

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.001

• 基础研究 •

基于 COMSTAT 软件对微生物被膜进行定量分析的方法与意义 *

陈璐^{1,2} 王博^{1,2} 姚蜜蜜^{1,2} 蔡中华^{1△}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084; 2 清华大学深圳研究生院海洋科学与技术学部 广东 深圳 518055)

摘要 目的:微生物被膜是一种具有协调性、功能性和高度结构性的膜状复合物,它可以为微生物提供良好的生存环境,免受外界因素的干扰。研究发现,具有产生微生物被膜能力的细菌治病性明显增强,而现今缺乏一种分析微生物被膜的有效手段。本文探讨利用 COMSTAT 软件对微生物被膜进行定量分析的方法和意义,为对微生物被膜定性定量分析提供支持手段,从而为研究微生物被膜致病性提供方法理论基础。**方法:**以葡萄球菌为研究模型,利用激光扫描共聚焦显微镜成像技术,结合 COMSTAT 微生物被膜分析软件对微生物被膜的单位面积生物量、基质覆盖率、平均厚度、粗糙系数等方面进行定量分析,研究了该葡萄球菌的生物被膜生长变化过程,并考察了抗生素对其生物被膜的抑制作用。**结果:**在葡萄球菌生物被膜生长过程中,生物量、平均厚度以及平均扩散距离等结构指标数值都有明显增加,而粗糙度和表面积与生物量比值呈现降低趋势,表明了微生物被膜由发生向成熟的转化过程。与此同时,经 10 μ g/mL 和 100 μ g/mL 的卡那霉素处理得到的葡萄球菌微生物被膜生长受到明显抑制,且随着卡那霉素的浓度增加,抑制效果随之增加。**结论:**本文运用 COMSTAT 软件的分析方法首次从生物量、平均厚度等结构指标数值的角度描述了葡萄球菌生物被膜,从而有效评价微生物被膜发生、发展、成熟以及崩解的生长过程。该技术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,具有理论指导意义。

关键词: COMSTAT 软件;微生物被膜;定量分析;葡萄球菌

中图分类号: Q93-31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)07-1201-06

Construction and Significance of Quantitative Analysis of Microbial Biofilm Based on COMSTAT Program *

CHEN Lu^{1,2}, WANG Bo^{1,2}, YAO Mi-mi^{1,2}, CAI Zhong-hua^{1△}

(1 School of life science, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

2 Division of Ocean Science and Technology, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518055, China)

ABSTRACT Objective: Microbial biofilms are coordinated, functional and highly structured community. Under the protection of biofilms, bacteria can be free from the interference of external factors. Studies found that biofilms should be responsible for some chronic and incurable diseases caused by pathogenic bacteria. Therefore, a pressing matter is searching for effective methods for the analysis of bacterial biofilm. We investigate the construction and significance of quantitative analysis of microbial biofilm based on COMSTAT program and aim to provide the method for qualitative and quantitative analysis, as well as theoretical basis of biofilm of pathogenic microorganisms. **Methods:** According to confocal microscopy imaging combined with COMSTAT analysis, *Staphylococcus* sp. was selected as the object of study. Features of Bio-volume, average thickness, average diffusion distance and etc. were determined to characterize the growth process of biofilm and inhibition of kanamycin. **Results:** During the biofilm process of *Staphylococcus* sp., feature index of bio-volume, average thickness and average diffusion distance are significantly increased, while the roughness coefficient and surface to volume ratio showed a decreasing trend, indicated the maturation process of biofilm. Also, biofilm structure of *Staphylococcus* sp. was inhibited by Kanamycin in both 10 μ g/ml and 100 μ g/ml treatment. **Conclusion:** The structural index of *Staphylococcus* sp. is well characterized, and the occurrence, development, maturation and dissolution process of biofilm are well evaluated based on quantitative analysis of COMSTAT program. There existed potential value on the study of theory mechanism of microbial biofilm formation, and could provide theoretical basis for the research on microbial biofilm treatment.

Key words: COMSTAT software; Microbial biofilm; Quantitative analysis; *Staphylococcus* sp.

Chinese Library Classification(CLC): Q93-31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)07-1201-06

* 基金项目: 国家 973 前期专项(2012CB426504); 国家自然科学基金项目(41106087); 国家海洋公益性项目(201205020-09; 20130502);

广东省自然科学基金项目(S2012010010855)

作者简介: 陈璐(1987-), 男, 硕士, 主要研究方向: 微生物分子生态学, E-mail: beckhalo333@sina.com

△ 通讯作者: 蔡中华, 电话: 0755-26036108, E-mail: caizh@sz.tsinghua.edu.cn

(收稿日期: 2013-07-11 接受日期: 2013-08-04)

前言

在自然及人工环境下,微生物极易吸附于物体表面,通过分泌胞外多糖,蛋白和核酸等,将其自身紧密包裹其中,形成微生物被膜(Bacterial Biofilm, BBF)^[1]。微生物被膜是一种具有协调性、功能性和高度结构性的膜状复合物,它可以保护微生物,并为微生物提供良好的生存环境^[2]。研究表明^[3],约90%以上的环境微生物生活在微生物被膜中,80%的细菌性疾病与细菌微生物被膜有关。正是因为有微生物被膜的保护,现有的抗生素药物难以进入微生物被膜的深处,对病原形成有效的抑杀。在微生物被膜的保护和抗生素抑杀的双重作用下,微生物很容易对抗生素产生特异性的耐药性,以抵抗抗生素的作用。因此,研究微生物被膜的形成过程对临床致病菌的预防和治疗具有重要的理论应用价值。

然而,影响微生物被膜的形成因素有很多,其中包括粘附介质的物化属性^[4,5],碳源的种类及浓度^[6,7],渗透压^[8],水流应切力^[9]以及微生物被膜内的群落组成^[10,11]。同样,由于分子微生物学技术手段的缺乏,开展微生物被膜形成的机制的研究存在极大的困难。近十年来,随着越来越多的基于实验室平台的生物被膜研究模型相继建立,科学家们可以在特定的条件下观察生物被膜的发生,发展以及成熟的过程^[12],大量的文献报道开始关注于微生物被膜的定量分析技术^[13],这可能为研究高度结构和功能化的微生物被膜提供有效的理论支持,给防治微生物被膜引起的细菌性疾病提供新的思路。

本文以一株实验室筛选得到的葡萄球菌(*Staphylococcus sp.*)为模型,利用激光扫描共聚焦显微镜成像技术结合 COMSTAT 微生物被膜分析软件对生物被膜的单位面积生物量、基质覆盖率、平均厚度、粗糙系数等方面进行定量分析,研究了该葡萄球菌的生物被膜生长变化过程,并考察了抗生素对其生物膜的抑制作用。运用该分析方法首次从结构指标数值的角度描述了葡萄球菌生物被膜,从而有效评价微生物被膜发生、发展、成熟以及崩解的生长过程。该技术在研究微生物被膜形成的理

论机制方面存在潜在价值,在研究微生物被膜治病性方面具有理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 微生物被膜培养生长模型

本实验取活化后的葡萄球菌 50 μL ($\text{OD}_{600}=0.5$) 加入到 10 mL 已灭菌 M63 培养基中(硫酸铵 0.2 g, 磷酸二氢钾 1.36 g, 七水合硫酸亚铁 0.5 mg, 甘油 0.2 g, 酪蛋白水解物 0.5 g, 七水合硫酸镁 0.2 g, 葡萄糖 0.2 g, 去离子水 100 mL), 充分振荡混匀。取一次性聚乙烯无菌平板(直径 90 mm), 在正中放入一张已灭菌盖玻片, 将上述稀释的菌液加入到无菌平板中, 30℃ 静置培养, 注意保持空气湿度。

1.2 微生物被膜样品的制备

培养时间完成后, 用镊子将长有微生物被膜的盖玻片(观察样品)小心取出, 放置于洁净的培养皿中, 用生理盐水轻柔洗去表面残余培养基。

染料的配制: 取洁净 EP 管, 用锡箔纸包紧, 向其中加 1 mL DMSO, 将荧光染料 LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit 放于室温下融化, 取 1.5 μL SATO9 染料加入到 DMSO 中, 震荡混匀。

加 200 μL 染料于盖玻片上, 确保整个片子被染液覆盖, 用锡箔纸包起放有盖玻片的培养皿, 染色 20-30 min 后, 取出盖玻片, 并将其边缘液体吸干, 加 10 μL 封片剂到洁净的载玻片上, 将盖玻片染色面朝下放置, 压紧, 并排除气泡, 确保视野清晰不流动。将制备好的片子用锡箔纸包好, 用激光扫描共聚焦显微镜观察。

1.3 样品的观察

首次, 按相应顺序打开激光扫描共聚焦显微镜(OLYMPUS), 进入操作软件 FV10, 选择相应染料选项, 调节适合的激发光范围。其次, 选择 100 倍油镜, 滴油, 倒置放置已染好片子, 选择光源, 调节粗细准焦螺旋, 获得清晰的观察视野。再次, 切换视野到扫描界面, 将扫描速度调至最高, 调整亮度等参数, 获得清晰



图1 基于 COMSTAT 软件分析的方法步骤

Fig.1 Step methods based on the COMSTAT analysis

的扫描界面,转动细准焦螺旋,确定样本上下底面参数,之后将扫描速度调至 20 倍,进行 Z 轴扫描,获得一组样本图像。最后,保存图像,并相应的转换为立体(3D)图像。

1.4 基于 COMSTAT 的分析方法

COMSTAT 分析软件是由 Arne Heydorn 团队针对微生物被膜分析自主开发的、基于 MATLAB 平台的分析操作程序,首先将软件文件导入 MATLAB 路径,有关的 COMSTAT 分析步骤参照 Arne Heydorn 等的报道^[14, 15]:将特定格式的图片数据直接导入 COMSTAT 软件中,经 CHECKALL 程序验证上传图片数据的准确性和完整性,使用 LOOK 或 LOOKTIF 程序设定灰度阈值,本实验选取阈值为 10。最后,运行 COMSTAT 程序进行相关操作,根据研究需要选择分析内容,最后将得到的数据导出用于后续分析(图 1)。

1.5 抗生素对 *Staphylococcus sp.*生物被膜产生影响的检测

依照方法 1.1 所示,葡萄球菌生物被膜培养 4 d 完成后,取对照组观察生物被膜形成情况。实验组分别滴加终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素,轻轻混匀,继续培养 1 d。之后小心取出长有微生物被膜的盖玻片,制备样品,激光扫描共聚焦显微镜观察,COMSTAT 软件分析。

2 结果

2.1 激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)观察 *Staphylococcus sp.*生物被膜生长情况

经过 4 天培养过程, *Staphylococcus sp.* 微生物被膜生长情况如图 2 所示。由图片结果的直观判断可以得出, *Staphylococcus sp.*生物被膜生物量呈现明显增长趋势,并表现出结构化的微生物被膜形态。

2.2 利用 COMSTAT 软件对 *Staphylococcus sp.* 生物被膜生长

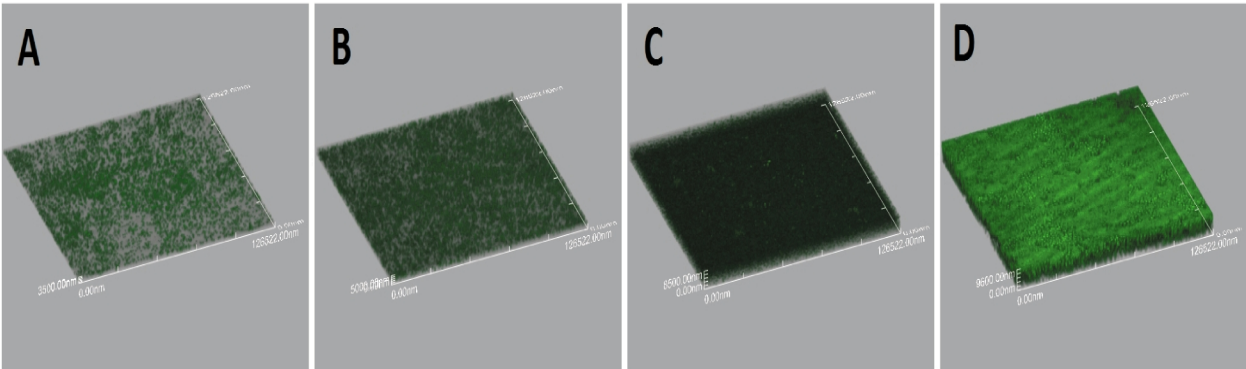


图 2 *Staphylococcus sp.*的微生物被膜生长变化情况(4 天)

Fig.2 The biofilm 3D structure of *Staphylococcus sp.* within the growth of four days

A.培养 1 天后微生物被膜 3D 结构; B.2 天后; C.3 天后; D.4 天后

A. The biofilm structure (3D) of *Staphylococcus sp.* after one day's growth; B. two days; C. three days; D. four days

表 1 基于 COMSTAT 分析的微生物被膜结构指标

Table 1 Index of biofilm structure based on COMSTAT analysis

微生物被膜结构特征数据指标 Features calculated by COMSTAT	含义 Implication
生物量 Bio-volume	表示生物被膜的整体体积,也可间接作为衡量单位面积微生物数量的标准 Represents the overall volume of the biofilm, and also provides an estimate of the biomass in the biofilm
基质覆盖率 Substratum coverage	反映微生物定殖于基质表面的效率 Reflects how efficiently the substratum is colonized by bacteria of the population
平均厚度 Mean thickness	提供测定微生物被膜空间大小的方法 Provides a measure of the spatial size of the biofilm
分数维 Fractal dimension	用于度量微生物被膜结果复杂程度的特征量 Measures the structural complexity of biofilm
粗糙系数 Roughness coefficient	衡量微生物被膜厚度变化的程度,也可表示生物被膜的异质性程度 Provides a measure of how much the thickness of the biofilm varies, and is an indicator of biofilm heterogeneity
平均扩散距离 Average diffusion distance	表示微生物被膜中营养源和微生物之间的扩散距离 Measures the distances over which nutrients have to diffuse from the voids to bacteria within micro-colonies
平均扩散距离/平均扩散距离 Average diffusion distance/average diffusion distance	反映接触营养源的微生物被膜比例大小以及微生物被膜适应环境的能力 Reflects what fraction of the biofilm is exposed to the nutrient flow and indicates how the biofilm adapts to the environment

进行指标分析

利用 COMSTAT 软件可进行多项微生物被膜结构指标分析,具体内容及其含义归纳见表 1。

本实验分别从生物量、平均厚度、粗糙系数、平均扩散距离、表面积于生物量比值等方面考察了葡萄球菌的微生物被膜生长情况,见表 2。由表可知,随着培养时间的增长,葡萄球菌

的生物量由 1.47(第一天)增长到 10.33 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ (第四天)。与此同时,微生物被膜的平均厚度也随着培养天数的增加逐渐增大,在第四天达到最大值 9.26 μm 。在平均扩散距离的指标方面,前三天表现了缓慢的增长趋势,分别为 0.14、0.21 和 0.83 μm ,在第四天迅速增加,达到 3.41 μm 。然而,葡萄球菌微生物被膜的粗糙系数以及表面积与生物量比值等指标均与培养天

表 2 葡萄球菌微生物被膜生长特征指标统计
Table 2 Biofilm features of *Staphylococcus sp.*

	培养天数 Day	生物量 Bio-volume	平均厚度 Mean thickness	粗糙系数 Roughness coefficient	平均扩散距离 Average diffusion distance	表面积与生物量比值 Surface to volume ratio
葡萄球菌 <i>Staphylococcus sp.</i>	1	1.47± 0.01	1.60± 0.34	0.77± 0.16	0.14± 0.03	4.01± 0.82
	2	2.70± 0.25	3.26± 0.71	0.51± 0.07	0.21± 0.01	3.00± 0.14
	3	6.73± 3.44	8.06± 0.42	0.11± 0.04	0.83± 0.30	0.96± 0.60
	4	10.33± 1.74	9.26± 1.65	0.10± 0.06	3.41± 0.77	0.56± 0.33

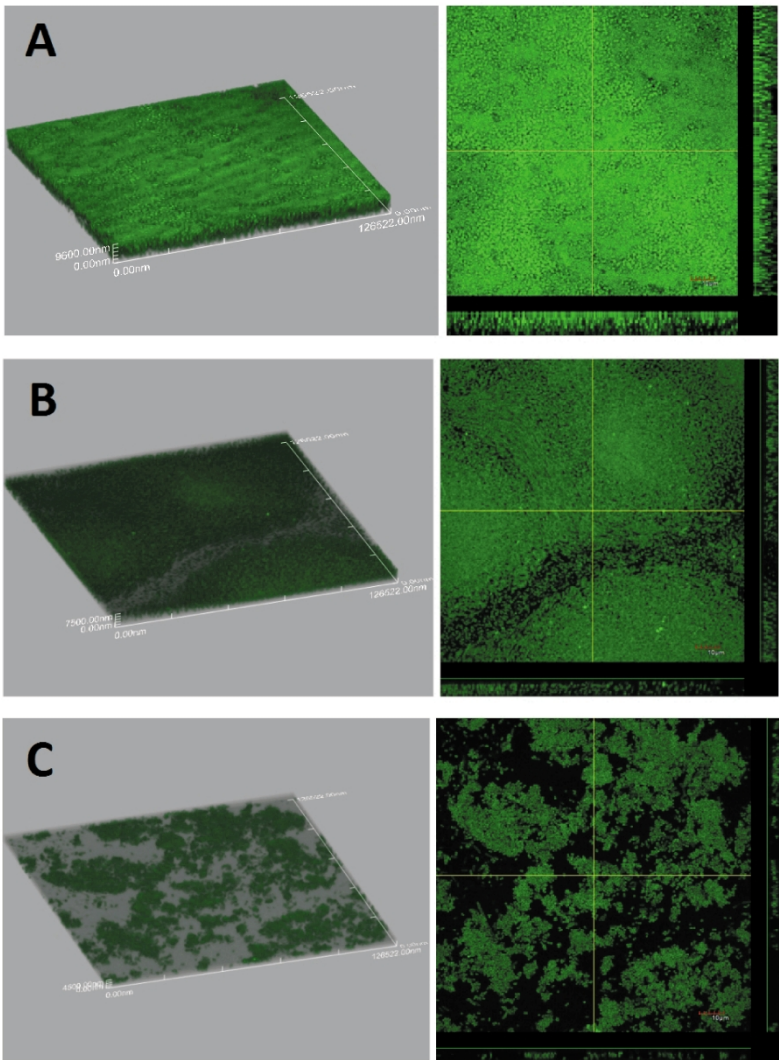


图 3 卡那霉素对葡萄球菌微生物被膜生长的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effect of Kanamycin on biofilm growth of *Staphylococcus sp.*

A.培养四天后的葡萄球菌微生物被膜生长情况(阴性对照;左侧为 3D 成像图,右侧为平面图,下同);B.同样培养时间后,加入终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素培养一天,观察结果; C.加入终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡那霉素培养一天,观察结果
A. Biofilm structure of *Staphylococcus sp.* after 4 days' growth(Negative control; 3D Structure on the left and planar structure on the right); B. Added with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration) Kanamycin; C. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (final concentration) Kanamycin

数呈现负相关的变化趋势,分别在第四天达到最小的粗糙系数 0.10 和最小的表面积与生物量比值 0.56。

2.3 抗生素对 *Staphylococcus sp.* 微生物被膜生长的抑制作用

3D 成像及平面图结果表明,较阴性对照相比,经 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素处理得到的葡萄球菌微生物被膜生长受到明显抑制,且随着卡那霉素的浓度增加,抑制效果随之增加(图 3)。

为进一步考察卡那霉素对葡萄球菌生物被膜的抑制效果,

我们采用 COMSTAT 软件对微生物被膜的生物量、平均厚度、平均扩散距离以及表面积与生物量比值进行了分析,结果见图 4。随着卡那霉素的加入,微生物被膜的生物量、平均厚度和平均扩散距离随之减少,且与抗生素浓度的增加呈负相关关系,表明抗生素在一定程度上导致生物被膜中微生物数量减少,结构性受到破坏。然而,表面积与生物量比值随卡那霉素浓度增加而增加,同样反映了葡萄球菌微生物被膜面对抗生素的干扰形态结构发生明显变化,表现出一定适应环境能力。

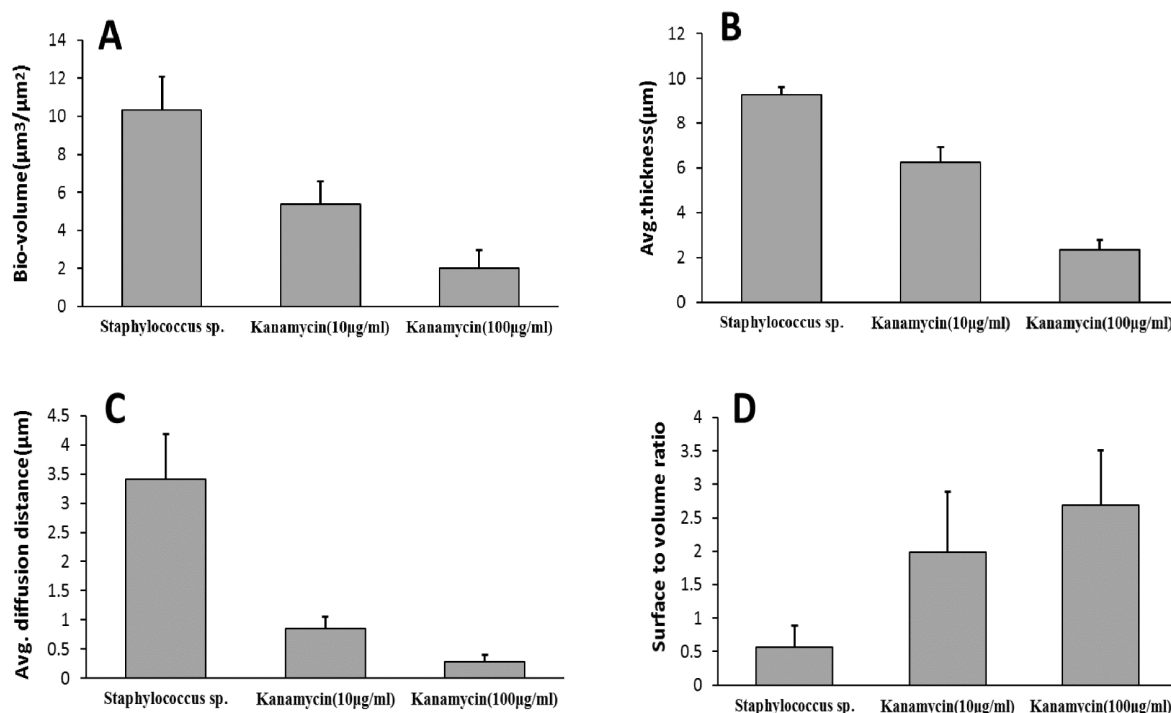


图 4 基于 COMSTAT 分析的卡那霉素抑制葡萄球菌微生物被膜空间结构数据

Fig.4 COMSTAT analysis of biofilm structure of *Staphylococcus sp.* inhibited by Kanamycin

A. 生物量; B. 平均厚度; C. 平均扩散距离; D. 表面积与生物量比值

A. Bio-volume; B. Average thickness; C. Average diffusion distance; D. Surface to volume ratio

3 讨论

近些年来,随着在食品饲养行业中抗生素的滥用,细菌产生了越来越强的耐药性^[2]。尤其对于致病菌来说,越来越多的研究表明它们可以分泌胞外多聚物质将其自身包裹其中,形成生物被膜,以进一步降低抗生素的伤害作用^[16,17]。因此,研究微生物被膜的形成机制,用以“剥去”这层微生物的保护外壳,已经获得越来越多的关注^[18,19]。然而,现有的微生物被膜分析技术存在很大缺陷,难以对生物被膜的特征参数进行定义和描述,更无法对生物被膜进行定性、定量分析。本文介绍一种基于新型 COMSTAT 软件对微生物被膜进行定量分析的技术,具有一定的研究价值。

COMSTAT 软件是丹麦技术大学微生物系的 Arne Heydorn 教授团队于 2000 年开发的专门针对微生物被膜分析的一款计算机软件,它可以对由 CLSM 获得的三维图片堆进行生物被膜空间结构定量分析,从而更加直观的了解不同微生物被膜的空间构造。本研究基于 COMSTAT 软件分析为基础,结合实验室建立的微生物被膜培养模型和激光扫描共聚焦显微镜观

测技术,并以实验室筛选得到的一株葡萄球菌为研究模型,成功地观测到葡萄球菌微生物被膜的发生、发展、成熟以及抗生素抑制后的崩解情况。COMSTAT 分析结果显示,随着葡萄球菌微生物被膜的成熟,单位面积生物量、平均厚度以及平均扩散距离逐渐增加,粗糙度和表面积与生物量比值逐渐减少,表明微生物被膜的生长过程与生物量紧密相关。在微生物被膜形成阶段,细菌随机附着于基质表面,形成分散的聚状复合体,导致粗糙度和表面积于生物量比值的数值相对较高。进入生长阶段后,随着群落中微生物数量增加,单位面积生物量和平均厚度等指标可以直观反映生物被膜的均一度逐渐增加的过程;与此同时,平均扩散距离数值指标的增加也相应表现出生物被膜中获得食物营养源的距离增加,竞争压力逐渐增大。然而,当加入抗生素后,微生物被膜的理化特征明显变化,微生物被膜的生物量、平均厚度和平均扩散距离随抗生素浓度增加而减少,表面积和生物量比值逐渐增加,表明生物被膜的异质性逐渐增加,卡那霉素对葡萄球菌生物被膜有一定抑制作用,对成熟的生物被膜有破坏作用。

综上所述,COMSTAT 软件分析的各项指标可以切实地反

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