

补肾生骨汤对股骨头无菌性坏死大鼠的影响

艾力江·阿斯拉¹ 梁治权² 李雷疆² 邓迎杰² 廖军^{2△} 王继先²

[摘要] 目的:探讨补肾生骨汤调节 miR-135b-5p/Runt 相关基因 2(RUNX2)信号轴对股骨头无菌性坏死(ONFH)大鼠的影响。方法:将 SD 大鼠随机分为假手术(Sham)组、ONFH 组、低/中/高剂量补肾生骨汤(0.13,0.26,0.52 g/mL,L/M/H-补肾生骨汤)组、H-补肾生骨汤+miR-135b-5p agomir 组、H-补肾生骨汤+agomir-NC 组,采用液氮冷冻法制备 ONFH 大鼠模型;苏木精-伊红(HE)染色观察股骨头组织病理改变;检测血浆中纤维蛋白原(FIB)、血管内皮生长因子(VEGF)、一氧化氮合成酶(NOS)、骨钙素(BGP)水平;RT-qPCR 仪、Western Blot 法分别检测股骨头组织中 miR-135b-5p、RUNX2 表达水平;双荧光素酶实验分析 miR-135b-5p 与 RUNX2 的靶向关系。结果:与 Sham 组比较,ONFH 组股骨头组织发生区域性缺损,骨小梁稀疏、行走不规则,空骨陷窝增多明显;血浆中 FIB 表达升高,VEGF、NOS、BGP 表达降低($P<0.05$);经 L/M/H-补肾生骨汤干预后,上述情况均改善,且经 H-补肾生骨汤干预改善更明显;在 H-补肾生骨汤干预的基础上增加 miR-135b-5p agomir 干预后,H-补肾生骨汤干预的改善作用被削弱。与 Sham 组比较,ONFH 组股骨头组织中 miR-135b-5p 表达升高,RUNX2 表达降低($P<0.05$);经 H-补肾生骨汤干预后,miR-135b-5p 表达降低,RUNX2 表达升高($P<0.05$);在 H-补肾生骨汤干预的基础上增加 miR-135b-5p agomir 干预后,miR-135b-5p 表达升高,RUNX2 表达降低($P<0.05$)。双荧光素酶实验结果显示,miR-135b-5p 与 RUNX2 存在靶向关系。结论:补肾生骨汤能促进 ONFH 大鼠股骨头组织修复,可能与下调 miR-135b-5p 进而靶向上调 RUNX2 有关。

[关键词] 补肾生骨汤;股骨头无菌性坏死;骨钙素;血管内皮生长因子;一氧化氮合成酶

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)01-0007-06

Efficacy of Bushen Shenggu Decoction on miR-135b-5p/RUNX2 Signaling Axis in Rats with Aseptic Necrosis of the Femoral Head

Ailijiang Asila¹ LIANG Zhiquan² LI Lei Jiang²
DENG Yingjie² LIAO Jun^{2△} WANG Jixian²

¹ Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, China;

² Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China.

Abstract Objective: To investigate the efficacy of Bushen Shenggu decoction on microRNA (miR)-135b-5p/Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) signaling axis in rats with aseptic necrosis of the femoral head (ONFH). **Methods:** SD rats were randomly divided into Sham operation group, ONFH group, low/medium/high-dose Bushen Shenggu decoction (0.13,0.26,0.52 g/mL) groups, H-Bushen Shenggu decoction + miR-135b-5p agomir group, and H-Bushen Shenggu decoction + agomir-NC group. The ONFH rat model was established by liquid nitrogen freezing method. Histopathological changes of femoral head were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of fibrinogen (FIB), vascular endothelial growth factor (VEGF), nitric oxide synthase (NOS) and osteocalcin (BGP) in plasma were detected. RT-

qPCR and Western Blot were performed to detect the expression levels of miR-135b-5p and RUNX2 in femoral head tissue, respectively. The targeting relationship between miR-135b-5p and RUNX2 was analyzed by dual luciferase experiments. **Results:** Compared with the Sham group, the femoral head tissue in the ONFH group had regional defects,

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目
(2019D01C178)

¹ 新疆维吾尔自治区中医药研究院(乌鲁木齐,830000)

² 新疆医科大学附属中医医院骨科

[△]通信作者 E-mail: devil1234543@163.com

sparse and irregular trabecular bone, and greatly more empty bone lacunae; the expression of FIB in plasma increased, while the expression of VEGF, NOS and BGP decreased ($P < 0.05$). After the intervention of L/M/H-Bushen Shenggu decoction, the above conditions were improved, and the improvement was more obvious after the intervention of H-Bushen Shenggu decoction. After adding miR-135b-5p agomir on the basis of H-Bushen Shenggu decoction intervention, the improvement efficacy of H-Bushen Shenggu decoction intervention was weakened. Compared with the Sham group, the expression of miR-135b-5p in the femoral head tissue of the ONFH group increased, and the expression of RUNX2 decreased ($P < 0.05$). After the intervention of H-Bushen Shenggu decoction, the expression of miR-135b-5p decreased and the expression of RUNX2 increased ($P < 0.05$), the expression of miR-135b-5p increased and the expression of RUNX2 decreased after agomir intervention on the basis of H-Bushen Shenggu decoction ($P < 0.05$). The results of dual luciferase experiments showed that miR-135b-5p had a targeting relationship with RUNX2. **Conclusion:** Bushen Shenggu decoction can promote the repair of femoral head tissue in ONFH rats, which may be related to the down-regulation of miR-135b-5p and the targeted up-regulation of RUNX2.

Keywords: Bushen Shenggu decoction; osteonecrosis of the femoral head; bone glaprotein; vascular endothelial growth factor; nitric oxide synthase

股骨头无菌性坏死(Osteonecrosis of the Femoral Head, ONFH)是一种进行性疾病,若不及时治疗会导致股骨头塌陷和髋关节功能障碍,而最终不可避免地行全髋关节置换术^[1-2]。中医学根据 ONFH 临床症状,将其归属于“骨痹”“骨痿”“骨蚀”范畴,认为“肾虚”“血瘀”为该病的主要病机,治则应补肾通络^[3-4]。补肾生骨汤是本院国家级老中医王继先在 50 余年的临床经验基础上总结而来的中药方剂,具有补肾、强筋骨、活血化瘀之功效,在 ONFH 的治疗中取得了很好的疗效^[5-6]。诸多证据表明,微小 RNA (microRNA, miRNA)可以调节骨发育和再生,在 ONFH 的发生发展中起着重要作用^[7]。有研究发现 miR-135b-5p 在 ONFH 中高表达,有望成为 ONFH 的潜在诊断生物标志物^[8]。Runt 相关基因 2 (Runt-Related Transcription Factor 2, RUNX2)是成骨细胞分化标志物,其表达下调可促进 ONFH 的进展。有报道证实 miR-135b-5p 可通过靶向调控 RUNX2 而影响骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[9]。基于上述原因,笔者采用液氮冷冻法制备 ONFH 大鼠模型,观察补肾生骨汤对 ONFH 大鼠的作用,并探究 miR-135b-5p/RUNX2 信号轴作为其药理机制的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验动物及细胞

7~8 周龄 SPF 级 SD 大鼠,雌性,体重为(220±20)g,由新疆医科大学实验动物中心提供。饲养环境:温度为 20~24℃,湿度为 50%~60%,光照 12 h/黑暗 12 h 交替模式,自由摄食、进水。本研究已通过新疆医科大学实验动物中心伦理委员会审批(审批号为 2019-0315-2)。

人肾上皮细胞系 293T 细胞(货号为 HEMCL-032,上海赛百慷生物技术股份有限公司),采用 RPMI

1640 培养基(含双抗、10%FBS),于 5%CO₂ 培养箱中(37℃)常规传代培养。

1.2 主要试剂与仪器

HE 染色试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 试剂盒(货号为 C0105S、P0013B、P0012S,上海碧云天生物技术有限公司);纤维蛋白原(Fibrinogen, FIB)测试盒、血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)测试盒、一氧化氮合成酶(Nitric Oxide Synthase, NOS)测试盒、骨钙素(Bone Glaprotein, BGP)测试盒(货号为 H275、H044-2、A014-2-2、H152,南京建成生物工程研究所);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(货号为 RR047A、RR820A, Takara 公司);miR-135b-5p agomir, agomir-NC、miR-135b-5p mimic、mimic-NC、RUNX2 野生型(RUNX2-WT)质粒、RUNX2 突变型(RUNX2-MUT)质粒均由上海柯雷生物科技公司提供;兔源一抗 anti-β-Actin、anti-RUNX2 及山羊抗兔二抗(货号为 ab8227、ab264077、ab6721, Abcam 公司);双荧光素酶测试盒(货号为 11402ES60, 上海翌圣生物科技公司)。

光学显微镜(型号为 NIKON E100, 上海普赫生物科技有限公司),分光光度计(型号为 SmartSpec Plus, 上海奥陆生物科技有限公司),凝胶成像系统(型号为 WD-9413A, 北京六一生物科技有限公司),RT-qPCR 仪(型号为 ABI 7500, 上海艾研生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 补肾生骨汤方剂制备 补肾生骨汤方剂组成:黄芪、丹参 30 g,党参、当归、续断各 15 g,山甲、伸筋草 10 g,牛膝、骨碎补、甘草、赤芍各 12 g。将上述药材用水浸泡 30 min,煎煮 2 次(每次 40 min),过滤、合并两

次药液,应用旋转蒸发仪使其浓缩至膏状,而后于 60 ℃ 进行真空干燥即完成制备,使用时用生理盐水溶解。

1.3.2 实验分组、ONFH 模型制备及干预 将 SD 大鼠随机分为假手术(Sham)组、ONFH 组、低/中/高剂量补肾生骨汤(L/M/H-补肾生骨汤)组、H-补肾生骨汤+miR-135b-5p agomir 组、H-补肾生骨汤+agomir-NC 组,每组各 14 只。参考方姝晨等^[10]研究,采用液氮冷冻法制备 ONFH 大鼠模型。麻醉大鼠后消毒、备皮,定位右髂棘中下 1/3 交点与大转子连线中点,沿躯干纵轴作一长约 1 cm 切口,暴露关节囊并锐性切开,后前驱、内收术侧髋关节,后向背侧、后侧牵拉大转子,并剪断股骨头韧带,使股骨头脱位、暴露,将冷冻杆(自制)浸于液氮中 5 s 后取出,迅速将冷冻杆头部置于股骨头上 3 s,反复 15 次,而后冲洗创口、复位髋关节,逐层关闭创口。Sham 组大鼠不作液氮冷冻处理,其余操作同造模大鼠。术后所有大鼠单笼饲养。

造模后次日根据分组进行给药干预。按照种鼠间体表面积换算法(70 kg 成人给药剂量 14.4 g/d,200 g 大鼠对应给药剂量为成人的 6.3 倍)将补肾生骨汤设置为低、中、高三个剂量(1.3,2.6,5.2 g/kg),并用生理盐水配置为 0.13,0.26,0.52 g/mL 混悬液以 10 mL/kg 的剂量灌胃给药,1 次/d;miR-135b-5p agomir、agomir-NC 浓度均为 10 nmol/L(200 μ L,每 2 周注射 1 次),L/M/H-补肾生骨汤组在灌胃补肾生骨汤的基础上尾静脉注射 200 μ L 生理盐水,H-补肾生骨汤+miR-135b-5p agomir 组、H-补肾生骨汤+agomir-NC 组在灌胃补肾生骨汤基础上尾静脉注射 200 μ L miR-135b-5p agomir、agomir-NC,Sham 组、ONFH 组灌胃、尾静脉注射等量生理盐水,连续给药 8 周。

1.3.3 苏木精-伊红(HE)染色观察股骨头组织病理改变 于末次给药 24 h 后麻醉大鼠,每组随机选取 7 只大鼠,取腹主动脉血,加入 EDTA 抗凝后离心收集血浆,于-80 ℃ 下保存备用。而后取出股骨头并立即用预冷 PBS 冲洗,置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,后置于 10% EDTA 中脱钙 30 d,常规石蜡包埋、切片(4 μ m 厚),而后行常规 HE 染色,于光学显微镜下观察,并随机选取 10 个视野,计算空骨陷窝率。空骨陷窝率=(空骨陷窝总数/骨陷窝总数) \times 100%。其余大鼠麻醉后直接处死,取出股骨头,预冷 PBS 冲洗后剪成两半,于-80 ℃ 下保存备用。

1.3.4 检测血浆中 FIB、VEGF、NOS、BGP 水平 取出保存的血浆,利用 FIB、VEGF、NOS、BGP 试剂盒测定血浆中的 FIB、VEGF、NOS、BGP 水平,严格参照说明书操作。

1.3.5 RT-qPCR 仪检测股骨头组织中 miR-135b-5p 表达水平 取出保存的 7 只大鼠股骨头组织,剪成 1 mm³ 的小块,利用 Trizol 法提取总 RNA,测定其浓度后利用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA,而后利用 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II 试剂盒对 cDNA 进行扩增,借助 RT-qPCR 仪检测扩增后的 miR-135b-5p 水平。引物序列(5'-3')如下:miR-135b-5p: F/GGTATGGCTTTTCAT TCCT, R/CAGTGC GTGTCGTGGAGT。U6: F/GGA-GCGAGATCCCTCCAAAAT, R/GGCTGTTGTCA TACTCTCATGG。

1.3.6 Western Blot 法检测股骨头组织中 RUNX2 表达水平 取出保存的 7 只大鼠股骨头组织,剪成 1 mm³ 的小块,随后加入预冷的 RIPA 裂解液进行匀浆、离心收集上清液即为蛋白溶液,BCA 法测定浓度后进行定量、变性,随后进行凝胶电泳、转膜、封闭,孵育兔源一抗 anti- β -Actin、anti-RUNX2(4 ℃ 过夜),次日孵育山羊抗兔二抗(室温 2 h),滴加 ECL 发光液后置于凝胶成像系统中显影,利用 Image J 软件进行量化分析。

1.3.7 双荧光素酶实验分析 miR-135b-5p 与 RUNX2 的靶向关系 利用 ENCORI 数据库预测 miR-135b-5p 与 RUNX2 的结合位点,将 RUNX2 全序列插入到 pmirGLO 载体中构建 RUNX2-WT 质粒,同时对预测的结合位点进行突变并插入到 pmirGLO 载体中构建 RUNX2-MUT 质粒。实验分组如下:RUNX2-WT + miR-135b-5p mimic 组、RUNX2-WT + mimic-NC 组、RUNX2-MUT + miR-135b-5p mimic 组、RUNX2-MUT + mimic-NC 组。

待 293T 细胞融合度生长至 30%~40% 时,根据实验分组利用 Lipofectamine-2000 对其进行转染,于转染 6 h 时更换培养液 1 次,继续转染 42 h 后利用双荧光素酶测试盒检测各组 293T 细胞荧光素酶活性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,行 One-way ANOVA 分析,进一步两两比较行 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组股骨头组织病理改变

与 Sham 组比较,ONFH 组股骨头组织发生区域性缺损,骨小梁稀疏、行走不规则,可见少量脂肪细胞增生及纤维组织增生,空骨陷窝增多明显;经 L/M/H-补肾生骨汤干预后,上述病理改变均减轻,且经 H-补肾生骨汤干预减轻更明显;在 H-补肾生骨汤干预的基础上增加 miR-135b-5p agomir 干预,H-补肾生骨汤减轻股骨头组织病理改变的作用被削弱,见图 1 及表 1。

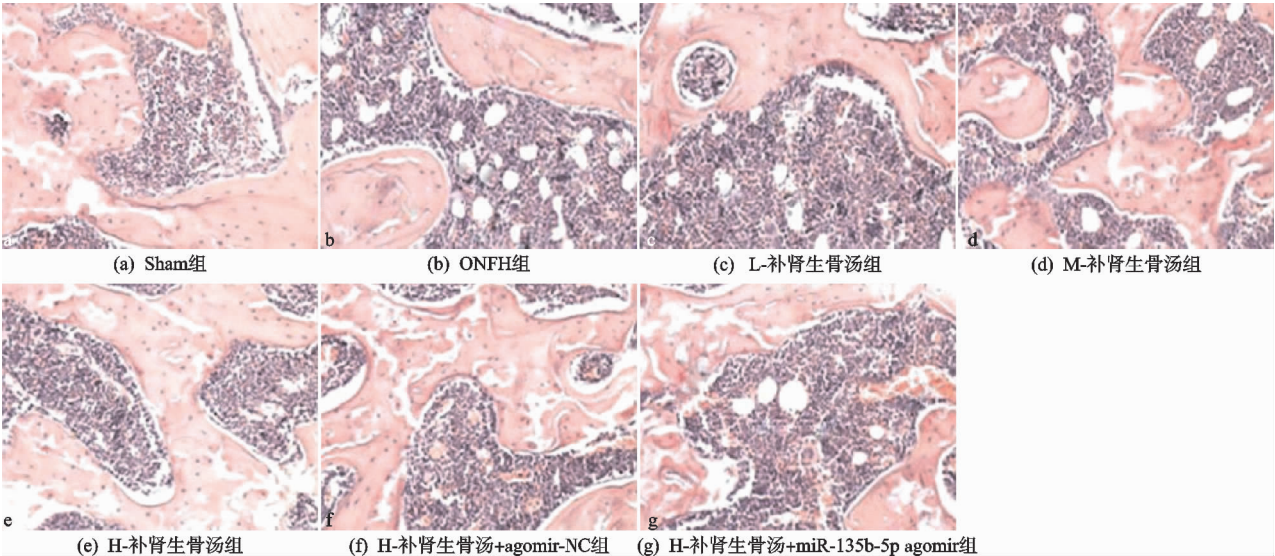


图 1 各组股骨头组织病理改变(HE, ×100)

表 1 各组股骨头组织空骨陷窝率($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	空骨陷窝率/%
Sham 组	8.75±1.13
ONFH 组	26.41±2.92 ¹⁾
L-补肾生骨汤组	21.18±2.37 ²⁾
M-补肾生骨汤组	17.09±1.65 ²⁾³⁾
H-补肾生骨汤组	11.54±1.38 ²⁾³⁾⁴⁾
H-补肾生骨汤+agomir-NC 组	11.56±1.37
H-补肾生骨汤+miR-135b-5p agomir 组	18.22±2.04 ⁵⁾⁶⁾

注:1)与 Sham 组比较, $P<0.05$; 2)与 ONFH 组比较, $P<0.05$; 3)与 L-补肾生骨汤组比较, $P<0.05$; 4)与 M-补肾生骨汤组比较, $P<0.05$; 5)与 H-补肾生骨汤组比较, $P<0.05$; 6)与 H-补肾生骨汤+agomir-NC 组比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组血浆中 FIB、VEGF、NOS、BGP 表达水平($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	FIB/(g · L ⁻¹)	VEGF/(pg · mL ⁻¹)	NOS/(U · mL ⁻¹)	BGP/(μg · L ⁻¹)
Sham 组	2.68±0.49	164.83±10.19	18.45±1.39	6.32±0.79
ONFH 组	5.34±0.76 ¹⁾	72.16±5.94 ¹⁾	7.16±0.72 ¹⁾	1.48±0.21 ¹⁾
L-补肾生骨汤组	4.51±0.54 ²⁾	95.38±7.26 ²⁾	9.83±0.89 ²⁾	2.46±0.37 ²⁾
M-补肾生骨汤组	3.69±0.41 ²⁾³⁾	124.15±8.52 ²⁾³⁾	12.74±1.16 ²⁾³⁾	3.79±0.55 ²⁾³⁾
H-补肾生骨汤组	2.81±0.35 ²⁾³⁾⁴⁾	149.62±9.37 ²⁾³⁾⁴⁾	16.19±1.28 ²⁾³⁾⁴⁾	5.68±0.74 ²⁾³⁾⁴⁾
H-补肾生骨汤+agomir-NC 组	2.76±0.33	151.38±9.31	16.24±1.29	5.59±0.73
H-补肾生骨汤+miR-135b-5p agomir 组	3.92±0.45 ⁵⁾⁶⁾	113.26±8.45 ⁵⁾⁶⁾	11.53±1.04 ⁵⁾⁶⁾	2.65±0.41 ⁵⁾⁶⁾

注:同表 1。

与 Sham 组比较, ONFH 组股骨头组织中 miR-135b-5p 表达升高, RUNX2 表达降低 ($P<0.05$); 与 ONFH 组比较, H-补肾生骨汤组股骨头组织中 miR-135b-5p 表达降低, RUNX2 表达升高 ($P<0.05$); 与 H-补肾生骨汤组比较, H-补肾生骨汤+miR-135b-5p agomir 组股骨头组织中 miR-135b-5p 表达升高, RUNX2 表达降低 ($P<0.05$), 见图 2 及表 3。

2.4 miR-135b-5p 与 RUNX2 靶向关系验证

ENCORI 数据库显示 RUNX2 为 miR-135b-5p 的潜在靶基因, 结合位点见图 3。RUNX2-WT+miR-

2.2 各组血浆中 FIB、VEGF、NOS、BGP 表达水平

与 Sham 组比较, ONFH 组血浆中 FIB 表达升高, VEGF、NOS、BGP 表达降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 ONFH 组比较, L/M/H-补肾生骨汤组血浆中 FIB 表达降低, VEGF、NOS、BGP 表达升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 且 H-补肾生骨汤组降低/升高更明显; 与 H-补肾生骨汤组比较, H-补肾生骨汤+miR-135b-5p agomir 组血浆中 FIB 表达升高, VEGF、NOS、BGP 表达降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。

2.3 各组股骨头组织中 miR-135b-5p 与 RUNX2 表达水平

135b-5p mimic 组 293T 细胞的相对荧光素酶活性低于 RUNX2-WT + mimic-NC 组、RUNX2-MUT + miR-135b-5p mimic 组 293T 细胞的相对荧光素酶活性 ($P<0.05$), 见表 4。

3 讨论

ONFH 是一种常见骨科疾病, 其病理特征是由于股骨头供血中断而导致的进行性骨细胞和骨髓坏死。目前, ONFH 的发病机理尚不明确, 以血液高凝状态学说、血管病变学说、骨丢失学说等观点较为常见^[1]。FIB 是凝血因子的一种, 可促进血小板的聚集, 增加血

RUNX2 有关。

参考文献

- [1] PETEK D, HANNOUCHE D, SUVA D. Osteonecrosis of the femoral head: pathophysiology and current concepts of treatment[J]. EFOR Open Rev, 2019, 4(3): 85-97.
- [2] HAO Y Q, GUO H, ZHU T, et al. Core decompression, lesion clearance and bone graft in combination with Tongluo Shenggu decoction for the treatment of osteonecrosis of the femoral head: a retrospective cohort study[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(41): e12674.
- [3] 金红波, 赖永德. 探讨肾虚、血瘀、湿毒与非创伤性股骨头坏死的发生[J]. 四川中医, 2018, 36(3): 47-49.
- [4] 杜敏东, 刘雄, 秦刚, 等. 髋关节外科脱位头颈开窗打压植骨术联合活血补肾方治疗中晚期肾虚血瘀型股骨头坏死的临床疗效[J]. 广西医学, 2019, 41(22): 2821-2824.
- [5] 方锐, 邹全. 王继先辨治股骨头无菌性坏死经验初探[J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(6): 1-2.
- [6] 洪汉刚, 张凯, 梁治权, 等. 王继先主任医师应用活血通络法治疗儿童股骨头坏死的临床经验总结[J]. 新疆中医药, 2012, 30(2): 51-53.
- [7] LI Z, YANG B, WENG X, et al. Emerging roles of microRNAs in osteonecrosis of the femoral head[J]. Cell Prolif, 2018, 51(1): e12405.
- [8] ZHANG M, CHEN D, ZHANG F, et al. Serum exosomal hsa-miR-135b-5p serves as a potential diagnostic biomarker in steroid-induced osteonecrosis of femoral head [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(5): 2136-2154.
- [9] SARTORI E M, MAGRO-FILHO O, SILVEIRA MENDONÇA D B, et al. Modulation of microRNA expression and osteoblast differentiation by nanotopography[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2018, 33(2): 269-280.
- [10] 方姝晨, 邹季, 史政康, 等. 三七总皂苷对股骨头坏死大鼠股骨头成骨作用影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2020, 28(6): 6-9.
- [11] LIU L, SONG J, LI J, et al. Isoform 1 of fibrinogen alpha chain precursor is a potential biomarker for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Proteomics Clin Appl, 2020, 14(6): e1900099.
- [12] LV W, YU M, YANG Q, et al. Total flavonoids of rhizoma drynariae ameliorate steroid-induced avascular necrosis of the femoral head via the PI3K/AKT pathway[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 345-354.
- [13] CHEN L, WEI P, JIANG K, et al. Apolipoprotein A1 and neuronal nitric oxide synthase gene polymorphisms and hormone-related osteonecrosis of the femoral head[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(14): 3159-3163.
- [14] 刘静, 徐江林, 石晓路, 等. 益气活血法对舒张性心力衰竭大鼠心肌细胞钙稳态的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(2): 165-175.
- [15] 陈章美, 夏中尚, 邓家刚, 等. 基于数据挖掘中药复方治疗下肢骨折用药规律探析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(6): 191-195.
- [16] 廖林丽, 李翔, 王静敏, 等. 基于关联规则和因子分析研究中医治疗视网膜静脉阻塞的组方用药规律[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(11): 1384-1388.
- [17] 徐雪莲, 魏睦新. 炮山甲联合化痰消瘀方治疗慢性萎缩性胃炎伴异型增生疗效观察[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(9): 649-652.
- [18] YU L, YAO T, JIANG Z, et al. Integrated analysis of miRNA-mRNA regulatory networks associated with osteonecrosis of the femoral head[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021: 8076598.
- [19] WU X, SUN W, TAN M. Noncoding RNAs in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Biomed Res Int, 2019: 8140595.

(收稿日期: 2022-07-14)