

人 TRAIL 基因原核表达载体的构建及鉴定 *

刘转转¹ 郝林² 范涛² 贺厚光² 尤红娟¹ 汤仁仙¹ 韩从辉^{2△}

(1 徐州医学院病原生物与免疫学教研室 江苏 徐州 221004 2 徐州市中心医院泌尿外科 江苏 徐州 221009)

摘要 目的:克隆肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)基因片段(114~281 氨基酸残基)并构建原核表达载体。方法:取健康人外周血提取总 RNA,设计合成引物并引入 EcoR I 和 Xho I 酶切位点,RT-PCR 扩增 TRAIL 基因的胞外区片段,克隆入原核表达载体 pGEX-6P-1 中,经双酶切、PCR 及测序鉴定阳性克隆。结果:从外周血 cDNA 中扩增出 501 bp 的目的片段,测序结果证实成功构建重组质粒 pGEX-6P-1/TRAIL。结论:成功构建 TRAIL 基因的原核表达载体 pGEX-6P-1/TRAIL,为肿瘤细胞的凋亡研究提供理论依据。

关键词 TRAIL RT-PCR 克隆

中图分类号 Q75, Q78, R730.231 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)07-1220-04

Construction and Identification of Prokaryotic Expression Vector of Human TNF-related Apoptosis Inducing Ligand*

LIU Zhuan-zhuan¹, HAO Lin², FAN Tao², HE Hou-guang², YOU Hong-juan¹, TANG Ren-xian¹, HAN Cong-hui^{2△}

(1 Department of Microbiology and Immunology, Xuzhou Medical College, Xuzhou Jiangsu 221004, China;

2 Department of urology, Xuzhou Central Hospital, 221009, Xuzhou, China)

ABSTRACT Objective: To clone and construct the prokaryotic expression vector of the TNF-related apoptosis inducing ligand gene (amino acids 114~281). **Methods:** RNA was extracted from the peripheral blood of health adult. A pair of primers with restriction site EcoR I/Xho I was designed. The extracellular domain region of TRAIL gene was amplified by RT-PCR and then cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-6P-1. The recombinants were confirmed by EcoR I/Xho I digestion, PCR, and DNA sequencing. **Result:** The extracellular domain region with a molecular size of 501 bp of TRAIL gene was amplified successfully. DNA sequencing showed that the recombinant plasmid was successfully constructed. **Conclusion:** A prokaryotic expression vector pGEX-6P-1/TRAIL was constructed successfully, which provides theory for tumor apoptosis research.

Key words: TRAIL; RT-PCR; Cloning

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78, R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)07-1220-04

前言

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL), 又称凋亡素-2 配体 (Apo-2L), 属于肿瘤坏死因子家族成员, TRAIL 能特异性诱导肿瘤细胞凋亡而对正常细胞无影响^[1]。因此, 在肿瘤治疗领域具有潜在的应用前景^[2]。

人 TRAIL 基因在脾、肺、前列腺等组织以及外周血淋巴细胞中均有表达^[3], 其 cDNA 全长为 1042 bp, 编码 281 个氨基酸, 为典型的 I 型跨膜蛋白, 由胞浆区(14 个氨基酸)、跨膜区(26 个氨基酸)和胞膜外区(241 个氨基酸)组成, C 端 114~281 氨基酸残基形成一个同源的三聚体结构, 其可与受体结合。TRAIL 最早由 Wiley SR 等^[4] 从人心肌 cDNA 文库中克隆。TRAIL 通过与其受体特异性结合而介导肿瘤细胞的凋亡, 但其诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制尚未完全阐明。本研究以正常人外周血淋巴细胞的 TRAIL 全长 cDNA 为模板, RT-PCR 扩增

了 TRAIL 的胞外区片段(114~281 氨基酸残基), 经酶切和测序证实其正确性, 为进一步研究及临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

原核表达质粒 pGEX-6P-1 购自 Novagen 公司, E.coli DH5α 购自北京全式金公司, 限制性内切酶 EcoR I、Xho I、T4DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶均购自 MBI Fermentans 公司, 质粒抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自 Promega 公司, TRIzol、逆转录试剂盒购自上海生工生物技术公司, DNA marker 和氨苄青霉素购自北京天根生物技术公司, 其它试剂为国产分析纯。

1.2 RT-PCR 引物

根据 TRAIL 基因编码序列 (Genebank accession U37518) 设计引物。上游引物: 5'- CCGGAATTCGTGAGA GAAAGAG-GTCCTC-3', 共 28 个碱基, GAATTC 为 EcoR I 酶切位点, CCG

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30973443) 徐州市科技计划项目(XM08C055)

作者简介: 刘转转(1983-), 女, 医学硕士, 主要研究方向: 感染与免疫, E-mail: liouzhuazhuan12@163.com

△通讯作者: 韩从辉, 电话: 13813461893, E-mail: hancongdoctor@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2010-12-07 接受日期: 2010-12-31)

为该酶的保护碱基。下游引物 5'- CCGGCTCGAGTTAGC-CAACTAAAAAGGCC-3', 共 30 个碱基,CTCGAG 为 Xho I 酶切位点,CCGG 为该酶的保护碱基,引物由上海生工生物技术公司合成。

1.3 人外周血淋巴细胞分离

采人静脉血 2 mL 加入肝素抗凝管,轻轻混匀,然后用毛细吸管吸取抗凝血缓慢加入含 2 mL 淋巴细胞分离液的离心管,离心 2 000 r/min,15 min 后取出,用吸管轻轻吸取离心管内的单个核细胞层至另一干净试管内,生理盐水洗涤 3 次,每次 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清,用适量生理盐水重悬沉淀,调整细胞浓度至 10^6 /mL。

1.4 淋巴细胞总 RNA 提取及逆转录

在上述细胞悬液中,加入 TRIzol 充分混匀,然后加入氯仿进行相分离,取水相用异丙醇沉淀 RNA,再用 75 %乙醇洗涤沉淀,适量的 0.1 % DEPC 水溶解。

逆转录反应体系为 20 μ L, 包括细胞 RNA 1 μ g, OligodT₁₅ 1 μ L, 70 °C 水浴 10 min 后,立即冰浴 2 min。补加 dNTP (10 mM) 2 μ L, M-MLV 缓冲液 2 μ L, M-MLV 逆转录酶 (200 U) 1 μ L, Rnase 抑制剂 0.5 μ L, MgCl₂ (25 mM) 4 μ L, 加 0.1 % DEPC 水至 20 μ L, 于 42 °C 水浴 1 h, 经 70 °C, 10 min 终止反应, -20 °C 保存。

1.5 TRAIL 基因扩增

以合成的 cDNA 为模板进行 PCR, 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定。琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。

1.6 TRAIL 基因与载体的连接、转化及鉴定

将 PCR 产物 (TRAIL) 和原核表达质粒 pGEX-6P-1 经 EcoR I, Xho I 双酶切, 琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化酶切产物。目的基因 (501 bp) 与质粒 (4900 bp) 按 10 : 1 摩尔比混合于 25 μ L 反应体系中, 16 °C 连接 16-20 h。取连接产物 10 μ L 转化入 E.coli DH5 α 感受态细胞, 氨苄青霉素筛选阳性克隆, 对阳性克隆提取质粒进行 PCR 及双酶切, 1 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 阳性菌液送上海 Invitrogen 公司测序鉴定。

2 结果

2.1 TRAIL 基因的 RT-PCR 结果

TRAIL 的胞外区片段为 501 bp。依据本文设计的引物扩增目的基因, PCR 产物经 1 % 的琼脂糖凝胶电泳显示, 在约 500 bp 处有一特异扩增条带, 分子量大小与预期值相符 (图 1)。

2.2 重组质粒 pGEX-6P-1/TRAIL 的鉴定结果

重组质粒 pGEX-6P-1/TRAIL 进行 EcoR I + Xho I 双酶切和 PCR 扩增鉴定, 结果显示 pGEX-6P-1/TRAIL 双酶切可见约 4 900 bp 和 501 bp 两条带, PCR 扩增出约 501 bp 的目的片段。以上结果表明已获得 pGEX-6P-1/TRAIL 重组质粒 (图 2)。

2.3 重组质粒测序结果

重组质粒 pGEX-6P-1/TRAIL 用通用引物, 正方向进行序列测定, 测序结果与已发表的基因 (Genebank accession U37518) 序列进行比较, 结果显示完全正确 (图 3)。

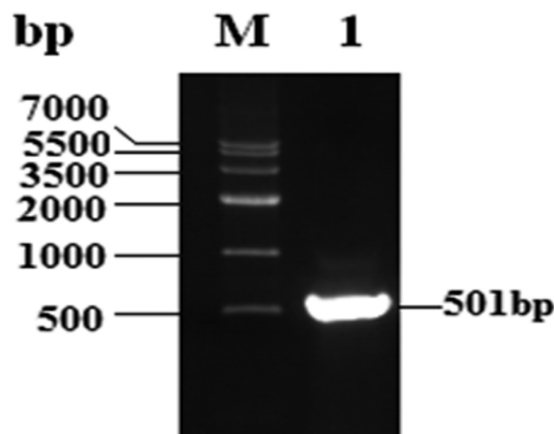


图 1 TRAIL 的 PCR 产物 M: DNA 标准分子量; 1: TRAIL 的 PCR 产物

Fig.1 The PCR products of TRAIL M: DNA marker; 1: The PCR products of TRAIL

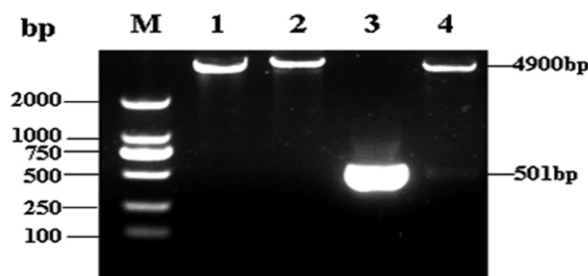


图 2 pGEX-6P-1/TRAIL 重组质粒的酶切和 PCR 鉴定 M: DNA 标准分子量; 1: pGEX-6P-1; 2: pGEX-6P-1/TRAIL; 3: pGEX-6P-1/TRAIL 的 PCR 产物; 4: pGEX-6P-1/TRAIL 的 EcoR 和 Xho 双酶切

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pGEX-6P-1/TRAIL by restriction digestion and PCR M: DNA marker; 1: pGEX-6P-1; 2: pGEX-6P-1/TRAIL; 3: EcoR and Xho digested pGEX-6P-1/TRAIL; 4: PCR products using pGEX-6P-1/TRAIL as template

Query	54	GTGAGAGAAAGAGGTCCTCAGAGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACAGAGGAAGAAGC	113
Sbjct	435	GTGAGAGAAAGAGGTCCTCAGAGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACAGAGGAAGAAGC	494
Query	114	AACACATGTCTTCTCCTCAAACTCCAAGAATGAAAGGCTCTGGGCGGCAAAATAAATCC	173
Sbjct	495	AACACATGTCTTCTCCTCAAACTCCAAGAATGAAAGGCTCTGGGCGGCAAAATAAATCC	554
Query	174	TGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTCACTCTGAGCACTTGCACTTGAGGAATGTTGAA	233
Sbjct	555	TGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTCACTCTGAGCACTTGCACTTGAGGAATGTTGAA	614
Query	234	CTGGTCATCCATGAAAAGGGTTTACTACATCTATTCCCAACATACCTTTGGATTTCAG	293
Sbjct	615	CTGGTCATCCATGAAAAGGGTTTACTACATCTATTCCCAACATACCTTTGGATTTCAG	674
Query	294	GAGGAATAAAGAAAACACAAGAGACAAACAAATGGTCCAATATATTACAAATAC	353
Sbjct	675	GAGGAATAAAGAAAACACAAGAGACAAACAAATGGTCCAATATATTACAAATAC	734
Query	354	ACAAGTTATCTGACCCCTATATTGTGATGAAAAGTGCTAGAAATAGTTGTTGGTCTAAA	413
Sbjct	735	ACAAGTTATCTGACCCCTATATTGTGATGAAAAGTGCTAGAAATAGTTGTTGGTCTAAA	794
Query	414	GATGAGAAATATGGACTCTATTCCATCTATCAAGGGGGAATATTGAGCTTAAGGAAAT	473
Sbjct	795	GATGAGAAATATGGACTCTATTCCATCTATCAAGGGGGAATATTGAGCTTAAGGAAAT	854
Query	474	GACAGAAATTTTGTCTGTAAACAATGAGCACTTGATAGACATGGACCATGAAGCAGT	533
Sbjct	855	GACAGAAATTTTGTCTGTAAACAATGAGCACTTGATAGACATGGACCATGAAGCAGT	914
Query	534	TTTTTCGGGCTTTT TAGTTGGCTAACT 562	
Sbjct	915	TTTTTCGGGCTTTT TAGTTGGCTAACT 943	

图 3 克隆的 TRAIL 基因与已发表的 TRAIL 基因序列比较

Fig.3 Alignment of gene order of the cloned TRAIL gene and the known TRAIL gene

3 讨论

细胞凋亡是自身维持体环境稳态平衡的一种程序性自杀

机制,它可为机体清除肿瘤细胞、自身反应性细胞和病毒感染细胞,对维持生物体的正常发育起着不可或缺的作用。肿瘤发生的一个重要原因就是发生转化的细胞不能正常凋亡,细胞凋亡异常在大多数恶性肿瘤的发病机制上已经占有重要地位^[5]。

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)家族的成员都是广谱抗肿瘤细胞因子,能够诱导多种肿瘤细胞发生凋亡,并且其抗肿瘤效应可以不依赖于肿瘤细胞的 P53 基因状态,因此一直是肿瘤治疗研究的热点^[6]。在目前已经发现的 TNF 家族的成员中, TNF- α 在发挥其抗肿瘤作用的过程中会产生类似败血症性休克的严重炎症反应,而 FasL 或 Fas 抗体在治疗肿瘤时可以导致致命的肝脏损害,因此基于 TNF 或 FasL 的死亡受体配体系统在肿瘤治疗的临床应用受到了极大的限制。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand TRAIL)是继 TNF 和 FasL 之后发现的第三个 TNF 超家族的新成员,其最大特点是能够诱导多种肿瘤细胞和转化细胞发生凋亡而对正常细胞却没有明显的毒副作用, TRAIL 对肿瘤细胞的选择性杀伤效应为以死亡受体配体系统为基础的肿瘤治疗研究带来了新的希望^[7]。

TRAIL 广泛表达于脾、胸腺、前列腺、膀胱、肺、小肠、外周血淋巴细胞等多种正常组织,尤其是在活化的 CD3⁺ 细胞及 CD4⁺、CD8⁺、TCR 细胞表面,均可以检测到 TRAIL 的高水平表达,由此人们推测 TRAIL 可能对细胞的增殖与死亡,特别是对 T 和 B 淋巴细胞的活化有着很重要的功能^[8]。目前已确认的 TRAIL 受体有五个:(1)两个功能受体 DR4(death receptor 4)和 DR5(death receptor 5),死亡受体 DR4、DR5 分别由 468 个氨基酸和 411 个氨基酸组成,均为 I 型跨膜糖蛋白,两者细胞外区域都含有两段富含半胱氨酸的结构域(cysteine-rich domains, CRDs),细胞内区域含有一段死亡结构域(death domain, DD),与 TRAIL 结合后可激发并传导死亡信号,激活半胱氨酸蛋白酶级联反应,诱导细胞凋亡,故为死亡受体。(2)两个诱骗受体 DcR1 (decoy receptor1) 和 DcR2 (decoy receptor2):诱骗受体 DcR1、DcR2 分别由 299 个氨基酸和 386 个氨基酸组成,广泛表达于正常组织。其中 DcR1 无细胞内死亡结构域, DcR2 仅有 1/3 死亡结构域,不能传导凋亡信号。两者细胞外区域都含有 CRDs,与 DR4、DR5 的细胞外功能区同源性很高,故能竞争性结合 TRAIL,使正常细胞逃逸 TRAIL 介导的凋亡^[9]。

虽然 TNF- α 和 FasL 都能诱导肿瘤细胞凋亡,但 TNF- α 会激活核因子 NF- κ B 而产生严重的炎症反应, FasL 会引起致命的肝损伤,这二者的毒副作用极大地限制了它们在肿瘤治疗上的应用。TRAIL 与前两者比较,其优势在于:(1) TNF- α 与 FasL 大都表达于激活的免疫细胞,而 TRAIL 却持续地表达于大多数正常细胞中;(2)具有强大诱导肿瘤细胞凋亡的能力,但对正常细胞基本无影响;(3)比 FasL 有更广的抗癌谱;(4)对核因子 NF- κ B 仅有很微弱的激活作用,即使是全身用药,也不会象 TNF- α 那样产生严重的炎症反应。因此, TRAIL 被认为是一种更为安全且极具潜力的抗肿瘤因子。这预示着 TRAIL 可能成为一种新的抗肿瘤药物^[10]。

对 TRAIL 的研究,从最初的全长表达,然后不断截断,目的是为得到分子量更小,生物活性更强的蛋白用于肿瘤的治疗和研究。研究表明,从 95 位残基或 104 位残基开始构建克隆表

达的蛋白均有活性。王军^[11]等运用晶体结构分析显示 TRAIL 的 N 端活性最佳的部位为 114 位氨基酸。本文应用 RT-PCR 扩增 TRAIL 的 114~281 氨基酸残基,插入原核表达载体 pGEX-6P-1 的多克隆位点,经双酶切, PCR 测序鉴定证实我们已成功构建重组质粒 pGEX-6P-1/TRAIL。

TRAIL 具有分布广、靶向性强的特点,可以特异性地结合死亡受体(DR),经接头蛋白介导,激活 caspases 而快速、直接地启动肿瘤细胞的凋亡过程^[12]。正常细胞内存在与 DR 高度同源的诱骗受体,与 TRAIL 竞争性结合而逃避凋亡。TRAIL 能抑制前列腺癌、膀胱癌、肺癌及鼻咽癌等肿瘤细胞生长并产生细胞毒效应^[13-16],而人体正常细胞对 TRAIL 诱导的凋亡呈免疫耐受。本文构建的重组质粒 pGEX-6P-1/TRAIL 将进一步用于 TRAIL 蛋白的表达研究, pGEX-6P-1 作为原核表达载体,将外源基因置于载体蛋白谷胱甘肽 S 转移酶(GST)基因之后,可以减少大肠杆菌稀有密码子对真核基因表达的影响,容易诱导目的蛋白高效表达,又便于纯化目的蛋白^[17]。

参考文献(References)

- [1] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family[J]. J Biol Chem, 1996, 271(22): 12687-90
- [2] 郝林,史振铎,韩从辉. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)及抗肿瘤作用.现代生物医学进展, 2009, 9(20): 3983-3985
Hao Lin, Shi Zhen-duo, Han Cong-hui. TRAIL and Anti-Tumor Effect, Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(20): 3983-3985
- [3] Secchiero P, Vaccarezza M, Gonelli A, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a potential candidate for combined treatment of hematological malignancies [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(29): 3673-3681
- [4] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. Immunity, 1995, 3(6): 673-682
- [5] Almer M, vander Sloot, Vicente Tur, et al. Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor. PNAS[J]. 2006, 103: 8634-8639
- [6] MP Simons, WM Nauseef, TS Griffith. et al. insights into BCG immunotherapy for bladder cancer [J]. Immunol Res, 2007,39 (1-3): 79-93
- [7] Dorsey JF, Mintz A, Tian XB, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and paclitaxel have cooperative in vivo effects against glioblastoma multiforme cells [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8: 3285-3295
- [8] Dmitri V, Rozanov, Alexei Y, et al. Engineering a leucine zipper-TRAIL homotrimer with improved cytotoxicity in tumor cells[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8: 1515-1525
- [9] Mitchell RS, Fang J, Indira J. Bortezomib Sensitizes Non-Hodgkin's Lymphoma Cells to Apoptosis Induced by Anti bodies to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 [J]. Clin Cancer Res, 2007,13: 5528-5534
- [10] HM Rosevear, AJ Lightfoot, MA O'Donnell, et al. The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma

- of the bladder[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009,28(3-4): 345-353
- [11] 王军, 于雯华, 康舒里, 等. 重组可溶性人 TRAIL 抑制肿瘤细胞增殖[J]. 武汉大学学报(理学版), 2005, 51(4): 467-471
- Wang Jun, Yu Wen-hua, Kang Shu-li, et al. Antitumor Activity of Recombinant Soluble Human TRAIL[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 2005, 51(4): 467-471
- [12] Tong H, Lu C, Yang Y, et al. Role of caspase 8 as a determinant in trail sensitivity of neuroblastoma cell lines[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2009, 26(8): 549-559
- [13] Zoog SJ, Ma CY, Kaplan-Lefko PJ, et al. Measurement of conatumumab-induced apoptotic activity in tumors by fine needle aspirate sampling [J]. Cytometry A, 2010, 77(9): 849-860
- [14] Sanlioglu AD, Karacay B, Koksali IT, et al. DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells [J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(12): 976-984
- [15] 陈剑秋, 朱春生, 贡振扬, 等. 肿瘤靶向性人可溶性 TRAIL 载体的构建及其在鼻咽癌细胞株 CNE-2 的表达[J]. 中国耳鼻喉咽喉底外科杂志, 2007, 13(6): 407-410
- Chen Jian-qiu, Zhu Chun-sheng, Gong Zhen-yang, et al. Cloning of soluble hTRAIL tumor-specific vector and expression in nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-skull Base Surgery, 2007, 13(6): 407-410
- [16] Wang D, Shi L. High-level expression, purification, and in vitro refolding of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 157(1): 1-9
- [17] 刘洪波, 范学工, 李宁, 等. 可溶性 GS-TrhTRAIL₍₅₅₋₂₈₁₎最佳表达条件及凋亡活性研究[J]. 生命科学研究, 2005, 9(3): 267-271
- Liu Hong-bo, Fan Xue-gong, Li Ning, et al. Optimum Expression Conditions and Detection Apoptosis Activity of Soluble GST-rh TRAIL₅₅₋₂₈₁ [J]. Life Science Research, 2005, 9(3): 267-271
-
- (上接第 1227 页)
- [16] 刘宏伟, 孙俊英, 王勇, 等. 生物活性玻璃复合自体骨髓移植修复良性骨肿瘤术后骨缺损 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(11): 1349-1353
- Liu Hong-wei, Sun Jun-ying, Wang Yong, et al. Repairing bone defects of benign bone neoplasm by grafting of bioactive glass combined with autologous bone marrow [J]. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery, 2008, 22(11): 1349-1353
- [17] 殷浩, 孙俊英, 赖震, 等. 生物活性玻璃在四肢骨不连及骨缺损中的应用[J]. 苏州大学学报, 2007, 27(4): 629-630
- Yin Hao, Sun Jun-ying, Lai Zhen, et al. Applications of bioactive glass in bone nonunion and bone incomplete of limbs [J]. Academic Journal of Suzhou University, 2007, 27(4): 629-630
- [18] 杨兴, 孙俊英, 刘宏伟等. 经椎弓根内固定附加生物活性玻璃行椎体后外侧融合治疗胸腰椎爆裂骨折 [J]. 中国临床实用医学, 2009, 3(1): 46-48
- Yang Xing, Sun Jun-ying, Liu Hong-wei, et al. Pedicle screw fixation combining with the bioactive glass posterolateral fusion in the treatment of thoracolumbar burst fractures[J]. China Clin Prac Med, 2009, 3(1): 46-48
- [19] 殷浩, 孙俊英, 赖震等. 生物活性玻璃结合椎弓根钉翻修术治疗腰椎内固定失败[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2008, 23(1): 4-6
- Yin Hao, Sun Jun-ying, Lai Zhen, et al. Revision of Lumbar Pedicle Screw Internal Instrumentation with Bioactive Ceramic [J]. Chinese Journal of Bone and Joint Injury, 2008, 23(1): 4-6
- [20] Reitman CA, Nguyen L, Fogel GR. Biomechanical evaluation of relationship of screw pullout strength, insertional torque, and bone mineral density in the cervical spine [J]. J Spinal Disord Tech, 2004, 17(4): 306-311