

基础研究

人髓核软骨样细胞的生物学特性观察

张荣峰, 阮狄克, 张 超, 辛洪奎

(海军总医院骨科 100037 北京市)

【摘要】目的:探讨人髓核软骨样细胞的生物学特性,为组织工程椎间盘种子细胞的选取提供依据。**方法:**髓核组织取材于 3 例脊柱侧凸行前路矫形手术者(年龄 11~13 岁),依次用 0.25%胰蛋白酶和 0.2%Ⅱ型胶原酶分离髓核细胞,用含 10%胎牛血清(FBS)的 F12 培养液培养细胞,取传 1~7 代次细胞进行光镜、电镜检查,观察细胞形态学改变,对细胞计数、二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)摄取进行比较,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定细胞的聚集蛋白聚糖(Aggrecan)、Ⅰ型和Ⅱ型胶原蛋白信使 RNA(mRNA)的表达情况。**结果:**体外培养条件下,传 3 代之前的细胞形态正常,胞浆丰富;传 4 代起,部分细胞的形态逐渐向长梭形演化。与传 1 代细胞相比,传 2、3 代细胞数量增殖无明显减缓($P>0.05$),传 4 代细胞第 4 天开始生长减慢($P<0.05$),传 5~7 代细胞第 2 天即较传 1 代细胞数量明显减少($P<0.05$)。传 1~3 代细胞的 MTT 摄取吸光度值差异无统计学意义($P>0.05$),和传 1 代相比,传 4 代具有统计学差异($P<0.05$),传 5~7 代的差异更显著($P<0.01$)。聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原在传 3 代之前各代次的 mRNA 表达量间无统计学差异($P>0.05$),和传 1 代相比,Ⅱ型胶原从第 4 代起表达量显著下降($P<0.05$),聚集蛋白聚糖从第 5 代起表达量显著下降($P<0.05$),而从传 5 代起髓核软骨样细胞开始表达Ⅰ型胶原。**结论:**髓核细胞传代后前 3 代细胞形态良好,增殖能力强,聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原 mRNA 表达良好,适合作为组织工程椎间盘的种子细胞。

【关键词】髓核;细胞培养;聚集蛋白聚糖;Ⅱ型胶原;Ⅰ型胶原;组织工程

中图分类号:R361,R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-11-0870-05

Research on biological characteristics of human chondrocyte-like cells in nucleus pulposus/ZHANG Rongfeng, RUAN Dike, ZHANG Chao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(11): 870~874

【Abstract】Objective: To investigate the biological characteristics of human chondrocyte-like cells in nucleus pulposus(NP) so as to lay the ground for selecting the seed-cells for the purpose of tissue engineering intervertebral disc. **Method:** NP specimens were obtained from anterior surgical procedures performed on 3 donors with idiopathic scoliosis (aged 11-13 years). NP cells were isolated from NP tissue by 0.25% pronase and 0.2% type II collagenase independently and cultured in F12 containing 10% FBS. After passaging for 1-7 generations, the cellular morphology was observed by light and electron microscope, the growth counting and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) test were tested parallelly. The message RNA (mRNA) expression of type I, II collagen were assayed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. **Result:** Cultured in vitro, cells before passage 3st had normal morphology and abundant cytoplasm. Some cells evolved into a long-spindle shape gradually from passage 4th. Growth counting assay showed that the quantity of passage 2th and 3th didn't decreased obviously compared with passage 1st ($P>0.05$). Cells of passage 4th began to growth slowly after 4 days ($P<0.05$). The quantity of passage 5-7th cells decreased significantly after 2 days ($P<0.05$). MTT showed there was no difference with respect to optical density at passage 1-3th, however statistical significance existed between passage 4th and passage 1st ($P<0.05$), especially between passage 5-7th and passage 1st ($P<0.01$). RT-PCR showed the mRNA expression of aggrecan and type II collagen before passage 3th didn't have statistical significance ($P>0.05$). Compared with passage 1st, the expression of type II collagen decreased significantly from passage 4th ($P<0.05$) and aggrecan decreased significantly from passage 5th ($P<$

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30730095)

第一作者简介:男(1977-),医学硕士,主治医师,研究方向:脊柱外科

电话:(010)66958520 E-mail:zhangrongfeng200@163.com

0.05).The expression of type I collagen began to visualize from passage 5th.**Conclusion:**The NP cells before passage 3th can act as seed-cells for tissue-engineering intervertebral disc for their better morphology, powerful proliferation and mRNA expression of type II collagen and aggrecan.

【Key words】 Nucleus pulposus; Cell culture; Aggrecan; Collagen II; Collagen I; Tissue engineering

【Author's adress】 Department of Orthopaedic Surgery, Navy General Hospital, Beijing, 100037, China

椎间盘退变是引起腰痛的主要原因之一。椎间盘组织一旦出现退变,很难逆转。通过体外构建组织工程椎间盘的方法治疗椎间盘退行性疾病已经成为目前脊柱领域研究的新方向^[1]。人髓核细胞是组织工程椎间盘种子细胞的主要来源之一,但体外培养条件下,细胞会随着传代次数的增多出现“去分化”现象,因此,种子细胞的选择必须有一定的代次限制。我们通过对人髓核软骨样细胞进行体外培养和生物学特性观察,比较不同代次髓核细胞的形态学、增殖特性,以及细胞的主要细胞外基质成分基因表达情况,从而为种子细胞的选择提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和组织来源

HAM'S/F12 培养液、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(HyClone 公司), II 型胶原酶(Gibco 公司),二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)(Sigma 公司),培养瓶、培养板(Costar),引物合成(北京奥科生物技术公司),Trizol 试剂(Gibco 公司),逆转录试剂盒(Promega 公司),倒置相差显微镜(Olympus, Japan),透射电子显微镜(JEOL-1230 型),酶标仪(Elx800, USA),聚合酶链反应(PCR)仪(MJ, USA),电泳仪(Bio-Rad, USA)。

人髓核组织取自 3 例因脊柱侧凸行前路矫形手术者,年龄 11~13 岁,分别取自 T6/7、T7/8 和 T9/10 椎间盘(每例只取一个椎间盘),术前 MRI 检查证实实验用椎间盘信号与正常椎间盘信号一致。取材时严格无菌操作,均在取材后 2h 内进行分离培养。

1.2 细胞分离与培养

取得椎间盘组织后,立即在超净工作台内去除纤维环及交界区组织,保留髓核组织,将每例髓核组织分别用 PBS 液冲洗后剪成碎块,用 0.25% 的胰蛋白酶 37℃ 消化 20min, 1000r/min 离心 5min, 去上清液,用 0.2% 的胶原酶 37℃ 消化 4h,

1000r/min 离心 5min, 弃上清液,用含 10% FBS 的 F12 培养液悬浮细胞,台盼蓝染色,用计数板进行细胞计数。以 2×10^4 个细胞/ml 接种在培养瓶中,置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。隔 2~3d 换含 10% FBS 的 F12 培养液,细胞生长达 80% 融合后,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。实验用传 1~7 代次细胞。

1.3 细胞形态及电镜观察

每日在倒置显微镜下观察不同代次髓核软骨样细胞的形态、生长情况,每代细胞在培养后 5~7d,细胞融合达 80% 时用细胞刮刀刮取细胞,常规透射电镜制样处理,电镜下观察细胞超微结构。

1.4 细胞计数

每代髓核细胞在培养后 5~7d,细胞融合达 80% 时用 0.25% 的胰蛋白酶消化,用含 10% FBS 的 F12 培养液悬浮细胞,用计数板对细胞进行计数后得出细胞密度,取出一定量细胞,用含 10% FBS 的 F12 培养液调整密度为 1×10^4 个/ml,接种于 24 孔培养板,每例标本每代细胞接种 42 孔,每孔 0.5ml,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,隔日换含 10% FBS 的 F12 培养液。每天取 6 孔细胞,接连取 7d,用 0.25% 胰蛋白酶消化后计数。

1.5 MTT 摄取实验

对于传 1~7 代次细胞,每代细胞融合达 80% 时,0.25% 的胰蛋白酶消化、含 10% FBS 的 F12 培养液悬浮细胞后,同上法调整密度为 1×10^4 个/ml,接种于 96 孔培养板,每例标本每代细胞接种 6 孔,每孔 0.1ml,置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,48h 后每孔内加入 MTT 20μl,继续孵箱内培养,4h 后移除培养液,每孔加入 DMSO 100μl,振荡 10min,于酶标仪 490nm 波长下测定各孔的吸光度值。

1.6 细胞外基质成分 mRNA 表达测定

每代髓核细胞达 80% 融合后,按照 Gibco 公司 Trizol 试剂一步法说明,分别提取每代髓核细胞的总 RNA,紫外分光光度仪测定其纯度与浓度。取 2μg 总 RNA,按照逆转录试剂盒说明,用禽

类成髓细胞瘤病毒(AMV)逆转录酶进行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),每例标本每代细胞分装 6 个 PCR 管,分别扩增聚集蛋白聚糖(Aggrecan)和 I、II 型胶原基因,以磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参物。

引物设计参照文献^[2],序列如下:GAPDH 上游 5'-TCACCATCTTCCAGGAGCGA-3',下游 5'-CACAATGCCGAAGTGCTCGT-3'; I 型胶原上游 5'-TCTGCCCCGTGGGCTTATGA-3',下游 5'-CATTGCCTTTGATTGCTGGG-3'; II 型胶原上游 5'-ATGACAATCTGGCTCCCAAC-3',5'-GAACCTGCTATTGCCCTCTG-3';聚集蛋白聚糖上游 5'-AGACAGTGACCTGGCCTGAC-3',下游 5'-TGCCCTCTCCAGTCTCATTC-3'。

PCR 的反应条件均为:94℃ 1min,然后热循环:94℃ 45s,55℃ 45s,72℃ 45s,循环 30 次,最后 72℃延伸 5min。PCR 产物在 0.8%琼脂糖凝胶中电泳,电泳图片用 IBAS 2.5 图像处理系统分析,以聚集蛋白聚糖和 I、II 型胶原 mRNA 吸光度与 GAPDH 吸光度的比值作为其相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件进行处理,实验结果用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。结果分析采用 One-Way ANOVA 方法,将传 2~7 代细胞与传 1 代细胞进行比较。 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 形态学观察

获取的髓核组织与纤维环内层界限明显,呈半透明胶冻状,含水量丰富,台盼蓝染色活性细胞数 92%。

初消化的髓核软骨样细胞需 6~7d 贴壁,光

镜下观察初贴壁时细胞呈短梭形、多角形,胞质向外伸突,然后突起逐渐伸长,经 8~12d 达亚融合状态后呈漩涡状或火焰状的细胞团,胞质丰富,具有折光性,有一个较大的卵圆形核,轮廓清晰,可见 1~3 个核仁。与原代细胞相比,细胞传代后贴壁时间明显缩短,均于 4h 即可见大部分细胞贴壁。传 2、3 代细胞形态与原代细胞相似,但细胞的胞突略有伸长(图 1,后插页 III)。从传 4 代起,生长逐渐趋缓,细胞突起逐渐延长,向梭形演化,胞质逐渐减少,折光性降低(图 2,后插页 III)。传 6、7 代时大部分细胞演化为长梭形,生长滞缓,即出现老化现象(图 3,后插页 III)。

透射电镜下观察髓核软骨样细胞传代后,前 3 代细胞内胞浆丰富,有丰富的线粒体、粗面内织网和游离核糖体,核大圆形,核仁明显(图 4,后插页 III),传 4 代时可见胞浆内线粒体减少,粗面内织网轻度扩张(图 5,后插页 III)。随着传代次数的增多,髓核细胞内的细胞器明显减少,胞浆内出现空泡,内织网明显扩张(图 6,后插页 III)。

2.2 细胞计数

体外培养条件下,细胞传代接种后,每代细胞的每日细胞数量逐渐增加,但生长平缓,第 4 天起快速生长,细胞数量明显增加,到第 6 天细胞生长再次减缓。每天细胞计数与传 1 代细胞相比,传 2、3 代细胞增殖数量无明显减少($P>0.05$),传 4 代细胞第 4 天开始出现生长减慢($P=0.027$),传 5~7 代细胞均在接种后第 2 天即出现细胞数量较传 1 代明显减少,差异有显著性($P<0.05$ 或 0.01)(表 1)。

2.3 MTT 摄取实验

髓核软骨样细胞 MTT 摄取实验,传 1~3 代细胞的吸光度值分别为 0.186 ± 0.015 、 0.179 ± 0.013 、 0.154 ± 0.018 ,差异无显著性;传 4 代细胞的吸光

表 1 传 1~7 代次髓核软骨样细胞计数结果 ($\bar{x}\pm s, n=18$)

培养时间	细胞计数(个/ml)						
	传 1 代	传 2 代	传 3 代	传 4 代	传 5 代	传 6 代	传 7 代
1d	4333±290	4358±323	4262±577	4354±188	4228±289	4075±346	3802±216
2d	8835±764	8646±642	8176±1040	7832±867	6503±503 ^①	5892±753 ^①	4175±2473 ^②
3d	12839±1273	12547±1368	12440±2752	12093±1385	9166±763 ^①	8473±557 ^①	5505±1324 ^②
4d	25671±2027	24649±1593	22128±2366	19482±1256 ^①	12333±1157 ^②	11398±1042 ^②	7167±1263 ^②
5d	31374±2355	30476±1846	28678±2562	25375±1742 ^①	17186±1534 ^②	14697±1475 ^②	7839±1064 ^②
6d	59873±1775	55978±2264	53330±2085	41761±1587 ^②	24179±2470 ^②	18513±1263 ^②	9674±1302 ^②
7d	62677±2141	58854±2360	57506±2174	49366±2264 ^②	27834±1787 ^②	21579±1584 ^②	9972±1044 ^②

注:与传 1 代比较,① $P<0.05$,② $P<0.01$

度值为 0.132 ± 0.011 , 和传 1 代相比有显著性差异 ($P < 0.05$); 传 5~7 代细胞的吸光度值分别为 0.085 ± 0.006 、 0.071 ± 0.014 、 0.044 ± 0.015 , 差异更加显著 ($P < 0.01$), 说明髓核软骨样细胞传 3 代前细胞活性高, 具有良好的增殖能力, 传 4 代细胞的增殖活性开始降低, 传 5~7 代细胞的增殖活性降低更明显。

2.4 各代次髓核细胞主要细胞外基质相关基因表达情况

髓核软骨样细胞主要表达聚集蛋白聚糖和 II 型胶原, 根据光密度比值分析, 二者在传 3 代之前各代次间的 mRNA 表达量无显著性差异 ($P > 0.05$); 和传 1 代相比, II 型胶原从第 4 代起表达量显著下降 ($P < 0.05$), 聚集蛋白聚糖从第 5 代起表达量显著下降 ($P < 0.05$), 并随传代次数的增多, 表达量下降更显著 ($P < 0.01$); 而从传 5 代起髓核软骨样细胞开始少量表达 I 型胶原 (表 2)。

表 2 各代次髓核软骨样细胞主要细胞外基质相关基因 mRNA 的相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=18$)

	II 型胶原/ GAPDH	聚集蛋白聚糖/ GAPDH	I 型胶原/ GAPDH
传 1 代	1.593 ± 0.024	0.892 ± 0.038	0
传 2 代	1.587 ± 0.018	0.855 ± 0.021	0
传 3 代	1.371 ± 0.029	0.751 ± 0.025	0
传 4 代	0.850 ± 0.016^{①}	0.748 ± 0.023	0
传 5 代	0.652 ± 0.023^{②}	0.527 ± 0.014^{①}	0.128 ± 0.016^{①}
传 6 代	0.274 ± 0.015^{②}	0.438 ± 0.008^{②}	0.405 ± 0.011^{②}
传 7 代	0.245 ± 0.009^{②}	0.166 ± 0.012^{②}	0.357 ± 0.006^{②}

注: 与传 1 代细胞比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$

3 讨论

椎间盘髓核和纤维环内的细胞数量均很少, 细胞外基质丰富^[1]。在胚胎期和 10 岁前的小儿髓核组织内有脊索细胞和软骨样细胞。出生后脊索细胞逐渐减少, 正常人 10 岁以后消失, 完全被软骨样细胞取代^[2]。本研究髓核组织取材于 10~13 岁少儿, 细胞形态及表型表达均与软骨样细胞一致。从组织分离后原代细胞的贴壁时间需 6~7d, 需要如此长的贴壁时间在其他组织器官原代细胞培养中尚未见报道, 这可能与椎间盘细胞较低的生理代谢水平有关。

正常髓核组织呈凝胶样, 含水量可达 80%。由于人正常髓核组织取材困难, 而胎儿标本又受伦理限制, 本研究取材于脊柱侧凸患儿, 与退变髓

核比较, 本研究髓核组织 MIR 检查与正常髓核组织信号等同, 标本呈凝胶样, 含水量丰富, 无纤维样变, 根据椎间盘退变评分系统^[4], 可以作为正常的髓核组织。本研究显示, 传 3 代之前的细胞主要表达聚集蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白, 这与文献报道的正常髓核细胞的细胞外基质成分^[5]相一致。聚集蛋白聚糖是蛋白聚糖的主要形式, 大量存在于 II 型胶原蛋白组成的网状结构中, 在吸收水分方面发挥重要作用。正是髓核的这种特殊结构, 使其具有独特的粘弹特性, 从而在承受和吸收脊柱的压力方面发挥重要作用^[4]。

因椎间盘系无血管组织, 营养的供给主要通过组织间的弥散和渗透^[6], 并且髓核细胞自我修复的能力低, 较纤维环细胞更容易丢失细胞外基质成分^[7], 随着年龄的增长极易发生退变。椎间盘退变的主要机制首先是椎间盘内髓核细胞逐渐衰老、凋亡, 并导致细胞外基质的化学成分和结构改变^[8], 直接的变化是髓核细胞表达的蛋白聚糖和 II 型胶原的减少, I 型和 III 型胶原增多, 逐渐呈纤维样变化, 丧失粘弹特性, 这种变化与退变程度正相关^[9]。本研究提示多次传代后的髓核软骨样细胞, 聚集蛋白聚糖和 II 型胶原基因表达明显减少, 而且出现 I 型胶原的表达, 说明髓核细胞多次传代后出现与退变髓核细胞相似的基因表达变化。由于细胞外基质是由细胞产生和维持的, 所以这种成分和结构的改变必然由细胞本身的信号转导、蛋白和表型表达发生变化所致, 引起这种变化的机制尚不完全清楚, 细胞数量减少的原因主要是细胞的衰老、死亡, 其中凋亡是细胞死亡的一种重要形式^[10]。

椎间盘不具备自我修复能力, 对于椎间盘退变性疾病, 传统外科治疗方法是髓核切除术和脊柱融合术, 虽然确实能有效缓解疼痛, 但存在术后椎间隙变窄并继发腰椎不稳、椎管狭窄、退行性小关节炎以及相邻节段椎间盘退变加速等问题^[11]。

20 世纪末人们开始研究椎间盘置换技术在临床应用的可能, 阮狄克等^[12]在同种异体椎间盘移植基础研究的基础上已初步应用于临床, 结果表明异体椎间盘移植后可以存活, 并发挥一定的生理功能。虽然人工椎间盘和人工髓核假体已用于临床治疗^[13], 但因椎间盘组织结构和功能的复杂性, 其效果有待临床进一步观察。

随着近二十余年来组织工程学的创建与发

展,利用生物相容性良好的多孔材料作为支架,将椎间盘细胞种植于支架内,模仿机体的三维生存环境,促进细胞表型的表达,形成组织工程椎间盘,是近几年来研究的新方向。组织工程椎间盘既能维持节段稳定性又能保持节段的活动性,重建了病变椎间盘的解剖和功能,可以避免邻近椎间盘应力过度增加,从而减少了相邻椎间盘的退变,其广阔的发展空间和巨大的应用前景得到了学者的认可和重视^[14]。

目前用作组织工程椎间盘研究的种子细胞主要来源于体外培养的髓核细胞,退变的髓核细胞持续增殖能力低,更容易衰老、凋亡,并且主要细胞外基质基因表达的成分发生了改变^[8],不适合作为种子细胞。正常髓核细胞增殖能力强,能够表达正常的表型,并且 mRNA 的表达量高,适合作为组织工程椎间盘研究的种子细胞。但体外培养条件下,细胞随着传代次数的增多出现“去分化”现象(又称“老化”现象)，“去分化”现象主要表现为细胞的基因表达发生改变^[15],因此种子细胞的选择必须有一定的代次限制。本研究提示,髓核细胞体外传代过程中,传 4 代时细胞的聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原基因表达明显较原代减少,传 5 代时不仅细胞增殖能力降低,而且出现Ⅰ型胶原的表达,说明细胞出现老化现象,表型表达发生改变,因此不宜作为组织工程椎间盘研究的种子细胞。而传代后前 3 代细胞形态良好,增殖能力强,并且表型表达稳定,适合作为组织工程椎间盘的种子细胞。

4 参考文献

1. Sato M, Kikuchi M, Ishihara M, et al. Tissue engineering of the intervertebral disc with cultured annulus fibrosus cells using atelocollagen honeycombshaped scaffold with a membrane seal (ACHMS scaffold) [J]. Med Biol Eng Comput, 2003, 41 (3): 365-371.
2. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Immortalization of human nucleus pulposus cells by a recombinant SV40 adenovirus vector [J]. Spine, 2004, 29 (14): 1515-1523.
3. Poiradeau S, Monteiro I, Anract P, et al. Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells: comparison with cartilage cells from the same animals [J]. Spine, 1999, 24 (9): 837-844.
4. Sive J, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs [J]. J Clin Pathol: Mol Pathol, 2002, 55 (2): 91-97.
5. Halloran D, Grad S, Stoddart M, et al. An injectable cross-linked scaffold for nucleus pulposus regeneration [J]. Biomaterials, 2008, 29 (4): 438-447.
6. Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ, et al. Studies of human intervertebral disc cell function in a constrained in vitro tissue culture system [J]. Spine, 2004, 29 (11): 1187-1195.
7. Cs-Szabo G, Ragasa-San JD, Turumella V, et al. Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the annulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration [J]. Spine, 2002, 27 (20): 2212-2219.
8. Modic M, Ross J. Lumbar degenerative disk disease [J]. Radiology, 2007, 245 (1): 43-61.
9. 赵勇, 王文波, 李吉友, 等. 骨形态发生蛋白-2 与椎间盘细胞 Sox-9 和Ⅱ型胶原基因的调控关系 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15 (10): 612-615.
10. Horner H, Roberts S, Bielby R, et al. Cells from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system on matrix expression and cell phenotype [J]. Spine, 2002, 27 (10): 1018-1028.
11. Yorimitsu E, Chiba K, Toyama Y, et al. Long-term outcomes of standard discectomy for lumbar disc herniation: a follow-up study of more than 10 years [J]. Spine, 2001, 26 (6): 652-657.
12. 阮狄克, 何勃, 侯黎升, 等. 颈椎间盘移植的临床研究 [J]. 脊柱外科杂志, 2003, 1 (1): 11-13.
13. Ray CD. The PDN prosthetic disc-nucleus device [J]. Eur Spine, 2002, 11 (Suppl 2): 137-142.
14. Hirokazu M, Amit K, Charles A, et al. Tissue-engineering composites of annulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement [J]. Spine, 2004, 29 (12): 1290-1298.
15. Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, et al. Human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype [J]. Spine, 2005, 30 (24): 2743-2748.

(收稿日期: 2008-06-12 修回日期: 2008-09-16)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)