

橡皮筋挂线手术方法制备复杂性肛瘘大动物模型与评估

马木提江·阿巴拜克热,陈慧,刘学

(新疆医科大学第一附属医院肛肠科,新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830011)

摘要:**目的** 制备和评估橡皮筋挂线手术方式的大动物肛瘘模型。**方法** 选择 15 头猪(体质量 35 ~ 42 kg)随机数字表法分成两组,实验组(8 头)全麻下用橡皮筋挂线手术方法建立 24 个肛瘘瘻管管道,对照组(7 头)全麻下用人工损伤方法建立 21 个管道。30 d 后,所有动物进行 MRI 检查,实验组取出橡皮筋,两组接受临床和组织病理学评估。**结果** 实验组与对照组在体质量、性别、瘻管数量等一般特征上对比差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验后所有动物均存活。实验组 24 个瘻管中,瘻管不愈合者(符合临床肛瘘者)18 个,经核磁共振证实在高信号状态下可清晰呈现典型瘻道结构形态者 15 个,经病理学确认固定的瘻管样结构者 14 个,临床造模成功率 75.00%。对照组 21 个瘻管中,15 个管道完全愈合,6 个不愈合(符合临床肛瘘者),经核磁共振证实在高信号状态下可清晰呈现典型瘻道结构形态者 5 个,经病理学确认固定的瘻管样结构者 4 个,临床造模成功率 28.57%。造模成功率比较,实验组显著优于对照组($P < 0.05$)。**结论** 橡皮筋挂线手术方法建立肛瘘模型稳定可靠,磁共振成像及组织学证实,实验组挂线手术方法建立的大动物瘻管具有出丰富的肉芽组织,大动物肛瘘模型可以进一步用于研究肛瘘的诊断与治疗领域。

关键词:直肠瘻;挂线法;磁共振成像;猪

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.03.016

Establishment and evaluation of large animal model of complex anal fistula using rubber ligation surgery

Mamutijiang Ababaikere, CHENG Hui, LIU Xue

(Anorectal Surgical Department, First Teaching Hospital, Xinjiang Medical University, Wulumuqi, Xinjiang 830011, China)

Abstract: Objective To create and evaluate an experimental porcine model of fistula-in-ano by using rubber ligation surgery. **Methods**

Fifteen healthy porcine were assigned into two groups randomly. Experiment group animals received rubber ligation procedure and control group received artificial damage processes. Thirtydays later after each procedure, fistula model of all porcine were detected by MRI imaging and pathological examination. **Results** All animals were alive. Baseline data of two groups were not significant statistically. Clinical success rate of animal model on experiment group was 75.00% (18 fistulas were confirmed in clinical, 15 fistulas were confirmed by MRI, and 14 fistulas were confirmed by pathology). Clinical success rate of porcine fistula model of control group was 28.57% (6 fistulas were confirmed in clinical, 5 fistulas were confirmed by MRI, and 4 fistulas were confirmed by pathology). Experimental group was significantly better than control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Operation method with rubber ligation can establish reliable fistula model. Model fistula had rich granulation tissue through the confirmation of MRI and pathology. Animal models of anal fistula can be used for the diagnosis and treatment research of anal fistula.

Key words: Rectal fistula; Thread-ligating therapy; Magnetic resonance imaging; Swine

肛瘘是肛周皮肤和直肠、肛管相通的一种慢性感染性管道,临床表现为反复发作的肛周感染,破溃流脓,若长期不治疗或治疗不规范以及长时间无法闭合的病人可能会发生肛周肛管癌性病变。肛瘘不能自愈,若不治疗,会反复发作进而引发直肠肛管周围脓肿,因此必须手术治疗^[1]。到目前为

止,全球范围内还缺乏复杂性肛瘘的“金标准”术式及客观的手术前后疗效评价体系。复杂性肛瘘的诊断及治疗是近年来国内外研究的一个热点。目前国内外采取的治疗肛瘘的手术方法很多,但都存在一定的复发率和肛门功能障碍等一系列问题。手术前瘻管主干以及分支瘻管的形态诊断不明或瘻管分支管道检查欠缺、治疗方法的选择不当和达不到根治性治疗是手术后症状再次出现的重要原因。相反,手术中为了过于强调根治将瘻管周围肌性结构的清理引起肛门括约肌误伤,最终造成完全性或不完全性肛门失禁^[2]。虽然用切开挂线法治

基金项目:新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(科技援疆项目)基金资助(2016E02063)

通信作者:马木提江·阿巴拜克热,男,教授,主任医师,博士后,硕士生导师,研究方向:肛肠外科,E-mail:834140633@qq.com

疗复杂性肛瘘是我国建国以来结直肠肛门外科治疗肛肠疾病的标志性成果之一。但由于手术后反复紧线而对病人造成痛苦,故切开挂线手术一直没有被认为是肛瘘治疗的“金标准”。因此首先通过动物模型的建立后,进一步在动物体内研究不同手术方式的优越性比较,找出最适合此种疾病愈合过程的手术或其他方法。

由于2005年之前用小动物建立的肛瘘模型始终未能很好地解释肛瘘的发病机制及相关愈合过程,国外肛肠外科专家 Gordon N 于2005年用大白猪成功建立肛瘘模型,并提出猪肛门直肠的解剖类似于人类,猪肛瘘模型对肛瘘的诊治研究可能提供平台。虽然这种模型有报道,但只限于一两篇,且局限在单纯性肛瘘领域。目前诊治矛盾主要集中在高位复杂性肛瘘上,尤其不同新型手术方式的疗效比较如纤维蛋白封闭剂或 AFP plug 等,还需进一步建立复杂性肛瘘为研究对象的动物模型研究。本前瞻性研究的目的是用橡皮筋挂线手术方法建立一种实验性猪复杂性肛瘘模型,以评估复杂性肛瘘的治疗方法的安全性及有效性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 研究时间:2014年3月至2016年12月。本研究的研究对象为新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院以及新疆维吾尔自治区畜牧科学院动物实验中心的健康长白杂交猪15头(平均体质量35~42 kg)。实验猪使用合格证号:SYXK(新)2015-0002。喂养环境:温度为24℃,室内通风良好,猪舍内风速0.20 m·s⁻¹,底料适当,饲槽及猪的密度均匀。研究组严格遵循“3R”原则(即减少、替代、优化),做到尽可能地减少活体动物实验,尽可能减少了实验动物的使用量;在实验前进行了前期训练,减少了对它们的恐惧和不安及对它们身体的疼痛、创伤、出血。

1.2 分组与基础干预 所有动物选择同种动物,所有动物用电脑随机数字表“S”型分组方法随机分成两组,实验组(8头)在全麻下用橡皮筋挂线手术方法制备24个肛瘘瘘管管道。对照组(7头)在全麻下用人工损伤方法制备21个肛瘘管道。实验组与对照组在体质量、性别、瘘管数量等一般特征上对比差异无统计学意义($P>0.05$)(见表1)。30 d后,所有动物进行MRI检查,实验组取出橡皮筋,两组接受临床和组织病理学评估。术前用药(舒泰1 mL·kg⁻¹和鹿眠宁10 mL·kg⁻¹)肌内注射,并肛周进行利多卡因2 mL局部麻醉。本研究在履行1986年动物研究伦理学法规,中华人民共和国动物保护

法及相关法律法规的基础上,通过了新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院医学研究伦理委员会委员的批准。伦理批准文号:IACUC20160901-03。

表1 两组实验猪一般情况比较

组别	猪雄雌比/头	平均体质量/(kg, $\bar{x} \pm s$)
对照组	4/3	38.9 ± 2.2
实验组	4/4	39.9 ± 1.7
$\chi^2(u)$ 值	0.058 6	(0.974 7)
P 值	0.808 7	0.329 7

1.3 实验组造模方式 麻醉生效后,常规消毒后,所有的猪在侧卧位进行了肛门视诊、指诊及肛门镜检查。在截石位3、9及12点位置,离肛门约2 cm处,在肛缘外侧进行0.5 cm切口进入坐骨直肠坐骨肛门窝对应的部位。考虑到6点的位置极为接近猪尾巴及尾骨,有通过脊髓引发败血症的可能性而没有被使用。用中弯钳从小切口处直接穿入齿状线以上肛门括约肌结构。中弯钳刺破肛门直肠黏膜,中弯钳从肛门内夹取橡皮筋穿过整个瘘道,使皮筋在肛周切口处穿出。用细线固定皮筋,避免其脱落及堵塞肛门,纱布包扎固定切口。将猪送回饲养室,观察直至动物苏醒,术后进行生命体征进行监测。

1.4 对照组造模方式 麻醉、消毒、肛肠检查均与实验组相同。在截石位3、9及12点位置,离肛门约2 cm处,在肛缘外侧进行0.5 cm切口进入坐骨直肠坐骨肛门窝对应的部位。用中弯钳从小切口处直接穿入齿状线以上部分,纱布包扎固定切口,术后一切观察与治疗均与实验组相同。

1.5 术后观察 两组动物每日观察伤口并进行换药处理。术后第30天,全麻下去除挂线并当日行MRI检查,观察管道周围形态,并全身麻醉下切取瘘管组织进行苏木精-伊红染色显微病理学检查确认管道形态,所有动物在全身麻醉下去除挂线后行MRI检查及切取瘘管组织进行病理学检查进一步确认。

1.6 观察指标 形成瘘管外口流有分泌物,初诊触及明显条索状物并瘘管未愈合表明临床造模成功。MRI显示瘘管样结构,组织病理学证实有瘘管基本形态,管壁富有增生的结缔组织及瘢痕组织,成纤维细胞成分验证瘘管已经形成。

1.7 统计学方法 应用Excel软件建立数据库,应用SPSS 19.0统计软件进行分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料组间比较

采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

所有动物均存活。实验组与对照组在体质量、性别、瘘管数量等一般特征上对比差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验组中,不愈合者(符合临床肛瘘者)18 个,经核磁共振证实在高信号状态下可清晰呈现典型瘘道结构形态者 15 个,经病理学确认固定的瘘管样结构者 14 个,临床造模成功率 75%。对照组中,15 个管道完全愈合,6 个不愈合(符合临床肛瘘者),经核磁共振证实在高信号状态下可清晰呈现典型瘘道结构形态者 5 个,经病理学确认固定的瘘管样结构者 4 个,造模成功率28.57%。造模成功率比较,实验组模型成功率显著优于对照组($P < 0.05$)(见表 2)。

表 2 两组造模成功率比较

组别	猪数/ 头	瘘管 数量/个	临床造模 成功率/%	MRI 造模 成功率/%	病理学造模 成功率/%
对照组	7	21	28.57	23.81	19.05
实验组	8	24	75.00	62.50	58.33
χ^2 值			7.924 5	5.313 6	5.658 5
P 值			0.004 9	0.021 2	0.017 4

3 讨论

肛瘘是指肛管与肛周皮肤之间形成的一种相互连通的慢性感染性“通道”,也称为“肛管直肠瘘”^[3]。肛瘘,尤其是高位复杂性肛瘘在临床上是极为常见而又比较难解决的外科疾患,目前是当今世界肛肠外科领域难治性疾病之一,术后复发率高、手术创面的愈合时间过长、术后控制排便功能障碍是本病的诊治难点之一。肛瘘虽然属于慢性感染性通道,但它与一般性感染不同^[4]。目前国内外治疗肛瘘的方法很多,传统的肛瘘治疗如瘘管切除、瘘管切开、挂线疗法、瘘道旷置引流术等手术方式的共同缺点是创伤大、愈合时间长、部分病人可出现肛门功能受损甚至大便失禁(在高位复杂性肛瘘可达 10%~50%,大便失禁率 23%~55%^[5-8]),而经肛直肠黏膜瓣下移内口修补术复发率较高,生物蛋白胶封堵术虽然对瘘管有良好的封堵作用,但国外 Meta 分析中成功率差异大。

不难看出,上述手术方式均有明显缺陷,均未能成为高位复杂性肛瘘的标准术式,但考虑到高位复杂性肛瘘有一定的癌变率,多数学者更倾向于手术治疗。需要结直肠肛门外科领域紧急解决的最突出问题是找到一种既符合肛门直肠解剖生理又能消除所有症状的微创术式。国内肛门直肠疾病

的研究多数围绕临床研究,基础研究较少。随着对肛周解剖、肛门直肠生理及肛瘘发病机制的研究和新的治疗观念及手段的应用,肛肠疾病动物研究也有了较大的进步,然而由于技术难度大,耗费大,无法较为容易开展大动物的基础研究。目前国内肛瘘的模型研究也寥寥无几。若能通过大动物模型研究阐明肛瘘的发病与发展过程,积极寻求可能根治肛瘘的手段,既要达到根治的同时,也要有效维护肛门括约肌功能的完整性,临床上对实际病人起着很重要的作用。这就需要比较系统的动物研究支持。有些新的微创手术方式(如纤维蛋白胶或生物补片^[9-10]等)也应通过完整的动物实验数据阐明瘘管的愈合机制相关证据。

由于人类肛瘘及肛门括约肌的切除性研究不现实,肛瘘理想的动物模型模式是牧羊犬,然而因为这些物种的肛门腺体结构与人类不同,且因国家动物保护法的限制,无法用猴等动物做模型,考虑到肛门外括约肌环绕肛管的布置更类似于人类的肛门直肠结构,我们设计用猪进行手术方法建立肛瘘模型并获得满意的标本。本研究为肛瘘的进一步诊治研究提供可行的实验动物模型。实验组中,不愈合者(符合临床肛瘘者)18 个,经核磁共振证实在高信号状态下可清晰呈现典型瘘道结构形态者 15 个,经病理学确认固定的瘘管样结构者 14 个,临床造模成功率 75%。我们通过手术方法获得的所有模型成功肛瘘通过核磁共振及苏木精-伊红染色显微分析,可发现腔瘘管组织与邻近肉芽组织的形态,在肛门肌肉组织结构上与人类肛门外括约肌结构及其相似。模型瘘管经核磁共振证实瘘管区域高信号与人类肛瘘表现相同,可清晰发现齿状线,腺体内括约肌结构及瘘管管壁。通过动物模型研究,经 MRI 以及组织病理学证实及评估,猪肛门腺及肛门外括约肌周围结构结构与人类极为相似。模型肛瘘经组织学检查评估有瘘管腔及肛瘘的典型组织病理学特征。我们认为通过挂皮筋或橡皮筋瘘管易创建,且有很好的耐受性,经磁共振成像和组织学评估证实,形成的瘘管类似于人类肛瘘结构。我们观察实验动物 30 d 后,对照组 15 个及实验组 6 个瘘管自行闭合。自行闭合可能与猪机体抗感染能力较强有关^[11],有关自行闭合的相关机制还需要进一步研究。本研究中发现瘘管周围许多上皮与成纤维细胞、炎细胞及肌细胞增生。故可以认为,人类肛瘘的形成可能与人造管道周围组织慢性肛管直肠上皮化有关。本研究同时阐明,单纯损伤性过程无法制备满意的肛瘘标本,必须给足

够的时间让瘻管管道逐步形成。

人类肛瘻高复发始终未得到解决^[12-15]。国外众多肛肠外科科学家探索应用微创手术方式治疗肛瘻,然而均未能形成标准的治疗方法^[16-19]。我们也尝试了微创手术方式的探索^[20],但后期随访发现,成功率不令人满意。对于疗效较低,甚至有较大争议的治疗手段更有必要从动物研究或其他机制研究验证或阐明相关的机制。猪肛门解剖类似于人类,核磁共振成像、组织学证实:人工形成的瘻管具有丰富的肉芽组织,挂线橡皮筋方法简单易操作,这种方法制作的大动物肛瘻模型可以进一步用于研究肛瘻的诊断与治疗领域。

参考文献

- [1] MCCOLL I. The comparative anatomy and pathology of anal glands [J]. *Ann R Coll Surg Engl*, 1967, 40 (1): 36-67. PMID: 6016560.
- [2] LUNNISS PJ, ARMSTRONG P, BARKER PG, et al. Magnetic resonance imaging of anal fistulae [J]. *Lancet*, 1992, 340 (8816): 394-396.
- [3] HARVEY CE. Perianal fistula in the dog [J]. *Vet Rec*, 1972, 91 (2): 25-33.
- [4] GREINER TP. Surgical treatment of canine perianal fistulas [J]. *Vet Med Small Anim Clin*, 1981, 76(5): 663-664.
- [5] PARKS AG. Pathogenesis and treatment of fistula-in-ano [J]. *BMJ*, 1961, 1 (5224): 463-469.
- [6] BUCHANAN GN, SIBBONS P, OSBORN M, et al. Experimental model of fistula-in-ano [J]. *Dis Colon Rectum*, 2005, 48(2): 353-358.
- [7] HAN JG, XU HM, SONG WL, et al. Histologic analysis of acellular dermal matrix in the treatment of anal fistula in an animal model [J]. *J Am Coll Surg*, 2009, 208(6): 1099-1106.
- [8] ADEDEJI OA, BAILEY CA, VARMA JS. Porcine dermal collagen graft in abdominal-wall reconstruction [J]. *Br J Plast Surg*, 2002, 55(1): 85-86. DOI: 10.1054/bjps.2001.3711.
- [9] LEONARDO LENISA, ELOY ESPÍN-BASANY, ANDREA RUSCONI, et al. Anal fistula plug is a valid alternative option for the treatment of complex anal fistula in the long term [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2010, 25(12): 1487-1493.
- [10] DE LA PORTILLA F, RADA R, JIMEN'EZ-RODRIGUEZ R, et al. Evaluation of a new synthetic plug in the treatment of anal fistulas: results of a pilot study [J]. *Dis Colon Rectum*, 2011, 54(11): 1419-1422. DOI: 10.1097/DCR.0b013e31822c4d59.
- [11] OMMER A, HEROLD A, JOOS A, et al. Gore bioa fistula plug in the treatment of high anal fistulas-initial results from a German multicenter-study [J]. *German Medical Science*, 2012, 10(13): 1-17. DOI: 10.3205/000164.
- [12] VAN DER HAGEN SJ, BAETEN CG, SOETERS PB, et al. Long-term outcome following mucosal advancement flap for high perianal fistulas and fistulotomy for low perianal fistulas: recurrent perianal fistulas: failure of treatment or recurrent patient disease? [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2006, 21(8): 784-790. PMID: 16538494.
- [13] JORDÁN J, ROIG JV, GARCÍA-ARMENGOL J, et al. Risk factors for recurrence and incontinence after anal fistula surgery [J]. *Colorectal Dis*, 2010, 12(3): 254-260.
- [14] O'RIORDAN JM, DATTA I, JOHNSTON C, et al. A systematic review of the anal fistula plug for patients with Crohn's and non-Crohn's related fistula-in-ano [J]. *Dis Colon Rectum*, 2012, 55(3): 351-358. DOI: 10.1097/DCR.0b013e318239d1e4.
- [15] VAN KOPEREN PJ, D'HOORE A, WOLTHUIS AM, et al. Anal fistula plug for closure of difficult anorectal fistula: a prospective study [J]. *Dis Colon Rectum*, 2007, 50(12): 2168-2172. PMID: 17701369.
- [16] SCHWANDNER O, STADLER F, DIETL O, et al. Initial experience on efficacy in closure of cryptoglandular and Crohn's transphincteric fistulas by the use of the anal fistula plug [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2008, 23(3): 319-324. PMID: 18038233.
- [17] KY AJ, SYLLA P, STEINHAGEN R, et al. Collagen fistula plug for the treatment of anal fistulas [J]. *Dis Colon Rectum*, 2008, 51(6): 838-843. DOI: 10.1007/s10350-007-9191-2.
- [18] LAWES DA, EFRON JE, ABBAS M, et al. Early experience with the bioabsorbable anal fistula plug [J]. *World J Surg*, 2008, 32(6): 1157-1159. DOI: 10.1007/s00268-008-9504-1.
- [19] CHRISTOFORIDIS D, ETZIONI DA, GODLBERG SM, et al. Treatment of complex anal fistulas with the collagen fistula plug [J]. *Dis Colon Rectum*, 2008, 51(10): 1482-1487.
- [20] A BA-BAI-KE-RE MM, WEN H, HUANG HG, et al. Randomized controlled trial of minimally invasive surgery using acellular dermal matrix for complex anorectal fistula [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(26): 3279-3286. DOI: 10.3748/wjg.v16.i26.3279.

(收稿日期:2016-11-01,修回日期:2017-02-02)