

基础研究

青少年特发性脊柱侧凸患者终板软骨的组织形态学研究

马兆龙¹, 邱 勇¹, 朱 锋¹, 王守丰¹, 吴 波²

(1 南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 210008 南京市; 2 南京军区总医院病理科 210002 南京市)

【摘要】目的:观察青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)患者终板软骨的组织学形态,探讨其与 AIS 发生、发展的关系。**方法:**20 例 AIS 患者,前路手术时分别获取 20 份顶椎及 18 份下端椎终板软骨,每份均包含凸侧与凹侧。切片行 HE 染色,光镜下观察终板软骨组织形态,采用病理图像分析系统测量终板软骨肥大区的厚度、细胞巢面积、巢内细胞数及增殖区细胞数(个/视野)。参照 Enneking 法设定曲度因子(factor of curve, FC),将顶椎标本分为 FC $\leq$ 6 组(11 例)和 FC>6 组(9 例)。比较上述指标在不同部位、不同 FC 分组下的差异。**结果:**顶椎凸侧的上述指标均显著高于凹侧($P<0.05$);下端椎仅凸侧肥大区细胞巢平均面积显著大于凹侧($P<0.05$);顶椎与下端椎间同侧比较,仅下端椎凹侧肥大区的细胞数显著大于顶椎($P<0.05$)。FC>6 组的顶椎凸侧和凹侧终板软骨肥大区的巢内细胞数显著小于 FC $\leq$ 6 组($P<0.05$),FC>6 组的凸侧增殖区细胞数也显著小于 FC $\leq$ 6 组($P<0.05$)。**结论:**AIS 患者终板软骨的组织学变化特征更倾向于与脊柱不同部位、不同状态下机械应力差异有关的继发性改变;但组织学变化与机械应力变化之间不完全平行,AIS 的发生、发展可能伴有生物力学以外的因素。

【关键词】青少年特发性脊柱侧凸;组织形态学;终板软骨

中图分类号:R682.3, R322.7 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-09-0660-05

Histomorphological study of the spinal endplate cartilages in adolescent idiopathic scoliosis/MA Zhao-long, QIU Yong, ZHU Feng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(9):660-664

【Abstract】 Objective:To investigate the histomorphology of endplate cartilages in apex and lower extreme vertebrae of patients with adolescent idiopathic scoliosis (AIS) and explore the correlation between the histomorphology and the genesis and progress of AIS.**Method:**Twenty cases with AIS were recruited in the study. 20 samples of endplate cartilages in apex vertebra and 18 ones in inferior extreme vertebra were obtained respectively through anterior approach operation. Each included the convex and concave side. Hematoxylin & eosin (HE) staining was employed and the structure of endplate cartilage was observed under light microscope, then the pathological image analysis system was used for quantitative measurement of thickness of the hypertrophic zone in endplate cartilage, the average area of cell-nest, the average number of cells inside cell-nest or the proliferative zone of each visual field (piece/visual field). Factor of curve (FC) was determined according to Enneking method, and samples from apex vertebra were divided into FC $\leq$ 6 group (11 cases) and FC>6 group (9 cases). The above measurements between different parts or groups were compared. **Result:**In the apex vertebrae, the all measurements of the convex side were significantly higher than that of the concave side ($P<0.05$). In the extreme vertebrae, only the average area of cell-nest in the hypertrophic zone of the convex side was significantly higher than that of the concave side ($P<0.05$). On the comparison of ipsilateral side, only the average number of cells inside cell-nest in the concave side in the extreme vertebrae was significantly higher than that in the apex vertebrae ($P<0.05$). No matter whether in the convex or concave side of the apex vertebrae, the average number of cells inside cell-nest was significantly lower in FC>6 group than in FC $\leq$ 6 group ($P<0.05$). For the proliferative zone of convex side, the average number of cells for each visual field was significantly lower in FC>6 group compared with that of FC $\leq$ 6 group ($P<0.05$). **Conclusion:**The

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30672131),江苏省卫生厅科研重大项目基金(K200610)

第一作者简介:男(1965-),副主任医师,医学博士,研究方向:脊柱外科(现工作于南京市上海梅山医院骨科 210039)

电话:(025)86364029 E-mail:njmzlong@163.com

histomorphological changes of the endplate cartilage are likely to be the secondary changes associated with the difference of mechanical stress occurring in various parts of the spine under different state. There may exist the factors beyond biomechanics on the genesis and progress of AIS as the changes between histomorphology and mechanical stress were not totally paralleled.

【Key words】 Adolescent idiopathic scoliosis; Histomorphology; Endplate cartilage

【Author's address】 Spinal Surgery, Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, 210008, China

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS) 是青少年脊柱畸形最常见的类型, 临床诊断和治疗虽已取得较大进展, 但病因及发病机理尚未阐明。目前认为 AIS 系多因素发病, 临床众多现象提示生长发育与 AIS 的发生及发展有着肯定的联系^[1-3]。围绕 AIS 发病的生长发育机理已提出许多假说^[4-6], 其中生长发育失衡已被公认为 AIS 的发生原因之一, 有很多证据表明 AIS 患者存在软骨内成骨异常^[4-8]。AIS 患者身材瘦高及四肢纤细修长的外型特征提示其体内存在以软骨内成骨活跃为主的异常^[2,3,6]。脊柱终板软骨组织结构类似于长骨骨髓, 具有软骨内成骨的生长方式^[9], 且椎体的纵向生长以软骨内成骨为主^[6,9], 因而脊柱终板软骨值得研究。由于对 AIS 患者椎体终板软骨标本取材上存在困难和其他限制, 目前对其组织学研究较少。本研究通过观测 AIS 患者顶椎及下端椎终板软骨组织形态, 了解其结构特征, 以分析该组织形态是否存在原发性或继发性异常, 进而探讨它们与 AIS 发生、发展的关系。

1 资料和方法

1.1 一般资料

2004 年 11 月~2006 年 4 月在我科接受前路手术的 AIS 患者 20 例, 均为女性; 年龄 12~17 岁, 平均 14.4 ± 1.5 岁; 术前 Cobb 角 $25^\circ \sim 105^\circ$, 平均 $47.4^\circ \pm 20.4^\circ$; Risser 分级 0~3, 平均 2.0 ± 0.4 。Lenke 1a 型 3 例, 1b 型 5 例, 1c 型 6 例, 5c 型 4 例, 6c 型 2 例。术前均接受详细的体格和神经系统检查、颅脑和全脊髓 MRI, 排除可能的神经肌源性、结缔组织性、骨骺发育不良等非特异性临床病因。

1.2 标本采集和制备

每例患者前路手术方案均包含椎体间融合术, 术中暴露融合区域后, 从椎体凸侧前方截取终板软骨, 取材部位为顶椎区、下端椎区, 共截取 20 份顶椎、18 份下端椎终板软骨, 每份均含凸侧、

凹侧, 其中 10 例顶椎标本为整块截取, $3 \times 2 \text{ cm}$ 大, 另 10 例为凸、凹侧分离截取; 18 例下端椎标本中 12 例为凸、凹侧分离截取。截取后立即用 4% 多聚甲醛固定 24h; 于 0.5 mol/L 的乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) 内脱钙 2~3 周; 脱钙后常规石蜡包埋, 自动超薄切片机切片, 切片方向为自凸侧向凹侧沿终板软骨中线并垂直于终板面, 凸、凹侧分离截取者标注位置, 切片厚度为 $5 \mu\text{m}$, 每份标本凸侧、凹侧各切片 5 张。

1.3 组织学检查

1.3.1 苏木素-伊红(HE)染色 每份标本凸侧与凹侧各取 2 张切片, 将相匹配的凸侧与凹侧切片组织置于 1 张玻片上进行 HE 染色, 光镜下观察生长板软骨细胞各层结构变化; 通过数字图像采集仪采集图片, 分别于同一张载玻片的凸/凹侧的同区层采集图片各 3 张; 直接输入同机的病理图像分析系统(HMIAS-2000)进行测量。

1.3.2 测量指标 测量顶椎和下端椎终板软骨肥大区的厚度、细胞巢面积、巢内细胞数; 增殖区细胞数($\times 400$, 光镜)。每项指标重复测 2 次, 取均值并记录。

1.4 统计学处理

参照 Enneking 法^[7]设定曲度因子(factor of curve, FC), $\text{FC} = \text{Cobb 角角度值} \div \text{该曲度内包含的椎体数}$, 如 Cobb 角度值为 49° , 含 7 个椎体, 则曲度因子 = 7。按其大小分为 $\text{FC} \leq 6$ 组(11 例)和 $\text{FC} > 6$ 组(9 例), 比较不同曲度对观测指标的影响。

采用 SPSS 13 软件包进行分析, 所有数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 将测量结果按凸侧与凹侧、顶椎与下端椎的同侧、顶椎的不同曲度因子组($\text{F} \leq 6$ 组和 $\text{F} > 6$ 组)进行配对比较; 每组数据均进行正态分布检验、组间配对 t 检验, 设定 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 组织形态

顶椎及下端椎终板软骨内均有类似四肢长骨骺板样软骨内成骨表现,但分区结构不如四肢典型,可大致分辨出静止区、增殖区、肥大区、钙化区(图 1,后插页 II)。肥大区境界相对清晰,而静止区、增殖区分界不清。静止区邻近髓核组织,软骨细胞呈小圆形,软骨基质丰富;增殖区细胞排列紧密,细胞体积增大,胞浆透亮;部分标本可见增殖区和肥大区交界处细胞呈柱状样排列结构;肥大区细胞体积大,胞浆丰富,有较大的细胞巢,巢内规则排列细胞数个到十几个不等;钙化区有血管长入及钙沉积。在顶椎凸侧终板软骨板,上述各区结构相对凹侧更清晰、厚度更大、细胞排列更规则和密集、细胞巢更多更大;在下端椎,凸、凹侧之间差异相对较小(图 1,2,后插页 II)。

2.2 测量结果

见表 1。顶椎凸侧肥大区的厚度、细胞巢面积、巢内细胞数均显著高于凹侧($P<0.05$);下端椎仅凸侧肥大区细胞巢面积显著大于凹侧($P<0.05$);顶椎与下端椎间同侧比较,仅下端椎凹侧肥大区的巢内细胞数显著大于顶椎($P<0.05$)。顶椎凸侧增殖区的细胞数显著高于凹侧($P<0.05$),下端椎凸、凹侧间无显著性差异($P>0.05$),顶椎与下端椎间同侧比较也无显著性差异($P>0.05$)。

FC>6 组的顶椎凸侧和凹侧终板软骨肥大区的巢内细胞数均显著小于 FC≤6 组($P<0.05$),FC>6 组的凸侧增殖区细胞数也显著小于 FC≤6 组($P<0.05$)(表 2)。

3 讨论

3.1 生长发育因素与 AIS 发生和发展的关系

目前围绕 AIS 发病的生长发育因素的研究大致归为两类,一是假设由偏心性生长模式启动侧凸,即于对称性双侧中的一方生长过快触发侧凸,再由原发因素和继发性因素共同加速侧凸进展;另一类假设生长模式正常,但存在侧凸进展的病理基础。侧凸发生的启动因素、侧凸进展的发展因素可能是同一因素,也可能为不同因素。

Roaf^[4]在解剖学测量基础上提出了“脊柱生长失衡假说”。Porter^[5]在解剖学研究基础上提出了“神经-骨生长失衡假说”(uncoupled neuro-osseo growth)。Guo 等^[6]利用 MRI 测量脊柱结构并提出“软骨内成骨-膜内成骨失衡假说”(uncoupled endochondral-membranous bone formation)。Millner 等^[8]认为椎体前方生长速度较快产生了脊柱旋转不稳的力学基础。Goto^[1]和 Azegami 等^[10]通过有限元数学模型模拟出脊柱前柱生长快于后柱时便可导致脊柱的旋转侧凸畸形。这些假说的发生前提均是脊柱的生长发育失衡。

Millner 等^[8]推测 AIS 好发于胸段并且总向右侧旋转是基于解剖原因,即中下胸段胸椎正常状态下即存在轻微的不对称,构成不稳定的潜在结构基础,在此基础上,内外环境的很小改变即可以启动上述脊柱生长失衡等病理过程。一旦出现脊柱不对称,则遵循 Hueter-Volkman 定律^[11,12],即慢性轴向非对称性负荷下,压力抑制软骨生长,张

表 1 20 例 AIS 患者顶椎与下端椎终板软骨肥大区和增殖区组织形态学比较

			肥大区			增殖区细胞数
			厚度(μm)	细胞巢面积(μm ²)	细胞数(个/巢)	(个/视野)
顶椎	凸侧	20	254±111	5269±1833	9.4±3.9	37.8±15.4
	凹侧	20	162±102 ^①	3181±1167 ^①	4.2±2.7 ^①	23.2±10.7 ^①
下端椎	凸侧	18	199±103	4599±1324	9.6±3.2	37.0±14.5
	凹侧	18	178±92	3767±877 ^①	8.0±4.2 ^②	29.2±9.6

注:①与相同椎体凸侧比较 $P<0.05$,②与顶椎同侧比较 $P<0.05$

表 2 20 例 AIS 患者不同曲度因子组顶椎肥大区和增殖区的组织形态学比较

			肥大区			增殖区细胞数
			厚度(μm)	细胞巢面积(μm ²)	细胞数(个/巢)	(个/视野)
凸侧	FC≤6	11	274±145	5247±2036	11.6±2.8	44.8±2.1
	FC>6	9	221±45	5235±1701	7.2±3.9 ^①	32.8±16.5 ^①
凹侧	FC≤6	11	201±123	3523±1168	5.8±2.6	25.5±11.1
	FC>6	9	123±33	2908±1099	2.7±1.4 ^①	23.2±11.0

注:①与同侧FC≤6 组比较 $P<0.05$

力促进软骨生长。由此进一步加重压力侧与张力侧生长失衡,并形成“恶性循环”^[4]。但 Millner 设定的初始原因尚未被普遍接受。

3.2 软骨内成骨与 AIS 发生、发展的关系

可以发现,上述基于生长发育因素导致 AIS 的假说大多涉及到一个共同的组织学过程,即脊柱终板软骨的软骨内成骨。胚胎学研究显示单个脊椎存在多个次级骨化中心^[16]。这些骨化中心之间软骨内成骨过程的差异和联系值得关注。

围绕脊柱软骨内成骨,有学者^[14-16]试图论证不同个体间、同一个体不同部位间(如脊柱前/后柱、椎体凸/凹侧间)的软骨细胞增殖活性存在差异,并由此导致“脊柱生长失衡”,但证据尚不充分。Enneking 等^[7]通过组织切片测量 AIS 患者关节突软骨组织级别(histologic grade)以表示组织增殖活跃程度高低,其测量结果显示该指标凸侧小于凹侧,且轻度侧凸组与重度侧凸组无显著性差异,均未遵循 Hueter-Volkmann 定律。由此他推断 AIS 产生于骨外因素,骨和软骨的变化仅仅是这些因素的继发改变。可见,各种内外因素导致软骨内成骨模式改变可能是 AIS 发生发展的基本途径。

3.3 软骨细胞增殖活跃度观测指标的设定及意义

Farnum 等^[9]认为在软骨内成骨,维持骨纵向生长的三项关键指标包括增殖区细胞数量、肥大区细胞体积和基质的产生量,它们同时也是评判细胞增殖活跃程度的最基本、最简易的指标。终板软骨的肥大区境界相对清晰,而静止区、增殖区分界不清,故仅测量肥大区厚度。据此我们选择了肥大区的厚度、细胞巢面积、巢内细胞数和增殖区细胞数作为观测指标,这些观察对象位于脊柱终板软骨的增殖区、肥大区,该两区结构在本组标本上稳定存在。细胞数多、细胞巢的面积大、软骨层厚度大,代表组织增殖活跃度高。

组织形态结果显示终板软骨内有类似四肢长骨骺板样软骨内成骨表现,这是本研究的组织学基础。同时按照 Farnum 三项关键指标比较凸/凹侧大体结构,显示凸侧细胞数、细胞巢的面积、软骨层厚度均大于凹侧,提示顶椎凸侧的软骨细胞有更高的增殖活跃度,推断由此可以导致脊柱生长失衡。

本组测量结果显示,顶椎凸侧各项指标显著

高于凹侧($P<0.05$),符合 Hueter-Volkmann 定律,推断这些差异可能是机械应力作用下的继发性改变。在下端椎,仅凸侧肥大区细胞巢面积显著大于凹侧($P<0.05$),假定端椎凸/凹侧间机械应力基本对等,则该表现仍近似于符合 Hueter-Volkmann 定律。顶椎与下端椎间同侧比较,仅凹侧肥大区细胞数有显著性差异($P<0.05$),可能与顶椎/端椎同一侧的机械应力差异较小有关,仍近似于符合 Hueter-Volkmann 定律。这些组织学变化特征都倾向于与脊柱凸/凹侧、顶椎/端椎间机械应力差异相关的继发性改变。

为了进一步比较不同曲度或不一样大小的机械应力状态对观察指标的影响,我们参照 Enneking 法^[7]设定了曲度因子(factor of curve, FC),按其大小分为两组。结果显示,在顶椎,无论肥大区、增殖区,凸侧的细胞数在张应力更大的 FC>6 组反而更少,即组织增殖活跃程度更低,提示组织学改变与机械应力变化之间不完全平行,不符合 Hueter-Volkmann 定律,推断可能存在生物力学以外促进因素,或者该力学因素超出了 Hueter-Volkmann 定律适用的力学强度的阈值范围。

综上所述,本组顶椎凸侧的软骨细胞有更高的增殖活跃度,终板软骨的组织学变化特征更倾向于与脊柱凸/凹侧、顶椎/端椎间机械应力差异有关的继发性改变,其中未发现启动脊柱侧凸的原发性因素;即使属于继发性改变,仍然会作为侧凸进展的发展因素加速侧凸的“恶性循环”式进展,即前述的模式二状态。同时在 Enneking 法分组状态下,组织学变化与机械应力变化之间不完全平行,提示 AIS 的发生、发展可能伴有生物力学以外因素,仍需进一步明确。

4 参考文献

1. Goto M, Kawakami N, Azegami H, et al. Buckling and bone modeling as factors in the development of idiopathic scoliosis [J]. Spine, 2003, 28(4): 364-370.
2. Cheung CSK, Lee WTK, Tse YK, et al. Abnormal peri-pubertal anthropometric measurements and growth pattern in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 598 patients [J]. Spine, 2003, 28(18): 2152-2157.
3. Ylikoski M. Height of girls with adolescent idiopathic scoliosis [J]. Eur Spine J, 2003, 12(3): 288-291.
4. Roaf R. Vertebral growth and its mechanical control [J]. J Bone Joint Surg Br, 1960, 42(1): 40-59.
5. Porter RW. The pathogenesis of idiopathic scoliosis: uncoupled

- neuro-osseous growth[J].Eur Spine J,2001,10(6):473-481.
6. Guo X, Chau WW, Chan YL, et al. Relative anterior spinal overgrowth in adolescent idiopathic sciliosis;results of disproportionate endochondral-membranous bone growth [J].J Bone Joint Surg Br,2003,85(7):1026-1031.
7. Enneking WF, Harrington P. Pathological changes in scoliosis [J].J Bone Joint Surg Am,1969,51(1):165-184.
8. Millner PA,Dickson RA. Idiopathic scoliosis;biomechanics and biology [J].Eur Spine J,1996,5(6):362-373.
9. Farnum CE, Wilsman NJ. Converting a differentiation cascade into longitudinal growth;stereology and analysis of transgenic animals as tools for understanding growth plate function [J].Curr Opin Orthop,2001,12(5):428-433.
10. Azegami H,Murachi S,Kitoh J, et al. Etiology of idiopathic scoliosis [J].Clin Orthop,1998,12(357):229-236.
11. Aronsson DD,Stokes IAF,Rosovsky J,et al.Mechanical modulation of calf tail vertebral growth;implications for scoliosis progression[J].J Spinal Disord,1999,12(2):141-146.
12. Stokes IA,Spence H,Aronsson DD,et al.Mechanical modulation of vertebral body growth;implications for scoliosis progression [J].Spine,1996,21(10):1162-1167.
13. Ganey TM, Ogden JA. Development and Maturation of the Axial Skeleton [M].Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins,2001.3-54.
14. 朱锋,邱勇,孟魁,等.青少年特发性脊柱侧凸脊柱前后柱软骨骨细胞的增殖和凋亡[J].中华外科杂志,2004,42 (20):1221-1224.
15. 孙强,邱勇,刘臻,等.SOX9 在青少年特发性脊柱侧凸患者骨髓间质干细胞的表达及意义[J].中国脊柱脊髓杂志,2006,16(3):216-219.
16. Antoniou J,Arlot V,Goswami T,et al. Elevated synthetic activity in the convex side of scoliotic intervertebral discs and endplates compared with normal tissues [J].Spine,2001,26(10):E198-206.

(收稿日期:2008-03-24 修回日期:2008-07-22)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 李伟霞)

消息

全国骨科主任临床诊疗经验与手术操作技能技巧演示高研班

中国医师协会定于 2008 年 10 月 10 日至 17 日召开国家级继续医学教育项目培训班,就骨关节、关节镜、脊柱、骨创伤、骨肿瘤、骨神经、小儿骨科、医疗纠纷等八个方面邀请全国知名院士及近 30 多位著名专家授课。

关节外科:腕关节损伤的诊断与治疗技巧;微创小切口人工全髋关节置换术要点与对策;规范的人工关节置换及失误处理;人工关节置换后感染的治疗;人工髋关节翻修的要点及技巧;膝关节置换要点及手术技巧;膝关节前交叉韧带重建术的操作要点及失误分析;关节镜创新技术与临床应用系列研究;肩关节置换术操作要点、失误分析及并发症预防。脊柱外科:寰枢椎椎弓根螺钉的操作要点;枕颈部畸形的诊治进展;颈胸腰椎管狭窄诊治进展及手术操作技巧;C1、C2 脱位外科治疗进展及策略;重度腰椎滑脱的手术操作技巧、要点及失误分析;下腰椎手术失败原因分析及再手术治疗;PKP 手术操作技巧、要点及失误分析;胸腰椎椎弓根螺钉置入的操作要点及失误分析;各类侧凸畸形螺钉布点的原则及融合规则;脊柱后凸畸形外科治疗经验技巧与治疗误区;各种胸腰椎前路手术的操作技巧、要点及失误分析;脊柱侧凸后路矫治术中钩棒系统具体操作技巧、要点;先天性半椎体切除的手术技巧;颈椎前路各种手术的操作技巧、要点及失误分析;颈椎后路侧块螺钉及椎弓根螺钉操作技巧、要点及失误分析;脊柱非融合技术应用技巧。骨肿瘤:常见骨与软组织肉瘤的化疗、放疗及保肢手术操作要点;脊柱常见肿瘤及恶性肿瘤的化疗进展及手术技巧;盆底部肿瘤手术操作技巧及注意事项;骶骨肿瘤手术操作技巧、要点及失误分析。骨创伤:微创技术在骨科的应用;骨盆髌臼骨折诊治进展及手术操作要点及失误分析;踝关节几种不同损伤的诊疗和治疗技巧;踝外翻矫正手术的操作技巧、要点及失误分析;内镜下治疗腰椎间盘突出的技巧;常用外固定架在骨激光术中的操作技巧;Ilizarov 架的使用操作技巧及在肢体矫形术中的运用。小儿骨科:发育性髋脱位的系统化治疗;儿童骨折治疗的现状与进展。

授课专家:王澍寰、党耕町、李子荣、周勇刚、寇伯龙、刘玉杰、黄公怡、邹德威、叶启彬、王以鹏、孙宇、郭卫、徐万鹏、吴兴宝、张铁良、张建中、夏核桃、秦泗河、杨建平、郭源等国内知名专家。

详情请致电(010)81519114 或 13501321596 陈老师咨询或索要通知文件。