

通痹方热奄包外敷对家兔退变颈椎间盘细胞凋亡相关基因 *Caspase-3* 和 *Bcl-2* mRNA 的影响^{*}

徐银琴^{**}, 王光义^{***}

(贵州医科大学附院 针灸科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨通痹方热奄包外敷对家兔退变椎间盘细胞凋亡相关基因天冬氨酸特异性蛋白酶-3 (*Caspase-3*) 和 B 淋巴细胞瘤-2 (*Bcl-2*) mRNA 表达的影响。方法: 普通级新西兰大白兔 18 只随机均分为空白组 (正常兔, 不做任何干预)、模型组 (颈椎病模型兔, 不予任何治疗) 及热敷组 (颈椎病模型兔, 通痹方热奄包外敷治疗), 各组家兔于造模前、造模第 30 天及治疗结束后拍摄颈椎 X 线并评分; 治疗 15 次后留取各组家兔 C3-4 和 C4-5 椎间盘, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色观察 C3-4 椎间盘组织形态学变化并评分, 实时荧光定量法检测 C4-5 椎间盘 *Caspase-3* 和 *Bcl-2* mRNA 相对表达量。结果: 模型组和热敷组家兔造模后颈椎 X 线评分分别较空白组升高, 热敷组家兔治疗后颈椎 X 线积分改善程度较模型组大, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); HE 染色结果显示, 模型组家兔 C3-4 椎间盘评分比空白组升高, 热敷组评分比模型组降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与空白组相比, 模型组家兔 C4-5 椎间盘内 *Caspase-3* mRNA 表达升高、*Bcl-2* mRNA 表达降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 热敷组家兔椎间盘内 *Caspase-3* mRNA 表达降低、*Bcl-2* mRNA 表达升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 通痹方热奄包可通过上调 *Bcl-2* mRNA 表达、抑制 *Caspase-3* mRNA 表达减少椎间盘细胞凋亡, 延缓椎间盘退变。

[关键词] 椎间盘; 细胞凋亡; 通痹方; 热敷; 天冬氨酸特异性蛋白酶-3; B 淋巴细胞瘤-2

[中图分类号] R244.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2020)04-0438-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2020.04.012

The Effect of the External Application of Tongbi Hot Compress on mRNA Expression Levels of *Caspase-3* and *Bcl-2* in Rabbit Degenerated Intervertebral Discs

XU Yinqin, WANG Guangyi

(Department of Accupuncture, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of the external application of tongbi hot compress on mRNA expression levels of *Caspase-3* and *Bcl-2* in rabbit degenerated intervertebral discs. **Methods:** Eighteen ordinary New Zealand white rabbits were randomly divided into a blank group (normal rabbits), a model group (rabbits with cervical spondylosis) and a hot compress group (rabbit with cervical spondylosis + external application of tongbi hot compress). The rabbits were photographed and scored by cervical X-ray before the model, on the 30th day of the model and after the treatment. After 15 treatments, the C3-4 intervertebral discs were stained with hematoxylin-eosin (HE) to observe and score the morphological changes of intervertebral discs, and real-time qPCR was used to detect the relative expression of *Caspase-3* and *Bcl-2* mRNA in C4-5 intervertebral discs. **Results:** The X-ray scores were higher in the model group and the hot compress group than those in the blank group after

^{*}[基金项目] 贵州省中医药局中医药、民族医药科学技术研究课题 (QZXY-2016-075); 贵阳市科技计划项目 [筑科合同 (2019) 9-1-4]

^{**} 贵州医科大学 2017 级硕士研究生

^{***} 通信作者 E-mail: 573087568@qq.com

modeling, and the improvement of X-ray scores was higher in hot compress group than that in model group ($P < 0.05$). HE staining showed that the C3-4 intervertebral disc scores were higher in model group than those in blank group, while the scores were lower in hot compress group than those in model group ($P < 0.05$). When compared with the blank group, *Caspase-3* mRNA levels were increased, while *Bcl-2* mRNA levels were decreased in the model group ($P < 0.05$); when compared with the model group, *Caspase-3* mRNA levels were decreased, while *Bcl-2* mRNA levels were increased in hot compress group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tongbi hot compress can reduce the apoptosis of intervertebral disc cells and delay the degeneration of intervertebral disc by up-regulating the *Bcl-2* mRNA and downregulating *Caspase-3* mRNA.

[**Key words**] intervertebral disk; apoptosis; tongbi prescription; hot compress; cysteine-containing aspartate-specific protease-3 (*Caspase-3*); b lymphocytoma-2 (*Bcl-2*)

椎间盘退变被认为是引起颈、腰椎病疼痛的主要原因,而颈腰痛是目前临床最常见的颈椎病和腰椎病的就诊原因,每年医疗费用巨大^[1]。椎间盘退变是由衰老、异常应力、损伤等多种因素引起的椎间盘慢性退行性病变,其病理过程往往伴随着细胞减少、细胞外基质丢失、I 型胶原大量合成等,最终导致椎间盘结构和功能发生改变^[2]。有研究指出,椎间盘细胞过度凋亡导致的细胞数量减少和细胞活力丧失可直接影响椎间盘的功能^[3]。因此,能否有效抑制椎间盘细胞凋亡、改善椎间盘功能成为临床治疗椎间盘退行性疾病新的攻破点。中药热奄包作为一种中医保守疗法,药物在热力作用下可直接渗透至病灶深部,有疏通经络、活血化瘀、缓解疼痛及减轻炎症的作用^[4]。天冬氨酸特异性蛋白酶-3 (cysteine-containing aspartate-specific protease-3, *caspase-3*) 是半胱氨酸蛋白酶家族的成员,与细胞凋亡有着密不可分的关系,可通过降解细胞内底物激活细胞凋亡通路,致使细胞凋亡^[5]。B 淋巴细胞瘤-2 (B lymphocytoma-2, *Bcl-2*) 是 *Bcl-2* 家族主要的抗凋亡蛋白,可抑制细胞色素 C 释放,阻止下游胱冬肽酶的激活,从而起到抑制凋亡发生的作用^[6]。因此,本研究通过建立新西兰大白兔颈椎间盘退变模型,探讨中药热奄包外敷疗法对退变椎间盘细胞凋亡相关基因 *Caspase-3* 和 *Bcl-2* mRNA 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要药品、试剂及仪器

1.1.1 实验动物 普通级新西兰大白兔[SYXK (黔)2018 - 0001] 18 只,雌雄各半,每只体质量 2.0 ~ 2.5 Kg,贵州医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要药品与试剂 通痹方(葛根 20 g、桂枝 12 g、伸筋草 10 g、牛膝 10 g、路路通 10 g、细辛 10 g、防风 10 g、川芎 15 g、红花 10 g、没药 20 g、赤芍 15 g、独活 15 g、威灵仙 15 g 及秦艽 15 g)为贵州医科大学附属医院针灸科自制方,中药材均购自贵州医科大学附属医院;TRIZOL 试剂盒和荧光定量试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,逆转录试剂盒购自日本 Takara 公司,苏木素 - 伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色液购自湖南艾佳生物有限公司,引物由中国生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.1.3 主要仪器 1730R 高速冷冻离心机(香港基因有限公司)、YB - 6LF 生物组织石蜡包埋机(孝感亚光医用技术有限公司)、YT - 6C 生物组织摊烤片机(孝感亚光医用技术有限公司)、AE41 光学显微镜(厦门麦克奥迪医疗诊断系统有限公司)和 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组 18 只家兔适应性喂养 7 d 后随机分为空白组、模型组及热敷组,每组各 6 只。模型组和热敷组家兔采用长期低头位建模法建立颈椎病家兔模型^[7],即将家兔置于兔固定盒内,充分显露颈部,敷以保湿冰袋,使其颈部成低头屈曲位 45°、3 h/次、2 次/d,造模 30 d 后拍摄颈椎 X 线片,见家兔颈椎出现生理曲度改变、反弓或椎间隙变窄、椎间孔变小、椎体出现骨质增生或椎体周围软组织钙化等变化中的 2 项时即视为造模成功。空白组同期正常饲养,不做任何干预;模型组仅作造模处理,不予任何治疗;热敷组造模成功后用通痹方药制成热奄包,加水煎熬后去除药包多余水分,将温度适宜的热奄包置于家兔颈部进行热敷,1

次/d、15 min/次,治疗 5 次,休息 2 d,共治疗 15 次。

1.2.2 颈椎影像学观察及评分 各组家兔在造模前、造模第 30 天及治疗结束后拍摄颈椎左侧位 X 线,观察颈椎病变情况,并参照文献[8]方法以造模前 X 线检查作参照,于造模第 30 天、治疗结束后 2 个时间节点对颈椎椎间隙、椎体前后缘、颈椎上下关节突骨质增生情况、椎间孔、颈椎生理曲度进行评分,并计算治疗后 X 线积分改善程度(治疗后 X 线积分改善程度 = 造模后 X 线积分 - 治疗后 X 线积分)。

1.2.3 颈椎间盘组织形态学观察及评分 于治疗结束后第 2 天取出各组家兔 C3-4 椎间盘在 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h,4 ℃ 冰箱过夜,0.9% 生理盐水浸洗 2~3 次,置于 10% EDTANA2 溶液脱钙,经石蜡包埋、切片、苏木素 - 伊红染色液染色,光学显微镜下观察组织形态学变化,参照文献[9]方法对椎间盘组织形态进行评分,评分范围从正常椎间盘 4 分到严重退变椎间盘 12 分。

1.2.4 椎间盘 Caspase-3 和 Bcl-2 mRNA 采用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(Real-time Quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)法检测。 取各组家兔 C4-5 椎间盘液氮研磨后用 Trizol 法提取总 RNA,参照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 反应,反应体系为 10 μL:SYBR Mix 5 μL,引物各 0.5 μL,cDNA 1 μL,ddH₂O 3 μL。反应参数为 50 ℃ 2 min、95 ℃ 15 s、95 ℃ 15 s 和 60 ℃ 1 min,40 个循环,以 GAPDH 作为内参基因,根据 2^{-ΔCt} 法计算 Caspase-3 和 Bcl-2 mRNA 的相对表达量。见表 1。

表 1 相关引物序列
Tab.1 Primer sequences

名称	引物序列 5'~3'	产物大小/bp
Bcl-2	上游:GTTTCAAAGCGGCTCTCACC	136
	下游:TTCCTACGTGATGTTGTGTT	
Caspase-3	上游:TGCCATGCTGAAAGAGTACG	105
	下游:GTGGCATCAAGGAATAGGA	
GAPDH	上游:CGCCTGGAGAAAGCTGCTA	104
	下游:ACGACCTGGTCCTCGGTGTA	

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 颈椎 X 线评分

与空白组相比,模型组和热敷组家兔造模后颈椎 X 线评分升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);热敷组家兔治疗后颈椎 X 线积分改善程度较模型组大,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组家兔颈椎 X 线评分和积分改善程度比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 The effect of tongbi hot compress on X-ray imaging scores and score improvement of rabbits' cervical spine in the different groups($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	造模后积分/分	积分改善程度/分
空白组	6	1.17 ± 0.41	-0.17 ± 0.41
模型组	6	4.67 ± 0.52 ⁽¹⁾	0.17 ± 0.41
热敷组	6	4.33 ± 0.52 ⁽¹⁾	0.83 ± 0.75 ⁽²⁾

注: ⁽¹⁾ 与空白组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 C3-4 椎间盘组织结构

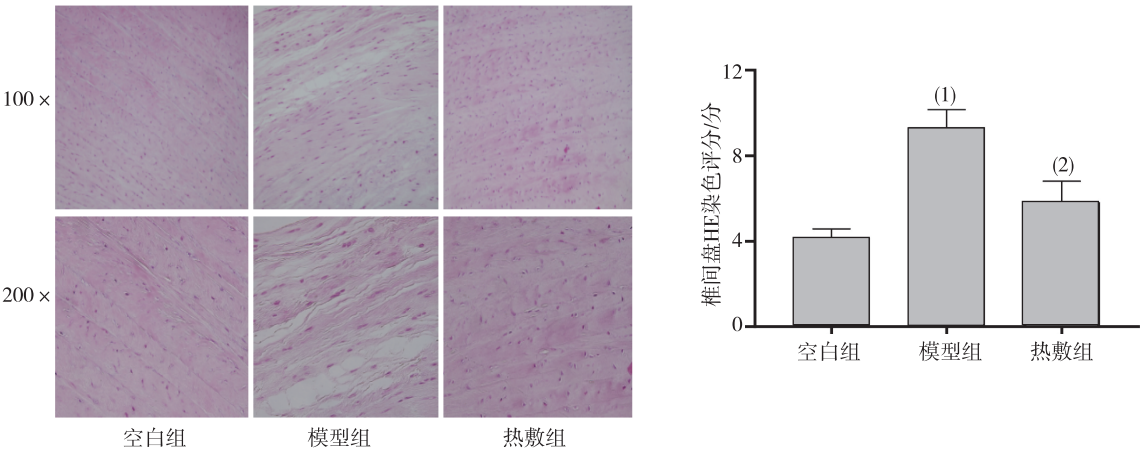
HE 染色结果显示,空白组家兔 C3-4 椎间盘纤维环层次分明、排列整齐、结构正常、细胞分布均匀,模型组家兔椎间盘纤维环可见纤维排列松散紊乱、出现较多撕裂和细胞肿胀变性,热敷组家兔椎间盘纤维环排列相对整齐、层次相对清楚和细胞形态稍好;模型组家兔椎间盘评分比空白组升高,热敷组评分比模型组降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 C4-5 椎间盘 Caspase-3 和 Bcl-2 mRNA 的相对表达量

与空白组相比,模型组家兔 C4-5 椎间盘内 Caspase-3 mRNA 表达升高、Bcl-2 mRNA 表达降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,热敷组家兔椎间盘内 Caspase-3 mRNA 表达降低,Bcl-2 mRNA 表达升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

椎间盘由中心的髓核、包裹于髓核周围的纤维环以及上下端的软骨终板构成^[10],位于上下两椎体之间,起到缓冲震荡、均匀分散脊柱应力、连接椎体及维持脊柱高度的作用,是人体最容易发生退变的组织^[11]。导致椎间盘发生退变的因素众多,常



注: ⁽¹⁾ 与空白组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 各组家兔 C3-4 椎间盘纤维环组织学及 HE 染色评分

Fig. 1 The effect of tongbi hot compress on histology of C3-4 intervertebral disc annulus in the different groups

表 3 各组家兔椎间盘 *Caspase-3* 和 *Bcl-2* mRNA 相对表达量比 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The effect of tongbi hot compress on *Caspase-3* and *Bcl-2* mRNA in C4-5 intervertebral discs in the different groups

组别	<i>Caspase-3</i> mRNA	<i>Bcl-2</i> mRNA
空白组	0.23 ± 0.03	0.85 ± 0.07
模型组	0.91 ± 0.03 ⁽¹⁾	0.61 ± 0.05 ⁽¹⁾
热敷组	0.69 ± 0.06 ⁽²⁾	1.51 ± 0.07 ⁽²⁾

注: ⁽¹⁾ 与空白组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

见的有机压力、创伤、免疫因素以及缺血缺氧等均可诱使椎间盘过早的发生退变^[12]。本研究使用低头位造模法经长时间诱导之后建立家兔颈椎间盘退变模型,较好的模拟人类长期低头颈椎异常应力所致颈椎间盘退变,且兔颈椎结构与人类颈椎结构极为相似,这使得研究所用模型更符合临床实际。建立模型后,本研究观察到家兔颈椎 X 线出现了不同程度的椎间隙狭窄、曲度变直,椎体边缘观察到骨赘形成,小关节出现增生硬化等情况,说明模型建立成功。在对家兔颈椎 X 线的评分中,与空白组相比,模型组和热敷组家兔造模后颈椎 X 线评分升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);热敷组家兔治疗后颈椎 X 线积分改善程度较模型组大,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);椎间盘 HE 染色显示,空白组家兔椎间盘纤维环层次分明、排列整齐、结构正常、细胞分布均匀,模型组家兔椎间盘纤维环可见纤维排列松散紊乱,出现较多撕裂和细胞肿胀变性,热敷组家兔椎间盘纤维环排列相对整

齐、层次相对清楚和细胞形态稍好;模型组家兔椎间盘评分比空白组升高,热敷组评分比模型组降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。这些结果提示建模过程中家兔的不当体位以及异常应力致使家兔颈椎椎间盘发生退变,经过通痹方外敷治疗后从影像学上家兔颈椎整体退变情况较前好转,从组织形态学上椎间盘退变程度也较治疗前减轻。

细胞凋亡是一种由基因调控的细胞自主性死亡,存在于机体的整个生命过程维持机体器官或组织内环境的稳定^[13],对机体的免疫和防御反应、疾病或中毒引起的细胞损伤等都具有非常重要的作用^[14]。研究发现,细胞凋亡异常与椎间盘退变的发生发展密切相关,细胞凋亡异常增多导致椎间盘细胞活性降低、活性细胞数量减少,加重了椎间盘退变过程^[15]。研究发现软骨细胞凋亡异常增加,会导致椎间盘内的活化软骨细胞数量减少,软骨细胞合成和 (或) 降解细胞外基质的能力降低,致使代谢产物堆积于椎间盘内,营养物质的供应减少,最终导致椎间盘发生退变^[16]。同样有很多研究者认为,细胞凋亡过度或衰老会引起的椎间盘髓核细胞数目减少和细胞活性降低,细胞外基质合成减少而分解增加是导致椎间盘退变的主要原因^[17]。也有研究认为细胞凋亡导致的纤维环细胞减少是纤维环退变的主要原因,而椎间盘纤维环细胞减少,细胞外基质成分也不断减少,进而导致椎间盘发生退变^[18]。总而言之,细胞凋亡是椎间盘退变的重要环节,椎间盘细胞过度凋亡后导致的细胞数量减少、细胞活性降低以及细胞外基质成分合

成减少,是促进椎间盘退变和衰老主要因素。Caspase 级联反应是细胞凋亡通路的中心环节,Caspase-3 作为 Caspase 级联反应下游最关键的凋亡蛋白酶,在死亡受体途径与线粒体凋亡途径等途径中介导了细胞凋亡^[5]。在正常情况下,胞质中的 Caspase-3 以无活性的酶原形式存在,细胞发生凋亡时被释放到细胞质中的细胞色素 C 激活天冬氨酸特异性蛋白酶-9 (cysteine-containing aspartate-specific protease-9, Caspase-9),继而激活 Caspase-3^[19];被活化后的 Caspase-3 直接参与切割或降解细胞的多种结构和功能蛋白,引起细胞功能障碍、细胞凋亡^[20]。对人退变椎间盘的研究表明,椎间盘退行性病变患者血清中 Caspase-3 和 Caspase-9 的浓度明显高于正常健康者,而且 Caspase-3、Caspase-9 的浓度与椎间盘突出节段的数量有直接联系,指出凋亡因子 Caspase-3 和 Caspase-9 椎间盘退变的发生或发展过程中起到重要作用^[21]。在线粒体凋亡通路上 Bcl-2 家族是细胞凋亡的调控者,以线粒体为调控凋亡单位,Bcl-2 为抗凋亡蛋白,Bcl-2 家族蛋白 Bax 为促凋亡蛋白,当 Bcl-2 表达降低、Bax 表达升高时,线粒体通道开放释放出细胞色素 C 等诱导凋亡因子启动下游凋亡发生^[22]。Bcl-2 是线粒体凋亡途径上最重要的抗凋亡因子,通过减少凋亡诱导因子、与促凋亡因子 Bax 结合、拮抗凋亡蛋白酶等发挥抑制凋亡作用^[23]。有研究报道,Bcl-2 可抑制线粒体中内源性核酸内切酶及细胞色素 C 的释放,干预 Caspase-3 活化进而发挥抗凋亡的作用,认为 Bcl-2 可能抑制了 Caspase-3 的合成^[6]。有人在对人类退变椎间盘的研究中发现,在椎间盘退行性变程度逐渐加重的过程中,髓核组织中的 Bax 和 Caspase-3 表达量也呈现出增长趋势,Bcl-2 则趋于下降^[24],这说明椎间盘退行性变程度越重,髓核细胞的凋亡水平越高。周文明等^[10]用补肾壮督方对椎间盘退变模型大鼠干预后发现,经干预后大鼠退变椎间盘中活化 Caspase-3 表达量明显下降,Bcl-2 表达量明显增加。同以上研究结果一致,本次研究结果显示:与空白组相比,模型组家兔椎间盘内 Caspase-3 mRNA 表达升高、Bcl-2 mRNA 表达降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,热敷组 Caspase-3 mRNA 表达较模型组降低,Bcl-2 mRNA 表达较模型组升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。提示造模后家兔退变颈椎间盘内细胞凋亡增多,而在治疗后,与模型组相比较,热敷组

Caspase-3 表达降低、Bcl-2 表达升高则说明经通痹方热奄包外敷治疗后椎间盘内细胞凋亡较前减少。

在既往的研究中研究者用中药热奄包对腰椎间盘突出症患者进行热敷治疗后,患者腰骶部疼痛及下肢麻木症状明显缓解^[25]。有临床研究采用中药热奄包联合手法治疗腰椎间盘突出症患者总有效率达 92.5%,VAS 评分较治疗前显著降低^[4]。本研究所用通痹方为自拟方,在临床应用 10 余年,口谕颇佳。全方以红花、赤芍、独活、威灵仙、防风、细辛等祛风除湿、舒筋通络、活血止痛为主,辅以川芎、桂枝、葛根温通经脉、通达气血,全方合用具有温经通络止痛、调和气血、祛湿除寒的作用,主要治疗以颈椎病、腰椎病、风湿性关节炎等为主的痹证^[26]。用此方制成热奄包对疼痛局部进行热敷可使药效渗透到病变局部,起到温经散寒、活血通络止痛的作用,且温热的药物直接作用于局部可促进经脉气血运行、扶正祛邪,能有效改善患者局部畏寒、疼痛不适等情况。

综上所述,通痹方热奄包外敷治疗可导致抗凋亡因子 Bcl-2 表达上调和凋亡执行因子 Caspase-3 的表达下调,从而减少椎间盘细胞凋亡,改善椎间盘退变程度。

4 参考文献

- [1] SUJA M, JAMES Y, 汤洋,等. 富血小板血浆注射慢性盘源性腰痛的新疗法[J]. 中国疼痛医学杂志, 2019, 25(10): 721-724.
- [2] ROBERTS S, EVANS H, TRIVEDI J, et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc[J]. Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume, 2006, 88 (Sup 2): 10-14.
- [3] ZHANG F, ZHAO X, SHEN H, et al. Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration (Review) [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2016, 37(6): 1439-1448.
- [4] 杨风云, 邓许勇, 王丽华, 等. 中药热奄包配合正脊手法治疗腰椎间盘突出症的临床研究[J]. 中国当代医药, 2017, 24(36): 114-116.
- [5] 刘王波, 彭禹, 马瑞, 等. 地黄饮子汤对 rt-PA 溶栓后急性脑梗死大鼠神经细胞凋亡及 Bcl-2、Caspase-3 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2019, 28(8): 1366-1369.
- [6] 李卫峰. Ki-67、Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 在脑胶质瘤组织中的表达及临床意义[J]. 陕西医学杂志, 2018, 47(11): 1377-1379.
- [7] 张欣, 李殿宁, 李开平, 等. 无创兔颈型颈椎病动物模型

的建立[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(4): 913.

[8] 余家阔, 吴毅文, 戴先进, 等. 颈椎病生物力学发病机制实验研究[J]. 安徽医科大学学报, 1990, 25(1): 47-51.

[9] MASUDA K, AOTA Y, MUEHLEMAN C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration[J]. Spine, 2005, 30(1): 5-14.

[10] 周文明, 林一峰, 张震, 等. 补肾壮督方对大鼠退变椎间盘细胞线粒体凋亡通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(19): 25-31.

[11] 李咸周, 张存鑫. 内质网凋亡途径参与了高糖诱导髓核细胞凋亡的过程[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(36): 5778-5784.

[12] LIU Z, SHI X, SHA L, et al. Tapetal-delayed programmed cell death (PCD) and oxidative stress-induced male sterility of *aegilops uniaristata* cytoplasm in wheat[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(6): 1708.

[13] 胡艳红, 张凡, 张楚焱, 等. 程序性细胞死亡形式研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(12): 85-89.

[14] 张雪梅, 江维. 血红素氧合酶-1 通过 NF- κ B 信号通路抑制人退变椎间盘髓核细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(7): 561-568.

[15] SCHLEICH C, MÜLLER-LUTZ A, ZIMMERMANN L, et al. Biochemical imaging of cervical intervertebral discs with glycosaminoglycan chemical exchange saturation transfer magnetic resonance imaging: feasibility and initial results[J]. Skeletal Radiol, 2016, 45(1): 79-85.

[16] 刘福水, 赵梅梅, 方婷, 等. 针刀治疗对颈椎病兔椎间盘软骨细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(07): 1579-1582, 1800-1802.

[17] 张雯, 徐辉, 罗大伟, 等. 牵张应力对退变椎间盘髓核细胞增殖凋亡及细胞外基质表达的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2018, 40(10): 721-726.

[18] BATEMAN AH, BALKOVEC C, AKENS MK, et al. Closure of the annulus fibrosus of the intervertebral disc using a novel suture application device in vivo porcine and ex vivo biomechanical evaluation[J]. The Spine Journal, 2016, 16(7): 889-895.

[19] 尹东亮, 卢沛林, 尹润龙, 等. 过表达 PRRX1 通过 p53 介导的线粒体凋亡途径诱导肝癌 SMMC7721 细胞凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(6): 662-668.

[20] 陈伟, 马磊, 杨立山. 甘草次酸对哮喘大鼠气道重塑及肺组织 Caspase-3、Bax、Bcl-2 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(4): 16-19.

[21] 赵英伦, 马元, 莫森, 等. 腰椎间盘突出症患者血清中 Caspase-3 和 Caspase-9 活性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2): 13-15.

[22] 张丽丽, 李雁. 加味温胆方对心肌缺血(痰浊血瘀证)大鼠细胞凋亡及 Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2018, 27(12): 2140-2144, 2155.

[23] 丁实, 赵学荣, 李宝群, 等. 基于 Bcl-2/Beclin-1 复合体探讨黄连素对脑缺血再灌注损伤大鼠模型的保护作用[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 651-657.

[24] 吴学铭, 刘畅, 王伟恒, 等. BNIP3 与 LC3B 在椎间盘退行性变过程中的作用[J]. 脊柱外科杂志, 2017, 15(6): 351-356.

[25] 古继容. 中药热奄包护理对缓解腰椎间盘突出症疼痛的观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(1): 164.

[26] 罗先意, 黄少炎, 史红美, 等. 中药热奄包外敷干预颈型颈椎病家兔的实验研究[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(11): 1258-1261.

(2020-01-05 收稿, 2020-03-31 修回)

中文编辑: 严征; 英文编辑: 张启芳