

退行性腰椎滑脱黄韧带病理组织学和免疫组化的观察

毛兆光^{1*}, 范顺武¹, 赵凤东¹, 朱有法²

(1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院骨科, 浙江 杭州 310016; 2. 浙江大学医学院病理学教研室)

摘要 目的:探讨退行性腰椎滑脱症患者黄韧带椎板间部组织学特征和新生成胶原的主要种类。**方法:**对手术切除的退行性腰椎滑脱椎板间部黄韧带进行常规 HE 染色和 Masson 三色改良法胶原染色,同时用免疫组化的方法检测退变黄韧带中 I 型胶原的表达情况,普通光镜观察。**结果:**退行性腰椎滑脱组黄韧带弹力纤维减少,胶原成分显著增加,结构紊乱;免疫组化示基质染色明显深于对照组,其浅黄色至棕褐色阳性表达产物也见于成纤维细胞、成软骨细胞和软骨细胞的胞浆中, I 型胶原表达阳性率和表达强度与正常组之间差异均具有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论:**退行性腰椎滑脱黄韧带退变增生肥厚,并有软骨化和骨化倾向,新生的胶原以 I 型胶原为主。

关键词 腰椎滑脱; 黄韧带; 病理学; 免疫组化; I 型胶原

Pathological and immunohistochemical observation on the ligamentum flavum of degenerative lumbar spondylolisthesis MAO Zhao-guang^{*}, FAN Shun-wu, ZHAO Feng-dong, ZHU You-fa^{*}. Department of Orthopaedics, Sir Run Run Shaw Hospital, Medical College of Zhejiang University, Zhejiang Hangzhou, 310016, China

Abstract Objective: To study the pathological features and the type of proliferative collagen of the interlaminar portion of the ligamentum flavum in degenerative lumbar spondylolisthesis (DLS). **Methods:** Pathological observation with HE staining and Masson trichrome staining and immunostaining for collagen type I in DLS were done under optical microscope using surgical specimens of the interlaminar portion of ligamentum flavum from patients. **Results:** The degenerative ligamentum flavum showed decrease of the elastic fibers and significant increase of collagen fibers, with distorted fibrous structure. The immunostaining of collagen type I was more marked in the extracellular matrix of ligamentum flavum in DLS group than that of the control group. Collagen type I was also presented in the cytoplasm of fibroblasts, chondroblasts and chondrocytes. The positive expression rate and expression intensity of collagen type I in the cell of ligamentum flavum were statistical significance between the DLS group and the control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** The kind of proliferative collagen in the ligamentum flavum of degenerative lumbar spondylolisthesis is mainly collagen type I. There is tendency of chondrogenesis and ossification of the ligamentum flavum in degenerative lumbar spondylolisthesis.

Key words Lumbar spondylolisthesis; Ligamentum flavum; Pathology; Immunohistochemistry; Collagen type I

退行性腰椎滑脱症多伴有黄韧带的增生和肥厚,从而加重其腰腿痛的症状。目前,黄韧带增生与肥厚的影像学研究较多,但有关其病理学变化和增生胶原类型的研究报道很少。我们应用 Masson 三色改良法行胶原染色和免疫组化方法以了解退行性

腰椎滑脱症患者增生和肥厚黄韧带的胶原增生情况,并探讨黄韧带在退行性腰椎滑脱病程中的变化和意义。

1 材料与方法

1.1 材料 20 例腰椎黄韧带标本分两组,退行性腰椎滑脱(DLS)组 10 例,其中男女各 5 例;年龄 35 ~ 69 岁(平均 49 岁);取材部位:L₄₋₅ 5 例,L₅S₁ 5 例;黄韧带厚度 4.4 ~ 8.0 mm(平均 5.4 mm)。正常对照

*现作者单位:江山市人民医院骨科,浙江 江山 324100
通讯作者:毛兆光 Tel:13366301638 E-mail:mzg0906@163.com

组 10 例,7 例取自腰椎骨折手术患者,3 例取自意外死亡者,其中男 6 例,女 4 例;年龄 30~53 岁(平均 45 岁);取材部位:L₃₋₄3 例,L₄₋₅4 例,L₅S₁3 例;黄韧带厚度 2.0~4.1 mm(平均 3.2 mm)。所有黄韧带标本均取自椎板部的中央部分(椎板间部)。经 *t* 检验,两组病例的平均年龄差异无显著性($P>0.05$),而两组黄韧带平均厚度差异有显著性($P<0.05$)。

1.2 方法 上述标本经 10% 甲醛固定 24~48 h,石蜡包埋后 5 μ m 连续切片。所有标本均行常规 HE 染色和 Masson 三色改良法染色,普通光镜观察;石蜡切片脱蜡至水,3% 过氧化氢甲醇液 20 min 封闭内源性过氧化酶,0.1% 胰酶消化 20 min, PBS 冲洗,滴加一抗型胶原抗体,1:50 稀释,4℃ 冰箱过夜后 PBS 冲洗,滴加 En Vision 液,室温 30 min 后 PBS 冲洗, DAB 显色,苏木素复染 30 秒,脱水,透明,封片。阴性对照切片染色以 PBS 代替一抗,重复上述步骤。

1.3 普通光镜观察 分别在低倍镜($\times 100$)和高倍镜($\times 400$)下观察两个组别的常规 HE 切片、Masson 三色改良法切片以及免疫组化切片。两人盲法观察两个组别免疫组化切片型胶原在黄韧带细胞中的表达情况,具体方法为每张免疫组化切片随机观察 10 个高倍视野($\times 400$),以胞浆和胞膜中出现浅黄至棕褐色颗粒为阳性表达的判定标准,计算出各标本的表达阳性百分率(阳性表达细胞与细胞总数之百分比)。表达强度具体评定标准:按切片中细胞显色有无及深浅计分:0 分,细胞无显色;1 分,显色为浅黄;2 分,为棕黄色;3 分,为棕褐色。按切片中显色细胞的比例评分:1 分,显色细胞占切片中细胞总数的 25% 以下;2 分,26%~50% 细胞显色;3 分,51%~75% 细胞显色;4 分,76% 以上细胞显色。每例黄韧带积分 = $\sum x$,按积分高低分为:阴性(-)积分为 0 分;弱阳性(+)积分 1~3 分;阳性(+)积分 4~6 分,强阳性(++)积分 7 分。计算出 DLS 组和正常对照组的细胞表达阳性率和表达强度^[1]。

1.4 统计方法 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用秩和检验(Willcoxon 法)进行统计分析;表达强度比较采用 Ridit 分析。

2 结果

2.1 常规 HE 染色和 Masson 三色改良法染色

2.1.1 正常对照组 黄韧带以弹力纤维为主,弹力纤维与黄韧带的长轴平行,直径大致相等,排列紧密

而规则,表面光滑,并常发出分支交错相连成网状结构,弹力纤维间可见少量的胶原纤维和散在的成纤维细胞。成纤维细胞及其胞核呈纺锤状,显示稀少的胞浆和胞浆物质。

2.1.2 退行性腰椎滑脱组 黄韧带弹力纤维减少,胶原成分显著增加,弹性纤维直径减少、变细,排列杂乱而无规则,部分断裂变形,并被大束的胶原纤维所分隔,纤维周围可见局部脂肪浸润。Masson 染色见胶原纤维明显增多,局部有细胞聚集现象。韧带中心区有较大的纤维化区域。韧带内的小血管腔变窄,有不少病例可见血管数增多。细胞数量较正常更多,并显示出合成活跃的成纤维细胞的形态特征,胞体和胞核均增大,呈椭圆形,胞浆丰富。亦可见少量散在的成软骨细胞和软骨细胞。

2.2 型胶原免疫组化结果 DLS 组基质染成棕色,明显深于正常对照组;其浅黄色至棕褐色阳性表达产物也见于成纤维细胞、成软骨细胞和软骨细胞的胞浆中。型胶原表达阳性率($\%, \bar{x} \pm s$) DLS 组为 41.60 ± 18.81 ,正常组为 2.07 ± 3.21 ,两组之间差异有显著性($P<0.01$)。型胶原表达强度 DLS 组 2 例(+),7 例(++),1 例(+++);而正常组 5 例(-),5 例(+),两组之间差异有显著性($P<0.05$)。

3 讨论

退行性腰椎滑脱常伴有椎管狭窄,主要原因是椎间盘、小关节或韧带的退行性改变。黄韧带是脊柱后部重要的连接结构,作为脊柱运动节段的成分之一,具有维持脊柱稳定和保持椎间盘有一定的压力以保证椎间盘营养供给等重要生理作用。正常的黄韧带主要由弹力纤维构成,弹力纤维和胶原纤维分别占 80%、20%,因此具有很强的弹性。正常黄韧带中以型胶原为主,其抗牵张力强。正常的黄韧带细胞成分很少,主要为成纤维细胞。黄韧带退变后,其弹力纤维明显减少,而胶原纤维却显著增加,甚至成为韧带的主要成分,从而黄韧带的弹性明显下降且肥厚,可引起多种脊柱疾病,包括退行性腰椎滑脱。腰椎退行性滑脱后同样也可增加黄韧带的劳损和变性,导致黄韧带的增生肥厚,加重患者的腰腿痛症状。但是有关退行性腰椎滑脱病例中,黄韧带肥厚和增生的病理研究报道较少,因此了解其增生的实质和胶原类型,从而阐明黄韧带在退行性腰椎滑脱病程中的变化和作用很有必要。

本实验 HE 染色和 Masson 三色改良染色发现退行性腰椎滑脱组黄韧带弹力纤维显著减少,结构紊

乱,胶原纤维大量增生,免疫组化证实黄韧带细胞中型胶原的表达显著增高,另外,其基质染色深度也明显高于正常对照组,提示肥厚的黄韧带中央部有大量型胶原的增生,这同黄韧带骨化过程中和腰椎管狭窄症患者黄韧带骨附着部增生的胶原种类一致^[2,3]。并且退行性腰椎滑脱组成纤维细胞显示出合成活跃的形态学特征,并出现了少量的成软骨细胞和软骨细胞。型胶原体积比型胶原体积大 25%,含水量高 25%,而高水化纤维更适于变形,承受和吸收压、应力。这可理解为退行性腰椎滑脱病程早中期的腰椎不稳,黄韧带受到过度拉伸,导致型胶原的代偿增生。这种增生一方面有助于病变节段的稳定,但另一方面黄韧带过度的增生和软骨化倾向,则导致黄韧带的肥厚,从而加重椎管狭窄的症状。

有研究表明,腰椎不稳所产生的机械力可导致黄韧带肥厚^[4]。退行性腰椎滑脱病程早中期的腰椎不稳,黄韧带受到过度的拉伸,可能是黄韧带肥厚退变的直接原因。机械的牵张力可促进平滑肌细胞和肾小球膜细胞产生 TGF- β_1 ^[5,6], Nakatani 等^[7]应用腰椎管狭窄症患者的黄韧带细胞作体外培养实验也证实,机械的牵张力可明显促进黄韧带细胞产生 TGF- β_1 。而 TGF- β_1 是一种对多种类型结缔组织具有较复杂生物学作用的生长因子,能调节细胞的增殖与分化,增加细胞外基质的合成。TGF- β_1 可促进黄韧带细胞胶原的合成^[8]。另有研究表明同种异构体 TGF- β_2 、TGF- β_3 和血小板源性生长因子-AB 等因子可能也参与了黄韧带的退变这一过程^[9-12]。因此黄韧带的退变是一个十分复杂的过程,详细的机制还有待于进一步深入的研究。

参考文献

- 1 官国先,张祥福,杨发端,等.转化生长因子型受体在大肠癌及癌前病变中的表达.中华病理学杂志,1998,27(4):306-307.
- 2 Ono K, Yonenobu K, Miyamoto S, et al. Pathology of ossification of the posterior longitudinal ligament and ligamentum flavum. Clin Orthop, 1999, 359:18-26.
- 3 Jong-Beom P, Ham C, Jir-Dyung L. Quantitative analysis of transforming growth factor-beta in ligamentum flavum of lumbar spinal stenosis and disc herniation. Spine, 2001, 26(2):492-495.
- 4 Fukuyama S, Nakamura T, Ikeda T, et al. The effect of mechanical stress on hypertrophy of the lumbar ligamentum flavum. J Spinal Disord, 1995, 8:126-130.
- 5 Li Q, Muragaki Y, Hatamura, et al. Stretch-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rabbit aortic media and a possible involvement of angiotensin and transforming growth factor. J Vasc Res, 1998, 35:93-103.
- 6 Hirakata M, Kaname S, Chung UG, et al. Tyrosin kinase dependent expression of TGF- β induced by stretch in mesangial cells. Kidney Int, 1997, 51:1028-1036.
- 7 Nakatani T, Marui T, Hitora T, et al. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor- β_1 . J Orthop Res, 2002, 20:1380-1386.
- 8 Marui T, Niyibizi C, Georgescu HI, et al. Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. J Orthop Res. 1997, 15:18-23.
- 9 Lee TY, Chin GS, Kim WJ, et al. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. Ann Plast Surg, 1999, 43:179-184.
- 10 Friess H, Lu Z, Riesle E, et al. Enhanced expression of TGF- β s and their receptors in human acute pancreatitis. Ann Surg, 1998, 227:95-104.
- 11 Smith JD, Bryant SR, Couper LL, et al. Soluble transforming growth factor-beta type receptor inhibits negative remodeling, fibroblast transdifferentiation, and intimal lesion formation but not endothelial growth. Circ Res, 1999, 84:1212-1222.
- 12 Johnson DW, Saunders HJ, Baxter RC, et al. Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells. Kidney Int, 1998, 54:747-757.

(收稿日期:2004-03-01 本文编辑:王宏)

·读者·作者·编者·

本刊对“通讯作者”有关事宜的声明

本刊要求集体署名的文章必须明确通讯作者。凡文章内注明通信作者的稿件,与该稿件相关的一切事宜(包括邮寄稿件、收稿通知单、退稿、退修稿件、校样、版面费、稿费、赠刊等)均与通信作者联系。如文内未注明通信作者的文章,按国际惯例,有关稿件的一切事宜均与第一作者联系,特此声明!

本刊编辑部