

基础研究

不对称力学负荷对山羊脊柱生长板影响的组织学观察

宋迪煜, 郑国权, 张巍, 张如意, 孟传龙, 白林, 张永刚

(解放军总医院骨科 100853 北京市)

【摘要】目的:观察不对称力学负荷对山羊脊柱生长板的影响,探讨机械性因素调节脊柱生长的可能机制。**方法:**9 只未成年雌性山羊随机分为实验组($n=6$)和对照组($n=3$),实验组采用单侧椎弓根螺钉不对称拴系的方法建立脊柱侧凸模型;对照组只作相同切口暴露,不进行固定。8 周后获取侧凸顶椎(对照组相应节段)上下椎间盘及生长板,聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)包埋,不脱钙切片,Giemsa 染色,镜下观察生长板情况。**结果:**对照组两侧生长板无明显差异;实验组非加压侧生长板增殖肥大层高度明显大于加压侧。实验组加压侧增殖肥大层软骨细胞数量少、形态异常、排列不规则,非加压侧软骨细胞增殖活跃,肥大层明显增厚;加压侧生长板最边缘的骺板内软骨细胞朝应力方向向外排列。**结论:**不对称力学负荷可导致生长板两侧软骨细胞增殖、肥大、形态及排列等的差异,并改变软骨内成骨方向,最终可能改变脊柱的生长方向。

【关键词】脊柱侧凸;机械性调节;脊柱生长;生长板

中图分类号:R682.3,R361 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-03-0218-04

The effect of asymmetrical loading on the growth plate of goat's spine:a histomorphological study/
SONG Diyu,ZHENG Guoquan,ZHANG Wei,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2008,18
(3):218~221

【Abstract】 Objective:To investigate the possible mechanism of the mechanical modulation of spinal growth through analyzing the effect of asymmetrical loading on the growth plate of goat's spine.**Method:**Nine premature female goats were divided randomly into experimental group ($n=6$) and control group ($n=3$).In experimental group scoliosis was created using unilateral pedicle screws asymmetric tethering and in control group the spine of goats were exposed without internal fixation.Eight weeks later,growth plates of apical vertebra and two adjacent intervertebral discs were harvested.All specimens were embedded with polymethyl methacrylate (PMMA),sliced undecalcified and stained with Giemsa,then the histomorphological change of the growth plate was investigated.**Result:**There was no difference between both sides of growth plate in the control group,while in the experimental group the height of proliferation and hypertrophy zones of the non-loading side was obviously higher than that of the loading side.In the loading side,the number of chondrocytes of proliferation and hypertrophy zones was less than normal,and the cell's morph was abnormal with irregular arrangement of chondrocytes.However,proliferation of chondrocytes was active and the hypertrophy zone was thickening in the non-loading side.In addition,the chondrocytes in the edge of loading side were aligned to the direction of the load rather than to the ossify layer.**Conclusion:**The asymmetrical loading on spine can result in difference of proliferation,hypertrophy,morph and arrangement of chondrocytes between loading and non-loading side of growth plate and also result in the change of the direction of endochondral ossification,which may eventually modulate the growth of spine.

【Key words】 Scoliosis; Mechanical modulation; Spinal growth; Growth plate

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

现有的研究^[1-4]表明,力学负荷能够调节脊柱

的生长,在脊柱侧凸进展中有着重要作用,而脊柱的生长又与生长板关系密切。本研究利用单侧椎弓根螺钉不对称拴系的方法建立山羊脊柱侧凸模型,对侧凸凸侧与凹侧的生长板进行组织学观察,并同正常生长板对照,旨在探讨生长板在不对称

基金项目:科技部“863”专题课题(编号:2006AA02Z4D6)

第一作者简介:男(1979-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(010)66936902 E-mail:sondysdy@yahoo.cn

通讯作者:张永刚,主任医师,教授,博士生导师

力学负荷调节脊柱生长中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及模型制作

选用 6~8 周龄健康雌性山羊 9 只 (体重 5~8kg, 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), 随机分为实验组 ($n=6$) 和对照组 ($n=3$)。参照文献^[5]建立脊柱侧凸模型: 山羊麻醉后俯卧位, 脊柱右侧旁正中切口, 钝性游离皮肤至左侧。分别在 T6、T7 和 L1、L2 或 L2、L3 水平用血管钳钝性分离左侧竖脊肌, 显露横突, 实验组在 T6、T7 和 L1、L2 或 L2、L3 左侧各置入 1 枚特制椎弓根螺钉, 共 4 枚。椎弓根钉置入完毕后, 显露右侧第 9~12 肋, 在距肋骨头约 3cm 处切除 2cm 肋骨。根据脊柱的柔韧性评估脊柱可造成的弯曲角度对不锈钢棒进行预弯。将预弯好的不锈钢棒水平穿过竖脊肌, 上下两端固定于预置的椎弓根螺钉, 以造成脊柱左侧的不对称拴系。对照组只做相同切口显露, 不进行内固定。

1.3 观察方法

所有山羊术后即刻以及术后 4 周、8 周分别进行 X 线胸椎正侧位检查, 记录 Cobb 角, 观察脊柱侧凸进展情况。8 周后处死山羊, 获取实验组山羊侧凸的顶椎上下椎间盘及生长板, 对照组在相应节段取材。大体观察顶椎和相邻椎间盘变化情况。所有标本均包括凹凸两侧, 以便进行自身凹凸侧对照。将取材标本用 40% 的酒精固定, 75%、95% 和 100% 的酒精梯度脱水以及二甲苯透明, 然后分别经过溶液 I (甲基丙烯酸甲酯 75ml+邻苯二甲酸二丁酯 25ml)、溶液 II (甲基丙烯酸甲酯 75ml+邻苯二甲酸二丁酯 25ml+过氧化苯甲酰 1.0g)、溶液 III (甲基丙烯酸甲酯 75ml+邻苯二甲酸二丁酯 25ml+过氧化苯甲酰 2.5g) 后, 用甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 包埋、切片及 Giemsa 染色, 显微镜下观察椎体生长板整体形态变化、凹凸侧生长板软骨细胞的形态和排列情况。

2 结果

对照组山羊均未出现脊柱侧凸、椎体旋转和楔形变。实验组山羊在 8 周时均产生明显的脊柱侧凸 (图 1), 术后即刻 Cobb 角为 $30.0^{\circ} \pm 9.6^{\circ}$, 术后 8 周 Cobb 角进展为 $48.2^{\circ} \pm 13.3^{\circ}$, 两者有统计学差异 ($P < 0.05$); 侧凸顶椎的分布: T12 4 只, T11 1

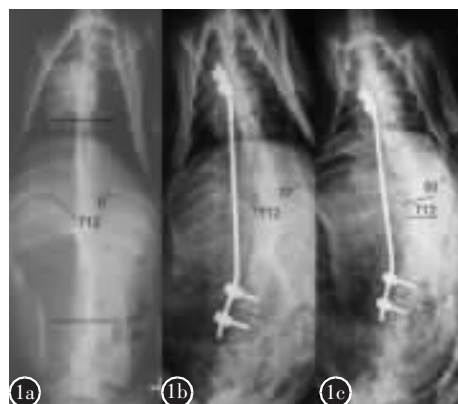


图 1 实验组山羊脊柱后前位 X 线片 a 术前, 无侧凸 b 术后即刻, 侧凸 Cobb 角 37° , 椎体无旋转 c 术后 8 周, 侧凸 Cobb 角为 50° , 顶椎 T12 楔形变明显, 并出现严重旋转

只, T10 1 只, 所有顶椎均有不同程度的楔形变及旋转。

对照组标本 Giemsa 染色低倍镜下观察可见软骨终板两侧高度基本一致, 椎间盘无楔形变 (图 2, 后插页 II); 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, 生长板两侧的各细胞层高度及细胞形态无明显差别 (图 3, 后插页 II)。

实验组凹凸两侧生长板均存在一定的差异, 低倍镜下见两侧软骨终板高度明显不一, 凸侧 (非加压侧) 高于凹侧 (加压侧); 凹侧椎体外缘明显超出终板, 椎间盘楔形变明显 (图 4, 后插页 II)。高倍镜下凹侧生长板软骨增生程度一般, 增殖层和肥大层高度降低, 肥大软骨细胞数量明显减少, 且排列不紧密, 散在分布呈团状; 骺板软骨细胞形态异常, 细胞体积相对正常细胞小, 细胞核变成扁平状, 体积变小, 胞浆相对较多; 细胞整体排列不规则, 有的区域细胞分散排列, 有的区域虽然形成柱状排列, 但是中间的空隙较大 (图 5, 后插页 II)。同时可见凹侧最边缘骺板内的软骨细胞不是向其骨化层排列, 而是朝应力方向向外排列 (图 6, 后插页 II)。凸侧生长板软骨细胞增殖活跃, 肥大层明显增厚, 细胞较多, 细胞呈圆形, 肥大细胞密集且厚度较大, 呈典型的锥形结构, 软骨增殖巢内新生软骨细胞密集, 通常有 10~20 个新生软骨细胞 (图 7, 后插页 II)。

3 讨论

目前青少年特发性脊柱侧凸 (adolescent idiopathic scoliosis, AIS) 的病因仍不明确, 但力学

因素在脊柱侧凸进展的过程中起着非常重要的作用,能够造成侧凸进展的“恶性循环”^[6]。在本动物实验中,以生长期的山羊作为研究对象,采用不对称拴系的方法建立脊柱侧凸模型。同对照组相比,不对称拴系成功地改变了山羊脊柱的生长,X线结果和大体所见均证实山羊脊柱侧凸凸向非加压侧,并伴有顶椎楔形变及旋转。实验结果表明,不对称应力负荷可引起脊柱的不对称生长,牵张力侧的生长明显快于压力侧,这符合 Hueter-Volkmann 定律,也与 Stokes^[2]、Braun 等^[4]的实验结果基本一致。

关于力学负荷调节脊柱生长的机制,Stokes 等^[7]的研究认为,AIS 患者脊柱的延长主要有赖于椎体高度的变化,而且这一结论同样适用于普通的青少年。椎体的生长同椎体生长板的关系密切,椎体生长板在青春发育期前发挥着与长骨骨髓相同的作用,是脊柱纵向生长的最重要结构。椎体的纵向生长,即高度的增加是椎体上下两端生长板软骨内化骨的结果^[8],主要通过生长板增殖区软骨细胞增殖、肥大区软骨细胞增大和基质合成增加及软骨细胞凋亡和软骨基质矿化来完成的^[9]。有研究^[10]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。此外,肥大软骨细胞分泌的 X 型胶原、碱性磷酸酶等物质也均是细胞外基质矿化所必需的^[9],细胞分泌功能的异常势必会影响最终的软骨内骨化过程。影响生长板软骨细胞活性的因素很多,力学负荷是外在的一个重要因素^[11]。为观察机械负荷影响下椎体生长与软骨细胞的关系,Stokes 等^[12]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区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。此外他们还发现,细胞大小测量值相对于对照组的百分比变化明显小于生长率相对于对照组百分比变化,提示除软骨细胞肥大影响生长率外,软骨细胞增殖速率及基质增加均受力学负荷调节,二者共同参与对椎体生长板生长的影响。Stokes 等^[13]在后续的研究中进一步证实,生长板增殖层细胞数、肥大区最终成熟软骨细胞的高度对生长率的多元线性回归系数分别为 0.72 和 1.39,表明肥大区软

骨细胞对于椎体的纵向生长有着尤为重要的作用。

以往有关椎体生长板的研究大部分来源于小动物,而且主要集中在力学负荷对短节段尾骨椎体的影响。有关大动物脊柱生长板的研究,尤其是对侧凸模型脊柱生长板的研究比较少。本研究采用的山羊侧凸模型是目前研究脊柱侧凸比较好的大动物模型^[4,5]。在本研究中笔者进一步发现,凹侧最边缘骺板内的大量软骨细胞不是向其骨化层排列,而是朝应力方向向外排列,这样,椎体不是纵向成骨,而是相对横向成骨,冠状面的组织学检查证实凹侧椎体外缘明显超出椎间盘软骨终板外缘,而非加压侧则不同,椎间盘软骨终板最外缘超出椎体外缘。这种软骨内成骨方向的改变也可能影响了椎体的生长。Mente 等^[14]用荧光标记的方法证实,不对称力学负荷引起的椎体楔形变是由于两侧生长板不对称生长造成的。本研究显示,生长板的不对称生长不仅体现在软骨细胞数量和功能的不对称性,而且也表现为软骨内骨化方向的差异,两者的共同作用最终可能引起椎体非对称性生长,引起椎体楔形变、脊柱侧凸。

在 AIS 患者中,生长板同样存在着不对称性。邱勇等^[14]观察了先天性脊柱侧凸患者(congenital scoliosis, CS)和 AIS 患者脊柱前后柱生长板增殖层内的软骨细胞大小、数目以及肥大细胞区的大小,发现 AIS 患者前柱的各项指标均大于后柱,同年龄段的 CS 患者这种前后柱的差异却不明显。由此他们认为 AIS 患者在脊柱生长发育时期脊柱前后柱生长板软骨生长模式存在差异,这种差异可能会导致前柱生长快于后柱。王守丰等^[15]发现 AIS 患者脊柱前柱生长板组织学分级、增殖和肥大层软骨细胞的增殖指数(PCNA)及凋亡指数(PARP)均明显高于后柱,进一步证实了上述观点。既然力学负荷能够干扰软骨细胞的增殖和肥大及软骨细胞的分泌功能,进而影响脊柱的生长,那么就有可能通过机械力来调节 AIS 患者脊柱前后柱生长板的差异,以达到矫正畸形的目的。

本研究只是对山羊侧凸模型脊柱生长板的初步观察,样本数有限,仅为定性观察。以后的工作主要集中在增加样本量,定量测定生长板各观察指标,进一步分析生长板凹凸侧差异同 Cobb 角大小、侧凸进展之间的相关性。此外,力学负荷与软骨细胞改变、生长板生长率、脊柱延长率及生长

方向等之间的量效关系也有待进一步探讨。

4 参考文献

1. Mente PL, Aronsson DD, Stokes IA, et al. Mechanical modulation of growth for the correction of vertebral wedge deformities[J]. J Orthop Res, 1999, 17(4):518-524.
2. 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.
3. Newton PO, Faro FD, Farnsworth CL, et al. Multilevel spinal growth modulation with an anterolateral flexible tether in an immature bovine model[J]. Spine, 2005, 30(23):2608-2613.
4. Braun JT, Hoffman M, Akuz E, et al. Mechanical modulation of vertebral growth in the fusionless treatment of progressive scoliosis in an experimental model [J]. Spine, 2006, 31(12):1314-1320.
5. 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.
6. Roaf R. The treatment of progressive scoliosis by unilateral growth-arrest[J]. J Bone Joint Surg Br, 1963, 45:637-651.
7. Stokes IA, Windisch L. Vertebral height growth predominates over intervertebral disc height growth in adolescents with scoliosis[J]. Spine, 2006, 31(14):1600-1604.
8. Dickson RA, Deacon P. Spinal growth[J]. J Bone Joint Surg Br,

1987, 69(5):690-692.

9. Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85(4):715-726.
10. 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.
11. Arriola F, Forriol F, Canadell J. Histomorphometric study of growth plate subjected to different mechanical conditions (compression, tension and neutralization): an experimental study in lambs: mechanical growth plate behavior[J]. J Pediatr Orthop, 2001, 10(4):334-338.
12. 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.
13. Stokes IA, Clark KC, Farnum CE, et al. Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction[J]. Bone, 2007, 41(2):197-205.
14. 邱勇, 朱锋. 特发性脊柱侧凸患者脊柱前后柱生长板的组织学形态[J]. 中国医学科学院学报, 2005, 27(2):148-152.
15. 王守丰, 邱勇, 夏才伟, 等. 青少年特发性脊柱侧凸患者脊柱前后柱骨骺软骨的组织形态学对比研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2007, 17(4):305-309.

(收稿日期: 2007-12-07 修回日期: 2008-01-21)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

首届全国脊柱非融合新技术研讨班通知

脊柱非融合技术是针对传统的融合手术有可能导致脊柱退变加速及活动功能丧失而提出的一种新的脊柱稳定技术, 这种技术又称为半刚性或半坚强固定技术, 允许手术节段的脊柱维持一定的活动功能。该技术是目前脊柱外科中的新技术、新理论、新热点。

由中国人民解放军空军总医院、《中国脊柱脊髓杂志》编辑部和国际脊柱功能重建学会中国分会(SASCB)联合主办, 中国人民解放军空军总医院承办的“全国脊柱非融合新技术研讨班”(2008年国家级继续教育项目, 编号: 2008-04-07-017)将于2008年5月23~25日在北京召开。届时将邀请该领域著名专家做系统发言, 探讨脊柱非融合领域的基本理论, 重点介绍临床应用技术及最新进展, 并针对临床疑难问题及病历开展研讨。

大会主席: 邱贵兴院士、张光铂教授、侯树勋教授、王岩教授; 执行主席: 伍骥教授。

报名方式: 欢迎以 E-mail 的方式和手机短信报名, 务请注明: 姓名、性别、职称、单位、联系电话、详细通讯地址、邮编等。参加人数限制为 100 名, 按报名回执时间的先后定额。有意发言者, 请将 500-800 字结构式摘要和全文各一份发至组委会, 截稿日期 2008 年 3 月 20 日。参加者可获得国家一类学分。欢迎各级脊柱等骨科医师踊跃参加。会议注册费 500 元人民币, 食宿由会务组安排, 费用自理。

会期安排: 2008 年 5 月 23 日 14:00~22:00 时报到, 24 日会议, 25 日上午 12:00 前撤离。报到地点: 北京市海淀区阜成路 40 号 裕龙大酒店大堂(空军总医院西侧)。

联系地址: 北京市海淀区阜成路 30 号空军总医院骨科, 邮编: 100036; 联系人: 伍骥, 崔玉明, 范恒华; 电话: (010)66928362, 68410099 转 6362, 6361; 13331161086(伍骥), 13811882676(崔玉明), 13366566637(范恒华)。E-mail: bjwuji@yahoo.com.cn, fanhh8@yahoo.com.cn。如需要会务组预定回程机票或火车票者, 务必在 2008 年 5 月 10 日前与会议联系人确认。