

· 基础研究 ·

骨细胞分离培养及其与成骨细胞鉴别比较的实验研究

汤小康¹, 程婉¹, 许兵¹, 应航¹, 童培建^{1,2}, 肖鲁伟¹

(1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006)

【摘要】 目的:建立比较稳定的骨细胞实验室分离培养方法,并将其部分生物学特性与实验室培养的成骨细胞进行比较研究,明确两者区别。**方法:**采用序列酶消化法,分别从 3 只 3 d SD 乳鼠骨骼中分离培养骨细胞和成骨细胞,培养 24 h 后进行细胞形态学观察。第 1 代细胞用碱性磷酸酶试剂盒采用重氮盐法(改良 Kaplow 氏法)染色,采用免疫细胞化学法对细胞的骨钙素(BGP)染色,测定碱性磷酸酶并计算其活性。**结果:**骨细胞多呈星状或树枝状,且有很多的突触;成骨细胞呈长梭形,有少量的突触。骨细胞碱性磷酸酶染色,胞浆内 cAKP 颗粒不明显;成骨细胞碱性磷酸酶染色,胞浆内可见众多 cAKP 颗粒。骨细胞 BGP 染色阳性明显,成骨细胞 BGP 染色阳性不如骨细胞明显。ALP 在骨细胞中分泌较成骨细胞低,且有统计学差异。**结论:**实验室条件下能培养出骨细胞,该类细胞和成骨细胞有明显区别。

【关键词】 骨细胞; 成骨细胞; 细胞分离

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.03.014

Experimental study on the isolated culture of osteocytes and identification of osteoblasts in rats TANG Xiao-kang, CHENG Wan, XU Bing, YING Hang*, TONG Pei-jian, and XIAO Lu-wei. *The First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To establish a more stable method to isolate osteocytes in vitro, and then to find the differences with osteoblast biological characteristics. **Methods:** Osteocytes and osteoblasts were isolated from the bone tissue of 3-day-old rats using sequential collagenase digestion. The cells were identified through cell morphology after 24 hours later. Alkaline phosphatase (ALP) kit was used to stain the first generation cells by Kaplow-way, the bone gla protein (BGP) of the cells were stained by immunocytochemistry. Measured ALP and computed its activity. **Results:** Osteocytes and osteoblasts showed obviously differences in cell morphology. Osteocytes were star-shaped or dendrite-shaped within more dendrites, while osteoblasts were spindle-shaped with short dendrites. Osteocytes were negative for ALP, but osteoblasts were positive; Osteocytes were more positive for BGP, and osteoblasts were less positive. The secretion of ALP in osteocytes was lower than that of osteoblasts. **Conclusion:** Osteocytes can be isolated and cultured in vitro. These characteristics of osteocytes are apparently difference with those of osteoblasts.

KEYWORDS Osteocytes; Osteoblasts; Cell separation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(3):227-231 www.zggszz.com

骨细胞和成骨细胞是骨组织细胞的重要组成部分。骨细胞由成骨细胞分化而来,占骨组织细胞总量的 95%,是矿化的骨基质中惟一的一种细胞,也是骨组织中数量最多、寿命最长的细胞^[1],其对机械应力最为敏感^[2],是骨组织中机械应力的主要感受器^[3-4]。成骨细胞是骨形成细胞,对骨组织的生长发育、骨代谢平衡、骨量平衡和损伤修复起关键作用^[5],是骨组织中机械应力的主要效应细胞^[6]。相对成骨细胞而

言,由于骨细胞的位置特殊,使可供在体外进行研究的骨细胞的获得比较困难^[7];而成骨细胞体外培养方法开始于 20 世纪 60 年代,目前这种方法已发展成为一种重要的且较为成熟的实验方法^[8]。随着新技术方法的应用,对成骨细胞系终末分化的细胞研究逐渐深入,人们由此对骨细胞的兴趣大增。近年来的研究发现,骨细胞不仅能影响局部骨转换活性,而且对全身矿物质的体内平衡也有多种功能,因此,对骨细胞的研究可以为代谢性骨病的治疗提供新的途径^[9-10]。然而由于目前可供体外实验研究的骨细胞系较少,有效稳定的骨细胞分离方法尚不十分明确,研究者多选择较易获得的成骨细胞进行实验,而忽略了对骨组织中含量最多的骨细胞进行探究。为此,笔

基金项目:浙江省自然科学基金(编号:Y2110928);浙江省中医药科学研究基金计划(编号:2010ZA020)

Fund program: National Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Y2110928)

通讯作者:应航 E-mail: yh@zjtm.net

者尝试利用序列酶消化法从 3 d 龄 SD 乳鼠骨骼中分离培养骨细胞, 通过其与实验室常规培养的成骨细胞进行形态学比较, 并结合碱性磷酸酶染色、碱性磷酸酶活性测定和骨钙素染色等实验手段, 对分离的骨细胞进行鉴定。从而探索建立较为稳定的区别于成骨细胞培养的实验室骨细胞分离培养方法, 为进一步开展实验研究提供手段。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 3 d 龄 SD 乳鼠 6 只, 清洁级。由浙江中医药大学动物实验中心提供, 分别用于骨细胞和成骨细胞分离培养。

1.2 主要器材 二氧化碳恒温培养箱 (德国 Thermo 电子公司), 双人单面超净工作台 (苏州净化设备有限公司), 倒置显微镜及显微拍摄系统 (德国 Leica 公司), BioTek 800 酶标仪 (美国 BioTek 公司), 6 孔培养板, 24 孔培养板, 96 孔培养板 (美国 Corning 公司)。

1.3 试剂 RPMI 1640 含双抗培养基 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (杭州四季青生物公司), 0.25% 胰蛋白酶 (吉诺生物医药技术有限公司), I 型胶原酶 (达文生物有限公司), PBS 缓释液 (吉诺生物医药技术有限公司), 0.02% EDTA (吉诺生物医药技术有限公司), D-Hanks 溶液 (吉诺生物医药技术有限公司), 碱性磷酸酶试剂盒 (南京建成生物公司), 碱性磷酸酶活性测定试剂盒 (南京建成生物公司), 小牛血清蛋白 BSA (北京元亨金马生物技术开发有限公司), Rabbit Anti-BGP (博士德生物工程有限公司), 碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG, DAB (A/B/C) (中杉金桥生物制品有限公司)。

1.4 干预措施

1.4.1 骨细胞序列消化分离、培养及传代 主要参考 GU^[4,7] 的培养方法改进后步骤如下: ①在无菌状态下取得 3 只 3 d 龄 SD 乳鼠骨组织 (长骨和颅骨), 长骨在去掉干骺端后纵向剖开骨髓腔刮除骨髓, 将骨片放入 70% 的酒精, 15 s 取出放入 PBS 缓释液内备用; ②在 PBS 中清洗骨组织, 尽可能剔除周围软组织和骨膜, 此过程重复 3~4 次; ③将骨组织剪成 1 mm×3 mm 骨片, 放入试验前临时配制的胶原酶溶液的培养皿中 (I 型胶原酶溶于 PBS 缓冲剂中, 1 mg/ml), 置于 37 °C 温箱 20 min, 然后去掉上清液, 用 D-Hanks 溶液清洗骨片 2 次, 这个过程共重复 4 次; ④另取新的培养皿, 将骨片放入 0.02% EDTA 溶液 (含 0.1% 小牛血清白蛋白) 中, 置于 37 °C 温箱 20 min, 然后去掉上清液, 用 D-Hanks 溶液清洗骨片 2 次; ⑤将骨片放入试验前临时配制的胶原酶溶液 (I 型胶原酶溶于 PBS 缓冲剂中, 1 mg/ml), 置于

37 °C 温箱 20 min, 然后去掉上清液, 用 D-Hanks 溶液清洗骨片 2 次; ⑥取一新的培养皿, 将骨片放入 0.02% EDTA 溶液 (含 0.1% 小牛血清白蛋白), 置于 37 °C 温箱 20 min, 然后去掉上清液, 用 D-Hanks 溶液清洗骨片 2 次, 并将骨片剪成 1 mm×1 mm 小块; ⑦将骨片放入装有试验前临时配制的胶原酶溶液 (I 型胶原酶溶于细胞分离缓冲剂中, 1 mg/ml) 的试管中, 置于 37 °C 恒温水浴锅 40 min; ⑧反复振荡用力吸吹骨片, 收集上清液, 离心 (1 000 r/min, 10 min), 然后去掉上清液, 向试管内加入 1640 培养液 (含有 10% 胎牛血清), 吹打培养液, 吸取培养液, 显微镜下用计数板计数, 然后接种于 6 孔培养板中, 置于细胞培养箱 (37 °C, 5% CO₂) 培养, 24 h 左右换液 1 次, 以后 2~3 d 换液 1 次, 至细胞长成融合状态进行细胞传代。

1.4.2 成骨骨细胞序列消化分离、培养及传代 取 3 d 龄 SD 乳鼠 3 只, 颈椎脱臼后, 75% 乙醇浸泡 10 min。揭去头顶皮肤, 切下头盖骨置于 PBS 液内, 清除骨膜、血管等结缔组织, 用 PBS 液清洗 2 次后, 将清洗至发白的头盖骨剪成 1 mm×1 mm 小片。将骨片移入 5 ml、0.25% 胰蛋白酶溶液内, 37 °C 下预消化 20 min, 以清除纤维组织。将骨片移入另一含 5 ml、0.1% I 型胶原酶溶液中, 37 °C 振荡消化分离细胞 60 min, 收集消化液。将收集的消化液在 1 000 r/min 下离心 10 min, 吸去上清液, 沉淀的细胞团块用培养液制成细胞悬液。剩余骨片重复用 I 型胶原酶震荡消化、离心, 制成细胞悬液, 将两次细胞悬液混匀、计数, 置入 6 孔培养板中, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 左右换液 1 次, 以后 2~3 d 换液 1 次, 至细胞长成融合状态进行细胞传代。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 骨细胞、成骨细胞细胞形态观察 培养 24 h 细胞贴壁后, 可将盛有骨细胞和成骨细胞的 6 孔培养板至于倒置荧光显微镜下进行观察、拍照。

1.5.2 骨细胞、成骨细胞碱性磷酸酶 (ALP) 染色 采用重氮盐法 (改良 Kaplow 氏法) 行碱性磷酸酶染色, 步骤如下: ①固定: 抽吸 6 孔培养板中一孔或多孔的培养液, 用 PBS 缓冲剂清洗 2 次, 待干燥后, 滴加固定液固定 3 min; ②加底物应用液: 固定样本后, 滴加底物运用液, 将培养板放入湿盒 (含双蒸水纱布的容器) 避光 37 °C 孵育 15 min, 用双蒸水水洗; ③复染: 趁湿用复染液复染 (苏木素或甲基绿) 3 min 左右, 水洗, 显微镜下观察。

1.5.3 骨细胞、成骨细胞骨钙素 (BGP) 染色 采用免疫细胞化学法, 一抗为兔抗骨钙素抗体 (Rabbit Anti-BGP), 二抗为碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG,

按照 DAB 试剂盒要求操作,步骤如下:①吸弃培养液, PBS 快速冲洗数次, 95%乙醇固定, 室温 30 min, 蒸馏水洗 3 次, 每次 5 min; ②加入 0.1% Triton 破膜, 室温 10 min, PBS 洗 3 次; ③加入 1% BSA 封闭, 室温 30 min; ④加入一抗(1:200), 室温孵育 120 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; ⑤加入二抗(1:200), 室温孵育 90 min, PBS 洗 3 次每次 5 min; ⑥将 DAB 浓缩显色液稀释后, 滴加显色 5~10 min, PBS 洗 3 次; ⑦待干燥后显微镜下观察。

1.5.4 骨细胞、成骨细胞碱性磷酸酶(AKP)测定

将两种细胞传代, 混悬液稀释, 计数均为 2×10^5 个/ml, 将混悬液接种于 24 孔培养板, 每孔接种 600 μ l, 36 h 细胞完全贴壁后按试剂盒操作说明测定, 方法如下: 在 96 孔酶标板上分测定孔、标准孔、空白孔, 测定孔加入各组细胞上清液, 每孔 30 μ l, 标准孔加入浓度为 0.02 mg/ml 酚标准应用液 30 μ l, 空白孔加入双蒸水(培养液差异显著, 应考虑取空白培养液替代)30 μ l。每孔继续加入缓冲液 50 μ l, 基质液 50 μ l, 充分混匀后, 将酶标板置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min, 各孔加入显色剂 150 μ l, 轻轻振荡孔板均匀, 在波长 520 nm 下, 酶标仪测定各孔吸光度。测定后计算碱性磷酸酶含量。公式如下: 碱性磷酸酶含量(金氏单位)=[(测定孔吸光度-空白孔吸光度)/(标准孔吸光度-空白孔吸光度)] \times 酚标准品浓度(0.02 mg/ml) \times 100 ml \times 样品测定前稀释倍数。单位定义: 100 ml 液体在 37 $^{\circ}$ C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间数据的比较采用两样本均数的 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 镜下观察, 骨细胞多呈星状或树枝状, 形态偏短偏圆, 表面有 4 个以上的突触与周围细胞相联系(见图 1)。成骨细胞多呈梭形, 形态偏瘦偏长, 表面有 2~3 个突触与周围细胞相联系(见图 2)。

2.2 碱性磷酸酶(ALP)染色 骨细胞甲基绿和苏木素分别染色胞浆内无明显咖啡色或红棕色 cAKP 颗粒, 碱性磷酸酶染色阴性(图 3-4); 成骨细胞甲基绿和苏木素分别染色, 胞浆内可见明显咖啡色和红棕色 cAKP 颗粒, 碱性磷酸酶染色阳性(图 5-6)。

2.3 骨钙素(BGP)染色 骨细胞、成骨细胞骨钙素染色均为阳性, 但骨细胞骨钙素染色细胞边界清晰, 胞浆呈黄色, 较成骨细胞明显(见图 7-8)。

2.4 碱性磷酸酶(AKP)测定 按相关公式对两组

酶标仪读数进行计算, 得出 ALP 活性(金氏单位)值。采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 成骨细胞(6 孔)碱性磷酸酶的活性(0.5015 ± 0.0473)明显高于骨细胞(0.3341 ± 0.0341), 差异具有统计学意义($t = 7.032, P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 骨细胞和成骨细胞形态学上的差异 在成骨细胞向骨细胞的分化过程中, 细胞的体积不断减小, 成熟的骨细胞体积减少 70%, 骨细胞丢失了部分细胞器但却获得了很多长突触, 这些含有细胞浆的突触将骨细胞与其他骨细胞、成骨细胞和破骨细胞联系在一起, 并成为骨细胞在形态学方面一个显著的特征。从本实验结果可以看到, 骨细胞较成骨细胞体积小、突触多, 这种形态有利于增强骨细胞的感应性, 从而使它更好地发挥感应细胞的作用, 与有学者指出的, 占骨组织细胞总量为 95% 的骨细胞, 是对机械应力最敏感的细胞, 是骨组织中机械应力的主要感受器, 它可以将机械应力转化为生化信号, 在骨的功能性适应变化启动之前将力学信号整合加工, 并通过缝隙连接和旁分泌的形式将相应的电、化学信号传给效应细胞的理论^[3]相吻合。

3.2 骨细胞和成骨细胞碱性磷酸酶表达差异 碱性磷酸酶(ALP)主要分布于细胞膜的钙结合转运蛋白, 促进细胞成熟、钙化, ALP 的定量检测可以反映成骨细胞的分化水平, 其活性越高, 说明前成骨细胞向成熟的成骨细胞分化的越明显。ALP 活性的高表达是成骨细胞分化成熟的早期标志, ALP 活性增强时, 骨形成增强, 并促进骨基质矿化形成, 故 ALP 的活性是反映成骨细胞分化程度和功能状态的良好指标^[11]。本实验发现骨细胞碱性磷酸酶的表达与活性要低于成骨细胞, 该实验结果与 Kato^[12]、Gu 等^[7]实验结果相符, 证明实验室条件下, 确实能从骨组织中分离出与成骨细胞在碱性磷酸酶表达上存在显著差异的骨细胞。

3.3 骨细胞和成骨细胞骨钙素染色差异 骨代谢生化指标中的骨钙素(BGP)是骨形成的特异性标志物, 骨钙素是骨组织中丰富的非胶原蛋白, 其主要功能是维持骨的正常矿化速率, 抑制异常羟磷灰石结晶的形成, 抑制软骨的矿化速率, 维持骨量平衡, 参与骨骼重塑^[11]。Kato 等^[12]实验结果表明成骨细胞骨钙素染色阴性, 骨细胞骨钙素染色为阳性; 而 Gu 等^[7]认为, 骨细胞和成骨细胞骨钙素染色皆为阳性。本实验证实成骨细胞骨钙素染色虽为阳性, 但较骨细胞更不明显, 说明骨细胞骨钙素含量要高于成骨细胞, 其原因有待进一步研究, 可能与细胞基因表达的差异、细胞的来源不同和染色方法差异有关。

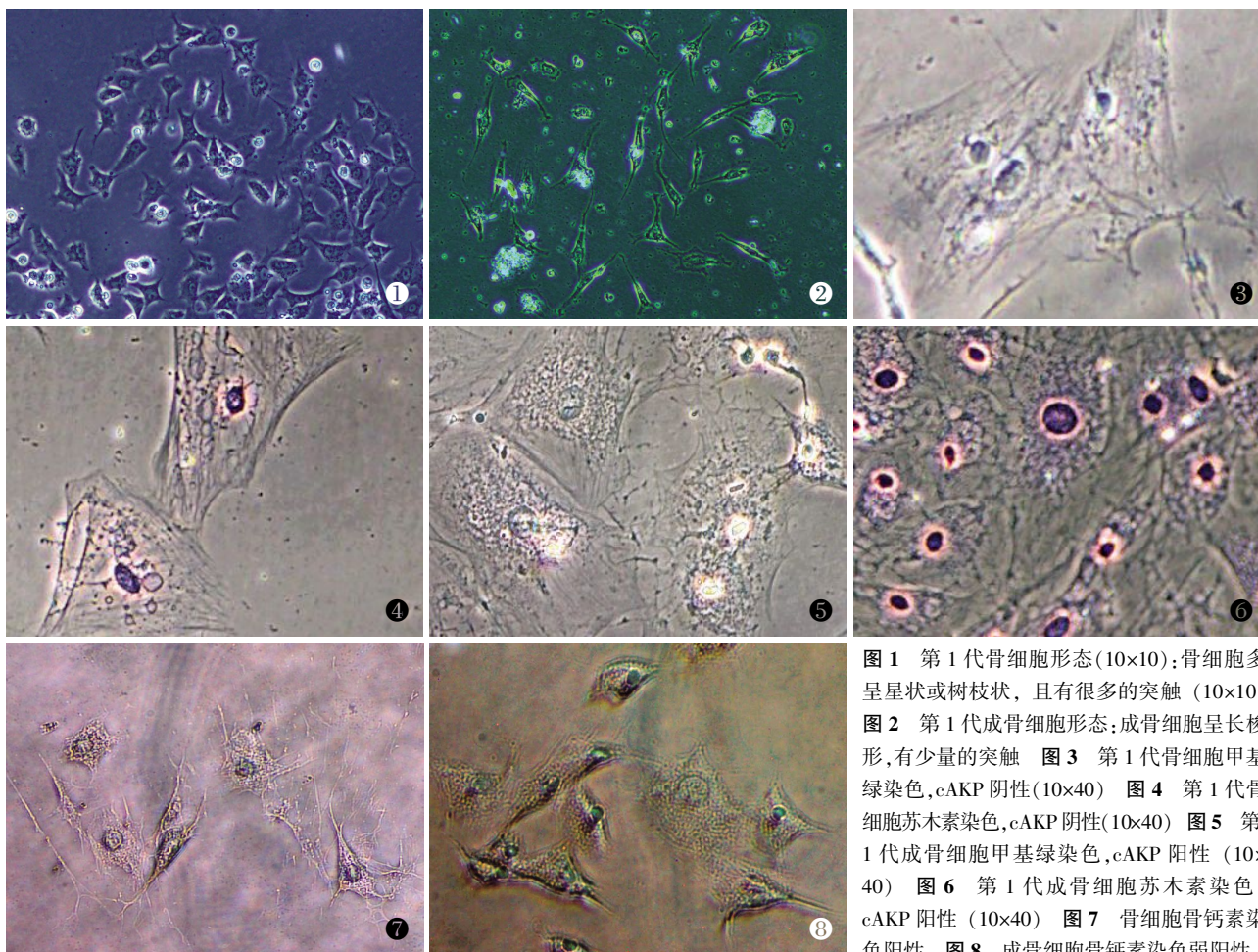


图 1 第 1 代骨细胞形态(10×10);骨细胞多呈星状或树枝状,且有很多的突触(10×10) 图 2 第 1 代成骨细胞形态;成骨细胞呈长梭形,有少量的突触 图 3 第 1 代骨细胞甲基绿染色,cAKP 阴性(10×40) 图 4 第 1 代骨细胞苏木素染色,cAKP 阴性(10×40) 图 5 第 1 代成骨细胞甲基绿染色,cAKP 阳性(10×40) 图 6 第 1 代成骨细胞苏木素染色,cAKP 阳性(10×40) 图 7 骨细胞骨钙素染色阳性 图 8 成骨细胞骨钙素染色弱阳性

Fig.1 Appearance of the first generation osteocytes(10×10);osteocytes were star-shaped or dendrite-shaped within more dendrites **Fig.2** Appearance of the first generation osteoblasts (10×10);osteoblasts were spindle-shaped with short dendrites **Fig.3** The first generation osteocytes were negative for methyl green stain(10×40) **Fig.4** The first generation osteocytes were negative for hematoxylin(10×40) **Fig.5** The first generation osteoblasts were positive for methyl green stain(10×40) **Fig.6** The first generation osteoblasts were positive for hematoxylin(10×40) **Fig.7** The osteocytes were positive for BGP stain(10×40) **Fig.8** The osteoblasts were weakly positive for BGP stain(10×40)

总之,由于骨细胞培养和鉴别的技术难题,很多研究者在骨组织科学的研究中会选择拥有成熟细胞培养鉴定方法的成骨细胞进行实验研究,而忽略了骨细胞与成骨细胞很多不同的生物学特性给研究带来的不同结果。同时,成骨细胞具备向骨细胞分化的能力,而骨细胞在应答机械应力信号时树突伸长,并释放可溶性因子(如 PGE2,ATP 和 NO),向效应细胞发送信号,调节成骨细胞的功能^[13],很多围绕成骨细胞的研究中,由于没有考虑数目为成骨细胞 10 倍之多的骨细胞存在的干扰问题,故也不能准确说明问题。本实验证明,在实验室条件下能培养出骨细胞,且该类细胞和成骨细胞有明显区别,将进一步深入研究骨细胞、成骨细胞的相互关系,以及它们特有的生物特性提供良好基础。

参考文献

[1] Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocytes: central conductors of bone biology in normal and pathological conditions[J]. Acta Physiol (Oxf), 2012, 204(3): 317-330.

[2] Lu XL, Huo B, Chiang V, et al. Osteocytic network is more responsive in calcium signaling than osteoblastic network under fluid flow [J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(3): 563-574.

[3] Bakk AD, Klein-Nulend J. Mechanisms of Osteocyte Mechanotransduction[J]. Clin Reviews Bone Mineral Metabolism, 2010, 8(4): 163-169.

[4] 谷国良. 骨细胞的功能:生物学研究和机理探讨[J]. 中华骨质疏松骨矿盐疾病杂志, 2009, 2(1): 1-12.
Gu GL. Osteocyte function: biology and mechanisms[J]. Zhonghua Gu Zhi Shu Song Gu Kuang Yan Ji Bing Za Zhi, 2009, 2(1): 7-9. Chinese.

[5] 徐杨俊, 赵建宁. 体外培养成骨细胞的研究进展[J]. 中国骨伤, 2010, 23(7): 562-565.
Xu YJ, Zhao JN. Progressing study in osteoblasts cultured in vitro [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(7): 562-565. Chinese with abstract in English.

[6] Lozupone E, Favia A, Grimaldi A. Effect of intermittent mechanical force on bone tissue in vitro: preliminary results[J]. J Bone Miner Res, 1992, 7(Suppl 2): S407-409.

[7] Gu G, Nars M, Hentunen TA, et al. Isolated primary osteocytes express functional gap junctions in vitro [J]. Cell Tissue Res,

- 2006, 323(2): 263-271.
- [8] 吴承亮, 肖鲁伟, 童培建. 改良大鼠成骨细胞原代培养方法的实验研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2006, 30(5): 459-456.
Wu CL, Xiao LW, Tong PJ. Experimental research on primary culture of improved rats' osteoblast[J]. Zhe Jiang Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao, 2006, 30(5): 459-456. Chinese.
- [9] Delgado-Calle J, Sañudo C, Bolado A, et al. DNA methylation contributes to the regulation of sclerostin expression in human osteocytes[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(4): 926-937.
- [10] Rommel G, Bacabac; Jack J. W. A. Van Loon. Stress response by bone cells and implications on microgravity environment[J]. Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism, 2010, 8(4): 179-188.
- [11] 许兵, 方剑利, 刘慧. 补肾活血方对去势大鼠的影响研究[J]. 中华骨质疏松骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(3): 177-182.
Xu B, Fang JL, Liu H. The experimental study of influence of *Bushenhuoxue* in ovariectomized rats[J]. Zhonghua Gu Zhi Shu Song Gu Kuang Yan Ji Bing Za Zhi, 2011, 4 (3): 177-182. Chinese.
- [12] Kato Y, Windle JJ, Koop BA, et al. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(12): 2014-2023.
- [13] Hamblin R, Rieger R. Physiologically based mathematical model of transduction of mechanobiological signals by osteocytes[J]. Biomech Model Mechanobiol, 2012, 11(1-2): 83-93.
(收稿日期: 2012-06-20 本文编辑: 王玉蔓)

《中国骨伤》杂志 2013 年重点专题征稿通知

《中国骨伤》杂志在广大读者、作者和编者的参与和努力下, 已相继被美国《医学索引》(IM/MEDLINE), 荷兰《医学文摘》(EMBASE)、WHO 西太区《医学索引》(WPRIM)、美国《化学文摘》(CA)等国际著名医学数据库收录。据 2012 年中国科学技术信息所承担的科学技术部发展计划司委托项目《中国科技论文统计与分析》的年度报告中发布了最新的美国 MEDLINE 收录中国论文最多的 20 种期刊中, 《中国骨伤》杂志名列其中, 说明我刊在促进国际间学术交流的道路上不断的探索前行, 得到了国内外广大学者的好评和关注。以下是《中国骨伤》杂志 2013 年拟刊出的重点专题征稿通知, 欢迎广大读者和作者有针对性的踊跃投稿。

1. 脊柱微创手术的选择
2. 脊柱动力化固定与非动力化固定的选择
3. 颈椎疾病的前后路手术选择原则
4. 保守治疗在脊柱疾患中的疗效及评价
5. 胸椎管狭窄症手术适应证及方法选择
6. 退变性脊柱侧凸的治疗策略
7. 异体韧带与人工韧带的临床应用
8. 关节不稳的镜下治疗
9. 严重畸形膝骨关节炎人工关节置换的手术问题
10. 踝关节骨折畸形愈合的手术治疗
11. 人工关节翻修术常见问题的处理
12. 人工关节置换术后的功能康复
13. 假体周围骨折的分型及处理
14. 复杂性骨折不愈合骨缺损的治疗策略
15. 四肢软组织缺损的修复
16. 老年股骨颈骨折治疗方法的选择及手术失败原因分析
17. 脊柱转移性肿瘤的诊治与治疗
18. 大块异体骨和肿瘤假体在骨肿瘤保技术中的应用
19. 手法治疗在脊柱、关节和创伤疾病中的应用和探讨
20. 中医药在脊柱、关节、创伤疾病中的应用和探讨

《中国骨伤》杂志社