

电针对颈椎病大鼠椎间盘软骨细胞及 MCP-1/CCR2 信号通路的影响

彭婧嫔 谭桂兰 赖丽金 杨晓玲

(广东省深圳市龙华区人民医院中医科, 深圳, 518109)

摘要 目的:观察电针对颈椎病大鼠椎间盘软骨细胞及 MCP-1/CCR2 信号通路的影响。方法:将 45 只雄性 SD 大鼠,按照随机数字表法分为 3 组,假手术组、模型组和电针组,每组 15 只。除假手术组外均建立动静力失衡性颈椎病模型,并于造模后 3 个月开始电针干预双侧颈夹脊穴,30 min/次,1 次/d,14 d 为 1 个疗程。研究中通过电子透射电镜观察颈椎间盘软骨细胞的形态判定颈椎病造模是否成功;而后采用免疫组化检测颈椎间盘软骨细胞中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的表达情况;接着采用实时聚合酶链式反应 (Real time PCR) 检测 MCP-1/CCR2 信号通路,观察电针对 MCP-1/CCR2 信号通路的影响。结果:1) 假手术组的颈椎间盘软骨细胞表面较光滑,可见微绒毛样凸起,细胞整体形态上类似椭圆形,细胞核形态类似一个肾脏,且细胞核完整无破损,染色质均匀;而细胞外的基质中含有丰富且排列有序的胶原纤维;模型组中的颈椎间盘软骨细胞出现退行性改变,其细胞表面的微绒毛样凸起明显减少,细胞核破损,染色质明显固缩,细胞外基质中的胶原纤维明显减少,排列无序。提示颈椎病造模成功。2) 与假手术组比较,模型组和电针组大鼠 TNF- α 和 IL-6 表达均较密集,阳性表达增多 ($P < 0.05$), 其中是电针组 TNF- α 和 IL-6 表达明显较模型组降低 ($P < 0.05$), 提示电针能够抑制颈椎病大鼠椎间盘软骨细胞的 TNF- α 和 IL-6 表达。3) 与假手术组比较,模型组和电针组颈椎间盘中 MCP-1/GAPDH 和 CCR2/GAPDH 均增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 电针组与模型组比较,颈椎间盘中 MCP-1/GAPDH 和 CCR2/GAPDH 低于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论:电针可以抑制颈椎病大鼠椎间盘软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 表达,可能与抑制 MCP-1/CCR2 信号通路的激活有关。

关键词 电针;颈椎病;大鼠;椎间盘;软骨细胞;MCP-1;CCR2;信号通路

Effect of Electroacupuncture on Chondrocyte and MCP-1/CCR2 Signaling Pathway of Intervertebral Disc in Rats with Cervical Spondylopathy

Peng Jinpin, Tan Guilan, Lai Lijin, Yang Xiaolin

(The People's Hospital of Longhua District, Shenzhen 518109, China)

Abstract Objective: To observe the effect of electroacupuncture on chondrocyte and MCP-1/CCR2 signaling pathway of intervertebral disc in rats with cervical spondylosis. **Methods:** A total of 45 male SD rats were divided into three groups according to random number table, a sham operation group, a model group and an electro-acupuncture group, with 15 rats in each group. Except for the sham operation group, the models of dynamic and static imbalance cervical spondylosis were established, and electro-acupuncture intervention on bilateral cervical Jiaji (EX-B2) acupoints was started 3 months after modeling, 30 minutes a day for 14 days. In this study, the morphology of cervical intervertebral disc chondrocyte was observed by transmission electron microscopy to determine the success of cervical spondylosis modeling. Then the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in cervical intervertebral disc chondrocyte was detected by immunohistochemistry. Then real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect MCP-1/CCR2 signaling pathway and observe the effect of electroacupuncture on MCP-1/CCR2 signaling pathway. **Results:** 1) The surface of cervical intervertebral disc chondrocyte in sham operation group was smooth, with microvilli-like protuberance, oval shape of cell as a whole, and the shape of nucleus was similar to that of a kidney, and the nucleus was intact without damage and the chromatin was uniform; the extracellular matrix contained abundant and orderly collagen fibers; the degeneration of cervical intervertebral disc chondrocyte appeared in the model group. The microvilli-like protrusions on the cell surface were significantly reduced, the nucleus was damaged, the chromatin was obviously condensed, and the collagen fibers in the extracellular matrix were significantly reduced and arranged in disorder. It is suggested that cervical spondylosis was successfully modeled. 2) Compared with sham operation group, the expression of TNF- α and IL-6 in model group and electro-acupuncture group were more intensive and positive ($P < 0.05$). Among them, the expression of TNF- α and IL-6 in electro-acupuncture group was significantly decreased than that in the model group ($P < 0.05$), suggesting that electro-acupuncture could inhibit the ex-

pression of TNF- α and IL-6 in intervertebral disc chondrocytes of rats with cervical spondylosis. 3) Compared with sham operation group, MCP-1/GAPDH and CCR2/GAPDH in cervical intervertebral disc of the model group and the electro-acupuncture group increased, with statistical significance ($P < 0.05$); compared with model group, MCP-1/GAPDH and CCR2/GAPDH in cervical intervertebral disc of electro-acupuncture group were lower than model group, with statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** Electroacupuncture can inhibit the expression of TNF- α and IL-6 in the chondrocyte of intervertebral disc of rats with cervical spondylosis, which may be related to the inhibition of the activation of MCP-1/CCR2 signaling pathway.

Key Words Electroacupuncture; Cervical spondylosis; rat; Intervertebral disc; Chondrocyte; MCP-1; CCR2; Signaling pathway
中图分类号: R245.3 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.06.014

颈椎病是临床常见疾病, 由于椎间盘/椎体退行性改变后累及颈椎及其周围组织而导致以颈肩部肌肉酸痛、手指麻木、头晕头痛等为主要临床表现的一类征候群。随着生活方式的改变, 颈椎病的患者群结构发生了变化, 呈年轻化趋势, 严重影响生命质量, 故积极开展颈椎病的防治具有重要临床意义。针灸是中医传统疗法, 数十年来针刺夹脊穴可有效治疗脊柱疾病的报道不胜枚举, 但其作用机制目前尚不明。大量研究^[3-5]显示颈椎病的病因与炎症反应不无关系^[1-3], 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 是 CC 类细胞趋化因子, 它通过与其特异性趋化因子受体-2 (CCR2) 受体结合, 诱导单核/巨噬细胞的招募以及活化, 介导机体大部分炎症反应过程的发生发展, 故我们设想电针有效改善颈椎病的作用机制可能通过介导 MCP-1/CCR2 信号通路有关, 基于此, 我们进行相关动物实验, 具体如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 SD 雄性大鼠 45 只, SPF (Speciifc Psthogen Free) 级 (动物生产许可证号: SCXK (京) 2016-0006), 体质量 (250 ± 20) g, 相同饲养环境下, 相同批次的喂养饲料, 密闭饲养。

1.1.2 仪器与试剂 SDZ-II 电针治疗仪 (购于广州市邦善医疗器械有限公司); 一次性使用无菌针灸针 (生产厂家: 苏州医疗用品厂有限公司, 规格: $0.35 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$, 华佗牌); 台式高速离心机 (Eppendorf, 德国, 型号: 5418R); 抗体 MCP-1 (批号: ab179886)、CCR2 (批号: ab203128) 和 GAPDH (批号: ab181602), 相应二抗 (CST 公司, 美国, 批号: 1728392); MCP-1、CCR 和 GAPDH 引物合成序列, Trizol (批号: 76575) 和 DEPC (批号: 546865) 均购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; iScript cDNA Synthesis kit 反转录试剂盒 (购于伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司, 批号: 1728392); Realtime PCR 定量试剂盒 (SYBRGreen, 购买于上海索莱宝生物科

技有限公司, 批号: 4827101); 伯乐荧光定量 PCR 仪 (购于美国 BIO-RAD 公司, 型号: CFX384Touch)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 本研究建立动静力失衡性颈椎病模型, 对除假手术组外大鼠称重并记录, 根据每只大鼠的体质量 3 mL/kg 采用 10% 水合氯醛腹腔注射进行常规麻醉; 麻醉后在大鼠项部备皮, 以颈背正中纵向切口, 长度 2 cm 左右, 用弯镊钝性分离各层肌肉, 从右侧颈夹肌、头最长肌、颈最长肌及寰最长肌开始依次横向切断, 接着依次切除右侧颈髂肋肌、头半棘肌、右侧棘上韧带和棘间韧带, 常规术后缝合, 造模完成后随机分模型组和电针组。假手术组仅将皮肤切开后立即缝合, 无需作钝性分离和切除肌肉韧带等其他处理。所有动物于恒温房内苏醒后, 正常饲养 3 个月。按随机数字表法分为 3 组, 假手术组、模型组、电针组, 每组 15 只。

1.2.2 干预方法 假手术组: 正常饲养, 不做任何处置。模型组: 于造模 3 个月后, 每天抓取 1 次, 不做针刺处置。电针组: 造模 3 个月后开始电针, 取穴: 参照大鼠穴位图谱, 取双侧颈夹脊穴, 将大鼠固定后常规消毒穴区皮肤, 直刺进针, 进针深度 $3 \sim 5 \text{ mm}$, 轻捻转提插后左右两侧分别通过针柄接电针治疗仪, 刺激电压为 $2 \sim 5 \text{ V}$, 疏密波 ($2/100 \text{ Hz}$), 强度以大鼠四肢轻度上下抖动为度。30 min/次, 1 次/d, 连续治疗 14 d 后处死。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 电子透射电镜进行模型评价 以电子透射电镜观察颈椎间盘的超微结构, 以此来判定大鼠颈椎病造模是否成功。具体步骤如下: 首先以最快的速度将所取颈椎间盘放入 pH 7.2 的前固定液中并在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 1 d; 然后在 pH 7.0 的脱钙液中浸泡样品 2 周 (隔天换 1 次脱钙液); 接着常规 1 mol/L PBS 漂洗后浸泡于后固定液中 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 1.5 h; 常规漂洗、脱水, 在丙酮与包埋剂中浸透, 包埋聚合后进行超薄切片, 厚度为 90 nm , 所有切片均于 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘烤 3 h; 最后以醋酸铀染色, 透射电镜下观察并拍照。

表1 MCP-1/CCR2 通路的引物正方向序列和扩增长度

基因	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')	扩增长度
MCP-1	TGTCCCAAAGAAGCTGTACTATTTGT	TTCTGATCTCACTTGCTTCTGCTC	120
CCR2	GGAATCTTCTTCATTATCCTCCTGAC	TGACTACACTTGTTATTACCCCAAAGG	112
GAPDH	CCACATCGCTCAGACACCAT	GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT	307

1.2.3.2 免疫组化法检测肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的表达 动物于造模电针干预 14 d 后,通过用 10% 水合氯醛过量麻醉致死,然后在 4 ℃ 下将造模是 C6-T2 段压尼龙鱼线处脊髓及神经根剥离出来放置于 4% 福尔马林中,48 h 后进行常规组织脱水和透明处理,然后在二甲苯与石蜡混合液中进行渗透和常规石蜡包埋,采用美国旋转切片机连续切片 4 μm 厚度,每张切片均以防脱载玻片承载并于贴片后放置在 60 ℃ 烤箱中烘烤 5 h。常规脱蜡水化后,以枸橼酸缓冲液在微波炉中加热至沸腾,闭门焖 5 min 进行抗原修复,待冷却至室温后 PBS 泡洗后加封闭液封闭 10 min,防水笔在切片周围画好隔离圈后,加入一抗 TNF-α 和 IL-6 4 ℃ 冰箱孵育过夜,次日于 37 ℃ 烤箱中回温 45 min,PBS 泡洗 3 次,5 min/次,加入对应二抗,室温反应 10 min,PBS 泡洗 3 次,5 min/次,DAB 显色后再浸泡于苏木素中复染 30 s,常规脱水封片后在显微镜下观察,计数,拍片。

1.2.3.3 实时定量聚合酶链式反应 (Real time PCR) 检测 MCP-1/CCR2 信号通路 根据 Realtime PCR 定量试剂盒 (SYBR Green) 说明书中的具体操作方法进行检测,提取椎间盘软骨细胞总 RNA,用紫外分光光度计测定 260 nm 与 280 nm 处的光密度值,两者相除获得光密度比值,估算样品中的 DNA 浓度,再根据 cDNA 反转录试剂盒对大鼠椎间盘软骨细胞样本进行反转录;在 RNaseFree 处理过的 EP (50 μL) 管中依次加入 12.5 μL 的 SYBRPremixEx-TaqTM II (2 ×),PCRForwardPrimer (10 μmol/L, MCP-1, CCR2, GAPDH, 见表 1) 和 PCRReversePrimer (10 μmol/L, MCP-1, CCR2, GAPDH, 见表 1) 各 1 μL,2 μL 的 cDNA 模板,最后以 8.5 μL 灭菌蒸馏水将整个反应体系的终量补充到 25 μL,随后将所有样本的 EP 管放入实时定量 PCR 扩增仪中进行 Real time PCR 反应,反应条件为 95 ℃ 预变性 30 s、95 ℃ 变性 5 s、退火 30 s、72 ℃ 延伸 20 s,其中条件扩增循环 40 次。利用实时定量 PCR 仪绘出扩增曲线,进行 MCP-1/GAPDH 和 CCR2/GAPDH 的结果分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,3 组数据同时符合正态分布和方差齐性则采用单因素方差分析,若其中一组数据不符合正态分布,则采用多组秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 颈椎病造模成功率的超微结构评定 通过透射电镜评定大鼠颈椎病造模是否成功,假手术组的椎间盘软骨细胞表面较光滑,可见微绒毛样凸起,细胞整体形态上类似椭圆形,细胞核形态类似一个肾脏,且细胞核完整无破损,染色质均匀;而细胞外的基质中含有丰富且排列有序的胶原纤维;模型组中的椎间盘软骨细胞出现退行性改变,其细胞表面的微绒毛样凸起明显减少,细胞核破损,染色质明显固缩,细胞外基质中的胶原纤维明显减少,排列无序。提示,本研究颈椎病造模成功。见图 1。

2.2 电针对椎间盘软骨细胞 TNF-α 的影响 免疫组化 TNF-α 呈棕褐色阳性表达在胞质内,其中浅棕色表示 TNF-α 弱阳性表达,而无色表示未见 TNF-α 表达为阴性表达。与假手术组比较,模型组和电针组大鼠 TNF-α 表达均较密集,阳性表达增多 ($P < 0.05$),其中是电针组 TNF-α 表达明显较模型组降低 ($P < 0.05$),提示电针能够抑制颈椎病大鼠椎间盘软骨细胞的 TNF-α 表达。见图 2。

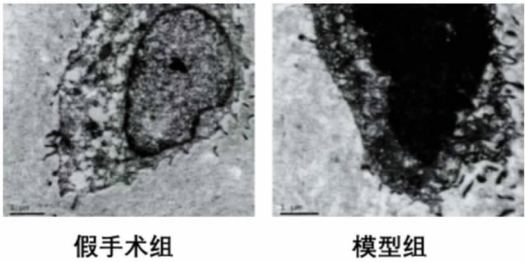


图1 颈椎病造模成功的超微结构评定
(5% 醋酸铀 + 枸橼酸铅双染色, ×10 000)

2.3 电针对椎间盘软骨细胞 IL-6 的影响 免疫组化 IL-6 呈棕褐色阳性表达在胞质内,其中浅棕色表示 IL-6 弱阳性表达,而无色表示未见 IL-6 表达为阴性表达。与假手术组比较,模型组和电针组大鼠 IL-6 表达均较密集,阳性表达增多 ($P < 0.05$),其中

是电针组 IL-6 表达明显较模型组降低 ($P < 0.05$), 提示电针能够抑制颈椎病大鼠椎间盘软骨细胞的 IL-6 表达。见图 3。

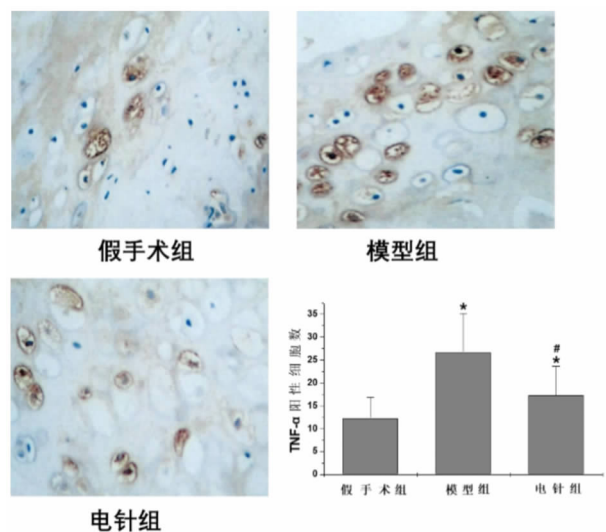


图 2 各组颈椎间盘软骨细胞 TNF- α 的比较 (IHC 染色, $\times 200$)

注:与假手术组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

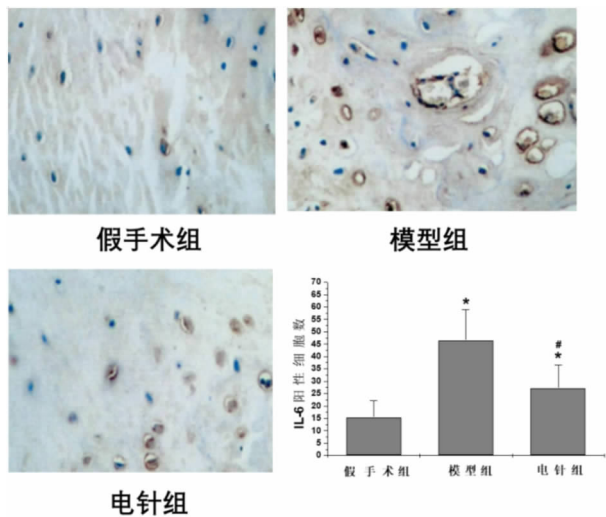


图 3 各组颈椎间盘软骨细胞 IL-6 的比较 (IHC 染色, $\times 200$)

注:与假手术组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组大鼠颈椎间盘软骨细胞 MCP-1/CCR2 通路的 RNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	MCP-1/GAPDH	CCR2/GAPDH
假手术组	1.17 $\pm$ 0.19	1.98 $\pm$ 0.34
模型组	3.01 $\pm$ 0.26 *	3.67 $\pm$ 0.41 *
电针组	2.14 $\pm$ 0.33 * Δ	2.96 $\pm$ 0.32 * Δ

注:与假手术比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.5 电针对大鼠颈椎间盘软骨细胞 MCP-1/CCR2 通路的影响 与假手术组比较,模型组和电针组颈椎间盘中 MCP-1/GAPDH 和 CCR2/GAPDH 均增高,

差异有统计学意义 ($P < 0.05$);电针组与模型组比较,颈椎间盘中 MCP-1/GAPDH 和 CCR2/GAPDH 低于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

颈椎病属于中医学“痹证”“痿证”等范畴,与肝、脾、肾、督脉等关系密切,外因不外乎风寒湿邪瘀滞经络,瘀血阻滞,劳损、外伤等^[7]。大量临床及动物研究显示,当颈椎病发生时椎间盘及其周围组织被异常激活,从而导致 MCP-1/CCR2 信号通路被活化,进一步诱导退变区域的单核/巨噬细胞发生招募和活化效应,促使炎症反应因子的释放、转移、重新合成等环节,从而导致椎间盘周围的炎症反应过度增强,诱发软骨细胞的凋亡,抑制其增殖,导致椎间盘退行性病变发生^[8-9],故我们认为减轻椎间盘局部炎症反应是治疗颈椎病的关键。

随着疾病研究的不断深入,我们发现颈椎病发生发展过程中随着椎间盘周围的巨噬细胞被大量激活,大量炎症反应因子譬如 TNF- α 、IL-6 等浓度上调对椎间盘组织产生一定的破坏效应,同时还 NF- κ B 抑制蛋白 (I κ B) 激酶复合体产生明显的激活作用,促进其磷酸化过程,由此经过蛋白酶小体作用后促进其与 NF- κ B 发生分解,NF- κ B 被抑制的作用明显减弱,由此 NF- κ B 的 p50 亚基暴露后产生核移位,启动了促炎因子 TNF- α 、IL-6 等基因的表达,由此进一步上调了 TNF- α 、IL-6 的浓度。本研究对 15 只 SD 大鼠进行颈椎病模型制备,通过透射电镜我们发现大鼠颈椎间盘软骨细胞出现退行性改变,其细胞表面的微绒毛样凸起明显减少,细胞核破损,染色质明显固缩,细胞外基质中的胶原纤维明显减少,排列无序,这提示我们造模是成功的,在随后的研究中我们发现模型组大鼠 TNF- α 、IL-6 明显过表达,这提示颈椎病大鼠确实存在明显的炎症反应,且 MCP-1 和 CCR2 均有高表达,文献^[10]显示 MCP-1 和 CCR2 相互作用产生的结合物是激活单核/巨噬细胞的关键产物,促进上述细胞向椎间盘组织趋化,进一步增强了椎间盘区域的炎症反应效应,促进 TNF- α 、IL-6 等炎症反应因子的释放,加速了椎间盘退行性病变的进程。在研究中我们发现经过电针夹脊穴干预的大鼠 TNF- α 、IL-6 含量,或者 MCP-1 和 CCR2 基因表达都有明显下调。

夹脊穴属于经外奇穴,因其操作简便,效果显著而广泛应用于脊柱疾病的治疗。从解剖学上认为颈部夹脊穴处由背阔肌、菱形肌、斜方肌三大肌肉共同构成肌肉分布格局^[11-12],刺激此部位可以一定程度

缓解上述肌肉的痉挛,明显改善病情。从中医角度认为夹脊穴乃督脉、膀胱经循行之处,督脉乃阳脉之海,是一身阳气之总;足太阳膀胱经分布广泛,本着经脉所过主治所及之理念,足太阳膀胱经所治之病广泛^[13-18]。夹脊穴是督脉与足太阳膀胱经的交汇处,有枢纽的作用,针刺夹脊穴不仅对上述2条经脉有调节作用,还可作用于其间的连接,实现对五脏六腑的调节作用。本研究结果显示与假手术组比较,电针组 TNF- α 和 IL-6 表达明显较模型组降低且 MCP-1、CCR2 表达量亦低于模型组,这提示提示电针夹脊穴能够抑制颈椎病大鼠椎间盘软骨细胞的 TNF- α 、IL-6、MCP-1、CCR2 的表达。

综上所述,电针可以抑制颈椎病大鼠椎间盘软骨细胞中 TNF- α 和 IL-6 表达,可能与抑制 MCP-1/CCR2 信号通路的激活有关。

参考文献

- [1] 徐丽莺,邵斌. 电针夹脊穴联合补肾通络方治疗脊髓型颈椎病 30 例临床观察[J]. 中国民族民间医药,2018,27(22):109-111.
- [2] Wang XY, He W, Shi H, et al. Effects of Electroacupuncture at PC6 and ST36 on HeartRate Variability in Anesthetized Mice[J]. World J Tradit Chin Med, 2015, 1(3):67-70.
- [3] 施金杉. 电针疗法“颈四针”穴与“颈夹脊”穴治疗神经根型颈椎病的疗效对照观察[J]. 中医临床研究,2018,10(31):30-32.
- [4] Li W, Nyhan MM, Wilker EH, et al. Recent exposure to particle radioactivity and biomarkers of oxidative stress and inflammation: The Framingham Heart Study[J]. Environ Int, 2018, 121(Pt 2):1210-1216.
- [5] 刘改霞,孙雨瑶,陈子璐,等. 炎性疼痛对小鼠外周组织炎性反应及 TNF- α 和 MCP-1 的表达水平的影响[J]. 西安交通大学学报:医学版,2019,40(1):1-6.
- [6] 王先海,李珍斌,李小妹,等. 通经定晕丸阻断颈椎病大鼠 NF- κ B

激活 MCP-1/CCR2 通路及 TNF- α 及 IL-1 β 、IL-6 表达的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2018,23(4):370-376.

- [7] 赵崇清,薛原,薛兴平. 颈椎病与中医辨证关系的探讨(附 100 例分析)[J]. 中国中西医结合影像学杂志,2006,4(3):199-200, 203.
- [8] Karateev AE, Erdes ShF. Use of nonsteroidal anti-in-inflammatory drugs in case of ankylosing spondylitis; long and persistently[J]. Ter Arkh, 2014, 86(11):123-127.
- [9] Puvanesarajah V, Jain A, Shimer AL, et al. Complications and mortality following one to two-level anterior cervical fusion for cervical spondylosis in patients above 80 years of age[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2017, 42(9):E509-E514.
- [10] Nagashima H, Morio Y, Yamane K, et al. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of patients with cervical myelopathy and lumbar radiculopathy[J]. Eur Spine J, 2009, 18(12):1946-1950.
- [11] 史哲. 夹脊穴临床功效分析[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(1):153.
- [12] 林秋吉,沈晓明. 颈型、神经根型颈椎病针灸治疗近况[J]. 中医药信息,2005,22(4):40-42.
- [13] 刘鹏宇,郑健刚. 针刺夹脊穴治疗颈、腰椎病临床研究进展[J]. 长春中医药大学学报,2012,28(1):178-180.
- [14] 谭奇纹. 论华佗夹脊穴与经络脏腑的联系[J]. 中医药信息, 2004, 21(2):6-7.
- [15] 刘迪,陈璐璐,耿楠,等. “动光明”刺灸法治疗郁病的临床应用[J]. 环球中医药,2018,11(11):1706-1708.
- [16] 刘道龙,褚雪菲,萨仁. 电针委阳穴、承山穴结合毫火针治疗老年性不安腿[J]. 长春中医药大学学报,2018,34(4):730-732.
- [17] 周丽,刘晓君,毛玮,等. 针刺治疗功能性消化不良的选穴规律[J]. 湖北中医药大学学报,2018,20(2):124-126.
- [18] 李建宇,宋雪艾,蔡昱,等. 仰韶文化人面鱼纹寓意与足太阳经功能相关理论渊源初探[J]. 中医学报,2018,33(3):405-410.

(2019-01-03 收稿 责任编辑:王明)