

DOI: 10.13376/j.cblls/2020079

文章编号: 1004-0374(2020)06-0641-08

慢性胰腺炎动物模型的比较与选择

魏圆圆¹, 许小凡², 段丽芳¹, 张红^{1,2*}

(1 陕西中医药大学基础医学院, 西安 712046; 2 陕西中医药大学医学科研实验中心, 西安 712046)

摘要: 慢性胰腺炎 (chronic pancreatitis, CP) 是一种慢性消化系统疾病, 主要病理表现为胰腺的慢性炎症, 最终以纤维化替代胰腺的正常组织, 导致胰腺的内、外分泌功能损伤。近年来, 为了深入研究 CP 的发病机制, 研究人员开展了大量动物实验研究, 涉及多种动物模型。选择合适的动物模型对开展后续的实验研究具有重要的意义。现从造模的方式入手, 比较多种常用的 CP 动物模型, 为 CP 研究过程中模型的选择提供依据。

关键词: 慢性胰腺炎; 动物模型; 非侵入性; 侵入性; CP 相关的模式动物

中图分类号: R-332; R576 **文献标志码:** A

Comparison and selection of animal models of chronic pancreatitis

WEI Yuan-Yuan¹, XU Xiao-Fan², DUAN Li-Fang¹, ZHANG Hong^{1,2*}

(1 Basic Medical Department, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China;

2 Medical Research Experimental Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

Abstract: Chronic pancreatitis (CP) is a common digestive disease. Its pathological manifestation shows like chronic inflammation of the pancreas, eventually replacing the normal pancreatic tissue with fibrosis, resulting in disorder of endocrine and exocrine functions of pancreas. In order to understand the pathogenesis of CP comprehensively, a large number of animal experimental studies have been carried out, involving a variety of animal models in recent years. It is very meaningful to choose the appropriate animal model for the subsequent experimental research. This article focuses on the modeling methods of CP by comparing the characteristics of various CP animal models, and hopes to provide evidences for selecting models in the CP research.

Key words: chronic pancreatitis; animal model; non-invasive; invasive; CP-related model animals

慢性胰腺炎 (chronic pancreatitis, CP) 是一种进行性的胰腺纤维化炎症综合征, 可造成胰腺实质损伤或产生持久的应激反应。CP 的主要表现为: 胰腺腺泡萎缩、纤维化、内外分泌功能减弱以及腹痛等^[1]。CP 发病机制复杂, 目前尚未阐明。近年来为了深入研究 CP 的发病机制, 研究人员开展了大量的动物实验, 主要通过模拟人类 CP 的病因、病理生理变化来制作动物模型。

CP 动物模型的制作方法有多种, 主要归纳为非侵入性和侵入性以及模拟人类 CP 的模式动物。本文将比较各种常用 CP 动物模型的特点, 为慢性胰腺炎研究过程中动物模型的选择提供参考依据。

1 非侵入模型

非侵入模型是指不需要对动物实施手术, 操作过程相对简单的造模方法, 主要采用腹腔注射、饮食喂饲、静脉注射等方法将造模剂注入动物引发模型。

1.1 腹腔注射

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 反复发作被

收稿日期: 2020-02-09; 修回日期: 2020-03-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673816); 胰、肝疾病的分子机制及中医药防治创新团队项目(2019-YL14); 陕西省自然科学基金基础研究一般项目(2018JM7085)

*通信作者: E-mail: zhangh1227@163.com; Tel: 029-38183453

认为是 CP 发生的主要因素^[2-4], AP 患者经过治疗可以恢复胰腺的结构和功能,但是 AP 的反复发作却能放大胰腺损伤和炎症的程度,使胰腺的修复过程中断,促进 CP 的发展^[5]。各种造模剂多次腹腔注射就是基于 AP 反复发作可以向 CP 转化而采用的造模方式,常用的可以导致 CP 的造模剂主要有:雨蛙素(Caerulein)、L-精氨酸(L-Arginine)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、乙醇和环孢素 A(cyclosporin A, CsA) 等。

在非侵入模型中,重复注射 Caerulein 是最常用的方法^[6-7]。Bansod 等^[8]采用瑞士白化小鼠,以每天 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的剂量,腹腔注射 6 次 Caerulein,每次间隔 1 小时,3 天/周,持续重复 3 周可以成功诱导 CP 动物模型。组织学研究显示,胰腺中炎症细胞浸润和胶原沉积增加, α -平滑肌肌动蛋白 [α -smooth muscle actin, α -SMA; 胰腺星状细胞(pancreatic stellate cells, PSCs)活化的标志物]、I 型胶原 $\alpha 2$ (collagen type I $\alpha 2$, COL1A2)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)的表达增加。此种方法在 C57BL/6 小鼠中也可成功诱发 CP 模型^[9-10],但 Ulmasov 等^[11]通过对比 Jackson 实验室的 B6J 亚株和来自 Harlan 实验室的 B6N 亚株发现,与 B6N 小鼠相比, B6J 小鼠表现出更严重的胰腺萎缩、腺泡细胞结构的破坏和炎症细胞的浸润。

Caerulein 主要用于大、小鼠 CP 模型的复制,虽然 Caerulein 注射的时间和剂量在不同文献的报道中稍有不同^[9-10],但最常用的注射剂量是 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,腹腔注射 6 次/天,每次间隔 1 小时,3 天/周,共 6~10 周^[7]。为了增加 CP 的严重程度,缩短成模时间, Caerulein 也常与其他的造模方式联合。Ahmadi 等^[12]采用 33% 的乙醇 (3 g/kg, 7 次/天, 1 天/周) 及 Caerulein (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 次/天, 6 天/周) 联合腹腔注射 6 周后发现,联合注射组比 Caerulein 单纯注射组表现出更严重的胰腺腺泡损伤,并且炎症细胞浸润和实质纤维化的程度增加;他们认为该模型的病理变化与酒精性慢性胰腺炎的初始阶段相似,适合模拟早期酒精性胰腺炎。Gómez 等^[13]采用 CsA (20 mg/kg) 腹腔注射 Wistar 大鼠连续 15 天,并且在第 1 天和第 8 天腹腔注射 Caerulein (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 4 次/天,每次间隔 1 小时,发现 15 天即可诱导出 CP 的相应病理改变。他们认为主要机制是: Caerulein 的短期过度刺激可导致胰腺腺泡细胞一过性萎缩,诱发胰腺的急性损伤引起 AP,但是这种胰腺腺泡细胞的改变具有自限性,即,停止 Caerulein 注射后胰腺腺

泡细胞的损伤可以恢复,而反复多次注射则会促进胰腺的损伤^[14]。CsA 可以导致转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β) 过表达以及肌成纤维细胞过度增殖,使 Caerulein 所引发的腺泡细胞自限性改变转化为慢性病变^[15]。

Arginine 是常用的复制 AP 动物模型的药物,近年来发现其反复多次腹腔注射也可以导致 CP 的发生^[7]。L-Arginine 的注射浓度和次数与模型的成败密切相关^[16]。Sun 等^[17]采用 15% 的 L-Arginine 分别按照 4 g/kg、4.5 g/kg 和 5 g/kg 的剂量腹腔注射 C57BL/6J 小鼠 (2 次,每次间隔 1 小时),发现几乎所有的 5 g/kg 组小鼠在第 2 次给药后不久死亡,4.5 g/kg 组小鼠多数在 1 天内死亡,而 4 g/kg 组小鼠第 2 次注射后虽行动迟缓,但 3 天后未见死亡,并出现了腺泡细胞坏死;由此推测, L-Arginine 的有效剂量和毒性剂量水平非常接近, 4g/kg 似乎是诱导小鼠 CP 的适宜剂量。Wang 等^[18]采用 8% 的 L-Arginine (4 g/kg) 腹腔注射 Balb/c 小鼠 2 次,每次间隔 1 小时,注射后 48 小时发现小鼠胰腺呈灰红色,有明显的粗糙感。镜下可见胰腺小叶和腺泡间隔增宽,并出现坏死和弥漫性出血,坏死面积达 20%;注射后 72 小时,小鼠胰腺可见大量白细胞浸润,坏死面积 >30%;但是注射后 7 天,大量小鼠死亡,存活率下降至 47.8%。而通过提高 L-Arginine 的浓度,减少腹腔注射的容积,可以降低小鼠的死亡率^[19]。Hu 等^[19]采用 12% 的 L-Arginine (4 g/kg) 腹腔注射 C57BL/6 小鼠 (2 次/天, 3 天/周, 共 7 周) 成功诱导出 CP 模型,动物的死亡率为 15%;而进一步采用 20% 的 L-Arginine (3.5 g/kg) 腹腔注射昆明小鼠 2 次,每次间隔 1 小时,72 小时可见小鼠胰腺腺泡细胞坏死、胰腺炎症及出血,该剂量 L-Arginine 每周重复注射,在造模后 4 周可引起胰腺炎细胞浸润及纤维化等慢性炎症改变^[20]。而且范建伟等^[21]研究发现, L-Arginine 诱导的昆明小鼠 CP 模型病变程度在不同性别中存在明显差异,雄性小鼠的胰腺损伤比雌性小鼠出现的更早、更严重;造模 2 周后,雌性小鼠仅见胰腺轻度水肿、少量炎细胞浸润,而雄性小鼠则可见大量胰腺组织萎缩、坏死及炎细胞浸润,甚至还有少量胶原纤维的沉积,胰腺 α -SMA、FN 的表达水平也明显高于同一时间点的雌性小鼠。由此可知,采用 L-Arginine 复制 CP 模型应使用同性别小鼠,且雄性小鼠更适用于 L-Arginine 复制 CP 动物模型。

LPS 常与乙醇协同使用以增加胰腺的损伤程

度, 也被用于研究酒精性 CP 的发病机制^[17,22]。有学者为了模拟长期酗酒导致的 CP, 采用 25% 乙醇代替 SD 大鼠的饮水, 12 周后腹腔注射 2 mg/kg LPS, 发现胰腺出现明显的纤维化, 因此, LPS 和乙醇联合应用已被作为一种建立大鼠 CP 模型的常用方法, 但该方法是否可以导致小鼠 CP 尚不清楚^[23-24]。Sun 等^[25]给 SD 大鼠喂饲含乙醇的液体饲料 (15 g·kg⁻¹·d⁻¹, 占总热量的 36%) 共 10 周, 在第 8 周时, 尾静脉分别注射生理盐水或 LPS (3 mg/kg), 连续 3 周, 结果发现: 乙醇喂饲结合尾静脉注射生理盐水组大鼠胰腺仅有少量的胰腺星状细胞 (PSCs) 活化, I 型胶原 $\alpha 1$ (COL1A1) 的表达和纤维化水平均较低, 提示单纯饮酒并不易导致明显的胰腺损伤; 而联合 LPS 注射后则明显可见胰腺胶原沉积增加、胰腺纤维化, COL1A1 含量、PSCs 活化的数量以及血清 TGF- $\beta 1$ 水平升高, 提示 LPS 可能通过提高炎症反应促进酒精性胰腺炎的进展。

1.2 饮食喂饲

在西方国家, 流行病学研究显示, 长期酗酒是引发 CP 的最常见病因^[26], 但仅给小鼠饮用 25% 乙醇 4 个月并不能导致慢性胰腺炎样的病理损伤。因此, 在啮齿类动物中, 乙醇可能通过加重胰腺炎的严重程度而更适合作为其他 CP 造模方法的佐剂^[23]。高浓度的乙醇及其代谢产物可能通过增加胰腺腺泡细胞内钙超载导致细胞中的酶活性增加^[27-28]。Yuvaraj 和 Geetha^[29]给雄性白化大鼠喂饲与普通饲料等热量、含 36% 乙醇的饮食, 结合腹腔注射低剂量 Caerulein (20 μ g/kg, 3 次/周) 3 周, 发现大鼠胰腺损伤的同时, 血清中脂肪酶/淀粉酶比值、氧化应激指数和胰腺还原型谷胱甘肽/氧化谷胱甘肽比值都有所升高, 因此认为该方法适合诱导大鼠的酒精性 CP 模型。Vonlaufen 等^[30]采用静脉注射 LPS (3 mg/kg, 1 次/周), 结合含乙醇的液体饲料 (占总热量的 36%) 喂饲 SD 大鼠 10 周, 发现大鼠胰腺腺泡细胞坏死, 炎细胞浸润, 并有胰腺纤维化发生。切换到正常饮食 3 天后, 可见胰腺纤维化部分消退; 正常饮食 7 天后, 活化的 PSCs 发生凋亡, 数量急剧减少, 胰腺的纤维化完全消退。而对于持续饮酒大鼠, 其胰腺活化的 PSCs 数量则没有减少, 维持原有的数量, 提示乙醇可能具有抑制活化的 PSCs 凋亡的作用。

此外, Ida 等^[31]采用 C57BL/6J 小鼠, 先禁食 24 小时, 继而给予 100% 胆碱缺乏乙硫氨酸补充 (choline deficient ethionine-supplemented, CDE) 饲料

喂养 72 小时, 常规饲料喂养 72 小时, 7 天为一个周期, 经饲喂 24 个周期后观察到慢性胰腺炎的病理改变, 如腺泡细胞萎缩、腺泡导管化生 (acinar to ductal metaplasia, ADM) 和纤维化形成。而 Nadella 等^[32]使用了改良的 75% CDE 饲料, 该饲料毒性较小, 不会导致胰腺坏死, 持续喂养 18 周后发现小鼠可出现胰腺水肿、ADM 及纤维化。

1.3 静脉注射

Cui 等^[33]给予 Wistar 大鼠二丁基二氯化锡 (dibutyltin dichloride, DBTC) (7 mg/kg) 尾静脉注射 4 周后发现, 大鼠胰腺可见炎细胞浸润、胰腺腺体萎缩及纤维化等明显的 CP 病理学变化。DBTC 诱发 CP 的机制主要包括两个方面^[34], 一是 DBTC 可以导致胆管上皮损伤和胆管堵塞, 继而引发胆汁淤积, 造成胆源性胰腺炎和胰腺的坏死; 二是可以影响胰腺腺体的血液供应导致腺泡细胞损伤。Zhang 等^[35]结合 DBTC 的脂溶性及其对腺泡细胞的直接损害作用, 给小鼠进行一次性尾静脉注射 DBTC, 同时每天喂饲含 10% 乙醇的饮水, 观察到小鼠先表现为 AP, 血清淀粉酶水平升高, 随后进展为 CP, 出现了胰腺导管扩张、纤维化以及巨噬细胞和 T 细胞浸润。此模型模拟了两种 CP 的主要病因: 乙醇摄入和导管梗阻, 观察到了胰腺从急性到慢性的损伤变化。

2 侵入性模型

侵入性方法主要包括胰腺导管结扎和导管逆行性注射, 其原理主要是基于导管堵塞可引起胰液排泄障碍、胰管高压、胰液溢出, 致使胰酶在胰腺异常活化, 从而引起 CP 的发生^[16]。

2.1 导管结扎

导管结扎在大小鼠中均被用于诱导 CP 模型^[14,24]。然而, 由于啮齿动物胰腺解剖结构存在较大差异, 所致模型的程度和范围并不一定完全一致。如小鼠胰腺由三个叶组成, 且每个叶均有单独的导管, 可排出胰液^[34]。因此, 结扎导管时可能只影响动物胰腺的一部分, 而剩余部分可以作为对照。该造模方法对小鼠胰腺内外分泌功能影响较小, 可以进行长期研究^[8]。而大鼠只有一个主胰管, 主胰管发生阻塞后可直接造成整个胰腺的损伤^[14]。舒健等^[36]采用西双版纳小型猪分离主胰管后, 以双股 3.0 号聚丙烯线进行结扎, 聚丙烯线溶解后可造成超过 75% 以上的主胰管狭窄, 在 5 周左右可诱导慢性阻塞性胰腺炎模型, 但是其成功率仅为 68.2%, 分析其原

因可能与此模型中所用的小型猪个体差异大,致使主胰管的结扎程度不均有关。

胰管结扎法也与其他方法一起用于复制 CP 模型。Sendler 等^[24]发现,在 C57BL/6 小鼠结扎胰管后,结合一次性腹腔注射超大剂量的 Caerulein (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 21 天后即可诱导出明显的 CP 改变,且该模型比使用相同剂量 Caerulein 腹腔注射 (2 次/周,共 10 周)表现出更严重的胰腺纤维化,胰腺组织明显减少。这种方法只需一次操作,但是可以导致胰腺进行性损伤,引起 PSCs 活化,诱导大量细胞外基质沉积,促进胰腺纤维化的形成。但该模型在注射 Caerulein 后 48 小时内死亡率为 10%~15%^[37]。

2.2 导管逆行性注射法

2% 三硝基苯磺酸 (trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS) 胰管逆行注射不仅可以诱导 CP 模型,导致胰腺进行性纤维化损伤、导管狭窄、腺体萎缩^[38],而且能诱导腹部超敏反应,常被用作诱导持续性胰腺疼痛的模型^[38-41]。Bai 等^[40]采用 2% TNBS,以 50 mmHg 的压力在 2~5 min 内对 SD 大鼠的胰管进行逆行注射,并保持压力 30 min,关腹后 21 天不仅观察到与人类 CP 相似的病理改变,而且表现出明显的机械性痛觉过敏。而采用相同的造模方法发现, TNBS 注射 3 天后,大鼠胰腺可见急性炎症表现,5 周后则可见大量胰腺腺泡萎缩甚至消失,导管周围和小叶内纤维化以及间质增生^[42]。王兴鹏等^[43]分别采用 0.4 mL 的 1%、2%、4% TNBS 经恒流输液泵在 60 min 内对 SD 大鼠的胰管进行逆行注射,然后保持 10 min,发现采用 2% TNBS 注射后胰腺立即出现组织水肿、出血和局灶坏死;4 周后胰腺表面出现不规则结节,胰尾组织明显萎缩;在第

5~7 周时胰腺纤维化更加明显,大鼠死亡率为 12%。而采用 4% TNBS 胰管内注射在第 4 周就可见到胰腺组织高度纤维化,但大鼠死亡率高达 75%。而降低 TNBS 的浓度,则可减少动物的死亡率。如采用 1% TNBS 胰管内注射,大鼠死亡率为 0,但是第 7 周时也仅见到胰腺组织轻度纤维化。

此外, Unal 等^[44]使用胰岛素注射器将 1 mL 的 48% 乙醇注入 Wistar 大鼠的胆总管中,将胆总管暂时用 1/0 丝线结扎以防止乙醇逆行泄漏,输注后第 3 天成功诱导 AP 模型,第 7 天即可获得 CP 模型,成功率为 100% 且无并发症和死亡。而通过将 Wistar 大鼠胰管插管一端垂直抬高,可导致持续性胰管高压来诱导 CP,2 周内几乎所有的大鼠都可观察到胰腺实质性损害并伴有纤维化,动物的死亡率亦低于 5%,但考虑到高昂的设备维护费用及动物的实际状态,此模型很难维持 3 周,可能不适于进行长期研究^[45]。

前文所述几种 CP 造模方式各有优缺点,现总结为表 1。

3 CP 相关的模式动物

CP 相关的模式动物近年来已经成为 CP 发病机制研究的热点,其主要围绕四个方面的发病机制进行诱导:胰蛋白酶原激活、自噬受损、炎症通路激活及其他。

3.1 胰蛋白酶原激活

胰蛋白酶的异常活化与 AP 和 CP 发病均密切相关,胰蛋白酶在胰腺中的活性过高会导致腺泡细胞损伤和炎症反应^[46]。多项研究认为,AP 的发生和随后 CP 的进展通常受到编码消化蛋白酶或其抑

表1 几种CP造模方式的优缺点比较

造模方式	优点	缺点
腹腔注射Caerulein	操作方法简单,成模率稳定,模型的病理改变与人类CP相似	价格昂贵,造模成本较高
腹腔注射L-Arginine	操作方法简便,价格较为经济,模型的病理改变与人类CP相似	L-Arginine的有效剂量与毒性剂量非常接近;不同种属小鼠造模后病变程度存在差异
CED饮食饲喂	比腹腔注射模型操作更加简单	CDE饮食较昂贵,长期饲喂成本较高;动物摄入CDE饮食的量难以监测,模型的均一性不够稳定
静脉注射DBTC	造模时间相对较短,且能观察到胰腺从急性到慢性的损伤变化过程	DBTC对肝胆有毒性损伤;且DBTC需溶于有机溶剂,如尾静脉注射速度过快,易致动物出现肺栓塞,致死率可达30%,因此,对操作者的技术要求较高
导管结扎与导管逆行性注射	在短时间内即可引起严重的胰腺损伤,导致明显的CP改变	需开腹寻找胰管,而胰管通常较为细小,因此,对手术操作要求高,动物死亡率较高

制剂的相关基因调控^[47]。与胰蛋白酶原激活相关的基因有: 阳离子胰蛋白酶原 (recombinant protease serine 1, PRSS1)、糜蛋白酶 C (chymotrypsin C, CTRC) 和丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal1 型 (serine protease inhibitor Kazal type 1, SPINK1) 等^[47]。

2018年, Geisz 和 Sahin-Toth^[48] 构建了内源性 PRSS1 (T7 亚型) 激活肽中携带杂合子 p.D23A 突变的小鼠 (T7D23A 小鼠), PRSS1 突变体对胰蛋白酶原的激活比野生型增加了 50 多倍, 该小鼠表现为胰腺内胰酶过度激活。T7D23A 小鼠早期可见自发性 AP, 随后出现进行性萎缩性 CP, 伴有腺泡细胞丢失、纤维化、导管扩张和脂肪替代。Huang 等^[49] 利用完整弹性蛋白酶启动子驱动野生型 PRSS1、突变体 p.R122H 在小鼠胰腺内表达, 建立了 PRSS1 转基因小鼠和 PRSS1^{R122H} 转基因小鼠, 发现这两种转基因小鼠的胰腺均可见到点状炎症损伤, 但 PRSS1^{R122H} 小鼠的胰腺损伤更加明显, 表现为各种炎性细胞浸润增加; 而采用 LPS (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 次/周, 共 2 周) 腹腔注射发现, PRSS1^{R122H} 小鼠的胰腺重量显著减轻, 慢性炎症改变比 PRSS1 小鼠更为明显, 内质网应激和氧化应激反应相关基因表达增加。在乙醇喂养或高脂饮食后, PRSS1^{R122H} 小鼠也表现出比 PRSS1 小鼠更严重的 CP。鉴于乙醇和高脂饮食是 CP 发病的常见病因, PRSS1^{R122H} 小鼠可作为人类遗传性胰腺炎模型, 并可用于研究 LPS、乙醇或高脂饮食诱导胰腺炎的机制。

已知通过降解胰蛋白酶、糜蛋白酶可以减少酶的激活, 对胰腺起到保护作用, 而酶的降解失常则与 AP 和 CP 有一定关系, 如 CTRC 基因的功能缺失性突变作为 CP 常见的危险因素^[47], 可使糜蛋白酶分泌减少、活性减弱, 导致胰蛋白酶过度激活。研究表明, C57BL/6N 小鼠的 CTRC 基因外显子 2 的单核苷酸缺失将导致不能表达功能性 CTRC。而恢复一个功能性 Ctrc 位点 (Ctrc+ 小鼠), 并通过腹腔注射 Caerulein (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 6 次/天, 2 天/周, 共 10 周) 来诱导 CP, 结果发现: 与 C57BL/6N 对照组相比, Ctrc+ 小鼠胰腺萎缩、纤维化症状明显减轻; 测定 Ctrc+ 和 C57BL/6N 小鼠胰蛋白酶和糜蛋白酶的活性发现, 与 C57BL/6N 对照组相比, Ctrc+ 小鼠胰蛋白酶活性显著降低^[47]。

研究表明, SPINK1c.194+2T>C 突变是中国特发性 CP 患者中最常见的基因突变^[50]。2020年, Sun 等^[51] 采用 Caerulein (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5 次) 腹腔注射出生 7 周后的杂合 Spink1c.194+2T>C 突变小鼠

(Spink1^{+/-} 小鼠), 发现 Spink1^{+/-} 小鼠在 9 周时出现胰腺腺泡萎缩和炎细胞浸润、PSCs 活化、ADM 及胰腺纤维化等 CP 病理特征, 且部分 Spink1^{+/-} 小鼠在出生 13 周左右也能自发性发展为 CP。

3.2 自噬受损

自噬是真核细胞捕获细胞内蛋白质、脂质等大分子物质, 并将其送至溶酶体进行降解的过程^[52]。自噬紊乱与胰腺炎有一定的关系, 自噬相关基因的改变可以引发 CP 样的病理改变^[53]。

Gukovsky 和 Gukovskaya^[54] 将 floxed Atg5^{F/F} 小鼠和 Ptf1a-Cre 小鼠杂交, 构建了特异性胰腺 Atg5 缺失的小鼠 (简称 A5 小鼠), 发现小鼠在 4 到 16 周龄时可进展为 CP, 并且发现雄性小鼠比雌性小鼠表现出更加严重的 CP。Diakopoulos 等^[55] 的研究发现, 不同性别的 A5 小鼠在 4 周龄时没有明显差异, 但是到 36 周龄时雌性小鼠的胰腺只有轻微的炎症, 内分泌的形态和功能基本正常, 而雄性小鼠的胰腺出现了明显的炎症和纤维化, 以及严重的胰岛破坏和高血糖。以上研究结果提示: A5 小鼠的胰腺再生可能是性别依赖性的, 自噬损伤对雌性胰腺的影响较小。这些发现与临床上男性人群中 CP 患病率较高相类似^[56]。此外, Antonucci 等^[57] 构建了胰腺 Atg7 基因敲除的小鼠 (Atg7 ^{Δ Pan}), 在 4 到 12 周龄也发现了 CP 的病理改变, 甚至比 A5 小鼠表现出更严重的腺泡细胞变性、胰腺炎症、广泛纤维化以及 ADM 形成。但是, 在人类中, 无论什么性别的 CP 患者, 其胰腺组织中 ATG5 的外显子序列均没有发现任何与 CP 相关的基因改变^[55]。

3.3 炎症通路的激活

近年来的大量研究提示, 转录因子核因子 $-\kappa\text{B}$ (nuclear factor kappa-B, NF- κB) 过度活化与 AP 和 CP 的发生发展密切相关^[58], 针对 NF- κB 通路的转基因小鼠常被用于诱发 CP 模型。Daniluk 等^[59] 将 LSL-K-RasG12D 小鼠与 CreERT 小鼠杂交得到双转基因小鼠 (acinar-Ras 小鼠), 采用 Caerulein (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 进行短暂处理 (0.5、1、3 小时) 后发现, 短期内 acinar-Ras 小鼠与对照组小鼠无明显差异, 但是对照组小鼠在 1 周内胰腺外观恢复正常, 而 acinar-Ras 小鼠表现出胰腺炎症持续发展、腺泡丢失等 CP 症状。对于在胰腺腺泡细胞中表达致癌的 Ras 但缺乏 IKK2 基因 (acinar-Ras-IKK^{fl/fl}) 的小鼠, 采用 Caerulein 进行短暂处理后发现, IKK2 缺失的小鼠胰腺纤维化、炎症程度、活性 Ras 水平均显著降低。因此, NF- κB 活性的降低可抑制 Ras 活性的增加, 降低胰

腺癌变的风险。Huang 等^[60]为了观察腺泡细胞中 NF- κ B 在胰腺炎中的作用,采用 LSL-p65 小鼠(含有 p65 的全长互补 DNA)和 LSL-IKK2 小鼠(将 IKK2 的 T 环中的 2 个保守的丝氨酸替换为谷氨酸产生 IKK2 转基因小鼠)分别与 CreERT 小鼠杂交,构建了 p65 过表达小鼠和 IKK2 过表达小鼠。在低剂量 Caerulein (50 μ g/kg, 5 次/天,腹腔注射 1 次/周,持续 5 周)的刺激下, p65 过表达小鼠可观察到胰腺局灶性慢性损伤,包括腺泡萎缩、持续性炎细胞浸润和纤维化,而 IKK2 过表达小鼠也观察到明显的 CP 病理表现。进一步通过 Ela-CreERT \times LSL-IKK2 \times LSL-p65 杂交获得 p65 与 IKK2 共表达转基因小鼠,发现其胰腺的损伤明显加重,并可见纤维化相关因子大量表达,提示腺泡细胞 NF- κ B 的活性与 CP 的严重程度相关。

3.4 其他遗传因素相关的CP模型

OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) 大鼠是从 Long-Evans 远交系大鼠种群中发现,通过筛选超重大鼠近交培育而成,该大鼠 CCK-A 受体的表达完全缺失^[61]。WBN/Kob 大鼠是从 Wistar 系的 WBN 大鼠近交培育得来^[62]。研究发现:WBN/Kob 大鼠和 OLETF 大鼠可以自发性出现与人类 CP 类似的症状^[63-64]。WBN/Kob 雄性大鼠在 12 周龄时自发出现 CP,表现为胰腺小叶间出血、水肿和炎细胞浸润,16 周龄时出血和水肿减少,表现为位于小叶内的结节状的纤维化,36 周龄时发生糖尿病。OLETF 雄性大鼠胰腺导管腔的形态改变、胰腺的组织学改变与胰管结扎组大鼠相同。31 周龄时 OLETF 大鼠表现为胰腺肿胀、胰岛萎缩和纤维化,腺泡空泡形成,外分泌实质丢失,小叶间却很少见到纤维化^[63-64],这与人类 CP “小叶间纤维化”的特征表现不同。

4 问题与展望

CP 病因复杂,其发病机制目前尚未阐明,现有的动物模型为人类 CP 研究提供了大量的实验证据。但是,由于动物与人类胰腺之间在解剖学和生理学上存在差异,在现有的大多数动物模型中,几乎没有单一的动物模型可以完全模拟人类 CP 的所有特征。考虑到 CP 发病的复杂性,今后或许可以将不同的造模方式结合起来,以模拟出更加符合人类 CP 特征的动物模型,这将极大推进 CP 的研究进展。

[参 考 文 献]

- [1] Whitcomb DC, Frulloni L, Garg P, et al. Chronic pancreatitis: an international draft consensus proposal for a new mechanistic definition. *Pancreatol*, 2016, 16: 218-24
- [2] Ahmed Ali U, Issa Y, Hagenaars JC, et al. Risk of recurrent pancreatitis and progression to chronic pancreatitis after a first episode of acute pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2016, 14: 738-46
- [3] Whitcomb DC, North American Pancreatitis Study Group. Pancreatitis: TIGAR-O version 2 risk/etiology checklist with topic reviews, updates, and use primers. *Clin Transl Gastroenterol*, 2019, 10: e00027
- [4] Sankaran SJ, Xiao AY, Wu LM, et al. Frequency of progression from acute to chronic pancreatitis and risk factors: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 2015, 149: 1490-500.e1
- [5] Choi JW, Lee SK, Kim MJ, et al. Piperine ameliorates the severity of fibrosis via inhibition of TGF β /SMAD signaling in a mouse model of chronic pancreatitis. *Mol Med Rep*, 2019, 20: 3709-18
- [6] Zhao JB, Liao DH, Nissen TD. Animal models of pancreatitis: can it be translated to human pain study? *World J Gastroenterol*, 2013, 19: 7222-30
- [7] Klauss S, Schorn S, Teller S, et al. Genetically induced vs. classical animal models of chronic pancreatitis: a critical comparison. *FASEB J*, 2018, 32: 5778-92
- [8] Bansod S, Khurana A, Godugu C. Cerulein-induced chronic pancreatitis in Swiss albino mice: an improved short-term model for pharmacological screening. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2019, 96: 46-55
- [9] Rastellini C, Han S, Bhatia V, et al. Induction of chronic pancreatitis by pancreatic duct ligation activates BMP2, apelin, and PTHrP expression in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 309: G554-65
- [10] Mrazek AA, Porro LJ, Bhatia V, et al. Apigenin inhibits pancreatic stellate cell activity in pancreatitis. *J Surg Res*, 2015, 196: 8-16
- [11] Ulmasov B, Oshima K, Rodriguez MG, et al. Differences in the degree of cerulein-induced chronic pancreatitis in C57BL/6 mouse substrains lead to new insights in identification of potential risk factors in the development of chronic pancreatitis. *Am J Pathol*, 2013, 183: 692-708
- [12] Ahmadi A, Nikkhoo B, Mokarizadeh A, et al. An optimised mouse model of chronic pancreatitis with a combination of ethanol and cerulein. *Cent Eur J Immunol*, 2016, 41: 54-63
- [13] Gómez JA, Molero X, Vaquero E, et al. Vitamin E attenuates biochemical and morphological features associated with development of chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287: G162-9
- [14] Lerch MM, Gorelick FS. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 2013, 144: 1180-93
- [15] Pallet N, Thervet E, Anglicheau D. c-Jun-N-terminal kinase signaling is involved in cyclosporine-induced epithelial phenotypic changes. *J Transplant*, 2012, 2012: 348604

- [16] Zhan X, Wang F, Bi Y, et al. Animal models of gastrointestinal and liver diseases. *Animal models of acute and chronic pancreatitis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 311: G343-55
- [17] Sun Y, Xing GM, Bai J, et al. A new mouse model of chronic pancreatitis in C57BL/6J strain that mimics the human pathology. *Pancreas*, 2014, 43: 148-50
- [18] Wang N, Zhang F, Yang L, et al. Resveratrol protects against L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis in mice by enhancing SIRT1-mediated deacetylation of p53 and heat shock factor 1. *Int J Mol Med*, 2017, 40: 427-37
- [19] Hu N, Shen Y, Liu F, et al. Morphological and immunobiochemical analysis of the liver in L-arginine induced experimental chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 2017, 17: 247-54
- [20] 张晓芹, 贾晓云, 史迎莉, 等. 灯盏花素通过抑制MCP-1的表达对L-精氨酸诱发重症急性胰腺炎小鼠的治疗作用研究. *中国现代医学杂志*, 2013, 23: 17-21
- [21] 范建伟, 许小凡, 辛嘉其, 等. 性别对L-精氨酸诱发的昆明小鼠慢性胰腺炎的影响. *中国病理生理杂志*, 2018, 34: 328-34
- [22] Li H, Xiu M, Wang S, et al. Role of gut-derived endotoxin on type I collagen production in the rat pancreas after chronic alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res*, 2018, 42: 306-14
- [23] 彭晓华, 周旭春. 酒精联合内毒素诱导慢性胰腺炎模型的建立. *重庆医科大学学报*, 2010, 35: 1851-3
- [24] Sendler M, Beyer G, Mahajan UM, et al. Complement component 5 mediates development of fibrosis, via activation of stellate cells, in 2 mouse models of chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 2015, 149: 765-76. e10
- [25] Sun L, Xiu M, Wang S, et al. Lipopolysaccharide enhances TGF- β 1 signalling pathway and rat pancreatic fibrosis. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 2346-56
- [26] Pezzilli R, Caputo F, Testino G, et al. Alcohol-related chronic exocrine pancreatic insufficiency: diagnosis and therapeutic management. A proposal for treatment by the Italian Association for the Study of the Pancreas (AISP) and the Italian Society of Alcoholology (SIA). *Minerva Med*, 2019, 110: 425-38
- [27] Gerasimenko JV, Lur G, Sherwood MW, et al. Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on Ca²⁺ release via acid store IP3 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 10758-63
- [28] Lu Z, Karne S, Kolodziej T, et al. Alcohols enhance caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282: G501-7
- [29] Yuvaraj K, Geetha A. Effect of *Morus alba* root bark extract on gene-level expression of inflammatory markers in rats subjected to ethanol and cerulein induced pancreatitis-influence of heat shock protein 70. *J Complement Integr Med*, 2018, 16: /j/jcim.2019.16.issue-2/jcim-2017-0149/jcim-2017-0149.xml
- [30] Vonlaufen A, Phillips PA, Xu ZH, et al. Withdrawal of alcohol promotes regression while continued alcohol intake promotes persistence of LPS-induced pancreatic injury in alcohol-fed rats. *Gut*, 2011, 60: 238-46
- [31] Ida S, Ohmuraya M, Hirota M, et al. Chronic pancreatitis in mice by treatment with choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Exp Anim*, 2010, 59: 421-9
- [32] Nadella S, Ciofoaia V, Cao H, et al. Cholecystokinin receptor antagonist therapy decreases inflammation and fibrosis in chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci*, 2020, 65: 1376-84
- [33] Cui LH, Li CX, Zhuo YZ, et al. Saikosaponin d ameliorates pancreatic fibrosis by inhibiting autophagy of pancreatic stellate cells via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Chem Biol Interact*, 2019, 300: 18-26
- [34] Aghdassi AA, Mayerle J, Christochowitz S, et al. Animal models for investigating chronic pancreatitis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011, 4: 26
- [35] Zhang H, Liu B, Xu XF, et al. Pathophysiology of chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride joint ethanol in mice. *World J Gastroenterol*, 2016, 22: 2960-70
- [36] 舒健, 赵建农, 张小明. 小型猪慢性胰腺炎模型的建立. *中国实验动物学报*, 2008, 16: 135-7
- [37] Bombardo M, Chen R, Malagola E, et al. Inhibition of class I histone deacetylases abrogates tumor growth factor expression and development of fibrosis during chronic pancreatitis. *Mol Pharmacol*, 2018, 94: 793-801
- [38] Chen L, Yu B, Luo D, et al. Enteric motor dysfunctions in experimental chronic pancreatitis: alterations of myenteric neurons regulating colonic motility in rats. *Neurogastroenterol Motil*, 2018, 30: e13301
- [39] Qian N, Liao YH, Feng QX, et al. Spinal toll like receptor 3 is involved in chronic pancreatitis-induced mechanical allodynia of rat. *Mol Pain*, 2011, 7: 15
- [40] Bai Y, Ma LT, Chen YB, et al. Anterior insular cortex mediates hyperalgesia induced by chronic pancreatitis in rats. *Mol Brain*, 2019, 12: 76
- [41] Luo D, Chen L, Yu B, Inhibition of the high affinity choline transporter enhances hyperalgesia in a rat model of chronic pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 488: 204-10
- [42] Liu PY, Lu CL, Wang CC, et al. Spinal microglia initiate and maintain hyperalgesia in a rat model of chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 2012, 142: 165-73.e2
- [43] 王兴鹏, 龚自华, 吴凯, 等. 三硝基苯磺酸诱导大鼠慢性胰腺炎模型的建立. *中华病理学杂志*, 2003, 32: 80-2
- [44] Unal E, Atalay S, Tolan HK, et al. Biliopancreatic duct injection of ethanol as an experimental model of acute and chronic pancreatitis in rats. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 304-10
- [45] Yamamoto M, Otani M, Otsuki M. A new model of chronic pancreatitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291: G700-8
- [46] Geisz A, Jancso Z, Nemeth BC, et al. Natural single-nucleotide deletion in chymotrypsinogen C gene increases severity of secretagogue-induced pancreatitis in C57BL/6 mice. *JCI Insight*, 2019, 4: e129717
- [47] Hegyi E, Sahin-Toth M. Genetic risk in chronic pancreatitis: the trypsin-dependent pathway. *Dig Dis Sci*, 2017, 62:

- 1692-701
- [48] Geisz A, Sahin-Toth M. A preclinical model of chronic pancreatitis driven by trypsinogen autoactivation. *Nat Commun*, 2018, 9: 5033
- [49] Huang H, Swidnicka-Siergiejko AK, Daniluk J, et al. Transgenic expression of PRSS1^{R122H} sensitizes mice to pancreatitis. *Gastroenterology*, 2020, 158: 1072-82
- [50] Zou WB, Boulling A, Masson E, et al. Clarifying the clinical relevance of SPINK1 intronic variants in chronic pancreatitis. *Gut*, 2016, 65: 884-6
- [51] Sun C, Liu M, An W, et al. Heterozygous Spink1 c.194+2T>C mutant mice spontaneously develop chronic pancreatitis. *Gut*, 2020, 69: 967-8
- [52] Diakopoulos KN, Lesina M, Wormann S, et al. Impaired autophagy induces chronic atrophic pancreatitis in mice via sex- and nutrition-dependent processes. *Gastroenterology*, 2015, 148: 626-38 e17
- [53] Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20: 460-73
- [54] Gukovsky I, Gukovskaya AS. Impaired autophagy triggers chronic pancreatitis: lessons from pancreas-specific *Atg5* knockout mice. *Gastroenterology*, 2015, 148: 501-5
- [55] Diakopoulos KN, Lesina M, Wormann S, et al. Impaired autophagy induces chronic atrophic pancreatitis in mice via sex- and nutrition-dependent processes. *Gastroenterology*, 2015, 148: 626-38.e17
- [56] Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 2013, 144: 1252-61
- [57] Antonucci L, Fagman JB, Kim JY, et al. Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E6166-74
- [58] Tan P, Wang A, Chen H, et al. SPOP inhibits mice pancreatic stellate cell activation by promoting FADD degradation in cerulein-induced chronic pancreatitis. *Exp Cell Res*, 2019, 384: 111606
- [59] Daniluk J, Liu Y, Deng D, et al. An NF- κ B pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *J Clin Invest*, 2012, 122: 1519-28
- [60] Huang H, Liu Y, Daniluk J, et al. Activation of nuclear factor- κ B in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice. *Gastroenterology*, 2013, 144: 202-10
- [61] Ashizawa N, Hamamoto N, Kinoshita Y. Morphological changes of pancreatic ducts in Otsuka Long-evans Tokushima Fatty rats. *Pancreas*, 2006, 32: 417-21
- [62] Tsuchitani M, Saegusa T, Narama I, et al. A new diabetic strain of rat (WBN/Kob). *Lab Anim*, 1985, 19: 200-7
- [63] Ishida K, Mizuno A, Sano T, et al. Plasma glucagon responses to insulin-induced hypoglycemia and arginine in spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) rats, Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Acta Endocrinol*, 1993, 129: 585-93
- [64] Suda K, Takase M, Fukumura Y, et al. Histopathologic difference between chronic pancreatitis animal models and human chronic pancreatitis. *Pancreas*, 2004, 28: e86-9