

基础研究

神经纤维瘤蛋白在先天性脊柱侧凸患者
成骨细胞和软骨细胞中的表达陈 晖¹, 邱 勇¹, 陈蕾蕾¹, 李 雷², 周祀桥³

(1 南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科; 2 科研部; 3 病理科 210008 南京市中山路 321 号)

【摘要】目的:检测神经纤维瘤蛋白在先天性脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞中的表达。**方法:**6 例先天性脊柱侧凸患者, 在后路手术时取髂骨及髂骨生长板, 分离、培养成骨细胞和软骨细胞, 分别行碱性磷酸酶染色和甲苯胺蓝染色。逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)检测神经纤维瘤蛋白 mRNA, 间接免疫荧光和 Western blot 检测神经纤维瘤蛋白在成骨细胞和软骨细胞中的表达。**结果:**先天性脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞中存在 II 型神经纤维瘤蛋白表达, 该蛋白主要分布在细胞浆, 所表达蛋白为三磷酸鸟苷酶活化蛋白(GAP)活性较弱的 II 型异构体。**结论:**先天性脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞中存在神经纤维瘤蛋白表达, 但该蛋白是否通过对成骨细胞和软骨细胞的影响导致骨骼系统异常还有待于进一步研究。

【关键词】神经纤维瘤蛋白; 成骨细胞; 软骨细胞; 先天性脊柱侧凸

中图分类号: R682.3, R363.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2006)-03-0220-04

The expression of neurofibromin in osteoblasts and chondrocytes from patients with congenital scoliosis/
CHEN Hui, QIU Yong, CHEN Leilei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2006, 16(3): 220~
224

【Abstract】Objective: To detect the expression of neurofibromin in osteoblasts and chondrocytes from patients with congenital scoliosis. **Method:** The cancellous bone and growth plate were harvested from ilia of 6 patients with congenital scoliosis in posterior approach surgery. The osteoblasts and chondrocytes were isolated and cultured in vitro, and confirmed by alkaline phosphatase staining and toluidine blue staining. RT-PCR was performed to detect the neurofibromin mRNA, indirect immunofluorescence and Western blot were done to confirm the expression of neurofibromin in osteoblasts and chondrocytes. **Result:** Type II neurofibromin was expressed in these osteoblasts and chondrocytes, the protein was mainly located in cytosol. **Conclusion:** Neurofibromin is expressed in osteoblasts and chondrocytes from patients with congenital scoliosis, but the protein expressed is type II isoform with relatively weak GAP activity. Whether neurofibromin contributes to the abnormalities of bone through its influence on osteoblasts and chondrocytes or not needs to be further studied.

【Key words】 Neurofibromin; Osteoblasts; Chondrocytes; Congenital scoliosis

【Author's address】 Nanjing University Medical School Affiliated Gulou Hospital, Nanjing, 210008, China

I 型神经纤维瘤病 (type 1 neurofibromatosis, 以下简称 NF1) 也称周围型神经纤维瘤病或 Von Recklinghausen 病, 是一种高突变率常染色体显性遗传疾病。其骨骼异常多数表现为脊柱侧凸, 发病率约 20%^[1]。NF1 脊柱侧凸患者常伴有脊柱后凸和明显的营养不良性改变, 畸形进展快速, 骨骼萎缩等解剖学因素常常导致内固定困难、术

后假关节发生率高和纠正丢失明显^[2]。作为 NF1 基因的蛋白产物, 神经纤维瘤蛋白缺失被认为是 NF1 各种临床表型的基础^[3]。目前普遍认为, 神经纤维瘤蛋白不仅作为肿瘤抑制因子发挥作用, 也参与正常细胞增殖和分化的调节。NF1 患者成骨细胞和软骨细胞是否存在神经纤维瘤蛋白表达缺失, NF1 患者骨骼异常是否和由此导致的细胞增殖分化异常有关目前仍不清楚。迄今为止, 神经纤维瘤蛋白在人骨骼系细胞中的表达情况尚未见报道。我们采用 RT-PCR、免疫荧光技术和 Western blot 检测神经纤维瘤蛋白在先天性脊柱侧凸患者

基金项目: 南京市科技攻关重点项目, 项目编号: ZKX0313

第一作者简介: 男 (1971-), 主治医师, 博士研究生, 研究方向: 脊柱畸形

电话: (025) 83304646-11200 E-mail: chen_hui82@hotmail.com

成骨细胞和软骨细胞中的表达情况。

1 材料与方法

1.1 标本来源

先天性脊柱侧凸患者 6 例, 男性和女性各 3 例, 年龄 7~13 岁, 平均 11 岁。影像学资料证实有半椎体畸形, 侧凸类型为胸弯或胸腰弯, 骨盆正位片显示双侧髂骨无异常, Risser 征 I~III。所有病例无长期服用影响骨代谢药物的病史, 均排除骨骼代谢性疾病。后路矫形手术中取髂骨松质骨和生长板外侧半。

1.2 成骨细胞和软骨细胞培养

所取髂骨松质骨和生长板称重分别约 600mg 和 500mg 左右。成骨细胞培养采用植块法, 软骨细胞采用透明质酸酶、胰酶和胶原酶(Sigma)序贯消化分离, 培养液成分: DMEM/F12 1:1 (Hyclone), 10%胎牛血清(Hyclone), 青霉素 100 U/ml (Sigma), 链霉素 100μg/ml (Sigma), 抗坏血酸 50μg/ml (Sigma)。细胞接近融合时传代。所有检测细胞均为传代第二代细胞。检测前制备细胞爬片, 碱性磷酸酶(改良钙钴法)和甲苯胺蓝染色。

1.3 RT-PCR

选用 24 周引产胎儿脑组织作阳性对照^[4], Trizol 提取细胞及引产胎儿脑组织总 RNA, 分光光度计定量, A260/280>1.8。选择 β-actin 作为内参照, 一步法 RT-PCR(Clontech)。50μl 反应体系, 其中含 20pmol 引物, 10U M-MuLV 逆转录酶, 2U Taq DNA 聚合酶, 10nmol 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP), 75nmol/L MgCl₂, 反应缓冲液。β-actin (500bp) 引物: 上游 5'-CCAAGGCCAACCGCGA-GAAGATGAC-3', 下游 5'-AGGGTACATGGTG-GTGGTGCCAGAC-3'; 神经纤维瘤蛋白引物: 上游 5'-CAGAATTCCCCCTCAACTTCGAAGT-3', 下游 5'-TGCCTGCTGCATCAAAGTTGCTTTTCAC-3' (该引物可同时扩增 I 型和 II 型神经纤维瘤蛋白 mRNA, 分别为 303bp 和 366bp^[5])。逆转录条件为 50℃ 60min 和 94℃ 10min, 变性 94℃ 45s, 退火 64℃ 60s, 延伸 72℃ 60s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 10min。反应产物用 2%琼脂凝胶电泳, 溴化乙锭染色, FR 200 凝胶成相系统分析结果。反应产物送至上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4 免疫荧光检测

取 3 例先天性脊柱侧凸患者的成骨细胞和软骨细胞制备细胞滤片, 4%多聚甲醛室温下固定 10min, 0.1% Triton X-100 10min 增加膜通透性。封闭液孵育 30min, 骨钙素或 II 型胶原一抗孵育 30min (Santa Cruz, 1:100), 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记二抗孵育 30min (北京中杉, 1:100), 神经纤维瘤蛋白一抗孵育 30min (Novus, 1:100), 罗丹明标记二抗孵育 30min (北京中杉, 1:100), Hoechst 33258 孵育 5min, 每次孵育之后用 0.01M 磷酸盐缓冲液 (PBS) 充分冲洗 3~5 次, 自然风干后中性树脂封片, MRC-1024 ES 激光扫描共聚焦显微镜观察。

1.5 免疫沉淀和 Western blot 检测

取 5×10⁶ 成骨细胞和软骨细胞 (各 6 例), 冷 PBS 洗涤后加入 200μl 放射免疫沉淀液 (RIPA) 缓冲液 (含 5μl 蛋白酶抑制剂), 50% (v/v) 蛋白 A-琼脂糖凝胶预处理, 改良 Lowry 法测定蛋白浓度。等量总蛋白中加入 2μg 神经纤维瘤蛋白多抗 (Novus), 4℃过夜, 加入 50μl 蛋白 A-琼脂糖凝胶, 4℃过夜, 离心、洗涤免疫沉淀产物, 十二烷基硫酸钠 (SDS) 上样缓冲液溶解沉淀, 煮沸后进行 7% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。将蛋白运用湿转法转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 4℃过夜, 5%脱脂奶粉封闭, 加入神经纤维瘤蛋白单抗 (1:1000), 4℃过夜, 二抗常温下孵育 3h, 增强化学发光测定系统 (ECL) 化学发光法检测。

2 结果

2.1 成骨细胞和软骨细胞培养

植块法成骨细胞原代培养时间需要 4 周左右, 可从 600mg 松质骨中获得 2~3×10⁶ 个细胞, 台盼蓝染色细胞存活率约 80%。倒置显微镜下成骨细胞呈梭形、锥形和不规则多边形, 细胞爬片碱性磷酸酶染色阳性。酶消化法可从 500mg 生长板中获得大约 5×10⁵ 个软骨细胞, 台盼蓝染色细胞存活率约 70%。贴壁后软骨细胞大多呈锥形和不规则多边形, 长满后可呈典型铺路石样外观。细胞爬片甲苯胺蓝染色阳性。

2.2 神经纤维瘤蛋白 mRNA 在成骨细胞和软骨细胞中的表达

RT-PCR 结果显示, 6 例成骨细胞和软骨细胞均表达神经纤维瘤蛋白 mRNA (图 1a、b)。胎儿

脑组织中 I 型和 II 型神经纤维瘤蛋白 mRNA 均有表达,且以 I 型 mRNA 表达为主,而先天性脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞中仅检测到 II 型神经纤维瘤蛋白 mRNA(图 1c、d)。反应产物测序结果和 Genbank 中神经纤维瘤蛋白序列相吻合。

2.3 神经纤维瘤蛋白在成骨细胞和软骨细胞中的表达

骨钙素和 II 型胶原是成骨细胞和软骨细胞特异性蛋白,免疫荧光结果显示这两种细胞中绿色荧光强度较高(FITC 标记二抗,绿色荧光,图 2a、b,后插页 II)。这两种细胞中神经纤维瘤蛋白免疫荧光染色均呈阳性(罗丹明标记二抗,红色荧光,图 2c、d,后插页 II),但荧光强度相对较弱。核染色后显示红色荧光和绿色荧光一样,分布以胞浆为主(图 2e、f,后插页 II)。

单纯 Western blot 难以检测到神经纤维瘤蛋白,蛋白提取液免疫沉淀后 Western blot 检测结果显示成骨细胞和软骨细胞中存在神经纤维瘤蛋白表达(图 3a、b),提示该蛋白水平较低,分子量在 220kDa 左右。

3 讨论

脊柱侧凸和胫骨假关节等骨骼异常可由 NF1 所致,是该病特征性表现,但目前对 NF1 患者的骨骼生物学和相关骨骼异常的机制却所知甚少。Abdel-Wanis 曾提出 NF1 患者脊柱侧凸的发病机制是神经纤维瘤蛋白缺乏导致的椎体成骨缺陷这一假说^[6],认为可能是由于缺乏该蛋白导致成骨细胞中丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)途径激活,增加的有丝分裂信号干扰核心结合转录因子 1(Cb-fa1)等成骨细胞特异性转录因子,造成 I 型胶原合成减少^[7]。越来越多的研究发现,除作为肿瘤抑制因子外,神经纤维瘤蛋白参与多种组织生长发育及修复过程中细胞增殖和分化的调节,如神经元分化^[4]、心脏发育^[8]、血管内膜修复^[9]、淋巴细胞发生和功能^[10]、成纤维细胞介导的伤口愈合^[11]等。神经纤维瘤蛋白功能缺失是 NF1 各种临床表型基础的观点正逐渐被接受。但直到目前为止,神经纤维瘤蛋白在人骨骼系细胞中的表达情况尚未见报道。本研究通过对先天性脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞的体外培养,应用 RT-PCR、

1a

1b

1c

1d

3a

3b

图 1 神经纤维瘤蛋白 mRNA 在先天性脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞中的表达 a 成骨细胞中有神经纤维瘤蛋白表达 b 软骨细胞中有神经纤维瘤蛋白表达 c 胎儿脑组织中 I 型和 II 型神经纤维瘤蛋白 mRNA 均有表达,但以 I 型 mRNA 为主,成骨细胞中仅检测到 II 型 mRNA 表达 d 与成骨细胞相似,软骨细胞中也仅检测到 II 型 mRNA 表达

图 3 免疫沉淀和 Western blot 检测神经纤维瘤蛋白在先天性脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞中的表达 a 免疫沉淀和 Western blot 结果显示成骨细胞中存在神经纤维瘤蛋白表达 b 免疫沉淀和 Western blot 结果显示软骨细胞中存在神经纤维瘤蛋白表达

Western blot 和免疫荧光技术分别证实这两种细胞中均存在神经纤维瘤蛋白表达。神经纤维瘤蛋白包含 2818 个氨基酸,主要功能位于三磷酸鸟苷酶活化蛋白相关区域 (GRD,GAP related domain),该蛋白和 p120 GAP 一起构成哺乳类动物细胞中 2 种主要的 Ras-GAP^[12]。Kuorilehto 等^[13]发现小鼠肋骨生长板软骨细胞、骨膜和骨小梁成骨细胞中均存在神经纤维瘤蛋白表达,生长板中表达以肥大层软骨细胞明显,认为神经纤维瘤蛋白可能扮演骨骼系细胞中 Ras-GAP 角色,从而影响成骨,并导致营养不良性改变等骨骼系统异常。本研究结果进一步提示,神经纤维瘤蛋白可能在人成骨细胞和软骨细胞也发挥 Ras-GAP 作用。

Ras 是控制细胞增殖和分化信号转导途径的分子开关,神经纤维瘤蛋白作为细胞中主要 Ras-GAP,可以大大增加内源性 Ras-GTP 酶效率,使 Ras 由活化的 GTP 结合状态转化成失活的 Ras-GDP,从而抑制 Ras 信号激活。Ras-MAPK 途径是成骨细胞和软骨细胞中重要的信号转导途径,主要介导生长因子等细胞外信号的增殖和分化效应^[14,15]。神经纤维瘤蛋白作为 Ras 信号途径活化的主要抑制性调节因子,是否影响成骨细胞及软骨细胞增殖和分化,从而在骨组织的发育和重建过程中也发挥重要作用是众多学者关心的问题。Yu 等^[16]报道,伴随 Ras 信号系统的活化,NF1+/-小鼠骨祖细胞表现出较高增殖率和明显的成熟前凋亡,骨祖细胞前体细胞表现较低的成骨细胞分化率,从而认为神经纤维瘤蛋白和其 Ras 信号活化抑制作用是成骨细胞功能所必需的。本研究免疫荧光结果显示,先天性脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞中神经纤维瘤蛋白表达相对较弱,分布以胞浆为主。这与以前神经纤维瘤蛋白在神经元中的亚细胞定位研究结果相似^[17]。免疫沉淀和 Western blot 结果提示神经纤维瘤蛋白在 NF1 脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞中表达水平较低,分子量在 220kDa 左右。由于神经纤维瘤蛋白在中枢神经系统表达水平较高且 I 型和 II 型均有表达,作者选择胎儿脑组织作为 RT-PCR 阳性对照^[4],结果发现成骨细胞和软骨细胞中仅存在 II 型神经纤维瘤蛋白 mRNA 表达,脑组织中 I 型和 II 型 mRNA 均表达并以 I 型 mRNA 为主。II 型和 I 型神经纤维瘤蛋白区别是在功能区域中(Gln1370 后)插入 21 个氨基酸(外显子 23a),该插入片段

破坏 5c 螺旋,使 GRD 区域部分暴露,暴露部分的较强电荷极性干扰 Ras 结合,从而大大减弱其 GAP 活性^[18]。

本研究在 Kuorilehto 和 Yu 等学者动物实验结果的基础上,进一步检测了神经纤维瘤蛋白在先天性脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞中的表达,用 RT-PCR、免疫荧光、免疫沉淀和 Western blot 等方法对该蛋白作了系统的研究。研究发现神经纤维瘤蛋白在先天性脊柱侧凸患者成骨细胞和软骨细胞中存在表达,分布以胞浆为主,所表达蛋白为 GAP 活性较弱的 II 型异构体。神经纤维瘤蛋白在人成骨细胞和软骨细胞 Ras-GAP 活性中扮演何种角色,该蛋白对这两种细胞的增殖和分化是否影响,以及该蛋白功能缺陷和骨骼异常之间的关系还有待于进一步研究。

4 参考文献

1. Akbarnia BA, Gabriel KR, Beckman E, et al. Prevalence of scoliosis in neurofibromatosis [J]. Spine, 1992, 17(8): S244-248.
2. Kim HW, Weinstein SL. Spine updates: the management of scoliosis in neurofibromatosis [J]. Spine, 1997, 22(23): 2770-2776.
3. Kim HA, Ling B, Ratner N. NF1-deficient mouse Schwann cells are angiogenic and invasive and can be induced to hyperproliferate: reversion of some phenotypes by an inhibitor of farnesyl protein transferase [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(2): 862-872.
4. Yunoue S, Tokuo H, Fukunaga K, et al. Neurofibromatosis type I tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GTPase-activating protein function toward Ras [J]. J Biol Chem, 2003, 278(29): 26958-26969.
5. Aaltonen V, Bostrom PJ, Soderstrom KO, et al. Urinary bladder transitional cell carcinogenesis is associated with down-regulation of NF1 tumor suppressor gene in vivo and in vitro [J]. Am J Pathol, 1999, 154(3): 755-765.
6. Abdel-Wanis ME, Kawahara N. Bone development in neurofibromatosis 1 [J]. Med Hypotheses, 2003, 60(4): 459-462.
7. Abdel-Wanis ME, Kawahara N. The role of neurofibromin and melatonin in pathogenesis of pseudarthrosis after spinal fusion for neurofibromatous scoliosis [J]. Med Hypotheses, 2002, 59(5): 395-398.
8. Lakkis MM, Epstein JA. Neurofibromin modulation of ras activity is required for normal endocardial mesenchymal transformation in the developing heart [J]. Development, 1998, 125(22): 4359-4367.
9. Hamilton SJ, Friedman JM. Insights into the pathogenesis of neurofibromatosis 1 vasculopathy [J]. Clin Genet, 2000, 58(5): 341-344.
10. Ingram DA, Zhang L, McCarthy J, et al. Lymphoproliferative defects in mice lacking the expression of neurofibromin:

- functional and biochemical consequences of Nf1 deficiency in T-cell development and function [J]. Blood, 2002, 100(10): 3656-3662.
11. Atit RP, Crowe MJ, Greenhalgh DG, et al. The Nf1 tumor suppressor regulates mouse skin wound healing, fibroblast proliferation, and collagen deposited by fibroblasts [J]. J Invest Dermatol, 1999, 112(6): 835-842.
12. Li Y, O'Connell P, Breidenbach HH, et al. Genomic organization of the neurofibromatosis type 1 (NF1) [J]. Genomics, 1995, 25(1): 9-18.
13. Kuorilehto T, Nissinen M, Koivunen J, et al. NF1 Tumor suppressor protein and mRNA in skeletal tissues of developing and adult normal mouse and NF1-deficient embryos [J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(6): 983-989.
14. Hippskind RA, Bilbe G. MAP Kinase signaling and gene expression in osteoblasts [J]. Front Biosci, 1998, 3: 804-816.
15. Stanton LA, Underhill TM, Beier F. MAP kinases in chondrocyte differentiation [J]. Dev Biol, 2003, 263(2): 165-175.
16. Yu X, Chen S, Potter OL, et al. Neurofibromin and its inactivation of Ras are prerequisites for osteoblast functioning [J]. Bone, 2005, 36(5): 793-802.
17. Vandenbroucke I, Van Oostveldt P, Coene E, et al. Neurofibromin is actively transported to the nucleus [J]. FEBS Lett, 2004, 560(1-3): 98-102.
18. Scheffzek K, Ahmadian MR, Wiesmüller L, et al. Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications [J]. EMBO J, 1998, 17(15): 4313-4327.
- (收稿日期: 2005-09-22 修回日期: 2006-01-12)
(英文编审 蒋欣)
(本文编辑 卢庆霞)

读者·作者·编者

什么叫“蛋壳”技术

张永刚

(解放军总医院骨科 100853 北京市)

20世纪40年代, Michele 和 Krueger 从脊柱后方通过椎弓根进行椎体病变的活检和椎体感染的引流。70年代开始, Heinig 利用这项技术进行脊柱骨折的前方减压, 即通过椎弓根将椎体挖空后, 再将后凸的骨折块夯入挖空后的椎体内, 并于80年代发表论文时命名为“蛋壳”技术(eggshell procedure)^[1]。因其以椎弓根为向导, 将椎体的松质骨完全去除后只剩下一薄层皮质骨外壳, 与蛋壳相似, 故用“蛋壳”一词来形容。同一时期, Thomasen 也利用椎弓根进行椎体的楔形截骨, 矫正脊柱后凸畸形, 称为经椎弓根闭合楔形截骨术(transpedicle closing wedge osteotomy)^[2]。但楔形截骨术与蛋壳技术略有不同, 前者是椎体楔形截骨后的闭合, 单一脊椎截骨平均可矫正30°左右的后凸畸形, 而后者则是椎体的塌陷, 通过间隙内支撑植骨, 能够完成不同角度和方向的矫形, 矫正角度也更大。近年来, 有学者又提出了一些概念, 如去除椎弓根截骨(pedicle subtraction osteotomy, PSO)、经椎弓根椎体切除术(transpedicle vertebrectomy 或 transpedicle corpectomy)和脊椎柱切除术(vertebral column resection, VCR)^[3-5]。无论采用何种名称, 其核心都是采取单一的后路手术, 通过椎弓根对椎体和椎间盘进行操作, 完成椎体截骨、椎体切除和椎间盘切除。

在临床上, 只有在用其它更容易的方法不能达到手术目的时才采取“蛋壳”技术。通常主要用来治疗复杂脊柱爆裂骨折、陈旧性骨折后凸畸形、先天性脊柱侧后凸畸形、重度僵硬性脊柱侧后凸畸形、感染晚期后凸畸形和脊柱肿瘤等。该技术的优点在于^[6]: (1)通过后路手术完成椎管前方的减压, 避免了前路手术; (2)通过适当改变矫形旋转轴心点, 能够获得充分的矫形, 而脊髓部位的后柱仍然为短缩, 减少了脊髓损伤; (3)截骨面为松质骨, 愈合快。缺点是手术操作难度大, 出血多, 需要有经验的脊柱外科医生来实施。

从我们的经验来看, 该技术的要点是截骨时要保留脊椎的后方结构或椎弓根的内侧壁, 避免操作时损伤脊髓或神经根; 椎体的外侧壁要充分研磨如蛋壳或截断, 才能顺利闭合腔隙; 使用特殊的器械或角度咬钳将残留的后壁去除, 以避免损伤脊髓。蛋壳技术是不得已时采取的手术方法, 实施时要充分考虑到其难度和风险。

参考文献

1. Heinig CF, Boyd BM. One stage vertebrectomy or eggshell procedure [J]. Orthop Trans, 1985, 9(11): 130-136.
2. Thomasen E. Vertebral osteotomy for correction of kyphosis in ankylosing spondylitis [J]. Clin Orthop, 1985, 194: 192-197.
3. Berven SH, Deviren V, Smith JA, et al. Management of fixed sagittal plane deformity [J]. Spine, 2001, 18(26): 2036-2041.
4. Mikles MR, Graziano GP, Hensinger RN. Transpedicular eggshell osteotomies for congenital scoliosis using frameless stereotactic guidance [J]. Spine, 2001, 26(20): 2289-2295.
5. Suk SI, Chung ER, Kim JH, et al. Posterior vertebral column resection for severe rigid scoliosis [J]. Spine, 2005, 30(14): 1682-1687.
6. Murrey DB, Brigham CD, Kiebzak GM, et al. Transpedicular decompression and pedicle subtraction osteotomy (eggshell procedure) [J]. Spine, 2002, 27(21): 2338-2343.