论著

文章编号:1000-5404(2007)09-0752-04

可取出式食管支架预防烧伤后瘢痕狭窄的实验研究

周景海,蒋耀光,王如文,范士志 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042)

提 要:目的 探讨可取出式食管支架(retrievable esophageal stent,RES)置入烧伤家犬食管内4个月后能否顺利取出及对食管烧伤后瘢痕狭窄的预防作用。**方法** 24只家犬根据随机数字表法分为对照组(未烧伤)、烧伤组(烧伤后不给予任何治疗)及治疗组(伤后2周置入RES,4个月后拔管),治疗组又根据拔管后观察时间分为治疗Ⅰ组(拔管后立即处死)及治疗Ⅱ组(拔管后2个月处死)。测定离体食管的狭窄指数,观察其显微及超微结构,比色法检测食管组织羟脯氨酸含量,分别采用原位杂交及ELISA法测定食管组织Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA表达及蛋白水平,检测食管顺应性及生物力学特性,RT-PCR及Western blot分别测定TGF-β1、Smad3、Smad7的mRNA表达及蛋白水平。**结果** RES置入4个月后能顺利取出。烧伤组伤后3周发生吞咽困难,仅1只家犬存活至实验完毕,治疗Ⅰ、Ⅱ组实验中无死亡,RES置入后进食无异常,处死前体质量与实验前无显著性差异。与烧伤组相比,治疗Ⅰ、Ⅱ组食管狭窄指数、组织羟脯氨酸水平和Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA表达及蛋白水平均显著减低($P<0.05$);食管顺应性及弹性明显增加,组织学检查胶原纤维较细,排列较规则;食管组织TGF-β1、Smad3 mRNA表达及蛋白水平下调,而Smad7升高($P<0.01$)。**结论** RES置入烧伤家犬食管内4个月能顺利取出,取法简便。RES能有效预防食管烧伤后瘢痕狭窄形成。食管组织TGF-β1、Smad3增加及Smad7降低可能是RES预防烧伤瘢痕狭窄的分子机制之一。

关键词:可取出式食管支架;食管烧伤;狭窄;预防;犬

中图法分类号:R571.101;R644.06;R655.4 **文献标识码**:A

Prevention of esophageal stricture with retrievable esophageal stent after corrosive esophageal burns in dogs

ZHOU Jing-hai, JIANG Yao-guang, WANG Ru-wen, FAN Shi-zhi (Thoracic and Cardiovascular Surgery Research Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To probe whether retrievable esophageal stent (RES) can be removed successfully 4 months after placement and prevent forming esophageal stricture in dogs with corrosive esophageal burns. **Methods** Twenty-four dogs were randomly divided into control (without esophageal burns), burn (without treatment for esophageal burns) and treatment group (RES was placed at 2 weeks after esophageal burns and removed 4 months later). The treatment group was further divided into RES Ⅰ (dogs being killed immediately after RES withdrawal) and RES Ⅱ (dogs being killed 2 months after RES removal). Stricture index was measured and microscopic and ultrastructural features were observed in the harvested esophagus. Hydroxyproline quantities by colorimetry, type Ⅰ and Ⅲ collagen mRNA expression by *in situ* hybridization and their protein levels by ELISA were detected in esophageal tissues. The esophageal compliance and biomechanics were also examined in dogs. TGF-β1, Smad3, Smad7 mRNA expression by RT-PCR and their protein levels by Western blotting were investigated. **Results** One dog died of aspiration less than 24 h after esophageal burns in the burn group, and others developed progressive dysphagia since 3 weeks after injury, only one dog survived. No animal deaths in the groups RES Ⅰ and Ⅱ through the experiment. All dogs could intake regular diet following RES replacement and no significant changes was in their weight before and after the experiment. In comparison with the burn group, stricture index, type Ⅰ ānd Ⅲ collagen mRNA and protein levels, and hydroxyproline quantities decreased significantly in the groups RES Ⅰ and Ⅱ ($P<0.05$), while the esophageal compliance and elasticity among the biomechanics improved dramatically; Histopathological study revealed that collagen

作者简介:周景海(1965-),男,河北省广平县人,博士,主治医师,主要从事食管疾病的外科治疗方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68757241, E-mail: zhzhlu1993@yahoo.com.cn

通讯作者:蒋耀光,电话:(023)68757261

收稿日期:2006-12-12;修回日期:2007-01-05

diameter was thinner and its orientation tended toward regular and parallel pattern; TGF-β1 and Smad3 mRNA and protein levels increased but Smad7 decreased significantly in esophageal tissues in the groups RES Ⅰ and Ⅱ ($P<0.01$). **Conclusion** RES can be extracted successfully and conveniently 4 months after placement and prevent developing esophageal stenosis in dogs with corrosive esophageal burns. The changes of TGF-β1, Smad3 and Smad7 mRNA and protein levels might relate to the preventive role of RES.

Key words: retrievable esophageal stent; esophageal burn; stricture; prevention; dog

目前预防食管烧伤后瘢痕狭窄的措施中，食管腔内置管有明显的疗效，但现有的食管导管多为硅胶管，有一定缺陷[1,2]。镍钛记忆合金食管支架已广泛用于缓解晚期食管癌症状，但由于支架置入后不易取出，限制了其在食管良性疾病中的应用[3]。我们与北京有研亿金新材料股份有限公司联合设计研制出可取出式镍钛记忆合金食管支架（retrievable esophageal stent，RES），研究其置入家犬食管 4 个月后能否顺利取出，并探讨其对食管烧伤后瘢痕狭窄的预防作用。

1　材料与方法

1.1　RES 的设计、置入及取出方法

1.1.1　RES 的设计　　RES 长 16 cm，内径 2 cm，双面带膜，超过支架上缘 1 cm，能在体内维持 4 个月以上。直径约 0.5 cm 镍钛记忆合金线环绕支架上缘 1 周后余长为 50 cm 作为牵引线。RES 末端附有抗反流活瓣（图 1）。

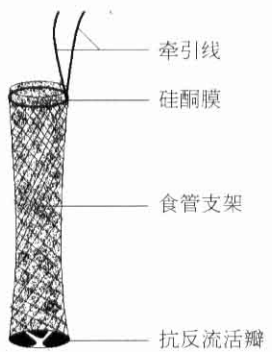


图 1　RES 示意图

1.1.2　RES 的置入　　RES 套入支架置入器内，置入器沿引导钢丝插至下胸段食管，释放支架。牵引线套入一根 10F 小导管，自咽部引出固定于颈部皮肤。

1.1.3　RES 的取出　　16F Foley 导管插至 RES 上缘，家犬头部抬高 45°，注入冰盐水 100 ml。将支架牵引线穿过食管镜后上提，使支架上口缩小，同时下推食管镜，将支架拖入食管镜内，取出 RES。

1.2　实验动物

健康成年家犬 24 只，购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心，雌雄不限，体质量 12～18 kg，根据随机数字表法分为对照组、烧伤组、治疗Ⅰ组及治疗Ⅱ组。①烧伤组（$n=6$）：速眠新Ⅱ 0.2 ml/kg 肌注全麻成功后，将双根 Foley 导管插至胸段食管，导管间距为 10 cm，气囊充气以固定导管。经近侧导管注入 10% NaOH 溶液 10 ml，1 min 后抽出灌注碱液，20 ml 生理盐水冲洗 3 次。补液 3 d 后恢复进食，存活动物 4.5 个月后处死。②对照组（$n=6$）：将 10% NaOH 改为生理盐水，余同烧伤组。③治疗Ⅰ组（$n=6$）：同烧伤组致伤家犬，伤后 2 周置入 RES，4 个月后取出支架，处死实验动物。④治疗Ⅱ组（$n=6$）：同治疗Ⅰ组取出支架，观察 2 个月后处死家犬。

1.3　实验方法

1.3.1　取材　　实验动物晚期死亡或处死后，取出胸段食管，检测食管顺应性后，纵形剖开食管，测量管壁最大厚度，墨染拓片测出最窄处周径，推算出管腔内径，计算出狭窄指数（食管壁厚度/内径）。切取烧伤组及治疗Ⅱ组 1 mm×1 mm×2 mm 食管组织 3 块，2% 戊二醛固定，观察其超微结构变化。使用的容器、刀具等均经高压消毒后用 1/10 000 DEPC 清洗，切取 1.5 cm×1.2 cm×1.2 cm 食管组织，迅速投入含有 1/1 000 DEPC 的 4% 多聚甲醛溶液内，常规脱水，二甲苯透明，石蜡包埋。再取 1～2 cm^3 组织块，用经 250 ℃高温消毒去 RNA 酶的锡铂纸包裹后液氮冷冻，移入 -70 ℃冰箱冻存，以行分子生物学检查。余食管组织亦于 -70 ℃冰箱内冻存。

1.3.2　病理学观察　　食管组织 HE 染色，用光镜及透射电镜观察。

1.3.3　食管组织羟脯氨酸含量测定　　采用比色法，试剂盒购自南京建成生物工程有限公司，根据说明书进行操作。

1.3.4　食管组织Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 表达　　采用原位杂交检测，试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。结果判断以细胞质内呈现棕黄色的颗粒为阳性，观察记录 3 个高倍视野细胞总数及阳性细胞数，计算出阳性细胞占细胞总数的百分比，用半定量的方法表示Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 的表达。

1.3.5　食管组织Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白的水平　　ELISA 法测定，试剂盒购自大连泛邦化工技术开发有限公司。

1.3.6　食管组织生物力学检测　　采用组织拉伸法测定。

1.3.7　食管组织转化生长因子-β1（transforming growth factor-beta1，TGF-β1）、Smad3 及 Smad7 mRNA 表达　　RT-PCR 测定，以 β-actin 为内参照进行半定量分析。

1.3.8　食管组织 TGF-β1、Smad3 及 Smad7 蛋白含量测定　　采用 Western blot 法，以对照组为参照进行半定量分析。

1.4　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析。

2　结果

2.1　实验动物的一般情况

烧伤组中 1 只家犬致伤 24 h 内因误吸引起急性呼吸功能衰竭死亡，余 5 只伤后第 3 周出现吞咽困难，第 4 周发生反吐，其中 3 只伤后 2 个月死亡，另 1 只 3 个月死亡，仅 1 只存活至伤后 4.5 个月处死。治疗Ⅰ、Ⅱ组家犬 RES 置入后第 1 周食欲下

降，第2周恢复正常，直至4个月后处死前进食无明显异常。实验后烧伤组体质量不仅低于实验前，而且低于对照组及治疗组，差别非常显著。治疗组体质量与实验前无显著性差异。

2.2 组织病理学观察

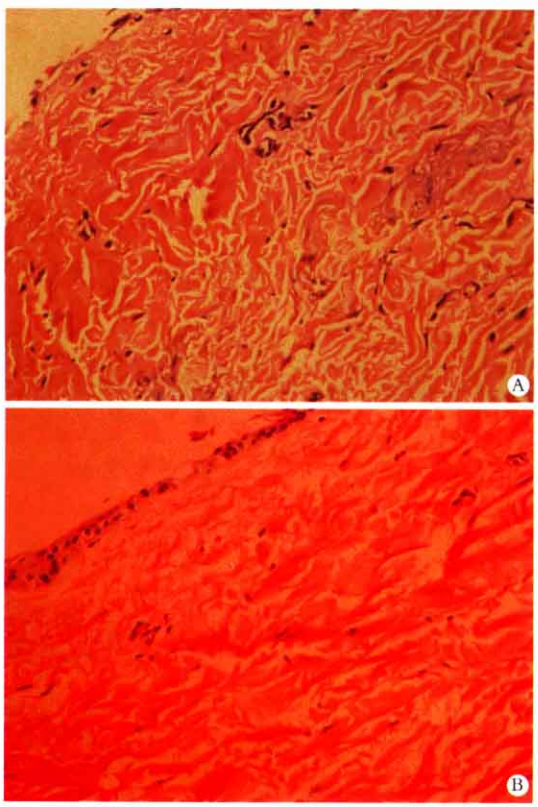
2.2.1 食管大体病理观察 将RES取出后，检查导管无明显血迹及食管组织。与对照组及治疗Ⅰ、Ⅱ组相比，烧伤组离体食管管腔缩小，管壁增厚，狭窄指数升高，差别均非常显著（$P<0.01$）。治疗Ⅰ、Ⅱ组与对照组狭窄指数无显著性差异（$P>0.05$）（表1）。

表1 实验后各组动物的狭窄指数变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	食管管径（mm）	管壁厚度（mm）	狭窄指数
对照组	6	20.2±1.5[a]	1.5±0.6[a]	0.075±0.028[a]
烧伤组	5	11.6±1.1	4.6±0.9	0.401±0.093
治疗Ⅰ组	6	20.0±1.3[a]	1.3±0.5[a]	0.066±0.025[a]
治疗Ⅱ组	6	21.0±0.9[a]	1.5±0.6[a]	0.071±0.025[a]

a：$P<0.01$，与烧伤组比较

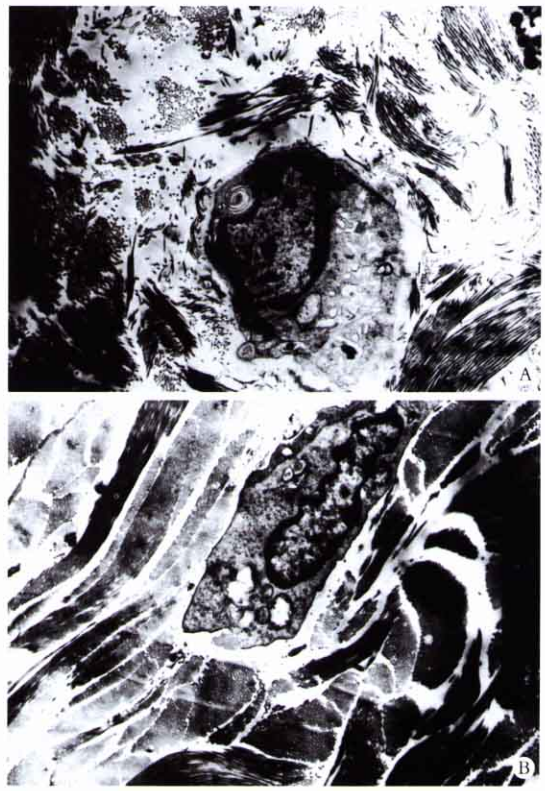
2.2.2 食管组织显微结构 烧伤组食管组织含大量粗大的胶原纤维，排列紊乱，胶原纤维之间有较多的成纤维细胞，仅见少量炎症细胞。治疗Ⅱ组上皮层仅2～5层，可见扁平鳞状上皮，胶原纤维密度降低，代之以较细的纤维组织，排列方向与上皮趋向平行，成纤维细胞数量减少（图2）。治疗Ⅰ组与Ⅱ组表现相近。



A：烧伤组；B：治疗Ⅱ组

图2 家犬食管组织的显微结构（HE×200）

2.2.3 食管组织超微结构 透射电镜下烧伤组食管组织内成纤维细胞数量较多，细胞质内含大量扩张粗面内质网及较多高尔基复合体；可见肌成纤维细胞；胶原纤维粗大，致密，直径约100 nm，排列紊乱，有些呈结节或旋涡状排列。治疗Ⅱ组成纤维细胞数量较少，细胞质内细胞器及糖原颗粒明显减少；未见肌成纤维细胞；胶原纤维较细，直径40～80 nm，平均60 nm，排列较规则，多呈细束状平行排列（图3）。



A：烧伤组；B：治疗Ⅱ组

图3 家犬食管组织的超微结构（TEM×4 200）

2.3 食管组织羟脯氨酸水平

对照组、烧伤组、治疗Ⅰ组、治疗Ⅱ组食管组织羟脯氨酸水平分别为（0.374±0.079）、（0.946±0.210）、（0.405±0.117）、（0.427±0.135）μg/mg，烧伤组明显高于其他各组（$P<0.05$）。治疗Ⅰ、Ⅱ组与对照组无显著性差异（$P>0.05$）。

2.4 食管组织Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达及蛋白含量

烧伤组食管组织Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA表达及蛋白含量明显高于对照组及治疗Ⅰ、Ⅱ组，差别非常显著（$P<0.01$），后3组之间无显著性差异（$P>0.05$）（表2）。

表2 各组家犬食管组织Ⅰ型、Ⅲ型胶原mRNA表达及蛋白含量的测定（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	mRNA阳性表达率		蛋白含量	
		Ⅰ型胶原（%）	Ⅲ型胶原（%）	Ⅰ型胶原（mmol/L）	Ⅲ型胶原（nmol/L）
对照组	6	11.2±1.5[a]	7.3±1.6[a]	7.3±1.9[a]	169.9±71.2[ab]
烧伤组	5	40.6±4.4	24.6±4.4	22.2±2.2	422.9±101.3
治疗Ⅰ组	6	11.2±1.8[a]	9.0±2.1[a]	7.7±1.3[a]	162.7±47.1[ab]
治疗Ⅱ组	6	14.2±2.3[a]	8.2±1.5[a]	7.6±2.0[a]	202.7±88.7[a]

a：$P<0.01$，与烧伤组比较；b：$P<0.01$，与治疗Ⅱ组比较

2.5 食管组织顺应性及生物力学检测

对照组、烧伤组、治疗Ⅰ组、治疗Ⅱ组食管组织、弹性模量、屈服强度、抗拉强度、断裂强度及定伸应力均明显高于其他各组（$P<0.05$），而定应力伸长率及断裂伸长率显著减低（$P<0.05$），治疗Ⅰ、

Ⅱ组与对照组各项生物力学指标无显著性差别($P>0.05$)。

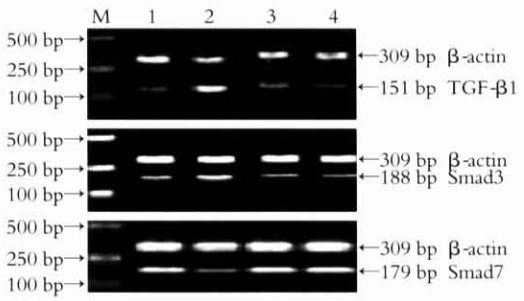
2.6　食管组织 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 表达及蛋白含量

烧伤组 TGF-β1、Smad3 mRNA 表达及蛋白含量升高，Smad7 mRNA 及蛋白含量降低，与其他各组差别均非常显著(表3，图4、5)。比较了 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 及蛋白的相关性，结果 TGF-β1 与 Smad3 呈显著正相关($r=0.887$，$r=0.838$，$P<0.01$)，而与 Smad7 呈明显的负相关，Smad3 亦与 Smad7 呈显著负相关($r=-0.845$，$r=-0.944$，$P<0.01$)。

表3　食管组织 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 表达及蛋白含量($\bar{x}\pm s$)

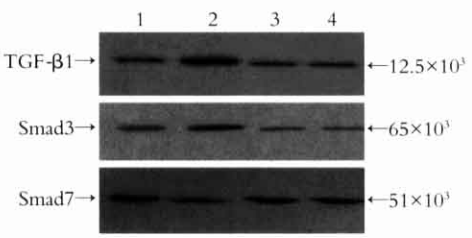
组别	n	mRNA 表达			蛋白含量		
		TGF-β1	Smad3	Smad7	TGF-β1	Smad3	Smad7
对照组	6	0.41±0.1[a]	0.43±0.1[a]	0.63±0.0[a]	1.00±0.0[a]	1.00±0.0[a]	1.00±0.0[a]
烧伤组	5	1.28±0.1	1.05±0.2	0.28±0.0	1.98±0.1	2.61±0.5	0.31±0.1
治疗Ⅰ组	6	0.55±0.2[a]	0.51±0.1[a]	0.91±0.3[a]	0.84±0.2[a]	1.04±0.1[a]	1.00±0.1[a]
治疗Ⅱ组	6	0.43±0.1[a]	0.44±0.1[a]	0.86±0.1[a]	0.85±0.2[a]	0.97±0.1[a]	1.01±0.1[a]

mRNA 及蛋白含量分别以 β-actin 及对照组为参照；a：$P<0.01$，与烧伤组比较



M：DNA 标准；1：对照组；2：烧伤组；3：治疗Ⅰ组；4：治疗Ⅱ组

图4　RT-PCR 检测家犬食管组织 TGF-β1、Smad3 及 Smad7 mRNA 表达



1：对照组；2：烧伤组；3：治疗Ⅰ组；4：治疗Ⅱ组

图5　Western blot 检测家犬食管组织 TGF-β1、Smad3 及 Smad7 的蛋白水平

3　讨论

现有的金属支架不能用于食管烧伤后瘢痕狭窄的预防，这与下列因素有关：①导管需留置管 4～6 个月才能有效预防狭窄形成[4,5]。②金属支架在食管内能引起大量纤维组织增生，易发生置管后再狭窄，其中以支架上、下端最为明显。③支架长期留置食管腔内不仅易发生再狭窄，而且引起食管穿孔、大出血等致命并发症[6]。④虽然 Song 等[7]设计了专门用于取食管支架的金属钩，也只能取出置入后不超过 2 个月的支架。

RES 有以下特点：①为避免纤维组织自支架网眼长入，RES 双面带膜，适当增加了硅酮膜厚度，使之在食管内留置最少 4 个月而仍能保持完好。②硅酮膜超过支架上缘 1 cm，以阻止纤维组织自上缘长入。③采用抗反流支架不仅预防胃食管反流，亦能一定程度的阻止纤维结缔组织自下缘长入。④支架上缘套入长镍钛合金丝，在取支架时上提，能使支架上缘收缩，易于将镍钛记忆合金支架回收。⑤牵引线在食管内部分套入小导管内，避免了对周围组织的损伤。本研究结果显示，RES 置入烧伤后食管 4 个月后能顺利取出，方法简便，检查支架完整，未见血迹及食管组织。治疗Ⅰ、Ⅱ组食管狭窄指数、羟脯氨酸含量、Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 表达及蛋白水平均显著降低，食管组织顺应性及弹性增强，病理组织学检查成纤维细胞数减少，胶原纤维细且密度降低，排列较规则，表明烧伤家犬置入 RES 后，食管组织胶原纤维的合成及沉积减少，排列方向趋向一致，因而即使拔管后仍能有效预防食管烧伤后瘢痕狭窄的形成。

TGF-β 是创伤修复调节重要的生物活性物质，也是引起瘢痕形成、组织纤维化主要细胞因子，其信号传导蛋白 Smad3、Smad7 与 TGF-β 创伤修复功能密切相关[8]。TGF-β 能刺激Ⅰ、Ⅲ型胶原基因表达及蛋白合成，Smad3 与组织纤维化密切相关，而 Smad7 能抑制组织胶原蛋白沉积[9]。本研究结果显示，食管烧伤置入 RES 后 TGF-β1、Smad3 mRNA 及蛋白水平明显降低，而 Smad7 mRNA 及蛋白水平显著升高，这可能是 RES 预防烧伤后瘢痕狭窄的分子机制之一。

参考文献：

[1] Zhou J H, Jiang Y G, Wang R W, *et al*. Management of corrosive esophageal burns in 149 cases [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 130(2): 449-455.

[2] Reyes H M, Hill J L. Modification of the experimental stent technique for esophageal burns[J]. J Surg Res, 1976, 20(2): 65-70.

[3] Ackroyd R, Watson D I, Devitt P G, *et al*. Expandable metallic stents should not be used in the treatment of benign esophageal strictures[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(4): 484-487.

[4] Ramasamy K, Gumaste V V. Corrosive ingestion in adults[J]. J Clin Gastroenterol, 2003, 37(2): 119-124.

[5] 周景海，蒋耀光，王如文，等. 食管腔内置管预防食管腐蚀伤后瘢痕狭窄[J]. 中国胸心血管外科临床杂志，2005，12(2)：79-81.

[6] Lee J G, Hsu R, Leung J W. Are self-expanding metal mesh stents useful in the treatment of benign esophageal stenoses and fistulas? An experience of four cases[J]. Am J Gastroenterol, 2000, 95(8): 1920-1925.

[7] Song H Y, Jung H Y, Park S I, *et al*. Covered retrievable expandable nitinol stents in patients with benign esophageal strictures: initial experience[J]. Radiology, 2000, 217(2): 551-557.

[8] Attisano L, Wrana J L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily[J]. Science, 2002, 296(5573): 1646-1647.

[9] Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing[J]. J Dermatol Sci, 2004, 35(2): 83-92.

（编辑　邓强庭）