

## 链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病肾病模型的建立及肾脏病理结构改变

李徽徽, 柴继侠, 周艳梅

**[摘要]** **目的:** 探讨糖尿病大鼠肾脏结构的变化, 建立糖尿病肾病大鼠模型。 **方法:** 雄性清洁 SD 大鼠 48 只, 随机分为实验组 (DM 组,  $n = 24$ ) 和对照组 (NC 组,  $n = 24$ )。DM 组大鼠一次足量腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 制备糖尿病动物模型, NC 组给予等量的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。分别于注射后 1、4、8 和 12 周, 检测体重、血糖、24 h 尿量、24 h 尿蛋白、肾重指数 (肾脏重量/体重) 和肾脏病理结构的变化。 **结果:** 与 NC 组相比, DM 组大鼠血糖明显升高, 肾重指数增加 ( $P < 0.01$ ); 随着病程的延长, 24 h 尿量、24 h 尿蛋白量均持续升高 ( $P < 0.01$ )。病理切片显示, DM 组大鼠肾脏重量增加、肾小体肿胀、肾小囊腔缩小、血管球内皮细胞排列紊乱和肾小体基膜增厚等。 **结论:** STZ 可诱导糖尿病大鼠肾脏结构和功能受损, 成功制备糖尿病肾病大鼠模型。

**[关键词]** 糖尿病; 糖尿病肾病; 链脲佐菌素; 大鼠

**[中国图书资料分类法分类号]** R 587.1 **[文献标识码]** A

### Pathological structural changes of the kidney in streptozotocin-induced rat model of diabetic nephropathy

LI Hui-hui, CHAI Ji-xia, ZHOU Yan-mei

(Department of Histology and Embryology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore pathological structural changes in the kidney of diabetic rats and establish the rat model of diabetic nephropathy. **Methods:** Forty eight male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group and experimental group (24 for each). Twenty-four rats in the experiment group were intraperitoneally injected with streptozotocin to set up animal modal of diabetes. At 1, 4, 8 and 12 weeks, the were recoved weight, blood glucose, 24-hour urine volume, 24-hour urinary protein, kidney hypertrophy index and pathological changes of kidney. **Results:** The diabetic group was detected. The higher level ( $P < 0.01$ ) of blood glucose, more 24 hour urine and 24 hour urinary protein than the control group ( $P < 0.01$ ). The changes of kidney structure was obvious in light microscope. **Conclusions:** Kidney damage of diabetic rats had been induced by streptozotocin injection, and the rat model of diabetic was successively established.

**[Key words]** diabetes; diabetic nephropathy; streptozotocin; rat

糖尿病 (diabete smellitius, DM) 是一种以高血糖为特征的代谢性疾病, 随着人们生活水平的提高和生活方式的改变, 其发病率逐年上升。糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病全身性微血管合并症之一, 糖尿病患者一旦发生肾脏损害, 出现持续尿蛋白则病情不可逆转, 往往进行性发展直至肾功能衰竭。本研究通过一次性腹腔注射大剂量链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ), 建立糖尿病大鼠模型, 检测不同时间肾脏的病理变化, 为糖尿病肾病的研究提供动物模型。

### 1 材料与方 法

1.1 实验动物和糖尿病模型的建立 雄性清洁 SD 大鼠 48 只, 体重 ( $180 \pm 20$ ) g, 随机分为实验组 (DM

组,  $n = 24$ ) 和对照组 (NC 组,  $n = 24$ )。禁食 12 h, DM 组大鼠一次性腹腔注射新配制 STZ 65 mg/kg, STZ 临用前用枸橼酸钠缓冲液 (0.1 mol/L, pH 4.5) 配制, 10 min 内用完。NC 组大鼠注射等剂量的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。DM 组大鼠给药 72 h 后尾静脉采血, 7 天后复测随机血糖, 以两次随机血糖  $> 16.7$  mmol/L 确定为 DM 模型建立成功, 未成模鼠退出 DM 组。各大鼠在同一动物房内分笼饲养, 标准饮食。继续喂养 12 周。

1.2 标本收集测定 2 组大鼠分别于成模后 1、4、8 和 12 周清晨空腹称体重, 尾静脉采血测外周血血糖; 实验结束前 1 天, 用代谢笼收集 24 h 尿量。实验结束时, 大鼠禁食 8 h, 水合氯醛腹腔麻醉, 心脏取血, 随后取左肾称重, 取右肾纵形切开, 10% 中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切成 3  $\mu$ m 厚的切片, 脱蜡水化, HE 染色。

1.3 统计学方法 采用方差分析、 $q$  检验和  $t$  检验。

[收稿日期] 2010-04-28

[作者单位] 蚌埠医学院 组织学与胚胎学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 李徽徽 (1981 -), 女, 助教。

2 结果

2.1 一般表现 DM 组大鼠 24 只成模,成模率 100%。造模成功后,DM 组大鼠出现显著的多饮、多尿、多食的症状,毛色无光泽,精神萎靡,反应迟钝,夜间活动显著减少,生长迟缓,体重增长缓慢,部分 DM 组大鼠见双眼白内障。NC 组大鼠形体适中,精神状况良好,反应灵敏,毛发光泽,饮食、饮水正常,体重随时间增长。

2.2 体重与血糖 4 个时间内,NC 组大鼠体重随时间延长体重逐渐增加( $P < 0.01$ ),DM 组大鼠体重均无明显改变( $P > 0.05$ ),但 8 周和 12 周时体重均低于 NC 组( $P < 0.01$ )。DM 组大鼠于注射 STZ 后,血糖均  $> 16.7$  mmol/L,4 个时间内 DM 组与 NC 组大鼠血糖差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。2 组内各个时间点差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )(见表 1)。

表 1 各时间 NC 与 DM 大鼠体重、空腹血糖比较( $n_i = 6; \bar{x} \pm s$ )

时间 (周)	体重(g)				空腹血糖(mmol/L)			
	NC	DM	t	P	NC	DM	t	P
1	216.40 ± 18.63	223 ± 21.32	0.57	>0.05	5.05 ± 0.72	24.64 ± 4.37	10.83	<0.01
4	247.28 ± 23.26	229 ± 27.58	1.24	>0.05	5.73 ± 0.53	25.87 ± 3.12	15.59	<0.01
8	369.63 ± 41.32 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>	247 ± 57.23	4.26	<0.01	5.59 ± 0.48	23.54 ± 5.29	8.28	<0.01
12	437.42 ± 53.66 <sup>**<math>\Delta\Delta</math>##</sup>	263 ± 49.61	5.85	<0.01	4.96 ± 0.64	24.87 ± 4.96	9.75	<0.01
F	47.13	1.14	—	—	2.46	0.27	—	—
P	<0.01	>0.05	—	—	>0.05	>0.05	—	—
MS <sub>组内</sub>	1 368.711	1 737.906	—	—	0.360	20.354	—	—

q 检验:与 1 周比较<sup>\*</sup> $P < 0.01$ ;与 2 周比较 <sup>$\Delta\Delta$</sup>  $P < 0.01$ ;与 8 周比较<sup>##</sup> $P < 0.01$

2.3 尿量与 24 h 尿蛋白 DM 组大鼠于注射 STZ 后,从 1 周起 24 h 尿量较 NC 组有上升趋势,4 个时间内,DM 组尿量均显著多于 NC 组( $P < 0.01$ )。组内各个时间点尿量均无明显变化( $P > 0.05$ )。DM 组大鼠于注射 STZ 后,从 1 周起 24 h 尿蛋白较 NC

组有上升趋势,在 4、8 和 12 周,DM 组 24 h 尿蛋白均显著高于 NC 组( $P < 0.01$ ),在 DM 组中 1、4、8 和 12 周组间差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。NC 组差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )(见表 2)。

表 2 各时间 NC 与 DM 大鼠尿量、尿蛋白比较( $n_i = 6; \bar{x} \pm s$ )

时间 (周)	尿量(ml)				尿蛋白(mg/24 h)			
	NC	DM	t	P	NC	DM	t	P
1	18.72 ± 8.24	58.82 ± 19.43	4.65	<0.01	0.106 ± 0.018	0.108 ± 0.024	0.16	>0.05
4	20.61 ± 7.83	70.58 ± 17.49	6.39	<0.01	0.102 ± 0.009	0.323 ± 0.048 <sup>**</sup>	11.08	<0.01
8	20.75 ± 9.23	68.39 ± 14.36	6.84	<0.01	0.125 ± 0.023	0.509 ± 0.065 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>	13.64	<0.01
12	23.50 ± 10.62	79.03 ± 17.75	6.58	<0.01	0.098 ± 0.022	0.678 ± 0.073 <sup>**<math>\Delta\Delta</math>##</sup>	18.63	<0.01
F	0.28	1.37	—	—	2.42	115.99	—	—
P	>0.05	>0.05	—	—	>0.05	<0.01	—	—
MS <sub>组内</sub>	81.796	301.174	—	—	0.000 4	0.003 1	—	—

q 检验:与 1 周比较<sup>\*</sup> $P < 0.01$ ;与 2 周比较 <sup>$\Delta\Delta$</sup>  $P < 0.01$ ;与 8 周比较<sup>##</sup> $P < 0.01$

2.4 肾脏重量/体重 DM 组大鼠的肾脏重量/体重在 4 个时间内与 NC 组差异均有统计学意义( $P <$

$0.01$ )。2 组内各时间点差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )(见表 3)。

表 3 NC 与 DM 大鼠不同时间肾重指数(mg/g;% )的比较( $n_i = 6; \bar{x} \pm s$ )

分组	1 周	4 周	8 周	12 周	F	P	MS <sub>组内</sub>
NC	0.317 ± 0.034	0.295 ± 0.028	0.324 ± 0.032	0.308 ± 0.025	1.05	>0.05	0.001
DM	0.579 ± 0.047	0.543 ± 0.057	0.582 ± 0.036	0.571 ± 0.069	0.66	>0.05	0.003
t	11.06	9.57	13.12	12.12	—	—	—
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—

2.5 病理学光镜变化 观察不同时间点 DM 组大鼠肾脏的病理变化。组织切片显示:DM 组大鼠第 4 周时肾小体体积增大,系膜基质增多;第 8 周时系膜基质明显增多,毛细血管壁增厚,管腔变窄,肾小体部分上皮细胞开始空泡变性;第 12 周时,足突融合,肾小体基膜较对照组明显增厚,内皮细胞排列紊乱,正常滤过屏障结构丧失。随着病程进展,出现肾

脏病理改变的大鼠比例升高。在 4 周时,有明显肾脏病理改变的大鼠数目为 1 只,而在 12 周时,DM 组大鼠均表现明显的病理性改变。NC 组大鼠 HE 染色可见肾小体毛细血管内皮细胞排列整齐,基膜厚度无改变,毛细血管祥形态规则,血管腔内少量红细胞残留,各时间点 NC 组大鼠均无显著病理改变(见图 1~5)。

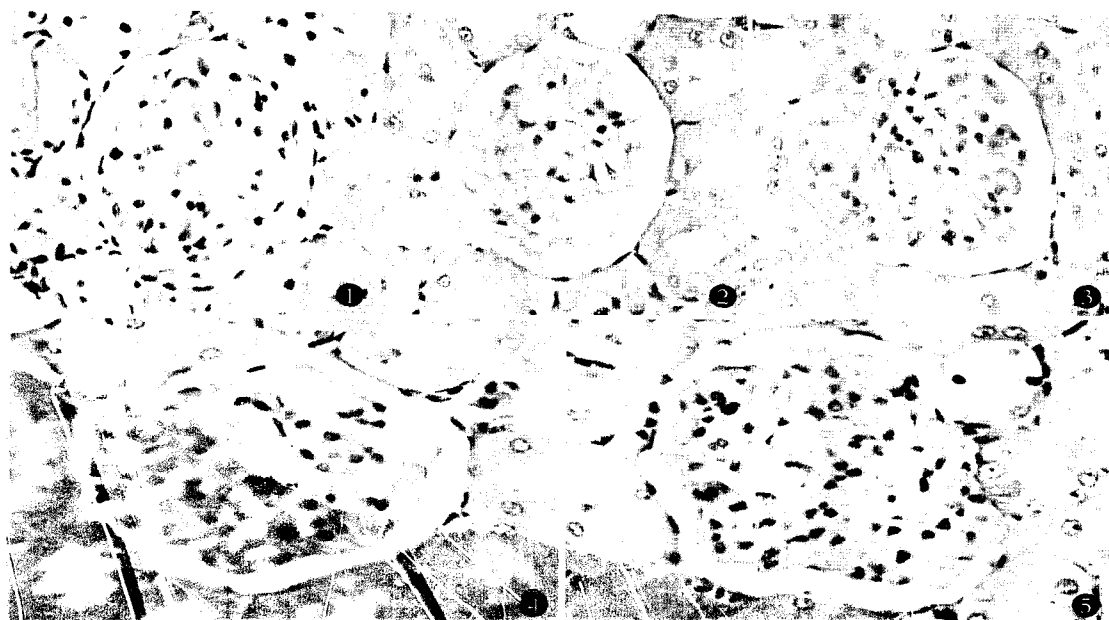


图 1 NC 组大鼠,肾脏组织无显著病理改变 图 2 DM 组大鼠 1 周时,肾脏组织无显著病理改变 图 3 DM 组大鼠 4 周时,肾小体体积增大,系膜基质增多 图 4 DM 组大鼠 8 周时,系膜基质明显增多,毛细血管壁增厚 图 5 DM 组大鼠 12 周时,系膜基质明显增多,肾小体基膜增厚

### 3 讨论

DM 是最常见的慢性病之一,临床上 DM 以高血糖为主要特点,DN 是 DM 严重慢性并发症之一,其发生率约占 I 型 DM 患者的 30%~40%<sup>[1]</sup>。高血糖是 DN 发病最关键的因素。高血糖可导致一系列血管活性因子反应性增强,如血管紧张素 II、血管紧张素转化酶、内皮素、激肽释放酶-激肽系统、前列腺素系统、血栓素、心钠素和一氧化氮(NO)等活性改变,这些因素均可使肾小体入、出球微动脉舒缩平衡失调,造成肾小体高灌注、高内压和高滤过,即“三高”状态,这种状态不但促使蛋白从毛细血管壁滤过增加,导致蛋白尿的发生,同时由于增加了对肾小体毛细血管机械牵张力,导致肾脏固有细胞合成和分泌更多的血管活性因子,从而促使血管通透性进一步增加<sup>[2]</sup>,加重了蛋白尿。当血液流经血管球毛细血管时,管内血压较高,血浆内部分物质经有孔内皮、基膜和足细胞裂孔膜滤入肾小囊腔形成原尿,这三层结构称为滤过膜。滤过膜三层结构上的孔道,构成了物质滤过的机械屏障。滤过膜各层覆盖

有带负电荷的物质,主要为糖蛋白,能阻止带负电的大分子通过,构成了电荷屏障。滤过膜的结构和功能完整是保证血浆蛋白不会漏出的重要因素。当血糖升高时可激活蛋白激酶 C,产生糖基化终产物,促进甘油二酯的合成,使肾小体滤过率升高,引起微量白蛋白尿;最后肾脏局部产生大量的转化生长因子- $\beta$ ,该因子可增加细胞外 I、IV、V、VI 型胶原及纤维素等基质的沉积,导致系膜扩张、肾小体基膜增厚等肾脏损害<sup>[3]</sup>,使肾小体的机械屏障破坏,滤过功能受损。肾小体内皮细胞及系膜细胞可以产生硫酸乙酰肝素,HS 是电荷屏障的重要组成成分。DM 状态下当 HS 所带负电荷数量减少,肾小体滤过膜电荷屏障破坏,则可产生蛋白尿<sup>[4]</sup>。

目前,研究 DN 的动物模型均由建立 DM 动物模型获得,而建立 DM 动物模型主要有 4 种方法,包括胰腺切除、化学物质诱导(主要指用 STZ、四氧嘧啶诱导)、自发性模型、转基因模型等。其中,STZ 诱导模型是最常用的模型,具有耗时短、方法简便、易于掌握、重复性好的特点<sup>[5]</sup>。STZ 能引起 DM 的机制可概括为<sup>[6]</sup>:(1)STZ 直接破坏胰岛  $\beta$  细胞;(2)

[文章编号] 1000-2200(2010)09-0872-05

· 基础医学 ·

## RNA 干扰对胆囊癌细胞上皮细胞黏附因子表达的影响

贾兴胜, 刘会春, 张 军

**[摘要] 目的:**观察 RNA 干扰(RNAi)对胆囊癌 GBC-SD 细胞株中上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EP-CAM)表达的抑制作用。**方法:**针对 EP-CAM 基因的不同位点构建 4 个 miRNA 重组质粒。经 DNA 测序后,用 Lipofectamine™ 2000 介导转染人胆囊癌 GBC-SD 细胞株,48 h 后用 RT-PCR 和 Western blot 检测 EP-CAM 的 mRNA 和蛋白的表达变化情况。**结果:**经测序分析证实,靶向 EP-CAM 的 4 个 miRNA 重组质粒均构建成功。RT-PCR 及 Western Blot 技术显示,4 个重组质粒均不同程度地抑制靶基因 EP-CAM 的表达。**结论:**针对人 EP-CAM 基因的 miRNA 表达载体能有效地下调 GBC-SD 细胞中 EP-CAM mRNA 及蛋白的表达。

[关键词] 胆囊肿瘤;上皮细胞黏附分子;RNA 干扰;表达载体

[中国图书资料分类法分类号] R 735.8 [文献标识码] A

### RNA interference on the expression of epithelial cell adhesion molecule mRNA in human gallbladder cancer cells

JIA Xing-sheng, LIU Hui-chun, Zhang Jun

(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

**[Abstract] Objective:** To evaluate the inhibitory effect of RNA interference (RNAi) on the expression of epithelial cell adhesion molecule (EP-CAM) mRNA and protein in human gallbladder cancer cells. **Methods:** Four recombinant plasmids targeting human EP-CAM gene were transfected into GBC-SD cells by Lipofectamine 2000 after DNA sequencing; RT-PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of EP-CAM. **Results:** Four EP-CAM-targeted microRNA (miRNA)-1, -2, -3 and -4 were successfully inserted into the plasmid vector, and the coding sequences of the obtained miRNA were consistent with the designed fragments. The results indicated that four recombinant plasmid could effectively knock down the expression of EP-CAM mRNA and

protein in human gallbladder cancer cells. **Conclusions:** The recombinant plasmid pcDNA™ 6.2-GW/EmGFPmiR miRNA targeting human EP-CAM gene can effectively down-regulate the expression of EPCAM mRNA and protein in human GBC-SD cells.

**[Key words]** gallbladder neoplasms; epithelial cell adhesion molecule; RNA interference; plasmid vector

[收稿日期] 2010-01-07

[基金项目] 安徽高等学校省级自然科学基金资助项目 (KJ2009A163)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 肝胆外科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 贾兴胜(1969-),男,硕士研究生,主治医师。

[通讯作者] 刘会春, 研究生导师, 主任医师, 教授。

STZ 激活自身免疫过程,进一步导致 B 细胞的损害;(3)遗传因素的影响;(4)通过 NO 和自由基两种途径损伤胰岛 B 细胞,诱发 DM 发生。用 STZ 建立 DM 大鼠模型时,雄性鼠更敏感。在本实验中,用 STZ 一次足量给予雄性 SD 大鼠,从而制备出 DM 的动物模型。本文结果表明,注射 STZ 后,SD 大鼠开始出现“三多”(多饮、多食、多尿)症状,体重减轻、脱毛、毛色失去光泽等 DM 的表现。在 DM 发展的各时间点,DM 大鼠血糖持续处于高水平。随着病程的延长,DM 组大鼠的 24 h 尿量增多,肾重指数增加,肾脏重量和体积增大。组织切片示:肾小囊腔缩小;肾小体体积增大、肿胀,毛细血管内皮细胞排列紊乱、肿胀、基膜增厚、毛细血管管腔变窄;肾间质部分小血管玻璃样变性,部分可见间质纤维化,正常滤过屏障结构丧失,提示肾脏已出现明确的结构和功能改变,蛋白质的滤过持续增加,24 h 尿蛋白明显高于

同期 NC 组,病程越长病变越明显。

## [参 考 文 献]

- [1] Meyer TW. Mechanisms of proteinuria in diabetic renal disease [J]. Semin Nephrol, 1990, 10(3):194-202.
- [2] Gruden G, Thomas S, Burt D, et al. Mechanical stretch induces vascular permeability factor in human mesangial cells; mechanisms of signal transduction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(22):12112-12116.
- [3] Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16 (Suppl 1): S30-S33.
- [4] Raats CJ, Van Den Born J, Berden JH. Glomerular heparan sulfate alternation: mechanisms and relevance for proteinuria [J]. Kidney Int, 2000, 57(2):385-400.
- [5] 李聪然, 游雪甫, 蒋建东. 糖尿病动物模型及研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(1):59-63.
- [6] 黄松. 糖尿病动物模型研究现状及进展 [J]. 广西医学, 2002, 24(1):46-48.