论著

文章编号:1000-5404(2010)17-1838-04

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

程 飞,张献全,虎琼华,唐 晋 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院中心ICU)

【摘要】 目的 建立一种操作简单、病变典型、稳定性好的大鼠急性坏死性胰腺炎模型。方法 100只SD大鼠采用随机数字法分为急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis,ANP)模型组(A组,$n=50$)和对照组(C组,$n=50$),C组接受生理盐水对照,A组大鼠分3次腹腔内注射8% L-精氨酸(3×1.5 g/kg,每次间隔1 h),第3次注射后选取6、12、24、48 h和72 h 5个时相点观测两组大鼠胰腺病理学和血清淀粉酶水平的变化情况。结果 L-精氨酸注射后6 h可见胰腺少量炎细胞浸润、腺泡水肿;12 h见胰腺较多的炎细胞浸润,小叶结构紊乱和小叶间水肿;24 h见胰腺大量炎细胞浸润,腺小叶结构损坏和局灶性坏死;48 h见弥漫性腺泡坏死和脂肪组织坏死;72 h见胰腺大片凝固性坏死和胰腺结构模糊;同时胰腺组织病理评分(A组 *vs* C组)呈现相同的时相性变化[6 h (5.26±1.30) *vs* (0.67±0.52),$P<0.01$;12 h (6.83±1.20) *vs* (0.57±0.43),$P<0.01$;24 h (7.43±1.40) *vs* (0.47±0.63),$P<0.01$;48 h (8.27±1.10) *vs* (0.43±0.65),$P<0.01$;72 h (7.63±1.20) *vs* (0.67±0.52),$P<0.01$]。各组血清淀粉酶水平(A组 *vs* C组),A组呈时相性变化,C组各时相点无明显差异[6 h (6 090±475) U/L *vs* (1 465±106) U/L,$P<0.01$;12 h (19 975±962) U/L *vs* (1 535±157) U/L,$P<0.01$;24 h (20 970±1 027) U/L *vs* (1 620±174) U/L,$P<0.01$;48 h (2 390±233) U/L *vs* (1 450±97) U/L,$P<0.01$;72 h (1 680±205) U/L *vs* (1 560±162) U/L,$P>0.05$]。结论 分3次腹腔内注射大剂量L-精氨酸可成功制备操作简单、病变典型、重复性好和非侵入性的大鼠急性坏死性胰腺炎模型。

【关键词】 大鼠;L-精氨酸;坏死性胰腺炎;模型;腹腔内注射
【中图法分类号】 R-332;R576;R977.4 【文献标志码】 A

Establishment of rat acute necrotizing pancreatitis model by intraperitoneal injection with excessive dose of L-arginine

Cheng Fei, Zhang Xianquan, Hu Qionghua, Tang Jing (Intensive Care Unit, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【Abstract】 Objective To establish a simple rat model of acute necrotizing pancreatitis (ANP) with typical pathological lesion and good stability. Methods One hundred rats were randomly divided into ANP group (group A) and control group (group C), 50 rats in each group. Rats in group C received normal saline. Rats in group A were intra-peritoneally injected with L-arginine (1.5 g/kg each time, 3 times, at 1 h interval) at the concentration of 80 g/L to establish a rat ANP model. Changes in pancreatic pathology and serum amylase level were observed 6, 12, 24, 48 and 72 h after last injection. Results The lobule and interstitial edema, mild and moderate inflammatory infiltration were observed respectively, 6 and 12 h after establishment of the model. The acinar architecture was partially destroyed with focal necrosis and severe inflammatory infiltration, mass coagulation necrosis and acinar architecture were markedly disrupted 24 and 72 h after establishment of the model. The histopathological score for pancreas was higher in group A and in group C at different time points after establishment of the model (5.26±1.30 *vs* 0.67±0.52 at 6 h, 6.83±1.2 *vs* 0.57±0.43 at 12 h, 24th 7.43±1.40 *vs* 0.47±0.63 at 24 h, 48th 8.27±1.10 *vs* 0.43±0.65 at 48 h, 7.63±1.20 *vs* 0.67±0.52 at 72 h, $P<0.01$). The serum amylase level was also higher in group A than in group C at different time points after establishment of the model (6 090±475 U/L *vs* 1 465±106 U/L at 6 h, 19 975±962 U/L *vs*1 535±157 U/L at 12 h, 20 970±1 027 U/L *vs* 1 620±174 U/L at 24 h, 48th 2 390±233 U/L *vs* 1 450±97 U/L at 48 h, 1 680±205 U/L *vs* 1 560±162 U/L at 72 h, $P>0.05$). Conclusion Intraperitoneal injection with excessive dose of L-arginine (three times at one-hour interval) can induce a simple and noninvasive rat ANP model with typical lesion and good stability.

【Key words】 rat;L-arginine;acute necrotizing pancreatitis;model;intra-peritoneally injected

Supported by the Project Chongqing Municipal Health Bureau (2006-B-34). Corresponding author Zhang Xianquan, Tel:86-23-63693309, E-mail:qzhng@yahoo.com

【基金项目】 重庆市卫生局课题(2006-B-34)
【通信作者】 张献全,电话:(023)63693309,E-mail:qzhng@yahoo.com

急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)是临床常见的危重症,疾病进展迅速,病死率高,发病机制复杂,目前的胰酶活化学说、继发系统性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、胰腺微循环障碍、肠道细菌移位等观点都不能全面的阐述 ANP 的病理生理改变[1,2],因此建立合适的动物模型对其深入研究非常必要。经典的 ANP 模型主要有牛磺胆酸钠逆行胰管注射法[3],但存在腹部手术引起腹腔感染和 SIRS 等风险。近年国内外都研究应用腹腔内大量注射 L-精氨酸制备 ANP 模型[4,5],目前的情况是病变与临床符合较好,但模型死亡率高,不利于系统全面观察。我们对大剂量 L-精氨酸腹腔内注射的方法进行改良,采用 8% L-精氨酸分 3 次腹腔内注射方法建立了大鼠 ANP 模型,其具有病理改变典型、操作简单、死亡率低、重复性好等特点,对深入研究重症胰腺炎的 SIRS 和腹腔感染的病理生理变化具有帮助。

1　材料与方法

1.1　试剂

左旋精氨酸,美国 Sigma 公司分析纯,通过上海生物工程技术有限公司购进;血清淀粉酶试剂,日本 Olympus 公司。

1.2　动物及分组

健康雄性 SD 大鼠(清洁级)100 只,2 ~ 3 个月龄,体质量 250 ~ 300 g(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),采用随机数字法分成 2 组,ANP 模型组(A 组,$n = 50$)和生理盐水对照组(C 组,$n = 50$),各组再按随机排列表法随机分成造模后 6、12、24、48 h 和 72 h 5 个时相点,每个时相点 10 只。

1.3　模型的制备

参考赖铭裕等[6]方法,改良大剂量左旋精氨酸腹腔内注射法制备大鼠 ANP 模型。实验前大鼠禁食 12 h,自由饮水,ANP 模型组大鼠分 3 次腹腔内注射 8% L-精氨酸溶液(3 × 1.5 g/kg),每次间隔 1 h,对照组注射等体积的无菌生理盐水。

1.4　观察指标

1.4.1　血清淀粉酶测定　　实验大鼠在造模后 6、12、24、48 h 和 72 h 5 个时相点分批处死,取腹主动脉血 3 ml,抗凝,3 000 r/min 离心 15 min,取血清,-80 ℃保存。人工碘比色法测定血清淀粉酶。

1.4.2　胰腺组织病理学检查　　解剖大鼠,观察胰腺大体变化,取胰头部胰腺组织,用 10% 的福尔马林液固定,常规制成石蜡切片,HE 染色,光镜下观察组织学改变,参考 Nakamura 等[7]标准进行组织病理学评分(表 1)。

1.5　统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 13.0 统计软件进行分析,2 组血清淀粉酶差别比较采用 t 检验,病理评分比较用秩和检验。

表 1　胰腺组织病理分级标准评分

指标	分级标准	评分
水肿	无	0
	小叶间局灶性水肿	1
	小叶间弥散性水肿	2
	小叶结构紊乱分离	3
炎症细胞浸润	无	0
	局限于导管内	1
	实质内(<50% 小叶)	2
	实质内(>50% 小叶)	3
腺泡坏死	无	0
	导管周围坏死(<5%)	1
	局灶性坏死(5% ~20%)	2
	弥漫性坏死(>20%)	3

2　结果

2.1　大鼠存活情况

A 组大鼠注射 L-精氨酸后 6、12、24、48、72 h 大鼠死亡数分别为 0、1、2、2、1,总死亡率为 12%。

2.2　血清淀粉酶的变化情况

模型组大鼠血清淀粉酶水平呈时相性变化,6 h 明显升高,24 h 达到高峰,48 h 明显下降,72 h 接近对照组水平,对照组大鼠血清淀粉酶水平各时相点无明显差异(表 2)。

表 2　急性胰腺炎模型组和对照组各时相点血清淀粉酶测定(U/L, $\bar{x} \pm s$)

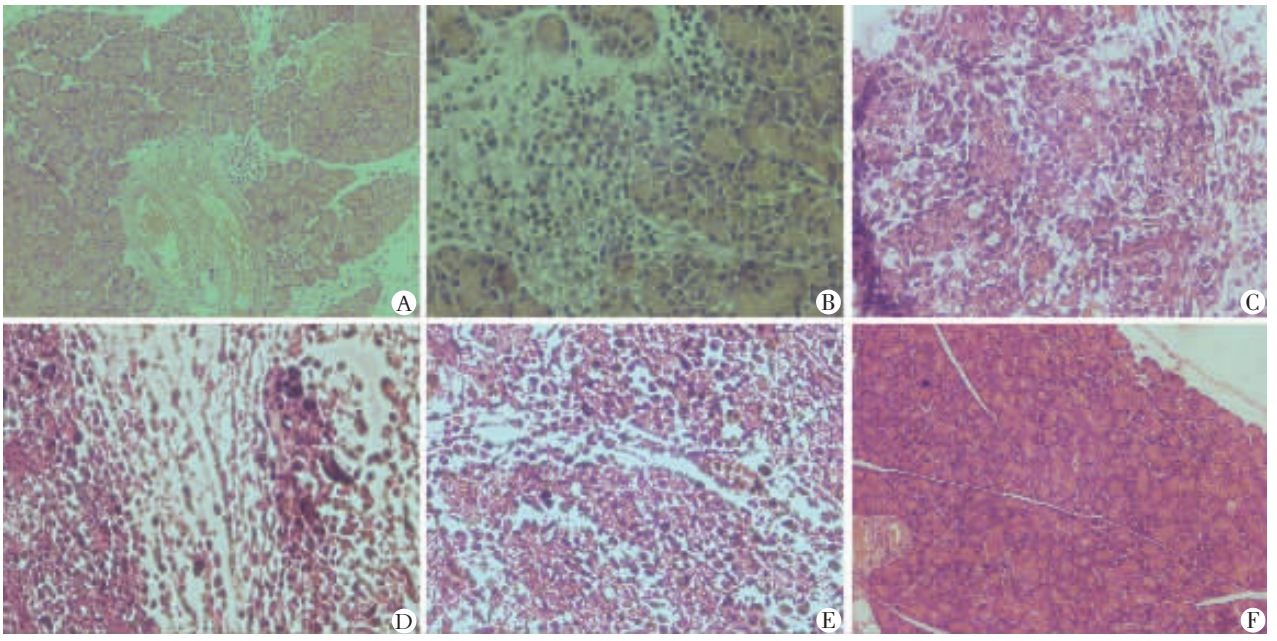
组别	n	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
模型组	44	6 090 ± 475[a]	19 975 ± 962[a]	20 970 ± 1 027[a]	2 390 ± 233[a]	1 680 ± 205
对照组	50	1 465 ± 106	1 535 ± 157	1 620 ± 174	1 450 ± 97	1 560 ± 162

a:$P < 0.01$,与对照组比较

2.3　胰腺组织病理改变

2.3.1　大体观　　各时相点处死的 ANP 模型组大鼠解剖后,可见腹腔内数量不等的淡黄色或红色血性腹水,伴有不同程度的鼓肠、节段性肠坏死,腹腔脏器黏连、脂肪皂化现象,并随着时相点的推移而加重,48 h 达高峰。至 72 h 后腹腔脏器粘连和肠胀气程度略有减轻,胰腺外观变成灰白色,部分有暗红色出血样改变。对照组大鼠未见明显异常。

2.3.2　镜下观察　　ANP 组大鼠造模 6 h 后胰腺小叶间隙增宽,轻度充血水肿,少量中性粒细胞、淋巴细胞浸润(图 1A)。病理评分增高与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$);12 h 后炎性细胞浸润加重,小叶间水肿充血明显(图 1B);24 h 后见大量炎性细胞浸润,腺小叶结构损坏和局灶性坏死(图 1C);48 h 见重度水肿,弥漫性腺泡细胞坏死,大量脂肪组织坏死,胰腺结构模糊(图 1D)。此时胰腺组织病理评分最高(表 3);72 h 后可观察到腺泡细胞坏死、核固缩,但炎症细胞浸润和水肿较 48 h 有所减轻(图 1E)。对照组标本(图 1F)腺泡结构完整、腺小叶清晰仅个别见轻度水肿及少量炎症细胞浸润,未见坏死。胰腺病理评分标准见表 1,根据胰腺小叶间水肿、炎症细胞浸润、腺泡坏死程度等方面综合评价,评分在注射后 6 h 明显升高,后逐渐加重,至 72 h 后有所下降,但与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$)。其呈现与病理性改变相一致的时相性变化(表 3)。



A:L-arginine 腹腔注射造模后 6 h(×100);B:造模后 12 h(×200);C:造模后 24 h(×200);D:造模后 48 h(×200);E:造模后 72 h(×200);F:生理盐水组(×100)

图1 光镜观察造模后不同时相点胰腺组织病理学改变 (HE)

表3 急性胰腺炎模型组和对照组各时相点胰腺组织病理评分($\bar{x} \pm s$)

组别	n	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
模型组	44	5.26±1.30[a]	6.83±1.20[a]	7.43±1.40[a]	8.27±1.10[a]	7.63±1.20[a]
对照组	50	0.67±0.52	0.57±0.43	0.47±0.63	0.43±0.65	0.67±0.52

a:$P<0.01$,与对照组比较

3 讨论

制备坏死性胰腺炎动物模型是研究急性重症胰腺炎的主要方法,坏死性胰腺炎的模型制备分为侵入和非侵入两类,前者主要有逆行胰管注射牛磺胆酸和结扎十二指肠等方法,从病理学上可以得到比较确定的胰腺炎模型,但实验中的麻醉和手术,影响重症胰腺炎严重并发症-SIRS 和腹腔局部感染的观察。1984 年 Mizunuma 等[8] 首次应用大剂量 L-精氨酸腹腔内注射建立大鼠急性胰腺炎模型,克服了上述缺点,但由于过高的死亡率和重复性差等问题仍未得到广泛应用。

本研究综合近年来胰腺炎的研究进展,通过大量的预实验以调整 L-精氨酸的总剂量、给药次数和药物浓度等,在确保大鼠坏死胰腺炎病理改变的同时,尽可能的降低病死率,结果发现 L-精氨酸诱导的 ANP 的剂量范围非常窄,当浓度超过 20% 或总量超过 10 g/kg 时,实验大鼠 90% 以上在 12 h 内死亡;而当浓度小于 6% 时,胰腺仅表现水肿型胰腺炎的改变。采用分 2 次注射给药后,当总量超过 5 g/kg 或 2 次中单次超过 2 g/kg,大鼠死亡率也超过 50%;而当总量小于 3.6 g/kg 时,胰腺呈单纯水肿性改变。最终我们确定采用 8% L-精氨酸分 3 次注射,每次 1.5 g/kg,间隔 1 h 的方法成功制备大鼠坏死性胰腺炎模型,其胰腺病理改变典型,与大剂量 L-精氨酸 1 次注射[9] 以及经典的牛黄胆酸相似[10],且大鼠死亡率较单次大剂量注射明显减少,对后续研究影响较小,增加实验可持续性。

大剂量左旋精氨酸腹腔注射制备大鼠 ANP 模型胰腺病变范围更均匀广泛,所致胰腺炎在形态、生化改变、时间进程上与临床非胆源性重症胰腺炎更接近[11],有利于研究重症胰腺炎的全身炎症反应综合征、腹腔局部感染和全身感染等主要病理生理改变。

大剂量左旋精氨酸腹腔注射制备大鼠 ANP 模型在实验上已得到确认,但其机制尚未完全清楚,目前认为大剂量 L-精氨酸腹腔注射后,可以通过转化生成 NO 途径引起难治性的血管扩张和胰腺低灌注;通过转录因子 NF-κB 影响 IL-1β、TNF-α 等炎症因子而影响炎症反应;通过增加热休克蛋白 HSP27、HSP70、胰腺炎相关蛋白和空泡膜蛋白表达以及降低内源性过氧化物歧化酶而引起胰腺坏死性改变。近年来发现大剂量注射左旋精氨酸可导致大鼠内毒素血症,其释放的前炎因子可以增强外源性胆囊收缩素受体表达和胰酶分泌变化。总之,大剂量 L-精氨酸注射大鼠腹腔后,L-精氨酸可能通过促进炎症反应、破坏胰腺结构等多种途径诱导急性重症胰腺炎的发生[12-15]。

本研究发现大剂量 L-精氨酸分 3 次腹腔内注射可以较好的制备 ANP 大鼠模型,其具有方法简便、病变典型、重复性好和创伤小等优点,但其结果受注射总剂量、浓度、次数、间隔时间等多因素影响明显,同时

L-精氨酸至 ANP 的作用机制尚不十分清楚,随着研究的深入将得到进一步阐明。

参考文献:

[1] Kingsnorth A, O'Reilly D. Acute pancreatitis[J]. BMJ, 2006, 332(7549):1072-1076.
[2] 兑丹华, 高占峰, 赵鹏, 等. 清胰Ⅱ号和粉防己碱对实验性重症急性胰腺炎的治疗作用[J]. 第三军医大学报, 2005, 27(24):2418-2421.
[3] Uoda T, Takeyama Y, Kuroda Y. Animal experimental models for acute pancreatitis[J]. Nippon Rinsho, 2004, 62(11):1984-1988.
[4] Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Sari R, *et al*. L-arginine-induced experimental pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(14):2003-2009.
[5] 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-G1018.
[6] 赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 等. 腹腔注射左旋精氨酸诱导急性坏死性胰腺炎大鼠模型[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(22):2233-2236.
[7] Nakamura H, Tashiro M, Asaumi H, *et al*. Increased expression of Smad6 deteriorates murine acute experimental pancreatitis in two models[J]. Gut, 2008, 57(6):788-798.
[8] Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas[J]. J Nutr, 1984, 114(3):467-471.
[9] Bohus E, Coen M, Keun H C, *et al*. Temporal metabonomic modeling of L-arginine-induced exocrine pancreatitis[J]. J Proteome Res, 2008, 7(10):4435-4445.
[10] 钟敦璟, 郭红, 郝嘉, 等. STAT3 对大鼠重症急性胰腺炎血清体外作用 AT-Ⅱ SP-C 的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(19):1807-1809.
[11] Rickes S, Uhle C. Advances in the diagnosis of acute pancreatitis[J]. Postgrad Med J, 2009, 85(1002):208-212.
[12] Czako L, Takacs T, Varga I S, *et al*. The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis: inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin[J]. J Physiol Paris, 2000, 94(1):43-50.
[13] Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takacs T, *et al*. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis[J]. Gut, 2008, 57(2):259-267.
[14] Kubisch C H, Sans M D, Arumugam T, *et al*. Early activation of endoplasmic reticulum stress is associated with arginine-induced acute pancreatitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291(2):G238-G245.
[15] Lechin F, van-der-Dijs B. Arginine-induced pancreatitis: involvement of the autonomic nervous system?[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(6):G1450-G1452.

(收稿 2010-02-25 修回 2010-05-05)
(编辑 王 红)

(上接 1833 页)

减慢输注速度后自行缓解,所有患者在用药期间生命体征平稳。

2.4 心理护理

该病起病急骤,头痛剧烈,病程长,症状复杂,有较重的经济负担,患者的紧张、焦虑情绪较为突出。部分患者由于剧烈反复的头痛症状,抑郁、焦虑尤为明显,严重者无法入睡,个别患者有轻生念头。另外,尼莫通半衰期短,用药比较频繁,并会用药持续整个疗程,患者耐受性较差,用药期间需要耐心解释,消除顾虑。我们发现,深入病房与患者及家属讲解 SAH 及 DCI 的相关知识并介绍治疗成功的病例对消除患者疑虑增强患者信心有很好的效果。护理过程中我们注意对患者给予鼓励,应重视患者家属的作用,对他们积极解释和指导,共同帮助患者克服困难,以继续坚持治疗。经过精心的心理疏导,绝大多数患者能够正视病情、积极配合治疗和护理,情绪明显好转。

3 讨论

蛛网膜下腔出血后发生迟发性脑缺血是比较严重的并发症,仅次于再出血,处置不当可能引起死亡。目前治疗脑血管痉挛尚无特效方法,钙通道阻滞剂尼莫通是迄今唯一得到正式的能治疗 SAH 并能降低 DCI 发生率和不良转归风险的有效药物。但使用尼莫通后仍有 18% 的迟发性脑缺血发生[5]。因为特效治疗方法的缺乏,所以对症治疗和护理的重要性就更加凸现。

该病例患者起病急骤,患者有剧烈的头痛,护理的重点是:①注意减轻疼痛症状,患者头痛剧烈,并诉"爆裂状"疼痛,剧烈的疼痛对患者的睡眠影响很大,所以护理中应该积极缓解疼痛,促进患者放松。②注意监控心功能、血压、心律、肝肾功能,因为尼莫通对外周血管也有一定的扩血管作用,有可能会因为对外周血管的扩血管作用导致不良反应。③严格控制输液速度,速度过快会有低血压、血管刺激征等不良反应,故应控制速度并严密观察。④注意监测颅内高压的敏感征兆,例如意识状态和瞳孔。⑤重视溶剂酒精的刺激性,应深静脉注射、混合葡萄糖和生理盐水并控制流速。

参考文献:

[1] 杨莘. 脑卒中患者的护理[M]//杨莘. 神经疾病护理学. 北京:人民卫生出版社, 2005:106.
[2] Vergouwen M D, Vermeulen M, Coert B A, *et al*. Microthrombosis after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an additional explanation for delayed cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(11):1761-1770.
[3] Roos Y B, Levi M, Carroll T A, *et al*. Nimodipine increases fibrinolytic activity in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2001, 32(8):1860-1862.
[4] 杨莘. 脑卒中患者的护理[M]//杨莘. 神经疾病护理学. 北京:人民卫生出版社, 2005:119.
[5] 闫丽清, 李英. 蛛网膜下腔出血后迟发性脑缺血的临床观察[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2008, 11(2):105-106.

(收稿 2010-04-15 修回 2010-06-03)
(编辑 邓强庭)