

基础研究

中央型腰椎管狭窄症患者黄韧带
组织生化成分变化的研究赵良军¹, 汤晓正¹, 彭芬芬², 吴鸿亮², 熊 龙¹, 刘亚云¹, 李东升¹

(1 江西省人民医院骨科 330006 南昌市; 2 南昌大学医学院 330006 南昌市)

【摘要】目的:通过测定中央型腰椎管狭窄症患者腰椎黄韧带胶原蛋白和蛋白多糖含量变化,观察组织显微结构改变,探讨黄韧带组织生化成分改变与中央型腰椎管狭窄症发病的相关性 **方法:**收集中央型腰椎管狭窄症患者的腰椎黄韧带 65 块作为退变组,正常腰椎黄韧带 27 块作为对照组,采用微量羟脯氨酸测定法和硫酸-呋啉法分别测定两组黄韧带中羟脯氨酸及糖醛酸吸光度,并计算胶原蛋白和蛋白多糖含量;游标卡尺测量黄韧带厚度;并行 HE 染色和 Masson 染色,显微镜下观察各组组织结构改变。**结果:**退变组黄韧带厚度、胶原蛋白及蛋白多糖含量均高于对照组,差异有显著性($P<0.05$);病理学观察退变黄韧带弹性纤维排列紊乱,数量减少,胶原纤维增生。**结论:**退变腰椎黄韧带中胶原蛋白和蛋白多糖含量增加,黄韧带生化成分改变可能引起黄韧带厚度增加,参与中央型腰椎管狭窄症的发生。

【关键词】黄韧带;腰椎管狭窄症;胶原;蛋白多糖;病理

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2010.11.05

中图分类号:R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-11-0898-04

Diversification of biochemical compositions on the lumbar ligamentum flavum due to central lumbar spinal stenosis/ZHAO Liangjun, TANG Xiaozheng, PENG Fenfen, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(11):898-901

【Abstract】 Objective:To investigate the contents of collagen protein and proteoglycan in ligamentum flavum of lumbar spine as well as the relationship between content diversification in ligamentum flavum and the rate of central lumbar spinal stenosis. **Method:**65 pieces of ligamentum flavum specimen harvested from patients with central lumbar spinal stenosis were used as degenerative group. Meanwhile 27 specimens from healthy lumbar spine were used as control group. The contents of collagen and proteoglycan in ligamentum flavum were determined by absorbance of hydroxyproline assay, and the uronic acid was determined by micro-hydroxyproline assay and sulfuric acid-carbazole. The thickness of ligamentum flavum was measured by sliding caliper. Pathological changes were observed following HE and Masson staining. **Result:**The thickness of ligamentum flavum and the contents of collagen protein and proteoglycan in ligamentum flavum of degenerative group were higher than those of control group, which showed significant difference ($P<0.05$). Pathology results showed the elastic fibers in ligamentum flavum disorganizing and scant while collagen fibers proliferating in degenerative group. **Conclusion:**The raising of collagen and proteoglycan as well as changing of its contents in ligamentum flavum may lead to the increase of ligamentum flavum's thickness, which contribute to central lumbar spinal stenosis.

【Key words】 Ligamentum flavum; Lumbar spinal stenosis; Collagen; Proteoglycan; Pathology

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, 330006, China

黄韧带肥厚是引起退变性中央型腰椎管狭窄

症的常见原因之一^[1],国内对腰椎黄韧带中生化成分含量变化的研究较少。笔者拟通过测定腰椎黄韧带中胶原蛋白和蛋白多糖含量变化,观察组织显微结构改变,探讨黄韧带厚度变化与中央型腰椎管狭窄症发病的关系。

第一作者简介:男(1985-),医学硕士,住院医师,研究方向:脊柱外科

电话:(0791)68966216 E-mail:zhaoliangjun163@163.com

通讯作者:汤晓正 E-mail:nanchang2006@yahoo.cn

1 材料和方法

1.1 一般资料

2009 年 7 月~2010 年 6 月,收集临床手术中行椎板减压切除的腰椎黄韧带。选取中央型腰椎管狭窄症患者 30 例作为退变组,其中男 12 例,女 18 例;年龄 40~69 岁,平均 56.2 岁,获得 L3/4、L4/5、L5/S1 黄韧带分别为 20、25、20 块,总计 65 块。中央型腰椎管狭窄症患者根据临床症状、体征、X 线及 CT 确诊:患者有间歇性跛行,腰后伸试验阳性,休息时无腰腿痛,无坐骨神经痛症状,直腿抬高试验阴性。腰椎骨折患者 12 例(伤前无腰腿痛病史)作为对照组,其中男 7 例,女 5 例,年龄 24~35 岁,平均 28.5 岁,获 L3/4、L4/5、L5/S1 的黄韧带分别为 9、9、8 块,总计 26 块。取材方法:手术用磨钻、环锯、骨刀及咬骨钳沿两侧腰椎关节突关节及椎弓根边缘,上至需椎板减压的腰椎上关节突关节连线,下至下一腰椎上关节突连线椎板上缘,经掀盖法或开窗法行全椎板或半椎板切除减压,取下黄韧带后备用。

1.2 方法

1.2.1 黄韧带厚度测定 取材后选取椎板间黄韧带(棘突至关节突关节连线中点),修整后即游标卡尺测量其上、中、下三处黄韧带厚度,取平均值,然后置于-80℃的冰箱保存备用。

1.2.2 羟脯氨酸和胶原蛋白含量测定 标本脱脂、干燥,取 10mg 样本置 EP 管中研磨,加入 0.3ml 蒸馏水及 6mol/L 盐酸 0.3ml 离心均匀。置入 120℃ 高压锅中水解 2h,加水稀释至 1.5ml,12000r/min 离心 15min。取待测液 50μl,加入 0.05mol/L 硫酸铜溶液 25μl 及 10%氢氧化钠溶液 25μl;加入 6%双氧水溶液 25μl,60℃水浴 10min,期间振荡。加入 6mol/L 盐酸 50μl 及 5%对二甲氨基苯甲醛溶液 50μl,50℃水浴 15min,冰上冷却后酶标仪测定在 560nm 的吸光度值。按 Grant 的方法,计算胶原蛋白百分含量^[2]:胶原%=羟脯氨酸%×7.46。

1.2.3 蛋白多糖含量测定 标本脱脂、脱水,取 10mg 样本置 5ml 试管中制成匀浆,加入木瓜蛋白酶溶液 0.25ml,60℃水浴消化 7h。冷却后加入 20%三氯乙酸 0.25ml,室温放置 2h 后 3500r/min 离心 5min。取上清液 50μl,用蒸馏水稀释至 5ml,取其中 0.25ml 配成待测液,加入浓硫酸 1.5ml。振荡混合,100℃水浴 5min。冷却至室温后,加入 25μl 咔唑溶液,在 520nm 处测定吸光值。计算糖醛酸含量^[3]:糖醛酸含量 (mg/100mg)=浓度×5 [(1/0.05)×(100/20)]×1000。

1.2.4 组织学观察 取腰椎黄韧带标本用甲醛固定行 HE 染色和 Bouin 氏液固定行 Masson 染色,镜下观察各组组织学变化(胶原纤维呈蓝色,弹性纤维呈红色)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件包,对数据进行 *t* 检验分析,所有数据以均数±标准差表示,设 *P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 腰椎黄韧带肉眼大体观察

正常腰椎黄韧带无明显肥厚、钙化或骨化;退变组黄韧带厚度增加,椎板结合处可有少量骨化。

2.2 腰椎黄韧带厚度、胶原蛋白及蛋白多糖含量变化

退变组腰椎黄韧带厚度、羟脯氨酸、胶原蛋白及蛋白多糖含量较对照组增加,差异有显著性 (*P*<0.05,表 1)。

2.3 腰椎黄韧带病理学 HE 染色及 Masson 三色染色

正常黄韧带弹性纤维沿其长轴纵行排列,直径大致相等,排列紧密,细长且呈束状,分枝相互联结成网,胶原纤维量少;退变组黄韧带正常组织结构消失,弹性纤维排列紊乱、数量减少,胶原纤维增生(图 1~4)。

表 1 对照组及退变组腰椎(L3/4、L4/5、L5/S1)黄韧带厚度、羟脯氨酸、胶原蛋白及蛋白多糖含量变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	黄韧带厚度(mm)	羟脯氨酸(mg/g)	胶原蛋(mg/g)	蛋白多糖(mg/g)
对照组	26	2.916±0.188	53.890±2.312	405.747±29.554	27.681±3.134
退变组 L3/4	20	4.969±0.085 ^①	69.517±2.241 ^①	518.598±16.723 ^①	76.481±3.605 ^①
退变组 L4/5	25	5.154±0.193 ^①	72.729±1.844 ^①	542.605±13.793 ^①	97.843±6.487 ^①
退变组 L5/S1	20	4.575±0.152 ^①	67.493±4.228 ^①	498.501±24.692 ^①	81.331±5.251 ^①

注:①与对照组比较 *P*<0.05

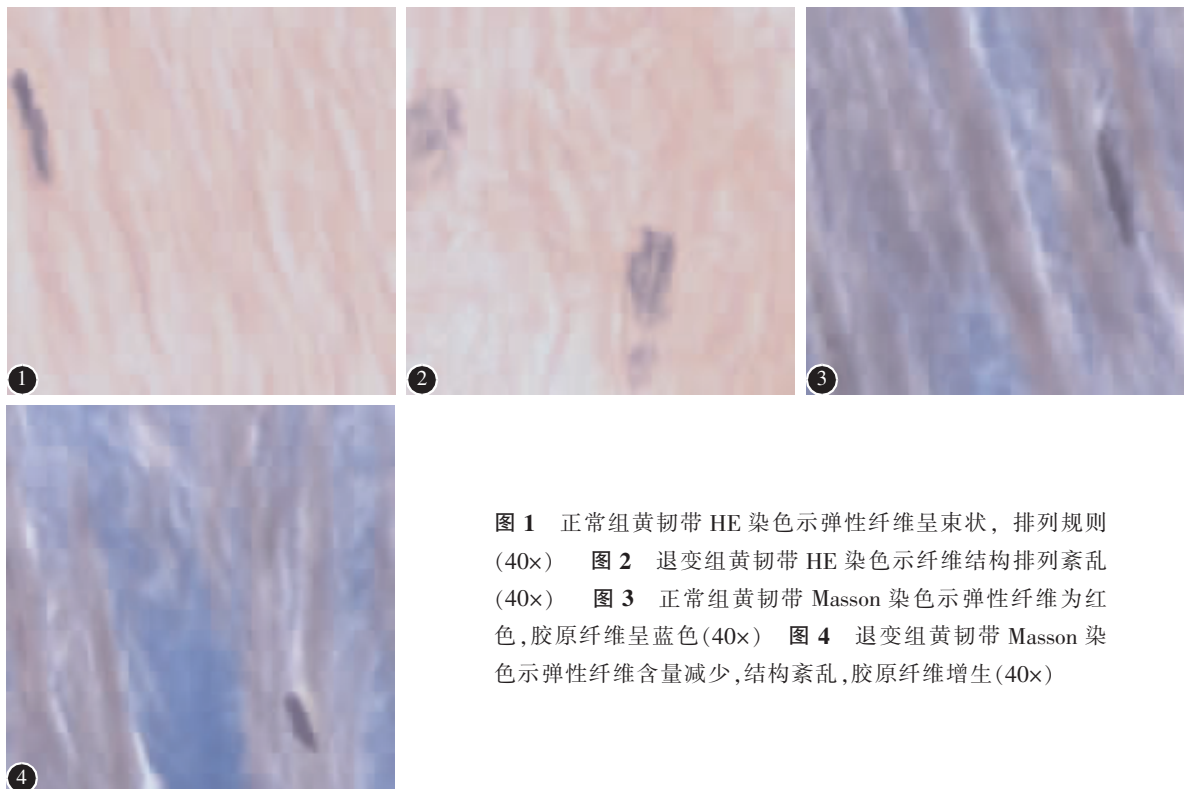


图 1 正常组黄韧带 HE 染色示弹性纤维呈束状, 排列规则 (40 $\times$) 图 2 退变组黄韧带 HE 染色示纤维结构排列紊乱 (40 $\times$) 图 3 正常组黄韧带 Masson 染色示弹性纤维为红色, 胶原纤维呈蓝色 (40 $\times$) 图 4 退变组黄韧带 Masson 染色示弹性纤维含量减少, 结构紊乱, 胶原纤维增生 (40 $\times$)

3 讨论

3.1 腰椎黄韧带组织显微结构变化

黄韧带是脊柱后部重要的连接结构, 其基质主要由水、胶原蛋白和蛋白多糖构成。胶原可分为弹性纤维、胶原纤维和网状纤维, 弹性纤维使韧带在载荷下具有延伸性, 胶原纤维维持组织强度和刚度, 网状纤维提供容积; 弹性纤维的排列结构、含量及其与胶原纤维的比例等影响黄韧带的预张力和生物学功能^[4,5]。本研究病理学显示退变黄韧带弹性纤维直径大小不一、排列紊乱及数量减少, 胶原纤维增生。戴力扬等^[6]研究认为黄韧带弹性纤维与胶原纤维比例失调, 可致黄韧带肥厚。

3.2 腰椎黄韧带中胶原蛋白含量变化

正常黄韧带中弹性纤维与胶原纤维维持在适当比例, 多数学者报道其含量比为 2:1, 羟脯氨酸对维持胶原蛋白分子的三螺旋结构起重要作用, 可作为半定量测定胶原蛋白的指标。退变黄韧带的羟脯氨酸和胶原蛋白含量增加, 表明腰椎黄韧带在退变过程中可能被反复牵拉, 充血肿胀, 供血供氧不平衡, 通过胶原代偿性增生来维持其强度及刚度, 最终引起黄韧带肥厚并突向椎管, 导致腰椎管容积减小^[7]。张喜善等^[8]研究发现黄韧带在退变过程中可导致应力集中, 胶原含量增加, 成纤维

细胞数量增多且逐渐转向纤维化, 可致黄韧带肥厚及骨化。Nakatani 等^[9]将体外培养的黄韧带细胞给予 48h 牵张后, 黄韧带细胞胶原 mRNA 表达显著增强, 胶原含量增加。

3.3 腰椎黄韧带中蛋白多糖含量的变化

蛋白多糖由透明脂酸蛋白核心、非胶原蛋白链及多糖聚合体构成, 带有大量的负电荷, 对水及阳离子具有较大的亲和力, 为组织提供良好的水合空间; 多糖聚合体由核心蛋白和糖氨聚糖链共价连接聚合而成, 在维持胶原排列的有序性、防止胶原的降解、维持细胞表型及传递信息方面具有重要作用^[10]。本研究退变黄韧带蛋白多糖含量增加, 可能间接影响胶原蛋白的代谢, 二者共同促使黄韧带肥厚, 导致腰椎管腔狭小, 引起腰腿痛症状。目前研究认为蛋白多糖的过量表达加速了胶原蛋白变性, 使韧带组织的粘弹性及对抗压力减弱, 逐渐导致韧带组织纤维化及骨化^[11]。

正常状态下黄韧带处于一定的张力中, 腰椎退变对椎间盘及韧带的影响较大, 反复的机械牵张可引起黄韧带的厚度增加^[12]。正常黄韧带胶原蛋白与蛋白多糖维持在一定比例, 其相互作用可阻止细胞基质的纤维化及钙化, 使韧带富有弹性, 在保持韧带整体功能方面发挥着极其重要的生物

学作用^[13]。黄韧带肥厚程度与弹性纤维减少及纤维化程度呈正相关,反复损伤后纤维化修复是黄韧带增厚的主要原因^[14];退变组黄韧带中羟脯氨酸、胶原蛋白及蛋白多糖含量增加,表明黄韧带在腰椎退变过程中,可能承受着较大的旋转及牵张应力,反复的机械牵张引起黄韧带厚度增加,加快了腰椎黄韧带的退变速度及程度^[14]。

综上所述,腰椎黄韧带在退变过程中胶原蛋白、蛋白多糖含量增加及组织显微结构紊乱,黄韧带胶原蛋白和蛋白多糖代谢紊乱、比例失调,可导致黄韧带预张力及弹性下降,加速了黄韧带肥厚,可引起腰椎管容积变小,压迫马尾神经,出现腰腿痛的临床症状;腰椎退变及不稳,产生更多的旋转及牵张应力,反复牵拉损伤黄韧带,使其发生损伤后纤维化修复,进一步加重黄韧带肥厚程度,可见退变性黄韧带生化成分改变与中央型腰椎管狭窄症的发生关系密切。

4 参考文献

1. 王伟敦,倪斌,于沈敏.腰椎管狭窄症与黄韧带的病理关系研究[J].中国矫形外科杂志,2003,11(10):664-666.
2. 杨秀颖,杜冠华.组织羟脯氨酸含量微量测定方法及应用[J].中国药理学通报,2004,20(7):836-837.
3. 林颖,黄琳娟,田庚元.一种改良的糖醛酸含量测定方法[J].中草药,1999,30(11):817-819.
4. Frank C, Amiel D, Woo SL, et al. Normal ligament properties and ligament healing [J]. Clin Orthop Relat Res, 1985, 196: 15-25.
5. Okuda T, Baba I, Fujimoto Y, et al. The pathology of ligamentum flavum in degenerative lumbar disease [J]. Spine, 2004, 29(15): 1689-1697.
6. 戴力扬,杜晓冰.黄韧带退行性改变的的组织学观察及其与腰椎椎管狭窄症的关系[J].中华骨科杂志,1995,15(4):195-197.
7. Postacchini F, Gumina S, Cinotti G, et al. Ligamenta flava in lumbar disc herniation and spinal stenosis: light and electron microscopic morphology [J]. Spine, 1994, 19(8): 917-922.
8. 张喜善,范锡海,张延明,等.黄韧带退变早期的超微结构实验研究[J].中国矫形外科杂志,2009,17(17):1344-1347.
9. Nakatani T, Marui T, Hitora T, et al. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor beta1 [J]. Orthop Res, 2002, 20(6): 1380-1386.
10. 张超,陈飞雁,夏军,等.三羟基异黄酮对关节软骨细胞合成胶原和蛋白多糖的影响 [J]. 复旦学报(医学版),2009,34(6): 440-444.
11. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction [J]. J Exp Med, 2000, 191(2): 275-286.
12. Kaneyama S, Doita M, Nishida K, et al. Thoracic myelopathy due to ossification of the yellow ligament in young baseball pitchers [J]. Spinal Disord Tech, 2008, 21(1): 68-71.
13. 杨建辉,吕建国,申晓东.雌激素对骨关节炎模型软骨基质蛋白多糖变化的影响[J].西安交通大学学报(医学版),2004,25(6):584-586.
14. Sairoy K, Biyani A, Goel VK, et al. Pathomechanism of ligamentum flavum hypertrophy: a multidisciplinary investigation based on clinical, biomechanical, histologic and biologic assessments [J]. Spine, 2005, 30(23): 2649-2656.

(收稿日期:2010-08-09 修回日期:2010-09-29)

(英文编审 蒋欣/刘思麒)

(本文编辑 刘彦)

消息

第六届全国 PLDD 微创技术讲习班 暨椎间盘介入微创技术经验交流学术会通知

为了规范和推广经皮激光间盘减压术(PLDD)等椎间盘介入微创技术,北京市垂杨柳医院(北京微创医院)、中华医学会激光医学分会、定于 2010 年 12 月 17~19 日在北京举办“第六届全国 PLDD 微创技术讲习班暨椎间盘介入微创技术经验交流学术会”。

内容包括:一、推广中华医学会激光医学分会制定的 PLDD 治疗颈腰椎病的指南。二、PLDD 技术的基础与临床研究进展、PLDD 常用激光设备的特性、PLDD 适应证和禁忌证、评价标准、手术操作讲座及临床经验交流。三、射频消融、臭氧等间盘介入微创技术讲座及临床经验交流。

学分情况:培训合格者授予国家级继续教育 I 类学分 4 分。培训费用:1000 元(包括注册、饮食、资料费等);住宿统一安排,费用自理。日程安排:2010 年 12 月 17~19 日。12 月 17 日全天报到(不设接站)。报名方式:请于 12 月 1 日前信函或电话回执,以便安排食宿。联系地址:北京市朝阳区垂杨柳南街 2 号 北京市垂杨柳医院骨科 100022;联系人:张彤童(13810936372)、韩正锋(13466356425)或 67718822 转 2097/2046;E-mail:zhangtong6789@163.com、rlxpldd@sina.com;查询网址: <http://www.rlxpldd.com>。