

髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料对兔股骨头缺血坏死的修复作用^{*}

吕亚军 任立中 李军 张海静 张志坤

(河北医科大学第一医院骨二科, 河北 石家庄 050031)

【摘要】 目的 探讨髓芯减压联合血管内皮生长因子(VEGF)与胶原基骨移植材料对兔股骨头缺血坏死的修复作用。**方法** 对 24 只 SPF 级家兔股骨头内注射无水乙醇建立兔股骨头坏死模型,然后将家兔随机分为模型对照组(A 组)、髓芯减压+自体松质骨组(B 组)、髓芯减压+胶原基骨修复材料组(C 组)和髓芯减压+胶原基骨修复材料+VEGF 组(D 组),每组 6 只,共治疗 12 周。通过苏木精伊红(HE)染色观察组织切片形态。采用骨密度分析系统(QCT PRO V6.1)测量家兔股骨头骨密度(BMD)。Western blot 检测 VEGF、Collagen I、Runt 相关转录因子 2(RUNX2)、骨钙素(OCN)、Wnt-3a、 β -catenin 和 GSK-3 β 的蛋白表达。**结果** 术后 12 周时,与 B、C 组比较,D 组家兔股骨头骨小梁排列较整齐,骨髓中观察到大量微血管的形成,可见明显成骨,且坏死区基本被修复。与 A 组相比,B 组、C 组和 D 组家兔股骨头空骨陷窝比率均显著降低($P < 0.05$);D 组家兔股骨头空骨陷窝比率小于 B 组和 C 组($P < 0.05$)。与 A 组相比,B 组、C 组和 D 组家兔股骨头的骨密度均显著升高($P < 0.05$);D 组骨密度显著高于 B 组和 C 组($P < 0.05$)。与 B 组和 C 组相比,D 组 VEGF、Collagen I、RUNX2 和 OCN 的蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$);与 B 组和 C 组相比,D 组 Wnt-3a 和 β -catenin 的蛋白表达水平均显著升高,GSK-3 β 的蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。**结论** 髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料对兔股骨头缺血坏死可有效促进坏死股骨头的修复,提高骨密度及成骨蛋白的表达。

【关键词】 股骨头坏死;血管内皮生长因子;髓芯减压;胶原基骨修复材料;骨密度

【中图分类号】 R459.9;R68 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2023.08.002

Research on the repair effect of core decompression combined with VEGF and collagen-based bone graft material on avascular necrosis of the femoral head in rabbits

LYU Yajun, REN Lizhong, LI Jun, ZHANG Haijing, ZHANG Zhikun

(Department of Orthopedics, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China)

【Abstract】 Objective To investigate the repair effect of core decompression combined with VEGF and collagen-based bone graft material on avascular necrosis of the femoral head in rabbits. **Methods** 24 rabbits were injected with absolute ethanol into the femoral heads to establish a rabbit femoral head necrosis model. Then the rabbits were randomly divided into model control group (group A), core decompression + autologous cancellous bone group (group B), core decompression + collagen-based bone repair material group (group C) and core decompression + collagen-based bone repair material + VEGF group (group D). There were 6 animals in each group for a total of 12 weeks of treatment. The morphology of tissue sections was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Bone mineral density (BMD) was measured using the Bone Density Analysis System (QCT PRO V6.1). The protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), Collagen I, Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteocalcin (OCN), Wnt-3a, β -catenin and GSK-3 β were detected by Western blot. **Results** At 12 weeks postoperatively, compared with groups B and C, the trabecular bones of group D were arranged more neatly, a large number of microvessel formation was observed in the bone

基金项目:河北省卫计委指导课题(ZD20140210)

通讯作者:张志坤,副主任医师,E-mail:363984991@qq.com

引用本文:吕亚军,任立中,李军,等.髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料对兔股骨头缺血坏死的修复作用[J].西部医学,2023,35(8):1098-1103.DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2023.08.002

marrow, obvious osteogenesis was seen, and the necrotic area was basically repaired. Compared with group A (29.23 ± 5.00 %), the ratio of empty bone lacuna in group B (18.52 ± 3.25 %), group C (14.21 ± 2.97 %) and group D (9.34 ± 3.82 %) was significantly reduced ($P < 0.05$). In addition, the ratio of empty bone lacuna in group D was significantly lower than that in groups B and C ($P < 0.05$). Compared with group A (369.38 ± 25.38 mg/cm³), the bone density of group B (450.53 ± 21.32 mg/cm³), group C (510.60 ± 37.51 mg/cm³) and group D (579.05 ± 36.93 mg/cm³) significantly increased ($P < 0.05$). In addition, the bone density of group D was significantly higher than that of group B and C ($P < 0.05$). Compared with group B and group C, the protein levels of VEGF, Collagen I, RUNX2 and OCN in group D were significantly higher ($P < 0.05$). Compared with groups B and C, the protein levels of Wnt-3a and β -catenin in group D were significantly increased, and the protein expression level of GSK-3 β was significantly decreased ($P < 0.05$).

Conclusion Core decompression combined with VEGF and collagen-based bone graft material can effectively promote the repair of necrotic femoral head and increase the expression of bone mineral density and osteogenic protein in the treatment of avascular necrosis of the femoral head in rabbits.

【Key words】 Femoral head necrosis; Vascular endothelial growth factor; Core decompression; Collagen-based bone repair material; Bone density

股骨头坏死(Osteonecrosis of femoral head, ONFH)致残率高,严重影响患者的生活水平^[1-3]。股骨头发生缺血性坏死后,骨组织表现为血管再生、新骨形成和死骨吸收^[4-5]。然而,随着 ONFH 疾病的进展,血管再生和新骨形成减弱,而死骨吸收增强^[6]。髓芯减压已广泛应用于 ONFH 的治疗,可降低骨内压力,延缓坏死进程^[6]。髓芯减压所形成的空腔通常需要植骨来完成。胶原基骨修复材料是利用仿生原理由低结晶度纳米级羟基磷灰石与胶原通过物理方法自组装而成,该成分与天然骨的成分几乎完成吻合^[7-8]。胶原基骨修复材料具有诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的能力及无免疫原性、可降解、易塑形等特性,在骨修复过程中起骨诱导,加快骨愈合的作用^[7]。血管再生在骨形成和骨改建过程中至关重要^[9]。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是最重要的血管生成因子,具有促进血管内皮细胞分裂及血管生成等作用^[9-10]。VEGF 通过直接吸引内皮细胞和破骨细胞,促进成骨细胞的分化,在骨再生过程中对骨形成和修复至关重要^[10-12]。本实验以兔为研究对象,向股骨头注入无水乙醇方法构建股骨头坏死模型,采用髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料治疗兔股骨头坏死,研究 VEGF、胶原基骨修复材料对股骨头坏死区域骨修复的影响,探索应用髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料治疗股骨头坏死的新领域。

1 材料与方法

1.1 动物 24 只 6 月龄 SPF 级家兔购自河北医科大学实验动物中心,雌雄不限,合格证号为 SCXN(冀)2013-1-003,体质量(2.21 ± 0.29)kg。家兔饲养在 12:12 h 的光明-黑暗周期中,室温设定为 25℃,相对湿度设定为 60%,不限制进食和饮水。本研究已获得医院伦理委员会通过。

1.2 动物模型的建立 参考文献^[13]中的方法建立 ONFH 兔模型。腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉兔,将兔俯卧位固定,剃毛,消毒,铺巾。在大转子外侧剪开皮肤和筋膜,分离肌肉,在 X 线引导下,经股骨头穿刺、克氏针扩髓,然后将无水乙醇 1 mL (0.1 mL/min)缓慢注射至股骨头中心(图 1)。医用骨蜡封闭皮质骨孔洞,逐层缝合。6 周后进行 CT 扫描,CT 检查中根据是否观察到股骨头坏死、骨密度增高、股骨头外形改变等特征来判断建模结果(图 2)。



图 1 ONFH 家兔建模的 X 线片

Figure 1 X-ray film of ONFH rabbit modeling

1.3 动物分组和治疗 将 24 只家兔随机分为模型对照组(A 组)、髓芯减压+自体松质骨组(B 组)、髓芯减压+胶原基骨修复材料组(C 组)和髓芯减压+胶原基骨修复材料+VEGF 组(D 组),每组 6 只,按照相应的治疗方法对家兔进行分组治疗。腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉兔,将兔俯卧位固定,在大转子外侧剪开皮肤和筋膜,分离肌肉,在 X 线引导下,用 19G 骨穿针经皮从大转子处钻入股骨头区,然后进行药物治疗。B、C 和 D 组家兔均进行髓芯减压治疗,在此基础上,B 组在股骨头减压区植入自体松质骨,C 组在股

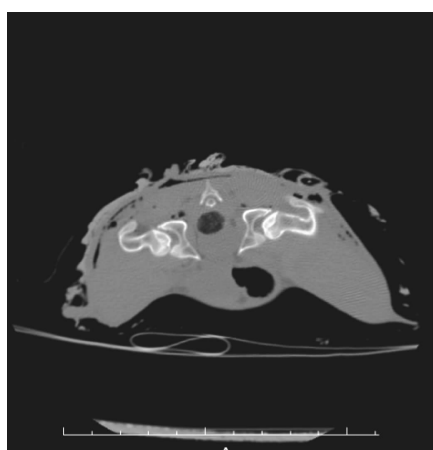


图 2 建模 6 周后的 CT 图像

Figure 2 CT image after 6 weeks of modeling

注:CT 图像显示家兔股骨头坏死,骨密度明显增高,股骨头外形改变。

骨头减压区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,国械注准 20143461867),D 组在股骨头减压区植入胶原基骨修复材料的基础上,注入 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 VEGF 蛋白(上海沪震实业有限公司)。采用医用纤维蛋白胶封堵钻孔。手术后,家兔每日肌肉注射 10 万 U 青霉素,连续 3 d,以防止感染。

1.4 Western blot 检测蛋白水平 治疗 12 周后,麻醉动物,用空气栓塞法处死动物,并取出股骨头,用预冷的 DEPC 水冲洗,将每个股骨头用组织研磨机将股骨头在液氮中粉碎,在 RIPA(美国 Thermo Fisher 公司)中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。裂解产物随后在 15000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min。通过 BCA 法测量总蛋白质浓度。用 12% SDS-PAGE(碧云天生物技术研究所在)对蛋白质电泳 90 min。然后,将蛋白质转移到 PVDF 上,将膜用 5% 脱脂乳室温下封闭 1 h。然后将膜与 VEGF (1:1000 稀释)、Collagen I(1:1000 稀释)、RUNX2(1:2000 稀释)、OCN(1:1500 稀释)、Wnt-3a(1:1000 稀释)、 β -catenin(1:2000 稀释)、GSK-3 β (1:2000 稀释)和 β -actin(1:2000 稀释)一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。然后将膜与山羊抗兔 IgG H&L(HRP)二抗(1:1000 稀释)室温孵育 1 h。抗体均购自英国 Abcam 公司。使用增强化学发光(ECL)底物试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)显影。在 Image J 软件上分析蛋白质条带的灰度值。 β -actin 作为内参蛋白。

1.5 HE 染色观察家兔股骨头组织切片形态 取股骨头用 0.9%氯化钠冲洗,脱钙,切成 5 mm 厚的石蜡切片。进行苏木精-伊红(HE)染色(碧云天生物技术研究所在),显微镜下观察切片。随机选取 10 个高倍视野,每个视野计数 50 个骨陷窝。用空骨陷窝数除以

总骨陷窝数来计算空骨陷窝的比率。

1.6 骨密度分析系统(QCT PROV 6.1)测量家兔股骨头的骨密度 采用荷兰飞利浦 Incisive 64 排 CT 扫描后,应用曼德思维软件公司的骨密度分析系统(QCT PRO V6.1)测定并分析骨密度(BMD)。

1.7 统计学分析 使用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析及 LSD 检验分析组间差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组家兔的一般情况 本研究过程中无家兔死亡。A 组家兔精神萎靡不振,行动迟缓,皮毛无光泽,皮下脂肪减少,弹跳能力降低。B、C 和 D 组家兔精神状态较 A 组改善,活动灵敏度增加,皮毛呈现光泽,其中 D 组家兔的一般情况优于其他组。

2.2 4 组家兔股骨头组织病理学形态 HE 染色结果显示,A 组出现典型的骨坏死,坏死区域位于松质骨和软骨下区域,骨髓结构紊乱,骨髓细胞坏死,碎片聚集,普遍观察到脂肪生成,脂肪细胞数量和大小增高,骨小梁变薄,可见大量空隙;与 A 组相比,B、C 和 D 组骨髓结构紊乱较轻,骨小梁增厚,可见蓝染的再生软骨,空隙较少,脂肪细胞数量减少,空腔数量减少;与 B、C 组比较,D 组骨小梁排列较整齐,骨髓中观察到大量微血管的形成,可见明显成骨,且坏死区基本被修复,见图 3。4 组空骨陷窝的比率比较差异有统计学意义($F = 58.475, P < 0.001$);与 A 组相比,B、C 和 D 组家兔股骨头空骨陷窝的比率均降低($P < 0.05$);D 组家兔股骨头空骨陷窝的比率小于 B、C 组($P < 0.05$),见图 4。

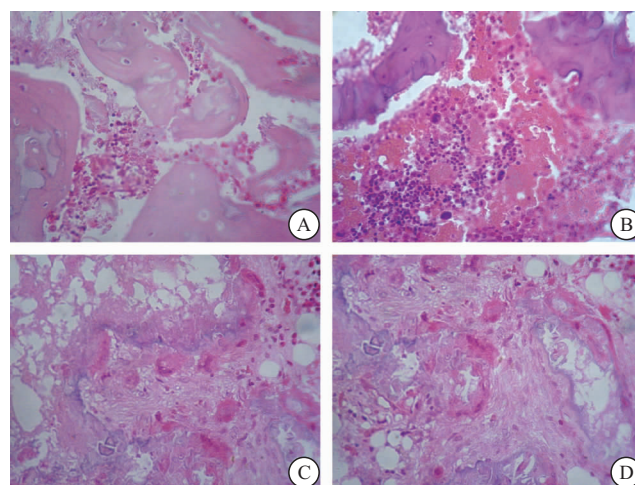


图 3 股骨头组织苏木精伊红(HE)染色图(400 $\times$)

Figure 3 Femoral head tissue hematoxylin and eosin (HE) staining

注:A. A 组;B. B 组;C. C 组;D. D 组。

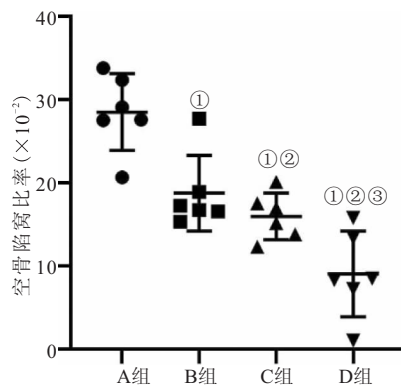


图 4 4 组空骨陷窝的比率

Figure 4 The ratio of empty bone lacunae of each group

注:与 A 组比较,① $P<0.05$;与 B 组比较,② $P<0.05$;与 C 组比较,③ $P<0.05$ 。

2.3 4 组家兔股骨头骨密度比较 4 组家兔股骨头的骨密度比较差异有统计学意义($F=98.524, P<0.001$);与 A 组相比,B、C 和 D 组家兔股骨头的骨密度均显著升高($P<0.05$);D 组家兔股骨头的骨密度显著高于 B、C 组($P<0.05$),见图 5。

2.4 4 组家兔的股骨头组织中 VEGF、Collagen I、RUNX2 和 OCN 蛋白表达水平比较 Western blot 结果显示,4 组家兔的股骨头组织中 VEGF、Collagen I、

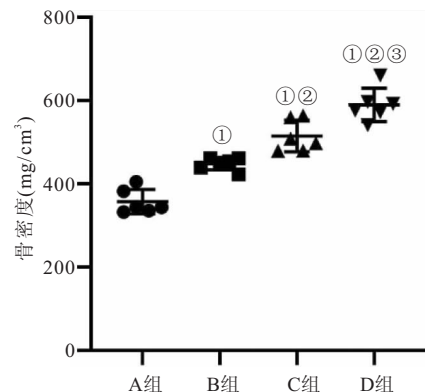


图 5 4 组的骨密度

Figure 5 Bone mineral density of each group

注:与 A 组比较,① $P<0.05$;与 B 组比较,② $P<0.05$;与 C 组比较,③ $P<0.05$ 。

RUNX2 和 OCN 蛋白表达水平比较差异有统计学意义(F 分别为 92.706、48.725、39.251、50.263,均 $P<0.05$);与 A 组相比,B、C 和 D 组股骨头组织中 VEGF、Collagen I、RUNX2 和 OCN 的蛋白表达水平均升高($P<0.05$);D 组 VEGF、Collagen I、RUNX2 和 OCN 的蛋白表达水平均高于 B、C 组($P<0.05$),见图 6。

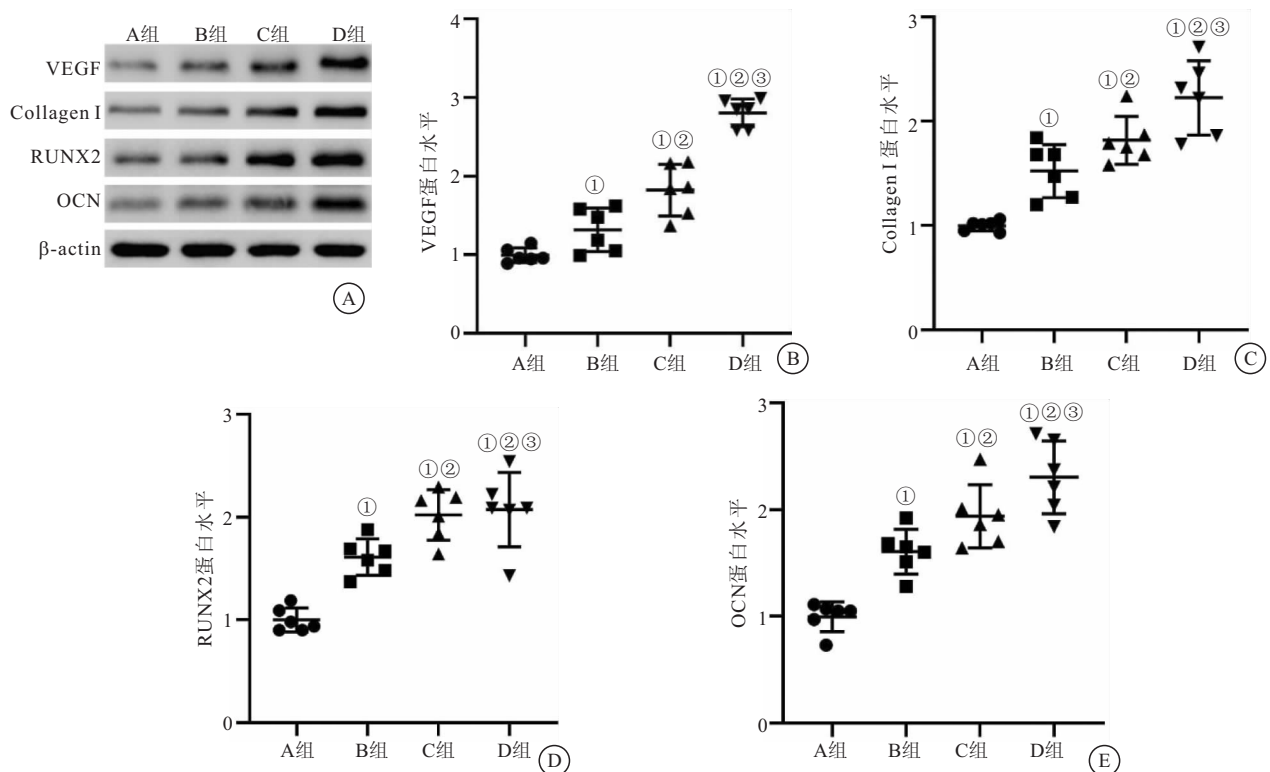


图 6 4 组股骨头组织中 VEGF、Collagen I、RUNX2 和 OCN 的表达

Figure 6 Expression of VEGF, Collagen I, RUNX2 and OCN in femoral head tissues of each group

注:A. Western blot 检测 VEGF、Collagen I、RUNX2 和 OCN 的蛋白表达;B. VEGF 蛋白水平;C. Collagen I 蛋白水平;D. RUNX2 蛋白水平;E. OCN 蛋白水平。与 A 组比较,① $P<0.05$;与 B 组比较,② $P<0.05$;与 C 组比较,③ $P<0.05$ 。

2.5 4 组家兔的股骨头组织中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达水平比较 Western blot 结果显示,4 组家兔的股骨头组织中 Wnt-3a、 β -catenin 和 GSK-3 β 的蛋白表达比较差异有统计学意义(F 分别为 138.292、395.503、223.654,均 $P < 0.05$);与 A 组相比,B、C 和 D 组股骨头组织中 Wnt-3a 和 β -catenin 的蛋白表达水平均显著升高,GSK-3 β 降低($P < 0.05$);D 组 Wnt-3a 和 β -catenin 的蛋白表达水平均显著高于 B、C 组,GSK-3 β 低于 B、C 组($P < 0.05$),见图 7。

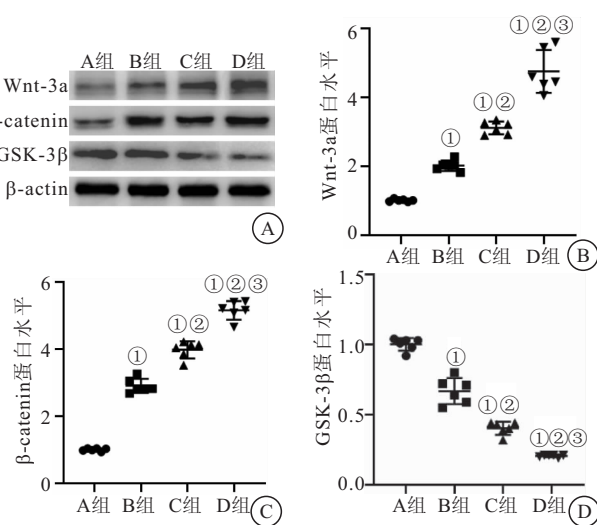


图 7 4 组股骨头组织中 Wnt-3a、 β -catenin 和 GSK-3 β 的表达

Figure 7 Expression of Wnt-3a, β -catenin and GSK-3 β in femoral head tissues of each group

注:A. Western blot 检测 Wnt-3a、 β -catenin 和 GSK-3 β 的蛋白表达;B. Wnt-3a 蛋白水平;C. β -catenin 蛋白水平;D. GSK-3 β 蛋白水平。与 A 组比较,① $P < 0.05$;与 B 组比较,② $P < 0.05$;与 C 组比较,③ $P < 0.05$ 。

3 讨论

在股骨头坏死早期机械性破坏发生前,通过髓芯减压同时去除坏死骨组织已经成为一种广泛认可的治疗方法^[6]。然而,髓芯减压所形成的空腔,通常需要植骨来完成。胶原基骨修复材料是利用仿生原理由低结晶度纳米级羟基磷灰石与胶原通过物理方法自组装而成,该成分与天然骨的成分几乎完成吻合。胶原基骨修复材料具有诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的能力及无免疫原性、可降解、易塑形等特性,在骨修复过程中起骨诱导,加快骨愈合的作用。

VEGF 能作用于血管内皮细胞并促进其增殖和血管生成^[14]。血管再生参与骨形成和骨改建过程^[15-16]。骨折愈合过程中,血管再生可促进新骨形成^[17]。Gerber 等^[18]研究表明阻断内源性 VEGF 活性,骨形成与骨吸收就停止。Midy 等^[19]报道,VEGF 能直接刺激成骨细胞碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,ALP)活性,并促进成骨细胞的迁移与分化。胶原基骨修复材料有以下优势:①通过生物酶定向酶切技术,产品无任何排异发生。②具有贯通性良好的孔隙率和多尺度孔径,可充分保证血液在其中的流动以及细胞的迁徙与附着。③能够提高自体诱导的效果和材料在骨重建中的再利用。④参与骨重建的过程完全与机体自身的骨愈合周期吻合,能确保骨组织按人体自身实际需要准确地完成全部自诱导过程,不出现异常刺激。⑤可任意塑形,根据需要无缝隙完成填充,不遗留残腔。⑥作为水溶性(非油性)可塑型材料,具有更高的安全性。本课题组采用了一种髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料的综合疗法来治疗无水乙醇骨内注射诱导的兔股骨头坏死模型,结果显示,髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料治疗 12 周后的家兔身体状态最佳,股骨头组织病理学改变明显减轻,股骨头骨密度最高,坏死区域基本被修复,治疗效果显著优于髓芯减压+自体松质骨组和髓芯减压+胶原基骨修复材料组。说明髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料是治疗股骨头坏死的潜在高效疗法,原因可能与胶原基骨修复材料的骨诱导活性以及 VEGF 的促血管生成活性有密切的关系。

Collagen I、RUNX2 和 OCN 均是参与骨形成和骨重塑密切相关的蛋白质,Collagen I 可影响成骨细胞的功能,参与调节人骨髓间充质干细胞骨向分化^[20]。RUNX2 调节成骨细胞、间充质干细胞中的相关成骨基因的转录、翻译和定向分化^[21]。OCN 是一种促进骨形成和矿化的骨基质蛋白^[22]。本研究检测了 4 组家兔的股骨头组织中 Collagen I、RUNX2 和 OCN 的表达水平,结果显示,髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料最大限度的升高了股骨头组织中 Collagen I、RUNX2 和 OCN 的表达水平,提示骨形成蛋白的高表达也是该疗法发挥作用的机制之一。

Wnt/ β -catenin 信号通路是骨稳态的关键调节剂,该通路的激活可促进骨形成^[23]。据报道,股骨头缺血性坏死中 Wnt/ β -catenin 信号通路被抑制^[24]。Wnt/ β -catenin 信号通路的激活可促进成骨^[25]。本研究结果显示,髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料最大限度地激活了 Wnt/ β -catenin 信号通路。

4 结论

应用髓芯减压联合 VEGF 与胶原基骨移植材料治疗家兔股骨头坏死具有良好的效果,可有效促进坏死股骨头的修复,提高骨密度及成骨蛋白的表达,该治疗方法可能是治疗股骨头坏死的新型高效疗法,具有较高的临床研究价值。

【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.
- [2] 李安明, 史国号, 刘德玉, 等. 陶瓷骨打压植骨联合富血小板血浆治疗早期股骨头坏死 [J]. 西部医学, 2020, 32(12): 1778-1783.
- [3] 杨璐希, 吴少平, 黄雨, 等. 造模早期免疫素性股骨头坏死骨质结构动态变化影像学观察 [J]. 西部医学, 2021, 33(4): 506-510.
- [4] MONT M A, SALEM H S, PIUZZI N S, *et al.* Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: Where Do We Stand Today?: A 5-Year Update [J]. J Bone Joint Surg Am, 2020, 102(12): 1084-1099.
- [5] ZHAO D, ZHANG F, WANG B, *et al.* Guidelines for clinical diagnosis and treatment of osteonecrosis of the femoral head in adults (2019 version) [J]. J Orthop Translat, 2020, 21: 100-110.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] CHAO P C, CUI M Y, LI X A, *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.
- [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.
- [11] CLARKIN C E, EMERY R J, PITSILLIDES A A, *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.
- [12] DAI J, RABIE A B. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification [J]. J Dent Res, 2007, 86(10): 937-950.
- [13] 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.
- [14] MELINCOVICI C S, BOŞCA A B, ŞUŞMAN S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. Rom J Morphol Embryol, 2018, 59(2): 455-467.
- [15] DIOMEDE F, MARCONI G D, FONTICOLI L, *et al.* Functional Relationship between Osteogenesis and Angiogenesis in Tissue Regeneration [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3242.
- [16] TONG X, CHEN X, ZHANG S, *et al.* The Effect of Exercise on the Prevention of Osteoporosis and Bone Angiogenesis [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 8171897.
- [17] APTE R S, CHEN D S, FERRARA N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development [J]. Cell, 2019, 176(6): 1248-1264.
- [18] GERBER H P, VU T H, RYAN A M, *et al.* VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation [J]. Nat Med, 1999, 5(6): 623-628.
- [19] MIDY V, PLOUËT J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199(1): 380-386.
- [20] SONG S J, JEON O, YANG H S, *et al.* Effects of culture conditions on osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells [J]. J Microbiol Biotechnol, 2007, 17(7): 1113-1119.
- [21] KOMORI T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2 [J]. Cell Tissue Res, 2010, 339(1): 189-195.
- [22] WEI J, KARSENTY G. An overview of the metabolic functions of osteocalcin [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2015, 16(2): 93-98.
- [23] 曾照辉, 刘怡, 王国梁, 等. 姜黄素通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进骨折愈合 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(16): 3011-3017, 3048.
- [24] 张晨, 李苗, 马骏, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路在大鼠早期激素性股骨头缺血性坏死中的作用机制研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2016, 30(6): 661-668.
- [25] 李嘉骏, 夏天, 刘佳敏, 等. 淫羊藿苷调控成骨信号相关通路治疗激素性股骨头缺血性坏死的分子机制 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(5): 780-785.

(收稿日期:2022-06-09;修回日期:2023-06-27;编辑:黎仕娟)