

上海科学技术出版社,1999:271-280

- 6 吴孟超. 肝癌外科综合治疗的现状和前景[J]. 中华肝胆外科杂志,2006,12(1):1-4
- 7 National Comprehensive Cancer Network. NCCN Hepatobiliary Cancers Clinical Practice Guidelines in Oncology (Version 2. 2009). http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
- 8 Turner T, Misso M, Harris C, *et al.* Development of evidence - based clinical practice guidelines (CPGs): comparing approaches. Implement Sci. 2008,3:45 <http://www.implementationscience.com/content/3/1/45>
- 9 吴一龙. 恶性肿瘤多学科综合治疗的困境[J]. 循证医学,2008,8(1):1-2
- 10 Wang YH, Liu JF, Li F, *et al.* Radiofrequency Ablation Combined With Transarterial Chemoembolization for Unresectable Primary Liver Cancer[J]. CMJ,2009,122(8):889-894
- 11 王昌俊. 人体内环境与肿瘤治疗[J]. 环球中医药,2010,3(2):133-134
- 12 Luk JM, Wang X, Liu P, *et al.* Traditional Chinese herbal medicines for treatment of liver fibrosis and cancer: from laboratory discovery to clinical evaluation [J]. Liver Int,2007,27(7):879-890
- 13 Martin RC, Eid S, Scoggins CR, *et al.* Health - related quality of life: return to baseline after major and minor liver resection [J]. Surgery, 2007,142(5):676-684
- 14 Yamazaki S, Takayama T. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: evidence - based outcomes [J]. World J Gastroenterol, 2008,14(5):685-692
- 15 王悦华. 肝细胞癌多学科诊疗临床思维方法的 PBL 教学体会 [J]. 中国医学教育技术,2010,24(4):408-411
- 16 Mendizabal M, Reddy KR. Current management of hepatocellular carcinoma [J]. Med Clin North Am,2009,93(4):885-900
- 17 中华医学会外科学分会肝脏学组. 肝细胞肝癌外科治疗方法的选择 [J]. 腹部外科,2008,21(5):262-264

(收稿:2010-12-23)

(修回:2011-05-10)

小鼠重症急性胰腺炎模型研究进展

王 艳 衣恩通 阴赓宏

重症急性胰腺炎(SAP)是临床常见的危重病,其发病急,进展快,病死率高,严重危害人们的健康。研究人体 SAP 存在诸多困难,所以学者们通过建立动物模型研究其发病机制、转归及治疗方法。小鼠是常用的实验动物,近年来国内外学者就小鼠重症急性胰腺炎造模方法、特点及应用等进行了一系列研究,现介绍如下。

一、逆行性胆总管注射牛磺胆酸钠

迄今为止,这种造模方法在大鼠中已广泛应用^[1,2]。近年来已有不少学者应用逆行性胆总管注射牛磺胆酸钠致小鼠重症急性胰腺炎,此模型的原理是模拟了胆汁反流机制造成胰腺炎。

1. 造模方法:Wittel UA^[3]于2006年报道了在10倍光学放大镜下逆行性胆总管注射牛磺胆酸钠致小鼠 SAP 模型的成功,理想的注射量是4%牛黄胆酸钠每公斤体重2ml,24h 小鼠病死率达到了10%。2008

年 Wittel UA^[4]再次报道了此方法致小鼠 SAP 模型的建立,采用雄性 BALB/c 小鼠(体重 26.2 ± 1.9 g),异氟烷及丁丙诺啡皮下注射麻醉,取上腹正中切口进入腹腔,以连接有0.54mm 聚乙烯管的0.4mm 针头在胆胰管开口处逆行穿刺十二指肠前壁,通过十二指肠乳头插入胆胰管远端。分别在近肝门及胆胰管开口处将胆胰管两端钳闭,应用输液泵以恒定速度注入4%牛磺胆酸钠(1ml/kg),注射中监测压力,完毕保持5min后,可见小鼠胰腺出现出血、坏死,拔出穿刺针,去除动脉夹及结扎线,无损伤线缝合十二指肠穿刺处,两层关腹。

2. 模型特点:此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,胰腺损伤组织学分级比用雨蛙素进行超刺激诱导的胰腺炎要明显增高,血清淀粉酶和脂肪酶、炎症介质白介素6的浓度也明显高于雨蛙素模型。

3. 应用评价:该模型可模拟临床胆汁反流性胰腺炎,诱发成功率高,有很好的重复性和可比性。在病因、致病机制及病理等方面与临床上的 SAP 极为相似,可以比雨蛙素诱导的模型出现更重的胰腺局部损伤和全身性炎症反应及更高的病死率。Laukkanen 等^[5]研究指出,该模型更适于通过基因修饰小鼠品

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7102038)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院感染暨重症医学科

通讯作者:阴赓宏,医学博士,教授,主任医师,博士生导师,电子邮箱:modsen@yahoo.com.cn

系来研究胰腺炎的发病机制,Wittel UA 等^[4]认为,该模型为研究野生型小鼠和基因工程小鼠 SAP 全身并发症的潜在机制提供了可靠的小鼠模型。因此,该模型对于研究不同基因产物在胰腺炎相关的全身性炎症反应综合征进展过程中的作用比较有价值。但此方法为有创性,操作费时,实验动物存活期短,不利于对在体组织的观察(如对胰腺微循环的观察)。且该方法需要一定技术上的挑战,手术过程本身依赖于个人技术和经验。另外,手术后小鼠必须存活的要求,意味着因手术和麻醉原因导致大约 10% 的动物损失应考虑到实验计划中,尤其是当仅有少量的转基因动物能够获得的时候。

二、雨蛙素联合脂多糖腹腔注射

雨蛙素腹腔内注射造模的原理,是利用雨蛙素作为胆囊收缩素的类似物,其重要作用是刺激胰腺的外分泌,使胰蛋白水解酶大量分泌,引起胰腺泡自溶。李全生等^[6]报道了大剂量雨蛙素腹腔注射法建立 ICR 小鼠急性坏死性胰腺炎模型。在雨蛙素诱导的急性轻型胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)的基础上,给予腹腔内联合注射大剂量(10mg/kg)脂多糖,可以加重胰腺炎的严重度,使 MAP 向 SAP 进展,并产生全身性炎症反应,导致胰外多器官的损伤,机制可能与自由基释放-清除机制和氧化-抗氧化机制紊乱有关^[7]。Vaccaro 等^[8]认为脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可直接作用于胰腺腺泡细胞,使细胞核严重改变,细胞浆内大量空泡出现,胰腺炎相关蛋白(PAP)mRNA 高表达,凋亡因子 TNF- α 、IL-1 和 IL-8 mRNA 表达增加,最终导致胰腺损伤。

1. 造模方法:李全生等^[6]采用雄性 ICR 小鼠,体重 30~35g,小鼠腹腔注射雨蛙素(50 μ g/kg),每小时 1 次,共 7 次,小鼠出现急性坏死性胰腺炎。金畅等^[9]用雨蛙素联合脂多糖腹腔内给药造模,采用雌性 NIH 小鼠,体重 25.0 $\pm$ 3.0g,小鼠腹腔内注射雨蛙素 50 μ g/(kg·h),连续 6 次,在末次雨蛙素注射后腹腔注射脂多糖(10mg/kg),小鼠出现 SAP。

2. 模型特点:雨蛙素诱导小鼠重症急性胰腺炎模型近似人类急性胰腺炎(AP)的病理生理过程。有研究报道此种模型小鼠约 40% 腺泡细胞发生坏死,与单纯雨蛙素模型及生理盐水对照组相比,雨蛙素联合脂多糖组出现血清淀粉酶增高,胰腺水肿,重量增加,大量炎症细胞浸润,胰腺组织出现坏死和出血,电镜观察显示腺泡细胞超微结构破坏严重,同时胰外多器官出现不同程度的损伤,具有典型的重症急性胰腺炎

的病理特征。

3. 应用评介:SAP 患者在疾病进展的早期病死率可以达到 20%,而单纯雨蛙素诱导的 SAP 模型早期胰腺炎相关的病死率没有被观察到,胰腺损伤往往较轻,且损伤程度不一致^[10]。雨蛙素联合脂多糖致小鼠 SAP 模型具有人类 SAP 的病理改变,为非创伤性,操作简单,成模快速稳定,重复性好。此模型目前已广泛应用,主要用于 AP 细胞生物学和病理生理学研究,也用于研究全身性疾病反应,尤其是胰腺炎相关的肺损伤病理过程及肠道内分泌的相互作用^[11,12]。

三、L-精氨酸腹腔内注射

Tani 等^[13]首次报道了腹腔内注射过量 L-精氨酸(L-arginine, L-Arg)能致大鼠急性胰腺炎,认为大剂量 L-Arg 可能减少多胺合成从而抑制核酸及蛋白质合成,而胰腺腺泡细胞的蛋白质合成最为活跃,因此极易受损伤。另外,由于 L-Arg 是一氧化氮(NO)的前体物,一氧化氮合酶活化后,在蛋白二硫化物还原酶(NADPH)参与下 L-Arg 转化成 NO,NO 释放过多可引起毛细血管过度扩张、血流淤滞、血压下降、局部炎症扩散、组织利用氧减少,导致胰腺组织损伤^[14]。另有研究认为 L-Arg 对 AP 的发生有双重作用,低剂量 L-Arg(75、150mg/kg)使胰腺组织中 NO 浓度升高致正常相近的水平,细胞保护作用占优势,促进了胰腺腺泡细胞凋亡,减轻胰腺病理损害^[15];高剂量 L-Arg(1200、2400mg/kg)使胰腺组织中 NO 浓度升高超出正常水平,细胞毒作用占优势,胰腺腺泡细胞凋亡减少,胰腺病理损害加重。

1. 造模方法:雄性 C57BL/6 小鼠,体重 25~30g,腹腔内注射 8% 的 L-Arg 盐酸化物(pH 值调为 7.0),剂量 4g/kg,间隔 1h 后注射第 2 次^[16]。雄性昆明小鼠,体重 18~22g,胰腺炎组小鼠腹膜分两次注射 20% L-Arg(4g/kg),注射间隔为 1h^[17]。

2. 模型特点:腹腔内注射大剂量 L-Arg 后,小鼠胰腺病变逐渐加重,48h 出现典型的急性坏死性胰腺炎病理改变。在注射 L-Arg 后 6h、12h、24h 血清淀粉酶活性与对照组比较差异有显著性,6h 血清淀粉酶活性达到最高,此后开始下降,48h 和 72h 血清淀粉酶与对照组比较差异无显著性,提示急性胰腺炎时,随着胰腺病变的加重到一定程度,胰酶释放反而减少^[17]。Dawra^[16]认为该模型胰腺损伤进展缓慢,在 L-Arg 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。但是此研究没有介绍模型动物的病死率。

3. 应用评介:此模型操作简便,成本低,可重复性好,克服了其他模型需行剖腹术等缺点,减少了外源性细菌污染机会。同时与人类 AP 的病程及组织学改变相似,损伤病变程度在不同的胰腺部位比较一致,可以通过剂量依赖调节胰腺细胞坏死的程度,因此对于研究胰腺炎发生和发展过程的分子机制有帮助。此外,该模型的多器官损伤,严重影响了急性胰腺炎的病情和病死率,更适合用来研究胰外器官的损伤及其作用机制。但此模型进展成胰腺炎较慢,造模需要相对较长的时间进程,L-Arg 的长期给药往往容易造成慢性胰腺炎。吕金利等^[18]研究表明在相同剂量 L-Arg 的诱导下,c57BL/6 小鼠急性胰腺炎 24h 病死率(10%)显著低于 BALB/c 小鼠 24h 病死率(40%),两系小鼠组织炎症因子表达的差异与其病死率差异有明显相关性。因此在选用此方法造模时,要考虑不同品系小鼠病死率不同。

四、雨蛙素联合肠激酶静脉内注射

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(enterokinase,EK)可以激活蛋白酶,此模型小鼠胰腺组织中蛋白酶的活性最高,而蛋白酶激活对于局部和全身炎症反应的进展似乎是必要的。关于蛋白酶亚细胞释放及其激活过程的机制还有待于进一步研究证实^[19]。

1. 造模方法:Werner Hartwig 等^[19]于 2008 年利用静脉内注射雨蛙素及肠激酶建立了 SAP 小鼠模型。采用雄性 Balb/c 小鼠(20~25g),经腹腔内麻醉,于右侧颈内静脉插入一个聚乙烯导管(内径 0.28mm),导管沿血管走行经皮下移行至肩胛上区,外侧与一个厚的聚乙烯导管相连,允许动物自由活动。导管插入术后,在灌注开始前所有动物必须是清醒的。将雨蛙素溶于 0.9% 氯化钠溶液中,连续灌注 6h,2h 后当雨蛙素诱导的胰腺炎致细胞外胰蛋白酶原升高时,注入来源于猪肠道的肠激酶。对照组分别注射乳酸盐林格溶液或雨蛙素或肠激酶。

2. 模型特点:与对照组相比,同时注射雨蛙素和肠激酶模型组的动物进展成局部和全身器官的损伤。胰腺和肺组织损伤的程度随着所注射的雨蛙素/肠激酶的浓度增加而升高,这些动物的生存率减低。早期出现腺泡细胞凋亡,胰腺坏死在疾病进展的后期被观察到。血中乳酸脱氢酶、白介素-1 α 、白介素-1 β 的水平反映了细胞损伤和全身性炎症反应。该模型的特点是:疾病早期即出现严重的胰腺水肿,白细胞浸润,腺泡细胞凋亡,而在疾病进展的后期出现胰腺坏

死和动物死亡率。死亡率的比较:同时注射最大剂量的 EK 和雨蛙素的小鼠在 12h 内死亡率为 100%,而对照组则均生存。小鼠的平均生存时间与注入的 EK 的量呈负相关。

3. 应用评介:此方法成模简单,无需剖腹术,重症急性胰腺炎发生仅需几小时。胰腺炎的严重程度可通过注入肠激酶的量来调节。同时作为评价胰腺炎相关性肺损伤的定量参数-髓过氧化物酶活性,在此模型中明显高于雨蛙素和肠激酶单独注射的对照组,有利于胰腺炎相关肺损伤的研究。该造模方法对今后利用转基因鼠研究急性重症胰腺炎有一定的价值。

五、无胆碱乙硫氨酸膳食

无胆碱乙硫氨酸(choline-deficient,ethionine-supplemented,CDE)膳食可诱发小鼠出血坏死性胰腺炎和脂肪坏死。此方法造模的原理是乙硫氨酸干扰了细胞内甲硫氨酸的代谢,从而干扰了细胞膜磷脂的合成,通过饮食中缺乏胆碱使这种作用得到加强,导致胰腺细胞外放作用受阻,雌激素在其中也起着重要作用,所以一般均选择雌鼠制作该模型。

1. 造模方法:1992 年 Niederau^[20]给 4~6 周、体重 10~14g 的雌性小鼠服用 CDE 膳食,饲料成分包括蔗糖 55%,猪油 20%,大豆蛋白 10%,添加各种维生素和无机盐,加上 3% 乙硫氨酸,诱发出小鼠急性出血坏死性胰腺炎。2007 年 Seerden 等^[28]通过喂食 CDE 饮食诱导 OF1 小鼠出现急性坏死性胰腺炎。方法:OF1 幼龄雌性小鼠,体重 10~15g,CDE 饮食 72h,禁食 1 夜后处死小鼠,病理证明小鼠出现急性坏死性胰腺炎。

2. 模型特点:Niederau^[20]发现此模型小鼠急性出血性胰腺炎紧随 CDE 饮食后发生,同时伴随弥漫性腹腔内脂肪坏死和严重的全身效应,如酸中毒、缺氧和血容量不足。通过胆碱缺乏饮食持续时间的不同能够导致不同的死亡率:饲喂 CDE 食物 4 天(约 3g/d),5 天死亡率为 100%;喂饲 1 天,5 天死亡率降为 66%。为了确保同质性和可重复性,该模型小鼠的性别、年龄和体重必须匹配,所有动物摄入饮食的种类也应该是相同的。

3. 应用评介:此方法为无创性,适用于 SAP 病理生理以及治疗干预的研究,死亡率可通过调整喂养时间控制。近年来,该方法越来越多地被用于 AP 胰外器官损伤机制的研究。但此模型存在一些局限性:如仅能用于幼龄的雌性小鼠,诱导期较长,出现较高的小鼠死亡率,而且对于小鼠 CDE 饮食的进食量很难

控制,导致病情轻重度和病理变化程度不一致,限制了此模型的应用。此外,其全身并发症与胰腺炎的不相关(如腮腺炎和脂肪肝)使这个模型对于研究 AP 全身性事件的使用受到了一定限制^[21]。该模型对于研究胰腺病理变化的时间过程也有一定的局限性,因为不能明确胰腺损伤发生的具体时间,故该模型仅被少量研究采用。诱导小鼠 SAP 的方法还有十二指肠闭襟法、雨蛙素腹腔注射联合胰管复扎法、胰管合并胆管结扎等,这些模型对从不同方面阐明 SAP 的发病机制及治疗,发挥了重要的作用^[22]。

六、结 语

1. 造模方法:小鼠 SAP 造模方法,可归类为侵入型和非侵入型两大类。一个理想的动物模型应该具备与人类疾病的相似性、可重复性、适用性以及可控性、易行性和经济性等几个基本条件,以上小鼠 SAP 模型各具优缺点,可以根据研究的重点来选择。

2. 小鼠的选择:目前主要分为常规小鼠和基因工程小鼠两大类。基因工程小鼠是指运用转基因、基因打靶及基因敲除等技术,研究特定基因在疾病发生发展过程中的作用。这种小鼠模型具有稳定性、重复性好,不受药物影响等优点。近年来国内外学者们已利用转基因小鼠进行了多项研究,但目前基因敲除小鼠价格昂贵,在一定程度上限制了其应用。

3. 小鼠动物模型为 SAP 的发生机制、器官功能损伤、发病过程、干预研究,以及延缓疾病的发展进程甚至降低致死率提供了更多的选择。随着实验技术水平的提高以及基因修饰小鼠应用的增加,相信会有更完善更具代表性的模型为人类急性胰腺炎的研究做出贡献。

参考文献

- Xiping Z, Jie Z, Qin X, *et al.* Influence of baicalin and octreotide on NF- κ B and p-selectin expression in liver and kidney of rats with severe acute pancreatitis. *Inflammation*, 2009, 32(1): 1-11
- Zhang XP, Zhang L, Yang P, *et al.* Protective effects of baicalin and octreotide on multiple organ injury in severe acute pancreatitis. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(2): 581-591
- Wittel UA, Boss B, Lauch R, *et al.* Severe necrotizing pancreatitis in mice induced by retrograde taurocholate infusion into the common bile duct. *Pancreas*, 2006, 33(4): 507
- Wittel UA, Wiech T, Chakraborty S, *et al.* Taurocholate-induced pancreatitis: a model of severe necrotizing pancreatitis in mice. *Pancreas*, 2008, 36(2): 9-21
- Laukkarinen JM, Van Acker GJ, Weiss ER, *et al.* A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion

- of Na-taurocholate. *Gut*, 2007, 56(11): 1590-1598
- 李全生,陈晓理,周总光,等. 雨蛙素腹腔注射法建立小鼠急性坏死性胰腺炎模型的实验研究. *中国普外基础与临床杂志*, 2004, 11(4): 335-337
- 金畅,李继承. 雨蛙素联合脂多糖致小鼠重症急性胰腺炎模型的建立及其机理的探讨. *实验生物学报*, 2003, 36(2): 91-96
- Maria I, Ezequiel LC, Angela M. Lipopolysaccharide Directly Affects Pancreatic Acinar Cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 2000, 45(5): 915-926
- 金畅,李继承. 雨蛙素联合脂多糖致小鼠重症急性胰腺炎模型. *中国医学科学院学报*, 2002, 24(4): 393-396
- Su KH, Cuthbertson C, Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB*, 2006, 8(4): 264-286
- Chen YP, Ning JW, Ji F. Establishment of the critical period of severe acute pancreatitis-associated lung injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(5): 535-540
- Li Y, Ding J, Wang L, *et al.* Down-regulation of tumor necrosis factor-associated factor 6 is associated with progression of acute pancreatitis complicating lung injury in mice. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 217(4): 279-285
- Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, *et al.* A new model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive dose of arginine in rats. *Dig Dis Sci*, 1990, 35(3): 367-374
- Hishikawa K, Nakaki T, Suzuki H, *et al.* Role of L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension. *J Hypertens*, 1993, 11(6): 639-645
- 吴涛,陈熹,纪宗正. 精氨酸对急性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的影响. *第四军医大学学报*, 2007, 28: 1570-1572
- Dawra R, Sharif R, Phillips P, *et al.* Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(4): G1009-G1018
- 赵秋玲,黄承钰,徐家玉,等. 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(2): 141-144
- 吕金利,申海鹰,沈利群,等. 不同品系小鼠急性胰腺炎预后差异及其机制探讨. *实用医药杂志*, 2006, 23(9): 1074-1076
- Hartwig W, Schimmel E, Hackert T, *et al.* A novel animal model of severe pancreatitis in mice and its differences to the rat. *Surgery*, 2008, 114(3): 394-403
- Niederau C, Luthen R, Niederau MC, *et al.* Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, methionine-supplemented diet. *Methodology and standards Eur Surg Res*, 1992, 24(suppl 1): 40-54
- Seerden TC, De Man JG, Holzer P, *et al.* Experimental pancreatitis disturbs gastrointestinal and colonic motility in mice: effect of the prokinetic agent tegaserod. *Neurogastroenterol Motil*, 2007, 19(10): 856-864
- Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, *et al.* Role of Toll-Like Receptor 4 in the Pathophysiology of Severe Acute Pancreatitis in Mice. *Surg Today*, 2007, 37(10): 867-873

(收稿:2010-12-21)

(收稿:2011-06-25)