

三七总皂苷干预酒精性股骨头缺血坏死模型兔的超微结构

王大伟, 卢培根, 贾永龙, 张睿昕, 莫坚, 苑井宽(广西中医药大学附属瑞康医院, 广西壮族自治区南宁市 530011)

文章亮点:

- 1 实验通过用股骨头穿刺介入给药的方法, 证实三七总皂苷治疗早期酒精性股骨头缺血性坏死兔动物模型的作用机制, 利用透射电镜观察造模后的兔股骨头骨组织超微结构的变化情况。
- 2 实验结果证实三七总皂苷可有效促进早期兔酒精性股骨头缺血性坏死骨细胞超微结构形态修复, 可为中药防治股骨头缺血坏死提供新的治疗靶点。

关键词:

实验动物; 组织构建; 三七总皂苷; 股骨头缺血性坏死; 超微结构; 动物模型; 实验研究; 酒精; 广西壮族自治区自然科学基金

主题词:

人参皂甙类; 股骨头坏死; 成骨细胞; 骨保护素; 模型; 动物

基金资助:

2012年广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053122): 三七总皂苷干预兔酒精性股骨头缺血性坏死的超微结构研究; 2011年度广西壮族自治区中管局中医药科技专项(GZKZ1123): 三七总皂苷干预兔酒精性股骨头缺血性坏死的超微结构研究

摘要

背景: 前期研究已明确三七总皂苷能抑制乙醇诱导的兔骨髓基质干细胞成脂分化, 证实三七总皂苷能够促进兔成骨细胞的增殖和分化, 并能提高成骨细胞的骨保护素 mRNA 的相对表达量而对其细胞核因子 κB 受体活化因子配体 mRNA 有抑制作用。

目的: 进一步观察三七总皂苷对兔酒精性股骨头缺血坏死超微结构的影响。

方法: 白酒灌胃 6 周制备新西兰兔股骨头酒精性缺血坏死模型, 造模成功的模型兔分别于股骨头局部注射生理盐水、复方骨肽及三七总皂苷, 注射量为 0.1 mL/kg, 每周给药 1 次, 连续治疗 4 周, 通过透射电镜观察各组超微结构变化。

结果与结论: 透射电镜显示, 酒精性缺血坏死骨细胞线粒体肿胀, 嵴结构模糊, 粗面内质网上多聚核糖体脱颗粒, 骨细胞内可见脂滴出现。与生理盐水组相比, 三七总皂苷组骨细胞线粒体肿胀消退, 可见到嵴结构, 粗面内质网上多聚核糖体增多, 脂滴数量明显减少。复方骨肽组超微结构形态改变与三七总皂苷组相似。三七组和复方骨肽组骨细胞超微结构形态变化明显好于生理盐水组($P < 0.05$)。实验证实三七总皂苷可有效促进早期兔酒精性股骨头缺血性坏死骨细胞超微结构的修复。

王大伟, 卢培根, 贾永龙, 张睿昕, 莫坚, 苑井宽. 三七总皂苷干预酒精性股骨头缺血坏死模型兔的超微结构[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(27):4277-4281.

Total saponins of panax notoginseng affects ultrastructure of a rabbit model of alcoholic avascular necrosis of the femoral head

Wang Da-wei, Lu Pei-gen, Jia Yong-long, Zhang Rui-xin, Mo Jian, Yuan Jing-kuan (Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have demonstrated that total saponins of panax notoginseng can inhibit the ethanol-induced adipogenic differentiation of rabbit bone marrow stromal cells and confirmed that total saponins of panax notoginseng promoted the proliferation and differentiation of rabbit osteoblasts, and improved the osteoprotegerin mRNA relative expression in osteoblasts so as to inhibit receptor activator of nuclear factor κB ligand mRNA expression.

OBJECTIVE: To observe effects of total saponins of panax notoginseng on the ultrastructure of the rabbit models of alcoholic avascular necrosis of the femoral head.

METHODS: New Zealand rabbit models of alcohol-induced avascular necrosis of the femoral head were established by gavage of spirit. Successful rabbit models were separately injected with saline, compound bone peptide and total saponins of panax notoginseng group, 0.1 mL/kg, once a day, for 4 consecutive weeks. The ultrastructure of each group were observed by transmission electron microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: Transmission electron microscopy showed that osteocytes after alcoholic avascular necrosis of the femoral head presented mitochondrial swelling and fuzzy crista structure, and

王大伟, 男, 1956年生, 上海市人, 汉族, 教授, 主任医师, 主要从事骨与关节退变与缺血性疾病的防治研究。

通讯作者: 卢培根, 广西中医药大学在读硕士, 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西壮族自治区南宁市 530011

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.27.003
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)27-04277-05

稿件接受: 2014-04-06

Wang Da-wei, Professor, Chief physician, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Lu Pei-gen, Studying for master's degree, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Accepted: 2014-04-06

degranulation of polysomes on rough endoplasmic reticulum. Lipid droplets were seen in osteocytes. Compared with saline group, mitochondria swelling subsided, cristae appeared, the number of polysomes increased on rough endoplasmic reticulum, but the number of lipid droplet decreased in total saponins of panax notoginseng group. Morphological changes in ultrastructure were similar between compound bone peptide group and total saponins of panax notoginseng group. Morphological changes in ultrastructure were more significant in the total saponins of panax notoginseng and compound bone peptide groups compared with saline group ($P < 0.05$). Results verified that total saponins of panax notoginseng could effectively restore ultrastructure of osteocytes of rabbit models of alcoholic avascular necrosis of the femoral head in the early stage.

Subject headings: ginsenosides; femur head necrosis; osteoblasts; osteoprotegerin; models, animal

Funding: the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region in 2012, No. 2012GXNSFAA053122; the Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project of Guangxi Administration of Traditional Chinese Medicine in 2011, No. GZKZ1123

Wang DW, Lu PG, Jia YL, Zhang RX, Mo J, Yuan JK. Total saponins of panax notoginseng affects ultrastructure of a rabbit model of alcoholic avascular necrosis of the femoral head. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(27):4277-4281.

0 引言 Introduction

股骨头缺血性坏死是由于各种原因破坏股骨头血供,使骨的活性成分(骨细胞、骨髓造血细胞和脂肪细胞)死亡的一种病理过程^[1]。酒精性股骨头缺血性坏死导致非创伤性股骨头缺血性坏死的最为常见的因素之一^[2],该病死致残率极高,常累及中青年,呈进展性和致残性发展^[3]。当患者出现明显的关节疼痛和活动受限时,病程已发展至股骨头变形塌陷及不可逆性骨性关节炎^[4-5],患者将失去劳动能力,无特效治疗方法,最终不得不接受人工关节置换^[6]。酒精性股骨头缺血性坏死发病机制与治疗已成为骨科领域的一项世界性研究课题。

已有研究证实三七总皂苷能阻断受体操纵性钙通道、增强一氧化氮的扩张血管作用、改善微循环、具有抗缺血再灌注损伤的作用^[7-9]。作者在前期的研究中从细胞分子生物学水平上已明确三七总皂苷能抑制乙醇诱导的兔骨髓基质干细胞成脂分化,证实三七总皂苷能够促进兔成骨细胞的增殖和分化;并能提高成骨细胞的骨保护素mRNA的相对表达量,而对其细胞核因子 κ B受体活化因子配体mRNA有抑制作用^[10-11]。

实验研究予三七总皂苷干预兔酒精性股骨头缺血性坏死,通过透射电镜观察兔股骨头骨组织超微结构变化,从组织学层面探索三七总皂苷对于骨细胞的作用,为股骨头缺血性坏死的早中期中药介入治疗提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机分组动物实验。

时间及地点: 实验于2012年12月至2013年11月在广西中医药大学及广西医科大学完成。

材料:

实验动物: 8-10周龄健康新西兰雄性大白兔70只,体质量(2.5±0.5) kg,由广西医科大学动物实验中心提供,动物质量合格证号: SCXK桂2009-002。

实验过程中对动物的处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定^[12]。

三七总皂苷干预酒精性股骨头缺血坏死模型兔实验用试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
北京方庄二锅头	北京方庄酒厂
三七总皂苷	江苏康宝制药有限公司(国药准字Z32020670)
复方骨肽注射液	南京新百药业有限公司(国药准字 H32020004)
H-7650型透射电子显微镜	HITACHI

方法:

动物模型制作: 所有新西兰雄性大白兔参照刘忠堂等^[13]灌胃法,予食用白酒(乙醇体积分数为56%)8 mL/(kg·d),每天进食后灌胃1次,连续灌胃6周。因腹泻及其他原因死亡8只,剩余62只。随机抽取8只,行透射电镜观察骨细胞超微结构变化。

分组及干预: 将剩余54只兔用随机数字表法均分为3组($n=18$),生理盐水组、复方骨肽组、三七总皂苷组。各组大白兔正常饲料喂养1周后,行右侧大转子区皮肤常规备皮,消毒,第一次穿刺在C臂机透视下操作并取得穿刺经验,具体步骤为扣及大转子底部,向内上方130°-140°用自制8号骨穿针经皮穿刺至股骨头软骨下(图1),拔出内芯,用注射器按分组分别推注0.1 mL/kg的生理盐水、三七总皂苷及复方骨肽注射液,每周给药1次,连续治疗4周^[14]。

超微结构透射电镜切片制备:

脱钙与固定: 予实验兔行空气栓塞法处死后,立即取新鲜兔股骨头切薄片,投入4 °C浓度为5%戊二醛40 g/L多聚甲醛骨组织固定液固定10 h。后用0.1 mol/L磷酸钙缓冲液充分漂洗,投入EDTA脱钙液(pH 7.2-7.4)脱钙3周。再用刀片将样品修成1 mm³, EDTA脱钙液二次脱钙5 d, 0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次, 1%锇酸做后固定1.5 h,后继续予0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次。

脱水、浸透与包埋: 体积分数50%, 70%, 80%, 90%乙醇, 1:1的90%乙醇:90%丙酮脱水各10 min, 90%丙酮、100%丙酮脱水3次,每次10 min。脱水后入1:1、1:3的100%丙酮与环氧树脂包埋剂混合液浸透,再用纯环氧树脂包埋剂全包埋。



图1 酒精性股骨头缺血性坏死模型兔股骨头穿刺注射三七总皂苷
Figure 1 Femoral head puncture with injection of total saponins of panax notoginseng in a rabbit model of alcoholic avascular necrosis of the femoral head

图注: 向内上方 130°~140°用自制 8 号骨穿针经皮穿刺至股骨头软骨下。

聚合: 放入温箱中聚合, 37 °C 15 h、45 °C 12 h、60 °C 24 h 聚合。

切片: 用半薄片钻石刀进行切片, 发现切片上存在有意义的结构换超薄切片钻石刀进行超薄切片。厚度在 80 nm 左右, 为白色或淡黄色, 用饱和醋酸双氧铀和柠檬酸铅进行双染色各 15 min。

主要观察指标: 在造模前、造模 6 周后及穿刺给药 4 周后选取各穿刺注射组兔股骨头骨细胞进行透射电镜观察, 观察细胞胞浆, 线粒体, 粗面内质网, 多聚核糖体等超微结构, 对其形态学改变进行分析。

统计学分析: 由第二作者采用 SPSS 18.0 分析软件进行统计分析, 行多组间两两比较, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入生理盐水, 三七总皂苷及复方骨肽注射液股骨头穿刺注射新西兰雄性白兔共 54 只, 3 组均造模成功, 无脱失, 均进入结果分析。

2.2 透射电镜观察结果

造模前: 兔股骨头骨细胞细胞器丰富, 可见较多嵴结构清晰线粒体, 富含粗面内质网, 多聚核糖体多, 可见细小颗粒, 见图 2A。

造模后: 兔股骨头骨细胞线粒体肿胀, 嵴结构模糊, 粗面内质网上多聚核糖体脱颗粒, 骨细胞内可见脂滴出现, 见图 2B。

经股骨头穿刺注射治疗 4 周后: ①三七总皂苷组线粒体肿胀较前消退, 嵴结构变清晰, 粗面内质网上多聚核糖体增多, 脂滴减少(图 2C)。②复方骨肽组: 超微结构形态改变与三七总皂苷组相似(图 2D)。③盐水组: 线粒体肿胀, 嵴结构模糊, 粗面内质网上多聚核糖体脱颗粒, 骨细胞内仍可见脂滴(图 2E)。

2.3 骨细胞超微结构统计学分析 股骨头穿刺给药 4 周后三七总皂苷组及复方骨肽注射液组大部分骨细胞超微结构可见改变, 盐水组偶见改变, 见表 1。

表 1 股骨头穿刺给药 4 周后各组超微结构改变数量及改变率

Table 1 Number and rate of altered ultrastructure in each group at 4 weeks after administration by femoral head puncture

组别	有改变(只)	无改变(只)	变化率(%)
三七总皂苷组	16 ^a	2 ^a	89
复方骨肽组	15 ^a	3 ^a	83
盐水组	2	16	11

表注: 与盐水组比较, ^a $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

Hippocrates 早在 1794 年就提出大量饮酒会引骨坏死, 而股骨头则是酒精引起骨坏死发生最多的部位^[14]。Matsu 等^[15]流行病学调查显示, 饮酒发生股骨头缺血性坏死的相对危险度为 7.8, 并且存在明显的酒精剂量正相关关系。国内非创伤性股骨头缺血性坏死患者中, 酒精中毒引起者占第一位, 北京积水潭医院随机收集调查了 1996 至 2000 年的 306 例成人非创伤性股骨头缺血性坏死, 发现由于过量饮酒引起患者 139 例(占 46.10%), 高于激素引起患者(占 34.10%)^[16]。

陈海涛等^[17]收集了 980 例广西各地区股骨头缺血性坏死患者临床资料分析致病原因, 结果示酒精性患者占 12.0%~32.7%, 平均 27.6%。最新流行病学研究显示东亚人群对股骨头缺血性坏死更加易感, 酒精性股骨头缺血性坏死患者约占总患者数的 30%^[18]。

国内外学者对酒精性股骨头坏死发病机制进行了深入研究探讨, 多认为与脂肪代谢紊乱、骨内压升高、骨质疏松及内源性糖皮质激素分泌增加等有关^[19]。脂代谢紊乱, 骨髓基质细胞成脂分化及脂肪细胞肥大是较为成熟的观点。有研究表明骨髓间充质干细胞成骨成脂分化能力的改变从而导致股骨头缺血性坏死, 长期摄入酒精使骨髓基质细胞成骨作用降低, 诱导骨髓间充质干细胞成脂分化导致骨细胞缺血、缺氧, 代谢活动降低, 修复坏死骨的成骨细胞数量减少, 最终导致股骨头坏死、塌陷^[20-21]。最新研究证实乙醇能够促进髓内脂肪细胞大量增殖肥大, 从而使相对封闭的骨髓内压力显著增高, 微小血管因受压而变细, 最终导致血流受阻或者中断, 从而形成股骨头缺血性坏死^[22]。

股骨头缺血性坏死属于中国医学“骨蚀”“骨痹”“瘀血”“酒病”的病症范畴。喻嘉言指出“久饮者环跳受伤”, 饮酒所致“环跳受伤”即为酒精性股骨头疾病。本病多因患者素体肾气亏虚, 复由偏嗜饮酒而发病。综合历代医家归纳其病因病机为肾虚、血瘀、痰湿等, 治疗上以活血化瘀、通痹止痛、补肾强骨为法。蔺道人在《理伤续断方》中以“通筋络, 壮筋骨”为治则治疗“骨痹”。股骨头缺血性坏死用药以活血化瘀、续筋接骨为主的方药如三七, 当归, 骨碎补等来治疗早期股骨头缺血性坏死, 并取得了满意的疗效^[23-24]。

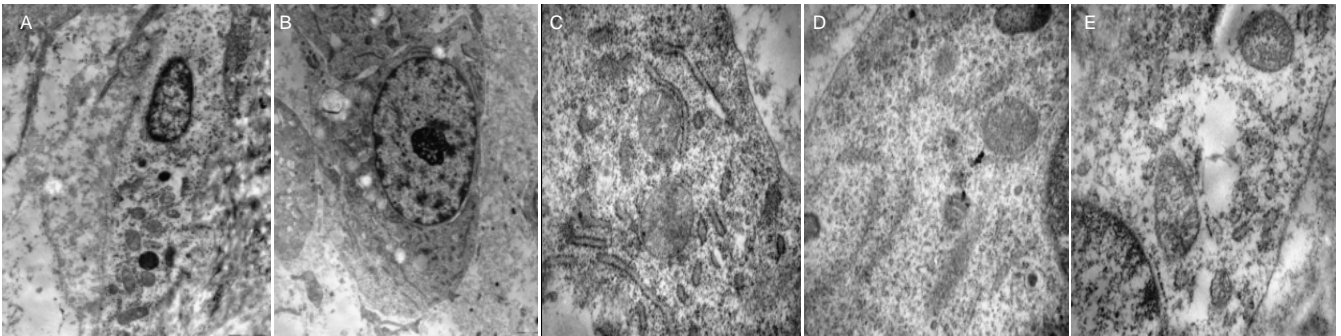


图2 不同方式干预后酒精性坏死兔股骨头骨细胞形态学观察

Figure 2 Morphological observation of osteocytes in a rabbit model of alcoholic avascular necrosis of the femoral head after intervention with various methods

图注: ①图中A为正常兔股骨头骨细胞($\times 15\ 000$); B为酒精性坏死兔股骨头骨细胞($\times 10\ 000$); C为三七总皂苷组($\times 50\ 000$); D为复方骨肽组($\times 50\ 000$); E为盐水组($\times 50\ 000$)。②A为正常兔股骨头骨细胞: 细胞器丰富, 可见较多嵴结构清晰线粒体, 富含粗面内质网; B为酒精性坏死兔股骨头骨细胞: 线粒体肿胀, 嵴结构模糊, 粗面内质网上多聚核糖体脱颗粒, 骨细胞内可见脂滴出现; C为三七总皂苷组: 线粒体肿胀较前消退, 嵴结构变清晰, 多聚核糖体增多, 脂滴减少; D为复方骨肽组: 线粒体肿胀较前消退, 嵴结构变清晰, 多聚核糖体增多, 脂滴减少; E盐水组: 线粒体肿胀, 嵴结构模糊, 粗面内质网上多聚核糖体脱颗粒, 骨细胞内仍可见脂滴。

三七为五加科多年生草本植物三七的根, 主产于广西、云南等地, 性味甘、微苦、温, 归肝、胃经, 具有活血化瘀定痛等疗效, 主要应用于人体内外跌打损伤、瘀滞肿痛之证。三七总皂苷是三七的主要活性成分, 在临床上对于软组织损伤, 骨折的愈合, 骨关节损伤, 肢体功能的恢复及软化瘢痕等有较好的疗效^[25-27]。有研究证实三七总皂苷具有改善血液流变学, 降低血流黏度, 从而促进股骨头坏死区域骨修复和生长的作用^[28]。通过局部穿刺注射三七总皂苷, 可以观察到股骨头组织形态改变, 骨小梁面积分数显著增高, 空骨陷窝计数显著降低^[29]。

王义生等^[30]给予家兔灌胃烈性酒6个月, 通过透射电镜观察到兔股骨头软骨下骨细胞内脂质沉积, 甚或脂肪充满整个骨陷窝, 骨细胞固缩、死亡。齐振熙等^[31]采用酒精灌胃法造模, 20周后观察到大鼠股骨头骨细胞线粒体肿胀, 粗面内质网上多聚核糖体脱粒、解聚, 骨细胞内有脂滴出现。白良川等^[32]采用电针与中成药干预兔酒精性股骨头缺血性坏死模型, 4周后用透射电镜观察股骨头骨细胞, 细胞器清晰可见, 核膜完整, 细胞核固缩改善, 电针组细胞胞浆内脂滴消失。

胡敏等^[33-34]予药物干预激素性兔酒精性股骨头缺血性坏死模型, 经透射电镜观察股骨头细胞8周至16周, 可见骨细胞内线粒体肿胀消退, 脂滴消失, 骨细胞形态结构恢复正常的过程; 并可见较多成骨细胞、破骨细胞、新生骨细胞及骨基质, 新生骨形成小梁。

实验采用灌胃法予新西兰雄性大白兔予连续灌胃6周食用白酒, 股骨头局部穿刺给药干预4周, 通过透射电镜观察兔股骨头骨组织超微结构的具体变化情况。结果显示盐水组线粒体肿胀, 嵴结构模糊, 粗面内质网上多聚核糖体脱颗粒, 骨细胞内仍可见脂滴, 少量出现的超微结构改变有可能是因为股骨头穿刺起到钻孔减压效果所致。而经三七总皂苷干预后, 酒精性股骨头坏死动物模型骨组织受损

程度明显减轻, 线粒体肿胀较前消退, 嵴结构较前清晰, 粗面内质网上多聚核糖体增多, 脂滴数量明显减少; 复方骨肽组骨细胞超微结构形态改变与三七总皂苷组相似。可以认为是三七总皂苷促进兔成骨细胞的增殖分化, 修复坏死骨的成骨细胞数量增多; 另一方面, 三七总皂苷抑制了成脂分化, 使脂代谢正常进行, 并且改善血液流变学, 骨细胞能够用保持充分的血氧供给, 从而使得细胞形态恢复。通过本实验证实三七总皂苷可有效促进早期兔酒精性股骨头缺血性坏死骨细胞超微结构形态修复, 可为中药防治股骨头缺血坏死提供新的治疗靶点。

致谢: 感谢广西中医药大学动物实验中心提供实验动物及饲养方法上给予大量帮助; 感谢广西中医药大学附属瑞康医院放射科给予的大量帮助; 感谢广西医科大学电镜实验室各位老师透射电镜制备及观察给予大量帮助。

作者贡献: 实验设计评估、审校及成文为王大伟, 实验实施、资料收集为全体作者, 共同对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》及《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 酒精性股骨头坏死-股骨头坏死又称股骨头无菌性坏死, 或股骨头缺血性坏死, 是由于多种原因导致的股骨头局部血运不良, 从而引起骨细胞进一步缺血、坏死、骨小梁断裂、股骨头塌陷的一种病变。酒精性股骨头坏死是因为大量酗酒而引起的一种股骨头坏死, 是脂类代谢异常导致该结果的主要原因。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 董晓俊. 股骨头坏死[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 33.
- [2] Bartonicek J, Fric V, Skála-Rosenbaum J, et al. Avascular necrosis of the femoral head in pertrochanteric fractures: a report of 8 cases and a review of the literature. *J Orthop Trauma*. 2007;21(4):229-236.
- [3] Carlson ER, Gerard DA. Commentary - Is the Bone Turnover of the Jawbone and Its Possible Oversuppression by Bisphosphonates of Etiological Importance for the Pathogenesis of the Bisphosphonate-Related Osteonecrosis? *J Oral Maxillofac Surg*. 2013. pii: S0278-2391(13)01502-4.
- [4] Mont MA, Jones LC, Hungerford DS. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(5):1117-1132.
- [5] 裴福兴. 加强基础与临床研究, 努力提高我国股骨头坏死总体诊治水平[J]. *中华骨科杂志*, 2010, 30(1): 3-5.
- [6] 张强, 王岩, 陈怡婷, 等. 中国人股骨头缺血性坏死股骨近端的形态研究[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(2): 138-142.
- [7] Dong TT, Cui XM, Song ZH, et al. Chemical assessment of roots of *Panax notoginseng* in China: regional and seasonal variations in its active constituents. *J Agric Food Chem*. 2003; 51(16):4617-4623.
- [8] Guan YY, Zhou JG, Zhang Z, et al. Ginsenoside-Rd from *panax notoginseng* blocks Ca²⁺ influx through receptor- and store-operated Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 2006;548(1-3):129-136.
- [9] 袁志兵, 李晓辉, 李淑慧, 等. 三七总皂苷对动脉粥样硬化斑块稳定性的影响[J]. *中国天然药物*, 2006, 4(1): 62-65.
- [10] 王大伟, 潘华, 李红波, 等. 三七总皂苷对酒精诱导骨髓基质干细胞分化影响的实验研究[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(8): 1410-1413.
- [11] 王大伟, 史宝明, 李小峰, 等. 三七总皂苷干预股骨头缺血性坏死兔成骨细胞护骨素基因的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(20): 3728-3732.
- [12] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [13] 刘忠堂, 王坤正. 酒精和激素性股骨头缺血性坏死发病机制的实验研究[J]. *温州医学院学报*, 1999, 29(3): 184-187.
- [14] Chang CC, Greenspan A, Gershwin ME. Osteonecrosis: current perspectives on pathogenesis and treatment. *Semin Arthritis Rheum*. 1993;23(1):47-69.
- [15] Matsuo K, Hirohata T, Sugioka Y, et al. Influence of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status on idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res*. 1988;234:115-123.
- [16] 熊腾滨. 酒精性股骨头缺血性坏死发病机制的研究进展[J]. *河南医学研究*, 2003, 12(3): 286-288.
- [17] 陈海涛, 安玉光, 张栋, 等. 广西各地区酒精性股骨头坏死的流行病学调查报告[J]. *中国中医药咨讯*, 2010, 35: 277-277.
- [18] 甘迪, 张长青. 酒精性股骨头缺血性坏死的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2013, 27(3): 365-368.
- [19] 王大伟, 史宝明, 张爽. 构建酒精性股骨头坏死动物模型的理论依据及造模方法[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 15(50): 39-42.
- [20] Suh KT, Kim SW, Roh HL, et al. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;(431):220-225.
- [21] Shapiro F, Connolly S, Zurakowski D, et al. Femoral head deformation and repair following induction of ischemic necrosis: a histologic and magnetic resonance imaging study in the piglet. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91(12):2903-2914.
- [22] 陈跃平, 高辉, 陈亮, 等. 乙醇对股骨头髓内脂肪细胞的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(35): 6221-6227.
- [23] 冯伟, 傅文或, 魏义勇, 等. 单味中药对成骨相关基因表达的影响[J]. *中医正骨*, 2004, 16(3): 6-8.
- [24] 仲兆富, 安建原, 刘诗荣, 等. 化痰逐瘀法治疗 II 期酒精性股骨头缺血性坏死的疗效观察[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2003, 11(6): 41-43.
- [25] Chan P, Thomas GN, Tomlinson B. Protective effects of trilinolein extracted from *panax notoginseng* against cardiovascular disease. *Acta Pharmacol Sin*. 2002;23(12): 1157-1162.
- [26] Chen SC, Cheng JJ, Hsieh MH, et al. Molecular mechanism of the inhibitory effect of trilinolein on endothelin-1-induced hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Planta Med*. 2005;71(6):525-529.
- [27] Xu QF, Fang XL, Chen DF. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from *Panax notoginseng* in rats. *J Ethnopharmacol*. 2003;84(2-3): 187-192.
- [28] 滕居赞, 林宝举, 苏波, 等. 三七总皂苷对激素性股骨头坏死家兔血液流变学影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013, 15(007): 31-33.
- [29] 吴惠斌, 史宝明. 三七总皂苷对兔酒精性股骨头坏死模型组织形态学的影响[J]. *甘肃中医学院学报*, 2012, 29(6): 4-7.
- [30] 王义生, 李月白. 酒精性股骨头缺血性坏死发病机制的实验研究[J]. *中华骨科杂志*, 1998, 18(4): 231-233.
- [31] 齐振熙, 喻灿明. 酒精性股骨头缺血性坏死的动物模型研究[J]. *福建中医学院学报*, 2005, 15(2): 35-36.
- [32] 白良川, 何光远, 姚长风, 等. 电针对激素性股骨头坏死家兔局部组织血流量、骨钙素及超微结构影响的实验研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2011, 19(9): 1-3.
- [33] 胡敏, 赵宏斌, 董锡亮, 等. 普伐他汀修复激素性股骨头坏死兔模型的超微结构评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(37): 6861-6864.
- [34] 胡敏, 赵宏斌, 钱传云, 等. 恒古骨伤愈合剂对兔激素性股骨头坏死模型超微结构的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(3): 486-489.