

基础研究

人脊椎骨中褪黑素受体 mRNA 的表达及其意义

吴亮¹, 邱勇¹, 李雷²

(1 南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科; 2 科研部 210008 江苏省南京市)

【摘要】目的:检测人脊椎骨中是否存在褪黑素受体 mRNA 的表达,并探讨其意义。**方法:**取手术切除的人脊椎松质骨,抽提总 RNA。用逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测褪黑素受体 MT1、MT2 mRNA 的表达。**结果:**人脊椎骨总 RNA 以 MT1 和 MT2 两种受体引物进行的 RT-PCR 产物电泳呈阳性条带,其基因片段长度与 MT1 和 MT2 受体引物之间的核酸长度相当。**结论:**人脊椎骨中存在 MT1、MT2 两种褪黑素受体 mRNA 的表达,证明脊椎骨是褪黑素作用的靶器官。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。

【关键词】 褪黑素;受体;脊椎

中图分类号:R682.3,Q576 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-04-0232-03

Detection of melatonin receptor mRNA in human vertebra/WU Liang, QIU Yong, LI Lei//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(4): 232~234

【Abstract】 Objective:To verify the expression of melatonin receptor mRNA in human vertebra, and study its significance. **Method:**Spongy bone of human vertebrae was collected to obtain total RNA and the mRNA of melatonin receptor was detected by reverse transcript-polymerase chain reaction(RT-PCR) method. **Result:**The electrophoretic results of RT-PCR products by MT1 and MT2 primer were all positive. **Conclusion:**There exists melatonin receptor gene in human vertebra. It suggests that melatonin may act on the spine directly and regulate its growth and development.

【Key words】 Melatonin; Receptor; Vertebra

【Author's address】 Spinal Service, Affiliated Gulou Hospital, Medical College of Nanjing University, Nanjing, 210008, China

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^[1,2]。一般认为褪黑素主要通过褪黑素膜受体起作用,褪黑素受体分为 MT1、MT2、MT3 三种亚型,其中在人类只存在 MT1、MT2 两种亚型,其 DNA 序列已经清楚^[3]。褪黑素与特发性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^[4]。本实验试图检测人脊椎骨中是否存在褪黑素受体,从而明确褪黑素是否可以直接作用于脊柱来调节其生长发育。

1 材料与方法

1.1 实验标本

脊椎骨组织 1 例取自 18 岁男性脊柱骨折患者;5 例取自青少年特发性脊柱侧凸患者,其中男

性 1 例,女性 4 例,平均年龄 14.5 岁,平均 Cobb 角 78.6°。胚胎卵巢组织取自流产胎儿。

1.2 实验试剂及仪器

褪黑素受体引物、 β -actin 引物由上海生物工程有限公司合成。总 RNA 抽提所用 Trizol 试剂为 GIBCO 公司产品。RT-PCR 反应试剂盒购于 CLONTECH 公司 TITANIUM™ ONE-STEP RT-PCR KIT。电泳 Marker 为 MBI 公司产品。其它试剂为国产,分析纯级。MJ 公司生产的 PTC-200 基因扩增仪;Heraeus 公司生产的 Stratos 高速冷冻离心机;上海复日公司生产的 FR-200 紫外成像系统。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 提取 取椎体、棘突及关节突松质骨各约 100mg,剪成 2mm³ 大小碎粒,PBS 冲洗 3 次致碎粒颜色变白,用 0.25%胰酶-EDTA 37℃消化两次,每次 30min。3000 转/min 离心 10min,弃上清液。加入 Trizol 试剂 1ml,静置 5min,加入氯仿 200 μ l,剧烈振荡 15s,静置 2min,12000 转/min

第一作者简介:男(1975-),医师,医学硕士,研究方向:脊柱外科
电话:(025)83307114 E-mail:Drwuliang@yahoo.com.cn

4℃下离心 15min。小心吸取上清液(约 600μl),加入异丙醇 500μl,混匀,静置 10min,12000 转/min 4℃下离心 10min。弃去上清液,加入 75%乙醇 1ml 洗涤,漩涡震荡 30s,7500 转/min 4℃离心 5min,弃上清液,重复洗涤一次,弃上清液。风干后加入焦碳酸二乙酯(DEPC)水 55℃、10min 充分溶解,调整浓度为 0.2μg/μl;分光光度计测其 260nm/280nm 比值在 1.8~2.0 之间,证明抽提效果良好。取胚胎卵巢组织 50μg,加入 Trizol 试剂 1ml,彻底匀浆,静置 5min,其余步骤同前。

1.3.2 引物设计与 RT-PCR MT1 引物序列:上游引物为 5'-GGTGCTGATGTCGATA-3',下游引物为 5'-AGAAGATGACTATGATCATG-3',扩增片段长度为 368bp;MT2 引物序列:上游引物为 5'-CTCCCTATCGCTGTCGTGTC-3',下游引物为 5'-ATCTGGGGAGCCATTTCTTG-3',扩增片段长度 224bp;内参照 β-actin 引物序列参考 Titan™ One Tube RT-PCR Kit(德国 BM 公司产品)说明书,上游引物为 5'-CCAAGGCCAACC GCGAGAA-GATGAC-3';下游引物为 5'-AGGTACATG-GTGCTGCCGCCAGAC-3',扩增片段长度为 587bp。RT-PCR 采用一步法进行,反应总体系为 50μl,其中 Thermostrabilizing Reagent 25μl,GC-Melt 10μl,10 X Buffer 5μl,50 X dNTP Mix 1μl,Oligo (dt) Primer 1μl,50 X RT-TITANIUM Taq Enzyme Mix 1μl,Recombinant Rnase Inhibitor 1μl,MT1 或 MT2 Primer Mix 2μl,β-actin Primer Mix 2μl,模板 2μl。模板 a、b 为椎体松质骨及关节突松质骨总 RNA;模板 c 为双蒸水,作为阴性对照;模板 d 为胚胎卵巢组织总 RNA,作为阳性对照^[9]。将各反应管同时置于同一 PCR 扩增仪中,94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 50s,循环 35 次。最后 72℃延伸 10min。

1.3.3 RT-PCR 产物检测 在含有 0.5%溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶上加入扩增产物 10μl 及 2μl 溴酚兰缓冲液,电泳 8V/cm,30min,紫外观察扩增条带。扩增所得阳性产物各取 2.5μl 作为模板,重新配制各自反应体系,进行再扩增,琼脂糖凝胶电泳,胶回收,送上海生物工程技术有限公司测序。

2 结果

见图 1。所有以 MT1、MT2 为引物的椎体、棘突及关节突松质骨 RT-PCR 产物中,均可见大小

分别为 400bp 和 200bp 左右的阳性条带,阳性对照胚胎卵巢 RT-PCR 产物也可见 400bp 和 200bp 左右的阳性条带。测序结果表明人脊椎骨 MT1、MT2 的 RT-PCR 产物序列与 GeneBank 中 MT1、MT2 的 cDNA 序列相吻合,说明人脊椎骨中确实存在 MT1、MT2 mRNA 的表达。阴性对照组未扩增出阳性条带,排除了总 RNA 中污染基因组 DNA 引起的假阳性的可能。β-actin 内对照呈阳性,说明总 RNA 抽提物是正常的。

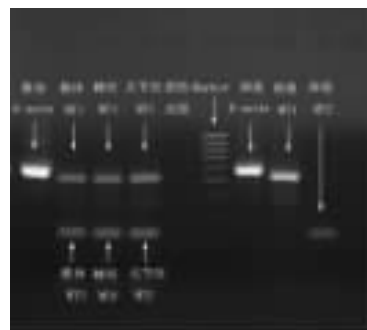


图 1 脊椎骨中 MT1、MT2 mRNA 的 RT-PCR 检测结果

3 讨论

3.1 褪黑素受体的生物学特性和体内分布情况

褪黑素受体具有以下特点:(1)低结合容量(0.1~10fmol/mg);(2)高亲和力(0.1~80pmol/L);(3)动力学分析表明其结合为可逆性及可饱和性;(4)特异性分析表明该特异结合位点只对 Mel 及其激动剂具高度特异性;(5)亚细胞分布的研究结果表明褪黑素受体既存在于细胞膜也存在于细胞核内,表明褪黑素不仅作用于细胞膜,也与核内受体结合,促进基因转录及蛋白合成过程;(6)褪黑素受体也存在明显的昼夜节律,且与褪黑素的节律相反,褪黑素受体的节律是自主的,受控于昼夜节律起步点^[6-8]。赵瑛等^[9]应用放射配体结合法证实了中期引产胎儿 16 个脑区包括大脑皮质(额叶、顶叶、枕叶、颞叶)、海马、扣带回、视交叉、嗅球、丘脑、下丘脑、桥脑、中脑、延髓、小脑、胼胝体,以及脊髓都存在褪黑素受体。其中以视交叉含量最高,可能与褪黑素的主要功能——光感受和光信号转导有关;嗅球含量较高,提示褪黑素对嗅觉有一定的调节作用;下丘脑含量也较高,推测与褪黑素对内分泌系统的调节作用有关;脊髓存在褪黑素受体,且颈胸段含量高于腰骶段,提示褪黑素对脊髓神经信号的传入与传出有一定的调节作用,但其具体作用机制有待进一步阐明。鉴于褪黑

素作用的广泛性,推测人体许多组织器官可能是其作用的靶器官。刘志民等^[7]应用放射配体结合法首次证实了人胚胎 16 个外周组织(心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、大肠、甲状腺、胸腺、肾上腺、卵巢、子宫、睾丸、前列腺及膀胱组织)均存在褪黑素的特异性结合位点,其中胸腺及脾脏结合容量最高,甲状腺、肾上腺、性腺组织次之,这些均与褪黑素所具有的对免疫及内分泌系统的明确调节作用相吻合。本实验利用 RT-PCR 扩增出的基因片段长度与 MT1、MT2 受体引物之间的核酸长度相当,证明人脊椎骨中确实存在褪黑素受体。因此可以认为脊柱是褪黑素直接作用的靶器官。

3.2 褪黑素及其受体与特发性脊柱侧凸的关系

特发性脊柱侧凸是青少年最常见的脊柱畸形,其病因学一直是研究的热点^[9]。Machida 等^[10]报导鸡切除松果体后可产生脊柱侧凸,其椎体旋转、剃刀背畸形以及体感诱发电位的变化均与人类非常相似。他们对 90 只孵化后 3d 的鸡行松果体切除术,结果发现发生脊柱侧凸的鸡其褪黑素水平明显比未发生脊柱侧凸的鸡低,而术后补充褪黑素可明显降低脊柱侧凸的发生率^[4]。因此,他们认为褪黑素的缺乏是导致脊柱侧凸发病的原因。Machida 等^[11]还发现在特发性脊柱侧凸患者中,进展性脊柱侧凸患者(>10°/年)的褪黑素水平明显比稳定性脊柱侧凸患者(<10°/年)。因此,他们认为褪黑素可作为判断特发性脊柱侧凸进展性的有效指标。但他们同时指出对于其它类型的脊柱侧凸,如先天性脊柱侧凸,用褪黑素判定其进展性并不适用。Fagan^[12]认为褪黑素可能与脑干的平衡功能和脊柱的生长对称有关。Machida 等^[4,11]认为由于褪黑素的缺乏所导致的中枢神经系统(包括下丘脑、脑干、小脑、脊髓)功能异常可影响脊柱和椎旁肌生长发育的对称性和平衡性,从而导致脊柱侧凸。Inoh^[13]则认为褪黑素除了作用于中枢神经系统以外,还可以直接调控脊椎的生长和塑型。本实验结果证实了 Inoh 的观点,褪黑素可以直接通过存在于脊椎骨中的 MT1、MT2 受体来调节人体脊柱的生长发育。Koyama 等^[14]对 4 周的雌鼠连续 4 周注射不同剂量的褪黑素,结果发现小鼠的骨密度平均增加 36%,单位体积中的骨量增加 49%。Cheng 等^[15]发现 58% 的 AIS 患者存在骨量降低,骨质疏松的发生率高达 18%。表明褪黑素可抑制破骨细胞活性,促进成骨细胞的分化和新骨

形成。他们认为此种改变是原发性的,与 AIS 的病因学密切相关。因此可以推测褪黑素缺乏所导致的骨量降低可能在 AIS 的发病中发挥重要作用。

本实验证实了人脊椎骨中确实存在褪黑素受体,为研究褪黑素与特发性脊柱侧凸的关系提供了实验依据。然而,对于褪黑素通过脊椎骨中的褪黑素受体调节脊柱生长发育的具体作用机制尚需进一步研究。

4 参考文献

1. Cagnacci A. Melatonin in relation to physiology in adult humans[J]. *J Pineal Res*, 1996, 21(4): 200-213.
2. Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, et al. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin[J]. *Biol Signals Recept*, 1999, 8(12): 56-63.
3. Kokkola T, Laitinen JT. Melatonin receptor genes[J]. *Ann Med*, 1998, 30(1): 88-94.
4. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, et al. Role of melatonin deficiency in the development of scoliosis in pinealectomised chickens[J]. *J Bone Joint Surg[Br]*, 1995, 77(1): 134-138.
5. 刘冬萍, 孙中安, 刘志民. RT-PCR 分析探测人胚胎卵巢中的褪黑素受体[J]. *江西医学院学报*, 2001, 41(4): 41-43.
6. 赵瑛, 邵福源, 何淑芬, 等. 人胚胎中中枢神经系统褪黑素受体的鉴定及生物学特性[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(1): 12-14.
7. 刘志民, 邹俊杰, 沈玉美, 等. 人胚胎外周组织褪黑素受体的鉴定[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(1): 8-11.
8. 赵瑛, 邵福源, 彭树勋. 大鼠下丘脑褪黑素受体昼夜节律的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(11): 1066-1067.
9. 朱锋, 邱勇, 郑伟娟, 等. 青少年特发性脊柱侧凸患者椎间盘纤维环胶原的分布及其意义[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2004, 14(4): 233-236.
10. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, et al. An experimental study in chickens for the pathogenesis of idiopathic scoliosis[J]. *Spine*, 1993, 18(): 1609-1613.
11. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, et al. A possible role in pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis[J]. *Spine*, 1996, 21(10): 1147-1152.
12. 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.
13. Inoh H, Kawakami N, Matsuyama Y, et al. Correlation between the age of pinealectomy and the development of scoliosis in chickens[J]. *Spine*, 2001, 26(9): 1014-1021.
14. Koyama H, Nakade O, Takada Y, et al. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation[J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(7): 1219-1229.
15. Cheng JC, Guo X. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A primary problem or secondary to the spinal deformity[J]. *Spine*, 2002, 27(15): 1716-1721.

(收稿日期: 2004-08-09 修回日期: 2004-10-28)

(英文编审 王忠植)

(本文编辑 卢庆霞)