技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)12-1851-03

酒精联合内毒素诱导慢性胰腺炎模型的建立

彭晓华,周旭春
(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:用酒精联合内毒素建立一个新型的慢性胰腺炎(Chronic pancreatitis,CP)的大鼠模型,为研究 CP 的发病机制提供合适的动物模型。方法:18 只 1 月龄雄性 SD 大鼠随机分为对照组、酒精组和模型组,每组各 6 只。饲以 25%酒精,12 周后反复腹腔注射脂多糖(Lipopolysaccharides,LPS),建立 CP 的动物模型。在光镜下观察胰腺组织显微结构变化,用 Masson 染色法观察胰腺组织胶原的改变,并测定胰腺组织匀浆中的淀粉酶和脂肪酶及血糖浓度。结果:模型组胰腺小叶内可见炎症细胞浸润,胶原纤维较对照组和酒精组明显增多,胰腺组织内淀粉酶和脂肪酶降低($P<0.05$)。结论:在长期摄入乙醇的基础上反复腹腔注射 LPS 可造成 CP 发生,本模型可以用于 CP 的研究。

【关键词】酒精;内毒素;慢性胰腺炎;模型
【中国图书分类法分类号】R657.51 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-25

Establishment of models of chronic pancreatitis with ethanol and endotoxin

PENG Xiao-hua, et al
(*Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the pathogenesis of chronic pancreatitis (CP) by establishing a new pancreatitis model in rats suitable for investigation of the processes and mechanisms leading to pancreatic fibrosis. The model was established with ethanol and lipopolysaccharides (LPS, endotoxin). *Methods*: Eighteen one-month old male SD rats were randomly divided into control group, alcohol group, and model group. After fed with 25% alcohol for twelve weeks, the rats in model group were injected with lipopolysaccharides (LPS). Pancreatic morphology was conducted with haematoxylin-eosin stain, collagen deposition was determined by Masson stain, and the amylase and lipase in pancreatic tissue homogenate were evaluated by colorimetry. *Results*: Compared with control group, the acinar cells with vacuolization, inflammatory cell infiltration and collagen increasing were observed in the model group. Lipase and amylase were significantly decreased in the model group ($P<0.05$). *Conclusion*: Combined with ethanol, LPS can induce chronic pancreatitis. The rat model may be useful for studying the mechanism of chronic pancreatitis.

【Key words】Ethanol; Endotoxin; Chronic pancreatitis; Model

慢性胰腺炎(Chronic pancreatitis,CP)是由于胰腺慢性持续性进行性炎症引起的胰腺组织和功能的不可逆性损伤,主要表现为顽固性腹痛、腹泻、胰腺内分泌和外分泌功能减退等。近年来 CP 的发病率逐年上升,发病机理不清,尚无特异性的诊断方法和有效的治疗手段。建立符合临床实际的 CP 动物模型对本病的研究有重要意义。本文参考文献[1],模拟长期饮酒,采用对长期酒精饲养的低龄大鼠反复腹腔注射脂多糖(Lipopolysaccharides,LPS)建立大鼠 CP 模型,观察大鼠胰腺组织结构和功能的变化,评价造模的效果。

作者介绍:彭晓华(1984-),女,硕士,
研究方向:慢性胰腺炎发生机制。
通讯作者:周旭春,女,副教授,E-mail:chqxchzh@163.com。
基金项目:重庆医科大学校办课题(编号:QD200508);重庆市卫生局科研项目(编号:062096)。

1 材料和方法

1.1 材料

18 只 1 月龄雄性 SD 大鼠,体重 95 ~ 105 g,由重庆医科大学实验动物中心提供(实验动物使用合格证:SCXK(渝)2007-0001);LPS 为 Sigma 公司产品。血糖仪为强生公司产品。淀粉酶检测试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司,脂肪酶检测试剂盒购自德国 Roche Diagnostics GmbH 公司。

1.2 造模方法

SD 大鼠适应饲养 1 周,常规饲料及饮水,环境温度、湿度适宜,随机分为 3 组即对照组、乙醇组和乙醇加 LPS 组(即模型组),每组大鼠每日供给的饲料相同,饲养 17 周。乙醇组和模型组以 25%乙醇代替饮水,模型组分别在第 13、14、15、16 周腹腔内注射 2 mg/kg LPS,每周 1 次共 4 次,于最后 1 次注射 1 周后处死动物,取血及胰腺组织。

1.3　胰腺病理学检查

将部分胰腺组织固定于 10%多聚甲醛溶液中，常规石蜡包埋，切片后 HE 染色，光镜下观察。由 2 位资深病理学专家采用双盲法评定。炎症分级参考文献[2]。

1.4　胰腺组织胶原纤维检测

应用 Masson 胶原纤维染色法观察胰腺组织纤维化。胰腺组织石蜡切片常规脱蜡至水，苏木精染色 5 min 后，用95%乙醇冲洗 2 次，苦味酸乙醇分色 5 min。双蒸水冲洗后将切片浸入丽春红酸性品红中染色 5 min，再用蒸馏水冲洗后浸入1%的磷钼酸染色 5 min，直接浸入醋酸苯胺蓝液中 5 min，后将切片浸入 1%醋酸中处理 1 min。乙醇脱水，二甲苯透明后中性树胶封片。

1.5　胰腺外分泌功能检测

取部分胰腺组织制成组织匀浆，3 000 g 离心后取上清液，检测淀粉酶和脂肪酶含量，以 U/g 组织为单位。

1.6　胰腺内分泌功能检测

大鼠麻醉后经腹主动脉抽血，测血糖浓度。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 17.0 统计软件分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　胰腺组织病理形态学变化

对照组在整个观察期间未见明显病理改变。与对照组相比，乙醇组仅见胰腺腺泡细胞水肿，腺泡细胞中有空泡样改变。模型组空泡样改变加重，胰腺小叶间隙增大，腺泡周围纤维增多，胰腺小叶内及小叶间毛细血管充血、出血，并有单核细胞、淋巴细胞浸润，可见少量腺泡细胞坏死，但未见胰腺导管内蛋白栓子形成。3 组胰岛结构均无明显变化（图 1）。

2.2　胰腺组织胶原纤维的变化

与对照组相比，酒精组仅有少量胶原纤维分布在胰腺导管和血管周围，小叶内没有胶原纤维浸润。模型组胶原纤维明显增加，主要分布在胰腺导管周围，使管壁增厚。小叶间和小叶内也可见纤维组织浸润。可见腺泡细胞萎缩（图 2）。

2.3　胰腺分泌功能检测

与对照组比较，酒精组淀粉酶、脂肪酶含量略有下降，但没有统计学意义。模型组胰腺组织淀粉酶、脂肪酶含量减少，与酒精组和对照组比较有统计学意义，$P<0.05$。各组间血糖比较没有统计学差异。结果见表 1。

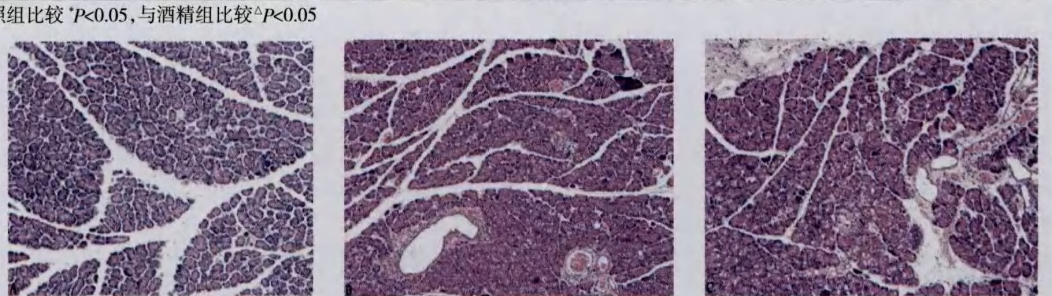
3　讨　论

CP 的发生机制目前仍不清楚，其主要原因就是缺乏一个合适的动物模型。目前 CP 的动物模型主要可以分为三类，一是通过手术结扎胰管或逆行胰管注射化学制剂，导致胰管阻塞，造成 CP[3,4]；二是通过反复腹腔或静脉注射蛙皮素（Caerulein）等引起反复急性胰腺炎发生，导致胰腺腺泡细胞

表 1　胰腺组织匀浆淀粉酶、脂肪酶含量和血糖浓度（$\bar{x} \pm s$）

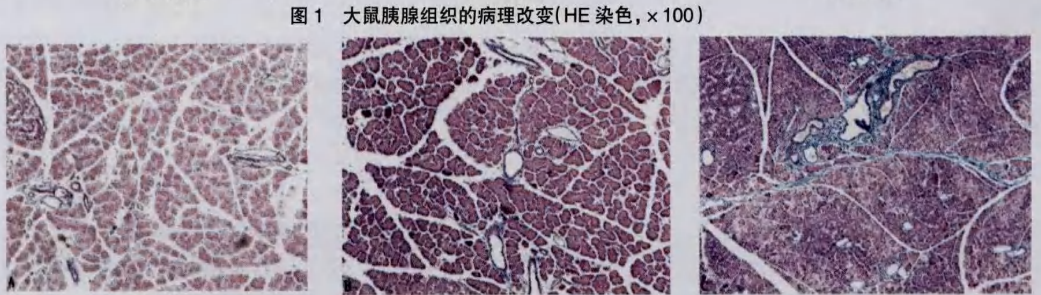
组别	例数	淀粉酶含量（U/g）	脂肪酶含量（U/g）	血糖（mmol/L）
对照组	6	12 357.33 ± 1 558.20	30 086.67 ± 4 871.15	7.03 ± 0.12
酒精组	6	8 661.33 ± 535.54	24 149.33 ± 2 753.31	5.63 ± 0.59
模型组	6	5 428.00 ± 547.33*△	9 122.67 ± 1 250.16*△	6.67 ± 0.83

注：与对照组比较 *$P<0.05$，与酒精组比较 △$P<0.05$



A. 对照组　　B. 酒精组　　C. 模型组

图 1　大鼠胰腺组织的病理改变（HE 染色，×100）



A. 对照组　　B. 酒精组　　C. 模型组

图 2　大鼠胰腺组织胶原纤维的改变（Masson 染色，×100）

坏死，纤维结缔组织增生，诱导 CP 动物模型[5,6]；三是通过转基因或者病毒感染等方法造成大鼠的免疫缺陷，诱发 CP，胰腺纤维化[7,8]。各个模型通过不同的机制达到胰腺纤维化的目的，各有其优缺点，手术操作动物的死亡率较高，而蛙皮素、病毒感染和转基因所致的动物模型，实验成本较高。理想的动物模型应该能够较准确的复制人类疾病的病理过程，又具备可重复性高、成本低的优势。

由于 CP 患者中 90%都有长期饮酒史，因而我们推测在 CP 中酒精是一个必要因素。但临床研究发现只部分酗酒者才会发生 CP，我们既往的研究也发现给大鼠酒精饲养长达半年，仅见到胰腺腺泡细胞呈退行性改变，未看到典型的 CP 的病理改变[9]。以上研究提示我们酒精只是 CP 的重要诱因。在酒精相关性疾病的研究中，人们发现长期饮酒会损伤肠黏膜屏障，造成血中内毒素水平增加[10]。目前的研究认为内毒素可以通过激活单核细胞系统促使细胞因子释放，造成胰腺损伤[11]。Fortunato 给大鼠酒精饲料喂养 14 周后，给予内毒素静脉内注射，发现内毒素和酒精有协同作用，可造成胰腺腺泡细胞凋亡、坏死等损伤性改变[2]。有学者用含酒精的 Lieber-DeCarli 饲料喂养大鼠 10 周，联合内毒素 3 mg/kg 腹腔内注射 3 次，成功诱导大鼠慢性胰腺炎发生[1]。由于 Lieber-DeCarli 饲料价格昂贵，国内暂无销售。本研究中我们使用 25%的酒精代替饮水，模拟长期饮酒患者。我们发现单纯使用酒精 4 月后，仅观察到胰腺腺泡细胞呈空泡样改变，与对照组相比，胰腺组织的淀粉酶和脂肪酶虽有降低，但却无统计学差异，与我们既往的研究略有差异。原因可能是与本研究中我们观察的时间相对较短，仅 4 个月，而我们既往的研究为半年有关。LPS 是革兰阴性细菌的细胞壁成分，是内毒素的主要部分，本实验中我们使用酒精饲养和 LPS 腹腔内注射，观察到胰腺腺泡细胞空泡化，腺泡细胞萎缩，甚至可见胰腺腺泡细胞坏死，腺泡细胞周围出血，萎缩的腺泡细胞、胰管周围、小叶间和小叶内纤维结缔组织增多，并有单核细胞、淋巴细胞浸润。同时我们发现胰腺组织的淀粉酶和脂肪酶较对照组明显降低。这些胰腺的形态和功能均提示胰腺发生了慢性损伤性改变，CP 造模成功。本模型的机制可能是乙醇及其代谢产物既可以直接损伤胰腺腺泡细胞，还可通过氧化应激和降低胰腺血流等作用间接损伤胰腺组织[12,13]。同时低剂量的LPS 反复腹腔注射造成了低浓度的内毒素血症，内毒素和酒精联合激活了胰腺星状细胞，造成了胰腺纤维化，导致慢 CP 发生[1]。

总之，本研究中我们使用酒精和内毒素联合成功建立了 CP 动物模型。本模型具有以下特点：①动物死亡率低，成模效率高。实验过程中没有大鼠死亡。②实验成本低，本研究使用的 LPS 价格低廉且用量小，实验动物选择大鼠，实验费用少。③本实验中我们选用酒精和内毒素联合，模拟了长期酗酒者发生 CP、胰腺纤维化的病理过程，较符合临床实际，可用于对酒精性 CP 发病机制的研究。

参 考 文 献

[1] Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, et al. Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model[J]. Gastroenterology, 2007, 133(4): 1293-1303.

[2] Fortunato F, Deng X, Gates L K, et al. Pancreatic response to endotoxin after chronic alcohol exposure: switch from apoptosis to necrosis[J]? Am J Physiol, 2006, 290(2): G232-G241.

[3] Kishi S, Takeyama Y, Ueda T, et al. Pancreatic duct obstruction itself induces expression of alpha smooth muscle actin in pancreatic stellate cells[J]. J Surg Res, 2003, 114(1): 6-14.

[4] Yamaguchi T, Kihara Y, Taguchi M, et al. Persistent destruction of the basement membrane of the pancreatic duct contributes to progressive acinar atrophy in rats with experimentally induced pancreatitis[J]. Pancreas, 2005, 31(4): 365-372.

[5] Perides G, Tao X, West N, et al. A mouse model of ethanol dependent pancreatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54(10): 1461-1467.

[6] Gukovsky I, Lugea A, Shahsahebi M, et al. A rat model reproducing key pathological responses of alcoholic chronic pancreatitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(1): G68-G79.

[7] Archer H, Jura N, Keller J. A mouse model of hereditary pancreatitis generated by transgenic expression of R122H Trypsinogen [J]. Gastroenterology, 2006, 131(6): 1844-1855.

[8] Jerrells T R, Vidlak D, Strachota J M. Alchoholic pancreatitis: mechanisms of viral infections as cofactors in the development of acute and chronic pancreatitis and fibrosis[J]. Leukoc. Biol, 2007, 81(2): 430-439.

[9] 周旭春，唐承薇，刘纯伦. 长期乙醇摄入导致胰腺腺泡细胞退行性改变[J]. 中华消化杂志，2005，25(5)：284-286.

[10] Muthu E, Keshavarzian A, Engen P, et al. Intestinal dysbiosis: A possible mechanism of alcohol-Induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2009, 33(10): 1836-1846.

[11] Szabo G, Mandrekar O S. Effect of ethanol on inflammatory responses[J]. Pancreatology, 2007, 7(23): 115-123.

[12] Schilling M K, Redaelli C, Reber P U, et al. Microcirculation in chronic alcoholic pancreatitis: a laser Doppler flow study[J]. Pancreas, 1999, 19(1): 21-25.

[13] Vonlaufen A, Wilson J S, Apte M V. Molecular mechanisms of pancreatitis: Current opinion[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(9): 1339-1348.

（责任编辑：关蕴良）