维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0194-04

尿道下裂术后尿道瘢痕的对比实验研究

刘 星[1],张德迎[1],魏光辉[1],张晓萍[2]

(1.重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科;2.重庆医科大学儿科研究所,重庆 400014)

【摘 要】目的:对比尿道下裂不同术式的伤口愈合过程,为术后尿道瘢痕性狭窄的防治提供理论依据。方法:制作尿道下裂动物模型,采用3种术式修复尿道。系统动态观察伤口愈合、瘢痕增生情况,以及细胞因子 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMactin)和转化生长因子 β1(TGF-β1)在伤口中的表达。结果:Mathieu 组与 Onlay island flap(Onlay)组尿道腹侧胶原增生显著,明显强于尿道板正中切开卷管(Tubularized incised plate urethroplasty,TIPU)组($P<0.05$)。TIPU 组与 Mathieu 组和 Onlay 组比较,术后 6 周、3 月 TGF-β1 与 α-SMactin 表达均明显减弱($P<0.01$)。结论:TIPU 重建的尿道更接近正常解剖结构,尿道壁瘢痕增生较轻,是一种较为理想的手术方式。尿道愈合过程中成纤维细胞保持长时间活性,可能是尿道下裂术后尿道狭窄形成及渐进加重的病理基础。

【关键词】尿道下裂;瘢痕;尿道狭窄;手术方式

【中国图书分类法分类号】R726.9 【文献标识码】A 【收稿时间】2007-08-20

Comparative experimental study on urethral scar following hypospadiac repair

LIU Xing, et al

(*Department of Urology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To compare characters of urethral healing after different surgical procedures to provide theoretical support for preventing and curing urethral scaring stricture after hypospadias repair. *Methods*: Hypospadiac animal model was established and three surgical procedures were adopted to repair urethra. The dynamic changes of urethral healing and scar were observed, the expressions of α-SMactin and TGF-β1 were examined. *Results*: Mathieu and Onlay island flap (Onlay) had notable collagenous proliferation, which was significantly stronger than that of Tubularized Incised Plate urethroplasty (TIPU) ($P<0.05$). The expressions of TGF-β1 and α-SMactin were markedly higher in Mathieu and Onlay than that in TIPU at 6 weeks and 3 months. *Conclusion*: TIPU is a comparatively ideal surgical procedure since urethra repaired by TIPU is more similar to normal anatomy and urethral scar proliferation was less than that in Mathieu and Onlay urethroplasty. The activity of fibroblasts kept long in all these urethroplasties, which may be the pathological foundation for the formation and gradual aggravation of urethral stricture following hypospadiac repair.

【Key words】 Hypospadias; Scar; Urethral stricture; Surgical procedure

尿道下裂是小儿最常见的先天性尿路及外生殖器畸形。尿道下裂手术方式已达300余种,不管哪种手术方式都无法避免尿道瘘及尿道瘢痕狭窄的发生,尤其尿道狭窄,治疗后易复发,且有进行性加重趋势,始终是小儿泌尿外科十分棘手的难题。Snodgrass 于 1994 年首次提出 TIPU 治疗远端型尿道下裂[1],由于该术式操作简单、短期随访并发症少、整形效果优于 Mathieu 及 Onlay 术式,近年来越来越流行[2]。但是,目前仍然缺乏针对 TIPU 及其它主要术式的修复尿道愈合特征及其远期效果的病理学实验评价。本研究对比尿道下裂新旧术式,分析成形尿道愈合及瘢痕转归等过程,旨在为术式的优选及术后尿道瘢痕性狭窄的防治提供理论依据。

作者介绍:刘 星(1977-),男,硕士,
研究方向:儿童先天生殖器畸形。

通讯作者:魏光辉,男,教授,E-mail:ghwei@mail.chcmu.com。

1 材料与方法

1.1 制作动物模型

成年雄性新西兰大白兔(3~4kg)26只,购于重庆医科大学实验动物中心。随机抽取2只作为正常对照,其余按随机

维普资讯 http://www.cqvip.com

分组方法编号分为 TIPU 组、Mathieu 组和 Onlay 组，每组各 8 只。用速眠新Ⅱ注射液（长春军事医学科学院兽医研究所）0.1~0.2ml/kg 行大腿肌肉注射麻醉，0.5%盐酸普鲁卡因溶液作阴茎根部局部阻滞麻醉。用 0 号丝线横穿阴茎头牵引阴茎，F_{10} 号硅胶尿管经尿道口插入至膀胱。距离尿道口约 1.0cm 处剪开尿道腹侧壁，形成 1.0cm×0.5cm 大小的尿道缺损（形似下裂尿道口），以此建立兔远端型尿道下裂模型。

1.2 重建尿道

TIPU 术式：沿背侧尿道内壁（尿道板）正中由远及近全层纵切 2cm（见图 1-A），用 7-0 可吸收线间断缝合尿道粘膜，5-0 可吸收线缝合皮下组织及皮肤，牵引丝线固定尿管。Mathieu 术式：在下裂尿道口的近端取 1 个“U”形皮瓣，长宽分别为 1.0cm 与 0.5cm（见图 1-B）。皮瓣由近端向远端翻转与尿道粘膜缝合。Onlay 术式：于下裂尿道口远端、阴茎头右侧，游离 1 个同样大小的包皮内板皮瓣（见图 1-C）。将带蒂皮瓣向左下方翻转与尿道粘膜缝合，其余步骤同 TIPU 术式。术后均予青霉素 5 万 U/kg，庆大霉素 0.25 万 U/kg 肌肉注射，每天 2 次，连续 7d，直至拔除尿管。

1.3 判断有无尿道狭窄

分别于术后 5d、14d、6 周及 3 月每组各处死 2 只实验兔。F_{10} 号硅胶尿管探查尿道，并行尿道膀胱逆行造影，观察有无尿道狭窄。

1.4 组织细胞形态学观察

切取阴茎，4%多聚甲醛固定 24h，常规石蜡包埋。6μm 连续切片，行 HE 染色、Masson 染色（广州华俊医疗器械有限公司）以及免疫组化检测 TGF-β1（Research Diagnostics International）、α-SMactin（Sigma），采用标准 SABC 法染色（武汉博士德生物工程有限公司）。每张切片随机选择 4 个高倍镜视野，采用 Image-pro plus 图像分析系统，确定一定阈值分割胶原纤维组织或阳性细胞进行综合评定，测定出目标区域的面密度，并求出各组均值。

1.5 统计学分析

实验数据以（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS13.0 数据统计软件进行分析处理，ANOVA 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 伤口观察

实验组 24 只动物，伤口均无感染，转移皮瓣均无坏死。全部动物均无明显尿道狭窄征象。

2.2 组织细胞形态学发现

HE 染色可见正常兔尿道粘膜由假复层柱状上皮构成。TIPU 术后 5d，尿道粘膜已经完全再上皮化，增生上皮呈复层立方形（见图 2-A）；Mathieu 和 Onlay 术后 5d，皮瓣与尿道粘膜衔接处出血多，尿道粘膜仍未愈合。术后 14d 观察，尿道粘膜完全再上皮化（见图 2-B）。Masson 染色镜下观察，胶原纤维为蓝色，细胞质、肌纤维、红细胞为红色，细胞核为蓝褐色。TIPU 术后 5d，尿道壁胶原纤维增生不明显；术后 14d，粘膜下大量胶原纤维增生，与对照组比较有统计学意义（$P<0.05$）（见图 2-C）。术后 3 月，

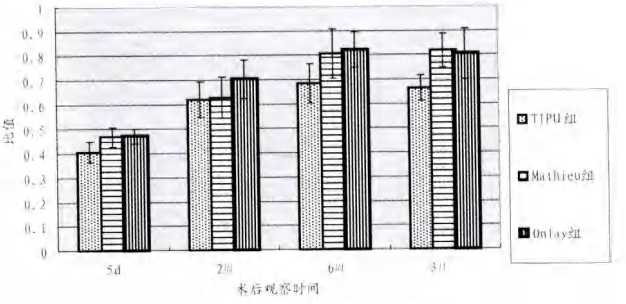


表 1 各实验组胶原纤维面密度值

粘膜下胶原纤维量无明显变化。Mathieu 和 Onlay 术后 14d，皮瓣与粘膜衔接处以疏松的结缔组织为主，皮瓣深面纤维组织增生较同期 TIPU 组显著（见图 2-D）；术后 6 周及 3 月，衔接处疏松的结缔组织被纤维组织代替，纤维组织的阳性面积与 14d 比较有显著性差异（见表 1）。

2.3 TGF-β1 在组织中的表达

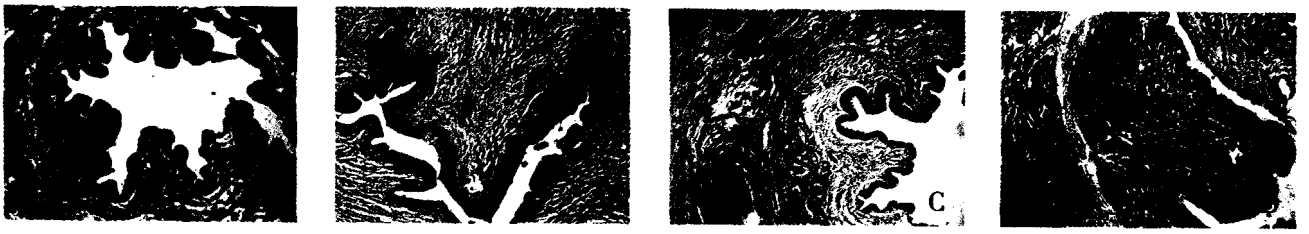
对照组尿道腹侧软组织内表达 TGF-β1 阳性



A. 兔 TIPU 术，纵行切开背侧尿道粘膜（尿道板）；B. 兔 Mathieu 术，于下裂尿道口近端获取阴茎中缝皮瓣，向远端翻转与尿道粘膜吻合；C. 兔 Onlay 术，游离包皮内板皮瓣向左下方翻转与尿道粘膜吻合。

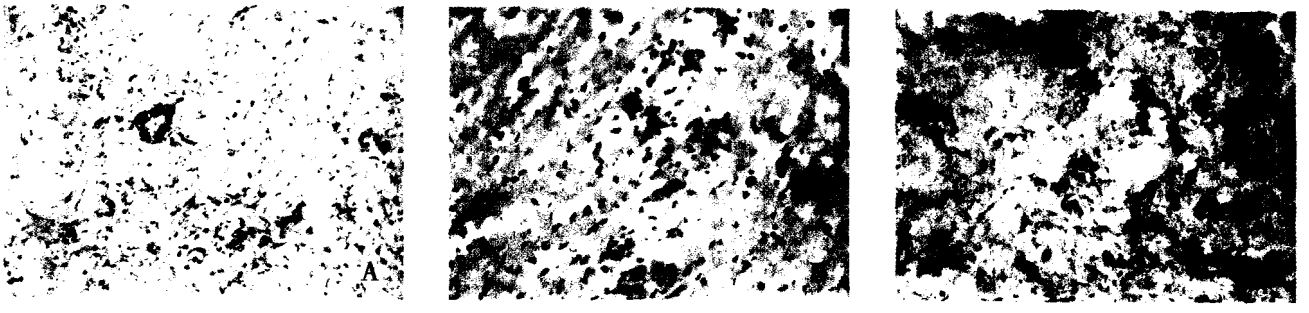
图 1 采用不同术式修补尿道下裂动物模型尿道

维普资讯 http://www.cqvip.com



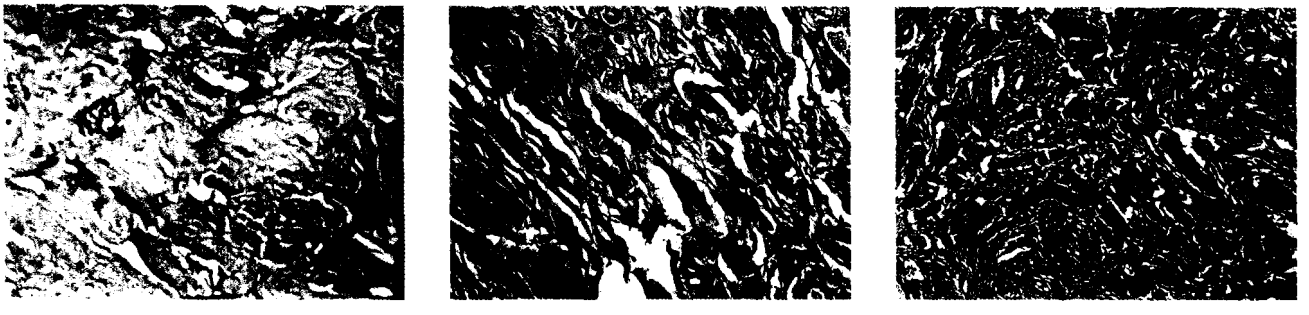
A. TIPU 术后 5d,尿道背侧(红箭头)与腹侧(蓝箭头)粘膜分别完全上皮化(HE×40);B. Mathieu 术后 2 周,阴茎皮肤(红箭头)与正常尿道粘膜(蓝箭头)共同构成新尿道壁(HE×40);C. TIPU 术后 2 周,尿道腹侧胶原纤维增生显著(箭头所示)(Masson×40);D. Mathieu 术后 2 周,皮瓣衔接处(红箭头)无明显的纤维增生,皮瓣深面(蓝箭头)纤维组织增生(Masson×40)

图 2 尿道下裂修复术后组织学表现



A. 正常对照组 TGF-β1 表达细胞数量少,以血管内皮细胞表达为主;B. TIPU 术后 2 周,TGF-β1 阳性面积较正常对照组增多;C. Mathieu 术后 2 周,TGF-β1 阳性面积较同期 TIPU 术后增多

图 3 尿道腹侧壁软组织内 TGF-β1 表达情况(SABC×200)



A. 正常对照组;B. TIPU 术后 2 周,α-SMactin 阳性面积较正常对照组增加;C. Mathieu 术后 2 周,α-SMactin 阳性面积较同期 TIPU 术后明显增多

图 4 尿道腹侧壁软组织内 α-SMactin 的表达情况(SABC×200)

细胞数量少,实验组着色面积及强度较对照组明显增高($P<0.05$)。各实验组 TGF-β1 表达均以术后 2 周、6 周最强,组内各期比较无显著性差异($P>0.05$);TIPU 组与同期 Mathieu 和 Onlay 组比较,TGF-β1 表达均较弱,有统计学意义($P<0.01$)。见图 3。

2.4 α-SMactin 在组织中的表达

对照组尿道腹侧软组织内表达 α-SMactin 较少,各实验组 α-SMactin 表达均以术后 6 周和 3 月最强;TIPU 组与同期 Mathieu 和 Onlay 组比较,α-SMactin 表达均较弱,有统计学意义($P<0.01$)(见图 4)。

3 讨 论

尿道下裂术式繁多,术后并发症常见。几种以保留尿道板为基础的术式均取得较好临床效果,尿道板的重要性日益受到重视[3]。TIPU 近年来才在国内开展,目前的研究仅就尿道板的病理特征以及尿

维普资讯 http://www.cqvip.com

道板切口是否上皮化愈合进行讨论[4,5],而缺乏与传统术式在成形尿道壁纤维化轻重程度比较。

兔阴茎及尿道的胚胎发育与人类相近,包括相似的尿道板卷曲形成尿道腔的发育过程,拥有相似的阴茎海绵体、包皮及背外侧神经分布,是理想的研究尿道下裂以及尿道损伤愈合的动物模型[6,7]。在实验中模拟临床常用术式对尿道下裂动物模型进行尿道重建,对比研究尿道替代材料(尿道板、包皮或阴茎皮肤)的愈合过程。实验表明,TIPU 术后 5d,尿道壁吻合处已完全上皮化,伴有轻度瘢痕增生和炎症反应。Mathieu 与 Onlay 的粘膜愈合速度较 TIPU 慢,转移皮瓣与粘膜衔接处有明显瘢痕纤维化增生。Masson 染色观察也发现 Mathieu 与 Onlay 尿道腹侧胶原纤维比 TIPU 明显增强。提示重建修复尿道术后,相对 Mathieu 组和 Onlay 组,TIPU 组尿道壁粘膜愈合更快,尿道壁纤维化增生程度更轻。

为进一步研究瘢痕形成及转归特点,实验检测了 TGF-β1 与 α-SMactin 在尿道组织中的表达情况。目前认为,创伤修复是多种修复细胞、生长因子和细胞外基质之间相互作用的复杂动态过程,生长因子参与了创伤愈合的整个过程并在其中发挥着举足轻重的作用。TGF-β 是目前已知与瘢痕形成关系最密切、最有代表性的生长因子,TGF-β 的过度产生与许多纤维化疾病有关,因此是促纤维化的重要介质之一[8]。TGF-β1 在体细胞系中所占的比例最高(>90%),活性最强,与瘢痕的产生有着密切的关系,是增生性瘢痕产生的原因之一。TGF-β1 不仅能诱导人真皮成纤维细胞表达 α-SMactin,而且也能使成纤维细胞向表达 α-SMactin 的肌成纤维细胞转化[9]。肌成纤维细胞与瘢痕挛缩关系密切。α-SMactin 是血管平滑肌结构特有的肌动蛋白,是平滑肌细胞收缩的结构基础。α-SMactin 作为细胞骨架蛋白,是成纤维细胞收缩表型(即肌成纤维细胞)的典型标志。组织损伤后,成纤维细胞被激活并增殖,一部分成纤维细胞转化成肌成纤维细胞,是组织纤维化的早期活动。表达 α-SMactin 的肌成纤维细胞与伤口收缩和细胞外基质的产生相关,研究 α-SMactin 在尿道伤口愈合过程中的表达,可更精确地了解肌成纤维细胞的生活周期和作用。

研究中,Mathieu 及 Onlay 组与 TIPU 组比较,术后 6 周及 3 月 TGF-β1 与 α-SMactin 表达强度及胶原纤维化程度更强,有显著性差异,提示 Mathieu 和 Onlay 组尿道腹侧成纤维细胞及肌成纤维细胞的活性更强。在 Mathieu 和 Onlay 组,阴茎皮瓣及包皮与粘膜的愈合,其瘢痕化趋势及伤口收缩程度均比 TIPU 组的粘膜与粘膜愈合显著,提示 Mathieu 和 Onlay 术式更易发生尿道狭窄。我们推测,由于 TIPU 术式尿道粘膜愈合速度较 Mathieu 和 Onlay 术式快,使其发生感染及尿外渗的机率减小,也进一步减少纤维化诱发因素及瘢痕化程度。但是在此项实验的动物中没有发现尿道狭窄,可能与兔尿道壁软组织薄弱,顺应性及弹性大有关。

TGF-β1 与 α-SMactin 在各实验组中均于术后 2 周表达逐渐增强并达到峰值,与皮肤愈合规律一致,但是二者表达持久(>3 月),提示尿道组织在修复术后保持较长时间成纤维活性,表明重建尿道的愈合方式与皮肤不同。TGF-β1 与 α-SMactin 持续表达较强的原因尚不十分清楚,可能与尿道周期性的伸缩活动以及尿道组织的炎症反应有关:Jordan 等[10]认为尿道切口的自然收缩与皮肤瘢痕收缩不同,尿道切口的愈合存在尿道狭窄倾向。由于尿道周期性的伸缩活动,尿道成纤维细胞在张力作用下产生大量的胶原纤维及纤维连接蛋白,增加其创面的收缩能力,易形成增生性瘢痕。体外实验也表明,在外力作用下尿道成纤维细胞合成胶原及纤维连接蛋白的能力增加[11];尿道内,尿液与粘膜接触及尿外渗导致炎症反应持续存在,造成上皮愈合后单核巨噬细胞大量聚集,持续合成与分泌 TGF-β1、bFGF、EGF 等多肽生长因子,导致成纤维细胞功能活跃,胶原过度合成,肌成纤维细胞持续存在,进而细胞外基质大量沉积而形成瘢痕增生和管腔狭窄。本实验中 α-SMactin 的持续较强表达,其机制可能与 TGF-β1 持续高表达及其它细胞生长因子的直接或间接作用有关。因此,设法减轻尿液刺激引起的炎症反应程度、缩短愈合过程、抑制单核巨噬细胞过度浸润及其活性、避免 TIPU 术中尿道板切口过深及术后感染,将有助于预防和减轻术后尿道瘢痕增生和尿道狭窄。

综合以上研究,我们发现 TIPU 伤口愈合更快、纤维增生更少,其重建尿道更接近正常解剖组织结构,是一种较为理想的手术方式。同时,由于尿道下裂术后成纤维细胞将保持长时间活性,存在尿道狭窄倾向,故应重视尿道下裂术后的远期疗效随访。

参 考 文 献

(下转第 215 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

MPa,扁平状水流 0.250~0.350MPa,雾状水流 0.140~0.300MPa,在此压力范围内能有效清除创口内血凝块、组织碎屑及细菌,没有二次创伤发生,也无细菌、异物渗入深层组织。在本实验中选择的压力柱状水流用 0.180MPa,扁平状水流用 0.300MPa,雾状水流用 0.200MPa,其流量分别约为 270ml/min、260ml/min、400ml/min。结果显示冲洗效果显著,冲洗后伤口局部细菌含量明显减少,每个油镜视野下细菌数 <1 个,即 $<1\times10^5$CFU/g 组织。在冲洗流量相等的条件下,柱状水流的压力较扁平状水流低,这是由于柱状水流着力点比较集中所致。而常规的倒水法仅产生约 40Pa 的压力,因此对细菌、异物的清除能力较差。我们体会,选择机械冲洗压力需根据不同损伤类型、损伤程度、污染轻重、冲洗水流形式及流量来决定,不能一概而论。

尽管 DMTR 具有显著的清洗效果,但仍不能替代清创术,特别是在严重、复杂性开放伤时,必须二者配合使用才更有利于创伤的愈合。

(致谢:感谢周冀英教授对本课题的支持及对论文修改提出的宝贵意见。)

参 考 文 献

[1] Bahrs C,Schnabel M,Frank T,et al. Lavage of contaminated surfaces: an in vitro evaluation of the effectiveness of different systems[J]. J Surg Res,2003;112(1):26-30.

[2] Howell JM,Chrisholm CD. Outpatient wound preparation and care:a national servey[J]. Ann Emerg Med,1992;21(8):976-981.

[3] Murray CK,Roop SA,Hospenthal DR,et al. Bacteriology of war wounds at the time of injury[J]. Mil Med,2006;171(9):826-829.

[4] Leslie T,Aitken DA,Barrie T,et al. Residual debris as a potential cause of postphaco-emulsification endophthalmitis[J]. Eye,2003;17(4):506-512.

[5] 王丽姿,李亚洁.创伤伤口冲洗方法及装置的研究进展[J]. 护士进修杂志,2003;18(8):746-748.

[6] Bowler PG,Duerden BI,Armstrong DG.Wound microbiology and associated approaches to wound management[J]. Clin Microbiol Rev,2001;14(2):244-269.

[7] Svoboda SJ,Bice TG,Gooden HA,et al. Comparison of bulb syringe and pulsed lavage irrigation with use of a bioluminescent musculoskeletal wound model[J]. J Bone Joint Surg Am,2006;88(10):2167-2174.

[8] Boyd JI,Wongworawat MD. High-pressure pulsatile lavage causes soft tissue damage[J]. Clin Orthop Relat Res,2004;42(7):13-17.

[9] Hassinger SM,Harding G,Wongworawat MD. High-pressure pulsatile lavage propagates bacteria into soft tissue[J]. Clin Orthop Relat Res,2005;43(9):27-31.

[10] Adili A,Bhandari M,Schemitsch EH.The biomechanical effect *of high-pressure irrigation on diaphyseal fracture healing in vivo*[J]. J Orthop Trauma,2002;16(6):413-417.

[11] Polzin B,Ellis T,Dirschl DR.Effects of varying pulsatile lavage pressure on cancellous bone structure and fracture healing[J]. J Orthop Trauma,2006;20(4):261-266.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 197 页)

[1] Snodgrass W. Tubularized incised plate urethroplasty for distal hypospadias[J]. J Urol,1994;151(2):464-465.

[2] Ververidis M,Dickson AP,Gough DCS. An objective assessment of the results of hypospadias surgery[J]. BJU Int,2005;96(1):135-139.

[3] Erol A,Baskin LS,Li YW,et al. Anatomical studies of the urethral plate: why preservation of the urethral plate is important in hypospadias repair[J]. BJU Int,2000;85(6):728-734.

[4] Lopes JF,Schned A,Ellsworth PI,et al. Histological analysis of urethral healing after tabularized incised plate urethroplasty[J]. J Urol,2001;166(3):1014-1017.

[5] Genc A,Tanell C,Gunsar C,et al. Histopathological evaluation of the urethra after the Snodgrass operation:an experimental study in rabbits[J]. BJU Int,2002;90(9):950-952.

[6] Kurzrock EA, Jegatheesan P, Cunha GR, et al. Urethral development in the fetal rabbit and induction of hypospadias:a model for human development[J]. J Urol,2000;164(5):1789-1792.

[7] Scherz HC,Kaplan GW,Boychuk DI,et al. Urethral healing in rabbits[J]. J Urol,1992;148(2Pt2):708-710.

[8] Moulin V,Tam BY,Castilloux G,et al. Fetal and adult human skin fibroblasts display intrinsic differences in contractile capacity[J]. J Cell Physiol,2001;188(2):211-222.

[9] 黄 辉,屠胜建,鲍卫汉、α-平滑肌肌动蛋白在瘢痕成纤维细胞中的表达[J]. 中国修复重建外科杂志,2001;15(6):347-350.

[10] Jordan GH,Schlossberg SM, Devine CJ. Surgery of the penis and urethra[M].7th edition. Philadelphia:WB Saunders company,1997.3343.

[11] Baskin LS,Howard PS,Macarak E. Effect of mechanical forces on extracellular matrix synthesis by bovine urethral fibroblasts in vitro[J]. J Urol,1993;150(2Pt2):637-641.

(责任编辑:关蕴良)