

基础研究

应用 luzindole 建立双足大鼠脊柱侧凸模型

马晓生, 吕飞舟, 吴俊哲, 陈 誉, 接 健, 马天文, 张 权, 姜建元

(复旦大学附属华山医院骨科 200040 上海市)

【摘要】目的:探讨应用褪黑素拮抗剂 luzindole 建立双足大鼠脊柱侧凸模型的可行性。**方法:**健康刚断乳 SD 大鼠 30 只,随机分为 A、B、C、D、E 共 5 组,每组 6 只。A、B、C、D 四组通过截去双前肢和尾巴建立双足大鼠模型, A、B、C 三组每天 18:00~20:00 点间腹腔注射褪黑素拮抗剂 luzindole,剂量分别为 0.2mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg;D 组每天相同时间腹腔注射同体积的生理盐水;E 组作为空白对照组。观察 3 个月,每只大鼠每天称重,每间隔 1 个月摄脊柱全长正位 X 线片,观察各组大鼠体重变化及侧凸发生情况。**结果:**A、B、C 三组共有 7 只大鼠发生了脊柱侧凸,发生率为 38.9%,其中 A 组有 3 只发生了脊柱侧凸,Cobb 角为 29°~34°,较 B、C 两组显著($P<0.05$);D、E 两组均未发生脊柱侧凸。不同时间点 5 组大鼠体重均有增加,体重增加最多的是注射褪黑素拮抗剂剂量最大的 C 组。**结论:**对双足大鼠使用 0.2mg/kg 褪黑素拮抗剂 luzindole 能成功建立脊柱侧凸模型;并且可促进大鼠的生长。

【关键词】脊柱侧凸;双足大鼠;褪黑素;luzindole

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.10.14

中图分类号:R682.3,Q576 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-10-0774-04

Establishment of the scoliosis model in bipedal rats/MA Xiaosheng, LÜ Feizhou, WU Junzhe, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(10): 774~777

【Abstract】Objective:To discuss the feasibility and effect of establishing a scoliosis model of bipedal rats by using the antagonist of melatonin receptor, luzindole. **Method:**Thirty healthy and weaning SD rats were divided to five groups randomly with each group of six rats. The animals in groups A, B, C and D were made for bipedal models. The group A, B and C were abdominally given the antagonist of melatonin receptor, luzindole (ip) from 6pm to 8pm every evening. The doses of luzindole were 0.2mg/kg, 0.5mg/kg and 1mg/kg for three groups respectively. The group D was administered the same volume of normal saline (ip) contemporarily. The group E made up of quadruped rats were looked as sham. Three months later, all rats were weighted every day and taken X-ray of whole spine every month to note the status of scoliosis. **Result:** 7 (38.9%) animals in group A, B and C developed scoliosis. Three rats in group A had developed scoliosis with the curve Cobb's angle range of 29°~34°, which was more distinctive than those in group B and C ($P<0.05$), while animals in groups D and E had no scoliosis. The animals in group C accepting the highest dose of antagonist of melatonin receptor had body weight increased most. **Conclusion:** Use of 0.2mg/kg antagonist of melatonin (luzindole) can establish the scoliosis model successfully, and promote the growth of rats as well.

【Key words】Scoliosis; Bipedal rat; Melatonin; Luzindole

【Author's address】Department of Orthopaedics, Huashan Hospital, Fudan University, 200040, China

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)是一种严重危害青少年健康的疾病,约占全部脊柱侧凸的 80%。几千年来,其发病机制尚未明确。目前研究认为特发性脊柱侧凸可能

与下列因素有关:(1)遗传因素;(2)肌肉骨骼系统;(3)生物力学因素;(4)结缔组织发育异常;(5)神经-平衡系统功能障碍;(6)神经内分泌系统异常。现在许多研究根据特发性脊柱侧凸的已知的病因,制作了许多相关动物模型,如松果体切除鸡及双足大鼠模型、持续光照鸡模型、低氧暴露小鼠模型、脊柱栓系兔模型、肋骨栓系山羊模型、肋骨切除犬模型等。其中前三种模型比较符合特发性,

第一作者简介:男(1972-),副教授,医学博士,研究方向:脊柱侧凸

电话:(021)52887130 E-mail:mxs893@sina.com

通讯作者:吕飞舟

后面几种更像是继发性改变。目前还没找到制作理想脊柱侧凸动物模型的办法。本实验希望通过向双足大鼠腹腔注射褪黑素拮抗剂制造大鼠脊柱侧凸模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

同时期出生的健康刚断乳的 SD 大鼠 30 只,雌雄相当,体重约 50g,所有动物均购自复旦大学医学院动物房。所有大鼠均在 10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔注射麻醉下摄脊柱全长正位 X 线片,体位为站立位,将头部和身体摆正好后摄片。摄片参数为 41kV,2.80mAs。摄片结果均未发现任何脊柱侧凸或其他脊柱畸形,符合实验要求。所有动物室内分组笼养,室温控制在(22±2)℃,8:00~20:00 时自然光线或开灯,其余时间关灯。由专人喂养,自由饮水,并根据大鼠的生长速度调节饲料和饮用水的高度。所有饲料均购自复旦大学医学院动物房。Luzindole(褪黑素 MEL-a 受体的拮抗剂,5mg/支)(美国 Sigma 公司)。

1.2 双足鼠模型制作及动物分组

所有动物适应性生长 1 周,随机分为 5 组,每组为 6 只。A、B、C、D 四组为双足大鼠组,分别在 10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔注射麻醉下,将鼠两条前腿在肩关节水平、尾巴在基底部用 3 个 0 不可吸收缝线打结,然后将大鼠前腿用剪刀剪掉,尾巴在根部剪掉。由于结扎牢固,无明显出血。术后双足鼠均能直立行走,饮食生活均无困难。根据大鼠的生长速度,每天对大鼠食物和饮用水的高度进行调节,促使大鼠直立的时间变长。A、B、C 三组每天 18:00~20:00 时腹腔注射褪黑素拮抗剂 luzindole,剂量分别为 0.2mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg。D 组每天相同时间腹腔注射相同体积的生理盐水。E 组为四足大鼠组,为空白对照。用苦味酸标志分组,A 组涂苦味酸于左耳,B 组涂于右耳,C 组涂于左半身,D 组涂于右半身,E 组不做任何标志。每个组再用苦味酸编号为 1、2、3、4、5、6。

1.3 褪黑素拮抗剂 luzindole 溶液的配制

本实验所使用的褪黑素拮抗剂 luzindole 为美国 Sigma 公司生产,规格为 5mg/支,晶体、脂溶性,先用无水酒精将其溶解,然后将其配制于生理盐水(NS)中。配成三种浓度的 luzindole 溶液,第一种是 A 组用,为 5mg luzindole/250ml NS。第二

种是 B 组用,为 5mg luzindole/100ml NS。第三种是 C 组用,为 10mg luzindole/100ml NS。

1.4 观察指标

1.4.1 体重记录 每只大鼠每天称重并记录。实验时间为每天 18:00~20:00 时。时间为 3 个月。

1.4.2 脊柱侧凸 Cobb 角 每间隔 1 个月摄脊柱全长正位 X 线片,仍用 10%水合氯醛(300mg/kg)腹腔注射麻醉下摄脊柱全长 X 线片,体位为站立位,将头部和身体摆正好后摄片。摄片参数仍为 41kV,2.80mAs。记录脊柱侧凸的发生情况,脊柱侧凸的诊断标准为 Cobb 角大于 10°。

1.4.3 血小板中钙调蛋白水平 实验结束时所有大鼠被处死前,抽各组的静脉血,离心分离出血小板,用 ELISA 法测定各组血小板中的钙调蛋白水平。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件分析数据,数据以均数±标准差表示,组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 体重测量结果

D 组中的 1 只双足大鼠死于麻醉过量,其余均健康存活,死亡动物被排除在研究之外。双足大鼠几乎直立行走,躯干在胸部前屈,但在觅食或饮水时,躯干立刻变直,它们饮食和生活均无困难。大鼠逐渐适应了双足行为,甚至有时双足大鼠可直立奔跑、蹲坐时胸腹部能够离开地面。各组大鼠的平均体重情况见表 1。在第 3 个月时,注射褪黑素拮抗剂 luzindole 浓度最高的 C 组大鼠平均体重增加最多。

2.2 大鼠脊柱侧凸的发生情况

D、E 组无 1 例发生脊柱侧凸,腹腔注射褪黑素拮抗剂 luzindole 的实验组第 3 个月时有 7 只双足大鼠发生了脊柱侧凸,发生率为 38.9%,侧凸 Cobb 角 12°~34°,平均 20°,侧凸的部位均为胸腰段,凸向右侧的有 4 只,凸向左侧的有 3 只(表 2 及图 1)。

3 讨论

3.1 实验原理

Thillard^[1]于 1959 年报道松果体切除可以诱导出鸡脊柱侧凸的动物模型,O'Kelly 等^[2]对鸡、大

表 1 各组大鼠不同观察时间点的平均体重情况
($\bar{x}$,g)

	0.5 个月	1 个月	1.5 个月	2 个月	2.5 个月	3 个月
A 组	170	205	220	226	262	305
B 组	151	197	223	245	260	267
C 组	189	238	271	304	334	335
D 组	156	207	238.3	258	281	266
E 组	141	193	219	259	304	310

注:同时间点各组间比较 $P>0.05$

表 2 各组不同观察时间发生脊柱侧凸的大鼠数量

	1 个月时	2 个月时	3 个月时(Cobb 角)
A 组(6 只)	1	2	3(34°、30°、29°)
B 组(6 只)	1	1	2(29°、25°)
C 组(6 只)	0	1	2(13°、12°)
D 组(5 只)	0	0	0
E 组(6 只)	0	0	0

鼠和仓鼠行松果体切除术,虽然三组动物的血浆褪黑素都降到零,但是只有鸡发生了侧凸。Machida 等^[3]将松果体切除的四足鼠前肢剪除造成了鼠的二足行走状态,从而诱导出鼠侧凸模型。这些实验充分说明了褪黑素的减少和双足状态是脊柱侧凸发生的前提条件,这也是本实验的实验原理基础。

研究^[4]证明将大鼠的松果体切除或通过持续光照可制作脊柱侧凸模型,可能是因为切除松果体后或持续光照后褪黑素降低。褪黑素(Mel)存在

明显昼夜节律,光中期最低,暗中期最高,很多实验表明褪黑素受体(MR)也有昼夜节律,峰值在光中期(12:00),谷值在暗中期(0:00),傍晚 18:00~20:00 时为第二次高峰,且研究表明褪黑素受体的昼夜节律是自主的,不受褪黑素的调节^[5,6]。故本实验腹腔注射 luzindole 在每天 18:00~20:00 时,并保证每天均同一时间注射。

3.2 结果分析

3.2.1 成功率 MR 属膜受体,是 G 蛋白偶联受体超家族的一员,有 7 个跨膜段。根据 MR 对 Mel 的亲合力,可分为高亲合力受体(ML1,pmol/L)和低亲合力受体(ML2,nmol/L)。吴亮等^[7]证实了人脊椎骨中存在 MT1、MT2 两种褪黑素受体,MT2 受体在椎旁肌的凹侧明显大于凸侧,而 MT1 没有显著的差别,褪黑素可能通过存在于脊椎骨中的 MT1、MT2 受体来调节脊柱的生长发育。邱勇等^[8]也指出特发性脊柱侧凸患者两侧椎旁肌 MT2 存在差异,MT1 无明显差异,认为这种 MT2 的差异可能为继发性改变,在特发性脊柱侧凸的发病中不起主要作用。而本实验所使用褪黑素拮抗剂 luzindole 是褪黑素的高亲合力受体拮抗剂,低亲合力受体没有被拮抗,这可能是本实验相对松果体切除的脊柱侧凸模型成功率较低的原因。

3.2.2 体重变化 Nagai 等^[9]在 1976 年通过实验得出 AIS 患者的生长激素分泌比相同年龄的健康对照组高。Dymling 等^[10]在 1978 年报道了 1 例全垂体功能减退症用生长激素治疗发生了明显的结



图 1 腹腔注射褪黑素拮抗剂或生理盐水后 3 个月时各组大鼠脊柱侧凸发生情况 a A 组大鼠胸腰段向右侧凸,Cobb 角约为 30° b B 组大鼠胸腰段向左侧凸,Cobb 角约为 29° c C 组大鼠胸腰段向左侧凸,Cobb 角约为 13° d、e D、E 组大鼠均未发生脊柱侧凸

构性脊柱侧凸。Machida 等^[11]报道了松果体切除后发生脊柱侧凸的小鸡较没有侧凸的小鸡长的大,且在切除松果体的小鸡皮下注射生长激素,较单纯松果体切除的小鸡,脊柱侧凸的严重程度更大,且进展更快。褪黑素和生长激素表现出相反的作用。这可能是腹腔注射褪黑素拮抗剂 luzindole 浓度最高的 C 组平均体重明显大于其他各组的原因。

3.2.3 侧凸 Cobb 角变化 Benitez^[12]和 Anton^[13]提出了褪黑素和钙调蛋白相互作用学说,在用褪黑素培养的马-达二氏犬肾(细胞系)[Madin-Darby canine kidney(cell line),MDCK]和神经母细胞瘤(N1E-115)细胞中,低浓度(10^{-9} mol/L)褪黑素可拮抗 Ca^{2+} 和钙调蛋白的结合,引起细胞骨架的改变,而高浓度(10^{-5} mol/L)时褪黑素与细胞小管非特异性结合,可抑制特异性的对 Ca^{2+} -钙调蛋白的拮抗作用。可以看出褪黑素和钙调蛋白的相互作用关系既可以结合又可以拮抗。本实验 C 组使用褪黑素拮抗剂浓度比较高,使与褪黑素受体结合的褪黑素减少,这时候的褪黑素可能处于相对低浓度水平,此时褪黑素可能作为钙调蛋白的拮抗剂,因此如果与褪黑素受体结合的褪黑素减少,相应地作为钙调蛋白的拮抗剂的褪黑素相对增多。而最新研究表明^[14,15],钙调蛋白的拮抗剂三苯氧胺 tamoxifen(TMx)可有效改变双足先天性褪黑素缺乏的 C57BL/6 小鼠和松果体切除鸡脊柱侧凸模型的自然进程,使侧凸角度变小。此时的褪黑素作为钙调蛋白的拮抗剂也会使侧凸角度变小,所以本研究中 C 组侧凸角度较 A、B 组小。

4 参考文献

- Thillard MJ. Vertebral column deformities following epiphysectomy in the chick [J]. C R Hebd Seances Acad Sci, 1959, 248 (8): 1238-1240.
- O'Kelly C, Wang X, Raso VJ, et al. The production of scoliosis following pinealectomy in young chickens rats and hamsters[J]. Spine, 1999, 24(1): 35-43.
- Machida M, Dubousset J, Imamura Y, et al. An experimental study in chickens for the pathogenesis of idiopathic scoliosis[J]. Spine, 1993, 18(12): 1690-1695.
- 王亭, 胡有谷, 郑英刚, 等. 褪黑素在鸡脊柱侧凸模型中的作用[J]. 中华骨科杂志, 2002, 22(10): 623-626.
- 赵瑛. 松果腺褪黑素受体研究现状及展望[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(11): 1054-1057.
- Azeddine B, Letellier K, Wang da S, et al. Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2007, 462: 45-52.
- 吴亮, 邱勇, 李雷. 人脊椎骨中褪黑素受体 mRNA 的表达及其意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(4): 232-234.
- 邱勇, 吴亮, 王斌, 等. 特发性脊柱侧凸双侧椎旁肌褪黑素受体含量的差异性比较研究[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(12): 826-829.
- Nagai T, Obata K, Ogata T. Growth hormone therapy and scoliosis in patients with Prader-Willi syndrome[J]. Am J Med Genet A, 2006, 140(15): 1623-1627.
- Dymling JF, Willner S. Progression of a structural scoliosis during treatment with growth hormone: a case report[J]. Acta Orthop Scand, 1978, 49(3): 264-268.
- Machida M, Dubousset J, Imamura Y, et al. Pathogenesis of idiopathic scoliosis: SEPS in chickens with experimentally induced scoliosis and in patients with idiopathic scoliosis[J]. J Pediatr Orthop, 1994, 14(3): 329-335.
- Benitez KG, Huerto DL, Anton TF. Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro[J]. Brain Res, 1991, 557(1-2): 289-292.
- Anton TF, Martinez I, Tovar R, et al. Modulation of the sub-cellular distribution of calmodulin by melatonin in MDCK cells[J]. J Pineal Res, 1998, 24(1): 35-42.
- Akel I, Demirkiran G, Alanay A, et al. The effect of calmodulin antagonists on scoliosis: bipedal C57BL/6 mice model [J]. Eur Spine J, 2009, 18(4): 499-505.
- Akel I, Kocak O, Bozkurt G, et al. The effect of calmodulin antagonists on experimental scoliosis: a pinealectomized chicken model[J]. Spine, 2009, 34(6): 533-538.

(收稿日期: 2009-05-19 修回日期: 2009-07-21)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)