

青少年特发性脊柱侧凸患者椎体生长板中 Runx2 及 X 型胶原表达

俞 扬, 王守丰, 邱 勇, 王 斌, 朱泽章, 朱 锋

(南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008 江苏省南京市)

【摘要】目的:观察青少年特发性脊柱侧凸(AIS)患者上、下端椎和顶椎椎体生长板凸、凹侧软骨细胞的生物活性差异,探讨其在 AIS 发生和发展中的作用。**方法:**在对 12 例 AIS 患者行胸椎侧凸前路松解手术或前路矫形手术时获取上、下终椎和顶椎椎体生长板,分成凸、凹侧 2 组,共 72 枚标本,应用免疫组织化学方法检测 Runx2 和 X 型胶原蛋白的表达,原位杂交方法检测 Runx2 mRNA 表达。所有染色结果通过图像分析系统进行半定量分析。**结果:**AIS 患者顶椎椎体生长板凸、凹两侧的 X 型胶原、Runx2 和 Runx2 mRNA 表达总量存在显著性差异($P<0.05$)。顶椎椎体生长板凹侧 X 型胶原的表达总量低于下终椎椎体生长板凹侧的表达总量($P<0.05$)。顶椎椎体生长板凹侧 Runx2 的表达总量低于上、下终椎椎体生长板凹侧的表达总量($P<0.05$)。顶椎椎体生长板凹侧单一软骨细胞 Runx2 表达量高于凸侧和上、下终椎椎体生长板凹侧单一软骨细胞的表达($P<0.05$)。顶椎椎体生长板凹侧高倍视野下平均 Runx2 mRNA 表达总量低于上、下终椎椎体生长板的凹侧($P<0.05$)。顶椎椎体生长板凸侧单一细胞 Runx2 mRNA 表达量低于凹侧($P<0.05$)。顶椎椎体生长板凹侧高倍视野下平均 X 型胶原阳性细胞密度和 Runx2 阳性细胞密度低于凸侧和上、下终椎椎体生长板凹侧阳性细胞密度($P<0.05$)。**结论:**AIS 患者上、下终椎和顶椎椎体生长板凸、凹侧软骨细胞存在不同的生物活性和细胞动力学,这可能是力学条件改变后的一种继发性改变,但其可能在 AIS 的进展中发挥重要作用。

【关键词】特发性脊柱侧凸;椎体;生长板;软骨细胞;Runx2;X 型胶原

中图分类号:R682.3,R363.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-09-0655-05

Expression of Runx2 and type X collagen in human vertebral growth plates of adolescent idiopathic scoliosis/YU Yang, WANG Shoufeng, QIU Yong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(9):655-659

【Abstract】 Objective:To define the possible role of Runx2 and type X collagen in the induction and progression of adolescent idiopathic scoliosis.**Method:**Seventy two specimens of vertebral growth plates either from convex or concave side were collected at the upper end vertebrae, apex vertebrae and lower end vertebrae of the scoliotic spine from 12 patients who underwent anterior release or fusion. Expressions of Runx2 and type X collagen were examined by immunohistochemistry. The mRNA of Runx2 was detected in the specimen for three patients by the in situ hybridization. All the results were analyzed with the image analysis system.**Result:**There were significant differences of the total expression of type X collagen, Runx2 protein and Runx2 mRNA between convex side and concave side of the apex vertebral growth plates ($P<0.05$). The total expression of type X collagen in the concave side of the lower end vertebral growth plates was higher than that in the same side of apex ($P<0.05$). The total expression of Runx2 in the concave side of the upper and lower end vertebral growth plate was higher than that in the concave side of the apex ($P<0.05$). The expression of Runx2 per cell in the concave side of the apex was higher than those in the convex side of the apex and in the concave side of the upper and lower end vertebral growth plates as well ($P<0.05$). The cell density of type X collagen or Runx2 positive chondrocytes in the concave side of apex was lower than that in the convex side and in the concave side of upper and lower end vertebra ($P<0.05$).**Conclusion:**The difference in expression of type X collagen and Runx2 and the difference in cell density of type X collagen and Runx2

基金项目:江苏省卫生厅科研重大项目(编号:K200610)

第一作者简介:男(1963-),副主任医师,研究方向:脊柱外科

电话:(025)83304616-12101 E-mail:wsf0135@126.com

positive chondrocytes between convex side and concave side of the vertebral growth plates may implicate that the biological activity and cell kinetics of the chondrocytes in the various regions are different, which may be the secondary changes to the mechanical environment and likely play an important role in the progression of adolescent idiopathic scoliosis.

【Key words】 Idiopathic scoliosis; Vertebral body; Growth plate; Chondrocytes; Runx2; Type X collagen

【Author's address】 Spinal Surgery, Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, 210008, China

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)的发生和进展出现于青少年快速生长期,非对称性生长被认为是 AIS 的病因之一^[1]。一些研究报告椎体左右两侧差异性的生长率可以产生椎体非对称性生长,进而导致椎体楔形变,这可能在脊柱侧凸的进展中发挥重要作用^[2-4]。椎体前柱生长主要来源于椎体生长板软骨内成骨作用,椎体生长板发挥着类似于长骨骨骺生长板的作用^[5,6]。对椎体生长板基质及其调节因子的研究可以为 AIS 的发生和发展提供分子生物学依据。本研究通过半定量的方法比较 AIS 患者椎体生长板凸、凹侧软骨细胞 X 型胶原、Runx2 及 Runx2 mRNA 的表达,进而探讨生长板软骨细胞生物活性及其在 AIS 发生和发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本取材与处理

椎体生长板取自我院 2004 年 11 月~2006 年 4 月行前路松解或前路矫形手术治疗的 12 例 AIS 患者,所有标本均取自于胸弯的上、下终椎和顶椎。在前路松解或前路矫形手术时从凸侧向凹侧完整切取全层生长板,然后按凸、凹侧分成 2 组,共获取 72 份标本。患者年龄 11~18 岁,平均 14.5 岁。均为女性,2 例月经未来潮,10 例初潮至手术时的时间为 1~36 个月,平均 8.6 个月。Risser 征为 0~4 级,0 级 3 例,2 级 2 例,3 级 6 例,4 级 1 例。脊柱侧凸 Cobb 角为 48°~109°,平均 62.1°。根据 Lenke 分型系统^[7]分型:Lenke 1A 3 例,Lenke 1B 5 例,Lenke 1C 4 例。PUMC 分型:I a 3 例,II b₁ 4 例,II b₂ 2 例,II c₁ 2 例,II d₂ 1 例。术中切取生长板后立即用 4%多聚甲醛固定。24h 后用 0.5M 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙 2 周,石蜡包埋,切片,片厚 4~5 μm,行 HE 染色、免疫组织化学和原位杂交实验。

1.2 HE 染色

每个标本取 3 张切片于二甲苯中脱蜡、酒精梯度水化、HE 染色、脱水、透明和封片。光镜下根据静止层、增殖层和肥大层软骨细胞的形态确定椎体生长板不同的分层区域。观察并描述椎体生长板组织结构的病理变化。

1.3 免疫组织化学染色

每个标本取 2~3 张切片于二甲苯中脱蜡,酒精梯度脱水(100%, 90%, 80%和 70%),0.3%过氧化氢液中浸泡 30min(消除切片组织中内源性过氧化物酶),于 10%柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中煮沸 15min 修复抗原,滴加相应抗体(鼠抗人 X 型胶原抗体,DAKO, Denmark;鼠抗人 Runx2 抗体,Lab Vision, USA),在 4°C 下孵育 16h, PBS 漂洗 3min, 3 次。滴加二抗(EnVisionTM 法), 37°C, 15min, PBS 漂洗 4 次,每次 3min。滴加 DAB 显色,镜下控制。苏木素衬染,封片观察。同时设置阴性对照。

1.4 原位杂交

在 GeneBank 中检索 Runx2 对应 cDNA 的核苷酸序列并设计引物,序列上游为 5' GCAAG CTTGCATTCCTCATCCAGTATGAGA3', 下游为 5' CGGAATTCGTAAAGGTGGCTGGATAGTGCA3' (上海 Sangon 公司合成),聚丙烯酰胺电泳(PAGE 纯化)。Trizol 试剂提取法提取 AIS 患者椎体生长板软骨组织中总的 Runx2 RNA,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增合成 347bp 左右的 cDNA 片段,并将其克隆至 pGEM 3Zf(+) DNA(Promega)载体上。然后,用 EcoRI 酶切使其线性化, RNA 聚合酶体外转录合成正、反义探针(T7 RNA 聚合酶合成反义探针, Sp6 RNA 聚合酶合成正义探针),用地高辛抗体标记(DIG RNA Labeling Kit, Roche Diagnostics)。原位杂交方法按文献^[8]方法进行,最终应用甲基绿复染,封片,照像,观察。

1.5 定量分析及统计学处理

应用影像学分析系统 Image Pro-Plus (IPP 5.1, Chicago, USA)对阳性细胞的染色强度进行半

定量评估。评估指标包括:累积光密度(integrated optional density, IOD)总和,单个细胞的累积光密度(IOD/cell)和平均细胞密度。每张切片随机测量 5 个高倍视野($\times 400$)。累积光密度总和代表高倍视野下平均 Runx2、Runx2 mRNA 或 X 型胶原的表达总量;单个细胞的累积光密度反映平均单个细胞的 Runx2、Runx2 mRNA 和 X 型胶原的表达量;平均细胞密度代表高倍视野下染色为阳性的软骨细胞数量(cells/HP)。图像处理结果数据均以中位数(四分位间距)表示。应用 SPSS 10.0 统计软件(SPSS, Chicago, USA)进行分析。两两比较应用 Wilcoxon 秩和检验,组间比较应用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 组织学观察

所有椎体生长板标本在光镜下按静止层、增殖层、肥大层和钙化层观察。所有患者椎体生长板存在一定程度的退变。椎体凹侧生长板的各层结构均较凸侧相对短小且排列不规则(图 1, 后插页 I)。

2.2 免疫组织化学和原位杂交结果评估

见图 2~4(后插页 I)。棕褐色染色颗粒为免疫组织化学染色阳性反应,紫蓝色染色颗粒为原位杂交染色阳性反应。X 型胶原表达于肥大软骨细胞浆内和肥大软骨细胞周围基质,Runx2 表达于前肥大软骨细胞和肥大软骨细胞核内。AIS 患者顶椎椎体生长板凸、凹侧 X 型胶原、Runx2 和 Runx2 mRNA 表达总量存在显著差异($P < 0.05$),顶椎椎体生长板凹侧 X 型胶原的表达总量低于下终椎椎体生长板凹侧的表达($P < 0.05$),顶椎椎体生长板凹侧 Runx2 的表达总量低于上、下终椎椎体生长板的凹侧表达($P < 0.05$)。顶椎椎体生长板凹侧单一软骨细胞 Runx2 表达量高于凸侧和上、下终椎椎体生长板凹侧单一软骨细胞的表达($P < 0.05$)。顶椎椎体生长板凹侧高倍视野下平均 Runx2 mRNA 表达总量低于上、下终椎椎体生长板的凹侧($P < 0.05$)。顶椎椎体生长板凸侧单一细胞 Runx2 mRNA 表达量低于凹侧($P < 0.05$)。顶椎椎体生长板凹侧高倍视野下平均 X 型胶原阳性细胞密度和 Runx2 阳性细胞密度低于凸侧和上、下终椎椎体生长板凹侧阳性细胞密度($P < 0.05$) (表 1~3)。

表 1 12 例 AIS 患者上、下终椎和顶椎凸凹侧终板 X 型胶原表达情况

	表达总量		单一细胞表达量		阳性细胞密度(个/HP)	
	凸侧	凹侧	凸侧	凹侧	凸侧	凹侧
上终椎	6942.07(14319.76)	6509.89(12649.74)	762.63(1786.52)	902.41(1302.69)	8.5(13)	9.0(12)
顶椎	8245.03(17748.47)	5004.73(9146.51) ^{①②}	961.62(1544.82)	969.42(1556.45)	10(13.75)	6(8) ^{①②③}
下终椎	7248.27(11537.06)	8169.49(12845.68)	982.85(1349.52)	980.44(1307.64)	9(13)	10(15.5)

注:①与同组凸侧比较 $P < 0.05$;②与同侧下终椎比较 $P < 0.05$;③与同侧上终椎比较 $P < 0.05$

表 2 12 例 AIS 患者上、下终椎和顶椎凸凹侧终板 Runx2 表达情况

	表达总量		单一细胞表达量		阳性细胞密度(个/HP)	
	凸侧	凹侧	凸侧	凹侧	凸侧	凹侧
上终椎	9988.10(11498.15)	7206.45(11743.32)	1239.79(1458.92)	1197.41(1897.92)	9(10.75)	6(11.75)
顶椎	11074.38(15737.56)	5858.52(7994.09) ^{①②③}	1336.27(1736.62)	1612.60(2200.14) ^{①②③}	10(13.5)	3(4) ^{①②③}
下终椎	9314.46(14498.14)	7587.44(10865.69)	1298.08(1728.30)	1167.63(1653.60)	8.5(11)	7(9)

注:①与同组凸侧比较 $P < 0.05$;②与同侧下终椎比较 $P < 0.05$;③与同侧上终椎比较 $P < 0.05$

表 3 12 例 AIS 患者上、下终椎和顶椎凸凹侧终板 Runx2 mRNA 表达情况

	表达总量		单一细胞表达量	
	凸侧	凹侧	凸侧	凹侧
上终椎	5127.04(11664.21)	4999.38(12077.25)	988.05(1725.52)	1137.23(1732.87)
顶椎	6107.77(13557.58)	4156.21(5844.18) ^{①②③}	1017.96(1608.03)	1239.05(1859.60) ^①
下终椎	6122.54(10000.24)	6457.32(11844.67)	1000.37(1659.680)	1167.43(1782.04)

注:①与同组凸侧比较 $P < 0.05$;②与同侧下终椎比较 $P < 0.05$;③与同侧上终椎比较 $P < 0.05$

3 讨论

AIS 的病因仍不明确。一些作者认为其受力学因素影响所致^[9], 遵循 Hueter-Volkmann 定律, 即压力抑制生长, 张力下或压力降低条件下促进其生长^[10]。Enneking^[11]和 Michelsson^[12]推测脊柱侧凸的主要发病机制为椎体不对称性生长。对脊柱侧凸动物模型椎体生长板的组织学研究表明, 软骨生成下降、软骨细胞柱状排列紊乱和椎体生长板早期生长停滞^[11, 12]。McCarroll 等^[13]在对特发性脊柱侧凸患者行单侧骨骺阻滞时获取胸椎凸侧椎体生长板的标本进行研究, 发现软骨生长迟缓和紊乱。在本研究中, 我们发现 AIS 患者椎体生长板软骨有一定程度的退变, 与凸侧相比, 椎体凹侧生长板的静止层、增殖层和肥大层相对短小, 而且有时不能清楚分界增殖层与肥大层。这些组织学发现可能表明椎体凹侧生长缓慢, 凸侧生长正常或加快, 凸、凹侧生长的差异可能在 AIS 进展中发挥重要作用。

X 型胶原是一条短链胶原蛋白, 由三条相同的螺旋链组成, 分子量(Mr)为 59000D。X 型胶原是肥大软骨细胞合成的特异性基质^[14]。Iyama 等^[15]应用免疫染色和原位杂交技术, 研究鸡胚处于软骨内成骨过程中的椎体内 X 型胶原的时空间的表达, 他们的结果表明, 在软骨内成骨过程中, 在血管的植入和软骨内骨化之前, 肥大软骨细胞合成分泌 X 型胶原, 这说明肥大软骨细胞在调节软骨内成骨过程中的重要作用。Jacenko 等^[16]发现携带 X 型胶原突变基因的小鼠出现骨骼畸形(脊柱干骺端结构不良), 组织学表现为肥大的生长软骨受到抑制和新生骨量下降。他们认为 X 型胶原通过形成细胞周围的聚集网络在肥大的软骨基质中起结构性支撑作用。Aigner 等^[17]首次报道 X 型胶原在 AIS 患者椎间盘的异常表达, 并认为 X 型胶原除了在椎体生长板的肥大软骨细胞表达外, 不应该在年龄小于 40 岁的人椎间盘内表达。尽管以上研究探讨了 X 型胶原在人的椎间盘或生长板表达, 但是 X 型胶原在 AIS 患者椎体生长板凸、凹侧的表达差异尚没有研究报道。何海龙等^[18]对特发性脊柱侧凸患者生长板内 X 型胶原分布及表达进行了研究, 结果显示 X 型胶原主要分布于肥大软骨细胞周围, mRNA 分布于生长板软骨内肥大软骨细胞。认为侧凸患者 X 型胶原表达显著增高主要是由于长期应力引起生长板软骨的早期钙化所

致。本研究发现, AIS 患者顶椎椎体生长板凸、凹侧总的 X 型胶原表达存在差异, 下终椎椎体生长板凹侧的表达高于顶椎椎体生长板凹侧的表达。尽管顶椎椎体生长板凹侧 X 型胶原单个细胞的表达高于凸侧 X 型胶原单个细胞的表达, 但其差异没有统计学意义($P>0.05$)。在顶椎椎体生长板, 凹侧 X 型胶原阳性细胞的平均密度低于凸侧和上、下终椎椎体生长板的凹侧($P<0.05$)。这表明, 在 AIS 患者椎体生长板凸、凹侧和终椎与顶椎生长板软骨细胞的活性存在差异。这种差异可能造成椎体两侧生长速率的不同, 从而影响椎体的生长。机械应力和畸形可能会影响细胞密度。细胞密度在脊柱侧凸顶椎椎间盘最低, 施加于小鼠尾椎椎间盘的高度压力负荷导致细胞死亡^[19]。在脊柱侧凸, 由于压力变化或营养供给下降可能影响细胞密度。X 型胶原的表达差异表明, 肥大软骨细胞的功能可能由于压力的变化而受到影响。这种软骨细胞动力学的变化可能在椎体的生长和脊柱侧凸的发生, 特别是脊柱侧凸的进展中起重要作用。

椎体的生长主要依靠椎体生长板的软骨内成骨。椎体生长板内软骨细胞系的分化成熟受一系列软骨细胞合成调节因子的调节。增殖层细胞合成 Sox9 转录因子, 其调节基质细胞向成软骨细胞分化^[20]。Sox9 又调节软骨细胞合成 II 型胶原, 构成生长板软骨基质的框架。软骨细胞成熟后, 逐渐肥大并分泌 X 型胶原, X 型胶原为肥大后软骨进行软骨内成骨的主要基质成分之一。Runx2 是 Runx 家族成员之一, 为转录调节因子。在软骨内成骨过程中, Runx2 调节软骨细胞成熟和终末分化。体外研究表明, Runx2 增量调节骨基质成分基因的表达, 包括 I 型胶原、X 型胶原、骨桥蛋白、骨涎蛋白、骨钙素和纤维粘连蛋白。Zheng 等^[21]发现在软骨生成过程中, Runx2 直接作用于 X 型胶原基因并调节 X 型胶原的表达。本研究对 AIS 患者椎体生长板内软骨细胞 Runx2 进行了免疫定量检测, 顶椎椎体生长板凹侧总的 Runx2 表达量低于凸侧和上、下终椎椎体生长板凹侧。单个细胞 Runx2 的表达量与总表达量不同, 顶椎椎体生长板凹侧单个细胞 Runx2 表达量高于凸侧和上、下终椎椎体生长板凹侧。本研究中, Runx2 mRNA 的表达仅在 3 例患者的标本中检测, 目的是证明与蛋白表达的一致性。顶椎椎体生长板凹侧 Runx2 mRNA 表达总量低于凸侧和上、下终椎椎体生长

板的凹侧,与其蛋白表达相似。然而,单一细胞的 Runx2 mRNA 表达量仅在顶椎椎体凸、凹侧有差异。这可能意味着不同的力学环境影响软骨细胞的功能。椎体生长板凹侧压力增加,可能刺激软骨细胞表达 Runx2 蛋白,进而增加 X 型胶原的合成,这可能是软骨细胞的一种负反馈调节。Runx2 阳性细胞密度与 X 型胶原阳性细胞密度相似。顶椎椎体生长板凹侧细胞密度低于凸侧和上、下终椎椎体生长板的凹侧。这也可能是由于力学环境的变化和营养供给下降所引起。但在本研究中,没有非脊柱侧凸青少年椎体标本作为对照组,是其缺陷。

Runx2 和 X 型胶原在不同椎体的凸、凹侧表达差异可能提示 AIS 患者椎体生长板软骨细胞功能的变化,这些变化可能是力学负荷改变后的继发性改变,但这可能影响椎体的生长,进而在 AIS 的发展中起作用。

4 参考文献

- Little DG, Song KM, Katz D, et al. Relationship of peak height velocity to other maturity indicators in idiopathic scoliosis in girls[J]. J Bone Joint Surg Am, 2000, 82(5): 685-693.
- Stokes IA, Laible JP. Three-dimensional osseo-ligamentous model of the thorax representing initiation of scoliosis by asymmetric growth[J]. J Biomech, 1990, 23(6): 589-595.
- Millner PA, Dickson RA. Idiopathic scoliosis: biomechanics and biology[J]. Eur Spine J, 1996, 5(6): 362-373.
- Parent S, Labelle H, Skalli W, et al. Vertebral wedging characteristic changes in scoliotic spines [J]. Spine, 2004, 29(20): E455-462.
- Zhu F, Qiu Y, Yeung HY, et al. Histomorphometric study of the spinal growth plates in idiopathic scoliosis and congenital scoliosis[J]. Pediatr Int, 2006, 48(6): 591-598.
- Wang SF, Qiu Y, Ma ZL, et al. Histologic, Risser sign, and digital skeletal age evaluation for residual spine growth potential in Chinese female idiopathic scoliosis [J]. Spine, 2007, 32(15): 1648-1654.
- Lenke LG, Betz RR, Harms J, et al. Adolescent idiopathic scoliosis: a new classification to determine extent of spinal arthrodesis[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 80(8): 1169-1181.
- Rabie ABM, Tang GH, Urban Hagg. Cbfa1 couples chondrocytes maturation and endochondral ossification in rat mandibular condylar cartilage [J]. Archives of Oral Biology, 2004, 49(2): 109-118.
- Mente PL, Stokes IA, Spence H, et al. Progression of vertebral wedging in an asymmetrically loaded rat tail model[J]. Spine, 1997, 22(12): 1292-1296.
- Bibby SR, Jones DA, Lee RB, et al. The pathophysiology of the intervertebral disc[J]. Joint Bone Spine, 2001, 68(6): 537-542.
- Enneking WF, Harrington P. Pathological changes in scoliosis [J]. J Bone Joint Surg Am, 1969, 51(1): 165-184.
- Michelson JE. The development of spinal deformity in experimental scoliosis [J]. Acta Orthop Scand Suppl, 1965, 81(Suppl): 1-91.
- McCarroll HR, Costen W. Attempted treatment of scoliosis by unilateral vertebral epiphyseal arrest [J]. J Bone Joint Surg Am, 1960, 42(6): 965-978.
- Quarto R, Dozin B, Tacchetti C, et al. In vitro development of hypertrophic chondrocytes starting from selected clones of dedifferentiated cells[J]. J Cell Biol, 1990, 110(4): 1379-1386.
- Iyama K, Ninomiya Y, Olsen BR, et al. Spatiotemporal pattern of type X collagen gene expression and collagen deposition in embryonic chick vertebrae undergoing endochondral ossification[J]. Anat Rec, 1991, 29(4): 462-472.
- Jacenko O, LuValle PA, Olsen BR. Spondylometaphyseal dysplasia in mice carrying a dominant negative mutation in a matrix protein specific for cartilage-to-bone transition[J]. Nature, 1993, 365(6441): 56-61.
- Aigner T, Greskott KR, Fairbank JC, et al. Variation with age in the pattern of type X collagen expression in normal and scoliotic human intervertebral discs [J]. Calcif Tissue Int, 1998, 63(3): 263-268.
- 何海龙, 吴志宏, 仇建国, 等. X 型胶原基因在特发性脊柱侧凸患者顶椎椎间盘内表达的初步研究[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(20): 1861-1865.
- Lotz JC, Chin JR. Intervertebral disc cell death is dependent on the magnitude and duration of spinal loading[J]. Spine, 2000, 25(12): 1477-1483.
- Rabie ABM, She TT, Hagg U. Functional appliance: accelerates and enhances condylar growth [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2003, 123(1): 40-48.
- Zheng Q, Zhou G, Morello R, et al. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo [J]. J Cell Biol, 2003, 162(5): 833-842.

(收稿日期: 2008-03-03 修回日期: 2008-04-08)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 朱琳)