

· 实验研究 ·

改良逆行胆胰管注射法制备轻重不同两种大鼠急性胰腺炎模型

Development of severe and mild acute pancreatitis rats models by modified retrograde cholangiopancreatic duct infusion of bile salt

许永春, 李兆申^{*}, 屠振兴, 满晓华 (第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 采用不同浓度的牛磺胆酸钠逆行胆胰管注射, 复制轻重不同两种实验性大鼠急性胰腺炎(AP)模型。方法: 64只大鼠随机分为假手术(SO)组、0.5%牛磺胆酸钠(ST)组和5% ST组, 胆胰管逆行注射浓度分别为0.5%和5%的ST诱导AP, 采用酶法检测血淀粉酶、血糖、肌酐, 化学比色法检测血钙和速率法检测丙氨酸转氨酶, 观察24h病死率及胰腺组织病理学改变。结果: 与SO组相比, 0.5% ST组血淀粉酶升高($P < 0.01$), 血糖、血钙、肌酐及丙氨酸转氨酶数值无显著差异, 病理检查胰腺轻度肿胀, 间质水肿, 属轻型急性胰腺炎(MAP); 5% ST组血淀粉酶、血糖、肌酐及丙氨酸转氨酶均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 血钙降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 病理检查胰腺组织有明显出血坏死, 符合重型急性胰腺炎(SAP)。0.5% ST组和5% ST组24h病死率分别为0和35% (7/20)。结论: 采用浓度为0.5%和5%的ST逆行大鼠胆胰管注射, 可复制出理想的MAP和SAP模型。

[关键词] 急性胰腺炎; 疾病模型; 动物; 牛磺胆酸钠; 逆行胆胰管注射法

[中图分类号] R 576 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X (2004) 11-1251-02

* 急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)发病机制还未完全阐明, 建立合适的动物模型有助于其研究。目前AP模型制作, 较多采用逆行胆胰管注射3%~5%的牛磺胆酸钠(ST)复制重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)和腹腔注射雨蛙素复制轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)。我们采用不同浓度的ST逆行胆胰管注射, 复制出轻重不同的两种AP模型, 简便、可靠、重复性及可比性好, 适合AP发病机制和治疗学的研究, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 健康雄性SD大鼠64只, 体质量200~250g, 清洁级, 上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 随机分为假手术(SO)组8只, 0.5% ST(美国Sigma公司)组28只, 5% ST组28只。

1.2 模型的制备 参照Schmidt等^[1]方法并改良: SD大鼠术前禁食12h和禁水6h; 1%戊巴比妥钠30mg/kg腹腔麻醉, 无菌条件下上腹正中切口进腹, 于十二指肠内侧见片状分布的胰腺; 找到胆胰管, 肝门部胆胰管用无损伤动脉夹夹闭, 从胆胰管开口十二指肠系膜缘对侧肠壁穿刺插入导管, 导管进入肠腔后对准膨大壶腹中心插入胆胰管约1cm, 微量泵以0.1ml/min速度推注5% ST 1ml/kg, 观察10min后拔管, 去除动脉夹, 缝合十二指肠穿刺口并关腹。同法以0.5%的ST制备另一组模型。诱发胰腺炎后3、6、12h自大鼠股静脉取血1ml, 3000r/min离心10min, 取上清置于-80℃冰箱保存。大鼠清醒后自由饮水、禁食。假手术组仅翻动胰腺后关腹。

1.3 观察指标 (1)病死率的观察: 其中0.5% ST组和5% ST组中各取20只, 诱发AP后, 观察大鼠24h存活情况。(2)采用酶法(麦芽糖)检测血淀粉酶, 葡萄糖氧化酶法检测血糖, 化学比色法检测血钙, 酶法检测肌酐, 速率法检测丙氨酸转氨酶, 按Hitachi 7600型全自动生化分析仪(日本)

标准规程操作。(3)造模后12h处死大鼠, 取胰腺组织予10%中性甲醛固定, 脱水, 石蜡包埋制片, H-E染色, 由专业的病理医师观察每一张病理切片, 每张切片观察20个视野。胰腺组织的损伤评价根据Schmidt等^[1]的评分标准改进。

1.4 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 11.0统计软件, 采用 t 检验对各组均数进行显著性检验。

2 结果

2.1 AP模型大鼠血清生化指标检测结果 与SO组相比, 0.5% ST组、5% ST组血清淀粉酶水平均明显升高($P < 0.01$), 其中0.5% ST组升高程度相对较轻。0.5% ST组各时间点血钙、血糖、肌酐及丙氨酸转氨酶水平与SO组相比无显著差异; 5% ST组各时间点血糖、肌酐及丙氨酸转氨酶检查数值显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而血钙水平明显低于SO组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 详见表1。

2.2 AP模型大鼠胰腺组织病理学改变及评分 肉眼观察, SO组胰腺外观正常, 0.5% ST组胰腺轻度肿胀, 5% ST组大鼠胰腺肿胀明显, 质地较硬, 有大片黄色坏死灶, 大网膜、肠系膜上见大量皂化斑, 腹腔有中至大量血性腹水。显微镜下(图1), 0.5% ST组胰腺间质水肿, 伴少至中等量炎细胞浸润, 腺泡和导管基本正常, 未见出血坏死, 属水肿型AP, 水肿及炎细胞浸润积分值分别为(1.38 ± 0.48)和(1.63 ± 0.47)分; 5% ST组胰腺组织大片出血、凝固性坏死及脂肪坏死, 坏死区见大量中性粒细胞和单核细胞浸润, 血管破裂出血, 符合坏死型AP病理表现, 水肿、炎细胞浸润、出血以及坏死积分值分别为(3.63 ± 1.21)、(3.25 ± 1.28)、(2.50 ± 0.93)和(2.75 ± 1.04)分, 与0.5% ST组比较均有显著差异($P < 0.01$)。

* [作者简介] 许永春(1971-), 男(汉族), 硕士, 主治医师

* Corresponding author. E-mail: zsl@online.sh.cn

表1 各组不同时间点血清淀粉酶、血糖、血钙、肌酐和丙氨酸转氨酶检测结果

		(n=8, $\bar{x} \pm s$)				
组别		血清淀粉酶 ($\text{zB}/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	血糖 ($\text{mg}/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Ca^{2+} ($\text{mg}/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	肌酐 ($\text{mg}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	丙氨酸转氨酶 ($\text{zB}/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
SO	3 h	1 024 ± 51	4.82 ± 0.52	2.36 ± 0.19	70.3 ± 15.5	38.3 ± 5.5
	6 h	1 035 ± 83	5.03 ± 0.62	2.31 ± 0.15	72.9 ± 14.4	34.8 ± 5.2
	12 h	1 012 ± 62	4.96 ± 0.43	2.34 ± 0.16	69.3 ± 16.4	42.7 ± 13.6
0.5% ST	3 h	1 523 ± 116**	5.12 ± 0.59	2.29 ± 0.13	69.4 ± 17.7	41.1 ± 6.6
	6 h	2 259 ± 256**	5.03 ± 0.68	2.32 ± 0.11	72.1 ± 18.7	37.4 ± 7.2
	12 h	2 759 ± 551**	4.92 ± 0.69	2.31 ± 0.13	68.7 ± 12.8	40.3 ± 8.6
5% ST	3 h	2 913 ± 562**	7.66 ± 1.41**	2.24 ± 0.11*	87.4 ± 21.6*	139.5 ± 58.3**
	6 h	5 853 ± 680**	10.22 ± 1.43**	1.98 ± 0.15**	94.6 ± 13.3**	353.8 ± 115.5**
	12 h	9 546 ± 1 084**	14.12 ± 2.85**	1.80 ± 0.13**	131.7 ± 20.5**	589.7 ± 157.3**

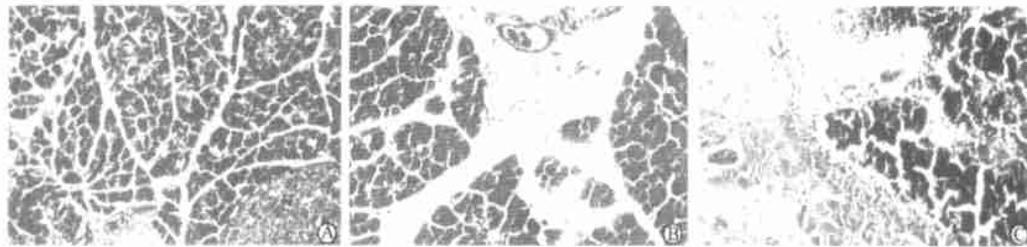
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 SO 组比较

图1 AP模型大鼠胰腺组织病理学改变(H-E, ×200)

A: SO组; B: 0.5% ST组; C: 5% ST组

2.3 大鼠AP模型的病死率 模型制作24 h后,0.5% ST组病死率为0(0/20),5% ST组病死率为35%(7/20)。

3 讨论

要建立一个理想的AP动物模型,应使其发病机制与人相似,重复性好,非侵入性,且简便、价廉,疾病进程、并发症、病死率与人类AP相似并具有同样的治疗反应^[2]。目前尚无某种模型能与人类AP发病过程完全一致,每种模型仅在某些方面与临床患者有不同程度的相似性,因而应根据不同的研究目的,选择相应的动物模型。

现有的AP动物模型主要包括胰管结扎法、乙硫氨酸饮食法、逆行胰胆管注射法和促胰液分泌法(包括雨蛙素腹腔注射法),能分别复制出MAP或SAP模型。其中胆胰管注射法由Aho等^[3]1980年首创,以后不断改进,运用较为广泛,该模型的致病因素与临床相似,可模仿胰管梗阻、胆汁反流等病因形成的AP。通过改变注射速度、注射持续时间、药物浓度可以产生轻重不同的AP,能较好地控制AP病变程度,也适合评价药物的疗效。目前较多运用逆行胆胰管注射3%~5%的ST复制SAP模型,以及蛙素腹腔注射复制MAP模型。

我们采用不同浓度的ST逆行大鼠胆胰管注射,同时复制出轻重不同两种AP模型。比较雨蛙素腹腔注射,用浓度为0.5%的ST复制的MAP模型,价格更低廉,且与3%~5%的ST复制的SAP模型同时运用,具有一定的可比性,均简便、可靠,适合AP发病机制和治疗学的研究。

本研究显示注射5% ST组有一定的病死率,血淀粉酶、血糖升高,血钙降低,有显著的肝肾等器官功能损害,病理检

查可见胰腺出血坏死,炎症细胞浸润,血管破裂出血,出现血性腹水,与SAP患者临床表现相似,符合其诊断标准^[4],可模拟人类SAP伴有的器官功能障碍,运用于研究其发病机制、评价药物疗效。而0.5% ST组仅能引起一过性血淀粉酶升高,无其他器官功能改变,病理检查胰腺组织水肿,炎细胞浸润,胰腺腺泡导管均正常,符合MAP的病理表现。另外,本实验改良Schmidt等方法^[1],采用穿刺十二指肠壁的办法,操作相对简单、省时,避免了切开十二指肠壁损伤过大,缝合困难,且易造成肠道机械梗阻,以及出血多,影响大鼠有效循环血量等缺点。运用微量注射泵推注ST溶液,可保持恒定注射速度以及胰胆管压力,使实验重复性好,结果更为可靠。

[参考文献]

- [1] Schmidt J, Rattner DW, Lewandowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluation therapy [J]. *Ann Surg*, 1992, 215(1): 44-56
- [2] Ulrich CD 2nd, Kopras E, Wu Y, et al. Hereditary pancreatitis: epidemiology, molecules, mutations, and models [J]. *J Lab Clin Med*, 2000, 136(4): 260-274
- [3] Aho HJ, Koskenaho SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1980, 15(4): 411-416
- [4] 中华医学会外科学会胰腺学组. 急性胰腺炎的临床诊断及分级标准(1996年第二次方案) [J]. *中华外科杂志*, 1997, 35(12): 773-774

[收稿日期] 2004-03-06

[修回日期] 2004-05-29

[本文编辑] 曹静