

A 7. 0T micro-MRI study on inhibition of epidural adhesions, scarring by topical application of mitomycin C and poly-(DL-lactic acid) films

ZANG Feng-chao, JIANG Zhen-yang, YANG Xiang-yu, WEN Song, TENG Gao-jun*
(Department of Radiology, Zhongda Hospital, Southeast University, Jiangsu Key Laboratory of Molecular and Functional Imaging, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective** To compare the effect of topical application of poly-(DL-lactic acid) (DL-PLA) film and mitomycin C (MMC) alone, as well as the combination of DL-PLA film and MMC in inhibition of rat epidural adhesions after laminectomy with 7. 0T micro-MRI. **Methods** Sixteen SD rats were randomly divided into 4 groups (each $n=4$) according to epidural local application of drugs after laminectomy: Group A: MMC 0. 67 mg/ml alone; group B: Saline and 0. 05 mm DL-PLA film; group C: Combination of MMC 0. 67 mg/ml and 0. 05 mm DL-PLA film; group D (as control): Saline alone. Rats were killed and MR scan was performed 4 weeks later to measure the scar tissue areas and adhesions between the dura mater of spinal cord and other tissues with stereoscopic microscope. **Results** The epidural scar tissues were not very dense, the scar areas reduced and had small quality of adhesions with the dura mater of spinal cord in Group A and B. The scar tissues were less dense and the scar areas were smaller in Group C. Group D had dense epidural scar tissue, larger scar areas and close-up adhesions with the dura mater of spinal cord. **Conclusion** Topical application of concentration of 0. 67 mg/ml MMC or 0. 05 mm DL-PLA film can reduce epidural scar tissue. The effect of inhibition adhesions would be more pronounced when they were both used.

[Key words] Laminectomy; Dura mater; Adhesion; Mitomycin; Poly-(DL-lactic acid); Magnetic resonance imaging

7. 0T micro-MRI 评价局部应用丝裂霉素 C 和消旋聚乳酸膜抑制大鼠硬膜外粘连及瘢痕形成

臧凤超, 姜振洋, 杨翔宇, 文 颂, 滕皋军*

(东南大学附属中大医院放射科 江苏省分子影像与功能影像重点实验室, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的** 应用 7. 0T micro-MR 比较单独应用丝裂霉素 C(MMC)、消旋聚乳酸(DL-PLA)膜以及二者联合应用(MMC+DL-PLA 膜)时抑制大鼠椎板切除术后硬膜外粘连的效果。**方法** 将 16 只 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 4 只, 椎板切除术后于硬膜外给予不同局部处理: 单纯 MMC 组局部应用 MMC 0. 67 mg/ml; 单纯 DL-PLA 膜组给予生理盐水和 0. 05 mm 厚 DL-PLA 膜; MMC+DL-PLA 膜组给予 MMC 0. 67 mg/ml 和 0. 05 mm 厚 DL-PLA 膜; 对照组单纯应用生理盐水。术后 4 周处死大鼠, 分别行 7. 0T micro-MR 扫描及瘢痕组织面积测定, 并于镜下观察硬脊膜与后方瘢痕组织粘连情况。**结果** 单纯 MMC 组和单纯 DL-PLA 膜组硬膜外瘢痕组织较疏松, 瘢痕面积小, 与硬脊膜部分粘连。MMC+DL-PLA 膜组硬膜外瘢痕组织较疏松, 瘢痕面积更小, 与硬脊膜未形成明显粘连。对照组标本硬膜外瘢痕组织致密, 瘢痕面积大, 与硬脊膜形成紧密粘连。**结论** 局部单独应用浓度为 0. 67 mg/ml 的 MMC 或 0. 05 mm 厚的 DL-PLA 膜均能减少硬膜外瘢痕组织增生, 二者联合应用时效果更显著。

[作者简介] 臧凤超(1975—), 男, 江苏徐州人, 硕士, 工程师。研究方向: 磁共振在生物医学中的应用。E-mail: zangfengchao@163.com

[通讯作者] 滕皋军, 东南大学医学院附属中大医院放射科 江苏省分子影像与功能影像重点实验室, 210009。E-mail: gjteng@vip. sina.com

[收稿日期] 2011-06-22 [修回日期] 2011-10-25

[关键词] 椎板切除术;硬膜;粘连;丝裂霉素;消旋聚乳酸膜;磁共振成像

[中图分类号] R445.2; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-8475(2012)02-0129-04

腰椎椎板切除术后硬膜外纤维化及粘连、瘢痕是导致腰椎手术失败综合征的相关因素之一^[1],严重影响脊柱外科手术治疗效果。研究开发预防硬膜外粘连和瘢痕组织形成的材料和方法是脊柱外科亟待解决的问题^[2-3]。本实验观察、对比局部应用丝裂霉素 C(mitomycin C, MMC)和消旋聚乳酸 [Poly-(DL-lactic acid), DL-PLA]膜预防大鼠椎板切除术后硬膜外粘连的效果,为临床预防椎板切除术后硬膜外粘连形成提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠 16 只,体重 200~220 g,2 月龄,购自南京市青龙山动物中心。本实验得到东南大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物及主要器材 DL-PLA 膜(分子量 30 万,厚度 0.05 mm,山东岱罡生物有限公司);注射用 MMC

(浙江海正药业);Bruker 7.0T micro-MR 成像系统(东南大学江苏省分子影像与功能影像重点实验室提供);体视显微镜(江南禹城光学仪器公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 根据椎板切除术后硬膜外局部应用的药物及处理方法不同^[4-7],将 16 只清洁级健康 SD 大鼠随机平均分为 4 组:①单纯 MMC 组:局部应用 MMC 0.67 mg/ml;②单纯 DL-PLA 膜组:局部应用生理盐水和 0.05 mm 厚的 DL-PLA 膜;③ MMC+DL-PLA 膜组:局部应用 MMC 0.67 mg/ml 和 0.05 mm 厚的 DL-PLA 膜;④对照组:局部仅应用生理盐水。

1.3.2 手术方法 采用 10% 水合氯醛(0.35 ml/kg 体重)腹腔麻醉后,俯卧位保定大鼠,根据其最后一根肋骨与最后一节胸椎相连的解剖学关系,体外定位

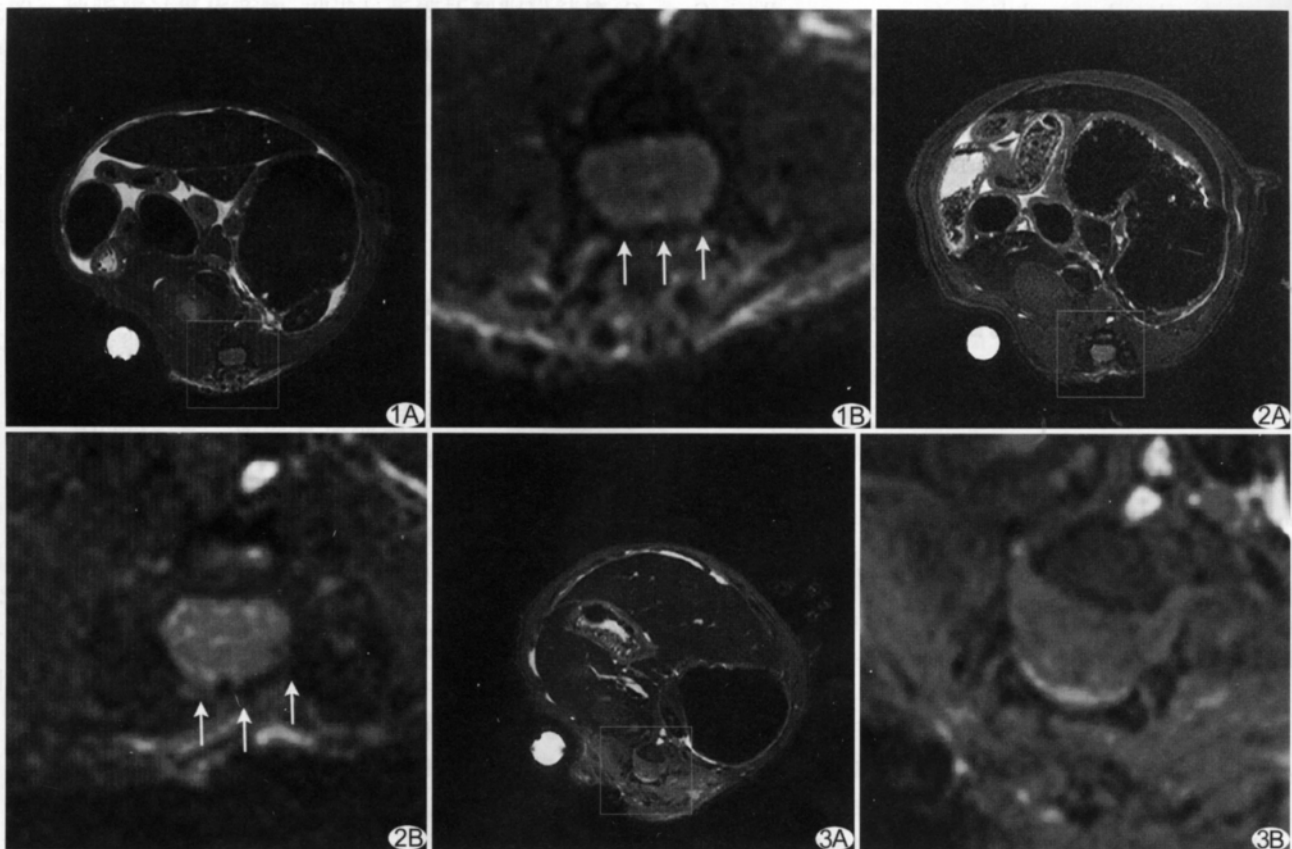


图 1 单纯 MMC 组 硬脊膜与后方瘢痕部分有模糊低密度间隙(箭),瘢痕面积较小,但有轻度粘连 A. 所选 ROI 的部位; B. ROI 放大图像(×20) 图 2 单纯 DL-PLA 膜组 硬脊膜与后方瘢痕有明显低密度间隙(箭),瘢痕面积较单纯 MMC 组大,但粘连程度却小于单纯 MMC 组 A. 所选 ROI 的部位; B. ROI 放大图像(×20) 图 3 MMC+DL-PLA 膜组 硬脊膜与后方瘢痕有明显低密度间隙,瘢痕面积和粘连程度均小于单纯 MMC 组和 MMC+DL-PLA 膜组 A. 所选 ROI 的部位; B. ROI 放大图像(×20)

L1、2 椎板。大鼠背部术区备皮、消毒,取脊柱正中切口,长约 2.0~3.0 cm;分离肌肉等组织结构,暴露 L1、2 椎板。于镜下切除 L1 椎板,形成约 0.2 cm×0.5 cm 的缺损,暴露硬脊膜,压迫止血;单纯 MMC 组和 MMC+DL-PLA 膜组以 0.4 cm×0.6 cm 棉片浸透,0.67 mg/ml MMC 置于硬脊膜后方,单纯 DL-PLA 膜组和对照组以 0.4 cm×0.6 cm 棉片浸透等量生理盐水。10 min 后各组均取出棉片,并以生理盐水冲洗手术野 3 次。对单纯 DL-PLA 膜组和 MMC+DL-PLA 膜组再分别于椎板缺损处覆盖 DL-PLA 膜,DL-PLA 膜预制成上下均有凹口的条形膜,其上下缺损处分别与上下位的棘突根部嵌合,然后各组逐层缝合手术切口。待动物清醒后送回笼养,自由饮食。术后每 3 天观察实验动物手术切口愈合及肢体运动情况。

1.3.3 检测方法 micro-MR 成像:手术 4 周后采用 10%水合氯醛腹腔过量麻醉处死动物行 MR 扫描,以防止呼吸伪影。采用 Bruker 7.0T micro-MR 成像系统,MSME T2W 序列,扫描参数:TR 4391 ms,TE 33.0 ms,层数 40 层;层厚 0.5 mm,层间距 0;平均采集次数 8;扫描时间约为 9 min 22 s 160 ms。扫描结束后采用 Image J 软件测量硬脊膜后方瘢痕面积。

镜下观察:扫描结束后取出大鼠,于镜下暴露手术区,观察硬脊膜与后方瘢痕组织粘连情况。由 1 名医师采用盲法于镜下对各组大鼠术后的脊髓椎管区进行解剖,根据评分标准和解剖时的易分离性进行评分。评分标准:0 分:硬脊膜与瘢痕组织无明显粘连;1 分:硬膜外有稀疏而散在的膜性粘连,瘢痕组织易与硬脊膜钝性分离;2 分:硬脊膜与瘢痕组织粘连较广泛和致密,钝性分离阻力较大,分离后硬脊膜仍保持完整;3 分:粘连广泛、致密,硬脊膜与瘢痕无法钝性分离,锐性分离后的硬脊膜难以保持完整。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 11.0 统计软件。术后硬脊膜后方 MR 测量瘢痕面积采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;镜下所见粘连程度采用分值表示。对各组定量结果采用单因素方差分析,对等级资料采用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

术后 3 天大鼠生存良好,未见明显感染,四肢运动正常;术后 1 周,2 只大鼠后腿出现不完全运动功能障碍;术后 4 周,大鼠生存状态良好。

MRI 显示,MMC+DL-PLA 膜组粘连不明显,瘢痕面积较小;单纯 MMC 组、单纯 DL-PLA 膜组明显不粘连,但瘢痕面积较 MMC+DL-PLA 膜组大;对照组粘连严重,瘢痕面积最大。

镜下观察,单纯 MMC 组和单纯 DL-PLA 膜组动物硬膜外瘢痕组织较疏松,瘢痕面积较小,与硬脊膜部分粘连,较易剥离;单纯 MMC 组抑制瘢痕纤维化的效果较单纯 DL-PLA 膜组略好,单纯 DL-PLA 膜组防止粘连的效果较单纯 MMC 组略好。MMC+DL-PLA 膜组动物硬膜外瘢痕组织较疏松,瘢痕面积更小,与硬脊膜未形成明显粘连,易于完整剥离(图 1~3)。对照组动物硬膜外瘢痕组织致密,瘢痕面积较大[(5.64±0.95)mm²],与硬脊膜形成紧密粘连,无法完整剥离(图 4)。单纯 MMC 组、单纯 DL-PLA 膜组、MMC+DL-PLA 膜组瘢痕面积分别为(2.93±0.58)mm²、(3.27±0.82)mm²、(1.74±0.49)mm²,与对照组比较,瘢痕面积及粘连程度差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),组间两两比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05,表 1)。

表 1 体视显微镜下观察评分(分)

组别	Rydell 分级			
	0	I	II	III
单纯 MMC 组	0	1	3	0
单纯 DL-PLA 膜组	0	2	2	0
MMC+DL-PLA 膜组	3	1	0	0
对照组	0	0	0	4

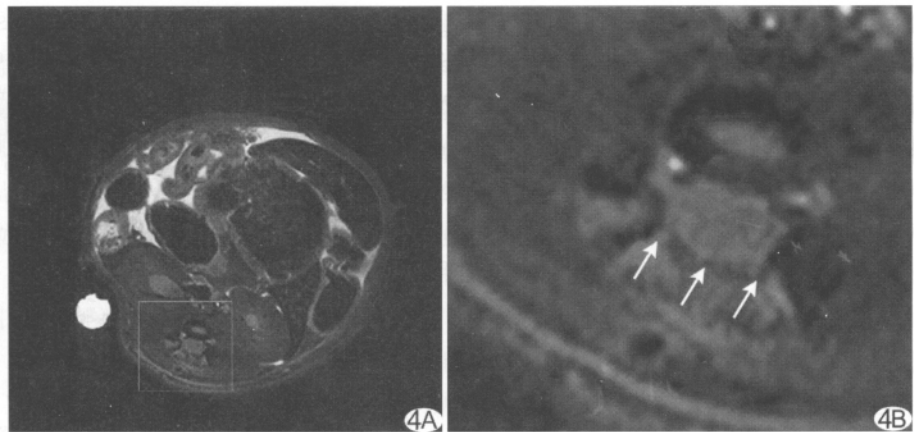


图 4 对照组 硬脊膜与后方瘢痕紧密粘连,瘢痕面积最大,粘连程度最重(箭示粘连区) A. 所选 ROI 的部位; B. ROI 放大图像(×20)

3 讨论

腰椎椎板切除术后硬膜外纤维化及粘连、瘢痕是导致腰椎手术失败综合征的相关因素之一。目前对于术后硬膜外粘连和瘢痕的形成机制和原因尚无统一认识。综合多种理论,腰椎椎板切除术后硬膜外粘连和瘢痕形成是动态的病理过程,纤维环和后纵韧带损伤、血肿导致释放一系列炎症介质,最后成纤维细胞趋化、增殖,合成胶原至静止。预防硬膜周围瘢痕粘连需采用各种综合措施,如术中使用微创手术(如椎间盘镜手术)减少对骶棘肌的剥离和损伤,尽量少切除椎板,彻底止血、冲洗切口,术后适时引流,以及在硬膜外腔放置有效的预防粘连材料;同时,使用机械屏障隔离受损的肌肉与硬膜,可以明显减少粘连。

理想的预防粘连材料应为具有良好生物相容性的半流体物质,尽可能遮挡硬膜和包裹住神经根,且无不良反应,而且后期是可吸收材料^[8]。本实验应用的 DL-PLA 膜为物理可降解材料,具有良好的生物相容性,制成薄膜后仍具有一定强度,可起到机械屏障作用,从而预防瘢痕粘连;主要作用原理是利用聚乳酸薄膜的屏障作用将成纤维细胞和硬膜囊隔开,待膜吸收后形成潜在腔隙,而此时纤维细胞增生及分泌已经不活跃,不会形成新的瘢痕,可一定程度上减少硬膜外粘连。MMC 则是一种抑制成纤维细胞生长的常用药物,也可有效预防硬膜外粘连和纤维化,目前临床多用作抗癌药物^[9]。Su 等^[10]和 Liu 等^[11]的实验研究确定了 MMC 的应用价值和最佳浓度。本实验发现,DL-PLA 膜为生物相容性好的可吸收薄膜,具有物理阻挡作用,与 MMC 联合应用,可在一定程度上形成一种三维立体形式,预防硬膜外的粘连和纤维化。

本实验结果显示,应用 7.0T micro-MR 可以测量瘢痕面积,并对硬膜外瘢痕的形成过程进行活体动态观察。本研究中对对照组标本硬膜外瘢痕组织致密,瘢痕面积大,与硬脊膜形成紧密粘连;单纯 MMC 组和单纯 DL-PLA 膜组标本硬膜外瘢痕组织较疏松,瘢痕面积减小,与硬脊膜部分粘连;MMC+DL-PLA 膜组标本硬膜外瘢痕组织较疏松,瘢痕面积更小,与对照组相比差异有统计学意义,与硬脊膜未形成明显粘连。综

合实验结果,局部单独应用浓度为 0.67 mg/ml 的 MMC 或 0.05 mm 厚 DL-PLA 膜均能有效减少硬膜外瘢痕组织增生,二者合用时效果更显著,提示联合应用 MMC 和 DL-PLA 能够提升预防硬膜外粘连的效果,但还需要长期临床观察加以进一步验证。

总之,DL-PLA 薄膜为与 MMC 联合应用可在一定程度上对硬膜外粘连和纤维化形成立体预防。

[参考文献]

- [1] 梁裕,张云海,龚耀成. 预防椎板切除术后硬膜外瘢痕的实验研究. 中华创伤杂志, 2000, 16(6): 353-355.
- [2] 孙钰,曹晓建,王雷,等. 羟基喜树碱和丝裂霉素 C 预防椎板切除后硬膜外瘢痕粘连的研究. 南京医科大学学报:自然科学版, 2007, 27(11): 1213-1216.
- [3] Rajan MS, Brart DP, Patmore A, et al. Cellular effects of mitomycin C on human corneas after photorefractive keratectomy. *Cataract Refract Surg*, 2006, 32(10): 1741-1746.
- [4] 陆圣华,曹晓建. 丝裂霉素 C 预防大鼠椎板切除后硬膜外粘连的量效关系及安全性. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(5): 379-383.
- [5] Lee JY, Stenzel W, Ebel H, et al. Mitomycin C in preventing spinal epidural fibrosis in a laminectomy model in rats. *J Neurosurg*, 2004, 100(1 Suppl Spine): 52-55.
- [6] 金大地,林献章,王立. 生物降解聚丙烯酰胺对椎管术后瘢痕粘连预防作用的研究. 中国脊柱脊髓杂志, 1997, 7(4): 162-164.
- [7] 曹晓建,张宁,金正帅,等. 丝裂霉素 C 和 5-氟尿嘧啶预防椎板切除术后硬膜外瘢痕粘连的效果比较. 中华实验外科杂志, 2006, 23(6): 731-733.
- [8] 陈立科,李康华,曹盛俊. 几丁糖与人工骨联合应用预防椎板切除术后硬膜外粘连的实验研究. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(4): 239-241.
- [9] 陆圣华,曹晓建,王立新,等. 7.0T Micro MRI 观察丝裂霉素 C 预防硬膜外粘连的效果研究. 南京医科大学学报:自然科学版, 2008, 28(10): 1263-1266.
- [10] Su C, Yao C, Lu S, et al. Study on the optimal concentration of topical mitomycin-C in preventing postlaminectomy epidural adhesion. *Eur J Pharmacol*, 2010, 640(1-3): 63-67.
- [11] Liu J, Ni B, Zhu L, et al. Mitomycin C-polyethylene glycol controlled-release film inhibits collagen secretion and induces apoptosis of fibroblasts in the early wound of a postlaminectomy rat model. *Spine J*, 2010, 10(5): 441-447.