DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20251124.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1089.R.20251124.1026.002

毛蕊异黄酮促进大鼠骨质疏松性骨折愈合的机制研究

韩小飞[1],马运锋[2]✉
(1.河南中医药大学第二附属医院 河南省中医院骨病一科,河南 郑州 450002;2.河南中医药大学第三附属医院骨病科,河南 郑州 450003)

[摘要] **目的**:探讨毛蕊异黄酮促进骨质疏松性骨折(osteoporotic fracture,OPF)愈合的潜在机制。**方法**:采用10 μmol/L羰基氰化物-间氯苯腙(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone,CCCP)处理MC3T3-E1细胞在体外构建成骨细胞氧化应激损伤模型,随后采用不同浓度(0、10、20、40、60 μmol/L)毛蕊异黄酮处理MC3T3-E1细胞。检测细胞活力、氧化应激水平(MDA、ROS、GSH和SOD)、细胞凋亡率和成骨分化能力(评估ALP活性,基质矿化率,以及OPN、RUNX2、和BMP2蛋白水平)。此外,采用100 nmol/L丝裂原激活蛋白激酶8(MAPK8)干扰质粒(sh-MAPK8)转染毛蕊异黄酮处理的MC3T3-E1细胞来进行逆转实验。最后,在体内建立大鼠OPF模型,并采用30 mg/kg毛蕊异黄酮灌胃治疗,1次/d,持续4周。**结果**:CCCP明显抑制MC3T3-E1细胞活力,而60 μmol/L毛蕊异黄酮逆转了CCCP对MC3T3-E1细胞活力的抑制作用($P<0.01$)。此外,毛蕊异黄酮明显逆转了CCCP诱导的MC3T3-E1细胞中MDA和ROS水平升高,GSH水平、SOD活性及ALP活性降低,基质矿化面积减少,以及OPN、RUNX-2、BMP2蛋白水平降低,并减轻了细胞凋亡($P<0.01$)。毛蕊异黄酮主要靶向促进MAPK8蛋白表达抑制MC3T3-E1细胞的氧化应激和细胞凋亡,促进成骨分化($P<0.01$)。体内实验结果显示毛蕊异黄酮促进OPF大鼠的骨折愈合。**结论**:本研究表明毛蕊异黄酮可能通过促进MAPK8的表达抑制氧化应激,加速成骨分化,进而促进OPF愈合。

[关键词] 骨质疏松性骨折;毛蕊异黄酮;MAPK8;氧化应激;细胞成骨
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)19-1451-10

Mechanism study of calycosin promoting of healing of osteoporotic fracture in rats

HAN Xiaofei[1], MA Yunfeng[2]✉
(1. *Department of Osteopathy, the Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine /Henan Provincial Hospital of Traditional Chinse Medicine, Zhengzhou* 450002, *China*; 2. *Department of Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou* 450003, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the* 2019 *Henan Provincial Health Commission Traditional Chinese Medicine Scientific Research Special Project* (2019*ZY*2149); 2020 *Henan Provincial Health Commission Traditional Chinese Medicine Scientific Research Special Project* (20-21*ZY*3013).

[*Author*]: *HAN Xiaofei, Ph.D., Candidate, E-mail: hanxiaofeidoc@sina.com.*
[*Correspondence to*]: *MA Yunfeng, E-mail: weiminwanghb@sina.com.*

Received: 2025-09-15 *Revised*: 2025-09-30 *JHMU*, 2026;32(19):1451-1460

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To investigate the potential mechanisms of calycosin on osteoporotic fracture(OPF) healing. **Methods**: MC3T3-E1 cells were treated with 10 μmol/L carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) to establish an oxidative stress injury cell model of osteoblasts *in vito*. Subsequently, MC3T3-E1 cells were treated with different concentrations of calycosin (0, 10, 20, 40,60 μmol/L). Cell viability, oxidative stress levels (evaluated by MDA content, ROS level, GSH level, and SOD activity), cell apoptosis, and osteogenic differentiation ability (assessed by ALP activity, matrix mineralization rate, and protein lev-

[基金项目] 2019年河南省卫健委中医药科学研究专项课题(2019ZY2149);2020年度河南省卫健委中医药科学研究专项课题(20-21ZY3013)
[作者简介] 韩小飞,博士研究生,E-mail: hanxiaofeidoc@sina.com。
[通讯作者] 马运锋,E-mail: weiminwanghb@sina.com。
[收稿日期] 2025-09-15 [修回日期] 2025-09-30 网络出版时间:2025-11-24 12:15:55

els of OPN, RUNX2, and BMP2) were measured. Additionally, MC3T3-E1 cells treated with calycosin were transfected with 100 nmol/L mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8) interference plasmid (sh-MAPK8) to perform reverse experiments. Finally, a rat OPF model was established *in vivo*, and OPF rats were administered 30 mg/kg calycosin *via* gavage once daily for 4 weeks. **Results**: CCCP significantly inhibited the viability of MC3T3-E1 cells, while 60 μmol/L calycosin reversed the inhibitory effect of CCCP on MC3T3-E1 cell viability ($P<0.01$). Additionally, in MC3T3-E1 cells, calycosin markedly reversed CCCP-induced increases in MDA and ROS levels, decreases in GSH level, SOD activity, and ALP activity, reduction in matrix mineralization area, and decreases in OPN, RUNX-2, and BMP2 protein levels, and attenuated apoptosis ($P<0.01$). Calycosin exerts its effects primarily by upregulating MAPK8 protein expression, thereby attenuating oxidative stress and apoptosis in MC3T3-E1 cells and promoted osteogenic differentiation ($P<0.01$). *In vivo* experiments demonstrated that calycosin promoted fracture healing in OPF rats. **Conclusion**: This study suggested that calycosin may promote the expression of MAPK8 to inhibit oxidative stress and accelerate osteogenic differentiation, thereby promoting the healing of OPF.

[**Key words**] Osteoporotic fracture; Calycosin; MAPK8; Oxidative stress; Cell osteogenesis

骨质疏松性骨折(osteoporotic fracture,OPF)仍然是全球重大的公共卫生挑战,骨折不愈合是骨折再生和修复的严重并发症,也是导致二次手术的棘手挑战之一[1]。双膦酸盐是常用的改善OPF患者骨量的传统药物,但长期使用双膦酸盐可能导致血管生成受损和颌骨坏死等不良后果[2]。因此,筛选新的OPF患者临床治疗药物显得尤为重要。据报道,活性氧(reactive oxygen,ROS)积累引起的氧化应激损伤是骨折不愈合的重要因素之一[3]。ROS过度积累造成骨折部位氧化应激微环境,促进破骨细胞分化和骨吸收,导致成骨细胞丧失增殖和分化的生物学功能,进而影响骨折愈合过程[4,5]。然而,骨折愈合过程中氧化应激的调节机制尚不完全清楚。因此,深入探究ROS的产生机制对于了解OPF的发病机制和开发其潜在治疗策略至关重要。

毛蕊异黄酮(Calycosin)是黄芪的主要成分之一,具有免疫调节、抗炎、抗癌和抗氧化特性[6]。据报道,毛蕊异黄酮可减轻卵巢切除大鼠的骨质疏松症[7]。一项生物信息学研究报道,毛蕊异黄酮作为补中益气汤的活性成分之一,通过作用于靶基因丝裂原激活蛋白激酶8(mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8)对OPF表现出直接治疗作用[8]。MAPK8(亦称JNK,Jun氨基末端激酶)是一种应激激活的蛋白激酶,在炎症反应、细胞分化和细胞死亡等生理病理过程中发挥重要调控作用[9]。本团队前期发表的文章已明确揭示了MAPK信号通路在骨类疾病中的重要意义,并论证了包括黄酮类、多酚类和苷类等中药活性成分在这些疾病中的治疗潜力[10,11],为本研究的开展提供了坚实的理论依据。然而,关于毛蕊异黄酮靶向MAPK8治疗OPF的作用机制尚不清楚。因此,本研究拟深入探讨毛蕊异黄酮调节OPF愈合的分子机制,以期为OPF的治疗提供一定的药物证据和潜在的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞与动物 小鼠胚胎成骨细胞(MC3T3-E1,SNL-518)购自天津汇晟生物科技有限公司。8周龄健康雌性SD大鼠(体重230～270g,动物生产许可证号:SCXK(豫)2022-0001;使用许可证号:SYXK(豫)2021-0018)由河南省实验动物中心,并饲养于标准动物实验室。本实验按照河南省中医院伦理委员会关于实验动物饲养和使用原则进行,并经河南省中医院伦理委员会批准,伦理批准号:HNUCM-2024-027。

1.1.2 主要试剂与仪器 毛蕊异黄酮(纯度≥98%,CAS20575-57-9)购自上海源叶生物科技有限公司;血清钙(Ca,F10472)、碱性磷酸酶(ALP,N10577)和活性氧(ROS,EEAO19)试剂盒购自美国赛默飞公司;血清磷(P,MBS8243207)试剂盒购自美国MyBiosource公司;谷胱甘肽(GSH,S0053)测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Lipofectamine 2000(11668019)和TRIzol(15596018CN)试剂购自美国赛默飞公司;化学发光试剂盒(WBKLS0100)购自德国默克公司;CCK-8试剂盒(CK04)购自日本Dojindo Molecular Technologies公司;V-FITC/PI染色试剂盒(AP101)购自杭州联科生物;丙二醛(MDA)检测试剂盒(MAK085)购自Sigma-Aldrich公司;PrimeScript™ RT reagent Kit(RR037A)和TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ(RR820A)购自TaKaRa生物公司;基因过表达载体(pcDNA-MAPK8)和对照载体(pcDNA 3.1)由南京金斯瑞生物科技构建;MAPK8干扰载体(sh-MAPK8)和阴性对照(sh-NC)由上海生工生物工程股份有限公司设计、合成并验证;骨桥蛋白抗体(anti-OPN,MAA899hu22)购自上海钰博生物科技有限公司;anti-MAPK8(IPDX07402)购自武汉湖北艾普蒂生物工程有限公司;超氧化物歧化酶(SOD,

ab65354)检测试剂盒、Runt相关转录因子2蛋白抗体(anti-Runx2,ab236639)、骨形态发生蛋白2抗体(anti-BMP2,ab284387)、β-肌动蛋白抗体(anti-β-actin,ab8227)和免疫球蛋白G(IgG,ab6721)购自英国Abcam公司。

电泳仪(DYCN-24DN)、凝胶成像分析仪(WD-9413B)购自北京六一仪器厂;Multiskan GO全波长酶标仪(51119300)购自美国Thermo公司;流式细胞仪(CytoFLEX)购自美国Beckman公司;细胞培养箱(HF-90)购自上海力申科学仪器公司;实时荧光定量PCR仪(QuantStudio™ 5)购自美国Applied Biosystems公司;双能X线骨密度仪(GE Prodigy Pro)购自美国General Electric公司;荧光倒置显微镜(MF52-N)购自广州明美光电技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 将MC3T3-E1细胞接种在基础培养基(10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素、α-MEM)中培养,每2天更换1次培养基。随后,使用羰基氰化物3-氯苯基腙(CCCP,10 μmol/L),刺激细胞1 h,并用10 μmol/L CCCP培养基替换24 h后,成骨培养基培养6 d建立细胞模型[12]。细胞分组如下:对照(Control)组、CCCP处理(CCCP)组、CCCP联合60 μmol/L毛蕊异黄酮处理(CCCP+Cal)组、CCCP联合MAPK8过表达载体处理(CCCP+pcDNA-MAPK8,阳性对照)组和CCCP联合60 μmol/L毛蕊异黄酮和MAPK8基因敲低处理(CCCP+Cal+sh-MAPK8)组。

1.2.2 细胞转染 将MC3T3-E1细胞接种在6孔板中并培养至80%。采用Lipofectamine 2000试剂将pcDNA-MAPK8、sh-MAPK8及其阴性对照转染至MC3T3-E1细胞并置于37 ℃、5% CO_2条件下培养24 h,收集细胞用于随后的体外实验。

1.2.3 实时定量PCR(QPCR) 使用TRIzol试剂提取总RNA,并使用PrimeScript™ RT reagent Kit进行反转录以获得cDNA样本。随后使用TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ进行实时定量PCR,方法如下:在95 ℃下10 min;35个循环,95 ℃下15 s,60 ℃下20 s,72 ℃下15 s。*β-actin*作为内参,相对表达量计算公式为$2^{-\Delta\Delta Ct}$。引物序列如下所示:*MAPK8*正向引物:5′-CCAGGACTGCAGGAACGAGT-3′,反向引物:5′- CCACGTTTTCCTTGTAGCCC-3′;*β-actin*正向引物:5′-TCG TGC GTG ACA TTA AGG AG-3′,反向引物:5′-GTC AGG CAG CTC GTA GCT CT-3′。

1.2.4 Western blot分析 使用RIPA裂解液分别从细胞和组织中提取总蛋白。使用10% SDS-PAGE分离蛋白并转移到聚偏二氟乙烯膜上。转膜结束后,使用5%脱脂奶粉封闭膜2 h。随后,将膜与一抗在4 ℃下孵育过夜。接着与二抗于室温条件下孵2 h,使用增强的化学发光试剂盒检测蛋白质的表达情况并拍照记录。实验中使用的一抗为OPN(1∶300)、MAPK8(1∶500)、Runx2(1∶500)、BMP2(1∶400)、β-actin(1∶400)、二抗为IgG(1∶500)。

1.2.5 细胞活力检测 使用CCK-8试剂盒检测MC3T3-E1细胞的活力。将细胞以3×10^4细胞/孔的浓度接种到96孔板中,培养48 h后在培养基中添加10 μL CCK-8试剂,并于37 ℃黑暗中孵育2 h。使用酶标仪在450 nm处测定的吸光度值来评估细胞活力。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 使用膜联蛋白V-FITC/PI染色试剂盒进行凋亡检测。将不同处理的细胞转染到6孔板中,在室温下与5 μL的FITC偶联的Annexin-V和10 μL PI孵育5 min,并采用流式细胞仪检测染色细胞以评估细胞凋亡水平。

1.2.7 MDA水平检测 MDA检测试剂盒评估细胞裂解液中的MDA浓度。

1.2.8 细胞内ROS检测 收集处理的细胞,并加入一定量的DCFH-DA探针溶液。在37 ℃培养箱中避光孵育20 min后,用无血清细胞培养液洗涤细胞3次。最后,收集细胞,使用FACSCalibur流式细胞仪(Becton Dickinson,San Jose,CA,USA)检测细胞内的荧光强度。

1.2.9 GSH检测 根据制造商说明,使用GSH测定试剂盒对GSH进行定量。

1.2.10 SOD活性检测 使用SOD检测试剂盒评估SOD活性。

1.2.11 细胞成骨分化 将800 μL的1 mol/L β-甘油磷酸酯和200 μL的0.5 mol/L抗坏血酸加入99 mL BMSC培养基中。在达到融合后,将细胞培养基转换为成骨细胞分化培养基。分化培养基每隔1 d更换1次。大约3周后,用肉眼观察细胞,并使用茜素红染色来评估各组的矿化程度。

1.2.12 成骨指标检测 按照ALP活性测定试剂盒、钙测定试剂盒和磷测定试剂盒,检测细胞ALP活性以及钙和磷含量。

1.2.13 OPF大鼠模型构建 将大鼠随机分为假手术组(sham)、模型组(OPF)和毛蕊异黄酮治疗组(OPF+Cal),每组13只。根据已发表文献通过卵

巢切除术联合骨折手术建立OPF大鼠模型[13]。大鼠腹腔注射3%的40 mg/kg戊巴比妥钠进行麻醉。随后，手术摘除卵巢并对伤口结扎。卵巢摘除后观察培养4周，从大鼠右侧股骨中段处纵形切开皮肤，暴露并固定股骨，在股骨干中段约1/3处锯断成横行骨折，再用克氏针逆行刺入骨折近端至后侧的股骨大转子处穿出，用生理盐水冲洗后缝合伤口。假手术组大鼠仅暴露卵巢不摘除。

大鼠建模次日，毛蕊异黄酮组大鼠每日口服30 mg/kg毛蕊异黄酮进行治疗，持续4周[14]。实验结束后采集大鼠颈动脉血液并分离血清。采血结束后脱颈处死大鼠，分离两侧股骨组织，并置于4 ℃冰箱中保存。

1.2.14　指标检测　通过双能X线骨密度仪检测大鼠股骨密度(bone mineral density，BMD)。使用ALP活性测定试剂盒、钙测定试剂盒和磷测定试剂盒，检测大鼠血清中的ALP活性以及钙和磷含量。提取不同处理组大鼠股骨组织总蛋白，并使用Western blot分析检测成骨相关蛋白表达水平。

收集的大鼠股骨组织使用4%多聚甲醛在棕色小瓶中固定2 d，然后用10%乙二胺四乙酸(EDTA，PH 7.2)脱钙4周。脱钙后，将组织包埋在石蜡中，并制作5 μm切片，然后将切片在二甲苯中脱蜡，并用分级乙醇系列进行水合。随后使用H&E染色试剂盒(碧云天，中国)，并按照厂商说明检查形态学变化。

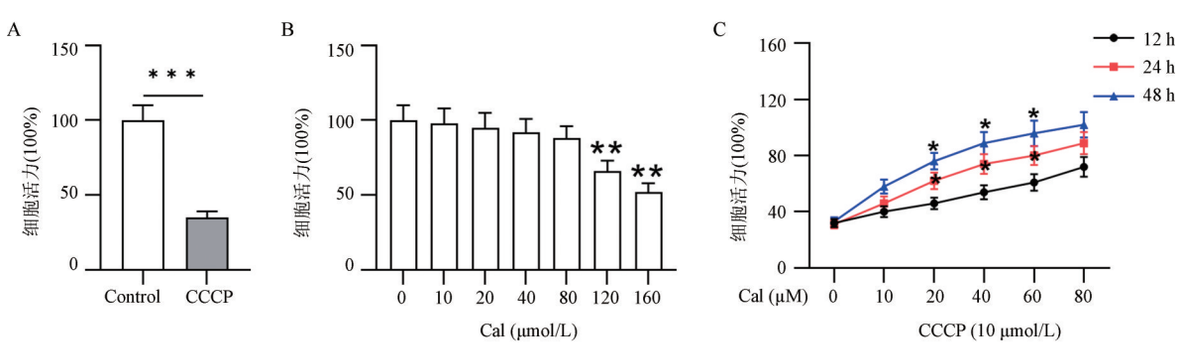
1.3　统计学处理

使用SPSS 22.0进行数据分析。数据表示为$\bar{x}\pm s$。显著性差异分析采用t检验和方差分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　毛蕊异黄酮缓解CCCP对MC3T3-E1细胞活力的抑制作用

使用10 μmol/L CCCP处理MC3T3-E1细胞48 h后细胞活力明显降低($t=10.45$，$P<0.001$，图1A)。此外，本研究发现用不同浓度毛蕊异黄酮处理MC3T3-E1细胞，当浓度大于120 μmol/L时细胞活力明显降低(图1B，$P<0.01$)。随后，分别使用0、10、20、40、60和80 μmol/L的毛蕊异黄酮处理CCCP诱导的MC3T3-E1细胞12、24、48 h，结果显示，毛蕊异黄酮以剂量依赖的方式明显减轻了CCCP诱导的MC3T3-E1细胞损伤，尤其是60 μmol/L(图1C，$P<0.05$)。因此，本研究在后续的实验中采用60 μmol/L的毛蕊异黄酮处理MC3T3-E1细胞。



$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

A：CCK8检测MC3T3-E1细胞活力；B：CCK-8测定不同浓度的毛蕊异黄酮处理后的MC3T3-E1细胞活力；C：不同浓度的毛蕊异黄酮处理CCCP预处理的MC3T3-E1细胞12、24、48 h，CCK-8测定细胞活力

图1　毛蕊异黄酮缓解CCCP对MC3T3-E1细胞活力的抑制作用

Fig 1　Calycosin attenuated the inhibitory effects of CCCP on MC3T3-E1 cell viability

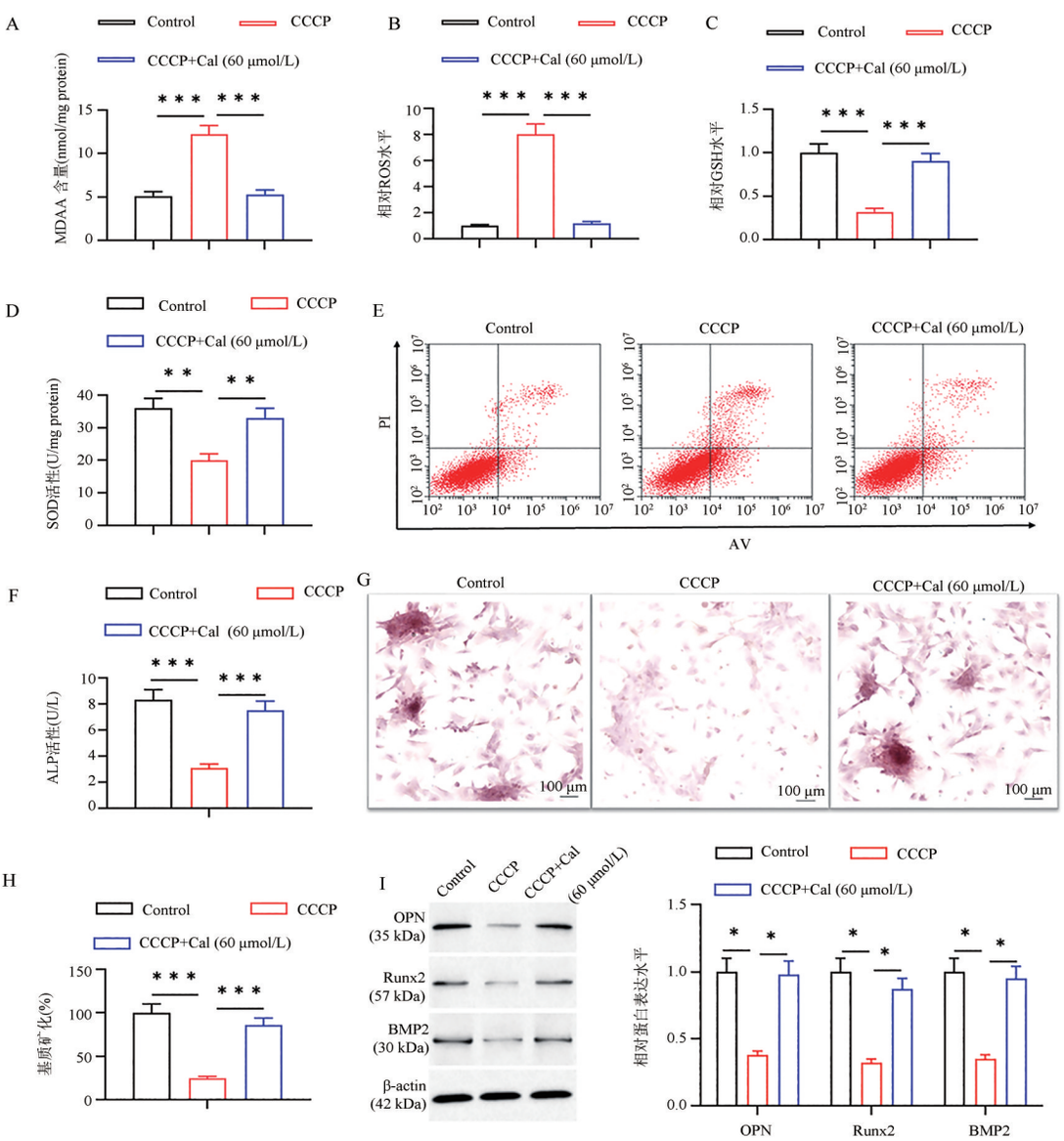
2.2　毛蕊异黄酮减轻MC3T3-E1细胞氧化应激损伤并诱导其成骨分化

结果显示，CCCP处理明显升高MC3T3-E1细胞内MDA和ROS水平，降低GSH浓度和SOD活性，而60 μmol/L的毛蕊异黄酮处理减弱了CCCP对MC3T3-E1细胞MDA和ROS水平的增加作用，以及对GSH和SOD的减弱作用($F_{MDA}=98.06$，$F_{ROS}=215.1$，$F_{GSH}=61.58$，$F_{SOD}=29.59$，$P<0.001$，图2A～D)。流式细胞术实验结果显示，CCCP促进了MC3T3-E1细胞凋亡，而毛蕊异黄酮抑制MC3T3-E1细胞凋亡(图2E)。上述结果表明毛蕊异黄酮保护MC3T3-E1细胞免受CCCP诱导的氧化应激损伤。此外，MC3T3-E1细胞是一种多能干细胞，可以分化成多种细胞类型，如成骨细胞、软骨细胞、肌肉细胞等。为了探究毛蕊异黄酮对MC3T3-E1细胞成骨分化的影响，本研究采用毛蕊

异黄酮处理CCCP预处理的MC3T3-E1细胞。ALP活性检测结果显示,CCCP降低ALP活性,而毛蕊异黄酮升高ALP活性($F=57.84$,$P<0.001$,图2F)。此外,使用茜素红染色来评估各组的矿化程度,结果显示,与空白对照组相比,CCCP组的MC3T3-E1细胞表现出较低的成骨能力(钙结节较少)和较低水平的骨基质矿化水平,而毛蕊异黄酮处理增加了MC3T3-E1细胞的成骨能力(大量钙结节)(图2G,$F=85.20$,$P<0.001$,图2H)。Western blot结果显示,CCCP降低了成骨标志蛋白OPN、Runx2和BMP2水平,毛蕊异黄酮升高OPN、Runx2和BMP2蛋白水平(图2I,$P<0.05$)。以上结果表明,毛蕊异黄酮可能促进MC3T3-E1细胞成骨分化。

2.3 毛蕊异黄酮通过上调MAPK8抑制CCCP诱导的MC3T3-E1细胞的氧化应激

据报道,毛蕊异黄酮可能通过作用于靶基因*MAPK8*对OPF表现出直接治疗作用,然而其具体调控机制尚不清楚。Western blot结果显示,与空白对照组比较,CCCP处理的MC3T3-E1细胞中



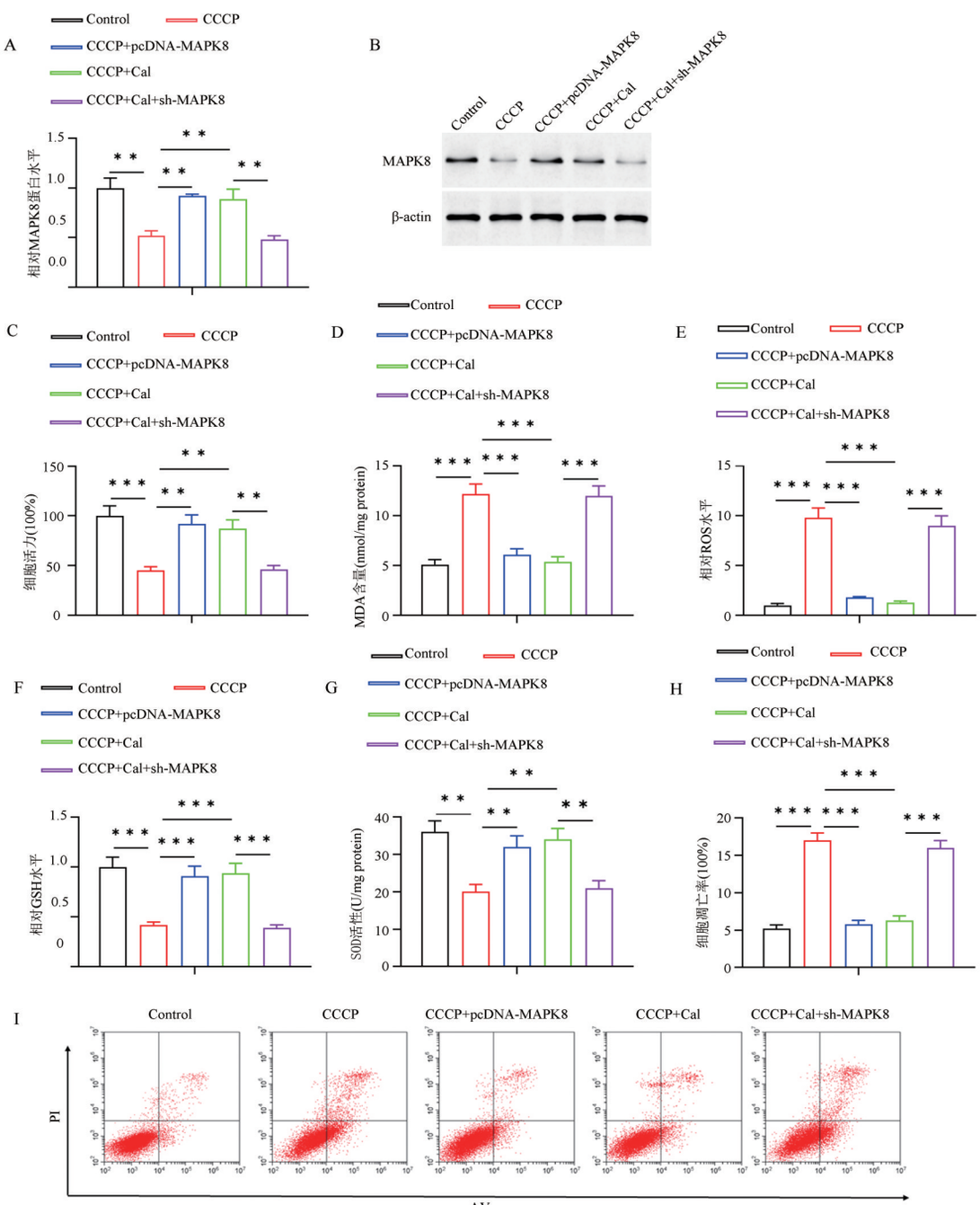
$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$

A:试剂盒检测MDA含量;B:DCFH-DA荧光探针法检测脂质ROS水平;C:GSH检测试剂盒检测GSH水平;D:SOD检测试剂盒检测SOD活性;E:流式细胞术检测细胞凋亡;F:ALP活性检测试剂盒测定ALP活性;G和H:茜素红染色评估细胞成骨分化能力(×100);I:Western blot检测成骨相关蛋白OPN、Runx2和BMP2表达水平

图2 毛蕊异黄酮减轻MC3T3-E1细胞氧化应激损伤并诱导其成骨分化

Fig 2 Calycosin alleviated oxidative stress injury and induced osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells

MAPK8蛋白水平下调，而毛蕊异黄酮处理明显促进MAPK8蛋白表达。干扰MAPK8后逆转了毛蕊异黄酮对MAPK8表达水平的促进作用（$F=36.13$，$P<0.01$，图3A，B）。CCK8结果显示，过表达MAPK8或施用毛蕊异黄酮缓解了CCCP对MC3T3-E1细胞活力的抑制作用，而干扰MAPK8则抵消了毛蕊异黄酮对MC3T3-E1细胞活力的促进作用（$F=35.64$，$P<0.01$，图3C）。此外，过表达MAPK8或施用毛蕊异黄酮减弱了CCCP诱导的MC3T3-E1细胞氧化应激损伤，表现在MDA和ROS水平的降低以及GSH水平和SOD活性的升高（$P<0.01$）；干扰MAPK8逆转了毛蕊异黄酮对CCCP诱导的MC3T3-E1细胞氧化应激损伤的缓解作用（$F_{MDA}=68.56$，$F_{ROS}=141.5$，$F_{GSH}=42.58$，$F_{SOD}=$



$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

A，B：Western blot检测MC3T3-E1细胞系中MAPK8蛋白的表达水平；C：CCK8检测细胞活力；D：试剂盒检测MDA含量；E：DCFH-DA荧光探针法检测脂质ROS水平；F：GSH检测试剂盒检测GSH水平；G：SOD检测试剂盒检测SOD活性；H：细胞凋亡率统计；I：流式细胞术代表性

图3　毛蕊异黄酮通过上调MAPK8抑制CCCP诱导的MC3T3-E1细胞的氧化应激

Fig 3　Calycosin Attenuates CCCP-Induced Oxidative Stress in MC3T3-E1 Cells via Upregulation of MAPK8

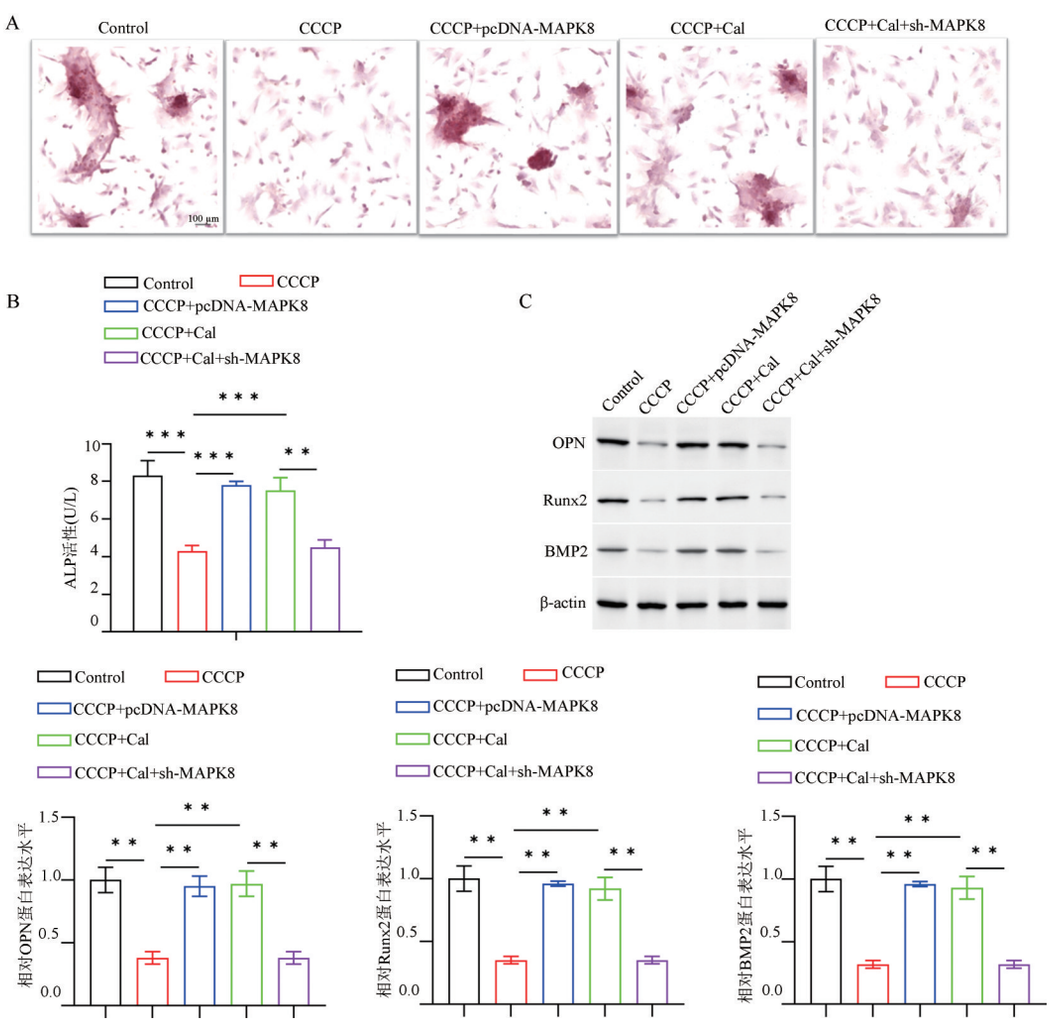
14.34，$P<0.01$，图3D～G）。流式细胞术实验结果显示，MAPK8和毛蕊异黄酮减弱了CCCP处理对MC3T3-E1细胞凋亡水平的促进作用，干扰MAPK8抵消了毛蕊异黄酮对MC3T3-E1细胞凋亡水平的抑制作用（$F=182.7$，$P<0.001$，图3H）。以上结果表明毛蕊异黄酮通过促进MAPK8表达抑制MC3T3-E1细胞的氧化应激损伤和凋亡。

2.4 毛蕊异黄酮通过上调MAPK8促进MC3T3-E1细胞的成骨分化

茜素红染色结果显示，过表达MAPK8和毛蕊异黄酮促进MC3T3-E1细胞的成骨分化，而干扰MAPK8逆转了毛蕊异黄酮对MC3T3-E1细胞成骨能力的促进作用（图4A）。此外，过表达MAPK8和毛蕊异黄酮升高MC3T3-E1细胞中ALP活性，而干扰MAPK8则逆转了毛蕊异黄酮对ALP活性的促进作用（$F=39.00$，$P<0.01$，图4B）。Western blot结果显示，过表达MAPK8和毛蕊异黄酮增加了MC3T3-E1细胞中成骨标志蛋白OPN、Runx2和BMP2的表达水平，而干扰MAPK8则抵消了毛蕊异黄酮对MC3T3-E1细胞中成骨标志蛋白表达水平的促进作用（图4C，$P<0.01$）。以上结果表明，毛蕊异黄酮可能通过促进MAPK8的表达促进MC3T3-E1细胞成骨分化。

2.5 毛蕊异黄酮通过抑制氧化应激增强骨质疏松大鼠的骨折愈合

OPF建模次日，大鼠每天口服30 mg/kg毛蕊异黄酮进行治疗，持续4周。实验结束后采集大鼠血浆分离血清，随后安乐死大鼠并分离股骨组织。Western blot结果显示，OPF大鼠股骨组织中MAPK8下调，使用毛蕊异黄酮治疗后增加了组织



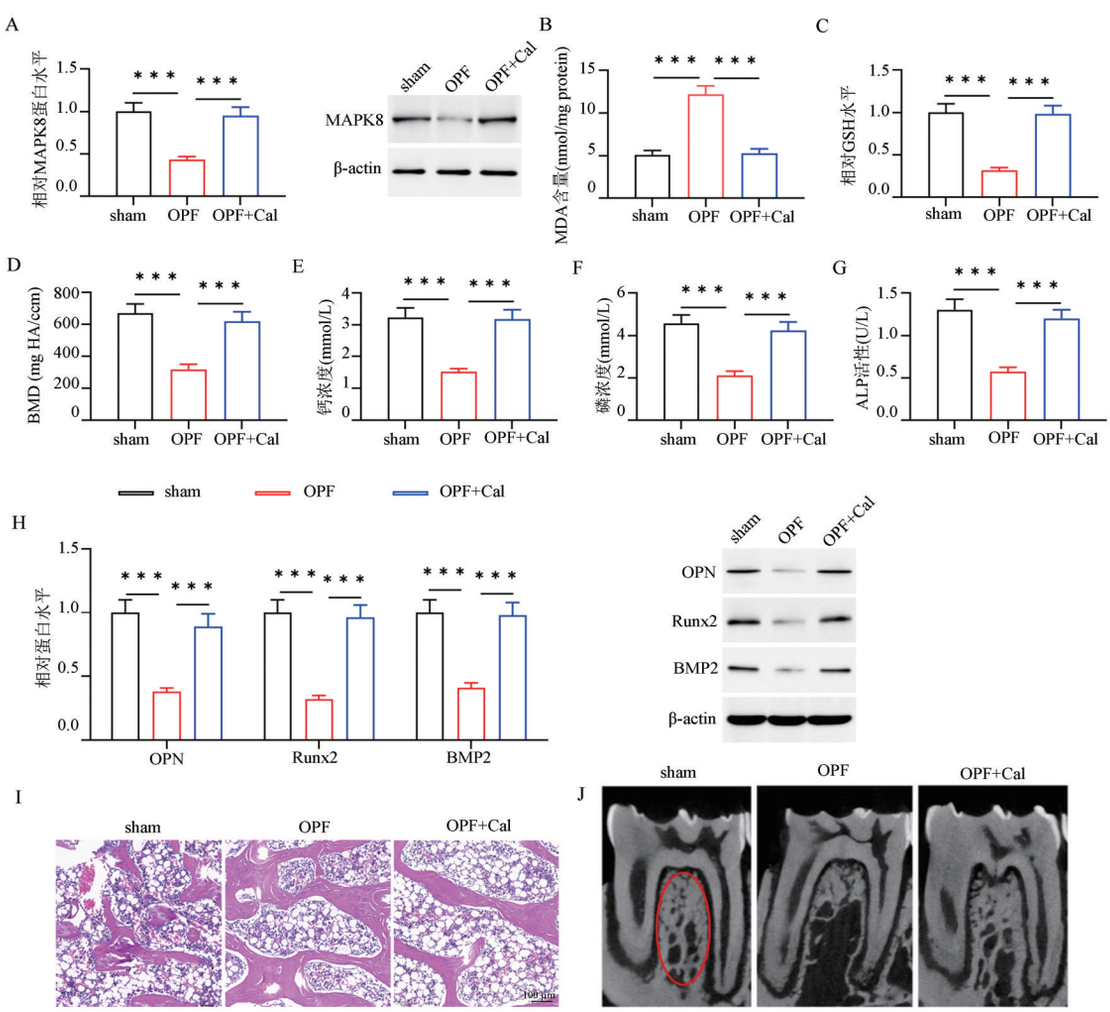
$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

A：茜素红染色评估细胞成骨分化能力（×100）；B：ALP活性检测试剂盒测定ALP活性；C：Western blot检测成骨相关蛋白OPN、Runx2和BMP2表达水平

图4 毛蕊异黄酮通过上调MAPK8促进MC3T3-E1细胞的成骨分化

Fig 4 Calycosin promotes osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells via upregulation of MAPK8

中MAPK8的表达水平（F=41.51，P<0.001，图5A）。与假手术组相比，OPF模型组大鼠股骨组织中MDA水平增加，GSH水平降低；毛蕊异黄酮治疗后MDA水平下降，而GSH水平增加（F_{MDA}=98.06，F_{GSH}=64.48，P<0.001，图5B，C）。双能X线骨密度仪检测大鼠股骨BMD，结果显示，与假手术组相比，OPF模型组大鼠股骨BMD明显降低，毛蕊异黄酮治疗升高OPF大鼠股骨BMD（F=39.21，P<0.001，图5D）。与假手术组相比，OPF模型组大鼠血清中钙和磷浓度以及ALP活性降低，毛蕊异黄酮治疗升高OPF大鼠血清中血清钙和磷浓度，以及ALP活性（$F_{钙}$=74.34，$F_{磷}$=73.40，F_{ALP}=82.33，P<0.001，图5E～G）。Western blot结果显示，与假手术组相比，OPF模型组大鼠股骨组织中成骨相关蛋白（OPN、Runx2和BMP2）表达降低，毛蕊异黄酮治疗增加了OPF大鼠股骨组织中OPN、Runx2和BMP2蛋白水平（图5H，P<0.001）。股骨组织切片H&E染色结果显示，与假手术组相比，OPF组的大鼠骨小梁数减少、骨小梁结构异常变薄和出现骨折，毛蕊异黄酮治疗增加了骨小梁数并且使骨小梁密集连续（图5I）。与此同时，与假手术组相比，OPF模型组大鼠的股骨骨折线清晰可见，断端错位，缝隙大，毛蕊异黄酮治疗使得骨折断端缝隙缩小，不断愈合（图5J）。以上结果表明，毛蕊异黄酮通过抑制氧化应激促进成骨分化，从而促进骨质疏松大鼠的骨折愈合。



***P<0.001

A：Western blot检测MAPK8表达；B：MDA检测试剂盒检测大鼠血清MDA含量；C：GSH检测试剂盒检测大鼠血清GSH水平；D：大鼠股骨BMD指标；E：钙检测试剂盒检测血清钙浓度；F：磷检测试剂盒检测血清磷浓度；G：血清中ALP活性测定；H：Western blot检测成骨相关蛋白OPN、Runx2和BMP2表达水平；I：H&E染色分析大鼠股骨组织形态（×100）；J：X射线观察各组大鼠骨折愈合情况

图5　毛蕊异黄酮通过抑制氧化应激增强骨质疏松性大鼠骨折愈合

Fig 5　Calycosin enhances fracture healing in osteoporotic rats via suppression of oxidative stress

3 讨论

OPF是临床上常见的疾病,双膦酸盐和甲状旁腺激素类似物等常用药物虽然有效,但通常伴随有严重副作用,给患者带来极大经济负担[15]。伴随着中医药深入研究,中药多靶点作用机制、较低毒副作用和高耐受性使其在骨疾病治疗中具有独特优势。研究发现,毛蕊异黄酮在多种骨疾病治疗中具有良好效果。例如,毛蕊异黄酮可以通过抑制炎症和软骨细胞凋亡,减轻氧化应激,缓解膝骨关节炎和类风湿性关节炎的进展[12,16]。在骨质疏松症方面,毛蕊异黄酮能缓解去卵巢大鼠的骨质疏松症[7]。本研究首先通过CCCP诱导MC3T3-E1细胞损伤,随后,采用不同浓度的毛蕊异黄酮进行干预。结果发现,CCCP处理后细胞活性明显降低,60 μmol/L毛蕊异黄酮可以明显恢复受损细胞活性。随后,本研究进一步采用毛蕊异黄酮治疗OPF大鼠。结果发现,毛蕊异黄酮治疗后OPF大鼠骨小梁数增加且其排列更为密集连续,同时缩小骨折断端缝隙,促进OPF大鼠的骨折愈合。因此,本研究的结果证实了毛蕊异黄酮在OPF治疗中的巨大潜力。

缓解氧化应激和促进成骨分化可以有效改善OPF的骨修复过程[17],而毛蕊异黄酮对氧化应激和氧化应激诱导的细胞凋亡具有保护作用[6]。研究发现,毛蕊异黄酮可以促进成骨自噬,从而刺激骨髓间充质干细胞的成骨分化,进而缓解骨质疏松症状[18]。此外,毛蕊异黄酮通过Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路缓解细胞氧化应激和铁死亡[19]。本研究采用毛蕊异黄酮干预了CCCP处理的MC3T3-E1细胞,随后检测细胞凋亡和氧化及成骨分化相关指标。结果发现,毛蕊异黄酮明显逆转了CCCP介导的MDA、ROS水平升高,以及GSH、SOD活性降低,并降低了细胞凋亡率。此外,毛蕊异黄酮提高了损伤细胞中的ALP活性并促进了细胞基质矿化,提高了OPF大鼠血清BMD、钙、磷和ALP活性;同时,体内外实验结果表明毛蕊异黄酮可以提高成骨标志蛋白OPN、Runx2和BMP2的表达。上述结果证明毛蕊异黄酮可以有效缓解氧化应激并促进成骨分化。

研究发现,*MAPK8*可作为调节炎症反应、细胞分化和细胞死亡等过程的关键基因[9]。*MAPK8*过度表达降低了内皮细胞凋亡、氧化应激和促炎细胞因子的产生,并促进大鼠骨髓来源的内皮组细胞的成骨分化[19,20]。也有研究发现,*MAPK8*激活可以保护去卵巢大鼠的骨细胞免受氧化应激,从而促进自噬并抑制细胞凋亡[21]。本研究在MC3T3-E1细胞内进行了MAPK8过表达和沉默干预,结果发现,MAPK8过表达与毛蕊异黄酮的作用效果相当,缓解细胞氧化应激,促进细胞成骨分化,而MAPK8沉默则逆转了毛蕊异黄酮的作用效果。此外,动物实验结果也表明,OPF大鼠经毛蕊异黄酮治疗后股骨组织中MAPK8的蛋白表达量明显升高。因此,毛蕊异黄酮可以通过促进靶基因MAPK8的蛋白表达,抑制CCCP诱导的细胞氧化应激和凋亡,促进细胞成骨分化,最终促进OPF愈合。

综上所述,毛蕊异黄酮可能通过促进靶基因MAPK8蛋白表达抑制氧化应激诱导的成骨细胞凋亡,促进成骨细胞分化,从而促进骨质疏松大鼠的骨折愈合。这些发现为毛蕊异黄酮被开发为OPF治疗药物的应用提供了一定的理论依据。

作者贡献度说明:

马运锋:论文构思、设计、监督和校对;韩小飞:实验准备、操作、数据分析和论文写作。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 McCloskey E, Tan ATH, Schini M. Update on fracture risk assessment in osteoporosis[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2024,31(4):141-148.

2 Bolland MJ, Nisa Z, Mellar A, et al. Fracture prevention with infrequent zoledronate in women 50 to 60 years of age[J]. N Engl J Med, 2025,392(3):239-248.

3 Liu H, Pan W, Liu H, et al. Biomimetic cryogel promotes the repair of osteoporotic bone defects through altering the ROS niche *via* down-regulating the ROMO1[J]. Int J Biol Macromol, 2024,257(Pt 1):128481.

4 Luo Z, Ma J, Wang Y, et al. Application of Mg-MOF-loaded gelatin microspheres with osteogenic, angiogenic, and ROS scavenging capabilities in bone defect repair[J]. Int J Biol Macromol, 2024,280(Pt 2):135721.

5 Wang B, Zhan Y, Yan L, et al. How zoledronic acid improves osteoporosis by acting on osteoclasts[J]. Front Pharmacol, 2022,13:961941.

6 Qu N, Qu J, Huang N, et al. Calycosin induces autophagy and apoptosis *via* Sestrin2/AMPK/mTOR in human papillary thyroid cancer cells[J]. Front Pharmacol, 2022,13:1056687.

7 Xiang S, Luo Y, Liu W, et al. Calycosin alleviates ovariectomy-induced osteoporosis by promoting BMSCs autophagy *via* the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2025, 398(9):11963-11974.

8 Hua Z, Dai S, Li S, et al. Deciphering the protective effect of Buzhong Yiqi decoction on osteoporotic fracture through network pharmacology and experimental validation[J]. J Orthop Surg Res, 2023, 18(1): 86.

9 Zhang Y, Zhang J, Sun Z, et al. MAPK8 and CAPN1 as potential biomarkers of intervertebral disc degeneration overlapping immune infiltration, autophagy, and ceRNA[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1188774.

10 耿燕慧, 康煜, 郑昊, 等. 中药调控MAPK信号通路治疗膝骨关节炎的研究进展[J]. 中国医药导报, 2024, 21(34): 60-64.
Geng YH, Kang Y, Zheng H, et al. Research progress on Chinese materia medica regulating MAPK Research progress on Chinese materia medica regulating MAPK [J]. Chin Med Herald, 2024, 21(34): 60-64.

11 刘尚尚, 叶国庆, 耿燕慧, 等. 中医药介导相关信号通路治疗骨质疏松症研究进展[J]. 陕西中医, 2025, 46(3): 428-432.
Liu SS, Ye GQ, Geng YH, et al. Research progress of traditional Chinese medicine-mediated related signaling pathways in treatment of osteoporosis [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2025, 46(3): 428-432.

12 Guo X, Pan X, Wu J, et al. Calycosin prevents IL-1β-induced articular chondrocyte damage in osteoarthritis through regulating the PI3K/AKT/FoxO1 pathway[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Animal, 2022, 58: 491-502.

13 Wang R, Na H, Cheng S, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on fracture healing in a rat osteoporotic model[J]. Exp Ther Med, 2023, 26(3): 412.

14 Li N, Tu Y, Shen Y, et al. Calycosin attenuates osteoporosis and regulates the expression of OPG/RANKL in ovariectomized rats *via* MAPK signaling[J]. Pharmazie, 2016, 71(10): 607-612.

15 Dong L, Jiang L, Xu Z, et al. Denosumab, teriparatide and bisphosphonates for glucocorticoid-induced osteoporosis: A bayesian network meta-analysis[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1336075.

16 贾洋洋, 王吉利, 李小玉, 等. 毛蕊异黄酮治疗骨和软骨代谢相关疾病作用机制的研究进展[J]. 中医正骨, 2025, 37(8): 30-35.
Jia YY, Wang JL, Li XY, et al. Advances in research on the mechanisms of calycosin in treatment of bone and cartilage metabolism-related diseases [J]. J Tradit Chin Orthopedics Traumatol, 2025, 37(8): 30-35.

17 Sheppard AJ, Barfield AM, Barton S, et al. Understanding reactive oxygen species in bone regeneration: A glance at potential therapeutics and bioengineering applications[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 836764.

18 Xiang S, Luo Y, Liu W, et al. Calycosin alleviates ovariectomy-induced osteoporosis by promoting BMSCs autophagy *via* the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2025, 398: 11963-11974.

19 Han Q, Shi J, Yu Y, et al. Calycosin alleviates ferroptosis and attenuates doxorubicin-induced myocardial injury *via* the Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1497733.

20 Zhang SX, Yu CH. Silencing of UCA1 attenuates the ox-LDL-induced injury of human umbilical vein endothelial cells *via* miR-873-5p/MAPK8 axis[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2023, 39(1): 6-15.

21 Wei L, Chai S, Yue C, et al. Resveratrol protects osteocytes against oxidative stress in ovariectomized rats through AMPK/JNK1-dependent pathway leading to promotion of autophagy and inhibition of apoptosis [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 16.

[本文编辑] 朱 昊