

· 基础研究 ·

淫羊藿苷对大鼠股骨头坏死微血管内皮细胞的影响[△]

岳聚安¹, 高贺¹, 张启栋², 余华晨², 刘沛², 文鹏飞², 程立明², 郭万首^{2*}

(1. 航空总医院, 北京 1000121; 2. 中日友好医院关节外科, 北京 100029)

摘要: [目的] 进一步验证淫羊藿苷 (icariin, ICA) 是否可有效的调控激素诱导的股骨头 BMECs 中 miRNA-23b 表达失衡, 保护 BMECs 功能、预防激素性 ONFH 的发生。[方法] 90 只雌性 SD 大鼠随机三组, 每组 30 只动物。模型组给予脂多糖大剂量甲强龙建立股骨头坏死模型, 并给予生理盐水灌胃。ICA 组同模型组给药, 并给予 ICA (每天 60 mg/kg) 灌胃, 连续灌注 4 周。空白组仅给予等量生理盐水。4 周处理动物, 取股骨头行组织学检查, 另外, 自股骨头分离股骨头微血管内皮细胞 (bone microvascular endothelial cells, BMECs) 进行鉴定、细胞凋亡检测和 miRNA-23b 表达的生物信息学分析。[结果] 组织形态计量方面, 模型组股骨头骨小梁的宽度和骨小梁面积明显低于空白组与 ICA 组 ($P < 0.05$), 而空白组与 ICA 组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。模型组的空骨陷窝率明显高于 ICA 组和空白组 ($P < 0.05$)。细胞凋亡方面, BMECs 活细胞率由高至低依次为: 空白组 $>$ ICA 组 $>$ 模型组 ($P < 0.05$), 其中, 模型组显著低于空白组和 ICA 组 ($P < 0.05$), 而空白组和 ICA 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。早期凋亡细胞率由高至低依次为: 模型组 $>$ ICA 组 $>$ 空白组 ($P < 0.05$), 其中, 模型组显著高于空白组 ($P < 0.05$), 而空白组与 ICA 组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。生物信息分析表明: 与空白组相比, 模型组 miRNA-23b 表达下调 ($P < 0.05$), ICA 组与空白组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。[结论] ICA 在此动物模型可有效预防激素性 ONFH 发生, 同时可保护 BMECs, BMECs 中的 miRNA-23b 可能是 ICA 预防激素性 ONFH 的作用靶点。

关键词: 淫羊藿苷, 微血管内皮细胞, 股骨头坏死, 骨小梁, 凋亡

中图分类号: R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2022) 03-0248-06

Effect of icariin on bone microvascular endothelial cells in femoral head necrosis models of rats // YUE Ju-an¹, GAO He¹, ZHANG Qi-dong², YU Hua-chen², LIU Pei², WEN Peng-fei², CHENG Li-ming², GUO Wan-shou². 1. Aviation General Hospital, Beijing 100012, China; 2. Department of Joint Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Abstract: [Objective] To further verify whether icariin (ICA) regulate the expression imbalance of mirNA-23B in hormone-induced femoral head bone microvascular endothelial cells (BMECs), protect the function of BMECs, and prevent the occurrence of hormone-induced osteonecrosis of femoral head (ONFH). **[Methods]** Ninety female SD rats were randomly assigned to three groups with 30 animals in each group. The animals in the model group were given high dose of methylprednisolone with lipopolysaccharide to establish femoral head necrosis model, and were gavaged with normal saline. Those in the ICA group were given the drugs as the model group, and were simultaneously gavaged with ICA 60 mg/kg · d⁻¹ intragastrically for 4 weeks. However, the rats in the blank group only received the same amount of normal saline. At 4 weeks, the femoral heads were harvested for histological examination. In addition, BMECs were isolated from the femoral heads for identification, detection of apoptosis and bioinformatics analysis of miRNA-23B expression. **[Results]** In term of histomorphometry, the width and area of trabecular bone in the model group were significantly lower than those in blank group and ICA group ($P < 0.05$), while which was not significantl different between blank group and ICA group ($P > 0.05$). The ratio of empty bone lacunae in model group was significantly higher than that in ICA group and blank group ($P < 0.05$). In terms of cell apoptosis, the active cell ratios of BMECs were ranked from high to low: the blank group $>$ the ICA group $>$ the model group ($P < 0.05$), which in the model group was significantly lower than the blank group and ICA group ($P < 0.05$), while there was no significant difference between blank group and ICA group ($P > 0.05$). Conversely, the ratios of early apoptotic cells from high to low was: the model group $>$ the ICA group $>$ the blank group ($P < 0.05$), in which the model group was significantly higher than the control group ($P < 0.05$), whereas there was no a significant difference between blank group and ICA group ($P > 0.05$). As results of bioinformation analysis, mirNA-23B expression was down-regulated significantly in the mod-

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.03.12

△基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81673776);国家自然科学基金青年基金项目(编号:81703896)

作者简介:岳聚安, 博士, 副主任医师, 研究方向: 关节外科, (电话)18810262022, (电子信箱)yuejuan361@sina.com

*** 通信作者:**郭万首, (电话)010-84206197, (电子信箱)zrwanshou@sina.com

el group compared with that in the blank group ($P < 0.05$), but there was no a significant difference between the ICA group and the blank group ($P > 0.05$). [Conclusion] The ICA does effectively prevent the occurrence of steroid-induced ONFH and protect BMECs in this animal models, in which the mirNA-23b in BMECs may be the target of ICA to prevent steroid-induced ONFH.

Key words: icariin, microvascular endothelial cells, osteonecrosis of femoral head, bone trabecular, apoptosis

股骨头坏死 (osteonecrosis of femoral head, ONFH) 已经成为一个日益严重的全球性健康问题^[1]。目前 ONFH 的发病机制尚未完全清楚, 但人们普遍认为, 各种创伤性和非创伤性损伤损害了本已不稳定的股骨头微循环, 最终导致骨髓和骨细胞死亡^[2, 3]。糖皮质激素的使用已成为 ONFH 最常见的发病原因^[2, 3]。尽管激素诱导 ONFH 发病机制尚不完全清楚^[4], 但有研究表明, 激素诱导股骨头微血管内皮细胞 (bone microvascular endothelial cells, BMECs) 损伤或功能障碍可能在激素性 ONFH 的发病机制中发挥重要作用^[5-7]。MicroRNAs (miRNA) 是一类广泛存在于真核生物中的内源性非编码的小 RNA, 在转录后水平通过 RNA 诱导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 和其靶基因 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR) 结合来调节靶基因行使功能。miRNA 受到越来越多的关注, 其不仅调控生物体的正常发育、组织平衡、生理功能, 也参与疾病的发生、发展及康复等多阶段的复杂过程^[3]。淫羊藿苷 (icariin, ICA; C33H40O15; 分子量: 676.67) 是从淫羊藿中提取的黄酮类化合物, 可以有效预防骨质疏松症、保护血管内皮细胞功能及预防激素性 ONFH 的发生^[8-10]。作者所在团队前期体外实验研究表明 ICA 可能通过调控激素诱导 BMECs 中 miRNA-23b 表达失衡及保护 BMECs 的功能来预防激素性 ONFH 的发生^[11, 12]。现阶段该课题组通过建立大鼠激素性 ONFH 模型及 ICA 预防激素性 ONFH 模型组, 分别提取不同组大鼠股骨头 BMECs 进行原代培养, 通过动物体内试验进一步验证 ICA 是否可保护 BMECs 的功能, 同时采用 miRNAs 基因芯片进一步探寻激素性 ONFH 发生时 BMECs 中 miRNA-23b 表达是否发生改变; ICA 对异常表达的 miRNA-23b 是否有调控作用, 来验证前期研究的结论及观点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

该动物实验研究程序严格遵守世界医学协会《赫尔辛基宣言》所规定的国际规则和条例。实验前, 90

只 8 周龄雌性 SPF 级 SD 大鼠 (北京华阜康生物科技股份有限公司) 置于特定无病原体条件下适应性饲养 1 周 (环境温度 20℃, 光照/暗循环 12 h, 湿度 48%)。标准的啮齿动物饲料饲养。ICA (批号: H0030, 中国, 索莱宝科技有限公司); 内皮细胞培养基 (货号: 1001, 美国, Sciencell); 离心机 (型号: 8622, 日本, 久保田); 脂多糖 (货号: L2880, 美国 Sigma 公司); 甲强龙 (货号: H20080284, 美国, 辉瑞制药公司); 芯片扫描仪 (型号: G2565CA, 美国, Agilent 公司); CX41 荧光显微镜 (型号: CX41 日本, Olympus 公司)。

1.2 体内实验

1.2.1 动物分组与处理

90 只雌性 SD 大鼠采用随机数字表法分为三组, 每组 30 只。模型组: 腹腔连续注射 2 次脂多糖 (20 μg/kg), 每次间隔 24 h, 24 h 后肌内连续注射 3 次大剂量甲强龙 (40 mg/kg), 每次间隔 24 h, 同时给予与 ICA 组等量生理盐水灌胃。ICA 组: 大鼠给予脂多糖及甲强龙的剂量及时间同模型组, 首次肌注脂多糖后给予大鼠 ICA (每天 60 mg/kg) 灌胃, 连续灌注 4 周。空白组: 仅给予等量生理盐水腹腔注射、肌注及灌胃。4 周后处死大鼠, 随机选择各组动物进行实验。

1.2.2 骨形态计量分析

三组大鼠每组随机取 10 只大鼠股骨头行 HE 染色, 病理变化由两位独立观察者进行评估。采用 image-pro-plus 图像分析系统计算单位面积的骨小梁面积百分比、骨小梁宽度和空骨陷窝率。

1.3 体外实验

1.3.1 BMECs 分离与鉴定

采用作者所在实验室前期建立的 BMECs 分离培养方法完成大鼠股骨头 BMECs 的提取及鉴定^[3]: 每组 20 只大鼠均采用脱臼法处死后, 75% 酒精浸消毒。后外侧入路取出股骨头, 去除软骨后, 将股骨头用组织剪切为 1 mm³ 碎骨粒。装入含有 10 ml DMEM 培养基的离心管中, DMEM 培养基清洗骨粒 2 次。离心管内加入含 0.2% I 型胶原酶的 DMEM 培养基 2 ml, 37℃ 水浴消化 30 min, 随后加入 0.25% 胰蛋白酶消化 5 min。采用 200 目细胞筛过滤, 将滤液置于

4℃、430×g 离心机中离心 6 min。将细胞接种在 35 mm 直径培养皿中，放入 37℃、5%CO₂、95%湿度的细胞培养箱中培养。72 h 后磷酸盐缓冲液冲洗一次弃去未贴壁的细胞，重新更换培养基，以后每 3~5 d 更换培养基 1 次，倒置显微镜下观察细胞形态；每组随机取 1 份细胞行流式细胞仪对股骨头微血管内皮细胞特异性抗原 CD31 和Ⅷ因子相关抗原（vWF）进行鉴定。

1.3.2 BMECs 细胞凋亡检测

每组取 15 只大鼠的 BMECs 行流式细胞仪凋亡检测。BMECs 培养皿中加不含 EDTA 的胰蛋白酶消化后离心（2 000 r/min，5 min）。PBS 洗涤 2 次，以 1~5×10⁵/管收集细胞，PBS 洗涤 1 次，离心去除 PBS，加入冰预冷的 70%的乙醇固定，离心弃去固定液，3 ml PBS 重悬 5 min，400 目筛网过滤，离心（1 000 r/min，5 min）弃去 PBS，加入 1 ml PI 染色，4℃冰箱冻存 30 min 后行流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.3 BMECs 细胞 miRNA-23b 检测及生物信息学分析

每组取 3 只大鼠 BMECs 样本进行生物信息学分析。使用 TRIzol 试剂（按照说明书操作步骤进行操作）对 BMECs 总 RNA 提取质检。质检合格的 total RNA 进行纯化、去磷酸化及标记。随后使用 Agi-

lent 芯片扫描仪对甩干的芯片进行扫描及数据提取，分析 miRNA-23b 表达量。利用 Gene Ontology（GO）软件对 miRNA-23b 调控靶基因进行功能注释分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析；计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示；资料呈正态分布时，两组间的比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法；资料呈非正态分布时，采用秩和检验；*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织观察与形态计量结果

三组股骨头组织学 HE 染色观察见图 1。空白组骨小梁排列整齐，无明显变薄、破裂（图 1a），小梁内可见大量散在蓝色骨细胞核和微血管（图 1d）。模型组出现早期骨坏死表现，骨小梁稀疏、断裂，小梁间隙变宽，小梁间隙充满大量纤维化组织（图 1b），骨小梁内可见大量空骨陷窝（图 1e）。ICA 组股骨头解剖结构（图 1d）与空白组解剖结构相似，骨小梁中可见散在蓝染的细胞核、空骨陷窝及微血管（图 1f）。

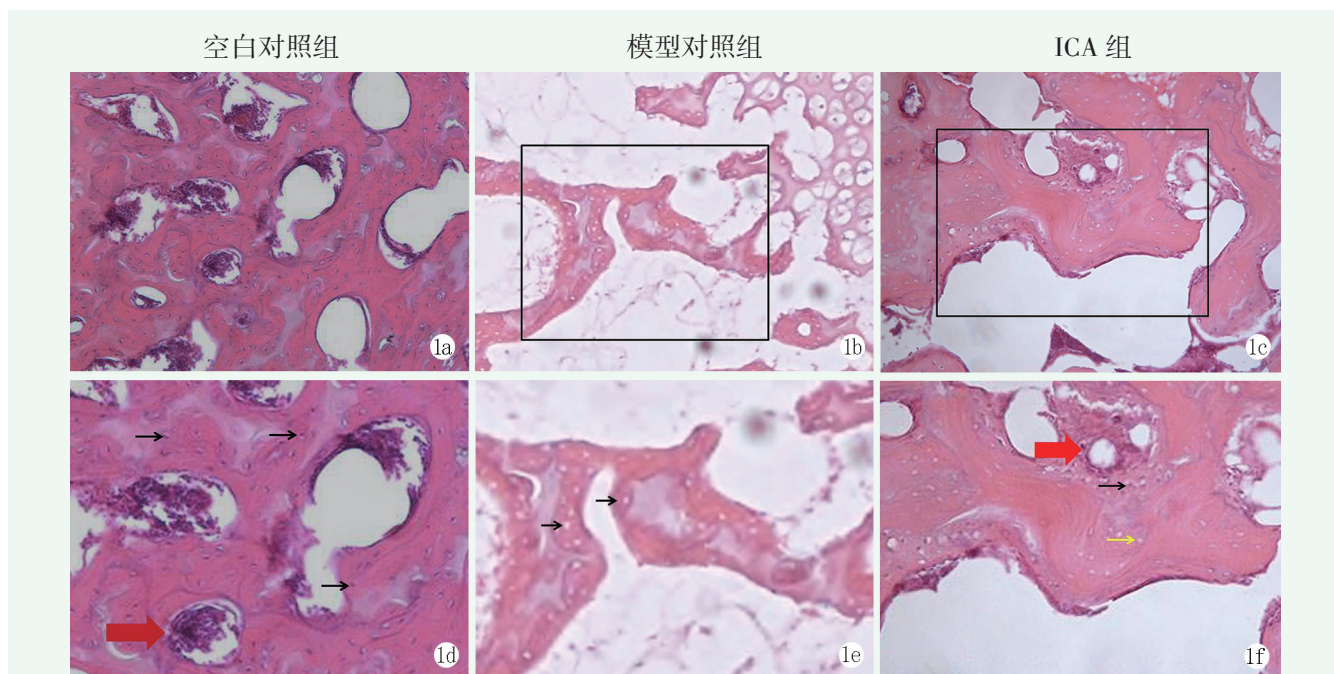


图 1 三组动物股骨头组织学观察（HE） 1a~1c: 低倍镜下所见 1a: 空白对照组（×100），骨小梁排列整齐，无明显变薄及断裂，散在大量微血管 1b: 模型对照组（×100）：骨小梁稀疏、断裂，空骨陷窝较多，未见微血管 1d~1f: 分别为上述三组黑色框部分高倍镜下（×200）所见 1d: 黑色箭头为骨陷窝，红色箭头为微血管 1e: 黑色箭头为空骨陷窝 1f: 黑色箭头为骨细胞，红色箭头为微血管，黄色箭头为空骨陷窝

组织形态计量结果见表 1, 模型组股骨头骨小梁的宽度明显低于空白组与 ICA 组 ($P < 0.05$), 空白组股骨头骨小梁的宽度与 ICA 组之间无明显差异 ($P > 0.05$); 模型组股骨头骨小梁面积百分比明显低于空

白组与 ICA 组 ($P < 0.05$), 空白组股骨头骨小梁面积百分比与 ICA 组之间无明显差异 ($P > 0.05$); 模型组的空骨陷窝率明显高于 ICA 组 ($P < 0.05$)。

表 1 三组大鼠股骨头形态计量检测结果 ($\bar{x} \pm s$) 与比较

指标	空白组 (n=10)	模型组 (n=10)	ICA 组 (n=10)	P 值
骨小梁宽度 (μm)	862.17 \pm 153.82	407.54 \pm 141.17	836.50 \pm 132.16	0.024
骨小梁面积百分比 (%)	53.43 \pm 3.31	35.68 \pm 5.69	52.59 \pm 3.22	0.018
空骨陷窝率 (%)	0	32.51 \pm 13.81	13.77 \pm 5.54	0.041

2.2 BMECs 鉴定

BMECs 细胞鉴定结果见图 2。接种 48 h 后换液, 荧光显微镜下可见少量散在贴壁长梭形细胞 (图 2a), 接种 5 d 后可见明显细胞集落 (图 2b), 接种

12 d 后细胞铺满培养皿底, 并呈现铺路石样外观 (图 2c)。流式细胞仪检测 BMECs 特异性抗原分子, 99% 的细胞同时表达 CD31 和 vWF (图 2d) [13]。

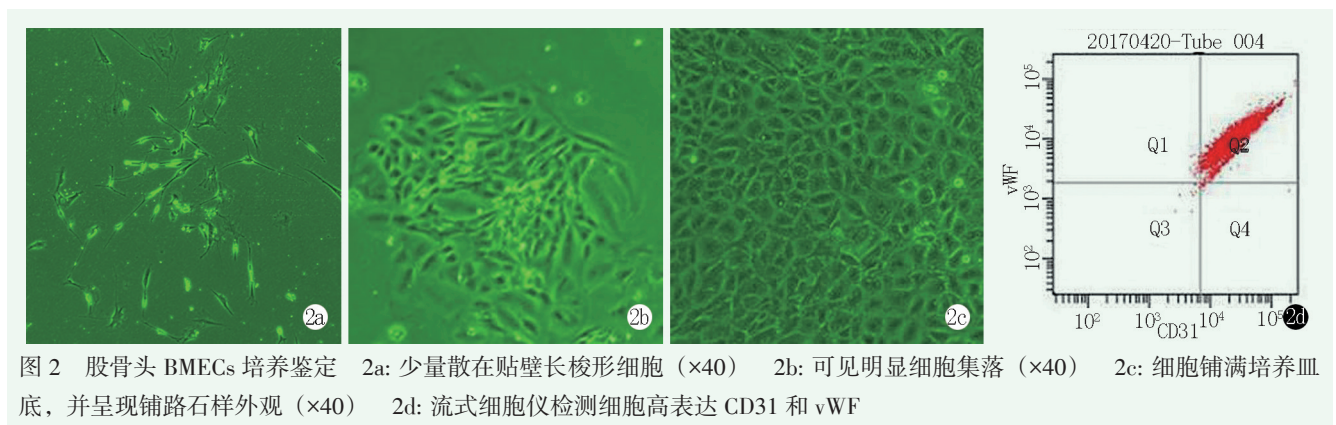


图 2 股骨头 BMECs 培养鉴定 2a: 少量散在贴壁长梭形细胞 ($\times 40$) 2b: 可见明显细胞集落 ($\times 40$) 2c: 细胞铺满培养皿底, 并呈现铺路石样外观 ($\times 40$) 2d: 流式细胞仪检测细胞高表达 CD31 和 vWF

流式细胞仪 BMECs 细胞凋亡检测结果见表 2, 三组间坏死细胞百分比的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。BMECs 活细胞比率由高至低依次为: 空白组 $>$ ICA 组 $>$ 模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中, 模型组 BMECs 活细胞比率明显低于空白组和 ICA 组 ($P < 0.05$), 而空白组和 ICA 组活细胞

百分比无显著差异 ($P > 0.05$)。早期凋亡细胞比率由高至低依次为: 模型组 $>$ ICA 组 $>$ 空白组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中, 模型组早期凋亡细胞比率明显高于空白组 ($P < 0.05$), 空白组与 ICA 组早期凋亡细胞比率的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。三组间晚期凋亡细胞比率的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

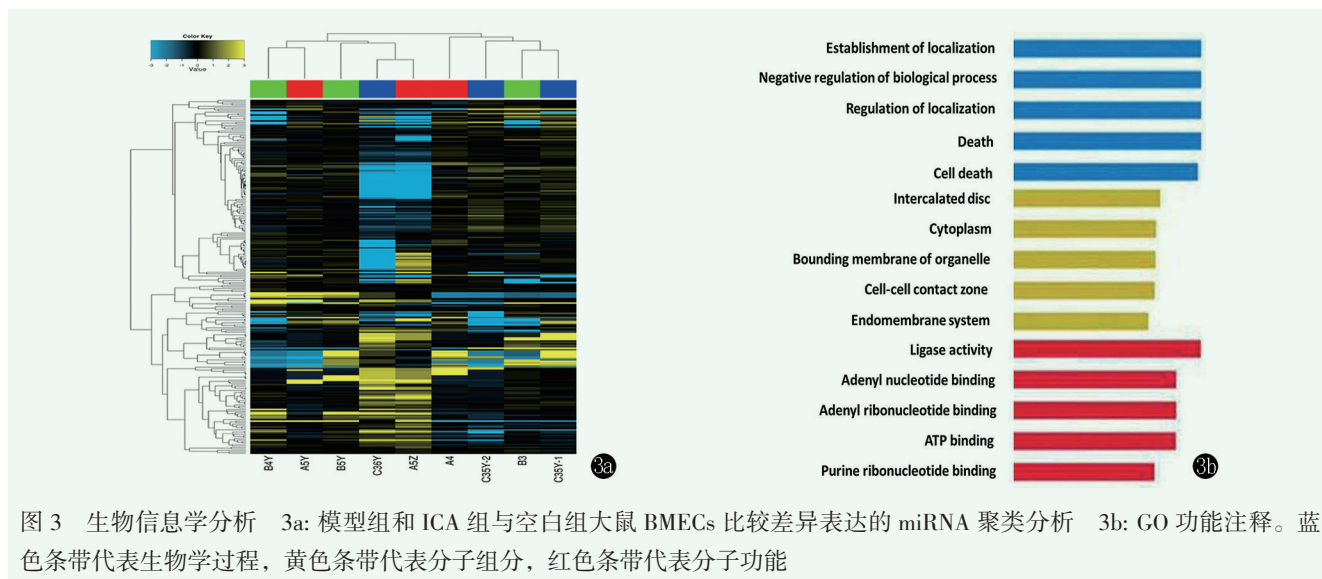
表 2 三组大鼠股骨头 BMECs 细胞凋亡检测结果 (% , $\bar{x} \pm s$) 与比较

指标	空白组 (n=10)	模型组 (n=10)	ICA 组 (n=10)	P 值
坏死细胞比率	9.23 \pm 6.50	11.37 \pm 5.40	7.89 \pm 3.49	0.346
活细胞比率	77.15 \pm 4.16	57.24 \pm 6.2	70.14 \pm 5.53	<0.001
早期凋亡细胞比率	5.64 \pm 3.97	15.92 \pm 10.38	10.92 \pm 6.20	0.022
晚期凋亡细胞比率	15.37 \pm 3.77	14.82 \pm 7.83	12.51 \pm 3.23	0.107

2.3 miRNA-23b 检测结果及生物信息学分析

miRNA 信号变化聚类分析与 GO 功能注释详见图 3。与空白组相比, 模型组 miRNA-23b 表达下调, 差异有统计学意义 ($P = 0.032$), ICA 组 miRNA-23b 表达量与空白组比较仍然下降, 但差异无统计学意义 ($P = 0.079$); 但 miRNA-23b 在 ICA 组中的表达

量高于模型组。因此, ICA 对糖皮质激素诱导的 BMECs 中 miRNA-23b 的异常表达有一定的调控作用。经 GO 数据库对 miRNA-23b 靶基因参与的细胞室 (cellular compartment)、分子功能 (molecular function) 和生物过程 (biological process) 进行了标准化描述, 详见图 3b。



3 讨论

自 Lee^[14] 首次发现 miRNA 以来, 越来越多的 miRNAs 被发现, miRNA 也成为了医学研究的热点。miRNAs 在细胞中对 mRNA 和蛋白质的表达有一定的调控作用, 因此, miRNA 的异常表达与许多疾病的发生发展有关^[15]。miRNA 异常表达的发现为 ONFH 的诊治及预防提供了新的思路。BMECs 参与骨吸收、新骨形成、血管生成、营养物质和代谢物质的运输、维持骨微环境的平衡等多种生理及病理过程^[16]。早在 1948 年, Chandler 等^[17] 研究发现 ONFH 发生的原因可能是微血管损伤。Séguin 等^[18] 和 Kerachian 等^[19] 也发现内皮功能障碍与非创伤性 ONFH 发病密切相关。因此, 在基因水层面研究股骨头 BMECs 具有重要意义, 有助于识别药物作用靶点及相关信号通路等。

ICA 是中药淫羊藿的有效活性成分, Hu 等^[20, 21] 发现 ICA 可有效抑制氧化低密度脂蛋白引起的人脐静脉内皮细胞损伤和凋亡及缺氧引起的腕静脉内皮细胞损伤。作者所在团队体外实验研究表明 ICA 可有效抑制激素诱导股骨头 BMECs 损伤^[11]。现阶段本团队通过动物体内实验研究进一步验证, ICA 可有效保护激素诱导的 BMEC 损伤, 降低 BMECs 的凋亡率。有研究表明, ICA 具有性激素样作用, 其可有效促进骨组织蛋白合成和成骨细胞生长, 从而有利于骨组织再生及修复^[22, 23]。本中心组织的一项多中心随机双盲对照试验证实, 服用主要成分为 ICA 的仙灵骨葆胶囊可有效降低激素性股骨头坏死的发病率^[22]。本团队前期实验研究也表明, ICA 可促进动物体内的内皮

细胞增殖、迁移、成管, 促进微血管形成, 改善微循环, 促进骨组织修复, 延缓股骨头坏死病情的进展^[24]。作者通过动物实验也揭示了, ICA 可有效的预防激素性股骨头坏死的发生。

miR-23b 是一种多功能的非编码 mi-RNA, 具有调控血管生成的作用, 尤其在富含血管内皮细胞的组织中高表达如心脏、肺等^[25]。miRNA-23b 的靶基因及多条相关信号通路, 在细胞凋亡、增殖、分化, 血管形成及干细胞分化方面具有重要的调节作用^[11]。Zhou 等^[26] 研究发现 miRN-23b 的表达与调节血管内皮细胞功能及调控血管的完整性相关, miRNA-23b 过表达可能与血管的新生有关。赵丁岩等^[11] 研究表明上调 miRNA-23b 可能抑制 BMECs 的凋亡和促进新生血管形成。作者前期体外实验研究表明, 激素可抑制 BMECs 中 miR-23b 的表达; BMECs 经 ICA 干预后, 可有效的调控激素对 miRNA-23b 表达量的影响, 同时推测 ICA 可能通过调控骨微血管内皮细胞 miR-23b 的表达量来参与激素性股骨头坏死病理过程的调控^[11], 同时作者也发现 ICA 在体外可促进微血管生成, 而且可以增加激素诱导后大鼠股骨头微血管的密度。该系列研究提示 ICA 在预防糖皮质激素诱导的 ONFH 中具有一定的作用^[24]。现阶段, 本研究通过动物体内实验进一步验证了 ICA 对激素诱导的 miR-23b 表达量的下降有一定的调控作用。这为下一步深入研究股骨头坏死的发病机制, 探究 ICA 的作用靶点奠定良好基础。

该研究存在以下不足之处: (1) 体内研究表明, ICA 对激素诱导 miRNA-23b 表达量的下降有一定的调控作用, 但 miRNA-23b 的表达量未完全恢复到正常值, 因此 ICA 的最佳给药剂量可能需要进一步探

索；(2) 前期研究预测的 miRNA-23b 靶基因可能调控的信号通路及现阶段对 miRNA-23b 靶基因功能注释分析，需要进一步研究；(3) 前期实验已验证 Agilent 芯片检测 miRNA 表达量的准确性^[3, 11]，因此该研究没有对 miRNA-23b 表达量进行 PCR 验证。

ICA 在动物体内可有效的预防激素诱导的 ONFH 的发生，同时可保护 BMECs，BMECs 中的 miRNA-23b 可能是 ICA 预防激素性股骨头坏死的作用靶点。

参考文献

- [1] He MC, Zhang J, Chen XJ, et al. Osteoclastic activity was associated with the development of steroid-induced osteonecrosis of femoral head [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48 (1): 1036-1046.
- [2] Liu L, Gao F, Sun W, et al. Investigating clinical failure of core decompression with autologous bone marrow mononuclear cells grafting for the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head [J]. *Int Orthop*, 2018, 42 (7): 1575-1583.
- [3] Yue J, Wan F, Zhang Q, et al. Effect of glucocorticoids on miRNA expression spectrum of rat femoral head microcirculation endothelial cells [J]. *Gene*, 2018, 651 (1): 126-133.
- [4] Wang A, Ren M, Song Y, et al. MicroRNA expression profiling of bone marrow mesenchymal stem cells in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head associated with osteogenesis [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24 (12): 1813-1825.
- [5] Li YM, Wang SX, Gao HS, et al. Factors of avascular necrosis of femoral head and osteoporosis in SARS patients' convalescence [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2004, 84 (16): 1348-1353.
- [6] Starklint H, Lausten GS, Arnoldi CC. Microvascular obstruction in avascular necrosis. Immunohistochemistry of 14 femoral heads [J]. *Acta Orthop Scand*, 1995, 66 (1): 9-12.
- [7] Kang P, Shen B, Yang J, Pei F. Circulating platelet-derived microparticles and endothelium-derived microparticles may be a potential cause of microthrombosis in patients with osteonecrosis of the femoral head [J]. *Thromb Res*, 2008, 123 (2): 367-373.
- [8] Feng R, Feng L, Yuan Z, et al. Icaritin protects against glucocorticoid-induced osteoporosis in vitro and prevents glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis in vivo [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67 (1): 189-197.
- [9] Zhao DY, Yu QS, Guo WS, et al. Effect of icaritin on the proteomic expression profile of bone microvascular endothelial cells of human femoral head against steroids-induced lesion [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2016, 96 (13): 1026-1030.
- [10] Zhao J, Ohba S, Komiyama Y, et al. Icaritin: a potential osteoinductive compound for bone tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16 (1): 233-243.
- [11] 赵丁岩, 郭万首, 俞庆声, 等. 淫羊藿苷对激素诱导损伤骨微血管内皮细胞微小 RNA 表达的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20 (15): 2140-2147.
- [12] 赵丁岩, 俞庆声, 郭万首, 等. 淫羊藿苷对激素诱导损伤人股骨头微血管内皮细胞蛋白质表达谱的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2016, 96 (13): 1026-1030.
- [13] 岳聚安, 王冉东, 张启栋, 等. 激素对大鼠股骨头骨微血管内皮细胞 miRNA 表达谱的生物信息学探索 [J/CD]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2020, 15 (2): 103-109.
- [14] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75 (5): 843-854.
- [15] Prabakar A, Natarajan J. MicroRNA mediated network motifs in autoimmune diseases and its crosstalk between genes, functions and pathways [J]. *J Immunol Methods*, 2017, 440 (1): 19-26.
- [16] Lu YF, Yu QS, Guo WS, et al. A method for isolated culture of bone microvascular endothelial cells of human femoral head [J]. *Zhongguo Gu Shang*, 2014, 27 (10): 843-847.
- [17] Chandler FA. Coronary disease of the hip [J]. *J Int Coll Surg*, 1948, 11 (1): 34-36.
- [18] Séguin C, Kassis J, Busque L, et al. Non-traumatic necrosis of bone (osteonecrosis) is associated with endothelial cell activation but not thrombophilia [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47 (8): 1151-1155.
- [19] Kerachian MA, Harvey EJ, Cournoyer D, et al. Avascular necrosis of the femoral head: vascular hypotheses [J]. *Endothelium*, 2006, 13 (4): 237-244.
- [20] Hu Y, Li H, Liu K, et al. Protective effects of icaritin on human vascular endothelial cells induced by oxidized low-density lipoprotein via modulating caspase-3 and Bcl-2 [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17 (5): 6835-6839.
- [21] Wang YK, Huang ZQ. Protective effects of icaritin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(2): 174-182.
- [22] Li ZR, Cheng LM, Wang KZ, et al. Herbal Fufang Xian Ling Gu Bao prevents corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head-A first multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *J Orthop Translat*, 2018, 12 (1): 36-44.
- [23] Wang Z, Wang D, Yang D, et al. The effect of icaritin on bone metabolism and its potential clinical application [J]. *Osteoporos Int*, 2018, 29 (3): 535-544.
- [24] Yu H, Yue J, Wang W, et al. Icaritin promotes angiogenesis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral heads: In vitro and in vivo studies [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 (11): 7320-7330.
- [25] 朱超, 姜彦峰. 股骨头坏死患者血清 miRNA-210, miRNA-23b 检测的应用价值 [J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32 (4): 57-59, 151.
- [26] Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, et al. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (20): 8287-8292.

(收稿:2021-07-01 修回:2021-10-19)

(同行评议专家: 李丹)

(本文编辑: 宁桦)