

基础研究

山羊腰椎间盘损伤后蛋白基因产物 9.5
免疫组化染色阳性神经纤维的分布

任东风, 侯树勋, 吴文闻, 商卫林

(解放军总医院第一附属医院骨科 全军骨科研究所 100037 北京市)

【摘要】目的:观察山羊腰椎间盘损伤后不同时间点蛋白基因产物 9.5(protein gene product 9.5, PGP9.5)免疫组化染色阳性神经纤维在损伤椎间盘内的分布,探讨山羊椎间盘损伤后是否出现神经内生长。方法:15 只 6 月龄山羊,用直径 1.2mm 的穿刺针刀刺伤 L5/6 椎间盘前纤维环全层和 L6/7 椎间盘后部纤维环内层, L4/5 椎间盘作为对照椎间盘。在造模后 3 周、3 个月、6 个月各取 5 只动物处死,取目标椎间盘光镜下观察椎间盘后部纤维环的组织学改变,检测 PGP9.5 免疫阳性神经纤维的分布并用半定量方法进行评分。结果:在观察期间 L6/7 椎间盘后部损伤纤维环未愈合, L4/5 椎间盘在各个时间点均未出现裂隙, L5/6 椎间盘仅在 6 个月时有 1 个椎间盘出现多个裂隙。损伤后 3、6 个月,在 L6/7 椎间盘右后 1/4 区很容易检测到 PGP9.5 免疫阳性神经纤维,神经纤维沿穿刺道及周围组织向内生长。L4/5 和 L5/6 椎间盘相同区域未检测到相关免疫阳性反应神经纤维。在髓核中未发现 PGP9.5 免疫染色阳性神经纤维。结论:山羊椎间盘前方损伤后部纤维环内层后,纤维环内层很难愈合,并出现 PGP9.5 免疫阳性神经纤维分布,说明椎间盘后部纤维环内层损伤可发生神经内生长。

【关键词】椎间盘;纤维环刺伤;神经内生长;免疫组化

中图分类号:R681.5, Q189 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-07-0538-04

The expression of protein gene product 9.5 (PGP9.5) immunopositive nerve fibers in goat lumbar intervertebral disc after lesion/REN Dongfeng, HOU Shuxun, WU Wenwen, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(7):538~541

【Abstract】 Objective: To study the expression of protein gene product 9.5 (PGP9.5) immunopositive nerve fibers of goat intervertebral disc after lesion at different time interval and explore if the nerve further ingrowth into the goat lumbar intervertebral disc after lesion. Method: 15 goats, 5 for each group, were subjected to surgery, using puncture knife (1.2mm diameter), the inner side of posterior annulus fibrosus of L6/7 intervertebral discs were penetrated as the experimental intervertebral disc, the full-thickness of anterior annulus fibrosus of L5/6 intervertebral discs were penetrated as the positive control, L4/5 intervertebral discs as the intact control. The examination of histology from posterior annulus fibrosus of the target discs were taken at the 3 weeks, the 3 and 6 months after operation, the expression of PGP9.5 immunopositive nerve fiber was determined and scored with a semiquantitative method. Result: A total of 15 L6/7 posterior inner annulus fibrosus disruption were not healed during experimental session. The fissures of posterior annulus fibrosus were not observed at each time interval in the L4/5 intact control intervertebral disc and the L5/6 intervertebral discs with injured anterior annulus fibrosus. PGP9.5 immunopositive nerve fibers were easily observed in the right posterior outer 1/4 region of L6/7 discs, in addition, the ingrowth of nerve fibers into the disc along the puncture tract and periphery tissue was also observed, the immunopositive nerve fibers were absent in the same regions of L4/5 and L5/6 discs at 3 weeks to 6 months postoperatively. PGP9.5 immunopositive nerve fibers were not observed in the nucleus pulposus of any disc examined. Conclusion: The disrupted inner posterior annulus fibrosus stabbed through anterior lumbar discs of goat is hard to heal, the expression of PGP9.5 immunopositive nerve fiber can be observed in this region. This finding suggests that intervertebral disc injury in inner posterior annulus fibrosus can lead to nerve ingrowth.

【Key words】 Intervertebral disc; Puncted annulus fibrosus; Nerve fiber ingrowth; Immunohistochemistry

【Author's address】 Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing, 100037, China

第一作者简介:男(1972-),主治医师,医学博士,研究方向:腰痛的基础与临床

电话:(010)66867350 E-mail:stonedance1972@yahoo.com.cn

腰痛在临床上极为常见,椎间盘作为腰痛的重要致痛源,愈来愈受到广大学者关注^[1]。正常椎间盘仅在纤维环的外层有感觉神经纤维分布。有研究发现,神经纤维出现在慢性腰痛患者椎间盘髓核和纤维环内层,而无腰痛症状者的椎间盘内层中没有神经纤维分布^[2-4]。提示神经内生可能是椎间盘源性腰痛潜在的病理神经解剖基础。

椎间盘是人体最大的无血供组织,不充分的营养供应使其损伤后很难愈合。纤维环内层损伤后是否能引起神经内生还不是很明确。我们采用针刺损伤山羊腰椎间盘后部内层纤维环,观察纤维环损伤后椎间盘的组织学变化和蛋白基因产物 9.5(PGP9.5)免疫阳性神经纤维分布情况,探讨椎间盘纤维环内层损伤后是否发生神经内生。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

15 只 6 月龄山羊,雌雄不分,体重 15~25kg,平均 18.5kg。所有动物手术前全麻后摄取全腰椎 X 线片,排除腰椎先天畸形和病变。按腰椎运动单位分为 3 组:L4/5,纤维环没有损伤的阴性对照组;L5/6,针刺损伤全层前纤维环组;L6/7,损伤全层前纤维环与后纤维环内层组。

1.2 手术方法

肌注速眠新(0.3ml/kg)和氯胺酮(40mg/kg)麻醉山羊,剪去背中部和左肋部毛发,取右侧卧位,手术区消毒,从肋床下缘约 4cm 偏离椎旁肌 2cm 纵形切开皮肤直到骨盆环。小心分离皮下组织、腹膜外脂肪和椎旁肌,暴露 L3~L7 椎体前外侧,触摸椎间盘前方最凸点为椎间盘前正中点。仔细暴露出 L5/6 和 L6/7 椎间盘前方纤维环,用穿刺针刀经 L6/7 椎间盘前正中点平行于邻近上下终板小心刺入髓核,然后偏离正中线向右 30°穿过髓核刺入后纤维环内侧,穿刺深度 15mm。L5/6 椎间盘同上述过程小心刺入髓核,但不刺入后侧纤维环。L4/5 椎间盘暴露穿刺点但不穿刺损伤纤维环。完成操作后,用不吸收线逐层缝合深、浅筋膜和皮肤。在整个操作过程中注意不破坏椎体的骨膜组织和上下终板。分别于术前、手术结束时和术后前 3d 肌注青霉素 2.5 万 U/kg。术后置于牧场,在通风、接受自然光照条件下圈养。

1.3 检测方法

在术后 3 周和 3、6 个月分别随机取 5 只动物

通过静脉注射过量戊巴比妥钠(1.2g/kg)处死。截取完整腰椎标本(L1~S1)。用窄的钢锯截下 L4~5、L5~6、L6~7 三个脊柱运动节段,包括相应头、尾半个椎体,椎间盘和连接韧带,用钢锯在正中矢状位切开标本,福尔马林溶液中固定 1 周,EDTA 脱钙 8 周后,轴向切取左侧椎间盘组织块,石蜡包埋,间隔 250 μ m 轴状位切取 5 μ m 厚度切片,HE 染色光学显微镜下观察髓核、纤维环的改变;PGP9.5 免疫组化染色观察神经纤维分布情况。兔抗 PGP9.5 多克隆抗体(1:100,Ultracclone)和 UltraSensitive™ S-P Kit 试剂盒(购自福建 Maixin 公司)。按 S-P 方法进行 PGP9.5 抗原染色,阳性产物呈棕黄色颗粒状。应用 MIAS300 图像分析仪,参考 Madsen 描述的半定量方法^[5],根据切片的阳性产物在实验椎间盘右后 1/4 区的分布情况进行评分:0 分,椎间盘中没有免疫阳性细胞和免疫阳性反应;1 分,在椎间盘观察区可见 1~2 个阳性细胞;2 分,在椎间盘外部的 2 个或 2 个以上视野可见 2 个以上阳性细胞;3 分,在椎间盘 2 个以上视野内可见 2 个甚至更多阳性细胞,并延伸到椎间盘中央区。

1.4 统计学处理

记录各组数据,进行组间方差分析,在 SPSS 11.0 软件上进行, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学观察

各时间点 L4/5(未损伤椎间盘纤维环)均保持完整结构。L5/6(前纤维环损伤椎间盘)在 6 个月时有 1 个椎间盘髓核内出现多个裂隙,纤维软骨排列不整齐,其内软骨样细胞增多,出现空泡样细胞,后部纤维环出现裂隙,有少量的肉芽组织出现,细胞密度增高,其余 14 个在髓核和后部纤维环均未出现裂隙。L6/7(后部内纤维环损伤椎间盘)在 3 周时,穿刺道处髓核纤维软骨排列杂乱,后外侧纤维环内层破裂处出现髓核组织,纤维软骨排列杂乱,其内软骨样细胞增多;靠近后纤维环损伤处外侧边缘周围组织增生,胶原纤维肿胀,并有崩解(图 1a,后插页 II);在 3 及 6 个月时,纤维环内部损伤处有软骨样细胞增生,在损伤处外部纤维环出现大量杂乱的毛细血管肉芽组织,并向中央生长,细胞密度较正常纤维环增高(图 1b,后插页 II)。

2.2 免疫组化检测

损伤后 3、6 个月, 在 L6/7 椎间盘的右后 1/4 区检测到 PGP9.5 免疫阳性神经纤维分布, 神经沿穿刺道及周围纤维环板层生长(图 2a、2b, 后插页 II)。L4/5 椎间盘相同区域未检测到相关免疫阳性反应神经纤维。L5/6 椎间盘在损伤后 3 周至 6

个月, 神经出现很少(图 2c, 后插页 II)。免疫染色得分见表 1。L6/7 的 PGP9.5 免疫阳性反应得分在 3 周时都为 0; 在 3 个月时平均为 2.0; 在 6 个月时为 2.6。L6/7 椎间盘损伤后, 时间影响神经的分布($P<0.05$)。在所有椎间盘髓核中没有发现 PGP9.5 免疫阳性染色神经纤维。

表 1 不同实验椎间盘内纤维环 PGP9.5 免疫组化染色得分

实验动物 编号	3周			3个月			6个月		
	L4/5	L5/6	L6/7	L4/5	L5/6	L6/7	L4/5	L5/6	L6/7
1	0	0	0	0	0	1	0	1	2
2	0	0	0	0	0	1	0	0	2
3	0	0	0	0	0	3	0	0	3
4	0	0	0	0	1	2	0	2	3
5	0	0	0	0	0	3	0	0	3
均值	0	0	0	0	0.2	2.0 ^①	0	0.6 ^②	2.6 ^③

注: ①与同时时间点 L5/6 比较 $P<0.05$; ②与 3 个月时 L5/6 比较 $P>0.05$; ③与 3 个月时 L6/7 比较 $P>0.05$

3 讨论

椎间盘内结构和生化的改变被认为在腰痛症状的产生中起重要作用。放射状撕裂见于椎间盘的早期退变, 撕裂可从髓核延伸到纤维环外部, 引起腰痛。纤维环损伤后将经历一个怎样的病理过程, 其与腰痛的发生有何关系, 还不是十分清楚。研究发现^[6,7], 人为造成纤维环边缘小的损伤(4~5mm)后, 椎间盘退变加速, 纤维环最终完全破裂到椎间盘中央髓核。同时, 外部损伤处很快由血管和肉芽组织愈合, 纤维环内部、髓核由于无血管, 很难发生愈合。椎间盘损伤后, 退变加速, 并释放一些因子, 如纤维生长因子-2(FGF-2)和转化生长因子-T(TGF-T), 均影响血管神经的内生长^[8,9]。本实验 L6/7 后部内层纤维环损伤后, 穿刺道周围出现大量的肉芽组织, 并沿穿刺道及周围向内生长, 3、6 个月时在纤维环处有软骨样细胞增生, 出现大量杂乱的毛细血管肉芽组织, 细胞密度较正常纤维环增高, 可能是损伤后试图修复的表现。与以往实验结果相似^[6]。

研究发现^[7], 纤维环损伤可引起椎间盘的退变, 退变椎间盘可释放大量的炎性介质, 当这些炎症介质通过破裂的椎间盘裂隙漏出, 刺激纤维环外部的神经末梢, 引起腰痛。纤维环破裂后引起硬膜的炎症也可能参与腰痛的发生。

神经内生长可能是椎间盘源性腰痛潜在的致病机制。椎间盘内的压力降低和蛋白多糖内容物减少, 可促使神经血管内生长^[10-12]。另外, 损伤后

的炎症反应也可通过刺激神经生长因子(NGF)的产生, 促进神经内生长^[10,11]。PGP9.5 是一种神经元特异蛋白。标准的免疫组化技术显示 PGP9.5 染色阳性反应表达在中枢神经和外周神经系统的神经元和神经纤维上^[12]。我们以前的研究已发现损伤可引起椎间盘发生进行性退变^[13]。本实验中我们用 PGP9.5 抗体免疫组化染色观察神经在损伤椎间盘内生长情况, 发现后部内纤维环损伤椎间盘在 3、6 个月时很容易观察到阳性染色纤维, 神经沿着穿刺道及周围生长; 而未损伤椎间盘中未发现神经表达, 前纤维环损伤椎间盘中则少见表达。说明椎间盘损伤后可能诱导了神经内生长。由于观察的时间较短, 我们观察的神经内生长只限于纤维环, 是否会入髓核, 需进一步观察。另外, 本实验只是初步观察了神经纤维在损伤椎间盘中的分布。至于损伤为何和如何引起神经内生长, 将是今后一个研究重点。

4 参考文献

- Schwarzer AC, Derby R, Bodguk N, et al. The prevalence and clinical features of internal disc disruption in patients with chronic low back pain[J]. Spine, 1995, 20(16): 1878-1883.
- Leslie TA, Emson PC, Dowd PM, et al. Nerve growth factor contributes to the up-regulation of growth-associated protein 43 and preprotachykinin a messenger RNAs in primary sensory neurons following peripheral inflammation [J]. Neuroscience, 1995, 67(35): 753-761.
- Freemont AJ, Watkins A, Maitre CL, et al. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc[J].

- J Pathol, 2002, 197(11):286-292.
4. Peng B, Wu W, Hou S, et al. The pathogenesis of discogenic low back pain[J]. J Bone Joint Surg(Br), 2005, 87-B(1):62-67
 5. Madsen JE, Wang JS, Hukkanen M, et al. Sensory nerve ingrowth during bone graft incorporation in the rat [J]. Acta Orthop Scand, 1996, 67(6):217-220.
 6. Osti OL, Vernon-Roberts B, Fraser RD. Annulus tears and intervertebral disc degeneration: an experimental study using an animal model[J]. Spine, 1990, 15(6):762-767.
 7. Kääpä E, Grönblad M, Hols S, et al. Neural elements in the normal and experimentally injured porcine intervertebral disk [J]. Eur Spine J, 1994, 3(2):137-142.
 8. Melrose J, Smith S, Little CB, et al. Repair of annular disc lesions: spatial and temporal localisation of TGF- β , SPARC (osteonectin/BM-40) and FGF-2 are early responses in experimentally injured ovine discs [J]. Trans Orthop Res Soc, 2001, 26(12):896-898.
 9. Qian X, Davis AA, Goderie SK, et al. FGF-2 concentration regulates the generation of neurones and glia from multipotent cortical stem cells[J]. Neuron, 1997, 18(5):81-93.
 10. Aoki Y, Ohtori S, Ino H, et al. Disc inflammation potentially promotes axonal regeneration of dorsal root ganglion neurons innervating lumbar intervertebral disc in rats[J]. Spine, 2004, 29(23):2621-2626.
 11. Aoki Y, Akeda K, An H, et al. Nerve fiber ingrowth into scar tissue formed following nucleus pulposus extrusion in the rabbit annular-puncture disc degeneration model: effects of depth of puncture[J]. Spine, 2006, 31(21):E774-E780.
 12. Johnson WEB, Evans H, Menage J, et al. Immunohistochemical detection of Schwann cells within innervated and vascularized human intervertebral discs [J]. Spine, 2001, 26(23):2550-2557.
 13. 任东风, 侯树勋, 彭宝淦, 等. 山羊腰椎间盘损伤后 MRI 及组织学改变[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(12):142-147.

(收稿日期:2008-03-03 修回日期:2008-05-08)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 朱琳)

(上接第 511 页)

T3、T6 两侧椎板、棘突内外板及 T2~T6 横突制成粗糙渗血的骨面, 取髂后上嵴松质骨制成骨块和细小骨粒分别植于 T4/5 间隙和骨面, 取 6×3.5cm 自体髂骨皮质骨板固定在 T3~T6 棘突间保护胸髓后方。伤口安放引流管一根, 逐层严密缝合切口。术中按 NASCIS II 方案应用大剂量甲基强的松龙预防脊髓损伤。术中出血 2800ml。术后严格卧床, 轴向翻身, 抗生素预防感染。术后 12d 复查 X 线片示内固定位置良好, 矢状面椎体序列完全恢复, 冠状面移位纠正稍差, 有旋转(图 5、6)。术后 2 个月时随访, 患者双下肢肌力、感觉正常, 脊髓神经功能 Frankel 分级为 E 级。

讨论 T4~T6 为胸椎椎管最狭窄段, 胸髓的血供相对比较薄弱, 所以中上胸椎骨折脱位常导致脊髓完全性损伤。本例 T4 骨折伴完全脱位胸髓却幸免损伤, 实属罕见。考虑可能是 T5 椎板断裂, 其后部结构漂浮后移避免了胸髓受压。

由于脊柱三柱损伤, 脊柱严重不稳, 有手术指征。因



图 5 术后胸椎正位 X 线片示冠状面移位纠正稍差, 有轻度旋转

图 6 术后胸椎侧位 X 线片示矢状面椎体序列完全恢复

中上胸椎的相对稳定性, 加之没有脊髓损伤, 对该患者手术的目的是去除压迫、保护脊髓, 恢复脊柱稳定性。经后路直视下通过侧后方可以对前方进行操作, 手术简单、安全、有效^[1]。为防止复位造成脊髓损伤, 术前计划行后路减压后原位固定融合。但术中发现将胸髓悬空保护后, 可经左、右后外侧用剥离器撬拔 T4 椎体使之复位, 但是脊柱侧方的移位因为怕出现脊髓损伤没有再进一步复位。后路椎弓根固定技术能贯穿固定脊柱三柱的大部分, 固定牢固, 对椎体复位固定效果比较好。另外脊髓受压主要来自后方以及后路手术出血较少, 创伤较小, 也是手术选择后路的原因。

患者术前脊髓神经功能 Frankel 分级为 E 级, 术中难点在如何保护脊髓的功能。术前让患者保持镇静, 避免翻身, 所有的移动都使用铲式担架。术中, 将胸髓周围在复位时可能造成压迫的组织清除, 将胸髓悬空, 最后才复位。在每一步操作时, 都确保胸髓免受牵拉和压迫。另外, 在切开皮肤之时, 采用 NASCIS II 治疗方案给予大剂量甲基强的松龙, 预防由于手术造成的脊髓损伤^[2]。手术最后用皮质骨板固定在 T3~T6 棘突间保护胸髓, 避免恢复过程中后方瘢痕组织的粘连压迫。治疗该病例成功保护了脊髓功能, 恢复了脊柱序列和稳定性, 但远期效果有待进一步随访。

参考文献

1. 李鸿, 王伟, 潘良春, 等. 上胸椎骨折脱位的后路手术方法探讨[J]. 创伤外科杂志, 2007, 9(2):115-117.
2. 黄异飞, 吴彦生, 艾克拜尔, 等. 大剂量甲基强的松龙在伴有严重脊髓受压的脊髓型颈椎病围手术期的应用[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2007, 17(6):443-445.
3. 王永惕, 陈增海. 腰椎管扩大成形术——椎板截骨再植与棘突植骨的临床应用[J]. 中华骨科杂志, 1995, 15(10):644-647.

(收稿日期:2007-09-24 修回日期:2007-10-24)

(本文编辑 卢庆霞)