

· 论著 · 一次研究 ·

熏洗汤熏蒸对大鼠尾椎间盘退变模型中聚集蛋白聚糖与 II 型胶原表达的影响研究



熊 光¹, 董辰鹏², 杨国誉², 徐志强², 吴星火²

1. 麻城市人民医院骨科 (湖北黄冈 438399)

2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科 (武汉 430022)

【摘要】目的 探讨熏洗汤熏蒸对椎间盘退变模型中聚集蛋白聚糖 (AGG) 与 II 型胶原 (COL2A1) 表达的影响, 深入理解中药熏洗疗法在细胞和分子水平上的作用机制。**方法** 采用 Sprague-Dawley 大鼠构建椎间盘退变模型, 通过针刺法造成椎间盘损伤。将大鼠分为正常对照 (CON) 组、模型 (PUN) 组和熏蒸 (CHF) 组, CHF 组接受熏洗汤熏蒸治疗, 持续 4 周。影像学检测椎间盘相对高度, 使用 Masson 三色染色观察椎间盘结构变化; 免疫组化检测 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体的表达; 采用定量反转录聚合酶链式反应和蛋白质印迹法评估 AGG 和 COL2A1 基因和蛋白表达变化。**结果** 12 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 4 只。与 CON 组相比, PUN 组椎间盘高度明显丢失 ($P < 0.05$), CHF 组可以部分恢复椎间盘高度 ($P < 0.05$)。PUN 组髓核组织中 AGG mRNA 和 COL2A1 mRNA 及蛋白表达较 CON 组明显下降 ($P < 0.05$); CHF 组髓核组织中 AGG mRNA 和 COL2A1 mRNA 及蛋白表达较 PUN 组有明显提高 ($P < 0.05$)。组织学检测显示, 与 PUN 组相比, CHF 组髓核凝胶特性部分恢复, 聚多糖含量回升; CHF 组髓核组织中 NLRP3 表达明显减低。**结论** 熏洗汤熏蒸治疗能提高椎间盘退变模型中 AGG 和 COL2A1 的表达, 降低 NLRP3 的表达, 这可能是其治疗腰椎退变性疾病的作用机制之一, 本研究为椎间盘退变性疾病的治疗提供了新思路。

【关键词】 熏洗汤; 熏蒸; 椎间盘退变; 聚集蛋白聚糖; II 型胶原; 腰椎退变性疾病

【中图分类号】 R 285.5 **【文献标识码】** A

Study on the effect of fumigation decoction on the expression of aggrecan and type II collagen in a rat model of intervertebral disc degeneration

XIONG Guang¹, DONG Chenpeng², YANG Guoyu², XU Zhiqiang², WU Xinghuo²

1. Department of Orthopedics, Macheng People's Hospital, Huanggang 438399, Hubei Province, China

2. Department of Orthopedics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Corresponding author: WU Xinghuo, Email: wuxinghuo@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of fumigation decoction on the expression of aggrecan (AGG) and type II collagen (COL2A1) in an intervertebral disc degeneration (IDD) model, and to gain an in-depth understanding of the cellular and molecular mechanisms underlying traditional Chinese medicine fumigation therapy. **Methods** An IDD model was

DOI: 10.12173/j.issn.1005-0698.202501034

基金项目: 湖北省自然科学基金联合基金重点项目 (2024AFD257)

通信作者: 吴星火, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, Email: wuxinghuo@163.com

established using Sprague-Dawley rats by inducing disc injury via needle puncture. The rats were divided into three groups: normal control (CON), model (PUN), and fumigation (CHF). Only the CHF group received treatment with fumigation decoction for 4 weeks. Imaging analysis was conducted to assess the relative height of intervertebral discs, while Masson's trichrome staining was used to observe structural changes in the discs. The expression of NLRP3 inflammasome was detected by immunohistochemistry. Quantitative RT-PCR and Western blotting were employed to evaluate the expression levels of AGG and COL2A1 genes and proteins. **Results** A total of 12 rats were randomly divided into 3 groups, with 4 rats in each group. Compared with the CON group, disc height was significantly lost in the PUN group ($P<0.05$), and disc height could be partially restored in the CHF group ($P<0.05$). In the PUN group, the expression levels of AGG mRNA and COL2A1 mRNA and protein in the nucleus pulposus tissue were significantly lower than those in the CON group ($P<0.05$). Compared with the PUN group, the CHF group showed significantly increased expression levels of AGG mRNA and COL2A1 mRNA and protein in the nucleus pulposus tissue ($P<0.05$). Histological analysis revealed that, compared with the PUN group, the CHF group exhibited partial restoration of the gel-like properties of the nucleus pulposus and an increase in proteoglycan content. Additionally, NLRP3 expression in the nucleus pulposus tissue of the CHF group was markedly reduced. **Conclusion** Fumigation decoction treatment can enhance the expression of AGG and COL2A1 and decrease the expression of NLRP3 in IDD models, which may be one of its mechanisms for treating lumbar degenerative diseases. This research provides new insights into the treatment of IDD.

【Keywords】 Fumigation decoction; Fumigation; Intervertebral disc degeneration; Aggrecan; Type II collagen; Lumbar degenerative diseases

腰椎退变性疾病 (lumbar degenerative diseases, LDD) 是以椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 为核心病理特征的脊柱退行性疾病。随着人口老龄化加剧及现代生活方式改变, 其发病率逐年攀升, 已成为全球范围内重大公共卫生问题^[1]。LDD 以椎间盘基质降解为特征性改变, 其中聚集蛋白聚糖 (aggrecan, AGG) 作为维持髓核水合状态的核心蛋白聚糖, 其降解直接导致椎间盘生物力学功能丧失; 而 II 型胶原 (collagen type II alpha 1, COL2A1) 构成的纤维网架结构破坏, 则加剧椎间盘结构失稳^[2]。这种进行性退变最终压迫神经根或脊髓, 引发一系列临床症状, 如腰部疼痛、下肢放射痛、麻木、活动受限, 甚至更严重的神经功能障碍, 影响患者的生活质量。现代医学对 LDD 的干预策略主要包括保守治疗、微创手术、开放手术等。保守治疗以对症治疗为主, 包括非甾体抗炎药、肌肉松弛剂、营养神经药物和物理治疗等, 虽能短期缓解症状, 但其局限性日益凸显; 无论是微创手术还是开放手术, 虽能解除机械压迫, 却难以逆转退变进程^[3]。中医学基于“肾主骨”“肝主筋”理论, 将 LDD 归为“骨痹”“筋伤”范畴, 《医宗必读》提出“治痛痹者, 散寒为主, 疏风燥湿仍不可缺, 大抵参

以补火之剂”的治则, 现代临床实践证实补肾强骨、通络止痛类中药可通过多靶点干预延缓退变进程^[4-5]。值得关注的是, 中药外治法具有局部药物浓度高、不良反应小等优势, 在骨科领域展现出独特价值^[6]。华中科技大学同济医学院附属协和医院和医院的临床经验方熏洗汤通过透皮给药实现温经通络之效, 对各种关节痛、肌痛、腰痛具有明显的治疗作用, 但其作用机制尚未明确。

目前研究多聚焦于中药内服对椎间盘细胞的影响, 而外治法在 IDD 中的分子调控机制研究甚少。基于蛋白聚糖-胶原网络在椎间盘稳态中的关键作用, 本研究拟通过建立 IDD 动物模型, 采用免疫组化、蛋白质印迹 (Western blotting) 等技术, 系统观察熏洗汤熏蒸治疗对 AGG、COL2A1 表达的调控作用, 揭示中药外治法延缓 IDD 的分子机制, 为优化临床治疗方案提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

LEICA RM2016 病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司), NIKON ECLIPSE CI 正置光学显微镜 (日本尼康公司), mp115KANMK3 酶标仪 (美国 Thermo 公司), ChemiDoc™ XRS+ 凝胶成像

系统(美国 Bio-rad 公司), DYCZ-24DN 垂直电泳槽(北京六一仪器厂), DYCZ-40 电转仪(北京六一仪器厂), HI650 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), A300 PCR 仪(杭州 LongGene 公司), QuantStudio 12K 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司), Chemi-DocMP 成像系统(美国 Bio-Rad 公司), HYZ-IB 熏蒸装置(河南翔宇医疗公司)。

1.2 药品与试剂

Trizol 试剂(晶科德生物科技武汉有限公司, 批号: 603072921), SYBR Premix Ex Tag 试剂盒(擎科生物科技有限公司, 批号: 1F124601), RIPA 裂解缓冲液(碧云天生物技术股份有限公司, 批号: 092221220307), 抗 AGG(英国 Abcam 公司, 批号: GR103983-1)、COL2A1(武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 00140436)、NLRP3(美国 proteintech, 批号: 00092561)和 GAPDH 一抗(美国 Proteintech, 批号: 10028231), 增强化学发光试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific, 批号: 2600181), Masson 染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号: GP2105474), COL2A1 和 AGG 引物合成(南京擎科生物科技有限公司, 批号: TSP20250106-027-00193), 甲醛缓冲液(武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号: GP2212019)。

熏洗汤为医院自制, 处方: 寻骨风 15 g、当归尾 12 g、凤仙透骨草 15 g、海桐皮 12 g、续断片 12 g、伸筋草 15 g、花椒 12 g, 加入 1 000 mL 纯净水, 自动煎药机煎煮成 70% 浓度的中药液保存。所用药材均由华中科技大学同济医学院附属协和医院药剂科提供(批号: 202406013)。

1.3 实验动物

健康清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 2 月龄, 雄性, 购自华中科技大学同济医学院实验动物中心, 合格证编号: 430726241100700154, 动物伦理批号: AMUWEC20210946。SD 大鼠饲养于 SPF 级环境中, 用独立通风笼具, 室温 22~25 °C, 小鼠自由摄食和饮水。

1.4 研究方法

1.4.1 大鼠 IDD 模型的构建

采用针刺法建立 IDD 模型^[7]。用 2% (w/v) 戊巴比妥 40 mg · kg⁻¹ 麻醉大鼠, 然后用 20 号针从背侧穿过尾部皮肤刺穿大鼠椎间盘 (Co5/6、

6/7、7/8 和 8/9), 在椎间盘内停留 10 s, 穿刺针长度预先确定, 以确保穿刺深度约为 4 mm。通过影像学及组织学检查评估退变改变。

1.4.2 动物分组及熏洗汤熏蒸治疗 IDD

12 只 SD 大鼠随机分为 3 组: 正常对照 (CON) 组、模型 (PUN) 组和熏蒸 (CHF) 组, 每组 4 只。CON 组不造模, 不采取任何干预措施, 常规饲养, 自由活动。其余大鼠适应性饲养 1 周后, 按“1.4.1”项下方法造模。PUN 组单纯造模, 正常饲养, 无特殊干预; CHF 组造模成功后第 2 天, 给予熏洗汤熏蒸治疗, 将大鼠放入动物熏蒸装置, 加入熏洗汤药液 200 mL 进行全身熏蒸, 蒸汽温度为 40~45 °C, 每天 1 次, 每次 23 min, 连续治疗 4 周。

1.4.3 标本采集及处理

4 周后处死各组大鼠, 收集椎间盘及邻近椎体, 一部分组织迅速置于液氮中冰冻, 转入 -80 °C 冰箱中保存待用; 另一部分组织固定, 脱钙, 石蜡包埋, 制作切片。

1.4.4 定量反转录聚合酶链式反应

用 Trizol 试剂从髓核组织中提取总 RNA, 然后根据标准实验方案通过定量反转录聚合酶链式反应 (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 进行逆转录和扩增。采用逆转录酶由总 RNA 生成互补 DNA (complementary DNA, cDNA), 实时定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 使用 SYBR Premix Ex Tag 试剂盒进行。扩增循环条件包括 40 个循环: 每个循环在 95 °C 变性 5 s, 随后在 60 °C 下扩增 24 s。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参。PCR 引物序列包括 COL2A1, 209bp, F:5'-TCCTAAGGGTGCCAATGGTGA-3', R:5'-AGGACCAACTTTGCCTTGAGGAC-3'AGG, 240bp, F:5'-CAGAATGGGAACACGCTATAC-3', R:5'-GCCTTCTGTACTTTCTCTGT-3', 引物合成。使用 GAPDH 进行标准化。所有数据均进行 3 次测试, 取其平均值。

1.4.5 Western blotting

使用 RIPA 裂解缓冲液从大鼠髓核组织中提取总蛋白。使用 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质。使用 400 mA 恒定电流将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜上 2 h, 然后在 25 °C 下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。然后, 4 °C 下与

稀释的抗 AGG (1:100)、COL2A1 (1:30) 和 GAPDH 一抗 (1:5 000) 孵育过夜。随后, 与 1:3 000 稀释的二抗在 25 ℃下孵育 1 h。使用增强化学发光试剂盒评估蛋白表达水平, 并使用 Chemi-DocMP 成像系统进行可视化。

1.4.6 椎间盘高度与组织学检测

采集各组大鼠鼠尾椎间盘, 拍摄数字 X 线照片, 计算椎间盘高度指数 (disc height index, DHI), 用于评估椎间盘的高度。DHI= 侧位椎间隙高度 / 相邻椎体高度。

将大鼠鼠尾椎间盘在磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 中洗涤, 用 4% 甲醛缓冲液 (pH 7.4) 固定 12 h, 在 10% 甲酸溶液中脱钙, 乙醇脱水, 并行石蜡包埋。标本切成 4 μm 切片, 脱腊和再水化, 并用 Masson 三色染色, 观察椎间盘纤维环组织及髓核组织结构变化。

1.4.7 免疫组化检测

将大鼠椎间盘髓核组织石蜡包埋后制备成 4 mm 厚切片。切片与一抗 [NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein3, NLRP3) 炎症小体,

1:500] 于 4 ℃孵育过夜。PBS 清洗切片 3 次后加入二抗, 室温避光孵育 2 h 并进行 DAPI 染色、封片, 荧光显微镜下观察。

1.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠IDD情况

与 CON 组相比, PUN 组大鼠椎间盘高度明显丢失 ($P < 0.05$); 与 PUN 组相比, CHF 组经熏洗汤熏蒸可以部分恢复椎间盘高度 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 大鼠尾椎间盘组织中 AGG mRNA 和 COL2A1 mRNA 表达

PUN 组髓核组织中 AGG mRNA 和 COL2A1 mRNA 的表达较 CON 组明显下降 ($P < 0.05$); CHF 组髓核组织中 AGG mRNA 和 COL2A1 mRNA 的表达较 PUN 组有明显提高 ($P < 0.05$)。见图 2。

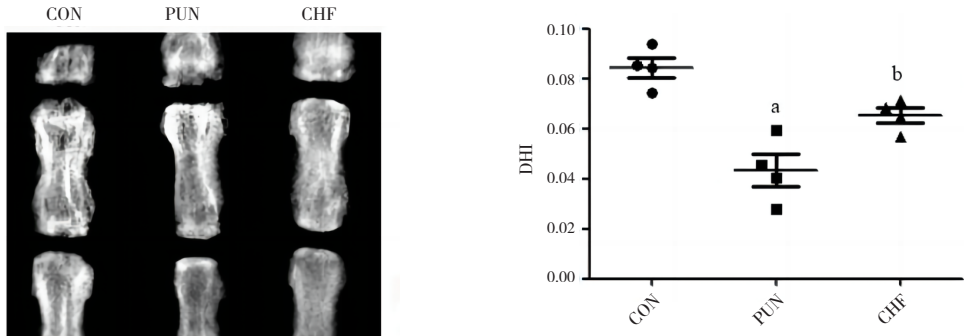


图1 熏洗汤熏蒸对实验大鼠椎间盘高度的影响 ($n=4$)

Figure 1. Herbal fumigation decoction on intervertebral disc height in experimental rats ($n=4$)

注: A. 大鼠鼠尾X线照片图; B. 椎间盘高度分析散点图; 与CON组比较, $^a P < 0.05$; 与PUN组相比, $^b P < 0.05$ 。

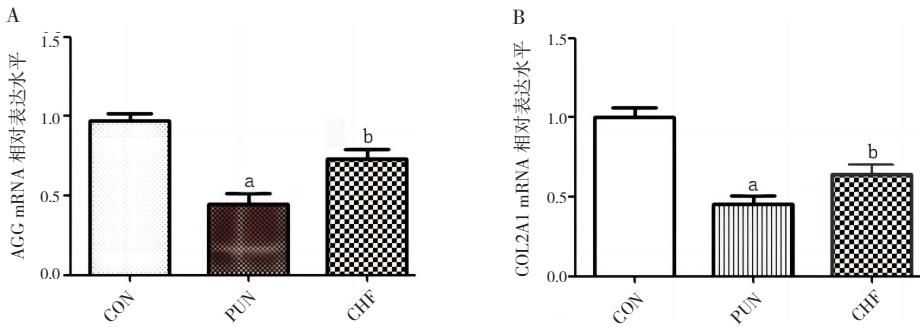


图2 髓核组织中AGG mRNA与COL2A1 mRNA的表达水平 ($n=4$)

Figure 2. The expression of AGG mRNA and COL2A1 mRNA in the nucleus pulposus tissue ($n=4$)

注: A. AGG; B. COL2A1; 与CON组相比, $^a P < 0.05$; 与PUN组, $^b P < 0.05$ 。

2.3 大鼠尾椎间盘组织中AGG和COL2A1蛋白表达情况

PUN 组髓核组织中 AGG 和 COL2A1 蛋白的表达较 CON 组明显下降 ($P < 0.05$) ; CHF 组髓核组织中 AGG 和 COL2A1 蛋白的表达较 PUN 组有明显提高 ($P < 0.05$) 。见图 3、图 4。

2.4 椎间盘组织学评估

CON 组鼠尾椎间盘髓核组织呈椭圆形凝胶状结构, 边界清晰, 聚多糖浓集; PUN 组髓核脱水

皱缩, 凝胶基质崩解, 聚多糖含量下降, 椎间盘高度塌陷; 而 CHF 组髓核凝胶特性部分恢复, 聚多糖含量回升, 椎间盘高度部分恢复, 提示病理学改变明显减轻。见图 5。

2.5 椎间盘髓核组织NLRP3的表达变化

CON 组鼠尾椎间盘髓核组织有少量 NLRP3 炎症小体的表达, PUN 组髓核组织结构紊乱, NLRP3 表达显著增高; 与 PUN 组相比, CHF 组髓核组织 NLRP3 的表达明显减低。见图 6。

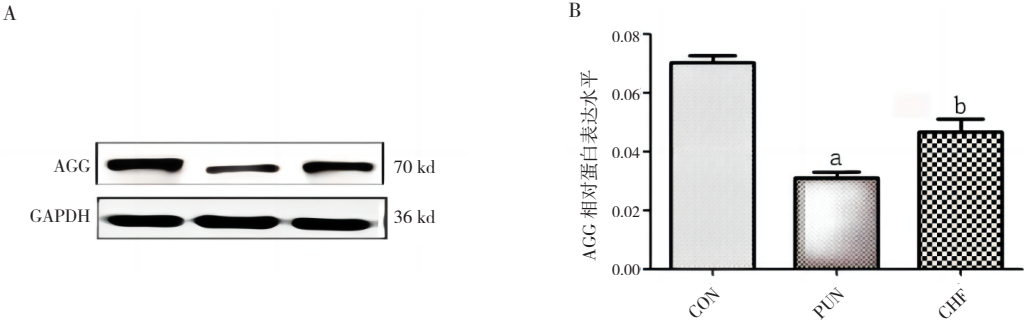


图3 髓核组织中AGG蛋白的表达水平 (n=4)

Figure 3. The expression of AGG proteins in the nucleus pulposus tissue (n=4)

注: A. Western blotting; B. 蛋白定量分析; 与CON组相比, ^a $P < 0.05$; 与PUN组, ^b $P < 0.05$ 。

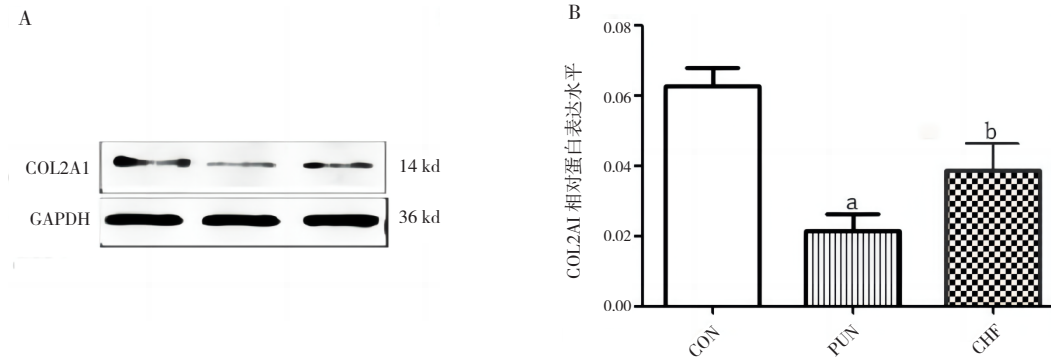


图4 髓核组织中COL2A1蛋白的表达水平 (n=4)

Figure 4. The expression of COL2A1 proteins in the nucleus pulposus tissue (n=4)

注: A. Western blotting; B. 蛋白定量分析; 与CON组相比, ^a $P < 0.05$; 与PUN组, ^b $P < 0.05$ 。

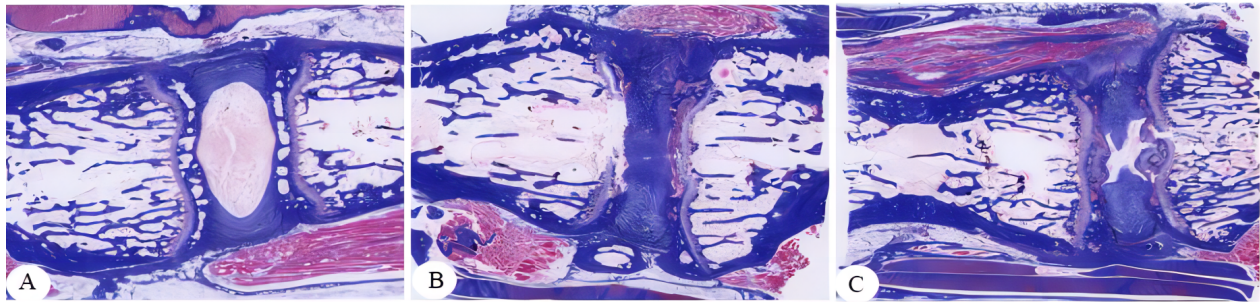


图5 大鼠尾椎间盘组织学染色图 (MASSON染色, 200 ×)

Figure 5. Histological staining images of rat caudal intervertebral disc tissue (MASSON, 200 ×)

注: A. CON 组; B. PUN 组; C. CHF组。

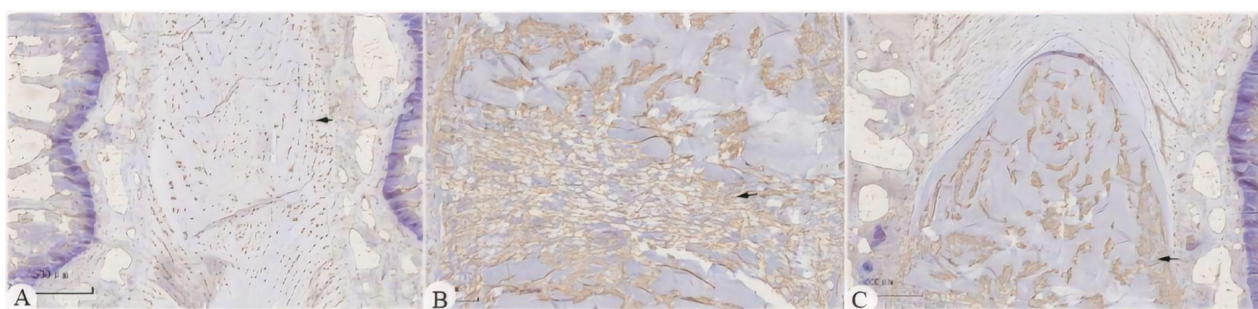


图6 大鼠尾椎间盘组织免疫组化染色 (NLRP3, 400 ×)

Figure 6. Immunohistochemical staining of rat caudal intervertebral disc tissue (NLRP3, 400 ×)

注: A. CON 组; B. PUN 组; C. CHF 组。

3 讨论

中医药在治疗 LDD 方面积累了丰富的经验,并提供了一种不同于现代医学的视角和解决方案^[4, 8-9]。中医理论强调整体观念和辨证论治的原则,认为人体是一个有机的整体,疾病的产生是由于内外环境失衡所致。基于此理念,熏洗汤通过外治法直接作用于病变部位,体现了中医药治疗的特性和优势。熏洗汤组方包括寻骨风、当归尾、凤仙透骨草、海桐皮、续断片、伸筋草和花椒 7 味药材,方中君药寻骨风祛风湿、通经络、止痛,海桐皮与寻骨风协同增强祛风除湿之力;臣药当归尾活血化瘀、通经止痛,凤仙透骨草祛风湿、活血散瘀;佐药续断片强筋骨、续折伤,伸筋草舒筋活络、缓解拘挛;使药花椒温通散寒、止痛之效;七味药材各具特色,能够相互配合,形成协同作用,体现了中医药治疗 LDD 的独特思路。

寻骨风是常用的祛风湿、通经络的药物,含有倍半萜、菲类衍生物及甾醇类等成分,能有效抑制炎症反应^[10];当归尾含挥发油、阿魏酸等成分,可治疗血瘀证,显著改善血流动力学各项指标^[11];凤仙透骨草具有祛风湿、活血、消肿、止痛等功效,其抗炎效果是成分群综合作用的结果,可降低肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等炎症因子的分泌^[12];海桐皮、花椒、凤仙透骨草也具有除湿通经、散寒止痛的作用,能达到温经散寒、活血通络的功效^[13];续断片具有活血化瘀、消肿止痛的作用,是缓解腰椎间盘突出症常用药物^[14];伸筋草具有抗炎、镇痛、抗氧化等多种功效,通过抑制 IL-

1 β 、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 的表达水平发挥作用^[15]。花椒在临床上主要用于抗炎与镇痛^[16]。选择合适的药物配伍和熏蒸温度,并遵循医生指导,就能达到减毒增效目的。

熏洗疗法是中医传统治疗方法之一,它结合了热疗和药疗的作用,对于改善局部血液循环、促进炎症吸收、缓解疼痛等方面有显著效果^[17-18]。热疗利用熏洗液产生的热量进行治疗扩张毛细血管,改善淋巴循环,增加组织的血液供应,放松肌肉,减少痉挛等。通过熏洗的方式,药物可以直接作用于病变部位,加快有害物质的代谢,减轻炎症介质的渗出,进而有效缓解局部疼痛。通过煎煮药物产生的温热蒸汽作用于腰椎局部,不仅能改善局部血液循环,促进炎症吸收,还能通过调节神经系统的反应,缓解疼痛症状。此外,中药成分可能通过皮肤渗透进入体内,发挥抗炎、抗氧化等多重作用,有助于延缓 IDD 进程。

椎间盘髓核组织主要由髓核细胞和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 构成,ECM 由多种成分组成,蛋白聚糖特别是 AGG 和 COL2A1 共同作用以保持椎间盘的强度和弹性,并维持其吸水能力,两者共同维持 ECM 的“张力-抗压”平衡,这对于维持椎间盘结构完整性至关重要^[19-20]。AGG 与 COL2A1 的比例直接影响 ECM 的渗透压和机械强度。AGG 通过转化生长因子 β 信号通路促进 COL2A1 合成,而 COL2A1 通过整合素信号增强 AGG 的稳定性,形成正反馈调节^[21]。在 LDD 中,氧化应激、炎症因子 (如 TNF- α 、IL-6) 及基质降解酶 (如基质金属蛋白酶 3、基质金属蛋白酶 13) 的激活导致 AGG 与 COL2A1 的合成减少、降解增加^[22-23]。AGG 和 COL2A1 的表达水平异常与 LDD 的病理进程密切相关。在

LDD 进程中, 两者的同步减少或结构异常可导致 ECM 崩解, 引发椎间盘突出、终板硬化及椎间隙狭窄等病理改变。本研究结果显示, 熏洗汤熏蒸 4 周后, 大鼠椎间盘椎间隙相对高度及组织学退变程度均有显著改善, 椎间盘髓核组织 AGG 和 COL2A1 的 mRNA 和蛋白水平表达显著增多, 因此可以认为熏洗汤熏蒸通过提高 AGG 和 COL2A1 的表达发挥其对 LDD 的治疗作用。NLRP3 炎症体的激活与一种名为焦亡的程序性细胞死亡形式密切相关, 这种细胞死亡伴随着炎症反应的发生。当 NLRP3 炎症体被激活后, 可以促使 NP 细胞发生焦亡, 进而加剧椎间盘微环境炎症和基质降解。前期研究发现, 通过 NLRP3 炎症小体活化, 阻断 caspase-1 介导的 gasdermin D 剪切, 减轻椎间盘细胞焦亡^[24]。因此, 在 LDD 过程中, 熏洗汤熏蒸可调节 NLRP3 炎症小体介导的 NP 细胞焦亡。

本研究存在以下局限性: ①本研究主要采用大鼠 IDD 模型进行实验, 可能无法完全模拟人类 LDD 的复杂性和多样性, 限制了研究结果对临床应用的直接指导意义; ②本研究分组 ($n=4$), 每只大鼠选取四节连续的尾椎 (Co5/6、6/7、7/8 和 8/9), 实际每组有 16 个椎间盘 ($n=16$), 样本量虽然满足统计分析的基本要求, 但仍较小; ③虽然探讨了熏洗汤对 AGG 和 COL2A1 表达的影响, 但对其作用机制的具体细节仍需进一步深入研究。综上所述, 本研究丰富了熏洗汤在 LDD 治疗中的理论基础, 为临床实践提供了新的思路和方法; 未来研究可在更大样本量和更长时间跨度的基础上, 进一步探讨熏洗汤的作用机制, 为患者提供更为有效的治疗方案。

利益冲突声明: 作者声明本研究不存在任何经济或非经济利益冲突。

参考文献

- Ravindra VM, Senglaub SS, Rattani A, et al. Degenerative lumbar spine disease: estimating global incidence and worldwide volume[J]. *Global Spine J*, 2018, 8(8): 784–794. DOI: [10.1177/2192568218770769](https://doi.org/10.1177/2192568218770769).
- Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29(23): 2691–2699. DOI: [10.1097/01.brs.0000146101.53784.b1](https://doi.org/10.1097/01.brs.0000146101.53784.b1).
- 吴晓东, 袁文. 腰椎间盘突出症治疗方法的进展和并发症的防范[J]. *中国骨伤*, 2024, 37(3): 219–221. [Wu XD, Yuan W. Progress on treatment and prevention of complications of lumbar disc herniation[J]. *China Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 2024, 37(3): 219–221.] DOI: [10.12200/j.issn.1003-0034.20240123](https://doi.org/10.12200/j.issn.1003-0034.20240123).
- 韩涛, 于杰, 金哲峰, 等. 中药干预椎间盘退变治疗腰椎间盘突出症作用机制研究进展[J]. *世界中医药*, 2023, 18(21): 3042–3046. [Han T, Yu J, Jin ZF, et al. Research progress in the mechanisms of Chinese medicines in the treatment of lumbar disc herniation due to intervertebral disc degeneration[J]. *World Chinese Medicine*, 2023, 18(21): 3042–3046.] DOI: [10.3969/j.issn.1673-7202.2023.21.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-7202.2023.21.007).
- 李艳, 陆华岭, 吴耀持. 基于“肝主筋”理论治疗腰椎间盘突出症思路探析[J]. *江苏中医药*, 2014, (11): 6–7. [Li Y, Lu HL, Wu YC. Exploration of therapeutic strategies for lumbar disc herniation based on the theory of "Liver Governing Sinews"[J]. *Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2014, (11): 6–7.] <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/jszy201411003>.
- Zhu L, Yu C, Zhang X, et al. The treatment of intervertebral disc degeneration using traditional Chinese medicine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263: 113117. DOI: [10.1016/j.jep.2020.113117](https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113117).
- Hua W, Li S, Luo R, et al. Icariin protects human nucleus pulposus cells from hydrogen peroxide-induced mitochondria-mediated apoptosis by activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(1): 165575. DOI: [10.1016/j.bbadis.2019.165575](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165575).
- 李兆勇, 张晨阳, 郭彦涛, 等. 基于数据挖掘的中医医案古籍腰痛症用药规律研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(10): 1280–1282. [Li ZY, Zhang CY, Guo YT, et al. Research on prescriptions and herbs for lumbago in ancient books of traditional Chinese medical records based on data mining[J]. *Journal of Hunan University of Chinese Medicine*, 2020, 40(10): 1280–1282.] DOI: [10.3969/j.issn.1674-070X.2020.10.021](https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-070X.2020.10.021).
- 吴国林, 何元诚. 中医药治疗腰椎间盘突出症的治疗进展[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2010, 18(5): 70–72. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/zgzygsk201005033>.
- 陈铎葆, 徐冰, 李兵, 等. 寻骨风对抗炎、镇痛作用的研究[J]. *基层中药杂志*, 2001, 15(1): 9–10. [Chen DB, Xu B, Li B, et al. Study on the anti-inflammation and analgesia of Aristolochia mollissima Hance[J]. *Primary Journal Of Chinese Materia Medica*, 2001, 15(1): 9–10.] DOI: [10.3969/j.issn.1673-6427.2001.01.004](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-6427.2001.01.004).
- 杨秀娟, 邓毅, 杨志军, 等. 当归不同药用部位对急性血瘀模型大鼠的活血作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(18): 2187–2190. [Yang XJ, Deng Y, Yang ZJ, et al. Effect of different medicinal part in Angelica sinensis on the promoting blood in acute blood stasis rats[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, 34(18): 2187–2190.] DOI: [10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.18.016](https://doi.org/10.13699/j.cnki.1001-6821.2018.18.016).
- 蒋丽, 郭瑞齐, 管仁伟, 等. 凤仙透骨草 HPLC 指纹图谱及其与抗炎活性的谱效关系[J]. *山东中医药大学学报*, 2022, 46(6): 747–757. [Jiang L, Guo RQ, Guan RW, et al. HPLC fingerprint of Fengxiantougucao(*impatiens balsamina* L.) and spectral-

- effect relationship with anti-inflammatory activity[J]. Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2022, 46(6): 747-757.] DOI: [10.16294/j.cnki.1007-659x.2022.06.014](https://doi.org/10.16294/j.cnki.1007-659x.2022.06.014).
- 13 李照辉,熊圣仁,郑竑,等. 海桐皮汤熏洗治疗跟痛症 130 例临床观察[J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(11): 10-12, 38. [Li ZH, Xiong SR, Zheng H, et al. Clinical observation on 130 cases of painful heel syndrome treated by fumigation and washing with Haitongpi tang[J]. Rheumatism and Arthritis, 2021, 10(11): 10-12, 38.] DOI: [10.3969/j.issn.2095-4174.2021.11.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4174.2021.11.003).
- 14 赵睿晞,王人彦. 张玉柱教授治疗腰椎间盘突出症的用药规律分析[J]. 中医正骨, 2021, 33(8): 39-42. [Zhao RX, Wang RY. An analysis of clinical medication rules of Professor Zhang Yuzhu in treatment of lumbar disc herniation[J]. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 2021, 33(8): 39-42.] DOI: [10.3969/j.issn.1001-6015.2021.08.008](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-6015.2021.08.008).
- 15 朱杰,于立芹,张华南,等. 伸筋草经皮给药对小鼠抗炎镇痛作用及机制研究[J]. 中医药导报, 2021, 27(6): 40-44. [Zhu J, Yu LQ, Zhang HN, et al. Study on the anti-inflammatory and analgesic effects and mechanism of the transdermal administration of Shenjinciao(lycopodium herba)on mice[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology, 2021, 27(6): 40-44.] DOI: [10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2021.06.017](https://doi.org/10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2021.06.017).
- 16 边甜甜,司昕蕾,牛江涛,等. 花椒挥发油部位经清炒法炮制前后在小鼠体内的抗炎与镇痛作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(4): 369-371, 376. [Bian TT, Si XL, Niu JT, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of Volatile oil from Zanthoxylum bungeanum Maxim before and after processing by stir frying in mice[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2019, 35(4): 369-371, 376.] DOI: [10.13699/j.cnki.1001-6821.2019.04.015](https://doi.org/10.13699/j.cnki.1001-6821.2019.04.015).
- 17 娄纯彪,刘蓓,刘茜,等. 中药熏洗联合局部注射治疗跟痛症的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019, 27(3): 20-22, 28. [Lou CB, Liu B, Liu Q, et al. The clinical research of Herbal fumigation and wash therapy combined with local injection in treating calcaneodynia[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics, 2019, 27(3): 20-22, 28.] <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/zgzygsk201903005>.
- 18 周积,梁玉婷,邱轶鑫,等. 中药熏蒸治疗腰椎间盘突出症的用药规律探析[J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(4): 31-34, 73. [Zhou L, Liang YT, Qiu YX, et al. Medication rule of traditional Chinese medicine fumigation and steaming therapy in treatment of lumbar disc herniation[J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 2023, 39(4): 31-34, 73.] DOI: [10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2023.04.007](https://doi.org/10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2023.04.007).
- 19 Wei Q, Zhang X, Zhou C, et al. Roles of large aggregating proteoglycans in human intervertebral disc degeneration[J]. Connect Tissue Res, 2019, 60(3): 209-218. DOI: [10.1080/03008207.2018.1499731](https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1499731).
- 20 Wei Y, Tower RJ, Tian Z, et al. Spatial distribution of type II collagen gene expression in the mouse intervertebral disc[J]. JOR Spine, 2019, 2(4): e1070. DOI: [10.1002/jsp2.1070](https://doi.org/10.1002/jsp2.1070).
- 21 Chen F, Lei L, Chen S, et al. Serglycin secreted by late-stage nucleus pulposus cells is a biomarker of intervertebral disc degeneration[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 47. DOI: [10.1038/s41467-023-44313-9](https://doi.org/10.1038/s41467-023-44313-9).
- 22 Hao Z, Tao C, Aimin WU. Effects of oxidative stress on mitochondrial functions and intervertebral disc cells[J]. Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), 2024, 55(2): 249-255. DOI: [10.12182/20240360201](https://doi.org/10.12182/20240360201).
- 23 徐浩伟,房心月,常圣杰,等. 延缓椎间盘退变的抗衰老疗法研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2024, 32(19): 1770-1775. [Xu HW, Fang XY, Chang SJ, et al. Research progress of anti-aging therapy to delay disc degeneration[J]. Orthopedic Journal of China, 2024, 32(19): 1770-1775.] DOI: [10.20184/j.cnki.Issn1005-8478.100462](https://doi.org/10.20184/j.cnki.Issn1005-8478.100462).
- 24 Chi S, Li S, Xu Z, et al. The involvement of DDX3X in compression-induced nucleus pulposus pyroptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 655: 1-10. DOI: [10.1016/j.bbrc.2023.02.074](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.02.074).

收稿日期: 2025 年 01 月 10 日 修回日期: 2025 年 05 月 09 日
 本文编辑: 周璐敏 沈静怡