



一次性静脉注射高剂量链脲佐菌素建立 1型糖尿病小型猪模型

崔永春, 李凯, 张宏, 刘晓鹏, 袁卫民, 李巨波, 吴爱丽, 唐跃

(中国医学科学院北京协和医学院国家心血管病中心, 阜外心血管病医院动物实验中心,
心血管疾病国家重点实验室, 北京市心血管植入材料临床前评价重点实验室, 北京 100037)

【摘要】目的 探讨通过一次性注射高剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)方法建立1型糖尿病小型猪模型的可行性。**方法** 中华实验小型猪耳缘静脉一次性注射链脲佐菌素溶液150 mg/kg, 分别在给药前和给药后10 min、30 min、90 min、第1天、第2天、第3天和第7天空腹采集静脉血, 动态监测空腹血糖, 并利用静脉糖耐量实验和C肽释放实验对模型进行鉴定。**结果** 给药后第1天开始, 模型组空腹血糖明显升高并始终维持在16.7~20.6 mmol/L的浓度范围, 达到糖尿病标准; 静脉葡萄糖耐量试验和C肽释放实验结果表明, 静脉注射体积分数50%的葡萄糖1 h后模型猪血糖浓度高于11.1 mmol/L, 2 h后未能恢复至空腹血糖水平; 而胰岛素和C肽在注入葡萄糖后基本未发生任何反应, 始终保持痕量水平。**结论** 一次性静脉注射大剂量链脲佐菌素的方法能够成功建立1型糖尿病小型猪模型。

【关键词】 1型糖尿病, 小型猪, 链脲佐菌素; 血糖

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 04-0012-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.04.003

Establishment of a miniature pig model of type 1 diabetes by single intravenous injection of high dose streptozotocin

CUI Yong-chun, LI Kai, ZHANG Hong, LIU Xiao-peng, YUAN Wei-min, LI Ju-bo, WU Ai-li, TANG Yue

(State Key Laboratory of Cardiovascular Diseases, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases,
Beijing Municipal Key Laboratory for Pre-clinical Evaluation of Cardiovascular Implantation Devices,
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100037, China)

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of establishing mini-pig model of type 1 diabetes by single intravenous injection of high dose streptozotocin. **Methods** Eight male Zhonghua mini-pigs (22.6 ± 1.8 kg) were administrated with high-dose streptozotocin (150 mg/kg) into the ear vein. Before and 10, 30, 90 minutes, 1, 3 and 7 days after administration of streptozotocin, blood samples were obtained respectively, and used to dynamically monitor the fasting blood-glucose. C peptide and insulin levels were evaluated by IVGTT test. **Results** Since 24 hours after STZ administration, the fasting blood-glucose level was increased significantly compared with that of pre-administration and maintained at 16.7–20.6 mmol/L, while the C peptide and insulin levels were decreased significantly. IVGTT results showed that blood sugar levels at 1 h after intravenous injection of 50% glucose were much higher than 11.1 mmol/L and failed to restore to fasting glucose levels until 2 h, insulin and c-peptide did no response after injection of glucose, always kept at a trace level. **Conclusion** A single high-dose streptozotocin injection can be used to establish a mini-pig model of type 1 diabetes successfully.

【基金项目】北京市科委科技计划“常见心脑血管缺血性疾病模型研发公共平台建设”(Z101107052210004)基金;协和青年基金“糖尿病小型猪急性心肌缺血代谢组学研究(2012-XHQ04)支持。

【作者简介】崔永春,女,博士,研究方向:心脑血管动物模型的研发。

【通讯作者】唐跃, Email: tangyue1226@vip.sina.com

【Key words】 Type 1 diabetes; Mini-pig; Streptozotocin; Blood glucose

1 型糖尿病,原名胰岛素依赖型糖尿病,由于自身免疫抗体、遗传因素、病毒感染或药物毒性使胰岛分泌胰岛素的 β 细胞发生不可逆性损伤,导致胰岛内胰岛素绝对不足,从而引发糖代谢紊乱,长期高血糖为特征的多种物质代谢紊乱综合征。起病比较急剧,多发生在儿童和青少年,不能治愈,严重影响了患者的生活质量,对于其疾病发生机制的认识以及诊疗新方法的开发尚需加强^[1-2]。

建立贴近人类疾病特征的动物模型是理解疾病发生发展病理机制、药物新靶点发现以及临床前药效学评价等生物医学研究的必要条件,是人类征服糖尿病疾病进程的关键环节。因此,本文采用糖脂代谢与人类更加接近的小型猪作为模式动物,同时针对小型猪胰岛 β 细胞的葡萄糖转运蛋白 2 (glucose transport protein 2, GLUT2) 表达量较低的特点,探索通过一次性静脉注射高剂量链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 方法建立小型猪 1 型糖尿病模型,并对模型进行评价,为 1 型糖尿病相关研究提供大动物模型支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

中华实验小型猪,6~8 月龄,8 只,体重(22.6 ± 1.8) kg,雄性。购自北京市琉璃河科兴实验动物养殖中心【SCXK(京)2009-0026】。根据动物生长情况,每日喂食 2 次,自由饮水。实验受中国医学科学院阜外心血管病医院实验动物福利与伦理委员会审批,审批编号为 2012-1-12-XHQ。实验遵循《北京市实验动物福利与伦理指南》和《关于善待实验动物的指导性意见》条例要求^[3],在中国医学科学院阜外心血管病医院动物实验中心【SYXK(京)2011-0011】完成。

1.2 柠檬酸钠溶液(0.1 mol/L)的配制

柠檬酸 2.1 g 加入双蒸水 100 mL 中配成 A 液,柠檬酸钠 2.94 g 加入双蒸水 100 mL 中配成 B 液,将 A、B 液按比例(1:1)混合,调节 pH 4.2~4.5,即是所需配置链脲佐菌素的柠檬酸缓冲液。

1.3 STZ 溶液的配制

按照 150 mg/kg 剂量,根据动物体质量称取适量 STZ 溶于 0.1 mol/L 柠檬酸钠(pH 4.5~5.0)溶液中,使终浓度为 80 g/L。采用 0.22 μ m 针头式过滤器过滤除菌。因 STZ 溶液不稳定,故实验使用新鲜

配制的链脲佐菌素溶液。

1.4 1 型糖尿病猪模型的建立

动物禁食约 16 h,利用氯胺酮(35 mg/kg)和安定(1.5 mg/kg)肌肉注射,常规麻醉动物,耳缘静脉一次性注入 STZ 溶液(150 mg/kg)建立 1 型糖尿病小型猪模型,于 2 min 内注完。

1.5 空腹血糖的测定

分别在给药前和给药后 10 min、30 min、90 min、第 1 天、第 2 天、第 3 天和第 7 天空腹采集血液,利用手持式 JPS-5 型全血葡萄糖测试仪(北京怡成生物电子有限公司)检测血糖浓度。如果出现反应性低血糖,静脉注射体积分数 50% 高糖(0.5 g/kg)溶液,尽量使血糖维持在正常水平;分别在给药后 1d、2 d、3 d 和 7 d 连续监测空腹血糖,如果连续 7 d 空腹血糖浓度均 ≥ 7 mmol/L 则认为糖尿病模型成功。

1.6 静脉葡萄糖耐量(IVGTT)试验

在 STZ 注射后 7 d,动物空腹静脉注射葡萄糖 0.5 g/kg,总量不超过 50 g,于注射前及注射后 60、120 min 采集血液检测血糖,并利用德国西门子 ACS-180 Plus 全自动免疫分析仪检测血胰岛素及 C 肽水平^[4],以鉴定糖尿病模型的类型。

1.7 统计学分析

计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据用 SPSS 10.0 统计学软件(SPSS, Chicago, IL, USA)进行统计学分析,先用单因素方差分析,再用组间 t 检验比较组间差别的统计学意义。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 实验动物数量分析

纳入小型猪 8 只,均进入结果分析,无死亡和感染,无脱失值。

2.2 1 型糖尿病小型猪空腹血糖监测

为动态监测糖尿病小型猪空腹血糖水平,分别在给药前、给药后 10 min、30 min、90 min、第 1 天、第 2 天、第 3 天和第 7 天分别采集外周血,利用血糖监测仪测定空腹血糖。结果如表 1 所示,自链脲佐菌素给药后第 1 天开始,血糖明显升高并稳定维持在 16.7~20.6 mmol/L 浓度水平,与给药前相比,明显升高($P < 0.01$),说明空腹血糖达到糖尿病诊断标准(≥ 7 mmol/L)。

表 1 糖尿病小型猪空腹血糖的测定 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab. 1 Fasting blood-glucose in the minipigs

时间点 Time points	空腹血糖浓度/mmol/L Fasting blood-glucose concentration	P 值 P value
BA	3.06 ± 0.81	-
PA 10 min	5.43 ± 1.66	0.12
PA 30 min	5.56 ± 1.57	0.18
PA 90 min	6.03 ± 1.21	0.08
PA d1	16.81 ± 0.52*	0.03
PA d2	19.13 ± 0.61*	0.02
PA d3	19.71 ± 0.55*	0.04
PA d7	19.75 ± 0.49*	0.02

注:与给药前比较,* $P < 0.05$ 。BA:给药前;PA:给药后。PA d1:给药后第 1 天;PA d2:给药后第 2 天;PA d3:给药后第 3 天;PA d7:给药后第 7 天。

Note: * $P < 0.05$ vs. BA. BA: Before STZ administration; PA: Post STZ administration. PA d1: First day post administration; PA d2: Second day post administration; PA d3: Third day post administration; PA d7: Seventh day post administration.

表 2 不同时间点血糖和胰岛素检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab. 2 Results of intravenous glucose tolerance test at different time points

时间点 Time points	血糖浓度/mmol/L Blood glucose	血清胰岛素/mU/dL Blood insulin	血 C 肽浓度/nmol/L Blood C peptide
STZ 给药前 (Before STZ)	3.06 ± 0.81	15.65 ± 0.19	0.56 ± 0.29
STZ 给药后 1 周 (1 week after STZ administration)	注糖前 (Before glucose inj.)	13.32 ± 1.31*	2.23 ± 0.21*
	注糖后 1 h (1 h after glucose inj.)	26.23 ± 0.21**	1.54 ± 0.82
	注糖后 2 h (2 h after glucose inj.)	25.15 ± 2.21**	1.98 ± 0.51
			0.21 ± 0.06

注: * $P < 0.05$ vs. STZ 给药前, ** $P < 0.05$ vs. 注糖前空腹血糖。

Note: * $P < 0.05$ vs. before STZ administration, ** $P < 0.05$ vs. fasting blood glucose level before glucose injection

3 讨论

目前,国内外研究常用的 1 型糖尿病动物模型包括:①自发性糖尿病转基因动物模型(如 NOD 小鼠、BB 糖尿病大鼠)^[5-9];②柯萨奇病毒感染法^[10-12];③胰腺切除法^[13,14];④化学药物诱导法^[15,16]。其中,自发性糖尿病模型及病毒诱导法均适用于小动物,但啮齿类动物病理生理过程与人类相去甚远,在欧美多项大规模、多中心临床研究发现利用啮齿类动物获得的药效学结果与临床研究结果严重脱节,因此近些年来人们积极探索与优化大动物模型的建立方法^[17]。

鉴于胰腺法切除对动物造成较大伤害,影响其健康状况。因此,本研究拟利用化学药物破坏胰岛 β 细胞法建立糖尿病小型猪模型。化学诱导剂主要包括链脲佐菌素 STZ 和四氧嘧啶 2 种药物,但两种方法比较,链脲佐菌素优于四氧嘧啶,因其造模稳定、快速、种属选择性不强、复制模型前不需要严格禁食等^[18-21]。

应用 STZ 建立 1 型糖尿病模型是目前国内

2.3 静脉糖耐量试验

为了进一步确定糖尿病分型,实验于给药后 1 周进行了静脉葡萄糖耐量试验和 C 肽释放试验(见表 2)。静脉注射 50% 葡萄糖后 1 h, 8 只实验动物血糖均明显升高,达到 26 mmol/L 左右 (> 11.1 mmol/L 临界值);在注糖 2 h 后仍维持在较高水平(约 25 mmol/L);而血胰岛素始终变化不明显。C 肽释放规律检测结果与血胰岛素变化情况相近,注糖后 1 ~ 2 h 与空腹水平比较,差异均无显著性,而且给予 STZ 后的空腹血 C 肽水平较给药前 (0.22 ± 0.08 nmol/L vs. 0.56 ± 0.29 nmol/L) 明显降低 ($P < 0.05$),这符合 1 型糖尿病特征。

外公认的方法^[22-25]。它经葡萄糖转运蛋白 2 进入胰腺胰岛 β 细胞,通过 DNA 烷基化及 ADP 核糖基化作用诱发 β 细胞变性坏死,胰岛素缺失与血糖升高,引发糖尿病^[26]。因为猪的胰岛细胞葡萄糖转运蛋白 2 表达量较其他物种(如鼠和犬)低,因此在建立小型猪糖尿病模型时,需要倍加链脲佐菌素剂量(100 ~ 200 mg/kg)^[27-30]。因此,本研究采用静脉一次性注射高剂量(150 mg/kg) STZ 方法建立小型猪糖尿病模型。

空腹血糖测定结果发现,与给药前相比,实验动物在静脉注射 STZ 后 1 天开始,空腹血糖已经持续升高,高于 7 mmol/L 的诊断标准。静脉葡萄糖耐量试验和 C 肽释放实验结果表明,静脉注射体积分数 50% 葡萄糖 1 h 后模型猪血糖浓度高于 11.1 mmol/L, 2 h 后未能恢复至空腹血糖水平;而胰岛素和 C 肽在注入葡萄糖后基本未发生任何反应,说明模型组胰岛 β 细胞分泌胰岛素和 C 肽功能已经丧失。根据 2010 年 ADA 糖尿病诊断标准,上述参数变化特征符合 1 型糖尿病标准,说明建模成功。

参 考 文 献

- [1] Preiss D, Sattar N. Pharmacotherapy: statins and new-onset diabetes—the important questions [J]. *Nat Rev Cardiol*. 2012, 9(4) :190 – 192.
- [2] Tan DA. Changing disease trends in the Asia-Pacific [J]. *Climacteric*. 2011, 14(5) :529 – 534.
- [3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals [S]. 2006 – 09 – 30.
- [4] Strauss A, Tiurbe C, Chodnevskaja I, et al. Use of the continuous glucose monitoring system in Goettingen minipigs, with a special focus on the evaluation of insulin-dependent diabetes [J]. *Transplant Proc*. 2008, 40(2) :536 – 539.
- [5] Diz R, Garland A, Vincent BG, et al. Autoreactive effector/memory CD4 + and CD8 + T cells infiltrating grafted and endogenous islets in diabetic NOD mice exhibit similar T cell receptor usage [J]. *PLoS ONE*. 2012, 7(12) :e52054.
- [6] Bortell R, Yang C. The BB rat as a model of human type 1 diabetes [J]. *Methods Mol Biol*. 2012, 933 :31 – 44.
- [7] Zhao YY, Huang XY, Chen ZW. Daintain/AIF-1 (allograft inflammatory factor-1) accelerates type 1 diabetes in NOD mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 427(3) :513 – 517.
- [8] Grant CW, Duclos SK, Moran-Paul CM, et al. Development of standardized insulin treatment protocols for spontaneous rodent models of type 1 diabetes [J]. *Comp Med*. 2012, 62(5) :381 – 390.
- [9] Wu J, Kakoola DN, Lenchik NI, et al. Molecular phenotyping of immune cells from young NOD mice reveals abnormal metabolic pathways in the early induction phase of autoimmune diabetes [J]. *PLoS ONE*. 2012, 7(10) :e46941.
- [10] Jaidane H, Sane F, Gharbi J, et al. Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models [J]. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009, 25(7) :591 – 603.
- [11] Colli ML, Nogueira TC, Allagnat F, et al. Exposure to the viral by-product dsRNA or Coxsackievirus B5 triggers pancreatic beta cell apoptosis via a Bim/Mcl-1 imbalance [J]. *PLoS Pathog*. 2011, 7(9) :e1002267.
- [12] Sauter P, Hober D. Mechanisms and results of the antibody-dependent enhancement of viral infections and role in the pathogenesis of coxsackievirus B-induced diseases [J]. *Microbes Infection/Institut Pasteur*. 2009, 11(4) :443 – 451.
- [13] Maeda H, Hanazaki K. Pancreatogenic diabetes after pancreatic resection [J]. *Pancreatology*. 2011, 11(2) :268 – 276.
- [14] Lehach EI, Bodnar Iu I, Bozhok HA. Prophylaxis of a specific type diabetes mellitus development using pancreatic insulin autotransplantation after pancreatic resection [J]. *Klin Khir*. 2011, (12) :63 – 67.
- [15] 关子安, 孙茂欣, 关大顺, 等. 现代糖尿病学 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2001.
- [16] 杜冠华, 李学军, 张永祥, 等. 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.
- [17] Wszola M, Berman A, Fabisiak M, et al. TransEndoscopic Gastric SubMucosa Islet Transplantation (eGSM-ITx) in pigs with streptozotocine induced diabetes-technical aspects of the procedure - preliminary report [J]. *Ann Transplant*. 2009, 14(2) :45 – 50.
- [18] Strauss A, Moskalenko V, Tibe C, et al. Goettingen minipigs (GMP) : comparison of two different models for inducing diabetes [J]. *Diabetol Metab Syndr*. 2012, 4(1) :7.
- [19] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas [J]. *Physiol Res*. 2001, 50(6) :537 – 546.
- [20] 刘亚千, 李春海, 陈华. 三个品系实验用小型猪部分血液生化指标比较 [J]. *实验动物科学*, 2007, 24(5) :24 – 26.
- [21] 陈华. 小型猪糖尿病模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 16(6) :458 – 462.
- [22] Dutta T, Chai HS, Ward LE, et al. Concordance of changes in metabolic pathways based on plasma metabolomics and skeletal muscle transcriptomics in type 1 diabetes [J]. *Diabetes*. 2012, 61(5) :1004 – 1016.
- [23] Yu X, Park BH, Wang MY, et al. Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105(37) :14070 – 14075.
- [24] Galan M, Kassan M, Choi SK, et al. A novel role for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and its downstream endoplasmic reticulum stress in cardiac damage and microvascular dysfunction in type 1 diabetes mellitus [J]. *Hypertension*. 2012, 60(1) :71 – 80.
- [25] Gunawardana SC, Piston DW. Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant [J]. *Diabetes*. 2012, 61(3) :674 – 682.
- [26] Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, et al. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates) : role of GLUT2 transporter and [beta]-cell plasticity [J]. *Transplantation*. 2006, 81(1) :36 – 45.
- [27] Jensen-Waern M, Andersson M, Kruse R, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes in domestic pigs with focus on the amino acid metabolism [J]. *Lab Anim*. 2009, 43(3) :249 – 254.
- [28] Von Wilmowsky C, Stockmann P, Metzler P, et al. Establishment of a streptozotocin-induced diabetic domestic pig model and a systematic evaluation of pathological changes in the hard and soft tissue over a 12-month period [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2010, 21(7) :709 – 717.
- [29] Lee PY, Park SG, Kim EY, et al. Proteomic analysis of pancreata from mini-pigs treated with streptozotocin as a type I diabetes models [J]. *J Microbiol Biotechnol*. 2010, 20(4) :817 – 820.
- [30] Hara H, Lin YJ, Zhu X, et al. Safe induction of diabetes by high-dose streptozotocin in pigs [J]. *Pancreas*. 2008, 36(1) :31 – 38.

[收稿日期] 2014-04-11