

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.23.024

重症急性胰腺炎大鼠模型制备方法的改进^{*}

赵啟庆¹, 陈秀金², 胡吉富^{3△}

(1. 大理学院大理附属医院麻醉科, 云南大理 671000; 2. 大理学院昆明附属医院普外科, 昆明 650011; 3. 大理学院大理附属医院普外科, 云南大理 671000)

摘要:目的 探讨 3.5% 牛磺胆酸钠胰腺被膜下均匀多点注射诱导重症急性胰腺炎(SAP)大鼠模型方法的改进。方法 96 只健康 SD 大鼠随机分成 SAP 组($n=42$)、假手术组($n=42$)和空白对照组($n=12$)。SAP 组在胰腺被膜下均匀多点注射 3.5% 牛磺胆酸钠, 假手术组同法注射 0.9% 生理盐水, 两组均于术后 2、4、6、12、24、48 h 分别处死 7 只大鼠测血清淀粉酶值, 观察胰腺大体形态及光学显微镜下的病理改变。空白对照组大鼠于实验前全部处死, 测得正常血清淀粉酶值并制作正常胰腺组织标本作为参考对照。结果 SAP 组各时间点血清淀粉酶值均较假手术组、空白对照组对应时间点明显升高($P<0.0001$), 假手术组、空白对照组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。SAP 组胰腺大体组织及光学显微镜下病理改变均较假手术组、空白对照组明显。结论 改良的胰腺被膜下注射法能制备典型的 SAP 模型, 且具有操作简单、诱导成功率高、结果稳定和病死率低等优点, 是一种较为理想的制模方法。

关键词:重症急性胰腺炎; 动物模型; 方法改进

中图分类号: R657.51

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)23-3042-03

The improvement of severe acute pancreatitis rat model preparation methods^{*}

Zhao Qiqing¹, Chen Xiujin², Hu Jifu^{3△}

(1. Department of Anesthesiology, Dali Affiliated Hospital, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China;

2. Department of General Surgery, Kunming Affiliated Hospital, Dali University, Kunming 650011, China;

3. Department of General Surgery, Dali Affiliated Hospital, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: Objective To study severe acute pancreatitis(SAP) in rats model method improvement, these rates were given uniform and multi-point injecting with 3.5% of the taurocholic acid sodium in pancreas capsule. Methods 96 healthy SD rats randomly divided into SAP group ($n=42$) and sham-operated group ($n=42$), blank control group ($n=12$). SAP group was given uniform multi-point injection of 3.5% sodium taurocholic acid in the pancreas capsule, Sham-operated group was injected with 0.9% saline injection, two groups were recorded the measurement of serum amylase values by killing 7 rats in 2, 4, 6, 12, 24 and 48 h respectively, and observed pancreas in form and then pathological changes. The whole rates of control group were killed before the experiment to measure normal values of serum amylase and make normal pancreas tissue specimen as a reference. Results Each time point of the serum amylase values of SAP group were obviously increased compared with the corresponding time points sham-operated group and blank control group($P<0.0001$), no difference between sham-operated group and blank control group; Pancreas gross tissue and then observed pathological changes of SAP group are more obvious than the sham-operated group and blank control groups.

Conclusion The improved injection in the pancreas capsule is an ideal method of moulding, which can make typical SAP model and have simple operation, induced by a high success rate, and have the stability and low mortality rate.

Key words: severe acute pancreatitis; animal models; improve methods

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)因其起病急骤, 发展迅速, 病死率高, 早期诊断和治疗已成为普通外科的难题之一。为进一步研究其病因、发病机制、病理变化以及寻求更有效的治疗方法, 建立 SAP 实验动物模型也逐步成为了一项研究热点^[1-3]。本研究对传统胰腺被膜下注射法进行了改良, 旨在建立一种操作简单、重复性好、病死率低且结果可靠的 SAP 制备方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁成年 SD 大鼠 96 只, 体质量(270 ±

20)g。随机分为 SAP 组($n=42$)、假手术组($n=42$)和空白对照组($n=12$)。

1.2 主要试剂及药品 大鼠血清淀粉酶试剂盒(购自美国 R&D 公司); 牛磺胆酸(Taurocholic Acid Sodium, 购自美国 In-alco 公司); 水合氯醛(附属医院配制); 注射用青霉素钠(购自广州白云山天心制药股份有限公司)。

1.3 实验具体过程及方法 提前购买 SD 大鼠, 普通饲料适应性喂养 2 周, 各组大鼠实验前禁食 12 h, 自由饮水。

1.3.1 实验方法 3.5% 水合氯醛(0.8 mL/100 g)腹腔注射

* 基金项目: 教育部 2012 年国家级大学生创新创业训练计划项目(201210679005); 云南省大学生创新创业训练计划项目(2012dl045)。

作者简介: 赵啟庆(1990—), 住院医师, 本科, 主要从事临床麻醉工作。△ 通讯作者, Tel: 13887296819; E-mail: dlxyhjf@163.com。

麻醉大鼠。待麻醉满意后将大鼠固定于手术台上,备皮,碘伏消毒,铺巾。在剑突下作长约 2~3 cm 的正中纵行切口,然后逐层切开直至进入腹腔。沿十二指肠 C 形结构找到胰腺组织。SAP 组采用一次性 BD 胰岛素注射器在胰腺被膜下多点均匀注射 3.5% 牛磺胆酸钠(0.16 mL/100 g,0.2 mL/min)致胰腺被膜均匀隆起。假手术组同法注射 0.9% 生理盐水(0.16 mL/100 g,0.2 mL/min)。3 min 后将胰腺复位,腹腔内留置注射用青霉素钠 20 万单位,确认腹腔内无活动性出血后逐层关腹。乙醇消毒切口,皮下注射生理盐水补液(3 mL/100 g)。大鼠苏醒后禁食,自由饮水,分笼饲养。空白对照组大鼠直接处死,采血测量其正常血清淀粉酶值并制作正常胰腺组织标本以供参考对照。

1.3.2 标本采集及检测 3 组大鼠在各时间点处死后采血,离心收集血清于 EP 管内待测血清淀粉酶值,肉眼观察胰腺大体病理改变并取胰腺组织于 10% 甲醛固定后制作石蜡切片进行光学显微镜下病理组织学观察。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本间的均数比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清淀粉酶含量检测 大鼠血清淀粉酶检测结果显示,SAP 组各时间点血清淀粉酶水平均较假手术组、空白对照组对应时间点显著增高($P < 0.000 1$),假手术组与空白对照组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);进一步分析各时间点显示,大鼠血清淀粉酶呈时相性变化,其中 2、4、6、12 h 急剧升高,24 h 达到高峰。3 组大鼠血清淀粉酶随时间变化含量比较见表 1。

表 1 3 组大鼠血清淀粉酶随时间变化含量比较($\bar{x} \pm s, U/L, n=7$)

血清淀粉酶(U/L)	SAP 组 (n=42)	假手术组 (n=42)	空白对照组 (n=12)	P
2 h	2 598.57±69.32	1 960.86±78.08	1 884.43±32.89	<0.002 0
4 h	4 917.57±96.54	2 007.14±84.78		<0.000 1
6 h	7 633.00±144.17	1 991.71±17.74		<0.000 1
12 h	12 866.29±162.80	1 938.14±35.78		<0.000 1
24 h	13 543.00±98.61	1 879.71±36.04		<0.000 1
48 h	13 505.00±74.72	1 861.71±33.57		<0.000 1

P 值为 SAP 组和假手术组比较结果。

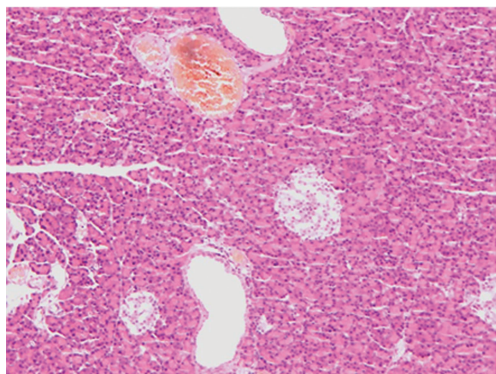


图 1 正常胰腺组织(HE, ×400)

2.2 胰腺组织观察 空白对照组为正常胰腺组织,呈淡粉红色,轮廓清晰、均匀一致。光学显微镜显示小叶结构清晰,腺泡细胞结构完整,未见充血水肿和出血坏死。假手术组轮廓稍模糊,各时间点胰腺组织出现轻度水肿,光学显微镜下可见小叶间隙增宽,腺泡细胞水肿且部分间质内炎细胞浸润,随着时间的延长生理盐水被吸收,胰腺组织结构逐渐恢复正常。SAP 组各时间点胰腺体积增大,病变程度随时间延长而加重,胰腺组织出现不同程度的充血水肿伴散在点片状出血坏死,腹腔内可见腹水。正常胰腺组织见图 1,病变组织见图 2。

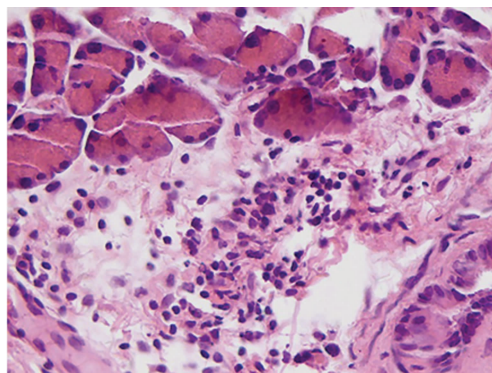


图 2 SAP 组 12 h 时胰腺组织(HE, ×400)

3 讨 论

目前,SAP 动物模型的制作方法较多,但均不是较为理想的方法。逆行性胆总管注射法造模过程繁琐、诱导成功率偏低且大鼠病死率高,不便长时间观察;结扎法肠坏死率高且易合并感染;雨蛙素和 L-精氨酸均采用药物腹腔注射诱导,容易引起其他脏器的损伤,导致成模动物的病死率高低和存活时间长短不一;饮食造模法,鉴于无法精确掌握其饲喂量而导致同组实验动物模型差异较大,不利于实验的进一步研究^[4-16]。因此,目前各种大鼠 SAP 造模方法均有待改进。

胰腺被膜下注射法机制为在胰腺被膜下注射牛磺胆酸钠后,发生早期化学刺激使胰腺细胞直接受损,促使胰腺腺泡细胞破裂释放大量胰酶,最终胆盐激活胰酶发生自身消化,导致胰腺出血和坏死并继发 MCD 与多器官损伤。

本研究对胰腺被膜下注射法进行了一些改进:(1)调整了用药浓度、剂量及注药速度。预实验时,本研究采用 5% 牛磺胆酸钠(2 mL/kg,0.2 mL/min)的方案,发现实验动物在短期内病死率高,不利于长时间观察。因此,本研究采用 3.5% 牛磺胆酸钠(0.16 mL/100 g,0.2 mL/min),结果表明该方案能成功诱导病变典型的 SAP 模型,且降低了实验动物的病死率。(2)采用一次性 BD 胰岛素注射器水平进针的方法。预实验中发现胰腺被膜菲薄,并紧贴于胰腺组织上,而且其间有许多小血管分布,若使用较粗的针头或以一定角度进针,则易导致针头不在被膜下而直接刺入胰腺组织内,且易损伤小血管。一次性 BD 胰岛素注射器针头直径仅为 0.33 mm,可有效控制注药时间。水平方式进针能够提高穿刺的成功率,一定程度上减少药物浪费,并能减少多点穿刺对胰腺组织的直接损伤和突破小血管导致的出血^[4]。

综上所述,经改良的胰腺被膜下注射法能够成功诱导病变典型的 SAP 模型,并能避免逆行性胆总管注射法复杂的操作过程及因扎穿胆总管造成胆漏或穿刺“假道”造成药物浪费,具

有操作简单、模型诱导成功率高、结果稳定、省时省力、大鼠存活率高、利于长时间观察等优点,能为大批量 SAP 模型的制备提供较为可靠的方法。

参考文献:

- [1] 杨元生,崔淑兰,陈昱,等.重症急性胰腺炎实验动物模型的研究进展[J].世界华人消化杂志,2009,17(25):2601-2606.
- [2] 许娟娟,刘俊,侯晓华.急性胰腺炎动物模型不同造模方法与肠道细菌易位的关系[J].中华胰腺病杂志,2010,10(3):225-226.
- [3] Schmidt J,Rattner DW,Lewandrowski K,et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy[J]. Ann Surg,1992,215(1):44-56.
- [4] 钱明平,房林,沈蓉蓉,等. BD 针在大鼠急性胰腺炎模型制作中的应用[J]. 重庆医学,2008,37(11):1219-1220.
- [5] 朱长炎,赵海峰,曾宥有,等.一种新型小鼠重症急性胰腺炎模型的制作及评估[J].中国组织工程研究,2012,16(42):7861-7865.
- [6] 杨平,寇明文,赵戈,等. L-精氨酸和雨蛙素诱导急性胰腺炎模型的对比研究[J]. 现代生物医学进展,2012,12(15):2810-2813.
- [7] 沈佳庆,杨丽娟,胡国勇,等.牛磺胆酸钠在大鼠急性胰腺炎模型中的半数致死量(LD50)研究[J]. 现代生物医学进展,2011,11(19):3618-3620.
- [8] 闫堃,黎一鸣,纪宗正,等.缓释泵法制急性胰腺炎大鼠模型[J].中国普外基础与临床杂志,2011,18(7):717-

721.

- [9] 杜章,吴伟林,邵峰,等.应用一次性静脉留置针对大鼠重症急性胰腺炎模型制作方法的改进[J].肝胆胰外科杂志,2012,24(5):399-402.
- [10] 白槟,徐斌,刘朝旭,等.逆行胰胆管注射牛磺胆酸钠诱导重症急性胰腺炎模型多器官损害观察[J].科学技术与工程杂志,2013,10(15):225-226.
- [11] 谢阳云,余凤梅,杨丽红,等.逆行胃左动脉腹腔干治疗大鼠胰腺炎的模型制作[J].肝胆胰外科杂志,2013,25(1):47-50.
- [12] 刘君君,陈昱,龙友明,等. L-精氨酸诱导大鼠急性坏死性胰腺炎模型的建立[J].中国药理学通报,2009,25(10):1392-1394.
- [13] 刘震雄,李慧艳,赵曙光,等.大鼠重症急性胰腺炎模型制备方法的建立与探讨[J].中国现代医学杂志,2010,20(6):861-864.
- [14] 程飞,张献全,虎琼华,等.大剂量 L-精氨酸分 3 次腹腔内注射制备大鼠急性坏死性胰腺炎模型[J].第三军医大学学报,2010,32(17):1838-1841.
- [15] 郝建志,方驰华,范应方,等.一种效果确切的大鼠重症急性胰腺炎模型[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(28):5193-5196.
- [16] 刘尧,兑丹华,兰天罡,等.大鼠急性重症胰腺炎模型制备的技术改进[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,32(6):570-572,582.

(收稿日期:2014-02-08 修回日期:2014-04-22)

(上接第 3041 页)

参考文献:

- [1] 何铸.中药刘寄奴的考证[J].中药材科技,1981,16(4):42-44.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:91-92.
- [3] 汪凤山,刘娟.阴行草化学成分及药理作用研究进展[J].黑龙江医药科学,2008,31(6):61-62.
- [4] Zhao MB,Wei HL,Li J,et al. Determination of luteolin and acteoside in Siphonostegiae Herba by high-performance liquid chromatography[J]. J Chin Pharmac Sci, 2012,15(21):333-335.
- [5] 林宗涛,梁毅,刘淑娟,等. HPLC 法测定北刘寄奴中木犀草素和芹菜素的含量[J].药物分析杂志,2011,31(9):1689-1692.
- [6] 刘吉成. HPLC 测定黑草中木犀草素和芹菜素的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(20):72-74.
- [7] 李才堂,文萍,郭琦丽,等. HPLC 测定裸花紫珠药材中毛蕊花糖苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):

84-86.

- [8] 陈腾飞,萧伟,尚强,等. HPLC 法测定不同产地墨旱莲药材中木犀草素含量[J].南京中医药大学学报,2011,27(2):158-160.
- [9] 肖琳,贾娜,何姣,等.青叶胆药材及饮片中獐牙菜苦苷和龙胆苦苷的含量测定[J].药物分析杂志,2009,29(5):876-879.
- [10] 邹国栋,程艳阳,方铁铮,等. HPLC 法测定紫珠叶中毛蕊花糖苷的含量[J].药物分析杂志,2010,30(1):160-162.
- [11] 黄权芳,伍小燕,黄敏,等. HPLC 法测定壮骨清热颗粒中木犀草素的含量[J].中药新药与临床药理,2010,21(3):285-287.
- [12] 苏春英,苏本华,孙静. HPLC 法测定浮萍中芹菜素的含量[J].中医药信息,2013,30(3):32-34.
- [13] 宋丽军,赵文昌,曾秋玲,等.护骨胶囊中 5 种成分 HPLC 同时测定方法的建立[J].中药材,2012,35(12):2019-2023.

(收稿日期:2014-02-01 修回日期:2014-04-13)