

• 综述 •

介绍几种诱发性糖尿病动物模型

孙 焕, 陈 广, 陆付耳*

(华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 综述诱发性糖尿病动物模型。方法: 主要对诱发性糖尿病动物模型的制备方法、机理进行综述, 并评价各自的优缺点。结果: 诱发性糖尿病动物模型可分为化学试剂诱发模型、转基因模型、基因敲除模型等。结论: 诱发性糖尿病动物模型的制备方法很多, 各有其特点。糖尿病动物模型研究的不断进展, 为深入探讨糖尿病病因、病机及其药物治疗提供了借鉴。

[关键词] 糖尿病; 诱发性; 动物模型

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2007)02-0065-04

Introduction of Several Methods to Establish the Induced Animal Models of Diabetes Mellitus

SUN Huan, CHEN Guang, LU Fu-er*

(Institute of Integrative Traditional & Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Hubei Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To introduce some methods of producing the induced animal models of diabetes mellitus. **Methods:** The preparation methods and mechanism for the induced animal models of diabetes mellitus are summarized. The advantage and disadvantage of each method are reviewed respectively. **Results:** The induced animal models of diabetes mellitus currently available could mainly be divided into three categories: chemical reagent induced model, transgenic model, gene knock-out model, etc. **Conclusion:** There are many methods in establishing the induced animal models of diabetes mellitus with their own characters individually. The research progress on animal models of diabetes mellitus might facilitate the further exploration on the etiology, pathogenesis and drug therapy of diabetes mellitus.

[Key words] Diabetes mellitus; Inducibility; Animal model

糖尿病动物模型的制备方法多种多样, 目前一般分为自发性动物模型和诱发性动物模型。自发性动物模型价格昂贵, 饲养困难, 其应用受到限制。这里重点介绍诱发性动物模型的制备。

1 化学试剂诱发糖尿病

1.1 四氧嘧啶(Alloxan) 诱发糖尿病 Alloxan 是一

种特异的胰岛β细胞毒剂, 可选择性地损伤多种动物的胰岛β细胞, 引起实验性糖尿病。它常用于制备1型糖尿病动物模型。

1.1.1 造模方法 给动物一次性静脉或腹腔注射1%~5%的Alloxan水溶液100~200 mg/kg^[1]。

1.1.2 机制 Alloxan是自由基活性剂, 其所产生的H₂O₂等负离子自由基能选择性地直接损伤胰腺β细胞的DNA, 引起胰腺β细胞的死亡, 胰岛素合成受阻, 引起高血糖^[2]。

1.1.3 优点 用药量少, 操作方法简便且价廉。由

[收稿日期] 2006-07-12

[通讯作者] * 陆付耳, Tel/Fax: (027) 83662220; E-mail: felu@tjh.tjmu.edu.cn

于血浆半衰期仅 1~2 min, 故能快速成模, 且注射速度越快成模率越高^[3]。

1.1.4 缺点 大剂量的 Alloxan 可致动物酮症酸中毒而死亡^[4], 可致肝、肾组织中毒性损害。因此, 使用 Alloxan 制备糖尿病模型时要严格控制剂量^[5]。

1.1.5 注意事项 Alloxan 水溶后不稳定, 应现用现配^[3]。

1.2 链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 诱发糖尿病

STZ 是一种药效强大的烷化剂, 能干扰葡萄糖的转运, 影响葡萄糖激酶的功能, 诱导 DNA 双链的断裂^[6]。

1.2.1 造模方法 (1) 迟发型: 大鼠第 1 天腹腔注射福氏佐剂 0.5 mL, 次日按 25 mg/kg 腹腔注射 STZ 溶液, 每周 1 次, 连续 3 周。此模型接近人类 1 型糖尿病。(2) 速发型: 动物喂以高糖高脂饲料 1~2 个月(饲料组成: 10% 猪油、20% 蔗糖、2.5% 胆固醇、1% 胆酸盐、66.5% 常规饲料)^[7], 诱导出胰岛素抵抗后, 按 25~30 mg/kg 腹腔注射 STZ, 一周后断尾取血测空腹血糖或口服葡萄糖耐量试验。给糖调节受损动物, 继续饲高糖高脂饲料可出现高血糖症、尿酮尿酸症和“三多一少”症状, 进而发生白内障、糖尿病性心脏病、糖尿病性肾病等并发症。此模型适用于人类 2 型糖尿病的研究。

1.2.2 机制 STZ 引起糖尿病的机制可能通过以下几个途径: (1) STZ 直接破坏胰岛 β 细胞: 首先将其 DNA 碱基上的特殊位点烷基化后, 进一步作用于 ADP 核糖体合成酶。从而损伤胰岛 β 细胞, 使 β 细胞数量明显减少, 残存的 β 细胞几乎完全脱颗粒, 胰岛素合成和分泌减少, 引起糖代谢紊乱致血糖升高^[8]。(2) 通过 NO 和自由基途径损伤胰岛 β 细胞: STZ 是一种含亚硝基的化合物, 可以诱导 NO 的合成, 增加对胰岛 β 细胞的氧化侵袭而特异性破坏胰岛 β 细胞^[9]。(3) STZ 激活自身免疫过程: 在迟发型模型中 STZ 诱导胰岛 β 细胞发生改变, 来自脾脏细胞的被激活的具有细胞毒性作用的 T 淋巴细胞将上述变性的胰岛 β 细胞当作靶细胞进行攻击, 导致自身免疫过程的发生, 使胰岛 β 细胞损害加重, 造成胰岛素分泌减少和胰岛素抵抗。(4) 在速发型糖尿病模型中高糖高脂饮食引起血浆甘油三酯和游离脂肪酸水平增高, 后者通过糖脂肪酸循环, 胰岛素信号转导等多个不同途径抑制糖储存, 降低胰岛素敏感性, 而致胰岛素抵抗的发展为糖尿病。近年来有人提出

在基础代谢状态下, 机体葡萄糖氧化作用增强, 而在胰岛素刺激的情况下, 葡萄糖氧化作用降低, 处于“代谢僵直”状态, 从而导致甘油三酯在肌细胞中蓄积, 表现为胰岛素抵抗^[10]。而 STZ 导致 β 细胞功能衰竭, 胰腺不能维持足够的胰岛素分泌来克服胰岛素抵抗, 糖耐量迅速恶化, 发展为糖尿病^[11]。

1.2.3 优点 STZ 对组织毒性小, 诱发动物糖尿病模型成功率高, 且一般不表现自发性缓解^[12]。

1.2.4 缺点 STZ 剂量过大易导致动物死亡。因多尿, 高糖, 体重明显减轻, 故体重较轻的动物易死亡^[13]。

1.2.5 注意 利用 STZ 造模时应控制剂量。STZ 必须 4℃ 保存及新鲜配制^[14]。

1.3 Alloxan-STZ 联合给药诱发糖尿病

1.3.1 造模方法 Alloxan 和 STZ 用 50 mmol/L 无菌枸橼酸钠缓冲液 (pH=4.5) 分别配成 200 mg/mL 和 120 mg/mL 的溶液。实验动物禁食 24 h 后, 氯胺酮麻醉下行股静脉穿刺, 留置导管, 经导管分别注入上述浓度的 Alloxan 50 mg/kg 和 STZ 30 mg/kg。给药后 24 h 血糖升高, 48 h 后血糖 ≥ 11.1 mmol/L 且持续两周维持在此高血糖水平^[15]。

1.3.2 机制 Alloxan 和 STZ 都能通过其毒性作用选择性破坏胰岛 β 细胞, 使胰岛素分泌减少, 从而诱导实验动物的糖尿病状态^[15]。

1.3.3 优点 两药合用, 减少二者剂量, 既降低了由于单用 Alloxan 对肝、肾的损害, 又弥补了单用 STZ 剂量过大而致动物死亡或剂量过小而成模率低的不足^[15]。

1.3.4 注意事项 两药诱导后 10 h 左右可出现急性低血糖反应, 故给药后应在第 8, 10, 13 h 经皮下注射补充一定量的葡萄糖, 以预防发生致命的低血糖^[15]。

1.4 肾上腺素 (AD) 诱发高血糖

1.4.1 造模方法 小鼠皮下注射 AD 240 μ g/kg, 给药后 135 min 从小鼠眼底静脉丛取血测血糖。如未完全出现高血糖, 应追加注射 1 次 AD, 直到出现糖尿病症状^[9]。

1.4.2 机制 AD 进入体内促进肝脏及肌肉糖原分解, 肌肉中糖酵解生成的乳酸增多, 经三羧酸循环糖异生增快。同时激活丙酮酸羧化酶, 使丙酮酸向磷酸烯醇式丙酮酸转化促进糖异生, 导致血糖升高^[9]。

1.4.3 优点 使用肾上腺素建立模型简单、易行,

灵敏度高^[9]。

1.4.4 缺点 AD造模所测定的血糖不完全是葡萄糖,专一性不强^[9]。

1.5 其他 给动物注射甲状腺素、生长素、胰高血糖素从而产生糖尿病^[16]。环丙庚哌连续给药4周可见高血糖症状,并出现胰岛素 β 细胞的分泌颗粒逐渐消失^[17]。脑炎病毒、心肌炎病毒、IL-1等对 β 细胞有选择性毒性作用^[17]。柯萨奇病毒等病毒通过诱导机体产生自身免疫反应而引起糖尿病。使用环孢菌素A等免疫抑制剂可以提高造模成功率^[13]。

2 转基因动物模型

2.1 造模方法 研究者按照自己的意愿,借助于实验手段来控制实验动物的特定基因组和其表达等,使动物表现特有的遗传性状。利用转基因技术,将人类疾病基因转移给动物,以获得相应疾病的动物模型。转基因技术可用来制备1型或2型糖尿病模型^[7]。

2.2 机制 小鼠的某些突变基因和人类糖尿病相关基因为同源染色体,如产生肥胖的Cpe^{fat}使雄性鼠胰岛过度肥大增生,产生终生高胰岛素。Lep^{ob}是影响能量代谢的突变基因,转基因纯合体出现摄食过量和糖尿病症状。被转移的基因随机性地和宿主基因结合,它们的一些产物可以表达修饰基因。从理论上讲,这项技术允许一个复杂系统中的单个元素有选择性的紊乱。例如,啮齿类动物可以产生高表达或低表达某种蛋白,这被认为在葡萄糖代谢中起到了关键性作用。利用这种技术,可以用来寻找糖尿病相关基因的进化、功能、致病机制、胰腺胰岛进化发育以及各种基因的表达、激素的分泌等^[7]。

2.3 优点 首先,哺乳动物和人的基因组有很大的同源性;其次,哺乳动物繁殖很快,克服了人作为研究对象的局限性;再次,体内实验更能反映基因作用的真实性^[18]。

2.4 缺点 来源于人的外源蛋白在动物体内由于作用环境的差异可能会造成功能的差异而导致没有出现相应的表型性^[17]。另外还需构建合适的载体,选择合适的动物种属^[19]。

3 基因敲除动物模型

基因敲除是利用基因同源重组原理,用突变的外源DNA片段整合入受体细胞的DNA同源序列中,取代某一特定基因从而获得基因型发生改变的基因靶动物,以研究靶基因的体内功能或相关疾病的致

病机制。利用基因敲除技术可以观察候选基因在产生胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷中的作用。

3.1 单基因敲除术 利用基因敲除产生的胰岛素受体缺失纯合子(InsR^{-/-})小鼠出现生长迟缓和外周胰岛素抵抗,有高甘油三脂血症和高血压的代谢综合征特征。Glut-4^{+/-}小鼠随年龄增长出现外周胰岛素抵抗,发展成高血压和糖尿病。Glut-4的一个等位基因敲除可导致严重的外周胰岛素抵抗,且小鼠出现与2型糖尿病病人相似的糖尿病性心肌病和脂肪肝。因此,Glut-4^{+/-}小鼠是研究非肥胖性2型糖尿病发病的理想模型^[20]。

3.2 多基因敲除术 敲除胰岛素受体底物-1基因纯合子(IRS-1^{-/-})小鼠 β 细胞增生,代偿了胰岛素抵抗而保持血糖正常; β 细胞特异性葡萄糖激酶杂合子GK^{+/-}小鼠由于胰岛素分泌减少,出现轻度糖耐量异常。这两种小鼠杂交产生的双敲除模型显示胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能障碍,出现糖尿病^[21]。

3.3 优点 单基因敲除技术为研究单个蛋白在胰岛素信号转导中的作用提供了重要手段。多基因敲除的动物模型显示了同时存在胰岛素分泌和作用的轻微缺陷能导致糖尿病,表明不同遗传位点的缺陷在糖尿病发病中的重要作用;提示胰岛素抵抗的形成可能涉及胰岛素信号转导途径中多个环节的缺陷^[22]。

3.4 缺点 由于胰岛素抵抗有不同的遗传背景,不同遗传背景产生的基因敲除小鼠,同样的突变可产生不同的基因表型,这与2型糖尿病的表型特征在不同种族间存在着差异性相似。因此,单靠基因敲除这项技术还很难揭示胰岛素抵抗和糖尿病发生的根本机制^[22]。

4 结语

胰岛素抵抗和胰岛功能受损是糖尿病发病机制中两个重要环节^[23]。Mauricio认为糖尿病发病的最终途径是通过胰岛细胞凋亡^[24]。以上各种方法制备的糖尿病动物模型都在研究糖尿病病因、发病机制、发病过程中起到重要作用。而转基因动物模型和基因敲除技术还处于研究阶段,它们也将成为研究的热点,如果将它们和其他分子生物学技术结合起来,可能会从根本上揭示胰岛素抵抗以及糖尿病产生的分子机制,使其有助于糖尿病的预防和治疗,给人类健康带来福音。

[参考文献]

- [1] 黄松, 洗苏. 糖尿病动物模型研究现状及进展[J]. 广西医学, 2002, 24(1): 46-48.
- [2] Takasu N, Komiya T, Asawa T, *et al.* Streptozocin and alloxan induced H₂O₂ generating and DNA fragmentation in pancreatic islets[J]. *Diabetes*. 1991, 40: 1141-1145.
- [3] 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): 255-257.
- [4] 徐叔云. 药理学试验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 813-815.
- [5] 潘竞锵, 刘慧纯, 刘广南, 等. 荔枝核降血糖、调血脂和抗氧化的实验研究[J]. 广东药学, 1999, 9(1): 47-50.
- [6] 郭啸华, 刘志红, 李恒, 等. 高糖高脂饮食诱导的 2 型糖尿病大鼠模型及其肾病特点[J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10(5): 290-294.
- [7] Ree DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus [J]. *Diabetic Medicine*. 2005, 22: 359-370.
- [8] 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: 3113-3117.
- [9] 鼓芳, 杨远华. 实验性糖尿病动物模型制备及指标测定评价[J]. 大理学院学报, 2003, 1: 1-3.
- [10] Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination[J]. *Diabetes*. 2000, 49(5): 677-683.
- [11] Proietto J, Filippis A, Nakhla C, *et al.* Nutrient-induced insulin resistance[J]. *Mol Cell Endocrinol*. 1999, 151: 143-149.
- [12] 徐建华, 孙中华, 颜燕, 等. 应用于保健食品功能学评价的糖尿病动物模型研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(6): 668-669.
- [13] 王宝金, 代解杰. 糖尿病动物模型的研究进展[J]. 上海实验动物科学, 2003, 23(2): 116-118.
- [14] 杜丽坤, 赵莹, 杜立杰, 等. 实验性糖尿病动物模型的建立[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(5): 581.
- [15] 刘晟, 王维, 罗贤明, 等. 药物诱导狗 1 型糖尿病的研究[J]. 湖南医科大学学报, 2000, 25(2): 125-128.
- [16] 董叫云, 陈志龙. 糖尿病动物模型制作及进展[J]. 中华国际医学杂志, 2001, 7: 148-150.
- [17] 孙以方, 白德成, 张文慧. 医学实验动物学教程[M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 1998. 278-289.
- [18] 王毅, 骆惠均, 王芳, 等. PC-1 转基因小鼠的建立及其与 2 型糖尿病发病关系[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005, 12(6): 554-556.
- [19] 杨玉芳, 丁彦青. 转基因小鼠技术在肿瘤研究中的应用与发展[J]. 医学综述. 2004, 10(1): 1-2.
- [20] Jarvis FM, Kahn CR. Understanding the pathogenesis and treatment of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: What can we learn from transgenic and knockout mice[J]. *Diabetes Metab*. 2000, 26: 433-448.
- [21] Terauchi Y, Iwamoto K, Tamemoto H, *et al.* Development of non-insulin dependent diabetes mellitus in the double knockout mice with disruption of insulin receptor substrate 1 and beta cell glucokinase genes. Genetic reconstitution of diabetes as a polygenic disease[J]. *J Clin Invest*. 1997, 99: 861-866.
- [22] 周丽斌, 陈名道. 基因敲除技术在 2 型糖尿病研究中的应用[J]. 国外医学内分泌学分册, 2002, 5(3): 177-180.
- [23] Polonsky K, Sturis J, Bell GI. Non-insulin dependent diabetes mellitus a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance[J]. *N Eng J Med*, 1996, 334: 777-783.
- [24] Mauricio D, Mandrup-Poulsen T. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death[J]. *Diabetes*, 1998, 47: 1537-1543.