



肠粘连动物模型及模型评价方法的研究进展

李培宁^{1,2}, 罗敏辉^{2,3}, 任海涛⁴, 王晖^{1*}, 唐小江^{2*}

(1. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 2. 广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248;
3. 南方医科大学公共卫生学院, 广州 510515; 4. 佛山泰尔健生物科技有限公司, 广东 佛山 528225)

【摘要】 肠粘连是外科手术后的一个常见难题, 可引起严重的并发症。为解决该难题, 探讨肠粘连的形成机制及防治措施已成为外科手术的研究重点。其中, 肠粘连动物模型作为肠粘连形成机制、预防、治疗的重要载体, 在粘连的研究中发挥着重要作用。本文就肠粘连动物模型的建立方法及模型的评价方法展开综述。

【关键词】 肠粘连; 动物模型; 评价方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0101-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.019

Research progress of animal models of intestinal adhesion and their evaluation methods

LI Pei-ning^{1,2}, LUO Min-hui^{2,3}, REN Hai-tao⁴, WANG Hui¹, TANG Xiao-jiang²

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan, Guangdong 528248;
3. Department of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515;
4. Foshan Tailgen Biological Technology, Co., LTD, Foshan, Guangdong 528225)

【Abstract】 Intestinal adhesion can cause serious complications, so it has been a common problem after surgery. In order to solve this problem, investigating the formation mechanism of intestinal adhesion, as well as the preventive and therapeutic measures become a focus in surgery. As important carriers, animal models have played very important role in the research of formation mechanism, prevention and treatment of intestinal adhesion. In this article, the establishment and evaluation methods of animal models of intestinal adhesion will be reviewed.

【Key words】 Intestinal adhesion; Animal model; Evaluation methods

肠粘连是手术中创伤、大量出血、感染、异物存留等原因引起的肠管与肠管之间、肠管与腹膜之间、肠管与腹腔脏器之间的不正常粘连, 属于生理愈合的范畴, 也是一种常见的病理反应^[1]。长期以来肠粘连一直是外科手术后的一个常见且棘手的问题, 多数可引起慢性牵连性疼痛、顽固性腹痛、不育及粘连性肠梗阻, 多需要二次手术解除。处理不及时可导致腹腔炎、水、电解质紊乱, 还可导致部分机体功能

不全, 甚至危及生命^[2]。为解决该难题, 探讨肠粘连的形成机制及防治措施已成为外科手术的研究重点。基于这个现状, 人们制作了多种肠粘连动物模型及相应的评价方法, 本文将对此进行综述。

1 肠粘连动物模型

参考临床上导致肠粘连的原因, 将此类动物模型分为以下几类。

[基金项目] 广东省医学实验动物中心科研项目(2012001)。

[作者简介] 李培宁(1988-), 女, 硕士研究生。E-mail: lpn1117@163.com。

[通讯作者] 王晖(1964-), 男, 教授, 硕士。E-mail: gdwanghui2006@126.com;

唐小江(1967-), 男, 主任医师, 博士。E-mail: river-t@126.com。

1.1 单因素肠粘连模型

1.1.1 盲肠摩擦模型

鉴于盲肠是动物腹腔中最粗、通路最多的肠段,且血管丰富,故实验多选盲肠作为创伤肠段。一般先将盲肠置于空气中暴露 5~10 min,摩擦盲肠浆膜面使之失去光泽,并出现点状出血。该模型是目前国内外最常用的造模方法,多用于局部粘连的预防性研究^[3-5]。但此造模方法较单一,不能完全模拟临床上引发粘连的原因,且人的盲肠作用并不明显,盲肠摩擦模型不具有代表性。

1.1.2 回肠剥离模型

部分文献采用手术刀片锐性剥离回肠末端浆膜层,使之毛糙、出血,形成大面积的机械损伤^[6],所以此模型较适用于广泛、大面积粘连的预防性研究。不足之处在于,锐性剥离浆膜面易致肠穿孔,手术时需谨慎操作。

1.1.3 空肠摩擦模型

也有少量实验选取距大鼠屈氏韧带 6 cm 的远侧空肠,反复摩擦至浆膜层出现针尖状出血点,造成空肠的摩擦损伤^[7]。选取此方法建立肠粘连模型的原因在于空肠具有良好的血运、易于游离,且腹腔活动度较大,比较容易成模,符合临床胰腺消化道重建手术的粘连发生情况^[8],故此手术有一定的局限性,较少用于肠粘连模型的制作。

1.1.4 肠吻合模型

切除坏死的肠段,或消化道重建等原因而进行的肠道吻合术,也可引起术后粘连的发生。此类模型主要模拟临床中切除部分肠段的手术操作,多采用端端缝合的方法对肠道行吻合术^[9-10]。这类方法在粘连模型中较为多见。

1.1.5 腹膜损伤模型

一般对腹壁剪去一定面积大小的腹膜层连带肌肉层,造成严重的粘连模型。Hwang 等^[11]研究得出该模型的成模率高于传统的单一因素造模,粘连等级也较传统单一因素模型高。这种造模方法可模拟临床情况,被证实是可复制的,但不能涵盖临床上引起粘连的所有原因。

1.2 多因素肠粘连模型

1.2.1 盲肠摩擦+对应腹壁损伤模型

该模型主要针对临床上创伤、出血的粘连形成原因,是最常见的肠粘连模型。手术操作中,用手术刀片或无菌纱布轻擦盲肠浆膜层,出现一定面积的均匀出血点,切除盲肠对应腹壁的腹膜和肌肉层,形

成相应大小的缺损。也有实验在此基础上,滴加无水乙醇至盲肠创面,加速出血,刺激粘连的形成。以及增加腹腔在空气中的暴露时间,加重肠粘连的程度^[12-13]。此类手术操作有一定的复杂性,需要控制多方面因素,以确保模型的均一性、重复性。且盲肠的位置相对固定,活动度小,适合于评价流动性和扩散性差的防粘连药物的药效,如膜状防粘连药物,胶原蛋白海绵、聚乳酸防粘连膜等。

1.2.2 回肠摩擦+对应腹壁损伤模型

文献中也多选用回肠末端近盲肠部位的肠段,用手术刀片刮擦浆膜面及相应的腹壁。相对盲肠损伤,该模型扩大了创伤面积,可有效模拟临床上大面积肠道损伤^[14]。因回肠的活动度大于盲肠,故此模型适合于评价流动性和扩散性好的防粘连药物的药效,如透明质酸钠凝胶等。

1.3 局部缺血模型

缺血也是形成术后肠粘连的一个关键因素。大量动物实验表明,肠道局部缺血,也可引起组织粘连。实验操作中,多数实验在对实验动物肠壁及腹壁摩擦的基础上,用无齿镊夹持盲肠系膜动脉 1~2 min,形成短暂的局部缺血,以加速粘连的形成^[15]。也有对腹膜做缺血性结扎以诱发粘连。

术后肠粘连的形成原因是不同的,建模时应针对不同的病因以及不同物理性质的防粘连药物,选择相应的模型制作方法。由于单因素造模并不能真实模拟临床情况,而且也不可保证模型的成功率,故多因素造模方法更为常用。此外,对创伤面积、局部缺血时间进行量化,严格控制损伤程度,可避免人为因素的干扰,使模型在均一性、稳定性和重复性上得到控制。

2 肠粘连动物模型的评价方法

肠粘连动物模型的建立是否有说服力,以及如何评价防粘连药物的防治效果,关键在于评价方法。目前常用的评价方法总结如下。

2.1 目视评分法

评价动物模型的肠粘连等级,多采用剖腹探查进行目视评分。该方法简单直观,可采用双人双盲法进行操作。常见的评分方法,国内有胡建敏法^[16],国外有 Nairs 法^[17]、Philips 法^[18]、Leach 法^[19]等。

胡建敏法侧重粘连面积,分级如下:0 级,完全无粘连;I 级,切口与网膜或肠管创面及肠管相互间

有膜状粘连,限一处,粘连面积不超过创面的 10%; II 级,两处 I 级粘连,面积达 20%,分离时有渗血; III 级,广泛粘连,面积达 40% 以上,分离困难,出血多; IV 级,紧密粘连,纠结成团块状,粘连面积达 60% 以上,分离困难。

Nair 法侧重粘连带的数量及脏器的粘连。分级如下: 0 级,完全无粘连; I 级,内脏间或内脏与腹壁间有 1 条粘连带; II 级,内脏间或内脏与腹壁间有 2 条粘连带; III 级,多于 2 条粘连带,而内脏未直接粘连到腹壁; IV 级,内脏直接粘连到腹壁,不管粘连多少。

Phillips 法侧重粘连的程度和有无肠梗阻,以及分离的难易程度。分级如下: 0 级,完全无粘连,肠管浆膜面修复良好; I 级,肠管与周围组织少量粘连,疏松易分,无渗血; II 级,肠管与周围组织轻到中度粘连,肠管可呈“U”形,分离时局部有渗血; III 级,肠管与周围组织广泛粘连,较难分离,无肠梗阻; IV 级,肠管与周围组织紧密粘连成团,分离困难,引起肠梗阻。

另外,还有 Bellico 法^[20],其从粘连面积、粘连物血管生长程度、粘连物韧性三个方面综合评分,将三者加和作为粘连评分结果,以判断粘连情况,具有更大的参考价值。评分方法: 0 分,完全无粘连; 1 分,粘连面积 < 25%,粘连带成薄膜、透明状,无血管,易分离; 2 分,粘连面积为 26% ~ 50%,粘连带不透明,或半透明,无血管,可牵引分离; 3 分,粘连面积为 51% ~ 75%,粘连带不透明,存在毛细血管,需锐性分离; 4 分,粘连面积为 76% ~ 100%,粘连带不透明,存在大的毛细血管,需锐性分离。

2.2 病理分析

病理分析多采用光镜法^[14,21]、扫描电镜法和透射电镜法^[22]。这三种方法对腹膜和肠壁的创面的微观分析是一致的,也是互补的。

光镜下可大体观察损伤处肠壁、腹壁各层的厚度,毛细血管的增生程度,炎性细胞浸润程度,成纤维细胞及间质细胞的多少,结缔组织的分布等方面,以判断模型的粘连程度^[23]。扫描电镜则进一步从各粘连相关细胞的大小形态变化,及电子密度的分布情况进行分析。而透射电镜在细胞超微结构上,对扫描电镜的结果进一步补充,分析细胞器变化,如细胞核的形态,线粒体的数量多少,染色质致密程度及电子密度。可见,三种方法联用可全面分析创面

部位损伤情况。

2.3 羟脯氨酸 (Hydroxyproline, Hyp) 含量测定

术后粘连的形成与组织的创伤修复有关,临床研究发现,被标记的羟脯氨酸可很快出现在创伤愈合的组织中。Hyp 作为胶原纤维的分解产物,组织中其水平的高低能客观、灵敏地反映粘连程度,两者存在正相关性,Hyp 含量越多,反映组织修复过程越明显,粘连形成也增多^[24]。同时,尿液中 Hyp 排泄量的多少也可反映出损伤部位修复程度,故也可根据尿液中 Hyp 的动态变化预测粘连发生的趋势。因此,将组织或者尿液中 Hyp 的含量结合粘连分级评分结果共同判定粘连情况会更客观^[9]。

2.4 免疫组化检测 MMPs、TIMPs 的表达

基质金属蛋白酶 MMPs 是一类依赖锌离子催化的蛋白酶,可降解细胞外基质 ECM 中的各种蛋白组分,在组织修复与重塑、炎症反应、血管再生等过程中发挥重要作用。MMPs 与其特异性抑制剂 TIMPs,共同参与创伤修复和合成与溶解 ECM 及粘连的形成过程。研究发现,术后第 2 天,肠粘连模型组大鼠粘连肠壁组织中 MMP-9 表达高于对照组, TIMP-1 的表达也升高;术后第 7 天,高表达的 TIMP-1 抑制 MMP-9 的活性,促进纤维蛋白的沉积,间接促进粘连的形成。提示,两者的活性表达也是影响肠粘连形成的因素^[25]。

除上述方法以外,肠粘连的评价方法还可从组织中 IgG 抗原表达、血液粘度及血浆纤维蛋白原浓度、各种细胞因子及粘连相关蛋白的表达等方面进行评价。也可以辅以腹腔镜、磁共振成像 MRI、B 超、彩超等方法^[26],这些辅助方法各有优缺点,但均不需要开腹,即可多方位地动态观察肠管与腹壁粘连的部位、类型和范围,且多种方法结合可提高肠粘连诊断的准确率,对临床病例的诊断具有极大的指导意义。

3 结论

肠粘连的发病率及其不良的健康危害倍受医学界关注,如何防治肠粘连已经成为了外科研究的重点。由于哺乳动物之间粘连的形成机制是相似的,故肠粘连的防治研究多采用动物模型。鉴于术后形成粘连的部位和原因不一,及防粘连药物流动性和扩散性的不同,因此制作肠粘连动物模型的方法也不尽相同。总的来说,有效模拟临床手术对机体的创伤,精确控制手术操作,并制作出稳定、可重复的

肠粘连动物模型,对于探讨粘连的形成机制,采取有效的防粘连措施及评价防粘连药物药效方面具有重要意义。此外,为保证肠粘连动物模型评价方法的客观性,采用双人双盲法判断粘连等级,从而避免主观性的影响,也可将多种评分方法结合起来进行综合评价。

参 考 文 献

- [1] Ward BC, Panitch A. Abdominal adhesions: current and novel therapies [J]. *J Surg Res*, 2011, 165(1): 91-111.
- [2] Boland GM, Weigel RJ. Formation and prevention of postoperative abdominal adhesions [J]. *J Surg Res*, 2006, 132(1): 3.
- [3] Panahi F, Sadraie SH, Khoshmohabat H, et al. Macroscopic and pathological assessment of methylene blue and normal saline on postoperative adhesion formation in a rat cecum model [J]. *Int J Surg*, 2012, 10(9): 537-541.
- [4] Lalountas MA, Ballas KD, Skouras C, et al. Preventing intraperitoneal adhesions with atorvastatin and sodium hyaluronate/carboxymethyl cellulose: a comparative study in rats [J]. *Am J Surg*, 2010, 200(1): 118-123.
- [5] Lalountas M, Ballas KD, Michalakias A, et al. Postoperative adhesion prevention using a statin-containing cellulose film in an experimental model [J]. *Br J Surg*, 2012, 99(3): 423-429.
- [6] 王东红, 李亮, 盛丽, 等. 浆膜剥脱法建立大鼠粘连性不完全性肠梗阻模型 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2011, 18(4): 384-388.
- [7] 林刚, 蒲永东, 杨波. 链激酶预防肠粘连的动物实验研究 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2002, 9(6): 407.
- [8] 刘国魁. 胰管空肠架桥吻合术的动物实验研究 [D]. 河北医科大学, 2011.
- [9] Ward BC, Kavalukas S, Brugnano J, et al. Peptide inhibitors of MK2 show promise for inhibition of abdominal adhesions [J]. *J Surg Res*, 2011, 169(1): 27-30.
- [10] Morello S, Southwood LL, Engles J, et al. Effect of intraperitoneal PERIDAN™ concentrate adhesion reduction device on clinical findings, infection, and tissue healing in an adult horse jejunostomy model [J]. *Veter Surg*, 2012, 41(5): 568-581.
- [11] Hwang HJ, An MS, Ha TK. All the commercially available adhesion barriers have the same effect on adhesion prophylaxis? A comparison of barrier agents using a newly developed, severe intra-abdominal adhesion model [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2013, 28(8): 1117-1125.
- [12] Cashman JD, Kennah E, Shuto A, et al. Fucoïdan film safely inhibits surgical adhesions in a rat model [J]. *J Surg Res*, 2011, 171(2): 495-503.
- [13] Yetkin G, Uludag M, Citgez B, et al. Prevention of peritoneal adhesions by intraperitoneal administration of vitamin E and human amniotic membrane [J]. *Int J Surg*, 2009, 7(6): 561-565.
- [14] Karaca T, Ugur Gözalan A, Yoldas Ö, et al. Effects of tamoxifen citrate on postoperative intra-abdominal adhesion in a rat model [J]. *Int J Surg*, 2013, 11(1): 68-72.
- [15] 牛雯, 刘毅, 李志超, 等. 淀粉型可吸收多聚糖止血粉预防大鼠术后肠粘连 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(12): 2287-2289.
- [16] 胡建敏, 杨春. 人体脂肪及 α -糜蛋白酶联合腹腔灌注预防肠粘连的实验研究 [J]. *普外基础与临床研究*, 1997, 4(1): 40.
- [17] Nair SK, Bath IK, Aurora AL. Role of proteolytic enzymes in the prevention of post-operative intraperitoneal adhesions [J]. *Arch Surg*, 1974, 108(6): 273-280.
- [18] Phillips RKS, Dudley HAF. The effect of tetracycline lavage and trauma on visceral and parietal peritoneal ultrastructure and adhesion formation [J]. *Br J Surgery*, 1984, 71(7): 537-539.
- [19] Leach RE, Burns JW, Dawe EJ, et al. Reduction of postsurgical adhesion formation in the rabbit uterine horn model with use of hyaluronate/carboxymethylcellulose gel [J]. *Fert Steril*, 1998, 69(3): 415-418.
- [20] Belluco C, Meggiolaro F, Pressato D, et al. Prevention of postsurgical adhesions with an autocross linked hyaluronan derivative gel [J]. *J Surg Res*, 2001, 100(2): 217-221.
- [21] Kahyaoglu S, Timur H, Kaba M, et al. Prevention of adhesion formation in Wistar-albino rats by increased bowel movements achieved with oral ricinus oil use for 8 days postoperatively: an experimental study [J]. *Eur J Obst Gynecol Repr Biol*, 2012, 165(2): 337-341.
- [22] 张恒, 唐德刚, 王宁生. 枳朴方中空栓对术后肠粘连大鼠肠浆膜的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 20(6): 503-504.
- [23] Shahrama E, Sadraie SH, Kaka G, et al. Evaluation of chitosane gelatin films for use as postoperative adhesion barrier in rat cecum model [J]. *Int J Surgery*, 2013, 11(10): 1097-1102.
- [24] 崔娟娟, 冯占芹, 张守强, 等. 羧甲基壳聚糖冲洗液预防大鼠术后腹膜粘连 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(8): 1250-1255.
- [25] 韩娜, 姿艳辉, 郭新华. 基质金属蛋白酶-9 及组织抑制剂-1 在大鼠肠粘连形成过程中的作用 [J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(5): 720-722.
- [26] Guerriero S, Ajossa S, Garau N, et al. Diagnosis of pelvic adhesions in patients with endometrioma: the role of transvaginal ultrasonography [J]. *Fert Steril*, 2010, 94(2): 742-745.

[收稿日期] 2014-09-16