

· 药理 ·

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

周文明¹, 林一峰^{2*}, 张震³, 白荣飞⁴

(1. 广州中医药大学, 广州 510000; 2. 广州中医药大学附属骨伤科医院, 广州 510240;
3. 深圳市沙井人民医院, 广东深圳 518104; 4. 广东省中医院, 广州 510030)

[摘要] **目的:**观察补肾壮督方对大鼠退变椎间盘细胞凋亡的影响,探讨其改善椎间盘退变的机制。**方法:**100只SD雄性大鼠,采用纤维环全层针刺造模,随机分为空白组,模型组,补肾壮督方低、中、高剂量组(0.38, 0.77, 1.53 g·kg⁻¹),连续中药灌胃4周后,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠椎间盘组织病理学变化;原位末端转移酶标记法(TUNEL)检测退变椎间盘中髓核细胞凋亡率,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测椎间盘组织中活化半胱氨酸蛋白酶-3(active Caspase-3),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),细胞色素C(cytC)及Bcl-2相关X蛋白(Bax)蛋白水平。**结果:**与空白组比较,模型组大鼠椎间盘组织病理学评分显著增加,髓核细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$),active Caspase-3, cytC和Bax表达量均明显增加($P < 0.05$),Bcl-2表达量明显下降($P < 0.05$)。与模型组比较,补肾壮督方低、中、高剂量组组织病理学评分明显降低($P < 0.05$),髓核细胞凋亡率明显减少($P < 0.05$),active Caspase-3, cytC及Bax表达量均明显下降($P < 0.05$),Bcl-2表达量明显增加($P < 0.05$)。**结论:**补肾壮督方可能通过减少active Caspase-3, cytC和Bax蛋白表达,增加Bcl-2蛋白表达,抑制线粒体凋亡通路,并存在一定剂量依赖性,从而改善椎间盘退变。

[关键词] 椎间盘退变; 细胞凋亡; 线粒体通路; 补肾壮督方; 阳和汤

[中图分类号] R2-0; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)19-0025-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191937

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190617.1158.015.html>

[网络出版时间] 2019-06-18 14:36

Effect of Bushen Zhuangdu Recipe on Mitochondrial Apoptotic Pathway in Degenerative Intervertebral Disc Cells in Rats

ZHOU Wen-ming¹, LIN Yi-feng^{2*}, ZHANG Zhen³, BAI Rong-fei⁴

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China;

2. Orthopaedic and Traumatic Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510240, China;

3. Shenzhen Shajing People's Hospital, Shenzhen 518104, China;

4. Gangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510030, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of mitochondrial apoptotic pathway in rat degenerative intervertebral disc cells in improving intervertebral disc degeneration under the action of Bushen Zhuangdu recipe. **Method:** The 100 SD male rats were randomly divided into blank group, model group, low, medium and high dose Bushen Zhuangdu recipe group (0.38, 0.77, 1.53 g·kg⁻¹). Histopathological changes of rat intervertebral discs were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining after 4 weeks of continuous administration of Chinese medicine. The apoptotic rate of nucleus pulposus cells in degenerative intervertebral discs was detected by TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling), and the levels of active CysteinyI aspartate-specific proteinase-3 (active Caspase-3), B cell leukemia-2 (Bcl-2), cytochrome C (cytC) and Bcl-2-

[收稿日期] 20190413(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81574000)

[第一作者] 周文明,在读博士,从事中医药防治脊柱退行性疾病的临床与实验研究,E-mail:wm13462004@163.com

[通信作者] *林一峰,主任医师,博士生导师,从事中医药防治脊柱退行性疾病的临床与实验研究,E-mail:lyf@gzucm.edu.cn

associated X protein (Bax) protein in intervertebral discs were detected by Western blot. **Result:** Compared with blank group, the histopathological score of intervertebral disc in the model group was significantly increased, the apoptosis rate of nucleus pulposus was significantly increased ($P < 0.05$), the expression levels of active Caspase-3, cytC and Bax were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression levels of Bcl-2 were significantly decreased ($P < 0.05$). After the intervention of Bushen Zhuangdu recipe. Compared with model group, the histopathological score of Bushen Zhuangdu recipe low, medium and high dose groups were significantly reduced ($P < 0.05$), the expression levels of active Caspase-3, cytC and Bax were significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression levels of Bcl-2 were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Bushen Zhuangdu recipe may improve the degeneration of intervertebral disc by reducing the expression of active Caspase-3, cytC and Bax, increasing the expression of Bcl-2 and inhibiting the apoptotic pathway of mitochondria in a dose-dependent manner.

[Key words] intervertebral disc degeneration; apoptosis; mitochondrial pathway; Bushen Zhuangdu recipe; Yanghetang

据目前研究显示,椎间盘退行性变(IDD)在正常成人 20~30 岁之间即开始^[1]。随着老龄化社会的临近,椎间盘退行性疾病也日益常见,由其所导致的社会经济负担也逐渐加重^[2]。Gruber 等^[3]研究发现,在术中取出的退变椎间盘,其细胞凋亡率高达 53%~73%。有文献表明椎间盘退化与椎间盘细胞行为变化有关^[4],其中椎间盘细胞凋亡起着关键性作用。ZHAO 等^[5]发现椎间盘细胞在硝普钠诱导后,细胞线粒体膜电位降低,细胞色素 C(cytC)在细胞质中的数量增加,线粒体凋亡通路参与了椎间盘细胞凋亡,并在椎间盘退变中发挥重要作用。

临床上对于椎间盘退行性疾病的治疗,主要包括药物治疗如非甾体类抗炎药、皮质类固醇以及理疗等,但这类药物只是针对具体症状,并不能逆转疾病进程;手术治疗则采用椎间盘切除植骨融合,或采用脊柱内镜,但手术会带来如再突出、邻近节段退变加速等并发症;生物治疗如富血小板血浆髓核间注射、细胞疗法等方兴未艾^[6-8];在椎间盘退行性疾病的治疗中,中药具有毒副作用小,安全有效的独特优势,补肾壮督方是林一峰教授通过多年临床总结在阳和汤基础上化裁而来的经验方,对于椎间盘退行性疾病疗效显著,具有补肾壮督、通络止痛的功效^[9-10]。本课题组通过前期研究发现,该方可以显著提高椎间盘退变大鼠椎间盘线粒体三磷酸腺苷(ATP)酶活性,明显改善大鼠椎间盘退变^[11],但其具体的作用机制尚未阐明。本研究通过针刺椎间盘建立椎间盘退变大鼠模型,通过苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠椎间盘组织病理学变化,原位末端转移酶标记(TUNEL)法检测髓核细胞凋亡率,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测线粒体凋亡通路关键

蛋白表达量,来探讨补肾壮督方治疗椎间盘退变的可能机制。

1 材料

1.1 动物 102 只 SPF 级雄性 4 周龄 SD 大鼠,体质量 300~400 g,购自广州中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2013-0034。本实验所涉及实验动物经过广州中医药大学实验动物伦理委员会审核通过。

1.2 中药制备 补肾壮督方配方组成如下:鹿角胶 10 g,海马 5 g,黄芪 30 g,熟地黄 20 g,细辛 4 g。以上中药均由广州中医药大学第三附属医院提供,并经广州中医药大学第三附属医院中药房吴雪茹主任中药师鉴定为正品。各中药剂量按上述比例混合,加 6 倍量水后浸泡 30 min,加热煮沸后再煎煮 30 min 取汁;第二煎加 5 倍量水,同前煎煮后取汁,将以上 2 次煎煮好的药液均匀混合,以洁净纱布滤除药渣,药液用旋转蒸发器浓缩至生药含量 $1.56 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,常温冷却后,置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

1.3 试剂 TUNEL 试剂盒(上海罗氏制药有限公司,批号 11684817910);anti-active Caspase-3 抗体,anti-cytC,B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax)抗体,Bcl-2 抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号分别为 C0302, C0321, C0323, C0330];辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G,HRP 标记的羊抗兔 IgG(武汉博士德生物公司,批号分别为 BA1054, BA1050);PVDF 膜(德国 Merck Millipore 公司,批号 GA0301);全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司,批号 J2496);BeyoECL Plus(上海碧云天生物技术有限公司,批号

P0018);HE 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 G1106)。

1.4 仪器 NikonEclipseCI 型正置光学显微镜及成像系统(日本尼康公司);BSD-YX(F)3200 型恒温摇床,STS-8A-A 型脱色摇床(上海博迅公司);DMI6000B 型荧光倒置显微镜(德国徕卡公司);HC-3618R 型台式高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);VE-386 型半干转膜仪, EPS-200 型电泳仪, Tanon-4100 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);HWS-5A 型恒温水浴锅(上海百典仪器设备有限公司);UV-2450 型分光光度计(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 标准条件下适应性饲养 1 周。将 102 只大鼠用黑色记号笔编号后,逐一称体质量,取体质量最大和体质量最小的大鼠进行造模预实验。剩余大鼠按体质量分层随机法分为 5 组,分别为空白组,模型组,补肾壮督方低、中、高剂量组,每组 20 只。空白组仅暴露椎间盘,除空白组外其他组参照崔力扬等^[12]实验研究方法造模,即针刺穿透纤维环全层造模。术后禁食禁水 6~8 h,并给予 8 万单位青霉素注射,0.2 mL/只,连续 3 d 以预防感染。造模成功后,对补肾壮督方低、中、高剂量组大鼠予以补肾壮督方灌胃,灌胃前将药液置于温水中恢复室温后,蒸馏水稀释至合适浓度,根据动物与人之间等效剂量换算^[13],补肾壮督方低、中、高剂量分别为 0.38,0.77,1.53 g·kg⁻¹,上、下午各灌胃 1 次,空白组和模型组给予等量生理盐水灌胃。

2.2 标本采集 按上述方法中药灌胃 4 周后,每组随机抽出 10 只大鼠,腹腔注射麻醉,取原切口分离腹腔组织,截取 L4/L5 腰椎及其间的椎间盘组织,无菌生理盐水冲去血渍后,4% 中性多聚甲醛溶液固定,预备作石蜡切片;另外一部分椎间盘组织则放入的冻存管内,置于液氮中保存备用。

2.3 HE 染色观察椎间盘组织病理学变化 标本 24 h 脱水后,完成石蜡包埋固定椎间盘,修整蜡块,在石蜡切片机 4 μm 厚连续切片,按照 Solarbio HE 染色试剂盒说明书进行染色操作。二甲苯脱蜡后,梯度无水乙醇脱蜡至水;苏木素染液染色 6 min,并使用自来水进行冲洗;使用分化液分化 30 s 使用自来水浸泡 15 min;置于伊红染液 2 min,并用自来水冲洗;常规脱水、透明、封片。对各组椎间盘组织进行病理学 Masuda 评分^[14],评分标准见表 1。

2.4 原位末端转移酶标记法(TUNEL)检测大鼠

表 1 椎间盘退变组织学分级

Table 1 Histological grading of intervertebral disc degeneration

椎间盘组织	椎间盘光镜下形态	评分/分
纤维环	纤维环软骨层纹理正常,无破裂扭曲	1
	破裂、扭曲的纤维少于纤维环的 30%	2
	破裂、扭曲的纤维超过纤维环的 30%	3
纤维环和髓核间的界线	正常	1
	微中断	2
	中等或严重中断	3
髓核中的细胞	正常凝胶样基质中的细胞含少量空泡	1
	细胞和空泡数量轻度减少	2
	细胞数量中等或严重减少,没有空泡	3
髓核中的基质	基质正常凝胶样外观	1
	轻微凝结	2
	基质中等或严重凝结	3

退变椎间盘髓核细胞凋亡率 椎间盘组织石蜡切片按常规方法脱蜡至水,PBS 洗 3 次,每次 5 min,加入蛋白酶 K 工作液,37 °C 反应 30 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;于室温水解 15 min,去除组织蛋白,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min;浸入封闭液中,室温封闭 10 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min;玻片干后,加 TUNEL 反应混合液 50 μL,加盖玻片在 37 °C 暗湿盒中反应 1 h。PBS 洗 3 次,每次 5 min,滴加 2 mg·L⁻¹ DAPI 染液,染色 10 min,流水冲去染液,滤纸吸除多余水分,加滴荧光封片液,置于荧光显微镜下观察,激发波长 360~400 nm。荧光显微镜下,每个样品随机计数 4 个视野,计算凋亡细胞数/(凋亡细胞数+正常细胞数),发红色荧光占蓝色荧光细胞百分比为细胞凋亡率,取其平均值作为最终髓核细胞凋亡率。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测椎间盘组织中 active Caspase-3, Bcl-2, cytC, Bax 蛋白的表达 提取椎间盘组织总蛋白质,调整样品的蛋白浓度。制备不连续系统 SDS-PAGE,每孔上样 40~60 μg 进行电泳分离蛋白。转膜完成后, TBST 漂洗 5 min,洗去残留转膜液;5% 脱脂奶粉封闭液完成封闭;再加入按说明书稀释好的一抗,4 °C 过夜。孵育后 TBST 洗 3 次,每次 5 min。按说明书对 HRP 标记的二抗进行稀释,操作同前,室温轻摇孵 1 h,孵育完毕 TBST 洗 3 次,每次 5 min。在暗室将杂交后印迹膜放入显色盒中,加上显色液,经 ECL 化学发光, X 光片压片,显影、定影、洗片,获取目的条带图像。

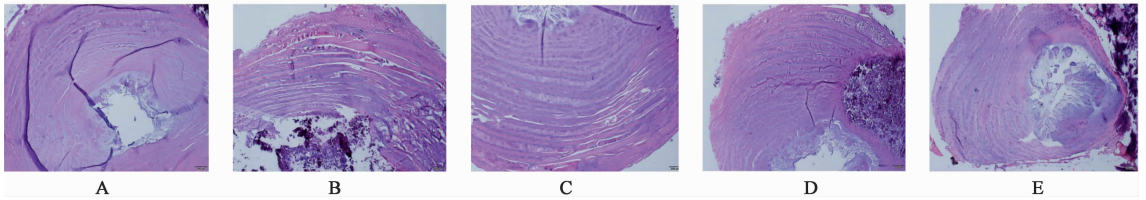
2.6 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行

统计分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Levene 法行方差齐性检验,方差齐性则采用组间比较方差齐采用单因素方差分析,两两比较则采用 LSD 检验,方差不齐采用 Dunnett T3, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠各组椎间盘退变组织学评分的影响 与空白组[组织病理学评分为 (5.20 ± 0.48) 分]比较,模型组[组织病理学评分为 (11.40 ± 0.55) 分]椎间盘髓核基质严重凝结,髓核细胞明显减少,髓核

与纤维环的界线模糊,纤维环排列混乱,其组织学评分较空白组明显增高 ($P < 0.05$);与模型组比较,补肾壮督方低、中、高剂量组椎间盘髓核基质从中等凝结到轻微凝结,髓核细胞数量从明显减少到数量中等,髓核与纤维环的界线从轻度中断到清晰,纤维环排列从轻度扭曲到清晰,与模型组比较,补肾壮督方低[(10.60 ± 0.53) 分],中[(8.20 ± 0.42) 分],高剂量组[(7.20 ± 0.48) 分]组织病理学评分明显减低 ($P < 0.05$)。见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 补肾壮督方低剂量组;D. 补肾壮督方中剂量组;E. 补肾壮督方高剂量组(图 2,3 同)

图 1 补肾壮督方对大鼠椎间盘组织病理学的影响(HE, $\times 200$)

Fig.1 Effect of Bushen Zhuangdu recipe on histopathology of rat intervertebral disc (HE, $\times 200$)

3.2 对大鼠椎间盘髓核细胞各组凋亡率水平的影响 与空白组比较,模型组椎间盘组织髓核细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,补肾壮督方高、中、低剂量中药组椎间盘组织内髓核细胞凋亡率均显著减少 ($P < 0.05$),与补肾壮督方低剂量比较,补肾壮督方中、高剂量组凋亡率明显减少 ($P < 0.05$)。见图 2,表 2。

3.3 对大鼠各组椎间盘组织 active Caspase-3, Bcl-2, Bax 及 cytC 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 active Caspase-3, Bax, cytC 蛋白表达量明显增加 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$);与模型组比较,补肾壮督方低、中、高剂量组椎间盘组织中 active Caspase-3, Bax, cytC 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$);补肾壮督方中、高剂量组椎间盘组织中 active Caspase-3, Bax, cytC 较补肾壮督方低剂量组明显减少 ($P < 0.05$),补肾壮督方中、高剂量组 Bcl-2 较低剂量组明显增加 ($P < 0.05$)。见图 3,表 3。

4 讨论

椎间盘由内层髓核、外层纤维环及上下终板所构成,而髓核组织则是由髓核细胞,以及由蛋白多糖及 II 型胶原为主的细胞外基质所共同构成。椎间盘退变的发生往往伴随着髓核细胞的减少,细胞外基质的丢失, I 型胶原的大量合成,最终导致纤维环破裂^[15]。虽然目前对椎间盘退变的具体分子机制尚不完全清楚,但大量的实验表明椎间盘细胞凋亡所

导致的细胞数量减少在椎间盘退变过程中起着关键的作用^[4]。研究显示,椎间盘细胞过度凋亡导致其细胞活力丧失直接影响椎间盘本身的功能,继而椎间盘出现退变又引起髓核细胞的凋亡,而髓核细胞的凋亡又加速了椎间盘的退变与衰老^[16-17]。本实验中通过 HE 染色显示模型组椎间盘组织出现髓核基质严重凝结,髓核细胞明显减少,髓核与纤维环的界线模糊,纤维环排列混乱;低、中、高剂量组椎间盘组织较模型组在组织病理学及其评分上均有不同程度改善;TUNEL 检测大鼠退变的椎间盘组织中髓核细胞凋亡情况,发现模型组椎间盘组织内髓核细胞凋亡率较模型组显著增加,补肾壮督方低、中、高剂量组的凋亡率均有不同程度降低。以上实验结果表明,髓核细胞的过度凋亡可能参与了椎间盘组织退变的病理过程。

细胞凋亡作为生物体内不可缺少的正常死亡现象,就其途径可分为 2 种:外源性通路(死亡受体通路)和内源性通路(线粒体凋亡通路)。线粒体不仅是细胞能量代谢的中心,同时也是调节大部分凋亡通路的主要细胞器,是细胞凋亡调控的活动中心^[18-19]。研究表明,多种因素引起的椎间盘细胞凋亡主要由线粒体凋亡通路所介导^[4,17]。线粒体凋亡通路是通过细胞内部变化激活凋亡程序,其依赖于线粒体向细胞质溶质释放关键性蛋白质 cytC,一旦 cytC 释放到细胞质溶质中,在脱氧三磷酸腺苷(dATP)存在的条件下即与凋亡蛋白酶活化因子 1

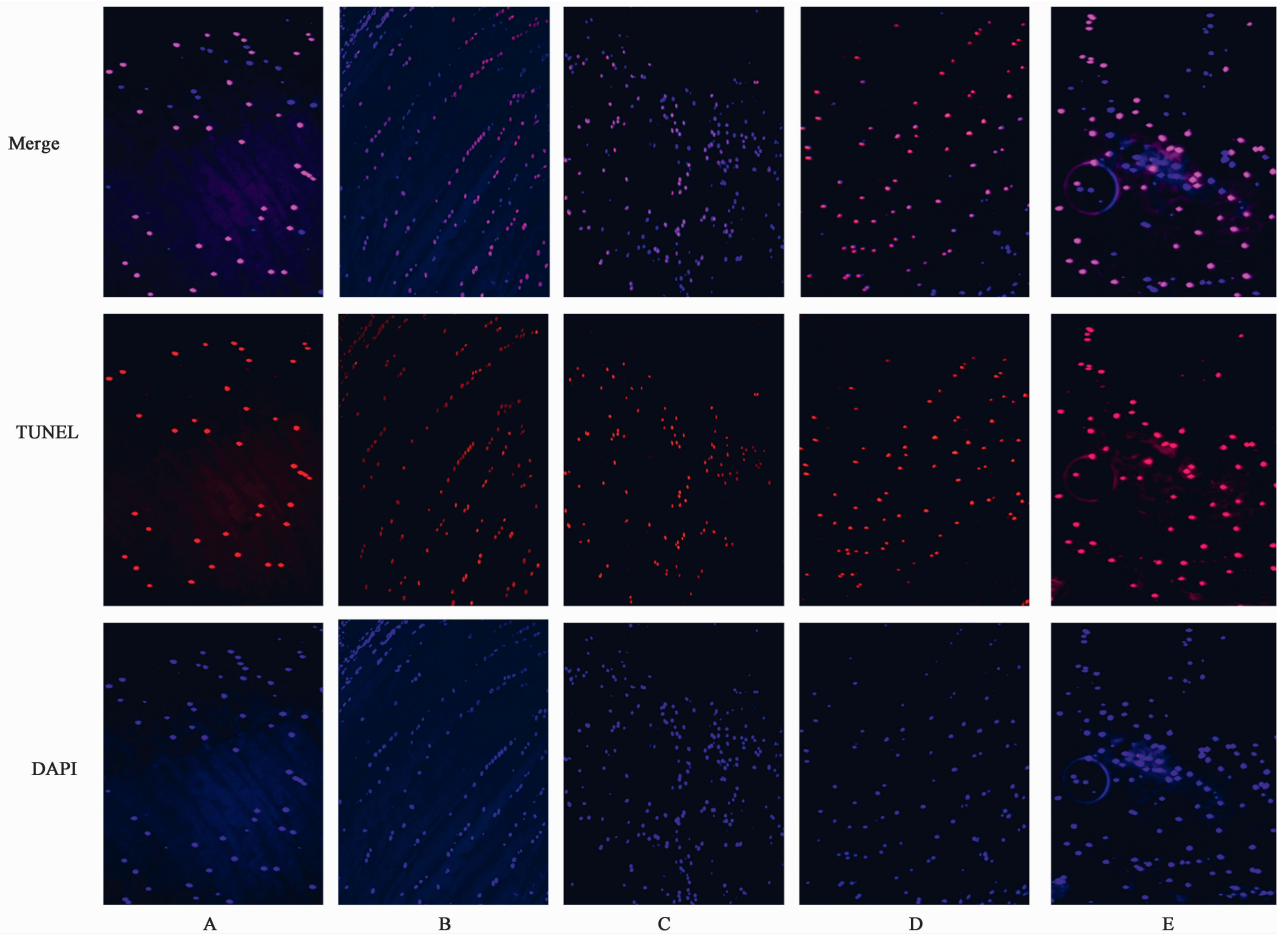


图 2 补肾壮督方对大鼠椎间盘髓核细胞凋亡影响 (TUNEL, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Bushen Zhuangdu recipe on apoptosis of nucleus pulposus cells in rats (TUNEL, $\times 400$)

表 2 补肾壮督方对大鼠椎间盘髓核细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Bushen Zhuangdu recipe on apoptosis rate of nucleus pulposus cells in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	髓核细胞凋亡率/%
空白	-	0.38 ± 0.02
模型	-	$0.66 \pm 0.04^{1)}$
补肾壮督方	0.38	$0.59 \pm 0.02^{2)}$
	0.77	$0.41 \pm 0.04^{3)}$
	1.53	$0.39 \pm 0.06^{3)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

(Apaf1)结合,引起 Apaf1 寡聚化成凋亡小体,激活 Caspase-9 及 Caspase-3 并引起级联反应,导致细胞凋亡^[20]。其中 cytC 在激活的线粒体凋亡通路中发挥重要作用^[21]。Bcl-2 蛋白家族(包括 Bax, Bak, Bcl-xL 等)在线粒体外膜上分布最多,它们能够调节线粒体膜通道的开放以及凋亡相关物质的流动,

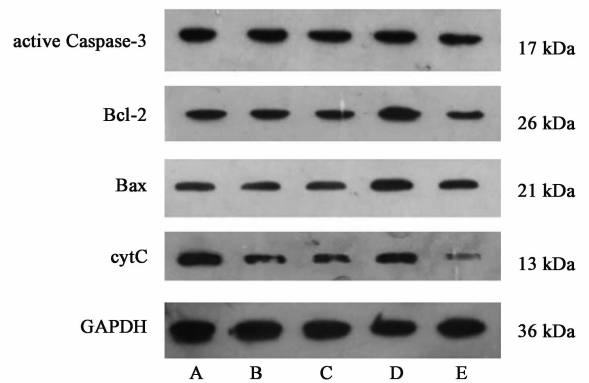


图 3 大鼠 active Caspase-3, Bcl-2, Bax 及 cytC 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of active Caspase-3, Bcl-2, Bax and cytC in rats

是调节线粒体凋亡通路的关键蛋白家族^[21]。Bcl-2 蛋白家族分为抑制凋亡家族成员如 Bcl-2, Bcl-xL 等以及促进凋亡家族成员 Bax, Bak 等。其中 Bcl-2 主要分布在线粒体膜与细胞质中,可以抑制 Caspase 激活,还可以调节线粒体膜电位变化,线粒体对

表 3 补肾壮督方对大鼠椎间盘组织 active Caspase-3, Bcl-2, cytC 及 Bax 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Bushen Zhuangdu recipe on active Caspase-3, Bcl-2, cytC and Bax in rat intervertebral disc tissues ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	active Caspase-3/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	cytC/GAPDH
空白	-	0.93 ± 0.14	1.62 ± 0.24	0.52 ± 0.01	1.47 ± 0.04
模型	-	2.15 ± 0.18 ¹⁾	0.61 ± 0.12 ¹⁾	0.87 ± 0.04 ¹⁾	1.93 ± 0.03 ¹⁾
补肾壮督方	0.38	1.56 ± 0.39 ²⁾	0.99 ± 0.11 ²⁾	0.76 ± 0.01 ²⁾	1.41 ± 0.01 ²⁾
	0.77	1.06 ± 0.21 ³⁾	1.40 ± 0.24 ³⁾	0.66 ± 0.03 ³⁾	1.39 ± 0.01 ³⁾
	1.53	0.95 ± 0.24 ³⁾	1.55 ± 0.13 ³⁾	0.58 ± 0.02 ³⁾	1.31 ± 0.03 ³⁾

Ca²⁺ 的耐受性及线粒体膜通透性进而改变线粒体蛋白释放,发挥调节细胞凋亡的作用^[22-23]。Bax 则分布在细胞质中,具有促进细胞凋亡的作用。Bax 通过与 Bid(同属 Bcl-2 蛋白家族)结合,自身构象发生改变进而引发 cytC 的释放^[24]。Caspase-3 是一种凋亡效应蛋白,在多种细胞凋亡过程中都有表达增加的现象^[25-27]。通过研究发现,与空白组比较较模型组 active Caspase-3, cytC, Bax 蛋白的表达显著增加,而 Bcl-2 表达则显著降低;补肾壮督方干预后,补肾壮督方低、中、高剂量组 active Caspase-3, cytC, Bax 蛋白均有不同程度降低,Bcl-2 表达则不同程度增高,并具有一定剂量依赖性。因此,笔者推测线粒体通路所导致的椎间盘细胞凋亡可能参与了椎间盘退变过程。

本课题组经长期临床研究观察,同时结合历代医家有关论述,提出椎间盘退行性病变责之于督脉,而督脉气衰、阳气不振是椎间盘退行性疾病的病机所在的学术观点^[28]。临床治疗上则以温养督脉为治则,针对病情辅以化痰除湿,祛风散寒、舒经通络等治法,通过长期的临床实践形成了补肾壮督方^[29],并取得了良好的临床疗效^[30]。方中以鹿角胶强督脉之气,海马壮督脉之阳,两者同为君药;黄芪以补气行血,熟地黄滋阴和阳,同为臣药;佐以细辛,以通络化痰,温经止痛。诸药和合,发挥温肾壮督,益气活血的功效。

综上所述,补肾壮督方可能通过下调促凋亡相关蛋白表达,上调抑制凋亡相关蛋白表达,从而抑制线粒体通路所导致的椎间盘细胞凋亡,进而改善椎间盘退行性变。

[参考文献]

[1] Hegewald A A, Ringe J, Sittinger M, et al. Regenerative treatment strategies in spinal surgery [J]. Front biosci, 2007, 13(5): 1520-1525.
[2] Vassilaki M, Hurwitz E L. Insights in public health:

perspectives on pain in the low back and neck: global burden, epidemiology, and management [J]. Hawaii J Med Public Health, 2014, 73(4): 122-126.

[3] Gruber H E, Hanley E N. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc: comparison of surgical specimens with normal controls [J]. Spine, 1998, 23(7): 751-757.
[4] DING F, SHAO Z W, YANG S H, et al. Role of mitochondrial pathway in compression-induced apoptosis of nucleus pulposus cells [J]. Apoptosis, 2012, 17(6): 579-590.
[5] ZHAO C Q, ZHANG Y H, JIANG S D, et al. Both endoplasmic reticulum and mitochondria are involved in disc cell apoptosis and intervertebral disc degeneration in rats [J]. Age, 2010, 32(2): 161-177.
[6] Sugawara T, Itoh Y, Hirano Y, et al. Longterm outcome and adjacent disc degeneration after anterior cervical discectomy and fusion with titanium cylindrical cages [J]. Acta Neurochir, 2009, 151(4): 303-309.
[7] 赵新华, 袁航, 钱金黔, 等. 后路椎体间融合术治疗复发性腰椎间盘突出症围手术期并发症及其危险因素 [J]. 中华骨科杂志, 2016, 36(17): 1121-1125.
[8] 吴俊龙, 张超, 周跃. 微创脊柱内镜技术的发展现状与展望 [J]. 骨科, 2016, 7(1): 65-68.
[9] 史鹏亮, 林一峰, 唐汉武. 温养督脉法治疗腰椎间盘突出症伴发心理障碍患者疗效及对 HAMD-24 量表评分的影响研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(2): 307-310.
[10] 梁祖建, 直彦亮. 林一峰教授从督脉论治腰椎间盘突出症经验介绍 [J]. 新中医, 2010, 42(1): 33-34.
[11] 张震, 刘海全, 林一峰, 等. 补肾壮督散水煎液对大鼠腰椎间盘退变的影响及其机制 [J]. 山东医药, 2017, 57(16): 33-35.
[12] 崔力扬, 刘尚礼, 丁悦, 等. 大鼠腰椎间盘针刺退变模型的建立 [J]. 中国矫形外科杂志, 2007(13): 1008-1011.
[13] 汤家铭, 陈民利. 医学实验动物学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 209-211.

- [14] Kim K S, Yoon S T, LI J, et al. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(1):33-37.
- [15] Roberts S, Evans H, Trivedi J, et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88(Suppl 2):10-14.
- [16] ZHAO C Q, JIANG L S, DAI L Y. Programmed cell death in intervertebral disc degeneration [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(12):2079-2088.
- [17] Tschoeke S K, Hellmuth M, Hostmann A, et al. Apoptosis of human intervertebral discs after trauma compares to degenerated discs involving both receptor-mediated and mitochondrial-dependent pathways [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(7):999-1006.
- [18] 朱玉山, 陈俭. 线粒体与细胞凋亡调控 [J]. *生命科学*, 2008, 20(4):506-513.
- [19] 郑文凯, 祝勇, 杨学军. 细胞凋亡与椎间盘退变的研究进展 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2016, 48(12):1459-1463.
- [20] ZOU J, CHEN Q, JIN X, et al. Olaquinox induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HepG2 cells [J]. *Toxicology*, 2011, 285(3):104-113.
- [21] Puente-Maestu L, Perez-Parra J, Godoy R, et al. Abnormal transition pore kinetics and cytochrome C release in muscle mitochondria of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 40(6):746-750.
- [22] Bosoi C R, YANG X, Huynh J, et al. Systemic oxidative stress is implicated in the pathogenesis of brain edema in rats with chronic liver failure [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(7):1228-1235.
- [23] 朱赛君, 沈明勤, 许尤琪. 益肺散结方对小鼠 Lewis 肺癌组织 Bcl-2、Bax、MMP-9 表达的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(9):920-923, 971.
- [24] 杨禹晗, 陈超英, 袁占鹏. 玉竹提取物对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞线粒体损伤及凋亡的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(16):136-140.
- [25] Ahsan R, Taijima N, Chosa E, et al. Biochemical and morphological changes in herniated human intervertebral disc [J]. *J Orthop Sci*, 2001, 6(6):510-518.
- [26] 祝一叶, 周恩超, 高坤, 等. 紫苏叶水提物对阿霉素致 HK-2 细胞氧化损伤的保护及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(12):50-57.
- [27] 肖韩艳, 刘颖, 张岩, 等. 姜黄素对 $\text{A}\beta_{(25-35)}$ 诱导的 PC12 细胞线粒体内细胞色素 C 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(23):116-121.
- [28] 林一峰, 牛维. 脊柱退行性疾病从督脉论治探讨 [J]. *安徽中医学院学报*, 2002, 21(5):4-6.
- [29] 林一峰, 梁祖建, 李彩华. 浅谈温养督脉法治疗脊柱退行性疾病的思路与方法 [J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29(2):215-216.
- [30] 梁祖建, 直彦亮. 林一峰教授从督脉论治腰椎间盘突出症经验介绍 [J]. *新中医*, 2010, 42(1):33-34.

[责任编辑 孙丛丛]