

# 通痹方热敷联合针刺治疗对退变椎间盘细胞凋亡相关基因 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 的影响

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3004>

徐银琴<sup>1</sup>, 史红美<sup>2</sup>, 王光义<sup>3</sup>

2095-4344.3004

投稿日期: 2020-02-17

送审日期: 2020-02-26

采用日期: 2020-04-11

在线日期: 2020-08-25

中图分类号:

R244.9; R274; R289; R446;

R318

文章编号:

2095-4344(2021)05-00713-06

文献标识码: A

## 文章快速阅读:

### 文章特点一

△通痹方为中药方剂, 通过局部外敷的方式进行治疗, 具有祛风除湿、通络活血止痛的作用, 主要治疗颈椎病、腰椎病、风湿性关节炎等疾病, 疗效颇佳;

△通痹方热敷联合针刺疗法通过影响 caspase-3、Bcl-2 mRNA 的表达减轻椎间盘退变。

### 新西兰大白兔制备颈椎病理模型

#### 分组及处理:

- (1) 空白对照组: 不做处理;
- (2) 模型对照组: 仅造模;
- (3) 针刺治疗组: 造模+针刺治疗;
- (4) 联合治疗组: 造模+针刺+通痹方热敷。

#### 观察指标:

- (1) 颈椎退变及评分;
- (2) 椎间盘退变程度并评分;
- (3) Caspase-3、Bcl-2 mRNA 表达。

## 文题释义:

**通痹方:** 为贵州医科大学附属医院针灸科自拟方, 在临床应用十余年, 收效甚好。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, 主要治疗以颈椎病、腰椎病、风湿性关节炎等为主的痹症。

**椎间盘退变:** 是引起颈、腰椎病的主要原因, 可由衰老、异常应力、损伤等多种因素所引起。其继发病理改变包括脊柱节段不稳、骨刺形成、椎管狭窄、椎间盘膨出、椎间盘突出等, 若累及到神经根、脊髓、椎动脉、交感神经、脊髓前中央动脉等周围组织结构, 可引发头晕头痛、颈肩疼痛、上肢麻木等相应症状。

## 摘要

**背景:** 研究表明, 针刺及中药热敷治疗椎间盘退行性疾病具有良好的疗效, 但2种方法联合应用对椎间盘细胞凋亡的影响尚不明确。

**目的:** 探讨通痹方热敷联合针刺治疗对颈椎病模型家兔椎间盘细胞凋亡相关基因Caspase-3、Bcl-2 mRNA的影响。

**方法:** 24只新西兰兔随机分为空白对照组、模型对照组、针刺治疗组、联合治疗组, 各6只。除空白对照组外, 其余3组制备颈椎病理模型, 造模成功后针刺治疗组采取针刺治疗30 min/(次·d)、联合治疗组给予通痹方热敷联合针刺治疗45 min/(次·d); 于造模前、造模30 d、治疗结束后拍摄家兔颈椎X射线片并评分, 治疗15次后留取各组兔C<sub>3,4</sub>、C<sub>4,5</sub>椎间盘。苏木精-伊红染色观察C<sub>3,4</sub>椎间盘组织形态学变化并评分, 实时荧光定量PCR法检测C<sub>4,5</sub>椎间盘Caspase-3、Bcl-2 mRNA相对表达量。实验方案经贵州医科大学动物伦理委员会批准。

**结果与结论:** ①与模型对照组相比, 针刺治疗组、联合治疗组颈椎病变减轻, X射线评分降低( $P < 0.05$ ), 联合治疗组评分与针刺治疗组比较无明显差别( $P > 0.05$ ); ②与模型对照组相比, 针刺治疗组、联合治疗组椎间盘组织损伤减少, 评分降低, 且联合治疗组评分低于针刺治疗组( $P < 0.05$ ); ③针刺治疗组、联合治疗组较模型对照组Caspase-3 mRNA表达下降、Bcl-2 mRNA表达增加, 联合治疗组较针刺治疗组Caspase-3 mRNA表达低、Bcl-2 mRNA表达高( $P < 0.05$ ); ④结果表明, 通痹方热敷联合针刺治疗可延缓椎间盘退变, 其机制可能与Bcl-2 mRNA表达增加, Caspase-3 mRNA表达减少有关。

**关键词:** 针刺; 热敷; 椎间盘; 退变; 细胞凋亡; 蛋白; 基因; 实验

**缩略语:** 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3: cysteine-containing aspartate-specific protease-3, caspase-3; B淋巴细胞瘤2: B lymphocytoma-2, Bcl-2

## Effects of *Tongbi* prescription hot compress combined with acupuncture on mRNA expressions of apoptosis-related genes, Caspase-3 and Bcl-2, in degenerative intervertebral discs

Xu Yinqin<sup>1</sup>, Shi Hongmei<sup>2</sup>, Wang Guangyi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 贵州医科大学, 贵州省贵阳市 550004; <sup>2</sup> 贵州省职工医院, 贵州省贵阳市 550025; <sup>3</sup> 贵州医科大学附属医院, 贵州省贵阳市 550004

第一作者: 徐银琴, 女, 1993年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 2020年贵州医科大学毕业, 硕士, 主要从事中医、针灸治疗脑血管疾病、风湿性疾病的研究。

通讯作者: 王光义, 硕士, 主任医师, 教授, 贵州医科大学附属医院, 贵州省贵阳市 550004

<https://orcid.org/0000-0002-2096-3416> (徐银琴)

基金资助: 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), 项目负责人: 王光义; 贵阳市科技计划项目[筑科合同(2019)9-1-4], 项目负责人: 王光义

引用本文: 徐银琴, 史红美, 王光义. 通痹方热敷联合针刺治疗对退变椎间盘细胞凋亡相关基因 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 的影响[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(5):713-718.



<sup>1</sup>Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; <sup>2</sup>Guizhou Provincial Staff Hospital, Guiyang 550025, Guizhou Province, China; <sup>3</sup>Guizhou Medical University Affiliated Hospital, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Xu Yinqin, Master, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

**Corresponding author:** Wang Guangyi, Master, Chief physician, Professor, Guizhou Medical University Affiliated Hospital, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Acupuncture and hot compress of traditional Chinese medicine therapy have good curative effect on degenerative diseases of the intervertebral disc; however, the combination effect of these two methods on the apoptosis of intervertebral disc cells remains unclear.

**OBJECTIVE:** To explore the effects of Tongbi prescription hot compress combined with acupuncture on the mRNA expression of apoptosis-related genes, Caspase-3 and Bcl-2, in intervertebral disc cells in a rabbit model of cervical spondylosis.

**METHODS:** Twenty-four rabbits were randomly divided into normal group, model group, acupuncture group and combination treatment group, with six rabbits in each group. Except for the normal group, animal models of cervical spondylosis were established in the other three groups. After successful modeling, acupuncture treatment (30 minute once a day) and Tongbi Recipe hot compress combined with acupuncture therapy (30 minutes once a day) were done in the acupuncture group and combination treatment group, respectively. The cervical spine X-ray of each rabbit was taken and scored before modeling, at 30 days after molding as well as at the end of the treatment. The C<sub>3-4</sub> and C<sub>4-5</sub> intervertebral discs of each group were collected after treatment for 15 times. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the morphological changes of C<sub>3-4</sub> discs, and real-time quantitative PCR was used to detect the relative expression of Caspase-3 and Bcl-2 mRNA in C<sub>4-5</sub> intervertebral discs. The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Guizhou Medical University.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the model group, the cervical spine lesions in the acupuncture group and combination treatment group were significantly reduced, with a significant reduction in the X-ray scores ( $P < 0.05$ ). However, there was no significant difference between these treatment groups. The injury of intervertebral disc tissue and scores in the acupuncture group and combination treatment group were lower than those in the model group, and the score of the combination treatment group was significantly lower than that of the acupuncture group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the expression of Caspase-3 mRNA decreased and the expression of Bcl-2 mRNA increased in the acupuncture group and combination treatment group, and the combination treatment group had lower Caspase-3 mRNA expression and higher Bcl-2 mRNA expression than the acupuncture group ( $P < 0.05$ ). To conclude, Tongbi prescription hot compress combined with acupuncture therapy can delay the degeneration of intervertebral disc, and its mechanism may be related to the up-regulation of Bcl-2 mRNA expression and down-regulation of Caspase-3 mRNA expression.

**Key words:** acupuncture; hot compress; intervertebral disc; degeneration; apoptosis; protein; gene; experiment

**Funding:** the Scientific and Technological Research Project of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine of Guizhou Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, No. QZXY-2016-075 (to WGY); the Guiyang Municipal Science and Technology Plan Program, No. (2019)9-1-4 (to WGY)

**How to cite this article:** XU YQ, SHI HM, WANG GY. Effects of Tongbi prescription hot compress combined with acupuncture on mRNA expressions of apoptosis-related genes, Caspase-3 and Bcl-2, in degenerative intervertebral discs. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(5):713-718.

## 0 引言 Introduction

颈椎病是临床具有高发病率的疾病，其产生的活动受限、疼痛不适等给人们的正常工作和生活带来了极大的不便<sup>[1]</sup>。颈椎病的发病是由于椎间盘发生退变，影响其相邻部位的椎体、小关节、血管、神经等组织，导致头、颈、肩、背、上肢等部位出现不同程度的不适<sup>[2]</sup>；细胞凋亡、炎症反应、细胞外基质降解被认为是与椎间盘退变密切相关的几个重要事件<sup>[3]</sup>。近年来，越来越多的研究者认为细胞凋亡在椎间盘退变发生、发展的过程中扮演着关键角色，有人提出抑制椎间盘细胞凋亡或增强其抗凋亡的能力有助于椎间盘退变的防治<sup>[4-5]</sup>。因此，有效地抑制椎间盘细胞凋亡延缓椎间盘退变为临床治疗此类疾病提供了新思路<sup>[6]</sup>。目前对于椎间盘退行性疾病的治疗主要有中医保守治疗、康复治疗以及手术治疗等<sup>[7]</sup>，其中中医针灸、推拿、中药等保守疗法得到广大患者的青睐和认可。中药外敷作为一种中医保守疗法，具有以药物直接作用于局部、温和刺激、疗效好、见效快的特点，在临床上逐渐得到推广应用，但目前关于中药外敷治疗颈椎病的研究较少且主要集中在临床研究上。此次研究以颈椎病模型兔为观察对象，探讨针刺、针刺联合中药外敷治疗对模型兔颈椎间盘细胞凋亡相关因子天冬氨酸特异性蛋白酶3(cysteine-containing aspartate-specific protease-3, caspase-3)及B淋巴细胞瘤2(B lymphocytoma-2, Bcl-2)的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组动物对照实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年12月至2019年8月在贵州医科大学实验动物中心及分子生物学重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 成年健康新西兰大白兔(以下简称家兔)24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及饲养，生产许可证号SCXK(黔)2018-0001。

1.3.2 主要仪器 高速冷冻离心机(香港基因有限公司)、生物组织石蜡包埋机(孝感亚光医用技术有限公司)、生物组织摊片机(孝感亚光医用技术有限公司)、光学显微镜(厦门麦克奥迪医疗诊断系统有限公司)、实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司)、数字化悬吊式X射线拍摄系统(YZB/SPA 4054-2010)。

1.3.3 实验用主要药物与试剂 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，购自贵州医科大学附属医院；TRIZOL试剂盒和荧光定量试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司)，反转录试剂盒(日本Takara公司)，苏木精-伊红染色液(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。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及造模 24只家兔适应性喂养7 d后随机选取6只作为空白对照组，其余18只进行无创型低头位造模法建立颈椎病模型<sup>[8]</sup>，并随机分为模型对照组、针刺治疗组和联合治疗组，每组6只。将家兔置于兔固定盒内，充分显

## 组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	制备家兔颈椎病模型
研究问题借鉴已:	参考文献 [8] 造模
有动物模型造模:	
选择动物的条件:	成年健康新西兰大白兔, 体质量 2.0-2.5 kg
模型与所研究疾病的关系:	无创型低头位造模法建模, 与人类颈椎病常见发病原因相似
动物来源与品系:	新西兰大白兔由贵州医科大学实验动物中心提供
模型技术描述:	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
动物数量及分组方法:	24 只家兔随机分为空白对照组、模型对照组、针刺治疗组、联合治疗组, 各 6 只
造模后实验观察指标:	治疗结束后, X 射线片观察颈椎变化; 苏木精-伊红染色观察椎间盘组织形态学改变; RT-PCR 检测 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 表达
造模后动物处理:	治疗结束后麻醉家兔用空气栓塞法处死, 取出 C <sub>3-4</sub> 、C <sub>4-5</sub> 椎间盘, 待检测
伦理委员会批准:	实验方案经贵州医科大学动物伦理委员会批准

露颈部皮肤, 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, 所有家兔均拍摄颈椎 X 射线片, 若家兔颈椎出现生理曲度改变、反弓或椎间隙变窄、椎间孔变小或椎体出现骨质增生或椎体周围软组织钙化等 2 项时即视为造模成功。

**1.4.2 干预方法** ①空白对照组: 同期正常饲养, 不做任何处理; ②模型对照组: 仅作造模处理, 余不进行任何治疗; ③针刺治疗组: 将新西兰家兔固定在治疗台上, 参照《实验针灸学》选择双侧第 3-6 对颈夹脊穴 (第 3 至第 6 颈椎棘突下旁开 0.3-0.5 cm) 进行针刺<sup>[9]</sup>, 穴位局部消毒后, 行针刺治疗 1 次/d, 30 min/次, 治疗 5 次后, 休息 2 d, 共治疗 15 次; ④联合治疗组: 每日行同针刺治疗组针刺治疗结束后, 用通痹方药制成热奄包, 加水大火煮沸后小火熬 30 min 后取出药包去除多余水分, 待药包温度降至皮肤耐受时置于家兔颈部进行热敷, 1 次/d, 15 min/次, 治疗 5 次后, 休息 2 d, 共治疗 15 次。

**1.4.3 取材及保存方法** 治疗结束后麻醉家兔用空气栓塞法处死, 迅速切开颈部皮肤逐层剥离颈部肌肉, 取出颈椎于冰上剥离出 C<sub>3-4</sub>、C<sub>4-5</sub> 椎间盘。C<sub>3-4</sub> 椎间盘固定于 40 g/L 多聚甲醛溶液中用于苏木精-伊红染色, C<sub>4-5</sub> 椎间盘冻存于 -80 °C 冰箱用于椎间盘 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 的检测。

**1.4.4 颈椎影像学观察及评分** 所有家兔在造模前, 造模 30 d 及治疗结束后拍摄颈椎左侧位 X 射线片, 观察颈椎病变情况, 并参照余家阔等<sup>[10]</sup>的影像评分方法对造模 30 d、治疗结束后 2 个时间节点的颈椎病变情况进行评分, 评分越高, 颈椎病变越严重。

**1.4.5 椎间盘组织形态学观察及评分** C<sub>3-4</sub> 椎间盘在 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 48 h, 4 °C 冰箱过夜, 生理盐水浸洗两三次, 置于 10%EDTANa2 溶液脱钙, 经石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色法染色, 光学显微镜下观察组织形态学变化, 参照 MASUDA 等<sup>[11]</sup>的方法对椎间盘组织形态进行评分。评

分对纤维环、纤维环与髓核之间的边界、髓核细胞、髓核基质 4 个类别进行, 每个类别 3 分, 评分范围从正常椎间盘 4 分到严重退化椎间盘 12 分。

**1.4.6 实时荧光定量 PCR 法检测椎间盘 caspase-3、Bcl-2 mRNA** 取 C<sub>4-5</sub> 椎间盘液氮研磨之后用 Trizol 法提取总 RNA, 参照反转录试剂盒说明书反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 反应体系为 10 μL: SYBR Mix 5 μL, 上下游引物各 0.5 μL, cDNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 3 μL。反应参数设置为: 50 °C 2 min, 95 °C 15 s, 95 °C 15 s、60 °C 1 min 40 个循环。以 GAPDH 作为内参基因, 根据 2<sup>-ΔCt</sup> 法计算 Bcl-2、caspase-3 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列及产物大小  
Table 1 | Primer sequences and product length

基因名称	上游引物	下游引物	产物大小
Bcl-2	GTT TCA AAG CCG CTC TCA CC	TTC CCT ACG TGA TGT TGT GTT	136 bp
Caspase-3	TGC CAT GCT GAA AGA GTA CG	GTG GCA TCA AGG GAA TAG GA	105 bp
GAPDH	CGC CTG GAG AAA GCT GCT A	ACG ACC TGG TCC TCG GTG TA	104 bp

**1.5 主要观察指标** ①X 射线片家兔颈椎影像学改变并进行 X 射线评分; ②椎间盘组织形态学改变及评分; ③椎间盘 Bcl-2、caspase-3 mRNA 的相对表达量。

**1.6 统计学分析** 研究数据经检验后均满足参数检验的应用条件 (符合正态性和方差齐性), 因此研究中的数据采用完全随机设计资料的方差分析, 差异有显著性意义后 ( $P < 0.05$ ), 用 LSD 法进行组与组之间的两两比较, 同样,  $P < 0.05$  认为差异有显著性意义; 资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 所有分析在 SPSS 19.0 统计软件下完成。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 实验所用 24 只新西兰大白兔均进入最终结果分析。

**2.2 造模后家兔颈椎影像** 造模 30 d 后家兔颈椎 X 射线片见: 空白对照组家兔颈椎曲度、椎间孔、椎间隙均无明显改变, 未出现骨质增生、软骨及附着韧带钙化等情况。模型对照组、针刺治疗组、联合治疗组家兔颈椎均出现不同程度的颈椎曲度改变、椎间隙椎间孔变窄、椎体和小关节增生等改变, 见图 1。

**2.3 颈椎 X 射线评分** 对各组家兔颈椎 X 射线的评分显示, 造模 30 d 后模型对照组、针刺治疗组、联合治疗组评分较空白对照组显著升高 ( $P < 0.05$ ); 治疗结束后针刺治疗组、联合治疗组颈椎 X 射线评分较模型组降低 ( $P < 0.05$ ); 针刺治疗组、联合治疗组评分无明显差别, 差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 | 家兔颈椎 X 射线影像学评分 (x̄±s, n=6)  
Table 2 | Radiological scoring of rabbit cervical spine

组别	造模 30 d	治疗结束后
空白对照组	1.17±0.41	1.33±0.52
模型对照组	4.67±0.52 <sup>a</sup>	4.50±0.55
针刺治疗组	4.50±0.55 <sup>a</sup>	3.33±0.52 <sup>b</sup>
联合治疗组	4.50±0.55 <sup>a</sup>	3.17±0.41 <sup>b</sup>

表注: 与空白对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型对照组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$

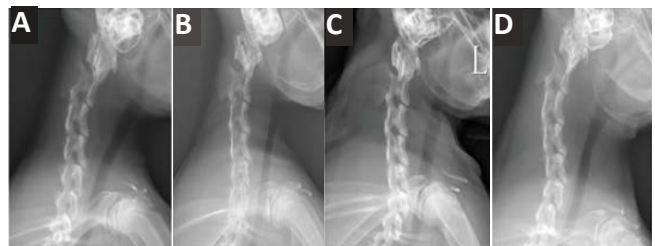
**2.4 椎间盘苏木精-伊红染色和评分** 各组家兔椎间盘纤维环组织形态学改变见：空白对照组家兔纤维环层次分明，排列整齐，结构正常，细胞分布均匀；与空白对照组相比，模型对照组纤维环可见纤维排列松散紊乱，出现较多撕裂，细胞肿胀变性；针刺治疗组、联合治疗组纤维环排列相对整齐，层次相对清楚，细胞形态稍好，见图2。对椎间盘组织形态评分显示：模型对照组椎间盘评分显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ )；针刺治疗组、联合治疗组评分较模型组明显降低 ( $P < 0.05$ )；联合治疗组评分明显低于针刺治疗组 ( $P < 0.05$ )，见图3。

**2.5 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 的相对表达量** 与空白对照组相比，模型对照组家兔椎间盘内 Caspase-3 mRNA 表达升高、Bcl-2 mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ )。与模型对照组相比，针刺治疗组、联合治疗组 Caspase-3 mRNA 表达降低，Bcl-2 mRNA 表达升高 ( $P < 0.05$ )，与针刺治疗组相比，联合治疗组 Caspase-3 mRNA 表达较低，Bcl-2 mRNA 表达较高 ( $P < 0.05$ )，见图4。

### 3 讨论 Discussion

颈椎病是临床常见的一种以退行性病理改变为基础的疾病，随着科技的发展、人们工作和生活方式的改变，其发病率呈逐年升高的趋势<sup>[12]</sup>。大量与颈椎相关的流行病学调查研究和生物力学研究显示，长期处于异常应力作用下会导致颈椎间盘、关节及椎体退变，颈椎病的发生与颈椎长时间处于异常应力状态下有密不可分的关系<sup>[13]</sup>。家兔颈椎恒为7块，且椎体结构与人类颈椎构造极为相似，是一种很好的动物模型。此次研究使用长期低头位方法经长时间诱导之后建成颈椎病家兔模型，与人类长期低头作息所致颈椎病相似度很高，使研究更具有说服力。建模结束后，发现家兔颈椎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，关节突关节出现增生硬化等情况。既往研究表明，在人类颈椎病中颈椎退变及椎间盘突出等情况在C<sub>2-7</sub>颈椎均有发生，以C<sub>4-6</sub>颈椎发病率较高<sup>[14-15]</sup>，在建立颈椎病家兔模型的过程中发现家兔颈椎处于45°屈曲位时以第4颈椎为最高点，而造模后X射线片显示家兔颈椎退变在第3-6颈椎均有发生，以第4颈椎附近较多。

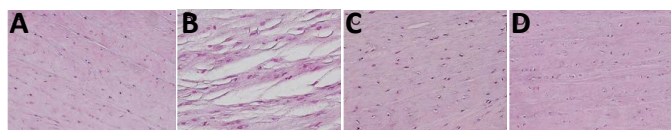
椎间盘由两端的软骨终板、中间的髓核及环绕髓核的纤维环组成，具有维持脊柱的稳定性，减震、合理分散脊柱轴向压力的作用<sup>[16-18]</sup>。在椎间盘退变过程中主要有炎症反应、细胞凋亡、细胞外基质降解等三大事件发生<sup>[19]</sup>。正常机体内，细胞凋亡与增殖维持着动态平衡，而这个平衡被打破则会导致疾病发生，研究显示细胞凋亡异常增多是导致椎间盘退变发生以及加重退变进展的重要因素<sup>[20]</sup>，有学者在研究椎间盘成熟和退变过程时发现，退变阶段椎间盘内细胞凋亡率较高<sup>[21]</sup>。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡，其意义在于清扫机体内衰老、变异、感染或癌变等异常细胞，维持机体器官或组织内环境的稳定<sup>[22]</sup>。近年来，越来越多的研



图注：A 为空白对照组；B 为模型对照组；C 为针刺治疗组；D 为联合治疗组。除空白对照组外，其他组家兔颈椎均出现不同程度的颈椎曲度改变、椎间隙椎间孔变窄、椎体和小关节增生等改变

图1 | 各组家兔造模后颈椎 X 射线影像

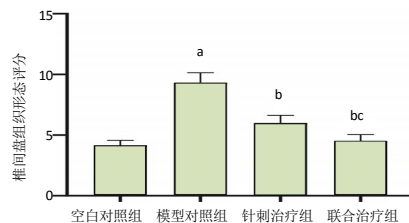
Figure 1 | Radiological observation of the cervical spine of rabbits after modeling



图注：A 为空白对照组；B 为模型对照组；C 为针刺治疗组；D 为联合治疗组。与空白对照组相比，模型对照组纤维环可见纤维排列松散紊乱，出现较多撕裂，细胞肿胀变性；针刺治疗组、联合治疗组纤维环排列相对整齐，层次相对清楚，细胞形态稍好

图2 | 各组家兔椎间盘苏木精-伊红染色观察 (x200)

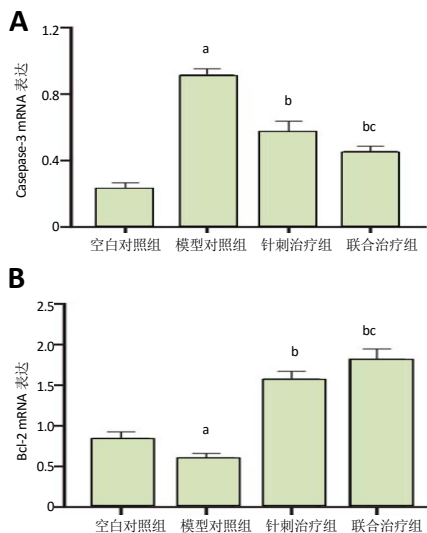
Figure 2 | Hematoxylin-eosin staining of rabbit intervertebral discs (x200)



图注：与空白对照组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型对照组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与针刺治疗组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$

图3 | 各组兔椎间盘组织形态评分

Figure 3 | Histomorphologic scoring of rabbit intervertebral discs



图注：A 为 Caspase-3 mRNA 相对表达量；B 为 Bcl-2 mRNA 相对表达量。与空白对照组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型对照组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与针刺治疗组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$

图4 | 椎间盘内 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 的相对表达量

Figure 4 | Relative expression levels of Caspase-3 and Bcl-2 mRNAs in the intervertebral disc



究发现细胞凋亡异常增多导致椎间盘内活性细胞数量减少,椎间盘内的胶原构成改变,椎间盘细胞外基质的代谢平衡被打破<sup>[23-24]</sup>。因此,抑制椎间盘细胞凋亡在延缓椎间盘退变治疗退行性疾病中起到重要的作用。

Caspase-3 作为 Caspase 级联反应下游最关键的凋亡蛋白酶,是细胞凋亡重要的执行因子和效应因子,在多个凋亡途径发挥重要作用,执行不可逆转的程序性细胞死亡<sup>[25-26]</sup>。其在正常情况下是以无活性的方式存在,被激活后引起直接参与切割或降解细胞的多种结构和功能蛋白,致使细胞功能障碍,凋亡小体形成,最终导致细胞凋亡<sup>[27-28]</sup>。Bcl-2 家族是线粒体凋亡途径上重要的凋亡家族,包括促凋亡因子和抑凋亡因子,Bcl-2 是最重要的抗凋亡因子<sup>[29-31]</sup>,可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抗凋亡作用<sup>[32]</sup>。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,阻碍 Caspase-3 活化而发挥抑凋亡作用,认为 Bcl-2 可能抑制了 Caspase-3 的合成<sup>[33]</sup>。LIU 等<sup>[34]</sup>的研究也认为 Bcl-2 可通过抑制 Caspase-3 的激活阻止细胞的凋亡。在此次研究中也发现,造模后与空白对照组相比,模型对照组家兔椎间盘内 Caspase-3 表达显著升高、Bcl-2 表达则降低;而治疗后,联合治疗组与针刺治疗组家兔椎间盘内的 Bcl-2 表达明显升高,而 Caspase-3 则降低,这说明干预对椎间盘细胞凋亡产生了影响,而治疗后椎间盘退变减轻可能与上调 Bcl-2、抑制 Caspase-3 的表达有关。

针灸治疗颈椎病疗效肯定,在临床上应用广泛,研究认为针刺颈部夹脊穴可起到镇痛、消炎、缓解肌肉张力等作用,可降低椎间盘压力,使椎间孔和椎间距适当增大,减少对神经根的压迫,松懈粘连,恢复颈椎的平衡<sup>[35]</sup>。中医治疗颈椎病除了采用针灸治疗还时常会选取推拿、拔罐、电针、口服或外用中药等方法配合使用以提高疗效,中药热敷便是其中一种,其直接作用于局部,利用药效与温度达到温经通络止痛、调和气血、祛湿除寒的作用,可有效改善患者颈椎局部疼痛不适的情况<sup>[36]</sup>。近年来有大量临床研究指出中药热敷疗法及其与其他疗法共同运用对于颈椎病、腰椎间盘突出、膝骨性关节炎、坐骨神经痛等疾病有较好的疗效<sup>[37-39]</sup>,一项对中药热敷治疗颈椎病的临床观察中,研究者采用中药热敷联合推拿治疗 60 例椎动脉型颈椎病有效率达 96.67%,优于单纯推拿治疗<sup>[40]</sup>。此次研究所用通痹方为贵州医科大学附属医院针灸科自拟方,在临床应用十余年,收效甚好。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,主要治疗以颈椎病、腰椎病、风湿性关节炎等为主的痹症<sup>[41]</sup>。此次实验在针刺治疗的基础上加以通痹方热敷包热敷治疗旨在提高治疗治疗的疗效,而研究结果表明治疗后联合治疗组较模型组相比颈椎病减轻、X 射线评分降低,苏木精-伊红染色显示椎间盘退变显著减少、评分显著降低且优于针刺治疗组。

在此次研究中发现经针刺及针刺联合中药热敷治疗 15 d 后家兔颈椎退变情况有所缓解,两治疗组椎间盘组织形态学改变较模型组家兔椎间盘减轻。另一方面则发现经治疗后,较模型组而言,治疗组家兔椎间盘内 Caspase-3 的表达水平下降,而 Bcl-2 的表达水平增加,这提示针刺及其联合疗法可减轻椎间盘退变程度,延缓椎间盘退变,其机制可能与上调抗凋亡因子 Bcl-2 的表达,下调凋亡因子 Caspase-3 的表达有关。

**作者贡献:** 实验设计由王光义、徐银琴完成,实验实施由所有作者共同完成,资料收集由徐银琴、史红美完成,实验评估由所有作者共同完成。

**经费支持:** 该文章接受了“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]”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] MARTIROSYAN NL, PATEL AA, CAROTENUTO A, et al. Genetic alterations in intervertebral disc disease. *Front Surg*. 2016;21(2):59.
- [2] ZHAO GS, ZHANG Q, QUAN ZX. Mid-term efficacy and safety of cervical disc arthroplasty versus fusion in cervical spondylosis: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Rep*. 2017;6(2):159-166.
- [3] PHILLIPS KL, CULLEN K, CHIVERTON N, et al. Potential roles of cytokines and chemokines in human intervertebral disc degeneration: interleukin-1 is a master regulator of catabolic processes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(7):1165-1177.
- [4] DAHIA CL, MAHONEY EJ, DURRANI AA, et al. Postnatal growth, differentiation, and aging of the mouse intervertebral disc. *Spine*. 2009;34(5):447.
- [5] MILLWARD S J, COSTELLO P W, FREEMONT A J, et al. Regulation of catabolic gene expression in normal and degenerate human intervertebral disc cells: implications for the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *J Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):243.
- [6] 张雪梅, 江维. 血红素氧合酶-1 通过 NF-κB 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.
- [7] 赵英伦, 马元, 李东冉, 等. 凋亡促进因子 TFAR19, Apaf-1 与腰椎间盘突出症的关系研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2):30-32.
- [8] 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.

- [9] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 314-325.
- [10] 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.
- [11] MASUDA K, AOTA Y, MUEHLEMAN C, et al. A Novel Rabbit Model of Mild, Reproducible Disc Degeneration by an Anulus Needle Puncture: Correlation Between the Degree of Disc Injury and Radiological and Histological Appearances of Disc Degeneration. *Spine*. 2005; 30(1): 5-14.
- [12] EVA S, JAVIER P E, JOHAN H, et al. Healthy lifestyle behavior and risk of long duration troublesome neck pain or low back pain among men and women: results from the Stockholm Public Health Cohort. *Dove Press*. 2017;9: 491-500.
- [13] 吴炳轩, 刘宝戈, 刘振宇, 等. 颈椎曲度和活动度参数的影响因素 [J]. 中华骨科杂志, 2014, 34(4): 380-386.
- [14] 买小军, 王学琦, 卢万春, 等. X线平片、CT、MRI 诊断颈椎病的价值 [J]. 中国医学影像学杂志, 2009, 17(3): 220-222.
- [15] 杨平. 青年型颈椎病 X线诊断的临床分析 [J]. 中国医药指南, 2015, 13(9): 98-99.
- [16] 常献, 陈斌, 李长青. 髓核细胞老化机制研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(1): 40-42.
- [17] 孟祥宇, 夏建龙. 椎间盘退变的机制及修复 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(11): 1768-1773.
- [18] 李文举, 李亦梅. 椎间盘退变机制研究现状及生物治疗展望 [J]. 中国骨与关节外科, 2014, 7(1): 66-69.
- [19] HASCHTMANN D, FERGUSON SJ, STOYANOV JV. Apoptosis and gene expression of collagenases but not gelatinases in rabbit disc fragment cultures. *J Neurosurg Spine*. 2008; 8(6): 552.
- [20] 邹璟, 姜梦雅, 李解, 等. 细胞凋亡参与电针对退变椎间盘保护作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(9): 2271-2273.
- [21] DING F, SHAO ZW, YANG SH, et al. Role of mitochondrial pathway in compression induced apoptosis of nucleus pulposus cells. *Apoptosis*. 2012; 17 (6): 579-590.
- [22] 陈琪, 石芳芳, 杨曦, 等. 不同代次髓核细胞生物学特性的比较研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(6): 660-667.
- [23] 黄秀芳, 原向伟. Sox9 和 II 型胶原蛋白在人腰椎间盘退变中的表达及意义 [J]. 中国医药科学, 2014, 4(3): 18-21.
- [24] MA K, CHEN S, LI Z, et al. Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019; 27(1): 41-48.
- [25] MAZUMDER S, PLESCA D, ALMASAN A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2008; 414: 13-21.
- [26] 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.
- [27] 陆洋, 孔灵菲, 耿秀娟. Caspase-3、Caspase-9 在哮喘大鼠模型嗜酸性粒细胞中的表达及糖皮质激素的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(11): 1033-1035.
- [28] ABOUTALEB N, SHAMSAEI N, RAJABI H, et al. Protection of hippocampal CA1 neurons against ischemia/reperfusion injury by exercise preconditioning via modulation of Bax/Bcl-2 ratio and prevention of caspase-3 activation. *Basic Clin Neurosci*. 2016; 7(1): 21-29.
- [29] XIA Z, DICKENS M, RAINGEAUD J, et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995; 270(5240): 1326-1331.
- [30] KLUCK RM, BOSSY-WETZEL E, GREEN DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997; 275(5303): 1132-1136.
- [31] OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74(4): 609-619.
- [32] 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.
- [33] 肖飞, 刘鹏, 程光宇, 毕海洋, 于楠楠. 天麻素穴位注射对戊四氮致病模型大鼠脑内海马区凋亡调控因子 Bcl-2、Caspase-3 表达的影响 [J]. 针灸临床杂志, 2019, 35(10): 66-70.
- [34] LIU G, WANG T, WANG T, et al. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. *Biomedical Reports*. 2013; 1(6): 861-867.
- [35] 袁效智. 中药热敷联合针灸治疗腰椎间盘突出症的效果分析 [J]. 医学信息, 2015, 28(40): 21-21.
- [36] 江明, 张宏波. 局部针刺联合中药包热敷治疗神经根型颈椎病的疗效 [J]. 医学信息, 2019, 32(15): 149-151.
- [37] 李峰. 按摩推拿配合中药热敷治疗坐骨神经痛临床效果观察 [J]. 河南医学研究, 2016, 25(10): 1819-1819.
- [38] 李毅敏, 伍永灼, 郑文诺. 针灸推拿配合中药湿热敷治疗椎动脉型颈椎病 60 例临床研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(9): 61-62.
- [39] 赵荣华. 针灸推拿分期施用治疗颈椎病的研究 [J]. 中国急救医学, 2016, 36(z2): 118-119.
- [40] 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.
- [41] 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.