

牛磺胆酸钠在大鼠急性胰腺炎模型中的半数致死量(LD50)研究

沈佳庆¹ 杨丽娟¹ 胡国勇² 程 礼¹ 王兴鹏^{2△}

(1 上海市第一人民医院消化内科 上海 200080 2 上海市第十人民医院消化内科 上海 200072)

摘要 目的 通过使用不同浓度的牛磺胆酸钠(TC)建立急性胰腺炎(AP)模型,观察相应的死亡率,进而计算其半数致死量。方法 使用不同浓度的 TC (0 % (wt/vl)、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、9 %) 观察 AP 造模 72 小时后各组的死亡率。同时分析 TC 浓度与组织病理评分、血清淀粉酶和外周血细胞变化的相关性。结果 TC 的半数致死量为 3.409 %。并且,TC 的浓度与组织病理评分、血清淀粉酶和外周血细胞变化密切相关。结论 TC 所致 AP 造模的最佳剂量为 3.409 %。

关键词 牛磺胆酸钠(TC) 急性胰腺炎(AP) 造模 ;半数致死剂量(LD50)

中图分类号 R657.51 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 19-3618-03

Median Lethal Dose 50 (LD50) Study of Taurocholic Acid Sodium in a Rat Model of Acute Pancreatitis

SHEN Jia-qing¹, YANG Li-juan¹, HU Guo-yong², CHENG Li¹, WANG Xing-peng^{2△}

(1 Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Institute of Pancreas Diseases, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, PR China; 2 Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, PR China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the doses of TC and the relevant mortality by applying the acute pancreatitis (AP) model induced by taurocholic acid sodium (TC). **Methods:** A series of concentrations of TC (0% (wt/vl), 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 9%) were used and the mortality of animals was detected within 72h after the induction of AP. The correlations between concentrations of TC and histopathological scores, serum amylase and peripheral blood cells were analyzed. **Results:** The median lethal dose (LD50) was 3.409%. There was a close relationship between concentrations of TC and histopathological scores, serum amylase and peripheral blood cells. **Conclusion:** The appropriate concentration of TC for the mortality study in this AP model is 3.409%.

Key words: Taurocholic acid sodium (TC); Acute pancreatitis (AP); Median lethal dose 50 (LD50)

Chinese Library Classification(CLC): R657.51 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)19-3618-03

前言

目前急性胰腺炎(AP)动物模型有很多种,最常见的有腹腔注射雨蛙肽(胆囊收缩素类似物)、腹腔注射左旋精氨酸和逆行胰胆管灌注牛磺胆酸钠(TC)^[1]。逆行胰胆管灌注 TC 导致的 AP 被认为可以模拟人胆源性胰腺炎,而且还可以引起全身性炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能不全(MODS)^[2,3]。所以该模型目前应用较广泛。但是不同的实验室所用的 TC 浓度各异。且目前尚无文献报道 TC 所用剂量与 AP 的死亡率和严重程度的相关性。本实验基于使用不同浓度的 TC 造模,进而推算出其半数致死剂量(LD50)。

1 材料与方法

1.1 材料

牛磺胆酸钠(Sigma 公司);戊巴比妥钠、无水乙醇、甲醛、二甲苯、石蜡、蜂蜡(国药集团化学试剂有限公司)苏木精-伊红染色液(上海虹桥乐翔医用试剂技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 200-250g SD 大鼠 70 只随机分为 7 组,每组 10 只,分别给予不同浓度的 TC 0 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、9 % (wt/vl)。造模参照 Ishibashi T 的方法并改进^[4]。SD 大鼠术前禁食 12 小时和禁水 6 小时。3 %戊巴比妥钠腹腔麻醉后,无菌条件下上腹正中切口进腹,于十二指肠内侧见片状分布的胰腺,找到胆胰管后,肝门部胆胰管用动脉夹夹闭,从胆胰管开口十二指肠系膜缘对侧肠壁穿刺插入导管,导管进入肠腔后对准膨大壶腹中心插入胆胰管约 1cm,微量注射泵以 0.1 ml/min 速度推注 TC 溶液(1 ml/kg,浓度如上所述)观察 10 min 后拔管,去除动脉夹,缝合十二指肠穿刺口并关腹。大鼠清醒后自由饮水,禁食 1 天。0% TC 组的大鼠仅灌注生理盐水。

1.2.2 死亡率观察 诱发 AP 后,观察 72 小时内大鼠的存活情况。

1.2.3 胰腺组织病理学评分 AP 造模 72 小时后处死大鼠,取 0 %、2 %、4 %和 5 %组大鼠的胰腺组织于 4 %多聚甲醛溶液固定,脱水,石蜡包埋后制片,HE 染色,盲法观察每一张切片,每张切片观察 20 个视野。胰腺损伤程度的评分主要基于胰腺组织的水肿、炎症、空泡化和坏死。评分根据 Schmidt 等的评分标准并有所改进^[5]。

1.2.4 血清淀粉酶检测 AP 造模 24 小时后,0 %、1 %、3 %和 9 %组大鼠尾静脉取血用于检测血中淀粉酶。全血 4 °C 过夜凝血

△通讯作者 王兴鹏:Tel:021-663300588,

E-mail: xingpengwang1965@yahoo.cn

(收稿日期 2011-04-05 接受日期 2011-04-30)

后 3000 转 /min 离心 10 min。罗氏全自动生化分析仪检测血清中淀粉酶的水平。

1.2.5 外周血细胞检测 AP 造模 24 小时后,使用日本光电全自动血细胞计数仪检测 0%、1%、3%和 9%TC 组大鼠外周血白细胞计数以及中性粒细胞和淋巴细胞的比例。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS18.0 统计学软件进行统计学分析结果以平均数± 标准误表示。采用方差分析进行统计学检验,两两比较采用 q 检验。相关性分析采用 Spearman 检验。显著性差异为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 TC 在 AP 模型中的 LD50

诱发 AP 后 72 小时各组的死亡率如下 0 %组 0 % (0/10) ,1 %组 0 % (0/10) ,2 %组 20 % (2/10) ,3 %组 40 % (4/10) ,4 %组 50 % (5/10) ,5 %组 60 % (6/10) ,9 %组 90 % (9/10) 。绝大多数大鼠死于造模后的 48 小时内。动物的死亡率与所用 TC 的浓度高度相关 ($P<0.05$, $r=0.976$,图 1)。经过加权概率单位法分析,计算出在 AP 造模时,TC 的半数致死剂量为 3.409 %。

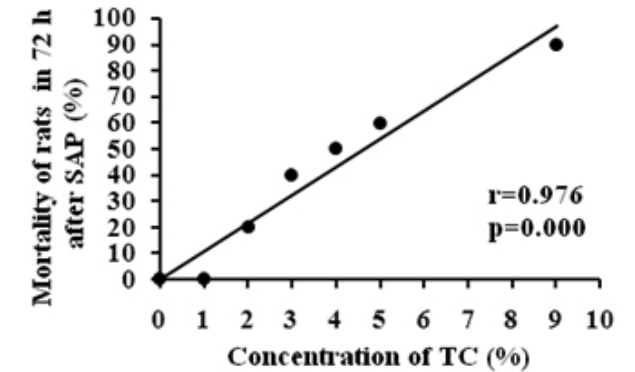


图 1 急性胰腺炎造模后 72 小时牛磺胆酸钠浓度与大鼠死亡率的相关性分析

Fig. 1 Correlation analysis between concentration of TC and mortality of rats in 72 h after AP

2.2 胰腺组织病理学评分

0 %、2 %、4 %和 5 %组的大鼠胰腺脱水包埋制片后,HE 染色。0 %组的胰腺组织主要表现为轻度损伤 局部的间质水肿和少量的炎症细胞浸润。尚未能观察到腺泡细胞和导管细胞的损伤。2 %、4 %和 5 %组胰腺组织出现大量腺泡坏死、脂肪坏死、严重的出血和导管复合体形成。组织水肿明显,且有大量的炎症细胞浸润(图 2A)。各组间的组织病理学评分均有显著差异,且评分随 TC 的使用浓度升高而升高(图 2B)。

2.3 血清淀粉酶

造模后 24 小时后,取 0 %、1 %、3 %和 9 %组血清检测淀粉酶活性。与 0 %组 (2052.90 ± 248.42 U/L) 相比,1 %组大鼠的血清淀粉酶变化不显著。但是在 3 %和 9 %组淀粉酶明显升高 (13706.67 ± 2080.77 U/L 和 24049.33 ± 3716.67 U/L)。并且 3 %和 9 %组之间的差异也具有统计学意义(图 3)。

2.4 外周血细胞检测

造模后 24 小时,检测 0 %、1 %、3 %和 9 %组的外周血白

细胞计数和中性粒细胞、淋巴细胞的比例。1 %、3 %和 9 %组的外周血白细胞计数 ($23896 \pm 1330 /\mu\text{L}$, $25463 \pm 1522 /\mu\text{L}$ 和 $25881 \pm 2075 /\mu\text{L}$) 显著高于 0 %组($16016 \pm 867 /\mu\text{L}$),但是三组之间差异尚不具有统计学意义(图 4A)。然而,随着 TC 使用剂量的增加,中性粒细胞的比例显著增加,淋巴细胞的比例则显著降低 ($P<0.01$, $r = 0.702$ 和 -0.687) (图 4B,C)。

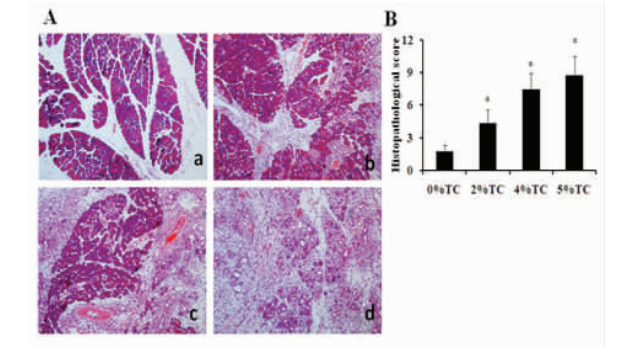


图 2 急性胰腺炎造模后 72 小时的组织病理学改变 (HE 染色,× 100) 。a 0%TC 组,b 2%TC 组,c 3.5%TC 组,d 5%TC 组。B 各组的组织病理学评分

Fig. 2 A. Histopathological changes of pancreas 72 h after AP (HE staining, × 100) .a: 0 %TC group, b: 2 %TC group, c: 3.5 %TC group, d: 5 %TC group. B: Histopathological scores in each group, * $P<0.05$. N=4-8

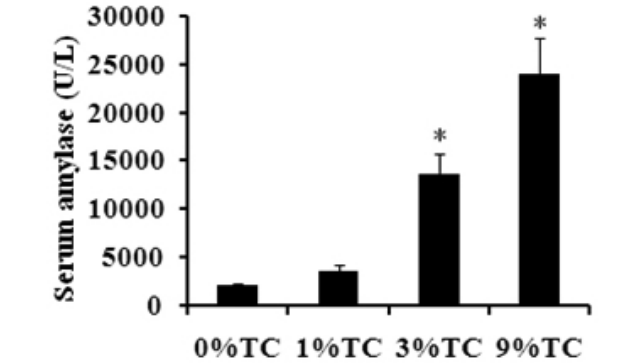


图 3 急性胰腺炎造模后 24 小时后血清淀粉酶检测。
Fig.3 Serum amylase assessment in 24 h after AP.* $P<0.05$. N=3-10

3 讨论

作为常见的一种疾病,AP 主要分为两类 水肿型 AP 和坏死性 AP。水肿型 AP 具有自限性,治疗相对容易。但是,大约 20 %的患者会罹患坏死性胰腺炎,其中 10~30 %可能导致死亡^[6]。所以,建立一个与临床相关性高、重复性好的动物模型对于 AP 的研究至关重要。现在,AP 的动物模型有很多种 腹腔注射雨蛙肽、腹腔注射精氨酸和逆行胰胆管灌注牛磺胆酸钠等。虽然腹腔注射雨蛙肽适用于多种动物,如 小鼠、大鼠、狗和仓鼠,但是该模型一般只能引起急性水肿型胰腺炎,且不能进行死亡率的研究^[7]。腹腔注射精氨酸可以引起严重的胰腺损伤,但是该模型的临床相关性较低,而且该模型尚不能引起内分泌系统损伤,然而急性坏死性胰腺炎通常会伴有暂时的血糖升高^[7-9]。目

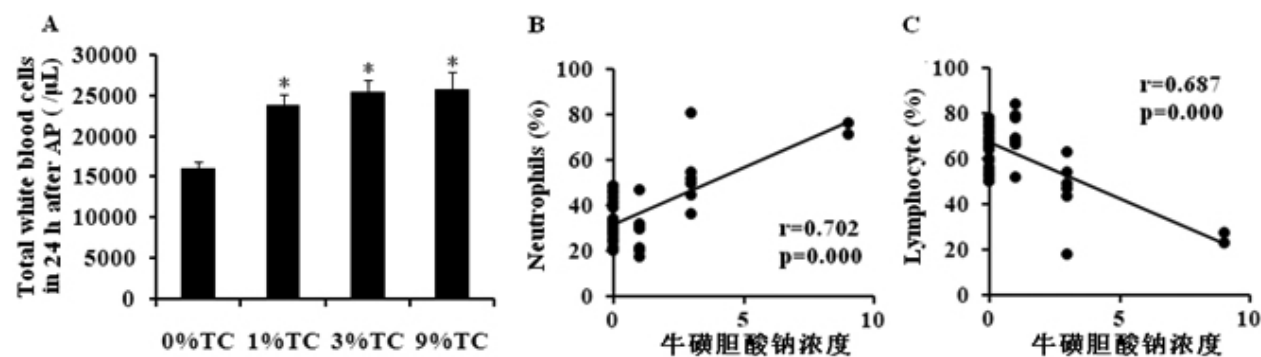


图 4 A. 急性胰腺炎造模后 72 小时外周血白细胞检测。B,C: 急性胰腺炎造模后 72 小时外周中性粒细胞比例和淋巴细胞比例与牛磺胆酸钠浓度的相关性分析

Fig.4 A. Total white blood cell counting in 24 h after AP. B, C: Correlation analysis between concentration of TC and percentages of peripheral neutrophils and lymphocytes in 24 h after AP. *P<0.05, N=3-10

前人们认为逆行胰胆管灌注牛磺胆酸钠导致的 AP 可以模拟人胆源性胰腺炎,同时该模型还可以导致全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能不全(MODS)^[2,3]。因此该模型上可以用于研究 AP 的全身反应。由于存在一定的死亡率,该模型尚可以用于研究药物对 AP 死亡率的作用。然而,各个实验室之间所用的 TC 浓度各异(自 3%~5%不等),因而死亡率亦不稳定^[10-12],所以所得的研究结果很难用于横向比较。

本研究通过使用不同浓度的 TC 来观察各组的死亡率,发现大鼠的死亡率与所用牛磺胆酸钠的浓度密切相关,TC 在该模型中的 LD50 是 3.409%。与此同时还发现 TC 的使用浓度与胰腺炎的严重程度指标(血清中的淀粉酶、外周血中性粒细胞和白细胞、以及胰腺组织评分)高度相关。说明该 AP 模型很适合于药效学的研究,特别是死亡率的研究,其合适的剂量为 3.409%。当所研究的药物是保护 AP 时,TC 的浓度可以选择略大于 3.409%;当所研究的药物对 AP 有害时,TC 的浓度可以选择略小于 3.409%。

与我们的研究结果相同的是,许永春等的研究结果也表明不同浓度的牛磺胆酸钠逆行大鼠胰胆管注射,可以导致不同程度的急性胰腺炎。其中 0.5%的 TC 可以引起轻型的 AP,而 5%的 TC 可以复制重症 AP 模型^[13]。Zhang XP 等的研究结果显示 3.5%的牛磺胆酸钠造模不但可以引起严重的坏死性胰腺炎,还可以引起肺、肝、肾和心脏等多器官的功能衰竭,因此是一种较好的研究 AP 合并 MODS 的动物模型^[3],并且该浓度与我们所得的 LD50 十分接近。但是该研究并未展开多浓度组之间的比较分析,并未阐明大鼠的死亡率与浓度之间的关系,故我们的结果可以给予该研究的不足之处以适当的补充。

参考文献(References)

[1] Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators[J]. Shock, 2005, 24 Suppl 1:45-51
[2] Liu ZH, Peng JS, Li CJ, et al. A simple taurocholate-induced model of severe acute pancreatitis in rats[J]. World Journal of Gastroenterology,

2009, 15: 5732-5739
[3] Zhang XP, Zhang J, Ma ML, et al. Pathological changes at early stage of multiple organ injury in a rat model of severe acute pancreatitis[J]. Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International, 2010, 9:83-87
[4] Ishibashi T, Zhao H, Kawabe K, et al. Blocking of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) activity attenuates the severity of acute pancreatitis in rats[J]. Journal of Gastroenterology, 2008, 43:79-85
[5] Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy [J]. Annals of Surgery, 1992, 215: 44-56
[6] David C, Whitcomb N. Acute pancreatitis[J]. New England Journal of Medicine, 2006, 354:2142-2150
[7] Kim HS, Christine C, Christopher C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis[J]. HPB, 2006, 8: 264-286
[8] Mentula P, Kylanpää M, Kempainen E, et al. Obesity correlates with early hyperglycemia in patients with acute pancreatitis who developed organ failure[J]. Pancreas, 2009,38: e21-25
[9] Solomon SS, Duckworth WC, Jallepalli P, et al. The glucose intolerance of acute pancreatitis: hormonal response to arginine[J]. Diabetes, 1980, 29:22-26
[10] Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis [J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1980,15: 411-416
[11] Aho HJ, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions[J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology,1980, 15: 417-424
[12] Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intra-ductal sodium taurocholate injection[J]. European Surgical Research, 1983, 15: 28-36
[13] 许永春,李兆申,屠振兴,等. 改良逆行胆胰管注射法制备轻重不同两种大鼠急性胰腺炎模型 [J]. 第二军医大学学报,2004,25(11): 1251-1252