

文章编号:1007-4287(2007)01-0036-04

STZ 诱导 C57BL 小鼠 T1DM 模型优化的研究

宋 旸^{1,2}, 朴松兰³, 盛春华¹, 常 颖¹, 金正贤¹, 张桂珍^{1*}(1. 吉林大学中日联谊医院 中心研究室, 吉林 长春 130033; 2. 吉林大学临床医学三系;
3. 长春中医药大学 病理教研室)

摘要:目的 探索制备 T1DM 小鼠模型优化条件,为研究 T1DM 病因及发病机理提供理想的动物模型。方法 分别应用不同剂量、不同性别小鼠以小剂量、多次注射链脲佐菌素方法(multiple low dose of streptozotocin, MLDS)制备 T1DM 小鼠糖尿病模型,动态监测小鼠血糖水平、体重的变化,比较不同方法糖尿病模型成功率与糖尿病小鼠死亡率。结果 MLDS 诱导雌性 C57BL 小鼠 T1DM 模型 STZ 小剂量组模型成功率为 0,死亡率为 22.06%。STZ 大剂量组模型成功率为 57.14%,死亡率为 28.56%;MLDS 诱导 C57BL 雄性小鼠 T1DM 模型的结果,T1DM 组小鼠模型成功率为 75%,死亡率为 20%;MLDS 诱导雄性 C57BL 小鼠 T1DM 模型再研究结果,T1DM 组小鼠模型成功率为 84.6%,死亡率为 0。结论 C57BL 雄性小鼠更适合用于制备 MLDS 诱导 T1DM 模型,65 mg/kg. BW STZ 造模剂量优于其它三种剂量。

关键词:T1DM;糖尿病小鼠模型;链脲佐菌素;MLDS 方法

中图分类号:R587.1

文献标识码:A

Improved investigation of C57BL mice T1DM model induced by STZ SONG Yang, PIAO Song-lan, SHENG Chu-hua, et al. (Central Laboratory, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, China)

Abstract: Objective To investigate the methods of T1DM mice model induced by STZ for preparing a better mice T1DM model. **Methods** To induce T1DM mice model with the injection of MLDS of different dosages of streptozotocin, female and male mice respectively. The blood glucose, body weight, DM incidence, and DM mortality of mice model were inspected. **Results** DM incidence and mortality was 0% and 22.06% in C57BL female T1DM model mice; the incidence and mortality was 75% and 20% respectively in C57BL male T1DM model mice; the DM incidence was 84.6% but its mortality was 0% in C57BL male T1DM model mice induced by STZ 65 mg. BW. **Conclusion** The better T1DM mice model was made in C57BL male mice and injection of STZ 65 mg. BW. with MLDS.

Key words: type 1 diabetes; mice model; multiple low dose of streptozotocin

(Chin J Lab Diagn, 2007, 11: 0036)

糖尿病是由遗传因素与环境因素共同导致的复杂病^[1],由于糖尿病的病因与发病机理还未得到最终阐明,缺乏控制糖尿病发病率的有效措施,使糖尿病发病率随着人们生活条件的改善呈现不断攀升的趋势。在糖尿病研究领域优化糖尿病实验动物模型的研究,寻找更接近人类糖尿病自然发病过程的动物模型,对于深入研究糖尿病病因及发病机理,阐明糖尿病及其并发症发生发展的细胞分子生物学机制具有重要的科学意义。

在 1 型糖尿病实验动物模型研究领域,传统上应用一次大剂量胰岛 β 细胞毒化学药物(链脲佐菌素或四氧嘧啶等)注射造模,由于大量胰岛 β 细胞短时间骤然破坏,模型鼠往往死于化学药物注射后的高胰岛素血症与继之发生的重度糖尿病,较高的模

型动物死亡率常常使实验研究进入困境。随着人类基因组计划的实施与糖尿病病因与发病机理研究的不断深入,不仅提出了胰岛 β 细胞受损的自身免疫机理、氧化侵袭机理、细胞凋亡机理、遗传学分子机理^[2-10],而且证实了胰岛 β 细胞破坏引起糖尿病发作是一个渐进发生、累积加重的过程,相应地糖尿病实验动物模型由小剂量多次注射链脲佐菌素(multiple low dose of streptozotocin, MLDS)鼠模型代替了一次大剂量注射化学药物实验鼠模型。尽管 MLDS 糖尿病动物模型问世以来为糖尿病病因与发病机理的细胞分子机理研究奠定了重要科学基础,但在动物模型制备的化学药物种类、注射剂量、注射时间等条件选择上存在较多问题。本研究通过对 MLDS 方法诱导的 T1DM 模型优化研究,为 T1DM 模型制备提供进一步的最佳化条件,使糖尿病病因与发病机理的研究建立在更科学化的实验动物模型基础之上。

1 材料与方法

1.1 小剂量多次注射链脲佐菌素(multiple low dose

基金项目:吉林省科技厅国际合作项目资助(20020704);吉林大学本科生研究计划资助

* 为通讯作者

of streptozotocin, MLDS) 诱导雌性 C57BL 小鼠 T1DM 模型的研究

1.1.1 实验动物 健康纯系雌性 C57BL 小鼠 22 只, 体重 16 ± 2 g, 由中国医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 实验分组与模型制备方法

22 只雌性小鼠适应性喂养 1 周之后随机分为 3 组: (1) STZ 小剂量组 (7 只, 52 mg/kg. BW); (2) STZ 大剂量组 (7 只, 72 mg/kg. BW); (3) 正常对照组 (8 只)。

应用 0.1M pH4.4 枸橼酸盐缓冲液配制 0.6% STZ 溶液, 各组按相应剂量腹腔注射, 每日 1 次, 连续 5 日。正常组注射同体积的 0.1M pH4.4 枸橼酸盐缓冲液。

模型判别标准: 注射 STZ 第 19 天小鼠血糖大于等于 12 mmol/L, 持续 2 周可作为 T1DM 动物模型。

1.1.3 观察指标

(1) 一般状态: 观察小鼠饮水进食及活动情况, 每周测一次体重。

(2) 使用末梢全血血糖测试仪 (怡成公司), 每周测一次血糖浓度。

(3) 糖尿病模型成功率与死亡率。

1.2 MLDS 诱导 C57BL 雄性小鼠 T1DM 模型的研究

1.2.1 实验动物 健康纯系雄性 C57BL 小鼠 40 只, 体重 22 ± 2 g, 由吉林大学基础医学部实验动物中心提供。

1.2.2 实验分组、模型制备与观察指标

40 只雄性小鼠适应性喂养 1 周之后随机分为 2 组: (1) T1DM 组 (20 只); (2) 正常组 (20 只)。模型制备方法同前, 以 75 mg/kg. BW 剂量给 T1DM 组小鼠腹腔注射。糖尿病模型判别标准同 1.12; 观察指标同 1.13。

1.3 MLDS 诱导雄性 C57BL 小鼠 T1DM 模型再研究

1.3.1 实验动物 健康纯系雄性 C57BL 小鼠 26 只, 体重 18 ± 2 g, 由吉林大学基础医学部实验动物中心提供。

1.3.2 实验分组、模型制备与观察指标

将 26 只雄性小鼠适应性喂养 1 周之后随机分为 T1DM 组 (13 只); 正常组 (13 只), 模型制备方法同前, 以 65 mg/kg. BW 剂量给 T1DM 组小鼠腹腔注射。糖尿病模型判别标准与观察指标分别同 1.12 与 1.13。

2 实验结果

2.1 MLDS 诱导雌性 C57BL 小鼠 T1DM 模型结果

2.1.1 T1DM 小鼠一般状态

STZ 小剂量组和 STZ 大剂量组小鼠于注射 0.6% STZ 一周后饮水量明显增加, 约为造模前的 2-3 倍, 进食量也明显增加, 活动减少, 以 STZ 大剂量组为重。在整个实验期间正常组小鼠体重有稳步增长; STZ 小剂量组小鼠体重在注射 1 周后短暂下降之后增长缓慢; STZ 大剂量组小鼠体重也在 1 周下降, 下降幅度大于 STZ 小剂量组, 详见图 1 (W0 周为注射 STZ 第 1 天)。

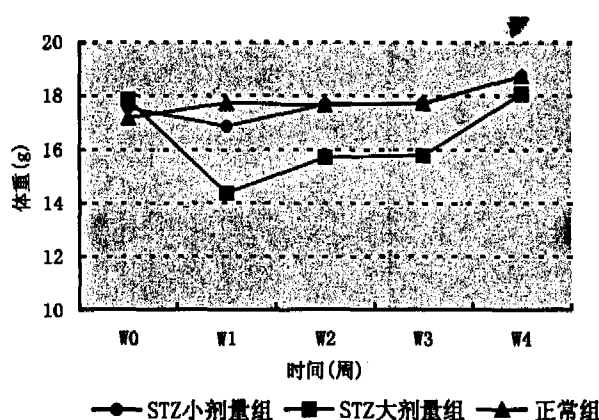


图 1 T1DM 小鼠体重曲线

2.1.2 注射 STZ 前后 T1DM 小鼠血糖水平测试结果

注射 STZ 第 33 天, STZ 小剂量组小鼠血糖水平高于正常组, 但无显著差异; STZ 大剂量组小鼠血糖水平明显升高 (自身前后对比 $P < 0.01$), 并明显高于 STZ 小剂量组和正常组, $P < 0.01$, 详见图 2。

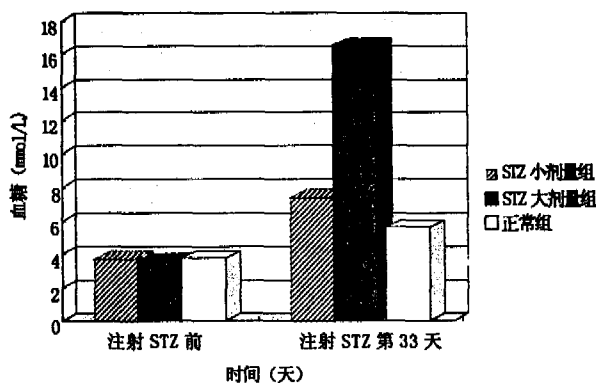


图 2 注射 STZ 前后 T1DM 小鼠血糖水平

2.1.3 T1DM 组小鼠模型成功率及死亡率

注射 STZ 第 33 天 STZ 小剂量组模型成功率为

0,死亡率为 22.06%。STZ 大剂量组模型成功率为 57.14%,死亡率为 28.56%。

2.2 MLDS 诱导 C57BL 雄性小鼠 T1DM 模型结果

2.2.1 T1DM 小鼠一般状态

注射 STZ 第 8 天开始, T1DM 组小鼠饮水量及尿量明显增加, 活动减少, 体重下降明显(自身前后对比 $P < 0.01$), 体重明显低于正常组 ($P < 0.01$), 详见图 3。

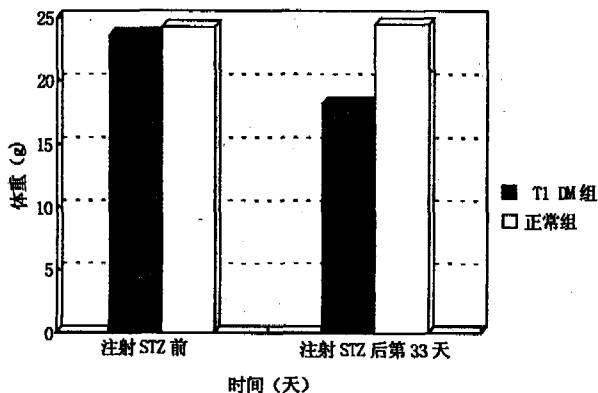


图 3 注射 STZ 前后 T1DM 小鼠体重变化

2.2.2 T1DM 小鼠血糖测试结果

T1DM 组小鼠注射 STZ 前后血糖变化极显著 ($P < 0.01$), 注射 STZ 后第 33 天血糖明显高于正常组 ($P < 0.01$), 见图 4。

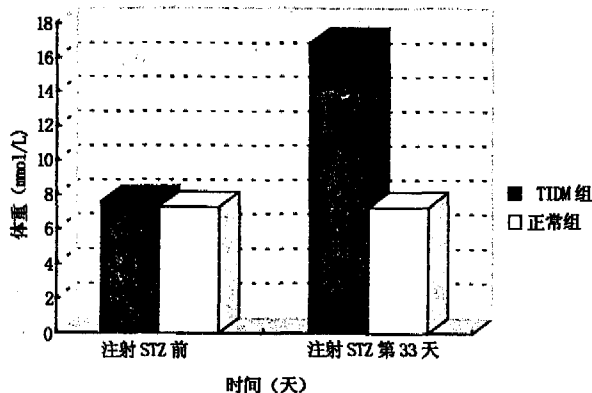


图 4 注射前后 T1DM 小鼠血糖水平

2.2.3 T1DM 组小鼠模型成功率及死亡率

造模 20 只小鼠, 注射 STZ 第 33 天 T1DM 组小鼠模型成功率为 75%, 死亡率为 20%。

2.3 MLDS 诱导雄性 C57BL 小鼠 T1DM 模型再研究结果

2.3.1 T1DM 小鼠一般状态

注射 STZ 第 8 天开始 T1DM 小鼠饮水量及尿量明显增加, 活动减少, 小鼠体重明显下降(自身前后对比 $P < 0.05$), 并且明显低于正常组, $P < 0.05$, 详见图 5。

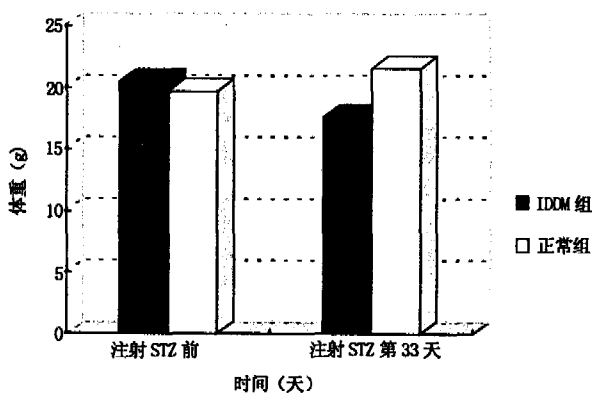


图 5 注射 STZ 前后 IDDM 小鼠体重变化

2.3.2 T1DM 小鼠血糖测试结果

T1DM 组小鼠注射 STZ 后第 33 天, 血糖明显升高(自身前后对比 $P < 0.01$), 并且高于正常组 ($P < 0.01$)。见图 6。

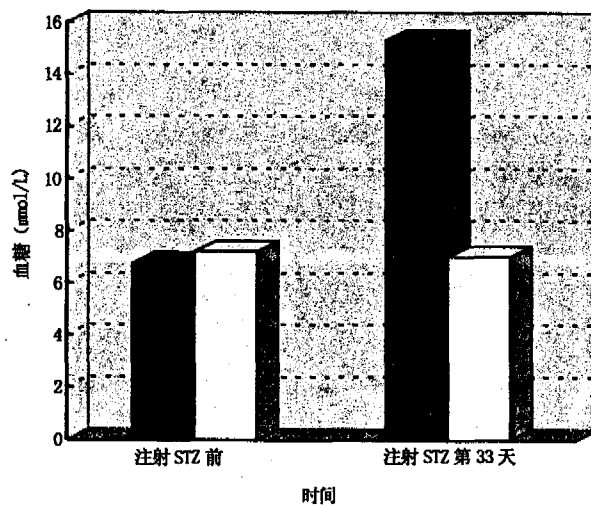


图 6 注射 STZ 前后 T1DM 小鼠血糖水平

2.3.3 T1DM 组小鼠模型成功率及死亡率

本实验共造模 13 只, 注射 STZ 第 33 天 T1DM 组小鼠模型成功率为 84.6%, 死亡率为 0。

3 讨论

化学药物诱导的糖尿病鼠模型, 应用时间较长的是一次性大剂量注射 β 细胞毒药物(链脲佐菌素或四氧嘧啶), 短时间内大量胰岛 β 细胞破坏往往使

动物死于 β 细胞迅速破坏、释放胰岛素所致的严重低血糖和随之产生的胰岛素分泌减低所致的严重高血糖反应。

近年来糖尿病的分子病因学及发病机理研究取得了长足的进展,提出了T1DM发病是由遗传因素与环境因素联合致病的复杂病。 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。从 β 细胞代谢偏移到糖尿病发作,经过较长时间的潜临床状态。因此,出现了与人类T1DM发病机理相适应的动物模型,即应用小剂量多次注射STZ方法(multiple low dose of streptozotocin, MLDS)诱导的糖尿病鼠动物模型。与一次大剂量注射化学药物模型相比,MLDS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,不失为一种较先进的T1DM动物模型。

STZ是经典的致糖尿病药物,具有活泼的烃基结构,可以直接损伤胰岛 β 细胞DNA,刺激其释放 H_2O_2 。过量的 H_2O_2 及其转化形成的羟自由基引起细胞DNA断裂,增加脂质过氧化物水平,抑制胰岛素释放^[11]。此外STZ存在亚硝基基团,可产生胰岛 β 细胞毒物质-NO。NO参与许多自由基级联式反应,诱导胰岛 β 细胞凋亡;还能抑制线粒体功能,降低 β 细胞代谢和胰岛素分泌^[12]。STZ由于对实验动物的胰岛 β 细胞具有高度选择性的毒性作用,被较多地用于诱导实验性糖尿病动物模型。C57BL小鼠是近交系小鼠,因其实验结果精度高、可比性好、应激反应均一等优点受到较多的应用。

本实验采用MLDS方法,应用雌性和雄性C57BL小鼠诱导了自身免疫性小鼠T1DM模型。为了提高T1DM鼠模型制备的科学性,本实验分别使用C57BL雌性小鼠和雄性小鼠进行3个批次模型优化研究。第一次实验选用C57BL雌性小鼠,以两种不同剂量(52 mg/kg. BW和72 mg/kg. BW)STZ制备T1DM模型,实验结果表明,大剂量组模型成功率明显高于小剂量组,但尚未达到理想的水平。第二次实验选用C57BL雄性小鼠,以75 mg/kg. BW剂量制备模型,模型成功率高于第一次实验的大剂量组,但死亡率较高。第三次实验选用C57BL雄性小鼠,以65 mg/kg. BW剂量制备模型,模型成功率高于第二次实验的T1DM组,且死亡率较低。实验三中以较

低的剂量(与第一次实验中大量组相比)获得较高的模型成功率可能与雄性小鼠体内睾酮提高STZ诱导的高血糖症反应有关^[13,14]。

总之,C57BL雄性小鼠更适合用于制备STZ诱导T1DM模型,65 mg/kg. BW STZ造模剂量优于其它三种剂量。

参考文献:

- [1]王 姐. 预防I型糖尿病的可能性[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2001, 17(1):5.
- [2]Mathews CF, Grazer RT, Baglay RJ, et al. Genetic analysis of resistance to Type-1 Diabetes in ALR/Lt mice, a NOD-related strain with defenses against autoimmune-mediated diabetogenic stress [J]. Immunogenetics, 2003, 55(7):491.
- [3]Brodnicki TC, Quirk F, Iorahan G. A susceptibility allele from a nondiabetic-prone mouse strain accelerates diabetes in NOD congenic mice[J]. Diabetes, 2003, 52(1):218.
- [4]Kagi D, Ho A, Odermatt B, et al. TNF receptor 1-dependent beta cell toxicity as an effector pathway in autoimmune diabetes[J]. J Immunol, 1999, 162(8):4598.
- [5]Lanagawa O, Shimizu J, Vaupel BA. Thymic and postthymic regulation of diabetogenic CD8 T cell development in TCR transgenic nonobese diabetic (NOD) mice[J]. J Immunol, 2000, 164(10):5466.
- [6]余奇文, 李宁丽, 张冬青, 等. 可溶性 Fas、可溶性 Fas 配体与细胞因子在I型糖尿病发病中的意义[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2001, 11(1):31.
- [7]Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, et al. The role of Fas in autoimmune diabetes[J]. Cell, 1997, 89:17.
- [8]Tabatabaie T, Graham KL, Vasquez AM, et al. Inhibition of the cytokine-mediated inducible nitric oxide synthase expression in rat insulinoma cells by phenylN-tert-butylnitron[J]. Nitric Oxide, 2000, 4(2):157.
- [9]Benov L, Batinic-Haberle I. A manganese porphyrin suppresses oxidative stress and extends the life span of streptozotocin-diabetic rats[J]. Free Radic Res, 2005, 39(1):81.
- [10]Dursun E, Timur M, Dursun B, Suleymanlar G, Ozben T. Protein oxidation in Type 2 diabetic patients on hemodialysis[J]. J Diabetes Complications, 2005, 19(3):142.
- [11]Kanto H, Fujii J, Seo HG, et al. Apoptosis cell death triggered by nitric oxide in pancreatic β -cells[J]. Diabetes, 1995, 44(7):733.
- [12]Kwon NS, Lee SH, Choi CS, et al. Nitric oxide generation from streptozotocin[J]. FASEBJ, 1994, 8(4):529.
- [13]Abdelhakim L, Mohamed H, Patricia SO, et al. Interleukin-11 inhibits NF- κ B and AP-1 activation in islets and prevents diabetes induced with streptozotocin in mice [J]. Experimental Biology and Medicine, 2004, 229(5):425.
- [14]Rossini AA, Williams RM, Appel MC, et al. Sex differences in the multiple-dose streptozotocin model of diabetes [J]. Endocrinology, 1978, 103(4):1518.

(收稿日期:2006-10-16)