或间接传导力导致的骨骼完整性和连续性的中断。创伤性骨

折常由外力所致, 骨折后若不及时治疗可能会引发骨折移位、关节炎、骨头坏死等, 因此骨折后的愈合过程十分重要<sup>[11]</sup>。骨折愈合是一个复杂的过程,

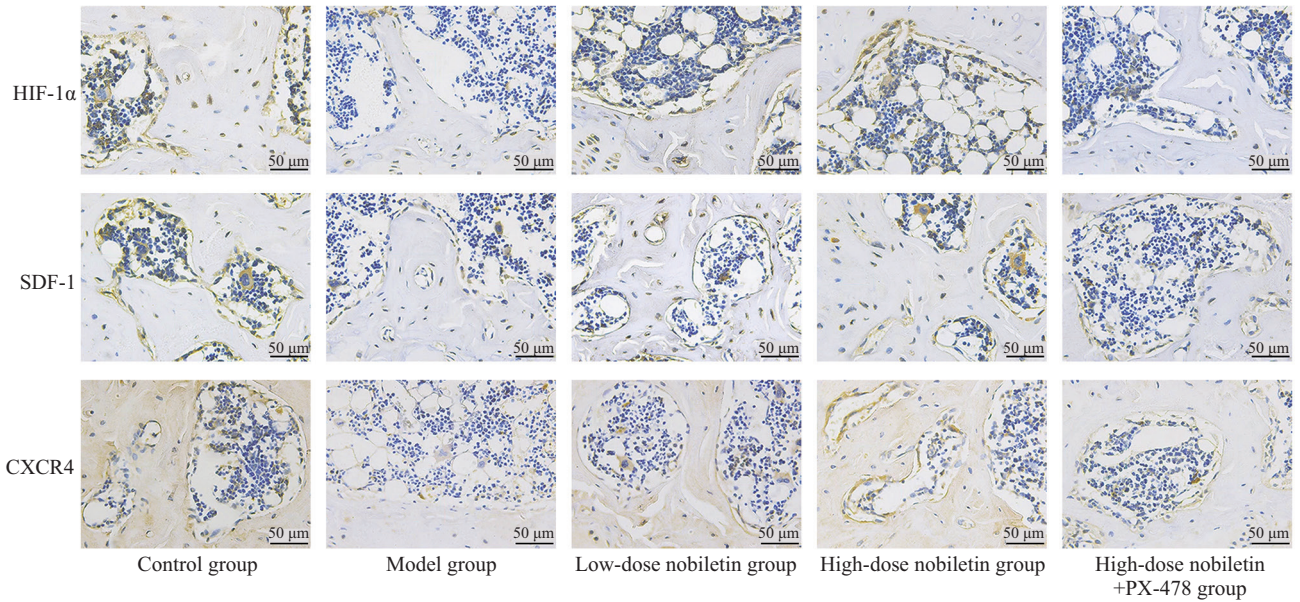


图4 各组大鼠股骨组织HIF-1α、SDF-1、CXCR4的免疫组化图

Fig.4 Immunohistochemical plots of HIF-1α, SDF-1 and CXCR4 in femoral tissues of rats in each group

表6 各组大鼠股骨组织HIF-1α、SDF-1、CXCR4阳性细胞率

Table 6 Positive cell rates of HIF-1α, SDF-1 and CXCR4 in femoral tissues of rats in each group

分组 Groups	HIF-1α	SDF-1	CXCR4
Control group	74.16±6.53	72.34±6.16	68.45±6.69
Model group	15.74±2.21*	16.47±2.13*	14.69±2.07*
Low-dose nobiletin group	38.92±3.56 <sup>#</sup>	34.51±3.45 <sup>#</sup>	30.61±3.28 <sup>#</sup>
High-dose nobiletin group	61.25±4.97 <sup>#△</sup>	57.64±4.78 <sup>#△</sup>	53.43±4.64 <sup>#△</sup>
High-dose nobiletin+PX-478 group	18.34±2.62 <sup>▲</sup>	20.13±2.56 <sup>▲</sup>	16.87±2.15 <sup>▲</sup>

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ ; \* $P<0.05$ , 与对照组比较; <sup>#</sup> $P<0.05$ , 与模型组比较; <sup>△</sup> $P<0.05$ , 与川陈皮素低剂量组比较; <sup>▲</sup> $P<0.05$ , 与川陈皮素高剂量组比较。

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ ; \* $P<0.05$  compared with the control group; <sup>#</sup> $P<0.05$  compared with the model group; <sup>△</sup> $P<0.05$  compared with the low-dose nobiletin group;

<sup>▲</sup> $P<0.05$  compared with the high-dose nobiletin group.

表7 各组大鼠成骨细胞增殖活性

Table 7 Proliferation activity of osteoblasts in each group of rats

川陈皮素浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of nobiletin / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	D值 D value		
	1 d	2 d	3 d
0	0.65±0.04	0.70±0.06	0.73±0.08
2.5	0.71±0.05	0.80±0.07	0.86±0.07*
5	0.82±0.06*	0.85±0.08*	0.91±0.09*
10	0.90±0.07*	0.89±0.07*	0.95±0.06*
20	0.96±0.09*	0.93±0.08*	0.98±0.08*
40	0.91±0.08*	0.88±0.07*	0.83±0.06
80	0.70±0.06	0.76±0.05	0.67±0.06

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与0  $\mu\text{mol/L}$ 比较。

$\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with the 0  $\mu\text{mol/L}$ .

其所需时间长且涉及到多学科, 而中医在治疗骨折方面一直以来具有一定的传统优势, 较多研究均证实了中药治疗在促进骨愈合中的作用<sup>[12-13]</sup>。本研究

发现创伤性骨折大鼠周围软组织受损严重, 骨小梁密度和厚度均降低, 血清中骨形成标志物BGP、ALP水平显著降低, 炎症因子IL-6、TNF- $\alpha$ 水平显著



表8 各组大鼠成骨细胞PCNA水平  
Table 8 PCNA levels in osteoblasts of rats in each group

组别 Groups	D值 D value			
	1 d	2 d	3 d	5 d
Blank group	0.17±0.03	0.19±0.04	0.22±0.03	0.25±0.04
Low concentration nobiletin group	0.25±0.04*	0.31±0.03*	0.34±0.04*	0.36±0.05*
High concentration nobiletin group	0.36±0.06*#	0.43±0.05*#	0.46±0.06*#	0.48±0.07*#
High concentration nobiletin+PX-478 group	0.20±0.05 <sup>△</sup>	0.23±0.04 <sup>△</sup>	0.25±0.05 <sup>△</sup>	0.27±0.05 <sup>△</sup>

$\bar{x}\pm s, n=6; *P<0.05$ , 与空白组比较; # $P<0.05$ , 与川陈皮素低浓度组比较; <sup>△</sup> $P<0.05$ , 与川陈皮素高浓度组比较。

$\bar{x}\pm s, n=6; *P<0.05$  compared with the blank group; # $P<0.05$  compared with the low concentration nobiletin group; <sup>△</sup> $P<0.05$  compared with the high concentration nobiletin group.

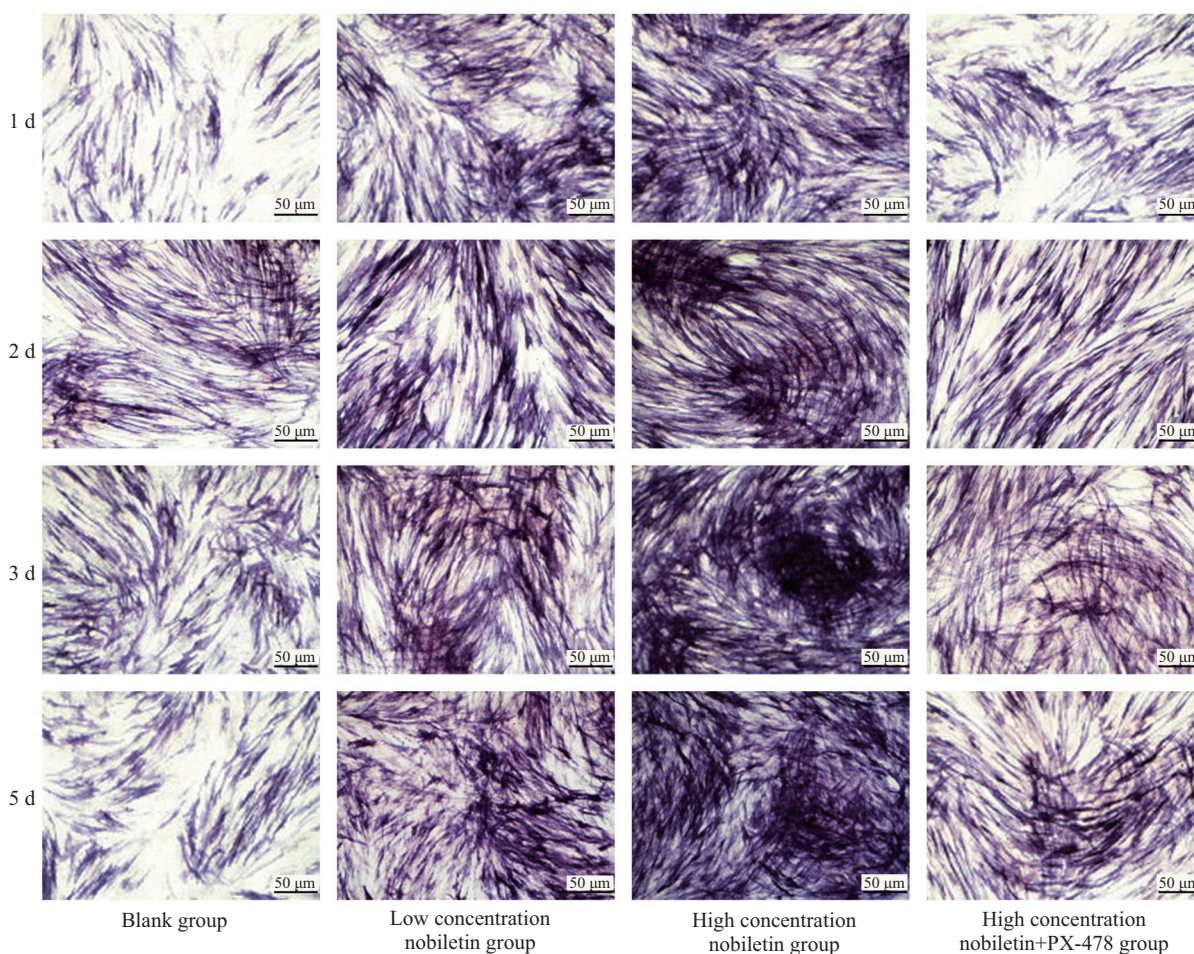


图5 各组大鼠成骨细胞ALP染色图  
Fig.5 ALP staining of osteoblasts in each group of rats

升高, 证明创伤性骨折大鼠模型构建成功。

川陈皮素是一种具有多种生物活性和药理作用的黄酮类化合物。川陈皮素具有显著的抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗病毒等生物活性, 同时还表现出抗血细胞凝集、抗血栓形成、抗过敏、抗胆碱酯酶和抗癫痫等多种药理作用<sup>[14]</sup>。有研究表明川陈皮素

可通过促进细胞成骨分化相关基因合成促进成骨分化<sup>[15]</sup>。另外, 川陈皮素不仅能抑制骨吸收还能有效修复卵巢切除术引起的骨质疏松<sup>[16]</sup>。结合已有的相关研究, 推测川陈皮素可参与促进创伤性骨折大鼠的骨愈合, 因此本实验以川陈皮素干预治疗创伤性骨折大鼠, 结果显示川陈皮素处理可以有效缓解创

表9 各组大鼠成骨细胞ALP水平  
Table 9 ALP levels of osteoblasts in rats of each group

组别 Groups	D值 D value			
	1 d	2 d	3 d	5 d
Blank group	0.24±0.03	0.28±0.05	0.29±0.04	0.27±0.03
Low concentration nobiletin group	0.36±0.05*	0.39±0.06*	0.41±0.05*	0.42±0.05*
High concentration nobiletin group	0.47±0.05**	0.51±0.07**	0.53±0.07**	0.55±0.06**
High concentration nobiletin PX-478 group	0.27±0.04 <sup>△</sup>	0.31±0.03 <sup>△</sup>	0.33±0.04 <sup>△</sup>	0.35±0.05 <sup>△</sup>

$\bar{x} \pm s, n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与空白组比较; # $P<0.05$ , 与川陈皮素低浓度组比较; <sup>△</sup> $P<0.05$ , 与川陈皮素高浓度组比较。

$\bar{x} \pm s, n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with the blank group; # $P<0.05$  compared with the low concentration nobiletin group; <sup>△</sup> $P<0.05$  compared with the high concentration nobiletin group.

表10 各组大鼠成骨细胞COL-I水平  
Table 10 COL-I levels in osteoblasts of rats in each group

组别 Groups	D值 D value			
	1 d	2 d	3 d	5 d
Blank group	0.18±0.02	0.22±0.03	0.24±0.03	0.20±0.02
Low concentration nobiletin group	0.27±0.03*	0.30±0.03*	0.32±0.03*	0.34±0.04*
High concentration nobiletin group	0.39±0.05**	0.41±0.05**	0.43±0.06**	0.45±0.05**
High concentration nobiletin+PX-478 group	0.21±0.03 <sup>△</sup>	0.24±0.04 <sup>△</sup>	0.26±0.04 <sup>△</sup>	0.23±0.03 <sup>△</sup>

$\bar{x} \pm s, n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与空白组比较; # $P<0.05$ , 与川陈皮素低浓度组比较; <sup>△</sup> $P<0.05$ , 与川陈皮素高浓度组比较。

$\bar{x} \pm s, n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with the blank group; # $P<0.05$  compared with the low concentration nobiletin group; <sup>△</sup> $P<0.05$  compared with the high concentration nobiletin group.

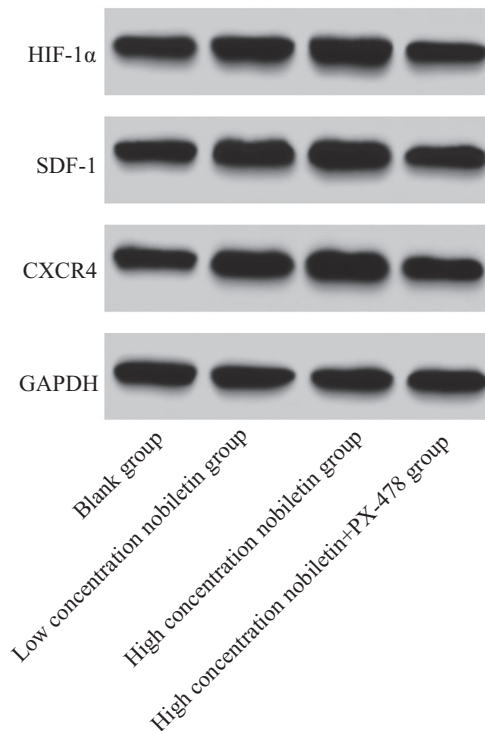


图6 各组大鼠成骨细胞HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4蛋白表达水平

Fig.6 The protein expression levels of HIF-1 $\alpha$ , SDF-1 and CXCR4 in osteoblasts of rats in each group

表11 各组大鼠股骨组织HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA和蛋白相对表达水平Table 11 Relative expression levels of HIF-1 $\alpha$ , SDF-1, and CXCR4 mRNA and protein in femoral tissues of rats in each group

组别 Groups	mRNA			蛋白 Protein		
	HIF-1 $\alpha$	SDF-1	CXCR4	HIF-1 $\alpha$	SDF-1	CXCR4
Blank group	1.00±0.02	1.00±0.03	1.00±0.04	0.95±0.05	0.96±0.05	0.97±0.04
Low concentration nobiletin group	1.35±0.15*	1.41±0.14*	1.29±0.09*	1.31±0.11*	1.37±0.12*	1.25±0.09*
High concentration nobiletin group	1.57±0.19*#	1.62±0.21*#	1.67±0.21*#	1.50±0.15*#	1.57±0.16*#	1.61±0.14*#
High concentration nobiletin+PX-478 group	1.12±0.11 $\Delta$	1.17±0.12 $\Delta$	1.15±0.05 $\Delta$	1.04±0.08 $\Delta$	1.11±0.09 $\Delta$	1.06±0.09 $\Delta$

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$ , 与空白组比较; # $P<0.05$ , 与川陈皮素低浓度组比较;  $\Delta P<0.05$ , 与川陈皮素高浓度组比较。

$\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ; \* $P<0.05$  compared with the blank group; # $P<0.05$  compared with the low concentration nobiletin group;  $\Delta P<0.05$  compared with the high concentration nobiletin group.

伤性骨折大鼠周围软骨组织的病理变化, 增加大鼠骨小梁密度和厚度、骨体积分数, 提高BGP、ALP水平, 降低IL-6、TNF- $\alpha$ 水平, 缓解骨折引起的炎症反应, 且随着川陈皮素添加剂量的增多这种作用逐渐增强。说明川陈皮素通过促进细胞分化, 减轻炎症来促进骨折愈合。

成骨细胞是形成骨的功能细胞, 它们合成和分泌胶原蛋白和糖蛋白, 在骨吸收时形成非矿化骨基质, 最终形成骨组织<sup>[17]</sup>。本研究发现, 川陈皮素治疗组的成骨细胞数量明显高于空白组。此外, 川陈皮素上调了成骨细胞增殖标志物PCNA的活性<sup>[18]</sup>。

ALP被认为是成骨细胞分化的早期标志<sup>[19]</sup>。药物干预2天后, 川陈皮素低、高浓度组ALP活性显著增强, 而川陈皮素低浓度组ALP活性高于未干预川陈皮素组。在ALP染色中, 川陈皮素处理组的阳性表达明显强于未处理组, 且趋势与ALP活性相似。其他成骨标志物, 如COL-I<sup>[20]</sup>, 也显示出类似的模式。川陈皮素低、高浓度干预后, ALP和COL-I活性随干预天数的增加而增加。但高浓度(>20  $\mu\text{mol/L}$ )给药对成骨细胞有一定的毒性, 使成骨细胞活性降低。这些数据表明, 川陈皮素促进成骨细胞成骨, 这种作用是浓度依赖性的。

HIF-1 $\alpha$ 活性的增加可以提高细胞在缺氧环境中的活力, 促进细胞黏附、迁移和血管生成。HIF-1 $\alpha$ 可以通过调节表面分子的表达水平, 促进干细胞向缺血和缺氧部位迁移, 这是许多配体和受体之间相互作用的结果, 其中包括HIF-1 $\alpha$ 的下游基因SDF-1, 它与其特异性受体CXCR4结合, 形成一对偶联分子<sup>[21]</sup>。SDF-1是一种主要由间充质干细胞分泌的蛋白。当SDF-1在多种类型的细胞表面特异性结合CXCR4时, 激活的SDF-1/CXCR4可以刺激与干细胞动员和迁移调节

相关的下游信号通路, 诱导MSC向受损部位迁移并参与损伤修复<sup>[22]</sup>。XUE等<sup>[23]</sup>研究发现HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4信号轴在颅脑损伤骨折修复中起重要作用, 通过激活该通路蛋白的表达能加速颅脑损伤骨折愈合。本实验结果显示, 模型组大鼠股骨组织中HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA水平和蛋白表达水平均显著低于对照组, 川陈皮素处理组大鼠股骨组织中HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA水平和蛋白表达水平均显著高于模型组, 且川陈皮素高剂量组的作用更强, 说明川陈皮素可能通过激活HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4信号通路缓解骨折大鼠病理损伤, 促进骨愈合。体外实验结果也显示, 川陈皮素干预能上调成骨细胞HIF-1 $\alpha$ 、SDF-1、CXCR4 mRNA和蛋白表达水平, 与体内研究结果一致。此外, 川陈皮素高剂量联合HIF-1 $\alpha$ 通路抑制剂PX-478组可抑制川陈皮素对创伤性骨折大鼠的治疗效应和对成骨细胞增殖、分化的促进作用, 提示川陈皮素是通过HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4信号通路来促进创伤性骨折大鼠的骨愈合。

综上所述, 川陈皮素减轻创伤性骨折大鼠的病理症状和炎症损伤, 促进骨愈合, 刺激成骨细胞增殖和分化, 这与川陈皮素激活HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4信号通路有关。但本研究仅仅分析了一条信号通路, 川陈皮素是否作用于其他通路, 仍需后续研究。

## 参考文献 (References)

- [1] CONE R, ROSZMAN A, CONWAY Y, et al. Risk factors for nonunion of distal femur fractures [J]. J Orthop Trauma, 2023, 37(4): 175-80.
- [2] PANTELI M, VUN J S H, POUNTOS I, et al. Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: a systematic review and an update on current insights [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26(3): 601-23.
- [3] YANG Z, FENG L, WANG M, et al. Sesamin promotes osteopo-

- rotic fracture healing by activating chondrogenesis and angiogenesis pathways [J]. *Nutrients*, 2022, 14(10): 2106.
- [4] QIN Y, YANG J, LI H, et al. Recent advances in the therapeutic potential of nobiletin against respiratory diseases [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155506.
- [5] 方红育, 黄涛, 周少怀, 等. 川陈皮素通过抑制STING/NF- $\kappa$ B信号通路促进骨质疏松大鼠的骨折愈合[J]. *免疫学杂志* (FANG H Y, HUANG T, ZHOU S H, et al. Nobiletin promotes fracture healing in osteoporosis rats by inhibiting STING/NF- $\kappa$ B signal pathway [J]. *Immunological Journal*), 2023, 39(10): 857-64.
- [6] MANGIAVINI L, PERETTI G M, CANCIANI B, et al. Epidermal growth factor signalling pathway in endochondral ossification: an evidence-based narrative review [J]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 37-50.
- [7] 李慧, 孙卫国. 脂联素调控 SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 信号轴在炎症微环境下牙周膜干细胞成骨分化中的作用[J]. *解剖学研究* (LI H, SUN W G. Role of adiponectin regulating SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 signal axis in osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells under inflammatory microenvironment [J]. *Anatomy Research*), 2023, 45(1): 15-20.
- [8] 陈月, 苗存良, 安志辉, 等. 芹菜素调节 OPG/RANKL/RANK 信号通路对创伤性骨折大鼠骨折愈合的影响[J]. *国际检验医学杂志* (CHEN Y, MIAO C L, AN Z H, et al. Effect of apigenin on fracture healing in rats with traumatic fracture by regulating OPG/RANKL/RANK signaling pathway [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*), 2023, 44(12): 1446-51.
- [9] ROJASAWASTHIEN T, USUI M, ADDISON W N, et al. Nobiletin, a NF- $\kappa$ B signaling antagonist, promotes BMP-induced bone formation [J]. *FASEB Bioadv*, 2022, 5(2): 62-70.
- [10] LI L, PANG Y, ZHANG L, et al. Triiodothyronine potentiates angiogenesis-related factor expression through PI3K/AKT signaling pathway in human osteoarthritic osteoblasts [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(6): 819-25.
- [11] 刘娟娟, 魏戎, 武军龙, 等. 益肾健骨汤对创伤性骨折骨密度及骨折愈合速度的影响[J]. *中华中医药学刊* (LIU J J, WEI R, WU J L, et al. Effect of Yishen Jiangu decoction on bone density and fracture healing rate in patients with traumatic fractures [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*), 2021, 39(6): 157-9.
- [12] 陆飞, 周静, 金涛. 山姜素调节 cAMP/PKA/CREB 信号通路促进骨质疏松性骨折大鼠骨折愈合[J]. *中国组织工程研究* (LU F, ZHOU J, JIN T. Alpinetin promotes fracture healing in rats with osteoporotic fracture by regulating the cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2025, 29(12): 2438-43.
- [13] CHENG L, WANG G, LU H, et al. Effect of Bushen Tiansui decoction on delayed fracture healing: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2023, 23(4): 471-88.
- [14] MOAZAMIYANFAR R, REZAEI S, ALIASHRAFZADEH H, et al. Nobiletin in cancer therapy; mechanisms and therapy perspectives [J]. *Curr Pharm Des*, 2023, 29(22): 1713-28.
- [15] PANG Y, LIU L, MU H, et al. Nobiletin promotes osteogenic differentiation of human osteoblastic cell line (MG-63) through activating the BMP-2/RUNX-2 signaling pathway [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28(9): 4916-20.
- [16] WANG Y, XIE J, AI Z, et al. Nobiletin-loaded micelles reduce ovariectomy-induced bone loss by suppressing osteoclastogenesis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 26(14): 7839-49.
- [17] SUN Z, JIN H, ZHOU H, et al. Guhong injection promotes fracture healing by activating Wnt/beta-catenin signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109436.
- [18] ZHANG K, GE W, LUO S, et al. Static magnetic field promotes proliferation, migration, differentiation, and AKT activation of periodontal ligament stem cells [J]. *Cells Tissues Organs*, 2023, 212(4): 317-26.
- [19] SHEN Y, ZHANG Y, WANG Q, et al. MicroRNA-877-5p promotes osteoblast differentiation by targeting EIF4G2 expression [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1): 134.
- [20] NANASHIMA N, HORIE K, OEY I. Blackcurrant extract promotes differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts [J]. *Biomed Rep*, 2024, 21(2): 121.
- [21] CHEN W, WU P, YU F, et al. HIF-1 $\alpha$  regulates bone homeostasis and angiogenesis, participating in the occurrence of bone metabolic diseases [J]. *Cells*, 2022, 11(22): 3552.
- [22] KONG L, ZUO R, WANG M, et al. Silencing microRNA-137-3p, which targets RUNX2 and CXCL12 prevents steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by facilitating osteogenesis and angiogenesis [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(4): 655-70.
- [23] XUE Y, LI Z, WANG Y, et al. Role of the HIF-1 $\alpha$ /SDF-1/CXCR4 signaling axis in accelerated fracture healing after craniocerebral injury [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(4): 2767-74.