

单次大剂量对比多次小剂量 STZ 诱导 昆明小鼠糖尿病肾病的研究

姚亚兰 王金霞 阚春明 吴永贵 王 坤

摘要 目的 研究单次大剂量注射与多次小剂量连续注射链脲佐菌素(STZ)诱导昆明小鼠糖尿病肾病的成模率,以得出最佳的建模方法。方法 26只昆明小鼠随机分为3组:阴性对照组6只(注射等量的柠檬酸盐缓冲液)、单次大剂量组10只(150 mg/kg 单次腹腔注射)、多次小剂量组10只(40 mg/kg 连续注射5 d)。末次注射后,每天记录饮水量,并于注射后第3、7、14、28天检测随机血糖。在注射STZ后4、10周各处死一半的小鼠,处死前分别测量小鼠体重和随机血糖,并记录小鼠成模后第2、4、10周24 h尿量;眼球取血测定血肌酐、血尿素氮;以及取肾脏组织作肾脏病理。结果 与单次大剂量组相比,多次小剂量组成模率高,死亡率低。单次大剂量组、多次小剂量组分别与阴性对照组相比,10周时24 h尿蛋白值均差异有统计学意义($P < 0.05$)。4周小鼠肾组织光镜无明显变化;10周出现肾小球肥大,系膜增生等。结论 多次小剂量注射STZ(40 mg/kg,连续注射5 d)是合理的诱导糖尿病小鼠发生肾病的方法。

关键词 链脲佐菌素;糖尿病肾病;不同剂量;昆明小鼠

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)12-1786-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.009

随着人们生活方式的转变,糖尿病的发病率正在不断提高,其并发症糖尿病肾病的发病率也在升高^[1]。糖尿病肾病是糖尿病最严重的微血管病变之一,其死亡率很高,已经成为终末期肾病的主要原因。在糖尿病肾病发病机制及干预方面的研究中,理想的动物模型是重要的研究工具。传统建模方法有链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)或四氧嘧啶药物诱导^[2],现有的糖尿病肾病模型新进展显示,C57BL/6J品系小鼠可能并不是糖尿病肾病模型的理想动物,利用eNOS基因敲除技术、ob/ob BTBR小鼠可以建立与人类糖尿病肾病更接近的动物模

型^[3]。我国在利用转基因技术制作糖尿病肾病模型方面的技术尚不成熟,因此需要建立容易获取且稳定的糖尿病肾病模型以便于开展相关研究。该研究利用STZ建立昆明小鼠糖尿病肾病模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂 26只雄性昆明小鼠(安徽医科大学实验动物中心),6~8周龄,28~40 g,饲养于清洁、通风的动物房内,室温20~28℃,湿度45%~70%,光线昼夜交替进行,以普通饲料饲养,所有小鼠自由摄食、饮水。STZ(美国Sigma公司);柠檬酸盐缓冲液由柠檬酸(上海苏懿化学试剂有限公司,批号:20150323)和柠檬酸三钠(天津市大茂化学试剂厂,批号:20160227)配制而成,并用0.2 μm的一次性过滤器除菌。

1.2 主要方法

1.2.1 模型的建立 适应性饲养1周后,26只小鼠随机自由分为3组:阴性对照组6只小鼠腹腔注射等体积的柠檬酸盐缓冲液;单次大剂量组10只小鼠腹腔注射STZ 150 mg/kg一次;多次小剂量组10只小鼠连续5 d腹腔注射STZ 40 mg/kg。柠檬酸盐缓冲液由柠檬酸和柠檬酸三钠配制成pH 4.0~4.5、浓度0.1 mol/L。STZ需要现配现用,且在低温条件下由柠檬酸盐缓冲液溶解成STZ溶液。造模之前小鼠禁食14~16 h,注射STZ溶液2 h内给小鼠进食,以防低血糖,注射后连续监测3 d血糖,随后在第1、2、4、10周末均测量血糖,若随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L,并出现多饮、多食、多尿即糖尿病造模成功。以后于第1、2、4、10周用小鼠剪尾法检测血糖(拜安康血糖测试纸及血糖仪,批号分别为142059、2032),并观察小鼠的一般情况。

1.2.2 标本的收集与处理 持续喂养至注射STZ后4周,每组随机选取一半的小鼠用代谢笼收集小鼠24 h尿液并记录尿量,测小鼠尿总蛋白(重庆博士泰生物技术有限公司总蛋白检测试剂盒);眼球取血分离血清,测定血尿素氮、血肌酐;处死小鼠,取双肾,去包膜后将肾脏置于10%中性福尔马林中固

2017-08-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81374034)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肾脏内科,合肥 230022

作者简介:姚亚兰,女,硕士研究生;

王 坤,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: wangkun258@sina.com

定,制作蜡块,其余小鼠于第10周末用上述方法收集血、尿及组织标本。

1.2.3 肾脏组织病理学检测 取固定后的肾组织作石蜡包埋,脱蜡水化,再切成2 μm 切片,以作HE、PAS染色。在普通光学显微镜下观察肾小球、肾小管的形态变化等,且光镜下观察小鼠肾小球肥大、系膜增生及细胞外基质增生程度等变化,并记录评分。评分标准在PAS染色上进行,肾脏切片为3 μm ,评分标准严格按照Tervaeet等提出的病理分型标准执行^[4-5]。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行分析,将所有计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较运用两独立样本 t 检验,多组间比较运用单因素方差分析,分析尿蛋白随时间变化运用Pearson积矩相关系数分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 注射STZ后,给予小鼠充足饲料和水,勤更换垫料,每天观察小鼠活动及状态,记录小鼠饮水量,可显示注射STZ后小鼠出现多饮、多食、多尿情况;在注射STZ 3 d内,单次大剂量组死亡2只小鼠,到达4周期间,单次大剂量组又死亡1只小鼠,注射STZ 4周后,各组均处死一半的小鼠,处理后各组还剩余:阴性对照组3只,单次大剂量组4只,多次小剂量组5只。至观察终点10周期间,单次大剂量组又死亡1只鼠。最终的实验分组中阴性对照组3只,单次大剂量组3只,多次小剂量组5

只,两种剂量组均成模。实验过程中,阴性对照组、多次小剂量组均无死亡,单次大剂量组共死亡4只。

2.2 随机血糖变化 注射STZ后,单次大剂量组血糖迅速升高,多次小剂量组血糖逐渐升高;单次大剂量组血糖在注射STZ 1周后血糖值超过血糖仪最上限,此后维持在高水平上,血糖呈增高趋势($P = 0.009$);多次小剂量组的血糖相比阴性对照组差异有统计学意义($P < 0.05$),多次小剂量组血糖在注射STZ 3周血糖值也超过血糖仪最上限,此后也维持在高水平上,血糖呈增高趋势($P < 0.05$)。见表1。

2.3 小鼠饮水量变化 小鼠在注射STZ后出现糖尿病多饮症状,单次大剂量组和多次小剂量组与阴性对照组比较,饮水量差异有统计学意义($P < 0.05$);单次大剂量组与多次小剂量组相比饮水量差异无统计学意义。见表2。

2.4 各组小鼠尿总蛋白的比较 2、4、10周时,与阴性对照组相比,单次大剂量组和多次小剂量组的24 h尿蛋白显著升高,差异有统计学意义($P = 0.011, 0.002, 0.021$),但两种剂量组之间差异无统计学意义。运用Pearson积矩相关系数分析比较小鼠尿蛋白随时间变化的关系,结果显示:时间与尿蛋白值间呈正相关性($r = 0.818, P = 0.001$),提示尿蛋白随时间有增高趋势。见表3。

2.5 各组小鼠血肌酐、血尿素氮的比较 4、10周时,与阴性对照组相比,单次大剂量组和多次小剂量组的血肌酐、血尿素氮差异均无统计学意义。见表4。

表1 各组小鼠建模前后随机血糖变化 (mmol/L $\bar{x} \pm s$)

项目	阴性对照组($n=6$)	单次大剂量组($n=10$)	多次小剂量组($n=10$)	F值	P值
造模前	7.28 $\pm$ 2.71	9.87 $\pm$ 1.80	9.18 $\pm$ 1.41	1.31	0.291
造模后					
1周	9.28 $\pm$ 1.39	H	20.46 $\pm$ 8.84*	13.30	0.009
3周	7.60 $\pm$ 1.20	H	H	—	—
4周	6.55 $\pm$ 1.32	H	H	—	—
10周	6.00 $\pm$ 1.14	H	H	—	—

H:表示血糖值超过血糖仪最上限,由于血糖值超过血糖仪最上限,无法得出具体数值,因此不能进行统计学分析,但可以得出血糖呈增高趋势;与阴性对照组比较:* $P < 0.05$

表2 各组小鼠24 h饮水量变化 [ml/(只·d) $\bar{x} \pm s$]

造模后	阴性对照组($n=6$)	单次大剂量组($n=10$)	多次小剂量组($n=10$)	F值	P值
1周	5.71 $\pm$ 0.89	21.69 $\pm$ 5.01*	12.53 $\pm$ 8.30*	25.22	0.000
2周	4.41 $\pm$ 0.79	31.30 $\pm$ 4.19*	31.17 $\pm$ 7.65*	63.86	0.000
4周	5.12 $\pm$ 0.57	34.68 $\pm$ 1.41*	39.78 $\pm$ 3.71*	520.76	0.000
0周	4.33 $\pm$ 0.84	49.09 $\pm$ 1.97*	49.43 $\pm$ 0.98*	2 732.96	0.000

与阴性对照组比较:* $P < 0.05$

表3 各组小鼠24 h尿蛋白总量的变化(mg/d, $\bar{x} \pm s$)

注射 STZ 后尿蛋白	阴性对照组($n=6$)	单次大剂量组($n=10$)	多次小剂量组($n=10$)	F 值	P 值
2 周	1.95 ± 0.99	10.47 ± 4.06*	9.78 ± 6.78*	5.68	0.011
4 周	0.86 ± 1.65	19.64 ± 4.32*	38.47 ± 9.35*	19.68	0.002
10 周	3.47 ± 0.61	37.56 ± 15.70*	22.20 ± 11.97*	6.57	0.021

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ 表4 各组小鼠血肌酐、血尿素氮值($\bar{x} \pm s$)

项目	阴性对照组($n=6$)	单次大剂量组($n=10$)	多次小剂量组($n=10$)	F 值	P 值
血肌酐($\mu\text{mol/L}$)					
4 周	39.07 ± 13.49	25.90 ± 6.05	17.25 ± 5.18	5.52	0.036
10 周	18.90 ± 5.94	12.45 ± 0.21	14.73 ± 3.88	1.32	0.363
血尿素氮(mmol/L)					
4 周	9.07 ± 0.65	12.13 ± 1.98	13.55 ± 3.80	2.36	0.165
10 周	8.15 ± 1.20	10.35 ± 0.78	12.33 ± 3.67	0.81	0.497

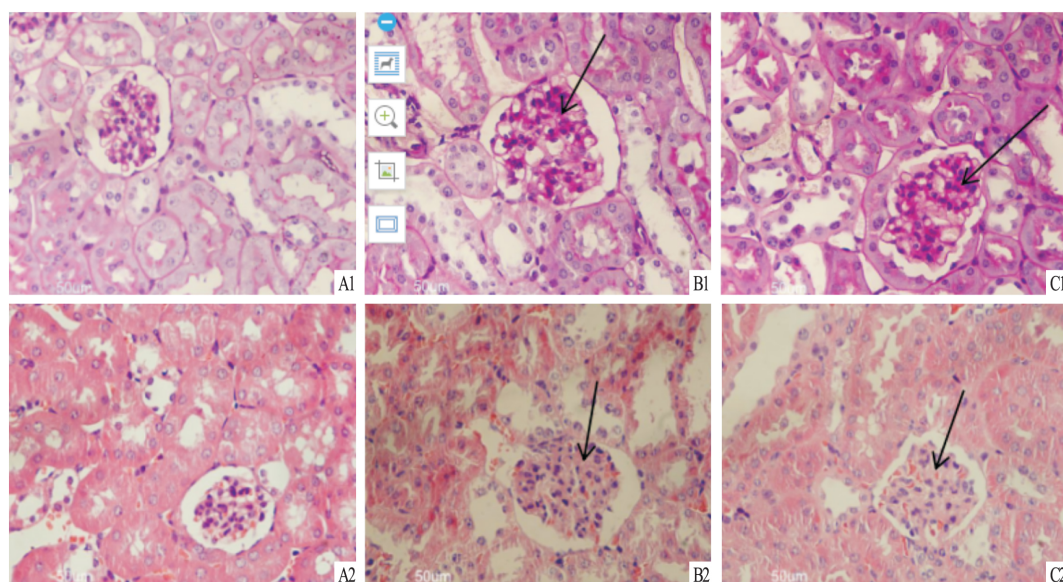


图1 PAS、HE 染色观察显微镜下肾小球、肾小管的形态变化 ×400

A: 阴性对照组; B: 单次大剂量组; C: 多次小剂量组; 1: PAS 染色; 2: HE 染色; 箭头所指为系膜增生, 基质增多处

2.6 肾脏病理 对小鼠肾脏标本进行光镜检查, 光镜检查包括 HE、PAS 染色。HE 染色: 与阴性对照组相比, 两种剂量组小鼠可见明显的肾小球细胞增多, 毛细血管狭窄。PAS 染色: 与阴性对照组相比, 两种剂量组小鼠可见肾小球体积增大, 系膜细胞增生, 系膜基质增多等。见图 1。

标准为 0 ~ 25% 为 0 分, 25% ~ 50% 为 1 分, > 50% 为 2 分。评分结果显示: 单次大剂量组与多次小剂量组评分均高于阴性对照组, 与阴性对照组相比, 单次大剂量组和多次小剂量组评分差异有统计学意义 ($P = 0.011$, $P = 0.001$)。

3 讨论

糖尿病是全身代谢性疾病, 发病率不断增长, 其并发症糖尿病肾病的发病率也在逐年增加, 严重威

胁人类的健康。STZ 是诱导糖尿病的经典化学试剂^[6], STZ 通过对胰岛的毒性损害作用直接损伤胰岛 β 细胞, 使胰岛素分泌不足形成糖尿病, 长期糖尿病会产生并发症糖尿病肾病。STZ 剂量过大则小鼠易死亡, 剂量过小则成模率不高^[7]。对于 STZ 诱发糖尿病的注射剂量的文献报道不一致, 且成模率均较高, 但不同剂量 STZ 是否能引起糖尿病肾病的报道较少; 合适的注射方式及注射时间的报道也不一致。根据文献^[8-9]报道, 本实验选择 150、40 mg/kg 分别进行单次大剂量腹腔注射及多次连续小剂量腹腔注射。所以寻找出最佳剂量 STZ 形成的并发症肾病模型对亟待解决的糖尿病肾病研究尤其重要。

目前研究显示, 糖尿病模型大部分是采用 C57BL/6J 小鼠^[10]、SD 大鼠^[11] 及高脂膳食加小剂量 STZ 大鼠^[12] 造模形成, C57 品系小鼠实验环境要求

高,而利用昆明小鼠造模的实验报道比较少,对其造模的合适剂量、注射方式等研究不够深入,昆明小鼠是我国常用实验动物之一,抗病力和适应力强,繁殖率和成模率高^[13]等优点,所以利用昆明小鼠创建糖尿病肾病模型的研究非常有必要。

STZ 诱导小鼠糖尿病肾病的给药方式、注射方法有多种,本实验采用单次大剂量(150 mg/kg)^[8]、多次小剂量(40 mg/kg 连续 5 d)^[9]腹腔注射给药,结果上述两组小鼠均出现尿量增多、饮水量增多,糖尿病症状非常明显。采取小鼠断尾法检测血糖,结果显示两种剂量组小鼠血糖均明显高于阴性对照组,在造模 1 周后显著升高,这些结果均显示单次大剂量与多次小剂量 STZ 均能较好诱导糖尿病。本研究还显示多次小剂量组成模率高且死亡率低于单次大剂量组,大剂量使胰岛细胞大量破坏,血糖迅速升高,血糖波动幅度大,而小剂量破坏部分胰岛细胞,血糖缓慢升高,血糖相对稳定,这一结果与文献报道^[9]类似。

造模后 4、10 周分别测小鼠尿蛋白和取部分肾脏组织做病理,显示尿蛋白高于阴性对照组,但肾脏病理于 4 周时肾小球肥大,系膜增生等表现不明显,第 10 周时出现肾小球肥大,系膜增生等变化,这些病理变化与文献^[14]报道相似。相比阴性对照组,两种剂量组小鼠 HE 染色可见明显的肾小球细胞增多,两种剂量组小鼠 PAS 染色可见肾小球体积增大,系膜细胞增生,系膜基质增多等,这与早期糖尿病肾病的病理变化一致。10 周时血肌酐值与血尿素氮值反而比 4 周时小,注射 STZ 2、4 周后,两种剂量组尿蛋白相比阴性对照组均有差异统计学意义,但 4 周时肾脏病理变化仍不明显,说明病理改变与尿蛋白的出现明显是不同步的,这些可能是糖尿病肾病早期高滤过的表现,因肾脏病理改变的滞后所以选择 10 周作为观察终点,且实验结果显示 10 周时病理改变和尿蛋白改变均很明显,因此选择 10 周作为观察终点很合理。

本实验的关键是 STZ 的制备与注射以及后期

小鼠的饲养,小鼠要勤换垫料、换水、喂饲料,防止感染。综合实验结果及前人的实验理论,本研究可得出,多次小剂量连续注射 40 mg/kg STZ 是较单次大剂量注射 150 mg/kg STZ 更为合理而有效的建立昆明小鼠糖尿病肾病模型的方法。

参考文献

- [1] Tuttle K R, Bakris G L, Bilous R W, et al. Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference [J]. *Diabetes Care* 2014, 37(10):2864-83.
- [2] 杨润军,李青旺,赵蕊. 四氧嘧啶与链脲佐菌素诱导小鼠糖尿病模型的效果比较[J]. *西北农林科技大学学报* 2006, 34(2):17-20.
- [3] Betz B, Conway B R. Recent advances in animal models of diabetic nephropathy [J]. *Nephron Exp Nephrol* 2014, 126(4):191-5.
- [4] Hoshino J, Mise K, Ueno T, et al. A pathological scoring system to predict renal outcome in diabetic nephropathy [J]. *Am J Nephrol* 2015, 41(4-5):337-44.
- [5] 安玉,徐峰,乐伟波,等. 糖尿病肾病病理分型临床应用的评估[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志* 2013, 22(4):301-8.
- [6] Furman B L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats [J]. *Curr Protoc Pharmacol* 2015, 547(Suppl 70):1-20.
- [7] 夏旋,翁建平. 链脲佐菌素在糖尿病模型中的应用研究[J]. *国际内科学杂志* 2009, 36(9):540-3.
- [8] 田河林,韦立顺,许忠新,等. 糖尿病小鼠肾小球微血管密度与 VEGF 表达的研究[J]. *中国病理生理杂志* 2012, 28(2):358-61.
- [9] 杨巍,罗春元,于春雷,等. 不同剂量 STZ 诱导小鼠糖尿病模型的发病机制[J]. *吉林大学学报* 2006, 32(3):432-5.
- [10] 宋立江,刘长青,郭金铭,等. 四种小鼠链脲佐菌素血糖模型成模率比较[J]. *预防医学论坛* 2009, 15(1):58-9.
- [11] Dang J K, Wu Y, Cao H, et al. Establishment of a rat model of type II diabetic neuropathic pain [J]. *Pain Medicine* 2014, 15(4):637-46.
- [12] 孙俊英,郭延云,陈丽,等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立与评价[J]. *安徽医科大学学报* 2007, 42(4):433-5.
- [13] 杨悦,刘彦娟. 实验用昆明小鼠的饲养管理[J]. *养殖技术顾问* 2008(9):3-4.
- [14] Pourghasem M, Shafi H, Babazadeh Z. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy [J]. *Caspian J Intern Med* 2015, 6(3):120-7.

The study of single high-dose versus multiple low-dose of STZ in inducing diabetic nephropathy in Kunming mice

Yao Yalan, Wang Jinxia, Kan Chunming, et al

(Dept of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the model of diabetic nephropathy in Kunming mice by single-dose high-dose injec-

网络出版时间: 2017-10-16 9:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20171016.0920.010.html>

钛纳米管表面固定成骨细胞特异性多肽的实验研究

高启坤 宋婷婷 吴齐越 庄艳琴 陈慧敏 吴明月

摘要 目的 探讨在 TiO_2 纳米管表面固定成骨细胞特异性识别多肽的方法,为钛种植体表面生物化修饰提供新的方法和思路。方法 应用多巴胺共价键合将多肽固定在 TiO_2 纳米管基材表面,构建生物活性涂层。结果 通过场发射扫描电镜、原子力显微镜、接触角测量仪、X射线光电子能谱仪、荧光显微镜对样品进行表征,证实钛纳米管表面能够成功固定成骨细胞特异性多肽。结论 通过化学偶联的方法,可将成骨细胞特异性识别多肽固定在钛纳米管基材表面,成功构建生物活性涂层。

关键词 TiO_2 纳米管;多巴胺;成骨细胞特异性识别多肽;化学偶联

中图分类号 R 318.08

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)12-1790-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.010

近年来,纳米化改性是钛基种植体表面改性研究的重要方向,仿生构建接近天然骨组织结构的纳米级粗糙表面已成为该领域研究的热点内容^[1]。 TiO_2 纳米管化学性质稳定、结构规整、高度有序,有骨组织相近的纳米级粗糙度且与钛基体结合牢固,其底端封闭,可作为多肽、生长因子等生物活性分子的缓释载体^[2]。该研究通过阳极氧化法在钛基材表面原位构建高度有序的 TiO_2 纳米管阵列,采用具备活化复合功能膜特性的多巴胺作为媒介^[3],将成骨细胞特异性识别多肽固定在钛基材表面,构建钛纳米管-多巴胺-成骨细胞特异性识别多肽复合活性涂层,为钛种植体表面生物化修饰研究提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

1.1.1 材料 纯度 99.99% 钛片(北京中金研新材料科技有限公司);多巴胺(美国 Sigma-Aldrich 公司);异硫氰酸(fluorescein isothiocyanate, FITC)荧光标记的成骨细胞特异性识别多肽(上海科肽生物科

2017-08-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81170993)

作者单位:安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:高启坤,男,硕士研究生;

吴明月,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: wumingyue321@126.com

tion and multiple doses of continuous injection of streptozotocin(STZ) to obtain the best modeling method. **Methods**

Kunming mice($n=26$) were randomly divided into 3 groups: mice in the negative control group($n=6$) were injected with an equal volume of sodium citrate buffer intraperitoneally, mice in the single high-dose group($n=10$) were injected with 150 mg/kg STZ only once, mice in the multiple low-dose group($n=10$) were injected with 40 mg/kg STZ for 5 consecutive days. Then the water intake was recorded daily after the last injections. The blood glucose levels were examined in the 3th, 7th, 14th day and 4th, 10th week. 4 weeks and 10 weeks after injection, half of the mice were sacrificed respectively. The body weight and random blood glucose in mice were measured before death. The 24-hour urine volume were recorded in the 2nd, 4th, 10th week. Serum creatinine(Scr), blood urea nitrogen(BUN) were determined by eyeball blood in the 4th, 10th week, and the kidneys were taken for pathological examination. **Results** The multiple low-dose group displayed higher modeled rate and lower mortality than the single high-dose group. After 10 weeks, between negative control group and single high-dose group, the statistical significance existed in the 24-hour urine protein level of the mice, so did the negative control group and the multiple low-dose group. The renal pathological changes in the 4th week were not obvious, but they exhibited glomerular hypertrophy and mesangial proliferation in the 10th week. **Conclusion** The multiple low-dose STZ injection (40 mg/kg for 5 consecutive days) is a reasonable method for inducing mouse diabetic nephropathy.

Key words streptozotocin; diabetic nephropathy; different dose; Kunming mice