

· 基础研究 ·

开放获取

黄豆黄苷对地塞米松诱导成骨细胞凋亡的影响[△]

李润泽¹, 刘启彬¹, 陈长军¹, 马小杰², 宫傲², 张磊^{1*}

[1. 山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)骨外科, 山东济南 250000; 2. 山东中医药大学, 山东济南 250000]

摘要: [目的] 探讨黄豆黄苷(glycitin, GL)对地塞米松(dexamethasone, DEX)诱导的成骨细胞凋亡和氧化应激损伤的保护作用,并探讨其可能的分子机制。[方法] 应用DEX刺激MC3T3-E1细胞模拟激素性股骨头坏死(glucocorticoids-induced osteonecrosis of the femoral head, GC-ONFH)体内的激素环境,根据细胞处理不同分为3组,对照组(blank control, BC):培养基中加入等量的PBS;DEX组:培养基中加入浓度为100 μmol/L的DEX;DEX+GL组(dexamethasone+glycitin, DEX+GL):培养基中加入浓度为100 μmol/L的DEX以及浓度为15 μmol/L的GL,干预时间为24 h,不分时间组。MC3T3-E1细胞传代常规培养48 h后,将细胞培养基更换为成骨诱导培养基。[结果] 流式细胞检测方面,与BC组比较,DEX组细胞凋亡率显著增加,与DEX组相比,DEX+GL组细胞凋亡率显著降低[(9.8±1.5)% vs (17.7±1.4)% vs (13.6±0.4)%, $P<0.001$]。RT-qPCR检测方面,BC组,DEX组和DEX+GL组的基因表达水平分别为, Collagen I [(1.0±0.0) vs (0.5±0.3) vs (1.0±0.2), $P=0.011$], Runx-2 [(1.0±0.0) vs (0.6±0.1) vs (1.1±0.0), $P<0.001$], Cleaved Caspase 3 [(1.0±0.0) vs (1.3±1.3) vs (0.9±0.0), $P=0.002$], Bax [(1.0±0.0) vs (1.4±0.3) vs (0.8±0.1), $P=0.008$], 差异均有统计学意义。Western blot检测方面,与BC组相比,DEX组ALP、Collagen I、Runx-2、Bcl-2、Wnt3a、β-catenin的蛋白表达水平显著下降($P<0.05$);与DEX组相比,DEX+GL组上述蛋白表达水平显著增加($P<0.05$)。与BC组相比,DEX组Cleaved Caspase 3、Bax的蛋白表达水平显著增加($P<0.05$),与DEX组相比,DEX+GL组上述两指标的蛋白表达水平显著减少($P<0.05$)。与BC组相比,DEX组的细胞绿色荧光显著增强($P<0.05$),与DEX组相比,DEX+GL组绿色荧光显著减弱($P<0.05$)。[结论] GL能够逆转DEX介导的成骨细胞成骨抑制、改善DEX介导的成骨细胞凋亡增加,保护DEX介导的成骨细胞氧化应激损伤,其机制可能与GL激活Wnt3a/β-Catenin信号通路有关。

关键词: 黄豆黄苷, 成骨细胞, 成骨分化, 细胞凋亡, ROS, Wnt/β-Catenin

中图分类号: R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478(2024)24-2264-07

Effect of glycitin on osteoblast apoptosis induced by dexamethasone // LI Run-ze¹, LIU Qi-bin¹, CHEN Chang-jun¹, MA Xiao-jie², GONG Ao², ZHANG Lei¹. 1. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital, Shandong First Medical University, Jinan, Shandong 250000, China; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250000, China

Abstract: [Objective] To investigate the protective effect of glycitin (GL) on apoptosis and oxidative stress injury of osteoblasts induced by dexamethasone (DEX), and to explore its possible molecular mechanism. [Methods] MC3T3-E1 cells were stimulated with DEX to simulate the hormonal environment in vivo in glucocorticoids-induced osteonecrosis of the femoral head (GC-ONFH). According to different treatments, the cells divided into 3 groups, including blank control group (BC) with the same amount of PBS added into the medium, the DEX group with DEX in 100 μmol/L added into the medium, and the DEX+GL group with DEX in 100 μmol/L and GL in 15 μmol/L added to the medium, and the intervention time of 24 h. The MC3T3-E1 cells were routinely cultured for 48 h, and the cell medium was changed to osteogenic induction medium. [Results] In term of flow cytometry, the apoptosis rate of DEX group was significantly increased compared with that of the BC group, while which of DXM+GL group was significantly decreased compared with the DEX group [(9.8±1.5)% vs (17.7±1.4)% vs (13.6±0.4)%, $P<0.001$]. In term of RT-qPCR detection, the gene expression levels of BC, DEX and DXM+GL groups were as follows: Collagen I [(1.0±0.0) vs (0.5±0.3) vs (1.0±0.2), $P=0.011$]. Runx-2 [(1.0±0.0) vs (0.6±0.1) vs (1.1±0.0), $P<0.001$]. cleaved Caspase 3 [(1.0±0.0) vs (1.3±1.3) vs (0.9±0.0), $P=0.002$], BAX [(1.0±0.0) vs (1.4±0.3) vs (0.8±0.1), $P=0.008$] respectively, with statistically significant differences among the 3 groups. In term of western blot assay, protein expression levels of ALP, Collagen I, Runx-2, Bcl-2, Wnt3a and β-catenin in

DOI:10.20184/j.cnki.Issn1005-8478.100967

△基金项目: 山东省重点研发计划项目(编号:2019GSF107057);山东省自然科学基金项目(编号:ZR2020MH087;ZR2023QH517);济南市临床医学科技创新计划项目(编号:202328059)

作者简介: 李润泽,在读硕士研究生,研究方向:骨外科,(电子信箱)1473158842@qq.com

***通信作者:** 张磊,(电子信箱)qygzl1818@163.com

DEX group were significantly decreased compared with those in BC group ($P<0.05$), while which in DXM+GL group were significantly increased compared with those in the DEX group ($P<0.05$). However, the protein expression levels of Cleaved Caspase 3 and BAX in the DEX group were significantly increased compared with the BC group ($P<0.05$), while which were significantly decreased in the DXM+GL group compared with those in DEX group ($P<0.05$). The green fluorescence of DEX group was significantly enhanced compared with that in the BC group ($P<0.05$), whereas which in DXM+GL group was significantly weakened compared with that in the DEX group ($P<0.05$). [Conclusion] GL does reverse DEX-mediated osteoblast inhibition, improve DEX-mediated osteoblast apoptosis, and protect Dex-mediated osteoblast oxidative stress injury, which may be related to the activation of Wnt3a/ β -Catenin signaling pathway by GL.

Key words: glycitin, osteoblast, osteogenic differentiation, apoptosis, ROS, Wnt/ β -Catenin

激素性股骨头坏死 (glucocorticoids-induced osteonecrosis of the femoral head, GC-ONFH) 是一种难治性骨病, 好发于年轻人群, 患者常在 2~3 年内发生股骨头塌陷, 其关节功能逐渐丧失^[1, 2]。糖皮质激素 (glucocorticoids, GCs) 的使用是其重要的诱因, DEX 属于重要的 GCs。GCs 可以引起骨代谢失衡、局部血运破坏, 同时还降低成骨细胞 (osteoblast, OB) 成骨活性, 促进破骨细胞 (osteoclast, OC) 破骨活性, 降低骨髓间充质干细胞 (bone marrow stromal stem cells, BMSCs) 成骨分化能力并增加其成脂分化, 股骨头随病情进展不断塌陷^[3-5]。股骨头坏死的保头治疗方式众多, 但其疗效仍有限, 许多患者仍无法摆脱全髋关节置换术 (total hip arthroplasty, THA) 的命运。

GC-ONFH 的发病机制众多, 目前研究发现炎症性骨免疫介导的骨代谢失衡在其发病中发挥关键作用。研究发现, T 细胞亚群失衡可以增加股骨头内破骨性 T 细胞的表达, 进而促进了股骨头的骨吸收和股骨头塌陷^[6]。此外, 坏死骨组织可以增加促炎性 M1 型巨噬细胞的比例, 导致慢性炎症进而干扰骨修复^[7]。其中, M1 型巨噬细胞还能够增加 BMSCs 和骨细胞的凋亡而参与 GC-ONFH 进展, 其机制与 M1 巨噬细胞分泌的 TNF- α 激活 NF- κ B 信号通路有关, 清除 M1 型巨噬细胞能够延缓 GC-ONFH 进展^[8]。GCs 还可通过调节内质网应激诱导 OB、BMSCs 以及内皮细胞的凋亡 (apoptosis), 导致血运受损、骨修复障碍而导致股骨头坏死发生, 而干预细胞凋亡则能够对 GC-ONFH 产生治疗作用^[9]。此外, GCs 通过抑制 Wnt 信号通路、干扰骨介导骨代谢障碍而参与 GC-ONFH 发病, 而激活 Wnt 信号通路, 抑制骨细胞的凋亡、促进骨形成及血管新生则可对 GC-ONFH 产生治疗作用^[10]。在众多的骨细胞中, OB 是介导 GC-ONFH 发病、促进骨形成的关键细胞之一^[11]。

黄酮类化合物是一类广泛存在于食物和药物中的多酚化合物, 其生物活性众多且毒副作用低, 具有良

好的应用前景^[12]; 根据化学结构的不同, 黄酮类化合物可分为黄酮、异黄酮、二氢异黄酮等。其中, 黄豆黄苷 (glycitin, GL) 是异黄酮衍生出来的一种化合物, 其结构与雌激素相同^[13]。GL 药用作用广泛, 具有抗菌、抗病毒、抗衰老等作用^[14]。有研究指出, GL 可通过其抗炎作用抑制 NF- κ B 信号通路, 抑制软骨细胞破坏、延缓骨关节炎进展^[15]。也有研究称, GL 可促进 BMSCs 成骨分化并抑制其成脂分化^[16]。但是 GL 抑制 GCs 介导的成骨细胞凋亡、促进其成骨分化及相关分子机制仍未阐明。因此, 本文将探讨 GL 调控 GCs 介导的成骨细胞凋亡及其成骨分化的分子机制, 为进一步挖掘 GL 在激素性股骨头坏死治疗中的作用奠定新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

MC3T3-E1 细胞系购自上海中乔新舟公司; 地塞米松、GL 购自 MCE 公司; α -MEM 培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素双抗购自 Gibco 公司; 成骨诱导培养基购自赛业 (广州) 生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒、荧光定量逆转录试剂盒购自 Vazyme 公司; Runx-2、Collagen I、Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase 3、Wnt3a、 β -catenin 购自 Cell Signaling 公司; β -actin 购自 Proteintech 公司; 活性氧 (ROS) 检测试剂盒购自赛维尔公司。

1.2 细胞分组与体外处理

将 MC3T3-E1 细胞接种于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素双抗的 α -MEM 培养基, 并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 细胞生长至 80% 融合度时传代。根据既往文献确定了地塞米松 (dexamethasone, DEX) 的浓度为 100 μ mol/L, GL 浓度为 15 μ mol/L^[9, 15]。根据细胞处理不同, 将细胞分为 3 组, 稀释达六孔板密度要求后, 每组两孔, 加入六孔板, 分组及处理方式: 对照组 (blank control, BC); 培养基中

加入等量的 PBS；DEX 组：培养基中加入浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEX；DEX+GL 组（dexamethasone+glycitolin, DEX+GL）：培养基中加入浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEX 以及浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 GL，干预时间为 24 h，不分时间组。MC3T3-E1 细胞传代常规培养 48 h 后，将细胞培养基更换为成骨诱导培养基。

1.3 检测方法

1.3.1 流式细胞检测

收集经胰酶消化后的 BC 组、DEX 组、DEX+GL 组细胞，离心后去上清，剩余产物用 PBS 重悬；根据试剂商提供的说明书，将样品与 500 μl 缓冲液、5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 混合避光反应 15 min，然后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况，对细胞的不同状态（主要是早凋、晚凋与死亡）进行比例和数量分析并计算凋亡率。

1.3.2 RT-qPCR 检测

实时定量 PCR 检测 mRNA 的表达情况。将细胞常规培养 48 h 后，继续成骨诱导培养 48 h。根据试剂商提供的说明书，使用 Trizol 提取 BC 组、DEX 组、DEX+GL 组细胞的总 RNA，先逆转录为 cDNA，再进行实时定量 PCR，检测 Runx-2、Collagen I、Bax、Cleaved Caspase 3 的表达水平，平行重复 3 次。使用 GAPDH 作为内参，以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 来计算上述基因 mRNA 的相对表达量^[17]。所用的 PCR 引物序列见表 1。

表 1. 实时定量 PCR 引物序列
Table 1. Real-time quantitative PCR primer sequence

Gene symbol (Mus)	Primer sequences (5' - 3')
GAPDH	Forward: AGAACATCATCCCTGCATCC
	Reverse: AGTTGCTGTGAAGTCGC
Runx-2	Forward: ATGCTTCATTCGCCTCACAAA
	Reverse: GCACTCACTGACTCGGTTGG
Collagen I	Forward: CGGACCTAAAGGGGAGATGG
	Reverse: CCAGCCGCACTGAATTGAGT
Cleaved Caspase-3	Forward: CATGGGAGCAAGTCAGTGGA
	Reverse: TGACATTCCAGTGCTCTTATGGA
Bax	Forward: ACCAGGCTGGCTGGGAAG
	Reverse: CCTTTCCTCCCTCCCCCATTC

1.3.3 Western blot 检测

采用 Western blot 法检测各组细胞中凋亡指标 (Bax、Cleaved Caspase 3、Bcl-2)、成骨指标 (ALP、Collagen I、Runx-2) 蛋白表达水平变化情况：将细胞常规培养 48 h 后，继续成骨诱导培养 48 h。根据试剂说明，使用 BCA 检测试剂盒计算蛋白质样品的浓度，

然后依次进行了电泳、转膜、封闭、敷一抗、敷二抗、显影等操作，并以 β -actin 作为内参蛋白，使用 Image J 计算 Bax、Cleaved Caspase 3、Bcl-2、ALP、Collagen I 和 Runx-2 蛋白的相对表达量^[18]。

1.3.4 ROS 检测

按 ROS 测试盒说明书操作，配置 2'、7'-二氯荧光素二乙酸酯工作液，并与洗涤后的 BC 组、DEX 组、DEX+GL 组 MC3T3-E1 细胞孵育，避光孵育 30 min，PBS 缓冲液洗涤后在荧光显微镜下观察细胞内活性氧自由基的含量^[19]。每个实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.4.2 软件 (San Diego, CA, USA) 进行统计分析。对于符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞检测

流式细胞术检测结果见图 1 及表 2，与 BC 组比较，DEX 组细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$)；与 DEX 组相比，DEX+GL 组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。

2.2 RT-qPCR 检测

qPCR 结果见表 2，与 BC 组相比，DEX 组 Collagen I、Runx-2 的基因表达水平显著下降 ($P < 0.05$)；与 DEX 组相比，DEX+GL 组上述指标的基因表达水平显著增加 ($P < 0.05$)。与 BC 组相比，DEX 组 Cleaved Caspase 3、Bax 的基因表达水平显著增加 ($P < 0.05$)，与 DEX 组相比，DEX+GL 组其基因表达水平显著下降 ($P < 0.05$)。

2.3 Western blot 检测

Western blot 结果见表 2，与 BC 组相比，DEX 组 ALP、Collagen I、Runx-2、Bcl-2、Wnt3a、 β -catenin 的蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$)，与 DEX 组相比，DEX+GL 组上述检测指标的蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$)。与 BC 组相比，DEX 组 Cleaved Caspase 3、Bax 的蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$)，与 DEX 组相比，DEX+GL 组上述两指标蛋白的表达水平显著下降 ($P < 0.05$)。

2.4 ROS 检测

ROS 检测结果见图 1 及表 2，与 BC 组相比，DEX 组细胞的绿色荧光显著增强 ($P < 0.05$)，与 DEX 组相比，DEX+GL 组绿色荧光显著减弱 ($P < 0.05$)。

表 2. 三组细胞检测结果比较
Table 2. Comparison of detection results among the 3 groups

指标	BC 组 (n=3)	DEX 组 (n=3)	DEX+GL 组 (n=3)	P 值
流式检测细胞凋亡 (% , $\bar{x} \pm s$)	9.8±1.5	17.7±1.4	13.6±0.4	<0.001
RT-qPCR 检测 (相对表达量, $\bar{x} \pm s$)				
Collagen I	1.0±0.0	0.5±0.3	1.0±0.2	0.011
Runx-2	1.0±0.0	0.6±0.1	1.1±0.0	<0.001
Cleaved Caspase-3	1.0±0.0	1.3±1.3	0.9±0.0	0.002
Bax	1.0±0.0	1.4±0.3	0.8±0.1	0.008
Western blot 检测 (相对表达量, $\bar{x} \pm s$)				
ALP	1.0±0.0	0.7±0.1	0.9±0.1	<0.001
Collagen I	1.0±0.0	0.7±0.1	1.0±0.0	<0.001
Runx-2	1.0±0.0	0.5±0.1	0.9±0.1	<0.001
Cleaved Caspase-3	1.0±0.0	1.6±0.1	1.2±0.1	<0.001
Bax	1.0±0.0	1.3±0.1	1.1±0.1	<0.001
Bcl-2	1.0±0.0	0.7±0.0	0.9±0.1	0.002
Wnt3a	1.0±0.0	0.7±0.1	1.0±0.1	<0.001
β -catenin	1.0±0.0	0.8±0.1	1.1±0.1	0.003
ROS 检测 (相对表达量, $\bar{x} \pm s$)				
ROS	1.0±0.0	2.0±0.2	1.3±0.1	<0.001

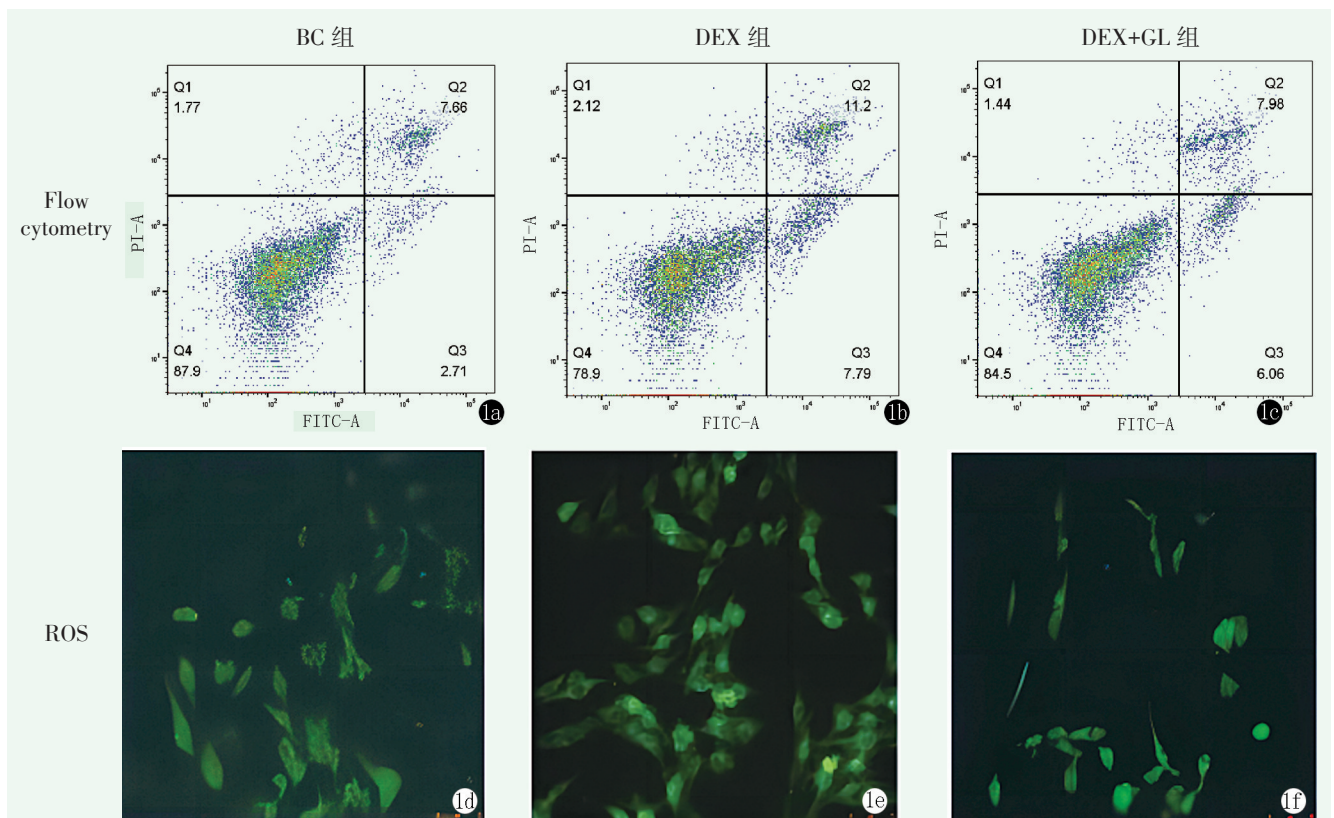


图 1. 3 组细胞流式细胞和 ROS 检测所见。1a: BC 组流式细胞检测细胞凋亡率结果；1b: DEX 组流式细胞检测细胞凋亡率结果；1c: DEX+GL 组流式细胞检测细胞凋亡率结果；1d: BC 组 ROS 荧光染色结果；1e: DEX 组 ROS 荧光染色结果；1f: DEX+GL 组 ROS 荧光染色结果。

Figure 1. Three groups of cells observed by flow cytometry and ROS assay. 1a: Flow cytometry in BC group was used to detect apoptosis rate; 1b: Flow cytometry in DEX group was used to detect apoptosis rate; 1c: Flow cytometry in DEX+GL group was used to detect apoptosis rate; 1d: Results of ROS fluorescence staining in BC group; 1e: Results of ROS fluorescence staining in DEX group; 1f: Results of ROS fluorescence staining in DEX+GL group.

3 讨论

激素性股骨头坏死是一种骨科难治性疾病，其治疗效果往往不佳，患者病情进展后常常因为严重的关节功能障碍而威胁患者的正常生活^[1]。而长期或过度使用 GCs 也是引起非创伤性股骨头坏死，特别是 GC-ONFH 最常见的原因^[4]。虽然 GC-ONFH 发病机制尚未完全明确，但细胞成骨分化障碍、血管生成受阻、细胞凋亡等因素已被认为在其发病中发挥关键作用，而成骨细胞凋亡是 GC-ONFH 的重要细胞学改变^[9]。本研究进一步验证了 GC-ONFH 发病机制，即在 GCs 的持续作用下，引起成骨细胞凋亡的同时，降低其成骨分化能力，使得股骨头内骨代谢处于负平衡状态，引起骨修复障碍，破坏股骨头内的骨支撑结构，进而引发股骨头塌陷，上述结果与既往研究一致^[11]。

Runx2、ALP、Collagen I、OCN 是成骨分化过程中的主要调控因子，与成骨细胞的功能密切相关^[20, 21]。本研究表明，与对照组相比，DEX 处理后 MC3T3-E1 细胞中的 Runx-2、Collagen I、ALP 的表达出现显著降低，提示 DEX 可以导致成骨细胞的成骨能力显著下降。而 GL 处理则显著增加了 GCs 所致的成骨细胞的成骨能力，增强了其成骨分化潜能，促进成骨细胞的正常功能的恢复。

细胞凋亡是一种常见的细胞死亡方式。既往研究证实，Bax 是一种促进凋亡蛋白，而 Bcl-2 则可抑制细胞凋亡，因此，Bcl-2/Bax 的比率可决定细胞凋亡的状态；而 Cleaved Caspase 3 是 Caspase 家族中引起细胞凋亡的具体执行酶^[12]。本研究发现 GL 可以下调 DEX 诱导的 Bax 和 Cleaved Caspase 3 表达升高，上调 DEX 诱导的 Bcl-2 表达降低，证明 GL 对 DEX 诱导的成骨细胞凋亡具有一定的抑制作用。流式细胞学结果也进一步验证了上述结果的一致性。本研究发现，GL 能显著抑制 MC3T3-E1 细胞的凋亡，进而具有延缓因成骨细胞减少所致的骨质流失的潜在作用。

线粒体是细胞能量代谢的中心，并在细胞凋亡调控中发挥关键作用。研究表明，线粒体的功能紊乱可引发严重代谢中断并产生大量 ROS，过多的 ROS 会降低细胞活性并引发细胞凋亡^[22]。有研究发现，DEX 可促进成骨细胞内 ROS 的产生，并降低线粒体膜电位，引起成骨细胞的凋亡^[23]。而活性氧清除剂可以通过消除 ROS，进而减轻线粒体自噬和细胞凋亡，从而恢复成骨细胞的正常功能^[24]。在本实验

中，GCs 能够增加 MC3T3-E1 细胞 ROS 的产生，而加入 GL 后其 ROS 的产生减少。这表明，GL 可以通过抑制 ROS 的产生，进而有助于减轻成骨细胞的凋亡，并促进其正常功能的恢复。

Wnt/ β -catenin 信号通路在调节成骨细胞分化、活性氧的产生和凋亡过程中发挥重要作用，与 GC-ONFH 的发病有密切联系^[10, 25, 26]。研究表明，大量 ROS 产生后可通过抑制性激活 β -catenin 信号通路，来激活 Cleaved Caspase 3 而诱导细胞凋亡^[25]。而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路则可通过抑制过氧化应激，恢复成骨细胞的正常功能，进而促进其成骨分化和骨修复^[26]。其中，Wnt3a 可通过上调 Wnt/ β -catenin-信号通路，促进成骨细胞的成骨分化及其介导的骨修复，进而促进骨微结构的修复^[27, 28]。本研究进一步发现，GCs 可以抑制 Wnt/ β -catenin-信号通路，而 GL 则可通过 Wnt3a 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路，这可能是 GL 参与保护 DEX 诱导的成骨细胞凋亡、成骨障碍和氧化应激损伤的重要机制。

综上所述，本研究首次证明了 GL 能够改善 GCs 介导的成骨细胞凋亡、成骨阻抑及氧化应激损伤，其机制可能与激活 Wnt/ β catenin 信号通路有关。因此，GL 有可能成为一种很有前途的防治 GC-ONFH 的黄酮类化合物。本研究具有以下局限性：(1) 未在动物模型中研究 GL 对 GC-ONFH 干预的效应及相应调控机制；(2) 未在其他细胞模型，如破骨细胞、BMSCs 及内皮细胞等研究 GL 的治疗作用。因此，后续实验可针对上述不足开展进一步深入研究，进一步提高本实验的科学性，并为防治早期 GC-ONFH 提供新思路 and 更完善的理论依据。

参考文献

- [1] 陈长军, 赵鑫, 罗月, 等. 股骨头坏死保头治疗现状及预后影响因素的研究进展 [J]. 中华骨科杂志, 2021, 41 (1): 49-57. DOI: 10.3760/cma.j.cn121113-20200804-00482.
Chen CJ, Zhao X, Luo Y, et al. Research progress on current status of head-preserving treatment for osteonecrosis of the femoral head and its prognostic factors [J]. Chinese Journal of Orthopaedics, 2021, 41 (1): 49-57. DOI: 10.3760/cma.j.cn121113-20200804-00482.
- [2] Chen CJ, Li DH, Zhao X, et al. Mid- to long-term results of modified non-vascularized allogeneic fibula grafting combined with core decompression and bone grafting for early femoral head necrosis [J]. J Orthop Surg Res, 2020, 15 (1): 116. DOI: 10.1186/s13018-020-1565-3.
- [3] 陈长军, 赵鑫, 陈李毅, 等. 外泌体在骨代谢及骨、关节疾病诊治中的研究进展 [J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46 (5): 610-

617. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002695.
- Chen CJ, Zhao X, Chen LYL, et al. Progress of exosomes in bonemetabolism, and diagnosis and treatment of bone and joint diseases [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2021, 46 (5) : 610–617. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002695.
- [4] 赵鑫, 陈长军, 李东海, 等. 间隙连接蛋白-43 调控骨组织细胞间平衡在激素性股骨头坏死中的研究进展 [J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46 (3) : 257–262. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002689.
- Zhao X, Chen CJ, Li DH, et al. Research progress of connexin 43 regulating intercellular balance of bone tissue in glucocorticoids-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2021, 46 (3) : 257–262. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002689.
- [5] Liu X, Gu Y, Kumar S, et al. Oxylipin-PPAR γ -initiated adipocyte senescence propagates secondary senescence in the bone marrow [J]. Cell Metabol, 2023, 35 (4) : 667–84.e6. DOI: 10.1016/j.cmet.2023.03.005.
- [6] Chen CJ, Zhao X, Luo Y, et al. Imbalanced T-cell subsets may facilitate the occurrence of osteonecrosis of the femoral head [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 4159–4169. DOI: 10.2147/jir.S367214.
- [7] Chen CJ, Fu L, Luo Y, et al. Engineered exosome-functionalized extracellular matrix-mimicking hydrogel for promoting bone repair in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. ACS Appl Mater Interf, 2023, 15 (24) : 28891–28906. DOI: 10.1021/acsmi.3c01539.
- [8] Cheng Y, Chen H, Duan P, et al. Early depletion of M1 macrophages retards the progression of glucocorticoid-associated osteonecrosis of the femoral head [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 122: 110639. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110639.
- [9] Tao SC, Yuan T, Rui BY, et al. Exosomes derived from human platelet-rich plasma prevent apoptosis induced by glucocorticoid-associated endoplasmic reticulum stress in rat osteonecrosis of the femoral head via the Akt/Bad/Bcl-2 signal pathway [J]. Theranostics, 2017, 7 (3) : 733–750. DOI: 10.7150/thno.17450.
- [10] Li D, Yang Z, Luo Y, et al. Delivery of MiR335-5p-pendant tetrahedron DNA nanostructures using an injectable heparin lithium hydrogel for challenging bone defects in steroid-associated osteonecrosis [J]. Adv Healthc Mater, 2022, 11 (1) : e2101412. DOI: 10.1002/adhm.202101412.
- [11] 赵鑫, 罗月, 陈长军, 等. 连接蛋白-43 在大鼠激素性股骨头坏死组织和成骨细胞中的表达变化及调控机制 [J]. 中华骨科杂志, 2021, 41 (16) : 1152–1162. DOI: 10.3760/cma.j.cn121113-20210219-00183.
- Zhao X, Luo Y, Chen CJ, et al. Study on the expression of connexin-43 in steroid-induced osteonecrosis of femoral head and osteoblasts in rats and its regulation mechanism [J]. Chinese Journal of Orthopaedics, 2021, 41 (16) : 1152–1162. DOI: 10.3760/cma.j.cn121113-20210219-00183.
- [12] 陈钱, 陈长军, 候爽, 等. 黄酮类化合物体外诱导肿瘤细胞凋亡及其机制研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2016, 37 (3) : 228–232. DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2016.03.028.
- Chen Q, Chen CJ, Hou S, et al. Progress in the study of flavonoids inducing apoptosis in tumor cells in vitro and its mechanism [J]. Journal of Jilin Medical University, 2016, 37 (3) : 228–232. DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2016.03.028.
- [13] 钟敏, 李明华, 程显隆, 等. HPLC 法同时测定保健食品中黄豆黄苷以及黄豆黄素的含量 [J]. 中国保健营养, 2013, 23 (5) : 1025–1026.
- Zhong M, Li MH, Cheng XL, et al. Simultaneous determination the content of glycitin and glycitein in the health food by HPLC-method [J]. China Health Care and Nutrition, 2013, 23 (5) : 1025–1026.
- [14] Zhang L, Chen J, Chai W, et al. Glycitin regulates osteoblasts through TGF- β or AKT signaling pathways in bone marrow stem cells [J]. Exper Ther Med, 2016, 12 (5) : 3063–3067. DOI: 10.3892/etm.2016.3696.
- [15] Wang W, Yang R, Zhang M, et al. Glycitin suppresses cartilage destruction of osteoarthritis in mice [J]. Inflammation, 2020, 43 (4) : 1312–1322. DOI: 10.1007/s10753-020-01210-3.
- [16] Li XH, Zhang JC, Sui SF, et al. Effect of daidzin, genistin, and glycitin on osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells and adipocytic transdifferentiation of osteoblasts [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26 (9) : 1081–1086. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2005.00161.x.
- [17] 张雷, 段广超, 吴智辉. miR-494 对骨肉瘤细胞增殖和侵袭的作用 [J]. 中国矫形外科杂志, 2021, 29 (21) : 1974–1977. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2021.21.11.
- Zhang L, Duan GC, Wu ZH. Effects of miR-494 on proliferation and invasion of osteosarcoma cells [J]. Orthopedic Journal of China, 2021, 29 (21) : 1974–1977. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2021.21.11.
- [18] 张恒维, 刘晓伟, 段康颖, 等. 1,25 二羟基维生素 D3 对强直性脊柱炎巨噬细胞极化的作用 [J]. 中国矫形外科杂志, 2022, 30 (15) : 1395–1400. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.15.11.
- Zhang HW, Liu XW, Duan KY, et al. Role of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the polarization of macrophages in ankylosing spondylitis Role of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the polarization of macrophages in ankylosing spondylitis [J]. Orthopedic Journal of China, 2022, 30 (15) : 1395–1400. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2022.15.11.
- [19] 孙庆鹏, 皮红林, 何继文, 等. EZH2 抑制剂 GSK126 对激素性股骨头坏死骨髓间充质干细胞增殖的影响 [J]. 中国矫形外科杂志, 2018, 26 (23) : 2183–2188. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2018.23.14.
- Sun QP, Pi HL, He JW, et al. Effect of GSK126 on the proliferation of mesenchymal stem cells in patients with steroid-associated osteonecrosis [J]. Orthopedic Journal of China, 2018, 26 (23) : 2183–2188. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2018.23.14.
- [20] Zhao X, Alqwbani M, Luo Y, et al. Glucocorticoids decreased Cx43 expression in osteonecrosis of femoral head: The effect on proliferation and osteogenic differentiation of rat BMSCs [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25 (1) : 484–498. DOI: 10.1111/jcmm.16103.

- [21] Chen CJ, Alqwbani M, Zhao J, et al. Effects of teriparatide versus salmon calcitonin therapy for the treatment of osteoporosis in Asia: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Endoc Metab Immune Disord Drug Targ*, 2021, 21 (5) : 932-942. DOI: 10.2174/1871530320999200817114817.
- [22] PRizwan H, Pal S, Sabnam S, et al. High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes [J]. *Life Sci*, 2020, 241: 117148. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117148.
- [23] Peng P, Nie Z, Sun F, et al. Glucocorticoids induce femoral head necrosis in rats through the ROS/JNK/c-Jun pathway [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11 (1) : 312-321. DOI: 10.1002/2211-5463.13037.
- [24] Liu M, Wu X, Cui Y, et al. Mitophagy and apoptosis mediated by ROS participate in AICl (3)-induced MC3T3-E1 cell dysfunction [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 155: 112388. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112388.
- [25] Huang L, Liu Z, Liu H, et al. Iron overload impairs bone marrow mesenchymal stromal cells from higher-risk MDS patients by regulating the ROS-related Wnt/ β -Catenin pathway [J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020: 8855038. DOI: 10.1155/2020/8855038.
- [26] Ma XY, Wen XX, Yang XJ, et al. Ophiopogonin D improves osteo-integration of titanium alloy implants under diabetic conditions by inhibition of ROS overproduction via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Biochimie*, 2018, 152: 31-42. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.04.022.
- [27] Chen X, Yang K, Sun P, et al. Exercise improves bone formation by upregulating the Wnt3a/ β -catenin signalling pathway in type 2 diabetic mice [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2021, 13 (1) : 116. DOI: 10.1186/s13098-021-00732-6.
- [28] 陈长军, 赵鑫, 罗月, 等. 外泌体的优化策略及在促进骨修复再生中的应用研究进展 [J]. *中华骨科杂志*, 2023, 43 (24) : 1688-1694. DOI: 10.3760/cma.j.cn121113-20230825-00122.
- Chen CJ, Zhao X, Luo Y, et al. Enhancing bone regeneration: advances and innovations in exosome engineering [J]. *Chinese Journal of Orthopaedics*, 2023, 43 (24) : 1688-1694. DOI: 10.3760/cma.j.cn121113-20230825-00122.

(收稿:2023-12-28 修回:2024-09-26)
(同行评议专家: 郭保生, 孙国栋)
(本文编辑: 宁桦)

(上接 2263 页)

- [18] Cho JH, Choi JS, Chun SW, et al. The IL-1B genetic polymorphism is associated with aspirin-induced peptic ulcers in a Korean ethnic group [J]. *Gut Liver*, 2016, 10: 362-368. DOI: 10.5009/gnl15129.
- [19] Zheng WJ, Chen MY, Si XS, et al. Associations between interleukin-1-B gene-511G/A polymorphism and sepsis risk: A meta-analysis [J]. *Cytokine*, 2022, 157: 155953. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.155953.
- [20] Kapelski P, Skibinska M, Maciukiewicz M, et al. Association study of functional polymorphisms in interleukins and interleukin receptors genes: IL-1A, IL-1B, IL-1RN, IL-6, IL-6R, IL-10, IL-10RA and TGF- β 1 in schizophrenia in Polish population [J]. *Schizophr Res*, 2015, 169 (1-3) : 1-9. DOI: 10.1016/j.schres.2015.10.008.
- [21] Smith AJP, Keen LJ, Billingham MJ, et al. Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL-1R1-IL-1A-IL-1B-IL-1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis [J]. *Genes Immun*, 2004, 5: 451-460. DOI: 10.1038/sj.gene.6364107.
- [22] Zhang JH, Sun XD, Wang JM, et al. Association of the IL-1RN variable number of tandem repeat polymorphism and Helicobacter pylori infection: a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0175052. DOI: 10.1371/journal.pone.0175052.

(收稿:2023-11-06 修回:2024-06-27)
(同行评议专家: 江起庭, 魏世隽, 孟庆阳, 张思成)
(本文编辑: 宁桦)