

链脲菌素和四氧嘧啶诱导糖尿病大鼠模型的比较

★ 周吉银 周世文 (第三军医大学新桥医院 重庆 400037)

关键词:糖尿病;动物模型;链脲菌素;四氧嘧啶;大鼠

中图分类号:R 587.1 文献标识码:A

糖尿病(Diabetes mellitus, DM)是一种常见的内分泌代谢疾病,随着生活方式的改变和老龄化进程的加速,尤其是发展中国家糖尿病的患病率正呈快速上升趋势,预计 2025 年全球糖尿病发病人数将超过 3 亿,而我国将达 3800 万,总数仅次于印度^[1],成为继心脑血管疾病、肿瘤之后的另一个全球性的公共健康问题。糖尿病的急、慢性并发症,尤其是慢性并发症累及多个器官,致残、致死率高,给个人、家庭和社会带来沉重的负担,对其防治已成为当今医学科学工作者的一个重大课题。自从 Minkowshi 等^[2]用切除狗胰腺的方法建立糖尿病动物模型已经有了 110 多年的历史,目前已有多种糖尿病动物模型可供选择。为研究糖尿病形成的病因,建立合适的糖尿病动物模型无疑对人类糖尿病研究是至关重要的,它可以解决许多在临床上所不能解决的问题。各种糖尿病模型具有各自不同的特征,这使得对于特定研究选择正确模型显得很困难^[3]。目前国内最常使用的是用化学药物造模,为便于选择和建立合适的模型,本文就两种化学药物诱导糖尿病方面做一综述。

化学药物诱导法是指运用化学药物损伤胰岛 β 细胞导致胰岛素缺乏,引起实验性糖尿病而制得动物模型的方法,是药理学研究中的经典方法。其诱发的糖尿病模型具有发病率高、造模时间短、发病时间整齐和病情的严重程度较统一等优点,但其发病机制及病理生理改变与人类 2 型糖尿病差别太大。一般采用大鼠制作糖尿病动物模型^[4],链脲菌素(Streptozotocin, STZ)和四氧嘧啶(Alloxan)是目前两种最常用的化学药物。

1 链脲菌素(STZ)

STZ 为一种广谱抗菌素,具有抗菌、抗肿瘤作用及致糖尿病的副作用。STZ 对一定种属实验动物的胰岛 β 细胞具有高度选择性毒性作用,可使大鼠等多种动物产生糖尿病。由于其对组织毒性相对较小,动物存活率高,是目前国内外使用最广泛的一种制备糖尿病动物模型的化学诱导剂。

1.1 STZ 致糖尿病的机理 STZ 引起糖尿病的机理至今仍未完全了解清楚。根据文献有以下几种机制参与糖尿病的形成:(1) STZ 直接破坏胰岛 β 细胞:主要见于注射人剂量的 STZ 后所引起的实验性糖尿病。于德民等^[5]给 Wistar 大鼠

注射 STZ 后,即可见到胰岛 β 细胞大量坏死,胰岛 β 细胞数量明显减少,残存的胰岛 β 细胞几乎完全脱颗粒。由于大量乃至全部胰岛 β 细胞被破坏,胰岛素合成和分泌减少或完全缺失,因而引起糖代谢紊乱,最终导致糖尿病形成。(2) STZ 激活自身免疫过程,进一步导致 β 细胞的损害:常见于多次小剂量注射 STZ 诱发的糖尿病,可能是通过免疫机制引起的。Mabley 等^[6]表明体内多聚腺苷二磷酸核糖合成酶的激活导致多次小剂量注射 STZ 复制的糖尿病大鼠 β 细胞损伤和死亡,离体细胞培养也表明其激活在细胞因子介导的胰岛素分泌和成活力方面有作用。(3) 通过一氧化氮(NO)和自由基两种途径损伤胰岛 β 细胞,诱发糖尿病发生: Papaccio 等^[7]在测定 STZ 诱导糖尿病大鼠胰岛 β 细胞超氧化物歧化酶(SOD)水平时,发现随着 STZ 剂量的增加, SOD 相应减少,当 SOD 达到最低值时血糖上升,同时发现伴随 SOD 的下降,胰岛 β 细胞周围巨噬细胞浸润明显增加。El-Mahmoudy 等^[8]观察到对 1 型糖尿病形成的预防是通过 NO 抑制通路来挽救 β 细胞实现的。Takasu 等^[9]在分离 STZ 所致糖尿病大鼠的胰岛细胞时,发现 STZ 能刺激胰岛细胞产生 H_2O_2 ,使细胞 DNA 断裂。由此推断, $STZ \rightarrow H_2O_2 \rightarrow DNA \text{ 断裂} \rightarrow \beta$ 细胞损伤 $\rightarrow$ 糖尿病发生。此外 STZ 含亚硝基,本身能释放 NO,通过 NO 作用而损伤 β 细胞。当联合使用诱导型 NOS 抑制剂和自由基清除剂能阻止多次低剂量 STZ 诱导糖尿病的发生,因此推测 STZ 对 β 细胞损伤是通过 NO 和自由基两种途径进行的^[10]。伴随着 1 型糖尿病发生,凋亡细胞数量增加^[11]、 H_2S 生物合成紊乱^[12],表明细胞凋亡和 H_2S 可能在 STZ 诱导糖尿病发病机理中扮演着重要角色。

1.2 溶剂、用药剂量、给药途径、给药方法的选择及血糖值

近年来一般采用 pH4.5 的 0.1 mol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液或 pH4.0 的酸化生理盐水作溶剂。适当 STZ 剂量的选择主要从用药后糖尿病患病率、自然阴转率、病死率三方面进行观察,以患病率高、自然阴转率低、病死率低的剂量为最佳剂量。目前 STZ 常用剂量为 25~150 mg/kg 体重。Caluwaerts 等^[13]用低剂量 STZ(30, 30/20 和 35 mg/kg 体重)复制的糖尿病模型,其葡萄糖浓度、正常胰岛素对葡萄糖负载的反应和巨大胎儿缺失的高度差异性以及胎儿胰岛素浓

度效应的不一致性,因此认为这不是一个好的妊娠糖尿病模型。给药途径有静脉注射、腹腔注射、皮下注射和心内注射等。一次大剂量、一次小剂量或多次小剂量三种不同的给药方式,均可造成糖尿病。长期以来,动物糖尿病血糖值的确立标准各文献报道不一致,Lynch等^[14]的标准为注射STZ 3~4周后,大鼠的血糖 >13.9 mmol/L确定为糖尿病模型。随着国内外学者研究的深入,已经基本倾向于糖尿病动物空腹或非空腹的成模血糖标准为 $11.1\sim 16.7$ mmol/L。

2 四氧嘧啶

四氧嘧啶大鼠糖尿病模型是评价抗糖尿病药物疗效及安全性的常用模型^[15]。四氧嘧啶是数十年来用于复制糖尿病动物模型的药物,是一种 β 细胞毒剂,可选择性地使大鼠等多种动物的胰岛 β 细胞很快呈现不可逆性的损害、坏死,使其分泌胰岛素的功能发生障碍,注射后24小时可出现持续性高血糖,最终导致血糖过高和糖尿病发生。四氧嘧啶同时也造成肝、肾组织毒性损害,目前相对较少使用。

2.1 四氧嘧啶致糖尿病的机理 四氧嘧啶致糖尿病的作用机制学说较多,包括线粒体靶学说、DNA靶学说和自由基学说^[16]。DNA靶学说认为作为胰岛 β 细胞毒剂的四氧嘧啶能够切断DNA链。机体为修复被切断的DNA链,激活多聚ADP核糖体合成酶的活性,从而使辅酶I含量下降,导致mRNA功能受损,使作为基质的NAD被大量消耗,而其它许多重要的生化合成代谢所必需的NAD减少,导致实质性 β 细胞数不足和 β 细胞合成胰岛素原减少,最终导致胰岛素缺乏。线粒体学说^[17]认为四氧嘧啶能够影响线粒体内丙酮酸氧化过程中的脱羧酶和脱氢酶,从而引起生物体代谢异常,促发糖尿病。自由基的攻击也是四氧嘧啶诱导糖尿病形成的重要原因之一。四氧嘧啶化学性质极不稳定,其作用位点在胰岛 β 细胞膜上,胰岛 β 细胞不易耐受自由基,特别是OH-自由基。在细胞膜外生产的自由基能与胰岛 β 细胞膜上离子化的两个相邻SH基起反应,导致其细胞膜的通透性增高;而自由基对 β 细胞膜的攻击,可造成细胞膜产生脂质过氧化作用,并可使胰岛素受体破坏并减少。由于胰岛 β 细胞中SH基含量较其他组织多,故四氧嘧啶选择性地损害胰岛 β 细胞造成糖尿病的发生^[18]。多不饱和脂肪酸能通过加强抗氧化状态、抑制细胞因子的生成来预防糖尿病产生^[19]并减弱糖尿病的氧化应激^[20]和在高危人群中可能有预防糖尿病的作用^[21]。

2.2 溶剂、用药剂量、给药途径、给药方法的选择及血糖值

四氧嘧啶使用前用无菌生理盐水配制相应浓度的溶液,由于易分解,应现配现用。四氧嘧啶的血浆半衰期仅 $1\sim 2$ min,故静脉注射时,给药速度亦影响实验结果,注射越快越容易引起糖尿病,通常应在30 s内将四氧嘧啶溶液注入。给药剂量与给药途径相关,与血糖浓度升高成正相关,一般按 $100\sim 200$ mg/kg体重静脉或腹腔注射给药^[22]。Federiuk等^[23]发现多次给予四氧嘧啶较单次给药导致明显更高的死亡率。单次高剂量(200 mg/kg体重)腹腔注射是最好的给药方法,可诱导与人类1型糖尿病很相似的大鼠模型,结果有70%的1型糖尿病发病率和只有10%的死亡率,静脉注射相

同剂量更具毒性。为避免在造模期间大量胰岛素释放引起低血糖症和防止酮症酸中毒,经常性地监测葡萄糖浓度和适当地补充糖类和液体是至关重要的。对于需长期处理的模型,每天给予长效胰岛素是安全和有效的,但速效胰岛素须谨慎使用,因能很快降低葡萄糖浓度。选择较多的给药途径为尾静脉注射和腹腔注射,静脉注射给药可节省试剂,动物表现出明显的“三多一少”症状,而腹腔给药的动物“三多一少”症状不明显;造模后15天,静脉给药的动物血糖值仍可维持在较高水平,而腹腔给药的略高于正常水平,不利于对糖尿病的进一步研究,因此宜采用静脉给药。灌胃给药操作简单,对四氧嘧啶溶液的无菌和pH值要求不高,造模后血糖值持续升高,但幅度不大^[24]。四氧嘧啶对动物 β 细胞有特异性损害作用,静脉给药后,动物血糖值出现3个时相的波动,动物的血糖值出现不同程度的高血糖,与文献相符^[25]。王开富等^[26]认为当血糖浓度 ≥ 10.0 mmol/L时,胰岛素 β 细胞有不同程度的损害。低剂量四氧嘧啶对 β 细胞虽有损害作用,但 β 细胞也有自身修复的功能,故剂量过小不能达到明显破坏 β 细胞的有效浓度,使其在短期内修复至正常水平从而导致造模失败。因此建议在动物不禁食的情况下,为造成明显的糖尿病模型所需的静脉注射剂量需 ≥ 40 mg/kg^[27]。此外还应注意动物品系、性别、体重等的选择,体重与造模后糖尿病轻重有相关性。禁食会使动物对四氧嘧啶致高血糖更为敏感,这样能提高造模动物的存活率,获得适用的糖尿病动物模型^[24]。

3 四氧嘧啶和STZ联合用药

四氧嘧啶和STZ分别单独使用时,毒性较大,复制成功率低^[28],为此,郑里翔^[29]采用联合使用小剂量STZ(30 mg/kg)加四氧嘧啶(50 mg/kg)方法,一次静脉注射,既减少每种试剂的剂量,降低毒性,又增加造模的成功率。因STZ用量减少而降低成本,且用此法复制的模型与临床1型糖尿病有很多相似之处,故所建立的大鼠糖尿病模型可代表1型糖尿病模型^[30]。

4 四氧嘧啶和STZ作用的异同点

四氧嘧啶和STZ在致大鼠糖尿病作用方面虽有许多相似之处,如两者造模后测定血糖浓度,方法简便准确,取样量少,可反映葡萄糖的真实值,但仍有几方面的不同。四氧嘧啶造模的大鼠血糖浓度比较稳定且维持长,有明显而永久性的糖尿病症状,是比较理想的糖尿病模型,但死亡率较高,且造模同时也致肝、肾组织毒性损害,部分动物能够自然缓解。影响四氧嘧啶致糖尿病作用的因素很多,例如不同动物对四氧嘧啶的敏感性差异很大,饲料和动物的营养状况也影响其致糖尿病的发病率。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理,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理及并发症较理想的模型,其中毒机制的研究比较深入,组织毒性相对较小,在国内外广泛用于复制糖尿病模型。STZ造模较四氧嘧啶发生率高,稳定而快速,一般不表现自发性缓解,STZ致糖尿病作用也几乎不受饲料成分和营养状态的影响,即复制前不需禁食。两者相比较STZ优于四氧嘧啶,不足之处是

价格较昂贵。

参考文献

- [1] Chen D, Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2005, 7(4): 307
- [2] 杜冠华, 李学军, 张永祥, 等译. 药理学实验指南—新药发现和药理学评价[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 698
- [3] Brondum E, Nilsson H, Aalkjaer C. Functional abnormalities in isolated arteries from Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated diabetic rat models[J]. *Horm Metab Res*, 2005, 37 (Suppl 1): 56
- [4] Pettepher CC, LeDoux SP, Bohr VA, et al. Repair of alkali-labile sites within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells after exposure to the nitrosourea streptozotocin[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(5): 3 113
- [5] 于德民, 吴锐, 尹滩, 等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 1995, 3(2): 105
- [6] Mabley JG, Suarez-Pinzon WL, Hasko G, et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase by gene disruption or inhibition with 5-iodo-6-amino-1, 2-benzopyrone protects mice from multiple-low-dose streptozotocin-induced diabetes[J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 133(6): 909
- [7] Papaccio G, Frascatore S, Esposito V, et al. Early macrophage infiltration in mice treated with low-dose streptozotocin decreases islet superoxide dismutase levels: prevention by silica pretreatment[J]. *Acta Anat (Basel)*, 1991, 142(2): 141
- [8] El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, et al. Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism[J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5(1): 195
- [9] Takasu N, Komiya I, Asawa T, et al. Streptozotocin- and alloxan-induced H_2O_2 generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H_2O_2 as mediator for DNA fragmentation[J]. *Diabetes*, 1991, 40(9): 1 141
- [10] Mabley JG, Southan GJ, Salzman AL, et al. The combined inducible nitric oxide synthase inhibitor and free radical scavenger guanidinoethyl disulfide prevents multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in vivo and interleukin-1 β -induced suppression of islet insulin secretion in vitro[J]. *Pancreas*, 2004, 28(2): E39
- [11] Kolesnyk Iu M, Trailin AV, Orlovskiy MA. Study of apoptosis manifestations in streptozotocin diabetes mellitus[J]. *Fiziol Zh*, 2003, 49(5): 82
- [12] Yusuf M, Kwong Huat BT, Hsu A, et al. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(4): 1 146
- [13] Caluwaerts S, Horemans K, van Bree R, et al. Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational diabetes mellitus? [J]. *J Soc Gynecol Investig*, 2003, 10(4): 216
- [14] Lynch JJ, 3rd, Jarvis MF, Kowaluk EA. An adenosine kinase inhibitor attenuates tactile allodynia in a rat model of diabetic neuropathic pain[J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 364(2~3): 141
- [15] 张均田. 现代药理学实验方法[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 981
- [16] 杨秀伟, 王多佳. 四氧嘧啶性糖尿病与自由基反应[J]. *国外医学内分泌学分册*, 1994, 14(3): 144
- [17] Sandler S, Welsh M, Andersson A. Nicotinamide does not protect islet B-cell metabolism against alloxan toxicity[J]. *Diabetes*, 1984, 33(10): 937
- [18] 叶燕丽, 王辉云, 王莲桂, 等. 四氧嘧啶制作大鼠糖尿病模型——剂量探讨与方法改进[J]. *实验动物科学与管理*, 2001, 18(2): 54
- [19] Krishna Mohan I, Das UN. Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by polyunsaturated fatty acids [J]. *Nutrition*, 2001, 17(2): 126
- [20] Suresh Y, Das UN. Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus. Effect of omega-3 fatty acids [J]. *Nutrition*, 2003, 19(3): 213
- [21] Suresh Y, Das UN. Protective action of arachidonic acid against alloxan-induced cytotoxicity and diabetes mellitus[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2001, 64(1): 37
- [22] El-Missiry MA, Othman AI, Amer MA. L-Arginine ameliorates oxidative stress in alloxan-induced experimental diabetes mellitus[J]. *J Appl Toxicol*, 2004, 24(2): 93
- [23] Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, et al. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment[J]. *Comp Med*, 2004, 54(3): 252
- [24] 嵇扬, 张葵荣, 王文俊. 建立四氧嘧啶糖尿病模型的研究[J]. *中医药学刊*, 2003, 21(7): 1 125
- [25] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 1 066
- [26] 王开富, 李鸣真, 叶望云, 等. 四氧嘧啶剂量和家兔性别对制作糖尿病模型的影响[J]. *同济医科大学学报*, 1994, 23(3): 223
- [27] 何学令, 尹海林. 四氧嘧啶剂量和给药途径对制作大鼠糖尿病模型的影响[J]. *四川动物*, 2003, 22(4): 255
- [28] Gordon EJ, Markees TG, Phillips NE, et al. Prolonged survival of rat islet and skin xenografts in mice treated with donor splenocytes and anti-CD154 monoclonal antibody[J]. *Diabetes*, 1998, 47(8): 1 199
- [29] 郑里翔. STZ 和 alloxan 联合使用复制实验性糖尿病大鼠模型 [J]. *中国病理生理杂志*, 1999, 15(8): 758
- [30] Sbraccia P, Giaccari A, D'Adamo M, et al. Expression of the two insulin receptor isoforms is not altered in the skeletal muscle and liver of diabetic rats[J]. *Metabolism*, 1998, 47(2): 129

(收稿日期: 2006-03-30)

欢 迎 投 稿 ! 欢 迎 订 阅 !