

新型壳聚糖衍生物预防椎板切除术后硬膜外粘连的实验研究

刘双利, 侯春林, 魏长征, 郭兴锋, 尹刚, 徐镇

(第二军医大学附属长征医院 200003 上海市)

【摘要】目的:探讨一种新型壳聚糖衍生物——羟丁基壳聚糖对椎板切除术后硬膜外粘连的预防作用。**方法:**36 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 2% 羟丁基壳聚糖组(A 组)、3% 羟丁基壳聚糖组(B 组)及对照组(C 组), 每组 12 只。三组大鼠行 L2 椎板切除术后, A、B 组于硬脊膜外分别注入 2ml 浓度为 2%、3% 羟丁基壳聚糖溶液, C 组旷置, 然后缝合切口。术后 6 周取材, 大体观察硬膜外粘连情况, 进行 Rydell 分级; 行免疫组织化学检测, 计算羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)含量; 切片行 HE 染色, 观察硬膜外瘢痕增生情况, 并行成纤维细胞计数。**结果:**术后 6 周 A 组及 B 组硬膜外粘连程度均较 C 组轻, Rydell 评分差异显著($P < 0.05$), 而 A、B 组之间无显著性差异($P > 0.05$); 三组硬膜外瘢痕组织中 Hyp 含量分别为 $0.284 \pm 0.065 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、 $0.302 \pm 0.109 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、 $0.963 \pm 0.188 \mu\text{g}/\text{mg}$, A、B 组含量均较 C 组少, 差异显著($P < 0.05$), 而 A、B 组之间无显著性差异($P > 0.05$); 组织学观察见 A 组及 B 组与 C 组比较硬脊膜外胶原增生较少, 瘢痕组织结构疏松, 但三组成纤维细胞计数无显著性差异($P > 0.05$)。**结论:**羟丁基壳聚糖能够有效阻隔大鼠硬膜外瘢痕组织, 明显减少胶原组织增生, 具有良好的预防硬膜外粘连的作用, 有望成为一种新型防粘连生物医学材料。

【关键词】羟丁基壳聚糖; 椎板切除术; 硬膜外粘连; 实验研究

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.10.13

中图分类号: R687.3, Q539 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2009)-10-0769-05

Experimental study of a new chitosan on preventing epidural adhesion after laminectomy/LIU Shuangli, HOU Chunlin, WEI Changzheng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(10):769-773

【Abstract】 Objective: To explore the effect of a new chitosan -hydroxybutyl chitosan on preventing epidural adhesion after laminectomy. **Method:** 36 Sprague-Dawley rats were randomly and evenly divided into three groups, the 2% hydroxybutyl chitosan group (group A), the 3% hydroxybutyl chitosan group (group B) and the control group (group C). Laminectomy was performed on L2 segment in each rat. After that, the exposed duramaters in group A and B were covered respectively with 2ml 2% and 3% hydroxybutyl chitosan solution, while in group C the exposed duramater was left uncovered. 6 weeks after operation, specimens were harvested and then subjected to gross, immunohistochemical and histological examinations to compare their therapeutic effects on epidural cicatricial tissues. **Result:** According to the Rydell scoring, the adhesion in group A and group B was both significantly minor than in group C ($P < 0.05$), while the difference between group A and B showed no significance ($P > 0.05$). The content of Hyp in group A, B and C was $0.284 \pm 0.065 \mu\text{g}/\text{mg}$, $0.302 \pm 0.109 \mu\text{g}/\text{mg}$ and $0.963 \pm 0.188 \mu\text{g}/\text{mg}$ respectively with the difference between group C and group A and B significant ($P < 0.05$). According to the histological observation, the epidural collagenous fiber in group A and B was less than in group C. The scar tissue had loose structure. But the number of collagenoblasts in three groups showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** Hydroxybutyl chitosan can effectively separate the epidural scar tissue and reduce the amount of Hyp which is expected to be a new anti-adhesion biomaterial.

【Key words】 Hydroxybutyl chitosan; Laminectomy; Epidural adhesion; Experimental study

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China

第一作者简介: 男(1977-), 主治医师, 硕士研究生在读, 研究方向: 生物医学材料

电话: (0310)4459193 E-mail: llgs12@sohu.com

通讯作者: 侯春林 E-mail: chunlin_hou@yahoo.com.cn

椎板切除术是脊柱外科常用的手术方式,但术后易发生硬膜外粘连,因其可导致腰椎术后综合征(failed back surgery syndrome, FBSS),严重影响手术疗效并给患者造成极大的痛苦,一直以来是众多学者研究的热点^[1]。对如何预防椎板切除术后硬膜外粘连,国内外学者进行了大量的实验及临床研究^[2-5]。目前较为公认的预防硬脊膜周围纤维化的最好材料是半流体物质^[6],如透明质酸钠(HA)、羧甲基壳聚糖(CH)、纤维蛋白胶(FG)等。而上述材料仍然存在半衰期较短、体内降解较快,临床应用时可能会随患者体位改变而流出体外等缺点^[7,8]。为此,我们通过前期实验合成了壳聚糖的一种新的衍生物——羟丁基壳聚糖(hydroxybutyl chitosan, HBC)。HBC 是一种智能型生物材料,由于其独特的温敏性和良好的生物学活性,近年已被国外学者所关注^[9,10]。而我们前期实验的检测结果显示,所合成的 HBC 具有良好的温敏性,在生理温度(37℃)下,该材料可由液态迅速转化为凝胶,并且其凝胶的机械强度较现在临床应用的 CH 凝胶及 HA 凝胶均大大增加,在动物体内降解时间也明显延长。本次动物实验,旨在探讨其对椎板切除术后硬膜外粘连的预防作用,为新型壳聚糖衍生物的开发及临床应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料及仪器

HBC (浓度 2%、3%, 自制); 羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)试剂盒(南京建成生物工程研究所); PBS 液(第二军医大学附属长海医院病理科实验室); TSM-1 型电磁搅拌器、PT100 实验动物手术台(上海实验仪器设备厂); 真空干燥机(FTS 公司, 美国); AEG-120 电子分析天平(上海江岳电子科技有限公司); 721 型紫外分光光度计(天津拓普仪器有限公司); DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司); TDL-50B 台式高速离心机(上海隆拓仪器厂); 倒置相差显微镜(上海宙山精密光学仪器厂)。

1.2 实验动物及分组

清洁级 SD 大鼠 36 只, 雌雄各半, 由第二军医大学实验动物中心提供, 体重 250~280g, 按体重编号并随机分为 3 组: 2% 羟丁基壳聚糖组(A 组)、3% 羟丁基壳聚糖组(B 组)及对照组(C 组), 每组 12 只。

1.3 动物模型制作

动物采用戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉。仰卧位固定, 术区消毒, 于 L2、L3 椎体做背部正中纵形切口, 长约 3cm, 显露并切除 L2 棘突及椎板, 暴露硬脊膜后, A、B 组分别于硬脊膜外注入 2%、3% 羟丁基壳聚糖溶液 2ml, C 组旷置, 而后逐层缝合切口, 术后分笼标准喂养。

1.4 检测指标

1.4.1 大体观察 术后 6 周每组取 6 只大鼠, 颈椎脱臼法处死, 沿原皮肤切口进入, “U”形切开筋膜层及两侧骶棘肌, 将 L2 硬脊膜后侧“U”形瘢痕及肌肉组织条向上方剥离, 大体观察硬脊膜外瘢痕生成情况。参照 Rydell 分级标准^[8]将硬膜外粘连程度分为 4 级: 0 级, 硬膜囊与瘢痕组织或移植植物无明显粘连; I 级, 硬膜外有稀疏而散在的膜性粘连, 瘢痕组织或充填物易与硬膜囊钝性分离; II 级, 硬膜囊与瘢痕组织粘连较广泛和致密, 钝性分离阻力较大, 分离后硬膜囊仍保持完整; III 级, 粘连广泛、致密, 硬膜囊与瘢痕无法钝性分离, 锐性分离后的硬膜囊难以保持完整。记录结果并行统计分析。

1.4.2 免疫组织化学检测 术后 6 周将上述每组 6 只大鼠大体观察后, 每只均切取硬脊膜后部 90~110mg 肌肉瘢痕组织, 漂洗、吸干水分后称重, 沸水浴充分水解 20min, 调 pH 值至 6.0~6.8, 2770×g 离心 10min, 取上清, 加入羟脯氨酸(Hyp)显色剂, 于 550nm 处经紫外分光光度计测定吸光度(A)值, 计算每毫克湿组织中 Hyp 的含量。计算公式为: Hyp 含量(μg/mg)=[(测定管 A 值-空白管 A 值)/(标准管 A 值-空白管 A 值)×标准管含量(5μg/ml)×水解液总体积(10ml)/组织湿重(mg)]。记录结果并行统计分析。

1.4.3 组织学观察 术后 6 周时剩余每组 6 只大鼠均处死并矩形切取手术段脊柱, 包括其后侧瘢痕组织及骶棘肌。经 6% 硝酸脱钙, 常规脱水, 石蜡包埋, 每标本于中段切取 2 张切片, 行 HE 染色, 于 200 倍显微镜下观察硬膜外瘢痕增生情况并选 1 张切片采用 Leica Qwin plus 图像分析系统进行成纤维细胞计数。计数时取同一放大率的组织图像(×400), 选取 100×100μm 作为计数范围, 每张切片计数三个不同区域, 取其平均值。记录结果并进行统计分析。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 大体观察的 Rydell 评分结果采用多组等级资料比较的秩和检验(Kruskal-Wallis H 检验), 多重比较采用 Nemenyi 检验; Hyp 含量及成纤维细胞计数结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

所有动物术后情况良好, 无步态异常、感染及死亡。术后 6 周, A、B 组硬膜外可见稀疏而散在的膜性粘连, 瘢痕组织与硬膜囊易钝性分离, 硬膜囊光滑、完整, Rydell 分级主要为 0~I 级; C 组硬膜外瘢痕组织致密, 粘连广泛, 瘢痕组织与硬膜囊不易钝性分离, 分离后硬膜囊多不完整, Rydell 评分集中在 II~III 级(图 1)。A、B 组与 C 组差异均有统计学意义($P < 0.05$), 而 A、B 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 各组术后硬膜外粘连 Rydell 分级 (n=6)

	Rydell 分级			
	0	I	II	III
A 组	1	4	1	0
B 组	2	4	0	0
C 组	0	1	2	3

2.2 免疫组织化学检测

各组硬膜外瘢痕组织中 Hyp 含量结果见表 2, A、B 组 Hyp 含量均比 C 组少, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而 A 组与 B 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 组织学观察

显微镜下可见 A、B 组硬脊膜与瘢痕组织之间有明显间隙, 局部少量材料存留, 硬膜外胶原组织增生较少, 瘢痕组织结构疏松, 胶原纤维与硬膜平行排列, 毛细血管少量增生, 成纤维细胞与纤维细胞混杂, 数量较多。C 组硬膜外胶原组织大量增生, 形成致密瘢痕, 硬脊膜与瘢痕组织粘连紧密, 毛细血管大量增生且扩张明显, 成纤维细胞及纤维细胞数量不多(图 2)。但三组成纤维细胞计数差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 2)。

3 讨论

椎板切除造成的局部组织缺损修复主要是通

表 2 各组硬膜外瘢痕组织中 Hyp 含量及成纤维细胞计数

组别	n	Hyp 含量($\mu\text{g}/\text{mg}$)	成纤维细胞计数 (个/计数区域)
A 组	6	0.284 $\pm$ 0.065 ^①	10.9 $\pm$ 2.4 ^②
B 组	6	0.302 $\pm$ 0.109 ^①	11.2 $\pm$ 1.1 ^②
C 组	6	0.963 $\pm$ 0.188	10.3 $\pm$ 1.2

注: 与 C 组比较^① $P < 0.05$, ^② $P > 0.05$

过纤维结缔组织增生来完成, 其修复过程为早期的肉芽组织产生及晚期的瘢痕组织形成^[11]。关于椎板切除后硬膜周围瘢痕形成的来源, 目前较为公认的是 Songer 等提出的“三维立体学说”, 即硬膜周围的纤维化既来自后方损伤的骶棘肌创面, 亦来自前方损伤的纤维环和后纵韧带, 后者的纤维瘢痕包绕神经根, 导致侧方受累。因此认为预防硬脊膜周围纤维化最好的材料是半流体物质, 它可包绕神经根及硬脊膜, 达到三维屏障作用。HBC 是通过对壳聚糖分子上的 6-OH 和 NH₂ 进行化学修饰而得来的一种新型壳聚糖衍生物, 近来有研究表明^[9,10], HBC 不仅具有独特的物理性质——温敏性, 即在温度达到最低临界温度以上时, 该材料可由液态转化为凝胶, 而且体外实验表明, 它可使间充质干细胞及椎间盘细胞保持较高的活性, 并能促进间充质干细胞的分化, 因此表现出了良好的生物学活性。

本实验正是利用 HBC 的温敏性, 将其溶液喷涂于椎板切除后的硬脊膜外, 它可流至神经根周围及硬脊膜前方, 而后, 在体温的作用下, 形成不可流动的半刚性凝胶, 环绕硬脊膜形成阻隔层, 起到三维屏障作用。同时, 因其最低临界温度较低(20℃左右), 在生理温度(37℃)时其凝胶的机械强度较目前临床应用的 CH 凝胶及 HA 凝胶均大大增加, 在动物体内降解时间也明显延长, 克服了以往半流体防粘连材料半衰期较短、临床应用时随患者体位改变而流出体外的缺点。

本次实验的大体观察结果表明, 术后 6 周时, A、B 组硬膜外粘连均较 C 组轻, 组织学观察可见硬膜外存在明显间隙, 局部少量材料残留, 证实了 HBC 通过良好的物理阻隔发挥对椎板切除术后硬膜外粘连的良好预防作用。同时, 实验还发现术后 6 周 A 组及 B 组硬膜外胶原组织增生较少, 瘢痕组织结构疏松, 硬膜外瘢痕组织中 Hyp 含量两组均显著少于 C 组。Hyp 是胶原蛋白中的特征性氨

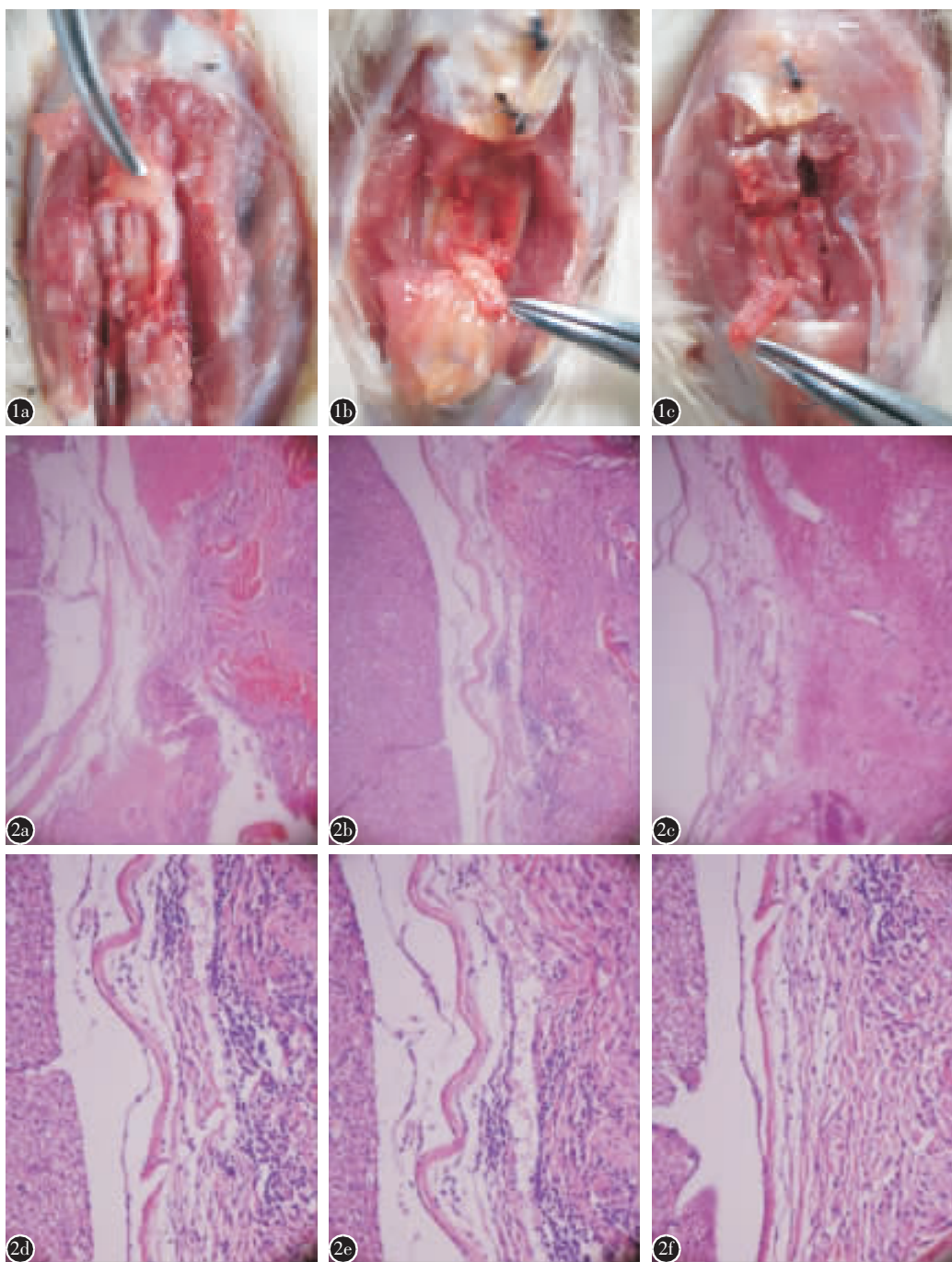


图 1 术后各组大体观察 **a,b** A、B 组硬膜外粘连较轻,硬膜囊光滑、完整 **c** C 组硬膜外瘢痕组织致密,不易钝性分离
图 2 术后各组组织学观察 **a,b** A、B 组硬脊膜与瘢痕组织之间有明显间隙,硬膜外瘢痕疏松(HE $\times 200$) **c** C 组硬膜外形成致密瘢痕,与硬脊膜粘连紧密(HE $\times 200$) **d,e,f** 三组成纤维细胞与纤维细胞混杂,成纤维细胞计数无明显差异

基酸,而胶原蛋白是构成瘢痕组织中胶原纤维的主要成分,因此把瘢痕组织中的 Hyp 含量作为衡量机体瘢痕胶原组织代谢的重要指标^[12]。而本实验结果表明,HBC 可明显抑制椎板切除术后硬膜外胶原组织增生及代谢,从而减少瘢痕组织的形成,达到减轻粘连的作用。另外,本次实验中,术后

6 周的 Rydell 分级结果及 Hyp 含量定量分析结果均表明,A 组与 B 组的防粘连效果无显著性差异,即浓度为 2%(V/V)的 HBC 即可起到预防硬膜外粘连的作用。

成纤维细胞作为组织修复细胞的主要成分,在炎性介质及生长因子的趋化作用下,通常于术

后 2~3d 出现在椎板缺损区,与毛细血管一起长入血凝块。在血小板、巨噬细胞释放的生长因子刺激下进行增殖,于术后 5~6d 开始合成胶原,产生胶原纤维。既往研究证实^[13,14],壳聚糖及其衍生物通过抑制成纤维细胞增殖而减少瘢痕组织增生,进而预防组织粘连。而本次实验的硬膜外瘢痕组织中成纤维细胞计数结果显示,三组间无显著性差异。由此,我们推测 HBC 减少椎板切除术后硬膜外胶原组织增生及代谢的机制,并非直接抑制成纤维细胞的增殖,而可能通过影响成纤维细胞的某些活性,如刺激成纤维细胞分泌某些细胞因子如 IL-8 等^[15],进而抑制成纤维细胞合成、分泌胶原的功能^[16],也可通过其他途径抑制胶原基因的表达,进而减少胶原蛋白的合成^[17,18]。其具体机制尚有待于进一步研究探讨。

综上所述,本次动物实验表明新型壳聚糖衍生物 HBC 可通过其独特的物理性质,起到三维屏障的作用,发挥预防椎板切除术后硬膜外粘连的优势,同时可明显抑制椎板切除术后硬膜外胶原组织的增生及代谢,从而减少瘢痕组织的形成。

4 参考文献

- Alkalay RN, Kim DH, Urry DW, et al. Prevention of postlaminectomy epidural fibrosis using bioelastic materials [J]. *Spine*, 2003, 28(15):1659-1665.
- Kato T, Haro H, Komori H, et al. Evaluation of hyaluronic acid sheet for the prevention of postlaminectomy adhesions [J]. *Spine J*, 2005, 5(5):479-488.
- Bora H, Aykol SV, Akyurek N, et al. Inhibition of epidural scar tissue formation after spinal surgery: external irradiation versus spinal membrane application [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 51(2):507-513.
- Touliatos AS, Soucacos PN, Beris AE. Post-discectomy peridural fibrosis: comparison of conventional versus microsurgical techniques [J]. *Microsurgery*, 1992, 13:192-195.
- Gerszten PC, Moossy JJ, Flickinger JC, et al. Inhibition of peridural fibrosis after laminectomy using low-dose external beam radiation in a dog model [J]. *Neurosurg*, 2004, 5(6):1478-1485.
- Lee JY, Stenzel W, Ebel H, et al. MitomycinC in preventing spinal epidural fibrosis in a laminectomy model in rats [J]. *J Neurosurg*, 2004, 100(1 Suppl Spine):52-55.
- 张宇, 周初松, 蒋刚彪, 等. 壳聚糖/聚乙二醇琥珀酸酯/丝裂霉素 C 释药系统预防椎板切除术后硬脊膜外瘢痕粘连的实验研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(10):1222-1226.
- Tatsui CE, Martinez G, Li X, et al. Evaluation of DuraGen in preventing peridural fibrosis in rabbits [J]. *J Neurosurg Spine*, 2006, 4(1):51-59.
- Jiyoung D, Daniel S, Yoshitsune SY, et al. Temperature-responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disk cells [J]. *Biomaterials*, 2006, 27:406-418.
- Beiyi C, Jiyoung D, Tuan LT, et al. Dynamics of smooth muscle cell deadhesion from thermosensitive hydroxybutyl chitosan [J]. *Biomaterials*, 2007, 28:1503-1514.
- 庞祖才, 许汉权, 谢伟坚, 等. 预防椎板切除术后硬膜外粘连的实验研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(12):1176-1179.
- 王立新, 曹晓建, 张宁, 等. 丝裂霉素 C 对大鼠硬膜外瘢痕组织中羟脯氨酸含量的影响 [J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2005, 15(2):110-112.
- Carvalho V, Domingues L, Gama M. The inhibitory effect of an RGD-human chitin-binding domain fusion protein on the adhesion of fibroblasts to reacylated chitosan films [J]. *Mol Biotechnol*, 2008, 40(3):269-279.
- 王德娟, 莫家骢, 潘仕荣, 等. 羧甲基壳聚糖预防大鼠术后腹膜粘连的研究 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2008, 29(3):287-293.
- Ueno H, Nakamura F, Murakami M, et al. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(15):2125-2130.
- Attia J, Legendre F, Nguyen QT, et al. Evaluation of adhesion, proliferation, and functional differentiation of dermal fibroblasts on glycosaminoglycan-coated polysulfone membranes [J]. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14(10):1687-1697.
- Okamura Y, Normura A, Minami S, et al. Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on release of type I collagenase from fibroblasts [J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6(5):2382-2384.
- Strand SP, Issa MM, Christensen BE, et al. Tailoring of chitosans for gene delivery: novel self-branched glycosylated chitosan oligomers with improved functional properties [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(11):3268-3276.

(收稿日期:2009-05-31 修回日期:2009-06-26)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)