

• 骨骼肌肉影像学 •

腰椎间盘突出胶原含量变化影响 MRI 信号强度的研究

余文昌, 杨建勇, 庄文权, 陈韵彬, 郑石芳

【摘要】 目的:研究退变腰椎间盘突出组织胶原含量的变化对 MRI 信号强度的影响。**方法:**28 例患者行腰椎间盘突出 MRI 扫描,依据 T₂WI 信号强度对其退变程度分为三类;测量拟手术椎间盘及脑脊液 T₂WI 信号强度,计算出二者的比值。全部患者行 PLD 手术,取出的 30 个髓核标本行 I、II 型胶原的免疫组化染色,并测定染色区的平均光密度以及半定量胶原含量。**结果:**全部髓核组织中均有 I、II 型胶原的阳性染色,II、III 类椎间盘胶原染色强度分别为 0.50 ± 0.08 、 0.54 ± 0.06 ,二者之间差异有显著性意义($t = -2.51, P = 0.02$)。胶原染色总强度与平均信号强度比值之间的相关系数为 $-0.73 (P < 0.001)$ 。**结论:**腰椎间盘突出时,胶原含量的增多是引起椎间盘 T₂WI 信号强度降低的生物化学基础之一。

【关键词】 椎间盘突出,腰椎;磁共振成像;免疫组织化学;胶原

【中图分类号】R445.2 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1000-0313(2005)08-0721-03

Correlative Study on Collagen Content of Degenerative Lumbar Intervertebral Disc and MRI Signal Intensity YU Wen-chang, YANG Jian-yong, ZHUANG Wen-quan, et al. Department of Radiology, Fujian Province Tumor Hospital, Fuzhou 350014, P. R. China

【Abstract】 Objective: To study change of collagen content cause the influence to MRI signal intensity (SI) of lumbar intervertebral disc. **Methods:** 28 cases with lumbar intervertebral disc herniation received MRI examination. All discs were classified into three categories according to their SI in T₂WI image. After SI of disc and cerebrospinal fluid SI were measured, the ratio of disc SI to cerebrospinal fluid SI was calculated. All cases received PLD procedure and 30 specimens of lumbar intervertebral disc were got. The type I and II, collagen in the specimens were stained by the method of immunohistochemical method. The optical density means of positive staining areas were measured to represent for the collagen content. **Results:** There existed positive staining areas of I, II type, collagen in all specimens. The optical density means of II, III type, collagen were respectively 0.4798 ± 0.0783 , 0.5421 ± 0.0579 . There was statistically significant difference between them ($t = -2.509, P = 0.018$). The correlative coefficient between SI ratio and collagen staining intensity was $-0.728 (P = 0.000)$. **Conclusion:** Increasing of collagen content is one of biochemical backgrounds to cause the decreasing of disc T₂WI signal intensity when lumbar intervertebral disc degenerates.

【Key words】 Intervertebral disc herniation, lumbar vertebrae; Magnetic resonance imaging; Immunohistochemistry; Collagen

当腰椎间盘突出发生退变时,髓核内蛋白多糖含量减少、胶原含量增多与水分的减少之间存在内在联系,水分含量的变化引起椎间盘 MRI 信号强度改变^[1]。本文测量不同退变程度椎间盘髓核胶原蛋白免疫组化阳性染色区光密度值,以半定量显示胶原含量的差异,并分析它与椎间盘 T₂WI 信号强度测量值之间的相关性,旨在揭示退变椎间盘内胶原含量的变化对 MRI 信号强度的影响。

材料与方法

本组 28 例患者确诊为腰椎间盘突出症,男 18 例,女 10 例,年龄 25~71 岁,平均 43.1 岁;症状出现时间为 2~10 年。28 例中有 2 例 L₄₋₅、L₅-S₁ 椎间盘同时行经皮穿刺椎间盘切除术(percutaneous lumbar dis-

cectomy, PLD); 18 例行 L₄₋₅ 椎间盘 PLD 术; 8 例行 L₅-S₁ 椎间盘 PLD 术,共选用 30 个椎间盘标本。手术中取出的髓核组织用作胶原的免疫组化染色和常规病理染色。

全部椎间盘 MRI 扫描:采用 Siemens 1.5T Magnetom vision 超导型磁共振进行。脊柱阵列线圈,自旋回波序列,视野 260 mm × 260 mm,矩阵为 256 × 256,扫描范围包括 L₃₋₄、L₄₋₅、L₅-S₁ 三个椎间盘。矢状面 T₁WI 参数:TR 697 ms, TE 12 ms; T₂WI 参数:TR 3600 ms, TE 120 ms; 轴面 T₂WI 参数:TR 3900 ms, TE 120 ms; 平均采集 3 次。层厚、层距分别为 4 mm 和 0.4 mm。

椎间盘退变程度的评估:采用 Minna tertti^[2] 分类方法, MRI 上依据 T₂WI 信号强度将椎间盘分为 3 个种类: I 类,椎间盘为均匀明亮的高信号,示为正常椎间盘; II 类,椎间盘为灰色、不均匀、中等信号强度,示早期退行性变; III 类,外观黑暗,极低信号强度或者

作者单位: 350014 福州,福建省肿瘤医院放射科(余文昌、陈韵彬、郑石芳); 510089 广州,中山大学附属第一医院放射科(杨建勇、庄文权)

作者简介: 余文昌(1971-),男,湖北潜江人,博士,主要从事肿瘤影像诊断及介入放射治疗工作。

无信号,示明显退变(图 1~3)。

信号强度测量方案:用 MRI 机内的 Mean/Curve 测量软件进行测量,利用 T₂WI 矢状面图像,在拟手术的椎间盘髓核前、中、后部各选取一个圆形兴趣区,分别测量其信号强度;在腰椎段的脑脊液区域取 3 个兴趣区,分别测量其信号强度。3 个兴趣区信号强度的平均值代表该椎间盘或脑脊液的平均信号强度,计算椎间盘与脑脊液的平均信号强度比值。

I、II 型胶原的免疫组化染色:采用 SABC 法, DAB 显色。①石蜡组织切片,室温下干燥过夜,切片保存备用;②二甲苯脱蜡 2 次,每次 10 min;③100%的乙醇脱水 2 次,每次 2 min;④3%的双氧水室温下孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化酶的活性;⑤热修复抗原:将切片浸入 0.01M 的枸橼酸盐缓冲液中(PH=6),电炉加热至沸腾后断电,间隔 5 min 后,反复一次;待冷切后用 0.1M 的 PBS 洗涤 2 次;⑥滴加正常山羊血清封闭液,室温下孵育 10 min,甩去多余液体,不洗;⑦滴加 1:100 稀释的一抗,37℃孵育 2h;⑧滴加生物素化山羊抗兔的 IgG,20℃孵育 20 min,0.1M 的 PBS 洗涤 2 min×3 次。⑨滴加试剂 SABC,20℃孵育 20 min,0.1M 的 PBS 洗涤 5 min,4 次;⑩DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒,取 1 ml 的蒸馏水,加试剂盒中的 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后加至切片;室温显色,镜下控制反应时间,一般在 5~30 min;蒸馏水洗涤;■苏木素轻度复染,脱水,透明,封片。

平均光密度的测量方法:用德国 Zeiss Axiotron 研究型显微镜,图像放大 100 倍后全面浏览,找出阳性染色区域,将均匀染色的胶原置于测量区,之后改为 200 倍观察倍数,由 JVC KY-F3OB 彩色图像摄录仪将镜下的图像呈现于显示器上,再利用德国 Kontron Ibas 2.0 全自动图像分析系统测算出胶原组织的平均光密度。分别测量 I、II 型胶原的平均光密度,用二者之和代表胶原染色总强度。平均光密度与阳性染色度成正比,即平均光密度值越大,代表阳性染色越强,胶原组织含量越高。

统计方法:全部统计过程使用统计软件 SPSS 10.0 完成。标本内胶原蛋白的染色强度同平均信号强度比值之间的相关性采用 Pearson 相关检验,II、III 类椎间盘的 I、II 型胶原染色强度之间的差异

采用 *t* 检验。

结 果

在光学显微镜下观察,全部髓核组织中均有 I、II 型胶原的阳性染色。阳性反应表现为髓核组织内的 I、II 型胶原染色成棕黄色或深棕色;典型表现为平行的条带状,可以汇集成大片状的棕色染色区;有时在染色区内可发现软骨样细胞分布(图 4、5)。

经 Pearson 相关检验表明,胶原染色总强度与平均信号强度比值之间的相关系数为 -0.728 ($P < 0.001$),呈负相关。

II、III 类椎间盘胶原总染色强度相关统计学参数见表 1。

表 1 II、III 类椎间盘胶原总染色强度相关统计学参数

统计参数	总染色强度	
	II 类椎间盘	III 类椎间盘
最小值	0.32	0.42
最大值	0.57	0.62
均值	0.48	0.54
标准差	0.08	0.06

t 检验表明,II、III 类椎间盘胶原总染色强度之间的差异存在显著性意义, $t = -2.509$, $P = 0.018$,由此说明 III 类椎间盘胶原染色总强度明显高于 II 类椎间盘。



图 1 L₃₋₄ I 类椎间盘,MR 表现为均匀明亮高信号(箭),为正常椎间盘。

图 2 L₄₋₅ II 类椎间盘,MR 表现为灰色中等信号强度(箭),示早期退变。

图 3 L₅-S₁ III 类椎间盘,MR 表现为外观黑暗的极低信号强度(箭),示明显退变。

图 4 病理片示 I 型胶原的免疫组化染色,呈片状棕黄色(×200)。

图 5 病理片示 II 型胶原的免疫组化染色,平行的条带状分布,棕黄色。

讨 论

1. 用免疫组化技术半定量胶原含量的稳定性

免疫组化是用于显示大分子结构非常实用的技术,Roberts 等^[3]用此技术详细观察了人体椎间盘中各型胶原的分布及染色情况,发现正常椎间盘内Ⅱ型胶原广泛分布于细胞外基质中,而仅在外层纤维环中有Ⅰ型胶原染色。已有体外研究发现椎间盘内胶原与水分之间的相关系数为 $-0.735^{[4]}$,表明胶原蛋白含量增多与水分减少之间存在联系,而水分子是椎间盘内 MRI 敏感质子的主要来源,其含量的变化必定会引起椎间盘信号强度的改变,本实验基于此点来研究椎间盘平均信号强度同脑脊液信号强度比与胶原染色总强度之间的相关性。

本实验利用免疫组化的方法来染色显示髓核组织中的Ⅰ、Ⅱ型胶原,之后测定其平均光密度来反映胶原染色强度,是一种较客观的反映髓核内胶原含量差异的研究方法。因为实验中采用的是Ⅰ、Ⅱ型胶原的单克隆抗体,胶原相互之间没有交叉反应,保证了胶原染色的敏感性与特异性^[5];而且由于髓核内大量存在的胶原纤维染色呈片状,使用全自动图像分析系统测定平均光密度时,可以非常方便选取测定区域,避免了测定结果受到主观因素的影响^[6]。

本组胶原总的染色强度与平均信号强度比值之间的相关系数为 -0.728 ,相关系数在 $P=0.01$ 水平具有显著性意义。这充分说明,髓核组织内的胶原蛋白对腰椎间盘的 MRI 信号强度存在负性影响。已有文献表明胶原蛋白是一种 T_2 值较短的组织,其 MRI 信号衰减快,这将会影响到椎间盘 T_2WI 信号强度^[7]。

2. 用脑脊液信号强度校正腰椎间盘信号强度

尽管我们测量椎间盘 T_2WI 信号强度时,采用了选取椎间盘前、中、后部三个兴趣区分别测量后取平均值的方法,但实验中不可避免受到一定主观因素的影响,例如有时可能将兴趣区偏大而包括了部分终板;对向后突出的髓核选测量区时还会受到脑脊液部分容积的影响,而且由于本实验中腰椎的 MRI 扫描均采用脊柱阵列线圈, L_{4-5} 、 L_5-S_1 椎间盘在磁场中所处的位置存在一定差异,在腰椎中部的椎间盘信号强度偏高,因其最近表面线圈的中心远离中心的椎间盘信号强度值较低^[8]。为了消除主观、客观因素对测量的影响及克服仪器本身存在的不稳定因素^[9],引入了脑脊液 T_2WI 信号强度作为病变腰椎间盘信号强度的校正标准,以此建立平均信号强度比值。脑脊液是一种均质性液体,信号强度均匀,便于测量兴趣区的选取,稳定

性较好。

3. 不同退变程度椎间盘内胶原染色强度的差异

本实验结果表明,Ⅱ类椎间盘的胶原总染色强度为 0.48 ± 0.08 ;而Ⅲ类椎间盘内胶原总染色强度为 0.54 ± 0.06 ,经统计检验,Ⅲ类椎间盘组织内胶原总染色强度高于Ⅱ类椎间盘。由此表明随着椎间盘退变程度加剧,其内胶原含量增多,Kaapa 等^[10]的动物实验及推论为此提供了解释,当椎间盘的纤维环受到损伤时,纤维环可以通过Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型胶原的大量合成形成肉芽组织以达到修复,而髓核组织也发生继发退行性变,产生大量的Ⅰ、Ⅲ型胶原而纤维化。

总之,我们通过利用免疫组化的方法对椎间盘内胶原进行半定量分析,表明椎间盘组织内胶原蛋白的含量受到其退变程度的影响。腰椎间盘退变时,胶原含量的增多是引起椎间盘 T_2WI 信号强度降低的生物化学基础之一。

参考文献:

- [1] Mathur DE. Biomedical Implications of the Relaxation Behavior of Water Related to NMR Imaging[J]. Br J Radiol, 1984, 57(683): 955-976.
- [2] Minna terhti, Hannupaajanen, Mattilato, et al. Disc Degeneration in Magnetic Resonance Imaging: a Comparative Biochemical, Histologic and Radiologic Study in Cadaver Spines[J]. Spine, 16(6): 629-634.
- [3] Schollmeier G, Lahr-Eigen R, Lewandrowski KU, et al. Observation on Fiber-Forming Collagens in the Anulus Fibrosus[J]. Spine, 2000, 25(21): 2736-2741.
- [4] Weidenbaum M, Foster R, Best BA, et al. Correlating Magnetic Resonance Imaging with the Biochemical Content of the Normal Human Intervertebral Disc[J]. J Orthop Res, 1992, 10(4): 552-561.
- [5] Wick G, Nowack H, Hahn E, et al. Visualization of Type I and II Collagens in Tissue Sections by Immunohistologic Techniques[J]. J Immunol, 1976, 117(1): 298-303.
- [6] 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4(1): 89-92.
- [7] Bydder GM. New Approaches to Magnetic Resonance Imaging of Intervertebral Discs, Tendons, Ligaments and Menisci[J]. Spine, 2002, 15, 27(12): 1264-1268.
- [8] Lupma EK, Raininko R, Nummi PJ, et al. Suitability of Cerebrospinal Fluid as a Signal-Intensity Reference on MRI: Evaluation of Signal-Intensity Variations in the Lumbosacral Dural Sac[J]. Neuroradiology, 1997, 39(10): 728-732.
- [9] Hardy PA. Intervertebral Disks on MR Images: Variation in Signal Intensity with the Disk-to-Magnetic Field Orientation[J]. Radiology, 1996, 200(1): 143-147.
- [10] Kaapa E, Han X, Holm S, et al. Collagen Synthesis and Types I, III, IV, and VI Collagens in an Animal Model of Disc Degeneration[J]. Spine, 1995, 20(1): 59-67.

(收稿日期: 2004-11-29 修回日期: 2005-02-23)