

椎体加压钉固定对脊柱侧凸山羊椎体生长板影响的组织学观察

郑国权, 宋迪煜, 孟传龙, 张巍, 张如意, 白林, 张永刚

(解放军总医院骨科 100853 北京市)

【摘要】目的:定量分析椎体加压钉(Staple)固定矫正山羊脊柱侧凸后椎体生长板的组织形态学变化,探讨 Staple 固定对侧凸椎体生长板的影响。**方法:**用单侧椎弓根螺钉不对称拴系的方法对 10 只 7~10 周龄雌性山羊建立脊柱侧凸模型。术前、术后均行脊柱后前位和侧位 X 线平片检查,术后每 4 周检查一次,观察山羊脊柱弯曲情况。8~10 周后,将成功建立脊柱侧凸模型的山羊随机分为对照组和 Staple 治疗组,两组山羊均取出后路拴系,Staple 治疗组取出拴系后在最大弯曲椎体的凸侧前路置入记忆合金 Staple。继续观察 8 周后完整获取两组山羊的顶椎上生长板、顶椎上一个椎体的下生长板以及两者之间的椎间盘,聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)包埋,不脱钙切片,甲苯胺蓝染色,镜下测量生长板生长方向上增殖层、肥大层高度。**结果:**10 只山羊中有 9 只术后 8~10 周内进展为明显的脊柱侧凸,Staple 治疗组($n=5$)和对照组($n=4$)的 Cobb 角分别为 $47.2^\circ \pm 11.2^\circ$ 、 $51.0^\circ \pm 17.7^\circ$,两组无显著性差异($P>0.05$)。Staple 治疗组在 Staple 置入后即刻 Cobb 角为 $34.8^\circ \pm 12.4^\circ$,与置入前比较无明显差异($P>0.05$);置入后 8 周为 $15.6^\circ \pm 11.7^\circ$,与置入后即刻比较明显变小($P<0.05$);对照组在拴系取出术后即刻和术后 8 周 Cobb 角无明显变化($P>0.05$)。Staple 治疗组生长板凸侧肥大层高度为 $29.17 \pm 4.38 \mu\text{m}$,凹侧为 $42.46 \pm 8.43 \mu\text{m}$,两侧有显著性差异($P<0.05$);凸侧增殖层高度为 $75.70 \pm 18.36 \mu\text{m}$,凹侧为 $81.65 \pm 12.49 \mu\text{m}$,两侧无显著性差异($P>0.05$)。对照组生长板肥大层与增殖层高度两侧均无显著性差异($P>0.05$)。**结论:**Staple 固定矫正脊柱侧凸重要的细胞学机制可能是逆转了生长板肥大层两侧原有的差异,使凸侧高度低于凹侧。

【关键词】椎体加压钉;脊柱侧凸;生长板;组织学

中图分类号:R687.3,R361 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-11-0857-04

Histomorphological study of the effect of Staple on the vertebral growth plates in goat scoliosis/ZHENG Guoquan, SONG Diyu, MENG Chuanlong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(11):857~860

【Abstract】Objective:To evaluate the role of vertebral growth plates in the correction of scoliosis by quantifying histomorphology of vertebral growth plates in goat scoliosis corrected by Staple.**Method:**Experimental scoliosis was created in 10 juvenile female goats (7~10 weeks) using unilateral pedicle screws asymmetric tethering. Serial X-ray postoperatively were performed every 4 weeks to investigate the development of the spinal curve. After a period of 8~10 weeks, goats were randomized into Staple treated group and control group. All tethers were removed in both groups while Staple group underwent anterior vertebral stapling using shape-memory-alloy Staples along the convexity of the maximal curvature after posterior tether being removed. After another 8 weeks of observation, the superior growth plate of apical vertebra and the inferior growth plate of proximal vertebra and the intervertebral disc between the two growth plates were completely harvested from all goats. After that, the specimens were embedded in polymethyl methacrylate (PMMA) and sliced undecalcified, stained with toluidine blue. The height of proliferative zonal and the hypertrophic zonal were measured respectively.**Result:**9 of 10 tethered goats had progressive scoliotic curves of significant magnitude during 8~10 weeks of tethering, with Cobb angle of $47.2^\circ \pm 11.2^\circ$ in Staple group ($n=5$) and $51.0^\circ \pm 17.7^\circ$ in control group ($n=4$), however there was no difference in two groups. In Staple group, the Cobb angle immediately after sta-

基金项目:科技部“863”课题(编号:2006AA02Z4D6)

第一作者简介:男(1976-),博士研究生,主治医师,研究方向:脊柱外科

电话:(010)66939439 E-mail:zgq951@yahoo.com.cn

通讯作者:张永刚

pling was $34.8^{\circ} \pm 12.4^{\circ}$, there was significant difference between before-stapling and after-stapling ($P < 0.05$). The Cobb angle at 8th weeks after the stapling was $15.6^{\circ} \pm 11.7^{\circ}$, and there was significant difference compare that immediately after the stapling ($P < 0.05$), whereas Cobb angles in control group had no change between immediately after removing the tether and 8th weeks after removing the tether ($P > 0.05$). In Staple treated group, the hypertrophic zonal height of concave side ($42.46 \pm 8.43 \mu\text{m}$) was higher than that of stapled side ($29.17 \pm 4.38 \mu\text{m}$) ($P < 0.05$), no difference existed in the proliferative zonal height between two sides ($P > 0.05$). In control group, there were no difference between the height of both hypertrophic and proliferative zone in concave side and those in convex side. **Conclusion:** The cytological mechanism of correction of scoliosis with Staple may be underlying the intrinsic difference in the hypertrophic zone of both sides, which cause the hypertrophic zonal height of concavity exceed that of convexity.

【Key words】 Staple; Scoliosis; Growth plate; Histomorphology

【Author's address】 Department of Orthopaedics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing, 100853, China

Staple固定是一种矫正脊柱侧凸的非融合技术,其作用机制为阻滞生长板的生长,从而达到调节脊柱生长^[1]、矫正脊柱侧凸的目的^[2]。脊柱的生长与椎体生长板关系密切,持续的机械性应力可以明显改变生长板的组织形态^[3,4]。以往研究主要集中在应力对正常生长板的影响,Staple固定对侧凸椎体生长板的影响是什么,其组织形态有何变化,目前少见报道。本实验通过观察山羊脊柱侧凸模型进行Staple固定矫形后椎体生长板的组织形态变化,定量分析凹凸两侧生长板的差异,旨在探讨Staple固定对侧凸椎体生长板的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用7~10周龄健康雌性山羊10只,体重6~8kg,由解放军总医院动物中心提供,已通过国家动物检疫中心检测。

1.2 山羊侧凸模型的建立及侧凸矫正

所有山羊采用单侧(左侧)椎弓根螺钉不对称拴系的方法^[5,6]建立脊柱侧凸动物模型,观察8~10周。将9只建模成功的山羊随机分为Staple治疗组($n=5$)和对照组($n=4$),建模完成时两组的Cobb角无统计学差异。对照组单纯后路取出椎弓根螺钉内固定系统,不进行侧凸矫形。Staple治疗组先后路手术取出椎弓根螺钉内固定系统,再进行前路Staple(镍钛记忆合金,钉齿间距6.5mm,深度4mm,北京恒世利德科技有限公司)固定矫形。

Staple矫形术与Braun等^[2]报道类似,主要过程如下:山羊左侧卧位,经第11或12肋间隙进入胸腔,显露胸椎及胸腰段。根据术前X线显示的弯曲特点,选择矫治节段。辨认椎体和椎间隙,在

侧前方置入已经撑开的记忆合金Staple钉,使每个Staple跨过一个椎间盘及相邻两个椎体生长板。Staple置入位置均在主弯区凸侧,在上端椎与下端椎之间根据椎体楔形变情况置入4~5枚Staple,用40℃~50℃的温盐水纱布覆盖Staple钉,使之变形恢复原始形状。按标准术式关闭胸腔。

两组山羊再继续观察8周,术后即刻以及术后每隔4周进行X线脊柱正侧位片检查,记录Cobb角,观察脊柱侧凸矫正情况。

1.3 标本处理

观察8周后,先用苯巴比妥或安定将山羊镇静,然后静脉推注15%的KCl溶液处死山羊,完整获取每只山羊的顶椎上一个Staple节段,包含顶椎上生长板、顶椎上一个椎体的下生长板以及两者之间的椎间盘,每个Staple节段包括凹凸两侧。将取材标本用40%酒精固定,经酒精梯度脱水、二甲苯透明后,用聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)包埋。每个标本冠状位正中切3张不脱钙切片,片厚50 μm ,各切片间至少间隔100 μm 。切片用甲苯胺蓝染色,用于观察生长板软骨。

1.4 生长板肥大层及增殖层高度测定

生长板肥大层及增殖层高度测定均在不脱钙的甲苯胺蓝染色切片中进行,用Olympus BX51生物显微镜及Olympus DP70图像采集系统获取典型的照片,图片像素为1360×1024,并将镜头旋转至图片边框垂直线与生长方向重合。

将获取的图片用Image-pro plus图像分析软件进行分析:载入图片,选定标尺使单位像素转换为 μm 。高倍显微镜下生长板可以分为静止层、肥大层、增殖层、钙化层。调用测量菜单,先手工确定

肥大层的上下界限:与串珠状排列的增殖软骨细胞相比,细胞较大、较圆的认为是上界;软骨细胞开始有凋亡表现、前缘基质开始矿化处认为是下界(图 1,后插页 I)。各界线至少标记 30 个点,系统自动将点拟合光滑的曲线。测量两线之间的平均距离即为肥大层的高度(hypertrophic zonal height)。生长板每侧各测 3 张切片,每张切片随机测 3 次,共测 9 次,最后再取上下生长板的平均值。用类似的方法测量增殖层高度(proliferative zonal height)。增殖层界限确定:增殖软骨细胞表现为串珠状,串珠开始处为上界,肥大层的上界即为增殖层的下界(图 1,后插页 I)。

1.5 统计方法

用 SPSS 15.0 进行统计分析。数据采用均数 $\pm$ 标准差表示,组间 Cobb 角比较采用独立样本 t 检验;组内 Cobb 角前后两个时间点的比较以及生长板细胞学参数的自身凹凸两侧比较采用自身配对 t 检验, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 脊柱 X 线观察

建模术后 8~10 周 9 只建模山羊进展为明显的脊柱侧凸,随机分组后组间 Cobb 角无统计学

差异($P>0.05$);Staple 治疗组($n=5$)治疗 8 周后平均矫正 $19.2^{\circ}\pm 8.1^{\circ}$,术后即刻 Cobb 角与治疗 8 周时 Cobb 角之间有显著性差异($P<0.05$,图 2a、b、c);对照组($n=4$)拴系取出术后 Cobb 角无明显变化,拴系取出术后即刻与取出术后 8 周时 Cobb 角无显著性差异($P>0.05$,图 3a、b、c,表 1)。

2.2 生长板的组织学观察

Staple 组山羊甲苯胺蓝染色低倍镜下可见椎间盘略有楔形变,凸向原凹侧。高倍镜下见生长板静止层、增殖层、肥大层、钙化层明显。凹凸两侧增殖层细胞均明显呈串珠状排列,但凹侧(非 Staple 侧)增殖层软骨细胞核明显。Staple 侧肥大软骨细胞相对较少,形态不典型(图 4a,后插页 I);生长板凹侧肥大层明显,肥大软骨细胞较多,细胞较圆且厚度较大,胞浆丰富(图 4b,后插页 I)。对照组凹凸两侧生长板镜下无明显差别(图 5a、b,后插页 I)。

2.3 生长板肥大层及增殖层高度的测量

Staple 组生长板凸侧肥大层高度明显小于凹侧,两侧差异有显著性($P<0.05$),但增殖层高度两侧无显著性差异($P>0.05$);对照组生长板肥大层与增殖层高度两侧均无显著性差异($P>0.05$,表 2)。



图 2 Staple 治疗组 a 术前 X 线侧位片示 Cobb 角 56° b 术后即刻 Cobb 角为 48° c 术后 10 周 Cobb 角减小为 20°
图 3 对照组 a 术前 X 线侧位片示 Cobb 角为 64° b 去除拴系后即刻 Cobb 角为 62° c 术后 8 周 Cobb 角仍为 62°

表 1 Staple 组和对照组山羊不同时间点的脊柱侧凸 Cobb 角 ($\bar{x}\pm s, ^{\circ}$)

	n	建模后	取出拴系/Staple 术后当天	术后 8 周
Staple 组	5	47.2 ± 11.2^{①}	34.8 ± 12.4^{②③}	15.6 ± 11.7^{②④}
对照组	4	51.0 ± 17.7	49.3 ± 18.0	49.0 ± 17.6

注:与对照组相比① $P>0.05$,② $P<0.05$;③与同组建模后比较 $P>0.05$;④与同组术后当天比较 $P<0.05$

表 2 Staple 组和对照组山羊脊柱侧凸生长板肥大层及增殖层高度测量结果 ($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$)

	n	增殖层		肥大层	
		凸侧	凹侧	凸侧	凹侧
Staple 组	5	75.70 ± 18.36	81.65 ± 12.49^{①}	29.17 ± 4.38	42.46 ± 8.43^{②}
对照组	4	89.37 ± 8.10	81.83 ± 1.28^{①}	32.10 ± 0.92	31.95 ± 1.19^{①}

注:与同组凸侧相比① $P>0.05$;② $P<0.05$

3 讨论

有关正常山羊脊柱 Staple 固定半侧骨骺阻滞实验结果^[1]显示了 Staple 固定对骨骺的加压阻滞功能,可以造成正常脊柱一定的侧凸。本实验结果表明,Staple 固定可以调节脊柱生长,在一定程度上矫正了畸形,在 8 周观察期内 Staple 组平均矫正 $19.2^{\circ} \pm 8.1^{\circ}$,而对照组 Cobb 角无明显变化,这一结果与 Braun 等^[2]实验结果基本一致。

椎体的纵向生长是通过生长板的软骨内骨化过程完成的^[7]。Staple 固定对脊柱生长进行调节,必定会影响生长板的形态与功能。本研究发现,Staple 治疗侧凸 8 周后,最为明显的改变是肥大层。与凸侧(Staple 侧)相比,Staple 组凹侧肥大层明显,肥大软骨细胞较多且典型,细胞较圆、厚度较大,胞浆丰富。进一步的定量分析证实凹侧肥大层高度明显大于 Staple 侧。而在对照组中肥大层高度两侧是基本一致的。提示生长方向上肥大层高度的变化可能是 Staple 矫正脊柱侧凸重要的细胞学机制。肥大软骨细胞被认为是反应生长率变化最好的指标^[8]。已有研究^[9]表明,长骨生长速率的不同,40%~50%是由肥大层软骨细胞肥大程度不同造成的,30%~40%源于软骨细胞分泌的软骨基质,剩余 10%则是由于软骨细胞增殖程度不同。Stokes 等^[3]通过施加纵向压力和张力于小鼠第 7 尾椎,结果表明,受压力和张力椎体的生长率分别是对照椎体的 52%和 113%,在纵向生长方向上生长板肥大层的高度及肥大软骨细胞的肥大程度与椎体生长率明显正相关;受压椎体中的肥大层高度、软骨细胞平均高度以及细胞高度增加量分别是对照组的 87%、85%和 78%。

Bylski-Austrow 等^[4]用类似 Staple 的置入物对正常猪的胸椎进行短节段加压,术后 8 周影像学显示脊柱侧凸形成;组织学结果表明,在冠状面上从凸侧到加压侧,生长板肥大层高度、肥大软骨细胞高度及宽度都逐渐减小;置钉侧肥大层的平均高度是凸侧的 80%,肥大软骨细胞高度是凸侧的 85%,而细胞宽度的差异相对比较轻微。我们前期的研究^[10]也表明,山羊侧凸模型建立时凸侧肥大层高度明显大于加压侧,加压侧肥大层软骨细胞数量少、形态异常、排列不规则。因此在侧凸矫正中,Staple 需要明显逆转肥大层两侧原有的对比。Staple 对侧凸椎体凸侧持续的加压力可能明显改变了肥大层细胞的活性和功能,使原本比较高的肥大层高度逐渐降低,最终抑制凸侧生长,而相对

促进凹侧生长。肥大层无论是正常还是异常,其对应力的反应性似乎是类似的。

在 Staple 治疗后椎体生长板两侧增殖层高度基本一致,但是对照组两侧也无差异,因此目前无法肯定 Staple 对其有何影响。可能是增殖层对压力反应的阈值比较高,或者敏感度较低,因有研究表明^[11],压应力可以造成生长板增殖层高度的降低。也有可能是建模造成的增殖层病理状态改变了其对应力的反应。

另外,本研究中对照组没有开胸,是不完全对照,但开胸手术本身对脊柱生长板影响有限,且本研究在定量观察生长板时采用的是自身凹凸侧对照,设计不足对本研究结果影响较小。

4 参考文献

1. 张永刚,张巍,郑国权,等.山羊胸椎半侧骨骺加压矫形钉固定抑制脊柱生长的研究[J].中华外科杂志,2007,45(8):537-539.
2. Braun JT, Ogilvie JW, Akyuz E, et al. Fusionless scoliosis correction using a shape memory alloy staple in the anterior thoracic spine of the immature goat [J]. Spine, 2004, 29(18): 1980-1989.
3. Stokes IA, Mente PL, Iatridis JC, et al. Enlargement of growth plate chondrocytes modulated by sustained mechanical loading [J]. J Bone Joint Surg Am, 2002, 84(10): 1842-1848.
4. Bylski-Austrow DI, Wall EJ, Glos DL, et al. Spinal hemiepiphyseodesis correlates with physal histomorphometric gradients [J]. Stud Health Technol Inform, 2006, 123: 261-266.
5. Zhang Y, Wang Y, Zheng G, et al. Unilateral pedicle screws asymmetric tethering: an innovative method to create idiopathic deformity [J]. J Orthop Surg, 2007, 2: 18.
6. 郑国权,张永刚,张巍,等.单侧椎弓根钉内固定建立新型山羊脊柱侧凸模型的实验研究[J].脊柱外科杂志,2007,5(1): 29-32.
7. Dickson RA, Deacon P. Spinal growth [J]. J Bone Joint Surg Br, 1987, 69(5): 690-692.
8. Alberty A, Peltonen J, Ritsila V. Effects of distraction and compression on proliferation of growth plate chondrocytes: a study in rabbits [J]. Acta Orthop Scand, 1993, 64(4): 449-455.
9. Wilsman NJ, Farnum CE, Leiferman EM, et al. Differential growth by growth plates as a function of multiple parameters of chondrocytic kinetics [J]. J Orthop Res, 1996, 14(6): 927-936.
10. 宋迪煜,郑国权,张巍,等.不对称力学负荷对山羊脊柱生长板影响的组织学观察[J].中国脊柱脊髓杂志,2008,18(3): 218-221.
11. 张箐,吴守义,沈金根,等.压力和张力对骨骺板软骨细胞的影响 [J].中华小儿外科杂志,1995,16(4): 227-228.

(收稿日期:2008-06-03 修回日期:2008-09-17)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)