

胶原海绵联合地塞米松预防大鼠椎板切除后硬膜瘢痕粘连的研究

夏英鹏, 申庆丰, 李辉南, 徐天同

天津市人民医院 脊柱外科, 天津 300121

摘要: 目的 评价不同硬膜外覆盖物以及局部应用类固醇激素对腰椎术后瘢痕形成的影响, 并初步探讨其机制。方法 Wistar 大鼠 80 只随机数字表法分为 4 组: 胶原海绵+地塞米松组、胶原海绵组、明胶海绵组和对照组(无任何硬脊膜外覆盖物), 每组实验动物 20 只, 麻醉后在背部正中做切口行 L1-L5 全椎板切除, 造成 0.5 cm×1.0 cm 骨性缺损, 显露硬膜。胶原海绵+地塞米松组动物硬膜外放置胶原海绵并注射 0.1 mL 地塞米松, 胶原海绵组动物硬膜外放置胶原海绵, 明胶海绵组动物硬膜外放置明胶海绵, 对照组直接缝合肌肉组织。手术后 12 周重新切开伤口, 观察硬膜外瘢痕形成及与硬脊膜粘连情况。应用免疫组化和 Western blot 检测显示硬膜外瘢痕及周围组织中 TGF- β_1 、VEGF 表达情况, 比较各组间差异。结果 肉眼及光镜观察胶原海绵+地塞米松组和胶原海绵组的硬膜外瘢痕粘连明显少于明胶海绵组和对照组, 而胶原海绵+地塞米松组与胶原海绵组之间无显著差异, 明胶海绵组与对照组间无显著差异; 免疫组化及 Western blot 检测显示胶原海绵+地塞米松组和胶原海绵组硬膜外瘢痕及周围组织中 TGF- β_1 、VEGF 的表达显著少于明胶海绵组和对照组, 而胶原海绵+地塞米松组与胶原海绵组之间、明胶海绵组与对照组之间均无明显差异。结论 胶原海绵可以显著降低实验大鼠腰椎术后硬膜周围瘢痕增生粘连的形成, 同时加用局部注射地塞米松并没有加强这种作用; 局部应用明胶海绵不能减少硬膜外瘢痕增生粘连的形成。胶原海绵应用后局部的 TGF- β_1 和 VEGF 的低表达可能是减少硬膜外瘢痕增生粘连的重要机制之一。

关键词: 胶原海绵; 地塞米松; 硬膜外瘢痕; 明胶海绵; TGF- β_1 ; VEGF

中图分类号: R965; R977.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)03-0294-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.008

Prevention of collagen sponge combined with dexamethasone on subdural scar adhesion after laminectomy in rats

XIA Ying-peng, SHEN Qing-feng, LI Hui-nan, XU Tian-tong

Department of Spine Surgery, Tianjin Medical Union Centre, Tianjin 300121, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of different epidural covering objects and local usage of steroid hormone on scar formation after spinal operation and to explore its mechanism. **Methods** Wistar rats (80) were randomly divided into four groups: collagen sponge + Dexamethasone (Dex) group, pure collagen sponge group, gelatin sponge group, and control (no epidural covering) group. After anesthesia, incisions were made in the middle of rat back, L1-L5 laminectomy was performed to leave 0.5 cm × 1.5 cm defects on the dura matter. Epidural placement of collagen sponge and Dex (0.1 mL) was given to rats in collagen sponge + Dex group, epidural placement of collagen sponge in pure collagen sponge group, epidural placement of gelatin sponge in gelatin sponge group, and just directed suture in control group. Twelve weeks after operation, we observed the epidural scar formation and the dura adhesion. Application of immunohistochemistry and Western blotting analysis showed the expression of epidural scar and surrounding tissues in TGF- β_1 and VEGF, and the differences between gelatin sponge group and control group were compared. **Results** Through macroscopic and microscopic observation, the epidural scar adhesion of collagen sponge + Dex group and pure collagen sponge group was obviously less than that in gelatin sponge group and the control group; while no significant difference was detected between collagen sponge + Dex group and pure collagen sponge group, and between gelatin sponge group and control group. Immunohistochemistry and Western blotting analysis showed the TGF- β_1 and VEGF in epidural scar and surrounding tissues in collagen sponge + Dex group and pure collagen sponge group were significantly less than those of gelatin sponge group and control

收稿日期: 2013-05-06

基金项目: 天津市卫生局立项课题 (2011KZ54)

作者简介: 夏英鹏 (1972—), 男, 天津人, 主任医师, 硕士, 天津市人民医院脊柱 3 科科长, 研究方向为脊柱脊髓疾患的临床与基础研究。

Tel: (022) 27557147 E-mail: xiayingpeng3753@hotmail.com

group; but no significance was detected between collagen sponge + Dex group and pure collagen sponge group and between gelatin sponge group and control group. **Conclusion** Collagen sponge could significantly reduce the formation of postoperative epidural scar adhesion in rats, while local injection of Dex could not enhance this effect; the local use of gelatin sponge could not reduce the formation of epidural scar adhesion. The expression of TGF- β_1 and VEGF in the scar and surrounding tissue is significantly lower in the rats applied with collagen sponge, which should be an important mechanism for its prevention of epidural scars.

Key words: collagen sponge; dexamethasone; epidural scar; gelatin sponge; TGF-1; VEGF

椎板切除术是脊柱外科常用手术方法之一,但术后因硬膜外瘢痕粘连等因素严重影响手术疗效,所以时至今日预防硬膜外粘连仍是脊柱外科的研究热点^[1]。国内外学者为了减少瘢痕粘连的形成,进行了大量生物材料和人工合成防粘连材料方面的研究,但没有一种材料能完美地解决硬膜外瘢痕粘连问题^[2]。本实验采用动物实验的方法对脊柱外科手术中常用的预防瘢痕方法包括胶原海绵、明胶海绵及类固醇激素(地塞米松)局部使用进行了对照研究,以期指导临床合理选择硬膜外覆盖物,预防瘢痕增生和纤维粘连。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用 Wistar 大鼠购自天津市华荣实验动物科技有限公司。胶原海绵(北京天新福医疗器械有限公司,批号 1330009),地塞米松(天津金耀氨基酸有限公司,批号 1210251),TGF- β_1 、VEGF 多抗、SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2~7.4)、0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)等试剂购自美国西格玛奥德里奇公司。次高相对质量标准蛋白购自上海逸晗生物科技有限公司。

1.2 动物模型建立与分组

Wistar 大鼠 80 只,雌雄各半,体质量 100~120 g,于天津市疾病预防控制中心毒理实验室驯养 1 周,使用随机数字表随机分为 4 组:胶原海绵+地塞米松组、胶原海绵组、明胶海绵组、对照(无任何硬膜外覆盖物)组。每组动物均行腰椎板切除手术。麻醉后剃毛,行背部正中切口,做 L1~L5 全椎板切除,造成 0.5 cm×1.0 cm 缺损,显露硬膜。胶原海绵加地塞米松组的动物硬膜外放置胶原海绵,并注射地塞米松 0.1mL,胶原海绵组的动物硬膜外放置胶原海绵,明胶海绵组的动物硬膜外放置明胶海绵,对照组直接缝合肌肉筋膜组织,于手术后 12 周重新切开伤口,观察硬膜外瘢痕形成情况。实验期 12 周,从原手术入路进入,逐层观察。

1.3 肉眼观察和瘢痕组织评级

使用手术用放大目镜观察。从原手术入路逐层解剖观察大体标本后,观察瘢痕与硬脊膜的关系以及周围瘢痕生成情况,根据改良 Rydell-balazs 标准进行粘连程度评分^[3]。0 分:硬膜与疤痕组织无明显粘连;1 分:硬膜外有薄而散的膜性粘连,但牵拉疤痕组织或充填组织粘连易与硬膜分离;2 分:硬膜与疤痕粘连较广泛和致密,但仍可钝性分离,分离后硬膜仍完整;3 分:粘连致密,硬膜与疤痕需锐性分离,分离后的硬膜难以保持完整。

1.4 光镜观察硬膜外瘢痕形成状况

观察大体标本后,截取椎板缺损区的脊柱,包括硬膜外瘢痕、脊髓及两侧软组织,石蜡包埋切片,HE 常规染色。采用双盲法,由两位经验丰富但对实验分组不详的病理科医师作光镜观察者,观察术后各组动物纤维瘢痕的形成情况、粘连范围大小。根据硬膜粘连面积、硬膜外胶原密度及瘢痕组织向椎管侧方和后方延伸程度 3 个方面,按改良 Nussbaum 标准评分^[4],3 个方面合计最高为 3 分。0 分:硬膜粘连面积<25%,硬膜外胶原稀疏,瘢痕和充填物无明显的侧方及后方延伸;0.5 分:硬膜粘连在 25%~50%,胶原较致密,瘢痕侧方延伸达神经根与椎板缺损之间或部分嵌入椎板缺损,但未压迫硬膜囊;1 分:硬膜粘连>50%,硬膜外胶原致密,瘢痕包绕或伸达一侧或双侧神经根,或瘢痕嵌入椎管,硬膜囊或脊髓受压变形。

1.5 免疫组化检测 β_1 转化生长因子(TGF- β_1)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达

石蜡包埋切片常规免疫组织化学染色(SP 法)操作,一抗应用 TGF- β_1 、VEGF 多克隆抗体,阴性对照用磷酸盐缓冲溶液(PBS)代替一抗,其余步骤相同。细胞内有棕黄色粗颗粒分布或棕黄色细颗粒分布者为阳性反应。应用 HPIAS-1000 彩色病理图文分析系统测定片中阳性反应物的吸光度。

1.6 Western blotting 测定脊髓中 TGF- β_1 、VEGF 蛋白

1.6.1 电泳 将截取的瘢痕及周围组织放入胞质提

取液 (100 g/L), 应用超声组织粉碎仪匀浆, 冰上裂解 30 min 后 10 000 r/min 离心 15 min, 上清物用考马斯亮兰 G250 试剂盒测定蛋白浓度。标准恒压电泳 3 h, 根据次高相对分子质量标准蛋白质来确定目的蛋白的大致位置。

1.6.2 转膜与包被 采用醋酸纤维素膜, 4 °C 170 mA 恒流转膜 1 h。用丽春红 S 染膜, 去离子水漂洗脱色, 同时转移后的胶行考马斯亮蓝染色, 置于封闭液中 4 °C 过夜。

1.6.3 与抗体反应并显色 加入 TGF-β₁、VEGF 多克隆抗体 (1 : 500), 4 °C 孵育过夜; 二抗采用 HRP 标记的鼠抗羊 IgG (1 : 1 000), 化学发光法显色。将显色条带扫描到计算机中, 用 Gel.Pro 凝胶分析软件对其进行半定量分析。

1.7 统计学分析

数据用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析、Fisher 精确检验和 *t* 检验。

2 结果

2.1 肉眼大体标本观察和瘢痕组织评级

胶原海绵+地塞米松组椎板切除区可见瘢痕组织, 手术创面肌肉瘢痕化, 瘢痕组织与硬膜轻度粘连, 容易钝性分离。胶原海绵组椎板切除部位, 情况类似胶原海绵+地塞米松组椎板切除区域, 手术创面肌肉瘢痕化, 瘢痕组织轻度硬膜粘连, 容易钝性分离。明胶海绵组可见手术创面肌肉明显瘢痕化, 并有类骨质形成, 其与脊膜背侧粘连紧密, 钝性分离非常困难; 对照组硬膜外覆盖物植入区后方情况类似于明胶海绵组情况, 增生瘢痕组织与硬膜粘连

无法钝性分离。

Rydell-balazs 评分结果统计显示: 胶原海绵+地塞米松组、胶原海绵组与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$), 与明胶海绵组比较差异也有显著行 ($P < 0.01$), 而胶原海绵+地塞米松组与胶原海绵组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 明胶海绵组与对照组之间差异也无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 1。

表 1 Rydell-balazs 评分和 Nuss-baum 标准评分

Table 1 Results of Rydell-balazs score and Nuss-baum standard score

组 别	Rydell-balazs 评分	Nuss-baum 评分
对照	2.93 ± 0.13	2.80 ± 0.16
明胶海绵	2.95 ± 0.28	2.75 ± 0.17
胶原海绵+地塞米松	1.27 ± 0.12**▲▲	1.61 ± 0.15**▲▲
胶原海绵	1.31 ± 0.19**▲▲	1.59 ± 0.11**▲▲

与对照组比较: ** $P < 0.01$ 与明胶海绵组比较: ▲▲ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ▲▲ $P < 0.01$ vs gelatin sponge group

2.2 光镜观察硬膜外瘢痕形成状况

应用光学显微镜观察标本超微结构, 改良 Nuss-baum 标准评分, 结果显示胶原海绵+地塞米松组、胶原海绵组与对照组比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 与明胶海绵组比较差异也有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 而胶原海绵+地塞米松组与胶原海绵组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 明胶海绵组与对照组之间也无显著差异 ($P > 0.05$), 结果见图 1 和表 1。

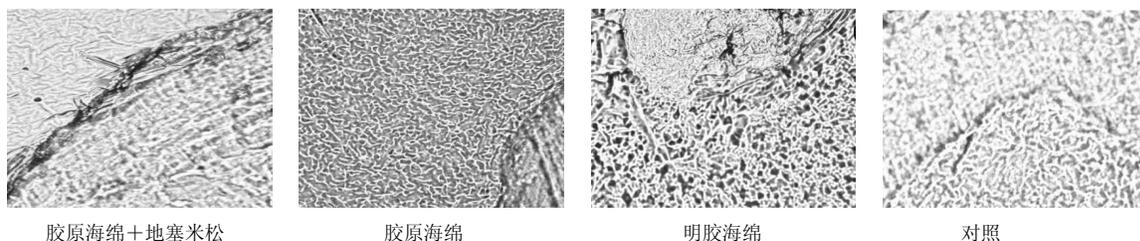


图 1 光镜观察硬膜外瘢痕形成状况

Fig. 1 Light microscopic observation of epidural scar formation

2.3 免疫组化结果

TGF-β₁ 和 VEGF 在 4 组标本中均有阳性表达, 但在胶原海绵+地塞米松组和胶原海绵组中表达显著低于明胶海绵组和对照组, 应用吸光度分析显示: 胶原海绵+地塞米松组、胶原海绵组与对照组比较

差异均有显著性 ($P < 0.01$), 与明胶海绵组比较差异也有显著意义 ($P < 0.01$); 而胶原海绵+地塞米松组与胶原海绵组间比较无显著差异 ($P > 0.05$), 明胶海绵组与对照组之间比较也无显著差异 ($P > 0.05$), 结果见图 2 和表 2。

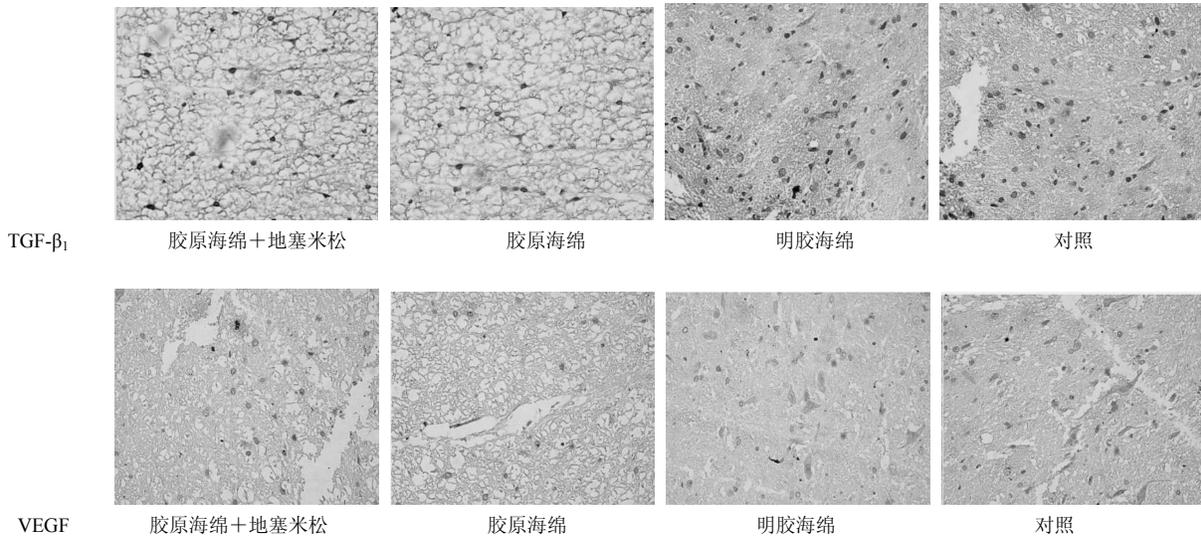


图 2 免疫组化表达结果

Fig. 2 Results of immunohistochemistry expression

表 2 免疫组化吸光度结果

Table 2 Absorption of immunohistochemistry

组 别	TGF-β ₁	VEGF
对照	237.26 ± 12.19	339.37 ± 13.64
明胶海绵	241.52 ± 13.14	342.69 ± 12.85
胶原海绵+地塞米松	151.82 ± 13.82**▲▲	117.82 ± 19.16**▲▲
胶原海绵	146.94 ± 11.56**▲▲	119.95 ± 17.03**▲▲

与对照组比较: ** $P < 0.01$ 与明胶海绵组比较: ▲▲ $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs control group; ▲▲ $P < 0.01$ vs gelatin sponge group

表 3 Western blotting 条带吸光度检查结果

Table 3 Absorption of Western blotting band

组 别	TGF-β ₁	VEGF
对照	159.91 ± 10.20	149.27 ± 10.58
明胶海绵	162.37 ± 13.47	147.37 ± 16.42
胶原海绵+地塞米松	68.65 ± 9.81**▲▲	57.14 ± 11.39**▲▲
胶原海绵	71.47 ± 11.67**▲▲	59.31 ± 8.74**▲▲

与胶原海绵+地塞米松组比较: ** $P < 0.01$ 与胶原海绵组比较: ▲▲ $P < 0.01$

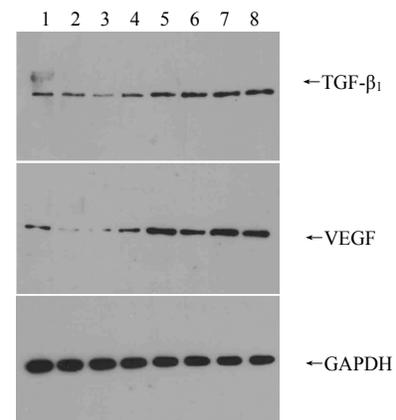
** $P < 0.01$ vs collagen sponge plus dexamethasone group; ▲▲ $P < 0.01$ vs collagen sponge group

2.4 Western blotting 测定脊髓中 TGF-β₁、VEGF 蛋白表达

TGF-β₁ 和 VEGF 蛋白在 4 组标本中均有阳性表达,但在胶原海绵+地塞米松组、胶原海绵组中的表达明显低于明胶海绵组和对照组,应用吸光度分析显示:胶原海绵+地塞米松组、胶原海绵组与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$),与明胶海绵组比较差异也有显著性 ($P < 0.01$);而胶原海绵+地塞米松组与胶原海绵组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。明胶海绵组与对照组比较差异也无显著性 ($P > 0.05$),结果见表 3 和图 3。

3 讨论

椎板切除造成的局部骨缺损的修复需要经历炎症反应、肉芽组织产生、瘢痕组织形成等过程,基本环节为纤维母细胞的增生,瘢痕与硬脊膜的接触粘连^[5]。后路椎板切除后在椎管后壁形成所谓的“椎板切除膜”^[5],与硬脊膜、神经根粘连,可以造成神经根的牵扯和压迫,引起神经营养与传导障碍。



1、2-胶原海绵+地塞米松 3、4-胶原海绵 5、6-明胶海绵
 7、8-对照

1,2-collagen sponge plus dexamethasone 3,4-collagen sponge
 5,6- gelatin sponge 7,8-control

图 3 Western blotting 电泳条带比较结果

Fig. 3 Results of Western blotting electrophoresis band

Songer 等^[6]研究发现,硬膜周围纤维化与脊柱病变的性质和手术创伤有关,首次提出了纤维化形成的三维立体学说。多年来人们一直在探索一种理想的方法来预防和减少瘢痕组织的增生和粘连,但是临床观察远期效果不甚理想。而且大量的临床病例研究已经证明硬膜外瘢痕粘连一旦形成并出现症状,手术和非手术治疗的效果都不理想^[2],所以如何预防或减少椎板切除术后硬膜外瘢痕形成,对提高脊柱外科手术疗效具有重要意义。

3.1 胶原海绵与明胶海绵的比较

LaRocca 在 1974 年发现明胶海绵可有效地防止硬膜外和神经根的粘连,但以后很多学者重复此实验结果大相径庭。国外实验还表明,明胶海绵可引起神经纤维轻度水肿和脱髓鞘改变,神经外周呈重度炎症,认为明胶海绵无明显预防瘢痕粘连效果^[7];国内不少学者的实验证明明胶海绵使用后期粘连反而会加重,所以建议不要把明胶海绵放于硬膜外^[8]。尽管如此,因为明胶海绵价格便宜使用方便,兼有止血功能,所以仍然是临床最为常用的预防瘢痕的方法。本次实验结果也证明,术后 12 周,应用明胶海绵硬膜外瘢痕及硬膜粘连情况与对照组无差异,说明胶海绵并无预防术后硬膜外瘢痕增生和粘连的作用。

胶原蛋白以其天然的低毒性、低免疫性和机体相容性好等优点,广泛应用于生物医学材料和临床医疗。近年来也开始尝试用于预防硬膜外瘢痕的形成。但是能否有效尚未形成定论。本实验使用的胶原海绵由牛跟腱制备而来,国内学者利用 SDS-PAGE 法对这种胶原海绵进行了较全面的结构分析,证明是由 I 型胶原组成,郑旭伟等^[9]通过动物实验,证实此种胶原海绵有促进组织修复作用,植入后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,但未见后续报道。本实验结果证明,硬膜外放置胶原海绵可以明显降低实验动物术后硬膜外瘢痕的增生,并减轻瘢痕与硬膜的粘连。

3.2 局部类固醇激素的应用

长期以来激素一直是用于治疗增殖性瘢痕和瘢痕挛缩的首选药物,但是对于全身或局部应用类固醇激素来预防硬膜外瘢痕粘连,其效果仍存有争议。有实验证实局部应用类固醇激素动物的瘢痕组织生成及成熟均较对照组晚,但瘢痕较多,因而推论类

固醇激素只能延缓而不能减少椎管内瘢痕组织的增生形成。本次研究通过动物实验证实胶原海绵同时加用局部注射类固醇激素(地塞米松)并没有加强这种抑制硬膜外瘢痕和粘连形成的作用,由此可见局部应用类固醇激素并无减轻硬膜外瘢痕增生粘连的作用。

3.3 胶原海绵发挥作用的机制的探讨

由于椎板切除术后瘢痕纤维组织形成过程包括水肿形成、肉芽组织形成、纤维化和致密瘢痕形成。目前已经证实, TGF- β_1 与早期的炎性细胞反应、肉芽组织纤维化以及瘢痕的增生和挛缩有关。TGF- β_1 可促进成纤维细胞和成骨细胞外基质的合成,而且 TGF- β_1 可以诱导多种细胞分泌胶原纤维^[10],所以选作本次研究的免疫组化指标;血管内皮生长因子(VEGF)是一种对血管生长有极强诱导作用的因子,是目前所知的唯一作用于血管内皮的生长因子,VEGF 极其重要的生物学功能就是增加血管通透性,从而促进血管的形成。瘢痕组织在组织学上含有丰富的微血管,VEGF 在瘢痕组织中表达增强说明瘢痕组织中有新生血管形成。新生血管的形成成为瘢痕组织的增生提供了营养基础,在瘢痕组织的形成、发展中起着重要的作用^[11],所以也纳入本次研究的免疫组化参考指标。本次研究免疫组化和 Western blotting 结果均显示应用胶原海绵后瘢痕及周围组织中 TGF- β_1 、VEGF 表达显著减少,这可能是其减少硬膜外瘢痕增生及粘连的重要机制之一。

总之,通过本次研究初步证实胶原海绵可以明显降低实验动物腰椎板切除后硬膜外瘢痕粘连的形成,同时证明局部加用类固醇激素(地塞米松)在术后近期并没有加强这种预防作用;硬膜外覆盖明胶海绵和术后直接缝合伤口相比既没有增加也不会减少硬膜外瘢痕的形成。免疫组化研究显示应用胶原海绵后局部组织中 TGF- β_1 、VEGF 表达显著减少,说明这可能是其减少硬膜外瘢痕粘连的重要机制之一。

参考文献

- [1] Collins R L, Christiansen D, Zazanis G A, et al. Use of collagen film as a dural substitute: preliminary animal studies [J]. *J Biomed Mater Res*, 1991, 25(2): 267-276.
- [2] Gudmundsson G, Sogaard I. Complications to the use of vicryl-collagen dural substitute [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 1995, 132(1/3): 145-147.
- [3] Rydell N, Balazs E A. Effect of intra-articular injection of

- hyaluronic acid on the clinical symptoms of osteoarthritis and on granulation tissue formation [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1971, 80: 25-32.
- [4] Nussbaum C E, McDonald J V, Baggs R B. Use of Vicryl (polyglactin 910) mesh to limit epidural scar formation after laminectomy [J]. *Neurosurgery*, 1990, 26(4): 649-654.
- [5] 孙 康, 姜长明, 吕德成, 等. 预防椎板切除术后硬膜周围纤维化与粘连的实验研究 [J]. *中华骨科杂志*, 1995, 15(11): 728-731.
- [6] Songer M N, Rauschnig W, Carson E W, *et al.* Analysis of peridural scar formation and its prevention after lumbar laminotomy and discectomy in dogs [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1995, 20(5): 571-580.
- [7] Laun A, Tonn J C, Jerusalem C. Comparative study of lyophilized human dura mater and lyophilized bovine pericardium as dural substitutes in neurosurgery [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 1990, 107(1/2): 16-21.
- [8] 宫良泰, 许复郁, 戴国锋, 等. 明胶海绵对硬脊膜作用的实验研究 [J]. *山东医科大学学报*, 2001, 39(4): 373-374.
- [9] 郑旭伟, 刘忠军. 人工硬脊膜修补硬脊膜及预防椎管内粘连的实验观察 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2006, 16(1): 52-55.
- [10] Orchard J A, Ibbotson R E, Davis Z, *et al.* ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia [J]. *Lancet*, 2004, 363(9403): 105-111.
- [11] Laera Z. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(9): 893-901.