

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.12.1360

· 综述 ·

链脲佐菌素诱导的小鼠糖尿病视网膜病变模型的构建

高鑫, 宋洪元, 沈炜*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院眼科, 上海 200433

[摘要] 长期以来, 链脲佐菌素(STZ)被广泛用于诱导多种动物的糖尿病视网膜病变(DR)模型。STZ诱导的动物DR模型的临床特征和病理变化与人1型糖尿病的DR相似, 经常被用来研究DR的发病机制及进行新型抗DR药物的临床前评估。小鼠体型小、动物成本低、容易操作及诱导成功率高, 是研究DR的最佳模型动物之一。建立小鼠DR模型时仍存在许多问题, 例如模型的再现性以及STZ的动物致死性等。通过查阅文献发现, 在使用STZ构建动物DR模型时, 应当注意几个关键因素, 如STZ的制备、给药剂量、给药途径、饲养方式, 各类动物的年龄、体质量和性别等。本综述分析了STZ致DR的机制, 指出了STZ诱导小鼠DR模型的关键环节, 介绍了降低STZ致死率的方法。

[关键词] 链脲佐菌素; 糖尿病; 糖尿病视网膜病变; 动物疾病模型; 小鼠

[中图分类号] R 587.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)12-1360-04

Establishment of streptozotocin-induced diabetic retinopathy model in mice

GAO Xin, SONG Hong-yuan, SHEN Wei*

Department of Ophthalmology, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] Streptozotocin (STZ) has been widely used to create diabetic retinopathy (DR) model in a variety of animals. The clinical features and pathological changes of the animal models of DR induced by STZ are similar to those of DR of human type 1 diabetes mellitus, so the animal models are frequently used to study the pathogenesis of DR and evaluate new pre-clinical anti-DR drugs. Mice are one of the best models to study DR because of small size, low cost, ease of operation and high success rate of induction. However, researchers also face many challenges in inducing mouse model of DR, such as reproducibility of the model and animal lethality by STZ. In the process of inducing animal DR model by STZ, we need to pay attention to several key factors, including the preparation of STZ, suitable dosage, route of administration, feeding method, and age, body mass and gender of the animals. This review analyzes the mechanism of STZ-induced DR, emphasizes the important processes of STZ-induced mouse DR model, and proposes the methods to reduce the lethality of STZ.

[Key words] streptozotocin; diabetes mellitus; diabetic retinopathy; animal disease models; mice

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(12): 1360-1363]

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的微血管并发症之一, 糖尿病发展10年后约60%的患者会进展到增殖期DR, 约35%的患者会致盲^[1]。因此, 建立用于反映疾病病理特征的DR动物模型, 对于找到更好的DR治疗方法是必不可少的^[2]。四氧嘧啶、链脲佐菌素(streptozocin, STZ)、地塞米松、肾上腺素等药物均可成功诱导小鼠DR模型, 其中STZ构

建DR模型的成功率高, 因此STZ诱导小鼠DR模型被广泛应用^[3]。STZ通过对胰岛β细胞DNA的烷基化作用破坏胰岛β细胞, 使之合成分泌胰岛素不足, 诱发糖尿病^[4]。进而, 糖尿病小鼠在高血糖状态下通过一系列途径诱发视网膜病变。然而, 该动物模型的诱导成功率受诸如STZ的制备和施用途径、STZ剂量、动物年龄、性别等因素的影响, 尤其是高剂量的STZ会引起小鼠死亡^[5-6]。

[收稿日期] 2018-05-06 **[接受日期]** 2018-06-25

[基金项目] 国家自然科学基金(81700839), 上海市自然科学基金(15ZR1413200)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81700839) and Natural Science Foundation of Shanghai (15ZR1413200)。

[作者简介] 高鑫, 硕士生。E-mail: chykgao@163.com

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-31161999, E-mail: shenwei@smmu.edu.cn

1 STZ 诱导 DR 的机制

1.1 STZ 引起糖尿病的机制 STZ 首先将胰岛 β 细胞 DNA 碱基上的特殊位点烷基化, 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^[4]。

STZ 是一种含亚硝基的化合物, 可以诱导一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的合成、释放抑制 DNA 保护酶, 导致 DNA 的损伤; 且可以通过抑制顺乌头酸酶合成影响线粒体氧化呼吸复合物, 导致线粒体能量供应紊乱, 增加对胰岛 β 细胞的氧化侵袭而特异性破坏胰岛 β 细胞, 从而导致糖代谢紊乱^[3]。

STZ 诱导的小鼠糖尿病模型在早期阶段会产生氧自由基, 如超氧阴离子自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 等会引起小鼠体内促氧化剂和抗氧化剂失衡导致氧化应激, 并与 NO 途径相互作用导致 β 细胞破坏, 引起糖代谢紊乱^[7]。

单次大剂量注射 STZ 可引起快速的大量胰岛 β 细胞坏死, 通常诱导形成 1 型糖尿病模型; 多次低剂量注射则造成部分胰岛 β 细胞损伤, 激发炎症反应, 从而导致胰岛 β 细胞迅速失活, 其同样诱导为 1 型糖尿病模型^[8]。

1.2 STZ 引起 DR 的机制 视网膜毛细血管主要由内皮细胞和周细胞组成, 后者的主要作用是调节视网膜毛细血管局部血流量和血管通透性, 并可以抑制内皮细胞的增殖。可在电镜下观察到 DR 模型中毛细血管基底膜增厚, 周细胞线粒体肿胀, 细胞核内染色质浓缩, 细胞质空泡化, 细胞器消失。视网膜神经细胞也会因微环境改变而发生病理变化, 视网膜中的胶质细胞处于神经元和血管之间, 对传递环境信息有非常重要的作用, 而 DR 动物模型中星形胶质细胞明显减少^[9]。

长期高血糖引起机体蛋白质非酶糖化, 形成的糖基化终产物 (advanced glycation end product, AGE) 大量堆积是导致视网膜毛细血管周细胞凋亡和 DR 发生的主要原因^[10]。糖化血红蛋白含量与红细胞聚集速度呈正相关, 大量红细胞聚集易使微小动脉形成血栓; 糖化血红蛋白对氧的亲合力

增大, 氧解离速率降低, 使组织缺氧, 诱发多种血管生长因子表达增加, 这是 DR 发生和进展的基础^[11]。缺血、缺氧可导致光感受器和双极细胞层水肿和增厚, 色素上皮层细胞水肿以及双极细胞排列紊乱^[12]。

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是介导新生血管的主要生长因子, 小鼠 DR 模型诱导成功 5 个月后, VEGF 及其受体 2 表达明显升高。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 是一类调控蛋白, 其可以使细胞外基质降低而促进 VEGF 分泌, 在 DR 模型中 MMP-2 和 MMP-9 表达增加^[13]。

高血糖导致的视网膜毛细血管渗漏主要是由 VEGF 介导, VEGF 通过升高内皮细胞内 Ca^{2+} 和氧自由基的浓度增加谷氨酰胺转移酶 2 (transglutaminase 2, TGase2) 的活性, 促进应力纤维的形成和钙黏蛋白的降解。在实验动物玻璃体内注射 TGase2 抑制剂后, 血管渗漏情况明显减轻, 证明 TGase2 在 DR 过程中扮演着要角色^[14]。

2 影响 STZ 诱导糖尿病模型的因素

2.1 STZ 的制备 STZ 是一种可溶于水、醇和酮的亲水化合物, 在 pH 4.5 的酸性溶液中较稳定, 在 pH > 4.5 的环境下降解^[5]。最好将 STZ 溶于冰的 pH 4.5 柠檬酸钠缓冲液中, STZ 见光易分解, 应避免光保存^[15]。STZ 溶液最好在制备后 15~20 min 内注射到动物体内, 以防止其降解。STZ 溶液可在黑暗、4 °C 的条件下保存 40 d, 但以每天 0.1% 的速率降解^[16]。

2.2 实验动物的选择 STZ 的致糖尿病活性在不同品种、性别和年龄的动物中不同, 这可能与胰岛 β 细胞的损伤和修复等机制有关^[17]。用小鼠、大鼠、猴子、豚鼠、仓鼠、狗和猫均可成功诱导糖尿病模型, 其临床特征和病理改变均与人糖尿病类似^[18]。葡萄糖转运蛋白 2 (glucose transporter 2, GLUT2) 的表达是区别不同种类动物对 STZ 致糖尿病作用敏感性的关键因素, GLUT2 可特异性地将 STZ 吸收到胰岛 β 细胞加强 STZ 的致糖尿病作用, 大多数啮齿类动物有 GLUT2 表达, 而人体因不表达或很少表达 GLUT2 而有抗 STZ 致糖尿病的作用。考虑到动物体型的大小、操作的难易度、实验动物成本和诱导成功率, 通常选择小鼠诱导 DR

模型。某些种类的大鼠如 Wistar-Kyoto 大鼠对 STZ 的作用具有抗性,这可能是由于 Wistar-Kyoto 大鼠中有高脂蛋白脂肪酶库^[19]。8~10 周龄、处于青春期的小鼠对 STZ 的致糖尿病作用较敏感,而性未成熟的小鼠敏感性较低^[20]。雄性小鼠对 STZ 致糖尿病作用的敏感性比雌性小鼠高,这可能与两者的激素差异有关。雌激素在控制糖代谢过程中起着关键作用,STZ 诱导成功的糖尿病小鼠模型使用外源雌激素后血糖可降至正常水平^[5]。

2.3 剂量与注射途径 STZ 的剂量是其致高血糖作用的决定性因素,不同动物使用剂量不同。在较低剂量下 STZ 可能不会引起糖尿病,而在较高剂量时又可能导致动物死亡。不同动物个体应选择最佳 STZ 剂量诱导 DR。通常低于 60 mg/kg 剂量的 STZ 可引起高血糖的可逆升高,而高于 200 mg/kg 剂量则会导致小鼠死亡,研究表明小鼠最佳诱导剂量是 55 mg/kg^[5]。多次低剂量 STZ 注射后予以高脂饮食可引起胰岛素抵抗^[21]。STZ 的作用取决于其生物利用度,给药途径同样是诱导 DR 动物模型的关键因素。消化道中的酶和其强酸环境会使 STZ 降解,因此不可口服 STZ。饮食是决定动物体内血糖水平的因素之一,因此要建立稳定的糖尿病模型需要给予适当的高脂饮食。在注射 STZ 前小鼠需要禁食 4 h,在测量血糖浓度之前需要禁食 24 h^[22]。腹腔内注射和静脉注射两种方式均可成功诱导 STZ 剂量依赖的 DR 动物模型。进行腹腔注射 STZ 时有可能将其注射至腹膜腔内,会导致实验动物死亡,因此静脉注射是比腹腔注射更加稳定的方法^[23]。相比多次低剂量注射诱导产生的糖尿病模型,其病理变化过程与人的糖尿病病理变化更相似。在高脂饮食 4 周后腹腔注射较低剂量(45 mg/kg) STZ,其诱导成功率升高^[24]。

3 STZ 诱导小鼠 DR 的局限性

STZ 诱导小鼠 DR 模型的主要缺点是持续时间长,这增加了实验成本^[25]。STZ 有细胞毒性,可以破坏心脏、肾脏、中枢神经系统等重要脏器的功能,导致实验动物剂量依赖性死亡^[11]。STZ 剂量高于 200 mg/kg 会导致小鼠死亡^[5]。实验动物有 STZ 中毒现象时可以通过注射药物降低实验动物的死亡率,如他克林可以作为糖基清除剂在注射 STZ 后使用^[26]。通过改进实验方法,也可以降低实验动物

的死亡率,如选择实验动物时尽量选用雄性小鼠,小鼠周龄要达到性成熟期(尽量在 8~9 周龄),采用高脂饮食伴注射较低剂量 STZ 的方式,或尽量采用静脉注射等。

4 小结

STZ 诱导的小鼠 DR 模型的临床特征和病理变化与人的 DR 相似,所以该模型经常被用来研究 DR 的发病机制以及进行新型抗 DR 药物的临床前评估。通过研究实验方法和 STZ 局限性可以对原有的实验方法进行改进,找到解决其中问题的方法,提高诱导模型的成功率。

[参考文献]

- [1] WONG T Y, MWAMBURI M, KLEIN R, LARSEN M, FLYNN H, HERNANDEZ-MEDINA M, et al. Rates of progression in diabetic retinopathy during different time periods: a systematic review and meta-analysis[J]. *Diabetes Care*, 2009, 32: 2307-2313.
- [2] PODELL B K, ACKART D F, RICHARDSON M A, DILISIO J E, PULFORD B, BASARABA R J. A model of type 2 diabetes in the guinea pig using sequential diet-induced glucose intolerance and streptozotocin treatment[J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10: 151-162.
- [3] GHASEMI A, JEDDI S. Anti-obesity and anti-diabetic effects of nitrate and nitrite[J]. *Nitric Oxide*, 2017, 70: 9-24.
- [4] WILSON G L, LEITER E H. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990, 156: 27-54.
- [5] GOYAL S N, REDDY N M, PATIL K R, NAKHATE K T, OJHA S, PATIL C R, et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes—a clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics[J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 244: 49-63.
- [6] DEEDS M C, ANDERSON J M, ARMSTRONG A S, GASTINEAU D A, HIDDINGA H J, JAHANGIR A, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models[J]. *Lab Anim*, 2011, 45: 131-140.
- [7] RAZA H, PRABU S K, JOHN A, AVADHANI N G. Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12: 3133-3147.
- [8] FURMAN B L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats[J]. *Curr Protoc Pharmacol*, 2015, 70:

- 5.47.1-5.47.20.
- [9] 朱华,李彦红,徐艳峰,徐玉环,许庆刚,尹红霞,等. 小剂量多次注射链脲佐菌素建立糖尿病早期视网膜病变动物模型[J]. 中国实验动物学报,2016,24:487-493.
- [10] STITT A W. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. Exp Mol Pathol, 2003, 75: 95-108.
- [11] 陈雨,朱晓华. 糖尿病视网膜病变发病机制的研究进展[J]. 国际眼科杂志,2006,6:433-435.
- [12] REN Z, LI W, ZHAO Q, MA L, ZHU J. The impact of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on the expressions of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β_1 in the retinas of rats with diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 63: 474-480.
- [13] YU Z Y, LU B, GONG C Y, JI L L. Streptozotocin induced diabetic retinopathy in C57 mice and the expression of some pro-angiogenic molecules[J]. Int Eye Sci, 2016, 16: 1-6.
- [14] LEE Y J, JUNG S H, KIM S H, KIM M S, LEE S, HWANG J, et al. Essential role of transglutaminase 2 in vascular endothelial growth factor-induced vascular leakage in the retina of diabetic mice[J]. Diabetes, 2016, 65: 2414-2428.
- [15] National Toxicology Program. NTP 12th report on carcinogens[J]. Rep Carcinog, 2011, 12: iii-499.
- [16] DE LA GARZA-RODEA A S, KNAÄN-SHANZER S, DEN HARTIGH J D, VERHAEGEN A P, VAN BEKKUM D W. Anomer-equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus musculus*)[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49: 40-44.
- [17] RODRIGUES B, CAM M C, JIAN K, LIM F, SAMBANDAM N, SHEPHERD G. Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on cardiac lipoprotein lipase activity[J]. Diabetes, 1997, 46: 1346-1353.
- [18] KUMAR S, SINGH R, VASUDEVA N, SHARMA S. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents[J/OL]. Cardiovasc Diabetol, 2012, 11: 9. doi: 10.1186/1475-2840-11-9.
- [19] LENZEN S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes[J]. Diabetologia, 2008, 51: 216-226.
- [20] KROMANN H, CHRISTY M, LERNMARK A, NEDERGAARD M, NERUP J. The low dose streptozotocin murine model of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: studies *in vivo* and *in vitro* of the modulating effect of sex hormones[J]. Diabetologia, 1982, 22: 194-198.
- [21] ZHANG Y, WANG P, XU Y, MENG X, ZHANG Y. Metabolomic analysis of biochemical changes in the plasma of high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats after treatment with isoflavones extract of *radix puerariae*[J/OL]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 4701890. doi: 10.1155/2016/4701890.
- [22] DAMASCENO D C, NETTO A O, IESSI I L, GALLEGOS F Q, CORVINO S B, DALLAQUA B, et al. Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes[J/OL]. BioMed Res Int, 2014, 2014: 819065. doi: 10.1155/2014/819065.
- [23] HAYASHI K, KOJIMA R, ITO M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29: 1110-1119.
- [24] MA Q, GUO Y, SUN L, ZHUANG Y. Anti-diabetic effects of phenolic extract from rambutan peels (*Nephelium lappaceum*) in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice[J/OL]. Nutrients, 2017, 9: 801. doi: 10.3390/nu9080801.
- [25] REUTER T Y. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes[J]. Drug Discov Today, 2007, 4: 3-8
- [26] KANG H S, YANG H, AHN C, KANG H Y, HONG E J, JAUNG E B. Effects of xenoestrogens on streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Physiol. Pharmacol, 2014, 65: 273-282.

[本文编辑] 尹 茶