

不同孔径 β -TCP 对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及成骨作用的体外研究

刘楠 李海 赵黎 胡玲琬

【摘要】 目的 探讨不同孔径 β -磷酸三钙(β -TCP)对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)增殖及成骨分化的作用。**方法** 体外原代培养 BMSC,取第 2 代细胞悬液 $100\ \mu\text{l}$ (细胞浓度 $2\times 10^6/\text{ml}$)接种于 5 组不同孔径($187\sim 300$ 、 $300\sim 375$ 、 $375\sim 500$ 、 $500\sim 750$ 、 $750\sim 830\ \mu\text{m}$)的圆盘状多孔 β -TCP 材料中。采用细胞计数试剂盒(CCK-8)测定 BMSC 接种后 3、24、48、72 h 增殖情况;扫描电镜观察接种 72 h 后 BMSC 在多孔 β -TCP 上贴附、生长情况;碱性磷酸酶(ALP)试剂盒检测接种 72 h 后 BMSC 的 ALP 活性。**结果** 接种后 48 h BMSC 在各组多孔 β -TCP 上均有显著增殖,其中 $500\sim 750\ \mu\text{m}$ 组增殖最快($P<0.05$);扫描电镜观察显示,BMSC 在多孔 β -TCP 材料上黏附、伸展、聚集,生长状态良好;接种后 72 h 各组 BMSC 的 ALP 活性均明显增高,其中 $500\sim 750\ \mu\text{m}$ 组 ALP 活性最高($P<0.05$)。**结论** 不同孔径的多孔 β -TCP 对 BMSC 增殖及成骨分化均有促进作用,其中 $500\sim 750\ \mu\text{m}$ 孔径的促进作用最明显,可能是促进 BMSC 增殖及成骨分化的最适孔径。

【关键词】 β -磷酸三钙;骨髓间充质干细胞;细胞增殖;碱性磷酸酶活性;体外研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-7083.2012.06.021

Effect of various pore sizes of porous beta-tricalcium phosphate on proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cell: An in vitro study LIU Nan, LI Hai, ZHAO Li, HU Ling-long. Department of Pediatric Orthopaedics, Xin-Hua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of various pore sizes of porous beta-tricalcium phosphate (β -TCP) on the proliferation and osteogenic differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in rat. **Methods** BMSCs were isolated from rat femur and cultured in vitro. The same volume of $100\ \mu\text{l}$ of second passage cells suspension with concentration of $2\times 10^6/\text{ml}$ were implanted in porous β -TCP with disc shape and various pore sizes ($187\sim 300\ \mu\text{m}$, $300\sim 375\ \mu\text{m}$, $375\sim 500\ \mu\text{m}$, $500\sim 750\ \mu\text{m}$, $750\sim 830\ \mu\text{m}$). Cell proliferation was evaluated at 3, 24, 48, 72 hours after implantation by cell counting kit-8 (CCK-8). The morphology of BMSCs growing on β -TCP was observed by scanning electron microscope (SEM). Osteogenic differentiation of BMSCs was evaluated in terms of activity of alkaline phosphatase (ALP) in cells at 72 hours after implantation by ALP assay. **Results** BMSCs in all groups grew fast at 48 hours after implantation, while the cells in group of $500\sim 750\ \mu\text{m}$ showed the highest proliferation ($P<0.05$). Good adhesion, extension and aggregation of the cells were also demonstrated in each group by means of SEM. ALP activity of BMSCs in all groups increased at 72 hours after implantation, while cells in group of $500\sim 750\ \mu\text{m}$ increased most significantly ($P<0.05$). **Conclusions** Various pore sizes (pore sizes range: $187\sim 830\ \mu\text{m}$) of porous β -TCP could enhance the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs implanted, the highest improvement has been found in the porous β -TCP with pore size of $500\sim 750\ \mu\text{m}$, which is supposed to be the optimal pore size for growth and osteogenic differentiation of BMSCs.

【Key words】 β -tricalcium phosphate; Bone marrow mesenchymal stem cell; Cell proliferation; Activity of alkaline phosphatase; In vitro study

β -磷酸三钙(β -TCP)具有良好的生物相容性及一定的骨诱导性,作为骨移植材料具有广泛的临床应用前景。多孔孔径是 β -TCP 重要结构参数,对细胞长入、骨组织形成有重要作用。研究发现 β -TCP 孔径大于 $100\ \mu\text{m}$ 才适合细胞长入和组织形成^[1],孔径在 $800\ \mu\text{m}$ 左右的 β -TCP 同样可以满足骨组织生长需要,但对于是否存在可促进骨组织生长的最适孔径,目前研究结果并不一致^[2-4]。这可能在于那些研究中还混杂有孔隙率、孔内连接径等其他多孔结构参数的变化,因此很难明确孔径作为单一因

素对细胞生长及骨组织形成的影响。本研究选用可溶性球模注浆技术^[5]制备多孔 β -TCP,通过体外细胞试验探讨 β -TCP 不同孔径对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)增殖、成骨特性的作用。

1 资料与方法

1.1 实验材料

选取圆盘状无菌 β -TCP(直径 $12\ \text{mm}$,高 $4\ \text{mm}$),按孔径分为 5 组($187\sim 300\ \mu\text{m}$ 组、 $300\sim 375\ \mu\text{m}$ 组、 $375\sim 500\ \mu\text{m}$ 组、 $500\sim 750\ \mu\text{m}$ 组、 $750\sim 830\ \mu\text{m}$ 组),每组 20 个样本。采用可溶聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)球模注浆技术(上海贝奥路生物材料有限公司)制备多孔 β -TCP 材料,各组材料的孔隙率、孔内连接径相对恒定,孔径为唯一变量。

实验采用 4 周雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(中国

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20090073120037)、上海市科委医学引导类项目(09411962600)、上海市卫生局青年科研项目(2008Y069)

作者单位:200092, 上海交通大学医学院附属新华医院小儿骨科

科学院上海实验动物中心), 体重 60~80 g, 以及低糖 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶、含青霉素-链霉素无菌磷酸盐缓冲液(PBS, Gibco 公司)、细胞计数试剂盒(CCK-8, 日本同仁化学研究所)、碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)、Bio-Rad 蛋白测定试剂盒(Bio-Rad 公司)。

1.2 测量 β -TCP 结构参数

多孔 β -TCP 的理论孔径、孔内连接径数值由上海贝奥路生物材料有限公司提供。采用扫描电镜、微 CT (MicroCT) 测量各组 β -TCP 实际孔径、孔内连接径数值^[5], 各组 β -TCP 孔隙率以 Archimedes 排水法测量。

1.3 BMSC 培养及接种

体外原代培养 SD 大鼠股骨 BMSC^[6]后, 取生长良好的第 2 代细胞浓度为 2×10^6 /ml 的单细胞悬液 100 μ l 缓慢滴入 5 组 β -TCP 样本(提前在 DMEM 培养液中浸泡 12 h)^[7], 置入 37℃5%CO₂ 细胞培养箱 1 h 后取出并置于新培养皿中, 加入 1.5 ml 含 5%FBS 的 DMEM 培养液, 放入 37℃5%CO₂ 细胞培养箱培养, 每 24 h 换液一次。

1.4 测定 BMSC 增殖

按照 CCK-8 试剂盒说明, 分别在 BMSC 接种后 3、24、48、72 h 取各组样本, 培养皿中加入 CCK-8 测量液 100 μ l, 37℃5%CO₂ 细胞培养箱培养 3 h, 全自动酶标仪检测溶液吸光度和光密度(OD), 检测波长为 450 nm, 参比波长为 630 nm。为研究 BMSC 增殖, 将不含 BMSC 的等量培养液滴入多孔 β -TCP 中作为阴性对照组, 将等量 BMSC 悬液直接接种于培养皿中培养作为阳性对照组。BMSC 增殖程度(% Control, 控制率) = (样本组 OD 值 - 阴性对照组 OD 值) / (阳性对照组 OD 值 - 阴性对照组 OD 值) $\times 100\%$ ($n=6$)。

1.5 观察 BMSC 形态

细胞接种 72 h 后将各组样本用 0.25%戊二醛固定, 梯度乙醇脱水, 临界点干燥, 表面喷金并在扫描电镜下观察 BMSC 形态。

1.6 测定 ALP 活性

取接种 72 h 的各组样本, 吸弃样本中培养液, PBS 缓慢冲洗 3 遍后根据 ALP 测定试剂盒说明将 50 μ l 测定液滴入多孔 β -TCP 样本中, 充分混匀, 37℃水浴 15 min 后加入显色剂 1.5 ml, 立即混匀并吸取等量 1 ml 溶液于酶标仪 520 nm 波长处测定吸光度和 OD 值。将不含 BMSC 的多孔 β -TCP 作为阴性对照, 将试剂盒自带的标准管溶液作为阳性对照。ALP 活性测定值(金氏单位 U/mg) = (测定管 OD 值 - 空白管 OD 值 / 标准管 OD 值 - 空白管 OD 值) $\times 0.005$ mg $\times 200$, 同时用 Bio-Rad 蛋白检测试剂盒检测样本内 BMSC 蛋白浓度, 得到标准化 ALP 活性测定值($n=3$)。

1.7 统计学分析

所有数据均用 SAS 9.1.3 统计学分析软件处理, 样本均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组样本实际测量孔隙率及孔内连接径的差异比较用单因素方差分析, 各组样本不同时间

点 BMSC 增殖及 ALP 活性测定值差异比较用双因素方差分析, 均以 $P < 0.05$ 为有统计学显著差异。

2 结果

各组多孔 β -TCP 样本的结构参数详见表 1, 其中各组实际测量孔径、实际测量孔内连接径和孔隙率均无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 各组 β -TCP 结构参数的理论及实际测量值

| 组别及理论孔径(μ m) | 理论孔内连接径(μ m) | 实际测量孔径(μ m) | 实际测量孔内连接径(μ m) | 孔隙率(%) |
|-------------------|-------------------|------------------|---------------------|------------------|
| 187~300 | 120 | 233.2 \pm 21.3 | 121.4 \pm 15.2 | 0.6909 \pm 5.4 |
| 300~375 | 120 | 342.1 \pm 25.2 | 122.8 \pm 13.9 | 0.6814 \pm 6.1 |
| 375~500 | 120 | 477.9 \pm 19.9 | 119.3 \pm 17.6 | 0.6828 \pm 6.3 |
| 500~750 | 120 | 640.5 \pm 29.7 | 116.9 \pm 15.1 | 0.6783 \pm 5.2 |
| 750~830 | 120 | 783.4 \pm 30.6 | 118.4 \pm 18.1 | 0.6559 \pm 5.5 |

各组多孔 β -TCP 中 BMCS 增殖情况见图 1。BMCS 种植 3 h 后各组无明显差异($P > 0.05$), 至 48 h 时各组 BMCS 增殖均显著加强, 分别为 187~300 μ m 组 1.41 \pm 0.17, 300~375 μ m 组 1.89 \pm 0.16, 375~500 μ m 组 2.00 \pm 0.12, 500~750 μ m 组 2.41 \pm 0.13, 750~830 μ m 组 1.54 \pm 0.15, 其中 500~750 μ m 组 BMCS 增殖最快($P < 0.05$)。72 h 时各组 BMCS 仍处于增殖状态(增殖水平控制率 > 1), 但增殖程度较 48 h 明显减慢($P < 0.05$), 其中 500~750 μ m 组增殖程度仍高于其他组($P < 0.05$)。

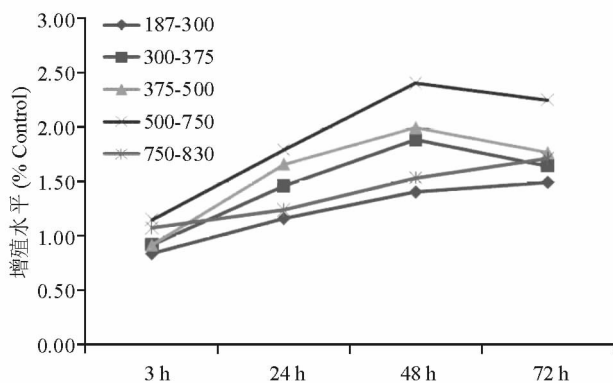


图 1 不同孔径 β -TCP 中 BMCS 增殖情况

BMSC 种植 72 h 后, 扫描电镜观察可见多孔 β -TCP 材料表面有大量 BMCS 通过细胞伪足黏附或连接在孔隙边缘, 细胞伸展成多边形或其他不规则形, 并通过伪足与周围细胞相连并聚集(见图 2), 提示细胞在多孔 β -TCP 材料中生长状况良好。

多孔 β -TCP 中 BMCS 种植 72 h 后 ALP 活性见表 2, 结果显示各组 BMCS 的 ALP 活性均为阳性($P < 0.05$), 其中 500~750 μ m 组活性明显高于其他组($P < 0.05$)。

不同孔径(187~830 μ m)的多孔 β -TCP 对 BMCS 增殖及成骨分化均有促进作用, 其中 500~750 μ m 孔径的促进作用最明显, 可能是促进 BMSC 增殖及成骨分化的最适孔径。

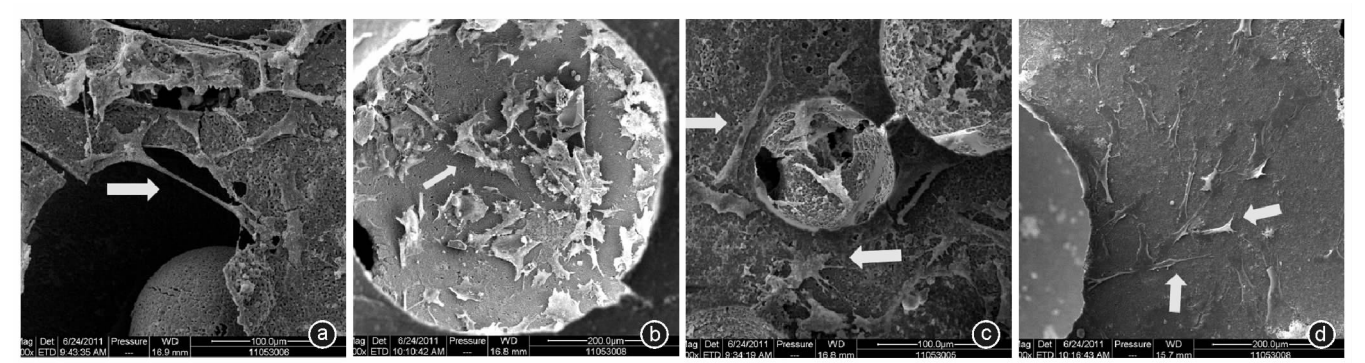


图 2 扫描电镜显示多孔 β -TCP 中 BMSC 形态 a、b、c、 β -TCP 表面 BMCS 通过细胞伪足黏附或连接在孔隙边缘(箭头处) d. 细胞伸展成多边形或其他不规则形(箭头处)

| 组别 | 187~300 μm | 300~375 μm | 375~500 μm | 500~750 μm | 750~830 μm | 阴性对照 |
|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| ALP | 0.82 \pm 0.14 * | 0.74 \pm 0.1 * | 0.8658 \pm 0.13 * | 1.018 \pm 0.17 * # | 0.8137 \pm 0.13 * | 0.470 \pm 0.08 |

注: * 与阴性对照组比较, $P < 0.05$; # 与其他组比较, $P < 0.05$

3 讨论

多孔 β -TCP 的化学成分与人体骨骼成分相同,有良好的骨传导性、生物降解性及一定的骨诱导性,其多孔的物理结构特性,如孔径、孔隙率及孔内连接径等结构参数同样对骨组织长入有重要生物学作用。目前使用可溶 PMMA 球模注浆技术可以构建具有单一结构参数变化而其他因素相对恒定的多孔 β -TCP^[5]。本实验中各组多孔 β -TCP 的孔径在一定范围内(187~830 μm)变化,而孔隙率及孔内连接径则无显著性差异,因而可用于研究单一结构参数孔径对细胞的生物学作用。

既往体外研究^[8-10]提示,小孔径多孔生物材料促进细胞增殖,但关注的孔径均在 100 μm 以下,且含有孔隙率变化。近年体内研究^[5]显示,当孔隙率及孔内连接径相对恒定、孔径在 300~700 μm 范围变动时,小孔径材料表面积相对较大,可促进纤维组织生长,而大孔径材料则可促进毛细血管生长,但仍无法明确孔径对细胞增殖及成骨分化的具体作用。本实验显示 500~750 μm 孔径的 β -TCP 中 BMCS 增殖速度最快,这可能与孔径对培养液的虹吸作用及扩散作用有关^[1,11]。孔径越小虹吸作用越强,可使培养液更快进入材料内部孔隙中,利于细胞生长,但同时孔径越小扩散作用越差,不利于细胞代谢产物自材料内部扩散出,这两种相反的作用共同决定了细胞周围培养液的更换速度,而 500~750 μm 孔径可能使得这两种作用对培养液更换达到了最适合细胞生长的程度,所以该孔径可能是促进 BMCS 增殖的最适孔径。本实验中还发现,培养 72 h 后各组 BMCS 增殖程度均明显减缓,这与以前的研究相一致^[1,3],主要与细胞在三维多孔结构材料上的体外培养方式有关。多孔材料浸泡在培养液中使得材料内部培养液交换较差,BMCS 多贴附于三维材料结构外层,仅较少进入结构内层或中心;一旦 BMCS 在外层增殖明显,就逐渐出现接触抑制,因此增殖速度会逐渐减慢。

既往对多孔 β -TCP 中细胞成骨的研究^[9-11]表明,孔

径与体外培养细胞的成骨分化无关,而孔隙率可通过 β -TCP 孔隙的总体积影响细胞聚集密度而调节细胞成骨分化。本研究结果提示,当孔隙率相对恒定时,不同孔径对体外 BMCS 成骨分化也有促进作用,其中 500~750 μm 孔径的作用最明显。因为种植在多孔材料中的 BMCS 贴附于材料表面,表面积大小和 BMCS 数量同样可影响 BMCS 聚集密度,而当孔隙率相对恒定时,孔径小的 β -TCP 表面积相对较大,如果此时 BMCS 数量较少,则细胞分布相对分散,聚集较少,成骨分化程度相对较低。500~750 μm 孔径的多孔材料表面积及其对细胞增殖的影响,可能使 BMCS 聚集程度最适合 BMCS 成骨分化,因此该孔径 BMCS 的 ALP 活性最高。

本研究还存在一定局限性。首先,所用多孔材料孔径范围选择较为局限。目前研究^[12]已发现纳米级多孔生物材料具有完全不同的物理特性和生物响应性。本研究旨在关注目前临床广泛应用的生物材料孔径(187~830 μm),以明确材料孔径对细胞增殖及成骨的作用,故未选用纳米级孔径材料。其次,本研究中 BMCS 体外培养时间较短(培养 72 h 即出现 BMCS 增殖速度减慢,之前预实验显示培养 96 h 后会出现增殖停止),这也是目前三维材料作为细胞体外培养支架所面临的主要问题,与材料内部细胞培养液的有效交换有关。如果使用灌注式生物反应器^[13]促进培养液交换,可能有助于延长细胞体外培养时间。尽管如此,本研究仍对多孔 β -TCP 孔径对 BMCS 生长和成骨分化的作用作了有益探讨,并在一定孔径范围内初步确定适合 BMCS 生长及分化的最适孔径,为今后进一步体内实验及临床研究提供了实验准备。

参考文献

- 1 Lu JX, Flautre B, Anselme K, et al. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. J Mater Sci Mater Med, 1999, 10(2):111-120
- 2 Gauthier O, Boulter JM, Aguado E, et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. Biomaterials, 1998, 19(1-3):133-139

- 3 Flautre B, Descamps M, Delecourt C, et al. Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections-experimental study in the rabbit. *J Mater Sci Mater Med*, 2001, 12(8):679-682
- 4 Gotz HE, Muller M, Ennkel A, et al. Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants. *Biomaterials*, 2004, 25(18):4057-4064
- 5 Feng B, Jinkang Z, Zhen W, et al. The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture in vivo. *Biomed Mater*, 2011, 6(1):015007
- 6 屠锦雯, 张晓玲. 生物力学信号对骨髓间充质干细胞体内体外成骨分化的影响. *国际骨科学杂志*, 2008, 29(4):253-256
- 7 Li X, Li D, Wang L, et al. Osteoblast cell response to beta-tricalcium phosphate scaffolds with controlled architecture in flow perfusion culture system. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19(7):2691-2697
- 8 Akay G, Birch MA, Bokhari MA. Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. *Biomaterials*, 2004, 25(18):3991-4000
- 9 Itoh M, Shimazu A, Hirata I, et al. Characterization of CO3Ap-collagen sponges using X-ray high-resolution microtomography. *Biomaterials*, 2004, 25(13):2577-2583
- 10 Takahashi Y, Tabata Y. Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004, 15(1):41-57
- 11 Rose FR, Cyster LA, Grant DM, et al. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. *Biomaterials*, 2004, 25(24):5507-5514
- 12 Ozkan S, Kalyon DM, Yu X. Functionally graded beta-TCP/PCL nanocomposite scaffolds: in vitro evaluation with human fetal osteoblast cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 92(3):1007-1018
- 13 Xie Y, Hardouin P, Zhu Z, et al. Three-dimensional flow perfusion culture system for stem cell proliferation inside the critical-size beta-tricalcium phosphate scaffold. *Tissue Eng*, 2006, 12(12):3535-3543

(收稿:2012-09-09;修回:2012-10-07)

(本文编辑:边倩)

(上接第 394 页)

- 23 Youn I, Jones DG, Andrews PJ, et al. Periosteal augmentation of a tendon graft improves tendon healing in the bone tunnel. *Clin Orthop Relat Res*, 2004, 419:223-231
- 24 孙然, 陈百成, 张晓阳, 等. 骨膜包裹腓绳肌腱重建前交叉韧带促进腱骨愈合的临床观察. *中华医学杂志*, 2010, 90(3):182-186
- 25 Matsumoto T, Ingham SM, Mifune Y, et al. Isolation and characterization of human anterior cruciate ligament-derived vascular stem cells. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(6):859-872
- 26 Mifune Y, Matsumoto T, Ota S, et al. Therapeutic potential of anterior cruciate ligament derived stem cells for anterior cruciate ligament reconstruction. *Cell Transplant*, 2012, 21(8):1651-1665
- 27 Matsumoto T, Kubo S, Sasaki K, et al. Acceleration of tendon-bone healing of anterior cruciate ligament graft using autologous ruptured tissue. *Am J Sports Med*, 2012, 40(6):1296-1302
- 28 Yamazaki S, Yasuda K, Tomita F, et al. The effect of transforming growth factor-beta1 on intraosseous healing of flexor tendon autograft replacement of anterior cruciate ligament in dogs. *Arthroscopy*, 2005, 21(9):1034-1041
- 29 Kovacevic D, Fox AJ, Bedi A, et al. Calcium-phosphate matrix with or without TGF- β 3 improves tendon-bone healing after rotator cuff repair. *Am J Sports Med*, 2011, 39(4):811-819
- 30 Kim HM, Galatz LM, Das R, et al. The role of transforming growth factor beta isoforms in tendon-to-bone healing. *Connect Tissue Res*, 2011, 52(2):87-98
- 31 Zhai W, Wang N, Qi Z, et al. Platelet-rich plasma reverses the inhibition of tenocytes and osteoblasts in tendon-bone healing. *Orthopedics*, 2012, 35(4):e520-e525
- 32 Vogrin M, Rupprecht M, Dinevski D, et al. Effects of a platelet gel on early graft revascularization after anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective, randomized, double-blind, clinical trial. *Eur Surg Res*, 2010, 45(2):77-85
- 33 Fleming BC, Spindler KP, Palmer MP, et al. Collagen-platelet composites improve the biomechanical properties of healing anterior cruciate ligament grafts in a porcine model. *Am J Sports Med*, 2009, 37(8):1554-1563
- 34 Wang FS, Yang KD, Chen RF, et al. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. *J Bone Joint Surg*, 2002, 84(3):457-461
- 35 石斌, 刘玉杰, 李志超, 等. 体外冲击波促进兔 ACL 重建后腱骨愈合的实验研究. *中国矫形外科杂志*, 2008, 16(4):292-295
- 36 Qin L, Wang L, Wong MW, et al. Osteogenesis induced by extracorporeal shockwave in treatment of delayed osteotendinous junction healing. *J Orthop Res*, 2010, 28(1):70-76
- 37 Papatheodorou LK, Malizos KN, Poultsides LA, et al. Effect of transosseous application of low-intensity ultrasound at the tendon graft-bone interface healing: gene expression and histological analysis in rabbits. *Ultrasound Med Biol*, 2009, 35(4):576-584
- 38 Walsh WR, Stephens P, Vizesi F, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on tendon-bone healing in an intra-articular sheep knee model. *Arthroscopy*, 2007, 23(2):197-204
- 39 Lu CC, Liu YC, Cheng YM, et al. Augmentation of tendon-bone interface healing with low-intensity pulsed ultrasound. *Orthopedics*, 2009, 32(3):173
- 40 Yeh WL, Lin SS, Yuan LJ, et al. Effects of hyperbaric oxygen treatment on tendon graft and tendon-bone integration in bone tunnel: biochemical and histological analysis in rabbits. *J Orthop Res*, 2007, 25(5):636-645
- 41 Chen CH, Chang CH, Wang KC, et al. Enhancement of rotator cuff tendon-bone healing with injectable periosteum progenitor cells-BMP-2 hydrogel in vivo. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011, 19(9):1597-1607
- 42 Gulotta LV, Kovacevic D, Packer JD, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with scleraxis improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med*, 2011, 39(6):1282-1289
- 43 Kim HJ, Nam HW, Hur CY, et al. The effect of platelet rich plasma from bone marrow aspirate with added bone morphogenetic protein-2 on the Achilles tendon-bone junction in rabbits. *Clin Orthop Surg*, 2011, 3(4):325-331

(收稿:2012-08-03;修回:2012-08-18)

(本文编辑:边倩)

(上接第 406 页)

- 12 Kawamura K, Momohara S, Tomatsu T. Alignment of lower extremity in rheumatoid arthritis patients with a history of both total hip replacement and total knee replacement. *Ryumachi*, 2003, 43(4):638-643
- 13 Bonner TJ, Eardley WG, Patterson P, et al. The effect of post-operative mechanical axis alignment on the survival of primary total knee replacements after a follow-up of 15 years. *J Bone Joint Surg Br*, 2011, 93(9):1217-1222
- 14 Werner FW, Ayers DC, Maletsky LP, et al. The effect of valgus/varus malalignment on load distribution in total knee replacements. *J Biomech*, 2005, 38(2):349-355
- 15 Choi WC, Lee S, An JH, et al. Plain radiograph fails to reflect the alignment and advantages of navigation in total knee arthroplasty. *J Arthroplasty*, 2011, 26(5):756-764
- 16 Huang TW, Hsu WH, Peng KT, et al. Total knee replacement in patients with significant femoral bowing in the coronal plane: a comparison of conventional and computer-assisted surgery in an Asian population. *J Bone Joint Surg Br*, 2011, 93(3):345-350
- 17 张卉, 程晓光. 负重位 DR 片在诊断膝骨关节炎患者中的应用价值. *中国临床医学影像杂志*, 2008, 19(6):445-446
- 18 陈汉忠, 徐向东. CR 与 DR 在下肢全长摄影中的应用比较. *放射学实践*, 2009, 24(2):209-211
- 19 李亚雄, 王予生, 赵海竹, 等. DR 在肢体全长成像中的应用. *中国临床医学影像杂志*, 2009, 20(5):396
- 20 陆春花, 赵文荣, 周汝康, 等. 数字化功能位全下肢 X 线摄影在膝关节置换术中的应用. *现代医学*, 2010, 38(5):513-514
- 21 Kim YH, Kim JS, Choi Y, et al. Computer-assisted surgical navigation does not improve the alignment and orientation of the components in total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*, 2009, 91(1):14-19
- 22 Nunley RM, Ellison BS, Zhu J, et al. Do patient-specific guides improve coronal alignment in total knee arthroplasty? *Clin Orthop Relat Res*, 2012, 470(3):895-902

(收稿:2012-10-08;修回:2012-10-26)

(本文编辑:边倩)