

基础研究

颈椎前路融合术对相邻节段终板影响的组织学观察

丁 亮¹, 彭耀庆², 何友智², 黄永辉¹, 孙太存¹, 左 华¹

(1 江苏大学附属医院骨科 212001 江苏省镇江市; 2 中南大学湘雅三医院骨科 410013 湖南省长沙市)

【摘要】目的:观察颈椎前路融合术后相邻节段软骨终板的组织形态学变化,探讨颈椎前路融合术对相邻节段软骨终板的影响。**方法:**6 只健康 3~4 岁雌性山羊,随机分为 I、II 组,每组 3 只。I 组为假手术组,仅切开显露颈椎椎体及椎间盘;II 组为实验组,行颈前路减压自体髂骨植骨钢板内固定术。手术节段均为 C3/4。手术 6 个月于腹腔注射麻醉下切取 I 组及经 X 线证实手术节段已骨性融合的 II 组山羊 C2/3、C4/5 上、下终板右侧组织块制备电镜标本,观察软骨终板细胞以及细胞外基质超微结构;空气栓塞法处死山羊,完整取下包含上、下终板及部分终板下骨质的 C2/3 和 C4/5 椎间盘,于正中矢状面上切取组织块制备光镜标本,行 HE 染色,测量软骨终板缺损的宽度并参考 Ariga 评价标准判定其退变情况,测量软骨终板钙化层厚度。**结果:**I 组软骨终板组织学表现正常,II 组 83.3% 出现轻度退变,两组比较有统计学意义 ($P < 0.001$);各组均未观察到中、重度退变情况。I、II 组软骨终板钙化层厚度分别为 $71.9 \pm 2.3 \mu\text{m}$ 与 $92.6 \pm 14.2 \mu\text{m}$,两组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。透射电镜观察显示,与 I 组比较,II 组软骨终板细胞以及细胞外基质发生退变。**结论:**颈椎前路融合术可导致相邻节段软骨终板退变,而这种改变可能是引起相邻节段椎间盘营养障碍和退变的始动因素。

【关键词】 颈椎;前路手术;相邻节段;软骨终板;退变;组织学;超微结构;山羊

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2009.02.13

中图分类号:R687.3,R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-02-0134-04

Histological study on the effect of anterior cervical spine fusion on adjacent-level intervertebral endplate/DING Liang,PENG Yaoqing,HE Youzhi,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009,19(2):134~137

【Abstract】 Objective:To determine the effect of cervical spine fusion on adjacent intervertebral cartilage endplate after anterior cervical decompression and ilium crest graft plus plate instrumentation.**Method:**6 healthy mature female goats,age between 3 and 4 year-old,were divided into sham operation group (I) and experimental group (II) randomly.A sham operation was carried out on group I by exposing the vertebrae body and intervertebral disc alone,while the goats in group II underwent anterior cervical decompression and ilium crest graft plus plate instrumentation.The Operation site was C3/4 intervertebral disc.6 months after operation,partial adjacent intervertebral endplates(C2/3 and C4/5) in group I and II was obtained through intraperitoneal anaesthesia and processed into electron microscopic analysis,the fusion status in surgical segments had been proved by X-ray,then the ultrastructure of cartilage cells and extracellular matrix was observed under transmission electronic microscopy.The intervertebral discs of C2/3 and C4/5 containing cartilage endplates were obtained en bloc after sacrificing the animals by venous air embolism,the specimens were then sliced up on the mid-sagittal plane and made into light microscopic samples with HE stain.The degree of degeneration was determined by measuring the defect of cartilage endplates according to Ariga standard,the thickness of calcified cartilage endplate was also measured under light microscopy.**Result:**83.3% of cartilage endplate in group II showed slight degeneration while the histological demonstration was found normal in group I according to Ariga standard,with significant difference between two groups ($P < 0.001$).No further destruction such as moderate or severe degeneration could be seen in both groups.The thickness of calcified cartilage endplate in two groups was $71.9 \pm 2.3 \mu\text{m}$ and $92.6 \pm 14.2 \mu\text{m}$ respectively,with significant difference be

第一作者简介:男(1982-),医师,医学硕士,研究方向:椎间盘退变

电话:(0511)85082239 E-mail:dl1900@sina.com

通讯作者:彭耀庆

tween two groups ($P<0.05$). A degeneration on cartilage endplate cells and extracellular matrix was found in Group II under electron microscopy. **Conclusion:** Significant histologic changes occur in adjacent intervertebral cartilage endplate after anterior cervical spine fusion, which may result in further dystrophia and degeneration of the intervertebral disc.

【Key words】 Cervical vertebrae; Anterior approach; Adjacent segment; Cartilage endplate; Degeneration; Histology; Ultrastructure; Goat

【Author's address】 Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, 212001, China

随着手术方法的日趋成熟以及脊柱内固定器械的不断完善,颈椎前路融合术治疗脊髓型、神经根型颈椎病的成功率有了明显提高。近年来有文献报道术后可因邻近节段退变出现新的神经根和/或脊髓受压症状^[1-3]。但以往研究主要集中在临床随访观察。软骨终板与椎间盘的正常生理功能及退变密切相关^[4,5],颈椎前路融合术对相邻节段终板有何影响,其组织形态有何变化,目前报道不多。本研究通过观察颈椎前路融合术后相邻节段软骨终板的组织形态学变化,探讨该手术对相邻节段软骨终板的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

6只3~4岁健康雌性山羊,体重30~40kg(由中南大学湘雅医学院动物学部提供);随机分为I、II组,每组3只。I组为假手术组,仅切开显露颈椎椎体及椎间盘;II组为实验组,行颈前路减压自体髂骨植骨钢板内固定术。两组手术节段均为C3/4。

1.2 手术过程及术后处理

常规禁食水12h,麻醉前15min肌注安定(20mg/只)、阿托品(0.02mg/kg)。予以3%戊巴比妥(30mg/kg)腹腔注射麻醉。麻醉显效后,取仰卧位稳妥固定山羊,常规消毒铺单。行右侧颈前外侧纵行切口,经颈动脉鞘和气管食管之间隙,显露颈椎椎体及椎间盘,经C型臂X线机定位椎间隙后,I组手术至此完成;II组在C3/4椎间盘打入宽度10mm环锯钻芯扁刀,用直径10mm的环锯套入指示钻芯,加压并顺时针旋转。环锯逐渐下沉1cm时停止旋转(未钻透椎体),取出钻芯、环锯、骨和椎间盘组织,用刮匙刮除残余髓核、纤维环和软骨板,直至后纵韧带,并修整钻孔成纵长方形,生理盐水反复冲洗,清除组织碎片。测量C3、C4

椎体前后径,根据修整后骨槽的大小取三面带皮质骨的髂骨骨块植入其中,前方以颈椎前路钢板(长度为30mm;螺钉4枚,长度为13mm)加以固定。术毕冲洗伤口,逐层缝合,无菌敷料覆盖并用绷带包扎。不固定山羊的颈部。术后立即拍摄颈椎正、侧位X线片,证实植骨块和钢板位置良好。禁食24h后给予规律饮食。肌注青霉素160万U/d,连续5d。

1.3 标本制备

II组山羊于术前、术后即时和术后1、3、6个月分别摄颈椎X线片,了解植骨块的位置与植骨融合情况。手术6个月后于麻醉下切取I组及经颈椎X线片证实手术节段已骨性融合的II组山羊C2/3、C4/5右侧上、下终板组织块(麻醉与手术方法同前),大小约1×1×1mm(共24个标本),生理盐水冲洗干净后浸入2.5%戊二醛磷酸缓冲液中,于4℃环境下过夜,经漂洗、后固定、系列脱水、包埋剂浸透、包埋、聚合后,进行组织修块,每个标本切超薄切片(60nm,徕卡UC6切片机)两张,行醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,透射电子显微镜(日立H-7500)下观察并拍照(德国CCD系统)。然后以空气栓塞法处死山羊,完整取下包含上下终板及部分终板下骨质的C2/3和C4/5椎间盘,于正中矢状面上切取组织块(共12个标本),用福尔马林液浸泡固定,5%硝酸脱钙,常规石蜡包埋后行连续切片,每个标本切2张,片厚4μm,进行HE染色。

1.4 观察指标、方法及评价

1.4.1 X线影像学观察 根据Emery等^[6]制定的放射学骨性融合标准,颈椎侧位X线片上手术节段有桥梁样骨小梁跨过椎体-植骨界面以及植骨块与上下椎体界面之间无透亮带者视为骨性融合。

1.4.2 光镜观察 每个标本分别测量上下软骨终

板缺损宽度,取较严重的一侧作为该标本的缺损宽度值。各组标本不区分 C2/3 与 C4/5 椎间隙,合并观察测量(以下相同)。软骨终板的缺损根据其带状结构消失或仅有间断的残留带状结构进行判断。参考 Ariga 等^[7]椎间盘退变组织学评价标准:用 r 表示终板软骨缺损的宽度占整个终板宽度的比例,将椎间盘分为正常($r=0$),轻度退变($r<25\%$),中度退变($25\%\leq r<50\%$),重度退变($r\geq 50\%$)。

根据彭宝淦等^[8]测定软骨终板钙化层厚度的方法,以潮标为界(潮标为 HE 染色中钙化区与非钙化区之间的嗜碱性条纹,如有多处潮标,以表面者为准),测定各组山羊 C2/3、C4/5 椎间盘上下终板正中矢状位中心部位的钙化层厚度。每个标本上下终板各测 3 个视野,各视野中必须包括全程软骨终板,每个视野测 3 次并取其平均值,双盲法测量并记录,最后以上下软骨终板的平均值作为该标本钙化层的厚度。

1.4.3 透射电镜观察 观察软骨终板细胞形状,细胞膜完整性,细胞突起多少,细胞质内细胞器多少,细胞核形状,核膜完整性,核内有无异染色质,核的电子密度高低。观察软骨终板细胞外基质中胶原含量,胶原粗细,排列是否规则,有无网状结构。

1.5 统计学分析

所有数据采用 SPSS 12.0 统计软件处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

所有实验山羊无颈部手术区及髂骨供骨区的感染与神经损伤等并发症发生,无死亡。术后第 1 天恢复正常饮食,2 只取髂骨山羊出现跛行,术后 3~4d 内均逐渐恢复正常活动。Ⅱ组山羊术后 6 个月摄颈椎 X 线片提示手术节段均已骨性融合(图 1),且无钢板、螺钉松动及断裂。

HE 染色光镜下观察,Ⅰ组山羊软骨终板呈带状结构排列,无缺损(图 2a,后插页Ⅲ);Ⅱ组 83.3%(5/6)出现轻度退变(图 2b,后插页Ⅲ),与Ⅰ组比较有统计学意义($P<0.001$);各组均未观察到中、重度退变情况。Ⅰ组软骨终板有大量血管分布,软骨细胞排列有序(图 3a,后插页Ⅲ);Ⅱ组钙



图 1 Ⅱ组山羊术后 6 个月颈椎 X 线侧位片示植骨块无移位,椎间隙前半部分已骨性融合,钢板与螺钉固定牢靠

化层厚度增厚,血管数目减少,潮标前移,可见多处潮标,钙化的软骨细胞较多(图 3b,后插页Ⅲ)。Ⅰ、Ⅱ组软骨终板钙化层厚度分别为 $71.9\pm 2.3\mu\text{m}$ 与 $92.6\pm 14.2\mu\text{m}$,两组比较有统计学意义($P<0.05$)。

透射电镜下组织学观察,Ⅰ组软骨终板中绝大多数软骨细胞呈椭圆形、梭形,细胞膜连续完整,细胞突起、细胞器较多,细胞核的电子密度较高(图 4a,后插页Ⅲ);细胞外基质中胶原含量丰富,连接形成网状结构(图 5a,后插页Ⅲ)。Ⅱ组软骨终板中多数细胞已经形成凋亡体或细胞碎片,核膜不完整,核内全为异染色质,核的电子密度极高(图 4b,后插页Ⅲ);细胞外基质中胶原含量少,排列不规则,网状结构不明显(图 5b,后插页Ⅲ)。

3 讨论

近年来,颈椎前路融合术后相邻节段的退变问题已引起学者们的广泛关注^[1-3]。颈椎前路融合术后,无论颈椎是屈曲还是后伸,融合区上、下相邻节段的活动度都会增加^[9]。相邻节段活动度代偿性增加,导致应力异常集中于相邻节段椎间盘和关节突,并促使其发生退变。软骨终板为一扁圆盘状半透明结构,其中心部位与髓核相接触,边缘与纤维环的内层纤维相移行连接,与纤维环壁形成了一个严密包容髓核的容器,起缓冲外力和传递应力的作用。椎间盘本身为无血供组织,其营养物质的获得和代谢产物的排出通过骨髓腔-血窦-软骨终板界面的扩散作用完成,终板途径为椎间盘营养的主要途径^[10],因此软骨终板既有屏障功能,又有营养中介作用。文献报道软骨终板与椎间盘的正常生理功能及退变密切相关^[4,5]。彭宝

淦等^[8]在建立兔颈椎间盘退变模型的过程中,发现软骨终板钙化层厚度与椎间盘退变程度明显相关,软骨终板钙化层越厚,椎间盘退变越严重。本研究中,颈椎前路融合术后,光镜下观察山羊软骨终板可有轻度缺损,出现潮标前移,钙化层厚度增厚,经进一步定量分析,Ⅰ、Ⅱ两组比较有统计学意义。这可能是颈椎融合术后手术节段的部分运动和载荷功能丧失,使相邻节段应力增加,而这种应力改变可导致软骨终板通过钙化与骨化进行骨塑形,以适应负荷传导和支持的需要。此外,骨性终板增厚可能导致椎间盘营养障碍而发生退变,退变椎间盘含水量减少,髓核变小,纤维环松弛,从而使纤维环作用于软骨终板的应力增加,导致软骨终板进一步钙化与骨化,并形成恶性循环。

Ariga 等^[11]研究发现小鼠椎间盘软骨终板随着年龄和外在压力的增加,凋亡细胞增多,细胞密度显著降低,且凋亡细胞越多,终板退变越严重。王拥军等^[12]通过建立动静力失衡颈椎间盘退变模型,发现退变椎间盘内有典型凋亡细胞,以软骨细胞为主,提示退变椎间盘中软骨细胞凋亡增多可能是椎间盘退变的机理之一。本研究中,透射电镜观察显示颈椎前路融合术后软骨终板凋亡细胞增多,细胞外基质中胶原含量较少且短,网状结构不明显,表明软骨终板出现退变,而软骨细胞凋亡可能为导致退变的原因之一。引起细胞凋亡的机制目前尚不明确,可能与颈椎融合术后相邻节段的应力增加有关,因有研究表明^[13]椎间盘的载荷增加可使细胞凋亡增多。软骨细胞凋亡增多可能进一步影响终板的营养渗透功能,从而使椎间盘营养供应减少,影响髓核再生和基质合成,导致椎间盘退变。

通过对山羊生活习性观察,其颈部大部分时间均保持直立状态,且本实验中,实验组各山羊髂骨植骨块固定稳定,故术后未予颈托固定,同时也避免了因长时间外固定加速相邻节段退变的可能,使实验结论更为准确。此外,本实验仅研究了与手术节段相邻的上下椎间盘软骨终板的组织形态学变化,未能观察更多的邻近节段,因此不能确定可能受到影响的节段范围。颈椎前路融合术后可导致相邻节段软骨终板退变,这种改变可能是引起椎间盘营养障碍和退变的始动因素,但其具体机制尚有待进一步研究。

4 参考文献

1. Yue WM, Brodner W, Highland TR. Long-term results after anterior cervical discectomy and fusion with allograft and plating: a 5- to 11-year radiologic and clinical follow-up study [J]. *Spine*, 2005, 30(19): 2138-2144.
2. Goffin J, Geusens E, Vantomme N, et al. Long-term follow-up after interbody fusion of the cervical spine [J]. *Spinal Disord Tech*, 2004, 17(2): 79-85.
3. Sailhan F, Gollogly S, Roussouly P. The radiographic results and neurologic complications of instrumented reduction and fusion of high-grade spondylolisthesis without decompression of the neural elements: a retrospective review of 44 patients [J]. *Spine*, 2006, 31(2): 161-170.
4. Pye SR, Reid DM, Lunt M, et al. Lumbar disc degeneration: association between osteophytes, end-plate sclerosis and disc space narrowing [J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66(3): 330-333.
5. 应航, 詹红生, 陈立, 等. 颈椎间盘压缩力学性能改变与终板蛋白多糖变化关系的实验研究 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2003, 13(10): 612-615.
6. Emery SE, Bolesta MJ, Banks MA, et al. Robinson anterior cervical fusion: comparison of the standard and modified techniques [J]. *Spine*, 1994, 19(6): 660-663.
7. Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc [J]. *Spine*, 2001, 26(22): 2414-2420.
8. 彭宝淦, 施杞, 沈培芝, 等. 软骨终板钙化与椎间盘退变关系的实验研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2000, 7(2): 147-150.
9. Eck JC, Humphreys SC, Lim TH, et al. Biomechanical study on the effect of cervical spine fusion on adjacent-level intradiscal pressure and segmental motion [J]. *Spine*, 2002, 27(22): 2431-2434.
10. van der Werf M, Lezuo P, Maissen O, et al. Inhibition of vertebral endplate perfusion results in decreased intervertebral disc intranuclear diffusive transport [J]. *J Anat*, 2007, 211(6): 769-774.
11. Ariga K, Yonenobu K, Nakase T, et al. Mechanical stress-induced apoptosis of endplate chondrocytes in organ-cultured mouse intervertebral discs: an ex vivo study [J]. *Spine*, 2003, 28(14): 1528-1533.
12. 王拥军, 施杞, 李家顺, 等. 退变大鼠颈椎间盘细胞凋亡的实验研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2002, 10(13): 1311-1313.
13. Ariga K, Yonenobu K, Nakase T, et al. Mechanical stress induced apoptosis of endplate chondrocytes in organ-cultured mouse intervertebral discs: an ex vivo study [J]. *Spine*, 2003, 28(14): 1528-1533.

(收稿日期: 2008-07-21 末次修回日期: 2008-12-10)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)