

高能震波对兔缺血性坏死股骨头血管内皮生长因子表达的影响*

马焕芝¹ 曾炳芳^{1,2} 李晓林¹ 柴益民¹

摘要

目的:观察高能震波对缺血性坏死股骨头血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响,探讨高能震波治疗股骨头缺血性坏死的作用机制。

方法:健康雄性新西兰白兔 32 只,3.0—4.0kg,平均 3.1kg。联合应用甲基强的松龙和内毒素 6 周诱发双侧早期股骨头缺血性坏死的动物模型。所有实验兔左后腿作为治疗侧,采用能流密度 0.26mJ/mm²,频率 1Hz,冲击量为 2000 次的高能震波治疗,右后腿作为对照侧,不予治疗。分别于治疗后第 1、2、4、8、12 周各取 6 只动物处死,取股骨头标本行实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、免疫组化染色,检测 VEGF 的表达。

结果:高能震波治疗显著增加了兔股骨头骨组织中 VEGF mRNA 的表达,治疗侧股骨头 VEGF mRNA 的表达在治疗后第 1、2、4 和 8 周显著高于对照侧,在治疗后第 2 周 VEGF mRNA 的表达最高。高能震波治疗后第 4、8 和 12 周,治疗侧股骨头 VEGF 平均染色面积百分比显著高于对照侧($P<0.01$, $P<0.01$ 和 $P<0.01$)。高能震波治疗后第 2、4、8 和 12 周,治疗侧股骨头 VEGF 平均吸光度显著高于对照侧($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$ 和 $P<0.01$)。

结论:高能震波治疗能有效促进缺血性坏死股骨头 VEGF 的表达,可能有助于增加股骨头的血管生成,加速股骨头坏死的修复。

关键词 股骨头坏死; 糖皮质激素类; 高能震波; 血管内皮生长因子

中图分类号:R683 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-01-0013-06

Effect of high energy shock wave on the expression of vascular endothelial growth factor in adult rabbits with avascular necrotic femoral head/MA Huanzhi, ZENG Bingfang, LI Xiaolin, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(1): 13—18

Abstract

Objective: To investigate the effect of high energy shock wave on the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in adult rabbits with avascular necrotic femoral head, and to explore the mechanism of high energy shock wave treated on avascular femoral head necrosis.

Method: Thirty-two male adult New Zealand white rabbits, weight 3.0 to 4.0 kg (average weight 3.1 kg) were used to establish rabbit models of avascular femoral head necrosis. Bilateral femoral head necrosis was induced by methylprednisolone and endotoxin. The left hind limbs (treatment sides) of all rabbits received high energy shock wave treatment on femoral heads and the right limbs (control sides) of all rabbits received no shock wave treatment. The rabbits were sacrificed at the 1st (n=6), 2nd (n=6), 4th (n=6), 8th (n=6) and 12th (n=6) week after shock wave therapy respectively. The femoral heads were harvested and freed of soft tissue and cartilage. Immunohistochemistry staining and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques were used for the detection of VEGF.

Result: Compared with the contralateral control without high energy shock wave treatment, the VEGF mRNA expression levels increased to high level at the 1st, 2nd, 4th, 8th week after treatment and reached to the peak at

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571898); 1 上海交通大学附属第六人民医院骨科,上海,200233; 2 通讯作者
作者简介:马焕芝,男,博士,主治医师; 收稿日期:2009-03-17

the 2nd week after treatment. At the 4th,8th and 12th week after treatment, the average percentage of VEGF staining areas of femoral heads in treatment sides was significantly higher than those in control sides ($P<0.01,P<0.01,P<0.01$,). At the 2nd,4th,8th and 12th week after treatment, the VEGF average optical density of the femoral heads in treatment sides was significantly higher than that in control sides($P<0.01,P<0.01,P<0.01,P<0.01$,).

Conclusion: High energy shock wave may provide the effect of promoting the expression of VEGF in necrotic femoral head of rabbit, increasing angiogenesis of necrotic femoral head, and accelerating the repairing process of femoral head necrosis.

Author's address Department of Orthopaedic Surgery, the 6th People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200233

Key words femoral head necrosis; glucocorticoids; high energy shock wave; vascular endothelial growth factor

股骨头缺血性坏死是骨科常见病,致残率高,早期治疗是关键。高能震波是一项非侵入性的治疗技术,能刺激骨的生成;临床上用于治疗股骨头缺血性坏死,效果满意^[1],但其作用机制尚不明了^[2]。本实验应用高能震波治疗兔股骨头缺血性坏死,观察高能震波对缺血性坏死股骨头血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达的影响,探讨高能震波(high energy shock waves, HESW)治疗股骨头缺血性坏死的作用机制,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Trizol RNA 提取试剂盒(美国 Life Technologies 公司);逆转录-聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)试剂盒(美国应用生物公司);VEGF 免疫试剂盒(武汉博士德生物有限公司)。

Real-time 检测仪(7300Sequence Detection System 美国应用生物公司);低温冷冻离心机(Sigma 公司);KS400 图像分析系统(Kaiser 公司)。

1.2 股骨头缺血性坏死动物模型的制备

取健康成年雄性新西兰白兔 32 只,体重 3.0—4.0kg,平均 3.1kg。由上海宝牧实验动物养殖场提供。参考 Yamamoto 法^[3],所有动物均行耳缘静脉注射大肠杆菌内毒素(O111:B4 Sigma)10 μ g/kg,24h 后重复给药一次,在第二次注射大肠杆菌内毒素后,立即臀肌注射甲基强的松龙(美国法码西亚药厂比利时生产厂,进口药品注册证号:H20040338)40mg/kg,共 3 次,每次间隔 24h。给药后 6 周,随机取 2 只兔静脉注射空气处死后,取双侧股骨头行常规组织

学检查,可见骨小梁稀疏、变细,空骨陷窝明显增多(图 1),即证实造模成功。

图 1 用药后 6 周新西兰白兔股骨头髓内脂肪堆积,骨小梁稀疏、变细,空骨陷窝明显增多(HE $\times 40$)



1.3 高能震波治疗实验

采用以色列 MEDISPEC 公司生产的 Orthospec 骨伤科震波治疗仪进行治疗实验。治疗前用脱毛剂(硫酸钡)将兔双髌皮肤绒毛脱净,涂医用超声耦合剂,2.5%的戊巴比妥静脉麻醉,绑扎固定于自制兔台上,将高能震波的焦点对准股骨头。所有实验兔左后腿作为治疗侧,采用能流密度(energy flux density, ED)0.26mJ/mm²,频率 1Hz,冲击量为 2000 次的高能震波治疗,右后腿作为对照侧,不予治疗。

1.4 标本采集

在 6 周高能震波治疗后第 1、2、4、8 和 12 周,随机取 6 只兔处死,取出股骨头,沿冠状面锯开,一部分装入冻存管,置液氮中备用;另一部分 10%福马林固定,5%EDTA 脱钙。

1.5 实时荧光定量 RT-PCR 检测兔股骨头组织 VEGF mRNA

从液氮中取出股骨头标本,取 100mg 股骨头骨组织匀浆,Trizol 提取总 RNA。根据 GenBank 数据库

中获得的基因序列设计引物和探针, VEGF 引物序列:上游引物 F:5'-TGCCACCGAGGAGTTCA-3, 下游引物 R:5'-GGCCCTGGT GAGGTTT GAT-3, 探针 Pro:5'-CGTCACCATGCAGA TCATGCG-3; GAPDH 引物序列:上游引物 F:5'-AAACTCACTGGCATGGCCTT-3, 下游引物 R:5'-TTAGCAGCTTTCTCCAGGCG-3, 探针 Pro:5'-GGTCGTGGACCTGACCTG-3。取 4 μ l RNA 模板做逆转录反应, 反应体系如下:5 \times 逆转录 buffer 4 μ l, 上游引物 F 0.4 μ l, 下游引物 R 0.4 μ l, dNTPs 0.2 μ l, 逆转录酶 MMLV 1 μ l, DEPC 处理水 10 μ l, RNA 模板 4 μ l, 总体积 20 μ l, 反应条件:37 $^{\circ}$ C 1h;95 $^{\circ}$ C 5min。使用美国 ABI 公司的 ABI-7300 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 反应。将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增扩增体系如下:5 \times PCR buffer 10 μ l, 外上游引物 F 0.5 μ l, 外下游引物 R 0.5 μ l, dNTPs 0.5 μ l, 荧光探针 0.5 μ l, Taq 酶 1 μ l, ddH₂O 水 32 μ l, cDNA 模板 5 μ l, 总体积 50 μ l。扩增条件:①93 $^{\circ}$ C 2min;②93 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 1min, 10Cycle;③93 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 1min, 30Cycle。Ct 值相对定量, Ct 值是指每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值所经历的循环数, 用相对定量表达样本基因的数量。先选看家基因 GAPDH 的数量作内参进行标准化, 再任选一标本的数量进行校正, 通过公式计算得出目的基因的表达量。

Δ Ct=目的基因的 Ct 值-GAPDH 的 Ct 值; $\Delta\Delta$ Ct=某一标本的 Δ Ct-校正标本的 Δ Ct; 某一标本目的基因的数量通过公式计算得出: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

1.6 免疫组化染色

股骨头标本用 10%福马林固定, 5%EDTA 脱钙, 常规脱水脱脂, 低熔点石蜡(56 $^{\circ}$ C)包埋, 切片作免疫组织化学染色。免疫组织化学染色采用过氧化酶标记的链霉卵白素 (streptavidin-peroxidase, S-P) 免疫组织化学方法。应用 VEGF 单克隆抗体效价为 1:100。免疫组织化学染色观察指标:平均染色面积百分比和平均吸光度, 计算机自动统计分析系统测出每张切片中的 5 个骨小梁视野和 5 个髓腔内视野的阳性染色面积占整个观察视野面积的百分比和吸光度, 取其算术平均值平均染色面积百分比和平均吸光度, 前者代表 VEGF 分布面积的大小, 后者代表

单位面积内 VEGF 含量。

1.7 统计学分析

所有数据以均值 \pm 标准差表示, 应用 SPSS11.5 进行数据分析, 采用完全随机设计的单因素方差分析, 两两比较采用其中的 Student-Neuman-Keuls 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实时荧光定量 RT-PCR 检测兔股骨头组织 VEGF mRNA

高能震波治疗显著增加了兔股骨头骨组织中 VEGF mRNA 的表达, 治疗侧股骨头 VEGF mRNA 的表达在治疗后第 1、2、4 和 8 周显著高于对照侧, 在治疗后第 2 周 VEGF mRNA 的表达最高 (图 2—4)。

2.2 免疫组化结果

对照侧股骨头软骨下骨组织中骨化细胞和血管内皮细胞有少量 VEGF 的阳性表达。高能震波治疗后第 2—4 周, 骨化细胞和血管内皮细胞 VEGF 的表达增强。治疗后第 8 周, 纤维肉芽组织中的成纤维细胞和血管内皮细胞有 VEGF 的强阳性表达, 骨基质和骨细胞也有 VEGF 的阳性表达。治疗后第 12 周, 骨小梁和骨髓中均有 VEGF 的表达, 沿骨小梁排列的骨化细胞 VEGF 的表达呈强阳性 (图 5)。治疗后第 4—12 周, 治疗侧股骨头 VEGF 的平均染色面积百分比和平均吸光度均显著高于对照组 (表 1)。

表 1 高能震波治疗后不同时间点兔股骨头 VEGF 免疫组化图像分析结果 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

时间	动物数	平均染色面积百分比 (%)		平均吸光度 (A)	
		对照组	治疗组	对照组	治疗组
第 1 周	6	3.66 \pm 0.76	4.22 \pm 1.71 ^①	0.146 \pm 0.027	0.116 \pm 0.020 ^①
第 2 周	6	3.99 \pm 1.84	6.29 \pm 2.07 ^①	0.128 \pm 0.025	0.191 \pm 0.035 ^②
第 4 周	6	4.25 \pm 0.93	10.42 \pm 2.39 ^②	0.164 \pm 0.014	0.259 \pm 0.030 ^②
第 8 周	6	5.95 \pm 1.69	20.20 \pm 3.95 ^②	0.152 \pm 0.022	0.484 \pm 0.067 ^②
第 12 周	6	6.51 \pm 2.44	16.26 \pm 3.05 ^②	0.185 \pm 0.026	0.394 \pm 0.056 ^②

①与对照组比较 $P>0.05$; ②与对照组比较 $P<0.01$

3 讨论

高能震波是高压放电而产生的一种高能冲击波, 以声学特性传播, 只有在相同声阻抗的递质中才能不衰减地直线传导。由于人体软组织的声阻抗和水相似, 而骨组织和结石的声阻抗相同, 大约是水的

图2 VEGF 基因(mRNA)扩增动力学曲线

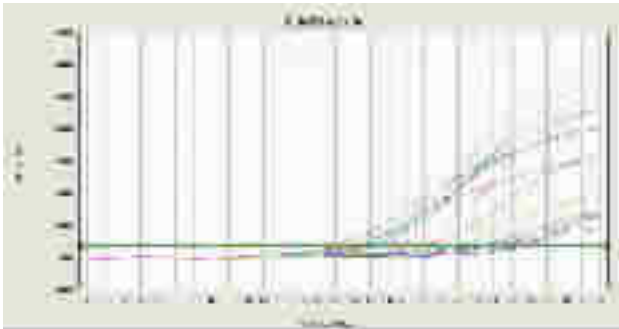


图3 GAPDH 基因(mRNA)扩增动力学曲线

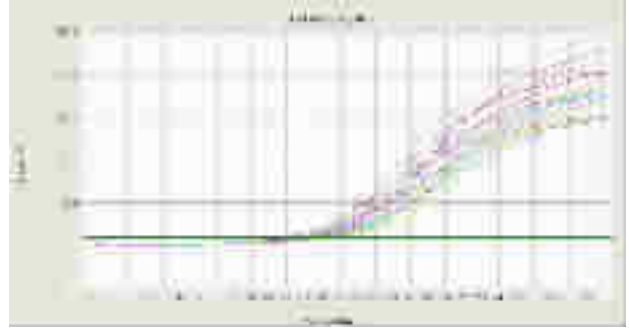
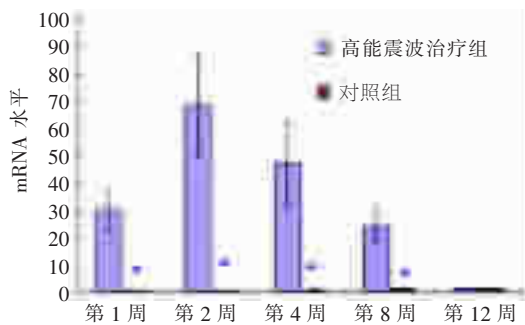


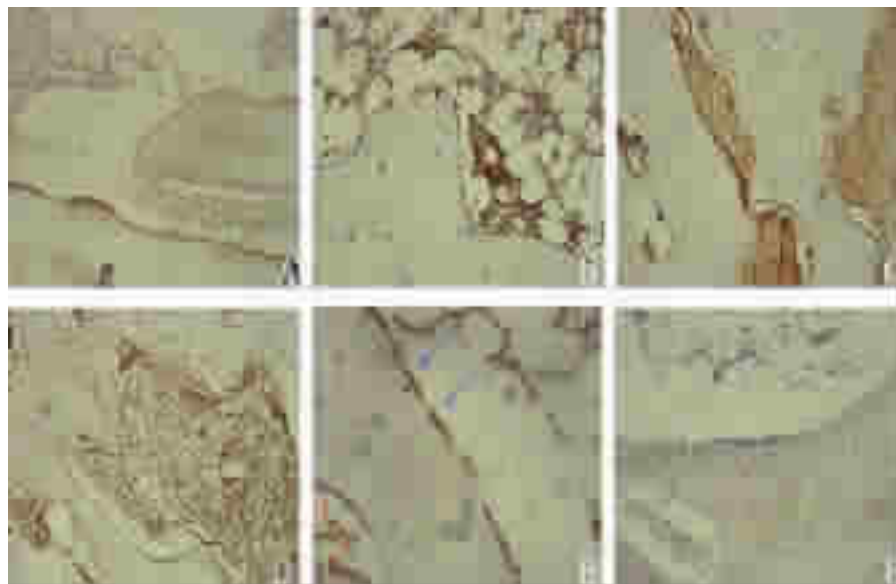
图4 高能震波治疗组和对照组股骨头在治疗后第1、2、4、8和12周 VEGF mRNA 的表达



* 与对照组比较 $P < 0.05$; (将治疗后第1周对照组 VEGF mRNA 的表达量标准化为 1)

5倍。高能震波穿过人体软组织时不会衰减和引起组织损伤,遇到不同密度或声阻抗界面时,由于声阻抗突然改变,震波能量就会释放出来,产生机械应力,造成结石或骨的碎裂,引起组织细胞的生物化学效应。临床上,高能震波技术除用于治疗尿路结石、涎腺结石和胆囊、胰管结石外,近年来在国内外还广泛用于骨科领域,并且在治疗一些肌肉骨骼疾病方面取得较好的疗效。高能震波技术具有非侵入性、组织损伤小、疗效显著等优点。应用高能震波技术治疗骨不连、骨折延迟愈合、肩周炎、网球肘及跟痛症,已逐渐为临床骨科医生所接受^[1,4-8],甚至有学者提出

图5 高能震波治疗后股骨头 VEGF 免疫组织化学染色观察



A: 对照侧股骨头软骨下骨组织中骨化细胞和血管内皮细胞有少量 VEGF 的阳性表达 ($\times 200$); B: 治疗后第4周骨化细胞和血管内皮细胞 VEGF 的表达增强 ($\times 200$); C: 治疗后第8周纤维肉芽组织中 VEGF 强阳性表达 ($\times 200$); D: 治疗后第12周骨小梁和骨髓中均有 VEGF 的表达 ($\times 200$); E: 高倍镜下显示骨化细胞和血管内皮细胞中 VEGF 的阳性表达 ($\times 400$); F: 阴性对照 ($\times 200$)

将冲击波作为治疗上述疾患的首选途径^[9]。随着高能震波治疗在骨科应用和研究的广泛开展,对高能震波的生物学特性的认识不断加深。研究发现,高能震波对骨组织不仅能造成微小骨折,形成小血肿,刺激骨痂生长,诱导骨生长,促进骨愈合;同时也有刺激局部血管再生的生物学作用^[9-10]。因而有学者尝试应用高能震波治疗股骨头坏死^[11]。高能震波是一项非侵入性的治疗技术,以适当的能量强度和脉冲次数作用于骨组织时,能刺激骨的生成;临床上用于治疗骨折延迟愈合或不连接、股骨头缺血性坏死,效果满意^[2]。尽管临床与实验研究都证实高能震波具有促进骨生成的作用,但机制尚不清楚^[1-2,12],因此有关高能震波促进骨生成的实验与临床研究仍在继续。

骨细胞通过其机械性刺激感受器对机械刺激产生反应,将生物物理刺激转换成生物化学信号,改变细胞的基因表达和适应性。高能震波通过脉冲声能和压力引起骨组织的增殖性、适应性塑建反应,有利于骨的修复^[13]。Dorotka等^[14]研究发现,骨髓基质细胞的增殖率随高能震波的剂量和脉冲次数的增加而增加,却使软骨细胞的增殖能力下降;细胞乳酸脱氢酶的检测分析证实,震波的剂量增加,其对细胞的毒性也增加。可见,震波治疗能够增加骨髓基质细胞的增殖率但并不能促进软骨细胞的增殖,需要对骨髓基质细胞作进一步的体外实验,才能明确其在震波诱导的骨生成机制中所发挥的作用。在应用震波治疗邻近软骨的病变之前,还得进行一系列体内和体外实验,以明确其有效性和安全性。Chen等^[13]首先发现高能震波能促进间充质干细胞分化为骨生成细胞,这一过程是由细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)介导的。随后,他们对ERK和p38激酶在高能震波诱导的骨生成的作用作了进一步的研究。结果发现,鼠节段性股骨缺损经震波治疗后,骨痂中ERK和p38的磷酸化作用增强,促进了细胞的蛋白生物合成和新骨的形成,增加了细胞的有丝分裂和合成代谢。研究表明,高能震波之所以能促进节段性骨缺损的骨形成与ERK和p38的激活有关,在分子水平上证实骨修复过程中骨组织能够将高能震波的物理刺激转换成有丝分裂信号促进软骨和骨的生成。

骨修复过程中,骨痂形成的调节是由骨生长因子的协同表达介导的,骨组织能够通过合成代谢分子或骨组织的细胞因子的释放将物理刺激转换成生物化学信号。研究已经证实高能震波能够有效促进骨的生成,但高能震波释放的声能和高压如何转化为生物学信号,有哪些骨生长因子参与这个过程,这些问题日益受到学者们的关注,因为回答这些问题对于阐明高能震波的作用机制,使之更好地应用于骨科临床具有重要意义。Chen等^[10]在鼠股骨骨缺损部位施加0.16mJ/mm²,500次脉冲的震波,治疗后第3、7、14和28天用RT-PCR技术检测TGF- β 1和VEGF-A的表达。结果发现,震波治疗使TGF- β 1和VEGF-A mRNA在骨缺损组织中的表达显著增加,其中TGF- β 1的免疫反应性在震波治疗后立即被诱导出来,而VEGF-A的表达则有一段延迟时间,在骨化软骨连接处的软骨细胞和骨化细胞中清楚地显示有VEGF-A的表达。他们认为TGF- β 1在间充质干细胞的募集和分化过程中发挥趋化和促有丝分裂作用,促进间充质细胞向骨祖细胞的分化;VEGF-A的表达有利于血管的生成,增加骨缺损部位的血流,促进骨缺损的愈合。多种动物模型的实验研究证实,高能震波能够有效地促进骨生成,其主要机制为骨细胞的选择性破坏、骨小梁的微骨折、髓腔的小量出血、局部生长因子的释放、间充质干细胞的募集、分化以及新生血管的形成^[14]。本研究证实高能震波治疗显著增加了兔股骨头骨组织中VEGF mRNA的表达,治疗侧股骨头VEGF mRNA的表达在治疗后第1、2、4和8周显著高于对照侧,在治疗后第2周VEGF mRNA的表达最高。免疫组化的结果进一步证实了高能震波治疗对VEGF表达的促进作用。本研究的结果与Wang等^[15]的研究结果是一致的,他们将高能震波作用于新西兰白兔跟腱与骨的结合部,发现新生血管的数量增加、与血管生成相关标志物,包括内皮细胞一氧化氮合成酶(eNOS)、VEGF和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达都显著增加。其中eNOS和VEGF第1周就开始升高,持续8周,第12周时下降;而PCNA和新生血管在第4周时开始增加,持续12周。研究结果提示,高能震波首先刺激eNOS、VEGF和PCNA等与血管生成相关的生长因子的表达,进而诱导新

生血管生长,增加局部血供,促进细胞增殖和组织再生,以修复肌腱或骨组织。Chen等^[10]应用高能震波处理鼠股骨节段性骨缺损,通过RT-PCR检测发现,骨折愈合过程中血管生成和软骨内骨化的重要调节因子VEGF的表达显著增加,是它使骨缺损部位的新生血管增加,改善局部血流,促进节段性骨缺损的愈合。

4 结论

本动物实验应用高能震波治疗兔早期股骨头坏死,通过免疫组织化学染色和实时荧光定量RT-PCR检测VEGF的表达和分布,评估高能震波对股骨头VEGF及其基因表达的影响。结果证实高能震波治疗能够显著增加兔股骨头VEGF及其基因的表达,VEGF是促进血管生成的重要细胞因子,并因此促进骨的生成。该细胞因子表达的增加对促进股骨头的血管生成和骨修复具有重要作用,在分子水平上证实高能震波治疗股骨头坏死是有效的,为高能震波治疗股骨头坏死提供了坚实的理论基础。

参考文献

[1] Wang CJ, Chen HS, Chen CE, et al. Treatment of nonunions of long bone fractures with shock waves[J]. Clin Orthop Relat Res, 2001, (387):95—101.
[2] Wang CJ, Wang FS, Huang CC, et al. Treatment for osteonecrosis of the femoral head: comparison of extracorporeal shock waves with core decompression and bone-grafting [J]. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87(11):2380—2387.
[3] Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, et al. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits

with Shwartzman reaction [J]. Clin Orthop Relat Res, 1995, (316): 235—243.
[4] Stasinopoulos D, Johnson MI. Effectiveness of extracorporeal shock wave therapy for tennis elbow (lateral epicondylitis) [J]. Br J Sports Med, 2005, 39(3):132—136.
[5] Wang CJ, Wang FS, Yang KD, et al. The effect of shock wave treatment at the tendon-bone interface—an histomorphological and biomechanical study in rabbits [J]. J Orthop Res, 2005, 23(2): 274—280.
[6] 张璐. 体外冲击波治疗运动员髌腱末端病疗效分析 [J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(10):934—935.
[7] Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, et al. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF- β 1 and IGF-I expression [J]. J Orthop Res, 2004, 22(4):854—861.
[8] 黄国志, 梁东辉, 樊涛, 等. 体外冲击波用于治疗腰脊神经后支损伤综合征的临床观察 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(5):433—434.
[9] McClure SR, Van Sickle D, White MR. Effects of extracorporeal shock wave therapy on bone [J]. Vet Surg, 2004, 33(1):402—408.
[10] Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF- β 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats [J]. J Orthop Res, 2004, 22(3):526—534.
[11] Wang CJ. An overview of shock wave therapy in musculoskeletal disorders [J]. Chang Gung Med J, 2003, 26(4):220—232.
[12] Wang FS, Yang KD, Kuo YR, et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic proteins in extracorporeal shock wave-promoted healing of segmental defect [J]. Bone, 2003, 32(4):387—396.
[13] Chen YJ, Kuo YR, Yang KD, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 kinase in shock wave-promoted bone formation of segmental defect in rats [J]. Bone, 2004, 34(3):466—477.
[14] Dorotka R, Kubista B, Schatz KD, et al. Effects of extracorporeal shock waves on human articular chondrocytes and ovine bone marrow stromal cells in vitro [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2003, 123(7):345—348.
[15] Wang CJ, Wang FS, Yang KD, et al. Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits [J]. J Orthop Res, 2003, 21(6):984—989.

(上接 12 页)

[3] 朱立国, 张清, 高景华, 等. 旋转手法治疗神经根型颈椎病的临床观察 [J]. 中国骨伤, 2005, 18(8):489—490.
[4] 王之虹. 推拿手法学 [M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.81.
[5] 金斌, 邱桂春, 李义凯. 颈椎定点旋转手法所致咔嚓声响的定位研究 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(4):421—422.
[6] 张军, 孙树椿, 武震, 等. 颈椎活动角度测量仪在颈性眩晕疗效评价中的应用 [J]. 中医正骨, 2007, 19(4):10.
[7] 赵定麟. 现代颈椎病学 [M]. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 2001.35.
[8] 裘法祖, 孟承伟. 外科学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996.698.
[9] Trott PH, Percy MJ, Ruston SA, et al. Three-dimensional analysis of active cervical motion: the effect of age and gender. [J]. Clin Biomech (Bristol, Avon), 1996, 11(4):201—206.
[10] 陈肇辉, 黄文华, 赵卫东, 等. 人体颈部活动度在体测量方法研究 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2003, 21(4):411—412.
[11] Martínez-Segura R, Fernández-de-las-Penas C, Ruiz-Sáez M,

et al. Immediate Effects on neck pain and active range of motion after a single cervical high-velocity low-amplitude manipulation in subjects presenting with mechanical neck pain: a randomized controlled trial [J]. J Manipulative Physiol Ther, 2006, 29(7):511—517.
[12] Ylinen J, Nuorala S, Häkkinen K, et al. Axial neck rotation strength in neutral and prerotated postures [J]. Clin Biomech (Bristol, Avon), 2003, 18(6):467—472.
[13] 聂东, 徐明. 肌肉牵拉后即刻收缩与延时收缩对肌张力的影响 [J]. 成都体育学院学报, 2004, 30(3):72—74.
[14] 齐向东, 赵卫东, 李鉴轶, 等. 软组织激光全息扫描鼻眶窝的三维数字图像分析 [J]. 中华整形外科杂志, 2004, 20(4):252—255.
[15] 李义凯, 彭玉初, 蔡乐农. 推拿所致咔嚓声响的研究 [J]. 颈腰痛杂志, 2004, 25(1):59—60.
[16] Reggars JW, Pollard HP. Analysis of zygapophyseal joint cracking during chiropractic manipulation [J]. J Manipulative Physiol Ther, 1995, 18(2):65—71.