



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.02.011
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3785.shtml

· 基础研究 ·

氟尿嘧啶缓释剂对兔胆肠吻合口愈合影响的研究

方征¹, 史嵩², 张永杰²

(1. 中国人民解放军第一〇一医院 普通外科, 江苏 无锡 214044; 2. 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院 胆道二科, 上海 200438)

摘要

目的: 探讨氟尿嘧啶缓释剂对兔胆肠吻合口组织愈合的影响, 为其临床应用的可行性及安全性提供依据。

方法: 40只健康新西兰兔随机均分为实验组与对照组, 两组均行胆管十二指肠侧侧吻合后, 实验组于胆肠吻合口旁植入氟尿嘧啶缓释剂, 对照组植入空颗粒。两组于术后3、7、14、21 d取胆肠吻合口组织, 观察腹腔内及吻合口大体情况, 行van der Ham粘连评分, 测定吻合口破裂压(ABP), 行吻合口组织病理学及胶原结缔组织检测。

结果: 实验组存活18只, 1只死于胆汁漏, 1只死于腹腔感染; 对照组存活19只, 1只死于胆汁漏, 两组死亡率差异无统计学意义($P>0.05$)。两组吻合口大体愈合情况相似, 术后各时间点van der Ham评分与ABP差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。组织病理学检测(HE染色及Mallory三色法)显示两组术后吻合口周围炎症反应、新生毛细血管和胶原纤维增生情况基本相似。

结论: 氟尿嘧啶缓释剂不影响兔胆肠吻合口的愈合, 可作为预防和治疗胆胰恶性肿瘤术后局部复发和转移的一种安全的辅助化疗手段。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(2):192-197]

关键词

胆管肠吻合术; 吻合口; 伤口愈合; 药物植入物; 氟尿嘧啶; 兔
中图分类号: R657.4

Influence of sustained-release fluorouracil implants on healing of bilioenteric anastomosis in rabbits

FANG Zheng¹, SHI Song², ZHANG Yongjie²

(1. Department of General Surgery, the 101th Hospital of PLA, Wuxi, Jiangsu 214044, China; 2. Department of Biliary Tract Surgery, Ward 2, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Corresponding author: ZHANG Yongjie, Email: yjoy005@sina.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the influence of sustained-release fluorouracil implants on the healing process of the bilioenteric anastomosis in rabbits, so as to provide data related to the safety and feasibility of its clinical application.

Methods: Forty healthy New Zealand rabbits were equally randomized into experimental group and control group. Rabbits in both groups underwent bilioenteric anastomosis, and those in experimental group received sustained-release fluorouracil implantation near the anastomotic stoma, while those in control group received the empty granules instead. In both groups, the tissues around the anastomotic site were harvested on postoperative

收稿日期: 2013-11-26; 修订日期: 2014-01-26。

作者简介: 方征, 中国人民解放军第一〇一医院主治医师, 主要从事肝胆胰肿瘤外科方面的研究。

通信作者: 张永杰, Email: yjoy005@sina.com

day (POD) 3, 7, 14, 21 d respectively, and the general conditions of the abdominal cavity and anastomotic stoma were observed, van der Ham adhesion scoring for the anastomotic stoma was performed, the anastomotic bursting pressure (ABP) was measured, and the histopathological changes and collagenous connective tissues at the anastomotic stoma were examined.

Results: In experimental group, 18 rabbits survived, one died of postoperative bile leakage and one died of abdominal infection; 19 rabbits survived in control group and one died of bile leakage, and there was no statistical difference in mortality between the two groups ($P>0.05$). The general healing statuses of the two groups were similar, and there was no significant difference in van der Ham score or ABP at each time point between the two groups (all $P>0.05$). The histopathological examinations (HE staining and Mallory's trichrome staining) demonstrated that the two groups showed a similar pattern regarding the inflammatory reactions, neovascularization, and collagen fiber hyperplasia around the anastomotic stoma after operation.

Conclusion: Sustained-release fluorouracil implant exerts no obvious influence on the healing process of the bilioenteric anastomosis in rabbits, so it can be used as a safe adjuvant chemotherapeutic method for prevention and treatment of postoperative local recurrence and metastasis of biliopancreatic malignant tumors.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(2):192-197]

KEYWORDS Portoenterostomy; Surgical Stomas; Wound Healing; Drug Implants; Fluorouracil; Rabbits

CLC number: R657.4

原发于肝内外胆管、胰头以及壶腹周围的恶性肿瘤,手术是首选的治疗手段,但因此类肿瘤恶性程度高,早期发现困难,80%~90%接受外科手术治疗的患者早期出现复发或转移^[1]。间质化疗(interstitial chemotherapy)是指将抗癌药物载入到不可降解或可降解的赋形剂中制成药物缓释系统,经不同方式植入(或注入)肿瘤组织、瘤周组织的间质中或肿瘤切除术后的瘤床,在植入部持久地保持局部药物高浓度,防止肿瘤的复发或转移,并很大程度的降低全身毒副反应^[2-4]。术中早期间质化疗越来越得到大家的重视。笔者前期研究^[5]已证明胆肠吻合口旁植入氟尿嘧啶缓释剂化疗能使局部胆肠吻合口、肠管及胆管组织持久维持较高的有效药物浓度。但是持续的高化疗药物浓度是否会导致胆肠吻合口愈合不良或增加吻合口瘘的发生率尚鲜有研究报道,因此本研究设计以新西兰兔为模型,研究胆肠吻合术后腹腔内植入氟尿嘧啶缓释剂,观察胆肠吻合口愈合情况,吻合口张力强度,吻合口病理变化,探讨氟尿嘧啶缓释剂术中应用的安全性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 新西兰白兔40只,体质量约(2.0±0.4)kg,

雌雄各半;由第二军医大学实验动物中心提供,经检疫驱虫,驯养2周,分笼饲养。

1.1.2 药物 氟尿嘧啶缓释剂(商品名:中人氟安,规格0.1g,芜湖先声中人药业有限公司生产,国药准字H20030345)。空植入颗粒,与中人氟安颗粒大小,材质相同,由芜湖先声中人药业有限公司惠赠。

1.1.3 主要药品和试剂 DEPC、PMSF和电泳级琼脂糖购自上海捷倍思生物科技公司,DAPI,蛋白酶抑制剂Cocktail、 β -巯基乙醇和TEMED购自美国Sigma-Aldrich公司,Mallory三色染色法试剂盒购自上海虹桥乐翔医用试剂技术有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 动物模型的建立 动物实验前24h禁食,自由饮水,以3%戊巴比妥钠(1mL/kg)耳缘静脉注射麻醉后行无菌剖腹术。取仰卧位,固定于手术台,备皮,碘酒、酒精消毒手术野,铺巾,上腹正中切口入腹,长约5~6cm。提出十二指肠,显露胆总管,为简化手术,取距胆管与十二指肠开口处远端5cm十二指肠行胆管十二指肠侧侧吻合。分别纵行切开胆管及十二指肠管1cm左右,内置硬膜外导管支撑,6-0PGA可吸收缝合线两层法连续缝合,生理盐水冲洗确定无胆瘘,手术完成。

1.2.2 实验分组 将实验兔随机分为实验组与对

对照组, 每组 20 只。实验组于吻合口旁单点植入中人氟安 50 mg (根据实验动物与人的药物剂量换算方法^[6]以及药品说明书推荐间质化疗剂量), 关腹。对照组植入对照空白颗粒, 关腹。术后静脉注射青霉素 20 万 U, 静脉注射 5% 葡萄糖氯化钠溶液 10 mL。12 h 后恢复进食。术后 3、7、14、21 d 分别处死随机组和对照组各 4 只。如出现意外死亡, 立即对死亡动物进行解剖明确死亡原因, 并记录。

1.2.3 观察指标 (1) 腹腔内及吻合口大体情况: 观察两组腹腔内及吻合口旁粘连, 脓肿等情况, 以及胆肠吻合口完整性, 局部有无充血、水肿、粘连、感染及坏死等表现。根据 van der Ham 等^[7]的方法进行评分: 0 分为无粘连; 1 分为轻度粘连 (主要在吻合口和网膜之间); 2 分为中度粘连 (吻合口和小肠之间, 吻合口两侧及网膜粘连); 3 分为重度粘连 (吻合口周围形成脓肿)。(2) 吻合口两边各取约 3 cm 胆管与肠管, 胆管和肠管一端结扎, 置于林格液中, 胆管一端与微量输液泵连接, 肠管一端与压力测试仪连接。用输液泵以 2 mL/min 向胆管内注入亚甲蓝溶液, 观察有亚甲蓝溢出时, 即吻合口破裂压力 (mmHg, 1 mmHg=0.133 kPa)^[8]。(3) 吻合口病理学观察: 取胆肠吻合口胆管十二指肠各 1 cm, 置于 10% 中性甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 切片 (4 μm), 苏木精-伊红染色, 光镜观察吻合口愈合情况。Mallory 三色法 (MCT) 分析胶原结缔组织增生情况。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 11.0 统计软件处理。所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吻合口组织大体情况及评分

实验组 1 兔死于术后 48 h, 剖腹探查证实腹腔内大量胆汁, 死于胆汁漏; 1 兔死于术后 1 周, 剖腹发现腹腔内恶臭, 无胆汁样液体, 考虑为腹腔内感染, 胆肠吻合口辨别不清。对照组 1 兔死于术后 72 h, 剖腹探查证实胆汁漏所致。两组死亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。其余动物均术后 12 h 开始进食, 第 1 天较迟钝, 第 2 天恢复正常活动,

食欲、精神均恢复正常。

大体观察, 两组均未见明显感染、坏死等征象, 未见吻合口瘘。或多或少均存在充血, 炎性渗出, 尤以 7~14 d 时较明显, 实验组和对照组无明显差异。腹腔内及吻合口情况, 粘连最轻的为术后 3 d, 实验组有 1 动物甚至未发现任何粘连。粘连最严重的为术后 14 d, 未发现腹腔内严重粘连及脓肿形成。吻合口 van der Ham 评分, 两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 实验组和对照组胆肠吻合口 van der Ham 评分
Table 1 Van der Ham scores of the bilioenteric anastomosis of experimental group and control group

组别	术后时间 (d)			
	3	7	14	21
实验组	3	4	6	4
对照组	2	3	6	4
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.2 吻合口破裂压力

实验组各时间点的吻合口破裂压力均高于对照组, 但差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 2)。

表 2 实验组和对照组吻合口 ABP (mmHg)
Table 2 The anastomosis bursting pressure of experimental group and control group (mmHg)

组别	术后时间 (d)			
	3	7	14	21
实验组	71.78 ± 9.01	118.24 ± 10.02	161.95 ± 17.12	233.18 ± 12.85
对照组	79.65 ± 8.14	122.36 ± 12.72	167.39 ± 9.27	251.63 ± 14.19
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.3 吻合口病理学观察

吻合口 HE 结果显示: 术后 3~7 d 实验组与对照组吻合口周围均有大量新生毛细血管生成并有炎症细胞浸润, 同时可观察到成纤维细胞增生, 提示术后的炎症反应及修复增生反应 (图 1)。术后 14~21 d 实验组与对照组吻合口均以成纤维细胞增生为主, 增生血管较前减少 (图 2)。

Mallory 三色法结果: 胶原纤维、各种结缔组织被染成不同程度的蓝色; 细胞核、细胞质、神经纤维和平滑肌纤维被染成红色; 弹力纤维、血细胞和髓鞘被染成橙黄色。染色结果提示术后两组胶原结缔组织随时间逐渐增生 (蓝染区逐渐扩大), 两组的增生情况无明显差异 (图 3)。

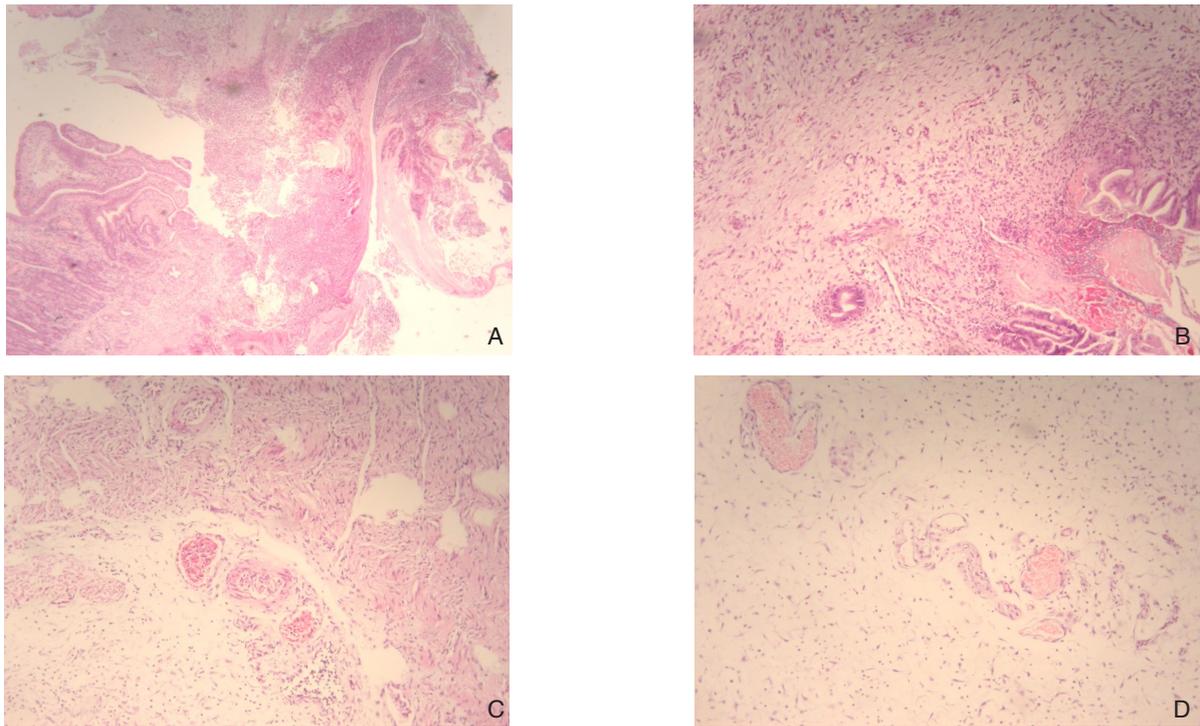


图 1 两组术后 7 d 吻合口 HE 染色 (×200) A, B: 对照组 (吻合口有大量增生的毛细血管和梭形的成纤维细胞, 组织疏松, 少量炎细胞浸润); C, D: 实验组 (大量增生的毛细血管和梭形的成纤维细胞, 组织疏松, 部分毛细血管管腔充血)

Figure 1 HE staining for the anastomotic tissues in the two groups on POD 7 (×200) A, B: Control group (marked proliferation of capillaries and spindle-shaped fibroblasts and loose texture with mild inflammatory cell infiltration in the anastomotic tissues); C, D: Experimental group (marked proliferation of capillaries and spindle-shaped fibroblasts and loose texture with some capillary hyperemia in the anastomotic tissues)

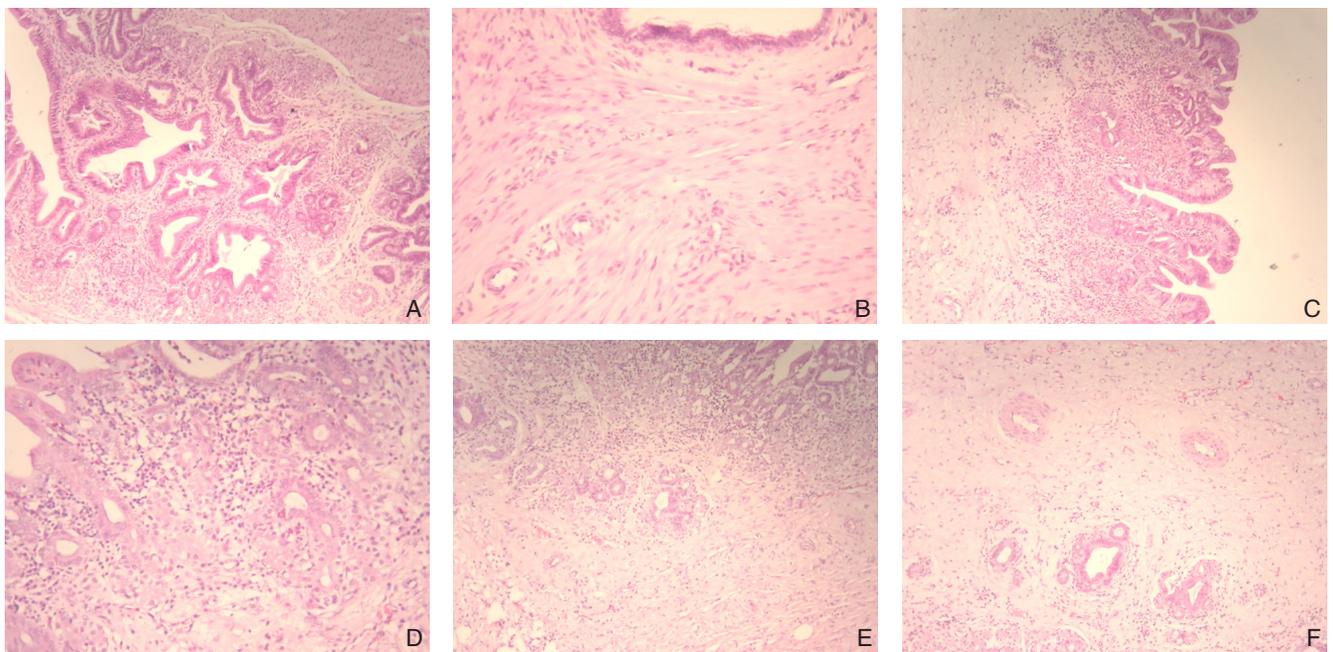


图 2 术后 21 d 吻合口 HE 染色比较 (×200) A, B: 对照组 (吻合口周围黏膜腺体及管周腺体增生, 间质毛细血管数量减少, 胶原纤维生成, 组织致密); C, D: 实验组 (黏膜腺体增生覆盖瘢痕表面, 黏膜下仍可见少量混合炎细胞浸润); E, F: 实验组 (间质被大量胶原结缔组织替代, 结构致密, 毛细血管数量减少)

Figure 2 HE staining for the anastomotic tissues in the two groups on POD 21 (×200) A, B: Control group (mucosal gland and perivascular hyperplasia, decreased interstitial capillaries, collagenous fiber formation and loose texture); C, D: Experimental group (mucosal gland hyperplasia on the cicatricial surface, with submucosal mixed inflammatory cell infiltration); E, F: (replacement of interstitial tissue by collagen connective tissue, compact texture with reduced capillaries)

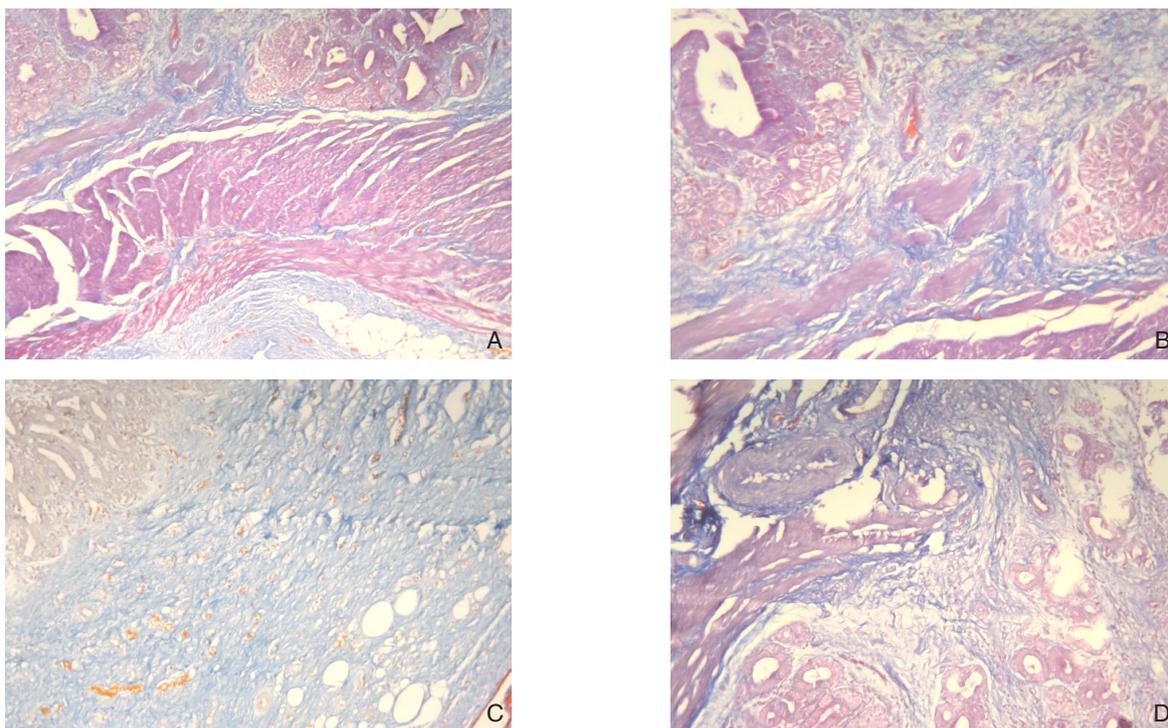


图 3 吻合口 Mallory 三色法染色 (×200) A: 实验组术后 7 d; B: 对照组术后 7 d; C: 实验组术后 21 d; D: 对照组术后 21 d

Figure 3 Mallory's trichrome staining for the anastomotic tissues in the two groups (×200) A: Experimental group on POD 7; B: Control group on POD 7; C: Experimental group on POD 21; D: Control group on POD 21

3 讨论

近年,随着对胆道及壶腹周围恶性肿瘤认识的提高,影像诊断的进步,手术经验的积累和手术切除范围的扩大化,手术切除率得到了明显的提高,但 5 年生存率仍较低。如何对以上恶性肿瘤进行有效综合治疗是困扰胆道外科的难题。迄今为止,手术切除是目前该病最理想的治疗方法,胆肠吻合是胆道外科标志性操作之一,对无法切除的肿瘤也是一种积极的治疗方法,可延长患者的生存期,是确保实现胆道通畅引流的最常用、重要的手段。只有在有效的胆道引流后,化疗才有意义。随着近来间质化疗的提出,术后及术中早期化疗得到更加重视,手术中,残留微小癌灶几乎全部进入增殖期(化疗敏感期),所以,术中化疗被认为是最佳化疗时机^[9]。但术中化疗对吻合口愈合的影响仍是临床医师颇为担心的问题,且胆肠吻合口愈合不良及吻合口瘘是此类手术最常见也是最危险的并发症,因此本研究的目的就在于对化疗药氟尿嘧啶缓释植入剂对胆肠吻合口愈合的安全性的探讨。

本实验组在胆肠吻合口旁植入氟尿嘧啶缓释植入剂 50 mg,对照组植入空白植入粒子进行对照

研究分析,结果表明,在 3~7 d 内,实验组胆肠吻合口炎性渗出及粘连较对照组明显,考虑与氟尿嘧啶植入剂早期快速释放有关,药物于 24 h 内在植药区域形成一个较高的药物浓度^[10],在开始 3~7 d 时间内,局部药物浓度达到最高。在前 3 d,粒细胞及巨噬细胞使坏死的创缘以及纤维蛋白凝块的降解,导致组织局部充血、毛细血管通透性升高、局部水肿以及趋化作用因子活化,类似急性炎症反应。氟尿嘧啶植入剂恰恰是通过局部毛细血管进入组织和血液,因此这一时间药力最强,在 1 周内实验组愈合轻度受影响。但氟尿嘧啶植入剂又因为其独特的组织构架具有较强安全性。其扩散方式为在浓度梯度作用下向膜外扩散(即渗透-扩散机制),释药时间长短由膜层数控制,这种给药方式使得全身正常细胞药量负荷相对较少,从而将 5-FU 的毒性控制在最小范围。张卫等^[11]研究认为术后早期腹腔化疗干扰伤口的正常愈合。杨广令等^[12]认为中人氟氨腹腔化疗全身不良反应小,对大鼠结肠吻合口愈合的影响较小。王志刚等^[13]在临床观察中发现,只要手术操作得当,局部用药并不会增加发生吻合口瘘的机会。这些均与氟尿嘧啶植入剂的代谢过程中实际利用率高与局

部缓释化疗特点有关,在本实验过程中,12~21 d时,两组大体标本情况及吻合口 van der Ham 评分无差异,并且进一步做吻合口病理 HE 及 Mallory 三色法特殊染色时,术后 3~7 d 直至第 21 d,以成纤维细胞增生为主,胶原结缔组织占到主体,在两组的增生的情况下,两组的吻合口的愈合无差异,表明术中氟尿嘧啶缓释剂对兔胆肠吻合口愈合无明显影响。

综上所述,胆肠吻合口旁植入氟尿嘧啶缓释剂化疗不影响胆肠吻合口愈合,可作为预防和治疗胆胰恶性肿瘤术后胆肠吻合口局部复发和转移的一种安全有效的辅助化疗手段。

参考文献

- [1] 戴俊峰. 间质化疗与全身化疗治疗局部晚期胰腺癌的临床疗效对比分析[J]. 中外医学研究, 2013, 11(6):33-34.
- [2] 张香子, 玄云泽. 间质化疗联合手术对口腔鳞癌的临床疗效[J]. 实用口腔医学杂志, 2013, 29(1):68-71.
- [3] 周毅, 关健华, 林启谋, 等. 乳腺癌术中植入缓释氟尿嘧啶间质化疗的研究[J]. 南昌大学学报:医学版, 2012, 52(1):33-35.
- [4] Chen W, Wu Z, Yang H, et al. In vitro and in vivo evaluation of injectable implants for intratumoral delivery of 5-fluorouracil[J]. Pharm Dev Technol, 2014, 19(2):223-231.
- [5] 方征, 史嵩, 俞文隆, 等. 胆肠吻合口旁植入氟尿嘧啶缓释剂的药代动力学变化及其意义[J]. 广东医学, 2011, 32(16):

- 2107-2109.
- [6] 施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989:429-432.
- [7] Van der Ham AC, Kort WJ, Weijma IM, et al. Effect of antibiotics in fibrin sealant on healing colonic anastomoses in the rat[J]. Br J Surg, 1992, 79(6):525-528.
- [8] 鲍扬, 李幼生, 黎介寿, 等. 一种新型腹腔感染动物模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(1):99-100.
- [9] 陈开运, 向国安, 王汉宁, 等. 射频消融及 125I 粒子植入在预防肝癌切除术后局部复发的作用[J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(8):626-628.
- [10] 管培霞, 颜士杰. 氟尿嘧啶植入剂的研究进展及其在腺癌中的临床应用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(7):827-831.
- [11] 张卫, 韩文妙, 郁解非. 结肠吻合口愈合的实验研究及其进展[J]. 国际外科学杂志, 1990, 17(2):88-91.
- [12] 杨广令, 张俊华, 张银旭, 等. 腹腔植入化疗对大鼠结肠吻合口愈合影响的实验研究[J]. 山东医药, 2010, 50(4):46-49.
- [13] 王志刚, 刘庆华, 金永必, 等. 氟尿嘧啶植入剂在进展期直肠癌综合治疗中的临床观察[J]. 中国当代医药, 2009, 16(20):28-29.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 方征, 史嵩, 张永杰. 氟尿嘧啶缓释剂对兔胆肠吻合口愈合影响的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(2):192-197. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.02.011

Cite this article as: FANG Z, SHI S, ZHANG YJ. Influence of sustained-release fluorouracil implants on healing of bilioenteric anastomosis in rabbits[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(2):192-197. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.02.011

本刊为《中国学术期刊网络出版总库》期刊

为了实现学术期刊媒体的数字化、网络化转型,更好地推进学术文献资源的广泛传播和深度开发利用,本刊已加入《中国学术期刊网络出版总库》。在我刊刊登的文章,该数据库可免费提供作者文章引用统计分析资料。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明或另投它刊。作者著作权使用费将在本刊稿酬中一次性给付。

《中国学术期刊网络出版总库》通过“中国知网”(www.cnki.net)和“中国期刊网”(www.chinajournal.net.cn)进行网络出版与信息服务。其集成整合和优化利用我国知识信息资源,向国内外读者提供动态信息服务,欢迎广大作者、读者浏览。

中国普通外科杂志编辑部