

单侧肾切除联合链脲佐菌素诱导糖尿病肾病 大鼠建模方法改进与评价

郭丛丛¹, 焦明文², 张亚芹², 孙洁¹, 范正媛¹, 廖琳^{2*}

(1. 山东中医药大学, 山东济南 250355; 2. 山东省千佛山医院, 山东济南 250014)

摘要:优化单侧肾切除联合链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病肾病(DKD)大鼠建模方法,研究该模型大鼠的肾脏病变特点,为药物药效学评价和临床基础研究提供稳定平台。选取健康雄性大鼠 12 只,随机分为单侧肾切组(UNIX 组)和糖尿病肾病组(DKD 组)。采用背侧横行切口配合皮内缝合的方法切除右肾,术后大鼠腹腔一次性注射 STZ 40 mg/kg 诱导糖尿病,UNIX 组大鼠给予相同剂量柠檬酸缓冲液。动态检测两组大鼠体重、血糖、24 h 尿蛋白变化,并于第 12 周末观察大鼠肾脏病变。采用该手术方式,大鼠术后成活率可达 100%。与 UNIX 组相比,DKD 组大鼠体重增长缓慢或负增长($P < 0.01$),24 h 尿蛋白明显增多($P < 0.01$),血糖维持在 28 mmol/L~32 mmol/L。肾脏病变符合早期 DKD 表现。背侧横行切口配合皮内缝合右肾摘除术,联合腹腔注射 STZ 诱导的 DKD 大鼠造模方法成模率高。该模型与人类糖尿病肾病早期临床症状、病理变化相似,适用于 DKD 的机制研究及药物研发。

关键词:糖尿病肾病;链脲佐菌素;单侧肾切除

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2019.02.027

中图分类号:S8526.5;S865.13

文献标识码:B

文章编号:1007-5038(2019)02-0135-05

近年来糖尿病的发病率在全球范围内逐年增加,据国际糖尿病联盟统计,2014 年全球共有糖尿病患者 4.22 亿,预计到 2040 年这一数据将达到 6.42 亿^[1]。糖尿病肾病(Diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病最常见的微血管并发症,现已成为终末期肾脏病的首要原因,其致死率远远高于糖尿病本身。因此,构建理想的 DKD 动物模型,对研究该疾病的发病机制及正确评价各种药物的疗效具有重要意义。目前,DKD 动物模型主要分为诱发性、自发性及转基因三类。自发性及转基因动物模型价格昂贵,来源有限,对饲养和繁殖条件要求较高,限制了试验研究。药物诱导性 DKD 动物模型是实验室目前常用的 DKD 造模方法。链脲佐菌素(streptozocin, STZ)对肝肾损害较小,可通过葡萄糖转运蛋白定向破坏胰岛 β 细胞,是近年来诱导糖尿病发生的首选药物^[2-4]。研究报道单侧肾切除联合注射 STZ 的方法与保留双肾单纯大剂量注射 STZ 的方法相比,前者成模率高,且可加速糖尿病导致的肾脏病变病程,缩短试验周期^[5]。然而,既往单侧肾切除术后腹腔感染死亡率较高。本研究进一步优化肾切除方法,总结了试验过程中的经验,动态观察该模型

的稳定性,以期为 DKD 机制研究及药物研发提供稳定可靠的载体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 12 只,体重 200 g \pm 20 g,由北京华阜康实验动物技术有限公司提供。

1.1.2 主要试剂 链脲佐菌素、考马斯亮蓝, Sigma 公司产品;糖原染色试剂盒、电镜固定液,武汉谷谷生物科技有限公司产品;100 mg/mL 水合氯醛、40 mg/mL 中性甲醛溶液,山东省千佛山医院实验动物中心提供。

1.1.3 主要仪器 代谢笼,苏州市君圣实验动物设备有限公司产品;三诺金准型血糖仪、血糖检测试纸,三诺生物传感股份有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 给予普通饲料、自由饮水,适应性喂养 1 周后,随机分为单侧肾切除组(UNIX 组)6 只和糖尿病肾病组(DKD 组)6 只。所有动物手术前禁食不禁水 12 h。100 mg/mL 水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔麻醉,常规脱毛消毒皮肤,在

收稿日期:2018-03-19

基金项目:国家自然科学基金项目(81570742,81770822);山东省中医药科技发展计划项目(2017-172);济南市科技发展计划项目(201602172)

作者简介:郭丛丛(1990-),女,山东淄博人,博士研究生,主要从事中西医结合内分泌与代谢性疾病研究。* 通讯作者

耳尖和尾巴的连线与右肋弓下缘交点处做横行切口,长约1 cm。然后逐层分离皮肤、黏膜、肌肉三层,暴露肾周脂肪,止血钳夹住肾周脂肪向上提拉可暴露右肾,推挤上下切口肌肉组织,直至右肾明显暴露。剥离肾脏脂肪及肾上腺,结扎右肾门血管,切除右肾。检查无出血后,逐层缝合各组织。其中,肌肉及黏膜层可用连续缝合法,皮肤则应用皮内缝合法(具体过程如图1)。待大鼠从麻醉状态恢复后放回笼子。术

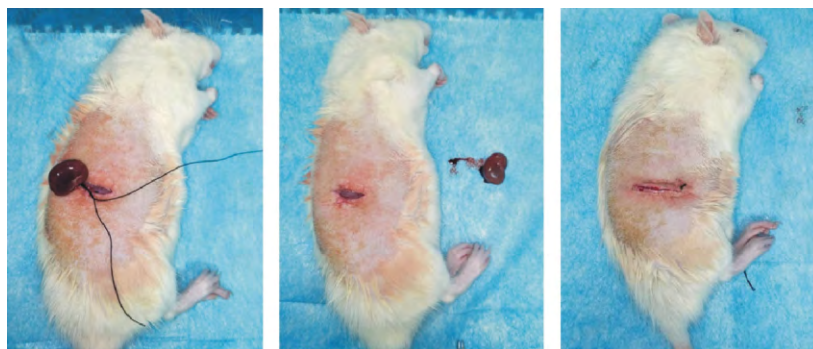


图1 大鼠右侧肾切除术操作图解

Fig. 1 Operation diagram of right nephrectomy in rats

1.2.2 血糖、尿蛋白检测 分别于术前,STZ注射后3 d,糖尿病成模后第2、4、6、8、12周7个时间点大鼠尾尖采血,用三诺血糖仪测定各时间点血糖值。次日,禁食不禁水,将大鼠转入代谢笼内,收集24 h尿液,测量尿量。充分混匀尿液后,取部分尿液以3 000 r/min离心10 min,吸取上清,用考马斯亮蓝法检测尿蛋白浓度。

1.2.3 糖原染色 在试验第12周末处死大鼠,取左肾,部分肾组织40 mg/mL中性甲醛溶液固定48 h,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切割制备3 μ m厚左右的组织薄片,进行糖原染色(periodic acid-Schiff, PAS),光镜下观察肾脏病理组织学变化。

1.2.4 电镜 12周末处死大鼠,迅速剖腹取出左肾,剥离肾包膜,剪取左肾上极少许肾组织,置于冰上,切成1 mm³小块,保证肾组织完全浸没在20 mg/mL戊二醛中。标本的双固定、脱水、浸透与包埋系列制备、半薄切片、切片、电子染色等后续步骤由山东微亚生物技术有限公司完成;然后通过透射电镜观察肾皮质足细胞病理形态学变化。

1.2.5 统计分析 试验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示,采用SPSS 21.0统计软件进行数据处理。两组间比较采用独立t检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 两组大鼠一般情况

本次研究两组大鼠单侧肾切除术后均无死亡,

后1周,所有大鼠禁食不禁水12 h,DKD组大鼠按40 mg/kg腹腔注射10 mg/mL(即10 mg/1 mL)STZ。STZ溶于柠檬酸盐溶液(双蒸水分别溶解柠檬酸及柠檬酸三钠,浓度为0.1 mol/L,二者按照1:1比例混合)。UNX组大鼠腹腔注射相同体积但不含STZ的柠檬酸盐溶液。注射72 h后,尾尖采血测随机血糖,两次结果都高于16.7 mmol/L则糖尿病造模成功^[5]。糖尿病成模后大鼠继续普通饲料,自由饮水喂养。

且DKD组大鼠注射STZ后全部诱导成糖尿病。整个试验过程中,UNX组大鼠一般状况良好,毛发顺滑有光泽,反应灵敏。DKD组大鼠成模后毛发杂乱、枯黄,精神萎靡、嗜睡,反应迟钝。UNX组大鼠饮水量同手术前,24 h尿量维持在10 mL左右,体重逐步增加。与UNX组大鼠相比,DKD组大鼠饮水量明显增加;24 h尿量UNX可达200 mL;体重增加减缓,部分大鼠体重甚至减轻($P < 0.01$,图2)。糖尿病成模前,两组大鼠的随机血糖水平基本一致。整个试验过程中,UNX组大鼠随机血糖在5 mmol/L~8 mmol/L之间,DKD组大鼠的随机血糖则明显升高($P < 0.01$,图3),维持在28 mmol/L~32 mmol/L之间。试验过程中DKD组大鼠无自发血糖恢复。

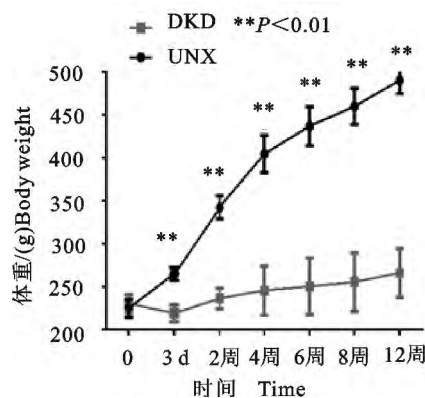


图2 两组大鼠体重变化

Fig. 2 The changes of body weights in two groups of rats

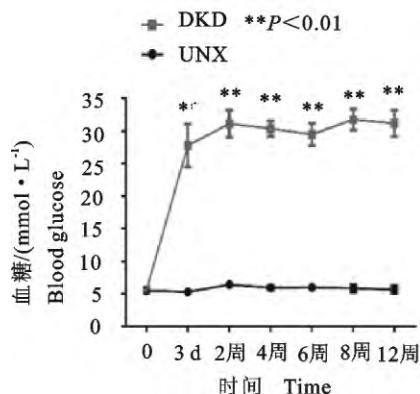


图3 两组大鼠随机血糖变化

Fig. 3 The changes of blood glucose in two groups of rats

2.2 两组大鼠尿蛋白变化

与 UNX 组相比,DKD 组大鼠在糖尿病成模后第 6 周 24 h 尿蛋白开始增加 ($P < 0.05$),第 8 和第 12 周时尿蛋白明显增加 ($P < 0.01$,图 4)。

2.3 糖原染色

UNX 组大鼠肾小球结构清晰,未见系膜基质

增生及基底膜增厚;肾小管结构正常,排列整齐,间质无炎症和纤维化。DKD 组大鼠镜下可见肾小球肥大,系膜细胞轻度增生;肾小管排列紊乱,肾小管基底膜增厚,部分管腔内可见蛋白样物质或蛋白管型,肾小管上皮细胞脱落,微绒毛变稀疏、甚至脱落等 DKD 早期肾脏损伤病理变化(图 5)。

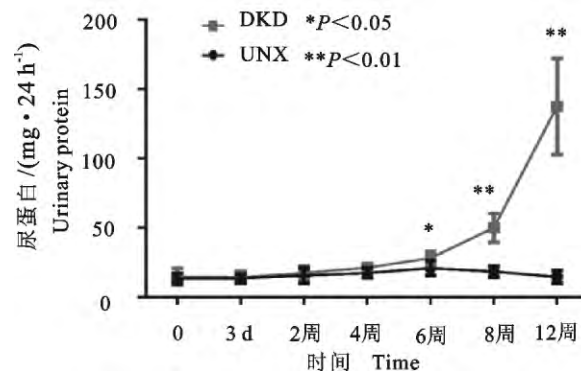
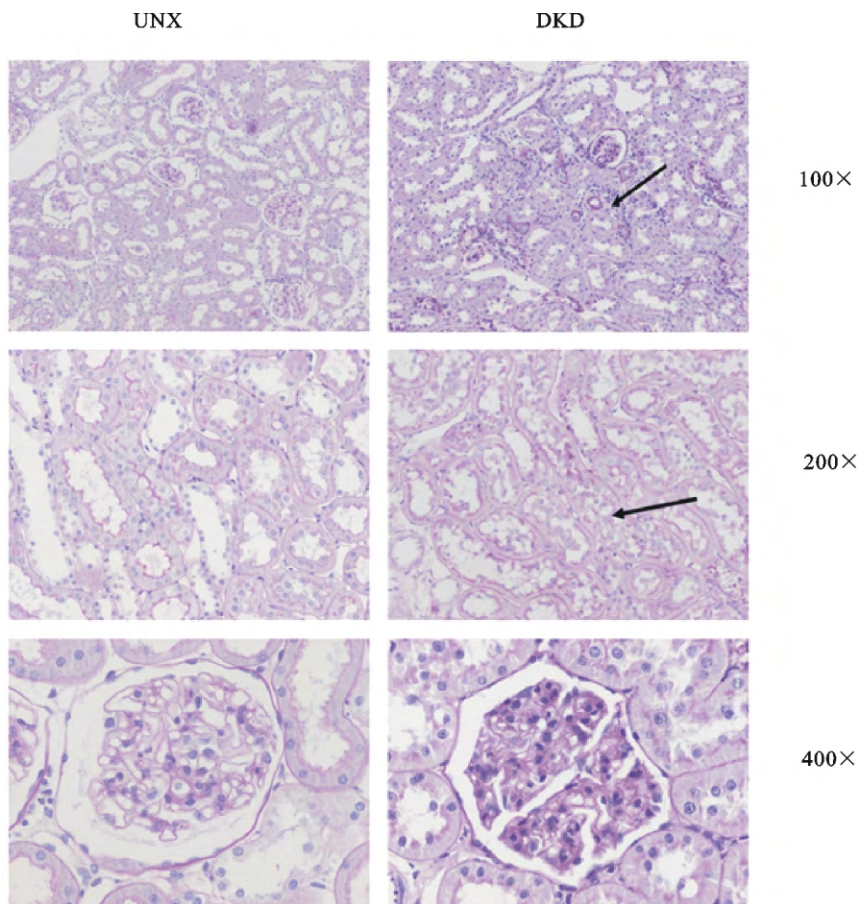


图4 两组大鼠尿蛋白变化

Fig. 4 The changes of urinary proteins in two groups of rats



箭头:肾小管基底膜增厚,部分管腔内可见蛋白样物质或蛋白管型,肾小管上皮细胞脱落

Arrowhead;the basilar membrane of the renal tubule was thickened, the protein like materials or the protein tube types were seen in some lumens,and the epithelial cells of the renal tubule fell off

图5 两组大鼠肾糖原染色

Fig. 5 Periodic acid-schiff staining(PAS) in two groups of rats

2.4 电镜

电镜结果进一步清晰观察到 UNX 组大鼠足突

排列整齐,DKD 组大鼠的足突增宽,部分足突融合,甚至脱落(图 6)。

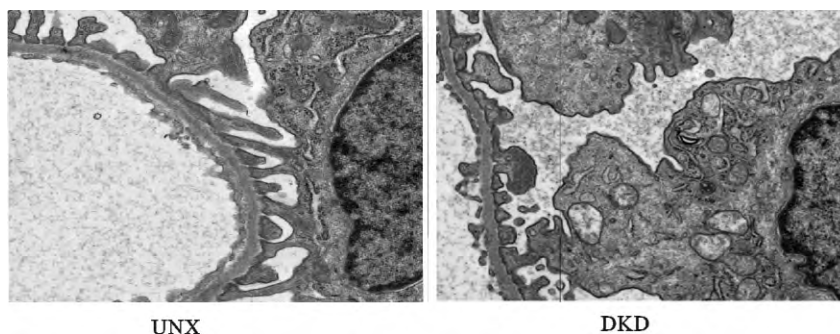


图 6 两组大鼠电镜下足突变化(15 000×)

Fig. 6 The changes of foot process in two groups of rats observed by electron microscope(15 000×)

3 讨论

糖尿病肾病是一种慢性肾脏病,以系膜扩张,足突丢失,基底膜增厚,肾小球及肾小管实质细胞损伤导致的肾小球硬化和肾间质纤维化为主要病理特点^[6-7]。随着糖尿病的发病率逐年增加,DKD 发病率也迅速增长,合适的 DKD 动物模型对深入研究疾病的发病机制,寻找有效的治疗途径具有重要意义。本研究参阅了大量文献,选择了实用经济、可行性高的单侧肾切除联合 STZ 诱导模型。经过反复实践以及对既往经验的总结,本研究方案保证了手术的成功率和成模率,并且糖尿病成模后血糖稳定。

本研究总结出以下经验。第一,既往研究多采用腹部切口,此手术方式需要经过腹膜,拨动肠胃,常常导致大鼠腹腔感染引起的肠坏死、肠梗阻和肠胀气。本研究在大鼠耳朵尾巴连线与右肋弓的交界点做横行切口可正对右肾,位置准确。切口 1 cm 即可,过大可造成缝合费时费力,延长大鼠愈合周期。同时,横向切口可减少背部张力,防止刀口撕裂。第二,逐层分离大鼠皮肤、黏膜、肌肉,可减少出血,方便缝合。第三,暴露肾组织后,肾动静脉分离应分别结扎,这样可减少因打结不牢导致的出血死亡。第四,大鼠的皮肤坚韧,分别缝合肌肉、黏膜、皮肤三层,这样弯针易于穿透各组织层,减轻缝合压力。本研究大鼠皮肤采用皮内缝合的方法,将缝合线隐藏于皮内,可大大降低大鼠撕咬缝合线的风险,减少术后皮肤撕裂。第五,缝合时注意不要将毛发卷进刀口,因为毛发可影响刀口的愈合,增加感染机率。第六,因鲜血可刺激大鼠撕咬伤口,缝合完成后应先用生理盐水擦拭皮肤血迹,然后用碘伏消毒伤口,并用红霉素染膏或青霉素粉涂抹于刀口周围。第七,术后大鼠要与未手术的大鼠分笼喂养,每笼 2 只~3 只,以减少大鼠间相互撕咬。本方案经过多次验证

单侧肾切除的成功率可达 100%。

DKD 大鼠造模品系以 Wistar 和 SD 为主,6 周龄~8 周龄,大鼠的体重在 200 g~250 g 之间。体重过小可增加死亡率^[8];体重过大,则成模率下降,并且增加 STZ 用量,提高造模成本。有研究认为保留双肾联合一次性注射 STZ 的方法诱导的 DKD 大鼠模型,STZ 的用量在 60 mg/kg 为最佳^[9],但这种大剂量诱导的方法大鼠死亡率可达 30%。本研究 STZ 的用量为 40 mg/kg,这个剂量明显减少了动物的死亡率,根据既往反复实践的结果计算,该剂量成模率可达 88.8% 以上。张丽芬等^[10]通过尾静脉注射 STZ 35 mg/kg 造模成功率可达 88.6%。该方法能确保药物剂量的准确无误及吸收充分,降低 STZ 的用量。但 STZ 很不稳定,需要现用现配,最好半小时内使用完毕,给药过程应快速。尾静脉注射相较于腹腔注射有一定的难度,在注射技术尚未成熟之前难以保证 STZ 在规定时间内用完。注射前大鼠应禁食 12 h,STZ 应多配一定的药量,预防注射过程中的药物耗损。大鼠在代谢笼中留尿需禁食 24 h,否责食物残渣及粪便过多会影响尿液的检测结果。本研究在留尿当天未进行血糖检测,以减少对大鼠的应激。整个留尿过程必须保证大鼠的饮水量,因糖尿病大鼠缺水容易诱发酮症,增加死亡率。本研究在试验中发现反复禁食也会增加大鼠诱发酮体的机率,造成死亡率增加,因此未检测空腹血糖,而是检测随机血糖。该模型大鼠多饮、多尿、多排粪的症状明显,应及时处理粪便,保持环境卫生,减少大鼠发生烂尾、尿路感染等疾病。

本研究发现糖尿病造模后第 6 周时大鼠尿蛋白开始增加,并逐渐加重。成模后 12 周 DKD 组大鼠的肾脏病理变化结果提示符合人类糖尿病肾病早期病理变化特点。有研究长时间观察该模型,发现糖

糖尿病成模后第 5 到 8 个月能形成明显的肾小球硬化、肾小管间质纤维化等类似于人类 DKD 中晚期的肾脏病理变化^[11]。总之,单侧肾切除联合 STZ 诱导的糖尿病肾病动物模型具有操作较简单、成本低、耗时短的特点,适用于药物研发和临床基础研究。本研究方案能大大降低大鼠的死亡率,构建出稳定的 DKD 大鼠模型。

参考文献:

- [1] Sagoo M K, Gnudi L. Diabetic nephropathy: Is there a role for oxidative stress? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 116: 50-63.
- [2] Lv Z, Hu M, Fan M, et al. Podocyte-specific Rac1 deficiency ameliorates podocyte damage and proteinuria in STZ-induced diabetic nephropathy in mice [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 342.
- [3] Chandramouli C, Reichelt M E, Curl C L, et al. Diastolic dysfunction is more apparent in STZ-induced diabetic female mice, despite less pronounced hyperglycemia [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2346.
- [4] 郭学军, 邹移海, 吴 凌, 等. 链脲佐菌素诱导 SD 和 Wistar 大鼠糖尿病模型的影响因素 [J]. *中国实验动物学报*, 2008(4): 301-304.
- [5] Komers R, Oyama T T, Beard D R, et al. Rho kinase inhibition protects kidneys from diabetic nephropathy without reducing blood pressure [J]. *Kidney Int*, 2011, 79(4): 432-442.
- [6] Zhao T T, Zhang H J, Lu X G, et al. Chaihuang-Yishen granule inhibits diabetic kidney disease in rats through blocking TGF-beta/Smad3 signaling [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90807.
- [7] Keating S T, van Diepen J A, Riksen N P, et al. Epigenetics in diabetic nephropathy, immunity and metabolism [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(1): 6-20.
- [8] 邢淑丽, 郑君芙, 黄文政. 单侧肾切除 STZ 诱导糖尿病肾病大鼠动物模型研究 [J]. *中国中医急症*, 2006(6): 643-644.
- [9] 李 伟, 张 红, 殷松楼, 等. 不同剂量链脲佐菌素诱导 SD 大鼠糖尿病肾病模型的研究 [J]. *徐州医学院学报*, 2006(1): 52-55.
- [10] 张丽芬, 吕仁和, 黄文政. 链脲佐菌素糖尿病肾病大鼠模型的建立及稳定性评价 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014(4): 8-12.
- [11] Huang L, Haylor J L, Hau Z, et al. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2009, 76(4): 383-394.

Improvement and Evaluation of Diabetic Kidney Disease Animal Model in Uninephrectomized Streptozotocin-induced Diabetic Rats

GUO Cong-cong¹, JIAO Ming-wen², ZHANG Ya-qin², SUN Jie¹, FAN Zheng-yuan¹, LIAO Lin²

(1. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong, 250355, China*;

2. *Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Jinan, Shandong, 250014, China*)

Abstract: To provide stable platform for the study of pharmacodynamic evaluation and clinical basic research, we optimized the method of diabetic kidney disease animal model in uninephrectomized streptozotocin-induced diabetic rats and studied the characteristics of renal lesions in the model. A total of 12 male Wistar rats were randomly divided into UNX group and DKD group. The right nephrectomy was made by dorsal lateral cut and intradermal suture. DKD model was made by administration of streptozotocin (STZ) in a single dose of 40 mg/kg intraperitoneally after operation. The rats in UNX group were given the same dose of citric acid buffer. The body weight, blood glucose and 24 h urine protein were tested. And the pathology of the kidney was observed at the end of 12 weeks. The survival rate of the rats was 100% after operation. The body weight of rats in the DKD group decreased significantly compared with that in the UNX group ($P < 0.01$). And the 24-h urine protein was significantly increased compared with that in the UNX group ($P < 0.01$). The random blood sugar was maintained between 28 mmol/L-32 mmol/L. The animal model established by dorsal lateral nephrectomy and STZ injection provided an effective method, which is in accordance with human early DKD manifestation. It is suitable for studies on drug pharmacodynamic evaluation and basic clinical studies.

Key words: diabetic kidney disease; streptozotocin; uninephrectomy