

• 实验研究 Experimental research •

端口改良型气管支架动物实验研究

王 超, 王 勇, 朱光宇, 陈 荔, 陆 建, 李田宽, 郭金和

【摘要】 目的 探讨端口改良型气管支架在减轻支架两端良性组织增生方面的效果。**方法** 选择比格犬 12 只, 随机分为实验组($n=6$)和对照组($n=6$), 实验组留置端口改良型全覆膜自膨式金属支架, 对照组留置直筒形全覆膜自膨式金属支架, 术后 2、4、8、16 周作 CT 检查, 计算气管狭窄指数及支架移位程度。术后 16 周处死所有实验犬, 取支架周围气管组织作肉眼观察、苏木精-伊红染色及增殖细胞核抗原(PCNA)染色观察, 定量分析增生细胞阳性表达。**结果** 所有气管支架均释放到位。实验组气管狭窄指数总体上显著大于对照组($P<0.01$), 第 4、8 周时两组间差异有统计学意义($P<0.05$), 第 2、16 周时两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。两组第 16 周时病理学表现相仿, 支架移位程度和术后并发症差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 通过改进覆膜支架端口设计减少气管壁良性增生是有效的, 本实验所用端口改良型气管支架具有一定的延迟支架术后良性再狭窄效果。

【关键词】 气管支架; 良性再狭窄; 动物实验

中图分类号: R562.12 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2016)-09-0793-05

A newly designed airway stent with modified ends: an experimental study in animals WANG Chao, WANG Yong, ZHU Guang-yu, CHEN Li, LU Jian, LI Tian-kuan, GUO Jin-he. Department of Intervention and Vascular Surgery, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing, Jiangsu Province 210009, China

Corresponding author: GUO Jin-he, E-mail: jinheguo@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of end-modified airway stent in reducing benign hyperplasia of the tissue around both ends of the stent. **Methods** A total of 12 experimental beagles were randomly and equally divided into the study group ($n=6$) and the control group ($n=6$). End-modified fully covered self-expandable metallic stent was employed in the beagles of the study group, while cylindrical fully covered self-expandable metallic stent was adopted in the beagles of the control group. Follow-up CT examination was performed at 2, 4, 8 and 16 weeks after stent implantation. Tracheal stenosis index and stent displacement degree were calculated. All experimental beagles were sacrificed at 16 weeks after stent implantation. The tracheal tissues around the stent were collected for macroscopic examination, and HE staining as well as proliferating cell nuclear antigen (PCNA) staining, which were used to quantitatively analyze the positive expression of proliferating cells. **Results** All stents were successfully implanted in the trachea. The tracheal stenosis index of the study group was generally significantly higher than that of the control group ($P<0.01$). The differences in the tracheal stenosis index determined at 4 and 8 weeks after stent implantation were statistically significant between the two groups ($P<0.05$), although the differences at 2 and 16 weeks after stent implantation were not statistically significant between the two groups ($P>0.05$). At 16 weeks after stent implantation the pathological findings of the two groups were basically similar, and the differences in the stent displacement degree and the incidence of postoperative complications were not statistically significant between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** Improvement of the design at the end of covered stent is an effective way to reduce the benign hyperplasia of the tissue around both ends of the

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2016.09.013

基金项目: 国家自然科学基金(81471762)

作者单位: 210009 南京 东南大学附属中大医院介入与血管外科

通信作者: 郭金和 E-mail: jinheguo@sina.com

stent. End-modified fully covered self-expandable metallic stent used in the study group carries certain effect in delaying stent benign re-stenosis after stent implantation. (J Intervent Radiol, 2016, 25: 793-797)

[Key words] tracheal stent; benign re-stenosis; animal experiment

自膨式金属支架(SEMS)具有操作简单、快捷、安全的特点,近年在良恶性中央气道狭窄介入治疗中得到广泛应用,但气管支架留置后良性再狭窄问题始终影响患者预后^[1]。为有效减轻良性增生性再狭窄,防止移位,国外第三代 SEMS 采用全覆膜及端口改良设计^[2];国内学者也指出支架构型改进有助于减少术后并发症发生^[3-4],但近年仍缺少对照性研究报道。本研究旨在通过动物实验,比较端口改良型与直筒形全覆膜 SEMS 在减轻良性组织增生、预防良性再狭窄方面的差异。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

取 12 只健康实验用比格犬(东南大学医学院实验动物中心提供),雌雄不限,体重(12.92 ± 0.84) kg,犬龄 18~24 个月。采用计算机区组随机化法(区组大小为 4)将实验犬分成两组,每组 6 只。实验组留置端口改良型全覆膜自膨式镍钛合金网状支架,对照组留置直筒形全覆膜自膨式镍钛合金网状支架。

1.2 材料与仪器

实验组用气管支架系依据实验犬气管解剖特点定制的长 40 mm、直径 18 mm 全覆膜自膨式镍钛合金网状支架(南京微创医学科技有限公司),覆以硅胶膜,支架两端呈拱形(直径 20 mm),边缘内收(直径 18 mm)(图 1①);对照组气管支架呈直筒形。检查设备:Innova 3100 IQ 型 DSA 造影机(美国通用公司)、Sensation 64 排螺旋 CT 机(德国 Siemens 公司)。

1.3 动物实验

实验前 3 d 观察并记录实验犬呼吸、发声及进食情况,CT 平扫测量气管内径,实验前禁食 6 h,禁饮 4 h。实验犬称重后以 3%异戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉注射,麻醉深度 2~3 h,完全麻醉后仰卧位固定于 DSA 手术台上,5 F 单弯导管配合下经口将 0.035 英寸超滑导丝送入气管及一侧主支气管,退出导管,沿导丝置入预装支架输送器,迅速将支架释放至气管颈段(支架上缘距声门下缘约 2 cm)(图 1②),立即透视观察支架膨胀情况及位置。术后作 CT 平扫、曲面三维重建,观测支架位置及相应段气管管径。术后前 3 d 肌肉注射地塞米松(1 mg,每日

1 次)及青霉素(3 万 U/kg,每日 2 次)预防感染、减轻喉头水肿及气道反应。

1.4 观察指标

术后观察实验犬一般情况,如精神状况及饮水、进食、发声,记录有无咳嗽、咳痰、咯血、喘鸣、呼吸困难等情况。

术后第 2、4、8、16 周分别对实验犬作麻醉后 CT 平扫、曲面三维重建检查,观察支架有无断裂、移位及端口组织增生等情况,记录支架位置(支架上缘距声门下缘距离),测量相应段气管管径,计算支架移位程度及气管狭窄指数。气管管径:(短径+长径)/2;支架移位程度:复查时支架位置-原始支架位置;气管狭窄指数:支架段气管最窄处直径/气管正常直径 $\times 100\%$ 。

术后第 16 周时分别处死所有实验犬,作病理学观察:①肉眼观察:沿支架纵向切开气管,取支架段及支架两端 2 cm 范围内气管组织,观察大体变化。②苏木精-伊红(HE)染色:标本经固定、脱水、包埋、切片、HE 染色,光镜(40~400 倍)下观察气管壁损伤及增生情况。③免疫组化分析:分别另取支架上端口、中段、下端口处气管组织切片作免疫组化分析,一抗选择小鼠抗人增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体(南京迅贝生物技术公司),二抗选择羊抗小鼠 IgG。每张切片选取黏膜下层 5 个具有典型病理特征区域,在 400 倍光镜下采集图像,采用 Image-Pro Plus 6.0 版图像分析软件对每张切片免疫组化结果作定量分析,计算测量区域阳性细胞核平均积分光密度值,取均值作为该切片测量值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料先用 Shapiro-Wilk 检验和 Levene 检验,分别检验样本正态性及方差齐性。比较狭窄指数及移位程度时,实验组与对照组组间整体上采用重复测量的方差分析,组间两两比较用多变量方差分析。比较术前气管内径、支架初始位置及平均积分光密度值时,实验组与对照组组间均采用独立样本 *t* 检验。计量资料组内两两比较均用最小显著性差异(LSD)-*t* 检验。比较术后并发症时,采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验法。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验犬一般情况

所有实验犬气管支架均顺利释放到位,术后无急性呼吸困难及咯血,仅表现为轻度咳嗽,3~5 d 逐渐缓解。3 只实验犬(实验组 1 只,对照组 2 只, $P>0.05$)于术后 10~12 周出现轻度喘鸣,2 只实验犬(每组各 1 只, $P>0.05$)于第 16 周复查 CT 时发现肺部炎症。所有实验犬术后饮水、进食及活动情况较术前无明显改变。

2.2 影像学检查

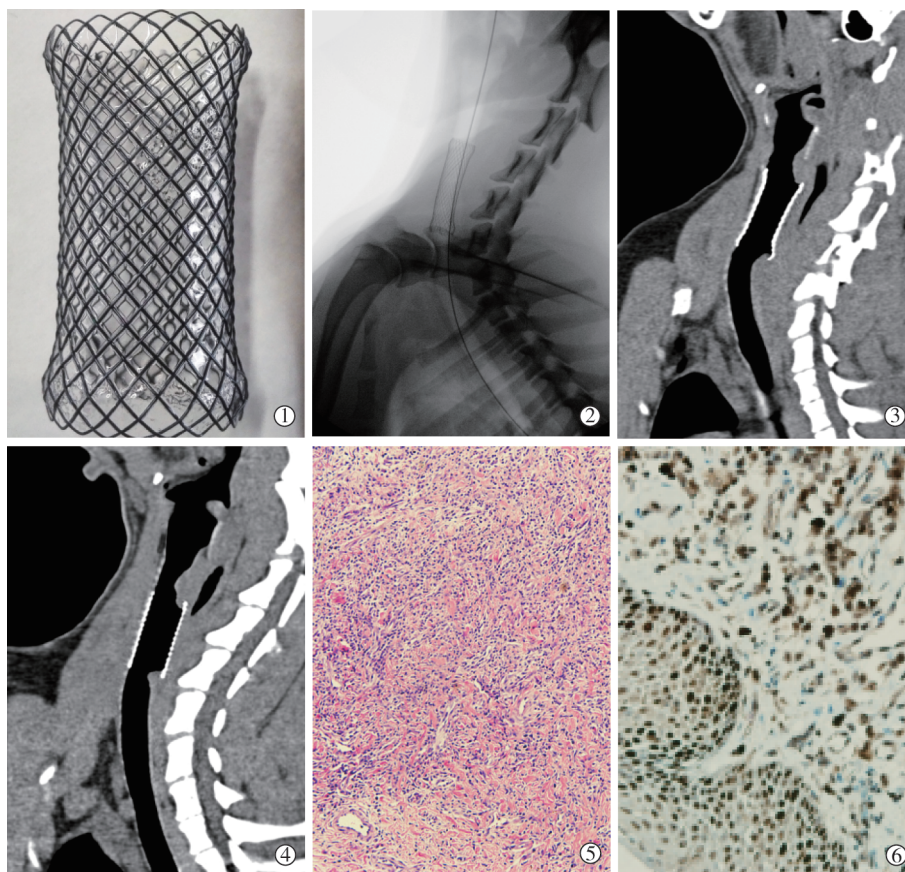
气管再狭窄情况:术前测量实验犬颈段气管内径为(13.94 ± 0.77) mm,支架直径与气管直径比例为(1.29 ± 0.07):1。实验组与对照组实验犬气管直径分别为(14.00 ± 0.89) mm、(13.88 ± 0.71) mm,差异无统计学意义($P>0.05$)。支架留置后即刻 CT 显示支架尚未充分膨开,第 2 周复查时已充分膨开,此时实验组有 2 只未观察到明显组织增生,其余 10 只均可见支架端口处轻度增生;第 4、8、16 周时两组支

架端口增生及狭窄程度逐渐加重(图 1③④);第 2、4、8、16 周时两组气管狭窄指数变化见表 1。气管狭窄指数整体上比较,实验组显著大于对照组($F=22.783$, $P=0.001$),其中第 4、8 周时差异均有统计学意义($P<0.05$),第 2、16 周时差异均无统计学意义($P>0.05$);两组组内各时间点间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 两组术后各时间点气管狭窄指数变化 $\bar{x}\pm s$

| 组别 | 第 2 周 | 第 4 周 | 第 8 周 | 第 16 周 |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 实验组($n=6$) | 1.11 ± 0.06 | 1.00 ± 0.06 | 0.85 ± 0.07 | 0.65 ± 0.10 |
| 对照组($n=6$) | 1.06 ± 0.05 | 0.92 ± 0.07 | 0.74 ± 0.09 | 0.58 ± 0.09 |
| F 值 | 2.574 | 5.157 | 6.107 | 1.791 |
| P 值 | 0.140 | 0.047 | 0.033 | 0.210 |

支架移位情况:留置支架后测得实验组与对照组支架原始位置分别为(21.46 ± 2.09) mm、(20.77 ± 2.52) mm,差异无统计学意义($P>0.05$)。两组术后复查时支架移位程度变化见表 2。支架移位程度上比较,两组间差异无统计学意义($F=0.223$, $P=$



①实验组支架全长 40 mm,体部直径 18 mm,两端呈拱形(直径 20 mm),边缘内收(直径 18 mm);②术中 DSA 示支架释放至气管颈段;③④术后 8 周实验组和对照组气管支架两端均见软组织增生,主要位于气管膜部;⑤术后 16 周实验组和对照组镜下 HE 染色示黏膜下层见大量肉芽组织形成及慢性炎性细胞浸润($\times 100$);⑥术后 16 周实验组和对照组 PCNA 免疫组化分析示上皮基底膜层及黏膜下层广泛阳性(棕黄色)表达($\times 400$)

图 1 两组支架留置后气管再狭窄实验图像

0.647);两组同一时间点及每组相邻时间点间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 两组术后各时间点支架移位程度变化 $\bar{x}\pm s, \text{mm}$

| 组别 | 第 2 周 | 第 4 周 | 第 8 周 | 第 16 周 |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 实验组($n=6$) | 6.85 \pm 2.09 | 7.21 \pm 1.73 | 7.03 \pm 1.76 | 6.91 \pm 1.91 |
| 对照组($n=6$) | 7.51 \pm 2.11 | 7.72 \pm 2.34 | 7.59 \pm 2.19 | 7.38 \pm 1.97 |

2.3 病理学检查

肉眼观察发现,术后 16 周两组气管壁均有软组织增生,主要位于支架两端,尤以气管膜部为著,伴局部充血、水肿、坏死,支架体部气管壁轻度增生,未突破支架覆膜。

HE 染色后镜下观察发现,术后 16 周两组气管壁形态基本相似。黏膜层假复层纤毛柱状上皮发生广泛鳞状化生。黏膜下层主要表现为以慢性炎症为主的炎性反应,可见慢性炎性细胞(淋巴细胞、浆细胞、单核细胞)浸润、新生毛细血管数目减少,胶原纤维增多,部分转化为瘢痕组织,局部亦可见急性炎性反应,表现为新生毛细血管明显增多,伴中性粒细胞浸润(图 1⑤)。外膜层未见明显病理改变。

免疫组化分析显示,两组气管壁黏膜层和黏膜下层均为 PCNA 广泛阳性表达(图 1⑥),免疫组化定量分析所得结果见表 3。两组间上端口、中段、下端口处软组织平均积分光密度值差异均无统计学意义($P>0.05$)。两组上下端口处平均积分光密度值均明显高于中间段($P<0.001$),上下端口间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 两组术后第 16 周平均积分光密度值 $\bar{x}\pm s, \%$

| 组别 | 上端口 | 中端 | 下端口 |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 实验组($n=6$) | 4.30 \pm 0.68 | 2.09 \pm 0.41 | 4.59 \pm 0.82 |
| 对照组($n=6$) | 4.09 \pm 0.57 | 2.35 \pm 0.62 | 4.80 \pm 0.60 |

3 讨论

国内前期动物实验表明覆膜支架能有效减少覆膜处气管壁良性增生^[5],但增生好发于支架两端。与裸支架相比,传统直筒形全覆膜支架并不能减轻良性再狭窄程度^[6]。这是因为支架边缘与气管壁较差的贴合性增加了支架对管壁的刺激,反复摩擦带来机械刺激导致软组织损伤,产生局部炎症,从而诱导肉芽组织产生,逐渐累积最终发生再狭窄^[7]。本研究将支架两端设计为拱形,其边缘内收,一方面可减轻气道损伤、减少良性增生,另一方面通过增加支架局部径向支撑力,降低支架移位率。这一构型类似于美国 Alveolus 公司 AERO 支架。AERO 支架由镍钛管直接镂刻形成,与本实验中所用网状编

织支架相比有着更好的稳定性,但支架顺应性方面表现欠佳^[2]。目前已有小样本多中心研究验证 AERO 支架在减轻软组织良性增生方面的优越性^[8]。

本实验未构建气管狭窄模型,主要基于以下原因:①临床上 SEMS 多用于治疗恶性气管狭窄,而现有模型均为气管壁良性狭窄模型。②国外多采用物理电灼法或化学损伤法^[9]构建气管狭窄模型,均需使用气管镜,甚至需多次繁琐操作,且气管狭窄程度不易控制。国内有学者采用部分切除气管环^[6]及植入裸支架^[10]方法构建气管狭窄模型,前者所建模型狭窄程度仅达 20%~30%,既不会产生临床症状,也无法给予支架足够压力;后者则是严重破坏了局部气管壁顺应性,与临床情况不符。③国内外现有动物实验已验证正常气管内留置支架的可行性与安全性^[11-12]。支架直径选择是实验设计的重要一环,所选支架直径过小,既会增加支架与气管壁额外摩擦,又易造成支架移位、脱落;所选支架直径过大,则会增加支架对气管壁压迫,加重损伤^[13]。目前临床上对支架直径选择尚无统一标准。林爱军等^[14]研究认为犬类动物实验中选用支架与气管直径比为 1.20~1.30:1,既能保持支架位置稳定,亦不会造成过大刺激。本实验未构建动物狭窄模型,为减少移位,选用稍大的(1.29 \pm 0.07):1 支架与气管直径比,术后所有支架虽均向声门方向移位,但在 1 cm 以内,且主要发生于 2 周内,2 周后支架位置相对固定,两组移位程度差异无统计学意义;实验犬术后短期内仅表现为轻度咳嗽,3~5 d 逐渐缓解,这可能归因于术后糖皮质激素及抗生素应用,10 周时 3 只犬出现轻度喘鸣,16 周时 2 只犬 CT 证实为肺炎,均考虑与再狭窄、痰液滞留有关,但两组并发症发生类型和发生率无明显差异。

本实验采用狭窄指数反映气管狭窄程度,其计量与狭窄程度呈负相关。实验结果表明实验组气管狭窄程度总体上显著小于对照组,虽然第 2、16 周时两组间狭窄指数存在差异,但并无统计学意义;支架留置后由于支架纵向顺应性及边缘贴合度较差,支架边缘对气管形成剪切力,边缘内收可减小剪切力,对气管壁产生保护作用;我们认为,支架留置初期支架摩擦、压迫产生的机械刺激对气管壁的影响,可能强于支架构型改良所产生的保护作用,因此两组间第 2 周时差异不明显。支架留置第 4、8 周时,气管壁黏膜层逐渐发生鳞状上皮化生,耐摩擦能力加强,支架边缘对气管壁直接刺激在组织损伤、肉芽组织增生方面起主要作用,此时两组间

构型改良带来的差异更加显著。支架留置第 16 周时,端口处已有良性增生限制了支架运动,支架边缘对气管壁刺激有所减小,两组间肉芽组织增生差异反而变小。与一些临床研究^[15-16]相比,本实验中实验犬术后肉芽组织增生更为严重,这也使得两组间差异更为显著;我们认为这一现象主要与实验对象选择及缺少术后气道护理有关,术后局部黏液滞留会加重感染,诱导过多肉芽组织形成^[1]。此外,样本量与测量误差对于组间狭窄指数比较,也存在一定影响。

支架留置第 16 周时,两组病理组织肉眼及光镜观察结果并没有明显差异。镜下可观察到纤维性修复过程各阶段表现,其中以肉芽组织形成伴慢性炎性细胞浸润为主,局部亦可见较新鲜肉芽组织和成熟纤维结缔组织。基于以上结果,我们认为 SEMS 留置后良性增生是组织反复损伤的修复过程,即使在留置后期,局部区域仍可有较强的增殖活性。PCNA 是一种仅在增殖细胞合成与表达的多肽,可有效反映细胞增殖活性。由于后期良性增生程度主要与黏膜下层肉芽组织增生、重塑情况相关,本实验选取黏膜下层具有典型病理特征区域测量阳性细胞核平均积分光密度值,以定量比较两组间增生组织增殖活性。本实验测得两组间对应部位增生组织平均积分光密度值差异无统计学意义,说明第 16 周时两组增生组织增殖活性相仿,预示未来增生趋势可能无明显差异。

综上,通过改进全覆膜 SEMS 端口设计减少支架植入后气管壁良性增生是可行有效的。与传统直筒形支架相比,本研究实验组所用端口改良型气管支架可减少气管壁良性增生,具有一定的延迟支架术后良性再狭窄效果,且未增加支架相关并发症,但在预防支架远期再狭窄方面尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ost DE, Shah AM, Lei X, et al. Respiratory infections increase the risk of granulation tissue formation following airway stenting in patients with malignant airway obstruction[J]. Chest, 2012, 141: 1473-1481.
- [2] Dutau H, Musani AI, Plojoux J, et al. The use of self-expandable metallic stents in the airways in the adult population[J]. Expert Rev Respir Med, 2014, 8: 179-190.
- [3] 王 勇, 朱海东, 郭金和. 支架植入治疗恶性气道狭窄的研究进展[J]. 介入放射学杂志, 2015, 24: 172-176.
- [4] 王洪武. 严格掌握气管支架适应证, 及时处理并发症[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37: 221-222.
- [5] 刘兆玉, 郎 旭, 卢再鸣, 等. 实验犬留置不同类型气管支架的基础研究[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 485-488.
- [6] 林爱军, 郭启勇, 乞文旭, 等. 实验犬气管狭窄模型置留覆膜, 非覆膜金属支架后管腔再狭窄的规律[J]. 中国医学影像技术, 2010, 26: 1648-1651.
- [7] Breitenbucher A, Chhajed PN, Brutsche MH, et al. Long-term follow-up and survival after Ultraflex™ stent insertion in the management of complex malignant airway stenoses[J]. Respiration, 2008, 75: 443-449.
- [8] Mehta AC. AERO self-expanding hybrid stent for airway stenosis [J]. Expert Rev Med Devices, 2008, 5: 553-557.
- [9] Bolliger CT, Wyser C, Wu X, et al. Evaluation of a new self-expandable silicone stent in an experimental tracheal stenosis[J]. Chest, 1999, 115: 496-501.
- [10] 张梦琦, 魏 宁, 徐 浩, 等. 可回收 Niti 记忆合金支架在犬气管狭窄模型置入中的实验研究[J]. 当代医学, 2015, 21: 1-4.
- [11] 路慧彬, 韩新巍. 气道内支架: 动物实验研究的现状与进展 [J]. 介入放射学杂志, 2009, 18: 72-76.
- [12] Kim DH, Choi CB, Chung WH, et al. Preliminary study for a newly designed silicone stent and delivery system for canine obstructive tracheal disease[J]. J Vet Med Sci, 2012, 74: 1323-1326.
- [13] 王广发. 良性中心气道狭窄的介入治疗[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33: 14-16.
- [14] 林爱军, 郭启勇, 刘兆玉, 等. 实验犬气管内留置非覆膜金属支架植入术的病理反应[J]. 中国介入影像与治疗学, 2009, 6: 23-27.
- [15] Marchese R, Poidomani G, Paglino G, et al. Fully covered self-expandable metal stent in tracheobronchial disorders: clinical experience[J]. Respiration, 2015, 89: 49-56.
- [16] Dooms C, De Keukeleire T, Janssens A, et al. Performance of fully covered self-expanding metallic stents in benign airway strictures[J]. Respiration, 2009, 77: 420-426.

(收稿日期:2016-01-18)

(本文编辑:边 估)

[1] Ost DE, Shah AM, Lei X, et al. Respiratory infections increase the risk of granulation tissue formation following airway stenting