

雷阳,李慧英,孟东方,等. 激素性股骨头坏死动物模型构建的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(10): 1352-1360.
LEI Y, LI H Y, MENG D F, et al. Research progress in constructing animal models of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(10): 1352-1360.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.10.013

激素性股骨头坏死动物模型构建的研究进展

雷阳¹, 李慧英^{2*}, 孟东方², 张向北¹, 王凯¹

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院骨科一区, 郑州 450000)

【摘要】 激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)作为一种复杂难治性疾病,其发病率逐年上升并呈现出年轻化趋势。良好的疾病动物模型可以为 SONFH 的发病机制研究和治疗手段开发提供重要的支撑条件,本文通过回顾与整理国内外近年来 SONFH 动物模型相关的实验研究,从动物选择、造模方法、模型评价等方面归纳和分析 SONFH 动物模型构建的最新进展,为 SONFH 的相关研究提供参考。

【关键词】 激素性股骨头坏死;动物模型;模型构建;模型评价;造模方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 10-1352-09

Research progress in constructing animal models of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head

LEI Yang¹, LI Huiying^{2*}, MENG Dongfang², ZHANG Xiangbei¹, WANG Kai¹

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Zone One Department of Orthopedics and Traumatology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

Corresponding author: LI Huiying. E-mail: lihuiying39@163.com

【Abstract】 As a complex and refractory disease, the incidence of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH) is increasing year by year and showing an increasing trend in younger people. A good animal model of disease can provide important support for studying the pathogenesis of SONFH and the development of treatment method. In this paper, the latest progress made in the construction of SONFH animal models is summarized and analyzed from the aspects of animal selection, modeling method, and model evaluation. To achieve this, we review and categorize the experimental studies related to SONFH animal models conducted in China and overseas in recent years, providing a reference for related research of SONFH.

【Keywords】 SONFH; animal models; model construction; model evaluation; molding method

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)是一种由于股骨头中的静脉淤滞或动脉血供损伤或中断,导致骨细胞和骨髓成分部分死亡,进而导致股骨头结构退化和塌陷,引起髋关节疼痛和功能障碍的疾病^[1]。ONFH 的患病率逐年上升^[2],仅在中国就有约 812 万例非创伤性 ONFH。

由于临床上糖皮质激素(glucocorticoid, GC)的广泛应用,尤其近年来新冠疫情的发生,使得激素性股骨头坏死(steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)的发病率逐年上升且发病年龄趋于年轻化,在非创伤性股骨头坏死中比例高达 51%,居于首位^[3-5]。

【基金项目】 河南省中医药科学研究专项(2021JDZY009, 2022JDZX123, 2023ZY2029)。

Funded by Henan Special Research Project of Traditional Chinese Medicine(2021JDZY009, 2022JDZX123, 2023ZY2029)。

【作者简介】 雷阳,男,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治骨伤疾病。Email:leiyang6548@163.com

【通信作者】 李慧英,女,博士,教授,研究方向:中西医结合防治骨伤疾病。Email:lihuiying39@163.com

SONFH 作为一种难治性疾病,其发病机制尚不明确,目前认为与解剖结构、细胞凋亡和自噬、脂质代谢与脂肪栓塞、内皮细胞损伤与凝血异常、氧化应激及活性氧机制、分子途径、遗传易感性及表观遗传学、类固醇相关性 ONFH 中的非编码 RNA 等相关^[6]。因此,建立一种稳定、可重复性高、易于评价且能最大程度模拟人类 SONFH 主要病理特征的实验动物模型,对深入研究 SONFH 的发病机制、防治策略意义重大。目前尚无理想的动物模型。

现有动物模型的“金标准”评价手段是组织病理学检查,能在病变组织中观察到骨小梁内弥漫性空骨陷窝、骨细胞核固缩和骨髓细胞坏死等典型特征^[7-10],但该法属于有创性操作,对于实验成本及操作技术有较高要求。为此,常见的无创诊断方式如 X 线平片、显微计算机断层扫描 (micro computed tomography, Micro-CT)、超声等被广泛应用。然而 X 线和 Micro-CT 对 ONFH 早期阶段缺乏敏感性^[11-14],骨扫描特异性不足,磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 虽因高敏感性和特异性成为早期诊断 ONFH 的首选方法^[15],但成本高昂且动物配合度有限。其他评价方法中,行为学观察主观性强,实验室检查特异性弱,仅作为辅助诊断使用^[16-17]。这些评价方式的局限性,进一步增加了探索理想模型的挑战。

本文以“激素性股骨头坏死,激素型股骨头坏死,激素性股骨头缺血性坏死,动物模型”为主题词在中国知网、万方、维普数据库和中国生物医学文献数据库进行高级检索;以“steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, steroid-induced osteonecrosis of femoral head, animal model”关键词,在 PubMed 数据库进行检索。检索时间为 2013 年 1 月 1 日 ~ 2024 年 1 月 1 日,纳入与主题相关的近 10 年文献,尤其是侧重于激素性股骨头坏死动物模型造模的研究。

1 激素性股骨头坏死动物模型的动物选择

理想的动物模型应力求模拟人类发病机制并复制相应病理过程。多年来,SONFH 动物模型多选择四足动物,如小鼠^[18]、大鼠^[19]、兔^[20]、猪^[21],以及犬、山羊和马等^[22],但四足动物与人类的髋部结构及力学特性有明显差异,难以有效模拟人类股骨头承重的真实状态。对两足动物的研究则仅限于鹅、

鸡、鸵鸟和鸬鹚^[23]等非哺乳动物,尽管这些动物的负重模式与人类较接近,但与人类亲缘性较远,其解剖结构和生理特征也存在显著性差异,难以完全复制人类的病理过程。

大型哺乳动物存在成本高、饲养条件苛刻、样本量有限等缺点,不适合作为 ONFH 模型的首选。且出于人道主义,也应当减少大型动物的使用^[24]。相比之下,小型哺乳动物成本低、饲养方便、更易满足伦理要求,更具有普遍优势,且小动物低体重的优势使得其在抗体、生物制剂等特异性试剂的使用中具有更好的成本效益与操作性^[25]。因此,小型哺乳动物如兔、大鼠、小鼠、树鼯等已成为建立 SONFH 模型的优先选择。

1.1 兔

兔因其股骨头血液供应与股骨头相对大小更接近人类而成为最常用的动物模型之一。目前为止,SONFH 家兔模型在使用 GC 的类型、剂量、用药方法等方面尚未统一,有报道称单纯激素诱导的兔 SONFH 模型以新西兰白兔配合地塞米松 (dexamethasone, DEX) 为佳,GC 联合脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导以甲泼尼龙 (methylprednisolone, MPS) 为佳,GC 联合血清以 DEX 为宜^[26]。目前主要通过 GC 单独给药以及 GC 联合 LPS 给药两种方式进行骨坏死诱导。CASEY 等^[27]对两批新西兰白兔进行单次肌注 MPS (20 mg/kg),成功率分别为 77.8% 和 82.9%。QIN 等^[28]采用激素联合 LPS 的经典方法成功造成 SONFH 兔模型,成功率较高 (93%)。

股骨头塌陷被认为是 SONFH 的最终阶段,目前的动物模型存在着诱发广泛股骨头坏死的缺点,缺乏对股骨头局部受压的具体研究,在 LPS + MPS 给药的基础上,LI 等^[29]探索了一种新的家兔股骨头坏死模型,利用 3D 打印技术和生物力学原理将应力因素集成到建模过程中,模拟人类股骨头的局部压迫,成功复制了包括股骨头塌陷,以及软骨下大量空骨陷窝、软骨缺损和软骨下骨折等病理特征,显示出了模拟疾病进展的能力,为探索 SONFH 的发病机制提供了新的方向。

1.2 大鼠

大鼠繁殖快、易饲养,体型适中,股骨头的大小适用于成像分析,具备显著的实验优势。大鼠 SONFH 模型一般通过 GC 单独给药以及 GC 联合 LPS 给药两种方式进行诱导。TAO 等^[30]对 20 只健

康雌性 SD 大鼠肌注 MPS (20 mg/kg), 连续 3 周, 每周连续 3 d, 6 周后 Micro-CT 显示 80% 大鼠股骨头下软骨层出现明显的骨矿物质丢失和囊性变性等骨小梁变化, 苏木素-伊红 (HE) 染色显示骨小梁稀疏甚至消失。SUN 等^[31] 利用 LPS (20 μ g/kg) 联合 MPS (60 mg/kg) 对雄性 SD 大鼠进行造模, 通过 X 线片及股骨头大体形态观察可见股骨头关节面明显变形、塌陷, Micro-CT 可见骨小梁稀疏、断裂, HE 染色显示骨小梁出现弥漫性空骨陷窝、骨小梁塌陷, 证实造模成功。

1.3 小鼠

SONFH 小鼠模型使用相对较少, 因其体型小, 一定程度上妨碍了影像学评价, 但在涉及分子机制相关研究中具有巨大潜力^[32], 尤其是转基因小鼠^[33]。有研究探索小鼠内皮细胞 *Piezo1* 基因敲除对骨坏死发生发展的影响, 通过腹腔注射 LPS (20 μ g/kg) 联合肌注 MPS (40 mg/kg) 进行造模, 发现内皮细胞 *Piezo1* 基因缺失可以加重小鼠 SONFH 的严重程度^[34]。

近年来小鼠 SONFH 模型的建立以使用药物 DEX 为主。YANG 等^[35] 筛选了 14 个小鼠品系, 发现 BALB/c 小鼠更适合进行骨坏死诱导, 且连续 DEX 给药成模率更高。研究表明^[36-37], 该品系小鼠对 DEX 最敏感, 且进行 SONFH 诱导时雌性小鼠的发病率高于雌性小鼠。研究发现^[38], 天冬酰胺酶 (asparaginase, ASP) 联合 DEX 给药的小鼠骨坏死发生率与骨骺动脉病变发生率均高于仅接受 DEX 的小鼠, 原因在于 ASP 可抑制血管生成, 影响局部血液供应, 导致血管内皮细胞损伤。LIU 等^[39] 首次提出了使用血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 联合 ASP 和 DEX 模拟小鼠 SONFH 的方法, 2 mg/L DEX 自由饮水法配合每周两次腹腔内注射 1200 IU/kg ASP, 同时皮下植入胶囊渗透泵, 以 0.28 mg/kg 剂量持续泵送 Ang II, 持续给药 8 周, 分别于末次给药后第 4 和 8 周对小鼠造模效果进行评估, 结果发现在第 4 周时小鼠造模成功率为 50%, 第 8 周时成功率为 70%, 均高于单纯 DEX + ASP 组 (第 4 周 30%, 第 8 周 40%)。

1.4 树鼩

树鼩作为一种新兴实验动物, 与人类的遗传相关性比传统的啮齿类动物更为紧密, 其生理特征如解剖特征、神经发育、免疫和代谢系统与灵长类动物 (包括人类) 高度相似, 且具有体型小、摄食成本

低、繁殖周期短等优点, 在生物医学研究中有巨大潜力^[40-42]。CHEN 等^[41] 认为, 利用树鼩诱导高成模率 SONFH 动物模型应当使用与既往动物不同剂量和规格的 LPS 和 MPS, 其团队给予树鼩静脉注射 1 次 LPS (300 μ g/kg) 24 h 后, 再腹腔注射 MPS (130 mg/kg), 之后保持此剂量每周腹腔注射两次 MPS, 持续 12 周, 血清生化显示骨碱性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, BALP)、骨 GLA 蛋白 (bone glutamic acid protein, BGP)、I 型胶原 N 端前肽 (N-terminal propeptide of type I collagen, P1NP) 和 I 型胶原 C 端前肽 (C-terminal propeptide of type I collagen, P1CP) 的水平显著升高, Micro-CT 和病理样本显示股骨头关节面变形、塌陷, 骨质疏松明显, 骨小梁变细、断裂, 周围骨髓细胞或脂肪细胞坏死, 成功地复制了 GC 诱导的骨坏死树鼩模型。

1.5 鸱鸒

作为双足 ONFH 动物模型, 鸱鸒和鸵鸟已被用于开发创伤模型和评估某些手术方式效果, 在建立 SONFH 模型中也得到了部分学者认可。鸱鸒是大型双足动物, 因其与人类相似的生物力学特性, 在股骨头塌陷机制方面的研究具有一定优势^[43]。ZHENG 等^[44] 和 QIN 等^[45] 使用 MPS 联合 LPS 的方法对鸱鸒造模, 12 周后经 Micro-CT 检验发现股骨头塌陷发生率为 70%。然而, 两足动物大多是非哺乳动物, 在激素敏感性方面与哺乳动物存在显著差异, 因此难以模拟激素诱导的 ONFH 的自然过程^[40]。因此, 近年来学者们减少了 ONFH 动物模型中双足非哺乳动物的使用。

2 激素性股骨头坏死动物模型的构建方法

糖皮质激素广泛用于治疗炎症性、变应性和自身免疫性疾病, 包括系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)、实体器官移植 (肾、肝、心脏等)、白血病、严重急性呼吸系统综合症 (severe acute respiratory syndrome, SARS)、恶性肿瘤、肾功能衰竭、皮肤病等。糖皮质激素的使用是骨坏死发展的关键风险因素已经是国内外公认的事实^[15, 46], 但基础疾病也是骨坏死发展的重要危险因素。因此, 国内外 SONFH 常用的建模方法为模拟 SONFH 发病机制的糖皮质激素诱导, 以及模拟炎症临床环境而采用异体血清联合激素诱导和脂多糖联合激素诱导。过量使用糖皮质激素会抑制动物免疫系统,

为减少肺部感染等致死并发症,降低模型死亡率,通常需要给予青霉素等抗生素预防感染。从生物力学的角度考虑,造模过程中应增加动物机械应力训练,可通过悬吊引水法或提高食槽高度,以及增加运动量的方式尽可能使动物贴近人类的 SONFH 发病机制^[47]。在此,本研究总结了常用动物模型的建模方法(表 1)。

表 1 SONFH 动物模型
Table 1 Animal models of SONFH

动物类型 Animal type	性别 Gender	造模药物 Molding drug	造模周期 Molding period	观察周期 Observation cycle	成功率/% Rate of success/%	文献来源 Literature resources
日本大耳白兔 Japanese rabbits	—	MPS(20 mg/kg)	1 d 1 day	14 d 14 days	70. 00	[48]
	雄 Male	MPS(40 mg/kg) × 3	3 d 3 days	12 周 12 weeks	83. 33	[49]
	—	PDN(10 mL/kg) × 8	4 周 4 weeks	10 周 10 weeks	90. 00	[50]
	雄 Male	HS(10 mL/kg) × 1 + HS(7. 5 mL/kg) × 1 + MPS(45 mg/kg) × 3 + PNC(100 000 U) × 7	6 周 6 weeks	8 周 8 weeks	54. 00	[51]
	雌雄各半 Half male and half female	LPS(5 μg/kg) × 1 + MPS(20 mg/kg) × 3	—	6 周 6 weeks	80. 00	[52]
新西兰白兔 New zealand white rabbits	雌雄各半 Half male and half female	LPS(10 μg/kg) × 1 + MPS(40 mg/kg) × 3	3 d 3 days	3 周 3 weeks	93. 00	[53]
	雌雄各半 Half male and half female	HS(10 mL/kg) × 2 + PA(8 mg/kg) × 6	5 周 5 weeks	8 周 8 weeks	80. 00	[17]
	雌/雄 Male/femal	HS(10 mL/kg) × 1 + HS(5 mL/kg) × 2 + MPS(7. 5 mg/kg) × 14 + PNC(800 000 U) × 12	10 周 10 weeks	16 周 16 weeks	88. 89	[54]
SD 大鼠 SD rats	雄 Male	LPS(20 μg/kg) × 3 + MPS(60 mg/kg) × 4	1 周 1 week	5 周 5 weeks	—	[31]
	雌 Female	MPS(20 mg/kg) × 9	3 周 3 weeks	6 周 6 weeks	80. 00	[30]
	—	LPS(20 μg/kg) × 2 + MPS(40 mg/kg) × 3	1 周 1 week	16 周 16 weeks	90. 00	[55]
	雄 Male	LPS(20 μg/kg) × 1 + MPS(100 mg/kg) × 3 + MPS(40 mg/kg) × 18	6 周 6 weeks	8 周 8 weeks	100. 00	[56]
	雄 Male	LPS(10 μg/kg) × 1 + MPS(20 mg/kg) × 3	4 d 4 days	8 周 8 weeks	—	[12]
Wistar 大鼠 Wistar rats	雄 Male	LPS(2 mg/kg) × 2 + MPS(20 mg/kg) × 3	4 d 4 days	8 周 8 weeks	—	[12]
	雄 Male	LPS(2 mg/kg) × 2 + MPS(20 mg/kg) × 5	7 d 7 days	—	83. 33	[57]
	雄 Male	DEX(50 mg/kg) × 12	6 周 6 weeks	6 周 6 weeks	—	[58]
	雄 Male	LPS(2 mg/kg) × 2 + MPS(20 mg/kg) × 3	5 d 5 days	4 周 4 weeks	66. 70	[59]
	雄 Male	DEX(2 mg/L) + ASP(1200 IU/kg) × 16 + Ang II(0. 28 mg/(kg·d)) × 8 w	8 周 8 weeks	8 周 8 weeks	70. 00	[39]
BALB / c 小鼠 BALB / c mice	雄 Male	DEX(2 mg/L) + ASP(1200 IU/kg) × 16	8 周 8 weeks	8 周 8 weeks	40. 00	[39]
	雄 Male	DEX(4 mg/L) + ASP(1500 IU/kg) × 12	6 周 6 weeks	6 周 6 weeks	44. 00	[38]
	雄 Male	DEX(4 mg/L) + DEX(2 mg/L)	12 周 12 weeks	12 周 12 weeks	40. 00	[36]
	雄 Male	DEX(4 mg/L) × 90 d	90 d 90 days	90 d 90 days	47. 00	[37]

续表 1

动物类型 Animal type	性别 Gender	造模药物 Molding drug	造模周期 Molding period	观察周期 Observation cycle	成功率/% Rate of success/%	文献来源 Literature resources
C57BL/6 小鼠 C57BL/6 mice	雄 Male	DEX (4 mg/L) × 90 d	90 d 90 days	90 d 90 days	25.00	[37]
	雌 Female	LPS (20 μg/kg) × 2 + MPS (40 mg/kg) × 1 + PNC (30 000 U)	3 d 3 days	4 周 4 weeks	80.00	[37]
树鼯 Tree shrew	雄 Male	LPS (300 μg/kg) × 1 + MPS (130 mg/kg) × 24	12 周 12 weeks	12 周 12 weeks	—	[41]

注:—,未报道;MPS:甲泼尼龙;PDN:泼尼松龙;PA:醋酸泼尼松龙;LPS:脂多糖;HS:马血清;PNC:青霉素;DEX:地塞米松;ASP:天冬酰胺酶;Ang II:血管紧张素 II。
Note.—, Unreported. MPS. Methylprednisolone. PDN. Prednisolone. PA. Prednisolone acetate. LPS. Lipopolysaccharide. HS. Horse serum. PNC. Penicillin. DEX. Dexamethasone. ASP. Asparaginase. Ang II. Angiotensin II.

2.1 糖皮质激素单独造模

GC 是 SONFH 发生发展的关键危险因素,GC 使用剂量和给药方式是 SONFH 的发生率的重要影响因素。GC 的种类繁多,国内外普遍采用的 GC 以 MPS、DEX 和醋酸泼尼松龙 (prednisolone acetate, PA) 为主,主要通过肌肉注射、腹腔注射、静脉注射、自由饮水等途径给药,其中肌肉注射因操作简易、创伤小、低死亡率成为目前最常见的给药方式。单次肌注 MPS^[27] 以及连续大剂量注射 MPS 均能成功造模。REN 等^[50] 对成年日本大白兔连续 4 周臀肌注射泼尼松龙溶液 (10 mg/kg) 建立 SONFH 模型,第 10 周时兔出现跛行,病理切片可见股骨头小梁变薄,断裂、排列不规则,空骨陷窝增加、骨核收缩, MRI 可见“双线征”,造模成功率在 90% 以上。ZHU 等^[49] 采用了连续大剂量注射 MPS 的方法,对家兔进行臀肌注射 MPS (40 mg/kg),每日 1 次,连续 3 次,分别于末次给药后 2、6、8、10、12 周进行血液学检查、放射学分析和组织病理学检查,结果提示兔骨坏死模型构建成功,第 12 周观察到成功率为 83.33%,动物存活率为 86.67%。YAMAMOTO 等^[60] 通过臀肌注射 MPS 20 mg/kg 对 28 周龄以上雄性日本大白兔进行造模,成功率为 60%。TAO 等^[30] 对健康雌性 SD 大鼠肌注 MPS 20 mg/kg 进行 SONFH 诱导,6 周后成功率为 80%,实验中无死亡事件。有报道比较了 MPS 单次肌注给药后不同时间段日本大白兔组织病理变化,发现给药后 3 和 5 d 未发现骨坏死,而给药 14 d 后骨坏死发生率为 70%^[48],这提示 MPS 给药后需要一个慢性、动态的骨坏死诱导过程。

糖皮质激素单独建模还原了 SONFH 发生发展的直接危险因素,且操作简单,可重复性强,但造模周期相对较长,成模率不够稳定,且因干预手段单一,无法全面反映 SONFH 的完整发病过程,限制了

其在发病机制研究中的应用。

2.2 糖皮质激素联合异体血清造模

同种异体血清可诱导Ⅲ型超敏反应,抗原-抗体复合物沉积在小血管基底膜中导致毛细血管充血、水肿、坏死和局部中性粒细胞浸润,在免疫系统的参与下引发一系列的反应导致组织损伤^[22]。这种炎症过程类似于诸多使用 GC 治疗的自身免疫性疾病中机体的炎症过程。在此炎症/超敏反应基础上,GC 的加入不仅抑制了免疫反应,还抑制了胶原蛋白和弹性纤维的合成,血管炎症变得更加复杂,进而导致股骨头缺血性坏死。早期激素联合异体血清法常使用 10 mL/kg 血清重复 2 次的给药剂量,易引起免疫反应过度并致死,如今多采用首次血清 10 mL/kg 后减量给药的方式来有效降低实验动物死亡率^[61-62]。WANG 等^[63] 将马血清以 10 mL/kg 的剂量静脉注射到新西兰成年白兔体内,第 4 周将马血清剂量减至 6 mL/kg 进行第二次注射,第 6 周时连续 3 d 腹腔注射 MPS (45 mg/kg),结果显示,5 只白兔在造模期间死亡 (12.5%),35 只存活动物中共有 15 只表现出双侧股骨头坏死的早期 MRI 特征 (37.5%),表现为 T1WI 上软骨下局限性的低信号带和 T2WI 上的“双线征”。为提高造模成功率,另一项研究^[51] 采用了马血清首次给药剂量 10 mL/kg,第 4 周以 7.5 mL/kg 的剂量重复给药,第 6 周臀肌注射 MPS (45 mg/kg) 3 次建立兔骨坏死模型,最终骨坏死造模成功率为 54%。有研究在此基础上进一步改进方法:对新西兰大白兔经耳缘静脉注射马血清 (10 mL/kg),2 周后,再次注射马血清 (5 mL/kg),连续 2 d;第 5 周臀肌注射醋酸甲泼尼龙 (7.5 mg/kg),3 d 一次,持续 6 周,同时给予每周 2 次注射青霉素 80 万 U 预防感染,分别于第 12、14、16 周通过影像学及组织病理学对模型进行验证评估,总成模率为 84.62%,最终动物死亡率为

13.33%, 其中, 在第 16 周兔模型的成功率最高 (88.89%)^[54], 明显提高了造模成功率。

激素联合异体血清造模法模拟了 GC 治疗过程中机体的炎症状态, 更贴近临床实际情况, 但该方法多用于兔 SONFH 模型, 且存在免疫过度致动物死亡的风险, 现已较少使用该方法。

2.3 糖皮质激素联合脂多糖造模

LPS 又称细菌内毒素, 可诱导免疫刺激因子, 激活血管内皮细胞、血小板、单核/巨噬细胞和其他成分, 引起发热、微循环障碍, 甚至内毒素性休克和弥散性血管内凝血。LPS 与 GC 联合使用模拟了宿主的炎症状态, 模拟血管损伤这一机制对 SONFH 进行诱导^[22,64]。LPS 和 GC 的剂量与骨坏死率相关, 研究表明, LPS 联合 GC 诱导的 SONFH 成功率为 66% ~ 93%, 但较高剂量或较低剂量 LPS 都会导致实验动物死亡率升高。以家兔为例, YAMAMOTO 等^[65]在研究中报道使用 LPS (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 死亡率为 40%, YANG 等^[52]和 SONG 等^[66]采用低剂量 LPS (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 的死亡率均为 20%。QIN 等^[28]采用的单次静脉注射 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LPS 联合 3 次臀肌注射 20 mg/kg MPS 法, 6 周后骨坏死率 93%、死亡率 0%, 双侧股骨头病理组织切片可见典型的骨小梁内骨细胞缺失、骨陷窝排列紊乱、周围骨髓坏死, 显微血管造影可见骨髓血管内弥漫性血栓形成, 证实 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 的剂量在家兔模型中更为安全可靠, 被诸多学者采纳, 另有学者在此基础上探索了高剂量 MPS 的造模方案: ÖZMEN 等^[53]对新西兰兔耳缘静脉注射 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 24 h 后, 连续 3 d 臀肌注射 MPS (40 mg/kg), MPS 末次给药 3 周后进行模型评价, 结果显示骨坏死率为 93%, 其中干骺端病变发生率 83%, 死亡率 12.5%。由此可见, 低剂量 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 联合高剂量 MPS 可达到高发病率和低死亡率的目的。其他学者也证实, 对于兔模型, LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + MPS (40 mg/kg) 方案成功率高于 LPS (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + MPS (20 mg/kg) 方案 (81.3% vs. 90%)^[67-68]。

LPS/MPS 大鼠模型是 GC 诱导的 ONFH 的较理想临床前动物模型, 采用 LPS (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 联合 MPS (60 mg/kg) 以及 LPS (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 联合 MPS (40 mg/kg) 的给药方案均可成功诱导骨坏死^[9,31]。在单独使用 MPS (20 mg/kg) 诱导的大鼠模型中, 骨坏死的成功率为 80%, 而在 LPS (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) $\times$ 2 联合 MPS (40 mg/kg) $\times$ 3 诱导的大鼠模型中成功率可达

90%^[30,55]。有研究认为四足动物存在自发修复 SONFH 的机制, 对成年 SD 大鼠尾静脉注射 LPS (0.2 mg/kg) 24 h 后连续 3 d 腹腔注射 MPS (100 mg/kg), 然后在第 2 ~ 6 周每周注射 3 次低剂量 MPS (40 mg/kg), 分别在诱导后 2 周和 6 周进行评估, 骨坏死发生率分别为 100% 与 70%, 大鼠死亡率为 15.8%^[56], 这也提示造模后对模型评估时间节点应当提前。总体而言, LPS (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) $\times$ 2 + MPS (40 mg/kg) $\times$ 3 以及 LPS (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 联合 MPS (100 mg/kg) + MPS (40 mg/kg) 的建模方法成功率高, 死亡率低, 是大鼠 SONFH 的可行建模方法。

激素联合脂多糖造模法模拟人类 SONFH 的血管损伤机制及炎症状态, 造模成功率高, 发生骨坏死时间早, 是兔及大鼠模型比较成熟的造模法。但有报道称兔和大鼠注射 LPS 后均会出现不同程度的精神状态异常、生命体征不稳^[52,69], 可能是引起动物死亡的主要因素。也有学者认为使用 LPS 可能存在与人类骨坏死不同的病理机制^[61]。

3 小结

SONFH 是一种致残性关节疾病, 可影响所有年龄段的患者, 且发病群体正趋于年轻化。探索 SONFH 的确切发病机制并找到理想的治疗方法至关重要。动物模型作为研究疾病发病机制及干预措施的重要体内实验平台, 目前以小型哺乳动物为主要研究对象, 常用的模型动物包括兔、大小鼠。虽然树鼯在实验研究中展现出较大潜力, 但由于缺乏统一的造模标准, 尚未得到广泛应用。

对于 SONFH 模型的评价, 有创方式首选组织病理学, 无创方式首选 MRI。尽管近年来出现了超声造影^[70]、超声分子成像^[71]、同步加速器硬 X 射线相差成像 (phase-contrast imaging, PCI)^[52]、Tc-Cys-Annexin V 单光子发射计算机断层扫描 (single-photon emission computed tomography, SPECT)^[54] 等新评价技术, 但囿于成本以及操作性, 尚未普及。

SONFH 造模方法中, 单纯激素法造模干预周期相对较长, 激素联合 LPS 或同种异体血清的建模方法更贴近 ONFH 发病机制, 且建模时间短, 骨坏死表型更明显。GC 联合马血清主要用在构建家兔骨坏死模型, 对于机体炎症状态的模拟较 LPS 更为单一, 因此近年来逐渐减少了此法的使用。在常用动物模型中, 家兔模型以新西兰白兔采用低剂量 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 联合高剂量 MPS (20、40 mg/kg) 造模效

果较好。大鼠模型以 SD 大鼠为主,使用高剂量 LPS (20 $\mu\text{g/kg}$) 诱导为宜。小鼠模型多选用 BALB/c 小鼠,以 DEX 饮水联合 ASP 为主的方法进行造模。此外,在动物模型中尤其是大小鼠模型中选用雄性动物进行造模或可取得更高的造模成功率。

对于 SONFH 动物模型造模最佳观察周期国内外甚少提及,考虑到 GC 作用效应以及动物自身 ONFH 修复机制的因素,结合众多实验研究数据发现,单纯激素法在造模给药后 10 ~ 12 周模型成功率较高,在采用 LPS 联合 MPS 造模法在造模试剂给药 2 ~ 4 周后可以取得最理想造模成功率。对于使用 DEX 饮水给药法的小鼠模型,在 6 ~ 8 周时可以取得较高成模率。基于此,本文可为今后 SONFH 相关研究提供参考依据,减少后续实验研究的时间成本,获取最大效益。

参 考 文 献(References)

- [1] ZHANG J, CAO J, LIU Y, et al. Advances in the pathogenesis of steroid-associated osteonecrosis of the femoral head [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(6): 667.
- [2] QUAN H, REN C, HE Y, et al. Application of biomaterials in treating early osteonecrosis of the femoral head: research progress and future perspectives[J]. *Acta Biomater*, 2023, 164: 15-73.
- [3] ZHANG F, WEI L, WANG L, et al. FAR591 promotes the pathogenesis and progression of SONFH by regulating Fos expression to mediate the apoptosis of bone microvascular endothelial cells [J]. *Bone Res*, 2023, 11(1): 27.
- [4] GAO Y, YOU Y, ZHANG P, et al. Cortistatin prevents glucocorticoid-associated osteonecrosis of the femoral head via the GHSR1a/Akt pathway[J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 132.
- [5] JIANG H, LIN C, CAI T, et al. Taxifolin-mediated Nrf2 activation ameliorates oxidative stress and apoptosis for the treatment of glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Phyther Res*, 2024, 38(1): 156-173.
- [6] CHANG C, GREENSPAN A, GERSHWIN M E. The pathogenesis, diagnosis and clinical manifestations of steroid-induced osteonecrosis [J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102460.
- [7] ZHANG X, YANG Z, XU Q, et al. Dexamethasone induced osteocyte apoptosis in steroid-induced femoral head osteonecrosis through ROS-mediated oxidative stress[J]. *Orthop Surg*, 2024, 16(3): 733-744.
- [8] ZHANG X, LI Z, XU X, et al. Huogu injection protects against SONFH by promoting osteogenic differentiation of BMSCs and preventing osteoblast apoptosis[J]. *Cell Tissue Res*, 2024, 395(1): 63-79.
- [9] DASI M F, YAPRAK SARAC E, GOK YURTTAS A, et al. The effects of thymoquinone on steroid-induced femoral head osteonecrosis; an experimental study in rats [J]. *Jt Dis Relat Surg*, 2022, 33(3): 553-566.
- [10] STEINBERG M E, HAYKEN G D, STEINBERG D R. A quantitative system for staging avascular necrosis [J]. 1995, 77(1): 34-41.
- [11] MA J, SUN Y, ZHOU H, et al. Animal models of femur head necrosis for tissue engineering and biomaterials research [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2022, 28(5): 214-227.
- [12] DENG G, DAI C, CHEN J, et al. Porous Se @ SiO2 nanocomposites protect the femoral head from methylprednisolone-induced osteonecrosis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 1809-1818.
- [13] ZUO R, KONG L, WANG M, et al. Exosomes derived from human CD34⁺ stem cells transfected with miR-26a prevent glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis and osteogenesis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 321.
- [14] XU J, QIU X, YU G, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibitor can protect the femoral head against tobacco smoke exposure-induced osteonecrosis in spontaneously hypertensive rats [J]. *Toxicology*, 2022, 465: 153045.
- [15] LIU L H, ZHANG Q Y, SUN W, et al. Corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head: detection, diagnosis, and treatment in earlier stages [J]. *Chin Med J*, 2017, 130(21): 2601-2607.
- [16] 蒋玮, 曹林忠, 邹明峻, 等. 激素性股骨头坏死动物模型的建立及评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6): 799-804.
- JIANG W, CAO L Z, WU M J, et al. Establishment and evaluation of animal models of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(6): 799-804.
- [17] 佟鹏, 王洋, 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.
- TONG P, WANG Y, LIANG Y. Establishment and comprehensive evaluation of animal models of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(32): 5169-5174.
- [18] LI S, KONG Z, MA B, et al. Low miR-182-5p expressing extracellular vesicles derived from human bone marrow stromal cells of subjects with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head aggravate disease progression [J]. *J Bone Miner Res*, 2023, 38(7): 976-993.
- [19] LI W, LI W, ZHANG W, et al. Exogenous melatonin ameliorates steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by modulating ferroptosis through GDF15-mediated signaling [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 171.
- [20] XU D F, QU G X, YAN S G, et al. Microbubble-mediated ultrasound outweighs low-intensity pulsed ultrasound on osteogenesis and neovascularization in a rabbit model of steroid-associated osteonecrosis [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 4606791.
- [21] DRESCHER W, WEIGERT K P, BÜNGER M H, et al.

- Femoral head blood flow reduction and hypercoagulability under 24 h megadose steroid treatment in pigs [J]. J Orthop Res, 2004, 22(3): 501–508.
- [22] XU J, GONG H, LU S, et al. Animal models of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head—a comprehensive research review up to 2018 [J]. Int Orthop, 2018, 42(7): 1729–1737.
- [23] LI Z, SHAO W, LV X, et al. Advances in experimental models of osteonecrosis of the femoral head [J]. J Orthop Translat, 2023, 39: 88–99.
- [24] TANNENBAUM J, BENNETT B T. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015, 54(2): 120–132.
- [25] AGUIRRE J I, CASTILLO E J, KIMMEL D B. Preclinical models of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) [J]. Bone, 2021, 153: 116184.
- [26] 胡智星, 李群, 杨超, 等. 不同因素影响激素性股骨头坏死家兔模型建模效果的网状 Meta 分析 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(6): 976–984.
- HU Z X, LI Q, YANG C, et al. Network meta-analysis of the modeling effects of different factors on rabbit models of steroid-induced osteonecrosis of femoral head [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(6): 976–984.
- [27] CASEY K M, GORE F, VILCHES-MOURE J G, et al. Management of morbidity and mortality in a New Zealand white rabbit model of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Comp Med, 2021, 71(1): 86–98.
- [28] QIN L, ZHANG G, SHENG H, et al. Multiple bioimaging modalities in evaluation of an experimental osteonecrosis induced by a combination of lipopolysaccharide and methylprednisolone [J]. Bone, 2006, 39(4): 863–871.
- [29] LI Y, ZHANG J, ZHAO Y, et al. A novel animal model of osteonecrosis of the femoral head based on 3D printing technology [J]. J Orthop Surg Res, 2023, 18(1): 564.
- [30] TAO S C, YUAN T, RUI B Y, 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.
- [31] SUN H, ZHANG W, YANG N, et al. Activation of cannabinoid receptor 2 alleviates glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral head with osteogenesis and maintenance of blood supply [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(11): 1035.
- [32] YAMAGUCHI R, KAMIYA N, KUROYANAGI G, et al. Development of a murine model of ischemic osteonecrosis to study the effects of aging on bone repair [J]. J Orthop Res, 2021, 39(12): 2663–2670.
- [33] YAN R, JIANG R, HU L, et al. Establishment and assessment of rodent models of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) [J]. Int J Oral Sci, 2022, 14(1): 41.
- [34] 潘兆丰, 杨均政, 何琪, 等. 内皮细胞 *Piezo1* 敲除对激素性股骨头坏死模型小鼠的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(32): 5107–5111.
- PAN Z F, YANG J Z, HE Q, et al. Effect of endothelial *Piezo1* knockout on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in mice [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(32): 5107–5111.
- [35] YANG L, BOYD K, KASTE S C, et al. A mouse model for glucocorticoid-induced osteonecrosis: effect of a steroid holiday [J]. J Orthop Res, 2009, 27(2): 169–175.
- [36] JANKE L J, LIU C, VOGEL P, et al. Primary epiphyseal arteriopathy in a mouse model of steroid-induced osteonecrosis [J]. 2013, 183(1): 19–25.
- [37] SHIDARA K, MOHAN G, EVAN LAY Y A, et al. Strain-specific differences in the development of bone loss and incidence of osteonecrosis following glucocorticoid treatment in two different mouse strains [J]. J Orthop Translat, 2019, 16: 91–101.
- [38] LIU C, JANKE L J, KAWEDIA J D, et al. Asparaginase potentiates glucocorticoid-induced osteonecrosis in a mouse model [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151433.
- [39] LIU J, LI C, YANG F, et al. Effects of angiotensin II combined with asparaginase and dexamethasone on the femoral head in mice: a model of steroid-induced femoral head osteonecrosis [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 975879.
- [40] YAO Y G. Creating animal models, why not use the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*)? [J]. Zool Res, 2017, 38(3): 118–126.
- [41] CHEN Q, MA Z X, XIA L B, et al. A tree shrew model for steroid-associated osteonecrosis [J]. Zool Res, 2020, 41(5): 564–568.
- [42] SHOU S, LIU M, YANG Y, et al. Animal models for COVID-19: hamsters, mouse, ferret, mink, tree shrew, and non-human primates [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 626553.
- [43] FAN M, PENG J, WANG A, et al. Emu model of full-range femoral head osteonecrosis induced focally by an alternating freezing and heating insult [J]. J Int Med Res, 2011, 39(1): 187–198.
- [44] ZHENG L Z, LIU Z, LEI M, et al. Steroid-associated hip joint collapse in bipedal emus [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76797.
- [45] QIN L, YAO D, ZHENG L, et al. Phytomolecule icaritin incorporated PLGA/TCP scaffold for steroid-associated osteonecrosis: proof-of-concept for prevention of hip joint collapse in bipedal emus and mechanistic study in quadrupedal rabbits [J]. Biomaterials, 2015, 59: 125–143.
- [46] KONARSKI W, POBOŻY T, KONARSKA K, et al. Osteonecrosis related to steroid and alcohol use—an update on pathogenesis [J]. Healthcare (Basel), 2023, 11(13): 1846.
- [47] 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.
- [48] TSUCHIYA M, ICHISEKI T, UEDA S, et al. Mitochondrial stress and redox failure in steroid-associated osteonecrosis [J]. Int J Med Sci, 2018, 15(3): 205–209.
- [49] ZHU T, JIANG M, ZHANG M, et al. Construction and

- validation of steroid-induced rabbit osteonecrosis model [J]. *MethodsX*, 2022, 9: 101713.
- [50] REN X, SHAO Z, FAN W, et al. Untargeted metabolomics reveals the effect of lovastatin on steroid-induced necrosis of the femoral head in rabbits [J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 497.
- [51] TIAN L, DANG XQ, WANG CS, et al. Effects of sodium ferulate on preventing steroid-induced femoral head osteonecrosis in rabbits [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2013, 14(5): 426–437.
- [52] YANG X, SHI L, LI A, et al. Phase-contrast imaging with synchrotron hard X-ray reveals the effect of icariin on bone tissue morphology and microstructure in rabbits with early glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1155532.
- [53] ÖZMEN E, İZOL ÖH, ATASOY S, et al. The effects of prophylactic tadalafil use on VEGF expression in the rabbit model of steroid-induced femoral head avascular necrosis [J]. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2023, 57(5): 237–242.
- [54] WANG X, LI J, MAN D, et al. Early detection of steroid-induced femoral head necrosis using (99m)Tc-Cys-Annexin V-based apoptosis imaging in a rabbit model [J]. *Mol Med*, 2020, 26(1): 120.
- [55] SUN Y, LIANG M, XING Y, et al. Cyasterone has a protective effect on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *PLoS One*, 2023, 18(10): 293530.
- [56] ZHENG LZ, WANG JL, KONG L, et al. Steroid-associated osteonecrosis animal model in rats [J]. *J Orthop Translat*, 2018, 13: 13–24.
- [57] 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.
- [58] CUI D, ZHAO D, HUANG S. Beneficial contribution of a safflower (*Carthamus tinctorius* L.) polysaccharide on steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 123: 581–586.
- [59] CHEN S, LI J, 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.
- [60] YAMAMOTO H, UESHIMA K, SAITO M, et al. Evaluation of femoral perfusion using dynamic contrast-enhanced MRI after simultaneous initiation of electrical stimulation and steroid treatment in an osteonecrosis model [J]. *Electromagn Biol Med*, 2018, 37(2): 84–94.
- [61] NAKATA K, MASUHARA K, NAKAMURA N, et al. Inducible osteonecrosis in a rabbit serum sickness model: deposition of immune complexes in bone marrow [J]. *Bone (New York, N. Y.)*, 1996, 18(6): 609–615.
- [62] 王伟, 刘利英, 王坤正, 等. 激素性股骨头坏死模型的建立及其发病机理的探讨 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2007, (5): 544–547.
- WANG W, LIU LY, WANG KZ, et al. Construction of the model of steroid-induced osteonecrosis in rabbits and exploration of the pathogenesis of the osteonecrosis femoral head [J]. *J. Xi'an Jiaotong Univ, Med Sci*, 2007, (5): 544–547.
- [63] WANG W, LIU L, DANG X, et al. The effect of core decompression on local expression of BMP-2, PPAR- γ and bone regeneration in the steroid-induced femoral head osteonecrosis [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2012, 13: 142.
- [64] FINCH ER, JANKE LJ, SMITH CA, et al. Bloodstream infections exacerbate incidence and severity of symptomatic glucocorticoid-induced osteonecrosis [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2019, 66(6): e27669.
- [65] YAMAMOTO T, HIRANO K, TSUTSUI H, et al. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1995(316): 235–243.
- [66] SONG Q, NI J, JIANG H, et al. Sildenafil improves blood perfusion in steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbits via a protein kinase G-dependent mechanism [J]. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2017, 51(5): 398–403.
- [67] SHI L, MAO T, LUO P, et al. Effect of icariin on early steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rabbits [J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2020, 34(2): 206–212.
- [68] 陈雷雷, 陈晓波, 洪郭驹, 等. 联合高分辨率 MRI 和 micro-CT 评价桃红四物汤对兔股骨头坏死的修复作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(01): 25–30.
- CHEN LL, CHEN XB, HONG GJ, et al. Effect of Taohong Siwu Decoction on the repair of steroid-induced osteonecrosis of femoral head in rabbit models evaluated by high-resolution MRI combined with Micro-CT [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(01): 25–30.
- [69] LI G, LIU H, ZHANG X, et al. The protective effects of microRNA-26a in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by repressing EZH2 [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(5): 551–566.
- [70] CHEN YY, WU XS, TIAN YY, et al. Evaluation of femoral head perfusion by contrast-enhanced ultrasound in a rabbit model of steroid-induced osteonecrosis [J]. *J Ultrasound Med*, 2020, 39(5): 987–995.
- [71] ZHAO P, ZHAO S, ZHANG J, et al. Molecular imaging of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head through iRGD-targeted microbubbles [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(9): 1898.