

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

孙光权,邱 勇,黄爱兵,李海波,邱旭升

(南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008 南京市)

【摘要】目的:观察青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)患者软骨细胞中褪黑素受体含量的变化,并探讨其与 AIS 病因学的关系。**方法:**随机选取 2007 年 1 月~2007 年 12 月在我院手术治疗的 22 例 AIS 患者及 8 例非脊柱侧凸(肿瘤、外伤等)患者(对照组)。AIS 组患者年龄 10~16 岁,平均 12.7 岁,平均 Cobb 角 60.1°,其中 10 例在术中取髂软骨,12 例取棘突软骨。对照组患者年龄 10~15 岁,平均 12.9 岁,其中 7 例在术中取髂软骨,1 例取棘突软骨。对髂软骨和棘突软骨标本进行细胞培养至二代,取二代细胞用 II 型胶原免疫组化染色方法进行软骨细胞表型鉴定,并抽提总 RNA,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测软骨细胞中褪黑素受体两种亚型 MTNR1A、MTNR1B 的 mRNA 表达量。**结果:**两组患者软骨细胞 II 型胶原免疫组化染色均为阳性表达。AIS 组软骨细胞中 MTNR1A、MTNR1B mRNA 的相对表达量分别为 0.44 ± 0.29 和 0.54 ± 0.31 ,对照组分别为 0.69 ± 0.18 和 0.83 ± 0.30 ,组间比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)。**结论:** AIS 患者软骨细胞中 MTNR1A、MTNR1B 的 mRNA 表达均减少,这可能与 AIS 的发生、发展有关。

【关键词】青少年特发性脊柱侧凸;褪黑素受体;软骨细胞

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2009.03.12

中图分类号:R682.3,Q735 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-03-0227-04

Expression of melatonin receptors in chondrocyte of adolescent idiopathic scoliosis patients/SUN Guangquan, QIU Yong, HUANG Aibing, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(3): 227~230

【Abstract】 Objective: To investigate the expression of melatonin receptors in chondrocyte derived from adolescent idiopathic scoliosis (AIS) patients, and explore the role of melatonin in the pathogenesis of scoliosis. **Method:** From January 2005 to December 2005, two groups were defined as AIS group and control group. AIS group consisted of 22 patients with an average age of 12.7 years, ranging from 10 to 16 years. The average Cobb angle was 60.1°. 10 patients' iliac cartilage and 12 patients' spinal process cartilage were taken during spinal surgery. Control group consisted of 8 subjects with an average age of 12.9 years, ranging from 10 to 15 years who underwent surgery because of benign tumors, trauma. 7 patients' iliac cartilage and 1 patients' spinal process cartilage were taken during surgery. The chondrocyte from iliac cartilage and spinal process cartilage were cultivated and serial subcultivated in vitro. Immunohistochemical stain of collagen II were performed to confirm the P2 chondrocyte phenotype. The mRNA expression of melatonin receptor 1A (MTNR1A) and melatonin receptor 1B (MTNR1B) in chondrocyte were detected by RT-PCR method. **Result:** The collagen type II immunohistochemical staining was positive in cells of two groups. The mRNA expression level of MTNR1A and MTNR1B was 0.44 ± 0.29 and 0.54 ± 0.31 in AIS group and 0.69 ± 0.18 and 0.83 ± 0.30 in control group respectively, which showed significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Decreased expression of MTNR1A and MTNR1B in chondrocyte of AIS patients were detected. This abnormal expression of melatonin receptor in AIS patients show that melatonin may be related to the pathogenesis of AIS.

【Key words】 Adolescent idiopathic scoliosis; Melatonin receptor; Chondrocyte

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

基金项目:江苏省卫生厅重大项目(K200610)

第一作者简介:男(1981-),医学硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(025)83105121 E-mail:sunguangquan1981@163.com

褪黑素(melatonin)是松果体分泌的一种重要的神经内分泌激素,在哺乳动物中主要有两个亚

型,褪黑素受体 1A(MTNR1A)和褪黑素受体 1B(MTNR1B)。其与青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)发病的关系是近年来研究的热点^[1,2]。但是, AIS 患者外周血清褪黑素水平与脊柱侧凸之间是否有着必然联系目前还存在争议^[3,4]。Moreau 等^[5]研究发现 AIS 患者的发病可能与血清褪黑素水平没有直接相关性,但是与褪黑素信号传导通路异常密切相关。我们先前的研究^[6]发现 MTNR1B 基因多态性与 AIS 的发病显著相关,与 Moreau 的研究结果相符,提示褪黑素受体的基因多态性可能通过调节受体的表达,从而影响褪黑素信号的传导。本研究旨在探讨 AIS 患者软骨细胞中是否存在褪黑素受体的表达异常,从而了解其与 AIS 病因学之间的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

随机选取 2007 年 1 月~2007 年 12 月在我院手术治疗的 22 例 AIS 患者及 8 例非脊柱侧凸患者。AIS 组患者均行全脊髓 MRI 检查,排除神经系统可能存在的病变;年龄 10~16 岁,平均 12.7 岁,其中女性 20 例,男性 2 例; Cobb 角 40°~100°,平均 60.1°,Risser 征 0~3 级。对照组 8 例,均摄站立位全脊柱正位 X 线片,排除脊柱侧凸,其中脊柱肿瘤 2 例,椎间盘突出症 1 例,脊柱骨折 1 例,髋关节脱位 4 例;年龄 10~15 岁,平均 12.9 岁,女性 7 例,男性 1 例, Risser 征 0~3 级。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 组中 10 例患者在侧凸手术中取髂软骨, 12 例取棘突软骨。对照组中 7 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。

采用胚胎卵巢组织作为褪黑素受体表达阳性对照(胚胎卵巢组织取自流产胎儿)。

1.3 实验试剂及仪器

胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(GIBCO 公司); II 型胶原一抗、二抗、增敏二氨基联苯胺(DAB)显色液(北京中杉金桥);褪黑素受体引物、 β -actin 引物、SuperScript™ III 逆转录酶(美国 Invitrogen 公

司);CK40 相差显微镜(Olympus 公司),Megafuge 110R 冷冻离心机(Heraeus 公司),电泳仪(Bio2Red 公司),MJ2100 型 PCR 仪(MJ 公司)。

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%胎牛血清(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

采用 II 型胶原免疫组织化学法进行软骨细胞的表型鉴定。对 P2 代细胞用爬片技术培养,待细胞贴壁后 2~3d 取下载玻片, PBS 浸泡 3 次,每次 10min; 3%过氧化氢室温下孵育 10min; PBS 浸泡 3 次,每次 5min,加丙酮固定 30min, PBS 浸泡 3 次,每次 10min, 10%牛血清白蛋白室温下封闭 20min; 弃去液体,滴加 1:100 的一抗 4℃过夜; PBS 洗 3 次,每次 10min;滴加 1:100 的二抗, 37℃孵育 30min; PBS 浸泡 3 次,每次 10min; DAB 显色(按说明书操作),苏木素复染,脱水,封片。用 PBS 代替一抗作为空白对照。光镜下观察 II 型胶原的表达。

1.6 软骨细胞总 RNA 的抽提

取 5×10⁶ 个 P2 代细胞,加 1ml Trizol 静置 5min(室温),加入 200 μ l 氯仿,剧烈振荡 15s,静置 3min, 4℃ 12000r/min 离心 15min。取上层水相(约 600 μ l),加入异丙醇 500 μ l,混匀,室温静置 10min, 4℃ 12000r/min 离心 10min,弃上清液。加 75%酒精 1ml 震荡混匀, 4℃ 7000r/min 离心 5min,弃上清液,重复 2 次。风干酒精加入 DEPC 水充分溶解沉淀。比色法测定样本 OD_{260/280} 值,计算总 RNA 浓度,如此值在 1.8~2.0,说明 RNA 抽提效果良好。取流产胎儿卵巢组织 50 μ g,加入 Trizol 试剂 1ml,彻底匀浆,静置 5min,其余步骤同前。将两组样本总 mRNA 逐个抽提后放入 -80℃冰箱,待所有样本收集完全后,集中进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。

1.7 引物设计与 RT-PCR

MTNR1A、MTNR1B 及内参照 β -actin 的引物序列及其扩增片段长度见表 1。采用两步法 RT-

表 1 MTNR1A、MTNR1B 和内参照 β -actin 的引物序列及产物长度

	引物序列	片段长度
MTNR1A	上游 5'-GGTGCTGATGTCGATA-3'	368bp
	下游 5'-AGAAGATGACTATGATCATG-3'	
MTNR1B	上游 5'-CTCCCTATCGCTGTCGTGC-3'	224bp
	下游 5'-ATCTGGGGAGCCATTCTTG-3'	
β -actin	上游 5'-GGCATCCTCACCTGAAGTA-3'	200bp
	下游 5'-GGGCTGTTGAAGCTCTCAA-3'	

PCR 进行。(1)逆转录过程:使用 Invitrogen 公司的两步法进行 RT-PCR 反应(按说明书操作);(2)聚合酶链反应(PCR)过程:反应总体积为 25 μ l,体系成分:10 $\times$ buffer 2.5 μ l,25mM Mg^{2+} 1.5 μ l,2.5mM 脱氧核苷三磷酸(dNTP)2 μ l,上游引物 1 μ l,下游引物 1 μ l,cDNA 2 μ l,Taq 酶 0.2 μ l,DEPC 预处理水 14.8 μ l。将反应管置于 PCR 扩增仪中,95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45s,55 $^{\circ}$ C 退火 45s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,以上三步循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.8 RT-PCR 产物检测与结果处理

在含有 0.5%溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶上加入扩增产物 5 μ l 及 1 μ l 溴酚兰缓冲液,8V/cm 电泳 30min,紫外线下观察扩增条带。数码摄像后应用 Bandscan 5.0 图像分析软件对条带进行吸光度峰值下灰度积分,所得数值与相应 β -actin 灰度积分值的比值即为 MTNR1A 和 MTNR1B mRNA 的相对量。

1.9 统计分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,

MTNR1A、MTNR1B 的相对含量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

两组患者髌软骨和棘突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,后插页 II)。

所有以 MTNR1A、MTNR1B 为引物的软骨细胞 RT-PCR 产物中,均可见大小分别为 368bp 和 224bp 的条带,说明人软骨细胞中确实存在 MTNR1A、MTNR1B 的表达(图 2)。

AIS 组软骨细胞中 MTNR1A、MTNR1B 的 mRNA 相对表达量分别为 0.44 ± 0.29 和 0.54 ± 0.31 ,对照组分别为 0.69 ± 0.18 和 0.83 ± 0.30 ,组间比较均有显著性差异($P < 0.05$)。

3 讨论

1959 年 Thillard^[7]发现松果体切除可以导致新生小鸡脊柱畸形的发生。由于褪黑素是松果体分泌的主要激素,因此,血清褪黑素水平低下与脊柱侧凸发生之间是否有着必然联系引起了研究者的广泛兴趣。Machida 等^[8]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。由此他们认为褪黑素的缺乏可能是导致脊柱侧凸发病的原因。但褪黑素与脊柱侧凸之间的关系存在很多的争议。有学者发现松果体切除后并不是所有的小鸡都会出现脊柱侧凸^[9],并且多数学者发现



图 2 以 MTNR1A、MTNR1B 为引物的棘突软骨、髌软骨细胞及卵巢组织的 RT-PCR 产物中,均可见大小分别为 368bp 和 224bp 的条带

肌肉内移植松果体或者腹腔内注射褪黑素并不能阻止脊柱侧凸的发生与发展^[3,4]。还有研究表明 AIS 患者的血清褪黑素水平并不比正常人低^[10]。因此我们推测可能有褪黑素血清水平以外的环节异常导致脊柱侧凸的发生。

Moreau 等^[5]研究发现 AIS 患者成骨细胞的褪黑素信号传导通路存在异常,他认为这种异常可能与 Gi 蛋白 (inhibitory guanine nucleotide-binding protein) 过度磷酸化有关。我们先前的研究也发现 MTNR1B 基因启动子区基因多态性与 AIS 的发病相关^[6]。因此我们认为褪黑素受体基因多态性的异常可能影响受体的表达, AIS 患者中异常的受体表达同样可以引起褪黑素传导信号大小的改变,最终与脊柱侧凸的发生发展相关。

目前认为脊柱前后柱生长的不平衡在 AIS 的发生和发展中发挥重要作用^[11]。椎体的生长主要来源于椎体生长板,在生长期,生长板内的软骨细胞受局部生长因子和全身激素的调节,从而保证生长板内软骨细胞增殖与凋亡的平衡^[12],而褪黑素可能是其中一个重要的调节因素。然而对于褪黑素在软骨细胞上的表达,国内外尚未见报道。本实验利用 RT-PCR 扩增出的基因片段长度与 MTNR1A、MTNR1B 引物之间的核酸长度相当,证明软骨细胞中确实存在褪黑素受体,可以认定软骨细胞也是褪黑素作用的靶细胞。褪黑素可能通过软骨细胞中的 MTNR1A、MTNR1B 直接作用于软骨组织,来调节软骨细胞的增殖与凋亡和软骨内成骨活跃程度,影响人体脊柱的生长发育。本研究发现 AIS 组患者软骨细胞中 MTNR1A、MTNR1B 的表达均显著低于非脊柱侧凸组。这与我们之前 MTNR1B 基因多态性的研究结果是一致的^[6]。邱勇等^[13]也发现 AIS 患者两侧椎旁肌褪黑素受体表达存在差异。由此,我们推测褪黑素受体基因多态性的异常可能影响了褪黑素受体的表达,进而引起下游褪黑素信号传导通路的异常,最终影响脊柱侧凸的发生发展。Sobajima 等^[10]对脊柱侧凸兔模型的研究提示无功能性的褪黑素受体同样可能会导致脊柱侧凸的发生。

本研究初步揭示了 AIS 患者软骨细胞中 MTNR1A、MTNR1B 分布存在异常,其可能与 AIS 的发生、发展有关,但其具体机制仍然不明。另外受体的异常表达可能不仅反映在受体的数量,在受体的信号传导通路中也会有所改变。因此,有关

AIS 软骨细胞中褪黑素受体的研究仍需进一步深入。

4 参考文献

1. Oyama J, Murai I, Kanazawa K, et al. Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels [J]. *J Pineal Res*, 2006, 40(3): 219-224.
2. 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.
3. Wang X, Moreau M, Raso VJ, et al. Changes in serum melatonin levels in response to pinealectomy in the chicken and its correlation with development of scoliosis [J]. *Spine*, 1998, 23(22): 2377-2381.
4. Bagnall KM, Beuerlein M, Johnson P, et al. Pineal transplantation after pinealectomy in young chickens has no effect on the development of scoliosis [J]. *Spine*, 2001, 26(9): 1022-1027.
5. Moreau A, Wang DS, Forget S, et al. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis [J]. *Spine*, 2004, 29(16): 1772-1781.
6. Qiu XS, Yeung HY, Qiu Y, et al. Melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism is associated with the occurrence of adolescent idiopathic scoliosis [J]. *Spine*, 2007, 32(16): 1748-1753.
7. Thillard MJ. Deformation de la collone vertebrale consecutives a lepiphsyctomie chez le poussin [J]. *C Rend Acad SC*, 1959, 46(1): 22-26.
8. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, et al. Melatonin: a possible role in pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis [J]. *Spine*, 1996, 21(10): 1147-1152.
9. Bagnall K, Raso VJ, Moreau M, et al. The effects of melatonin therapy on the development of scoliosis after pinealectomy in the chicken [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1999, 81(2): 191-199.
10. Sobajima S, Kin A, Baba I, et al. Implication for melatonin and its receptor in the spinal deformities of hereditary lordoscoliotic rabbits [J]. *Spine*, 2003, 28(6): 554-558.
11. Zhu F, Qiu Y, Yeung HY, et al. Histomorphometric study of the spinal growth plates in idiopathic scoliosis and congenital scoliosis [J]. *Pediatr Int*, 2006, 48(6): 591-598.
12. Provot S, Schipani E. Molecular mechanisms of endochondral bone development [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(3): 658-665.
13. 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.

(收稿日期: 2008-07-28 末次修回日期: 2008-12-12)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)