

不同 Miyazaki 分级颈椎间盘内髓核细胞的生物学特性

武振方, 刘晓伟, 康治理, 童 也, 何 鹏, 王 洋, 许 斌

[南京大学医学院附属金陵医院(东部战区总医院)骨科 210002 南京市]

【摘要】目的:比较不同 Miyazaki 分级颈椎间盘内髓核细胞生物学特性的差异,评估该分级系统反映颈椎间盘退变程度的可靠性与一致性。**方法:**收集我院 2017 年 12 月~2018 年 7 月 36 例行颈前路手术患者术中切除的颈椎间盘髓核组织。患者男 21 例,女 15 例,年龄为 41.2 ± 4.5 岁,手术节段为单节段 27 例,两节段 9 例。将收集到的 45 个髓核组织按照术前颈椎 MRI T2 像上的 Miyazaki 分级分为 4 组,依次为 II 级($n=6$), III 级($n=10$), IV 级($n=14$), V 级($n=15$)。组织切片后行甲苯胺蓝染色,观察髓核组织内细胞的密度以及分布情况。免疫组织化学染色和蛋白免疫印迹实验检测不同分级组织内聚集蛋白聚糖(Aggregan)和 II 型胶原蛋白(type II collagen, Col II)的表达量。采用酶消化法分离不同分级髓核组织内的细胞并进行体外培养,光镜下观察髓核细胞的形态,台盼蓝染色测定各组髓核细胞的活性比率,CKK-8 法绘制各组 1 代髓核细胞的生长曲线。**结果:**II 级组髓核组织内细胞密度显著高于 III 级组,III 级组高于 IV 级组,V 级组的细胞密度最低。Aggregan 和 Col II 在 II 级组织中表达量最高,III 级组高于 IV 级组,V 级组中表达量最低,组间比较均有统计学差异($P<0.05$)。II 级组椎间盘内髓核细胞多呈三角形、短棱形,折光性较好;III 级组髓核细胞出现突起,轮廓不清晰;IV 级组细胞形态多呈长梭形,细胞扁平且突起明显;V 级组髓核细胞形态各异,轮廓模糊,折光度差。II、III、IV、V 级组的细胞活性比率分别为 $(94.8 \pm 2.8)\%$ 、 $(84.3 \pm 2.6)\%$ 、 $(75.1 \pm 4.8)\%$ 和 $(66.1 \pm 3.3)\%$,其中 II 级组高于 III 级组,IV 级组低于 III 级组,而 V 级组最低,组间比较均有统计学差异($P<0.05$)。II 级组髓核细胞生长速率比 III 级组快,III 级组比 IV 级组快,V 级组生长速率最低,组间比较均有统计学差异($P<0.05$)。**结论:**颈椎间盘 Miyazaki 分级系统可以较好地反映髓核细胞的生物学特性和颈椎间盘的退变程度,可作为临床治疗和诊断的重要参考。

【关键词】 颈椎;椎间盘;髓核细胞;Miyazaki 分级;生物学特性

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.10.06

中图分类号:R681.5,R322.7 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2019)-10-0903-08

Biological characteristics of nucleus pulposus cells in cervical intervertebral discs with different Miyazaki grades/WU Zhenfang, LIU Xiaowei, KANG Zhili, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(10): 903-910

【Abstract】 Objectives: To compare the biological characteristics of cervical nucleus pulposus cells in different Miyazaki grades in order to evaluate the reliability of the grading system. **Methods:** These 45 nucleus pulposus were collected from 36 patients (aged 41.2 ± 4.5 years) undergone anterior cervical operation from December 2017 to July 2018 in our hospital, including 21 males and 15 females, and 27 cases of single segment surgery, and 9 cases of two segments surgery. The 45 nucleus pulposus were divided into 4 groups according to Miyazaki classification, grade II ($n=6$), grade III ($n=10$), grade IV ($n=14$) and grade V ($n=15$). Tissue sections were stained with toluidine blue to observe the density and distribution of nucleus pulposus cells. Immunohistochemistry and western blotting were performed to determine the expression levels of type II collagen and aggregan in different Miyazaki grades of nucleus pulposus tissue. The nucleus pulposus cells were isolated by trypsin and collagenase II and cultured to observe cells morphology under light microscope. The activity ratio of nucleus pulposus cells was determined by trypan blue staining and the growth curve of

基金项目:原南京军区医疗卫生科技基金重大专项(15DX019)

第一作者简介:男(1990-),硕士研究生在读,研究方向:脊柱外科

电话:(025)80860023 E-mail:zhenfang.wu@foxmail.com

通讯作者:许斌 E-mail:xubinnz@163.com

nuclear cells was drawn by CCK-8 kit. **Results:** The nucleus pulposus cells density in grade II was higher than that in grade III and IV, followed by that in grade V. The expression of type II collagen and aggrecan was the highest in grade II, followed by that in grade III, IV and grade V, with significant differences between every two groups ($P<0.05$). In addition, the cells in grade II were triangular and short spindle in shape, with pretty well refractive index. While the cells in grade III had long processes, vague outline and pseudopodium. For the grade IV and V, these cells had many different shapes, longer processes, blurred outlines and poor refractive index. The cell activity ratio was $(94.8\pm2.8)\%$ in grade II group, $(84.3\pm2.6)\%$ in grade III group, $(75.1\pm4.8)\%$ in grade IV group and $(66.1\pm3.3)\%$ in grade V group, with significant differences between every two groups ($P<0.05$). The cell growth rate in grade II of passage 1 cells were markedly faster than that of grade III ($P<0.05$), and that of grade III was faster than that of grade IV ($P<0.05$), so was that of grade IV than grade V ($P<0.05$). **Conclusions:** The Miyazaki grading system could reflect biological characteristics of nucleus pulposus cells and the degree of disc degeneration well and provide an important reference for clinical treatment and diagnosis.

[Key words] Cervical vertebra; Intervertebral disc; Nucleus pulposus cell; Miyazaki grade; Biological characteristics

[Author's address] Department of Orthopaedics, Jinling Hospital, Nanjing University School of Medicine, Nanjing, 210002, China

椎间盘退变是多种内、外因素共同参与引起椎间盘形态、组织结构乃至细胞和分子水平发生异常的动态变化过程,也是颈椎病及腰椎间盘突出症的直接病因^[1-3]。椎间盘退变程度的准确评估可为颈、腰椎疾病临床治疗方案的制定以及预后评估提供重要的参考依据,特别是对于初次手术方式和范围的确定具有重要意义^[4]。目前基于MRI对椎间盘退变进行分级的方法能够从影像学水平直接反映椎间盘结构的变化,临床操作简单,应用也比较广泛^[5]。其中常用于评估腰椎间盘退变的Pfirrmann分级系统已证实与组织学及解剖学结构具有较好的一致性,可直观可靠地反映腰椎间盘的退变程度^[6,7]。尽管颈椎与腰椎的椎间盘具有相同的组织来源和物质组成,但两者在椎体活动度、生物应力以及椎间盘形态和体积等方面均存在较大差异,可能导致椎间盘退变机制和病理表现不同,故直接使用Pfirrmann分级系统评估颈椎间盘的退变程度显然是不科学的^[8]。针对上述问题学者们也制定了多种颈椎间盘退变的分级系统,其中Christe等^[9]和Kolstad等^[10]根据颈椎间盘髓核信号、椎间高度以及椎间盘脱垂等MRI检查结果对颈椎间盘进行分级,但两种分级系统的稳定性及临床效力尚不明确,对于病变早期表现也不够敏感,未能得到普遍应用。Miyazaki等^[11]参考腰椎评估系统并结合既往研究以及MRI检查信息建立的颈椎间盘退变分级系统稳定性较好,临床应用也相对较多,但目前该分级系统与椎

间盘退变程度是否具有较好的一致性仍无明确结论。本研究通过比较不同Miyazaki分级颈椎间盘组织中髓核细胞的密度、形态、活性、生长速率及细胞外基质蛋白表达情况,进而评估该分级系统是否可以较好地反映颈椎间盘组织的退变程度。

1 材料与方法

1.1 组织获取

收集2017年12月~2018年7月我院骨科36例患者在颈前路椎体次全切除减压融合术(anterior cervical corpectomy and fusion, ACCF)或颈前路椎间盘切除减压融合术(anterior cervical discectomy and fusion, ACDF)术中切除的颈椎间盘髓核组织,其中单节段27例,两节段9例,将收集的45个髓核组织按照术前颈椎MRI T2像上的Miyazaki分级分为4组,依次为II级($n=6$), III级($n=10$), IV级($n=14$), V级($n=15$)(图1)。研究中排除有颈椎外伤、肿瘤、风湿疾病等病史的患者。Miyazaki分级由3个高年资医生根据术前颈椎MRI检查T2像的情况按Miyazaki分级系统共同评定,具体分级标准: I级,髓核呈高信号,结构均一呈白色,与纤维环界限清晰,椎间盘高度正常; II级,髓核呈高信号,结构不均一,中间有横纹出现,与纤维环界限清晰,椎间盘高度正常; III级,髓核呈中等信号,结构不均一,呈灰色至黑色,与纤维环界限不清晰,椎间盘高度正常或降低; IV级,髓核低信号,结构不均一呈灰色至黑色,

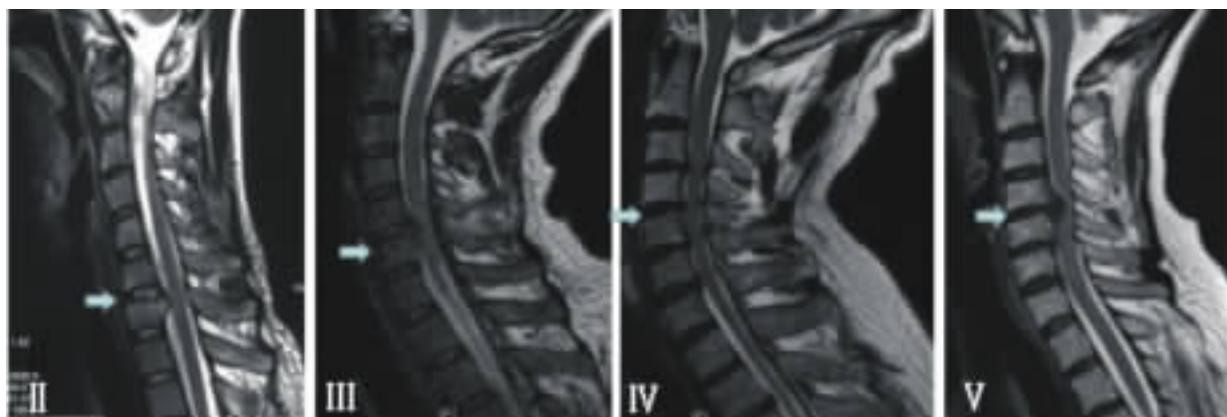


图 1 术前不同 Miyazaki 分级的颈椎间盘 MRI 表现(白色箭头所示): II 级,髓核高信号,结构不均匀,出现横纹带,呈白色,与纤维环界限清晰,椎间盘高度正常; III 级,髓核中等信号,结构不均匀,呈灰色,与纤维环界限模糊,椎间盘高度稍降低; IV 级,髓核低信号,结构不均匀,呈黑色,与纤维环界限消失,椎间盘高度稍降低; V 级,髓核低信号,结构不均匀,呈黑色,与纤维环界限消失,椎间盘高度塌陷明显

Figure 1 MRI findings of cervical intervertebral discs with different Miyazaki grades preoperatively (As indicated by white arrows): Grade II, the nucleus signal intensity was hyperintense and the structure was inhomogenous with horizontal band; The distinction of Nucleus and annulus was clear and disc height was normal. Grade III, The nucleus signal intensity was intermediate and nucleus structure was inhomogenous and gray; The distinction of nucleus and annulus was unclear and disc height was slightly decreased. Grade IV, The nucleus signal intensity was hypointense and nucleus structure was inhomogenous and black; The distinction of nucleus and annulus was lost and disc height was slightly decreased. Grade V, The nucleus signal intensity was hypointense and nucleus structure was inhomogenous and black; The distinction of nucleus and annulus was lost and disc height was collapsed

与纤维环界限消失,椎间盘高度正常或消失; V 级,髓核低信号,结构不均一,呈灰色至黑色,与纤维环界限消失,椎间盘高度塌陷明显。其中 I 级常见于正常椎间盘,临床获取较为困难,故本研究未取得 I 级椎间盘组织。术中切取髓核组织过程中观察 II~V 级组织大体外观和质地变化。36 例患者中,男 21 例,女 15 例,年龄 41.2 ± 4.5 岁,所有患者术前均告知详情并签署知情同意书,且经医院伦理委员会审查通过(编号:2016NZGKJ-010)。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂:胎牛血清(Cellsera,澳大利亚), DMEM/F12 细胞培养基(Gibco,美国), II 型胶原酶(Invitrogen,美国), II 型胶原蛋白(type II collagen, Col II) 和聚集蛋白聚糖(Aggrecan)一抗(Proteintech,美国),台盼蓝染色液和甲苯胺蓝染色液(Solarbio,北京),CCK-8 试剂盒(Dojindo,日本),组织蛋白提取试剂盒(Invent,北京)。主要仪器:超净工作台(Thermoscientific,美国),细胞培养箱(Airtech,美国),普通倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂,中国),细胞培养板(康宁公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 髓核组织切片甲苯胺蓝染色 收集术中切除的髓核组织并切取黄豆粒大小的组织块放入 10% 的甲醛固定,石蜡包埋后切片,然后在二甲苯中进行脱蜡 10min,使用不同浓度梯度的无水乙醇依次漂洗 3min,最后蒸馏水浸洗 3 次。放入 1% 的甲苯胺蓝溶液中室温浸染 10min。再次水洗去除多余的染色液,无水酒精脱水,使用二甲苯透明,中性树胶封固,镜下观察髓核组织内细胞和基质的染色情况。

1.3.2 髓核组织免疫组织化学染色 髓核组织用 10% 甲醛固定,石蜡包埋切片,二甲苯浸泡 5min,无水酒精浸泡脱水 2 次,每次 3min,然后磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次。用 3% 的过氧化氢室温孵育 5min 灭活内源性过氧化物酶,在热修复抗原后,封闭 20min,Col II 一抗和聚集蛋白聚糖一抗按 1:200 比例稀释,37℃ 湿盒孵育 2h,二抗室温孵育 30min 后二氨基联苯胺(DAB)显色,终止显色后继续苏木素复染 10min,冲洗干净后脱色封片,光学显微镜下观察组织内 Col II 和聚集蛋白聚糖的表达情况并拍照保存。

1.3.3 测定髓核组织内 Col II 和聚集蛋白聚糖的

表达 获取不同退变等级的髓核组织,用生理盐水清洗两次去除血污,按照组织蛋白提取试剂盒的操作步骤提取总蛋白并煮沸处理蛋白样品。随后蛋白电泳和转膜后用 10%的脱脂奶粉封闭 1h,洗净,分别加入聚集蛋白聚糖一抗(1:1000)和 Col II 一抗(1:500),室温孵育 4h,PBS 洗膜 3 次,每隔 5min 一次,再加入 1:2000 稀释的通用型二抗,室温孵育 1h,再次 TBST 洗膜,每隔 5min 一次,共 4 次,使用化学发光显色。内参使用 GAPDH (1:10000),检测方法同上。使用 Image J 1.46r 软件分析实验所得条带,以目的蛋白条带和内参条带的灰度比值为各组蛋白的表达量。

1.3.4 髓核细胞的分离与培养 将取出的髓核组织放入细胞培养瓶内(含少量 DMEM/F12 细胞培养基)然后置入冰盒内迅速带回实验室。1h 内在超净台内用 DMEM 高糖培养基冲洗组织 3 次去除血污,修剪掉纤维环、软骨板和交界性组织,将剩余胶冻样髓核组织剪碎至 1mm^3 大小。与 0.25%的胰蛋白酶按 1:2 体积装入试管,37℃消化 25min,每 5min 轻轻摇动 1 次。加入含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养液终止消化并吹打。1000r/min 离心 5min,弃去上清液。加入 1.5 倍体积 0.2%的 II 型胶原酶,37℃静置消化 4h,组织块由块状变为絮状直至消失;200 目不锈钢网过滤,去除未能完全消化的组织;1000r/min 离心 5min,去除上清液;用 DMEM/F12 培养液吹匀细胞,再次离心,重复 3 次。吸取适量细胞悬液,用计数板进行细胞计数,台盼蓝染色测定刚分离的细胞的活性比率,按 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 T25 的细胞培养瓶中,加入 6ml 含 10%FBS 的 F12/DMEM 培养液。置于 37℃、5%CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。3d 后首次半量换液,以后每 3d 全量换液一次。各组分离培养髓核细胞融合至 85%,0.25%胰酶消化后按 1:2 进行传代,24h 后髓核细胞贴壁,置于普通显微镜下观察其细胞形态并拍照记录。

1.3.5 髓核细胞生长速率测定 取各组将要传代的 1 代髓核细胞,待细胞融合达 85%时,用 0.25%的胰酶消化后,再以含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基制成单细胞悬液并计数,以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 96 孔板中,每孔 200 μl ,共设 10 组,标记 1~10 号,每组 3 个复孔,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。共培养 10d,每天在一组的 3 个复孔中加入 CCK-8 溶液 10 μl ,培养箱中孵育 4h,设置 3 个复孔,取

平均值。在酶联免疫检测仪上选择 460nm 波长,测定 10d 内每组的吸光度值。以吸光度值为纵坐标轴、细胞培养时间为横轴绘制髓核细胞生长曲线。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析处理,数据以均数 $\pm$ 标准差的形式表示。不同组间比较符合正态分布的采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验法进行分析。不同组间生长速率不符合正态分布,故采用秩和检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 髓核组织甲苯胺蓝染色比较

镜下观察 II 级组髓核组织内细胞密度较高,基质染色深,组织内可见多个软骨陷窝,且染色较深,而 III 级组髓核组织内细胞密度较 II 级组明显降低,基质着色变浅,软骨陷窝数量减少;IV 和 V 级组织内细胞密度逐渐降低,基质着色较浅,组织内均未见明显的软骨陷窝(图 2)。

2.2 髓核组织免疫组化染色比较

镜下观察 II 级髓核组织内细胞密度最大,细胞内 Col II 和聚集蛋白聚糖的表达阳性,呈棕黄色,染色强度较高;而 III 级组织内细胞密度较 II 级降低,染色强度开始降低,IV 级组织内 Col II 和聚集蛋白聚糖的染色强度低,蛋白表达量较 II 级和 III 级都明显降低,而 V 级组织内细胞密度极低,Col II 和聚集蛋白聚糖的染色强度最低(图 3)。

2.3 髓核组织内 Col II 和聚集蛋白聚糖表达量比较

聚集蛋白聚糖的灰度值 II 级组为 1.25 ± 0.11 , III 级组为 0.70 ± 0.08 , IV 级组为 0.41 ± 0.05 , V 级组为 0.28 ± 0.03 ;Col II 的灰度值 II 级组为 1.21 ± 0.13 , III 级组为 0.85 ± 0.14 , IV 级组为 0.51 ± 0.12 , V 级组为 0.29 ± 0.06 。表明 II 级组内 Col II 和聚集蛋白聚糖表达量最高,而 III 级组 Col II 和聚集蛋白聚糖的表达量均降低,与 II 级组比较均有统计学意义($P < 0.05$),IV 级和 V 级组 Col II 和聚集蛋白聚糖的表达量较 III 级组均降低且有统计学差异($P < 0.05$);而 IV 级组两种蛋白的表达量也高于 V 级组,差异也有统计学意义($P < 0.05$)(图 4)。

2.4 髓核细胞活性比较

II 级组刚分离的原代髓核细胞的活性比率为

(94.8 ± 2.8)%, Ⅲ级组为(84.3 ± 2.6)%, Ⅳ级组和Ⅴ级组分别为(75.1 ± 4.8)%和(66.1 ± 3.3)%, 组间两两比较均存在统计学差异($P < 0.05$)。

2.5 髓核细胞形态学比较

镜下观察Ⅱ级组的1代髓核细胞多呈短梭形或三角形, 细胞轮廓饱满且清晰, 折光性好; Ⅲ级组细胞外观多呈长梭形, 细胞轮廓多扁平且欠清晰; Ⅳ级组细胞长梭形, 可见部分细胞伸出突起, 细胞外形多样, 细胞轮廓也不够清晰, 折光性不佳; Ⅴ级组细胞形态多样, 多伴有明显的长突起, 细胞扁平明显, 折光性差(图5)。

2.6 髓核细胞生长速率比较

观察1代髓核细胞培养过程中10d的生长情况, Ⅱ级组内细胞生长速率明显快于Ⅲ级组($P < 0.05$), Ⅲ级组内细胞生长速率快于Ⅳ级组($P < 0.05$), Ⅳ级组髓核细胞生长速率快于Ⅴ级组($P < 0.05$)(图6)。

3 讨论

目前评估椎间盘退变程度的方法较多, 其中组织病理学多被认为是评价椎间盘退变的“金标准”, 但该方法在指导术前评估和治疗方面作用有限^[9]。而基于MRI检查评价椎间盘退变是目前应用最为广泛的方法, 其中Miyazaki等^[11]建立的评估系统虽然也参考了腰椎MRI分级标准并且综合考虑了髓核信号强度、髓核结构分布、髓核与纤维环界限以及椎间高度的变化情况, 但其更加注重MRI中髓核信号强度及其结构的均一性变化, 这更加符合椎间盘退变过程中髓核组织的形态学和组织内部成分变化的特点, 关于该系统评估颈椎间盘退变的临床应用及其可靠性已成为临床研究的热点问题。

颈椎间盘Miyazaki分级系统中Ⅰ级常见于幼儿, 一般健康成年人的颈椎间盘组织也只能达到Ⅱ级, Ⅰ和Ⅱ级常被认为是正常椎间盘组织^[12]。

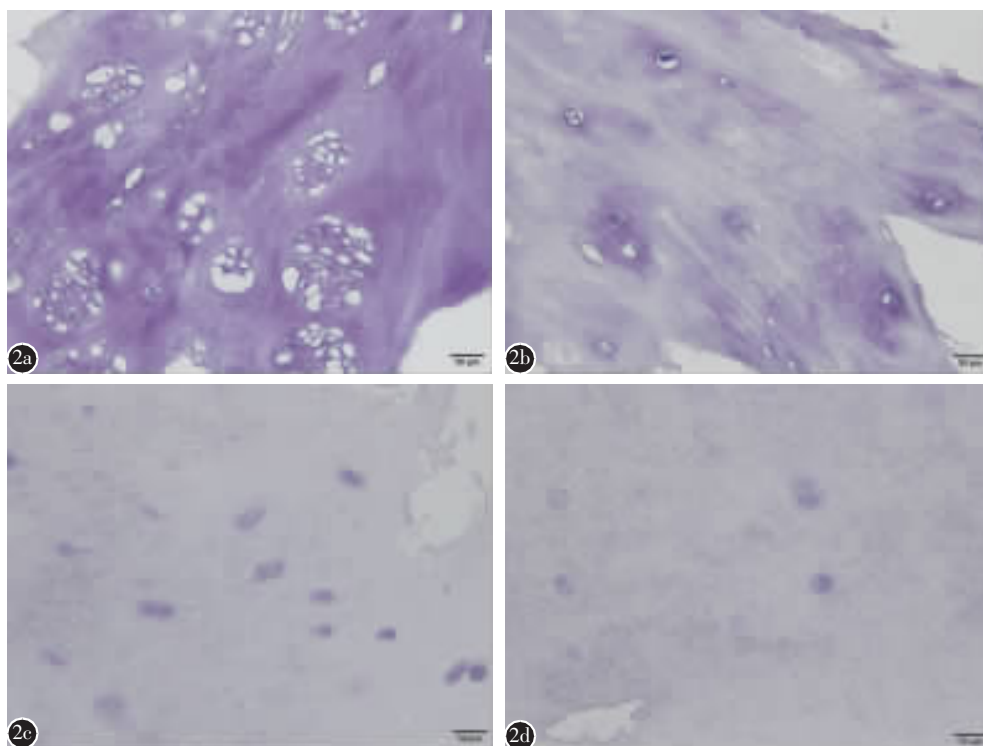


图2 不同Miyazaki分级的髓核组织甲苯胺蓝染色比较($\times 200$) a Ⅱ级, 细胞密度较高, 基质甲苯胺蓝染色深, 可见多个深染的软骨陷窝 b Ⅲ级, 细胞密度低, 基质着色变浅, 软骨陷窝数量减少 c Ⅳ级, 细胞密度较低, 基质着色浅, 组织内未见明显的软骨陷窝 d Ⅴ级, 细胞密度很低, 基质着色浅, 组织内未见软骨陷窝

Figure 2 The comparison of toluidine blue staining of nucleus pulposus tissues with different Miyazaki grades **a** Grade II: The cells intensities were apparently hyperintense and the matrix was remarkably dyed by toluidine blue with many cartilage capsules occurred in nucleus pulposus **b** Grade III: The cells intensities and the matrix staining were decreased and cartilage capsules were lesser as well **c** Grade IV: The cells intensities and the matrix staining were obviously decreased with few cartilage capsules seen in nucleus pulposus **d** Grade V: The cells and cartilage capsules were extremely less innucleus pulposus tissue

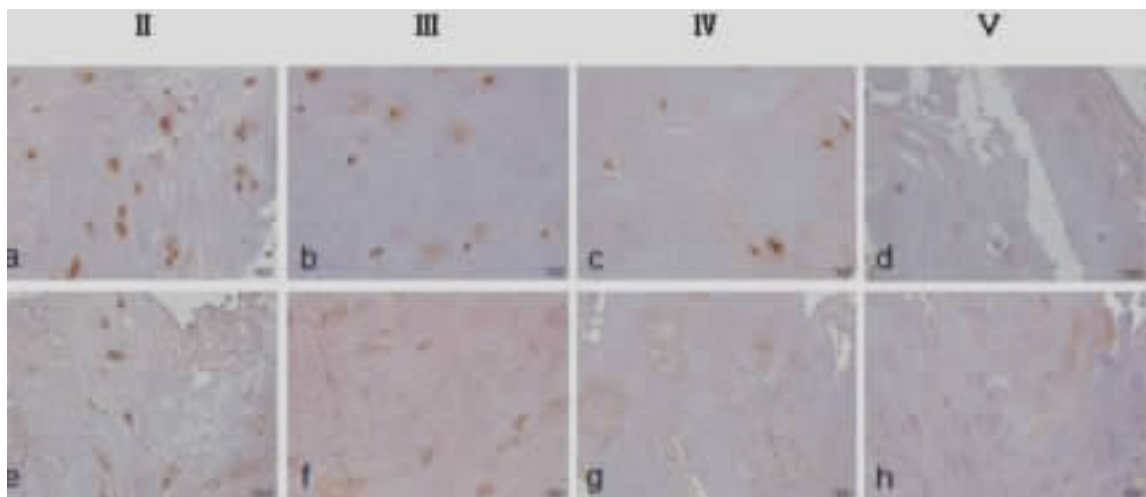


图 3 不同 Miyazaki 分级的髓核组织免疫组化染色($\times 200$)比较(a~d, II 型胶原蛋白,e~h, 聚集蛋白聚糖)。II 级组髓核细胞密度高, II 型胶原蛋白和聚集蛋白多糖的染色强度高(a,e); III 级组髓核细胞密度降低, II 型胶原蛋白和聚集蛋白多糖染色强度开始降低(b,f); IV 级组髓核细胞密度较低, 染色强度明显降低(c,g); V 级组髓核细胞密度极低, 染色橙黄色阳性细胞很少(d,h)

Figure 3 Immunohistochemical staining of nucleus pulposus tissues with different Miyazaki grades: Col II (a~d), Aggrecan(e~h)($\times 200$). The cells density in grade II was high and the positive expression rate of Col II and aggrecan was the highest(a, e). In grade III, the cell density and the positive expression rate of Col II and aggrecan decreased significantly(b, f). The cells density and the positive expression rate of Col II and aggrecan in grade IV group were significantly lower(c, g). In grade V group, the quantity of nucleus pulposus cell which positive expressed Col II and aggrecan was markedly low(d, h)

临床上 I 级组织难以获取, 本研究选取 II~V 级颈椎间盘髓核组织进行分组研究, 术中发现 II 级髓核组织常呈鲜红的胶冻状, 质地柔软, 黏性较好; 而 III、IV 级组织质地较硬, 组织黏度下降, V 级组织外观呈灰白色, 质地硬, 且多伴有钙化, 可见不同 Miyazaki 分级的髓核组织在大体外观上差异明显。研究报道组织学外形的改变是椎间盘退变的重要

表现, 且多与组织内部髓核细胞的生物学特性改变密切相关, 所以不同 Miyazaki 分级的组织学改变可在一定程度上反映椎间盘退变的程度^[13]。

既往研究认为椎间盘退变起始于髓核组织, 而髓核细胞是组织内主要的功能和修复细胞, 髓核组织解剖学结构异常、髓核细胞数量和活性降低以及细胞外基质成分改变是椎间盘退变的重要表现, 也是从组织病理水平上反映椎间盘退变程度的重要依据^[14,15]。研究发现细胞外基质合成和降解代谢失衡引起 Col II 和聚集蛋白聚糖等成分的异常变化在椎间盘退变过程中发挥着重要作用, 随着组织退变程度的加重, 细胞外基质相关成分的变化加剧, 髓核组织吸附水分以及抵御椎间盘压力负荷的能力也会降低, 从而引起椎体间高度降低以及组织内部大体结构的变化^[16]。本研究通过组织切片免疫组化染色和蛋白免疫印迹实验证实, 随着 Miyazaki 分级等级的增高, 髓核组织内细胞数量以及 Col II 和聚集蛋白聚糖等细胞外基质主要成分含量也在显著降低。椎间盘细胞外基质中水分、Col II 和聚集蛋白聚糖等成分与 MRI

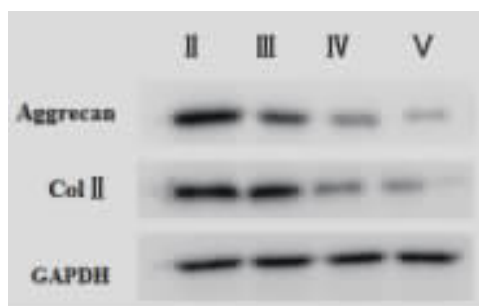


图 4 不同退变等级的髓核组织内 II 型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖的表达量的比较

Figure 4 Expression levels of type II collagen and aggrecan in nucleus pulposus tissues with different Miyazaki grades

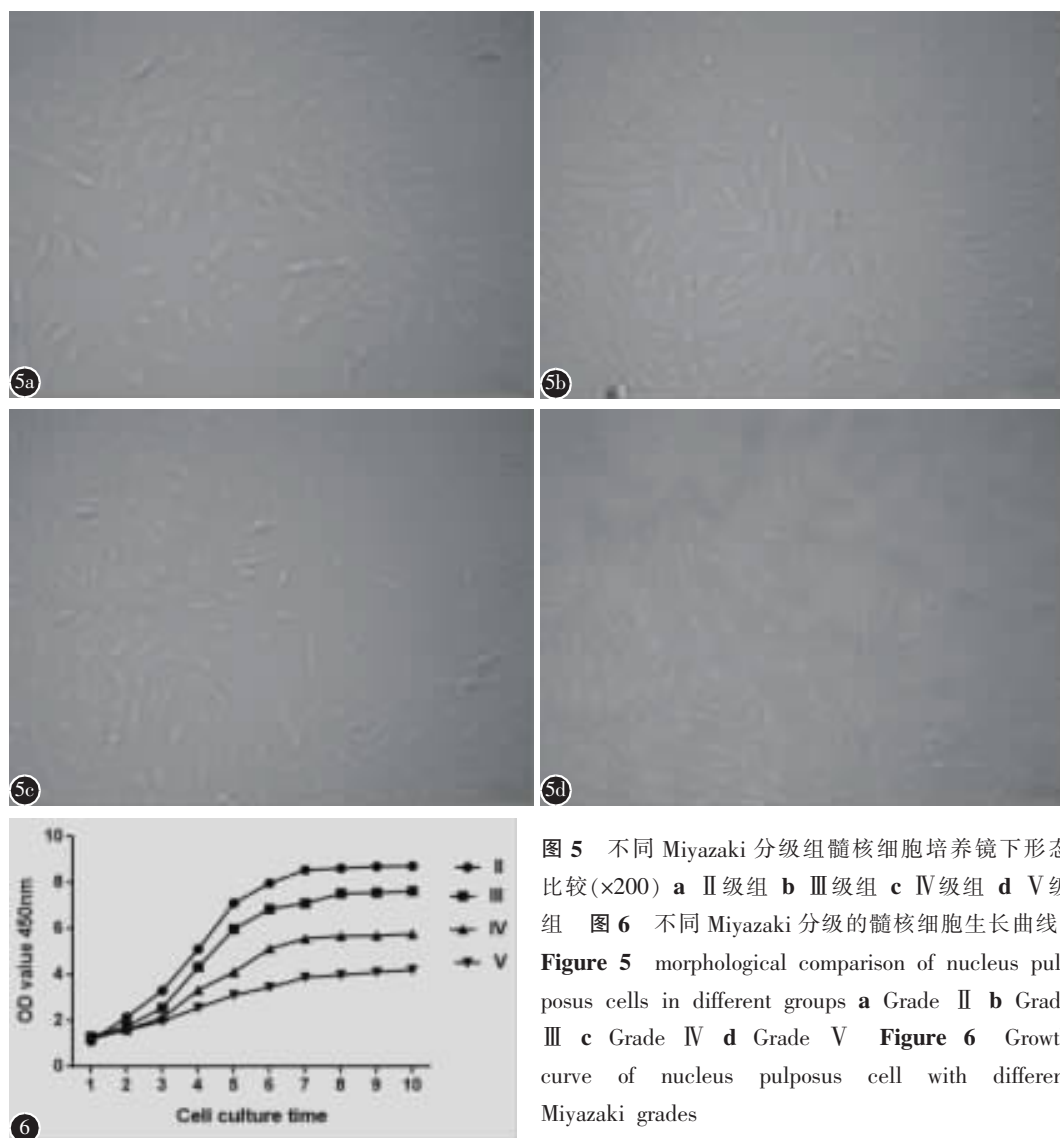


图5 不同 Miyazaki 分级组髓核细胞培养镜下形态比较($\times 200$) a II级组 b III级组 c IV级组 d V级组 图6 不同 Miyazaki 分级的髓核细胞生长曲线
Figure 5 morphological comparison of nucleus pulposus cells in different groups a Grade II b Grade III c Grade IV d Grade V Figure 6 Growth curve of nucleus pulposus cell with different Miyazaki grades

信号强度之间均存在密切的相关性,因此 MRI 可较好地反映细胞外基质种类和含量变化。研究也发现细胞外基质中 Col II 和聚集蛋白聚糖的表达量与椎间盘退变程度存在较好的相关性,说明 Miyazaki 分级系统通过影像学检查评估颈椎间盘退变程度具备较好的理论基础,可在细胞外基质分子水平上证实椎间盘退变的程度^[17-19]。

此外,髓核组织是体内最大的无血管组织,损伤修复能力较差,而导致其退变的根本原因在于长期非均衡应力和炎症反应等多种因素引起的髓核细胞退变和老化^[20]。研究表明,髓核细胞的形态学改变、活性降低和数量丢失等都是髓核细胞退变的表现,也是椎间盘退变重要的病理基础^[21,22]。本研究镜下观察不同 Miyazaki 分级的髓核细胞,其形态学外观也存在着较大的差异,髓核细胞从三角形或短棒状、细胞轮廓清晰饱满的类软骨细

胞开始向长梭形、多角形且细胞轮廓扁平欠清晰并可伸出伪足的成纤维细胞转化,符合既往研究中关于椎间盘退变过程髓核细胞逐渐出现老化的特征^[23]。而不同 Miyazaki 分级之间髓核细胞成纤维化趋势的转变可能与椎间盘细胞退变后细胞代谢异常导致其内部支架结构的减少有关,因此 Miyazaki 分级之间髓核细胞外形的改变也可在一定程度上反映椎间盘细胞的退变^[24]。

此外,细胞数量的丢失以及活性的降低与髓核细胞增殖与凋亡失衡、细胞自噬水平的失代偿以及死亡率增高等过程有关,也是椎间盘退变过程重要的病理学基础^[25]。髓核细胞是椎间盘组织最主要的合成和修复细胞,髓核细胞数量减少以及细胞外基质合成代谢降低等一系列功能状态的改变可使其维持椎间盘外形以及生物力学稳定的能力下降,进而导致椎间盘退变的发生^[13]。本研究

通过髓核组织切片染色以及体外分离培养不同 Miyazaki 分级的髓核细胞发现,随着分级的增加,组织内细胞密度逐渐减小,细胞活性以及增殖速率也在显著下降。既往研究认为髓核细胞数量的减少与活性的降低伴随着椎间盘退变的整个动态变化过程,且与椎间盘退变的程度呈正相关^[26,27]。由此可见,Miyazaki 分级系统可从影像学角度反映髓核细胞的密度和活性,进而可判定椎间盘组织的退变程度。

综上所述,随着 Miyazaki 退变等级的提高,髓核组织内细胞密度、细胞活性、增殖能力以及细胞外基质蛋白合成能力明显下降,因此 Miyazaki 颈椎间盘退变分级系统可较好地反映颈椎间盘的退变程度,可为临床治疗以及预后评估提供重要的参考依据。

4 参考文献

- Kuga N, Kawabuchi M. Histology of intervertebral disc protrusion: an experimental study using an aged rat model [J]. Spine(Phila Pa 1976), 2001, 26(17): E379-384.
- 郑启新, 邹杭玮, 郭晓东. 腰椎间盘突出性疾病的研究进展及展望[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(11): 1573-1576.
- 陈国仙, 叶道明, 王万明. 椎间盘退变机制研究进展[J]. 脊柱外科杂志, 2006, 4(3): 174-178.
- Sugawara T, Itoh Y, Hirano Y, et al. Long term outcome and adjacent disc degeneration after anterior cervical discectomy and fusion with titanium cylindrical cages[J]. Acta Neurochir (Wien), 2009, 151(4): 303-309.
- Benneker LM, Heini PF, Anderson SE, et al. Correlation of radiographic and MRI parameters to morphological and biochemical assessment of intervertebral disc degeneration[J]. Eur Spine J, 2005, 14(1): 27-35.
- Pfirschnig CWA, Metzendorf A, Zanetti M, et al. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration [J]. Spine(Phila Pa 1976), 2001, 26(17): 1873-1878.
- 杨勇, 梁伟, 罗卓荆, 等. 不同 Pfirschnig 分级椎间盘内髓核细胞生物学特性的比较[J]. 脊柱外科杂志, 2011, 9(4): 244-248.
- 刘晓伟, 陈宇, 陈德玉. 颈椎间盘退变 MRI 分级标准的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23(1): 70-73.
- Christe A, Laubli R, Guzman R, et al. Degeneration of the cervical disc: histology compared with radiography and magnetic resonance imaging [J]. Neuroradiology, 2005, 47(10): 721-729.
- Kolstad F, Myhr G, Kvistad KA, et al. Degeneration and height of cervical discs classified from MRI compared with precise height measurements from radiographs [J]. Eur J Radiol, 2005, 55(3): 415-420.
- Miyazaki M, Hong SW, Yoon SH, et al. Kinematic analysis of the relationship between the grade of disc degeneration and motion unit of the cervical spine [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33(2): 187-193.
- Miyazaki M, Hong SW, Yoon SH, et al. Reliability of a magnetic resonance imaging-based grading system for cervical intervertebral disc degeneration[J]. J Spinal Disord Tech, 2008, 21(4): 288-292.
- 陈琪, 石芳芳, 杨曦, 等. 不同代次髓核细胞生物学特性的比较研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(6): 660-667.
- 孟祥宇, 夏建龙, 杨挺, 等. 椎间盘退变的机制及修复[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(11): 1768-1773.
- Yang X, Li X. Nucleus pulposus tissue engineering: a brief review [J]. Eur Spine J, 2009, 18(11): 1564-1572.
- LeMaitre CL, Pockert A, Buttle DJ, et al. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 4): 652-655.
- 丛琳, 屠冠军. 退行性变腰椎间盘 MRI 信号强度与 aggrecan 含量的相关性研究[J]. 中国医科大学学报, 2010, 38(9): 687-689.
- 余文昌, 杨建勇, 庄文权, 等. 腰椎间盘胶原含量变化影响 MRI 信号强度的研究[J]. 放射学实践, 2005, 20(8): 721-723.
- Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2006, 31(18): 2151-2161.
- Tow BPB, Hsu WK, Wang JC. Disc regeneration: a glimpse of the future[J]. Clin Neurosurg, 2007, 54(1): 122-128.
- Chen JW, Ni BB, Li B, et al. The responses of autophagy and apoptosis to oxidative stress in nucleus pulposus cells: implications for disc degeneration [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(4): 1175-1189.
- Kalichman L, Hunter DJ. The genetics of intervertebral disc degeneration associated genes[J]. Joint Bone Spine, 2008, 75(4): 388-396.
- Hu MH, Hung LW, Yang SH, et al. Lovastatin promotes redifferentiation of human nucleus pulposus cells during expansion in monolayer culture [J]. Artif Organs, 2011, 35(4): 411-416.
- Li S, Duance VC, Blain EJ. Zonal variations in cytoskeletal element organization, mRNA and protein expression in the intervertebral disc[J]. J Anat, 2008, 213(6): 725-732.
- Rajpurohit R, Risbud MV, Ducheyne P, et al. Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: expression of hypoxia-inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2 [J]. Cell Tissue Res, 2002, 308(3): 401-407.
- Lin Y, Yue B, Xiang H, et al. Survivin is expressed in degenerated nucleus pulposus cells and is involved in proliferation and the prevention of apoptosis in vitro [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(1): 1026-1032.
- Li Z, Li X, Chen C, et al. Melatonin inhibits nucleus pulposus(NP) cell proliferation and extracellular matrix(ECM) remodeling via the melatonin membrane receptors mediated PI3K-Akt pathway[J]. J Pineal Res, 2017, 63(3): e12435.

(收稿日期:2019-04-11 末次修回日期:2019-09-19)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 李伟霞)