

黄芩素预防大鼠激素性股骨头坏死的作用机制

马万里, 杨红胜, 屈波, 张正东, 龚凯, 林炎水

<https://doi.org/10.12307/2024.391>

投稿日期: 2023-03-21

采用日期: 2023-06-02

修回日期: 2023-07-25

在线日期: 2023-08-10

中图分类号:


R459.9; R318; R285.5

文章编号:

2095-4344(2024)23-03661-08

文献标识码: B

文章快速阅读: 黄芩素干预激素性股骨头坏死的应用效果

实验对象	观测指标	研究结果
 10 周龄 SD 雄性大鼠 36 只随机分组 ($n=12$): (1) 空白对照组; (2) 模型组; (3) 黄芩素干预组。	(1) 血清指标检测; (2) 股骨头组织形态学分析; (3) 股骨头 Micro-CT 扫描与骨三维重建。	(1) 黄芩素干预降低了早期氧化应激产物丙二醛的上升; (2) 骨组织中空骨陷窝率、细胞凋亡率以及破骨细胞数量被降低; (3) 一定程度改善了骨组织参数; (4) 激素诱导的股骨头骨坏死发生率被有效降低。

文题释义:

激素性股骨头坏死: 由过量或者长期的激素类药物应用引发的多种代谢紊乱如高脂血症、骨代谢失衡、骨组织细胞凋亡等所导致的股骨头组织结构发生一系列异常病理改变进而坏死的病变, 也是激素类药物的严重不良反应之一, 在非创伤性股骨头坏死中居主导地位。

黄芩素: 由传统中药黄芩干燥根部中提取的一种黄酮类化合物, 又名5, 6, 7-三羟基黄酮, 化学分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$, 是其活性成分之一, 具有多种药理活性, 对机体组织的多种生理、病理代谢活动过程有着调节作用, 例如调节脂代谢、促进骨形成、抑制骨吸收、抗氧化应激损伤等, 同时也可能是桃红四物汤中治疗股骨头坏死的一种关键性核心化合物。

摘要

背景: 激素性股骨头坏死的发生是多种机制参与的复杂过程, 目前针对该疾病早期的干预尚无标准治疗药物。目前的研究显示黄芩素具有多种药理活性如调节脂代谢、骨代谢、细胞凋亡及抗氧化应激等作用, 这为激素性股骨头坏死的预防和治疗提供了思路。

目的: 观察黄芩素对激素性股骨头坏死的预防效果, 探究其可能的机制。

方法: 10周龄雄性SD大鼠36只随机均分至3组, 分别为空白对照组、模型组、黄芩素干预组($n=12$), 后两组均以腹腔注射脂多糖+肌注甲泼尼龙琥珀酸钠执行造模, 空白对照组中以生理盐水替代造模药物。黄芩素干预组在初次肌注激素时即予以黄芩素300 mg/kg灌胃(1次/d, 持续6周), 黄芩素在其余组中以生理盐水替代。实验2周时测定大鼠血清中氧化应激产物丙二醛水平; 6周时测定血脂指标及骨形成代谢标志物水平, 并经苏木精-伊红染色、抗酒石酸酸性磷酸酶染色、TUNEL染色对股骨头组织形态学改变进行分析, 对股骨头行Micro-CT扫描、骨三维重建以分析骨组织结构和参数的改变。

结果与结论: ①血清指标方面, 与空白对照组相比, 模型组丙二醛、三酰甘油、 β -I型胶原羧基末端肽水平升高, 骨特异性碱性磷酸酶和I型前胶原氨基末端肽水平降低($P < 0.05$); 黄芩素干预组丙二醛水平较模型组下降($P < 0.05$), 且与空白对照组无明显组间差异($P > 0.05$); 三酰甘油高于空白对照组($P < 0.05$), 且与模型组无明显组间差异($P > 0.05$); 骨特异性碱性磷酸酶、 β -I型胶原羧基末端肽较另两组无明显组间差异($P > 0.05$), I型前胶原氨基末端肽低于空白对照组($P < 0.05$), 且与模型组无明显组间差异($P > 0.05$); ②股骨头组织形态学分析显示, 模型组大鼠股骨头中空骨陷窝率、破骨细胞计数、细胞凋亡率均较另两组显著升高($P < 0.05$), 骨髓腔中脂肪细胞显著增多, 骨小梁厚度变薄、排列稀疏且连续性出现较多中断, 骨坏死率(75%)高于黄芩素干预组(25%)(精确显著性单侧、双侧结果均小于0.05); 黄芩素干预组中股骨头骨髓腔脂肪细胞也有增多, 骨小梁改变大致与模型组相似; ③Micro-CT结果显示, 模型组骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量、骨密度等骨组织参数较空白对照组下降而骨小梁分离度增大($P < 0.05$), 整体呈现显著的骨质量丢失; 黄芩素干预组骨组织参数方面较模型组改善, 体现在骨体积分数、骨小梁厚度和骨小梁分离度上优于模型组($P < 0.05$), 骨小梁数量、骨密度与空白对照组无明显组间差异($P > 0.05$); ④尽管黄芩素未能明显改善激素性股骨头坏死大鼠的血脂异常和促进骨形成, 但可能通过减轻氧化应激损害、减少细胞凋亡、抑制破骨细胞等机制降低了激素诱导股骨头骨坏死的发生率, 提示其在激素性股骨头坏死早期预防中有一定效果。

关键词: 激素性股骨头坏死; 黄芩素; 破骨细胞; 细胞凋亡; 氧化应激

Mechanisms by which baicalein protects against steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats

Ma Wanli, Yang Hongsheng, Qu Bo, Zhang Zhengdong, Gong Kai, Lin Yanshui

Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan Province, China

Ma Wanli, Master candidate, Physician, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan Province, China

Corresponding author: Lin Yanshui, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan Province, China

成都医学院第一附属医院骨科, 四川省成都市 610500

第一作者: 马万里, 男, 1994年生, 汉族, 成都医学院在读硕士, 医师, 主要从事股骨头坏死、骨质疏松方面的研究。

通讯作者: 林炎水, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 成都医学院第一附属医院骨科, 四川省成都市 610500

<https://orcid.org/0009-0002-6670-8733> (马万里)

基金资助: 成都医学院-成都市第七人民医院联合科研基金重点项目(2022LHJYZD-03), 项目负责人: 杨红胜

引用本文: 马万里, 杨红胜, 屈波, 张正东, 龚凯, 林炎水. 黄芩素预防大鼠激素性股骨头坏死的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(23):3661-3668.



Abstract

BACKGROUND: The development of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head is a complex process involving multiple mechanisms. There is still no standard therapeutic drug for early intervention of this disease. Current studies have shown that baicalein has various pharmacological activities such as regulating lipid metabolism, bone metabolism, apoptosis and anti-oxidative stress, which provides an idea for the prevention and treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head.

OBJECTIVE: To observe the preventive effect of baicalein against steroid-induced osteonecrosis of the femoral head and to investigate its possible mechanism.

METHODS: Thirty-six 10-week-old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups ($n=12$ per group): blank control group, model group, and baicalein intervention group. In the model group and baicalein intervention group, intraperitoneal lipopolysaccharide and intramuscular injection of methylprednisolone sodium succinate were performed for modeling, while normal saline was used as a substitute for the modeling drug in the blank control group. Baicalein 300 mg/kg was administered by gavage (once a day for 6 weeks) at the time of initial intramuscular glucocorticoid injection in the baicalein intervention group, and baicalein was replaced by normal saline in the other two groups. The serum level of malondialdehyde in rats was detected at 2 weeks of the experiment. Blood lipid indicators and bone formation metabolic markers were detected at 6 weeks of the experiment, the histomorphometric changes of the femoral head were analyzed by hematoxylin-eosin staining, anti-tartaric acid phosphatase staining and TUNEL staining, and the femoral head was subjected to Micro-CT scanning and three-dimensional reconstruction of the bone in order to analyze the alterations of bone tissue structure and parameters.

RESULTS AND CONCLUSION: The serum levels of malondialdehyde, triglyceride, β -collagen type I carboxy-terminal peptide were increased and the serum levels of bone specific alkaline phosphatase and pre-collagen type I amino-terminal peptide were decreased in the model group compared with the blank control group ($P < 0.05$). The serum level of malondialdehyde decreased in the baicalein intervention group compared with the model group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the baicalein intervention group and blank control group ($P > 0.05$). The serum level of triglyceride was higher in the baicalein intervention group than the blank control group ($P < 0.05$), but had no significant difference between the baicalein intervention group and model group ($P > 0.05$). There were also no significant differences in the levels of bone specific alkaline phosphatase and β -collagen type I carboxy-terminal peptide between the baicalein intervention group and the other two groups ($P > 0.05$). The serum level of the baicalein intervention group was lower in the baicalein intervention group than the blank control group ($P < 0.05$) but had no significant difference between the baicalein intervention group and model group ($P > 0.05$). Histomorphological analysis of the femoral head showed that the rate of bone empty lacuna, osteoclast counting and cell apoptosis rate in the femoral head of model group rats were significantly higher than those of the other two groups ($P < 0.05$). There was a significant increase in the number of adipocytes in the bone marrow cavity of the femoral head, bone trabeculae were thinned and sparsely arranged with more disruptions in the continuity. The incidence of osteonecrosis was higher in the model group (75%) than in the baicalein intervention group (25%; bilateral and unilateral exact significance results were both 0.05). There was also an increase in the number of adipocytes in the bone marrow cavity of the femoral head in the baicalein intervention group, and the trabecular changes were roughly similar to those in the model group. Micro-CT results showed that bone volume fraction, trabecular thickness, trabecular number, and bone mineral density decreased and trabecular separation increased in the model group compared with the blank control group ($P < 0.05$). Overall significant bone mass loss was observed in the model group. Bone tissue parameters in the baicalein intervention group were significantly improved than those in the model group, which were reflected in bone volume fraction, trabecular thickness and trabecular separation ($P < 0.05$), and trabecular number and bone mineral density had no significant difference between the baicalein intervention group and blank control group ($P > 0.05$). Although baicalein failed to significantly ameliorate dyslipidemia and promote bone formation in rats with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, it could reduce the incidence of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by reducing oxidative stress damage, decreasing cell apoptosis, inhibiting osteoclasts, suggesting its effectiveness in the early prevention of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head.

Key words: steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; baicalein; osteoclast; cell apoptosis; oxidative stress

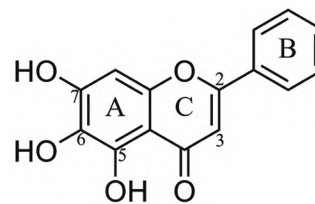
Funding: Chengdu Medical College – Chengdu Seventh People's Hospital Joint Research Fund (Major Project), No. 2022LHJYZD-03 (to YHS)

How to cite this article: MA WL, YANG HS, QU B, ZHANG ZD, GONG K, LIN YS. Mechanisms by which baicalein protects against steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(23):3661-3668.

0 引言 Introduction

糖皮质激素诱导的股骨头坏死 (glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head, GIOFH) 的发病与进展是多机制参与的复杂过程, 长期或过量激素类药物诱发的血脂异常^[1]、骨髓间充质干细胞脂肪分化加强和骨向分化减弱^[2]、骨形成减少和破骨细胞的骨吸收增强^[3-6]、骨组织细胞凋亡^[7-8]、氧化应激损伤等均可能与股骨头骨质量下降、骨坏死病变密切相关^[5, 8]。若不能早期有效干预, 股骨头进行性的破坏与塌陷等加重, 则需行全髋关节置换术^[9]。在药物防治方面, 2019年的一篇系统综述中回顾总结后提出目前并无明确推荐用于股骨头坏死的市场药物, 如抗凝药、血管扩张药、他汀类降脂药物等西药类药物虽然可以应用, 但都不是确切有效的^[10]。而近年来, 越来越多针对 GIOFH 发病的预防或改善疾病进程的中医药研究显示出富有希望的结果^[11-14], 但所用药物大都为中医药方剂, 所含成分较为复杂, 其中的具体有效成分不甚明确, 值得进一步分析和研究。

黄酮类化合物黄芩素 (Baicalein) 是黄芩根部提取物中的一种重要活性成分^[15], 又名 5, 6, 7-三羟基黄酮, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$, 结构式如图 1 所示。近年来许多相关的研究提示其具有广泛的药理活性, 对机体组织中一些生物信号通路、组织细胞的生理和病理代谢活动具有调节作用, 相关研究提示黄芩素具有抑制脂肪细胞分化形成和胞中脂质蓄积^[16-17]、



图注: A、C、B 标记依次为黄芩素化学结构中的 A 环、C 环和 B 环, A 环上 5、6、7 标记处为其 3 个羟基的连接位点; 2、3 标记了 C2-C3 双键

图 1 | 黄芩素结构式

Figure 1 | Structural formula of baicalein

改善高脂血症^[18]、促进成骨细胞分化和骨形成^[19-21]、抑制破骨细胞的分化形成和骨吸收活性^[22]、抗细胞凋亡以及良好的抗氧化能力^[23-26]。此外, FU 等^[11]的网络药理学研究分析显示, 黄芩素可能是经典名中药方剂桃红四物汤中治疗股骨头坏死的一种关键性核心化合物。因此, 推测黄芩素在 GIOFH 发病过程中可能是一种有效的干预药物, 此次实验从表型水平探究黄芩素对 GIOFH 的保护效果, 为发现新的 GIOFH 预防治疗药物提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验; 实验定量资料先经单因素方差分析法对组间差异性进行检测, 方差齐使用 LSD 检验对组间差异性的两两比较进行检测, 方差不齐使用 Welch 校正, 两两比较使用 Dunnett's T3 检验; 定性资料行 Fisher 精确检验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 11 月至 2023 年 2 月完成, 在成都医学院 SPF 级动物实验中心进行饲养与药物干预, 指

标检测在成都医学院科研实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 动物及分组 10 周龄 SD 雄性大鼠 36 只 (SPF 级), 体质量 (326.8±10.1) g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(川)2020-030, 饲养于成都医学院 SPF 级动物实验中心, 单位实验动物使用许可证号: SYXK(川)2015-196。

饲养期间允许大鼠自由进食纯净水和饲料 (SPF 级维持料), 室温维持在 20-25 °C, 室内光照条件为明暗交替照射 (12 h/12 h), 间隔 1 日更换一次垫料以保持笼内环境清洁, 适应性喂养 1 周后检查确认大鼠健康状况均无异常, 经随机数字表法将大鼠分为 3 组, 分别为空白对照组、模型组、黄芩素干预组, 每组 12 只 (每组 2 笼, 每笼 6 只), 而后依实验方案分组处置。动物实验方案经成都医学院实验动物福利伦理委员会批准 (批准号: 成医动伦 [2022] 第 035 号), 严格遵守国家科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》和《四川省实验动物管理办法》。

1.3.2 主要试剂与仪器 黄芩素 (Baicalein, 98% 纯度) (阿拉丁公司, 中国), 脂多糖 (索莱宝公司, 中国), 甲泼尼龙琥珀酸钠 (麦克林公司, 中国), 丙二醛试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 总胆固醇检测试剂、三酰甘油检测试剂 (迈瑞公司, 中国), 大鼠骨特异性碱性磷酸酶 (bone specific alkaline phosphatase, BALP) ELISA 试剂盒、I 型前胶原氨基末端肽 (pre-collagen type I amino-terminal peptide, PINP) ELISA 试剂盒、β-I 型胶原羧基末端肽 (β-collagen type I carboxy-terminal peptide, β-CTX) ELISA 试剂盒 (均购自茁彩公司, 中国), 抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒 (宇劲公司, 中国), TUNEL 染色试剂盒 (Roche 公司, 瑞士), UV752N 紫外可见分光光度计 (佑科公司, 中国), 兽用全自动生化分析仪 (BS-240vet, 迈瑞公司, 中国), 显微 CT (Micro-CT, 中科凯盛公司, 中国), 全自动染色机 (RS36, 派斯杰公司, 中国), 荧光显微镜 (Leica 公司, 德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物造模与给药 采用随机数字表法将大鼠随机分至空白对照组、模型组、黄芩素干预组, 每组 12 只。模型组参考 DONG 等^[27] 的方法进行造模, 首先经腹腔注射脂多糖 (20 μg/kg) 2 次, 间隔 24 h; 第 2 次脂多糖注射后间隔 24 h 肌注甲泼尼龙琥珀酸钠 (40 mg/kg), 共 3 次 (注射间隔 24 h); 初次注射激素的同时以生理盐水代替黄芩素灌胃 (1 次/d, 共 6 周)。黄芩素干预组以上述同法造模, 并在初次注射激素时即予以黄芩素 300 mg/kg 由生理盐水配置为悬浊液灌胃 (1 次/d, 共 6 周)。空白对照组在其他实验组所用注射/灌胃药物同一给药时间段以相同剂量生理盐水替代给予。

1.4.2 血清指标检测

氧化应激产物丙二醛水平测定: 实验进行至 2 周时, 大鼠禁食水 12 h 后以实验用大鼠固定器固定后经鼠尾静脉取血约 2 mL 于 4 °C 静置暂存, 并离心提取上层血清, 使用硫代巴比妥酸法遵相应试剂盒说明操作, 检测氧化应激产物丙二

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	通过动物实验从表型水平观察黄芩素早期干预对激素性股骨头坏死是否有保护效果
借鉴已有标准动物模型造模	实验动物参考 DONG 等 ^[27] 的方法进行激素性股骨头坏死模型建立
动物来源及品系	10 周龄 SD 雄性大鼠 36 只 (SPF 级) 购自成都达硕实验动物有限公司
造模技术描述	首先经腹腔注射给与大鼠脂多糖 (20 μg/kg) 2 次, 间隔 24 h; 第 2 次脂多糖注射后间隔 24 h 肌注甲泼尼龙琥珀酸钠 (40 mg/kg), 共 3 次 (注射间隔 24 h)
造模主要诱导用药	脂多糖 + 甲泼尼龙琥珀酸钠
动物数量及分组方法	大鼠经随机数字表法分至空白对照组、模型组、黄芩素干预组, 每组 12 只
造模成功评价指标	骨小梁中弥漫性地出现空骨陷窝或核固缩态的骨细胞, 周围骨髓伴有坏死 ^[3]
造模后实验观察指标	①血清指标: 氧化应激产物丙二醛; 血脂 (总胆固醇、三酰甘油); 骨代谢标志物; ②股骨头组织形态学改变以及空骨陷窝率、股骨头骨坏死率、破骨细胞计数、细胞凋亡率; ③股骨头感兴趣区骨组织参数
造模后动物处理	取标本前禁食水 12 h; 实验 2 周时经鼠尾静脉取血液标本; 实验 6 周时戊巴比妥钠 40 mg/kg 经腹腔内注射实施麻醉并经腹主动脉取血, 后经下腔静脉注射戊巴比妥钠 (200 mg/kg) 实行安乐死并取出双侧股骨头
伦理委员会批准	动物实验方案经成都医学院实验动物福利伦理委员会批准, 批准号: 成医动伦 [2022] 第 035 号

醛水平, 每组检测重复 3 次。

血脂水平与骨代谢标志物测定: 实验第 6 周末, 大鼠禁食水 12 h 后称质量并以戊巴比妥钠 40 mg/kg 经腹腔内注射实施麻醉, 麻醉满意后由下腹部经腹主动脉取血约 6 mL, 4 °C 静置暂存, 随后离心取上层血清, 兽用全自动生化分析仪检测血脂 (总胆固醇、三酰甘油) 水平; ELISA 法遵相应试剂盒说明操作检测大鼠骨形成代谢标志物 BALP、PINP 和骨吸收标志物 β-CTX 水平, 每组检测重复 3 次。

1.4.3 股骨头标本影像学及病理分析 实验第 6 周末大鼠采集血液后, 经下腔静脉注射戊巴比妥钠 (200 mg/kg) 实行安乐死, 随后以实验用大鼠手术器械解剖暴露下肢股骨颈, 截断股骨颈以取出双侧股骨头, 生理盐水冲洗后拍摄股骨头大体外观照片, 随后剔除股骨头周围附着软组织, 生理盐水冲洗净后经 40 g/L 多聚甲醛进行固定。一侧股骨头用于 Micro-CT 扫描及骨三维重建, 另一侧用于股骨头标本切片制作及组织形态学观察、分析。

(1) 股骨头 Micro-CT 检测: 大鼠股骨头标本经 40 g/L 多聚甲醛固定后置入 Micro-CT, 设置参数 (能量/强度 = 600 keV, 500 μA, 7 W; 4 帧叠加曝光时间 = 446 ms, 扫描时间 = 8 min), 进行扫描, 对股骨头软骨下骨松质区 (感兴趣区域) 测量记录骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁分离度、骨小梁数量、骨密度等 5 项骨组织参数, 测量部位如图 2 所示; 使用 NRecon (1.7.4.2 版) 重建程序行股骨头骨三维重建。

(2) 标本切片制作: 股骨头标本采集后完全浸置于 40 g/L 多聚甲醛当中固定, 持续 48 h, 固定完后冲净甲醛并浸置在事先配置好的 15% 乙二胺四乙酸当中进行脱钙, 每隔 3 d 观察脱钙情况, 视情况 3-5 d 更换一次新鲜脱钙液, 以针刺入

股骨头时若无明显阻力感,可认为脱钙完成,脱钙后的标本置入全自动脱水机完成脱水过程,而后依序行组织包埋和切片,切片厚度为 5 μm。

(3) 苏木精-伊红染色观察股骨头坏死数量和股骨头空骨陷窝率:染色后组织病理改变是判断样本股骨头是否发生骨坏死的依据,XIE 等^[3]认为特征性改变为骨小梁中弥漫性地出现空骨陷窝或核固缩态的骨细胞,周围骨髓伴有坏死,将符合此描述的股骨头记为骨坏死阳性否则为阴性,计算各组股骨头骨坏死率=100%×骨坏死阳性股骨头数/该组大鼠数量;每个股骨头抽取一张染色切片在 200 倍镜下观察并任意选取 8 个视野观察、计算空骨陷窝率=100%×空骨陷窝总数/总骨陷窝数。

(4) 抗酒石酸酸性磷酸酶染色和破骨细胞数量检测:切片脱蜡、复水后滴加按试剂盒比例说明配置好的抗酒石酸酸性磷酸酶染液(酒石酸液:底物液 A:底物液 B=10:90:1),在湿盒、室温下孵育 3 min;蒸馏水洗 3 次后于磷酸缓冲盐溶液中浸泡 10 min,烘漂仪 37 °C 下烘干切片;滴加核染色剂后 5 s 左右,蒸馏水冲净染液;最后依序行脱水、透明和封装。400 倍镜视野中,细胞核≥3 个的染色阳性(细胞质红色或酒红色)细胞被认为是破骨细胞,每个股骨头抽取一张切片并随机选取 5 个视野对破骨细胞数量进行统计。

(5) TUNEL 染色和凋亡细胞百分率计算:切片脱蜡复水后以柠檬酸微波修复 8 min,随后磷酸缓冲盐溶液洗 3 次(5 min/次),荧光 TUNEL 孵育液(试剂 A:试剂 B=1:30)在暗处进行配制,随后于 37 °C 下孵育 1 h;再次磷酸缓冲盐溶液洗 3 次(5 min/次)后加入 DAPI 进行染核 15 min,磷酸缓冲盐溶液冲洗后甘油明胶对切片封固,-20 °C 下保存用于后续观察。此次研究所用试剂盒的阳性表达为:正常细胞核呈现为蓝光,凋亡细胞核呈现为绿光。每个股骨头抽取一张切片于荧光显微镜 400 倍镜视野下随机选取 3 个视野区域,每个视野区域记录 3 张图片,依次为蓝光(DAPI)、绿光(TUNEL)、混合光(Merge)。最后计算图中凋亡细胞百分率=100%×凋亡细胞总数/细胞总数。

1.5 主要观察指标 ①血清指标:氧化应激产物丙二醛;血脂(总胆固醇、三酰甘油);骨代谢标志物(BALP、PINP、β-CTX);②股骨头组织形态学改变以及空骨陷窝率、股骨头骨坏死率、破骨细胞计数、细胞凋亡率;③股骨头感兴趣区域骨组织参数。

1.6 统计学分析 SPSS 26.0 及 GraphPad Prism 9 软件用于此次研究分析、作图。定量资料先进行正态性以及方差齐性的检验,分布通过正态性检验的资料使用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,先通过单因素方差分析法对组间差异性进行检测,方差齐使用 LSD 检验对组间差异性的两两比较进行检测,方差不齐使用 Welch 校正,两两比较使用 Dunnett's T3 检验。定性资料以频数来表示,行 Fisher 精确检验。 $P < 0.05$ 判定为差异有显著性意义。文章统计学方法已经成都医学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 此次实验中 SD 大鼠无意外死亡,36 只均进入结果分析。

2.2 血清指标检测

2.2.1 丙二醛水平 如表 1 所示,实验 2 周时模型组的丙二醛水平高于空白对照组($P < 0.05$);黄芩素干预组的丙二醛水平低于模型组($P < 0.05$),且与空白对照组无明显组间差异($P > 0.05$),提示模型组中发生了氧化应激损害,而黄芩素早期给药可有效干预这一损害。

表 1 | 各组大鼠血清指标比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)
Table 1 | Serum indexes of rats in each group

血清指标	空白对照组	模型组	黄芩素干预组	F 值	P 值
丙二醛 (nmol/mL)	4.58±0.78	5.77±0.99 ^a	4.93±0.59 ^b	4.62	< 0.05
总胆固醇 (mmol/L)	1.55±0.21	1.65±0.15	1.57±0.11	0.82	> 0.05
三酰甘油 (mmol/L)	0.56±0.16	0.94±0.15 ^a	0.87±0.15 ^b	13.77	< 0.001
BALP (ng/mL)	50.85±15.21	32.56±8.55 ^a	40.30±8.01	5.48	< 0.05
PINP (ng/mL)	21.70±3.22	12.42±3.60 ^a	15.46±4.00 ^b	13.68	< 0.001
β-CTX (pg/mL)	61.31±17.42	85.86±15.57 ^a	70.63±13.97	4.98	< 0.05

表注:丙二醛水平于实验 2 周时测得,其余指标在实验 6 周时测得。与空白对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$ 。BALP 为骨特异性碱性磷酸酶,PINP 为 I 型前胶原氨基末端肽,β-CTX 为 β-I 型胶原羧基末端肽

2.2.2 血脂水平 总胆固醇在第 6 周时组间无明显统计学差异($P > 0.05$);三酰甘油的水平表现为模型组与黄芩素干预组均高于空白对照组,差异有显著性意义(P 均 < 0.05),但模型组与黄芩素干预组无明显组间差异($P > 0.05$),提示黄芩素未能改善造模药物诱发的血脂异常。见表 1。

2.2.3 骨代谢标志物水平 见表 1。

BALP 水平:模型组 $<$ 空白对照组($P < 0.05$),黄芩素干预组与另两组无明显组间差异($P > 0.05$)。

PINP 水平:模型组 $<$ 空白对照组($P < 0.05$),黄芩素干预组 $<$ 空白对照组($P < 0.05$),模型组与黄芩素干预组无明显组间差异($P > 0.05$)。

β-CTX 水平:模型组 $>$ 空白对照组($P < 0.05$),黄芩素干预组与另两组无明显组间差异($P > 0.05$)。

由骨代谢标志物水平的组间差异可知,此次研究中黄芩素对于 GIOFH 大鼠模型的骨形成代谢促进作用尚不显著,骨吸收代谢的影响暂不明确。

2.3 股骨头大体外观情况 空白对照组股骨头外观结构完好,表面软骨光滑润泽呈现乳白色;模型组与空白对照组相比股骨头外形未见明显塌陷变扁,结构完整,但软骨区域较粗糙且色泽稍暗淡,部分标本在软骨周缘区域出现暗红色病变区;黄芩素干预组结构同样均完整无缺失,无明显塌陷变形,软骨质地、色泽较空白对照组无明显差异,部分标本在软骨周缘区域出现暗红色病变但与模型组相比范围较小、程度较轻,提示黄芩素的早期干预对股骨头软骨的病理改变有一定的益处。见图 3。

2.4 股骨头组织切片苏木精-伊红染色

2.4.1 切片观察分析 如图 4A 所示,空白对照组组织结构完整,可见粗壮的骨小梁及周围骨髓腔内少量脂肪细胞、大量

造血细胞, 骨小梁的结构连续性无明显异常, 排列规整, 其中偶尔可见空骨陷窝; 模型组骨小梁较空白对照组明显地厚度变薄, 排列稀疏, 连续性出现较多中断, 骨髓腔的脂肪细胞明显增多, 骨小梁上的空骨陷窝明显增多; 黄芩素干预组骨小梁厚度同模型组相似地比空白对照组变薄, 排列较为稀疏, 连续性时有中断, 骨髓腔内的脂肪细胞也有增多, 部分区域可见量空骨陷窝但较模型组少, 提示黄芩素的早期干预对减少股骨头中空骨陷窝的形成以及骨小梁结构连续性的维持有一定改善作用。股骨头空骨陷窝率分析结果如图 4B 所示, 模型组 > 黄芩素干预组 > 空白对照组, 组间差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 提示黄芩素干预显著减少了空骨陷窝的形成。

2.4.2 股骨头骨坏死率 各组大鼠股骨头标本经判定发生骨坏死的例数如表 2 所示; 模型组与黄芩素干预组之间股骨头骨坏死率经费舍尔精确检验 (Fisher's exact test), 精确显著性 (双侧) 结果为 $0.039 < 0.05$, 精确显著性 (单侧) 结果为 $0.020 < 0.05$ 。统计学意义上表明黄芩素干预治疗可有效降低造模药物诱发的股骨头骨坏死的发生。

表 2 | 各组大鼠股骨头骨坏死率 (n)

组别	股骨头骨坏死 (+)	股骨头骨坏死 (-)	总计
空白对照组	0	12	12
模型组	9	3	12
黄芩素干预组	3	9	12
总计	12	24	36

2.5 股骨头组织切片抗酒石酸酸性磷酸酶染色 染色阳性表现为胞浆呈红色或酒红色, 细胞核为蓝色或深蓝色, 为破骨细胞。在 400 倍镜下 3 组标本切片中均观察到破骨细胞, 见图 5A。破骨细胞计数结果如图 5B 所示: 模型组 > 空白对照组 ($P < 0.05$); 黄芩素干预组 < 模型组 ($P < 0.05$), 黄芩素干预组与空白对照组间无明显统计学差异, 提示黄芩素干预可有效减少破骨细胞的形成。

2.6 股骨头组织切片 TUNEL 染色 如图 6A 所示, 空白对照组可见大量密集排列的正常细胞核, 其间偶见少量散布的凋亡细胞核; 模型组正常细胞核群较空白对照组显稀疏且其内部及周围均可见较多弥散性分布的凋亡细胞核; 黄芩素干预组稍显稀疏的正常细胞核群间见较多散布性分布的凋亡细胞核, 数量较空白对照组多, 但比模型组明显减少。细胞凋亡率分析结果如图 6B 示: 模型组 > 黄芩素干预组 > 空白对照组, 组间差异均有显著性意义 ($P < 0.05$), 提示黄芩素干预显著抑制了股骨头中细胞凋亡的发生。

2.7 股骨头 Micro-CT 检测

2.7.1 股骨头感兴趣区域骨组织参数 见表 3。

空白对照组 vs. 模型组: 骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数量、骨密度方面, 空白对照组 > 模型组 ($P < 0.05$); 骨小梁分离度方面模型组 > 空白对照组 ($P < 0.05$)。

空白对照组 vs. 黄芩素干预组: 骨体积分数、骨小梁数量、

表 3 | 各组大鼠股骨头感兴趣区域骨组织参数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)
Table 3 | Bone tissue parameters of the region of interest in the rat femoral head

骨组织参数	空白对照组	模型组	黄芩素干预组	F 值	P 值
骨体积分数 (%)	59.831±2.233	49.788±3.051 ^a	55.113±6.700 ^b	8.25	< 0.05
骨小梁厚度 (mm)	0.127±0.004	0.110±0.007 ^a	0.119±0.007 ^{ab}	11.49	< 0.05
骨小梁分离度 (mm)	0.128±0.006	0.153±0.005 ^a	0.142±0.005 ^{ab}	33.49	< 0.05
骨小梁数量 (1/mm)	4.720±0.183	4.386±0.214 ^a	4.537±0.132	5.98	< 0.05
骨密度 (g/cm ³)	0.747±0.040	0.657±0.055 ^a	0.702±0.061	4.84	< 0.05

表注: 与空白对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与模型组相比, ^b $P < 0.05$

骨密度都无明显组间差异; 骨小梁厚度方面空白对照组 > 黄芩素干预组 ($P < 0.05$), 骨小梁分离度方面空白对照组 < 黄芩素干预组 ($P < 0.05$)。

模型组 vs. 黄芩素干预组: 骨体积分数、骨小梁厚度方面黄芩素干预组 > 模型组 ($P < 0.05$); 骨小梁分离度方面黄芩素干预组 < 模型组 ($P < 0.05$); 骨小梁数量、骨密度方面黄芩素干预组与模型组无明显组间差异。

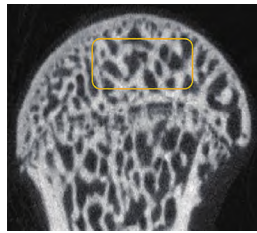
结果提示模型组的各项骨组织参数均下降, 而黄芩素可一定程度地改善股骨头骨组织参数, 主要体现在骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁分离度方面。

2.7.2 Micro-CT 扫描与骨三维重建 3 组大鼠股骨头外形均无明显变扁塌陷, 但模型组与空白对照组相比可见骨小梁数量减少, 部分区域骨小梁连续性断裂, 骨小梁分离度增加, 厚度变薄, 整体上表现为明显的骨质量丢失改变; 黄芩素干预组改变情况与此大致相似但程度较轻。扫描图像的组间差异与骨组织参数的组间改变基本一致, 见图 7。

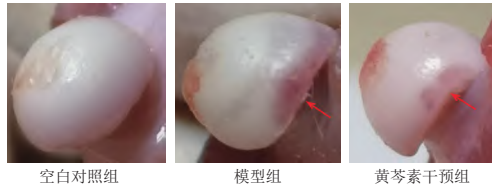
3 讨论 Discussion

对 GIOFH 的病理机制更深入的了解是实施有效干预治疗的关键, 多种有关的因素经研究后已被发现和提出^[3]。诸多机制中, 血脂异常是 GIOFH 发生发展重要的原因之一^[28]。研究提示高脂血症是大剂量或长期应用激素类药物的患者发生股骨头坏死的危险因素^[1, 29]。黄芩素报道在体外可抑制脂肪细胞的诱导形成^[30], 推测可能与其下调部分脂肪生成过程中表达上调的基因及上调该过程中表达下调的基因有关。细胞实验提示黄芩素能抑制部分早期成脂转录因子 mRNA 的表达, 调节细胞周期使其阻滞在早期成脂阶段, 进而抑制脂肪细胞分化过程中的脂质积累^[17]。还有学者认为黄芩素能通过促进腺苷酸活化蛋白激酶活性来改善高脂血症^[38]。与以上研究不同, 此次实验的研究结果中黄芩素并未能显著改善大鼠三酰甘油的异常升高情况, 黄芩素干预组骨髓腔中脂肪细胞的体积及占比与模型组相比没有明显的改善。提示黄芩素从改善血脂异常方面对 GIOFH 的保护效果暂不成立。

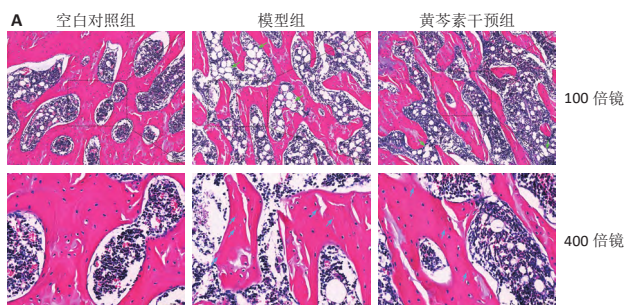
有报道, 黄芩素能促进胞外基质矿化、骨转化标志物如碱性磷酸酶、骨钙素、Runt 相关转录因子 2 和 I 型胶原等的表达^[19]。WANG 等^[31]也发现黄芩素可显著增强人原代成骨细胞的矿化程度; 而在去卵巢诱导的骨质疏松症大鼠模型中黄芩素的应用使得骨形成增加^[32]。在细胞实验中, 黄芩干燥根提取物 (黄芩素为主要活性成分之一) 刺激骨髓间充质



图注：黄色框选区域为骨组织参数测量部位
图 2 | 大鼠股骨头感兴趣区域
Figure 2 | Regions of interest of the rat femoral head



图注：红色箭头示软骨病变区
图 3 | 各组大鼠股骨头标本大体外观
Figure 3 | General appearance of the rat femoral head



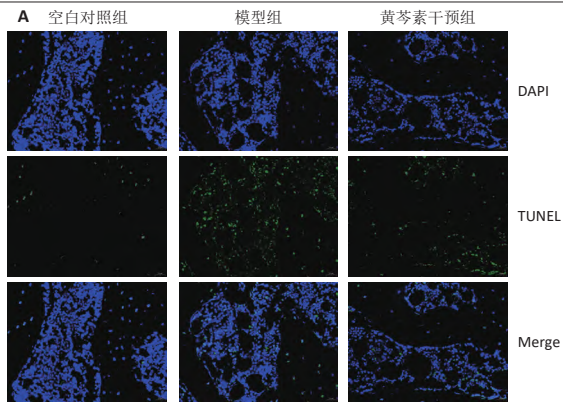
图注：图 A 中绿色箭头标记脂肪细胞，蓝色箭头标记空骨陷窝；图 B 中，与空白对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$
图 4 | 各组大鼠股骨头组织苏木精 - 伊红染色 (A) 及股骨头空骨陷窝率 (B)
Figure 4 | Hematoxylin-eosin staining (A) and rate of bone empty lacuna (B) in the rat femoral head



图注：图 A 为 400 倍镜视野，绿色箭头标记破骨细胞；图 B 中，与空白对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$
图 5 | 各组大鼠股骨头组织抗酒石酸酸性磷酸酶染色 (A) 及破骨细胞计数 (B)
Figure 5 | Tartrate-resistant acid phosphatase staining (A) and osteoclast count (B) in the rat femoral head

干细胞可促进其增殖，成骨相关基因的表达及成骨分化^[33]。KIM 等^[22] 研究发现小鼠单核细胞 / 巨噬细胞系 RAW264.7 细胞和小鼠骨髓源性巨噬细胞向破骨细胞的诱导分化形成均可被黄芩素所抑制。付方胜等^[34] 学者则经体外细胞实验发现黄芩素对核因子 κB 受体激活因子配体诱导的破骨细胞分化及骨吸收活性有抑制效果。

此次研究中模型组大鼠骨形成代谢标志物水平均低于空白对照组，骨吸收代谢标志物水平高于空白对照组，苏木精 -



图注：图 A 为 400 倍镜视野；每行由左向右依次为蓝光 - DAPI，绿光 - TUNEL，混合光 - Merge；其中正常细胞核呈现蓝光，凋亡细胞核呈现绿光，在 Merge 上可重合；图 B 中，与空白对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与模型组相比，^b $P < 0.05$
图 6 | 各组大鼠股骨头 TUNEL 染色荧光图像 (A) 及细胞凋亡率 (B)
Figure 6 | Fluorescence images of TUNEL staining (A) and rate of cell apoptosis (B) in the rat femoral head

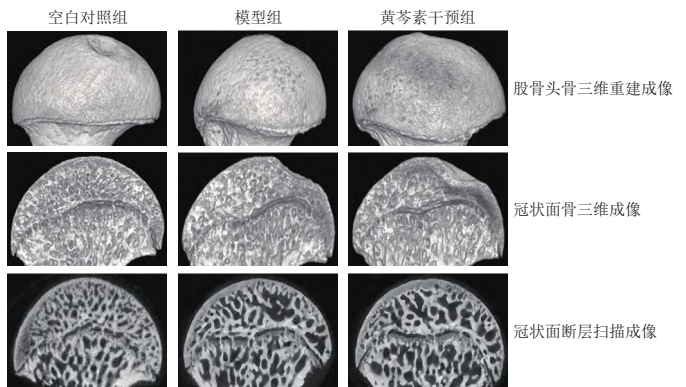


图 7 | 各组大鼠股骨头 Micro-CT 扫描与骨三维重建
Figure 7 | Micro-CT scanning and three-dimensional bone reconstruction of the rat femoral head

伊红染色的病理改变和升高的破骨细胞数以及普遍下降的骨组织参数提示该组大鼠的骨组织形成被抑制，骨吸收增强，骨组织质量下降。在黄芩素干预组中，骨形成代谢标志物均没有显著的提升，提示骨形成代谢可能没有得到明显促进，即此次研究的结果提示黄芩素对激素类药物诱导的骨形成抑制改善效果尚不明显。但实验中股骨头组织形态学分析表明黄芩素的干预使空骨陷窝形成和破骨细胞数有明显下降，细胞凋亡率也较模型组显著降低，同时骨组织参数量在骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁分离高度方面都有改善，这些结果提示黄芩素可能是经其他方面的作用来干预 GIOFH 发病进程中的病理改变。

有研究报道 GIOFH 动物模型和患者的股骨头中出现大量的凋亡骨细胞^[35]。转基因小鼠的体内实验证明糖皮质激素会直接作用于成骨细胞和骨细胞并促进其凋亡，并且是除骨质流失外糖皮质激素诱发骨强度下降的主要原因^[36]。MOUTSATSOU 等^[37] 研究认为糖皮质激素能通过作用于骨组

织细胞上的糖皮质激素受体, 既会抑制成骨细胞系向骨细胞的分化及增殖, 降低其成熟与活力, 还会诱使成骨细胞和骨细胞凋亡。诸多研究数据表明, 通过凋亡相关信号通路对骨细胞和成骨细胞中与凋亡相关的因子如 Bcl-2、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶及 Bax 等进行调节, 确实能够对激素性股骨头坏死产生保护作用^[7, 38-40]。而在改善细胞凋亡方面, 黄芩素具有良好的药理作用, 其作用机制也被大量研究。

ZHANG 等^[23]认为黄芩素预处理可降低含白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的培养液刺激诱导的人软骨细胞凋亡, 分析可能与其抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶信号通路有关。YI 等^[24]发现黄芩素经灌胃给药可降低小鼠骨关节炎模型中软骨细胞的凋亡相关蛋白 Bax、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 的 mRNA 和蛋白表达, 提升抗凋亡蛋白 Bcl-2 mRNA 以及蛋白的表达量, 进而抑制软骨细胞凋亡, 改善软骨损伤。而在 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡研究中发现, 黄芩素可通过预防氧化应激、上调 Bcl-2、下调 Bax 的表达和抑制线粒体功能异常来阻碍细胞凋亡^[41]。这些研究提示黄芩素通过调节凋亡相关的信号通路及蛋白的异常表达, 在部分组织细胞的病理改变中具有一定抑制细胞凋亡的作用。此次实验中 TUNEL 染色结果提示, 模型组大鼠股骨头内发生了显著的细胞凋亡现象, 这与上述报道一致, 而黄芩素干预组中细胞凋亡的发生被有效抑制, 这可能是该组空骨陷窝率显著低于模型组的原因, 更多的骨组织细胞得以存活, 对骨组织结构质量的维持有着一定作用, 这可能是黄芩素干预组骨组织参数改善的原因之一。此外, 作者观察到黄芩素干预组股骨头软骨的病变较模型组更轻, 而一项体内和体外实验发现过量糖皮质激素可诱导小鼠软骨细胞凋亡^[42], 结合前述 ZHANG 等^[23]和 YI 等^[24]关于黄芩素对软骨细胞凋亡的抑制作用, 推测黄芩素在改善股骨头软骨的病变中具有一定作用。这些方面的具体机制尚需后续进一步的实验研究证实。

氧化应激反应/损伤在股骨头坏死病理改变中扮演了重要角色^[43], 对 GIOFH 的患者和 SD 大鼠模型的股骨头分析表明其抗氧化酶表达下降, 发病过程中活性氧水平升高^[5], 且血液检测中氧化损伤标志物丙二醛出现了上升, 而抗氧化物质谷胱甘肽下降^[44]。临床研究报道, 在 GIOFH 患者切除的股骨头内侧肌肉血管小动脉中检测到抗 8-OHdG 抗体(一种氧化应激标志)的表达, 也证实了氧化损伤的存在^[45]。周年等^[46]认为, 氧化应激过程产生的过量活性氧对骨质有多种不利影响, 不但损害骨髓间充质干细胞的增殖能力及抑制其向成骨细胞分化的过程, 还会促使已成熟的成骨细胞发生凋亡, 并可能促进单核巨噬细胞向破骨细胞分化, 从而多方面地扰乱骨稳态。作为一种优良的天然抗氧化剂, 黄芩素的天然化学结构中 A 环所含的 3 个羟基具有强大的抗氧化功效, 可在体内以脱羧方式清除自由基^[47], 终止自由基反应^[48], 其 C2-C3 双键的提供电子能力, 也具备抗氧化的作用^[49]。

前期有相关研究数据表明血清丙二醛水平在造模给药后 2 周时显著升高^[44, 50], 故作者参考前人的报道选择在 2 周时

检测丙二醛水平, 以此来探究予以激素造模的同时给予黄芩素干预能否在早期有效对抗氧化应激损伤, 降低丙二醛水平。结果表明模型组的丙二醛水平显著高于空白对照组, 提示其体内发生了氧化应激损伤, 而黄芩素干预组中丙二醛水平明显降低。与既往的研究相一致, 黄芩素可通过减轻氧化应激损伤对 GIOFH 产生保护作用。此外, 有报道表明黄芩素在体内部分转化为黄芩苷后同样可继续提供抗氧化能力, 继续降低丙二醛水平^[51-52]。

综上所述, 此次研究证实了黄芩素早期干预可降低 GIOFH 大鼠早期丙二醛水平及其股骨头中破骨细胞的数量, 抑制细胞凋亡现象, 降低空骨陷窝率, 一定程度上改善股骨头骨组织参数, 有效降低股骨头骨坏死率, 可有效预防 GIOFH 的发病, 具有进一步临床开放和研究的价值。

但此次研究中样本量较少, 所取得的数据和结论尚待更多实验进一步考证; 实验中对于血清指标如丙二醛、骨代谢标志物等没有动态监测; 在黄芩素对骨代谢的调节、抗氧化损伤、改善细胞凋亡等作用方面未深入检测相关信号通路的 mRNA 和蛋白表达水平。

致谢: 感谢此次研究过程中所有参与人所做出的贡献。

作者贡献: 马万里进行实验设计与实施、论文初稿撰写; 屈波参与实验设计; 龚凯指导数据分析; 实验评估为张正东, 指导实验操作; 杨红胜负责文稿审校, 指导论文撰写; 林炎水负责实验整体把握, 指导实验设计与论文修改。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] KURODA T, TANABE N, WAKAMATSU A, et al. High triglyceride is a risk factor for silent osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2015;34(12):2071-2077.
- [2] HOUDEK MT, WYLES CC, PACKARD BD, et al. Decreased Osteogenic Activity of Mesenchymal Stem Cells in Patients With Corticosteroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. *J Arthroplasty*. 2016;31(4):893-898.
- [3] XIE XH, WANG XL, YANG HL, et al. Steroid-associated osteonecrosis: Epidemiology, pathophysiology, animal model, prevention, and potential treatments (an overview). *J Orthop Translat*. 2015;3(2):58-70.
- [4] KIM HJ. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *J Clin Invest*. 2006;116(8):2152-2160.
- [5] CHEN K, LIU Y, HE J, et al. Steroid-induced osteonecrosis of the femoral head reveals enhanced reactive oxygen species and hyperactive osteoclasts. *Int J Biol Sci*. 2020;16(11):1888-1900.
- [6] JIA D, O'BRIEN CA, STEWART SA, et al. Glucocorticoids Act Directly on Osteoclasts to Increase Their Life Span and Reduce Bone Density. *Endocrinology*. 2006;147(12):5592-5599.

- [7] ZHAN J, YAN Z, ZHAO M, et al. Allicin inhibits osteoblast apoptosis and steroid-induced necrosis of femoral head progression by activating the PI3K/AKT pathway. *Food Funct.* 2020;11(9):7830-7841.
- [8] JIA YB, JIANG DM, REN YZ, et al. Inhibitory effects of vitamin E on osteocyte apoptosis and DNA oxidative damage in bone marrow hemopoietic cells at early stage of steroid-induced femoral head necrosis. *Mol Med Rep.* 2017;15(4):1585-1592.
- [9] MONT MA, SALEM HS, PIUZZI NS, et al. Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: Where Do We Stand Today? *J Bone Joint Surg Am.* 2020; 102(12):1084-1099.
- [10] LEE Y J, CUI Q, KOO KH. Is There a Role of Pharmacological Treatments in the Prevention or Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head?: A Systematic Review. *J Bone Metab.* 2019;26(1):13.
- [11] FU F, HUANG Z, YE H, et al. Mechanisms and Molecular Targets of the Tao-Hong-Si-Wu-Tang Formula for Treatment of Osteonecrosis of Femoral Head: A Network Pharmacology Study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;2020:1-13.
- [12] ZHANG P, XU H, WANG P, et al. Yougui pills exert osteoprotective effects on rabbit steroid-related osteonecrosis of the femoral head by activating β -catenin. *Biomed Pharmacother.* 2019;120:109520.
- [13] MEI R, CHEN D, ZHONG D, et al. Metabolic Profiling Analysis of the Effect and Mechanism of Gushiling Capsule in Rabbits With Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head. *Front Pharmacol.* 2022;13:845856.
- [14] HUANG Z, FU F, YE H, et al. Chinese herbal Huo-Gu formula for the treatment of steroid-associated osteonecrosis of femoral head: A 14-year follow-up of convalescent SARS patients. *J Orthop Translat.* 2020;23:122-131.
- [15] LI H, JIANG Y, CHEN F. Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 812(1):277-290.
- [16] CHA MH, KIM IC, LEE BH, et al. Baicalein Inhibits Adipocyte Differentiation by Enhancing COX-2 Expression. *J Med Food.* 2006;9(2):145-153.
- [17] SEO MJ, CHOI HS, JEON HJ, et al. Baicalein inhibits lipid accumulation by regulating early adipogenesis and m-TOR signaling. *Food Chem Toxicol.* 2014;67:57-64.
- [18] RAHIMI VB, ASKARI VR, HOSSEINZADEH H. Promising influences of *Scutellaria baicalensis* and its two active constituents, baicalin, and baicalein, against metabolic syndrome: A review. *Phytother Res.* 2021;35(7):3558-3574.
- [19] CAI P, LU Y, YIN Z, et al. Baicalein ameliorates osteoporosis via AKT/FOXO1 signaling. *Aging (Albany NY).* 2021;13(13):17370-17379.
- [20] JIN D, LI S, TANG J, et al. Regulation of bone formation by baicalein via the mTORC1 pathway. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:5169-5183.
- [21] KIM JM, LEE SU, KIM YS, et al. Baicalein stimulates osteoblast differentiation via coordinating activation of MAP kinases and transcription factors. *J Cell Biochem.* 2008;104(5):1906-1917.
- [22] KIM MH, RYU SY, BAE MA, et al. Baicalein inhibits osteoclast differentiation and induces mature osteoclast apoptosis. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(11): 3375-3382.
- [23] ZHANG X, ZHU Y, CHEN X, et al. Baicalein ameliorates inflammatory-related apoptotic and catabolic phenotypes in human chondrocytes. *Int Immunopharmacol.* 2014;21(2):301-308.
- [24] YI N, MI Y, XU X, et al. Baicalein Alleviates Osteoarthritis Progression in Mice by Protecting Subchondral Bone and Suppressing Chondrocyte Apoptosis Based on Network Pharmacology. *Front Pharmacol.* 2022;12:788392.
- [25] YUNE TY, LEE JY, CUI CM, et al. Neuroprotective effect of *Scutellaria baicalensis* on spinal cord injury in rats. *J Neurochem.* 2009;110(4):1276-1287.
- [26] DONG Q, CHU F, WU C, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi extract protects against alcohol-induced acute liver injury in mice and affects the mechanism of ER stress. *Mol Med Rep.* 2016;13(4):3052-3062.
- [27] DONG Y, LI Y, HUANG C, et al. Systemic application of teriparatide for steroid induced osteonecrosis in a rat model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015;16:163.
- [28] BAEK SH, KIM KH, LEE WK, et al. Abnormal Lipid Profiles in Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: A Comparison with Osteoarthritis Using Propensity Score Matching. *J Bone Joint Surg Am.* 2022;104(Suppl 2):19-24.
- [29] WU X, GENG C, SUN W, et al. Incidence and Risk Factors of Osteonecrosis of Femoral Head in Multiple Myeloma Patients Undergoing Dexamethasone-Based Regimens. *Biomed Res Int.* 2020;2020:1-7.
- [30] SAAD B, GHAREEB B, KMAIL A. Metabolic and Epigenetics Action Mechanisms of Antiobesity Medicinal Plants and Phytochemicals. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021;2021:1-19.
- [31] WANG XH, GUO YW, TOLBA E, et al. Two-Armed Activation of Bone Mineral Deposition by the Flavones Baicalin and Baicalein, Encapsulated in Polyphosphate Microparticles. *Am J Chin Med.* 2017;45(3):533-555.
- [32] SAUL D, GLEITZ S, NGUYEN HH, et al. Effect of the lipoxigenase-inhibitors baicalein and zileuton on the vertebra in ovariectomized rats. *Bone.* 2017; 101:134-144.
- [33] 桂林源, 刘世宇, 邱新毓, 等. 黄芩小分子化合物对雌激素缺乏骨质疏松的预防和治疗作用 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2016,26(5):294-300.
- [34] 付方胜, 丁佳昕, 邵思远, 等. 黄芩素抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化和功能 [J]. 锦州医科大学学报, 2019,40(2):18-20+118-119.
- [35] MAZUR CM, ANDRADE CDC, TOKAVANICH N, et al. Partial prevention of glucocorticoid-induced osteocyte deterioration in young male mice with osteocin gene therapy. *iScience.* 2022;25(9):105019.
- [36] O'BRIEN CA, JIA D, PLOTKIN LI, et al. Glucocorticoids Act Directly on Osteoblasts and Osteocytes to Induce Their Apoptosis and Reduce Bone Formation and Strength. *Endocrinology.* 2004;145(4):1835-1841.
- [37] MOUTSATSOU P, KASSI E, PAPAVALIIOU AG. Glucocorticoid receptor signaling in bone cells. *Trends Mol Med.* 2012;18(6):348-359.
- [38] FENG Z, ZHENG W, TANG Q, et al. Fludarabine inhibits STAT1-mediated up-regulation of caspase-3 expression in dexamethasone-induced osteoblasts apoptosis and slows the progression of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rats. *Apoptosis.* 2017;22(8):1001-1012.
- [39] 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. *Theranostics.* 2017;7(3):733-750.
- [40] XUE X, FENG Z, LI Z, et al. Salidroside inhibits steroid-induced avascular necrosis of the femoral head via the PI3K/Akt signaling pathway: In vitro and in vivo studies. *Mol Med Rep.* 2017;17(3):3751-3757.
- [41] ZHANG S, YE J, DONG G. Neuroprotective effect of baicalein on hydrogen peroxide-mediated oxidative stress and mitochondrial dysfunction in PC12 cells. *J Mol Neurosci.* 2009;40(3):311-320.
- [42] JIN S, YANG L, MENG C, et al. Sequential Epiphyseal Cartilage Changes of Femoral Heads in C57BL/6 Female Mice Treated with Excessive Glucocorticoids. *Cartilage.* 2020;13(2_suppl):453S-464S.
- [43] LU C, QI H, XU H, et al. Global research trends of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: A 30-year bibliometric analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:1027603.
- [44] LU BB, LI KH. Lipoic acid prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatol Int.* 2011;32(6):1679-1683.
- [45] IUCHI T, AKAIKE M, MITSUI T, et al. Glucocorticoid Excess Induces Superoxide Production in Vascular Endothelial Cells and Elicits Vascular Endothelial Dysfunction. *Circ Res.* 2003;92(1):81-87.
- [46] 周年, 刘波, 徐彭. 氧化应激与骨质疏松症的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014,20(12):1485-1489.
- [47] 代重山, 汤树生, 张青杰, 等. 黄芩苷和黄芩素的生物学功能及其在动物生产中的应用 [J]. 中国饲料, 2015(8):11-14+18.
- [48] DOK-GO H, LEE KH, KIM HJ, et al. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res.* 2003;965(1-2): 130-136.
- [49] GRIGALIU I, PETRIKAITE V. Relationship between Antioxidant and Anticancer Activity of Trihydroxyflavones. *Molecules.* 2017;22(12):2169.
- [50] 李东, 宋启春, 赵研, 等. 白藜芦醇对免疫诱导股骨头缺血性坏死抗氧化应激和抗凋亡作用的实验研究 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2022, 37(12):1276-1280.
- [51] 刘靖丽, 崔莹超. 黄芩素和黄芩苷抗氧化活性与结构关系的密度泛函理论研究 [J]. 云南民族大学学报 (自然科学版), 2017,26(6):461-464.
- [52] JIANG WB, ZHAO W, CHEN H, et al. Baicalin protects H9c2 cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress through activation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;45(3):303-311.

(责任编辑: WL, GD, ZN, LWI)