DOI:10.16016/j.1000-5404.201603106

输尿管镜下电凝构建兔尿道狭窄模型

何 凡,杨振兴,黄 磊,方针强,胡晓燕,李龙坤 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院泌尿外科)

[**摘要**] **目的** 采用输尿管镜下电凝建立兔尿道狭窄模型。**方法** 新西兰雄性兔18只,采用随机数字表法分为手术组(10只)、对照组(8只)。采用自制电凝装置,在可视操作下,对手术组兔尿道球部进行环状多点位电凝,对照组仅实施尿道镜检查。术后第30天行逆行尿道造影和尿道镜检查,同时取手术组损伤段尿道组织及对照组相应部位尿道组织进行病理组织学观察。**结果** 成功建立兔尿道狭窄模型,实验过程中无实验动物死亡。术后30 d,手术组10只动物尿道球部均显示典型狭窄征象[狭窄段内径(1.69±0.28)mm,狭窄长度(16.93±2.82)mm];组织学观察显示狭窄段尿道上皮剥脱、缺失,黏膜下组织发生明显纤维化增生伴成纤维细胞浸润,Masson染色呈蓝色。对照组HE染色观察显示结构正常,Masson染色观察显示无纤维组织增生。**结论** 采用输尿管镜下电凝装置成功建立兔尿道狭窄模型,该方法具有操作简单、精确、成功率高等优点,可以为尿道狭窄研究提供良好的动物模型。

[**关键词**] 尿道狭窄;医源性损伤;输尿管镜;电凝

[**中图法分类号**] R-332;R693.2;R699.1 [**文献标志码**] A

Rabbit model of urethral stricture with self-made electric coagulation under direct urethroscopic visualization

He Fan, Yang Zhenxing, Huang Lei, Fang Zhenqiang, Hu Xiaoyan, Li Longkun (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish an experimental rabbit model of urethral stricture using self-made electric coagulation under direct urethroscopic visualization. **Methods** Eighteen adult male New Zealand rabbits were random divided into control ($n=8$) and experimental groups ($n=10$). All rabbits underwent retrograde urethrography and transurethral endoscopy with a F9 urethroscope after intramuscular anesthetic injection. A self-made electric coagulation instrument was adopted to inflict the urethral bulb in all rabbits from the experimental group under direct visualization. The rabbits of the control group was only given by urethroscopic examination. In 30 d after surgery, all animals were evaluated with retrograde urethrography, urethroscopy, HE and Masson staining. **Results** A rabbit model of urethral stricture was successfully established, and no animals died during the process of experiment. In 30 d postoperatively, typical stricture (inner diameter: 1.69±0.28 mm; stricture length: 16.93±2.82 mm) was observed in the urethral bulb of all rabbits from the experiment group 100% (10/10). Histological examination showed a normal urethra and no fibrosis hyperplasia in the controls, while stripped and missed epithelia in the urethral stricture and obviously fibrosis hyperplasia accompanied by fibroblasts in submucosal tissue in the experimental group. **Conclusion** A rabbit model of urethral stricture is successfully established using self-made electric coagulation under direct urethroscopic visualization, with the advantages of easy to operate, accurate and high success rate, which providing an ideal object for the research concerning urethral strictures.

[**Key words**] urethral stricture; iatrogenic injury; ureteroscopy; electric coagulation

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81230017) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81470989). Corresponding author: Li Longkun, E-mail:lilongk@hotmail.com

[**基金项目**] 国家自然科学基金重点项目(81230017);国家自然科学基金面上项目(81470989)

[**通信作者**] 李龙坤,E-mail:lilongk@hotmail.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160516.1351.009.html(2016-05-16)

尿道狭窄是泌尿外科的常见疾病,治疗效果欠佳,容易复发。常规尿道扩张失败后常常需手术治疗,但手术治疗的效果依然不理想,对患者的心理、生理造成极大的损害。目前导致尿道狭窄的常见病因主要有创伤和感染[1]。近年来,随着泌尿外科学的发展,输尿管镜等腔内操作器械得到了广泛应用,经尿道器械检查、治疗和留置导尿等经泌尿系统的腔内操作所致的医源性尿道狭窄明显增加。国外医源性尿道狭窄所占的比例已逾50%[2-3]。医源性尿道狭窄作为目前较常见的类型,其形成原因也比较复杂,除感染、缺血和导尿管刺激外,创伤无疑占有重要地位[4-5]。尿道狭窄一旦形成,多需手术治疗,而手术又可造成新的尿道创伤,从而使尿道狭窄的治疗陷入恶性循环。近年对于尿道狭窄的病因及治疗等方面的研究取得了较大的进步,如利用组织工程技术,以人工合成可降解材料或自身的组织对外伤、感染等所致的尿道狭窄进行修复研究[6]。理想的动物模型是研究的基础,以往尿道狭窄动物模型的建立有多种方法[7],常用的F13号小儿电切镜下操作,对内径较小的兔尿道而言显得过大,电切镜操作的精准性难以把握,而采用更小的内镜下操作时则需要使用如钬激光这类昂贵的实验设备。因此,建立一种简单、方便、成功率高、可行性好并能够满足多数实验室研究的尿道狭窄动物模型,对于尿道狭窄的研究及治疗有着重要的意义。本实验利用开放手术用的普通电刀、双J管置管用的合金导丝以及输尿管导管3种易获取的常用设备材料构建出自制的电凝装置,在F9号输尿管镜视下电凝兔球部尿道,为尿道狭窄模型的建立提供更加经济、方便、有效的建模方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 20周龄雄性新西兰兔18只(由第三军医大学实验动物中心提供),体质量(2.08±0.13)kg,单只独笼,定时标准饲料饲养。自由饮水,饲养观察1周。采用随机数字表法分为手术组(10只)和对照组(8只)。

1.1.2 主要药品试剂 戊巴比妥钠(湖北兴垠河),320 mg/mL碘佛醇注射液(江苏恒瑞),4%多聚甲醛固定液(武汉博士德),液氮固定液(重庆金麦公司)。

1.1.3 实验材料 F9号输尿管镜(德国STORZ公司),F4号输尿管导管(上海上医康鸽),F4号合金导丝(德国巴德),电凝刀设备(日本OLYMPUS UES-40),各种手术器械、注射器(第三军医大学新桥医院中心实验室提供)。

1.2 方法

1.2.1 自制电凝装置 取F4输尿管双J管合金导丝1根,套入F4号输尿管导管内,合金导丝远端超出输尿管导管3 mm,作为电凝设备,将制作好的电凝装置置入输尿管镜内。用自制绝缘材料将合金导丝的近端与电凝刀套接,当电凝刀触发电凝操作时,合金导丝传导能量至远端与接触的尿道组织产生电凝效应。

1.2.2 尿道狭窄模型制作 10只雄性新西兰兔分批采用3%戊巴比妥钠1.5~2 mL/kg后腿肌肉注射麻醉,麻醉成功后兔取仰卧位置于操作台上,固定四肢及头部,会阴部碘伏消毒铺巾。主刀持F9输尿管镜,进入兔尿道,将自制电凝设备置入输尿管镜,选择电凝点接触尿道黏膜,备电凝,助手将带合金导丝的输尿管导管近端通过接触电凝刀(设定电凝功率40 W),瞬间多次激发电凝尿道,完成精准的电凝过程。镜体置于精阜远端,电凝操作点选定兔球部尿道,取选定处尿道的12、2、4、6、8、10点共6点位进行环状电凝,电凝功率40 W,每次电凝激发时间0.3 s,电凝深度至尿道肌层,电凝长度5 mm。以上操作主刀均由同一名经验丰富的泌尿外科医师完成。动物手术前后均不使用抗生素。对照组只进行尿道镜检查,不做电凝。

1.2.3 尿道造影 术后30 d,同1.2.2方法麻醉后成功后,将兔取斜仰卧位置于数字胃肠机的X线检查床上。将50 mL注射器直接接尿道外口,在X线监视下缓慢向尿道内注入碘佛醇注射液(碘含量320 mg/mL),待兔尿道及膀胱显影后摄片。参考Meria等[8]的方法(测量狭窄远端正常尿道直径和狭窄尿道直径,前者与后者之比为狭窄比,比值越高说明狭窄程度越重),进行尿道管腔测量和尿道狭窄程度计算。

1.2.4 尿道镜检 维持动物麻醉状态,仰卧位固定后采用F9输尿管镜进入尿道,观察尿道狭窄形成情况。

1.2.5 病理学检查 术后30 d,新西兰兔麻醉后,手术采集尿道活体标本。切取狭窄段尿道组织,标本用4%多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋后,5 mm厚连续切片,分别进行HE染色和Masson染色。光镜下观察标本的组织形态学改变,进一步证实尿道瘢痕组织的形成。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件,计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较行t检验,计数资料以率表示,组间比较行χ^2检验。

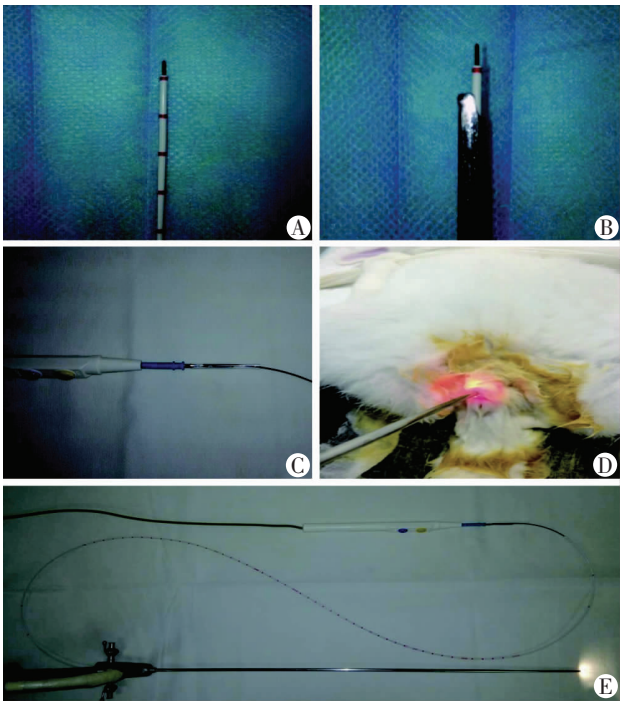
2 结果

2.1 实验动物情况

手术组10只动物无死亡,其中2只术后轻度肉眼血尿,未予处理,2 d后自行缓解。对照组动物均未出现异常情况。

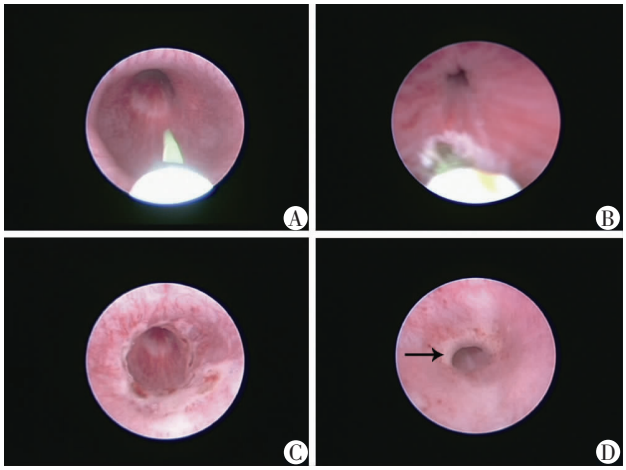
2.2　电凝装置的构建及尿道狭窄模型的建立

成功构建电凝装置(图1),实验动物尿道损伤均位于球部尿道的12、2、4、6、8、10点,创面深达肌层。造成损伤部尿道侧壁圆孔状样毁损区,创面边缘立即出现红肿、出血、中心区出现焦化,周围尿道黏膜出现红肿,轻微渗血(图2)。



A:合金导丝置入F4号输尿管导管内,合金导丝远端超出输尿管导管3 mm;B:电凝合金导丝置入输尿管镜;C:合金导丝连接电刀;D:输尿管镜置入兔尿道;E:自制装置

图1　电凝装置的构建

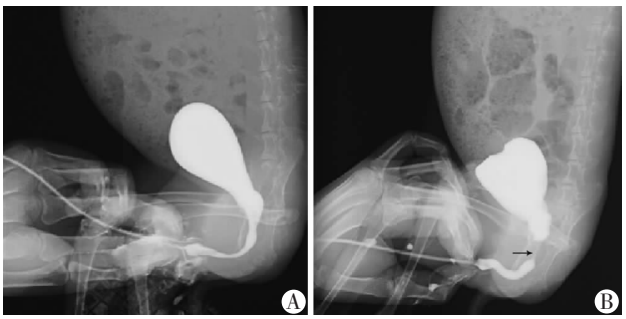


A:输尿管镜下自制电凝装置置入兔尿道;B:可视下电凝;C:电凝后可见尿道侧壁圆孔状样半壁毁损区,创面边缘立即出现红肿、出血、中心区出现焦化,周围尿道黏膜出现红肿,轻微渗血;D:术后30 d,可见瘢痕及狭窄,狭窄环黏膜苍白、结构僵硬、弹性丧失　↑:示狭窄环

图2　手术组术中、术后30 d尿道损伤输尿管镜下观察

2.3　尿道镜观察及尿道造影

术后复查尿道镜(图2)检查,手术组均可见尿道瘢痕及狭窄,狭窄环黏膜苍白、结构僵硬、弹性丧失;对照组尿道黏膜光滑无瘢痕及狭窄。尿道造影(图3)检查见手术组均发生尿道狭窄,尿道黏膜粗糙,球部尿道内径较对照组明显狭窄。手术组术后测量尿道球部狭窄段内径(1.69±0.28)mm,对照组术后球部相应段内径(7.76±0.59)mm,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。术后测量手术组狭窄长度(16.19±2.41)mm,狭窄段与尿道远端正常段相比较,缩窄率达(78.58±3.16)%。

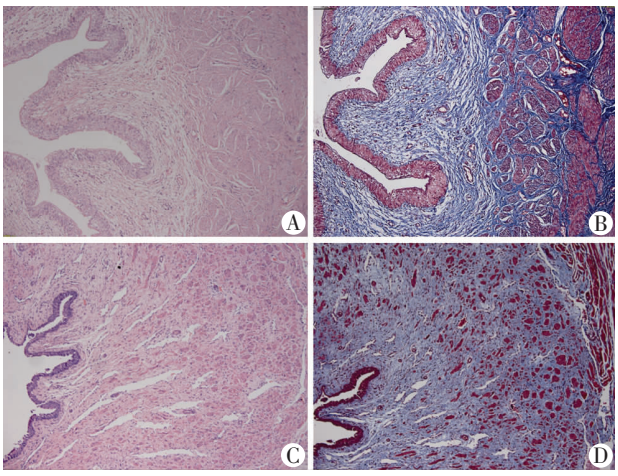


A:对照组　尿道黏膜光滑未见狭窄;B:手术组　↑:示球部尿道明显狭窄

图3　术后30 d手术组和对照组兔尿道造影对比

2.4　病理检查

与对照组相比,手术组电凝术后第30天尿道组织形态学观察显示尿道狭窄段尿道黏膜上皮变薄脱落,黏膜固有层变薄或缺失,HE染色及Masson染色显示浅肌层纤维组织明显增生、肌层结构排列紊乱(图4)。



A:对照组尿道光镜下表现,染色结构正常(HE ×100);B:对照组无纤维组织增生,结构正常(Masson×100);C:手术组尿道光镜表现,可见尿道黏膜下纤维增生深达肌层,肌层结构紊乱,成纤维细胞浸润(HE ×100);D:手术组黏膜下及肌肉层胶原纤维过度增生,染色呈蓝色(Masson ×100)

图4　术后30 d手术组和对照组兔尿道病理学观察

3 讨论

尿道狭窄一直是泌尿外科医师在临床上遇到的一大难题,其治疗效果差,手术治疗后复发率高[9-10]。损伤若处理不当,疾病转归不良,将给患者带来严重的心理、经济负担[11]。因此针对尿道损伤导致狭窄病因、病理的研究,对尿道狭窄的治疗具有重要的意义。建立一种简单、稳定、成功率高的尿道狭窄模型是尿道狭窄治疗及研究的前提。

兔是构建尿道狭窄模型最常用的动物,以往主要通过复杂的手术或者特殊器械进行手术构建[8,12-13]。常见模型构建方式可分为开放尿道缺损和腔道内损害,而腔道内损害根据损害部位、深度、能量、方式,构建模型成功率以及狭窄程度往往差异明显。经典的开放尿道缺损建模,特点是可操作性强,可重复性稳定,但操作复杂,手术时间长,术后往往出现损伤部位深,术后尿道瘘发生率高,诱发感染导致术后动物死亡率较高等。随着手术器械的改进,内镜下腔道内损害构建模型方便、有效,术后动物死亡率明显下降,目前逐渐获得认可[7,13]。因成年雄兔尿道内径与人类 1 岁婴幼儿尿道相当,具有相似的组织学构造[14],F13 号小儿内镜便常用于兔尿道狭窄模型的构建。但使用中我们发现 F13 号内镜尺寸对于兔尿道仍显偏大,操作中电切刀在腔内活动明显受限,术中视野受到影响。即使将电切刀改为钬激光电灼后能部分解决上述问题,但小儿内镜和钬激光不属于常用器械,模型构建存在获取特殊器械困难的限制,推广受到限制。因此,我们选用 F9 号输尿管镜,解决小儿内镜过大的问题,同时通过自制 F4 合金导丝套入 F4 号输尿管导管后外接电凝设备激发电凝产生尿道损害,成功构建尿道狭窄模型。通过上述方法,解决实验设备器械的限制,模型构建稳定、高效且经济。

尿道完整性和组织结构的破坏,以及组织损伤的过度修复会造成过度纤维化瘢痕形成,从而产生瘢痕性尿道狭窄瘢痕。Faydaci 等[13]对 F13 号内镜下电切至尿瘘与电凝黏膜层形成溃疡 2 种建模方式进行对比研究,认为电切更容易构建模型。此方法中电凝的方式与 Meria 等[8]构建电凝至黏膜下的动物模型相比,前者电凝深度及长度均不及后者,因此造成明显的建模差异。通过破坏黏膜下结构,造成尿液外渗可强化瘢痕纤维化,加重尿道狭窄程度[15-16]。由此我们认为,电凝可以构建尿道狭窄,只是选择的深度需要达到黏膜下层。我们选择更细的合金导丝作为电凝设备,可以在保证手术野清晰的条件下,造成尿道黏膜下肌层的破坏,利于瘢痕增生尿道狭窄形成。此外,已有研究报道尿道狭窄建模成功率大约为 50%,建模后近乎一半无法成功[12],建模的失败可能与尿道海绵体血管窦丰富的血供有关[17],延长损伤长度,可以有效抑制修复能力,提高建模成功率。因此,在保证损伤深度前提下,结合导丝纤细的特性,我们选择 5 mm 电凝长度。本实验对常用设备进行改造和利用,术后 30 d 尿道造影结果显示损伤组建模后测量狭窄内径(1.69 ± 0.28) mm,长度(16.19 ± 2.41) mm,管腔狭窄率(78.58 ± 3.16)%,与对照组相比差异明显,病理结果显示手术组尿道呈典型的瘢痕狭窄纤维化改变,建模成功率 100%。

本实验采用输尿管镜、合金导丝、输尿管导管等常用、易操作的器械成功自制电凝装置。输尿管镜自制电凝装置与小儿膀胱镜建模方法同样具有建模稳定性好、成功率高的优点,但前者更具有制作简便,成本低廉,操作简单明显的优势,可在直视的情况下进行环状多点位的电凝,电凝的范围及深度等都能很好地把握,操作更加精准等。近年来,随着泌尿外科腔镜技术的发展,由泌尿外科手术操作所导致的发生在尿道的感染与医源性损伤比例增加[18],通过电凝造成尿道黏膜损伤与狭窄更符合医源性尿道损伤或者感染的病理机制,因此本方法是一种理想的尿道狭窄动物模型的制作方法。

参考文献:

[1] Wang D J, Li M Y, Huang W T, *et al*. Repair of urethral defects with polylactid acid fibrous membrane seeded with adipose-derived stem cells in a rabbit model[J]. Connect Tissue Res, 2015, 56(6): 434-439. DOI: 10.3109/03008207.2015.1035376

[2] Sangkum P, Levy J, Yafi F A, *et al*. Erectile dysfunction in urethral stricture and pelvic fracture urethral injury patients: diagnosis, treatment, and outcomes[J]. Andrology, 2015, 3(3): 443-449. DOI: 10.1111/andr.12015

[3] Tricard T, Padja E, Story F, *et al*. Benefit of clean intermittent self-catheterization in the management of urethral strictures[J]. Prog Urol, 2015, 25(12): 705-710. DOI: 10.1016/j.purol.2015.07.010

[4] Martins F E, Kulkarni S B, Joshi P, *et al*. Management of Long-Segment and Panurethral Stricture Disease[J]. Adv

Urol, 2015, 2015: 853914. DOI: 10.1155/2015/853914

[5] Simhan J. Reducing Iatrogenic Urethral Trauma[J]. J Urol, 2015, 194(4): 871-872. DOI: 10.1016/j.juro.2015.07.034

[6] Zhang K, Guo X, Zhao W, *et al*. Application of Wnt Pathway Inhibitor Delivering Scaffold for Inhibiting Fibrosis in Urethra Strictures: *In Vitro* and *in Vivo* Study[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 27659-27676. DOI: 10.3390/ijms161126050

[7] Hu W F, Li C L, Zhang H P, *et al*. An experimental model of urethral stricture in rabbits using holmium laser under urethroscopic direct visualization[J]. Urol Int, 2014, 93(1): 108-112. DOI: 10.1159/000355353

[8] Meria P, Anidjar M, Brouland J P, *et al*. An experimental model of bulbar urethral stricture in rabbits using endoscopic radiofrequency coagulation[J]. Urology, 1999, 53(5): 1054-1057.

[9] Nguyen T H, Rhee Y H, Ahn J C, *et al*. Circumferential irradiation for interstitial coagulation of urethral stricture[J]. Opt Express, 2015, 23(16): 20829-20840. DOI: 10.1364/OE.23.020829

[10] Heyns CF, van-der-Merwe J, Basson J, *et al*. Treatment of male urethral strictures-possible reasons for the use of repeated dilatation or internal urethrotomy rather than urethroplasty [J]. S Afr J Surg, 2012, 50(3): 82-87.

[11] 刘东林. 男性尿道狭窄的病因及防治[J]. 山西医药杂志, 2015, 44(9): 1070-1071.

[12] Andersen H L, Duch B U, Nielsen J B, *et al*. An experimental model for stricture studies in the anterior urethra of the male rabbit[J]. Urol Res, 2003, 31(6): 363-367. DOI: 10.1007/s00240-003-0333-2

[13] Faydaci G, Tarhan F, Tuncer M, *et al*. Comparison of two experimental models for urethral stricture in the anterior urethra of the male rabbit[J]. Urology, 2012, 80(1): 225.e7-225.e11. DOI: 10.1016/j.urology.2012.04.025

[14] Pansadoro V, Emiliozzi P. Internal urethrotomy in the management of anterior urethral strictures: long-term followup [J]. J Urol, 1996, 156(1): 73-75.

[15] Rosenstein D I, Alsikafi N F. Diagnosis and classification of urethral injuries[J]. Urol Clin North Am, 2006, 33(1): 73-85, vi-vii. DOI: 10.1016/j.ucl.2005.11.004

[16] Scherz H C, Kaplan GW, Boychuk D I, *et al*. Urethral healing in rabbits[J]. J Urol, 1992, 148(2 Pt 2): 708-713.

[17] Italiano G, Abatangelo G Jr, Calabro A, *et al*. Reconstructive surgery of the urethra: a pilot study in the rabbit on the use of hyaluronan benzyl ester (Hyaff-11) biodegradable grafts[J]. Urol Res, 1997, 25(2): 137-142. DOI: 10.1007/bf01037930

[18] 石松山, 赵先诚, 周兵, 等. 医源性尿道损伤的原因及防治探讨[J]. 浙江临床医学, 2014, 16(10): 1633-1634.

(**收稿**:2016-03-17;**修回**:2016-03-31)

(编辑 龙 亮)