doi:10.11659/jjssx.01E021120

·基础研究·

脂肪干细胞旁分泌因子干预兔激素性股骨头缺血性坏死的研究

陈军平[1],谭伟源[1],张菊芳[1],李松军[1],邝立鹏[1],余杰锋[1],刘立军[2],张 炜[1] [1.遵义医科大学第五附属(珠海)医院骨科,广东 珠海 519100;2.中山大学附属第一医院骨科,广东 广州 510080]

[摘 要] **目的** 探讨脂肪干细胞(ADSCs)旁分泌因子治疗家兔激素性股骨头缺血性坏死(SANFH)的效果。**方法** 将63只SPF级雌性家兔随机分为对照组、模型组和干预组,每组21只,模型组和干预组造模成功后分别于股骨头关节腔注射生理盐水和ADSCs旁分泌因子。4周后评价3组家兔血液流变学指标、股骨头HE染色切片和MRI最大灌注参数,使用放射免疫法测定家兔血清骨形态发生蛋白-2(BMP-2)和转化生长因子-β(TGF-β)水平。**结果** 治疗后,对照组切片未见明显异常;模型组骨细胞核固缩、坏死,骨小梁中有大量空骨陷窝形成,成骨细胞缺失,血管内血栓形成,造血细胞坏死;干预组骨细胞核固缩不明显,骨陷窝较对照组略增加,部分细胞核周围可见空晕形成。治疗前,3组MRI最大灌注参数比较差异有统计学意义($F=341.625$,$P<0.05$),且干预组和模型组均显著低于对照组($P<0.05$),干预组与模型组比较差异无统计学意义($P=0.437$)。治疗后,3组MRI最大灌注参数间差异有统计学意义($F=89.761$,$P<0.05$),且对照组和干预组均显著高于模型组($P<0.05$),干预组与对照组比较差异无统计学意义($P=0.331$)。治疗后,对照组MRI最大灌注参数与治疗前比较差异无统计学意义($P>0.05$);干预组和模型组MRI最大灌注参数均较治疗前显著升高($P<0.05$)。治疗后,3组血液流变学指标比较差异具有统计学意义($P<0.05$),其中模型组血液流变学指标均显著高于对照组和干预组($P<0.05$)。与治疗前比较,治疗后干预组血液流变学指标均显著下降($P<0.05$)。与治疗前比较,治疗后干预组BMP-2和TGF-β水平均显著升高($P<0.05$),且治疗后干预组显著高于模型组($P<0.05$)。**结论** SANFH家兔关节腔内注射ADSCs旁分泌因子可改善组织病理情况,提高组织最大灌注参数,纠正血液流变学异常,促进股骨头修复。

[关键词] 脂肪干细胞;股骨头坏死;激素性股骨头缺血性坏死;HE染色;最大灌注参数

[中图分类号] R687.4 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-01-26

Study on the intervention of paracrine factor of adipose-derived stem cells on steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rabbits

CHEN Jun-ping[1], TAN Wei-yuan[1], ZHANG Ju-fang[1], LI Song-jun[1], KUANG Li-peng[1], YU Jie-feng[1], LIU Li-jun[2], ZHANG Wei[1] [1. Department of Orthopedics, Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai Guangdong 519100, China; 2. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou Guangdong 510080, China]

Abstract: Objective To investigate the effect of paracrine factor of adipose-derived stem cells (ADSCs) in the treatment of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head (SAFNH) in rabbits. **Methods** A total of SPF grade female rabbits were randomly divided into the control group, the model group and the intervention group, with 21 rabbits in each group. Rabbits in the model group and the intervention group were injected with saline and paracrine factor of ADSCs into the joint cavity of the femoral head respectively after successful modeling. The hemorheology indexs, HE staining sections of femoral head and MRI maximum perfusion parameters in the three groups were evaluated after 4 weeks, and the levels of serum bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and transforming growth factor-β (TGF-β) were detected by radioimmunoassay method. **Results** After treatment, no obvious abnormality was found in the sections of the control group; in the model group, nuclear pyknosis and necrosis of the osteocyte nuclei were seen, a large number of empty bone lacunas were formed in the trabeculae, with absent osteoblasts, intravascular thrombosis and hematopoietic cell necrosis; in the intervention group, nuclear pyknosis of the osteocyte nuclei was not obvious, the bone lacuna was slightly increased compared with the control group, and halo formation around some nuclei was seen. Before treatment, there were statistically significant differences in MRI maximum perfusion parameters among the three groups ($F=341.625$, $P<0.05$), and the intervention group and the model group were significantly lower than the control group ($P<0.05$), but there was no significant difference between the intervention group and the model group ($P=0.437$). After treatment, there were statistically significant differences in the MRI maximum perfusion parameters among the three groups ($F=89.761$, $P<0.05$), and the control group and the intervention group were significantly higher than the model group ($P<0.05$), while there was no statistically significant

[基金项目] 广东省珠海医学科技计划项目(20191210E030081)

[通信作者] 陈军平,E-mail:psbycjply@163.com

difference between the intervention group and the control group ($P=0.331$). There was no significant difference in the MRI maximum perfusion parameters in the control group before and after treatment ($P>0.05$); the MRI maximum perfusion parameters in both the intervention group and the model group after treatment were significantly higher than those before treatment ($P<0.05$). There were statistically significant differences in hemorheology indexs among the three groups after treatment ($P<0.05$), in which hemorheology indexes in the model group were significantly higher than those in the control group and the intervention group ($P<0.05$). Hemorheology indexes of the intervention group after treatment were lower than those before treatment ($P<0.05$). The levels of BMP-2 and TGF-β after treatment were significantly higher than those before treatment in the intervention group ($P<0.05$), and the intervention group was significantly higher than the model group after treatment ($P<0.05$). **Conclusion** Intra-articularly injected paracrine factor of ADSCs into rabits with SANFH can improve the histopathological condition, increase the maximum perfusion parameters, correct the hemorheological abnormalities, and promote the repair of the femoral head.

Keywords: adipose-derived stem cells; necrosis of femoral head; steroid-induced avascular necrosis of the femoral head; HE staining; maximum perfusion parameter

长期高剂量使用激素导致的股骨头缺血性坏死称为激素性股骨头缺血性坏死(steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, SANFH),其致残率较高,是骨科常见的难治症之一。目前,SANFH 主要治疗手段包括髋关节牵引制动、中药治疗、钙剂治疗等,但都缺乏确切疗效。脂肪组织遍布于哺乳动物全身,不仅维持能量代谢,而且有内分泌作用,给组织工程和再生医学领域提供了新的研究方向。其中干细胞工程将脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)用于骨关节炎、糖尿病、心脏病、乳房切除后和面部创伤后修复中的软组织再生和重建[1],也有研究提出 ADSCs 可用于修复缺血坏死的股骨头,帮助其重建骨小梁等结构[2],让 SANFH 患者看到了治疗的新曙光。有观点认为,ADSCs 在一些组织损伤的治疗过程中主要依赖其旁分泌功能作用[3],而目前对于 ADSCs 旁分泌因子的研究主要集中于心肌梗死、皮肤软组织修复及抗衰老等方面,国内外尚未见 ADSCs 治疗 SANFH 的相关报道。因此,本研究拟建立兔 SANFH 模型,评价 ADSCs旁分泌因子治疗兔 SANFH 的疗效。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

实验动物:63 只体质量 2 ~ 3 kg 的 SPF 级雌性家兔,由四川大学华西医院动物实验中心提供,实验动物合格证号:SCXK(川)2014 - 0013。主要仪器:血液流变分析仪(LG-R-80A,北京世帝科学仪器有限公司)、signal excite HD-1.5 Twin-speed MRI 扫描仪(GE,美国)、显微镜(Leica DM3000, Leica,德国)。主要试剂:4% 多聚甲醛固定液(生产批号:20190103,银川市伟博鑫生物科技有限公司)、甲基强的松龙琥珀酸钠(生产批号:20190723,普强苏州制药有限公司)、注射用普鲁卡因青霉素(生产批号:A1900417,华北制药集团先泰药业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与动物造模[4] 随机取 42 只家兔,采用马血清联合甲基强的松龙琥珀酸钠建立 SANFH 模型:取马血清(10 mL/kg)于兔耳缘静脉注射,3 周后重复注射 1 次;重复注射马血清 2 周后在兔腹腔内注射甲基强的松龙琥珀酸钠(45 mg/kg),每天 1 次,连续 3 d。注射激素期间同时肌肉注射青霉素 10 万单位预防感染,每天1 次,连续 7 d。通过电子计算机 X 射线断层扫描机行双侧股骨头断层扫描成像,骨小梁大量空骨陷窝形成或存在核固缩骨细胞,且骨小梁周围骨髓组织发生坏死则可定义为骨坏死,提示造模成功。造模完成后将 42 只家兔随机分为模型组和干预组,每组 21 只,其中干预组在家兔的股骨头关节腔注射 ADSCs旁分泌因子 100 μL,制作方法:取 2×10^6 个 ADSCs细胞混悬于 1 mL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中,取 0.1 mL PBS 与 0.1 mL 透明质酸以 1∶1的比例混合制成;模型组家兔在股骨头关节腔注射等量生理盐水。其余 21 只家兔设为对照组,每次均在兔耳缘静脉和腹腔内注射等量的生理盐水,同时预防性肌肉注射青霉素预防感染,每天 1 次,连用 7 d。

1.2.2 家兔 ADSCs 制备[5] 无菌条件下取各组家兔颈背部脂肪组织约 3 g,去除血管及浅筋膜等组织后用 PBS 反复冲洗,剪碎至糊状,置于 37 ℃恒温振荡水浴摇床中,并注入浓度为 0.1% 的Ⅰ型胶原酶0.2 mL。使用等体积完全培养基中和,离心,弃上清,沉淀,重悬,80 目尼龙筛网过滤后接种于培养基中,37 ℃、5% CO_2 孵箱内培养。5 d 后换液,吹去红细胞。待细胞长满培养孔面积的 60%,使用 0.25% 胰蛋白酶消化,进行原代传代。最终将细胞制成 2×10^6/mL 的 ADSCs 条件培养液备用。

1.2.3 血液流变学指标检测 在治疗前及治疗4周后,于禁食12 h后在家兔耳缘静脉采血5 mL,使用血液流变分析仪测定家兔全血黏度、血浆黏度、红细胞聚集指数和红细胞压积等血液流变学指标。

1.2.4 血清软骨生长相关因子检测 取2 mL血样,于4 ℃以1 500 r/min离心5 min,取上清,放射免疫法测定样本骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)和转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)的含量。

1.2.5 MRI最大灌注参数检测 在治疗前及治疗4周后,以3%戊巴比妥钠麻醉家兔,使之仰卧于磁共振平台上,髋关节充分外展,将表面线圈固定于双侧髋关节外侧体表,对双侧髋关节进行动态增强核磁扫描。采用T1加权的超快梯度回波,在125 s内获得256张动态图像。预扫描15 s取得基线数值后,使用自动高压注射仪以0.5 mL/s的速度和0.5 mmol/kg的剂量通过耳缘静脉注射Gd-DTPA和6 mL生理盐水。选择股骨头位置作为感兴趣区测定信号强度。基线信号强度定义为前15 s获得的图像信号强度平均值,最大信号强度定义为125 s测定时间内的峰值。灌注参数最大信号增强=(最大信号强度-基线信号强度)/基线信号强度×100%,将双侧股骨头最大信号增强的平均值作为每只家兔灌注参数的评价指标。

1.2.6 HE染色观察病理形态 完成上述所有检测后,处死家兔,取双侧股骨头标本,10%多聚甲醛固定24 h,快速脱钙液脱钙16 h,常规石蜡包埋切片后行HE染色,中性树脂封片。显微镜下观察骨组织、骨髓组织、骨小梁及髓内脂肪组织的变化。

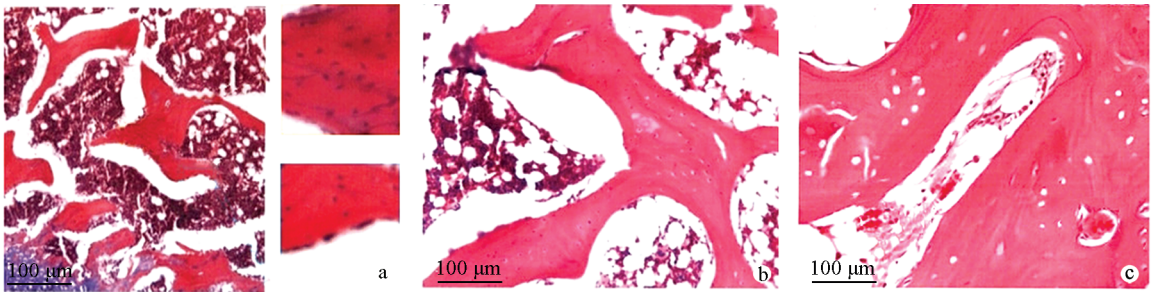
1.3 统计学方法

数据使用SPSS 24.0软件进行统计分析,Prism GraphPad 7制图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用*LSD*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 家兔股骨头病理切片结果

对照组家兔的股骨头标本中可见骨小梁排列整齐、致密饱满,有成骨细胞附着,骨细胞清晰可见,骨细胞核位于中央,髓腔内造血细胞丰富(图1a)。模型组家兔的股骨头标本中可见骨小梁周围成骨细胞缺失,形成大量空骨陷窝,血管内血栓形成;骨细胞核固缩、坏死,骨髓腔内出血,造血细胞坏死(图1b)。干预组家兔的股骨头标本中骨细胞核固缩不明显,骨陷窝较对照组略增加部分,部分细胞核周围可见空晕形成(图1c)。

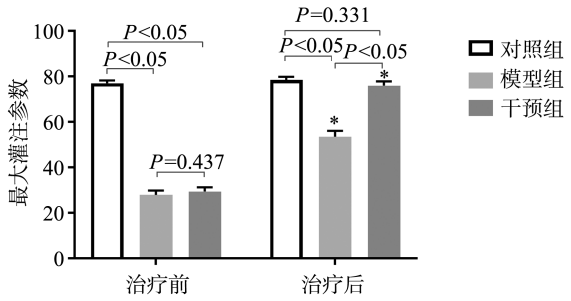


a:对照组;b:模型组;c:干预组

图1 家兔股骨头切片

2.2 家兔MRI最大灌注参数比较

治疗前,3组MRI最大灌注参数比较差异有统计学意义($F=341.625$, $P<0.05$),且干预组和模型组均显著低于对照组($P<0.05$),干预组与模型组比较,差异无统计学意义($P=0.437$)。治疗后,3组MRI最大灌注参数比较差异有统计学意义($F=89.761$, $P<0.05$),且对照组和干预组均显著高于模型组($P<0.05$),干预组与对照组比较差异无统计学意义($P=0.331$)。治疗后,对照组MRI最大灌注参数与治疗前比较差异无统计学意义($P>0.05$);干预组和模型组MRI最大灌注参数均较治疗前显著升高($P<0.05$),见图2。



*:与本组治疗前比较,$P<0.05$

图2 家兔最大灌注参数比较

2.3 治疗后家兔血液流变学指标比较

治疗前,干预组和模型组各血液流变学指标均高于对照组($P<0.05$);但干预组与模型组比较,差异无

统计学意义($P>0.05$)。与治疗前比较,治疗后干预组各血液流变学指标均显著下降($P<0.05$),对照组和模型组与治疗前比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。治疗后,3 组各血液流变学指标比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),且模型组均高于对照组和干预组($P<0.05$),干预组与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 家兔血液流变学指标比较

组别	时间点	全血黏度/(mPa·s^{-1})			血浆黏度	红细胞	红细胞
		高切(200 S^{-})	中切(100 S^{-})	低切(10 S^{-})	/mPa·s^{-1}	聚集指数	压积/%
对照组	治疗前	4.25±0.34	5.63±0.54	7.82±0.47	1.63±0.37	3.52±0.43	45.02±1.37
模型组		7.63±0.48*	8.86±0.43*	12.02±0.61*	4.12±0.51*	6.23±0.44*	50.07±1.35*
干预组		7.85±0.32*	8.93±0.52*	12.15±0.52*	4.27±0.43*	6.38±0.46*	49.87±1.43*
F		572.133	299.828	442.739	238.045	276.623	89.686
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
对照组	治疗后	4.02±0.32#	5.12±0.48#	7.43±0.44#	1.72±0.35#	3.03±0.34#	44.66±1.53#
模型组		6.57±0.41	7.45±0.36	9.92±0.59	3.59±0.32	5.12±0.32	48.18±1.04
干预组		4.04±0.35#△	5.37±0.53#△	7.54±0.26#△	1.83±0.23#△	3.32±0.18#△	44.81±1.36#△
F		344.758	160.847	204.668	249.710	322.556	47.340
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.003

*:与对照组治疗前比较,$P<0.05$;#:与模型组治疗后比较,$P<0.05$;△:与干预组治疗前比较,$P<0.05$

2.4 家兔血清 BMP-2 和 TGF-β 水平

治疗前,对照组 BMP-2 和 TGF-β 含量高于模型组和干预组($P<0.05$),模型组和干预组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与治疗前比较,治疗后干预组 BMP-2 和 TGF-β 水平均显著升高($P<0.05$),模型组和对照组 BMP-2 和 TGF-β 水平无明显变化($P>0.05$)。治疗后,模型组 BMP-2 和 TGF-β 水平低于干预组与对照组($P<0.05$),但干预组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 家兔血清 BMP-2 和 TGF-β 水平

组别	BMP-2/(ng·mL^{-1})		TGF-β/(ng·mL^{-1})	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	12.87±0.54	13.20±0.60#	16.52±1.05	16.65±1.10#
模型组	8.65±0.47*	9.50±0.88	12.57±0.41*	13.04±0.55
干预组	8.43±0.52*	11.94±0.63#△	12.38±0.63*	15.37±0.41#△
F	503.882	503.882	503.882	503.882
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

*:与对照组治疗前比较;$P<0.05$;#:与模型组治疗后比较,$P<0.05$;△:与干预组治疗前比较,$P<0.05$

3 讨论

一项研究表明,高剂量皮质类固醇(强的松类 > 20 mg·kg^{-1}·d^{-1})的使用与股骨头坏死之间存在显著相关性[6],而其长期使用是导致非创伤性股骨头坏死的主要原因[7],这可能是由于长期使用高剂量糖皮质激素可直接或间接导致凝血障碍,使血液处于高凝状态,显著降低股骨头和股骨颈血流量[8],随后出现血流不畅、缺血,最终导致缺血性股骨头坏死。研究表明,ADSCs 可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱等多种细胞,补充替代老化、缺损的组织细胞;还可通过旁分泌功能合成及分泌多种细胞因子、多肽类、气体分子等活性成分,提高受损细胞的生命力和抗凋亡能力。但也有研究认为,ADSCs 在一些组织损伤的治疗过程中主要依赖旁分泌功能,因而 ADSCs 的旁分泌功能成为了目前研究的热点[9]。本研究通过建立兔 SANFH 模型,探讨 ADSCs 旁分泌因子治疗兔 SANFH 的疗效。

通过 MRI 观察家兔股骨头组织内部血流的灌注情况,可以评估组织血液灌注状态[10]。Kolb 等[11]和 Momii 等[12]使用 MRI 评估坏死股骨头的血运重建,认为通过 MRI 可了解股骨头血流灌注情况,评估股骨头状态。本研究运用 MRI 评估家兔股骨头血液灌注情况,结果显示,干预组和模型组治疗后 MRI 最大灌注参数均显著上升,且干预组治疗后 MRI 最大灌注参数显著高于模型组,而治疗后干预组和对照组最大灌注参数差异无统计学意义。表明 ADSCs 可改善 SANFH 家兔股骨头的血液灌注情况,且经 ADSCs 旁分泌因子干预的家兔恢复情况显著优于模型组,可达到对照组水平,即与正常家兔无异。微循环中血液黏度主要受红细胞可变性和血浆黏度的影响[13],红细胞可变性下降可使微循环阻力增加、血液流动减慢,从而增加血液黏度。血液黏度的增加在血循环中表现为血流速度减慢、红细胞相互聚集,进而导致股骨头血液灌注量降低,使骨细胞处于缺血、缺氧状态,股骨头血供明显减少,最终导致股骨头缺血性坏死。Drescher 等[14]的研究表明,高剂量甲基强的松龙输注会导致猪的股骨头血液流变学改变,血流量减少,血浆高凝,最终导致股骨头坏死的发生。Chen 等[15]的研究表明,促红细胞生成素可通过抑制成骨细胞和骨细胞的凋亡及增加血

管内皮生长因子的表达,对糖皮质激素引起的股骨头坏死起到显著的保护作用。Worrall 等[16]的研究则认为血红蛋白红细胞压积比率对儿童股骨头坏死有较好的预测性。本研究结果显示,治疗后对照组和干预组高切、中切和低切全血黏度均显著低于模型组,且血浆黏度、红细胞聚集指数和红细胞压积也显著低于模型组,这表明经 ADSCs 旁分泌因子干预的家兔股骨头血液流动性显著优于模型组。BMP-2 可以补充分化成骨祖细胞的间充质细胞,刺激骨祖细胞分化为骨系细胞[17]。TGF-β 是一类细胞生长分化调节蛋白,能够促进骨膜中成骨细胞和成软骨细胞增生,促使骨细胞胶原及基质蛋白的合成和钙化,减少破骨细胞的形成,抑制骨吸收[18]。本研究发现,治疗后干预组 BMP-2 和 TGF-β 显著升高,且干预组显著高于模型组,这表明干预组股骨头坏死部位得到了修复,经 ADSCs 旁分泌因子干预可以促进股骨头的修复。

综上,ADSCs 旁分泌因子可以有效改善 SANFH 家兔组织的血液灌注和血液流变学参数,对 SANFH 有积极的治疗效果。但本研究为小样本单中心动物研究,研究时间较短,尚需大样本量、远期动物模型以及临床研究进一步证实。

[参考文献]

[1] Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells: a review[J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(4): 1111 – 1126. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011.

[2] Minteer D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2013, 129: 59 – 71. doi: 10.1007/10 – 2012 – 146.

[3] Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing[J]. Wound Repair Regen, 2014, 22(3): 313 – 325. doi: 10.1111/wrr.12173.

[4] Wen Q, Ma L, Chen YP, et al. A rabbit model of hormone-induced early avascular necrosis of the femoral head[J]. Biomed Environ Sci, 2008, 21(5): 398 – 403. doi: 10.1016/S0895 – 3988(08)60060 – 4.

[5] Kuroda K, Kabata T, Hayashi K, et al. The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2015, 16: 236. doi: 10.1186/s12891 – 015 – 0701 – 4.

[6] Cohen-Rosenblum A, Cui Q. Osteonecrosis of the femoral head[J]. Orthop Clin North Am, 2019, 50(2): 139 – 149. doi: 10.1016/j.ocl.2018.10.001.

[7] Yoon BH, Jones LC, Chen CH, et al. Etiologic classification criteria of arco on femoral head osteonecrosis part 1: glucocorticoid-associated osteonecrosis[J]. J Arthroplasty, 2019, 34(1): 163 – 168. e1. doi: 10.1016/j.arth.2018.09.005.

[8] Zhang Q, LV J, Jin L. Role of coagulopathy in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. J Int Med Res, 2018, 46(6): 2141 – 2148. doi: 10.1177/0300060517700299.

[9] Fracaro L, Senegaglia AC, Herai RH, et al. The expression profile of dental pulp-derived stromal cells supports their limited capacity to differentiate into adipogenic cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2753. doi: 10.3390/ijms21082753.

[10] 张海平,敖国昆,袁小东,等. 股骨头坏死磁共振灌注参数与 ARCO 分期的相关性[J]. 中国医学影像学杂志, 2016, 24(4): 316 – 320. doi: 10.3969/j.issn.1005 – 5185.2016.04.019.

[11] Kolb AR, Patsch JM, Vogl WD, et al. The role of the subchondral layer in osteonecrosis of the femoral head: analysis based on HR-QCT in comparison to MRI findings[J]. Acta Radiol, 2019, 60(4): 501 – 508. doi: 10.1177/0284185118786070.

[12] Momii K, Hamai S, Motomura G, et al. Revascularization of the necrotic femoral head after traumatic open anterior hip dislocation in a child: a case report[J]. J Med Case Rep, 2019, 13(1): 254. doi: 10.1186/s13256 – 019 – 2192 – 7.

[13] Köksal C, Ercan M, Bozkurt AK. Hemorrheological variables in critical limb ischemia[J]. Int Angiol, 2002, 21(4): 355 – 359. doi: 10.2176/nmc.40.244.

[14] Drescher W, Weigert KP, Bünger MH, 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. doi: 10.1016/j.orthres.2003.10.002.

[15] Chen S, Li JP, 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. doi: 10.3892/ijmm.2014.1644.

[16] Worrall D, Smith-Whitley K, Wells L. Hemoglobin to hematocrit ratio: the strongest predictor of femoral head osteonecrosis in children with sickle cell disease[J]. J Pediatr Orthop, 2016, 36(2): 139 – 144. doi: 10.1097/BPO.0000000000000409.

[17] Kišonaitė M, Wang X, Hyvönen M. Structure of Gremlin-1 and analysis of its interaction with BMP-2[J]. Biochem J, 2016, 473(11): 1593 – 1604. doi: 10.1042/BCJ20160254.

[18] Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-β and the TGF-β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(5): a021873. doi: 10.1101/cshperspect.a021873.

(编辑:龙小芬)