

下肢伸直襁褓体位对髋臼软骨复合体发育影响的实验研究

赵小明,王恩波,李建军,周春芳,赵群,张立军

(中国医科大学附属盛京医院小儿骨科,辽宁 沈阳 110004)

[摘 要] 目的 本实验通过建立下肢伸直襁褓体位的大鼠动物模型及对实验动物进行大体标本及病理研究观察,探讨下肢伸直襁褓体位对髋臼软骨复合体大体形态及其不同骺板区域软骨细胞成熟的影响。方法 实验组:将 31 只新生 Wistar 幼鼠用医用胶带将双小腿、双髋关节缠绕固定 10 d,保持髋关节伸直内收位,模拟双下肢伸直襁褓体位。对照组:另 31 只新生幼鼠双下肢不予处置。母鼠喂养,笼中自由活动。10 d 后处死,通过大体标本、组织学、VEGF 和 X 型胶原免疫组化染色观察髋臼变化。结果 下肢伸直襁褓体位动物模型制作成功。大体观察:实验组髋臼变小变浅,内部软组织增生,49 髋发生髋关节脱位(49/54),部分出现假臼;对照组髋臼轮廓正常,无假臼出现,2 髋脱位(2/60),对照组脱位率与实验组差异有非常显著性($P < 0.01$)。番红 O-快绿染色见实验组橙红色软骨区域较对照组宽。实验组髋臼软骨复合体的髂骨、坐骨、耻骨各支肥大层 VEGF 和 X 型胶原表达较对照组低;实验组髋臼关节软骨髂骨支肥大层 VEGF 与 X 型胶原阳性表达较坐骨支、耻骨支低。结论 下肢伸直襁褓体位大鼠髋臼软骨复合体骺板肥大层软骨细胞 VEGF、X 型胶原的表达水平降低,显示该体位可能导致髋臼软骨复合体软骨细胞成熟障碍,干扰髋臼正常发育乃至脱位。 [中国当代儿科杂志,2009,11(10):836-840]

[关键词] 下肢伸直襁褓体位;VEGF;X 型胶原;发育性髋关节发育不良;髋臼软骨复合体;新生大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)10-0836-05

Developmental changes of acetabular cartilage complex: an experimental study of a straight-leg swaddle model of newborn rats

ZHAO Xiao-Ming, WANG En-Bo, LI Jian-Jun, ZHOU Chun-Fang, ZHAO Qun, ZHANG Li-Jun. Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Zhao Q, Email: peaceharmonysky@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective By establishing a model of straight-leg swaddle of newborn rats and observing the experimental animals' hips morphologically and pathologically, this study explored the changes of gross appearance of the acetabulum and the maturity of cartilage cells in the different regions of acetabular cartilage complex. **Methods** The legs and hips were fixed by adhesive tape for 10 days in the position of hip extension and adduction in 31 newborn Wistar rats (experimental group). The other 31 newborn rats without legs and hips treatment were used as the control group. After 10 days raising in the same condition, all the rats were sacrificed. The gross appearance, histological observations and VEGF and type X collagen immunohistochemistry were used for examining the acetabulum changes. **Results** A straight-leg swaddle model of newborn rats was established successfully. In the experimental group the acetabulum became shallow and small and surrounded by more soft tissues. There were 49 dislocated hips (49/54) in the experimental group and 2 hips dislocated (2/60) in the control group ($P < 0.01$). Fake acetabulum appeared in the experimental group. In the control group, the shape of the acetabulum was normol, and no fake acetabulum was found. The safranin O-fast green staining showed that the orange-red cartilage in the experimental group was wider than the control group. Immunohistochemistry observations showed VEGF and type X collagen immunoreactivities in the hypertrophic layer of the acetabular cartilage complex in the experimental group were lower than those in the control group. The percentages of VEGF positive and type X collagen positive cells in the iliac hypertrophic layer of the acetabular articular cartilage were significantly higher than those in the ischiadic ramus and the pubic branch in the experimental group. **Conclusions** VEGF and type X collagen immunoreactivities in acetabular cartilage cells decrease in a straight-leg swaddle model of newborn rats. This suggests that this position might lead to dysmaturity of the acetabular cartilage cells and affect the development of the acetabulum.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (10):836-840]
Key words: Straight-leg swaddle; VEGF; Type X collagen; Developmental dysplasia of the hip; Acetabular cartilage complex; Newborn rats

[收稿日期]2008-12-22;[修回日期]2009-02-27
[基金项目]国家自然科学基金(30700877)。
[作者简介]赵小明,男,硕士研究生。主攻方向:儿童四肢畸形。
[通讯作者]赵群,男,教授,中国医科大学附属盛京医院小儿骨科,邮编:110004。

发育性髋关节发育不良 (developmental dysplasia of the hip, DDH) 是小儿外科常见的导致肢体终身残疾的一种发育障碍性疾病, 目前 DDH 的真正病因不清楚。髋臼在发育过程中受多方面的影响, 一些学者通过流行病学调查发现双下肢伸直襁褓体位是髋臼发育异常的重要危险因素^[1,2]。髋臼软骨复合体不断骨化而最终行成骨性髋臼, 所以在生长发育过程中, 髋臼软骨复合体的大体形态及发育直接影响着髋臼的最终形态^[3,4]。VEGF 是目前已知的促血管生成因子中同时具备促血管增生和增强血管通透功能的生长因子, 且骨形成过程中强烈地依赖血管生成^[5,6]; X 型胶原蛋白在软骨成熟层中的出现是软骨内成骨的强烈信号^[7]。因此, VEGF 与 X 型胶原能较好的间接反应软骨细胞的成熟。本研究通过建立双下肢伸直襁褓体位动物模型, 首次应用组织学特殊染色及免疫组织化学方法研究双下肢伸直襁褓体位下的新生幼鼠髋臼软骨形态及 VEGF、X 型胶原表达, 以探讨该体位对髋臼软骨复合体大体形态及其不同骺板区域软骨细胞成熟的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

Wistar 新生幼鼠共 62 只 (雌性 34 只, 雄性 28 只), 体重 6.0 ~ 7.0 g, 由中国医科大学附属盛京医院试验中心动物部提供。

小鼠 VEGF IgG 单抗 (Upstate 公司, 美国), 小鼠 X 型胶原 IgG 单抗 (Upstate 公司, 美国), 番红-O (Sigma-aldrich, 德国), 快绿 (Sigma-aldrich, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 模型制作及分组 实验组 31 只, 依据随机数字表从雌性大鼠中随机抽取 17 只幼鼠编号, 同法, 抽取雄性大鼠 14 只。抽取的动物双小腿、双髋关节处医用胶带缠绕固定, 呈髋关节内收伸直、双下肢并拢位, 膝关节和尾部可活动。对照组 31 只 (雌性 17 只, 雄性 14 只) 不做处理。实验组固定幼鼠时, 注意手法轻柔, 避免暴力性脱位, 每日于固定时间松解固定之胶带 1 次, 松解 1 min 后重新固定, 避免由于幼鼠生长而产生的胶带对下肢的压力。出生 10 d 内 2 组混合由各自母鼠母乳喂养, 笼内自由活动。10 d 后处死所有实验动物, 进行观察。

1.2.2 观察指标 大体观察: 动物处死后, 打开双侧髋关节囊, 肉眼观察是否存在髋关节脱位、是否存在假臼, 并观察髋臼变化。

组织学观察: 将两组髋臼标本 4% 多聚甲醛液

固定 48 h, 10% EDTA 脱钙 20 d, 逐级酒精脱水, 髋臼水平位石蜡包埋, 自髋臼底连续切片厚 5 μm , 自出现关节腔第 1 张切片标记为 1 号, 第 2 张切片标记为 2 号, 1 号切片之前一张切片标记为 -1 号, 以此类推, 分别取实验组与对照组各 41 张相同编号切片脱蜡, 0.1% 番红 O-快绿染色, 封片, 镜下观察、采集图像 (NIS-Elements F 2.30)、测量 (NIS-Elements BR 2.10): 取橙红色区域各支最狭窄处测量、记录。

免疫组织化学染色观察: 取石蜡切片分为 I、II 两组, 各组为标记序号相同的实验组和对照组石蜡切片, 组 I 取实验组与对照组各 53 张石蜡切片, 组 II 为实验组与对照组各 55 张石蜡切片, 进行脱蜡, 梯度酒精水化, 置于 3% H_2O_2 -甲醇溶液中浸泡 10 min, PBS 洗 2 min, 3 次。加入 10% 山羊血清 10 min, 吸去血清; I 组加入适量 1:200 小鼠 VEGF IgG 单抗, II 组加入适量 1:200 小鼠 X 型胶原 IgG 单抗, 湿盒内 4 $^\circ$ 孵育过夜, PBS 洗 2 min, 3 次; 加入抗小鼠生物素化二抗孵育 10 min, PBS 洗 2 min, 3 次; 加入过氧化物酶标记的链亲和素孵育 10 min, PBS 洗 2 min, 3 次, 滴加新鲜 DAB 显色液室温显色 2 ~ 5 min, 自来水充分冲洗, 经苏木素复染, 盐酸酒精分化, 脱水、透明、封片, 镜下观察、采集图像。细胞浆呈棕褐色颗粒细胞为染色阳性细胞, 400 倍光镜下计数 Y 型软骨和髋臼关节软骨髂骨、坐骨、耻骨各支增殖层、肥 layers 和静止层的 VEGF、X 型胶原阳性细胞和总细胞数, 每区随机取 5 个视野, 取均数, 计算各区 VEGF、X 型胶原阳性细胞率。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 脱位率比较应用 χ^2 检验; 实验组与对照组番红 O-快绿染色软骨宽度、VEGF 阳性细胞率、X 型胶原阳性细胞率, 两两比较采用 t 检验; 实验组髋臼关节软骨髂骨支肥大层 VEGF、X 型胶原阳性细胞率与实验组髋臼关节软骨耻骨、坐骨肥大层 VEGF、X 型胶原阳性细胞率, 两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

实验组 4 只 (雌性 3 只, 雄性 1 只) 死亡, 实验组总死亡率 12.9%, 造模成功率 87.1%; 对照组 1 只 (雄性) 死亡, 对照组总死亡率 3.2%。

2.1 大体观察

打开髋关节囊可见实验组共脱位或半脱位 49 髋 (49/54), 脱位率为 90.8%, 对照组 2 髋 (2/60) 脱

位,脱位率为33.3%。实验组与对照组髌关节脱位率差异有非常显著性($\chi^2 = 234011.973, P < 0.01$)。两组雌、雄性脱位率差异无显著性(实验组雌雄间: $\chi^2 = 0.00757, P > 0.05$;对照组雌雄间: $\chi^2 = 0.28320, P > 0.05$)。实验组髌臼周围软组织增多,髌关节囊松弛,增厚,完全脱位的关节囊被拉向后上方。髌臼明显变浅,上缘变钝、变直,向上倾斜,入口径变小,形状类椭圆形,其内充填较多软组织,软骨失去光泽,髌臼边缘的臼唇内翻。股骨头非球形而覆盖不良。

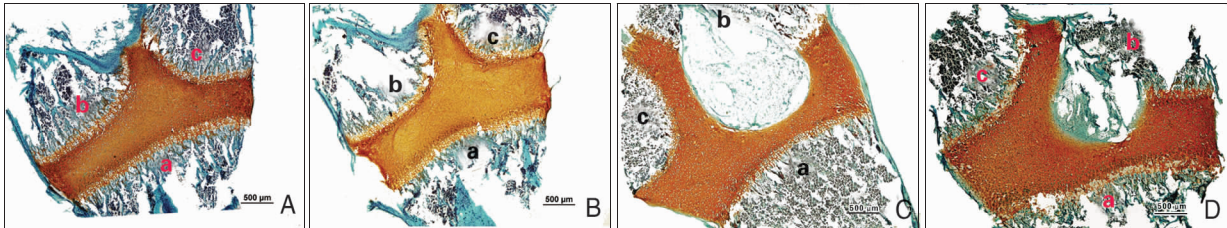


图1 髌臼番红 O-快绿染色 ($\times 40$) (软骨显示橙红色,骨组织被染成绿色) A、C 为对照组,B、D 为实验组。A、B 中橙红色区域为 Y 型软骨,C、D 中橙红色区域为髌臼关节软骨。实验组 B、D 橙红色区域较对照组 A、C 明显增宽,且髌骨支边缘不规则,肥大层细胞局部厚度变薄,细胞大小不一,形态不规则。a,b,c 分别为围成髌臼的髌骨,坐骨,耻骨。

2.3 免疫组织化学染色观察

2.3.1 VEGF 免疫组织化学染色观察 VEGF 免疫反应性(VEGF immunoreactivity, VEGF-IR)阳性为胞浆棕黄着色,阴性为胞浆蓝染(图2)。

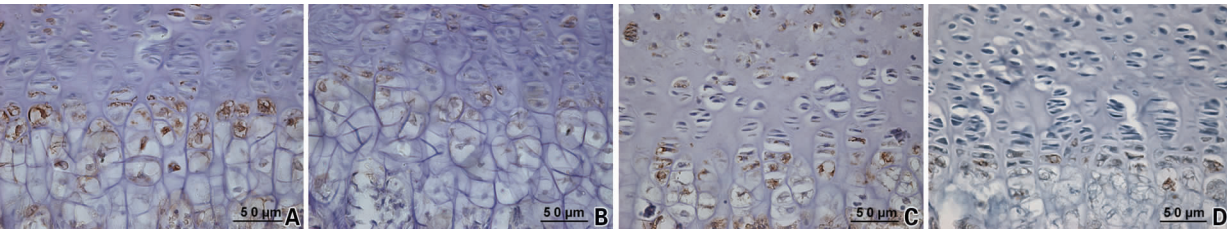


图2 VEGF 免疫组织化学染色 ($\times 400$) (阳性为胞浆棕黄着色,阴性为胞浆蓝染) A:对照组髌臼关节软骨髌骨支髌板肥大区、增殖区 VEGF 表达; B:实验组髌臼关节软骨髌骨支髌板肥大区、增殖区 VEGF 表达; C:对照组 Y 形软骨髌骨支髌板肥大区、增殖区 VEGF 表达; D:实验组 Y 形软骨髌骨支肥大区、增殖区 VEGF 表达。对照组 A、C 肥大层软骨细胞 VEGF 阳性率高,肥大层软骨细胞肥大、空虚化,形态规则,排列有序;实验组 B、D 肥大区软骨细胞 VEGF-IR 阳性率较对照组 A、C 低,软骨细胞大小不一,形态不规则,排列紊乱。

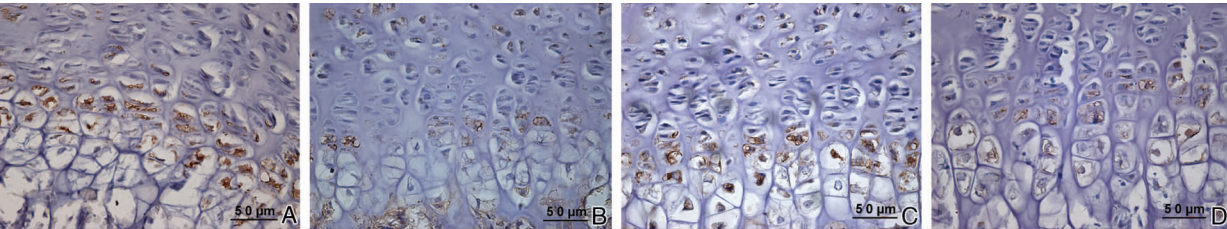


图3 X型胶原免疫组织化学染色观察 ($\times 400$) (阳性为胞浆棕黄着色,阴性为胞浆蓝染) A 为对照组髌臼关节软骨髌骨支髌板肥大区、增殖区 X 型胶原表达; B 为实验组髌臼关节软骨髌骨支髌板肥大区、增殖区 X 型胶原表达; C 为对照组 Y 形软骨髌骨支髌板肥大区、增殖区 X 型胶原表达; D 为实验组 Y 形软骨髌骨支肥大区、增殖区 X 型胶原表达。对照组 A、C 肥大层软骨细胞 X 型胶原阳性率高,肥大层软骨肥大、空虚化,形态规则,排列有序;实验组 B、D 肥大区软骨细胞 X 型胶原阳性率较 A、C 低,软骨细胞大小不一,形态不规则,排列紊乱。

2.2 组织学观察

组织切片番红 O-快绿染色可见:软骨部分被染成橙红色,骨组织为绿色区域。同号切片,取橙红色区域各支最狭窄处分别比较,实验组 Y 型软骨三支较对照组增宽,髌臼关节软骨亦增宽,差异有显著性(表1)。髌板静止层与增殖层软骨细胞数增多,大小不一,形态不规整,肥大层细胞局部厚度变薄,实验组部分髌骨支肥大层不均匀;对照组增殖层、静止层细胞大小适中、规则,肥大层厚度均匀、规则(图1)。

2.3.2 X型胶原免疫组织化学染色观察 X 型胶原免疫反应性(COL X immunoreactivity, COL X-IR)阳性为胞浆棕黄着色,阴性为胞浆蓝染(图3)。

X 型胶原免疫组化阳性表现与 VEGF 相近。对照组:髌臼软骨复合体髌板肥大层软骨细胞肥大、空虚化,形态规则,排列有序,胞浆被染成蓝色,其中可见许多胞浆棕黄色的软骨细胞,COL X-IR 和 VEGF-IR 表达水平高,而增殖层存在少量棕黄色软骨细胞,静止层几乎无 VEGF-IR 和 COL X-IR 阳性表达。

实验组:髌臼软骨复合体髌板肥大层软骨细胞

肥大、空虚化,细胞大小不一,形态不规则,排列紊乱,胞浆被染成蓝色,其中可见许多胞浆棕黄色的软骨细胞,但较对照组低,差异有显著性;而增殖层存在少量棕黄色软骨细胞,静止层几乎无 VEGF-IR 及 COL X-IR 阳性表达。而髌臼关节软骨髌骨支肥大层 VEGF-IR 和 COL X-IR 表达水平较余两支低,见表 2。

表 1 实验组与对照组髌臼软骨番红 O-快绿染色宽度比较 (μm, $\bar{x} \pm s$)

组别	切片数	Y 形软骨			髌臼关节软骨		
		髌骨耻骨间支	髌骨坐骨间支	坐骨耻骨间支	髌骨支	耻骨支	坐骨支
对照组	41	519.5 ± 16.6	548.7 ± 17.3	250.0 ± 8.4	266.2 ± 9.9	334.4 ± 11.8	506.5 ± 17.9
实验组	41	636.4 ± 18.1 ^a	629.9 ± 20.4 ^a	314.9 ± 13.7 ^a	327.9 ± 11.0 ^a	467.5 ± 15.5 ^a	792.9 ± 21.5 ^a

a: 与对照组比较, $P < 0.01$

表 2 实验组与对照组髌臼软骨复合体髌板肥大区 X 型胶原阳性细胞率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	切片数	Y 形软骨肥大区			髌臼关节软骨肥大区		
		髌骨支	耻骨支	坐骨支	髌骨支	耻骨支	坐骨支
对照组	55	63.1 ± 3.6	61.4 ± 4.1	65.1 ± 2.4	61.2 ± 4.6	60.7 ± 4.0	65.4 ± 5.1
实验组	55	29.2 ± 2.0 ^a	31.3 ± 3.3 ^a	28.7 ± 2.0 ^a	14.2 ± 1.0 ^a	30.0 ± 3.6 ^{a,b}	27.7 ± 2.7 ^{a,b}

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与同组髌骨支比较, $P < 0.01$

3 讨论

DDH 是小儿外科常见的,导致肢体终身残疾的一种发育障碍性疾病,目前 DDH 的真正病因不清楚。一些学者通过流行病学调查发现习惯背背婴儿的民族,如朝鲜、香港和非洲一些国家发育性髋关节脱位发病率非常低。相反,位于寒冷地区习惯双下肢捆绑式襁褓的一些民族,如意大利北部,加拿大、北美印第安人等 DDH 发病率明显增高^[1,2],并推断人类出生后髋关节伸直内收体位会导致髋关节发育不良^[8],但至今为止没有模拟该体位的动物模型报道。本研究通过动物实验研究上述推论并从组织学、免疫组织化学方面研究该体位对髌臼软骨复合体大体形态及软骨细胞成熟的影响。

髌臼是由髌骨、坐骨和耻骨围成,前方为耻骨,上方为髌骨,后方为坐骨。出生时,髌臼为一软骨复合体,称为髌臼软骨复合体,由位于内侧的 Y 形软骨和位于外侧的杯状髌臼关节软骨组成^[9,10]。目前国内外文献资料中对髌臼软骨复合体的相关报道较少,且未见深入的实验研究。

Wistar 幼鼠 2 周可以断母乳,因此 10 d 龄幼鼠相当于人类婴儿期,婴儿期人类自然体位是髋关节外展屈曲,Wistar 大鼠出生 10 d 内体位与人类相近。该期实施固定,处理方式接近人类婴儿期直腿襁褓。由于婴儿期并非整日襁褓且襁褓时婴儿髋、膝关节可做轻微活动,同时为避免实验动物在实验

处理过程中发生暴力性脱位,故实验组间歇松解固定胶带,同时实验组在模拟直腿襁褓体位的同时又允许幼鼠髋、膝关节轻微屈伸活动,更贴近人类出生后直腿襁褓的自然状态。本实验中,幼鼠 10 d 后实验组髌臼明显变浅,其内充填较多软组织,髌臼边缘的白唇内翻,大部分会在真臼顶部边缘出现假臼,而对照组髌臼轮廓正常,髌臼软骨表面光滑,无髌脱位及假臼出现。实验组髋关节脱位率发生率明显高于对照组($P < 0.01$)。番红 O-快绿染色可见实验组橙红色软骨区域各支最狭窄处分别比对照组增宽,差异有显著性,髌骨支橙红色软骨边缘不规则,肥大层软骨细胞大小不一,形态不规整。因此通过大体形态及软骨的番红 O-快绿染色观察,可以证实该体位可导致大鼠髌臼发育障碍、髋关节脱位。

VEGF 对正常生长板形态发生和软骨内骨化中心形成起重要作用^[11]。有研究认为^[12],VEGF 在骨形成与代谢中主要有以下作用:①促进血管生成参与骨发育形成;②作为旁分泌因子参与骨形成与代谢;③通过促进内皮细胞增殖参与骨愈合和代谢。因此 VEGF 是反应软骨细胞成熟的指标之一。本实验结果表明 VEGF 高水平表达于软骨髌板肥大区,而肥大区正是软骨即将骨化的重要部位,VEGF 诱导新生血管长入,钙盐沉积而完成软骨内化骨过程。实验组肥大区 VEGF 表达水平明显低于对照组,表明实验组 VEGF 在软骨骨化过程中不能提供良好的软骨骨化环境,软骨细胞成熟障碍,正常骨化延迟,导致髌臼发育障碍。X 型胶原在骨生长中的作用已

引起许多学者的注意^[13,14]。现在证实该蛋白在软骨成熟层中的出现是软骨内成骨的强烈信号^[7,15],本实验中X型胶原免疫组化染色主要定位于肥大区,该结果能进一步证明髌臼软骨复合体髌板肥大区即为髌臼软骨内成骨的重要部位。生长发育期的软骨,在即将钙化之前,软骨细胞变形膨大,成为肥大软骨细胞,开始合成X型胶原蛋白,并将其分泌到肥大细胞外即将钙化的基质中。X型胶原分子既可以与 Ca^{2+} 结合,又可以被基质小泡吸附,从而介导 Ca^{2+} 向基质小泡内快速流入,启动小泡内 Ca^{2+} 骨化晶核的形成,从而启动软骨内骨化^[16,17]。实验组COL X表达水平明显较对照组低,表明软骨肥大细胞合成分泌X型胶原能力降低、发育不成熟,进而影响了髌臼正常发育。本实验中利用反应软骨细胞成熟的2个指标VEGF与X型胶原蛋白,证明了下肢伸直襁褓干扰了髌臼软骨复合体软骨细胞的成熟,延迟髌臼正常骨化,导致髌臼发育障碍。

自Klisic^[18]提出发育性髌脱位以来,学者更加重视髌臼及股骨头间相互的机械应力刺激,髌臼的最终形状和其深度很大程度上依赖于头臼的相互作用。双下肢伸直襁褓时,髌关节固定不动,处于失动态,头臼间失去了正常的动态刺激,并且髌臼对股骨头的包容差,达不到生理性同心,使得头臼失去了正常的解剖关系和生物力学内环境。实验结果示实验组VEGF及X型胶原免疫组化表达水平较对照组低,而实验组髌臼周围软骨髌骨支VEGF及X型胶原免疫组化表达水平较耻骨支、坐骨支低。此结果表明在双下肢伸直襁褓时髌臼软骨复合体整体软骨内骨化较差,而以髌臼关节软骨髌骨支髌板为重。而髌骨支髌板的发育构成了髌臼的顶壁,这可能直接导致了髌臼顶壁缺陷、不能良好覆盖股骨头,进一步发展而出现髌关节脱位。Smith等^[19]通过一系列动物实验证明,髌臼发育不良是髌关节脱位的后果而不是原因,是继发于髌关节脱位的。当股骨头停止生长或是发生脱位时,Harrison^[20]发现髌臼窝就会停止在深度上的生长,并且导致关节软骨的萎缩与退化。本实验中使髌关节伸直内收的襁褓体位使髌臼与股骨头几乎完全失去了动态力学刺激,导致整个髌臼软骨复合体软骨内骨化障碍。

本实验通过成功建立双下肢伸直襁褓体位大鼠动物模型并对该体位的髌臼发育进行大体、组织学观察,结果类似人类发育性髌脱位的各种表现。而免疫组化实验结果VEGF及X型胶原在该体位髌臼髌板软骨的低水平表达进一步证实,双下肢伸直襁褓体位影响髌臼软骨复合体的正常骨化,导致髌

臼发育障碍。

[参 考 文 献]

- [1] Kutlu A, Memik R, Mutlu M, Kutlu R, Arslan A. Congenital dislocation of the hip and its relation to swaddling used in Turkey [J]. J Pediatr Orthop, 1992, 12(5):598-602.
- [2] Kremli MK, Alshahid AH, Khoshhal KI, Zamzam MM. The pattern of developmental dysplasia of the hip [J]. Saudi Med J, 2003, 24(10):1118-1120.
- [3] Connolly P, Weinstein SL. The natural history of acetabular development in developmental dysplasia of the hip [J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2007, 41(Suppl 1):1-5.
- [4] Cashin M, Uthoff H, O'Neill M, Beaulé PE. Embryology of the acetabular labral-chondral complex [J]. J Bone Joint Surg Br, 2008, 90(8):1019-1024.
- [5] Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(11):2017-2027.
- [6] Higashikawa A, Kawaguchi H, Nakamura K, Chung U. Interactions of chondrocytes and osteoblasts during endochondral bone formation [J]. Clin Calcium, 2006, 16(5):829-836.
- [7] Ishimaru J, Handa Y, Kurita K, Goss AN. The effect of occlusal loss on normal and pathological temporomandibular joints: an animal study [J]. J Craniomaxillofac Surg, 1994, 22(2):95-102.
- [8] Herring JA. Developmental dysplasia of the hip [M]. //Herring JA. Tachdjian's Pediatric Orthopaedics. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2002, 513-517.
- [9] Ponseti IV. Growth and development of the acetabulum in the normal child. Anatomical, histological, and roentgenographic studies [J]. J Bone Joint Surg Am, 1978, 60(5):575-585.
- [10] O'Hara JN. Congenital dislocation of the hip: acetabular deficiency in adolescence (absence of the lateral acetabular epiphysis) after limbectomy in infancy [J]. J Pediatr Orthop, 1989, 9(6):640-648.
- [11] Bluteau G, Julien M, Magne D, Mallein-Gerin F, Weiss P, Daculsi G, et al. VEGF and VEGF receptor are differentially expressed in chondrocytes [J]. Bone, 2007, 40(3):568-576.
- [12] 张先龙,戴克戎. 血管内皮生长因子在骨形成与代谢中的作用 [J]. 中华骨科杂志, 1998, 18(2):113-115.
- [13] Ali AM, Sharawy M. An immunohistochemical study of the effects of surgical induction of anterior disc displacement in the rabbit craniomandibular joint on type I and type II collagens [J]. Archs Oral Biol, 1995, 40(6):473-480.
- [14] Christesen LV, Ziebert GJ. Effects of experimental loss of teeth on the temporomandibular joint [J]. J Oral Rehabil, 1986, 13(6):587-598.
- [15] Sweeney E, Campbell M, Watkins K, Hunter CA, Jacenko O. Altered endochondral ossification in collagen X mouse models leads to impaired immune responses [J]. Dev Dyn, 2008, 237(10):2693-2704.
- [16] Kirsch T, von der Mark K. Ca^{2+} binding properties of type X collagen [J]. FEBS Lett, 1991, 294(1-2):149-152.
- [17] Kirsch T, Ishikawa Y, Mwale F, Wuthier RE. Roles of the nucleational core complex and collagens (types II and X) in calcification of growth plate cartilage matrix vesicles [J]. J Biol Chem, 1994, 269(31):20103-20109.
- [18] Klisic PJ. Congenital dislocation of the hip—a misleading term: brief report [J]. J Bone Joint Surg, 1989, 71(1):136.
- [19] Smith WS, Iretton RJ, Coleman CR. Sequelae of experimental dislocation of a weight-bearing ball and socket joint in a young growing animal [J]. J Bone Joint Surg Am, 1958, 40(5):1121-1127.
- [20] Harrison TJ. The influence of the femoral head on pelvic growth and acetabular form in the rat [J]. J Anat, 1961, 95:12-24.

(本文编辑:吉耕中)