



三种不同严重程度大鼠重症胰腺炎模型比较研究

袁琳¹,周秉舵²,王晓素²,吴中华¹,孔婧²,徐亭亭²,
王宏伟²,朱生樑²,方盛泉²,周莉²,刘春芳²,张秀莲²,王轶²

(1. 上海中医药大学科技实验中心, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院消化科, 上海 200437)

【摘要】 目的 为研究者选择合适的牛磺胆酸钠浓度来制备大鼠重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP) SAP模型提供依据。方法 将60只SD大鼠随机分为假手术组、1.5%浓度组、3.5%浓度组和5%浓度组,造模各组分别用1.5%、3.5%和5%牛磺胆酸钠按逆行胆胰管注射法制备SAP模型。术后统计各组大鼠的死亡率;检测血清淀粉酶、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)水平;观测各组大鼠胰腺组织HE染色病理评分。结果 5%浓度组死亡率较1.5%浓度组显著升高,血清淀粉酶、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)水平、出血和腺泡组织坏死的病理评分较1.5%浓度组和3.5%浓度组均有显著升高。结论 5%的牛磺胆酸钠逆行胆胰管注射法能更好的制备SAP模型,且更符合SAP的生理、病理表现。

【关键词】 重症胰腺炎;逆行胆胰管注射法;牛磺胆酸钠;模型;动物

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015)05-0020-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.005

Comparative study of severe acute pancreatitis model in rats with three different severity

YUAN Lin¹, ZHOU Bing-duo², WANG Xiao-su², WU Zhong-hua¹, KONG Jing², XU Ting-ting², WANG Hong-wei²,
ZHU Sheng-liang², FANG Sheng-quan², ZHOU Li², LIU Chun-fang², ZHANG Xiu-lian², WANG Yi²

(1. Shanghai University of T. C. M Experiment Center for Science and Technology, Shanghai 201203, China;

2. Department of Gastroenterology, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

【Abstract】 **Objective** to provide the evidence for inducing the SAP model in rats with proper concentration of sodium taurocholate. **Methods** 60 SD rats were divided into sham operated group, group of 1.5% in concentration, group of 3.5% in concentration and group of 5% in concentration randomly, while the SAP model was induced by the sodium taurocholate concentration of 1.5%, 3.5% and 5% with the method of retrograde injection into the biliopancreatic duct. To calculate the mortality of different groups, measure the serum amylase, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6), and to observe the pancreatic pathological scores of HE staining in rats. **Results** The mortality in group of 5% in concentration has a significant ascending compared with group of 1.5% in concentration, while the serum amylase, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), pathological score of hemorrhage and acinar necrosis in group of 5% in concentration have a significant ascending compared with group of 1.5% in concentration and group of 3.5% in concentration. **Conclusions** A better SAP model may be induced by sodium taurocholate with the concentration of 5% by the method of retrograde injection into the biliopancreatic duct, which may accord with the

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金(81302929);上海市教委科研创新项目(14YZ065);上海市杏林新星计划(ZYSNXD011-RC-XLXX-20130019)。

【作者简介】 袁琳(1980-),女,博士生,助理研究员,研究方向:中西医结合实验研究。

【通讯作者】 周秉舵(1978-),男,博士,主治医师,研究方向:胰腺疾病研究。E-mail: tcmzbd@hotmail.com。

physiological and pathological manifestation of SAP.

【Key words】 Severe acute pancreatitis; The method of retrograde injection into the biliopancreatic duct; Sodium taurocholate; Model, animal

重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP) 动物模型的制备对于 SAP 的研究至关重要,目前最常用的制备方法为逆行胆胰管注射法。其制备试剂牛磺胆酸钠最常用的浓度为 1.5%、3.5% 和 5%,制备模型时不同浓度的选择常常给研究者带来疑问,基于此,试通过本研究比较了三个不同浓度下逆行胆胰管注射法制备大鼠 SAP,以期为研究者选择合适的牛磺胆酸钠浓度来制备 SAP 大鼠模型提供依据。

1 材料和方法

1.1 动物

60 只清洁级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重 260 ~ 280 g。由中国科学院上海斯莱克实验动物有限公司提供【SCXK(沪)2010-0017】。实验大鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2009-0069】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 药品和试剂

牛磺胆酸钠(美国 Sigma 公司,批号 CAS145-42-6);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号 WS20051129);TNF- α (上海森雄科技实业有限公司,批号 SXB004);IL-6 ELISA 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司,批号 SX01165)

1.3 主要仪器

酶标仪(BioRAD, model 680);自动生化检测仪(Olympus, Au560);自动脱水机(Leica, TP1020);自动包埋机(Leica, EG1160);显微镜(OLYMPUS, BX50);全自动显微镜照相装置(Olympus, PM30-35DX2);微量注射泵(浙江医药公司, WZ-50C2)。

1.4 实验方法

1.4.1 造模方法 将 60 只大鼠随机分为假手术组($n=15$),1.5% 浓度组($n=15$),3.5% 浓度组($n=15$),5% 浓度组($n=15$)。参照逆行胆胰管注射法制备重症胰腺炎模型。2% 戊巴比妥 0.2 mL/100g 腹腔麻醉,固定、备皮,消毒。沿腹白线正中切口约 1.5 cm,暴露腹腔,持弯镊子寻找十二指肠(位于右侧腹腔深部,被肝叶覆盖)。双手持镊轻拉肠段,充分暴露胰腺,见胰腺被小肠呈 C 型包绕,胆胰管为乳白色,开口于十二指肠,呈一白色光点。用动脉夹阻断胆胰管入肝门处,左手中指垫纱布,拇指与

食指夹持胰头部,用 5.5 号头皮针沿白色光点处缓慢穿刺胆胰管。用微量泵以 12 mL/h 的速度,1 mL/kg 的剂量,各组分别持续匀速输入 1.5%、3.5% 和 5% 的牛磺胆酸钠,注完后继续维持压力 3 min。去动脉夹,观察胰体和胰尾部情况,可见胰腺有明显出血点和水肿,逐层缝合肌层和皮肤。术后,于所有实验动物左右后肢皮下各注射生理盐水 10 mL/kg,均禁食不禁水。假手术组仅开腹、翻转胰腺后关腹。

1.4.2 检测项目与方法 各组大鼠于术后 24 h 麻醉后开腹,腹主动脉取血 3~5 mL,分离血清,检测淀粉酶(Amy),采用 ELISA 法测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6);靠近十二指肠壶腹部取 1 cm \times 1 cm 胰腺组织,用 10% 的甲醛固定,脱水、透明与浸蜡、包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色后光镜下观察病理组织形态。

1.5 统计学方法 数据均采用 SPSS 17.0

软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间两两比较用单因素方差分析;计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠死亡率比较

手术各组大鼠术后均出现萎靡不振,皮毛竖立等表现,以 5% 浓度组为甚,假手术组麻醉苏醒后表现无异常。假手术组大鼠死亡 1 只,考虑为麻醉意外。1.5% 浓度组死亡 1 只,3.5% 浓度组死亡 2 只,5% 浓度组死亡 4 只。5% 浓度组死亡率较 1.5% 浓度组显著升高($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 大鼠死亡率比较

Tab. 1 Comparison of mortality between different groups

组别 Group	N	死亡数 Numbers of death	死亡率% Mortality
假手术组 Sham operated group	15	1	6.7
1.5% 浓度组 Group of 1.5% in concentration	15	1	6.7
3.5% 浓度组 Group of 3.5% in concentration	15	2	13.3
5% 浓度组 Group of 5% in concentration	15	4	26.7 ^{*#}

注:与假手术组比, * $P < 0.05$; 与 1.5% 浓度组比, # $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ vs. Sham operated group; # $P < 0.05$ vs. Group of 1.5% in concentration.

表 2 各组血清淀粉酶、TNF- α 、IL-6 水平比较Tab. 2 Comparison of serum amylase, TNF- α and IL-6 between different groups

组别 Group	血清淀粉酶 (U/L) Serum amylase	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
假手术组 Sham operated group	502.2 \pm 38.81	11.5 \pm 0.65	12.9 \pm 0.61
1.5% 浓度组 Group of 1.5% in concentration	1674.3 \pm 101.09*	29.43 \pm 1.98*	49.4 \pm 2.12*
3.5% 浓度组 Group of 3.5% in concentration	1785.0 \pm 98.43*	34.12 \pm 3.01*	56.5 \pm 3.21*
5% 浓度组 Group of 5% in concentration	2315 \pm 112.14* [#] Δ	88.12 \pm 3.09* [#] Δ	119.42 \pm 4.76* [#] Δ

注:与假手术组比,* $P < 0.05$;与 1.5% 浓度组比,[#] $P < 0.05$;与 3.5% 浓度组比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ vs. Sham operated group; [#] $P < 0.05$ vs. Group of 1.5% in concentration; $\Delta P < 0.05$ vs. Group of 3.5% in concentration.

表 3 各组胰腺组织评分比较

Tab. 3 Comparison of pathological score between different groups

组别 Group	水肿 edema	炎症浸润 Inflammation infiltrate	出血 Hemorrhage	腺泡坏死 Acinar necrosis
假手术组 Sham operated group	0.39 \pm 0.23	0.20 \pm 0.30	0.11 \pm 0.10	0.10 \pm 0.19
1.5% 浓度组 Group of 1.5% in concentration	1.76 \pm 0.29*	1.42 \pm 0.19*	0.76 \pm 0.23*	1.89 \pm 0.34*
3.5% 浓度组 Group of 3.5% in concentration	1.88 \pm 0.56*	1.45 \pm 0.25*	0.87 \pm 0.29*	2.01 \pm 0.45*
5% 浓度组 Group of 5% in concentration	1.90 \pm 0.50*	1.73 \pm 0.31*	1.12 \pm 0.73* [#] Δ	3.01 \pm 0.71* [#] Δ

注:与假手术组比,* $P < 0.05$;与 1.5% 浓度组比,[#] $P < 0.05$;与 3.5% 浓度组比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ vs. Sham operated group; [#] $P < 0.05$ vs. Group of 1.5% in concentration; $\Delta P < 0.05$ vs. Group of 3.5% in concentration.

2.2 生化指标检测结果

各浓度组血清淀粉酶水平较假手术组显著升高 ($P < 0.05$),5% 浓度组较 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高 ($P < 0.05$);各浓度组 TNF- α 水平较假手术组显著升高 ($P < 0.05$),5% 浓度组较 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高 ($P < 0.05$);各浓度组 IL-6 水平较假手术组显著升高 ($P < 0.05$),5% 浓度组较 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高 ($P < 0.05$)。1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组的各实验室检查比较均未见明显差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

2.3 组织病理学观察结果

各浓度组胰腺组织水肿、炎症浸润、出血、腺泡坏死的组织评分较假手术组均有明显升高 ($P < 0.05$);在出血和腺泡组织坏死方面,5% 浓度组较 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高 ($P < 0.05$);1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组的胰腺组织水肿、炎症浸润、出血、腺泡坏死的组织评分未见明显差异 ($P > 0.05$) (表 3,彩插 8 图 1)。

3 讨论

SAP 的造模方法分为非侵入型和侵入型两种。常见的非侵入型制备方法包括饲喂法、雨蛙素 (caerulein, CAE) 注射法、L-精氨酸注射法^[1-2]。饲喂法指给造模动物喂食无胆盐乙硫氨酸 (choline deficient methionine supplemental, CDE) 而诱发 SAP。1992 年 Niederau 等^[3] 给雌性小鼠服 CDE 诱发出

SAP。CAE 注射法指给造模动物注射雨蛙素而诱发的胰腺炎。此法有损伤较小,操作较简便,可重复性好,给药方式多样 (皮下注射、肌肉注射、静脉注射、腹腔注射) 等诸多优点,主要用于水肿型胰腺炎发病机理的研究。L-精氨酸注射法多指腹腔多次注射 L-精氨酸而诱发 SAP。此法操作简便、价钱便宜、感染机会少等,缺点是成活率偏低。

侵入型制备方法主要有电针刺激法、结扎法和逆行胆胰管注射法。电针刺激法可较好的模拟胆源性胰腺炎,但操作较复杂,可重复性较差,成活率偏低。结扎法有十二指肠闭襻法和胆总管结扎法两种。1975 年 Nevalainen^[4] 报道十二指肠闭襻法,即结扎胆总管开口远近各 1cm 的十二指肠,使十二指肠腔内压力增高,致胆汁返流入胰管引起胰腺炎。此法与临床常见的急性胆源性胰腺炎类似,虽然操作简单,但易引起感染,也影响肠道的正常生理功能。王广义等^[5] 将胆总管结扎法改进为胆总管末端结扎法,结果呈现典型急性胰腺炎的征象,缺点是实验动物的死亡率较高,可重复性较差。1980 年 Aho^[6] 首次采用切开大鼠十二指肠前壁,经十二指肠乳头插入塑料管,向胰胆管内逆行注射 5% 牛磺胆酸钠,制备成急性出血坏死性胰腺炎 (acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis, AHNP) 模型,称为胆胰管逆行注射法,或者称为逆行胆胰管注射法 (retrograde injection into the biliopancreatic duct)。Zhang^[7] 等用 0.1 mL/100 g, 3.5% 牛磺胆酸钠逆行注射胆胰管也成功建立小鼠 SAP 模型。此

法效果确切,在病因、致病机制及病变等方面与临床 SAP 相似,且诱发成功率高,有很好的重复性,因此是目前被证明的最有效的 SAP 研究的动物模型。

逆行胆胰管注射法的造模过程需经过麻醉、备皮、消毒、开腹、寻找胰腺、夹闭胆胰管、穿刺及注射、关腹这 8 个步骤。其中关键部分和难点为“寻找胰腺”和“逆行胆胰管穿刺”两方面。对于“寻找胰腺”,首先要明确大鼠胰腺的解剖位置,其胰腺组织被小肠组织包围呈 C 型。故较容易由胃而找到小肠,从而由 C 型小肠包绕的位置找到胰腺组织。对于“逆行胆胰管穿刺”,涉及到选择“穿刺器具”和“穿刺点”两个方面。对于“穿刺器具”,最常用的是头皮针和 BD 套管针。头皮针的优点价格便宜,而 BD 套管针其优点是进针后,可以拔出针芯,继续进针,减少胆胰管的损伤。从课题组的长期实践来看,BD 套管针在拔出针芯再进针的过程中,可能有两个问题。其一,因为动作繁琐而增加了手术时间,增加了大鼠感染机会,增加了胰腺组织额外损伤的可能。其二,再次进针时,因为针芯已退出,此时的进针依靠针芯外侧的塑料套管,因摩擦或者韧性不足,可能加重胆胰管的损伤,甚至因用力进针可能会出现胰腺组织的撕裂等意外情况。因此本次研究,课题组采用了 5.5 号头皮针,从而减少手术时间,简化流程,减少胰腺及大鼠的额外损伤。其次是“穿刺点”的选择,“穿刺点”可以选择的两个地方分别是穿过胰腺组织的胆胰管上和胆胰管入十二指肠处。对于在穿过胰腺组织胆胰管上进针,存在增加胰腺组织额外损伤和难以刺入胆胰管两个问题。因此本课题组穿刺点选在胆胰管入十二指肠处,此处相对容易进入胆胰管,又可减少胰腺的额外损伤。但要注意尽量靠近胰腺组织,减少十二指肠的穿刺。

文献记载最多的牛磺胆酸钠注射浓度分别为 1.5%、3.5%、5%^[6-8]。研究结果表明,三种浓度均在不同程度上制备 SAP 模型。从死亡率的角度看,5% 浓度组与临床中死亡率相近。从实验室结果看,

5% 浓度组血淀粉酶、TNF- α 水平、IL-6 水平较 1.5%、浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高,而 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组之间的上述检查比较均未见明显差异。在病理评分的四个方面里,出血和腺泡组织坏死方面,5% 浓度组较 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高,1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组的胰腺组织水肿、炎症浸润、出血、腺泡坏死的组织评分未见明显差异。以上结果说明 5% 的牛磺胆酸钠逆行胆胰管注射法能更好的制备 SAP 模型,且更符合 SAP 的生理、病理表现。

参考文献:

- [1] Liang HY, Chen T, Wang T, *et al.* Time course of intestinal barrier function injury in a sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis in rat model[J]. *J Dig Dis*, 2014, 15(7):386-393.
- [2] 周秉舵,朱生樑,马淑颖,等. 急性胰腺炎动物模型的研究进展[J]. *中国实验动物学志*, 2006, 16(7):442-446.
- [3] Niederau C, Luthen R, Niederau MC, *et al.* Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding acholine-deficient, ethionine-supplemented diet: methodology and standards[J]. *Eur Surg Res*, 1992, 24(1):40-54.
- [4] Nevalainen TJ. Acute pancreatitis caused by closed by closed duodenal loop in the rat[J]. *Scand J Gastroent*, 1975, 10(5):521-527.
- [5] 王广义,刘铜军,尹为民,等. 三种实验型急性胰腺炎动物模型比较[J]. *中华实验外科杂志*, 1995, 12(1):56.
- [6] Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis[J]. *Scand J Gastroenterol*, 1980, 15(4):411-416.
- [7] Zhang XP, Ye Q, Jiang XG, *et al.* Preparation method of an ideal model of multiple organ injury of rat with severe acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(34):4566-4573.
- [8] 余夙慧,康牧星,孙洪伟,等. SIRS 发展在胰腺坏死、继发感染致胰腺炎病变加重中的作用[J]. *肝胆外科杂志*, 2014, 26(1):43-47.

[修回日期]2015-04-21