

腹腔注射左旋精氨酸诱导急性坏死性胰腺炎大鼠模型

赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成

赖铭裕, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科 广西壮
族自治区南宁市 530021
梁志海, 唐国都, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西
壮族自治区南宁市 530021
孙学成, 温州医学院第一附属医院消化内科 浙江省温州市
325035
广西自然科学基金资助, No. 0447054
通讯作者: 唐国都, 530021, 广西南宁市双拥路6号, 广西医科大
学第一附属医院消化内科. tguodu02@yahoo.com.cn
电话: 0771-5356501
收稿日期: 2006-04-17 接受日期: 2006-05-11

L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis by intraperitoneal injection in rats

Ming-Yu Lai, Zhi-Hai Liang, Guo-Du Tang, Xue-Cheng
Sun

Ming-Yu Lai, Department of Gerontism Gastroenterology,
the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University,
Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region,
China
Zhi-Hai Liang, Guo-Du Tang, Department of Gastroen-
terology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical
University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous
Region, China
Xue-Cheng Sun, Department of Gastroenterology, the First
Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou
325035, Zhejiang Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi
Zhuang Autonomous Region, China, No. No. 0447054
Correspondence to: Guo-Du Tang, Department of Gastro-
enterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical
University, Nanning 530021, Guangxi Province,
China. tguodu02@yahoo.com.cn
Received: 2006-04-17 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To evaluate the method and mechanism of
L-arginine induced acute necrotizing pancreatitis
in rats.

METHODS: A total of 60 rats were randomly
divided into control group (C, $n = 24$), acute
pancreatitis group (A, $n = 36$). The rat model of
acute necrotizing pancreatitis was induced by
intraperitoneal injection of *L*-arginine (1.0 mg/g,
all 3 times) at the concentration of 60 g/L. All
the rats were killed at 4th, 12th, 24th and 36th h
after modeling. The histopathological scores for
pancreas and the level of serum amylase were

investigated.

RESULTS: Histopathological results revealed
that the acinar architecture was destroyed with
necrosis, interstitial edema and inflammatory
infiltration at 24th h after *L*-arginine injection.
Pancreatic necrosis mainly centralized in the
edge area of glandular lobule. In comparison
with those in group C, the histopathological
scores for the pancreas (4 h: 4.45 ± 1.33 vs 0.50 ± 0.55 , $P < 0.01$; 12 h: 5.33 ± 1.66 vs 0.67 ± 0.82 , $P < 0.01$; 24 h: 7.89 ± 1.67 vs 0.67 ± 0.82 , $P < 0.01$; 36 h: 8.33 ± 1.12 vs 0.67 ± 0.82 , $P < 0.01$) and the serum level of amylase (4 h: 8296.16 ± 1028.21 nkat/L vs 6315.10 ± 816.83 nkat/L, $P < 0.01$; 12 h: 11255.92 ± 2565.18 nkat/L vs 5867.84 ± 632.29 nkat/L, $P < 0.01$; 24 h: 54424.22 ± 27125.09 nkat/L vs 6078.05 ± 1070.88 nkat/L, $P < 0.01$; 36 h: 28494.53 ± 12278.62 nkat/L vs 6286.26 ± 1074.38 nkat/L, $P < 0.01$) were significantly increased in group A at different time points.

CONCLUSION: The rat model of acute necrotiz-
ing pancreatitis can be induced by intraperitoneal
injection of *L*-arginine (1.0 mg/g, three times) at
the concentration of 60 g/L at an hourly interval.

Key Words: Acute necrotizing pancreatitis; *L*-ar-
ginine; Rat model

Lai MY, Liang ZH, Tang GD, Sun XC. *L*-arginine-
induced acute necrotizing pancreatitis by intraperitoneal
injection in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*
2006;14(22):2233-2236

目的:通过大剂量左旋精氨酸(*L*-arginine)
ip诱导大鼠急性胰腺炎(acute necrotizing
pancreatitis, ANP)模型, 探讨此模型制备的方
法和机制。

方法:将60只SD大鼠随机分为正常对照组(C
组, $n = 24$), ANP模型组(A组, $n = 36$)。C组接
受生理盐水对照; A组用60 g/L左旋精氨酸分3
次ip建立ANP模型。分别观察两组大体病理变
化、光镜下病理评分、血清淀粉酶水平。

■背景资料

急性坏死性胰腺
炎(ANP)是病死
率较高的疾病, 其
发病机制未完全
阐明, 多年来国内
外学者致力于制
备良好的ANP动
物模型用于ANP
的基础研究, 目前
所用的多种ANP
动物模型制备方
法均有不足之处,
本文试用腹腔注
射大剂量左旋精
氨酸(*L*-arginine)
腹腔注射法制备
ANP大鼠模型, 探
讨这种新的ANP
实验模型形成机
制, 希望为ANP的
实验研究提供更
多选择。

■研发前沿

迄今尚未有一种
ANP模型能与
人类ANP发病过程
完全一致, 可以全
面解释ANP的发
病机制, 每一种模
型均只能在一定
程度上反映ANP
的某一病理生理
学方面的改变情
况。此外, 从动物
模型得到的实验
数据和结果并不
完全适用于人类。
能模拟人类ANP
发病机制和病理
生理学改变的
ANP动物模型必
将对ANP的发病
机制基础研究及
临床治疗起到巨
大的推动作用。

■创新盘点

腹腔注射大剂量L-arginine制备ANP大鼠模型,此模型制作方法简单,价廉,不需特殊材料及设备,重复性好,损伤小,病变程度在不同的胰腺部位比较均匀一致,克服了其他模型需行剖腹术等缺点,大大减少了外源性细菌污染机会,且与人类ANP的病程及组织学改变相似。

结果: L-arginine ip后24 h可观察到集中于小叶边缘区的大片胰腺组织坏死、腺小叶结构消失, A组的病理评分(4 h: 4.45 ± 1.33 vs 0.50 ± 0.55 , $P < 0.01$; 12 h: 5.33 ± 1.66 vs 0.67 ± 0.82 , $P < 0.01$; 24 h: 7.89 ± 1.67 vs 0.67 ± 0.82 , $P < 0.01$; 36 h: 8.33 ± 1.12 vs 0.67 ± 0.82 , $P < 0.01$)、血清淀粉酶(4 h: 8296.16 ± 1028.21 nkat/L vs 6315.10 ± 816.83 nkat/L, $P < 0.01$; 12 h: $11\ 255.92 \pm 2565.18$ nkat/L vs 5867.84 ± 632.29 nkat/L, $P < 0.01$; 24 h: $54\ 424.22 \pm 27\ 125.09$ nkat/L vs 6078.05 ± 1070.88 nkat/L, $P < 0.01$; 36 h: $28\ 494.53 \pm 12\ 278.62$ nkat/L vs 6286.26 ± 1074.38 nkat/L, $P < 0.01$)各时点都比C组明显升高。

结论: 采用分3次ip 60 g/L左旋精氨酸方法可成功诱导ANP模型。

关键词: 急性坏死性胰腺炎; 左旋精氨酸; 大鼠模型

赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成. 腹腔注射左旋精氨酸诱导急性坏死性胰腺炎大鼠模型. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2233-2236

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2233.asp>

0 引言

急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)是病死率较高的疾病,其发病机制未完全清楚,传统的胰酶活化学说不能满意解释ANP的病程发展和转归,近年来先后提出ANP后继发系统性炎症反应综合征(SIRS)、胰腺微循环障碍、肠道细菌移位等理论对ANP的病理生理机制有重要意义. 为阐明ANP的发病机制,大量的研究采用动物实验进行,诱导满意的ANP动物模型是关键的一步,传统的胰胆管逆行注射、十二指肠结扎等实验方法存在一定的缺点. 我们以大剂量左旋(L-arginine)ip法制备ANP大鼠模型,探讨这种新的ANP实验模型形成机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠(清洁级)60只, 2-3月龄, 体重250-350 g(由广西医科大学实验动物中心提供), 随机分成正常对照组(C组, $n = 24$)、急性胰腺炎组(A组, $n = 36$)。左旋精氨酸, 美国Sigma公司分析纯, 通过深圳晶美生物工程有限公司购进; 血清淀粉酶试剂, 英国Randox公司。

1.2 方法 ANP动物模型的制备: 参照尚宏清 *et al*^[1]方法经改良^[2]大剂量左旋精氨酸ip法制备大鼠AP模型. 所有大鼠实验前禁食12 h, 自由饮水; A

表 1 病理分级标准评分

指标	分级标准	评分
水肿	无	0
	小叶间灶性水肿	1
	小叶间弥散性水肿	2
	腺体紊乱分离	3
炎症细胞浸润	无	0
	局限导管内	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
	灶性坏死 (5%~20%)	2
	弥散性实质坏死 (>20%)	3

表 2 两组大鼠病理评分 (mean \pm SD)

分组	n	4 h	12 h	24 h	36 h
C	6	0.50 ± 0.55	0.67 ± 0.82	0.67 ± 0.82	0.67 ± 0.82
A	9	4.45 ± 1.33^b	5.33 ± 1.66^b	7.89 ± 1.67^b	8.33 ± 1.12^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

组大鼠分3次给予ip左旋精氨酸(3×1.0 g/kg体重), 间隔1 h, 诱导ANP模型; C组大鼠生理盐水ip对照, 用量计算同左旋精氨酸. 在注射左旋精氨酸诱导ANP模型后4, 12, 24, 36 h共4个时分批处死, 从腹主动脉取血, 离心后留血清-80℃下保存待测; 同时提取胰腺组织. 提取胰头部位组织用40 g/L福尔马林液固定, 石蜡包埋、切片及HE染色. 由病理科医生按盲法对大鼠胰腺组织切片在光镜下观察并参考Kusske *et al*^[3]标准进行组织病理学评分. 对大鼠胰腺组织在光镜下的表现按水肿、炎细胞浸润、坏死3方面的轻重程度评分(表1). 血清淀粉酶测定: 用底物酶学法在大型生化仪(Hitachi 7100)上检测血清淀粉酶水平。

统计学处理 应用SPSS 10.0分析, 对两组间病理评分应用秩和检验, 血清淀粉酶数据差别比较采用 t 检验. 实验数据均以mean \pm SD表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺组织病理改变 各时点处死的A组大鼠解剖后在腹腔内可见数量不等的淡黄色或红色血性腹水, 而且同时可观察到不同程度的鼓肠、腹腔脏器黏连、脂肪皂化现象, 胰腺外观变成灰白色, 部分有暗红色出血样改变. 观察时间越长, 以上表现越重. C组大鼠大体观无变化. A组胰腺标本在镜下可见胰腺腺泡水肿、组织坏死, 在胰腺实质、间质内有中性粒细胞、淋巴细胞浸润以

表 3 大鼠血清淀粉酶活性对比 (mean \pm SD, nkat/L)

分组	n	4 h	12 h	24 h	36 h
C	6	6315.10 \pm 816.83	5867.84 \pm 632.29	6078.05 \pm 1070.88	6286.26 \pm 1074.38
A	9	8296.16 \pm 1028.21 ^b	11 255.92 \pm 2565.18 ^b	54 424.22 \pm 27 125.09 ^b	28 494.53 \pm 12278.62 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

及出血病灶形成. 随时间延长病变加重, 24 h以后可见大片胰腺组织凝固性坏死、腺小叶结构消失、大量炎症细胞浸润. C组标本腺泡结构完整、腺小叶清晰, 多数无病理改变, 个别只见轻度水肿及少量炎症细胞浸润, 无细胞坏死, 多数评分为0分, 个别在1-2分间. A组大鼠胰腺各时点病理评分较C组明显增高($P < 0.01$), 时间越长、评分越高(表2).

2.2 血清淀粉酶水平 C组血清淀粉酶水平在各时点变化不明显, A组大鼠血清淀粉酶水平在各时点都比C组明显增高($P < 0.01$), 在第24 h达到高峰, 随后有所下降(表3).

3 讨论

实验性动物ANP模型可分为侵入性和非侵入性两类. 侵入性模型主要有: 逆行性胰管注射牛磺胆酸钠, 手术结扎胰、胆管或胰胆管共同通道, 十二指肠闭袢法而致ANP模型等. 这些方法都需要对动物实施麻醉、剖腹手术等复杂的创伤性操作, 术中易损伤腹腔脏器, 且需要实验人员掌握一定的手术技巧和设备. 所以, 侵入性模型操作较复杂, 费用高. 近年来, 人们越来越重视非侵入性ANP模型的制备, 目前常用的有: ip蛙皮素和食物诱导(CDE)两种. 这两种模型操作简单, 但前者胰腺损害较轻, 多用于研究急性水肿型胰腺炎(AEP); 后者病情所产生的损害程度取决于实验鼠的性别、年龄和质量, 使用受到限制^[4]. 由于左旋精氨酸诱导大鼠ANP所使用方法、剂量和浓度在国内外各家报道不一^[1-2,5-6], 本实验组须通过预实验摸索合适的具体诱导方法, 我们在使用80 g/L及以上的左旋精氨酸浓度注射时大鼠死亡率高, 不利于观察12 h以后的变化; 当降低注射浓度到6%时胰腺损伤以水肿为主, 坏死少见, 必须在降低左旋精氨酸浓度(60 g/L)同时增加ip次数(3次)才能诱导出满意的ANP模型, 其方法简便、成本低、可重复性好、动物损伤小, 病变程度在不同的胰腺部位比较一致, 克服了侵入性模型需行剖腹术的缺点, 减少了外源性细菌污染机会, 与人类ANP的

病程及组织学改变相似, 他是目前研究ANP发病机制及防治措施较为理想、值得推广的动物模型^[7]. 在本实验中, A组的血清淀粉酶增高, 高峰出现在24 h, 随观察时间的延长, A组大鼠的大体病理和组织病理学改变加重, 胰腺组织坏死明显、病理评分加重, 胰腺损伤随时间延长而加重, 本实验方法形成稳定的ANP模型是肯定的. 值得注意的是, 本模型胰腺大片的凝固性坏死多集中于腺小叶周边, 与赵秋玲 *et al*^[8]观察到的坏死明显集中于小叶边缘区一致, 与传统的逆行性胰管注射牛磺胆酸钠有所区别.

大剂量左旋精氨酸ip制备大鼠ANP模型的作用机制未完全清楚, 最早应用的Tani *et al*^[5]认为, 实验原理在于他能减少多胺的合成, 抑制蛋白及蛋白质合成, 损伤蛋白质合成最为活跃的胰腺细胞, 从而导致胰腺炎发生. 随着研究的深入, 左旋精氨酸诱导ANP模型的形成机制有以下观点: (1)左旋精氨酸作为一氧化氮(NO)的前体, 当大剂量给药时产生过量的NO, 导致了难治性的血管扩张和胰腺低灌注^[9], 导致血流淤滞、血压下降、局部炎症扩散, 组织利用氧减少, 而引起胰腺组织病理损伤; (2)大剂量左旋精氨酸改变胰腺腺泡细胞的肌动蛋白细胞骨架, 增加了热休克蛋白的表达^[10]; (3)左旋精氨酸能诱发腺泡细胞胰腺炎相关蛋白的细胞凋亡和基因表达^[11], 促进了ANP的发生; (4)NF- κ B是多种ANP动物模型的共同机制, 左旋精氨酸(3 g/kg) ip可诱导ANP, 注射后12-36 h观察到NF- κ B活性和IL-1 β 和TNF- α 浓度的增高, 在注射左旋精氨酸前应用干预药物可抑制NF- κ B活性、减轻ANP病理损害, 通过抑制NF- κ B活性、减少前炎症细胞因子合成对减轻ANP有利^[12]; (5)l-arginine左旋精氨酸诱导的ANP模型中发现胰腺组织的丙二酰二醛(MDA)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化物歧化酶(Mn, Cu, Zn-SOD)以及血清TNF- α , IL-6的水平明显上升, 应用黄嘌呤氧化酶抑制剂干预可减轻实验动物胰腺的水肿、炎症及坏死程度, 同时检测的以上指标均有所降低, 所以氧自由基、前炎症因子^[6,13]等物

■名词解释

精氨酸是一种半必需氨基酸, 其左旋体l-arginine经一氧化氮合酶催化生成一氧化氮(NO), 是NO的唯一来源. 小剂量l-arginine可改善组织微循环, 大剂量对组织有损伤作用.

■同行评价

该文采用腹腔注射大剂量左旋精氨酸制备急性坏死性胰腺炎大鼠模型,以病理所见和血清淀粉酶为观察指标,探讨左旋精氨酸的使用方法、剂量和浓度。本模型的建立为急性胰腺炎的研究提供了一个较理想的平台,为模型制备提供简单、有供较准确剂量可依的方法。该模型成功率高,较侵入性模型有不受技术、设备、条件和手术损伤程度影响的不利因素限制。因此是一个较理想的模型。

质增加参与了ANP的病理生理机制。大剂量左旋精氨酸ip法能成功建立ANP大鼠模型,其方法简便、成本低、可重复性好,是目前研究ANP发病机制及防治措施较为理想、值得推广的动物模型。

4 参考文献

- 1 尚宏清,李非,张再兴,孙家邦. 分次大剂量L-精氨酸腹腔内注射致大鼠急性坏死性胰腺炎模型的研究. 首都医科大学学报 2000; 21: 322-324.
- 2 谭至柔,唐国都,姜海行,邓德海,袁海峰. 抗氧化剂对急性胰腺炎大鼠核因子- κ B和一氧化氮合酶的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 711-713
- 3 Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996; 120: 284-288; discussion 289
- 4 林振和,陈垦. 实验性胰腺炎动物模型研究进展. 胰腺病学 2003; 3: 176-178
- 5 Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, Nakamura T, Fujii M, Fujisawa T, Koide M, Otsuki M. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 367-374
- 6 Czako L, Takacs T, Varga IS, Hai DQ, Tiszlavicz L, Hegyi P, Mandi Y, Matkovics B, Lonovics J. The pathogenesis of L-arginine-induced acute

necrotizing pancreatitis: inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin. *J Physiol Paris* 2000; 94: 43-50

- 7 Toma H, Winston J, Micci MA, Shenoy M, Pasricha PJ. Nerve growth factor expression is up-regulated in the rat model of L-arginine-induced acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2000; 119: 1373-1381
- 8 赵秋玲,黄承钰,徐家玉,张银柱,刘静. L-精氨酸诱导小鼠急性坏死性胰腺炎模型的建立. 疾病控制杂志 2004; 8: 141-144
- 9 周总光,陈友岱. 胰腺微循环障碍的影响因子与急性胰腺炎. 中国科学基金 2001: 13-16
- 10 Tashiro M, Schafer C, Yao H, Ernst SA, Williams JA. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells. *Gut* 2001; 49: 241-250
- 11 Motoo Y, Taga K, Su SB, Xie MJ, Sawabu N. Arginine induces apoptosis and gene expression of pancreatitis-associated protein (PAP) in rat pancreatic acinar AR4-2J cells. *Pancreas* 2000; 20: 61-66
- 12 Rakonczay Z Jr, Jarmay K, Kaszaki J, Mandi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takacs T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 696-709
- 13 Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J. Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1770-1777

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台,欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信),免收出版费,写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间