

强直性脊柱炎棘上棘间韧带的扫描电镜与成纤维细胞培养研究

高根德* 刘耀升 童培建

(浙江中医学院附属医院,浙江 杭州 310009)

【摘要】目的 观察强直性脊柱炎(AS)棘上棘间韧带的超微结构和探讨成纤维细胞在韧带骨化中的作用,找出 AS 韧带中胶原紊乱排列和钙颗粒沉积是否由成纤维细胞活动引起。方法 采用扫描电镜—X 线能谱仪联机对 AS 脊柱韧带进行观察。采用细胞培养法对 AS 棘上棘间韧带成纤维细胞进行体外培养,显微观察和组化染色等。结果 扫描电镜显示韧带上的胶原排列紊乱,其间有钙颗粒沉积,X 线能谱能显示出钙峰。细胞培养观察到 AS 成纤维细胞增殖活跃,分泌颗粒旺盛。细胞经 Alcain Blue、甲苯胺蓝、ARS 染色均呈阳性反应。AKP 酶测试亦显示有多量 AKP 存在于胞体内外。结论 AS 的成纤维细胞能分泌各种成骨基质。AS 脊柱韧带中的胶原纤维排列紊乱和钙沉积与该细胞的活动密切相关。

【关键词】 脊柱炎,强直性 显微镜检查,电子,扫描 细胞,培养的

Scanning electron microscopy of supra-interspinous ligament in cases of ankylosing spondylitis and culture of fibroblasts in vitro GAN Gen-de, LIU Yaosheng, TONG Pei-jian. The Affiliated Hospital of Zhejiang TCM College (Zhejiang Hangzhou, 310009)

【Abstract】 **Objective** To observe the ultrastructure of supra-interspinous ligament of ankylosing spondylitis(AS), to evaluate the role of fibroblasts in ossification of ligament, and to discuss if disorderly arrangement of collagen and sedimentation of calcium granule in AS are induced by fibroblasts. **Methods** Scanning electron microscope (SME) and X-ray microanalytic system were used to examine spinal ligament of AS. The fibroblasts of supra-interspinous ligament of AS were cultured in vitro and the cells were observed by microscope after histochemical staining. **Results** The results of SME examination displayed that the collagen fibers of ligament arranged in disorder and calcium granule deposited in gaps of the collagen of AS which can be seen as a calcium peak by X-ray microanalytic system examination. The results of cell culture showed that fibroblasts which secreted a lot of granules were in active proliferation conditions. The fibroblasts showed positive reaction when they were stained by Alcain Blue, Toluidin Blue and Alizarin Red S. The results of AKP enzyme test showed that there were many AKP within and outside the fibroblast cells. **Conclusion** The fibroblasts of AS can secrete different kinds of osteogenic matrix which is closely related to disordered arrangement of collagen and sedimentation of calcium granule of spinal ligament of AS.

【Key Words】 Spondylitis, rigidity Scanning electron microscopy Cells, cultured

在强直性脊柱炎(AS)的发病过程中,脊柱韧带、椎间盘、滑膜等软组织发生骨化,导致脊柱最后强直。但其原因和机理均不清楚。因此明确引起组织骨化的细胞成分是十分重要的。至今,国内外尚无有关 AS 韧带成纤维细胞的有关报导,我们从培养 AS 韧带、滑膜成纤维细胞成功的基础上,进行了

进一步的研究。本文报告 AS 棘上棘间韧带的扫描电镜观察和成纤维细胞在体外培养的分泌功能及它们之间的关系。

1 材料与方法

1.1 韧带的扫描电镜观察 标本取自 2 例(19 岁和 22 岁)男性 AS 脊柱驼背矫形的尚未钙化区的棘上棘间韧带组织,2 例(45 岁、62 岁)男性腰间盘突出症手术切下的同名韧带,组织块切成 1mm ×1mm ×1mm 大小,每例取 6 块,2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定,系列乙醇脱水,真空干燥,喷金后置入扫描电镜(Hitach S 570 型)-X 线能谱仪(TN-5504, Bonan)联机观察。

*现在美国明尼苏达州大学医学中心,博士后。

基金项目:浙江省卫生厅科研基金资助(编号:98A203)

作者简介:高根德(1952-),男,浙江人,硕士,教授,硕士生导师,主要从事骨伤科强直性脊柱炎的研究。

1.2 成纤维细胞培养 上述病例同时另行取得棘上棘间韧带标本 1cm × 2cm × 3cm, 各 2 块, 经生理盐水漂洗, 立即放入装有 Hanks 氏液的培养瓶中。在超净工作台 (SWCT-1F 型苏州化学仪器厂产) 上, 用眼科剪将韧带切成 1mm × 1mm × 1mm 的小块, Hanks 氏液漂洗 3 遍。预先在培养瓶底壁涂一层血清, 将组织块以每瓶 24 小块的密度接种于 25ml 培养瓶里, 轻轻翻转培养瓶, 向瓶内注入适量 1640 培养液 (含 10% 小牛血清, 青霉素 100U/ml, 链霉素 100μg/ml), 使其刚刚没过组织小块, 放入 37℃、5% CO₂ 的培养箱 (美国 Quene 2711 型) 中, 静置 3 小时, 组织块贴壁后将培养瓶轻轻翻转, 于 CO₂ 培养箱内继续培养。定期换液。细胞长满瓶底后用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 传代细胞以 105/ml 的密度接种于铺有盖玻片的培养瓶内, 连续培养 5 代, 第 3 代细胞收获后用于实验。

1.3 培养细胞显微观察和各种染色 在倒置相差显微镜 (日本 Olympus PG2 型), 逐日作活体细胞观察, 观察培养细胞的形态和生长情况。甲苯胺蓝 (上海试剂 3 厂) 染色显示胶原呈蓝色。阿利新蓝 (alcian blue 6GX, Z chemicals 产品) 染色显示酸性粘多糖呈蓝色。茜红素 (alizarin red S, ARS, 上海试剂 3 厂) 染色, 显示钙盐呈红色。碱性磷酸酶 (AKP, AKP 试剂盒上海虹桥医用试剂盒实验研究所) 反应, 显示 AKP 呈亮红色。四环素荧光标记 (德国 Opton 荧光显微镜观察), 钙盐呈金黄色荧光反应。各种组化方法是长满玻片的细胞经系列乙醇逐级脱水固定后进行染色。

2 结果

2.1 超微结构 扫描电镜下见 AS 组棘上棘间韧带中的胶原纤维排列非常紊乱, 有断裂现象 (图 1), 其间有钙颗粒沉积, 经 X 线能谱扫描, 有钙峰出现 (图 2, 3)。对照组标本胶原纤维排列整齐 (图 4), 经扫描无钙颗粒的沉积。上述标本在扫描观察过程中, 细胞成分很少见到或难以确定, 故本文从略。

2.2 培养的成纤维细胞的观察

2.2.1 活体观察 贴壁培养第 10 天, 组织块边缘观察到有梭形细胞萌出, 培养第 18 天, 韧带块间的空隙已被细胞群覆盖。细胞呈螺旋状、放射状分布。活体细胞呈典型的长梭形, 亦有细胞为星形, 细胞的两个长突起可有树枝样分叉, 也有部分细胞呈多突起状。培养的细胞多可出现伪足, 连续观察可发现伪足有伸缩活动。细胞的两个长突起常可观察到分泌不透光结节, 结节逐渐融合扩大, 有时可将两个或多个细胞突起连接在一起, 亦有结节因密度较小而通过细胞的一侧突起悬浮于培养基中。细胞胞体也可通过伪足的收缩活动向胞体一侧分泌空泡样的颗粒, 亦可分泌少量不透光颗粒 (图 5), 逐渐融合进细胞周围的结节中。传代培养第 2、3 天, 细胞进入指数分裂期, 此时细胞两极突起伸展更加明显, 有时可达细胞体的 2~3 倍。传代中后期细胞已长满大部分瓶底。此时细胞突起短缩, 相邻细胞突起间可相互连结, 大量的不透光结节散布于细胞之间 (图 6), 细胞长满瓶底后, 失去典型的梭形, 呈鳞片样分布。两组细胞在形态、大小及生长状况方面均相似, 但 AS 组细胞分泌的结节较多较大。

2.2.2 甲苯胺兰染色观察 传代培养早期的 AS 组细胞胞质呈均匀的蓝色。后期部分结节呈蓝黑色阳性反应, 周围有

蓝色云雾状着色区 (图 7), 亦有结节呈不透光的黑色。对照组细胞胞质染色呈弱阳性。

2.2.3 阿利新蓝染色观察 传代早期 AS 组细胞胞体即呈蓝绿色阳性反应, 示含有酸性粘多糖 (图 8)。传代中后期, 细胞胞质呈弱阳性反应。对照组细胞染色呈弱阳性, 结节染色呈阴性。

2.2.4 茜素红染色观察 传代培养早期 AS 组细胞呈淡红色弱阳性反应, 示含有钙质, 结节呈阴性。传代中后期结节阳性率增加, 结节内部隐约可观察到许多 ARS 阳性反应的泡状物, 泡状物沉积于结节的过程隐约可辨 (图 9)。对照组细胞胞质及分泌结节染色均呈阳性反应, 至中后期, 细胞及少数结节呈弱阳性反应。

2.2.5 AKP 反应 AS 组细胞传代培养第 3 天, 胞质 AKP 反应阴性, 培养液涂片可发现少量斑片样阳性反应物。传代第 7 天胞质内可见淡黄色阳性反应小颗粒 (图 10), 而此时培养液中观察到斑片样阳性反应物增大、增多, 其中红色颗粒逐渐沉积的过程隐约可辨 (图 11)。对照组细胞的 AKP 反应为阴性。

2.2.6 四环素荧光标记 传代培养第 3 天, AS 组细胞分泌出的小结节呈较弱的阳性反应, 中后期大部分结节呈强金黄色荧光反应 (图 12)。对照组细胞胞质染色呈弱阳性。

3 讨论

3.1 培养的 AS 韧带成纤维细胞的生物学特性和临床联系 细胞增殖比对照组细胞快。成纤维细胞通过伪足的收缩, 有极缓慢的移动和分泌胞体内颗粒的功能。能分泌胶原。分泌酸性粘多糖。从图 5 可以看出, AS 成纤维细胞胞体内均有蓝色斑片, 提示该细胞自胞体内向体外不断分泌粘多糖。分泌钙颗粒。这些钙颗粒是由小颗粒汇成结节排出胞体外的。但其运转排泄过程尚待进一步证实。分泌碱性磷酸酶。这些酶由胞体内产生外排到培养基中。对照组细胞 AKP 染色仅显微弱阳性, 两者有显著区别。本实验表明 AS 的碱性磷酸酶活性较高, 能促进韧带骨化。柴本甫等的研究^[1-2]指出: 成纤维细胞具备成骨的三个条件, 包括提供基质钙化必需的钙; 分泌或形成钙化的基质小泡; 合成分泌可钙化的胶原纤维。在某些特定的条件下, 它就会起成骨的作用。本实验也验证了 AS 的成纤维细胞有分泌骨基质的功能, 因此可以认为成纤维细胞在 AS 脊柱韧带骨化中有重要作用。这提示 AS 的临床治疗应针对成纤维细胞, 可能进一步提高疗效。

3.2 AS 韧带超微结构与体外培养的成纤维细胞生物学特性之间的关系 扫描电镜显示 AS 韧带胶原纤维排列紊乱, 钙颗粒沉积其中, 这一现象促使我们考虑它的原因和钙盐来源。结合 AS 的成纤维细胞向培养基中排泄各种骨基质, 我们有理由认为, 这些紊乱排列的胶原和胶原中的钙颗粒来源于成纤维细胞。从韧带主要是胶原和成纤维细胞来分析, 也支持我们的实验推理。本研究对照组的成纤维细胞却是非常稳定的, 我们认为, AS 患者体内血液成份中某些特殊的细胞因子的作用使成纤维细胞受到刺激, 致使该细胞不断增殖, 分泌骨基质, 最后, 胶原中沉积了足够的钙颗粒, 成纤维细胞被固定而成为骨细胞。整条脊柱于是就成了“竹节椎”。从临床角度

分析, AS 病人的脊柱 X 线片, 一般先有椎小关节模糊, 此时病人的脊柱已僵硬; 而数年后才慢慢出现前纵、后纵、棘间、棘上韧带以及椎间盘的骨化。这说明椎小关节内的滑膜先发生炎性病变, 炎性病变则易提供炎性细胞因子, 遂使成纤维细胞启动成骨潜能, 导致各韧带逐渐骨化。

(本文图 1~12 见插页 1)

参考文献

[1] 柴本甫, 汤雪明. 实验性骨折愈合的电镜放射自显影研究. 中华骨科杂志, 1990, 10(3): 200-202.

[2] 柴本甫, 汤雪明, 李慧. 骨折二期愈合过程中的成纤维细胞成骨作用. 中华骨科杂志, 1996, 16(4): 245-248.

(收稿: 1999-07-07 修回: 2000-05-25 编辑: 房世源)

· 仪器与器械 ·

钢针钻头定位器

付梓新

(解放军八二医院, 江苏 淮阴 223001)

在骨科临床实践中, 注意到在使用摇钻钻孔和克氏针作导针或髓内针的过程中, 经常出现钻头穿过骨皮质后, 过度穿入对面软组织而损伤深部重要血管和神经, 或者损伤关节面, 影响肢体功能的恢复。究其原因: 一是操作者对解剖不熟, 不能正确估计骨骼的厚度。二是术前准备不充分, 没有预先测量好骨骼进针的深浅。三是操作者动作粗暴, 用力过猛, 致突然突破骨皮质时, 由于阻力骤减而收不住手, 以致造成严重医疗事故。四是很多骨科手术持续时间长, 医生经过几个小时的工作已很疲惫, 术者想早点结束手术, 以致操之过急。为此, 笔者研制出一种简单实用的小器械: 钢针钻头定位器, 较妥善地解决了这个问题。现介绍如下:

它主要包括两个部分: 一是主体, 即一根空心不锈钢管(规格有不同管径和不同长度), 二是固定装置, 即一个旋钮(见图 1)。



图 1 钢针钻头定位器示意图

用法: 先设计好需要钻入的深度, 然后将定位器套在钻头上即可, 再将钻头装入摇钻, 为防滑动, 定位器最好抵住摇钻体。这样即可防止摇钻钻入过深, 此定位器尤宜使用电钻时配备。同理此定位器上普通钻头可安全方便地代替颅骨钻。

下面列举一下中国成人常见骨科手术钻针深度。(此数据是在江西中医学院解剖教研室测量 17 具成人骨骼标本得出的平均数值, 仅作参考, 具体操作时宜因人而异。)

(1) 锁骨: 此骨手术虽简单, 但应格外小心, 因其后下方有锁骨下动静脉、臂丛神经和肺尖。若用接骨板行骨折内固定, 此钻头定位器尤显重要。中内 1/3 处前后径 1.353cm, 上下径 1.321cm; 中段前后径 1.121cm, 上下径 1.052cm; 中外 1/3 处前后径 2.157cm, 上下径 0.873cm。

(2) 肱骨: 外科颈(为临床阅片测量参考, 此数据取大结节顶部下 3cm 处测量) 前后径 2.554cm, 内外径 2.953cm; 中段前后径 2.012cm, 内外径 2.051cm; 髁上(取肱骨滑车关节面上 4cm 处测量) 前后径 1.657cm, 内外径 3.256cm。

(3) 桡骨: 粗隆下前后径 1.213cm, 内外径 1.257cm; 中段前后径 1.204cm, 内外径 1.253cm; 下端(取桡骨茎突尖上 3cm) 前后径 1.217cm, 内外径 1.953cm。

(4) 尺骨: 桡骨粗隆水平稍下方前后径 1.623cm, 内外径 1.427cm; 中段横切面呈尖端向外的等腰三角形, 前后径 1.253cm, 内外径 1.497cm; 下端(取尺骨茎突尖上 3cm 处) 前后径 1.053cm, 内外径 0.954cm。

(5) 手舟骨: 舟骨骨条植骨时, 进针点应在舟骨结节处尽量靠近大多角骨, 进针方向应向后约 10°~15°, 并斜向上与桡骨纵轴呈 40°~60° 角。舟骨全长 2.193cm, 腰部宽 1.057cm, 腰部厚 0.912cm。

(6) 股骨颈: 长度为 10.362cm(此数据为便于临床击入加压螺钉等内固定物参考, 取股骨颈纵轴线在关节面顶端和大粗隆下之间的长度), 颈部前后径为 2.653cm, 上下径 3.352cm。

(7) 股骨干: 上端(取小粗隆下 3cm 测量) 前后径 2.632cm, 内外径 2.954cm; 中段前后径(卡尺卡在股骨粗线上) 2.757cm, 内外径 2.712cm; 下端(取股骨髁关节面上 6cm) 前后径 2.832cm, 内外径 3.954cm。

(8) 胫骨: 横切面呈三角形, 测量时为标尺卡在底边和胫前嵴上作前后径, 内外径为标尺卡在胫骨内面和外侧最凸起点上。粗隆下前后径为 3.654cm, 内外径为 2.624cm; 中段前后径 2.953cm, 内外径 1.957cm; 中下 1/3 交界处前后径 2.273cm, 内外径 1.934cm。

这件小器械在骨科临床中确能解决一些问题, 尤其对低年资的骨科住院医师更为适宜。

(编辑: 李为农)

强直性脊柱炎棘上棘间韧带的扫描电镜 与成纤维细胞培养研究

(正文见 338 页)

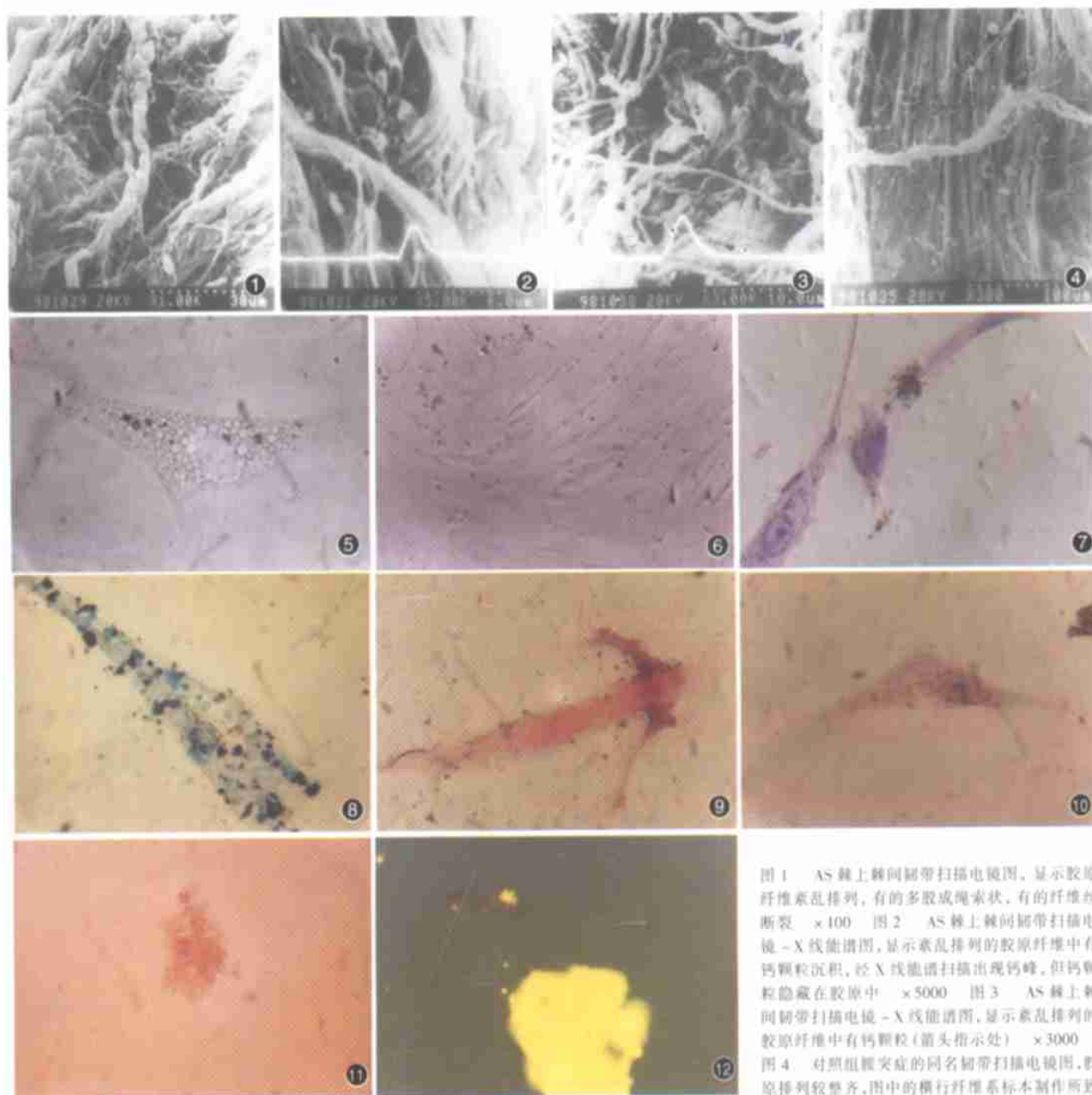


图1 AS棘上棘间韧带扫描电镜图,显示胶原纤维紊乱排列,有的多股成绳索状,有的纤维丝断裂 $\times 100$ 图2 AS棘上棘间韧带扫描电镜-X线能谱图,显示紊乱排列的胶原纤维中有钙颗粒沉积,经X线能谱扫描出现钙峰,但钙颗粒隐藏在胶原中 $\times 5000$ 图3 AS棘上棘间韧带扫描电镜-X线能谱图,显示紊乱排列的胶原纤维中有钙颗粒(箭头指示处) $\times 3000$ 图4 对照组同名的同名韧带扫描电镜图,胶原排列较整齐,图中的横行纤维系标本制作所致 $\times 3000$ 图5 原代培养第4天的AS成纤维细胞,胞质中有大量空泡和少量黑色颗粒 未染色 $\times 800$ 图6 传代培养第5天的AS成纤维细胞,细胞间布满大量不透光的小颗粒,由细胞所分泌 未染色 $\times 200$ 图7 传代培养第7天的AS成纤维细胞,甲苯胺蓝染色呈强阳性 $\times 800$ 图8 传代培养第3天的AS成纤维细胞,胞体膨大,胞质中阿利新蓝染色阳性,胞质与细胞外均有蓝黑色的薄片 $\times 800$ 图9 传代培养第7天的AS成纤维细胞,ARS染色强阳性,胞体中隐约可见红色小颗粒,这些小颗粒在细胞一侧汇集成结节,使染色变深 ARS染色 $\times 800$ 图10 传代培养第7天的AS成纤维细胞,细胞中出现大量亮红色AKP阳性反应颗粒 AKP染色 $\times 400$ 图11 传代培养第7天的AS成纤维细胞,培养液中的AKP颗粒聚集成团 $\times 400$ 图12 传代培养第7天的AS成纤维细胞,培养液中出现四环素标记的金黄色钙粒 $\times 400$

维细胞,胞质中有大量空泡和少量黑色颗粒 未染色 $\times 800$ 图6 传代培养第5天的AS成纤维细胞,细胞间布满大量不透光的小颗粒,由细胞所分泌 未染色 $\times 200$ 图7 传代培养第7天的AS成纤维细胞,甲苯胺蓝染色呈强阳性 $\times 800$ 图8 传代培养第3天的AS成纤维细胞,胞体膨大,胞质中阿利新蓝染色阳性,胞质与细胞外均有蓝黑色的薄片 $\times 800$ 图9 传代培养第7天的AS成纤维细胞,ARS染色强阳性,胞体中隐约可见红色小颗粒,这些小颗粒在细胞一侧汇集成结节,使染色变深 ARS染色 $\times 800$ 图10 传代培养第7天的AS成纤维细胞,细胞中出现大量亮红色AKP阳性反应颗粒 AKP染色 $\times 400$ 图11 传代培养第7天的AS成纤维细胞,培养液中的AKP颗粒聚集成团 $\times 400$ 图12 传代培养第7天的AS成纤维细胞,培养液中出现四环素标记的金黄色钙粒 $\times 400$