

• 实验研究 •

身痛逐瘀汤方对椎间盘退变中 PI3K/AKT 通路影响的研究

刘志超¹ 张帆² 祝永刚¹ 肖辉灯¹ 郭菲宇¹ 张万祥¹ 卢通¹ 齐磊³ 柳根哲^{1△}

[摘要] 目的:探明静水压下髓核细胞凋亡及基质代谢的相关分子生物学机制,揭示身痛逐瘀汤方对静水压下髓核细胞凋亡及基质代谢的调控机制及作用靶点。方法:将 8 只新西兰兔处死后无菌条件下取出髓核,分为 8 组,将 8 组髓核细胞分离培养、鉴定及传代后,加入身痛逐瘀汤方含药血清中,在体外静水压加载系统中进行干预,在 0.3 MPa,1 MPa 及 3 MPa 压力下作用 4 h,24 h 后,使用倒置相差显微镜观察髓核细胞加压前后的形态及生长状况;采用透射电镜观察各组髓核细胞超微结构的变化及差异;使用 Cell Counting Kit-8 法检测各组髓核细胞的增殖活性;使用 Annexin V-FITC/Propidium Iodide 双染法检验各组髓核细胞的凋亡状况;使用凝胶电泳迁移法(EMSA)检验各组髓核细胞中 PI3K/AKT(磷脂酰肌醇 3-激酶)/(丝氨酸/苏氨酸激酶)的活跃情况;Western Blot 法检验 Sox9, Collagen II, BAD, Caspase-9 及 GSK-3 在髓核细胞中含量的变化。结果:在同一压力与作用时间下倒置相差显微镜及透射电镜示中药干预组较单纯压力组髓核细胞形态及超微结构保存更完整,生长状况更好;CCK-8 法示中药干预组髓核细胞增殖活性更高;Annexin V-FITC 检验结果示中药干预组髓核细胞凋亡百分比更低;凝胶电泳迁移法及 Western Blot 法示 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达水平明显升高。结论:身痛逐瘀汤能明显激活 PI3K/AKT 信号通路的表达,延缓椎间盘的退变。

[关键词] 静水压;PI3K/AKT 通路;髓核细胞;身痛逐瘀汤;细胞凋亡;基质代谢

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)10-0014-06

Biomechanical Study on the Expression of PI3K/AKT in the Degeneration of Intervertebral Disc with Shentong Zhuyu Decoction

LIU Zhichao¹ ZHANG Fan² ZHU Yonggang¹ XIAO Huideng¹ GUO Feiyu¹
ZHANG Wanxiang¹ LU Tong¹ QI Lei³ LIU Genzhe^{1△}

¹ Department of Orthopedics, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China;

² Department of Orthopedics, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

³ Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China.

Abstract Objective: To explore the molecular biological mechanism of apoptosis and matrix metabolism of nucleus pulposus cells under hydrostatic pressure, and to reveal the regulation mechanism and action target of Shentong Zhuyu Decoction on apoptosis and matrix metabolism of nucleus pulposus cells under hydrostatic pressure. **Methods:** The nucleus was removed from 8 New Zealand rabbits after being executed in sterile condition, and divided into 8 groups. After 8 groups of nucleus pulposus cells were isolated, cultured, identified and passaged, they were added to the serum of Shentong Zhuyu Decoction and intervened in hydrostatic loading system in vitro. The morphology and growth of nucleus pulposus cells were observed by inverted phase contrast microscope before and after 4 h and 24 h exposure to 0.3 MPa, 1 MPa and 3 MPa pressure. The ultrastructural changes and differences of nucleus pulposus cells were observed by transmission electron microscope. The Cell Counting Kit-8 assay was used to detect the proliferative activity of nucleus pulposus cells. The

apoptosis of nucleus pulposus cells was examined by Annexin V-FITC/Propidium Iodide double staining method, and the EMSA was used to test the PI3K/AKT of nucleus pulposus cells in each group. The changes of content of Sox9, Collagen II, Bad, Caspase-9 and GSK-3 in nucleus pulposus cells were examined by Western blot method. **Results:** Under the same

基金项目:北京中医药大学校级科研课题(2017-JYB-JS)

¹ 首都医科大学附属北京中医医院骨科(北京, 100010)

² 北京中医药大学东直门医院骨科

³ 北京中医药大学

[△]通信作者 E-mail: 1607253442@qq.com

pressure and action time,the inverted phase contrast microscope and transmission electron microscopy showed that the morphology and ultrastructure of the nucleus pulposus cells were more complete and the growth condition was better than that of the simple pressure group. CCK-8 method showed that the proliferative activity of nucleus pulposus cells was higher in Chinese herbal intervention group. Annexin V-FIT test showed that the percentage of apoptosis was lower in the Chinese herbal intervention group and the EMSA and Western Blot showed that the expression of PI3K/AKT pathway related genes and proteins were increased significantly. **Conclusion:** Shentong Zhuyu Decoction can obviously activate the expression of PI3K/AKT signaling pathway and delay the degeneration of intervertebral disc.

Keywords: hydrostatic pressure;PI3K/AKT pathway;nucleus pulposus cells;Shentong Zhuyu decoction;apoptosis;matrix metabolism

静水压是人体椎间盘承受载荷的主要力学形式,其对椎间盘髓核细胞的生长发育和基质代谢具有重要的调节作用。早前研究显示^[1,2]椎间盘髓核细胞代谢及炎症因子的基因表达与静水压强度、作用时间、药物之间存在“压力-时间-药物”调节轴。最新研究表明^[3]PI3K/AKT 信号通路与椎间盘退变密切相关,当细胞因子与受体结合,引起 PI3K 的磷酸化后促使磷脂酰肌醇 3-三磷酸(PIP3)的产生。AKT 能够与 PIP3 发生联系,从而到达细胞膜上,然后在 PDK1,PDK2(3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1,2)催化下发生磷酸化(主要磷酸化位点:苏氨酸 Thr308 和丝氨酸 Ser473),后作用于各种细胞因子和蛋白酶,控制细胞蛋白质合成以及增殖和凋亡等。

对国内 1991-2010 年刊载中药治疗腰椎间盘突出症相关 143 篇文献分析结果显示^[4],中药治疗腰椎间盘突出症疗效显著,活血化瘀、舒筋通络位于中医药治疗腰椎间盘突出症最常用的 11 种治法之中。本研究通过模拟椎间盘内静水压环境,并利用身痛逐瘀汤含药血清对髓核细胞进行干预,对实验各组髓核细胞的结构、活性、凋亡率以及相关蛋白的表达水平进行检测,以探明身痛逐瘀汤方对椎间盘退变的生物力学影响。

1 材料与方法

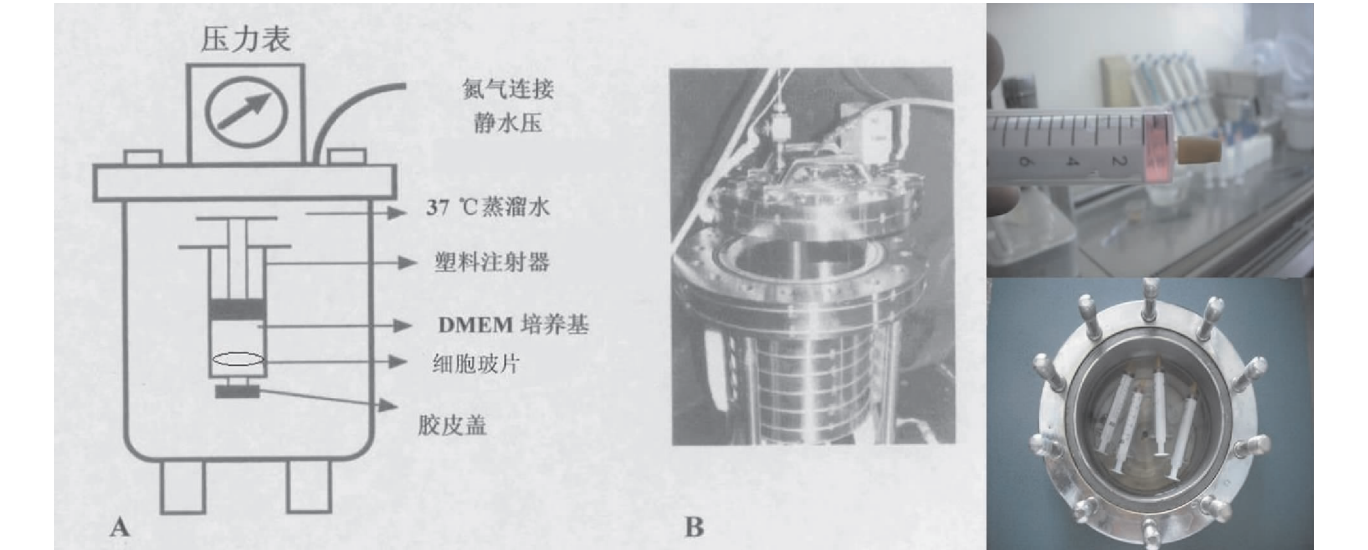


图 1 医用恒温静水压压力罐

1.1 实验动物

将 8 只新西兰兔(5 月龄,2~4 kg,动物性别无要求)分为 8 组,然后经空气栓塞处死后在清洁实验室取出腰段髓核后,剔除周围软组织,将椎间盘纤维环去除后分离出髓核。中国中医科学院实验动物中心提供健康实验兔,实验动物许可证号 SYXK(京)2018-0018。

1.2 实验药物及试剂

身痛逐瘀汤方临床常用剂量均在《中华人民共和国药典》规定范围内,其组成中药由北京中医药大学东直门医院药剂科提供;DMEM/F12 培养基(GIBCO, C11330500BT);CCK-8 试剂盒(Beyotime 公司, C0038);凋亡试剂盒(Beyotime, C1063)。

1.3 实验仪器

医用恒温静水压压力罐(柳根哲教授设计,专利号: ZL 20 152 010 8857. 5);倒置相差显微镜(奥林巴斯, IX50);透射电镜(Hitachi, HF5000);凝胶电泳仪(DEDUYIQI, DYCP-44P);实时荧光定量 PCR 仪(美国, StepOnePlus);Western Blot 分析仪(美国, Simon)。医用恒温静水压压力罐由压力容器、气压源、压力显示仪器、智能温控以及活塞装置和细胞爬片等组成。将培养基及传代的髓核细胞一起放入压力罐中,通过压力显示仪可以调节压力罐内压力,范围 0~5 MPa,见图 1。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 髓核细胞的分离培养、鉴定及传代:在 37℃ 浴箱中将 0.25% 胰酶与髓核细胞中溶解 30 min,以 1 000 r/min 速度离心 5 min,上清液倒出,磷酸缓冲液清洗后与 0.3% II 型胶原酶混合溶解 3 h,经 100 μ m 滤网滤过,上清液倒出后于培养基传代,倒置相差显微镜下见到髓核细胞增殖到大约 90% 瓶底时传代,获得第 3 代髓核细胞后开始实验。另取部分原代培养的细胞行 II 型胶原免疫组化染色鉴定。

1.4.2 分组方法 本研究共分为 8 组,空白对照组:1) 常压环境/单纯 DMEM 培养组;2) 常压环境/DMEM+中药血清组。单纯压力干预组:1) 0.3 MPa 压力环境/单纯 DMEM 培养组;2) 1 MPa 压力环境/单纯 DMEM 培养组;3) 3 MPa 压力环境/单纯 DMEM 培养组。压力+中药血清干预组:1) 0.3 MPa 压力环境/DMEM+中药血清组;2) 1 MPa 压力环境/DMEM+中药血清组;3) 3 MPa 压力环境/DMEM+中药血清组。根据 Nachemson 的经典实验结果^[5],平卧休息位时最低约 0.3 MPa,坐位时接近 1 MPa,弯腰搬重物可达 3 MPa,故在本实验中压力值的选择也参考以上数据。

1.4.3 干预方法 体外静水压加载系统干预髓核细胞培养过程:将传 3 代髓核细胞放入医用恒温静水压压力罐中,然后向其中加入氮气形成压力,通过压力表逐渐加压到 0.3 MPa,1 MPa 和 3 MPa,温度保持在 37℃ 左右。另设对照组为常压(\approx 0.1 MPa)。每个静水压分别作用时间 4 h 和 24 h。

1.4.4 标本制作方法 中药含药血清的制备及细胞干预:身痛逐瘀汤方中药由秦艽 3 g,羌活 3 g,桃仁 9 g,川芎 6 g,红花 9 g,当归 9 g,香附 3 g,没药 6 g,牛膝 9 g,地龙 6 g,川乌 3 g,甘草 6 g 组成,将上述药材放入 20 倍蒸馏水泡洗、煮沸、分离、精炼、干燥后收获固体浸膏,称重计算药物含量及灌胃药物浓度。按兔体表面积(试验兔灌胃剂量=临床正常量 \times 体表面积 \times DMEM 稀释系数,11.6 g/(kg \cdot d))连续灌胃 3 d,第 3 天灌胃 2 h 后进行麻醉,然后

经腹主动脉采血,离心、严格灭活后低温保存。

1.5 实验指标测定

1.5.1 细胞形态、生长状况及超微结构变化 使用倒置相差显微镜及透射电镜观察髓核细胞加压前后的形态、生长状况及超微结构的变化与差异。

1.5.2 细胞增殖活性检测 使用 CCK-8 试剂盒对各组髓核细胞进行增殖活性检测。

1.5.3 细胞凋亡情况检测 使用 Annexin V-FITC 双染法观察各组髓核细胞的凋亡情况。

1.5.4 EMSA 法检测 PI3K/AKT 活性 使用 EMSA 法检测各组髓核细胞中 PI3K/AKT 的激活情况。使用核蛋白抽提试剂盒提取细胞核蛋白,按照产品说明书进行 PI3K/AKT 探针标记,采取 10 V/cm 的电压电泳 10 min,然后干燥 EMSA 胶,用 X 线片压片,并检测对比各组灰度值。

1.5.5 Western Blot 法检验 PI3K-AKT 相关蛋白表达 提炼细胞总蛋白后通过 BCA 法确定 PI3K-AKT 通路相关蛋白质含量。将 100 μ g 蛋白通过凝胶电泳分散后进入到硝酸纤维素膜上,然后利用脱脂奶粉密闭。以 Sox9, Collagen II, BAD, Caspase-9 及 GSK-3 特异性抗体标记相关蛋白,Western Blot 技术检测上述蛋白在髓核细胞中含量的变化。

1.6 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计软件对所得数据进行统计处理,所有样品均重复测定 3 次。各组 II 型胶原表达情况的比较采用 *t* 检验,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 髓核细胞的培养、鉴定及传代

髓核细胞第 1,2 及 3 代的生长曲线呈 S 形,第 3~7 天时呈直线增殖,此阶段细胞生长最快、活力最高,进入第 8 天后细胞生长停止,呈水平线,此时髓核细胞必须进行传代,不然细胞出现变形,从而衰亡。第 5,6 代髓核细胞突起呈长梭形,生长缓慢,出现老化现象,因此实验最好采用第 1,2 及 3 代细胞^[6],见图 2。

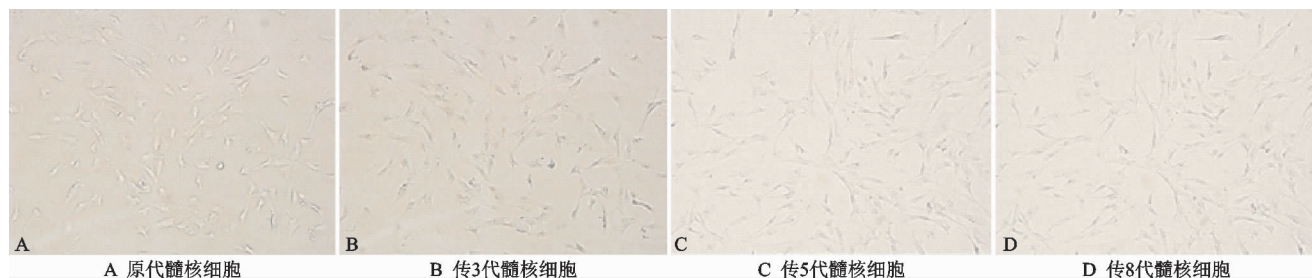


图 2 髓核细胞传代情况(100 \times)

2.2 细胞形态、生长状况及超微结构变化

2.2.1 细胞形态和生长状况变化 1) 细胞体积:髓核细胞在 0.3 MPa,1 MPa 及 3 MPa 静水压下作用 4 h

后,髓核细胞体积均缩小,3 MPa 下细胞体积缩小最明显,0.3 MPa 和 1 MPa 压力下体积缩小差别不明显。2) 突起:0.3 MPa,1 MPa 及 3 MPa 静水压下髓核

细胞突起均变短,3 MPa 下突起缩短最明显,0.3 MPa 和1 MPa压力下突起短缩差异不明显,部分髓核细胞

突触不显著,呈皱缩状改变。3)静水压作用下 30~120 min髓核细胞的形态学无明显变化,见图 3-4。

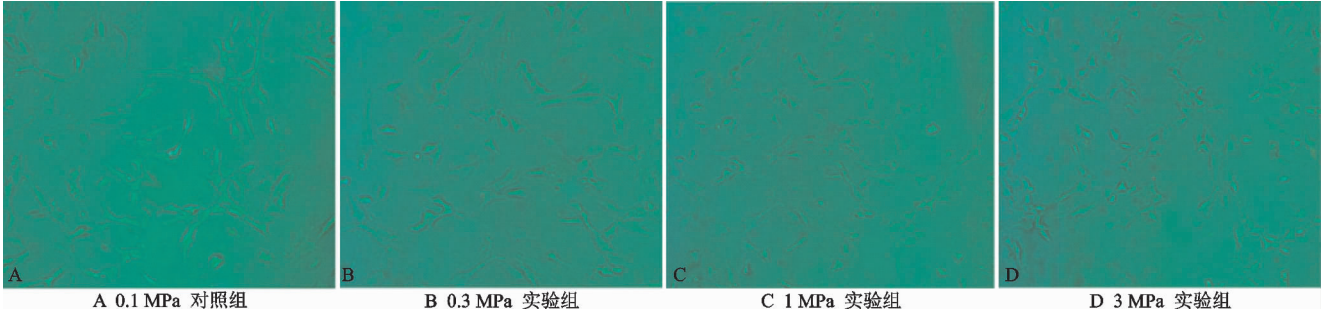


图 3 倒置显微镜下静水压下作用 4 h 各组髓核细胞形态学观察(200×)

2.2.2 细胞超微结构变化 通过与 0.1 MPa 下结构完整的髓核细胞比较,髓核细胞在 0.3 MPa,1 MPa 及 3 MPa 静水压下作用 4 h 后突起均有断裂;0.3 MPa,

1 MPa静水压下主级突起完整,次级突起断裂;3 MPa 静水压下主级突起与次级突起均有断裂。静水压作用下 30~120 min 下髓核细胞形态未见明显变化。

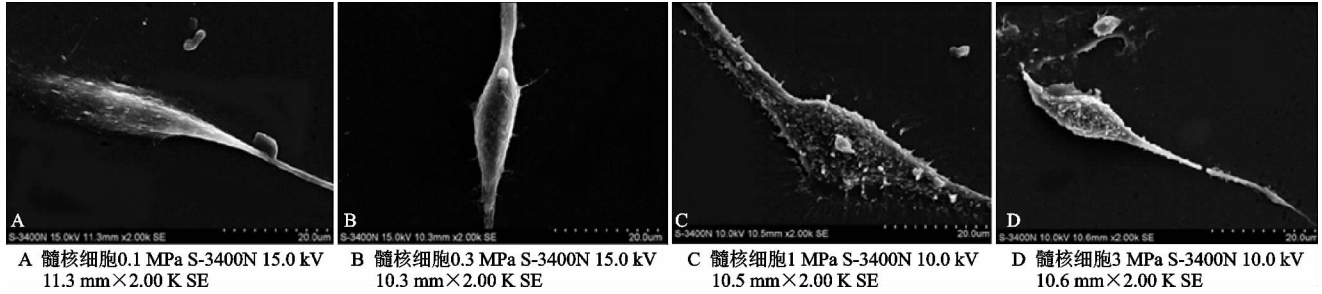


图 4 不同静水压下人髓核细胞形态的扫描电镜观察(×2.00 K SE)(静水压下作用 4 h)

2.3 髓核细胞成活率检测

当压力作用 30 min 时 0.3 MPa,1 MPa 及 3 MPa 静水压下细胞生存率均较低。随着压力时间的增加,0.3 MPa,1 MPa 静水压下细胞成活率逐步上涨,其中 0.3 MPa 静水压下细胞增长速度大于 1 MPa;在 3 MPa静水压下,细胞生存率随时间延长而下降。静水压下作用时间超过 2 h 时,0.3 MPa 下髓核细胞的存活率明显高于 3 MPa,见图 5。

故不详细列举。

2.4 静水压作用 4 h 后Ⅱ型胶原表达情况

中药组的Ⅱ型胶原整体高于单纯压力组,说明身痛逐瘀汤方能有效延缓椎间盘的退变,且 0.3 MPa 与 1 MPa 静水压下无明显差异,见图 6 及表 1。Sox9, BAD,Caspase-9 及 GSK-3 表达结果同 Collagen Ⅱ,

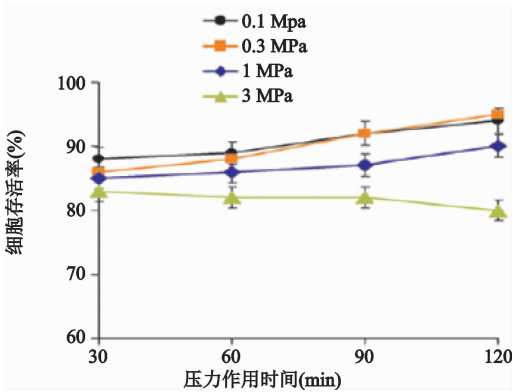


图 5 各组髓核细胞存活率检测

表 1 髓核细胞Ⅱ型胶原表达情况(±s)

组别	0.3 MPa	1 MPa	3 MPa
单纯压力组	0.770±0.260	0.740±0.200	0.420±0.220
压力+中药组	0.880±0.430	0.800±0.320	0.460±0.160

注:3 MPa 静水压下中药组与单纯压力组Ⅱ型胶原产生量差异无统计学意义($P>0.05$),说明 3 MPa 压力髓核细胞已被完全破坏,PI3K/AKT 通路无法激活。Ⅱ型胶原在 0.3 MPa 下中药组表达最多,在 3 MPa 下单纯压力组表达最少。

2.5 PI3K/AKT 活性情况

观察髓核细胞在 0.3 MPa 和 3 MPa 压力下作用 4 h 后 PI3K,PIP3 及 AKT 蛋白酶的表达,中药组明显

高于对照组,说明身痛逐瘀汤方可能通过上调 PI3K/AKT 通路的表达延缓髓核细胞的凋亡,从而减缓椎间盘的退变,见图 7,8 及表 2。

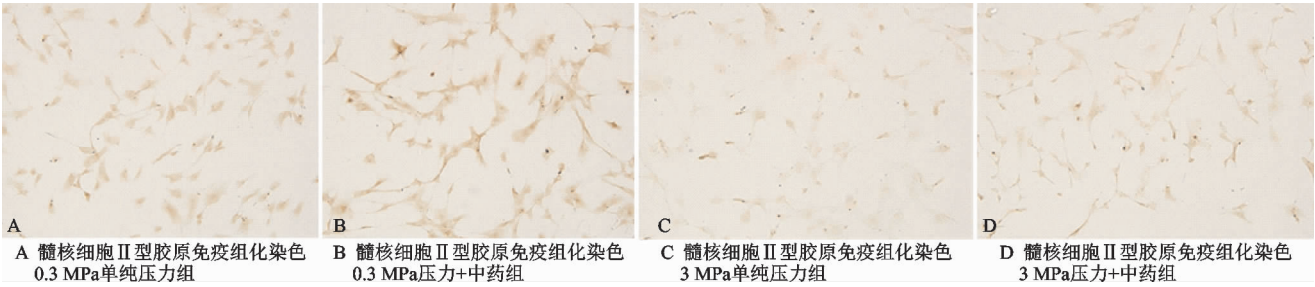


图 6 不同静水压下人髓核细胞Ⅱ型胶原表达免疫组化染色(静水压下作用4 h)(100×)

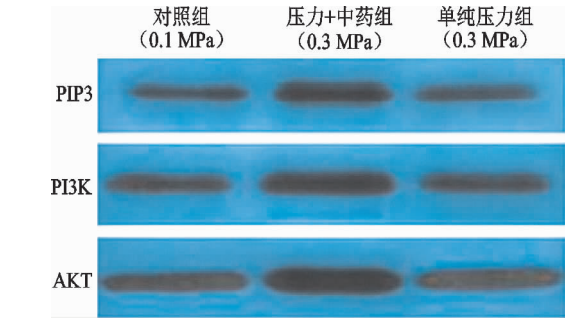


图 7 PI3K-AKT 通路相关蛋白表达及磷酸化水平
(0.3 MPa 下作用 4 h)

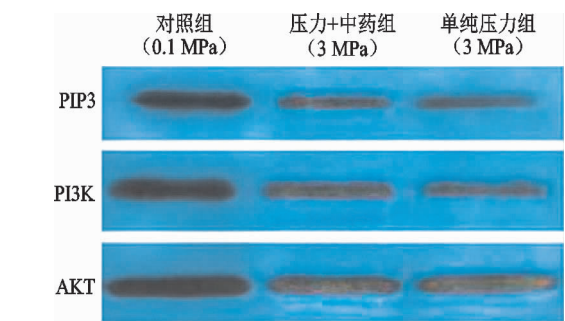


图 8 PI3K-AKT 通路相关蛋白表达及磷酸化水平
(3 MPa 下作用 4 h)

表 2 各组 PI3K-AKT 通路相关蛋白表达情况
(0.3 MPa 压力下)($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PI3K	PIP3
对照组	6	1.112±0.002	0.245±0.006 ¹⁾
单纯压力组	6	1.098±0.004	0.358±0.007
压力+中药组	6	1.120±0.001	0.728±0.014 ¹⁾
P		0.096	0.028

注:髓核细胞 0.3 MPa 压力下作用 4 h 后 PI3K, PIP3 及 AKT 蛋白酶表达水平逐渐升高,表明 PI3K-AKT 信号通路的激活。压力组与中药组髓核细胞在 3 MPa 压力下作用 4 h 后 AKT-PIP3-AKT 蛋白酶表达水平均较低,差异无统计学意义($P>0.05$),说明髓核细胞在 3 MPa 压力下细胞形态及超微结构已经被完全破坏,药物无法恢复。

3 讨论

3.1 压力负荷对椎间盘髓核退变的影响

作用于椎间盘的诸多力学形式中,静水压是椎间盘在人体日常活动中承受负荷的最主要形式^[7,8]。研究证明^[9,10],压力对髓核细胞活性和细胞外基质的合成具有双向调节作用:一方面,适当的压力可以促进髓

核细胞的发育成熟;另一方面,不当、过载的负荷则会加速髓核细胞的凋亡,导致椎间盘的老化,从而引起颈腰部疼痛等疾病。其机理是当过高的压力作用到椎间盘上,椎间盘内的静水压增加,导致椎间盘内水分外出,基质分解加快,诱发椎间盘退变。与此同时,如果椎间盘内静水压缺失同样会导致椎间盘组织内蛋白聚糖的表达降低,引起椎间盘退变^[11]。因此,适当的静水压对刺激椎间盘细胞及基质增殖代谢具有重要影响。课题前期研究结果^[12]也显示:单纯培养的髓核细胞在 0.3 MPa 静压负荷下,细胞活性较好,基质合成增加,而在 3 MPa 高负荷下持续受压时,髓核细胞的凋亡率增加,胞外基质分解代谢明显加快。这些结果同国外研究者的研究结果一致^[13,14]。

3.2 时间对椎间盘髓核退变的影响

前期研究结果^[15,16]显示髓核细胞表现出对“压力-时间-药物”影响因素敏感,静水压下作用时间超过 4 h 后,髓核细胞的合成、分解过程先增快后减慢,细胞炎症因子先增高后下降,但总体来说细胞分解过程大于合成过程,因此表现为分解大于合成趋势。但超过 24 h 由于细胞受压时间过长处于不可逆的状态,因此试验选择 4 h 及 24 h 作为对照。

3.3 药物对椎间盘髓核退变的影响

中医发展过程中历代医家把腰椎间盘突出归于“腰腿痛”范围,其多由寒湿、湿热、瘀血或肾虚而来^[17,18]。中医历代医家大多认为腰腿痛以气血瘀阻经络多见,清代王清任《医林改错》最早记载身痛逐瘀汤,其功效以活血通络止痛见长。现在西医基础研究指出腰椎间盘突出引起腰腿痛的主要原因是由于神经根受压水肿,细胞中大量炎性因子的释放所致^[19]。北京中医药大学东直门医院名老中医孙呈祥教授根据多年临床经验总结,指出椎间盘退变的主要病机为气滞、血瘀、络阻,缓解临床腰腿痛的用药核心是行气活血,关键是祛瘀通络,并以中医经典方剂身痛逐瘀汤临床辨证加减治疗腰椎间盘突出等椎间盘退变性疾病,经临床二十余年的验证,屡见佳效,为无数患者解决腰腿痛之苦。国内有关身痛逐瘀方治疗腰椎间盘突出等相关临床研究报道显示该方临床效果显著^[20-24]。身痛逐瘀汤中主要用药,如当归、牛膝、红花、川芎、地龙、没

药、威灵仙等活血祛瘀通络中药位于治疗椎间盘突出最为常用的 20 种中药之中。但目前对于身痛逐瘀汤方用于治疗椎间盘退变性疾病的疗效机制尚无明确报道,亟待进一步深入研究。

本研究存在一些不足之处:实验所用药物为中药复方制剂,暂无相关药理毒理及药效动力学研究;另外,本实验为体外实验,不完全反映体内细胞通路的变化,后期还需实行体内实验进行佐证;椎间盘细胞外基质炎性因子种类繁多,成分复杂,本研究所选取的检测指标能否完全反映身痛逐瘀汤方作用机制亦不确定。

综上,身痛逐瘀汤方可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路,进而调控通路相关分子蛋白的表达,延缓椎间盘的退变。但是身痛逐瘀汤方只是延缓椎间盘退变,并未阻止椎间盘退变的发生。尽管如此,这也部分探明了静水压诱导椎间盘髓核细胞凋亡及调控基质代谢的分子生物学机制,局部揭示了身痛逐瘀汤方治疗椎间盘退变性疾病的疗效机制及作用靶点,为中医药治疗椎间盘退行性疾病提供新的微观生物学证据。

参考文献

- [1] 陈江,贾育松,柳根哲,等. 体外静水压环境下细胞因子诱导骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化[J]. 中国组织工程研究,2016,20(2):191-196.
- [2] Chen J, Jia YS, Liu GZ, et al. Role of LncRNA TUG1 in intervertebral disc degeneration and nucleus pulposus cells via regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2017,491(3):4-7.
- [3] 鲁花,于露,甄欢欢,等. 骨形态发生蛋白 9 激活 PI3K/Akt 信号通路抑制退变髓核细胞的炎症反应和凋亡[J]. 第三军医大学学报,2016,38(18):2047-2052.
- [4] 黄云鸿,周红海,周诚恩,等. 中药治疗腰椎间盘突出症文献分析[J]. 中医正骨,2013,25(8):13-14.
- [5] Rosenzweig DH, Gawri R, Moir J, et al. Dynamic loading, matrix maintenance and cell injection therapy of human intervertebral discs cultured in a bioreactor[J]. European Cells & Materials,2016,30(1):26-31.
- [6] 李大鹏,吴燕,黄永辉,等. 人髓核细胞分离、传代培养方法的建立及意义[J]. 山东医药,2017,57(32):1-4.
- [7] 武海军,银和平,胡继平,等. 非接触共培养条件下骨髓间充质干细胞向类髓核细胞的诱导分化[J]. 中国组织工程研究,2016,20(45):6706-6713.
- [8] 易威威,温亚枫,刘浠,等. NF- κ B 抑制剂对脂多糖刺激的退变人椎间盘髓核细胞炎症因子表达的影响[J]. 第三军医大学学报,2017,39(8):755-759.
- [9] 白亦光,陈巧玲,刘康,等. 高渗培养基对椎间盘内髓核细

胞活力及代谢的影响[J]. 山西医科大学学报,2016,47(6):531-535.

- [10] Paul CPL, Emanuel KS, Kingma I, et al. Changes in intervertebral disc mechanical behavior during early degeneration[J]. J Biomech Eng,2018,140(9):8-9.
- [11] 柳根哲,孙旗,陈江,等. 高静水压下益气活血汤通过 p38MAPK 信号通路对兔椎体终板软骨细胞的调控作用[J]. 现代中西医结合杂志,2018,27(10):1027-1030.
- [12] 孙旗. 静水压下川芎嗪对兔椎体终板软骨细胞相关基因表达的影响[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [13] Lin Y, Jiao Y, Yuan Y, et al. Propionibacterium acnes induces intervertebral disc degeneration by promoting nucleus pulposus cell apoptosis via the TLR2/JNK/mitochondrial-mediated pathway[J]. Emerging Microbes & Infections,2018,7(1):1-2.
- [14] Bowden JA, Bowden AE, Wang H, et al. In vivo correlates between daily physical activity and intervertebral disc health[J]. Journal of Orthopaedic Research,2018,36(5):5-6.
- [15] Zhao QL, Zheng Q, Xu HG, et al. Expression of AMP-activated protein kinase in subcultured rat endplate chondrocytes[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research,2016,20(29):4297-4299.
- [16] 王效,徐宏光,肖良,等. 大鼠腰椎终板软骨干细胞的分离及分化[J]. 中国组织工程研究,2018,22(13):2093-2097.
- [17] 陈梦霞,郭遂群,李新军. 身痛逐瘀汤加减联合止痛散治疗腰椎间盘突出症临床观察[J]. 实用中医药杂志,2018,34(5):524-525.
- [18] 许贤盛. 身痛逐瘀汤加减治疗老年性腰腿痛的临床疗效[J]. 深圳中西医结合杂志,2018,28(3):57-58.
- [19] 崔允强. 独活寄生汤加减联合射频热凝术治疗腰椎间盘突出症及对患者血清 TNF- α 及 IL-1 β 水平的影响研究[J]. 亚太传统医药,2018,14(6):158-159.
- [20] 王利霞. 加味身痛逐瘀汤配合推拿牵引治疗腰椎间盘突出症效果观察[J]. 实用中医药杂志,2018,34(5):519-520.
- [21] 胡学伏,刘超,伍新林. 身痛逐瘀汤联合西医治疗腰椎间盘突出症[J]. 中医学报,2018,33(6):1124-1127.
- [22] 郭振,李引刚. 中西医结合治疗腰椎间盘突出症临床观察[J]. 实用中医药杂志,2018,34(2):188-189.
- [23] 李厚坤,李孟,李汉,等. 身痛逐瘀汤加减治疗腰椎间盘突出症 30 例[J]. 河南中医,2016,36(6):1107-1108.
- [24] 叶建辉,何煜才,欧永祯,等. 腰椎间盘内注射结合超激光治疗椎间盘源性腰痛的远期疗效分析[J]. 中国医学创新,2018,15(8):116-119.

(收稿日期:2018-07-02)