



辛伐他汀 PLGA 缓释微球对大鼠椎间盘退变的影响

陈涛^{1,2}, 奚菊群³, 刘忠军⁴, 王静成², 冯新民², 张亮^{2,4*}, 杨建东^{2*}, 黄泽楠²,
毕松超²

(1. 中南大学湘雅医学院, 长沙 410013; 2. 扬州大学临床医学院, 江苏扬州 225001;
3. 扬州大学医学院药理学系, 江苏扬州 225001; 4. 北京大学第三医院骨科, 北京 100191)

【摘要】目的 探讨辛伐他汀 PLGA 缓释微球局部注射治疗大鼠椎间盘退变的疗效。**方法** 通过复乳法制备辛伐他汀 PLGA 缓释微球, 观察微球的表征及体外释药情况。将 SD 大鼠椎间盘退变模型分为对照组(注射生理盐水)及实验组(注射辛伐他汀 PLGA 微球), 注射 2、4 周后处死实验动物, 通过影像学、组织学及分子生物学进行评估。**结果** 辛伐他汀 PLGA 缓释微球呈球形、形状规则, 表面光滑, 平均粒径为 $(1.52 \pm 0.54) \mu\text{m}$, 载药率为 $(23.3 \pm 1.3)\%$, 包封率为 $(90.4 \pm 2.6)\%$ 。体外药物释放试验显示在最初 24 h 内释放率为 45%, 而在随后 144 h 内累计释放率超过 81.2%。实验组治疗后椎间盘退变程度有所减轻, 与对照组同时点比较, 椎间隙高度指数、MRI 评分、HE 染色及甲苯胺蓝染色评分差异均有显著性 ($P < 0.05$)。实验组中骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、II 型胶原、蛋白多糖及缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 的 mRNA 表达较对照组明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** 制备的辛伐他汀 PLGA 缓释微球可达到较好的药物缓释效果。局部注射辛伐他汀 PLGA 缓释微球可以改善椎间盘退变程度, 促进髓核组织中 II 型胶原及蛋白多糖表达, 其机制可能与 HIF-1 α 及 BMP-2 表达增加有关。

【关键词】 椎间盘退变性疾病; 辛伐他汀; 微球; 骨形态发生蛋白 2; 缺氧诱导因子-1 α

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 08-0049-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.08.010

Intradiscal injection of simvastatin-loaded PLGA microspheres retards progression of intervertebral disc degeneration in a rat model

CHEN Tao^{1,2}, XI Juqun³, LIU Zhongjun⁴, WANG Jingcheng², FENG Xinmin², ZHANG Liang^{2,4*},
YANG Jiandong^{2*}, HUANG Zenan², BI Songchao²

(1. Xiangya School of Medicine Central South University, Changsha 410013, China; 2. Department of Orthopedics, Clinical Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001; 3. Pharmacology Department of Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001; 4. Department of Orthopaedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the local injection of simvastatin-loaded PLGA microspheres on intervertebral disc degeneration in a rat model. **Methods** The simvastatin-loaded PLGA microspheres were prepared by a double emulsion method; at the same time, the characteristics and drug release in vitro of the microspheres were observed.

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金(81401830); 江苏省青年医学重点人才项目(QNRC2015342)

【作者简介】 陈涛(1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 骨与关节退变性疾病的研究。E-mail: 513042245@qq.com

【通信作者】 张亮(1983—), 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 脊柱退变性疾病的基础与临床研究。E-mail: zhangliang6320@sina.com。

杨建东(1969—), 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 脊柱退变性疾病的基础与临床研究。E-mail: yangjiandong69@sina.com。

* 共同通信作者

The intervertebral disc degeneration models were injected with simvastatin-loaded PLGA microspheres (experimental group) or saline solution (control group). The rats were sacrificed and evaluated by radiological, histological, and molecular biology analyses at predetermined time points. **Results** The morphology of the microspheres was homogeneous, with a smooth surface and an average size of about $1.52 \pm 0.54 \mu\text{m}$. Drug loading efficiency and the rate of drug loading of the microspheres were approximately $90.4 \pm 2.6\%$ and $23.3 \pm 1.3\%$. The drug release rate of the microspheres within the first 24 h was about 45%. In addition, the cumulative release rate was more than 81.2% in the subsequent 144 h. A single dose of simvastatin-loaded PLGA microspheres injected into the intervertebral disc showed a tendency to increase the mRNA levels of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), collagen type II, proteoglycan, and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). The disc height index% (DHI) and MRI scores of the experimental group were all significantly different from those in the control group in the same period. In addition, simvastatin treatment also improved histological changes induced by needle puncture. **Conclusions** Simvastatin-loaded PLGA microspheres hold great promise for use as a drug-delivery system. The injection of simvastatin-loaded PLGA microspheres into degenerated intervertebral disc may result in the retardation of disc degeneration. Moreover, the expression of collagen type II and proteoglycan was also increased, the mechanism of which might be related to the increased expression of HIF-1 α and BMP-2.

【Keywords】 degenerative disc disease; simvastatin; microsphere; BMP-2; HIF-1 α

腰痛已成为 45 岁以上人群功能受限的最主要原因,80% 的成年人一生中受到不同程度的腰痛影响^[1]。在美国,每年用于治疗腰痛的花费高达 1000 亿美元^[2]。尽管腰痛的确切致病因素仍不明确,但研究发现至少 40% 的腰痛与椎间盘退变密切相关^[3]。目前无论保守治疗或手术治疗均只能改善症状,无法实现改善椎间盘退变的本质。近年来,采用细胞生物学手段,通过促进细胞外基质合成或抑制其降解,以期从根本上延缓或逆转椎间盘退变^[4]。研究发现骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)可以影响椎间盘细胞外基质的合成,上调 BMP-2 表达可以促进正常髓核细胞甚至是退变髓核细胞的细胞外基质 II 型胶原及蛋白多糖的表达,从而重建正常椎间盘的功能^[5-6]。考虑到在脊柱融合手术中直接使用 BMP 的多种并发症^[7],因此直接将 BMP 用于椎间盘退变的治疗存在一定风险。

他汀类药物属羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG - COA)还原酶抑制剂,临床上广泛用于高脂血症的治疗。研究发现,辛伐他汀可通过甲羟戊酸途径上调髓核细胞中骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 得表达,从而促进 II 型胶原及蛋白多糖等细胞外基质表达^[8]。邹立学等^[9]进一步研究发现小于 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的较低浓度范围内辛伐他汀对细胞活力无明显影响。进一步将辛伐他汀植入大鼠退变椎间盘,治疗 2 周后发现磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)上椎间盘信号好转,髓核细胞外基质合成增加,II 型胶原及 BMP-2 的 mRNA 表达增加^[10]。然而辛伐他汀难溶于水,口服生物利用度低等缺点限制了其临床应用。聚合

物缓释微球作为一种新型药物载体,由天然或合成的高分子物质聚合而成,具有靶向给药、提高药物稳定性及控制药物释放等优势。聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA)是一种常用的药物缓释系统,其负载的药物已成功用于多种疾病动物模型的治疗^[11]。

因此,本研究通过在大鼠退变椎间盘内注入辛伐他汀-PLGA 缓释微球,通过影像学、组织学及分子生物学等评估对于椎间盘退变的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 32 只,3 月龄,体重 320 ~ 400 g,购自江苏大学实验动物中心[SCXK(苏)2013-0011 号],动物饲养及取材于扬州大学农学院动物实验设施内进行[SYXK(苏)2017-0044 号],并通过扬州大学实验动物福利伦理委员会的福利伦理审查。

1.2 主要试剂与仪器

辛伐他汀、PLGA(PLA:PGA = 50:50,分子量 = 31000)、HEPES(美国 Sigma 公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);二氯甲烷、聚乙烯醇、100% 乙醇(国药集团化学试剂北京有限公司);RT-PCR 引物(上海吉凯生物);紫外可见光光度计(U-3900 Hitachi);扫描电镜(S-4800II Hitachi);X 线(MX-20,美国 Faxitron 公司);MRI(7.0T, Bruker Pharmascan 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 椎间盘退变动物模型的制备

采用本课题组既往的方法制备^[12],1% 戊巴比

妥纳溶液,以 0.4 mL/kg 经腹腔注射麻醉。达到麻醉效果后,用数字式钨钨线摄像机拍摄大鼠尾椎正位片,定位 Co6/7、Co7/8、Co8/9 尾椎椎间隙(Co6/7、Co8/9 作为穿刺组,Co7/8 作为对照组)。大鼠俯卧位,消毒骶部及鼠尾,用 21 号注射针头于背侧中心经皮垂直穿刺入椎间隙约 5 mm 后,注射针头旋转 360 度,并停留 30 s。术后再次消毒,并密切观察至麻醉苏醒,放回笼中自由活动。

1.3.2 辛伐他汀 PLGA 缓释微球制备

将 PLGA 与辛伐他汀按质量比 10:3.3 共同溶解于二氯甲烷中,形成均匀分散液;加入 200 μ L 水,超声混合;缓慢加入 10 mL 的 5% 聚乙烯醇水溶液中,超声粉碎 3 min,加入 50 mL 0.3% 聚乙烯醇水溶液中,搅拌过夜,除净有机溶剂;冷冻干燥 48 h,获得辛伐他汀 PLGA 缓释微球。

1.3.3 微球的包封率及载药量测定

精确称量 5 mg 的微球,配成 100 mL 的乙醇溶液,以乙醇为空白对照,在 238 nm 处测定吸光度,根据标准曲线计算微球中辛伐他汀含量。根据以下公式计算包封率和载药量:包封率 = 微球中的辛伐他汀总量/微球总量 \times 100%,载药量 = 实际载药量/理论载药量 \times 100%。

1.3.4 缓释微球形态观察及微球的体外释放

通过扫描电镜观察微球形状、大小和表面形态。取干燥的辛伐他汀 PLGA 缓释微球及空白微球粉末各 0.005 g,用 20 mL 磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4) 分散,37 $^{\circ}$ C 水浴;分别于不同时间间隔取 3 mL 上清液,用新鲜磷酸盐缓冲液 3 mL 补足原液;紫外可见光光度计检测各试样于 238 nm 处的吸收值,通过标准曲线方程求出各试液中辛伐他汀浓度,计算累积释放量,确定载药微球的辛伐他汀释放曲线。

1.3.5 实验分组及处理

在实验动物造模完成 2 周后将模型动物尾椎 Co6/7 节段作为对照组,Co8/9 作为实验组,每组 16 只。对照组注入等量生理盐水,实验组注入辛伐他汀 PLGA 缓释微球溶液 2 μ L,注射时采用生理盐水将微球浓度调整到 5 mg/mL,为防止 PLGA 微球溶液的弱酸性特征,故采用 DMEM 培养基、HEPES 及 NaHCO₃ 将溶液 pH 值调整到中性。使用 31G 针头的微量注射器,手术方法同模型建立,注射后,在局部停留 30 s,保证注射液不会溢出,同时每次注射后都更换新的无菌微量注射器。

1.3.6 X 线观察椎间隙高度

在注射前、注射后 2 周及 4 周时进行大鼠尾椎 X 线检查,扫描参数为 50 kV,100 mA,50 ms。根据 X 线计算椎间隙高度指数 (disc height index, DHI) 用以表示椎间隙高度^[7],相对椎间隙高度指数 (DHI%) = (穿刺后 DHI/穿刺前 DHI) \times 100%。

1.3.7 核磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 检查

在注射前、注射术后 2 周及 4 周时采用进行 MRI 检查,扫描参数如下:序列重复时间/回波时间为 3000/30 ms,层厚 0.5 mm,间隔 0 mm。根据矢状位 T2WI 像 Pfirrmann 进行分级评分^[13]。

1.3.8 组织学检查

MRI 扫描后采用注射戊巴比妥过量麻醉法处死,切取对照组及实验组椎间盘(包含上下终板),4% 多聚甲醛固定 3 d,脱钙处理,石蜡包埋后切片,进行苏木素-伊红 (HE) 染色,并按照 Keorochana 等^[14]方法评分;甲苯胺蓝染色按照 Norcross 等^[15]方法进行评分。

1.3.9 RT-qPCR 检测

处死后的大鼠,切取对照组及实验组椎间盘,将髓核剪成 1 mm³ 左右小块并研磨,采用 Trizol 法提取总 RNA,按照 qPCR 试剂盒操作说明书进行 BMP-2、低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、II 型胶原及蛋白多糖 mRNA 表达检测,同时将甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参照。RT-qPCR 反应步骤:95 $^{\circ}$ C 20 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,重复 40 个循环,每次循环读取 Ct (cycle threshold) 值,重复 3 组。所得各组 Ct 值用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示计算各靶基因相对表达水平。各引物序列信息见(表 1)。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

名称 Name	引物序列 Primer sequence(5' \rightarrow 3')
骨形态发生蛋白 2 BMP-2	AACACTGTGCGCAGCTTCC CTCCGGGTGTTTTCCAC
缺氧诱导因子 1 α HIF-1 α	GTCTCCATTACCTGCCTCTG GATTCTTCGCTTCTGTGCTTC
II 型胶原 Collagen II	AAGAAGCACATCTGTTTGG CAGTGGACAGTAGACGGAGG
蛋白多糖 Aggrecan	CGAGAATCAAATGGAGCCG CACAACACCTTTACCACGAC
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	TGACTTCAACAGCGACACCCA CACCTGTTGCTGTAGCCAAA

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,实验数据以

平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 手术前后及组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 辛伐他汀 PLGA 缓释微球的表征

图 1a 可见辛伐他汀 PLGA 缓释微球呈球形、形状规则, 分散性好且无聚集现象, 表面光滑, 分布均匀, 平均粒径为 $(1.52 \pm 0.54) \mu\text{m}$ 。微球载药率为 $(23.3 \pm 1.3)\%$, 包封率为 $(90.4 \pm 2.6)\%$ 。图 1b 所示, 微球包裹的辛伐他汀在最初 24 h 内存在药物突释现象, 约占药物总量的 45%, 而在随后 144 h 内持续缓慢释放辛伐他汀且释放浓度较稳定, 累计释

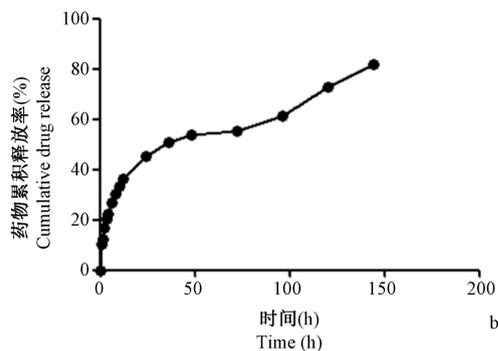
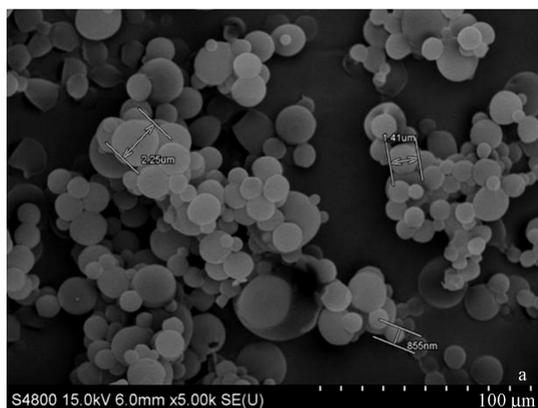
放超过 81.2%。由此可见, 本实验制备的辛伐他汀 PLGA 缓释微球能够满足缓释要求。

2.2 相对椎间隙指数

图 2 所示, 对照组椎间隙高度进一步降低, 与治疗前相对椎间隙指数比较, 2 周及 4 周时差异均有显著性 ($P < 0.05$)。实验组治疗后椎间隙高度降低不明显, 与治疗前相对椎间隙指数比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$); 但 4 周时与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.3 MRI 评分

图 3 所示, 对照组椎间盘退变程度进一步加重, 与治疗前 MRI 评分比较, 2 周及 4 周时差异均有显

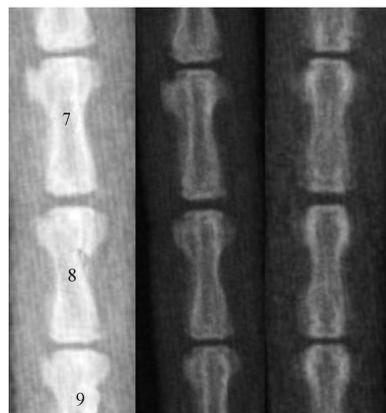


注: (a) 辛伐他汀 PLGA 缓释微球的扫描电镜图片; (b) 微球药物释放曲线。

图 1 辛伐他汀 PLGA 缓释微球形态及药物释放曲线

Note. (a) SEM image of simvastatin-loaded PLGA microspheres. (b) Cumulative drug release rate of microspheres.

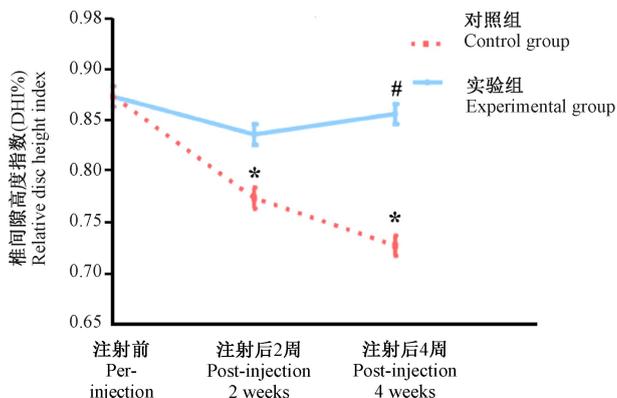
Figure. 1 SEM image of simvastatin-loaded PLGA microspheres and cumulative drug release rate



注射前
Per-
injection

注射后2周
Post-injection
2 weeks

注射后4周
Post-injection
4 weeks



注: 与同组注射前比较, $*P < 0.05$; 与对照组比较, $\#P < 0.05$ 。

图 2 对照组及实验组椎间隙高度及相对椎间隙高度指数

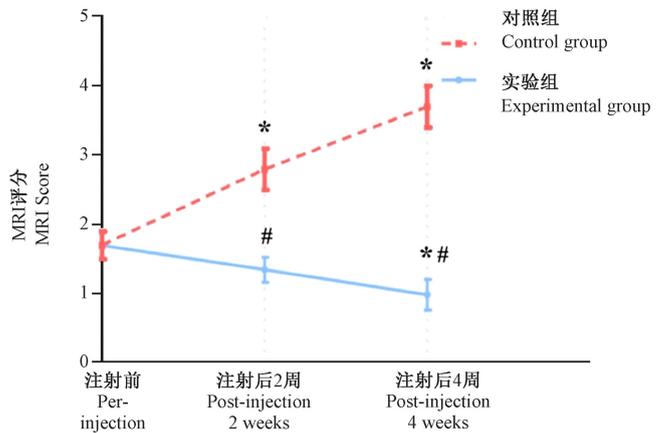
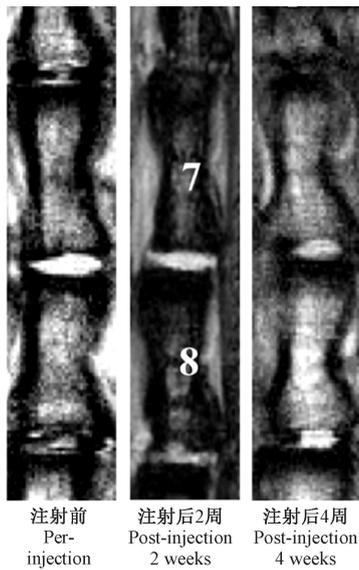
Note. Compared with the pre-injection, $*P < 0.05$. Compared with the control group, $\#P < 0.05$.

Figure. 2 The disc height and DHI% of the control group and experimental group

著性($P < 0.05$)。实验组治疗后椎间盘退变程度有所减轻,与治疗前 MRI 评分比较,4 周时差异有显著性($P < 0.05$);与对照组同时间点比较,差异均有显著性($P < 0.05$)。

2.4 苏木素-伊红染色结果

图 4 所示,对照组 HE 染色评分逐渐增加,4 周时与治疗前比较差异有显著性($P < 0.05$)。实验组治疗后 HE 染色评分逐渐降低,与治疗前及对照组相同时间点比较,差异均有显著性($P < 0.05$)。

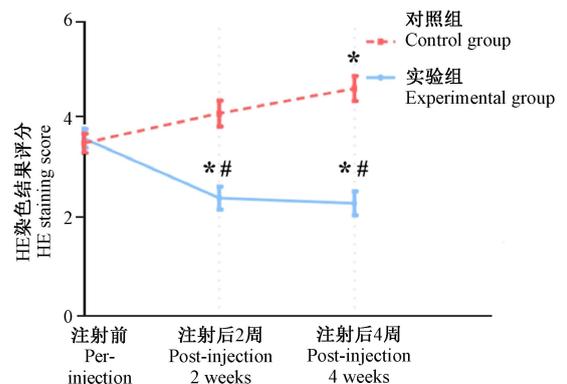
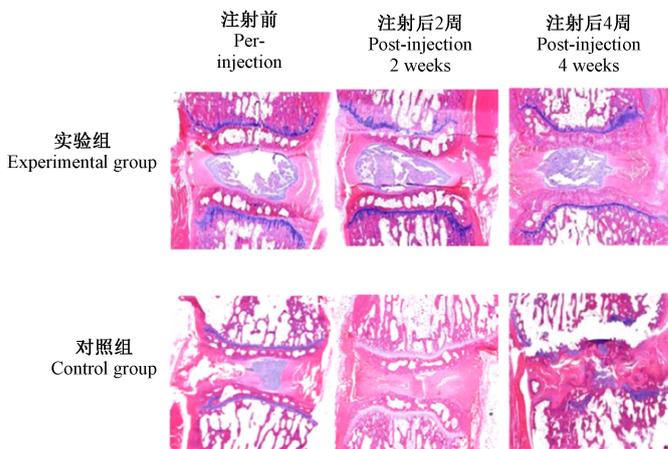


注:与同组注射前比较, * $P < 0.05$;与对照组比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 对照组及实验组 MRI 影像及评分

Note. Compared with the pre-injection, * $P < 0.05$. Compared with the control group, # $P < 0.05$.

Figure. 3 MRI images and scores of the control group and experimental group



注:与同组注射前比较, * $P < 0.05$;与对照组比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 对照组及实验组 HE 染色图像及 HE 染色评分

Note. Compared with the pre-injection, * $P < 0.05$. Compared with the control group, # $P < 0.05$.

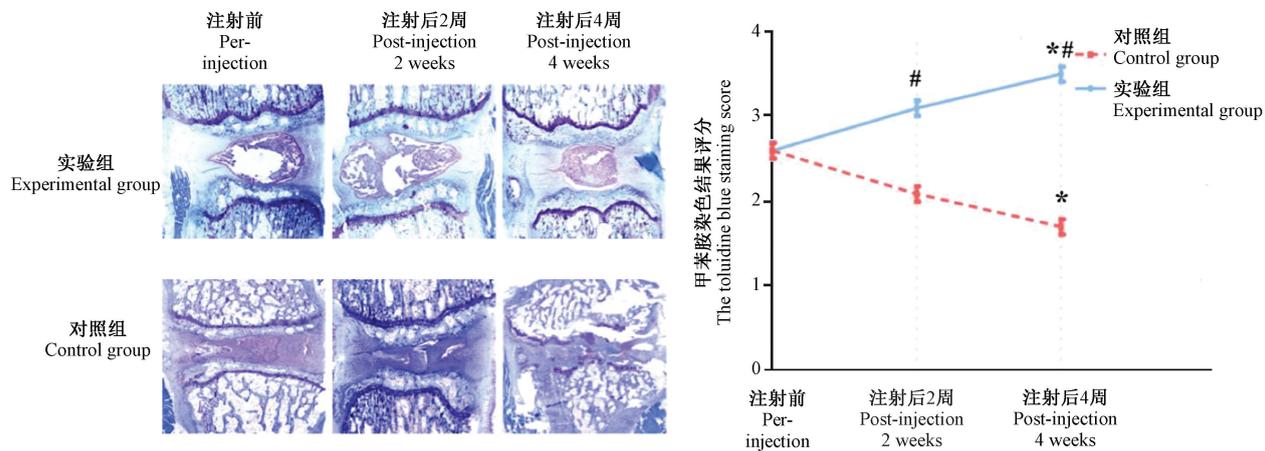
Figure. 4 The HE staining images and scores of the control group and experimental group

2.5 甲苯胺蓝染色结果

图 5 所示,对照组甲苯胺蓝染色评分逐渐降低,4 周时与治疗前比较差异有显著性($P < 0.05$)。实验组治疗后甲苯胺蓝染色评分逐渐增加,4 周时与治疗前比较差异有显著性($P < 0.05$);与对照组同时间点比较,差异均有显著性($P < 0.05$)。

2.6 RT-qPCR 检测结果

与对照组比较,实验组中 BMP-2、HIF-1 α 、II 型胶原及蛋白多糖表达明显增加,差异有显著性($P < 0.05$),但 2 周与 4 周时比较,差异无显著性($P > 0.05$)。(图 6)

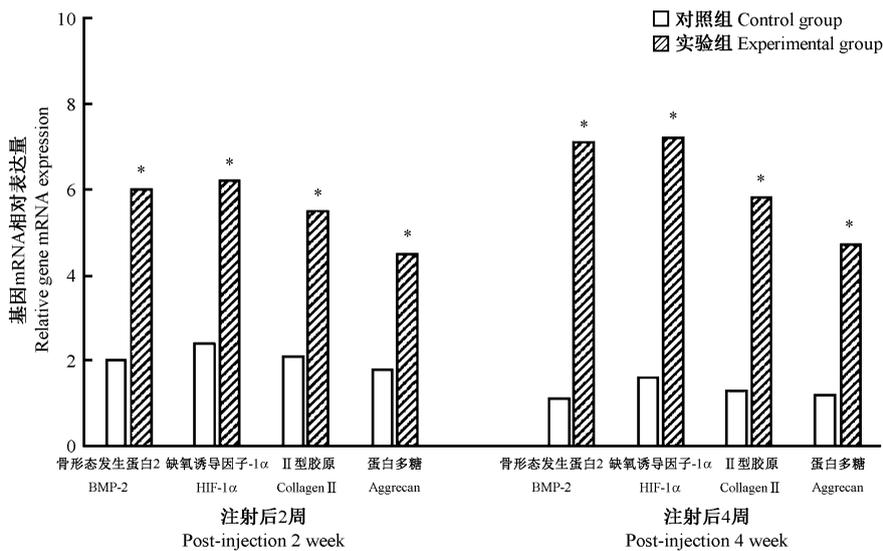


注:与同组注射前比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, # $P < 0.05$ 。

图5 对照组及实验组甲苯胺蓝染色图像及甲苯胺蓝染色评分

Note. Compared with the pre-injection, * $P < 0.05$. Compared with the control group, # $P < 0.05$.

Figure 5 The toluidine blue staining images and scores of the control group and experimental group



注:与同时时间点对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图6 对照组及实验组的 BMP-2、HIF-1α、Collagen II 和 Aggrecan 基因 mRNA 相对表达量比较

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 6 BMP-2, HIF-1α, collagen II, and aggrecan mRNA expression of the control group and experimental group

3 讨论

研究表明,辛伐他汀可促进 II 型胶原及聚集蛋白聚糖等椎间盘细胞细胞外基质的 mRNA 表达^[8-9]。本课题组前期研究发现合适浓度的辛伐他汀可以促进椎间盘髓核内源性干细胞增殖及细胞外基质分泌,同时有助于诱导髓核干细胞向髓核细胞分化^[16-17]。因此本研究通过建立椎间盘退变动物模型,研究椎间盘内局部注射 PLGA 辛伐他汀缓释微球的治疗效果,以期延缓甚至逆转椎间盘退变

进程。结果发现在椎间盘退变 2 周后注射 PLGA 辛伐他汀缓释微球, MRI 上椎间盘退变评分明显改善,并且在注射后 4 周时达到最佳;组织学评分在治疗后逐渐好转,且细胞外基质成分 II 型胶原及蛋白多糖 mRNA 表达逐渐增加,与文献报道类似^[10]。说明辛伐他汀 PLGA 缓释微球可以有效改善椎间盘退变进程。

高分子材料 PLGA 因具有良好的生物降解性、相容性、无刺激性、无免疫原性及无毒等特点,已被广泛用于药物缓释和被动靶向给药系统,且已用于

临床^[11]。因此本研究选择 PLGA 作为缓释材料负载辛伐他汀,以提高辛伐他汀使用效率。从 PLGA 辛伐他汀缓释微球的体外释放曲线可看出,缓释微球包裹的辛伐他汀可以达到较稳定的缓释效果,保证椎间盘内稳定的药物浓度,为退变椎间盘提供可靠的再生环境。

对于辛伐他汀促进椎间盘退变修复的机制,目前研究认为辛伐他汀主要通过上调髓核细胞中 BMP-2 表达,从而促进髓核细胞外基质的表达^[5,9-10]。而 Hu 等^[18]研究发现他汀类药物可使单层培养的已去分化的髓核细胞表型发生逆转,从而促进 II 型胶原等细胞外基质表达。本课题组前期研究还发现适当浓度的辛伐他汀可在体外促进内源性髓核干细胞增殖和细胞外基质 II 型胶原及蛋白多糖的分泌,其机制可能与 HIF-1 α 信号通路有关^[16,19]。Liu 等^[20]研究发现 HIF-1 α 可以通过 NOTCH1 信号途径调节椎间盘髓核细胞中蛋白多糖及 II 型胶原表达,从而影响椎间盘退变进程。於绍龙等^[21]研究还发现, HIF-1 α 基因可以增强转染 BMP-2 基因的骨髓间充质干细胞的成骨分化能力,说明一定程度上 HIF-1 α 可以促进 BMP-2 在目标细胞中发挥应有作用。结合本研究结果,注射辛伐他汀 PLGA 缓释微球后椎间盘中 HIF-1 α 及 BMP-2 表达均明显增加,表明辛伐他汀可能通过 HIF-1 α 及 BMP-2 途径来促进髓核细胞外基质表达,以及促进髓核组织中残留的髓核干细胞增殖等途径,来实现修复重建退变椎间盘的目的,但具体作用机制及信号通路仍需进一步研究明确。

本研究仍存在一些不足,尽管细针穿刺纤维环制作的椎间盘退变动物模型在组织学与人类椎间盘退变进程相似,但两者生理病理过程是否完全相同仍不可知,且因种属不同,因此应用于临床时应慎重。另外,本研究未比较不同浓度梯度的辛伐他汀 PLGA 缓释微球的疗效,无法得到最佳药物浓度。

综上所述,本实验发现在局部注射辛伐他汀 PLGA 缓释微球可以改善 SD 大鼠椎间盘退变程度,其机制可能与 HIF-1 α 及 BMP-2 信号通路有关,这为辛伐他汀用于治疗椎间盘退变性疾病提供了一定的理论依据。

参考文献:

[1] 董文兰,李镒冲,刘世炜,等. 1990 与 2013 年中国人群腰痛疾病负担分析 [J]. 中华预防医学杂志, 2017, 51(2):132.

- [2] Manchikanti L, Hirsch JA. An update on the management of chronic lumbar discogenic pain [J]. Pain Manag,2015, 5(5): 373-386.
- [3] Zheng C, Chen J. Disc degeneration implies low back pain [J]. Theor Biol Med Model,2015, 12(1):24.
- [4] Nikkhoo M, Wang JL, Abdollahi M, et al. A regenerative approach towards recovering the mechanical properties of degenerated intervertebral discs: Genipin and platelet-rich plasma therapies [J]. Proc Inst Mech Eng H,2017, 231(2):127-137.
- [5] Leung VY, Zhou L, Tam WK, et al. Bone morphogenetic protein-2 and-7 mediate the anabolic function of nucleus pulposus cells with discrete mechanisms [J]. Connect Tissue Res,2017, 58(6):573-585.
- [6] Ye S, Ju B, Wang H, et al. Bone morphogenetic protein-2 provokes interleukin-18-induced human intervertebral disc degeneration [J]. Bone Joint Res,2016, 5(9):412-418.
- [7] Rocque BG, Kelly MP, Miller JH, et al. Bone morphogenetic protein-associated complications in pediatric spinal fusion in the early postoperative period: an analysis of 4658 patients and review of the literature [J]. J Neurosurgery Pediatr,2014, 14(6):635-643.
- [8] Zhang H, Lin CY. Simvastatin stimulates chondrogenic phenotype of intervertebral disc cells partially through BMP-2 pathway [J]. Spine,2008, 33(16): E525-E531.
- [9] 邹立学,郑启新,李景峰,等. 辛伐他汀对兔髓核细胞的影响 [J]. 中华实验外科杂志,2010,(11):1618-1620.
- [10] Than KD, Rahman SU, Wang L, et al. Intradiscal injection of simvastatin results in radiologic, histologic, and genetic evidence of disc regeneration in a rat model of degenerative disc disease [J]. Spine J,2014, 14(6):1017-1028.
- [11] Mir M, Ahmed N, Rehman AU. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery [J]. Colloids Surf B Biointerfaces,2017, 159:217-231.
- [12] 陈涛,刘忠军,王静成,等. 经皮细针穿刺纤维环建立建立大鼠尾椎椎间盘退变动物模型 [J]. 中国医师杂志,2018,20(3): 347-351
- [13] Urrutia J, Besa P, Campos M, et al. The Pfirrmann classification of lumbar intervertebral disc degeneration: an independent inter- and intra-observer agreement assessment [J]. Eur Spine J, 2016, 25(9):2728-2733.
- [14] Keorochana G, Johnson JS, Taghavi CE, et al. The effect of needle size inducing degeneration in the rat caudal disc: evaluation using radiograph, magnetic resonance imaging, histology, and immunohistochemistry [J]. Spine J,2010, 10(11):1014-1023.
- [15] Norcross JP, Lester GE, Weinhold P, et al. An in vivo model of degenerative disc disease [J]. J Orthop Res,2003, 21(1):183-188.
- [16] 黄泽楠,刘忠军,王静成,等. 辛伐他汀对大鼠髓核间充质干细胞增殖及分泌功能的影响 [J]. 中国脊柱脊髓杂志,2017, 27(7):627-633.