

L-精氨酸诱发慢性胰腺炎性骨质疏松动物模型的建立及其机制

李娜^{1*}, 马立凯², 张君蕾², 丁宁², 杨冬梨¹, 宋锦逸³

陕西中医药大学 1. 基础学院; 2. 中医学院; 3. 临床医学院, 陕西 咸阳 712046

摘要: **目的** 建立慢性胰腺炎性骨质疏松动物模型, 分析慢性胰腺炎(CP)对小鼠骨质流失的影响及机制。 **方法** 40只6~8周龄的昆明小鼠分为对照组($n=20$)和CP组($n=20$)。腹腔注射L-精氨酸构建CP小鼠模型; 对照组注射等量生理盐水。分别在造模后第8周和第12周取材, HE染色和Masson染色观察小鼠胰腺的病理学改变; micro-CT、HE染色等观察小鼠骨质量及骨形态学改变; 免疫组织化学染色检测骨形成标志OPN和Runx2蛋白表达; ELISA法检测小鼠粪便弹性蛋白酶-1、血清vitD、Ca²⁺和骨钙素的表达。 **结果** 与对照组相比, 造模8周后CP组小鼠胰腺实质结构出现萎缩、坏死, 伴有大量炎细胞浸润且纤维化程度增加; 股骨和胫骨的骨小梁密度下降, 骨微结构显著破坏, 整体骨量下降($P<0.05$); 骨组织中骨形成标志蛋白OPN和Runx2表达显著下降($P<0.05$)。CP组小鼠粪便中粪便弹性蛋白酶-1、血清中vitD、Ca²⁺和骨钙素表达显著下降($P<0.05$)。随着造模时间延长至12周, 上述变化更显著。 **结论** 腹腔注射L-精氨酸成功构建慢性胰腺炎性骨质疏松的小鼠模型, 其病理机制与vitD吸收障碍导致骨形成减少相关。

关键词: 慢性胰腺炎; 骨质疏松; 骨形成; 动物模型

中图分类号: R576; R68 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2026.08.1076

Animal modeling of chronic pancreatitis-induced osteoporosis with L-arginine and its preliminary mechanism

LI Na^{1*}, MA Likai², ZHANG Junlei², DING Ning², YANG Dongli¹, SONG Jinyi³

1 College of Basic Medicine; 2. College of Traditional Chinese Medicine; 3. College of Clinical Medicine,

Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To establish an animal model of chronic pancreatitis-induced osteoporosis and to investigate the effects of chronic pancreatitis (CP) on bone loss in mice and the underlying mechanism. **Methods** Forty Kunming (KM) mice aged 6-8 weeks were divided into control group ($n=20$) and CP group ($n=20$). The CP mouse model was established by intraperitoneal injection of L-arginine, while the control group received an equal volume of normal saline. Samples were collected at 8 and 12 weeks after modeling. Pathological changes in the pancreas were observed by HE staining and Masson staining. Bone quality and bone morphology were assessed by micro-CT and HE staining. The expression of bone formation markers OPN and Runx2 proteins was detected by immunohisto-

收稿日期: 2026-04-14 修回日期: 2026-05-21

基金项目: 陕西省教育厅科学研究项目(25JK0416); 秦创原中医药产业创新聚集区项目(L2024-QCY-ZYJJQ-X08); 陕西中医药大学大学生创新创业项目(S202410716049, S202510716070)

* 通信作者 (corresponding author): 2111130@sntcm.edu.cn

chemical staining. Levels of fecal elastase-1, serum vitamin D, Ca^{2+} , and osteocalcin were measured by ELISA.

Results At 8 weeks after modeling, compared with the control group, the CP group showed atrophy and necrosis of the pancreatic parenchyma, accompanied by extensive inflammatory cell infiltration and increased fibrosis; decreased trabecular bone density in the femur and tibia, significant destruction of bone microstructure, and reduced overall bone mass ($P < 0.05$); and significantly decreased expression of bone formation markers OPN and Runx2 proteins in bone tissue ($P < 0.05$). The CP group also exhibited significantly lower levels of fecal elastase-1, serum vitamin D, Ca^{2+} , and osteocalcin ($P < 0.05$). These changes became more significant with the extension of modeling duration to 12 weeks. **Conclusions** Intraperitoneal injection of L-arginine successfully establishes a mouse model of chronic pancreatitis-induced osteoporosis. The pathological mechanism is associated with impaired vitamin D absorption leading to reduced bone formation.

Key words: chronic pancreatitis; osteoporosis; bone formation; animal model

慢性胰腺炎 (chronic pancreatitis, CP) 是胰腺实质出现不可逆的损伤,其典型的临床表现可出现五联征:腹痛、胰腺钙化、胰腺假性囊肿、脂肪泻及糖尿病^[1]。流行病学调查显示近 70% 的 CP 患者患有骨质减少或骨质疏松症,发生低创伤性骨折的风险增加^[2-4]。2020 年美国胃肠病学会发布的 CP 临床指南虽已明确将骨质疏松症列为重要并发症,建议进行骨密度筛查,但临床落实仍不理想^[5]。

骨质疏松症发病的直接原因是由成骨细胞介导的骨形成和由破骨细胞介导的骨吸收所维持的平衡被打破,导致骨组织微结构破坏及骨量减少。CP 患者具有多种可造成骨量降低的风险因素,包括胰腺外分泌功能不全 (exocrine pancreatic insufficiency, EPI)、脂溶性维生素缺乏、低体质指数、慢性炎症、吸烟、喝酒和性腺机能减退等^[6]。然而,慢性胰腺炎性骨质疏松 (chronic pancreatitis-induced osteoporosis, CP-OP) 确切的发病机制尚不明确,而且目前多数研究局限于临床患者的数据分析,尚缺乏成熟的动物模型。本研究采用腹腔注射精氨酸的方法构建 CP-OP 小鼠模型,并初步探索 CP-OP 的发病机制,以期对胰-骨轴的实验研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:6~8 周龄 SPF 级雄性昆明小鼠,体质量 28~33 g [陕西中医药大学,许可证号为 SYKX-2026-003]。所有实验方案和程序均符合陕西中医药大学实验动物伦理要求 (动物伦理批号:

SUCMDL20240311007)。

1.1.2 主要试剂:L-精氨酸 (Sigma-Aldrich 公司); HE 染色试剂盒和 Masson 染色液 (武汉博士德生物工程有限公司); Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2) 抗体 (Santa Cruz 公司); 骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司); ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的分组及处理:将小鼠按数字随机法分成 2 组,每组 20 只。模型组小鼠腹腔注射 20% 的 L-精氨酸,注射剂量为 3 g/kg,每天 2 次,间隔 1 h,每周 1 d。对照组小鼠注射等量的生理盐水。正常喂养,连续注射,分别在第 8 周和第 12 周取材。

1.2.2 HE 和 Masson 染色观察胰腺组织病理:小鼠胰腺组织固定后,经脱水后石蜡包埋,取 3 μm 厚的切片。HE 染色观察胰腺组织形态学改变,Masson 染色观察胰腺组织纤维化程度。

1.2.3 micro-CT 测定骨密度及骨微结构参数:小鼠右侧胫骨用 4% 多聚甲醛固定 48 h, micro-CT 扫描后进行分析 and 三维重建,观察小鼠骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨体积分数 (bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb. Th) 和骨小梁数目 (trabecular number, Tb. N) 的变化情况。

1.2.4 HE 观察骨组织病理:小鼠右侧股骨用 4% 多聚甲醛固定 48 h, EDTA 脱钙 1 个月后包埋于石蜡中,取 5 μm 厚的冠状切片。HE 染色观察骨组织病理改变。

1.2.5 免疫组化法检测小鼠骨组织中 Runx2 和 OPN 阳性表达:小鼠股骨切片二甲苯脱蜡后,过氧化氢灭活内源性酶,使用枸橼酸缓冲液进行抗原修复,封闭后切片,分别与 Runx2 和 OPN 抗体孵育过夜。次日经 PBS 冲洗后二抗染色 1 h, DAB 显色。光学显微镜观察和拍照,采用 Image-pro Plus 6.0 软件测量切片平均吸光度(absorbance, A)。

1.2.6 ELISA 法检测小鼠粪便 FE-1 水平及血清骨代谢指标水平:取小鼠粪便和血清,参照各自 ELISA 试剂盒说明书检测各组小鼠粪便中粪便弹性蛋白酶-1(fecal elastase-1, FE-1)及血清中 vitD、钙和骨钙素(osteocalcin, BGP)表达水平。

1.3 统计学分析

应用 Graphpad Prism 8.0 软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用 *t* 检验,每组实验重复 3 次以上。

2 结果

2.1 各组实验小鼠胰腺组织病理学变化和纤维化程度

HE 染色显示,造模 8 周后,与对照组相比,CP 组胰腺组织出现萎缩、坏死及大量炎细胞浸润;造模 12 周后,胰腺损伤进一步加重,胰腺组织实质结构大面积消失(图 1A)。Masson 染色显示,造模时间越久,CP 组胰腺组织中胶原纤维表

达越高(图 1B)。

2.2 各组实验小鼠骨微结构改变

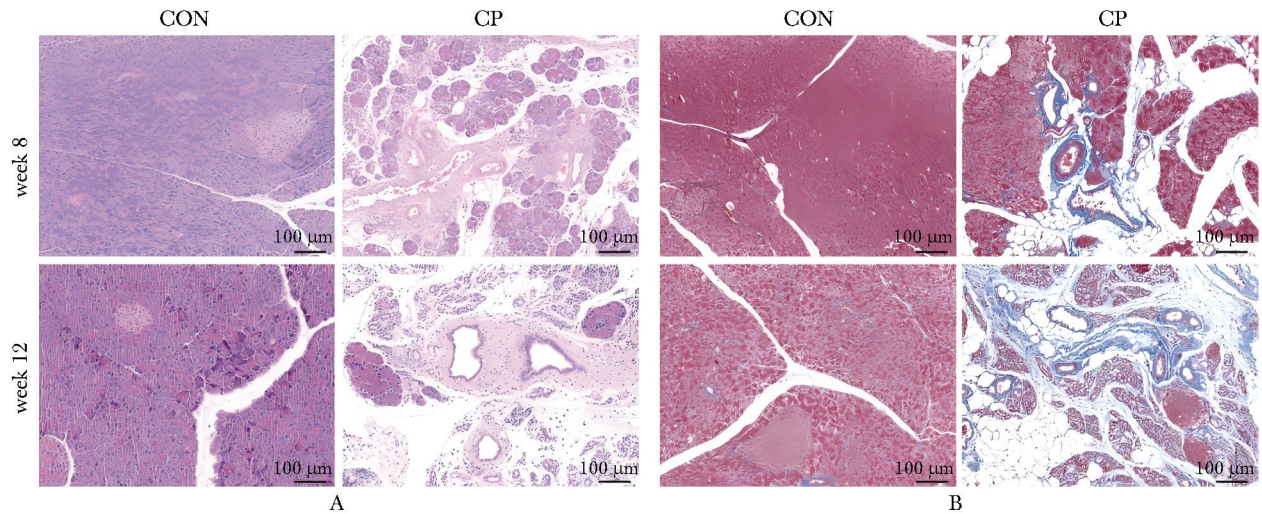
图 2A 从上至下依次为 micro-CT 扫描后各组小鼠胫骨纵断面、横断面及横断面三维重建图。结果显示各组小鼠皮质骨厚度几乎不变;随着建模时间的延长,CP 模型组小鼠骨小梁密度不断下降,结构显著破坏,整体骨量下降(图 2A)。图像定量分析骨微结构参数,结果显示第 8 周时 BMD、BV/TV 和 Tb. N 下降($P<0.05$)。造模 12 周时,CP 组的 BMD、BV/TV、Tb. Th 和 Tb. N 显著降低($P<0.05$)(图 2B)。

2.3 各组实验小鼠骨形态学改变

HE 染色显示对照组骨小梁结构完整,排列整齐;CP 组股骨体积和骨小梁数量明显减少,骨小梁损伤,分布离散不规则,骨髓腔中脂肪细胞数量增加。造模 12 周时,CP 组小鼠骨组织上述病理学形态改变更明显(图 3)。

2.4 各组实验小鼠胰腺外分泌功能及血清骨形成指标改变

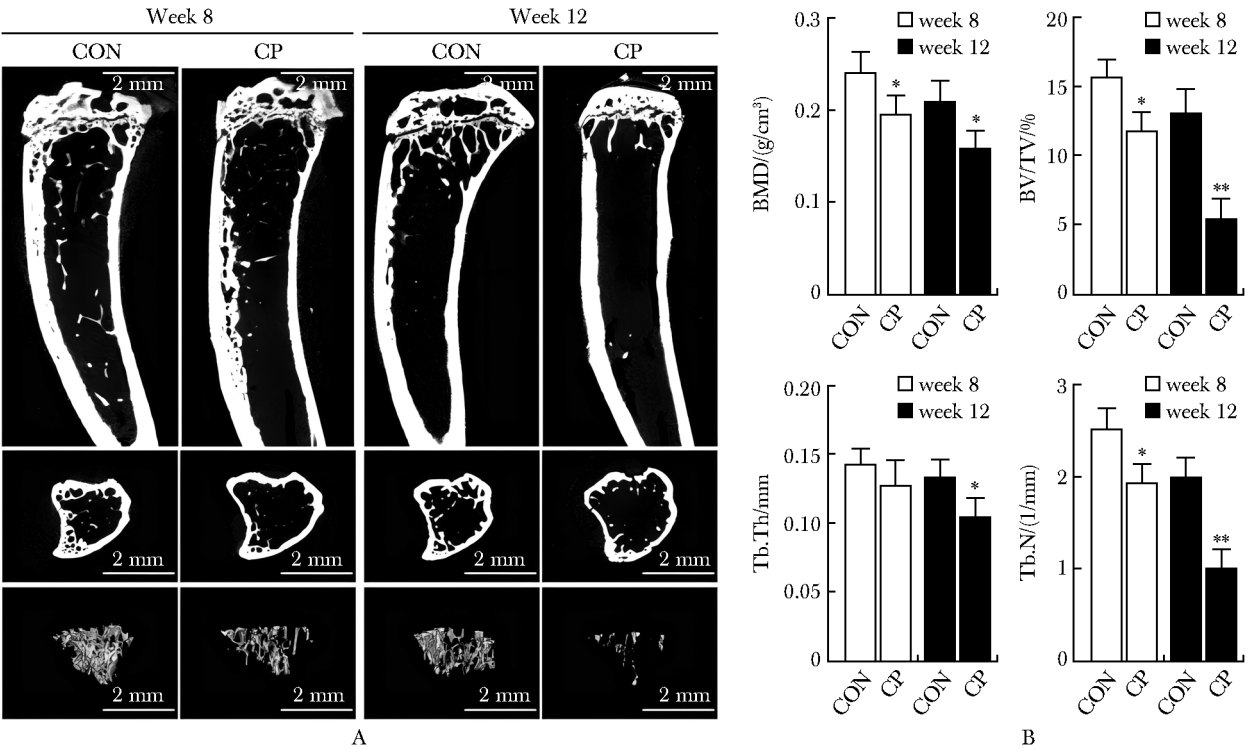
FE-1 反映胰腺分泌消化酶的能力,其水平与 EPI 正相关。ELISA 检测显示随着造模时间的延长,CP 组小鼠粪便中 FE-1 含量不断降低($P<0.01$)(图 4A)。血清骨形成指标检测发现,CP 组小鼠血清中 vitD、Ca²⁺ 和 BGP 的表达水平显著降低($P<0.05$)(图 4B~D)。



A. HE staining; B. Masson staining

图 1 各组实验小鼠胰腺组织病理学变化和纤维化程度

Fig 1 Histopathological changes and degree of fibrosis in the pancreatic tissues of experimental mice in each group



A. 3D reconstruction of the bone; B. quantitative statistical chart of BMD, BV/TV, Tb. Th and Tb. N in mice, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with CON group at the same time point; BMD. bone mineral density; BV/TV. bone volume fraction; Tb. Th. trabecular thickness; Tb. N. trabecular number.

图2 各组实验小鼠骨微结构改变
Fig 2 Changes in bone microarchitecture of experimental mice in each group ($n=5$)

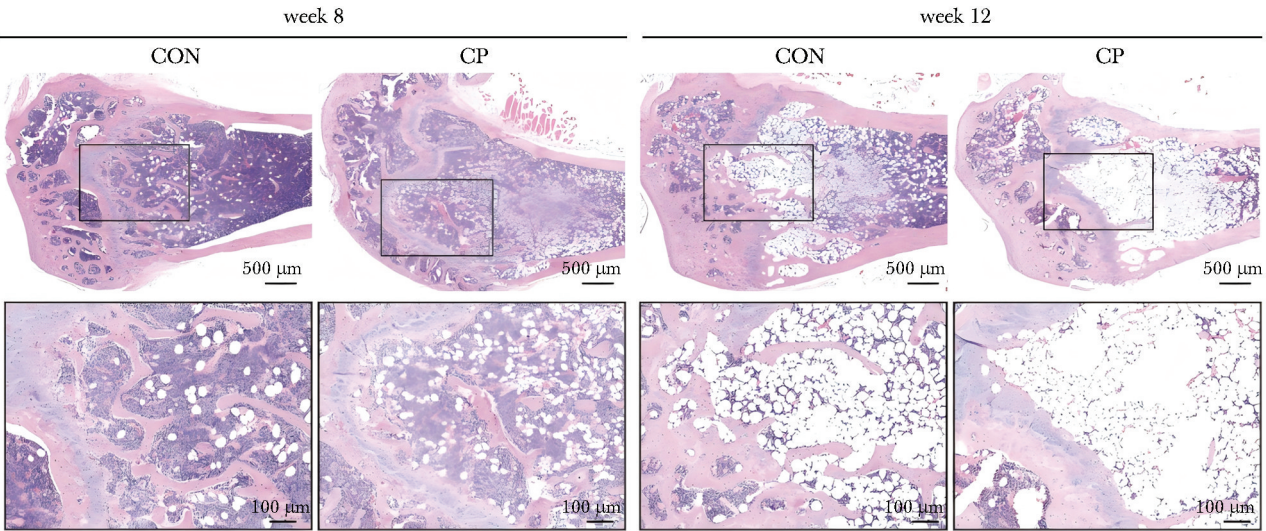


图3 各组实验小鼠骨形态学改变
Fig 3 Bone morphological changes in experimental mice in each group

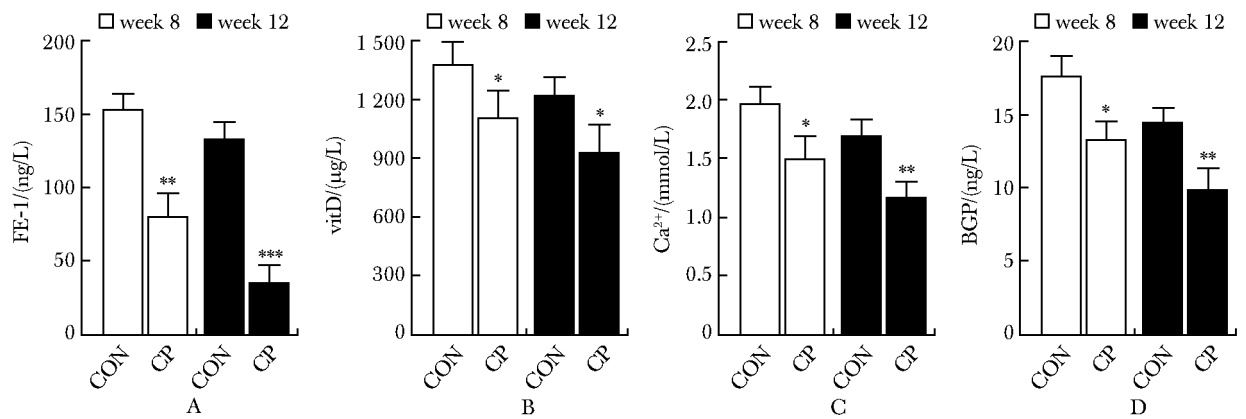
2.5 各组实验小鼠骨组织中骨形成指标表达

免疫组化染色显示,对照组骨组织中 OPN 和 Runx2 高表达,CP 模型组表达显著降低($P<0.05$)。随着造模时间延长,CP 模型组骨组织中 OPN 和

Runx2 表达下降更明显($P<0.01$)(图 5)。

3 讨论

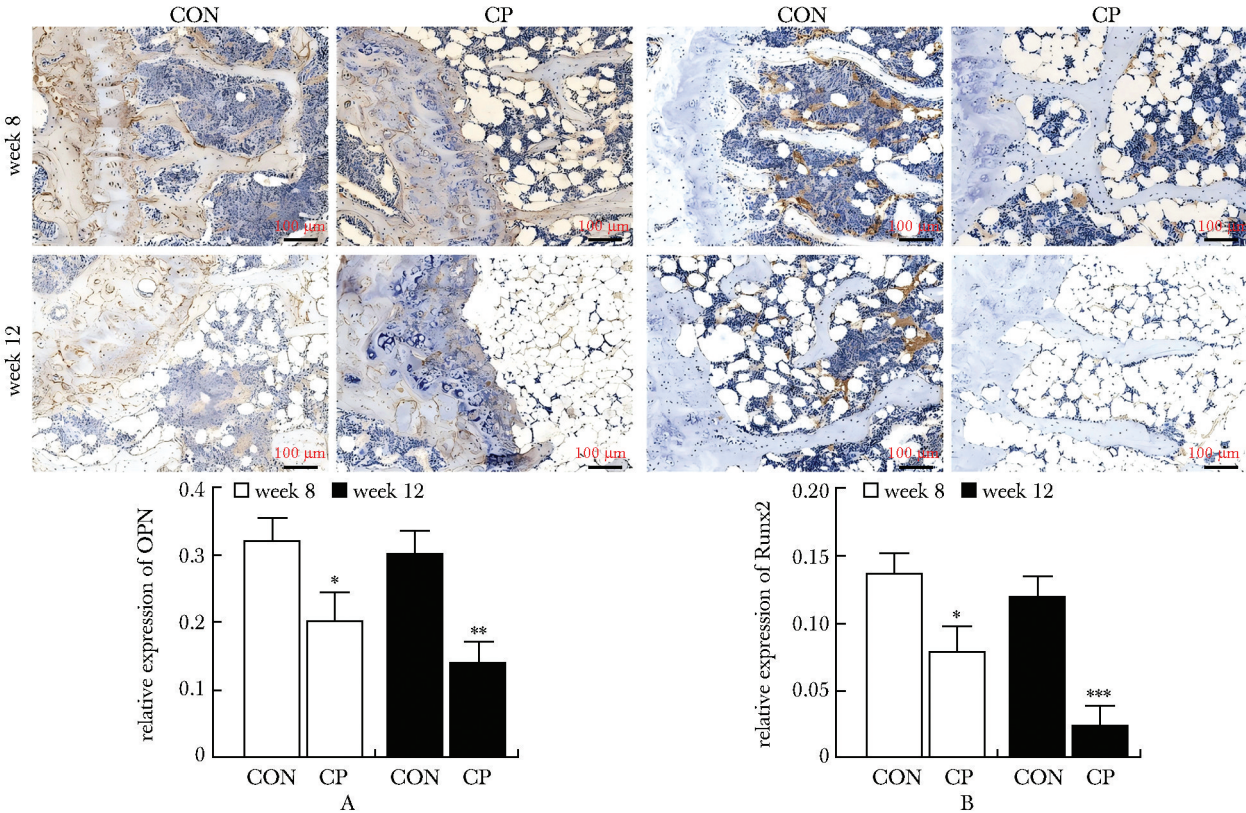
近年来,研究表明 CP 和骨代谢之间具有密切关



A. FE-1 levels in the feces of the mice;B-D. vitD, Ca²⁺ and BGP levels in the serum of the mice; *P<0.05, **P<0.01 ***P<0.001 compared with the control group at the same time point; FE-1. fecal elastase-1;vitD. vitamin D;BGP. osteocalcin.

图4 各组实验小鼠胰腺外分泌功能改变及血清骨形成指标表达

Fig 4 Changes in pancreatic exocrine function and expression of serum bone formation markers in experimental mice of each group (n=5)



A. OPN levels in the bone tissue of the mice;B. Runx2 levels in the bone tissue of the mice; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with the control group at the same time point.

图5 各组实验小鼠骨组织中骨形成指标表达

Fig 5 Expression of bone formation markers in bone tissue of experimental mice in each group (n=5)

联。临床研究显示 CP 患者骨质疏松症的患病率可达 23%~39%,骨量减少的患病率高达 40%~70%,椎体骨折风险较健康人群增加 2~4 倍^[4]。但目前有关 CP 和骨质疏松症相关性的研究多来自临床报道,基

于动物模型的发病机制研究较少。本研究采用长时间、低剂量腹腔注射 L-精氨酸的方法,构建 CP-OP 小鼠模型。造模 8 周时,CP 小鼠已经开始出现骨密度降低,骨微结构破坏及骨量减少的表现。当连续造模

12周时,CP小鼠的骨组织结构破坏更明显。以上结果证实本研究成功构建了CP-OP小鼠模型。近期有研究采用腹腔注射雨蛙素的方法构建CP-OP小鼠模型,造模8周出现骨密度、骨小梁厚度和骨体积分数显著降低的表现^[7],与本研究结果基本一致。相比之下,本研究使用腹腔注射L-精氨酸的方法更简便,成本较低(雨蛙素每周注射3d,每天6次;L-精氨酸每周注射1d,每天2次);且最新研究提示L-精氨酸法与人CP的分子特征相似度更高(雨蛙素与人CP有2%基因相似度,L-精氨酸为22%),构建的CP-OP模型与人类疾病更相似^[8]。

慢性、系统性的炎症通过促进破骨细胞功能,加速骨吸收引发骨质疏松,传统观点认为CP小鼠体内大量炎症细胞因子的释放会促进骨丢失,从而诱发骨质疏松^[9]。本研究基于CP-OP小鼠模型发现CP会破坏骨形成,导致骨代谢失衡。BGP、OPN和Runx2是骨形成相关标志物。造模8周和12周时,ELISA显示CP组小鼠血清中BGP表达水平显著降低,免疫组化染色显示CP组小鼠骨组织中OPN和Runx2表达水平显著降低。

CP疾病进展过程中,腺泡和导管细胞逐渐破坏,

导致胰酶和碳酸氢盐分泌减少,最终导致消化、吸收不良引起EPI。轻度EPI的症状主要与脂肪吸收不良有关,包括腹胀、痉挛和胀气,而严重EPI的症状包括原因不明的体质量减轻和脂肪泻^[10]。临床研究中常用粪便中脂肪含量或FE-1含量测定胰腺的外分泌功能。研究表明CP患者中BMD、骨矿物质含量的降低与粪便中脂肪含量升高或FE-1降低呈正相关^[11]。EPI引起脂肪吸收不良,导致CP患者脂溶性维生素吸收障碍。研究表明CP患者的脂溶性维生素A、D、E和K水平显著降低,同时检测到血清中BGP水平降低^[12]。本研究发现造模8周,CP小鼠粪便中FE-1含量显著降低,血清中vitD和Ca²⁺含量显著降低;造模12周时上述改变更明显。提示CP进展过程中,EPI加重促使脂溶性vitD吸收不良,引起血钙减少,导致骨形成减少,诱发骨质疏松。

综上所述,本研究通过长时间、低剂量腹腔注射L-精氨酸的方法成功构建CP-OP小鼠模型,且初步探索CP导致vitD吸收障碍,抑制骨形成,诱发骨质疏松的发病机制。这不仅为深入探究CP-OP的发病机制提供了动物模型,而且为胰-骨轴机制的深入研究提供了参考。

参考文献:

- [1] Thierens N, Verdonk RC, Löhr JM, *et al.* Chronic pancreatitis[J]. *Lancet*, 2025, 404: 2605-2618.
- [2] Koh A, Oyende O, Humes DJ, *et al.* Risk of osteopaenia, osteoporosis and osteoporotic fractures in patients with chronic pancreatitis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Nutr*, 2023, 42: 1086-1094.
- [3] Wang T, Xiong K, He Y, *et al.* Chronic pancreatitis-associated metabolic bone diseases: epidemiology, mechanisms, and clinical advances [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2024, 326: e856-e868.
- [4] Ramai D, Facciorusso A, Maida M, *et al.* Prevalence of osteopathy in chronic pancreatitis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2023, 14: e00623. doi: 10.14309/ctg.0000000000000623.
- [5] Gardner TB, Adler DG, Forsmark CE, *et al.* ACG clinical guideline: chronic pancreatitis[J]. *Am J Gastroenterol*, 2020, 115: 322-339.
- [6] 李娜, 李涛, 张红. 慢性胰腺炎相关骨病发生风险的研究进展[J]. *生命科学*, 2022, 34: 1199-1204.
- [7] Liu X, Hu F, Zhang Y, *et al.* Metabolomics approach revealed polyunsaturated fatty acid disorders as pathogenesis for chronic pancreatitis-induced osteoporosis in mice[J]. *Metabolites*, 2025, 15:173.
- [8] Galande S, Ravikanth VV, Tokala RK, *et al.* Transcriptomic analysis of pancreatic tissue from humans and mice identifies potential gene signatures and unexplored pathways during progression from acute to chronic pancreatitis[J]. *Gene*, 2025, 940: 149200.
- [9] 夏婷, 李双庆. 炎症相关骨质疏松症的发病机制[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21: 117-120.
- [10] Erchinger F, Engjom T, Dimcevski G, *et al.* Exocrine pancreas insufficiency in chronic pancreatitis-Risk factors and associations with complications. A multicentre study of 1869 patients[J]. *Pancreatol*, 2022, 22:374-380.
- [11] Sudeep K, Chacko A, Thomas N, *et al.* Predictors of osteodystrophy in patients with chronic nonalcoholic pancrea-titis with or without diabetes [J]. *Endocr Pract*, 2011, 17: 897-905.
- [12] Greer JB, Greer P, Sandhu BS, *et al.* Nutrition and inflammatory biomarkers in chronic pancreatitis patients[J]. *Nutr Clin Pract*, 2019,34: 387-399.