

不同浓度地塞米松对成骨细胞骨钙素基因表达和细胞增殖的影响

胡新永¹ 吕 原¹ 杨华清¹ 耿同超²

摘要 目的:研究不同浓度地塞米松对成骨细胞骨钙素基因表达和细胞增殖的影响。方法:从新生 SD 大鼠颅盖骨分离培养成骨细胞,随机分为 4 组,A 组加入 1×10^{-7} mol/L 地塞米松;B 组加入 5×10^{-8} mol/L 地塞米松;C 组加入 1×10^{-8} mol/L 地塞米松;D 组作为空白对照。96h 后提取细胞 RNA,RT-PCR 一步法分析成骨细胞骨钙素 mRNA 表达,放射免疫法测定细胞培养上清液中骨钙素含量,MTT 法测定成骨细胞增殖率。结果:A 组、B 组、C 组与 D 组细胞骨钙素基因表达比值分别为 0.359 ± 0.026 、 0.386 ± 0.017 、 0.447 ± 0.024 、 0.414 ± 0.013 ,4 组之间差异均有显著性意义,A 组低于 D 组 ($P < 0.01$),B 组低于 D 组 ($P < 0.01$),C 组高于 D 组 ($P < 0.01$)。A 组、B 组、C 组与 D 组细胞培养上清液中骨钙素含量分别为 2.635 ± 0.218 、 2.860 ± 0.093 、 3.447 ± 0.024 、 3.168 ± 0.335 ng/ml,4 组之间差异均有显著性意义,A 组低于 D 组 ($P < 0.01$),B 组低于 D 组 ($P < 0.01$),C 组高于 D 组 ($P < 0.01$)。4 组细胞增殖率之间差异均有显著性意义,A 组低于 D 组 ($P < 0.01$),B 组低于 D 组 ($P < 0.05$),C 组高于 D 组 ($P < 0.01$)。结论: 1×10^{-8} mol/L 的地塞米松促进成骨细胞骨钙素基因表达和细胞增殖, 5×10^{-8} mol/L 和 1×10^{-7} mol/L 的地塞米松则抑制成骨细胞骨钙素基因表达和细胞增殖。

关键词 成骨细胞;地塞米松;骨钙素;基因表达;细胞增殖

中图分类号:R681, R741 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-10-0899-05

The effect of differential concentration of dexamethasone on the expression of osteocalcin mRNA and proliferation of osteoblast/HU Xinyong, LU Yuan, YANG Huaqing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(10): 899—903

Abstract Objective: To study the effect of differential concentration of dexamethasone on the expression of osteocalcin mRNA and the proliferation of osteoblast. **Method:** The osteoblasts were collected from newborn SD rats' skull and cultured, and then were randomly divided into 4 groups (8 samples for each group): In Group A, the cells were treated with dexamethasone of 1×10^{-7} mol/L, in Group B, the cells were treated with dexamethasone of 5×10^{-8} mol/L, in Group C, the cells were treated with dexamethasone of 1×10^{-8} mol/L; in Group D, were cultured without medicine. **Result:** The expression of osteocalcin mRNA in group A, B, C, D was 0.359 ± 0.026 , 0.386 ± 0.017 , 0.447 ± 0.024 , 0.414 ± 0.013 . There were significant differences of the expression of osteocalcin mRNA between group A, group B, group C and group D. In group A it was much lower than that of group D ($P < 0.01$), Group B was decreased remarkably than that of group D ($P < 0.01$), Group C was much higher than that of group D ($P < 0.01$). The level of osteocalcin in the culture medium in group A, B, C, D was 2.635 ± 0.218 , 2.860 ± 0.093 , 3.447 ± 0.024 , 3.168 ± 0.335 ng/ml. There were significant differences of the level of osteocalcin between group A, group B, group C and group D, Group A was much lower than that of group D ($P < 0.01$), Group B was decreased remarkably than that of group D ($P < 0.01$), Group C was much higher than that of group D ($P < 0.01$). The ratio of osteoblast proliferation in group A, B, C, D was 0.2644 ± 0.0081 , 0.2773 ± 0.0114 , 0.2961 ± 0.0085 , 0.2850 ± 0.0116 . There were significant differences of the ratio of osteoblast proliferation between the four group. **Conclusion:** It demonstrates that dexamethasone of 1×10^{-8} mol/L increases significantly the expression of osteocalcin mRNA and proliferation of osteoblast, dexamethasone of 1×10^{-7} mol/L and 5×10^{-8} mol/L declines significantly the expression of osteocalcin mRNA and the proliferation.

Author's address Department of Orthopaedic Surgery of Yuquan Hospital of Tsinghua University, Beijing, 100049

Key words osteoblast; dexamethasone; osteocalcin; expression of mRNA; proliferation

1949 年开始应用糖皮质激素作为抗炎和免疫抑制药物以来,糖皮质激素性骨质疏松症在临床上越来越常见,应用外源性糖皮质激素后一年其发病率为 0.6%—6%^[1],但是目前其分子生物学发病机制

1 清华大学玉泉医院骨科,北京,100049

2 清华大学玉泉医院神经内科

作者简介:胡新永,男,硕士,主治医师

收稿日期:2007-06-28

仍不清楚,尚无有效的治疗方法。由于糖皮质激素良好和独特的药理作用而在临床上广泛应用,很多患者必须长期甚至终生使用,同时,糖皮质激素性骨质疏松症引起的骨折常常延迟愈合或不愈合,致残率极高。我们采用体外培养的成骨细胞,给予不同浓度的地塞米松,观察对成骨细胞骨钙素基因表达和成骨细胞增殖分化的影响,对促进和抑制成骨细胞增殖的浓度进行界定,为临床合理使用糖皮质激素提供一个理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Trizol Reagent (美国 Invitrogen 公司); One Step RT-PCR Kit (日本 Takara 公司); RPMI Medium 1640 (美国 Invitrogen 公司); 大鼠骨钙素引物 (北京奥科生物技术有限责任公司); 内参 (Actin) 引物 (北京奥科生物技术有限责任公司); DNA Maker (日本 Takara 公司); MTT 试剂 (美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (美国 Invitrogen 公司); 25cm² 培养瓶 (美国 Costar 公司)。

1.2 成骨细胞的分离培养与鉴定

按照胡新永等^[2]的方法,选用正常 SD 新生大鼠,取颅盖骨,经过两次酶消化得到沉淀细胞。利用差速黏附法除去成纤维细胞,得到纯化的成骨细胞^[3]。分离的成骨细胞 24h 后贴壁生长,显微镜下形态观察呈上皮样,梭形或多边形,胞浆丰富、清晰,并伸出多个细而短的突起与周围细胞相连,细胞核大而清晰,圆形或卵圆形,含 1 个明显的核仁,成骨细胞长满瓶底后,原代培养的细胞有规律排列,可呈同心圆样向周围放射性生长^[4]。细胞合成的碱性磷酸酶重氮盐法染色呈黑色颗粒,培养 96h 时,细胞阳性率 100%。用 PBS 代替底物的阴性对照片细胞内无黑色颗粒。通过形态学观察和碱性磷酸酶细胞化学染色^[5-6],证明培养的细胞具有成骨细胞的形态特征和分泌碱性磷酸酶的生物学行为。

1.3 实验分组和处理

纯化原代成骨细胞 1×10⁶ 个/ml 密度种植于 25cm² 培养瓶中,采用随机数字表法分为 A、B、C、D 四组,每组 8 份,A 组加入 1×10⁻⁷ mol/L 地塞米松^[7]; B 组加入 5×10⁻⁸ mol/L 地塞米松; C 组加入 1×10⁻⁸ mol/L 地塞米松^[8]; D 组为空白对照,每 2d 换液 1 次。

1.4 成骨细胞骨钙素基因表达

1.4.1 成骨细胞总 RNA 的提取及分析: 纯化的成骨细胞培养 96h 后,吸去培养液用于测定其中骨钙素含量,Trizol Reagent 提取细胞总 RNA 的步骤如

下^[9]:培养瓶置于冰上,直接加入 1ml Trizol 试剂,反复吹打;将细胞裂解液转移至新的 Eppendorf 管中,室温放置 5min;加入 0.2ml 氯仿,剧烈混匀 15s;室温放置 2—3min;12000rpm,4℃离心 15min;可见上层水相,中间混合相,下层酚相。吸取水相,转至新的 Eppendorf 管中,约 0.5ml;加入 0.5ml 异丙醇,颠倒混匀,室温放置 10min;12000rpm,4℃离心 10min;吸去液体可见白色沉淀,加入 75%乙醇 1ml,剧烈混匀;9000rpm,4℃离心 5min;吸去液体,真空干燥 5min;溶于 25μl DEPC 处理水中,60℃,10min。

取少量 RNA,经紫外线扫描,吸收峰位于波长 260nm 处,RNA 纯度 OD260/OD280 在 1.8—2.0 之间。RNA 浓度(μg/ml)=OD260 值×40μg/ml×稀释倍数。RNA 完整性鉴定采用甲醛琼脂糖电泳方法,用溴化乙锭染色后在紫外线下观察,可见 5S、18S 和 28S 三条带,说明 RNA 完整。

1.4.2 引物合成:成骨细胞骨钙素(osteocalcin)和内参 β-actin 引物序列为:

Osteocalcin:

上游引物-5'AAGCCAGCGACTCTGAGTCT 3'

下游引物-5'GAGGCAGAGAGGGAACAGG 3'

β-actin:

上游引物-5'CATCCTGCGTCTGGACCT 3'

下游引物-5'TCAGGAGGAGCAATGATCTTG 3'

osteocalcin 产物为 317bp 的核苷酸,β-actin 产物为 480bp 的核苷酸。

1.4.3 One Step RT-PCR 反应体系:按以下组成配制 50μl RT-PCR 反应液:10×一步法 RNA PCR 缓冲液 5μl;MgCl₂ (25mM)10μl; dNTP 混合物 (10mM)5μl;RNase 抑制物 (40U/μl)1μl;AMV RTase XL(5U/μl)1μl;AMV-Optimized Taq(5U/μl)1μl;骨钙素上游特异性引物(20μM)1μl;骨钙素下游特异性引物(20μM)1μl;β-actin 上游特异性引物 1μl;β-actin 下游特异性引物 1μl;Total RNA 10μl;RNase 免除 dH₂O 13μl。

反应条件 RT 反应: 50℃ 30min;RTase 失活: 94℃ 2min;PCR 反应 (30Cycles):94℃ 30s; 59.2℃ 30s;72℃ 2min。

1.4.4 成骨细胞骨钙素 mRNA 表达的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳和观察测定:PCR 反应结束后,取 10μl 反应液,在含 0.5μg/ml 溴化乙锭的 1.2%琼脂糖凝胶上,恒压 100V 电泳 1h 左右,紫外线下观察并用凝胶成像分析系统做 PCR 产物半定量分析,测量和计算各组目的扩增带与 β-actin 吸光度的比值。设置 β-actin 作为内参对照,防止细胞数目差异

而造成误差。

1.5 成骨细胞培养上清液中骨钙素含量测定

纯化的成骨细胞培养 96h 后, 取上清液, 采用骨钙素放免试剂盒检测, γ 计数器测定沉淀物每分钟计数值, 根据标准品曲线测得样品骨钙素的含量。

1.6 成骨细胞增殖率测定

应用 10% 胎牛血清的培养液 (RPMI Medium 1640) 调节纯化的成骨细胞浓度 1×10^4 个/ml, 接种于 96 孔培养板, 每孔 0.2ml, 随机分为 A、B、C、D 4 组, 每组 15 份, 24h 后细胞贴壁, 更换培养液, A 组加入 1×10^{-7} mol/L 地塞米松; B 组加入 5×10^{-8} mol/L 地塞米松; C 组加入 1×10^{-8} mol/L 地塞米松; D 组作为空白对照。培养 72h。PBS 配制 MTT 5mg/ml, 0.22 μ m 微孔滤器过滤除菌, 于培养结束前 4h, 每孔加 MTT 20 μ l, 4h 后, 吸净培养液, 加入 DMSO 200 μ l, 振荡 10min, 使结晶充分溶解, SUNRISE 酶标仪测量 490nm 波长的吸光度值 (OD)^[10]。

1.7 统计学分析

数据均以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS10.0 软件包进行统计学处理, 各组间比较采用单因素方差分析, 样本均数间的两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 成骨细胞骨钙素 mRNA 表达结果

成骨细胞培养 96h 后, 骨钙素 PCR 扩增产物电泳分离后紫外灯下观察, A、B、C 和 D 组均出现两条带, 骨钙素基因阳性扩增片段为 317bp, β -actin 为 480bp。A、B、C 和 D 组骨钙素 mRNA 与 β -actin 吸光度比值分别为 0.359 ± 0.026 、 0.386 ± 0.017 、 0.447 ± 0.024 、 0.414 ± 0.013 , $F = 26.472$ 。A 组骨钙素 mRNA 表达最低, C 组骨钙素 mRNA 的表达最高。A 组较 D 组降低 13.3%, 二者差异有显著性意义, $P < 0.01$ 。B 组较 D 组降低 6.8%, 二者差异有显著性意义, $P < 0.01$ 。C 组较 D 组增加 8.0%, 二者差异有显著性意义, $P < 0.01$ 。见图 1。

2.2 成骨细胞培养液中骨钙素含量

成骨细胞培养 96h 后, A、B、C、D 4 组培养液中骨钙素含量分别为 2.635 ± 0.218 、 2.860 ± 0.093 、 3.447 ± 0.024 、 3.168 ± 0.335 ng/ml, $F = 61.416$ 。A 组培养上清液中骨钙素含量最低, C 组培养上清液中骨钙素含量最高。A 组较 D 组降低 16.8%, 二者差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。B 组较 D 组降低 9.7%, 二者差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。C 组较 D 组增加 8.8%, 二者差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

2.3 成骨细胞增殖率

成骨细胞培养 96h, A 组成骨细胞数目最少, 密度最小; B 组成骨细胞数目比较少, 密度较低; C 组成骨细胞数目最多, 密度最大, D 组成骨细胞正常生长。A、B、C、D 组成骨细胞增殖率 OD 值为 0.264 ± 0.008 、 0.277 ± 0.011 、 0.296 ± 0.009 、 0.285 ± 0.0116 , $F = 26.404$ 。A 组细胞增殖率最低, C 组细胞增殖率最高。A 组较 D 组降低 7.2%, 二者比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。B 组较 D 组降低 2.7%, 二者比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。C 组较 D 组增加 3.9%, 二者比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。

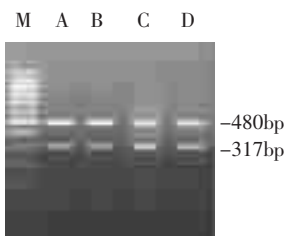


图 1 成骨细胞培养 96h 后, 4 组成骨细胞骨钙素基因的表达

3 讨论

从细胞水平看, 成骨细胞是糖皮质激素作用于骨的主要位点, 成骨细胞对糖皮质激素有特异性受体及高度亲和性, 糖皮质激素正是通过与其特异性受体结合而作用于成骨细胞的增殖、分化和功能, 影响骨形成。体外培养的大鼠颅骨可显示糖皮质激素的双重作用^[11], 最初 I 型胶原及碱性磷酸酶暂时合成增加, 但长期应用 ^3H 脯氨酸对 I 型胶原的掺入观察合成率, 可发现 DNA 含量及分裂指数降低, 糖皮质激素还可以降低 I 型胶原蛋白的表达及其稳定性, 使胶原蛋白的合成减少, 此作用具有细胞特异性, 同时又以组织特异性的方式提高大鼠成骨细胞间质胶原酶 mRNA 的表达和蛋白酶的水平, 促进 I 型胶原蛋白的分解, 使骨丢失增加。

在骨重建时, 生理浓度的糖皮质激素发挥的是一种允许作用, 有益于成骨细胞, 它能促进骨和骨胶生成, 促进人类骨髓干细胞分化为成骨细胞, 同时抑制单核细胞转化为破骨细胞。本实验研究表明 1×10^{-8} mol/L 的地塞米松对体外培养的成骨细胞骨钙素基因表达和细胞增殖有明显的促进作用, 因此 1×10^{-8} mol/L 的地塞米松是大鼠的生理剂量。

在成骨细胞体外培养的研究中, 有的学者观察到糖皮质激素能抑制成骨细胞的产生、促使成骨细胞及骨细胞的凋亡, 从而导致骨质形成障碍, 引起骨质疏松。但也有人在体外实验中发现糖皮质激素能诱导成骨细胞分化而表现出成骨细胞的特征, 如碱

性磷酸酶的分泌、矿化骨结节的形成等。导致这一矛盾结果的原因是在于实验中所用的糖皮质激素的剂量不同,抑制骨细胞分化的剂量是超生理剂量,而促进骨细胞分化的剂量仅为 1×10^{-8} mol/L 的地塞米松,此剂量对大鼠而言是生理剂量。能导致骨质疏松的是糖皮质激素的长期超生理剂量应用的结果,它可使成骨细胞的分化受到明显的抑制,使骨细胞的数目显著减少,严重影响骨细胞的正常功能,使骨形成作用延迟,从而造成骨量丢失^[12]。本实验研究提示:生理浓度 1×10^{-8} mol/L 的地塞米松对成骨细胞的增殖有促进作用,而 5×10^{-8} mol/L 和 1×10^{-7} mol/L 的地塞米松对体外培养的成骨细胞的增殖有抑制作用,此浓度超越生理浓度,抑制成骨细胞的生长和增殖,骨形成量减少。

骨钙素是成骨细胞合成分泌的一种非胶原蛋白,是反映成骨细胞分化成熟的指标,能准确表示成骨细胞的活性,当骨形成和骨吸收偶联时,骨钙素的主要生理作用是反映骨转换的指标,当骨形成和骨吸收解偶联时,骨钙素是反映骨形成的特异指标,它能准确反映成骨细胞的成骨功能。在本试验中,成骨细胞培养 96h 后,通过 RT-PCR 方法发现: 5×10^{-8} mol/L 和 1×10^{-7} mol/L 的地塞米松显著抑制成骨细胞骨钙素 mRNA 的表达,而 1×10^{-8} mol/L 的地塞米松促进成骨细胞骨钙素 mRNA 基因的表达。

在此实验中,A 组、B 组成骨细胞骨钙素 mRNA 的表达、成骨细胞培养液中骨钙素含量和成骨细胞增殖率明显受到地塞米松的抑制,与 D 组相比差异有显著性,而且成骨细胞增殖的变化趋势与骨钙素 mRNA 的表达相似,说明糖皮质激素抑制成骨细胞合成与分泌骨钙素的功能,骨钙素 mRNA 的表达下调是成骨细胞增殖率降低的重要发生机制。

超生理剂量的糖皮质激素抑制成骨细胞前身细胞的分化和成熟成骨细胞的功能,促进成骨细胞和骨细胞凋亡,使骨细胞数目减少,同时还抑制 I 型胶原合成^[13]。长期大剂量使用糖皮质激素不仅可抑制成骨细胞增殖,促进其凋亡,减少骨骼中活性成骨细胞成分,导致骨生成能力下降,而且可使成骨细胞不能正常募集到骨侵蚀表面,使得被破骨细胞吸收的骨面未能及时被修复,造成骨质的丢失,导致骨质疏松症^[14]。超生理剂量的糖皮质激素主要抑制骨形成,最显著的特点是骨小梁变薄,骨重建在糖皮质激素的作用下,每经历一次循环后,骨小梁的形成都被抑制而使骨小梁逐步变薄,骨组织的分解代谢增强而合成代谢下降^[15]。在此实验中, 5×10^{-8} mol/L 和 1×10^{-7} mol/L 的地塞米松是超生理剂量的糖皮质激素,

其抑制成骨细胞骨钙素基因表达,降低成骨细胞增殖率,成骨细胞数目明显减少。

超生理剂量的糖皮质激素可有下列几种来源^[16-17]:①垂体性 Cushing 综合征;②肾上腺性 Cushing 综合征;③异源性 ACTH 综合征和异源性 CRH 综合征;④医源性 Cushing 综合征,如长期应用糖皮质激素类药物;⑤糖皮质激素过敏综合征,主要见于获得性免疫缺陷综合征(AIDS)患者。超生理剂量(每日服用强的松 7.5mg 或长期治疗)的糖皮质激素将引起骨骼四方面的症状:①骨生长抑制;②骨折延迟愈合;③骨坏死;④糖皮质激素性骨质疏松症。临床症状可单独或几种同时存在,其中尤以糖皮质激素性骨质疏松症和骨坏死最常见。如果长期每日口服泼尼松达到 7.5mg,椎体骨折的风险增加 5 倍以上,股骨近端骨折的相对危险性为同龄对照组的 2 倍以上^[18]。因此预防糖皮质激素副作用的关键在于合理使用糖皮质激素,切断医源性 Cushing 综合征的发生。

本结果表明,生理浓度 1×10^{-8} mol/L 的地塞米松促进成骨细胞骨钙素基因表达和细胞增殖; 5×10^{-8} mol/L 和 1×10^{-7} mol/L 的地塞米松则是超生理剂量的糖皮质激素,其抑制成骨细胞骨钙素基因表达和细胞增殖。因此,建议糖皮质激素的临床应用需要注意以下几点^[1]:①尽量避免滥用糖皮质激素,对可用可不用患者要首先采用非糖皮质激素类药物治疗;②选择最佳的剂量、用法和疗程^[19],尽可能采用局部制剂,必须口服给药时,主张采用隔日疗法,以尽可能保存正常的下丘脑-垂体-肾上腺轴反馈功能,减少糖皮质激素性骨质疏松症的发生^[20];③在疾病条件允许情况下减少糖皮质激素剂量或停用,如必须长期应用,则使用最小的有效剂量。尽量正确和合理使用糖皮质激素,减少其副作用。

参考文献

- [1] 廖二元,谭利华主编. 代谢性骨病学[M]. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社,2003.1052—1058.
- [2] 胡新永,耿同超,王义生. 成骨细胞培养上清液对大鼠糖皮质激素性骨质疏松症的治疗作用[J]. 中国康复医学杂志,2006,21(9), 796—799.
- [3] 章静波,张世馥,黄东阳主编. 组织和细胞培养技术[M]. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社,2002.96—98.
- [4] 苏欣,廖二元,罗湘杭. 人成骨细胞体外培养、鉴定及护骨素表达的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(4): 283—286.
- [5] Dost P, Ten Cate WJ, Wiemann M. Osteoblast-like cell cultures from human stapes [J]. Acta Otolaryngol, 2002, 122(8): 836—840.
- [6] Vaes BL, Dechering KJ, Feijen A, et al. Comprehensive mi-

- croarray analysis of bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation resulting in the identification of novel markers for bone development[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(12): 2106—2118.
- [7] 李月白, 胡新永, 王义生. 辛伐他汀与地塞米松对成骨细胞内皮细胞型一氧化氮合酶基因表达及增殖的影响[J]. 中华骨科杂志, 2006, 26(9): 614—617.
- [8] 杨林, 陶天遵, 刘枫晨, 等. 地塞米松对成人成骨细胞增殖和分化影响的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 2001, 21(8): 493—497.
- [9] 司徒镇强, 吴军正主编. 细胞培养[M]. 第 1 版. 西安: 世界图书出版西安公司, 2004. 334—336.
- [10] 邵敏, 庄洪. 含药血清对体外培养成骨细胞的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(2): 117—119.
- [11] 郭世绂, 罗先正, 邱贵兴主编. 骨质疏松基础与临床[M]. 第 1 版. 天津: 天津科技出版社, 2001. 384—390.
- [12] Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, et al. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Rheumatology(Oxf), 2001, 40(10): 74—83.
- [13] Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone[J]. J Clin Invest, 1998, 102(2): 274—282.
- [14] 邹丽宜, 吴铁. 糖皮质激素与骨质疏松[J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(2): 177—181.
- [15] 李月白, 胡新永, 王义生. 辛伐他汀对糖皮质激素性骨质疏松大鼠骨代谢的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(2): 269—272.
- [16] 廖二元, 超楚生主编. 内分泌学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 879—908.
- [17] 廖二元, 超楚生主编. 激素不敏感综合征和激素过敏综合征[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 310—311.
- [18] Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, et al. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin[J]. J Clin Invest, 1999, 104(10): 1363—1374.
- [19] American college of Rheumatology Ad Hoc Committee: Recommendation for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis; 2001 update. American college of Rheumatology Ad Hoc Committee on glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(7): 1496—1503.
- [20] Geusens P, Menten J, Vosse D, et al. Recovery from severe glucocorticoid-induced osteoporosis in an adolescent boy[J]. J Clin Densitom, 2001, 4(4): 389—394.

(上接 898 页)

4 结论

硬膜外腔植入异体髓核可引起背根神经节细胞 TNF- α 表达增加, 提示髓核可引起背根神经节细胞内部炎症; 髓核中的胶原蛋白在这种变化中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Boden SD, Davis DO, Dina TS, et al. Abnormal magnetic resonance scans of the lumbar spine in asymptomatic subjects: A prospective investigation [J]. J Bone Joint Surg, 1990, 72: 403—408.
- [2] Kawakami M, Weinstein JN, Spratt KF, et al. Experimental lumbar radiculopathy: Immunohistochemical and quantitative demonstrations of pain induced by lumbar nerve root irritation of the rat[J]. Spine, 1994, 19: 1780—1794.
- [3] Olmarker K, Rydevik B, Nordborg C. Autologous nucleus pulposus induces neurophysiologic and histologic changes in porcine cauda equina nerve roots [J]. Spine, 1993, 18: 1425—1432.
- [4] Rose MA, Kam PCA. Gabapentin: pharmacology and its use in pain management[J]. Anaesthesia, 2002, 57: 451—462.
- [5] Armijo JA, Pena MA, Adin J, et al. Association between patient age and gabapentin serum concentration-to-dose ratio: a preliminary multivariate analysis [J]. Ther Drug Monit, 2004, 26(6): 633—637.
- [6] Onda A, Yabuki S, Kikuchi S. Effects of neutralizing antibodies to tumor necrosis factor- α on nucleus pulposus-induced abnormal nociceptive responses in rat dorsal horn neurons [J]. Spine, 2003, 28(10): 967—972.
- [7] Olmarker K, Rydevik B. Selective inhibition of tumor necrosis factor α prevents nucleus pulposus induced thrombus formation, intraneural edema, and reduction of nerve conduction velocity: possible implications for future pharmacologic treatment strategies of sciatica[J]. Spine, 2001, 26(8): 863—869.
- [8] Hiroshi T, Toru S, Yukikazu O, et al. Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine [J]. Spine, 1996, 21(2): 218—224.