

兔不同程度椎体切除相邻椎间盘的组织学变化*☆

张亮¹, 靳安民², 高粱斌¹, 李健¹, 杨波¹, 张志¹, 王箭¹

Histological changes in rabbit adjacent intervertebral disc following different degrees of vertebral body resection

Zhang Liang¹, Jin An-min², Gao Liang-bin¹, Li Jian¹, Yang Bo¹, Zhang Zhi¹, Wang Le¹

Abstract

BACKGROUND: It remains unclear whether partial vertebral body resection affects nutrition path of intervertebral disc, thereby leading to degeneration of intervertebral disc.

OBJECTIVE: To investigate the impact of the degrees of vertebral body resection in rabbit on degeneration of adjacent intervertebral disc.

METHODS: A total of 10 New Zealand rabbits were divided into two groups according to the degrees of resection of vertebral body (1/2 and 3/4). At 6 months after operation, the intervertebral disc adjacent to the injured vertebrae and the normal intervertebral disc (normal control) were evaluated by means of hematoxylin-eosin staining to determine the number of vascular buds in Cartilage end-plate, and the changes of nucleus pulposus. The vertebral discs were also measured by alcian blue stained and calculated image optical density (IOD) to evaluate the changes of proteoglycan in nucleus pulposus.

RESULTS AND CONCLUSION: When the removal of vertebral body was less than 1/2 in anterior decompression, the nutrition condition remained unchanged, so a single segment fusion with anterior bisegment fixation should be considered. If vertebral body resection was more than 3/4, the adjacent intervertebral disc exhibited significant changes in nutritional status and lead to intervertebral disc degeneration. Therefore, double segment fusion with anterior bisegment fixation should be considered.

Zhang L, Jin AM, Gao LB, Li J, Yang B, Zhang Z, Wang L. Histological changes in rabbit adjacent intervertebral disc following different degrees of vertebral body resection. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(30): 5631-5634. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 切除部分椎体是否可能会导致椎间盘营养通道的破坏, 从而导致椎间盘的退行性变, 目前很少有研究涉及。

目的: 评估兔椎体不同程度切除对相邻椎间盘退行性变的影响。

方法: 将 10 只新西兰兔分为 2 组, 根据椎体不同程度切除植骨内固定, 分为切除 1/2 椎体组和切除 3/4 椎体组。在造模后 6 个月处死动物, 获取伤椎下位椎间盘及正常椎间盘组织(设为正常对照组); 并进行苏木精-伊红染色, 观察椎间盘组织学改变, 检测椎体软骨终板血管芽数量; 通过阿新蓝染色测量图像阳性吸光度以评价椎间盘髓核组织中蛋白多糖的变化。

结果与结论: 兔椎体切除小于 1/2 时, 相邻椎间盘营养状况不会有明显改变; 如果前路减压需切除椎体不超过 1/2 时应考虑单节段植骨融合双节段固定。椎体切除大于 3/4 时, 相邻椎间盘营养状况会有明显改变, 并导致椎间盘退行性变; 如果前路减压需切除椎体超过 3/4 时应考虑切除相邻椎间盘行两节段植骨融合。

关键词: 椎间盘; 椎体部分切除; 退行性变; 血管芽; 组织学

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.30.029

张亮, 靳安民, 高粱斌, 李健, 杨波, 张志, 王箭. 兔不同程度椎体切除相邻椎间盘的组织学变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(30):5631-5634. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

Atlas等^[1-2]根据CT及X射线, 将胸腰椎爆裂骨折分类, 其中占比例最多的B型(占54.7%), 其特点是椎体上位终板的破坏, 椎体上部分压缩并向后凸, 下终板及下位椎间盘完整。该型骨折治疗过程能否只切除伤位椎间盘和部分伤椎, 融合两个椎体, 而保留下位椎间盘, 在植骨融合后拆除内固定以最大程度保留脊柱活动度。本实验于不同程度切除兔椎体植骨内固定后, 观察椎体软骨终板血管芽数量、椎间盘组织学改变、椎间盘髓核组织中蛋白多糖的变化, 评估兔椎体不同程度切除对相邻椎间盘退行性

变的影响, 以期为临床伤椎下位椎间盘保留与否提供参考。

1 材料和方法

设计: 观察对比动物实验。

时间及地点: 于2008-06/2009-06在南方医科大学珠江医院中心实验室完成。

材料: 健康成年新西兰大白兔10只, 南方医科大学动物实验中心提供(许可证号: SCXK(粤)2006-0015), 雌雄各5只, 兔龄均为4个月, 平均体质量为1.5 kg。在标准条件下适应性饲养3周, 实验过程中对动物处置方法符合动物伦理学要求^[3]。

¹Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China; ²Orthopedics Center of Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Zhang Liang☆, Doctor, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China zldxx861@sina.com

Supported by: the Medical Health Science and Technology Program of Guangzhou, No. 2009-YB-165*

Received: 2010-04-15
Accepted: 2010-06-28

¹广州医学院第三附属医院骨科, 广东省广州市 510150; ²南方医科大学珠江医院骨科中心, 广东省广州市 510282

张亮☆, 男, 1971年生, 福建省周宁县人, 汉族, 2010年南方医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事脊柱外科方面的研究。zldxx861@sina.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)30-05631-04

收稿日期: 2010-04-15
修回日期: 2010-06-28
(20100415001/G·A)

方法:

动物模型的建立与分组: 动物实验前称质量, 用30 g/L的戊巴比妥钠注射液1 mL/kg行耳缘静脉注射麻醉。麻醉成功后, 备皮、消毒、铺巾。采用腹正中切口, 长约10 cm经腹腔暴露并钝性分离椎前软组织, 暴露脊柱正前方。显露L₁₋₃椎体, 按随机数字表法分为2组, 每组5只。椎体切除1/2组: 切除腰1/2椎间盘及L₂椎体上1/2, 取桡骨植入, 在腰椎前侧方安置钢板螺钉固定于L₁, L₃椎体。椎体切除3/4组: 切除腰1/2椎间盘及L₂椎体上3/4, 取桡骨植入, 在腰椎前侧方安置钢板螺钉固定于L₁, L₃椎体。造模后庆大霉素8万单位肌肉注射1次/d, 共3 d。

观察方法: ①观察造模后兔子的饮食、活动、切口愈合情况; 取材时观察固定范围内椎间盘表面情况, 有无红肿等。②X射线片观察: 造模后及造模后6个月行X射线片检查, 观察L_{2/3}椎间隙的改变, 植骨区融合情况。③组织处理: 在造模后6个月处死动物, 并取材: 获取伤椎下位椎间盘及正常椎间盘组织(设为正常对照组), 伤椎下位完整椎间盘组织包括椎体上下终板以及L_{4/5}椎间盘。并进行固定、包埋, 制成蜡块, 组织学切片, 然后分别进行苏木精-伊红染色和阿辛蓝染色。

主要观察指标: ①椎间盘的苏木精-伊红染色观察纤维环、髓核的变化, 并依据Norbert Boos观察指标评价椎间盘退行性变的等级^[4]。②阿辛蓝染色的强度通过使用图像分析软件Image-Pro Plus的强度分析功能进行评价, 测量图像阳性的吸光度值(A)。③椎体软骨终板血管芽数量: 取苏木精-伊红染色切片, 低倍光学显微镜下(x40)计数软骨终板血管芽数(头侧和尾侧血管数之和除以2)。

设计、实施、评估者: 设计、实施、评估均为本文作者, 均经过正规培训, 未采用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者应用SPSS 13.0统计软件进行数据处理, 结果采用完全随机方差分析。

2 结果

2.1 大体观察结果 10只兔子造模后瘫痪2只, 腹部感染死亡1只, 均给予补充标本处理; 余兔子造模后无死亡及伤口感染, 饮食情况良好。造模后6个月X射线片提示椎体切除1/2组椎体植骨区愈合良好, 椎体切除3/4组椎体植骨区骨生长稍差。

2.2 苏木精-伊红染色结果 椎体切除1/2组(图1)与正常标本组(图2)比较无明显差别, 椎间盘纤维环和髓核的界限正常, 软骨终板无钙化形成, 血管床无减少, 髓核细胞正常, 髓核的基质无压缩, 部分样本见少许纤维扭转, 未见纤维环断裂。椎体切除3/4组(图3)与正常标本组比较有明显差别, 椎间盘纤维环结构紊乱, 髓核细胞

退行性变, 并出现钙化情况。

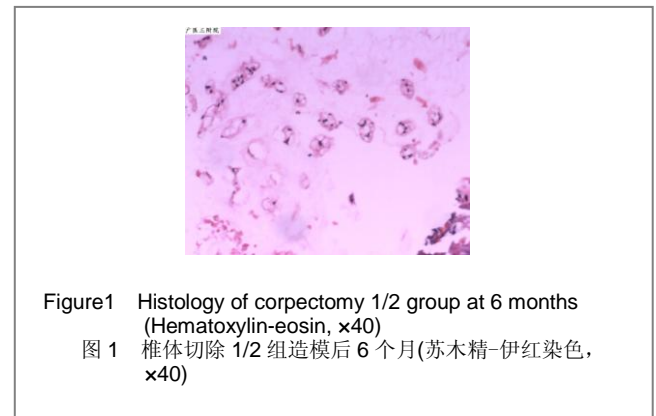


Figure1 Histology of corpectomy 1/2 group at 6 months (Hematoxylin-eosin, x40)
图1 椎体切除1/2组造模后6个月(苏木精-伊红染色, x40)

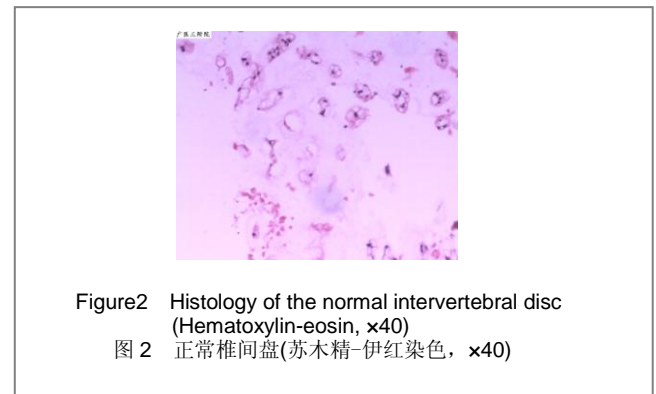


Figure2 Histology of the normal intervertebral disc (Hematoxylin-eosin, x40)
图2 正常椎间盘(苏木精-伊红染色, x40)

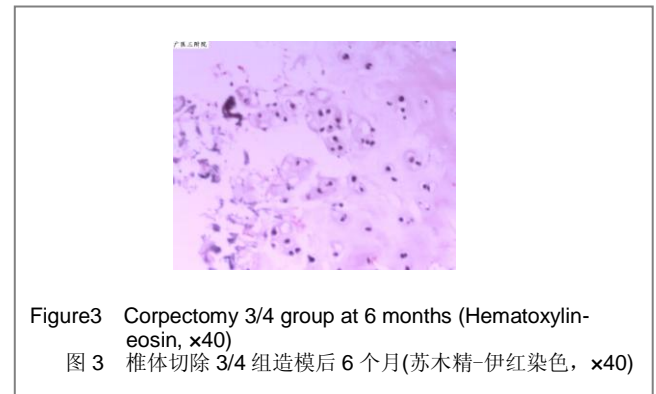


Figure3 Corpectomy 3/4 group at 6 months (Hematoxylin-eosin, x40)
图3 椎体切除3/4组造模后6个月(苏木精-伊红染色, x40)

方差分析提示各组间Norbert Boos评分差异有显著性意义($F=4.113$, $P=0.044$), 其中椎体切除1/2组与正常对照组差异无显著性意义(8.20 ± 2.28 , 7.85 ± 2.16 , $P=0.776$), 椎体切除3/4组评分(11.4 ± 2.07)高于椎体切除1/2组及正常对照组($P > 0.05$)。

2.3 椎体软骨终板血管芽数量 椎体切除1/2组组织纤维环排列规则, 结构尚完整, 髓核结构正常, 未见纤维化, 血管芽数目正常(图4), 与正常对照组(图5)无明显差别。椎体切除3/4组可见软骨板变薄, 细胞数减少, 血管芽数目减少, 腔隙较小; 髓核及纤维环细胞数减少, 髓核内可见较多的死亡细胞; 部分组织纤维环排列不规则, 但结构完整, 髓核结构基本正常, 未见纤维化(图6)。

方差分析提示各组间椎体软骨终板血管芽数量差异有显著性意义($F=17.878$, $P=0.000$), 两两比较椎体

切除3/4组椎体软骨终板血管芽数量少于椎体切除1/2组 (10.40 ± 1.67 , 19.00 ± 2.35 , $P=0.000$), 椎体切除3/4组椎体软骨终板血管芽数量少于对照组 (20.4 ± 4.04) ($P=0.00$), 椎体切除1/2组与对照组软骨终板血管芽数量差异无显著性意义 ($P=0.454$)。

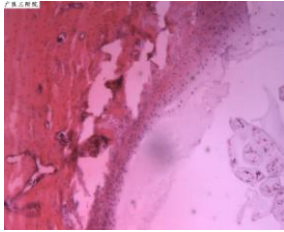


Figure 4 Vertebral endplate vascular buds of corpectomy 1/2 group at 6 months (Hematoxylin-eosin, $\times 40$)
图4 造模后6个月切除伤椎1/2伤椎下终板血管芽(苏木精-伊红染色, $\times 40$)

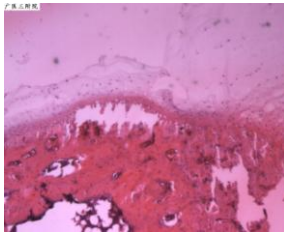


Figure 5 Normal rabbit vertebral endplate vascular buds after operation six months (Hematoxylin-eosin, $\times 40$)
图5 造模后6个月正常椎体终板血管芽(苏木精-伊红染色, $\times 40$)

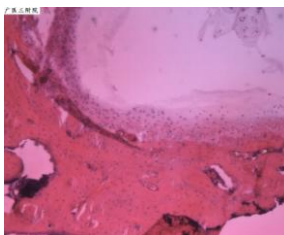


Figure 6 Vertebral endplate vascular buds of corpectomy 3/4 group at 6 months (Hematoxylin-eosin, $\times 40$)
图6 造模后6个月切除伤椎3/4伤椎组下终板血管芽(苏木精-伊红染色, $\times 40$)

2.4 阿辛蓝染色结果 方差分析提示各组间阿辛蓝染色的A值差异有显著性意义 ($F=9.248$, $P=0.004$), 椎体切除1/2组伤椎下位椎间盘髓核组织的阿辛蓝染色A值与对照椎间盘组织差异无显著性意义 ($16\ 190\ 448.0 \pm 362\ 150.76$, $16\ 362\ 375.2 \pm 467\ 886.0$, $P=0.582$)。椎体切除3/4组伤椎下位椎间盘髓核组织的阿辛蓝染色A值 ($15\ 515\ 147.8 \pm 464\ 893.1$) 与对照椎间盘组织及椎体切除1/2组比较差异有显著性意义 ($P=0.004 < 0.01$)。

3 讨论

3.1 动物模型的选择 兔是目前最常用的实验动物之一, 具有实验方便, 价格适中, 可以使用大规模试验等优点, 而且其椎间盘在解剖上和组织学结构上与人类椎间盘相似, 已有大量研究通过制作兔腰椎椎间盘退行性变、损伤等模型进行了评价椎间盘置换和移除效果、椎间盘退行性变^[5]。1959年Wiley等^[6]发现兔子的颈、胸、腰椎的动静脉与人体十分相似, 兔椎体血管分布及椎间盘终板的血供也与人类椎体极为相似, 从椎体滋养血管切片图, 可以看出血管的分布特点是在椎体近上终板1/3是有明显血管滋养, 在椎体中1/2稍下也有明显滋养血管主干分布。本实验根据椎体内滋养血管分布有一定的规律性的特点, 通过对新西兰兔不同程度切除椎体, 研究血供情况变化对椎间盘的营养影响, 为临床选择伤椎体减压后是否保留提供理论依据。为了排除年龄因素干扰, 本实验选择的新西兰兔初始兔龄均为4个月。

3.2 椎体切除与终板血供 通过对椎体切除1/2组和正常椎体终板椎体软骨终板血管芽数量的比较, 发现两组差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 椎体切除3/4组血管芽数量少于椎体切除1/2组 ($P < 0.01$), 这表明随着椎体血供的破坏, 终板的血管数在降低, 终板的营养功能降低。进入椎体的血管在椎体终板及其下吻合成血管网, 形成血管芽状, 它们在营养物质渗透上起着最重要作用^[7]。当切除椎体1/2时, 残余椎体血供没有明显改变, 对最终形成血管芽数量没有明显影响。而当椎体切除3/4时, 椎体的血供明显受破坏, 残余椎体终板的血供明显减少, 形成的血管芽数目减少, 从而影响椎间盘的营养供应。本实验只是粗略的提示当椎体切除小于1/2时, 保留椎间盘的血供不会受到明显影响。在1/2到3/4之间是否会受到明显影响, 需要更深入研究。本实验对上述结论进一步予以证实, 动物与人类在终板下血管分布上的一致性反映了两者在营养生理方面的相似性, 椎体不同程度切除可以导致终板下血管分布的改变和椎间盘营养的改变。

3.3 终板血供与椎间盘营养及椎间盘退行性变 椎体终板内有大小不等的孔状结构, 中央区域多, 周边少^[8-9]。椎体的血窦与软骨终板有直接接触。Moore等^[10]对羊椎间盘终板的研究发现髓核营养主要来自于终板中心区域的血管, 此外很少再有其他的营养来源。如该营养通路发生障碍, 将直接影响髓核的细胞代谢。动物与人类在终板下血管分布上的比较相似, 一定程度上反映了两者在营养生理方面的相似性。阿新蓝试剂为阳离子剂, 能将多聚阴离子染成蓝色^[11-12], 在组织切片上, 染色反应强度反映着蛋白多糖的浓度, 根据这个特性可以在椎间盘基质中得到蛋白多糖分子的改变。本实验发现各组椎间盘组织阿辛蓝染色强度如下, 正常椎间盘组织组与

椎体切除1/2组差异无显著性意义($P > 0.05$), 椎体切除3/4组与正常椎间盘组织组及椎体切除1/2组相比则明显降低。提示正常椎间盘组、椎体切除1/2组蛋白多糖含量相当, 而椎体切除3/4组蛋白多糖含量明显减少。椎间盘髓核内有胶原纤维网状结构、粘多糖蛋白复合体和硫酸软骨素, 使髓核具有与水结合的能力^[13]。随着蛋白多糖的丢失、椎间盘的渗透压下降, 椎间盘在负荷下维持水合作用的能力降低^[14], 其高度和液体含量的丢失加快^[15], 并导致椎间盘的刚度下降, 最终使得椎间盘在负荷下容易膨胀、突出, 这种重要的改变对脊柱结构及功能有着强烈的影响。本实验认为椎体切除小于1/2时, 对残余椎体下方间盘蛋白多糖含量影响情况影响不大, 对椎间盘功能可能影响不大。当切除大于3/4时则有明显影响, 有可能影响到椎间盘功能, 最后导致椎间盘退行性变。

观察椎间盘髓核的组织学改变是了解椎间盘组织改变的基础。椎体切除1/2组与正常标本组比较无明显差别, 椎间盘纤维环和髓核的界限正常, 软骨终板无钙化形成, 血管床无减少, 髓核细胞正常, 髓核的基质无压缩, 部分样本见少许纤维扭转, 未见纤维环断裂。椎体切除3/4组与正常标本组比较有明显差别, 椎间盘纤维环结构紊乱, 髓核细胞退行性变, 并出现钙化情况。说明当椎体切除1/2尚不足以引起椎间盘退行性变的发生, 当椎体切除3/4时已经可以引起椎间盘退行性变的发生。目前, 椎间盘髓核组织学改变的观察指标并没有统一的标准, 在此作者采用Norbert Boos评分, 本实验结果显示椎体切除1/2组与正常标本组在组织学、Norbert Boos评分方面差异无显著性意义, 而椎体切除3/4组与前两者比较在组织学、Norbert Boos评分方面则存在不同差异。椎间盘的营养途径主要有纤维环途径和椎体终板-软骨终板-椎间盘途径, 而后者对椎间盘营养供应更为重要。椎体切除达3/4时, 椎体终板会产生相应变化, 导致椎间盘营养供应的减少、蛋白多糖含量改变, 最终导致椎间盘退行性变。

结论: ①兔椎体切除小于1/2时, 相邻椎间盘营养状况不会有明显改变, 当如果前路减压需切除椎体不超过1/2时应考虑单节段植骨融合双节段固定。②兔椎体切除大于3/4时, 相邻椎间盘营养状况会有明显改变, 并导致椎间盘退行性变。如果前路减压需切除椎体超过3/4时应考虑切除相邻间盘行两节段植骨融合。

4 参考文献

[1] Atlas SW, Regenhagen V, Rogers LF, et al. The radiographic characterization of burst fractures of the spine. Am J Roentgenol. 1986;147(3):575-582.
 [2] Denis F. The three column spine and its significance in the classification of acute thoracolumbar spinal injuries. Spine. 1983;8:817-831.

[3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
 [4] Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, et al. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. Spine. 2002;27(23):2631-2644.
 [5] Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, et al. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated gene transfer of the human transforming growth factor encoding gene. Spine. 1999; 24(23):2419-2429.
 [6] Wiley A, Trueta J. The normal vascular supply of the vertebral column in the growing rabbit. J Bone Joint Surg Br. 1959;41-B: 796-809.
 [7] Hutton WC, Murakami H, Li J, et al. The effect of blocking a nutrition path way to the intervertebral disc in the dog model. Spinal Disord Tech. 2004;17(1):53,63-69.
 [8] Silva MJ, Wang C, Keaveny TM, et al. Direct and computed tomography thickness measurements of the human lumbar vertebral shell and endplate. Bone Joint Surg. 1994; 15(4): 409-414.
 [9] Ren XJ, Mei FR, Zhou JH. Zhongguo Linchuang Jipouxue Zazhi. 1999;17(2):172-174. 任先军, 梅芳瑞, 周军海. 颈椎终板的解剖及生物力学特征的研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 1999, 17(2):172-174.
 [10] Moore RJ, Osti OL, Vernon R, et al. Changes in Endplate Vasculature After an Outer Anulus Tear in the Sheep. Spine. 1992; 17(8):874-878.
 [11] Scott JE. Histochemistry of Alcian blue Metachromasia of Alcian blue, Astra blau and other cationic phthalocyanine dyes. Histochemie. 1970;21: 277-285.
 [12] Maitre CL, Hoyland JA. Studies of human intervertebral disc cell function in a constrained in vitro tissue culture system. Spine. 2004; 29(11):1187-1195.
 [13] Urban JP, McMullin JF. Swelling pressure of the lumbar intervertebral discs: influence of age, spinal level, composition and degeneration. Spine. 1988;13: 179-187.
 [14] Lyons G, Eisenstein SM, Sweet MB. Biochemical changes in intervertebral disc degeneration. Biochim Biophys Acta. 1981;673: 443-453.
 [15] Frobin W, Brinckmann P, Kramer M, et al. Height of lumbar discs measured from radiographs compared with degeneration and height classified from MR images. Eur Radiol. 2001;11:263-269.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 广州市医药卫生科技项目(2009-YB-165)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 胸腰椎爆裂性骨折 Denis B 型伤椎下位椎间盘的影像学和组织学初步研究表明其形态和功能的正常, 有保留价值, 但伤椎不同程度切除, 对相邻椎间盘退行性变的影响尚无相关研究。文章通过观察不同程度切除兔椎体植骨内固定后, 椎体软骨终板血管芽数量、椎间盘组织学改变、椎间盘髓核组织中蛋白多糖的变化, 评估兔椎体不同程度切除对相邻椎间盘退行性变的影响, 以期为临床伤椎下位椎间盘保留与否提供参考。

课题评估的“金标准”: 椎间盘髓核组织学改变的观察指标尚无统一标准, 实验中采用 Norbert Boos 评分参照以往与年龄相关椎间盘退行性变的研究。

设计或课题的偏倚与不足: 实验动物选择新西兰兔, 所得结果只能作为人类椎体切除参考, 如有条件选择灵长类, 则研究结果更具有临床参考价值。

提供临床借鉴的价值: 兔椎体切除小于 1/2 时, 相邻椎间盘营养状况不会有明显改变, 提示如果前路减压需切除椎体不超过 1/2 时应考虑单节段植骨融合双节段固定。椎体切除大于 3/4 时, 相邻椎间盘营养状况会有明显改变, 并导致椎间盘退行性变。如果前路减压需切除椎体超过 3/4 时应考虑切除相邻间盘行两节段植骨融合。