

## L-精氨酸和雨蛙素诱导急性胰腺炎模型的对比研究

杨平<sup>1</sup> 寇明文<sup>1</sup> 赵戈<sup>1</sup> 卢鹏<sup>1</sup> 宋振顺<sup>2△</sup>

(1 第四军医大学西京医院 陕西 西安 710032 2 上海同济大学附属第十人民医院肝胆胰外科 上海 200072)

**摘要** 目的: 研究 L-精氨酸和雨蛙素分别诱导 SD 大鼠急性胰腺炎(AP)模型的差异,为进一步研究急性胰腺炎提供可靠模型。方法: L-精氨酸采用 3 次腹腔注射,间隔 1 h,雨蛙素采用 7 次腹腔注射,间隔 1 h 诱导急性胰腺炎模型。碘-淀粉比色法检测血清淀粉酶水平,血清脂肪酶测定试剂盒检测脂肪酶活性,胰腺组织切片观察组织的破坏情况,TUNEL 法检测腺泡细胞凋亡。结果: ①L-精氨酸诱导的大鼠模型血清淀粉酶和脂肪酶水平在诱导成功后 6 h 即显著升高,蛙皮素诱导的大鼠模型在 12 h 显著升高,与正常对照组比较均有统计学差异( $P<0.05$ ),提示急性胰腺炎建模成功。②L-精氨酸诱导的模型中胰腺组织结构破坏,有大片出血坏死灶,大量炎细胞浸润,而蛙皮素诱导的模型组织腺泡、间质水肿,炎性细胞浸润,少量散在出血坏死灶,血管变化常不明显,渗液清亮。结论: L-精氨酸和雨蛙素均能诱导 SD 大鼠急性胰腺炎模型, L-精氨酸诱导重症急性胰腺炎,雨蛙素诱导轻型急性胰腺炎,是研究急性胰腺炎的良好模型。

**关键词** 急性胰腺炎; L-精氨酸; 雨蛙素; 模型

中图分类号: R-332, R322.61 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)15-2810-04

## Comparison of the Model of Acute Pancreatitis Induced by L-arginine and Cerulein

YANG Ping<sup>1</sup>, KOU Ming-wen<sup>1</sup>, ZHAO Ge<sup>1</sup>, LU Peng<sup>1</sup>, SONG Zhen-shun<sup>2△</sup>

(1 Department of Hepatobiliary & Pancreato-splenic Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China;

2 Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, Tenth People's Hospital, Shanghai, 200072, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the difference of the models of acute pancreatitis(AP) induced by L-arginine and cerulein, so as to provide reliable models for further study of the acute pancreatitis. **Method:** Acute pancreatitis was induced in Sprague-Dawley rats either by giving three intraperitoneal injections of L-arginine, each at concentrations of 200 mg/100g body weight, with an interval of 1 h, or by giving seven intraperitoneal injections of cerulein, each at concentrations of 40  $\mu$ g/kg body weight, with an interval of 1 h. Severity of AP was assessed by analysis of serum amylase and lipase activity. Samples of pancreas were taken for measuring hematoxylin-eosin staining. Apoptosis in pancreatic acinar cell was determined with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling technique (TUNEL). **Result:** ① Serum amylase and lipase activity has significantly increased at 6 h timepoint in the model of AP induced by L-arginine, and more higher with the extension of time. It has significantly increased at 12 h timepoint in the model induced by cerulein. Both have significantly difference( $P<0.05$ ). ② The administration of L-arginine caused severe necrotizing pancreatitis, including large hemorrhage focal necrosis, and obvious inflammatory infiltration. However, there were edema of acinus and interstitial, a small amount of inflammatory cell infiltration in the model, which induced by cerulein. **Conclusion:** Acute pancreatitis were induced by L-arginine and cerulein. L-arginine could induce severely, and cerulein induce mildly. There both are feasible models of acute pancreatitis for further research.

**Key words:** Acute pancreatitis; L-arginine; Cerulein; Model

**Chinese Library Classification:** R-332, R322.61 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2012)15-2810-04

### 前言

急性胰腺炎是临床上常见的急腹症之一,由多种病因导致胰酶在胰腺内被激活后引起胰腺组织自身消化、水肿、出血甚至坏死的炎症反应<sup>[1,2]</sup>。临床以急性上腹痛、恶心、呕吐、发热和血胰酶增高等为特点<sup>[3]</sup>。发病率约为 40/10 万,20% 的轻型患者虽经严格正规治疗后仍发展成重症急性胰腺炎,且死亡率高达

30%,给患者带来巨大的生命威胁<sup>[4,5]</sup>。急性胰腺炎的发病机制目前尚不清楚,建立与人类急性胰腺炎相似的动物模型至关重要。本研究旨在通过观察二种不同药物诱导的急性胰腺炎模型对比,为下一步更好的进行研究该疾病做基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物与试剂

实验使用 SD 大鼠,6-8 周,180-220g,由第四军医大学实验动物中心提供。 $\alpha$ -淀粉酶测定试剂盒购买于四川迈克生物科技股份有限公司,脂肪酶检测试剂盒由上海荣盛生物技术有限公司提供,TUNEL 试剂盒由罗氏(Roche)公司嘉美诺斯生物科技

作者简介: 杨平(1985-)男,硕士研究生,主要研究方向:急性胰腺炎的机制研究, Tel: 15020909226, E-mail: yzpr2101@163.com

△通讯作者: 宋振顺, E-mail: songzs@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2011-12-06 接受日期: 2011-12-30)

(北京)有限公司提供。实验在第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科实验室完成。

## 1.2 实验方法和步骤

1.2.1 动物处理 54 只 SD 大鼠购于第四军医大学实验动物中心, SPF 级, 6-8 周, 约 200g 左右。置于第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科实验室动物房饲养。动物给予充足饲料和水, 12 h 灯光/12 h 黑暗环境下适应 1 周。实验动物随机分成 3 组 A 组(正常对照组 6 只) B 组(雨蛙素诱导组 24 只); C 组(L- 精氨酸诱导组 24 只)

1.2.2 试剂的配制 L- 精氨酸粉末 20 g 溶于 100 ml 0.9 % 的氯化钠溶液中, 搅拌并加热至 30 ℃ 左右, 氢氧化钠调整溶液 pH 值至 7.0, 配成 20 % 的 L- 精氨酸溶液。雨蛙素粉末 0.5 mg 先涡旋振荡, 使之脱离管壁, 溶于 1000  $\mu$ L 生理盐水中, 配成存储液储存于 -80 ℃ 冰箱中。

1.2.3 诱导急性胰腺炎模型 诱导前 12 h 禁食水。配制好的 20 % L- 精氨酸溶液腹腔注射 3 次, 2.0g/kg 体重, 间隔 1 h, 腹腔注射配制好的雨蛙素 7 次, 40  $\mu$ L/kg 体重, 间隔 1 h, 正常对照组腹腔注射等量无菌生理盐水 6 次, 间隔 1 h。模型诱导后给予动物进食水。

1.2.4 血清和组织检测 药物注射最后一次后 3、6、12、24 h 处死相同数量的动物模型(6 只), 在无菌操作下迅速从下腔静脉获取血液、腹腔获取胰腺组织。血液经 4000 rpm 离心 5 min, 小

心吸取上层血清, 存储于 -80 ℃ 保存用于检测淀粉酶和脂肪酶活性, 胰腺组织剪成块状浸泡于 4 % 多聚甲醛溶液中, 用于组织石蜡切片和 TUNEL 法检测。胰腺组织病理学评分: 在光镜下由三位病理科医师双盲随机阅片, 每张切片随机选择 5 个高倍视野, 观察胰腺组织病理学的变化, 按照 schmidt 等标准从水肿、出血、坏死及炎症细胞浸润 4 个方面进行评分。

## 1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SPSS13.0 软件处理数据, 两组间均数比较用 t 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ ,  $P<0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 急性胰腺炎模型病理及评分

A 组(正常对照组)大鼠模型胰腺组织石蜡切片显示组织结构完整, 纹理清晰, 腺泡细胞排列整齐, 几乎无细胞破坏和炎症细胞浸润(图 1)。B 组(雨蛙素诱导的急性胰腺炎大鼠)肉眼观组织水肿、肿胀、变硬, 少量坏死, 周围组织可见钙化灶, 大量淡黄色腹水渗出, 镜下见组织结构紊乱, 纹理交错, 腺泡细胞点状坏死, 少量炎症细胞浸润(图 2)。而 C 组(L- 精氨酸诱导的急性胰腺炎)肉眼见胰腺腺体增大、肥厚, 呈暗紫色, 坏死灶散在分布, 镜下见脂肪坏死, 腺泡严重破坏, 血管被消化, 大片状出血, 腺泡及小叶结构模糊不清(图 3)。胰腺组织病理评分如表 1。

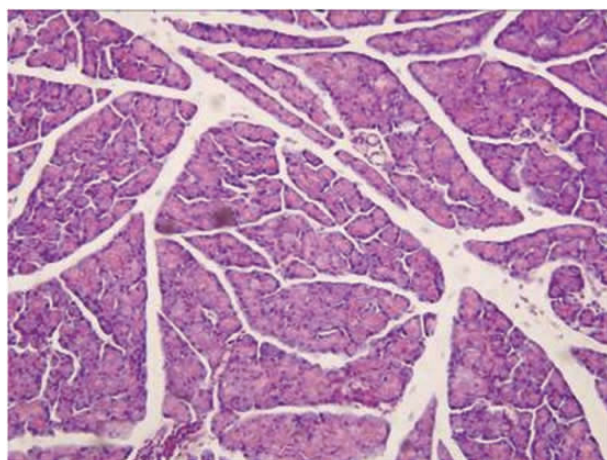


图 1 A 组胰腺组织切片 HE 染色 (200 $\times$ )

Fig. 1 Hematoxylin-eosin staining of pancreatic tissue of group A (200 $\times$ )

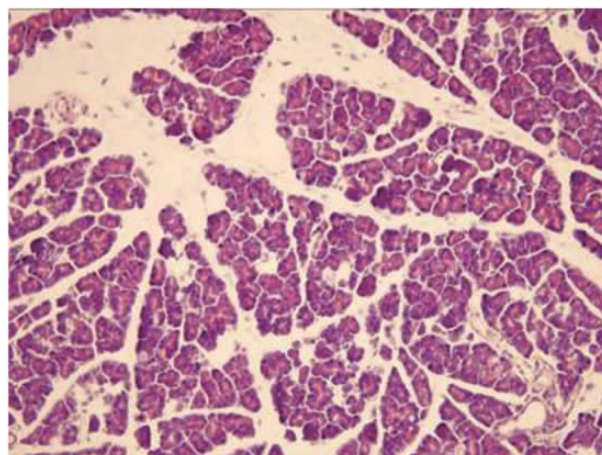


图 2 B 组胰腺组织切片 HE 染色 (200 $\times$ )

Fig. 2 Hematoxylin-eosin staining of pancreatic tissue of group B (200 $\times$ )

### 2.2 血清淀粉酶和脂肪酶活性

A 组血清淀粉酶和脂肪酶水平无明显升高, 在各点保持相对较平稳水平; C 组为 L- 精氨酸诱导的急性胰腺炎模型, 血清淀粉酶和脂肪酶水平在 6 h 时即明显升高, 并随着时间的延长仍持续上升, 显著高于 A 组( $P<0.01$ )。B 组为雨蛙素诱导的急性胰腺炎模型, 血清淀粉酶和脂肪酶在 6 h 有明显升高, 12 h 达到最高峰( $P<0.05$ ), 24 h 时淀粉酶水平明显下降, 接近正常水平(表 2)。

### 2.3 TUNEL 法检测胰腺组织腺泡细胞的凋亡

A 组仅有少量的腺泡细胞凋亡, 而 B 组可见明显的大量腺泡细胞凋亡, 呈片状, 并随着时间的延长有显著的上升; C 组有少量凋亡细胞, 呈点状分布, 但凋亡指数随着时间延长而降低。

(表 3)。

## 3 讨论

急性胰腺炎是突发的急性腹部胰腺组织炎症反应, 其发病率随着人们生活水平的提高有明显的上升趋势, 但治疗方式却仍以传统的支持治疗为主<sup>[6-8]</sup>, 没有重大进展, 致使总死亡率仍然保持较高水平<sup>[9]</sup>。虽对于急性胰腺炎的基础研究已持续多年, 但动物模型的制备却不够理想, 没有符合人类急性胰腺炎的良好模型。Wittel 等使用 4 % 牛磺胆酸钠在 10 倍光学放大镜下逆行性总胆管注射小鼠, 制备 SAP 模型, 并报道已成功诱导<sup>[10]</sup>。该模型腺泡细胞坏死是以胰头部位广泛区域的坏死为特征的, 与临床病理有细微差距, 且制备模型时需开腹手术, 操作过程复



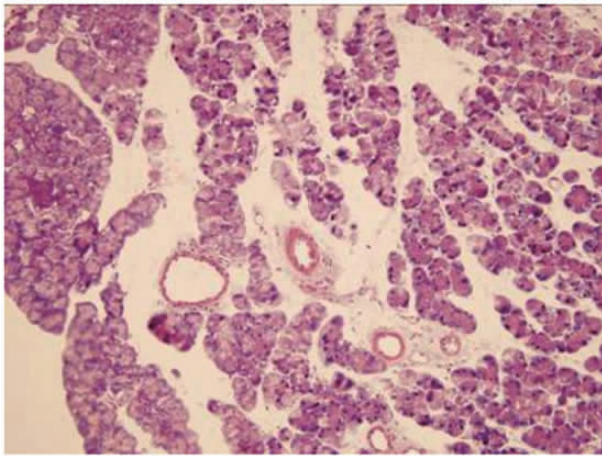


图 3 C 组胰腺组织切片 HE 染色 (200×)

Fig. 3 Hematoxylin-eosin staining of pancreatic tissue of group C (200×)

杂,不利于对在体组织的观察(如对胰腺微循环的观察),初学者较难掌握。Werner Hartwig 等利用静脉内大剂量注射雨蛙素及

肠激酶建立了 SAP 小鼠模型,该模型是在雨蛙素诱导小鼠急性轻型胰腺炎的基础上,静脉内注入肠激酶(EK),肠激酶激活蛋白酶加重胰腺炎炎症反应的<sup>[11]</sup>。肠激酶的使用使得该模型不但造成重症急性胰腺炎,而且诱发其他重要器官的炎症反应,且剂量要求较大,小鼠的反应不一,模型不够稳定。Tani 等首次使用了 2 次腹腔内注射过量 L-精氨酸(4 g/kg)诱导大鼠急性胰腺炎<sup>[12]</sup>,但 Dawra 等认为该模型胰腺损伤进展缓慢,在 L-精氨酸注射后 72h 达到高峰,胰腺损伤组织出现了纤维重建,同时伴随肺损伤<sup>[4]</sup>。

本实验利用小剂量多次腹腔注射雨蛙素或 L-精氨酸的方式诱导轻型或重症急性胰腺炎大鼠模型。从血清学方面看,雨蛙素诱导的轻型急性胰腺炎淀粉酶和脂肪酶活性均在 6 h 时开始升高,12h 达到最高峰,24 h 时明显下降,而 L-精氨酸诱导的重症急性胰腺炎在 6h 时已明显升高,与对照组比较有统计学意义,并随着时间的延长仍持续上升,到 24 h 时到高峰,均与众多临床上分析该疾病结果近似<sup>[13,14]</sup>。从组织形态学方面看,雨蛙素诱导的轻型急性胰腺炎胰腺组织水肿、肿胀、变硬,组织

表 1 不同时间点胰腺组织病理评分(̄x±s)

Table 1 Pathological severity scores at each timepoints

Group	Number	3h	6h	12h	24h
Group A	6	0.86± 0.26	1.02± 0.32	1.63± 0.54	1.25± 0.21
Group B	6	2.36± 1.38	6.39± 2.35 a	10.61± 3.44 a	5.23± 3.69 a
Group C	6	5.32± 2.89 b	9.56± 3.32 b	13.68± 2.54 b	16.69± 3.36 b

Note: a P<0.05, group B compared with group A; b P<0.05, group C compared with group A.

表 2 不同时间段血清淀粉酶水平(U/L, ̄x±s)

Table 2 Serum amylase at each timepoints

Group	Number	3h	6h	12h	24h
Group A	6	489.36± 123.33	503.98± 163.38	512.77± 205.66	506.78± 136.59
Group B	6	633.53± 238.64	1205.69± 325.52 ●	2196.56± 326.78 ●	965.63± 254.67 ●
Group C	6	933.45± 213.23	2305.23± 465.93 ▲	3022.55± 956.64 ▲	3877.57± 698.36 ▲

Note: ● P<0.05, group B compared with group A; ▲ P<0.01, group C compared with group A.

表 3 各组大鼠组织细胞凋亡检测结果(̄x±s)

Table 3 Result of cell apoptosis at each timepoints

Group	Number	3h	6h	12h	24h
Group A	6	0	0.32± 0.12	0.41± 0.15	0.14± 0.06
Group B	6	4.63± 1.22 a	5.62± 2.02 a	6.32± 2.87 a	3.26± 1.96 a
Group C	6	4.56± 2.98 b	5.69± 2.63 b	8.54± 3.65 b	9.85± 2.55 b

Note: a P<0.05, group B compared with group A; b P<0.01, group C compared with group A.

周围有散在钙化灶,大量淡黄色腹水渗出,镜下见组织结构紊乱,纹理交错,腺泡细胞点状坏死,少量炎症细胞浸润,L-精氨酸诱导的急性胰腺炎胰腺腺体增大、肥厚,呈暗紫色,坏死灶散在分布,镜下见脂肪坏死,腺泡严重破坏,血管被消化,大片状出血,腺泡及小叶结构模糊不清,均与临床上急性胰腺炎疾病相似。石蜡组织切片凋亡细胞检测同样证实轻型急性胰腺炎腺

体腺泡破坏较少,而重症急性胰腺炎破坏明显增多。虽然与其他方法有众多的相似之处,但本实验具有更明显的优势,对模型的建立进行了更深入的探讨<sup>[4,9,11,15-18]</sup>。

急性胰腺炎模型对于该疾病的基础研究非常关键,良好的模型应该模拟临床上疾病的病因和发病机制。目前急性胰腺炎的制作模型有很多,如牛黄胆酸钠逆行胰胆管注射<sup>[19]</sup>,大剂量

L- 精氨酸腹腔注射<sup>[20]</sup> ,雨蛙素联合脂多糖或肠激酶静脉注射或腹腔多次注射<sup>[21]</sup> ,以及无胆碱乙酰硫氨酸膳食<sup>[22]</sup>等等 ,但都因各种原因不能很好的模拟人体疾病而对急性胰腺炎的基础研究产生影响。本实验通过小剂量多次注射雨蛙素或 L- 精氨酸诱导轻型或重症急性胰腺炎 ,无创性 ,操作简单易学 ,很好的模拟了人体急性胰腺炎的发病机制 ,为将来进一步研究急性胰腺炎提供了良好的基础。

#### 参考文献(References)

- [1] Ding SP, Li JC, Jin C. A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide [J]. World J Gastroenterol, 2003,9(3):584-589
- [2] Negro P, Ciani R, Risetti A, et al. Administration of caerulein during experimental acute pancreatitis in mice [J]. Boll Soc Ital Biol Sper, 1978,54(8): 759-764
- [3] 王艳, 衣恩通, 阴宏. 小鼠重症急性胰腺炎模型研究进展[J]. 医学研究杂志, 2011,40(7):144-147  
Wang Yan, Yi En-Hong, Yin Hong. Research progress of the severe acute pancreatitis in mice [J]. J Med Res, 2011, 40(7):144-147
- [4] Dawra R, Sharif R, Phillips P, et al. Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292 (4): G1009-1018
- [5] 张艳梅, 欧阳艳君, 宋艳琴. 重症急性胰腺炎的治疗现状[J]. 中国误诊学杂志, 2011,11(21): 5067-5069  
Zhang Yan-mei, Ouyang Yan-jun, Song Yan-qin. Treatment situation of severe acute pancreatitis [J]. Chin J Misdiag, 2011, 11(21): 5067-5069
- [6] 牛晓亚, 许有慧. 加味承气汤治疗急性胰腺炎临床观察 [J]. 中国中药杂志, 2011,36(16):2297-2298  
Niu Xiao-ya, Xu You-hui. The analyse of clinal in acute pancreatitis using Dachengqi Decoction [J]. Chin Med Health, 2011,36 (16): 2297-2298
- [7] 孙备, 张太平. 重症急性胰腺炎病人的免疫治疗 [J]. 中国实用外科杂志, 2011,31(8): 737-743  
Sun Bei, Zhang Tai-ping. Immunotherapy of the patient of acute pancreatitis [J]. Chin J App Surg, 2011, 31(8):737-738
- [8] 杨胜江. 中西医结合治疗急性胰腺炎 30 例[J]. 中国中医急症, 2011, 20(8): 1313-1314  
Yang Sheng-jiang. Thrity patient of acute pancreatitis using combined treatment of traditional Chinese medicine and western medicine [J]. J Emer Trad Chin Med, 2011, 20(8):1313-1314
- [9] Suzuki S, Miyasaka K. Induction of acute pancreatitis by cerulein in human IL-6 gene transgenic mice [J]. Pancreas, 2000,21(1):86-92
- [10] Wittel UA, Rau B, Gansauge F, et al. Influence of PMN leukocyte-mediated pancreatic damage on the systemic immune response in severe acute pancreatitis in rats [J]. Dig Dis Sci, 2004,49 (7-8):1348-1357
- [11] Hartwig W, Schimmel E, Hackert T, et al. A novel animal model of severe pancreatitis in mice and its differences to the rat [J]. Surgery, 2008,144(3):394-403
- [12] Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, et al. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats [J]. Dig Dis Sci, 1990,35(3):367-374
- [13] 李霞, 孙晓娟. 121 例急性胰腺炎临床分析[J]. 中国现代药物应用, 2007,5:42-43  
Li Xia, Sun Xiao-juan. The analyse of clinal 121 patients of acute pancreatitis [J]. Chin Mod Drug App, 2007,5:42-43
- [14] 罗学斌. 204 例急性胰腺炎临床分析[J]. 云南医药, 2010,1:95-96  
Luo Xue-bin. The analyse of clinal 204 patients of acute pancreatitis [J]. Med of Yunnan, 2010,1:95-96
- [15] Niederau C, Brinsa R, Niederau M, et al. Effects of C1-esterase inhibitor in three models of acute pancreatitis [J]. Int J Pancreatol, 1995,17(2):189-196
- [16] Lloret Linares C, Pelletier AL, Czernichow S, et al. Acute pancreatitis in a cohort of 129 patients referred for severe hypertriglyceridemia [J]. Pancreas, 2008,37(1):13-20
- [17] Sakurai Y, Shintani N, Arimori A, et al. Cerulein-induced acute pancreatitis in PACAP knockout mice [J]. J Mol Neurosci, 2011,43 (1):8-15
- [18] Al-Azzawi HH, Wade TE, Swartz-Basile DA, et al. Acute pancreatitis in obesity: adipokines and dietary fish oil [J]. Dig Dis Sci, 2011,56(8): 2318-2325
- [19] Wittel UA, Wiech T, Chakraborty S, et al. Taurocholate-induced pancreatitis: a model of severe necrotizing pancreatitis in mice [J]. Pancreas, 2008,36(2): e9-21
- [20] Paszt A, Eder K, Szabolcs A, et al. Effects of glucocorticoid agonist and antagonist on the pathogenesis of L-arginine-induced acute pancreatitis in rat [J]. Pancreas, 2008,36(4):369-376
- [21] Jin C, Li JC. A mouse model of severe acute pancreatitis induced by caerulein plus lipopolysaccharide [J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2002,24(4):393-396
- [22] Lu SC, Gukovsky I, Lugea A, et al. Role of S-adenosylmethionine in two experimental models of pancreatitis [J]. FASEB J, 2003,17(1): 56-58