

基础研究

褪黑素信号通路对青少年特发性脊柱侧凸软骨细胞增殖的影响

朱 锋, 邱 勇, 张 兴, 王渭君, 刘 臻, 郭 惊, 吕 峰, 林小龙

(南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008)

【摘要】目的:检测褪黑素对青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)患者软骨细胞增殖的影响,并探讨其与 AIS 病因学的关系。方法:选取 2009 年 1 月~2010 年 12 月在我院手术治疗的 15 例 AIS 患者(AIS 组)和 6 例非脊柱侧凸患者(对照组)的软骨组织(髂软骨或棘突软骨)行软骨细胞培养。取 P2 代细胞分别用浓度为 0M、 10^{-11} M、 10^{-9} M、 10^{-7} M、 10^{-5} M 褪黑素连续刺激 3d。加入 Brdu 12h 后用 ELLSA 法标记,显色后在酶标仪 450nm 波长下检测光密度(optical density, OD)值以评估软骨细胞的增殖情况。结果:不同浓度(10^{-11} M、 10^{-9} M、 10^{-7} M、 10^{-5} M)褪黑素刺激以后,对照组软骨细胞的 OD 值分别增加了 $(5.7\pm 6.7)\%$ 、 $(32.1\pm 11.1)\%$ 、 $(57.5\pm 11.9)\%$ 、 $(103.2\pm 16.2)\%$ ($P<0.05$)。AIS 组软骨细胞的 OD 值相分别增加了 $(-0.3\pm 22.3)\%$ 、 $(5.8\pm 29.9)\%$ 、 $(12.7\pm 36.1)\%$ 、 $(10.2\pm 44.0)\%$ ($P>0.05$)。结论:褪黑素可以有效促进正常软骨细胞增殖,但是却无法有效促进 AIS 患者软骨细胞的增殖,说明 AIS 患者中褪黑素信号通路调节软骨内成骨的过程可能存在异常。

【关键词】青少年特发性脊柱侧凸;褪黑素;增殖;软骨细胞

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.02.12

中图分类号:R682.3 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2013)-02-0156-05

The effect of melatonin on the proliferation of chondrocytes in the growth plate of the adolescent idiopathic scoliosis patients/ZHU Feng, QIU Yong, ZHANG Xing, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2013, 23(2): 156-160

【Abstract】 Objectives: To identify the effect of melatonin on the proliferation of chondrocytes in the growth plate of adolescent idiopathic scoliosis(AIS) patients, and to explore the role of melatonin in the etiopathogenesis of AIS. Methods: The chondrocytes derived from iliac growth plate of 15 AIS patients and 6 controls were cultured in monolayer and passaged. The growth plate chondrocytes at the end of second passage were cultured with melatonin for 3 consecutive days and reached the final concentration of 0M, 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M. The chondrocytes proliferation was investigated based on ELLSA after the cells incubated with Brdu for 12 hours. Optical density(OD) value was measured by microplate reader at the wavelength of 450nm. Results: After the treatment of melatonin, the OD value of the normal growth plate chondrocytes increased by $(5.7\pm 6.7)\%$, $(32.1\pm 11.1)\%$, $(57.5\pm 11.9)\%$, $(103.2\pm 16.2)\%$ ($P<0.05$) respectively, and the OD value of the AIS growth plate chondrocytes increased by $(-0.3\pm 22.3)\%$, $(5.8\pm 29.9)\%$, $(12.7\pm 36.1)\%$, $(10.2\pm 44.0)\%$ ($P>0.05$) respectively. Conclusions: The proliferation of chondrocytes of growth plate can be promoted by melatonin in the normal group but not in the AIS group, which suggests that the abnormal process of endochondral ossification regulated by the melatonin may contribute to the onset and progression of AIS.

【Key words】 Adolescent idiopathic scoliosis; Melatonin; Proliferation; Growth plate chondrocytes

【Author's address】 Spine Surgery, Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical School, Nanjing, 210008, China

基金项目:江苏省创新学者攀登项目(编号:BK2009001)

第一作者简介:男(1977-),副主任医师,博士学位,研究方向:脊柱外科

电话:(025)83105113 E-mail:qiaojun0616@163.com

通信作者:邱勇 E-mail:scoliosis2002@sina.com

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)是一种复杂的三维脊柱畸形,多发于青春期的女孩,其发病率为 2%~4%,病因尚不清楚^[1]。目前对 AIS 的人体测量学研究发现 AIS 女孩在青春期启动后其身高明显较同龄的正常女

孩高,臂长较长^[2]。影像学研究发现 AIS 女孩的胸椎椎体较正常对照组高,椎弓根较对照组细,提示 AIS 患者的前柱软骨内成骨过快、而后柱的膜内成骨较慢^[3]。我们以往的组织计量学研究显示 AIS 患者前柱生长板的增殖和分化的活性较高^[4],分子生物学研究表明 AIS 患者软骨细胞中的重要转录因子(SOX9)表达较正常对照高^[5]。这些研究均表明 AIS 患者存在软骨内成骨-膜内成骨的不对称,然而其发生机制却尚不清楚。褪黑素一直是 AIS 病因学研究的一个重要方向,其信号通路异常是否影响了 AIS 患者的软骨内成骨未检索到报道。故本研究的目的旨在探讨褪黑素在调节 AIS 生长板中软骨细胞增殖的过程是否存在异常,进而影响其脊柱的生长发育。

1 材料与方法

1.1 研究对象

随机选取 2009 年 1 月~2010 年 12 月在我院手术治疗的 15 例 AIS 患者(AIS 组)和 6 例非脊柱侧凸患者(对照组)。AIS 组患者胸主弯 9 例,腰主弯 6 例;年龄 11~16 岁,平均 13.4 岁,其中女性 13 例,男性 2 例;Cobb 角 40°~64°,平均 51.87°±8.34°;Risser 征 0~2 级,其中 0 级 6 例,1 级 1 例,2 级 8 例;对照组 6 例,其中骨盆骨折 3 例,腰椎滑脱 2 例,嗜酸性肉芽肿 1 例;年龄 10~16 岁,平均 12.5 岁,男性 4 例,女性 2 例,Risser 征 0~2 级。AIS 患者通过前屈试验及前后位 X 线平片确诊,经 MRI 排除可能存在的神经系统病变。排除有明确病因的先天性脊柱侧凸、神经肌源性脊柱侧凸、结缔组织病、骨软骨发育不良或者内分泌疾病伴发的脊柱侧凸。对照组青少年既往均无骨骼疾病史、代谢性疾病史或生长发育障碍等。如体检发现背部可疑不等高者,进行 X 线检查确认无脊柱畸形。本研究中所有患者因脊柱融合的需要,均需术中取自体髂骨。本课题获得医院伦理委员会批准通过,研究对象及其家长知情同意。

1.2 标本取材

AIS 组患者均在侧凸手术中取髂软骨。对照组中 5 例取髂软骨,1 例取棘突软骨。髂软骨于脊柱植骨融合术中取髂骨时采集髂后上嵴约 1×1×1cm 大小髂软骨,棘突软骨于手术暴露脊柱时取 0.3×0.3×0.5cm 大小棘突软骨,所有标本置于无菌离心管中。

1.3 实验试剂及仪器

达氏修正伊氏培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 低糖培养液 (pH7.2, Gibco), 胎牛血清 (FBS, Gibco), 双抗 (青霉素、链霉素) (Sigma), 0.25% 胰酶+0.02% 乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) (Sigma), 0.2% II 型胶原酶 (Gibco), 兔抗人 II 型胶原蛋白抗体 (一抗, 武汉博士德), 山羊抗兔 IgG (二抗, 北京博奥森), 链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合体 (SABC) 免疫组织化学试剂盒 (北京博奥森), 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 染色试剂盒 (北京博奥森), Brdu 细胞增殖试剂盒 (Millipore) YJ-875 医用净化工作台 (苏州净化仪器厂), CO₂ 细胞培养箱 (NAPCO), Megafuge1.0R 冷冻离心机 (Heraeus), CK40 相差显微镜 (Olympus), 酶标仪 (Sunrise), 25cm²、75cm² 细胞培养瓶 (Corning), 6 孔、96 孔细胞培养板 (Corning), 15ml 一次性离心管, 天平, 加样器。

1.4 软骨细胞的体外培养、扩增

将获取的标本采用两步酶消化法:0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (EDTA) 消化 30min, 0.2% II 型胶原酶消化 4.6h。消化后, 收集软骨细胞, 细胞计数板计数, 再接种于含 10% FBS 的 DMEM 培养皿中, 5% CO₂ 培养箱中饱和湿度、37℃ 下培养, 每 3~4d 换液一次, 待细胞近融合时, 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化 2~3min, 计数后按 1:3 传代。

1.5 软骨细胞的表型鉴定

将 P2 代软骨细胞按 2.4×10⁵/孔接种于放有盖玻片的 6 孔板内培养, 盖玻片提前用 75% 酒精浸泡过夜, 待细胞 70% 融合时取出爬片, 5% 多聚甲醛固定 20min, 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5min, 3% H₂O₂ 去离子水孵育 15min, 以灭活内源性过氧化物酶, 用山羊血清室温封闭 20min。甩去多余液体不洗。滴加 1:100 的一抗, 4℃ 过夜, 阴性对照以 PBS 代替一抗。PBS 冲洗 2min×3 次。滴加 1:100 的二抗, 37℃ 恒温箱 20min, PBS 冲洗 3min×3 次。滴加 SABC, 37℃ 恒温箱 20min。PBS 冲洗 5min×4 次。DAB 显色, 蒸馏水洗涤, 0.1% 茜素红复染 5min, 充分水洗。梯度酒精脱水, 镜下观察并拍照。

1.6 用 Brdu 法检测褪黑素处理后的软骨细胞的增殖

取 P2 代细胞计数后接种于 96 孔培养板中, 每孔 1×10⁴ 个细胞, 10% 胎牛血清培养基培养 24h

后,无血清培养 24h。然后用浓度分别 0M、 10^{-11} M、 10^{-9} M、 10^{-7} M、 10^{-5} M 褪黑素连续刺激(每 24h 更换一次培养基)3d。在褪黑素刺激结束前 12h 掺入 $10\mu\text{g/ml}$ Brdu。固定后分别用 anti-BrdU 的一抗和羊抗鼠的 IgG 二抗标记,四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)显色反应终止后置于酶标仪 450nm 波长测定光密度(optical density, OD)值。

1.7 统计分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,OD 值相对于空白对照的变化以百分比表示,所以数值均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,不同褪黑素浓度分组之间用单因素方差分析(ANOVA)进行比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

软骨组织细胞培养的 P2 代细胞进行 II 型胶原免疫组织化学染色观察显示,细胞核周围可见

棕褐色颗粒染色呈片状或团块状,为阳性结果(图 1)。

分别用浓度为 10^{-11} M、 10^{-9} M、 10^{-7} M、 10^{-5} M 的褪黑素连续刺激 3d 之后,正常人软骨细胞的 OD 值分别增加了 $(5.7\pm 6.7)\%$ 、 $(32.1\pm 11.1)\%$ 、 $(57.5\pm 11.9)\%$ 、 $(103.2\pm 16.2)\%$ ($P<0.05$)。褪黑素对正常软骨细胞的增殖起促进作用(图 2)。AIS 患者软骨细胞的 OD 值分别增加了 $(-0.3\pm 22.3)\%$ 、 $(5.8\pm 29.9)\%$ 、 $(12.7\pm 36.1)\%$ 、 $(10.2\pm 44.0)\%$ ($P>0.05$)。褪黑素对 AIS 患者软骨细胞的增殖没有显著的促进作用(图 2),且在不同 Risser 征和不同弯型中均没有显著的促进作用($P>0.05$,表 1)。

3 讨论

褪黑素是由松果体分泌的一种神经内分泌激素,除了调节生物的昼夜节律和季节性节律以外还广泛参与神经内分泌系统、生殖系统、免疫系统、心血管系统的功能调节^[6,7]。褪黑素与特发性

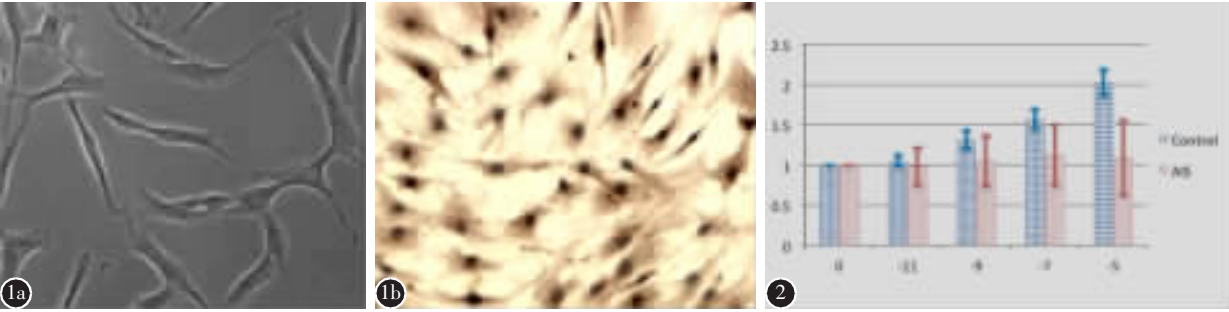


图 1 a P2 生长板软骨细胞 ($\times 100$) b II 型胶原免疫组织化学染色示细胞核周围可见棕褐色颗粒染色呈片状或团块状 ($\times 100$) 图 2 正常和 AIS 软骨细胞分别用浓度为 0M、 10^{-11} M、 10^{-9} M、 10^{-7} M、 10^{-5} M 的褪黑素刺激 3d 后 OD 值
Figure 1 a The growth plate chondrocytes P2 ($\times 100$) b Type II collagen immunohistochemical staining showed visible brown granular staining shaped patchy or mass around the nucleus Figure 2 The OD value of the AIS and normal growth plate chondrocytes after the treatment of melatonin for 3 days at the concentration of 0M, 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M

表 1 10^{-11} M、 10^{-9} M、 10^{-7} M、 10^{-5} M 褪黑素刺激后不同 Risser 征及不同弯型软骨细胞的 OD 值
Table 1 The OD value of the chondrocytes in different Risser syndrome and different curved after 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-5} M melatonin stimulated

	0M	10^{-11} M	10^{-9} M	10^{-7} M	10^{-5} M
Risser 0*	1	$(96.9\pm 13.0)\%$	$(95.7\pm 14.0)\%$	$(96.6\pm 21.5)\%$	$(88.1\pm 32.8)\%$
Risser 2	1	$(94.1\pm 27.2)\%$	$(114.1\pm 39.9)\%$	$(120.2\pm 42.8)\%$	$(122.7\pm 47.3)\%$
胸弯 Thoracic scoliosis	1	$(105.7\pm 20.7)\%$	$(104.7\pm 26.2)\%$	$(115.6\pm 40.7)\%$	$(115.1\pm 46.1)\%$
腰弯 Lumbar scoliosis	1	$(91.3\pm 19.4)\%$	$(107.4\pm 31.7)\%$	$(108.6\pm 22.8)\%$	$(103.5\pm 34.5)\%$

注: *Risser 征 1 级因例数少未进行统计分析
Note: *There was no statistical analysis in Risser 1 syndrome due to little cases

脊柱侧凸的关系一直是人们研究的热点,很多学者认为褪黑素的缺乏可能是导致脊柱侧凸发病的原因^[8]。自半个世纪前 Thillard 等通过切除鸡的松果体成功建立了脊柱侧凸模型后^[9],先后又有很多学者通过切除松果体在双足小鼠和大鼠身上成功复制了该模型^[8,10],并被认为是诸多脊柱侧凸的动物模型中唯一与人类 AIS 侧凸三维结构最为相似的模型^[11]。松果体的主要功能之一是分泌褪黑素,切除松果体导致的褪黑素缺乏就被认为是动物实验中脊柱侧凸发生的原因。后期研究在褪黑素自然缺乏、光照抑制缺乏的小鼠中均成功建立脊柱侧凸^[12,13]。然而对比 AIS 患者与年龄、性别匹配的正常对照的血清褪黑素和尿中褪黑素的代谢产物后,多数研究并未发现 AIS 患者的褪黑素水平存在异常,不能支持该假说^[14,15]。马晓生等通过注射褪黑素受体的抑制剂来拮抗褪黑素的功能成功建立脊柱侧凸动物模型,提示即使褪黑素水平正常,若其信号不能正常传递发生作用,也可能导致脊柱侧凸发生^[16]。

近年一些研究发现在 AIS 患者的成骨细胞、肌细胞及淋巴细胞中,褪黑素的信号通路均存在异常^[17-20]。我们的基因学研究发现褪黑素 MT2 受体的基因多态性与 AIS 的发病有关,是 AIS 的致病基因^[21];此外我们还发现 AIS 患者软骨细胞的 MT2 受体 mRNA 表达较正常对照者高^[22],并且在凹凸侧肌肉中的表达也存在显著性差异^[23]。这些提示 MT2 受体也可能在褪黑素信号通路异常中发挥作用。因此,尽管 AIS 患者的血清褪黑素水平并不存在异常,其信号通路中的这些异常也可能导致其发生功能异常而在 AIS 患者的病理变化及发病机制中发生作用。

软骨内成骨是一个非常复杂的过程^[24],包括了软骨细胞的增殖、肥大和凋亡等不同阶段;每一个不同阶段又包含各种复杂的胞外基质合成过程。软骨细胞的增殖和肥大,以及此过程中所伴随的细胞外基质的合成是长骨软骨内成骨纵向生长的主要力量^[25-27]。我们既往的研究证实人类脊椎骨中确实存在褪黑素受体的表达,认为褪黑素可以直接作用于脊柱^[28]。孙光权等^[29]的研究又证实了人类的软骨细胞中也存在褪黑素受体的表达,说明褪黑素可以直接作用于软骨细胞而影响软骨内成骨,而进一步影响脊柱的生长发育。故我们推测 AIS 患者中褪黑素信号通路调节软骨内成骨的

过程可能存在异常,进一步影响了 AIS 患者脊柱的正常生长发育。

我们的研究结果显示褪黑素可以有效促进正常软骨细胞的增殖,且这种促进作用存在明显的剂量依赖;结果中显示,大剂量的褪黑素使正常软骨细胞的增殖能力提高了大约一倍。然而在 AIS 患者中,褪黑素却无法有效促进软骨细胞的增殖,其增殖能力在不同浓度的褪黑素作用下没有差异。在 Risser 0 和 Risser 2 两组 AIS 患者中褪黑素都无法促进其软骨细胞的增殖,在胸弯组和腰弯组的 AIS 患者中褪黑素同样均无法促进其软骨细胞的增殖。即意味着 AIS 患者软骨细胞增殖对褪黑素的无反应性不受骨骼成熟度和弯型的影响。

Man 等^[30]在研究褪黑素对 AIS 成骨细胞的作用时也同样发现,褪黑素可以有效促进正常成骨细胞的增殖,但却无法有效促进 AIS 患者成骨细胞的增殖。这些研究结果中 AIS 患者软骨细胞增殖对褪黑素的无反应性佐证了 AIS 患者中褪黑素信号通路调节软骨内成骨的过程中存在异常,并进一步影响了 AIS 患者脊柱的正常生长发育;其效果也正好相当于脊柱侧凸动物模型中的松果体切除或者生理性低褪黑素。AIS 患者软骨细胞增殖对褪黑素的无反应性可能类似于动物模型中的松果体切除或生理性低褪黑素;共同印证了 AIS 褪黑素信号通路的异常可能是其发病的原因。

4 参考文献

1. Roach JW. Adolescent idiopathic scoliosis [J]. Orthop Clin North Am, 1999, 30(3): 353-365.
2. Siu King Cheung C, Tak Keung Lee W, Kit Tse Y, et al. Abnormal peri-pubertal anthropometric measurements and growth pattern in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 598 patients[J]. Spine, 2003, 28(18): 2152-2157.
3. Guo X, Chau WW, Chan YL, et al. Relative anterior spinal overgrowth in adolescent idiopathic scoliosis: results of disproportionate endochondral-membranous bone growth [J]. J Bone Joint Surg Br, 2003, 85(7): 1026-1031.
4. Zhu F, Qiu Y, Yeung HY, et al. Histomorphometric study of the spinal growth plates in idiopathic scoliosis and congenital scoliosis[J]. Pediatrics International, 2006, 48(6): 591-598.
5. 黄爱兵, 邱勇, 殷刚, 等. 青少年特发性脊柱侧凸患者软骨细胞中 Sox9 的表达及意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(12): 929-933.
6. Cagnacci A. Melatonin in relation to physiology in adult humans[J]. J Pineal Res, 1996, 21(4): 200-213.

7. Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, et al. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin[J]. *Biol Signals Recept*, 1999, 8(1-2): 56-63.
8. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, et al. Role of melatonin deficiency in the development of scoliosis in pinealectomized chickens[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1995, 77(1): 134-138.
9. Thillard MJ. Vertebral column deformities following epiphysectomy in the chick[J]. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 1959, 248(8): 1238-1240.
10. Turgut M, Yenisey C, Uysal A, et al. The effects of pineal gland transplantation on the production of spinal deformity and serum melatonin level following pinealectomy in the chicken[J]. *Eur Spine J*, 2003, 12(5): 487-494.
11. Wang X, Jiang H, Raso J, et al. Characterization of the scoliosis that develops after pinealectomy in the chicken and comparison with adolescent idiopathic scoliosis in humans[J]. *Spine*, 1997, 22(22): 2626-2635.
12. Machida M, Dubousset J, Yamada T, et al. Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6J mice without pinealectomy[J]. *J Pineal Res*, 2006, 41(1): 1-7.
13. 李中实, 康宇宁, 刘成刚, 等. 光照后鸡褪黑素变化与脊柱侧凸关系的实验研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2003, 13(5): 4.
14. Fagan AB, Kennaway DJ, Sutherland AD. Total 24-hour melatonin secretion in adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study[J]. *Spine*, 1998, 23(1): 41-46.
15. Brodner W, Krepler P, Nicolakis M, et al. Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2000, 82(3): 399-403.
16. 马晓生, 吕飞舟, 吴俊哲, 等. 应用 luzindole 建立双足大鼠脊柱侧凸模型[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2009, 19(10): 4.
17. Moreau A, Wang DS, Forget S, et al. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis[J]. *Spine*, 2004, 29(16): 1772-1781.
18. Letellier K, Azeddine B, Blain S, et al. Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis and new molecular concepts[J]. *Med Sci(Paris)*, 2007, 23(11): 910-916.
19. 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.
20. 邱旭升, 邱勇, 陈晖, 等. 青少年特发性脊柱侧凸患者褪黑素信号传导通路的初步研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2007, 17(3): 201-204.
21. Qiu XS, Tang NL, Yeung HY, et al. Melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism is associated with the occurrence of adolescent idiopathic scoliosis[J]. *Spine*, 2007, 32(16): 1748-1753.
22. 孙光权, 邱勇, 黄爱兵, 等. 青少年特发性脊柱侧凸患者软骨细胞中褪黑素受体的表达量[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2009, 19(3): 227-230.
23. Qiu Y, Wu L, Wang B, et al. Asymmetric expression of melatonin receptor mRNA in bilateral paravertebral muscles in adolescent idiopathic scoliosis [J]. *Spine*, 2007, 32(6): 667-672.
24. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate[J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 332-336.
25. Hunziker EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes [J]. *Microsc Res Tech*, 1994, 28(6): 505-519.
26. Adams SL, Cohen AJ, Lassova L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(3): 635-641.
27. Solomon LA, Berube NG, Beier F. Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2008, 84(2): 123-130.
28. 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.
29. 孙光权, 邱勇, 朱泽章, 等. 人软骨细胞中褪黑素受体 mRNA 的表达及意义[J]. *江苏医药*, 2009, 35(2): 156-158.
30. Man GC, Wang WW, Yeung BH, et al. Abnormal proliferation and differentiation of osteoblasts from girls with adolescent idiopathic scoliosis to melatonin[J]. *J Pineal Res*, 2010, 49(1): 69-77.

(收稿日期:2012-07-02 修回日期:2012-10-10)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)