

文章编号:1004-7220(2016)05-0396-05

各种防粘连产品对腹壁肌肉愈合的影响

原芳¹, 林龙翔¹, 高权荣², 张会会¹, 秦岭^{1,3}, 孙雨龙¹

(1. 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055; 2. 内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010059;

3. 香港中文大学医学院骨科实验室, 香港 999077)

摘要: **目的** 评价目前主要防粘连产品对腹壁肌肉愈合的影响,为临床使用防粘连产品提供指导。**方法** 实验使用成年SD大鼠,除假手术组外,对大鼠盲肠及相对腹壁肌肉制造损伤,然后不使用(粘连组)或使用不同防粘连产品覆盖损伤处,手术14d后,检测大鼠腹壁肌肉力学性质和组织学特征,评价损伤肌肉愈合程度。**结果** 聚乳酸医用膜组和医用聚乙二醇小檗碱液组腹壁肌肉愈合侧的最大抗张力和刚度均与正常侧相近($P>0.05$);医用几丁糖组和Sepafilum组愈合侧的最大抗张力明显低于正常侧($P<0.05$),刚度则不存在显著差异($P>0.05$);粘连组和医用透明质酸钠凝胶组腹壁肌肉愈合侧的力学性质明显小于正常侧($P<0.05$)。HE染色显示,医用透明质酸钠凝胶、聚乳酸医用膜和医用聚乙二醇小檗碱液组血管增生较多;透明质酸钠凝胶组的纤维结构松散,炎性细胞浸润不均匀,其他产品组炎性细胞浸润充分,且纤维形成致密。**结论** 聚乳酸医用膜和医用聚乙二醇小檗碱液促进腹壁肌肉愈合的能力优于医用透明质酸钠凝胶、医用几丁糖和Sepafilum。

关键词: 防粘连产品;肌肉愈合;生物力学;组织学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.05.396

Effect of anti-adhesion products on the healing of abdominal muscles

YUAN Fang¹, LIN Long-xiang¹, GAO Quan-rong², ZHANG Hui-hui¹, QIN Ling^{1,3}, SUN Yu-long¹ (1. *Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China*; 2. *Basic Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China*; 3. *Orthopedic Laboratory, School of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China*)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of commonly used anti-adhesion products on the healing of abdominal muscles, and to provide guidance for surgeons to use anti-adhesion products in their clinical practice. **Methods** Adult SD rats were used. Except the sham group, surgical traumas were created on the serosal layer of the cecum and the underlying muscles of the abdominal wall. The wounds were covered without (Adhesion group) or with anti-adhesion products. Fourteen days after the surgery, the mechanical properties and histology of abdominal muscles were investigated to evaluate the healing of injured muscles. **Results** The ultimate tensile force and stiffness of the healing abdominal muscles in the groups of Poly(lactic acid) membrane and Medical poly(ethylene glycol) berberis lye were the same as those of normal muscles ($P>0.05$). The ultimate tensile force of the healing muscle in the groups of Chitosan gel and Sepafilum was significantly smaller than that of normal muscles ($P<0.05$). But their stiffness did not show any significant differences ($P>0.05$). The significant losses of mechanical properties of the healing muscles occurred in the Adhesion and Medical sodium hyaluronate gel group ($P<0.05$). HE staining indicated that more capillaries were found in Medical sodium hyaluronate gel, Poly(lactic acid) membrane and Medical poly(ethylene glycol) berberis lye group. The wound in Medical sodium hyaluronate gel group had less fibroblasts and fewer inflammatory cells, while the inflammatory cells were fully infiltrated with dense fibers in the other product groups. **Conclusions** Poly(lactic acid) membrane and Medical poly(ethylene glycol) berberis lye can promote abdominal muscle healing and are superior to Medical sodium hyaluronate gel, Chitosan gel and Sepafilum.

Key words: Anti-adhesion products; Muscle healing; Biomechanics; Histology

收稿日期:2016-04-01; 修回日期:2016-06-02

基金项目:中国科学院“百人计划”和深圳市研究项目(JCYJ20140417113430613,KQCX2015033117354153)。

通信作者:孙雨龙,研究员,E-mail: yl.sun@siat.ac.cn。

腹部手术后有 67% ~ 93% 的病人发生粘连^[1-2],腹部粘连可能会导致严重的临床并发症,如慢性盆腔疼痛、不孕症以及肠梗阻等^[3],严重影响手术效果及患者生活质量。许多产品用于临床防治各类手术后可能的粘连^[4],优秀的防治组织粘连产品不仅要能有效地防治组织粘连,同时也要不影响甚至促进组织修复。在研发和推广这类产品时,通常会关注产品防治组织粘连的效果,而忽略产品对组织修复的影响,临床医生缺乏全面的信息来选择最优的防粘连产品。本研究利用动物模型,采用生物力学和组织学方法评价目前国内常用防粘连产品对腹壁肌肉修复的影响,为临床选择使用防粘连产品提供指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 SD 大鼠 68 只,SPF 级,年龄 6 ~ 8 周,体重 230 ~ 280 g,由广东省松山湖明珠动物实验中心提供。动物恒温饲养,每天明/暗交替各 12 h,食物和饮水充足。动物在实验前一周进行检疫,待适应环境后进行实验。

1.2 主要材料和仪器

1.2.1 防粘连产品 医用透明质酸钠凝胶(上海建华精细生物制品有限公司);聚乳酸可吸收医用膜(上海典范医疗科技有限公司);医用聚乙二醇小檗碱液(黑龙江燎原科技有限公司);医用几丁糖(上海其胜生物制剂有限公司);Seprafilm[赛诺菲(中国)投资有限公司]。

1.2.2 主要试剂 戊巴比妥钠(默克公司);生理盐水(四川科伦药业);75% 医用酒精(广东宝锭山药业有限公司);碘伏消毒液(江西草珊瑚消毒用品有限公司);红霉素软膏(吉林市吴太感康药业有限公司)。

1.2.3 主要仪器 医用真丝缝合线(上海浦东金环医疗用品股份有限公司);可吸收缝合线(上海浦东金环医疗用品股份有限公司);可调式软组织切割器(自行设计);多角度力学测试仪(Mayo Clinic, 美国)。

1.3 手术方法

按照文献报道^[5],构建动物腹部粘连模型。在无菌环境中,大鼠行腹腔麻醉(戊巴比妥钠 40 mg/kg),

沿腹中线皮肤开口 6 cm,再沿腹白线肌肉切口 5 cm,拉出盲肠,按照不同处理分组。假手术组($n=8$)直接将盲肠放回腹腔,依次缝合腹部肌层及皮肤;其余组均用牙刷刷盲肠 100 次,造成约 1 cm × 2 cm 的点状出血损伤,在盲肠所在侧腹壁距离腹中线 1 cm 处钝性剥离同样大小的浅层肌肉。粘连组直接将盲肠放回腹腔,依次缝合关腹。产品实验组用纱布止血,将 0.6 mL 液体产品医用透明质酸钠凝胶(HA)、医用聚乙二醇小檗碱液(PLA)或医用几丁糖(Chitosan)均匀涂抹于腹壁和盲肠损伤处,或将聚乳酸可吸收医用膜(PEG)或 Seprafilm(2 cm × 3 cm)覆盖在腹壁和盲肠损伤处,聚乳酸可吸收医用膜用缝线固定四角,然后将盲肠放回腹腔,损伤处对应贴近,逐层关腹。最后用红霉素软膏涂抹皮肤缝合处,标记后放回笼内。所有的关键手术操作(开关腹、制造创伤、涂覆和固定材料等),均由同一名实验者完成,以消除不同实验者操作引入的误差。

1.4 组织愈合的力学测量

术后 14 d 腹腔注射过量戊巴比妥钠(120 mg/kg)处死大鼠,U 型切口打开腹腔,并充分暴露内脏组织。如大鼠腹壁肌肉有粘连,先行钝性分离,铺展开,利用自行设计的可调节式软组织切割器,垂直于腹中线切取宽度为 1 cm 的腹壁肌肉条带。为保证断裂点位于愈合处,则在愈合处及对侧正常肌肉条带人为造成垂直于肌肉条带长轴的 5 mm 切口[见图 1(a)中箭头所示],用夹持器夹持肌肉条带两端[见图 1(b)],在力学测试仪上以 1.9 mm/s 速度拉伸至断裂,记录整个过程的拉力及拉伸位移,计算拉伸腹壁肌肉的刚度。

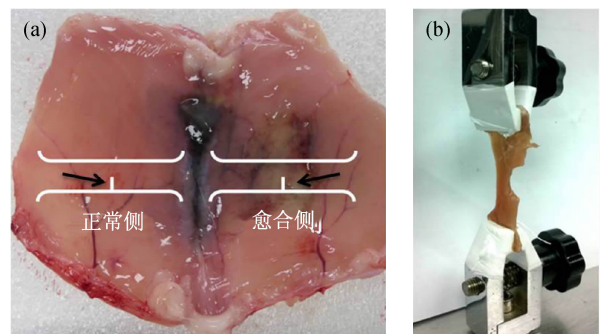


图1 腹壁肌肉取样(a)和力学测试(b)示意图

Fig. 1 Photographic illustrations of dissecting abdominal muscle bands (a) and failure test of parietal peritoneum (b)

1.5 组织愈合的组织学评价

取愈合侧腹壁肌肉及对侧正常肌肉,石蜡包埋切片后,进行 HE 染色,观察组织再生的纤维化、炎性浸润及血管增生情况。

1.6 统计学分析

实验中数据均以均值 \pm 标准差表示,使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,相同实验组的正常侧和愈合侧采用配对 t 检验,不同实验组的正常侧采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示两组数据间差异存在统计学意义。

2 实验结果

2.1 力学测试结果

图2所示为典型的正常和愈合腹壁肌肉拉伸曲线。曲线前半阶段,随着施加在肌肉的作用力增加,肌肉被拉长,到达极限载荷后,肌肉抗张力迅速减小,最后趋于零,肌肉完全断裂。曲线前半段线性区的斜率即为肌肉的刚度。

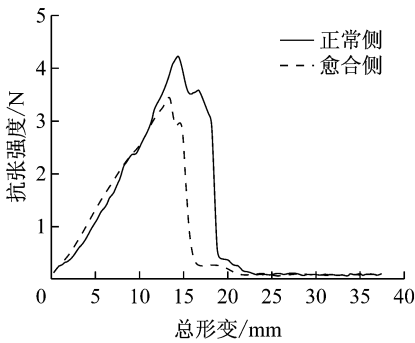


图2 正常和愈合腹壁肌肉拉伸曲线

Fig.2 Force-deformation curve of normal and healing abdominal muscles

结果表明,不同实验组间正常侧未受损腹壁肌肉的极限载荷相近($P > 0.05$),均在 4.9 N 左右。对比愈合肌肉和对侧未损伤肌肉的极限载荷,聚乳酸可吸收医用膜组最为相近,两者几乎相同;医用聚乙二醇小檗碱液组愈合肌肉极限载荷为正常侧的 87%,但两者不存在统计学差异($P > 0.05$);其余 4 组愈合肌肉极限载荷显著小于正常侧肌肉的极限载荷。其中,粘连组、医用透明质酸钠凝胶组、医用几丁糖组、Seprafilm 组腹壁愈合肌肉极限载荷分别是正常肌肉的 61% ($P = 0.034$)、71% ($P = 0.007$)、64% ($P = 0.004$)、60% ($P < 0.001$,见图 3)。

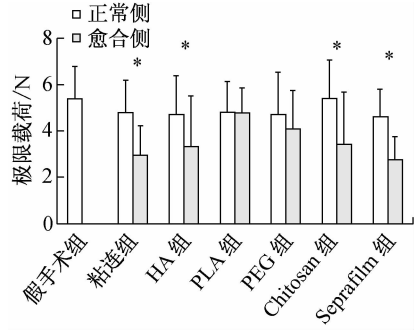


图3 各组正常和愈合腹壁肌肉的极限载荷 (* $P < 0.05$)

Fig.3 Ultimate tensile force load of normal and healing abdominal muscles in different groups

各实验组间正常侧未受损腹壁肌肉的刚度相近($P > 0.05$),约为 283 N/m。对比愈合肌肉和对侧未损伤肌肉的刚度,聚乳酸可吸收医用膜组也最为相近,数值上愈合肌肉的刚度甚至超过正常肌肉的刚度。与聚乳酸可吸收医用膜组相同,医用聚乙二醇小檗碱液组、医用几丁糖组和 Seprafilm 组愈合肌肉和对侧未损伤肌肉的刚度没有统计差异($P > 0.05$),愈合肌肉的刚度分别是对侧未损伤肌肉刚度的 89%、89% 和 63%。医用透明质酸钠凝胶组和粘连组愈合肌肉刚度显著低于对侧未损伤肌肉刚度($P < 0.05$),愈合肌肉的刚度分别是对侧未损伤肌肉刚度的 76% 和 58% (见图 4)。

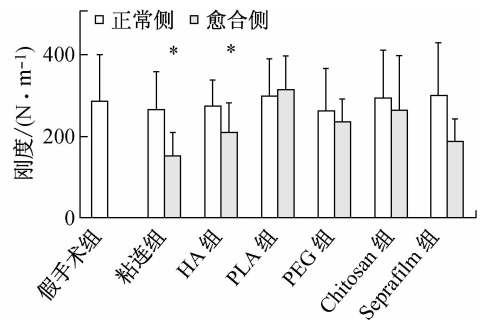


图4 各组正常和愈合腹壁肌肉的刚度 (* $P < 0.05$)

Fig.4 Stiffness of normal and healing abdominal muscles in the different groups

2.2 组织学评价结果

由 HE 染色结果可见,假手术组腹壁肌肉均质红染,细胞浸润正常。粘连组和实验组具有不同程度的纤维化、炎性浸润及血管增生。与粘连组相比,医用透明质酸钠凝胶组、聚乳酸可吸收医用膜组和

医用聚乙二醇小檗碱液组提示较多的血管增生,而医用几丁糖组和 Seprafilm 组则无明显区别。医用透明质酸钠凝胶组的纤维结构松散,炎性细胞浸润

不均匀,其他产品组炎性细胞浸润充分,且纤维形成致密(见图5)。

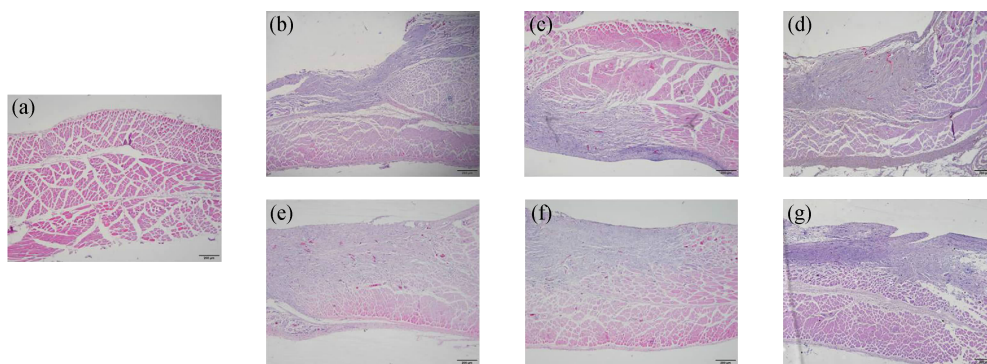


图5 正常腹壁肌肉和各实验组腹壁肌肉愈合处的 HE 染色(40×) (a)假手术组,(b)粘连组,(c)医用透明质酸钠凝胶组,(d)聚乳酸可吸收医用膜组,(e)医用聚乙二醇小檗碱组,(f)医用几丁糖组,(g)Seprafilm 组

Fig.5 HE staining of normal and healing abdominal muscle in different groups (a) Sham group, (b) Adhesion group, (c) HA group, (d) PLA group, (e) PEG group, (f) Chitosan group, (g) Seprafilm group

3 讨论

组织愈合包括组织形态的重建以及组织功能的恢复,组织的力学性质是组织功能的一个重要指标,本研究主要采用生物力学方法研究组织的力学性质,进一步用组织学方法观察组织重建的情况,综合评价目前常用防粘连产品对腹壁肌肉修复的影响。

组织包括多种细胞以及其与细胞外基质构成的多种组织亚结构。理想的组织修复是缺损的组织由新生的原组织细胞修复,恢复原有的结构和功能,如加速腹壁肌肉腹膜的再生,可有效防止其与相邻组织发生粘连,促进肌肉层的重建,加快创伤处力学性质的恢复,有助于患者尽早开展康复训练。然而组织中各种细胞固有的增生能力不同,创伤后如果某些组织的细胞增殖缓慢,无法及时恢复此类细胞构建的组织亚结构,机体则会选择由其他性质的细胞(通常是成纤维细胞)增生来替代^[6-7],这样重建的组织形态和功能虽不能完全复原,但仍能修复创伤(纤维组织-瘢痕愈合),维持机体结构完整,有利于内环境稳定。一个好的防粘连产品,应不仅能够防止相邻组织的粘连,而且能够让受损组织各种细胞有序地修复自身各种组织亚结构。

防粘连产品用于临床防治软组织在创伤和手术后发生的粘连。造成术后粘连的原因很多,主要是

创伤引发一系列后续的出血、炎症、纤维沉积等生理反应,如果在相邻组织间的纤维蛋白沉积和纤维蛋白溶解之间不平衡,就会发生组织粘连^[8-11]。目前防粘连产品主要是在创面产生初期,通过隔离损伤组织与周围组织的接触来避免粘连的产生,但作为一个外源性材料,防粘连产品会影响组织愈合进程中的多个生理过程,如炎性细胞分泌细胞因子募集细胞、促进细胞增殖、纤维蛋白原的合成与降解平衡、新生血管生成、营养物质运输等。在严重情况下,防粘连产品甚至可能引起异物反应,抑制组织愈合。因此,防粘连产品的促进修复能力也逐渐成为评价产品的一项指标^[12-13]。

本研究的生物力学评价结果表明,医用透明质酸钠凝胶组和粘连组腹壁肌肉的最大抗张力和刚度尚未恢复到正常水平;医用几丁糖组和 Seprafilm 组的愈合侧最大抗张力依然明显低于正常侧,但其刚度已经与正常侧相差无几;聚乳酸可吸收医用膜组和医用聚乙二醇小檗碱液组愈合侧的力学性能恢复较快,已经与正常侧无明显差别。根据组织学染色发现,故医用透明质酸钠凝胶组 14 d 后纤维数量及结构均低于正常组织,医用透明质酸钠凝胶促进肌肉重建能力最差。尽管医用几丁糖和 Seprafilm 促进纤维增殖能力也较差,但是增殖的纤维已恢复正常水平,具有相应的弹性模量应用。聚乳酸可吸收

医用膜组和医用聚乙二醇小檗碱液组肌肉重建最好,力学性能恢复也最优。

本课题组前期动物实验发现,聚乳酸可吸收医用膜防治大鼠腹部粘连的效果远优于医用透明质酸钠凝胶、医用几丁糖和医用聚乙二醇小檗碱液^[14];本研究发现,聚乳酸可吸收医用膜和医用聚乙二醇小檗碱液对大鼠腹部肌肉愈合的促进作用优于医用透明质酸钠凝胶和医用几丁糖,因此说明目前聚乳酸可吸收医用膜是防治大鼠腹部粘连的最佳产品。

尽管聚乳酸可吸收医用膜在防治腹部粘连、促进组织愈合方面显示了明显的优势,但该产品仍存在一系列缺点:①难以在微创手术中使用;②难以紧密贴附于组织表面,需要用缝线固定在组织表面;③降解缓慢,在术后2周仍非常完整;④有异物反应。因此,有待进一步研发临床使用方便、防治粘连效果显著、促进组织愈合的防粘连产品。

参考文献:

- [1] MENZIES D, ELLIS H. Intestinal obstruction from adhesions: How big is the problem [J]. *Ann R Coll Surg Engl*, 1990, 72: 60-63.
- [2] WEIBEL MA, MAJNO G. Peritoneal adhesions and their relation to abdominal surgery: Postmortem study [J]. *Am J Surg*, 1973, 126(3): 345-353.
- [3] VRIJLAND WW, JEEKEL J, VAN GELDORP HJ, *et al*. Abdominal adhesions: Intestinal obstruction, pain, and infertility [J]. *Surg Endosc*, 2003, 17(7): 1017-1022.
- [4] 张会会, 原芳, 孙雨龙. 国内手术防粘连产品的基础研究和临床研究[J]. *医学信息*, 2014, 27(1): 442-445
- [5] HARRIS ES, MORGAN RF, RODEHEAVER GT. Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents [J]. *Surgery*, 1995, 117(6): 663-669.
- [6] SHAW TJ, MARTIN P. Wound repair: A showcase for cell plasticity and migration [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 14(42): 29-37.
- [7] DESMOULIÈRE A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis [J]. *Cell Biol Int*, 1995, 19(5): 471-476.
- [8] THOMPSON JN, WHAWELL SA. Pathogenesis and prevention of adhesion formation [J]. *Br J Surg*, 1995, 82(1): 3-5.
- [9] HELLEBREKERS BW, KOOISTRA T. Pathogenesis of postoperative adhesion formation [J]. *Br J Surg*, 2011, 98(11): 1503-1516.
- [10] KIM TH, PARK JS, AN SS, *et al*. Inhibition of thrombin-activated fibrinolysis inhibitor decreases postoperative adhesion [J]. *J Surg Res*, 2015, 193(2): 560-506.
- [11] HOLMDAHL L, IVARSSON ML. The role of cytokines, coagulation, and fibrinolysis in peritoneal tissue repair [J]. *Eur J Surg*, 1999, 165(11): 1012-1019.
- [12] YAN L, SUN Y, LI X, *et al*. The effect of hydroxycamptothecin on wound healing following reduction of the knee intra-articular adhesion in rabbits [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(1): 221-227.
- [13] NTOURAKIS D, KATSIMPOULAS M, TANOGLIDI A, *et al*. Adhesions and healing of intestinal anastomoses: The effect of anti-adhesion barriers [J]. *Surg Innov*, 2016, 23(3): 266-276.
- [14] 张会会, 原芳, 高权荣, 等. 四种临床产品预防手术后腹部粘连效果比较[J]. *中国综合临床*, 2015, 31(2): 618-619.