激素性股骨头坏死血管新生相关基因的鉴定及其靶向中药成分筛选验证

肖　振[1]，李盛华[2*]

1. 甘肃中医药大学，甘肃 兰州　730000
2. 甘肃省中医院，甘肃 兰州　730050

摘　要：目的　基于生物信息学分析筛选激素性股骨头坏死（steroid induced osteonecrosis of femoral head，SONFH）中涉及血管生成相关的基因，进一步探讨其作用机制并筛选靶向中药活性成分。**方法**　通过 Perl 语言和 R 软件处理 GEO 数据，获得 SONFH 的关键差异基因，使用 David 工具进行基因本体（gene ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）分析。然后使用 STRING 平台和 Cytoscape 软件分析蛋白互作关系，用 MCODE 和 CytoHubba 插件识别重要基因簇模块和核心基因，并进一步验证。使用 CTD 数据库搜索靶向核心基因的中药活性成分并用 autodock vina 软件进行分子对接，以及探索核心基因与 SONFH 的相互作用。利用激素诱导人股骨头骨微血管内皮细胞（bone microvascular endothelial cells，BMECs），通过 CCK-8、细胞划痕实验和 Transwell 实验观察白藜芦醇对细胞增殖及迁移的影响，通过 Western blotting 法检测白藜芦醇对细胞中血管内皮生长因子 A（vascular endothelial growth factor，VEGFA）及磷脂酰肌醇-3-羟激酶（phosphatidylinositol-3-hydroxykinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）通路蛋白表达的影响。**结果**　在 SONFH 中鉴定出 118 个与血管新生相关的关键基因，GO 富集分析显示主要参与血管生成、细胞的增殖和迁移等，KEGG 通路主要涉及 PI3K/Akt 信号通路、黏附斑信号通路、细胞外基质受体互作通路和 Ras 相关蛋白 1（Ras-related protein 1，Rap1）信号通路等。鉴定出 10 个核心基因依次为 *PDGFRB*、*THY1*、*PTPRC*、*ITGB1*、*VEGFA*、*ALB*、*INS*、*IGF1*、*CD44* 和 *COL1A1*。通过验证，核心基因的表达差异明显，其中 *PTPRC*、*CD44*、*ITGB1* 表达上调。受试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）分析提示 *PTPRC*、*CD44*、*IGF1*、*PDGFRB*、*ITGB1* 和 *VEGFA* 具有潜在诊断价值。白藜芦醇、雌二醇、槲皮素和姜黄素与核心基因的相互作用指数较高，其中白藜芦醇最高，可能为修复 SONFH 主要药物活性成分。体外实验表明，白藜芦醇能逆转激素诱导的 BMECs 增殖活性降低，增加细胞划痕愈合率，促进细胞迁移，增加细胞中 VEGF、PI3K 和 Akt 蛋白相对表达量，尤其白藜芦醇浓度为 100 μmol/L 时效果最为显著（$P<0.05$），当使用 PI3K 抑制剂 3-MA 时，细胞增殖及迁移效果明显被抑制（$P<0.05$）。**结论**　通过生物信息学分析鉴定了核心基因与通路，并筛选其受靶向调控的主要中药活性成分，通过细胞实验证实白藜芦醇可能通过 PI3K/AKT/VEGF 信号通路参与激素诱导的骨微血管内皮细胞损伤的修复，为 SONFH 的分子发病机制和新的治疗靶点提供了数据支持。

关键词：生物信息学；激素性股骨头坏死；血管新生；白藜芦醇；雌二醇；槲皮素；姜黄素

中图分类号：R285；R284　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)05 - 1526 - 14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.020

Identification of angiogenesis related genes in steroid induced osteonecrosis of femoral head and screening and verification of active components of targeted traditional Chinese medicine

XIAO Zhen[1], LI Sheng-hua[2]

1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China
2. Gansu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective　To screen the genes related to angiogenesis in steroid induced osteonecrosis of femoral head (SONFH) based on the bioinformatics analysis, and further explore its mechanism of action and screen the active components of targeted traditional Chinese medicine. **Methods**　The key differential genes of SONFH were obtained by processing GEO data with Perl language and R software, and the gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) were analyzed with David tool. Then, STRING platform and Cytoscape software were used to analyze protein interactions, and MCODE and CytoHubba plug-ins were used to identify

收稿日期：2022-10-19

基金项目：国家自然科学基金项目（81860861）

作者简介：肖　振，男，博士研究生。Tel: 18691997133　E-mail: 768261846@qq.com

***通信作者：**李盛华，男，博士生导师，主要从事中医药治疗骨关节疾病的基础与临床研究。E-mail: lshgsszyy@163.com

important gene cluster modules and core genes, which were further verified. The CTD database was used to search the active components of traditional Chinese medicine targeting the core gene, and the autodock vina software was used to perform molecular docking, as well as explore the interaction between the core gene and SONFH. Human bone microvascular endothelial cells (BMECs) were induced by hormone, and the effects of resveratrol on cell proliferation and migration were observed by CCK-8, cell scratch assay and Transwell assay. The effect of resveratrol on protein expression of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and phosphatidylinositol-3-hydroxykinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway in cells was detected by Western blotting. **Results** A total of 118 key genes related to angiogenesis were identified in SONFH. GO enrichment analysis showed that it was mainly involved in angiogenesis, cell proliferation and migration. KEGG pathway was mainly involved in PI3K/Akt signal pathway, adhesion plaque signal pathway, extracellular matrix receptor interaction pathway and Ras-related protein 1 (Rap1) signal pathway. Ten core genes were identified as *PDGFRB*, *THY1*, *PTPRC*, *ITGB1*, *VEGFA*, *ALB*, *INS*, *IGF1*, *CD44* and *COL1A1*. Through verification, the up-regulated expression of *PTPRC*, *CD44* and *ITGB1* was significantly different. Receiver operating characteristic (ROC) analysis suggested that *PTPRC*, *CD44*, *IGF1*, *PDGFRB*, *ITGB1* and *VEGFA* had potential diagnostic value. The interaction index of resveratrol, estradiol, quercetin and curcumin with core genes was higher, and resveratrol was the highest, which could be the main active ingredient in repairing SONFH. *In vitro* experiments showed that resveratrol could reverse the decrease of proliferation activity of BMECs induced by hormones, increase the scratch healing rate, promote cell migration, and increase the relative expression levels of VEGF, PI3K and Akt in cells, especially the effect was most significant when the concentration of resveratrol was 100 μmol/L ($P < 0.05$). When PI3K inhibitor 3-MA was used, cell proliferation and migration were significantly inhibited ($P < 0.05$). **Conclusions** Through bioinformatics analysis, the core genes and pathways were identified, and the main active components of targeted traditional Chinese medicine were screened. Through cell experiments, it was confirmed that resveratrol might play a role in repairing hormone-induced bone BMECs injury through PI3K/AKT/VEGF signal pathway. Our research provides data support for the molecular pathogenesis of SONFH and new therapeutic targets.

Key words: bioinformatics; steroid induced osteonecrosis of femoral head; angiogenesis; resveratrol; estradiol; quercetin; curcumin

激素性股骨头坏死（steroid induced osteonecrosis of femoral head，SONFH）是一种常见的进行性骨病，80%的患者会在 1～4 年内出现髋关节塌陷，最终需行人工关节置换，给社会家庭带来沉重负担[1]。SONFH的发生是由于免疫相关疾病过度使用糖皮质激素（glucocorticoid，GC）造成。GC 诱导的骨内皮细胞凋亡可激活血栓形成并减少血管生成[2]。骨内皮细胞包括骨微血管内皮细胞（bone microvascular endothelial cells，BMECs）和内皮祖细胞（endothelial progenitor cells，EPCs），在维持血管稳态以及股骨头血供中起着重要的作用。由骨内皮细胞受损引起的血管生成受损、细胞凋亡异常、血栓形成和脂肪栓塞被认为是 SONFH 的关键发病机制[3-8]。研究发现，骨细胞不能在距离血管超过 100 mm 处存活，所以学者们普遍认为血管发育总是先于成骨[9]。多项研究表明，血管内皮损伤与 SONFH 密切相关，来自 SONFH 患者的 BMECs 具有抑制迁移、血管生成受损和凋亡活性增加的特点[10-11]。另外，通过血管造影观察血管化大转子的骨移植治疗股骨头坏死能明显改善股骨头的血液灌注，并大幅改善患者髋关节活动功能[12]。因此，改善骨内皮细胞形态及功能是防控 SONFH 发生和发展的重要调节因子。

血管生成是支持 SONFH 修复的关键因素。研究发现使用普伐他汀和淫羊藿苷能促进血管新生，预防 SONFH 的发生[13-14]。银杏叶提取物能增加 SONFH 模型小鼠血管内皮细胞的活性，抑制甲强龙诱导的内皮细胞凋亡和功能丧失，逆转激素对磷酸化磷脂酰肌醇-3-羟激酶（phosphorylated phosphatidylinositol-3-hydroxykinase，p-PI3K）、磷酸化蛋白激酶 B（phosphorylated protein kinase B，p-Akt）和磷酸化内皮型一氧化氮合酶（phosphorylated endothelial nitric oxide synthase，p-eNOS）表达水平的抑制，预防骨坏死[15]。本研究基于生物信息学分析筛选 SONFH 中与血管生成相关的差异表达基因，进一步通过基因本体（gene ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）富集分析，确定 SONFH 发病机制，以及核心基因的表达、功能、相互作用及信号通路，并进一步筛选靶向中药活性成分，为靶向修复骨内皮细胞和探索 SONFH 的治疗靶点提供新思路。

1 材料与方法

1.1 SONFH 与血管新生相关的差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）的筛选

从GEO数据库检索“steroid induced osteonecrosis of the femoral head”或“SONFH”获得 GSE123568 和 GSE74089 数据集。GSE123568 包含 10 个对照样

本和 30 个 SONFH 样本，GSE74089 包含 SONFH 和对照各 4 个样本。检索 Genecards 数据库获得 SONFH 靶基因 2174 个。再通过检索“endothelial cells”和“glucocorticoid”，获得 GSE25269 数据集，包含 2 个对照组内皮细胞样本和 2 个地塞米松干预的细胞样本。使用 Prel 语言处理数据集，R 软件的 svg 包对数据集去批次处理，通过 limma 包限定 $P<0.05$ 获得 DEGs，制做热图进行可视化分析。

1.2 关键基因的筛选及 GO 和 KEGG 富集分析

将各数据集 DEGs 导入 venny2.1 软件，获得 SONFH 中与血管新生相关的关键基因。进一步使用 David 软件获取 GO 富集和 KEGG 通路相关信息。

1.3 关键基因的 PPI 网络构建与核心基因的筛选

通过 STING 平台和 Cytoscape 3.9.0 软件，深入了解 SONFH 中差异表达血管新生相关基因的内在联系。使用 MCODE 插件对基因进行聚类分析，使用 CytoHubb 插件获取核心基因。

1.4 鉴定与 SONFH 相关的核心基因

为了验证核心基因筛选的可靠性，使用 GSE123568 数据集鉴定选定的核心基因的表达水平。进一步使用 CTD 数据库验证核心基因与 SONFH 之间的相互作用关系。

1.5 靶向核心基因的中药活性成分筛选

CTD 数据库是比较毒理基因组学数据库，采用 CTD 数据库搜索靶向作用于核心基因的中药活性成分（限定 interactions≥2）。

1.6 分子对接

在 TCMSP 平台、ZINC 数据库搜索与核心基因作用指数最高的中药活性成分的 3D 结构（mol2 格式），在 PDB 数据库中输入核心基因 Uniprot ID，下载相关靶蛋白的 pdb 格式文件，经 PyMOL 去水加氢后，使用 Autodock vina1.1.2 软件进行分子对接，再用 PyMOL 软件将结果可视化。

1.7 体外实验验证

1.7.1 细胞及试剂　人 BMECs 购自 ICELL（上海）生物技术股份有限公司，白藜芦醇（resveratrol）、3-MA（PI3K 抑制剂）购自 MCE 上海皓元生物医药科技有限公司，注射用甲泼尼龙琥珀酸钠（methylprednisolone sodium，MPS，辉瑞制药有限公司），实验时将 MPS 溶于 ECM 培养基，3-MA 和白藜芦醇分别溶于 DMSO，原液浓度均为 100 mmol/L，后续实验使用内皮细胞培养基（endothelial cell medium，ECM）稀释至合适浓度。

0.1%胰蛋白酶-EDTA、细胞计数试剂盒 8（cell counting kit 8，CCK-8）、RIPA 裂解液（北京索莱宝科技有限公司）；蛋白酶和磷酸酶抑制剂（Thermo Fisher Scientific 公司，美国）；Matrigel 基质胶（BD Biosciences 公司，美国）；Transwell 小室（24 孔培养板）、96 孔培养板（Corning 公司，美国）；血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）兔抗多克隆抗体（1∶1000）、PI3K 兔抗多克隆抗体（1∶1000）、Akt 兔抗多克隆抗体（1∶1000）、磷酸甘油醛脱氢酶（reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase，GAPDH）兔抗多克隆抗体（1∶5000）；辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记羊抗兔二抗（1∶5000）均为 ImmunoWay 公司产品。

1.7.2 白藜芦醇对 MPS 干预后 BMECs 增殖的影响　使用 ECM 培养制备 BMECs 混悬液，细胞数 2×10^5 个/mL，加入 96 孔板中，每孔 100 μL，空白组不加细胞仅加 100 μL ECM。过夜贴壁后，对照组加入 ECM，处理组分别用终浓度 25、50、75、100、200 μmol/L 白藜芦醇＋20 μg/mL（终质量浓度）MPS[16] 处理 24、42、72 h 后，每孔加入 10 μL CCK-8 避光孵育 2 h。酶标仪（BioRed，美国）检测 450 nm 处的吸光度（A），计算细胞活力。实验重复 3 次。

$$细胞存活率=(A_{处理}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})$$

1.7.3 白藜芦醇对 MPS 干预后 BMECs 迁移的影响　**（1）**划痕实验：将细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板内，分为 6 组：对照组、模型（10 mg/mL MPS）组、3-MA 抑制剂（10 mg/mL MPS＋5 mmol/L[16] 3-MA＋100 μmol/L 白藜芦醇）组及白藜芦醇低、中、高剂量（10 mg/mL MPS＋50、100、200 μmol/L 白藜芦醇）组。细胞在无血清培养基中饥饿 8 h 后，用 200 μL 移液管吸头刮去内皮细胞，洗涤未附着的细胞，每组给予相应药物，培养 0、24 h 后拍照，计算划痕愈合率。实验重复 3 次。

$$划痕愈合率=(0\ h\ 划痕宽度-24\ h\ 划痕宽度)/0\ h\ 划痕宽度$$

（2）Transwell 迁移实验：分组和给药同划痕实验，消化细胞并用 PBS 洗涤 3 次去除血清影响，用无血清培养基调整细胞密度为 1×10^5 个/mL，每孔加入 200 μL 细胞悬液于 Transwell 小室内，24 孔板内加入 750 μL 含 10% FBS 的 ECM 培养基。每组给予相应药物，孵育 24 h 后，Transwell 小室用甲醇固定，0.1%结晶紫染色；随后用棉签去除每个小室内部未迁移细胞，倒置显微镜下观察。随机取 3 个视野计数迁移细胞并取均值，实验重复 3 次。

1.7.4 蛋白质印记分析 分组和给药同划痕实验，BMECs 给予相应处理 48 h 后，通过 RIPA 裂解缓冲液（含蛋白酶和磷酸酶抑制剂 1∶100）提取蛋白质，紫外分光光度计测定蛋白浓度并稀释浓度至 10 mg/mL。加入 5×上样缓冲液混合均匀，在 95 ℃下加热 5 min 导致蛋白质变性。使用 8% SDS-PAGE 分离胶分离 40 μg 蛋白质样品，然后将其转移到 PVDF 膜上，用 10%脱脂牛奶封闭 2 h，然后一抗在随后的 4 ℃下孵育过夜。之后，与其相应的二抗进行孵育。用电化学发光法观察条带。Image Lab 3.0 软件用于量化条带灰度值。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

使用 GraphPad Prism 9.0.0 统计分析，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用独立样本 t 检验，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

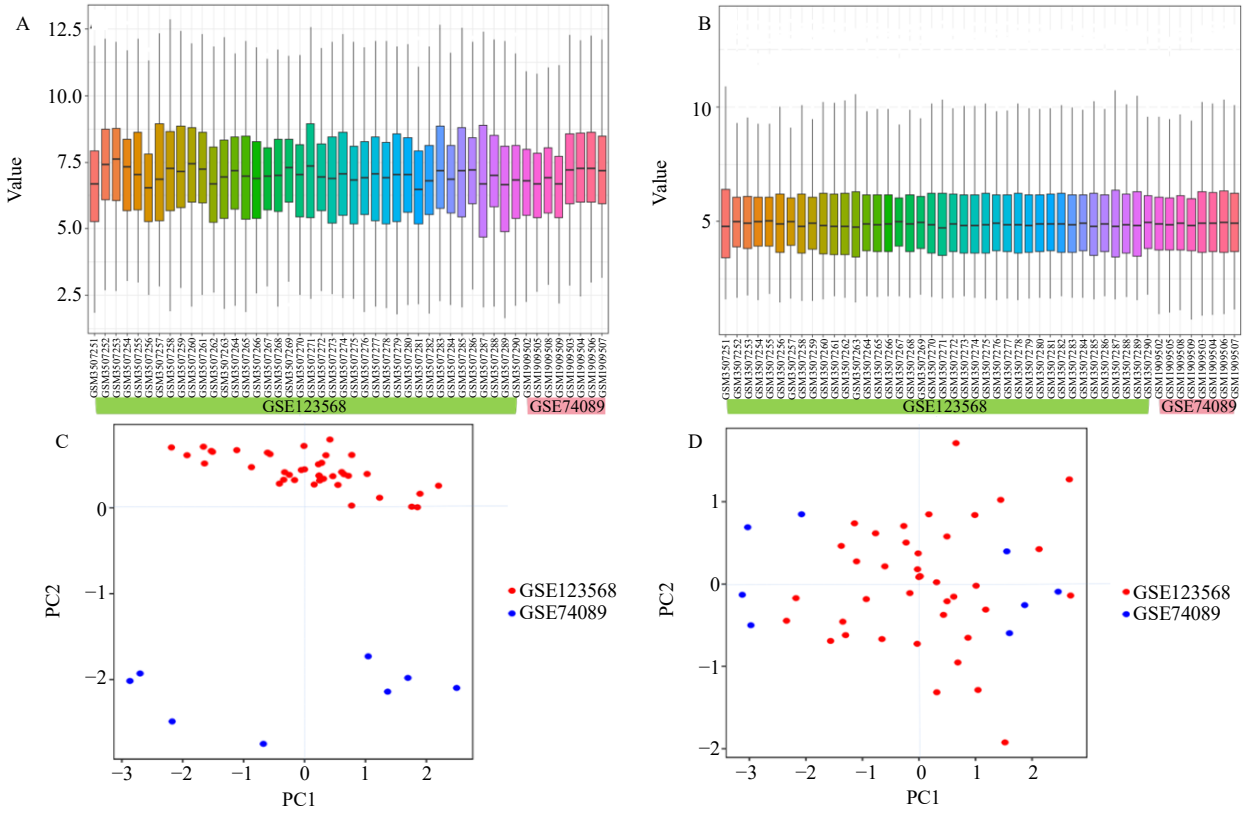
2.1 SONFH 与血管新生的 DEGs 的确定

数据集和平台信息见表 1，通过 GEO2R 获得差异表达基因，以 $P<0.05$ 为条件筛选 DEGs，GSE123568 包含 12 796 个，GSE74089 包含 12 120 个，Genecards 包括 2354 个，其中 GSE123568 和 GSE74089 的数据经 Perl 语言处理合并及 R 软件（svg 包）矫正后，使用 ggplot2 包将数据可视化，见图 1，SONFH 差异基因火山图及热图见图 2。综合各数据集共获得 SONFH 的 DEGs 963 个，见图 3-A。

表 1 数据集基本信息

Table 1 Basic information of data set

序号	GSE 编号	平台	样品	归属
1	GSE123568	GPL15207	40 例患者和 10 例对照	SONFH
2	GSE74089	GPL13497	4 例患者和 4 例对照	SONFH
3	GSE25269	GPL570	2 个激素处理和 2 个对照	血管生成相关



A-去批次处理前数据集的基因表达水平 B-去批次处理后数据集的基因表达水平 C-去批次处理前数据集之间的主成分分析 D-去批次处理后数据集之间的主成分分析

A-gene expression level of data set before de-batch processing B-gene expression level of data set after de-batch processing C-principal component analysis between data sets before de-batch processing D-principal component analysis between data sets after de-batch processing

图 1 GEO 数据矫正

Fig. 1 GEO data correction

同样筛选 GSE25269（P<0.05）数据集获得与血管生成相关的 2373 个 DEGs，前 50 个 DEGs 热图见图 3-B。

2.2　关键基因的筛选

将 SONFH 中与血管生成相关的基因定义为关键基因。将各数据集 DEGs（P<0.05）导入 venny 2.1 软件，获得 118 个 SONFH 中与血管新生相关的 DEGs（图 3-C）。其中 74 个在 SONFH 中表达上调，44 个在 SONFH 中表达下调。

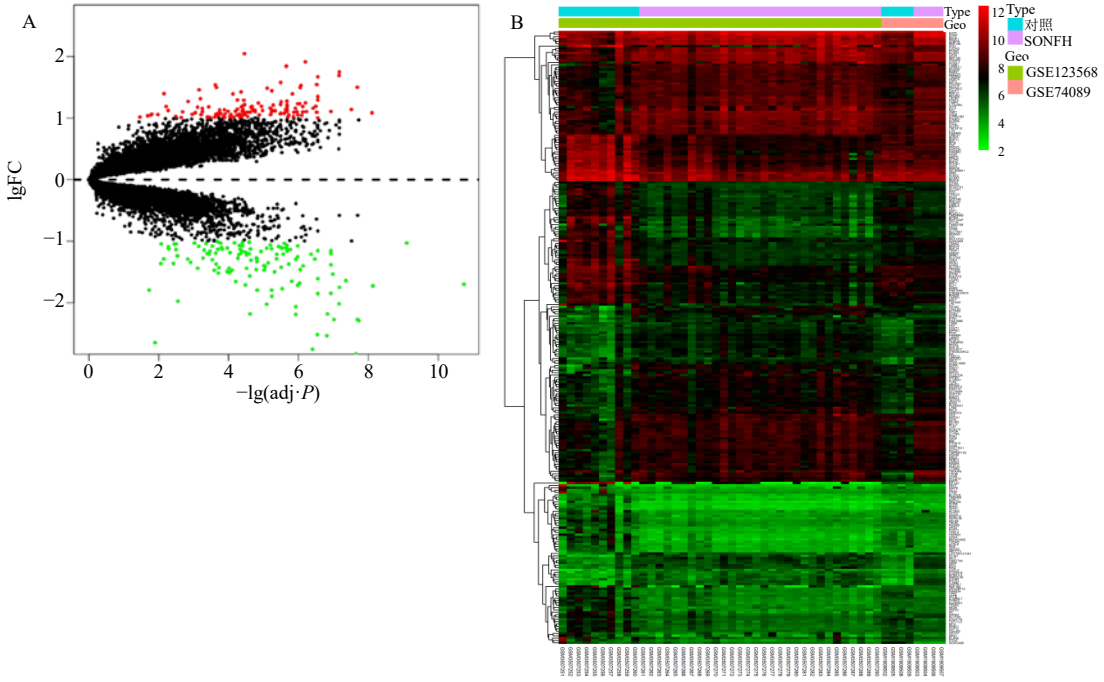
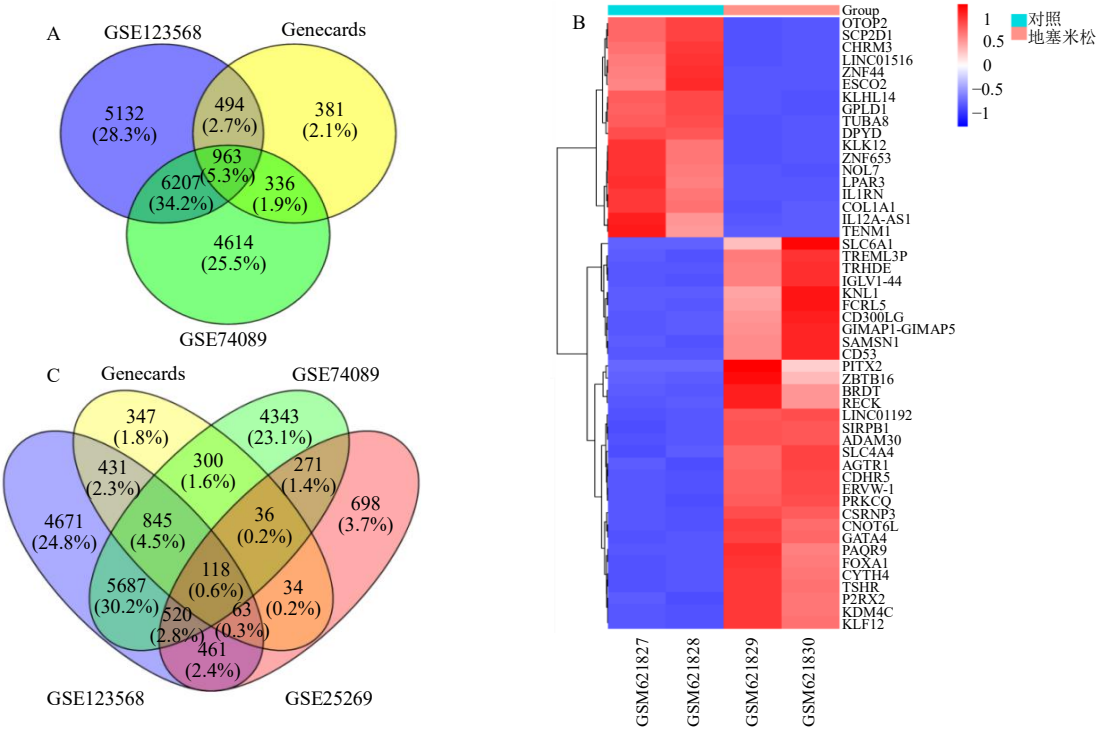


图 2　SONFH 的 DEGs 火山图和聚类热图

Fig. 2　Volcano map (A) and clustering heat map (B) of DEGs of SONFH



A-SONFH 的 DEGs　B-GSE25269 的 DEGs 热图　C-SONFH 中与血管生成相关的基因

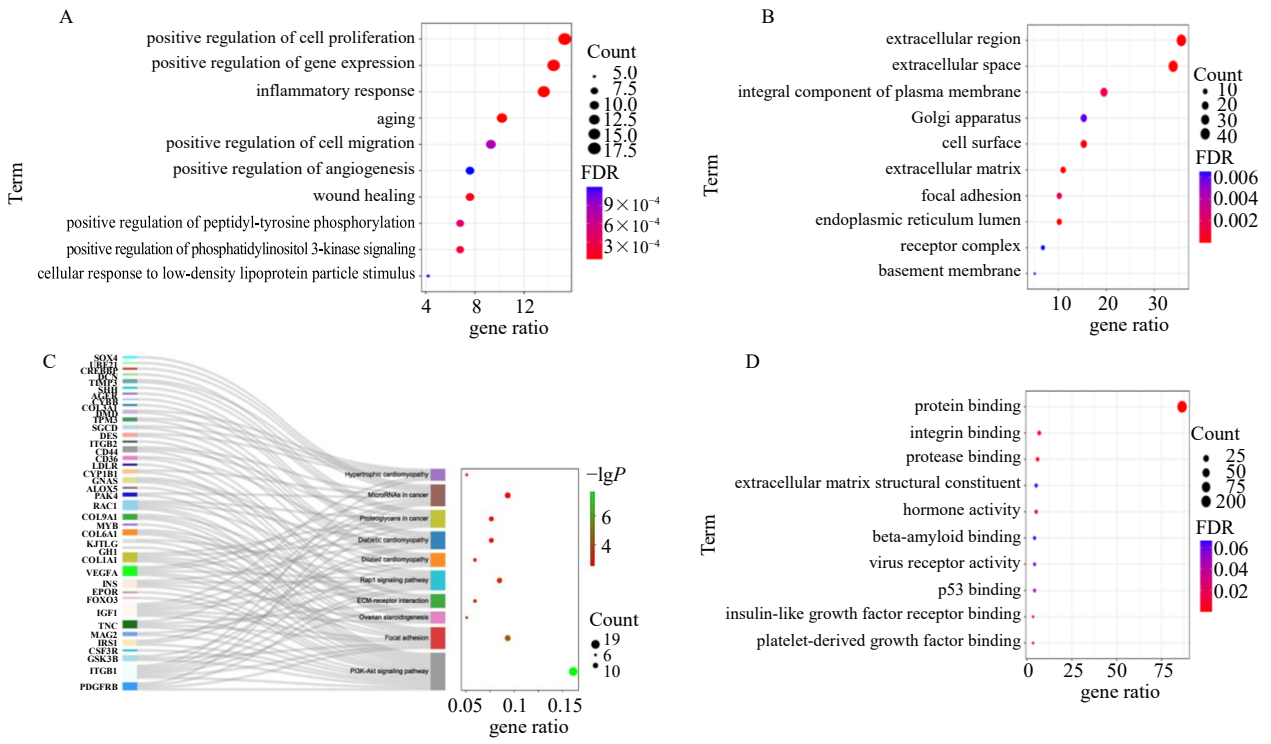
A-DEGs of SONFH　B-DEGs heat map of GSE25269　C-genes related to angiogenesis in SONFH

图 3　SONFH 和血管新生相关的 DEGs 及关键基因的筛选

Fig. 3　SONFH and angiogenesis related DEGs and screening of key genes

2.3 关键基因 GO 和 KEGG 富集分析

使用 DAVID 数据库进行关键基因的 GO 富集（图 4-A、B、D）和 KEGG 通路富集分析，GO 富集中生物过程主要涉及正调控血管生成、细胞黏附、炎症、细胞增殖、迁移和伤口愈合等；细胞组分主要涉及细胞外间隙、细胞外基质和胞外区；分子功能涉及蛋白质结合、血小板衍生生长因子和蛋白酶结合等。KEGG 主要富集到 PI3K 信号通路、黏附斑信号通路、细胞外基质受体互作通路和 Ras 相关蛋白 1（Ras-related protein 1，Rap1）信号通路等，关键基因与通路的桑基气泡图见图 4-C。



A-生物过程 GO 分析　B-细胞组分 GO 分析　C-KEGG 分析　D-分子功能 GO 分析

A-GO analysis of biological process　B-GO analysis of cell component　C-KEGG analysis　D-GO analysis of molecular function

图 4　关键基因的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 4　GO and KEGG enrichment analysis of key genes

2.4 关键基因蛋白质相互作用网络（protein-protein interaction network，PPI）及核心基因筛选

将 DEGs 导入 STRING 平台，隐藏无连接的节点，获得包含 102 个节点和 443 条边的 PPI 网络，再导入 Cytoscape，使用 NetworkAnalyzer 工具计算节点属性，节点大小对应度（degree）大小，见图 5。再使用 Cytoscape 的 MCODE 插件寻找关键的子网络 6 个，见图 6-A～F，其主要子网络（图 6-A）涉及 vegf 激活的血小板衍生生长因子受体信号通路对细胞增殖、一氧化氮介导的信号转导调节、冠状血管形态发生和细胞黏附的正调节。

通过 Cytoscape 软件中的 CytoHubba 插件筛选关键基因中最大中心度（maximal clique centrality，MCC）评分前 10 位的基因，定义为核心基因。通过筛选依次为血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，*VEGFA*）、白蛋白（albumin，*ALB*）、胰岛素（insulin，*INS*）、胰岛素样生长因子 1（insulin-like growth factor 1，*IGF1*）、透明质酸的受体（CD44）、整合素 β-1（integrin beta-1，*ITGB1*）、Thy-1 膜糖蛋白（Thy-1 membrane glycoprotein，*THY1*）、血小板衍生生长因子受体 β（platelet-derived growth factor receptor beta，*PDGFRB*）、受体型酪氨酸蛋白磷酸酶 C（receptor-type tyrosine-protein phosphatase C，*PTPRC*）和胶原蛋白 α-1（collagen alpha-1(I) chain，*COL1A1*），见图 6-G。进一步对核心基因富集通路分析，结果显示通路主要富集到 PI3K-Akt、黏附斑、Ras 和 Rap1 信号通路等（图 7），与关键基因富集通路大致相同。

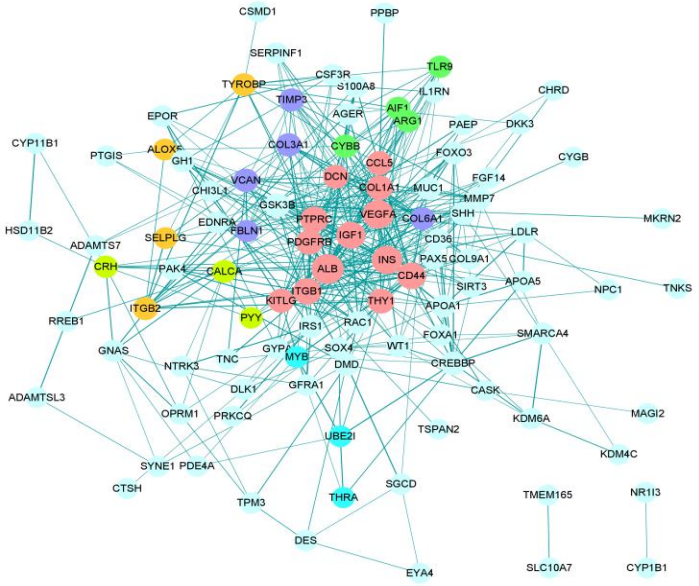


图 5　关键基因 PPI 网络 (节点大小对应度值大小)

Fig. 5　PPI network of key genes (node size correspondence degree value size)

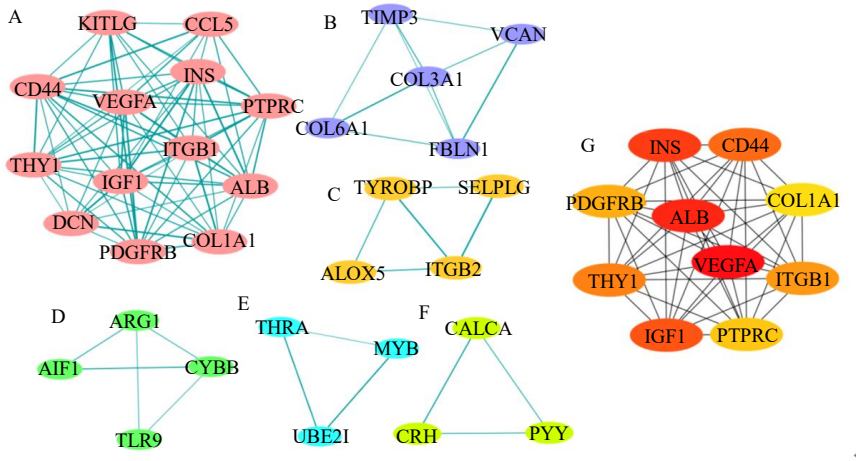


图 6　PPI 网络基因簇模块 (A～F) 与核心基因 (G)

Fig. 6　Gene cluster module of PPI network (A—F) and core genes (G)

2.5　SONFH 血管新生相关的核心基因的筛选及鉴定

通过验证 GSE123568 数据集鉴定选定的 10 个核心基因的表达水平，发现核心基因表达均差异明显（$P<0.05$，图 8-A），尤其 *PTPRC*、*CD44*、*IGF1* 和 *VEGFA* 的差异最为显著，其中 *CD44*、*ITGB1* 和 *PTPRC* 表达上调，其余皆表达下调。进一步受试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）分析显示 *PTPRC*、*CD44*、*IGF1*、*PDGFRB*、*ITGB1* 和 *VEGFA* 的曲线下面积（area under curve，AUC）值分别为 0.897、0.837、0.777、0.770、0.767 和 0.703（图 8-B）。

再使用 CTD 数据库验证核心基因与 SONFH 之间的相互作用关系（图 9），结果发现 *COL1A1*、*IGF1*、*VEGFA* 和 *PTPRC* 与 SONFH 作用指数较高，提示可能为干预修复 SONFH 的重要靶点。

2.6　靶向核心基因的中药活性成分筛选

CTD 数据库中靶向作用于核心基因的中药活性成分（interactions≥2）见表 2。结果显示白藜芦醇、姜黄素、雌二醇和槲皮素等与核心基因相互作用指数较高，提示这些活性成分可能是作用核心基因促进血管新生修复 SONFH 关键药物成分。

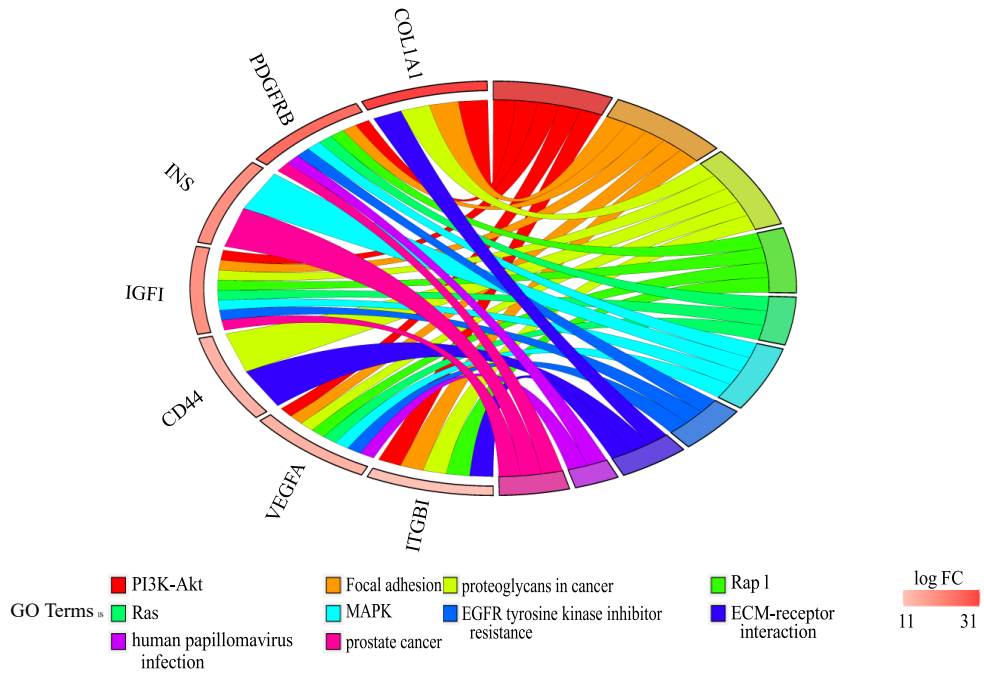
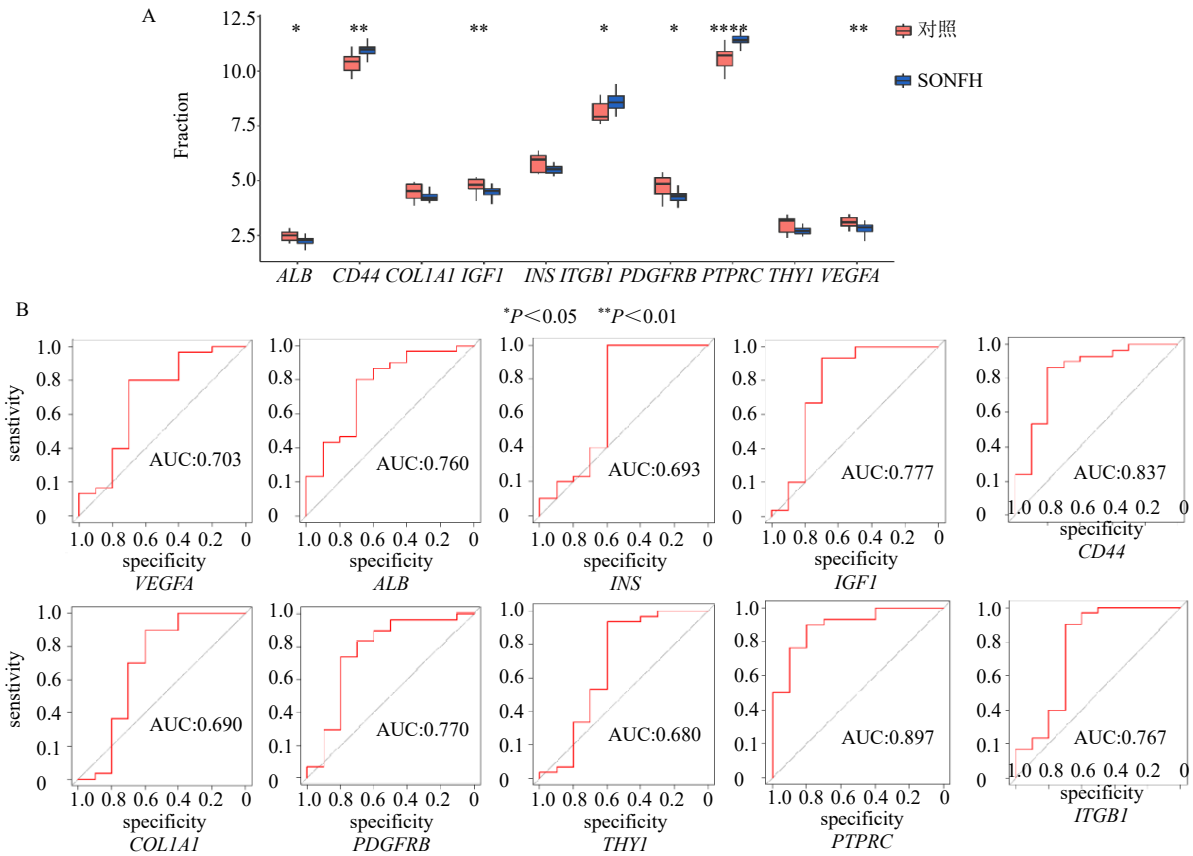


图 7　核心基因富集通路图

Fig. 7　Enrichment pathway map of core genes



A-核心基因在数据集中的表达情况　B-核心基因作为诊断标志物的特异性和敏感度

A-expression of core genes in data set　B-specificity and sensitivity of core genes as diagnostic index

图 8　核心基因在 SONFH 中的表达情况

Fig. 8　Expression of core genes in SONFH

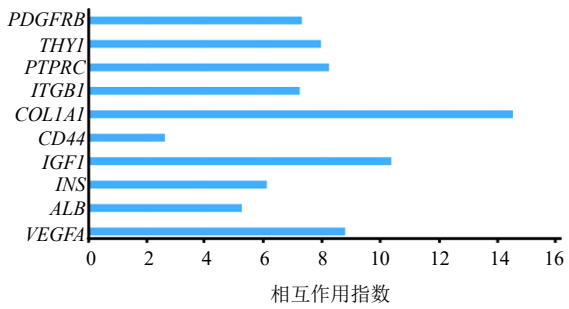


图 9　核心基因与 SONFH 相互作用指数

Fig. 9　Interaction index of core genes and SONFH

2.7　分子对接

通过 Autodock vina 软件分子对接，显示靶向核心基因的主要中药活性成分白藜芦醇与 *VEGFA*、*PTPRC*、*ITGB1*、*PDGFRB*、*IGF1* 和 *CD44* 结合能均小于−5 kcal/mol（1 kcal＝4.2 kJ），结合稳定，结合能依次为−6.2、−6.1、−5.9、−5.6、−5.2 和−5.3 kcal/mol。白藜芦醇与各蛋白形成氢键丰富，结构构象稳定，如与 *VEGFA* 通过氨基酸残基 SER-9、GLY-42、GLY-41、LYS-103 形成 4 个氢键；与 *PTPRC* 通过氨基酸残基 SER-828/SER-829、ARG-834、GLY-833、HIS-797、GLN-872 形成 6 个氢键；与 *PDGFRB* 通过氨基酸残基 SER-40、SER-39、SER-77、ARG-19、ARG-37、PTR-1 形成 6 个氢键；与 *ITGB1* 通过残基 ARG-309、THR-310、SER-233 形成 3 个氢键；与 *IGF1* 通过氨基酸残基 GLY-19、GLN-15 形成 2 个氢键；与 *CD44* 通过氨基酸残基 SER-109、ILE-26、GLU-37 形成 3 个氢键（图 10），结果提示白藜芦醇有可能通过核心基因 *VEGFA*、*PTPRC*、*ITGB1*、*PDGFRB*、*IGF1* 和 *CD44* 发挥修复 SONFH 的作用。

表 2　靶向作用核心基因的中药活性成分

Table 2　Active components of traditional Chinese medicine targeting core genes

基因	活性成分	化合物编号	作用指数	基因	活性成分	化合物编号	作用指数
VEGFA	白藜芦醇	D000077185	94	*IGF1*	雌二醇	D004958	120
	雌二醇	D004958	55		黄体酮	D011374	65
	槲皮素	D011794	42		白藜芦醇	D000077185	32
	姜黄素	D003474	36		辣椒素	D002211	16
	穿心莲内酯	C030419	19		槲皮素	D011794	7
CD44	白藜芦醇	D000077185	16		姜黄素	D003474	6
	雌二醇	D004958	11	*THY1*	雌二醇	D004958	3
	木黄酮	D019833	7	*PDGFRB*	白藜芦醇	D000077185	8
	山柰酚	C006552	7		姜黄素	D003474	6
	香豆素	D003375	2		香豆素	D003375	2
COL1A1	白藜芦醇	D000077185	28		大黄素	D004642	2
	槲皮素	D011794	20	*INS*	白藜芦醇	D000077185	42
	姜黄素	D003474	15		槲皮素	D011794	16
	雌二醇	D004958	8		姜黄素	D003474	12
	木黄酮	D019833	8		黄芩素	C006680	2
ITGB1	麦冬素 D	C046996	9	*ALB*	白藜芦醇	D000077185	14
	槲皮素	D011794	7		槲皮素	D011794	8
	雌二醇	D004958	3		姜黄素	D003474	7
	黄体酮	D011374	3		儿茶素	D002392	5
	姜黄素	D003474	2		肉豆蔻酸	D019814	5
PTPRC	木黄酮	D019833	2				

2.8　白藜芦醇对 MPS 干预后 BMECs 的影响

2.8.1　对 BMECs 增殖的影响　CCK8 检测显示，白藜芦醇浓度为 100 μmol/L 且作用 48 h，能显著改善 MPS 对 BMECs 活性的抑制，见图 11。

2.8.2　对 BMECs 迁移的影响　划痕实验和 Transwell 实验结果（图 12）表明，基于划痕愈合率和细胞迁移数量两方面，模型组 BMECs 的迁移显著低于对照组（$P<0.05$），白藜芦醇低、中、高剂量组 BMECs 的迁移明显高于模型组，白藜芦醇中剂量组明显高于 3-MA 抑制剂组（$P<0.05$）。

2.8.3　对细胞蛋白表达的影响　Western blotting 检测结果（图 13）显示，与对照组比较，模型组 PI3K/Akt/VEGF 通路蛋白表达降低，其中 PI3K 表

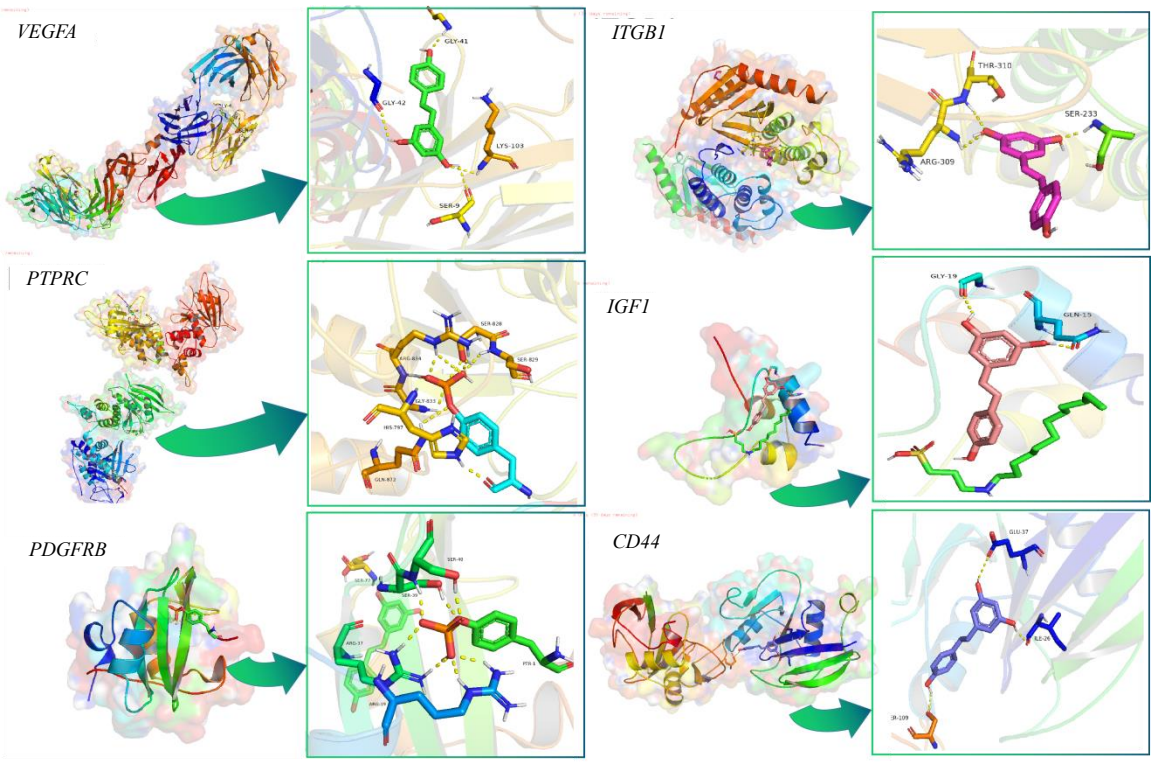


图 10　白藜芦醇与核心基因结合位点

Fig. 10　Sites of resveratrol binding to core gene

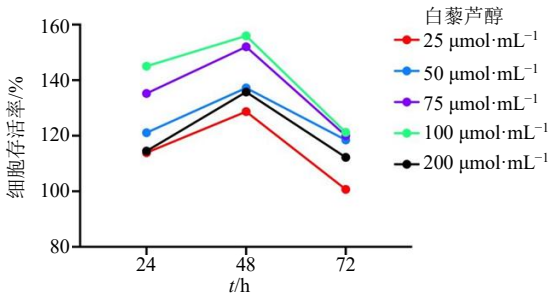


图 11　白藜芦醇对 MPS 干预后 BMECs 活力的影响 (n=3)

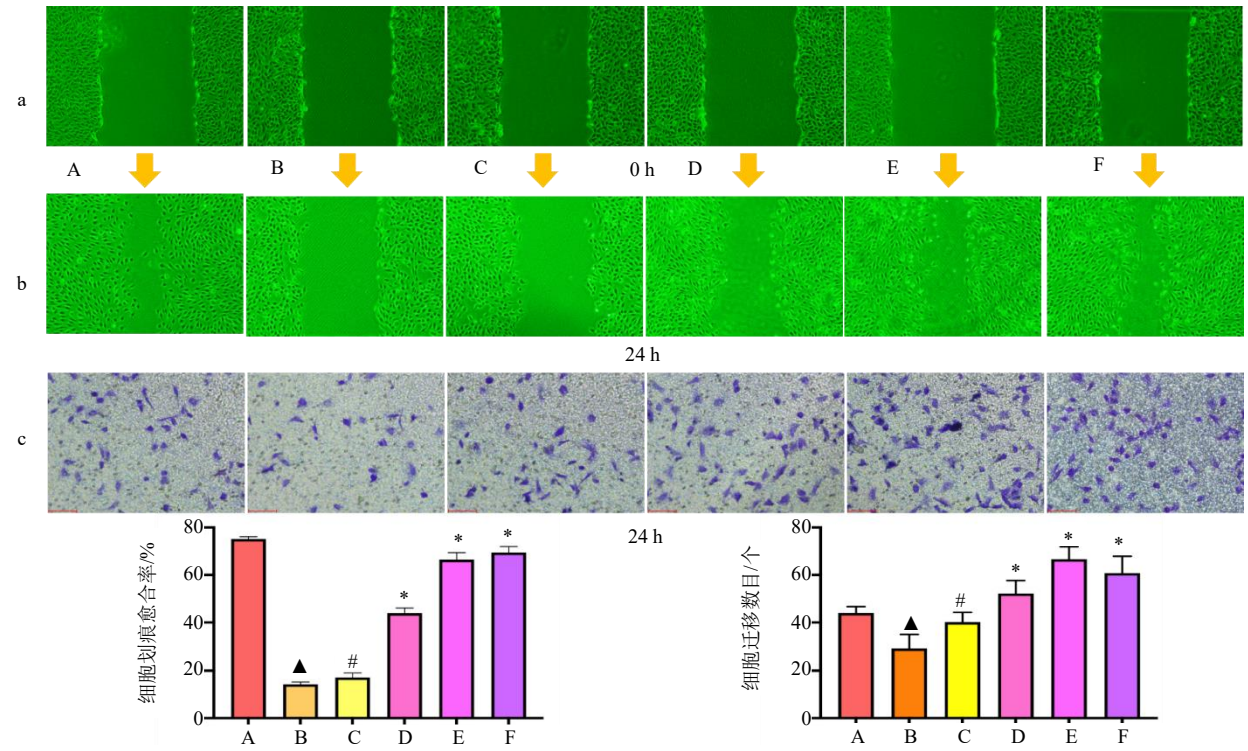
Fig. 11　Effect of resveratrol on BMECs activity after MPS intervention (n = 3)

达水平降低显著（P<0.05）；与模型组比较，白藜芦醇低、中、高剂量组中 Akt、VEGF 蛋白相对表达量均明显升高（P<0.05），白藜芦醇中、高剂量组 PI3K 蛋白相对表达量明显升高（P<0.05），而 3-MA 抑制剂组较白藜芦醇中剂量组通路蛋白表达明显降低（P<0.05）。

3　讨论

SONFH 是难治性骨科疾病，主要由血液供应中断和凝血系统功能障碍引起，导致骨细胞死亡、股骨头塌陷。GC 的使用抑制了血管生成、骨修复和一氧化氮的代谢，通过调节血管活性介质如内皮素-1、去甲肾上腺素和缓激肽来诱导骨内股骨头动脉血管的收缩导致股骨头缺血，以及增加骨内压引起缺血，促进内皮细胞的凋亡，减少流向股骨头的血量[17-20]。骨内皮细胞不仅可以形成微血管系统，为发育中的骨骼提供营养，还可以在体外和体内增强间充质干细胞的成骨分化，促进骨修复。因此，寻找 SONFH 中与血管生成相关的基因，在诊断和修复 SONFH 方面具有重要作用。

本研究分析了公共数据库中可用的微阵列数据集 GSE123568、GSE74089、GSE25269 和 Genecards 数据库，获得 SONFH 的 DEGs 共 963 个，血管生成相关 DEGs 共 2373 个，获得 SONFH 中与血管生成相关的关键基因 118 个，其中 74 个在 SONFH 中表达上调，44 个在 SONFH 中表达下调。这些基因主要富集于正调控血管生成、细胞黏附、炎症、细胞增殖和迁移、伤口愈合等，大部分作用于细胞质和核质。有研究证实细胞因子 IL-10 和 TNF-α 与 SONFH 的发生有关[21]。据报道，促红细胞生成素通过刺激 VEGF 的表达来促进血管生成，以保护股骨头免受 GC 诱导的骨坏死的侵害[22-23]。细胞黏附相



A-对照组　B-模型组　C-3-MA 抑制剂组　D-白藜芦醇低剂量组　E-白藜芦醇中剂量组　F-白藜芦醇高剂量组　与对照组比较：▲P<0.05；与模型组比较：*P<0.05；与白藜芦醇中剂量组比较：#P<0.05，下图同　a-0 h 细胞划痕（×40）　b-24 h 细胞划痕（×40）　c-24 h Transwell 细胞迁移（×40）

A-control group　B-model group　C-3-MA inhibitor group　D- resveratrol low dose group　E-resveratrol medium dose group　F-resveratrol high dose group　▲P < 0.05 *vs* control group　*P < 0.05 *vs* model group　#P < 0.05 *vs* resveratrol medium dose group, same as below figures　a-0 h cell scratch (× 40)　b-24 h cell scratch (× 40)　c-24 h Transwell cell migration (× 40)

图 12　白藜芦醇对细胞迁移的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 12　Effects of resveratrol on cell migration ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

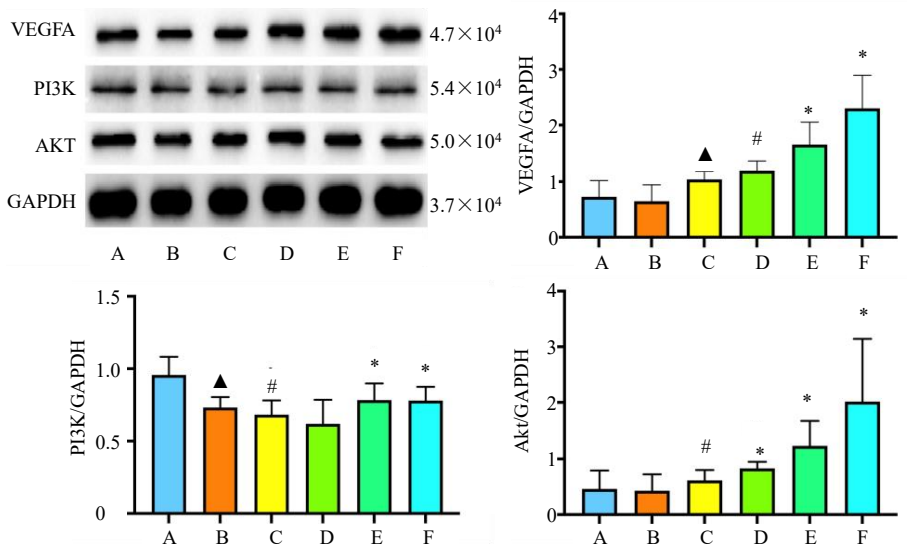


图 13　白藜芦醇对 MPS 诱导降低的 BMEC 中 PI3K/Akt/VEGF 信号通路蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 13　Effects of resveratrol on PI3K/Akt/VEGF signaling pathway protein expression in MPS induced BMECs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

关蛋白 Rap1 在 SONFH 中下调，对股骨头内微血管内皮细胞黏附及迁移造成障碍，未能对受损血管内皮及时修复，加速骨坏死进程[24]。此外，KEGG 富集分析主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、黏着斑信号通

路、细胞外基质受体互作通路和 Rap1 信号通路等。参与这些途径的大多数基因都被上调了。PI3K-Akt 是一个重要而复杂的信号通路，其在干细胞调节的细胞存活、增殖、迁移和血管生成中起着核心作用。激活 PI3K-Akt 信号通路可显著增强各种组织中内皮细胞的功能[25]。黏着斑激酶（focal adhesion kinase，FAK）是一种非受体蛋白酪氨酸激酶和支架蛋白，可介导许多细胞功能，包括黏附、迁移和侵袭。FAK 抑制剂可减少滑膜成纤维细胞的侵袭和迁移，因此，抑制 FAK 可能有助于改善在 SONFH 发展中的骨髓水肿和滑膜炎[26]。黏着斑与细胞生长、形状和运动有关。研究表明，黏着斑是股骨头坏死后未成熟关节软骨中显著丰富的生物学途径[27]。本团队前期研究发现非创伤性股骨头坏死可能与信号通路 Rap1/PI3K/Akt 受到抑制导致其表达下降所引起的血管内皮损伤有关[24]。细胞外基质受体互作通路与血管生成、软骨生成和软骨退化有关[28]，且在股骨头坏死的髓软骨中显着富集[29]。本研究结果提示 PI3K-Akt 信号通路、黏着斑和 Rap1 信号通路等参与了 SONFH 的发病机制。

10 个核心基因是 *VEGFA*、*ALB*、*INS*、*IGF1*、*CD44*、*ITGB1*、*THY1*、*PDGFRB*、*PTPRC* 和 *COL1A1*。这些核心基因都可能在 SONFH 发生和发展中起到重要作用。*VEGFA* 基因位于染色体 6p31.3[30]，是编码血管内皮生长因子的成员，与 VEGF 受体在胞外结合，刺激细胞内酪氨酸激酶，促进内皮细胞增殖，增加血管通透性。已有研究将 VEGFA 启动子区域内的多个遗传多态性与非创伤性 SONFH 的疾病状态联系起来。VEGFA 是血管生成的关键介质[31]，诱导内皮细胞增殖，促进细胞迁移，抑制细胞凋亡并诱导血管通透。使用 VEGF 受体拮抗剂可以在动物模型中阻断血管生成并诱导 SONFH[32]。IGF1 调控细胞生长、分化，如刺激成骨细胞和内皮细胞的增殖，促进组织再生与修复。IGF1 可逆转地塞米松对 PI3K-Akt 信号通路的抑制，并抑制其下游叉头框蛋白 O1（forkhead box protein O1，FOXO1）的表达，进而治疗 SONFH[33]。CD44 抗原是透明质酸（hyaluronic acid，HA）的受体。通过其与 HA 和其他配体（如骨桥蛋白、胶原蛋白和基质金属蛋白酶）的亲和力来介导细胞与细胞、细胞与基质的相互作用，其与 HA 的结合在细胞迁移中起作用。PDGFRB 通过促进周细胞和平滑肌细胞向内皮细胞的增殖、迁移和募集，在血管发育中起至关重要的作用[34]。PTPRC 是抗原受体激活 T 细胞所需的蛋白质酪氨酸-蛋白质磷酸酶。有研究发现微重力环境中的小鼠股骨头出现了骨吸收，检测髓腔分离的细胞显示早期间充质干细胞造血分化的基因 PTPRC 的表达显著下调[35-36]。COL1A1 在 SONFH 模型兔中的表达被抑制，使用葛根素后 COL1A1 的表达升高，且 SONFH 模型兔的成骨能力增加[37]。目前 *ALB*、*INS*、*CD44* 和 *THY1* 等核心基因在骨坏死中的作用机制尚不清楚，有待于进一步研究。

通过 GSE123568 数据集鉴定，发现核心基因尤其是 *PTPRC*、*CD44*、*IGF1* 和 *VEGFA* 的表达差异最为显著。ROC 分析显示 *PTPRC*、*CD44*、*IGF1*、*PDGFRB*、*ITGB1* 和 *VEGFA* 的 AUC 值均大于 0.7，具有较大可能性成为 SONFH 潜在生物标志物，Ma 等[38]在 1 项汉族人群 *VEGFA* 与 SONFH 的遗传关系的研究中，*VEGFA* 单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms，SNP）基因型 rs2010963 与 SONFH 显著相关。通过 CTD 数据库验证核心基因与 SONFH 之间的相互作用关系，发现 *COL1A1*、*IGF1*、*VEGFA* 和 *PTPRC* 与 SONFH 作用指数较高，提示可能为干预修复 SONFH 的重要靶点。目前已有通过 VEGFA 防治 SONFH 的研究，有研究发现促红细胞生成素通过刺激 VEGFA 的表达，可保护股骨头免受 GC 诱导的骨坏死的侵害[39]。CTD 数据库筛选靶向核心基因的中药活性成分，发现白藜芦醇、姜黄素、雌二醇和槲皮素等与核心基因相互作用指数相对较高，为防治 SONFH 提供了新的方向。

分子对接显示白藜芦醇与 SONFH 中与血管新生有关的核心基因结合稳定，并通过体外细胞实验证实白藜芦醇能显著上调本研究筛选的核心基因 *VEGFA* 及 PI3K/Akt 信号通路的表达水平，表明白藜芦醇对激素干预的 BMECs 的损伤具有修复作用，主要通过激活 PI3K/AKT/VEGF 信号通路提高 BMECs 的活性并促进细胞的迁移。也有研究发现，白藜芦醇可以改善 SOFNH 兔模型中的骨骼血液供应，以保护血管内皮细胞并减少血栓形成[40-41]。研究表明，姜黄素可通过抑制 Janus 激酶 1/2（Janus kinase 1/2，JAK1/2）-信号转导和转录激活因子 1（signal transducer and activator of transcription 1，STAT1）途径抑制 SONFH 模型小鼠细胞 M1 极化来防止炎症介导的骨细胞凋亡[42]，与本研究筛选结果一致，说明姜黄素有很大潜能成为临床治疗

SONFH 药物的新选择。

4 结论

通过生物信息学分析鉴定了 SONFH 血管新生相关的核心基因和通路，尤其是 *PTPRC*、*IGF1*、*VEGFA*、*ITGB1*、*PDGFRB* 和 *CD44* 核心基因和 PI3K 信号通路、黏附斑信号通路、细胞外基质受体互作通路和 Rap1 信号通路等，它们可能与 SONFH 发病密切相关；筛选出白藜芦醇最有可能成为预防或逆转骨坏死的潜在药物，并进行了实验验证。本研究有助于理解血管新生在 SONFH 发病机制中的作用，为寻找具有 SONFH 诊断或治疗价值的生物标志物的相关大样本研究提供参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Johnson A J, Mont M A, Tsao A K, *et al*. Treatment of femoral head osteonecrosis in the United States: 16-Year analysis of the nationwide inpatient sample [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2014, 472(2): 617-623.

[2] Kerachian M A, Harvey E J, Cournoyer D, *et al*. Avascular necrosis of the femoral head: Vascular hypotheses [J]. *Endothelium*, 2006, 13(4): 237-244.

[3] Huang C, Wen Z Q, Niu J J, *et al*. Steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: Novel insight into the roles of bone endothelial cells in pathogenesis and treatment [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 777697.

[4] Kong L C, Zuo R T, Wang M W, *et al*. Silencing microRNA-137-3p, which targets RUNX2 and CXCL12 prevents steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by facilitating osteogenesis and angiogenesis [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(4): 655-670.

[5] Kerachian M A, Séguin C, Harvey E J. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: A new understanding of the mechanisms of action [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 114(3/4/5): 121-128.

[6] Wang A, Ren M, Wang J C. The pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: A systematic review of the literature [J]. *Gene*, 2018, 671: 103-109.

[7] Hao Y Q, Lu C, Zhang B G, *et al*. Identifying the potential differentially expressed miRNAs and mRNAs in osteonecrosis of the femoral head based on integrated analysis [J]. *Clin Interv Aging*, 2021, 16: 187-202.

[8] Pouya F, Kerachian M A. Avascular necrosis of the femoral head: Are any genes involved? [J]. *Arch Bone Jt Surg*, 2015, 3(3): 149-155.

[9] Yu H Y, VandeVord P J, Mao L, *et al*. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(4): 508-517.

[10] Yu H C, Liu P, Zuo W, *et al*. Decreased angiogenic and increased apoptotic activities of bone microvascular endothelial cells in patients with glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020, 21(1): 277.

[11] Feng Y, Yang S H, Xiao B J, *et al*. Decreased in the number and function of circulation endothelial progenitor cells in patients with avascular necrosis of the femoral head [J]. *Bone*, 2010, 46(1): 32-40.

[12] Zhao D W, Yu X, Wang T, *et al*. Digital subtraction angiography in selection of the vascularized greater trochanter bone grafting for treatment of osteonecrosis of femoral head [J]. *Microsurgery*, 2013, 33(8): 656-659.

[13] Yue J A, Yu H C, Liu P, *et al*. Preliminary study of icariin indicating prevention of steroid-induced osteonecrosis of femoral head by regulating abnormal expression of miRNA-335 and protecting the functions of bone microvascular endothelial cells in rats [J]. *Gene*, 2021, 766: 145128.

[14] Jiang Y N, Zhang Y Q, Zhang H J, *et al*. Pravastatin prevents steroid-induced osteonecrosis in rats by suppressing PPARγ expression and activating Wnt signaling pathway [J]. *Exp Biol Med* (*Maywood*), 2014, 239(3): 347-355.

[15] Cao F, Qin K R, Kang K, *et al*. *Ginkgo biloba* L. extract prevents steroid-induced necrosis of the femoral head by rescuing apoptosis and dysfunction in vascular endothelial cells via the PI3K/AKT/*ENOS* pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 296: 115476.

[16] Gao J L, Zhang Q Y, Song L. Resveratrol enhances matrix biosynthesis of nucleus pulposus cells through activating autophagy via the PI3K/Akt pathway under oxidative damage [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4): BSR20180544.

[17] Li Y, Chen J C, Zhang Z N, *et al*. The experimental study on treatment of glucocorticoid-induced ischemic necrosis of femoral head by Gu Fu Sheng Capsule [J]. *J Tradit Chin Med*, 2004, 24(4): 303-307.

[18] Okon I A, Beshel J A, Nna V U, *et al*. *Gongronema* latifolium leaf extract protects against dexamethasone-induced myocardial cell injury via cardiac oxido-inflammatory molecules modulation [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(12): e14378.

[19] Lu Y F, Yu Q S, Guo W S, *et al*. Effect of glucocorticoids on the function of microvascular endothelial cells in the human femoral head bone [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2020, 29(3): 345-353.

[20] Yu H C, Yue J A, Wang W G, *et al*. Icariin 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.

[21] Yuan L, Li W, Tian Z B, *et al*. Predictive role of cytokines IL-10, IL-12 and *TNF*-α gene polymorphisms for the development of osteonecrosis of the femoral head in the Chinese Han population [J]. *Cell Mol Biol*, 2017, 63(9):

144-149.

[22] Yu Q S, Guo W S, Cheng L M, *et al*. Glucocorticoids significantly influence the transcriptome of bone microvascular endothelial cells of human femoral head [J]. *Chin Med J*, 2015, 128(14): 1956-1963.

[23] Chen S, Li J P, Peng H, *et al*. Administration of erythropoietin exerts protective effects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(4): 840-848.

[24] 胡星荣, 周明旺, 柳海平, 等. Rap1 蛋白在非创伤性股骨头坏死骨组织血管内皮中的表达 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2021, 52(3): 452-457.

[25] Liu X L, Li Q, Niu X, *et al*. Exosomes secreted from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(2): 232-244.

[26] Shelef M A, Bennin D A, Yasmin N, *et al*. Focal adhesion kinase is required for synovial fibroblast invasion, but not murine inflammatory arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(5): 464.

[27] Adapala N S, Kim H K W. Comprehensive genome-wide transcriptomic analysis of immature articular cartilage following ischemic osteonecrosis of the femoral head in piglets [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153174.

[28] Hou C H, Zhang Z J, Zhang Z Q, *et al*. Presence and function of microRNA-92a in chondrogenic ATDC5 and adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 4877-4886.

[29] Lin Z, Lin Y S. Identification of potential crucial genes associated with steroid-induced necrosis of femoral head based on gene expression profile [J]. *Gene*, 2017, 627: 322-326.

[30] Fu F Y, Huang Z Q, Ye H L, *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 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 7130105.

[31] Bosma E K, Darwesh S, Zheng J Y, *et al*. Quantitative assessment of the apical and basolateral membrane expression of VEGFR2 and NRP2 in VEGF-A-stimulated cultured human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Histochem Cytochem*, 2022, 70(8): 557-569.

[32] Gao Y S, Wang H F, Ding H, *et al*. A novel rat model of osteonecrosis of the femoral head induced by periarticular injection of vascular endothelial growth factor receptor 2 antibody [J]. *J Surg Res*, 2013, 183(1): e1-e5.

[33] Sun F, Zhou J L, Wei S X, *et al*. Glucocorticoids induce osteonecrosis of the femoral head in rats via PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway [J]. *Peer J*, 2022, 10: e13319.

[34] Ulvmar M H, Martinez-Corral I, Stanczuk L, *et al*. Pdgfrb-Cre targets lymphatic endothelial cells of both venous and non-venous origins [J]. *Genesis*, 2016, 54(6): 350-358.

[35] Blaber E A, Dvorochkin N, Torres M L, *et al*. Mechanical unloading of bone in microgravity reduces mesenchymal and hematopoietic stem cell-mediated tissue regeneration [J]. *Stem Cell Res*, 2014, 13(2): 181-201.

[36] Feng T, Gao Z B, Kou S, *et al*. No evidence for erythro-myeloid progenitor-derived vascular endothelial cells in multiple organs [J]. *Circ Res*, 2020, 127(10): 1221-1232.

[37] Jiang X, Chen W J, Su H, *et al*. Puerarin facilitates osteogenesis in steroid-induced necrosis of rabbit femoral head and osteogenesis of steroid-induced osteocytes via miR-34a upregulation [J]. *Cytokine*, 2021, 143: 155512.

[38] Ma W L, Xin K, Chen K, *et al*. Relationship of common variants in *VEGFA* gene with osteonecrosis of the femoral head: A Han Chinese population based association study [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16221.

[39] Chen S, Li J P, Peng H, *et al*. Administration of erythropoietin exerts protective effects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(4): 840-848.

[40] Zhai J L, Weng X S, Wu Z H, *et al*. Effect of resveratrol on preventing steroid-induced osteonecrosis in a rabbit model [J]. *Chin Med J*, 2016, 129(7): 824-830.

[41] Nan K, Pei J P, Fan L H, *et al*. Resveratrol prevents steroid-induced osteonecrosis of the femoral head via miR-146a modulation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2021, 1503(1): 23-37.

[42] Jin S, Meng C, He Y, *et al*. Curcumin prevents osteocyte apoptosis by inhibiting M1-type macrophage polarization in mice model of glucocorticoid-associated osteonecrosis of the femoral head [J]. *J Orthop Res*, 2020, 38(9): 2020-2030.

[责任编辑 潘明佳]