文章编号:1000-5404(2006)22-2247-03

论著

实验性糖尿病肾病大鼠模型建立及优化

徐 颖,周世文,汤建林,黄永平,陈 莎 (第三军医大学新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提 要:目的 比较几种不同因素组合对实验性糖尿病肾病大鼠模型建立中大鼠体质量、血糖及尿微量白蛋白的影响,确定建立糖尿病肾病大鼠模型的最佳方案。**方法** 雄性SD大鼠30只,随机分为5组,每组6只。A组(正常对照组),B组(高糖高脂饲料),C组[高糖高脂饲料+链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)组],D组(高糖高脂饲料+阿霉素+STZ组),E组(高糖高脂饲料+单肾切除+STZ组)。大鼠造模后每2周测体质量、进食量、饮水量、血糖及尿微量白蛋白。造模12周后,处死大鼠。**结果** E组大鼠明显多食、多饮、消瘦、血糖升高,尿微量白蛋白不仅与正常组比较有显著差异,并且与前几个模型组比较也都有显著性差异。肾/体质量比显著增大。**结论** 以大鼠高糖高脂饲料4周后单肾切除,2周后小剂量腹腔注射链脲佐菌素的模型为最佳。

关键词:糖尿病肾病;动物/模型;单肾切除;链脲佐菌素;阿霉素
中图法分类号:R-332;R587.2;R692 **文献标识码**:A

Optimal selection of rat models of experimental diabetic nephropathy

XU Ying, ZHOU Shi-wen, TANG Jian-lin, HUANG Yong-ping, CHEN Sha (Department of Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical university, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To compare different combinations of several factors in establishing rat model of experimental diabetic nephropathy and decide the preferred plan. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into 5 groups with six rats in every group. A was normal group; B was high-lipids and high-sucrose feeding group; C was high-lipids and high-sucrose feeding + streptozotocin (STZ) group; D was high-lipids and high-sucrose feeding + doxorubicin hydrochloride + STZ group; E was high-lipids and high-sucrose feeding + mono-nephrectomy + STZ group. The body weight, food-intake, water-intake volume, blood sugar, microprotein in urine were detected in every two weeks. Twelve weeks later after model establishment, the rats were put to death, then heart blood were prepared and kidney was weighed. **Results** Although taking more food and water, the rats of group E were more emaciated, of higher blood sugar and microprotein in urine, and increased kidney/body weight ratio. There was significant difference between the rats in group E and groups A, B, C, D. **Conclusion** The rat model established by first high-lipids and high-sucrose feeding for 4 weeks, then mono-nephrectomy, and 2 weeks later intraperitoneal administration of STZ is ideal.

Key words: diabetic nephropathy; animal/model; mono-nephrectomy; streptozotocin; doxorubicin hydrochloride

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是常见的糖尿病并发症之一,由于高血糖及高血脂所致的一系列代谢紊乱及血流动力学改变而导致的肾小球硬化症[1]。DN发病率有逐年上升的趋势[2]。糖尿病肾病发病机制目前尚不明了。为阐明DN的发病机制及筛选有效的药物,建立较为理想的糖尿病肾病动物模型显得尤为重要[3]。目前国内外所进行的糖尿病及其并发症实验动物研究多采用有糖尿病遗传倾向的近交系纯种动物,如KK小鼠、NDD小鼠、ob/ob小鼠、db/db小鼠、NSY小鼠、β糖尿病大鼠、Zucker fa/fa大鼠等。但是这些动物的来源少,饲养条件苛刻,并且其特点是遗传因素在发病过程中占主导地位,与临床上的2型糖尿病发病特征不完全吻合。有研究采用高糖高脂饲料、链脲佐菌素、单肾切除、阿霉素等因素建立糖尿病肾病动物模型,但对各因素组合对模型建立无系统性比较。我们对这几种因素对动物模型建立的作用进行了比较,为糖尿病肾病动物模型的建立提供实验支持和理论依据。

作者简介:徐 颖(1971-),女,江苏省江宁县人,博士,主管药师,主要从事糖尿病肾病方面的研究。电话:(023)68755311, E-mail: yljd@mail.tmmu.com.cn
通讯作者:周世文,电话:(023)68755311
收稿日期:2006-06-28;修回日期:2006-10-12

1 材料与方法

1.1 实验动物和饲料

1.1.1 实验动物 取45~50 d龄的成年雄性Sprague-Dawley大鼠30只,体质量200~250 g,分为5组,每组6只,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.1.2 高糖高脂饲料 普通饲料:白糖:猪油:鸡蛋=70:9:12:9,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

链脲佐菌素(STZ)购自Calbiochem公司;阿霉素注射液购自浙江海正药业股份有限公司;速眠新注射液购自长春农牧大学兽医研究所;血糖试纸购自强生公司;尿微量白蛋白试纸购自Roche公司。

1.3 主要指标及实验方法

1.3.1 大鼠糖尿病肾病大鼠模型的建立 A组正常组:普通饲料喂养;B组高糖高脂饲料组:高糖高脂饲料喂养。C组高糖高脂饲料+STZ组:高糖高脂饲料喂养6周后,腹腔注射STZ。D组高糖高脂饲料+阿霉素+STZ组:高糖高脂饲料喂养4周后,腹腔注射阿霉素,2周后注射STZ。E组高糖高脂饲料+单肾切除+STZ组:高糖高脂饲料喂养4周后,单肾切除,2周后注射STZ。

单肾切除:实验前大鼠禁食12 h,速眠新注射液以1.0 ml/kg腹腔注射,麻醉后消毒腹部,沿腹中线切开皮肤及肌肉,手术缝线沿肾蒂结扎左肾血管,剪掉肾脏,手术针缝合,肌注青霉素2万单位,单笼饲养,每日肌注青霉素2万单位2次,连续1周。

阿霉素给药方法:实验前大鼠禁食12 h,阿霉素按4 mg/kg腹腔注射,1周后再给予3.5 mg/kg。

链脲佐菌素给药方法:实验前大鼠禁食12 h,STZ临用前以0.1 mmol/L枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(pH 4.6)配制成5%的溶液,按40 mg/kg腹腔内注射STZ。

1.3.2 取材及生化指标的测定 大鼠造模后每2周放1次代谢笼,测体质量、血糖及尿微量白蛋白,采集各组大鼠24 h尿液,离心,用试纸测各组大鼠尿液中的尿微量白蛋白。

大鼠造模后12周禁食12 h,速眠新注射液以1.0 ml/kg腹腔注射,心脏取血。沿腹中线切开皮肤及肌肉,取大鼠肾脏,称重。

1.4 统计学方法

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0软件,作方差分析,两组间差异采用q检验。

2 结果

2.1 不同因素对大鼠体质量变化的影响

D组注射了阿霉素,8周时共死亡5只,剩余1只,不再纳入统计。

与A组比较,高糖高脂饲料喂养4周后大鼠体质量显著增加。B组单纯高糖高脂饲料喂养,体质量明显增加与各组比较有显著差异。腹腔注射STZ后仍以高糖高脂饲料喂养,大鼠体质量降低与A组及B组比较有显著性差异。结果见表1。

表1 各组大鼠的体质量变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$, g)

组别	0周	4周	6周	8周	10周	12周	14周	16周
A	247.1±4.0	279.5±11.1	295.5±10.4	308.6±13.1	325.0±12.7	344.3±13.0	367.3±11.7	383.6±12.4
B	262.8±9.3	330.5±10.6[a]	344.8±22.1[a]	387.8±24.3[a]	407.1±24.3[a]	435.3±30.9[a]	471.2±18.7[a]	491.7±17.4[a]
C	258.3±7.4	323.5±13.5[a]	350.0±23.9[a]	333.5±54.2	344.3±30.4	341.8±24.4	340.0±19.5	346.3±20.9
E	261.0±18.9	325.3±27.4[a]	350.3±26.1[a]	357.5±28.4[a]	327.3±36.6	327.8±38.6	334.8±39.9	338.2±40.0[a]

a: $P<0.05$,与A组比较

各组大鼠造模前后体质量差值,B组最高,依次为A、C、E组,B组显著高于A、C、E组,A组显著高于C、E组,C组与E组有显著性差异,表明大鼠饲以高糖高脂饲料,体质量显著升高,注射阿霉素和STZ后体质量显著下降,结果见表2。

表2 各组大鼠的体质量差值及肾/体质量($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	差值(g)	肾/体质量(E-03)
A	135.8±10.1	2.59±0.16
B	228.8±18.6[a]	3.82±0.14[a]
C	88.0±19.7[a]	4.26±0.15[a]
E	77.2±22.6[a]	6.87±0.44[a]

a: $P<0.05$,与A组比较

2.2 不同因素对大鼠肾/体质量变化的影响

各组大鼠造模前后肾/体质量,E组最高,依次为C、B、A组,A组与B、C、E组有显著性差异,B组与C、E组有显著性差异。结果见表2。表明E组造模前后肾代偿性增生最显著。

2.3 血糖的变化

各组大鼠造模前血糖无显著性差异,高糖高脂饲料喂养4周后,B、C、D、E组血糖升高,但无显著性差异,腹腔注射STZ及单肾切除合并腹腔注射STZ后血糖升高显著,16周时与A组及B组比较有显著性差异,而A组与B组比较无显著性差异。结果见表3,表明单纯高糖高脂饲料对血糖升高的影响不显著,而合并STZ及单肾切除对血糖有显著升高。

表3 各组大鼠血糖变化($n=6$, mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	0周	4周	6周	8周	10周	12周	14周	16周
A	2.52±0.17	2.55±0.27	2.62±0.19	4.40±0.39	3.03±0.49	3.60±0.17	5.13±0.1	5.45±0.34
B	2.53±0.26	2.70±0.30	3.18±0.30	5.27±0.44	4.03±0.43	5.36±0.22[a]	6.47±0.25[a]	7.25±1.34
C	2.67±0.29	2.78±0.24	20.25±3.22[a]	17.90±2.75[a]	15.17±5.85[a]	16.60±0.27[a]	16.43±0.22[a]	17.25±7.51[a]
E	2.63±0.29	2.57±0.30	20.86±3.9[a]	19.63±2.63[a]	23.41±1.26[a]	25.38±0.28[a]	26.53±0.26[a]	30.32±4.19[a]

a: $P<0.05$,与A组比较

2.4　尿微量白蛋白的变化

各组大鼠造模前尿微量白蛋白低于检测限，A 组与 B 组 16 周时尿微量白蛋白仍低于检测限，腹腔注射 STZ 及单肾切除合并腹腔注射 STZ 后出现尿微量白蛋白。

16 周时与 A 组比较显著升高，其中 E 组最高。结果见表 4。

表 4　各组大鼠尿微量蛋白的变化（$n=6$，mmol/L，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 周	4 周	6 周	8 周	10 周	12 周	14 周	16 周
A	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
B	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
C	<20	<20	<20	22.5 ±4.18	23.3 ±2.5	26.7 ±2.58	25 ±3.16	23.3 ±4.08
E	<20	<20	<20	23.3 ±2.58	30 ±4.47	31.7 ±5.16	32.5 ±9.35	32.5 ±5.24

3　讨论

对于糖尿病及其并发症的动物实验研究，尤其是动物模型的建立方法，有手术方法建模，化学药物如四氧嘧啶，链脲佐菌素（STZ）损伤胰岛 β 细胞建模，培养自发性糖尿病动物等的方法。目前糖尿病肾病实验研究的动物模型大多采用以下几种途径：① 静脉或腹腔注射大剂量链脲佐菌素（STZ）造成 DM 模型以后依其自然病情发展成 DN 模型（大约 3 个月）[4]。所造成的糖尿病状态类似于人类 1 型糖尿病。此类模型应用于糖尿病并发症研究的局限性在于大剂量 STZ 能够大面积甚至完全破坏胰岛 β 细胞，从而引起血糖急剧升高，大鼠体质量急剧下降，但与 2 型糖尿病并发肾病的病理变化存在差距。②采用小剂量注射 STZ 配合高糖高脂饲料的方法进行建模。大量文献报道也证实了这种建模方法的可行性，空腹血糖升高和糖耐量的异常是此类模型的特征，与临床 2 型糖尿病比较符合。但这种建模出现肾功能变化的时间较长，有时根本不出现。③阿霉素及柔红霉素肾病模型是曾被公认的微小病变模型，动物注射阿霉素后，使细胞膜和细胞内脂质过氧化，造成膜的结构破坏，造成肾小球滤过膜电荷屏障缺损和对大小分子滤过控制的缺陷，其病理改变与人类微小病变肾病极为相似，合并小剂量注射 STZ 可造成类似糖尿病肾病的病理变化[5]。我们在研究中发现由于阿霉素毒性太大，动物存活率低，不能作为常规的建模方法。④为了缩短肾功能损害出现的时间，并且使肾脏的增生变化更加明显，我们尝试采用高糖高脂饲料诱导出胰岛素的抵抗，切除单侧肾脏合并注射小剂量 STZ，单侧肾脏切除后导致对侧肾代偿性增生，而肾增生是 DN 的一个独立危险因素，若再给予小剂量 STZ 注射，加速 DN 的形成，节省造模和实验的时间[6]。在健康状态下，切除单侧肾脏以后，留存肾将发生代偿性增生，Olivetti 观察到幼年大白鼠肾切除 35 d 后留存肾小球体积增加 7.7 倍，而对照组仅增加了 4.5 倍，表明肾小球代偿性增大，剩下的肾代偿功能足以弥补切除肾脏所丧失的功能，但在病理状态下，如在高血糖环境下，肾脏代偿状态很容易被破坏，造成失代偿[7]。

在本实验中采用了几种方法进行对比，并从体质量、血糖、尿微量白蛋白的渐进性变化等方面进行了观察，结果显示：① 单用高糖高脂饲料喂养可以使大鼠体质量增加，并且能升高血糖；② 高糖高脂饲料加用小剂量注射链脲佐菌素可以显著升高血糖、血脂，尿微量白蛋白；③阿霉素由于毒性太大，加上注射 STZ 造成胰岛 β-细胞损害，大鼠死亡率高，不能作为成熟的建模方法；④ 高糖高脂饲料 + 单肾切除 + 注射 STZ 建模后显示，大鼠明显多食、多饮，体质量、肾/体质量比不仅与正常组有显著差异，并且与前几个模型组比较也都有显著性差异。尿微量白蛋白增加。

参考文献：

[1] VORA J, CARIDES G, ROBINSON P. Effects of Losartan-based therapy on the incidence of end-stage renal disease and associated costs in type 2 diabetes mellitus: a retrospective cost-effectiveness analysis in the United Kingdom[J]. Curr Ther Res, 2005, 66(6): 475 - 485.

[2] DALLA-VESTRA M, FIORETTO P. Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 and 2 diabetic patients[J]. Inter Con Ser, 2003, 125 (3): 163 - 169.

[3] 艾　静，王　宁，杜　杰，等. Wistar 大鼠 2 型糖尿病动物模型的建立[J]. 中国药理学通报，2004，20(11)：1309 - 1312.

[4] SAINI K S, THOMPSON C, WINTERFORD C M, *et al*. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, INS-1[J]. Biochem Mol Biol Int, 1996, 39(6): 1229 - 1236.

[5] 张　悦，魏　民，王　谦，等. 阿霉素复制大鼠微小病变肾病模型的研究[J]. 北京中医药大学学报，2002，25(2)：16 - 18.

[6] YOKOZAWA T, NAKAGAWA T, WAKAKI K, *et al*. Animal model of diabetic nephropathy[J]. Exp Toxicol Pathol, 2001, 53(5): 359 - 363.

[7] OLIVETTI G, ANVERSA P, RIGAMONTI W, *et al*. Morphometry of the renal corpuscle during normal postnatal growth and compensatory hypertrophy. A light microscope study[J]. J Cell Biol, 1977, 75(2 Pt 1): 573 - 585.

（编辑　张大春）