

· 基础研究 ·

骶管注射对腰椎间盘突出症大鼠模型神经根局部炎症因子的影响

温优良¹, 李智², 梁兴森³, 杨波⁴

(1.广州市第一人民医院康复医学, 广东 广州 510180; 2.广州市南沙区黄阁医院, 广东 广州 510310; 3.广东省第二人民医院, 广东 广州 510317; 4.南方医科大学, 广东 广州 510515)

【摘要】 目的: 研究骶管注射对腰椎间盘突出症(LDH)大鼠模型神经根局部炎症因子的作用, 以明确骶管注射治疗 LDH 的作用机制。方法: 48 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(A 组), 模型组(B 组), 中药组(C 组)及西药组(D 组), 每组 12 只, 均作硬膜外腔置管处理, 除假手术组外, 其余各组采用复合压迫与炎性刺激两种因素予以造模。各组大鼠于术后第 3 天开始按 1 ml/kg 剂量标准给予硬膜外注药, A 组和 B 组用生理盐水, C 组给予 2%利多卡因+复方丹参注射液+生理盐水(2:2:16)混合液, D 组给予 2%利多卡因+醋酸曲安奈德注射液+生理盐水(2:2:16)混合液。隔 1 周 1 次, 共计 3 次。每注射 1 次 1 周后, 各取 4 只大鼠处死采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测其神经根局部肿瘤坏死因子(TNF- α)、前列腺素 E2(PGE2)、白介素 1(IL-1)和白介素 6(IL-6)。结果: 与 A 组比较, B 组造模区神经根组织内 TNF- α 、PGE2、IL-1 和 IL-6 的含量增高($P<0.01$)。C 组和 D 组造模区神经根组织内 PGE2、IL-1 和 IL-6 的含量较 B 组明显减少, 且 D 组比 C 组更明显($P<0.05$), 各组造模区神经根组织内 TNF- α 变化不明显。结论: 复合压迫与炎性刺激两种因素可以导致相应神经根组织内产生大量的致炎因子 TNF- α 、PGE2、IL-1 和 IL-6。骶管注射治疗通过有效减少神经根压迫区部分炎性介质 PGE2、IL-1 和 IL-6 含量而起作用, 且糖皮质激素作用比复方丹参注射液明显。

【关键词】 骶管注射; 椎间盘移位; 炎症因子; 大鼠, Sprague-Dawley

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2014.02.015

Effects of sacral canal injection on nerve root local inflammatory factors in rat model with lumbar disc herniation

WEN You-liang*, LI Zhi, LIANG Xing-sen, and YANG Bo. *Department of Rehabilitation Medicine, the First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To explore the effects of sacral canal injection on nerve root local inflammatory factors in rat model with lumbar disc herniation, in order to identify its mechanism of treatment. **Methods:** Forty-eight male SD rats were randomly divided into sham operation group (group A), model group (group B), Chinese medicine group (group C) and western medicine group (group D). There were 12 rats in each group. The model of lumbar disc herniation was established using compression and inflammatory stimulation in group B, C, D. All rats were given epidural catheterization and group A and B with physiological saline (1 ml/kg), group C with mixed liquor of 2% lidocaine and compound *Danshen* injections and physiological saline (2:2:16) and group D with mixed liquor of 2% lidocaine and triamcinolone acetonide injection and physiological saline (2:2:16), once a week for a total of three treatments. Four rats were killed every 1 week after injection for once, and the inflammatory factors of tumor necrosis factor (TNF- α), prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6) were detected by ELISA method. **Results:** The levels of TNF- α , PGE2, IL-1 and IL-6 in compressed nerve tissues in group B were increased than those of group A ($P<0.01$). The levels of PGE2, IL-1 and IL-6 in group C and D were decreased than those of group B, and group D was much less ($P<0.05$). There was no significant difference in level of TNF- α among group B, C, D ($P>0.05$). **Conclusion:** Compound compression with inflammatory stimulation can lead to massive release of inflammatory mediators, such as TNF- α , PGE2, IL-1 and IL-6. Both injection with compound *Danshen* injections and triamcinolone acetonide injections by sacral canal can reduce the levels of part inflammatory mediators (PGE2, IL-1 and IL-6), and the effect of Glucocorticoid is better than *Danshen* ($P<0.05$).

KEYWORDS Sacral canal injection; Intervertebral disk displacement; Inflammatory factors; Rat, Sprague-Dawley

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(2): 153-156 www.zggszz.com

基金项目: 广东省医学科研基金立项课题(编号: A2012137)

Fund program: Foundation of Medical Scientific Research by Guangdong Province (No. A2012137)

通讯作者: 温优良 E-mail: wliangliang2010@126.com

Corresponding author: WEN You-liang E-mail: wliangliang2010@126.com

骶管注射疗法就是将一定量的治疗药物经骶裂孔滴入或注入骶管内硬膜外腔来达到治疗目的的一种治疗方法,目前已被广泛应用于以腰椎管狭窄症和腰椎间盘突出症为代表的腰腿痛治疗。该疗法在取得较好临床疗效同时也显现出一些问题,为此本课题组先前进行了有关骶管注射药物配伍、糖皮质激素合理使用及注射体位摆放等方面基础研究^[1-3]。另外,为了更好地论证骶管注射或硬膜外腔注射对机体代谢等方面所产生的影响以指导临床治疗,笔者也进行了系列动物实验^[4-7]。以上系列研究的开展为规范骶管注射提供了较好的理论支持。一直以来,文献报道骶管注射治疗腰椎间盘突出症的临床疗效较佳,本课题组先前观测结果也证实了此观点^[8-9],但对其作用机制的研究不够深入,为此本项目就骶管注射疗法对大鼠模型神经根局部炎症因子 TNF- α 、PGE2、IL-1 和 IL-6 的相关作用进行了实验研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 健康成年雄性 SD 大鼠 48 只,由南方医科大学动物实验中心提供。合格证号:SCXK(粤)2012-0011,体重 250~300 g,由广东省实验动物监测所检测。按体重分层随机分为 4 组,假手术组(A 组),模型组(B 组),中药组(C 组)和西药组(D 组),每组 12 只。大鼠于造模手术前后进食普通饲料、自由饮水,在相对湿度 50%~70%、室温 20~25℃,光照周期昼夜对半的同等条件下饲养。

1.2 实验药剂及仪器 醋酸曲安奈德注射液(上海通用药业股份有限公司,批号 120503,1 ml:40 mg);盐酸利多卡因注射液(上海禾丰制药有限公司,批号 120503,5 ml:0.1 g);0.9%氯化钠注射液(上海百特医疗用品有限公司,批号 SO912096);丹参注射液(华北制药股份有限公司,批号 1106013,每支 10 ml);水合氯醛(天津市百世化工有限公司,批号 20100772)。ELISA 试剂盒(Endogen,美国)购自深圳晶美生物工程公司;酶标仪 Well Scan, MK-2352 型(芬兰);Thermo Micro 高速微量离心机(美国 Thermo 公司);微量可调移液器 4910 型(Eppendorf 德国);电子天平 BS200S-WE1 型(Sartorius 德国)。

1.3 动物造模 以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉(3.5 ml/kg)后,以 L₅ 棘突为中心取背部正中纵行切口,依次切开分离各组织层,并咬除 L₄、L₅ 棘突及右侧椎板、关节突和部分椎弓根等,显露右侧硬脊膜及右侧神经根神经节,采用铬制肠线环扎 L₄、L₅ 神经根,松紧度适宜。接着在鼠尾近根部纵行切开,分离显露 2 个椎间隙,横向切开纤维环取出髓核组织(约 0.4 mg)移植到右侧 L₄、L₅ 神经节周围,每个神经节

周围移植 2 个椎间盘的髓核组织。将 PE-0503 导管一端 8 mm 处打结,从 L₅ 半椎管切除向头侧置入硬膜外腔约 4 mm,用丝线固定,另一端经皮下隧道引到大鼠两耳间,封管固定。逐层缝合包扎,送动物室相同环境正常饲养,术后 3 d 给予青霉素肌注,4 万 U/d。假手术组,取尾部髓核组织但不将其置于暴露神经根部位,其余组操作同前^[10-11]。

1.4 注药方法 各组大鼠均于术后第 3 天通过外置硬膜外管腔按每次 1 ml/kg 剂量标准进行注药,A 组和 B 组给予生理盐水,C 组给予 2%利多卡因+复方丹参注射液+生理盐水(2:2:16)混合液,D 组给予 2%利多卡因+醋酸曲安奈德注射液+生理盐水(2:2:16)混合液。各组大鼠注药为每周 1 次,每次间隔 1 周,共连续注药 3 次。

1.5 取材与检测 4 组大鼠分别于每次用药处理后满 1 周,即第 2 周、第 3 周及第 4 周各取 4 只,过量麻醉处死后取神经根周围组织 0.3~0.5 g,-80℃冰箱保存。将各组冷冻的样本研磨成匀浆,经过萃取、离心等处理后获取上清液备用。

1.6 观察项目与方法 应用双抗体两步夹心酶联免疫吸附法测定各组大鼠神经根部位 TNF- α 、PGE2、IL-1 和 IL-6 的含量,具体操作步骤严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理,所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,同一时间点上不同组别两两比较采取 LSD 法(方差齐)或 Dunnett's T3 法(方差不齐),组间不同时间点两两比较采取 Bonferroni 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

造模大鼠于术后 1~2 h 清醒,未出现死亡,其切口在 6~8 d 愈合,未见明显感染征象。骶管注射用药后 1、2、3 周,与 A 组比较,造模 3 个组别的 TNF- α 、PGE2、IL-1 和 IL-6 的检测值明显上升,4 组间差异有统计学意义($P<0.01$),提示本项目采用大鼠自体髓核移植复合脊神经结扎的动物造模是成功的。与 B 组比较,C 组和 D 组均能够降低神经根局部炎症因子 PGE2、IL-1 和 IL-6 的含量,且用药第 3 周降低尤为明显,组间差异有统计学意义($P<0.01$),但对 TNF- α 的抑制作用不明显。D 组对 SD 大鼠神经根局部炎症因子 PGE2、IL-1 和 IL-6 的抑制作用优于 C 组(见表 1)

3 讨论

本项目通过向 SD 大鼠腰椎间盘突出模型的硬膜外腔/骶管注射不同药物,发现中药丹参注射液和西药醋酸曲安奈德注射液均能够降低其神经根局部

表 1 用药后不同时间各组大鼠神经根局部 TNF- α 、PGE2、IL-1 和 IL-6 的比较($\bar{x}\pm s$, ng/L)

Tab.1 Level of TNF- α , PGE2, IL-1 and IL-6 in nerve root locally at different times among different groups ($\bar{x}\pm s$, ng/L)

组别	鼠数 (只)	TNF- α			PGE2			IL-1			IL-6		
		1 周	2 周	3 周	1 周	2 周	3 周	1 周	2 周	3 周	1 周	2 周	3 周
A 组	4	18.7 \pm	15.45 \pm	4.56 \pm	54.2 \pm	50.8 \pm	48.9 \pm	49.5 \pm	45.1 \pm	38.4 \pm	78.1 \pm	70.2 \pm	50.0 \pm
		1.86	0.9	1.5	1.9	0.8	2.0	2.1	2.5	2.4	3.4	1.3	3.3
B 组	4	140.3 \pm	97.5 \pm	68.5 \pm	148.7 \pm	140.1 \pm	75.8 \pm	215.2 \pm	180.6 \pm	121.1 \pm	230.2 \pm	192.5 \pm	150.3 \pm
		1.8 [#]	1.1 [#]	2.2 [#]	2.1 [#]	0.5 [#]	1.6 [#]	3.2 [*]	5.2 [*]	2.4 [*]	1.8 [*]	2.6 [*]	2.6 [*]
C 组	4	135.6 \pm	91.8 \pm	60.6 \pm	45.8 \pm	40.9 \pm	34.8 \pm	188.2 \pm	155.4 \pm	91.7 \pm	180.6 \pm	156.5 \pm	98.7 \pm
		1.2	2.7	3.1	1.2 ^Δ	2.6 ^Δ	1.2 ^Φ	5.3 ^{*Φ}	4.8 ^{*Φ}	1.8 ^{*Φ}	2.2 ^{*Φ}	2.3 ^{*Φ}	3.5 ^{*Φ}
D 组	4	130.2 \pm	70.3 \pm	58.3 \pm	33.6 \pm	30.0 \pm	28.6 \pm	175.5 \pm	140.2 \pm	60.1 \pm	170.2 \pm	140.5 \pm	75.3 \pm
		2.7	3.1 [*]	3.2 [*]	0.8 ^{Φ*}	2.3 ^{Φ■}	0.6 ^{Φ■}	2.1 ^{*Φ■}	2.9 ^{*Φ■}	3.2 ^{*Φ*}	1.6 ^{*Δ}	2.8 ^{*Φ■}	2.6 ^{*Φ■}

注:与 A 组比较, [#]F=6.81, P<0.05; ^{*}F=9.38, P<0.01。与 B 组比较, ^ΔF=10.65, P<0.05; ^ΦF=7.68, P<0.01。C 组与 D 组间比较, ^{*}F=11.72, P<0.05; [■]F=13.34, P<0.01

Note: Compared with group A, [#]F=6.81, P<0.05; ^{*}F=9.38, P<0.01. Compared with group B, ^ΔF=10.65, P<0.05; ^ΦF=7.68, P<0.01. Comparison between group C and D, ^{*}F=11.72, P<0.05; [■]F=13.34, P<0.01

炎症因子 PGE2、IL-1 和 IL-6 的含量, 西药的抑制作用比中药更为明显且用药第 3 周降低尤为明显, 但对 TNF- α 的抑制作用均不明显。

3.1 骶管注射疗法对腰椎间盘突出症的作用 腰椎间盘突出症导致腰腿痛的原因, 目前比较公认的有化学性神经根炎学说、自身免疫学说及机械压迫学说 3 种。有研究报道手术时对周围有炎症的神经根给予极轻微的刺激, 患者即可出现明显的放射痛, 而对于正常的神经根哪怕给予更强的刺激却没有这种反应, 表明只有在化学性神经根炎形成的基础上使窦椎神经末端的伤害感受器易化为极敏感, 或者炎症介质 TNF- α 、PGE2、IL-1 和 IL-6 等直接导致其电生理变化后, 即便轻微的机械压迫也能够致痛^[12]。由此可见, 神经根局部炎症因子在腰椎间盘突出症致痛方面起关键作用。目前, 对于骶管注射疗法治疗腰椎间盘突出症所致腰腿痛作用机制主要有液压分离、淡化炎性介质的浓度、改善微循环及营养神经等几种学说, 这些学说多从骶管注射高渗药液脱水作用及所注射有关药物的药理作用所推论得出。本研究通过造模动物在体实验回答了骶管注射疗法治疗腰椎间盘突出症的作用机制之一, 就是通过抑制神经根局部炎症因子 PGE2、IL-1 和 IL-6 的含量, 阻断“疼痛→小血管平滑肌紧张和肌紧张→炎症因子聚集→疼痛加剧”的恶性循环, 达到治疗目的。

3.2 腰椎间盘突出症患者神经根局部炎症因子 TNF- α 、PGE2、IL-1 和 IL-6 表达的意义 既往对于腰椎间盘突出症患者神经根局部炎症因子的研究, 多以手术取出的腰椎间盘突出标本与正常的腰椎间盘突出进行对比研究^[13], 该研究的优势就是可以按照临床分型(膨隆型、突出型及脱垂型或游离型等)进行, 比较贴切临床及影像学运用, 所得出的研究结果也论证

了神经根局部炎症因子在腰椎间盘突出症致痛方面起关键作用, 尤其是脱垂型或游离型中炎症因子更起着主导地位。有体外培养实验证明髓核组织产生 PGE2、IL-1 和 IL-6, 进而刺激炎症细胞的聚集, 激活炎症介质的释放等, 是炎症形成的关键因子, 该作用可以被倍他米松所抑制。然而, 体内实验研究发现糖皮质激素仅可抑制 IL-1 β , 对 IL-1 α 及 TNF- α 的作用不明显^[14-15]。本项目研究也佐证了此观点, 进一步说明了骶管注射疗法或硬膜外腔阻滞术中起关键作用的是糖皮质激素, 这也支持了笔者先前的临床疗效分组对比观测结果^[9]。TNF- α 是强有力的炎症细胞因子, 可以刺激产生 PGE2、IL-1、IL-6 和 IL-8 等其他细胞因子, 也可以上调金属蛋白酶的基因表达和活性及减低蛋白聚糖和胶原的合成等, 其表达水平与腰椎间盘突出类型有关, 即炎症反应与外层纤维环的完整性相关。既然糖皮质激素对 TNF- α 抑制作用不明显, 笔者是否可以通过研究发现其他 TNF- α 抑制剂来阻断腰椎间盘突出症所致腰腿痛? 这也提醒笔者如果仅仅应用单一的某种抗促炎因子的药物或许不能完全缓解临床症状, 但它可以有针对性地起到一定的协同治疗作用。本研究提示临床医生执行骶管注射腰椎间盘突出症时, 应该选择影像学提示外层纤维环完整(膨隆型、突出型)的病例进行, 药物选择以糖皮质激素为主, 并且最好坚持连续 3 周的注射。糖皮质激素可促进炎性介质吸收, 改善神经根淤血状态, 同时抑制炎性渗出, 减轻神经根无菌性炎症水肿和减轻细胞损伤; 从而阻断炎症介质对软组织的进一步损伤, 来降低神经根的敏感性, 最终就算神经根压迫尚未解除的情况下也会促使神经功能不同程度的恢复。

3.3 腰椎间盘突出症新模型的制备及研究展望

在机械压迫学说占主导地位的年代, 腰椎间盘突出症动物模型的设计多数采用外源介入压迫模拟突出的椎间盘; 此后随着学科发展认识的更新, 出现了非压迫性腰椎间盘突出动物模型的建立。从上述分析可知, 任何单一因素所施造模并不符合疾患实际病理变化, 为此笔者复合采用压迫(结扎神经根)与炎性刺激(髓核移植)两种因素予以造模更符合病患实际。大鼠无骶骨, 本项目关于骶管注射方面的研究只能采用腰部硬膜外腔注射的方式代替。虽说骶管注射实质上就是腰部低位硬膜外腔麻醉的一种, 或许笔者选择羊、兔子等更大型的动物造模并直接进行骶管注射而非硬膜外腔注射, 会更有说服力。另外, 目前已知的腰椎间盘突出症神经根局部细胞因子和炎症介质除本项目所研究的 TNF- α 、PGE2、IL-1 和 IL-6 外, 还有基质金属蛋白酶、磷脂酶 A2、一氧化氮及转化生长因子等, 所以今后笔者可以对其余炎症因子或对突出椎间盘组织的免疫源性和免疫复合物进行深入研究。

参考文献

[1] 温优良, 梁兴森, 林吕, 等. 骶管注射疗法的药物配伍稳定性研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(4): 810-812.
Wen YL, Liang XS, Lin L, et al. Stability of compatibility of drug used in sacral injection[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010, 30(4): 810-812. Chinese.

[2] 温优良, 李义凯, 梁兴森, 等. 糖皮质激素在骶管注射疗法中的配伍稳定性[J]. 颈腰痛杂志, 2010, 31(6): 407-410.
Wen YL, Li YK, Liang XS, et al. Stability of compatibility of glucocorticoid used in sacral injection[J]. Jing Yao Tong Za Zhi, 2010, 31(6): 407-410. Chinese.

[3] 陈泽群, 李义凯, 王荣春. 骶管注射术后患者体位对其临床疗效的影响[J]. 海南医学, 2012, 23(5): 31-33.
Chen ZQ, Li YK, Wang RC. Effect of patient positioning on the outcome of caudal epidural injections[J]. Hai Nan Yi Xue, 2012, 23(5): 31-33. Chinese.

[4] 杨波, 杜春晓, 李义凯, 等. 硬膜外腔注射不同浓度泼尼松对大鼠血糖、血脂及股骨头形态学的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(2): 174-176.
Yang B, Du CX, Li YK, et al. The effects of epidural different concentrations of prednisone injection on the blood glucose and blood lipids and morphology of femoral head in rats[J]. Guang Dong Yi Xue, 2012, 33(2): 174-176. Chinese.

[5] 杨波, 杜春晓, 李义凯. 硬膜外腔注射碱化溶液对大鼠神经根功能和组织学影响[J]. 颈腰痛杂志, 2012, 33(3): 170-173.
Yang B, Du CX, Li YK. Effects on function and histology of nerve root in rats with epidural injection by alkaline solution[J]. Jing Yao Tong Za Zhi, 2012, 33(3): 170-173. Chinese.

[6] 杜春晓, 杨波, 李义凯, 等. 硬膜外腔药物注射对大鼠股骨头的

形态学影响[J]. 颈腰痛杂志, 2011, 32(5): 328-330.
Du CX, Yang B, Li YK, et al. The effects of epidural drug injection on the morphology of femoral head in rats[J]. Jing Yao Tong Za Zhi, 2011, 32(5): 328-330. Chinese.

[7] 杜春晓, 杨波, 李义凯, 等. 硬膜外腔药物注射对大鼠肾上腺皮质功能的影响[J]. 颈腰痛杂志, 2011, 32(6): 403-406.
Du CX, Yang B, Li YK, et al. The effects of epidural drug injection on adrenocortical function of rats[J]. Jing Yao Tong Za Zhi, 2011, 32(6): 403-406. Chinese.

[8] 温优良, 梁兴森, 陈先武, 等. 骶管注射配合强刺激推拿手法治疗腰椎间盘突出症的疗效观察[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(6): 457-459.
Wen YL, Liang XS, Chen XW, et al. Clinical and trial study on the treatment of lumbar disc protrusion with sacral injection therapy and strong stimulation manipulation[J]. Zhonghua Wu Li Yi Xue Yu Kang Fu Za Zhi, 2012, 34(6): 457-459. Chinese.

[9] 温优良, 梁兴森, 陈先武, 等. 腰椎间盘突出症的骶管注射疗法[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2011, 19(3): 17-20.
Wen YL, Liang XS, Chen XW, et al. Sacral injection therapy treating lumbar disc protrusion[J]. Zhongguo Zhong Yi Gu Shang Ke Za Zhi, 2011, 19(3): 17-20. Chinese.

[10] Sasaki N, KiKuchi S, Kono S, et al. Anti-TNF- α antibody reduces pain-behavioral changes induced by epidural application of nucleus pulposus in a rat model depending on the timing of administration[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2007, 32(4): 413-416.

[11] 李智斌, 袁善卫, 朱超. 丹镁合剂对兔腰间盘突出症模型动物血清 IgG、IgM 的影响[J]. 中国骨伤, 2009, 22(10): 773-775.
Li ZB, Yuan PW, Zhu C. Effect of the mixed liquor of danshen (丹参) and magnesium sulfate injection on IgG and IgM in serum of rabbits with lumbar intervertebral disc herniation[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2009, 22(10): 773-775. Chinese with abstract in English.

[12] Kato T, Haro H, Komori H, et al. Sequential dynamics of inflammatory cytokine angiogenesis inducing factor and matrix degrading enzymes during spontaneous restoration of the herniated disc[J]. J Orthop Res, 2004, 22(4): 895-900.

[13] Haro H, Komori H, Kato T, et al. Experimental studies on the effects of recombinant human matrix metalloproteinase's on herniated disc tissues how to facilitate the natural resorption process of herniated disc[J]. J Orthop Res, 2005, 23(2): 412-419.

[14] 李盛华, 王久夏, 张佳红. 腰椎间盘突出症疼痛的免疫学理论探讨[J]. 中国骨伤, 2009, 22(4): 316-318.
Li SH, Wang JX, Zhang JH. Immunologic theory investigation and discussion of pain cause by lumbar intervertebral disc herniation (LDH)[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2009, 22(4): 316-318. Chinese with abstract in English.

[15] Kobayashi S, Meir A, Urban J. Effect of cell density on the rate of glycosaminoglycan accumulation by disc and cartilage cells in vitro[J]. J Orthop Res, 2008, 26(4): 493-503.

(收稿日期: 2013-09-04 本文编辑: 王宏)