

肥胖大鼠合并急性坏死性胰腺炎肝脏损伤评价*

李满¹ 余佳¹ 梅方超¹ 项明伟¹ 周瑜¹ 王卫星¹

〔摘要〕 目的:建立肥胖大鼠急性坏死性胰腺炎(ANP)模型并观察肝脏损伤特点。方法:40 只雄性 SD 大鼠随机分为普通饲料组(N 组)和高脂饲料组(H 组),每组 20 只,分别采用普通饲料和高脂饲料喂养 8 周并监测体重。然后分别将 N 组和 H 组大鼠随机分为对照组(N-control 组,H-control 组, $n=10$)和 ANP 组(N-ANP 组,H-ANP 组, $n=10$)。ANP 组大鼠通过胰胆管逆行注射牛磺胆酸钠方法建立 ANP 模型,术后 6 h 剖杀取材。全自动生化仪测量血清淀粉酶(AMY)、脂肪酶(LIPA),血清甘油三脂(TG)、总胆固醇(TC),谷丙转氨酶(ALT)、和谷草转氨酶(AST)水平,苏木精-伊红切片观察肝脏和胰腺组织病理变化。结果:高脂饲料喂养 8 周后大鼠体重明显增加($P<0.05$),腹腔脂肪组织增多,同时并发脂肪肝和高脂血症。联合胰胆管逆行注射牛磺胆酸钠方法建立 ANP 模型后肥胖大鼠腹腔可见明显皂化斑及肝脏坏死灶,血清转氨酶水平以及肝脏病理评级较非肥胖大鼠明显增高($P<0.05$)。结论:高脂饲料喂养联合胰胆管逆行注射法可建立肥胖大鼠 ANP 模型,肥胖大鼠发生 ANP 时肝脏损伤程度更重。

〔关键词〕 肥胖;急性坏死性胰腺炎;模型;肝脏损伤

doi:10.13201/j.issn.1009-5918.2017.07.014

〔中图分类号〕 R656.1 〔文献标志码〕 A

Establishment of obesity rat model with acute necrotic pancreatitis and evaluation for liver injury

LI Man YU Jia MEI Fangchao XIANG Mingwei ZHOU Yu WANG Weixing
(Department of Endoscopic Hepatobiliary Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)
Corresponding author: WANG Weixing, E-mail: sate.llite@163.com

Abstract Objective: To establish a model of obesity rat with acute necrotic pancreatitis (ANP) and observe the characteristics of liver injury. **Method:** Forty male SD rats were firstly divided into normal diet group (N group, $n=20$) and high fat diet group (H group, $n=20$) randomly. After 8 weeks of feeding with standard and high fat diet separately, the rats in N group and H group were randomly divided into sham operation group (N-control/H-control group, $n=10$) and acute necrotic pancreatitis (N-ANP/H-ANP group, $n=10$) separately. ANP model was induced by retrograde infusion of 5% sodium taurocholate saline solution into biliopancreatic duct, and rats in each group were sacrificed at 6 hours after the operation. The levels of serum amylase (AMY), lipase (LIPA), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured using automatic biochemistry analyzer. Pathological changes of pancreas and liver tissues were examined and pathological scores were recorded. **Result:** After 8 weeks, the body weights of high fat diets group rats were significantly higher than normal group ($P<0.05$). There is well marked increase and accumulation of intra abdominal fat in H group and the rats were complicated by fatty liver and hyperlipemia. Plenty of saponification and adiponecrosis could be found in H-ANP group rats and the concentration of serum ALT, AST in addition to the histological grading of liver injury were significantly higher than N-ANP group ($P<0.05$). **Conclusion:** High fat diets coupled with operations can successfully establish a model of obesity rat with acute necrotic pancreatitis. Liver injury is more critical during the process of ANP especially in obesity rats.

Key words obesity; acute necrotic pancreatitis; model; liver injury

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见急腹症,多种因素导致病情快速进展转变为急性坏死性胰腺炎(acute necrotic pancreatitis, ANP),其病情进展快,并发生持续性的多器官功能损伤,病死率可达 30%^{〔1〕}。多种因素可影响 AP 的发生发展,临床研究显示肥胖也是影响 AP 预后的重要指标,肥胖因素可增加 AP 的严重程度和患者病死率^{〔2〕}。随着肥胖患者增多,对肥胖合并 AP 的研究也逐渐受到学者关注。建立合适的动物模型,研究肥胖合并 ANP 患者病程进展特点、预后状况以及肥胖对 ANP 发展过程的影响机制等对临床治疗具有重要意义。本实验旨在通过高脂饲料喂养并人工干预诱导 ANP,观察肥胖大鼠与非肥胖大鼠合并 ANP 时肝脏损伤特点,为以后的研究奠定基础。

* 基金项目:天晴肝病研究基金扶持基金(No: TQGB20140182)
¹ 武汉大学人民医院肝胆外科(武汉,430060)
通信作者:王卫星, E-mail: sate.llite@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

40 只 SPF 级雄性 Sprague Dawley 大鼠(湖南斯莱克景达实验动物有限公司),每只体质量 180 g 左右;普通饲料(采用标准鼠粮,武汉大学人民医院实验动物中心统一配制),高脂饲料(Research Diets,D12492)。牛磺胆酸钠(美国,Sigma),异氟烷(上海雅培制药有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养及分组 40 只大鼠在 SPF 级环境下适应性喂养 2 d 后按随机数字表法分为 2 组:正常饲料组(N 组, $n=20$)和高脂饲料组(H 组, $n=20$)。N 组每日添加足够量普通饲料,H 组每日添加足够量高脂饲料,连续喂养 8 周。每 3 天称量并记录大鼠体重。8 周后,分别将 N 组和 H 组大鼠进一步随机分为 2 组,其中 N 组分为非肥胖对照组(N-control, $n=10$)和非肥胖合并 ANP 组(N-ANP 组, $n=10$);H 组分为肥胖对照组(H-control 组, $n=10$)和肥胖合并 ANP 组(H-ANP 组, $n=10$)。

1.2.2 手术造模 实验前所有大鼠禁食 12 h,自由饮水。动物取仰卧位,异氟烷吸入麻醉(氧流量 2 L/min,4%异氟烷诱导麻醉,2.5%异氟烷维持麻醉),上腹正中切口入腹。肝门处分离出胆总管后,用无损伤血管夹夹闭。4.5 号注射针头穿十二指肠壁,经十二指肠乳头逆行穿刺进入胰管,以微量注射泵恒速(0.1 ml/min)向胰管注入 5%牛磺胆酸钠(1 ml/kg)造模,夹闭主胰管 5 min 后观察胰腺组织出现水肿、出血等改变。大鼠术后皮下注射葡萄糖氯化钠溶液补液(20 ml/kg),麻醉苏醒后禁食不禁水。N-control 组和 H-control 组大鼠不实施手术,与造模组大鼠同一时间剖杀取材。

1.2.3 指标检测和分析 各组大鼠于造模后 6 h 处死,下腔静脉穿刺采血,2000 r/min 离心 15 min 后分离血清冻存,武汉大学人民医院检验科全自动生化仪(日本奥林巴斯)检测大鼠血清淀粉酶(AMY)、脂肪酶(LIPA)、甘油三脂(TG)、总胆固醇(TC),谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)水平。迅速留取适量胰头和肝脏组织,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋切片行苏木精-伊红染色光学显微镜下观察病理变化。参考 Schmidt 等^[3]方法根据胰腺是否出现水肿、坏死、出血和脂肪坏死及血管炎性细胞浸润等对胰腺进行病理学评分。参考 Camargo 等^[4]方法对肝脏组织行病理学评级。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据比较采用独立样本 t 检验,肝脏病理评级采用独立样本非参数检验。以 $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肥胖造模结果

2 组大鼠初始体重比较差异无统计学意义,按照实验方案喂养,大鼠体质量增长稳定。2 周后 H 组体重增加速度明显加快,8 周后体重大于 N 组,差异有统计学意义($t=7.026,P=0.000$),见表 1、图 1f。开腹可见高脂饲料喂养大鼠腹腔脂肪堆积,腹膜后及肾周脂肪明显增多(图 1a)。分别取 N-control 组和 H-control 组大鼠血清测量 TG 和 TC 水平。如表 2 所示,H 组大鼠血清 TG 和 TC 水平较 N 组增高,差异有统计学意义($t=3.903,P=0.001;t=4.422,P=0.000$),表明大鼠采用高脂饲料喂养后并发高脂血症。N 组大鼠肝脏表面光滑,边缘锐利,呈暗红色(图 1b);H 组大鼠肝脏肉眼观见肝脏呈灰黄色,弥漫性肿大,边缘较钝,表面红黄相间(图 1c)。光镜下肝细胞肿大,细胞质内充满大小不等的脂肪空泡,细胞核被挤压移位至脂滴边缘(图 1d、e),呈典型脂肪肝表现。

表 1 不同喂养时间大鼠体重 $\bar{g}, \bar{x} \pm s$		
时间	N 组	H 组
0 周	202.1±8.90	205.3±10.77
1 周	246.5±13.30	254.3±8.98
2 周	309.9±20.06	318.1±17.17
3 周	355.5±21.99	375.9±25.47 ¹⁾
4 周	385.9±44.14	436.3±39.58 ¹⁾
5 周	413.0±42.42	476.8±39.13 ¹⁾
6 周	433.9±38.69	507.9±40.71 ¹⁾
7 周	460.4±42.53	540.9±44.73 ¹⁾
8 周	473.2±35.31	578.6±46.14 ¹⁾

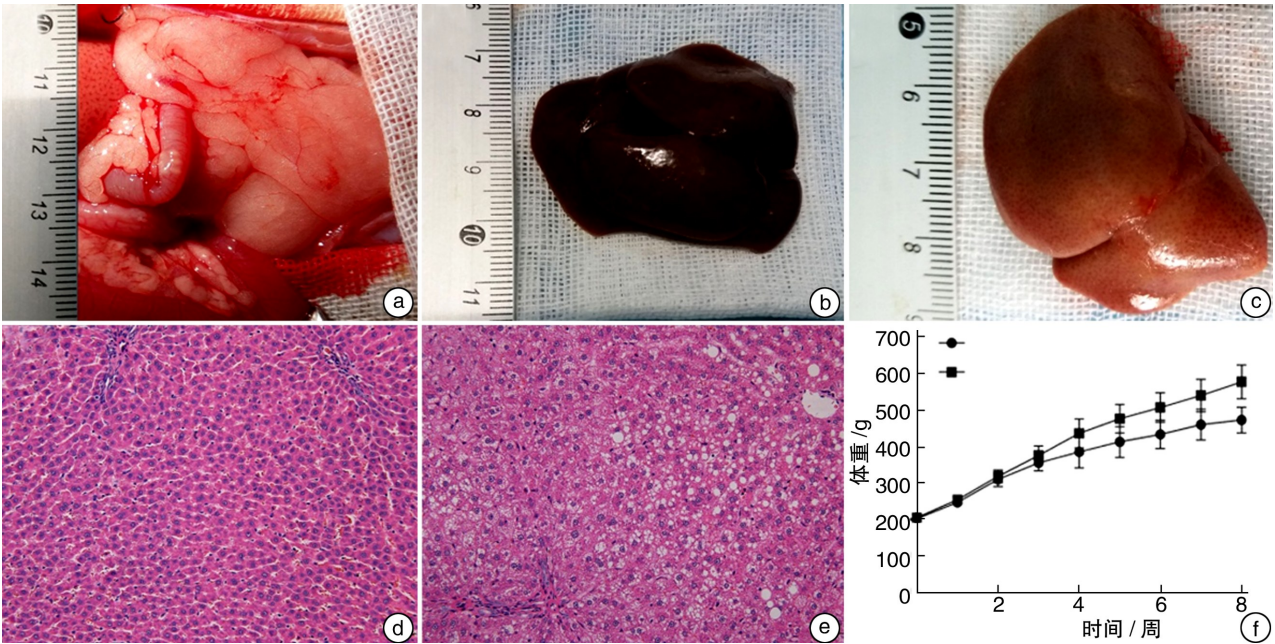
与 N 组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 肥胖合并 ANP 模型的建立

如表 3 所示,造模后 6 h,N-ANP 组和 H-ANP 组大鼠血清 AMY、LIPA 水平分别较 N-control 组和 H-control 组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。光镜下观察 N-control 组和 H-control 组大鼠胰腺组织未见明显改变。而 N-ANP 组和 H-ANP 组造模后胰腺组织可见腺泡水肿、片状坏死,间质出血,大量炎性细胞浸润(图 2),病理评分均较假手术组增加。

2.3 肥胖大鼠合并 ANP 损伤特点

造模 6 h 后 H-ANP 组血清胰脂肪酶水平比 N-ANP 组高,差异有统计学意义($t=3.251,P=0.006$),见表 3。开腹可见,H-ANP 组大鼠胰腺组织出血坏死,胰周、肠系膜及腹腔脂肪大量皂化斑形成(图 3a),肝脏表面凸凹不平,可见片状浅黄色软化灶(图 3b)。N-ANP 组和 H-ANP 组大鼠胰腺组织均出现出血、坏死等典型改变,且病理切片可



a:H 组大鼠腹腔脂肪;b:N 组大鼠肝脏离体标本;c:H 组大鼠肝脏离体标本;d、e:N-control 组和 H-control 组大鼠肝组织切片(×200);f:大鼠体重变化曲线图。

图 1 大鼠肥胖造模情况

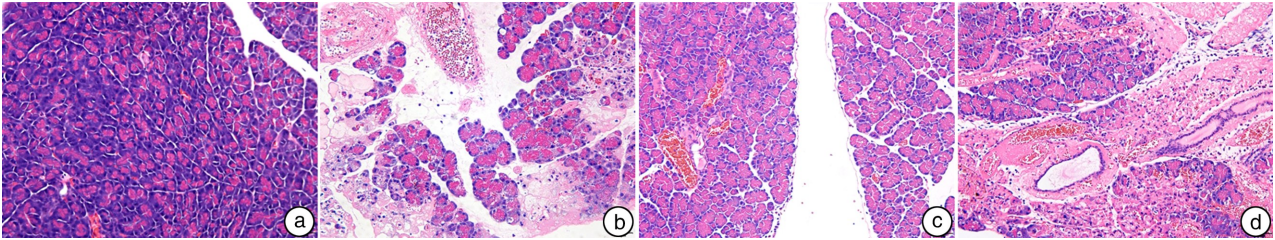
表 2 大鼠血清 TG、TC 水平 U/L, $\bar{x} \pm s$		
组别	TG	TC
N-control 组	0.52 ± 0.17	1.66 ± 0.35
H-control 组	$0.81 \pm 0.21^{1)}$	$2.24 \pm 0.58^{1)}$

与 N-control 组比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

见 H-ANP 组大鼠胰腺组织坏死面积、炎性细胞浸润较 N-ANP 组大鼠更重,病理评分增加。N-control 组和 H-control 组相比,大鼠血清转氨酶水平无明显差异;而 ANP 组大鼠血清转氨酶水平平均比 control 组高,且 H-ANP 组大鼠血清转氨酶水平明

表 3 大鼠血清 AMY、LIPA 水平及胰腺病理评分 U/L, $\bar{x} \pm s$			
组别	AMY	LIPA	胰腺病理评分/分
N-control 组	2137.7 ± 314.25	63.9 ± 21.16	0.30 ± 0.11
N-ANP 组	$8681.7 \pm 1779.41^{1)}$	$9464.2 \pm 2923.61^{1)}$	$11.97 \pm 1.83^{1)}$
H-control 组	2257.5 ± 492.50	28.7 ± 6.02	0.31 ± 0.11
H-ANP 组	$7325.0 \pm 2928.00^{1)}$	$17765.0 \pm 8348.9^{1)2)}$	$12.61 \pm 1.96^{1)}$

与 control 组比较,¹⁾ $P<0.05$;H-ANP 组与 N-ANP 组比较,²⁾ $P<0.05$ 。



a:N-control 组大鼠;b:N-ANP 组大鼠;c:H-control 组大鼠;d:H-ANP 组大鼠。

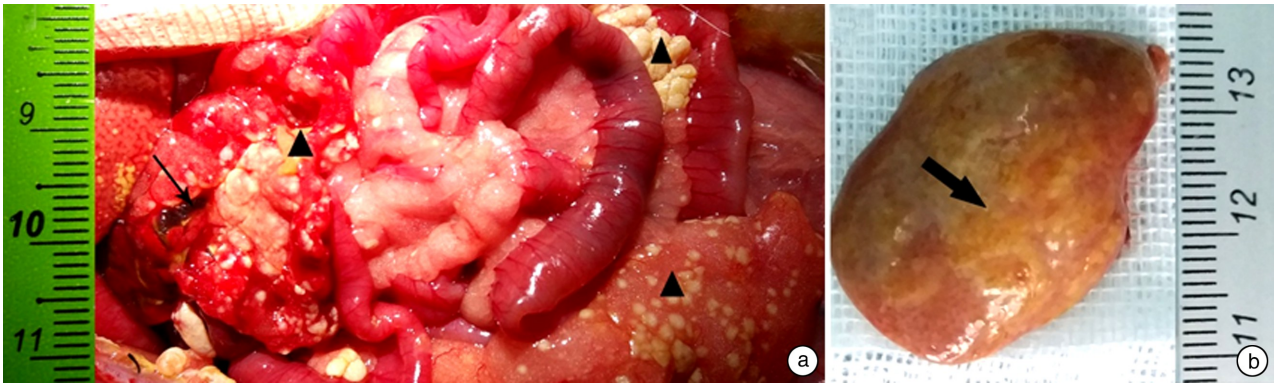
图 2 大鼠胰腺组织病理切片(×200)

显高于 N-ANP 组,差异有统计学意义(图 4)。光镜下观察 HE 切片,N-ANP 组细胞水肿,肝血窦结构紊乱,肝细胞点状坏死。H-ANP 组肝细胞明显水肿,可见片状坏死和出血灶,炎性细胞浸润,病理评级较 N-ANP 组明显增高(表 4、图 5)。说明肥胖

合并 ANP 时对肝脏损伤较 N 组加重。

3 讨论

生活习惯的改变导致肥胖人口数量快速增加,世界卫生组织统计数据示,从 1980~2008 年全球肥胖人数增加将近一倍^[5]。脂肪组织过多堆



a:造模后 6h 腹腔改变,示胰腺出血、坏死,示腹腔脂肪和肠系膜皂化斑;b:离体肝脏组织,示肝脏表面凸凹不平 and 浅黄色软化病灶。

图 3 肥胖大鼠合并 ANP 病理改变

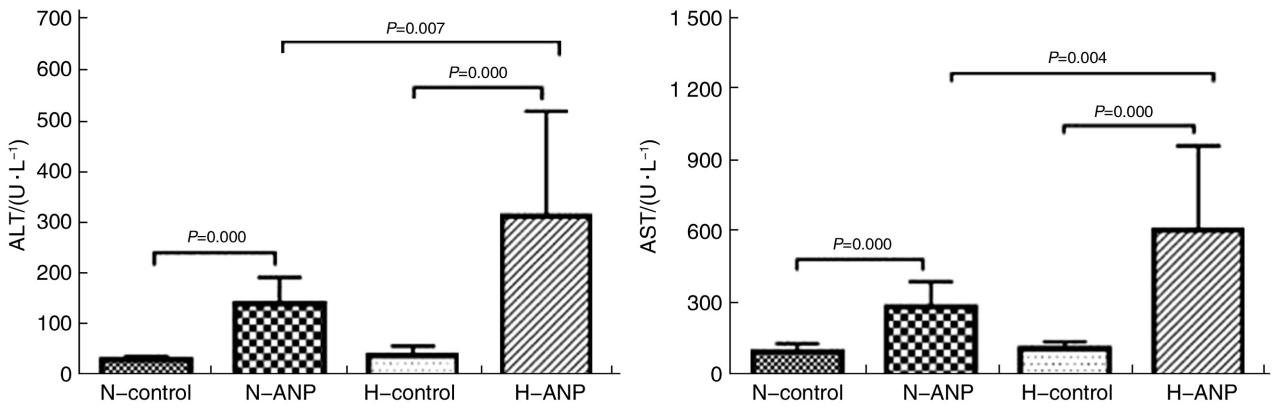


图 4 各组大鼠血清 ALT 和 AST 水平

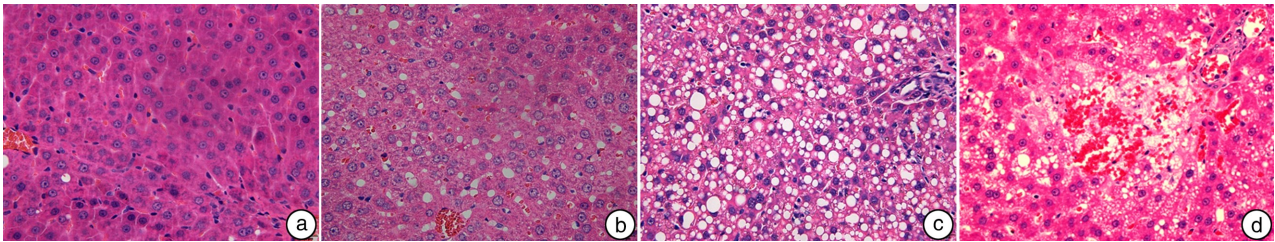
表 4 各组大鼠肝脏组织病理评级						例
组别	例数	分级				秩均值
		0	I	II	III	
N-control 组	10	10	0	0	0	10.00
N-ANP 组	10	0	3	6	1	27.25 ¹⁾
H-control 组	10	9	1	0	0	11.15
H-ANP 组	10	0	0	4	6	33.60 ^{1) 2)}

与 control 组比较,¹⁾ $P<0.05$;H-ANP 组与 N-ANP 组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

积会对机体健康造成严重影响。大量研究表明,肥胖与全身多器官多系统疾病有关如内分泌系统^[6]、

心血管系统^[7]和消化系统^[8]等,研究肥胖与疾病之间关系可以指导临床治疗并有助于改善疾病预后。本实验通过使用高脂饲料喂养 SD 大鼠其体重增长稳定,8 周后成功获取肥胖模型,并出现典型的脂肪肝、血脂升高的情况,方法简易可行。对饲养得到的肥胖大鼠采用胰胆管穿刺逆行注射牛磺胆酸钠方法造模,成功建立了肥胖大鼠 ANP 模型。该模型符合人体营养性肥胖并发 ANP 的生理过程,可以应用于研究肥胖与 ANP 之间关系的动物实验中。

ANP 发病机制复杂,临床上多种因素可导致病情快速进展转变为 ANP,增加诊治难度。研究



a:N-control 组大鼠;b:N-ANP 组大鼠;c:H-control 组大鼠;d:H-ANP 组大鼠。

图 5 大鼠肝脏组织病理切片(×400)

结果发现,肥胖大鼠诱发 ANP 时胰腺组织坏死严重,炎性细胞浸润更明显,说明肥胖患者发生 ANP 时病情可能更重,与目前临床研究结果基本一致^[2,9]。由于重症 ANP 临床上多因全身炎症反应综合征等因素导致多器官损伤,因此,肥胖大鼠并发 ANP 时血清及组织炎性递质表达水平、多器官损伤情况等还需深入研究以对 ANP 严重程度进行更准确的评估。肥胖患者机体处于一种慢性炎症状态^[10],Segersvard 等^[11]认为肥胖可以改变细胞因子相关基因的表达而增加肿瘤坏死因子- α 在多器官中的水平,进而加重 ANP 时肝、肺损伤程度。大量炎性递质产生和释放诱导炎症瀑布反应导致恶性循环加重病情并引起多器官功能损伤,而肥胖患者发生胰腺炎时血清白介素-1、6 和肿瘤坏死因子- α 等水平高于非肥胖患者,并且与中心性体脂分布有关^[12]。肥胖患者腹腔内大量脂肪组织堆积、内脏器官脂质沉积,AP 发生时胰脂肪酶释放可以导致脂肪组织坏死产生大量游离脂肪酸,促进轻型 AP 转化为重症 AP 导致多器官功能障碍,而且这一过程与胰腺组织坏死程度无特定联系^[13-14]。游离脂肪酸使细胞内钙释放并影响线粒体功能导致细胞死亡,严重的脂毒性可以促进炎症反应、组织坏死以及多器官损伤发生发展而加重胰腺炎病情^[15]。本实验发现,H 组大鼠并发 ANP 时血清脂肪酶水平明显升高,腹腔可形成大量典型皂化斑。肝脏组织出现片状坏死灶,肝功能以及肝脏病理损伤明显加重,提示可能与腹腔脂肪坏死以及脂肪肝的形成有关。且最新临床研究也发现非酒精性脂肪肝患者发生 AP 时出现重症 AP 以及器官损伤和局部并发症的概率更大^[16]。肝脏毗邻胰腺且有丰富的门静脉血供,ANP 发病过程中肝脏对炎症因子的调节和分布起至关重要的作用,是 ANP 引起多器官损伤过程的关键环节^[17],肥胖大鼠更易发生脂肪坏死同时促进炎症及氧化应激反应^[18]。

因此,临床需更加关注肥胖患者发生 AP 时病程进展,早期采取护肝治疗措施。通过建立肥胖大鼠 ANP 模型,为进一步探讨肥胖对 AP 严重程度的影响及其加重器官损伤的机制奠定了实验基础,对临床制定多学科综合治疗方案具有重要指导意义。

参考文献

[1] Janisch N H, Gardner T B. Advances in management of acute pancreatitis [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2016, 45(1): 1-8.

[2] Murata A, Ohtani M, Muramatsu K, et al. Impact of obesity on outcomes of paediatric acute pancreatitis based on a national administrative database [J]. *Pediatr Obes*, 2016, 11(3): 174-180.

[3] Schmidt J, Rattner D W, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy [J]. *Ann Surg*, 1992, 215(1): 44-56.

[4] Camargo C A Jr, Madden J F, Gao W, et al. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent [J]. *Hepatology*, 1997, 26(6): 1513-1520.

[5] Bischoff S C, Boirie Y, Cederholm T, et al. Towards a multidisciplinary approach to understand and manage obesity and related diseases [J]. *Clin Nutr*, 2017, 36(4): 917-938.

[6] Abraham S B, Rubino D, Sinaii N, et al. Cortisol, obesity, and the metabolic syndrome: a cross-sectional study of obese subjects and review of the literature [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, 21(1): E105-E117.

[7] Kotsis V, Nilsson P, Grassi G, et al. New developments in the pathogenesis of obesity-induced hypertension [J]. *J Hypertens*, 2015, 33(8): 1499-1508.

[8] Cox A J, West N P, Cripps A W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3(3): 207-215.

[9] Shin K Y, Lee W S, Chung D W, et al. Influence of obesity on the severity and clinical outcome of acute pancreatitis [J]. *Gut Liver*, 2011, 5(3): 335-339.

[10] Cottam D R, Mattar S G, Barinas-Mitchell E, et al. The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss [J]. *Obes Surg*, 2004, 14(5): 589-600.

[11] Segersvard R, Tsai J A, Herrington M K, et al. Obesity alters cytokine gene expression and promotes liver injury in rats with acute pancreatitis [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2008, 16(1): 23-28.

[12] Park J, Chang J H, Park S H, et al. Interleukin-6 is associated with obesity, central fat distribution, and disease severity in patients with acute pancreatitis [J]. *Pancreatol*, 2015, 15(1): 59-63.

[13] Patel K, Trivedi R N, Durgampudi C, et al. Lipolysis of visceral adipocyte triglyceride by pancreatic lipases converts mild acute pancreatitis to severe pancreatitis independent of necrosis and inflammation [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(3): 808-819.

[14] Noel P, Patel K, Durgampudi C, et al. Peripancreatic fat necrosis worsens acute pancreatitis independent of pancreatic necrosis via unsaturated fatty acids increased in human pancreatic necrosis collections [J]. *Gut*, 2016, 65(1): 100-111.

[15] Navina S, Acharya C, DeLany J P, et al. Lipotoxicity causes multisystem organ failure and exacerbates acute pancreatitis in obesity [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(107): 107-110.

[16] Mikolasevic I, Orlic L, Poropat G, et al. Nonalcoholic fatty liver and the severity of acute pancreatitis [J]. *Eur J Intern Med*, 2017, 38: 73-78.

[17] Wang Y, Liu W, Liu X, et al. Role of liver in modulating the release of inflammatory cytokines involved in lung and multiple organ dysfunction in severe acute pancreatitis [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2): 765-776.

[18] Pereda J, Perez S, Escobar J, et al. Obese rats exhibit high levels of fat necrosis and isoprostanes in taurocholate-induced acute pancreatitis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e44383.