

基础研究

高三尖杉酯碱对大鼠椎板切除术后
硬膜外粘连的影响孙斌磊^{1,2}, 戴纪杭², 孙 钰², 颜连启², 王静成²

(1 中南大学湘雅二医院骨科关节 410000 长沙市; 2 江苏省苏北人民医院骨科关节 225001 扬州市)

【摘要】目的:探讨局部应用不同浓度高三尖杉酯碱(homoharringtonine, HHT)对 L1 椎板切除术后大鼠硬膜外瘢痕粘连的预防效果。**方法:**将 36 只成年雄性 SD 大鼠, 2 月龄, 体重 279.42±32.58g(260~320g), 随机分成 A 组(HHT 0.2mg/ml 组)、B 组(HHT 0.1mg/ml 组)、C 组(生理盐水组)。制作 L1 椎板切除术模型, 显露硬脊膜, C 组生理盐水冲洗后直接逐层闭合切口, A、B 组分别用浸泡有不同浓度 HHT 的棉垫放入骨缺损区 5min, 生理盐水冲洗后再逐层闭合切口。术后 1 个月时, 行大体标本及组织病理学(HE 染色)观察硬膜外瘢痕粘连情况, 并使用 Image Pro Plus 软件进行成纤维细胞计数以及胶原光密度值分析。**结果:**A 组无明显粘连, B 组存在轻度粘连, C 组形成紧密的硬膜外瘢痕粘连。A 组硬膜外瘢痕中胶原光密度值(0.063±0.014)及成纤维细胞计数(8.43±2.52 个)较 C 组(0.186±0.005 和 22.47±2.37 个)明显降低, 且优于 B 组(0.126±0.017 和 14.60±1.67 个)($P < 0.05$)。**结论:**局部应用高三尖杉酯碱对预防硬膜外粘连有效, 可减少椎板切除术后瘢痕形成。且局部应用 0.2mg/ml 的高三尖杉酯碱防粘连效果更佳。

【关键词】椎板切除术; 大鼠; 高三尖杉酯碱; 硬膜外粘连; 安全性

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2020.05.10

中图分类号: R681.5, R973 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2020)-05-0454-05

The study of the effect and safety of homoharringtonine in the prevention of postlaminectomy epidural adhesion in rats/SUN Binlei, DAI Jihang, SUN Yu, et al//*Chinese Journal of Spine and Spinal Cord*, 2020, 30(5): 454-458

【Abstract】 Objectives: To determine the effect of local application of the homoharringtonine(HHT) in preventing postlaminectomy epidural adhesion in rats. **Methods:** A total of 36 adult male SD rats, aged 2 months and weight 279.42±32.58g(260~320g), were selected and randomly divided into group A(HHT 0.2mg/ml group), group B(HHT 0.1mg/ml group), and group C(normal saline group). The L1 laminectomy model was made and the dural membrane was exposed. In group C, the wound was closed layer by layer after normal saline irrigation. In groups A and B, cotton pads with different concentrations of HHT were soaked into the bone defect area for 5min, and then the wound was closed layer by layer after normal saline irrigation. At 1 month after surgery, gross specimens and histopathology (HE staining) were used to observe the condition of epidural scar adhesion, and the fibroblast count and collagen optical density were analyzed by Image Pro Plus. **Results:** There were no obvious adhesions in group A, mild adhesions in group B, and tight epidural scar adhesions in group C. The collagen optical density and fibroblast count in epidural scar in group A was 0.063±0.014 and 8.43±2.52 respectively, which were significantly lower than that in group C(0.186±0.005 and 22.47±2.37), and were better than that in group B(0.126±0.017 and 14.60±1.67)($P < 0.05$). **Conclusions:** Topical application of homoharringtonine has a good effect in preventing postlaminectomy epidural adhesion.

【Key words】 Laminectomy; Rat; Homoharringtonine; Epidural adhesion; Safety

【Author's address】 Department of Joint Orthopedics, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410000, China

基金项目: 江苏省医学创新团队(编号 CXTDB2017004)

第一作者简介: 男(1993-), 医学硕士, 研究方向: 瘢痕、干细胞

电话: 18994894821 E-mail: likezlf123@163.com

通讯作者: 王静成 E-mail: jingchengwyz@163.com

目前腰椎椎板切除术是治疗椎间盘突出症常见的治疗方法之一。尽管手术技术有所改进, 但腰椎手术后并发症的发生率仍不令人满意^[1-3]。硬膜

外纤维化被认为是引起神经根痛、持续性腰痛等并发症的主要原因之一^[4]。因此,预防硬膜外纤维化的形成可以被认为是处理这些问题的最佳方法。多年来,为了防止术后硬膜外纤维化,主要采用两种方法,包括术区局部用药和在暴露硬膜外植入材料^[5-8]。但是,这些研究结果并非完全没有并发症,在完成临床应用之前还需要更多的研究。因此,副作用小的预防硬膜外纤维化的措施是目前所迫切需要的。

有研究^[9]表明成纤维细胞增殖是硬膜外纤维化形成的主要原因。最近,许多研究人员通过抑制成纤维细胞增殖的方式来预防硬膜外纤维化,然而,确切的机制仍在探索过程中。高三尖杉酯碱(homoharringtonine, HHT)作为从常青树中提取的一种头孢紫杉醇酯,在中国用于治疗血液病有 40 年了^[10]。近来有研究^[11]证明其可以有效地抑制青光眼过滤术后成纤维细胞的增殖及预防术后粘连的形成。所以我们有理由认为 HHT 存在预防硬膜外粘连的可能,并通过大鼠模型的建立,对不同浓度的 HHT 预防硬膜外粘连局部应用的效果进行了观察和比较,并评价该药物的安全性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取成年雄性 SD 大鼠 36 只,鼠龄 2 个月,体重 279.42 ± 32.58 (260~320g),大鼠提供单位为扬州大学动物实验中心。本次动物实验经扬州大学动物伦理委员会批准,所有大鼠均得到精心照顾。依据以往研究^[12]报告,本次实验将大鼠随机分为 3 组,A 组(0.2mg/ml HHT 组),B 组(0.1mg/ml HHT 组)和 C 组(生理盐水组)。

1.2 动物模型制备

参考相关试验研究方法^[13],我们以 1%浓度的戊巴比妥钠液腹腔注射麻醉所有大鼠,剂量为 40mg/kg。将大鼠在俯卧固定位置放置,对其背部进行备皮,并给予常规消毒铺单。取正中切口,在 L1~L2 水平逐层分离皮肤、肌肉等组织,L1 完全暴露后,取出整个椎板以暴露硬脊膜。止血充分后,C 组生理盐水冲洗后直接逐层闭合切口;A、B 组分别用浸泡有不同浓度 HHT 的棉垫(0.4×0.4cm)放入骨缺损区 5min,然后将棉垫取出,用生理盐水冲洗后逐层闭合切口。

1.3 观察指标

1.3.1 大体观察 参照相关文献^[14,15],我们选取手术 1 个月后,随机从每组抽取大鼠 6 只。麻醉后进行局部解剖,解剖方法参照之前的手术方法。参照修正的 Rydell 评分标准,对硬膜外瘢痕粘连程度评级^[16]:手术区硬膜囊区无增生性瘢痕组织,无明显粘连为 0 级;分散的疤痕组织在手术区硬膜外可见,易于将增生性纤维组织与硬膜囊分离为 1 级;手术区硬膜囊与周围瘢痕组织,形成的粘连较为紧密,分离硬膜囊与粘连组织较为困难为 2 级;术区硬膜外纤维化粘连广泛且致密,无法将瘢痕组织与原有硬膜囊解剖分离为 3 级。

1.3.2 组织学观察 手术后 1 个月,用过量的 1%戊巴比妥钠麻醉溶液杀死各组剩余大鼠,然后通过心脏动脉灌注 4%的多聚甲醛,用多聚甲醛将手术导致缺损的脊柱节段固定,脱钙和脱水,制作石蜡标本并切片,进行苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 染色。HE 染色可使成纤维细胞核呈蓝色,用来观察 HE 染色后各组动物硬膜外粘连的程度,参照以前的研究^[17],我们取三个区域(100×100μm)的成纤维细胞数值。Masson 染色可使胶原纤维呈蓝染、肌纤维呈红染,蓝染程度越高提示观察区域内胶原纤维含量越高。实验完成后,分析胶原蛋白的光密度值,图像分析软件采用 Image Pro Plus 6.0。

1.4 统计学处理

数据分析采用统计学软件 SPSS 13.0 进行,用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,三组间计量资料的比较采用方差分析,组间比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

通过对各组大体观察,A 组椎板切除术区出现少量松散的瘢痕粘连组织,剥离瘢痕时较易与硬膜分离,Rydell 分级为 1 级。B 组手术区出现中度瘢痕粘连,可以将其与硬膜分离,分离后硬膜仍可保持完整,Rydell 分级为 2 级。然而,在 C 组中,椎板切除术区出现广泛而致密的硬膜外粘连,且难以与硬膜解剖分离,易伴有硬膜囊损伤,Rydell 分级为 3 级。

2.2 组织学观察

HE 染色:A 组硬膜外粘连非常稀疏(图 1a),成纤维细胞少量(图 2a)。B 组的硬膜外粘连较少

(图 1b),成纤维细胞数量相比前组减少(图 2b)。C 组的硬膜外粘连致密(星号),与硬膜的接触面积大(图 1c 箭头所示),疤痕区域有大量成纤维细胞(图 2c)。

Masson 染色: 相比较于 C 组,A 组和 B 组的组织胶原纤维密度显著减少,此外,在 A 组中,胶

原增生明显减少。然而,通过对对照组 Masson 染色观察,我们并没有发现在 C 组中胶原组织有明显的减少(图 3)。

2.3 成纤维细胞计数

如表 1 所示,A 组的成纤维细胞计数与 C 组相比明显较低($P<0.05$)。此外 B 组的成纤维细胞

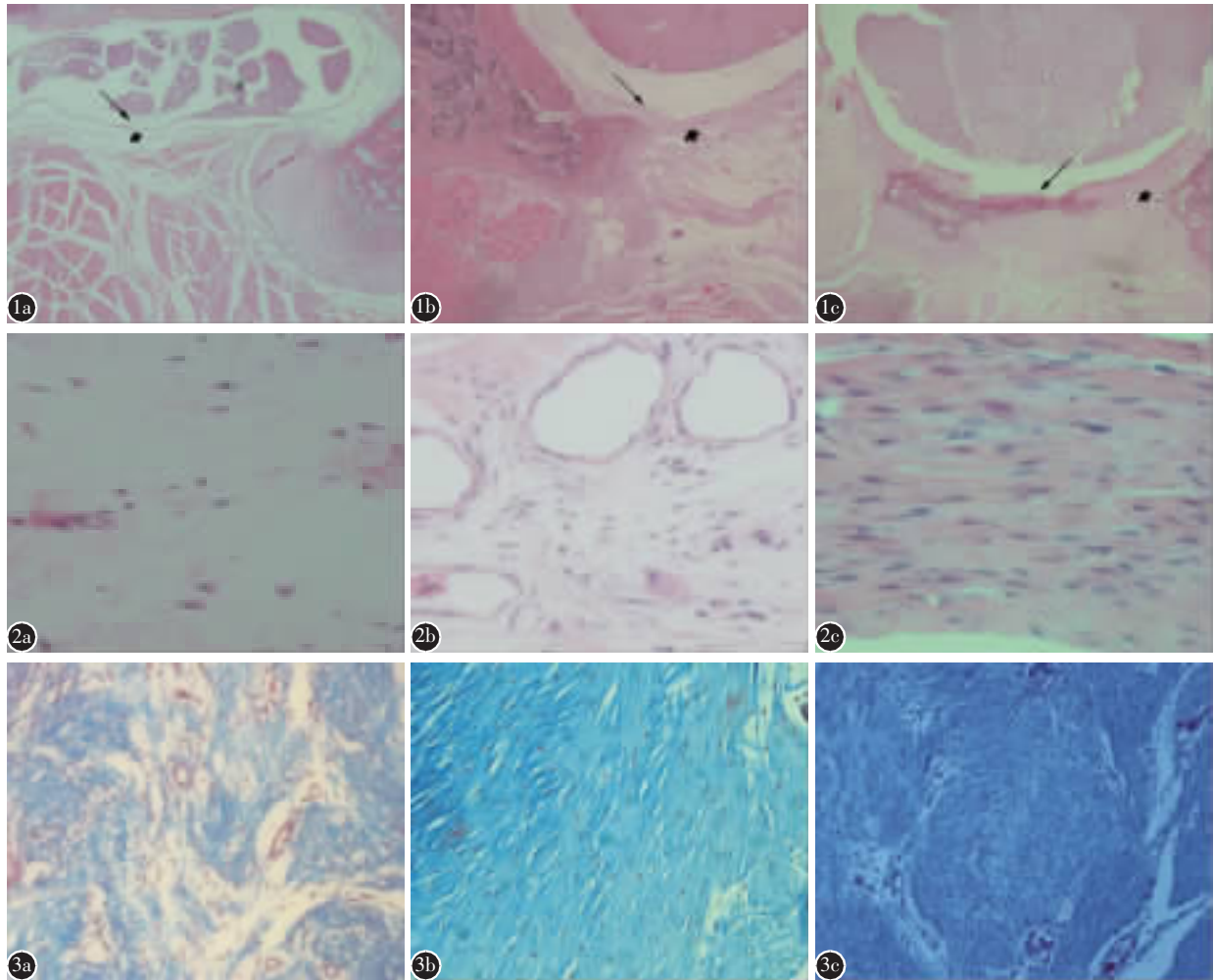


图 1 硬膜外瘢痕组织的组织学分析 **a** A 组硬膜外瘢痕组织稀疏(星号),与硬膜(箭头)之间可见明显的间隙或形成轻度纤维素样粘连 **b** B 组可见中等量的瘢痕组织(星号)出现在硬膜外,与硬膜(箭头)之间可见轻度纤维素样粘连 **c** C 组硬膜外瘢痕组织致密(星号),与硬膜(箭头)粘连紧密(HE 染色, $\times 40$) **图 2** 硬膜外瘢痕组织成纤维细胞的组织学分析 A 组(**a**)和 B 组(**b**)中的成纤维数目显著低于 C 组(**c**)(HE 染色, $\times 400$) **图 3** 硬膜外瘢痕组织胶原纤维增殖的组织学分析 A 组(**3a**)和 B 组(**3b**)中的胶原纤维量显著低于 C 组(**3c**)(Masson 染色, $\times 200$)

Figure 1 Histological analysis of epidural scar tissue **a** The epidural scar tissue in group A was sparse (*), with few adhesions to dura mater (arrow) were found in laminectomy defect sites **b** Moderate fibrosis scar tissues (*) with slight adherence (arrow) to dura mater were found in laminectomy defect sites of group B **c** Dense or thick fibrosis scar tissues (*) with extensive or firm adherence to dura mater were found in group C (HE, $\times 40$) **Figure 2** Histologic analysis of fibroblasts in epidural scar tissue. The number of fibroblasts in group A (**2a**) and group B (**2b**) was significantly lower than that in group C (**2c**) (HE, $\times 400$) **Figure 3** Histological analysis of collagen fiber proliferation in epidural scar tissue. The amount of collagen fibers in group A (**3a**) and group B (**3b**) was significantly lower than that in group C (**3c**) (Masson, $\times 200$)

计数也低于 C 组 ($P < 0.05$)。各组的胶原光密度值,随着用药浓度的增加而减少。A 组和 B 组的胶原光密度均低于 C 组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组切片中成纤维细胞计数、Masson 染色中光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Fibroblast counts in each group, optical density value of Masson staining of each group

	成纤维细胞计数 (n=6) Fibroblast count	光密度值 (n=3) Optical density value
A 组/Group A	8.43±2.52 ^{①②}	0.063±0.014 ^{①②}
B 组/Group B	14.60±1.67 ^①	0.126±0.017 ^①
C 组/Group C	22.47±2.37	0.186±0.005

注:①与 C 组比较 $P < 0.05$; ②与 B 组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with group C, $P < 0.05$; ②Compared with group B, $P < 0.05$

3 讨论

尽管硬膜外纤维化发展的确切机制尚不清楚,许多研究者认为成纤维细胞增殖是导致这种情况的最重要因素之一^[18,19]。有学者在对狗进行的椎板切除研究中发现术后瘢痕主形成自手术部位的骶棘肌,并在手术 7d 后于该部位逐渐出现成纤维细胞^[20]。另有学者报道了更进一步的研究,认为硬膜外瘢痕的形成不仅仅在来源于椎管后侧的骶棘肌,也来源于椎管前方的纤维环和后纵韧带,同时继发侧方神经根粘连^[21]。除此之外,分子机制也在硬膜外纤维化的进展中发挥了重要作用。粘连以及瘢痕的形成实际上是机体自我修复的过程,在手术部位椎板切除术后的修复过程中,许多因素增加了成纤维细胞的活性。在损伤发生的早期,各种炎症细胞如内皮细胞、肥大细胞、巨噬细胞等开始聚集。同时释放大量的生长因子,如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 等。随着成纤维细胞的连续活化增殖并转化成纤维细胞,以及胶原纤维的形成,大量的纤维结缔组织开始逐渐出现^[22]。最后,当纤维结缔组织达到成熟后变成硬膜外瘢痕组织引起粘连,也称硬膜外纤维化。硬膜外广泛的纤维化可能导致局部动脉供应受损,而且纤维化组织容易在硬脑膜和神经根上生长,并因此引起神经根病变,据报道,这是背部手术失败综合征的一个重要因素^[3]。

近年来研究发现, HHT 由于其特殊的药理作用被用来治疗眼部的一些增殖性病变。HHT 是一

种天然生物碱,是一种抑制蛋白质合成的药物^[23]。由于其对蛋白质合成的阻碍作用,使其可以降低许多蛋白质的表达,尤其是一些短寿命蛋白质,这些蛋白质在细胞存活和增殖中起着非常重要的作用^[24]。由于其上述特点,特别是对成纤维细胞增殖的抑制作用,近年来应用 HHT 治疗增殖性瘢痕疾病,取得了满意的效果。

在大鼠椎板切除术模型中,我们用不同浓度的 HHT 治疗缺损区。通过硬膜外纤维化大体观察评分、组织学观察和成纤维细胞计数等参数,评价了 HHT 对硬膜外纤维化的抑制作用。所有结果均表明,局部应用 HHT 可抑制大鼠椎板切除后成纤维细胞增殖,抑制硬膜外纤维化。在本次研究中,大鼠中没有任何副作用表现,如表皮坏死、手术切口感染或死亡。然而,高三尖杉酯碱作为一种抗肿瘤药物,可能对正常组织细胞造成损伤,其局部吸收引起的局部毒性反应或全身并发症尚不清楚,较高浓度或较大的表面应用面积可能引起更多的副作用。因此,本研究通过限制高三尖杉酯碱的药物应用范围和时间,以达到保证其安全性的目的。但未设置更多浓度组是本研究的不足,其他浓度 HHT 是否更有效或出现较大副作用还需要进一步实验研究。

考虑到以上所有结果,我们可以得出结论,局部应用适当浓度的高三尖杉酯碱可减少大鼠椎板切除术后硬膜外纤维化。

4 参考文献

- Tannoury T, Kempegowda H, Haddadi K, et al. Complications associated with minimally invasive anterior to the psoas (ATP) fusion of the lumbosacral spine [J]. Spine, 2019, 44 (19): E1122-E1129.
- 刘俊良, 镇万新, 高国勇, 等. 经皮椎间孔入路内镜下治疗复发性腰椎间盘突出症的临床研究[J]. 中华骨科杂志, 2018, 38(8): 477-484.
- 袁渤, 杜明奎, 匡正达. 腰椎手术失败综合征的病因及治疗进展[J]. 中华灾害救援医学, 2017, 5(3): 164-167.
- Bosscher HA, Heavner JE. Incidence and severity of epidural fibrosis after back surgery: an endoscopic study[J]. Pain Practice, 2010, 10(1): 18-24.
- 张伟, 王立新. 预防椎板切除术后硬膜外纤维化粘连的研究概况[J]. 中华全科医学, 2010, 8(12): 1599-1560.
- Huang Y, Shi R, Gong M, et al. Icarin-loaded electrospun PCL/gelatin sub-microfiber mat for preventing epidural adhesions after laminectomy[J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13(4): 4831-4844.

7. Wang H, Sun W, Fu D, et al. Update on biomaterials for prevention of epidural adhesion after lumbar laminectomy[J]. *J Orthop Translat*, 2018, 13: 41-49.
8. 孙培锋, 曲良, 夏国峰, 等. 白藜芦醇预防大鼠椎板切除术后硬膜外粘连的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2016, 24(15): 1419-1423.
9. Su, C, Sui T, Zhang, X, Zhang, H, et al. Efficacy of topical application of mitomycin -C on wound healing in a postlaminectomy rat model: an experimental study [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(1): 7-12.
10. Kantarjian H, O'Brien S, Jabbour E, et al. Effectiveness of homoharringtonine (omacetaxine mepesuccinate) for treatment of acute myeloid leukemia: a Meta-analysis of Chinese studies[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2015, 15(1): 13-21.
11. Peng D, Yu K, Tian X, et al. A randomized control clinical trial of glaucoma filtering surgery with homoharringtonine [J]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 1998, 34(5): 361-364.
12. Li X, Wang S, Dai J, et al. Homoharringtonine prevents surgery -induced epidural fibrosis through endoplasmic reticulum stress signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 815(2): 437-445.
13. 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[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(6): 731-733.
14. Wang S, Li X, Yan L, et al. Tamoxifen inhibits fibroblast proliferation and prevents epidural fibrosis by regulating AKT pathway in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(4): 937-942.
15. Li X, Chen H, Wang S, et al. Tacrolimus induces fibroblasts apoptosis and reduces epidural fibrosis by regulating miR-429 and its target of RhoE [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(4): 1197-1204.
16. Rydell N. Decreased granulation tissue reaction after installation of hyaluronic acid[J]. *Acta Orthop Scand*, 1970, 41(3): 307-311.
17. 李小磊, 颜连启, 王静成, 等. 局部应用他克莫司和丝裂霉素预防腰椎板切除术后硬膜外瘢痕粘连的比较[J]. *临床骨科杂志*, 2012, 15(5): 90-92.
18. Sun Y, Zhao S, Li X, et al. Local application of rapamycin reduces epidural fibrosis after laminectomy via inhibiting fibroblast proliferation and prompting apoptosis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2016, 11(1): 58.
19. 张伟, 王立新. 预防椎板切除术后硬膜外纤维化粘连的研究概况[J]. *中华全科医学*, 2010, 8(12): 1598-1599.
20. La Rocca H, Macnab I. The laminectomy membrane studies in its evolution, characteristics, effects and prophylaxis in dogs[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1974, 56(3): 545-550.
21. Songer MN, Ghosh L, Spencer DL. Effects of sodium hyaluronate on peridural fibrosis after lumbar laminotomy and discectomy[J]. *Spine*, 1990, 15(6): 550-554.
22. Sun Y, Wang L, Sun S, et al. The effect of 10-hydroxycamptothecin in preventing fibroblast proliferation and epidural scar adhesion after laminectomy in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 593(1-3): 44-48.
23. 朱莉兹·居雷尔, 布拉哈·格, 摩尔·珀·布, 等. U2504 确定 α 位点裂解抗生素的物种特异性: 与核糖体结合的泰妙菌素、高三尖杉酯碱和马钱子碱的结构[J]. *分子生物学杂志*, 2009, 389(1): 150-156.
24. Gu Y, Zhou H, Gan YC, et al. Small-molecule induction of phospho-eIF4E sumoylation and degradation via targeting its phosphorylated serine 209 residue[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(17): 15111-15121.

(收稿日期:2019-11-24 末次修回日期:2020-02-14)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 彭向峰)