论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201410027

可吸收缝线缝扎兔胆总管致良性狭窄模型的建立

邓世康,王 滔,邹 浩,张小文 (650101 昆明,昆明医科大学第二附属医院肝胆胰外科二病区)

[摘要] **目的** 利用可吸收缝线缝扎部分胆总管建立兔损伤性胆管狭窄动物模型。**方法** 24只新西兰兔按完全随机方法分为3组:正常对照组、假手术对照组和手术组。手术组用6-0可吸收缝线缝扎1/2胆总管,手术当天和术后15、30 d检验血清肝功能指标,取狭窄段胆总管行HE染色、Masson三色染色检测胶原纤维和肌纤维的表达,免疫组化DAB法检测狭窄段胆管组织Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达。**结果** 手术组动物直接胆红素、间接胆红素、丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶在30 d均高于术前($P<0.01$)。术中观察胆总管损伤处明显狭窄,手术组病理切片中,胶原纤维大量增生形成瘢痕组织,Ⅰ、Ⅲ型胶原随着时间推移表达强度逐渐增强。**结论** 可吸收缝线缝扎法可有效建立兔胆总管良性狭窄模型。

[关键词] 动物模型;兔;良性;胆总管;狭窄
[中图法分类号] R-322; R657.46 [文献标志码] A

Development of a rabbit model for benign stricture by partial common bile duct ligation with absorbable surgical suture

Deng Shikang, Wang Tao, Zou Hao, Zhang Xiaowen (Second Ward, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan Province, 650101, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a rabbit model for benign stricture by partial ligating common bile duct through absorbable surgical suture. **Methods** Twenty-four New Zealand rabbits were randomly divided into 3 groups: normal control group, sham-operation group and surgery group. The benign stricture of the common bile duct was achieved in the rabbits by partial ligation (50%) with VICRYL Rapide suture 6-0. Levels of liver function indicators were measured in 15 and 30 d after surgery. After a stricture was identified, the animal was killed and common bile duct samples were obtained for histopathological evaluation. The expression of collagen type Ⅰ and collagen type Ⅲ was measured by immunohistochemical assay. **Results** Serum levels of direct bilirubin (DBIL), indirect bilirubin (IDBIL), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were significantly higher than before surgery in the surgery group ($P<0.01$). The lesion of common bile duct was significantly stricture. Hematoxylin-eosin staining revealed that excess collagen deposition and formation of scar tissue were observed in the surgery group than the control group. The expression of collagen type Ⅰ and Ⅲ in the stricture bile ducts was enhanced with the time elapse in the surgery group. **Conclusion** Partial ligation of the common bile duct with the absorbable surgical suture is effect in the establishment of an animal model of benign common bile duct stricture.

[**Key words**] animal model; rabbits; benign; common bile duct; stricture

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81260084) and the Joint Special Funds of Yunnan Provincial Department of Science and Technology-Kunming Medical University (2011FB162). Corresponding author: Zhang Xiaowen, E-mail:zhangxiaowenlu@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81260084);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金(2011FB162)
[通信作者] 张小文,E-mail:zhangxiaowenlu@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150319.0952.016.html(2015-03-19)

长期胆管结石、反复化脓性胆管炎、胆道寄生虫感染、慢性胰腺炎、慢性十二指肠溃疡、外伤、医源性胆管损伤等,可形成胆管瘢痕性挛缩和瘢痕狭窄,即良性胆管瘢痕(benign bile duct scar, BBS)形成[1]。若狭窄

未解除,其后果将导致肝实质损害、门脉高压、胆汁淤积性肝硬化等,甚至危及生命。本研究利用可吸收缝线缝扎部分胆总管建立兔损伤性胆管狭窄动物模型,通过肝功能的测定和组织病理学变化验证模型制备可靠,为胆管良性狭窄的防治研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

健康新西兰大白兔24只,由昆明总医院动物实验中心提供。雌雄各半,体质量(2.8±0.2) kg。3%戊巴比妥钠、手术器械、手术台(由昆明总医院动物实验中心提供),青霉素购自华北制药股份有限公司。6-0可吸收缝线购自美国强生。Ⅰ型胶原抗体购自Proteintech公司。Ⅲ型胶原抗体购自Santa Cruz公司,UltraSensitive™ S-P超敏试剂盒(兔)和Masson三色染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 24只新西兰兔按完全随机方法分为正常对照组($n=6$),假手术对照组($n=6$)和手术组($n=12$),其中手术15 d($n=6$),手术30 d($n=6$)。

1.2.2 模型制备 动物术前禁食、禁饮6 h。3%戊巴比妥钠1 mL/kg耳缘静脉注射麻醉,仰卧位固定于手术台,常规备皮、消毒、铺巾。经上腹(剑突下缘)正中切口进腹,将十二指肠上部翻起后可见胆总管汇合部,离汇合部0.5 cm处钝性分离胆总管约2 cm,用6-0可吸收带针缝线自游离胆总管(距汇合部约1 cm)中心进针后结扎1/2胆总管(图1A、B、C),检查缝扎处无胆漏后逐层关腹,切口消毒后纱布包扎。假手术对照组动物仅开关腹,正常对照组则不做任何处理。术后连续3 d肌内注射青霉素80万U/只,常规饲养。

1.2.3 动物采血 手术当天(正常对照组和假手术对照组)和术后15、30 d(手术组),自耳缘静脉采血,检验血清肝功能指标:直接胆红素(DBIL)、间接胆红素(IDBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)。

1.2.4 标本采集、病理检查、免疫组织染色、Masson三色染色 各时间点,以空气注射处死动物,切取狭窄部胆总管,正常对照组及假手术对照组切取同部位胆总管,4%多聚甲醛固定。常规石蜡包埋,4 μm厚连续切片,行HE染色、免疫组化DAB法检测Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达、Masson三色染色检测胶原纤维的表达。倒置显微镜下观察并记录。

1.2.5 免疫组化评分标准 染色结果半定量分析:以染色强度结合阳性细胞数百分比综合计分。染色强度以多数细胞呈现的染色特性(染色深浅需与背景着色相对比)计分:无着色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分。阳性细胞百分比即10个视野(每400×高倍视野计数100个细胞)的阳性细胞平均数:0~5%为0分,>5%~25%为1分,>25%~50%为2分,>50%~75%为3分,>75%为4分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积:0分为阴性(-),1~4分为弱阳性(+),5~8分为中度阳性(++),9~12分为强阳性(+++)。

1.3 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件进行t检验、χ^2检验及Spearman相关分析。

2 结果

本实验中,由于假手术对照组没有损伤到胆管,其肝功能和其他指标与正常对照组是一致的,两组同为对照组。因此,结果中采用对照组代替正常对照组和假手术对照组。

2.1 术中观察

对照组胆总管直径1.5~2 mm(图1A)。手术组15 d,胆总管缝扎处轻度狭窄(图1D),狭窄处质软,缝线已完全被吸收;手术组30 d,缝扎处胆总管严重狭窄,质地变硬(图1E)。

2.2 血清肝功能检测结果

手术组术后15 d和30 d,DBIL、IDBIL、ALT和AST均显著高于对照组($P<0.01$),术后30 d明显高于术后15 d,差异均有统计学意义($P<0.01$,表1)。

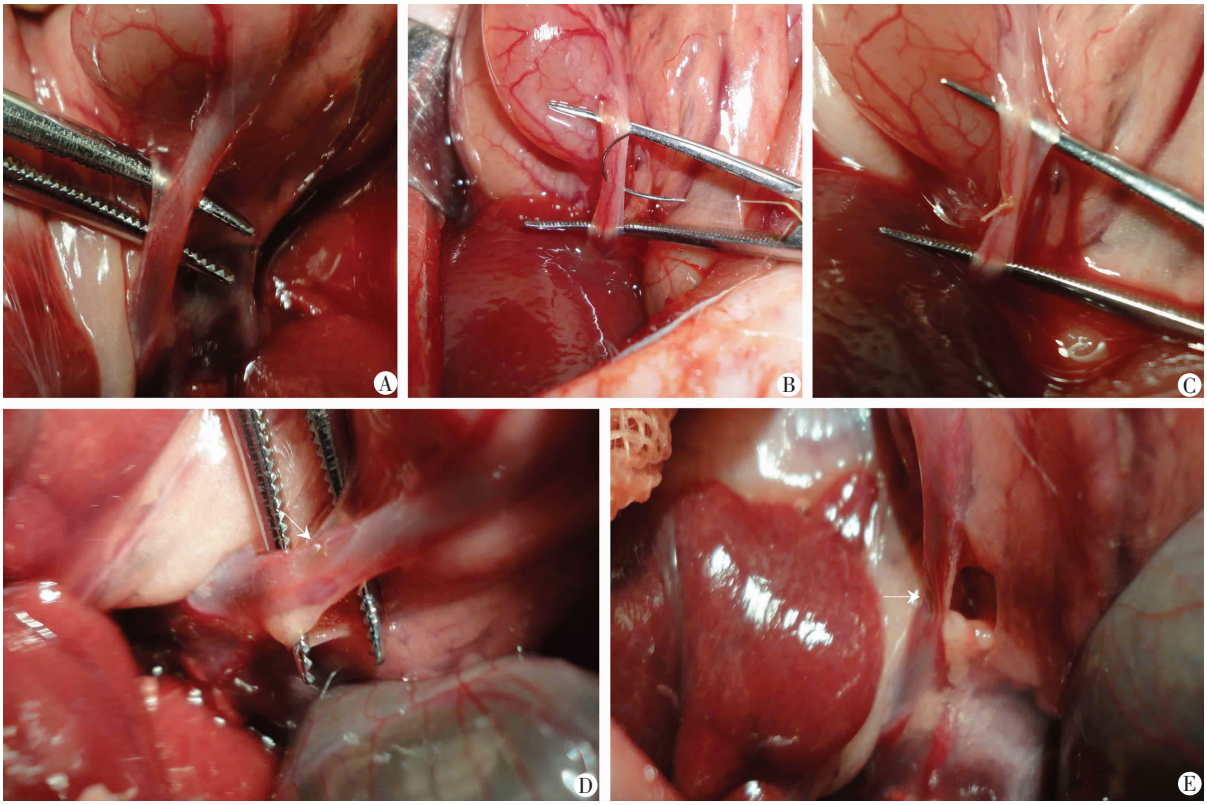
表1 手术及对照组兔肝功能测定结果($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	DBIL(μmol/L)	IDBIL(μmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
对照组	0.36±0.13	0.38±0.10	32.78±7.78	34.23±11.57
手术组15 d	2.40±1.27[a]	2.22±1.53[a]	50.14±14.81[a]	48.12±13.13[a]
手术组30 d	4.50±2.32[ab]	3.93±2.34[ab]	85.40±31.05[ab]	66.25±28.56[ab]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与手术组15 d比较

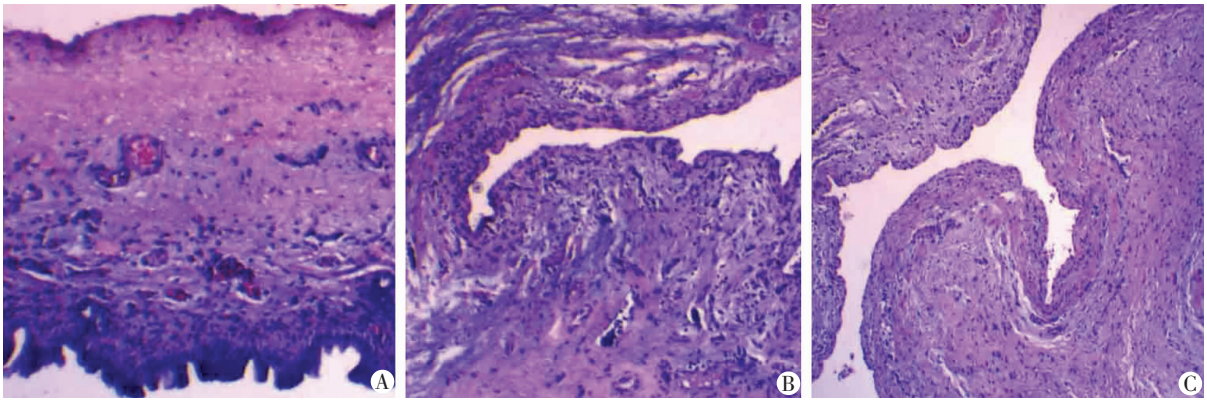
2.3 病理学观察

2.3.1 HE染色观察 对照组胆总管壁薄,厚度均一,黏膜为单层柱状上皮,排列整齐,黏膜下腺腔结构完整,细胞形态呈圆形或近似圆形,肌层薄,外膜平滑完整(图2A)。手术组15 d,胆管壁不规则增厚,上皮脱落,黏膜下腺体结构被破坏,增生的纤维组织中含有大量呈梭形的肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB),大量炎性细胞浸润(图2B);手术组30 d时,胆管壁明显增厚,黏膜上皮大片坏死脱落甚至消失,长梭形纤维细胞及广泛增生的胶原纤维束突入管腔,炎性细胞浸润,外膜不完整(图2C)。



A:正常胆总管;B: 6-0 可吸收带针缝线从胆总管中心穿出;C:结扎一半的胆总管;D: 手术组 15 d 胆 ↑:示总管缝扎处轻度狭窄;E: 手术组 30 d ↑:示缝扎处胆总管严重狭窄

图1 可吸收缝线缝扎兔胆总管致良性狭窄模型手术解剖观察



A:对照组;B:手术组 15 d;C:手术组 30 d

图2 对照组及模型组兔胆总管壁病理学观察 (HE ×40)

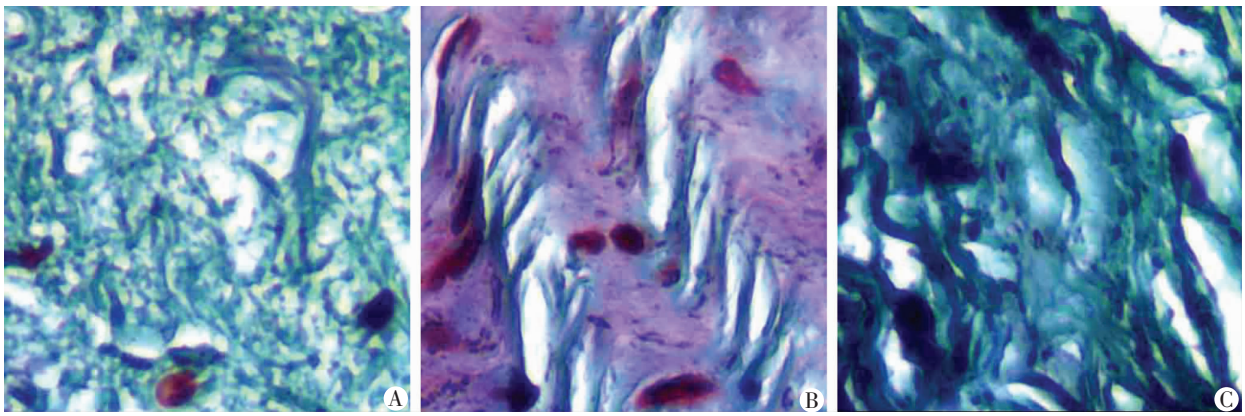
2.3.2 Masson 三色染色 Masson 染色中,胶原纤维呈绿色,胞质、肌纤维和红细胞呈红色,胞核呈蓝褐色。对照组纤维组织着色浅,较少的平滑肌层着色亦浅。手术组 15 d,增生的胶原纤维和肌纤维组织着色变深,增生的胶原纤维为绿色,肌纤维组织为红色,可见胞质深红染的梭形 MFB;手术组 30 d,肌纤维被大量增生的胶原纤维束所替代,胶原纤维着色变暗,胶原纤维为深绿色,长梭形纤维细胞由于被深绿色的胶原覆盖,整个细胞呈现为深褐色(图3)。

2.3.3 免疫组化染色观察 对照组中Ⅰ、Ⅲ型胶原阳性细胞数量极少。手术组 15 d,可见增生纤维组织中出现梭形的 MFB 表达Ⅰ、Ⅲ型胶原,总体评分高于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$);手术组 30 d,黏膜下出现阳性细胞,增生组织中大量长梭形纤

维细胞Ⅰ、Ⅲ型胶原表达为强阳性(图4),总体评分高于15 d组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。此外,Spearman 相关性分析发现,Ⅰ型胶原阳性等级与时间呈显著正相关($r=0.868$,$P<0.01$);Ⅲ型胶原阳性等级与时间呈显著正相关($r=0.877$,$P<0.01$),说明随着时间推移,Ⅰ、Ⅲ型胶原阳性等级逐渐增强,差异具有统计学意义($P<0.01$,表2)。

表 2　免疫组化检测对照组及手术组兔胆总管壁Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达(视野,$n=10$)

组别	Ⅰ型胶原阳性等级				Ⅲ型胶原阳性等级			
	−	+	++	+++	−	+	++	+++
对照组	8	2	0	0	8	2	0	0
手术组 15 d	0	5	5	0	0	4	6	0
手术组 30 d	0	1	3	6	0	1	2	7
χ^2值	36.000				39.000			
P值	<0.01				<0.01			



A:对照组;B:手术组 15 d;C:手术组 30 d

图 3　对照组及模型组兔胆总管壁 Masson 三色染色　(×400)

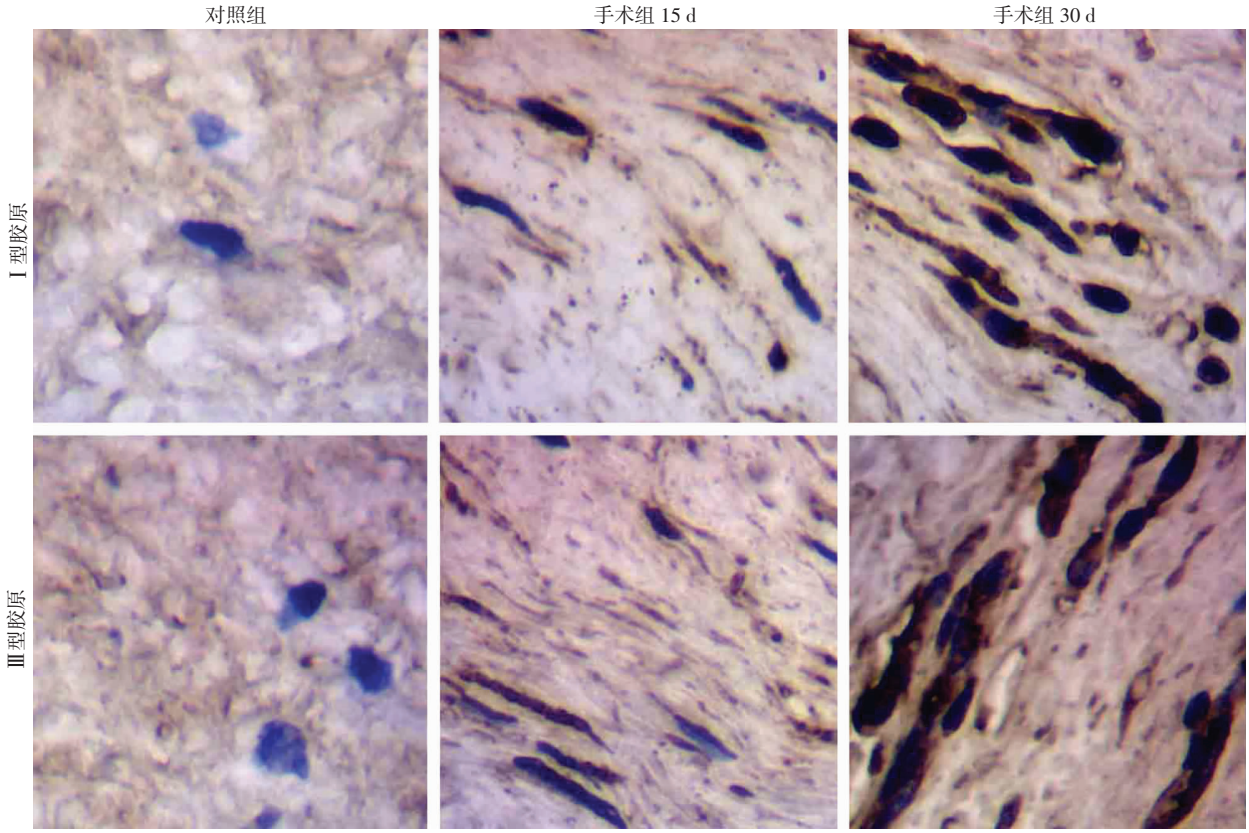


图 4　免疫组化检测对照组及手术组兔胆总管壁Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达　(S-P ×400)

3 讨论

随着胆道疾病发病人数的增多,无论是因为胆道结石还是因为外科治疗胆道疾病,胆道损伤的概率在增加,所造成的胆管良性瘢痕狭窄也随之增加。胆管良性瘢痕狭窄的治疗颇为棘手且预后极差,文献[2]报道其病死率可高达30%。目前胆管良性瘢痕狭窄以外科手术治疗为主,但并发症多,术后瘢痕性狭窄仍易复发[3]。良性胆管瘢痕发生机制复杂,对其形成机制尚缺乏足够的认识,可能涉及炎症反应、免疫反应、遗传等多种因素。我们的前期研究[4]发现CD68、TGF-β1、α-SMA在胆管瘢痕形成过程中起着重要作用。巨噬细胞通过释放各种介质,如TGF-β1、白介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、血管生成因子(WAF)等,参与组织炎症反应和免疫反应。瘢痕增生是胆管狭窄的主要原因,瘢痕增生主要由成纤维细胞过度生成和凋亡抑制、细胞外基质合成增加与降解失衡及大量细胞因子产生所致[5-6]。

胆管黏膜完整时,胆汁酸不会对胆管成纤维细胞产生任何影响;但胆管黏膜完整性被破坏时,胆汁酸就会对成纤维细胞产生作用。Carlson等[7]研究表明,结扎狗胆管后,由于管内压力增大,上皮细胞间连接变大,加之胆汁酸的持续刺激和细胞毒性,使黏膜坏死脱落,胆汁酸通过变大的细胞连接中渗透到上皮下,促使胶原大量生成,最终导致管壁增厚。国内学者[8-10]采用不同胆管缝合方式,发现胆汁刺激作用引起的管壁慢性炎症反应持续存在,巨噬细胞大量聚集,持续合成、分泌TGF-β1等因子,导致成纤维细胞增殖旺盛,胶原过度合成堆积,并向MFB转化,而MFB是造成胆管瘢痕性挛缩的重要原因。

鉴于此,我们用可吸收缝线缝扎一半胆总管的方法来制备胆管良性瘢痕狭窄模型。当然,也有学者用结扎法[11-12]、电凝法[13-14]、钳夹法[15-16]来制备模型。本模型的制备方法有其特有的优点:①通过缝针损伤胆管全层,胆汁酸能接触到损伤的组织,能更好地模拟临床情况;②使用6-0可吸收缝线,由于缝针直径小,不会过度损伤胆管而造成胆漏,其次,可吸收缝线避免了异物肉芽肿的形成;③缝扎一半胆总管,避免全结扎而引起的肝功能衰竭;④模型制备比较方便,有效缩短手术时间。用血清肝功能检测、HE染色、Masson三色染色、免疫组化Ⅰ、Ⅲ型胶原染色验证模型制备成功。胆管损伤初期主要是胆汁酸刺激引起炎症反应;随后主要是肉芽组织的增生,包括MFB、胶原组织、炎症细胞和新生血管的增生;随着胆汁酸持续刺激,MFB大量分泌胶原后形成纤维细胞,广泛增生的胶原组织逐渐形成增生性瘢痕组织。因此,对胆管良性瘢痕狭窄形成过程的深入研究,有助于治疗胆管良性瘢痕狭窄。

参考文献:

[1] 耿智敏, 徐军, 刘青光, 等. 良性胆管狭窄形成机制的研究[J]. 消化外科, 2002, 1(5): 321-323.

[2] 黄志强, 黄晓强. 胆管损伤模式的改变及其治疗进展[M]//黄志强, 黄晓强. 肝胆胰外科聚焦. 北京: 人民军医出版社, 2005: 216-226.

[3] 付天泽, 宋继东, 王瑞星, 等. 医源性胆道损伤的预防及处理[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(1): 99-100.

[4] 张小文, 施国明, 邹浩, 等. 良性胆管狭窄瘢痕中CD68、TGF-β1、α-SMA的表达[J]. 中华肝胆外科杂志, 2007, 13(11): 750-753.

[5] Zhang Q, Wu Y, Ann D K, *et al*. Mechanisms of hypoxic regulation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression in keloid fibroblasts[J]. J Invest Dcrmatol, 2003, 121(5): 1005-1012.

[6] Le A D, Zhang Q, Wu Y, *et al*. Elevated vascular endothelial growth factor in keloids: relevance to tissue fibrosis[J]. Cells Tissues Organs, 2004, 176(1/3): 87-94.

[7] Carlson E, Zukoski C F, Campbell J, *et al*. Morphologic, biophysical, and biochemical consequences of ligation of the common biliary duct in the dog[J]. Am J Pathol, 1977, 86(2): 301-312.

[8] 詹国清, 董家鸿, 王槐志, 等. 损伤性胆管狭窄手术时机与胆管胶原含量变化的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 9(11): 681-683.

[9] 耿智敏, 向国安, 韩庆, 等. 良性胆管狭窄形成机制的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2001, 7(10): 618-620.

[10] 何中林, 陈平, 闫洪涛, 等. 胆汁刺激与良性胆管狭窄形成机制的试验研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(15): 1699-1700, 1703, 封2.

[11] Rodriguez-Garay E A, Aguero R M, Pisani G, *et al*. Rat model of mild stenosis of the common bile duct[J]. Res Exp Med (Berl), 1996, 196(2): 105-116.

[12] 张守华, 廖彩仙, 张春兴, 等. 小鼠梗阻性黄疸模型的建立及动态观察[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(9): 1579-1581.

[13] Rumalla A, Petersen B T, Baron T H, *et al*. Development of a swine model for benign stenosis of the bile duct by endoscopic application of intraluminal thermal injury[J]. Gastrointest Endosc, 2003, 57(1): 73-77.

[14] 张洪战, 张明明, 胡冰. 兔胆管良性狭窄模型的建立及机制探讨[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(13): 5984-5988.

[15] 吕俊生, 陈大志, 秦建民, 等. 钳夹法建立小鼠胆管缺血狭窄模型[J]. 中华肝胆外科杂志, 2006, 12(6): 419-421.

[16] 鲁俊, 李良, 刘衍民, 等. β-氨基丙腈对兔胆管良性狭窄的作用[J]. 中华全科医学, 2011, 9(9): 1335-1336, 1372, 封3.

(**收稿**:2014-10-09;**修回**:2014-12-23)

(编辑 邓强庭)