

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.036

脐带间充质干细胞治疗粉碎性骨折 1 例并文献复习

杨华强^{1,2} 李红^{1△} 胡明军¹ 李玉玲¹ 覃骏¹ 董小林¹ 王黎¹

(1 湖北医药学院附属十堰市人民医院血液科 湖北 十堰 442000;

2 湖北医药学院附属太和医院细胞治疗中心 湖北 十堰 442000)

摘要 目的:观察脐带间充质干细胞治疗粉碎性骨折的疗效和安全性。**方法:**将脐带间充质干细胞经静脉输注和局部多点注射到常规治疗效果欠佳自愿接受干细胞移植的 1 例粉碎性骨折患者,4 次为一个疗程,每周间隔 1 次,每次治疗细胞总数 $(3\sim 7)\times 10^7$ 。术后 1、3、6 月定期观察患者临床症状及影像学变化并进行动态观察。**结果:**脐带间充质干细胞治疗后一月,患者在不帮助的情况下可独立缓慢行走,复查 X 线提示骨折部位有新生骨形成;干细胞治疗后三月,复查 X 线提示骨折愈合较前好转;半年后,患者右下肢受力明显好转,可以独立自由行走,复查 X 线提示右下肢骨折部位有连续性骨痂形成,骨折部位愈合良好。**结论:**脐带间充质干细胞移植治疗粉碎性骨折是一种安全、有效的手段,可促进粉碎性骨折的愈合,改善其生活质量。

关键词:骨折;粉碎性;治疗;脐带间充质干细胞

中图分类号:R683 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)07-1343-03

The Treatment of One Case Comminuted Fractures with Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation and Literature Review

YANG Hua-qiang^{1,2}, LI Hong^{1△}, HU Ming-jun¹, LI Yu-ling¹, QIN Jun¹, DONG Xiao-ling¹, WANG Li¹

(1 Department of Hematology, Shiyan Renming Hospital, Hu Bei Medical College, Shiyan, Hubei, 442000, China;

2 Center of Cell Therapy, Taihe Hospital, Hu Bei Medical College, Shiyan, Hubei, 442000, China)

ABSTRACT Objective: To observe the clinical effect and safety of umbilical cord mesenchymal stem cell(UC-MSC) transplantation in the treatment of comminuted fractures. **Methods:** One patient with comminuted fractures were received UC-MSC transplantation[4 times as a course of treatment which every time interval one week, cell numbers $(3-7)\times 10^7/\text{time}$] by intravenous infusion and local lesion multipoint injections. Clinical symptoms and change of iconography were observed from 1, 3 and 6 month after stem cell treatment. **Results:** After one month of UCB-MSC transplantation, the patient can walk slowly without help, and X-ray rechecked show new bone formation of fracture site. X-ray rechecked show fracture healing improved after three month of UCB-MSC transplantation. The strength of right lower extremity of the patient strengthen, walk freely without help, continuous callus formation of fracture site which hinted fracture site healing was better. The patient had no severe complications and clear side effects after transplantation. **Conclusions:** UCB-MSC transplantation is effective and safe method in the treatment of comminuted fracture. It can promote the healing of comminuted fracture and improve the quality of life.

Key words: Bone fracture; comminuted; Treatment; Umbilical cord mesenchymal stem cell

Chinese Library Classification(CLC): R683 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1343-03

前言

粉碎性骨折属于完全性骨折,指骨质碎裂成三块以上,又称为 T 或 Y 型骨折。粉碎性骨折是常见的一种骨折类型,由于外伤或病理等原因致使骨质部分或完全断裂,给人们带来的极大痛苦,严重者影响生活质量甚至导致死亡。该病目前治疗主要有骨折部位切开复位内固定、石膏外固定及功能锻炼等,但仍有一部分病人因为反复手术、骨质缺损、局部感染、供血障碍、复位和固定不佳等原因导致骨折延迟愈合或不愈合,给患

者和社会带来严重的经济负担和社会负担。近年来随着再生医学的发展和干细胞的研究进展,越来越多的研究表明间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)具有成骨作用,并且可以促进骨折的愈合^[1,2]。我院利用脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cell, UC-MSC)治疗粉碎性骨折 1 例,取得较好效果,现报道如下,并结合国内外相关文献进行复习,以提高我们对 UC-MSC 治疗粉碎性骨折的认识。

1 资料和方法

1.1 病例资料

患者,男,39 岁,船员,2010.4.18 在海上打鱼时被缆绳击中右小腿致“右胫腓骨开放性骨折”,在智利当地医院急诊手术行切开复位加内固定,因复位及愈合欠佳骨折后先后共行 5 次手术。病情稳定后回国并来本院继续治疗,2010.6.28 复查 X 线片示:右胫腓骨中下段粉碎性骨折,骨折复位尚好,骨折线较清

作者简介:杨华强(1973-),男,硕士,副主任医师,副教授,主要从事干细胞基础和临床应用研究

△通讯作者:李红, E-mail: yanghuaqiang2004@126.com,

电话:13986871847

(收稿日期:2013-07-17 接受日期:2013-08-15)

晰,未见明显骨痂生长,内固定物位置正常;右侧内踝陈旧性骨折;右小腿软组织中见散在多个金属影。2010.7.25 复查 X 线片示:右胫腓骨中下段骨折复位尚好,但伴有骨质缺损,愈合欠佳,踝关节骨质疏松。因患者骨折部位一直愈合不良,右下肢肿胀明显,不能受力,经医院骨科专家讨论后建议其行植骨手术或者试行 UC-MSC 治疗。经医院伦理委员会批准和患者知情同意,于 2010.7.28 起行 UC-MSC 治疗一个疗程。干细胞治疗后半月,患者右下肢受力明显好转,肿胀基本消失。干细胞治疗一月,患者已丢掉拐杖可独立缓慢行走,复查 X 线提示骨折部位有新生骨形成。干细胞治疗三月,复查 X 线提示骨折愈合较前好转。干细胞治疗半年余,患者右下肢受力明显好转,自己可以独立行走并从事日常活动,复查 X 线提示右下肢骨折部位连续性骨痂形成,愈合较好。



图 1 干细胞治疗前 X 线表现

Fig.1 The difference of X-ray between pre-treatment and post-treatment of stem cell;before stem cell transplantation



图 2 干细胞治疗 6 月后 X 线表现

Fig.2 The difference of X-ray between pre-treatment and post-treatment of stem cell;Six month after stem cell transplantation

1.2 脐带间充质干细胞制备及移植方法

取足月妊娠剖宫产健康胎儿的脐带,以 PBS 充分冲洗,剔除脐动、静脉,剩余的间质组织切割成直径约 1~2 mm 大小的组织块,置 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清、25 mM 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素)中,于含有 5%CO₂、37℃ 饱和湿度培养箱中培养,细胞达 80%汇合后,以 0.2%的胰酶/EDTA 消化并按 1:3 的比例传代。收集第 3 代细胞,细胞总数为 (2~6)×10⁷。流式细胞仪检测细胞表型并确定为脐带间充质干细胞。移植前由患者签署干细胞知情同意书。脐带间充

质干细胞移植 4 次为 1 疗程,每次间隔 1 周。第一、三次采用静脉输注,第二、四次采用骨折部位局部注射。局部注射主要是将 UC-MSC 经皮多点分层缓慢注射于骨折端周围,骨折端的瘢痕组织可先用骨穿针穿刺预制通道以提高干细胞液的驻留。术后应用抗生素预防感染,定期 X 线检查观察骨不连愈合状态。局部注射后观察穿刺点处有无渗血及末梢循环情况,机体有无发热、过敏及其他不适。

1.3 并发症和不良反应

局部注射干细胞后 1~2 天,患者感觉注射部位胀痛,余无不适感,各项指标均正常,无不良反应发生。

2 结果

该患者经常规治疗骨折延迟愈合,而经 UC-MSC 治疗后症状明显好转,UC-MSC 治疗一月,患者在不帮助的情况下可独立缓慢行走,复查 X 线提示骨折部位有新生骨形成;干细胞治疗三月,复查 X 线提示骨折愈合较前好转;半年后,患者右下肢受力明显好转,可以独立自由行走,复查 X 线提示右下肢骨折部位有连续性骨痂形成,骨折部位愈合良好。治疗过程中及治疗后各项生化指标正常,随访半年未发现明显的副作用。

3 讨论

粉碎性骨折是骨折中的严重类型,在治疗过程中常常由于反复手术、骨质缺损、局部感染、供血障碍、复位和固定不佳等原因导致骨折延迟愈合或不愈合,因此如何促进粉碎性骨折的愈合就成为研究的热门话题。骨折后的修复过程类似于胚胎期的骨形成,它存在两种骨化形式^[1]:软骨内成骨和膜内成骨。软骨内成骨先由 MSC 聚集并分化成软骨细胞,形成软骨组织,然后由骨组织取代软骨组织,最终完成骨化;膜内成骨骨骼不需要形成软骨中介,而是由骨膜内 MSC 直接分化为成骨细胞,形成骨组织。显然,骨修复过程中,需要骨折局部聚集数量足够的 MSC,然而,尽管骨折周围也存在 MSC,但仅能提供轻度骨折/骨缺损的修复需要。对于粉碎性骨折或伴有骨质缺损者,即使植入自体骨、异体骨或组织工程骨,除植骨周围有少量细胞存活外,大部分骨缺损内缺乏足够的活的 MSC。所以,向骨折/骨缺损部位引起足够的 MSC,是促进骨修复的前提条件及重要的细胞学基础。Kumar 等^[4]联合应用不同的生长因子和 C-X-C 家族趋化因子受体 4 型(CXCR4)抑制剂 AMD3100 动员小鼠体内的 MSC,探讨是否对骨骼部分缺损的小鼠模型有治疗作用,结果表明 IGF-1 和 AMD3100 可以促进小鼠骨骼的生长,进一步研究表明这种效应是由 Akt/PI3K, MEK1/2-Erk1/2 和 smad2/3 所介导的。Ai 等^[5]使用矿化骨异体移植或与骨髓 MSC 联合治疗胫骨骨折的模型小鼠,并比较两者对骨折的愈合率,并与对照组进行比较,结果表明与对照组比较矿化骨异体移植治疗和矿化骨联合骨髓 MSC 都可以促进骨折的愈合和新骨组织的形成。McNulty 等^[6]把 CXCR4 抑制剂 AMD3100 注射到大腿骨髓清除的小鼠模型后发现 AMD3100 可以导致干细胞的动员,并且增加骨容量,促进膜内骨的再生。Burastero 等^[7]研究发现人 MSC 联合骨形态发生蛋白类 -7(BMP-7)可以改善无胸腺小鼠临界值大小的部分骨质缺损的骨骼再生。

Kitaori 等^[8]研究进一步发现基质细胞来源的细胞因子 -1/CXC-R4 信号途径在 MSC 募集到骨折部位促进骨骼修复过程中具有重要作用。童培建^[9]等应用自体骨髓 MSC 移植治疗四肢骨折骨不连 48 例,并观察其治疗效果,结果表明 42 例患者达到骨性愈合,骨折愈合时间(注射骨髓 MSC 的时间)为 4.7 个月(3~6 个月),X 线显示骨折线消失和骨痂形成,提示我们经皮自体 MSC 移植术是一种治疗四肢骨干骨不连的有效和安全的方法,具有临床应用价值。李华涛^[10]等从脐带 Wharton 胶获取细胞培养、扩增,取传代细胞行免疫表型测定和成骨细胞诱导分化,并以 UC-MSC 移植治疗 1 例骨折感染外露后长期不愈病例,结果表明培养细胞形态类成纤维细胞,可长期稳定培养,传代细胞表达间充质干细胞免疫表型,成骨诱导分化的细胞茜素红染色胞浆中有大量的钙沉积,Von Kossa 染色有钙结节形成,该患者采用 UC-MSC 混悬液外用 4 次,肉芽组织迅速增生填满窦道并上皮化,12 d 创面愈合,该结果说明 UC-MSC 具有高度自我更新能力和分化潜能,能够向成骨细胞分化,将其移植治疗骨不连可以显著改善局部微环境。张远成等^[11]应用浓缩骨髓干细胞技术治疗 21 例骨折不愈合及延迟愈合患者,并观察其临床效果,结果表明骨折愈合 25 例,愈合时间 5 个月~2 年,平均 6.5 个月;骨折未愈合 5 例。全部病例无穿刺点感染及异常疼痛等并发症。袁进国等^[12]观察自体骨髓干细胞移植治疗骨不愈合的效果,并与自体髂骨植骨相比较,结果表明自体骨髓干细胞移植治疗骨不愈合疗程短、效果好,较传统植骨具有明显优势。张远成^[13]等探讨自体骨髓干细胞移植治疗骨不连 30 例患者,并观察其临床治疗效果,结果表明浓缩的骨髓干细胞悬液显微镜下单核细胞计数达到 10^5 个/mL 以上,涂片染色有活性细胞比率 > 95%,骨折愈合 25 例,愈合时间 5 个月~2 年,平均 7 个月,该结果提示我们应用自体浓缩骨髓干细胞经皮注入骨折端,是一种微创、安全、高效的治疗骨不连的方法。本文中该患者经常规治疗及多次手术后骨折长时间不愈合,经 UC-MSC 治疗后一月,患者在不帮助的情况下可独立缓慢行走,复查 X 线提示骨折部位有新生骨形成;干细胞治疗后三月,复查 X 线提示骨折愈合较前好转;半年后,患者右下肢受力明显好转,可以独立自由行走,复查 X 线提示右下肢骨折部位连续性骨痂形成,骨折部位愈合良好,无明显副作用及并发症,充分证明了这一技术具有可行性、有效性。但使用该法仍存在一些需进一步研究,如 UC-MSC 的分离、提纯、培养及浓缩,这些因素均与骨折愈合关系密切;此外,移植成功的前提条件为解决导致骨不连的技术性、生物性因素,如感染、固定不牢及成骨障碍、复位不佳等。

总之,采用干细胞技术促进骨骼的再生是一种新的治疗方法,国内外已有文献报道^[14-20],但是其远期效果以及治疗并发症还需要进一步观察。临床上细胞治疗尚处于初始阶段,很多机制尚未完全知晓,比如最适合的细胞浓度、治疗的次数、与不同内固定方式的相关性、可能出现的并发症防治等,值得在以后工作中进一步探讨。因此,在开展这项新技术时,一是要严格掌握好手术指征;二是需要建立科学的客观的疗效判断标准;三是需要对手术后的患者进行长时间的随访;四是开展这类新技术的单位应该具备所需的硬件和软件的条件。当然,还需要基础研究的支持。

参考文献(References)

- [1] Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration[J]. Vet Surg, 2006, 35(3): 232-242
- [2] Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone[J]. Injury, 2007, 38(Suppl 1): S26-32
- [3] 张完郁,徐皓,陈建梅.骨髓间充质干细胞在骨损伤治疗中的应用进展[J].实用医学杂志,2008,24(5):691-692
Zhang Wan-yu, Xu Hao, Cheng Jian-mei. The application progression of bone marrow mesenchymal stem cell in the treatment of bone injury[J]. The Journal of Practical Medicine, 2008, 24(5): 691-692
- [4] Kumar S, Ponnazhagan S. Mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in vivo augments bone healing in a mouse model of segmental bone defect[J]. Bone, 2012, 50(4): 1012-1018
- [5] Ai J, Ebrahimi S, Khoshzaban A. Tissue engineering using human mineralized bone xeno-graft and bone marrow mesenchymal stem cells allograft in healing of tibial fracture of experimental rabbit model[J]. Iran Red Crescent Med J, 2012, 14(2): 96-103
- [6] McNulty MA, Virdi AS, Christopherson KW, et al. Adult stem cell mobilization enhances intramembranous bone regeneration: a pilot study[J]. Clin Orthop Relat Res, 2012, 470(9): 2503-2512
- [7] Burastero G, Scarfi S, Ferraris C, et al. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats [J]. Bone, 2010, 47(1): 117-126
- [8] Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(3): 813-823
- [9] 童培建,厉昉,瞿杭波,等.经皮自体骨髓间充质干细胞移植治疗四肢骨折骨不连[J].中华创伤杂志,2007,23(7):499-501
Tong Pei-jian, Li Ju, Qu Hang-bo, et al. Transplantation of percutaneous autologous mesenchymal stem cells for treatment of ununion of extremity fractures[J]. Chin J Trauma, 2007, 23(7): 499-501
- [10] 李华涛,边琳芬,吴胜刚,等.脐带间充质干细胞促进骨愈合的体外实验及临床应用 1 例[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(45):8542-8546
Li Hua-tao, Bian Lin-fen, Wu Sheng-gang, et al. In vitro experiment of umbilical cord mesenchymal stem cells to promote bone healing and clinical application in one case[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(45): 8542-8546
- [11] 张远成,刘国辉,宓士军,等.应用浓缩骨髓干细胞技术治疗骨折不愈合[J].中国现代医学杂志,2008,18(16):2418-2421
Zhang Yuan-cheng, Liu Guo-hui, Mi Shi-jun, et al. The treatment of fracture nonunion with concentrated bone marrow[J]. Journal of Chinese modern medicine, 2008, 18(16): 2418-2421
- [12] 袁进国,周志玲,刘英飞,等.自体骨髓干细胞移植及自体髂骨植骨治疗骨不愈合的比较[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(1):183-186
Yuan Jin-guo, Zhou Zhi-lin, Liu Ying-fei, et al. Autologous bone marrow stem cell transplant versus autologous iliac bone graft for bone nonunion treatment. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(1): 183-186

映整个微生物被膜的生长变化过程,充分表明了基于 COMSTAT 软件开展的对微生物被膜的定量分析在研究微生物被膜形成的理论机制方面存在潜在价值,可以为研究微生物被膜治病性提供理论基础^[20]。同样,该技术不仅为分析微生物被膜提供可靠的方法保障,今后随着影像图片获取和处理方法的改进,以及该技术分析方法的日趋成熟,基于 COMSTAT 软件的分析方法还将为微生物被膜在病原学和生态学领域开展相关研究奠定更广泛的应用基础。

参考文献(References)

- [1] Kim Y G, Lee J H, Kim C J, et al. Antibiofilm activity of *Streptomyces* sp. BFI 230 and *Kribbella* sp. BFI 1562 against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2012, 96(6): 1607-1617
- [2] Stewart P S, William C J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms [J]. *The Lancet*, 2001, 358(9276): 135-138
- [3] Costerton J, Stewart P S, Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections [J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322
- [4] Dalton H M, Poulsen L K, Halasz P, et al. Substratum-induced morphological changes in a marine bacterium and their relevance to biofilm structure [J]. *Journal of bacteriology*, 1994, 176(22): 6900-6906
- [5] Cunliffe D, Smart C, Alexander C, et al. Bacterial adhesion at synthetic surfaces [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1999, 65(11): 4995-5002
- [6] Nielsen A T, Tolker N T, Barken K B, et al. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium [J]. *Environmental microbiology*, 2000, 2(1): 59-68
- [7] Wimpenny J W, Colasanti R. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models [J]. *FEMS microbiology ecology*, 1997, 22(1): 1-16
- [8] O'toole G A, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis [J]. *Molecular microbiology*, 1998, 28(3): 449-461
- [9] Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle J D, et al. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: An in situ investigation of biofilm rheology [J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1999, 65(1): 83-92
- [10] Kuehn M, Hausner M, Bungartz H J, et al. Automated confocal laser scanning microscopy and semiautomated image processing for analysis of biofilms [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1998, 64(11): 4115-4127
- [11] Murga R, Stewart P S, Daly D. Quantitative analysis of biofilm thickness variability [J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1995, 45(6): 503-510
- [12] Palmer JR R J. Microscopy flowcells: Perfusion chambers for real-time study of biofilms [J]. *Methods in enzymology*, 1999, 310: 160-166
- [13] Lawrence J, Korber D, Hoyle B, et al. Optical sectioning of microbial biofilms [J]. *Journal of bacteriology*, 1991, 173(20): 6558-6567
- [14] Heydon A, Ersbll B K, Hentzer M, et al. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms [J]. *Microbiology*, 2000, 146(10): 2409-2415
- [15] Heydon A, Nielsen A T, Hentzer M, et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT [J]. *Microbiology*, 2000, 146(10): 2395-2407
- [16] Barbeau J, Gauthier C, Payment P. Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review [J]. *Canadian journal of microbiology*, 1998, 44(11): 1019-1028
- [17] Costerton J W, Cheng K, Geesey G G, et al. Bacterial biofilms in nature and disease [J]. *Annual Reviews in Microbiology*, 1987, 41(1): 435-464
- [18] Hentzer M, Riedel K, Rasmussen T B, et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound [J]. *Microbiology*, 2002, 148(1): 87-102
- [19] You J, Xue X, Cao L, et al. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66 [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2007, 76(5): 1137-1144
- [20] Popat R, Cruz S A, Messina M, et al. Quorum-sensing and cheating in bacterial biofilms [J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 279(1748): 4765-4771

(上接第 1345 页)

- [13] 张远成,茹长英,刘国辉,等.自体骨髓干细胞移植治疗骨不连[J]. *中国骨肿瘤骨病*, 2010, 9(4): 320-322
Zhang Yuan-cheng, Ru Chang-ying, Liu Guo-hui, et al. Autologous bone marrow stem cell transplantation in the treatment of bone non-union[J]. *Chin J Bone Tumor & Bone Disease*, 2010, 9(4): 320-322
- [14] Liu X, Cao L, Jiang Y, Zeng B, et al. Repair of radial segmental bone defects by combined angiopoietin 1 gene transfected bone marrow mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma tissue engineered bone in rabbits [J]. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 2011, 25(9): 1115-1119
- [15] Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, et al. Bone regeneration and stem cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(4): 718-746
- [16] Beyth S, Schroeder J, Liebergall M, et al. Stem cells in bone diseases: current clinical practice[J]. *Br Med Bull*, 2011, 99N(5): 199-210
- [17] Bielby R, Jones E, McGonagle D, et al. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone [J]. *Injury*, 2007, 38 (Suppl 1N): S26-32
- [18] Griffin M, Iqbal SA, Bayat A, et al. Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2011, 93(4): 427-434
- [19] Schaefer DJ, Klemm C, Zhang XH, et al. Tissue engineering with mesenchymal stem cells for cartilage and bone regeneration[J]. *Chirurg*, 2000, 71(9): 1001-1008
- [20] Bagaria V, Patil N, Sapre V, et al. Stem cells in orthopedics: current concepts and possible future applications[J]. *Indian J Med Sci*, 2006, 60(4): 162-216