

脊柱侧弯动物模型制备方法的研究进展

冯巩, 徐烨, 赵旭, 冯其金

(天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150)

摘要 动物模型制备是科学实验中常用的一种方法, 动物模型用于研究人类疾病的成因、发展过程及治疗方法等。目前已知的脊柱侧弯动物模型较多, 主要有手术机械类模型、基因类模型、神经肌肉类模型、内分泌类模型。但目前尚没有一种简易、可重复性强、易于推广的脊柱侧弯动物模型制备方法。本文就脊柱侧弯动物模型制备方法的研究进展进行了综述。

关键词 脊柱侧凸; 模型; 动物; 综述

脊柱侧弯是脊柱的非正常弯曲, 是一种脊柱的三维畸形, 包括冠状位、矢状位和轴位上的序列异常^[1]。脊柱侧弯可分为早发性脊柱侧弯^[2]、青少年脊柱侧弯^[3]以及成人脊柱侧弯^[4], 其具体病因尚未完全明确, 可能与基因遗传^[5]、内分泌^[6]、神经肌肉系统病变^[7]等因素有关。脊柱侧弯的治疗方法因侧弯的严重程度而异, 轻度脊柱侧弯通常采用佩戴支具、按摩及功能锻炼等方法进行矫正, 而对于 Cobb 角 $\geq 40^\circ$ 的脊柱侧弯则建议手术治疗, 但一次手术难以达到预期效果, 通常需要翻修手术^[8]。为明确脊柱侧弯的发病原因以及寻找更好的治疗方法, 研究者们建立了各种脊柱侧弯动物模型。本文就脊柱侧弯动物模型制备方法的研究进展进行了综述, 以期对脊柱侧弯的相关研究提供参考。

1 手术机械类模型制备

目前通过手术内固定制备脊柱侧弯模型已经相对成熟^[9]。通过四足动物制备手术机械类脊柱侧弯模型的操作方法主要包括: ①切除肋骨; ②椎骨或肋骨相互固定。上述方法均在不改变椎体本身结构的情况下, 使脊柱或支撑组织失去平衡, 在此类动物模型中脊柱侧弯的进展同脊柱侧弯患者的病情进展一致。长期平卧的人类可以出现脊柱侧弯^[10], 表明重力不是脊柱侧弯发病的先决条件, 所以四足动物脊柱侧弯模型的制备具有一定的科学性。Meiring 等^[11]研究认为, 通过切除对侧肋骨及椎弓根螺钉固定能诱发特发性脊柱畸形。Sunni 等^[12]通过研究发现, 对牛脊柱进行椎体融合术后, 可使牛的 Cobb 角增加约 30° ,

而且还发现牛椎体骺板均有不同程度的损伤, 说明过大的应力在增加 Cobb 角的同时会损伤脊柱。Gross 等^[13]对实验猪进行了如下手术操作: ①于 $T_{10} \sim T_{11}$ 左侧开胸; ②于 T_9 和 T_{11} 放置螺钉; ③ T_{10} 椎体部分切除; ④横断棘间韧带; ⑤螺钉周围放置钢丝圈并拧紧。其实验结果发现, 术后即刻 6 只猪的 Cobb 角为 $30.5^\circ \pm 1.0^\circ$, 术后 5 周内 Cobb 角不断增加, 实验结束时 Cobb 角为 $50.3^\circ \pm 7.2^\circ$ 。出现该实验现象的原因可能是猪的体重不断增加(实验猪初始体质量约为 10 kg, 实验结束时体质量约为 25 kg), 此观点与 Laubach 等^[14]的观点一致。此外, 通过支具外固定也能制备脊柱侧弯动物模型。Banala 等^[15]用支具外固定小鼠脊柱 5 周后, 发现小鼠 Cobb 角约为 50° , 而摘除支具后 7 周, 小鼠的 Cobb 角却减小了 $10^\circ \sim 20^\circ$ 。

综上所述, 通过内固定和支具外固定都能制备脊柱侧弯动物模型, 内固定能够形成长期稳定的 Cobb 角, 缺点是会损伤实验动物, 制备成本高, 对个体较小的实验动物操作较难; 支具外固定的优势在于方便经济, 劣势在于实验后形成的 Cobb 角在支具撤离的一段时间后会减小。

2 基因类模型制备

随着基因测序技术的不断发展, 脊柱侧弯遗传学相关研究迅速增加。目前已知与脊柱侧弯相关的基因包括 TBX6、NPR2、ZMYND10、BNC52、POC5、ZIC3、NKAP 等^[16]。尽管越来越多的研究发现脊柱侧弯与遗传变异有关, 但其潜在的作用机制仍有待进一步研究。通过基因编辑建立动物模型, 可观察脊柱发育过程中存在一系列分子生物学的异常, 进而确定遗传因素在脊柱侧弯发病机制中的作用。

脊柱的发育方式主要为软骨内成骨。骨软骨病

基金项目: 天津市科技计划项目 (20JCYBJC00340)

通讯作者: 冯其金 E-mail: fengqijin@126.com

样变化可导致猪脊柱出现后凸,因此通过诱导软骨病样变化,能够制备与软骨相关的脊柱侧弯基因模型^[17]。Halanski 等^[18]通过减少山羊母体维生素 D 的摄取,发现其后代也出现了脊柱侧弯。TAQL (RS731236) 基因以及维生素 D 受体均参与维生素 D 的代谢途径,因此诱导维生素 D 作用路径相关基因突变,可使脊柱发生侧弯。Isaac 等^[19]以抗肌萎缩蛋白、肌营养不良蛋白双敲除小鼠作为肌肉骨骼过早老化模型,结果显示实验小鼠的骨矿物质密度和含量均显著降低,此现象同杜氏肌肉营养不良症患者的表现一致。从基因水平上抑制钙离子摄取以及减缓成骨细胞活跃性是造成脊柱强度不均而发生侧弯的一个重要途径。此外,肌萎缩蛋白缺乏可引起肌肉萎缩,同时也可导致骨质流失,诱发退行性脊柱侧弯^[20]。故影响钙离子跨膜吸收相关基因 CABP-D9K、TRPV6 的表达,可减少实验动物胃肠道对钙离子的吸收,减弱脊柱抗应力的能力,使椎体发生移位而形成侧弯。

SAMP8 小鼠是一种快速老化小鼠,是研究退行性脊柱侧弯的理想动物模型。Hu 等^[21]通过麻醉下截断 SAMP8 小鼠的前肢及尾巴来模拟人直立行走的实验研究,发现 SAMP8 小鼠的椎间盘发生了退变,包括椎间盘高度的减少和椎骨骨赘的形成,而且 SAMP8 小鼠发生脊柱侧弯率为 100%。这说明衰老、椎间盘退化及椎体骨赘的形成与退行性脊柱侧弯的发生有一定的潜在关系。以上模型能为脊柱侧弯基因方面的研究提供帮助,但不同基因模型可重复率有差异,且基因编码动物较普通实验动物昂贵。

3 神经肌肉类模型制备

神经元异常在神经肌肉性脊柱侧弯中起着重要作用^[22],Van Gennip 等^[23]通过实验进一步验证了该观点。Assaraf 等^[24]的研究结果显示,神经元中缺乏 piezo2 的小鼠患脊柱侧弯的概率高于正常小鼠。Kamal 等^[25]对雷诺综合征小鼠进行研究后发现,小鼠的骨刚度和骨负荷降低以及神经元异常可导致脊柱两侧的力学分布存在差异。在青少年特发性脊柱侧弯患者中,神经炎症和氧化过激也扮演着重要角色。sspO 蛋白是一种高分子糖蛋白,参与低密度脂蛋白识别。该蛋白与低密度脂蛋白对神经起到调节作用,sspO 蛋白缺乏能够诱导神经炎症。Rose 等^[26]通过对斑马鱼使用 sspO 表达抑制剂,制备出了斑马鱼脊柱侧弯模型。

肌肉的力学特性对人体力量的生成和控制发挥着至关重要的作用。肌肉力学失衡被认为是导致脊柱侧弯的原因之一^[27]。脊柱两旁的肌肉力学平衡维持着脊柱的正常形态,当一侧肌肉过度牵拉或萎缩,脊柱双侧力学就会失衡,从而发生脊柱侧弯。Xie 等^[28]研究发现,脊柱双侧肌肉的生物力学特征与肌肉纤维和胶原分布的差异相关。剥离实验动物单侧椎旁肌来模拟脊椎双侧力学失衡,可制备出符合条件的脊柱侧弯动物模型。该模型制备过程简易,但需注意肌肉剥离过程中对神经的损伤。杜氏肌肉营养不良症是由功能性肌营养不良蛋白丧失引起的,其特征是肌纤维肌膜缺乏抗肌营养不良蛋白的表达,该病与 75%~90% 的脊柱侧弯有关。Isaac 等^[19]以抗肌萎缩蛋白、肌营养不良蛋白双敲除小鼠和 C57BL/10 小鼠为研究对象,结果发现这 2 种小鼠均出现明显的脊柱侧弯,但前一种小鼠发生侧弯的比例高于后一种小鼠,且侧弯的角度也大于后一种小鼠。Wang 等^[29]通过对 C57BL/6 小鼠腹部注射地塞米松后发现,注射地塞米松的小鼠比正常小鼠体重减轻了 15.7%,而其全身脂肪含量较正常小鼠更高。地塞米松能诱导小鼠肌肉发育不良,对小鼠局部注射地塞米松可使小鼠脊柱两侧力学失衡而出现侧弯。

此类模型同手术机械类模型相似,均可直接改变脊柱两侧力学,其优点在于能够验证侧弯发生的原因,可重复性较强,而手术机械类模型则多用于脊柱侧弯治疗方法的疗效评价。

4 内分泌类模型制备

1959 年,Thillard 首次报道切除鸡体内松果体可制造出与人类脊柱侧弯解剖特征类似的脊柱畸形^[30]。此后许多研究者提出褪黑素的合成和代谢缺陷是导致脊柱侧弯的关键因素。目前已有研究表明,褪黑素缺乏与青少年特发性脊柱侧弯的发病机制有关^[31]。褪黑素是松果体分泌的一种神经内分泌激素^[32]。切除鸡体内松果体是一种早期脊柱侧弯动物模型的制备方法。目前缺乏褪黑素的 C57BL/6J 小鼠是另一种理想的脊柱侧弯动物模型,该模型的优点在于血清素 N-乙酰转移酶(该酶在褪黑素的合成中必不可少)基因的自然敲除,而无需切除松果体^[33]。Liu 等^[34]对 C57BL/6J 小鼠进行外源性褪黑素干预,结果发现干预 15 周时约 90% 的 C57BL/6J 小鼠出现了脊柱侧弯,Cobb 角平均约为 21°,而接受褪黑素治

疗的小鼠仅有约 5% 的小鼠出现了脊柱侧弯;在干预 20 周时未接受褪黑素治疗的小鼠骨小梁间距明显宽于接受褪黑素治疗的小鼠,但 2 组小鼠骨小梁数量并未有明显差异。由此可推测,褪黑素可通过改变骨小梁之间的间距来影响骨强度,进而诱发脊柱侧弯。Yang 等^[35]对双足大鼠腹部注射褪黑素拮抗剂 Luzindole,经过 6 个月的实验观察,发现使用 Luzindole 的双足大鼠脊柱侧弯率及侧弯程度均高于未使用 Luzindole 的双足大鼠;但对正常大鼠使用 Luzindole 后,并未出现明显侧弯。这表明单纯褪黑素缺乏并不能直接使脊柱发生侧弯。除褪黑素外,较低水平的雄激素也能影响女性青少年特发性脊柱侧弯患者的软骨发育,异常的软骨发育会加剧脊柱侧弯进程^[36]。在青少年特发性脊柱侧弯患者中丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路中 SPRY4 基因下调最严重^[37],SPRY4 基因可在褪黑素作用下上调,并以 EK-ERK1/2 依赖性方式促进成骨分化和褪黑素反应。对实验动物进行 SPRY4 基因敲除或注射 SPRY4 抗体,可使 MAPK 信号通路中 SPRY4 基因下调,破坏成骨分化,使脊柱出现侧弯。

5 小 结

手术机械类动物模型制备的可重复性强,适合新型内外固定方法治疗脊柱侧弯的研究,但在制备过程中应严格把控初始 Cobb 角;基因类动物模型制备成本较高,但能为脊柱侧弯基因方面的研究提供帮助;神经肌肉类动物模型制备的可重复性也较强,能验证脊柱侧弯发生的原因;内分泌类动物模型更适合药物治疗脊柱侧弯的研究。相信随着科学的不断进步,脊柱侧弯模型的制备方法将会不断完善,脊柱侧弯的发病机制也将更加清晰。

参考文献

- [1] SUNG P S, PARK M S. Asymmetrical thoracic-lumbar coordination during trunk rotation between adolescents with and without thoracic idiopathic scoliosis[J]. Spine Deform, 2022, 10(4): 783 – 790.
- [2] SHEN T S, SCHAIRER W, WIDMANN R. In patients with early-onset scoliosis, can growing rods be removed without further instrumentation? An evidenced-based review[J]. HSS J, 2019, 15(2): 201 – 204.
- [3] 冯其金, 陈文辉, 赵玲娟, 等. 中西医治疗青少年特发性脊柱侧弯的研究进展[J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(9): 110 – 112.
- [4] PASSIAS P G, AHMAD W, TRETIKOV P, et al. Identifying subsets of patients with adult spinal deformity who maintained a positive response to nonoperative management[J]. Neurosurgery, 2023, 93(2): 480 – 488.
- [5] ALMEKKAWI A K, CARUSO J P, EL AHMADIEH T Y, et al. Single nucleotide polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a systematic review and meta-analysis of the literature[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2023, 48(10): 695 – 701.
- [6] SMIT T H. Adolescent idiopathic scoliosis: the mechanobiology of differential growth[J]. JOR Spine, 2020, 3(4): e1115.
- [7] WEN J, WANG D, FANG K, et al. Effect of neurocentral cartilage destruction on spinal growth in immature rabbits[J]. J Int Med Res, 2019, 47(2): 951 – 961.
- [8] CHEUNG Z B, SELVERIAN S, CHO B H, et al. Idiopathic scoliosis in children and adolescents: emerging techniques in surgical treatment[J]. World Neurosurg, 2019, 130: e737 – e742.
- [9] HADDAD S, YASUDA T, VILA-CASADEMUNT A, et al. European Spine Study Group. Revision surgery following long lumbopelvic constructs for adult spinal deformity: prospective experience from two dedicated databases[J]. Eur Spine J, 2023, 32(5): 1787 – 1799.
- [10] BOBYN J D, LITTLE D G, GRAY R, et al. Animal models of scoliosis[J]. J Orthop Res, 2015, 33(4): 458 – 467.
- [11] MEIRING A R, DE KATER E P, STADHOUDER A, et al. Current models to understand the onset and progression of scoliotic deformities in adolescent idiopathic scoliosis: a systematic review[J]. Spine Deform, 2022, 11(3): 545 – 558.
- [12] SUNNI N, ASKIN G N, LABROM R D, et al. The effect of vertebral body stapling on spine biomechanics and structure using a bovine model[J]. Clin Biomech (Bristol, Avon), 2020, 74: 73 – 78.
- [13] GROSS R H, WU Y, BONTIUS D J, et al. Creation of a porcine kyphotic mode[J]. Spine Deform, 2019, 7(2): 213 – 219.
- [14] LAUBACH L, SHARMA V, ALSUMAIT A, et al. Socioeconomic factors correlation with idiopathic scoliosis curve type and cobb angle severity[J]. Cureus, 2023, 15(2): e34993.
- [15] BANALA R R, VEMURI S K, PENKULINTI M, et al. Development of novel animal model for studying scoliosis using a noninvasive method and its validation through gene-expression analysis[J]. Asian Spine J, 2019, 13(1): 126 – 134.

- [16] LV X, XU J, JIANG J, et al. Genetic animal models of scoliosis: a systematical review[J]. Bone, 2021, 152: 116075.
- [17] OLSTAD K, AASMUNDSTAD T, KONGSRO J, et al. Osteochondrosis and other lesions in all intervertebral, articular process and rib joints from occiput to sacrum in pigs with poor back conformation, and relationship to juvenile kyphosis[J]. BMC Vet Res, 2022, 18(1): 44.
- [18] HALANSKI M A, HILDAHL B, AMUNDSON L A, et al. Maternal diets deficient in vitamin D increase the risk of kyphosis in offspring: a novel kyphotic porcine model[J]. J Bone Joint Surg Am, 2018, 100(5): 406–415.
- [19] ISAAC C, WRIGHT A, USAS A, et al. Dystrophin and utrophin “double knockout” dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities[J]. J Orthop Res, 2013, 31(3): 343–349.
- [20] DOS SANTOS J F, LAZZARIN M C, BAPTISTA V I A, et al. Articular cartilage degeneration and bone adaptation due to lack of dystrophin in mice[J]. J Bone Miner Metab, 2022, 40(1): 29–39.
- [21] HU Z, TANG Z, KIRAM A, et al. The establishment of a mouse model for degenerative kyphoscoliosis based on senescence-accelerated mouse prone 8[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 7378403.
- [22] ASAHINA M, FUJINAWA R, NAKAMURA S, et al. Ngly1^{-/-} rats develop neurodegenerative phenotypes and pathological abnormalities in their peripheral and central nervous systems[J]. Hum Mol Genet, 2020, 29(10): 1635–1647.
- [23] VAN GENNIP J L M, BOSWELL C W, CIRUNA B. Neuroinflammatory signals drive spinal curve formation in zebrafish models of idiopathic scoliosis[J]. Sci Adv, 2018, 4(12): eaav1781.
- [24] ASSARAF E, BLECHER R, HEINEMANN-YERUSHALMI L, et al. Piezo2 expressed in proprioceptive neurons is essential for skeletal integrity[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 3168.
- [25] KAMAL B, RUSSELL D, PAYNE A, et al. Biomechanical properties of bone in a mouse model of Rett syndrome[J]. Bone, 2015, 71: 106–114.
- [26] ROSE C D, POMPILI D, HENKE K, et al. SCO-spondin defects and neuroinflammation are conserved mechanisms driving spinal deformity across genetic models of idiopathic scoliosis[J]. Curr Biol, 2020, 30(12): 2363–2373.
- [27] LIU Y, PAN A, HAI Y, et al. Asymmetric biomechanical characteristics of the paravertebral muscle in adolescent idiopathic scoliosis[J]. Clin Biomech (Bristol Avon), 2019, 65: 81–86.
- [28] XIE D, ZHANG J, DING W, et al. Abnormal change of paravertebral muscle in adult degenerative scoliosis and its association with bony structural parameters[J]. Eur Spine J, 2019, 28(7): 1626–1637.
- [29] WANG B Y, HSIAO A W, WONG N, et al. Is dexamethasone-induced muscle atrophy an alternative model for naturally aged sarcopenia model[J]. J Orthop Translat, 2022, 39: 12–20.
- [30] 刘立峰, 朱悦. 实验性脊柱侧凸建模方式的研究进展[J]. 中国骨与关节外科, 2009, 2(1): 80–85.
- [31] GARGANO G, OLIVA F, MIGLIORINI F, et al. Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis: the present evidence[J]. Surgeon, 2022, 20(6): e315–e321.
- [32] WANG S, LI S, ZHAI X, et al. Transcutaneous auricular vagal nerve stimulation releases extrapineal melatonin and reduces thermal hypersensitivity in Zucker diabetic fatty rats[J]. Front Neurosci, 2022, 16: 916822.
- [33] ZHANG Z, SILVEYRA E, JIN N, et al. A congenic line of the C57BL/6J mouse strain that is proficient in melatonin synthesis[J]. J Pineal Res, 2018, 65(3): e12509.
- [34] LIU H, LIU Z, MAN C W, et al. The effect of exogenous melatonin on reducing scoliotic curvature and improving bone quality in melatonin-deficient C57BL/6J mice[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6202.
- [35] YANG S, ZHENG C, JIANG J, et al. The value of applying a melatonin antagonist (Luzindole) in improving the success rate of the bipedal rat scoliosis model[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2017, 18(1): 137.
- [36] WU Y T, TANG M X, WANG Y J, et al. Lower androgen levels promote abnormal cartilage development in female patients with adolescent idiopathic scoliosis[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(9): 784.
- [37] LI J, LI N, CHEN Y, et al. SPRY4 is responsible for pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis by contributing to osteogenic differentiation and melatonin response of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11): 805.

(收稿日期: 2023-03-01 本文编辑: 时红磊)