

· 基础研究 ·

补肾活血方对沙鼠增龄过程中腰椎软骨终板钙化干预作用的初步研究

朱立国¹, 张平², 宋庆慧³, 张万强³, 朱宏伟², 杨丽平³, 朱岩², 王源³, 李玲慧⁴

(1. 中国中医科学院脊柱二科, 北京 100102; 2. 中国中医科学院望京医院病理科, 北京 100102; 3. 中国中医科学院望京医院药理实验室, 北京 100102; 4. 中国中医科学院骨伤综合科, 北京 100102)

【摘要】 目的: 探讨补肾活血方对腰椎软骨终板钙化的干预作用。方法: 选取 30 只 2 月龄和 7 月龄健康雄性长爪沙鼠, 分别喂养至 2 月龄(50~60 g)和 12 月龄(60~80 g)建立老龄沙鼠模型, 采用随机数字表方法分为 5 组: 正常组($n=6$), 模型组($n=6$, 给予生理盐水 4 ml/kg, 灌胃 30 d), 补肾活血方低剂量组($n=6$, 给予补肾活血方 1.9×10^{-3} ml/g 灌胃 30 d), 补肾活血方中剂量组($n=6$, 给予补肾活血方 3.8×10^{-3} ml/g 灌胃 30 d), 补肾活血方高剂量组($n=6$, 给予补肾活血方 7.6×10^{-3} ml/g 灌胃 30 d), 干预组从 7 月龄开始连续给药 1.36 g, 30 d。正常组 2 月龄及其他组 12 个月龄时处死动物, 取腰椎间盘组织, HE 染色体视法分析腰椎体软骨终板组织形态学、血管芽面积、非钙化/钙化层比值, 兔单克隆抗体免疫组化染色方法测定软骨终板 X 型胶原、BMPs 的表达。结果: 软骨终板血管芽相对面积测量显示, 与模型组相比, 补肾活血方中剂量组, 正常组增高($P < 0.05$), 大、小剂量组虽各有不同程度的增加, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$); 软骨终板非钙化层/钙化层厚度比值测量显示, 与模型组相比, 补肾活血方中剂量、正常组增加, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而补肾活血方大、小剂量组虽各有不同程度的增加, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。免疫组化染色软骨终板 X 型胶原的表达与模型组相比, 正常组、补肾活血方低、中、高剂量组均降低, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); BMPs 的表达, 与模型组相比, 正常组、补肾活血方中剂量组升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$), 大、小剂量组虽各有不同程度的升高, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 补肾活血方中剂量可延缓增龄过程中椎间盘软骨终板钙化, 提示可作为早期椎间盘退变的预防用药。

【关键词】 补肾活血方; 椎间盘退变; 软骨终板钙化; 沙鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2017.10.010

Preliminary study of intervention in effect of Bushen Huoxue recipe on calcification of lumbar vertebra cartilage endplate of the aging gerbils ZHU Li-guo, ZHANG Ping*, SONG Qing-hui, ZHANG Wan-qiang, ZHU Hong-wei, YANG Li-ping, ZHU Yan, WANG Yuan, and LI Ling-hui. *Department of Pharmacology, Wangjing Hospital of China Academy of Traditional Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

ABSTRACT Objective: To study the effect of Bushen Huoxue decoction on calcification of cartilage endplate in lumbar vertebrae. **Methods:** Six healthy male gerbils with 2-month-old were selected as normal control group, and 24 7-month-old healthy male gerbils were fed to 12-month-old to establish the aged gerbil model. Thirty gerbils were randomly divided into five groups as follow: the normal control group ($n=6$), model group ($n=6$, normal saline 4 ml/kg, intragastric 30 d), Bushen Huoxue low dose group ($n=6$, 1.9×10^{-3} ml/g given Bushen Huoxue recipe orally, 30 d), Bushen Huoxue middle dose group ($n=6$, 3.8×10^{-3} ml/g given Bushen Huoxue recipe orally, 30 d), Bushen Huoxue high dose group ($n=6$, 7.6×10^{-3} ml/g given Bushen Huoxue recipe orally, 30 d), the intervention group administered for 1.36 g from 7-month-old age, 30 d. The animals were sacrificed at the age of 2 months in the normal control group and 12 months of age in the other groups. The morphology of the lumbar vertebral cartilage endplate, the area of vascular bud, the ratio of non-calcified/calcified layer were analysis by HE chromosome visual method. The expression of type X collagen and BMPs in cartilage endplates were detected by rabbit monoclonal immunohistochemical staining. **Results:** The relative area of the vascular buds cartilage endplate measurements showed that compared with the model group, middle dose group and normal control group increased ($P < 0.05$), high and low dose groups all

基金项目: 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项课题(编号: JDZX2015275); 国家自然科学基金面上项目(编号: 81674005); 北京市自然科学基金青年项目(编号: 7164313); 中国博士后科学基金面上项目(编号: 2016M591364)

Fund program: Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81674005); State Administration of Traditional Chinese Medicine Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine Business Research Project (No. JDZX2015275)

通讯作者: 张平 E-mail: pinglele@sina.com

Corresponding author: ZHANG Ping E-mail: pinglele@sina.com

had different degrees of increase, but no statistical significance ($P>0.05$). The ratio of cartilage endplate thickness of non-calcified/calcified showed that compared with the model group, *Bushen Huoxue* middle dose, normal control group increased, with statistical significance ($P<0.05$), and high and low dose groups all had different degrees of increase, but there were no statistical significance ($P>0.05$). Compared with the model group, the expression of type X collagen in the cartilage endplate of the normal group, the *Bushen Huoxue* low, middle and high dose groups decreased, and had statistical significance ($P<0.01$); compared with the model group, the expression of BMPs in the normal group, *Bushen Huoxue* middle dose group increased, with statistically significant ($P<0.01$), while the high and low dose groups increased in different degrees, but there was no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion:** *Bushen Huoxue* prescription can delay the calcification of cartilage endplate in the process of aging, suggesting that it can be used as a preventive medicine for early disc degeneration.

KEYWORDS *Bushen Huoxue* recipe; Intervertebral disc degeneration; Cartilage endplate calcification; Gerbils

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2017, 30(10):926-932 www.zggszz.com

软骨终板是椎间盘最主要营养通路^[1],在椎间盘营养供应和代谢产物的排出方面发挥着重要的作用。在增龄过程中软骨终板的结构变化如软骨钙化、骨化、裂变和缺失等,必然影响椎间盘的营养供应,而营养供应不足是椎间盘退变的重要原因之一。因而延缓软骨终板的退变,对于椎间盘退变的修复和再生意义重大^[2-4],本实验应用中药补肾活血方对腰椎软骨终板钙化进行干预,探讨其作用。补肾活血方由杜仲、牛膝、补骨脂、丹参组成,有补肾活血、行气化痰之功。本实验研究其对自然增龄沙鼠椎间盘软骨终板钙化的影响,阐释椎间盘软骨终板钙化的病变过程及寻找其药物作用靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性长爪沙鼠 30 只,2 月龄正常组 6 只,体重 50~60 g,7 月龄 24 只饲养至 12 月龄(自然增龄造模),体重 60~70 g,由首都医科大学实验动物中心提供,适应性饲养 1 周,观察无异常者入组。

1.2 主要试剂与仪器

兔单克隆抗体 X 型胶原(bs-0554R)由北京博奥森生物技术有限公司提供、BMPs(BA1476)由武汉博士德生物公司提供,补肾活血方(杜仲、补骨脂、川牛膝、丹参)沙鼠用药按人和动物间体表面积折算的等效剂量比值计算望京医院中药制剂室煎制浓缩液为每毫升含生药 1.36 g)由药房提供,光学显微镜为奥林巴斯公司产品(BX51),高清晰病理图像分析仪为尼康公司产品(NIS-Elements D 3.2),组织切片机为德国莱卡公司产品(RM2235)。

1.3 模型制备及分组方法

模型制备方法为 7 月龄饲养至 12 月龄自然增龄,沙鼠用药按人和动物间体表面积折算的等效剂量比值计算,2 月龄为正常组,7 月龄为干预组分为模型组 6 只(0.5%生理盐水 4 ml/kg,1 只死亡),补肾活血方低剂量组(6.25 g/kg)6 只、补肾活血方中剂量组(12.5 g/kg)6 只、补肾活血方高剂量组(25 g/kg)

6 只、体重 60~80 g,干预组从第 7 月龄开始灌胃给药 30 d,然后常规饲养至 12 月龄处死动物取材。各组于同一天给予过量戊巴比妥钠处死,正常组于 2 月龄、实验组于满 12 月龄共同处死,取 L₁ 至 S₁ 段椎体标本,剔除软组织,放入 4%多聚甲醛固定。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 组织形态学研究

伊红-苏木素(HE)染色:取 L₄-L₅ 脊柱节段,包括 L₄、L₅ 椎体及 L_{4,5} 椎间盘,经多聚甲醛固定,中性 EDTA 脱钙液脱钙,常规石蜡包埋,用多聚赖氨酸处理载玻片,切片,每张厚 4 μm,HE 染色。取 HE 染色切片,各个标本连续 4 μm 横断面切片 2 张,显微镜下(×100)采集图像,组织形态学观察(图 1)。

1.4.2 软骨终板血管芽面积和钙化层、非钙化层厚度比值

体视法分析椎体软骨终板血管芽面积测量,软骨终板钙化层、非钙化层厚度比值测量取 HE 染色切片,各标本连续 4 μm 横断面切片 2 张,显微镜下(×40)采集图像,医学图像分析软件分析,采集数据。取 HE 染色切片,以潮标为分界线,显微镜下(×40)采集图像,医学图像分析软件分析测定每组椎间盘软骨终板正中矢状面前侧 1/3、中心点、后侧 1/3 钙化层和非钙化层的厚度,取 3 处测量的平均值,计算非钙化层/钙化层比值(图 2)。

1.4.3 免疫组化方法测定 X 型胶原和 BMPS 表达

椎间盘组织石蜡切片二甲苯脱蜡、逐级乙醇水化后,SP 法 DAB 显色,显微镜下(×400)采集图像,应用医学图像分析软件分析对组织切片进行 X 胶原、BMPs 平均光密度测量,采集数据。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 10 软件做统计分析,统计数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)来表示。软骨终板血管芽相对面积、非钙化/钙化层比值、X 胶原、BMPS 表达采用单因素方差分析进行统计分析,对于组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织形态学观察

HE 染色结果显示(图 1),正常组沙鼠椎间盘软骨终板软骨细胞排列规则,血管芽丰富。补肾活血方大、小剂量组与模型组无明显差异,但明显不同于正常组,表现为软骨终板变薄,软骨细胞数减少,排列紊乱,潮标前移,在靠近次级骨化中心的软骨终板和

骺板钙化,甚至完全骨化,软骨终板和髓核之间的过渡区被许多小软骨细胞所取代,血管芽周围钙化,血管芽数目减少,腔隙较小。部分组织纤维环排列不规则,但结构尚完整,大部分(90%)髓核结构基本正常,部分(10%)纤维化。补肾活血方中剂量组与模型组比较椎体软骨终板血管芽数目较多,但髓核与纤维环与模型组无明显差异。

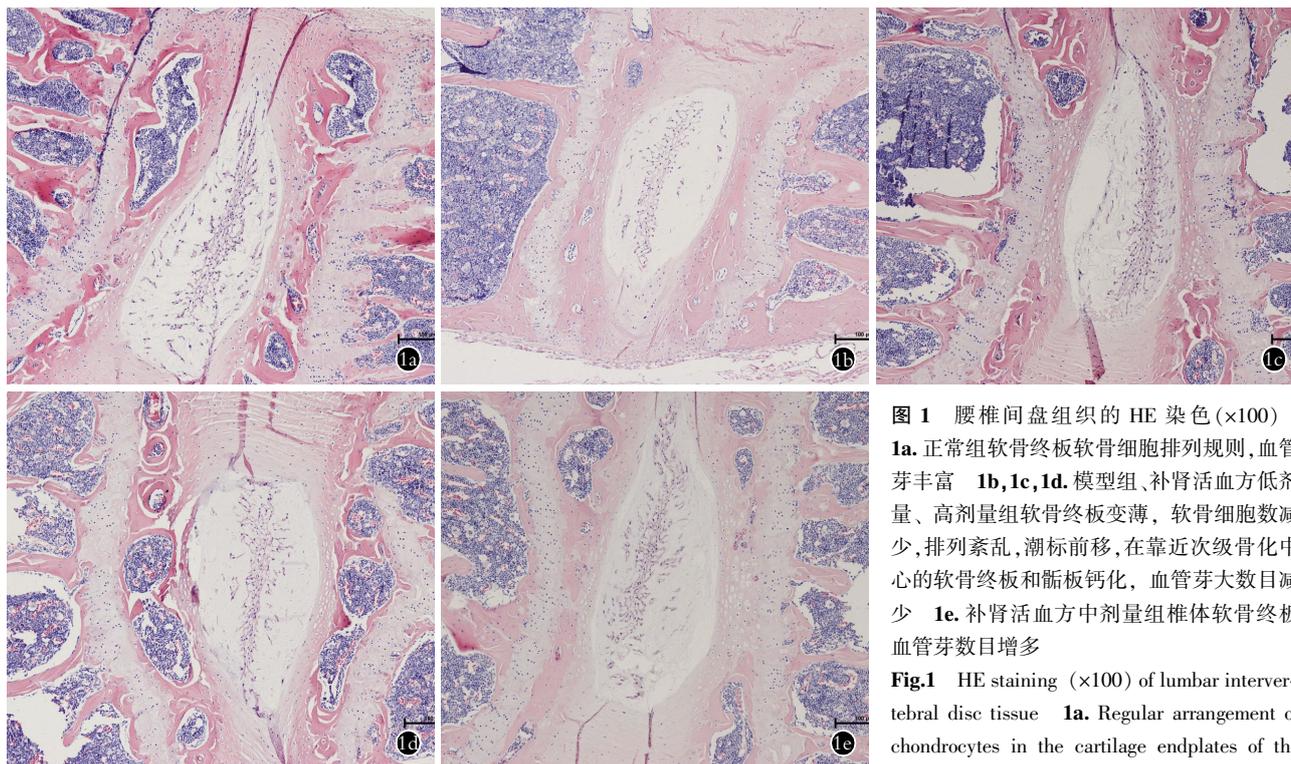


图 1 腰椎间盘组织的 HE 染色(×100)
1a. 正常组软骨终板软骨细胞排列规则,血管芽丰富 1b, 1c, 1d. 模型组、补肾活血方低剂量、高剂量组软骨终板变薄, 软骨细胞数减少, 排列紊乱, 潮标前移, 在靠近次级骨化中心的软骨终板和骺板钙化, 血管芽大数目减少 1e. 补肾活血方中剂量组椎体软骨终板血管芽数目增多

1b, 1c, 1d. The cartilage end plate of model group, low and high dose groups of *Bushen Huoxue* was thinning, cartilage cells decreased and arranged disorder, tidemark forward, near the secondary ossification of the cartilage end plate and epiphyseal plate calcified, vascular bud number decreased 1e. The number of vascular buds increased in middle dose group

表 1 各组软骨终板血管芽相对面积、软骨终板非钙化层/钙化层比值结果比较(̄x±s)

Tab.1 Comparison of the relative area of vascular buds and the ratio of non-calcified layer/calcified layer of cartilage end-plate among five groups(̄x±s)

组别	鼠数	软骨终板血管芽相对面积(S)	软骨终板非钙化/钙化层比值(C)
正常组	6	61.86±16.57*	1.59±0.89**
模型组	5	29.19±10.84	0.43±0.02
补肾活血方低剂量组	6	44.43±22.11#	0.65±0.10 ^{##}
补肾活血方中剂量组	6	57.99±18.45 [△]	0.96±0.02 ^{△△}
补肾活血方高剂量组	6	44.24±13.82 [§]	0.64±0.04 ^{§§}
F 值	-	3.18	0.03
P 值	-	6.97	0.001

注:与模型组比较, t=3.66, *P<0.05; t=1.37, #P>0.05; t=2.98, △P<0.05; t=1.90, §P>0.05; 与模型组比较, t=2.86, **P<0.05; t=4.37, ^{##}P<0.05; t=40, △△P<0.05; t=9.6, §§P<0.05

Note: Compared with model group, t=3.66, *P<0.05; t=1.37, #P>0.05; t=2.98, △P<0.05; t=1.90, §P>0.05; Compared with model group, t=2.86, **P<0.05; t=4.37, ^{##}P<0.05; t=40, △△P<0.05; t=9.6, §§P<0.05

2.2 软骨终板血管芽相对面积和非钙化层、钙化层比值测量

软骨终板血管芽相对面积、软骨终板非钙化层/钙化层比值显示,与模型组相比,正常组、补肾活血方中剂量组面积增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而大、小剂量组虽有不同程度的增加,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 1,图 1)。

2.3 免疫组化方法测定软骨终板中 X 型胶原和 BMPS 表达结果

免疫组化结果显示随着年龄增长 X 型胶原其表达随着年龄不断增加,与模型组相比,正常组、补

肾活血方低、中、高剂量组表达均降低,具有统计学意义 ($P < 0.01$,表 2,图 2);BMPs 的表达,与模型组相比,正常组、补肾活血方中剂量组升高具有统计学意义 ($P < 0.01$),大、小剂量组虽各有不同程度的升高,但均无统计学意义 ($P > 0.05$,表 2,图 3)。

3 讨论

3.1 自然增龄的沙鼠椎间盘退变模型

研究证实^[5-6]沙鼠在 2 月龄时椎间盘开始退变,大月龄动物椎间盘出现不规则盘边缘、楔入、缩小、终板钙化的退行性变化,12 个月大时,所有雄、雌性的腰椎均出现了终板钙化。椎间盘退变与年龄相

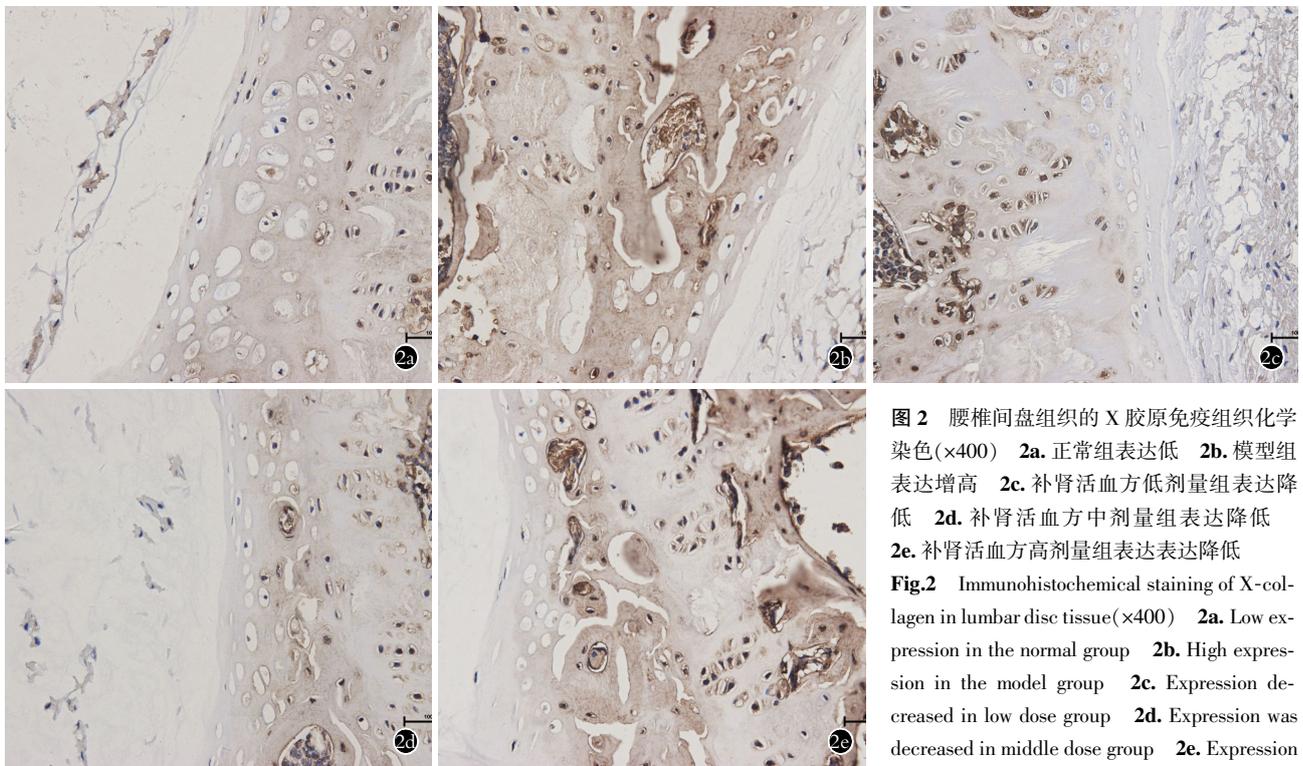


图 2 腰椎间盘组织的 X 胶原免疫组织化学染色(x400) 2a. 正常组表达低 2b. 模型组表达增高 2c. 补肾活血方低剂量组表达降低 2d. 补肾活血方中剂量组表达降低 2e. 补肾活血方高剂量组表达降低
Fig.2 Immunohistochemical staining of X-collagen in lumbar disc tissue(x400) 2a. Low expression in the normal group 2b. High expression in the model group 2c. Expression decreased in low dose group 2d. Expression was decreased in middle dose group 2e. Expression was decreased in high dose group

表 2 各组软骨终板中 X 型胶原、BMPS 表达结果比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of the expression of collagen type X and BMPS in the cartilage end plate among five group($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	软骨终板 X 胶原表达	软骨终板 BMPS 表达
正常组	6	0.21±0.02*	0.39±0.01**
模型组	5	0.45±0.04	0.30±0.02
补肾活血方低剂量组	6	0.30±0.05 [#]	0.31±0.01 ^{##}
补肾活血方中剂量组	6	0.25±0.03 [△]	0.34±0.03 ^{△△}
补肾活血方高剂量组	6	0.36±0.03 [§]	0.31±0.03 ^{§§}
F 值	-	33.02	12.18
P 值	-	1.2E-09	1.4E-06

注:与模型组比较, $t = -11.4, *P < 0.05; t = -5, ^{\#}P < 0.05; t = -8.72, ^{\Delta}P < 0.05; t = -4.44, ^{\S}P < 0.05$;与模型组比较, $t = 7.65, **P < 0.05; t = 1.6, ^{\#}P > 0.05; t = 2.42, ^{\Delta\Delta}P < 0.05; t = 0.49, ^{\S\S}P > 0.05$

Note: Compared with model group, $t = -11.4, *P < 0.05; t = -5, ^{\#}P < 0.05; t = -8.72, ^{\Delta}P < 0.05; t = -4.44, ^{\S}P < 0.05$; Compared with model group, $t = 7.65, **P < 0.05; t = 1.6, ^{\#}P > 0.05; t = 2.42, ^{\Delta\Delta}P < 0.05; t = 0.49, ^{\S\S}P > 0.05$

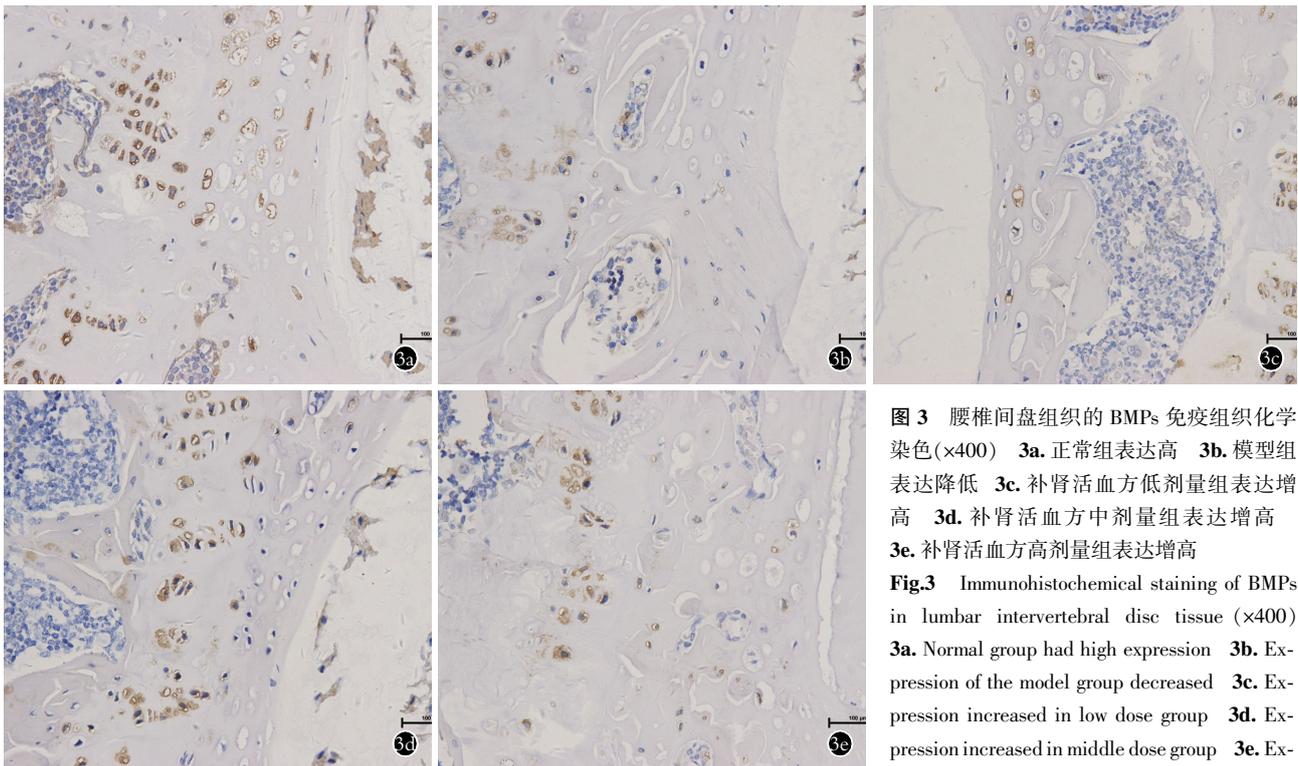


图 3 腰椎间盘组织的 BMPs 免疫组织化学染色(x400) **3a.** 正常组表达高 **3b.** 模型组表达降低 **3c.** 补肾活血方低剂量组表达增高 **3d.** 补肾活血方中剂量组表达增高 **3e.** 补肾活血方高剂量组表达增高
Fig.3 Immunohistochemical staining of BMPs in lumbar intervertebral disc tissue (x400) **3a.** Normal group had high expression **3b.** Expression of the model group decreased **3c.** Expression increased in low dose group **3d.** Expression increased in middle dose group **3e.** Expression increased in high dose group

关^[7],因此自然退变模型可较好的模拟人类椎间盘退变的生化及组织学改变,本实验采用自然增龄沙鼠模型,来评价补肾活血方的药效。实验结果显示,正常组(2月龄)和模型组(12月龄)有明显差异,证实了模型的成功选择。

3.2 软骨终板钙化与椎间盘退变

软骨终板是椎间盘退变的病理过程中最早出现退变的^[8],且它的退变可以引发相邻关节、组织的损害^[9-10]。Sharma等^[11]通过核磁共振成像证明,在椎间盘退变前软骨终板已经发生破坏。

研究发现^[7],软骨终板随年龄增大逐渐发生钙化,导致通透性降低髓核与纤维环的营养通路和代谢途径受阻。椎间盘营养的减少及代谢废物的聚集,微循环代谢紊乱,诱发椎间盘细胞分泌基质降解酶,加速了椎间盘的退变。X型胶主要分布于干骺端肥厚软骨的钙化带,由软骨内骨化过程中的肥大的软骨细胞所合成,其功能与软骨内骨化及矿化有关。研究表明^[12]椎间盘内X型胶原的出现是退变晚期的一种征象。骨形态发生蛋白(BMPs)能够诱导动物或人体间充质细胞分化为骨、软骨、韧带、肌腱和神经组织。BMPs^[13]是椎间盘内的功能性生长因子,在椎间盘退变中起到重要的作用。本文的实验证实模型组腰椎软骨钙化层和正常组相比明显增厚,表明腰椎软骨终板的不断钙化和骨化导致椎间盘营养发生障碍是启动腰椎间盘退变的关键因素,软骨终板非

钙化层/钙化层比值测定显示,补肾活血方有提高软骨终板非钙化层/钙化层比值的作用,可能与降低X胶原和升高BMPS的表达有关。

Gu等^[14]研究证实椎间盘缺乏营养供应可能对椎间盘退变具有长期效应(长达55年)。研究认为^[15]随着年龄的增加,软骨终板的钙化以及软骨终板中血管通道数目的急剧减少导致椎间盘的营养供应进一步减少,细胞废物的堆积和酸性环境(pH 6.3-6.6)的增加,以及其他应激因子可能负面影响细胞功能。因此改善软骨终板营养供应减少钙化,将有助于延缓髓核和纤维环的退变。我们的实验结果显示补肾活血方有提高椎间盘软骨终板血管芽相对面积而降低钙化层的作用,因此在椎间盘退变的早期应用,能延缓或改善椎间盘退变。

3.3 椎间盘退变病因病机

人体气血运行与椎间盘细胞内外信号转导过程之间存在内在联系,椎间盘退变病机为体姿失当,积劳受损,经脉之气不及贯串,气血失和,日久累积致气滞血瘀,椎间盘内营养供应不足,代谢产物堆积,椎间盘局部生化环境发生改变,最终导致结构和功能的改变。故治法最宜补肾活血为法,补肾活血方源于古方青娥丸,在我院椎间盘退行性病变的治疗及基础研究上已取得一定疗效。全方补肾强骨以治本,活血通络以治标,符合腰椎间盘退行性病变多属本虚标实的特点。

3.4 补肾活血方药理作用

补肾活血方中含有的君药杜仲在《神农本草经》和《本草纲目》中记载：“其性湿平，甘温能补，微辛能润，故能入肝而补肾；主治腰膝痛，补中益精气，坚筋骨，强志，除阴下痒湿，小便余沥；久服，轻身耐劳”。现代药理学研究认为，杜仲^[16]有抗氧化活性，可以减轻氧化应激对机体的损伤。杜仲可以双重调节人体骨代谢平衡作用^[17]。杜仲总多糖^[18]具备很好的抗肿瘤活性，能够增强机体的免疫力，对抗环磷酰胺引起的骨髓抑制效应。杜仲中桃叶珊瑚苷(AU)有抗炎作用^[19]。杜仲中所含的原儿茶酸、松脂醇和桃叶珊瑚苷保肝作用^[20-21]。杜仲可以保护镭对大鼠造成的肾损害^[22]，杜仲可以改善单侧输尿管阻塞造成的大鼠肾间质纤维化^[23]。

臣药牛膝《神农本草经》记载味苦、酸，性平，入肝、肾经。生用散瘀血，消肿痛；熟用补肝肾、强筋骨。具有填精补髓、益阴活血的功效。牛膝甾酮组分和皂苷组分都具有一定的抗炎作用^[24]，牛膝醇提物可以促进兔 OA 模型的软骨修复^[25]，牛膝的正丁醇提取部位具有显著的抗炎镇痛以及抗迟发型超敏反应作用^[26]。牛膝补肾壮骨有效部位具有明显的抗炎作用而不具有镇痛作用^[27]。

补骨脂最早记载于《开宝本草》，性温、味辛，归肾、脾经。具有补肾助阳、固精缩尿、温脾止泻、纳气平喘的功效。传统中医用于治疗阳痿遗精、遗尿、尿频、腰膝冷痛、肾虚作喘、五更泄泻等症。研究表明其具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化、抗炎和免疫调节等活性^[28-29]。

丹参具有的功效是：活血化瘀、养血安神、调经止痛、凉血消痈。丹参酮 II A 在心血管疾病的治疗方面以及在神经保护和缺血再灌注损伤的保护方面发挥着明显的作用，其抗炎、抗氧化、抗肿瘤等保护肝纤维化等多方面的生物学活性^[30]，丹参不同有效部位能明显改善血瘀大鼠的血液流变学及凝血功能异常^[31]。

四味中药的活性成分具有抗炎、镇痛、抗氧化、增强机体的免疫力、保肝护肾等功能。基于以上药理学研究和本实验结果证明，补肾活血方可增加软骨终板血管芽数量面积，降低 X 胶原、升高 BMPS 的表达，减轻软骨终板钙化程度，从而提高髓核营养供应改善椎间盘微环境，从而达到延缓椎间盘退变的作用。满足治疗和预防椎间盘退行性病变的要求。

参考文献

[1] Colombier P, Clouet J, Hamel O, et al. The lumbar intervertebral disc: from embryonic development to degeneration[J]. Joint Bone Spine, 2014, 81(2): 125-129.
[2] Liu HF, Zhang H, Qiao GX, et al. A novel rabbit disc degeneration

model induced by fibronectin fragment[J]. Joint Bone Spine, 2013, 80(3): 301-306.

- [3] Iatridis JC, Nicoll SB, Michalek AJ, et al. Role of biomechanics in intervertebral disc degeneration and regenerative therapies: what needs repairing in the disc and what are promising biomaterials for its repair[J]. Spine J, 2013, 13(3): 243-262.
[4] 魏晓宁, 王艳, 裴飞. 腰椎间盘结构, 盘内压力及不同载荷的影响: 生物力学研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(20): 3242-3247.
WEI XN, WANG Y, PEI F. Effects of lumbar intervertebral disc structure, intra-disc pressure and different loads: advances in biomechanics[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu, 2015, 19(20): 3242-3247. Chinese.
[5] Gruber HE, Gordon B, Norton HJ, et al. Analysis of cell death and vertebral end plate bone mineral density in the annulus of the aging sand rat[J]. Spine J, 2008, 8(3): 475-481.
[6] Gruber HE, Phillips R, Ingram JA, et al. Spontaneous age-related cervical disc degeneration in the sand rat[J]. Clin Orthop Relat Res, 2014, 472(6): 1936-1942.
[7] Nisolle JF, Bihin B, Kirschvink N, et al. Prevalence of age-related changes in ovine lumbar intervertebral discs during computed tomography and magnetic resonance imaging[J]. Comp Med, 2016, 66(4): 300-307.
[8] Jackson AR, Yuan TY, Huang CY, et al. Nutrient transport in human annulus fibrosus is affected by compressive strain and anisotropy[J]. Ann Biomed Eng, 2012, 40(12): 2551-2558.
[9] Wang Y, Videman T, Battie MC. ISSLS prize winner: Lumbar vertebral endplate lesions: associations with disc degeneration and back pain history[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2012, 37(17): 1490-1496.
[10] He X, Liang A, Gao W, et al. The relationship between concave angle of vertebral endplate and lumbar intervertebral disc degeneration[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2012, 37(17): 1068-1073.
[11] Sharma A, Parsons M, Pilgram T. Temporal interactions of degenerative changes in individual components of the lumbar intervertebral discs: a sequential magnetic resonance imaging study in patients less than 40 years of age[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(21): 1794-1800.
[12] Sweeney E, Roberts D, Lin A, et al. Defective endochondral ossification-derived matrix and bone cells alter the lymphopoietic niche in collagen X mouse models[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(19): 2581-2595.
[13] 周栩, 权正学. 骨形态发生蛋白在椎间盘退变修复中的作用机制研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(2): 161-163.
ZHOU X, QUAN ZX. Progress mechanism of bone morphogenetic protein in the treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Chong Qing Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2015, 40(2): 161-163. Chinese.
[14] Gu W, Zhu Q, Gao X, et al. Simulation of the progression of intervertebral disc degeneration due to decreased nutrition supply[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2014, 39(24): 1411-1417.
[15] Vo NV, Hartman RA, Patil PR, et al. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs[J]. J Orthop Res, 2016, 34(8): 1289-1306.
[16] 马山, 孙金杰, 王欣, 等. 杜仲乙醇提取物对脑老化模型小鼠血中氧化应激指标的影响[J]. 国际药理学研究杂志, 2016, 43(5): 922-925.

- MA S, SUN JJ, WANG X. Effects of ethanol extracts from eucommia ulmoides oliv on blood oxidative stress in brain aging model mice[J]. *Guo Ji Yao Xue Yan Jiu Za Zhi*, 2016, 43(5): 922-925. Chinese.
- [17] 蔡险峰, 徐贤柱, 郁晖晖, 等. 杜仲叶活性部位 I 调控骨代谢平衡作用研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14(7): 498-501.
CAI XF, XU XZ, YU HH, et al. Study on the regulation of bone metabolism by active part I of *Eucommia ulmoides* leaves[J]. *Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi*, 2008, 14(7): 498-501. Chinese.
- [18] 辛晓明, 王大伟, 赵娟, 等. 杜仲总多糖抗肿瘤作用的实验研究[J]. *医药导报*, 2009, 28(6): 719-721.
XIN XM, WANG DW, ZHAO J, et al. Experimental study on antitumor effect of total polysaccharide of eucommia ulmoides[J]. *Medical Herald*, 2009, 28(6): 719-721. Chinese.
- [19] Park KS, Chang IM. Anti-inflammatory activity of aucubin by inhibition of tumor necrosis factor- α production in RAW 264.7 cells[J]. *Planta Med*, 2004, 70(8): 778-779.
- [20] Kim HY, Kim JK, Choi JH, et al. Hepatoprotective effect of pinorensinol on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice[J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 112: 105-112.
- [21] 康桢, 吴卫华, 欧阳冬生. 桃叶珊瑚苷及其苷元药理学研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(24): 2585-2587.
KANG Z, WU WH, OUYANG DS. Advances in pharmacological studies of aucubin and its aglycones[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2007, 32(24): 2585-2587. Chinese.
- [22] Liu E, Han L, Wang J, et al. *Eucommia ulmoides* bark protects against renal injury in cadmium-challenged rats[J]. *J Med Food*, 2012, 15(3): 307-314.
- [23] 丁庆余, 宋恩峰, 贾汝汉. 杜仲对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2010, 11(2): 109-112.
DING QY, SONG EF, JIA NH. Effect of *Eucommia ulmoides* on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction[J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Shen Bing Za Zhi*, 2010, 11(2): 109-112. Chinese.
- [24] 杨柳, 颜美玲, 吴丽红, 等. 牛膝各拆分组分的抗炎活性研究[J]. *中医药信息*, 2016, 33(6): 8-11.
YANG L, YAN ML, WU LH, et al. Study on anti-inflammatory activity of the components of *Achyranthes bidentata*[J]. *Zhong Yi Yao* Xin Xi, 2016, 33(6): 8-11. Chinese.
- [25] 陈达, 廖州伟, 马笃军, 等. 牛膝醇提物对兔骨关节炎模型的疗效比较[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(25): 21-24.
CHEN D, LIAO ZW, MA DJ, et al. *Achyranthes bidentata* extract on rabbit osteoarthritis model comparison[J]. *Zhongguo Yi Yao Dao Bao*, 2016, 13(25): 21-24. Chinese.
- [26] 汪蓉, 沈晨, 吴虹, 等. 牛膝不同提取部位抗炎镇痛及抗迟发型超敏反应的作用[J]. *安徽中医药大学学报*, 2016, 35(3): 71-75.
WANG R, SHEN C, WU H, et al. Effects of anti-inflammatory analgesic and anti-delayed hypersensitivity of *Achyranthes bidentata* extract[J]. *An Hui Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao*, 2016, 35(3): 71-75. Chinese.
- [27] 杨柳, 张颖, 刘季, 等. 牛膝补肾壮骨有效部位抗炎、镇痛作用研究[J]. *中医药学报*, 2015, 43(6): 25-28.
YANG L, ZHANG Y, LIU J, et al. *Achyranthes Bushen Zhuanggu* effective part of anti-inflammatory, analgesic effect[J]. *Zhong Yi Yao Xue Bao*, 2015, 43(6): 25-28. Chinese.
- [28] 陈莹, 吴玥, 宋金春. 补骨脂化学成分及生物活性研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2016, 19(9): 1184-1188.
CHEN Y, WU Y, SONG JC. Progress in studies on chemical constituents and biological activities of *psoralea corylifolia*[J]. *Shi Yong Yao Wu Yu Lin Chuang*, 2016, 19(9): 1184-1188. Chinese.
- [29] 汪庆飞, 高家荣. 补骨脂的药理作用研究进展[J]. *中国妇幼健康研究*, 2016, 27(1): 256-257.
WANG QF, GAO JR. Progress of the pharmacological effects of psoralen[J]. *Zhongguo Fu You Jian Kang Yan Jiu*, 2016, 27(1): 256-257. Chinese.
- [30] 李筱筱, 武雪玲, 贾世亮, 等. 丹参酮 II A 药理作用的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2016, 6(33): 91-94.
LI XX, WU XL, JIA SL, et al. Progress of pharmacological effects of tanshinone II A[J]. *Sheng Wu Xue Za Zhi*, 2016, 6(33): 91-94. Chinese.
- [31] 蔡琳, 彭鹏, 郭甜. 丹参药理作用及临床研究进展[J]. *山东化工*, 2016, 45(17): 51-52.
CAI L, PENG P, GUO T. Progress and clinical research progress of *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Shan Dong Hua Gong*, 2016, 45(17): 51-52. Chinese.

(收稿日期: 2017-03-30 本文编辑: 李宜)