

• 论著 •

汉黄芩素及其抑制物细胞周期蛋白依赖性激酶 1 对人脑胶质瘤干细胞作用机制的研究

梁冰^{1, 2}, 梁海乾¹, 战丽¹, 李建伟^{1, 2}, 陈旭义^{1, 2}, 张赛¹

(1. 武警后勤学院附属医院, 天津 300162; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

【摘要】 目的 研究汉黄芩素及其抑制剂细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1) 对人脑胶质瘤干细胞 (BGSCs) 的作用机制。方法 使用不同浓度的汉黄芩素 (1、10、1000 μmol/L) 对 BGSCs 进行浸染, 并设空白对照组。采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测汉黄芩素对 BGSCs 增殖的影响; 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 CDK1 mRNA 表达; 同时检测脂质过氧化产物还原型谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 含量的变化。结果 汉黄芩素对人 BGSCs 增殖具有明显的抑制作用, 各剂量汉黄芩素组 BGSCs 增殖 [吸光度 (A) 值] 较空白对照组明显降低, 随给药浓度增加, 细胞生长抑制率 (IR) 较空白对照组逐渐增加, 以汉黄芩素 100 μmol/L 组作用更显著 [A 值: 0.18 ± 0.02 比 0.67 ± 0.03, IR: (64.43 ± 0.04) % 比 0, 均 P < 0.05]; 各剂量汉黄芩素组 CDK1 mRNA 表达 (A 值) 均较空白对照组有不同程度的提高, 在 10 μmol/L、100 μmol/L 汉黄芩素组出现显著提高 (0.378 ± 0.061、0.733 ± 0.081 比 0.125 ± 0.019, 均 P < 0.05); 脂质过氧化产物 GSH (mg/g)、SOD (U/g) 和 MDA (nmol/g) 在各个剂量汉黄芩素组与空白对照组比较差异均无统计学意义 (GSH: 474.51 ± 38.63、479.67 ± 15.89、481.17 ± 36.41 比 487.00 ± 28.53, SOD: 26.58 ± 2.26、26.75 ± 1.96、27.08 ± 1.52 比 27.31 ± 1.89, MDA: 4.92 ± 0.45、4.72 ± 0.73、4.61 ± 0.47 比 4.45 ± 0.26, 均 P > 0.05)。结论 CDK1 可能参与汉黄芩素抑制人 BGSCs 生长的作用机制, 该作用与脂质过氧化产物无关。

【关键词】 汉黄芩素; 细胞周期蛋白依赖性激酶 1; 脑胶质瘤干细胞

A research of mechanism and effects of wogonin and its inhibitor cyclin-dependent kinase 1 on human glioma stem cells LIANG Bing*, LIANG Hai-qian, ZHAN Li, LI Jian-wei, CHEN Xu-yi, ZHANG Sai. *Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Army Police, Tianjin 300162, China; Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Corresponding author: ZHANG Sai, Email: zhangsai728@yahoo.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism and effects of wogonin and its inhibitor cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) on human brain glioma stem cells (BGSCs). **Methods** BGSCs were treated with different concentrations (1, 10, 100 μmol/L) of wogonin and a blank control group was made. Cell growth inhibition of BGSCs was detected by assay of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). Expression of CDK1 mRNA was detected by retro transcriptive-polymerase chain reaction (RT-PCR). Simultaneously, lipid peroxidation products of glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), malondiadehyde (MDA) were tested. **Results** Wogonin significantly suppressed the growth of BGSCs [absorbance (A) value], statistical significant differences were found in study groups compared with blank control group. The cell growth inhibition rate (IR) was gradually increased with the administration of wogonin concentration increment, especially prominent in the wogonin 100 μmol/L group (A value: 0.18 ± 0.02 vs. 0.67 ± 0.03, IR: (64.43 ± 0.04) % vs. 0, both P < 0.05). Expression of CDK1 mRNA was significantly increased in 10 μmol/L and 100 μmol/L wogonin groups compared to that in the blank control group (0.378 ± 0.061, 0.733 ± 0.081 vs. 0.125 ± 0.019, both P < 0.05). There was no significant change in GSH (mg/g), SOD (U/g) and MDA (nmol/g) in all groups (GSH: 474.51 ± 38.63, 479.67 ± 15.89, 481.17 ± 36.41 vs. 487.00 ± 28.53, SOD: 26.58 ± 2.26, 26.75 ± 1.96, 27.08 ± 1.52 vs. 27.31 ± 1.89, MDA: 4.92 ± 0.45, 4.72 ± 0.73, 4.61 ± 0.47 vs. 4.45 ± 0.26, all P > 0.05). **Conclusion** CDK1 possibly participates in the mechanism of wogonin suppression of BGSCs growth which is not related to lipid peroxidation.

【Key words】 Wogonin; Cyclin-dependent kinase 1; Glioma stem cells

脑胶质瘤手术治疗不能完全切除, 术后极易复发, 化放疗效果差, 因此, 从中草药中寻找对脑胶质瘤具有治疗作用的物质很有必要。汉黄芩素是黄芩的有效成分之一, 国内外相关研究报道

显示, 汉黄芩素能抑制多种肿瘤细胞的生长^[1]、诱导肿瘤细胞的凋亡^[2], 对脑胶质瘤细胞亦有明显的抑制作用^[3]。脑胶质瘤干细胞 (BGSCs) 是脑胶质瘤的种子细胞, 决定了脑胶质瘤的发生发展^[4], 从肿瘤细胞源头寻找中药治疗脑胶质瘤的依据刻不容缓。汉黄芩素是一种天然的细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1) 抑制剂, 且 CDK1 与恶性肿瘤发生时细胞周期紊乱相关^[5], 在人脑胶质瘤中的表达可

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.03.005

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (11102235); 天津市自然科学基金重点项目 (12JCZDJC24100); 武警医学院科研基金面上项目 (WYM201118); 武警医学院科研基金博士启动金项目 (WYB201110)

通信作者: 张赛, Email: zhangsai728@yahoo.com

随着恶性程度的增高而逐渐增加^[6-7]。故本研究使用 BGSCs 作为研究对象,并将 CDK1 作为研究指标,探讨汉黄芩素对 BGSCs 的作用意义及 CDK1 是否参与其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验分组:用不同浓度的汉黄芩素对 CD133 磁珠分离的人 BGSCs (由武警医学院附属医院脑系科陈旭义博士惠赠) 进行浸染,分为空白对照组和 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 3 个给药组。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测 BGSCs 的增殖:传代细胞生长良好并处于对数生长期时,将约 1×10^4 的细胞转入 96 孔培养板,并向每个培养孔中加入 200 μl 培养液,培养 24 h。待细胞贴壁并进入对数生长期后进行药物干预,各给药组加入含不同浓度 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 汉黄芩素的 DMEM 培养液 200 μl ,空白对照组给予 DMEM 培养液。每种浓度设 5 个复孔。将细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中继续培养 48 h,取出 96 孔板,离心 10 min,弃上清液,并加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗。细胞终止孵育时向各孔加入 20 μl 新配制的 5 g/L 的 MTT 溶液,将培养板置于培养箱内 4 h 后,将二甲亚砷 (DMSO) 加入到培养孔中,充分振荡 10 min,在激发波长为 550 nm 时,使用酶标仪 (德国 Perlong Medical 公司) 测定反应体系的吸光度 (A) 值,将复孔的数值列入平均值。细胞生长抑制率 (IR) = (1 - 用药组平均 A 值) / 空白对照组平均 A 值,实验重复 3 次。

1.2.2 脂质过氧化产物的检测:将 BGSCs 接种于细胞培养瓶,培养 48 h 后,加入含不同浓度 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 汉黄芩素的 DMEM 培养液 200 μl ,培养 24 h 后弃培养液,用 pH 值为 7.4 的 PBS 冲洗,并加入 0.5 ml 的 PBS 覆盖细胞层,加入 0.25% 胰酶使细胞充分脱落。将细胞悬液转入 1.5 ml 的小离心管 (EP 管) 中,用 0.4 ml 的 PBS 冲洗瓶底后再转入上述 EP 管,离心 10 min,弃上清,加入细胞裂解液 100 μl ,置冰上 20 min,再离心 10 min,吸取上清液,用试剂盒 (南京建成生物公司) 检测 GSH、SOD、MDA 的水平,操作按试剂盒说明书要求进行。

1.2.3 逆转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 BGSCs CDK1 mRNA 的表达:用 TRIzol 提取细胞总 RNA,各个标本取 5 μg 的总 RNA 进行逆转录为 cDNA 后进行检测,95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下预变性 5 min,根据 RT-PCR 检测试剂盒步骤合成 cDNA 第一链。PCR

扩增引物由美国 Invitrogen 公司合成。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。通过在 80V 电泳及 2% 琼脂糖凝胶条件下鉴定 PCR 产物,再用紫外光凝胶成像系统扫描并记录实验结果,实验重复 3 次。

1.3 统计学分析:采用 SPSS 11.5 统计软件处理数据,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有参数用 Shapiro-Wilk 做正态分布检验,正态分布数据进行单因素方差分析,采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 汉黄芩素对 BGSCs 增殖的影响 (表 1):当汉黄芩素浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时,BGSCs 的增殖出现部分抑制,但与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);汉黄芩素 10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 组 BGSCs 的增殖受到了明显抑制,与空白对照组比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。随着给药浓度的增加,细胞增殖的 IR 逐渐增加,各给药组组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 汉黄芩素对体外培养 BGSCs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	BGSCs 增殖[(A)值]	IR (%)
空白对照组	5	0.67 \pm 0.03	0
汉黄芩素 1 $\mu\text{mol/L}$ 组	5	0.62 \pm 0.03	0.27 \pm 0.05
汉黄芩素 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	5	0.41 \pm 0.01 ^{ab}	25.93 \pm 0.03 ^{ab}
汉黄芩素 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	5	0.18 \pm 0.02 ^{abc}	64.43 \pm 0.04 ^{abc}

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与汉黄芩素 1 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,^b $P < 0.05$;与汉黄芩素 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,^c $P < 0.05$

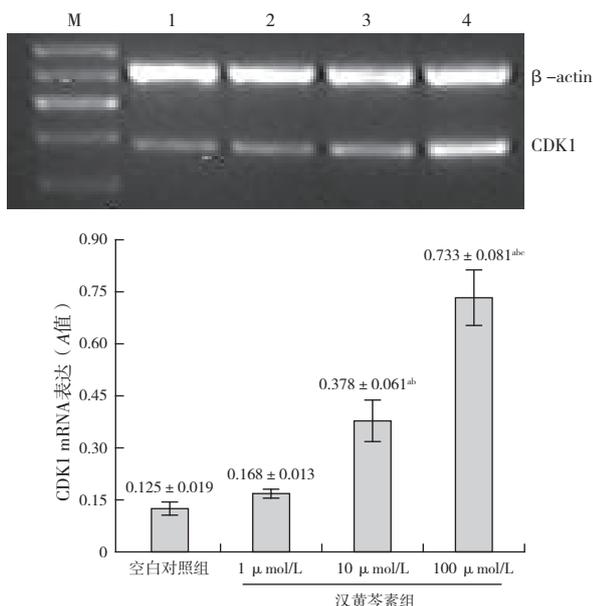
2.2 汉黄芩素对 BGSCs 中脂质过氧化产物的影响 (表 2):各剂量汉黄芩素给药组 GSH、SOD、MDA 浓度与空白对照组比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

表 2 不同浓度汉黄芩素对体外培养人 BGSCs 中脂质过氧化产物的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	GSH (mg/g)	SOD (U/g)	MDA (nmol/g)
空白对照组	5	487.00 \pm 28.53	27.31 \pm 1.89	4.45 \pm 0.26
汉黄芩素 1 $\mu\text{mol/L}$ 组	5	474.51 \pm 38.63	26.58 \pm 2.26	4.92 \pm 0.45
汉黄芩素 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	5	479.67 \pm 15.89	26.75 \pm 1.96	4.72 \pm 0.73
汉黄芩素 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	5	481.17 \pm 36.41	27.08 \pm 1.52	4.61 \pm 0.47

2.3 汉黄芩素对 BGSCs 的 CDK1 mRNA 表达的影响 (图 1):空白对照组 BGSCs 即有 CDK1 mRNA 表达。汉黄芩素组随着给药浓度的增加,CDK1 mRNA 表达逐渐增加,汉黄芩素 1 $\mu\text{mol/L}$ 组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);汉黄芩素 10 $\mu\text{mol/L}$

和 100 μmol/L 组均较空白对照组显著增加 (均 $P < 0.05$)；各给药组比较差异也有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。



注：M：Marker；1：空白对照组；2：汉黄芩素 1 μmol/L 组；3：汉黄芩素 10 μmol/L 组；4：汉黄芩素 100 μmol/L 组；与空白对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与汉黄芩素 1 μmol/L 组比较，^b $P < 0.05$ ；与汉黄芩素 10 μmol/L 组比较，^c $P < 0.05$

图 1 不同浓度汉黄芩素对 BGSCs CDK1 mRNA 表达的影响

3 讨论

汉黄芩素作为黄芩的主要活性成分之一，具有较强的抗炎、抗氧化作用^[8]，而自由基代谢紊乱与肿瘤的发生发展过程密切相关。近年来，氧自由基与肿瘤的关系逐渐被人们关注，并且形成了肿瘤发生的“自由基中毒学说”^[9]。本研究在探讨汉黄芩素对 BGSCs 的作用机制时检测了脂质过氧化指标。

本研究首先使用不同浓度的汉黄芩素对 BGSCs 进行浸染，随着汉黄芩素浓度的增加，细胞的增殖受到抑制，虽然在 1 μmol/L 时 BGSCs 的增殖仅受到了较小抑制，但在 10 μmol/L 和 100 μmol/L 时 BGSCs 的增殖受到了显著抑制。本研究结果表明，细胞受到的抑制与给药浓度呈正相关关系，提示汉黄芩素能明显抑制脑胶质瘤“种子细胞”的生长，且随着给药浓度的增加，IR 逐渐增加。在机体处于正常情况下，活性氧等自由基的数量处于平衡状态。但当机体受刺激或处于病态时，机体反应性地产生大量活性氧等自由基，影响氧化还原平衡，大量的活性氧自由基可对机体造成脂质过氧化等多种损伤。GSH、SOD 是机体抗氧化应激、抗脂质过氧化的重要蛋白，

可清除体内的超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 等自由基，抑制和防治氧化应激、脂质过氧化反应，是间接反映机体清除自由基效能的重要指标，而 MDA 是代表氧自由基的重要指标之一^[10]。在本实验中，各剂量汉黄芩素给药组均未见 GSH、SOD、MDA 的显著变化，提示汉黄芩素抑制 BGSCs 的增殖与脂质过氧化无关。

CDK1 可以和细胞周期蛋白 B1 (CyclinB1) 结合形成有丝分裂促进因子 (MPF)，MPF 在有丝分裂中起到重要作用，其过表达与人类多种恶性肿瘤分级、分期等相关^[11]。CDK1 参与肿瘤的机制可能有两种，一是 CDK1 在细胞周期中一系列的磷酸化及去磷酸化过程导致 MPF 在激酶活性上大量增加，从而驱动细胞进入并通过 M 期；二是恶性细胞进入 S 期和 G2 期时，细胞周期调控因子和 CDK 可大量增多并活化，从而有过多的 MPF 生成，在此环境下，可在一系列蛋白的作用下，形成不成熟的 CyclinB1/CDK1/Cdc25C 自动连锁式反馈环^[12]。又可因反馈环的形成激活肿瘤细胞中大量产生的 MPF 复合物，从而激发恶性细胞有缺陷的 G2/M 期而引发细胞核内某些重要蛋白结构和功能的改变。这些改变亦可使不稳定性遗传因素固定在恶性细胞中，同时 CDK1 触发的泛素依赖性的 CyclinB1 降解和 CDK1 自身失活的异常亦促进恶性细胞的发生发展^[13]。

本研究发现，未经处理的空白对照组 BGSCs 中亦有少量 CDK1 mRNA 表达；而给予汉黄芩素干预后，CDK1 mRNA 的表达出现升高，且与给药浓度呈正相关，当汉黄芩素的剂量增高达到 10 μmol/L 时，CDK1 mRNA 表达显著提高。说明 CDK1 是与细胞周期密切相关的蛋白，提示汉黄芩素对 BGSCs 的抑制作用可能与细胞周期有关。

综上，本研究提示，汉黄芩素可抑制 BGSCs 的生长，其抑制作用可能与 CDK1 过表达有关，只有当汉黄芩素浓度达到 10 μmol/L 以上时 CDK1 mRNA 表达会显著提高，所以汉黄芩素对 CDK1 的阻断作用是否只存在于一定浓度范围内，CDK1 在汉黄芩素 10 μmol/L、100 μmol/L 组的高表达是汉黄芩素的直接作用还是其药理作用引发的反馈性结果，这些还需进一步深入探讨。本研究的不足之处在于尚未对细胞周期的相关指标进行检测，也未对 CDK1 的基因进行干预，有待下一步深入研究揭示其分子机制。

参考文献

[1] Wang F, Song XM, Zhou M, et al. Wogonin inhibits H_2O_2 -induced vascular permeability through suppressing the phosphorylation of

caveolin-1. Toxicology, 2013, 305 (8): 10-19.

[2] Ma Z, Otsuyama K, Liu S, et al. Baicalein, a component of *Scutellaria radix* from Huang-Lian-Jie-Du-Tang (HLJDT), leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human myeloma cells. *Blood*, 2005, 105 (8): 3312-3318.

[3] 王醒, 郭力恒, 张敏州. 第二届全国中西医结合重症医学学术会议纪要. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19 (1): 8.

[4] Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*, 2004, 64 (19): 7011-7021.

[5] Zhang R, Loganathan S, Humphreys I, et al. Benzyl isothiocyanate-induced DNA damage causes G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Nutr*, 2006, 136 (11): 2728-2734.

[6] 黄强, 董军, 王爱东, 等. 建立人脑胶质瘤恶性进展相关基因表达谱. *中华肿瘤杂志*, 2003, 25 (5): 437-440.

[7] 陈启富, 王东军. Cyclin B1、CDK1 和 14-3-3 蛋白在人脑神经胶质瘤中的表达及意义. *四川医学*, 2009, 30 (3): 315-317.

[8] 孙健, 张扬, 温庆辉, 等. 汉黄芩素对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞增殖和周期的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16 (18): 169-172.

[9] 沈中阳, 李志军. 谈中西医结合急救医学的发展. *中国中西医结合急救杂志*, 2011, 18 (4): 195-196.

[10] 赵晓平, 范小璇, 余小波. 健脑益智胶囊对脑出血大鼠血清及脑组织中 SOD 和 MDA 的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16 (3): 156-158.

[11] Senju M, Sueoka N, Sato A, et al. Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of Cdc25C and Cdc2 in lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 132 (3): 150-158.

[12] Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 1994, 79 (4): 573-582.

[13] Samuel T, Weber HO, Funk JO. Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. *Cell Cycle*, 2002, 1 (3): 162-168.

(收稿日期: 2012-08-08)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

手法治疗小角度拇外翻的临床研究

刘增君, 李军, 沈华, 郑东

(天津市中医药研究院附属医院, 天津 300120)

拇外翻多以手术方式治疗, 应用手法对小角度拇外翻进行整复治疗, 恢复足踝部锁定结构, 调整畸形, 取得满意疗效, 报告如下。

1 资料和方法

1.1 患者入选标准:①拇趾疼痛、活动受限、外形不美观等。②拇外翻角度不大于 18°, 跖间关节角度不大于 13°, 足横弓塌陷及出现拇囊炎。

1.2 治疗方法:对 32 足患有小角度拇外翻的患者行手法治疗, 通过按摩推拿患者下肢肌肉尤其是足底屈肌和跖板复合体, 整复中附关节, 调整第一跖趾关节达到籽骨复位, 矫正拇外翻, 恢复其正常位置。

2 结果

32 足患者中, 26 足 (81.2%) 达到满意效果, 3 足 (9.4%) 基本满意, 3 足 (9.4%) 效果欠佳。18 例足外观较治疗前有明显改善, 2 例患者因足外观改善不明显, 主要是足部宽大, 而对治疗感到不满意。16 例患者没有明显疼痛及活动受限, 但仍有 4 例患者反映当行走超过 1 km 时会由于疼痛或第一跖趾关节导致的活动受限。

3 讨论

3.1 拇外翻的发病机制:一部分拇外翻是由于软组织的解剖关系紊乱、肌肉失衡所致^[1]。趾长伸肌和拇收肌对近节趾骨的肌性牵拉可导致跖骨头内侧受力和籽骨外侧不全脱位。一段时间后, 内侧关节囊延长, 外侧关节囊缩短, 外翻加剧。

3.2 拇外翻与韧带不稳定的关系:踝关节韧带包括联合韧带和内、外侧韧带。联合韧带维持胫腓骨之间的稳定^[2], 外侧韧带在外侧加固关节囊, 内侧韧带可抑制距骨外翻倾斜。这些韧带维持距关节和距下关节的稳定, 如果这些韧带走

形路径发生错误, 如踝关节慢性扭伤或韧带松弛等, 均可导致中足关节的不稳定^[3]。作为一个整体, 中足关节类似一个机械链, 连接着后足关节和前足关节, 中足关节变化会影响第一跖趾关节。第一跖趾关节的关节囊自身是由韧带、跖板复合体、跖籽韧带和趾籽韧带、拇展肌和拇收肌腱、趾短伸肌腱、拇短屈肌腱组成, 中足和后足的韧带位置正常影响前足位置的稳定。可以通过手法治疗或者手术治疗来恢复韧带的稳定, 最终调整前足韧带以改善拇外翻角度^[4]。

3.3 小角度拇外翻的治疗:拇外翻是指第一跖趾关节大拇趾外移, 病因多见于遗传或长时间穿高跟鞋导致第一趾受到不正常压力造成。研究发现一些小角度拇外翻可采用手法治疗的方式^[5], 而那些大角度和严重拇外翻则必须手术^[6]。

参考文献

[1] Easley ME, Kiezbak GM, Davis WH, et al. Prospective, randomized comparison of proximal crescentic and proximal chevron osteotomies for correction of hallux valgus deformity. *Foot Ankle Int*, 1996, 17 (6): 307-316.

[2] Göksel Karatepe A, Günaydin R, Adibelli ZH, et al. Foot deformities in patients with rheumatoid arthritis: the relationship with foot functions. *Int J Rheum Dis*, 2010, 13 (2): 158-163.

[3] Wu DY. Syndesmosis procedure: a non-osteotomy approach to metatarsus primus varus correction. *Foot Ankle Int*, 2007, 28 (9): 1000-1006.

[4] Kose O, Celiktas M, Kisin B, et al. Is there a relationship between forefoot alignment and ingrown toenail? A case-control study. *Foot Ankle Spec*, 2011, 4 (1): 14-17.

[5] Daniels SE, Golf M. Clinical efficacy and safety of tapentadol immediate release in the postoperative setting. *J Am Podiatr Med Assoc*, 2012, 102 (2): 139-148.

[6] Gantsoudes GD, Roocroft JH, Mubarak SJ. Treatment of talocalcaneal coalitions. *J Pediatr Orthop*, 2012, 32 (3): 301-307.

(收稿日期: 2013-05-10)
(本文编辑: 李银平)