

. 实验研究 .

脊髓拴系综合征终丝超微结构的观察分析

蒋擎玉 尚爱加 高 干 陶本章 汪 汇 王培新 孙梦纯 吴 言

【摘要】目的 探讨脊髓拴系综合征(TCS)病人脊髓圆锥末端终丝的结构变化,为TCS的诊治提供客观依据。方法 选择2021年10月~2022年5月手术切除的16例TCS病人的终丝标本,进行病理染色,并在显微镜和电镜下观察。结果 HE染色显示TCS终丝波浪状的弹性纤维明显减少,胶原纤维明显增多,可见大量的脂肪细胞。天狼猩红染色显示TCS终丝以Ⅰ型胶原纤维为主,Ⅲ型则嵌入其中。间二苯酚染色显示TCS终丝几乎都是浅色的胶原纤维。网状纤维染色显示TCS终丝多见空泡状的脂肪细胞,偶见穿梭于胶原纤维中的黑色网状纤维。扫描电镜观察显示TCS终丝多见大量排列紊乱、方向性差的胶原纤维,部分可见散在的脂肪细胞;透射电镜观察显示TCS终丝内部多见密集交错的胶原纤维以及这些纤维的规律性的横纹,偶可见成纤维细胞、脂肪细胞等。16例Ⅰ型胶原纤维数量增多,占终丝的大部分;6例可见脂肪细胞,3例显示小血管。结论 多数TCS终丝的弹性纤维、网状胶原纤维明显减少,Ⅰ型胶原纤维异常增加。

【关键词】脊髓拴系综合征;终丝;超微结构

【文章编号】1009-153X(2022)12-0995-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 744.9

Ultrastructure of filum terminale in patients with tethered cord syndrome

JIANG Qing-yu¹, SHANG Ai-jia¹, GAO Gan¹, TAO Ben-zhang¹, WANG Hui¹, WANG Pei-xin¹, SUN Meng-chun², WU Yan². 1. Department of Neurosurgery, PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2. Nankai University, Tianjin 300071, China

【Abstract】Objective To investigate the structural changes of filum terminale (FT) of patients with tethered cord syndrome (TCS) to provide objective evidence for the diagnosis and treatment of TCS. Methods The pathological staining was performed on the FT obtained from 16 patients with TCS who were surgically resected from October 2021 to May 2022. The structural changes were observed using a microscope and electron microscope. Results HE staining showed that the elastic fibers were significantly reduced, the collagen fibers were significantly increased, and many adipose cells could be seen within these fibers. Picro sirius red staining showed that the FT was mainly composed of type Ⅰ collagen fibers, with a few of type Ⅲ collagen fibers. M-diphenol staining showed that the FT was mainly composed of collagen fibers. Reticular fiber staining showed that many vacuolated adipose cells could be seen within the FT with a few black reticular fibers. Scanning electron microscopy showed that there were a lot of disordered collagen fibers with poor orientation in the FT, with some scattered adipocytes. Transmission electron microscopy showed that there were more dense interlacing collagen fibers and regular transverse lines of these fibers, and occasionally fibroblasts and adipocytes in the FT. The number of type Ⅰ collagen fibers increased in all 16 patients. Fat cells were seen in 6 patients and small blood vessels in 3 patients. Conclusions The elastic fibers and reticular collagen fibers of most FT in the patients with TCS are significantly reduced, while the type Ⅰ collagen fibers are abnormally increased.

【Key words】Tethered cord syndrome; Filum terminale; Ultrastructure; Pathological staining

脊髓拴系综合征(tethered cord syndrome, TCS), 又称脊髓拴系,因先天发育异常,使短而增厚的终丝组织弹性降低,对脊髓施加过度的牵引力导致脊髓圆锥低位、马尾神经受到牵拉,产生排尿和排便障碍、下肢感觉和运动障碍、足畸形等症状,随着生长

发育,症状也会逐渐加重^[1]。早期对该病的认识不足,脊髓圆锥被定义为脊髓的末端,终丝则被认为是一束无功能的纤维组织,部分学者将其称为“脊髓韧带”,也有学者将其描述为脊髓的末端,更有学者将其视为“脊髓的残余物”,忽略了终丝在TCS发病机制中起到不可或缺的作用^[2]。本文通过对比正常人与TCS终丝差异,探讨TCS的发病机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选择2021年10月~2022年5月手术切除的16例TCS病人的终丝标本,其中男5例,女11例;年龄3~69岁。16例均有大小便功能障碍及会阴

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.12.012

基金项目:首都卫生发展科研专项(2022-2-5022)

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院神经外科医学部(蒋擎玉、尚爱加、高 干、陶本章、汪 汇、王培新);300071 天津,南开大学(孙梦纯、吴 言)

通讯作者:尚爱加, E-mail: Shangaj@126.com

区感觉减退,其中4例有明显的下肢肌肉萎缩;腰骶部皮肤出现异常毛发增多1例,实性包块、异常毛发、先天性皮毛窦、骨赘以及色素沉着15例。MRI可见16例圆锥位置均平齐或低于腰2椎体下缘。1例正常终丝取自腰骶部神经鞘瘤,其终丝与神经鞘瘤粘连紧密,难以分离,同肿瘤一并切除。为预防马尾神经损伤,在电生理监测技术保护下,取新鲜终丝。3例有肉眼可见的与脂肪交织混杂的终丝组织。考虑到TCS通常伴有圆锥低位,为避免脊髓损伤,均取骶1椎体水平及以下硬膜囊内终丝。本文经病人及其家属知情同意并通过医院伦理委员会批准。

1.2 组织染色

1.2.1 HE染色 将石蜡切片依次放入二甲苯、无水乙醇、75%酒精脱蜡水化,苏木素染液染细胞核,85%、95%的梯度酒精脱水,伊红染液染细胞质,无水乙醇、二甲苯透明后,中性树胶封片,显微镜观察。

1.2.2 天狼猩红染色 将石蜡切片依次放入二甲苯、无水乙醇、75%酒精脱蜡水化。天狼猩红染液(武汉赛维尔生物科技有限公司)染色,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜观察并分析。

1.2.3 网状纤维染色 将石蜡切片依次放入二甲苯、无水乙醇、75%酒精脱蜡水化。酸化液氧化(0.5%高锰酸钾与0.5%硫酸1:1混匀),超纯水浸洗。滴加2%草酸漂白,超纯水浸洗。滴加网状纤维染液F(武汉赛维尔生物科技有限公司)避光媒染,超纯水浸洗。滴加网状纤维孵育液避光处理,超纯水浸洗。滴加10%中性甲醛液避光还原,肉眼观察组织未出现黄棕色时,可延长作用时间。超纯水浸洗,无水乙醇、二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜观察并分析。

1.2.4 间二苯酚品红染色 将石蜡切片依次放入二甲苯、无水乙醇、75%酒精脱蜡水化。间苯二酚品红染液A室温浸染,流水冲洗至流水无色。1%盐酸酒精分化液快速分化,显微镜观察到清晰的紫色的弹力纤维,背景淡紫色至几乎无色。间苯二酚碱性品红染液B与间苯二酚碱性品红染液C混合染色,无水乙醇快速脱水,二甲苯透明,中性树胶湿封,显微镜观察并分析。

1.3 电镜检测

1.3.1 透射电镜检测 新鲜组织确定取材部位,尽量减小牵拉、挫伤与挤压等机械损伤,1~3 min内取样,大小1 mm³。0.1 M磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗3次,每次15 min。随后,0.1 M磷酸缓冲液(pH 7.4)配制的1%锇酸避光室温固定2 h。0.1 M磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗3次,每次15 min。次入30%~50%~

70%~80%~95%~100%~100%酒精脱水(每次20 min),100%丙酮脱水两次(每次15 min)。812包埋剂包埋,37℃烤箱过夜,60℃烤箱聚合48 h,超薄切片(60~80 nm)超薄切片,150目方华膜铜网捞片。2%醋酸铀饱和酒精溶液避光染色8 min;70%酒精清洗3次;超纯水清洗3次;2.6%枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色8 min;超纯水清洗3次,滤纸稍吸干。铜网切片放入铜网盒内室温干燥过夜。最后透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

1.3.2 扫描电镜检测 取材同透射电镜。0.1 M磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗3次,每次15 min。0.1 M磷酸缓冲液(pH 7.4)配制1%锇酸室温避光固定1~2 h。0.1 M磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗3次,每次15 min。30%~50%~70%~80%~90%~95%~100%~100%酒精依次脱水,每次15 min,乙酸异戊酯脱水15 min。临界点干燥仪内干燥。随后,导电碳膜双面胶上放入离子溅射仪样品台上进行喷金30 s。扫描电子显微镜下观察。

2 结果

HE染色:正常终丝绝大部分由松散的结缔组织组成,胶原纤维主体呈粉红色,未见蓝染的细胞核(图1B)。TCS终丝波浪状的弹性纤维明显减少,胶原纤维明显增多,可见大量的脂肪细胞(图1A),这很可能与TCS终丝增粗有关。

天狼猩红染色:I型胶原呈橘黄色或亮红色,而Ⅲ型胶原呈绿色的细纤维,这说明TCS终丝的大部分为较粗的纵向胶原束(图1C、1D),以I型胶原纤维为主,Ⅲ型则嵌入其中。

间二苯酚染色:正常终丝的弹力纤维呈紫红色,大多纵向伸展,为保证终丝的伸展性,粉红色胶原纤维则十分稀疏(图1F);然而TCS终丝几乎都是浅色的胶原纤维(图1E)。

网状纤维染色:正常终丝弹力纤维呈黑色(1H)。TCS终丝多见空泡状的脂肪细胞,偶见穿梭于胶原纤维中的黑色网状纤维(图1G)。

扫描电镜观察:正常终丝纤维相对规整、粗细均匀。TCS终丝多见大量排列紊乱、方向性差的胶原纤维,部分可见散在的脂肪细胞(图2A);终丝以纵向胶原纤维束为主,横向纤维束穿插其中,互有间隔,纤维与纤维间不是紧密贴合(图2B)。

透射电镜观察:终丝内部多见密集交错的胶原纤维以及这些纤维的规律性的横纹,偶可见成纤维细胞、脂肪细胞等(图2C、2D)。

16 例 I 型胶原纤维数量增多,占终丝的大部分;6 例可见脂肪细胞,3 例显示小血管。16 例终丝扫描电镜下可见杂乱无章且呈束的胶原纤维,5 例 I 型胶原纤维增粗、变形,5 例可见脂肪细胞。16 例终丝透射电镜可见纵横交错的胶原纤维以及有规律的横纹,其中 1 例可见成纤维细胞。

3 讨论

TCS 最早于 19 世纪被发现。然而,直到 1953 年,Garceau^[3]才首次描述了终丝综合征,并推断可能是异常增厚的终丝过度牵引脊髓从而产生临床症状。此后于 1981 年,Yamada 等^[4]经动物研究后得出

终丝牵拉后产生脊髓神经细胞的功能障碍可能是线粒体氧化消化及代谢损伤所致。20 多年后,George 等^[5]对比了正常人和 TCS 终丝,确认大量室管膜细胞、神经和胶质组织的存在,颠覆了以往仅将终丝视为韧带的错误认识^[6]。

目前认为引起 TCS 的病因主要有:①先天神经系统发育畸形^[7]。远端神经管由尾部细胞团发育形成,发展成脊髓圆锥、马尾和终丝,其异常可能导致病理性终丝形成,增加未来拴系的可能性。②黏连、炎症或硬膜内手术后多见^[8],常拴系于硬膜背侧。有学者分析终丝的蛋白组学,通过对比正常终丝,提出差异蛋白可能参与异常的脂质等代谢,从而使终丝发生病理改变^[9]。关于原发性 TCS 的分型,一直充满争议。目前,国内较为广泛接受的是 Gabriel 等^[10]的分型:脊髓脊膜膨出修复术后型;蛛网膜粘连型;终丝紧张型;脂肪瘤型;脊髓纵裂畸形型。而尚爱加等^[11]根据多年治疗儿童 TCS 的经验,将此分型进一步修改完善:脊髓脊膜膨出修复术后型;脊髓脊膜膨出型;终丝紧张型;脂肪瘤型;脊髓纵裂畸形型。目前,TCS 的主要治疗方法是终丝切断术,尤其是伴有临床表现的病人^[12]。因为脊髓圆锥位置正常的病人也可能伴有终丝高张力的现象,无论终丝外观看起来是否正常,早期终丝切断都是首选的治疗方法^[13,14]。

本文以 TCS 终丝为研究对象,采用电镜和染色技术对终丝结构进行细致观察,探讨 TCS 终丝弹性减退、张力增大的机制。Chrenek 等^[15]在显微镜下观察发现,正常终丝可见室管膜细胞、神经胶质和神经元等原始成分。终丝具有狭长的中央管,该管由室

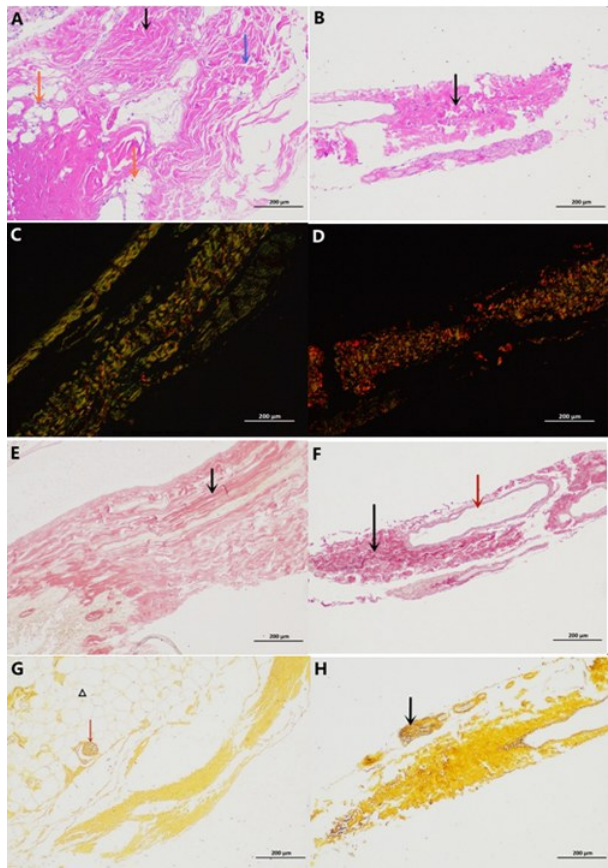


图 1 TCS 终丝病理染色

A. TCS 终丝 HE 染色(×100),组织增宽,内含大量空泡状脂肪(橙色↑示)、胶原纤维(蓝色↑示),以及少量弹力纤维(黑色↑示);B. 正常终丝 HE 染色(×100),可见大量弹力纤维(黑色↑示);C. TCS 终丝天狼猩红染色(×100),橘黄色 I 型胶原纤维阳性,绿色 III 型胶原纤维阳性;D. 正常终丝天狼猩红染色(×100);E. TCS 终丝间苯二酚品红染色(×100),弹力纤维明显不足(黑色↑示),多为胶原纤维;F. 正常终丝间苯二酚品红染色(×100),可见大量弹力纤维存在(黑色↑示),一血管穿行于纤维中(红色↑示);G. TCS 终丝网状纤维染色,存在大量空泡状脂肪(△示),未见明显网状纤维,红色↑为一小血管;H. 正常终丝网状纤维染色,可见大量黑色网状纤维(黑色↑处)与其他胶原纤维交织;TCS. 脊髓拴系综合征

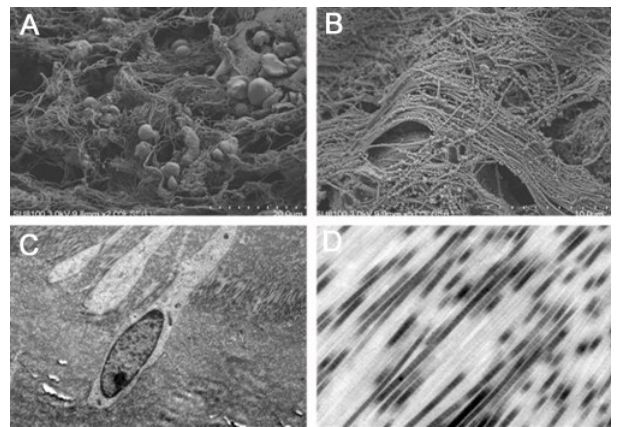


图 2 TCS 终丝电镜观察

A. TCS 终丝扫描电镜可见胶原纤维粗细不太均一,且杂乱无章,排列混乱;B. 正常终丝扫描电镜观察显示胶原纤维直径正常,排列有序,大体方向一致;C. TCS 终丝透射电镜可见胶原纤维中出现成纤维细胞;D. 正常终丝透射电镜观察见胶原纤维的周期性横纹;TCS. 脊髓拴系综合征

管膜细胞排列,同时被成纤维细胞、神经元和胶质细胞包围,形成典型的灰质。有髓纤维和无髓纤维在终丝周围的白质中呈岛状分布。本研究发现 TCS 病人 MRI 显示终丝张力明显增大、圆锥低位的原因可能是 I 型胶原纤维、弹性纤维以及网状纤维的含量变化,与此同时大量的脂肪组织浸润其中可能是终丝弹性下降的原因。文献报道,哺乳动物 I 型胶原蛋白是皮肤中主要的胶原蛋白类型,占皮肤胶原蛋白的 80%~90%,由真皮中成纤维细胞产生。深度创伤会导致疤痕。疤痕主要由过度合成和杂乱无章的 I 型纤维组成。若在重组过程中,有神经参与其中,则胶原纤维排布得井然有序^[16]。这是否是 TCS 病因之一有待进一步论证。

除了终丝,脂肪浸润也可见于肌肉中。Xu 等^[17]研究脂肪浸润损伤后的骨骼肌中发现的主要细胞群包括成纤维细胞和脂肪组细胞,证实 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路在内的脂质代谢途径改变了肌肉中的脂肪酸组成。张宇等^[9]在终丝蛋白组学的研究中发现载脂蛋白 A1 的表达上调。这表明当神经管发育异常时该蛋白有参与抑制高密度脂蛋白受体 SR-B1 的作用^[18]。这与 TCS 病因一致。

综上所述,本研究结果表明 MRI 显示的具有较高张力的终丝在显微结构下多由于弹性纤维、网状纤维减少, I 型胶原纤维及脂肪组织异常增加,最终使得终丝弹性减退、张力变大,从而导致大小便功能障碍、下肢肌肉萎缩等临床表现。本研究也存在诸多不足,如样本量不足以及正常终丝较难取得等问题,所观察的微观结构可能未必全面。

【参考文献】

[1] 依日扎提·艾力,王增亮. 隐匿性脊髓拴系综合征的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2021, 26(12): 967-969.

[2] Jiang Q, Tao B, Gao G, *et al.* Filum terminale: a comprehensive review with anatomical, pathological, and surgical considerations [J]. World Neurosurg, 2022, 164: 167-176.

[3] Saker E, Cox M, Loukas M, *et al.* George J. Garceau (1896-1977) and the first introduction of the "filum terminale syndrome" [J]. Childs Nerv Syst, 2017, 33(8): 1233-1236.

[4] Yamada S, Zinke D E, Sanders D. Pathophysiology of "tethered cord syndrome" [J]. J Neurosurg, 1981, 54(4): 494-503.

[5] George TM, Bulsara KR, Cummings TJ. The immunohistochemical profile of the tethered filum terminale [J]. Pediatr

Neurosurg, 2003, 39(5): 227-233.

[6] Picart T, Barrिताult M, Simon E, *et al.* Anatomical and histological analysis of a complex structure too long considered a simple ligament: the filum terminale [J]. World Neurosurg, 2019, 129: e464-e471.

[7] Tu A, Steinbok P. Occult tethered cord syndrome: a review [J]. Childs Nerv Syst, 2013, 29(9): 1635-1640.

[8] 陈可夫,贾连顺,史建刚. 脊髓栓系综合征病因的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(1): 55-57.

[9] 张宇. 儿童终丝蛋白质组学研究[D]. 郑州大学, 2020.

[10] Lee GY, Paradiso G, Tator CH, *et al.* Surgical management of tethered cord syndrome in adults: indications, techniques, and long-term outcomes in 60 patients [J]. J Neurosurg Spine, 2006, 4(2): 123-131.

[11] 尚爱加,张远征,程东源,等. 儿童脊髓栓系综合征的临床分型、手术治疗及疗效分析[J]. 中华神经外科杂志, 2012, 32(6): 606-610.

[12] Bradko V, Castillo H, Janardhan S, *et al.* Towards guideline-based management of tethered cord syndrome in spina bifida: a global health paradigm shift in the era of prenatal surgery [J]. Neurospine, 2019, 16(4): 715-727.

[13] Telfeian AE, Punsoni M, Hofstetter CP. Minimally invasive endoscopic spinal cord untethering: case report [J]. J Spine Surg, 2017, 3(2): 278-282.

[14] Okay O, Dalgic A, Yildirim AE, *et al.* Endoscopic untethering of tight filum terminale: an operative technique [J]. Turk Neurosurg, 2021, 31(1): 73-75.

[15] Chrenek R, Magnotti LM, Herrera GR, *et al.* Characterization of the filum terminale as a neural progenitor cell niche in both rats and humans [J]. J Comp Neurol, 2017, 525(3): 661-675.

[16] Kashimoto R, Furukawa S, Yamamoto S, *et al.* Lattice-patterned collagen fibers and their dynamics in axolotl skin regeneration [J]. iScience, 2022, 25(7): 104524.

[17] Xu Z, You W, Chen W, *et al.* Single-cell RNA sequencing and lipidomics reveal cell and lipid dynamics of fat infiltration in skeletal muscle [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2021, 12(1): 109-129.

[18] Santander N, Lizama C, Murgas L, *et al.* Transcriptional profiling of embryos lacking the lipoprotein receptor SR-B1 reveals a regulatory circuit governing a neurodevelopmental or metabolic decision during neural tube closure [J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 731.