

文章编号:1005-6947(2008)08-0764-04

· 基础研究 ·

犬急性重症胆管炎新模型建立

陈钟¹, 朱李璐¹, 葛存旺²

(1. 南通大学附属医院 肝胆外科, 江苏 南通 226001; 2. 南通大学 化学化工学院, 江苏 南通 226007)

摘要:目的 探讨建立一种适合于外科研究的犬急性重症胆管炎(ACST)模型的方法。方法 将10只犬随机分为两组,造模组和对照组(假手术组)。造模组采用胆总管置入T管,远端结扎,T管内注入大肠埃希菌后夹闭T管。观察手术后1周内动物一般情况,分别于术前、术后24,48,72 h和7d采血检测白细胞及分类、血清总胆红素(TB)、碱性磷酸酶(AKP)、谷丙转氨酶(ALT)、TNF- α 、IL-1 β 以及内毒素水平。处死实验动物观察胆管病理改变。结果 术前两组之间各项指标差异无显著性(均为 $P > 0.05$)。术后造模组犬血清TB, AKP, ALT, TNF- α , IL-1 β 及内毒素水平逐渐上升,且均明显高于对照组($P < 0.05$)。造模组胆管病理表现为明显的急性炎症。结论 该法建立犬重症胆管炎模型,可用于ACST的相关研究。
[中国普通外科杂志, 2008, 17(8):764-767]

关键词: 胆管炎;急性病;疾病模型,动物;狗

中图分类号: R 657.4 **文献标识码:** A

Establishment of a novel canine model of severe acute cholangitis

CHEN Zhong¹, ZHU Lirong¹, GE Cunwang²

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong Jiangsu 226001, China; 2. Chemistry and Chemical Industry College, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226007, China)

Abstract: Objective To establish a novel canine model of severe acute cholangitis (ACST). **Methods** Ten dogs were randomly divided into two groups: model group and control group. ACST models were established by placing T-tube in common bile duct and ligating the distal bile duct, then injecting *E. coli* through T-tube and closing the T-tube. The changes of peripheral WBC, total bilirubin, ALT, AKP, IL-1 β , TNF- α and endotoxin were observed pre-operatively and at 24 h, 48 h, 72 h, and 7 d post-operatively. The pathological changes of bile duct were observed when the dogs were sacrificed. **Results** There were no significant differences in all indices between two groups pre-operatively. Serum IL-1 β , TNF- α , endotoxin and total bilirubin, ALT, AKP level in model group increased gradually and were higher than control group ($P < 0.05$) post-operatively. Marked acute inflammation of bile duct was observed in model group. **Conclusions** This method of establishing canine ACST model can be used in related studies of ACST.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(8):764-767]

Key words: Cholangitis; Acute Disease; Disease Models, Animal; Dogs

CLC number: R 657.4 **Document code:** A

急性重症胆管炎 (acute cholangitis of sever

type, ACST) 又称急性梗阻性化脓性胆管炎, 是肝胆外科常见的急腹症; 其起病急骤, 发展迅速, 常伴有脓毒性休克, 病死率高。动物模型的建立是疾病实验性研究的基础。目前的 ACST 动物模型多用大鼠和家兔制作, 造模方法单一, 且与人类解剖结构和生理相差较远。本实验利用临床上常用的 T 管建立犬 ACST 模型, 旨在探讨一种适合外科研究的犬 ACST 模型。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(60571055); 江苏高校高新技术产业发展项目(JHB04-024)。

收稿日期: 2008-04-29; **修订日期:** 2008-06-23。

作者简介: 陈钟, 男, 南通大学附属医院主任医师, 主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者: 陈钟 E-mail: chenz999@hotmail.com

1 材料与方 法

1.1 实验菌株的制备

大肠埃希菌 ATCC25922 (南通大学附属医院微生物室)经复活增菌后,用生理盐水冲洗下菌苔并稀释;用细菌比浊仪(法国 Biomerieux)调制 5.5 个麦氏单位浓度的细菌备用。

1.2 实验动物与分组

成年本地杂种犬 10 只(南通大学实验动物中心),体重 (8.0 ± 0.5) kg,雌雄各半。随机分为造模组和对照组,每组 5 只。造模组:动物禁食不禁水 12 h 后,3% 戊巴比妥钠前肢内侧皮下头静脉注射麻醉。腹部备皮后常规消毒,于上腹中线作一 4 cm 切口开腹,游离胆总管,于距离十二指肠 1 cm 处切开胆总管置入直径 2.7 mm T 管(南通安琪医疗用品有限公司),远端用 4 号线双重结扎;妥善固定 T 管后经皮肤穿一小孔置于体外,逐层关腹。确定胆汁排出通畅后,向 T 管内缓慢注入大肠埃希菌 ATCC 25922 0.5 mL (5.5 个麦氏单位),注射速度为 0.5 mL/min;再注射空气 0.2 mL 注毕夹闭 T 管。对照组(假手术组):与造模组相同条件下进腹,仅行胆总管游离后关腹。所有犬术中及术后连续 3 d 给予 5% 葡萄糖溶液 250 mL 静脉滴注。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 实验室检测 各组分别于术前、术后 24, 48, 72h 和 7d 采外周静脉血,利用双抗夹心免疫酶联吸附试验(ELISA)法测定血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 1 β (IL-1 β) (试剂盒购于美国 Rapid Bio Lab)。用鲎试剂的合成基质偶氮显色法测定血清内毒素(试剂盒购于上海医化所);用日立 7600-020 全自动生化分析仪检测血清胆红素(TB),碱性磷酸酶(AKP),谷丙转氨酶(ALT);Sysmex SF-3000 全自动血细胞分析仪检测白细胞数及其分类。

1.3.2 胆管组织病理检查 术后 24 h 各组随机处死 1 只犬,取胆管组织置于 10% 甲醛溶液中固定 24 h 后常规石蜡切片,HE 染色,光学显微镜下观察。1 周后处死所有实验犬,以同样方法进行病理学观察。

1.4 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 State 8.0 软件行方差分析和配对 Student *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 一般情况

对照组犬麻醉苏醒后即可进食,活动量稍有减少,24 h 后一般情况与手术前无明显差异,1 周后活动基本恢复正常。造模组犬麻醉苏醒后进食量与活动量均明显减少,术后 24 h 开始出现尿色深黄,精神萎靡;1 只犬 48 h 后开始出现不进食,出现烦躁不安、躁动等表现。

2.2 血清 TNF- α , IL-1 β 和内毒素水平

术前两组犬血清 IL-1 β , TNF- α 和内毒素水平差异无显著性 ($P > 0.05$)。造模组术后血清 IL-1 β , TNF- α 和内毒素水平随着时间的延长而逐渐升高;对照组无明显变化 ($P > 0.05$)。术后各时点造模组上述 3 指标水平均明显高于对照组 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 两组手术前后血清 TNF- α , IL-1 β 和内毒素水平 ($\bar{x} \pm s$)

分组	IL-1 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	内毒素 (EU/mL)
对照 ($n=5$)			
术前	89.60 \pm 6.50	117.60 \pm 4.50	0.28 \pm 0.01
术后 24 h	97.20 \pm 4.87	126.80 \pm 8.56	0.28 \pm 0.02
48 h	102.80 \pm 5.26	146.00 \pm 13.49	0.28 \pm 0.02
72 h	115.20 \pm 14.41	151.60 \pm 16.35	0.29 \pm 0.01
7 d	112.40 \pm 13.61	150.20 \pm 29.69	0.29 \pm 0.01
造模 ($n=5$)			
术前	91.00 \pm 6.63	113.00 \pm 16.27	0.27 \pm 0.03
术后 24 h	140.75 \pm 28.85 ¹⁾	146.50 \pm 7.46 ¹⁾	0.37 \pm 0.03 ¹⁾
48 h	169.00 \pm 14.17 ¹⁾	190.00 \pm 23.45 ¹⁾	0.43 \pm 0.04 ¹⁾
72 h	178.50 \pm 7.42 ¹⁾	266.25 \pm 41.01 ¹⁾	0.48 \pm 0.05 ¹⁾
7 d	194.75 \pm 11.70 ¹⁾	340.25 \pm 43.63 ¹⁾	0.53 \pm 0.02 ¹⁾

注:1)与对照组同时点比较, $P < 0.05$

2.3 白细胞及其分类

术前两组犬外周血白细胞水平差异无显著性 ($P > 0.05$), 术后两组外周血白细胞水平均随着时间的延长而逐渐升高 ($P < 0.05$), 其中造模组外周血白细胞数及其分类比例在各时点明显高于对照组 ($P < 0.05$) (表 2)。

2.4 血清 TB, AKP 和 ALT 水平

两组犬术前血清 TB, AKP 和 ALT 水平差异无显著性 ($P > 0.05$), 术后对照组血清 TB, AKP 和 ALT 水平与术前差异亦无显著性 ($P > 0.05$)。造模组术后血清 TB, AKP 和 ALT 水平随着时间的延长逐渐升高, 且在各时点明显高于对照组 ($P < 0.05$) (表 3)。

2.5 病理改变

术后 24h 病理可见, 造模组犬胆管呈急性炎

症表现,而对照组犬胆管仅表现为轻微的炎症(图1-2)。1周后解剖实验动物,肉眼可见对照组犬胆总管周围无明显炎症病灶,造模组犬胆管局部有脓苔;病理显示造模组胆管呈大范围的炎性坏死,而对照组犬较前无显著病理变化(图3-4)。

表2 两组手术前后白细胞水平变化($\bar{x} \pm s$)

分组	白细胞数($\times 10^9/L$)	中性粒细胞
对照($n=5$)		
术前	11.22 ± 2.30	0.762 ± 0.030
术后24 h	13.35 ± 2.70	0.790 ± 0.034
48 h	15.17 ± 4.10	0.808 ± 0.042
72 h	16.11 ± 4.10	0.788 ± 0.031
7 d	17.97 ± 6.60	0.786 ± 0.043
造模($n=5$)		
术前	11.03 ± 1.10	0.740 ± 0.045
术后24 h	36.94 ± 7.60 ¹⁾	0.842 ± 0.048 ¹⁾
48 h	34.92 ± 5.40 ¹⁾	0.855 ± 0.026 ¹⁾
72 h	34.98 ± 2.70 ¹⁾	0.865 ± 0.037 ¹⁾
7 d	36.60 ± 2.50 ¹⁾	0.873 ± 0.026 ¹⁾

注:1)与对照组同时点比较, $P < 0.05$

表3 两组手术前后血清TB,AKP和ALT水平($\bar{x} \pm s$)

分组	TB($\mu\text{mol/L}$)	AKP(U/L)	ALT(U/L)
对照($n=5$)			
术前	6.98 ± 1.03	85.60 ± 19.70	43.20 ± 9.90
术后24 h	6.32 ± 2.74	84.40 ± 17.90	56.00 ± 12.60
48 h	6.36 ± 2.71	85.40 ± 17.40	57.40 ± 10.80
72 h	6.86 ± 2.92	85.60 ± 12.00	59.00 ± 10.50
7 d	6.58 ± 2.87	91.60 ± 16.70	52.00 ± 11.70
造模($n=5$)			
术前	6.98 ± 1.03	87.80 ± 21.70	46.25 ± 31.70
术后24 h	19.30 ± 7.72 ¹⁾	160.00 ± 64.00 ¹⁾	88.00 ± 14.80 ¹⁾
48 h	20.92 ± 7.06 ¹⁾	468.00 ± 61.50 ¹⁾	170.50 ± 47.50 ¹⁾
72 h	26.55 ± 8.39 ¹⁾	915.50 ± 88.10 ¹⁾	250.50 ± 41.20 ¹⁾
7 d	29.43 ± 7.53 ¹⁾	959.70 ± 68.00 ¹⁾	294.30 ± 48.80 ¹⁾

注:1)与对照组同时点比较, $P < 0.05$

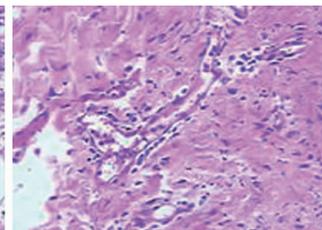
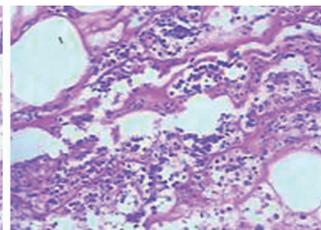
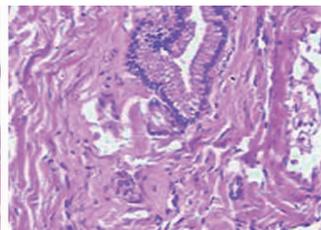
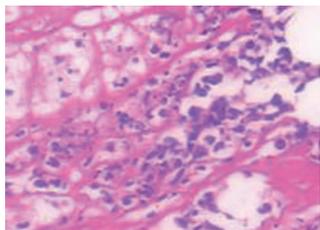


图1 术后24 h造模组犬胆管组织HE染色($\times 400$) 图2 术后24 h对照组犬胆管组织HE染色($\times 400$) 图3 术后1周造模组胆管组组织HE染色($\times 400$) 图4 术后1周对照组胆管组组织HE染色($\times 400$)

3 讨论

ACST的发病机制是,胆管梗阻后胆道系统内压力上升,胆汁分泌减少,胆汁淤滞,细菌大量繁殖引起胆管内化脓性感染。因此认为梗阻与感染是重症胆管炎发病中的两个主要因素。

以往建立ACST动物模型主要有直接注菌法、完全或不完全梗阻模型法以及可复性模型法等。直接注菌法,即单纯向胆管内注入细菌^[1]。此类方法仅模拟了“感染”的单一因素,造模效果差。尔后大多采用的是建立胆道完全梗阻模型并注入细菌^[2-3]或内毒素^[4]。这类方法造模效果可靠,病理改变明显,但创伤重,并发症、病死率高,有时在行进一步研究时需进行二次手术解除梗阻,增加了操作难度。因此,有学者在这一基础上改进为不完全梗阻性胆管炎模型^[5],即置管后

利用硅胶管的支撑作用适度结扎胆总管形成不完全梗阻。在梗阻性黄疸的实验研究方面,智绪亭等^[6]提出了可复性的梗阻性黄疸动物模型,即通过在胆总管后壁置一带有丝线的乳胶管并戳孔引出体外控制梗阻与再通。此类模型更接近临床,与梗阻性黄疸时病理变化一致,可用于ACST的实验研究。但此种方法不易控制梗阻程度且增加额外的感染机会。目前的胆管炎动物模型多采用大鼠和兔,与人的饮食结构不同,且胆道结构存在较大差异;而且此类动物的胆总管较短,胆管壁菲薄,置管困难且在胆道高压力的情况下容易发生胆瘘。也有报道应用马等大型动物制作模型^[7]。但这类动物实验价昂,不易大规模开展。本实验采用犬制作ACST模型,犬与人类的解剖结构和生理相近,易于操作。实验中通过先置入T管,然后结扎胆总管远端,再向T

管内注射细菌,成功制作3 ACST 犬模型。此方法造模可靠、置管妥善、易于控制梗阻,更接近于临床。本实验术后24 h造模组犬均开始表现出不同程度的发热(或体温 $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$)、食欲不振、呕吐、精神萎靡等症状,黄疸不明显,胆管病理呈急性炎症表现。1周后解剖实验动物可见胆管局部有脓苔,病理显示炎性坏死,结合其他指标证明造模确切。

本实验将炎症因子TNF- α , IL-1 β 与血清内毒素作为主要观察指标。因为该3指标在ACST的发展过程中起着重要作用。细菌感染时,可刺激单核巨噬细胞产生并释放大量TNF- α ^[8-9]。TNF- α 能促进炎症细胞黏附、游走、浸润及中性粒细胞脱颗粒,同时也通过自分泌方式作用于单核巨噬细胞本身而释放炎症介质加剧炎症反应^[10]。IL-1 β 也是促炎细胞因子,是在全身炎症反应中起核心作用的细胞因子^[11]。内毒素是革兰阴性细菌细胞壁的脂多糖成分,可以刺激某些效应细胞产生多种活性因子^[12-13]。此外,内毒素已被证明与梗阻性黄疸时的多种并发症和免疫功能不全有关^[14]。

本实验结果显示,对照组犬术后24h除出现短暂的活动量减少外,一般状况与手术前无明显差异;而造模组犬术后一般情况差或很差,其各时点的体温明显高于对照组($P < 0.05$)。这是由于对照组未造成梗阻亦未注射细菌,故症状较轻,术后恢复快,仅表现为手术引起的暂时性体温升高;而造模组因梗阻并注入细菌引起炎症反应而出现不同程度的ACST症状。术后两组血清IL-1 β , TNF- α 和内毒素水平随着时间的延长而逐渐升高,术后各时点造模组血清3指标水平明显高于对照组($P < 0.05$)。这是因为对照组随着手术性炎症的逐渐减轻,其炎症因子在短暂升高后下降并保持在一个较低的水平;同时也因为对照组不存在持续性感染,故内毒素一直处于较低水平。造模组因为革兰阴性菌持续释放内毒素,肠道菌群异位等原因以及梗阻的存在,内毒素反流入血,导致血清内毒素水平逐渐升高。造模组血清TB, AKP和ALT水平显著高于对照组($P < 0.05$)。这可能与胆道梗阻,胆道压力升高,细菌及内毒素反流造成肝脏损伤有关。造模组犬胆管病理于术后24h即呈急性炎症表现,而对照组仅表现为轻微的炎症;1周后造模组胆管显示大范围的炎性坏死,而对照组较前无显著病理变化。

研究表明,本模型基本能反映ACST的发病过程,制作简单可靠,易于控制,对ACST的实验性研究有一定的价值。本实验中胆总管远端仍选择结扎处理,解除梗阻后还不能恢复正常的生理结构。若进一步对T管工艺加以改进,可望建立能够恢复正常胆汁流通的可控性胆管炎模型。对此还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 苗雄鹰, 庄赞根. 茵陈胆道汤治疗急性胆管炎的实验研究[J]. 中西医结合外科杂志, 2000, 6(6): 406 - 408.
- [2] White JS, Hoper M, Parks RW, *et al.* Patterns of bacterial translocation in experimental biliary obstruction [J]. J Surg Res, 2006, 132(1): 80 - 84.
- [3] Gong GP, Wu CX, Liu CA. Liver sinusoidal endothelial cell injury by neutrophils in rats with acute obstructive cholangitis [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(2): 342 - 345.
- [4] Yoshida M, Yamamoto N, Nitta T, *et al.* Suppression of proliferative cholangitis by E2F decoy oligodeoxynucleotide [J]. J Surg Res, 2002, 102(2): 95 - 101.
- [5] 寇丽, 薛承锐, 齐清会. 大鼠急性不完全梗阻性胆管炎模型的建立[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2005, 11(2): 138 - 140.
- [6] 智绪亭, 李兆亭, 寿楠海, 等. 两种梗阻性黄疸实验模型的比较研究[J]. 普外基础与临床杂志, 1996, 3(2): 71 - 73.
- [7] Davis JL, Jones SL. Suppurative cholangiohepatitis and enteritis in adult horses [J]. J Vet Intern Med, 2003, 17(4): 583 - 587.
- [8] 姚咏明, 黎沾良. 脓毒性休克与细胞因子[J]. 中国实用外科杂志, 2000, 20(7): 433 - 435.
- [9] Stewart L, Oesterle AL, Grifiss JM. Cholangitis: bacterial virulence factors that facilitate cholangiovenous reflux and tumor necrosis factor-alpha production [J]. J Gastrointest Surg, 2003, 7(2): 191 - 198.
- [10] Gompertz S, O'Brien C, Bayley DL. *et al.* Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis [J]. Eur Respir J, 2001, 17(6): 1112 - 1119.
- [11] Chiang SR, Tang HJ, Chang PC, *et al.* Synergistic antimicrobial effect of cefotaxime and minocycline on proinflammatory cytokine levels in a murine model of *Vibrio vulnificus* infection [J]. Microbiol Immunol Infect, 2007, 40(2): 123 - 133.
- [12] 陈钟, 李根喜, 丁义涛. 生物人工肝系统治疗对急性肝衰竭犬血清内毒素的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(12): 905 - 907.
- [13] Menten BB, Tatliciglu E, Akyol G, *et al.* Intestinal endotoxins as co-factors of liver injury in obstructive jaundice [J]. HPB Surg, 1996, 9(2): 61 - 69.
- [14] 孟莹. 一氧化氮和内毒素在梗阻性黄疸致病机制方面的作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006, 15(5): 536 - 539.