doi:10.11659/jjssx.10E022102

·基础研究·

髓芯减压联合胶原基骨修复材料、VEGF对股骨头坏死家兔骨密度及生物力学的影响

吕亚军,李宜炯,赵振拴,张宇宸,王 伟 (河北医科大学第一医院骨二科,河北 石家庄 050031)

[摘 要] **目的** 探讨髓芯减压联合胶原基骨修复材料、血管内皮生长因子(VEGF)对股骨头坏死(ONFH)家兔模型的股骨头骨密度及生物力学的影响。**方法** 30只家兔股骨头内注射无水乙醇建立ONFH模型,随机分为健康对照组(A组)、模型组(B组)、髓芯减压联合自体松质骨组(C组)、髓芯减压联合胶原基骨修复材料组(D组)及髓芯减压联合胶原基骨修复材料和VEGF组(E组),每组6只。治疗8周后,分别检测各组家兔股骨头的骨密度和生物力学参数(最大应力、弹性模量、刚度、最大载荷和能量吸收),HE染色观察股骨头形态。qRT-PCR检测各组家兔的股骨头组织中骨保护素(OPG)、血管内皮生长因子164(VEGF164)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、核因子κB受体活化因子配体(RANKL)和核因子κB受体活化因子(RANK)的mRNA水平。**结果** B组的骨密度较A组显著降低($P<0.05$),E组的骨密度显著高于B组、C组和D组($P<0.05$)。与A组相比,B组的空骨陷窝比率显著增高($P<0.05$);与B组相比,C组、D组和E组的空骨陷窝比率均降低,以E组最低($P<0.05$)。与A组相比,B组的股骨头生物力学参数显著降低($P<0.05$);与B组相比,C组、D组和E组的股骨头生物力学参数均升高,以E组最高($P<0.05$)。与B组、C组和D组相比,E组股骨头组织中OPG、VEGF164和VEGFR2的mRNA水平均升高($P<0.05$),RANKL和RANK的mRNA水平均降低($P<0.05$)。**结论** 髓芯减压联合胶原基骨修复材料、VEGF可有效提高ONFH家兔股骨头的骨密度和强度,促进损伤区域的骨形成和血管生成,促进坏死性股骨头的修复。

[关键词] 股骨头坏死;髓芯减压;胶原基骨修复材料;血管内皮生长因子;骨密度;生物力学
[中图分类号] R681.8 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-10-19

Effects of core decompression combined with collagen-based bone repair material and VEGF on bone mineraldensity and biomechanics in rabbits with osteonecrosis of femoral head

LYU Ya-jun, LI Yi-jiong, ZHAO Zhen-shuan, ZHANG Yu-chen, WANG Wei (Second Department of Orthopedics, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang Hebei 050031, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of core decompression combined with collagen-based bone repair material and vascular endothelial growth factor (VEGF) on bone mineral density and biomechanics of the femoral head in rabbit model of osteonecrosis of femoral head (ONFH). **Methods** The ONFH model was established by injecting absolute ethanol into the femoral head of 30 rabbits. Then the rabbits were randomly divided into the healthy control group (group A), the model group (group B), the core decompression combined with autologous cancellous bone group (group C), the core decompression combined with collagen-based bone repair material group (group D) and the core decompression combined with collagen-based bone repair material and VEGF group (group E), with 6 rabbits in each group. After 8 weeks of treatment, the bone mineral density and biomechanical parameters (maximum stress, elastic modulus, stiffness, maximum load and energy absorption) of the femoral head of rabbits in each group were detected respectively, and the morphology of the femoral head was observed by HE staining. The mRNA levels of osteoprotegerin (OPG), vascular endothelial growth factor 164 (VEGF164), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) and receptor activator of nuclear factor-κB (RANK) in the femoral head tissue of rabbits in each group were detected by qRT-PCR. **Results** The bone mineral density of group B was significantly lower than that of group A ($P<0.05$), and the bone mineral density of group E was significantly higher than those of group B, group C and group D ($P<0.05$). Compared with group A, the ratio of empty bone lacunae in group B was significantly higher ($P<0.05$). Compared with group B, the ratios of empty bone lacunae in group C, group D and group E were decreased, and group E was the lowest ($P<0.05$). Compared with group A, the biomechanical parameters of the femoral head in group B were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with group B, the biomechanical parameters of the femoral head in group C, group D and group E were increased, and group E was the highest ($P<0.05$). Compared with group B, group C and group D, the mRNA levels of OPG, VEGF164 and VEGFR2 in the femoral head tissue of group E were increased ($P<0.05$), while the mRNA levels of RANKL and

[基金项目] 河北省卫计委指导课题(ZD20140210)
[通信作者] 王 伟,E-mail:w3201@163.com

RANK were decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Core decompression combined with collagen-based bone repair material and VEGF can effectively improve the bone mineral density and strength of the femoral head of ONFH rabbits, promote bone formation and angiogenesis in the injured area, and promote the repair of necrotic femoral head.

Keywords: osteonecrosis of femoral head; core decompression; collagen-based bone repair material; vascular endothelial growth factor; bone mineral density; biomechanics

股骨头坏死(osteonecrosis of femoral head,ONFH)是一种发病率和致残率较高的常见骨科疾病[1],其发病机制复杂,目前尚缺乏可靠的治疗方法[2-3]。髓芯减压治疗ONFH疗效较为确切,可有效降低骨内压力并延缓疾病进展[4],但易受到骨坏死位置和范围限制[4]。植骨是髓芯减压治疗后的重要步骤,主要用于填充髓芯减压治疗后形成的空腔。胶原基骨修复材料是植骨的理想材料,其成分类似于天然骨,具有诱导成骨、可降解、易塑形、无免疫原性等特性,比天然骨更利于骨修复[5-6]。血管再生是骨修复的关键环节[7]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可吸引内皮细胞和破骨细胞,促进成骨细胞分化,在骨修复过程中发挥重要作用[8-10]。骨密度及生物力学是评价骨形成和修复的主要指标。本研究首次开发了髓芯减压联合胶原基骨修复材料、VEGF治疗ONFH的新型复合疗法,并建立家兔ONFH模型,观察该复合疗法对家兔ONFH模型骨密度及生物力学的影响,以期为ONFH的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物

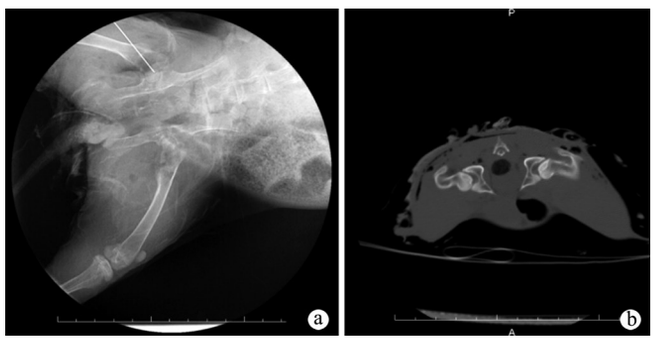
30只SPF级家兔购自河北医科大学实验动物中心[动物生产许可证号:SCXN(冀)2013-1-003],6月龄,体质量(2.21±0.29)kg。饲养条件:25 ℃、60%相对湿度、12 h昼夜交替。饲养期间不限制进食及饮水。本研究已获得河北医科大学第一医院医学伦理委员会批准(ZD20140210)。

1.2 动物模型的建立

参考文献[11]构建家兔ONFH模型。麻醉家兔并俯卧位固定,剪开大转子外侧筋膜和皮肤,钝性分离转子间的肌肉,X射线引导下于大转子外侧穿刺至股骨头中心,克氏针扩髓,将1 mL的无水乙醇注射至左侧股骨头中心,速度为0.1 mL/min(图1a)。造模6周后CT扫描观察到股骨头坏死、骨密度增高、股骨头外形改变等特征为建模成功(图1b)。

1.3 动物分组和治疗

将30只家兔随机分为健康对照组(A组)、模型组(B组)、髓芯减压联合自体松质骨组(C组)、髓芯减压联合胶原基骨修复材料组(D组)及髓芯减压联合胶原基骨修复材料和VEGF组(E组),每组6只。A组为未建模的家兔,B组家兔建模后正常饲养,不进行治疗;C组在髓芯减压基础上植入自体松质骨;D组在髓芯减压基础上植入胶原基骨修复材料(天津市赛宁生物工程技术有限公司);E组在髓芯减压基础上植入吸附有VEGF(约500 ng)的胶原基骨修复材料。各组在干预8周后进行后续实验。



a:X射线透视引导下的家兔ONFH造模;家兔ONFH造模6周后的髋关节冠状位CT图像

图1 动物模型的建立

1.4 骨密度的测量

40 mg/kg的硫喷妥钠腹腔注射麻醉家兔后固定,应用骨密度分析系统(QCT PRO V6.1)测定并分析骨密度。

1.5 组织病理学染色

C组、D组和E组ONFH模型家兔干预8周后,用40 mg/kg的硫喷妥钠腹腔注射麻醉家兔,用空气栓塞法处死,取出股骨头,EDTA脱钙后制作5 mm厚石蜡切片,进行HE染色。随机选取10个高倍视野,每个视野计数50个骨陷窝。空骨陷窝比率=空骨陷窝数/总骨陷窝数×100%。

1.6 生物力学测量

分离股骨头,用ETM103A微机控制电子万能试验机测量最大应力(N/mm^2)、弹性模量(kPa)、刚度(N/mm)、最大载荷(N)和能量吸收(N.mm)。

1.7 qRT-PCR

将股骨头标本放入液氮中,取出后移至液氮预冷

的研钵中研磨成粉末，然后用TRIzol试剂（美国Thermo Fisher）提取总RNA。使用SuperScrip Ⅳ逆转录酶（美国Thermo Fisher）进行逆转录，使用PowerUp SYBR Green Master Mix（美国Thermo Fisher）在荧光定量PCR仪上进行PCR。骨保护素（osteoprotegerin，OPG）、血管内皮生长因子164（vascular endothelial growth factor 164，VEGF164）、血管内皮生长因子受体2（vascular endothelial growth factor receptor 2，VEGFR2）、核因子κB受体活化因子配体（receptor activator of nuclear factor-κB ligand，RANKL）、核因子κB受体活化因子（receptor activator of nuclear factor-κB，RANK）和GAPDH引物序列见表1，扩增条件：95 ℃预变性10 min，95 ℃变性15 s，60 ℃退火60 s，40个循环。以GAPDH为内参基因，引物序列见表1，用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算mRNA相对表达量。

表1 引物序列

基因	引物序列
OPG	正向：5′-TGTTCTGGTGGACAGTTTGCC-3′
	反向：5′-CTCTCAATCTCGTCTGGGCTG-3′
VEGF164	正向：5′-AAAGCCCATGAAGTGGTGAAG-3′
	反向：5′-CATCTCTCCTATGTGCTGGCTTT-3′
VEGFR2	正向：5′-TTCATAATAGAAGGCGTCCAGG-3′
	反向：5′-GCATCATAAGGCAAGCGTTC-3′
RANKL	正向：5′-CCATCGGGTTCCCATAAAGTC-3′
	反向：5′-GATGCCTGAAGCAAATGTTGG-3′
RANK	正向：5′-AAGGGAGGGAAAACGCTGAC-3′
	反向：5′-CTGGAACCATCTTCTCCTCCC-3′
GAPDH	正向：5′-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3′
	反向：5′-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAA-3′

1.8 统计学分析

使用SPSS 22.0和GraphPad Prism 8.0软件分析数据，数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用单因素方差分析进行多组间比较，采用*LSD-t*检验进行两两比较。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

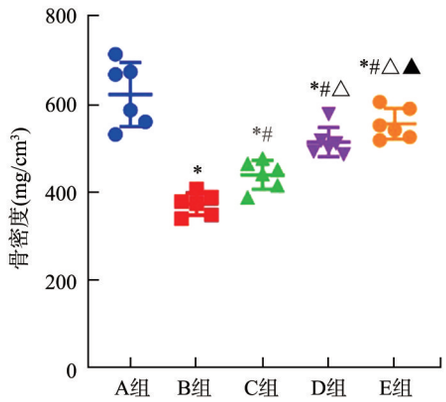
2 结果

2.1 各组家兔的一般情况观察

本研究过程中无家兔死亡。A组家兔精神状态正常，皮毛光泽，正常运动。B组家兔精神萎靡，皮毛无光泽，行动迟缓，弹跳能力降低。C组、D组和E组家兔精神状态较B组改善，皮毛恢复光泽，运动能力增加，其中E组家兔的一般情况优于其他组。

2.2 各组家兔的股骨头骨密度

各组家兔的股骨头骨密度差异有统计学意义（$P<0.001$）。与A组相比，B组的骨密度显著降低（$P<0.05$）；与B组相比，C组、D组和E组的骨密度均显著升高（$P<0.05$）；E组的骨密度显著高于C组和D组（$P<0.05$），见图2。



*：与A组比较，$P<0.05$；#：与B组比较，$P<0.05$；△：与C组比较，$P<0.05$；▲：与D组比较，$P<0.05$

图2 各组家兔的骨密度

2.3 各组家兔的股骨头组织病理学变化

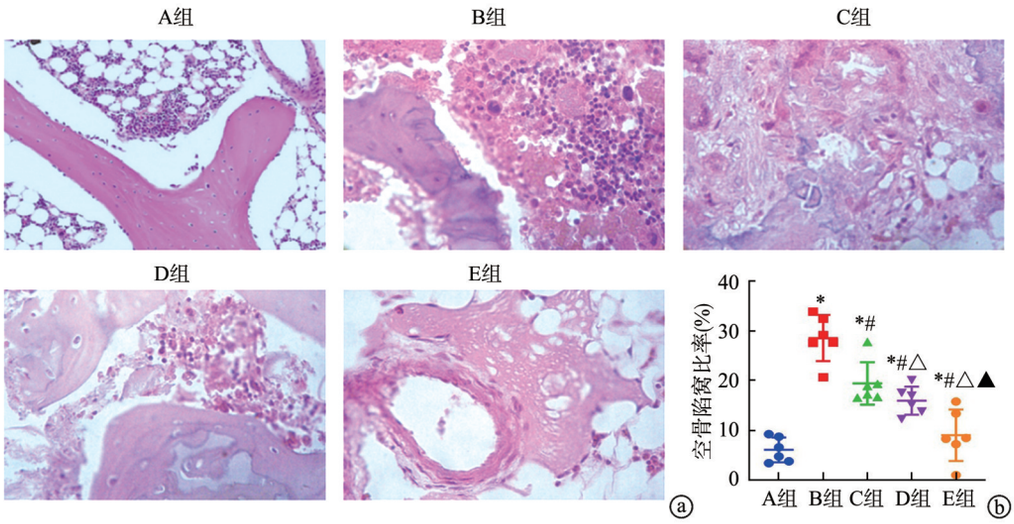
治疗8周后，A组家兔股骨头组织形态正常。B组股骨头组织骨小梁错乱且数量较少，血管数量也较少。与B组相比，C组、D组和E组骨小梁错乱明显改善，骨小梁增多，骨髓中血管形成明显增多。E组股骨头组织修复情况明显优于其他组。各组空骨陷窝比率差异有统计学意义（$F=21.340$，$P<0.001$）。与A组相比，B组的空骨陷窝比率显著增多（$P<0.05$）；与B组相比，C组、D组和E组的空骨陷窝比率均降低（$P<0.05$）；E组的空骨陷窝比率低于C组和D组（$P<0.05$），见图3。

2.4 各组家兔的股骨头生物力学参数变化

各组家兔的股骨头生物力学参数（最大应力、弹性模量、刚度、最大载荷和能量吸收）比较，差异有统计学意义（$P<0.001$）。与A组相比，B组的股骨头生物力学参数均显著降低（$P<0.05$）；与B组相比，C组、D组和E组的股骨头生物力学参数均升高（$P<0.05$）；E组的股骨头生物力学参数均高于C组和D组（$P<0.05$），见表2。

2.5 各组家兔的股骨头组织中OPG、VEGF164、VEGFR2、RANKL和RANK的表达

各组家兔股骨头组织中OPG、VEGF164、VEGFR2、RANKL和RANK的mRNA水平比较差异有统计学意义（$P<0.001$）。与A相比，B组股骨头组织中OPG、VEGF164、VEGFR2、RANKL和RANK的mRNA表达均增加（$P<0.05$）；与B组相比，C组、D组和E组股骨头组织中OPG、VEGF164和VEGFR2的mRNA表达均升高，RANKL和RANK的mRNA表达均降低（$P<0.05$）。与C组和D组相比，E组股骨头组织中OPG、VEGF164和VEGFR2的mRNA表达均升高，RANKL和RANK的mRNA表达均降低（$P<0.05$），见表3。



a:HE染色(×400);b:空骨陷窝比率 *:与A组比较,$P<0.05$;#:与B组比较,$P<0.05$;△:与C组比较,$P<0.05$;▲:与D组比较,$P<0.05$

图3 各组家兔股骨头组织的HE染色

表2 各组家兔的股骨头生物力学参数

组别	最大应力(N/mm²)	弹性模量(kPa)	刚度(N/mm)	最大载荷(N)	能量吸收(N. mm)
A组	17. 47±1. 39	93. 44±5. 39	638. 90±48. 75	895. 90±17. 83	1113. 68±72. 81
B组	9. 01±1. 63*	77. 00±5. 74*	442. 98±68. 48*	528. 52±62. 22*	620. 69±37. 41*
C组	14. 95±1. 53*#	84. 10±2. 62*#	511. 48±60. 26*#	591. 53±51. 158*#	715. 87±57. 12*#
D组	14. 50±0. 99*#	90. 35±7. 75*#△	600. 33±38. 04*#△	680. 74±42. 58*#△	908. 30±69. 14*#△
E组	17. 42±2. 29#△▲	93. 47±5. 40#△▲	681. 09±51. 75#△▲	863. 51±39. 62#△▲	1 020. 84±62. 06#△▲

*:与A组比较,$P<0.05$;#:与B组比较,$P<0.05$;△:与C组比较,$P<0.05$;▲:与D组比较,$P<0.05$

表3 各组家兔股骨头组织中OPG、VEGF164、VEGFR2、RANKL和RANK mRNA表达

组别	OPG	VEGF164	VEGFR2	RANKL	RANK
A组	1. 00±0. 03	1. 00±0. 03	1. 00±0. 04	1. 00±0. 04	1. 00±0. 07
B组	1. 95±0. 12*	1. 96±0. 09*	2. 32±0. 06*	4. 62±0. 35*	4. 89±0. 37*
C组	2. 94±0. 15*#	3. 05±0. 28*#	3. 31±0. 17*#	3. 33±0. 15*#	4. 00±0. 41*#
D组	4. 78±0. 29*#△	3. 81±0. 67*#△	4. 71±0. 28*#△	2. 48±0. 22*#△	3. 01±0. 19*#△
E组	5. 04±0. 11*#△▲	5. 66±0. 34*#△▲	5. 82±0. 30*#△▲	1. 50±0. 06*#△▲	1. 95±0. 14*#△▲

*:与A组比较,$P<0.05$;#:与B组比较,$P<0.05$;△:与C组比较,$P<0.05$;▲:与D组比较,$P<0.05$

3 讨论

本研究首次将髓芯减压、胶原基骨修复材料和VEGF这三种材料结合起来治疗ONFH,结果显示,髓芯减压联合自体松质骨、髓芯减压联合胶原基骨修复材料、髓芯减压联合胶原基骨修复材料和VEGF这三种治疗方法均有效提高了股骨头骨密度,HE染色结果表明上述治疗方法均可促进骨小梁形成、血管生成和ONFH区域的修复,并使空骨陷窝比率降低。通过检测股骨头生物力学参数变化可知,这三种治疗方法均提高了股骨头的力学强度,从而避免了股骨头塌陷骨折的发生。分析其原因,髓芯减压可降低骨内压、改善血供;胶原基骨修复材料孔隙率较高,孔径尺度多样,为血液流动提供了良好的基础;VEGF能促进血管内皮细胞增殖和血管生成,促进形成新骨,这三种材料均可促进ONFH区域的修复。

本研究还检测了各组家兔的股骨头组织中OPG、VEGF164、VEGFR2、RANKL和RANK mRNA的表达。OPG、RANKL和RANK是重要的骨形成调控因子。OPG作为RANKL的诱骗受体,与RANK结合并抑制破骨细胞生成[12-13]。RANKL与OPG有拮抗作用,其通过与RANK结合促进破骨细胞的生成和分化,RANKL/OPG比率决定了骨生成或骨吸收[14]。血管生成障碍可抑制骨形成,引起骨骼坏死[15]。VEGF/VEGFR信号通路是最重要的血管生成调节通路,在调节骨形成和骨修复中发挥重要作用,并刺激骨损伤部位血管再生[16-17]。脊椎动物VEGF家族中主要以VEGFA为主,

VEGFR2是VEGFR家族中的最主要受体[18-19]。本研究表明,髓芯减压联合自体松质骨、髓芯减压联合胶原基骨修复材料、髓芯减压联合胶原基骨修复材料和VEGF这三种治疗方法均升高了股骨头组织中OPG、VEGF164和VEGFR2的转录水平,降低了RANKL和RANK的转录水平,并且三种材料复合的效果最佳。说明三种材料复合疗法可有效调控骨形成基因和血管生成基因的表达。

本研究结果证实髓芯减压联合胶原基骨材料和VEGF的治疗效果优于髓芯减压联合自体松质骨和髓芯减压联合胶原基骨修复材料。分析其原因可能包括以下方面:①髓芯减压可降低骨内压,改善血供,促进坏死股骨头的修复[4]。②胶原基骨修复材料中的胶原为细胞生长提供了适宜的环境,并且该材料的孔隙率较高,孔径尺度丰富,有效保证了血液流动。③VEGF能特异性促进血管内皮细胞增殖和血管生成,促进新骨形成[20-22]。该复合疗法充分发挥了各材料的优势,从而最大限度地促进了ONFH区域的修复。

综上所述,髓芯减压联合胶原基骨修复材料和VEGF复合疗法可有效提高ONFH家兔股骨头的骨密度和强度,促进损伤区域的骨形成和血管生成,从而促进股骨头的修复,该疗法可能是治疗ONFH的新型高效疗法,具有较高的研究价值。

[参考文献]

[1] 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.

[2] Jing X, Du T, Yang X, et al. Desferoxamine protects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head via activating HIF-1α expression[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(12): 9864-9875. doi:10.1002/jcp.29799.

[3] Yin BH, Chen HC, Zhang W, et al. Effects of hypoxia environment on osteonecrosis of the femoral head in Sprague-Dawley rats[J]. J Bone Miner Metab, 2020, 38(6): 780-793. doi: 10.1007/s00774-020-01114-0.

[4] 魏 波,王黎明,徐 燕,等. 股骨头髓芯减压为基础治疗早期股骨头坏死[J]. 中国组织工程研究,2012,16(39):7390-7394. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.39.034.

[5] 庄传记,陈文昭,江新民. 骨形态发生蛋白9复合胶原基骨修复材料体外成骨性能与体内修复骨缺损[J]. 中国组织工程研究,2021,25(10):1489-1494.

[6] 李大鹏,沈铁城,黄永辉,等. 兔骨髓间充质干细胞与纳米晶胶原基骨修复材料体外构建组织工程骨的实验研究[J]. 江苏大学学报(医学版),2007,17(5):389-392. doi:10.3969/j.issn.1671-7783.2007.05.007.

[7] Chao PC, Cui MY, Li XA, et al. Correlation between miR-1207-5p expression with steroid-induced necrosis of femoral head and VEGF expression[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(7): 2710-2718. doi:10.26355/eurrev_201904_17541.

[8] Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, et al. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells[J]. J Cell Physiol, 2008, 214(2): 537-544. doi:10.1002/jcp.21234.

[9] Dai J, Rabie AB. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification[J]. J Dent Res, 2007, 86(10): 937-950. doi:10.1177/154405910708601006.

[10] Luo Y, Li D, Xie X, et al. Porous, lithium-doped calcium polyphosphate composite scaffolds containing vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded gelatin microspheres for treating glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Biomed Mater, 2019, 14(3): 035013. doi:10.1088/1748-605X/ab0a55.

[11] 陈 东,华文彬,叶树楠,等. 骨内注射无水乙醇建立兔股骨头坏死模型[J]. 中国组织工程研究,2013,17(2):205-209. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.02.004.

[12] Aruwajoye OO, Patel MK, Allen MR, et al. Microcrack density and nanomechanical properties in the subchondral region of the immature piglet femoral head following ischemic osteonecrosis[J]. Bone, 2013, 52(2): 632-639. doi:10.1016/j.bone.2012.07.028.

[13] Gou WL, Lu Q, Wang X, et al. Key pathway to prevent the collapse of femoral head in osteonecrosis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(15): 2766-2774.

[14] Erken HY, Ofluoglu O, Aktas M, et al. Effect of pentoxifylline on histopathological changes in steroid-induced osteonecrosis of femoral head: experimental study in chicken[J]. Int Orthop, 2012, 36(7): 1523-1528. doi:10.1007/s00264-012-1497-6.

[15] Marenzana M, Arnett TR. The key role of the blood supply to bone[J]. Bone Res, 2013, 1(3): 203-215. doi:10.4248/BR201303001.

[16] Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration[J]. Bone, 2016, 91: 30-38. doi:10.1016/j.bone.2016.06.013.

[17] Grosso A, Burger MG, Lunger A, et al. It takes two to tango: coupling of angiogenesis and osteogenesis for bone regeneration[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2017, 5: 68. doi:10.3389/fbioe.2017.00068.

[18] Hang D, Wang Q, Guo C, et al. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with VEGF165 transgenic bone marrow mesenchymal stem cells in mongrel dogs[J]. Cells Tissues Organs, 2012, 195(6): 495-506. doi:10.1159/000329502.

[19] Hong GJ, Lin N, Chen LL, et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and the risk of osteonecrosis of the femoral head: systematic review[J]. Biomed Rep, 2016, 4(1): 92-96. doi:10.3892/br.2015.527.

[20] Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development[J]. Cell, 2019, 176(6): 1248-1264. doi:10.1016/j.cell.2019.01.021.

[21] Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation[J]. Nat Med, 1999, 5(6): 623-628. doi:10.1038/9467.

[22] Midy V, Plouët J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199(1): 380-386. doi:10.1006/bbrc.1994.1240.

(编辑:贺绍梅)