

一种适用于初试者的 STZ 法建 T1DM 大鼠模型的技术方案

赵凌云¹, 刘南君¹, 许永杰¹, 李学英^{1*}, 刘晓红^{2*}

(¹ 遵义医学院细胞生物学与遗传学教研室, ² 生理学教研室, 贵州 遵义 563003)

[摘要] **目的:**探索一种适用于初学者的以 STZ 法复制 1 型糖尿病(T1DM)大鼠模型的技术方案。**方法:**100 只雄性 Wistar 大鼠随机分为模型组(DMM)和对照组(NC)。采用有别于现有文献报道的技术方案即分批次建模。DMM 组分 3 批依次分别一次性腹腔注射 60 mg/kg(DMM1)、70 mg/kg(DMM2)、55 mg/kg(DMM3)STZ 溶液,NC 组注射等量的柠檬酸盐缓冲液。DMM1、DMM2 建模未成功者均编为 DMM3。将 72 h 后禁食 17 h 空腹血糖值(FPG)≥11.1 mmol/L 和相应生理指标作为成模的判断依据。**结果:**DMM1 建模前后 FPG 无差异($P > 0.05$),DMM1 建模失败;DMM2 建模前后 FPG 具有显著差异($P < 0.05$),成模率为 75%。DMM3 补充剂量后建模成功。**结论:**分批次进行的 STZ 法建模方案适宜于初学者使用。

[关键词] 链脲佐菌素; 糖尿病; 动物模型; Wistar 大鼠

[中图分类号] R587.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)10-1480-03

A new and suitable technical scheme of establishing type 1 diabetes (T1DM) rats model by STZ injection for beginners

ZHAO Ling-yun¹, LIU Nan-jun¹, XU Yong-jie¹, LI Xue-ying^{1*}, LIU Xiao-hong^{2*}

(¹Department of Cell Biology and Genetics, ²Department of Physiology, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China)

[Abstract] **Objective:**To explore a new and suitable technical scheme of establishing type 1 diabetes (T1DM) rats model by STZ injection for beginners. **Methods:**Total 100 male Wistar rats were divided into diabetes mellitus model (DMM) group and the control group (NC) randomly. The technical scheme for establishing animal model is different from the existing literature. The DMM group of two batches were followed by a single intraperitoneal injection 60 mg/kg (DMM1) or 70 mg/kg (DMM2) STZ solution respectively. the NC group was injected with the same amount of citrate buffer. The rats in DMM1 and DMM2 groups, which didn't develop T1DM, were compiled into DMM3 group (55 mg/kg STZ by a intraperitoneal injection). After 72 h of STZ treatment, the rats were considered as T1DM model with fasting plasma glucose (FPG) after 17 h fasting ≥ 11.1 mmol /L and with corresponding physiological indicators. **Results:**The rat model can't be constructed successfully by a single intraperitoneal injection STZ of 60 mg/kg. The FPG of rats in DMM2 group changed significantly before and after STZ injection ($P < 0.05$), and 75% of rats developed T1DM. The rats that didn't develop T1DM with first injection of STZ developed T1DM after supplementary dose in DMM3 group. **Conclusion:** Constructing T1DM rats induced by STZ injection in batch is best for beginners to use.

[Key words] streptozotocin (STZ); diabetes mellitus; animal models; Wistar rats

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1480-1482]

国际糖尿病联盟 (IDF)2011 年 11 月公布的最
新数据显示,中国糖尿病(diabetes mellitus,DM)的

患病人数已超过 9 000 万,居世界第一,预计 2030
年将增至约 1.3 亿。患病人数快速增长给人类带来
极大的挑战,其发病机制复杂,防治及研究仍是医学
界一大难题。成功建立糖尿病模型是该疾病研究的
前提。目前,STZ 法诱导复制糖尿病大鼠模型,已经
是较成熟的建模方法了。但是,对于初次涉足糖尿病
模型建立的研究生,建立简便、周期短、可操作性强、

[基金项目] 贵州省教育厅基金资助项目(2004213);贵州
省卫生厅基金资助项目(2004)

*通讯作者, E-mail: leexueying4722@163.com; lxh680718@ya-
hoo.com

稳定的 DM 大鼠模型却是一件困难的事情,常由于大量的大鼠死亡,多次重做,实际建模成功率并不能达到文献报道的 75%,造成建模失败,不能进行后续实验。因此,本实验即针对糖尿病动物模型制备的技术路线在操作方式上进行优化。

1 材料和方法

1.1 材料

成年 Wistar 雄性大鼠 100 只,体重 220~250 g,清洁级[许可证编号(SCXK 京)2009-0004,由北京华卓康生物科技股份有限公司提供];链脲佐菌素(STZ, Sigma 公司,美国)。根据临床及文献报道,血糖仪及血糖试纸采用国产三诺安稳系列产品。

1.2 方法

1.2.1 STZ 注射液的配制

柠檬酸缓冲液的配制:柠檬酸 2.1 g 加入双蒸水 100 ml 配成 A 液;柠檬酸三钠 2.94 g 加入双蒸水 100 ml 配成 B 液。

STZ 配制液:用时取 28 ml A 液加 22 ml B 液,双蒸水稀释到 100 ml, pH=4.5,过滤除菌,按大鼠体重称取 STZ,用上述 A、B 液按 1:1 体积混合后调整 pH 为 4.5,该液要求现用现配,4℃配置,避光,尽量 15 min 内注射完毕。

DMM1 批注射用 STZ 溶液浓度为 1%, DMM2~3 批浓度为 2%, NC 组注射等体积的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH4.5),之后各组均给予自由摄食饮水,自然光照,室温 19~21℃,相对湿度 50%左右。

1.2.2 动物模型的制备

大鼠经适应喂养 2 周后随机分为模型组(DMM, $n = 90$)和正常对照组(NC, $n = 10$)。任意选择 10 只作为第一批(DMM1, $n = 10$),禁食不禁水 17 h 后以 60 mg/kg 剂量 STZ 注射,进行建模,将建模不成功的大鼠另作标记;1 周之内进行第二批

(DMM2, $n = 80$)建模,该组使用增加剂量 70 mg/kg STZ 注射;将 DMM1、DMM2 建模不成功的大鼠合编为第三批(DMM3, $n = 18$)建模,该组使用剂量 55 mg/kg STZ 注射。

1.2.3 观察指标

以 STZ 作用 72 h 后禁食 17 h 的空腹血糖(FPG) ≥ 11.1 mmol/L,及伴烦渴、多饮、多尿、体重下降为造模成功的依据^[1]。注射前(d0)、注射后(d3、d4、d5)分别剪尾取血,检测 FPG。每次取血后创口行酒精消毒并烧灼止血或涂擦金霉素软膏。计算成模率,死亡率。饲养中每天观察大鼠摄食、饮水、尿量、精神状态、活动情况。尿量以垫料潮湿程度表示。

1.3 统计学方法

全部数据用 SPSS17.0 软件包处理,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型组与正常组成模前后 FPG 值的比较

NC 组注射等体积的柠檬酸盐缓冲液 5 d 后的 FPG 与注射 STZ 前大鼠的血糖值无差异($P > 0.05$),对血糖无影响。第一批 DMM1 FPG 为 (8.18 ± 5.15) mmol/L, DMM1 造模前后比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),建模失败。第二批 DMM2 FPG 为 (19.70 ± 3.83) mmol/L,成模率是 75%。DMM2、DMM3 分别做造模前后比较,差异均具有显著统计学意义($P < 0.05$),建模成功。DMM3 补充剂量 55 mg/kg 后建模成功(表 1, 2)。

2.2 动物大体情况

模型组大鼠均出现多饮、多尿,体重增加缓慢甚至下降,且精神状态较成模前差,烂尾,各成模大鼠均出现嗜睡、不喜活动现象。正常组大鼠体形适中,精神状况良好,反应灵敏,动作敏捷,毛发有光泽。

表 1 各批次大鼠注射 STZ 前后 FPG 浓度

Table 1 FPG concentration of rats in each group before and after injection of STZ ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

批次	例数	STZ 剂量(mg/kg)	d0	d3	d4	d5
NC	10	60	5.66 ± 0.35	4.78 ± 1.00	5.45 ± 0.63	5.52 ± 0.65
DMM1	10	60	5.02 ± 0.32	6.01 ± 2.20	5.16 ± 1.91	8.18 ± 5.15
DMM2	80	70	5.65 ± 0.51	17.20 ± 3.60	18.90 ± 3.50	19.70 ± 3.83
DMM3	18	55	6.35 ± 1.04	17.20 ± 6.14	16.90 ± 6.14	17.20 ± 6.72

3 讨论

根据国内外文献报道,由于采用 STZ 诱导的 T1DM 大鼠模型,其临床表现与人类 T1DM 类似^[2-3],

该方法已经成熟地被应用于 T1DM 大鼠模型的复制。大鼠建模成功与否及成功率高低涉及到 STZ 的用量、大鼠体质和体重、给药方式、性别、实验动物种类、护理等因素,给药剂量多为 50~80 mg/kg^[4-5]。

表2 各批次大鼠成模率

Table 2 The success rates of T1DM rats construction by STZ injection in each group

批次	例数(n)	STZ 剂量(mg/kg)	成功(只/%)	死亡(只/%)
DMM 1	10	60	1/10%	0
DMM 2	80	70	60/75%	11/14.0%
DMM 3	18	55	13/72%	1/5.6%

大多数硕士生由于是第一次开展建模实验,对所购大鼠不了解,其诱导剂量也不清楚,对抓鼠、注射、剪尾、抗感染等操作也陌生,如果马上进行上百只大鼠的建模,则手忙脚乱,面对大量糖尿病大鼠更是护理不周,结果很容易导致建模的失败。这些学生大多都在经历着反复的失败,既耗时间、精力,又消耗经费,还不断接受失败的打击。仔细分析原因,STZ 诱导法本身是成熟的建模方法,但是操作者的技能基础和实验大鼠的耐受水平不同,所以,综合以上分析,作者认为初试者不宜直接应用 STZ 法进行批量大鼠的建模实验。应该先进行一个低剂量 STZ 诱导和小量大鼠建模的预实验,以便找到合适的诱导剂量,熟练掌握操作技能以及大鼠的护理方法。

本文设计的分批次、首次低剂量及重复注射 STZ 的技术路线,成功地达到了以上目的,为批量大鼠的建模实验奠定了成功的基础;第一批次使用大鼠 10 只,成模只有 1 只,其他存活,提示 STZ 剂量稍小,所以第二批次大鼠注射剂量调整到 70 mg/kg,大鼠数量 80 只,结果建模成功了 60 只,成模率达到文献记载的数据(75%),足以完成后续药物干预的实验研究。建模失败的大鼠还可以编入第三批次 DMM3,以 55 mg/kg 作为补充剂量重复注射,18 只大鼠有 13 只建模成功。该模型至少可维持 2 个月供药物干预实验。常规造模过程初试者不能控制大鼠死亡率,但本方法对于初试者,大鼠死亡率可控制在 14% 以下。该造模方法现已在其他项目组研究生实验中得到证实。

分批次建模(首批少量大鼠、低剂量 STZ,第二批大量大鼠、增加剂量 STZ)与文献报道的 STZ 诱导建模的原理相同,只是在实际操作路线上进行了改变。其最大的优点就是适用于首次进行建模实验研究的硕士生或青年教师。

分批次建模能够较快获得成功,其原因有以下几个方面:少量大鼠的建模预实验,可以为无建模经验者提供熟悉实验过程、实验技术和实验技能的时间和机会,也可使其熟悉实验过程中的各种变化因

素及应该采取的应对措施,尤其是熟练取血及伤口处理方法以预防感染;选择低剂量 STZ 注射,其意义在于在不知实验用大鼠对 STZ 剂量耐受的情况下,摸索出适合的诱导剂量,也由此决定第二批次大量大鼠建模的所用剂量,增加或不增加;在此操作基础上,当进行第二批次大量大鼠同时建模时,可以从容不迫地在短间内完成大量大鼠的注射和防感染护理、出现三多症状后的日常护理等全套操作,避免了糖尿病建模过程和后续研究中大鼠因衰竭和感染出现的大量死亡现象;对建模过程中出现的个别大鼠烂尾,也能及时给予局部消毒,外敷抗生素软膏及加强后期管理;对建模过程中大鼠因“三多”现象造成垫料湿烂,也能给以足够的应对措施即 1 日 3 次更换垫料及紫外灭菌以避免感染增加死亡率。

总之,本改进的分批次注射 STZ 诱导复制 Wistar 大鼠 T1DM 模型的技术方案,与经典的建模方法相比,更适用于初次进行建模的研究者。循序渐进可以增加成功的机会,减少重复实验的次数、时间、精力、经费的浪费、减少失败次数,宜在首次进行建模实验的研究者中推广。

[参考文献]

- [1] Matteucci E, Giampietro O. Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115(2): 163-172
- [2] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas[J]. *Physiol Res*, 2001, 50(6): 537-546
- [3] Lenzen S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes[J]. *Diabetologia*, 2008, 51(2): 216-226
- [4] 常利民,董佳生,徐华,等. SD 大鼠 1 型糖尿病动物模型的建立[J]. *山西医药杂志*, 2009, 38(3): 218-220
- [5] Guo M, Wang L, Lu Y. Impact of drug intervention or cardiomyopathy in STZ-induced type 1 diabetic rats[J]. *Clin Med China*, 2011, 27(3): 225-229

[收稿日期] 2012-04-19