

特发性脊柱侧凸患者髓核结构特点及相关病因学☆○

陆明^{1,2}, V.Ya. Fischenko^{○2}, V.A. Vleschenko^{○2}, Y. V. Fischenko^{○2}

Structural characteristics of nucleus pulposus and related etiology in patients with idiopathic scoliosis

Lu Ming^{1,2}, V. Ya. Fischenko², V.A. Vleschenko², Y. V. Fischenko²

¹Department of Orthopaedics, the 306 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China;

²Department of Spine Surgery, Orthopaedic Trauma Institute, Ukraine Academy of Medical Sciences, Kiev 252054, Ukraine

Lu Ming☆, Doctor, Associate chief physician, Associate professor, Department of Orthopaedics, the 306 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China; Department of Spine Surgery, Orthopaedic Trauma Institute, Ukraine Academy of Medical Sciences, Kiev 252054, Ukraine
luming8788@yahoo.com.cn

Received: 2010-03-13
Accepted: 2010-06-10

¹解放军306医院骨科,北京市100101; ²乌克兰医学科学院创伤矫形研究院脊柱外科,乌克兰基辅252054

陆明☆,女,1969年生,吉林省长春市人,汉族,1997年乌克兰医学科学院创伤矫形研究院毕业,医学博士,副主任医师,副教授,主要从事脊柱外科及生物力学方面的研究。
luming8788@yahoo.com.cn

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225(2010)37-07008-04

收稿日期:2010-03-13
修回日期:2010-06-10
(20100219004/YJ·Z)

Abstract

BACKGROUND: Support-motion system (skeleton-muscular system) alters during idiopathic scoliosis advancement. Some symptoms present with idiopathic scoliosis, others exhibit secondary scoliosis.

OBJECTIVE: To explore the relationship between pathological change features and etiology of the nucleus scoliosis in patients with scoliosis.

METHODS: Totally 214 main and compensatory curve samples of nucleus pulposus were harvested from 22 cases with King II, III types scoliosis, aged 13-15 years, including 3 males and 19 females. After conventional treatment, samples were performed epoxy-polymerization in the isinglass tube. Gelatin blocks were prepared 1 750 copies of a continuous ultra-thin tissue sections. The change features and histochemical alteration of nucleus pulposus were observed under an electron microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: Under an electron microscope, few fibrous tissue bands could be seen at the junction of plate and nucleus of hyaline cartilage, especially obviously in patients with King III type of scoliosis. There were metachromasia non-substances acid mucopolysaccharide and elastin in the nucleus pulposus cells, but it could not be confirmed resulting from hyaluronic acid (testis hyaluronic acid and bacteria) damage. Electric-chemistry observation showed that, compensatory bend vertex in the cartilage cells presented with nucleus unity, and few lysosomal solution containing lysosomal acid phosphatase could be seen. Dissolved body in these cells were clearly, but lack of internal structures. They were identified as idiopathic structural scoliosis, which not involved in cell self-consuming of dissolution or dissolution of other types of organizations. The various types of cells increased by exogenous brought a large number of lysosomal enzymes, and led to cell autologous consumption, the internal structure of the dissolution, but this destruction process in compensatory bend in the nucleus pulposus has not been found in. Accordingly, in the pathological process of reconstructing nucleus pulposus, lysosomal enzyme participates with the form of self-consuming, the ultrastructure of nucleus pulposus was damaged under condition of enzymatic action, thus, result in malformation.

Lu M, V.Ya. Fischenko, V.A. Vleschenko, Y. V. Fischenko. Structural characteristics of nucleus pulposus and related etiology in patients with idiopathic scoliosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(37): 7008-7011. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景:在脊柱侧凸疾病发展过程中,支撑-运动系统(骨骼-肌肉系统)的各个组成部分都发生变化。有些症状具有原发病的特点,另外一些表现为由脊柱侧凸继发的合并症。

目的:探讨脊柱侧凸患者髓核组织结构病理变化特点与病因学的相互关系。

方法:选择年龄在13~15岁的King II, III型脊柱侧凸患者22例,男3例,女19例,共214个主弯和代偿弯髓核标本。经常规处理后,在明胶管中进行环氧聚合。再将获得的组织明胶块经超声切片机制成1750份连续超薄组织切片,电镜下髓核组织标本的变化特点和组织化学性能的改变。

结果与结论:电镜下,在透明软骨板和髓核交界处显示不大的纤维组织条带层。并且以King III型脊柱侧凸患者最为明显。在髓核细胞中存在异染色的非黏多糖酸类物质和弹力蛋白,但不能证实其为,透明质酸(细菌和睾丸透明质酸)破坏的结果。电镜组织化学法观察发现,代偿弯顶点髓核中的软骨细胞具有统一性;少见含有均匀磷酸酶的溶体。这些细胞中的溶体清晰,缺少内部结构,被确定为原生性,不参与细胞的自我消耗性溶解和其他类型的组织消化溶解。而各种类型的由外生性细胞增多带来的大量溶体酶,并导致细胞的自体消耗,内部结构的溶解,但这种破坏过程在代偿弯的髓核组织中没有被发现。因此,说明在髓核组织的病理重建过程中溶体酶是以造成自体消耗的形式加入的,在酶的作用下髓核组织超微结构功能的破坏,引起畸形的发展。

关键词:脊柱侧凸;髓核组织;自耗性溶体酶;组织学观察;骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.37.040

陆明, V.Ya. Fischenko, V.A. Vleschenko, Y. V. Fischenko. 特发性脊柱侧凸患者髓核结构特点及相关病因学[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(37):7008-7011. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

在脊柱侧凸疾病发展过程中,支撑-运动系统(骨骼-肌肉系统)的各个组成部分都发生变化。脊柱侧凸患者主弯顶点间盘的超微结构的

观察中有意义的变化特点是主弯顶点间盘的超微结构与新生儿的间盘结构类似。本文引入对King II, III型脊柱侧凸患者,对其顶椎水平的凹侧和凸侧髓核结构特点进行研究,目的是要明确在脊柱侧凸畸形发展过程中,是否存在的组织结构改变与病因之间的相互关系。

1 对象和方法

设计: 对比观察。

时间及地点: 实验于1994/2004在乌克兰医学科学院创伤矫形研究院脊柱外科完成。

对象: 选择年龄在13~15岁的King II, III型脊柱侧凸患者22例, 男3例, 女19例。214个主弯和代偿弯的间盘髓核标本, 制作成1 750份主弯和代偿弯顶点的超薄组织切片。研究获得患者知情同意。

方法:

腰椎间盘的取材: 腰椎(代偿弯)间盘组织标本的取材是在施行后路腰椎矫形, 金属椎间撑开内固定+植骨融合手术时, 经硬脊膜穿刺, 用细套管针取活体组织标本。在充分显露棘突和椎体后部骨性附件后, 用带有导管芯的细套管针通过棘突的底部经硬脊膜向间盘穿刺。套管针的倾斜角度由侧弯角和椎体轴向的旋转角度决定。在套管针到达纤维环边界时, 拔出导管芯。套管针继续前行经过纤维环和髓核(直到产生落空感)。做套管针旋转运动, 将间盘组织切割成小的柱状体。利用套管针后方连接的真空注射器吸出组织标本。将从套管针中抽取的组织放置于固定液中。并在显微镜下进行髓核、纤维环和闭合骺板组织分离。从每例患者获得三四份腰椎间盘标本。

胸椎间盘的取材: 考虑到单纯行胸椎侧后方间盘活体组织穿刺取材, 会受到畸形变的脊柱和肋骨的阻挡, 而经腹腔的间盘穿刺取材过程又有损伤脊髓的风险。在胸椎楔形截骨和椎体截骨或髓核挖出术中通过开放的路径取材^[1]。在横突、肋骨和包括肋骨头的肋椎关节切断后, 暴露椎体的侧面, 在肋横突关节面的中心准确定位椎间盘。每例患者取三四份胸椎间盘标本。

间盘组织的取材选用圆筒形骨凿。在骨凿进入椎间隙达1.0~1.5 cm时, 用手握住骨凿, 使其产生轴向的旋转-进入动作, 使被切割下来的圆柱形间盘组织完全进入圆形骨凿的中空部分, 而与活体分离, 取材成功。立即将所获得组织放置于固定液中。取材中包括纤维环、髓核和骺板组织。

电镜下观察用标本制作: 应用于电镜下观察的标本制备, 将术中取材的间盘组织块经常规处理后, 在明胶管中进行环氧化聚合。再将获得的组织明胶块经超声切片机切片, 制备成40~60 μm的切片。该切片采用带45°倾角的玻璃刀具。相对切割的速度为1.0~2.0 mm/s'。

切片的制备过程在直视下完成。切片表面喷淋蒸馏水, 置于直径3 mm的电子光栅。对超声刀切片的对比研究和电子显微镜下观察的照片拍摄采用《Tecna》胶片。

电镜下间盘结构的组织化学改变观察用标本制作: 沸騰水浴, 体积分数4%甲醛液中静置10 min。再在体积分数10%甲醛溶液中添加上述制剂制成孵化液, 如果孵化

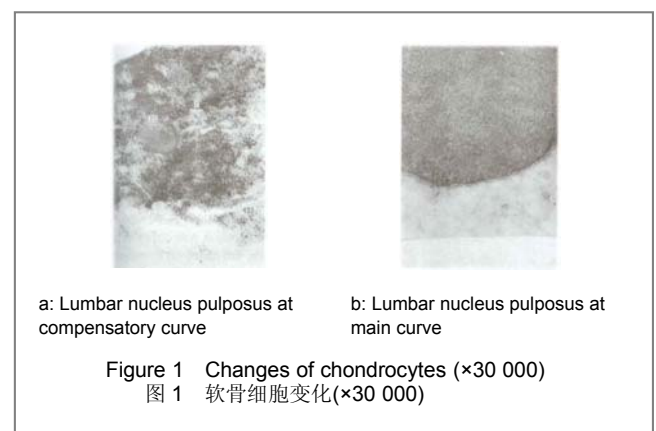
液中出现沉淀现象, 证实了存在溶体酶-酸性磷化物。经上述过程制备的标本及对照组标本制成超薄的切片, 以备电镜观察使用。

主要观察指标: 电镜下髓核组织标本的变化特点和组织化学性能的改变。

设计、实施、评估者: 设计者: 陆明, V.Ya.Fischenko; 实施者: 陆明, Y. V. Fischenko; 评估者: V.Ya.Fischenko, V.A. Vleschenko。

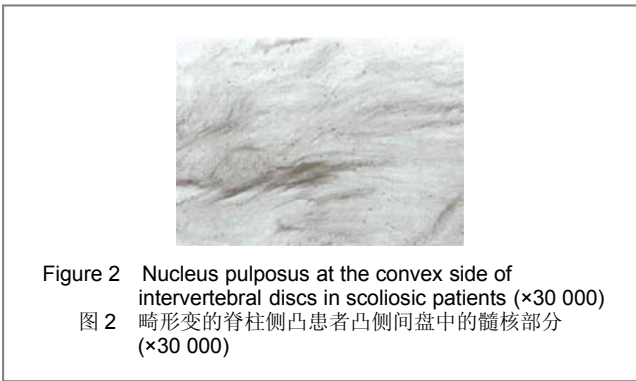
2 结果

2.1 软骨细胞变化 脊柱侧凸患者髓核纤维软骨板层的厚度明显变窄, 在与髓核交界的纤维组织移行区, 呈宽带分布。软骨板透明软骨层中的软骨细胞分布均匀, 很少会在1个软骨囊包中存在2个软骨细胞。细胞核致密, 软骨细胞的膜薄、窄, 含有少量的糖原, 这些特征都证实了软骨细胞活性功能较弱。在纤维软骨中, 软骨细胞体积明显增大, 细胞核中包含有染色质、糖原, 软骨细胞周围聚集着巨大的, 具有异染色特征的小颗粒和基质团块, 见图1a。在髓核中心, 无定形床基中电子密度较低, 弥散分布着微细的单染色体和缺少突起的胞浆的低分化圆形细胞, 见图1b。

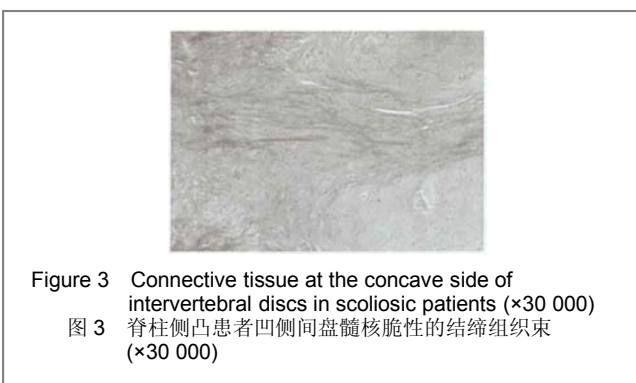


2.2 凸侧髓核组织变化 镜下见凸侧髓核组织拥有非常脆弱的细胶原纤维结构, 髓核组织的异染色性弱的特点, 但在细菌和透明质酸作用下髓核组织的异染色性减弱的程度不明显, 见图2。睾丸透明质酸孵化作用也没有完全去除其异染色性, 说明髓核组织中不仅存在透明质酸和4, 6, 硫酸软骨素, 还存在其他含有硫酸键的氨基葡萄糖类和糖原物质。

虽然髓核基质中的软骨细胞成分较少, 但与正常组织结构相比, 其数量仍较大。甲苯胺蓝染色呈弱阳性, 经过细菌酶和睾丸透明质酸作用, γ-异染性没有被减弱和破坏的软骨细胞的高亮染色等都证实了在这些细胞中存在能被苔红素染色的呈弹力纤维网状结构分布的弹力蛋白物质。



2.3 凹侧髓核组织变化 凹侧髓核中, 不十分成熟的纤维组织分布在与髓核交界的边缘处。独立、脆性的纤维束移行, 并穿过髓核组织, 见图3。

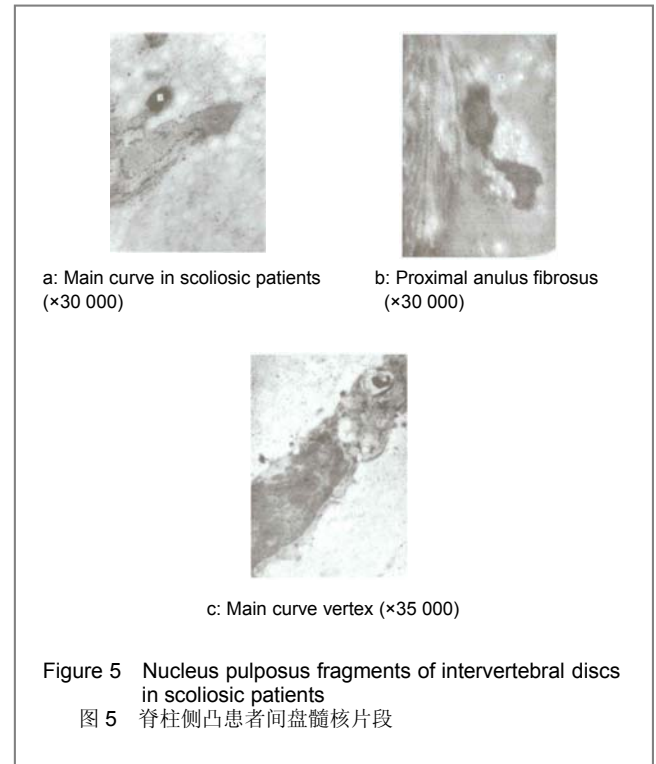


2.4 磷酸酶酸分布差异 观察发现, 主弯顶点髓核细胞中磷酸酶酸的差别分布是其存在的主要方式。溶体中包含的磷酸酶酸呈极不均匀的分布, 部分标本中的磷酸酶酸只分布在软骨细胞的边缘, 而另一组资料显示磷酸酶酸只有较低的含量, 见图4。在部分标本中甚至没有溶体的分布。髓核软骨细胞结构的变化, 证实其中存在着各种类型的由外生性细胞增多带来的大量溶体酶, 导致细胞的自体消耗, 内部结构的溶解, 而这种破坏过程在代偿弯的髓核组织中没有被发现。

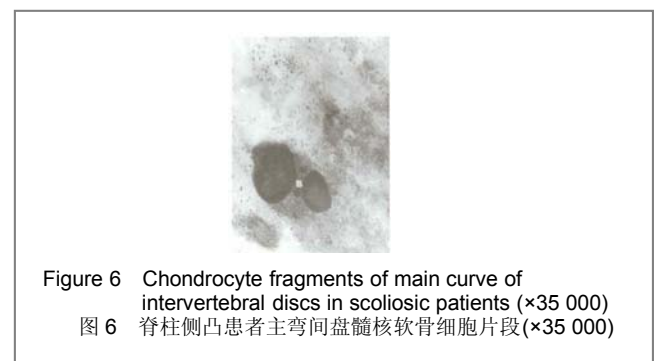


2.5 髓核细胞中的溶体 髓核细胞中包含不确定电子密度的各种类型的溶体。这些细胞器本身具有自体耗体的特性, 是参与组织溶解过程的溶体。髓核软骨细胞中的凋亡小体存在于细胞质的周边, 靠近软骨细胞的胞膜。主要表现为细胞周围的透明蛋白软骨床基中的电子

密度降低。另一部分凋亡小体中含有高浓度, 分布均匀的磷酸酶酸。是细胞中与生俱来的组织结构。部分含有高浓度磷酸酶酸的溶体位于软骨细胞胞浆突起的边缘出, 见图5。



2.6 代偿弯中的髓核软骨细胞与主弯中髓核软骨细胞间的差别 与之相类似的是代偿弯中的髓核软骨细胞与主弯中髓核软骨细胞间的差别, 其分布特点更具有边缘性, 见图6。如同新生儿的间盘组织一样, 主弯顶点间盘髓核结构特点是, 髓核中同种细胞中含有多种不定形物质和发育较弱的细胞器。



3 讨论

通过组织化学的方法观察, 在透明质酸酶的作用下, 胞浆的稳定异染色性证实了在其中存在着不类似于透明质酸和硫酸软骨素的成分。这种现象说明该物质与弹力蛋白具有同源性。另外一些髓核细胞经过鞣质透明

质酸酶的孵化作用后, 其异染性降低, 说明其胞浆存在着硫酸软骨素。通过对软骨细胞进行一系列的无色胞浆和致密细胞核观察, 没有观察到其异染性。髓核软骨细胞与终板软骨细胞间的差别在于期间分布的糖元为全核蛋白糖原。很多细胞中不含有糖元, 如透明软骨细胞和纤维层中软骨细胞。糖元充实着胞浆的大部分。也证实了髓核软骨细胞中存在着与正常间盘组织的软骨细胞相区别的新物质成分。

电镜下, 在透明软骨板和髓核交界处显示不大的纤维组织条带层。并且以king III型脊柱侧弯患者最为明显。患者的髓核组织在结构上与正常人不存在明显差别。但在髓核细胞中存在异染色物质。结果证实该物质非黏多糖酸类, 但也不能证实其为, 透明质酸(细菌和睾丸透明质酸)破坏的结果。这些细胞中含有能使锡克式反应阳性的物质, 经过淀粉酶作用后保留自己的染色特点。还含有通常状态下在软骨细胞和不能被区分出来的纤维软骨细胞中的弹力蛋白。这些细胞中的糖原较终板软骨细胞有明显增大。以上这些数据证实了终板软骨细胞和髓核软骨区发生的各个方向上的变化范围, 以及它们功能活性的大小。

髓核基质的甲苯胺蓝染色呈弱染色性, 并基质在髓核的边缘发生聚集现象。分别采用pH 5.0和pH 3.0的甲苯胺蓝进行髓核组织染色, 发现基质中心区的染色强度下降, 而在靠近纤维层方向上强度增加。这说明较致密的纤维束具有较强的异染性的特点。与细菌和透明质酸酶的孵化作用组对比, 其染色强度下降不明显, 而睾丸透明质酸的孵化作用能明显降低异染性的强度, 但异染性的特点仍有体现。证实睾丸透明质酸的孵化作用下, 基质中仍残留有具有异染色性的中性黏多糖类的物质。基质在淀粉酶的作用下, 使Pas-反应呈现阳性表现。因此, 作者认为, 基质中含有酸性和中性的黏多糖类物质, 至少量的透明质酸。在硫酸氨基葡萄糖类的代谢产物中, 硫酸软骨素占优势。经过睾丸透明质酸酶孵化作用的基质中残存的异染性物质主要为结缔组织, 如硫酸角质素和硫酸肝素。应用电组织化学法观察发现, 代偿弯顶点髓核中的软骨细胞具有统一性: 少见含有均匀磷酸酶酸的溶体。这些细胞中的溶体清晰, 缺少内部结构, 被定为原生性, 不参与细胞的自我消耗性溶解和其他类型的组织消化溶解。

由于与溶体相关的磷酸酶酸只存在于细胞器中, 其显像需要专门的标记方法^[2-3]。根据电组织化学反应强度的方法, 可以判断溶体中是否存在的一系列水解酶, 是否参与组织结构的溶解过程, 以及取决于髓核中分布的软骨细胞内溶体中磷酸酶酸的含量的增加可以间接性脊柱侧凸的严重程度。由此作者观察到在胞浆边缘含高浓度磷酸酶酸的溶体。其中被破坏的部分中磷酸酶酸的含量减少。在细胞溶体中的这些改变都证实了这个破坏

过程, 而软骨细胞边缘的基质处在溶解过程。

上述事实证实, 主弯间盘髓核的超微结构的改变证实了其与健康儿童之间存在的发育滞后的差别^[4-6]。(胚胎的)软骨细胞不成熟性反映了主弯顶点水平间盘的发育不良。还需进一步指出的是, 髓核组织的这一特性还不能完全适应儿童脊柱在该年龄段所应承受的来自垂直方向上的负荷。在对不同脊柱侧凸患者组, 不同年龄段的患儿的超微结构组织观察中, 表现出髓核组织的破坏随年龄的增长与脊柱侧凸的加重程度和病程的长短相适应的特点。并且胚胎期胎儿的间盘软骨细胞的数量范围代表着间盘发育不良的程度, 是导致恶性型脊柱侧凸的病理进程的加快, 程度加重的根本依据。

4 参考文献

- [1] Blount WP, Schmidt AC, Keever ED, et al. The Milwaukee brace in the operative treatment of scoliosis. J Bone Joint Surg Am. 1958; 40-A(3):511-525.
- [2] Roberts S, Eisenstein SM, Menage J, et al. Mechanoreceptors in intervertebral discs. Morphology, distribution, and neuropeptides. Spine (Phila Pa 1976). 1995;20(24):2645-2651.
- [3] Morin B, Poitras B, Duhaime M, et al. Congenital kyphosis by segmentation defect: etiologic and pathogenic studies. J Pediatr Orthop. 1985;5(3):309-314.
- [4] Wang S, Qiu Y, Zhu Z, et al. Histomorphological study of the spinal growth plates from the convex side and the concave side in adolescent idiopathic scoliosis. J Orthop Surg Res. 2007;2:19.
- [5] Stokes IA, Mente PL, Iatridis JC, et al. Growth plate chondrocyte enlargement modulated by mechanical loading. Stud Health Technol Inform. 2002;88:378-381.
- [6] V.Ya.Fischenko, Lu M, V.A.Vleschenko, et al. Linchuang Yixue Gongcheng. 2009;16(12):1-3.
V.Ya.Fischenko, 陆明, V.A.Vleschenko, 等. 通过建立实验动物模型实现对伴有复杂脊髓损伤的先天性脊柱侧凸疾病的实验医学研究[J]. 临床医学工程, 2009,16(12):1-3.

来自本文课题的更多信息——

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。

课题的意义: 揭示了在间盘组织的病理重建过程中溶体酶是以造成自体消耗的形式加入的, 接下来是启动畸形的发展机制——脊柱侧凸疾病病因——在酶的作用下间盘组织超微结构功能的破坏的过程。以及髓核组织的这一特性还不能完全适应儿童脊柱在该年龄段所应承受的来自垂直方向上的负荷。在对不同脊柱侧凸患者组, 不同年龄段的患儿的超微结构组织观察中, 表现出髓核组织的破坏随年龄的增长与脊柱侧凸的加重程度和病程的长短相适应的特点。并且胚胎期胎儿的间盘软骨细胞的数量范围代表着间盘发育不良的程度, 是导致恶性型脊柱侧凸的病理进程的加快, 程度加重的根本依据。具有重要的临床治疗指导意义。

课题评估的“金标准”: 细胞器结构观察的普遍方法是利用电镜观察, 可以通过较高的放大倍数查看细胞器细致的改变。

设计或课题的偏倚与不足: 本文仅观察了实验现象, 未观测间盘组织与患者不同阶段疾病的关系。

提供临床借鉴的价值: 通过对脊柱侧凸患者的间盘组织的病理重建过程以及畸形的发展机制和病程加重特点的认识, 为治疗学提供了重要的病理依据, 和理论指导。