

吴门枳壳甘草汤调控HIF-1 α /VEGF/Ang信号轴抑制退变椎间盘病理性血管新生的机制研究^Δ

黄泽灵^{1*}, 朱在师¹, 李宇卫^{1,2}, 徐波¹, 陈俊名¹, 张宝飞^{1,3}, 陆斌杰¹, 蔡学峰¹, 陈华^{1,2#} (1. 南京中医药大学附属苏州市中医医院骨伤科, 江苏苏州 215009; 2. 苏州市吴门医派研究院骨伤研究所, 江苏苏州 215009; 3. 曲阜市中医院骨伤科, 山东曲阜 273100)

中图分类号 R285;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)07-0807-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.07.07



摘要 **目的** 探讨枳壳甘草汤对退变椎间盘病理性血管新生的影响及机制。**方法** 动物实验设置假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)抑制剂(YC-1)组[2 mg/(kg·d), 尾静脉注射]和枳壳甘草汤低、中、高剂量组[3.06、6.12、12.24 g/(kg·d), 灌胃], 每组8只。除假手术组外, 其余各组均构建椎间盘退变大鼠模型。造模成功后, 每天给药1次, 连续3周。末次给药后, 观察大鼠椎间盘组织病理改变及血管新生情况, 检测大鼠椎间盘组织中炎症因子[白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)]水平以及血管生成相关蛋白[HIF-1 α 、血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF受体2(VEGFR2)、血管紧张素1(Ang 1)、Ang 2]表达水平。细胞实验中, 提取并培养大鼠原代髓核细胞, 以50 ng/mL TNF- α 诱导细胞退变。设置空白对照组(10%空白对照血清)、TNF- α 组(10%空白对照血清)、YC-1组(10%空白对照血清+0.2 mmol/L YC-1)和5%、10%、15%含药血清组(5%、10%、15%含药血清), 干预24 h后, 将髓核细胞与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)共培养。检测髓核细胞中II型胶原蛋白(Collagen II)、基质金属蛋白酶3(MMP-3)表达, 检测HUVEC增殖、迁移、成管能力, 检测HUVEC中HIF-1 α /VEGF/Ang信号轴及血管生成相关蛋白(在动物实验基础上新增MMP-2、MMP-9)表达水平。**结果** 动物实验结果显示, 与模型组比较, 各药物组大鼠椎间盘组织中CD31阳性表达减少($P<0.05$), 炎症因子及血管生成相关蛋白表达均显著下调($P<0.05$), 椎间盘病理改变减轻。细胞实验结果显示, 与TNF- α 组比较, 各药物组髓核细胞中Collagen II表达均显著上调、MMP-3表达均显著下调($P<0.05$), HUVEC增殖、迁移及成管能力显著减弱($P<0.05$), HUVEC中HIF-1 α 、VEGF、Ang 2 mRNA及蛋白和血管生成相关蛋白(除5%含药血清组的Ang 2 mRNA及HIF-1 α 、VEGFR2、Ang 2蛋白)表达均显著下调($P<0.05$)。**结论** 枳壳甘草汤可能通过抑制HIF-1 α /VEGF/Ang信号轴, 减弱血管内皮细胞的血管生成能力, 改善椎间盘病理性血管新生, 延缓椎间盘退变。

关键词 枳壳甘草汤; 椎间盘退变; 病理性血管新生; HIF-1 α /VEGF/Ang信号轴; 髓核细胞退变; 炎症因子

Mechanism of Wumen Zhiqiao gancao decoction inhibiting pathological angiogenesis in degenerative intervertebral discs by regulating HIF-1 α /VEGF/Ang signal axis

HUANG Zeling¹, ZHU Zaishi¹, LI Yuwei^{1,2}, XU Bo¹, CHEN Junming¹, ZHANG Baofei^{1,3}, LU Binjie¹, CAI Xuefeng¹, CHEN Hua^{1,2} (1. Dept. of Orthopedics and Traumatology, Suzhou Hospital of TCM Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Suzhou 215009, China; 2. Orthopaedic Traumatology Institute, Suzhou Academy of Wumen Chinese Medicine, Jiangsu Suzhou 215009, China; 3. Dept. of Orthopedics and Traumatology, Qufu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong Qufu 273100, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effect and mechanism of Zhiqiao gancao decoction (ZQGCD) on pathological angiogenesis of degenerative intervertebral disc. **METHODS** The rats were randomly divided into sham operation group (normal saline), model group (normal saline), hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) inhibitor (YC-1) group [2 mg/(kg·d), tail vein injection], and ZQGCD low-dose, medium-dose and high-dose groups [3.06, 6.12, 12.24 g/(kg·d)], with 8 rats in each group. Except for sham operation group, lumbar disc degeneration model of rat was constructed in all other groups. After modeling, they

were given relevant medicine once a day, for consecutive 3 weeks. After the last medication, pathological changes and angiogenesis of the intervertebral disc tissue in rats were observed; the levels of inflammatory factors [interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α)] and the expressions of angiogenesis-related proteins [HIF-1 α , vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor 2 (VEGFR2), angiotensin 1 (Ang 1), Ang 2] in the intervertebral disc tissue in rats were all determined. In cell

Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82174399); 苏州市科技发展计划项目(No.SKYD2023150, No.SYWD2024148); 江苏省研究生实践创新计划项目(No.SJCX24_1023); 第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目(No.国中医药人教函[2022]76号)

* **第一作者** 博士研究生。研究方向: 中西医结合治疗骨伤科疾病的临床与基础研究。E-mail: 1127062302@qq.com

通信作者 副主任中医师, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 中西医结合治疗骨伤科疾病的临床与基础研究。E-mail: chen20168@sina.com

experiment, the primary nucleus pulposus cells were isolated and cultured from rats, and cellular degeneration was induced using 50 ng/mL TNF- α . The cells were divided into blank control group (10% blank control serum), TNF- α group (10% blank control serum), YC-1 group (10% blank control serum+0.2 mmol/L YC-1), and 5%, 10%, 15% drug-containing serum group (5%, 10%, 15% drug-containing serum). After 24 hours of intervention, the nucleus pulposus cells were co-cultured with HUVEC. The expressions of Collagen II, matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in nucleus pulposus cells were detected. HUVEC proliferation, migration and tube forming ability were detected, and the expression levels of the HIF-1 α /VEGF/Ang signal axis and angiogenesis-related proteins (add MMP-2, MMP-9) in HUVEC were detected. **RESULTS** Animal experiments had shown that compared with model group, the positive expression of CD31 in the intervertebral disc tissues of rats in each drug group was down-regulated ($P<0.05$), the levels of inflammatory factors and angiogenesis-related proteins were decreased significantly ($P<0.05$), and the pathological changes in the intervertebral disc were alleviated. Cell experiments had shown that compared with TNF- α group, the expression of Collagen II in nucleus pulposus cells of all drug groups was significantly up-regulated ($P<0.05$), and the expression of MMP-3 was significantly down-regulated ($P<0.05$); the proliferation, migration and tubulogenesis of HUVEC were significantly weakened ($P<0.05$). The mRNA and protein expressions of HIF-1 α , VEGF, Ang 2 as well as the expression of angiogenesis-related proteins (except for the expression of Ang 2 mRNA and HIF-1 α , VEGFR2, Ang 2 protein in 5% drug-containing serum group) were significantly down-regulated ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** ZQGCD may inhibit the HIF-1 α /VEGF/Ang signal axis to weaken the angiogenic ability of vascular endothelial cells, improve pathological angiogenesis in the intervertebral disc, and delay the degeneration of the intervertebral disc.

KEYWORDS Zhiqiao gancao decoction; intervertebral disc degeneration; pathological angiogenesis; HIF-1 α /VEGF/Ang signal axis; degeneration of nucleus pulposus cells; inflammatory factors

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是指受年龄增长、肥胖、负重等不良因素影响,髓核组织水分减少,椎间盘失去弹性和张力,纤维环结构破坏、髓核组织结构发生异常改变^[1]。IDD是纤维环撕裂、脊柱不稳、小关节退变、椎间盘突出、椎管狭窄和慢性腰痛等脊柱疾病的基础,延缓IDD具有重要临床意义^[1]。正常成年人的椎间盘仅外层的纤维环长有小毛细血管,而在IDD过程中,血管由纤维环外层沿着裂隙向终板和纤维环内层长入,为免疫细胞提供了迁移通道;此外,巨噬细胞等免疫细胞通过新生的血管浸润到退变椎间盘之后,通过释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等促炎因子,启动下游免疫炎症反应,形成炎症微环境,加速疾病进程^[2]。因此,病理性血管新生被认为是IDD的重要标志之一。研究发现,由缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管紧张素(angiotensin, Ang)构成的信号轴在血管生成过程中起着重要作用^[3]。

枳壳甘草汤是苏州市中医医院骨伤科治疗腰椎退变疾病的常用经验方,该方由全国名老中医药专家龚正丰教授创立,具有逐瘀利水、通络止痛的功效。临床研究显示,该方单独使用或与腰椎牵引、椎间孔镜等疗法联用,均可有效缓解腰椎间盘突出及腰椎退变患者的疼痛症状、改善腰椎功能^[4-5]。前期研究显示,枳壳甘草汤可有效减少IDD模型大鼠椎间盘巨噬细胞浸润,抑制IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等炎症因子及单核细胞趋化蛋白1表达,延缓IDD进程^[6-7]。本研究在前期研究基础上,基于病理性血管新生与巨噬细胞浸润的联系,通过观察枳

壳甘草汤对退变椎间盘病理性血管新生及HIF-1 α /VEGF/Ang信号轴的影响,进一步探讨枳壳甘草汤治疗IDD的效应机制。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括ELx800型光吸收酶标仪(美国Bio-Tek公司)、Tanon 5200型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)、Heraeus Fresco17型离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司)、BSA124S-CW型电子天平(德国Sartorius公司)、DMI3000B型荧光显微镜(德国Leica公司)等。

1.2 主要药品与试剂

枳壳、黑丑、白丑饮片(批号分别为230307010、220906006、211227006,苏州天灵中药饮片有限公司)以及当归、三棱、莪术、甘草饮片(批号分别为230411、221021、221025、230207,苏州春晖堂有限公司)和丹参饮片(批号20230203-C5,贵州同德药业股份有限公司)均由苏州市中医医院药剂科采购并鉴定为真品。

HIF-1 α 抑制剂Lifiquat(YC-1,批号S7958,纯度99.94%)购自美国Selleck公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号分别为C0105S、P0010)均购自上海碧云天生物技术有限公司;IL-1 β 、IL-6、TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为LA167616H、LA160102H、LA166601H)均购自南京拉普达生物科技有限公司;兔源CD31、基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、II型胶原蛋白(Collagen II)、HIF-1 α 、MMP-2、MMP-9、Ang 1、Ang 2、VEGF、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗

体以及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗、Alexa Fluor488标记的羊抗兔二抗、Alexa Fluor594标记的羊抗兔二抗(批号分别为11265-1-AP、17873-1-AP、28459-1-AP、20960-1-AP、10373-2-AP、27306-1-AP、27093-1-AP、24613-1-AP、SA00001-2、19003-1-AP、81640-5-RR、SA00013-2、SA00013-4)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔源血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)多克隆抗体(批号AF6281)购自美国Affinity公司。

1.3 动物与细胞

本研究所用动物为健康清洁级雄性SD大鼠,共74只(68只大鼠的体重为220~250 g,用于动物实验及含药血清制备;6只大鼠的体重为140~160 g,用于髓核细胞原代提取),所有大鼠均购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2021-0011。饲养条件:规律进食,自由饮水,室温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%~70%,光暗周期(12 h/12 h)。所有动物实验均获得苏州市中医医院医学伦理委员会批准同意(批号为2021伦动批051)。

人脐静脉内皮细胞(HUVEC;产品编号:DFSC-EC-01)购于上海中乔新舟生物科技有限公司。

2 方法

2.1 药物制备

枳壳甘草汤由枳壳10 g、当归10 g、丹参10 g、三棱10 g、莪术10 g、黑丑6 g、白丑6 g和甘草6 g组成。全方加入500 mL冷水浸泡30 min,煮沸后文火煎至200 mL;药渣加入300 mL水,再次煎至200 mL;将2次药液混合后,用旋转蒸发器将其浓缩成质量浓度为1 g/mL(以生药量计,下同)的药液^[7]。精确称取3 mg YC-1,加入197.14 μL 二甲基亚砜配制成浓度为50 mmol/L的YC-1溶液。

2.2 动物实验

2.2.1 动物造模、分组与给药

将48只大鼠随机分为假手术组(8只)和造模组(40只)。造模组大鼠参考文献[8]方法构建IDD模型:大鼠以3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)腹腔注射麻醉后,用乙醇对尾部Co6/7/8节段进行消毒,用29G针头避开动静脉穿刺尾椎间盘,向椎间盘中心穿刺5 mm,刺入后针头旋转360 $^{\circ}$ 并留置10 s,消毒并标记穿刺位置,并以输液贴保护。假手术组大鼠采用21G针头在相同节段穿刺皮肤和肌肉(深度约为2 mm),不损伤椎间盘。造模后大鼠自由活动,1周后,若大鼠尾椎X线检查显示椎间盘高度下降,则证明造模成功^[9]。将造模成功的40只大鼠随机分为模型组、HIF-1 α 抑制剂组和枳壳甘草汤低、中、高剂量组,每组8只。HIF-1 α 抑制剂组大鼠尾静脉注射YC-1溶液[2 mg/(kg \cdot d)]^[10];枳壳甘草汤低、中、高剂量组大鼠

分别灌胃3.06、6.12、12.24 g/(kg \cdot d)枳壳甘草汤^[7],分别为临床等效剂量的0.5、1、2倍;假手术组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水。各组大鼠的灌胃体积均为12.24 mL/kg,每天给药1次,连续3周。

2.2.2 样本采集

末次给药1 h后,使用3%戊巴比妥钠麻醉并处死大鼠,然后快速离断大鼠Co5-9节段尾椎,一部分置于4%多聚甲醛中固定,用于病理染色;一部分在冰上分离提取Co6/7/8椎间盘组织,并置于一80 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中保存,用于相关指标检测(每组随机选择6只大鼠,进行各指标检测)。

2.2.3 椎间盘组织中炎症因子水平检测

称取“2.2.2”项下冻存的椎间盘组织100 mg,加入100 μL 磷酸盐缓冲液(PBS),置于冷冻研磨仪中研磨后,离心,吸取上清液。按ELISA试剂盒说明书操作步骤检测上清液中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

2.2.4 椎间盘组织病理变化观察

取“2.2.2”项下4%多聚甲醛固定后的椎间盘组织,常规进行脱钙、梯度脱水、石蜡包埋后,制成5 μm 切片。取部分切片行常规HE染色,显微镜下观察椎间盘组织病理改变情况并拍照。

2.2.5 椎间盘组织病理性血管生成检测

取“2.2.4”项下各组大鼠部分椎间盘组织切片,梯度复水后,进行抗原修复、5%脱脂奶粉室温孵育封闭;加入血管生成标志物CD31一抗(稀释比例1:200),室温孵育2 h;加入Alexa Fluor594标记的羊抗兔二抗(稀释比例1:1 000),室温孵育2 h;常规DAPI复染、封片,荧光显微镜下观察并拍照,阳性表达呈红色荧光。使用Image J软件统计阳性表达面积比(阳性表达面积比=阳性表达面积/总面积 \times 100%)。

2.2.6 椎间盘组织中血管生成相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。称取“2.2.2”项下冻存的椎间盘组织100 mg,加入200 μL RIPA裂解液,置于冷冻研磨仪中研磨后,以12 000 r/min离心20 min,吸取上清液,采用BCA法测定总蛋白浓度,加入loading buffer后加热使蛋白变性。取变性蛋白上样后,以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压150 V,电泳时间50 min)分离,将印迹转移(电流400 mA,转膜时间35 min)至PVDF膜,以5%脱脂奶粉封闭1 h;加入GAPDH、HIF-1 α 、VEGF、VEGFR2、Ang 1、Ang 2一抗(稀释比例分别为1:5 000、1:2 000、1:2 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000),在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;次日洗膜后加入对应HRP标记的羊抗兔二抗(稀释比例1:10 000),在室温下孵育1 h。利用化学发光成像系统进行显影,使用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参(GAPDH)蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.3 细胞实验

2.3.1 枳壳甘草汤含药血清制备

取SD大鼠20只,随机分为空白对照血清组和枳壳甘草汤含药血清组,各10只。枳壳甘草汤含药血清组按临床等效剂量灌胃6.12 g/(kg·d)枳壳甘草汤,空白对照血清组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续7 d。末次灌胃1 h后,以3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉采血,离心分离血清,56℃恒温水浴灭活30 min,微孔滤膜过滤除菌,分别得到空白对照血清和含药血清,-80℃保存备用。

2.3.2 大鼠原代髓核细胞提取与培养

取6只SD大鼠(体重140~160 g),以3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后脱颈处死,乙醇浸泡消毒2 min。切下尾部后剥离尾部皮肤,浸泡于乙醇中,转移至超净台。在超净台中切开大鼠椎间盘,以刮匙取出髓核,剪成大小约1 mm³的碎块,用0.2%的Ⅱ型胶原酶37℃消化2 h,细胞筛网过滤组织残渣,离心后弃上清。用含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM/F12细胞培养基重悬细胞,然后置于培养箱中常规培养。

2.3.3 髓核细胞分组干预后与HUVEC共培养

将第2代髓核细胞按5×10⁵个/孔接种于6孔板中,随机分成空白对照组、TNF-α组、YC-1组和5%、10%、15%含药血清组。除空白对照组外,其余各组均采用50 ng/mL TNF-α诱导髓核细胞退变模型^[1];同时,空白对照组、TNF-α组加入10%空白对照血清;YC-1组加入10%空白对照血清+0.2 mmol/L YC-1;5%、10%、15%含药血清组分别加入5%、10%、15%含药血清^[7]。干预24 h后,与提前接种于Transwell小室上室中的HUVEC(2×10⁴个/孔)在37℃培养箱中共培养24 h。

2.3.4 共培养后髓核细胞中Collagen II和MMP-3蛋白表达检测

按“2.3.3”项下分组操作,每组设置6个复孔。完成共培养后的髓核细胞加入4%多聚甲醛固定20 min,加入50 μL 1%破膜剂破膜20 min,再加入5%牛血清白蛋白室温孵育30 min;加入Collagen II和MMP-3一抗(稀释比例均为1:200),4℃孵育过夜;次日加入Alexa Fluor488标记的羊抗兔二抗和Alexa Fluor594标记的羊抗兔二抗(稀释比例均为1:1 000),室温孵育30 min;滴加含DAPI的抗荧光淬灭封片剂,置于荧光显微镜下拍照。使用Image J软件计算蛋白阳性表达面积比,Collagen II蛋白阳性表达呈绿色,MMP-3蛋白阳性表达呈红色。阳性表达面积比=阳性表达面积/总面积×100%。

2.3.5 共培养后HUVEC增殖活性检测

将HUVEC均匀接种于96孔板中(5×10³个/孔),每组设置6个复孔,并设置空白孔。常规培养24 h后,加入按“2.3.3”项下分组干预后的髓核细胞上清液继续培养24 h,采用CCK-8法经酶标仪在450 nm波长处检测各孔

吸光度,并计算细胞增殖率。细胞增殖率(%)=(实验组吸光度-空白孔吸光度)/(空白对照组吸光度-空白孔吸光度)×100%。

2.3.6 共培养后HUVEC迁移能力检测

按“2.3.3”项下分组操作,每组设置6个复孔。完成共培养后取出Transwell小室,用PBS冲洗3次后用4%多聚甲醛固定20 min;PBS冲洗2次,用0.1%结晶紫染液染色20 min,再次用PBS冲洗掉多余的染料;用棉签轻轻擦拭掉上室膜上未穿透的细胞,将小室膜取下,放在载玻片上,用中性树胶封片。在显微镜下观察并计数下室膜上的细胞数量,每组随机选取6个视野进行计数。

2.3.7 共培养后HUVEC成管能力检测

将DMEM/F12培养基和预冷的Matrigel基质胶按体积比2:1混合后配制实验用胶,并按300 μL/孔加入24孔板中,置于培养箱中固化。按“2.3.3”项下分组操作,每组设置6个复孔,完成共培养后收集HUVEC。采用无血清培养基进行重悬,向铺好基质胶的24孔板中加入细胞悬液(2×10⁴个/孔),37℃培养箱中培养4 h后,观察血管形成情况,并拍照。采用Image J软件分析成管情况,统计血管分支数量、总长度、总分支长度。

2.3.8 共培养后HUVEC中HIF-1α、VEGF、Ang 2 mRNA的表达检测

按“2.3.3”项下分组操作,每组设置6个复孔。完成共培养后收集HUVEC,提取细胞中总RNA,测定RNA浓度及纯度。合成cDNA后进行扩增实验,PCR反应体系(20 μL)为:PCR试剂10 μL,正、反向引物各0.4 μL,cDNA模板2 μL,dd H₂O 7.2 μL。扩增条件为:95℃预变性30 s;95℃变性10 s,60℃延伸/退火30 s,循环40次。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算细胞中HIF-1α、VEGF、Ang 2 mRNA表达情况。引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,引物序列及扩增产物大小见表1。

表1 引物序列及扩增产物大小

基因	引物序列(5'→3')	扩增产物大小/bp
HIF-1α	正向:CTAACTAGCCGAGGAAGAAGAACTATGAAC	107
	反向:CACTGAGGTTGGTTACTGTTGGTATC	
VEGF	正向:GGAGGAGGAAGAAGAGAAGGAAGAG	114
	反向:GCGGCTGGAGCACTGTCTG	
Ang 2	正向:TCGGAAGAGCATGGACAGCATAG	107
	反向:TGGAGGAAGAGCGGCAGTTG	
GAPDH	正向:GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC	157
	反向:GCTGATGATCTTGAGCGTTGTGC	

2.3.9 共培养后HUVEC中HIF-1α/VEGF/Ang信号轴及血管生成相关蛋白表达检测

按“2.3.3”项下分组操作,每组设置6个复孔。完成共培养后收集HUVEC,采用Western blot法检测细胞中相关蛋白表达情况,具体方法同“2.2.6”项下。其中,MMP-2、MMP-9一抗的稀释比例均为1:1 000,对应HRP标记的羊抗兔二抗的稀释比例为1:10 000。

2.4 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行数据统计分析。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 动物实验结果

3.1.1 大鼠椎间盘组织中炎症因子水平检测结果

与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘组织中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,各药物组大鼠椎间盘组织中上述炎症因子水平均显著降低($P<0.05$)。与HIF-1 α 抑制剂组比较,枳壳甘草汤高剂量组大鼠椎间盘组织中TNF- α 水平进一步降低($P<0.05$),IL-1 β 、IL-6水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠椎间盘组织中炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$, pg/mL)

组别	IL-1 β	TNF- α	IL-6
假手术组	122.06 \pm 16.20	336.95 \pm 31.68	79.15 \pm 21.34
模型组	699.56 \pm 58.25 ^a	957.47 \pm 81.79 ^a	385.94 \pm 32.83 ^a
HIF-1 α 抑制剂组	352.13 \pm 30.45 ^b	553.71 \pm 29.01 ^b	165.02 \pm 13.72 ^b
枳壳甘草汤低剂量组	585.95 \pm 28.25 ^{bc}	820.95 \pm 59.46 ^{bc}	322.93 \pm 44.63 ^{bc}
枳壳甘草汤中剂量组	470.18 \pm 30.30 ^{bc}	608.20 \pm 76.46 ^b	265.93 \pm 18.60 ^{bc}
枳壳甘草汤高剂量组	316.71 \pm 30.49 ^b	453.98 \pm 29.83 ^{bc}	162.53 \pm 22.27 ^b

a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与HIF-1 α 抑制剂组比较, $P<0.05$ 。

3.1.2 大鼠椎间盘组织病理改变观察结果

模型组大鼠髓核大量丢失,纤维环局部撕裂、排列紊乱;枳壳甘草汤低剂量组大鼠椎间盘组织中髓核皱缩超过1/3、结构紊乱,纤维环结构排列紊乱;各药物组大鼠椎间盘组织中髓核部分皱缩、结构尚完整,与纤维环界限清晰,纤维环结构和排列尚完整。结果见图1(全部图片可扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图1)。

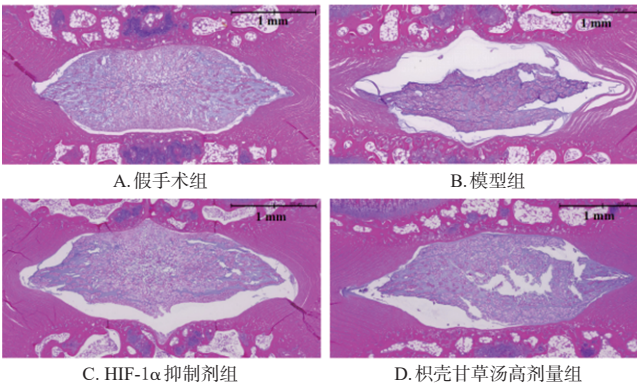
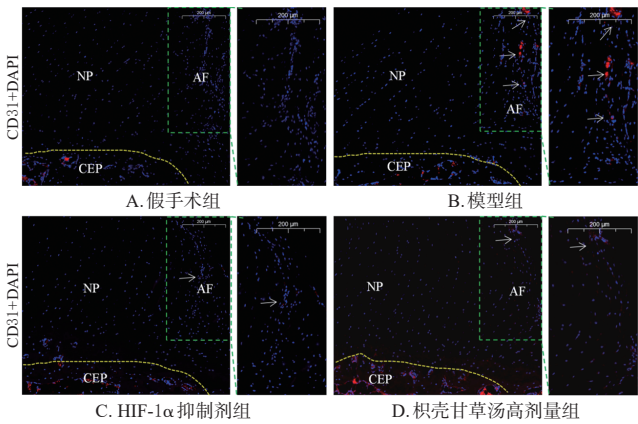


图1 各组大鼠椎间盘组织病理染色图(HE染色)

3.1.3 大鼠椎间盘组织病理性血管新生情况观察结果

与假手术组[(0.29 \pm 0.12)%]比较,模型组大鼠椎间盘组织中CD31阳性表达[(5.25 \pm 0.40)%]显著增多($P<0.05$)。与模型组比较,HIF-1 α 抑制剂组[(1.49 \pm

0.18)%]和枳壳甘草汤低、中、高剂量组大鼠椎间盘组织中CD31阳性表达[分别为(3.66 \pm 0.21)%、(2.28 \pm 0.18)%、(1.73 \pm 0.09)%]均显著减少($P<0.05$)。结果见图2(全部图片可扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图2)。

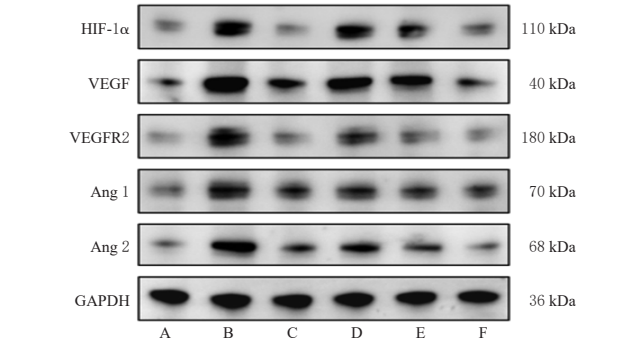


NP:髓核;AF:纤维环;CEP:软骨终板;→:阳性表达区域。

图2 各组大鼠椎间盘组织CD31免疫荧光染色图

3.1.4 大鼠椎间盘组织中血管生成相关蛋白表达检测结果

与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘组织中HIF-1 α 、VEGF、VEGFR2、Ang 1、Ang 2蛋白表达均显著上调($P<0.05$)。与模型组比较,各药物组大鼠椎间盘组织中上述蛋白表达均显著下调($P<0.05$)。与HIF-1 α 抑制剂组比较,枳壳甘草汤高剂量组大鼠椎间盘组织中VEGF、Ang 2蛋白表达进一步下调($P<0.05$),VEGFR2、Ang 1蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见图3、表3。



A:假手术组;B:模型组;C:HIF-1 α 抑制剂组;D:枳壳甘草汤低剂量组;E:枳壳甘草汤中剂量组;F:枳壳甘草汤高剂量组。

图3 各组大鼠椎间盘中血管生成相关蛋白表达的电泳图

3.2 细胞实验结果

3.2.1 共培养后髓核细胞中Collagen II和MMP-3蛋白表达检测结果

与空白对照组比较,TNF- α 组髓核细胞中Collagen II蛋白表达显著下调($P<0.05$),MMP-3蛋白表达显著上调($P<0.05$)。与TNF- α 组比较,各药物组髓核细胞中Collagen II蛋白表达均显著上调($P<0.05$),MMP-3

表3 各组大鼠椎间盘组织中血管生成相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	HIF-1 α / GAPDH	VEGF/ GAPDH	VEGFR2/ GAPDH	Ang 1/ GAPDH	Ang 2/ GAPDH
假手术组	0.25 \pm 0.02	0.32 \pm 0.03	0.18 \pm 0.02	0.24 \pm 0.03	0.25 \pm 0.04
模型组	0.82 \pm 0.04 ^a	1.20 \pm 0.10 ^a	0.86 \pm 0.06 ^a	0.82 \pm 0.04 ^a	1.11 \pm 0.10 ^a
HIF-1 α 抑制剂组	0.19 \pm 0.02 ^b	0.53 \pm 0.05 ^b	0.27 \pm 0.02 ^b	0.40 \pm 0.02 ^b	0.47 \pm 0.03 ^b
枳壳甘草汤低剂量组	0.73 \pm 0.02 ^{bc}	1.03 \pm 0.01 ^{bc}	0.65 \pm 0.04 ^{bc}	0.46 \pm 0.04 ^b	0.68 \pm 0.04 ^{bc}
枳壳甘草汤中剂量组	0.51 \pm 0.04 ^{bc}	0.92 \pm 0.04 ^{bc}	0.39 \pm 0.03 ^{bc}	0.41 \pm 0.05 ^b	0.50 \pm 0.04 ^b
枳壳甘草汤高剂量组	0.35 \pm 0.02 ^c	0.39 \pm 0.04 ^{bc}	0.28 \pm 0.03 ^b	0.41 \pm 0.03 ^b	0.28 \pm 0.02 ^{bc}

a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与HIF-1 α 抑制剂组比较, $P<0.05$ 。

蛋白表达均显著下调($P<0.05$)。与YC-1组比较,15%含药血清组髓核细胞中Collagen II蛋白表达进一步上调($P<0.05$),10%含药血清组髓核细胞中Collagen II蛋白表达和15%含药血清组髓核细胞中MMP-3蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表4[可扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看免疫荧光染色图(附图3)]。

表4 各组髓核细胞中Collagen II、MMP-3蛋白阳性表达面积比较($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	Collagen II	MMP-3
空白对照组	24.68 \pm 1.27	1.05 \pm 0.29
TNF- α 组	5.59 \pm 1.18 ^a	16.98 \pm 1.49 ^a
YC-1组	15.92 \pm 0.81 ^b	2.06 \pm 0.49 ^b
5%含药血清组	9.48 \pm 0.76 ^{bc}	8.71 \pm 0.89 ^{bc}
10%含药血清组	14.04 \pm 0.67 ^b	5.72 \pm 0.69 ^{bc}
15%含药血清组	19.81 \pm 1.05 ^{bc}	3.52 \pm 0.57 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与TNF- α 组比较, $P<0.05$;c:与YC-1组比较, $P<0.05$ 。

3.2.2 共培养后 HUVEC 增殖、迁移和成管能力考察结果

与空白对照组比较,TNF- α 组细胞增殖率显著升高($P<0.05$),迁移细胞数量显著增多($P<0.05$),成管能力显著增强($P<0.05$)。与TNF- α 组比较,各药物组细胞增殖率及成管能力均显著降低/减弱($P<0.05$),迁移细

胞数量均显著减少($P<0.05$)。与YC-1组比较,15%含药血清组细胞增殖率、迁移细胞数量及成管能力差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见图4(全部图片可扫描本文首页二维码,进入“增强出版”页面查看附图4)、表5。

表5 各组 HUVEC 的增殖、迁移及成管能力相关指标比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	细胞增殖率/%	迁移细胞 数量/个	成管能力相关指标		
			分支数量	总长度	总分支长度
空白对照组	100.00 \pm 0.00	66.67 \pm 5.89	16.17 \pm 3.06	3 182.33 \pm 469.78	2 274.67 \pm 205.69
TNF- α 组	153.08 \pm 3.35 ^a	189.67 \pm 4.46 ^a	61.50 \pm 4.42 ^a	9 334.50 \pm 410.17 ^a	9 348.33 \pm 660.86 ^a
YC-1组	112.72 \pm 5.39 ^b	64.50 \pm 5.39 ^b	15.83 \pm 3.71 ^b	3 237.50 \pm 481.49 ^b	2 599.33 \pm 334.87 ^b
5%含药血清组	142.64 \pm 3.29 ^{bc}	164.67 \pm 8.87 ^{bc}	49.67 \pm 6.92 ^{bc}	8 054.83 \pm 525.78 ^{bc}	6 648.50 \pm 337.65 ^{bc}
10%含药血清组	131.42 \pm 2.33 ^{bc}	126.33 \pm 5.57 ^{bc}	34.17 \pm 3.87 ^{bc}	5 875.33 \pm 292.07 ^{bc}	3 097.00 \pm 292.59 ^b
15%含药血清组	115.09 \pm 4.06 ^b	69.67 \pm 7.20 ^b	21.00 \pm 2.83 ^b	3 307.00 \pm 290.23 ^b	2 789.83 \pm 289.10 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与TNF- α 组比较, $P<0.05$;c:与YC-1组比较, $P<0.05$ 。

3.2.3 共培养后 HUVEC 中 HIF-1 α 、VEGF、Ang 2 mRNA 表达检测结果

与空白对照组比较,TNF- α 组HUVEC中HIF-1 α 、VEGF、Ang 2 mRNA表达均显著上调($P<0.05$)。与TNF- α 组比较,各药物组HUVEC中上述mRNA(除5%含药血清组Ang 2 mRNA)表达均显著下调($P<0.05$)。与YC-1组比较,15%含药血清组HUVEC中上述mRNA表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表6。

表6 各组 HUVEC 中 HIF-1 α 、VEGF、Ang 2 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	HIF-1 α	VEGF	Ang 2
空白对照组	1.01 \pm 0.07	1.00 \pm 0.04	1.01 \pm 0.06
TNF- α 组	3.86 \pm 0.30 ^a	4.43 \pm 0.40 ^a	3.16 \pm 0.31 ^a
YC-1组	1.56 \pm 0.17 ^b	1.81 \pm 0.30 ^b	1.86 \pm 0.26 ^b
5%含药血清组	3.22 \pm 0.28 ^{bc}	3.03 \pm 0.31 ^{bc}	2.79 \pm 0.24 ^c
10%含药血清组	2.23 \pm 0.15 ^{bc}	2.44 \pm 0.14 ^{bc}	2.36 \pm 0.22 ^{bc}
15%含药血清组	1.91 \pm 0.18 ^b	2.16 \pm 0.23 ^b	2.08 \pm 0.15 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与TNF- α 组比较, $P<0.05$;c:与YC-1组比较, $P<0.05$ 。

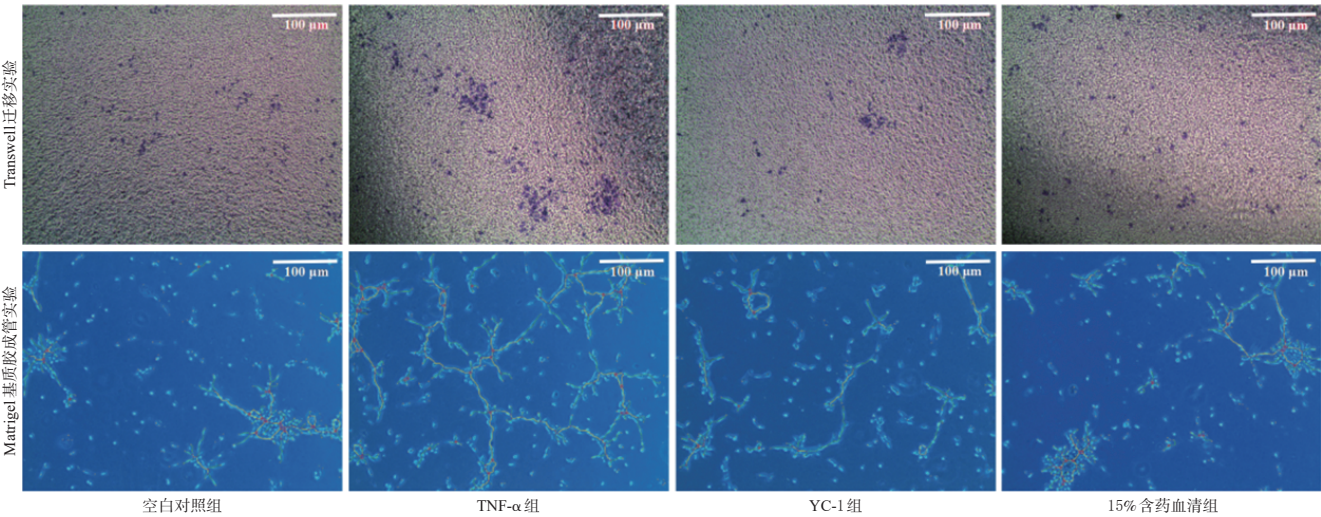
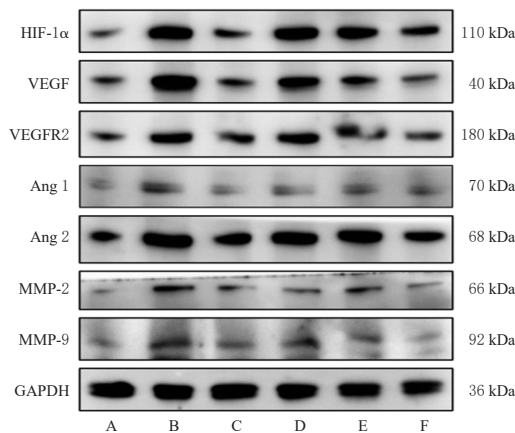


图4 各组细胞的Transwell迁移实验及Matrigel基质胶成管实验显微图

3.2.4 各组 HUVEC 中 HIF-1α/VEGF/Ang 信号轴及血管生成相关蛋白表达检测结果

与空白对照组比较, TNF-α 组 HUVEC 中 HIF-1α、VEGF、VEGFR2、Ang 1、Ang 2、MMP-2、MMP-9 蛋白表达均显著上调($P<0.05$)。与 TNF-α 组比较, 各药物组 HUVEC 中上述蛋白(除 5% 含药血清组 HIF-1α、VEGFR2、Ang 2 蛋白)表达均显著下调($P<0.05$)。与 YC-1 组比较, 15% 含药血清组 HUVEC 中 VEGFR2、MMP-9 蛋白表达进一步下调($P<0.05$), 15% 含药血清组 HUVEC 中 VEGF、Ang 2、MMP-2 及 5% 含药血清组 HUVEC 中 MMP-2 和 10% 含药血清组 HUVEC 中 MMP-9 蛋白表达差异均无统计学意义($P>0.05$), 结果见图 5、表 7。



A: 空白对照组; B: TNF-α 组; C: YC-1 组; D: 5% 含药血清组; E: 10% 含药血清组; F: 15% 含药血清组。

图5 各组 HUVEC 中 HIF-1α/VEGF/Ang 信号轴及血管生成相关蛋白表达的电泳图

表7 各组 HUVEC 中 HIF-1α/VEGF/Ang 信号轴及血管生成相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	HIF-1α /GAPDH	VEGF /GAPDH	VEGFR2 /GAPDH	Ang 1 /GAPDH	Ang 2 /GAPDH	MMP-2 /GAPDH	MMP-9 /GAPDH
空白对照组	0.22±0.02	0.32±0.02	0.40±0.02	0.18±0.02	0.48±0.03	0.13±0.03	0.17±0.02
TNF-α 组	1.17±0.04 ^a	1.16±0.06 ^a	0.92±0.05 ^a	0.50±0.03 ^a	1.27±0.07 ^a	0.48±0.03 ^a	0.62±0.04 ^a
YC-1 组	0.41±0.02 ^b	0.37±0.03 ^b	0.55±0.05 ^b	0.17±0.01 ^b	0.68±0.05 ^b	0.18±0.02 ^b	0.27±0.03 ^b
5% 含药血清组	1.10±0.08 ^c	0.87±0.04 ^c	0.92±0.72 ^{bc}	0.22±0.02 ^{bc}	1.22±0.07 ^c	0.22±0.03 ^b	0.46±0.03 ^{bc}
10% 含药血清组	0.97±0.04 ^{bc}	0.52±0.02 ^{bc}	0.72±0.03 ^{bc}	0.26±0.04 ^{bc}	1.11±0.05 ^{bc}	0.25±0.03 ^{bc}	0.30±0.04 ^b
15% 含药血清组	0.62±0.05 ^{bc}	0.39±0.04 ^b	0.48±0.02 ^{bc}	0.30±0.03 ^{bc}	0.70±0.03 ^b	0.17±0.02 ^b	0.18±0.02 ^{bc}

a: 与空白对照组比较, $P<0.05$; b: 与 TNF-α 组比较, $P<0.05$; c: 与 YC-1 组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

椎间盘由内部的髓核、外部的纤维环以及上下软骨终板组成。作为连结相邻椎体的纤维软骨样组织, 椎间盘在维持脊柱平衡、缓冲脊柱机械负荷等方面具有重要作用。正常椎间盘除了纤维环的外 1/3 有些许血管和神经末梢的浸润外, 内部无血管和神经生长, 营养供应主要依赖于椎体和软骨终板之间的液体交换^[1]。IDD 多由椎间盘内部合成代谢和分解代谢过程的不平衡而引起, 引发细胞外基质降解、纤维环破裂、病理性血管新生、氧化应激和炎症反应等一系列病理改变, 最终导致椎间盘

突出、椎间盘高度下降等^[1]。退变的椎间盘组织可分泌大量趋化因子, 诱使单核巨噬细胞通过新生血管从外周循环迁移至退变的椎间盘, 参与椎间盘的炎症反应^[2]。随着炎症反应的不断加剧, 椎间盘的炎症微环境逐渐形成, 纤维环细胞的凋亡和坏死增加, 胶原和蛋白多糖的合成减少, 进一步导致椎间盘基质的降解和退行性改变^[12]。同时, 炎症反应也可以促进血管内皮细胞的增殖和迁移, 促进病理性血管新生, 形成恶性循环^[13]。

现代医家将病理性血管新生归属于中医学“络病”范畴, 其认为西医血管相关疾病(如血管生成亢进的肿瘤、血管生成不足的心脑缺血性疾病等)的病理特征与中医“络脉亢进”“络脉虚滞”等理论相契合^[14-15]。龚正丰教授传承并发扬吴门医派“络病”理论, 将“络病”理论应用于椎间盘疾病的诊治中, 认为椎间盘髓核突出会破坏周围正常络脉的结构和功能, 同时椎间盘内部也会新生病理性络脉^[16]。龚教授治疗腰痛以通络止痛为原则, 拟方枳壳甘草汤, 方中枳壳破气、行痰, 三棱、莪术通经络、破瘀血, 黑丑、白丑消痰利水, 当归、丹参活血补血, 甘草和中缓急; 枳壳、三棱、莪术、黑丑、白丑皆为辛药, 取“辛药通络”之法。该方被收录于《国家级名医秘验方》, 临床应用广泛, 疗效颇佳^[4-5]。

髓核组织细胞外基质降解是 IDD 的主要病理特征之一, 其主要由 IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎症因子驱动。Collagen II 是细胞外基质的主要成分, 而细胞外基质降解与 MMP-3 的升高相关^[1]。本研究中模型大鼠椎间盘出现髓核组织细胞外基质降解、纤维环结构紊乱等病理改变, 椎间盘组织中炎症因子水平升高; 给予枳壳甘草汤后, 模型大鼠椎间盘组织中炎症因子水平降低, 椎间盘病理变化减轻, 髓核细胞中 Collagen II 表达增强, MMP-3 表达减弱, 表明枳壳甘草汤可通过抑制炎症因子表达及髓核组织细胞外基质降解延缓模型大鼠 IDD 进展。

研究表明, 退变的椎间盘组织中 HIF-1α、VEGF、Ang 2 等血管生成相关因子的表达均显著升高^[17-18]。在缺氧条件下, HIF-1α 的表达增加, 其通过与 HIF-1β 结合形成具有活性的 HIF-1 转录因子复合物, 识别并结合 DNA 上的缺氧反应元件, 从而启动一系列与血管生成相关的基因转录^[19]。VEGF 是血管生成过程中的主要驱动因子之一, 主要由 HIF-1α 调节产生, 可通过刺激血管内皮细胞的增殖、迁移和分化, 以及增加血管的通透性, 为新血管的形成提供基础; 此外, VEGF 可通过与血管内皮细胞上的受体(如 VEGFR1 和 VEGFR2)结合, 刺激内皮细胞中的怀布尔-帕拉德小体表达 Ang 2、MMP-2、MMP-9 等蛋白^[20]。在血管生成初期, Ang 2 的表达可以破坏血管内皮细胞与周围基质的连接, 使血管内皮细胞变得更具迁移性; 在血管生成后期, Ang 2 与 Ang 1 协同作用, 促进血管的稳定和成熟^[21]。MMP-2 和 MMP-9 通过降解

细胞外基质中的胶原蛋白、明胶和弹性蛋白等多种成分,从而在细胞迁移和组织重塑中发挥关键作用^[22]。本研究结果显示,模型大鼠椎间盘组织中血管明显增多,出现病理性血管新生,且 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR2、Ang 1、Ang 2 蛋白表达增加。而给予枳壳甘草汤后,其可抑制模型大鼠椎间盘病理性血管新生及 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR2、Ang 1、Ang 2 蛋白表达。

髓核细胞退变是 IDD 的早期表现。本研究将髓核细胞与 HUVEC 进行共培养,结果显示,退变髓核细胞能增强 HUVEC 增殖、迁移和成管能力,提高其 HIF-1 α /VEGF/Ang 信号轴及血管生成相关蛋白表达;经枳壳甘草汤含药血清干预后,髓核细胞退变减轻, HUVEC 增殖、迁移和成管能力减弱,细胞中 HIF-1 α /VEGF/Ang 信号轴及血管生成相关蛋白表达降低。这提示枳壳甘草汤能通过抑制髓核细胞退变及血管内皮细胞中 HIF-1 α /VEGF/Ang 信号轴表达,减弱血管内皮细胞增殖、迁移和成管能力,从而抑制病理性血管新生。

综上所述,枳壳甘草汤可以减弱血管内皮细胞的血管生成能力,改善椎间盘病理性血管新生,延缓 IDD,这可能与抑制 HIF-1 α /VEGF/Ang 信号轴有关。但本研究未与临床进行结合,日后将采用动态增强磁共振等技术观察枳壳甘草汤对患者椎间盘血管生成的影响,进一步阐明 IDD 机制及枳壳甘草汤的干预效果。

参考文献

- [1] KIRNAZ S, CAPADONA C, WONG T, et al. Fundamentals of intervertebral disc degeneration[J]. World Neurosurg, 2022, 157: 264-273.
- [2] LEE S, MILLECAMPS M, FOSTER D Z, et al. Long-term histological analysis of innervation and macrophage infiltration in a mouse model of intervertebral disc injury-induced low back pain[J]. J Orthop Res, 2020, 38 (6) : 1238-1247.
- [3] DUDLEY A C, GRIFFIOEN A W. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies[J]. Angiogenesis, 2023, 26(3): 313-347.
- [4] 仓挺松,陈阳,李宇卫. 枳壳甘草汤联合腰椎牵引改善腰椎间盘突出症疗效研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(13): 1981-1984.
- [5] 刘昱江,汪松林,蔡学峰,等. 基于 Pfirrmann 分级观察枳壳甘草汤治疗腰椎间盘突出症的临床疗效[J]. 浙江中医药大学学报, 2023, 47(6): 651-658.
- [6] 张擎天,黄泽灵,陈华,等. 枳壳甘草汤调控炎性小体改善腰椎间盘突出症痛敏的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2024, 32(1): 13-19.
- [7] HUANG Z L, LU B J, ZHANG X D, et al. Zhiqiao gancao decoction ameliorates hyperalgesia in lumbar disc herniation via the CCL2/CCR2 signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2023, 17: 2239-2257.
- [8] 陈飞,陆声,李娜,等. 椎间盘退变模型建立的研究进展

- [J]. 中国矫形外科杂志, 2022, 30(9): 821-825.
- [9] SU Q H, ZHANG Y, SHEN B, et al. Application of mo-lybdenum target X-ray photography in imaging analysis of caudal intervertebral disc degeneration in rats[J]. World J Clin Cases, 2020, 8(16): 3431-3439.
- [10] KONG L L, MA Y Z, WANG Z Y, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor 1 by YC-1 attenuates tissue plasminogen activator induced hemorrhagic transformation by suppressing HMGB1/TLR4/NF- κ B mediated neutrophil infiltration in thromboembolic stroke rats[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 94: 107507.
- [11] 王坤,李登宇,李文庆,等. miR-640 在腰椎间盘突出中的作用及相关机制研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2024, 34 (9): 950-959.
- [12] LI Z F, YANG H H, HAI Y, et al. Regulatory effect of inflammatory mediators in intervertebral disc degeneration[J]. Mediators Inflamm, 2023, 2023: 6210885.
- [13] 罗林钊,刘晏东,张彦军,等. 炎症细胞因子及其相关通路在椎间盘退变中的作用机制[J]. 中国细胞生物学学报, 2024, 46(10): 1842-1848.
- [14] 王一然,李晶. 从络病理论认识肿瘤新生血管[J]. 中医学报, 2023, 38(3): 525-529.
- [15] 王子健,郑为超. 基于络病和病络理论指导的血管生成的中医学认识[J]. 甘肃中医学院学报, 2012, 29 (2) : 11-13.
- [16] 张龙,沈晓峰,徐波,等. 吴门医派络病理论在骨伤科中的应用[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(8): 81-84.
- [17] AYDIN H E, YIGIT S, KAYA I, et al. VEGF and eNOS variants may influence intervertebral disc degeneration[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2022, 41 (10) : 982-993.
- [18] WANG K, LIU W, SONG Y, et al. The role of angiopoietin-2 in nucleus pulposus cells during human intervertebral disc degeneration[J]. Lab Invest, 2017, 97 (8) : 971-982.
- [19] SEROCKI M, BARTOSZEWSKA S, JANASZAK-JASIECKA A, et al. miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: a novel therapeutic target[J]. Angiogenesis, 2018, 21(2): 183-202.
- [20] SHAW P, DWIVEDI S K D, BHATTACHARYA R, et al. VEGF signaling: role in angiogenesis and beyond[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2024, 1879(2): 189079.
- [21] CHEN-LI G, MARTINEZ-ARCHER R, COGHI A, et al. Beyond VEGF: angiopoietin-Tie signaling pathway in diabetic retinopathy[J]. J Clin Med, 2024, 13(10): 2778.
- [22] RAO Q, YU H, LI R C, et al. Dihydroartemisinin inhibits angiogenesis in breast cancer via regulating VEGF and MMP-2/-9[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2024, 38 (1) : 113-125.

(收稿日期: 2024-12-10 修回日期: 2025-02-26)

(编辑: 林 静)