



腰椎板开窗术后微小骨粒回植模型的建立及意义

陈振南¹, 周 忠², 王万明², 郭 剑³, 徐志成³

(1. 福建中医药大学附属漳州中医院 骨伤科, 漳州 福建 363000; 2. 南京军区福州总医院 骨二科, 福州 福建 350025;
3. 福建中医药大学骨伤学院, 福州 福建 350108)

【摘要】 目的 建立兔腰椎板开窗术后微小骨粒回植模型, 为临床提供实验依据。**方法** 将 18 只雄性新西兰兔, 分为两组。对照组在全麻后以 L5 棘突为中心, 充分显露左侧 L5 椎板, 用微型小枪钳慢慢咬去椎板、黄韧带, 进行开窗术, 暴露约 0.8 x 0.3 cm 大小骨窗后直接缝合处理。实验组在 L5 左侧开窗后将开窗咬下的碎骨粒剪碎, 然后将碎骨粒镶嵌于医用胶原蛋白海绵, 塑成拱桥形, 放置于硬膜外开窗处, 缝合切口, 术后观察椎板开窗位置 CT 及组织学变化。**结果** CT 检查示术后 8 周实验组开窗处微小骨粒形成菲薄的骨板, 12 周后形成的骨板较厚, 骨梁连续, 椎管形态及容积无明显变化, 未见脊髓受压。对照组开窗处在 8、12 周局部有少量骨质增生, 周围黏连组织侵入椎管, 椎管未重建。**结论** 兔椎板开窗处再植自体微小骨粒的骨重建, 形成的骨板可遮挡疤痕侵入椎管, 减少椎管内黏连。

【关键词】 椎板开窗术; 回植; 胶原蛋白海绵

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 12-0042-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.009

Establishment of a rabbit model of lumbar laminectomy and bone grains replantation

CHEN Zhen-nan¹, ZHOU zhong², WANG Wan-ming², GUO Jian, XU Zhi-cheng

(1. Zhangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangzhou 363000, China;

2. Department of Orthopedics, Fuzhou General Hospital of PLA Nanjing Military Region, Fuzhou 350025;

3. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108)

【Abstract】 Objective To establish a rabbit model of lumbar laminectomy and bone grains replantation and provide experimental evidence for the clinical application. **Methods** Eighteen healthy male New Zealand rabbits were selected and randomly divided into two groups: the control group (n=6) and experimental group (n=12). The rabbits of control group were given general anesthesia, and taking the L5 spinous process as the center to perform left L5 laminectomy, using a micro lancet forceps to slowly bite the lamina and ligamentum flavum for fenestration and exposed to an approximately 0.8 cm x 0.3 cm sized bone window and then sutured the skin. The rabbits of experimental group were exposed to an approximately 0.8 x 0.3 cm sized bone window as well, and bone fragments were cut into small grains. Then the small bone grains were embedded in medical collagen sponge, to form an arch shape, and replanted them to the site of epidural fenestration. CT scan and histological changes were observed at 4, 8 and 12 weeks after operation. **Results** At 8 weeks after operation, CT examination showed that in the experimental group, a thin bone plate was formed by the bone grains. At

[基金项目] 福建省科技厅重点项目(2012Y5005)。

[作者简介] 陈振南(1989-), 男, 研究方向: 脊柱与四肢创伤, E-Mail: 1019128590@qq.com。

[通讯作者] 周忠, 副教授, 博士学位, 硕士生导师, E-Mail: zzhong6689@163.com。

12 weeks after operation, the bone plate became thicker and was connected with the vertebral bone, and with continuous bone trabeculae. The spinal canal and volume were not obviously changed, and no spinal cord compression was observed. The rabbits of control group showed segment lamina defects, a small scar protruding into the spinal canal, and the vertebral canal was not completely reconstructed. **Conclusions** The bone grains replantation can effectively promote bone reconstruction in the laminectomized rabbits, and the formed bone plate can prevent epidural scar from intruding into the spinal canal, and can reduce the postlaminectomy adhesion.

【Key words】 Lumbar laminectomy, Replantation; Bone; Collagen sponge; Rabbit

腰椎间盘突出症、腰椎管狭窄症是脊柱的最常见疾病,占脊柱外科手术的 70%,基于手术方法的改进,及对椎板减压范围的认识,从早期全椎板减压、半椎板减压,到目前公认对脊柱稳定影响最小的开窗减压,使手术疗效明显提高^[1,2],但仍有一部分患者疗效不佳,而硬膜外纤维疤痕黏连是最重要的原因,常导致腰椎术后失败综合征(failed back surgery syndrome, FBSS)^[3,4]。以往对预防硬膜外黏连的实验研究动物和临床病例都集中在针对全椎板切除后,应用阻隔材料上也因其操作复杂、增加损伤、价格昂贵等各种原因在临床上不易开展,本研究专注于目前临床应用最多的术式—椎板开窗术,开展局部预防硬膜外黏连的临床研究,所用材料为开窗减压的自体碎骨粒,并利用医用胶原蛋白海绵为载体,合理搭配运用而达到预期目的,成为一种操作简单,实用高效的临床方法,进而达到进一步提高腰椎手术疗效的目的。本课题选取兔子易于定位的左侧 L5 椎板进行开窗与右侧进行自身对照,通过椎板咬下的自体微小骨粒回植,预期达到形成骨性挡板遮挡硬膜外的黏连目的。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 月龄清洁级健康雄性新西兰兔 18 只,体重(2.2~2.5)kg,购自上海市松花江区松联实验动物饲养场,生产许可证号:SCXK(沪)2012-0011。将 18 只兔随机分为对照组(6 只),实验组(12 只),所有动物按照标准进行管理,采用标准饲料喂养,造模于南京军区福州总医院比较医学科动物实验室,使用许可证号:SYXK(闽 2013-0005)。实验后处置兔符合伦理学标准。

1.2 实验方法

新西兰兔术前腰背部术野备皮,范围在(12×20)cm 左右,实验动物用 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉注射全麻,并术前半小时常规给予头孢唑林钠 50 mg/kg 肌肉注射,预防感染。将兔子俯卧并置于

特制的固定架上,手术野去毛,记号笔定位 L5、L6,用碘伏消毒后,进行铺巾,以 L5 棘突为中心,切开皮肤及筋膜约 2 cm,锐性分离骶棘肌,充分显露左侧 L5 椎板,暴露出 L5 椎板“卵圆形”的小口,用微型小枪钳慢慢咬去椎板、黄韧带,然后沿着椎板边沿向上咬开椎板,进行开窗术,暴露约(0.8×0.3)cm 大小骨窗,将开窗咬下的碎骨粒剪碎,然后将碎骨粒镶嵌于医用胶原蛋白海绵,塑成拱桥形,放置于硬膜外开窗处,缝合切口,术后用碘伏消毒切口,回笼饲养。

1.3 观察指标

1.3.1 影像学检查:术后 4、8、12 周进行手术区域脊柱标本 CT 扫描,同时进行椎管矢状径测量。由两位经验丰富的影像科技师盲法、独立对 2 组兔腰椎实验节段矢状径大小进行测量,综合结果。

1.3.2 组织学观察:进行大体观察后,切取兔腰 5 椎体节段连同硬膜外组织标本,用中性福尔马林固定 2 d,用 10% 硝酸脱钙 48 h,然后进行标本脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、染色,每段横切片 4 张,厚约 3 μm,行 HE 染色,普通光镜观察瘢痕组织在硬膜外的分布及黏连的程度,评级标准参考文献[5],观察微小骨粒骨重建情况。

2 结果

2.1 椎管矢状径比较

实验组与对照组椎管矢状径大小比较(表 1),术后 4 周两组间矢状径大小比较差异无明显意义($P>0.05$),术后 8、12 周两组间矢状径比较均差异有显著性($P<0.05$),实验组椎管矢状径较对照组增宽,且比正常椎管(6.15 ± 0.06 mm)大,表明实验组术后未造成椎管狭窄。

2.2 两组兔椎板硬膜外黏连组织的组织学分级

对兔腰 5 椎体手术节段取材,采用普通光镜观察硬脊膜与硬膜外瘢痕组织的黏连情况,见表 2。由福州总院病理科协助盲法肉眼观察。由表中可以看出,两组术后组织学分级差异有统计学意义($P<0.01$),表明实验组碎骨粒回植形成的骨板可有

表 1 两组实验节段不同时间段椎管矢状径的变化 (mm, $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Changes of the sagittal diameter of vertebral canal in the two groups at 4, 8 and 12 weeks after operation (mm, $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	例数 Number	不同时间段椎管矢状径 Sagittal diameter of vertebral canal at different times		
		术后 4 周	术后 8 周	术后 12 周
		4 / 8 / 12 weeks after operation		
实验组 Experimental	12	6.16 $\pm$ 0.16	6.18 $\pm$ 0.13 *	6.17 $\pm$ 0.03 *
对照组 Control	6	6.15 $\pm$ 0.17	5.86 $\pm$ 0.12	5.88 $\pm$ 0.08

注:与对照组相比, * $P < 0.05$

Note. Experimental group compared with the control group, * $P < 0.05$.

表 2 两组兔椎板硬膜外黏连组织的组织学分级

Tab.2 Histological grade of the epidural adhesion in the two groups

组别 Groups	动物数 Number of rabbits	组织学分级 Histological grade			
		0 级 Grade 0	1 级 Grade 1	2 级 Grade 2	3 级 Grade 3
实验组 Experimental	12	4	6	2	0
对照组 Control	6	0	0	2	4

注:采用 Pearson 卡方检验,实验组与对照组比较, $P = 0.004 < 0.01$, 差异有统计学意义。

Note. Pearson Chi-square test, the experimental group compared with control group, * $P < 0.01$.

效减轻瘢痕形成及硬膜外黏连程度。

2.3 微小骨粒回植区 CT 表现

术后 4 周 CT 显示实验节段微小骨粒位置保持良好,回植区骨密度较低,椎管形态及容积无变化(图 1-②);术后 8 周实验节段椎板开窗处,覆盖的微小骨粒与周围的椎板界限接触紧密,形成菲薄的骨板,骨密度较前增高(图 1-⑤);术后 12 周 CT 显示实验节段微小骨粒与周围椎板骨质相连,形成密度较高、较厚的骨板,椎管形态及容积正常,未见硬膜外组织压迫脊髓(图 1-⑦)。

2.4 回植区黏连组织及骨组织学观察

术后 4 周,开窗处可见大量新生的编织骨,软骨细胞增生明显,伴有少量成纤维细胞(图 1-④);术后 8 周微小骨粒之间连接紧密,微小骨粒与椎板咬除缘之间有大量新生骨小梁生成,形成完整的骨板,结构较薄(图 1-⑥);术后 12 周微小骨粒形成的骨板较厚伴少量软骨纤维骨痂,与周围开窗椎板爬行替代(图 1-⑧)(图 1 见彩插 3)。

3 讨论

3.1 椎板开窗术微小骨粒回植预防硬膜外黏连理论基础。

腰椎间盘突出症及腰椎狭窄症作为脊柱疾患的常见病和多发病,尽管有通过椎间盘镜微创手术,但是传统的椎板减压目前还是解决腰椎间盘突出手术的常见方法。近几十年来,基于对腰椎稳定性的认识及椎板切除范围的探讨,椎板开窗术式是目前较为公认的方法。然而在取得较大成

功的同时,临床上也观察到部分患者效果不良,特别是远期随访效果较差。复习相关文献发现,硬膜外黏连是最主要的原因之一^[3,4]。然而针对椎板切除术后预防黏连的研究中,从黏连的“前源学说”到“后源学说”,再到“三维立体学说”,似乎随着理论提升,临床效果应该会得到广泛运用,但是目前研究主要基于实验的操作,临床运用很少。在硬膜外表面置入遮挡材料方面研究火热,如生物性和非生物性惰性材料中主要包括人体筋膜、皮肤、脂肪颗粒、纤维蛋白凝胶、膨体聚四氟乙烯、透明质酸^[6]、聚乙交酯、几丁糖^[7]、人工骨^[8-10]等,不同材料在体内相容性及毒性研究不确定特点。此外中医药制剂也在运用,如丹参透明质酸凝胶混合物^[11]、当归注射液^[12]、三七透明质酸钠凝胶^[13]等,这些制剂从“三维立体学说”角度阐释防黏连效果良好,可是在临床运用上要考虑腰椎手术常规放置引流管的事实,所以在黏连组织 4~6 周形成之前,这些制剂有可能被引流掉,也可能被人体吸收,起不到预防黏连目的,这也是为什么这类研究较多停留在实验研究阶段的原因之一。同时研究主要是通过全椎板的实验操作,与目前临床常用的椎板开窗术有一定的差距,所以需要更适合临床的材料及操作方式是骨科研究的重点,研究发现自体骨回植^[13]不仅经济,而且效果满意。

本实验选用新西兰兔,以 L5 椎体左侧为手术节段,主要是 L5 椎体在兔子实验操作上易于定位,采用左侧开窗与右侧自身对照,可以有效模仿临床

单侧椎间盘突出单侧减压的方法,不采用自身多节段实验的原因是防止因多处操作造成黏连组织评估的不可控性。实验着眼于开窗咬下的微小骨粒回植硬膜外,建立单侧椎板开窗微小骨粒回植的模型,符合临床单侧椎间盘突出症的手术治疗方法,同时在动物上可以与右侧进行对比,相比多节段自身对照,可能在评估硬膜外黏连上疗效更好。自体微小颗粒骨的成骨是以众多颗粒骨为中心的多点同时成骨,它以三种方式进行成骨,骨传导作用成骨、骨生成作用成骨、骨诱导作用成骨,成骨快,缺陷是不具备良好的支架作用;而医用生物蛋白海绵具有很好的支架作用,并经过一段时间可生物降解,两者各自突出优点,而且互补性很明显;另外椎板切除后本身还具有一定再生作用,在椎板开窗处较小的缺损区域,应会取得比较理想的骨重建效果,重新形成骨性屏障。

3.2 椎板开窗术微小骨粒回植的创新性及意义

实验采用碎骨粒回植是其中的亮点。自 1954 年 Konda 首先介绍了“椎板切除后骨成形术”及国内 1990 年王永惕^[14]率先开展“腰椎板截骨原位回植术”(lumbar laminotomy and replantation, LLR)以来,将完整的椎板切除然后直接回植回去是可行,但是其前提是腰椎严重狭窄的病人或是腰椎肿瘤需要全椎板切除手术才考虑,但是临床操作往往因为脊柱侧弯等原因不能完整椎板切除,同时椎板切除后回植与周围椎板的骨愈合情况不容乐观,因此全椎板切除整体回植的方式目前运用较少。临床研究^[15,16]也通过在硬膜外安放钛网配合螺丝钉固定于椎板切除位置,临床报道效果不错,然而却额外增加患者的费用,同时也有螺钉松动掉入椎管的医源性风险。本实验将在椎板减压过程中常规丢弃的碎骨粒再利用,重塑椎管,不仅可以减少患者的费用,而且提高临床疗效。

应用医用胶原蛋白海绵作为载体将碎骨粒进行塑形是保证回植模型建立的重点。理想的碎骨粒回植应该是植入物区稳定附着,并有血管长入,达到爬行替代的过程。胶原蛋白海绵具有良好的黏附性,可将自体碎骨粒有效的结合,既克服了单纯胶原蛋白海绵的抗压强度不足的缺点,又弥补了自体颗粒骨粘接力弱,易弥散,不易成型等不足。人们的研究热点是将胶原蛋白与自体骨髓^[17]、BMP^[18,19]、HA 等材料复合,不断提高修复材料的机械性能和骨结合能力^[20,21]。研究表明 I 型胶原蛋

白及其交联纤维结构对矿物沉积具有诱导作用,它的表面含有沉积矿物的位点,可有效地引发和控制矿化过程,促进骨形成并诱发至植入物中。因此医用生物蛋白海绵具有很好的支架作用,并经过一段时间可生物降解,与碎骨粒自身成骨特点,而且互补性很明显。随着胶原体内降解达到新生组织与植入物结构真正的融合实现从简单暂时的替代到永久的真正的重建。

3.3 本课题碎骨粒回植的优缺点及注意事项

观察椎板切除术后黏连的实验有鼠、兔、狗、羊的设计,但选择新西兰大白兔主要以下考虑:(1)兔椎板在体外容易定位;(2)兔椎板可以较大程度的椎板开窗操作,同时有良好的植骨床,局部相对稳定,在影像学上可以有效观察。因此新西兰兔是最为合适的,成为众多学者研究植骨与黏连的理想动物模型。近十几年来的研究中绝大实验都以全椎板切除为原型,来观察硬膜外黏连的情况,本实验通过椎板开窗术来观察,符合目前临床的手术方式,得出的实验结果将更有利指导临床。实验中通过微小骨粒回植在椎板开窗处较小的缺损区域,能达到骨重建,重新形成硬脊膜后方骨性屏障,遮挡黏连。模型建立后 4、8、12 周不同时间点矢状径均较正常组(6.15 ± 0.06) mm 大,表明术后未造成椎管狭窄,对马尾神经没有急性压迫和损害。组织学分级也发现实验组黏连程度较对照明显减轻,差距有统计学意义。但是在临床运用上也要非常注意碎骨回植操作,防止因为碎骨粒掉落椎管内造成医源性的椎管狭窄。

目前在椎间盘突出及狭窄中动物实验研究其实还不能完全模仿临床疾病的发病机制,腰椎间盘突出及狭窄主要的原因是髓核退变加上自身应力的作用导致纤维化破裂压迫神经导致,但是兔子主要行动方式是跑、跳,因此发病机制跟临床还是有很大的差距,但是本研究着力碎骨粒成骨这一方面,在新西兰兔腰椎上操作还是符合一定的临床实践的。

腰椎开窗位置进行微小骨粒回植不仅有利于骨重建,而且不会造成椎管内狭窄,操作安全、简单。它具有以下优点:(1)脊柱后方结构有效的重建,恢复了脊柱的完整及稳定性;(2)硬膜外形成骨性挡板可以有效防止“椎板切除膜”的形成,预防硬膜外黏连;(3)椎板开窗咬下的碎骨粒可以重新回收利用,不增加患者额外费用且效果满意;(4)手术

操作简单,临床适用性强,对患者无任何附加损伤。尽管如此,将微小骨粒回植运用到临床时其手术过程中要注意以下几点:(1)腰椎开窗手术一般辅助椎弓根系统,一方面保持脊柱后方的稳定性,一方面减少腰椎间盘突出复发。本实验可为临床提供依据,因此临床在内固定系统的基础进行碎骨粒的回植,相对比较安全,术后要腰围保护下活动,防止患者术后因不正确的体位造成碎骨粒掉入椎管内。(2)医用胶原蛋白海绵溶解时间一般在 2~3 个月,其支撑碎骨粒的强度是否合适也要关注,我们将碎骨粒通过特制钛网筛选,大小在 1~2 mm,均匀镶嵌于作为载体的医用胶原蛋白海绵,覆盖在硬膜外的胶原蛋白至少有 2 层,同时术中要充分止血。因此腰椎开窗术后微小骨粒回植有效促进椎板的再生,形成挡板,为预防腰椎术后硬膜外粘连提供一种新的思路。

参考文献:

- [1] 易红蕾,朱晓东,张伟,等. 椎板开窗减压 Coflex 动态固定治疗中度腰椎管狭窄症的疗效评价 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(10): 834-838.
- [2] 郭继东,侯树勋,李利,等. 椎板开窗髓核摘除术治疗腰椎间盘突出症 10 年以上随访的疗效评价 [J]. 中国骨伤, 2013, 26(1): 24-28.
- [3] Rabb CH. Failed back syndrome and epidural fibrosis [J]. Spine J, 2010, 10(5): 454-455.
- [4] 尹海磊,尹海霞,卢廷胜,等. 预防椎板切除术后硬膜外粘连黏连材料的研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(17): 1456-1458.
- [5] 王立新,曹晓建,张宁. 预防椎板切除术后硬膜外粘连的研究进展 [J]. 医学综述, 2005, 11(1): 72-73.
- [6] Kato T, Haro H, Komori H, et al. Evaluation of hyaluronic acid sheet for the prevention of postlaminectomy adhesions [J]. Spine J, 2005, 5(5): 479-488.
- [7] 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 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(4): 239-241.
- [8] 唐文胜,蒋电明,安洪,等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺复合人工椎板预防脊柱后路术后椎管内瘢痕粘连的实验研究 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(11): 675-678.
- [9] 唐欣,杨述华,李宝兴,等. 同种异体骨板覆盖预防硬膜外粘连黏连的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(8): 816-819.
- [10] 肖智博,吕富荣,吕发金,等. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺复合材料预防椎板切除后椎管狭窄粘连的初步影像研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(4): 489-493.
- [11] 张晨阳,张岩,梁文锴. 丹参透明质酸凝胶混合物预防椎板切除术后硬膜外粘连的实验研究 [J]. 解放军医药杂志, 2013, 25(3): 15-18.
- [12] 杨利学,邵松涛,王官林,等. 当归注射液预防椎板切除术后硬膜外粘连的实验研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(4): 4-7.
- [13] 周卫,刘灿,孔焕宇,等. 三七透明质酸钠凝胶对家兔硬膜外瘢痕中 Cox-2, TGF- β 1 及 CTGF 表达的影响 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2011, 21(5): 384-389.
- [14] 王永惕,陈增海. 腰椎管扩大成形术—椎板截骨再植与棘突植骨的临床应用 [J]. 中华骨科杂志, 1995, 5(10): 644-647.
- [15] 钟锐,林慰光,林本丹,等. 钛网椎管重建对硬膜外瘢痕粘连形成影响的实验研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2013, 21(5): 502-506.
- [16] 邱小波,潘显明,邓少林,等. 特制钛网椎板预防犬椎板切除术后硬脊膜粘连 [J]. 暨南大学学报:自然科学与医学版, 2011, 32(6): 650-653.
- [17] Dong YH, Chen XJ, Wang MH, et al. Construction of artificial laminae of the vertebral arch using bone marrow mesenchymal stem cells transplanted in collagen sponge [J]. Spine, 2012, 37(8): 648-653.
- [18] Cook SD, Dalton JE, Tan ME, et al. In vivo evaluation of recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1) implants as a bone graft substitute for spinal fusion [J]. Spine, 1994, 19: 1655-1663.
- [19] Boden SD, Moskovitz PA, Morone MA. Video-assisted lateral intertransverse process arthrodesis: validation of a new minimally invasive lumbar spinal fusion technique in the rabbit and nonhuman primate (rhesus) models [J]. Spine, 1996, 21: 2689-2697.
- [20] Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material: A randomized clinical trial [J]. J Bone Joint Surg, 1997, 79A(4): 49-502.
- [21] Tenhuisen KS, Martin RI, Klimkiewicz M, et al. Formation and properties of a synthetic bone composite: hydroxyapatite-collagen [J]. J Biomed Mater Res, 1995, 29(7): 803-810.

[修回日期]2015-08-17