

恒河猴糖尿病模型肾脏相关血液、 尿液指标的动态观察与分析

朱 华, 刘 颖, 邓 巍, 徐艳峰, 秦 川

(卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,
中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 动态观察小剂量多次注射链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病恒河猴动物模型早期肾脏指标的变化。**方法** 健康恒河猴 5 只, 小剂量(30 mg/kg)多次静脉注射链脲佐菌素(STZ), 血糖稳定大于 7.0 mmol/L 后每个月采集肾脏相关血清生化指标和尿常规。连续观察 13 个月。**结果** 5 只动物的平均血糖在 10w 左右达到稳定, 造模 3 个月后血糖值达到 8.31 ± 2.31 mmol/L, 此后持续平稳上升。总蛋白、球蛋白、甘油三酯持续上升, 分别在给药 10 个月、9 个月出现显著性差异($P < 0.05$)。白球蛋白比值下降, 在给药 11 个月开始出现显著性差异($P < 0.05$)。糖化血清蛋白(GSP)6 个月出现显著性差异($P < 0.05$), 9 个月出现极显著性差异($P < 0.01$)。血糖与 TP、GLOB、UREA、CR、 Mg^{2+} 、GSP 呈高度正相关关系, 与 A/G 呈高度负相关关系。**结论** 发现了与人类早期糖尿病肾病相似的血清学、尿液变化, 可作为相关疾病发病机制、药效学等研究的可靠模型。

【关键词】 糖尿病肾病; 模型; 动物; 恒河猴; 链脲佐菌素

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)06-0021-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2012.06.006

Dynamic Analysis of Biochemistry and Urinalysis of Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus in Rhesus Monkeys

ZHU Hua, LIU Ying, DENG Wei, XU Yan-feng, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science (CAMS) & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC))

【Abstract】 Objective To make a reproducible diabetes mellitus model in macaques intravenous injection with low dose streptozotocin(STZ). **Methods** we used STZ (30 mg/kg of body weight, intravenously, 3 days) to five macaques. The dynamic changes of the kidney related biochemistry index and routine urinalysis were measured for 13 months after the glucose is stable. **Results** Animal's average glucose is table at 10 week (8.31 ± 2.31 mmol/L). Compared with the contents before injection, TP, GLOB, TG increased significantly at 10 and 9 months ($P < 0.05$) while A/G reduced in plasma in macaques 11 months after streptozotocin injection($P < 0.01$). GSP have significant difference at 6 months ($P < 0.05$) and great significant difference at 9 months ($P < 0.01$). Significantly positive correlations were observed between Glu and TP, GLOB, UREA, CR, Mg^{2+} , GSP. Significantly negative correlations were observed between Glu and A/G. **Concusion** The present Diabetes Mellitus model in nonhuman primate mimics human early stage of DN and may be

[基金项目] 863 课题(2009ZX09503-025)。

[作者简介] 朱华, 副主任技师, 研究方向: 病理与病理生理学。Email: zhuh@cnilas.org。

[通讯作者] 秦川, 教授, 博士生导师。研究方向: 病理与病理生理学 Email: chuanqin@vip.sina.com。

useful in assessing safety and efficacy of protective agents.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Model, animal; Rhesus monkey; Streptozotocin

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)为糖尿病主要的微血管并发症,是糖尿病最严重的并发症之一^[1],主要指糖尿病性肾小球硬化症,是一种以血管损害为主的肾小球病变^[2]。早期多无症状,随着糖尿病的发展出现早期肾体积增大、肾小球滤过率增加、呈高滤过状态。以后逐渐出现间隙蛋白尿或微量白蛋白尿,随着病程的延长出现持续蛋白尿、水肿、高血压、肾小球滤过率降低,进而肾功能不全、尿毒症,是糖尿病主要的死亡原因之一。建立与糖尿病肾病发生发展类似的动物模型以深入研究非常重要。非人灵长类在解剖、生理等方面与人类类似。本实验通过小剂量多次注射链脲佐菌素(STZ)诱导恒河猴糖尿病动物模型并动态观察其肾脏相关指标,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物与模型制作方法

成年雄性恒河猴 5 只,购自军事医学科学院实验动物中心,年龄 4~6 岁,体重 5.5~6.5 kg。动物合格证号 SCXK-(军)2007-005。实验动物使用许可证号 SYXK(京)2010-0030。动物连续 3 d 静脉注射 STZ。末次注射后 72 h 检测末梢血糖,动物的血糖出现降低则再次注射 STZ^[3,4]。此后每隔 1 周监测一次空腹末梢血糖,直到平均值平稳。

1.2 检测指标及频率

1.2.1 血清学指标:总蛋白(TP,双缩脲法)、白蛋白(ALB,计算值)、球蛋白(GLOB,计算值)、白蛋白/球蛋白(A/G)、尿素(UREA,速率法)、肌酐(CR,酶法)、尿酸(UA,酶法)、甘油三酯(TG,氧化酶法)、胆固醇(TC,氧化酶法)、高密度脂蛋白(HDL-C,一步法)、低密度脂蛋白(LDL-C,一步法)、K⁺(电极法)、Na⁺(电极法)、Cl²⁻(电极法)、Ca²⁺(电极法)、P(磷钼酸紫外法)、Mg²⁺(化学测定法)、糖化血清蛋白(GSP,终点法)。使用仪器:日立全自动生化分析仪 7080 型,SIEMENS 2000 全自动化学发光分析仪,ST-360 酶标仪。

1.2.2 尿液指标:试纸法检测 pH 值、尿糖(Glu)、尿酮体(KET)、尿蛋白(PRO)。

1.2.3 检查频率及数据统计:空腹末梢血糖稳定后每月采集一次空腹静脉血进行上述检查,数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示,数据应用 SPSS13.0 软件包进行统计处

理数据,各指标的相关性用线性回归分析。

2 结果

2.1 血清生化指标

5 只动物的空腹末梢血平均血糖在 10 周左右达到稳定,造模 3 个月后空腹静脉血糖值达到 8.31 ± 2.31 mmol/L,此后持续平稳上升。血清总蛋白、球蛋白的含量在造模 10 个月显著增高($P < 0.05$)。白蛋白/球蛋白比值 11 个月显著下降($P < 0.05$)。Mg²⁺ 含量在 8 个月开始显著增高($P < 0.05$)。糖化血清蛋白值持续升高,6 个月出现显著性差异($P < 0.05$),9 个月出现极显著性差异($P < 0.01$)。尿素浓度呈现上升趋势,但观察到 12 个月时未见显著性差异。其余指标未观察到明显改变(表 1)。

2.2 各指标与血糖的相关性分析

经计算,血糖与 TP、GLOB、UREA、CR、Mg²⁺、GSP 的相关系数 r 值均大于 0.8,呈高度正相关关系。与 A/G 的相关系数为 -0.94707,呈高度的负相关关系(表 2)。(相关系数 r 表示的意义: $r = 0.00$,无相关; $r = 0.00 \sim \pm 0.3$,微正负相关; $r = \pm 0.30 \sim \pm 0.50$,实正负相关; $r = \pm 0.50 \sim \pm 0.80$,显著正负相关; $r = \pm 0.80 \sim \pm 1.00$,高度正负相关。)

2.3 尿液指标

造模 3 个月开始尿糖出现阳性,6 个月蛋白开始出现阳性。造模 12 个月有 1 只动物的酮体明确出现阳性。尿蛋白定量呈持续上升趋势,6 个月开始出现显著性差异($P < 0.01$)(表 3)。

3 讨论

人类糖尿病肾病的特征是:由小分子蛋白尿进展为大分子蛋白尿、肾功能下。降糖尿病患者一旦发生肾脏损害,出现持续性蛋白尿则病情常不可逆转,往往发展至终末期肾衰竭。因此,寻求早期诊断和有效的治疗是临床和基础研究共同关注的问题。新技术、新药物应用于临床,合适的动物模型必不可少。目前常用的糖尿病肾病动物模型有两种:自发型和诱发型^[5-8]。自发型动物模型因有某种异常的基因,可自发产生糖尿病。其肾脏病变特点与人类糖尿病肾病近似。但肾损害发生缓慢,建模周期长。诱发性糖尿病肾病动物模型是通过损

表 1 造模前后血清生化指标的变化
Tab.1 Change of serum index of the macaques(n = 5)

检测指标 Index	Glu (mmol/L)	TP (g/L)	GLOB (g/L)	A/G	UREA (mmol/L)	CR (μmol/L)	Mg ²⁺ (mmol/L)	GSP (mg/dL)
造模前 B. I	3. 62 ± 1. 97	67. 68 ± 2. 11	20. 78 ± 0. 96	2. 26 ± 0. 10	5. 10 ± 1. 38	49. 40 ± 14. 01	0. 69 ± 0. 04	146. 4 ± 19. 7
造模 3 个月 3msA. I	8. 31 ± 2. 31 **	69. 11 ± 21. 96	23. 50 ± 8. 73	1. 95 ± 0. 60	5. 65 ± 1. 87	51. 4 ± 5. 95	0. 72 ± 0. 23	168. 7 ± 19. 7
造模 6 个月 6msA. I	9. 87 ± 1. 49 **	70. 86 ± 2. 44	24. 76 ± 2. 42	1. 88 ± 0. 21	5. 82 ± 1. 18	50. 00 ± 7. 58	0. 79 ± 0. 13	186. 00 ± 27. 54 *
造模 7 个月 7msA. I	10. 34 ± 2. 02 **	73. 18 ± 2. 13	25. 72 ± 1. 64	1. 85 ± 0. 11	5. 89 ± 1. 16	53. 80 ± 6. 64	0. 85 ± 0. 09	179. 59 ± 24. 13 *
造模 8 个月 8msA. I	10. 97 ± 1. 31 **	72. 32 ± 0. 79	25. 3 ± 1. 66	1. 86 ± 0. 21	6. 05 ± 1. 94	52. 8 ± 5. 23	0. 98 ± 0. 55 *	197. 33 ± 19. 88 *
造模 9 个月 9msA. I	11. 25 ± 1. 21 **	75. 26 ± 2. 61	28. 32 ± 1. 90	1. 66 ± 0. 11	6. 35 ± 1. 22	58. 6 ± 26. 70	1. 06 ± 0. 15 *	210. 20 ± 31. 25 *
造模 10 个月 10msA. I	11. 36 ± 1. 02 **	84. 24 ± 4. 90 *	31. 28 ± 3. 34 *	1. 68 ± 0. 18	6. 83 ± 1. 70	55. 4 ± 20. 70	0. 95 ± 0. 03 *	245. 4 ± 25. 30 **
造模 11 个月 11msA. I	12. 71 ± 1. 55 **	83. 16 ± 3. 36 *	33. 42 ± 3. 95 *	1. 41 ± 0. 19 *	6. 85 ± 0. 75	61. 00 ± 17. 65	1. 02 ± 0. 05 *	229. 80 ± 23. 88 **
造模 12 个月 12msA. I	13. 40 ± 1. 23 **	86. 5 ± 1. 10 *	30. 82 ± 0. 86 *	1. 48 ± 0. 07 *	6. 98 ± 1. 63	60. 4 ± 21. 5	1. 07 ± 0. 02 *	273. 2 ± 21. 37 **
造模 13 个月 13msA. I	14. 01 ± 2. 31 **	84. 9 ± 1. 29 *	32. 99 ± 0. 87 *	1. 42 ± 0. 11 *	6. 91 ± 1. 23	62. 6 ± 13. 48	1. 04 ± 0. 08 *	321. 6 ± 33. 42 **

注: * P < 0. 05, ** P < 0. 01; BI, 注射前; AI, 注射后
Note: BI, before injection; AI, after iniectioin

表 2 各指标与血糖的相关性分析
Tab.2 Correlation analysis between Glu and other index

项目 Variable	TP	GLOB	A/G	UREA	CR	Mg ²⁺	GSP
r 值 r-value	0. 816599	0. 880327	- 0. 94707	0. 917548	0. 829292	0. 872011	0. 838191

表 3 造模前后肾脏相关尿常规指标
Tab.3 Change of routine urine index

检测指标 Index	GLU	KET	PRO(定性)	PRO(mg/L)
造模前 B. I	-	-	-	2. 12 ± 0. 3
造模 3 个月 3msA. I	“ + ” 2 只, “ - ” 3 只	-	-	12. 5 ± 8. 31
造模 6 个月 6msA. I	“ + + ” 2 只, “ + ” 3 只	-	“ + ” 1 只, “ - ” 4 只	47. 5 ± 7. 58 **
造模 7 个月 7msA. I	“ + + ” 3 只, “ + ” 2 只	“ ± ” 1 只, “ - ” 4 只	“ + ” 2 只, “ - ” 3 只	121. 82 ± 10. 31 **
造模 8 个月 8msA. I	“ + + ” 3 只, “ + ” 2 只	“ ± ” 1 只, “ - ” 4 只	“ + ” 3 只, “ - ” 2 只	175. 10 ± 19. 88 **
造模 9 个月 9msA. I	“ + + + ” 1 只, “ + + ” 2 只, “ + ” 2 只	“ ± ” 2 只, “ - ” 3 只	“ + ” 4 只, “ - ” 1 只	201. 77 ± 35. 426 **
造模 10 个月 10msA. I	“ + + + ” 2 只, “ + + ” 3 只	“ ± ” 3 只, “ - ” 2 只	“ + ” 3 只, “ + + ” 1 只, “ - ” 1 只	254. 33 ± 31. 32 **
造模 11 个月 11msA. I	“ + + + ” 2 只, “ + + + ” 3 只, “ + + + + ” 1 只	“ ± ” 4 只, “ - ” 1 只	“ + ” 3 只, “ + + ” 1 只, “ - ” 1 只	301. 71 ± 29. 69 **
造模 12 个月 12msA. I	“ + + + + ” 4 只, “ + + + + ” 1 只	“ + ” 1 只, “ ± ” 3 只, “ - ” 1 只	“ + ” 3 只, “ + + ” 1 只, “ - ” 1 只	396. 77 ± 33. 56 **
造模 13 个月 13msA. I	“ + + + + ” 4 只, “ + + + + ” 1 只	“ + ” 1 只, “ ± ” 3 只, “ - ” 1 只	“ + ” 3 只, “ + + ” 1 只, “ - ” 1 只	432. 77 ± 46. 58 **

伤动物的胰岛细胞,导致胰岛素缺乏从而引起实验性糖尿病或高血糖,进而引发糖尿病肾病。这种模型发病快速,造模稳定,发病时间和病情严重程度较一致。但此类模型多用大、小鼠等啮齿类动物,其发病机制及病理生理改变与人类糖尿病肾病差别较大^[5,6,7,8]。而对非人灵长类糖尿病肾病的研究存在不足^[5]。本实验通过静脉小剂量多次注射 STZ 使恒河猴的血糖长期维持在较高水平并持续观察肾脏相关血液、尿液指标,发现动物血糖保持高水

平 6 个月左右开始出现早期肾脏病变表现:总蛋白、白蛋白增高,说明肾小球毛细血管通透性已出现改变。肌酐、尿素氮经肾小球滤过后不被肾小管重吸收,通过肾小管完全排泄。所以在肾脏疾病初期的值通常不升高。在糖尿病人早期肾脏改变一般要 10 年左右才会发展成 DN。我们的模型验证了这一点:由于病变尚在早期,动物的肾脏还未出现器质性改变,所以血中肌酐、尿素氮水平未出现显著性

改变。但在相关性分析中,肌酐、尿素氮与血糖呈高度正相关关系,预示着随着血糖的升高,肌酐、尿素氮将出现改变。

血液中 Mg^{2+} 是机体内重要的阳离子,具有多种生化活性,对维持细胞正常代谢和生理功能方面起着重要的作用。我们研究发现糖尿病恒河猴 Mg^{2+} 血清浓度增高,并与空腹血糖含量呈正相关。正常情况下体内镁平衡主要靠肾调节,肾脏有很大的排 Mg^{2+} 能力。糖尿病时引起一系列代谢紊乱,肾小球滤过功能降低和肾小管对 Mg^{2+} 的重吸收作用,从而使尿镁排出减少。

在糖尿病人,只有当血糖达到一定的高度才能从尿中漏出糖,肾脏能够从尿中排出葡萄糖的最低浓度称为"肾糖阈"。正常人的肾糖阈为 $8.9 \sim 10.0$ mmol/L,即血糖 $\geq 8.9 \sim 10.0$ mmol/L 时,尿糖就会出现阳性。我们实验中的动物在平均血糖值为 8.31 ± 2.31 mmol/L 时就出现了尿糖,因此我们认为恒河猴的肾糖阈要低于人。这与文献报道的灵长类动物血糖正常值比人低 $1 \sim 1.7$ mmol/L 也是相符的。

本实验通过长期观察小剂量多次注射 STZ 诱导的恒河猴肾脏相关指标,发现了与人类早期糖尿病肾病相似血清学、尿液变化,可作为相关疾病发病机理、药效学等研究的可靠模型。因动物还在继续观察,故没有对胰脏、肾脏等进行组织病理学观察。胰腺细胞、肾脏的损伤程度及与血糖间的关系

等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the diabetes control and complications trial. 1996, Diabetes 45:1289 - 1298.
- [2] Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Role of advanced glycosylation products in complications of diabetes[J]. Diabetes Care 1988, 11, (Suppl. 1):73 - 79.
- [3] Wagner JD, Carlson CS, O'Brien TD, et al. Diabetes mellitus and islet amyloidosis in cynomolgus monkeys[J]. Lab. Anim. Sci, 1996, 46:36 - 41.
- [4] Howard CF. Nonhuman primates as models for the study of human diabetes mellitus[J]. Diabetes, 1982, 31 (Suppl. 1):37 - 42.
- [5] Howard CF, Yasuda M. Diabetes mellitus in nonhuman primates: recent research advances and current husbandry practices [J]. Med. Primates, 1990, 19:609 - 625.
- [6] Bach JF. Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other auto-immune diseases [J]. Arthritis Res, 2002, Suppl 3 : S1 - S15.
- [7] Shimada A, Charlton B, Taylor Edwards C, et al. Beta-cell destruction may be a late consequence of the autoimmune process in non-obese diabetes mice[J]. Diabetes, 1996, 45 (8) : 1063 - 1067.
- [8] Baeder WL, Sredy J, Sehgal SN, et al. Rapamycin prevents the on-set of insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice [J]. Clin Ex Immunol, 1992, 89 :1774 - 1781.

[修回日期] 2012-04-25