



STZ 诱导恒河猴糖尿病动物模型的建立

朱 华, 刘 颖, 马春梅, 黄 澜, 秦 川

(卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,
中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 复制稳定的链脲佐菌素诱导糖尿病恒河猴动物模型。方法 健康恒河猴 5 只, 小剂量 (30 mg/kg) 多次静脉注射链脲佐菌素, 分别在注射后 2、3 个月进行葡萄糖耐量实验并连续观察血糖、胰岛素、C 肽的变化。连续观察 12 个月。结果 随着时间推移, 动物出现典型的糖尿病症状。3 只动物的血糖静脉注射 1 次后持续 10 周稳定, 另外 2 只分别进行了第 2、3 次注射。动物血糖在 12 个月内平稳上升、胰岛素、C 肽分泌持续下降。2 个月时葡萄糖耐量减低明显 ($P < 0.01$)。结论 小剂量多次注射 STZ 后恒河猴可出现持续、稳定的糖尿病表现, 可作为相关研究的动物模型。

【关键词】 糖尿病; 模型, 动物; 恒河猴; 链脲佐菌素

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)06-0053-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.06.012

Establishment and Evaluation of Experimental Rhesus Monkeys Diabetes Model

ZHU Hua, LIU Ying, MA Chun-mei, HUANG Lan, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science (CAMS) & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To make a reproducible diabetes mellitus model in macaques by injecting streptozotocin (STZ). **Methods** we used STZ (30 mg/kg of body weight, intravenously, 3days) to five macaques. The dynamic changes of the glucose, C-peptide and insulin contents in plasma were measured for 12 months. The IVGTT were made at 2 and 3 month. **Results** Three of five monkeys became markedly hyperglycemic, 2 other monkeys received a second and third dose of STZ intravenously (30 mg/kg) after the first dose. Compared with the contents before injection, the glucose contents increased significantly while C-peptide and insulin contents reduced in plasma in macaques 1 week after streptozotocin injection ($P < 0.01$), Diabetic monkeys also had abnormal responses to an intravenous glucose tolerance test at 2 and 3month. **Conclusion** The results showed that low dose with 30 mg/kg STZ could lead to the significant changes in glucose, C-peptide and insulin content stably, indicating that macaques diabetes mellitus model was established successfully.

【Key words】 Diabetes mellitus; Model, animal; Rhesus monkey; Streptozotocin

目前糖尿病的研究所采用的动物多为大、小鼠,造模方法有自发和化学诱导等方法。自发糖尿病动物模型来源少、饲养条件苛刻,复制的模型周期长、方法复杂,有的死亡率、稳定性差。因此简

[基金项目] 863 课题 (2009ZX09503-025)。

[作者简介] 朱华, 副主任技师, 研究方向: 病理与病理生理学。E-mail: zhuh@cnilas.org。

[通讯作者] 秦川, 教授, 博士生导师。研究方向: 病理与病理生理学 E-mail: chuanqin@vip.sina.com。

单、经济的建立一种理想的糖尿病动物模型,模拟糖尿病的发病因素、发病过程和临床特征来研究糖尿病的发病机制和防治方法显得尤为重要。本文在现有文献基础上,用链脲佐菌素(STZ)诱导复制稳定的恒河猴糖尿病模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年雄性恒河猴 5 只,购自军事医学科学院实验动物中心,年龄 4~6 岁,体重 5.5~6.5 kg。动物合格证号:SCXK-(军)2007-005。实验动物使用许可证号 SYXK(京)2010-0030。

1.2 研究方法

1.2.1 基础指标采集:动物经过 4 周检疫期,采集体重、尿常规(定性、定量)、血糖、血清生化指标等的本底值无异常。

1.2.2 静脉葡萄糖耐量实验(IVGTT):50%葡萄糖注射液,0.5 g/kg 体重静脉推注,2~4 min 内注射完毕。以葡萄糖输注结束时为零点,于 0、5、10、20、30、40、60 min 测定血糖、胰岛素和 C 肽值。使用化学发光法进行检测,检测仪器 SIEMENS 2000 全自动化学发光分析仪。

1.2.3 STZ 的配制:柠檬酸 2.1 g,柠檬酸钠 2.94 g,分别用生理盐水定容至 100 mL,使其各自的浓度为 0.1 mol/L,取上述柠檬酸溶液 28 mL,柠檬酸钠溶液 22 mL 充分混匀,4℃ 冰箱保存备用。临用前用 0.1 mol/L 的柠檬酸缓冲液配成浓度为 3% 的 STZ (sigma,货号 365548)溶液,现用现配,注射时不用的 STZ 置于冰上。

1.2.4 模型制作:动物禁食 12 h 后,缓慢静脉注射新鲜配制的 STZ 30 mg/kg,时间不少于 2 min。连续给药 3 d,末次注射后 72 h 后检测末梢血空腹血糖,血糖 > 7.0 mmol/L 为模型成立。此后每隔 1 周监测一次末梢血空腹血糖,动物的血糖出现降低即再次注射。

1.2.5 检测指标和频率:分别在注射 STZ 前,给药后 2、3 个月进行葡萄糖耐量实验,动物末梢血空腹血糖全部稳定后,每月采集一次空腹静脉血,进行

糖化血清蛋白、尿常规、转铁蛋白、尿蛋白定量、尿微量白蛋白、尿 β 微球蛋白等指标的检测,并观察记录动物的体重变化和临床症状。

1.2.6 数据统计:数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示,数据处理采用 t 检验。

2 结果

2.1 临床症状

给药后动物出现渐进性的典型三多一少糖尿病症状:尿量增多,排尿次数增多;饮水量和饮水次数增多;食量增加但体重减轻(见表 1),9 个月后体重的减轻与造模前存在显著性差异($P < 0.05$)。动物表现出明显的精神不振,被毛脱落,皮肤破溃后不易愈合。一只动物在给药 9 个月后失明。

2.2 血糖、胰岛素、C 肽的变化

10 周时 5 只动物血糖全部达到稳定状态,其中 3 只的末梢血糖静脉注射 3 d 后持续 10 周稳定。0154 号动物的末梢血糖在第 4 周下降到 5.28 mmol/L,进行了第 2 次注射,连续注射 3 d,总给药量 180 mg/kg,此后血糖逐渐稳定上升。0096 号动物的血糖注射后第 3 周下降到 4.88 mmol/L,再次注射后 1 周、2 周(第一次注射后 4 周、5 周)的血糖分别为 5.26 mmol/L、5.01 mmol/L,仍未显著升高,于再次注射后 2 周进行了第 3 次注射,总给药量 270 mg/kg。此后末梢血糖逐渐稳定上升。所有动物的末梢血糖稳定后开始测定静脉血血糖、C 肽、胰岛素,与血糖的逐渐升高相对应,胰岛素、C 肽的分泌呈持续下降趋势。(图 1,2)

2.3 IVGTT 实验结果

给药前动物空腹血糖、胰岛素、C 肽平均值均在正常水平,5 min 达到峰值,60 min 恢复到正常水平,说明动物的胰腺功能正常。2 个月时的空腹血糖已达到 8.29 ± 0.33 mmol/L,60 min 时的血糖不能恢复到注射前水平,同胰岛素、C 肽分泌减少,说明动物的胰岛细胞已受到破坏,不能进行正常的血糖调节。3 个月时这种趋势更加明显。为保证后续试验正常进行不再进行糖耐量实验而只监测血清中血糖、胰岛素、C 肽的变化。

表 1 造模前后体重变化
Tab. 1 Body weight change

时间 Time	造模前 B. I	造模 3 个月 3ms A. I	造模 6 个月 6ms A. I	造模 9 个月 9ms A. I	造模 12 个月 12ms A. I
体重(kg) Body weight	5.6 ± 0.79	5.4 ± 0.93	5.0 ± 0.81	4.6 ± 0.22 *	4.0 ± 0.78 *

注: * $P < 0.05$, B. I: 注射前; A. I: 注射后

Note: B. I: before injection; A. I: after injection

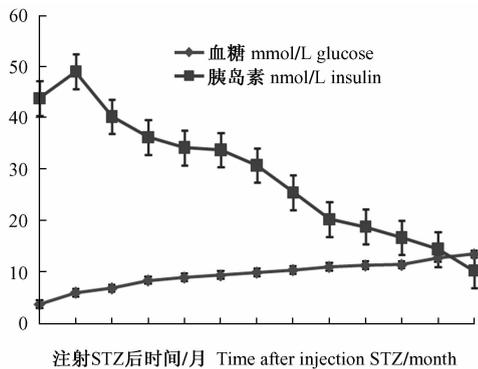


图 1 造模 12 个月的平均血糖、胰岛素变化
Fig. 1 Change of glucose and insulin in 12 months of the animal

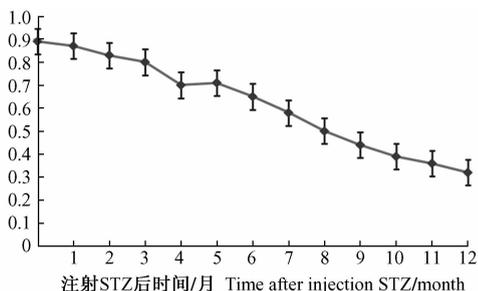


图 2 造模 12 个月的 C 肽分泌变化 (pmol/L)
Fig. 2 Change of C-peptide in 12 months of the animal (pmol/L)

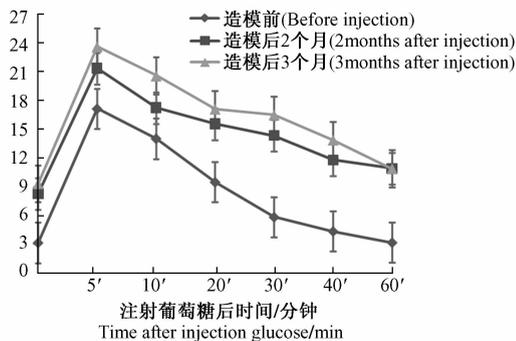


图 3 葡萄糖耐量实验结果 (mmol/L)
Fig. 3 Change of glucose in IVGTT (mmol/L)

3 讨论

所有种类动物模型中,在非人灵长类动物模型中观察到的血糖规律、病理特征与在人类糖尿病患者中观察到的临床特征最为相似。STZ 是一种含亚硝基的化合物,进入体内能特异性地破坏胰岛 β 细胞^[1]。机制之一是通过诱导 NO 的合成,增加对胰岛 β 细胞的氧化侵袭,与胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM) 病人发病时体内氧化侵袭增加相类似^[2]。

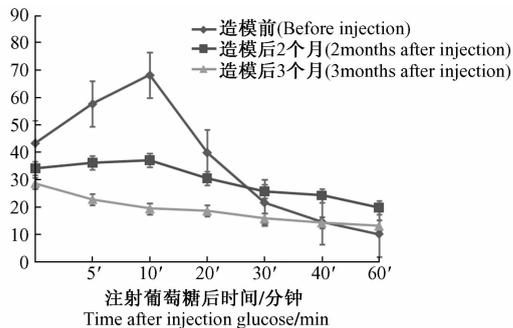


图 4 胰岛素释放实验结果 (nmol/L)
Fig. 4 Change of insulin in IVGTT (nmol/L)

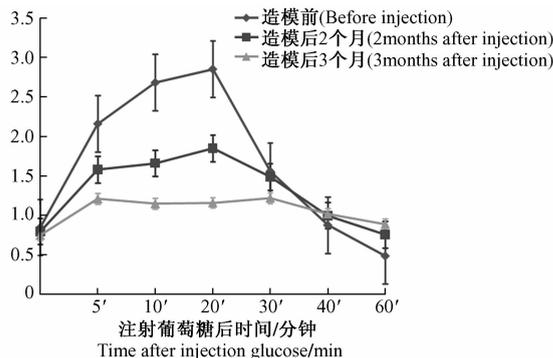


图 5 C 肽释放实验结果 (pmol/L)
Fig. 5 Change of C-peptide in IVGTT (pmol/L)

细胞损伤程度取决于 STZ 的量,低剂量诱导 β 细胞凋亡,高剂量致 β 细胞坏死。小剂量注射 STZ 可破坏少量胰岛细胞,死亡胰岛细胞作为抗原被巨噬细胞吞噬,产生 TH1 刺激因子,使 TH1 细胞系占优势而产生 IL-2 及 IFN- γ ,在胰岛局部促使炎性细胞浸润,并活化释放 IL-1、TNF- α 、IFN- γ 及 NO、H₂O₂ 等物质杀伤细胞^[3]。死亡胰岛细胞作为自身抗原,再次递呈给抗原递呈细胞进行处理,释放细胞因子,放大细胞损伤效应,最终导致 IDDM^[4]。目前采用小剂量多次注射 STZ 诱导的糖尿病模型可有效模拟糖尿病的病程及发病机制,并降低动物模型的死亡率,是研究进行性迟发性糖尿病的发病机制及并发症较理想的模型,其中毒机制的研究也比较深入,在国内外广泛用于糖尿病的造模。有文献报道单次给予 100 mg/kg 的剂量,恒河猴血浆胰岛素和 C 肽含量显著下降,血糖浓度显著升高,但随后逐渐恢复,在 15 周时基本恢复到正常水平。单次给予 150 mg/kg,动物在 4 周时即出现死亡^[5],死亡原因可能由于胰腺 β 细胞严重受损,内源性胰岛素严重不足,而又缺乏外源性胰岛素补充,致使糖代谢严重紊乱而导致,不能做为稳定的糖尿病模型。本实

验的目的是建立稳定的、可长期观察的糖尿病动物模型,因此选择较小剂量(30 mg/kg)多次注射,出现恢复趋势的动物立即给予第二次、第 3 次注射。虽然总的 STZ 用量等于甚至大于单次大剂量注射的量,但胰岛细胞受到的是长期、持久的刺激,使动物在不出现死亡的情况下血糖缓慢平稳增长,到 9 个月时胰岛素、C 肽的分泌显著降低但动物保持存活,并出现了肾脏相关血清生化等指标的改变(另文发表),得到了较满意结果。

恒河猴每只动物之间的个体差异较大,而且胰岛细胞有一定的自我修复功能,有文献报道一个周期的小剂量多次注射后血糖会出现恢复性减低,需要进行第 2 个甚至第 3 个周期的注射^[6],我们的研究验证了这一点:0154、0282 号动物注射后血糖降低,进行第 2 次注射。0282 号动物第 2 次注射后血糖仍未升高进行第 3 次注射。

本研究结果表明在少量多次注射 STZ 后恒河猴可出现持续、稳定的糖尿病表现,可作为相关研究的动物模型,截止到本文脱稿动物仍在继续观察,有关胰腺组织及其它脏器的病理学改变会在动

物安乐后进行报道。

参考文献:

- [1] Litwak KN, Cefalu WT, Wagner JD. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in cynomolgus monkeys: changes in carbohydrate metabolism, skin glycation, and pancreatic islets[J]. *Lab Anim Sci*. 1998,48(2):172-178.
- [2] Cefalu WT, Wagner JD, Bell-Farrow AD, Old world nonhuman primate models of type 2 diabetes mellitus[J]. *ILAR J*. 2006,47(3):259-271.
- [3] Tigno XT, Gerzanich G, Hansen BC. Age-related changes in metabolic parameters of nonhuman primates. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*[J]. 2004,59(11):1081-1088.
- [4] Role of glycated proteins in detecting and monitoring diabetes in cynomolgus monkeys[J]. *Lab Anim Sci*. 1993,43(1):73-77.
- [5] 庞荣清,何占龙,王惠莹,等. 实验性猕猴 1 型糖尿病模型的建立及评价[J]. *中国兽医学报*. 2007,27(2):234-238.
- [6] Kenneth N, Litwak, William T. Cefalu, Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Cynomolgus Monkeys: Changes in Carbohydrate Metabolism, Skin Glycation and Pancreatic Islets [J]. *Lab Anim Sci*,1998,48(2):172-178.

[修回日期]2012-04-25