

一种新型 L-精氨酸诱导的大鼠急性坏死性胰腺炎动物模型的建立

郭飞 刘江伟 许永华 朱淑萍 薛晓玉 袁芳 李鹏

【摘要】 目的 通过对大鼠胰腺注射 L-精氨酸的方法建立一种新型大鼠急性坏死性胰腺炎(ANP)动物模型。**方法** 将健康雄性 SD 大鼠 150 只随机分为:对照组、假手术组、ANP 模型组,每组 50 只。ANP 模型组在胰体尾部被膜下及实质内多点均匀注射 L-精氨酸。在造模完成后分别于 4 h、12 h、24 h、48 h、72 h 各时间点每组随机取 10 只大鼠做 CT 观察胰腺变化情况,并通过内眦静脉采血检测血淀粉酶、脂肪酶,取胰腺组织行病理组织学观察。**结果** 腹部 CT 可见胰腺病变随时间进程呈加重表现;ANP 模型组大鼠造模后血淀粉酶[4 h(1500.2 ± 328.5) U/L、12 h(2264.3 ± 366.2) U/L、24 h(2836.0 ± 505.2) U/L、48 h(3741.2 ± 551.8) U/L、72 h(2614.3 ± 361.5) U/L]和血清脂肪酶[4 h(343.2 ± 44.1) U/L、12 h(379.0 ± 39.1) U/L、24 h(432.3 ± 53.0) U/L、48 h(456.5 ± 64.9) U/L、72 h(451.1 ± 39.6) U/L]与对照组及假手术组比较显著升高,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。病理组织学观察可见造模后随时间进程胰腺炎呈加重表现。**结论** 实验通过对大鼠胰腺注射 L-精氨酸的方法成功地建立了一种典型、稳定、可重复的大鼠 ANP 动物模型,用于其发病机制及药物干预后的效果评价。

【关键词】 胰腺炎,急性坏死性; 精氨酸; 模型,动物; 大鼠

Establishment of a new rat model of acute necrotizing pancreas induced by administration of L-arginine

GUO Fei, LIU Jiang-wei, XU Yong-hua, ZHU Shu-ping, XUE Xiao-yu, YUAN Fang, LI Peng. Department of Hepatobiliary Surgery, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region, Urumqi 830000, China

Corresponding author: LIU Jiang-wei, Email: ljw273@sohu.com

【Abstract】 Objective To establish a new acute necrotizing pancreatitis model by injecting L-arginine in pancreas. **Methods** A total of 150 rats were randomly divided into control group ($n = 50$), sham-operated group ($n = 50$), ANP model group ($n = 50$). We multidrop uniformly injected L-arginine in capsule and parenchyma in ANP model group. All rats were observed at 4 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h after modeling. CT manifestation, the level of serum amylase and lipase of pancreas and histopathological change for pancreas were investigated. **Results** CT manifestation become more and more serious after modeling. The level of serum amylase [4 h(1500.2 ± 328.5) U/L, 12 h(2264.3 ± 366.2) U/L, 24 h(2836.0 ± 505.2) U/L, 48 h(3741.2 ± 551.8) U/L, 72 h(2614.3 ± 361.5) U/L] and serum lipase [4 h(343.2 ± 44.1) U/L, 12 h(379.0 ± 39.1) U/L, 24 h(432.3 ± 53.0) U/L, 48 h(456.5 ± 64.9) U/L, 72 h(451.1 ± 39.6) U/L] in group of ANP model were increased significantly after establishing the model. The tissue damage of pancreas become more serious after building the model. **Conclusions** By administration of L-arginine a new rat typical and stable model of acute necrotizing pancreas was established. It is an ideal animal model for the study of nosogenesis and therapy of pancreatitis.

【key words】 Pancreatitis, acute necrotizing; Arginine; Models, animal; Rats

目前,急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)作为一种常见的危重症,发病率和死亡率

较高,胆囊结石、过量饮酒、创伤、感染和遗传因素都可诱发胰腺炎,但其发病机制尚不十分清楚。需要有一种可靠的模拟人 ANP 的实验动物模型来更好地理解其发病机制和评估药物的治疗作用。为此,学者制作出各种 ANP 动物模型用于科学研究。通过大鼠腹腔闭合时注射 L-精氨酸、缩胆囊素、雨蛙素等诱导 ANP 是常见的动物模型,但给药剂量和频次不容易掌握,且多引发腹腔内多脏器损伤。我们通过开腹后对胰腺注射 L-精氨酸的方法成功模拟出 ANP 动物模型。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.12.010

基金项目:新疆军区医院优秀人才基金资助项目

作者单位:830000 兰州军区乌鲁木齐总医院肝胆外科(郭飞、刘江伟、李鹏),实验动物科(许永华),医学美容科(朱淑萍),放疗科(薛晓玉、袁芳)

通讯作者:刘江伟,Email:ljw273@sohu.com

材料和方法

1. 材料:8~10周龄SD大鼠150只,雄性,平均体重300g(均购自新疆乌鲁木齐疾控中心),SPF级,室温22℃,自由进食和水。L-精氨酸(sigma公司),全自动生化分析仪(迈瑞公司),脂肪酶试剂盒(南京建成公司)。

2. 实验分组、术前准备及术后处理:将150只雄性SD大鼠随机分为对照组、假手术组、ANP模型组,每组50只。术前12h禁食,自由饮水。将L-精氨酸溶于生理盐水中配制成150mg/L的溶液。3%戊巴比妥(40mg/kg)腹腔注射麻醉,备皮,碘伏消毒手术区。术中注意观察大鼠呼吸和心跳情况。术后放回饲养箱,苏醒后可饮水,4h后可进食。

3. 手术方法和步骤:ANP模型组:取上腹部正中切口,长约2cm,逐层切开入腹,在左侧腹部找到并提出脾脏和胰腺,将肠管推向下腹部,胃翻向头侧。取150mg/L的L-精氨酸1ml,在胰腺体尾部被膜下及实质内多点均匀注射。假手术组:开腹后翻动胰腺,将胰腺放回其解剖位置。对照组:不开腹,其他处理同其余两组。

4. 检测项目:ANP模型组、假手术组、对照组分别于4h、12h、24h、48h、72h,以3%戊巴比妥(40mg/kg)腹腔注射麻醉,行CT检查,观察SD大鼠腹腔内变化情况,后取SD大鼠内眦血3ml,测定血淀粉酶、脂肪酶。腹部以碘伏消毒,取上腹部正中切口,逐层切开入腹,迅速取0.5cm×0.5cm大小胰腺组织,用4%甲醛固定后石蜡包埋、切片、HE染色后行组织形态学观察。

5. 统计学分析:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,选用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,选用SPSS 17.0统计软件分析数据。

结 果

1. 血清淀粉酶和脂肪酶变化(图1):ANP模型组血清淀粉酶和脂肪酶于模型制作完成后即开始升高,24~48h升高明显,于48h达到峰值,其后略有下降。ANP模型组与假手术组和对照组各时间点比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组和假手术组各时间点比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2. 影像学变化(图2):CT检查可见胰腺明显肿胀,体积增大;胰腺实质边缘毛糙,胰管扩张,胰腺周围有少量渗出,肾前筋膜增厚;胰腺病变继续发展可见胰周积液形成,胰腺结构与周围组织分界不清,胰周脂肪模糊、消失,腹腔内腹水较前增加;部分大鼠左侧可见

少量胸腔积液。

3. 胰腺大体及组织病理学分析(图3):对照组及模型组在各时间点胰腺组织大体无明显变化,病理切片见胰腺腺泡结构完整,无坏死、破裂情况。ANP模型组在造模完成后可见胰腺组织轻微肿胀,进而有少量腹水形成,胰腺界限不清,后期胰腺与周围组织黏连严重,有钙化斑形成,部分大鼠有胰腺假性囊肿形成。病理切片可见组织轻度水肿,炎细胞浸润,进而组织水肿加重,炎细胞浸润明显,后期炎性细胞布满视野,部分腺泡细胞破裂、坏死、溶解,只剩解体细胞残片。根据Kusske胰腺病理学评分^[1]显示,ANP模型组各时间点胰腺炎症病变程度与对照组及假手术组比较均显著升高(P 均 < 0.05)。

讨 论

本实验通过对大鼠胰腺注射L-精氨酸的方法成功地建立了一种典型、稳定、可重复的大鼠ANP的动物模型。该模型可以观察到脂肪酶、淀粉酶随时间进程加重的变化,胰腺病理学可以观察到组织水肿、细胞肿胀、坏死、崩解等变化,与人ANP的发病过程相似。

有学者在腹部闭合情况下通过多次腹腔注射L-精氨酸的方法建立ANP动物模型,但我们在严格按文献给出剂量、浓度复制模型时未取得成功。腹腔注射后引起实验动物腹部肌肉剧烈收缩、表情淡漠、反应迟钝、呼吸心跳加快、饮水增多、进而死亡,解剖大鼠尸体发现腹腔内有腹水形成、大段肠管坏死、肝肾等器官有不同程度的损伤,降低给药剂量则实验动物对药物反应轻微,胰腺致伤不明显。

我们对大鼠麻醉后,在开腹条件下对胰腺行L-精氨酸注射,精准地致伤胰腺。避免了闭合条件下行腹腔注射引起的腹腔多脏器及全身其他器官的损伤和注射时将药物误注入血管和其他器官的情况发生,同时也避免了试验中由于剂量和浓度掌握不准确造成的实验动物意外死亡,导致成模率低,影响后续实验的进行。本模型术后大鼠存活情况良好,成模率100%,即成功地制作了ANP动物模型、单纯致伤了胰腺,又避免了实验动物造模过程中的死亡。实验中我们降低了L-精氨酸的浓度,胰腺损伤较轻,胰腺未达到坏死的程度。Rakoczay等^[2]研究表明闭合情况下大剂量腹腔注射L-精氨酸会在数小时内导致大鼠死亡,可能是高浓度L-精氨酸或其代谢产物腹膜内注射后吸收入血后,损伤中枢神经系统造成动物死亡。但我们在开腹下L-精氨酸浓度大于200mg/L时未造成实验动物死亡,但胰腺病变情况较重,不利于用于ANP发病机制及药物干预作用的研究。另外,腹膜内注射L-精氨酸诱

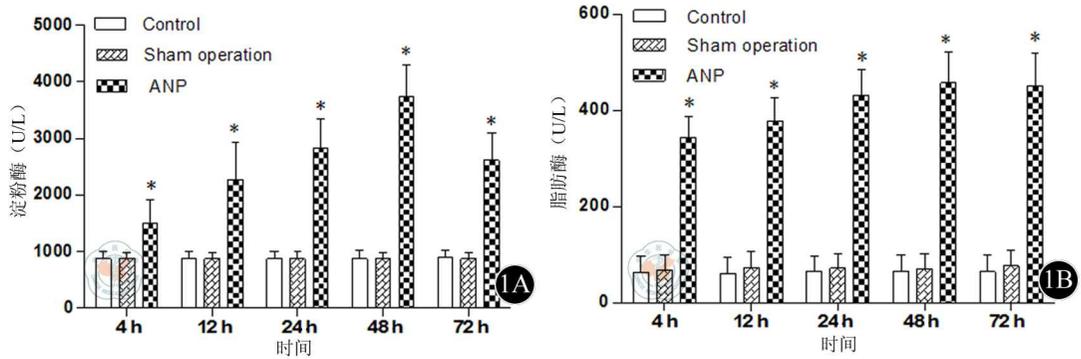


图1 1A: 血清淀粉酶变化。ANP模型组与假手术组和对照组各时间点比较, *P均<0.05; 1B: 血清脂肪酶变化。ANP模型组与假手术组和对照组各时间点比较, *P均<0.05

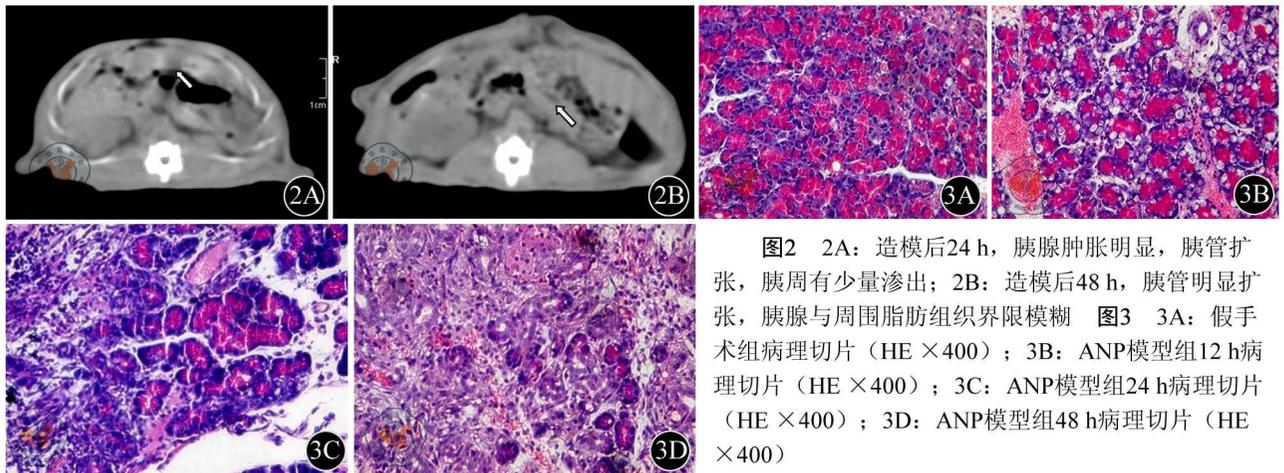


图2 2A: 造模后24 h, 胰腺肿胀明显, 胰管扩张, 胰周有少量渗出; 2B: 造模后48 h, 胰管明显扩张, 胰腺与周围脂肪组织界限模糊 图3 3A: 假手术组病理切片 (HE ×400); 3B: ANP模型组12 h病理切片 (HE ×400); 3C: ANP模型组24 h病理切片 (HE ×400); 3D: ANP模型组48 h病理切片 (HE ×400)

发的胰腺炎是由于药物直接作用胰腺造成的, 还是药物吸收入血后引发了胰腺炎, 文献中未给出说明。如果是药物吸收入血后造成胰腺炎, 药物是否引起其他器官和系统的损伤, 模型制作文献也未给出解答。本模型由于精准致伤胰腺, 注射药物未向腹腔内扩散, 胰腺损伤在前, 肺等其他器官损伤明确是由于胰腺炎引发的并发症, 符合胰腺炎及其并发症的发病机制。

动物模型制作完成后, 在未进行药物及其他治疗措施干预的情况下, 我们继续观察大鼠各项生命体征最长至15 d, 大鼠存活良好, 组织病理学可见胰腺坏死区域被大量成纤维细胞填充, 少量胰腺腺泡细胞再生。我们推测, 残留及再生胰岛和胰腺腺泡细胞分泌的胰岛素及酶类仍能保证大鼠正常生理需要。

血脂肪酶和淀粉酶是胰腺炎发生的重要指标。我们在实验中观察到血淀粉酶和脂肪酶的升高也说明了实验造成了胰腺腺泡细胞的损伤。淀粉酶和脂肪酶在造模完成后4 h开始升高, 24~48 h升高明显, 于48 h达到峰值, 其后降低。有数据研究表明在胰腺局部损伤后, 胰腺巨噬细胞释放大量IL-6、TNF-α等炎症因子^[3], 这些因子可以增加毛细血管的通透性、促进白细胞黏附和漏出, 进一步加重胰腺炎的病情。

L-精氨酸引发ANP的机制还不十分清楚, 氧自由

基、NO和炎症介质可能在其中起着重要作用。近来有学者指出内质网张力过高与ANP的发生有关。Kubisch等^[4]在L-精氨酸诱发的胰腺炎中观察到了内质网张力过高的现象。Shen等^[5]在L-精氨酸诱导的胰腺炎模型中观察到了GFBP-4上调, 其免疫组化的变化与组织形态学变化具有相关性。McClave^[6]则认为氧化应激与胰腺炎的发生具有相关性。Dawra等^[7]提出L-精氨酸的代谢中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在早期起了重要作用, 大鼠血中L-精氨酸和iNOS浓度的升高导致了NO的升高, 进而造成胰腺腺泡细胞的损伤。也有研究表明L-精氨酸减少了生长抑素的释放, 促进了急性胰腺炎腺泡细胞底膜及侧膜的异位分泌, 增加了间质中酶原颗粒的积聚, 破坏了细胞膜结构的完整性。Booth等^[8]在实验中发现线粒体、Ca²⁺、ROS的变化引起了胰腺腺泡细胞的死亡。胰腺腺泡细胞的自溶作用是当前胰腺炎研究的热点^[9]。蛋白激酶K受体的缺失减轻了胰腺炎的炎症反应^[10], 可能是由于蛋白激酶K受体介导了线粒体通透性的增加^[11]。Bhogal等^[12]研究认为抗氧化剂阻止坏死, 因此增加ROS的水平会加重坏死。有研究结果表明^[13], 非正常的Ca²⁺信号通过线粒体的去极化和下调ATP加重了胰腺腺泡细胞的坏

死。Yubero 等^[14]发现急性胰腺炎时趋化因子增加。Ramudo 等^[15]认为 NF- κ B 的上调在胰腺炎的发生中起着重要的作用。

综上所述,本模型操作简便、稳定、成模率高,与人 ANP 发病过程相似,可短时间内大量复制,能更好地帮助我们理解 ANP 的发病机制、病理过程和药物干预后的作用。ANP 的发生机制还有待于我们进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, et al. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery*, 1996, 120: 284-289.
- [2] Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Dósa S, et al. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Crit Care Med*, 2008, 36:2117-2127.
- [3] Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *Nutr*, 1984, 114:467-471.
- [4] Kubisch CH, Sans MD, Arumugam T, et al. Early activation of endoplasmic reticulum stress is associated with arginine-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291:238-245.
- [5] Shen JQ, Shen J, Wang XP. Expression of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) in acute pancreatitis induced by l-arginine in mice. *Acta Histochemica*, 2011, 114:379-385.
- [6] McClave SA. Drivers of oxidative stress in acute pancreatitis: the role of nutrition therapy. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2012, 36:24-35.
- [7] Dawra R, Sharif R, Phillips, P, et al. Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292:1009-1018.
- [8] Booth DM, Murphy JA, Mukherjee R, et al. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*, 2011, 140:2116-2125.
- [9] Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, et al. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Aspects Med*, 2010, 31:1-20.
- [10] He S, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*, 2009, 137: 1100-1111.
- [11] Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. RIP kinases initiate programmed necrosis. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1:8-10.
- [12] Bhogal RH, Curbishley SM, Weston CJ, et al. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation. *Liver Transpl*, 2010, 16:1303-1313.
- [13] Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne C, et al. Calcium elevation in mitochondria is the main Ca^{2+} requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. *J Biol Chem*, 2009, 284: 20796-20803.
- [14] Yubero S, Ramudo L, Manso MA, et al. The role of redox status on chemokine expression in acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792:148-154.
- [15] Ramudo L, Yubero S, Manso MA, et al. Signal transduction of MCP-1 expression induced by pancreatitis-associated ascitic fluid in pancreatic acinar cells. *J Cell Mol Med*, 2009, 7:1314-1320.

(收稿日期:2011-11-11)

(本文编辑:马超)

郭飞,刘江伟,许永华,等.一种新型 L-精氨酸诱导的大鼠急性坏死性胰腺炎动物模型的建立[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(12): 3190-3193.

中 华 临 床 医 生 杂 志