

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.008

链脲佐菌素诱导 C57 小鼠 1 型糖尿病模型的研究*

李 甜¹ 张亚楼¹ 陈 龙² 秦 纹¹ 钟近洁^{1△}

(1 新疆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011;

2 新疆医科大学基础医学院机能实验中心 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的:通过小剂量多次腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导建立与人类 1 型糖尿病相似的 C57 小鼠糖尿病模型,研究建模剂量和成模率。**方法:**将 32 只 C57 小鼠随机分为正常对照组(A)和实验组(B)。实验组(B)可分为低、中、高剂量组(50 mg/kg、70 mg/kg、90 mg/kg)(n=8)。两组都喂普通饲料 1 周后,B 组连续 5 天腹腔注射不同剂量 STZ,测定注射前、注射后 1 周、2 周、3 周、4 周、5 周的空腹血糖和体重,观察小鼠饮食、饮水和排尿情况。STZ 注射第 3 周进行口服糖耐量实验(OGTT)。**结果:**给药前 A、B 组体重和血糖无显著差异,给药 1 周后,B 组饮水量和进食量明显增加,体重减轻。C57 小鼠用药 2 周后,中剂量组达到建模标准,成模率 75%。各剂量组均出现了糖耐量异常。**结论:**诱导建立 C57 小鼠 1 型糖尿病模型方法是连续 5 日腹腔注射 STZ,适宜剂量为 70 mg/kg。

关键词:链脲佐菌素;1 型糖尿病;C57 小鼠

中图分类号:Q95-3,R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)26-5031-03

Study of Type 1 Diabetes Model Induced by Streptozotocin in the C57 Mouse*

LI Tian¹, ZHANG Ya-lou¹, CHEN Long², QIN Wen¹, ZHONG Jin-jie^{1△}

(1 Department of Histology and Embryology, Preclinical college, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China;

2 Department of Mechanism Lab Center, Preclinical college, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

ABSTRACT Objective: To establish a C57 mouse model of type 1 diabetes by multiple intraperitoneal injection of low concentration STZ, and evaluate model effect and the success rate. **Methods:** 32 C57 mice were randomly divided into normal control group (A) and experimental group (B). The experimental group (B) was divided into low, middle, high dose group (50 mg/kg, 70 mg/kg, 90 mg/kg) (n=8). The two groups were fed with normal diet for 1 week. Group B received different concentration of STZ for 5 consecutive days by intraperitoneal injection. Blood glucose were determined at pre-injection, 1 weeks after injection, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks, 5 weeks and body weight were also detected. At the same time animal's eating, drinking and voiding were recorded. 3 weeks after STZ injection. Oral glucose tolerance test (OGTT) was carried out at the same time. **Results:** Body weight and blood glucose group A and group B had no significant difference between group A and group B before drug administration. After treatment for 1 week, mice in group B had water intake and food intake increased, but weight lost. After 2 weeks medication, the C57 mice in middle dose group reached the standard of modeling, and the successful rate was 75%. Each dose group showed an impaired glucose tolerance. **Conclusion:** The establishment of type 1 diabetes model of C57 mice can be induced by STZ, with consecutive 5 days intraperitoneal injections, and suitable dose of 70 mg/kg.

Key words: Streptozotocin; Type 1 diabetes; C57 mouse

Chinese Library Classification: Q95-3, R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)26-5031-03

前言

1 型糖尿病(T1DM)是 T 细胞介导的自身免疫性疾病,以胰岛素极度缺乏为特征,主要是由于胰岛 β 细胞功能遭到破坏引起的^[1-3],表现为淋巴细胞浸润性胰岛炎,进行性破坏胰岛 β 细胞,丧失合成和分泌胰岛素的功能。制造理想的模拟人类 1 型糖尿病发病过程和代谢特征的动物模型,对糖尿病的机制研究以及糖代谢相关研究具有十分重要的意义。链脲佐菌素(STZ)是一种经典的制造糖尿病模型的药物,链脲佐菌素可以破坏小鼠的胰岛 β 细胞,从而使小鼠分泌胰岛素不足,目前

应用十分广泛^[4-7]。1 型糖尿病的胰岛 β 细胞破坏发作是一个渐进发生、累积加重的过程^[8],采用小剂量多次注射链脲佐菌素方的实验方法可以较好的制备 1 型糖尿病模型。研究报道的 STZ 造模剂量在 25 mg/kg-200 mg/kg 不等^[9-11],并且关于对 C57 小鼠 1 型糖尿病造模的报道在 STZ 注射剂量上尚有争议。本研究采用多次腹腔注射不同剂量链脲佐菌素 STZ 诱导 C57 小鼠 1 型糖尿病,以筛选造模的适宜剂量。

1 材料与方法

1.1 材料

* 基金项目:新疆医科大学校内支撑学科项目 - 人体解剖与组织胚胎学阶段性成果(XYDXK20780307);

国家自然科学基金项目(81160331, 81360409);新疆医科大学科研创新基金(XJC201134, XJC201229)

作者简介:李甜,硕士研究生,主要研究方向:慢性氟中毒与骨相关疾病电话:13999821799, E-mail:292629092@qq.com,

△通讯作者:钟近洁,教授,博士, E-mail:zhongjinjie@sina.com

(收稿日期:2013-12-12 接受日期:2014-01-08)

1.1.1 实验动物 雄性 C57 实验小鼠, SPF 级, 体重 16-17 g, 购自新疆医科大学实验动物中心, 动物合格证号: SCXK (新) 2011-0004。动物所经过 (AAALAC, 国际实验动物管理评鉴及认证协会) 认证。动物处理程序经过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会认证。

1.1.2 药品与溶液配置 链脲佐菌素 (STZ), 购自美国 Sigma 公司产品。柠檬酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$): 天津市盛奥化学试剂有限公司提供; 柠檬酸三钠 ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$): 天津永晟精细化工有限公司。柠檬酸钠缓冲液, 采用 0.1 mol/L 柠檬酸溶液与 0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液按照 37:13 的体积比配置 pH 4.0 的缓冲液。STZ 溶液配制: 以 0.1 mol/L, pH 4.0 柠檬酸缓冲液溶解, 配制成 4 mg/mL 的溶液, 0.22 μ m 滤器除菌, 避光, 现用现配, 配好的溶液置冰盒中保存, 运输。

1.1.3 主要仪器 血糖仪选用罗氏 Performa 卓越型血糖仪, 血糖试纸为卓越金锐血糖试纸。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 C57 雄性小鼠 32 只, 小鼠适应性喂养 1 周后随机分为正常对照组 (A) 8 只和实验组 (B)。B 组又可以分为低、中、高剂量 (50 mg/kg, 70 mg/kg, 90 mg/kg), 每组分 8 只, 共计 24 只。分别以剪毛的方式标记。A, B 组均给予普通饲料。

1.2.2 糖尿病模型的建立 各组按相应的剂量腹腔注射, 每日 1 次, 连续 5 日。注射前禁食 12 小时左右。正常组腹腔注射同体积的 0.1 M pH 4.0 枸橼酸盐缓冲液。

1.2.3 血糖和体重的测定 分组小鼠于给药前及给药后第 1、2、3、4、5 周体重和空腹血糖并记录。

1.2.4 糖耐量实验 小鼠实验前及实验期间禁食 16-18 小时, 禁食期间小鼠正常饮水。灌胃葡萄糖溶液 2.0 g/kg, 从鼠尾静脉取血, 血糖测试仪分别检测空腹 16 小时血糖及给药后 15 min、30 min、60 min 血糖数值, 观察血糖变化趋势。

1.2.5 数据处理 所有试验数据用统计软件 SPSS11.5 进行分析。结果用方差分析进行组间比较, 检验的显著性水准 $P=0.05$ 。

2 结果

2.1 C57 小鼠一般状态

C57 小鼠各实验组注射 STZ 1 周后饮水量和进食量明显增加, 活动减少, 以高剂量组和中剂量组表现最明显。正常组小鼠体重稳步增长, 低剂量组体重增长, 但相对正常组体重明显减轻, 并且增长缓慢。中剂量组和高剂量组在 2 周内体重有短暂的下降趋势, 2 周后体重有所增长。从第 3 周开始, 各剂量组体重基本处于下降趋势。实验剂量越高, 动物体重减轻越明显。见图 1。

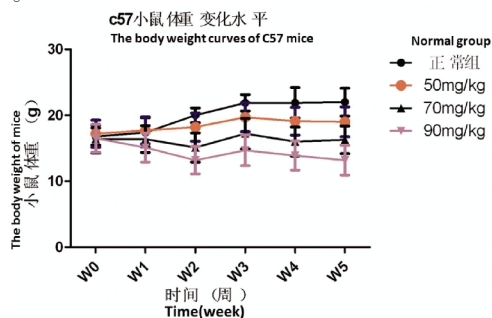


图 1 C57 小鼠体重变化曲线

Fig. 1 The body weight curves of C57 mice

2.2 实验过程中小鼠血糖变化

腹腔注射 STZ 后, 实验组各剂量组空腹血糖在一周内缓慢增高, 但是第 2 周有明显的下降。第 3 周开始, 实验组各剂量组空腹血糖均有迅速升高, 3 周末空腹血糖达到高峰。3 周后, 实验组各剂量组均有下降, STZ 低剂量组小鼠空腹血糖水平高于正常组, 但在 5 周末, 血糖值接近于正常空腹血糖接近于正常 ($P>0.05$)。腹腔注射 STZ 第 3 周开始, STZ 高剂量组和中剂量组小鼠血糖水平明显增高 ($P<0.05$), 可以诊断为糖尿病。中剂量组成模率 75%, 高剂量组的成模率 100%。低、中剂量未出现死亡, 高剂量在第 5 周出现死亡, 死亡率 25%。实验组剂量越高, 血糖值越高。见图 2。

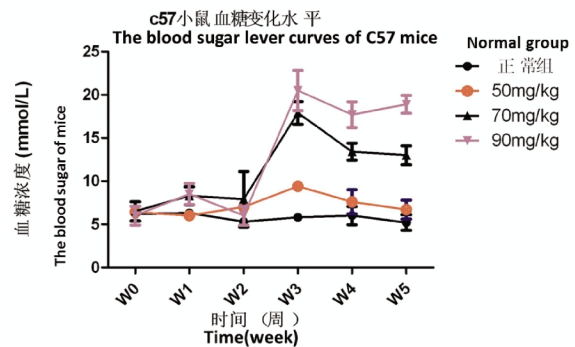


图 2 C57 小鼠注射 STZ 后血糖变化水平曲线

Fig. 2 The blood sugar level curves of C57 mice after STZ injection

2.3 小鼠糖耐量观察

STZ 腹腔注射第 3 周, 给予葡萄糖后正常组和低、中、高剂量组均在 30 min 出现餐后血糖峰值, 以后血糖逐步减低, 120 min 后接近给予葡萄糖前的水平。中剂量组和高剂量组空腹血糖高于正常, OGTT2 小时血糖均大于 11.1 mmol/L, 说明小鼠处理葡萄糖的能力明显降低, 可以确诊糖尿病。低剂量组 OGTT2 小时血糖介于 7.8-11.1 mmol/L 之间, 小鼠对葡萄糖的调节能力轻度下降, 可以诊断糖耐量减低, 但是尚不能诊断为糖尿病。见图 3。

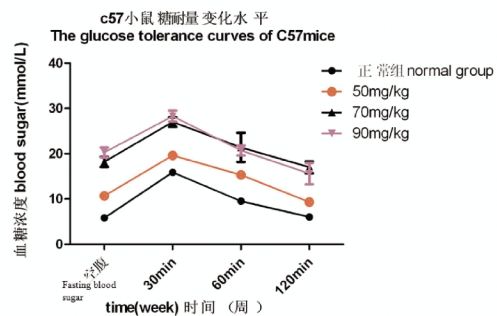


图 3 C57 小鼠注射 STZ 后糖耐量变化曲线

Fig. 3 The glucose tolerance curves of C57 mice after STZ injection

3 讨论

近年来随着人们生活水平的提高, 糖尿病的发病率呈上升趋势^[12]。糖尿病是一种多种病因引起全身性代谢紊乱疾病, 糖尿病的分子病因学及发病机理研究取得了一定的进展, 但是关于 T1DM 的发病机制并未明确。建立理想的 T1DM 模型动物模型显得尤为重要。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 是经典的

致糖尿病药物,STZ 对实验动物的胰岛 β 细胞具有高度选择性毒性作用^[13-15]。 β 细胞破坏是由胰岛自身免疫渐进性损害发生发展的结果。我们选用小剂量多次腹腔注射 STZ 方法诱导的 1 型糖尿病小鼠模型。这种方法能够引起机体对胰岛的自身免疫应答,诱导产生自身免疫介导的动物模型,能很好的模仿人类 T1DM 动物模型^[16]。小剂量多次注射 STZ 方法造成小批量、持续性、多次胰岛 β 细胞损害,这种渐进性胰岛损害与人类 T1DM 发病机制及胰岛损害时相类似,是目前比较理想的 T1DM 动物模型方法^[17]。

本实验选用雄性 C57 小鼠,实验组分为低、中、高剂量组(50 mg/kg、70 mg/kg、90 mg/kg)通过连续 5 日腹腔注射 STZ,诱导 β 细胞破坏,最终成模。实验各组小鼠均出现多饮、多食、多尿、体重减轻等表现,C57 小鼠注射 STZ 3 周后空腹血糖达到最高值,3 周后空腹血糖下降,低剂量组 4 周后出现复转。中剂量组和高剂量组空腹血糖均高于 7.8 mmol/L($P < 0.05$),以后血糖保持在较高水平,中剂量组和高剂量组均符合糖尿病诊断标准。高剂量组的模型成功率(87.5%)高于中剂量组的模型成功率为(75%),但是高剂量组死亡率也比较高,我们认为高剂量不是 T1DM 动物模型最适宜剂量。

口服糖耐量实验(OGTT)是检测糖尿病前期症状的一种实验室检查方法^[18-20]。当血糖升高的程度未达到糖尿病诊断标准,不能确诊糖尿病而进行的一种进一步确诊糖尿病的检验方法。低剂量组的血糖虽未达到诊断糖尿病的标准,我们采用口服葡萄糖耐量实验进行进一步验证。从实验结果看出,中剂量组和高剂量组的糖耐量异常,确诊为糖尿病。低剂量组虽不能确诊为糖尿病,但也出现了明显的糖耐量降低。

综上所述,可认为本次研究范围内诱导建立 C57 小鼠 1 型糖尿病模型的最佳方法是连续 5 日腹腔注射 STZ,适宜剂量为 70 mg/kg。

参考文献(References)

- [1] Pighin D, Karabatas L, Pastore C, et al. Role of lipids in the early developmental stages of experimental immune diabetes induced by multiple low dose streptozotocin[J]. J. Appl. Physiol, 2005, 98(3): 1064-1069
- [2] Ichinose K, Kawasaki E, Eguchi K. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy[J]. Am J Nephrol, 2007, 27: 554-564
- [3] Homo-Delarche F, Drexhage HA. Immune cells, pancreas development, regeneration and type 1 diabetes[J]. Trends Immunol, 2004, 25: 222-229
- [4] Cunha JM, Funez FQ, Parada CA, et al. Streptozotocin-induced mechanical hypernociception is not dependent on hyperglycemia[J]. Brazil J Me Biol Res, 2009, 42: 197-206
- [5] Kim JO, Lee GD, Kwon JH, et al. Anti-diabetic effects of new herbal formula in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(3): 421-426
- [6] He Y, Martinez-Fleites C, Bubba A, et al. Structural insight into the mechanism of streptozotocin inhibition of O-GlcNAc-case [J]. Carbohydr Res, 2009, 344(5): 627-631
- [7] Pathak S, Dorfmueller HC, Borodkin VS, et al. Chemical dissection of the link between streptozotocin, O-GlcNAc, and pancreatic cell death [J]. Chem Biol, 2008, 15(8): 799-807
- [8] 宋旻,朴松兰,盛春华,等. STZ 诱导 C57BL 小鼠 T1DM 模型优化的研究[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(1): 36-39
- [9] Song Yang, Piao Song-lan, Sheng Chun-hua, et al. Improved Investigation of C57BL mice T1DM model induced by STZ[J]. Chin J Lab Design, January, 2007, 11(1): 36-39
- [10] 徐斌,董英,张慧慧,等. 苦瓜多糖对链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠的降血糖效果[J]. 营养学报, 2006, 28(5): 401-408
- [11] Xu Bin, Dong Ying, Zhang Hui-Hui, et al. The antihyperglycemic effects of polysaccharide from momordica charantia in stz-induced diabetic mice[J]. Acta Nutimenta Sinica, 2006, 28(5): 401-408
- [12] 王大海,蔡丽娥,王立. 富铬乳酸杆菌对糖尿病大鼠血糖和血脂的影响[J]. 营养学报, 2008, 30(2): 218-219
- [13] Wang Da-hai, Cai Li-e, Wang Li. Influence of Chromium-enriched Lactobacillus on Blood Glucose and Serum Lipid Level in Diabetic Rats[J]. Acta Nutimenta Sinica, 2008, 30(2): 218-219
- [14] 张芳林,李果,刘优萍,等. 实验性 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其糖代谢特征分析[J]. 中国实验动物学报, 2002, (10): 16-20
- [15] Zhang Fang-lin, Li Guo, Liu You-ping, et al. Rat Model of Type 2 Diabetic Mellitus and Its Glycometabolism Characters [J]. Acta Laboratorium Animals Scienita Sinica, 2002, (10): 16-20
- [16] 罗亮,吴语宁,赵默吟. 1 型糖尿病动物模型研究进展[J]. 吉林农业, 2011, (12): 212-213
- [17] Luo Liang, Wu Yu-ning, Zhao Mo-han. Study on Development of Type1 Diabetes Animal Model[J]. Jilin Agriculture, 2011(12): 212-213
- [18] 杨金晶,杨秋萍. 链脲佐菌素诱导糖尿病动物模型的体会[J]. 昆明医学院学报, 2008, (2B): 164-166
- [19] Yang Jin-jing, Yang Qiu-ping. The Experience of Diabetes Animal Model Induced by STZ [J]. Journal of Kunming Medical University, 2008, (2B): 164-166
- [20] 郑素玲,陈超,武炜,等. 链脲佐菌素诱导小鼠 II 型糖尿病模型的研究[J]. 动物医学进展, 2010, 31(7): 60-63
- [21] Zheng Su-ling, Chen Chao, Wu Wei, et al. Study on Type2 Diabetes Mice Model Induced by Streptozotocin [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31(7): 60-63
- [22] Kwon NS, Lee SH, Choi CS, et al. Nitric oxide generation from streptozotocin[J]. FASEB J, 1994, 8(8): 529-533
- [23] Hisafumi Y, Zhenzi J, Maki N, et al. NO-mediated cytotoxicity contributes to multiple low dose streptozotocin induced diabetes but not to NOD diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2009, 83(2): 200-207
- [24] Tong Z, Liu WH. IgG-positive cells surround pancreatic ducts and form multiple layers after streptozotocin treatment[J]. Autoimmunity, 2013, 46(6): 369-374
- [25] Seda O, Kazdova L, Krenova D, et al. Rosiglitazone fails to improve hypertriglyceridemia and glucose tolerance in CD36-deficient BN.SHR4 congenic rat strain [J]. Physiological Genomics, 2003, 12(11): 73-78
- [26] 陈显,柳青. 膜糖蛋白 CD36 缺失对小鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(4): 485-487
- [27] Chen Xian, Liu Qing. Membrane glycoprotein CD36 deficiency promotes insulin resistance in C57BL/6 mice [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2010, 35(4): 485-487
- [28] Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet fed mouse: A model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type2 diabetes[J]. Diabetes, 2004, 53(3): S215-S219