

壳聚糖-羧甲基纤维素膜的制备及预防肠粘连的实验研究

肖海军,侯春林*,官士兵,刘亚平

(第二军医大学长征医院骨科,上海 200003)

[摘要] **目的:**制备壳聚糖-羧甲基纤维素膜并探讨其预防肠粘连的效果。**方法:**将壳聚糖和羧甲基纤维素按 1:1 质量比混合,加入戊二醛、硫酸铝铵双交联,甘油增塑后烘干成膜;测定膜的拉伸强度及断裂伸长率并行电镜扫描。48 只 SD 大鼠随机分成 3 组($n=16$),2 组擦伤其回肠浆膜,制成肠粘连模型,于损伤部位分别包裹壳聚糖-羧甲基纤维素膜、壳聚糖膜;另一组不作处理作为对照组。术后第 14 天观察各组肠粘连情况。**结果:**膜拉伸强度约为 20 MPa,断裂伸长率约为 65%;扫描电镜(SEM)显示膜表面结构呈相互交错的纤维状,表面有不规则的孔状结构。壳聚糖-羧甲基纤维素膜组和壳聚糖膜组的粘连程度显著低于对照组($P<0.01$)。光镜下见壳聚糖-羧甲基纤维素膜、壳聚糖膜组炎症反应轻微,纤维增生不显著;对照组粘连处纤维组织增生活跃,局部炎症反应明显。透射电镜下见壳聚糖-羧甲基纤维素膜组上皮细胞修复较壳聚糖膜组好,成纤维细胞增生不明显,对照组上皮细胞增生较慢,成纤维细胞分泌胶原功能活跃。**结论:**壳聚糖-羧甲基纤维素膜适于术中缝合需要,预防肠粘连效果显著,性能优于壳聚糖膜。

[关键词] 壳聚糖;羧甲基纤维素;肠;粘连

[中图分类号] R 619 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)07-0755-05

Preparation and evaluation of chitosan-carboxymethylcellulose membrane for prevention of postoperative intestinal adhesion: an experimental study

XIAO Hai-jun, HOU Chun-lin*, GUAN Shi-bing, LIU Ya-ping (Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare and evaluate the effectiveness of chitosan-carboxymethylcellulose membrane in preventing postoperative intestinal adhesion. **Methods:** Chitosan-carboxymethylcellulose membrane was prepared with 1:1 ratio of chitosan and carboxymethylcellulose. Glutaraldehyde and ammonium aluminium sulfate were used for cross-linkage, glycerin for enhancing plasticity; and then the product was dried. The membrane was observed with scanning electron microscopy (SEM) and its tensile strength and breaking elongation were measured. Forty-eight SD rats with ileum injury were randomly divided into A, B and C groups ($n=16$). During operation, the injury in group A was treated with chitosan-carboxymethylcellulose membrane, in group B with chitosan membrane, and in group C without treatment (control group). The adhesion was observed on the 14th postoperative day. **Results:** The tensile strength of chitosan-carboxymethylcellulose membrane was 20 MPa and the breaking elongation was 65%. SEM showed that the morphology of the membrane had crossed fibroid structures and irregular pores. The severity of adhesion in group A and B was significantly lower than that in group C ($P<0.01$). Milder inflammatory changes and less fibrous proliferation were found in group A and B compared with those in group C. Epithelia rehabilitated better in group A than in group B, and the proliferation of fibroblast was not significant under electron microscope. In group C, epithelia rehabilitated slowly and fibroblasts excreted collagen actively. **Conclusion:** Chitosan-carboxymethylcellulose membrane is feasible for suturing during operation and is effective in reducing intestinal adhesion and it is superior to chitosan membrane.

[KEY WORDS] chitosan; carboxymethylcellulose; intestines; adhesion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(7): 755-759]

在施行腹腔、心血管、脊柱、关节及肌腱等部位的外科手术后,普遍存在手术性粘连问题。术后粘连不仅会影响手术效果,还可导致严重的术后并发症,甚至会使一个成功手术归于失败,因此防止术后粘连一直是研究者努力解决的问题。目前国际上采用较多的是“短期屏障”法,即手术后在容易发生创面粘连的部位植入隔离材料,以防止组织或器官的粘连。早期采用的聚四氟乙烯、硅橡胶等因不能降

解,需二次手术取出,已逐渐被可降解吸收的隔离材料所取代。聚乳酸虽为可降解材料,但其缺陷在于降解产物呈酸性,局部蓄积易产生轻微无菌性炎症,

[基金项目] 国家自然科学基金(30170956)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30170956)。

[作者简介] 肖海军,博士生,主治医师。

E-mail: xiaohaijun89@163.com

* Corresponding author. E-mail: chunlin-hou@yahoo.com

预防粘连仅为物理屏障作用^[1]。壳聚糖作为天然可降解吸收的生物材料,由于其独特的生物相容性和降解性目前已被广泛用于医药领域。许多研究^[2~4]表明,壳聚糖不但能有效预防粘连,还可促进正常上皮细胞的生长。壳聚糖可制成不同的剂型,如凝胶、溶液、海绵状以及薄膜等,但其缺点是溶液、凝胶易流动,不易在局部形成较高浓度,而单纯应用壳聚糖制成海绵状及薄膜机械强度及韧性不够。为此,我们首次尝试将壳聚糖和具有良好成膜性、可降解吸收的防粘连材料羧甲基纤维素混合改性,制备能满足临床需要可缝合的壳聚糖复合膜,并观察其抗粘连效果,为进一步产业化提供实验依据及理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 壳聚糖-羧甲基纤维素膜的制备,将硫酸铝铵固体加入蒸馏水中,在50~60℃加热下使其溶解,配成0.15%浓度的硫酸铝铵溶液。将壳聚糖固体和羧甲基纤维素固体按质量比1:1用电子分析天平称取。先将称取的羧甲基纤维素固体缓慢加入硫酸铝铵溶液中,在室温下用磁力搅拌器快速搅拌(20 r/min)至溶解,再缓慢加入称取的壳聚糖固体继续搅拌至完全溶解配成1.5%的溶液。然后加入甘油(终浓度为0.8%)搅拌,再加入戊二醛(终浓度为0.003%)充分搅拌均匀。将溶液放入真空干燥箱中脱泡(真空压力达0.1 MPa)至细小气泡脱尽为止。按每盒10 ml标准加入5 cm×5 cm的不锈钢盒中,最后放入隔水式恒温干燥箱中在60~70℃下干燥成膜。用医用铝铂袋包装密封, γ 射线⁶⁰Co(2.5 kGy, 5 h)照射消毒备用。壳聚糖膜又名粘停宁,可降解防术后粘连膜,烟台万利医用品有限公司生产(产品批号:41208122407021)。

1.2 壳聚糖-羧甲基纤维素膜拉伸强度及断裂伸长率的测定 膜宽20 mm,夹持长度40 mm,拉伸速率为20 mm/min,通过电子拉力测试机测量。按下面公式计算:拉伸强度= $P/(b \cdot d)$,其中 P 为膜断裂时负荷(N), b 为膜宽度(mm), d 为膜厚度(mm);断裂伸长率= $(G-G_0)/G_0 \times 100\%$,其中 G_0 为膜初始有效长度(mm); G 为膜断裂时测量线之间的长度(mm)。

1.3 膜扫描电镜(SEM)检测 用SEM S-250型扫描电子显微镜观察壳聚糖-羧甲基纤维素膜的表面结构形态及膜的共混相容性,所用样品尺寸为1.5 cm×1.5 cm,膜的表面真空喷金后拍照,加速电压

为15 kV。

1.4 实验动物及分组 成年SD大鼠48只,由第二军医大学实验动物中心提供,体质量250~280 g,雌雄不限,随机分为3组,每组16只。

1.5 实验方法 为避免麻醉药物及穿刺对腹腔实验结果的干扰,全部动物均用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)股后肌肉注射麻醉。动物麻醉后仰卧位固定于平板上,剪除腹毛,脱毛剂脱毛,消毒术野,铺巾。在无菌操作下取下腹正中切口,长约3 cm,打开腹腔后找出回盲部将其提至切口外,然后距回盲部近端2 cm处用干纱布反复轻轻擦拭回肠前侧面的浆膜面,使浆膜受损(约0.5 cm×3 cm)至表面有针尖状出血点为止,但不要造成穿孔。经上述处理后分别在2组大鼠创面覆盖一张1 cm×4 cm的壳聚糖-羧甲基纤维素膜或壳聚糖膜,用5-0可吸收缝合线将边缘固定2~3针;剩下一组大鼠创面暴露不作任何处理作为对照组。然后将肠送回腹腔,用3-0的可吸收缝合线缝合逐层关腹。术后动物禁食12 h,分笼饲养。术后连续3 d每天肌注庆大霉素4 U预防感染。14 d后以同样的麻醉方法开腹检验、取材。

1.6 各项指标的观察

1.6.1 一般情况 比较2种膜在手术中的可操作性、体内残留情况,动物饲养存活情况。

1.6.2 肠粘连情况 为能更好的观察腹腔粘连情况,再次腹腔切口时包含原正中切口在内的、以底朝下的“U”型切口切开腹腔,然后将腹壁组织瓣向上掀起暴露腹腔。肠粘连程度参照 Philips 5级分级标准^[5],肠粘连程度为:0级,完全无粘连,回肠浆膜面修复良好;I级,回肠与周围组织少量粘连,疏松易分,无渗血,经处理的浆膜面同周围的肠壁、系膜、腹壁间的粘连面积占经处理的浆膜面面积百分比 $\leq 25\%$;II级,回肠与周围组织轻到中度粘连,肠管可呈“U”形,分离时局部有渗血,上述部位间的粘连百分比为26%~50%;III级,肠管与周围组织广泛粘连,较难分离,无肠梗阻,上述部位间的粘连百分比为51%~75%;IV级,肠管与周围组织紧密粘连成团,分离困难,引起肠梗阻,上述部位间的粘连百分比为76%~100%。

1.6.3 光镜观察 每组随机各取3只大鼠的创面部位肠管,用10%中性甲醛溶液固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋等步骤制成5 μ m石蜡切片。常规H-E染色,观察浆膜创面修复情况。

1.6.4 电镜观察 每组随机各取3只大鼠的创面部位肠管,用2.5%戊二醛溶液预固定,1%锇酸后固定。经系列丙酮脱水,环氧树脂Epon812浸透、包埋、聚合。定位后行连续超薄切片,醋酸铀枸橼酸铅电子染色,PHILIPS CM-120透射电子显微镜下观察浆膜面细胞超微结构。

1.7 统计学处理 数据用SPSS 11.0统计软件包处理,采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 壳聚糖-羧甲基纤维素膜各项指标观察 拉伸强度约为20 MPa,断裂伸长率约为65%。扫描电镜显示:膜较致密,没有发生相分离,膜表面结构呈相互交错的纤维状,表面有不规则的孔状结构(图1)。

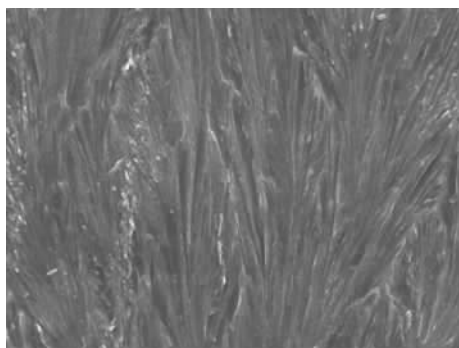


图1 壳聚糖-羧甲基纤维素膜表面扫描电镜图

Fig 1 Chitosan-carboxymethylcellulose membrane by SEM ($\times 2\ 000$)

2.2 术后一般情况 壳聚糖膜包裹肠壁后,虽然能缝合,但缝合线切割易拉豁,放置20~30 min左右就变成凝胶状态;而壳聚糖-羧甲基纤维素膜包裹肠壁后紧密黏附与浆膜创面,至手术完毕仍保持完整形态,而且能用可吸收缝合线缝合。术后第3天壳聚糖膜组动物死亡1只,死因为麻痹性肠梗阻;术后第9天对照组死亡1只,死因为广泛肠粘连导致绞窄性肠梗阻。术后第14天开腹观察术区,壳聚糖膜和壳聚糖-羧甲基纤维素膜形态已完全消失。

2.3 术后肠粘连评分 壳聚糖-羧甲基纤维素膜组、壳聚糖膜组的肠粘连主要属0~II级,对照组的粘连主要为III~IV级,壳聚糖-羧甲基纤维素膜组、壳聚糖膜组粘连程度明显低于对照组($P < 0.01$)。壳聚糖-羧甲基纤维素膜组粘连程度大于I级的有2只,占12.5%,壳聚糖膜组I级以上有5只,占

33.3%,壳聚糖-羧甲基纤维素膜组的粘连程度略轻于壳聚糖膜组。详见表1。

表1 三组动物肠粘连分级情况

Tab 1 Results of intestinal adhesion in 3 groups

Group	N	(n)				
		0	I	II	III	IV
CCM	16	6	8	2	0	0
CM	15	4	6	4	1	0
Control	15	0	0	2	5	8

CCM: Chitosan-carboxymethylcellulose membrane; CM: Chitosan membrane

2.4 光镜观察结果 壳聚糖-羧甲基纤维素膜组:浆膜层创面已大部分修复或完全修复,上皮细胞连续,少量成纤维细胞,胶原纤维疏松,组织炎症反应轻微(图2A);壳聚糖膜组:浆膜层创面已大部分修复,成纤维细胞轻度增生,周围有胶原纤维,组织炎症反应轻微(图2B);对照组:浆膜面未修复,粘连处纤维组织增生活跃,多量成纤维细胞及大量胶原纤维,局部炎症反应明显(图2C)。

2.5 透射电镜观察结果 壳聚糖-羧甲基纤维素膜组:浆膜层创面有上皮细胞覆盖,细胞扁平,修复的上皮细胞接近正常,胶原分泌不活跃(图3A,取材自壳聚糖-羧甲基纤维素膜组I级粘连的大鼠小肠);壳聚糖膜组:浆膜层创面有上皮细胞覆盖,细胞扁平,部分细胞表面微绒毛缺失,基膜不完整,局部浆膜下成分如胶原纤维等暴露于最上面(图3B,取材自壳聚糖膜组I级粘连的大鼠小肠);对照组:浆膜层创面上皮细胞完全消失,成纤维细胞和间质处于最表层,其周围有大量胶原纤维,成纤维细胞呈多角形,核不规则,粗面内质网增生扩张,高尔基体发达(图3C,取材自对照组III级粘连的大鼠小肠)。

3 讨论

肠粘连主要是由于手术创伤、局部缺血、异物存留、细菌感染、出血等导致的炎性反应。炎症引起血管通透性增加,纤维蛋白原渗出,形成纤维蛋白沉积,炎性细胞和受伤的间皮细胞产生纤溶酶原激活抑制物,导致纤维蛋白溶解作用降低,另外成纤维细胞增生,分泌胶原纤维,多种因素造成永久性纤维粘连^[6]。而纤维蛋白原渗出增加和间皮细胞在腹膜粘连形成中可能扮演重要作用,这些病理改变多发生在腹腔术后10 d内。因此,有学者认为,肠粘连预

防的重点应放在尽量减少纤维蛋白原渗出和促进腹膜间皮的生长时期^[7]。

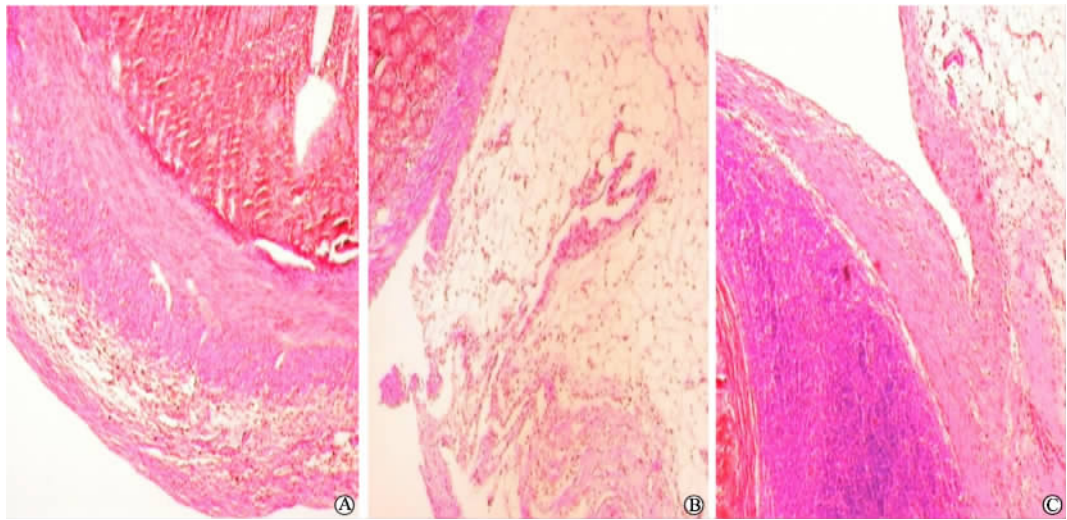


图2 各组光镜观察结果

Fig 2 Results of 3 groups under microscope(H-E, ×40)

A: The wounded serosa was uninterrupted and almost completely renovated. There were a few fibroblasts with loose collagen and mild inflammatory; B: Most wounded serosa was renovated, fibroblasts proliferated a little; and there was a small amount of collagen with mild inflammatory; C: The wounded serosa was not renovated. There were a large number of fibroblasts in adhesive parts with a great amount of collagen. The inflammatory was obvious

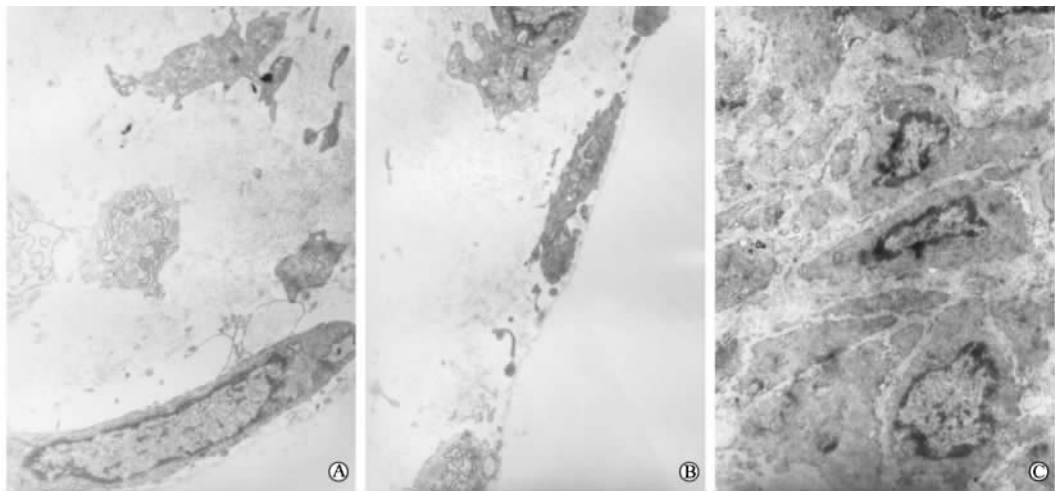


图3 各组电镜观察结果

Fig 3 Results of 3 groups under electron microscope(×6 000)

A: The wounded serosa was covered by flat epithelia. Fibroblast was not active; B: The wounded serosa was covered by flat epithelia absent of microvillus and fundus membrane. Part of collagen were exposed on the surface of wounded serosa; C: The wounded serosa was covered by polygonal fibroblast, without epithelia. Fibroblast was full of cytoplasm, rough endoplasmic reticulum and golgiapparatus, surrounded by large amount of collagen

壳聚糖具有抗感染、止血、抑制成纤维细胞生长及机械隔离的作用,并能在体内自动降解,其作为预防腹膜粘连的生物材料进行开发利用已被逐渐重视,并在动物实验及临床中证实了壳聚糖凝胶具有抗腹膜粘连的作用^[2,8]。但是将壳聚糖凝胶涂布于腹腔创面后,凝胶可发生流动而迅速扩散于整个腹

腔内,随后被降解吸收或术后引流排出,而不易在局部形成较高的浓度,从而使其发挥作用的时间缩短,作用强度减弱。将壳聚糖制成薄膜用于临床虽然取得了良好的效果^[9],但从本实验的结果来看,壳聚糖膜放入腹腔后变成凝胶时间太快,膜形态只能维持20~30 min,一方面不利于手术操作,另一方面也很

难发挥膜的作用。为了解决上述问题,本实验将壳聚糖和羧甲基纤维素混合经戊二醛、硫酸铝铵双交联制成的生物膜有如下优点:(1)具有一定的机械强度。经检测拉伸强度可达 20 MPa,扫描电镜显示膜较致密,没有发生相分离,膜表面结构呈相互交错的纤维状,表明膜的强度得到了明显的加强,实验中手术操作以及缝合也验证了其效果。(2)马建标等^[10]采用流延法制备壳聚糖膜,发现加入甘油能够改善膜的亲水性、水通透性以及顺应性。我们在膜的制备过程中也加入甘油来增加膜的顺应性。经检测壳聚糖-羧甲基纤维素膜断裂伸长率 65%,实验中观察发现膜在湿态下能黏附于损伤的肠壁并随肠管的蠕动表现出良好的顺应性。(3)膜变成凝胶时间较壳聚糖膜延长,能够在创面局部形成较高浓度,增加作用强度。(4)创面完全愈合后能够很快的降解吸收,不会干扰腹腔内的正常生理环境。

羧甲基纤维素同样也具有有良好的生物相容性以及可降解吸收的特性,并有预防粘连及不干扰创面愈合的作用^[11,12]。有实验证实,羧甲基纤维素在腹腔中发挥抗粘连的作用是由于具有类似于体液,如滑膜液的黏滞性,在上皮细胞再生期间可起到“漂浮浴”或“水化漂浮作用”,阻隔浆膜面与腹膜面从而防止粘连的形成;削弱成纤维细胞的活性或增殖,防止纤维蛋白沉积于受损的浆膜面;并防止纤溶酶原从创伤表面的除去,增加其活化作用的有效性^[12]。因此,羧甲基纤维素加入到壳聚糖中制成的生物膜,可充分发挥两种生物材料不同防粘连机制的互补作用。

由本实验结果可见,壳聚糖和羧甲基纤维素制成的生物膜有显著的预防粘连作用,术后肠粘连主要属 0~II 级,在统计学上与壳聚糖膜作用无明显差异。但壳聚糖-羧甲基纤维素膜组粘连程度大于 I 级的只有 2 只,占 12.5%,壳聚糖膜组 I 级以上有 5 只,占 33.3%,可见壳聚糖-羧甲基纤维素膜组的粘连程度比壳聚糖膜组略轻。从光镜及超微结构

观察来看,壳聚糖-羧甲基纤维素生物膜能促使损伤的肠壁浆膜层上皮细胞覆盖,创面修复略好于壳聚糖膜,这可能与壳聚糖-羧甲基纤维素膜中壳聚糖能促进上皮细胞生长、抑制成纤维细胞生长的生物学特性以及壳聚糖在局部保持较高浓度有关。

[参考文献]

- [1] 费起礼,孔令震,李兰萍,等. 聚乳酸薄膜预防肌腱粘连的研究[J]. 中国修复重建外科杂志,1992,6:65-67.
- [2] Diamond MP, Luciano A, Johns DA, et al. Reduction of post-operative adhesions by N, O-carboxymethylchitosan: a pilot study[J]. Fertil Steril, 2003, 80: 631-636.
- [3] 汤朝晖,侯春林. 几丁糖和透明质酸钠对人表皮角质细胞增殖的影响[J]. 中华创伤杂志,2003,19:368.
- [4] 陈百成,郭 斌,赵振栓,等. 壳聚糖膜置入预防膝关节术后粘连的实验研究[J]. 中华骨科杂志,2002,22:747-749.
- [5] Phillips RK, Dudley HA. The effect of tetracycline lavage and trauma on visceral and parietal peritoneal ultrastructure and adhesion formation[J]. Br J Surg, 1984, 71: 537-539.
- [6] 杨代志. 腹膜粘连的原因、发生机制和防治[J]. 中华腹部疾病杂志,2005,5:72-73.
- [7] 刘俊英,曾广仙,郑勇斌,等. 创伤性肠粘连形成过程中腹膜组织变化的形态学观察[J]. 中国体视学与图像分析,2003, 8: 97-100.
- [8] 周卸来,茹金泉,章志量,等. 壳聚糖凝胶对大鼠腹膜粘连的预防作用[J]. 肝胆胰外科杂志,2003,15:94-96.
- [9] 郭 军,阿不都海力力,王浩勇. 粘停宁对结核性腹膜炎并肠梗阻手术后肠粘连的预防[J]. 中国误诊学杂志,2005,5:493-494.
- [10] 马建标,王红军,何炳林,等. 壳聚糖膜的制备及其对人、大鼠皮肤成纤维细胞的相容性[J]. 天津工业大学学报,2001,20:1-5.
- [11] Yelimlies B, Alponat A, Cubukcu A, et al. Carboxymethylcellulose coated visceral face of polypropylene mesh prevents adhesion without impairing wound healing in incisional hernia model in rats[J]. Hernia, 2003, 7:130-133.
- [12] Sousa AA, Petroianu A, Trapiello Neto V, et al. Effect of sodium carboxymethylcellulose and methylprednisolone on the healing of jejunal anastomoses in rats[J]. Braz J Med Biol Res, 2001,34: 519-523.

[收稿日期] 2006-01-04

[修回日期] 2006-04-27

[本文编辑] 贾泽军