

· 基础研究 ·

活血止痛汤对硬膜外瘢痕组织中羟脯氨酸含量及其超微结构的影响

夏志敏¹, 周辉², 赵万军², 韩勇², 张志敬¹

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 杭州市中医院)

【摘要】目的:评价活血止痛汤预防实验性椎板切除术后硬膜外瘢痕形成与粘连的疗效。方法:雄性 SD 大鼠 90 只随机分成空白对照组、透明质酸钠组、活血止痛汤组, 每组 30 只。手术切除 L₄ - L₅ 腰椎椎板, 造成 0.25 cm × 1 cm 硬脊膜裸露区, 透明质酸钠组于硬膜囊外均匀地涂抹一层透明质酸钠约 0.3 ml, 其余 2 组以等量生理盐水处理。术后 2 周内活血止痛汤组予活血止痛汤 2.5 ml/kg 灌胃; 空白对照组和透明质酸钠组予等量生理盐水。术后第 2、4、8 周末处死动物, 测定其硬膜外瘢痕组织中羟脯氨酸含量, 按 Rydell 法评定粘连程度, 透射电镜观察其超微结构。结果: 第 2 周时, 透明质酸钠组羟脯氨酸含量明显低于空白对照组 ($P < 0.05$), 而活血止痛汤组虽然也较低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 第 4 周时, 与空白对照组相比, 透明质酸钠组和活血止痛汤组羟脯氨酸含量均较低 ($P < 0.05$), 但透明质酸钠组和活血止痛汤组的差异缺乏显著性。第 8 周时, 活血止痛汤组羟脯氨酸含量不仅低于空白对照组 ($P < 0.01$), 而且其与透明质酸钠组亦有显著性差异 ($P < 0.05$)。大体观察也发现透明质酸钠组和活血止痛汤组粘连程度明显降低 ($P < 0.05$)。各时相透明质酸钠组和活血止痛汤组瘢痕中成纤维细胞以及细胞内的细胞器数量均减少, 胶原纤维的合成受到抑制。结论: 活血止痛汤能降低硬膜外瘢痕中羟脯氨酸的含量, 抑制瘢痕组织中成纤维细胞和胶原的代谢, 减少硬膜外瘢痕的形成和粘连。

【关键词】 椎板切除术; 瘢痕; 羟脯氨酸; 活血止痛汤

Effect of Huoxue Zhitong decoction (活血止痛汤) on content of Hydroxyproline and ultrastructure of the epidural scar tissue XIA Zhim in^{*}, ZHOU Hui, ZHAO Wan-jun, HAN Yong, ZHANG Zhi-jing^{*} Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To evaluate the effect of *Huoxue Zhitong* decoction on content of Hydroxyproline and ultrastructure of the epidural scar tissue **Methods:** Ninety male SD rats were randomly divided into three groups, the control group (A, $n = 30$), sodium hyaluronate group (B, $n = 30$), *Huoxue Zhitong* group (C, $n = 30$). 0.25 cm × 1 cm dura mater uncovered area laminectomy was performed at L₄ and L₅, covered with 0.2 ml sodium hyaluronate in group B, covered with same amount of saline in group A and C. During 2 weeks after operation, in group C, rats were fed with *Huoxue Zhitong* decoction (2.5 ml/kg) by gavage, and with same amount of saline in group A and B. The animals were sacrificed at 2, 4 and 8 weeks after operation. The specimens were prepared for determination of the content of Hydroxyproline at scar tissue and the degree of scar adhesion according to Rydell method, and observed the ultrastructure changes of scar tissue with transmission electron microscope **Results:** At 2 weeks after operation, compared with group A, the content of Hydroxyproline of group B was decreased ($P < 0.05$), but group C compared with group A and B had no difference ($P > 0.05$). At 4 weeks, compared with group A, the content of Hydroxyproline of group B and C were decreased ($P < 0.05$). At 8 weeks, the content of Hydroxyproline of group C was significant decreased compared with not only group A ($P < 0.01$) but also with group B ($P < 0.05$). In group B and group C, the dura mater adhesion was decreased ($P < 0.05$), the proliferation of fibroblasts and fibroblastic function were inhibited ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Huoxue Zhitong* decoction inhibites the increase of Hydroxyproline and reduces the proliferation and collagen synthesis in fibroblast culture in the scar tissue

Key words Laminectomy; Cicatrix; Hydroxyproline; *Huoxue Zhitong* decoction

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(8): 532-535 www.zggszz.com

如何预防下腰椎手术后硬膜外瘢痕形成、粘连是脊柱外

科的一大难题。近年来国内外学者进行了大量研究, 多通过硬膜囊外放置生物或非生物材料以减少瘢痕的形成和粘连, 取得了较好的效果, 但其仍存在一些局限性。本研究以我院

临床验方活血止痛汤口服,预防实验性椎板切除术后瘢痕形成、粘连,观察其对硬膜外瘢痕组织中羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)的含量及其超微结构的影响。

1 材料与方

1.1 药物与试剂 活血止痛汤(川芎、苏木、当归、红花、伸筋草、桂枝等 15味)由杭州市中医院制剂室制备[浙卫准字(1999)第 0314号],批号 050521。每毫升含生药 0.67 g。透明质酸钠由山东正大福瑞达制药有限公司提供[国药准字 H10960136],批号 200508022。羟脯氨酸试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物与分组 雄性 SD大鼠(浙江中医学院实验动物研究中心提供)90只,体质量 350~400 g,各动物按体质量大小排序后随机数目表法随机分成空白对照组(A)、透明质酸钠组(B)、活血止痛汤组(C),每组 30只。

1.3 动物造模及给药 各动物 3%戊巴比妥钠 40 mg/kg体重腹腔麻醉成功后,背部去毛,常规消毒铺巾。无菌条件下进行手术。以 L₄-L₅棘突间隙为中心作后正中切口长约 4 cm,暴露分离椎旁肌,牵向两侧,暴露 L₅-L₆棘突及椎板,咬除 L₄-L₅棘突及全椎板,注意仔细操作以避免损伤脊髓神经,显露 L₄-L₅段硬膜囊后面约 0.25 cm × 1 cm 大小。生理盐水冲洗,去净术区血凝块和碎骨片。B组于硬膜囊外均匀地涂抹一层透明质酸钠约 0.3 ml,其余各组以等量生理盐水处理,逐层缝合筋膜及皮肤。聚维酮碘溶液再次消毒创面。

各动物术后单笼饲养 24 h,除 5只动物后肢不全瘫继续单笼饲养外,其余动物 24 h后按组分笼饲养。术后 3 d每日肌注青霉素 20 × 10⁴ U/kg,预防感染。自术后第 1天开始,C组各动物予活血止痛汤 2.5 ml/kg(按成人剂量换算)灌胃;A组和 B组予等量生理盐水。每日 1次,连续 14 d。

术后 10 d内陆续有 11只动物死亡,A组 4只,B组 3只,C组 4只。10 d后各动物状态良好。14 d后重新补齐各组动物数目,在与原实验完全相同的条件下完成造模、给药处理。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 标本处理 每组分别于术后 2、4、8周末脱臼法各处死 10只动物。原手术入路进入,细心分离,行大体观察;切取硬膜外瘢痕组织。标本分成 2份,1份 -20℃ 冰箱中保存,待测组织中 Hyp 含量;1份制成电镜切片行透射电镜观察。

1.4.2 大体观察 按 L₄-L₅段瘢痕组织形成的范围及与周围组织粘连情况,参考 Rydell 评分标准^[1]将粘连程度分为 4级。0级:未见瘢痕组织或肉芽组织;1级:硬膜外有薄而散在的膜性粘连,但牵扯瘢痕组织(或填充组织),粘连易与硬膜分离;2级:硬膜与瘢痕粘连较广泛而致密,仍可钝性分离,分离后硬膜完整;3级:粘连致密,硬膜与瘢痕需锐性分离,分离后硬膜难以保持完整。

1.4.3 Hyp 含量测定 采用碱水解法。称取 30~50 mg 湿组织块,95℃ 水浴水解 20 min,加入指示剂,调整 pH 值 6.0~6.8。稀释至 10 ml 后取 4 ml 加入 30 mg 活性炭混匀,3 500 r/min 离心 10 min,取上清 1 ml,按试剂盒说明,加入 Ehrlich 等试剂后,60℃ 水浴显色 15 min,冷却,3 500 r/min 离心 10 min,取上清在 1 cm 光径,550 nm 处读取吸光度值。按公式

计算出组织中 Hyp 的含量。每一标本重复 3次,取平均值。

1.4.4 电镜观察 取组织块切成 2 mm × 2 mm × 2 mm,经 2.5%戊二醛前固定,1%锇酸后固定,4%醋酸铀水溶液染色,50%、70%、90%、100%乙醇以及 100%丙酮逐级脱水,无水丙酮与包埋剂 1:1 体积混合渗透,纯包埋剂渗透、包埋,聚合,修块,超薄切片,4%醋酸铀、枸橼酸铅染色等处理后,高压 80 kv TECNA II0 透射电镜观察(浙江大学电镜室)。

1.5 统计学方法 各组大体观察数据的比较用多个独立样本秩和检验;Hyp 含量数据的比较($\bar{x} \pm s$)用单因素方差分析和 *q* 检验。两组数据的统计学分析均应用 SPSS 12.0 软件,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察 术后第 2 周时,硬膜外瘢痕组织多为肉芽组织,粘连均较轻,故均未进行该项评价;第 4 周时,各组均有不同程度的粘连,A 组粘连较重,瘢痕很难与硬膜完整分离,B、C 两组虽都有粘连,但大多尚可完整分离,两组与 A 组比较均有显著性意义;第 8 周时,各组粘连程度都有加重,A 组几乎无法与硬膜完整分离,C 组粘连加重较轻,有一半左右样本仍可小心分离,其与 A 组相比差异显著,而此时 B 组粘连加重较为明显,大多难以分离。各组数据见表 1。

表 1 术后第 4、8 周时各组粘连分级比较(例)

Tab 1 Comparison of adhesion at 4 and 8 weeks after operation in each group(case)

等级	4周			8周		
	A组	B组*	C组**	A组	B组	C组
0级	0	0	0	0	0	0
1级	1	3	2	0	1	1
2级	2	5	6	1	4	5
3级	7	2	2	9	5	4

注:与同期 A 组比较,**P* = 0.038,***P* = 0.048,*P* = 0.021

Note: as compared with group A at same time,**P* = 0.038,***P* = 0.048,*P* = 0.021

2.2 硬膜外瘢痕组织中 Hyp 含量 各组 Hyp 含量均随着病程延长而增加,但 B 组和 C 组的增长明显较缓。在术后第 2 周和第 4 周时,B、C 两组 Hyp 含量没有显著性差异,但第 8 周时,C 组 Hyp 含量不仅明显低于 A 组,而且与 B 组亦有显著性差异(*P* = 0.049)(见表 2)。

表 2 不同时相各组 Hyp 含量($\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{mg}$)

Tab 2 Comparison of Hyp content at different time in each group($\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{mg}$)

组别	例数	第 2 周	第 4 周	第 8 周
A 组	30	1.16 ± 0.30	1.34 ± 0.25	1.50 ± 0.18
B 组	30	0.90 ± 0.25*	1.14 ± 0.24	1.38 ± 0.19
C 组	30	0.99 ± 0.20	1.07 ± 0.21	1.23 ± 0.23

注:与同期 A 组相比,**P* = 0.021,*P* = 0.046,*P* = 0.006,*P* = 0.001

Note: as compared with group A at same time,**P* = 0.021,*P* = 0.046,*P* = 0.006,*P* = 0.001

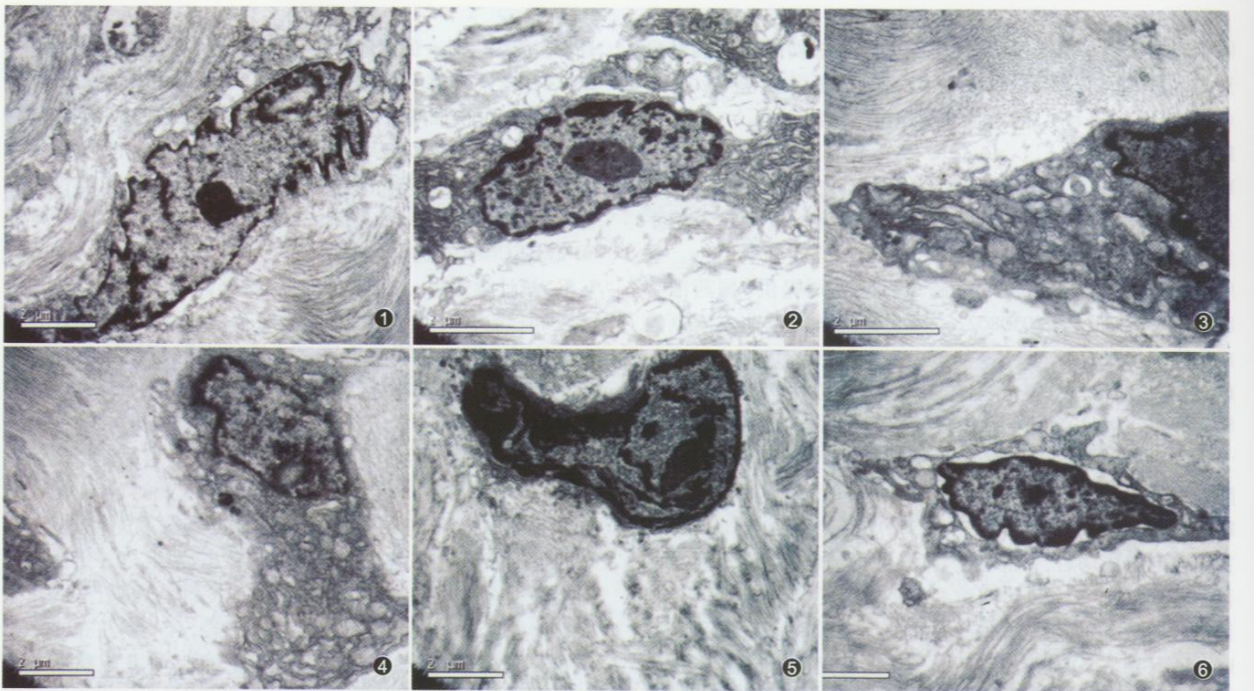


图 1 第 2 周 C 组成纤维细胞粗面内质网扩张,线粒体较多,细胞核大且染色较浅(透射电镜 ×15 000) 图 2 第 2 周 B 组细胞内粗面内质网扩张较轻,周围少量胶原排列稀疏(透射电镜 ×8 900) 图 3 第 4 周 A 组成纤维细胞内细胞器较前减少,核染色加深,胶原纤维较多,排列较乱(透射电镜 ×8 900) 图 4 第 4 周 C 组成纤维细胞核染色较 A 组浅,胶原纤维排列稀疏(透射电镜 ×6 200) 图 5 第 8 周 A 组可见成纤维细胞核染色很深,周围胶原纤维较多,排列致密、紊乱(透射电镜 ×8 900) 图 6 第 8 周 C 组细胞核染色亦加深,但胶原纤维相对稀疏、规则(透射电镜 ×6 200)

Fig 1 At 2 weeks in group C, fibroblast had rough endoplasmic reticulum expanding, more mitochondrion, the nucleus was big and stained light (TEM × 15 000) Fig 2 At 2 weeks in group B, rough endoplasmic reticulum expanded gently, collagen lined up loose (TEM ×8 900) Fig 3 At 4 weeks in group A, organelle of fibroblast decreased, nucleus stained deeply, collagen fiber was more and lined up disorderly (TEM ×8 900) Fig 4 At 4 weeks in group C, nucleus of fibroblast stained lighter than group A, collagen fiber lined up loose (TEM ×6 200) Fig 5 At 8 weeks in group A, nucleus of fibroblast stained deeply, collagen fiber was more and lined up closely and disorderly (TEM ×8 900) Fig 6 At 8 weeks in group C, nucleus stained deeply, but collagen fiber lined up raritans and ordinary (TEM ×6 200)

2.3 电镜观察 术后第 2 周, A、C 两组差异较小, 成纤维细胞较多, 呈椭圆形, 粗面内质网扩张, 线粒体较多, 高尔基体发达, 细胞核大染色浅 (见图 1); B 组成纤维细胞较小且数目较少, 呈梭形, 细胞内线粒体数目减少, 基质浅淡, 胶原较稀疏 (见图 2)。第 4 周 A 组细胞周围有较多的胶原纤维, 排列疏松紊乱, 细胞呈梭形, 核染色较 2 周时加深, 部分粗面内质网膨大呈泡状 (见图 3)。B 组和 C 组类似, 成纤维细胞减少, 细胞器较少, 胶原纤维形成不多 (见图 4)。第 8 周各组细胞均有浓缩, 核染色加深, 大部分成纤维细胞转变为纤维细胞, 以 A 组最为紊乱、密集 (见图 5)。各组可见到的少数成纤维细胞, 胞浆丰富, 线粒体多, 有大量粗面内质网和高尔基复合体。B、C 两组可见周期性横纹, C 组胶原纤维较 B 组排列疏松 (见图 6)。

3 讨论

下腰椎手术, 尤其是椎板切除手术损伤后纵韧带、骶棘肌以及纤维环, 引起局部血肿充填。成纤维细胞在炎症介质、生长因子等的趋化作用下与毛细血管一起长入血凝块。血小板、巨噬细胞释放转化生长因子 -、血小板衍生生长因子, 刺激成纤维细胞增殖、合成胶原, 产生胶原纤维。进而胶原沉积, 成纤维细胞转化为纤维细胞, 肉芽组织逐渐转化为瘢痕组

织。硬膜外瘢痕组织从前、后、侧方包绕神经根而导致病变, 这就是 Songer 等^[2]首先提出硬膜外瘢痕形成的三维立体学说。这是导致腰椎术后失败综合征^[3] (failed back surgery syndrome, FBSS) 的主要原因之一。该并发症手术和保守治疗效果均不佳, 二次手术治疗难度大、危险性高。

以往对于预防硬膜外瘢痕的研究, 大多在硬膜外放置自体脂肪、韧带、表皮、骨以及明胶海绵、硅胶膜、透明质酸钠、聚交酯、壳多糖、Polyactive、Adcon-L 等以减少或阻隔硬膜外瘢痕的粘连^[4-5], 其中透明质酸钠的效果是被大多数学者所公认的^[6]。但这些方法存在一些局限性: 自体组织如脂肪等因缺乏血供容易液化坏死, 引发感染; 这类组织后期抑制瘢痕形成粘连的效果有限。硬性材料和一些软性非生物材料虽可二维阻隔瘢痕的粘连, 但大多会带来异物存留、移位导致炎性刺激, 后期反而增加瘢痕的形成。液态或半液态材料如透明质酸钠、几丁糖等因有一定的流动性, 置入材料有时会随体位改变而流失、稀释; 这类材料一般能逐渐被机体吸收, 后期效果亦不理想。

通过药物的整体调节来预防硬膜外瘢痕粘连是一个新的方法。周辉等^[7]应用活血止痛汤预防免硬膜外瘢痕粘连的研究证实, 该药物通过活血化瘀, 减少局部血肿, 能下调 TGF-

的表达,从而减轻硬膜外瘢痕的增生、粘连。

胶原蛋白是瘢痕组织中胶原纤维的主要成分, Hyp是合成胶原的特有原料,约占胶原氨基酸总量的 13.4%。胶原以外的蛋白质几乎不含羟脯氨酸。因此,瘢痕组织中 Hyp含量可作为评价其胶原代谢的重要指标。我们的研究发现,术后第 2周时,活血止痛汤对硬膜外瘢痕中 Hyp的含量以及硬膜囊外的粘连情况影响较小;但第 4周和第 8周的检测都发现,活血止痛汤能显著降低硬膜外瘢痕中 Hyp含量,抑制胶原代谢和合成,其硬膜囊外的粘连程度也较轻。不仅如此,至第 8周时,活血止痛汤组比透明质酸钠组 Hyp含量更少。而此时透明质酸钠对减少硬膜外瘢痕组织中 Hyp含量以及减轻其粘连程度的作用已经不甚明显。由此可见,活血止痛汤虽然起效较慢,但其后期效果要优于透明质酸钠。电镜观察也证实,各时相活血止痛汤均可减少瘢痕中成纤维细胞以及细胞内细胞器的数量,降低细胞外胶原的沉积。

综上所述,活血止痛汤能降低硬膜外瘢痕中 Hyp的含量,抑制瘢痕组织中成纤维细胞和胶原的代谢,减少硬膜外瘢痕的形成和粘连。

参考文献

- Rydell N, Balazs EA. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of osteoarthritis and on granulation tissue formation. *Clin Orthop Relat Res*, 1971, 80: 25-32.
- Songer MN, Rauschnig W, Carson EW, et al. Analysis of peridural scar formation and its prevention after lumbar laminotomy and discectomy in dogs. *Spine*, 1995, 20(5): 571-580.
- Hazard RG. Failed back surgery syndrome: surgical and nonsurgical approaches. *Clin Orthop Relat Res*, 2006, 443: 228-232.
- Welch WC, Thomas KA, Cornwall GB, et al. Use of polylactide resorbable film as an adhesion barrier. *J Neurosurg*, 2002, 97(4 Suppl): 413-422.
- Fischgrund JS. Perspectives on modern orthopaedics: use of Adcon-L for epidural scar prevention. *J Am Acad Orthop Surg*, 2000, 8(6): 339-343.
- Kato T, Haro H, Komori H, et al. Evaluation of hyaluronic acid sheet for the prevention of postlaminectomy adhesions. *Spine*, 2005, 5(5): 479-488.
- 周辉, 郑悦亮, 赵万军, 等. 活血止痛汤对兔硬膜外瘢痕 TGF- β_1 表达的影响. *中国中医骨伤科杂志*, 2005, 13(2): 7-9.

(收稿日期: 2006-06-26 本文编辑: 李为农)

· 经验交流 ·

老年帕金森病合并股骨颈骨折治疗分析

于革会, 郭宇

(包头市第四医院骨科, 内蒙古 包头 014030)

关键词 帕金森病; 股骨颈骨折; 老年人

Therapeutic effect of Parkinson disease combined with femoral neck fracture in aged YU Ge-hui, GUO Yu Department of Orthopaedics, the Fourth Hospital of Baotou, Baotou 014030, Neimenggu, China

Key words Parkinson disease; Femoral neck fractures; Aged

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(8): 535-536 www.zggszz.com

随着社会的老齡化,骨质疏松症及由此而引发的股骨颈骨折的发生率逐渐升高^[1]。此类患者如不及时治疗,就不能迅速地、尽可能地恢复术前的活动状态,尤其是帕金森病患者由于长期卧床肌肉萎缩明显,使患者的一般健康状况迅速恶化,并发生坠积性肺炎、褥疮、深静脉炎、肺栓塞及泌尿系统感染等严重并发症乃至死亡。自 2001年 8月 - 2005年 2月对 12例 70岁以上老年帕金森病患者合并股骨颈骨折行股骨头置换术, 12例均获得随访,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组 12例,年龄为 70~85岁,平均(75.7 ± 4.5)岁。根据 Hoehn-Yahr分级方法^[2]: 期 3例(身体双侧或中线受影响,但没有平衡功能障碍); 期 6例(受损害的第一个症状是直立位反射,当转动身体时出现明显的站立不稳,或当患者两脚并立身体被推动时不能保持平衡); 期 3例(严重的无活动能力,但轻者仍可自己走路和站立)。

12例均采用双极人工股骨头置换术,其中新鲜骨折 10例,陈旧性骨折 2例。合并高血压病 5例,脑梗死 2例,肺气肿 1例(见表 1)。

1.2 治疗方法

1.2.1 术前处理 入院后常规检查心、肺、肝、肾功能以及电解质、血糖和凝血功能。对新鲜骨折患肢股骨髁上骨牵引 5~8 d,陈旧性骨折患肢股骨髁上骨牵引 7~10 d。高血压病患者用降压药治疗,使收缩压 < 150 mmHg,舒张压 < 90 mmHg;脑血管病患者经活血治疗病情平稳后再手术,肺感染者使用抗生素控制感染。

1.2.2 手术方式 本组病例均采用髋后外侧切口,至大粗隆后沿大粗隆后缘向股纵轴切开,呈“ \cap ”形切口,劈开臀大肌,切断外旋肌群,暴露关节囊,切除股骨头,术后修复外旋肌群。12例均采用人工股骨头置换术、骨水泥固定。术中出血 150~250 ml,手术时间 45~60 min。

1.2.3 术后处理 术后常规每天应用 2个剂量抗生素及活血药物,共 5 d。封闭包扎伤口,负压引流 24 h,待引流量