



常用大便失禁动物模型造模方法进展

王迪,王琛,曹永清,陆金根,董青军*

(上海中医药大学附属龙华医院,上海 200032)

【摘要】 大便失禁属于肛肠科疑难病,严重影响着患者的生活质量。目前大便失禁治疗方法繁多,疗效尚不肯定,作用机制尚不明确,因其动物模型尚不成熟导致动物实验等基础研究欠缺。本文总结、整理国内外几种典型的大便失禁动物模型的造模方法,进行了深入阐述,为今后大便失禁的深入研究奠定基础。

【关键词】 肛门失禁;大便失禁;动物模型;疾病模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 02-0244-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.02.018

Several commonly used modeling methods for animal models of fecal incontinence

WANG Di, WANG Chen, CAO Yongqing, LU Jingen, DONG Qingjun*

(Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Corresponding author: DONG Qingjun. E-mail: shdongqingjun@163.com

【Abstract】 Fecal incontinence is a common but refractory anorectal disorder, seriously affecting the quality of life of patients. Although there are many methods for the treatment of fecal incontinence, the efficacy is uncertain and the mechanism of action is not fully clear. This article summarizes several commonly used modeling method of typical fecal incontinence models at home and abroad, and explores in depth, laying the foundation for further studies on fecal incontinence.

【Key words】 anal incontinence; fecal incontinence; animal models; disease models

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

大便失禁(fecal incontinence)又称肛门失禁(anal incontinence),通常指肛门括约肌对气体及粪便的控制能力减弱或消失,导致患者不自主地排泄粘液、液体或固体的粪便,且至少持续三个月^[1-4],严重影响患者的生活质量。目前,大便失禁的发病率仍无统一的结论^[2],据相关文献^[3-5]报道,全球社区大便失禁的发病率从0.8%~7.8%不等,男女发病率约为3:1~6:1。另外根据国外几项基于社区的大型调查研究表明,社区居住的妇女大便失禁发

病率在7%~15%不等,住院病人则达到18%~33%,在养老院等机构发病率更高,且随年龄增长大便失禁发病率具有逐渐增高的趋势。

大便失禁的致病因素很多,主要有以下几种:(1)粪便成分异常,如肠易激综合征、感染性肠病、感染性腹泻等;(2)直肠容量和顺应性下降,如直肠容量不足的保肛手术(包括低位前切除术、结肠肛管吻合术等);(3)直肠感觉功能不全,如神经病变(包括痴呆、脑血管意外、运动性共济失调、多发性

【基金项目】国家自然科学基金青年项目(No. 81503577);海派中医流派(顾氏外科)传承研究基地建设项目(No. ZY3-CCCX-1-1004);曹永清上海市名老中医药专家学术经验研究工作室(No. SZYMZYGS4006)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(No. 81503577);Supported by the Construction Project of the Heritage Research Base of the Shanghai School of Traditional Chinese Medicine (Gu's surgery)(No. ZY3-CCCX-1-1004);Supported by Cao Yongqing Shanghai Famous Old Chinese Medicine Experts Academic Experience Research Studio(No. SZYMZYGS4006)。

【作者简介】王迪(1993—),女,硕士研究生在读,专业方向:肛肠良性疾病基础研究。Email:m18221167319@163.com

【通信作者】董青军(1980—),男,医学博士,主治医师,研究方向:肛肠疾病的临床及基础研究。E-mail:shdongqingjun@163.com

硬化等)、充盈性大便失禁(包括粪便嵌塞、功能性大便失禁、精神病治疗药等);(4)肛管括约肌或盆底肌功能失调,如损伤(包括产科损伤、直肠肛管手术、炎症等)、盆底肌神经支配障碍(包括阴部神经病变、盆底神经损伤等)^[4]。同时,大便失禁也会引起一系列并发症,如患者肛周皮肤长期受溢出粪便的刺激,经常遭受潮湿和代谢产物的侵蚀,容易造成会阴部、骶尾部皮炎及压力性溃疡等^[6]。更加重了病人的身心压力,同时也给家属及医务人员的护理工作带来了极大负担。

目前,大便失禁的治疗方法繁多,疗效尚不肯定,作用机制尚不确切,因此有必要开展大量的基础实验研究,通过动物实验寻找疗效确切的治疗方法。本文总结国内外几种经典的大便失禁动物模型的造模方法,并进行了深入阐述,为大便失禁的机理和临床治疗方案奠定基础。

1 肛门内外括约肌切断法

临床上,因肛瘘手术、会阴部外伤、分娩时会阴部撕裂等原因造成患者肛门内括约肌、耻骨直肠肌或者肛门外括约肌断离,使肛管不能保持有效的压力阻止粪便排出,从而造成肛门漏气、漏便等大便失禁症状^[6]。因此通过切断动物的肛门内外括约肌可以制作大便失禁的动物模型。

方法:成年大鼠,浓度为 1% 的戊巴比妥钠(40 mg/kg)或者浓度为 10% 的水合氯醛(4 mL/kg),进行腹腔注射麻醉^[8-9],截石位 6 点或 7 点处纵行切开大鼠内外括约肌,创面开放,术后可肌注 0.75% 布比卡因(0.5 mg/kg)镇痛,可预防性应用抗生素防止伤口感染。手术完成后将大鼠放置在恒温箱中直至苏醒,以降低大鼠的死亡率。模型建立后,每日设定进食、饮水量,定时观察排便状况;若出现大便次数增多,质稀不成形,甚或大便失禁,证明造模成功^[10-12]。肛门内括约肌损伤主要表现为肛管静息压(ARP)下降,肛管功能长度缩短,直肠肛管抑制反射减弱。肛管外括约肌损伤以肛管最大收缩压明显降低为主^[7]。因此,通过测量造模前后大鼠的肛门静息压和肛管最大收缩压可验证模型是否成功。

2 阴部神经切断法

解剖研究表明,阴部神经(pudendal nerve, PN)的分支直肠下神经支配肛门外括约肌(external anal

sphincter, EAS),若阴部神经及其分支损伤,则可影响 EAS 的功能从而造成大便失禁^[13]。据此,可以切断大鼠阴部神经模拟阴部神经损伤造成大便失禁模型。

方法:成年大鼠,常规腹腔注射麻醉后(麻醉方法同前),呈俯卧位(prone position)固定。在两后肢之间的背部区域退毛备皮,碘伏或酒精消毒后,在两后肢之间、脊柱正中纵行切开皮肤,于脊柱和股骨大转子之间依次纵行切开最大皮肤和臀大肌,沿切口向股骨方向及下方钝性分离,可在肌肉深面即坐骨直肠窝内看到一粗大且横向往走的神经,即腰骶干。沿腰骶干继续向上分离,看到其分支股后皮神经,继续向上分离,于近脊柱处可见两支神经分支,近处一支即为阴部神经,与阴部内动、静脉伴行,剥离、剪断双侧神经即可^[14-15]。术后用 3/0 缝线逐层缝合肌肉和皮肤。常规应用抗生素预防感染,并将大鼠放置在保温箱内至苏醒。阴部神经切断后,肛管括约肌失去神经支配,表现为肛管静息压和最大收缩压均明显下降,肛管功能长度缩短,直肠肛管抑制反射减弱等。因此,同样可以通过测定大鼠的肛门压力来验证模型成功与否^[7]。

3 直肠下神经切断法

直肠下神经(inferior rectal nerve, IRN)是阴部神经的分支,支配 EAS,因此,可以切断 IRN 来制作肛门失禁模型。

方法:成年大鼠,麻醉后(方法同前),呈仰卧位(supine position)。肛周退毛备皮,并用碘伏或酒精消毒皮肤。距离肛门或阴道约 0.5 cm 处做一长约 2 cm 的纵行切口。首先找到阴部内血管,以协助定位 IRN。对 IRN 实施电刺激,可以引起 EAS 的快速短暂收缩。据此可用电刺激法精确 IRN 的位置。确定 IRN 的位置后,可用脑动脉瘤夹夹闭神经。夹闭的脑动脉瘤夹可对神经产生持续的压力,夹闭 60 s 间歇 60 s 反复两次,即可 3/0 缝线缝合伤口^[16]。常规肌注止痛药物,预防性应用抗生素,术后将大鼠放置保温箱至苏醒,方法均同前。此方法模型可持续 4~6 周。

4 模拟产伤引起肛门失禁法

除肛门直肠手术、直肠脱垂等原因外,产伤是引起女性大便失禁的一个常见因素^[17]。因此,可以采用经大鼠盆腔,在子宫后行持续性球囊压迫的方

法来模拟分娩时胎儿对盆底肌肉等的压迫来制作便秘失禁模型。

方法:成年雌性大鼠,常规麻醉后,仰卧位固定。腹部退毛备皮,碘伏擦拭或者喷洒 70% 医用消毒酒精进行消毒。沿大鼠腹部正中中线做一起于耻骨联合终于腹部中间位置的长约 3 cm 的纵行切口,拨开网膜及输卵管等以获得清晰视野并能够精确定位球囊的位置。然后将两个儿童导尿管放置在子宫后方,每个球囊的最大容量为 1.5 mL。为测量子宫后球囊扩张时盆腔内的压力变化,同时在大鼠阴道内放置一充满水的大鼠左心室球囊压力导管,并将导管连至一压力感受器。经放大后的信号在记录纸上记录下来。经阴道测量的平均压力维持在 130 mmHg,这与女性在生产时盆腔所承受的压力相当。气囊充气扩张 1 h 后即可排除空气。此时检查确认腹部有无出血迹象,处理好后缝合即可。2/0 缝线缝合筋膜,3/0 缝线缝合皮肤。术后常规止痛、预防性应用抗生素,并将大鼠放置在保温箱内直至苏醒。此法所做的模型可维持 4 周左右^[16]。

5 双侧骶神经注射药物法

阴部神经来源于骶神经丛的 S₂-S₄ 骶神经根,发出分支支配会阴部皮肤和肌肉^[7]。肛门外括约肌为骨骼肌,受意识支配,产生 30% ARP,有较强的节制排便功能^[18-19]。Cosovic 等^[20]研究发现,局部注射利多卡因等局麻药物可使坐骨神经在 1 周后出现变性。另有研究表明^[21]局麻药物对神经损害程度随浓度升高而加重,当药物浓度达到一定水平时,可严重破坏神经细胞的结构使神经细胞功能永久性不可逆的丧失。因此,黄宗海等^[19]采用对兔的双侧骶神经注射高浓度麻醉药品的方法来制作肛门失禁模型。

神经定位:对兔行肛门外括约肌肌电图(EMG)检查同时进行穿刺定位骶神经。

方法:成年新西兰兔,建立兔耳缘静脉通路,30 g/L戊巴比妥(1 mL/kg)静脉注射麻醉。在兔骶部扪及骶骨下部,按照第 4 骶神经的解剖部位进行定位穿刺。在离穿刺部位较远处安置无关电极一枚,与穿刺针及脉冲器连接形成环路。电流 1.5 mA,脉冲频率 1 Hz。当与刺激电极相连的穿刺针进针达一定深度,出现与脉冲电流同步的肛门外括约肌收缩运动时,表明穿刺针接近或抵达第 4 骶神经,此时将脉冲电流关至 0.5 mA,肛门外括约肌仍在收

缩运动,表明已刺中第 4 骶神经。记录电极刺入的位置、方向、深度。然后调整刺激电流参数设置为方波,频率 1 Hz,波宽 50 μs,强度 5 mA。记录肛门外括约肌的 EMG 数据文件。在维持上述电流刺激及监测肛管内压力变化的情况下,于定位好的第 4 骶神经处,回抽无血液,在两侧第 4 骶神经处缓慢注射 50 g/L 罗哌卡因 0.1 mL/kg + 肾上腺素(1:250000),总剂量平均分为两侧注射。黄宗海等研究证实此方法制作的紧迫性大便失禁的模型在第 8 周依旧具有较好的稳定性。

综上所述,虽然引起大便失禁的病因复杂多样,但临床上主要以括约肌损伤或者神经损伤多见。众所周知,大鼠肛门括约肌的愈合能力极强,因此,大鼠肛门括约肌损伤后自愈时间较短,括约肌损伤的便秘失禁模型维持时间也相应缩短。目前,随着人口老龄化社会的到来,老年性大便失禁的患者呈逐年上升趋势,因便秘失禁而引起的社会经济负担越来越大,此类患者主要是神经和肌肉退化出现的肛门括约能力减弱或消失,其发病的机理更类似于神经的支配作用消失,因此,研究神经支配作用减退引起的大便失禁机制的临床意义更加重要,而且神经离断后具有不可再生性,使得神经损伤的失禁模型维持时间相对较长、模型较稳定。但是,切断神经的造模方法因其寻找相关神经较为困难,大鼠体型小,局部的视野暴露不充分,需要实验员具有较好的解剖学和外科基础,且大鼠神经离断后具有自愈的可能性,造模后模型的验证方法,这些都是困扰和阻碍动物实验研究的难点。因此,随着大便失禁的机理研究的深入,更多、更好的大便失禁动物模型的造模方法将不断涌现。

参 考 文 献(References)

- [1] Norton C, Whitehead WE, Bliss DZ, et al. Conservative and pharmacological management of faecal incontinence [M]. Paris, France: Health Publications, Ltd; 2009: 1521 - 1564.
- [2] Shah BJ, Chokhavatia S, Rose S. Fecal incontinence in the elderly: FAQ [J]. Am J Gastroenterol, 2012, 107(11): 1635 - 1646.
- [3] Rao SS, Bharucha AE, Chiarioni G, et al. Anorectal disorders [J]. Gastroenterology. 2016, 150(6): 1430 - 1442.
- [4] 姜勇,王振军. 大便失禁的病因、病理及诊治 [J]. 大肠肛门病外科杂志, 2000, 4(4): 39 - 42.
Jiang Y, Wang ZJ. Etiology, pathology and diagnosis of fecal incontinence [J]. J Coloproctol Surg, 2000, 4(4): 39 - 42.
- [5] Rajindrajith S, Devanarayana N M, Benninga M A. Review article: faecal incontinence in children: epidemiology,

- pathophysiology, clinical evaluation and management [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013, 37(1):37-48.
- [6] 孙雯, 岑琼, 王剑华. 老年人大便失禁护理的研究进展 [J]. *国际护理学杂志*, 2007, 26(3): 228-230.
Sun W, Cen Q, Wang JH. Research progress on fecal incontinence nursing in the elderly [J]. *Int J Nursing*, 2007, 26(3): 228-230.
- [7] 彭西兰, 毛细云, 王建民. 肛管直肠压力测定的临床研究进展 [J]. *中医药临床杂志*, 2011, 23(6): 562-564.
Peng XL, Mao XY, Wang JM. Clinical research progress of anal canal rectal pressure measurement [J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2001, 23(6): 562-564.
- [8] 李志勇, 孙建宁, 张硕峰. 水合氯醛和戊巴比妥钠对 SD 大鼠麻醉效果的比较 [J]. *四川动物*, 2008, 27(2): 299-302.
Li ZY, Sun JN, Zhang SF. Anesthetic effects of chloral hydrate and pentobarbital on SD rats [J]. *Sichuan J Zool*, 2008, 27(2): 299-302.
- [9] 张栋. 不同麻醉药对大鼠麻醉效果的比较 [J]. *实验动物科学*, 2007, 24(1): 19-20.
Zhang D. Anesthetic effects of different anesthetics on rats [J]. *Lab Animal Sci*, 2007, 24(1): 19-20.
- [10] Zutshi M, Salcedo LB, Zaszczurynski PJ, et al. Effects of sphincterotomy and pudendal nerve transection on the anal sphincter in a rat model [J]. *Dis Colon Rectum*, 2009, 52(7): 1321-1329.
- [11] Salcedo L, Sopko N, Jiang HH, et al. Chemokine upregulation in response to anal sphincter and pudendal nerve injury: potential signals for stem cell homing [J]. *Int J Colorect Dis*, 2011, 26(12): 1577-1581.
- [12] 李小嘉, 金文琪, 郭修田, 等. 电针对大鼠肛门括约肌损伤后间充质干细胞移植归巢的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2015, 28(2): 86-89.
Li XJ, Jin WQ, Guo XT, et al. Effect of electroacupuncture on mesenchymal stem cells transplantation and homing after anal sphincter injury in rats [J]. *J Shanghai Univ Tradit Chin Med*, 2015(2): 86-89.
- [13] 刘连成. 肛门括约肌的神经支配及临床意义 [A]; 第十八届中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会学术会议暨甘肃省第五届结直肠肛门外科学术年会论文汇编 [C]. 2015 年
Liu LC. Innervation of the anal sphincter and its clinical significance [A]. The 18th Session of Chinese Society of Integrative Medicine Colorectal Anorectal Professional Committee Meeting and Gansu Province Colorectal Anorectal Surgery Academic Annual Conference papers compilation [C]. 2015 年.
[14] 吴桂珠, 王金华, 郑珊, 等. 切断双侧阴部神经建立女性压力性尿失禁的动物模型及效果评价 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2016, 17(06): 533-537.
Wu GZ, Wang JH, Zheng S, et al. Establishment of an animal model of female stress urinary incontinence by cutting off both sides pudendal nerves and evaluation of its effects [J]. *Chin J Clin Obst Gynecol*, 2016, 17(06): 533-537.
- [15] 王皓羽, 杜小文, 徐剑炜, 等. 压力性尿失禁动物模型的建立及效果评价 [J]. *中国组织工程研究*, 2010, 14(11): 1959-1962.
Wang HY, Du XW, Xu JW, et al. Establishment of pressure animal model of urinary incontinence and its effect evaluation [J]. *J Clin Rehab Tissue Eng Res*, 2010, 14(11): 1959-1962.
- [16] Healy CF, O'Herlihy C, O'Brien C, et al. Experimental models of neuropathic fecal incontinence: an animal model of childbirth injury to the pudendal nerve and external anal sphincter [J]. *Dis Colon Rectum*, 2008, 51(11): 1619-1626.
- [17] Fang DT, Nivatvongs S, Vermeulen FD, et al. Overlapping sphincteroplasty for acquired anal incontinence [J]. *Dise Colon Rectum*, 1984, 27(11): 720-722.
- [18] Shafik A. A new concept of the anatomy of the anal sphincter mechanism and the physiology of defecation: mass contraction of the pelvic floor muscles [J]. *Invest Urology*, 1998, 9(1): 28-32.
- [19] 黄宗海, 傅晓静, 厉周. 肛门失禁动物模型的构建及评价 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(6): 1170-1172.
Huang ZH, Fu XJ, Li Zhou. Construction and evaluation of anal incontinence animal model [J]. *J Southern Med Univ*, 2009, 29(6): 1170-1172.
- [20] Cosović E, Mornjaković Z, Susko I, et al. Quantification of some qualitative changes of the rabbit sciatic nerve after the application of lidocaine into the mesoneurium [J]. *Medicinski Arhiv*, 2007, 61(4): 207-211.
- [21] Borgeat A, Blumenthal S. Nerve injury and regional anaesthesia [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2004, 17(5): 417-421.