

# 反流性食管炎大鼠模型的制备：不同管径内支架支撑幽门及前胃结扎\*☆

郑朝旭<sup>1</sup>, 林伟斌<sup>2</sup>, 余俊峰<sup>1</sup>, 陈流华<sup>1</sup>

## Preparation of reflux esophagitis rat models: Partial pylorus ligation plus forestomach ligation with different diameters of stents

Zheng Chao-xu<sup>1</sup>, Lin Wei-bin<sup>2</sup>, Yu Jun-feng<sup>1</sup>, Chen Liu-hua<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Partial pylorus ligation is a common method for establishment of reflux esophagitis (RE) model. The diameter of pylorus ligation is closely related to the efficacy of establishment.

**OBJECTIVE:** To investigate the diversity of partial pylorus ligation with different diameters of stents plus forestomach ligation and to find a rational method to induce RE in rats.

**MATERIALS:** Forty female Wistar rats were randomly divided into 2 groups, and 2.9 mm diameter and 3.7 mm diameter stents were inserted through the incision to sustain the pylorus and extracted after pylorus ligation. Then ligation of the transitional region between the forestomach and stomach was performed additionally to establish RE model. The body weights and 7-day survival rates of rats in each group were observed. The rats were sacrificed 7 days after the procedures, and the incidences of esophagitis of two groups were counted.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The 7-day survival rates of 2.9 mm diameter and 3.7 mm diameter stents groups were 35% (7/20) and 68.4% (13/19), respectively ( $P = 0.038$ ). The incidences of esophagitis were 85.7% (6/7) and 76.9% (10/13), respectively. There were no significant differences in the body weights of everyday postoperatively in survival rats between two groups ( $P > 0.05$ ). Successful RE model in rats can be established by partial pylorus ligation plus forestomach ligation. The pylorus ligation diameter is closely related to the survival rates of rats.

Zheng CX, Lin WB, Yu JF, Chen LH. Preparation of reflux esophagitis rat models: Partial pylorus ligation plus forestomach ligation with different diameters of stents. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(20): 3705-3708. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 部分幽门结扎法是制备反流性食管炎动物模型的常用方法之一。幽门结扎口径大小关系到能否有效建立反流性食管炎模型。

**目的:** 比较运用不同管径内支架并部分幽门加前胃结扎制备大鼠反流性食管炎模型的差异, 以寻求合理的制备模型方法。

**方法:** 将 40 只雌性 Wistar 大鼠随机分为 2 组。分别采用外径 2.9 mm 内支架和外径 3.7 mm 内支架支撑结扎幽门, 并加前胃结扎减少胃容量建立动物模型。观察大鼠体质量及 7 d 存活率。7 d 后处死大鼠, 取食管下段组织标本观察食管炎发生率。

**结果与结论:** 2.9 mm 内支架组和 3.7 mm 内支架组 7 d 存活率分别为 35%(7/20)和 68%(13/19), 差异有显著性意义 ( $P=0.038$ ); 两组食管炎发生率分别为 86%(6/7)和 77%(10/13), 以及两组存活大鼠结扎后每天体质量差异均无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。结果表明, 采用部分幽门加前胃结扎可成功建立反流性食管炎大鼠模型, 幽门结扎后管径与大鼠存活率密切相关。

**关键词:** 反流性食管炎; 动物模型; 幽门结扎法; 大鼠; 管径

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.20.022

郑朝旭, 林伟斌, 余俊峰, 陈流华. 反流性食管炎大鼠模型的制备: 不同管径内支架支撑幽门及前胃结扎[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(20):3705-3708. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

胃食管反流病是指过量胃十二指肠内容物反流入食管引起的烧心、反酸等症状, 或伴有食管炎及食管外表现的疾病<sup>[1-3]</sup>。因反流导致的食管黏膜破损称为反流性食管炎<sup>[4]</sup>。部分幽门结扎法是制备反流性食管炎动物模型的常用方法之一。幽门结扎口径大小关系到能否有效建立反流性食管炎模型, 提高反流性食管炎发生率, 避免幽门梗阻导致死亡。实验采用不同管径作为内支架支撑并部分幽门结扎加前胃结扎制备反流性食管炎模型, 探讨幽门结扎内径对大鼠

反流性食管炎模型的影响, 以寻找合理的模型制备方法。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2009-01/05在中山大学中山医学院动物实验中心完成。

**材料:**

**实验动物:** 雌性 Wistar 大鼠 40 只, 体质量 (160±20) g, 由广州南方医科大学动物实验中心提供(SCXK粤2006-0015), 自由进食标准颗粒饲料及饮水。实验过程中对动物处置符合2006年

<sup>1</sup>Department of Minimally Invasive Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Department of General Surgery, Hexian Memorial Hospital, Panyu District, Guangzhou 511400, Guangdong Province, China

Zheng Chao-xu<sup>☆</sup>, Doctor, Associate chief physician, Master's supervisor, Department of Minimally Invasive Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China zhengchaoxu@yahoo.com

Supported by: the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, No. 2005 B31201015\*

Received: 2009-11-30 Accepted: 2010-01-10

中山大学附属第一医院微创外科, 广东省广州市 510080; <sup>2</sup>广州市番禺区何贤纪念医院普外科, 广东省广州市 511400

郑朝旭<sup>☆</sup>, 男, 1970年生, 福建省泉州市人, 汉族, 2001年中山大学医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事胃肠道、肝胆胰脾疾病的微创治疗研究。zhengchaoxu@yahoo.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2010)20-03705-04

收稿日期: 2009-11-30  
修回日期: 2010-01-10  
(2009030002W-Z)

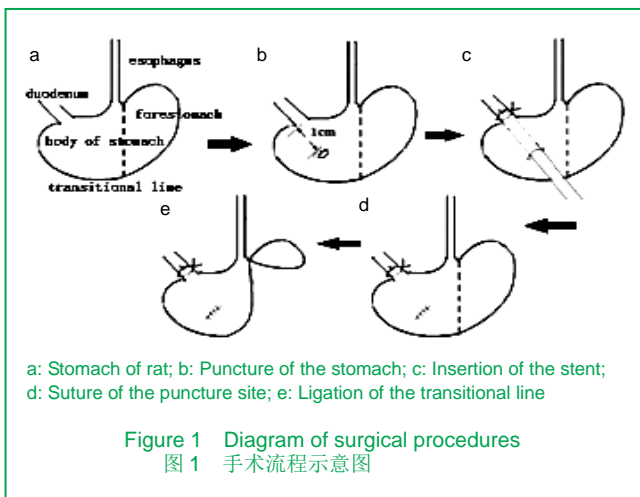
科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[5]</sup>。

**内支架:** 选用中心静脉穿刺扩张器(外径2.9 mm)及艾贝尔中心静脉穿刺针外套管(外径3.7 mm)均为广东省佛山市南海百合医疗科技有限公司产品。

**实验方法:**

**实验动物分组:** 随机分为2.9 mm内支架组和3.7 mm内支架组, 每组20只。

**动物模型建立:** 两组分别采用不同外径内支架支撑结扎幽门, 并加前胃结扎减少胃容量。术前24 h禁食不禁水, 予体积分数为10%水合氯醛0.03 mL/kg腹腔注射麻醉, 取上腹正中切口约2 cm。距幽门1 cm处胃壁切开小孔, 置入内支架, 以2-0号丝线结扎幽门环, 5-0号丝线将结扎线缝合固定于浆肌层, 抽出内支架后缝合胃切开头。将前胃排空, 2-0号线结扎前胃见图1。关腹。术后禁食不禁水48 h。



**大体观察和组织学观察:** 术后每天观察大鼠的体质量变化, 分析死亡大鼠的原因。术后7 d处死大鼠, 开腹观察大鼠食管下段有无扩张、穿孔, 取食管下段组织标本后剖开食管, 观察黏膜表面有无糜烂、溃疡。标本行石蜡包埋切片后苏木精-伊红染色观察。统计大鼠术后7 d存活率及食管炎发生率。反流性食管炎病理学诊断参照国外文献大鼠反流性食管炎的诊断标准<sup>[6-7]</sup>。光学显微镜下观察苏木精-伊红切片, 标本出现上皮层基底细胞增生超过3层, 固有层乳头延长超过上皮层厚度2/3及黏膜炎性细胞浸润者诊断为反流性食管炎。

**主要观察指标:** ①两组大鼠大体观察。②存活率。③食管炎发生率。④体质量。

**设计、实施、评估者:** 实验设计及评估为第一、二作者, 其余作者参与实施。

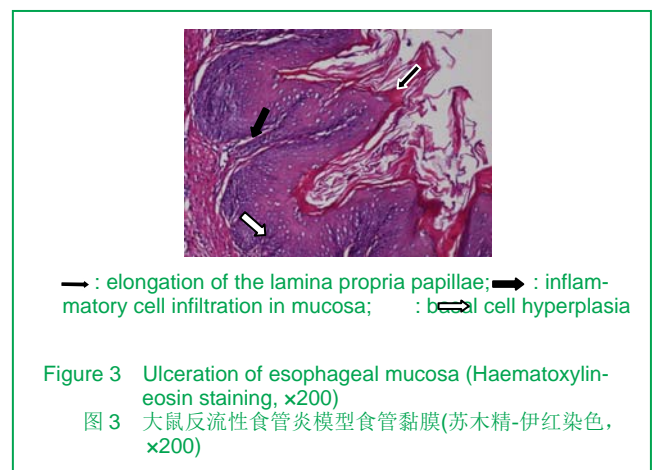
**统计学分析:** 应用SPSS 16.0 FOR WINDOWS统计软件包(SPSS Inc., USA)进行统计分析, 取检验水准 $\alpha=0.05$ 。采用Fisher精确概率法比较两组的7 d存活率及反流性食管炎发生率, 采用t 检验比较两组术后存活7 d的大鼠每天体质量变化。

**2 结果**

**2.1 两组大鼠一般情况** 术中3.7 mm内支架组因麻醉意外死亡1只, 术后饲养过程中2.9 mm内支架组死亡13只, 3.7 mm内支架组死亡6只。死亡原因主要有幽门梗阻、胃穿孔及腹腔感染、腹腔脓肿等。术后2~4 d 2.9 mm内支架组和3.7 mm内支架组各有7只和2只大鼠因幽门梗阻而死亡, 解剖时可见死亡大鼠胃扩张明显, 胃内残留食物呈团块状。胃穿孔可见于3只2.9 mm内支架组和2只3.7 mm内支架组大鼠, 穿孔部位均为胃切开头, 穿孔处可见部分缝合线头残留。另有3只2.9 mm内支架组和2只3.7 mm内支架组大鼠考虑为腹腔感染、腹腔脓肿而死亡, 解剖死亡大鼠时可见腹腔内脓性液体、小脓肿形成。

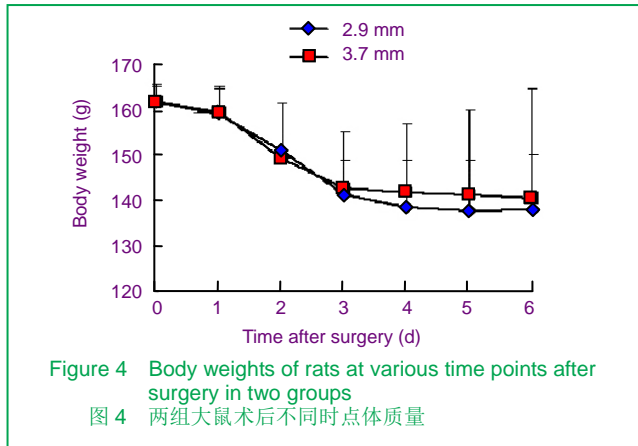
**2.2 存活率比较** 2.9 mm内支架组7 d存活率为35%(7/20), 3.7 mm内支架组7d存活率为68%(13/19)。经Fisher精确概率法(单侧检验)比较 $P=0.038$ , 两者存活率差异有显著性意义, 2.9 mm内支架组7 d存活率明显低于3.7 mm内支架组。

**2.3 食管炎发生率比较** 两组大鼠术后7 d取标本时可发现食管下段不同扩张, 管壁厚薄不一, 黏膜出现白斑、糜烂和溃疡见图2。组织学可见大鼠反流性食管炎模型食管组织上皮延长, 基底细胞增生, 黏膜固有层乳头延长, 黏膜层炎性细胞浸润, 见图3。



2.9 mm内支架组食管炎发生率为86%(6/7), 3.7 mm内支架组食管炎发生率为77%(10/13), 经Fisher精确概率法比较 $P=1.0$ , 两者食管炎发生率差异无显著性意义。

**2.4 体质量** 比较术后各时点两组大鼠的体质量, 差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。见图4。



### 3 讨论

正常食管结构存在以下抗反流损伤的机制: ①食管的抗反流屏障限制反流物进入食管。②食管管腔的清除机制保证反流物与食管上皮的接触时间短暂。③食管上皮组织本身具有一定的抵抗反流物损伤的功能<sup>[8]</sup>。但在胃食管反流频次增多、时间延长的情况下, 食管动力出现异常, 食管炎的发生难以避免<sup>[9-10]</sup>。另外, 反流液也通过刺激食管上皮细胞分泌细胞因子介导食管组织的损伤<sup>[11]</sup>。目前国内外主要通过外源性液体食管灌注和手术造成自身胃肠道反流两种方法来制备反流性食管炎的动物模型。前者单纯通过化学刺激损伤食管黏膜, 不能完全解释反流性食管炎的发病机制和疾病进展过程<sup>[12-13]</sup>。手术制备反流性食管炎模型可分为破坏食管下括约肌、结扎幽门或十二指肠及食管胃肠道吻合术3大类<sup>[8,14-17]</sup>, 其中结扎幽门或十二指肠的方法手术操作相对简单, 容易掌握。幽门结扎法通过手术造成动物幽门扩张受限, 进食后胃排空受阻, 继而胃内压力增高, 使胃液反流入食管, 损伤食管黏膜。与破坏食管下括约肌或食管胃肠道吻合术的方法比较, 结扎幽门或十二指肠的制备反流性食管炎模型的特点在于不改变食管下段括约肌的结构及正常消化道的排列, 能较好地模拟人体反流性食管炎的病理生理过程。

完全幽门结扎法多用于急性反流性食管炎的研究, 动物难以持续喂养, 多在术后一两天内死亡<sup>[8]</sup>。采用部分幽门结扎术可建立慢性酸性反流性食管炎动物模型<sup>[18-19]</sup>。如在部分幽门结扎术中将原有幽门管径缩小, 容易造成进食后幽门梗阻而死亡<sup>[20]</sup>。但如果结扎管

径过大, 无法达到限制食物通过幽门的作用, 可能使反流性食管炎的发生率降低。实验在行前胃结扎、减少胃容量的基础上, 比较用大于大鼠幽门管径及小于幽门管径的两种内支架支撑行幽门结扎, 探讨幽门结扎内径大小对反流性食管炎模型的存活率、食管炎发生率及营养状况的影响, 以便选择采用合适的结扎内径行幽门结扎建立大鼠反流性食管炎模型。

实验结果显示, 两组大鼠术后3 d均有体质量下降的表现, 考虑为禁食所致, 进食后体质量无明显增加或下降。术后发现两组大鼠各时点的体质量差异无显著性意义, 表明部分幽门结扎后幽门管径大小并不会影响大鼠术后营养状况。3.7 mm内支架组存活率较2.9 mm内支架组为高, 说明幽门结扎管径较大的大鼠存活可能性大。Omura等<sup>[21]</sup>将不同管径的Nelaton环固定于大鼠幽门处建立反流性食管炎模型, 结果显示, 管径越大, 存活率越高。实验结果与其报道具有一致性。3.7 mm内支架组采用3.7 mm内支架作为结扎, 其管径较大鼠幽门本身管径大, 并非严格定义的幽门结扎模型, 主要目的在于限制进食后幽门扩张, 减缓食物自胃内排空。而2.9 mm内支架组所用的内支架管径小于幽门本身管径, 结扎后幽门处于缩窄状态, 进食后容易引起梗阻, 35%(7/20)大鼠因幽门梗阻而死亡, 远高于3.7 mm内支架组10.5%(2/19)的梗阻死亡发生率。两组食管炎发生率差异无显著性意义, 但3.7 mm内支架组存活率高, 说明了应用3.7 mm管径内支架比2.9 mm管径结扎建立大鼠反流性食管炎模型更安全, 而诱导反流性食管炎的效果基本一致。

实验结果表明, 建立反流性食管炎模型时, 不仅缩窄幽门管径可造成反流, 限制幽门扩张也是使胃排空受限、导致食物聚积反流的有效手段。采用大于幽门管径的内支架置入幽门后进行幽门结扎较小于幽门管径的内支架具有更高的存活率, 且两者食管炎发生率未见明显区别。由于各种系大鼠体质量、幽门管径不尽相同, 所以应用幽门结扎法建立大鼠反流性食管炎模型时, 需考虑到大鼠的种系差异, 选择合适的幽门结扎管径, 才能建立高存活率和高食管炎发生率的模型。

### 4 参考文献

- [1] Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, et al. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(8):1900-1920.
- [2] Wu JC. Gastroesophageal reflux disease: an Asian perspective. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(12):1785-1793.
- [3] Mizyed I, Fass SS, Fass R. Review article: gastro-oesophageal reflux disease and psychological comorbidity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009; 29(4):351-358.
- [4] Noffsinger AE. Update on esophagitis: controversial and underdiagnosed causes. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(7):1087-1095.
- [5] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

[6] Fujiwara Y, Higuchi K, Hamaguchi M, et al. Increased expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptors in rat chronic reflux esophagitis. *J Gastroenterol Hepatol.*2004;19(5):521-527.

[7] Sugawa T, Fujiwara Y, Yamagami H, et al. A novel rat model to determine interaction between reflux oesophagitis and bronchial asthma. *Gut.*2008; 57(5):575-581.

[8] Li Y, Martin RC 2nd. Reflux injury of esophageal mucosa: experimental studies in animal models of esophagitis, Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Dis Esophagus.* 2007;20(5):372-378.

[9] Emerenziani S, Cicala M, Zhang X, et al. Effect of oesophagitis on proximal extent of gastro-oesophageal reflux. *Neurogastroenterol Motil.*2007;19(6):459-464.

[10] Fornari F, Callegari-Jacques SM, Scussell PJ, et al. Is ineffective oesophageal motility associated with reflux oesophagitis? *Eur J Gastroenterol Hepatol.*2007;19(9):783-787.

[11] Souza RF, Huo X, Mittal V, et al. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury. *Gastroenterology.*2009;137(5): 1776-1784.

[12] Li Y, Wo JM, Ellis S, et al. A novel external esophageal perfusion model for reflux esophageal injury. *Dig Dis Sci.*2006;51(3): 527-532.

[13] Ishiyama F, Iijima K, Asanuma K, et al. Exogenous luminal nitric oxide exacerbates esophagus tissue damage in a reflux esophagitis model of rats. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(5): 527-537.

[14] Tugay M, Yildiz F, Utkan T, et al. Esophagitis impairs esophageal smooth muscle reactivity in the rat model: an in vitro study. *Dig Dis Sci.*2003;48(11):2147-2152.

[15] Gaia Filho EV, Goldenberg A, Costa HO. Experimental model of gastroesophageal reflux in rats. *Acta Cir Bras.* 2005;20(6):437-444.

[16] Nishijima K, Miwa K, Miyashita T, et al. Impact of the biliary diversion procedure on carcinogenesis in Barrett's esophagus surgically induced by duodenoesophageal reflux in rats. *Ann Surg.*2004;240(1):57-67.

[17] Zhang T, Zhang F, Han Y, et al. A rat surgical model of esophageal metaplasia and adenocarcinoma-induced by mixed reflux of gastric acid and duodenal contents. *Dig Dis Sci.*2007;52(11): 3202-3208.

[18] Okuyama K, Saito N, Kume E, et al. Ecabet sodium prevents esophageal lesions induced by the reflux of gastric juice in rats. *Inflammopharmacology.*2007;15(2):90-94.

[19] Nagahama K, Yamato M, Nishio H, et al. Essential role of pepsin in pathogenesis of acid reflux esophagitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2006;51(2):303-309.

[20] Yang LT, Liu HM, Yang JL, et al. Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2007;23(4):825-827;832. 杨路亭, 刘红梅, 杨金良, 等. 各种不同慢性食管反流模型制备手术大鼠死因分析[J]. 中国病理生理杂志, 2007,23(4): 825-827;832.

[21] Omura N, Kashiwagi H, Chen G, et al. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. *Scand J Gastroenterol.*1999; 34(10):948-953.

来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 课题受广东省科技计划项目资助 ( 2005 B31201015 )。

**利益冲突:** 无利益冲突。

**课题的创新点:** 部分幽门结扎法是制备反流性食管炎动物模型的常用方法之一。实验通过支架来控制结扎直径并进行比较, 探讨直径与模型建立的关系, 有一定改进。

**课题评估的“金标准”:** 实验参照 Fujiwara 等和 Sugawa 等文献作为大鼠反流性食管炎的诊断标准。

**设计或课题的偏倚与不足:** 限于经费问题及大鼠幽门管径难以准确测定, 本课题仅采用稍大于及小于幽门管径的两种内支架行部分幽门结扎, 实验分组尚不够细致, 对结论的说服力可能存在一定影响。

**提供临床借鉴的价值:** 课题采用内支架幽门结扎加前胃结扎法建立反流性食管炎动物模型, 探索合理的造模方法, 以应用于反流性食管炎的发病机制及治疗的基础研究。

关于组织工程临床研究与应用学术争鸣: 本刊学术部

内容简介	网站点击更多
目前涎腺组织工程仍处于起步阶段, 其瓶颈及关键问题在于种子细胞。种子细胞的来源、提取、分离及培养, 细胞在支架材料上的迁移、附着及分化过程都需要深入研究。能否将干细胞诱导分化为腺泡细胞, 能否在涎腺组织中分离提取到干细胞, 从而解决种子细胞的来源问题, 值得重点研究。随着研究的进展, 有理由相信涎腺组织工程作为一种有潜力的治疗途径, 将来一定能用来修复涎腺缺损。	cn.zglckf.com/html/2010_03_31/2_6544_2010_03_31_100958.html
组织工程研发的部分医疗产品已走上临床, 美国已有多种组织工程皮肤和软骨产品实现规模化生产和上市销售, 符合了生长因子的骨修复材料也有产品上市, 含细胞的经典组织工程骨目前正在临床研究阶段, 相信不久将会有一大批组织工程骨产品上市销售。	cn.zglckf.com/html/2010_03_31/2_6544_2010_03_31_100960.html
膝关节交叉韧带损伤的评估与功能重建是骨科以及运动医学领域中最重要课题之一。自 20 世纪 80 年代初关节镜技术应用于交叉韧带重建以来, 这一课题得到了前所未有的重视和发展。尤其是前交叉韧带重建已经获得了令人鼓舞的临床效果, 但与之相关的争论也从未停止。在新技术、新材料以及新的理论不断涌现的今天, 以循证医学的观点总结自己以及前人和同行的经验教训, 了解该领域的共识与争论问题, 才能掌握研究动态与方向, 提高我们对交叉韧带损伤的诊治水平。	cn.zglckf.com/html/2010_04_13/2_6544_2010_04_13_102001.html
组织工程膀胱在动物实验和临床研究已经取得了巨大的成功, 并显示出其巨大的应用潜能; 但是, 目前组织工程膀胱的研究和应用仍然还面临着许多挑战, 主要有种子细胞来源受限, 缺乏理想的支架材料和生物反应器, 组织工程膀胱血管化不足, 膀胱功能恢复欠佳以及面临着医学伦理学的冲突。因此, 组织工程膀胱的临床应用还有多久才能实现?	cn.zglckf.com/html/2010_02_27/2_6544_2010_02_27_97413.html