

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.07.004 [http://www.crter.org]

陈少清, 林建平, 王诗忠, 陈乐春, 洪钰, 张坤木. 葛根素保护大鼠颈椎间盘纤维环细胞的最佳浓度[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(7):1156-1161.

葛根素保护大鼠颈椎间盘纤维环细胞的最佳浓度****◆

陈少清^{1,2}, 林建平^{1,3}, 王诗忠^{1,2}, 陈乐春³, 洪钰¹, 张坤木¹

1 福建中医药大学, 福建省福州市 350003

2 教育部省部共建中医骨伤及运动康复重点实验室, 福建省福州市 350003

3 福建省运动功能康复重点实验室, 福建省福州市 350003

文章亮点:

Fas 配体能够诱导大鼠颈椎间盘纤维环细胞凋亡, 增加大鼠成熟颈椎间盘纤维环细胞的凋亡率, 并观察到适宜质量浓度的葛根素对 Fas 配体诱导的大鼠椎间盘纤维环细胞具有保护作用, 为中药防治颈椎病提供理论基础。

关键词:

组织构建; 软骨组织构建; 颈椎病; 葛根素; 中药; 最佳浓度; 剂量依赖; Fas/FasL; 细胞凋亡; 纤维环细胞; 大鼠; 国家自然科学基金; 组织构建图片文章

摘要

背景: 葛根素能抑制椎间盘纤维环细胞凋亡, 在一定程度上延缓椎间盘退变。

目的: 观察最佳浓度葛根素对大鼠颈椎间盘纤维环细胞的保护作用。

方法: 用不同质量浓度 Fas 配体(5, 20, 50 $\mu\text{g/L}$)诱导大鼠颈椎间盘纤维环细胞凋亡, 用流式细胞仪 Annexin V-FITC-PI 双染法检测纤维环细胞凋亡情况, 通过 MTT 法和流式细胞仪观察不同质量浓度葛根素(0.01, 0.1, 1 g/L)对纤维环细胞的保护作用。

结果与结论: 5 $\mu\text{g/L}$ Fas 配体诱导的纤维环细胞存活率及早期凋亡率与胎牛血清对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 20 $\mu\text{g/L}$ 及 50 $\mu\text{g/L}$ Fas 配体组纤维环细胞存活率及早期凋亡率高于胎牛血清对照组($P < 0.01$), 且随着 Fas 配体质量浓度的增加, 大鼠成熟纤维环细胞活性比例逐渐降低, 而早期凋亡率逐渐增加。3 种浓度的葛根素作用 20 $\mu\text{g/L}$ Fas 配体诱导的纤维环细胞, 随着葛根素质量浓度的增加, 纤维环细胞存活比例逐渐增加, 而早期凋亡率逐渐减少($P < 0.01$)。结果提示: ①Fas 配体能够诱导大鼠颈椎间盘纤维环细胞凋亡, 增加大鼠成熟颈椎间盘纤维环细胞的凋亡率。②3 种质量浓度葛根素均有抑制椎间盘纤维环细胞死亡作用, 且呈剂量依赖型。③葛根素对大鼠颈椎间盘纤维环细胞有明显保护作用。

陈少清★, 男, 1983 年生, 福建省漳州市人, 汉族, 2009 年福建中医药大学毕业, 硕士, 助教, 医师, 主要从事脊柱病康复研究。

chenshaoqd@163.com

通讯作者: 王诗忠, 博士, 教授, 主任医师, 福建中医药大学, 福建省福州市 350003; 教育部省部共建中医骨伤及运动康复重点实验室, 福建省福州市 350003

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)07-01156-06

收稿日期: 2012-06-27

修回日期: 2012-07-28

(20120427002/M·W)

Puerarin protects rat cervical intervertebral disc annulus fibrosus cells: An optimal concentration study

Chen Shao-qing^{1,2}, Lin Jian-ping^{1,3}, Wang Shi-zhong^{1,2}, Chen Le-chun³, Hong Yu¹, Zhang Kun-mu¹

1 Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

2 Key Laboratory of Orthopedics and Exercise Rehabilitation of Ministry of Education, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

3 Fujian Rehabilitation Laboratory of Motor Function, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

Abstract

BACKGROUND: Puerarin restrains the apoptosis of disc annulus fibrosus cells and delays the degeneration of the intervertebral disc.

OBJECTIVE: To explore the protective role of puerarin in rat cervical intervertebral disc annulus fibrosus

Chen Shao-qing★, Master,
Assistant teacher, Physician,
Fujian University of Traditional
Chinese Medicine, Fuzhou
350003, Fujian Province,
China; Key Laboratory of
Orthopedics and Exercise
Rehabilitation of Ministry of
Education, Fuzhou 350003,
Fujian Province, China
chenshaoqd@163.com

Corresponding author: Wang
Shi-zhong, Doctor, Professor,
Chief physician, Fujian
University of Traditional
Chinese Medicine, Fuzhou
350003, Fujian Province,
China; Key Laboratory of
Orthopedics and Exercise
Rehabilitation of Ministry of
Education, Fuzhou 350003,
Fujian Province, China

Supported by: the National
Natural Science Foundation of
China, No. 30973764*; Fujian
Joint Research Project of
Health Education, No.
WKJ2008-2-48*; International
Cooperation Projects of Fujian
Provincial Department of
Science and Technology, No.
2009I0010*

Received: 2012-06-27

Accepted: 2012-07-28

cells.

METHODS: Cervical intervertebral disc annulus fibrosus cells were induced by different concentrations of Fas ligand (5, 20, 50 $\mu\text{g/L}$). The appropriate concentration of puerarin was detected using Annexin V-FITC-PI double staining to establish an *in vitro* apoptotic model of annulus fibrosus cells. Changes of annulus fibrosus cells in response to different concentrations of puerarin (0.01, 0.1, 1 g/L) were observed by flow cytometry and MTT method.

RESULTS AND CONCLUSION: 5 $\mu\text{g/L}$ Fas ligand had no significant influence on the survival rate and early-apoptotic rate of annulus fibrosus cells ($P > 0.05$). 20 and 50 $\mu\text{g/L}$ Fas ligand significantly promoted annulus fibrosus cells apoptosis ($P < 0.01$) in a dose-dependent manner. The 0.01, 0.1 and 1 g/L puerarin could improve the survival rate of Fas ligand-induced annulus fibrosus cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). These findings indicate that (1) Fas ligand can induce the disc annulus fibrosus to be in apoptosis status. (2) Puerarin (0.01, 0.1, 1 g/L) can promote the proliferation of disc annulus fibrosus cells in a dose-dependent manner. (3) The apoptosis rate of disc annulus fibrosus cells induced by Fas ligand *in vitro* can be restrained by puerarin interference.

Key Words: tissue construction; cartilage tissue construction; cervical spondylosis; puerarin; Chinese herbs; optimal concentration; dose-dependent; Fas/Fas ligand; cell necrosis; annulus fibrosus cells; rats; the National Natural Science Foundation of China; tissue construction photographs-containing paper

Chen SQ, Lin JP, Wang SZ, Chen LC, Hong Y, Zhang KM. Puerarin protects rat cervical intervertebral disc annulus fibrosus cells: An optimal concentration study. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(7): 1156-1161.

0 引言

颈椎间盘退变是导致颈椎病的重要原因, 其中椎间盘纤维环破裂被认为是重要的诱发因素^[1]。细胞凋亡的发现为深入认识椎间盘退变的生理病理过程及确切发病机制提供了新的方向。大量的研究也支持, 椎间盘细胞的过度凋亡是导致椎间盘细胞数量减少的主要原因^[2-7], 细胞数量减少必然导致其分泌合成细胞外基质减少从而不能补充修复已被降解的细胞外基质, 加速椎间盘的衰老和退变。Fas/Fas配体体系是椎间盘细胞进行凋亡的重要途径, 其凋亡信号转导的启动是通过Fas配体与其受体Fas结合, 从而激活Fas/Fas配体系统来实现的^[8-9], 说明Fas配体是启动细胞凋亡的开关。

葛根素(Puerarin, Pue)又名普乐林, 是从中药葛根中提取的主要有效成分, 有学者统计近10年来临床治疗不同类型颈椎病的中药内服方中葛根的使用率位居第一^[10], 临床上亦有单独运用其单体葛根素治疗颈椎病的报道^[11-15]。葛根素主要有扩张血管、降血脂血压、改善微循环、抗氧化、抗血栓形成, 修复内皮细胞损伤以及抑制脑细胞凋亡等药理作用^[16]。国内外尚未报道葛根素对椎间盘纤维环细胞凋亡的影响, 因此实验以Fas配体诱导大鼠颈椎间盘纤维环细胞凋亡, 建立椎间盘纤维环退变模型, 然后用葛根素进行干预, 探索葛根素对纤维环细胞的保护作用。

1 材料和方法

设计: 细胞水平实验。

时间及地点: 实验于2009年9月至2011年9月在福建中医药大学康复医学研究所完成。

材料:

实验动物: 1月龄清洁级SD大鼠2只, 雌雄不拘, 体质量120 g左右, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号SCXX (沪) 2008-0005。

药品、试剂与仪器: 葛根素(中国药品生物制品检定所), 重组大鼠 Fas-Ligand(R&D Systems 公司, 批号: IZN0807011), AnnexinV-FITC Conjugate(Invitrogen公司, 批号: 72620204A), 噻唑蓝、二甲基亚砷(Sigma公司), 胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、低糖DMEM培养基(Hyclone公司), CO₂培养箱(美国SHEL-LAB公司), FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司), ELX808全自动酶标仪(福建省医疗器械公司), 倒置显微照相机(OLYMPUS公司)。

实验方法:

纤维环细胞的取材及培养^[17]: 取1月龄的SD大鼠, 麻醉成功后, 无菌条件下取椎间盘纤维环, 剪成大小1 mm³, 先用0.25%胰蛋白酶消化20 min, 1 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心5 min, 弃掉上清液, 继续用0.2% II型胶原酶消化4 h, 1 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心5 min, 收集细胞沉淀, 接种培养, 细胞长满80%后传代。第3代纤维环细胞进行甲苯胺染色鉴定。

流式细胞仪检测不同质量浓度Fas配体诱导纤维环细胞存活率及凋亡率: 取第3代纤维环细胞进行酶消化、离心形成细胞悬液后, 以每孔细胞数 3×10^5 个传代接种于6孔板。先用体积分数为10%的胎牛血清培养, 于光学显微镜下观察, 待细胞长满80%, 弃掉上清液改用体积分数为2%的胎牛血清培养8 h, 弃掉上清液, 取4孔分别改用含体积分数为2%胎牛血清、5 μg/L Fas配体+体积分数为2%胎牛血清、20 μg/L Fas配体+体积分数为2%胎牛血清、50 μg/L Fas配体+体积分数为2%的胎牛血清诱导24 h, AnnexinV-FITC和PI双染法检测纤维环细胞的凋亡情况。

MTT比色法: 用体积分数为2%的胎牛血清分别配置质量浓度为1 g/L, 0.1 g/L, 0.01 g/L葛根素溶液和20 μg/L Fas配体溶液以及单纯体积分数为2%的胎牛血清作为培养液, 分别用于干预第3代大鼠颈椎间盘纤维环细胞, 取第3代纤维环细胞用排枪种到96孔板中, 每孔细胞数 4×10^3 – 5×10^3 , 待细胞贴壁后, 弃去上清液, 洗去未贴壁细胞。用上述培养液干预细胞, 分别干预24, 48 h。上述细胞按规定的时间干预后, 每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL, 37 °C孵育4 h, 终止培养, 小心吸弃培养板中的液体, 每孔加入150 μL二甲基亚砷, 振荡10 min, 使结晶物充分溶解。在酶标仪上以490 nm波长测定各孔吸光度值。

AnnexinV-FITC和PI双染法: 取第3代长满的细胞接种到6孔板, 每孔细胞数 3×10^5 个。先用体积分数为10%胎牛血清培养液培养待细胞长满80%后, 改为体积分数为2%的胎牛血清培养液培养8 h后, 弃掉上清液对细胞进

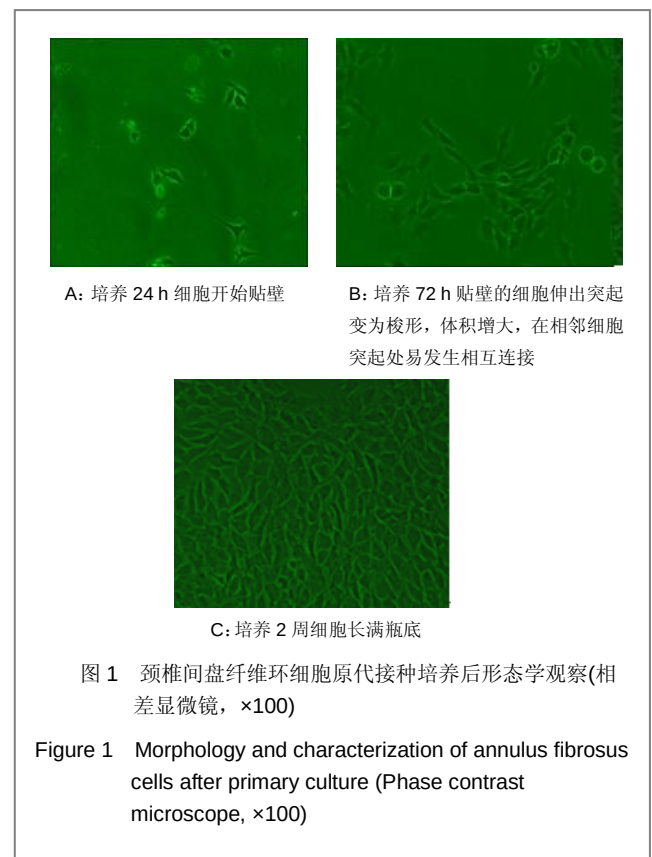
行相应的干预, 分别为含体积分数为2%的胎牛血清配成20 μg/L Fas配体^[18], 以及含体积分数为2%的胎牛血清配成20 μg/L Fas配体+1 g/L葛根素、20 μg/L Fas配体+0.1 g/L葛根素、20 μg/L Fas配体+0.01 g/L葛根素干预24 h后, 冷的PBS清洗2遍, 消化收集细胞, 分别加入100 μL buffer液悬浮细胞后, 加Annexin V-FITC 5 μL和PI 10 μL, 避光孵育15 min后, 分别加入400 μL buffer液重悬细胞, 随即用流式细胞仪进行凋亡率检测(按试剂盒说明)。

主要观察指标: 甲苯胺染色鉴定纤维环细胞; MTT比色法观察纤维环细胞的增殖情况; AnnexinV-FITC法检测纤维环细胞的凋亡率。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件分析。计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料进行比较时, 先作正态分布及方差齐性检验, 正态分布的计量资料多组间均数比较采用单因素方差分析; 方差齐用 t 检验, 方差不齐用秩和检验, 均为双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 颈椎间盘纤维环细胞形态观察及鉴定 见图1。



细胞原代培养接种后培养瓶中有很多漂浮的大小不等的散在形态为圆形的细胞, 24 h后细胞开始贴壁,

见图1A; 72 h后细胞形态发生变化, 贴壁的细胞伸出突起变为梭形, 体积增大, 在相邻细胞突起处易发生相互连接, 见图1B; 培养14 d后细胞长满瓶底(此时可作为传代细胞培养), 见图1C。颈椎间盘纤维环细胞培养传至第3代时甲苯胺蓝染色, 倒置相差显微镜观察细胞形态, 结果显示: 纤维环细胞甲苯胺蓝染色呈异染性, 胞浆染为紫色, 细胞核染为蓝色, 见图2。

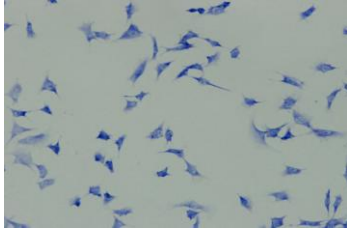


图2 甲苯胺蓝染色相差显微镜下第3代颈椎间盘纤维环细胞呈异染性, 胞浆染为紫色, 细胞核染为蓝色($\times 100$)

Figure 2 The third-passage annulus fibrosus cells stained with toluidine blue (Phase contrast microscope, $\times 100$)

2.2 不同质量浓度Fas配体干预第3代大鼠颈椎间盘纤维环细胞成活率和凋亡率比较 用流式细胞Annexin V-FITC-PI双染法检测的细胞凋亡散点图中可以区分出细胞凋亡, 见图3。

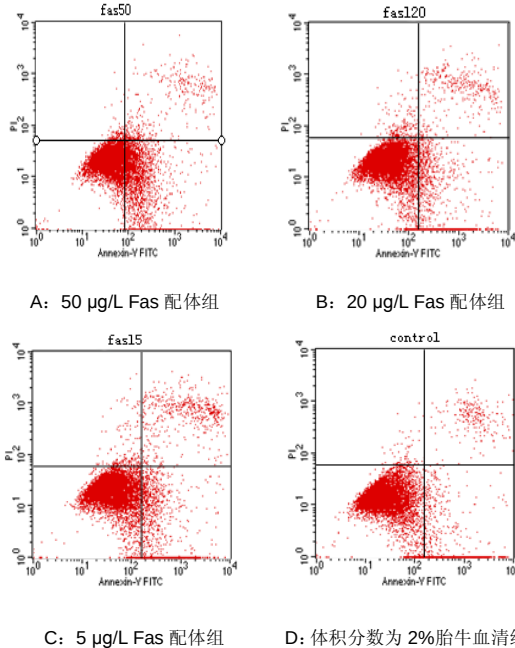


图3 流式细胞仪 Annexin V-PI 双染色法检测 Fas 配体诱导颈椎纤维环细胞凋亡率

Figure 3 The Annexin V-FITC assays for detecting the apoptosis of annulus fibrosus cells

体积分数为2%胎牛血清组和Fas配体处理组大鼠纤维环细胞的成活率及凋亡纤维环细胞的比例, 见表1。结果表明, 体积分数为2%胎牛血清组和Fas配体处理组间大鼠成熟纤维环细胞的成活率、死亡率及早期凋亡率均存在一定差异。其中高、中剂量Fas配体组纤维环细胞成活率及早期凋亡率与体积分数为2%胎牛血清组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$, $P < 0.05$); 但体积分数为2%胎牛血清组与低剂量Fas配体组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表1 各组颈椎纤维环细胞成活率及凋亡的比例

Table 1 The ratio of survival and apoptosis of annulus fibrosus cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

组别	AV-PI ⁺	AV ⁺ -PI ⁺	AV-PI ⁻	AV ⁺ -PI ⁻
体积分数为 2% 胎牛血清组	9.16 $\pm$ 3.54	10.31 $\pm$ 1.09	74.55 $\pm$ 4.11	5.85 $\pm$ 1.01
5 μ g/L FasL 组	11.64 $\pm$ 4.82	11.31 $\pm$ 1.49	70.20 $\pm$ 5.25	6.73 $\pm$ 0.87
20 μ g/L FasL 组	15.61 $\pm$ 3.79 ^a	14.28 $\pm$ 1.76 ^b	61.68 $\pm$ 4.72 ^a	8.44 $\pm$ 1.04 ^b
50 μ g/L FasL 组	16.58 $\pm$ 2.97 ^a	17.44 $\pm$ 1.50 ^{ac}	55.33 $\pm$ 3.45 ^{ac}	10.68 $\pm$ 1.19 ^{ac}

与体积分数为 2%胎牛血清组和 5 μ g/L FasL 组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$;
与 20 μ g/L FasL 组比较, ^c $P < 0.01$ 。

2.3 葛根素及Fas配体对颈椎间盘纤维环细胞活力的影响 MTT比色法检测细胞活性结果显示: 在24 h和48 h后均显示1 g/L葛根素组细胞活性为最大, 与其余各组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 0.1 g/L葛根素组次之, 20 μ g/L Fas配体组最低, 与体积分数为2%胎牛血清组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 见表2。

表2 MTT 比色法检测各组颈椎间盘纤维环细胞生长活力

Table 2 Cell viability of annulus fibrosus cells treated with puerarin detected using MTT method ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, Absorbance)

组别	24 h	48 h
1.0 g/L 葛根素组	0.436 $\pm$ 0.063 ^a	0.489 $\pm$ 0.054 ^{ac}
0.1 g/L 葛根素组	0.392 $\pm$ 0.026 ^a	0.425 $\pm$ 0.042 ^a
0.01 g/L 葛根素组	0.346 $\pm$ 0.025 ^b	0.364 $\pm$ 0.027 ^b
体积分数为 2%胎牛血清组	0.332 $\pm$ 0.032 ^b	0.343 $\pm$ 0.028 ^b
20 μ g/L Fas 配体组	0.289 $\pm$ 0.021	0.203 $\pm$ 0.021

与同时段其余各组比较, ^a $P < 0.01$; 与同时段 FasL 20 μ g/L 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 24 h 时比较, ^c $P < 0.05$ 。

2.4 葛根素对20 μ g/L Fas配体诱导凋亡的颈椎间盘纤维环细胞的保护作用 研究结果表明, 不同浓度葛根素组间大鼠成熟纤维环细胞的成活率、死亡率及早期凋亡

率均存在一定差异。高剂量葛根素组纤维环细胞成活率及早期凋亡率与低剂量葛根素组、胎牛血清组和20 $\mu\text{g/L}$ Fas配体组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$), 与中剂量葛根素组比较差异亦有显著性意义($P < 0.05$), 见图4、表3。

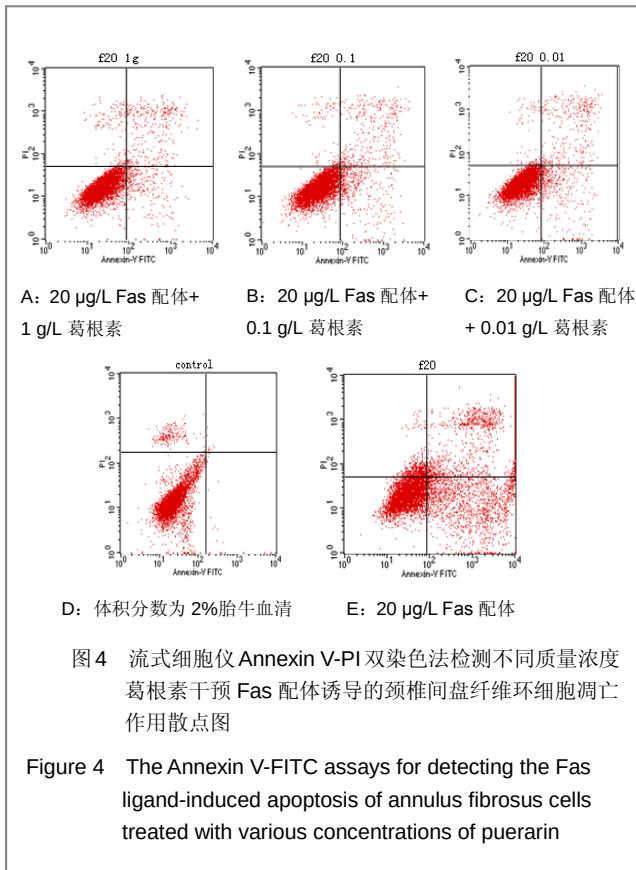


表3 不同质量浓度葛根素对 20 $\mu\text{g/L}$ Fas 配体诱导凋亡的颈椎间盘纤维环细胞的保护作用

Table 3 Protective role of various concentrations of puerarin in annulus fibrosus cells induced by 20 $\mu\text{g/L}$ Fas ligand ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

组别	AV ⁻ PI ⁺	AV ⁺ PI ⁺	AV ⁻ PI ⁻	AV ⁺ PI ⁻
20 $\mu\text{g/L}$ Fas 配体组	15.65 $\pm$ 4.43	14.75 $\pm$ 1.64	61.49 $\pm$ 5.01	8.25 $\pm$ 2.13
体积分数为 2%胎牛血清组	10.13 $\pm$ 2.71	9.79 $\pm$ 1.54	73.65 $\pm$ 4.34	6.50 $\pm$ 1.42
0.01 g/L 葛根素组	8.66 $\pm$ 2.48	10.40 $\pm$ 1.41	74.53 $\pm$ 4.32	6.48 $\pm$ 1.50
0.1 g/L 葛根素组	7.35 $\pm$ 2.47 ^a	8.54 $\pm$ 1.36 ^a	79.29 $\pm$ 3.88 ^a	4.83 $\pm$ 1.23 ^a
1.0 g/L 葛根素组	6.98 $\pm$ 2.04 ^{ab}	5.74 $\pm$ 1.42 ^{ab}	83.86 $\pm$ 3.29 ^{ab}	3.30 $\pm$ 0.90 ^{ab}

与 Fas 配体组、胎牛血清组和 0.01 g/L 葛根素组比较, ^a $P < 0.01$; 与 0.1 g/L 葛根素组比较, ^b $P < 0.05$ 。

随着葛根素质量浓度的增加, 大鼠颈椎间盘纤维环细胞活性比例逐渐增加, 而早期凋亡率逐渐减少。由此

证明葛根素对大鼠颈椎间盘纤维环细胞有保护作用, 能够抑制大鼠颈椎间盘纤维环细胞凋亡, 增加大鼠颈椎间盘纤维环细胞的成活率。

3 讨论

实验结果表明Fas配体能够诱导大鼠颈椎间盘纤维环细胞凋亡, 这与文献报道一致^[7], Fas-Ligand是死亡受体Fas的配体, 为一种C末端位于细胞外的II型跨膜蛋白, 为肿瘤坏死因子家族成员。大量研究支持, 椎间盘细胞可以通过自分泌或旁分泌配体Fas-Ligand与细胞膜上死亡受体Fas结合作为起始信号介导细胞凋亡程序^[5-6, 9-12]。Park等^[5-6]发现所有退变椎间盘样本中均发现Fas和Fas配体的强烈表达, 在细胞凋亡区域同时存在Fas和Fas配体的高度表达, 提示Fas/Fas配体系统启动了椎间盘细胞的凋亡, 同时Fas配体可以通过Fas介导细胞凋亡, 故实验利用重组大鼠Fas-Ligand试剂体外诱导大鼠颈椎间盘纤维环细胞建立退变模型。

实验结果表明适宜浓度的葛根素对Fas配体诱导的大鼠椎间盘纤维细胞具有保护作用, 关于葛根素对细胞的保护作用已有相关的报道^[19-22], 但其具体的保护细胞机制尚未明确, 王万铁等^[19]研究葛根素可通过特异性阻断电压操纵型与受体依赖型钙离子通道, 阻止细胞外钙离子内流, 一定程度上减轻细胞内钙超载。温葭等^[20]报道葛根素可以抑制缺血-再灌注引起的细胞凋亡; 抑制由过氧或缺氧等损伤引起的细胞凋亡; 影响心肌及血管平滑肌细胞的凋亡及促进各种癌细胞凋亡等。韩江全等^[21]研究葛根素可通过上调Bcl-2蛋白表达, 下调Bax蛋白表达减少脑缺血再灌注后神经细胞凋亡。肖旭等^[22]研究葛根素可上调Bcl-2蛋白表达, 抑制Caspase-3的表达, 减少肝细胞凋亡, 对肝脏缺血再灌注损伤有保护作用, 但葛根素对椎间盘纤维环细胞凋亡的影响国内外尚未报道, 葛根素是通过何种途径参与调控椎间盘纤维环细胞增殖与凋亡的动态平衡, 其具体作用机制还有待于进一步的研究。

基金资助: 国家自然科学基金(30973764); 福建省卫生教育联合攻关计划项目(WKJ2008-2-48); 福建省科技厅国际合作项目(2009I0010)。

作者贡献: 实验设计为陈少清, 王诗忠, 实验实施为林建平, 陈乐春, 实验评估为洪钰, 陈乐春, 资料收集为张坤木。陈少清成文, 林建平审校, 王诗忠, 陈少清对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Wang SZ, Chen SJ, Song HM. Zhongguo Kangfu Lilun yu Shijian. 2005;11(11):956.
王诗忠, 陈水金, 宋红梅. 颈椎间盘性拔伸手法治疗青年颈椎病的疗效分析[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(11):956.
- [2] Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it. Spine (Phila Pa 1976). 2006;31(18):2151-2161.
- [3] Zhao CQ, Jiang LS, Dai LY. Programmed cell death in intervertebral disc degeneration. Apoptosis. 2006;11(12):2079-2088.
- [4] Park JB, Kim KW, Han CW, et al. Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue. Spine (Phila Pa 1976). 2001;26(2):142-146.
- [5] Park JB, Chang H, Kim KW. Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue. Spine (Phila Pa 1976). 2001;26(6):618-621.
- [6] Rannou F, Lee TS, Zhou RH, et al. Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload. Am J Pathol. 2004;164(3):915-924.
- [7] Cui LY, Liu SL, Ding Y, et al. IL-1 β sensitizes rat intervertebral disc cells to Fas ligand mediated apoptosis in vitro. Acta Pharmacol Sin. 2007;28(10):1671-1676.
- [8] Hadjipavlou AG, Tzermiadianos MN, Bogduk N, et al. The pathophysiology of disc degeneration: a critical review. J Bone Joint Surg Br. 2008;90(10):1261-1270.
- [9] Wang YJ, Shi Q, Li JS, et al. Zhongguo Kangfu Yixue Zazhi. 2003;18(7):403-406.
王拥军, 施杞, 李家顺, 等. 椎间盘细胞信号传导及益气化痰方调控机理的研究[J]. 中国康复医学杂志, 2003, 18(7):403-406.
- [10] Yang J. Liaoning Zhongyi Zazhi. 2004;31(7):559.
杨军. 颈椎病常用内服中药选配规律[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(7): 559.
- [11] Zhao GC, Li CR. Sichuan Shengli Kexue Zazhi. 2009;31(1):24-25.
赵桂昌, 李才锐. 葛根素注射液对颈椎病的临床观察[J]. 四川生理科学杂志, 2009, 31(1):24-25.
- [12] Song YJ. Yunnan Zhongyi Zhongyao Zazhi. 2001;22(3):20-21.
宋云娟. 葛根素治疗颈椎病的临床观察[J]. 云南中医中药杂志, 2001, 22(3):20-21.
- [13] Qu SH. Xinjiang Zhongyiyao. 2005;23(5):28-29.
曲少华. 葛根素配合针灸电脑中频治疗颈椎病 31 例[J]. 新疆中医药, 2005, 23(5):28-29.
- [14] Yang SH. Hebei Zhongyi. 2006;28(10):746.
杨绍华. 葛根素合中药熏蒸治疗颈椎病临床观察[J]. 河北中医, 2006, 28(10):746.
- [15] Jiang DH, Zhang AH. Zhongguo Zhongyi Jichu Yixue Zazhi. 2004;10(10):759-761.
姜东辉, 张爱华. 葛根素配合手法治疗颈椎病 62 例临床疗效观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(10):759-761.
- [16] Zou QB. Zhongguo Xiandai Yaowu Yingyong. 2010;4(12):382-384.
邹清波. 葛根素对心血管系统的药用价值[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(12):382-384.
- [17] Zhou Q, Wang YJ, Shi Q. Jizhu Waikexue Zazhi. 2003;1(4):226-229.
周泉, 王拥军, 施杞. 椎间盘纤维环细胞的培养[J]. 脊柱外科杂志, 2003, 1(4):226-229.
- [18] Cui LY, Liu SL, Ding Y, et al. IL-1 β sensitizes rat intervertebral disc cells to Fas ligand mediated apoptosis in vitro. Acta Pharmacol Sin. 2007;28(10):1671-1676.
- [19] Wang WT, Hao ML, Wang FY, et al. Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2006;22(8):1575-1580.
王万铁, 郝卯林, 王方岩, 等. 葛根素对肺缺血-再灌注损伤时 Fas/FasL 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(8):1575-1580.
- [20] Wen J, Chen SL, Xu HX. Xiandai Zhongyao Yanjiu yu Shijian. 2006;20(1):61-64.
温霞, 陈士林, 徐宏喜. 葛根素对细胞凋亡影响的研究[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(1):61-64.
- [21] Han JQ, Li GC, Zhou XL, et al. Zhongxiyi Jiehe Xinnao Xueguanbing Zazhi. 2008;6(10):1179-1181.
韩江全, 李官成, 周晓兰, 等. 葛根素对大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(10):1179-1181.
- [22] Xiao X, Mei GL, Hu WD, et al. Jiaotong Yixue. 2008;22(5):472-473.
肖旭, 梅广林, 胡卫东, 等. 葛根素对大鼠肝缺血再灌注后 Caspase-3 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 交通医学, 2008, 22(5):472-473.