

慢性胃食管反流病大鼠模型制备方法的探讨

杨路亭¹, 张亚肖², 刘红梅¹, 杨金良², 姜慧卿^{3*}

(1. 河北医科大学第三医院消化科, 石家庄 050051; 2. 河北医科大学第三医院胸外科; 3. 河北医科大学第二医院消化科, 石家庄 050000)

[摘要] **目的:**探讨保留全胃的3种类型慢性胃食管反流病(GERD)动物模型制备方法,以提高模型制备的质量及成功率。

方法:雄性SD大鼠,随机分为假手术(SO)对照组($n=20$)、十二指肠胃食管反流(DGER)组($n=47$,食管胃十二指肠吻合术)、单纯胃食管反流(GER)组($n=20$,幽门部分缝扎+贲门肌切开术改行胃底食管吻合术)、十二指肠食管反流(DER)组($n=21$,空肠食管吻合术改行胆总管开口远侧十二指肠与食管吻合术),分别制备保留全胃的3种类型GERD动物模型。术后对动物持续喂养观察及测量体质量,并对非预期死亡动物随即进行尸体解剖;存活动物分批于术后1、2、3、4个月处死进行食管病理分析。**结果:**麻醉意外死亡3只。术后非预期死亡26只(24.1%),其中DGER组死亡18只(38.3%),GER组1只(5%),DER组死亡7只(33.3%)。SO组中动物未见死亡。尸解分析死亡原因有梗阻、感染、窒息、出血、吻合口瘘和穿孔等。各模型组存活动物均可见不同程度病变形成,且术后生存质量良好。**结论:**本研究所采用的保留全胃的3种类型慢性GERD动物模型制备方法,模型质量及病变形成率高,但术后动物死亡率亦较高。要制备符合研究需要的慢性GERD动物模型,不但要选择合理的术式以保证模型质量,还要采取一定措施预防术后并发症,降低非预期死亡率,以提高模型制备成功率。

[关键词] 胃食管反流;模型;动物;保留全胃

[中图分类号] R 571 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0431-04

Rat chronic gastroesophageal reflux disease model: a study of 3 preparation methods

YANG Lu-ting¹, ZHANG Ya-xiao², LIU Hong-mei¹, YANG Jin-liang², JIANG Hui-qing^{3*} (1. Department of Gastroenterology, The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, The Third Hospital of Hebei Medical University; 3. Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

[ABSTRACT] **Objective:** To introduce 3 methods for preparation of stomach-conserving gastroesophageal reflux disease (GERD) model in rats, so as to improve the quality and successful rate of model preparation. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were divided into sham-operated(SO) group ($n=20$) and 3 stomach-conserving reflux model groups: duodenogastroesophageal reflux (DGER) group ($n=47$, esophagogastroduodenal anastomosis), gastroesophageal reflux(GER) group ($n=20$, partial pyloric ligation + cardiomyotomy followed by gastric fundus-esophagus anastomosis) and duodeno-esophageal reflux (DER) group ($n=21$, jejuno-esophageal anastomosis followed by duodeno-esophageal anastomosis). Rats were observed closely after operation and their body weights were monitored. The rats that died unexpectedly were autopsied immediately and the surviving rats were sacrificed to observe the esophageal pathological changes at 1, 2, 3, and 4 months after operation. **Results:** Three rats died due to anesthetic accidents; 26 (24.1%) died unexpectedly after operation, 18 (38.3%) in DGER group, 1 (5%) in GER group, and 7 (33.3%) in DER group; no rat died in SO group. Necropsy showed that the death cause of rats included obstruction, infection, asphyxia, hemorrhage, anastomosis leakage and perforation, etc. Esophageal pathological changes were noticed in all rats of 3 model groups; the life quality of surviving rats was good. **Conclusion:** The 3 methods for establishing rat stomach-conserving GERD model can produce high quality model and high rate of pathological changes, but with high post-operation mortality. In addition to rational operative methods, avoiding post-operation complications and unexpected death are also very important for successful GERD model preparation.

[KEY WORDS] gastroesophageal reflux; models; animal; remaining stomach

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 431-434]

慢性胃食管反流病(GERD)动物模型制备方法多种多样,但要成功制备不同类型慢性GERD动物模型,一方面术式设计必须合理,另一方面还需注意术前、术中及术后诸多因素的影响。国内外文献报道的GERD模型制备方法^[1~5]大多需切除全胃,影响模型动物术后存活质量;部分仅能制

备急性模型,不符合GERD病程迁延特点。本研究分别采用

[作者简介] 杨路亭,教授、主任医师,硕士生导师。

E-mail: yang610805212@sina.com

* Corresponding author. E-mail: huiqingjiang@yahoo.com.cn

5种保留全胃的术式设计制备了3种不同类型慢性GERD大鼠模型,总结并探讨了不同类型慢性GERD模型制备经验。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性SD大鼠111只,清洁级,体质量(210±30)g,购于河北省实验动物中心[许可证号:SCXK(冀)2003-1-003]。每笼3~5只,标准实验条件[室温(23±2)℃,湿度(55±5)%],颗粒饲料喂养。

1.2 实验条件及物品准备 所有手术均在清洁级动物手术室内进行。实验人员穿消毒隔离服,戴无菌手套。备好电子秤、手术台、无菌孔巾、7-0无创尼龙缝线、麻醉剂(氯胺酮)、消毒剂(碘伏)、手术器械(剪刀、镊子、手术刀)等。

1.3 实验方法 按研究需要对实验大鼠分别设计制备了3种类型GERD动物模型,并随机选择20只作为假手术对照组。术前禁食24~30h,禁水12h。先用台式电子秤测量每只大鼠体质量,以氯胺酮100mg/kg腹腔注射麻醉成功后,将动物以仰卧位置于手术台上,四肢及头部固定。胸腹部以碘伏消毒,铺无菌孔巾。上腹正中开腹施行手术。吻合口选用7-0无创缝线全层密集缝合。术后禁食30h,自由进水。术后密切观察动物饮食、排便及活动情况,每周测量体质量1次。对死亡动物随即行尸体解剖,观察胸腹腔脏器大体改变,以对其死因作出分析判断。存活动物分批于术后1、2、3、4个月处死观察食管病理变化。

1.3.1 十二指肠胃食管反流(duodenogastroesophageal reflux,DGER)组 按Chen等^[1]采用的食管胃十二指肠吻合术(esophagogastroduodenal anastomosis,EGDA)制备模型共47只。于食管胃交接处和距幽门1cm十二指肠游离缘分别沿长轴全层切开1.5cm,黏膜面相对将两者行侧-侧吻合,保留全胃,注意避免伤及胃腺区。

1.3.2 单纯胃食管反流(gastroesophageal reflux,GER)组 先按于强等^[2]建立的酸性反流性食管炎大鼠模型改良制

备法行幽门部分缝扎+贲门肌切开;用外径1.55mm的金属针穿刺入胃并通过幽门,结扎剩余幽门;贲门肌纵行切开0.5cm。再改行食管下段与胃底吻合术;游离食管下段及胃底穹隆部,分别于食管下段与胃底相对位置做1.0cm切口,然后黏膜相对行侧-侧吻合,保留全胃。造模20只。

1.3.3 十二指肠食管反流(duodenoesophageal reflux,DER)组 先参照Kumagai等^[3]建立的食管-胃-空肠侧-侧吻合术制备十二指肠胃反流模型的方法,将其改良为空肠-食管侧-侧吻合术制备十二指肠食管反流模型;于胃食管交界处食管下段左侧壁和距Treitz韧带3cm远侧空肠游离缘分别做1.0cm切口,然后将食管空肠行侧-侧吻合术,使十二指肠液通过吻合口回流食管;后改行胆总管开口远侧十二指肠中段与食管下段吻合术;游离食管下段及胆总管开口远侧十二指肠,注意勿伤及胆管。将游离的十二指肠顺时针弯曲,于食管下段右侧壁和十二指肠中段(距胆总管开口远侧2cm处)游离缘分别做1.0cm切口,黏膜相对将两者侧-侧吻合,保留全胃。造模21只。

1.3.4 假手术组(sham operation,SO)组 常规麻醉开腹后,仅游离食管下段、十二指肠及胃底,约15min后关腹。共20只。

1.4 统计学处理 采用t检验和χ²检验。

2 结果

2.1 术后一般情况 各模型组术前平均体质量与对照组相比无显著性差异;术后1周各组动物体质量均有增加,但各模型组仍低于对照组(P<0.05或0.01),其中又以DER组和DGER组更为显著(P<0.01)。手术后2~4周各组大鼠饮食、活动基本恢复正常,GER组、DGER组平均体质量增加与对照组无明显差异,而DER组大鼠平均体质量增加显著低于对照组(P<0.01,表1)。所有死亡动物死前营养状态差,体毛无光泽,食少懒动,体质量不能恢复。

表1 各实验组大鼠术后体质量增加情况

Tab 1 Increase of body weight in all groups after operation

Group	N	Time post-operation(t/week)			
		1	2	3	4
GER	19	22.0±13.9*	57.1±16.3	80.2±21.5	99.8±29.7
DER	14	13.1±23.5**	39.6±37.5**	52.1±48.6**	62.4±55.6**
DGER	29	18.3±17.9**	65.3±30.3	90.0±22.3	118.8±36.1
SO	20	38.8±15.5	74.1±22.1	95.4±31.6	111.5±32.5

* P<0.05, ** P<0.01 vs SO group; GER: Gastroesophageal reflux; DER: Duodenoesophageal reflux; DGER: Duodenogastroesophageal reflux; SO: Sham operation

2.2 不同类型GERD实验动物模型的死亡率 111只实验大鼠除3只麻醉意外死亡外,其余108只于术后6周内非预期死亡共26只(24.1%),其中DGER组死亡18只(38.3%,18/47);GER组死亡1只(5%,1/20);DER组死亡7只(33.3%,7/21);SO组20只动物术后无死亡。各模型的死

亡率以GER组最低(P<0.05)。

2.3 死因分析 尸检分析显示动物死亡原因有梗阻、感染、窒息、出血、吻合口瘘和穿孔等。其中DGER组大鼠术后24h内死亡6只,3d内死亡8只,3~7d死亡4只;GER组仅1只于术后24h内死亡,为腹腔化脓感染所致;DER组大鼠于

术后 24 h 内死亡 3 只, 3 d 内死亡 2 只(分别死于腹腔感染和梗阻), 3~7 d 死亡 1 只(吻合口瘘), 尚有 1 只于术后 39 d 死亡, 尸检发现食管及胃腔内陈旧积血, 食管下段可见溃疡形成。

2.4 食管病理变化 术后 1 个月时除 GER 及 DGER 组各 1 只动物外, 余各组动物均可见不同程度肉眼病变, 2 个月时除 GER 组 1 只外各模型组均可见较明显的食管黏膜病变, 此后随时间延长各组食管黏膜改变逐渐加重, 并逐渐向上延伸, 尤以 DER 组为著(图 1)。光镜下以淋巴细胞及少量嗜酸性粒细胞和巨噬细胞浸润的慢性炎症为主, 某些动物尚伴有急性炎细胞浸润。食管上皮部分或全层缺损, 底部覆以渗出物及肉芽组织, 并可见食管上皮层不同程度增厚, 以基底层及棘层细胞增生为主, 乳头延长, 并可见溃疡形成(图 2), 以 DER 组为著。对照组均未见明显肉眼及组织学改变。

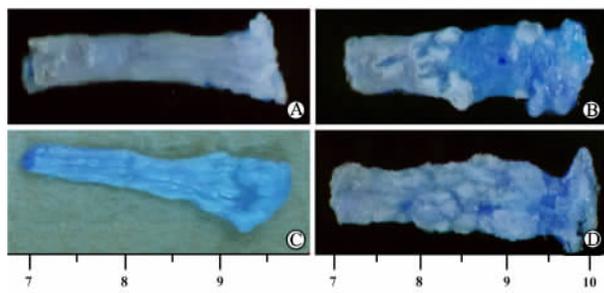


图 1 食管病变大体观察

Fig 1 Macro-specimen of esophagus in different models at the 4th month

A; SO, normal mucosa; B; DER, mucosa injury was severe and characterized by erosive, mucosal sloughing, reactive hyperemia, and necrosis; C; GER, esophageal mucosa with congestion and edema; D; DGER, mucosa with haemorrhagia and nodule

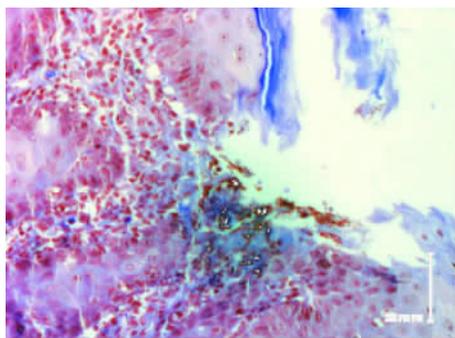


图 2 造模后食管病理变化, 形成溃疡

Fig 2 Ulceration was seen in DER group on the 4th month after operation (200×)

3 讨论

理想的动物模型制备方法, 一方面必须保证较高的存活率和生存质量, 方法应尽量简单易行; 另一方面更要求病变形成率高, 并符合研究需要。两者缺一不可。本研究所采用

的保留全胃的 3 种类型慢性 GERD 动物模型制备方法, 术后模型生存质量及病变形成率均较高, 但死亡率亦较高。

3.1 死亡原因分析 慢性 GERD 实验动物模型制备方法多种多样, 随术式不同术后死因报道不一。Chen 等^[1]报道食管胃十二指肠吻合术后死因可能有麻醉、出血、吻合口缝线断开或食管狭窄。Kumagai 等^[4]采用食管-胃-空肠侧-侧吻合术制备大鼠模型, 术后死因主要为十二指肠内容物反流并发症。王雯等^[5,6]采用不同术式制备 3 种反流性食管炎模型, 大鼠死亡多见于围手术期内, 其中单纯胃液反流组因手术方式复杂, 创伤较大且手术时间长, 死亡率最高(37.1%)。分析术后主要死因包括腹腔感染(弥漫性腹膜炎或脓肿)和肺部感染, 部分死于小肠出血坏死及吻合口出血。汪涛等^[7]制备胃十二指肠混合反流模型术后, 观察动物主要死亡原因为吻合口瘘、梗阻、肺部及腹腔感染。本研究观察发现: 动物死因包括消化道梗阻、胸腹腔感染、反流窒息、大出血、吻合口瘘、胃壁穿孔等单一或综合因素。主要与下列因素有关。

3.1.1 模型制备术式 食管胃十二指肠吻合术不失为一种制备慢性 DGER 模型较成功的方法⁽⁸⁾, 但手术方法较复杂, 技术要求较高, 术后死亡率亦较高。空肠食管侧-侧吻合术制备慢性 DER 模型, 因肠袢与食管下端左侧壁吻合后易于受胃底压迫(尤其于进食后)造成内容物输出受阻, 而改行胆总管开口远侧十二指肠中段与食管下段吻合术, 避免了胃底对肠袢的压迫, 另外十二指肠采取顺钟向吻合有利于内容物通过。但该术式难度较大, 技术要求亦较高, 故本组术后动物死亡率仍较高, 有待进一步探讨。

3.1.2 术中技巧及手术技能 同一术式中采用技巧不同, 术后存活率不同。汪涛等^[7]应用食管十二指肠吻合术探讨建立反流性食管炎大鼠模型的最佳方案。结果认为全层间断密集缝合是此模型最佳的吻合方式。大鼠内脏器官小, 对操作者手术技术及技巧要求较高。如 DER 组中死亡的动物大多可见胃扩张而吻合口无梗阻, 远段肠管空虚, 可能与肠管成角有关。肠管扭曲成角后易引起近端消化道梗阻, 从而使模型难以制备成功。

3.1.3 迷走神经损伤 本研究中所有术式均须游离食管下段, 可能损伤迷走神经。26 只术后死亡动物中大多有胃扩张, 除与手术技巧有关外, 可能与迷走神经损伤致消化道动力障碍亦有关。尤其在食管胃十二指肠吻合术后死亡大鼠, 大多胃肠普遍扩张, 考虑均与迷走神经损伤致排空障碍有关。

3.1.4 感染因素 术后死亡 26 只中腹腔感染 4 只, 除操作因素外, 可能与术前禁食时间不足, 手术时胃腔内较多食物残渣溢出造成腹腔污染有关。王雯等^[5,6]认为肺部感染高发可能是由食管反流所致。反流常导致呼吸系统损害^[9], 尤其当消化道梗阻伴大量胃肠内容物反流时极易并发吸入性病变, 如吸入性肺炎、胸腔感染, 甚至窒息。本研究中死于消化道梗阻动物中, 大多死前均有呼吸困难, 口鼻青紫, 甚至口鼻白沫外溢, 2 只可见并发胸腔感染。

3.2 术后动物生存质量 体质量变化是反映动物营养状态及生存质量的客观指标。本研究中实验动物手术前后体质量检测结果表明,尽管术后较术前一度下降(可能与术中失血及体液丢失有关),但1周后随着喂养时间延长各组存活动物平均体质量逐渐增加。DER组大鼠术后平均体质量增加低于对照组,可能与术中损伤较大或术后病变形成较重而影响营养有关。其余两组动物体质量增加与对照组无显著差异,提示保留全胃的造模方法有助于保证动物术后营养及生存质量。

3.3 食管病变形成 3种类型模型组动物均有不同程度病变形成,且术后喂养时间延长病变程度逐渐加重,食管下段病变向上段蔓延。尤以十二指肠液为主反流模型组显著,与文献报道一致^[6],说明本研究中采用的保留全胃的慢性GERD模型制备方法设计合理。

综上所述,本研究所采用的3种类型慢性GERD动物模型制备方法,术中全部保留全胃,术后模型生存质量及病变形成率均较高,符合GERD自然病程。但模型制备术后动物死亡率尚较高,为进一步提高GERD动物模型制备成功率,应注意以下几点:(1)术前禁食时间不应少于24h(我们后来将术前禁食时间延长至30h),否则若胃肠内食物残渣存留,术中易造成腹腔污染,增加术后感染机会;(2)选择某些术式制备GERD动物模型,术中应注意避免消化道扭曲成角导致术后梗阻;(3)游离食管下段时应谨慎操作,以免损伤迷走神经;(4)若术中发现胃内食渣残留较多,腹腔污染较重,应于关腹前以生理盐水充分冲洗后酌情给予抗生素预防感染。(5)吻合口须缝合扎实,以免吻合口漏及出血;(6)手术中一旦损伤大血管应及时有效结扎止血;(7)腹腔注射麻醉剂宜

选择左下腹为穿刺点。

[参考文献]

- [1] Chen X, Yang GY, Ding YW, et al. An esophagogastroduodenal anastomosis model for esophageal adenocarcinogenesis in rats and enhancement by iron overload[J]. *Carcinogenesis*, 1999,20:1801-1807.
- [2] 于强,袁红霞,崔乃强.酸性反流性食管炎大鼠模型的改良制备[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2002,10:74-75.
- [3] Kumagai H, Mukai-sho K, Sugihara H, et al. Cell kinetic study on histogenesis of Barrett's esophagus using rat reflux model[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2003,38:687-692.
- [4] Kumagai H, Mukai-sho K, Sugihara H, et al. Thiopropine inhibits development of esophageal adenocarcinoma induced by gastroduodenal reflux in rats[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25: 723-727.
- [5] 王雯,李兆申,许国铭,等.不同方式建成3种反流性食管炎模型[J]. *解放军医学杂志*, 2000,25:171-173.
- [6] 王雯,许国铭,李兆申,等.胃及十二指肠液对食管黏膜损伤的实验研究[J]. *中华消化杂志*, 2000,20:240-242.
- [7] 汪涛,陈杰,刘斌,等.反流性食管炎大鼠模型的建立[J]. *陕西医学杂志*, 2004,33:677-679.
- [8] Su Y, Chen X, Klein M, et al. Phenotype of columnar-lined esophagus in rats with esophagogastroduodenal anastomosis: similarity to human Barrett's esophagus[J]. *Lab Invest*, 2004,84: 753-765.
- [9] 程荣辉,翁雪建.以呼吸道症状为突出表现的胃食管反流病[J]. *中华消化杂志*, 2000,20:406-407.

[收稿日期] 2005-08-26

[修回日期] 2006-03-30

[本文编辑] 孙岩

Expression and characterization of Gag protein of HIV-1(CN) in *Pichia pastoris*

Jiang WZ, Jin NY, Li ZJ, Zhang LS, Wang HW, Zhang YJ, Han WY(Institute of Immunology, Second Military Medical University of PLA, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] To express the core protein of HIV-1 of Chinese prevalent strain (HIV-1(CN)) in *Pichia pastoris*, the full-length gag gene was inserted into the secretory expression vector pHILS1. Linearized recombinant plasmid pHILGAG by Sall was electrotransformed into the yeast strain GS115, and the yeast transformants were identified by PCR. To induce the interest protein to be expressed, the PCR positive transformants were inoculated in the medium of BMGY and BMMY, mRNA of the strain was detected by RT-PCR, and the expressed protein was analyzed by SDS-PAGE, Western blotting and thin layer scanning. mRNA (1.3 kb) was amplified by RT-PCR. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the molecular mass of the expressed protein was 55 kD, which was similar to the expected value, and the expressed protein could react with McAb to HIV-1 p24. Thin layer scanning analysis demonstrated that the whole amount of the expressed protein was approximately 13% of the soluble protein in the supernatant. The recombinant yeast had good genetic stability. The optimal expression conditions of the engineering yeast were as follows: BMMY medium, 80-90% of dissolved oxygen, 1% methanol, and 3-day-cultivation course. Gag proteins were expressed under the optimal expression condition and purified via gel filtration chromatography. The purity of the interest protein was up to 85%. After the purified proteins were inoculated into BALB/c mice, the anti-HIV-1 antibodies in the immunized mice could be detected by Western blotting.

[J Virol Methods, 2005,123: 35-40]