

· 基础研究 ·

5-氟尿嘧啶局部治疗兔瘢痕性 喉气管狭窄的实验研究

杨希之, 毛小慧, 敖华飞, 顾 健, 孔德秋

(上海交通大学医学院附属第三人民医院 耳鼻咽喉头颈外科, 上海 201900)

摘要: **目的** 评价5-氟尿嘧啶(5-Fu)对兔瘢痕性喉气管狭窄的疗效。**方法** 新西兰兔20只,利用尼龙刷刮擦法,刮除气管黏膜约0.5 cm宽度,诱导气管内瘢痕形成,将诱导瘢痕性喉气管狭窄成功的模型动物随机分为两组,每组10只,用5-Fu(A组)和生理盐水(B组)均于刮擦后7 d经气管穿刺瘢痕内注射给药,用药后4、8、12、16、20、24 d纤维喉镜下观察气管狭窄情况,并以用药日记作0天计算生存时间,利用Kaplan-Meier法计算生存率和绘制生存曲线,并做log-rank检验。**结果** 5-Fu组生存时间明显长于生理盐水组($P = 0.0128$);组织学观察, A组成纤维细胞和胶原纤维稀疏分散分布,主要位于组织深部,黏膜组织呈不均匀分布于刮擦区表面;B组管腔内刮擦区域充满了由增生的纤维细胞以及胶原纤维组成的瘢痕组织。**结论** 5-Fu对兔瘢痕型喉气管狭窄的治疗有一定的效果,可以作为喉气管狭窄的治疗方法进行进一步研究。

关键词: 5-氟尿嘧啶;喉气管狭窄;瘢痕性;狭窄度;局部治疗

中图分类号: R766.7

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2011)03-0175-06

Experimental study of 5-fluorouracil in the topical treatment of laryngotracheal stenosis in rabbit models

YANG Xi - zhi , MAO Xiao - hui , AO Hua - fei , et al .

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery , the Third People ' s Hospital , School of Medicine , Shanghai Jiaotong University , Shanghai 201900 , China)

Abstract : **Objective** To evaluate the efficacy of 5-fluorouracil (5-Fu) in treatment of laryngotracheal stenosis in rabbit models . **Methods** Tracheal menbrane of 20 New Zealand rabbits was scraped about 0.5 cm with a nylon brush to induce scar formation , and then randomly divided into 2 groups : 5-Fu group and saline group . Intralesional 5-Fu injection by tracheal puncture was given for seven days after surgery . The stenosis degree was observed under laryngofiberscope at days 4 , 8 , 12 , 16 , 20 , 24 after administration . The day of administration as day 0 , survival of animals was monitored . A survival curve was obtained by the Kaplan-Meier method and analyzed by the log-rank test . **Results** Survival time in the 5-Fu group was significantly prolonged compared to that in the control group ($P = 0.0128$) . Histologic photomicrographs of 5-Fu group showed that granulation tissue formation was rarely seen in the scraped lesion . The remain granulation tissue was patchy in distribution over the lesion . Most of the patchy granulations were located in deep layer of the tracheal rather than in superficial layer . Howener , in the control group dense granulation tissue composed of proliferating fibroblasts and thickened collagen fibers was seen in the scraped lesions . **Conclusion** 5-Fu can prevent airway stenosis in rabbit models .

基金资助:上海市卫生局青年基金项目资助(2010Y141)。

作者简介:杨希之,男,硕士研究生。

通讯作者:敖华飞,Email:david5882004@126.com.

Key words : 5-fluorouracil (5-Fu) ; Laryngotracheal stenosis , cicatrice ; Degree of stenosis ; Topical treatment

瘢痕性喉气管狭窄是气管插管、喉外科手术常见并发症,虽然发病率不高,但治疗却非常困难。目前,治疗方法主要为手术治疗和药物治疗,手术治疗主要包括球囊扩张术、支架植入术、喉气管重建术等。但由于其创伤性和较高的再狭窄率限制了其广泛应用^[1-2]。而药物治疗操作方便,创伤小,易于被患者接受,成为治疗喉气管狭窄的研究热点。5-Fu 是一种传统的抗肿瘤药物,它通过抑制细胞 DNA 合成,和掺入 RNA 干扰蛋白质的合成来抑制细胞的增殖^[3-4]。现已广泛应用于病理性瘢痕的治疗,取得较好的效果^[5]。国内外关于喉气管狭窄治疗的报道甚多,但对于药物治疗还处于初级阶段,国内可查文献中尚无关于药物治疗瘢痕性气管狭窄的报道。本实验将结合药物治疗瘢痕性气管狭窄最新研究进展,以探讨 5-Fu 在瘢痕型喉气管狭窄方面的疗效。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年新西兰白兔 20 只,体重 2.4 ~ 2.6 kg,雌雄不拘,由上海交通大学医学院实验动物中心提供。动物生产许可证:SCXK(沪)2007-0005,使用许可证号:SYXK(沪)2008-0050。

1.1.2 试剂 陆眠宁 II(原军需大学军事兽医研究所提供),3%戊巴比妥钠(购于上海试剂二厂),5-氟尿嘧啶(国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.3 仪器设备 奥林巴斯电子喉镜(BF-260 型),十万分之一电子天平(AE240 型,梅特勒-托利多有限公司),动物心电监护仪(美国 Surgivet V3404)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 参照国外研究报道^[6-7]刮擦法造模方式进行造模,所有实验兔造模前禁食 6 ~ 8 h,陆眠宁 II 0.1 ~ 0.2 ml/kg 静脉注射诱导麻醉,以及 3%戊巴比妥钠 0.5 ml/kg 静脉注射,维持麻醉后将实验兔

仰卧固定,并对其呼吸心率进行监护,剃光颈前区被毛,以 0.5%碘伏消毒,铺无菌巾,做颈前区正中纵向切口,长约 5 cm,逐层剥离直至暴露喉和气管,距环状软骨 2 cm 处横向切开气管,约周径 2/3,然后用尼龙刷沿头方向插入气管内,并来回进行刮擦 10 次左右,刮擦区域约距切口 0.5 cm,刮擦宽度约 0.5 cm,刮擦需在内镜监视下进行,以黏膜完全刮除为目的,刮擦中出现的气管内出血,可用止血棉球压迫止血,确认止血后,用 4-0 号单丝线进行 3-4 针间断缝合气管。然后肌肉、皮下组织、皮肤进行逐层缝合。

1.2.2 分组与干预 前期刮擦术后 1 周,将 20 只已经发生喉气管狭窄的实验兔按照随机原则分为两组。A 组(实验组):内镜指引下经皮穿刺,将 0.4 mg/ml 的 5-Fu 直接注射入狭窄处增生组织;B 组(对照组):药物改为生理盐水,用药方式同 A 组。各组实验兔分别在用药后 20 d 内不再予任何干预措施,对于观察期间死亡的实验兔,切取狭窄部位并做组织切片观察。

1.2.3 评价指标 治疗效果的评价指标主要为狭窄度(degree of stenosis)和生存时间,狭窄度计算公式为 $(1-s/S) \times 100\%$,其中 s 为发生狭窄时候气管通气腔的面积;S 为未发生狭窄时通气管腔面积,即刚刮擦完毕后对环状刮擦带所围成的面积。计算方法为全身麻醉下经内镜进行图片采集,经图片游标卡尺测量环状刮擦带的最大径 D 和最小径 d,所谓成管腔的面积即 $S = \pi \left(\frac{D+d}{2} \right)^2$,s 计算公式亦是如此。为保证测

量精确性,每次对气管狭窄度进行测量计算时严格保证将内镜前端定位于声带处进行采集。根据 Nakagishi^[6-7]报道的分级标准将狭窄度进行分级:1 级, $\leq 25\%$;2 级, $> 25\% \sim 50\%$;3 级, $> 50\% \sim 75\%$;4 级, $> 75\%$ 。生存时间以用药时间点记作 0 d,观察期间内发生实验兔死亡,均切取狭窄组织,置于 4%中性甲醛固定 24 h 后,清水漂

洗,石蜡包埋后切片,片厚 4 μm,常规 HE 染色,电子显微镜下观察。

1.3 统计学方法

应用 SPSS V13.0 软件进行统计分析。所有数据均以均数 ± 标准差表示 ($\bar{x} \pm s$),并进行 t 检验。以用药第 1 天记为生存期 0 天,利用 Kaplan-Meier 法计算生存率和绘制生存曲线并做 log-rank 检验, $P < 0.05$ 有意义。

2 结果

2.1 动物模型构建结果

构建模型时 1 只实验兔发生气管内出血窒息死亡,最后纳入药物干预实验的实验兔数量实际为 19 只,将 19 只实验兔进行分组,5-Fu 组(A 组)数量 10 只,对照组(B 组)9 只。各组实验兔体重、哮鸣音程度,以及狭窄度情况见表 1,刮擦后 7 d 各组动物均出现不同程度的哮鸣音,但各组之间无明显差异(表 1)。

2.2 药物治疗效果

对照组实验兔哮鸣音和狭窄程度进一步加重,于干预措施实施后第 8 d 已有一半死亡,19 d 时全部死亡。5-Fu 组因 1 只实

验兔穿刺时发生窒息死亡,所以实际纳入该组的实验兔数量为 9 只。药物注射后,A 组兔子的气管狭窄度以及哮鸣音得到较明显改善($P = 0.016$)。内镜下所见 5-Fu 组实验兔在第 4 天时黏膜仍有些红肿,但肉芽组织引起的狭窄得到改善,第 12 天时气管的狭窄情况得到明显改善,炎性红肿亦消失(图 1A、B、C);对照组在用药后瘢痕继续增生,狭窄度进一步增大(图 1D、E)。实验组不同用药天数喉气管狭窄情况见表 2。生存曲线显示 5-Fu 组实验兔的生存期明显较对照组延长($P = 0.0128$),5-Fu 组和对照组的中位生存期分别为 $17 \pm 2.1, 8 \pm 1.8$ (图 2),其中 5-Fu 组 2 只兔子的生存期甚至达 60 d。

气管狭窄组织标本切片显示,A 组刮擦区成纤维细胞和胶原纤维稀疏分散分布,主要位于组织深部,黏膜组织呈不均匀分布于刮擦区表面(图 3A、B)。B 组管腔内刮擦区域充满了由增生的纤维细胞以及胶原纤维组成的瘢痕组织,纤毛上皮变成柱状上皮或完全由瘢痕肉芽组织代替,瘢痕肉芽组合以不同方向突向管腔,导致管腔狭窄,瘢痕肉芽组织中见丰富毛细血管和炎症细胞(图 3C、D)。

表 1 造模 7 d 后各组实验兔指标

| 兔子编号 | 体重 (kg) | | 哮鸣音程度 | | 狭窄程度 | |
|------|---------|-----|-------|-----|------|-----|
| | A 组 | B 组 | A 组 | B 组 | A 组 | B 组 |
| 1 | 2.9 | 2.8 | ± | + | 2 | 3 |
| 2 | 2.8 | 3.0 | + | + | 3 | 4 |
| 3 | 2.9 | 2.8 | + | ++ | 2 | 3 |
| 4 | 2.7 | 2.9 | + | + | 2 | 3 |
| 5 | 3.0 | 3.1 | ++ | + | 4 | 2 |
| 6 | 2.8 | 2.9 | ± | + | 3 | 2 |
| 7 | 2.9 | 2.8 | ++ | + | 4 | 3 |
| 8 | 2.8 | 2.7 | + | ± | 3 | 3 |
| 9 | 3.1 | 2.7 | ± | + | 3 | 2 |
| 10 | 3.0 | - | + | - | 2 | - |

注:哮鸣音:无哮鸣(-);呼吸加促时出现哮鸣音(±);轻度哮鸣音(+);重度哮鸣音(++);狭窄程度:1级≤25%;2级>25%~50%;3级>50%~75%;4级>75%

表 2 5-Fu 组狭窄度变化

| 兔子编号 | 用药后天数 | | | | | | | 生存时间(d) |
|------|-------|---|---|----|----|----|----|---------|
| | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | |
| 1 | 2 | 2 | 3 | — | — | — | — | 10 |
| 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 生存 |
| 3 | 2 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | — | 22 |
| 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 生存 |
| 6 | 3 | 2 | 2 | 3 | — | — | — | 15 |
| 7 | 4 | 3 | — | — | — | — | — | 7 |
| 8 | 3 | 2 | — | — | — | — | — | 8 |
| 9 | 3 | 2 | 2 | 3 | 4 | | | 17 |
| 10 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | — | 21 |

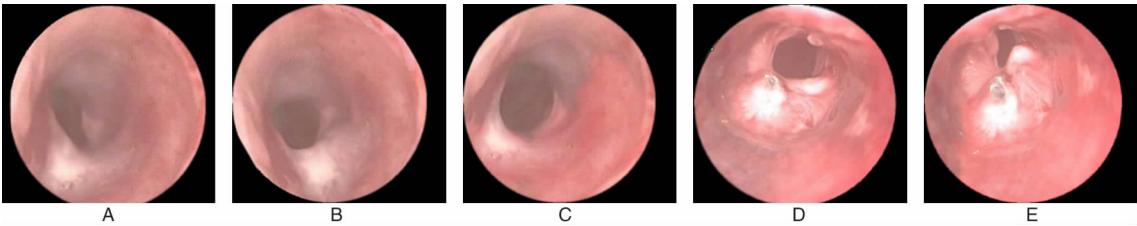


图 1 内镜下观察气管内所见

A、B、C 分别为实验组 2 号兔于用药后 4、8、12 d 的内镜下所见，D、E 为对照组 3 号兔于用药后 4、8 d 内镜下所见，该兔于第 10 d 死亡。

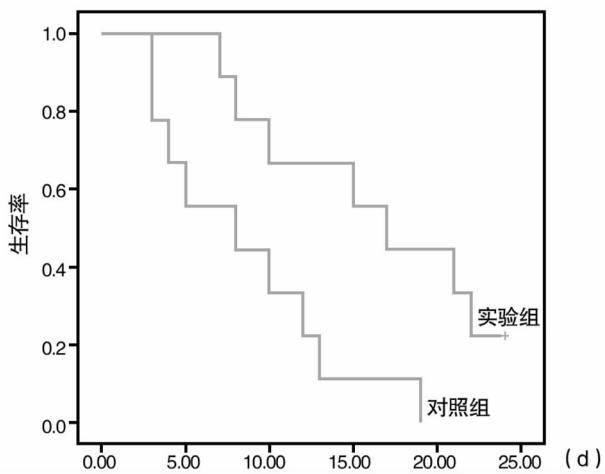


图 2 实验组和对照组的生存曲线

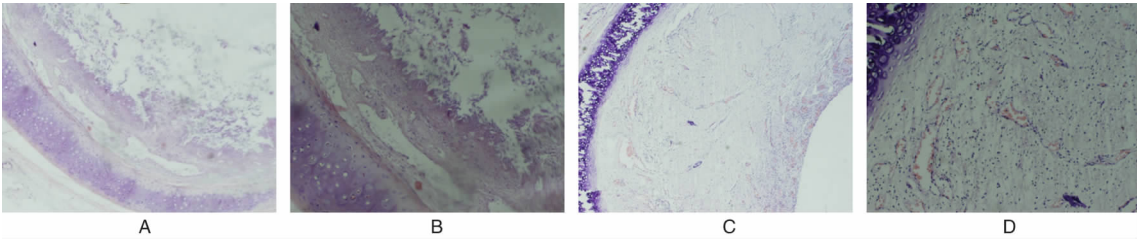


图 3 狭窄气管组织学观察

3 讨论

瘢痕性喉气管狭窄主要由于气管内插管、长期气管置管、外伤、气道烧伤等引起,主要机制为创伤引起的气管黏膜破坏,在愈合过程中则出现肉芽过度增生,瘢痕形成,最终导致喉气管狭窄^[8]。利用药物治疗瘢痕性喉气管狭窄,由于操作方便,创伤小,易于被患者接受等优点一直是研究热点,研究最多的药物为丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC) 和 5-Fu, MMC 和 5-Fu 并无明显差异^[9]。但由于研究对象以及用药方式不同,其治疗效果也是颇受争议^[10-14]。出现这种差异的原因推测可能是用药时间和用药方式的差异。瘢痕是一种致密的结缔组织,吴璇^[15]对气管内瘢痕组织病理研究指出,瘢痕组织主要决定僵硬度的 I 型胶原纤维增生,决定顺应性的 I 型/Ⅲ型比值升高而致,Ⅲ型胶原纤维主要出现在创口愈合初期,随着 I 型胶原纤维增生,决定顺应性的 I 型/Ⅲ型比值逐渐升高,从而使瘢痕组织僵硬,并且失去弹性,越到后期瘢痕组织越僵硬,瘢痕组织的这种致密结构导致药物表面用药时很难渗透到瘢痕内部。故在早期用药,药物可以较易渗透到局部组织,从而有效抑制成纤维细胞增殖,延缓狭窄。但存在着易出现急性狭窄,伤口迁延不愈等风险,原因不明,限制了其应用。狭窄中晚期,瘢痕僵硬,经表面给药时药物很难渗透到内部,加之药物由于气管内分泌液对其稀释和纤毛的排除作用,使局部的滞留时间大大缩短,故治疗效果比较差。所以,改进用药方式成为探索药物治疗新途径。

本实验参阅 Pubmed, Embase 等数据库有关于瘢痕型喉气管狭窄文献报道,对实验加以改进,将以往研究中经表面用药改为瘢痕内注射用药,这样既能使药物渗透到瘢痕内部发挥作用,又减少了药物在经气道的流失,取得了较理想效果。

本实验造模方式选用前期研究所采用的黏膜刮擦法,并加以优化,这种方法操作视野开阔,可以准确的进行操作,减少气管内出血引起窒息死亡的危险,6~8 d 即可

形成明显的气管狭窄,病理组织切片证实其病理结构与人瘢痕性喉气管狭窄病理结构相似,成功率较高^[16]。选择药物 0.4 mg/ml 的 5-Fu,最新研究证明低浓度的 5-Fu 对瘢痕成纤维细胞亦具有抑制增殖和诱导凋亡作用,并减少了局部副作用。虽然本实验证明 5-Fu 瘢痕内注射治疗瘢痕型喉气管狭窄具有一定疗效,但由于观察时间有限,没有对是否发生再狭窄做进一步观察,在以后的实验中将做进一步研究,以期药物治疗能成为喉气管狭窄新的治疗措施。

参考文献:

- [1] Heather C, Herrington BA, Stephen M, et al. Modern Management of Laryngotracheal Stenosis [J]. Laryngoscope, 2006, 116(9): 1553-1557.
- [2] 王春燕, 秦永. 喉气管狭窄外科治疗效果的分析 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2008, 43(12): 919-923.
- [3] Wendling J, Marchand A, Mauviel A, et al. 5-Fluorouracil Blocks Transforming Growth Factor- β -induced α 2 Type I Collagen Gene (COL1A2) Expression Human Fibroblasts via c-Jun NH2-Terminal Kinase/Activator Protein-1 Activation [J]. Molecular Pharmacology, 2003, 64(3): 707-713.
- [4] 陈天新, 李明, 武凤莲, 等. 5-Fu 抑制增生性瘢痕成纤维细胞增殖与 cyclinD1、CDK4 和 TGF- β 1 表达的关系 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2008, 19(6): 431-434.
- [5] 武晓莉, 刘伟, 曹谊林, 等. 低浓度 5-氟尿嘧啶抑制血管增生在瘢痕疙瘩综合治疗中的作用初探 [J]. 中华整形外科杂志, 2006, 22(1): 44-46.
- [6] NaKagishi Y, Morimoto Y, Fujita M, et al. Rabbit Model of Airway Stenosis Induced by Scraping of the Tracheal Mucosa [J]. Laryngoscope, 2005, 115(6): 1087-1092.
- [7] NaKagishi Y, Morimoto Y, Fujita M, et al. Photodynamic Therapy for Airway stenosis in Rabbit Models [J]. CHEST, 2008, 133(1): 123-130.
- [8] 秦永. 后天性喉气管狭窄的诊断与治疗 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2006, 41(5): 315-318.
- [9] Cincik H, Gungor A, Cakmak A, et al. The effects of mitomycin C and 5-fluorouracil/triamcinolone on fibrosis/scar tissue formation secondary to subglottic trauma (experimental study) [J]. Am J Otolaryngol, 2005, 26(1): 45-50.
- [10] Hartnick CJ, Hartley BE, Lacy PD, et al. Topical mitomycin application after laryngotracheal reconstruction: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J].

- Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2001, 127 (10) : 1260 - 1264.
- [11] Eliashar R, Gross M, Maly B, et al. Mitomycin does not prevent laryngotracheal repeat stenosis after endoscopic dilation surgery: an animal study [J]. Laryngoscope, 2004, 114 (4) : 743 - 746.
- [12] Perepelitsyn I, Shapshay SM. Endoscopic treatment of laryngeal and tracheal stenosis - has mitomycin C improved the outcome? [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2004, 131 (1) : 16 - 20.
- [13] Cincik H, Gungor A, Cakmak A, et al. The effects of mitomycin C and 5-fluorouracil/triamcinolone on fibrosis/scar tissue formation secondary to subglottic trauma (experimental study) [J]. Am J Otolaryngol, 2005, 26 (1) : 45 - 50.
- [14] Iniguez-Cuadra R, San Martin Prieto J, Iniguez-Cuadra M, et al. Effect of mitomycin in the surgical treatment of tracheal stenosis [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2008, 134 (7) : 709 - 714.
- [15] 吴璇,苏振忠,将爱云,等. 瘢痕性喉狭窄瘢痕组织中弹性纤维和胶原纤维分析 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2005, 26 (3) : 312 - 315.
- [16] 杨希之,毛小慧,敖华飞,等. 免瘢痕性喉气管狭窄模型的制备 [J]. 上海交通大学学报 (医学版) 2010, 30 (12) 1490-1494.
- (修回日期:2011-04-02)

· 消息 ·

《中耳炎基础及临床研究诊治新进展》国家继续教育项目通知

西安交通大学医学院第二附属医院(西北医院)耳鼻咽喉科头颈外科病院、陕西省康复学会听力康复委员会及西安交通大学医学院人体解剖与组织胚胎学系联合主办的第十期国家级继续医学教育项目“中耳炎基础及临床研究诊治新进展”【项目编号:2011-07-01-114(国)】将于2011年7月26~31日在西安市举办。学习班由许珉教授主持,采取专家讲课、手术演示、录相观摩等方式。

内容包括:中耳显微解剖;中耳炎分类;中耳炎形成机理及病理新进展;各类型中耳炎的特点、治疗原则及手术方法;鼓膜穿孔和听力学新进展以及与中耳炎相关的颞骨、面神经及听小骨影像诊断等。学习班将聘请全国知名专家授课交流。

学习班授予国家级继续教育 I 类学分 10 分。注册费:600 元,资料费:100 元,尸头训练费:600 元(限名额 20 人)。食宿统一安排,费用自理。报到时间:2011 年 7 月 25 日,欢迎来电来函垂询。

联系方式:西安市西五路 157 号,西安交通大学医学院第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科病院。邮编:710004;联系人:张晓彤,杜小滢;联系电话:029-87679866,87679708;传真:029-87275892;Email:ebh87679866@yahoo.com.cn;报名方式:以信件、传真及 Email 均可。