

## 自体腹膜移植回肠浆肌重建膀胱动物模型的初步建立\*

沈俊<sup>1,2</sup>, 宋志强<sup>1</sup>, 沈海山<sup>3</sup>, 聂义鑫<sup>3</sup>, 吴建臣<sup>3</sup>, 李胜文<sup>1,3,△</sup>

(1. 清华大学医学中心, 北京 100083; 2. 贵州医科大学附属医院泌尿外科, 贵阳 550004;

3. 清华大学第一附属医院泌尿外科, 北京 100016)

**[摘要]** **目的** 初步建立自体腹膜移植回肠浆肌层重建膀胱的家兔实验动物模型, 为以后动物模型的建立及临床应用这种新的手术方法提供基础实验依据。**方法** 使用封闭饲养的成年大耳白雌兔 7 只, 体质量 4.0~5.0 kg, 在静脉麻醉下行自体腹膜移植回肠浆肌层重建膀胱手术(选取近末段回肠祛除肠黏膜及黏膜下层, 取自体腹膜覆盖于带血供的浆肌层表面, 再与缺损顶部及前壁部分的膀胱残垣进行吻合修补重建膀胱), 术后 4、8 周分别安乐处死动物, 取出替代膀胱部位标本进行常规病理学及免疫组织化学检查。**结果** 7 只进行手术实验, 其中 3 只死于术后并发症, 剩余 4 只术后正常存活, 无肠梗阻、尿瘘或腹膜炎等并发症发生。所截取回肠段长约 4.0 cm, 腹膜面积约 4.0 cm×2.5 cm, 移植腹膜均全部成活, 术后观察动物排尿可, 黄清。病理学: 术后 4 周可见移植腹膜全部存活, 8 周可见移行上皮完全取代腹膜覆盖重建部位, 未见肠上皮细胞残留与再生。**结论** 自体腹膜移植回肠浆肌层重建膀胱手术是可行的, 它是一种较为理想的肠膀胱手术新方法, 同时也为更加接近人体的大型动物模型的建立及为这种新的手术方法可能在临床的应用提供最基本的实验依据。

**[关键词]** 模型; 动物; 腹膜; 膀胱; 回肠浆肌**[中图分类号]** R694**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)32-4471-03

## An initial experimental model of reconstruction bladder by ileal seromuscular with transplantation of autologous peritoneum\*

Shen Jun<sup>1,2</sup>, Song Zhiqiang<sup>1</sup>, Shen Haishan<sup>3</sup>, Nie Yixin<sup>3</sup>, Wu Jianchen<sup>3</sup>, Li Shengwen<sup>1,3,△</sup>

(1. Medical Center, Tsinghua University, Beijing 100083, China; 2. Department of Urology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 3. Department of Urology, the First Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop an ideal substitution material for bladder defect, which can reduce serious complications of urinary intestinal diversion, we establish experimental rabbit model of reconstruction the new bladder by ileal seromuscular with transplantation of autologous peritoneum. This animal research provides the basic ground for the experimental model and further clinical application of replacement bladder. **Methods** Randomly, seven experimental female rabbits were chosen, and their body weight was 4.0—5.0 kg. By intravenous anesthesia, the bladder substitute operation was carried out (to transplant the peritoneum to an ileum segment which mucosa had been removed. These flaps were used to mend and reconstruct the bladder by composite cystoplasty). Animals were euthanized at 4, 8 weeks for routine pathology and immunohistochemistry. **Results** Seven rabbits underwent reconstruction, but three were lost to complications. The length of ileum was 4.0 cm, and the area of substitute peritoneum was 4.0 cm×2.5 cm. Voiding behaviour was normal, and urine was clear in the remainder. At autopsy, reconstructed bladders were healthy. Pathological examination showed that the technique was successful in creating seromuscular segments with no epithelial remnants. When applied surgically, the seromuscular flaps with peritoneum survived at 4 weeks and the peritoneum was substituted by transitional epithelium at 8 weeks. **Conclusion** In this experimental rabbit model, reconstruction bladder by autologous peritoneum and seromuscular segment is an ideal approach for which can prevent regrowth by ileal epithelial cells and overcome the complications of conventional enterocystoplasty. Voiding behaviour is normal in the remainder. This animal study provides the basic ground for the large experimental model and further clinical application of the new enterocystoplasty.

**[Key words]** model; animal; peritoneum; bladder; ileal seromuscular

目前临床沿用及改良的各种肠膀胱手术仍然存在术后不同程度并发症, 如感染<sup>[1]</sup>、代谢紊乱<sup>[2]</sup>、肠黏液增多堵塞尿道<sup>[3]</sup>、结石形成<sup>[4]</sup>及恶性肿瘤形成或复发<sup>[5]</sup>等, 其原因在于膀胱具有分泌和吸收功能。为解决上述并发症, 作者选用家兔作为实验对象, 初步建立自体腹膜移植于去黏膜的回肠浆肌层重建膀胱的动物实验模型, 探讨其可行性, 为进一步临床实验提供实验基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料及术前准备** 选取健康成年大耳白雌兔 7 只, 普通级, 体质量 4.0~5.0 kg, 由清华大学第一附属医院动物实验中心提供。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。所需特殊仪器设备及耗材试剂如下: 一个双目手术显微镜平台(上海: SXP-1C), 上海精钟的眼科手术精细器械一套(剪刀 1 把, 镊子 2 把, 钳子 2 把), F10 双腔气囊尿管 7 根, F2.5 硬膜外导

管 14 根,4/0,6/0,8/0 微乔/单乔线(ETHICON)各 7 个,免疫组织化学试剂盒 2 个(Calretinin/CK7),由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。在充分的术前肠道准备(术前 24 h 禁食,不禁饮)及有效的麻醉下分别进行手术操作。

**1.2 手术方法** 全身静脉麻醉后,面罩吸氧,简易心电图监护。同时,仰卧位保定动物,剪除家兔下腹部毛,裸露皮肤,常规碘伏消毒 2 次,铺敷。沿下腹正中线切开皮肤、皮下、肌层直达盆腹腔,首先可见充盈的膀胱,大小约 6.0 cm×3.0 cm×2.0 cm,抽取尿液拍照比对,在膀胱顶部盆腹腔之间寻及腹膜反折,剪取面积约 4.0 cm×2.5 cm 腹膜,区分正反面,浸入生理盐水待用。切开膀胱,寻及两侧输尿管开口,用 F2.5 硬膜外导管分别置入输尿管上行 8.0~10.0 cm,其下端由尿道引出,并置入 F10 双腔气囊尿管。距回盲部约 10 cm 处以近方向选取长约 4 cm 回肠,血供良好。将回肠残端用 6/0 单乔线对位间断吻合,关闭系膜孔。将选取回肠段对系膜缘纵行剪开肠管,在一自制软木板(面积约 10.0 cm×10.0 cm)上平铺开,并用大头针固定肠壁边缘,置于显微镜平台下进行剥离肠黏膜及黏膜下层,仅留取浆肌层(图 1)。把选取的腹膜粗糙面贴于裸露的肠壁肌层上,用 8/0 微乔线间断缝合固定边缘。切除膀胱顶部及前壁部分(面积约 3.0 cm×2.0 cm),尿管注水囊 8~10 mL,将备好的腹膜肠壁覆盖其上并与膀胱残垣用 6/0 单乔线间断缝合关闭膀胱。查无明显出血,清点器械、敷料无误,分别用生理盐水和甲硝唑稀释液冲洗腹腔及创面,关闭切口,术毕。术中给予头孢呋辛 0.75 g(分 2 次)。外露尿管及输尿管导管用胶布固定于家兔尾巴上。

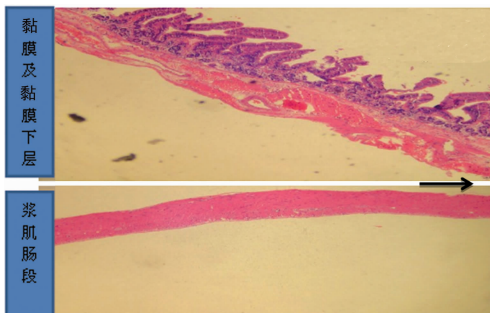


图 1 回肠壁剥离层面(HE×10)

**1.3 术后养护及管理** 术后继续禁食 2 d,不禁饮,补液 200 mL/d,每分钟 20 滴;术后 2 d 常规使用抗菌药物头孢呋辛 0.75 g/d(分 2 次);注意观察输尿管导管引流通畅情况,发现梗阻,即用庆大霉素稀释溶液适度冲洗抽吸,保持通畅引流。在输液过程中需要专人看护,避免动物抓咬输液管道。术后第 2 天输液完成之后麻醉下拔出尿管及双侧输尿管导管,术后第 3 天给予半流质饮食,术后第 4 天恢复正常饮食。术后 4 周与 8 周分别各安乐处死 2 只动物,再次打开盆腹腔,抽取膀胱内尿液拍照与术前比对,切除膀胱标本送病理科行常规 HE 染色及免疫组织化学染色检查。

## 2 结 果

7 只动物手术基本顺利完成(其中 2 只在剥离肠黏膜时破损失败,行二次截取肠段再次剥离成功),术后 3 只动物分别于第 3、4、5 天自行咬出尿管及输尿管导管,导致术后尿感感染死亡,1 只动物术后第 2 天早上发现输尿管导管堵塞无尿,引发急性肾盂肾炎和肾衰,立即用庆大霉素稀释液冲洗并抽吸导管,使其通畅引流,抢救成功。剩余 4 只动物术后恢复良好,拔出尿管及输尿管导管之后,观察其排尿通畅,尿液黄清,未见明显尿频。术前与术后分别抽取尿液对比无明显差异。术后 4 周安乐处死 2 只动物,见肠管吻合良好,通畅无梗阻,周围粘连

轻,膀胱周围轻-中度粘连,打开膀胱见重建膀胱肠壁及附着腹膜存活,分界尚清(图 2),切除膀胱标本送病理检查,分别进行常规 HE 染色及免疫组织化学(Calretinin)观察,结果如图 3 和图 4 所示;移植腹膜与肠壁浆肌层连接紧密,染色及显色区分明显,未见明显肠上皮及杯状细胞再生。术后 8 周安乐处死另 2 只动物,见术区盆腔中度粘连,切除并打开重建膀胱见吻合边缘模糊,腹膜替代部分似被完整尿路上皮覆盖(图 5),标本送检。HE 染色见表层上皮完整,细胞排列有序,与正常膀胱上皮类似,而且吻合处肌层交界明显,见图 6;移植腹膜(间皮类特异染色 Calretinin 阴性)未见显示,见图 7;浆肌肠段存活良好,其上覆盖 3~5 层尿路上皮移行上皮细胞(上皮类特异染色 CK7 强阳性),二者之间未见明显肠上皮及杯状细胞再生,见图 8。

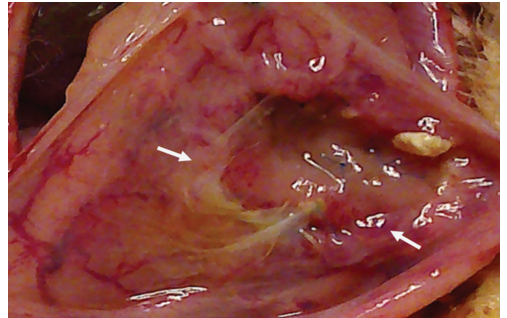


图 2 术后 4 周重建膀胱腔内吻合界面(箭头示)

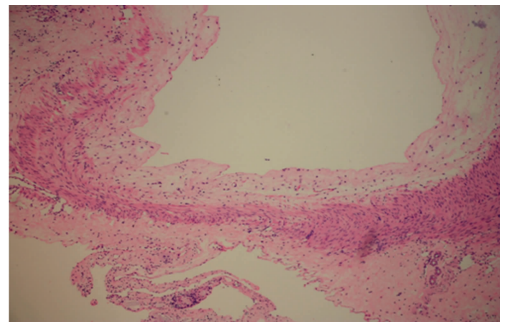


图 3 术后 4 周膀胱标本病理检查(HE×10)

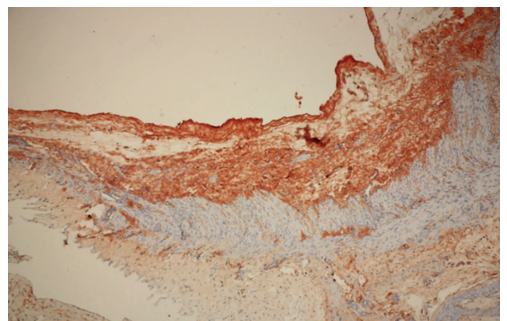


图 4 术后 4 周膀胱标本病理检查(Calretinin×20)

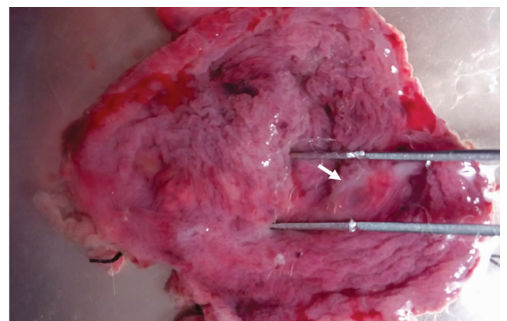


图 5 术后 8 周重建膀胱腔内吻合边缘模糊(箭头示)

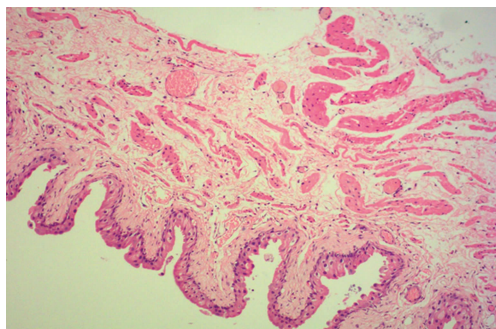


图 6 术后 8 周重建膀胱腔内表层(HE×20)

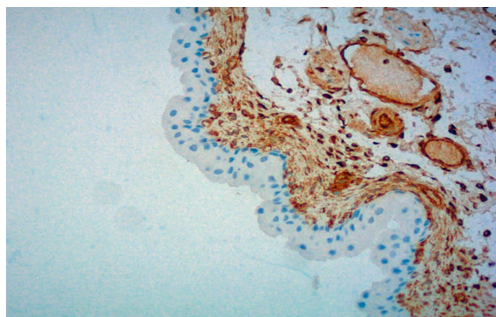


图 7 术后 8 周重建膀胱腔内表层(Calretinin×40)

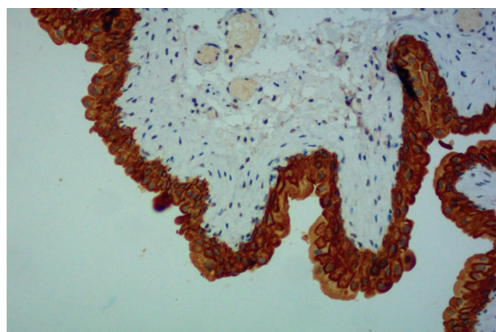


图 8 术后 8 周重建膀胱腔内表层(CK7×40)

### 3 讨 论

虽然肠膀胱手术技巧日臻完善,但用来修复膀胱的肠管本质未变,因而手术后与其相关的分泌及吸收所致并发症仍然困扰着临床医生与患者,尽管也有许多学者曾经想到破坏肠黏膜的方法<sup>[6]</sup>,如用机械方法刮除黏膜,或用化学方法(无水乙醇/酶)破坏黏膜,以期减少肠黏膜的分泌与吸收,但效果均不尽如人意。相对于传统方式而言,作者采用完整剥离肠黏膜及黏膜下层,并用自体腹膜移植覆盖的方法,既可祛除术后相关并发症,又可保护剥离创面肌层免受尿液刺激。Turner 等<sup>[7]</sup>建立动物模型取出膀胱黏膜上皮细胞在体外支架上进行培养扩增,然后再把该支架连同培养好的尿路上皮一起自体移植到一段带血供的结肠(去上皮浆肌层)上进行膀胱成型术,获得成功,但是,取出自体膀胱黏膜上皮细胞的局限性及培养时间较长,而且需二次手术可能,这就使得临床实际应用受限。另外,有研究报道<sup>[8-9]</sup>,可利用自体腹膜移植进行阴道重建,效果满意。因此,作者认为自体腹膜移植于去黏膜的浆肌肠段重建膀胱理论上是可行的。本实验的设计与初步建立家兔动物模型是成功的,通过手术前后家兔排尿行为及膀胱穿刺抽取尿液比较发现无明显异常改变,说明重建膀胱无肠黏液的分泌、梗阻及感染征象;术后 4 周的病理切片检查:常规 HE 染色与免疫组织化学 Calretinin 抗体(腹膜间皮类特异性抗体)特异阳性表达显色,证实移植腹膜与浆肌回肠段附着紧密,存活良好,二者之间

未见肠上皮再生。术后 8 周处死动物打开膀胱发现重建膀胱吻合边缘模糊,有一层膜覆盖,经免疫组织化学检查证实移植腹膜消失,取而代之的是尿路移行上皮(Calretinin 抗体染色阴性,上皮类特异性抗体 CK7 染色强阳性),仅有 3~5 层细胞,排列规则,说明此时移行上皮爬行修复初毕,上皮仍较薄。同样,有学者在用犬腹膜重建黏膜剥脱输尿管的实验时发现术后 10 周腹膜间皮被成熟的移行上皮替代<sup>[10-11]</sup>。有关移植腹膜消失或转化为尿路移行上皮的具体机制尚未明了,目前有两种假说<sup>[12-13]</sup>,其一是周围移行上皮细胞爬行长入,移植腹膜被上皮覆盖吸收,其二是腹膜间皮化生所致。本实验对此未作进一步研究。

对于肠黏膜剥离后是否会出现黏膜上皮再生以及继续分泌黏液的问题,从理论上讲只需将黏膜下层一并剥离,则不会出现黏膜再生与黏液分泌,因为黏膜再生的基础和主要分泌黏液的杯状细胞主要就在黏膜下层。有研究发现<sup>[14]</sup>,若将黏膜下层一起剥除会影响浆肌肠段的延展性,而切开浆肌层由外而内在黏膜肌与黏膜下层之间仔细剥离,在浆肌层面保留足够多的黏膜下血管,这样也可以避免肠黏膜再生,同时可以给移植植物提供更好的滋养血管。但文中未提及杯状细胞与黏液是否分泌的问题。本实验是将黏膜与黏膜下层一并剥离,结果未见肠黏膜及杯状细胞再生,重建膀胱内无黏液分泌,尿液清亮。尽管剥离后浆肌肠段收缩相对明显,但是术后伸展性良好,未见膀胱形态挛缩,分析其原因,可能与剥离黏膜时肠壁肌肉受刺激收缩,用腹膜覆盖创面避免接触尿液刺激,待其修复后延展性自然恢复。这和邹建华等<sup>[15]</sup>的研究结果一致。

本实验是用家兔作为实验对象,由于其肠管细小,肠壁菲薄,作者选择由腔内向外剥离黏膜及黏膜下层,这也是本实验难点所在,它不仅要求术者在显微镜下的熟练操作,而且需要助手的积极协调配合才能完成。Subramaniam 等<sup>[14]</sup>研究提出,在尿管水囊的支撑吸附下从乙状结肠管外剥脱浆肌层的方法更为优越,因为它不打开肠腔,可以减少肠内污物引起的感染,而且出血少,视野清晰,容易辨别剥离层次。他们用的实验动物是猪,对于大型动物来说,肠壁较厚,从腔外剥离肠黏膜的确优于从腔内剥离黏膜。作者曾尝试分别用猪的或家兔的肠管从腔外剥除肠黏膜,家兔的浆肌层菲薄,很难完整剥离获取,而对猪的肠壁剥离就相对容易。对于导尿管的留置问题也很重要,尿管的水囊主要起支撑重建膀胱部分腹膜的作用,输尿管导管是把尿液直接引出体外,避免过早浸泡刺激移植植物创面。不同动物尿管留置时间要求不一样,对于猪,要求留置尿管 2 周<sup>[7,14]</sup>,作者经过试验观察,家兔术后留置尿管时间最好不要超过 2 d。本实验死亡 3 只均是由于留置尿管超过 2 d 不能耐受,自行咬断拔出,从而导致膀胱尿道受损,出现尿瘘,感染死亡。另外,家兔的修复能力很强,虽然只带管引流 2 d,但术后检查发现移植腹膜与浆肌肠段存活良好,结合紧密。

自体腹膜移植浆肌肠段重建膀胱家兔模型的成功建立,为下一步使用更加接近人体的大动物做进一步实验研究奠定理论基础,它也为肠代输尿管的发展拓宽了思路,为这种新的手术方法可能在临床的应用提供最基本的实验依据。

### 参考文献

- [1] Shigemura K, Tanaka K, Arakawa S, et al. Postoperative bacteriuria, pyuria and urinary tract infection in patients with an orthotopic sigmoid colon neobladder replacement[J]. J Antibiot (Tokyo), 2014, 67(2):143-145. (下转第 4477 页)

用序贯疗法可缩短住院时间,降低治疗费用,减少静脉注射所致的疼痛及其他危险,增加患者的依从性。莫西沙星注射液说明书推荐对复杂盆腔感染患者(如伴有输卵管-卵巢或盆腔脓肿)治疗时,需经静脉给药,因此作者认为在初始治疗时宜选用莫西沙星注射液,在患者的症状体征缓解后应及时转为莫西沙星片口服给药方案,且根据莫西沙星注射液说明书,莫西沙星用于治疗社区获性肺炎和复杂腹腔感染均推荐序贯治疗。采用序贯治疗对选用的抗菌药物有较高的药代动力学要求,包括口服吸收良好、体内代谢少、半衰期长且生物利用度接近注射剂等,本研究表明莫西沙星口服吸收良好,在盆腔组织的药物浓度高,半衰期长,生物利用度高,能够满足序贯疗法对所选的抗菌药物的药代动力学要求,是序贯疗法治疗泌尿道感染、盆腔炎的合理选择。

#### 参考文献

[1] 孟静娟. 新抗生素莫西沙星国内外研究应用最新进展[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 98-101.

[2] 张亚坤, 张志清, 杨涛, 等. 盐酸莫西沙星氯化钠注射液在 Beagle 犬体内的药物动力学[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(4): 273-275.

[3] 钟明康. 感染模型家庭兔体内莫西沙星的药理学[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(1): 15-18.

[4] Fernández-Varón E, Bovaira MJ, Espuny A, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of moxifloxacin in rabbits after intravenous, intramuscular and oral administration[J]. J Vet Pharmacol Ther, 2005, 28(4): 343-348.

[5] Gardner SY, Davis JL, Jones SL, et al. Moxifloxacin pharmacokinetics in horses and disposition into phagocytes after oral dosing[J]. J Vet Pharmacol Ther, 2004, 27(1): 57-60.

[6] 陈锦虹. 莫西沙星治疗急性盆腔炎的临床疗效分析[J]. 中国实用医药, 2010, 5(7): 9-10.

[7] MacGowan AP. Moxifloxacin (Bay 12-8039): a new methoxy quinolone antibacterial[J]. Expert Opin Investig Drugs, 1999, 8(2): 181-199.

[8] 陈俊林, 施军卫, 顾德林, 等. 莫西沙星及利福布丁方案对初次复治涂阳肺结核超短程治疗价值[J]. 重庆医学, 2012, 41(28): 2966-2968.

[9] 周春丽, 周村建, 邓军, 等. 莫西沙星治疗非淋菌性尿道炎(宫颈炎) 86 例疗效分析[J]. 重庆医学, 2009, 38(4): 431-433.

[10] Müller M, Dela Pea A, Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents; distribution in tissue[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(5): 1441-1453.

[11] 王小均, 刘春涛, 余勤, 等. 盐酸莫西沙星的全身和肺部药代动力学比较研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2008, 7(2): 88-92.

[12] 钱嫣蓉, 万欢英, 项轶, 等. 莫西沙星在人体肺内的分布特征[J]. 中国新药与临床杂志, 2009, 1(1): 11-14.

(收稿日期: 2015-07-08 修回日期: 2015-08-16)

(上接第 4473 页)

[2] Vasdev N, Moon A, Thorpe AC. Metabolic complications of urinary intestinal diversion[J]. Indian J Urol, 2013, 29(4): 310-315.

[3] Ji H, Pan J, Shen W, et al. Identification and management of emptying failure in male patients with orthotopic neobladders after radical cystectomy for bladder cancer[J]. Urology, 2010, 76(3): 644-648.

[4] Tiu A, Soloway MS. Giant neobladder stone[J]. ANZ J Surg, 2014, 84(5): 390-391.

[5] Hadzi-Djoki J, Pejci T, Andrejevi V, et al. Transitional cell carcinoma in orthotopic ileal neobladder 12 years after radical cystectomy[J]. Vojnosanit Pregl, 2013, 70(11): 1062-1064.

[6] 高金龙, 王晓雄, 洪宝发, 等. 无水乙醇肠粘膜处理的实验研究[J]. 军医进修学院学报, 2006, 27(4): 292-294.

[7] Turner A, Subramanian R, David FM, Thomas, et al. Transplantation of Autologous Differentiated Urothelium in an Experimental Model of Composite Cystoplasty[J]. Eur Urol, 2011, 59(3): 447-454.

[8] Ait Sakel A, Asseban M, Kallat A, et al. Vaginoplasty from peritoneal tube of Douglas' pouch for androgen insensitivity syndrome (two case reports)[J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2014, 43(6): 470-473.

[9] 陈树波, 董丽霞. 改良会阴 H 形切口在腹腔镜下腹膜阴

道成形术中的应用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2013, 27(1): 69-71.

[10] Zhang J, Gu GL, Liu GH, et al. Ureteral reconstruction using autologous tubular grafts for the management of ureteral strictures and defects; an experimental study[J]. Urol Int, 2012, 88(1): 60-65.

[11] 荆翌峰, 夏术阶, 孙宏斌, 等. 游离腹膜管重建黏膜剥脱输尿管的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(3): 174-176.

[12] 荆翌峰, 夏术阶, 李杜渐, 等. 利用游离腹膜重建犬黏膜剥脱输尿管的远期疗效观察[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(6): 412-414.

[13] Nannil L, Vallasciani S, Fadda G, et al. Free peritoneal grafts for patch rethoplasty in male rabbits[J]. J Urol, 2001, 16(5): 578-580.

[14] Subramanian R, Turner AM, Abbas SK, et al. Seromuscular grafts for bladder reconstruction; extra-luminal demucosalisation of the bowl[J]. Urology, 2012, 80(5): 1147-1150.

[15] 邹建华, 南勋义, 党建功, 等. 膀胱粘膜点状移植于浆肌层肠段重建膀胱的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 1996, 17(6): 364-367.

(收稿日期: 2015-06-10 修回日期: 2015-09-16)