文章编号:1000-5404(2006)03-0215-05

论著

脱蛋白骨联合VEGF基因转染治疗股骨头缺血坏死

曹 凯[1],黄 伟[1],安 洪[1],蒋电明[1],黄 路[2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院骨科,重庆 400016,[2]儿童医院肾脏免疫科,重庆 400014)

提 要:目的 探索一种新的方法治疗股骨头早期缺血性坏死(avascular necrosis of the femoral head, AVNFH)。**方法** 69只AVNFH造模成功后的新西兰大白兔随机分成3组。第1组,将脱蛋白骨(deproteinized bone, DPB)复合pcDNA3.1/VEGF165质粒植入坏死的股骨头内,第2组植入DPB,第3组仅在股骨头内钻一隧道。术后3 d,1、2、4、8和16周获取标本。RT-PCR、Western blot和免疫组化技术分别检测VEGF165 mRNA、蛋白的表达及安全性。X线大体观察成骨情况,组织形态学分析血管发生和股骨头修复。**结果** 第1组VEGF165 mRNA和蛋白表达术后1周达到高峰,时间持续超过3周,第1组动物术后远膈脏器未检测到VEGF165的表达。血管形成术后2,4周增加,骨形成术后2,4和8周增加,与另两组相比差异有显著性($P<0.01$)。**结论** VEGF165基因转染可促进局部血管的早期形成,DPB-VEGF复合物可增加骨形成,VEGF基因治疗兔AVNFH有效、安全,脱蛋白骨联合VEGF165基因治疗为骨坏死的修复提供了理论基础。

关键词: 脱蛋白骨;血管内皮生长因子;基因治疗;股骨头缺血坏死

中图法分类号: R322.71; R459.9; R681.805 **文献标识码:** A

Deproteinized bone with VEGF gene transfer for avascular necrosis of the femoral head

CAO Kai[1], HUANG Wei[1], AN Hong[1], JIANG Dian-ming[1], HUANG Lu[2] ([1]Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital, [2]Department of Renal Diseases, The Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore a new method for early avascular necrosis of the femoral head (AVNFH) therapy. Methods Sixty-nine New Zealand adult rabbits with a mean weight of 2.8 kg after AVNFH establishment were randomly divided into 3 groups. In group 1, the deproteinized bone (DPB) combined with the recombinant plasmid pcDNA3.1/VEGF165 was implanted in the drilled channel of the necrotic femoral head. In group 2, only DPB was implanted. In group 3, only channel was drilled without DPB or plasmid implantation. Femoral head specimens were obtained at 3 d, 1, 2, 4 and 8 weeks after operation. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the security of this manipulation were examined by RT-PCR, Western blotting and immunohistochemical techniques. X-ray examined bone formation generally. Angiogenesis and repair of the femoral head were observed by histological and histomorphometric analysis. Results In group 1, the expression of VEGF was detected in the femoral head implanted by DPB-VEGF compound. The expression of VEGF165 mRNA and protein reached the maximum in 1 week after implantation and lasted more than 3 weeks, but none of them were detected in distant organs. The femoral head implanted by DPB-VEGF compound showed a significant difference in vascularization at 2 and 4 weeks and a significant difference in bone formation at 2, 4 and 8 weeks after operation from those in other groups on histomorphometric analysis ($P<0.01$). Conclusion The transfection of the VEGF165 gene enhances local angiogenesis in early stage and DPB-VEGF compound improves bone formation. VEGF gene therapy on rabbit AVNFH is effective and secure. The deproteinized bone combined with VEGF gene provides a potential method for therapy of osteonecrosis.

Key words: deproteinized bone; vascular endothelial growth factor; gene therapy; avascular necrosis of the femoral head

基金项目: 重庆市卫生局资助项目(002010)
Supported by the Research Foundation of Chongqing Bureau of Public Health (002010)

作者简介: 曹 凯(1975-),男,江西省九江市人,博士,主治医师,讲师,主要从事脊柱创伤与关节疾病方面的研究,发表论文9篇,现在南昌大学第一附属医院骨科,南昌 330006。电话:(0791)8692529,E-mail: kaicao2003@yahoo.com.cn

通讯作者: 黄 伟,电话:(023)89011202

收稿日期: 2005-01-28;**修回日期:** 2005-08-01

股骨头缺血性坏死(avascular necrosis of the femoral head, AVNFH)是一种发生在髋关节的棘手疾病[1]。在股骨头塌陷之前寻求一种改善血供,修复股骨头的方法是有意义之举。非手术治疗方法局限于观察和/或保护性负重,对于阻止疾病的进一步发展并没有效果。手术治疗的方法目前有髓芯转孔减压、结构和非结构骨瓣移植、血管化骨瓣移植和股骨截骨术等。髓芯转孔减压、骨瓣移植和股骨截骨术等手术治疗较适合早期股骨头坏死。然而 IOP (intraosseous pressure) 的升高与骨坏死并没有因果联系,所以髓芯转孔减压的目的值得商榷,术后骨折是主要的并发症;转孔减压联合松质骨瓣移植效果和风险与单纯转孔减压相同;血管化的骨瓣移植结果与非血管化的骨瓣移植结果并无显著的差异性,但操作更复杂,代价更高;成角截骨术的主要风险是术后骨不连,并为晚期人工关节假体置换设下障碍;旋转截骨术的技术要求高,风险与成角截骨术相似[2]。所以我们用 DPB-VEGF 复合物植入坏死股骨头以诱导血管的发生,促进股骨头的修复,现将结果小结如下。

1 材料与方法

1.1 材料

含人 VEGF165 全长 cDNA 的真核表达质粒 pcDNA3.1/VEGF165 由本研究室提供。琼脂粉、酵母提取物、胰蛋白胨购自 Sigma 公司,限制性内切酶(*Eco*R Ⅰ, *Xba* Ⅰ)购自 TaKaRa 公司, Marker (pBR322DNA/Alu Ⅰ)、Marker (λDNA/*Eco*R Ⅰ + *Hind*Ⅲ) 购自 Ferments 公司,TRIZOL、Taq DNA 聚合酶购自上海生工,M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Olig DT 购自 Promega 公司,PCR 引物由上海生工合成,马血清购自 PAA 公司,一抗小鼠抗人 VEGF 单克隆抗体、山羊多抗 actin 购自 Santa Cruz 公司,抗兔Ⅰ型胶原多克隆抗体购自博士德公司,二抗辣根酶标记山羊抗小鼠、碱磷酶标记马抗小鼠 IgG,辣根酶标记马抗山羊 IgG 购自北京中山公司,辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自博士德公司, BCIP/NBT, DAB 显色剂购自北京中山公司。

1.2 动物模型的制作和 DPB-VEGF 的置入

SDS 碱裂解法大量制备质粒 pcDNA3.1/VEGF165,聚乙二醇差异沉淀法纯化质粒。*Eco*R Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 双酶切鉴定确认纯化后的产物。过氧化氢乙醚法脱蛋白脱脂制备同种异体兔 DPB,直径为 3.0 mm 的小棒状,环氧乙烷消毒后复合 500 μg pcDNA3.1/VEGF165 质粒,无菌条件下晾干。使用马血清静脉注射和地塞米松腹腔注射联合诱导 AVNFH,经 MRI 筛选动物模型[3]。69 只 AVNFH 造模成功后的新西兰大白兔按随机分组设计分成 3 组,平均体质量 2.8 kg,每组 23 只。第 1 组,在双侧股骨近端外侧沿股骨颈钻一直径 3.0 mm 的隧道。DPB-VEGF 沿隧道植入股骨头内。第 2 组植入 DPB。第 3 组仅钻一隧道。股骨头标本分别于术后 3 d,1、2、4、8 和 16 周获取。

1.3 DPB-VEGF 置入后骨髓组织 VEGF165 mRNA 及蛋白的检测

取术后 3 d, 1、2 和 4 周标本骨髓组织 300 mg,TRIZOL 提取其中 100 mg 组织总 RNA,逆转录成 cDNA。PCR 扩增反应参数:95 ℃ 5 min, 94 ℃ 60 s, 62 ℃ 60 s, 72 ℃ 45 s 和 72 ℃ 5 min 30 个循环。VEGF165 引物序列:上游 5′-GAGGGCAGAATCATCACGAAGT-3′ 和下游 5′-TCCTATGTGCTGGCCTTGGTGA-3′,扩增片段长为 257 bp。内参照为 GAPDH:上游 5′-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3′ 和 下游 5′-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3′,扩增片段长为 195 bp,PCR 产物琼脂糖凝胶电泳。剩下 200 mg 组织用悬浮裂解液 1 ml 冰上匀浆 30 min,裂解物 4 ℃, 4 000×*g* 离心 10 min 取上清进行蛋白定量。SDS-PAGE 后将蛋白转膜。封膜 2 h 后与一抗(小鼠抗人 VEGF 单抗)、二抗(辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG,辣根酶标记马抗山羊 IgG)结合后 DAB 显色,actin 为内参照。取第 1 组各时间点动物心,肝,脾,肺和肾脏组织各 300 mg,100 mg 用于 VEGF165 mRNA 的检测,另 200 mg 用于 VEGF165 蛋白的检测,方法同上。

1.4 免疫组织化学分析

取术后 1、2、4、8 周标本组织制成制片。脱蜡、脱水后 3% 过氧化氢消除内源性过氧化物酶,山羊血清封闭 20 min。分别与小鼠抗人 VEGF 单抗,抗兔Ⅰ型胶原多抗 4 ℃孵育过夜,另用 PBS 替代一抗作为对照。与二抗(碱磷酶标记马抗小鼠 IgG,辣根酶标记山羊抗兔 IgG)室温结合 20 min 后分别用 BCIP/NBT, DAB 显色。核固红,苏木精复染色。每张Ⅰ型胶原切片随机选择 5 个视域,图像分析系统进行分析,结果用面积积分光密度表示(阳性积分光密度/统计场面积)。

1.5 X 线大体观察骨形成

各组动物术后 2、4、8、16 周进行普通 X 线片,观察骨痂形成情况。

1.6 墨汁灌注微血管分析

取术后 1、2、4、8 周动物麻醉后,腹主动脉插管,灌洗。从下腔静脉放血,待灌洗至双下肢肌肉和甲床变白,下腔静脉流出液变清亮。灌入中国墨汁至下肢肌肉和甲床变为深黑色,取下股骨头标本放置在 4 ℃ 冰箱中冷藏 24 h。标本制成透明切片,镜下观察,每张透明切片随机取 5 个视域,用图像分析仪进行分析,结果用面积积分光密度表示(阳性积分光密度/统计场面积)。

1.7 HE 染色组织形态学分析

取术后 1、2、4、8、16 周股骨头标本制成 HE 切片,镜下观察新骨形成。

1.8 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS8.2 软件进行完全随机设计的方差分析和 Tukey 检验。

2 结果

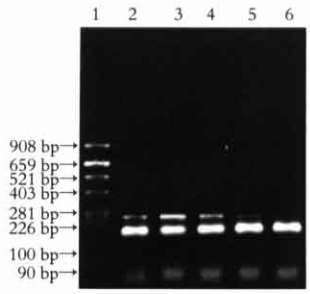
2.1 pcDNA3.1/VEGF165 纯化后产物的鉴定和动物模型的建立

*Eco*R Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ 双酶切后电泳显示 pcDNA3.1 (约 5.4

kb）和 VEGF165（约600 bp）两条条带，说明大量扩增、纯化后的产物为 pcDNA3.1/VEGF165。所有被筛选动物 MRI Stir 序列下显示股骨头内为不均质高信号，提示股骨头早期缺血坏死，模型建立成功。

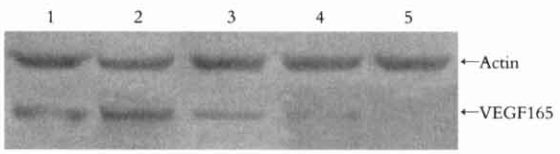
2.2　股骨头髓腔内 VEGF165 mRNA 和蛋白的表达

第1组髓腔组织 RT-PCR 扩增出产物为 257 bp 的 VEGF165 目的条带和 195 bp 的 GAPDH 条带。术后3 d 即有 VEGF165 mRNA 的表达，术后1周达到高峰，表达时间超过3周（图1）。Western blot 结果显示第1组有 VEGF165 蛋白的表达，术后1周达到高峰，术后第4周检测不到目的蛋白的表达（图2）。第2组和第3组无 VEGF165 mRNA 和蛋白的表达。第1组术后动物心，肝，脾，肺和肾脏组织亦无 VEGF165 mRNA 和蛋白的表达。



1：标准（pBR322DNA/Alu Ⅰ）；2-6：术后3 d，1、2、3、4周

图1　兔股骨头髓腔组织 RT-PCR 产物电泳



1-5：术后3 d，1、2、3、4周

图2　兔股骨头髓腔组织 Western blot 结果

2.3　免疫组织化学结果

第1组术后1周和2周可见股骨头髓腔内部分骨髓细胞蓝染，附着于骨小梁的成骨细胞也有蓝染（图3A）。这证实了 pcDNA3.1/VEGF165 质粒成功转染了这些细胞并被它们表达。术后4周不能检测到 VEGF165 的表达。而在其余组，术后1，2和4周都没有检测到 VEGF165 的表达。

术后2、4、8周Ⅰ型胶原被染成棕黄色（图3B）。图像分析系统分析显示术后2、4、8周第1组Ⅰ型胶原的面积积分光密度值明显高于其他组，差异有显著性（$P<0.01$）（表1）。

2.4　X 线大体观察结果

第1组术后2周植入物周围出现透光区、隧道内和钻孔处可见骨痂形成，4周后周围透光区逐渐变模糊、密度均匀，隧道内、钻孔处可见大量骨痂形成，8周透光区消失、骨痂形成较4周多。第2组术后4周和8周骨痂少于第1组；第3组术后4周和8周骨痂生成不明显（图4）。第1组和第2组术后16周植入区密度与周围骨质基本一致或难以辨认植入区。第3组术后16周钻孔隧道内低密度影一直存在。

表1　Ⅰ型胶原免疫组织化学图像分析结果

组别	术后2周	术后4周	术后8周
第1组	0.29±0.11	0.55±0.13	0.67±0.10
第2组	0.12±0.04[a]	0.33±0.09[b]	0.45±0.12[c]
第3组	0.07±0.04[a]	0.23±0.10[b]	0.31±0.08[c]

a：$P<0.01$，b：$P<0.01$，c：$P<0.01$，与第1组比较

2.5　术后新生微血管的形成

第1组术后2和4周，在修复区内存在大量的新生血管（图3C），与其他组相比有显著性差异（$P<0.01$）。但术后1周和8周各组无显著性差异（$P>0.05$）（表2）。

表2　微血管图像分析结果（IOD/μm^2，$\bar{x}\pm s$）

组别	术后1周	术后2周	术后4周	术后8周
第1组	0.07±0.04	0.33±0.10	0.57±0.16	0.56±0.11
第2组	0.05±0.04	0.17±0.09[a]	0.35±0.08[b]	0.48±0.12
第3组	0.06±0.04	0.18±0.08[a]	0.22±0.09[b]	0.48±0.18

a：$P<0.01$，b：$P<0.01$，与第1组比较

2.6　术后新骨的形成

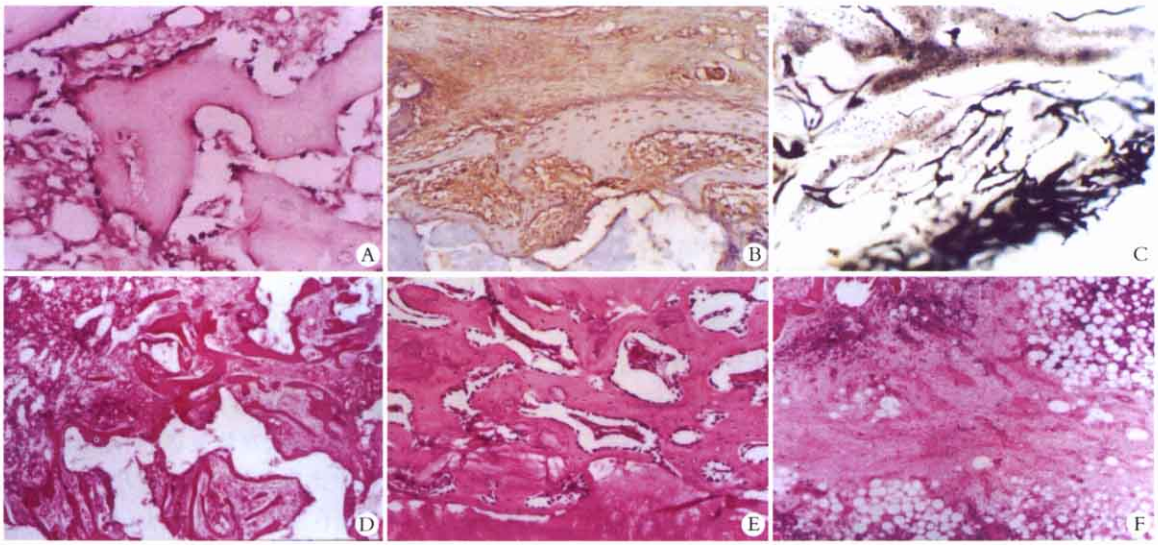
术后1周股骨头隧道内充满了骨髓细胞和红细胞，同时第1组植入区周围有肉芽组织形成，间充质细胞大量增生，有少量纤维组织围绕 DPB；

术后2周第1组可见胶原纤维和新骨附着于 DPB 和死骨。隧道及髓腔内充满增生的间充质细胞和成纤维细胞。第2组可见胶原纤维附着于 DPB 和死骨，新骨的形成明显比第1组弱。第3组仅见少量胶原纤维。

术后4周第1组隧道内可见大量伴有成骨细胞围绕的新生幼稚骨小梁，同时 DPB 和死骨表面也有大量新生的幼稚骨小梁，未见明显的异物反应。第2组修复组织主要为胶原纤维和早期骨样组织，DPB 和坏死骨边缘可见早期骨样组织开始生长。第3组隧道内见到丰富的胶原，增生的成纤维细胞和间质细胞较术后2周明显增多。

术后8周，第1组可见大量较成熟骨小梁伴随新生骨小梁和胶原形成，骨小梁部分替代了 DPB 和死骨，同时可见部分 DPB 已被吸收。第2组可见隧道内新生骨小梁发生并附着、替代部分 DPB 和死骨，DPB 开始吸收。第3组见到新生骨组织和胶原纤维充满髓腔（图3D-F）。

术后16周，第1、2组可见到包括各种骨髓细胞和成熟骨小梁在内的正常股骨头髓内结构，DPB 大部分已被吸收。而在第3组，成骨明显，但骨组织充满骨髓腔，缺少排列有序的成熟骨小梁结构，髓内结构欠正常。



A：第1组术后2周大量蓝染的成骨细胞附着于骨小梁(VEGF免疫组化染色×100)；B：第1组术后4周棕黄色的Ⅰ型胶原分布在新生骨小梁和DPB周围(Ⅰ型胶原免疫组化染色×100)；C：第1组术后2周修复区内存在大量的新生血管(中国墨汁灌注×200)；D：第1组术后8周股骨头大量较成熟骨小梁形成，部分替代了DPB和死骨，骨小梁表面有较多的成骨细胞附着，同时可见部分DPB已被吸收(HE×40)；E：第2组术后8周股骨头隧道内新生骨小梁发生并附着、替代部分DPB和死骨，DPB开始吸收(HE×200)；F：第3组术后8周股骨头新生骨组织和胶原纤维充满髓腔(HE×40)

图3 术后兔股骨头免疫组化与组织形态学分析



A：第1组周围透光区逐渐变模糊、密度均匀，隧道内、转孔处可见大量骨痂形成；B：第2组植入物周围可见少量骨痂形成；C：第3组隧道内无骨痂生成

图4 术后4周股骨头X线片表现

3 讨论

AVNFH的病理过程是由纤维血管组织的侵入和活骨边缘死骨的吸收为特征的自然修复。破坏性的死骨吸收同时缺乏伴随连续有效的新骨形成导致关节面的塌陷和应力的失稳。其最终导致AVNFH晚期继发性的关节破坏[4]。在自发的修复过程中存在血管发生和新骨形成缓慢，而坏死骨小梁吸收迅速这一矛盾，因此，促进微血管的增生和新骨的形成显得特别重要。

DPB具有天然的密集微孔系统，极有利于新生毛细血管的长入与间质细胞的迁入，从而诱导骨的发生[5]。过氧化氢乙醚法制备的DPB与Oswestry骨，Kiel骨和乙醇法制备的DPB相比有更好的机械强度，更适合作为骨移植材料。Schwartz[6]认为DPB有诱导促进骨发生的能力。笔者在实验中观察到在植入的DPB周围有骨诱导现象，术后8周诱导骨形成骨小梁，DPB开始吸收降解(图3E)。同时，DPB拥有良好的细胞相容性和组织相容性[7,8]。本实验中，光镜下观察早期见DPB周围有少量淋巴细胞浸润，后期无炎性细胞浸润。大体观察术后无1例发生局部红肿或渗液，创口愈合良好。显示DPB为一较为理想的骨移植修复材料。

DPB的“活化”有赖于周围新生血管和间质细胞的迁入[5]。新生血管形成可能与多种生长因子诱导

有关,包括碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子β(transforming growth factor-beta, TGF-β)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)和血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等。其中VEGF的优势在于既可刺激血管形成又可促进骨的形成和改建。另外,VEGF可介导其他因子的作用,多数骨诱导因子促进骨修复可能是通过刺激VEGF的产生来实现的[9]。实验证实DPB复合VEGF后,可增加局部微血管的形成,能增进DPB与受体骨愈合[10]。但VEGF蛋白半衰期短,注入体内易稀释,故外源给予VEGF蛋白质进行治疗效力有限,VEGF基因治疗可克服单纯蛋白质治疗的缺点。本实验观察到DPB-VEGF组术后2周和4周新生血管明显多于其他组($P<0.01$),新骨形成比其他组也更早(图3C、D)。以往认为VEGF受体只表达在内皮细胞上,事实上成骨细胞也表达VEGF受体。成骨细胞不但产生,同时也应答VEGF,VEGF可实现对成骨细胞的趋化和分化并促进基质的矿化[9,11]。实验中在DPB-VEGF组发现大量的成骨细胞黏附于DPB,死骨和新生骨小梁上。这些蓝染的成骨细胞还提示了VEGF165基因转染了成骨细胞并被其表达,或者成骨细胞应答了由其他细胞表达的VEGF165蛋白,或者两者兼有(图3A)。

Wolff[12]首次将表达荧光素酶的裸DNA质粒注射到小鼠的骨骼肌内,结果显示荧光素酶表达时间持续了2个月。人VEGF基因转染缺血骨骼肌后mRNA表达超过14 d,在缺血骨骼肌中的转染效率是正常骨骼肌的6倍[13]。Yang等[14]的实验显示坏死股骨头内转基因后两周仍可检测到VEGF165 mRNA的表达,但实验中以胶原作为承载体可能不利于VEGF165基因的转染以及VEGF165蛋白分泌后的扩散。本实验中VEGF165 mRNA和蛋白在兔缺血坏死股骨头内表达持续时间超过3周(图1,2),同时在心,肝,脾,肺和肾脏未检测到VEGF165的表达,说明VEGF基因治疗兔AVNFH有效,无"远隔效应"。本实验用DPB-VEGF复合物植入坏死股骨头以诱导血管的发生,促进早期坏死股骨头的修复与现有的治疗方法相比较,其优点有:较单纯髓芯转孔减压、非血管化骨瓣移植成血管成骨更早,本实验第1组早期血管形成较第2和第3组多,结果具有显著性差异(表2),早期成骨较后两组多,结果具有显著性差异(表1),骨周转较后两组快,术后远期可恢复股骨头髓内正常结构;较血管化骨瓣移植操作更简单,创伤更小,无需进行血管显微吻合,操作过程与髓芯转孔减压相似。

VEGF165基因转染可促进局部血管的早期形成,DPB-VEGF复合物可增加骨形成,促进AVNFH的修复。DPB联合VEGF165基因治疗为早期骨坏死的修复提供了理论基础。

参考文献:

[1] DRESCHER W, FURST M, HAHNE H J, *et al*. Survival analysis of hips treated with flexion osteotomy for femoral head necrosis[J]. J Bone Joint Surg Br, 2003, 85(7): 969-874.

[2] STULBERG B N. Osteonecrosis: what to do, what to do[J]! J Arthroplasty, 2003, 18(3 Suppl 1): 74-79.

[3] 曹　凯, 安　洪, 蒋电明,等. 骨坏死模型中脂类代谢异常对骨修复重建的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(35): 7952-7953.

[4] PLENK H JR, HOFMANN S, BREITENSEHER M, *et al*. Pathomorphological aspects and repair mechanisms of femur head necrosis[J]. Orthopade, 2000, 29(5): 389-402.

[5] 蒋电明, 安　洪, 吴祖尧. 异体脱蛋白骨关节移植的初步实验与临床应用[J]. 伤残医学杂志, 1998, 6(1): 5-8.

[6] SCHWARTZ Z, WEESNER T, VAN DIJK S, *et al*. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation[J]. J Periodontol, 2000, 71(8): 1258-1269.

[7] 李彦林,杨志明,解慧琪,等.生物衍生骨支架材料的体外细胞相容性实验研究[J].中国修复重建外科杂志, 2001, 15(4): 227-231.

[8] 杨志明,李彦林,解慧琪,等.生物衍生骨支架材料的组织相容性研究[J].中华整形外科杂志, 2002, 18(1): 6-8.

[9] STREET J, BAO M, DEGUZMAN L, *et al*. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(15): 9656-9661.

[10] 孟纯阳, 安　洪, 蒋电明,等. 带蒂骨膜包裹脱蛋白骨、血管内皮细胞生长因子复合体修复关节端缺损的实验研究[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(7): 413-416.

[11] TOMBRAN TINK J, BARNSTABLE C J. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(2): 573-579.

[12] WOLFF J A, MALONE R W, WILLIAMS P, *et al*. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*[J]. Science, 1990, 247(4949 Pt 1): 1465-1468.

[13] TSURUMI Y, KEARNEY M, CHEN D, *et al*. Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene[J]. Circulation, 1997, 96(9 Suppl): II-382-388.

[14] YANG C, YANG S, DU J, *et al*. Vascular endothelial growth factor gene transfection to enhance the repair of avascular necrosis of the femoral head of rabbit[J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(10): 1544-1548.

(编辑　刘洪娥)