·论 著·

rFN/CDH-BCP 组织工程骨的制备和体内融合效应的初步研究

向 强[1],崔 翔[2],王加旭[2],刘明华[1] (第三军医大学:1. 西南医院急救部;2. 新桥医院骨科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 制备复合 bMSCs 的 rFN/CDH-BCP 组织工程骨,并对其体内融合效应进行初步观测。**方法** 制备复合 bMSCs 的 rFN/CDH-BCP 组织工程骨,利用细胞离心粘附实验、MTT 实验和成骨诱导分化等方法观察组织工程骨界面对骨种子细胞的粘附和分化的影响。建立兔腰椎横突间植骨融合模型,以复合 bMSCs 的 rFN/CDH-BCP 组织工程骨植于预备的骨槽内,利用 X 线影像学和组织学技术观察融合部位新骨生成状况及种子细胞分布、转归状况。**结果** bMSCs 复合 24 h 后 rFN/CDH-BCP 表面和内部有大量细胞粘附,生长良好,成骨诱导 10 d 后,rFN/CDH-BCP 表面 ALP 活性显著升高($P<0.05$),21 d 后,钙结节广泛分布。bMSCs 复合 rFN/CDH-BCP 植入兔植骨融合区 12 周后 X 线和组织学显示有明显新生骨生成,对照组没有。**结论** rFN/CDH-BCP 组织工程骨在体内外均有良好的生物学效应,对新骨形成和骨成熟具有显著的促进作用和良好修复作用,具有较广阔的临床应用前景。

[关键词] 组织工程骨;间充质干细胞;腰椎融合;骨修复

[中图分类号] R318.17 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)06-0583-05

Healing response of a tissue engineered bone of bMSCs combined rFN/CDH-BCP in a rabbit model: a functional study in vivo

XIANG Qiang, CUI Xiang, WANG Jia-Xu, Liu ming-hua (1Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the healing response of a tissue engineered bone of bMSCs combined rFN/CDH-BCP in a rabbit model. **Methods** The biomimetic surface was achieved by immobilizing rFN/CDH onto biphasic calcium phosphate ceramic (BCP) covalently. The effect of rFN/CDH-BCP on adhesion, proliferation and differentiation were evaluated comprehensively by using cell centrifugal adhesive assay, MTT method, SEM, Alkaline phosphatase (ALP) activity and alizarin red staining respectively. A rabbit lumbar fusion model was established by implanting bMSCs combined rFN/CDH-BCP into intertransverse process space of $L_4 \sim L_5$, the fusion site bone formation was observed by imaging means, histological techniques was used to observe the new bone formation and distribution of seed cells. **Results** Cell centrifugal adhesive assay indicated the adherent bMSCs on rFN/CDH-BCP associated with the ligand density, the biomimetic surface possesses excellent biocompatibility. The ALP activity on rFN/CDH-BCP surface was the highest among all samples on the 10th day after induction ($P<0.05$). On the 21st day, alizarin red staining showed that the oval-shaped and orange-red nodules, either the number or the area, distributed wider on rFN/CDH-BCP surface. The results from X plain after 3 months revealed a fuzzy gap between material and bone bed, and higher cover rate of intertransverse process space with new bone deposition on rFN/CDH-BCP surface. **Conclusion** Histologically, rFN/CDH-BCP exhibited as interlacing bone trabecula bridging biomaterial suface and cortical bone of transverse process continously. The bone mass was much more than the ture BCP class. The comprehensive data reveals that when loaded with MSCs, rFN/CDH-BCP demonstrates superior characteristics of osteoconduction and osteoinduction, and substantially enhances healing capacity in vivo.

Keywords: tissue engineered bone; mesenchymal stem cell; lumbar fusion; bone repair

双嗜性分子重组纤维连接蛋白/钙粘附蛋白(recombinant fibronectin/cadherin chimera, rFN/CDH)实现了对 FN 和 CDH11 功能学的叠加[1],本实验把该融合蛋白引入双相钙磷陶瓷(Biphasic calcium phosphate ceramic, BCP)表面复合 bMSCs 制备组织工程骨,利用细胞离心粘附实验、MTT 实验和成骨诱导分化等方法观察骨种子细胞的粘附和分化,并把其应用于兔腰椎横突间植骨融合,观察融合部位新骨生成状况及种子细胞分布、转归状况,为该组织工程骨的临床研究和应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

rFN/CDH 融合蛋白(实验室自备),方法见文献[1],多孔双相钙磷陶瓷(prous BCP)购于四川大学,DMEM/F12 培养基,

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201306002

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171691)

[通讯作者] 刘明华,E-mail:jjbicu@sohu.com

[收稿日期] 2013-07-20 [修回日期] 2013-07-30

DTBP 双官交联剂,MTT,胎牛血清,胰蛋白酶,TEMED,Trypsin,购于美国 Sigma 公司,ALP 检测试剂盒,细胞钙含量检测试剂盒(ARⅢ)),钙结节染色试剂盒(茜素红)购于南京建成生物材料有限公司。

1.2 bMSCs 的分离和培养

选取健康 7 d 新西兰大白兔仔兔(购于第三军医大学实验动物中心),收集双侧股骨干骺骨髓 3 mL,采用密度梯度离心贴壁筛选法。离收集细胞,加入 percoll 细胞分离液,收集白膜层的单个核细胞,洗涤、离心后加入 DMEM/F12 培养基重悬细胞,按 10^5 ~ 10^6/mL 的密度接种于无菌 50 mL 培养瓶内。在 37 ℃、50% CO_2、饱和湿度恒温细胞培养箱内培养 24 hr 换液弃去未贴壁细胞,加入 DMEM/F12 培养基在 37 ℃、50% CO_2、饱和湿度恒温细胞培养箱内连续培养。倒置像差显微镜下观察细胞生长情况,每 2 ~ 3 d 换液 1 次,待细胞生长至 3 ~ 6 代、融合率达 70% ~ 80% 时即可用以成骨诱导分化实验。

1.3 bMSCs 复合 rFN/CDH-BCP

将生长至第 3 代、融合率达 70% ~ 80% 的 bMSCs 以 0.25% 胰蛋白酶消化成细胞悬液,计数、离心,制成密度为 10^7/mL 的单细胞悬液。将 rFN/CDH-BCP 平铺于 12 孔板塑料小皿底部,以每孔 1 mL 单细胞悬液(1×10^7 个细胞/孔)加入各孔 rFN/CDH-BCP 表面,在 37 ℃、50% CO_2、饱和湿度恒温细胞培养箱内培养过夜,使细胞充分贴附于 rFN/CDH-BCP 表面。

1.4 动物模型建立

选取健康成年新西兰大白兔 16 只(购于第三军医大学实验动物中心,雌雄不限),麻醉成功后消毒铺巾,定位 L_4 ~ L_5 间隙,后正中切口切开皮肤全层暴露至椎旁 2 ~ 3 cm,暴露 L_4、L_5 横突,打磨制备植骨床。每组随机选取 8 只大白兔,分别将单纯 BCP 材料(BCP 植入组)或 bMSCs 复合 rFN/CDH-BCP 材料(bMSCs-BCP 组织工程骨组)植入骨床处。术后 3 d 每日注射青霉素钠 40 万单位,每日 2 次。

1.5 指标检测

bMSCs 复合 rFN/CDH-BCP 24 h 后,利用 MTT 实验、扫描电镜、荧光染色等方法观察骨种子细胞的粘附、增殖和分化。利用 X 线影像学和组织学技术观察融合部位新骨生成状况及种子细胞分布、转归情况。

1.5.1 bMSCs 增殖率和活力检测 将 BCP 界面消毒、预湿后,置于 96 孔细胞培养板,取 bMSCs 单细胞悬液(第 3 ~ 6 代),以每孔 2 000 的初密度接种于 96 孔培养板,37 ℃、5% CO_2、适度饱和的培养箱中培养 1 ~ 9 d,隔日换液 1 次;每日行 MTT 检测,酶标仪检测并记录各孔 OD 值(检测波长 570 nm)。

1.5.2 描电镜观察 在 rFN/CDH-BCP 界面上将 300μl bMSCs 细胞悬液以 1 000 /片的初密度接种,复合 24 h,持续培养 48 h 后取出载有 bMSCs 的 rFN/CDH-BCP,经 PBS 液漂洗后 3% 戊二醛固定 2 h,梯度酒精脱水,真空干燥 8 h,真空镀膜仪喷金镀膜后 SEM 检测观察。

1.5.3 荧光染色 加入 0.5mg/mL 的 Hoechst 33342 母液培养至 3 ~ 6 代,密度为 10^5/mL 的 bMSCs 单细胞悬液,避光冰浴 20 min,细胞标记后细胞以 100 μl/孔的体积(10^4 个细胞/孔)加入 96 孔培养板各孔 BCP 表面,避光,胰酶消化,记录各孔荧光强度,置于细胞培养箱贴壁 2 ~ 4 hr,荧光倒置显微镜观测记录,并用 Viewfinder 图像分析软件分析。

1.5.4 rFN/CDH-BCP 界面细胞 ALP 活性测定 取各组诱导培养 10 d 的 hMSCs,消化、离心、收集,加入细胞裂解液,吹打混匀,反复 - 70 ℃急冻和 37 ℃融化 3 次,超声破碎,离心 12 000 r/min,1 ℃低温离心 15 min,收集上清检测。

1.5.5 rFN/CDH-BCP 界面细胞钙结节染色 采用茜素红法,取诱导培养 14 d 的 hMSCs 制成单细胞悬液(1×10^5/mL),加入 DMEM/F12 培养基,7 d 后弃培养液,依次进行 GENMED 固定,清理、染色,脱水,澄清,最后加入 GENMED 透亮液,光镜下观察。

1.5.6 X 线观察 术后 1 d、1 个月、3 个月将兔麻醉后俯卧位、侧位摄片,拍摄 X 线片,判断各组材料在体内成骨趋势和融合情况、对比成骨差异。

1.5.7 组织学检测 动物处死后,完整留取实验融合部位组织块,置入中性福尔马林溶液中固定 72 h,梯度酒精脱水,MMA 包埋,硬组织切片机切片,HE 染色和甲苯胺蓝染色。

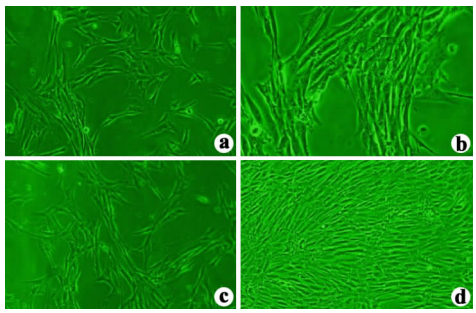
1.6 统计学分析

利用 SPSS 13.0 软件统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用独立样本 t 检验分析各组有无统计学差异及其有效性,$P < 0.05$ 为显著统计学差异。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞的形态学观察

倒置显微镜下骨髓间充质干细胞的形态学观察:原代 bMSCs 培养 72 h 换液后,即可观察到贴壁细胞,细胞形态短小,呈长梭型、纺锤形,培养至 7 d,细胞明显增多、变长、变大,长梭型、纺锤形形态更加明显,14 d 时,细胞基本铺满皿底,细胞排列呈螺旋状或漩涡状。传代培养中,细胞基本保持长梭型的形态(图 1)。



a:原代 bMSCs(× 100);b:原代 bMSCs(× 200);c、d:第三代 bMSCs(× 100)

图 1 骨髓间充质干细胞的形态学观察

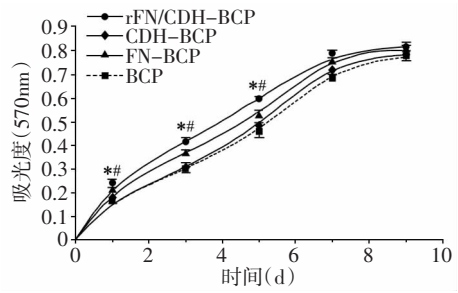
2.2 bMSCs 增殖率和活力的测定

bMSCs 与 rFN/CDH-BCP 复合 7 d 内测定细胞活力,绘制 bMSCs 增殖曲线图显示:rFN/CDH-BCP 界面的增殖率和细胞活力在前 7 d 的培养时间内,明显高于阴性(BCP 组)和阳性(FN-BCP 组,CDH-BCP 组)对照组($P < 0.05$),表现为 MTT 还

原产物溶液的吸光度显著高于对照组,7 d 以后各组吸光度无明显差异(图 2)。

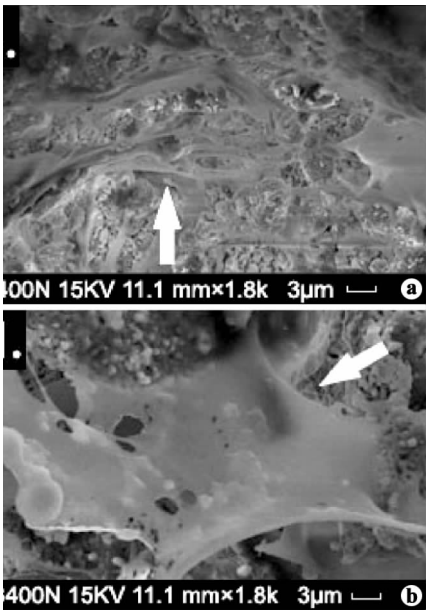
2.3 扫描电镜观察结果

扫描电镜观察显示,在 hMSCs 与 rFN/CDH-BCP 复合界面有大量细胞粘附,细胞充分伸展充分,呈多边形状或圆盘状,伪足样结构减少,形成致密的板层样结构覆盖在材料表面,如图中箭头所示。在单纯 BCP 界面,细胞伸展不良,呈条索状,可见大量伪足样结构深入材料孔隙内(图 3)。



*:与同时间点阴性和阳性对照组比较,$P<0.05$;#:与同时间点阴性和阳性对照组比较,$P<0.01$

图 2 bMSCs 增殖曲线图



a:BCP 组;b:bMSCs + rFN/CDH-BCP 组

图 3 rFN/CDH-BCP 界面对 hMSCs 生长形态的影响

2.4 bMSCs 粘附性测定。

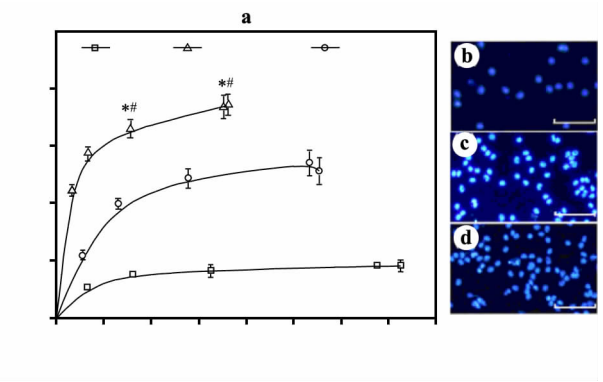
细胞离心粘附实验显示在 rFN/CDH-BCP 界面,随着 rFN/CDH 密度的增加,粘附的细胞数亦逐渐增多。rFN/CDH-BCP 表面明显优于阳性对照 CDH-BCP 和 FN-BCP 组,同时荧光显微镜下观测也发现了相同的结果(图 4)。

2.5 rFN/CDH-BCP 界面 ALP 活性测定

ALP 活性测定显示在 rFN/CDH-BCP 表面的 ALP 活性表现最高,显著高于阴性对照和阳性对照组,提示复合了 bMSCs 的 rFN/CDH-BCP 组织工程骨的成骨活性增强(图 5)。

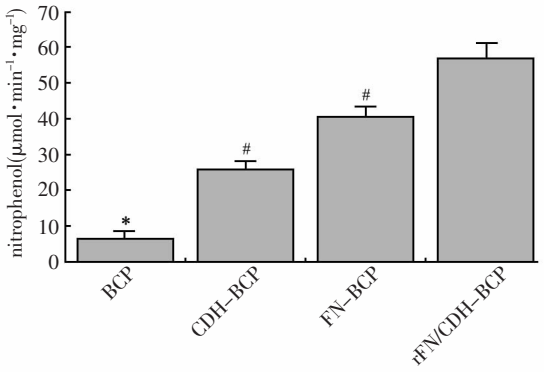
2.6 rFN/CDH-BCP 界面细胞钙结节染色

茜素红法检测成骨诱导后向细胞间钙结节形成情况显示,各组细胞间均有卵圆形、橘红色均染的结节斑,以 rFN/CDH-BCP 表面细胞形成最多,分布最广,提示复合了 bMSCs 的 rFN/CDH-BCP 组织工程骨能促进 bMSCs 的成骨分化(图 6)。



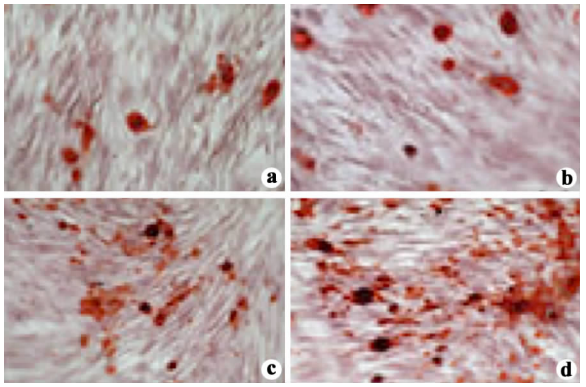
a:不同条件下 BCP 表面密度与细胞粘附数量的关系(*:与阳性对照相比,$P<0.01$;#:与阳性对照相比,$P<0.05$);b、c、d:荧光显微镜下细胞在不同 BCP 表面的粘附状况(标尺:200 μm)

图 4 bMSCs 在不同 BCP 处理表面粘附测定



*:与 rFN/CDH-BCP 组比较,$P<0.01$;#:与 rFN/CDH-BCP 组比较,$P<0.05$

图 5 bMSCs 在不同处理因素 BCP 表面的 ALP 活性变化



a:BCP;b:DHP-BCP;c:FN – BCP;d:rFN/CDH-BCP

图 6 bMSCs 在不同处理因素 BCP 表面的钙结节形态(茜素红染色后钙结节差异性表达)

2.7 X 线检测

术后 3 个月 X 线检测显示,单纯 BCP 移植组与横突间未见明显愈合,BCP 材料依然清晰可见。bMSCs + rFN/CDH-BCP 组织工程骨移植组横突间及周围已形成大量纤维骨痂结构,材料

与横突周围骨质融为一体,界限模糊(图 7)。



a:BCP 组;b:bMSCs + rFN/CDH-BCP 组

图 7 组织工程骨植入后横突间腰椎融合的 X 线放射学评价

双盲法评估融合动物数量和横突间隙骨痂填充率结果显示:bMSCs 复合 rFN/CDH-BCP 组织工程骨移植组达到 100% 融合率,单纯 BCP 移植组融合率为 40%。组织工程骨移植组横突间隙的骨痂填充率也明显优于 BCP 组($P<0.01$),提示其诱导新骨形成的能力增强(表 1)。

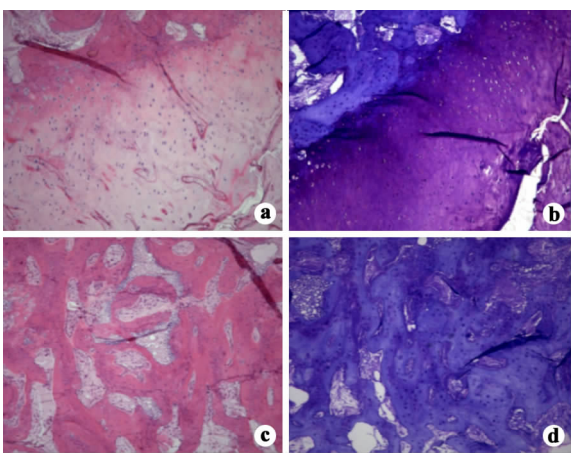
表 1 影像学表现下定量评估体内骨愈合效果($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	融合数[例(%)]	填充率(%)
BCP 组	2(40)	30.0 ± 5.5
bMSCs + rFN/CDH-BCP 组	5(100)	76.0 ± 13.3 *

*:与 BCP 组比较,$P<0.01$

2.8 组织学观察

组织学观察显示,单纯 BCP 植入组材料 - 骨床交界区以软骨组织为主,新生骨成熟度较低,材料与骨床间无骨性融合和钙化,组织学分级以软骨组织为主。bMSCs 复合 rFN/CDH-BCP 组植入组织学表现为融合区域出现成熟度较高的骨小梁交错性桥接与材料融为一体,HE 和甲苯胺蓝染色均有特征性表现,显示成骨能力显著强于单纯 BCP 植入组(图 8)。



a:BCP 组 HE 染色;b:BCP 组甲苯胺蓝染色;c:bMSCs + rFN/CDH-BCP 组 HE 染色;d:bMSCs + rFN/CDH-BCP 组甲苯胺蓝染色

图 8 复合 bMSCs 的 rFN/CDH-BCP 和单纯 BCP 植入 3 个月的组织学观察

3 讨论

目前多样化的骨替代材料,尤其是组织工程材料表现出了一定的临床应用前景,但由于材料本身特性单一,缺乏特定的结构和分子信号,影响了细胞粘附到材料上的效率,并由此限制了随后的材料 - 组织界面的骨诱导和骨生成作用[2]。为尝试解决这一难题,我们把兼有纤维连接蛋白(fibronectin, FN)和钙粘附蛋白(Cadherin, CDH)功能特点的双嗜性 rFN/CDH 融合蛋白引入多孔的双相钙磷陶瓷(Biphasic calcium phosphate ceramic, BCP)表面,以期获得一种在体外具有高效粘附性和良好促进骨种子细胞成骨分化潜能的生物界面,并对其实际应用价值进行评估。

细胞在材料界面的粘附与细胞迁移、增殖、分化,基质沉积、血管芽生成,材料降解等息息相关[3],细胞在材料表面的粘附特性是衡量材料生物相容性的一个重要指标。在实验中,我们采用离心促粘附实验检测了 bMSCs 在 rFN/CDH-BCP 界面的粘附状况。离心促粘附实验是通过适当的离心力促进细胞与材料的结合/脱离,用荧光标记的方法对有效粘附的细胞进行计数,具有准确、简捷、可控、假阳性率低的优势[4]。结果表明在 BCP 界面上粘附的 hMSCs 数量与 rFN/CDH 的密度成正相关,明显高于单纯 BCP 和 FN、CDH 修饰的 BCP 界面,证实了 rFN/CDH 修饰后的 BCP 界面对 bMSCs 的粘附能力明显增强。

单纯 BCP 材料对于细胞增殖无明显影响[5],为验证 bMSCs 在 rFN/CDH-BCP 界面的活力和增殖能力,我们采用了 MTT 检测法,MTT 代谢产物的量与细胞数量和活力呈正相关。实验结果显示:rFN/CDH-BCP 表面 bMSCs 的 MTT 代谢产物的量显著增加,明显高于单纯 BCP 材料组,提示 bMSCs 在 rFN/CDH-BCP 表面的增殖率和细胞活力明显优于单纯 BCP 材料。实验通过扫描电镜观察发现,在 rFN/CDH-BCP 材料的表面有大量 bMSCs,细胞充分伸展充分,呈多边形状或圆盘状,伪足样结构减少,形成致密的板层样结构覆盖在材料表面。而单纯 BCP 表面 bMSCs 少,细胞伸展不良,呈条索状,可见大量伪足样结构深入材料孔隙,此结果有效地说明了 rFN/CDH-BCP 界面能增强种子细胞的活力和增殖能力。

ALP 是成骨分化的早期标志物为,茜素红染色法检测成骨诱导后细胞间钙结节形成是评价成骨终末作用的有效指标[5]。实验结果显示 rFN/CDH-BCP 界面上 bMSCs 诱导 10 d 后 ALP 活力检测已明显增高,是单纯 BCP 组的 8.7 倍($P<0.05$),由此说明 rFN/CDH-

BCP 界面具有促进种子细胞早期成骨分化的作用。实验中把诱导 21 d 的 bMSCs 在体外继续培养 7 d,检测成骨诱导后向细胞间的钙结节形成情况显示 rFN/CDH-BCP 表面的细胞间质中存在大量的橘红色钙结节,提示此时进入基质矿化期,表明 rFN/CDH-BCP 表面具有更强信号以促进分化成熟的成骨细胞矿化。

材料在生物体内是涉及成千上万的信号分子效应蛋白和一系列胞内和 ECM 级联反应的复杂过程[6],通过组织学检测则可对组织 - 材料界面上的基质矿化、骨质沉积和新骨形态进行全面的了解[7]。把复合 bMSCs 的 rFN/CDH-BCP 组织工程骨用于兔腰椎横突间融合术后取材,X 线检测显示,单纯 BCP 移植组与横突间未见明显愈合,BCP 材料依然清晰可见。bMSCs + rFN/CDH-BCP 组织工程骨移植组横突间及周围已形成大量纤维骨痂结构,材料与横突周围骨质融为一体,界限模糊为。组织学切片发现单纯 BCP 植入组材料 - 骨床交界区以软骨组织为主,新生骨成熟度较低,材料与骨床间无骨性融合和钙化,组织学分级以软骨组织为主。bMSCs 复合 rFN/CDH-BCP 组植入组织学表现为融合区域出现成熟度较高的骨小梁交错性桥接与材料融为一体,HE 和甲苯胺蓝染色均有特征性表现,显示成骨能力显著强于单纯 BCP 植入组。实验结果显示,bMSCs + rFN/CDH-BCP 组织工程骨具有促进成骨细胞粘附和成骨的良好生物学效应,在体内表现出了良好的骨传导和骨诱导特性,是一种有广阔应用前景的骨修复材料。

[参考文献]

[1] Zhang Y, Zhou Y, Zhu J, et al. Effect of a novel recombinant protein of fibronectinIII7-10/cadherin 11 EC1-2 on osteoblastic adhesion and differentiation[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(9): 1999 - 2006.

[2] Green DW, Watson GS, Watson J, et al. New biomimetic directions in regenerative ophthalmology[J]. Adv Healthc Mater, 2012, 1(2): 140 - 148.

[3] Krauss Juillerat F, Borcard F, Staedler D. Functionalization of microstructured open-porous bioceramic scaffolds with human fetal bone cells [J]. Bioconjug Chem, 2012, 23(11): 2278 - 2290.

[4] Reyes CD, García AJ. A centrifugation cell adhesion assay for high-throughput screening of biomaterial surfaces[J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 67(1): 328 - 333.

[5] Li B, Chen X, Guo B, et al. Fabrication and cellular biocompatibility of porous carbonated biphasic calcium phosphate ceramics with a nanostructure[J]. Acta Biomater, 2009, 5(1): 134 - 143.

[6] Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, et al. Osteoporosis and biomaterial osteointegration[J]. Biomed Pharmacother, 2004, 58(9): 487 - 493.

[7] Magit DP, Maak T, Trioano N, et al. Healos/recombinant human growth and differentiation factor-5 induces posterolateral lumbar fusion in a New Zealand white rabbit model[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(19): 2180 - 2188.

(编辑:周小林)

(上接第 582 页)

[J]. Cancer, 1982, 49(6): 1221 - 1230.

[4] Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma[J]. Clin Orthop Relat Res, 1980, (153): 106 - 120.

[5] 郭 卫. 肢体恶性骨肿瘤保肢治疗的方法及原则[J]. 北京大学学报(医学版), 2012, 44(6): 824 - 827.

[6] Healey JH. Editorial: Limb preservation: past and present[J]. Clin Orthop Relat Res, 2013, 471(3): 733 - 734.

[7] Scully SP, Temple HT, O'keefe RJ, et al. The surgical treatment of patients with osteosarcoma who sustain a pathologic fracture[J]. Clin Orthop Relat Res, 1996, (324): 227 - 232.

[8] Tan PX, Yong BC, Wang J, et al. Analysis of the efficacy and prognosis of limb-salvage surgery for osteosarcoma around the knee[J]. Eur J Surg Oncol, 2012, 38(12): 1171 - 1177.

[9] Simon MA, Aschliman MA, Thomas N, et al. Limb-salkvage treatment versus amputation for osteosarcoma of the distal end of the femur[J]. J Bone Joint Surg Am, 1986, 68(9): 1331 - 1337.

[10] Pannier S, Mascard E, Glorion C. The reconstruction of limbs after a malignant tumor in children[J]. Soins Pediatr Pueric, 2013, (270): 20 - 22.

[11] Asavamongkolkul A, Waikakul S, Phimolsarnti R, et al. Endoprosthetic reconstruction for malignant bone and soft-tissue tumors[J]. J Med Assoc Thai, 2007, 90(4): 706 - 717.

[12] Aberg M, Rydholm A, Holmberg J, et al. Reconstruction with a free vascularized fibular graft for malignant bone tumor[J]. Acta Orthop Scand, 1988, 59(4): 430 - 437.

[13] Sekiguchi J, Kobayashi S, Ohmori K. Use of the osteocutaneous free scapular flap on the lower extremities[J]. Plast Reconstr Surg, 1993, 91(1): 103 - 112.

[14] Pan KL, Chan WH, Ong GB, et al. Limb salvage in osteosarcoma using autoclaved tumor-bearing bone[J]. World J Surg Oncol, 2012, 10: 105.

[15] Ji T, Tang X, Guo W. The use of Ligament Advanced Reinforcement System (LARS) in limb salvage surgery: a pilot clinical study[J]. J Arthroplasty, 2013, 28(6): 892 - 894.

[16] Doi K, Sakai K, Ihara K, et al. Reinnervated free muscle transplantation for extremity reconstruction[J]. Plast Reconstr Surg, 1993, 91(5): 872 - 883.

[17] Shintomi Y, Ohura T. The use of muscle vascularized pedicle flaps[J]. Plast Reconstr Surg, 1982, 70(6): 725 - 735.

(编辑:余汇洋)