doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.12.010

◇临床医学◇

十二指肠乳头区精细注射法诱导大鼠急性重症胰腺炎模型

刘璐璐¹, 唐敏², 宋莎莎¹, 江威¹, 徐诗霞³, 黄山¹, 陈治东¹, 章礼久¹作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院消化内科, 安徽 合肥 230601; ²安徽医科大学第四附属医院消化内科, 安徽 合肥 230012; ³皖南医学院药学院基础医学院, 安徽 合肥 241001

通信作者: 章礼久, 男, 主任医师, 副教授, 博士生导师, 研究方向为消化性溃疡、功能性胃肠病、慢性肝胆疾病的诊断和治疗

及胃镜检查检查和内镜下治疗, E-mail: zhanglijiu6336@163.com

基金项目: 安徽省自然科学基金(1708085QH192)

摘要: **目的** 观察十二指肠乳头区精细注射法建立大鼠急性重症胰腺炎模型的效果。 **方法** 大鼠通过简单随机化分组的方法分为: 假手术组、精细注射组(6 h、24 h)、被膜下组(6 h、24 h), 每组 15 只。精细注射组大鼠采用十二指肠乳头朝向胆管开口的部位精细注射, 被膜下组采用胰腺被膜下多点注射, 均采用胰岛素笔注射, 注射药物均为 5% 牛磺胆酸钠(1 mL/100 g)。比较各组死亡率、手术时间、血清淀粉酶含量、胰腺组织病理组织学变化及成模率。 **结果** (1) 被膜下组有两只大鼠死亡, 各组间死亡率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。 (2) 被膜下组较精细注射组手术时间明显缩短[(12.80 ± 1.15) min 比 (14.87 ± 1.19) min, $P < 0.05$]。 (3) 与假手术组(233.13 ± 67.75) U/L 比较, 精细注射组[6 h: (2 535.07 ± 999.83) U/L, 24 h: (4 161.87 ± 2 437.02) U/L]和被膜下组[6 h: (3 401.54 ± 870.05) U/L, 24 h: (3 503.67 ± 1 540.60) U/L]血清淀粉酶含量均显著升高($P < 0.05$)。与精细注射组 6 h 比较, 精细注射组 24 h 的血清淀粉酶含量明显升高($P < 0.05$)。 (4) 精细注射组 24 h 可见广泛凝固性坏死伴出血, 坏死区细胞结构不清, 实质内大量炎症细胞浸润。与假手术组比较, 被膜下组和精细注射组的胰腺炎病理评分均显著升高($P < 0.05$), 且精细注射组 24 h 的评分升高最显著($P < 0.05$)。 (5) 假手术组、被膜下组 6 h 和精细注射组 6 h 均无成模大鼠。精细注射组 24 h 成模率 100%(15/15) 最高($P < 0.05$)。 **结论** 十二指肠乳头区精细注射法建立大鼠急性重症胰腺炎模型具有血清淀粉酶含量变化显著、胰腺组织病理典型、成模率高的优点, 可为胰腺炎基础和临床研究提供基础, 值得推广。

关键词: 胰腺炎, 急性坏死性; 牛磺胆酸钠; 疾病模型, 动物; 肝胰管壶腹; 注射; 大鼠, Sprague-Dawley; 十二指肠乳头区精细注射法

Study on acute severe pancreatitis induced by fine injection of duodenal papilla region

LIU Lulu¹, TANG Min², SONG Shasha¹, JIANG Wei¹, XU Shixia³, HUANG Shan¹, CHEN Zhidong¹, ZHANG Lijiu¹

Author Affiliations: ¹Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230601, China; ²Department of Gastroenterology, Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230012, China; ³College of Basic Medicine, Medicine College of South Anhui Medical College, Hefei, Anhui 241001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of fine injection of duodenal papilla area on the establishment of severe acute pancreatitis models in rats. **Methods** The rats were randomly divided by simple randomization into: the sham operation group, the fine injection group(6 h, 24 h), the subcapsular group (6 h, 24 h), 15 in each group. The rats in the fine injection group were injected at the site of the duodenal papilla facing the orifice of the bile duct, while the rats in the subcapsular group applied multiple points injection under pancreatic capsule, they were injected with 5% Bile Salts (1 mL/100 g). The mortality, operation time, serum amylase content, pathological changes and modeling rate of pancreas were compared. **Results** (1) Two rats died in the subcapsular group, but there was no statistical significance between the groups ($P > 0.05$). (2) The operation time in the subcapsular group was significantly shorter than that in the fine injection group [(12.80 ± 1.15) min vs. (14.87 ± 1.19) min, $P < 0.05$]. (3) Compared with the sham operation group(233.13 ± 67.75) U/L, the hemodlastase contents in the fine injection group [6 h: (2 535.07 ± 999.83) U/L, 24 h: (4 161.87 ± 2 437.02) U/L] and the subcapsular group [6 h: (3 401.54 ± 870.05) U/L, 24 h: (3 503.67 ± 1 540.60) U/L] were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the fine injection group at 6 h, the hemodlastase content in the fine injection group at 24 h was significantly increased ($P < 0.05$). (4) In the fine injection group, extensive coagulation necrosis with hemorrhage was observed at 24 h, cell structure in the necrotic area was unclear, and a large number of inflammatory cells were infiltrated in the pa-

renchyma. Compared with the sham operation group, the pathological scores of pancreatitis of the subcapsular group and the fine injection group were significantly increased ($P < 0.05$), and the score of the fine injection group at 24 h was the most significant increase ($P < 0.05$). (5) There were no model rats in the sham operation group, the subcapsular group at 6 h and the fine injection group at 6 h. The rate of model formation was the highest in the fine injection group at 24 h ($P < 0.05$). **Conclusion** The method of fine injection of duodenal papilla area has the advantages of remarkable changes in hemodlastase content, typical pathology of pancreatic tissue and high rate of model formation. It can provide the basis for the basic and clinical study of pancreatitis, it is worth popularizing.

Key words: Pancreatitis, acute necrotizing; Taurocholic acid; Disease models, animal; Ampulla of vater; Injections; Rats, sprague-dawley; Method of accurate nipple injection

急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的特殊类型,是一种进展快、并发症多、病死率高的急腹症^[1-2],占AP的10%~20%。目前对该病的发病机制和病变过程缺乏深入认识。因此,选择合适的SAP建模方法对研究SAP具有深远意义。查阅国内外文献,建立AP模型的方法主要包括侵袭性和非侵袭性操作^[3-4],其中侵袭性操作有逆行胰胆管注射法^[5]、直接胰管结扎术法^[6]、微泵注入法^[7]及胰腺被膜下注射等。直接胰管结扎和微泵注入等方法对手术器械条件及术者的手术技能要求极高,操作难度大,不利于推广。胰腺被膜下注射法为胰腺被膜下打针法^[8]改良设计。非侵袭性操作包括:L-精氨酸(L-Arginine)注射法^[9-10]、雨蛙素注射法^[11-12]、无胆盐乙硫氨酸(CDE)^[13]喂养法等,但都适用于诱导轻型胰腺炎动物模型。除了上述造模方法,还有胰腺直接损伤法^[14], Harisa GI等^[15]报道的大鼠尾静脉注射泰洛沙泊(Tyloxapol)的高脂血症性AP方法。而另有电针刺刺激法、高钙血症法、动脉注射微球法、免疫介导法以及不同方法联合应用等多种类型^[16]的AP动物模型建立方法。但临床上最常见的胰腺炎类型为胆源性胰腺炎。本研究主要为模拟胆源性胰腺炎机理,建立对手术器械条件要求不高、操作时间短、可重复性强、稳定性好、死亡率低的SAP动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康SD大鼠75只,雄性,体质量范围为200~250 g,购于北京维通利华公司,6周,医学实验动物合格证号:170018,医学实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0006。适应性饲养1周,简单随机化分组法分为五组:假手术组、精细注射组6 h、精细注射组24 h、被膜下组6 h、被膜下组24 h,每组15只。

1.1.2 实验药品 在胰岛素笔中注入牛磺胆酸钠(5 g/100 mL灭菌水,5%)。配制好的5%牛磺胆酸

钠装入自制的胰岛素笔的3 mL针管中,每0.1毫升换算10个单位,按照0.1 mL/100 g进行总量计算,根据大鼠体质量计算胰岛素笔的注射量,准备试验器械及背景灯光。

1.2 实验方法

1.2.1 麻醉方法 腹腔注射10%水合氯醛(10 g水合氯醛,用无菌水配置成10%浓度的液体,4℃保存),按1 mL/100 g剂量麻醉。

1.2.2 手术方法 手术台上,大鼠给予备皮,消毒。精细注射法:仰卧固定,从腹部正中口切开约2 cm,逐层分离,将十二指肠轻轻提起,背景灯光照射下沿着肠系膜下方找出胆胰管口,用血管钳轻轻夹闭开口上下约5 mm处,在胆管距肠壁15 mm处用镊子轻轻夹住。用胰岛素笔连接BD针头避开血管,斜向穿刺肠壁至十二指肠乳头区,在胰胆管开口处,朝向胆管方向,深入2~3 mm,以0.1 mL/min的速度缓慢逆行注射入胆管内,待胰腺变色、水肿时结束手术,关闭腹腔(图1)。被膜下法:腹壁正中切口入腹,寻找胰腺组织及被膜,用胰岛素笔将所需体积的牛磺胆酸钠分次多部位注射入被膜下。假手术组:行开腹手术,开腹后翻动胃肠即关腹。上述操作仅行1次。

1.2.3 术前和术后管理 大鼠实验前12 h禁食不禁水。术后使用灯光照射,选用侧卧位或仰卧位,观察大鼠术后呼吸运动情况,必要时给予更换体位或心肺复苏。

1.2.4 血清学检测 各组大鼠分别于造模后6 h、24 h处死,颈动脉穿刺采血,离心机4 000 r/min离心10 min,取上层清液置于-20℃冰箱冻存,根据试剂盒说明书检测各组血清淀粉酶含量。

1.2.5 胰腺组织病理学检查 将实验大鼠分别在造模后6 h、24 h处死,取胰腺,选取胰腺多部位组织用4%多聚甲醛溶液固定2 h,常规制成4 μm的石蜡组织切片,行苏木精-伊红(HE)染色,在光镜下观察胰腺组织病理学改变,并根据Kusske标准对组织切片进行评分。

1.2.6 成模率统计 SAP诊断的金标准为组织病理,需同时可见组织明显水肿、炎症细胞浸润及出血坏死表现,以此来统计各组大鼠成模率。

1.3 统计学方法 采用SPSS 21.0统计软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,各组间整体比较采用单因素方差分析、多重比较采用LSD-*t*检验。计数资料采用例数及率表示,比较采用 χ^2 检验(整体+分割 χ^2 检验)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠死亡率比较 假手术组大鼠均存活,死亡率为0%(0/15)。30只精细注射组大鼠均存活,死亡率为0%(0/30)。被膜下组有两只大鼠在造模过程中因穿刺胰腺血管导致出血性休克而死亡,死亡率6.67%(2/30)。组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 手术时间比较 手术时间数据列于下表1。被膜下组较精细注射组手术时间明显缩短($P < 0.05$)。

表1 各组手术时间比较

组别	只数	手术时间/(min, $\bar{x} \pm s$)
假手术组	15	0.53±0.05
被膜下组	30	12.80±1.15 ^a
精细注射组	30	14.87±1.19 ^{ab}
<i>F</i> 值		1 043.923
<i>P</i> 值		0.000

注:手术时间为开腹至关腹时间,不包括麻醉、消毒、备皮及缝合等时间。a、b分别为和假手术组、被膜下组相比,均 $P < 0.05$

2.3 各组血清淀粉酶比较 如表2所示,整体比较(单因素方差分析)可知:整体差异有统计学意义($P < 0.05$)。多重比较并结合主要数据分析:与假手术组比较,其余各组血清淀粉酶含量均显著升高($P < 0.05$);精细注射组24 h较精细注射组6 h血清淀粉酶含量明显升高,且较被膜下组6 h也显著升高($P < 0.05$)。

2.4 胰腺组织病理学变化 造模结束后,光镜下观察胰腺组织病理并进行胰腺炎严重程度评分。可见(图2):精细注射组6 h与被膜下组6 h的胰腺细胞水肿、炎症细胞浸润、出血、坏死改变不明显。被膜下组24 h可见明显炎症细胞浸润、水肿以及少量的出血坏死表现。精细注射组24 h可见广泛凝固性坏死伴出血,坏死区细胞结构不清,实质内大量炎症细胞浸润。

参考胰腺炎Kusske评分标准对以上病理图片进行评分,结果如表2所示,整体比较(单因素方差分析)可知:整体差异有统计学意义($P < 0.05$)。多重比较并结合主要数据分析:与假手术组比较,其

余各组胰腺炎病理评分均显著升高($P < 0.05$);与6 h比较,24 h的胰腺炎病理评分明显升高($P < 0.05$);与被膜下组24 h比较,精细注射组24 h的胰腺炎病理评分明显升高($P < 0.05$)。

表2 各组血清淀粉酶、胰腺炎病理评分比较/ $\bar{x} \pm s$

分组	只数	血清淀粉酶(U/L)	胰腺炎病理评分/分
假手术组	15	233.13±67.75	1.23±0.63
被膜下组6 h	15	3 401.54±870.05 ^a	5.87±1.36 ^a
被膜下组24 h	15	3 503.67±1 540.60 ^a	12.27±1.03 ^{ab}
精细注射组6 h	15	2 535.07±999.83 ^{ab}	5.07±0.25 ^{ac}
精细注射组24 h	15	4 161.87±2 437.02 ^{abcd}	15.33±0.72 ^{abcd}
<i>F</i> 值		17.435	632.257
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注:a、b、c、d分别为和假手术组、被膜下组6 h、被膜下组24 h、精细注射组6 h相比, $P < 0.05$

2.5 各组成模率比较 如表3所示,整体比较(χ^2 检验)可知:整体差异有统计学意义($P < 0.05$)。多重比较并结合主要数据分析:假手术组、被膜下组6 h和精细注射组6 h均无成模大鼠。精细注射组24 h较被膜下组24 h的成模率明显升高($P < 0.05$)。

表3 各组成模率比较

分组	只数	成模率/只(%)
假手术组	15	0 (0)
被膜下组6 h	15	0 (0)
被膜下组24 h	15	9 (60) ^{ab}
精细注射组6 h	15	0 (0) ^c
精细注射组24 h	15	15 (100) ^{abcd}
χ^2 值		58.456
<i>P</i> 值		0.000

注:a、b、c、d分别为和假手术组、被膜下组6 h、被膜下组24 h、精细注射组6 h相比, $P < 0.05$

3 讨论

牛磺胆酸钠是人体内2种胆汁酸的主要成分之一,选用牛磺胆酸钠可模拟胆总管下段梗阻时胆汁酸反流引起的AP^[17-18]。

在预实验中,实验大鼠选择戊巴比妥钠进行麻醉,但发现术后大鼠多出现逐渐呼吸衰竭而死亡,死亡率极高。后选择水合氯醛麻醉后大鼠死亡率明显降低,在实验过程中无大鼠死于麻醉。

大鼠SAP模型诱导方法主要包括逆行胰胆管注射法和被膜下多点注射法。本研究发现被膜下多点注射牛磺胆酸钠法较逆行胰胆管注射法时间较短。但由于胰腺组织供血丰富,被膜下血管分布密集,多点注射时易导致出血,且血管较细,难以用止血钳止血,实验过程中两只大鼠均因失血性休克

死亡,故手术操作风险及难度较大。逆行胰胆管注射法大多具有重复性好、模型稳定的优点,病理改变存在剂量依赖性与时间依赖性,但此类方法均需通过显微镜反复精确调整角度,对胆管进行切开或穿刺置管,因胆管纤细,手术难度极大。且胰胆管隔着十二指肠肠壁,肠壁血管丰富,易发生失血性休克。

本研究对逆行胰胆管注射法进行改良,首次采用十二指肠乳头区精细注射法,使用胰岛素笔注入牛磺胆酸钠的方式控制给药剂量和速度。选择对十二指肠乳头朝向胆管开口的部位精细注射,保证一部分牛磺胆酸钠进入胆管,同时乳头水肿,避开十二指肠管壁血管,诱导SAP。此种方法无须进行胆管切开或对胆管进行穿刺置管,对胆管损伤小,基本无出血,操作难度显著降低。实验结果发现,十二指肠乳头区精细注射法与被膜下多点注射法相比较,手术时间稍长,但无死亡大鼠,诱导的模型大鼠血清淀粉酶含量升高显著,且呈进行性升高。精细注射法胰腺组织病理可见广泛凝固性坏死伴出血,坏死区细胞结构不清,实质内大量炎症细胞浸润,且根据Kusske标准,胰腺组织病理评分显著高于被膜下组。综上,十二指肠乳头区精细注射法具有成模率高、病理典型、与临床SAP状态相符的特点。

十二指肠乳头区精细注射法需要实验者掌握一定的外科手术技能,具备相应的解剖学知识。操作过程需在背景灯光照射下,避开十二指肠肠壁血管,正确识别胆管、胰管,找到胆胰管共同开口处,朝向胆管开口方向,注射速度要缓慢且均匀。

(本文图1,2见插图12-1)

参考文献

- [1] 王业流,方海明,章礼久.安徽省某“三甲”医院消化内科2010—2014年疾病谱变化趋势[J].安徽医药,2016,20(6):1098-1102.
- [2] 王文强,项和平,王伟,等.高脂血症性急性胰腺炎仓鼠胰腺微循环观察[J].中华急诊医学杂志,2017,26(11):1274-1278.
- [3] 陈杏田,杨元生,陈垦,等.急性胰腺炎实验动物模型的研究进展[J].中华全科医学,2017,15(5):857-860.
- [4] 杜军卫,赵海平,靳君华,等.急性胰腺炎动物模型研究进展[J].中国现代普通外科进展,2017,20(2):157-161.
- [5] AHO HJ, NEVALAINEN TJ, AHO AJ. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection [J]. European Surgical Research, 1983, 15(1): 28-36.
- [6] BUCHWALOW I, SCHNEKENBURGER J, ATIYAKSHIN D, et al. Oxidative stress and NO generation in the rat pancreatitis induced by pancreatic duct ligation [J]. Acta Histochemica, 2017, 119(3): 252-256.
- [7] PENG L, WU LG, LI B, et al. Early enteral nutrition improves intestinal immune barrier in a rat model of severe acute pancreatitis [J]. Journal of Hepato - Biliary - Pancreatic Sciences, 2016, 23(11): 681-687.
- [8] WANG X, ZHOU G, LIU C, et al. Acanthopanax versus 3-methyladenine ameliorates sodium taurocholate - induced severe acute pancreatitis by inhibiting the autophagic pathway in rats [J]. Mediators of Inflammation, 2016, 2016: 8369704. DOI: 10.1155/2016/8369704.
- [9] AZIZ NM, KAMEL MY, RIFAAI RA. Effects of hemin, a heme oxygenase-1 inducer in L-arginine-induced acute pancreatitis and associated lung injury in adult male albino rats [J]. Endocrine Regulations, 2017, 51(1): 20-30.
- [10] 王蓓蓓,于波,曲波,等.大鼠急性胰腺炎模型建立的探究[J].胃肠病学和肝病杂志,2013,22(11):1073-1075.
- [11] YIN T, PEETERS R, LIU Y, et al. Visualization, quantification and characterization of caerulein - induced acute pancreatitis in rats by 3.0T clinical MRI, biochemistry and histomorphology [J]. Theranostics, 2017, 7(2): 285-294.
- [12] WARZECHA Z, SENDUR P, CERANOWICZ P, et al. Protective effect of pretreatment with acenocoumarol in cerulein - induced acute pancreatitis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10): 1709.
- [13] 周英,马成才,吴运福,等.不同剂量雨蛙素诱导小鼠急性胰腺炎模型的对比研究[J].现代生物医学进展,2016,16(35):6804-6807.
- [14] 汤海涛,邢雪.急性胰腺炎实验动物模型的建立方法及研究进展[J].中国现代普通外科进展,2014,17(5):412-415.
- [15] HARISA GI, ALOMRANI AH, BADRAN MM. Simvastatin-loaded nanostructured lipid carriers attenuate the atherogenic risk of erythrocytes in hyperlipidemic rats [J]. Eur J Pharm Sci, 2017, 96: 62-71.
- [16] ROMERO R, MIRANDA J, CHAIWORAPONGSA T, et al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes [J]. Am J Reprod Immunol, 2014, 72(5): 458-474.
- [17] 吉九威,赵海平,胡文秀,等.亚甲蓝+牛磺胆酸钠联合逆行胰胆管注射法制备重症急性胰腺炎大鼠模型[J].中国普外基础与临床杂志,2018,25(9):1049-1054.
- [18] 朱擎天,路国涛.急性胰腺炎动物模型研究新进展[J].医学研究生学报,2017,30(12):1322-1325.

(收稿日期:2018-10-08,修回日期:2018-12-11)