基础研究 文章编号：0253-3626（2011）09-1057-03

壳聚糖聚乳酸膜的兔结肠瘘一期修复实验研究

曾志华[1]，陈 康[2]，李 瑛[2]，谢良宪[2]

（1. 重庆医科大学中医药学院针灸教研室，重庆 400050；2. 解放军三二四医院普外科，重庆 400020）

【摘 要】目的：研究壳聚糖聚乳酸膜（Chitosan-polylactic acid film，CPAF）对兔结肠瘘的一期治疗效果。方法：制备聚乳酸膜（Polylactic acid film，PAF）和 CPAF。新西兰大耳白兔 24 只，均分 3 组予以不同的处理（PAF 组、CPAF 组、对照组），结肠造瘘后荷包缝合，其中 PAF 组予以 PAF 覆盖缝合，CPAF 组予以 CPAF 覆盖缝合，对照组不作其他处理，平行观察，20 d 后处死动物作免疫组化检测转移生长因子 β_1（Transforming growth factor，TGF-β_1）。结果：PAF 和 CPAF 的物理特性无统计学差异。PAF 组和 CPAF组动物全部存活，对照组动物 7 d 内死亡。TGF-β1 免疫组化染色 CPAF 组明显少于 PAF 组和对照组，PAF 组明显少于对照组，结果有统计学差异。CPAF 组对 TGF-β_1 的抑制作用强于 PAF 组和对照组，结果差异显著。结论：CPAF 对兔结肠瘘的一期治疗效果优于 PAF。

【关键词】聚乳酸；壳聚糖；结肠瘘

【中国图书分类法分类号】R602 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-04

Research on effect of chitosan-polylactic acid film on rabbit colonic fistula for primary repair

ZENG Zhi-hua[1], CHEN Kang[2], LI Ying[2], XIE Liang-xian[2]

(1. Institue for Acupuncture, School of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of General Surgery, PLA 324 Hospital)

【Abstract】*Objective*: To compare therapeutic effects of chitosan-polylactic acid film on rabbit colonic fistula. *Methods*: Polylactic acid film(PAF) and chitosan-polylactic acid film(CPAF) were prepared.The rabbits were divided equally into three groups for different treatments (PAF group, CPAF group, control group), purse string suture following colon stoma.After such disposition, PAF group and CPAF group covered the suture with PAF and CPAF respectively, while control group did nothing.Rabbits were parallel observed and detected with immunohistochemical staining for TGF-β_1 after 20 days. *Results*: Physical characteristic had no statistics difference between PAF and CPAF.Rabbits in PAF and CPAF group all survived, but in control group were dead within 7 days.Immunohistochemical staining for TGF-β_1 had obviously smaller amount in CPAF than in PAF and control group, and PAF also smaller than control group.Statistics difference was observed.CPAF had more inhibition in TGF-β_1 than the other two group and the results were significant difference. *Conclusion*: CPAF had better therapeutic efficacy than PAF on colonic fistula.

【Key words】polylactic acid; chitosan; colonic

野战外伤、机械压迫、肿瘤、感染等可导致结肠瘘的形成。结肠瘘的污染严重，不能进行一期修复，目前的治疗方法主要是清理污染创面、引流、腹壁造瘘，待 3 个月后再做二期吻合[1,2]，能否进行结肠瘘的一期治疗是临床迫切需要解决的问题。

壳聚糖能抗菌、抗感染、抑制粘连，但是作用时间短；聚乳酸防止粘连效果好，但是抗感染效果差。目前没有一种单一的材料具有良好的长时间的抗菌、抗感染、抑制粘连作用，所以我们设计了壳聚糖聚乳酸（Chitosan-polylactic acid film，CPAF）复合膜，将其用于动物兔结肠瘘的一期修补，研究其和聚乳酸膜（Polylactic acid film，PAF）的疗效是否有差异。腹腔粘连带形成中成纤维细胞起重要作用，其中转移生长因子 β_1（Transforming growth factor，TGF-β_1）是成纤维细胞增殖的最重要介质，本课题研究不同生物膜对 TGF-β_1 的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

24 只清洁级新西兰大耳白兔（第三军医大学动物所提供）。同为雄性，体质量（2.5 ± 0.3）kg，月龄 12~16 月。PAF、CPAF 自制，其两者的物理性能指标委托维森公司进行检测，达到药典要求。KQ-400KD 型高功率数控超声波清洗器（昆

作者介绍：曾志华（1978-），女，讲师，硕士，研究方向：消化道疾病的新型治疗药物和材料。

通信作者：黄学宽，男，副教授，Email：xkhuang2002@163.com。

基金项目：成都军区资助项目（编号：MB07006）。

山超声仪器有限公司），CS101-3E 电热鼓风干燥箱（重庆万达仪器有限公司）。

1.2 分组

将实验动物随机分成 1、2、3 组，每组 8 只，同时喂养，平行观察。1 组：兔腹腔造瘘后荷包缝合，外覆盖 PAF（PAF组）；2 组：兔腹腔造瘘后荷包缝合，外覆盖 CPAF（CPAF 组）；3 组：兔单纯开腹造瘘后荷包缝合为对照组（C 组）。所有手术暴露时间控制在 0.5 h。

1.3 方法

1.3.1 自行设计制备 PAF 和 CPAF

（1）配料：将医用级聚乳酸配料，加入乙酸乙酯溶解成为 10%溶解液，确保混合液将聚乳酸配料完全溶解，没有残留聚乳酸配料。

（2）混合：用在室温下用磁力搅拌器快速搅拌 5 min（20 r/min）至完全溶解。将混合液用超声震荡混匀排气 30 min。

（3）制膜：将排气后混合液倒入直径 5 cm 玻璃皿模具中制成薄膜。

（4）聚合：将制成的薄膜放入电热鼓风干燥箱内在 60℃下加热 4 h，使之聚合成膜。

（5）消毒：将每张膜取出装入密封的包装袋内 Co^{60} 消毒装入盒内。

壳聚糖混合液的制备：将壳聚糖粉用 1%醋酸溶液溶解，在室温下用磁力搅拌器快速搅拌（20 r/min）至溶解配成1.5%的溶液，过滤后滤液用 NaOH 溶液调 pH=8，将析出的壳聚糖过滤，挤压水分，用蒸馏水冲洗至中性，真空干燥，得精制白色壳聚糖产品，并将其制成精细粉末。用磁力搅拌器快速搅拌（20 r/min）将壳聚糖粉末和聚乳酸溶液充分搅拌 5 min 使混合均匀，其余步骤同前。

1.3.2 结肠瘘动物模型疗效对比实验 速眠新麻醉，兔腹部备皮，开腹暴露结肠，造成 1 cm 结肠瘘口，清洁瘘口常规荷包缝合。其中 PAF 组在荷包缝合外面，予以 1 cm×1 cm×1 cm 聚乳酸膜覆盖，关闭腹腔。CPAF 组在荷包缝合外面，予以 1 cm×1 cm×1 cm CPAF 覆盖，关闭腹腔。C 组开腹造瘘，常规荷包缝合，关闭腹腔。3 组动物普通喂食，平行观察，腹部伤口每天清洁 2 次。20 d 后空气栓塞处死动物，取处理的结肠瘘部位作冰冻切片（Leica CM1900），免疫组化染色观察 TGF-β1。

1.4 观测指标

1.4.1 组织的大体和组织学观察 标本采集后作冰冻切片，采用 HE 染色，光镜观察组织学形态。

1.4.2 免疫组织化学 组织取材后，置入 4%多聚甲醛固定液，4℃固定 3 d，然后取出采用 Leica 1900 型恒温冷冻切片机进行冰冻切片。免疫组织化学染色：TGF-β_1（1:200）多克隆抗体（武汉，博士德公司），采用 SABC 法染色。TGF-β_1 一抗为兔源，二抗为小鼠抗兔。具体步骤如下：

（1）冰冻切片用 0.01 mol/L PBS 漂洗；

（2）0.3%H_2O_2/甲醇室温下孵育，0.3%Triton X-100 PBS，室温 30 min；

（3）一抗，于湿盒内 37℃孵育 2 h 后，转入 4℃，36 h；

（4）生物素化二抗（1:100），37℃，2 h；

（5）SABC 37℃，1 h，DAB 显色；

（6）苏木精染色，脱水，透明，中性树脂封片。

每批均设阴性对照：以 0.01 mol/L PBS 代替一抗，染色结果呈阴性。免疫组化切片的图像采集使用电子成像采集系统采集。

1.4.3 定量图像分析 采用 Leica Qwin（德国）图像分析系统，检测 PAF、CPAF 及 C 组免疫组化切片。在×40 倍物镜下，免疫组化染色根据阳性细胞显色强度，每例切片随机选择测定区域，观测 9 个视野，测定出目标区域的灰度，并求出实际染色灰度的均值；同时取 9 个视野测定出同一玻片空白区域的灰度的均值，用实际染色灰度的均值-空白区域灰度均值作统计分析。

1.5 统计学处理

结果用$\bar{x}\pm s$表示，2 组比较采用 *Student's t* 检验，多组比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用 LSD（方差齐）或 *Tamhane's T2*（方差不齐）检验，检验以 $P<0.05$ 为具有统计学意义。采用 SPSS17.0 统计软件进行处理。

2 结 果

2.1 膜物理性能的测定

制备的 PAF 和 CPAF 物理性能如下（表 1）。

表 1 PAF 和 CPAF 的物理性能的比较结果

检测项目	PAF	CPAF
厚度（mm）	2.21 ± 0.25	2.37 ± 0.33
水蒸气透过率 g/(m²·h)	3.27 ± 1.26	2.78 ± 1.19
延伸率	45.24 ± 1.79	46.43 ± 2.51
抗拉强度（kg/cm²）	7.93 ± 0.21	8.02 ± 0.17

注：*Student's t* 检验结果 PAF 和 CPAF 物理性能：厚度、水蒸气透过率、延伸率、抗拉强度均无统计学差异，$P>0.05$

2.2 动物术后情况的观察

动物模型观察期间第 1 天动物摄食精神差，活动减少，常卧笼中，大便较稀不成形，切口发红，体重下降。第 3~5 天动物摄食精神好转，活动增加，大便成形稍稀。C 组因为结肠水肿、伤口感染形成腹腔瘘，精神、食欲差，大便稀不成形，4~7 d 陆续死亡，在死亡后立即取标本。其余组动物第 10 天所有动物摄食精神好，活动基本正常，大便成形，大部分切口发红变淡，体重较术后增加。第 20 天剩余组动物摄食精神好，活动正常，大便成形，切口发红变淡，切口颜色基本正常，体重较术后增加，体重增加接近原重量，少数动物体重较术前增加。PAF 和 CPAF 组动物无死亡，无炎症表现，说明 PAF 和 CPAF 修补后没有造成腹腔瘘。处死动物后打开腹腔发现：PAF 组和 CAPF 组结肠无明显水肿，没有局部瘘和肠梗阻。其中 PAF 组有部分膜出现破碎，破口处形成局部粘连，CPAF 组膜形态完整光滑，没有粘连，C 组部分瘘口部分开放，腹腔污染严重，肠壁水肿局部坏死变色，局部形成粘连。

2.3 免疫组织化学

C 组中显示 TGF-β_1 阳性表达细胞数量较多，（图 1A）；PAF组TGF-β1阳性表达细胞数量减少（图1B）；CPAF组TGF-β_1阳性表达细胞偶见（图 1C）。箭头示阳性染色。