

定测将是其发展的趋势。

RT-LAMP 扩增反应中可以形成可视的焦磷酸镁白色沉淀,因此肉眼也可进行结果判别^[7]。目前,日本已利用这种特性研制出专门用于 LAMP 检测的实时监控浊度仪,可以实现对 LAMP 扩增过程的全程实时监控,但其价格昂贵不适于推广应用。利用电泳检测法判定结果具有灵敏度高的优点,对于一些弱阳性样本或扩增效率较低时的结果判定具有良好效果。其缺点是需要电泳设备和时间,并且要开盖检测,而此过程易产生气溶胶污染,影响后续实验。通过肉眼观察焦磷酸镁沉淀进行结果判定简便易行,反应后不用开盖,避免了气溶胶污染,但此方法判定结果比电泳检测灵敏度低 2~3 个数量级,在模板拷贝数很低或扩增效率不高时,此方法容易造成假阴性。反应后加荧光染料法的优点是灵敏度较高,在直接观察不能准确判断结果时,加入荧光染料可增加其可视性,提高判断的准确度;缺点是需要反应完成后开盖加染料,易产生气溶胶污染。反应前加染料法在反应完成后不需开盖即可观察结果,避免了气溶胶污染,同时该染料经优化后,阴阳性色差明显,更容易判断结果,避免了前 3 种方法的缺点。

从临床诊断需求来说,大部分检测只需要定性,因此,反应前加入不抑制反应的染料是即满足检测的

灵敏度需求,又可避免气溶胶污染,同时价格低廉的结果判定方法,在未来的 LAMP 诊断试剂中有较大的发展空间,有望在临床诊断上得到广泛应用。

参考文献

- 1 Saiki RK, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230: 1350-1354
- 2 Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 1991, 350: 91-92
- 3 Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, *et al.* Isothermal in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87: 1874-1878
- 4 Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, *et al.* Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme-DNA polymerase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89: 392-399
- 5 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: e63
- 6 Tomita N, Mori Y, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols*, 2008, 3(5): 877-882
- 7 Toriniwa H, Komiya T. Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol*. 2006, 50(5): 379-387

(收稿:2010-01-01)

(修回:2010-03-15)

获得性食管气管瘘食管改道术后旷置食管结构及屏障功能研究

杨光 白光振 李小飞 王小平 周勇安 韩勇 姜涛 程庆书

摘要 目的 探讨获得性食管气管瘘(tracheoesophageal fistula, TEF)食管改道术后旷置段食管组织结构及屏障功能的变化情况。**方法** 对 15 只瘘旷置(A组)杂种犬、15 只食管单纯旷置(B组)杂种犬及 5 只正常(C组)杂种犬的旷置段食管及正常食管进行大体标本、HE 染色、透射电镜(TEM)、扫描电镜(SEM)、硝酸镧示踪观察研究。**结果** A组与 B组犬旷置段食管组织结构及屏障功能变化一致。A、B组与 C组相比:①食管组织结构发生改变,黏膜下层腺体减少、缺失;②细胞间隙增宽,桥粒数目减少,屏障功能降低,但基膜完整未见破坏,镧颗粒未能突破;③细胞间隙极易见到镧颗粒填充,呈线状分布。**结论** 对于难治性获得性 TEF,食管旷置术并食管改道术是简便、可行、有效的方法,术后并发症少,值得推广应用。

关键词 瘘 旷置 屏障功能

The Research of Structure and Esophageal Barrier Function of Excluded Esophagus after Esophageal Diversion Surgery in Acquired Tracheoesophageal Fistula. Yang Guang, Bai Guangzhen, Li Xiaofei, Wang Xiaoping, Zhou Yongan, Han Yong, Jiang Tao, Cheng Qingshu.

作者单位:710038 西安,第四军医大学唐都医院胸腔外科

通讯作者:程庆书,电子邮箱:chechest@fmmu.edu.cn

Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Shanxi 710038, China

Abstract Objective To explore the changes of structure and esophageal barrier function of excluded esophagus after esophageal diversion surgery in acquired tracheoesophageal fistula. **Methods** 15 canis with the fistula was excluded (A group), and 15 canis with the esophagus was single excluded but not fistula (B group), and 5 canis had normal esophagus (C group). We observed the esophageal sample, H-E, transmission electron microscope (TEM), the scanning of electron microscope (SEM) and Lanthanum trace labeling. **Results** Changes of structure and esophageal barrier function of excluded esophagus in A group were identical with B group. Compared with A and B group, C group showed following changes: ① esophageal structure was changed; glandular organ in undermucous was reduced and deleted even. ② the score of the interstitial space was increased; the number of desmosome was decreased, and the esophageal barrier function was attenuated, but the basal lamina was not changed; lanthanum did not break through it. ③ the interstitial space was filled with lanthanum and its shape was linear. **Conclusion** For the refractory acquired TEF, esophageal exclusion surgery was convenient, easy, and effective. So the method deserves to be generalized.

Key words Fistula; Opend; Barrier function

获得性 TEF 是一种少见的难治性胸部疾病。对于瘻口位置低、面积大及直接修补困难且失败的获得性 TEF 在处理上仍然是一个问题。我们采用食管改道术 + 瘻旷置术先后治疗了多例患者, 术后恢复了呼吸道和食管功能, 效果良好。然而术后旷置段食管结构及功能有何改变尚不清楚, 为此我们首先建立犬食管气管瘻动物模型, 行食管改道术 + 瘻旷置术, 进而观察旷置段食管的结构及屏障功能有何变化, 这些变化对此术式是否有利, 为采用该术式治疗难治性获得性 TEF 提供依据。

对象与方法

1. 实验动物与分组: ①实验动物: 体重为 15 ~ 20kg 成年健康杂种犬 35 只, 雌雄不限, 均购于第四军医大学动物实验中心; ②分组: 随机分为 A 组 (TEF 模型建立 + 食管旷置术) 15 只, B 组 (单纯食管旷置术) 15 只, C 组 (空白对照) 5 只。

2. 模型制作: ①A 组犬术前用硫化钠脱毛备皮。速眠 II 注射液 0.2ml/kg 肌内注射麻醉后, 将犬固定于手术台上, 气管插管并行静脉切开输液。取左颈前距正中线约 1.5cm 纵行切口, 切口长约 10cm, 充分暴露食管及气管, 将食管后壁正中纵行切开约 4cm, 经此切口将食管前壁及气管膜部纵行切开约 2.5cm (图 1), 将食管前壁和气管膜部切口边缘间断缝合固定, 后将食管后壁切口间断缝合。取腹部正中切口, 行常规胃造瘻术。术后 A 组犬行氨苄西林 [4 克/(只·天)] 抗炎治疗 3 天, 并行胃饲营养 (饲料购于第四军医大学动物中心)。术后第 4 天行电子支气管镜检查, 并在食管腔内注入亚甲蓝观察模型建立是否成功 (图 2)。模型建立成功后, 在术后第 7 天行食管改道术 + 瘻旷置术, 距瘻口上下缘约 1cm 处切断食管, 间断缝合旷置段食管两端 (图 3), 随后将上下段分离食管分别在颈前右外侧行外置术 (图 4), 术后 A 组犬行氨苄西林 [4 克/(只·天)] 抗炎治疗 7 天, 并行胃饲营养; ②B 组犬术前准备及切口同 A 组犬, 将一段约 6cm 食管旷置, 间断缝合旷置段食管两端, 上下段分离食管分别在颈前右外侧行外置术。取腹部正中切口, 行胃造瘻术。术后 B 组犬行氨苄西林

[4 克/(只·天)] 抗炎治疗 7 天, 并行胃饲营养; ③C 组犬正常饲养。

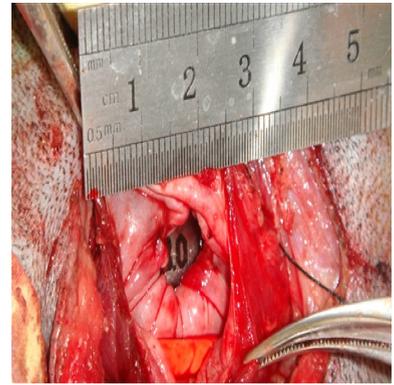


图 1 大体标本
食管前壁及气管膜部纵行切开

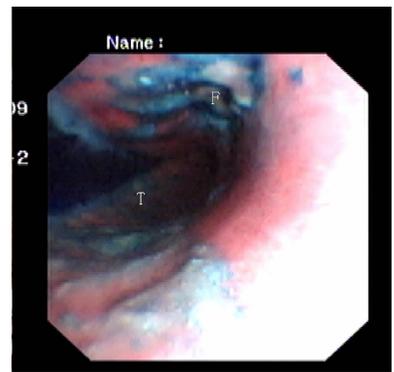


图 2 电子支气管镜检
F. 食管气管瘻口; T. 气管

3. 实验方法: ①观察 A、B 组犬一般情况; ②标本获取和观察: A、B 组犬分别在旷置术后第 1 周、3 周、8 周股动脉放血处死各 5 只, C 组犬在第 8 周股动脉放血处死 5 只。在各时间点取 A、B、C 组每只犬食管标本, 观察食管腔内及黏膜层变化; ③HE 染色: 在各时间点取 A、B、C 组每只犬食管组织各 3

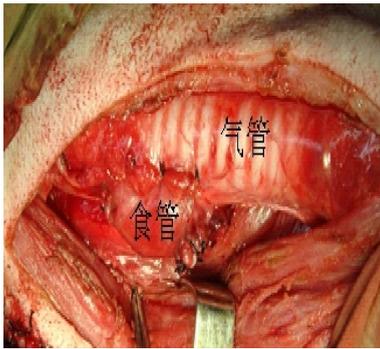


图3 大体标本
旷置段食管

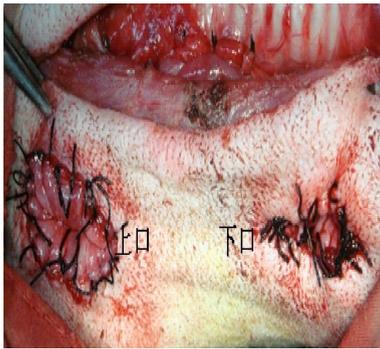


图4 大体标本
食管外置上、下口

块,中性甲醛固定,常规脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,行 HE 染色;④透射电子显微镜 (TEM) 观察:在各时间点取 A、B、C 组每只犬食管组织各 2 块 (1mm × 1mm × 3mm),冲洗,3% 戊二醛预固定,1% 锇酸后固定,脱水,环氧树脂包埋,半薄切片定位 (甲苯胺蓝染色,光镜观察)后,超薄切片,用醋酸铀及铅双染色,行 TEM 观察;⑤硝酸镧示踪:在第 8 周取 A、B、C 组每只犬食管组织各 1 块,大小约 1mm × 1mm × 3mm,以 3% 戊二醛加 4% 硝酸镧 (0.1mol/L 二甲砷酸钠缓冲液配制, pH7.4) 预固定,用 2% 硝酸镧二甲砷酸钠缓冲液漂洗,1% 锇酸后固定,脱水、环氧树脂包埋,超薄切片后用醋酸铀及铅双染色,行 TEM 观察;⑥扫描电子显微镜 (SEM) 观察:在各时间点取 A、B、C 组每只犬食管组织各 1 块 (8 ~ 10mm²),3% 戊二醛预固定,锇酸 - 丹宁酸 - 锇酸处理后脱水、干燥,用离子溅射仪喷涂,行 SEM 观察。

4. 实验仪器:日本电子 JEM - 2000EX 透射电子显微镜,日立 S - 3400N 扫描电子显微镜,均由第四军医大学电镜中心提供。

结 果

1. A、B 组犬一般情况:①A、B 组犬在各时间点均存活;②A 组犬在痿旷置术后 7 天内呼吸急促,有呛咳现象,未见咳痰咯血,后恢复正常;③B 组犬在食管旷置术后 2 天内呼吸稍急促,未见咳嗽、咳痰、呛

咳等现象,后恢复正常。

2. 标本观察,HE 染色及电镜结果:①标本观察:A、B 组犬与 C 组犬相比,存活 1 周时未见明显变化;存活 3 周时,旷置段食管黏膜表面黏液性物质减少,黏膜层光滑完整,食管韧性及收缩性良好,余未见异常;存活 8 周时,旷置段食管黏膜表面缺乏黏液性物质,黏膜层光滑完整,色泽发白,食管韧性及收缩性良好,余未见异常;②HE 染色:A、B 组犬与 C 组犬相比,存活 1 周时,黏膜层未见明显改变,黏膜下层有少到中量炎性细胞浸润 (图 5),食管腺体萎缩、减少,肌层及外膜未见改变;存活 3 周时,黏膜层存在,但细胞层数减少,缺少乳头样结构,黏膜下层腺体较前明显萎缩、减少 (图 6),黏膜下层微血管数量、密度减少并有少量炎性细胞浸润,肌层及外膜未见改变;存活 8 周时,黏膜层存在,但细胞层数较前明显减少,乳头样结构缺失,黏膜下层腺体大量减少、缺失,微血管数量、密度较前有所增加 (图 7),肌层及外膜未见明显改变;③电镜观察结果:A、B 组犬存活 1 周、3 周、8 周,与 C 组犬相比,SEM 见食管黏膜层上皮细胞间隙逐渐增宽 (图 8),部分上皮细胞脱落、紊乱,细胞表面微皱减少、不规则,存活第 8 周,A、B 组犬食管黏膜层胶原束露于表面;TEM 见黏膜层细胞间隙逐渐增宽,桥粒、半桥粒数量减少,细胞间连接结构减少,但都未发现细胞器严重损害,基膜完整无改变;硝酸镧示踪:存活第 8 周,A、B 组犬食管黏膜层细胞间隙极易见到镧颗粒填充,呈线状分布 (图 9),部分呈不规则斑点状,细胞内偶可见小颗粒状镧颗粒,未见镧颗粒突破基膜,并见巨噬细胞吞噬镧颗粒现象。

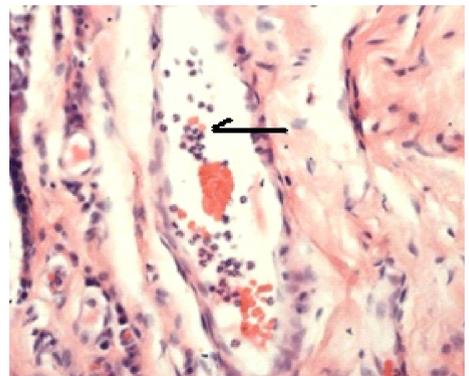


图5 HE 染色 (×200)
箭头所示为中性粒细胞

讨 论

获得性 TEF 的诊断方法主要包括 CT、食管造影及食管镜、电子支气管镜检查等方法^[1]。一般来说,

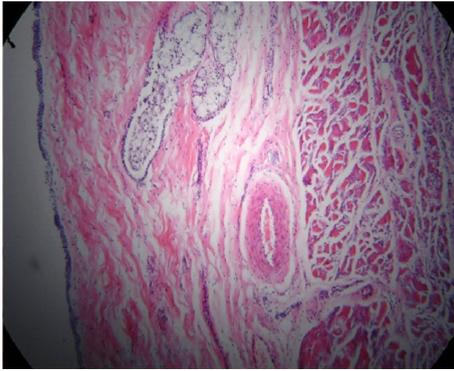


图6 HE染色(×200)

黏膜层细胞层数减少,黏膜下层腺体明显萎缩、减少,黏膜下层微血管数量、密度减少

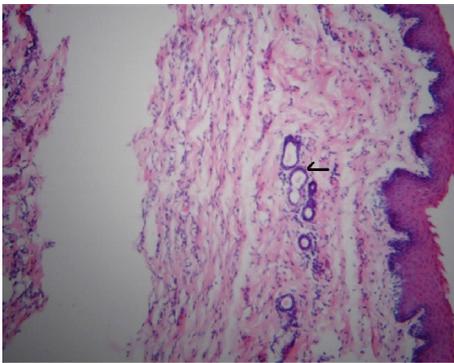


图7 HE染色(×100)

黏膜层乳头样结构缺失,黏膜下层腺体大量减少、缺失,微血管数量、密度较前有所增加



图8 SEM(×5k)

见食管黏膜层上皮细胞间隙增宽



图9 TEM(×30K)

黏膜层细胞间隙胶原颗粒呈线状分布

现再瘘和后期气管或食管狭窄等并发症^[5]。因此我们在 Utley 等^[6]介绍的方法上进行了改进^[7],用此方法治疗了多例经直接修补、直接修补加间置皮瓣均失败的 TEF 及巨大型 TEF 患者,手术操作简便、有效,术后恢复了呼吸道和食管功能,无一例再瘘及气管狭窄等并发症,效果良好。为了进一步了解旷置段食管的病理改变及屏障功能有何改变,这些改变对此术式和恢复是否有利,为此我们设计了该动物实验,为采用该术式治疗难治性的获得性 TEF 提供可靠依据。

此实验在制作动物模型之际,采用颈部食管旷置,上下段游离食管外置的方法,此方法的优点在于不需开胸手术,减少创伤及术后肺部并发症的发生,降低病死率。上段食管外置可以使犬唾液流出体外不会导致误吸,下段食管外置间接起到了胃肠减压的作用,不会因胃造瘘胃饲营养使腹内压过高,避免反流影响实验结果。此动物模型稳定、易行,达到了后期实验的要求。

正常生理状态下食管黏膜无吸收功能,其黏膜结构的完整性决定了对离子及小分子物质的屏障功能。食管黏膜在一定程度上能抵抗胃酸、胆盐及一些其他化学物质的损害,从而保证食管结构与功能的稳定^[8,9]。一般化学物质通过胃肠壁的途径有两种:第1种主要通过细胞表面的微孔、细胞间的微隙及细胞膜的脂溶性途径,第2种途径主要是透过细胞间的表面连接^[10],细胞间连接的变化是决定一些较大分子量物质通透性的重要因素。桥粒存在于上皮组织中,主要是维持上皮结构的完整性和稳定性,半桥粒位于上皮细胞的底面,作用是把上皮细胞与其下方的基板连接在一起,桥粒、半桥粒及上皮基膜对维持上皮组织的稳定性和分子屏障功能具有重要意义^[11]。镧离子作为电镜示踪物目前已经在超微结构的研究中得

根据气管处瘘口的位置及尺寸,外科治疗主要包括气管食管瘘切开分别修补术;食管双瓣修补气管缺损,同期完成胃或结肠代食管术;食管后壁瓣修补气管缺损、结肠代食管术^[2,3];支架及纤维蛋白胶^[4]等治疗方法,以上方法对于复杂性、面积过大及直接修补失败的获得性 TEF,无法取得良好效果,术后早期会出

到了广泛的应用, 镧颗粒不能通过正常的细胞膜及细胞间紧密连接, 可用来有效的观察细胞膜及细胞连接的损伤情况^[12]。

本实验通过 HE 染色、SEM、TEM 及镧示踪法等技术对旷置段食管的组织结构和屏障功能进行了观察和研究。实验发现, A、B 两组与 C 组相比, 旷置段食管黏膜上皮细胞层数减少变薄, 黏膜下层中腺体减少甚至缺如, 有利于减轻术后旷置段食管因分泌黏液对呼吸道产生的刺激。A、B 组黏膜层桥粒、半桥粒数量明显减少、密度降低, 上皮细胞间隙增加, 细胞间连接结构也减少, 并可见镧颗粒在黏膜层细胞间隙内存在且细胞内偶可发现镧颗粒, 以上改变使旷置段食管易受到一些外界抗原物质、毒素等的侵害, 从而加剧局部组织的病理损害^[13], 使旷置段食管发生糜烂、溃疡及再瘘等并发症。但在本实验中未见以上并发症发生, 旷置段食管肌层及外膜未见萎缩缺如, 韧性及收缩性良好, 这与基膜的完整性有着重要关系。本实验中, 虽 A、B 组桥粒、半桥粒密度减少, 上皮细胞间隙增加, 但上皮基膜完整未见破坏, 镧颗粒未能突破, 这对维持上皮组织的稳定性和分子屏障功能具有重要意义^[11], 它起到了保护性作用, 保证了旷置段食管不易发生糜烂、溃疡和再瘘等并发症, 旷置段食管黏膜的完整未改变有利于本术式。

本实验还发现, A 组与 B 组之间食管组织结构与上皮屏障功能的改变无明显差异, 说明瘘旷置与食管单纯旷置对食管的影响相同, 所以可以认为食管旷置对食管组织结构及屏障功能的改变起了决定性的作用, 这种改变的发生与旷置段食管黏膜层细胞层数减少、黏膜下层炎性细胞浸润及早期微血管数量减少密切相关, 今后在该术式应用中应尽量解决上述问题。

总之, 对于难治性的获得性 TEF, 食管旷置术并

食管改道术是简单、可行且有效的方法, 易于推广, 术后患者恢复良好, 远期未见旷置段食管糜烂、溃疡及再瘘等并发症, 效果满意。

参考文献

- 1 杨易, 赵珩, 黄偶麟, 等. 气管、支气管食管瘘的外科治疗. 中华胸心血管外科杂志, 2007, 2: 126 - 127
- 2 Kalkat MS, Parmar JM, Collins FJ, et al. Management of giant acquired tracheo - oesophageal fistula in a neonate using an oesophageal patch. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2003, 2(4): 633 - 635
- 3 De Castro G, Iribarren M, Rivo E, et al. Tracheoesophageal fistula in an intubated patient. Treatment through exclusion and esophageal patch. Cir Esp, 2005, 77(4): 230 - 232
- 4 Scappaticci E, Ardisson F, Baldi S, et al. closure of an iatrogenic tracheoesophageal fistula with bronchoscopic gluing in a mechanically ventilated adult patient. Ann Thorac Surg, 2004, 77(1): 328 - 329
- 5 程庆书, 韩勇, 刘锴, 等. 获得性气管食管瘘的诊治. 中华消化外科杂志, 2007, 6: 410 - 412
- 6 Utley JR: Giant tracheoesophageal fistula; management by esophageal diversion. J thorac Cardiovasc Surg, 1978, 75: 373
- 7 刘锴, 路明远, 张凡. 气管切开术后气管食管瘘手术治疗的改进. 中华外科杂志, 1981, 19(8): 496 - 497
- 8 王化虹, 田雨. 食管屏障功能和胃食管反流病. 中国临床营养杂志, 2008, 16(5): 306 - 309
- 9 Hannah VM, Ricard F, Daniel S. Esophageal dilated intercellular spaces(DIS) and nonerosive reflux disease. Am J Gastroenterol, 2008, 103(4): 1021 - 1028
- 10 Montalto M, Veneto G, Cuomo L, et al. intestinal Permeability. Recenti Prog Med, 1997, 88: 140 - 147
- 11 宛新建, 李兆申, 许国铭, 等. 食管“Z”型支架术后局部黏膜血流量及通透性变化分析. 世界华人消化杂志, 2000, 8: 10 - 14
- 12 王雯, 李兆申, 许国铭. 不同反流物对食管上皮屏障的损伤研究. 解放军医学杂志, 2000, 25: 319 - 322
- 13 Yu PW, Zeng DZ, Ma RM. Experimental research on the injury of gastrointestinal mucosa barrier in the time of abdominal trauma with infection. Zhonghua Chuangshang Zazhi, 2007, 12: 87 - 91

(收稿: 2010 - 01 - 17)

(收稿: 2010 - 03 - 20)

中国重离子治癌关键科学技术问题研究启动

由中科院近代物理研究所张红研究员为首席科学家主持的国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目——重离子治癌关键科学技术问题研究日前在兰州市启动; 同时启动的还有以该所所长肖国青研究员为首席科学家主持的“高能离子束与物质相互作用的微观机理研究”。两个项目是近代物理研究所首次作为第一承担单位主持的“973 计划”项目。两个项目的开展有望在离子束技术应用的新原理、新方法方面取得突破, 为我国新型材料的发展、信息和新能源、生命医学科学等国民经济和国家安全的重大需求奠定必要的理论和实验基础。“高能离子束与物质相互作用的微观机理研究”、“重离子治癌关键科学技术问题研究”两个项目前两年将分别获得国家 917 万元和 973 万元经费支持, 项目执行期为 5 年。