

基础研究

A 型肉毒毒素一侧椎旁肌注射建立双足直立鼠
脊柱侧凸模型的初步研究沈晓龙^{1,2}, 周许辉¹, 刘 洋¹, 田 野¹, 东 人¹, 袁 文¹

(1 第二军医大学附属长征医院骨科 200003 上海市凤阳路 415 号;

2 上海市第十人民医院骨科 200072 上海市延长中路 301 号)

【摘要】目的:探讨应用 A 型肉毒毒素(BTX-A)建立双足直立鼠脊柱侧凸模型的可行性。**方法:**将 56 只 4 周龄雌性 SD 大鼠随机分为 A、B、C、D、E、F、G 组, 每组 8 只。将所有大鼠截除双前肢, 予高笼喂养, 建立双足直立鼠模型, 同时行全脊柱前后位 X 线片检查, 剔除存在脊柱侧凸的大鼠, 并及时补充。截肢后 3d, A~F 组大鼠于胸椎后凸区域右侧椎旁肌多点注射 BTX-A, 注射剂量分别为 100U、50U、25U、12.5U、6.25U、3.125U, 注射体积为 0.5ml, G 组注射等体积生理盐水。注射后 2 周, 存活大鼠行全脊柱前后位 X 线片检查, 明确各组大鼠是否存在脊柱侧凸, 若脊柱向右侧侧凸成角定义为正值, 若脊柱向左侧侧凸成角定义为负值; 麻醉下切开背部皮肤, 肉眼观察大鼠背部肌肉形态变化, 留取注射区域椎旁肌标本行组织学检查。**结果:**双足直立鼠模型全部建立成功, 大鼠麻醉苏醒后可竖直站立取水。A~D 组大鼠于 BTX-A 注射后 5d 内相继死亡, E、F、G 组大鼠全部存活。注射后 2 周全脊柱前后位 X 线片检查, E、F 组大鼠均存在脊柱侧凸, 且注射侧为凸侧, E 组侧凸 Cobb 角为 37.5°~46.8°, 平均(41.9±3.4)°; F 组为 28.3°~37.3°, 平均(33.1±3.2)°; G 组侧凸 Cobb 角为 -8.2°~12.0°, 平均(2.9±6.8)°; E、F、G 组两两比较均有统计学差异($P<0.05$)。注射后 2 周, E、F 组大鼠切开背部皮肤, 见大鼠脊柱向注射侧侧凸, 肉眼及光镜下见注射 BTX-A 区域的椎旁肌明显萎缩; G 组肌肉无明显变化。**结论:**BTX-A 6.25U 及 3.125U 一侧椎旁肌注射可建立双足直立鼠脊柱侧凸模型, 椎旁肌肌力失衡可导致双足直立鼠脊柱侧凸发生。

【关键词】脊柱侧凸; A 型肉毒毒素; 椎旁肌注射; 双足直立鼠; 模型

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.09.12

中图分类号: R682.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-09-0824-05

Injection of Botulinum toxin A into unilateral paraspinal muscles to establish scoliosis model in immature bipedal rats/SHEN Xiaolong, ZHOU Xuhui, LIU Yang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(9): 824-828

【Abstract】Objectives: To discuss the feasibility and efficacy of injection of Botulinum toxin A into unilateral paraspinal muscles to establish scoliosis model in immature bipedal rats. **Methods:** 56 4-week old female SD rats were divided into 7 groups randomly. All rats underwent amputations of forelimbs under anesthesia and were kept in height-regulated cages. Group A-F received different concentrations of BTX-A respectively (100U, 50U, 25U, 12.5U, 6.25U, 3.125U, all in 0.5ml). Group G only received an injection of same amount of normal saline. 2 weeks after injection, AP X-rays were obtained under anesthesia. The rats were cut off the skin on the back. Naked-eye observations were taken. Morphological changes of paravertebral muscles were detected under light microscope. **Results:** The rats were observed to be able to stand bipedally immediately after the amputations of forelimbs. After BTX-A injection, the rats in group A-D were all dead, while all rats in group E, F and G survived. 2 weeks after injection, AP X-rays showed that all survived rats had developed scoliosis in group E and F, and all curves had convex towards right side. The mean Cobb angle in group E was (41.9±3.4)° at 2 weeks after injection, and the mean Cobb angle in group F and G was (33.1±

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(编号: 10140903700)

第一作者简介: 男(1983-), 医学博士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (021)81886806 E-mail: s-xiaolong@sohu.com

通讯作者: 袁文 E-mail: yuanwenspine@gmail.com; 周许辉 E-mail: czspine@yahoo.com

3.2)° and (2.9±6.8)° respectively. Naked-eye observations showed muscle atrophy on the convex side. The histological findings revealed the same as naked-eye observation. Those were not observed in group G.

Conclusions: Scoliosis model can be created by 6.25U or 3.125U BTX-A injection in immature bipedal rats, which indicates that paravertebral muscle imbalance can induce scoliosis.

【Key words】 Scoliosis; Botulinum toxin A; Injection into paraspinal muscles; Bipedal rats; Model

【Author's address】 Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China

特发性脊柱侧凸(idiopathic scoliosis, IS)是一种伴有椎体旋转的三维畸形,是儿童及青少年较常见的脊柱畸形,其具体发病机制尚不明确。建立理想的脊柱侧凸动物模型是探索其发病机制和治疗手段的基础。椎旁肌结构及功能的异常是否是脊柱侧凸的致病因素一直存在争议。我们认为两侧椎旁肌失衡可能会导致脊柱侧凸的发生,既往文献报道的造模方法都存在一些不足,我们试图探索一种更好的造模方法。研究发现,A型肉毒毒素(botulinum toxin A, BTX-A)能阻碍突触前膜乙酰胆碱的释放,使神经肌肉接头传导受阻,从而导致肌肉松弛,甚至瘫痪^[1]。若将 BTX-A 注射至双足直立鼠一侧椎旁肌,致两侧椎旁肌肌力不平衡,是否能够建立脊柱侧凸模型?合理的 BTX-A 剂量是多少?以往文献没有类似报道,我们就上述问题进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

56 只 4 周龄雌性 Sprague-Dawley (SD)大鼠(SPF 级),体重 90.6~105.2g,平均(97.3±4.1)g,由第二军医大学动物中心提供。大鼠随机分为 A~G 共 7 组,每组 8 只,G 组为对照组。

1.2 双足直立鼠模型的制备

采用 10%水合氯醛 3ml/kg 对大鼠行腹腔注射麻醉。取双侧上肢环形切口,分离肌肉筋膜,结扎大血管,从肩关节处截除双前肢,止血后缝扎切口。所有大鼠术后即刻行高笼喂养,将饲料槽及饮水瓶悬高,根据大鼠身长情况动态调整悬吊高度。

1.3 一侧椎旁肌注射 BTX-A

双足直立鼠模型建立后 3d 注射 BTX-A。BTX-A(衡力,兰州生物制品研究所生产):白色干粉,100U/支,注射前临时配制。双足直立鼠模型建立后 3d,大鼠体重为 89.3~102.8g,平均(95.8±3.2)g。腹腔注射麻醉下,于胸椎后凸顶点向下切开皮肤 1cm,向上切开皮肤 2cm,分离筋膜,充分

显露右侧椎旁肌,直视下 A~F 组于右侧椎旁肌多点注射 BTX-A(图 1),A~F 组的注射剂量分别为 100U、50U、25U、12.5U、6.25U、3.125U,各组注射体积均为 0.5ml,G 组注射等体积生理盐水。

注射完毕,缝扎切口,普通笼喂养 3d 后转入特制高笼喂养,动态调整饲料槽及饮水瓶的悬吊高度。

1.4 脊柱侧凸的观察

椎旁肌注射前及注射 2 周后分别行全脊柱前后位 X 线片检查。大鼠腹腔麻醉下,固定于特制纸盒内,大鼠躯干两侧予以纸板阻挡,防止大鼠左右倾斜;大鼠脊柱腰段后正中水平放置“V 形”开口的纸板,卡压大鼠脊柱,防止大鼠因重力因素而出现身体过度下移,将大鼠固定于竖直中立位,拍摄前后位 X 线片。选取骨盆、肩胛骨无明显倾斜的 X 线片,X 线数字图像导入电脑,采用 Photoshop CS5 软件测量大鼠胸弯的侧凸 Cobb 角,若脊柱向右侧侧凸成角定义为正值,若脊柱向左侧侧凸成角定义为负值。经 2 位临床医师(工作时间>5 年)不同时间测量侧凸 Cobb 角 2 次,取平均值。

1.5 椎旁肌观察



图 1 大鼠胸椎后凸顶点区域右侧椎旁肌注射 BTX-A,图中“x”为注射点

Figure 1 Toxin was injected into the paraspinal muscle at 8 sites. “x” was the injection site

椎旁肌注射后 2 周所有存活大鼠经 X 线检查后,随即切开大鼠背部皮肤,肉眼观察背部肌肉形态变化。取新鲜注射区域椎旁肌肌肉标本,置入预先配好的固定液中(10%福尔马林),肌纤维横切片,HE 染色观察肌间隙及肌纤维的横截面积的变化情况。

1.6 统计分析

相关数据输入 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,方差分析(LSD 检验)比较各组均数, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

双侧前肢截除手术麻醉苏醒后即刻大鼠可双足竖直站立取食水,可竖直站立四处嗅探,对外界刺激反应迅速。双足直立鼠模型建立成功,各组大鼠均存活。

注射 BTX-A 后,A、B、C 组大鼠均不能直立,呈双足、头部三点支撑蜷缩状态,活动迟缓,呼吸急促,部分大鼠出现张口呼吸,随后死亡;D 组大鼠麻醉苏醒后部分可直立,但 5d 内相继死亡;E、F、G 组大鼠麻醉苏醒后即刻可双足直立,均存活。

椎旁肌注射前双足直立鼠无明显脊柱侧凸。注射 BTX-A 后 2 周 E、F 组大鼠均出现脊柱侧凸,侧凸范围内的椎弓根影两侧不对称,脊柱向注射区域侧凸(图 2),E 组侧凸 Cobb 角为 $37.5^\circ \sim 46.8^\circ$,平均(41.9 ± 3.4) $^\circ$;F 组侧凸 Cobb 角为 $28.3^\circ \sim 37.3^\circ$,平均(33.1 ± 3.2) $^\circ$;G 组侧凸 Cobb 角为 $-8.2^\circ \sim 12.0^\circ$,平均(2.9 ± 6.8) $^\circ$ 。方差分析提示注射后 2 周 E、F、G 组侧凸 Cobb 角有统计学差异($P < 0.05$),3 组中两两比较(多重比较的 LSD 检验)均有统计学差异($P < 0.05$)。

椎旁肌注射后 2 周,E、F 组注射区域椎旁肌肌肉明显萎缩(图 3),脊柱出现侧凸,且凸向注射侧;G 组没有上述表现。光镜下,E、F 组注射区域椎旁肌肌纤维横截面积减小,缩小的横截面大多呈尖角状或长条状改变,肌纤维间隙增大,形态不规则的细胞明显增多,E 组上述变化较 F 组明显;G 组肌纤维连接紧密,无明显肌间隙(图 4)。

3 讨论

3.1 脊柱侧凸模型的建立方法

脊柱侧凸模型的研究一直是学者们关注的热点。Sarwark 等^[2]报道利用丝线拴系大鼠肩胛骨下

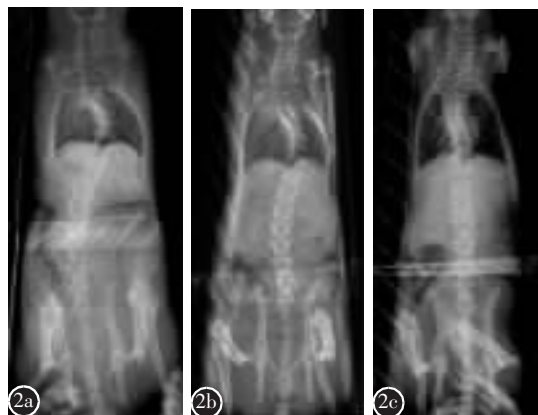


图 2 椎旁肌注射后 2 周脊柱 X 线片检查结果,右侧为注射侧 a E 组(BTX-A 注射剂量为 6.25U)胸椎侧凸 Cobb 角 41.2° b F 组(BTX-A 注射剂量为 3.125U)胸椎侧凸 Cobb 角 34.6° c G 组(生理盐水注射组)胸椎侧凸 Cobb 角 4.3°

Figure 2 X-rays shown spine scoliosis in bipedal rats at 2 weeks after injection a Cobb angle in group E is 41.2° b Cobb angle in group F is 34.6° c Cobb angle in group G is 4.3°

角及同侧骨盆制造侧凸模型,发现至少拴系 6 周可出现结构性脊柱侧凸。Joe^[3]通过电刺激大鼠一侧椎旁肌的方法建立脊柱侧凸模型,发现凸侧位于非刺激侧,侧凸角度随着时间的累积而不断加大,3 周时侧凸角度平均 18.6° ,停止电刺激后侧凸角度没有明显丢失。Machida 等^[4]通过截除双上肢建立直立的双足鼠模型,发现松果体切除(阻断褪黑素分泌)的双足鼠出现脊柱侧凸,而松果体切除的四足鼠和保留松果体的双足鼠并未发生脊柱侧凸。这与 Oyama 等^[5]的实验结果类似,作者认为褪黑素缺乏及直立姿势是鼠类模型脊柱侧凸发生发展的重要条件。然而,临床研究并未发现褪黑素缺乏与人类脊柱侧凸有相关性^[6,7]。

Smith 等^[8]报道通过拴系兔 T4~T10 的一侧椎板,可制造出缓慢进展的结构性侧凸动物模型。此后,通过拴系等纯机械外力的造模方式不断被研究者采用。Newton 等^[9]报道了经右侧胸腔入路钢丝拴系小牛的 T6~T7 或 T7~T8 椎体前外侧,12 周后发现小牛出现 12° 的胸椎侧凸。Braun 等^[10]通过对山羊 T5~L1 脊柱左后方拴系联合左侧肋骨捆绑及右侧肋骨切除,建立动物模型,由于此模型有椎体及椎间盘楔形变、椎体旋转及侧凸进展等表现,能很好模拟特发性脊柱侧凸的特点,作者认为此方法建模为今后研究特发性脊柱侧凸提供了

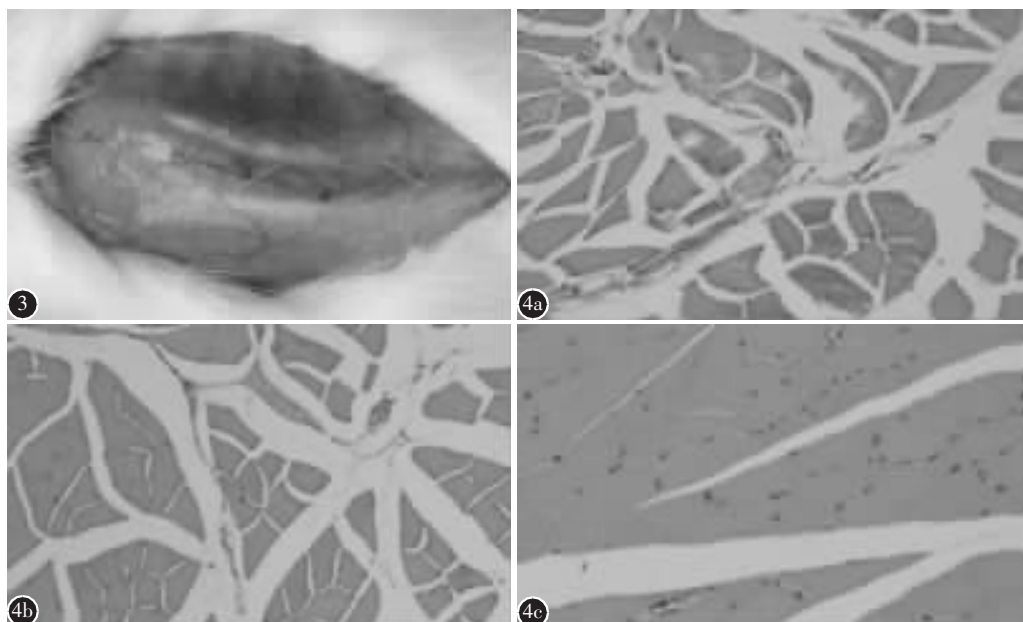


图 3 E 组大鼠 BTX-A 注射后 2 周肉眼观察,注射侧椎旁肌萎缩明显 图 4 注射后 2 周椎旁肌组织学检查(HE 染色, ×400) a E 组大鼠椎旁肌肌纤维横截面积减小,肌纤维间隙增大 b F 组大鼠椎旁肌肌纤维横截面积轻度减小,肌纤维间隙轻度增大 c G 组大鼠椎旁肌肌纤维连接精密

Figure 3 2 weeks after injection, muscle atrophy in the region of injection in group E **Figure 4 a** 2 weeks after injection, cross sectional area of fibers were significantly decreased at the injected regions in group E(HE, ×400) **b** 2 weeks after injection, cross sectional area of fibers were slightly decreased at the injected regions in group F(HE, ×400) **c** 2 weeks after injection, there was no evidence of decreased of cross sectional area at the injected regions in group G (HE, ×400)

实验基础。

国内也有不少学者通过拴系双足鼠肋骨或肩胛骨-髌骨建立了脊柱侧凸模型^[11-13]。由于双足直立鼠可双足行走和竖立站立,与人类生物力学相近^[14],同时,大鼠具有价格低廉、造模时间短等优点,因此双足直立鼠动物模型被越来越多的学者接受。

3.2 椎旁肌与脊柱侧凸的关系

椎旁肌是躯干姿势反射弧的效应器,与脊柱侧凸关系密切,椎旁肌病变可能会影响脊柱的序列变化。椎旁肌异常是否是特发性脊柱侧凸的致病因素一直存在争议,椎旁肌失衡的动物实验也不断在改进,但实验结果却存在很大差异。最早采用竖脊肌切除的方法建立脊柱侧凸模型,使用此类方式造模创伤大,正常解剖结构破坏严重,现已不再使用。有文献报道通过电刺激大鼠一侧椎旁肌可建立脊柱侧凸模型,侧凸凸向未刺激侧^[3,15],随后,电刺激方法被运用至临床,用于 IS 患者的保守治疗,但电刺激不能有效地阻止脊柱侧凸的进展,不被推荐用于 IS 患者的长期治疗^[16]。本研

究将一侧椎旁肌注射 BTX-A,导致大鼠椎旁肌肌力失衡,成功制造出双足直立鼠脊柱侧凸模型,本研究说明椎旁肌肌力失衡可导致脊柱侧凸的发生,此实验一方面成功制造脊柱侧凸动物模型,另一方面可能为 IS 的病因学研究及保守治疗提供参考。

3.3 BTX-A 的使用剂量

目前已上市的常用 BTX-A 有 Botox、Dysport 及衡力。文献报道,Botox 注射后平均 2~5d 起效,2 周左右注射区域出现轴突出芽现象,4 周后可传递神经冲动,肌肉仅可发生短暂颤动,9 周后轴突停止出芽,13 周后神经肌肉接头功能基本恢复,肌肉可正常收缩^[17]。注射部位不同,BTX-A 的使用剂量也不尽相同。Welham 等^[18]在 Brown-Norway 大鼠甲杓肌注射 Botox,使用的剂量是 0.03U/100g 体重。Tsai 等^[19]在 2 月龄雄性 SD 大鼠(平均 300g)咬肌注射 Botox,使用剂量是 2.5U/100g。Chen 等^[20]在研究 BTX-A 注射对幼鼠(29d 龄的 Wistar 大鼠)腓肠肌生长的影响中,使用 Botox 的剂量是 0.9U/100g。

本研究使用的是国产 BTX-A(衡力),该制剂与进口 Botox、Dysport 的效价换算比例没有文献明确报道,BTX-A 注射致椎旁肌失衡也没有相关文献报道。由于没有明确的参考剂量,因此,本研究采用不同剂量的 BTX-A 依次注射,注射 12.5U 及以上剂量的大鼠全部死亡。6.25U 与 3.125U 的剂量均可造模,两组大鼠注射 BTX-A 后即刻可双足竖直站立,对外界刺激反应迅速,没有明显异常状况发生,相比之下,E 组的侧凸 Cobb 角、椎体旋转程度均较 F 组明显,因此,可根据不同的模型要求,来选取不同的注射剂量。

本研究通过对双足直立鼠一侧椎旁肌注射 BTX-A 建立了脊柱侧凸模型,该模型具有以下优点:(1)双足直立鼠模拟人类直立姿势;(2)大鼠脊柱活动性完好,各方向活动均不受外力限制;(3)大鼠局部椎旁肌注射,不累及整个脊柱;(4)侧凸范围内的椎弓根影两侧不对称,侧凸伴有椎体旋转,能很好地模拟人类 IS;(5)建模手术创伤小;(6)从病因学角度说明椎旁肌肌力失衡可导致双足直立鼠脊柱侧凸的发生。但由于大鼠椎骨较小,X 线片放大后显影不清,导致测量误差偏大,有可能会影响统计学结果。本实验结果仅是前期研究的一部分,涉及的深度和细节有待进一步完善。同时,注射 BTX-A 后椎旁肌的显微结构变化及相关蛋白表达差异有待进一步研究。

4 参考文献

- Jankovic J. Botulinum toxin in clinical practice[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004, 75(7): 951-957.
- Sarwark JF, Dabney KW, Salzman SK, et al. Experimental scoliosis in the rat (I): methodology, anatomic features and neurologic characterization[J]. Spine, 1988, 13(5): 466-471.
- Joe T. Studies of experimental scoliosis produced by electrical stimulation: with special reference to the histochemical properties of the muscle[J]. Nihon Ika Daigaku Zasshi, 1990, 57(5): 416-426.
- Machida M, Saito M, Dubousset J, et al. Pathological mechanism of idiopathic scoliosis: experimental scoliosis in pinealectomized rats[J]. Eur Spine J, 2005, 14(9): 843-848.
- 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.
- Day GA, McPhee IB, Tuffley J, et al. Idiopathic scoliosis and pineal lesions in Australian children [J]. J Orthop Surg, 2007, 15(3): 327-333.
- Nelson LM, Ward K, Ogilvie JW. Genetic variants in melatonin synthesis and signaling pathway are not associated with adolescent idiopathic scoliosis[J]. Spine, 2011, 36(1): 37-40.
- Smith RM, Dickson RA. Experimental structural scoliosis[J]. J Bone Joint Surg Br, 1987, 69(4): 576-581.
- Newton PO, Fricka KB, Lee SS, et al. Asymmetrical flexible tethering of spine growth in an immature bovine model[J]. Spine, 2002, 27(7): 689-693.
- Braun JT, Ogilvie JW, Akyuz E, et al. Experimental scoliosis in an immature goat model: a method that creates idiopathic-type deformity with minimal violation of the spinal elements along the curve[J]. Spine, 2003, 28(19): 2198-2203.
- 刘立峰, 朱悦, 韩秀鑫, 等. 双足鼠对侧拴系脊柱侧凸模型的建立[J]. 中华骨科杂志, 2010, 30(10): 985-990.
- Liu L, Zhu Y, Han X, et al. The creation of scoliosis by scapula-to-contralateral ilium tethering procedure in bipedal rats: a kyphoscoliosis model[J]. Spine, 2011, 36(17): 1340-1349.
- 王储, 郝东升, 段圆慧, 等. 双足鼠脊柱侧凸模型手术方法改良[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(12): 1732-1733.
- Wada N, Toba Y, Iwamoto W, et al. Investigation and characterization of rat bipedal walking models established by a training program[J]. Brain Res, 2008, 1243: 70-77.
- Willers UW, Sevastik B, Hedlund R, et al. Electrical muscle stimulation on the spine: three-dimensional effects in rabbits [J]. Acta Orthop Scand, 1995, 66(5): 411-414.
- Durham JW, Moskowitz A, Whitney J. Surface electrical stimulation versus brace in treatment of idiopathic scoliosis [J]. Spine, 1990, 15(9): 888-892.
- Dolly JO, Aoki KR. The structure and mode of action of different botulinum toxins[J]. Eur J Neurol, 2006, 13(Suppl 4): 1-9.
- Welham NV, Marriott G, Tateya I, et al. Proteomic changes in rat thyroarytenoid muscle induced by botulinum neurotoxin injection[J]. Proteomics, 2008, 8(9): 1933-1944.
- Tsai CY, Huang RY, Lee CM, et al. Morphologic and bony structural changes in the mandible after a unilateral injection of botulinum neurotoxin in adult rats [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2010, 68(5): 1081-1087.
- Chen CM, Stott NS, Smith HK. Effects of botulinum toxin A injection and exercise on the growth of juvenile rat gastrocnemius muscle[J]. J Appl Physiol, 2002, 93(4): 1437-1447.

(收稿日期:2012-02-12 修回日期:2012-07-07)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)