

基础研究

特发性脊柱侧凸患者椎旁肌中
神经营养索 3 的表达及意义王 嵘¹, 邱 勇¹, 芮碧宇¹, 顾香芳², 夏才伟¹, 朱泽章¹

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

【摘要】目的:研究特发性脊柱侧凸(IS)患者椎旁肌组织中神经营养索 3(Neurotrophin-3, NT-3)在核酸水平(mRNA)的表达情况。**方法:**随机选择 19 例 IS 患者, 年龄 12~19 岁, 平均 14.3 岁, Cobb 角 42°~80°(平均 54°)。手术中取顶椎(T7~T10)凸侧、凹侧椎旁肌肉组织, 采用半定量 RT-PCR 法检测 NT-3 mRNA 表达水平。取 4 例相同年龄段的椎间盘突出患者手术切口头端非病变部位椎旁肌肉组织作为对照。**结果:**对照组椎旁肌中 NT-3 的 mRNA 表达阳性率 50%, 相对表达量为 0.0237 ± 0.0158 , IS 组患者椎旁肌中表达阳性率 63.16%, 相对表达量为 0.1213 ± 0.0939 , 较对照组表达量增加($P=0.051$)。9 例 Cobb 角 $>50^\circ$ 的 IS 患者表达阳性率为 44.44%, 相对表达量 0.0431 ± 0.0359 , 和对照组无明显差异; 10 例 Cobb 角 $\leq 50^\circ$ 的 IS 患者中表达阳性率为 80%, 相对表达量为 0.1604 ± 0.0895 , 与对照组和 Cobb 角 $>50^\circ$ 的 IS 患者比较有明显增加($P<0.01$)。**结论:**正常椎旁肌组织中 NT-3 在核酸水平微量表达, 特发性脊柱侧凸患者椎旁肌组织中 NT-3 mRNA 表达增加, 尤其在小角度 IS 患者中增加明显, 提示 IS 患者中存在神经营养因子表达异常。

【关键词】特发性脊柱侧凸; 椎旁肌; 神经营养索 3; 逆转录-聚合酶链反应

中图分类号: R682.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-07-0532-03

Neurotrophin-3 mRNA expression in paravertebral muscles of patients with idiopathic scoliosis/WANG Rong, QIU Yong, RUI Biyu, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(7): 532~534

【Abstract】Objective: To investigate Neurotrophin-3(NT-3) mRNA expression in paravertebral muscles in idiopathic scoliosis (IS). **Method:** Muscle samples were harvested from 19 female IS patients (mean age 14.3 years, range 12~19 years) with Cobb angle from 42°~80°(average 54°). Muscle biopsies were taken bilaterally from the deep paravertebral muscle at the apex of the curve(T7~T10) during surgery, which was snap frozen in -80°C and processed for semi-quantitation RT-PCR. Muscle biopsies were taken from two females and two male age-matched patients without scoliosis who were underwent spinal surgery for lumbar intervertebral disc herniation as control group. **Result:** Compared with control group, which had low level NT-3 mRNA expression (positive rate was 50% and comparative expression was 0.0237 ± 0.0158), a increase of NT-3 mRNA expression (positive rate was 63.16% and comparative expression was 0.1213 ± 0.0939) was found in IS group ($P=0.051$). The expression level of NT-3 mRNA in the patients with Cobb angle $\leq 50^\circ$ (positive rate was 80% and comparative expression was 0.1604 ± 0.0895) was statistical higher than that in the patients with the Cobb angle $>50^\circ$ or normal ($P<0.01$). **Conclusion:** There is increasing expression of NT-3 mRNA in the paravertebral muscle in idiopathic scoliosis.

【Key words】 Idiopathic Scoliosis; Paravertebral muscle; Neurotrophin-3; RT-PCR

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

临床上发现部分特发性脊柱侧凸(idiopathic scoliosis, IS)患者存在姿势反射失衡、本体感觉功

能异常^[1,2]。肌源性神经营养索 3(Neurotrophin-3, NT-3)和本体感觉功能关系密切, 其在 IS 患者骨骼肌中的表达目前尚不清楚。本研究通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 IS 患者椎旁肌组织中 NT-3 在核酸水平(mRNA)的表达情况, 探讨 NT-3 在 IS 发病中可能的作用。

基金项目: 南京市科技局人才培养项目(编号: 200306066)

第一作者简介: 男(1971-), 主治医师, 医学博士, 研究方向: 脊髓病变

电话: (025)83105113 E-mail: scoliosis2002@sina.com

通讯作者: 邱勇

1 资料与方法

1.1 研究对象

随机选取 2005 年 3 月~12 月期间手术的 IS 患者 19 例,均为女性,年龄 12~19 岁,平均 14.3 岁。Lenke I 型 14 例, III 型 5 例。Cobb 角 42°~80°,平均 54°。均为右侧胸椎侧凸,顶椎位于 T7~T10。按照侧凸程度分为:Cobb 角 $\leq 50^\circ$ 组,10 例,Cobb 角 42°~50°,平均 47.10°,年龄 13~19 岁,平均 14.6 岁。Cobb 角 $>50^\circ$ 组,9 例,Cobb 角 52°~80°,平均 61.7°,年龄 12~18 岁,平均 14.0 岁。19 例均行脊髓 MRI 检查,排除脊髓可能存在的病变或畸形。4 例行后路手术的青少年腰椎间盘突出症患者作为对照组,年龄 15~19 岁,平均 17.5 岁,女性 2 例,男性 2 例,均摄站立位全脊柱正位 X 线片,排除脊柱侧凸。IS 患者在行后路手术时分别于顶椎棘突两侧对称切取椎旁肌肉(竖脊肌),大小约 0.5×0.5×0.5cm;对照组标本取自腰椎椎间盘手术切口头侧非病变部位,方法和标本大小同 IS 组。标本放入液氮中冻存。

1.2 检测方法

取 100mg 肌肉组织,Trizol 试剂提取法提取 RNA,分光光度计测其 260/280 比值在 1.8~2.0 之间,证明抽提效果良好。采用一步法进行 RT-PCR。引物设计:NT-3(GenBank M37763)上游引物为 5'AGTTTGCCAGAAGACTCGCTC 3',下游引物为 5'ATTGTTTGACGGGAGAGTTGCC 3',长度 493bp;内参照 β -actin(GenBank BC002409)的上游引物为 5'GGCATCTCACCCTGAAGTA 3',下游引物为 5'GGGGTGTGAAGGTCTCAAA 3',长度 203bp,均由上海生物工程有限公司合成。具体参数采用:50 μ l 反应总体积,引物(20pmol/L)

混合物 2 μ l,模板 2 μ l,其他试剂量同说明书。50℃ 60min 反转录,94℃ 5min 预变性,94℃ 30s 变性,55℃ 30s 退火,72℃ 50s 延伸,循环 35 次。最后 72℃延伸 10min。NT-3 和内参照 β -actin 在相同的条件下分别在 PCR 扩增仪中反应获得 PCR 产物。2%琼脂糖凝胶上加入扩增产物 10 μ l,100V 下电泳 25min,紫外线下观察扩增条带并拍片。应用 Molecular Analyst 图像分析软件对条带进行吸光度峰值下灰度积分,所得 NT-3 灰度积分值与相应 β -actin 灰度积分值的比值即为 NT-3 mRNA 的相对表达量。

总 RNA 抽提所用 Trizol 试剂为美国 GIBCO 公司产品,RT-PCR 反应试剂盒购于美国 CLON-TECH 公司 (TITANIUM™ ONE-STEP RT-PCR KIT)。基因扩增仪为美国 MJ 公司 PTC-200 型,紫外成像系统为美国 UVP 公司 GDS-8000 System。

1.3 统计方法

NT-3 mRNA 的相对表达量用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据比较采用 t 检验,NT-3 mRNA 的表达阳性率比较采用 χ^2 检验,涉及到和对照组的表达阳性率的比较采用校正的 χ^2 检验。应用 SPSS 12 软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

见图 1 和表 1、2。两组间 NT-3 mRNA 表达阳性率无显著性差异 ($P=0.49$),IS 患者 NT-3 mRNA 表达量比对照组增加 ($P=0.051$)。Cobb 角 $\leq 50^\circ$ IS 组 NT-3 mRNA 表达阳性率比 Cobb 角 $>50^\circ$ IS 组显著性增加 ($P < 0.05$),NT-3 mRNA 相对表达量比 Cobb 角 $>50^\circ$ IS 组和对对照组有显著性增加 ($P < 0.001$),而 Cobb 角 $>50^\circ$ IS 组和对

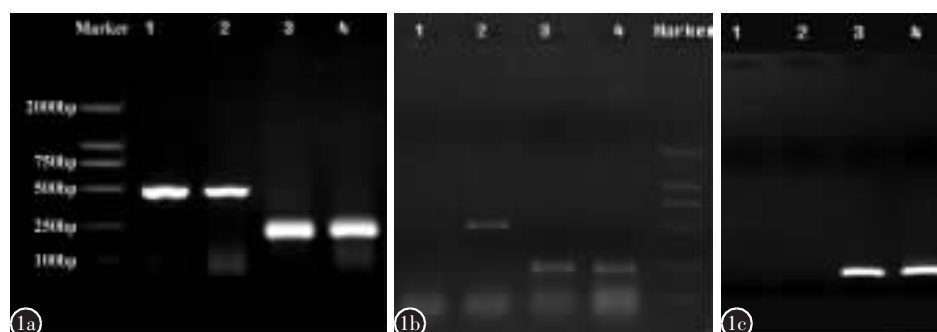


图 1 RT-PCR 扩增产物 2%琼脂糖凝胶电泳后的条带图 a IS 患者,女性,14 岁,胸椎右侧凸,顶椎 T9,Cobb 角 42°,双侧 NT-3 表达均为阳性[1 道:凹侧(左侧)NT-3(493bp);2 道:凸侧(右侧) NT-3(493bp);3 道:凹侧(左侧) β -actin(203bp);4 道:凸侧(右侧) β -actin(203bp);Marker:DNA 标记物(DL2,000 TaKaRa)] b IS 患者,女性,13 岁,胸椎右侧凸,顶椎为 T8,Cobb 角 77°,凸侧 NT-3 表达阳性 c 腰椎间盘突出症患者,女性,18 岁,双侧 NT-3 表达均为阴性

表 1 IS 患者与对照组椎旁肌 NT-3 mRNA 表达情况

	例数	标本数	表达阳性数	阳性表达率(%)	相对表达量
IS组	19	38	24	63.16	0.1213±0.0939
Cobb 角≤50°	10	20	16	80 ^①	0.1604±0.0895 ^②
Cobb 角>50°	9	18	8	44.44	0.0431±0.0359
对照组	4	8	4	50	0.0237±0.0158

注: ①与 Cobb 角>50° IS 组比较 $P<0.05$; ②与 Cobb 角>50° IS 组及对照组比较 $P<0.05$

表 2 IS 患者凸凹侧椎旁肌 NT-3mRNA 表达情况

	相对表达量		表达阳性率(%)	
	凹侧	凸侧	凹侧	凸侧
Cobb角≤50°	0.2018±0.1054	0.1190±0.0462 ^①	80.00	80.00 ^①
Cobb角>50°	0.0521±0.0423	0.0281±0.0197 ^①	55.56	33.33 ^①

注: ①与同组凹侧比较 $P>0.05$

组之间没有显著性差异。IS 患者椎旁肌凸凹侧 NT-3 mRNA 表达没有显著性差异。

3 讨论

NT-3 和神经生长因子(NGF)、脑源性生长因子(BDNF)、神经营养素 4/5 同属于神经生长因子基因家族,具有相似的一级结构和生化特点,其生理作用广泛,在骨骼肌中和本体感觉功能关系密切^[4]。NT-3 在骨骼肌中合成,经感觉神经转运至脊髓的背根神经节中^[5],和本体感觉神经元上的特异性受体 TrkC 结合发挥生理作用,调控本体感觉神经元,参与维持正常的躯体本体感觉功能和姿势反射^[4]。本研究中对对照组相对正常的椎旁肌组织检测发现 NT-3 mRNA 相对表达量很低(0.0237±0.0158),提示正常骨骼肌中 NT-3 mRNA 微量表达,和以往报道相符^[6],符合 NT-3 作为神经营养因子的特征。

临床上发现部分 IS 患者存在躯体本体感觉功能异常、姿势反射失衡,提示躯体姿势反射弧异常^[1,2]。本研究对 IS 患者椎旁肌中和本体感觉关系密切的 NT-3 表达进行了研究。实验前假设本体感觉差,作为主要的神经营养因子可能表达下降。通过半定量的 RT-PCR 方法,证实 IS 患者椎旁肌中确实存在 NT-3 表达的异常改变,但 NT-3 mRNA 表达增加。但由于是半定量,只能客观地反映变化的趋势,对具体的表达量不能测定。

IS 患者椎旁肌中 NT-3 表达增加的原因尚不清楚,可能和本体感觉异常后,肌源性 NT-3 表达反馈性增加有关,这是机体的内源性保护机制,所

以主要见于病变的早期,这也符合本实验发现的 NT-3 表达增加主要见于 Cobb 角≤50°的 IS 患者,随着病程的延续和侧凸程度的加重,机体内源性保护机制被逐渐耗竭,NT-3 表达增加的现象逐渐消失而不明显,此时失去神经营养因子的支持,本体感觉异常更加明显,部分患者在临床上表现出本体感觉功能障碍。

有研究发现在肌萎缩性(脊髓)侧索硬化症患者骨骼肌中的 NT-3 的表达量也明显增加^[6]。肌萎缩性(脊髓)侧索硬化症是一种神经元变性,神经功能存在异常,NT-3 的高表达提示了机体的内源性保护机制在发挥作用,而且在病程短的患者中 NT-3 表达增加更显著。本研究发现 IS 患者椎旁肌中 NT-3 mRNA 表达量增加,尤其是 Cobb 角≤50°的 IS 患者,提示骨骼肌中 NT-3 表达增加可能是 IS 患者本体感觉受损的继发改变,NT-3 是代偿性表达增加,而 IS 患者凸、凹侧椎旁肌 NT-3 表达无明显差异,符合以往的推论:IS 患者中存在本体感觉功能受损,而本体感觉受损的部位可能在脊髓甚至更高级的神经中枢^[7],从而表现下方椎旁肌中 NT-3 改变凸凹侧差异不显著。

4 参考文献

1. Byl NN, Holland S, Jurek A, et al. Postural imbalance and vibratory sensitivity in patients with idiopathic scoliosis: implications for treatment[J]. J Orthop Sports Phys Ther, 1997, 26(2): 60-68.
2. Gauchard GC, Lascombes P, Kuhnast M, et al. Influence of different types of progressive idiopathic scoliosis on static and dynamic postural control [J]. Spine, 2001, 26(9): 1052-1058.
3. 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.
4. Taylor MD, Vancura R, Patterson CL, et al. Postnatal regulation of limb proprioception by muscle-derived Neurotrophin 3 [J]. J Comp Neurol, 2001, 432(2): 244-258.
5. Tojo H, Takami K, Kaisho Y, et al. Analysis of Neurotrophin 3 expression using the lacZ reporter gene suggests its local mode of neurotrophic activity [J]. Neuroscience, 1996, 71(1): 221-230.
6. Kust BM, Copray JC, Brouwer N, et al. Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis [J]. Exp Neurol, 2002, 77(2): 419-427.
7. Byrd JA 3rd. Current theories on the etiology of idiopathic scoliosis[J]. Clin Orthop Relat Res, 1988, (229): 114-119.

(收稿日期: 2006-12-28 修回日期: 2007-03-02)

(英文编审 陆宁)

(本文编辑 卢庆霞)