

基础研究

胶原酶对山羊硬膜外移植自体
椎间盘组织溶解作用的观察李振宙¹, 侯树勋¹, 刘 茜², 商卫林¹, 吴闻文¹, 吴 叶¹

(1 解放军总医院第一附属医院骨科; 2 病理科 100037 北京市)

【摘要】目的:观察椎管内硬膜外腔注射胶原酶对山羊腰椎管内移植的自体椎间盘组织的溶解作用。**方法:**9 只成年山羊, 经腰椎后路右侧 L6/7、左侧 L3/4 椎板间隙移植自体椎间盘组织于椎管内神经根腋部, 随机选择向 2 个间隙移植周围灌注胶原酶 300U/0.3ml 或生理盐水 0.3ml。分别于术后 1d、1 周、2 周处死动物, 观察胶原酶灌注后椎管内移植的椎间盘组织的组织学变化情况。**结果:**灌注胶原酶 1d 时髓核组织基质明显溶解, 1 周时出现大量巨噬细胞浸润, 髓核结构明显破坏, 2 周时被肉芽组织替代; 而灌注生理盐水 1d 时髓核组织无明显变化, 1 周时髓核组织中出现大量淋巴细胞浸润, 2 周时出现纤维母细胞、成纤维细胞和巨噬细胞浸润。胶原酶对纤维环的溶解作用不明显。**结论:**硬膜外腔注射胶原酶能直接溶解椎管内髓核组织, 并能激发机体炎症反应过程, 加速髓核组织的破坏和吸收。

【关键词】胶原酶; 椎间盘; 化学髓核溶解术; 组织学; 山羊

中图分类号: R453, R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-11-0862-04

Chemonucleolysis of epidural injected collagenase on autografts of intervertebral disc tissue in sheep lumbar spinal canal in vivo/LI Zhenzhou, HOU Shuxun, LIU Qian, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(11): 862-864

【Abstract】 Objective: To study the chemonucleolysis of epidural injected collagenase on autografts of intervertebral disc tissue in sheep lumbar spinal canal in vivo. **Method:** 9 adult goats were randomly assigned into 3 groups: 1 day group, 1 week group, 2 weeks group. Autografts of intervertebral disc tissue was transplanted into lumbar spinal canal through interspaces between left L3/4 lamina and right L6/7 lamina. Collagenase (300U/0.3ml) or saline (0.3ml) was randomly epidural injected into lumbar spinal canal and infiltrated around autografts. Histological changes of autografts were studied. **Result:** Autografts of nucleus pulposus infiltrated with collagenase were dissolved significantly 1 day after injection, infiltrated with lots of macrophagocytes after 1 week and with structure of nucleus pulposus destroyed, replaced by granulation tissue after 2 weeks. While autografts of nucleus pulposus infiltrated with saline didn't show significant changes 1 day after injection, lots of lymphocytes infiltration was found after 1 week, fibroblasts and macrophagocytes infiltration was found after 2 weeks. Annular fibrosus showed only minimal dissolution on the edge of autografts by collagenase. **Conclusion:** Epidural injected collagenase can directly dissolve nucleus pulposus tissue and stimulate inflammatory response to accelerate disorganization and absorption of nucleus pulposus tissue.

【Key words】 Collagenase; Intervertebral disc; Chemonucleolysis; Histology; Goat

【Author's address】 Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing, 100037, China

胶原酶化学髓核溶解术是治疗腰椎间盘突出症的有效方法, 截止到 2002 年 12 月, 国内接受胶原酶注射的椎间盘突出症病例约 50 万^[1]。由于椎

间盘内注射胶原酶后常出现严重疼痛反应, 目前国内大多采用椎间盘外、硬膜外腔注射胶原酶治疗椎间盘突出症。但硬膜外注射胶原酶能多大程度溶解突出椎间盘组织尚不清楚。本实验采用山羊腰椎管内移植自体椎间盘组织模型, 观察硬膜外注射胶原酶对椎间盘组织的溶解情况。

第一作者简介: 男 (1975-), 主治医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (010)66867358 E-mail: lizhenzhou304@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 动物分组

9 只 6 月龄山羊, 体重 14~21kg, 平均 15.5kg。按椎管内灌注药物后处死时间随机分为 1d 处死组、1 周处死组和 2 周处死组, 每组 3 只。

1.2 实验步骤

肌注速眠新(0.3ml/kg)和氯胺酮(40mg/kg)麻醉实验动物。置山羊右侧卧位, 取腰椎左侧前方腹膜外入路暴露 L4/5、L5/6 腰椎间盘, 切取宽×高×深约为 5mm×2mm×7mm 的纤维环组织 2 块, 刮出髓核组织等分为 2 份。腰椎后路暴露右侧 L6/7、左侧 L3/4 椎板间隙, 靠外侧切开黄韧带, 每个间隙椎管内神经根腋部均移植 1 块纤维环组织及 1 份髓核组织; 按分组分别向移植物周围灌注胶原酶 300U/0.3ml 或生理盐水 0.3ml。

1.3 观察指标

在椎管内灌注药物后 1d、1 周和 2 周按分组处死动物, 取出 L3/4 和 L6/7 椎间盘, L3/4 椎管内移植物及同水平脊髓和神经根, L6/7 椎管内移植物和同节段脊髓和神经根, L1/2 节段脊髓和神经根。标本以 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 切片厚度为 3 μ m, 椎间盘组织分别行 HE 染色、番红 O-固绿染色和 Masson 三色胶原染色; 脊髓和神经根仅行 HE 染色。

2 结果

2.1 大体观察

各组动物移植手术后无瘫痪出现。胶原酶灌注后 1d, 胶原酶注射部位椎管内有出血灶; 灌注生理盐水的椎间盘组织移植物周围无明显出血。药物灌注后 2 周时硬膜和神经根与移植物之间有粘连, 以胶原酶注射部位明显。移植物同水平椎间盘无结构性改变。

2.2 光镜观察

药物灌注术后 1d、1 周、2 周后胶原酶注射部位和生理盐水注射部位脊髓、硬膜和神经根结构无明显异常; 同水平椎间盘结构和组织学无明显异常。

自体髓核组织移植物组织学变化: 灌注生理盐水后 1d, 髓核组织番红 O 染色特性仍存在, 髓核中胶原排列、类软骨细胞形态和数目与正常椎间盘相比无明显不同(图 1a, 后插页 II); 1 周时髓核组织番红 O 染色特性消失, 髓核中胶原排列、

类软骨细胞形态和数目与正常椎间盘相比无明显不同, 但组织中出现大量淋巴细胞和浆细胞浸润(图 1b, 后插页 II); 2 周时髓核组织中淋巴细胞明显减少, 出现纤维母细胞、成纤维细胞和巨噬细胞浸润, 髓核组织结构仍模糊可辨(图 1c, 后插页 II)。灌注胶原酶后 1d, 髓核组织番红 O 异染性消失, 胶原明显减少, 类软骨细胞聚集, 形态差异明显, 髓核基质被明显溶解(图 1d, 后插页 II); 1 周时髓核组织的结构模糊, 稀疏, 被大量巨嗜细胞浸润(图 1e, 后插页 II); 2 周时髓核组织结构无法辨认, 大量纤维母细胞和成纤维细胞增生, 组织中有大量新生血管形成(图 1f, 后插页 II)。

自体纤维环移植物组织学变化: 对照组纤维环结构和 Masson 胶原染色特性在生理盐水灌注后 2 周内没有明显改变(图 2a、b、c, 后插页 II)。胶原酶处理组纤维环在灌注后 1d 出现边缘结构疏松, Masson 染色明显变淡(图 2d, 后插页 II); 1 周时纤维环边缘出现大量纤维母细胞和成纤维细胞增生(图 2e, 后插页 II); 2 周时移植物边缘纤维环正常结构紊乱, 成纤维细胞增生伴大量新生血管长入, 移植物中央部位纤维环内也出现新生血管组织(图 2f, 后插页 II), 移植物体积没有明显缩小。

3 讨论

近 10 年来, 国内广泛开展胶原酶治疗腰椎间盘突出症, 尤其是硬膜外注射胶原酶法已相当普及。但由于硬膜外腔是一个很大的腔隙, 药液在硬膜外腔无法局限于突出椎间盘周围^[2]。尽管体外实验^[3,4]显示胶原酶能彻底溶解人椎间盘髓核组织, 但临床研究发现突出椎间盘经盘外胶原酶溶解术治疗后突出物大小变化不明显, 而经盘内胶原酶溶解术、盘内外胶原酶溶解术治疗后突出物变小非常明显^[5,6]。对于硬膜外注射胶原酶能多大程度溶解椎间盘组织及组织学演变, 目前有关研究甚少。温士旺等^[7]在家兔体内进行了胶原酶盘外溶核的实验研究, 切除家兔椎间盘水平棘突和椎板, 穿刺后外侧纤维环, 向椎间盘内注射生理盐水诱发髓核组织脱出, 硬膜外注射胶原酶后发现突出椎间盘髓核组织在术后 7、15、30d 出现胶原纤维疏松、淡染、断裂和溶解, 软骨细胞减少; 髓核组织内无炎性细胞浸润。但该研究设计切除了椎板使硬膜外腔的密封性受到了破坏, 同时创伤性

炎症反应也会影响对实验结果的解释。本研究的实验模型不破坏椎管的完整性,不对椎管内产生创伤,可以最大程度地减少影响观察的混杂因素。有研究表明^[8-10],胶原酶注射后作用时间在 2 周以内,故本实验观察自体椎间盘组织在灌注胶原酶后 2 周内的组织学变化过程。

本实验生理盐水对照组中,自体髓核组织移植进椎管后 1 周出现大量淋巴细胞和浆细胞浸润,2 周时淋巴细胞减少,出现巨噬细胞、纤维母细胞和成纤维细胞聚集。这与机体对自身抗原产生的免疫反应过程相一致。有研究发现狗椎管内游离的髓核组织 8~12 周后可部分或全部自然吸收,但局部仍然存在免疫反应现象,说明是自身免疫反应导致了髓核的自然吸收过程^[11]。本研究中尽管观察到自身免疫反应的存在,但由于观察时间短,2 周时尚无明显的髓核自然吸收现象。

本研究结果表明,胶原酶能有效促进髓核组织的溶解,并能通过激发机体炎症反应过程加速对髓核组织的破坏和吸收。纤维环组织移植到椎管内没有引起炎症细胞浸润,说明纤维环组织不会引起自身免疫反应或炎症反应。胶原酶尽管引起移植纤维环边缘的溶解,并有成纤维细胞增生及血管长入,但溶解程度很有限,大块纤维环组织仍然保持相对正常的结构。

本研究中与移植植物相同水平的椎间盘结构和组织学上没有发生改变,与金星等^[12]的结果一致,不支持酶液渗透的推论。但张达颖^[13]对拟行化学髓核溶解术的 47 例椎间盘脱出患者行硬膜外侧前隙造影发现 22 例出现椎间盘显影,提示造影剂经某种途径弥散到了突出物及椎间盘内;他们对这 22 例患者均行盘外胶原酶 1200U 注射,术后 3~6 个月随诊复查了患者 19 例,症状完全缓解 15 例。19 例均复查 CT,其中 9 例突出物明显缩小,7 例椎间盘出现了真空征。作者推测在盘外注射时产生了对盘内溶解减压的效果,其机制可能是胶原酶通过破裂的纤维环弥散至突出物及椎间盘内所致;而对于纤维环未破裂的椎间盘可能不会产生盘内减压效果。

胶原酶对椎管内神经组织的作用一直是临床关心的焦点。Olmarker 等^[14]建立实验模型模拟胶原酶从椎间盘漏出或意外注射入硬膜外或神经鞘内,发现高浓度胶原酶注射入硬膜外导致局部硬膜变薄。Rydevik 等^[15]对兔的正常神经涂以胶原酶

溶液,2h 后出现神经外膜水肿,束膜及内膜微血管无变化,神经功能无损害。本研究中胶原酶注射部位周围硬膜和神经根也没有发现组织学上的改变,说明胶原酶硬膜外注射是安全性的。

综上所述,胶原酶能直接溶解椎管内移植的髓核组织,激发机体炎症反应,促进对髓核组织的破坏和吸收;但对纤维环组织的溶解作用有限。

4 参考文献

1. 刘树合,白兰菊.胶原酶溶盘术[J].实用疼痛学杂志,2006,2(2):97-105.
2. 汪军民,朱珊珊,喻传兵,等.椎间盘内注射胶原酶治疗腰椎间盘突出症的影响因素分析[J].中华物理医学与康复杂志,2004,26(11):688-690.
3. 滕蔚然,杜宁.盘外置管法注射胶原酶溶解髓核的实验研究[J].中国骨伤,2006,19(2):94-95.
4. 杨述华,杜靖远,罗怀灿,等.化学溶核术治疗椎间盘突出症的临床研究[J].中华骨科杂志,1996,16(7):415-417.
5. 余庆阳,何斌.突出型腰椎间盘突出症胶原酶不同注射方法后的影像学改变[J].中医正骨,2005,17(8):21.
6. 许国增,崔伟锋,乔忆莲,等.胶原酶化学溶解术两种注射方法的临床对比研究[J].颈腰痛杂志,2004,25(2):94-96.
7. 温士旺,孟庆云,柳顺锁,等.胶原酶盘外溶核的实验研究[J].中华麻醉学杂志,2002,22(1):39-41.
8. Miyabayashi T, Lord PF, Dubielzig RR, et al. Chemonucleolysis with collagenase: a radiographic and pathologic study in dogs [J]. Vet Surg, 1992, 21(3): 189-194.
9. Bromley JW, Hirst JW, Osman M, et al. Collagenase: an experimental study of intervertebral disc dissolution [J]. Spine, 1980, 5(2): 126-132.
10. 王鲁博,汤华丰,于夕欣.胶原酶对兔腰椎间盘的溶解作用[J].中国矫形外科杂志,1996,3(3):208.
11. 宫良泰,许复郁,宋若先,等.免疫反应在实验性游离型腰椎间盘突出自然吸收中的意义[J].山东大学学报·医学版,2002,40(6):533-534.
12. 金星,杨春生,王力.胶原酶化学溶解术治疗腰椎间盘突出Ⅳ期临床试验中期总结报告简述[J].中国疼痛医学杂志,2004,10(6):380.
13. 张达颖.胶原酶化学溶解术治疗腰椎间盘突出症的几点思考[J].中国疼痛医学杂志,2006,12(1):64.
14. Olmarker K, Rydevik B, Dahlin LB, et al. Effects of epidural and intrathecal application of collagenase in the lumbar spine: an experimental study in rabbits [J]. Spine, 1987, 12(5): 477-482.
15. Rydevik B, Brown MD, Ehira T, et al. Effects of collagenase on nerve tissue. An experimental study on acute and long-term effects in rabbits [J]. Spine, 1985, 10(6): 562-566.

(收稿日期:2007-01-29 修回日期:2007-09-24)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)