

建立一种新型凝血因子V基因突变小鼠模型：突变小鼠无显著骨组织变化

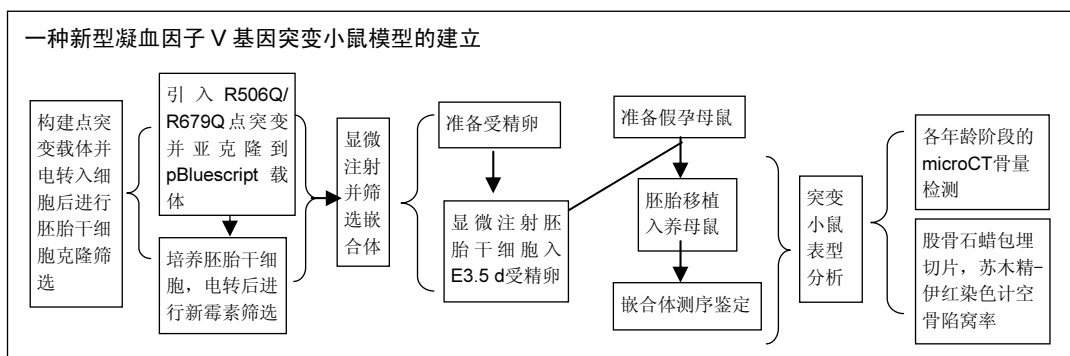
王宇英¹, 张琰², 祁进伟³, 尹兆光⁴(¹杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江省杭州市 310036; ²石家庄场站医院, 河北省石家庄市 050000; ³石家庄市灵寿县医院泌尿外科, 河北省石家庄市 050500; ⁴唐山市滦南县医院外一科, 河北省唐山市 063500)

引用本文: 王宇英, 张琰, 祁进伟, 尹兆光. 建立一种新型凝血因子V基因突变小鼠模型: 突变小鼠无显著骨组织变化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(46): 6861-6867.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.46.003

ORCID: 0000-0001-9124-4489(王宇英)

文章快速阅读:



王宇英, 女, 1981年生, 河北省灵寿县人, 汉族, 2008年河北医科大学毕业, 硕士, 实验师, 主要从事细胞生物学研究。

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)46-06861-07

稿件接受: 2016-09-30

文题释义:

凝血因子V: 位于内外源性凝血途径的交汇点, 能够加速和促进凝血酶原的激活和凝血酶的生成。活化的凝血因子V被活化蛋白C蛋白水解而失活, 在凝血酶形成的调节机制中至关重要。

R506Q/R679Q: 凝血因子V的失活与其重链上的3个位点 arg-306, arg-506, arg-679 的突变密切相关。当基因位点上的鸟嘌呤 G 突变为腺嘌呤 A, 编码氨基酸的谷氨酰胺被精氨酸替代, 形成了基因突变。突变后导致凝血酶对活化蛋白C产生活性抵抗, 使血液的凝血功能异常, 形成血栓倾向和高凝状态。文章将调查第506位和679位的同时突变 R506Q/R679Q 突变对骨坏死产生的功能和影响。

摘要

背景: 研究显示, 凝血因子V基因突变在自发性非创伤性股骨头坏死的发生率比健康对照组和继发性非创伤性股骨头坏死高, 血栓形成的发生率与此吻合。凝血因子V的失活能够加速和促进凝血酶原的激活及凝血酶的生成。其重链上的3个位点 arg-306, arg-506, arg-679 的突变导致血栓倾向和高凝状态。文章将调查第506位和679位的同时突变 R506Q/R679Q 对骨坏死产生的功能和影响。

目的: 建立凝血因子V第506位和679位的谷氨酰胺至精氨酸(Factor V^{R506Q/R679Q})点突变小鼠模型。

方法: 应用分子克隆技术构建 Factor V^{R506Q/R679Q} 点突变打靶载体, 将其线性化后电转到胚胎干细胞中, 然后筛选 G418 抗性的胚胎干细胞克隆进行胚胎显微注射, 将注射好的胚胎移植至同期发情的假孕受体母鼠输卵管内, 获得携带双侧 LoxP 基因的 Chimeric 小鼠。将突变鼠与 CMV-cre 转基因鼠杂交后, 得到只含 Factor V^{R506Q/R679Q} 的点突变鼠。PCR 法进行基因型鉴定后, 将突变小鼠和野生小鼠的骨苏木精-伊红染色和空骨陷窝率等进行比较, 对其骨组织情况及骨量进行分析。

结果与结论: ①与野生鼠相比, Factor V^{R506Q/R679Q} 点突变鼠胚胎及生后的生长发育无明显异常, 骨量及空骨陷窝率并无显著变化; ②结果提示, 成功建立了凝血因子 Factor V^{R506Q/R679Q} 点突变小鼠, 但突变小鼠并无显著骨组织变化。之后的研究应关注在外加因素刺激下突变小鼠的骨坏死诱发率。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 基因突变小鼠; 凝血因子V; 显微注射; 动物模型; 浙江省自然科学基金

主题词:

模型, 动物; 基因; 血液凝固因子; 组织工程

基金资助:

浙江省自然科学基金(LQ13H060003)

Wang Yu-ying, Master,
Experimentalist, College of
Life and Environmental
Science, Hangzhou
Normal University,
Hangzhou 310036,
Zhejiang Province, China

Establishment of a transgenic mouse model with coagulation factor V mutation, but with no obvious changes of bone tissue

Wang Yu-ying¹, Zhang Yan², Qi Jin-wei³, Yin Zhao-guang⁴ (¹College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, Zhejiang Province, China; ²Changzhan Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China; ³Department of Urology, Lingshou Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050500, Hebei Province, China; ⁴First Department of Surgery, Luannan Hospital of Tangshan, Tangshan 063500, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Blood coagulation factor V gene mutation in non-traumatic femoral head necrosis has been shown to have an higher incidence than that in healthy and secondary non-traumatic femoral head necrosis, and the incidence of thrombosis is positively related. Inactivated blood coagulation factor V can accelerate the activation of prothrombin and the generation of thrombin. Mutations at arg-306, arg-506 and arg-679 will result in the blood clots and hypercoagulable state. Here, this study is designed to investigate the influence of R506Q/R679Q on osteonecrosis.

OBJECTIVE: To establish the mouse model of mutations of Gln506Arg and Gln679Arg in coagulation Factor V (Factor V^{R506Q/R679Q}).

METHODS: Factor V^{R506Q/R679Q} point mutation target vector was constructed by molecular cloning technology, the linearization vector was transfected into embryonic stem cells, and then G418-resistant cells were screened and used for microinjection. The target blastocysts were transplanted to the fallopian tube of estrus mice to obtain the Chimera mice carrying bilateral LoxP gene, followed by mated with CMV-cre transgenic mice, and then the mice with Factor V^{R506Q/R679Q} point mutations were obtained. After genotype identification by PCR, hematoxylin-eosin staining results and percentage of empty lacunae were compared between the mutant and wild-type mice, and rat bone tissue and bone mass were analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: There were no obvious abnormalities in the embryonic and postnatal development, percentage of empty lacunae and bone mass of Factor V^{R506Q/R679Q} point mutation mice when compared with the wild-type mice. These results suggest that the mouse model with Factor V^{R506Q/R679Q} point mutation is established successfully, but there is no significant change in the bone tissue. The following research should focus on the effect of external stimulus on the incidence of osteonecrosis in a mutant mouse.

Subject headings: Models, Animal; Genes; Blood Coagulation Factors; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, No. LQ13H060003

Cite this article: Wang YY, Zhang Y, Qi JW, Yin ZG. Establishment of a transgenic mouse model with coagulation factor V mutation, but with no obvious changes of bone tissue. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2016;20(46):6861-6867.

0 引言 Introduction

非创伤性股骨头坏死是骨科常见的疑难病,常发生于30-50岁的中青年,其早期诊断困难,发病机制尚不十分清楚,还未建立起成熟的治疗体系,严重影响患者生活质量,也给社会带来巨大的人力财力损失。

与非创伤性股骨头坏死相关的各种危险因素包括静脉闭塞、激素使用过量、酒精成瘾、系统性红斑狼疮、血管炎、放射线疗法等^[1-8]。传统的动物模型造模手法从这些直观的原因着手,具体包括空气栓子阻塞法、糖皮质激素诱导法、液氮冷冻法、微波加热法等^[9-12]。但是,迄今为止尚未建立理想的动物模型可以最大限度的模拟其发病机制和临床过程^[13]。因为缺乏理想的动物模型,导致关于非创伤性股骨头坏死发病机制及治疗手段的深入探讨进展较缓。因此,探索更为理想的动物模型

是急待解决的问题。

诸多研究表明血管内凝血最可能是骨坏死的最终共同通路,凝血因子V基因突变使血液处于高凝状态,导致股骨头小血管的血栓形成,造成病变部位缺血、缺氧,骨生成降低,从而发生大面积细胞坏死,发展成为骨坏死^[14-16]。在对神经痛诱发的下颌齿槽骨坏死病例分析中,发现其凝血因子V基因突变率在患者中远远高于健康人群^[17]。有研究报道,自发性非创伤性股骨头坏死患者中的凝血因子V基因突变率显著高于其在健康人群或糖皮质激素、酒精滥用引发非创伤性股骨头坏死患者。在糖皮质激素或酒精滥用引发非创伤性股骨头坏死中的发生率为7%,而在自发性非创伤性股骨头坏死中的发生率为17%^[18]。最新的研究结果显示,凝血因子V基因突变在自发性非创伤性股骨头坏死的发生率比健

康对照组和继发性非创伤性股骨头坏死高, 血栓形成的发生率与此吻合^[19]。

凝血因子V位于内外源性凝血途径的交汇点, 能够加速和促进凝血酶原的激活和凝血酶的生成。活化的凝血因子V被活化蛋白C蛋白水解而失活, 在凝血酶形成的调节机制中至关重要^[20]。活化的凝血因子V的失活与其重链上的3个位点arg-306, arg-506, arg-679的突变密切相关^[21-23]。当基因位点上的鸟嘌呤G突变为腺嘌呤A, 编码氨基酸的谷氨酰胺被精氨酸替代, 形成了基因突变。突变后导致凝血酶对活化蛋白C产生活性抵抗, 使血液的凝血功能异常, 形成血栓倾向和高凝状态^[24-26]。而这3个位点中, 已经确定第506位的精/谷突变导致活化蛋白C抵抗和血栓形成风险增加^[27-33], 没有迹象表明第306位的突变与血栓形成的风险增加相关联^[34-36], 而第679的突变具体作用尚未有探究^[37]。文章将调查第506位和679位的同时突变R506Q/R679Q突变是否对骨坏死产生较大的功能和影响。

因此, 非创伤性股骨头坏死高度相关基因凝血因子V^{R506Q/R679Q}定点突变小鼠的建立将会为非创伤性股骨头坏死的机制研究提供新的思路, 之后的研究应该关注此突变小鼠在模拟状态下更加精准高效的产生非创伤性股骨头坏死疾病模型的可能性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物模型实验。

1.2 时间及地点 于2013年5月至2015年12月在杭州师范大学生命与环境科学学院完成。

1.3 材料

实验动物: 健康7周龄C57BL/6J雌鼠30只雄鼠10只, 交配获得实验用受精卵。健康7周龄ICR雌鼠20只雄鼠7只, 雄鼠结扎, 雌鼠交配检栓后作为假孕母鼠。

实验材料及来源: Hieff Mut Site-Directed Mutagenesis Kit 定点突变试剂盒 (yeasen, 11003ES10), BigDye3.1 试剂盒 (ABI, 4337455), DMEM (Invitrogen, 11960069), 胎牛血清 (Gibco, 10099-141), GLUTAMAX (Invitrogen, 35050061), 青霉素/链霉素混合液 (MPbio, 091670049), 0.5 mol/L Trypsin/ EDTA (MP, 091689149), 显微注射仪 (Nikon, Ti-S), 蛋白酶K/DNA提取缓冲液 (10 mmol/L Tris-cl, 0.1 mol/L EDTA, 0.5% SDS), 40 g/L 多聚甲醛 (PFA-PBS, pH=7.4), 水合氯醛 (美仑, MB4202), EDTA (Sigma, E9884)。

1.4 方法

1.4.1 突变靶载体的构建 小鼠凝血因子V基因是从129Sv文库克隆而得。目的基因质粒构建依照BAC修饰技术(图1), 具体如下: ①点突变的引入: 将目标向量的同源臂含有鼠凝血因子V基因的外显子9-14的片段(从位于内含子9的Nco I 位点到位于内含子14的Sal I 位点)亚克隆到pBluescript。按照Hieff Mut Site-Directed Mutagenesis Kit 定点突变试剂盒的要求制备突变模板, 设计R506Q/R679Q突变引物序列分别为5'-CCT GTA CAC CCT GCT GGT CCA GG-3'和5'GTC ATG GCT ACA CAG AAA ATG CAT GAT CGT-3'; ②载体构造: 将含突变位点的酶切位点为Sal I /BamH I 和Sph I /Hpa I 片段的13.6 kb 长的片段亚克隆回pBluescript。含有TK/neo-且其左右两边有loxP位点的基因序列被分子克隆到含有上述突变的Factor V基因的内含子10的位置。最终的目标载体上含有10.4 kb和3.2 kb的同源臂。测序验证确保没有其他突变发生。测序依照BigDye3.1试剂盒说明书步骤进行操作。

1.4.2 胚胎干细胞的培养及筛选 胚胎干细胞为原代129Sv D3第15代胚胎干细胞, 购于上海赛笠生物科技公司。具体方法如下: ①胚胎干细胞的培养及电转: 胚胎干细胞用DMEM、体积分数15%胎牛血清、GLUTAMAX、青霉素/链霉素混合液、0.5 mol/L Trypsin/EDTA培养基培养。将目标载体用Sfi I 酶切线性化后电转入胚胎干细胞; ②药物抗性克隆的筛选: 将电转后培养的胚胎干细胞进行新霉素筛选, 再通过PCR筛选单个靶克隆。从46个携带新霉素(G418)抗性克隆中获得了4个正确的目标胚胎干细胞克隆。通过测序检测到其中的2个克隆包含了R506Q/R679Q目标突变。采用pMC-Cre质粒暂时电转入技术去除目标载体的TK/neo序列。

1.4.3 显微注射及嵌合体的筛选 通过显微注射将靶载体导入小鼠囊胚, 传代交配得到杂合及纯合突变小鼠。具体如下: ①受精卵和假孕母鼠的准备: 先向可育雌鼠注射孕马血清和绒毛膜促性腺激素促其超排卵。检栓后第3.5天解剖受孕母鼠, 从输卵管内收集受精卵备用。将可育雌鼠与输精管结扎后绝育的雄鼠交配, 刺激雌鼠发生一系列妊娠变化而得到假孕母鼠, 作为受精卵突变基因后的养母; ②显微注射: 用显微注射仪将靶载体导入受精卵雄性原核内; ③胚胎移植: 将注射好的受精卵自背部植入假孕母鼠的输卵管内; ④嵌合体鉴定: 提取养母鼠所产小仔的尾部DNA。提取DNA步骤如下: 剪小鼠尾大约2 cm, 加入0.5 mL终浓度为100 mg/L蛋

白酶K/DNA提取缓冲液, 置于50 °C过夜。次日取出用等体积的(酚: 氯仿: 异戊醇=25: 24: 1)混合物抽提1次, 2 500 r/min 15 min离心, 收集水相, 入新管加无水乙醇得絮状沉淀, 灭菌水溶解。测序鉴定嵌合体。测序步骤同上。2对上下游引物分别为: 5'-TTG CCT CTG GGC TGA TAG GG-3', 5'-CCT AAT CTG TGC CAG CG-3'和5'-CCT CTG GAC TCT GAC TGC AG-3', 5'-TAT TCT GGA CTA CAA GAG TGA G-3'。产物片段大小分别为400 bp和139 bp。得到的雄性嵌合体与C57BL/6J雌性交配得到F1代杂合后代, 之后继续交配繁殖获得F5代R506Q/R679Q突变小鼠, 基因背景从129Sv-C57BL/6J向C57BL/6J基因背景进行纯化。所有实验动物饲养和使用均依照杭州师范大学实验用动物委员会相关规定和标准执行。

1.4.4 突变小鼠表型分析 通过染色和microCT技术检测杂合子及纯合子突变小鼠的组织学及骨量变化, 以野生型作为对照组。具体如下: ①microCT骨量检测: 在不同年龄阶段(从出生至8周大), 采用蛙式位(将动物麻醉, 俯卧, 呈蛙式位固定在工作台上, 尽可能使两侧髌关节外展、外旋)通过microCT检测骨量变化情况; ②组织学观察: 收集小鼠的左侧股骨头标本。称质量后, 按4 mL/kg剂量腹腔注射水合氯醛麻醉, 依次固定, 备皮, 消毒。严格无菌手术下迅速取出连同大小转子在内的左侧股骨头, 尽量除去周围软组织后, 将标本立即浸入40 g/L多聚甲醛中置于4 °C室固定过夜, 然后用10% EDTA-Tris缓冲液脱钙1周, 置于4 °C室摇床上加快脱钙速度, 每2 d更换1次脱钙液。脱钙完全后, 将标本置于自动脱水仪上, 从体积分数70%–100%乙醇来逐级脱水到二甲苯透明, 然后石蜡包埋, 修整组织块后沿冠状位切片。切片厚度4 mm, 行常规苏木精-伊红染色, 在光镜下观察股骨头下区骨小梁结构、骨细胞、骨髓脂肪细胞的变化, 高倍镜下任选20个视野, 计数每个视野的骨细胞数, 统计出空骨陷窝数。

1.5 主要观察指标

1.5.1 microCT检测 以野生型小鼠作为对照, 观察突变小鼠各年龄阶段的骨量情况, 包括骨量(骨量/骨组织总量)、类骨质面积、类骨质厚度。

1.5.2 组织学观察 取材股骨, 脱钙脱水进行石蜡包埋切片, 苏木精-伊红染色后观察骨小梁结构、骨细胞、骨髓脂肪细胞的变化并统计空骨陷窝率。

1.6 统计学分析 由第一作者进行统计学处理, 统计软件SPSS 16.0, 多组间各数值进行方差分析, $P < 0.05$

为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 突变小鼠构建及鉴定 应用BAC修饰及分子克隆技术构建Factor V定点突变目标载体, 将Factor V^{R506Q/R679Q}突变成功的质粒线性化后电转到胚胎干细胞。然后将G418抗性的胚胎干细胞显微注射到胚胎, 移植假孕受体母鼠内, 从而获得Chimera小鼠(图1, 图2A–D)。将含LoxP的Chimera鼠与cre小鼠杂交得到Factor V^{R506Q/R679Q}突变小鼠(图1), 基因型鉴定见图2E。

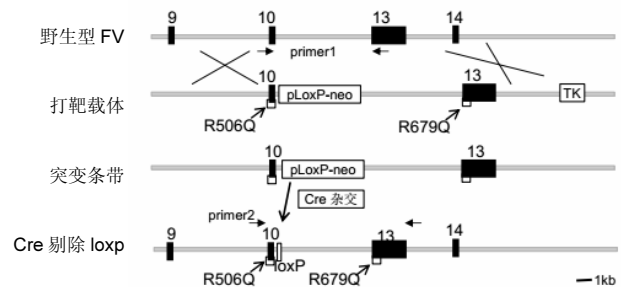


图1 通过基因打靶技术构建Factor V^{R506Q/R679Q} 敲入等位基因
Figure 1 The construction of Factor V^{R506Q/R679Q} allele by gene targeting technology

图注: Factor V 基因构建(外显子9到14), 目标向量携带R506Q/R679Q的突变和一个双旁侧有loxP位点的TK/neo盒, 以达到同源重组的预期结果。

2.2 基因型统计及骨量检测 基因背景纯化后, 对胚胎时期基因型进行统计分析(表1)。对出生后至8周龄大的下肢骨量进行活体microCT动态检测, 未发现显著变化($P > 0.05$), 见图3。

2.3 组织学检测 8周时取材左侧股骨组织进行苏木精-伊红染色光镜下观察股骨头下区骨小梁结构、骨细胞、骨髓脂肪细胞的变化, 高倍镜下任选多个视野, 计数每个视野的骨细胞数, 统计出空骨陷窝数来计算得到空骨陷窝率, 并进行统计学处理分析(图4, 表2)。实验数据结果显示与野生鼠相比, Factor V^{R506Q/R679Q}点突变鼠胚胎成活率及生后的生长发育情况无明显异常($P > 0.05$), 骨量及空骨陷窝率并无显著变化($P > 0.05$)。

3 讨论 Discussion

之前的研究报道表明股骨头小血管的血栓会造成缺血、缺氧, 大面积骨细胞坏死和骨生成降低, 最终造成骨坏死。在自发性非创伤性股骨头坏死和下颌槽骨坏死患者中的凝血因子V基因突变率远远高于健康人群或继发性骨坏死, 血栓的发生率与此吻合^[17-19]。凝血

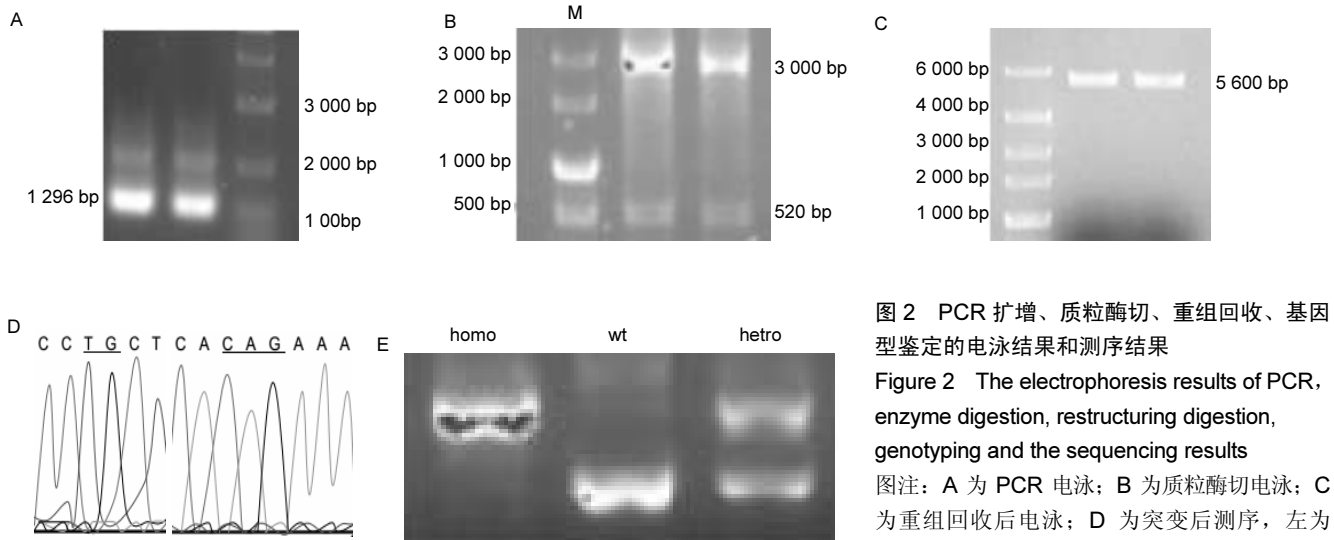


图2 PCR 扩增、质粒酶切、重组回收、基因型鉴定的电泳结果和测序结果

Figure 2 The electrophoresis results of PCR, enzyme digestion, restructuring digestion, genotyping and the sequencing results

图注: A 为 PCR 电泳; B 为质粒酶切电泳; C 为重组回收后电泳; D 为突变后测序, 左为 R506Q, 右为 R679Q; E 为突变小鼠 DNA PCR 基因型分析。野生型等位基因扩增产物为 124 bp, 突变型等位基因扩增产物为 263 bp。

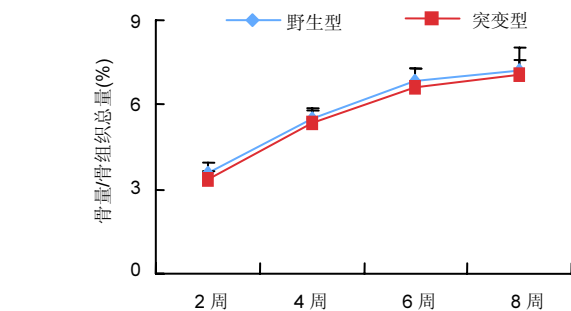


图3 野生小鼠及突变小鼠下肢骨量 microCT 结果

Figure 3 MicroCT results of the bone mass of the lower limb in the mutant and wild-type mice

图注: 结果显示, 与野生鼠相比, 突变小鼠骨量无明显变化。

表1 突变小鼠在出生后3周或胚胎18.5 d 的基因型分布

Table 1 The genotype distribution of mutant mice at embryonic 18.5 days or at 3 weeks old

项目	+/+	FvQ/+	FvQ/Q	总计
预期	25%	50%	25%	100%
出生后 21 d(n/%)	17/26	35/53	14/21	66
胚胎 18.5 d(n/%)	14/24	29/50	15/26	58

表注: 无论胚胎时期胎鼠还是出生后小仔的基因型分布比率与预期比率仅有微弱变化, 没有显著区别。

因子V 基因上 arg-306, arg-506, arg-679 三个位点的精氨酸/谷氨酰胺(R/Q)突变, 使凝血酶对活化蛋白 C 产生活性抵抗导致血栓倾向和高凝状态^[24-26]。其中第 306 位点突变对血凝的作用很弱, 第 506 和 679 位点突变同时突变对对骨组织的功能和影响尚不清楚。本课题旨在探索一种更为理想的研究非创伤性股骨头坏死的动物模型, 以便对于其发病机制及治疗手段进行后续的深入探讨。

作者应用分子克隆技术构建了 Factor V^{R506Q/R679Q}

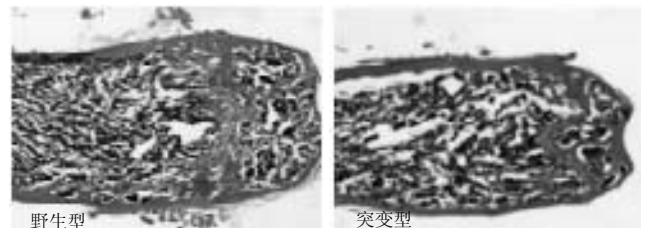


图4 野生小鼠及突变小鼠股骨头下区组织学观察结果(苏木精-伊红染色, ×100)

Figure 4 Histological changes in the lower portion of the femoral head in the mutant and wild-type mice (hematoxylin-eosin staining, ×100)

图注: 结果显示, 与野生鼠相比, 突变小鼠骨组织学无明显变化。

表2 空骨陷窝数统计

Table 2 The number of empty lacunae

项目	+/+	FvQ/+	FvQ/Q
骨组织样品数	8	9	8
空骨陷窝率($\bar{x} \pm s$, %)	32.18±2.83	29.87±3.95	30.04±3.71

突变质粒, 电转到胚胎干细胞, 筛选带 G418 抗性的胚胎干细胞显微注射并移植到养母鼠内, 获得的 Chimera 小鼠与 cre 小鼠杂交得到 Factor V^{R506Q/R679Q} 突变小鼠。经过对突变小鼠的基因背景纯化后, 进行基因型统计分析和活体 microCT 骨量动态检测, 发现突变小鼠与野生小鼠相关指标差异无显著性意义($P > 0.05$)。股骨组织的苏木精-伊红染色, 光镜下观察股骨头下区骨小梁结构及骨细胞并计数统计。实验结果显示, 与野生鼠相比, Factor V^{R506Q/R679Q} 点突变鼠胚胎成活率及生后的生长发育情况无明显异常($P > 0.05$), 骨量骨结构及空骨陷

窝率并无显著变化($P > 0.05$)。在小鼠发育生长过程中, 发现杂合子及纯合子与野生型相比差异无显著性意义。这些结果可以解释有血栓并发症的哺乳动物发生股骨头缺血性坏死的复杂性, 并启示着在其发病中有其他因子扮演着相互协作的重要角色^[38-39]。

文章结果提示,除了Factor V上R506Q/R679Q位点突变外,尚有其他重要因素在股骨头缺血性坏死的发生发展中发挥重要功能^[40-41]。之后的研究应关注在外加因素环境下,突变小鼠的诱发疾病发生率是否跟野生型小鼠相比有显著差异。

作者贡献: 第一作者负责整体实验设计和实施, 第二作者负责分子生物学及细胞培养, 第三作者负责显微注射, 第四作者负责突变小鼠表型分析。实验采用盲法评估。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。实验方案中有关动物伦理问题已经杭州师范大学实验动物伦理委员会讨论批准。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Arlet J. Nontraumatic avascular necrosis of the femoral head. Past, Present, and Future. Clin Orthop Relat Res. 1992;277:12-21.
- [2] Mont MA, Hungerford DS. Current concepts review. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. J Bone Joint Surg Am. 1995;77:459-474.
- [3] Fisher DE. The role of fat embolism in the etiology of corticosteroid-induced avascular necrosis: clinical and experimental results. Clin Orthop Relat Res. 1978;130:68-80.
- [4] Wang Y, Li Y, Mao K, et al. Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res. 2003;410:213-224.
- [5] Abu-Shakra M, Buskila D, Shoenfeld Y. Osteonecrosis in patients with SLE. Clin Rev Allergy Immunol. 2003; 25:13-24.
- [6] Wang TY, Avlonitis EG, Relkin R. Systemic necrotizing vasculitis causing bone necrosis. Am J Med. 1988;84: 1085-1086.
- [7] Massin P, Duparc J. Total hip replacement in irradiated hips: a retrospective study of 71 cases. J Bone Joint Surg Br. 1995;77:847-852.
- [8] Milner PF, Kraus AP, Sebes JI, et al. Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. N Engl J Med. 1991;325:1476-1481.
- [9] Lehner CE, Wilson MA, Dueland RT, et al. Sheep model of dysbaric osteonecrosis in divers and caisson workers. In: Urbaniak JR, Jones JP Jr, eds. Osteonecrosis - Etiology, Diagnosis, and Treatment. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1997:145-152.
- [10] Yang L, Boyd K, Kaste SC, et al. A mouse model for glucocorticoid-induced osteonecrosis: effect of a steroid holiday. J Orthop Res. 2009;27(2):169-175.
- [11] Takaoka K, Yoshioka T, Hosoya T, et al. The repair process in experimentally induced avascular necrosis of the femoral head in dogs. Arch Orthop Trauma Surg, 1981;99(2): 109-115.
- [12] Li Y, Han R, Geng C, et al. A new osteonecrosis animal model of the femoral head induced by microwave heating and repaired with tissue engineered bone. Int Orthop. 2009;33(2):573-580.
- [13] Chang G. Non-traumatic osteonecrosis of the femoral head - from clinical to bench. Med J. 2010;33(4): 351-360.
- [14] Jones JP Jr. Risk factors potentially activating intravascular coagulation and causing nontraumatic osteonecrosis. In: Urbaniak JR, Jones JP Jr, eds. Osteonecrosis: Etiology, Diagnosis, and Treatment. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1997:89-97.
- [15] Glueck CJ, Freiberg RA, Wang P. Detecting thrombophilia, hypo-fibrinolysis, and reduced nitric oxide production in osteonecrosis. Semin Arthroplasty. 2007;18:184-191.
- [16] Vosmaer A, Pereira RR, Koenderman JS, et al. Coagulation abnormalities in Legg-Calve-Perthes disease. J Bone Joint Surg Am. 2010;92(1):121-128.
- [17] Glueck CJ, McMahon RE, Bouquot JE, et al. Heterozygosity for the Leiden mutation of the factor V gene, a common pathoetiology for osteonecrosis of the jaw, with thrombophilia augmented by exogenous estrogens. J Lab Clin Med. 1997;130(5): 540-543.

- [18] Björkman A, Svensson PJ, Hillarp A, et al. Factor V Leiden and prothrombin gene mutation: risk factors for osteonecrosis of the femoral head in adults. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;(425):168-172.
- [19] Glueck CJ, Freiberg RA, Boriel G, et al. The Role of the Factor V Leiden Mutation in Osteonecrosis of the Hip. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2013;19(5):499-503.
- [20] Esmon CT. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost.* 2001;86: 51-56.
- [21] Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem.* 1994;269(50): 31869-31880.
- [22] Gale AJ, Yegneswaran S, Xu X, et al. Characterization of a factor Xa binding site on factor Va near the Arg-506 activated protein C cleavage site. *J Biol Chem.* 2007;282(30):21848-21855.
- [23] van der Neut Kolfschoten M, Dirven RJ, Vos HL, et al. Factor Va is inactivated by activated protein C in the absence of cleavage sites at Arg-306, Arg-506, and Arg-679. *J Biol Chem.* 2004;279(8):6567-6575.
- [24] Reitsma PH, van de Stolpe A. From gene to disease; risk factors for venous thrombosis: factor V Leiden and prothrombin 20210A. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2001; 145(38):1843-1845.
- [25] Glueck CJ, Glueck HI, Greenfield D, et al. Protein C and S deficiency, thrombophilia, and hypofibrinolysis: pathophysiologic causes of Legg-Perthes disease. *Pediatr Res.* 1994;35(4 Pt 1):383-388.
- [26] Glueck CJ, Brandt G, Gruppo R, et al. Resistance to activated protein C and Legg-Perthes disease. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;(338):139-152.
- [27] Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369:64-67.
- [28] Greengard JS, Sun X, Xu X, et al. Activated protein C resistance caused by Arg506Gln mutation in factor Va. *Lancet.* 1994;343(8909):1361-1362.
- [29] Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, et al. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* 1995;85(6):1504-1508.
- [30] Voorberg J, Roelse J, Koopman R, et al. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *Lancet.* 1994;343 (8912):1535-1536.
- [31] Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, et al. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1995;332(14):912-917.
- [32] Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet.* 1995;346(8983):1133-1134.
- [33] Williamson D, Brown K, Luddington R, et al. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306-->Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood.* 1998; 91(4): 1140-1144.
- [34] Chan WP, Lee CK, Kwong YL, et al. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood.* 1998;91(4):1135-1139.
- [35] Franco RF, Maffei FH, Lourenço D, et al. Factor V Arg306-->Thr (factor V Cambridge) and factor V Arg306-->Gly mutations in venous thrombotic disease. *Br J Haematol.* 1998;103(3):888-890.
- [36] Barhoover MA, Kalafatis M. Cleavage at both Arg306 and Arg506 is required and sufficient for timely and efficient inactivation of factor Va by activated protein C. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2011;22(4):317-324.
- [37] Norström E, Thorelli E, Dahlbäck B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood.* 2002;100(2):524-530.
- [38] Kita T, Banno F, Yanamoto H, et al. Large infarct and high mortality by cerebral ischemia in mice carrying the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(7):1453-1455.
- [39] Shanmugam VK, McNish S, Duncan J, et al. Late failure of a split-thickness skin graft in the setting of homozygous factor V Leiden mutation: a case report and correlative animal model from the Wound Etiology and Healing (WE-HEAL) study. *Int Wound J.* 2015; 12(5):537-544.
- [40] Kerschen E, Hernandez I, Zogg M, et al. Survival advantage of heterozygous factor V Leiden carriers in murine sepsis. *J Thromb Haemost.* 2015;13(6): 1073-1080.
- [41] Liang HP, Kerschen EJ, Basu S, et al. Coagulation factor V mediates inhibition of tissue factor signaling by activated protein C in mice. *Blood.* 2015;126(21):2415-2423.