

• 实验研究 Experimental research •

新型暂时性贲门支架治疗犬贲门失弛缓症的实验研究

旷小春, 程英升, 朱悦琦, 李 烽, 王卫国

【摘要】 目的 探讨新型暂时性贲门支架治疗实验性犬贲门失弛缓症的疗效和安全性, 研究支架取出后不同随访时间点的贲门段食管组织病理学变化特征。**方法** 采用苄基二甲基十四烷氯化铵(BAC)内镜下食管下括约肌(LES)内环周注射法, 24 条毕格犬成功建立实验性贲门失弛缓症模型, 随机分为对照组和实验组, 每组 12 条, 分别植入普通食管支架和新型贲门支架; 支架留置 4 d 后取出。于造模前、造模后和支架取出后 1 周、1、3 和 6 个月, 对各实验犬作食管测压和计时食管钡剂造影(TBE)检查, 并于支架取出后每一随访时间点各处死 3 条实验犬, 取贲门段食管作病理学检查。**结果** 支架植入、取出和随访检查均顺利实施。两组均未发生食管穿孔等严重并发症。组间比较显示实验组支架移位率较低(实验组 1 条, 对照组 5 条); 实验组 LES 静息压降低更显著(支架取出后 6 个月时, 组间差异有统计学意义, $P = 0.027$); 实验组 TBE 0 ~ 5 min 乘积差更大(支架取出后 3 个月时, 组间差异有统计学意义, $P = 0.009$)。LES 静息压组内多重比较显示实验组有效维持期更长。增殖细胞核抗原(PCNA)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)免疫组化标记染色均显示食管贲门段组织炎症反应在随访 1 个月时达峰值; Masson 三色法染色显示胶原纤维增生指数于随访 3 个月时趋于稳定状态。**结论** 本实验中, 新型暂时性贲门支架治疗犬贲门失弛缓症在安全性和疗效方面均优于普通食管支架。

【关键词】 失弛缓症; 食管; 支架; 犬模型

中图分类号: R-332 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2010)-07-0642-06

A newly-designed temporary cardia stent for the treatment of achalasia: an experimental study in canine models KUANG Xiao-chun, CHENG Ying-sheng, ZHU Yue-qi, LI Feng, WANG Wei-guo. Department of Radiology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Corresponding author: CHENG Ying-sheng, E-mail: shyhysh@163.com

【Abstract】 Objective To assess the efficacy and safety of a newly-designed temporary covered cardia stent for the treatment of achalasia in canine models and to investigate the histopathological changes at different points of follow-up time after the stent was removed. **Methods** The canine achalasia model was created by injecting benzyl-dimethyl-tetradecyl ammonium chloride (BAC) circumferentially into the lower esophageal sphincter (LES) of the dogs. Twenty-four dogs with achalasia were randomly and equally divided into two groups with 12 dogs in each group: control group (using routine esophageal stents) and study group (using newly-designed temporary covered cardia stents). Under fluoroscopic guidance stents were implanted in the esophagus and were taken away from the esophagus 4 days after stent insertion in experimental dogs of both groups. LES pressures and timed barium esophagography (TBE) were performed in all dogs before and immediately after the stenting procedure, as well as at one week, 3 and 6 months after the stent was removed. Every three dogs were sacrificed each time at one week, 3 and 6 months after the stent was removed. The esophageal cardia was excised and sent for pathological examination. **Results** All animals well tolerated the stent insertion/removal and the follow-up procedures. No severe complications such as esophageal perforation occurred. Comparison between two groups showed that stent migration occurrence was much lower in study group ($n = 1$) than that in control group ($n = 5$). The reduction of LES pressures in

study group was more significant in comparison with control group (at 6-month follow-up, $P = 0.027$). The difference in barium column product (height \times width) between 0-min and 5-min TBE was statistically significant in study

基金项目: 国家自然科学基金(No.30670614)资助课题

作者单位: 200233 上海市第六人民医院放射科(旷小春、朱悦琦、李 烽、王卫国); 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心(程英升)

通信作者: 程英升 E-mail: shyhysh@163.com

group (at 3-month follow-up, $P = 0.009$). Integrated analysis of multi-comparison for LES pressures among subgroups of each group revealed that the dogs in study group exhibited better outcomes than the dogs in control group. Both proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and α -smooth muscle actin (α -SMA) immunostaining revealed that the inflammatory reaction reached its peak at 1-month follow-up. Trichrome staining indicated that the collagenous fiber proliferating index inclined to be stable at 3-month follow-up. **Conclusion** In treating achalasia in canine models the newly-designed temporary covered cardia stent is superior to the routine esophageal stent in respect of safety and efficacy. (J Intervent Radiol, 2010, 19: 642-647)

【Key words】 achalasia; esophagus; stent; canine model

贲门失弛缓症(achalasia of cardia)是临床上最常见的良性食管运动障碍性疾病,目前治疗手段主要包括肉毒杆菌毒素注射疗法、腹腔镜下 Heller 术、球囊扩张术和暂时性支架植入术等。腹腔镜下 Heller 术联合胃底折叠术被认为是远期疗效最佳的贲门失弛缓症治疗方法,但技术要求高,费用高,且对于难治性病例亦不宜重复应用;肉毒杆菌毒素注射疗法安全性虽好,但中远期疗效欠佳;球囊扩张术具有微创、易操作、可重复应用等优点,但远期疗效也不理想,且有食管穿孔风险^[1-2]。2006 年,程英升等^[3]报道 4 种介入疗法的临床中远期疗效随访研究,得出暂时性支架成形术为贲门失弛缓症首选介入疗法的结论。近期国内文献报道应用可回收食管支架(支架直径 16 ~ 20 mm)治疗贲门失弛缓症,取得较好疗效,但支架移位率较高^[4-6]。2009 年,Zhao 等^[7]报道了一项前瞻性中远期随访研究,通过暂时性放置 30 mm 大直径自膨式金属支架治疗 75 例贲门失弛缓症患者,支架留置 4 ~ 5 d 后取出,取得了令人满意的效果。然而,因顾虑支架移位等严重并发症的潜在风险,国外对应用支架治疗贲门失弛缓症普遍持谨慎态度^[2,8]。

针对临床上食管支架置入后存在的口径偏小、扩张程度不够、稳定性欠佳、易于反流和复发率较高等缺点,本课题组设计了一种新型贲门支架。本实验以普通食管支架为对照,通过支架取出后短期随访 6 个月,研究该新型贲门支架治疗贲门失弛缓症犬模型的效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物及疾病模型制作

健康实验用毕格犬 24 条,8 月龄,体重(13.5 ± 2.2)kg,雌雄不限,由上海交通大学农学院提供(许可证号:SCXK2007-0004)。采用苄基二甲基十四烷氯化铵(benzyl-dimethyl-tetradecyl ammonium chloride, BAC)内镜下食管下括约肌(lower esophageal

sphincter, LES)内环周注射法建立贲门失弛缓症模型,成功建模 24 条,随机分为对照组和实验组,每组 12 条。实验期间未发生实验动物意外死亡事件。

1.2 方法

1.2.1 支架特征及支架的植入和取出 对照组采用普通食管支架(南京微创公司),规格为 18 mm × 80 mm,两端鼓形膨大处直径 25 mm,无抗反流瓣膜,支架体部外表面有硅胶覆膜,两端裸露,带回收线。实验组采用新型贲门支架(广州迪克医疗器械有限公司)(图 1),规格为 30 mm × 80 mm,支架体部长 60 mm,两端鼓形膨大处直径 35 mm,支架外表面完全硅胶覆膜,带回收线,上下段双重抗反流瓣采用非重叠设计进一步加强抗反流功能。2 种支架均为网织状结构,由镍钛记忆合金丝编织而成。

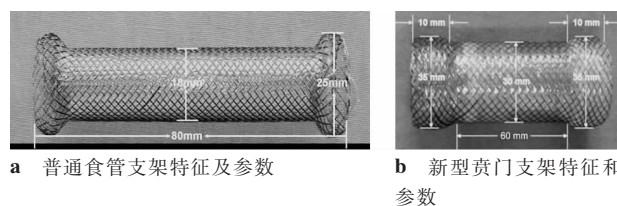


图 1 2 种支架比较

实验犬术前 24 h 禁食,5%戊巴比妥钠(上海新亚制药公司)30 mg/kg 静脉麻醉,左侧卧位,垫高头部及上胸部,置口垫并固定头部,注入少量稀钡显示贲门,摄影计数胸腰椎定好位,260 cm 交换导丝 DSA 透视下通过贲门进入胃腔,沿导丝引入支架输送装置,透视下将支架跨过贲门,释放支架,即刻造影观察钡剂通过贲门情况、支架膨胀程度及食管有无穿孔。支架置入后 3 d 内给以温热半固体食物,促进支架的完全膨胀。常规应用抗生素和止血剂,预防感染和出血。支架留置 4 d 后,实施静脉全麻后内镜下取出支架。支架取出后,内镜复查了解有无出血、黏膜撕裂等情况。支架取出术后 3 d 内喂以冷食物,之后恢复正常饲养。

1.2.2 食管测压 测压术前准备及麻醉方法与支架植入术相同。实验犬麻醉后经口腔插入测压管,

用胃镜观察并确保测压孔进入胃内后,拔出胃镜,调整测压管,使其测压孔位于 LES 压力最高处。测压仪动态测量 LES 静息压,并把 LES 静息压记录为呼吸中期 4 个测量数据的均数。

1.2.3 计时食管钡剂造影 (timed barium esophagography, TBE) 检查前准备及麻醉方法同支架植入术。实验犬麻醉后置放在 DSA 检查床上,垫高头部及上胸部,导丝引导下经口部插入 6 F 导管,经导管注入 50%硫酸钡混悬液 40 ml (山东青岛东风化工有限公司),在实验犬半斜卧位及 X 线球管轻度左后斜位下,于注钡后即刻(即 0 min)和注钡后 5 min 分别摄影,测量 0 min 和 5 min 食管钡柱高度(简称钡高)及食管最大钡剂宽度(简称钡宽)。分别计算 0 min 和 5 min 钡柱乘积(乘积 = 钡高 × 钡宽),借以表示钡柱面积;并求出 0 ~ 5 min 乘积之差(简称乘积差)(乘积差 = 0 min 乘积 - 5 min 乘积)。

1.2.4 病理组织学检查 支架取出后 1 周、1、3 和 6 个月,各时间点实验组和对照组各处死 3 条实验犬,取贲门段食管行病理组织学检查,观察黏膜层上皮细胞增生情况、黏膜下层胶原纤维和平滑肌细胞增生情况。Masson 三色法染色显示黏膜下层胶原纤维(着色成蓝色),反映支架植入性损伤后的瘢痕增生情况。胶原纤维增生指数定义为胶原纤维染色阳性面积占整个视野面积的百分比。组织切片分别以鼠抗-增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体和鼠抗- α -SMA 单克隆抗体标记,以 Envision 免疫组化技术染色,显示黏膜层上皮细胞和黏膜下层平滑肌细胞增生情况,反映食管贲门段在支架植入后的组织增生性炎症反应。PCNA 增生指数定义为黏膜层 PCNA 阳性细胞

数占有核细胞总数的百分比。 α -SMA 增生指数定义为黏膜下层 α -SMA 阳性细胞面积占整个视野面积的百分比。每一切片随机选择至少 20 个高倍 ($\times 400$) 视野计算百分比(图像专业处理软件,The Image-Pro Plus Version 6.0 software, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD)。

1.3 统计学处理

计量资料以均数及标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用独立样本 t 检验。组内多重比较,方差不齐时采用 Dunnett C 非参数检验;方差齐时,若样本量不等,采用 Scheffe 法两两比较,若样本量相等,则采用 Tukey 法两两比较。计数资料采用四格表卡方检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。统计学分析采用 SPSS 11.0 版本软件。

2 结果

2.1 支架植入和取出过程及并发症情况

支架植入时,支架及输送系统均顺利通过贲门狭窄处,支架即刻脱入胃腔事件对照组发生 1 例,实验组 0 例;支架植入后,即刻食管钡剂造影显示钡剂通过贲门顺利。支架留置 4 d 后经内镜下取出时,支架移位脱入胃腔事件对照组发生 4 例,实验组 1 例。两组支架移位率差异无统计学意义 ($P = 0.317$)。所有支架均成功取出。在支架取出术中,少量出血事件对照组发生 2 例,实验组 3 例,两组差异无统计学意义 ($P = 1.000$)。在支架植入和取出术中,均未发生食管穿孔等严重事件。

2.2 食管测压结果

各观察时间点的 LES 静息压值及组间比较结果见表 1。

表 1 各观察时间点 LES 静息压及组间比较

($\bar{x} \pm s$, mmHg)

组别	造模前	造模后	术后1周	术后1个月	术后3个月	术后6个月
对照组	22.88 ± 2.20	46.76 ± 5.40	21.51 ± 2.51	24.32 ± 3.49	29.27 ± 4.75	43.47 ± 3.86
实验组	22.88 ± 3.96	47.53 ± 6.98	20.65 ± 3.42	23.19 ± 4.08	27.42 ± 5.85	33.97 ± 2.92
P 值	1.000	0.766	0.491	0.536	0.561	0.027

注: P 值为同一观察时间点两组间均数比较概率

将对照组和实验组支架取出后各随访时间点的 LES 静息压值分别与造模后总体 LES 静息压值一起作方差分析,并以造模后总体数据为参照对象作两两比较。两两比较统计结果及组间对照见表 2。

表 2 LES 静息压组内两两比较结果及组间对照

参照对象	组别	术后1周	术后1个月	术后3个月	术后6个月
造模后	对照组	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.824
	实验组	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:表中数字为概率 P 值

2.3 TBE 结果

各观察时间点的 TBE 0 ~ 5 min 乘积差及组间比较结果见表 3。

将对照组和实验组支架取出后各随访时间点的 TBE 0 ~ 5 min 乘积差分别与造模后总体 TBE 0 ~ 5 min 乘积差一起作均数比较,重点关注以造模后总体为参照对象的两两比较。两两比较统计结果及组间对照见表 4。

表 3 各观察时间点 TBE 乘积差及组间比较

($\bar{x} \pm s, \text{cm}^2$)

组别	造模前	造模后	术后1周	术后1个月	术后3个月	术后6个月
对照组	16.83 ± 5.57	1.66 ± 2.39	19.73 ± 6.29	16.03 ± 3.85	8.86 ± 3.47	0.31 ± 0.67
实验组	14.99 ± 4.37	2.23 ± 1.83	22.30 ± 8.30	17.25 ± 7.94	14.96 ± 2.99	6.71 ± 5.11
P 值	0.378	0.522	0.402	0.686	0.009	0.098

注: 钡柱面积 \approx 钡高 \times 钡宽; 乘积差 = 0 min 钡柱面积 - 5 min 钡柱面积

表 4 TBE 0 ~ 5 min 乘积差组内两两比较结果及组间对照

参照对象	组别	术后1周	术后1个月	术后3个月	术后6个月
造模后	对照组	Dunnett C ^a	Dunnett C ^a	Dunnett C ^a	Dunnett C ^b
	实验组	Dunnett C ^a	Dunnett C ^a	Dunnett C ^a	Dunnett C ^b

注: 表中数字为概率 P 值; a 表示有统计学意义, b 表示 Dunnett C 非参数检验无统计学意义

图 2 示实验组 1 只犬在造模后、支架留置期间及支架取出后 1 周、1、3 和 6 个月所作的一系列 TBE 5 min 相。图 3 示对照组 1 只犬在造模后、支架留置期间及支架取出后 1 周、1、3 和 6 个月所作的一系列 TBE 5 min 相。

2.4 病理学检查结果

2.4.1 PCNA 免疫组化检查结果 支架取出后各随访时间点 PCNA 免疫组化标记染色(图 4a)示两组实验犬食管贲门段黏膜层上皮细胞 PCNA 增生指数均在随访 1 个月时达峰值, 两组间无统计学差异 ($P > 0.05$)。

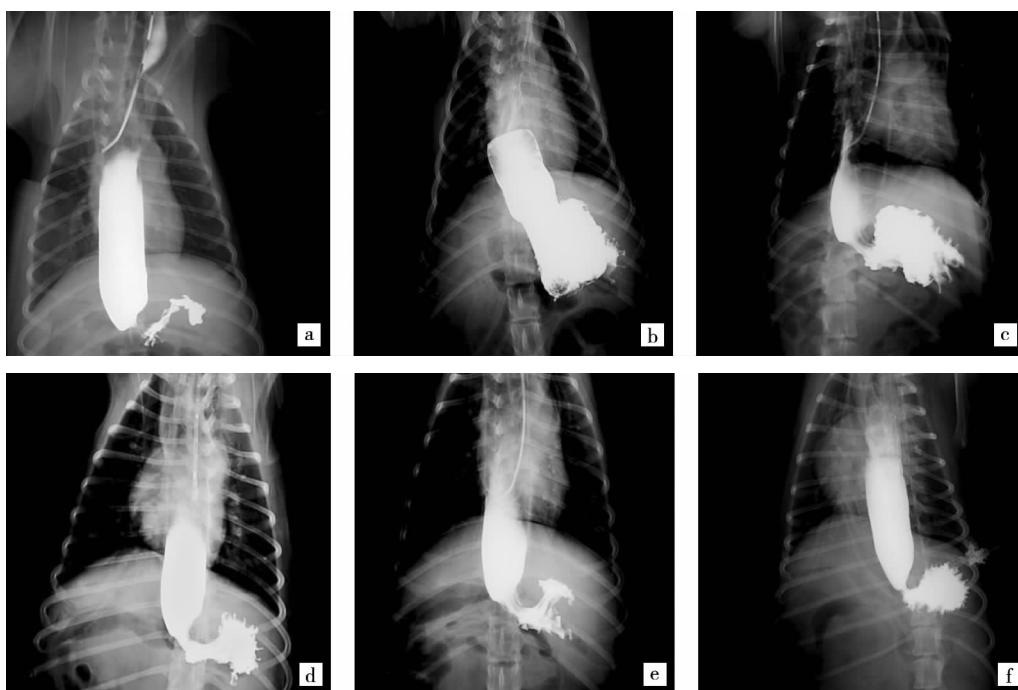
2.4.2 α -SMA 免疫组化检查结果 支架取出后各随访时间点 α -SMA 免疫组化标记染色(图 4b)示两

组实验犬食管贲门段黏膜下层 α -SMA 增生指数均在随访 1 个月时达峰值, 各随访时间点两组间均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.4.3 Masson 三色法染色检查结果 支架取出后各随访时间点 Masson 三色法染色(图 4c)示黏膜下层胶原纤维增生指数逐渐增高并于 3 个月时趋于稳定状态, 各随访时间点两组间均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

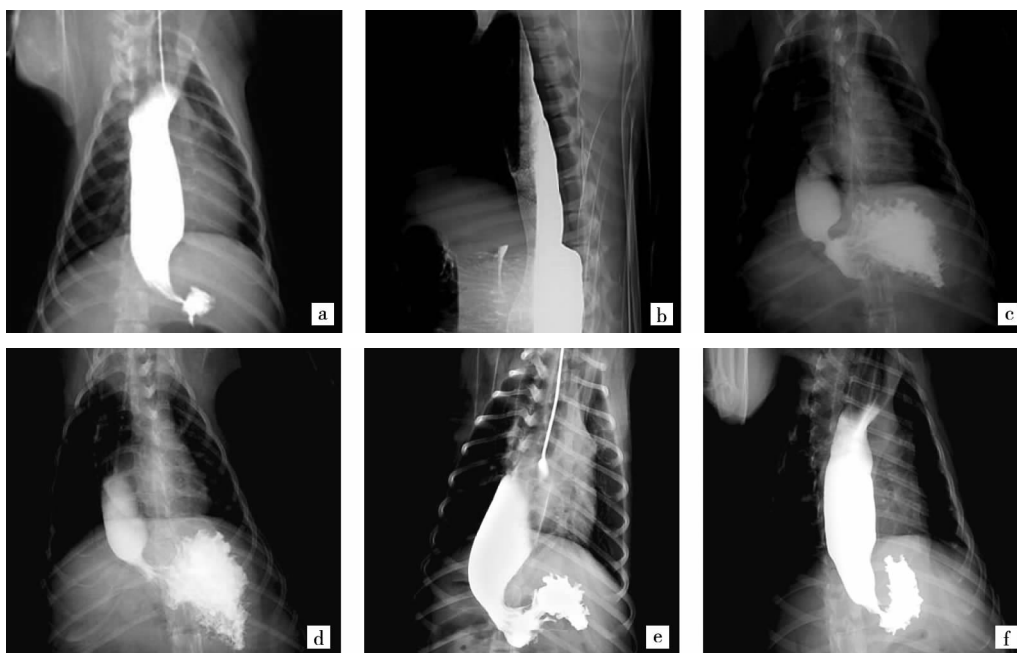
3 讨论

食管测压被认为是贲门失弛缓症诊断及疗效评价的金标准, 与其他方法相比, 灵敏度最高^[2,8]。本实验中, 实验组和对照组 LES 静息压在支架取出后 ≤ 3 个月时均无统计学差异, 而支架取出后 6 个月时, 两组间差异具有统计学意义。然而, 我们不能据此认为其中某个类型的支架就一定具有疗效, 因为目前支架成形术治疗贲门失弛缓症的临床应用尚不广泛, 国际医学界尚存争议, 临床上更不存在治疗贲门失弛缓症的标准型支架。因此, 判定 2 种支



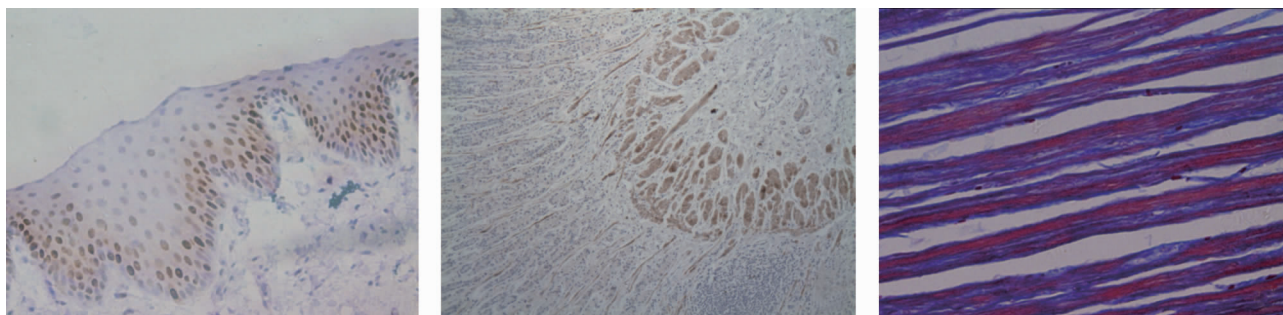
a 造模后, 食管明显扩张, 远端呈截断状, 钡剂通过贲门受阻; b 新型贲门支架植入后, 梗阻解除; c ~ f 分别为支架取出后 1 周、1、3 和 6 个月, 可见不同程度的贲门开放, 钡剂滞留程度在随访期呈渐进性加重, 与 a 相比较, 支架取出后前 3 次随访(图 c ~ e)时钡剂排空显著改善; 随访 6 个月时(图 f), 钡剂滞留程度仍明显低于造模后支架置入前。

图 2 实验组 1 只犬造模后及支架置入后各时间点贲门通过情况



a 造模后,食管明显扩张,远端呈鸟嘴样改变,钡剂通过贲门受阻;**b** 普通食管支架植入后,梗阻解除;**c~f** 分别为支架取出后 1 周、1、3 和 6 个月,可见不同程度的贲门开放,钡剂滞留程度在随访期呈渐进性加重;与 **a** 相比较,支架取出后前 3 次随访(图 **c~e**)示钡剂排空明显改善;随访 6 个月时(图 **f**),钡剂滞留程度已与造模后支架置入前(图 **a**)相仿。

图 3 对照组 1 只犬造模后及支架置入后各时间点贲门通过情况



a 支架取出后 1 个月,PCNA 免疫组化标记染色示食管贲门段黏膜层上皮组织 PCNA 增生指数达峰值×400 **b** 支架取出后 1 个月,α-SMA 免疫组化标记染色示黏膜下层 α-SMA 增生指数达峰值×400 **c** 支架取出后 3 个月,Masson 三色法染色示黏膜下层胶原纤维含量达峰值×400

图 4 组织学免疫组化图像

架治疗犬贲门失弛缓症的疗效优劣,以治疗前后之间的比较结果为依据更为合理。我们将支架置入后随访期间的 LES 静息压与造模后数据分别作组内多重比较。统计结果显示,新型贲门支架较普通食管支架疗效更持久。

TBE 可以客观反映单位时间内食管内液体排空情况和滞留程度,因此被广泛应用于贲门失弛缓症的诊断和疗效评价。文献中常用 TBE 5 min 钡高作为术前疗效预测和术后疗效评价的观测指标^[9-10]。而 Montazeri 等^[11]研究认为 TBE 5 min 钡柱面积与 LES 静息压相关性更高,对 LES 静息压预测价值更大。与以上文献不同,本实验的目的是比较 2 种支架的疗效,即组间疗效比较,而非术前术后的自身比较。经综合分析,我们筛选出 TBE 0~5 min 乘积

差作为本实验组间疗效比较的评价指标。

TBE 0~5 min 乘积差随访数据表明在支架取出后各随访时间点,实验组乘积差均数皆大于对照组。可以认为,相同时间内乘积差越大,食管钡剂排空量越大,食管越通畅。在支架取出后 1 周和 1 个月时,两组乘积差均数较为接近,无统计学差异,提示短期随访 1 个月内,普通食管支架和新型贲门支架疗效相似。在支架取出后 3 个月时,两组乘积差均数相差较大,差异有统计学意义($P = 0.009$),且实验组均数与造模前相应数据非常接近,两者比值为 99.80%,而对照组均数只有其造模前相应数据的 52.64%。这提示随访至 3 个月时,实验组仍维持较好疗效,而对照组疗效已显著下降。在支架取出后 6 个月时,两组乘积差均数相差亦较大,但差异无统

计学意义($P = 0.098$),考虑为样本量较小所致。同理,我们不能据此认为其中某个类型的支架就一定具有疗效。我们将治疗后随访期间数据与造模后数据分别作组内多重比较。统计结果显示,两组皆于随访至 6 个月时失去疗效。组间对照无明显差别。这一分析结果考虑与样本量较小有关。

本实验中两组均未发生食管穿孔等严重并发症。实验组支架移位率明显低于对照组,考虑为新型贲门支架管径大,纬向膨胀力大,从而增加了支架与食管黏膜间的摩擦力及在位稳定性。至于两组支架移位率无明显统计学差异($P = 0.317$),考虑为样本量较小所致。

目前,在支架成形术治疗贲门失弛缓症的众多临床报道中,支架留置时间各不一致,从 4 d ~ 3 个月不等^[3-7]。显然,在一定范围内,支架留置时间与疗效呈正相关,另一方面,支架留置时间可能与不良反应和不良事件(包括支架移位、食管壁炎性增生反应、支架粘连)的发生率及严重程度呈正相关。本实验中,两组 PCNA 及 α -SMA 增生指数均在支架取出后 1 个月时达峰值,提示支架植入后食管壁的增生性炎症反应在随访 1 个月时达最大程度。Masson 三色法染色显示支架取出后胶原纤维含量逐渐增高,于随访 3 个月时达峰值并趋于稳定状态,提示支架扩张致食管壁损伤后的瘢痕修复在支架取出后 3 个月内基本完成。由此,我们得到启发,即支架留置时间在以后的类似实验中可以适当延长,但不宜超过 3 个月,这样既可得到较充分的扩张时间,又不至于因显著瘢痕粘连致支架取出困难。但具体留置多长时间较为合适,则有待于进一步动物实验和临床研究。

[参 考 文 献]

- [1] 李柯蓓,施瑞华. 贲门失弛缓症的治疗进展[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17: 2333 - 2337.
- [2] Walzer N, Hirano I. Achalasia [J]. Gastroenterol Clin N Am, 2008, 37: 807 - 825.
- [3] 程英升,李明华,杨仁杰,等. 贲门失弛缓症的四种介入治疗成形术的选择和中远期疗效比较[J]. 介入放射学杂志, 2006, 15: 413 - 417.
- [4] 盛剑秋,晨智敏,余东亮,等. 全覆膜防反流食管支架治疗贲门失弛缓症临床疗效观察[J]. 中国消化内镜杂志, 2007, 1: 10 - 12.
- [5] 苏国强,马建华,郑卫权. 可回收金属内支架治疗贲门失弛缓症[J]. 实用医药杂志, 2009, 26: 21 - 23.
- [6] 王志强,王向东,孙刚,等. 可取出式全覆膜金属支架治疗难治性贲门失弛缓症[J]. 生物医学工程与临床, 2009, 13: 547 - 550.
- [7] Zhao JG, Li YD, Cheng YS, et al. Long-term safety and outcome of a temporary self-expanding metallic stent for achalasia: a prospective study with a 13-year single-center experience [J]. Eur Radiol, 2009, 19: 1973 - 1980.
- [8] Eckardt AJ, Eckardt VF. Current clinical approach to achalasia [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15: 3969 - 3975.
- [9] Kostic SV, Rice TW, Baker ME, et al. Timed barium esophagogram: A simple physiologic assessment for achalasia[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 120: 935 - 946.
- [10] Vaezi MF, Baker ME, Achkar E, et al. Timed barium oesophagogram: better predictor of long term success after pneumatic dilation in achalasia than symptom assessment[J]. Gut, 2002, 50: 765 - 770.
- [11] Montazeri G, Nouri N, Estakhri A, et al. Surface area: a better predictor of disease severity than the height and volume of the barium column in patients with primary achalasia [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18: 1203 - 1208.

(收稿日期:2010-01-25)