

盘外置管法注射胶原酶溶解髓核的实验研究

滕蔚然¹, 杜宁²

(1. 上海第二医科大学附属新华医院伤科, 上海 200092; 2. 上海市伤骨科研究所)

【摘要】 目的: 观察盘外置管法注射胶原酶是否有利于髓核的溶解以及胶原酶的注射剂量与滴速对髓核溶解的影响。方法: 实验中模仿临床的盘外置管法, 将手术中摘取的髓核在体外与胶原酶反应, 并且改变给药的速度和剂量, 运用免疫组化的单克隆抗体技术对髓核中I、II、III型胶原进行原位定性、定量研究以及HE染色对髓核中胶原的形态进行观察。结果: 缓慢滴注胶原酶可使髓核中胶原含量明显减少, 尤其是I、II型胶原的溶解更充分。结论: 采用盘外置管法慢速滴注胶原酶, 可提高胶原酶注射的精确性, 延长胶原酶与髓核的作用时间。

【关键词】 椎间盘化学溶解术; 胶原酶类; 椎间盘移位

An experimental study on nucleus pulposus dissolution via guttatum epidural injection of collagenase TENG Weiran*, DU Ning.* The Affiliated Xinhua Hospital of the 2nd Medical University of Shanghai, Shanghai 200092, China

ABSTRACT Objective: To investigate whether or not the guttatum epidural injection with collagenase is helpful to the dissolution of nucleus pulposus and the effects of the dosage and rate of guttatum epidural injection on the dissolution. **Methods:** In this in vitro study, the surgically-removed human disc material was incubated with the enzyme. The rate of injection and the doses of collagenase were changed during the experiment. Monoclonal antibodies of types I, II and III collagens and HE staining technique were used. The types I, II and III collagens in situ were quantitatively detected and the discolysis was investigated. **Results:** More nucleus collagens, especially types I and II collagens, were digested by guttatum epidural injection of collagenase at low speed. **Conclusion:** Guttatum epidural injection at low speed can enhance the accuracy of the injection and extend the reactive time of collagenase with the nucleus collagens. Thus, guttatum epidural injection at low speed is beneficial to treat the lumbar disc herniation.

Key words Intervertebral disk chemolysis; Collagenase; Intervertebral disk displacement

腰椎间盘突出症是引起腰腿痛最常见的原因之一, 胶原酶注射术是治疗椎间盘突出症的一种微创性治疗方法。胶原酶注射术是将胶原酶注射到突出椎间盘外周或盘中, 使之与髓核作用, 加速髓核的溶解, 以达到治疗的目的。胶原酶注射的方法有多种, 从注射方法分类有盘内法、盘外法和盘内外混合注射法; 从注射速度分类有即刻给药法和缓慢持续给药法。为了寻找更有效的给药途径, 观察盘外置管法注射胶原酶是否有利于髓核的溶解, 进行了本次实验研究。

1 材料和方法

1.1 材料 共有7枚髓核用于本次实验, 这些髓核取自7例腰椎间盘突出症患者, 这些患者均明确诊断为椎间盘突出症, 于2003年3月至2004年3月住院行髓核摘除术。患者年龄20~61岁, 平均42.9岁。主要试剂: Chemicon公司的鼠抗I型胶原单克隆抗体试剂、鼠抗II型胶原单克隆抗体试剂和鼠抗III型胶原单克隆抗体试剂; Lab Vision公司的羊抗鼠

HRP/DAB二抗试剂盒; 乔源公司生产的注射用胶原酶无菌冻干粉针剂。

1.2 方法 获得髓核后, 立刻送至实验室, 在无菌条件下, 将每枚髓核分成同样大小4份, 随机分配到3个实验组(A、B、C)和1个对照组(D)。模仿胶原酶盘外置管注射法, 在髓核上滴注胶原酶溶液, 并改变注药速度和给药剂量, 观察短期内髓核的变化和胶原的分解, 把A、B、C组分别以3种反应条件与胶原酶反应。A组1200U胶原酶用生理盐水稀释为4ml, 以滴速为0.4ml/min匀速滴加在髓核上, 模仿临床在手术室即刻推药法, 10min推完, 滴完后再缓滴生理盐水, 滴速为0.01ml/min, 观察5d; B组1200U胶原酶用生理盐水稀释为4ml, 以滴速为0.01ml/min匀速滴加在髓核上, 模仿临床上置管缓慢滴注法, 需6h以上滴完, 滴完后再缓滴生理盐水, 滴速为0.01ml/min, 观察5d; C组2400U胶原酶用生理盐水稀释为8ml, 以滴速为0.4ml/min匀速滴加在髓核上, 模仿临床手术室即刻推药法, 滴完后再缓滴生理盐水, 滴速为0.01ml/min, 观察5d; D组为对照组, 用0.9%生理盐水代替

胶原酶,以滴速为 0.4 ml/min 匀速滴加在髓核上。

髓核与胶原酶反应后在超净台放置观察 5 d, Leica 恒温冰冻切片机切片,冰冻切片厚 2 μm,用多聚甲醛固定,放置于 -20 ℃ 冰箱保存。把各组髓核所制成的冰冻切片进行 HE 染色和免疫组化染色,通过 HE 染色观察各组髓核中胶原的形态,免疫组化染色采用 I、II、III 型胶原的单克隆抗体对切片中的胶原定位,用 DAB 显色。最后对染色后的切片进行图像分析及统计学分析。

1.3 图像处理 Olympus AH2 显微镜下观察采集图像,并将图片输入计算机处理,在 Leica QW550 图像分析系统上对免疫组化染色切片的着色结果进行定量分析。胶原含量以免疫组化阳性指数(positive index, PI)表示,分别测定一定面积中的阳性信号面积和阳性信号平均灰度值,计算免疫组化阳性指数(PI)^[1]。PI= 阳性信号面积/所测组织面积 × 平均阳性程度。

1.4 统计方法 数据处理用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;组间均数比较用 *F* 检验;其中两两比较用 *q* 检验。均以 *P* < 0.05 为差异显著的标准。

2 结果

2.1 HE 染色结果观察 实验组髓核中胶原纤维变得纤细,甚至可见到部分纤维已断裂,排列稀疏,尤其在 B 组大量胶原纤维已经消失。而对照组髓核中胶原纤维粗大、扭曲、成团成簇状,排列紊乱。

2.2 免疫组化染色一般观察 4 组髓核的 I、II、III 型胶原均显色。对照组中, I 型胶原呈浅棕色,排列散乱, II 型胶原呈深棕色,排列致密, III 型胶原显色比 I 型胶原略深;实验组中, I、II、III 型胶原的着色均比对照组浅,可见到胶原纤维相互分离,处于降解状态。

表 1 髓核与胶原酶反应 5 d 髓核中 I、II、III 型胶原含量 PI 值比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of the contents of types I, II, III collagens in nucleus pulposus 5 days after guttatum epidural injection of collagenase($\bar{x} \pm s$)

Groups	Type I collagen	Type II collagen	Type III collagen
A	43.33 ± 12.60*	51.03 ± 14.16*	39.67 ± 7.89*
B	10.54 ± 6.73*▲	20.06 ± 5.13*▲	17.72 ± 6.32*
C	40.56 ± 11.93*	42.97 ± 7.61*	39.31 ± 10.07*
D	75.68 ± 17.70	126.04 ± 16.54	85.39 ± 15.31

注: * 实验组与对照组比较, *P* < 0.001; ▲ B 组与 A、C 组比较, *P* < 0.05
 Note: * *P* < 0.001 when control group was compared with group A, B and C; ▲ *P* < 0.05 when group A and C was compared with group B

2.3 免疫组化染色后髓核胶原含量比较 计算每组髓核中 I、II、III 型胶原含量 PI 值进行统计分析,结果见表 1。I、II、III 型胶原含量在实验组与对照组间差异存在显著性(*P* < 0.001)。在实验组中进行两两比较, B 组的 I、II 型胶原含量与 A、C 组相比差异有显著性(*P* < 0.05)。

3 讨论

盘外注射法可分为以下几种方法: ①硬膜外腔前间隙盘

外注射法,穿刺针从旁路进针,通过病变椎间孔到达硬膜外腔前间隙,采用该方法可将胶原酶注射到突出髓核处; ②硬膜外腔后间隙盘外注射法,包括硬膜外麻醉穿刺途径和骶管裂孔穿刺途径,此方法是将胶原酶注射到突出节段的硬膜外腔后间隙; ③硬膜外腔侧隐窝穿刺法,包括经椎板外切迹穿刺和经小关节突内缘穿刺,可将胶原酶注射到突出节段的硬膜外腔。不论采用何种穿刺方法,盘外注射法都是把胶原酶注射到突出椎间盘附近的硬膜外腔,因此避免了盘内注射时所引起的副反应^[2],但是,硬膜外腔是一个负压腔室,有利于药物扩散,注入的胶原酶溶液会沿着硬膜囊向两侧及上下节段扩散,降低了突出髓核周围的胶原酶浓度,而影响了疗效。手术过程中通过 C 形臂 X 线机观察,盘外注射即刻给药法注射胶原酶,推药速度越快,胶原酶向上下四周扩散的范围越大。因此,为了提高胶原酶注射术溶解髓核的疗效,从理论上讲应该提高胶原酶注射的精确性,使胶原酶长时间高浓度地作用在突出髓核的周围,为此,我们在临床上把在手术室直接通过穿刺针推药的方法改为置管法,将导管放在突出髓核的边缘上,用微型注射泵控制速度,慢速滴药,一般 1 200 U 胶原酶溶于 3 ml 生理盐水,分 3~6 h 滴完。

在观察临床疗效后,笔者设计本次实验,更直接地观察到髓核的溶解,并计算出通过置管法溶解髓核后胶原的含量。在实验组中, A、B、C 组的髓核外形在给药后有较明显的改变,变得柔软而黏稠,而对照组 D 组中髓核外形没有明显改变,仍然有固定的形态,可以设想这是因为前者的胶原框架被破坏,而后的胶原仍保持原状。HE 染色更进一步地诠释了上述变化, A、C 组模仿临床上即刻给药法,滴速相对较快,5 d 后的 HE 染色可以看出胶原纤维变得纤细,部分出现断裂, B 组模仿临床上置管缓慢滴注法,采用的是长时间缓慢给药的方法,反应 5 d 后 HE 染色可以看出胶原纤维排列比 A、C 两组更为稀疏,大量纤维已经消失,而对照组中仍有大量胶原纤维存在。通过免疫组化染色的胶原含量 PI 值测定,明确得出了各个实验组与对照组的胶原含量,统计结果可以看出,各个实验组的 I、II、III 型胶原含量与对照组相比差异有显著性(*P* < 0.001),实验组胶原含量明显少于对照组,模仿置管法持续给药的 B 组的 I、II 型胶原含量与 A、C 组相比差异有显著性(*P* < 0.05), B 组的 I、II 型胶原含量明显少于其他 2 个实验组。

实验证明,盘外置管法注射胶原酶能有效溶解髓核。置管法注射胶原酶提高了给药的精确性,通过微泵控制滴速,缓慢持续地给药能够使胶原酶溶液长时间高浓度地作用在突出的髓核上,有利于髓核中胶原的溶解。

参考文献

- 1 张锦生. 现代组织化学原理及应用. 第 2 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003. 133.
- 2 Wittenberg RH, Oppel S, Rubenthaler FA, et al. Five year results from chemonucleolysis with chymopapain or collagenase: A prospective randomized study. Spine, 2001, 26(17): 1835-1841.

(收稿日期: 2005-05-10 本文编辑: 王宏)