· 基础实验研究 ·

1 型糖尿病小鼠模型的构建

谭　潇[1,2]，肖建华[1△]

(1. 南华大学病原生物学研究所，湖南衡阳 421001；2. 邵阳医学高等专科学校，湖南邵阳 422000)

摘　要：目的　构建 1 型糖尿病小鼠模型，为进一步研究 1 型糖尿病发病机制及治疗方法提供依据。**方法**　模型的诱导采用多次小剂量链脲佐菌素(STZ)给药法(MLDSTZ)，雄性 BALB/c 小鼠 64 只，随机分为 3 组：模型组、阴性对照组、正常对照组。模型组小鼠连续 5 d 腹腔注射 STZ 溶液，阴性对照组腹腔注射柠檬酸缓冲液，正常对照组不注射。给药后观察小鼠一般状况，检测血糖、尿糖，同时以石蜡切片观察小鼠的胰腺组织病理变化。**结果**　STZ 诱导的糖尿病模型鼠与对照相比存在明显的多饮、多食、多尿和体质量减轻等典型的糖尿病表现。在末次注射 STZ 3 周后，模型组小鼠尿糖均为阳性，对照组均为阴性。在 4 周后，模型组小鼠空腹血糖水平明显高于对照组，差异有统计学意义($P<0.01$)。模型鼠均有不同程度的胰岛萎缩、胰岛 β 细胞空泡变性、数目减少及不同程度的胰岛炎改变。**结论**　采用 MLDSTZ 构建的 1 型糖尿病小鼠模型稳定，方法可靠。

关键词：糖尿病；　小鼠；　模型，动物；　链脲佐菌素

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.029　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2011)14-1589-03

Construction of mouse models of type 1 diabetes mellitus

Tan Xiao[1,2], *Xiao Jianhua*[1△]

(1. *Nanhua University Pathogenic Biology Research Institute*, *Hengyang Hunan* 421001, *China*; 2. *Shaoyang Medical College*, *Shaoyang Hunan* 422000, *China*)

Abstract: Objective　To construct mouse models of type 1 diabetes mellitus(T1DM) to provide the evidences for researches on the pathogenesis and therapeutic method. **Methods**　Mouse models of T1DM were induced through enterocoelia limosis injection of streptozotocin (MLDSTZ). 64 male BALB/c mice were randomly divided into three groups, including model group, negative controls and normal controls. Model mice received intraperitoneal injection continuously for 5 days with STZ solution, negative controls received intraperitoneal injection with citric acid buffer, and normal controls group were not treated. Then blood and urine sugar were detected after the injection, and changes of pancreas of the mice were observed. **Results**　Model mice induced by STZ were obviously with polydipsia, polyphagia, hyperdiuresis and loss of body weight, compared with controls. 3 weeks after the last time of STZ injection, model mice were positive with urine sugar, but controls were negative. After 4 weeks, fasting blood glucose level of model mice was higher than controls ($P<0.01$). Model mice were with different degrees of islet atrophy, beta cell vacuoles degeneration and decrease, and different degrees of islet inflammation. **Conclusion**　Mouse model of T1DM, constructed by using MLDSTZ, were stable. This result prove that the method is reliable.

Key words: diabetes;　mice;　model, animal;　streptozotocin

近年，由于生活水平的提高、饮食结构的改变、日趋紧张的生活节奏及少动多坐的生活方式等诸多因素，全球糖尿病发病率增长迅速，糖尿病已成为继肿瘤、心血管病之后第三大严重威胁人类健康的慢性疾病。目前全球糖尿病患者已超过1.2亿人[1]，中国患者人数居世界第二[2-3]。据世界卫生组织预计，到 2025 年，全球成人糖尿病患者人数将增至 3 亿，而中国糖尿病患者人数将达到 3 800 万，未来 50 年内糖尿病将是中国一个严重的公共卫生问题[4-5]。目前糖尿病及其并发症的病因、发病机理尚未完全阐明，其预防和治疗措施仍不完善。为此，本实验通过构建理想的 1 型糖尿病小鼠模型，为研究糖尿病的发病、治疗、预防及其并发症的转归奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料　清洁级健康 BALB/c 雄性小鼠 64 只(18～22 克/只)，购自南华大学实验动物中心；链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma 公司；血糖检测仪购自北京怡成生物电子技术有限公司；柠檬酸及柠檬酸三钠购自上海生物工程公司。

1.2　方法

1.2.1　1 型糖尿病小鼠模型的构建　模型的诱导采用多次小剂量 STZ 给药法(MLDSTZ)。64 只雄性 BALB/c 小鼠常规适应性饲养 2 周后开始造模，随机分为模型组(40 只)、阴性对照组(12 只)、正常对照组(12 只)。模型鼠连续 5 d 腹腔注射 STZ 溶液(60 mg/kg)，注射前禁食 8 h，不禁水。注射时将 STZ 溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中(pH 4.5)，避光冰上配制，溶解后尽量在 30 min 内完成注射。阴性对照组腹腔注射柠檬酸缓冲液，正常对照组不作处理。

1.2.2　指标测定　观察并记录小鼠一般状况，包括小鼠的精神状态、体质量、饮水量、食量、大小便等。血糖、尿糖检测：末次注射 1 周后，尾静脉采血，每周测定 1 次血糖和尿糖，持续观察 1 个月。胰腺组织病理切片观察：造模后 1 月，颈椎脱臼处死部分模型组和对照组小鼠，取胰腺，用 10%甲醛固定 48 h，双蒸水浸泡 3 次，每次 15 min，梯度乙醇脱水，石蜡包埋、切片，HE 染色，镜下观察小鼠胰腺组织的病理改变。

1.2.3　统计学处理　所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，使用 SPSS 11.5统计软件对资料进行多个独立样本 LSD-t 检验，$P<0.05$

△　通讯作者，E-mail：jhxiao223@163.com。

表示差异有统计学意义。

2 结　　果

2.1 一般状况的观察　对 3 组小鼠一般状况进行仔细观察，并于造模前后对小鼠的体质量进行监测，每周 1 次。结果显示，与对照组相比，在注射 STZ 后 4 d 起，模型鼠出现多尿现象，并开始出现饮水量的增加。造模后约 12 d 开始出现多食，尿量也明显增加。正常对照组及阴性对照组小鼠的体质量呈生理性增长，且两组无统计学意义差异（$P>0.05$）。模型组小鼠平均体质量显著下降，且明显低于阴性对照组及正常对照组（$P<0.01$）。在造模后第 4 周左右模型鼠平均体质量才有所增长（表 1）。结果表明，与对照组相比，STZ 诱导的糖尿病模型鼠存在明显的多饮、多食、多尿和体质量减轻等典型的糖尿病表现。

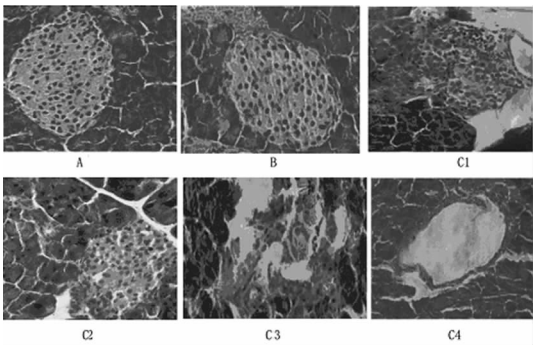
2.2 糖尿病模型鼠血糖和尿糖检测　在末次注射 STZ 1 周后，检测小鼠空腹血糖和尿糖水平，每周 1 次，连续 4 周。结果显示，模型鼠于 2 周后全部出现尿糖阳性，血糖也明显升高；其他两组尿糖均为阴性，血糖值正常。在 3 周后，模型鼠尿糖均为阳性，对照组均为阴性，模型组血糖进一步升高。在 4 周后，模型组血糖稍有下降，但是仍然明显高于阴性对照组（$P<0.01$），正常对照组和阴性对照组无统计学意义差异（$P>0.05$），见表 2。

表 1　正常对照组、阴性对照组和模型组小鼠的平均体质量变化（g）

组别	造模前	造模后 1 周	造模后 2 周	造模后 3 周	造模后 4 周
正常对照组	19.95±0.76	20.98±1.03	22.26±0.61	22.89±1.28	24.33±1.84
阴性对照组	20.15±0.95	20.79±1.13	21.89±0.90	23.33±0.70	24.92±2.07
模型组	20.35±0.87	18.84±0.78	17.52±0.74	16.25±0.75	16.34±1.11
F 值	1.052	38.348	278.970	478.406	237.933
P 值	0.356	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2　正常对照组、阴性对照组和模型组小鼠血糖的变化（mmol/L）

组别	造模前	造模后 1 周	造模后 2 周	造模后 3 周	造模后 4 周
正常对照组	4.33±0.93	4.29±0.84	4.46±0.89	4.36±0.81	4.31±1.09
阴性对照组	4.28±0.85	4.21±0.93	4.27±0.94	4.27±1.02	4.23±0.88
模型组	4.33±0.92	10.63±1.38	12.54±1.58	13.50±1.47	12.76±1.57
F 值	0.011	202.719	263.559	375.631	281.772
P 值	0.989	0.000	0.000	0.000	0.000



A：正常对照组；B：阴性对照组；C1～C4：模型组。

图 1　正常对照组、阴性对照组和模型组小鼠胰岛的病理变化（10×40）

2.3 胰腺组织的病理变化　造模后每周随机选取各组小鼠（模型组 10 只、阴性对照组 2 只、正常对照组 2 只），颈椎脱臼处死后，观察小鼠胰腺及胰岛组织的病理改变。结果显示，正常对照组和阴性对照组小鼠胰岛多为圆形或椭圆形的细胞团，数量多，均匀分布，分散于胰腺腺泡之间，胰岛界限清楚，无结构改变，无淋巴细胞浸润。注射 STZ 后，模型鼠胰腺组织均有不同程度的胰岛萎缩、数量减少、分布稀疏、胰岛细胞数减少、胰岛 β 细胞空泡变性，胰岛呈空虚状态；另外，模型鼠胰岛有不同程度淋巴细胞浸润及胰岛炎样改变，见图 1。

3 讨　　论

STZ 为一种广谱抗菌剂，具有抗菌、抗肿瘤作用及致糖尿病的副作用[6]，对实验动物胰岛 β 细胞具有高度选择性毒性作用，可使在实验动物中诱发糖尿病[7-8]。

本实验采用 MLDSTZ 诱导 1 型糖尿病。在实验中为了验证模型鼠已发生了 1 型糖尿病，笔者对 3 组小鼠进行了观察。与对照组相比，STZ 诱导的糖尿病模型鼠从 2 周后出现明显的多饮、多食、多尿和体质量减轻等典型的糖尿病临床表现。同时检测到模型鼠在造模 2 周后尿糖均呈阳性。在临床上糖尿病的诊断及治疗更重要的是患者血糖的检测，所以笔者对实验小鼠的血糖进行了检测。MLDSTZ 诱导的模型鼠在造模 2 周后血糖显著升高，达到糖尿病临床诊断标准。同时取小鼠的胰腺组织，制作病理切片来评价模型鼠的胰腺及胰岛组织的病理改变，发现模型鼠胰腺组织均有不同程度的胰岛萎缩、数量减少、分布稀疏、胰岛细胞数减少、胰岛 β 细胞空泡变性、胰岛呈空虚状态。胰岛有不同程度的淋巴细胞浸润，呈胰岛炎样改变，这与人类 1 型糖尿病胰岛炎样病理改变极其相似。这一结果与文献报道的结果一致[9-10]。

MLDSTZ 诱导糖尿病在某些方面与自身免疫性 1 型糖尿病类似[11]。MLDSTZ 组织毒性相对较小，胰岛细胞损伤并不

是由于 STZ 的直接细胞毒作用所致。研究表明 MLDSTZ 诱导的 1 型糖尿病是胰岛内浸润的炎性细胞引起的[12],原因有三:其一,在出现明显的高血糖之前已经有胰岛炎性细胞的浸润;其二,在无胸腺的裸鼠,不能用此方法复制出糖尿病模型;其三,将 MLDSTZ 诱导小鼠脾细胞过继转移给正常小鼠,能够诱导后者产生糖尿病[12]。在 MLDSTZ 小鼠的发病过程中,浸润的炎性细胞主要包括 T 淋巴细胞和巨噬细胞,它们通过释放大量促炎性细胞因子直接或间接损伤胰岛 β 细胞,最终导致糖尿病的发生。

综上所述,采用 MLDSTZ 诱导的糖尿病模型可有效模拟 1 型糖尿病的病程及发病机理,组织毒性相对较小,能有效降低动物模型的死亡率,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、病情的严重程度较统一、一般不表现自发性缓解等优点。因此,笔者认为 MLDSTZ 诱导的小鼠糖尿病模型是研究 1 型糖尿病的发病机理及并发症较理想的动物模型。

参考文献

[1] 渠利利,徐勇飞,朱婵. 2 型糖尿病相关基因多态性及其研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(8):836-838.

[2] 王智峰,朱峰,李秋梅. 我国 2 型糖尿病的发病现状、原因及防治探讨[J]. 亚太传统医药,2010,6(9):151-152.

[3] 王娴默,杨红英,肖林. 糖尿病鼠模型及其与醛糖还原酶相关研究[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(12):1115-1116.

[4] 王宣,路秀云. 糖尿病健康教育需求的调查分析[J]. 现代护理,2003,9(8):627-628.

[5] Chen D,Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes[J]. Diabetes Obes Metab,2005,7(4):307-317.

[6] Yuan WP, Liu B, Liu CH, et al. Antioxidant activity of chitooligo saccharides on pancreatic islet cells in streptozoto cin-induced diabetes in rats [J]. World J Gastroenterol,2009,15(11):1339-1345.

[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):540-543.

[8] 刘学政,萧鸿. 链脲佐菌素致糖尿病大鼠模型的研究[J]. 锦州医学院学报,2001,22(4):11-14.

[9] Sima AA,Garcia-Salinas R,Basu P. The BB Wistar rat:an experimental model for the study of diabetic retinopathy[J]. Metabolism,1983,32(Suppl l):136-140.

[10] Gardiner TA,Stitt AW,Anderson HR,et al. Selective loss of vascular smooth muscle cells in the retinal microcirculation of diabetic dogs[J]. Br J Ophthalmol,1994,78(1):54-60.

[11] 周吉银,周世文. 链脲菌素和四氧嘧啶诱导糖尿病大鼠模型的比较[J]. 江西中医学院学报,2006,18(4):44-46.

[12] Baik SH,Park IB,Choi KM,et al. BCG vaccine prevents insulitis in low dose streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Diabetes Res Clin Pract,1999,46(2):91-97.

(收稿日期:2011-03-23)

(上接第 1588 页)

感染最常见的病原菌之一,其多重耐药性及引起的感染高死亡率成为日趋严重的临床问题[6-7]。从表 1 可看出,本院近 4 年的 PA 在各类临床标本中的分布以呼吸道分泌物(48.21%)和伤口分泌物(39.70%)为主,两者之和高达87.91%。该结果与文献[8-11]报导基本相似,表明呼吸系统、外伤和手术伤口为医院 PA 感染的高发部位,应注意加强防范。

其次,从表 1 也可看出,呼吸道分泌物和伤口分泌物中,PA 的药物敏感性不一样。伤口分泌物中对 PA 耐药率最低的 4 种抗菌剂依次为:亚胺培南(5.88%)、妥布霉素(8.40%)、头孢吡肟(10.71%)、阿米卡星(11.55%)。而呼吸道分泌物中,对 PA 耐药率最低的 4 种抗菌剂依次为:妥布霉素(21.11%)、阿米卡星(23.88%)、亚胺培南(27.16%)、庆大霉素(28.20%)。因此,在对 PA 感染进行经验治疗时,应区别不同的感染部位而使用不同的抗菌剂。

最后,从表 1 可知,对于特定的抗菌剂,呼吸道分泌物 PA 的耐药率均显著高于伤口分泌物 PA。这可能与呼吸道感染发病频率较高,较伤口感染使用抗菌剂的可能性更大有关。因此,在对待呼吸道感染时,为达到临床疗效和控制耐药菌的发生,应更为谨慎地选择抗菌剂。

综上所述,呼吸系统、外伤和手术伤口为医院 PA 感染的主要部位,为了控制 PA 的院内感染,应加强呼吸系统和伤口的管理。而鉴于呼吸道和伤口分泌物中 PA 的耐药性不一样,在临床上经验用药时,应区别对待。

参考文献

[1] 陈世凤. 铜绿假单胞菌的临床分布特点及药物敏感性调查[J]. 亚太传统医药,2010,6(9):174-176.

[2] 梁冬玲,黄川锋. 183 株铜绿假单胞菌耐药性检测及临床意义分析[J]. 中国现代药物应用,2010,4(13):103-104.

[3] 朱照辉,胥琳琳,陈宗宁. 铜绿假单胞菌医院感染分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2010,7(22):2502-2503.

[4] 韦柳华,周定球,蒋利君,等. 420 株铜绿假单胞菌医院感染及耐药分析[J]. 抗感染药学,2010,7(1):46-48.

[5] 高辉,王杨,黄云昆,等. 2005～2009 年我院铜绿假单胞菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中国实验诊断学,2010,14(11):1761-1762.

[6] 徐晶,靖杰. 铜绿假单胞菌医院感染的现状及耐药性[J]. 武警医学院学报,2010,19(1):53-54.

[7] 钟政荣,郭普,乔艳,等. 231 株铜绿假单胞菌分布及药敏分析[J]. 临床输血与检验,2010,12(2):154-156.

[8] 邹自英,朱冰,汤雪晴,等. 医院铜绿假单胞菌感染分布与耐药性分析[J]. 西南国防医药,2010,20(11):1216-1218.

[9] 余建华,唐永明,穆琪,等. 铜绿假单胞菌的分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床,2010,7(22):2453-2454.

[10] 杨葵,杨萍. 铜绿假单胞菌感染临床分布情况及耐药监测[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(5):492-494.

[11] 张敏,申明凤,廖卫. 新乡市 1 731 株铜绿假单胞菌的耐药性变迁[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(2):133-136.

(收稿日期:2011-01-28)