

椎间盘纤维环中糖胺多糖的实验研究

王方¹ 沈姗安¹ 黄淦堂¹ 徐岚² 吴士良² 姜为民²

(1. 上海市第二人民医院, 上海 200011; 2. 苏州医学院, 江苏 苏州)

【摘要】 目的 研究正常和退变腰椎间盘纤维环中糖胺多糖(GAG)含量及其主要成份百分组成,探讨椎间盘退变的发生机理。方法 对34个正常纤维环和35个椎间盘突出症纤维环标本中GAG含量进行测定,并用醋酸纤维素膜电泳和光密度扫描的方法对GAG主要成份百分组成进行测定。结果 正常纤维环GAG含量为 $4.17 \pm 0.94 \text{ g}/100 \text{ g}$,退变纤维环GAG含量为 $3.57 \pm 0.98 \text{ g}/100 \text{ g}$,低于正常组($P < 0.05$);退变组GAG中硫酸软骨素(CS)百分值低于正常组($P < 0.05$);而其透明质酸(HA)和硫酸角质(KS)高于正常组($P < 0.05$)。结论 椎间盘纤维环中GAG含量下降,是引起纤维环胶原纤维稳定性降低,影响纤维环板层滑动,导致椎间盘退变、突出症发生的重要原因之一。退变纤维环GAG含量下降由其成分CS含量下降所致。

【关键词】 糖胺多糖 椎间盘突出,腰 病理学 透明质酸 硫酸角质

An Experimental Study of the Glycosaminoglycan in the Annuli Fibrosus of the Normal and Degenerated Intervertebral Disci WANG Fang, SHEN Shan'an, HUANG Gandang, et al. The Second People's Hospital (Shanghai, 200011)

【Abstract】 Objective To study the glycosaminoglycan (GAG) content and its percentage composition in annuli fibrosus of normal and degenerated intervertebral discs, and to discuss the pathogenesis of degeneration of intervertebral disc. **Methods** The GAG content and its percentage composition were determined in 34 specimens of normal annulus fibrosus (from autopsy specimens of patients of cerebral injury) and in 35 degenerated specimens of annulus fibrosus. Celluloseacetate membrane electrophoresis and optical density scanning were used in this experiment. **Results** The GAG content in normal group was higher than those in degenerated group ($P < 0.05$); The percentage composition of chondroitin sulfate (CS) in the degenerated group was lower than that in the normal group ($P < 0.05$); The percentage composition of hyaluronic acid (HA) and keratin sulfate (KS) was higher than that in the normal group ($P < 0.05$). **Conclusion** The decrease of GAG content in annuli fibrosus plays an important role in the decrease of stability of collagenous fibers. It also affects sliding of annuli fibrosus lamella and leads to the degeneration and herniation of intervertebral disc. The decrease of GAG content in the degenerated annuli fibrosus is mainly caused by the decrease of CS.

【Key Words】 Glycosaminoglycan Intervertebral disc displacement, lumbar Pathology Hyaluronic acid Keratosulfate

本文采用蛋白多糖分解后的提取物——糖胺多糖(Glycosaminoglycan, GAG)生化测定分析方法^[1]对正常纤维环和椎间盘突出症纤维环标本进行了研究。

1 材料和方法

1.1 取材 正常纤维环标本取自7例急性脑外伤患者,范围L₁~S₁,共34个标本,均为男性,平均年龄26.9岁(21~34岁);退变纤维环标本取自29例腰椎间盘突出症手术患者,范围L₃~S₁共35个,男性20例,女性9例,平均年龄27.4岁(20~34岁)。

标本取出后用0 生理盐水洗去表层血液,小玻璃瓶中密封-30 短期保存。

1.2 匀浆制备 切取少许纤维环标本,称取每份标本用量;切碎后加入0.1 M NaOH 1.5 ml,在冰水槽中用匀浆器制成乳白色匀浆;加入0.1 M HCl调至中性,加入2% NaN₃ 两滴。

1.3 GAG提取 在各试管中加入胰蛋白酶1 mg/ml,混匀后37 保存24h;加入60%三氯醋酸至终浓度为10%,混匀后放置24h;以14000 r/min离心20 min,留上清液,加入4倍体积无水乙醇,放置48h出

现白色絮状沉淀;以 14000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀溶于 1 ml 蒸馏水中即得 GAG 溶液。

1.4 GAG 含量测定 取 GAG 溶液 0.1 ml (标准管中取 1 mg/ml 氨基半乳糖 0.1 ml),以 6 M HCl 水解 GAG 游离出氨基己糖;加入乙酰丙酮 10.5 ml,90 水浴 30 min,使氨基己糖生成吡咯衍生物;冷却后加入 95%乙醇 2.5 ml,混匀后放置 20 min,加入对二甲氨基苯甲醛混匀后显红色,10 分钟内用 530 nm 分光光度计测定吸光值 OD。纤维环 GAG 含量 = (样本管 OD 值/标准管 OD 值) × 1 × 0.1 × (沉淀物稀释倍数/样本用量) (单位:g/100 g 湿重纤维环)。

1.5 GAG 成份分析 GAG 为多聚阴离子,主要成份有透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、硫酸角质 (karatin sulfate, KS) 和硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 等。本实验标准品和样本 GAG 点样经醋酸纤维素膜吡啶甲酸缓冲液电泳,8 V/cm,通电 60 min,取出后用阿利新蓝染色,经过脱色液 10 min、20 min、40 min 脱色后烘干,用岛津-930 荧光密度仪扫描,自动积分记录各区带相对百分值,得到 GAG 主要成份相对百分值。

1.6 统计学处理 电泳扫描图上由 GAG 点样端向阳极端多呈 HA、KS、CS 三条区带;但有的只有两条区带,为 KS 不明显;有的有四条区带,为 CS 分为 4-CS 和 6-CS 之故。为便于统计分析,考虑 KS 区带不明显或 KS 和 HA 区带未完全分开,本文将 HA + KS 百分值之和作为一组数据进行处理。计算正常组和退变组的 GAG、CS 和 HA + KS 共六组数据的均数加减标准误,并对正常组和退变组数据之间存在的差异是否有显著性,作 *t* 检验。

2 结果

2.1 纤维环 GAG 含量 (单位:g/100 g 湿重纤维环) 正常组含量为 4.17 ± 0.94 ;退变组含量为 3.57 ± 0.98 ,低于正常组,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 纤维环 GAG 主要成份分析 (单位:%) 正常组 CS 百分值为 72.6 ± 15.3 ;退变组 CS 百分值为 57.9 ± 13.0 ,低于正常组,差异有显著性 ($P < 0.05$)。正常组 HA + KS 百分值为 27.2 ± 13.3 ;退变组 HA + KS 百分值为 42.0 ± 12.9 ,高于正常组,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

正常椎间盘纤维环中,水含量占 60%~70%,胶原蛋白占其干重的 60%,蛋白多糖占干重的 20%,其余为少量的弹性蛋白、年龄色素^[2]。GAG 糖链与纤

维环中胶原纤维直接连接,使胶原纤维更加稳定^[3];同时蛋白多糖在纤维环板层间沉积,其 GAG 糖链与水结合,使纤维板层之间具有粘性,当脊柱在伸屈等运动过程中有利于纤维环板层间的滑动^[4]。椎间盘纤维环 GAG 含量的下降,会影响纤维环中胶原纤维的稳定性和纤维板层间的滑动,加剧纤维环退变进程,进一步诱发椎间盘突出。

根据 GAG 不同成分所带电荷的不同,电泳时迁移率也就不同,在实验中可将 GAG 分离。椎间盘纤维环中蛋白多糖水解出的 GAG 糖链,主要有 CS、KS、HA 和少量的硫酸肤质 (DS)。椎间盘中大多数细胞 (约 60%) 能产生 CS、KS 等 GAG 成份^[5]。本实验结果发现:退变组 GAG 含量较正常组下降的同时,其 GAG 中的 CS 百分值也较正常组下降,而退变组 HA + KS 百分值较正常组上升。纤维环中 GAG 主要成份以 CS 占绝大多数,因此退变纤维环中 GAG 含量下降由 CS 含量下降所致。椎间盘纤维环主要基质成份中,以 GAG 含量与其中水含量直接相关,而 GAG 不同主要成份中 CS 与水的亲和力最强^[6]。随年龄增长而逐渐加剧的椎间盘退变过程中,虽然 HA + KS 随年龄增长而增加,但是不足以补偿其中 CS 含量的下降,从而引起椎间盘纤维环中 GAG 含量和水含量下降^[4]。国外有关椎间盘 GAG 主要成份 HA + KS 的实验研究结果有较大的差异,可能与实验取材部位、方法的差异、实验误差有关。有实验研究发现,椎间盘退变时首先是 GAG 和水丢失,早期可刺激组织修复,当退变程度加重时这种修复不易进行,纤维环和髓核变性^[7]。

当压力、扭转外力作用于脊柱时,先作用于椎间盘软骨终板,再经过凝胶状髓核均匀地传递到纤维环,纤维环的作用为抗张力、保持椎间盘髓核容积、限制椎体间运动、维持椎体骨与韧带间解剖关系的稳定^[8]。GAG 含量和水含量减少会影响椎间盘纤维环生物力学性能,在退变的基础上易于破裂,引起椎间盘髓核突出。

总之,椎间盘纤维环中 GAG 含量 (主要是 CS 含量) 下降,是引起胶原纤维稳定性降低、影响纤维环板层滑动、导致椎间盘组织退变、椎间盘突出的重要原因之一。

参考文献

- [1] 方德福,周吕,丁濂,等. 现代医学实验技巧全书. 北京:北京医科大学、协和医科大学联合出版社. 1995. 679-684.
- [2] Sedowofia KA, Tomlinson IW, Weiss JB, et al. Collagenolytic enzyme systems in human intervertebral disc. Spine, 1982, 7(3): 213-221.

[3] Bernick S, Walker JM, Paule WJ. Age changes to the annulus fibrosus in human intervertebral disc. Spine, 1991, 16(5): 520-524.

[4] Scott JE, Bosworth TR, Cribb AM, et al. The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus. J Anat, 1994, 184(2): 73-82.

[5] Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF, et al. Identification of heterogeneous cell populations in normal human intervertebral disc. J Anat, 1995, 186(1): 43-53.

[6] Antoniou J, Steffen T, Nelson F, et al. The human lumbar intervertebral disc. J Clin Invest, 1996, 98(4): 996-1003.

[7] Lipson SJ, Muir H. Biochemical analysis of the prolapsed intervertebral disc for rabbit. Spine, 1981, 6(2): 194-210.

[8] Skaggs DL, Weidenbaum M, Latridis JC, et al. Regional variation in tensile properties and biochemical composition of the human lumbar annulus fibrosus. Spine, 1994, 19(12): 1310-1319.

(收稿: 1998-12-07 修回: 1999-09-14 编辑: 房世源)

手法介绍 ·

手法复位治疗股骨粗隆间骨折 152 例

邬强 杨宗显 赵泰晟 何年东
(成都军区八一骨科医院, 四川 成都 610011)

我院自 1988 年 5 月 ~ 1995 年 2 月, 运用拉旋挤靠瞬间复位法治疗股骨粗隆间骨折 152 例, 疗效满意, 现报告如下。

1 临床资料

本组 152 例中男 80 例, 女 72 例; 年龄 22 ~ 92 岁; 左侧 87 例, 右侧 65 例; 受伤至就诊时间半小时至 6 天。跌伤 106 例, 交通事故 31 例, 高处坠下 9 例, 其它损伤 6 例。骨折类型: 按天津医院骨科分类法 型(顺粗隆间型) 42 例, 型(顺粗隆间粉碎型) 89 例, 型(反粗隆间型) 8 例, 型(粗隆下型) 13 例。

2 治疗方法

2.1 整复方法(以左侧为例) 患者仰卧, 近端助手双手按住患者骨盆两侧髂嵴固定, 远端助手的右手扶住患者左侧窝及膝外侧, 左手握住左内踝及后踝。术者立于患者左侧, 左手由内侧握住骨折远端小粗隆部, 右手由外侧扶住骨折近端大粗隆部。远端助手使患者左下肢屈髋屈膝并外展外旋, 然后内收内旋顺势牵引左下肢向下, 与此同时, 术者左手卡靠小粗隆, 右手向下推挤大粗隆并内旋患肢, 远端助手将患肢拉直放平, 左下肢置于外展中立位, 测量双侧髌前上棘至内踝尖等长, 左下肢不外旋, 则复位成功。

2.2 固定方法 给予患肢水平皮牵引, 重量 4 ~ 5 kg, 皮肤对胶布过敏者改用泡沫套牵引。患髌外敷活血化瘀、消肿止痛药物, 用绷带由外向内缠绕, 经胯部到腰部作单髌人字包扎几圈, 用一小弧形压垫, 上方剪成弯月形, 内垫棉垫, 抵住小粗隆, 再用一大椭圆形压垫放置股骨大粗隆外侧, 用胶布粘贴。外用股骨小夹板(外侧板上至髂嵴, 下至股骨外踝上 3 cm; 内侧板上至耻骨, 下至股骨内踝上 3 cm; 前侧板上至腹股沟, 下至髌骨上 3 cm; 后侧板上至臀横纹, 下至窝上 3 cm), 用系带、绷带包扎固定。嘱患者做踝、趾关节的背伸跖屈活动及股四头肌静力性功能锻炼, 患肢置于外展中立位。每周换药 3 次。2 周后皮牵引重量减为 2 kg, 4 周后去除皮牵引, 6 周后带夹板扶拐患肢不负重地行走锻炼, 待骨折临床愈合后去除夹板渐次负重直至弃拐行走。

3 治疗结果

本组 152 例均获临床随访及 X 片复查, 随访时间为 13 ~ 80 个月, 平均 46 月, 全部获骨性愈合, 无延迟愈合或不愈合, 临床愈合时间为 4 ~ 9 周, 平均 7.8 周, 后遗髓内翻(颈干角在 115° ~ 125° 之间) 11 例, 其中 9 例合并肢体短缩(1.5 ~ 2 cm), 此 11 例均属不稳定骨折, 年龄在 85 岁以上, 计顺粗隆间粉碎型 9 例, 反粗隆间型 1 例, 粗隆下型 1 例。除 8 例轻度跛行外, 髌膝关节功能基本恢复正常。

4 讨论

由于患者多系高龄老人, 本身有诸多内科疾病, 对疼痛的耐受性差。因此手法复位前一定要详细询问病人的既往史, 仔细进行体格检查, 给予心电图检查, 以免患者复位时出现疼痛性休克以及继发心肌梗塞而死亡。运用何氏骨科的“骨折瞬间复位法”,^[1]以瞬间复位达到准确的整复, 既减轻了患者的痛苦, 又促进了骨折的愈合, 有利于关节功能的提前恢复。对于骨折远端向前移位的患者, 复位时屈髋屈膝的角度应小些, 以免造成骨折近端向前移位。

无移位的股骨粗隆间骨折或有移位的股骨粗隆间骨折复位后, 采用何氏骨科联合夹缚固定术, 用夹板、压垫、绷带、胶布、皮牵引外固定。在股骨粗隆间骨折整复后的固定中, 夹板起着主要的固定作用, 夹板的侧方压应力对骨折进行有效的固定, 能矫正或控制骨折的旋转成角移位, 使断端接触紧密, 有利于骨痂的生长, 促进骨折的愈合。两块压垫面积大, 无特殊作用力方向, 是使夹板在局部压应力增加, 在一定程度上可矫正侧方移位, 起辅助夹板的作用。绷带增加夹板的环周约束力, 皮牵引保持轴向位置相对稳定, 对抗内收肌和髂腰肌的紧张和回缩, 防止骨折远端向内向上移位和髓内翻的发生。胶布固定压垫, 起次要作用。患肢固定于外展中立位。患者皮牵引和卧床时间较短, 有利于预防合并症及髌膝关节功能的恢复。

参考文献

[1] 何天佐. 何氏骨科学. 上册. 北京: 中医古籍出版社, 1993. 36.
(编辑: 连智华)