doi:10.11659/jjssx.07E021142

·基础研究·

基于硬组织切片染色的颈椎钩椎关节的解剖研究

李梓瑜[1],刘宇航[1],史 君[2],曲星月[1],袁宏伟[3],李 琨[4,5],陈 杰[4],李筱贺[4],王海燕[4],和雨洁[4],李志军[4,5],张少杰[4,5],王 星[4,5] (1.内蒙古医科大学研究生院,内蒙古 呼和浩特 010110;2.内蒙古医科大学基础医学院生理学教研室,内蒙古 呼和浩特 010110;3.内蒙古医科大学基础医学院病理学教研室,内蒙古 呼和浩特 010110;4.内蒙古医科大学基础医学院解剖学教研室,内蒙古 呼和浩特 010110;5.内蒙古医科大学数字医学中心,内蒙古 呼和浩特 010110)

[摘 要] **目的** 利用硬组织切片技术、苏木精—伊红染色及甲苯胺蓝染色方法对成人钩椎关节的组织形态及各层结构进行观察,并对钩椎关节的解剖结构进行探讨。**方法** 选取成年男性全颈椎标本,截取 C_2 ~ C_6 钩椎关节进行福尔马林固定,脱水,于光固化机中包埋聚合。利用硬组织切片机对标本进行切片处理,磨片机对标本进行磨片处理,并使用苏木精—伊红及甲苯胺蓝进行染色。观察染色后钩椎关节组织形态及结构特点。**结果** 苏木精—伊红染色的钩椎关节骨切片可清晰见到椎体及椎间盘被钙盐沉积分开,上下椎体切面可见粉染骨小梁,骨小梁间可见骨髓组织。甲苯胺蓝染色的钩椎关节骨切片可见成骨细胞和破骨细胞的各种骨组织形态,椎体切面可见体积、宽度、分布均正常的蓝色骨小梁。**结论** 硬组织切片技术可以较完整保留钩椎关节的固有组织形态,经苏木精—伊红染色、甲苯胺蓝染色均可清晰观察到钩椎关节各层结构及形态特征。

[关键词] 钩椎关节;硬组织切片;苏木精—伊红染色;甲苯胺蓝染色;解剖结构

[中图分类号] R323 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-07-28

Anatomical study of cervical Luschka joint based on hard tissue section staining

LI Zi-yu[1], LIU Yu-hang[1], SHI Jun[2], QU Xing-yue[1], YUAN Hong-wei[3], LI Kun[4,5], CHEN Jie[4], LI Xiao-he[4], WANG Hai-yan[4], HE Yu-jie[4], LI Zhi-jun[4,5], ZHANG Shao-jie[4,5], WANG Xing[4,5] (1. Graduate School of Inner Mongolia Medical University, Huhhot Inner Mongolia 010110, China; 2. Department of Physiology of Basic Medical School, Inner Mongolia Medical University, Huhhot Inner Mongolia 010110, China; 3. Department of Pathology of Basic Medical School, Inner Mongolia Medical University, Huhhot Inner Mongolia 010110, China; 4. Department of Anatomy of Basic Medical School, Inner Mongolia Medical University, Huhhot Inner Mongolia 010110, China; 5. Center of Digital Medicine, Inner Mongolia Medical University, Huhhot Inner Mongolia 010110, China)

[基金项目] 国家自然科学基金(81860382,81860383,81560348);内蒙古自然科学基金(2020MS03061,2019MS08017,2019MS08139);内蒙古自治区科技发展计划项目(2019GG158);内蒙古自治区卫生健康委医疗卫生科技计划项目(202201217);内蒙古自治区高等学校青年科技英才项目(NJYT22009);内蒙古医科大学科研重点项目(YKD2021ZD011)

[通信作者] 王 星,E-mail:wangxing197911@163.com;张少杰,E-mail:24395982@qq.com

[14] 王云飞,骞立刚,焦建宝,等.羊耳菊水提物减轻免疫紊乱和软骨退变对 ACLT 诱导的骨关节炎大鼠保护作用[J].医学分子生物学杂志,2021,18(3):211 -216. doi:10.3870/j.issn.1672 -8009.2021.03.009.

[15] 张建业,张卫华,韩 俊,等.丹参酮ⅡA 抑制软骨细胞炎症、软骨基质降解的机制及对大鼠骨关节炎的影响[J].解放军医药杂志,2021,33(3):10 -16. doi:10.3969/j.issn.2095 -140X.2021.03.003.

[16] Wang C,Gao Y,Zhang Z,et al. Ursolic acid protects chondrocytes,exhibits anti-inflammatory properties via regulation of the NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway and ameliorates osteoarthritis[J]. Biomed Pharmacother,2020,130:110568. doi:10.1016/j.biopha.2020.110568.

[17] Ma TW,Wen YJ,Song XP,et al. Puerarin inhibits the development of osteoarthritis through antiinflammatory and antimatrix-degrading pathways in osteoarthritis-induced rat model[J]. Phytother Res,2020,35(5):2579 -2593. doi:10.1002/ptr.6988.

[18] Zhang B,Zhou H,Cheng Q,et al. Low-frequency low energy ultrasound combined with microbubbles induces distinct apoptosis of A7r5 cells[J]. Mol Med Rep,2014,10(6):3282 -3288. doi:10.3892/mmr.2014.2654.

[19] 瞿杭波,李庆庆,蒋增辉,等.姜黄素对骨关节炎软骨细胞增殖及分泌 MMP-13、IL-6 的影响[J].中国现代医生,2020,58(26):38 -40.

[20] Sentchordi-Montané L,Aza-Carmona M,Benito-Sanz S,et al. Heterozygous aggrecan variants are associated with short stature and brachydactyly:description of 16 probands and a review of the literature[J]. Clin Endocrinol (Oxf),2018,88(6):820 -829. doi:10.1111/cen.13581.

[21] Yuasa T,OtanI T,Koike T,et al. Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes:its possible role in joint degeneration[J]. Lab Invest,2008,88(3):264 -274. doi:10.1038/labinvest.3700747.

[22] 蔡 鑫,唐 芳,马武开,等.中医药调控 Wnt/β-catenin 信号治疗膝骨关节炎的研究进展[J].贵州中医药大学学报,2020,42(6):81 -85. doi:10.16588/j.cnki.issn2096 -8426.2020.06.018.

[23] Zhong G,Liang R,Yao J,et al. Artemisinin ameliorates osteoarthritis by inhibiting the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem,2018,51(6):2575 -2590. doi:10.1159/000495926.

[24] Ding QH,Ye CY,Chen EM,et al. Emodin ameliorates cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting NF-κB and Wnt/β-catenin signaling in-vitro and in-vivo[J]. Int Immunopharmacol,2018,61:222 -230. doi:10.1016/j.intimp.2018.05.026.

(编辑:贺绍梅)

Abstract: **Objective** To observe the histological morphology and structure of various layers of the Luschka joint in adult by hard tissue section technique, hematoxylin-eosin staining and toluidine blue staining, and to explore the anatomical structure of the Luschka joint. **Methods** The whole cervical vertebra specimens of male adult were selected, the C_2 to C_6 Luschka joint were cut for formalin fixation, dehydration, and embedded and polymerized in a light curing machine. The specimens were incised with a hard tissue slicer, grinded by a grinding machine, and stained with hematoxylin-eosin and toluidine blue. The histological morphology and structural characteristics of the Luschka joint after staining were observed. **Results** In the bone sections of Luschka joint stained with hematoxylin-eosin, it was visible that the vertebral bodies and intervertebral discs were separated by calcium salt deposition, powder-stained bone trabeculae could be seen on the upper and lower sections of vertebral bodies, and bone marrow tissue could be seen between the bone trabeculae. In the bone sections of Luschka joint stained with toluidine blue, various bone tissue morphologies of osteoblasts and osteoclasts were visible, and blue trabeculae with normal volume, width and distribution were visible in the section of vertebral body. **Conclusion** The hard tissue section technique can retain the intrinsic histological morphology of Luschka joint completely, and the structure and morphological characteristics of various layer in the Luschka joint can be clearly observed by hematoxylin-eosin staining and toluidine blue staining.

Keywords: Luschka joint; hard tissue section; hematoxylin-eosin staining; toluidine blue staining; anatomical structure

钩椎关节作为颈椎特有解剖结构,对维持人体颈椎正常生理活动起重要作用,其结构受损可造成各类颈部疾病。钩椎关节位于 C_2 ~ C_6 椎体后外侧,由后部两侧的小唇状椎体钩和相应的椎体下斜坡构成[1-2]。钩椎关节特殊的解剖位置使其在颈椎的运动及疾病中扮演着重要角色。在颈椎活动范围内,其外侧关节的相关运动是颈椎独特的活动特征[3-4]。钩椎关节的主要作用在于维持颈椎运动单元的稳定性和活动性,承受应力负荷,防止椎间盘向外侧或后外侧突出[5-6];其压缩作用表现为在椎间孔处压迫神经根,以及钩椎关节的骨赘侧唇压迫椎动脉[7]。故钩椎关节受损所带来的一系列不良影响在临床上具有重要研究价值。

经检索文献发现,以往对钩椎关节的研究多为探讨其解剖结构,从而得到应用于临床方面的结论。例如:仝苗苗[8]利用影像学技术测量颈椎钩椎关节的主要组成结构及其相邻骨性结构的形态学参数,分析青少年颈椎组成结构的生长变化特点;王晓刚等[9]利用超声检查方法与图像特征对颈椎重要骨性标志及毗邻结构进行研究,提供了具有实用价值的超声引导下颈部结构影像资料;王星等[2]对 3 岁儿童尸体标本颈椎进行连续切片并用苏木精—伊红染色,观察学龄前期儿童钩椎关节组织的发育特点,得出学龄前期儿童的颈椎尚未形成钩椎关节的结论。但是目前极少有学者对钩椎关节进行组织结构的细致研究,因此无法确定钩椎关节内部组织成分,无法分析其在生长发育过程中组织形态方面的变化,本研究即针对这一问题展开了观察与分析。

目前采用苏木精—伊红染色结合甲苯胺蓝染色、番红—固绿染色及阿尔新蓝过碘酸雪夫等染色法可以全面客观地观察到目标结构的组织形态特征[10]。故本研究利用苏木精—伊红染色和甲苯胺蓝染色对成人钩椎关节进行观察,并对钩椎关节的解剖结构进行探讨。

1 材料与方法

1.1 研究对象与主要试剂、仪器

选取 1 例成年男性全颈椎标本,截取 C_2 ~ C_6 钩椎关节进行脱水固定包埋。苏木精—伊红试剂盒,甲苯胺蓝试剂盒,光固化机,德国 EXAKT300CP 硬组织切片机,德国EXAKT400S磨片机,福尔马林液,梯度乙醇(70% ~95%),无水乙醇,Technovit 7200 树脂液,320 目、800 目、1 200目、4 000 目砂纸。

1.2 方法

标本经福尔马林液固定 48 h 后流水冲洗 24 h,行梯度乙醇(70% ~95%)上行脱水(每步 24 h),入无水乙醇 + Technovit 7200 树脂液(配制比 3∶7)浸液浸泡 2 d,入无水乙醇 + Technovit 7200 树脂液(配制比1∶1)浸液浸泡 2 d,入 Technovit 7200 树脂液浸泡 7 d 后,再入 Technovit 7200 树脂液浸泡 3 d,于光固化机中包埋聚合。将标本组织块取出,使用德国 EXAKT300CP 硬组织切片机对组织块进行不脱钙联合切片,切片厚度为 200 μm,以德国 EXAKT400S 磨片机依次使用320 目、800 目、1 200 目砂纸将切片磨至厚度为25 μm,最后以 4 000 目砂纸对打磨好的切片进行抛光。

苏木精—伊红染色:骨组织切片经梯度乙醇复水,浸入苏木精染色 3 ~8 min,流水冲洗,浸入 1% 盐酸酒精 30 s 进行分化,水洗,蒸馏水过洗,0.6% 氨水反蓝,流水冲洗,切片入伊红染液中染色 1 ~3 min,蒸馏水稍洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,将切片从二甲苯中取出稍晾干,中性树胶封片。

甲苯胺蓝染色:骨组织切片经梯度乙醇复水,甲苯胺蓝染色约 30 min,自来水冲洗,冰醋酸分化至细胞核清晰,自来水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.3 观察指标

观察钩椎关节中椎体、椎间盘、骨髓核、骨小梁、骨组织及骨髓组织的形态及结构特点。

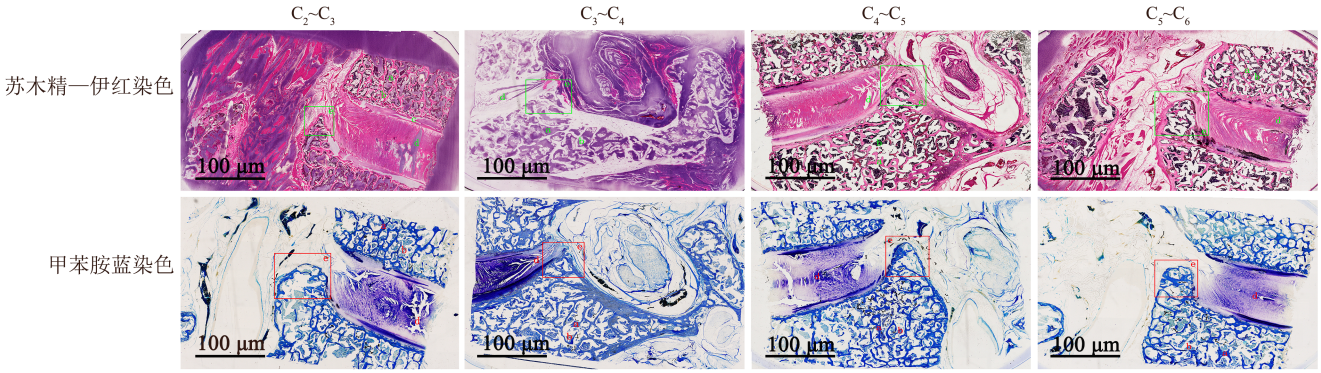
2 结果

2.1 苏木精—伊红染色结果

苏木精—伊红染色的钩椎关节侧纵切面上可见上下椎体及中间的椎间盘。周围结缔组织与椎体相通处可见不着色的钙盐沉积,中间可见骨髓核(软骨样基质),上下椎体切面可见粉染骨小梁,骨小梁之间可见紫色骨髓组织(图1)。

2.2 甲苯胺蓝染色结果

甲苯胺蓝染色的钩椎关节中可以观察到成骨细胞和破骨细胞的各种骨组织形态。切片中可见椎体切面蓝染骨小梁,骨小梁体积、宽度及分布均正常(图1)。



a:骨小梁;b:骨髓组织;c:钙盐沉积;d:骨髓核;e:钩突(方框)

图1 成人 C_2 ~ C_6 苏木精—伊红染色、甲苯胺蓝染色结果

3 讨论

钩椎关节是成人颈椎的结构,具有独特性,其类似于“双莲桥关节”,最早由德国解剖学家 Luschka 在对成人颈椎的局部解剖过程中发现[11]。钩椎关节作为颈椎特有的结构,对头颅及寰枢椎生长发育、生物力学稳定、三维支撑与多向运动、颈髓保护和脊柱多维运动起着至关重要的限制和保护作用[12]。详细观察钩椎关节形态学结构有助于了解生长发育过程中钩椎关节基本组织变化及内部组织形成情况。

为研究钩椎关节组织形态学结构,本实验将苏木精—伊红染色和甲苯胺蓝染色作为基本染色法,结合硬组织切片技术对钩椎关节形态学结构进行探讨。硬组织切片技术能够完整地保留骨组织原本的结构及成分,因此已成为目前最常用的观察骨组织的方式。其对于不脱钙的骨组织切片具有极佳的适配性,对研究骨组织成分以及骨形成有重要作用[13],对于了解生长发育及组织构成具有极大意义。既往文献发现,苏木精—伊红染色可避免因为钙的存在而受影响的骨组织切片[14-16]。苏木精—伊红染色作为标准的染色方法,可将胞质内的核糖体及细胞核内的染色质染成紫蓝色,将细胞质染成红色[17-18],该染色法通过阴阳离子互相结合,可起到加强固定效果[19]。在识别各种潜在的恶性病变中,甲苯胺蓝是一种实用且有效的辅助诊断工具[20-21],其吩噻嗪类碱性染料的特征可将细胞核染成蓝色[22-23]。本研究在对钩椎关节的观察中采用苏木精—伊红染色和甲苯胺蓝染色,在保留骨组织结构的情况下简化了实验步骤,又避免了脱钙失败对钩椎关节切片和染色的影响,两种染色方法相结合,可见钩椎关节骨小梁体积、宽度及分布均匀正常,骨髓组织分布于骨小梁之间,钙盐沉积在周围结缔组织与椎体相通处,上下椎体和椎间盘间隔鲜明。

在人体解剖结构中,钩椎关节及其毗邻结构对颈椎疾病的发生有着重要影响。Clausen 等[24]对钩椎关节生物力学进行了有限元分析发现,钩椎关节的形成对下颈椎耦合运动起着重要作用,其可增加颈椎的活动度,而钩椎关节中钩突的形成却对颈椎活动有着限制力学载荷的影响。钩突的病变或增生可压迫和刺激周围的血管与神经,从而产生不同类型颈椎病的相关症状[25-26];钩突也是骨关节炎发生的常见部位,关节表面因摩擦受损形成点蚀和磨痕,钩突变形成为骨赘刺,从而导致椎间孔狭窄[27-28]。钩突骨赘也可引起颈椎刺激或颈椎节段性不稳定[29-30],骨赘的形成会压迫椎动脉及交感神经,对颈椎型心绞痛的发病机制产生一定的影响[31]。

钩椎关节作为最早退变的关节之一,不仅会导致成人疾病,在儿童生长发育过程中也起着重要作用。

随着现代影像技术和相关研究手段的不断深入,普遍认为钩椎关节是根据颈椎发育的生物力学及随着年龄的增长、负重增加,颈椎钩突区域发生变化而形成的,即为反应性骨形成和退行性变的结果[32-33]。而儿童颈椎活动度有限,且颈椎负重较小,所以在儿童时期未形成钩椎关节[2]。故对钩椎关节的形成及影响等临床研究还有待深入。

综上,硬组织切片技术可以较完整地保留钩椎关节的固有组织形态,通过苏木精—伊红染色及甲苯胺蓝染色可清晰地观察成人钩椎关节的组织形态及各层结构。

[参考文献]

[1] Hartman J. Anatomy and clinical significance of the uncinate process and uncovertebral joint:a comprehensive review[J]. Clin Anat,2014,27(3):431-440. doi:10.1002/ca.22317.

[2] 王 星,康小燕,史 君,等.学龄前期儿童钩椎关节部位的组织学观察及意义[J].局解手术学杂志,2016,25(12):859-862. doi:10.11659/jjssx.06E016003.

[3] Yin Y,Qin X,Huang R,et al. Musculoskeletal ultrasound: a novel approachfor Luschka's joint and vertebral artery[J]. Med Sci Monit,2016,22:99-106. doi:10.12659/msm.896242.

[4] 杨 毅,刘 浩,孟 阳.钩椎关节及其与颈椎病关系的研究进展[J].中国脊柱脊髓杂志,2019,29(9):851-855. doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.09.12.

[5] 凌泽莎,贾功伟,虞乐华.钩椎关节增生对椎动脉型颈椎病影响的研究进展[J].中华物理医学与康复杂志,2013,35(8):668-670. doi:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.08.024.

[6] 王 星.青少年 Luschca 关节增龄变化的影像解剖学研究[D].呼和浩特:内蒙古医科大学,2010.

[7] 王 星.颈椎钩椎关节的基础与临床应用解剖学研究[D].北京:北京中医药大学,2021.

[8] 仝苗苗.13-17 岁青少年颈椎钩椎关节及其相邻骨性结构的影像学研究[D].呼和浩特:内蒙古医科大学,2020.

[9] 王晓刚,刘 颖,常洪波,等.颈椎及其毗邻结构的超声检查与临床意义[J].中国超声医学杂志,2020,36(7):581-584. doi:10.3969/j.issn.1002-0101.2020.07.003.

[10] 黄磊涛,赖 琦,李 帆,等.人腰椎小关节软骨不同染色方法的差异比较[J].中国组织工程研究,2017,21(24):3784-3789. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.24.003.

[11] 康小燕.7~12 岁儿童"Luschka joint"的数字化三维形态测量与有限元分析[D].呼和浩特:内蒙古医科大学,2016.

[12] 高改霞,卫小春,李 凯,等.大鼠膝关节软骨不同染色方法的差异[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(24):4385-4389. doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.24.004.

[13] Danz JC,Habegger M,Bosshardt DD,et al. Virtual tissue alignment and cutting plane definition:a new method to obtain optimal longitudinal histological sections[J]. J Anat,2014,224(2):85-94. doi:10.1111/joa.12140.

[14] 潘源城,张信照,陈顺有.三种染色方法观察骨骺损伤后骨桥形成过程的组织形态学特征[J].中国组织工程研究,2019,23(23):3649-3653. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.1308.

[15] 朱淑玲,武彤彤,吴惠如,等.不同脱钙条件对骨组织免疫组织化学染色抗原性的影响浅析[J].中国实用医药,2016,11(14):47-48. doi:10.14163/j.cnki.11-5547/r.2016.14.026.

[16] 徐丽娜,于顺禄.骨组织不脱钙大切片制作技术[J].临床与实验病理学杂志,2018,34(12):1397-1399. doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.12.029.

[17] 蒙芝健,吴强初,杨硕望,等.儿童陈旧性枢椎齿状突骨折并寰枢椎关节脱位后路手术的体会[J].广西医学,2012,34(11):1590-1591. doi:10.3969/j.issn.1006-5725.2010.12.020.

[18] 锡林宝勒日,徐万龙,白靖平,等.三种尼氏小体染色方法对放疗后犬脊髓神经元显示效果的比较[J].实用医学杂志,2010,26(12):2112-2114. doi:10.3969/j.issn.1006-5725.2010.12.020.

[19] 刘晓娟.组织化学染色方法在生长板组织学研究中的应用[D].石家庄:河北医科大学,2007.

[20] Awale R,Maji R,Patil P,et al. Toluidine blue:rapid and simple malaria parasite screening and species identification[J]. Pan Afr Med J,2017,28:27. doi:10.11604/pamj.2017.28.27.12488.

[21] Ribatti D. The staining of mast cells:a historical overview[J]. Int Arch Allergy Immunol,2018,176(1):55-60. doi:10.1159/000487538.

[22] 黄 师,侯铁胜,赵 鑫,等.山羊颈椎能成为人类颈椎的良好模型吗?[J].中国临床解剖学杂志,2008,26(3):329-331. doi:10.3969/j.issn.1001-165X.2008.03.029.

[23] Vidal BC,Mello MLS. Toluidine blue staining for cell and tissue biology applications[J]. Acta Histochem,2019,121(2):101-112. doi:10.1016/j.acthis.2018.11.005.

[24] Clausen JD,Goel VK,Traynelis VC,et al. Uncinate processes and Luschka joints influence the biomechanics of the cervical spine: quantification using a finite element model of the C5-C6 segment[J]. J Orthop Res,1997,15(3):342-347. doi:10.1002/jor.1100150305.

[25] 郭 翔.双侧经寰枢关节螺钉及寰椎椎板钩内固定的基础研究和临床评价[D].上海:第二军医大学,2009.

[26] Kocabiyik N,Ercikti N,Tunali S. Morphometric analysis of the uncinate processes of the cervical vertebrae[J]. Folia Morphol (Warsz),2017,76(3):440-445. doi:10.5603/FM.a2017.0010.

[27] Poulet B,Staines KA. New developments in osteoarthritis and cartilage biology[J]. Curr Opin Pharmacol,2016,28:8-13. doi:10.1016/j.coph.2016.02.009.

[28] Roelofs AJ,Kania K,Rafipay AJ,et al. Identification of the skeletal progenitor cells forming osteophytes in osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis,2020,79(12):1625-1634. doi:10.1136/annrheumdis-2020-218350.

[29] Wang Z,Wang X,Yuan W,et al. Degenerative pathological irritations to cervical PLL may play a role in presenting sympathetic symptoms[J]. Med Hypotheses,2011,77(5):921-923. doi:10.1016/j.mehy.2011.08.012.

[30] Wong SH,Chiu KY,Yan CH. Review article:osteophytes[J]. J Orthop Surg (Hong Kong),2016,24(3):403-410. doi:10.1177/1602400327.

[31] Feng F,Chen XY,Shen L,et al. Different surgical strategy for patients with cervical angina: a potential role of Luschka's joint osteophyte[J]. Orthop Surg,2020,12(6):1612-1620. doi:10.1111/os.12751.

[32] 吴学元,张党锋,刘洪亮,等.椎动脉型颈椎病外科治疗效果的观察[J].西安交通大学学报(医学版),2013,34(5):690-691. doi:10.7652/jdyxb201305031.

[33] Hartman J. Anatomy and clinical significance of the uncinate process and uncovertebral joint:a comprehensive review[J]. Clin Anat,2014,27(3):431-440. doi:10.1002/ca.22317.

(编辑:杨 颖)