

脉冲电磁场对人退变髓核细胞 A_{2A} 腺苷受体的影响

刘伟军 王威 黎清波 蔡磊 王正坤

华中科技大学同济医学院附属普爱医院(武汉市第四医院)脊柱二·骨肿瘤科,武汉 430030

通信作者:刘伟军;Email:iamliu2003@163.com

【摘要】 目的 观察脉冲电磁场对人退变髓核细胞 A_{2A} 腺苷受体及白细胞介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响。**方法** 取人退变髓核细胞进行体外培养,取生长良好的二代髓核细胞给予脉冲电磁场干预(磁场强度 0.8 mT,频率 50 Hz,脉宽 150 μ s,曝磁时间 30 min,共曝磁 6 次)。采用蛋白免疫印迹法(WB)及 RT-PCR 法观察髓核细胞 A_{2A} 腺苷受体表达变化,采用 ELISA 法检测髓核细胞炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 表达变化。另外本研究还分别采用 A_{2A} 腺苷受体拮抗剂和激动剂处理人退变髓核细胞,再采用 ELISA 法检测脉冲电磁场对人退变髓核细胞 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响。**结果** 人退变髓核细胞经脉冲电磁场处理后,发现 A_{2A} 腺苷受体表达水平明显增强($P < 0.05$),同时 IL-1 β 、TNF- α 表达水平明显降低($P < 0.05$)。人退变髓核细胞经 A_{2A} 腺苷受体拮抗剂处理后,发现能逆转脉冲电磁场对 IL-1 β 、TNF- α 的抑表达作用;人退变髓核细胞经 A_{2A} 腺苷受体激动剂处理后,发现能增强脉冲电磁场对 IL-1 β 、TNF- α 的抑表达作用。**结论** 脉冲电磁场干预能明显抑制人退变髓核细胞炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 表达,并且该抑制作用可能与上调 A_{2A} 腺苷受体表达有关。

【关键词】 脉冲电磁场; 腺苷受体; 髓核细胞; 炎症因子

基金项目:湖北省自然科学基金面上项目(2018CFB720)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.11.004

Effects of pulsed electromagnetic fields on the A_{2A} adenosine receptor in human degenerative nucleus pulposus cells

Liu Weijun, Wang Wei, Li Qingbo, Cai Lei, Wang Zhengkun

Spine Department, Wuhan Puai Hospital, Wuhan 430030, China

Corresponding author: Liu Weijun, Email: iamliu2003@163.com

【Abstract】 Objective To explore the expression of the A_{2A} adenosine receptor and the inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in human degenerative nucleus pulposus (NP) cells after they have been treated with a pulsed electromagnetic field (PEMF). **Methods** Human degenerative NP cells were cultured in vitro and treated using an 0.8mT PEMF with a pulse frequency of 50Hz. The pulse width was 150 μ s and the exposure time was 30min, repeated 5 times at 12 hour intervals. The expression of the A_{2A} adenosine receptor in NP cells was determined using western blotting and reverse transcription polymerase chain reactions. The expression of the inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α were detected using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The human degenerative NP cells were also treated with an antagonist and agonist of the A_{2A} adenosine receptor, and the expression of IL-1 β and TNF- α were also determined using ELISA. **Results** After the PEMF treatment the expression of the A_{2A} adenosine receptor increased significantly, while the expression of IL-1 β and TNF- α decreased significantly. However, the A_{2A} adenosine receptor antagonist reversed the inhibitory effect of the PEMF on the expression of IL-1 β and TNF- α , while the agonist played an opposite role. **Conclusion** A PEMF can significantly inhibit the expression of IL-1 β and TNF- α in human degenerative NP cells, which could be related to up-regulation of the expression of the A_{2A} adenosine receptor in those cells.

【Key words】 Pulsed electromagnetic fields; Adenosine receptors; Nucleus pulposus cells; Inflammatory cytokines

Funding: A Hubei Province Natural Science Foundation project

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.11.004

腰背痛是临床常见病,约 70%~80%人在其一生中都会经历腰背痛,当病情严重时会对生活质量造成

影响,并产生很多社会、经济问题^[1]。目前研究发现,导致腰背痛的病因很多,其中约 40%的疼痛与椎间盘

退变因素有关^[2-3]。炎症反应在盘源性腰背痛产生过程中具有重要作用^[4]；当椎间盘发生退变时，纤维环损伤使得原本包绕其中的髓核(nucleus pulposus, NP)组织暴露，并诱发免疫级联反应，在该过程中 NP 细胞参与了多种细胞因子如白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的分泌^[4]。腺苷受体(adenosine receptor, AR)在人体组织中广泛分布并参与炎症反应调控，目前已发现有 4 种 AR 亚型，分别是 A₁、A_{2A}、A_{2B} 及 A₃ 腺苷受体，其中 A_{2A} 腺苷受体在炎症反应中常发挥负性调控作用^[5]。相关研究显示，脉冲电磁场作为一种安全有效的微创干预手段，能明显缓解盘源性腰背痛病情，但其治疗机制尚不明确^[6]；同时有文献报道，脉冲电磁场能影响软骨细胞 A_{2A} 腺苷受体表达^[7]。基于此，本研究拟观察 50 Hz、0.8 mT 脉冲电磁场对人退变髓核细胞 A_{2A} 腺苷受体及炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响，初步探讨脉冲电磁场治疗盘源性腰背痛的作用机制。

材料与方法

一、主要仪器及试剂

本研究主要试剂包括 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)-LG 培养基(美国 Hyclone 公司)、优质胎牛血清(美国 Gibco 公司产)、A_{2A} 受体抗体(美国 Abcam 公司)、 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司)、All-in-oneTm qPCR Mix(美国 GeneCopoeia 公司)、合成引物(美国 Invitrogen 公司)、A_{2A} 受体激动剂 CV-1808(美国 Santa Cruz 公司)、A_{2A} 受体拮抗剂 CSC(英国 Tocris Bioscience 公司)等，IL-1 β 以及 TNF- α ELISA 检测试剂盒购于武汉菲恩生物科技公司。本研究主要使用仪器包括电磁场发生器(由海军工程大学电机系设计及制造)、倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司)、1240 型分光光度计(日本岛津公司)、迷你双电泳槽(北京市六一仪器厂)及凝胶成像仪(美国 Bio-RAD 公司)等。

二、实验材料取材

取腰椎间盘突出症、腰椎管狭窄症或腰椎滑脱症患者(性别不限)行髓核摘除或切除的退变椎间盘髓核组织，均由华中科技大学同济医学院附属普爱医院脊柱二科手术提供。标本取材均经患者知情同意并签署知情同意书；本研究同时经华中科技大学同济医学院附属普爱医院伦理委员会审批(审批批号：KY2018-019-01)。

三、NP 细胞提取与培养

将手术中取出的髓核组织放入含冰盐水的无菌试剂盒内，并及时转移至实验室。取材标本经含 0.1% 庆

大霉素的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)和 DMEM 各漂洗 3 次，将髓核组织放置于 DMEM 培养基中，采用 0.5% 链霉菌蛋白酶在培养箱内消化髓核约 30 min；在 4 °C 环境下离心(1500 rpm)10 min 后倒出液体；再用 0.2% 胶原蛋白酶消化(用 DMEM 配制，含 5% 胎牛血清)髓核 5 h，经 70 μ m 细胞过滤器过滤后离心去除液体，加入培养基再次离心(1500 rpm)10 min，再加入培养基(含 20% 胎牛血清及 2.5% 维生素 C 的 DMEM)混匀，经细胞计数后继续培养 7~10 d，待细胞铺满单层时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

四、实验分组及干预

取生长良好的二代细胞，调节细胞密度至 1×10^6 个/ml，将其分别接种于 A、B 共 2 组 6 孔板内，每孔 1 ml，加培养液至 2.5 ml。于接种第 2 天(约 24 h 后)将 B 组细胞放置于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱(内置磁场发生器)中进行曝磁培养，设置细胞培养板处的磁场强度为 0.8 mT，磁场频率 50 Hz，脉宽 150 μ s，曝磁时间 30 min，每间隔 12 h 给予 1 次曝磁干预，共干预 6 次。A 组细胞则放置于同等条件但无磁场干预的培养箱中培养。

同上法将髓核细胞接种于 C、D 共 2 组 6 孔板内，于接种 24 h 后将 D 组培养板中的 3 孔分别更换为含 0.5、1.0、5.0 μ g/ml CV-1808 的培养液；另外 3 孔则分别更换为含 0.5、1.0、5.0 μ M CSC 的培养液。C 组培养板则更换不含药物的培养液作为对照。C 组、D 组细胞均置于上述同样参数磁场中进行培养。

五、蛋白免疫印迹法检测 A_{2A} 受体表达

取出 6 孔板内 A、B 两组细胞，经 PBS 液洗涤 3 次后；刮下所有细胞并移入 5 ml 离心管中，在 4 °C 环境下离心(1500 rpm)5 min 收集细胞。加入适量预冷的 200 μ l RIPA 裂解液及 2 μ l 蛋白酶抑制剂，在冰面上裂解 30 min 后于 4 °C 环境下离心(15000 rpm)15 min，取上清即为细胞总蛋白。采用 BCA 法进行蛋白定量及调平，上样缓冲液混匀蛋白变性，置于 -80 °C 冰箱内保存。经 5% 浓缩胶及 12% 分离胶 SDS-PAG 凝胶电泳、PVDF 膜转印、5% TBST 脱脂奶粉室温封闭 2 h，用含 1% BSA 的 TBST 封闭液稀释抗体，4 °C 过夜；再用含 1% BSA 的 TBST 封闭液稀释相应二抗，室温下摇床孵育 PVDF 膜 2 h 进行 ECL 法显色。采用 Image Quant LAS4000 mini 超灵敏化学发光成像仪进行成像，以 β -actin 作为内参蛋白进行校准。

六、RT-PCR 检测 A_{2A} 受体表达

按照 Trizol 试剂盒操作说明提取 NP 细胞内总 RNA，并采用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度及纯度，经逆转录合成 cDNA，参照 All-in-oneTm qPCR Mix 试剂盒操作说明进行荧光定量 PCR 检测。引物由上

海生工生物工程有限公司设计合成,引物具体序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

引物	序列
A _{2A} R	上游:5'-CACGCAGAGTTCATCTTCA-3'
	下游:5'-ATGGGTACCACGTCCTCAA-3'
GAPDH	上游:5'-AACTTTGGCATTGT-3'
	下游:5'-ACACATTGGGGGTA-3'

七、ELISA 法检测 IL-1β 及 TNF-α 浓度

IL-1β 及 TNF-α 浓度检测步骤均严格参照试剂盒说明书进行。以 TNF-α 检测为例,将 50 μl 标准品、样品和对照品分别加入到涂布有微孔板的 6 孔板中,然后向每个孔加入 50 μl 特异性生物素偶联抗体。在 20~22 ℃ 环境下孵育 120 min 后弃去废液,洗涤 3 次后加入 100 μl 链霉抗生物素-辣根过氧化物酶,进一步孵育 60 min 后再次洗涤,加入 100 μl 底物色原液。经孵育 10 min 后再加入 100 μl 终止液,采用酶标仪(美国 BioTek 公司)检测 450 nm 处样本光密度值(optical density, OD),并根据标准曲线计算目标蛋白浓度。

八、统计学分析

本研究所得计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 20.0 版统计学软件包进行数据分析,多组间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA),进一步两两组间比较采用最小显著差异法(least-significant difference, LSD), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、脉冲电磁场对 NP 细胞 A_{2A} 受体蛋白表达的影响

通过蛋白免疫印迹法(Western Blot, WB)检测发现, B 组 NP 细胞经脉冲电磁场干预后,其 A_{2A} 受体蛋

白表达水平较 A 组细胞明显增强,具体情况见图 1。

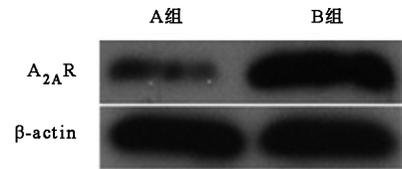


图 1 脉冲电磁场对 NP 细胞 A_{2A} 受体蛋白表达的影响

二、脉冲电磁场对 NP 细胞 A_{2A} 受体 mRNA、IL-1β 以及 TNF-α 表达的影响

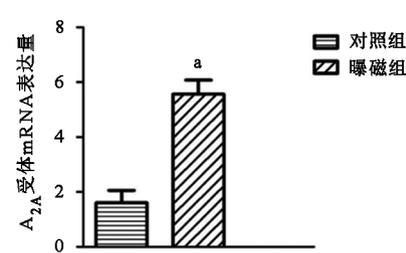
NP 细胞经脉冲电磁场干预后,发现其 A_{2A} 受体 mRNA 表达较对照组明显增强 ($P < 0.05$), 详见图 2。经脉冲电磁场处理的 NP 细胞其 IL-1β、TNF-α 表达均较未给予曝磁干预的对照明显降低,具体情况见图 3、4。

三、不同浓度 CV-1808 对曝磁处理后 NP 细胞 IL-1β 及 TNF-α 表达的影响

D 组 NP 细胞经不同浓度(包括 0.5、1.0、5.0 μg/ml) CV-1808 及脉冲电磁场处理后,发现该组 NP 细胞 IL-1β 及 TNF-α 表达水平均较 C 组细胞明显降低 ($P < 0.05$); 进一步比较发现, D2 (1.0 μg/ml) 组、D3 (5.0 μg/ml) 组 NP 细胞 IL-1β 及 TNF-α 表达水平亦较 D1 (0.5 μg/ml) 组明显降低 ($P < 0.05$), D2 组、D3 组 NP 细胞 IL-1β 及 TNF-α 表达水平组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具体情况见图 5、图 6。

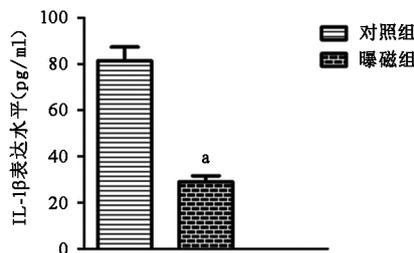
四、不同浓度 CSC 对曝磁处理后 NP 细胞 IL-1β 及 TNF-α 表达的影响

D 组 NP 细胞经不同浓度(0.5、1.0、5.0 μM) CSC 及脉冲电磁场处理后,发现该组 NP 细胞 IL-1β 及 TNF-α 表达水平均较 C 组 NP 细胞明显增强 ($P < 0.05$); 进一步比较发现, D1 (0.5 μM) 组、D2 (1.0 μM) 组、D3 (5.0 μM) 组 IL-1β 及 TNF-α 表达水平组间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具体情况见图 7、图 8。



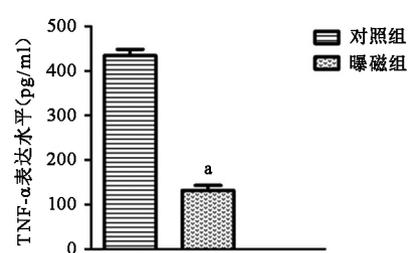
注:与对照组比较, $a P < 0.05$

图 2 对照组与曝磁组 A_{2A} 受体 mRNA 相对表达量比较



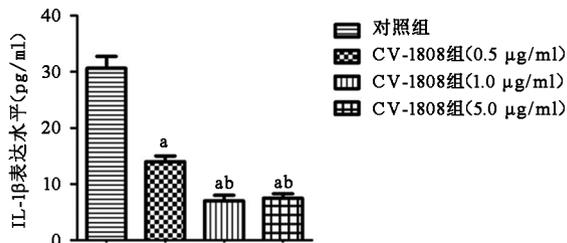
注:与对照组比较, $a P < 0.05$

图 3 对照组与曝磁组 IL-1β 表达量比较



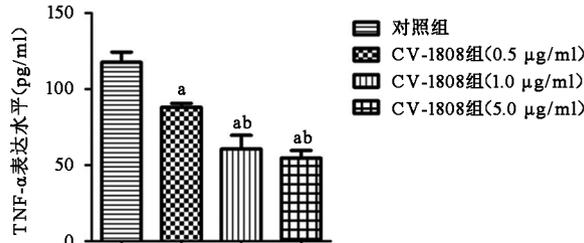
注:与对照组比较, $a P < 0.05$

图 4 对照组与曝磁组 TNF-α 表达量比较



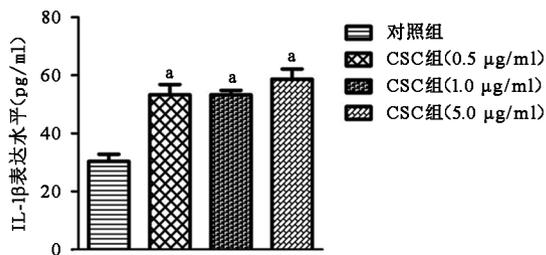
注:与对照组比较,^a*P*<0.05;与 CV-1808 组(0.50 μg/ml)比较,^b*P*<0.05

图 5 不同浓度 CV-1808 对曝磁处理后 NP 细胞 IL-1β 表达量的影响



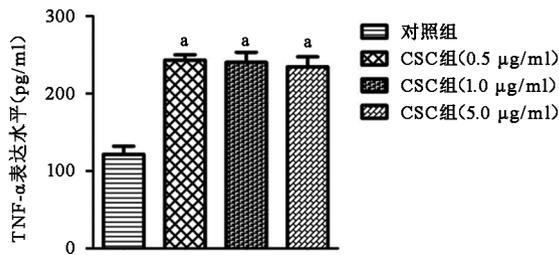
注:与对照组比较,^a*P*<0.05;与 CV-1808 组(0.50 μg/ml)比较,^b*P*<0.05

图 6 不同浓度 CV-1808 对曝磁处理后 NP 细胞 TNF-α 表达量的影响



注:与对照组比较,^a*P*<0.05

图 7 不同浓度 CSC 对曝磁处理后 NP 细胞 IL-1β 表达量的影响



注:与对照组比较,^a*P*<0.05

图 8 不同浓度 CSC 对曝磁处理后 NP 细胞 TNF-α 表达量的影响

讨 论

本研究发现脉冲电磁场干预能明显抑制人退变 NP 细胞炎症因子 IL-1β、TNF-α 表达;同时 NP 细胞经脉冲电磁场处理后,其 A_{2A} 腺苷受体表达水平明显增强;NP 细胞经 A_{2A} 腺苷受体拮抗剂处理后,能逆转脉冲电磁场对 IL-1β、TNF-α 的抑制作用;而经 A_{2A} 腺苷受体激动剂处理后,能增强脉冲电磁场刺激对 IL-1β、TNF-α 的抑制作用。

电磁场作为一种非侵入性治疗手段,目前在临床中得到广泛应用,如常被用于治疗腰痛等疾患,并取得较满意效果,但其作用机制目前尚不明确。相关研究表明,脉冲电磁场干预能显著促进软骨细胞 A_{2A}、A₃ 受体表达,并通过该受体调控 IL-6、IL-8 等炎症因子水平^[7]。NP 细胞与软骨细胞类似,在生物学特征方面具有很多相似之处^[8-10],但目前鲜见电磁场对 NP 细胞生物学影响的相关报道,故本研究选取 NP 细胞作为实验对象,并观察特定参数电磁场干预对 NP 细胞腺苷受体及炎症因子表达的影响。

NP 细胞在盘源性腰背痛产生过程中具有重要作用,如暴露于纤维环外的 NP 细胞参与多种细胞因子及趋化因子分泌,其中 IL-1 是关键性细胞因子之一,能促使 NP 细胞分泌 IL-4、IL-6、IL-10、TNF-α 等一系列细胞因子及多种基质金属蛋白酶(matrix metalloprotei-

nase, MMP)^[11-12],这些细胞因子或趋化因子能促进 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞及肥大细胞浸润,从而诱发免疫级联反应。在上述病理过程中,细胞因子能诱导纤维环外层血管及神经纤维再生长入,这是产生盘源性疼痛的重要基础^[13-14]。在炎症环境下,由椎间盘和免疫细胞产生的神经源性因子,特别是神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)等能诱导背根神经节中疼痛相关阳离子通道激活,这些通道去极化会导致椎间盘源性和下肢放射性疼痛^[4,15]。另外 IL-1、TNF-α 等细胞因子还能直接促进椎间盘细胞 P 物质表达,从而诱发盘源性腰痛^[16]。相关临床研究也表明,椎间盘组织内的炎症因子(如 IL-7、IL-8 及 IL-10 等)浓度与盘源性腰痛程度具有正相关性^[17]。本研究结果显示,经脉冲电磁场处理的人退变 NP 细胞 IL-1、TNF-α 表达水平均较未给予曝磁干预的对照细胞明显降低,表明脉冲电磁场干预能减轻人退变 NP 细胞介导的炎症反应,这可能也是脉冲电磁场能有效缓解盘源性腰背痛的重要机制之一。

相关研究指出,在炎症反应中腺苷是一种重要的内源性信号转导分子,主要聚集在炎症部位,通过激活并结合与 G 蛋白偶联的腺苷受体发挥生理效应;腺苷结合不同亚型受体,所产生的生理学效应也不同,其中 A_{2A} 腺苷受体在炎症反应中通常起负调控作用^[5]。本

研究结果显示,经脉冲电磁场处理后的人退变 NP 细胞其 A_{2A} 受体表达明显增强,表明 A_{2A} 受体可能参与了调控炎症因子表达过程。为进一步验证该结果,本研究分别采用 A_{2A} 受体拮抗剂和激动剂对曝磁 NP 细胞进行干预,发现 A_{2A} 腺苷受体拮抗剂能完全逆转脉冲电磁场对 NP 细胞 IL-1 β 、TNF- α 的抑表达作用; A_{2A} 受体激动剂则能进一步增强脉冲电磁场对 NP 细胞 IL-1 β 、TNF- α 表达的抑制作用。上述结果提示脉冲电磁场对人退变 NP 细胞炎症因子表达的抑制作用可能是通过上调 A_{2A} 腺苷受体实现的。

综上所述,本研究结果表明,脉冲电磁场干预能显著抑制人退变 NP 细胞炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 表达,并且该抑制作用可能是通过上调 A_{2A} 腺苷受体表达实现的;但 A_{2A} 受体是通过何种途径参与调控 IL-1 β 、TNF- α 表达,是否还调控其他细胞因子、趋化因子表达,均有待后续研究进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain [J]. *Lancet*, 1999, 354 (9178): 581-585. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)01312-4.
- [2] Schwarzer AC, Aprill CN, Derby R, et al. The prevalence and clinical features of internal disc disruption in patients with chronic low back pain [J]. *Spine*, 1995, 20(17): 1878-1883.
- [3] Molinos M, Almeida CR, Caldeira J, et al. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration [J]. *J R Soc Interface*, 2015, 12(104): 20141191. DOI: 10.1098/rsif.2014.1191.
- [4] Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(1): 44-56. DOI: 10.1038/nrrheum.2013.160.
- [5] Sands WA, Palmer TM. Adenosine receptors and the control of endothelial cell function in inflammatory disease [J]. *Immunol Lett*, 2005, 101(1): 1-11. DOI: 10.1016/j.imlet.2005.04.005.
- [6] Renato A, Hugo D, Rogério P, et al. Pulsed electromagnetic field therapy effectiveness in low back pain: A systematic review of randomized controlled trials [J]. *Porto Biomed J*, 2016, 1(5): 156-163. DOI: org/10.1016/j.pbj.2016.09.001.
- [7] Vincenzi F, Targa M, Corciulo C, et al. Pulsed electromagnetic fields increased the anti-inflammatory effect of A2A and A3 adenosine receptors in human T/C-28a2 chondrocytes and hFOB 119 osteoblasts [J]. *PLoS one*, 2013, 8(5): e65561. DOI: 10.1371/journal.pone.0065561.
- [8] Lee CR, Sakai D, Nakai T, et al. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat [J]. *Eur Spine J*, 2007, 16(12): 2174-2185. DOI: 10.1007/s00586-007-0475-y.
- [9] 刘伟军, 吴华, 葛保健, 等. 维拉帕米在电磁场刺激骨髓间充质干细胞增殖与分化过程中的作用 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28(2): 83-85. DOI: 10.3760/j.issn:0254-1424.2006.02.004.
- [10] 朱波, 吴华, 黄珊珊, 等. 电磁场作用下大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化与增殖 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2015, 37(10): 727-732. DOI: 10.3760/j.issn:0254-1424.2015.010.002.
- [11] 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 [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23(7): 1165-1177. DOI: 10.1016/j.joca.2015.02.017.
- [12] Zhongyi S, Sai Z, Chao L. Effects of nuclear factor kappa B signaling pathway in human intervertebral disc degeneration [J]. *Spine*, 2015, 40(4): 224-232. DOI: 10.1097/BRS.0000000000000733.
- [13] Ohtori S, Inoue G, Miyagi M. Pathomechanisms of discogenic low back pain in humans and animal models [J]. *Spine J*, 2015, 15(6): 1347-1355. DOI: 10.1016/j.spinee.2013.07.490.
- [14] Ohtori S, Miyagi M, Inoue G. Sensory nerve ingrowth, cytokines, and instability of discogenic low back pain: A review [J]. *Spine Surg Relat Res*, 2018, 2(1): 11-17. DOI: 10.22603/ssr.2016-0018.
- [15] Yang G, Liao W, Shen M. Insight into neural mechanisms underlying discogenic back pain [J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(11): 4427-4436. DOI: 10.1177/0300060518799902.
- [16] Kepler CK, Markova DZ, Hilibrand AS, et al. Substance P stimulates production of inflammatory cytokines in human disc cells [J]. *Spine*, 2013, 38(21): E1291-1299. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3182a42bc2.
- [17] Zhang Y, Chee A, Shi P, et al. Intervertebral disc cells produce interleukins found in patients with back pain [J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2016, 95(6): 407-415. DOI: 10.1097/PHM.0000000000000399.

(修回日期: 2019-10-20)

(本文编辑: 易 浩)