

· 基础研究 ·

补肾活血方调控兔激素性股骨头坏死 APN-AMPK 信号通路的实验研究

张翔¹ 吴泱² 董晓俊³ 张鸿振¹ 覃剑³ 李冬³ 朱一洲¹ 戴子一¹

摘要 目的 通过干预脂联素(APN)-单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)信号转导通路,观察股骨头局部血管重建,探讨采用补肾活血方治疗激素性股骨头坏死(SANFH)的作用机制。**方法** 27只健康成年白兔,随机分为正常组、造模组和实验组,每组9只,应用大肠杆菌脂多糖联合醋酸泼尼松龙诱导SANFH模型。实验组每天采用补肾活血方(5 mL/kg)灌胃,其他两组每天采用生理盐水(5 mL/kg)灌胃,疗程均为8周。实验过程中记录动物一般情况,造模前后、用药8周末分别对所有兔耳缘静脉取血2 mL,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测APN水平;检测实验组用药前后肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、骨保护素(OPG)水平和股骨头B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)表达情况,并在用药8周末进行X线检测。**结果** 造模组造模后APN浓度水平较造模前及正常组均下降($P < 0.05$);实验组用药8周末APN水平较造模组升高($P < 0.05$);TNF- α 免疫组化水平明显下降,OPG免疫组化水平升高,同时股骨头中Bcl-2表达较用药前明显升高,Caspase-3表达水平下降($P < 0.05$)。**结论** 补肾活血方通过调节APN-AMPK信号转导通路中APN、TNF- α /OPG、Bcl-2/Caspase-3表达,对兔SANFH发挥有效干预。

关键词 激素性股骨头坏死; APN-AMPK信号通路; 动物模型; 补肾活血法

Bushen Huoxue Recipe Regulated APN-AMPK Signal Pathway of Steroid-induced Avascular Necrosis of Femoral Head Rabbits ZHANG Xiang¹, WU Yang², DONG Xiao-jun³, ZHANG Hong-zhen¹, QIN Jian³, LI Dong³, ZHU Yi-zhou¹, and DAI Zi-yi¹ 1 Department of TCM Traumatology, Wenzhou Hospital of Integrative Medicine, Zhejiang University of Chinese Medicine, Zhejiang (325000); 2 Department of TCM Internal Medicine, Wenzhou Hospital of Integrative Medicine, Zhejiang University of Chinese Medicine, Zhejiang (325000); 3 Department of TCM Traumatology, Wuhan Hospital of TCM, Wuhan (430014)

ABSTRACT Objective To study the mechanism of tonifying Shen and activating blood circulation method for treating steroid-induced avascular necrosis of femoral head (SANFH) by interfering with adiponectin (APN)-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signal pathway and observing the local vascular reconstruction of femoral head. **Methods** Totally 27 healthy adult white rabbits were randomly divided into a normal group, a model group, and an experimental group, 9 rabbits in each group. SANFH model was induced by lipopolysaccharide (LPS) combined prednisolone acetate. Rabbits in the experimental group were administered with BSHXR (5 mL/kg), while rabbits in the other two groups were administered with normal saline (5 mL/kg). The treatment course for all was 8 weeks. During the experiment, the general conditions of the rabbits were recorded. Before and after modeling/at the end of the 8th week of the experiment, 2 mL blood was collected from the ear vein of all rabbits. APN was detected by ELISA. Expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), tumor necrosis factor (TNF- α), Caspase 3, and osteoprotegerin (OPG) were detected in the experimental group by immunohistochemical assay before and after treatment. X-ray examination was performed at the end of the 8th week of treatment. Re-

基金项目:湖北省中医药中西医结合科研项目(No. 2013Z-Y12)

作者单位:1. 浙江中医药大学附属温州市中西医结合医院中医骨伤科(浙江 325000); 2. 浙江中医药大学附属温州市中西医结合医院中医内科(浙江 325000); 3. 湖北省武汉市中医医院骨伤科(武汉 430014)

通讯作者:董晓俊, Tel: 027-82851690, E-mail: whdxj9988@yahoo.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20190919. 292

sults The APN concentration after modeling decreased in the model group, as compared with before modeling and the normal group ($P < 0.05$). The APN concentration after 8 weeks of administration increased more in the experimental group than in the model group ($P < 0.05$). The TNF- α expression significantly decreased and the OPG expression significantly increased. Meanwhile, the expression of Bcl-2 significantly increased and the expression of Caspase-3 obviously decreased ($P < 0.05$). Conclusion BX-HXR effectively intervened SANFH in rabbits by regulating the expressions of APN, TNF- α /OPG, Bcl-2/Caspase-3 in APN-AMPK signal pathway.

KEYWORDS steroid-induced avascular necrosis of femoral head; APN-AMPK signal pathway; animal model; tonifying Shen and activating blood circulation method

股骨头缺血性坏死 (avascular necrosis of femoral head, ANFH) 是骨科临床难点病重之一, 可导致髋关节疼痛、关节僵硬, 下肢肌肉萎缩等症状, 严重影响患者的生活质量, 80% 患者将会在 4 年内出现骨性关节炎甚至股骨头塌陷而致残^[1]。近年来, 由于激素类药物的广泛使用, ANFH 的发病率逐年递增, 其中以激素为诱发因素约占 50%^[2,3]。脂联素 (adiponectin, APN) 是一种新近发现由脂肪组织分泌、具有胰岛素增敏效应的激素, 可通过自身信号通路调节机体功能, 影响成骨细胞和破骨细胞分化^[4]。有研究显示 APN-单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 信号通路参与了内皮细胞功能失调和毛细血管稀疏化改变的病理生理, 而 ANFH 发病机制主要是局部脂质代谢异常引起的血管内皮功能和结构紊乱^[5,6]。因此本实验旨在应用中医药补肾活血方观察通过调节 APN-AMPK 信号转导通路, 介导脂质代谢, 调节股骨头局部血管重建, 治疗兔 ANFH 的可能作用机制, 为临床治疗提供实验依据。

材料与方

1 动物及分组 成年新西兰大耳白兔 27 只, 体重 (2.5 ± 0.2) kg, 雌雄各半, 由武汉市中医医院药学实验研究基地提供 [动物许可证号: SyXK (鄂) 2010-0056], 采用随机数字法分为正常组、造模组和实验组。实验过程中对动物处置符合 2006 年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[7]。

2 药物 本研究采用的补肾活血方是名老中医董晓俊教授根据多年临床治疗股骨头坏死经验, 研究出的治疗股骨头坏死的有效中草药组合, 由武汉市中医医院药剂科生产制备, 具体方药及制备过程: 熟地黄 10 g 山药 15 g 山茱萸 10 g 牡丹皮 10 g 茯苓 15 g 泽泻 10 g 鸡血藤 30 g 姜黄 10 g 骨碎补 10 g 续断 10 g 生地黄 15 g, 煎取 2 次后将药液合

并浓缩含生药 0.1 g/mL。醋酸泼尼松龙注射液 (125 mg/支, 浙江仙琚制药股份有限公司, 批号: H33020824); 大肠杆菌脂多糖 (*E.coli* lipopolysaccharide, LPS, 美国 Sigma 公司, 批号: 111 m4035V); 注射用青霉素钠 (80 万 U/支, 哈药集团制药总厂, 批号: A080700411)。

3 主要试剂及仪器 兔 APN 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海亚培生物科技有限公司); B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 免疫组化试剂盒、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 兔肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 3% H₂O₂ - 甲醇溶液、40% 甲醛溶液、胃蛋白酶、10% 水合氯醛溶液/中性树脂封固剂等辅助试剂均由武汉市中医院药学实验研究基地提供。显微镜 (BX-0001 型, 日本奥林巴斯公司), 石蜡切片机 (U-641 型, 美国贝克曼公司), 病理组织包埋机 (HM-BM 型, 深圳汇沃科技公司), 恒温培育箱 (DDIL-5 型, 上海安亭科学仪器厂), 台式低速自动平衡离心机 (TDZ4-WS 型, 湘仪集团), -80℃ 超低温保存箱由武汉市中医院药学实验研究基地提供。

4 造模及干预方法

4.1 模型制备 造模组和实验组各 9 只, 采用 LPS 联合糖皮质激素法进行造模^[8,9]。首先耳缘静脉注射 LPS (10 μ g/kg), 24 h 后再次给药 1 次; 随后立即臀肌注射醋酸氢化泼尼松龙 8 mg/kg; 正常组 9 只, 臀肌注射生理盐水 8 mg/kg。3 组均注射 3 周, 停药 3 周, 继续用药 3 周。3 组动物均单笼标准化饲养。术后 8 周在实验组和造模组随机抽取 2 只白兔拍股骨头正位片, 观察股骨头囊性变区域和防止股骨头塌陷, 之后处死取出双侧股骨头进行病理组织学检测, 观察到出现不同程度的骨小梁及骨髓组织坏死视为造模成

功^[8,9]。给予所有实验兔庆大霉素 8 万 U 肌肉注射,每周 2 次。

4.2 干预方法 参照参考文献[10,11],按体表面积换算:兔每日药量(体重 2.5 kg) = 成人(体重 65 kg)每日药量 $\times 0.07 \times 2.5 \times 2/3$,实验组每天采用补肾活血方 5 mL/kg 灌胃,正常组和造模组每天采用生理盐水 5 mL/kg 灌胃,疗程为 8 周,各组继续原来喂养方式。

5 观察项目及检测方法

5.1 一般情况 实验开始后,密切关注动物精神、毛发、饮食、二便、体重及活动状况,并详细记录。在造模后、补肾活血方用药 8 周过程中针对实验动物一般情况详细记录。

所有兔在实验 8 周末处死,处死后迅速解剖出兔左侧股骨,利用锯条将兔股骨干分成数块,每块长约 1.5 mm,剔除骨外膜,用 PBS 将髓腔冲洗干净,再用锡纸包裹骨组织。先将骨组织置于 -75°C 冰箱中 12 h,再投入液氮中保存。将右侧股骨头沿冠状面切开,固定,脱钙,石蜡包埋,保存待用。

5.2 APN 水平检测 造模前后、用药 8 周末分别对所有兔耳缘静脉取血 2 mL, -20°C 保存以备 APN-ELISA 检测。血清:1 000 $\times g$ 离心 10 min 将血清和红细胞迅速小心地分离。血浆:1 000 $\times g$ 离心 30 min 去除颗粒。细胞上清液:1 000 $\times g$ 离心 10 min 去除颗粒和聚合物。使用前,将所有试剂充分混匀。不要使液体产生大量的泡沫,以免加样时加入大量的气泡,产生加样上的误差,然后严格按照兔 APN ELISA 试剂盒说明书进行操作。

5.3 兔股骨头局部 TNF- α 、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)免疫组化检测 取出石蜡包埋标本,连续切片,厚度 4 μm ,严格按照兔 TNF- α 免疫组化试剂盒说明书进行检测。

5.4 兔股骨头 Bcl-2、Caspase-3 表达水平检测 取出石蜡包埋标本,脱蜡,用体积分数 3% 的 H_2O_2 - 甲醇室温下作用 15 min 后,蒸馏水冲洗,于 10g/L 胃蛋白酶 37°C 孵育 10 min,滴加 50 μL 小牛血清,室温封闭 25 min 后晾干,然后严格按照免疫组化试剂盒说明书进行检测。

5.5 X 线观察 用药 8 周末,分别从正常组和实验组中随机抽取 2 只,经耳缘静脉麻醉后,取双髌蛙式位进行 X 线检测。

6 统计学方法 应用 SPSS 19.00 软件进行统计处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间符合正态分布采用单因素方差分析,不符合正态分布的采用非参数检验。

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 造模第 2 天造模兔即出现神志萎靡症状,第 4 周出现食欲不振,体重明显减轻,步态异常,活动明显减少;至第 8 周末大部分兔子出现站立困难、跛行。正常组动物未出现明显异常,3 组兔均无死亡。实验组兔灌胃用药过程中未出现不良反应,用药 4 周后兔精神状态较造模组兔明显好转,食量较造模组更佳,两组兔主动活动均明显少于正常组;用药 8 周末,实验组兔精神状态保持良好,主动活动仍较少,考虑是骨坏死引起患肢活动时疼痛加剧,但较造模组兔活动有所改善。

2 3 组造模前后 APN 水平比较(表 1) 造模组和实验组造模后及用药 8 周末 APN 水平较造模前均下降($P < 0.05$),造模组较正常组下降明显($P < 0.05$)。实验组用药 8 周末较造模组 APN 水平升高($P < 0.05$)。

表 1 3 组造模前后 APN 水平比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	APN		
		造模前	造模后	用药 8 周
正常	9	6.317 \pm 0.341	6.410 \pm 0.363	6.215 \pm 0.280
造模	9	6.739 \pm 0.042	2.493 \pm 0.476 [*] Δ	1.005 \pm 0.650 [*] Δ
实验	9	6.382 \pm 0.179	2.230 \pm 0.391 [*]	3.011 \pm 0.225 [*] Δ

注:与本组造模前比较,^{*} $P < 0.05$;与正常组同期比较, ^{Δ} $P < 0.05$;与造模组同期比较, ^{Δ} $P < 0.05$

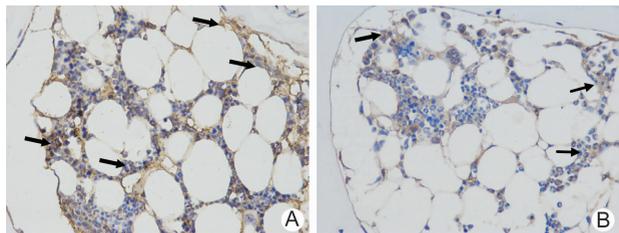
3 实验组用药前后 TNF- α 及 OPG 免疫组化水平比较(表 2,图 1、2) 用药 8 周末,实验组 TNF- α 免疫组化水平明显下降,OPG 免疫组化水平明显升高,与用药前比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 实验组用药前后 TNF- α 、OPG 免疫组化水平比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

时间	TNF- α	OPG
用药前	57 843.362 \pm 21 832.490	94 892.739 \pm 3 124.382
用药后	38 760.107 \pm 15 221.824 [*]	129 302.022 \pm 4 852.114 [*]

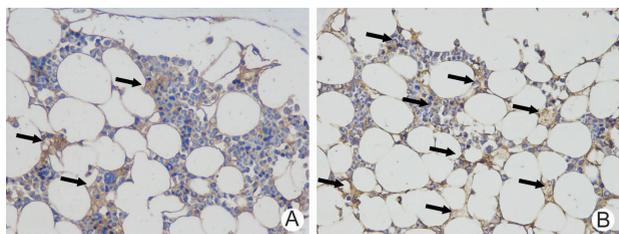
注:与用药前比较,^{*} $P < 0.05$; $n = 9$

4 实验组股骨头 Bcl-2、Caspase-3 表达水平比较(表 3,图 3、4) 实验组造模后股骨头周围 Bcl-2 表达较少,呈散在分布,用药 8 周末,Bcl-2 阳性表达较用药前增多($P < 0.05$)。实验组造模后股骨头周围 Caspase-3 表达较多,呈广泛分布,用药 8 周末,Caspase-3 阳性表达较用药前下降,与用药前比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



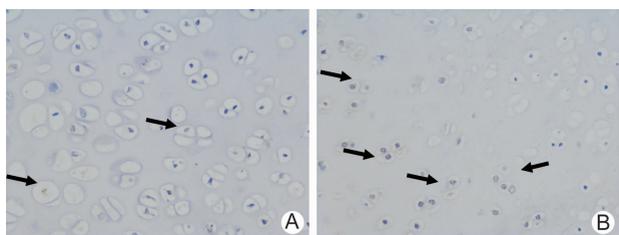
注:A 为实验组造模后,可见 TNF- α 表达较多,在骨细胞以及造血细胞胞浆中广泛比表达,呈强阳性;B 为实验组用药 8 周末,可见 TNF- α 表达减少,骨细胞、软骨细胞胞浆中散在表达,呈弱阳性;箭头所指为典型病理变化

图 1 实验组用药前后 TNF- α 免疫组化水平比较 (×400)



注:A 为实验组造模后,可见 OPG 散在表达,仅存在部分成骨细胞及骨细胞胞浆中,呈弱阳性;B 为实验组用药 8 周末,可见 OPG 表达明显较治疗前增多,在成骨骨细胞、软骨细胞和骨细胞胞浆中广泛表达,呈强阳性;箭头所指为典型病理变化

图 2 实验组用药前后 OPG 免疫组化水平比较 (×400)



注:A 为实验组造模后,可见 Bcl-2 表达,显色率较低;B 为实验组用药 8 周末,可见 Bcl-2 表达较用药前增多,在软骨细胞核周围和胞浆中广泛表达;箭头所指为典型病理变化

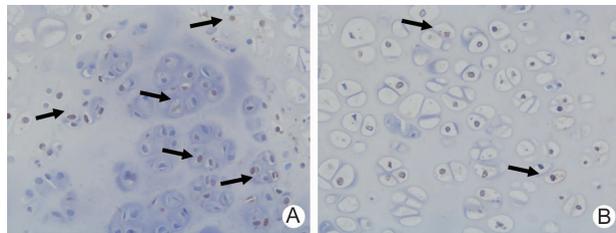
图 3 实验组用药前后股骨头 Bcl-2 表达水平比较 (×400)

表 3 实验组用药前后 Bcl-2、Caspase-3 阳性表达率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

时间	Bcl-2	Caspase-3
用药前	10.047 \pm 1.941	58.214 \pm 3.056
用药后	12.633 \pm 0.042*	40.570 \pm 2.612*

注:与用药前比较, * $P < 0.05$; $n = 9$

验组用药 8 周末,兔股骨头坏死程度未进一步加剧,骨密度和骨形态均较造模组明显改善。



注:A 为实验组造模后,可见 Caspase-3 表达较高,在软骨细胞核周围和胞浆中广泛表达;B 为实验组用药 8 周末,可见 Caspase-3 表达较用药前减少;箭头所指为典型病理变化

图 4 实验组用药前后股骨头 Caspase-3 表达水平比较 (×400)



注:A 为正常组;B 为实验组造模后;C 为实验组用药 8 周末;箭头所指为典型病理变化

图 5 正常组及实验组股骨头 X 光片观察结果比较

讨 论

激素性股骨头坏死(steroid-induced avascular necrosis of femoral head, SANFH)是 ANFH 比较常见的一种类型,诱因源自于大量使用糖皮质激素,导致股骨头脂质代谢异常、血管功能和结构的破坏,引起的股骨头血液供应破坏或骨细胞变性导致骨的有活力成分(骨细胞、骨髓造血细胞及脂肪细胞)死亡^[12,13]。其病因、发病机制较复杂,一般认为都经过股骨头缺血坏死、血管再生修复、骨髓细胞再生、骨小梁重建的过程,但在其病变过程中极易出现坏死区域骨内压增高、股骨头塌陷、变形,引起疼痛,功能障碍从而影响生活质量,甚至致残。根据目前的研究显示,笔者认为其发病的根本原因与脂质代谢相关,脂质代谢异常引起的脂肪沉积^[14,15],血液黏稠度增加引起血管内凝血、脂肪栓塞^[16,17],引起血管内皮损伤,导致骨内高压^[18]等等。所以,脂质代谢异常和血供的中断是该病发生的关键^[19]。

APN 最先由 Scherer PE 等^[20]证实存在于分离的鼠脂肪组织中,也称为脂肪细胞补体相关蛋白。研究

5 正常组及实验组 X 线观察结果比较(图 5)

用药 8 周末,正常组 X 显示未见明显异常;实验组造模后 X 光片显示股骨头轻度密度不均、骨小梁模糊;实

显示 APN 存在于人体基因中,是具有生物学表达的细胞因子,Oshima K 等^[21]研究显示 APN 能够抑制破骨细胞表达,同时促进成骨细胞形成。Luo XH 等^[22]发现 APN 影响机体免疫表达,通过升高 OPG 表达发挥抗炎作用。APN 是脂肪细胞分泌的特异性细胞因子,是脂肪细胞中表达最丰富的分泌蛋白^[23]。既往研究显示,APN 具有广泛的下游靶点,AMPK 是其下游经典靶点^[24,25]。人体中 APN 与卵巢颗粒细胞(granulosa cell,GC)膜脂联素受体(adiponectin receptor1, Adipo R1)结合后激活 AMPK 发挥生物效应,因此 APN 是 AMPK 的激活剂之一^[26]。在体内广泛表达 AMPK 信号通路可调节细胞能量代谢,可以调节糖脂代谢,促进能量代谢趋于平衡。改善体内 APN 浓度,能够促进 AMPK 信号通路正向传导,加强脂质代谢,从而对血管内皮起到保护作用^[27,28]。此外,APN 在体外培养的人内皮细胞表现出的抗凋亡作用也是通过 AMPK 信号转导通路介导的^[29]。研究发现 APN-AMPK 通路可能影响卵母细胞成熟及胚胎发育,同时 APN-AMPK 通路可以调控卵巢激素转化及糖脂代谢^[30]。赵勤等^[31]通过研究 APN 影响骨代谢过程,证实 APN 可作用于内分泌系统和影响胰岛素通路,调节体内糖脂代谢,这可能是由于 APN 通过影响蛋白因子表达,激活 AMPK 途径,加强了脂肪去路途径中各种转运体及酶的基因作用。邓蒂斯等^[32]研究通过将现代医学与中医学理论结合,认为 APN 分泌不足可导致痰湿聚集,采用补肾化痰法影响 APN-AMPK 信号通路能够激活下游信号传导,提高卵巢胰岛素敏感性,加快糖脂代谢。以上研究结果表明,APN-AMPK 信号通路参与了体内糖脂代谢,同时参与了内皮细胞功能失调和毛细血管稀疏化改变的病理生理过程。

ANFH 可归属于中医学中“骨痹”、“骨蚀”等范畴,激素类药物属于燥邪,久用伤阴,致经脉痹阻,气血瘀滞,所致股骨头骨质失去了抗压的能力和自行修复的能力而形成坏死^[33]。周李学等^[34]研究发现应用补肾活血法可影响兔 ANFH 模型 Wnt/-catenin 信号通路,进而影响相关蛋白和基因表达。江彬锋等^[35]通过应用中药方剂右归饮作用于大鼠 SANFH 模型,证实补肾活血法可刺激 APN 基因 Adipoq 表达,调节股骨头局部血管重建。因此治疗应以补益肝肾、活血通络为主^[36,37]。本次研究中,笔者发现补肾活血方可明显改善兔 SANFH 模型体内 APN 水平,通过干预 APN-AMPK 信号通路,改善兔 SANFH 模型病变区域 TNF- α 及 OPG 水平,降低炎症反应,抑制细胞凋亡,缓解实验兔 SANFH 进程。

补肾活血方以六味地黄丸为主要组成,熟地黄为君,滋阴补肾,填精益髓;配伍山茱萸养肝涩精,山药补脾固精,两药都可协助熟地黄以充复肾中阴精;鸡血藤活血舒筋,姜黄破血行气,通经止痛共为臣药。又配泽泻泻肾利湿,牡丹皮清泻肝火,茯苓健脾渗湿,以防补药滋腻太过;骨碎补,续断补肾强骨,兼以活血止痛;生地黄清热凉血活血为佐药。现代药理学研究表明,熟地黄可加快多能造血干细胞、骨髓红系造血祖细胞的增殖分化作用,显著抑制肝脏出血性坏死灶及单纯性坏死^[38]。山茱萸能增强机体的抗应激能力,其醇提物还有降血脂作用,可降低血清甘油三酯、胆固醇的含量,抗动脉硬化^[39]。山药含有大量的黏液蛋白、维生素及微量元素,能有效阻止血脂在血管壁的沉淀^[40]。鸡血藤有明显扩血管作用^[41],而牡丹皮在体外有显著的抗凝血作用^[42]。

利益冲突: 本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Ichiseki T, Ueda S, Ueda Y, et al. Involvement of necroptosis, a newly recognized cell death type, in steroid-induced osteonecrosis in a rabbit model [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(2): 110-114.
- [2] Signorino JA, Jayaseelan DJ, Brindle K. Atypical clinical presentation of rapidly progressing femoral head avascular necrosis [J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2017, 47(3): 217.
- [3] 王佰亮, 李铁军, 岳德波, 等. 骨髓间充质干细胞增殖能力与皮质类固醇性骨坏死 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(1): 7-13.
- [4] van Tienhoven-Wind LJ, Dullaart RP. Increased leptin/adiponectin ratio relates to low-normal thyroid function in metabolic syndrome [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 6.
- [5] 李子荣. 股骨头坏死临床诊疗规范(2015年版) [J]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2015, 9(1): 133-138.
- [6] Nam DH, Oh J, Roh JH, et al. Different expression of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor between diabetic and non-diabetic epiretinal membranes [J]. *Ophthalmologica*, 2009, 223(3): 188-191.
- [7] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. <http://www.nost.gov.cn/fggw/zfwj/>.
- [8] 佟鹏, 王祥, 梁瀛. 激素性股骨头缺血性坏死动物模型的建立及综合评估 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(32): 5169-5174.
- [9] 张翔, 董晓俊, 吴洪, 等. 早期激素性股骨头缺血性坏死动物模型的建立研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2018, 26(2): 67-71.
- [10] 陈奇主编. *中药药理研究方法学* [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 31.
- [11] 张冲, 黄芸, 张庆祝, 等. 补肾固筋方对膝骨性关节炎

- 模型兔血清及关节液 IL-1、TNF- α 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(3): 355-358.
- [12] 陈群群, 崔俊英. 3 种中医证型股骨头坏死患者的脂代谢特征对比研究[J]. 中医正骨, 2019, 31(1): 1-4.
- [13] 杜保波. 成人非创伤性股骨头缺血性坏死 DSA 影像表现及介入治疗的临床效果分析[J]. 现代医用影像学, 2019, 28(6): 1457.
- [14] Zhao FC, Hu HX, Zheng X, et al. Clinical analysis of 23 cases of steroid-associated osteonecrosis of the femoral head with normal initial magnetic resonance imaging presentation [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(49): e8834.
- [15] Li J, Wang J, Zhao J, et al. BOLD-MRI early detect femoral head osteonecrosis following steroid-treated patients[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(44): e8401.
- [16] Dong Y, Li T, Li Y, et al. Micro RNA-23a-3p inhibitor decreases osteonecrosis incidence in a rat model [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9331-9336.
- [17] Tian ZJ, Liu BY, Zhang YT, et al. MiR-145 silencing promotes steroid-induced avascular necrosis of the femoral head repair via upregulating VEGF[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(17): 3763-3769.
- [18] Pei J, Fan L, Nan K, et al. Excessive activation of TLR4/NF- κ B interactively suppresses the canonical Wnt/ β -catenin pathway and induces SAN-FH in SD rats[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11928.
- [19] Narayanan A, Khanchandani P, Borkar RM, et al. Avascular necrosis of femoral head: a metabolomic, biophysical, biochemical, electron microscopic and histopathological characterization[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10721.
- [20] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(45): 26746-26749.
- [21] Oshima K, Nampei A, Matsuda M, et al. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(2): 520-526.
- [22] Luo XH, Guo LJ, Xie H, et al. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway[J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(10): 1648-1656.
- [23] Woodward L, Akoumianakis I, Antoniadis C. Unravelling the adiponectin paradox: novel roles of adiponectin in the regulation of cardiovascular disease[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(22): 4007-4020.
- [24] 李宛静, 徐晓娟, 黄映红, 等. 补肾化痰方调控大鼠卵巢 GC 中 APN 信号通路机制的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(5): 642-644.
- [25] Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(18): 1895-1908.
- [26] Dai Y, Pang J, Gong H, et al. Roles and tissue source of adiponectin involved in lifestyle modifications[J]. *J Gerontol*, 2013, 68(2): 117-128.
- [27] 韩裕壁, 张福利. 化痰温胆汤对糖耐量减低大鼠胰岛素抵抗及 AMPK 信号通路的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017.
- [28] 玄玲玲, 侯琦. AMPK 与肺部炎症研究进展[J]. 药理学学报, 2014, 49(8): 1089-1096.
- [29] Peng K, Li Y, Long L, et al. Knockdown of FoxO3a induces increased neuronal apoptosis during embryonic development in zebrafish [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 484(2): 98-103.
- [30] 张莉, 白媛媛, 王玉环. 高分子脂联素与多囊卵巢综合征[J]. 实用糖尿病杂志, 2017, 13(2): 61-63.
- [31] 赵勤, 罗湘杭. 骨代谢过程中脂联素的相关作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, (6): 1127-1129.
- [32] 邓蒂斯, 徐晓娟. 补肾化痰法经 APN/AMPK 信号通路治疗肥胖 PCOS 的机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [33] 于潼, 谢利民, 吴懿, 等. 股骨头坏死不同中医证型 MRI 信号分布差异研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12): 1617-1620.
- [34] 周李学, 齐振熙. 补肾活血汤促进免疫激素性股骨头缺血坏死修复机制的研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2016.
- [35] 江彬锋, 方剑利, 俞楠泽, 等. 右归饮对大鼠激素性股骨头坏死局部脂联素表达的影响[J]. 中医正骨, 2010, 22(5): 11-14.
- [36] 田能, 孔祥英, 万蓉, 等. 健脾活血方对激素性股骨头坏死血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 48-51.
- [37] 陈晓波, 陈雷雷, 洪郭驹, 等. 桃红四物汤对激素性股骨头坏死股骨头微结构的影响及其机制[J]. 山东医药, 2017, 57(32): 5-9.
- [38] 李乃谦. 熟地黄活性成分药理作用的研究进展[J]. 中国处方药, 2017, 15(1): 14-15.
- [39] 杨雪, 季红, 刘颖男, 等. 山茱萸多糖提取纯化方法及药理作用研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(7): 1984-1986.
- [40] 王珺, 徐俊杰. 山药多糖的组成及其药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2018, 39(4): 304-306.
- [41] 谭静, 林红强, 王涵, 等. 鸡血藤的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中药与临床, 2018, 9(5): 61-65.
- [42] 吴桂莹, 亓玉玲, 郝宝燕, 等. 丹皮酚衍生物及其药理活性研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(4): 1001-1006.

(收稿: 2019-01-19 在线: 2019-10-12)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶