

# 中枢高瘦素水平对低褪黑素双足直立鼠模型脊柱侧凸作用相关研究

吴 涛,刘 军\*,沈一燧,王 刚,李威霖

(南京医科大学第二附属医院骨科,江苏 南京 210011)

**[摘要]** **目的:**通过建立中枢高瘦素双足直立鼠脊柱侧凸动物模型,研究中枢高瘦素水平在特发性脊柱侧凸发生发展过程中所发挥作用。**方法:**选取 C57BL/6J 小鼠 40 只,于 3 周龄行上肢截肢(合并鼠尾切除)法建立双足直立小鼠模型。然后将上述模型小鼠随机均分为两组:一组颅内注射瘦素过表达慢病毒载体,建立中枢高瘦素水平双足直立小鼠;另一组则颅内注射空白慢病毒载体,建立对照小鼠。术后进行小鼠直立体态诱导并监测体重变化。术后 4 个月,采用 X 片评估两组小鼠脊柱侧凸发生率及严重程度,然后收集小鼠血清,比较两组小鼠外周血瘦素浓度。**结果:**中枢高瘦素组双足直立小鼠虽术后即刻体重与对照组无显著差异,但术后各阶段体重均较对照组小鼠明显降低。此外,血清 ELISA 测量结果显示中枢高瘦素组小鼠外周瘦素水平较对照组明显升高[(488.1 ± 88.7)pg/ml vs. (159.5 ± 45.8)pg/ml,  $P < 0.05$ ]。术后 4 个月中枢高瘦素组 20 只小鼠均发生脊柱侧凸畸形,平均 Cobb 角 30.8°;而对照组 20 只小鼠中 18 只发生脊柱侧凸,平均 Cobb 角 20.3°。**结论:**虽然两组模型小鼠脊柱侧凸发生率未见显著差异,但中枢高瘦素小鼠脊柱侧凸严重程度明显高于对照组,提示中枢高瘦素水平对脊柱侧凸发生发展起促进作用。

**[关键词]** 双足直立鼠;脊柱侧凸;中枢高瘦素水平

**[中图分类号]** R682.13

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)06-784-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130613

## The effect of high central leptin activity on bipedal amputated mice with low melatonin level

Wu Tao, Liu Jun\*, Shen Yiyi, Wang Gang, Li Weilin

(Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

**[Abstract]** **Objective:**To investigate the role of high central leptin activity in the development of adolescent idiopathic scoliosis (AIS) in bipedal amputated C57BL/6J mice. **Methods:**Amputation of forelimbs and tails was performed at the age of 3-week on 40 C57BL/6J mice. Three days after procedure, these mice were randomly divided into two groups: 20 mice were injected in the hypothalamus with lentivirus vectors which overexpressed leptin, whereas the others were injected with control lentivirus vectors. X-rays were obtained at 20th week to determine the development of spinal deformity. After that all mice were sacrificed, and blood samples were collected. Then peripheral leptin levels were measured by an ELISA kit. Comparisons for the incidence of scoliosis, curve magnitude and peripheral leptin levels were performed between groups. **Results:**The body weight was found to be slightly lower in the leptin-vector-treated C57BL/6J mice when compared with control mice. Significantly higher peripheral serum leptin level was found in leptin-vector-treated mice than controls. Scoliosis was observed in all of 20 leptin-vector-treated mice with an average Cobb angle of 30.8°, and in 18 out of 20 controls with an average Cobb angle of 20.3°. **Conclusion:**Significantly severer curve were observed in leptin-vector-treated mice when compared with control mice, although no difference was observed in term of the scoliosis incidence between two groups. The result of the current study implied that the high central leptin activity might play an important role in the development of AIS.

**[Key words]** bipedal amputated mice; scoliosis; high central leptin activity

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 784-787]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81271987)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: 13776698080@139.com

青少年特发性脊柱侧凸畸形 (adolescent idiopathic scoliosis, AIS) 是发生于青春期前后以女性多见的脊柱侧凸畸形, 约占全部脊柱侧凸患者的 74.7%<sup>[1]</sup>。目前该病发病机制尚未探明, 近年来相关

研究发现 AIS 发病可能与中枢高瘦素水平有关<sup>[2-5]</sup>。但由于伦理学因素限制,上述结论均仅由间接证据推论得出,而缺乏直接证据予以支持。因此,本研究基于经典脊柱侧凸动物模型——C57BL/6J 双足直立小鼠,通过颅内注射瘦素过表达慢病毒载体技术建立中枢高瘦素水平脊柱侧凸动物模型,研究中枢高瘦素水平在 AIS 发生发展过程中所产生的作用,从而直接验证 AIS 中枢高瘦素假说。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本研究中实验动物为 3 周龄 C57BL/6J 雌性小鼠共 40 只,14~16 g,均由南京大学模式动物中心提供。小鼠按 SPF 级标准进行饲养:饲养环境温度控制在 20~24℃,光照控制在 7:00~19:00,空气湿度控制在 45%~55%,饲料与饮水可随意食用。

所用酶联免疫吸附试剂盒 (Quantikine Mouse Leptin Immunoassay, R&D 公司,美国)。其检查灵敏度为 < 22 pg/ml,批内和批间变异系数分别为 3.8%、5.8%。颅内注射所用瘦素过表达慢病毒载体及空白慢病毒载体均由上海生博生物有限公司提供。

### 1.2 方法

40 只小鼠均于 3 周龄用氯胺酮 (0.05 g/ml)与地西泮 (5 mg/ml)1:1 混合物按 10 ml/kg 剂量进行腹腔注射予以麻醉。麻醉生效后,将小鼠固定于解剖板,于小鼠两侧近肩关节结扎后切除上肢,然后于小鼠尾部基底部结扎后切除尾部,从而建立双足直立鼠模型。

下丘脑颅内注射操作则通过三维脑定向仪进行定位后再使用微量注射器进行注射,定位参数设

置为前囟前方 1.3 mm(AP 1.3),前囟侧方 0.3 mm(L 0.3)以及进针深度 5.8 mm(H 5.8)<sup>[6]</sup>。将上述双足直立小鼠随机均分为两组,每组小鼠 20 只。一组(中枢高瘦素组)颅内注入瘦素过表达慢病毒载体 ( $1.5 \times 10^8$  Tu/ml, 15  $\mu$ l/只),而另一组(对照组)则注入空白慢病毒载体 ( $1.5 \times 10^8$  Tu/ml, 15  $\mu$ l/只)。

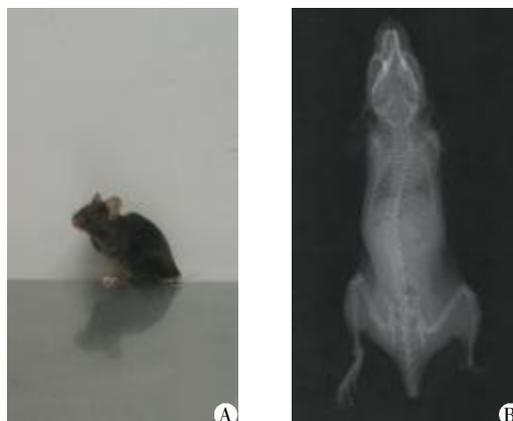
术后两组动物均采用特殊鼠笼喂养诱导直立体态(图 1A),鼠笼内饲料及饮用水悬空,悬空高度低于双足小鼠直立身高约 1~2 cm。术后每月测量并记录小鼠体重。术后 4 个月,麻醉小鼠后,将其置于一平板上,用线绳固定头部。然后倾斜平板,使之与水平面成 45°角,拍摄 X 线片。之后处死小鼠,获取血清于 -80℃冰箱内保存,然后通过 ELISA 试剂盒测定外周血清瘦素浓度。

### 1.3 统计学方法

记录两组小鼠体重、脊柱侧凸发生率、Cobb 角以及外周瘦素浓度,并计算出上述指标均值和标准差。运用统计学分析软件(SPSS13.0 软件包),用独立样本 *t* 检验及四格表卡方检验比较中枢高瘦素组与对照组双足直立鼠间上述指标差异,从而分析中枢高瘦素水平对脊柱侧凸影响。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

中枢高瘦素组双足直立小鼠(20 只)虽然术后即刻体重与对照组(20 只)无显著性差异 [ $(15.98 \pm 1.42)$ g vs.  $(16.26 \pm 0.99)$ g,  $P > 0.05$ ],但其术后 1 个月 [ $(14.99 \pm 1.22)$ g vs.  $(15.61 \pm 1.13)$ g,  $P < 0.05$ ],术后 2 个月 [ $(14.79 \pm 1.10)$ g vs.  $(16.63 \pm 1.44)$ g,  $P < 0.05$ ],术后 3 个月 [ $(15.22 \pm 1.53)$ g vs.  $(18.11 \pm$



A: 双足直立小鼠经直立诱导后小鼠体态;B: 双足直立小鼠发生脊柱侧凸时 X 线表现。

图 1 双足直立小鼠诱导脊柱侧凸成功后外观与影像学表现

Figure 1 The appearance and X-ray presentation of bipedal amputated scoliosis mice

1.25)g,  $P < 0.05$ ], 术后4个月[(17.73 ± 1.76)g vs. (19.54 ± 1.36)g,  $P < 0.05$ ] 体重均明显低于同期对照组小鼠(图2)。此外,血清瘦素 ELISA 检测结果显示中枢高瘦素组双足直立小鼠外周血清瘦素水平明显高于对照组 [(488.1 ± 88.7)pg/ml vs. (159.5 ± 45.8)pg/ml,  $P < 0.05$ , 表1]。

经过4个月姿势诱导,两组小鼠均具有保持双足直立体态能力。中枢高瘦素组双足直立小鼠20只均发生脊柱侧凸(图1B),平均 Cobb 角(30.8 ± 5.6)°; 而对照组20只小鼠中18只发生脊柱侧凸,平均 Cobb 角(20.3 ± 3.7)°(表1)。统计学分析结果显示中枢高瘦素组小鼠虽然脊柱侧凸发生率与对照组无显著性差异( $P > 0.05$ ),但其脊柱侧凸严重程度明显高于对照组( $P < 0.05$ )。

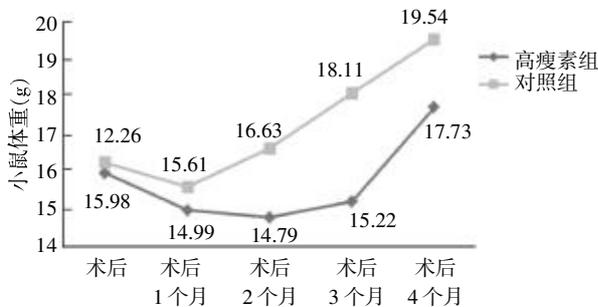


图2 两组 C57BL/6J 双足直立鼠体重改变

Figure 2 The changes in weight of two groups of bipedal amputated mice

表1 两组双足直立鼠影像学及血清学结果

Table 1 The radiological and serological result of two groups of bipedal amputated mice

观察指标	中枢高瘦素组	对照组	P 值
脊柱侧凸发生率(%)	100	90	0.245
脊柱侧凸严重程度(°)	30.8 ± 5.6	20.3 ± 3.7	0.001
外周瘦素水平(pg/ml)	488.1 ± 88.7	159.5 ± 45.8	0.002

### 3 讨论

瘦素是一种 ob 基因编码,由外周棕色脂肪组织分泌的激素,其进入血液后穿过血脑屏障,作用于下丘脑相应受体,发挥了调控机体代谢水平、生殖系统功能等多种机体重要功能<sup>[7]</sup>。人体测量学研究发现,较之正常同龄青少年,AIS 患者常具有偏瘦体态、较高身高、较长臂展等体态特征<sup>[8-9]</sup>,而其特征的形成与瘦素内分泌系统异常存在直接或间接关联。因此,近年来瘦素内分泌系统异常成为 AIS 病因学研究新的热点。Qiu 等<sup>[5]</sup>首次报道了 AIS 患者外周瘦素浓度明显低于同龄对照青少年,提出了瘦素内分泌系统异常可能与 AIS 发病存在相关性。在此基础上,

Burwell 等<sup>[3-4]</sup>回顾了瘦素内分泌系统功能与 AIS 患者临床特征形成过程间相关性,详细推演了中枢高瘦素活性导致 AIS 发生的可能机制,提出了中枢高瘦素活性可能是导致 AIS 发生的重要病因这一假说。Liu 等<sup>[2]</sup>则报道 AIS 患者体内瘦素生物利用度明显高于同龄青少年,这一发现意味着 AIS 患者外周瘦素更易进入中枢发挥其生理作用,从另一角度间接支持了此类患者可能存在中枢高瘦素活性状态这一假说。虽然上述研究均从不同角度揭示出中枢高瘦素水平与 AIS 发病间潜在相关性并建立了一套完整发病机制假说,但由于伦理学限制,这一假说目前仍缺乏直接证据的有力支持。因此,本研究采用建立中枢高瘦素脊柱侧凸动物模型这一方法,研究中枢高瘦素活性对 AIS 发生发展过程的影响,从而直接验证 AIS 中枢高瘦素假说。

C57BL/6J 双足直立小鼠模型是目前广泛应用于 AIS 病因学研究的动物模型之一<sup>[10]</sup>。相较于其他动物,小鼠与人类具有较高的同源性,故其内分泌及代谢调控系统与人类近似,常常用于瘦素内分泌调控系统功能研究<sup>[11-13]</sup>。而双足直立体态是双足直立小鼠作为脊柱侧凸模型动物的重要优势。相关研究表明 AIS 是一种与直立体态密切相关的疾病<sup>[14-15]</sup>。Machida 等<sup>[16]</sup>比较了双足直立松果体切除大鼠与四足松果体切除大鼠间脊柱侧凸发生率,发现双足直立大鼠脊柱侧凸发生率明显高于四足大鼠,从而提出直立体态也是脊柱侧凸重要发病因素。而后,该研究小组采用 C57BL/6J 小鼠再次进行类似研究,亦得到了相近结果,进一步支持上述观点<sup>[17]</sup>。因此,双足直立鼠所具有的直立体态使之可更为准确模拟出人类脊柱侧凸发生过程。此外,除了相似的内分泌系统及体态,高脊柱侧凸诱导率也是 C57BL/6J 双足直立小鼠模型较为突出的优点,其机制主要是低褪黑素水平通过影响青少年脊柱发育各个方面致使脊柱侧凸的发生<sup>[17]</sup>。Machida 等<sup>[17]</sup>构想了 C57BL/6J 双足直立小鼠这一动物模型并将其付诸实践,发现该模型脊柱侧凸诱导率远高于其他脊柱侧凸动物模型,达到 96.3%。另一项类似研究中脊柱侧凸 C57BL/6J 双足直立小鼠所占比例也达到了 64.3%。而本研究中对照组 C57BL/6J 双足直立小鼠脊柱侧凸发生率为 90%,与上述研究中脊柱侧凸发生率相近,进一步肯定了这一动物模型脊柱侧凸诱导的有效性。综合上述因素,本研究选取 C57BL/6J 双足直立小鼠作为研究中枢瘦素异常水平对脊柱侧凸作用的模型动物。

本研究中体重监测结果显示中枢高瘦素组双足直立小鼠术后4个月内各阶段体重均明显低于对照组小鼠,提示该组体重受到中枢高瘦素水平的影响。而术后4个月时中枢高瘦素组双足直立鼠外周瘦素水平明显高于对照组,则可能与中枢外源性瘦素水平升高后逆向进入外周有关。上述两项结果一致表明该组小鼠中枢瘦素水平明显升高,提示中枢高瘦素组双足直立鼠建模成功。根据影像学检查结果,本研究发现中枢高瘦素组双足直立鼠虽然脊柱侧凸发生率与对照组无明显差异,但其脊柱侧弯严重程度明显高于对照组,提示中枢高瘦素水平可在脊柱侧凸发生发展过程中起到促进作用。

虽然本研究得出中枢高瘦素水平可促使脊柱侧凸进展这一重要结论,但仍有如下缺陷:首先,由于技术的限制,本研究未能收集小鼠中枢脑脊液进行中枢瘦素水平直接测定,而通过体重监测与外周瘦素水平测定间接证明中枢高瘦素水平存在,一定程度上影响研究的准确性;其次,C57BL/6J双足直立鼠脊柱侧凸诱导率较高,从而掩盖了中枢高瘦素水平对脊柱侧凸发生率的影响。因此,本课题组还将在今后工作中针对上述问题进行探讨,进一步探究中枢高瘦素水平在脊柱侧凸发生发展过程所产生作用及其机制。

本研究结果显示中枢高瘦素水平致使双足直立鼠脊柱侧凸严重程度加重,提示中枢高瘦素水平在脊柱侧凸进展过程中可能发挥一定作用。

#### [参考文献]

- [1] 邱勇,朱丽华,宋知非,等.脊柱侧凸的临床病因学分类研究[J].中华骨科杂志,2000,20(5):265-268
- [2] Liu Z,Tam EM,Sun GQ,et al. Abnormal leptin bioavailability in adolescent idiopathic scoliosis:an important new finding[J]. Spine(Phila Pa 1976),2012,37(7):599-604
- [3] Burwell RG,Dangerfield PH,Moulton A,et al. Etiologic theories of idiopathic scoliosis:autonomic nervous system and the leptin-sympathetic nervous system concept for the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis[J]. Stud Health Technol Inform,2008,140:197-207
- [4] Burwell RG,Aujla RK,Kirby AS,et al. Body mass index of girls in health influences menarche and skeletal maturation;a leptin-sympathetic nervous system focus on the trunk with hypothalamic asymmetric dysfunction in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis? [J]. Stud Health Technol Inform,2008,140(1):9-21
- [5] Qiu Y,Sun X,Qiu X,et al. Decreased circulating leptin level and its association with body and bone mass in girls with adolescent idiopathic scoliosis [J]. Spine,2007,32(24):2703-2710
- [6] Toda C,Shiuchi T,Lee S,et al. Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues[J]. Diabetes,2009,58(12):2757-2765
- [7] Ahima RS,Dushay J,Flier SN,et al. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice [J]. J Clin Invest,1997,99(3):391-395
- [8] 邱勇,邱旭升,孙旭,等.青少年特发性脊柱侧凸女性患者的体重指数特征[J].中华外科杂志,2008,46(8):588-591
- [9] Lee WT,Cheung CS,Tse YK,et al. Generalized low bone mass of girls with adolescent idiopathic scoliosis is related to inadequate calcium intake and weight bearing physical activity in peripubertal period [J]. Osteoporos Int,2005,16(9):1024-1035
- [10] Akel I,Demirkiran G,Alanay A,et al. The effect of calmodulin antagonists on scoliosis:bipedal C57BL/6 mice model[J]. Eur Spine J,2009,18(4):499-505
- [11] Iwaniec UT,Boghossian S,Lapke PD,et al. Central leptin gene therapy corrects skeletal abnormalities in leptin-deficient ob/ob mice[J]. Peptides,2007,28(5):1012-1019
- [12] Banks WA,Clever CM,Farrell CL. Partial saturation and regional variation in the blood-to-brain transport of leptin in normal weight mice[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2000,278(6):E1158-1165
- [13] Halaas JL,Boozer C,Blair-West J,et al. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94(16):8878-8883
- [14] 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
- [15] 邱贵兴,肖军,吴志宏,等.双足鼠直立姿势相关因素及促直立的措施[J].中华实验外科杂志,2006,23(6):3
- [16] 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
- [17] 李海波,邱勇,孙光权,等.青少年特发性脊柱侧凸患者骨髓间充质干细胞褪黑素受体表达的研究[J].南京医科大学学报:自然科学版,2008,28(12):1547-1583

[收稿日期] 2013-02-23