

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.49.012 [http://www.crter.org]

杨立枫¹, 刘伟¹, 周晔¹, 冯子珊², 张莉¹, 赵伟¹, 李治¹ (1沈阳医学院附属中心医院, 辽宁省沈阳市 110024; 2中国医科大学附属盛京医院, 辽宁省沈阳市 110003)

人胎盘来源间充质干细胞移植促进肌腱移植在骨隧道内的愈合

杨立枫¹, 刘伟¹, 周晔¹, 冯子珊², 张莉¹, 赵伟¹, 李治¹ (1沈阳医学院附属中心医院, 辽宁省沈阳市 110024; 2中国医科大学附属盛京医院, 辽宁省沈阳市 110003)

文章亮点:

1 课题的创新性在于人胎盘来源干细胞在腱骨结合部的修复方面的研究国内外报道较少, 实验构建了具有多能性的人胎盘来源间充质干细胞植入肌腱-骨结合部鼠模型, 观察其在腱骨结合部修复中的作用。

2 结果证实人胎盘来源间充质干细胞移植于骨隧道内可使肌腱-骨结合处形成以韧带与骨软骨的结合为特征的典型的直接止点。

关键词:

干细胞; 干细胞移植; 人胎盘来源间充质干细胞; 骨隧道; 分化; 细胞移植; 腱骨结合; 干细胞图片文章

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 肌腱切断术; 细胞移植

基金资助:

沈阳市卫生局科研基金资助项目(F11-262-9-19)*

杨立枫, 男, 1962年生, 辽宁省沈阳市人, 回族, 1985年中国医科大学毕业, 副主任医师, 主要从事创伤骨科的研究。

通讯作者: 李治, 在读博士, 主任医师, 沈阳医学院附属中心医院, 辽宁省沈阳市 110024
lz8534@163.com

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344
(2013)49-08539-06

修回日期: 2013-11-06
(201310130/W·W)

摘要

背景: 研究表明, 人胎盘来源间充质干细胞来源广泛, 增殖能力强, 其移植对腱-骨愈合有明显的促进作用。

目的: 进一步验证人胎盘来源间充质干细胞对骨-肌腱结合处愈合的影响。

方法: 采用贴壁分离筛选法获取人胎盘来源间充质干细胞。30只雄性SD大鼠随机分为2组各15只。建立大鼠骨-肌腱损伤模型, 实验组在骨-肌腱结合面注入人胎盘来源间充质干细胞, 对照组只注入生理盐水。

结果与结论: 实验组人胎盘间充质干细胞移植后2, 4, 6周显微镜观察在腱骨界面有干细胞存在并有较多血管组织再生, 并且有部分纤维软骨增生。在移植后4, 6周实验组最大拔出载荷显著高于对照组($P < 0.05$)。说明人胎盘来源间充质干细胞可以促进骨-肌腱结合部的早期愈合, 提高其生物力学强度。

Human placenta-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes tendon graft healing in a bone tunnel

Yang Li-feng¹, Liu Wei¹, Zhou Ye¹, Feng Zi-shan², Zhang Li¹, Zhao Wei¹, Li Zhi¹ (1Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China; 2Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that human placenta-derived mesenchymal stem cells with strong proliferative ability have rich sources and can remarkably promote tendon-bone healing after cell transplantation.

OBJECTIVE: To observe the effect of human placenta-derived mesenchymal stem cells on tendon-bone healing in a bone tunnel.

METHODS: Human placenta-derived mesenchymal stem cells were separated using adherent separation screening method. Thirty 8-week-old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups, 15 rats as experimental group and 15 rats as control group. Experimental group were subjected to transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells and the control group were injected with saline solution.

RESULTS AND CONCLUSION: Stem cells, new vessels, and fibrocartilage hyperplasia were observed on the tendon-bone interface with microscope at 2, 4 and 6 weeks after cell transplantation in the experimental group. Biomechanically, the maximum pullout load in the experimental group was significantly higher than that in the control group at 4 and 6 weeks after cell transplantation ($P < 0.05$). These findings suggest that human placenta-derived mesenchymal stem cells can accelerate early tendon-bone healing in a bone tunnel and strengthen the biomechanical strength.

Subject headings: stem cells; mesenchymal stem cells; tenotomy; cell transplantation

Funding: the Scientific Research Funding of Shenyang Health Bureau, No. F11-262-9-19*

Yang LF, Liu W, Zhou Y, Feng ZS, Zhang L, Zhao W, Li Z. Human placenta-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes tendon graft healing in a bone tunnel. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(49):8539-8544.

Yang Li-feng, Associate chief physician, Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China

Corresponding author: Li Zhi, Studying for doctorate, Chief physician, Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China
lz8534@163.com

Accepted: 2013-11-06

0 引言 Introduction

肌腱止点损伤逐年增多, 如跟腱止点撕脱型断裂, 交叉韧带的止点撕脱和断裂的发病率逐年增高。肌腱-骨结合部愈合过程比较复杂, 该部位的特征性结构纤维软骨带的再生十分缓慢和困难, 促进其早期愈合一直是学者们研究热点之一。长期以来, 医学界先后采用了药物、手术、物理等方法治疗腱骨结合, 但效果均不理想。

近年来许多研究表明, 胎盘提取的间充质样干细胞培养后可分化成为脂肪细胞、成骨细胞以及其他细胞^[1-2]。此外, 胎盘是一种伦理上允许的、容易获得的间充质样干细胞来源, 可以用于未来试验及临床应用。Ouyang、Lim等^[3-4]发现将骨髓间充质干细胞用于腱骨愈合的动物实验, 可以促进骨隧道内腱骨结合部早期的愈合。

人胎盘来源间充质干细胞来源广泛, 增殖能力强, 避免了胚胎干细胞所带来的伦理学和法律问题, 具有更广阔的应用前景^[5], 人胎盘来源间充质干细胞移植为腱骨结合治疗提供了新的思路。为此, 实验将人胎盘来源间充质干细胞移植到腱骨结合动物模型中, 以观察其对腱骨结合大鼠的治疗作用。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2011年12月至2012年12月在沈阳医学院附属中心医院完成。

材料:

实验动物: 清洁级8周龄雄性SD大鼠30只, 体重280-330 g, 购自沈阳医学院实验动物中心。

人胎盘来源间充质干细胞移植促进肌腱移植在骨隧道内愈合实验所用试剂及设备:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养液	Gibco 公司, 美国
重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)	CYTOLAB 公司
胎牛血清	杭州四季青生物工程材料研究所
普鲁士蓝试剂盒	上海虹桥乐翔医用试剂公司
胰酶	Sigma 公司, 美国
CD105-PE、CD45-PE、CD106-PE、 CD34-PF、CD73-PE、CD90-PE、 流式细胞仪	BD 公司
CO ₂ 培养箱	Herabius 公司, 德国
CSS-44020 型生物力学试验仪	长春仪器厂
Olympus 显微镜	日本

实验方法:

人胎盘间充质干细胞分离培养: 经医院伦理委员会批

准, 在产妇知情同意的情况下, 胎盘组织由沈阳医学院附属中心医院妇产科获取临床正常剖宫产之足月健康产妇的新鲜胎盘组织。参照文献[6]的方法, 利用IV型胶原酶消化分离培养人胎盘间充质干细胞: 在无菌条件下分离胎盘脐带周围内层组织, 用组织剪修剪成1 cm×1 cm×1 cm大小, 用4 ℃ D-Hank's液冲洗两三遍, 红细胞裂解液4 ℃水浴5 min以去除红细胞, 0.1%IV型胶原酶37 ℃消化15 min后, 200目滤网过滤, D-Hank's液清洗后, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 接种于25 cm²培养瓶。37 ℃、体积分数5%CO₂饱和湿度静置培养。细胞密度达到70%融合后用2.5 g/L的胰蛋白酶消化传代培养。

细胞表面标记检测^[7]: 用2.5 g/L胰酶消化收获人胎盘来源间充质干细胞, PBS洗涤2次后, 细胞计数, 将细胞移入96孔板, 每孔细胞数在 $5 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 。以上, 分别与抗CD90, CD34单克隆抗体室温避光反应30 min, PBS洗涤2次, 10 g/L多聚甲醛固定后, 应用流式细胞仪分析细胞表面抗原结果分析表明, 所获得的人胎盘来源间充质干细胞具有均一的细胞表型, 表明细胞纯度较高, 高表达CD90, CD105; 不表达CD34, CD106。

动物实验: 8周龄雄性SD大鼠30只, 随机分成实验组和对照组各15只。将大鼠仰卧位固定于手术台上, 10 g/L的戊巴比妥钠50 mg腹腔注射全麻。常规消毒后取右下肢内侧纵行切口, 逐层分离出趾长屈肌腱, 远端离断, 见图1; 在股骨中远1/3处钻一直径约1.5 mm的骨隧道, 建立骨-肌腱损伤模型, 见图2; 再把肌腱从骨隧道中内向外穿出后末端用5-0丝线缝合固定。实验组在骨-肌腱界面注入人胎盘来源间充质干细胞悬液0.5 mL, 对照组注入等量生理盐水, 然后逐层关闭切口。



注: 逐层分离出趾长屈肌腱, 远端离断。

图1 大鼠趾长屈肌腱远端离断建立骨-肌腱损伤模型

Figure 1 A rat model of tendon-bone defects prepared by distal transection of digitorum longus tendon



注：股骨中远 1/3 处钻一直径约 1.5 mm 的骨隧道。

图2 大鼠股骨中远 1/3 处钻一骨隧道建立骨-肌腱损伤模型

Figure 2 Establishing a tendon-bone defect model in a rat by drilling a bone tunnel 1/3 distal to the middle femur

生物力学试验：分别在细胞移植后第2, 4, 6周取得组织标本，将标本固定在CSS-44020型生物力学仪上，进行牵拉试验，记录肌腱从骨隧道中完全脱出时的牵拉力，此为骨-肌腱结合处所承受的最大拔出载荷。

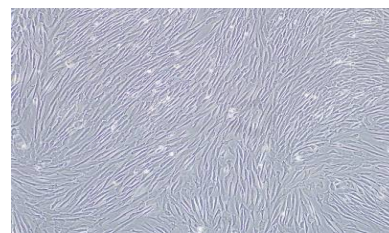
注意观察指标：①显微镜下人胎盘来源间充质干细胞形态学观察结果。②人胎盘间充质干细胞表面标记检测结果。③各时间点的组织切片苏木精-伊红染色显微镜观察结果。④生物力学试验结果。

统计学分析：实验的所有数据均采用SPSS 13.0统计学软件进行处理，同一时间点治疗组和对照组采用t检验，最大拔出载荷采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组内不同时间点采用方差分析， $P < 0.05$ 时为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠30只，分为2组，实验过程无脱失，全部进入结果分析。

2.2 显微镜下人胎盘来源间充质干细胞形态学观察结果 人胎盘来源间充质干细胞接种5 d后大部分细胞贴壁，细胞呈梭形，多角形，10-14 d后可见数个细胞集落，细胞大部分呈长梭形，胞浆丰富，核染色质深，核仁明显，呈平行排列或漩涡状生长，形态类似成纤维细胞，见图3。原代培养的细胞21-28 d接近80%融合，呈现集落方式生长。传代后的细胞生长速度明显增快，数量增多，细胞呈均质长梭行，形态较原代均一，见图4。5-7 d即可传代1次，传至10代后细胞生长速度减慢。



注：可见成纤维细胞样克隆，成放射状或漩涡状生长。

图3 第1代人胎盘来源间充质干细胞(×40)

Figure 3 Morphology of primary human placenta-derived mesenchymal stem cells (×40)

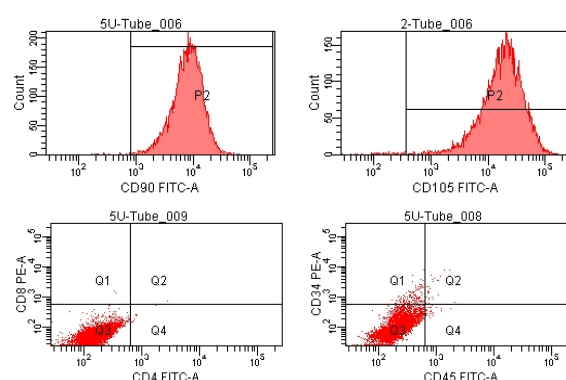


注：细胞形态均一，呈长梭形。

图4 第3代人胎盘来源间充质干细胞(×100)

Figure 4 Morphology of passage 3 human placenta-derived mesenchymal stem cells (×100)

2.3 人胎盘间充质干细胞表面标记检测结果 应用流式细胞仪分析表明，所获得的人胎盘来源间充质干细胞具有均一的细胞表型，表明细胞纯度较高，高表达CD90，CD105；不表达CD34，CD45。见图5。



注：结果显示细胞具有均一的细胞表型，高表达CD90，CD105；不表达CD34，CD45。

图5 人胎盘间充质干细胞表面标记流式细胞仪检测结果

Figure 5 Flow cytometry detection of surface markers of human placenta-derived mesenchymal stem cells

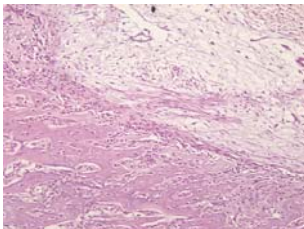
2.4 各时间点的组织切片苏木精-伊红染色显微镜观察结果 人胎盘间充质干细胞移植后第4周, 对照组骨-肌腱结合处见少量的类软骨细胞, 而且肌腱与骨之间结合比较松散, 能够清晰地辨别出二者之间的界限, 见图6; 实验组骨-肌腱界面之间以成纤维细胞以及类软骨细胞为主, 靠近肌腱侧以成纤维细胞为主, 靠近骨髓道侧以类软骨细胞为主而且排列不整, 并出现软骨化骨过程, 骨-肌腱之间没有明显界限, 见图7。



注: 骨与肌腱之间的结合比较疏松, 细胞排列不规整, 由炎性细胞及成纤维细胞组成。

图6 人胎盘间充质干细胞移植后第4周对照组大鼠骨与肌腱界面组织学观察(苏木精-伊红染色, $\times 20$)

Figure 6 Histological observation of the tendon-bone interface 4 wk after transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells in the control group (Hematoxylin-eosin staining, $\times 20$)

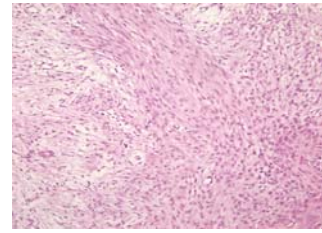


注: 骨与肌腱之间的新生组织以成纤维细胞和类软骨细胞为主, 靠近肌腱侧以成纤维细胞为主, 靠近骨髓道侧以类软骨细胞为主而且排列不整。

图7 人胎盘间充质干细胞移植后第4周实验组大鼠骨与肌腱界面组织学观察(苏木精-伊红染色, $\times 20$)

Figure 7 Histological observation of the tendon-bone interface 4 wk after transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells in the experimental group (Hematoxylin-eosin staining, $\times 20$)

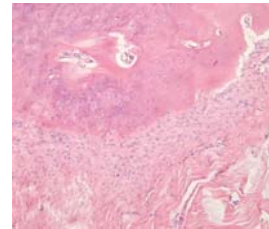
细胞移植后第6周, 对照组骨-肌腱界面之间见大量成纤维细胞以及胶原纤维增多, 而且排列规则, 骨与肌腱的连接紧密见图8; 而实验组骨-肌腱界面之间的胶原纤维合成明显增多, 类软骨细胞明显成熟逐步形成软骨移行带, 形成特有的“潮线”^[8], 出现了类似于韧带直接止点样结构, 见图9。



注: 骨-肌腱界面之间见大量成纤维细胞以及胶原纤维增多, 而且排列规则, 骨与肌腱的连接紧密。

图8 人胎盘间充质干细胞移植后第6周对照组大鼠骨与肌腱界面组织学观察(苏木精-伊红染色, $\times 20$)

Figure 8 Histological observation of the tendon-bone interface 6 wk after transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells in the control group (Hematoxylin-eosin staining, $\times 20$)



注: 骨-肌腱界面的类软骨细胞明显成熟, 胶原纤维增多, 形成“潮线”即软骨移行带, 出现了类似于韧带直接止点样结构。

图9 人胎盘间充质干细胞移植后第6周实验组大鼠骨与肌腱界面组织学观察(苏木精-伊红染色, $\times 20$)

Figure 9 Histological observation of the tendon-bone interface 6 wk after transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells in the experimental group (Hematoxylin-eosin staining, $\times 20$)

2.5 生物力学试验结果 见表1。

表1 大鼠人胎盘间充质干细胞移植后不同时间点骨-肌腱结合处所承受的最大拔出载荷

Table 1 The maximum pullout load at the tendon-bone interface at different time after transplantation of human placenta-derived mesenchymal stem cells

($\bar{x} \pm s$, $n=5$, N)

组别	2周	4周	6周
实验组	2.9 ± 0.7	6.8 ± 1.7^a	12.7 ± 1.5^a
对照组	1.1 ± 0.5	3.4 ± 1.9	7.6 ± 1.2

与对照组比较, $^a P < 0.05$ 。

注: 细胞移植后第4、6周实验组骨-肌腱结合处所承受的最大拔出载荷明显大于对照组。

3 讨论 Discussion

目前运动损伤、交通意外等导致的骨-肌腱结合部的损伤,发病率逐年增高,比如滑雪造成的膝关节交叉韧带损伤,网球运动导致的肩袖损伤以及羽毛球运动导致的跟腱损伤等等。临床上对于骨-肌腱损伤常采用手术来重建其稳定性,其中骨-肌腱结合部早期、可靠的愈合是成功恢复运动的关键。但是骨-肌腱结合部位愈合过程相当复杂,要恢复到生理强度十分困难和缓慢,所以加快并促进骨-肌腱结合部的早期愈合,早期功能恢复至关重要。

近年来,有学者对促进骨-肌腱结合部的早期愈合进行了一系列研究。Qin等^[9]研究发现,体外冲击波可通过软骨内化骨、纤维软骨再生诱导延迟愈合的腱-骨界面间骨生长。Zhai等^[10]报道采用富血小板血浆在体外培养肌腱细胞和成骨细胞,发现可促进其增殖。Chen等^[11]报道聚乙二醇二丙烯酸酯支架复合骨膜祖细胞和骨形态发生蛋白2并注射在兔腱骨界面,术后4、8周发现纤维软骨形成,生物力学性能也提高。

由于对促进骨-肌腱早期愈合的研究不断深入,越来越多的研究显示:骨形态发生蛋白,血管内皮生长因子、富血小板血浆、碱性成纤维细胞生长因子、骨髓间充质干细胞、以及转化生长因子等可以促进骨-肌腱的早期愈合^[12]。

实验结果表明,人胎盘来源间充质干细胞能够促进骨-肌腱结合部的早期愈合,6周时,在骨-肌腱结合处生成了过渡性纤维软骨带,塑形后重建了骨-肌腱直接止点样结构,明显促进了骨-肌腱的愈合。

骨-肌腱结合部的特征性结构是移行的纤维软骨带。大多数动物实验研究发现,肌腱移植在骨隧道内获得完全可靠的腱-骨愈合需要12-24个月甚至更长时间^[13-14],骨-肌腱结合部的特征性结构决定了该部位的特殊功能,确保将肌肉产生的收缩力传递到骨,并将集中的应力分散到骨与肌腱之间的缓冲带^[15]。

人胎盘来源间充质干细胞移植后能否形成正常肌腱-骨的止点是这次实验的最终目标,从术后6周的高倍显微镜下观察所见,人胎盘来源间充质干细胞移植于骨隧道内可使骨-肌腱结合处形成以韧带与骨软骨的结合为特征的典型的直接止点,证实了移植的肌腱与骨隧道内壁的愈合是界面间纤维组织形成、骨与肌腱相互长入、新骨的生成、局部的塑形改造过程^[16]。实验通过移植人胎盘来源间充质干细胞于骨-肌腱界面发现移植后4周显微镜下可见骨-肌腱界面有部分纤维软骨产生。证实人胎盘来源间充质干细胞可加快骨-肌腱愈合过程。

在移植或重建后的第6-12周是骨-肌腱结合部的力

学性能薄弱的时间点^[17]。骨与肌腱的牢固固定和早期愈合是重建中最重要的也是患者早期功能训练的前提。骨与肌腱之间的早期愈合能够满足患者术后早期运动、肌肉锻炼和负重要求,最终实现关节功能的最大化恢复。实验所进行的生物力学评价结果显示,实验组的最大拔出载荷在移植后4、6周明显高于对照组,表明人胎盘来源间充质干细胞在移植后4、6周就可以让骨-肌腱结合部牢固愈合,相对于对照组明显增强了骨-肌腱结合部的力学性能,提高了骨-肌腱愈合的质量。由此可以推断,移植的人胎盘来源间充质干细胞在骨-肌腱结合部特定的微环境和特定的细胞外基质刺激下,可向骨-肌腱特异性细胞分化,促进该部位的愈合,提高骨-肌腱愈合的质量,提高骨-肌腱结合部的生理力学强度。

Berg等^[18]的研究发现,肌腱在骨隧道内首先是在远离关节腔的部位与骨组织愈合,然后逐渐向关节腔方向发展,即骨-肌腱界面的愈合是从骨隧道的远端向近端发展的,直至最终愈合。本实验中实验组人胎盘来源间充质干细胞移植后第4周显微镜下见移植肌腱-骨界面有大量的毛细血管生成,而且毛细血管生成部位是在隧道远离关节腔的部位,证实了Berg等的结论。推测分析,关节液所含的细胞因子、生长因子抑制剂、蛋白水解酶等起到了抑制骨-肌腱愈合的作用所致。术后组织切片显微镜在腱骨结合部观察到纤维软骨形成区域首先出现在远离关节腔的骨-肌腱界面,证实骨隧道内肌腱与骨的愈合是从隧道远端向近端发展的。

综上所述,通过对骨隧道内骨-肌腱界面移植人胎盘来源间充质干细胞的研究表明,人胎盘来源间充质干细胞能够促进骨-肌腱结合部的早期愈合,实验组的力学特性明显高于对照组证实可以提高其生物力学强度,早期即有明显促进愈合作用。

作者贡献: 第一作者负责实验的实施及设计,通讯作者修改并审核,所有作者共同起草并监督,通讯作者对本文负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 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件。

学术术语: CD45-CD45 分子-所有白细胞上都有表达,称为白细胞共同抗原,广泛存在于白细胞表面,其胞浆区段具有蛋白质酪氨酸磷酸酶的作用,能使底物 P56lck 和 P59fyn 上酪氨酸脱磷酸而激活,在细胞的信息传导中发挥重要作用,可作为某些T细胞亚群的分类标志。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Yen BL, Huang HI, CHIEN CC, et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*. 2005;23(1):3-9.
- [2] Miki T, Marongiu F, Ellis EC, et al. Production of hepatocyte-like cells from human amnion. *Methods Mol Biol*. 2009;481:155-68.
- [3] Ouyang HW, Gob JC, Lee EH. Use of bone marrow stromal cells for tendon graft-to-bone healing: histological and immunohistochemical studies in a rabbit model. *Am J Sports Med*. 2004;2:321-327.
- [4] Lim JK, Hui J, Li L, et al. Enhancement of tendon graft osteointegration using mesenchymal stem cells in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*. 2004;9:899-910.
- [5] 张红艳, 杨乃龙, 孙晓娟, 等. 人胎盘源与人骨髓间充质干细胞的生物学性状比较[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010;14(45): 8386-8389.
- [6] Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, et al. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem*. 2007; 282(19):14243-14252.
- [7] 沙文琼, 王自能, 王冬菊. 人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的分离与纯化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010;14(10): 1833-1837.
- [8] Benjamin M, Kumai T, Milz S, et al. The skeletal attachment of tendons: tendon "enthuses". *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2002;133(4):931-945.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Omae H, Mochizuki Y, Yokoya S, et al. Augmentation of tendon attachment to porous ceramics by bone marrow stromal cells in a rabbit model. *International Orthopaedics (SICOT)*. 2007;31:353-358.
- [13] Goradia VK. Tendon healing in a bone tunnel. Parts I and II. *Arthroscopy*. 2003;19(1):111.
- [14] Shelbourne KD, Cart DR. Meniscal repair compared with meniscectomy for bucket-handle medial meniscal tears in anterior cruciate ligament-reconstructed knees. *Am J Sports Med*. 2003;31(5):718-723.
- [15] Benjamin M, Kumai T. The skeletal attachment of tendons-tendon entheses. *Comparative Biochemistry Physiology*. 2002;133:931-945.
- [16] Wen CY, Qin L, Lee KM, et al. Influence of bone adaptation on tendon-to-bone healing in bone tunnel after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *J Orthop Res*. 2009; 27(11):1447-1456.
- [17] 薛海滨, 敖英芳. 应用半腱肌腱重建前交叉韧带末端形成的特点[J]. *中国运动医学杂志*, 2002;2:127-130.
- [18] Berg EE, Pollard ME, Kang Q. Interarticular bone tunnel healing. *Arthroscopy*. 2001;17(2):189-195.