

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.05.027

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191113.1402.006.html\(2019-11-13\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191113.1402.006.html(2019-11-13))

电灼伤致创伤性局灶性胰腺炎大鼠模型的构建^{*}

仲卫冬¹, 钱雷敏¹, 钱建忠², 花晨², 张婷³, 陈海蛟³, 黄建明^{1△}

(江苏省江阴市人民医院:1. 胃肠外科;2. 病理科;3. 中心实验室 214400)

[摘要] **目的** 构建电灼伤致创伤性局灶性胰腺炎的动物模型,模拟临床胃癌根治术后胰腺炎。**方法** 将 30 只 SD 大鼠分为对照组和建模组,建模组使用高频电刀(模式:bipolar,功率:5 W)电凝胰腺被膜,对照组仅翻动胰腺后复位,分别在术后 24、72 h 和 7 d 3 个时间节点进行解剖和取材,提取血清、腹腔积液,切取胰腺组织并合理保存标本,使用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测血清和腹腔积液中的淀粉酶、磷脂酶 A2,切取胰腺组织做病理切片,行 HE 染色后观察病理改变。**结果** 术后 72 h,建模组大鼠血清淀粉酶水平明显高于对照组 [(70.94±2.14) U/L vs. (57.47±4.33) U/L, $P<0.01$]。建模组大鼠腹腔积液淀粉酶水平在术后 24 h [(154.73±7.65) U/L vs. (31.77±2.85) U/L, $P<0.01$]、72 h [(125.27±8.34) U/L vs. (32.28±4.62) U/L, $P<0.01$]、7 d [(103.53±10.56) U/L vs. (31.26±4.13) U/L, $P<0.01$]均明显高于对照组。术后 24 h 建模组大鼠血清磷脂酶 A2 水平高于对照组 [(7.18±0.68) ng/mL vs. (6.80±0.50) ng/mL, $P<0.05$];术后 72 h、7 d 建模组大鼠血清磷脂酶 A2 水平与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$);建模组大鼠腹腔积液磷脂酶 A2 水平在术后 24 h [(12.38±0.82) ng/mL vs. (7.74±0.52) ng/mL, $P<0.01$]、72 h [(11.28±0.71) ng/mL vs. (7.40±0.58) ng/mL, $P<0.01$]、7 d [(11.88±0.59) ng/mL vs. (7.18±0.84) ng/mL, $P<0.01$]均明显高于对照组。组织病理切片提示建模组的胰腺组织出现充血、水肿、局部坏死。**结论** 创伤性局灶性胰腺炎的大鼠模型构建简便,成功率高,为进一步研究奠定了基础。

[关键词] 电灼伤;创伤性局灶性胰腺炎;大鼠模型

[中图分类号] R365

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)05-0809-04

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Construction of rat model of traumatic focal pancreatitis by electric burn injury^{*}

ZHONG Weidong¹, QIAN Leimin¹, QIAN Jianzhong²,

HUA Chen², ZHANG Ting³, CHEN Haijiao³, HUANG Jianming^{1△}

(1. Department of Gastrointestinal Surgery; 2. Department of Pathology; 3. Central Laboratory, Jiangyin Municipal People's Hospital, Jiangyin, Jiangsu 214400, China)

[Abstract] **Objective** To construct the animal model of traumatic focal pancreatitis by electric burn injury for simulating pancreatitis after gastric cancer radical operation in clinic. **Methods** Thirty SD rats were divided into the control group(C) and modeling group(M). The M group used the high frequency electrotome (mode;bipolar,power:5 W) electrocoagulation pancreas envelop, while the control group only reset after turning over the pancreas. The dissection and sampling were performed at the time points of postoperative 24,72 h,7 d. The serum and ascites were extracted. The pancreatic tissue was taken and the sample was rationally preserved. The levels of amylase and phospholipase A2 in serum and ascites were detected by using the enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). The pancreatic tissue was taken for preparing the pathologic section. The pathologic change was observed after HE staining. **Results** The level of serum amylase at postoperative 72 h in the M group was significantly higher than that in the C group [(70.94±2.14) U/L vs. (57.47±4.33) U/L, $P<0.01$]. The levels of ascites amylase at postoperative 24,72 h and 7 d in the M group were significantly higher than those in the C group [(154.73±7.65) U/L vs. (31.77±2.85) U/L, $P<0.01$, (125.27±8.34) U/L vs. (32.28±4.62) U/L, $P<0.01$, (103.53±10.56) U/L vs. (31.26±4.13) U/L, $P<0.01$]. The level of serum phospholipase A2 at postoperative 24 h in the M group was significantly higher than

^{*} 基金项目:江苏省无锡市卫生局面上科研项目(MS201410)。 作者简介:仲卫冬(1987-),住院医师,硕士,主要从事胃肠外科肿瘤等的研究。 [△] 通信作者,E-mail:zwd4970@163.com。

that in the C group $[(7.18\pm0.68)\text{ng/mL vs. } (6.80\pm0.50)\text{ng/mL}, P<0.05]$, which at postoperative 72 h and on postoperative 7 d had no statistically significant difference between the C group and M group ($P>0.05$). The levels of ascites phospholipase A2 at postoperative 24,72 h,7 d in the M group were significantly higher than those in the C group $[(12.38\pm0.82)\text{ng/mL vs. } (7.74\pm0.52)\text{ng/mL}, P<0.01, (11.28\pm0.71)\text{ng/mL vs. } (7.40\pm0.58)\text{ng/mL}, P<0.01, (11.88\pm0.59)\text{ng/mL vs. } (7.18\pm0.84)\text{ng/mL}, P<0.01]$. The histopathological section examination revealed that the pancreatic tissue in the M group appeared hyperemia, edema and local necrosis. **Conclusion** The rat model construction of traumatic focal pancreatitis is simple with high success rate, which lays the foundation for further research.

[Key words] electric burn injury; traumatic focal pancreatitis; rat model

临床实践中,胃癌根治性手术需要清扫淋巴结及剥除胰腺被膜,电刀或超声刀的使用易导致创伤性局灶性胰腺炎^[1-2]。胰液含有胰蛋白酶,消化能力强,胰液渗出可导致吻合口漏、腹腔出血等严重情况。为进一步研究创伤性局灶性胰腺炎的发病机制,急需建立成活率高、可复制的疾病动物模型,为此,本研究选取SD大鼠,成功建立创伤性局灶性胰腺炎的动物模型,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级SD大鼠[由南通大学动物实验中心提供,生产许可证号:SYXK(苏)2015-0016]30只,体质量200~250 g,雄性。淀粉酶(AMS)、磷脂酶A2(PLA2)的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司,高频电刀(Conmed System 5000)购自美国Conmed公司。

1.2 方法

1.2.1 手术方法

将大鼠随机分为,对照组和建模组,各15只。具体操作:手术前12 h禁食水,备皮,采用10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)经大鼠腹腔注射麻醉,麻醉成功后,消毒、剖腹并解剖出胰腺组织,建模组使用高频电刀(模式:bipolar,功率:5 W)电凝胰腺被膜0.1 s,致靠近被膜的胰腺组织颜色发白,大鼠胰腺与人类的胰腺器官不同,广泛分布于大鼠肠系膜中,术中选取胰腺组织较为集中的区域(胃后方近脾门处),灼伤面积约1 cm×1 cm,复位胰腺后逐层缝合关腹。对照组仅翻动胰腺后复位,其余操作同建模组。术中注意补液,将2 mL/100 g的生理盐水下注射。术后注意保暖,使用棉布包裹大鼠。

1.2.2 取材

在术后24、72 h和7 d 3个时间点解剖两组大鼠,每组每个时间点解剖5只大鼠,采集血清、腹腔积液及胰腺组织并合理保存标本。

1.2.3 观察指标

(1)一般状况:手术过程中观察实验动物的一般状况,监测其术后精神状态、进食、排便的变化。(2)血清和腹腔积液AMS、PLA2:每组3个时间点应用AMS、PLA2的ELISA试剂盒进行检测。(3)大体观

察和病理检查:在3个时间点,观察腹腔积液量、胰腺及胰周组织情况,切取胰腺组织制作病理切片并进行HE染色和镜下观察。

1.3 统计学处理

采用SPSS20.0统计软件进行数据分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 手术情况及术后一般状况

麻醉诱导3 min后,大鼠角膜反射、肌腱反射消失,自主呼吸平稳,因操作简单,整个建模时间大约20 min,麻醉诱导后2 h左右大鼠开始苏醒,对照组和建模组无明显差异。建模组大鼠术后精神状态较对照组差,术后活动量较少,觅食行为延迟,排便延后且排便量减少。

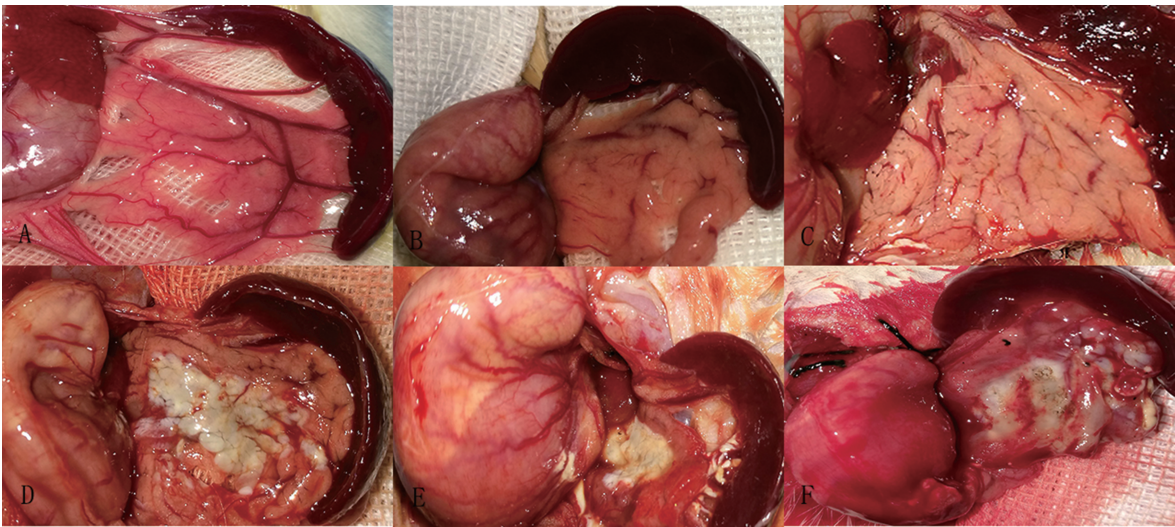
2.2 大体观察

建模组术后24 h腹腔积液(淡黄色)量达高峰,术后72 h腹腔积液较之前减少,术后7 d腹腔积液明显减少,见表1。建模组胰腺组织有充血、水肿、局部坏死表现,与周围组织粘连明显,周围渗出明显;对照组未见明显异常(图1)。

表 1 腹腔积液量($\bar{x}\pm s$, mL)			
组别	24 h	72 h	7 d
对照组	1.50±0.21	0.54±0.11	0.56±0.11
建模组	3.34±0.50	1.52±0.22	1.06±0.24

2.3 血清和腹腔积液AMS、PLA2的测定

术后72 h,建模组大鼠血清AMS水平明显高于对照组 $[(70.94\pm4.78)\text{U/L vs. } (57.47\pm4.33)\text{U/L}, P<0.01]$;而术后24 h,建模组大鼠血清AMS水平 $[(60.14\pm3.87)\text{U/L}]$ 与对照组 $[(56.91\pm4.08)\text{U/L}]$ 比较差异无统计学意义($P>0.05$),术后7 d,建模组大鼠血清AMS水平 $[(58.19\pm2.96)\text{U/L}]$ 与对照组 $[(56.96\pm5.26)\text{U/L}]$ 比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图2A。建模组大鼠腹腔积液AMS水平在术后24 h $[(154.73\pm7.65)\text{U/L vs. } (31.77\pm2.85)\text{U/L}, P<0.01]$ 、术后72 h $[(125.27\pm8.34)\text{U/L vs. } (32.28\pm4.62)\text{U/L}, P<0.01]$ 、术后7 d $[(103.53\pm10.56)\text{U/L vs. } (31.26\pm4.13)\text{U/L}, P<0.01]$ 均明

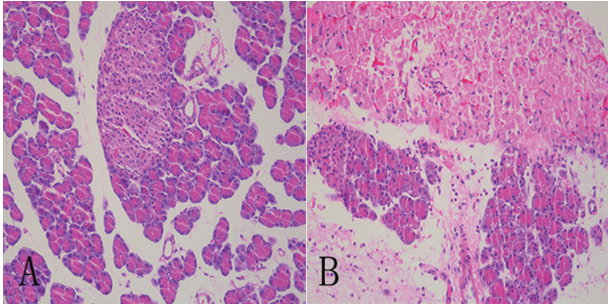


A: 对照组术后 24 h; B: 对照组术后 72 h; C: 对照组术后 7 d; D: 建模组术后 24 h; E: 建模组术后 72 h; F: 建模组术后 7 d。

图 1 剖腹大体观察

显著高于对照组, 见图 2B。建模组大鼠术后 24 h 血清 PLA2 水平 $[(7.18 \pm 0.68) \text{ ng/mL}]$ 高于对照组 $[(6.80 \pm 0.50) \text{ ng/mL}]$, $P < 0.05$; 建模组大鼠术后 72 h 血清 PLA2 水平 $[(6.88 \pm 0.67) \text{ ng/mL}]$ 与对照组 $[(6.96 \pm 0.35) \text{ ng/mL}]$ 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 建模组大鼠术后 7 d 血清 PLA2 水平 $[(7.4 \pm 0.76) \text{ ng/mL}]$ 与对照组 $[(6.94 \pm 0.36) \text{ ng/mL}]$ 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2C; 建模组大鼠腹腔积液 PLA2 水平在术后 24 h $[(12.38 \pm 0.82) \text{ ng/mL}]$ vs. $[(7.74 \pm 0.52) \text{ ng/mL}]$, $P < 0.01$ 、术后 72 h $[(11.28 \pm 0.71) \text{ ng/mL}]$ vs. $[(7.40 \pm 0.58) \text{ ng/mL}]$, $P < 0.01$ 、术后 7 d $[(11.88 \pm 0.59) \text{ ng/mL}]$ vs. $[(7.18 \pm 0.84) \text{ ng/mL}]$, $P < 0.01$ 均明显高于对照组, 见图 2D。

深部组织基本正常(图 3B), 术后 7 d 胰腺病理改变与术后 72 h 无明显差异。



A: 对照组 (HE×20); B: 建模组 (HE×10)。

图 3 胰腺组织病理切片

2.5 建模成功率

经血清和腹腔积液 AMS 测定和病理学观察证实, 建模组 15 只 SD 大鼠均为创伤性局灶性胰腺炎, 未有大鼠在 7 d 观察期内死亡, 建模成功率 100%。

3 讨论

目前胃癌的标准化手术需完整切除小网膜囊来达到根治效果, 而完整切除小网膜囊需剥除胰腺被膜、解剖胰尾部清扫脾门淋巴结及清扫胰腺上缘的脾动脉周围淋巴结, 在这些操作过程中常常使用电刀或超声刀, 容易损伤胰腺浅层组织, 从而导致创伤性局灶性胰腺炎^[1-7]。临床实践已证实创伤性局灶性胰腺炎不同于胆源性胰腺炎, 胰腺深部实质未发生病变, 早期全身性炎症改变不明显, 而局灶性改变明显^[2-4]。通过文献^[7-13]检索, 尚未有学者报道使用电凝镊电灼伤导致胰腺局灶性创伤而构建的创伤性局灶性胰腺炎动物模型。为深入探讨该类胰腺炎的发生机制、病理变化及治疗, 需建立良好的动物模型。

本研究顺利完成了所有动物模型建立的手术操作, 大鼠胰腺组织易辨认, 无需特殊器械, 操作简便, 手术成功率高。建模组的血清淀粉酶和磷脂酶 A2 分

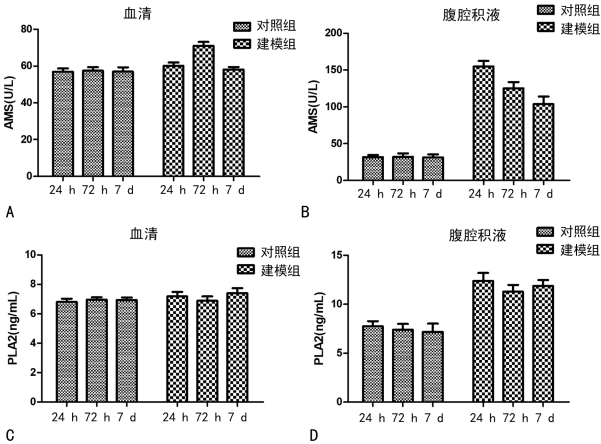


图 2 血清、腹腔积液淀粉酶和磷脂酶 A2 检测情况

2.4 组织病理学表现

对照组大鼠胰腺病理切片显示: 胰腺组织、腺体结构正常, 无明显炎性细胞浸润(图 3A)。建模组大鼠胰腺病理切片显示: 术后 24 h 胰腺浅表组织充血水肿明显, 术后 72 h 胰腺浅表组织出现出血、局部坏死,

别在术后 72 h 和 24 h 有增高,在其余时间点与对照组无明显差异,而其腹腔积液 AMS 和 PLA2 水平显著增高,此与本课题组以前报道^[3]的胃癌根治术后创伤性局灶性胰腺炎的 AMS 特点相似,创伤性局灶性胰腺炎的损伤较为局限,血清中的 AMS 和 PLA2 指标没有腹腔积液中升高明显。而建模组中胰腺创伤后直接暴露于腹腔,胰腺表层实质损伤后仍有少部分胰液漏出,并导致反应性腹腔积液,所以该类胰腺炎早期腹腔积液多,腹腔积液中的 AMS 和 PLA2 水平已显著升高,随后发生胰周组织的炎症反应,表现为粘连、组织充血、水肿等。

血清、腹腔积液的 AMS 和 PLA2 的差异及病理结果证实,构建的动物模型为创伤性局灶性胰腺炎模型,建模成功率为 100%,说明这种模型建立方法具有可行性和可重复性,建立的动物模型很好地模拟了临床事件,客观地反映出的实验数据与临床特征相符。建模过程中,使用双极电凝对胰腺进行电灼伤,容易控制创伤广度、深度及强度,保证了模型的均一性和可重复性。由于大鼠胰腺及周围组织解剖结果与人类存在一定差异,为更好地模拟人体创伤性局灶性胰腺炎,可选择大型哺乳动物作为建模对象。创伤性局灶性胰腺炎大鼠模型的成功建立,为进一步的机制研究和干预研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 黄建明,宣卓琦,蒋小青,等. 胃癌根治术后创伤性局限性胰腺炎 16 例诊治体会[J]. 中华胃肠外科杂志,2009,12(6):645-645.
- [2] DE OLIVEIRA ANDRADE R, KUNITAKE T, KOIKE M K, et al. Effects of diazoxide in experimental acute necrotizing pancreatitis[J]. Clinics (Sao Paulo), 2017(72):125-129.
- [3] HUANG J, QIAN L. The study on the efficacy of fibrin glue in preventing post-traumatic focal pancreatitis (PTFP) after radical gastrectomy [J]. J Gastrointest Surg, 2014, 18(3):476-480.
- [4] IRINO T, HIKI N, OHASHI M, et al. The hit and away technique: optimal usage of the ultrasonic scalpel in laparoscopic gastrectomy[J]. Surg Endosc, 2016(30):245-250.
- [5] 陆逸庭, 胡智明, 陶亮, 等. 胃癌根治术后早期并发重症急性胰腺炎的原因及其诊治[J]. 中华普通外科杂志, 2012, 27(3):241-242.
- [6] MATSUNAGA T, SAITO H, MURAKAMI Y, et al. Serum level of C-reactive protein on postoperative day 3 is a predictive indicator of postoperative pancreatic fistula after laparoscopic gastrectomy for gastric cancer[J]. Asian J Endosc Surg, 2017(10):382-387.
- [7] 陈杏田, 杨元生, 陈昱, 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.
- [8] 肖鲁瑶, 张杰, 郑帅, 等. pH 值和剂量对腹腔注射 L-精氨酸诱导小鼠急性胰腺炎模型的影响[J]. 首都医科大学学报, 2017, 38(5):73-76.
- [9] 耿诚, 孟意程, 徐新建, 等. 自体胆汁逆行胰管注射诱导比格犬重症急性胰腺炎模型建立[J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(1):61-64.
- [10] 薛新梅, 鲁梦婷, 魏娜, 等. 改良胰管逆行注射法制犬急性坏死性胰腺炎模型[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(1):47-50.
- [11] 肖鲁瑶, 张杰, 徐志刚, 等. 雨蛙素及脂多糖诱导小鼠急性胰腺炎效果分析[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(10):1384-1388.
- [12] KAWAMURA Y, SATOH S, SUDA K, et al. Critical factors that influence the early outcome of laparoscopic total gastrectomy [J]. Gastric Cancer, 2015(18):662-668.
- [13] 程振兴, 唐忠明, 余卫平, 等. 一种小鼠胆源性重症急性胰腺炎模型建立方法的改进[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(4):308-313.

(收稿日期:2019-06-06 修回日期:2019-10-25)