

补阳还五汤对急性脊髓损伤大鼠内质网应激相关因子影响的研究

齐英娜¹ 谭明生¹ 王延雷¹ 王威¹ 吴鑫杰¹ 郝庆英¹ 移平¹ 杨峰¹ 唐向盛¹

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤灌胃治疗对大鼠急性脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)的修复作用及作用机制。方法:将 SPF 级 3 月龄 Wistar 雌性大鼠 40 只,随机分成假手术组、模型组、甲强龙组、补阳还五汤组(中药组)。造模后第 1 天,甲强龙组经尾静脉注射甲强龙治疗共 24 h,首剂量为 30 mg/kg,余以 5.4 mg/(kg·h)每 4 h 给药 1 次;中药组以中剂量补阳还五汤颗粒剂,配制成含颗粒剂 2.00 g/mL 的水溶液,每天 3.5 g/kg 灌胃,相当于成人用量的 1 倍,1 次/d,共 14 d。治疗后第 1,3,7 及 14 天分别以 BBB 分级法评价神经功能恢复情况,Western Blot 法检测 SCI 节段 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 蛋白的表达。结果:各时间点 BBB 评分随时间延长而上升,差异有统计学意义($P < 0.01$);治疗后 7 d 和 14 d BBB 评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。组间比较:中药组和甲强龙组的 BBB 评分高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$);中药组和甲强龙组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后第 14 天大鼠脊髓组织中 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 蛋白的表达:中药组和甲强龙组各蛋白表达均低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$);与假手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);中药组和甲强龙组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:围手术期以补阳还五汤治疗急性 SCI,对大鼠脊髓损伤具有修复作用,其作用机制可能是通过抑制过度的内质网应激反应,下调 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 蛋白的表达。

[关键词] 脊髓损伤;督脉;补阳还五汤;内质网应激;细胞凋亡

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)02-0008-05

Effect of Buyanghuanwu Decoction on the Expression of Endoplasmic Reticulum Related Factors after Acute Spinal Cord Injury in Rats

QI Yingna¹ TAN Mingsheng¹ WANG Yanlei¹ WANG Wei¹ WU Xinjie¹
HAO Qingying¹ YI Ping¹ YANG Feng¹ TANG Xiangsheng¹

¹Department of Spine Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China.

Abstract Objective: To investigate the repair effect and mechanism of Buyanghuanwu decoction (BYHWD) on spinal cord injury (SCI) in rats. **Methods:** Forty female SPF Wistar rats were randomly divided into sham operation group (SO), model group, methylprednisolone group (MP), and BYHWD group, with 10 rats in each group. On the first day after model establishment, the MP group was treated with methylprednisolone injection through the tail vein for a total of 24 h. The first dose was 30 mg/kg, and then was administered with 5.4 mg/(kg·h) once, interval by every 4 h. The rats in BYHWD group were given middle dose of BYHWD at a final concentration of 2 g/mL, with BYHWD administration at 3.5 g/kg once a day (09:00) for 14 d, which was equivalent to 1 times adult dosage. Nerve functional recovery was evaluated by BBB score method at 1st, 3rd, 7th and 14th d after treatment, and the protein expression of Caspase-12, Caspase-9 and Caspase-3 in SCI tissue was detected by Western Blot method. **Results:** The results of BBB score showed that BBB score were increased as time increased ($P < 0.01$). There was no statistically significant difference between 7 d and 14 d ($P > 0.05$). The BBB score in BYHWD group and MP group were higher than that in model group ($P < 0.01$). There are no significant difference between BYHWD group and MP group ($P > 0.05$). The results of protein expression showed that the expression of Caspase-12, Caspase-9, and Caspase-3 in BYHWD group and MP group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.01$), which was no significant different with sham group ($P > 0.05$). There was no significant difference between BYHWD group and MP group ($P > 0.05$). **Conclusion:** BYHWD is effective for treating acute SCI during preoperative time point. Its mechanism may be through the inhibition of excessive endoplasmic reticulum stress reaction and down regulation of Caspase-12, Caspase-9 and Caspase-3 protein.

Keywords: spinal cord injury; buyanghuanwu decoction; endoplasmic reticulum stress; cell apoptosis

上颈脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)是由创伤、先天性畸形、肿瘤、类风湿关节炎、结核等常见疾病造成的病理转归结果,上颈椎解剖学结构复杂、手术技术难度大、临床风险高。Samuel 等^[1]分析 1 060 例急性创伤性脊髓中央损伤综合征,不良反应发生率为 23.4%,最常见的是血栓栓塞(5%),急性呼吸窘迫(3.7%),死亡(3%)。细胞凋亡参与了脊髓损伤的病理生理过程,过度的内质网应激是引起细胞凋亡的通路之一,而半胱氨酸蛋白酶(Caspase-12)是内质网应激引起细胞凋亡的重要代表^[2]。脊髓损伤后,Caspase-12^[3]从内质网进入到细胞液中作用于 Caspase-9,激活 Caspase-3 最后引起细胞凋亡。目前中西医结合是治疗脊髓损伤的新思路,中医学对脊髓损伤并无专著阐释,根据症状、体征可归于“体惰”“痿证”范畴。现代研究以补阳还五汤治疗脊髓损伤取得了较好的疗效^[4-6],谭明生等^[7]根据文献记载及临床研究,将寰枢椎脱位等导致的 SCI 辨证为督脉瘀阻证。临床研究发现围手术期给予补阳还五汤治疗 SCI,督脉瘀阻证候积分和 JOA 评分高于单纯手术减压,充分体现了“脊髓减压,从督论治”的学术思想^[8]。实验研究显示补阳还五汤能抑制脊髓损伤后 Caspase-3 表达以修复脊髓损伤^[9],但补阳还五汤能否通过抑制内质网应激相关因子 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 引起的细胞凋亡以修复脊髓损伤,尚缺乏实验研究。故本研究以补阳还五汤颗粒剂治疗急性上颈脊髓损伤动物模型,检测受压脊髓节段组织中 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 蛋白的表达,探索补阳还五汤颗粒剂治疗脊髓损伤的可能作用机制,同时也为补阳还五汤治疗中医“痿证”提供新的实验依据,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级别 3 月龄 Wistar 大鼠 40 只,雌性,体质量 260~300 g,军事医学科学院实验动物中心提供,实验动物许可证号 SCXK-(军)2017-0004。

1.2 实验药物及试剂

补阳还五汤按照《中华人民共和国药典》及规定剂量范围内的临床常用剂量,并参照徐志华等^[10]用药剂量称取组成。于中国中医科学院附属望京医院中药配方颗粒药房以中药配方颗粒自动化调配系统配制浓缩颗粒 14 剂,黄芪 6 g、赤芍 2 g、当归 3 g、地龙 1.5 g、川芎 1.66 g、红花 1.66 g、桃仁 1 g。戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司,批号 20160925,规格 5 g);注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(辉瑞公司,批号 H20060052,规格 0.5 g);Caspase-12(兔单抗,Proteintech,55238-1-AP,1:1 000);Caspase-9(兔单抗,Proteintech,10380-1-AP);

Caspase-3(兔单抗,Proteintech,19677-1-AP); β -actin(鼠单抗,Immunoway,YM3028);GAPDH 鼠单抗(美国,Immunoway,YM3029);山羊抗兔 IgG(H+L),HRP(CWBIO);山羊抗小鼠 IgG(H+L),HRP(CWBIO);BCA 蛋白定量试剂盒(CWBIO);蛋白质分子量 Marker(美国 Thermo)。

1.3 实验仪器

球囊压迫系统由经缠绕改良后的 SPL25012X 球囊导管(Medtronic,规格 2.5 mm \times 12 mm)、4 \times 10 缝合针和铜丝、压力泵(美国 Medtronic 公司,型号 Everest,规格 30 atm)、三通、Everest 手推压力泵(Medtronic,规格 30 atm)组成;Fresco 低温冷冻离心机(Thermo);MultiSkan 3 酶标仪(Thermo);Mini P-4 电泳槽(Cavoy);湿转电泳槽(Cavoy);电泳仪(Bio-Rad);水平脱色摇床(其林贝尔);酸度计 pH21(Hanna);电动组织匀浆(Fluka)。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 在前期大鼠急性上颈段球囊压迫型脊髓损伤模型^[11]建立的基础上进行改良。各组大鼠均以 2%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,暴露寰枕间隙及 C₁₋₂间隙后,以 2 mL 注射器自制神经剥离子和圆刀分离寰枕覆膜及寰、枢椎间黄韧带。在铜丝与调整后弧度为 15°的缝合针引导下置入椎管内,球囊位于 C₁后弓下,硬脊膜外。球囊头端于寰椎后弓下缘和枢椎椎板上缘间隙穿出,常规缝合手术切口,固定导管及肌肉注射青霉素 8.0 \times 10⁵ U 预防感染。模型组、甲强龙组和中药组大鼠术后 24 h 以手推压力泵向球囊内注射生理盐水至球囊内压力达 300 kPa,使球囊匀速膨胀,对颈脊髓产生急性压迫,持续压迫 48 h 后,以手推压力泵将球囊抽成负压并取出球囊导管,无需再次打开切口。单笼饲养,定期行膀胱按摩协助排尿。

1.4.2 分组方法 40 只 3 月龄 Wistar 大鼠随机分成 4 组(10 只/组):假手术组、模型组、甲强龙组、补阳还五汤组(简称中药组)。

1.4.3 干预方法 1)假手术组:置入球囊后无进一步处理。2)模型组:造模后不给予任何治疗。3)甲强龙组:造模后第 1 天经尾静脉注射甲强龙注射液治疗共 24 h,首剂量为 30 mg/kg,余以 5.4 mg/(kg \cdot h)每 4 h 尾静脉注射给药 1 次。4)中药组:按照 1 倍临床等效剂量换算大鼠灌胃给药,大鼠剂量(mg/kg)= $w \times$ 人的剂量(mg/kg, w 为换算系数 6.25)^[12],计算出大鼠的用药剂量约为 3.5 g/kg。每日 1 剂以 100 $^{\circ}$ C 蒸馏水配制成含生药 2 g/mL 的颗粒剂水溶液,给药体积为 1.75 mL/kg,1 次/d,连续灌胃 2 周。

1.4.4 标本制作方法 终末观察时各组大鼠以 2%

戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,取脊髓组织置于液氮中暂存后放入-80℃冰箱保存。预冷 RIPA 蛋白抽提试剂,加入蛋白酶抑制剂(磷酸化蛋白需要同时加入磷酸酶抑制剂)。在蛋白抽提开始前加入 0.1 mol/L PMSF 母液,PMSF 终浓度 1 mmol/L。称取组织质量以质量:裂解液体积=1:9 比例加入裂解液,Fluka 电动组织匀浆器 15 000 r/min 转速进行匀浆,每次 10 s,间隔 10 s,进行 3 次匀浆。匀浆时 EP 管需要浸入冰水混合物中进行降温。匀浆完成后在冰上孵育 20 min,4℃离心,13 000 r/min,20 min。离心完成后取上清,分装保存,待测。

1.5 实验指标测定

1.5.1 行为学检测 BBB 分级法^[13]评分是一项评价 SCI 大鼠后肢运动功能的评分标准,分级评分法将大鼠后肢运动分为 22 个等级,上颈脊髓损伤上肢行为学障碍重于下肢,故本研究参照 BBB 评分对 SCI 大鼠前肢进行 BBB 评分。后肢全瘫为 0 分,完全正常为 21 分,两者之间根据功能分别定为 1~20 分。造模前对所有大鼠均进行 BBB 评分,治疗后第 1,3,7 及 14 天对所有大鼠进行 BBB 评分,评分前对大鼠进行膀胱按摩排尿,避免因膀胱充盈而影响运动功能。评分者为两名熟悉评分标准的非本课题组人员,评分观察期为 4 min,两人分别记录各组评分结果,评分取平均值。

1.5.2 脊髓组织 Western Blot 法检测 取离心完成后的脊髓上清以 BCA 法蛋白定量,以 RIPA 调整蛋白浓度,加入 5 倍还原样品缓冲液后样品终浓度为 4 mg/mL。目的蛋白 WB 正式实验:1)根据目的蛋白的分子量,配制 12%的分离胶,浓缩胶浓度为 5%。2)待检测蛋白样品上样量 20 μg/孔。3)电泳条件:浓缩胶恒压 90 V,约 20 min;分离胶恒压 160 V,通过预染蛋白 Marker 来确定电泳停止时间。4)湿转法,转膜条件:300 mA 恒流,0.45 μm 孔径 NC 膜,转膜时间 1 h。转膜完成后丽春红染色试剂对膜进行染色,观察转膜效果。5)封闭:将膜完全浸没 3% BSA-TBST 中

室温轻摇 30 min。6)一抗孵育:用 3% BSA-TBST 稀释一抗,室温孵育 10 min,放入 4℃恒温箱过夜。7)第 2 天从 4℃恒温箱取出膜,室温孵育 30 min。洗膜:TBST 洗膜 5 次,每次 3 min。8)二抗孵育:用 5%脱脂奶粉-TBST 稀释二抗,山羊抗兔 IgG(H+L)HRP,1:10 000;山羊抗小鼠 IgG(H+L)HRP,1:10 000,室温轻摇 40 min。洗膜:TBST 洗膜 6 次,每次 3 min。9)ECL 加到膜上后反应 3~5 min,胶片曝光 10 s~5 min(曝光时间随不同光强度而调整),显影 2 min,定影。内参蛋白 WB 正式实验:Stripping Buffer 洗膜;将膜完全浸没在 5%脱脂奶粉-TBST 中室温轻摇 30 min。孵育内参:加 GAPDH 鼠单抗,用 5%脱脂奶粉-TBST 稀释抗体,1:20 000 稀释,室温孵育 2 h;洗膜。二抗孵育:用 5%脱脂奶粉-TBST 稀释二抗,山羊抗小鼠 IgG(H+L)HRP,1:10 000,室温轻摇 40 min;洗膜;定影同上。利用 Image J 软件对扫描图像的目的条带进行灰度分析,观察检测受压脊髓节段组织中 Caspase-12,Caspase-9 及 Caspase-3 蛋白的表达。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验组干预后各时间点前肢 BBB 评分采用重复测量数据的方差分析,前肢组间比较采用独立样本 *t* 检验,其余计量资料采用单因素方差分析,两两比较时采用方差分析中 LSD-*t* 检验,*P*<0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 BBB 评分结果

术中共废弃和补充大鼠 6 只,造模成功率为 85%。观察治疗后 1~14 d 大鼠功能评分的变化,假手术组大鼠前肢运动功能无明显变化。治疗后 3~14 d 治疗组的功能评分整体高于模型组,说明补阳还五汤和甲强龙在大鼠 SCI 后能较好地改善前肢运动功能,且两组 BBB 评分随时间延长而上升,但治疗后第 7~14 天,各组大鼠前肢运动功能恢复不明显,见表 1。

表 1 各组大鼠治疗后右前肢各时间点 BBB 功能评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	1 d 后	3 d 后	7 d 后	14 d 后
假手术组	21.000±0.000 ²⁾	21.000±0.000 ²⁾	21.000±0.000 ²⁾	21.000±0.000 ²⁾
中药组	9.700±3.713 ¹⁾	14.800±0.422 ¹⁾²⁾	18.900±1.287 ¹⁾²⁾	19.400±0.699 ¹⁾²⁾
甲强龙组	8.900±1.101 ¹⁾	15.200±0.919 ¹⁾²⁾	18.300±0.483 ¹⁾²⁾	19.400±0.966 ¹⁾²⁾
模型组	8.500±1.841 ¹⁾	13.300±1.252 ¹⁾	15.000±1.054 ¹⁾	15.500±2.273 ¹⁾
<i>F</i>	78.415	176.897	82.400	33.283
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:*F*_{时间}=191.101,*P*<0.05;*F*_{组间}=273.949,*P*<0.05;*F*_{交互}=23.964,*P*<0.05。1)与假手术组比较,*P*<0.01;2)与模型组比较,*P*<0.01。各组治疗后第 14 天与各时间点比较:中药组 *P* 分别为<0.001,<0.001,0.581;甲强龙组 *P* 分别为<0.001,<0.001,1.000;模型组 *P* 分别为<0.001,0.006,0.509。各时间点中药组与假手术组、甲强龙组、模型组比较:治疗后第 1 天 *P* 分别为 0.010,0.410,0.219;治疗后第 3 天 *P* 分别为<0.001,0.274,<0.001;治疗后第 7 天 *P* 分别为<0.001,0.130,<0.001;治疗后第 14 天 *P* 分别为 0.008,1.000,<0.001。

2.2 各组大鼠 Western Blot 法检测结果

观察治疗后第 14 天大鼠脊髓组织中 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 蛋白的表达,中药组和甲强龙组蛋白表达均低于模型组,与假手术组比较,各组蛋白表达无明显差异,说明补阳还五汤和甲强龙在大鼠

SCI 后可能通过下调 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 蛋白修复大鼠脊髓损伤,且治疗后第 14 天大鼠脊髓中 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 的表达基本恢复正常。蛋白表达 Western Blot 条带见图 1,条带光密度值分析见表 2。

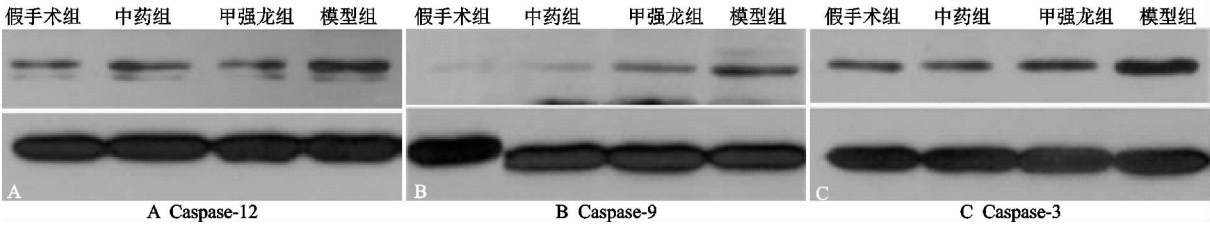


图 1 蛋白表达 Western Blot 检测图
表 2 各组大鼠 Caspase 蛋白表达结果(±s)

组别	Caspase-12	Caspase-9	Caspase-3
假手术组	0.118±0.074 ²⁾	0.138±0.105 ²⁾	0.154±0.061 ²⁾
中药组	0.214±0.069 ¹⁾²⁾	0.180±0.085 ²⁾	0.219±0.106 ²⁾
甲强龙组	0.206±0.077 ¹⁾²⁾	0.212±0.172 ²⁾	0.241±0.063 ¹⁾²⁾
模型组	0.348±0.092 ¹⁾	0.721±0.401 ¹⁾	0.493±0.112 ¹⁾
F	14.529	14.445	28.199
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:1)与假手术组比较,P<0.05;2)与模型组比较,P<0.05。Caspase-12:中药组与假手术组、甲强龙组、模型组进行比较,P 分别为 0.010,0.839,0.001。Caspase-9:中药组与假手术组、甲强龙组、模型组进行比较,P 分别为 0.685,0.752,<0.001。Caspase-3:中药组与假手术组、甲强龙组、模型组进行比较,P 分别为 0.106,0.596,<0.001。

3 讨论

中医学对 SCI 并无专著阐释,根据症状、体征可归于“体惰”“痿证”范畴,《难经·二十八难》记载:“督脉者…起于下极之腧,并于脊里,上至风府,入属于脑。”提示督脉循行于脊里,入络于脑,与脑和脊髓有密切的联系。上颈 SCI 根据动力位 X 线片、三维 CT 重建和 MRI 等研究发现^[14],上颈椎致压物引起椎管矢状径减小,压迫脊髓,脊髓与督脉密切相关,脊髓受压可能导致督脉的气血运行不畅,进而产生四肢麻木疼痛无力、活动受限等临床症状。《丹溪心法》:“痿证断不可作风治,而用风药。有湿热、湿痰、气虚、血虚、瘀血。”罗禹田、彭介寿根据文献记载及临床研究,将 SCI 辨证为督脉瘀阻证^[15]。从大量的Ⅲ类^[1]临床研究资料来看,手术减压治疗急性 SCI 是一种切实可行的治疗方法,术后受压节段脊髓压迫解除后,督脉气血部分得以运行,也从解剖形态结构上疏通了督脉。《医林改错》中首次提出以补阳还五汤,投以大量黄芪、白术等健脾补气之品结合活血化瘀中药以治痿。谭明生等^[8]于围手术期给予补阳还五汤治疗 SCI,督脉瘀阻证候积分和 JOA 评分高于单纯手术减压,充分体现了“脊髓减压,从督论治”的学术思想。现代研究表明^[9,16,17]补阳还五汤可通过抑制凋亡细胞以修复脊髓损伤。脊髓损伤分为原发性损伤和继发性损伤,在继发性损伤中,半胱氨酸蛋白酶(Caspase)在细胞凋亡过程中发挥

了重要作用,它能直接水解激活与 DNA 断裂密切相关的蛋白,又称为死亡蛋白酶。内质网应激有利于维持细胞的正常功能并使之存活,内质网信号通路是 Caspase-12 水解活化的唯一通路,所以是内质网应激引起细胞凋亡的重要代表。Caspase-12^[3]从内质网进入到细胞液中作用于 Caspase-9,激活 Caspase-3 最后引起细胞凋亡。补阳还五汤可通过抑制 Caspase-3 等凋亡细胞以修复脊髓损伤,本研究观察补阳还五汤对大鼠急性脊髓损伤后内质网应激导致的细胞凋亡的影响,对中药治疗脊髓损伤的可行性进行初步探索。发现造模后 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 均高于假手术组,经补阳还五汤和甲强龙治疗后 3 种凋亡细胞均明显下降,证明补阳还五汤可通过抑制内质网应激,下调 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 蛋白的表达以促进前肢运动功能的恢复,同时也为补阳还五汤治疗中医“痿证”提供了新的实验依据。

补阳还五汤是由生黄芪,当归尾、地龙、赤芍、川芎、桃仁、红花组成的复方,中药本身含有多种化学成分,方中单药的活性成分如川芎中的川芎嗪是从中药川芎中分离提纯出来的一种生物碱单体,研究显示^[18]川芎嗪注射液能抑制脊髓损伤后 Caspase-3 表达及神经细胞凋亡。黄芪注射液^[19]可以通过减少缺血再灌注途径导致的脊髓神经细胞中凋亡。芍药中的芍药苷^[20]可能是通过 TLR4/NF-κB 信号通路介导产生抗

炎和抗凋亡作用。红花中的红花黄素^[21]通过抑制大鼠脊髓损伤局部自由基生成、脂质过氧化等减少细胞凋亡。故补阳还五汤抗凋亡的作用是以其所含多种活性成分,通过多途径、多靶点的药物作用机制而产生整体调节作用的结果。

本研究中给予的补阳还五汤中剂量每天 3.5 g/kg 灌胃,相当于成人用量的 1 倍,尚需要进一步进行低剂量、中剂量和高剂量治疗 SCI 的对比研究。陈向荣等^[22]研究显示脊髓背侧半切断伤大鼠在损伤早期为 0 分,3~5 周后即达到了基本正常,临床观察到脊髓损伤患者肢体运动功能恢复能力较大鼠的肢体运动功能恢复能力有一定的差异性,大鼠肢体运动功能中有多少是自发性恢复的,目前尚无定论,尚需要进一步的研究。本研究发现甲强龙组和中药组大鼠 BBB 评分 7 d 和 14 d 后无明显差异,考虑与大鼠前肢功能恢复较快有关,与临床有一定的差异性。

围手术期联合补阳还五汤治疗急性 SCI 对大鼠脊髓损伤具有修复作用,其作用机制可能是通过抑制过度的内质网应激,下调 Caspase-12, Caspase-9 及 Caspase-3 蛋白的表达。

参考文献

- [1] Samuel AM, Grant RA, Bohl DD, et al. Delayed surgery after acute traumatic central cord syndrome is associated with reduced mortality [J]. *Spine*, 2015, 40(5): 349-356.
- [2] 岳原亦, 张扬, 张一奇. Caspase 家族与细胞凋亡[J]. *中国医疗前沿*, 2011, 6(6): 25-26.
- [3] 尹洪娜, 孙忠人, 李全. 电针夹脊穴对脊髓损伤大鼠内质网应激相关因子 Caspase-12 影响的实验研究[J]. *中医药学报*, 2016, 44(3): 33-36.
- [4] 张继平, 王志彬, 林爱华, 等. 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠脊髓组织病理学的影响[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2014, 20(3): 274-277.
- [5] 张亚, 饶耀剑. 补阳还五汤加减治疗急性颈髓损伤临床研究[J]. *中医临床研究*, 2014, 6(2): 21-22.
- [6] 徐志华, 余勤, 白月双, 等. 补阳还五汤联合鞘内注射间充质干细胞治疗脊髓损伤的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(12): 2726-2729.
- [7] 谭明生, 李显, 张恩忠, 等. 寰枢椎脱位外科治疗与疏通督脉瘀阻相关性研究[J]. *中国骨伤*, 2012, 25(11): 915-919.
- [8] 移平, 谭明生, 吕国华, 等. 督脉瘀阻型寰枢椎脱位手术联合中药治疗的临床研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2017,

25(1): 14-18.

- [9] 董贤慧, 谢红林, 贺小平, 等. 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠脊髓组织 Caspase-3 表达的影响[J]. *广东医学*, 2015, 36(1): 55-57.
- [10] 徐志华, 余勤, 白月双, 等. 补阳还五汤联合鞘内注射间充质干细胞治疗脊髓损伤的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(12): 2726-2729.
- [11] 谭明生, 齐英娜, 姜良海, 等. 球囊导管构建大鼠督脉瘀阻型上颈脊髓损伤模型的研究[J]. *中医正骨*, 2016, 28(12): 1-5.
- [12] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-203.
- [13] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1-21.
- [14] Tan M, Dong L, Wang W, et al. Clinical application of the "pedicle exposure technique" for atlantoaxial instability patients with a narrow c1 posterior arch[J]. *J Spinal Disord Tech*, 2015, 28(1): 25-30.
- [15] 罗禹田, 彭介寿. 中医疗愈外伤性截瘫[J]. *江苏中医药*, 1963(2): 37.
- [16] 侯兆阳, 陈哲, 魏家森. 补阳还五汤对急性脊髓损伤模型大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2015, 25(1): 8-11.
- [17] 董贤慧, 高维娟, 贺小平, 等. 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠脊髓神经细胞凋亡的影响[J]. *承德医学院学报*, 2014, 31(4): 286-288.
- [18] 赵玉鑫, 王洪, 杨述华, 等. 川芎嗪对大鼠脊髓损伤后 caspase-3 表达及细胞凋亡的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2006, 14(6): 54-57.
- [19] 周立亚, 刘肖瑜, 刘德玉. 黄芪注射液预处理对大鼠脊髓缺血再灌注模型脊髓功能和神经细胞凋亡表达的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2011, 19(10): 7-9.
- [20] 冯仲楷, 孙永强, 刘汝银, 等. 芍药苷对大鼠脊髓损伤的神经保护机制[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(5): 376-381.
- [21] 卜志勇, 郑玲, 李安军, 等. 红花黄素对大鼠脊髓损伤局部 SOD、MDA 和细胞凋亡的影响[J]. *湖北医药学院学报*, 2011, 30(1): 23-25.
- [22] 陈向荣, 游思维, 金大地. BBB 评分评估脊髓损伤大鼠后肢运动功能的探讨[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2004(9): 35-37.

(收稿日期: 2017-11-01)