

基础研究

周期性牵张应力对人退变髓核细胞增殖的影响

马信龙, 杨 召, 孙晓雷, 李秀兰, 马剑雄, 张 杨, 郭 悦

(天津医院骨科 300211 天津市)

【摘要】目的:观察周期性牵张应力对体外培养的人退变髓核细胞增殖的影响,为椎间盘退变的预防与治疗提供新的理论依据。**方法:**对体外培养的人退变髓核细胞利用甲苯胺蓝、番红 O 和 II 型胶原免疫细胞化学染色进行鉴定,并将 P3 代细胞接种于弹性膜片上,待贴壁后移入 ElectroForce 3200 力学试验仪搭载的 BioDynamic 生物反应舱内对其施加 0、5%、10% 和 15% 的应变作用 3h,受力完成后继续培养 24h,用流式细胞仪测定细胞周期,计算 S 期百分数及增殖指数。**结果:**应力刺激后各组细胞贴壁及形态良好;应变作用 3h 后,0、5%、10% 及 15% 应变组的 S 期百分数分别为 1.86 ± 1.22 、 2.07 ± 0.09 、 7.56 ± 1.40 及 7.55 ± 3.25 ,增殖指数分别为 3.47 ± 2.52 、 7.88 ± 2.45 、 16.05 ± 1.51 及 14.7 ± 0.61 。5% 应变组的增殖指数较 0 应变组明显增加 ($P < 0.05$);10% 和 15% 应变组较 0 和 5% 应变组的 S 期百分数及增殖指数明显增加 ($P < 0.05$);10% 和 15% 应变组间比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。**结论:**在一定周期性应力范围内,髓核细胞的增殖能力增强。

【关键词】髓核细胞;周期性牵张应力;增殖;细胞周期

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.07.13

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2012)-07-0645-06

Effects of cyclic distraction stress on proliferation of human nucleus pulposus cells/MA Xinlong, YANG Zhao, SUN Xiaolei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(7): 645-650

【Abstract】 Objectives: To investigate the effects of cyclic distraction stress on the proliferation of human nucleus pulposus cells(HNPCs). **Methods:** HNPCs were cultured in vitro and identified via the toluidine blue, safranin O and immunocytochemical stain of collagen II. P3 HNPCs were inoculated on elasticity polymer. After HNPCs were attached, BioDynamic test instrument was used to exert different distraction strain(0, 5%, 10%, and 15%) on HNPCs for 3 hours; after that, HNPCs were cultured for 24 hours, and the flow cytometry was used to examine the cell cycle and calculate the S phase fraction and proliferative index. **Results:** The cell adhesion and growth were well under different strain for 3h; S phase fraction in 0, 5%, 10% and 15% strain groups was 1.86 ± 1.22 , 2.07 ± 0.09 , 7.56 ± 1.40 and 7.55 ± 3.25 respectively. Proliferative index in these groups was 3.47 ± 2.52 , 7.88 ± 2.45 , 16.05 ± 1.51 and 14.7 ± 0.61 respectively. Compared with 0 strain group, proliferative index in 5% strain group increased significantly($P < 0.05$). Compared with 0 and 5% strain group, S phase fraction and proliferative index in 10% and 15% strain groups increased significantly ($P < 0.05$); but S phase fraction and proliferative index showed no significant difference between 10% and 15% strain groups($P > 0.05$). **Conclusions:** The proliferation of HNPCs increases under some stress.

【Key words】 Cyclic distraction stress; Human nucleus pulposus; Proliferation; Cell cycle

【Author's address】 Spine Surgery and Biomechanics, Department of Orthopaedics, Tianjin Hospital, Tianjin, 300211, China

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration,

IDD)可引起腰痛,是最常见的脊柱疾患^[1]。IDD 是一个包括多种因素在内的复杂的过程,但其退变机制尚不明确^[2]。近年来研究表明,生物力学因素在椎间盘退变过程中发挥着重要作用^[3-5]。正常组织在体内总是处于一定的应力环境下,应力对于基因表达、蛋白合成及细胞增殖具有重要作用。明确椎间盘髓核细胞在周期性牵张应力下的反应情

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(项目批准号:308011680);天津市应用基础及前沿技术研究计划(项目编号:09JCZDJC19600);天津市卫生局科研基金攻关项目(10KG111)

第一作者简介:男(1962-),博士生导师,研究方向:脊柱外科及骨科生物力学

电话:(022)28336713 E-mail:mjx969@163.com

通讯作者:孙晓雷 E-mail:anny.allan@126.com

况,有助于更好地利用细胞学方法来进行椎间盘退变的相关研究。因此,本实验对体外培养的人髓核细胞施加不同的周期性牵张应力,观察其对细胞增殖的影响,旨在研究应力与人髓核细胞早期力学应答的关系,并为椎间盘退变的预防与治疗提供新的理论依据

1 材料和方法

1.1 一般资料

人椎间盘组织取自 1 例 L4/5 椎间盘突出的患者,年龄为 29 岁,为手术治疗患者术中取材,在患者知情同意的情况下取少量 L4/5 椎间盘组织,取材时严格无菌操作,取材组织部分行病理切片 HE 染色,其余均在取材后 2h 内进行分离培养。病理切片示中度椎间盘退变:髓核和纤维环之间界限不清,存在缝隙,并有细胞群形成(图 1),退变程度参考 Sive 等^[6]制定的分级标准,本例为中度退变。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM/F12 培养基(PH 7.2, Gibco),胎牛血清(FBS, Gibco 公司),Ⅱ型胶原-EDTA(Sigma),番红 O、甲苯胺蓝溶液(东胜泰博),抗人Ⅱ型胶原多克隆抗体(博士德);百级层流细胞室(天津医院细胞工程室),CO₂ 培养箱(Hera-cell),恒温摇床(Heidolph),相差倒置显微镜(OLYMPUS),细胞培养板(corning),ElectroForce 3200 力学实验仪器(Bose)。

1.3 髓核细胞的体外分离和培养

将髓核组织用 D-Hanks 液冲洗三遍;用剪刀剪碎髓核组织,37℃下用 0.25%的胰蛋白酶和 0.2%的Ⅱ型胶原酶联合消化 50min,每 5min 轻轻摇动 1 次。收集消化液,1000r/min 离心 5min,去除上清液。用 DMEM/F12 培养液吹匀细胞,再次离心,重复 3 次。用计数板进行细胞计数,按 1×10^6 接种于底面积为 25cm² 培养瓶中,加入 5ml 含青霉素 100μ/ml、10% FBS 的 DMEM/F12 培养液。37℃、体积分数为 5%CO₂ 的培养箱中培养。每 2~3d 换液 1 次,90%融合后用质量分数为 0.25%的胰酶消化并按 1:2 比例传代。

1.4 髓核细胞的鉴定

(1)瑞氏-姬姆萨染色:第一代(P1)细胞爬片至 70%~80%融合时,将细胞爬片取出,瑞氏染液染色 5min, PBS 冲洗,二甲苯透明,中性树脂封

片,光镜下观察细胞形态。

(2)甲苯胺蓝染色:第一代细胞爬片至 70%~80%融合时,将细胞爬片取出,用新鲜配制的 4%多聚甲醛固定 20min,1%甲苯胺蓝染色 10min, PBS 冲洗,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察细胞分泌糖胺聚糖能力。

(3)番红 O 染色:第一代细胞爬片至 70%~80%融合时,将细胞爬片取出,用新鲜配制的 4%多聚甲醛固定 20min,1%番红 O 染色 10min, PBS 冲洗,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察细胞分泌蛋白多糖能力。

(4)Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色:第一代细胞爬片至 70%~80%融合时,将细胞爬片取出,用新鲜配制的 4%多聚甲醛固定 20min,0.1%triton X-100 打孔 20min, PBS 冲洗 3 次;3% H₂O₂ 作用 15min, PBS 冲洗 3 次;滴加 10%山羊血清封闭液室温封闭 10min,甩掉后充分晾干;滴加 1:50 稀释的Ⅱ型胶原多克隆抗体,4℃孵育过夜, PBS 冲洗 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记的二抗工作液,室温孵育 2h, DAB 避光显色 15min;设置阴性对照组,冲洗、脱水、封片,荧光显微镜下观察细胞。

1.5 单轴向周期性牵张应力加载

实验采用美国 Bose 公司 BioDynamic 细胞应力加载系统(图 2、3),该系统以弹性膜片作为细胞培养单元,配合 EletroForce 动力加载,整个系统由 Bose PCI 和 Win Testing 系统联合控制参数、持续时间、拉伸、松弛频率,使弹性膜片产生精准变形,使培养在其上的细胞受到拉伸力作用。细胞所受力值大小由弹性膜片拉伸应变率(%)表示,应变率越大,表示细胞所受牵张力越大。

将 P3 代髓核细胞以 2×10^5 数量接种于 4cm×2cm 大小的弹性膜片上,待细胞贴壁后置于 BioDynamic 生物反应舱中进行加载。基于以前预实验和相关文献^[7]报道,本实验将同步化生长的细胞随机分为四组,每组 3 个样本。A 组为空白对照组, B 组为 5%拉伸应变组, C 组为 10%拉伸应变组, D 组为 15%拉伸应变组。频率为 0.25Hz,即 4s 完成一次加载,加载时间均为 3h。

1.6 流式细胞仪测定细胞周期

受力完成后,细胞培养箱中继续培养 24h,给细胞充分的反应时间。后分别用胰酶消化对照组和实验组细胞,75%乙醇固定,4℃保存。碘化丙啶染色 30min,流式细胞仪测定细胞周期分布,所用

拟合软件为 CFlow Plus。根据细胞周期中 G0-G1 期和 G2-M 期细胞比例计算 S 期细胞比例, 进而计算细胞增殖指数(proliferative index, PI)。计算公式如下: S 期(%)=1-(G0/G1 期%+G2/M 期%); PI(%)=S 期%+G2/M 期%。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件包进行分析, 数据以均数±标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 髓核细胞单层培养以及形态观察

相差倒置显微镜观察消化组织块得到的细胞

为球形, 胞浆多, 核明亮而清楚, 悬浮于培养基中, 也可见少数尚未完全消化抱在一起的细胞团。原代髓核细胞贴壁时间较长, 24h 后开始有少量细胞贴壁(图 4), 7d 后可达 90% 贴壁, 并逐渐变为梭形, 胞核大而圆, 胞浆丰富, 内含分泌颗粒。1 周左右, 细胞间开始有突起相连接, 细胞保持单层生长, 经过 15~20d 后, 髓核细胞开始进入对数生长期, 增殖、融合非常活跃, 光镜下可见多处细胞克隆(图 5)。传代细胞贴壁时间较原代短, 约 2~3h, 其增殖速度加快, 经过约 7d, 细胞铺满培养瓶。

2.2 髓核细胞的鉴定

瑞氏-姬姆萨染色显示 P1 代髓核细胞呈多角形或短梭形, 核为圆形或椭圆形, 位于胞浆中央, 呈红紫色, 胞浆呈淡染(图 6); 甲苯胺蓝染色

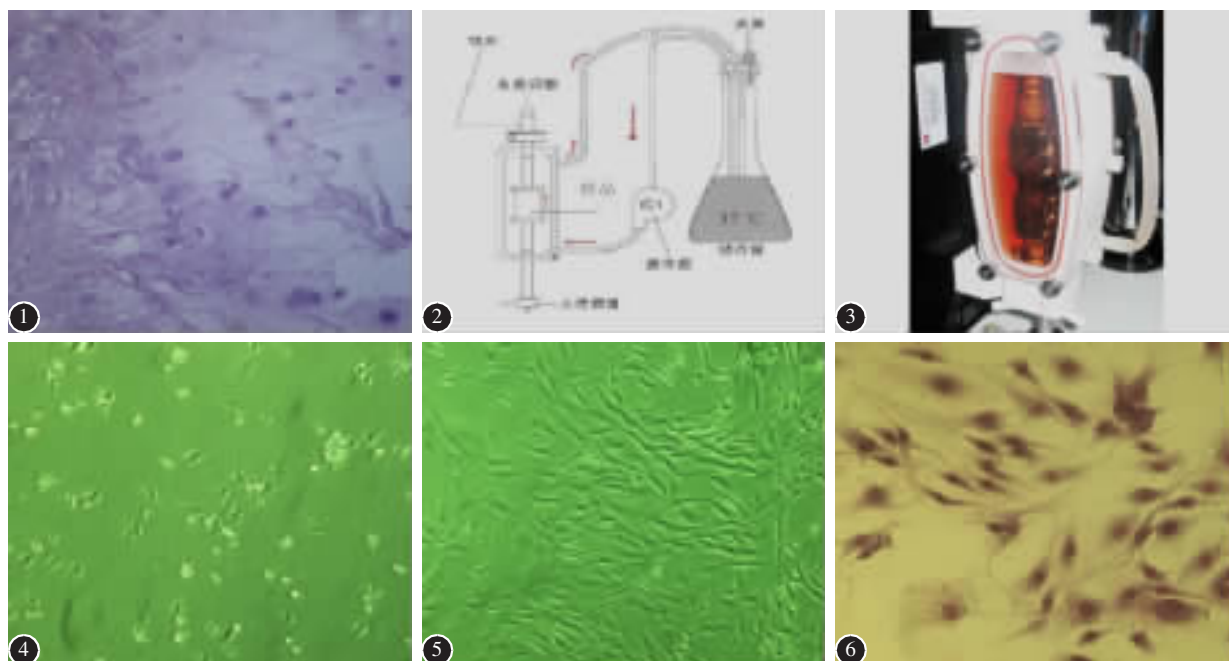


图 1 椎间盘组织 HE 染色显示髓核和纤维环之间界限不清, 存在缝隙, 并有细胞群形成($\times 100$) 图 2 BioDynamic 细胞应力加载系统示意图, 此装置包括生物反应舱、存储罐等装置 图 3 美国 Bose 公司的 BioDynamic 生物反应舱, 接种有细胞的弹性膜片置于其中进行力学加载 图 4 接种 24h 后的细胞开始有少量细胞贴壁($\times 100$) 图 5 接种 15d 后的细胞可见多处细胞克隆($\times 100$) 图 6 髓核细胞瑞氏-姬姆萨染色显示髓核细胞呈多角形或短梭形, 核为圆形或椭圆形, 位于胞浆中央, 呈红紫色, 胞浆呈淡染($\times 200$)

Figure 1 HE staining of intervertebral disc ($\times 100$) showed that the lack of demarcation and the presence of slits and cell clusters between the annulus fibrosus and nucleus pulposus in the degenerate intervertebral discs **Figure 2** The diagram of BioDynamic cell stress loading system included the bioreactor, storage tanks, etc **Figure 3** The elasticity polymer combined with HNPs was placed in the BioDynamic bioreactor to load stress (Bose company) **Figure 4** The inoculated cells began to adhere after 24 hours($\times 100$) **Figure 5** The inoculated cells had lots of cell clones after 15 days($\times 100$) **Figure 6** The Rui's Giemsa staining of nucleus pulposus cells: The nucleus pulposus cells were polygonal or short spindle. The reddish purple nuclei located in the cytoplasm were round or oval. The cytoplasm was light stained($\times 200$)

显示核呈蓝色,基质着色稍淡,说明细胞可以分泌糖胺多糖(图 7);番红-O 染色显示细胞被染成红色,圆形或短梭形,说明细胞可以分泌蛋白多糖(图 8);Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色显示细胞胞浆染成棕黄色,说明细胞能分泌合成Ⅱ型胶原,细胞核基本不着色,苏木素复染后核呈蓝色,胞浆仍为棕黄色(图 9)。

2.3 受力前和受力 24h 后的髓核细胞形态观察
接种在弹性膜片上的细胞能正常生长,粘附和伸展良好(图 10),加力过程中细胞基本无脱落或死亡,受牵张力后与受力前细胞形态上无明显差异(图 11)。

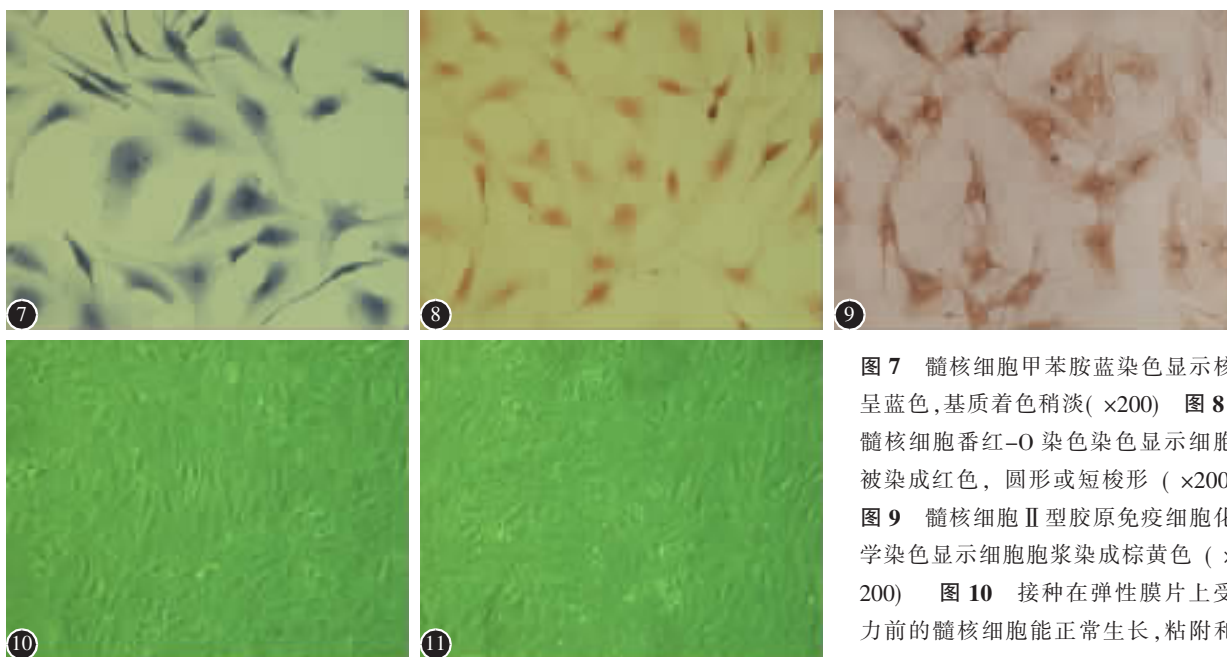
2.4 周期性牵张应力对髓核细胞增殖的影响

在选定的 0、5%、10%和 15%四个应变点,随着对髓核细胞刺激应变的增加,细胞 S 期百分比先逐渐增强而后减弱,在 10%应变时髓核细胞增殖最佳,其次是 15%和 5%应变点,对照组增殖最差;各组间比较 0 和 5%应变组无统计学意义($P>$

0.05),10%和 15%应变组也无统计学意义($P>$ 0.05),而 10%、15%应变组分别和 0、5%应变组比较时均有统计学差异($P<$ 0.05);增殖指数亦是随着应变的增加先逐渐增强而后减弱,各组间比较 10%和 15%应变组无统计学意义($P>$ 0.05),而 10%、15%分别和 0、5%应变组比较时均有统计学差异($P<$ 0.05)(表 1)。

3 讨论

IDD 发生率很高,在临床上非常常见,有研究统计 IDD 影响着全球约 80%的人口^[8]。椎间盘位于两个椎体之间,由髓核、纤维环、软骨终板三部分组成。目前认为椎间盘退变起源于髓核^[9],髓核细胞对胞外基质的合成、分泌和转归起主导作用。在胚胎期和小儿期的髓核组织内有脊索细胞和类软骨细胞组成。脊索细胞出生后逐渐减少,正常人 10 岁以后消失,完全被软骨样细胞取代^[10],其中类软骨细胞能分泌糖胺多糖、蛋白多糖,能分泌合



髓核细胞与受力前细胞形态上比较无明显差异($\times 100$)

Figure 7 The toluidine blue staining of nucleus pulposus cells: The nucleus were blue. The cell matrix was light stained. Those indicated that the cells could secrete glycosaminoglycan ($\times 200$) **Figure 8** The safranin O staining of nucleus pulposus cells: The red-stained cells were round or short spindle. This indicated that the cells could secrete proteoglycan. ($\times 200$) **Figure 9** The collagen II staining of nucleus pulposus cells: The cytoplasm was brown. This indicated that the cells could secrete and synthesis collagen II ($\times 200$) **Figure 10** The nucleus pulposus cells combined with elasticity polymer growth, adhesion and extend were very good before stress ($\times 100$) **Figure 11** There was no significant difference in the morphology between the nucleus pulposus cells after stress and the nucleus pulposus cells before stress ($\times 100$)

表 1 不同周期性牵张应力对人髓核细胞增殖的影响

 $(\bar{x} \pm s, n=12)$ **Table 1** The effects of different cyclic mechanical strain on the proliferation of human nucleus pulposus cells

应变 Strain	S期百分比 (S phase fraction)	增殖指数 (Proliferative index)
0	1.86±1.22	3.47±2.52
5%	2.07±0.09	7.88±2.45 ^①
10%	7.56±1.40 ^{①②}	16.05±1.51 ^{①②}
15%	7.55±3.25 ^{①②}	14.7±0.61 ^{①②}

注:①与 0 应变组比较 $P<0.05$; ②与 5%应变组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with 0 strain, $P<0.05$; ②Compared with 5% strain, $P<0.05$

成Ⅱ型胶原。本实验用的是人的髓核组织,故其中细胞为类软骨细胞。实验所培养出来的细胞,用甲苯胺蓝染色显示核呈蓝色,基质着色稍淡,说明细胞可以分泌糖胺多糖;番红-O染色显示细胞被染成红色,圆形或短梭形,说明细胞可以分泌蛋白多糖;Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色显示细胞胞浆染成棕黄色,说明细胞能分泌合成Ⅱ型胶原,细胞核基本不着色,苏木素复染后核呈蓝色,胞浆仍为棕黄色。故本实验所培养出来的细胞为髓核软骨样细胞。

椎间盘承受人体头、躯干及上肢的重量,在日常生活和劳动中,劳损较其他组织为重。椎间盘的血液供应很少,其营养主要依赖软骨终板的渗透,故极易退变。当脊柱轻度负荷、投掷铁饼和躯干快速旋转时,可引起纤维环的水平破裂;当跳高、跳远时脊柱承受压应力增加可使软骨终板破裂;从事重体力劳动者和举重运动者,因过度负荷造成椎间盘早期退变。此外,应力对于基因表达、蛋白合成及细胞增殖等具有重要作用。Sowa等^[11]发现静态压力可影响环氧合酶-2、基质金属蛋白酶-3和金属蛋白酶组织抑制剂-1。Gruber等^[12]发现机械应力可促进 Periostin 蛋白合成。Gilbert等^[13]发现周期性牵张应变可影响蛋白聚糖,Ⅰ、Ⅱ型胶原和基质金属蛋白酶-3、9、13等基因合成。还有研究表明,生理水平应力可促进基质合成^[14,15];而过度应力则会抑制基质合成和刺激基质降解酶的产生^[16]。椎间盘内所受压力在 0.1~2.5MPa 之间变化,生理水平应力可使椎间盘组织达到 25%的应变^[7]。力学加载时细胞实际受到的是应变而不是

应力^[18],细胞受力大小用细胞应变量来表示较力值更加合理。10000 微应变相当于 1%的形变,因此本实验以小于 20%不同应变区组来对髓核细胞进行力学加载。

S 期是细胞分裂的关键期,在此期间细胞的 DNA 含量通过复制而加倍;增殖指数是指处于 S 期和 G2M 期细胞之和占总细胞数的比例,它反映该群细胞的增殖速度。本实验结果显示,与对照组相比,5%对 S 期百分比无明显影响但可使髓核细胞增殖指数增加,而 10%和 15%应变均可使髓核细胞 S 期百分比和增殖指数增加,但两组间比较无统计学差异,由此我们可以看出,应力对髓核细胞增殖有一定影响,并且 10%~15%的应变区间可能是髓核细胞增殖最佳的应力范围。

IDD 是一个慢性发展、长期存在的病理改变。本实验从周期性牵张应力作用于体外培养的髓核细胞方面进行了研究,证实了在一定程度上周期性牵张应力可以促进髓核细胞增殖,为后续研究和临床应用提供了一定依据;但本研究只是单一应力刺激的细胞模型,忽略了椎间盘的生物学环境(低氧、缺血)对其的影响,不能够完全代表人体内生理环境中复杂的变化过程。关于周期性牵张应力如何影响椎间盘退变的机理还需进行更深入的探讨。

4 参考文献

1. Fekete TF, Porchet F. Overview of disc arthroplasty—past, present and future[J]. Acta Neurochir, 2010, 152(3): 393–404.
2. Freimark D, Czermak P. Cell-based regeneration of intervertebral disc defects: review and concepts[J]. Int J Artif Organs, 2009, 32(4): 197–203.
3. Zhang YH, Zhao CQ, Jiang LS, et al. Substrate stiffness regulates apoptosis and the mRNA expression of extracellular matrix regulatory genes in the rat annular cells[J]. Matrix Biol. 2011, 30(2): 135–144.
4. Hamilton DJ, Pilliar RM, Waldman S, et al. Effect of circumferential constraint on nucleus pulposus tissue in vitro [J]. Spine, 2010, 10(2): 174–183.
5. Gilbert HT, Hoyland JA, Freemont AJ, et al. The involvement of interleukin-1 and interleukin-4 in the response of human annulus fibrosus cells to cyclic tensile strain: an altered mechanotransduction pathway with degeneration [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(1): R8.
6. Sive JI, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs [J]. Mol Pathol, 2002, 55(2): 91–97.

7. O'Connell GD, Johannessen W, Vresilovic EJ, et al. Human internal disc strains in axial compression measured noninvasively using magnetic resonance imaging [J]. Spine, 2007, 32(25): 2860–2868.
 8. Chagnon A, Aubin CE, Villemure I. Biomechanical influence of disk properties on the load transfer of healthy and degenerated disks using a poroelastic finite element model [J]. J Biomech Eng, 2010, 132(11): 111006.
 9. Louman-Gardiner KM, Coombe D, Hunter CJ. Computation models simulating notochordal cell extinction during early ageing of an intervertebral disc[J]. Comput Methods Biomech Biomed Engin, 2011, 14(12): 1071–1077.
 10. Guehring T, Nerlich A, Kroeber M, et al. Sensitivity of notochordal disc cells to mechanical loading: an experimental animal study[J]. Eur Spine J, 2010, 19(1): 113–121.
 11. Sowa GA, Coelho JP, Bell KM, et al. Alterations in gene expression in response to compression of nucleus pulposus cells[J]. Spine J, 2011, 11(1): 36–43.
 12. Gruber H, Norris R, Kern M, et al. Periostin is expressed by cells of the human and sand rat intervertebral discs [J]. Biotech Histochem, 2011, 86(3): 199–206.
 13. Gilbert HT, Hoyland JA, Millward-Sadler SJ. The response of human annulus fibrosus cells to cyclic tensile strain is frequency-dependent and altered with disc degeneration [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(11): 3385–3394.
 14. Wang DL, Jiang SD, Dai LY. Biologic response of the intervertebral disc to static and dynamic compression in vitro [J]. Spine, 2007, 32(23): 2521–2528.
 15. Wuerz K, Godburn K, MacLean JJ, et al. In vivo remodeling of intervertebral discs in response to short- and long-term dynamic compression[J]. J Orthop Res, 2009, 27(9): 1235–1242.
 16. Adams MA, Dolan P, McNally DS. The internal mechanical functioning of intervertebral discs and articular cartilage, and its relevance to matrix biology[J]. Matrix Biol, 2009, 28(7): 384–389.
 17. Wilke HJ, Neef P, Caimi M, et al. New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life[J]. Spine, 1999, 24(8): 755–762.
 18. Owan I, Burr DB, Turner CH, et al. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain[J]. Am Physiol Soc, 1997, 273(3 Pt 1): c810–c815.
- (收稿日期: 2011-07-20 修回日期: 2012-02-03)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)

(上接第 644 页)

4 参考文献

1. 刘景臣, 李野, 武云涛, 等. 骶 2 椎弓根螺钉固定在腰骶部稳定性重建中的临床应用[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(5): 404–407.
 2. Yu BS, Zhuang XM, Zheng ZM, et al. Biomechanical comparison of 4 fixation techniques of sacral pedicle screw in osteoporotic condition[J]. J Spinal Disord Tech, 2010, 23(6): 404–409.
 3. 李孟军, 戴国强, 占新华, 等. 骶骨椎弓根及侧块的应用解剖研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(10): 864–867.
 4. 孙贺, 徐达传, 仇恒志, 等. 经后路第 2 椎椎螺钉进钉方法的应用解剖[J]. 中国临床解剖学杂志, 2002, 20(3): 181–183.
 5. Esenkaya I, Aluclu MA, Kavakli A, et al. Radiologic and morphologic evaluation of the lateral sacral mass[J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2003, 37(4): 330–339.
 6. Mirkovic S, Abitbol JJ, Steinman J, et al. Anatomic consideration for sacral screw placement[J]. Spine, 1991, 16(6 suppl): 289–294.
 7. Von Strempel A, Trenkmann S, Kirsch I, et al. The stability of bone screws in the os sacrum[J]. Eur Spine J, 1998, 7(4): 313–320.
 8. Zindrick MR, Wiltse LL, Widell EH, et al. A biomechanical study of intrapeduncular screw fixation in the lumbosacral spine[J]. Clin Orthop, 1986, 203: 99–112.
 9. 王奇, 黄其杉, 王向阳, 等. 骶骨后路钉板固定的解剖学研究[J]. 中华骨科杂志, 2010, 30(3): 277–281.
 10. Zheng Y, Lu WW, Zhu Q, et al. Variation in bone mineral density of the sacrum in young adults and its significance for sacral fixation[J]. Spine, 2000, 25(3): 353–357.
 11. Okuyama K, Sato K, Abe E, et al. Stability of transpedicle screwing for the osteoporotic spine: an in vitro study of the mechanical stability[J]. Spine, 1993, 18(0): 2240–2245.
 12. Ergur I, Akcali O, Kiray A, et al. Neurovascular risks of sacral screws with bicortical purchase: an anatomical study[J]. Eur Spine J, 2007, 16(9): 1519–1523.
- (收稿日期: 2011-11-28 修回日期: 2012-05-08)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)