

骨髓间充质干细胞在微损伤环境中修复骨不连

王月福¹, 于锡欣²(¹广饶县人民医院骨科, 山东省东营市 257300; ²山东省立医院脊柱外科, 山东省济南市 250021)

文章亮点:

- 1 已有研究表明, 向骨折骨不连部位引入足够的干细胞是促进骨修复的前提条件及重要的细胞学基础, 干细胞已成为治疗骨不连的理想种子细胞。
- 2 从病理、影像等方面证实, 在局部微损伤提供的诱导环境下, 骨髓干细胞能够修复兔桡骨骨缺损不连, 且效果显著, 为临床治疗骨缺损疾病提供有效的治疗方法。

关键词:

干细胞; 移植; 骨不连; 骨髓间充质干细胞; 干细胞治疗; 微损伤环境

主题词:

骨髓; 间质干细胞移植; 桡骨; 骨疾病; 组织工程

王月福, 男, 1979年生, 山东省诸城市人, 汉族, 主治医师, 主要从事骨科疾病相关研究。

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2015)41-06677-06

稿件接受: 2015-08-15

<http://www.crter.org>

摘要

背景: 骨髓干细胞能够增殖再生, 与传统的手术治疗方案结合能明显增强骨不连的治疗效果, 具有重要的应用价值。

目的: 探讨骨髓间充质干细胞在微损伤环境中对骨不连的治疗效果。

方法: 选取清洁级纯种新西兰大白兔 40 只, 采用随机数字表法分为实验组与对照组, 每组 20 只。按照手术操作流程获取胫骨骨髓, 分离培养骨髓间充质干细胞, 待细胞增殖到第 3 代够 10^7 数量级时, 进行超顺磁氧化铁纳米粒子培养标记。在兔前肢桡骨中段约 15 mm 处造成骨缺损, 骨缺损 6 周发生骨不连。实验组大白兔将骨髓间充质干细胞与髂骨碎粒一起植入骨缺损处。对照组不进行干细胞移植, 于骨缺损处植入髂骨碎粒。术后 12 周内, 观察大白兔骨不连部位大体形态、X 射线片、病理学染色结果。

结果与结论: 实验组术后明显发现骨痂, 骨缺损处逐渐修复, 直至完全愈合; 对照组大白兔骨不连部位没有骨痂, 骨髓腔封闭, 充填肉芽组织。实验组有增生活跃的软骨组织, 碎粒融合, 骨缺损处出现类骨质, 成骨细胞进行性增加; 对照组软骨增生差, 有大量死骨, 骨粒未融合, 没有成骨细胞。实验组桡骨缺损部位 X 射线显示云雾状影, 骨髓腔恢复再通, 骨骼塑形好; 对照组骨碎粒吸收较少, 骨髓腔部分闭塞, 骨骼未连接, 缺损处硬化。结果显示在局部微损伤环境中, 骨髓间充质干细胞能够增殖分化为成骨细胞, 修复骨缺损导致的骨不连具有显著效果。

王月福, 于锡欣. 骨髓间充质干细胞在微损伤环境中修复骨不连[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(41): 6677-6682.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.41.021

Bone marrow mesenchymal stem cells for bone nonunion under micro-damage environment

Wang Yue-fu¹, Yu Xi-xin² (¹Department of Orthopedics, Guangrao County People's Hospital, Dongying 257300, Shandong Province, China; ²Department of Spinal Surgery, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow stem cells combined with traditional surgery regimen can significantly improve the therapeutic effects on bone nonunion, which are considered to have an important application value.

OBJECTIVE: To explore therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells on bone nonunion under micro-damage environment.

METHODS: Forty New Zealand white rabbits were selected and randomized into experimental and control groups, 20 rabbits in each group. Bone marrow of the tibia was extracted to isolate and culture bone marrow mesenchymal stem cells. Passage 3 cells with the order of magnitudes of 10^7 were labeled by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. A 15-mm bone defect was made at the middle of the radius of the rabbit forelimb. Bone nonunion appeared at 6 weeks after bone defects. Bone marrow mesenchymal stem cells combined with iliac particles were implanted into the bone defect of rabbits in the experimental group, and only iliac particles were implanted into the bone defect of rabbits in the control group. Within 12 weeks after implantation, the bone nonunion was observed through gross morphology, X-ray observation, and pathological observation.

RESULTS AND CONCLUSION: After implantation, a remarkable callus was found in the experimental group, and the bone defect recovered gradually until it was completely healed; in the control group, there was no callus, and the bone marrow cavity was closed and full of granulation tissues. In the experimental group, there were

Wang Yue-fu, Attending physician, Department of Orthopedics, Guangrao County People's Hospital, Dongying 257300, Shandong Province, China

Accepted: 2015-08-15

actively proliferated cartilage tissues, bone particles were fused, osteoid structures appeared, and osteoblasts proliferated progressively; in the control group, poor cartilage hyperplasia was found, and there were a large amount of dead bone tissues but no fused bone particles and osteoblasts. In the experimental group, X-ray films on the defected radius showed cloudiness-like shadow, the bone marrow cavity was recanalized, and the skeleton was shaped well; in the control group, few bone particles were absorbed, the bone marrow cavity was partly recanalized, and the injured bone was not healed with osteosclerosis. These findings indicate that under the micro-damage environment, bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into osteoblasts to repair bone defects-induced bone nonunion.

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Radius; Bone Diseases; Tissue Engineering

Wang YF, Yu XX. Bone marrow mesenchymal stem cells for bone nonunion under micro-damage environment. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(41):6677-6682.

0 引言 Introduction

骨不连发生机制复杂,是临床常见的骨折治疗后并发症,可长期影响患者运动功能及外形,后果非常严重。骨不连的治疗方法较多,但效果有差异,干细胞移植是一项医学新技术,用于骨不连的治疗,无疑是一种良好的骨骼修复方法,其应用前景十分可观^[1]。骨不连的形成涉及多方面因素,包括骨折局部因素、全身因素、应力干扰、缺乏正确的功能锻炼、医源性因素等。骨组织受损后,可刺激骨髓间充质干细胞增生,当骨髓间充质干细胞达到一定数量产生正常成骨细胞,则可促进骨骼断端连接,因此骨髓间充质干细胞是缺损局部修复的必要条件^[2-3]。骨髓间充质干细胞容易被分离和培养,即使在体外也能再生,并且具有极强的分化潜力,可在特定条件下定向分化为成骨细胞,为治疗骨不连提供理想方法。本研究制造大白兔骨缺损骨不连模型,并模拟骨髓间充质干细胞移植治疗法,观察骨骼愈合效果,旨在以动物为模型证实微损伤环境下干细胞移植治疗骨不连的效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2013年1月至2015年1月在广州医科大学基础医学院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 标准单笼单独饲养的新西兰大白兔45只,清洁级,雌雄不限,4-6个月龄,体质量2.5-3.0 kg,由广州医科大学动物中心提供,广州医科大学动物实验室标准单笼单独饲养,专业人员负责颗粒饲料喂养。实验过程中动物处置符合2006年科技部《关于善待试验动物的指导性意见》中的要求。

1.3.2 主要试剂 超顺磁氧化铁纳米粒子、胎牛血清(Gibco公司),低糖DMEM(Hyclone公司),胰蛋白酶/EDTA(Solarbio公司),氯胺酮注射液(山西太原药业有限公司,国药准字H14022824),速眠新II号注射液(长春军需大学兽医研究所,兽药试字(2002)005004),注射用头孢唑林钠针剂(乐普药业股份有限公司,国药准字H41022070)。

1.3.3 主要仪器 CO₂培养箱(德国 Hereaus 公司),手外科微型电动摆锯(上海紫霄/鹤峰医疗器械科技有限公司),X射线机(丹东华日理学电气股份有限公司),倒置显微镜(Nikon公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞分离培养扩增 5只实验兔用肌注速眠新II号联合氯胺酮复合麻醉,给药量为0.25 mL/kg。麻醉生效后,穿刺部位碘伏消毒,双膝关节屈曲,18号腰穿针接5 mL注射器内含0.2 mL肝素钠(100 U/mL)于胫骨平台穿刺入胫骨髓腔后,分别于两侧抽取骨髓血各约5 mL(图1)。



图1 抽取骨髓血:于胫骨髓腔穿刺后抽取骨髓血5 mL

Figure 1 Bone marrow extraction: 5 mL bone marrow sample was extracted from the bone marrow of the tibia using puncture method

采用全骨髓贴壁培养筛选法分离培养骨髓间充质干细胞。抽吸的骨髓血用PBS洗涤2遍,弃上清,用含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM培养液重悬,吹打均匀后行细胞计数。以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度接种于培养瓶中,添加适量完全培养基,置37℃、体积分数5%CO₂饱和湿度孵箱中培养。48 h后首次换液,以后间隔2 d换液,待细胞90%融合时传代。先用PBS清洗2遍后,倒尽,使用0.25%胰酶消化2 min后离心,取上清液,向离心管内加完全培养基,吹打均匀后分装,用0.25%胰蛋白酶/EDTA消化,按1:3传代后继续培养,换液时先用PBS清洗2次,再加入新的培养基,换液后使用倒置相差显微镜观察细胞形态。消化传代扩增

纯化至第3代, 细胞数达到 10^7 数量级备用。

1.4.2 超顺磁氧化铁纳米粒子标记骨髓间充质干细胞 在第3代骨髓间充质干细胞悬液中加入超顺磁氧化铁纳米粒子(铁浓度为84 mg/L), 在37℃, 体积分数为5% CO_2 培养箱培养24 h。

1.4.3 骨不连模型制作 新西兰大白兔于实验室适应性喂养2周后, 采用复合麻醉, 麻醉成功后将家兔固定、处理皮毛, 手术部位取右前肢尺桡骨中段, 常规消毒、铺单, 于右前肢尺桡骨中段前内侧做纵行切口, 约2 cm, 向外侧翻开, 依次切开皮肤、筋膜, 钝性分离肌肉, 显露桡骨中段, 即桡骨弧顶段, 拨离骨膜, 直尺测量15 mm桡骨段标记(即桡骨弧顶上下各7.5 mm), 确定上、下截骨点, 微型电动摆锯分别于截骨点横形截骨, 两截骨平面保持平行, 完整切除游离标记段桡骨, 无菌生理盐水冲洗创面, 去除骨碎屑, 止血后, 逐层缝合(图2)^[4]。两组大白兔均给予头孢唑林钠, 正常活动, 喂养满6周后制备骨不连模型。

1.4.4 骨髓间充质干细胞治疗骨缺损骨不连 建立兔骨不连动物模型成功后, 采用随机数字表法将40只新西兰大白兔随机分为实验组和对照组, 每组20只。实验组植入培养好的同种异体干细胞混合自体髂骨粒复合材料, 对照组只植入自体髂骨粒。实验兔肌注速眠新II号联合氯胺酮复合麻醉, 常规固定、脱毛、备皮、消毒、铺单。术野碘伏消毒, 于右前肢尺桡骨中段造模切口再次做纵行切口, 约2 cm, 依次切开皮肤、筋膜, 钝性分离肌肉, 向外侧翻开, 显露骨缺损处, 去除肉芽组织, 对骨折断端制造微损伤环境: 适当咬除骨折硬化端, 骨髓腔再通, 于骨断端间及断端两端0.5 cm, 用1.0 mm克氏针环形钻孔做微损伤处理, 即在两骨缺损端1.5 cm部位, 用克氏针钻20个孔, 间距5 mm, 直至有血渗出, 周围软组织适当制造微损伤。取髂骨骨质, 以咬骨钳咬成碎骨粒, 体积约 0.5 cm^3 , 与扩增培养标记后的干细胞悬液混合, 复合物植入到骨缺损处(图3)。剩余干细胞混悬液注射到植骨及钻孔后的髓道内, 总植入干细胞量约0.3 mL, 数量约 1×10^7 。肌肉包裹覆盖, 缝合筋膜、皮肤。对照组骨缺损处理同前, 只植入碎骨粒, 植骨后缝合切口。实验兔术后给予头孢唑林钠肌注, 50 mg/(kg·d), 连续3 d。术后试验兔单笼喂养, 不限制活动。

1.5 主要观察指标

骨缺损处大体形态: 术后4, 6, 8, 12周每组随机处死1只动物后观察骨不连部位大体形态。

骨缺损处病理学形态: 术后4, 6, 8, 12周, 取处死兔的桡骨标本, 按照病理学观察步骤经甲醛溶液固定并做处理后进行切片, 切片行苏木精-伊红染色、普鲁士蓝染色。

X射线拍摄: 术后1, 2, 4, 6, 8, 12周, 拍摄前肢尺桡骨侧位X射线片, 观察骨缺损部位骨质愈合情况以及骨痂生长情况。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 参加实验共40只新西兰大白兔, 进入结果分析40只, 中途无脱落。

2.2 术后骨不连处大体形态

术后4周: 大体标本观察实验组和对照组外形差异不大, 可见骨缺损处植骨碎骨粒较松散, 周围软组织包绕, 骨痂较少, 骨不连骨缺损区无骨性连接。

术后6周: 实验组桡骨缺损处植入的碎粒多数融合, 骨痂相对大, 骨质较硬, 成骨外形差; 对照组桡骨缺损处植入的碎粒部分吸收, 仍有少量髂骨碎粒, 骨痂减少, 显示肉芽组织增生, 骨髓腔部分闭塞。

术后8周: 实验组桡骨缺损处植入的碎粒已经融合, 骨痂较大, 新生骨质硬, 愈合良好, 但骨不连未完全恢复; 对照组缺损处植入的髂骨碎粒吸收, 骨痂较少, 没有可辨别的新生骨质, 缺损处肉芽组织增生, 骨髓腔封闭, 骨不连未修复。

术后12周: 实验组骨缺损处形态与正常桡骨一样, 骨不连已经完全修复, 骨质硬, 成骨良好; 对照组新西兰大白兔桡骨缺损处部位被肉芽组织占据, 髓腔闭塞, 没有新生骨, 未得到修复。

2.3 两组新西兰大白兔术后病理学观察结果

术后4周: 实验组软骨细胞增生活跃, 增生面积大, 死骨形成, 普鲁士蓝染色看到蓝染颗粒干细胞, 能观察到成骨细胞; 对照组虽有软骨细胞增生, 但数量很少, 死骨很多, 普鲁士蓝染色没有蓝染颗粒。

术后6周: 实验组桡骨缺损处植入的骨碎粒融合, 软骨细胞增生、呈集落样, 观察到新生类骨质, 大量成骨细胞, 普鲁士蓝染色看到蓝染颗粒干细胞; 对照组切片中软骨细胞增生不活跃, 死骨较多, 成骨细胞较少, 缺损处长入纤维结缔组织, 普鲁士蓝染色没看到蓝染颗粒, 骨组织结构紊乱。

术后8周: 实验组桡骨缺损处切片中有大量编织骨, 成骨细胞数量较多, 排列稍整齐, 骨骼结构似正常骨, 有哈佛氏管重建, 普鲁士蓝染色看到少许蓝染成骨细胞(图4); 对照组桡骨缺损切片中观察到少量新生毛细血管, 还存在大量肉芽组织。

术后12周: 实验组桡骨缺损处见成熟骨小梁, 排列正常, 骨髓腔完全再通, 形成哈佛氏系统, 已经完全愈合(图5); 对照组桡骨缺损处切片编织骨仅少量, 成骨细胞也较少, 肉芽组织较多, 骨形态紊乱(图6)。

2.4 两组实验兔术后X射线片观察结果 见图7, 8。

术后1周: 两组桡骨X射线检查无明显差异, 植骨区及周围均未见明显新骨痂形成, 植骨粒于周围组织对比明显。

术后2周: 两组桡骨骨痂生长不明显, 但是可以明显看出实验组较对照组骨粒密度明显减低, 实验组有少量骨痂形成, 两组碎骨粒密度可以看出明显区别。



图2 制备骨不连模型: 完整切除游离标记段桡骨
Figure 2 Preparation of bone nonunion model: the free radial segment was completely removed



图3 骨髓间充质干细胞治疗骨不连: 植入碎骨粒和干细胞混合液的复合物
Figure 3 Bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of bone nonunion: the mixture of bone particles and stem cells was implanted

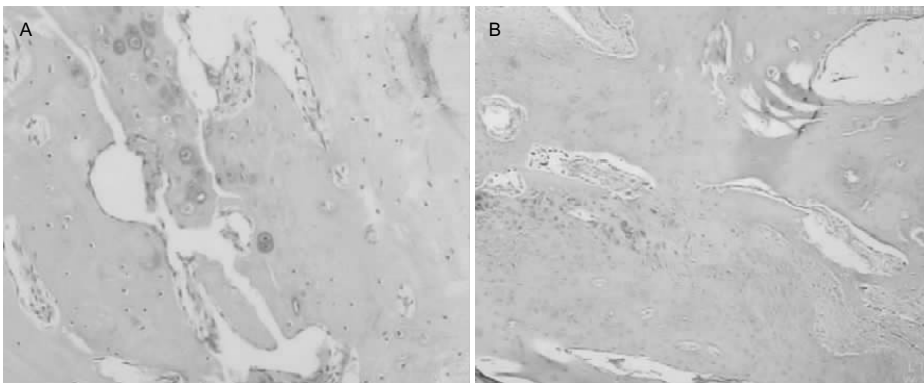


图4 术后8周实验组骨不连组织病理学观察情况(苏木精-伊红染色, ×200)
Figure 4 Pathological observation of bone nonunion at postoperative 8 weeks in the experimental group (hematoxylin-eosin staining, ×200)
图注: 实验组桡骨缺损处切片中有大量编织骨, 成骨细胞数量较多, 排列稍整齐, 骨骼结构似正常骨, 有哈佛氏管重建。

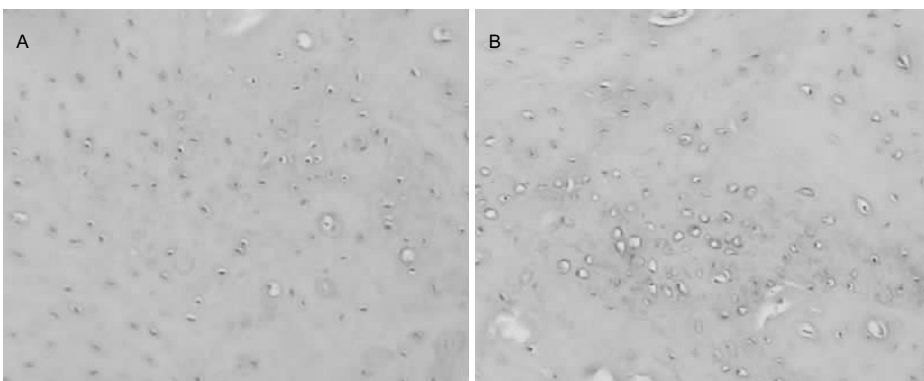


图5 术后12周实验组骨不连组织病理学观察情况(苏木精-伊红染色, ×200)
Figure 5 Pathological observation of bone nonunion at postoperative 12 weeks in the experimental group (hematoxylin-eosin staining, ×200)
图注: 桡骨缺损处见成熟骨小梁, 排列正常, 骨髓腔完全再通, 形成哈佛氏系统, 已经完全愈合。

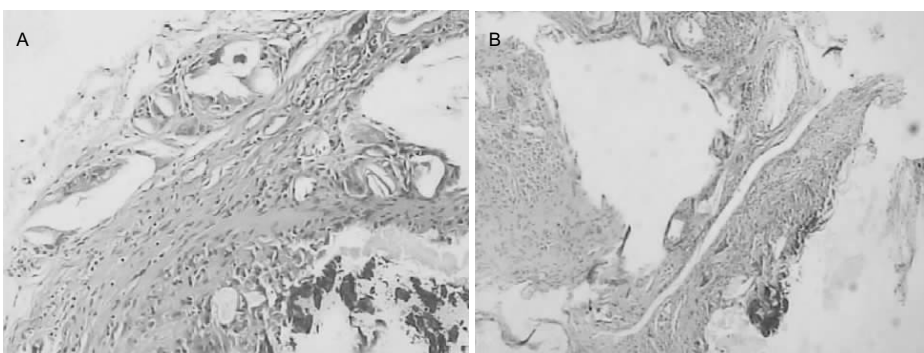


图6 术后12周对照组骨不连组织病理学观察情况(苏木精-伊红染色, ×400)
Figure 6 Pathological observation of bone nonunion at postoperative 12 weeks in the control group (hematoxylin-eosin staining, ×400)
图注: 桡骨缺损处切片中有少量成骨细胞, 肉芽组织较多, 骨形态紊乱。



图7 实验组兔术后桡骨缺损处X射线片观察结果

Figure 7 Postoperative X-ray observation of the rabbit radial defect in the experimental group

图注: 从左至右依次为实验组兔术后4, 6, 8, 12周桡骨缺损处X射线片。



图8 对照组兔术后桡骨缺损处X射线片观察结果

Figure 8 Postoperative X-ray observation of the rabbit radial defect in the control group

图注: 从左至右依次为对照组兔术后4, 6, 8, 12周桡骨缺损处X射线片。

术后4周: 对照组桡骨缺损处植入的髂骨碎粒减少, 断端边缘少量骨痂; 实验组骨缺损部位髂骨碎粒减少, 呈现云雾状影, 有模糊骨痂生长, 骨密度低。

术后6周: 对照组桡骨缺损处植入的髂骨粒减少, 断端周围骨痂量少, 骨髓腔闭塞比例高; 实验组桡骨缺损处植入的髂骨碎粒融合, 局部为云雾状影, 骨髓腔再通比例高。

术后8周: 对照组桡骨缺损处植入的髂骨粒有吸收, 但局部硬化, 没有骨性连接, 骨髓腔未再通; 实验组桡骨缺损处可见大骨痂, 断端有骨性连接, 骨髓腔恢复再通, 而外形稍差。

术后12周: 对照组桡骨缺损处植入的髂骨粒几乎已经吸收, 但断端硬化, 没有骨性连接, 骨髓腔封闭; 实验组和正常的骨组织一样, 骨髓腔已通, 骨外形良好。

3 讨论 Discussion

骨折是常见创伤, 通常是多种因素综合长期作用的结果, 包括全身因素、骨折局部因素、局部血供不足、感染、医源性因素、应力干扰、缺乏正确的功能锻炼等, 均可导致骨不连的发生。一般6个月骨折仍未愈合就视为骨不连, 美国FDA关于骨不连的时间标准延长至9个月, 并将持续3个月没有任何愈合迹象亦视为骨不连。根据X射线及组织学的表现可将骨不连分为肥大性(象腿或马蹄形)、萎缩性(萝卜根形)及假关节形成等类型。研究表明, 骨折的修复过程存在两种骨化形式: 软骨成骨和膜内成骨, 无论哪种方式, 都需要骨折部聚集数量足够的骨髓间充质干细胞, 再由骨髓间充质干细胞分化成软骨或成骨细胞。因此干细胞就成为治疗骨不连的理想种子细胞, 向骨折骨不连部位引入足够的干细胞是促进骨修复的前提条件及重要的细胞学基础, 人们就是利用这一原理, 将干细胞移植术引入骨不连治疗中^[5-15]。

干细胞的功能和命运受其所处的外部微环境的调

节^[16-19]。干细胞受此局部微环境的影响定向诱导分化, 启动系统性治疗。体外诱导干细胞程序复杂效果欠佳, 模拟愈环境困难, 本实验引入了“局部微损伤理论”, 体内诱导干细胞向成骨细胞分化。研究表明, 人体在正常状态下内部各结构的新陈代谢处于一个动态平衡中, 而在组织局部创造微损伤环境中, 其组织局部的平衡将被打破, 组织修复系统即将重新启动, 并主要表现为局部释放生物活性因子。骨不连为骨折愈合修复过程停止, 依据组织微损伤理论, 对骨不连组织的局部创造一个新的微损伤环境, 重新启动骨折修复, 其释放的生物活性因子不但会激活组织自身的修复能力, 还将促进移植或者迁移到局部的干细胞在损伤局部微环境刺激下趋化、生长, 启动干细胞的定向分化, 从而促进组织的再生与修复。目前最常用的骨不连模型实验动物为新西兰大白兔, 其骨骼与人类的骨骼相近, 转化速度快, 约达到了人类的3倍, 本研究以兔桡骨缺损不连模型行微损伤环境下干细胞治疗, 实验组对骨不连部位局部微损伤处理后植入自体骨碎粒同时局部应用分离扩增后的同种异体骨髓间充质干细胞, 而对照组无干细胞相关治疗, 由此对比干细胞治疗骨不连的疗效。同时, 鉴于颗粒骨可更有效填充所有腔隙及缺损处, 更利用爬行生长, 加快骨愈合的过程, 提高骨愈合质量, 缩短骨愈合时间, 且皮质骨移植时其细胞存活较少, 而松质骨骨细胞存活较多, 故本次干细胞移植实验选用松质骨颗粒进行移植。作者从造模、病理、影像等多个方面多个角度说明微损伤环境下干细胞移植在整个系统修复过程中, 实验组从骨痂及成骨量、骨密度、骨形态、修复时间均有明显的优势, 提示骨髓间充质干细胞是骨缺损骨不连治疗良好的种子细胞, 在局部微损伤提供的诱导环境下, 可向成骨细胞分化, 启动修复程序, 诱导成骨, 促进局部骨质修复, 且效果显著。

综上所述, 骨髓间充质干细胞有较明显的诱导成骨作用, 局部微损伤环境为其提供了良好的诱导环境, 分化成

骨良好。骨髓间充质干细胞在局部微损伤环境下修复大段缺损骨不连效果明确, 疗效显著, 具有积极意义。

作者贡献: 实验设计为王月福, 实验实施为王月福、于锡欣, 实验评估、资料收集为于锡欣。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中动物处置符合 2006 年科技部《关于善待试验动物的指导性意见》中的要求。实验动物在麻醉下进行所有手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

学术术语: 发生骨不连的原因? 骨不连是指骨折经过治疗后超出正常所愈合的时间, 延长治疗后仍不能够达骨性愈合(一般是骨折 8 个月); 目前公认的诊断标准仍是根据美国食品药品监督管理局(FDA)制定的标准, 即骨折至少 9 个月仍未愈合, 且近 3 个月内没有愈合迹象, 可确定为骨不连。骨不连是多种因素综合作用长期作用的结果, 主要原因包括: 全身因素、骨折局部因素、局部血供不足、感染、医源性因素、应力干扰、缺乏正确的功能锻炼等。根据 X 射线及组织学的表现将骨不连分为肥大性(象腿或马蹄形)、萎缩性(萝卜根形)及假关节形成等类型。

作者声明: 文章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。

4 参考文献 References

- [1] Luk KD, Lee CF, Cheung KM, et al. Clinical effectiveness of school screening for adolescent idiopathic scoliosis: a large population-based retrospective cohort study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010;35(17):1607-1614.
- [2] Katz DE, Herring JA, Browne RH, et al. Brace wear control of curve progression in adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(6):1343-1352.
- [3] Schiller JR, Thakur NA, Eberson CP. Brace management in adolescent idiopathic scoliosis. *Int Orthop Relat Res*. 2010; 468(3):670-678.
- [4] Gammon SR, Mehlman CT, Chan W, et al. A comparison of thoracolumbosacral orthoses and SpineCor treatment of adolescent idiopathic scoliosis patients using the Scoliosis Research Society standardized criteria. *J Pediatr Orthop*. 2010;30(6):531-538.
- [5] Alegre-Aguarón E, Desportes P, García-Álvarez F, et al. Differences in surface marker expression and chondrogenic potential among various tissue-derived mesenchymal cells from elderly patients with osteoarthritis. *Cells Tissues Organs*. 2012;196(3):231-240.
- [6] Chang CB, Han SA, Kim EM, et al. Chondrogenic potentials of human synovium-derived cells sorted by specific surface markers. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(1):190-199.
- [7] Stokes IA, McBride C, Aronsson DD, et al. Intervertebral disc changes with angulation, compression and reduced mobility simulating altered mechanical environment in scoliosis. *Eur Spine J*. 2011;20(10):1735-1744.
- [8] Kuroda R, Matsumoto T, Niikura T, et al. Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34+ cells for patients with femoral and tibial nonunion: pilot clinical trial. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(1):128-134.
- [9] Xue G, He M, Zhao J, et al. Intravenous umbilical cord mesenchymal stem cell infusion for the treatment of combined malnutrition nonunion of the humerus and radial nerve injury. *Regen Med*. 2011;6(6):733-741.
- [10] Zhao Z, Hao C, Zhao H, et al. Injectable allogeneic bone mesenchymal stem cells: a potential minimally invasive therapy for atrophic nonunion. *Med Hypotheses*. 2011;77(5): 912-913.
- [11] Kuroda R, Matsumoto T, Miwa M, et al. Local transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in a patient with tibial nonunion: a case report. *Cell Transplant*. 2011;20(9): 1491-1496.
- [12] Kallai I, van Lenthe GH, Ruffoni D, et al. Quantitative, structural, and image-based mechanical analysis of nonunion fracture repaired by genetically engineered mesenchymal stem cells. *J Biomech*. 2010;43(12):2315-2320.
- [13] Timek TA, Goodman SB, Whyte RI. Treatment of irradiated poststernotomy sternal nonunion with autologous stem cell-impregnated bone matrix and sternal plating. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139(3):788-789.
- [14] Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone*. 2010;46(2): 418-424.
- [15] Zilberman Y, Kallai I, Gafni Y, et al. Fluorescence molecular tomography enables in vivo visualization and quantification of nonunion fracture repair induced by genetically engineered mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2008;26(4):522-530.
- [16] 杨武斌, 王平, 师彬. 骨髓间充质干细胞的成骨性诱导[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(9): 2158-2160.
- [17] 代志鹏, 许伟华, 杨述华, 等. 人骨髓间充质干细胞的生物学特性及成骨诱导分化的研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(15): 1402-1407.
- [18] 徐斌, 周亮, 王英明, 等. 同种异体脱钙骨与骨髓间充质干细胞关节腔内共培养: 与同腔软骨性状的对比[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(8): 1165-1171.
- [19] 师彬, 杨武斌, 王平. 骨髓间充质干细胞诱导分化成骨细胞的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 228-231.