

基础研究

人工硬膜修补硬脊膜及预防椎管内粘连的实验观察

郑旭为(Tee, Seh Wee), 刘忠军

(北京大学第三医院骨科 100083 北京市)

【摘要】目的:观察人工硬膜(胶原海绵)敷贴修补硬脊膜破损的组织病理学反应和预防术后硬脊膜周围纤维化粘连的效果。**方法:**实验 A, 30 只家兔随机分成 3 组, 每组 10 只, 造成硬脊膜纵形破损, 随机分别应用人工硬膜、明胶海绵敷贴裂口处和旷置。术后 8d 和 30d 处死动物, 行肉眼和组织学观察, 同时进行缺损区瘢痕组织的成纤维细胞密度评级。实验 B, 12 只家兔随机分成 2 组, 每组 6 只, 进行 T10 和 T12 椎板切除, 使硬膜裸露, T10 缺损旷置, 作为空白对照, T12 缺损用人工硬膜或明胶海绵进行覆盖, 术后 30d, 处死动物取材。肉眼和组织学观察硬膜缺损处并按有关的组织学评级标准半定量分析。**结果:**实验 A 中人工硬膜在体内未引起不良反应。组织学观察发现植入物内有大量的成纤维细胞长入、毛细血管形成和胶原沉积, 植入物有降解趋势。实验 B 中与空白对照组比较, 人工硬膜组硬脊膜周围粘连较轻($P<0.05$)。**结论:**人工硬膜(胶原海绵)作为一种硬脊膜移植材料具有较好的组织相容性, 有促进组织修复作用; 早期能防止硬脊膜外瘢痕组织向椎管内侵入, 起到空间屏障作用, 在一定程度上减轻了纤维瘢痕组织侵入椎管所造成的硬脊膜周围纤维性粘连。

【关键词】胶原海绵; 硬脊膜; 移植术; 纤维化; 粘连; 兔

中图分类号: R318.08, R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2006)-01-0052-04

An experimental observation of the histopathological response of the artificial dura as an onlay dural graft and the prevention of peridural fibrosis and adhesion/TEE SehWee, LIU Zhongjun/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2006, 16(1): 52~55

【Abstract】 Objective: To evaluate the histopathological response of the artificial dura as an onlay dural graft and its efficacy as an interpositional material in the prevention of postlaminectomy peridural fibrosis and adhesion in an in vivo study (rabbit model). **Method:** Protocol A, durotomy and repair with onlay dural grafts (grafts were not sutured) was performed. 30 New Zealand white rabbits were utilized. Laminectomy of a 1.0×0.5cm defect at T12 was performed and then a 0.3cm linear dural incision was made. 30 animals were randomly allocated into 3 subgroups, 10 animals in each. In GS group, absorbable gelatin sponge was implanted as a dural graft without suture. In CS group, artificial dura (collagen sponge) was implanted as an onlay dural graft. In control group, the dural laceration was left untreated. Groups of rabbits were sacrificed at 8 and 30 days postoperatively. Macroscopic and histological evaluations of each specimen were performed, including a descriptive evaluation and quantitative scoring of the graft-sided cellular (fibroblasts) density. Protocol B, laminectomy and implantation of the interposition materials was performed. 12 New Zealand white rabbits were randomly allocated into 2 subgroups. All of the rabbits underwent laminectomy at T10 and T12. Half of the rabbits (6) had collagen sponge implantation and the other 6 had gelatin sponge implants at a randomly assigned level, with the remaining level served as an internal control (left uncovered). The animals were sacrificed at 30d postoperatively. Qualitative and semi-quantitative gross pathological and histological evaluations were performed for both the control and the experimental sites to assess the sponges' efficacy in preventing peridural fibrosis. **Result:** The use of artificial dura caused no severe adverse effect in vivo. Histological evaluation showed graft infiltration by fibroblasts, deposition of collagen and neovascularity. According to the scores of cell density, there was no difference among CS group, GS group and control group ($P>0.05$) at 8 days of postoperation. However, significant differences were observed at the different time intervals (8 and 30d) within each group. Compared to the control site, collagen sponge could prevent the invasion of fibrosis into the spinal canal and the area in contact with the exposed dura postlaminectomy after the period of 30 days ($P<0.05$). However, no difference in

第一作者简介: 男 (1976-), 马来西亚籍, 住院医师, 医学博士研究生, 研究方向: 脊柱外科

电话: (010)62017691-3010 E-mail: weezai@hotmail.com

efficacy was detected between the GS and control group. **Conclusion:** The artificial dura (collagen sponge) is safe to be used as an onlay dural graft. As an interposition material, collagen sponge promotes the healing process and is effective in preventing peridural fibrosis at the early stage. However its effect at the later stage of scar formation is still unknown. Further research on the use of collagen sponge as a dural graft is necessary to clarify its "watertight" features and barrier membrane effect.

【Key words】 Collagen Sponge; Dura; Graft; Fibrosis; Adhesion; Rabbit

【Author's address】 Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing, 100083, China

硬脊膜破损是脊柱外科手术中的常见并发症,随之引起的术后脑脊液漏及术后椎管内粘连可引起多种不良后果^[1]。应用胶原海绵修补硬膜破损及防止粘连是近几年来被用于临床的一种方法^[2,3]。本研究拟通过动物实验观察其敷贴修补硬脊膜破损时的组织病理学反应和预防术后硬脊膜周围纤维性粘连的效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

由两部分实验组成。

实验 A: 成年家兔(新西兰白兔)30 只,随机分为 3 组:硬脊膜破损组(Con 组)、硬脊膜破损胶原海绵敷贴组(CS 组)、硬脊膜破损明胶海绵敷贴组(GS 组),每组 10 只。

实验 B: 成年家兔 12 只,随机分为 2 组,每组 6 只。椎板切除,椎板切除术后硬脊膜外覆盖胶原海绵(CS 组)或明胶海绵(GS 组)。

1.2 实验方法

实验 A: 切除 T12 椎板,造成硬脊膜纵行破损约 0.3cm,随机选取人工硬膜(胶原海绵)、明胶海绵直接敷贴破损处;或旷置。分别于术后 8d 和 30d,每组随机选取 1~2 只家兔处死,肉眼解剖观察,另选 3~4 只行组织病理观察。

实验 B: 分别切除 T10、T12 椎板,形成两处缺损,一处缺损无任何覆盖,作为自身空白对照;另一缺损予明胶海绵(n=6)或人工硬膜(胶原海绵)(n=6)覆盖。术后 30d,各组选取 1 只家兔处死,肉眼解剖观察,另 10 只行组织病理观察。

完整取下整个手术节段(T12 或 T10~T12)椎体及其附件和椎旁肌,常规固定、脱钙、脱水、包埋、切片,经 HE 染色和 Masson 染色。确定观察内容和组织学评级标准,由不详实验分组的病理医生进行观察和评级。

1.3 组织学评级标准

实验 A,参考 Hinton^[4]和 Cobb^[5]的成纤维细胞

细胞密度评级,0 级:成纤维细胞<100/400HPF;I 级:成纤维细胞 100~150/400HPF;II 级:成纤维细胞>150/400HPF。取同一放大率下手术区域图像(×400 倍),直接输入计算机,利用图像分析,对成纤维细胞进行计数,半定量分析。为了减少误差,每个标本计数 3 个不同视野。

实验 B,参考改良 Nussbaum^[6]组织学评级标准(表 1)。

表 1 组织学评级标准

项目	等级		
	0	I	II
①硬膜外粘连长度比值 [*]	<10%	10%~20%	>20%
②硬膜外胶原密度 [△]	稀疏	较致密	致密
③纤维化或充填物向后及侧方延伸情况	无明显侧方及后方延伸	伸延达神经根与椎板缺损之间或后方部分嵌入椎板缺损,但未压迫硬膜囊	纤维化包绕或伸延达一侧或双侧神经根或瘢痕及充填物嵌入椎管,硬膜囊或脊髓受压变形

注: * 用计算机病理图像分析处理系统对组织切片中硬脊膜发生粘连的长度占硬膜囊周径长度的百分比进行半定量分析; △ 根据 Masson 染色中胶原染色深度评级

1.4 统计学分析

所有的评级结果采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理,行多个独立样本的 Kruskal-Wallis 检验及两个独立样本的 Mann-Whitney 检验进行统计分析。

2 实验结果

2.1 实验 A

所有动物切口均在术后 1 周内愈合,无切口感染、脑脊液渗出或皮下囊肿形成。术后 8d,原切口皮肤、皮下组织已愈合。GS 组与 CS 组的硬膜和背侧肉芽组织之间可见一膜性物覆盖(CS 质地较致密);与硬膜之间粘连较轻,可予钝性分离。原硬

膜裂口未见明显变化。空白组可见伴有出血灶的肉芽组织形成,缺损处为血肿组织覆盖,已部分机化,硬膜裂口处可见脊髓明显膨出。组织学观察三组椎板缺损处可见大量新生肉芽组织形成。炎性细胞多,以中心粒细胞为主。CS 组及 GS 组植入物周边可见大量梭形纤维细胞增殖及长入,胶原纤维较少,同时可见较多红细胞充填(图 1,后插页 I)。GS 组 1 例标本可见散在灶性异物巨细胞反应,植入物有降解,硬膜破损处可见薄层纤维连接,硬膜下组织粘连形成,椎板缺损边缘骨母细胞增生,并可见早期骨化及软骨化现象。空白组缺损区见大量红细胞充填,胶原纤维极少;硬脊膜增厚,并与肉芽组织间出现纤维性粘连;椎板缺损边缘骨化及软骨化现象不明显。三组的成纤维细胞密度评级见表 2。

表 2 三组动物不同时间点的组织学评级				
组别	n	成纤维细胞密度评级		
		0	I	II
术后 8d				
CS 组	3	0	0	3
GS 组	3	0	0	3
Con 组	3	0	2	1
术后 30d				
CS 组	4	1	3	0
GS 组	4	2	2	0
Con 组	4	4	0	0

注: 术后 8d, 3 组间比较 $P>0.05$, 术后 30d, CS 与 Con 组比较 $P<0.05$, GS 与 Con 组比较 $P>0.05$, 术后 8d 与术后 30d 相应组比较 $P<0.05$

术后 30d, 硬膜外纤维瘢痕质地较致密。GS 组未见植入物残留痕迹;CS 组可见少许残留物。GS 和 CS 组硬脊膜外纤维性粘连存在,但仍可小心钝性分离。空白组纤维瘢痕组织与硬脊膜粘连致密,并向椎管内延伸,钝性分离较困难。原硬脊膜裂口皆可见。组织学观察硬膜缺损区炎性细胞减少,成纤维细胞密度减低,大量胶原纤维形成。GS 组标本的植入物基本降解吸收,CS 组仍可见较

粗大的纤维结构(图 2,后插页 I)。硬脊膜增厚,破损区愈合不完全,硬脊膜损伤处与硬膜下组织粘连。空白组 2 例标本见撕裂口变形,伴有脊髓变形,硬膜与周围新生胶原粘连重。三组硬脊膜外皆可见较致密的胶原形成。CS、GS 组椎板缺损边缘见骨母细胞增生明显,出现明显新骨形成和软骨化生(以 CS 组为著)。空白组新骨形成程度较前两组轻。

2.2 实验 B

所有动物皆在术后 5~6d 内伤口完全愈合,且无伤口感染或其它并发症,无明显神经损害表现。术后 30d, 原切口进入,GS 组切开肌肉层可见有瘢痕组织形成,但质脆易切开,背侧纤维瘢痕组织形成较多,未见明显植入物残留;瘢痕与硬脊膜有粘连,尚能用神经剥离子钝性分离,硬脊膜表面尚光滑。CS 组可见残存的膜状物组织,紧密地贴在硬脊膜上,但能钝性分开。纤维瘢痕组织中可见新生骨形成。空白组,背侧瘢痕组织较多,质地尚脆,与硬脊膜粘连较明显,可见部分纤维瘢痕组织侵入椎管内,与硬脊膜之间需小心分离。组织学观察见三组椎板缺损处肉芽及炎性细胞减少,成纤维细胞减少,伴大量胶原纤维形成。GS 组植入物基本降解吸收,部分见丝状残留。CS 组仍可见较粗大纤维残留,椎板缺损边缘骨母细胞增生,出现不同程度新生骨形成和软骨化生。CS 组较明显,空白组程度最轻。GS 及 CS 组缺损区硬脊膜与周围纤维性粘连较轻,空白组大部分标本见纤维瘢痕组织自椎板缺损处向椎管内延伸,与周围胶原纤维粘连明显(图 3~5,后插页 I)。Masson 染色见三组硬脊膜外胶原密度皆较致密。组织学评级见表 3。

3 讨论

3.1 硬(脑)脊膜的自愈方式和再生

硬脊膜主要是由致密纵行排列的 I 型胶原组织组成,其内覆盖有上皮。1959 年,Keener 等研究

表 3 三组硬脊膜外粘连长度比值、胶原密度和纤维化范围的评级情况 (例)										
组别	n	硬脊膜外粘连长度比值等级 ^①			硬脊膜外胶原密度等级 ^②			硬脊膜外纤维化范围等级 ^③		
		0	I	II	0	I	II	0	I	II
明胶海绵组(GS)	5	3	2	0	1	4	0	3	2	0
人工硬膜组(CS)	5	4	1	0	1	4	0	4	1	0
空白对照组(Con)	5	1	5	2	2	6	0	1	5	2

注:①GS 组和 CS 组、Con 组比较 $P>0.05$, CS 组与 Con 组比较 $P<0.05$;②各组间比较 $P>0.05$;③GS 组与 Con 组比较 $P>0.05$, CS 组与 Con 组比较 $P<0.05$

发现,硬脑膜缺损的愈合过程主要是由源自其邻近软组织而非源自硬膜裂口边缘的成纤维细胞增殖和胶原纤维的沉积来完成的。其再生的发生主要是通过瘢痕组织的形成,而不是真正的硬膜组织替代修复过程。并认为若硬膜缺损区邻近骨组织,则硬膜的修复是不完全的。反之,邻近软组织的硬膜缺损区则可完全修复。同时也发现合并蛛网膜损伤时,无论何种覆盖物也无法避免硬膜与硬膜下组织粘连的形成。但 Schick 等^[7]在体外硬膜细胞培养的研究表明,硬膜裂口的修复主要是由来源于硬膜缺损边缘的成纤维细胞迁移参与完成的。同时发现胶原移植物最适合作为硬膜替代物。虽然硬膜有自然愈合的倾向,但其愈合是缓慢和不完全的。术中行硬膜修补或成形术能有效促进其愈合过程。本实验结果发现,在术后 8d,人工硬膜(胶原海绵)和明胶海绵组家兔的伤口均愈合良好,且组织学上可见植入物周边大量活跃的成纤维细胞增殖,并向植入物长入。术后 30d,组织学发现两种植入物内部皆可见成纤维细胞的长入和血管的形成,同时两者都有不同程度的降解,并为新胶原沉积所取代,未见明显的异物巨噬细胞反应。说明 CS 和 GS 皆能促进硬膜修复。因实验观察时间较短,术后 30d 组织学结果显示硬脊膜修复尚不完全。

3.2 硬脊(脑)膜移植或修补材料

对于硬脊膜破损,临床上常用的修补移植材料为自体筋膜(阔筋膜)、脂肪及肌肉糜等。但随之带来的是正常组织的医源性损伤、潜在感染及有时移植组织提供困难^[8]。实验使用的胶原海绵是由北京天义福医疗器材有限公司提供,是从牛跟腱制备而来;经物理、化学方法处理,加工成多孔状的胶原薄片。国内有学者利用 SDS-PAGE 法对其进行了较全面的结构分析,表明是由 I 型胶原组成,符合胶原蛋白的结构和组成特征^[9]。近年来,国内外有不少有关应用胶原海绵作为硬膜修补材料的基础和临床报导^[2,3,10]。Narotam 等^[2]最近发表了应用胶原基质直接敷贴修复硬膜损伤的技术。其防止术后脑脊液漏发生的有效率达 95%。本实验结果表明,人工硬膜和明胶海绵中的胶原可促进成纤维细胞活动,而多孔状海绵结构有利于成纤维细胞的长入附着,诱导成纤维细胞增殖及异胶原的产生、沉积及排列,促进肉芽组织的产生,并能加速硬膜再生。因人工硬膜具有可降解性,在

体内不形成包裹性肉芽压迫椎管内脊髓;未引起明显异物或慢性炎性反应,也未影响伤口愈合或引起感染,可见安全性较好。

3.3 硬膜周围纤维化粘连的形成及预防

1948 年 Key 等首次提出术后硬脊膜周围纤维化粘连的前源学说。1974 年,LaRocca 建立了“椎板切除膜”的后源学说。Touliatos 等亦指出合并血肿的软组织创伤,无论存在于椎管内的哪一个部位均会引起硬脊膜周围纤维化和粘连。而 Songer 等^[11]提出的纤维化形成的三维立体学说最受认可。本研究实验 B 中动物行椎板切除后未累及椎管前方及侧方结构,我们考虑纤维化粘连形成主要源于椎管后方。

近年来,预防术后粘连的材料研究较多,有些已在临床上应用并取得了一定的疗效。生物性材料如自体脂肪、韧带组织公认效果较好,但仍不乏坏死、易感染等弊端。合成材料如 Vicryl 网、ePTFE 膜、Adcon-L 凝胶等亦有并发症报导^[12]。明胶海绵为一种胶原性止血剂,较早被用于防止硬膜外粘连,目前临床应用普遍。人工硬膜(胶原海绵)及明胶海绵都具有多孔海绵状结构,都能吸收血液而达到止血目的^[9]。有效止血减少硬膜外血肿本身亦是预防和减少硬脊膜外瘢痕形成的重要因素^[12]。本研究结果显示,此两种材料都能在机体肉芽组织纤维化形成的早期起到空间屏障作用,防止椎管内纤维化粘连。但明胶海绵在第 4 周时已基本吸收,不能有效隔离瘢痕组织向椎管内蔓延。大部分学者的研究结果也表明,明胶海绵在术后早期防止硬脊膜周围纤维化粘连有一定作用,但晚期作用不明显,甚至在某种程度上可增加粘连^[3]。而胶原海绵于术后 30d 仍可见较粗大的胶原纤维结构可发挥空间隔离作用,预防硬脊膜周围纤维化粘连。文献报道^[10]该种材料降解吸收时间一般为 3 个月,

由于本实验观察时间较短,仅以家兔实验模型观察,胶原海绵的晚期作用尚需进一步研究探讨。

4 参考文献

1. Cammisa FP Jr, Girardi FP, Sangni PK, et al. Incidental durotomy in spine surgery [J]. Spine, 2000, 25(20):2663-2667.
2. Narotam PK, José S, Nathoo N, et al. Collagen matrix (DuraGen) in dural repair: analysis of a new modified technique [J]. Spine, 2004, 29(24):2861-2867.

3. Kelly DF, Oskouian RJ, et al. Collagen sponge repair of small cerebrospinal fluid leaks obviates tissue grafts and cerebrospinal fluid diversion after pituitary surgery [J]. Neurosurg, 2001, 49(4): 885-890.
 4. Hüseyin B, Sükrü A, Nalan A, et al. Inhibition of epidural scar tissue formation after spinal surgery: external irradiation vs. spinal membrane application [J]. Int J Radiation Oncology Biol Phys, 2001, 51(2): 507-513.
 5. Cobb MA, Badylak SF, Janas W, et al. Histology after dural grafting with small intestinal submucosa [J]. Surg Neurol, 1996, 46: 389-394.
 6. 孙康, 姜长明, 吕德成, 等. 不同材料预防椎板切除后硬膜粘连的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1996, 34(6): 339-343.
 7. Schick B, Wolf G, Romeike BF, et al. Dural cell culture: a new approach to study duraplasty [J]. Cell Tiss Org, 2003, 173: 129-137.
 8. 张更申, 张庆俊. 硬膜修补材料研究进展[J]. 河北医科大学学报, 1999, 20(6): 378-379.
 9. 武继民, 李荣, 王岩. 胶原海绵作为止血和创面敷料的临床实验[J]. 生物医学工程与临床, 2003, 7(3): 152-154.
 10. Narotam PK, Van Dellen JR, Bhoola KD. A clinicopathological study of collagen sponge as a dural graft in neurosurgery [J]. Neurosurg, 1995, 82(): 406-412.
 11. Songer MN, Rauschnig W, Carson EW, et al. Analysis of peridural scar formation and its prevention after lumbar laminotomy and discectomy in dogs [J]. Spine, 1995, 20(5): 571-580.
 12. Robertson JT, Soble-Smith J, Powers NI, et al. Prevention of cerebrospinal fistulae and reduction of epidural scar with new surgical hemostat device in a porcine laminectomy model [J]. Spine, 2003, 28(19): 2298-2303.
- (收稿日期: 2005-07-25 修回日期: 2005-11-01)
(英文编审 蒋欣)
(本文编辑 卢庆霞)

个案报道

颈胸段自发性硬膜外血肿 1 例报告

朱旭, 陈学明, 于振山

(北京潞河医院骨科 101149)

中图分类号: R744.1 文献标识码: B 文章编号: 1004-406X(2006)-01-0056-02

患者, 男性, 20 岁。因颈项背部疼痛, 双下肢麻木 2 个月, 加重 20h, 双下肢不能活动 4h 入院。2 个月前, 患者无诱因出现颈背部疼痛, 双下肢麻木, 于就近医院就诊, 拍片示颈椎反曲, C2/3 椎间孔变窄, 予口服止痛及神经营养药物等保守治疗, 疗效不明显。入院前 3d 曾行颈椎牵引治疗, 20h 前(凌晨 3~4 时), 患者突然出现颈背部剧痛, 到当地医院就诊, 予度冷丁 50mg 肌注, 症状不缓解, 急诊行胸段 MRI 检查未见明显异常, 转我院就诊。就诊过程中, 双下肢不能活动, 遂以截瘫原因待查收入院。查体: 神志清楚, 痛苦面容, 颅神经检查正常, C7、T1 棘突有压痛和叩击痛, 放射至肩背部, 双侧 T1 平面痛触觉过敏, T2~T3 平面痛触觉减退, T4 及以下平面痛触觉消失, 鞍区感觉消失; 左侧屈指深肌、小指外展肌肌力 3 级, 其余上肢肌力正常, 双下肢肌张力低, 肌力 0 级, 肛门括约肌收缩不能, 双侧肱二头肌、肱三头肌腱反射及双侧桡骨膜反射亢进, 双侧腹壁反射未引出, 双下肢膝和跟腱反射、球海绵体反射、肛周反射未引出, 双侧 Hoffmann 征阴性。X 线片示颈椎反曲, C2/3 椎间孔变窄。入院诊断: 截瘫原因待查, 急性脊髓压迫症, 硬膜外血肿? 入院后予截瘫护理、脱水、消肿、激素治疗并予颈胸段 MRI 检查, MRI 示 C6~T2 椎管左后部中等 T1 长 T2 信号, 脊髓受压向右前移位, 相应水平脊髓内可见片状长 T1 长 T2 信号(图 1、2), 诊断为 C6 下缘至 T2

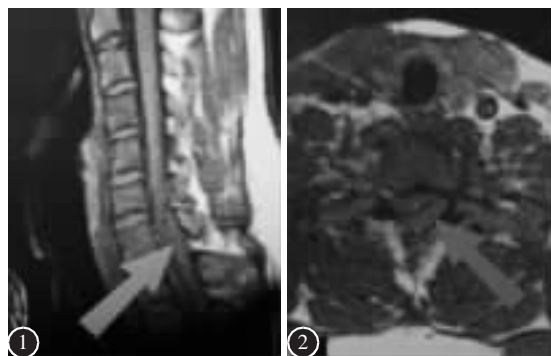


图 1 MRI 横断面示 C7~T1 水平椎管内左后方月牙形影

图 2 MRI 矢状面示 C6 椎体下缘至 T2 椎体上缘椎管后方等 T1 信号

上缘硬膜外出血, 相应水平脊髓水肿。入院第 20h 在复合吸入全麻下行椎管减压、血肿清除术。术中见 C6 下缘至 T2 椎弓根水平硬膜外左后方瘀血块, 约 5~6ml, C7~T1 左侧关节突水平有活动性出血, 咬除关节突内侧 1/2, 凝血酶明胶海绵压迫止血直至出血停止, 血肿清除后硬膜搏动良好。术后予抗炎、消肿、营养神经治疗(弥可保、维生素 B1), 并进行系统的康复锻炼 8 周, 感觉运动平面逐渐下

(下转第 61 页)