

· 基础研究 ·

三七透明质酸钠凝胶对家兔椎板切除术后硬膜外
瘢痕中胶原成分的影响

徐泉,周卫,孔焕宇,李莉,章永东,张兆杰,刘灿,王荣国
(中国中医科学院望京医院,北京 100102)

【摘要】目的:探讨三七透明质酸钠凝胶在家兔术后硬膜外瘢痕组织形成过程中对 I、III 型胶原表达的影响。方法:大耳白品系家兔 96 只,体重 2.0~2.5 kg,6 月龄,雌雄各半,按照完全随机方法分为生理盐水组(A)、三七组(B)、透明质酸钠组(C)、三七透明质酸钠凝胶组(D),制作家兔椎板切除模型,分别在硬膜囊周围涂抹生理盐水、三七浓缩液、透明质酸钠、三七透明质酸钠凝胶各 0.5 ml,各组术后 1、2、4、8 周取材,Masson 染色进行胶原生长情况的形态学观察,原位杂交方法分析 I、III 型胶原 mRNA 的表达。结果:Masson 染色中胶原纤维的排列,生理盐水组三七透明质酸钠凝胶组比对照组更加规整。I 型胶原 mRNA 表达三七透明质酸钠凝胶组在用药 4 周时明显低于生理盐水组、透明质酸钠组、三七组($P<0.01$);III 型胶原 mRNA 表达三七透明质酸钠凝胶组在用药 4 周时明显高于生理盐水组、透明质酸钠组、三七组($P<0.01$)。结论:三七透明质酸钠凝胶对家兔术后硬膜外瘢痕具有改善胶原纤维的排列,降低瘢痕硬度,增加瘢痕弹性的作用。

【关键词】 透明质酸; 凝胶类; 三七; 胶原 I 型; 胶原 III 型

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2010.04.013

The effect of the Sanqi (三七) qisodium hyaluronate gel on the collagen of epidural scar after rabbits laminectomy
XU Quan, ZHOU Wei, KONG Huan-yu, LI Li, ZHANG Yong-dong, ZHANG Zhao-jie, LIU Can, WANG Rong-guo. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

ABSTRACT Objectives: To study the effects of Sanqi (三七) qisodium hyaluronate gel on collagen- I and collagen-III expression in the process of rabbits' epidural scar formation after operation. **Methods:** Ninety-six white rabbits with 6-month-old, half males and half females, weighted from 2 to 2.5 kg, which were randomly divided into normal saline group (A), Sanqi (三七) group (B), qisodium hyaluronate group (C) and Sanqi (三七) qisodium hyaluronate gel group (D). The laminectomy of rabbits were performed in group A, B, C, D, the duras were surrounded with normal saline, Sanqi (三七) liquid, qisodium hyaluronate and Sanqi (三七) qisodium hyaluronate gel respectively. Animals of each group were killed at 1, 2, 4, 8 weeks after operation. Use Masson staining for histological observation of collagen, and in situ hybridization staining for the analysis of collagen- I and collagen-III expression. **Results:** In the Masson staining, Sanqi (三七) qisodium hyaluronate gel group was more regular than the control group in the shape of collagen texture. As to the expression of collagen- I, and Sanqi (三七) qisodium hyaluronate gel group was lower than normal saline group, the Sanqi (三七) group and qisodium hyaluronate group at 4 weeks after using medicine ($P<0.01$); while the Sanqi (三七) qisodium hyaluronate gel group was higher than normal saline group, Sanqi (三七) group and qisodium hyaluronate group in the collagen-III expression ($P<0.01$). **Conclusions:** Sanqi (三七) qisodium hyaluronate gel could improve collagen's arrangement of the rabbit's epidural scar after operation, reduce its rigidity and increase flexibility.

Key words Hyaluronic acid; Gels; Sanqi; Collagen type I; Collagen type III

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(4):278-281 www.zggszz.com

脊柱椎板减压术后硬膜外瘢痕是导致继发性椎管狭窄的重要原因之一^[1],因此,预防硬膜外瘢痕粘连,防止继发性椎管狭窄,对手术预后症状的改善具有重要意义。三七具有止血活血及抗纤维化作用^[2],本研究采用中药三七配合载体透明质酸钠作为新的

手术中植入材料,在胶原表型方面进行预防瘢痕粘连的机制探索。寻找一个中药或者中西药并用预防和治疗腰椎术后瘢痕粘连的有效方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 大耳白品系家兔 96 只,一级,体重

2.0~2.5 kg, 6 月龄, 雌雄各半, 北京市海淀兴旺动物养殖厂提供, 生产批号: Sxk(京)2006-0006。

1.2 实验药物 ①三七浓缩液: 由中国中医科学院中药研究所实验室自制。其中三七饮片来源北京市任草中药饮片公司, 批号: 001002002。②透明质酸钠: 注射级, 曲阜市广龙生物制品厂, 批号: 20051025。

③三七透明质酸钠凝胶: 中国中医科学院中药研究所实验室自制。三七浓缩液浓度 0.5 g/ml, 透明质酸钠浓度为 1.5%, 三七透明质酸钠凝胶是在 0.5 g/ml 三七浓缩液中加入适量透明质酸钠, 使透明质酸钠的浓度为 0.015 g/ml。

1.3 主要试剂及仪器 I 型胶原 (collagen-I)、III 型胶原 (collagen-III) 原位杂交试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), DAB 显色剂 (武汉博士德生物工程有限公司), Olympus Bx51 图像采集显微镜 (JAPAN), Evolution QE 图像采集软件 (JAPAN), IPP5.0 Media Cybernetics, Inc 图像分析系统。

1.4 实验方法

1.4.1 分组 按完全随机法将 96 只动物分为生理盐水组 (A)、三七组 (B)、透明质酸钠组 (C)、三七透明质酸钠凝胶组 (D), 每组 24 只。

1.4.2 造模方法 按 1 ml/kg 体重家兔耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠麻醉, 俯卧位固定, 背部术区剃毛, 无菌消毒后取背部正中切口, 分离软组织, 切除 L₆ 左侧椎板及棘突, 减压范围为 5.0 mm×1.2 mm, 剔除硬膜外脂肪暴露硬膜囊。清除切口内所有可见的碎骨片和失活组织, 彻底止血并在硬膜囊周围涂抹生理盐水、三七浓缩液、透明质酸钠、三七透明质酸钠各 0.5 ml, 逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤, 缝合皮肤前伤口表面点滴青霉素 1 ml (16 万 U/ml)。所有动物在术前、麻醉、术后的喂养、室温及其他管理条件均一致。

1.4.3 取材及样本处理方法 造模后分别于术后 1、2、4、8 周耳缘静脉空气栓塞处死家兔, 取 L₅、L₆、L₇ 椎体, 去除周围软组织后用生理盐水冲洗, 4% 多聚甲醛液中固定, 石蜡包埋, 蜡块制成 5 μm 层厚切片, 进行 Masson 染色, 对 1、2、4 周的组织切片进行原位杂交染色 (按照原杂试剂盒说明书步骤进行)。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 形态学观察 显微镜下观察不同时间点 Masson 染色组织的胶原生长情况。

1.5.2 I、III 型胶原 mRNA 的原位杂交阳性表达

I、III 型胶原 mRNA 的细胞胞浆呈棕黄色为阳性细胞。在每个组织切片的椎板缺损区依次选取 3 个相邻的视野, 应用图像采集软件摄片取图, IPP 5.0 图像分析系统进行阳性细胞累计光密度 (IOD 值) 测

定。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件, 对各组相同时间段 I、III 型胶原 mRNA 的原位杂交阳性细胞累计光密度 (IOD 值) 定量资料进行比较, 采用 One-Way ANOVY 单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察结果 Masson 染色后胶原纤维呈蓝色, 细胞核呈灰黑色, 肌纤维呈红色, 红细胞呈橘红色。

1 周: 各组胶原纤维尚未形成, 造模区的胶原纤维较少, 散布于细胞间隙, 在毛细血管中可见大量橘红色的红细胞, 在硬膜外可见大量未被吸收的血肿, 三七透明质酸钠凝胶组血肿较其他 3 组明显减少。

2 周: 各组胶原纤维开始形成, 但尚未完全成熟, 造模区胶原纤维较 1 周时明显增多, 较密集分布于细胞周围, 生理盐水组、三七组、透明质酸钠组中胶原纤维排列较紧密, 顺序性较差, 三七透明质酸钠凝胶组中胶原纤维比较疏松, 排列趋于规则。

4 周: 各组胶原纤维趋于成熟, 造模区胶原纤维较 2 周时明显增多增粗, 分布更加密集, 生理盐水组、三七组、透明质酸钠组中胶原纤维较紧密, 排列缺乏规律性, 三七透明质酸钠凝胶组胶原纤维较疏松, 排列相对规则。

8 周: 各组胶原纤维挛缩较明显, 造模区胶原纤维排列紧凑, 呈束带状分布, 生理盐水组、三七组、透明质酸钠组中胶原纤维紧密排列, 纵横交错, 排列紊乱, 三七透明质酸钠凝胶组相对疏松, 规则性束状排列。

2.2 I、III 型胶原 mRNA 的原位杂交阳性表达结果 I、III 型胶原 mRNA 的细胞胞浆呈棕黄色为阳性细胞; I、III 型胶原 mRNA 的原位杂交阳性细胞累计光密度 (IOD 值) 见表 1。

1 周: I 型胶原染色 IOD 值, 三七透明质酸钠凝胶组 (D) 明显低于生理盐水组 (A) ($P < 0.01$); III 型胶原染色 IOD 值, 三七透明质酸钠凝胶组 (D) 与生理盐水组 (A)、三七组 (B)、透明质酸钠组 (C) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 周: I 型胶原染色 IOD 值, 三七透明质酸钠凝胶组 (D) 明显低于生理盐水组 (A) ($P < 0.01$)、透明质酸钠组 (C) ($P < 0.05$); III 型胶原染色 IOD 值, 三七透明质酸钠凝胶组 (D) 明显高于生理盐水组 (A) ($P < 0.01$)、透明质酸钠组 (C) ($P < 0.05$)。

4 周: I 型胶原染色 IOD 值, 三七透明质酸钠凝胶组 (D) 明显低于生理盐水组 (A)、三七组 (B)、透明

表 1 各组术后不同时间硬膜外 I 型胶原 mRNA 与 III 型胶原 mRNA 阳性表达的 IOD 值($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab.1 The IOD of the postive expression of epidural scar collagen-I mRNA and collagen-III mRNA of each group in different time($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	I 型胶原 mRNA			III 型胶原 mRNA		
	1 周	2 周	4 周	1 周	2 周	4 周
A 组	29.687±4.310 ^{▲▲}	30.090±3.380 ^{▲▲}	31.230±4.721 ^{▲▲}	22.452±4.493	24.739±3.871 ^{▲▲}	25.895±4.076 ^{▲▲}
B 组	25.544±5.480	26.724±4.961	29.257±1.465 ^{▲▲}	24.445±2.269	26.371±2.244	28.904±7.698 ^{▲▲}
C 组	24.225±4.334	27.268±2.173 [▲]	29.878±3.645 ^{▲▲}	24.443±3.882	25.389±2.446 [▲]	27.051±4.511 ^{▲▲}
D 组	23.236±3.420	24.086±3.593	25.044±2.887	25.787±3.622	27.477±2.065	32.567±5.859
F 值	7.334	8.129	11.133	2.524	3.417	7.620
P 值	0.000	0.000	0.000	0.065	0.022	0.000

注: A、B、C 组与 D 组比较, [▲] $P<0.05$, ^{▲▲} $P<0.01$

Note: Group A, B, C vs group D, [▲] $P<0.05$, ^{▲▲} $P<0.01$

质酸钠组(C) ($P<0.01$); III 型胶原染色 IOD 值, 三七透明质酸钠凝胶组(D)明显高于生理盐水组(A)、三七组(B)、透明质酸钠组(C) ($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 瘢痕组织的形成 瘢痕组织形成是椎板切除术后组织缺损区修复的必然产物。成纤维细胞在组织损伤后第 3 天出现, 伤后 5~6 d 开始产生胶原, 其后 1 周胶原纤维形成甚为活跃, 以后逐渐缓慢下来^[3]。随着胶原纤维的增多, 肉芽组织逐渐转化为瘢痕组织。伤后 4 周瘢痕完全形成, 在 8~9 周基本成熟。

3.2 I、III 型胶原与瘢痕的关系 胶原是瘢痕组织细胞外基质的主要成分, 其主要功能是提供伤口的强度和完整性。瘢痕的形成与胶原的关系密切, 尤其是与 I、III 型胶原之间, 其含量以及相互的比例对于创面愈合的速度及质量有着密切的关系^[4]。有关研究表明^[5], 不同的胶原分子类型及比例组成的胶原纤维具有不同的物理性质。III 型胶原纤维表达主要在伤口愈合的早期, 是具有可曲性与柔韧性的一类胶原。III 型胶原形成一种支架, 随后聚集的 III 型胶原被快速聚集的 I 型胶原所覆盖, 后者能提供机械强度。III 型胶原含量越高, 胶原纤维越细, 弹性越好, 说明瘢痕的纤维化程度越低, 形成的瘢痕就越轻, 故提高 III 型胶原比例是减少瘢痕的重要手段^[6-7]。I 型胶原纤维主要表达在伤口愈合的晚期, 对伤口的抗张力以及收缩有重要的作用。I 型胶原纤维有很强的张力, 它的含量决定组织的僵硬程度, 而 III 型胶原纤维比 I 型胶原纤维更富有伸展性^[8]。因此, I、III 型胶原之间保持适当数量和比例对维持瘢痕组织的结构和功能具有重要意义。

3.3 三七透明质酸钠凝胶对 I、III 型胶原的作用 Masson 染色结果可见, 胶原纤维在造模后 1 周时形成较少, 2 周时开始大量形成, 4 周时趋向成熟, 8 周时出现挛缩, 在造模后各个时点, 三七透明质酸钠凝

胶组中胶原纤维的排列比对照组更加规整, 表明三七透明质酸钠凝胶对家兔术后硬膜外瘢痕具有改善胶原纤维排列的作用, 使胶原纤维的排列规整有序。

原为杂交染色结果可知, I 型胶原染色 IOD 值在各个时点三七透明质酸钠凝胶组明显低于生理盐水组, III 型胶原染色 IOD 值在各个时间点三七透明质酸钠凝胶组明显高于生理盐水组, 我们推论三七透明质酸钠凝胶可以抑制 I 型胶原的合成, 促进 III 型胶原的合成。本研究中三七组作为中药组, I、III 型胶原染色 IOD 值在 1、2 周时与三七透明质酸钠凝胶组比较无统计学差异 ($P>0.05$), 4 周时有统计学差异 ($P<0.01$)。这说明在 1、2 周三七组与三七透明质酸钠凝胶组对 I、III 型胶原的作用差异不大, 但在 4 周三七透明质酸钠凝胶组对 I、III 型胶原的作用要优于三七组。三七组在椎板缺损区局部应用三七浓缩液, 能够起止血活血的作用, 但三七浓缩液在局部不能长时间保留而容易被较快的吸收, 其效果不如三七透明质酸钠凝胶。透明质酸钠组作为西药组, I、III 型胶原染色 IOD 值在 1 周与三七透明质酸钠凝胶组比较无统计学差异 ($P>0.05$), 2、4 周时有统计学差异 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。这说明在 1 周透明质酸钠组与三七透明质酸钠凝胶组对 I、III 型胶原的作用差异不大, 但在 2、4 周三七透明质酸钠凝胶组对 I、III 型胶原的作用要优于透明质酸钠组。透明质酸钠组在椎板缺损区局部应用透明质酸钠凝胶, 仅在早期对局部瘢痕的抑制作用较明显, 其中晚期的效果不如三七透明质酸钠凝胶。

前期研究表明^[2], 中药三七具有止血活血的作用, 对肉芽组织增生有显著的抑制作用。透明质酸钠凝胶为生物体内普遍存在的酸性粘多糖, 具有良好的生物相容性^[9], 有一定的抑制局部瘢痕形成的作用^[10]。但三七浓缩液为稀薄的流体材料, 在局部存留时间短, 透明质酸钠凝胶对局部瘢痕的作用仅在早

期较明显,两者的作用均有局限性。三七透明质酸钠凝胶以透明质酸钠凝胶为介质,起到三维立体的物理阻挡作用^[11],三七提取物在局部存留更长时间,以达到三七提取物缓慢吸收,持续发挥药效,使三七提取物在瘢痕修复的不同时期发挥作用。三七透明质酸钠凝胶通过结合三七与透明质酸钠的作用,促进Ⅲ型胶原的合成,抑制Ⅰ型胶原的合成,新生的胶原纤维以网状排列方式沉积,排列趋于疏松,使瘢痕组织构成中硬度降低,而弹性有所提高,Ⅰ、Ⅲ型胶原之间相对数量和比例更加趋于合理,促进瘢痕软化。

参考文献

[1] Gasinski P,Radek M,Józwiaik J, et al. Peridural fibrosis in lumbar disc surgery—pathogenesis, clinical problems and prophylactic attempts. *Neurol Neurochir Pol*, 2000, 34(5):983-993.

[2] 张兆杰,周卫.三七透明质酸钠凝胶预防椎板切除术后粘连的实验研究. *中国骨伤*, 2007, 20(1):37-40.

[3] 王正国.创伤愈合与组织修复. 济南:山东科学技术出版社,

1998. 12.

[4] 沈权,侯筱魁.透明质酸钠对硬膜外疤痕中胶原代谢影响的实验研究. *中国矫形外科杂志*, 2000, 7(6):569-571.

[5] Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Mol Cell Biochem*, 1998, 181(1-2):71-76.

[6] 王荣国,周卫,章永东. TGF-β 促纤维化机制及中药干预的研究进展. *中国骨伤*, 2008, 21(2):161-163.

[7] 张剑,向军,王志勇,等.真皮“生物模板”对创面愈合中胶原影响的研究. *上海第二医科大学学报*, 2003, 23(5):393-395.

[8] 吴旋,苏振忠,蒋爱云,等.瘢痕性喉狭窄瘢痕组织中弹性纤维和胶原纤维分析. *中山大学学报*, 2005, 26(3):313-315.

[9] 周斌,王荣茂.活血消瘀冲剂预防腰椎间盘突出术后硬膜外瘢痕的临床研究. *中国骨伤*, 2004, 17(9):513-516.

[10] 吴斗,刘强,龚强,等.透明质酸抑制周围神经局部瘢痕形成的作用. *中国临床康复*, 2006, 10(9):77-80.

[11] 施洪臣,周强.预防椎板切除术后硬脊膜周围粘连的研究进展. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14(6):452-456.

(收稿日期:2010-01-14 本文编辑:王宏)

《中国骨伤》编辑委员会名单

名誉主编:(按首字汉语拼音字母顺序为序)

陈可冀(中国科学院院士) 葛宝丰(中国工程院院士) 沈自尹(中国科学院院士)
王澍寰(中国工程院院士) 吴咸中(中国工程院院士) 钟世镇(中国工程院院士)

顾问:(按首字汉语拼音字母顺序为序)

陈渭良 丁继华 冯天有 顾云伍 胡兴山 蒋位庄 孔繁锦 黎君若 李同生 梁克玉
刘柏龄 孟和 沈冯君 施杞 时光达 石印玉 孙材江 袁浩 赵易 朱惠芳
朱云龙 诸方受

主编:董福慧

副主编:(按首字汉语拼音字母顺序为序)

敖英芳 白人骁 杜宁 金鸿宾 李为农(常务) 吕厚山 邱勇 孙树椿 王岩
王满宜 卫小春

编委委员:(按首字汉语拼音字母顺序为序)

敖英芳 白人骁 毕大卫 陈仲强 董健 董福慧 董清平 杜宁 樊粤光 范顺武
郭万首 郭卫 何伟 胡良平 金鸿宾 雷仲民 蒋青 蒋协远 李盛华 李为农
李无阴 刘金文 刘兴炎 刘亚波 刘智 刘忠军 刘仲前 罗从风 吕厚山 吕智
马真胜 邱勇 阮狄克 沈霖 孙常太 孙树椿 孙天胜 谭明生 谭远超 童培建
王岩 王爱民 王和鸣 王坤正 王满宜 王序全 王拥军 韦贵康 卫小春 肖鲁伟
徐荣明 徐向阳 杨小平 姚共和 姚树源 余庆阳 袁文 詹红生 张俐 张保中
张春才 张功林 张连仁 张英泽 赵平 赵建宁 赵文海 郑忠东 周卫 朱立国
朱振安 邹季 顾华(美国) John W. McDonald(美国)

特约审稿人:(按首字汉语拼音字母顺序为序)

孙铁铮 王军强 许硕贵 杨自权 张建政 张民