

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.18.019 [http://www.crter.org]

田忠, 崔永春, 李凯, 李巨波, 王坤, 唐跃. 链脲佐菌素对1型糖尿病小型猪肝肾功能的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(18):3366-3373.

链脲佐菌素对1型糖尿病小型猪肝肾功能的影响***◆

田忠, 崔永春, 李凯, 李巨波, 王坤, 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, 心血管疾病国家重点实验室, 北京市 100037

文章亮点:

1 众所周知1型糖尿病为胰腺β细胞彻底丧失分泌胰岛素功能,造成糖代谢障碍进而引发全身代谢紊乱的综合征。由于肝肾为人体最重要的代谢器官,如果链脲佐菌素的肝肾毒性过大,势必对糖尿病模型的糖脂代谢相关研究结果产生影响。

2 实验重点在于高剂量链脲佐菌素对1型糖尿病小型猪肝肾功能的影响,以阐明此种建模方法的安全性和可靠性,为建立更加贴近临床的大动物模型提供数据支持。结果发现,静脉注射高剂量链脲佐菌素方法建立小型猪糖尿病模型对其肝肾功能影响不大。

3 实验提供了静脉注射高剂量链脲佐菌素后小型猪糖尿病模型肝肾功能数据,证实链脲佐菌素建模剂量(150 mg/kg)安全可靠。

关键词:

器官移植; 器官移植基础实验; 糖尿病; 1型糖尿病; 葡萄糖转运蛋白2; 小型猪; 肝肾功能; 省级基金

摘要

背景: 高剂量链脲佐菌素建立小型猪1型糖尿病模型是目前国内外公认的方法,但其对实验动物肝肾功能有何影响?

目的: 观察高剂量链脲佐菌素建立小型猪1型糖尿病模型对其肝肾功能的影响。

方法: 将巴马小型猪随机分为对照组和模型组。分别在耳缘静脉注射柠檬酸钠溶液或链脲佐菌素溶液前、后10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 1 d, 3 d和7 d各静脉采血1次,动态监测空腹血糖、C肽和胰岛素水平,检查肝肾功能,通过western blot法检测猪胰腺、肝脏、肾脏葡萄糖转运蛋白2的表达水平。

结果与结论: 给药后24 h开始,模型组空腹血糖明显升高并始终维持在17.7~20.1 mmol/L的浓度范围,C肽和胰岛素水平显著降低。与给药前相比,模型组肝肾功能血液指标中总蛋白、丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶和肌酐均无明显改变;尿素氮和白蛋白虽略有降低,但尚未达到显著性水平;尿酸水平明显降低($P < 0.05$)。Western blot结果表明,与对照组比较,模型组胰腺、肝和肾小管基底膜细胞葡萄糖转运蛋白2的表达均显著减少。证实,一次性注射高剂量链脲佐菌素可成功建立1型糖尿病小型猪模型,且对模型猪的肝肾功能无显著影响。

田忠★,男,1978年生,内蒙古自治区人,汉族,北京协和医学院在读硕士,主治医师。

xunzhaotian@yeah.net

通讯作者:唐跃,博士,主任医师。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,心血管疾病国家重点实验室,北京市100037

tangyue1226@vip.sina.com

并列通讯作者:崔永春,博士,助理研究员。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,心血管疾病国家重点实验室,北京市100037

cyc_fuwai@sina.com

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2013)18-03366-08

收稿日期:2013-02-18

修回日期:2013-03-08

(20130109012/NJ·C)

Streptozocin affects the hepatorenal function of type 1 diabetes mini-pigs

Tian Zhong, Cui Yong-chun, Li Kai, Li Ju-bo, Wang Kun, Tang Yue

State Key Laboratory of Cardiovascular Medicine, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Disease, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China

Abstract

BACKGROUND: It is an acknowledged method to establish type 1 diabetes models in mini-pigs with high doses of streptozocin, but there are few reports about its influence on hepatorenal function of animals.

OBJECTIVE: To explore the effect of high-dose streptozocin on hepatorenal function in type 1 diabetes mini-pigs.

Tian Zhong★, Studying for master's degree, Attending physician, State Key Laboratory of Cardiovascular Medicine, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Disease, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China
xunzhaotian@yeah.net

Corresponding author: Tang Yue, Doctor, Chief physician, State Key Laboratory of Cardiovascular Medicine, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Disease, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China
tangyue1226@vip.sina.com

Corresponding author: Cui Yong-chun, Doctor, Assistant researcher, State Key Laboratory of Cardiovascular Medicine, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Disease, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China
cyc_fuwai@sina.com

Supported by: Science and Technology Planning Project of Beijing Municipal Science and Technology Commission, No. Z101107052210004*; Union Youth Foundation, No. 2012-XHQ04*

Received: 2013-02-18
Accepted: 2013-03-08

METHODS: Obama mini-pigs were randomly divided into control group and model group. Before and 10 and 30 minutes, 1, 2 and 4 hours, 1, 3 and 7 days after ear vein administration of sodium citrate or streptozocin, the blood samples were obtained respectively, and used to dynamically monitor the fasting blood-glucose, C peptide and insulin levels, and the hepatorenal function was examined. Glucose transporter protein 2 expression levels in pancreas, liver and kidney were determined by Western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Since 24 hours after administration, fasting blood-glucose was increased significantly in the model group and maintained at 17.7–20.1 mmol/L, while the C peptide and insulin levels were decreased significantly. Compared with pre-administration, the total protein, alanine aminotransferase, aspartic acid transaminase and creatinine levels were not changed significantly in the model group; urea nitrogen and albumin levels were slightly decreased, but did not reach significant difference level; the blood uric acid was significantly reduced ($P < 0.05$). Western blot results showed that the expressions of glucose transporter-2 of pancreas, liver and renal basilar membrane cells in the model group were significantly lower than those in the control group. One-time high-dose streptozocin injection can establish the mini-pig model of type 1 diabetes successfully, and has no significant influence on the hepatorenal function.

Key Words: organ transplantation; basic experiment in organ transplantation; diabetes; type 1 diabetes; glucose transporter-2; mini-pig; hepatorenal function; provincial grants-supported paper

Tian Z, Cui YC, Li K, Li JB, Wang K, Tang Y. Streptozocin affects the hepatorenal function in type 1 diabetes mini-pigs. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(18):3366-3373.

0 引言

糖尿病是一种以长期高血糖为特征的多种物质代谢紊乱综合征, 是严重威胁人类健康的主要慢性病之一。随着现代生活模式的现代化和社会的老龄化发展, 糖尿病的发病率正在逐年增加, 根据国际糖尿病联盟(<http://www.medscape.com>)2012年的最新统计数据, 全球糖尿病患者的数量日益增加, 预计到2030年患者年总数会上升至5.5亿。糖尿病常并发酮症酸中毒、低血糖以及大血管、微血管和周围神经病变等严重病症, 已成为继肿瘤、心脑血管疾病之后第3位严重的主要慢性非传染性疾病, 是致死、致残并造成医疗费用逐年增高的一个主要原因。

糖尿病主要分为2型, 即1型糖尿病(β 细胞破坏, 通常导致胰岛素绝对缺乏)和2型糖尿病(主要由于胰岛素抵抗伴随胰岛素相对不足, 或胰岛素分泌缺陷并发或不并发胰岛素抵抗)。1型糖尿病较2型糖尿病发病率低(约1:9), 但较难治愈, 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, 而且糖尿病和糖尿病前期的患病率正在向更加年轻的人们蔓延, 这将会使未来的局势更加严峻^[1-2]。因此, 建立真实模拟人类疾病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。

目前, 国内外用于研究1型糖尿病的动物模型包括: 胰腺切除法^[3-4]、化学药物诱导法^[5-6]、柯萨奇病毒感染法^[7-9], 以及自发性糖尿病动物模型(如NOD小鼠、BB糖尿病大鼠)^[10-14]。其中切除胰腺法往往会对动物造成较大伤害, 影响其健康状况。病毒诱导法及现有自发性糖尿病模型均适用于小动物, 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^[15]。

对于大动物糖尿病模型应用最多的是化学药物特异性破坏胰岛 β 细胞方法, 主要包括链脲佐菌素和四氧嘧啶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^[16-19]。

应用链脲佐菌素建立 1 型糖尿病模型是目前国内外公认的方法^[20-23]。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^[17, 24]。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)^[25-29]。近期研究表明, 肝细胞和肾小管基底膜细胞同样表达葡萄糖转运蛋白 2 蛋白^[30-34], 链脲佐菌素通过肝肾代谢, 高剂量链脲佐菌素是否具有肝肾毒性? 是否对肝肾功能有影响? 目前尚无相关研究报道。

因此, 实验通过一次性静脉注射高剂量链脲佐菌素方法建立小型猪糖尿病模型, 并探讨链脲佐菌素对其次级作用脏器肝肾的毒性作用, 从而进一步阐明此种建模方法的安全性和可靠性, 为糖尿病相关研究提供数据支持, 确保糖尿病代谢相关研究获取更加科学、准确的数据。

1 材料和方法

设计: 对比观察, 动物实验。

时间及地点: 于 2012 年 10 月至 2013 年 1 月在中国医学科学院阜外心血管病医院动物实验中心进行。

材料:

构建小型猪糖尿病模型的主要试剂及仪器:

Main reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
链脲佐菌素、柠檬酸钠、柠檬酸 葡萄糖转运蛋白 2 抗体	美国 Sigma Aldrich 公司 上海爱丁堡生物科技发展有限公司
手持式全血葡萄糖测试仪 (JPS-5 型)	北京怡成生物电子有限公司
ACS-180 Plus 全自动免疫分析仪	德国西门子公司
DXC8000 全自动生化分析仪	美国贝克曼公司

实验动物: 巴马小型猪 12 只, 雌雄不限, 体质量 15–20 kg。购自东北畜牧研究, 生产许可证号: 230502600072021。根据动物生长情况, 每日喂食 2 次, 自由饮水。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科

学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[35]。

方法:

0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液配制: 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。

链脲佐菌素溶液的配制: 按照 150 mg/kg 剂量, 根据动物体质量称取适量链脲佐菌素溶于 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 μm 针头式滤器过滤除菌。因链脲佐菌素溶液不稳定, 故实验使用新鲜配制的链脲佐菌素溶液。

分组及 1 型糖尿病猪模型的建立: 将巴马小型猪 12 只随机分为模型组和对照组, 每组 6 只。动物禁食约 16 h, 常规麻醉动物, 模型组动物耳缘静脉一次性注入高剂量链脲佐菌素溶液 (150 mg/kg) 建立 1 型糖尿病猪模型, 于 2 min 内注完; 对照组静脉一次性注入等体积 0.1 mol/L 柠檬酸钠。分别在给药前和给药后 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h 采集血液, 利用手持式全血葡萄糖测试仪检测血糖。

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 1, 2, 3 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。

静脉葡萄糖耐量试验和 C 肽释放实验: 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^[36]。

肝肾功能检查: 分别在给药前和给药后 1 周从前腔静脉采集 2 mL 静脉血, 肝素抗凝, 送至阜外心血管病医院检验科。利用全自动生化分析仪检查肝肾功能各项指标。

Western blot 检测葡萄糖转运蛋白 2 蛋白表达量: 为测定胰腺、肝脏和肾小管基底膜细胞葡萄糖转运蛋白 2 的表达量, 在给药后 7 d 研究终点时, 在动物麻醉状态下, 腹腔注射体积分数 10% KCl 20–30 mL, 对动物实施安乐死, 并快速取出胰腺、肝脏和肾皮质区组织, 称取质量, 加入一定量的 PBS, 其缓冲液中可加入质量浓度 1 $\mu\text{g/L}$ 蛋白酶抑制剂或 50 U/mL 的抑肽酶。用手工或匀浆器将标本匀浆充分, 离心约 20 min 左右 (2 000–3 000 r/min), 收集上清, 利用 BCA 蛋白浓度测

定试剂盒(Solarbio, Peking, China)测定蛋白浓度。分别将各组平行孔等量蛋白与等体积 2×SDS 上样缓冲液于沸水中煮 5 min, 取 10 μL 上样进行 SDS-PAGE 电泳, 所使用的分离胶浓度为 10%。然后, 按照常规方法 50 mA 转膜 1 h, 体积分数 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入兔抗猪葡萄糖转运蛋白 2 抗体(1:800, A10648R, USA)和 GAPDH 抗体(1:1 000, Zymed, USA)杂交, 室温万向摇床上低速杂交 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入购自中国北京中杉生物技术有限公司的羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000), 室温孵育 1 h。

利用 Super signal femto chemiluminescent detection reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)检测免疫反应性葡萄糖转运蛋白 2 蛋白条带。利用 Bio-Rad 凝胶成像仪拍摄显像条带, 根据条带灰度判断蛋白表达量。

主要观察指标: ①鉴定小型猪糖尿病模型是否建立成功的血液学指标, 空腹血糖、血胰岛素和 C 肽水平。②反映小型猪肝肾功能的常用血液指标, 总蛋白、丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、肌酐、血尿素氮、白蛋白和血尿酸。③反映链脲佐菌素对胰腺、肝脏和肾脏组织毒性损伤机制指标, 葡萄糖转运蛋白 2 蛋白表达水平。

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。组间均数差异的比较采用两样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入小型猪 12 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、静脉糖耐量试验和 C 肽释放试验结果 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, 1 h, 2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d 采集外周血, 利用血糖监测仪测定空腹血糖。

结果发现, 自链脲佐菌素给药后 24 h 开始, 血糖明显升高并稳定维持在 17.7–20.1 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)。见图 1A。

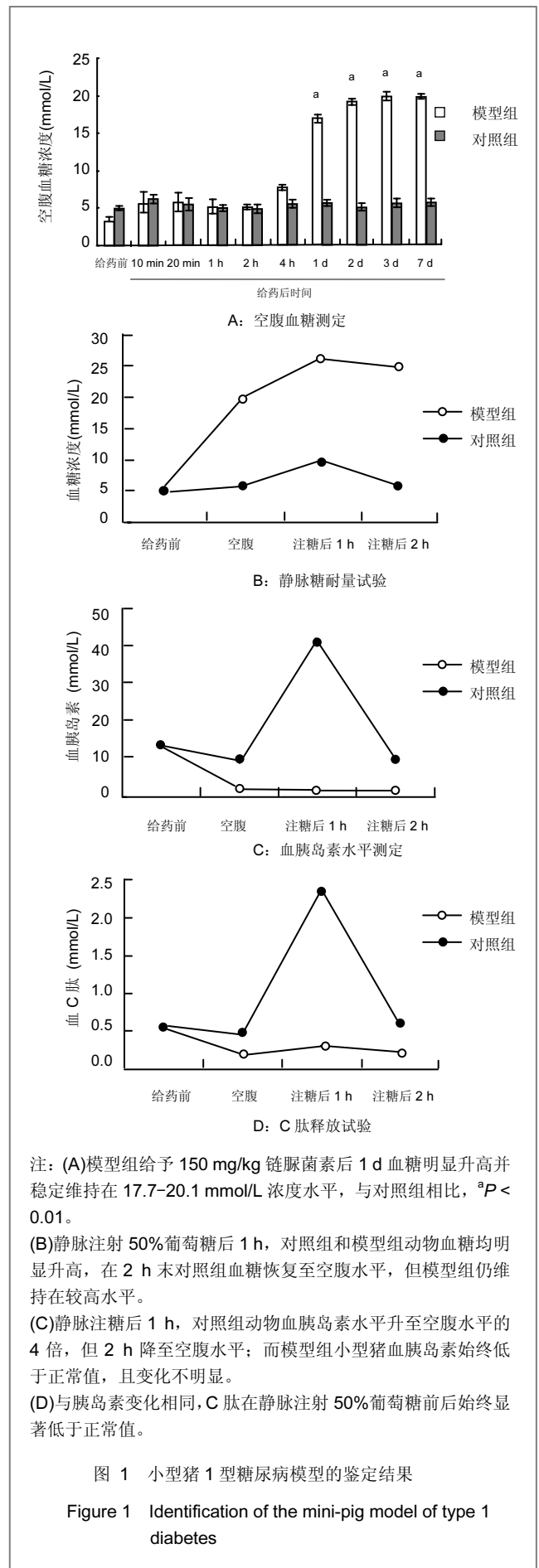


图 1 小型猪 1 型糖尿病模型的鉴定结果

Figure 1 Identification of the mini-pig model of type 1 diabetes

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。静脉葡萄糖耐量试验实验结果表明, 与给药前水平相比, 模型组链脲佐菌素处理后7 d空腹血糖水平明显高于7 mmol/L的糖尿病诊断标准, 空腹胰岛素水平显著下降; 对照组注射等体积0.1 mol/L柠檬酸钠前后的空腹血糖和胰岛素水平差异不明显。

静脉注射50%葡萄糖后1 h, 对照组和模型组动物血糖均明显升高, 模型组达到28 mmol/L左右(>11.1 mmol/L临界值), 对照组9.5 mmol/L左右(<11.1 mmol/L临界值); 在注糖2 h后对照组血糖恢复至空腹水平, 但模型组仍维持在较高水平(约25 mmol/L); 在静脉注糖后1 h, 对照组动物血胰岛素水平升至空腹水平的4倍, 但2 h降至空腹水平; 而模型组小型猪在静脉注糖前后, 血胰岛素始终变化不明显。见图1B, C。

C肽释放规律检测结果与血胰岛素变化情况相近, 见图1D。链脲佐菌素处理后1周, 模型猪血胰岛素空腹水平较给药前明显降低; 注糖后一两小时与空腹水平比较, 差异均无显著性意义。

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: 空腹血糖大于等于7 mmol/L; 静脉葡萄糖耐量试验经静脉注射50%葡萄糖1 h后血糖浓度>11.1 mmol/L, 血糖2 h后血糖浓度未降至空腹水平; 空腹胰岛素和C肽水平明显降低, 静脉注射50%葡萄糖前后2 h内, 二者血液水平始终变化不显著。说明小型猪静脉一次性注射高剂量链脲佐菌素(150 mg/kg)可成功建立1型糖尿病模型。

2.3 给药前后1型糖尿病猪模型的肝肾功能 为说明一次性静脉注射高剂量链脲佐菌素建立小型猪糖尿病模型是否能够造成肝肾功能损伤, 实验分别在给药前和给药后1周采集了各组实验小型猪的静脉血, 进行肝肾功能检查。

结果表明, 给药前实验小型猪的各项指标均正常。给药后1周, 血总蛋白、丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、肌酐水平均在正常范围内; 而白蛋白和尿素氮较给药前略有降低, 但尚未达到显著水平; 仅尿酸水平与正常值相比差异有显著性意义, 较给药前降低约10倍, 见表1。

表1 给药前后1型糖尿病模型猪肾功能检查

Table 1 Examination of hepatorenal function of mini-pig model of type 1 diabetes

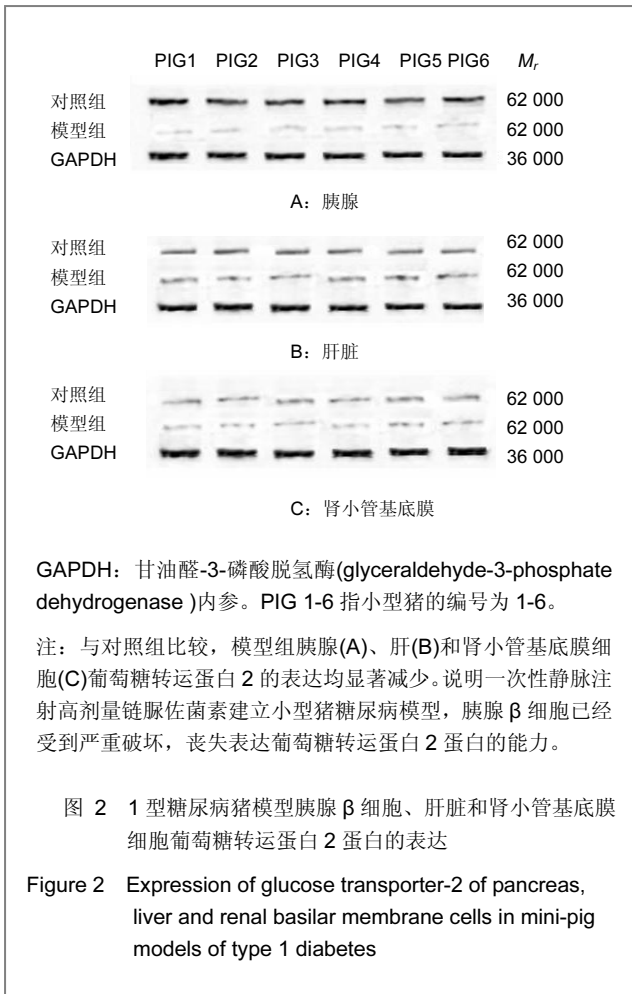
项目	对照组		正常值
	给药前	给药后7 d	
血总蛋白(g/L)	68.3±5.5	71.0±6.1	60-80
白蛋白(g/L)	38.6±4.2	40.2±3.3	35-55
丙氨酸氨基转移酶(nkat/L)	543.4±45.6	483.4±58.3	16.7-666.8
天门冬氨酸氨基转移酶(nkat/L)	396.7±188.4	383.4±123.0	16.7-666.8
肌酐(μmol/L)	64.2±12.4	73.4±12.2	44-133
尿素氮(mmol/L)	5.9±1.1	4.3±1.3	2.86-7.90
尿酸(μmol/L)	205±35.6	197.3±16.2	148.8-416.5
项目	模型组		正常值
	给药前	给药后7 d	
血总蛋白(g/L)	66.3±6.3	61.0±6.5	60-80
白蛋白(g/L)	36.6±4.3	20.2±3.5 ^a	35-55
丙氨酸氨基转移酶(nkat/L)	555.1±48.3	516.8±61.7	16.7-666.8
天门冬氨酸氨基转移酶(nkat/L)	430.1±205.1	400.1±126.7	16.7-666.8
肌酐(μmol/L)	66.2±13.4	75.4±15.2	44-133
尿素氮(mmol/L)	4.9±1.5	2.3±1.1	2.86-7.90
尿酸(μmol/L)	195.2±37.6	17.3±8.2 ^a	148.8-416.5

与给药前比较, ^aP < 0.01。

注: 给予150 mg/kg链脲佐菌素后7 d, 模型组肌酐水平较给药前降低约10倍, 其他肝肾功能指标无显著变化, 说明一次性静脉注射高剂量链脲佐菌素建立小型猪糖尿病模型对肝肾功能无损害。

2.4 1型糖尿病猪模型胰腺β细胞、肝脏和肾小管基底膜细胞葡萄糖转运蛋白2蛋白的表达 为说明糖尿病小型猪胰腺β细胞、肝脏和肾小管基底膜细胞葡萄糖转运蛋白2蛋白表达情况, 解释模型组血尿酸降低的可能机制, 实验分别采集对照组和模型组小型猪的胰腺、肝脏和肾皮质组织, 通过western blot方法检测其中葡萄糖转运蛋白2蛋白的表达水平。

结果如图2所示, 给药后1周, 链脲佐菌素处理组小型猪胰腺组织几乎无葡萄糖转运蛋白2蛋白表达, 说明胰腺β细胞已经受到严重破坏, 丧失表达葡萄糖转运蛋白2蛋白的能力, 见图2A。与胰腺组织比较, 对照组小型猪肝细胞和肾小管基底膜细胞葡萄糖转运蛋白2蛋白的表达丰度相对较低, 经链脲佐菌素处理后葡萄糖转运蛋白2蛋白仍有痕量表达, 见图2B, C。



3 讨论

实验采用静脉一次性注射高剂量链脲佐菌素方法建立小型猪糖尿病模型及其评价。空腹血糖测定结果发现, 与对照组相比, 链脲佐菌素处理组动物在给药后24 h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。

胰岛素是衡量胰岛β细胞功能的经典指标, C肽又称连接肽, 它与胰岛素有一个共同的前体-胰岛素原。一个分子的胰岛素原经酶切后, 裂解成一个分子的胰岛素和一个分子的C肽, 二者以等分子数共存于分泌颗粒并同时释放至毛细血管循环中, 且C肽不被肝脏破坏, 半衰期较胰岛素明显为长, 故测定血循环中C肽水平更

能准确反映β细胞分泌功能, 对糖尿病的诊断和治疗具有很大的意义^[37-38]。实验中的小型猪经高剂量链脲佐菌素处理后, 血胰岛素和C肽同时呈痕量水平, 符合1型糖尿病特征, 说明建模成功。

高剂量链脲佐菌素对其次级作用脏器肝肾的毒性作用评价, 从而进一步阐明此种建模方法的安全性和可靠性。给药后1周肝肾功能检查结果表明, 血总蛋白、丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、肌酐水平均在正常范围内, 白蛋白和尿素氮较给药前略有降低, 但尚未达到显著水平; 在各肝肾功能参数中仅尿酸水平与正常值相比具有显著差异。尿酸是嘌呤的代谢最终产物。体内的陈旧细胞, 富含嘌呤的食物(如动物内脏、海鲜等)在体内新陈代谢过程中, 其核酸氧化分解产物就有嘌呤。体内产生嘌呤后, 会在肝脏中再次氧化为尿酸。血中尿酸除小部分被肝脏破坏外, 大部分被肾小球过滤, 肾小管重吸收。

实验链脲佐菌素处理后小型猪出现血尿酸明显降低, 其可能机制包括: 一是链脲佐菌素通过葡萄糖转运蛋白2葡萄糖转运蛋白进入肾小管基底膜细胞, 产生细胞毒性, 使细胞内代谢改变, 不能产生足够的能量以维持物质的转运; 二是肾小管膜的完整性改变致发生泄漏而不能有效地重吸收, 这两者有时不可截然分开, 因为维持细胞间的完整性和保持小管上皮需要细胞内的能量^[39-40]。

Western blot结果也表明, 与肝脏和肾脏相比, 等量胰腺组织中葡萄糖转运蛋白2蛋白表达丰度更高^[41], 链脲佐菌素的作用位点也相应高出很多, 因此胰腺β细胞受损最为严重。肝脏和肾皮质葡萄糖转运蛋白2蛋白表达量相对偏少, 则受链脲佐菌素影响较小, 而肝脏相对于肾脏的代偿能力更强, 因此肝功能基本维持正常, 而肾小管的重吸收功能部分受损, 在本次实验体系中主要体现在血尿酸偏低。

实验的不足之处以及今后研究重点是增加动物数量, 更加细致全面地评估不同剂量链脲佐菌素建立不同型别糖尿病模型的稳定性、均一性和安全性。

基金资助: 实验部分内容获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”(课题编号Z101107052210004)基金和协和青年基金“糖尿病小型猪

急性心肌缺血代谢组学研究”(课题编号 2012-XHQ04)资助。

作者贡献: 崔永春、田忠、李凯负责课题实施、实验数据的搜集整理、撰写文章; 李巨波和王坤负责实验动物麻醉、给药、看护和饲养; 唐跃负责实验研究的指导、文章的审校和定稿。

利益冲突: 该课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益。

伦理要求: 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, 遵循《北京市实验动物福利与伦理指南》的要求。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Preiss D, Sattar N. Pharmacotherapy: Statins and new-onset diabetes—the important questions. *Nat Rev Cardiol.* 2012;9(4): 190-192.
- [2] Tan DA. Changing disease trends in the Asia-Pacific. *Climacteric.* 2011;14(5):529-534.
- [3] Maeda H, Hanazaki K. Pancreatogenic diabetes after pancreatic resection. *Pancreatol.* 2011;11(2):268-276.
- [4] Lehach EI, Bodnar lu I, Bozhok HA. Prophylaxis of a specific type diabetes mellitus development using pancreatic islet autotransplantation after pancreatic resection. *Klin Khir.* 2011; (12):63-67.
- [5] Guan ZA, Sun MX, Guan DS, et al. Tianjin: Tianjin Kexue Jishu Chubanshe. 2001.
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.
- [6] Du GH, Li XJ, Zhang YX, et al. Beijing Science Press. 2001.
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.
- [7] Jaidane H, Sane F, Gharbi J, et al. Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25(7):591-603.
- [8] 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. *PLoS Pathog.* 2011;7(9):e1002267.
- [9] 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. *Microbes and infection/Institut Pasteur.* 2009;11 (4):443-451.
- [10] 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. *PLoS One.* 2012;7(12):e52054.
- [11] Bortell R, Yang C. The BB rat as a model of human type 1 diabetes. *Methods Mol Biol.* 2012;933:31-44.
- [12] Zhao YY, Huang XY, Chen ZW. Daintain/AIF-1 (Allograft Inflammatory Factor-1) accelerates type 1 diabetes in NOD mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427(3):513-517.
- [13] Grant CW, Duclos SK, Moran-Paul CM, et al. Development of standardized insulin treatment protocols for spontaneous rodent models of type 1 diabetes. *Comp Med.* 2012;62(5): 381-390.
- [14] 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. *PLoS One.* 2012;7(10):e46941.
- [15] 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. *Ann Transplant.* 2009; 14(2):45-50.
- [16] Strauss A, Moskalenko V, Tiurbe C, et al. Goettingen Minipigs (GMP): Comparison of Two Different Models for Inducing Diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* 2012;4(1):7.
- [17] Szkudelski T. Themechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6): 537-546.
- [18] Liu YQ, Li CH, Chen H. *Shiyan Dongwu Kexue.* 2007;24(5): 24-26.
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.
- [19] Chen H. *Zhongguo Shiyan Dongwu Xuebao.* 2009;16(6): 458-462.
陈华. 小型猪糖尿病模型[J]. *中国实验动物学报*, 2009, 16(6): 458-462.
- [20] 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. *Diabetes.* 2012;61(5):1004-1016.
- [21] Yu X, Park BH, Wang MY, et al. Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(37):14070-14075.
- [22] 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. *Hypertension.* 2012;60(1):71-80.
- [23] Gunawardana SC, Piston DW. Reversal of type 1 diabetes in mice by Brown adipose tissue transplant. *Diabetes.* 2012; 61(3):674-682.
- [24] Dufrene D, van Steenberghe M, Guiot Y, et al. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and [beta]-cell Plasticity. *Transplantation.* 2006;81(1):36-45.
- [25] Jensen-Waern M, Andersson M, Kruse R, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes in domestic pigs with focus on the amino acid metabolism. *Lab Anim.* 2009;43(3):249-254.
- [26] 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. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(7):709-717.
- [27] 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 Microbiol Biotechnol.* 2010;20(4): 817-820.

- [28] Hara H, Lin YJ, Zhu X, et al. Safe induction of diabetes by high-dose streptozotocin in pigs. *Pancreas*. 2008;36(1):31-38.
- [29] Wang YT, Wang ZB. *Zhongguo Bijiao Yixue Zazhi*. 2012;21(12):70-73.
王月婷,王宗保. 小型猪糖尿病模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 21(12):70-73.
- [30] Aschenbach J, Steglich K, Gäbel G, et al. Expression of mRNA for glucose transport proteins in jejunum, liver, kidney and skeletal muscle of pigs. *J Physiol Biochem*. 2009;65(3): 251-266.
- [31] Freitas HS, Schaan BD, Seraphim PM, et al. Acute and short-term insulin-induced molecular adaptations of GLUT2 gene expression in the renal cortex of diabetic rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;237(1-2):49-57.
- [32] Goestemeyer A, Marks J, Srail S, et al. GLUT2 protein at the rat proximal tubule brush border membrane correlates with protein kinase C (PKC)- β and plasma glucose concentration. *Diabetologia*. 2007;50(10):2209-2217.
- [33] Park S-K, Haase VH, Johnson RS. von Hippel Lindau tumor suppressor regulates hepatic glucose metabolism by controlling expression of glucose transporter 2 and glucose 6-phosphatase. *Int J Oncology*. 2007;30(2):341-348.
- [34] Schmidt C, Höcherl K, Bucher M. Regulation of renal glucose transporters during severe inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(2):F804-F11.
- [35] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
- [36] 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. *Transplant Proc*. 2008;40(2):536-539.
- [37] Ludvigsson J. C-peptide in diabetes diagnosis and therapy. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013;5:214-223.
- [38] Wang S, Wei W, Zheng Y, et al. The role of insulin c-peptide in the coevolution analyses of the insulin signaling pathway: a hint for its functions. *PLoS One*. 2012;7(12):e52847.
- [39] Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes*. 1998;47(1):50-56.
- [40] Vallon V, Thomson SC. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Ann Rev Physiol*. 2012;74:351-375.
- [41] Kramer J, Moeller EL, Hachey A, et al. Differential expression of GLUT2 in pancreatic islets and kidneys of New and Old World nonhuman primates. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(3):R786-R793.