

山羊颈椎间盘纤维环组织成骨潜能的体内观察

卢旭华¹, 赵定麟¹, 陈德玉¹, 王新伟¹, 曹新峰¹, 孙海燕²

(1 第二军医大学长征医院骨科 200003 上海市; 2 解放军第 89 医院骨科 261021 山东潍坊市)

【摘要】目的:观察山羊颈椎椎间融合器内填充松质骨、纤维环组织后在体内的组织学变化过程,以了解纤维环组织在骨融合过程中的成骨潜能。**方法:**实验山羊按常规颈椎前路减压、内固定术式施术,术中随机取 C2~C6 椎间隙中相邻的两个间隙,每个间隙各置入两枚钛合金颈椎空心螺纹式柱状内固定器(CHTF),分别填充单纯松质骨(A组);松质骨+纤维环(B组);纤维环(C组)及空白对照(D组)。术后应用 X 线片、颈椎 CT 扫描等影像学检查及组织切片观察植骨融合及局部组织反应情况。**结果:**X 线片及 CT 示内置 CHTF 与椎体的骨-金属界面周围有骨组织生长,CHTF 与椎体终板接触部位有成骨现象,骨桥形成。A 组切片观察示新生软骨、骨小梁存在,原植入骨坏死;B 组纤维组织有坏死,原骨小梁、纤维环周围新生骨存在,新生软骨堆积;C 组术后 6 周纤维组织内有纤维软骨存在,术后 12 周新生软骨存在;D 组术后 6 周组织学观察无阳性染色结果,术后 12 周有少量新生软骨。**结论:**颈椎间盘纤维环组织有成骨潜能,成骨形式可能是成纤维细胞的软骨化骨。

【关键词】 成纤维细胞;成骨潜能;椎间盘纤维环

中图分类号:R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2005)-06-0357-04

In vivo study on osteogenic potential of annulus fibrosus in goat cervical intervertebral disc/LU Xuhua, ZHAO Dinglin, CHEN Deyu, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15 (6):357~360

【Abstract】 Objective: To explore the osteogenic potential annulus fibrosus of cervical intervertebral disc in vivo in goat model. **Method:** Cervical hollow threaded fixator(CHTF) filled with different combinations of cancellous bone and annulus fibrosus was applied to the anterior cervical intervertebral of fusion procedure in experimental goats. X-ray films and CT scans were taken after operation to acquire the status of fusional segments. Histological study of CHTF slice were performed to find the differentiation of annulus fibrosus. **Result:** X-ray films and CT scans showed evidence of stability of the operated segment obtained by CHTF technique. The callus was found around the CHTF after 6 weeks since operation, especially in the contact surface between the endplate of the vertebrae body and metal. Histological study of CHTF filled with cancellous bone showed both new cartilage and bone trabecula formation after 6 weeks since operation. After 12 weeks, new trabecula was obvious and necrosis cancellous was found. Histological study of CHTF filled with cancellous bone and annulus fibrosus showed tissue necrosis and a little fibrous cartilage formation around the fibrous tissue after 6 weeks since operation. At the point of 12 weeks, new bone trabecula and cartilage were found substituting the old trabecula or fibrous. The CHTF filled only with annulus fibrosus were found both fibrous cartilage and new cartilage formation. The CHTF filled with nothing were only found a little fibrous cartilage formation after 12 weeks. **Conclusion:** The study confirms progressive osteogenic capacity of fibroblasts in annular fibrosus in vivo. Perhaps proliferation of chondrocytes could replace normal fibroblast.

【Key words】 Fibroblasts; Osteogenic potential; Annulus fibrosus

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Shanghai, 200003, China

椎间盘组织的骨化机制及脊柱韧带、纤维组织的骨化演变过程尚不清楚。创伤学说认为纤维环撕裂、髓核脱出同时覆盖其表面的静脉易遭受轻微创伤,局部出血,以后血肿机化演变为软骨,

软骨骨化。此外,由于外伤或椎间盘本身变性致软骨板的营养渗透减少、消失,逐渐发生纤维化或骨化。本实验拟通过观察山羊颈椎椎间融合器内填充松质骨、纤维环组织后融合过程中的组织学变化,以期了解成纤维细胞成骨潜在在骨融合过程中的作用机制。为研究脊柱椎间盘纤维组织在退变过程中的骨化提供组织学理论基础。

第一作者简介: 男(1971-),医学博士,主治医师,研究方向:脊柱外科

电话:(021)63610109-73838 E-mail:xuhua-lu@sohu.com

1 材料与方法

1.1 实验对象

健康山羊 8 只, 雄性 5 只, 雌性 3 只, 年龄 6~12 个月, 平均 10 个月; 体重 20~26kg, 平均 23kg。

1.2 主要仪器及材料

实验用钛合金颈椎空心螺纹式柱状内固定器, 由常州康辉医疗器械有限公司仿人用钛合金颈椎空心螺纹式柱状内固定器 (cervical hollow threaded fixator, CHTF) 并参照羊的颈椎大小而定制。置入 CHTF 配套工具: 环锯及锯芯、丝锥、CHTF 持钳等。常规手术器械、高频电刀、X 线摄片机、深低温冰箱、隔水式恒温培养箱 (GNP-9160 型, 上海精宏实验设备有限公司)、莱卡 1600 锯式切片机 (德国)、Olympus 万能显微镜、99.5% 丙酮、甲基丙烯酸甲酯、过氧化苯甲酰 (上海钰森生物技术有限公司提供)。

1.3 实验方法

术前摄山羊颈椎 X 线片, 测量椎体高度、矢状径、椎间高度等, 以选择合适规格的 CHTF 并排除病变。每只山羊按常规颈椎前路减压、内固定术式施术, 术中随机取 C2~C6 椎间隙中相邻的两个间隙, 每个间隙各置入两枚钛合金 CHTF, 共 4 枚。3 枚 CHTF 中的填充组织分别为: 单纯松质骨 (A 组); 松质骨+纤维环 (B 组); 纤维环 (C 组); 1 枚 CHTF 中不充填任何组织, 为空白对照 (D 组)。

氯胺酮肌肉注射麻醉后, 取颈前右侧胸锁乳突肌内侧斜形切口, 暴露颈椎椎体前面。首先确定一椎间隙位置, 于椎间隙中部将前纵韧带横形切开, 将钻芯扁平状头部与椎间隙偏外侧呈平行椎间隙与椎体矢状面约成 30° 斜形状插至深部 (13mm), 再将环锯套至锯芯外向深部钻入, 将环锯连同钻芯一并取出骨芯, 用弧形刮匙清理骨孔并刮除椎体后缘骨质以扩大减压。选用相应规格的丝锥对环形骨孔进行攻丝, 其深度控制在距后纵韧带 2~3mm 处。同法在椎间隙的另一侧钻孔、攻丝。将环锯取出的椎间盘纤维环和骨质清理、分类处理, 选用的 CHTF 直径为 10mm, 长 10mm, 将碎骨 (泥) 充填 CHTF 后旋入椎间隙一侧骨孔。椎间隙另一侧骨孔作为对照, 旋入未放任何充填物的 CHTF。根据术中情况选取此手术间隙相邻的上或下椎间隙, 同前所述在椎间隙两侧钻孔、攻丝。先将所取的纤维环填入 CHTF 后旋入椎间隙

一侧骨孔。再将所取纤维环与骨质以 1:1 体积比例混合填入 CHTF 后旋入椎间隙另一侧骨孔。术中活动山羊颈部以确保 CHTF 固定可靠。

1.4 X 线片及 CT 观察

术后 1 周内摄手术部位 X 线正侧位片, 术后 6、12 周分别拍摄山羊颈椎正侧位 X 线片、颈椎 CT 平扫观察置入物在位情况及融合情况。融合达到与否依据下列标准判定: 正侧位摄片示 CHTF 周围无透光带存在; CHTF 与骨界面上有新骨形成; CT 摄片可见 CHTF 中空区域模糊且逐渐有骨组织生长。

1.5 组织学观察

术后 6 周、12 周时分别处死 4 只山羊, 切取 CHTF 及周围骨质, 置于 99.5% 分析纯丙酮溶液内固定、脱水、脱脂。甲基丙烯酸甲酯+过氧化苯甲酰配制成包埋剂包埋不脱钙标本。置 37℃ 温箱内聚合 1 周。以锯式切片机切成 300μm 厚的切片, 以甲苯胺兰染色, 封片。观察植骨融合情况及局部组织反应情况。切片置于显微镜下观察。新成骨组织被染成兰色, 原骨组织为淡灰黄色, 观察骨融合情况及钛合金周围组织相容性。

2 结果

所有动物均成活, 无手术切口感染, 均于术后 12h 内逐渐站立活动。

2.1 影像学观察

X 线片示置入的 CHTF 在整个实验过程中均在位, 无松动、移位、脱落。6 周时所有 CHTF 与椎体相对固定部位周围有骨组织生长, CHTF 与椎体终板接触位置有成骨现象, 骨桥形成 (图 1)。CT 平扫示 CHTF 中空部位模糊 (图 2)。12 周时 4 只山羊 X 线片示终板部位及骨-金属界面上有较多高密度骨桥形成, CT 平扫示 CHTF 中空模糊部位有高密度影, 提示有骨组织形成。

2.2 组织学观察结果

所有动物在术后 6 周、12 周取材时示 CHTF 均牢固在位, 无松动、移位, 周围组织表面颜色正常。CHTF 与骨接触的端面上椎体表面膨大, 硬度为骨性。12 周时填塞不同组织的各 CHTF 表面均被骨痂覆盖, 内置骨质的 CHTF 融合情况最好。组织学观察见表 1 及图 3、4 (后插页 IV)。各 CHTF 内均有纤维组织及软骨、骨组织长入。

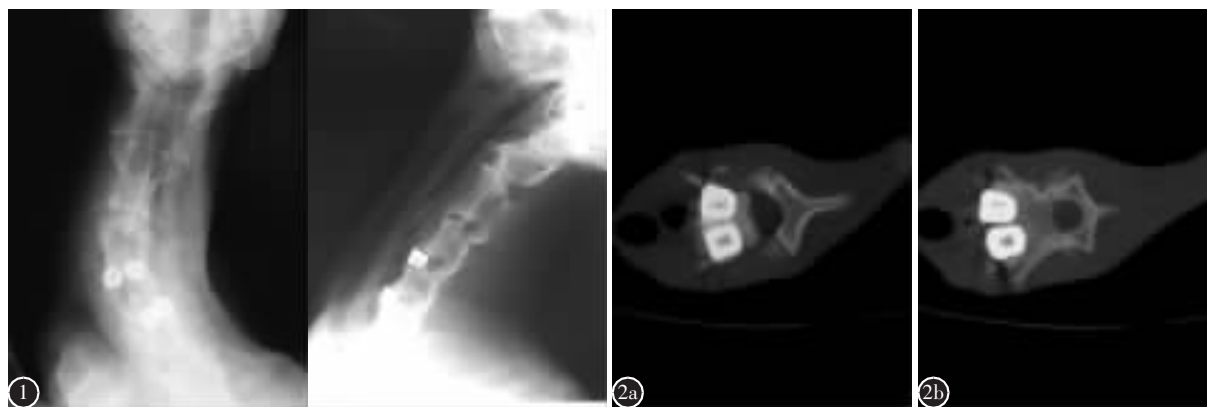


图 1 术后 6 周颈椎正侧位片示 CHTS 与椎体相对固定部位有成骨现象 图 2 实验山羊行颈椎前路椎间隙 CHTF 置入融合术后 6 周颈椎 CT 平扫示 CHTF 中空部位模糊[a 上方 CHTF (A 组); 下方 CHTF (D 组) b 上方 CHTF (B 组); 下方 CHTF (C 组)]

表 1 各组术后不同时间新骨生成情况

	观察时间	
	术后 6 周	术后 12 周
A 组	新生软骨、骨小梁存在	新骨生成明显、层状堆积, 原植入骨坏死
B 组	纤维组织内有纤维软骨、新生软骨存在	原骨小梁、纤维环周围新生软骨堆积, 新生骨存在
C 组	纤维组织有坏死、少量纤维软骨	新生软骨存在
D 组	无阳性染色结果	有少量新生软骨

3 讨论

3.1 成纤维细胞成骨的研究

Chalmers 等^[1]总结在软组织内诱导成骨必须具备三个条件:(1)有允许骨形成的环境;(2)有形成骨的前体细胞;(3)有局部诱导因子存在。本研究采用体内实验,融合环境适合骨细胞的形成,血液及周围骨质中含有可以诱导骨形成的多种细胞因子,如 BMP、转化生长因子 β (TGF β)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 等。Chai 等^[2]对骨折愈合机制的系列研究证实,在骨折愈合过程中,纤维骨痂中存在大量的具有成骨作用的成纤维细胞,可最终演变为骨细胞,并提出既有骨诱导因素又有成纤维细胞应答的成骨模式。但骨折愈合过程中具有成骨作用的成纤维细胞不知是来自于骨膜外层细胞,还是由骨髓基质细胞分化而来,抑或其它来源。本实验在颈椎前路环锯法减压、CHTF 置入内固定过程中仅对上下终板有部分破坏,保留部分终板,没有暴露至椎体骨质,刮取骨质来自椎体后缘。模拟临床手术过程,尽量避免椎体骨髓基质细胞对实验结果的影响。而保留终板的椎间融合

并不影响融合过程及结果已被证实^[3]。

3.2 CHTF 内不同充填物在椎间融合过程中的转归

在术后 6 周、12 周的影像学检查结果中,CHTF 位置均无改变,CHTF 前部均被骨痂所覆盖,组织切片也可见纤维骨痂覆盖在 CHTF 表面,这些情况说明 CHTF 钛合金材料的组织相容性好,不影响骨组织形成。实验结果表明:充填单纯松质骨的 CHTF 内的融合过程类似以往的植骨融合过程,为软骨化骨过程。在术后 6 周,由成纤维细胞、新生软骨、新生骨等组成骨痂组织,而原植骨组织大部分已坏死,形成保留骨小梁结构的空泡。在术后 12 周,新生骨已明显增多,并呈层状沉积,和原植骨组织相交织。

充填松质骨+纤维环的 CHTF 内的骨性融合结果不如单纯松质骨组,术后 6 周时不但有坏死的纤维组织出现,而且有纤维软骨、透明软骨分布在纤维环组织中。术后 12 周时这种软骨生长趋势已非常明显,并有新骨形成。其中的软骨细胞究竟是来源于纤维环中的软骨细胞,或由成纤维细胞所化生,还是来自骨髓基质细胞,有待进一步研究。

在临床实践中我们也发现行颈椎前路单间隙减压、融合器植骨固定术时,不另取自体髂骨,仅用刮除的椎体骨赘植骨,有时即便混杂有少量纤维环组织,其植骨效果经随访也未见有明显异常。

虽然单纯植入纤维环的 CHTF 内的融合结果较前两种更差,但术后 6 周时在纤维环组织内也有纤维软骨、透明软骨的出现和纤维组织的坏死,而且纤维组织呈趋化性排列,考虑有局部诱导因子的存在,成纤维细胞有间充质特性。有研究^[4]发

现软骨细胞可能会产生诱导骨生成的信号。软骨细胞以自分泌的方式表达可溶解的蛋白信号,选择性地促进骨生成。并且这种成骨效果不受外源性 BMP 的影响。考虑本实验中纤维环内存在的软骨细胞对成纤维细胞可能有诱导成骨作用。术后 12 周时,纤维环组织内有大量的新生软骨存在,无明显新骨形成。而且新生软骨的生成量较充填松质骨+纤维环的 CHTF 组多,原因可能是纤维环组织在缺乏充足骨诱导因子存在的情况下只能化生为软骨,而不能最终成骨。

未作任何充填的 CHTF 在术后 6 周时没有明显阳性发现,但在术后 12 周时发现少量新生软骨组织出现,考虑为骨愈合过程中周围纤维骨痂长入 CHTF 内所致。

3.3 椎间盘纤维组织在颈椎退变过程中的转归

Nagano 等^[5-7]提出随着椎间盘的退变,纤维环中的成纤维细胞增生、化生为软骨细胞,其增殖越过椎间盘边缘进而产生软骨内骨化形成骨赘。并认为 bFGF 能够促进软骨细胞增殖和稳定分化,并能促进细胞间基质的增殖和分化,bFGF 活性的增强加速了纤维环细胞的退变。在纤维环与软骨终板连接部位始终呈高表达的 bFGF,此处的软骨细胞可能存在某种潜能,在纤维环退变时能诱导纤维环中的成纤维细胞发生转化。

因此,本实验中单纯植入纤维环组织的 CHTF 组融合过程中的大量软骨生成现象可能是纤维环中软骨细胞的诱导作用,使成纤维细胞发生转化。成软骨细胞、成骨细胞等可以表达内源性 BMP^[8],而成纤维细胞的细胞膜上存在 BMP 的受体^[4],BMP 可通过细胞膜上的受体而促进成纤维

细胞的表型变化。我们有理由推断:骨折愈合或骨质融合过程中的 BMP 不仅作用于周围环境中未分化的间充质细胞,也可作用于已分化成熟的成纤维细胞,使成纤维细胞在成骨过程中发挥作用。

4 参考文献

1. Chalmers J, Gray DH, Rush J. Observation on the induction of bone in soft tissue[J]. J Bone Joint Surg (Br), 1975; 57(1): 36-39.
2. 汤雪明, 柴本甫. 实验性骨折愈合的超微结构研究——成纤维细胞与软骨细胞演变和归宿的电子显微镜观察[J]. 中华医学杂志, 1980; 60(7): 385-388.
3. 任先军, 焦文仓. 椎体终板的解剖与椎间植骨融合的相关性研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2002, 9(6): 590-592.
4. Hoshi K, Amizuka N, Sakou T, et al. Fibroblasts of spinal ligaments pathologically differentiate into chondrocytes induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2. Morphological examinations for ossification of spinal ligament[J]. Bone, 1997, 21(7): 155-162.
5. Nagano T, Yonenobu K, Miyamoto S, et al. Distribution of the basic fibroblast growth factor and its receptor gene expression in 20(18): 1972-1978.
6. Kato Y, Gospodarowicz D. Sulfated proteoglycan synthesis by confluent cultures of rabbit costal chondrocytes grown in the presence of fibroblast growth factor [J]. J Cell Biol 1985, 100(9): 477-485.
7. Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors[J]. Spine, 1991, 16(9): 253-260.
8. Ogawa Y, Schmidt DK, Nathan RM, et al. Bovine bone activin enhances bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation [J]. J Biol Chem, 1992, 267(3): 14233-14237.

(收稿日期: 2004-09-27 修回日期: 2005-03-15)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

消息

2005年骨折微创治疗与生物学固定技术学习班

由《中华创伤骨科杂志》编辑部和山东省医学会骨科学分会主办, 青岛市骨伤科医院承办的“2005年骨折微创治疗与生物学固定技术学习班”, 定于2005年8月19~22日在青岛举行。研讨会将邀请上海第九人民医院戴克戎院士, 北京积水潭医院荣国威教授、王满宜教授, 南方医科大学南方医院裴国献教授, 山东大学齐鲁医院陈允震教授, 山东省医院骨科周东升教授等创伤骨科专家就骨折的解剖、生物力学、影像学及CT/MRI诊断、分类、急救处理、内固定及外固定治疗、手术入路等进行专题演讲。

本项目为国家级继续教育项目, 记国家 I 类学分 10 分。欢迎报名参加! 会务费: 780 元/人, 食宿费: 100 元/天/人。报告地址: (1) 广州市南方医科大学南方医院《中华创伤骨科杂志》编辑部 510515 张宁编辑收; 电话: (020) 61641748; E-mail: zhangn_79@yahoo.com.cn。(2) 山东省青岛市骨伤科医院科教信息科 266021 丁梅老师收; 电话: (0532) 3615013。报到地点: 青岛市市南区彰化路 4 号邮电部疗养院。