

韩旭,王璇,余芝,等. STZ 制备糖尿病大鼠模型影响因素的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 716-725.
Han X, Wang X, Yu Z, et al. Research progress on factors influencing streptozotocin-induced diabetic rat models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 716-725.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.05.019

STZ 制备糖尿病大鼠模型影响因素的研究进展

韩旭,王璇,余芝,徐斌*

(南京中医药大学针药结合教育部重点实验室,南京 210023)

【摘要】 糖尿病(diabetes mellitus,DM)已成为世界范围的流行病,发病率逐年增加。为了更深入探究 DM 的发病机制、研发更有效的预防、治疗方案,研究人员需要和人类疾病相似的、稳定、可复制的动物模型。使用链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)诱导 DM 已半世纪之久,是目前基础研究中使用的最广泛的 DM 动物诱导药物。本文对 STZ 制备 DM 大鼠模型过程中的主要影响因素进行简要综述,综合相关已发表文献的研究成果及经验,以期能对今后 STZ 诱导的 DM 大鼠模型的制备提出一些可参考的建议。

【关键词】 链脲佐菌素;糖尿病;动物模型;影响因素

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)05-0716-10

Research progress on factors influencing streptozotocin-induced diabetic rat models

HAN Xu, WANG Xuan, YU Zhi, XU Bin*

(Key Laboratory of Acupuncture and Medicine Research of Ministry of Education, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Corresponding author: Corresponding author: XU Bin. E-mail: xubin@njucm.edu.cn

【Abstract】 Diabetes mellitus (DM) has become a worldwide epidemic, with an increasing incidence year by year. To further explore the pathogenesis of DM and develop more effective prevention and treatment programs, researchers need stable, replicable animal models that are similar to human diseases. The administration of streptozotocin (STZ) has been used for half a century to induce DM, and is the most widely used method for establishing animal models of DM in basic research. In this paper, the main factors influencing STZ-induced DM rat models are briefly reviewed. On the basis of the research result and related literature, some suggestions for the future preparation of STZ-induced DM rat models are made.

【Keywords】 streptozotocin; diabetes mellitus; animal model; influencing factor

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

2019 年,国际糖尿病(diabetes mellitus,DM)联合会发布数据显示:2019 年全球 DM 患病率为 9.3%,2030 年将上升到 10.2%,2045 年将上升到 10.9%^[1]。迫切需要更优的诊疗方案来对抗 DM,而临床前模拟人类 DM 的动物模型至关重要。相比

基因动物,化学药物损伤胰岛功能诱导 DM 操作简单、成本低、应用更广泛^[2]。常用试剂是链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)和四氧嘧啶(alloxan,ALX),ALX 在 1943 年首次用来诱导 DM^[3],它通过氧化应激破坏胰岛 β 细胞,但和 STZ 比,有效性低、副作用

【基金项目】 国家自然科学基金(81873238,81673883)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81873238, 81673883).

【作者简介】 韩旭(1993—),女,在读研究生,研究方向:针刺调节胃肠功能的规律研究。Email: 1020174451@qq.com

【通信作者】 徐斌(1965—),男,研究员,博士生导师,研究方向:针灸效应规律及机制研究。Email: xubin@njucm.edu.cn

大,会引起肝、肾毒性,故应用较少^[4]。STZ 最初是在 1960 年从不产色链霉菌中分离出来的,是一种亚硝基脲类似物,其 DM 致病性到 1963 年被报道^[5],STZ 对胰岛 β 细胞有高度选择性破坏作用,通过葡萄糖转运蛋白 2 进入 β 细胞,其细胞内作用导致 DNA 改变, β 细胞死亡的主要原因是 DNA 烷基化,一氧化氮和活性氧的协同作用也可能导致 STZ 引起 DNA 断裂和其他有害变化。DNA 损伤激活多聚 ADP 核糖基化,导致细胞烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和三磷酸腺苷的耗竭,蛋白质合成减少, β 细胞死亡^[4,6]。STZ 对其他组织器官毒性相对较小,造模成功率高,是国内外应用最广泛的 DM 模型化学诱导剂^[7]。但具体应用方法各文献报道不一,本文就 STZ 诱导的 DM 大鼠模型探讨可能对模型产生影响的要素,以期对今后 DM 大鼠模型的制备有所裨益。

1 动物选择

小鼠、大鼠、猪和猴子等对 STZ 敏感,兔不那么敏感^[8],大鼠和小鼠较常用^[9]。应用最多的是大鼠,体积小、生命周期短、来源广泛、经济、环境及遗传因素易控制,是较理想的选择,对于品系常使用 SD 或 Wistar 大鼠^[4,10]。农慧等^[10]使用同条件 STZ, Wistar 大鼠死亡率 > 50%,SD 大鼠抵抗力强于 Wistar 大鼠,推荐 SD 大鼠。且不同等级 SD 大鼠亦有差别,普通级死亡率 > 50%,SPF 级死亡率仅 2.17%。郭学军等^[11-12]研究显示 Wistar 大鼠的成模率和死亡率均高于 SD 大鼠,推测 Wistar 大鼠敏感性强于 SD 大鼠,抵抗力弱于 SD 大鼠。

1.1 大鼠性别

STZ 作用效果与大鼠性别相关,雄性比雌性更敏感^[13-14]。Ostenson 等^[15]用 STZ 诱导雄性和雌性新生大鼠 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM),两者的 β 细胞损伤参数无差异,但成年后雄性比雌性大鼠 DM 更严重,并证实了这种性别差异是雄激素依赖性的。Cortright 等^[16]研究显示,和雌性相比,雄性大鼠在线性生长和身体成分改变方面更受 STZ 影响。李莉等^[17]采用同条件 STZ,雌性和雄性大鼠成模率分别为 26.7% 和 46.7%。蒋升等^[18]观察了 STZ 诱导 DM 大鼠的血糖变化,雄性大鼠 2 周后血糖趋于稳定,雌性大鼠 4 周后趋于稳定。故除必须使用雌性的模型,建议选用雄性大鼠。

1.2 大鼠体重

陈静等^[19]研究显示 180 ~ 240 g 大鼠成模率较

高,随体重增加,成模率降低,死亡率增大。张新兰等^[20]结合成模率和死亡率考虑,220 ~ 260 g 大鼠最适合。黄琛等^[21]结果显示 201 ~ 240 g 大鼠成模率最高。后两项研究均表示随体重增加,死亡率逐渐降低。章成昌等^[22]采用高糖高脂饮食联合 STZ 诱导 T2DM,体重在 (240 $\pm$ 5) g 的大鼠成模率高,胰岛素水平接近正常对照组,体重高于此范围的成模率低,胰岛素水平偏低。综上建议选用体重在 220 ~ 240 g 的大鼠。

1.3 大鼠年龄

Wang 等^[23]探究了 STZ 对 6 ~ 23 周龄大鼠的毒性作用,发现 STZ 注射 1 周内动物的急性死亡率和年龄成反比,为降低死亡率应选择周龄 < 12 周的大鼠,如需更年长的动物,应考虑降低剂量。大鼠 β 细胞数量增加能力随年龄减弱,当年龄 > 1 岁后似乎没有这种能力,故不同年龄段大鼠对同剂量 STZ 的反应不同。高脂饮食 (high fat diet, HFD) 联合 STZ 的 T2DM 模型多使用 4 ~ 12 周的大鼠,8 周最常用^[24]。STZ 联合烟酰胺 (nicotinamide, NA) 的 T2DM 模型常用 6 ~ 12 周的大鼠,较年轻的大鼠对 STZ 的敏感性低,可以被 NA 更好的保护^[4]。使用 STZ 诱导 1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 较常用 8 ~ 10 周的大鼠^[25]。陈玥等^[26]汇总了常用实验动物和人类年龄相关性理论及计算方式,制成人类年和动物日匹配表,可以根据研究目的参考选择适合日龄的大鼠。

2 实验方案及操作

2.1 STZ 注射前禁食时间

STZ 分子含有一个高度活性葡萄糖侧链, β 细胞会对其错误识别,毒性基因随即带入细胞内,如果注射前或中给予含葡萄糖的物质或类似物,会与 STZ 竞争性的和 β 细胞结合,影响 STZ 发挥毒性作用,故注射前动物应充分禁食^[27-28]。有研究探究了禁食对成模的影响,黄琛波等^[29]结果显示非空腹组成模率为 60%,空腹组为 66.7%。黄琛等^[21]结果显示正常饮食组成模率 33.3%,禁食组成模率 66.6%。叶桐江等^[30]观察了 STZ 注射前禁食 12、16、20、24 h 的造模情况,随禁食时间的延长,造模率逐渐增高,但当超过 20 h,成模率无明显上升,死亡率大幅增高,故建议 20 h 为最佳禁食时间。

2.2 STZ 剂量

STZ 用量主要取决于想要模拟 DM 的类型及严

重程度^[14]。通常参考已发表文献,但即使同一品系动物来自不同供应商也存在差异,建议先进行预实验确定所用剂量。从造模成功率、死亡率、缓解率综合评判,以成模率高、病死率低、缓解率低为最佳剂量^[7]。STZ 价格较昂贵,卢慧等^[31]通过建立数学模型描述制作 DM 大鼠模型的成本,根据对血糖值及病程的要求计算出 STZ 剂量和大鼠体重的最优组合,但其仅考虑了死亡率和未成模率,未把发病机理的因素纳入。本文根据 STZ 注射剂量和次数分为:大剂量单次、小剂量单次和小剂量多次。

2.2.1 大剂量单次

大剂量单次多用于诱导 T1DM,损伤胰岛导致胰岛素分泌绝对减少而血糖增高。熊煜欣等^[32]设置了 20 ~ 60 mg/kg 梯度剂量组,STZ 注射 5 d 后,20、30 mg/kg 组血糖依旧在正常范围,说明此剂量不足以引起足够的 β 细胞损害,另外 3 组均出现高血糖,50、60 mg/kg 组成模率均为 100%。高鑫等^[28]对不同剂量 STZ 比较发现,剂量越小转阴率越高,不应 < 40 mg/kg。黄琛等^[21,33]比较了 40、50、60 mg/kg STZ 的造模情况,50 mg/kg 最佳。叶桐江等^[30]比较了 50、60、70 mg/kg STZ,成模率均较高,死亡率随剂量增加成倍增加,故推荐 50 mg/kg。李钊至等^[34]建议剂量在 40 ~ 50 mg/kg 最合适,45 mg/kg 有较高的成模率和较低的死亡率。郭延敏^[35]设置了 55 ~ 70 mg/kg 梯度剂量,65 mg/kg 成模率较高、死亡率低,与以上研究差异较大,可能是成模标准定的过高。综上建议 STZ 诱导 T1DM 单次注射剂量 45 ~ 50 mg/kg。

大剂量单次诱导 T2DM,使用 STZ 联合 NA,NA 是维生素 B3 的酰胺形式,利于细胞内 DNA 修复、维持烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平,对胰岛 β 细胞化学性与免疫性损伤有明显的防护作用^[9,36]。NA 对 STZ 的 DM 效应起保护作用,STZ 联合 NA 是一种非胰岛素抵抗、胰岛素缺乏的 T2DM 模型^[9]。Masiello 等^[37]比较了 100 ~ 350 mg/kg 范围内 4 个浓度的 NA,结果显示 230 mg/kg NA 结合 65 mg/kg STZ 致约 60% 的 β 细胞功能丧失,产生稳定、中度高血糖。Furman 等^[9]重复了上述方案,结果显示 75% ~ 80% 的大鼠出现中度高血糖。此方法主要变量是 NA 剂量(60 ~ 290 mg/kg)、STZ 剂量(45 ~ 65 mg/kg)和间隔时间(普遍 15 min)。翁琰等^[38]设置了 100 ~ 200 mg/kg 不同剂量 NA 联合 65 mg/kg STZ 造模,120 mg/kg 组成模率为 80%,无死亡,为最优剂量。

2.2.2 小剂量单次

小剂量单次多用于诱导 T2DM。T2DM 多发于成年,遗传易感性固然存在,但营养过剩、生活习惯不良等导致的超重、肥胖在病程中起重要作用^[39]。DM 前期患者通常会存在以高胰岛素血症、胰岛素抵抗和血脂异常为特征的肥胖状态^[24,40]。肥胖是 T2DM 发展最常见的危险因素^[41]。T2DM 早期以糖脂代谢紊乱及胰岛素抵抗为主,晚期以胰岛素相对缺乏为主,理想的模型应具备以上特点^[42-44]。HFD 可以引起糖脂代谢紊乱,通过糖脂脂肪酸循环、胰岛素信号转导等途径降低胰岛素敏感性^[44]。单纯 HFD 可以诱导 DM,短期内可引起胰岛素抵抗和/或葡萄糖耐受不良,但要使血糖升高需更长时间(> 10 周)^[4]。早期代偿机制(β 细胞的数量增加或功能增强)可以维持血糖正常,这时如给予小剂量 STZ 辅助部分破坏 β 细胞,机体失去了足够的代偿能力,短期内即可造模成功^[24,45]。

HFD 的成分和喂养时间都会影响体重增加和脂肪分布,本文主要探讨喂养时间,短期往往会诱发胰岛素抵抗和/或葡萄糖耐受不良,相对长期(5 周)会导致更高的体脂率,发展肥胖症要更长时间(> 3 个月),可以根据需要模拟的 DM 前期状态选择喂养时间^[24]。HFD 喂养时间的长短和胰岛素抵抗程度、血脂异常程度正相关,和 STZ 用量负相关,但考虑到动物生命周期、慢性并发症的发展及后续实验,建议 8 周为宜^[46-48]。陆少君等^[49]比较了 4 周和 8 周 HFD 的造模差异,发现 8 周动物生存状态差,4 周更佳,减少了死亡率,缩短实验周期和成本。T2DM 典型特征包括胰岛素抵抗和胰岛功能受损,桑延霞等^[50]研究显示,高热量饮食仅能诱导约 50% 的大鼠产生胰岛素抵抗,因此诱导后需先测量空腹胰岛素,筛选胰岛素抵抗大鼠,淘汰肥胖抵抗大鼠,保留肥胖大鼠,再行 STZ,使病理机制保持一致。少有报道 STZ 给药前高胰岛素血症、肥胖症、葡萄糖耐量降低等数据,它们代表 DM 前期状态,可以反映模型这一阶段的病理类型^[24]。

小剂量单次的用量要区分于 T1DM,即单独使用不能致高血糖,小部分破坏胰岛细胞,又保证一定的成模率^[48]。杨架林等^[51]研究显示,同用 25 mg/kg,只有在 HFD 后才能引起高血糖,普通饲料喂养不能引起高血糖,因为动物本身没有胰岛素抵抗, β 细胞对于小损伤还可以代偿。2 周 HFD 后,Islam 等^[52]分组给予 30、40、50 mg/kg STZ,发现 40

mg/kg 组更符合 T2DM 的特点;徐文平^[53]进行了 40、45、50 mg/kg 的剂量比较,45 mg/kg 成模率最高,无死亡。4 周 HFD 后,李柱云等^[54]比较了 30、40、50 mg/kg STZ 的造模情况,结果显示 40 mg/kg 组具有 T2DM 的主要特征,成模率最高,死亡率较高剂量低,稳定性较低剂量好。肖艳红等^[55]比较了 15 ~ 45 mg/kg STZ,35 mg/kg 最佳。陆少君等^[49]比较 35、40 mg/kg STZ 造模,成模率相同但 40 mg/kg 死亡率较高。邵俊伟等^[56]采用 35 mg/kg STZ,除因注射不当未成模外,其余均成模,无死亡,建议剂量在 30 ~ 40 mg/kg。章成昌等^[22]采用 35 mg/kg STZ,成模率 93%,无死亡。8 周 HFD 后,何清华等^[57]注射 STZ 30 mg/kg,成模率 100%,无死亡。同剂量魏占英等^[58]成模率 80%,死亡率 30%,优于其他方案。周迎生等^[59]建议 HFD 喂养 4 ~ 8 周后,以 25 ~ 40 mg/kg STZ 为宜。张汝学等^[60]采用 3 个月 HFD 加 30 mg/kg STZ,模型成功后如停用 HFD,空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)会在 5 ~ 7 d 后恢复正常,建议成模后最好维持 HFD。综上,HFD 喂养时间越长,胰岛素抵抗越明显,需要 STZ 的量越少。

2.2.3 小剂量多次

刘霆等^[61]应用 STZ 诱导 T1DM,30 mg/kg 每周 1 次,连续 4 周,观察到 STZ 诱导胰岛损伤有量效和时效关系,即逐渐加重胰岛损伤。大多数 T1DM 患者由于自身免疫系统紊乱, β 细胞被严重破坏,胰岛素分泌绝对不足而导致血糖升高,是一个自身免疫系统参与的渐进过程。小剂量多次可以不断激活自身免疫反应,破坏免疫机制,最终出现稳定持久的 DM。和大剂量单次比,能更好的模拟 T1DM 的发病过程,降低死亡率,不过造模周期较长。曾新生等^[62]认为一次性大量破坏胰腺 β 细胞使动物迅速达到过高的 FBG (> 20 mmol/L),不能很好的模拟 T1DM,其采用 30 或 40 mg/kg 隔天注射 3 次,期间喂养 1% 葡萄糖水,成模率较高。孟召祥等^[63]采用 35 mg/kg 每周 1 次,连续 4 周,成模率 91%,无死亡。

亦有 HFD 结合小剂量多次注射 STZ 的造模研究。林心君等^[64]在 4 周 HFD 后,2 次注射 STZ,对注射的间隔时间和用量进行探索,证实以 25 mg/kg 间隔 2 d 最佳,剂量计算使用体重联合表面积的计算法,因当大鼠 > 300 g 时,单纯以体重计算导致 2/3 大鼠死亡。此方案成模率高,无死亡,8 周后无自

愈。Zhang 等^[65]等认为小剂量多次注射可能会引起毒性反应和免疫反应的结合,逐渐引发高血糖,4 周 HFD 后,每周注射 1 次,连续 2 周,25 mg/kg 成功率 25%,30 mg/kg 成功率 85%。林燕超等^[46]在 8 周 HFD 后,连续 2 d 注射 20 mg/kg STZ,优于单次注射 20 或 30 mg/kg 组。但小剂量多次工作量大,总误差大,增加动物感染率。

大剂量单次广泛用于 T1DM 的药物实验,小剂量多次主要用于探讨胰岛坏死及增殖机制的研究^[66]。农慧等^[10]认为关于 DM 并发症的研究,因 T1DM 和 T2DM 的病理改变基本相同,所以可采用大剂量单次注射,缩短造模周期。对于妊娠 DM 模型,STZ 的用量从 25 ~ 65 mg/kg 不等,由于增加了胚胎因素,要根据具体研究目的,结合成模率、母鼠死亡率、子鼠生长状况等因素综合考虑^[67]。López 等^[68]研究表明,在大鼠妊娠第 6 天,注射 35 mg/kg STZ 可以模拟不受控制的或中度的妊娠期 DM 的大多数病理变化。

2.3 STZ 的配置

STZ 粉末 -20°C 避光保存,其溶液极不稳定,需现配现用,冰浴避光操作,缓冲液使用柠檬酸或枸橼酸缓冲液 ($\text{pH} = 4.2 \sim 4.5$),提前预冷^[24,34,46,69-70]。尽管 STZ 在缓冲液中具有最大稳定性,但短时间内仍会降解,配置后要在一定时间内尽快用完,文献报道不一: $5^{[9,71]}$ 、 $10^{[72]}$ 、 $15^{[70]}$ 、 $20^{[73]}$ 、 $30 \text{ min}^{[30,33,49]}$ 内,最好分多次配置,保险起见在溶解后 5 min 内用完。

2.4 STZ 给药途径

STZ 可以通过静脉、皮下、腹腔给药。黄波等^[29]比较了空腹腹腔注射和尾静脉注射的差异,后者成模率 93.3%,远大于腹腔注射组,推测可能与药物的吸收更直接有关。也有研究表明两种方式的成模率相当^[60,74]。尾静脉较细,不易操作,易造成药物损耗,不好控制速度,故常选择腹腔注射^[75-76]。注射前提起腹壁 30° 进针,进针前先回抽,不要误入皮下或脏器^[77]。最好注射在腹部同侧,保持操作一致性,利于血糖的均一稳定^[56]。

2.5 STZ 注射后的护理

注射后给予动物充足的水和食物,胰岛细胞坏死和胰岛素的突然释放,会导致致命的低血糖,为避免在 6 ~ 12 h 的低血糖期出现死亡,可以在给药后向动物提供 10% 的蔗糖水或葡萄糖水^[9,28]。大鼠很快会出现多饮、多食、多尿的症状,要保证充足的

供水量,及时更换垫料,保持鼠笼干燥清洁^[73]。动物如出现无法进食、饮水、站立、体温过低等虚弱或濒死状态,应遵守相关动物实验伦理规则,执行安乐死,最大程度减少动物的痛苦^[78]。

2.6 血糖测量

血糖测量最好在麻醉状态下进行,束缚应激可致大鼠血糖升高^[79]。可眼眶采血或断尾采血,但伤害较大,如测量较频繁,可用尾静脉采血^[73,80]。采血前注意清洁消毒,避免杂质影响测量结果,结束后止血以免感染^[81]。需要注意的是,当用葡萄糖作为 DM 诊断时,可使用全血、血清或血浆,推荐通过标准化酶法使用静脉血浆测量^[82]。血糖精确的目标是变异系数 $\leq 2.2\%$,在诊断人类 DM 时不推荐使用测量全血的便携式血糖仪,它们精度及重复性差且不同仪器存在差异,还没有血糖仪达到美国 DM 协会设定的分析误差 $< 5\%$ 的目标。优点是使用方便、创伤小^[83]。人类测量 FBG 需禁食 ≥ 8 h,李莉等^[17]提出 20:00 是大鼠进食高峰期,10:00 至 12:00 进食基本完成,此时禁食类似人类晚饭后禁食,晚 12:00 至晨 8:00 禁食更合理。Furman 等^[9]认为老鼠在夜间进食,测血糖前一夜的禁食实际上禁食了 24 h,可能引起影响血糖读数的一些生理反应,可以在 7:00 至 15:00 点禁食。

3 成模判断标准

DM 模型的判定标准不一,血糖、尿糖、葡萄糖耐量、胰岛素或 C 肽水平、胰腺组织形态学等都可以评价,最基础的是血糖,但不同物种血糖浓度不同,因此人类 DM 定义不一定适于动物^[84]。一般,STZ 诱导的大鼠非空腹血糖水平 > 200 mg/dL (11.1 mmol/L),FBG > 150 mg/dL (8.3 mmol/L)^[9]。农慧等^[10]认为 DM 大鼠不耐饥饿,夜间活动量大,禁食 > 12 h 易造成血糖过低而死亡,不推荐使用 FBG,使用随机血糖操作性更强。STZ 注射后的血糖变化表现为急性 3 期反应:(1)早期高血糖(2 ~ 4 h):肝糖原分解,胰岛素释放受到抑制;(2)低血糖(6 ~ 10 h):胰岛 β 细胞被破坏,胰岛素大量释放;(3)稳定高血糖(24 h 后):胰岛 β 细胞呈现不同程度的损伤,胰岛素含量下降^[4]。故多数研究在至少 72 h 后测量血糖。

胰腺受损后胰腺导管中干细胞可以分化成胰岛细胞,即胰岛功能的自行缓解^[85-87]。高鑫等^[28]表明在 10 d 内自然缓解率较高,最好成模 10 d 后再

做实验,减少自愈的干扰。邵俊伟等^[56]研究显示 FBG 在 1 周后达高峰,2 周基本稳定,推测其和 STZ 引起的慢性炎症、自身免疫系统机制相关。张巨彪等^[72]建议在建模后 3、7、14 d 测血糖,14 d 的血糖依然稳定者纳入实验。魏占英等^[58]研究显示 STZ 注射 9 d 后,FBG ≥ 20 mmol/L 的大鼠血糖始终维持较高的水平,反映内源性胰岛素分泌功能较差;FBG < 10 mmol/L 大鼠的血糖随后会出现一定程度的下降;FBG 处于 10 ~ 19.9 mmol/L 的稳定性好,更适合 T2DM 的研究。FBG 在 10 d 内波动,17 d 后基本稳定^[88]。汪峰等^[89]诱导 T1DM 模型发现自愈都发生在 STZ 注射 3 周内,3 周后趋于稳定且长期维持,建议至少连续 3 周监测,确保模型质量。魏泽宁^[90]等建立 T1DM 模型,对于单次给药未成模的大鼠,1 周后给予同剂量 STZ 补救,补救组均成模且和首次成模组血糖值无统计学差异,但在组织器官上的差异未探究。对于血糖过高(> 30 mmol/L)的大鼠,在不影响实验的前提下,可给予胰岛素适当维持生命周期^[30,77]。

大鼠 DM 诊断尚未标准化,但有 3 点共识:(1)同一实验中对照组和造模组采用同一方法测血糖,即动物均处于空腹或非空腹状态;(2)同一实验不同时使用 FBG 和非空腹血糖来判定;(3)高血糖被定义为模型组的血糖明显高于对照组,有统计学意义^[9]。对于 T2DM,高胰岛素—正常血糖钳夹术是测定胰岛素敏感性的金标准方法^[91]。糖耐量、胰岛素耐受程度、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)等可进一步评价模型的胰岛素分泌能力和组织对胰岛素的敏感性^[92]。

4 其他因素

周卫民等^[93]探究了光照对 STZ 诱导的大鼠模型的影响,光照可能会影响动物的内分泌和饮食,动物房内笼架的设置和顶部照明很难保证动物接收同等光照,离光源近、光照较强处,大鼠成模率较低,反之越高,但对模型的稳定性影响不大,提示光照也是一个影响因素。某些未知的环境条件和刺激可能会增加 STZ 诱导 DM 的变异性,应尽量保证动物处在均一的条件下^[14]。

5 结语

STZ 诱导造模是较理想且实用的 DM 造模方法,其缺点是价格昂贵,以非常快速、不自然的方式

诱发 DM,因此上述任何方案都无法精准地模拟人类 DM^[24]。模型的长度取决于研究目的,从几天的急性研究到数周的并发症研究,对于并发症研究,还应考虑如何保证动物的存活时间^[12]。T2DM 模型成模后最好继续维持 HFD^[94],或者后续再次注射 STZ 来维持模型稳定^[9]。目前 DM 动物模型分类较简单,临床上分类更加细致,如根据 T2DM 的持续时间和严重程度分为:FBG 受损型、糖耐量受损型,再考虑到血脂、炎症因素等分型,STZ 诱导的 DM 大鼠模型能否有更细致的分类有待研究^[12,24]。

参 考 文 献(References)

- [1] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the international diabetes federation diabetes atlas, 9th edition[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 157: 107843.
- [2] Islam MS, Loots du T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2009, 31(4): 249-261.
- [3] Dunn JS, Sheehan HL, Mclethie NGB. Necrosis of islets of langerhans produced experimentally[J]. Lancet, 1943, 241(6242): 484-487.
- [4] Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review)[J]. Acta Physiol Hung, 2014, 101(4): 408-420.
- [5] Rakietyen N, Rakietyen ML, Nadkarni MR. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)[J]. Cancer Chemother Rep, 1963, 29: 91-98.
- [6] Szkuldeshi T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in beta cells of the rat pancreas[J]. Physiol Res, 2001, 50(6): 536-546.
- [7] 周吉银,周世文. 链脲菌素和四氧嘧啶诱导糖尿病大鼠模型的比较[J]. 江西中医学院学报, 2006, 18(4): 44-46.
Zhou JY, Zhou SW. Comparison of diabetic rat models induced by streptozotocin and alloxan[J]. J Jiangxi Univ TCM, 2006, 18(4): 44-46.
- [8] Lazar M. Resistance of the rabbit to streptozotocin[J]. Lancet, 1968, 2(7574): 919.
- [9] Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats[J]. Curr Protoc Pharmacol, 2015, 70: 5.47.1-5.47.20.
- [10] 农慧,盛庆寿,梁健,等. STZ 诱导糖尿病大鼠模型的研究[J]. 广西医科大学学报, 2010, 27(1): 69-72.
Nong H, Sheng QT, Liang J, et al. Study on the model of diabetic rats induced by STZ[J]. J Guangxi Med Univ, 2010, 27(1): 69-72.
- [11] 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, 16(4): 301-304.
Guo XJ, Zou YM, Wu L, et al. Factors affecting the diabetic models induced by streptozotocin in SD and Wistar rats[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2008, 16(4): 301-304.
- [12] 陈枫,程锦楠,唐小平,等. 大鼠品系及药物剂量对糖尿病大鼠模型的影响[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(2): 156-158.
Chen F, Cheng JN, Tang XP, et al. Effects of streptozotocin dosage and the strains of rats on establishing diabetes mellitus animal model[J]. J Luzhou Med Univ, 2011, 34(2): 156-158.
- [13] Bell RC, Khurana M, Ryan EA, et al. Gender differences in the metabolic response to graded numbers of transplanted islets of langerhans[J]. Endocrinology, 1994, 135(6): 2681-2687.
- [14] Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, et al. Single dose streptozotocin induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models[J]. Lab Anim, 2011, 45(3): 131-140.
- [15] Ostenson CG, Grill V, Roos M. Studies on sex dependency of B-cell susceptibility to streptozotocin in a rat model of type II diabetes mellitus[J]. Exp Clin Endocrinol, 1989, 93(2-3): 241-247.
- [16] Cortright RN, Collins HL, Chandler MP, et al. Diabetes reduces growth and body composition more in male than in female rats[J]. Physiol Behav, 1996, 60(5): 1233-1238.
- [17] 李莉,陈光亮,韩茹,等. 多次低剂量链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病模型的方法学研究[J]. 安徽医药, 2012, 16(7): 888-890.
Li L, Cheng GL, Han R, et al. Methodology research of rat diabetic model induced by streptozotocin several times[J]. Anhui Med Pharmaceutical J, 2012, 16(7): 888-890.
- [18] 蒋升,谢自敬,张莉. 链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型稳定性观察[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(1): 16-18.
Jiang S, Xie ZJ, Zhang L. Observation of stability of type 1 diabetic rat models induced by streptozotocin[J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(1): 16-18.
- [19] 陈静,冯波,王成,等. 大鼠体重对 1 型糖尿病造模成功率的影响[J]. 现代医药卫生, 2014, 30(5): 670-671.
Chen J, Feng B, Wang C, et al. Influence of body mass on the success rate of modeling in type 1 diabetes[J]. J Modern Med Health, 2014, 30(5): 670-671.
- [20] 张新兰,张兰. 体重因素对链脲佐菌素所致糖尿病大鼠模型的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(5): 179.
Zhang XL, Zhang L. Effect of body weight on streptozotocin induced diabetic rats[J]. J Liaoning Univ Tradt Chin Med, 2008, 10(5): 179.
- [21] 黄琛,顾志峰,曹晓蕾,等. 1 型糖尿病大鼠模型建立及稳定性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(3): 49-51.
Huang S, Gu ZF, Cao XL, et al. Establishment and stability of type 1 diabetic rats model[J]. J Modern Lab Med, 2007, 22(3): 49-51.
- [22] 章成昌,谢光荣,姜玉涛,等. 链脲菌素制备 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J]. 安徽医药, 2012, 16(9): 1241-1244.
Zhang CC, Xie GR, Jiang YT, et al. Study on the model of type 2 diabetic rats with streptozotocin[J]. Anhui Med Pharmaceutical

- J, 2012, 16(9): 1241-1244.
- [23] Wang FY, Garyantes T. Improving the reliability and utility of streptozotocin-induced rat diabetic model [J]. J Diabetes Res, 2018, 2018; 8054073
- [24] Skovsø S. Modeling type II diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin [J]. Diabetes Investig, 2014, 5(4): 349-358.
- [25] Brøndum E, Nilsson H, Aalkjaer C. Functional abnormalities in isolated arteries from Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated diabetic rat models [J]. Horm Metab Res, 2005, 37(S1): 56-60.
- [26] 陈玥, 苏丹, 贵文娟, 等. 实验动物与人类年龄相关性研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 116-122.
- Chen Y, Su D, Gui WJ, et al. Advances in research on the correlation of ages between laboratory animals and humans [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 116-122.
- [27] Reynold AE. Possible animal models for diabetes mellitus: syndromes involving toxic or immune etiology [M]. Holland: Elsevier Science Publishers BV, 1983.
- [28] 高鑫, 侯积寿, 左静南, 等. 链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病模型 [J]. 上海第二医科大学学报, 1988, 8(3): 199-202.
- Gao X, Hou JT, Zuo JN, et al. Diabetes model induced by streptozotocin in rats [J]. J Shanghai Sec Med Univ, 1988, 8(3): 199-202.
- [29] 黄波, 刘学政, 庞东渤. 不同途径注射链脲佐菌素致大鼠糖尿病模型的研究 [J]. 锦州医学院学报, 2003, 24(1): 19-21.
- Huang B, Liu XZ, Pang DB. Study on diabetic model of rats induced by streptozotocin [J]. J Jinzhou Med College, 2003, 24(1): 19-21.
- [30] 叶桐江, 郑博文, 赵琳, 等. 链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型的最佳禁食时间与最优剂量 [J]. 兰州大学学报(医学版), 2019, 45(2): 52-55.
- Ye TJ, Zheng BW, Zhao L, et al. Optimal fasting time and dose of streptozotocin-induced diabetic rat model [J]. J Lanzhou Univ (Med Sci), 2019, 45(2): 52-55.
- [31] 卢慧, 胡波, 黄倩. 链脲菌素诱导的糖尿病大鼠模型制作成本研究 [J]. 生物数学学报, 2007, 22(3): 509-514.
- Lu H, Hu B, Huang Q. Study on the production cost of streptozotocin induced diabetic rat model [J]. J Biomathematics, 2007, 22(3): 509-514.
- [32] 熊煜欣, 杨莹, 陶文玉, 等. STZ 小剂量多次与大剂量单次腹腔注射诱导糖尿病大鼠模型的研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(9): 9-12.
- Xiong YX, Yang Y, Tao WY, et al. Research on streptozotocin induced diabetic rats by low dose repeated and large dose with a single intraperitoneal injection [J]. J Kunming Med Univ, 2014, 35(9): 9-12.
- [33] 苏力坦卡扎·仇曼, 何铁英, 林海, 等. 链脲佐菌素建立 1 型糖尿病大鼠模型的最优剂量研究 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2016, 23(1): 84-85.
- Qiuman SLTKZ, He TY, Lin H, et al. Study on the optimal dose of streptozotocin in the model of type 1 diabetic rats [J]. Chin J Bases Clin General Surg, 2016, 23(1): 84-85.
- [34] 李钊至, 吕敏, 梁魏, 等. 糖尿病大鼠模型的建立及评价 [J]. 基层医学论坛, 2017, 21(1): 4-5.
- Li ZZ, Lv M, Liang W, et al. Establishment and evaluation of diabetes rat model [J]. Med Forum, 2017, 21(1): 4-5.
- [35] 郭延敏. 链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠模型的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 15(8): 109-110.
- Guo YM. Study on diabetic rat model induced by streptozotocin [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2012, 15(8): 109-110.
- [36] Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2012, 237(5): 481-490.
- [37] Masiello P, Broca C, Gross R, et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide [J]. Diabetes, 1998, 47(2): 224-229.
- [38] 翁琰, 奚苗苗, 朱艳荣, 等. 烟酰胺联合链脲佐菌素诱导 2 型糖尿病大鼠模型的研究 [J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(12): 1571-1573, 1578.
- Weng Y, Xi MM, Zhu YR, et al. Study on the model of type 2 diabetic rats induced by nicotinamide and streptozotocin [J]. Shanxi Med J, 2013, 42(12): 1571-1573, 1578.
- [39] Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(2): 88-98.
- [40] Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, et al. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study [J]. Lancet, 2009, 373(9682): 2215-2221.
- [41] Ghasemi A, Jeddi S. Anti-obesity and anti-diabetic effects of nitrate and nitrite [J]. Nitric Oxide, 2017, 70: 9-24.
- [42] Tabak AG, Jokela M, Akbaraly TN, et al. Trajectories of glycemia, insulin sensitivity and insulin secretion preceding the diagnosis of type 2 diabetes: the whitehall II study [J]. Lancet, 2009, 373(9682): 2215-2221.
- [43] Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes [J]. J Clin Invest, 2006, 116(7): 1802-1812.
- [44] 祁秀茹, 王红杰. 高脂饮食联合链脲佐菌素诱导 2 型糖尿病大鼠模型的研究进展 [J]. 河北医药, 2015, 37(21): 3308-3310.
- Qi XR, Wang HJ. Research progress of high fat diet combined with streptozotocin induced type 2 diabetic rats [J]. Hebei Med J, 2015, 37(21): 3308-3310.
- [45] Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. Metabolism, 2000, 49(11): 1390-1394.
- [46] 林燕超, 吴佩文, 林东. 链脲佐菌素诱导 SD 大鼠糖尿病模型的影响因素 [J]. 中国社区医师, 2017, 33(35): 7-8, 11.
- Lin YC, Wu PW, Lin D. Influence factors of streptozotocin induced diabetic model in SD rats [J]. Chin Community Doctors, 2017, 33(35): 7-8, 11.
- [47] 向雪松, 王竹, 祝宇铭, 等. 链脲佐菌素注射剂量对建立 2 型

- 糖尿病大鼠模型的影响[J]. 卫生研究, 2010, 39(2): 138-142.
- Xiang XS, Wang Z, Zhu YM, et al. Dosage of streptozocin in inducing rat model of type 2 diabetes mellitus[J]. J Hygiene Res, 2010, 39(2): 138-142.
- [48] 张芳林, 李果, 刘优萍, 等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其糖代谢特征分析[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(1): 18-22.
- Zhang FL, Li G, Liu YP, et al. Rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2002, 10(1): 18-22.
- [49] 陆少君, 曾伟斌, 臧林泉. 2 型糖尿病大鼠模型制备实验研究[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(5): 624-628.
- Lu SJ, Zeng WB, Zang LQ. Experimental study on the preparation of type 2 diabetic rats [J]. J Guangdong Pharmaceutical Univ, 2017, 33(5): 624-628.
- [50] 桑延霞, 张军军. 膳食联合 STZ 诱导胰岛素抵抗的 2 型糖尿病大鼠模型的建立[J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(6): 789-792, 808.
- Sang YX, Zhang JJ. Establishment of type 2 diabetic rat model with insulin resistance induced by diet combined with STZ[J]. J Guangdong Pharmaceutical Univ, 2019, 35(6): 789-792, 808.
- [51] 杨架林, 李果, 刘优萍, 等. 长期高脂饮食加小剂量链脲佐霉素建立人类普通 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(3): 12-15.
- Yang JL, Li G, Liu YP, et al. Establishing a rat model similar to the adult patient of the general type 2 diabetes by long-term fat-enriched fed and lower dose of streptozocin-treated rats[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2003, 11(3): 12-15.
- [52] Islam MS, Choi H. Nongenetic model of type 2 diabetes: a comparative study[J]. Pharmacology, 2007, 79(4): 243-249.
- [53] 徐文平. 不同浓度 STZ 腹腔注射与 2 型糖尿病大鼠模型建立[J]. 中国民康医学, 2013, 25(9): 32-33.
- Xu WP. Establish the rat model of type 2 diabetes mellitus by injecting different dosage of streptozocin[J]. Med J Chin People's Health, 2013, 25(9): 32-33.
- [54] 李桂云, 吴正治. STZ 建立 2 型糖尿病大鼠模型的剂量探讨[J]. 深圳中西医结合杂志, 2007, 17(2): 74-77.
- Li GY, Wu ZZ. Study on the best dosage of streptozocin in inducing rat model of type 2 diabetes mellitus[J]. Shenzhen J Integrated Tradit Chin Western Med, 2007, 17(2): 74-77.
- [55] 肖艳红, 谷佳琦, 杨晔娟, 等. 高脂高糖饲料联合 STZ 诱导 2 型糖尿病大鼠模型 STZ 最佳剂量探讨[J]. 承德医学院学报, 2015, 32(5): 376-378.
- Xiao YH, Gu JQ, Yang YJ, et al. Study on optimal dose of stz in type 2 diabetes mellitus rats' model induced by high-fat and high-sugar diet combined stz[J]. J Chengde Med College, 2015, 32(5): 376-378.
- [56] 邵俊伟, 蔡逊, 马丹丹, 等. SD 大鼠 2 型糖尿病模型的建立与评价[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2014, 21(10): 1212-1215.
- Shao JW, Cai X, Ma DD, et al. Establishment and evaluation of type 2 diabetes SD rat model[J]. Chin J Bases Clin General Surg, 2014, 21(10): 1212-1215.
- [57] 何清华, 周迎生, 王征, 等. 2 型糖尿病大鼠模型制备的影响因素及其特点[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(6): 425-429, 490.
- He QH, Zhou YS, Wang Z, et al. Influencing factors in the development of rat model of type 2 diabetes mellitus and their characteristics[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2007, 15(6): 425-429, 490.
- [58] 魏占英, 沈丽, 冯晓慧, 等. 高脂饲料喂养时间和 STZ 剂量对建立 2 型糖尿病大鼠模型的影响[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(2): 42-46.
- Wei ZY, Shen L, Feng XH, et al. Effects of high-fat diet feeding time and streptozotocin dose on establishment of a rat model of type 2 diabetes mellitus[J]. J Med Res, 2014, 43(2): 42-46.
- [59] 周迎生, 高妍, 李斌, 等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(3): 154-158, 196.
- Zhou YS, Gao Y, Li B, et al. A rat model of type 2 diabetes mellitus induced by high fat chow and low dose streptozotocin injection[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2005, 13(3): 154-158, 196.
- [60] 张汝学, 贾正平, 李茂星, 等. 实验性 2 型糖尿病大鼠模型的建立和评价(Ⅲ、Ⅳ)—血脂水平和血浆糖代谢相关激素的变化[J]. 西北国防医学杂志, 2008, 29(6): 401-404.
- Zhang RX, Jia ZP, Li MX, et al. Establishment and evaluation of type 2 diabetic rat model(I): changes of body weight, plasma glucose level and hepatic glycogen content[J]. Med J National Defending Forces Northwest Chin, 2008, 29(6): 401-404.
- [61] 刘霆, 张桂珍, 卜丽莎, 等. STZ 小剂量多次注射诱导大鼠胰岛依赖性糖尿病动物模型探讨[J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(6): 578-580.
- Liu T, Zhang GZ, Bu LS, et al. Study on the animal model of insulin-dependent diabetes mellitus induced by STZ injection[J]. J Bethune Med Univ, 2001, 27(6): 578-580.
- [62] 曾新生, 姚微微, 丁芝祥, 等. 腹腔注射链脲佐菌素构建糖尿病大鼠模型[J]. 华夏医学, 2013, 26(5): 895-897.
- Zeng XS, Yao WW, Ding ZX, et al. Diabetic rat model built by intraperitoneal injection of streptozotocin [J]. Acta Med Sin, 2013, 26(5): 895-897.
- [63] 孟召祥, 高静, 张俊辉, 等. 多次小剂量 STZ 处理建立糖尿病大鼠模型及 EGF 与 Gastrin 联合应用对胰岛素分泌的影响[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(10): 1771-1774.
- Meng ZX, Gao J, Zhang JH, et al. Multiple low-dose STZ treatments to establish a diabetic rat model and the effect of combined application of EGF and Gastrin on insulin secretion[J]. Chin J Lab Diagn, 2013, 17(10): 1771-1774.
- [64] 林心君, 王麒又, 辛金钟, 等. 高成模率和高稳定性的糖尿病大鼠模型制备—高脂高糖膳食+STZ 体重联合体表面积法构建糖尿病大鼠模型[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(9): 2051-2054.
- Lin XJ, Wang QY, Xin JZ, et al. The study of establishing a

- highly stable and successful diabetic rat model [J]. Chin J Gerontol, 2013, 33(9): 2051-2054.
- [65] Zhang M, Lv XY, Li J, et al. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model[J]. Exp Diabetes Res, 2009, 2008(6): 704045.
- [66] 陈昕涛, 王敏君, 严文韬, 等. 1 型糖尿病动物模型和干细胞治疗的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31(4): 327-330.
- Chen XT, Wang MJ, Yan WT, et al. Research progress in animal model of type 1 diabetes and stem cell therapy [J]. Carcinog Teratogen Mutagen, 2019, 31(4): 327-330.
- [67] 李鑫, 杨慧霞. 实验性妊娠糖尿病大鼠模型的研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2012, 21(8): 648-650.
- Li X, Yang HX. Research progress of experimental gestational diabetes rat model[J]. Prog Obstet Gynecol, 2012, 21(8): 648-650.
- [68] López-Soldado I, Herrera E. Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring [J]. Exp Diabetes Res, 2003, 4(2): 107-118.
- [69] 崔雅忠, 杨丹, 张倩, 等. STZ 诱导的 2 型与 1 型糖尿病大鼠模型的对比研究[J]. 医学研究杂志, 2018, 47(5): 36-38.
- Cui YZ, Yang D, Zhang Q, et al. A comparative study of STZ induced type 2 and type 1 diabetic rats[J]. J Med Res, 2018, 47(5): 36-38.
- [70] 袁鑫, 蔡雪洲, 谢航, 等. 改良 2 型糖尿病大鼠模型的构建 [J]. 湖北科技学院学报 (医学版), 2014, 28(6): 472-474.
- Yuan X, Cai XZ, Xie H, et al. The construction of the improved type 2 diabetic model of rats[J]. J Hubei Univ Sci Tech (Med Sci), 2014, 28(6): 472-474.
- [71] 徐华, 何毅, 张鸣号, 等. 1 型糖尿病大鼠模型的建立及糖尿病并发症相关指标的测定[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(1): 90-92.
- Xu H, He Y, Zhang MH, et al. Establishment of model of type 1 diabetic rats and determination of diabetic complications related indexes[J]. J Ningxia Med Univ, 2010, 32(1): 90-92.
- [72] 张巨彪, 苏秀兰, 欧阳晓晖. 1 型糖尿病大鼠模型的建立及观察[J]. 医学综述, 2013, 19(2): 335-337.
- Zhang JB, Su XL, Ouyang XH. Establishment and observation of type 1 diabetic rat models[J]. Med Recapitulate, 2013, 19(2): 335-337.
- [73] 李娜娜, 马淑君, 周立. 1 型糖尿病大鼠模型制备经验[J]. 四川解剖学杂志, 2010, 18(3): 30-32.
- Li NN, Ma SJ, Zhou L. Experience of prepaion for type 1 diabetic rat model[J]. Sichuan J Anatomy, 2010, 18(3): 30-32.
- [74] 沈亚非, 徐焱成. 链脲佐菌素诱导实验性糖尿病大鼠模型建立的研究[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2005, 19(2): 79-80.
- Shen YF, Xu YC, et al. Study on experimental diabetes animal model in rats induced by streptozotocin[J]. J Practical Diagnosis Therapy, 2005, 19(2): 79-80.
- [75] 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.
- Chang LM, Dong JS, Xu H, et al. Establishment of SD rat model of type 1 diabetes mellitus [J]. Shanxi Med J, 2009, 38(3): 218-220.
- [76] 吴瑛, 张勇, 姚合斌. 高脂联合小剂量链脲佐菌素建立实验性 2 型糖尿病大鼠模型 [J]. 转化医学杂志, 2017, 6(6): 355-357.
- Wu Y, Zhang Y, Yao HB. Study of streptozotocin and high-fat diet inducing type 2 diabetes in a rat model[J]. Transl Med J, 2017, 6(6): 355-357.
- [77] 冯云华, 杨莹, 张瑛, 等. 从护理角度谈以 STZ 行 SD 大鼠糖尿病造模的对策 [J]. 昆明医学院学报, 2012, 33(3): 147-148.
- Feng YH, Yang Y, Zhang Y, et al. From the point of view of nursing, the countermeasures of diabetic model of SD rats with STZ[J]. J Kunming Med Univ, 2012, 33(3): 147-148.
- [78] 李楠, 王天奇, 何嘉玲, 等. 实验动物的安乐死及其实施方法的伦理分析[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 128-132.
- Li N, Wang TJ, He JL, et al. Ethical analysis of euthanasia methods for experimental animals[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(10): 128-132.
- [79] 毕文杰, 郑翔. 慢性束缚应激致大鼠持续性高血糖症与孤束核损伤有关[J]. 解剖学报, 2019, 50(4): 423-430.
- Bi WJ, Zheng X. Persistent hyperglycemia induced by chronic restraint stress in rat is associated with nucleus tractus solitarius injury[J]. Acta Anatomica Sin, 2019, 50(4): 423-430.
- [80] 申彦菊, 彭岚, 廖芝玲, 等. STZ 复制实验性 2 型糖尿病大鼠模型过程及经验总结 [J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(6): 821-823.
- Shen YJ, Peng L, Liao ZL, et al. Preparation and experience of rat model of type 2 diabetes induced by streptozotocin [J]. J Guangxi Med Univ, 2011, 28(6): 821-823.
- [81] 武燕, 袁红, 田环环, 等. 链脲佐菌素诱导 2 型糖尿病大鼠模型的探索[J]. 中医学报, 2014, 29(1): 25-27.
- Wu Y, Yuan H, Tian HH, et al. Streptozotocin induced type 2 diabetic rat model[J]. Acta Chin Med, 2014, 29(1): 25-27.
- [82] Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus[J]. Clin Chem, 2011, 57(6): e1-e47.
- [83] Matteucci E, Giampietro O. Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 115(2): 163-172.
- [84] King AJ. The use of animal models in diabetes research[J]. Br J Pharmacol, 2012, 166(3): 877-894.
- [85] 杜丽坤, 赵莹, 杜立杰, 等. 实验性糖尿病动物模型的建立 [J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(5): 581.
- Du LK, Zhao Y, Du LJ, et al. Establishment of experimental diabetes animal model [J]. Modern J Integrated Tradit Chin Western Med, 2004, 13(5): 581.
- [86] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. In vivo reprogramming of

- adult pancreatic exocrine cells to beta-cells[J]. *Nature*, 2008, 455(7213): 627–632.
- [87] Li W, Nakanishi M, Zumsteg A, et al. In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes[J]. *Elife*, 2014, 3(13): e01846.
- [88] 王艳, 刘蔚, 王征. 应用链脲左菌素构建 SD 大鼠 2 型糖尿病模型效果的研究[J]. *湖南农业科学*, 2012, 4(7): 130–132. Wang Y, Liu W, Wang Z. Construction of type 2 diabetic SD rat model by streptozotocin[J]. *Hunan Agr Sci*, 2012, 4(7): 130–132.
- [89] 汪峰, 杨国珍, 刘宓, 等. 链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型稳定性观察[J]. *贵阳医学院学报*, 2012, 37(1): 40–42. Wang F, Yang GZ, Liu M, et al. The stability of type 1 diabetes rat model induced by STZ and discussion on standards of successful modeling[J]. *J Guiyang Med College*, 2012, 37(1): 40–42.
- [90] 魏泽宁, 张凤成, 李传洁, 等. 1 型糖尿病大鼠模型的制备及建模失败后补救措施与效果[J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2016, 17(3): 135–139. Wei ZN, Zhang FC, Li CJ, et al. Establishment of type 1 diabetic rat models and effect of remedial measures for failed model[J]. *Chin J Prosthodont*, 2016, 17(3): 135–139.
- [91] Chao PC, Li Y, Chang CH, et al. Investigation of insulin resistance in the popularly used four rat models of type-2 diabetes[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 155–161.
- [92] Ghasemi A, Tohidi M, Derakhshan A, et al. Cut-off points of homeostasis model assessment of insulin resistance, beta-cell function, and fasting serum insulin to identify future type 2 diabetes: tehran lipid and glucose study[J]. *Acta Diabetol*, 2015, 52(5): 905–915.
- [93] 周卫民, 寿旗扬, 王德军, 等. 光照不均匀性对糖尿病大鼠模型成模率及稳定性的影响[J]. *浙江中医药大学学报*, 2010, 34(2): 153–154. Zhou WM, Shou QY, Wang DJ, et al. Influence of light inhomogeneity on the establishment of diabetes rat model[J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2010, 34(2): 153–154.
- [94] 陈欣, 文武, 郁正亚. 高糖高脂饲料联合小剂量链脲佐菌素制备 SD 大鼠 2 型糖尿病模型[J]. *中国医药导刊*, 2015, 17(7): 737–738, 740. Chen X, Wen W, Yu ZY. Preparation of rat model of type 2 diabetes mellitus with high glucose and high fat diet combined with low dose of streptozotocin[J]. *Chin J Med Guide*, 2015, 17(7): 737–738, 740.

[收稿日期] 2020-04-28

叶淑姿,肖芳. 原发性头痛动物模型的建立及评价方法的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 726-732.

Ye SZ, Xiao F. Advances in the establishment and evaluation of animal models of primary headache [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 726-732.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.05.020

原发性头痛动物模型的建立及评价方法的研究进展

叶淑姿,肖芳*

(中南大学湘雅公共卫生学院卫生毒理学系,长沙 410078)

【摘要】 原发性头痛是高致残率的疾病之一,往往于青壮年时期发病,患者在承受痛苦的同时也给社会带来沉重的疾病负担,然而其发病机制尚不明确。切实可靠的原发性头痛动物模型的建立有助于探索原发性头痛的发病机制并研发预防治疗的药物,本文将从模型建立的原理方法评价、适用范围以及各模型的优缺点等方面对现有原发性头痛动物模型的建立及评价方法的研究进展进行综述。

【关键词】 原发性头痛;偏头痛;紧张性头痛;动物模型;建立方法;评价方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 05-0726-07

Advances in the establishment and evaluation of animal models of
primary headache

YE Shuzi, XIAO Fang*

(Department of Heath Toxicology, School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China)

Corresponding author: XIAO Fang. E-mail: fangxiao@csu.edu.cn

【Abstract】 Primary headache is a condition with a high disability rate, particular in young adults. It not only brings suffering to the patients but also places a heavy burden on society. However, the pathogenesis of primary headache is still unclear. The establishment of reliable animal models of primary headache is helpful to explore the pathogenesis and develop drugs for prevention and treatment. Here, we comprehensively summarize animal models of primary headache in recent years from the perspectives of animal model principles, methods evaluations, scope of application, and advantages and disadvantages.

【Keywords】 primary headache; migraine headache; tension type headache; animal models; establishment methods; evaluation methods

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

偏头痛(migraine headache, MH)和紧张性头痛(tension type headache, TTH)是原发性头痛中最常见的两种类型。其中 MH 是以自主神经功能紊乱为特征,常伴有视物模糊、畏光、怕声等视觉、感觉异常等症状^[1]。TTH 则是以额、颞及枕部轻度或中度疼痛为主的无搏动性钝痛为特征,常伴有头部肌群的痉挛性收缩及压痛^[2]。国际头痛学会(International Headache Society, IHS)在 2013 年对头痛疾病进行了科学分类^[3],同时研究表明原发性头痛与焦虑、抑郁等不良心理症状存在正相关^[4]。2017 年 9 月,《Lancet Neurology》报道截至 2015 年神经系统疾病成为伤残调整寿命年(disability

[基金项目] 2020 年中南大学研究生科研创新项目(2020zzts795)。
Funded by Research and Innovation Project Graduate Students of Central South University in 2020 (2020zzts795)。

[作者简介] 叶淑姿(1996—),女,硕士研究生,研究方向:毒理学研究。Email: shuziye@csu.edu.cn

[通信作者] 肖芳(1982—),女,博士,副教授,博士生导师,研究方向:毒理学研究。Email: fangxiao@csu.edu.cn

adjusted life years, DALYs) 的主要影响因素, 分别占全球 DALYs 和死亡总人口的 10.2% 和 16.8%, 其中最常见神经系统疾病即为 MH 和 TTH^[5]。目前原发性头痛病因学研究发现其发病与遗传因素、内分泌因素、饮食因素、精神因素以及身体其他疼痛部位继发相关, 现有关于原发性头痛的学说有血管源性学说^[6]、皮层扩散性抑制学说^[7]、三叉神经血管学说^[8]以及基因学说^[9], 然而其发病机制至今尚未完全阐明。建立动物疾病模型是探索人类疾病本质及开发评价相应治疗药物的重要方法和手段。目前研究者们根据不同的病因学说理论建立了不同的原发性头痛动物疾病模型, 本文将通过综述近年来 MH 和 TTH 的实验动物疾病模型建立及评价方法的研究进展, 分析不同原发性头痛动物疾病模型的适用范围及其优缺点, 为进一步研究原发性头痛发病机制提供一定的理论基础和依据。

1 MH 动物模型

1.1 硝酸甘油 (nitroglycerin, NTG) 模型

1.1.1 NTG 动物模型原理

NTG 可使三叉神经核尾部和中脑导水管周围灰质神经元的兴奋性增强^[10], 提高脊髓背角对伤害性信息的传入反应, 进而使支配脑膜的三叉神经传入支产生迟发和长效的痛觉敏化^[11], 降低痛觉的阈值。NTG 是一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的供体物质之一, 可刺激机体促使其血管平滑肌释放 NO 引起颅内血管扩张产生头痛^[12], 同时 NO 通过弥散作用活化鸟苷酸环化酶, 可促使血管平滑肌松弛, 导致颅内血管异常扩张继而引发头痛。此外, NO 可以介导降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 等多种神经肽的释放, 触发神经源性炎症, 参与 MH 发作^[13]。

1.1.2 NTG 动物模型的建立方法

NTG 动物模型的建立方法包括 NTG 皮下注射^[14]、静脉注射^[15]和腹腔注射^[16], 其中以腹腔注射的方法最为常用。根据 MH 发作时间的长短可分为急性 MH 和慢性 MH, 同时 NTG 动物模型也可根据不同的模型制备方法模拟人群的急、慢性 MH。宋丹宁等^[17]对 220 ~ 260 g 的成年雄性 Wistar 大鼠进行一次臀部注射 10 mg/kg NTG (5 mg/mL, 含 30% 乙醇、30% 丙二醇和水) 建立急性 NTG 模型。制备慢性 NTG 模型的方法主要有以下三种。刘燕等^[14]采用 180 ~ 220 g 的 SD 雄性大鼠, 对其进行颈

背部皮下注射 NTG (10 mg/kg) 造模, 每周 1 次, 连续 3 周。Pradhan 等^[18]用 NTG 注射液 (5.0 mg/mL, 用适量生理盐水稀释后, 以 10 mg/kg 的剂量) 对 20 ~ 30 g 雌雄各半的 C57BL6/J 小鼠进行腹腔注射, 隔天 1 次, 连续 9 d, 共 5 次。Sufka 等^[19]采用体重为 250 ~ 330 g 的 SD 大鼠, 同时进行 NTG 的单次注射和重复注射 (每三天 1 次, 持续两周, 共 5 次) 造模, 根据国际头痛疾病分类第三版 (ICDH-3-Beta) 诊断标准比较单次和重复注射 NTG 大鼠的行为终点。

1.1.3 NTG 动物模型评价

NTG 动物模型成功建立的评价标准主要包括行为学评价和生物学评价两种。行为学观察指标主要有造模后异常症状出现与消失的时间、单次注射 NTG 模型 2 h 内单位时间内挠头、甩头、爬笼的次数增加^[19]、机械性痛觉和热痛觉过敏 (表现为机械痛阈和热痛阈下降^[1]), 重复注射 NTG 的模型动物可出现压力相关行为、活动度降低、畏光以及体重增量减少^[19]。耳红是该模型的特异性症状, 通常在 NTG 注射 2 ~ 3 min 即可出现, 并持续 3 h 左右^[20]。生物学指标可显示注射 NTG 后, 三叉神经节、硬脑膜的诱导型一氧化氮合酶 (inductive nitric oxide synthase, iNOS) 和原癌基因 *c-fos* 的 mRNA 表达^[21]水平较空白组明显升高, 中脑降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP) 基因表达也显著上升^[14]。

1.1.4 NTG 动物模型的适用范围及优缺点

NTG 动物模型制备中使用的动物易于获得、制备方法简单经济, 且能在短时间内大量复制, 能观察到动物在清醒状态下的行为学改变。特别是慢性 NTG 模型的建立能有效模拟急性 MH 向慢性 MH 的转变过程, 其中畏光等症状符合 ICDH-3-Beta 偏头痛的诊断标准, 具有临床同源性, 可用于开发治疗慢性 MH 的临床药物。但 NTG 动物模型的缺点在于其缺乏特异性, 对颅内血管起广泛性作用, 且全身反应也比较大。

1.2 皮层扩散性抑制 (cortical spreading depression, CSD) 模型

1.2.1 CSD 动物模型原理

该动物模型是基于 20 世纪 40 年代 Leao 首次提出的 CSD 学说^[22], 该学说认为脑血流改变主要受神经系统的调控^[23]。细胞内外离子的动态平衡受到体内外伤害性信息的影响, 机体一旦接收到伤害性信息, 便可产生一过性的去极化反应, 出现 MH

先兆症状^[24]。CSD 是发生于神经元和神经胶质细胞中传播缓慢的去极化波,速率约为 2 ~ 5 mm/min,持续约 1 min,随后出现数分钟的脑电活动抑制^[25]。此外,CSD 也可使三叉神经血管系统(trigeminovascular system, TGVS)活化,进而导致脑膜中血流量增加以及血浆蛋白外渗^[24]。

1.2.2 CSD 动物模型的建立方法

CSD 动物模型可由高 K⁺、兴奋性氨基酸(如 N-甲基天冬氨酸,NMDA)、针刺或电刺激等因素诱发。石宏等^[26]用高 K⁺和电针针刺法诱导 SD 成年大鼠(体重为 180 ~ 220 g),麻醉后进行股动脉插管并连接压力传感器,于脑立体定位仪固定,用 PCLab 生物信号采集系统连续监测各生理参数,保证其均在正常范围内。在保持硬脑膜完整的情况下,于颅顶开一个 CSD 的诱导窗口。电针组用电针针刺方法诱导产生 CSD,在诱导窗口小孔内进针并避开粗脑血管的位置;KCl 诱导组则是将浸有 3 mol/L KCl 溶液的滤纸敷于小孔上,每 10 min 更换 1 次,持续 1 h。也有报道如 Kaufmann 等^[27]选取 20 ~ 35 g 的 C57BL/6J 小鼠,局部用 KCl 诱发 CSD。

1.2.3 CSD 动物模型评价

CSD 动物模型的行为学观察指标主要包括造模后异常症状出现与消失的时间、单位时间内理毛、挠头、舔爪、无目的咀嚼、转向及甩头动作等。僵直是 CSD 动物模型特异性行为,尤其是持续 2 ~ 3 s 的短暂性僵直^[28]。有研究表明,注射 NMDA 1 h 内,可出现突然静止不动的僵直行为。用内源性成像方法可观测动物发生僵直行为后脑电波的传播图像,也可用电生理的方法验证模型是否成功建立^[26]。由于 CSD 动物模型是可通过诱导神经元泛通道连接蛋白(pannexin1, PANX1)去极化后通道开放,与活化的嘌呤能 P2X7 受体结合后形成 P2X7-PANX1 复合体,进而产生一系列生物学效应,最终引起 MH。因此,生物学指标表现为 PANX1 下游信号通路的 NO、P 物质、CGRP 等递质的释放以及原癌基因 *c-fos*、神经生长因子等表达的改变^[29]。

1.2.4 CSD 动物模型的适用范围及优缺点

此模型的 MH 发病机制与神经学说基本吻合,其中兴奋性氨基酸 NMDA 诱导造模法较为方便,手术创面小,造模成功率高,模型症状相似,重复性好。MH 动物模型可模拟有先兆症状的 MH,可用于研发先兆性 MH 治疗的临床药物。上述针刺法和高 K⁺法需在动物麻醉的状况下进行,故无法观察到

CSD 模型动物的行为学变化,且对操作技术要求高。

1.3 硬脑膜神经炎症模型

1.3.1 硬脑膜神经炎症动物模型原理

硬脑膜神经炎症动物模型是基于三叉神经血管学说而建立的,通过研究痛觉传导通路包括 TGVS 激活、敏化的重要作用进而探索 MH 的发病机制^[30]。MH 发生时,伤害性刺激信息通过三叉神经节传入,经感觉神经上行传导系统传入脑干、丘脑、皮质等痛觉中枢,引发头痛。与此同时,活化周围神经使其神经末梢释放血管活性促炎肽,如 CGRP、P 物质、神经激肽 A(neurokinin A, NKA)等,进而引发血管扩张和 MH 症状^[31]。

1.3.2 硬脑膜神经炎症动物模型的建立方法

目前,制备硬脑膜炎症动物模型主要借助“炎症汤”和辣椒素等化学刺激物以及电刺激硬脑膜来模拟。电刺激大鼠上矢状窦区硬脑膜模型,实际就是刺激三叉神经支配的硬脑膜血管系统及周边部位,进而激活 TGVS。TGVS 的激活和敏化主要表现为 CGRP 释放,神经源性硬脑膜血管扩张,硬脑膜血浆蛋白渗出等^[32]。吴蕾等将 5 ~ 6 周 SD 大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪,暴露出矢状缝、冠状缝以及部分人字缝后钻孔,垂直插入电极,单笼饲养适应性后第 8 天开始电刺激,每次 2 h,连续 3 d,电压为 3 ~ 5 V(电压确定标准:大鼠随电刺激出现节律性点头或者颤动胡须)^[32]。也可采用致炎剂刺激硬脑膜来建立硬脑膜神经炎症动物模型^[33]。20 世纪 80 年代, Moskowitz 等^[34]在实验中发现,电刺激三叉神经节能够引发无菌性脑膜炎。对 SD 大鼠进行每天 1 次,为期 21 d 的硬脑膜灌注“炎症汤”和皮下注射苯甲酸利扎曲坦可建立大鼠药物过量性头痛动物模型(MOH)^[35]。

1.3.3 硬脑膜神经炎症动物模型评价

面部机械痛阈值改变是硬脑膜神经炎症动物模型的特异性指标,因此可通过使用电子式机械测痛仪检测模型动物痛阈变化情况来判断模型是否建立成功。此外,硬脑膜神经炎症动物模型可见机械性痛觉过敏、行走距离减少、活动度增加、伤害性行为、焦虑和抑郁样行为、谷氨酸与 CGRP 等行为和生物学改变。Vurali 等^[36]在使用不同浓度的化学刺激物时,动物的行为学改变存在剂量依赖性,如行走距离减少,活动量增加,探索行为减少,且有研究表明雌性动物在更低的浓度下即可出现行为学改变^[37]。MOH 动物模型除了会出现以上硬脑膜神经

炎症动物模型的相关表现,还出现中脑导水管周围灰质 Toll 样受体 4(toll-like receptor4,TLR-4)的表达量升高^[35]。

1.3.4 硬脑膜神经炎症动物模型的适用范围及优缺点

三叉神经血管学说是目前较为完善的 MH 发病机制学说,具有一定的科学性和可行性,因此基于该学说的硬脑膜神经炎动物模型成为实验性 MH 动物模型的首选。然而该模型也存在不足之处,其使用的化学性刺激物可对血脑屏障造成损伤^[38],引起慢性硬脑膜炎,直接引发头痛而非该 MH 模型。而通过电刺激建立的上矢状窦模型,由于建模过程中动物处于麻醉状态,因此无法进行行为学观察。此外,该模型的建立对实验室和实验人员的手术操作方法技术要求高,不易在短时间内大量复制。

1.4 转基因 MH 动物模型

转基因 MH 动物模型是基于 MH 的一种罕见的常染色体显性遗传性疾病家族性偏瘫型偏头痛(familial hemiplegic migraine,FHM)。FHM 包括有 3 种亚型:FHM1 型、FHM2 型和 FHM3 型。其中的 FHM1 型是由编码 Ca^{2+} 通道的 *CACNA1A* 基因发生了突变^[39],FHM2 型是由于编码 Na^+/K^+ -ATP 酶的 *ATP1A2* 基因发生了突变^[39],而 FHM3 型是由于编码神经元电压门控 Na^+ 通道的 $\alpha 1$ 亚基的 *SCNA1A* 基因发生了突变^[40]。将 *CACNA1A* 基因中的点突变基因 *R192Q*^[41-43] 和 *S218 L*^[44-45] 分别转入啮齿类动物的基因中,插入 *R192Q* 突变基因的小鼠整体神经兴奋性增加, Ca^{2+} 通道功能增强,三叉神经血管中的 CGRP 受体敏感性降低^[43],具有 *S218 L* 突变基因的小鼠表现出更弱的 Ca^{2+} 相关去极化的电流强度,更强的 CSD 敏感性,且存在 MH 发生的临床同源性症状,如自发性畏光等^[45]。

1.4.1 转基因 MH 动物模型的建立方法

该动物模型采用胚胎干细胞同源重组的方法,人为将 MH 相关的基因导入啮齿类动物^[46]。研究者^[46]通过同源重组的方法在小鼠的同源基因 *CACNA1A* 的相应位置引入人类的 *R192Q* 突变基因,编码 Cav2.1 $\alpha 1$ 亚基。嵌合小鼠出生并通过生殖系传递 *R192Q KI + NEO* 等位基因,接着将该嵌合小鼠与腺病毒 EIIA 早期启动子控制下表达 Cre 重组酶的转基因小鼠进行杂交去除 *NEO* 基因,不断杂交使杂合子纯化成为 *R192Q KI* 小鼠。纯合子 *R192Q KI* 小鼠无明显表型,通过 Southern 印迹分析来证实

R192Q KI 纯合小鼠的正确同源重组。随后又将 *S218 L* 突变基因导入小鼠 *CACNA1A* 基因,通过表型、分子和电生理结果分析,探讨 *S218 L* 综合征的发病机制^[45]。

1.4.2 转基因 MH 动物模型评价

该动物模型通过使用基因靶向方法人为将 MH 相关的基因转入啮齿类动物,可导致一些离子通道改变,皮层谷氨酸能神经传递和 CSD 易感性发生改变^[43],因此可采用与 CSD 模型相同的检测评价方式,如电生理、表型和分子等进行分析。转基因 MH 动物模型麻醉后打开颅骨进行活体观察可见小鼠硬脑膜血管扩张,离体三叉神经节尾核,三叉神经节和硬脑膜中的 CGRP 含量升高^[43]。

1.4.3 转基因 MH 动物模型的适用范围及优缺点

转基因小鼠由于生存繁殖等原因,无法短期内进行大量复制,且 FHM 的发病机制与一般 MH 的发病机制在一定程度上存在差异,所得到的实验结果外推可行性差,但转基因头痛动物模型考虑到 MH 存在的遗传易感性,从基因分子遗传角度研究 MH,尤其是对 FHM 发病机制的研究具有不可或缺的作用。

2 TTH 动物模型

目前常用 ATP 颈部肌肉注射的方法建立 TTH 动物模型。

2.1 ATP 颈部肌肉注射致 TTH 动物模型原理

TTH 的发病可能受颅周肌障碍、心理、神经介质、中枢调节机制紊乱等多种因素影响^[47],慢性 TTH 常伴有颅周围组织的触痛增加^[48]。头颈部肌肉受到外界刺激可增加颅骨肌筋膜的触痛,这与 TTH 的产生高度相关^[47]。头颈部肌肉受损带来的伤害性信息传入中枢神经,致使皮层、丘脑、硬脑膜等感觉神经元对痛觉易敏,通过颈部注射外源性刺激物能诱发颈部肌肉疼痛,该痛觉作用于脑部感觉神经元网络,产生异源性突出易化^[49],进而产生 TTH。

2.2 ATP 颈部肌肉注射致 TTH 动物模型的建立方法

ATP 颈部肌肉注射致 TTH 动物模型,是现今国内外公认的 TTH 动物模型^[50]。将 ATP 作为外源性刺激物诱发颈部肌肉疼痛,异源性突出易化,最终引发 TTH。Nobel 等^[50]用 2% 异氟醚持续性麻醉雄性 Wistar 大鼠,右股动脉、静脉留置管进行监测给

药,使用动脉导管持续注入含 1 IU/mL 肝素的生理盐水,并将大鼠固定于脑立仪,备皮后钻颅窗并用生理盐水保持湿润,分离颈部肌肉用夹子夹住,最后切开寰枕韧带,露出下面的硬脊膜。将稳定的 ATP 类似物 α 、 β -5'-三磷酸腺苷(α , β -meATP, 10 mmol/L)注入同侧颞肌,30 min 后在同侧颈部肌肉和/或颞肌内注射 2%利多卡因进行局部麻醉,期间常规检查和记录大鼠的麻醉程度、心率、血压,并用脑膜、颞肌和颈肌的传入信息记录三叉神经脊髓神经元的持续活动。王谦等^[49]通过半棘肌注射 1 μ mol/L α , β -meATP 也成功建立 TTH 动物模型。

2.3 ATP 颈部肌肉注射致 TTH 动物模型评价

通过监测张颌反射(jaw-opening reflex, JOR)可判断是否成功建模。JOR 是通过监测电刺激舌肌的传入神经完成^[50],当 ATP 颈部肌肉注射致 TTH 动物模型建模后, JOR 的疼痛阈值较建模前降低。首先,将两根能释放矩形脉冲时长 500 μ s, 频率 0.1 Hz, 每组为 8 次脉冲的电极插入舌右侧缘,再将两根记录电极插入右侧二腹肌前腹,记录通过电刺激舌肌诱发出的 JOR, 5 min 重复 1 次。在得到稳定的基线后,注射 α , β -meATP 引发异源性突出易化并持续观察 60 min,记录二腹肌肌电和脑干诱发电位或记录 JOR 发生的潜伏期及波幅反映肌筋膜敏感程度^[50],最后与正常组进行对比判断。

2.4 ATP 颈部肌肉注射致 TTH 动物模型的适用范围及优缺点

ATP 颈部肌肉注射致 TTH 动物模型是由稳定的 ATP 类似物 α , β -meATP 引发异源性突出易化,其模拟头颈部伤害性信息传入中枢增强的发病机制,具有良好的科学可行性,可用于研发治疗发作性 TTH 的相关药物,但不适用于其他受体靶向治疗药物的研究^[51],且实验条件要求高,不易大量复制。

3 结语

建立并使用动物模型有利于对原发性头痛的发病机制和治疗方法进行深入研究,从而将基础实验与临床应用衔接。以上各个动物模型虽分别在不同方面模拟人类原发性头痛发病,但没有一个模型可以完全模拟其发病机制。通过对过去研究的分析,我们可知评价一个原发性头痛动物模型是否成功建立往往可以从行为学和生物学两个方面进行综合判断。其中行为学指标包含有特异性和非特异性,然而仍有部分动物模型的这些指标仍不够

完善,缺乏特异性和规范性。而生物学指标往往是多个信号通路的下游分子事件,无法全面显现模型的作用机制,不利于预防和治疗药物的研发,因此也需要对模型的中游分子进行分析,找出特异性指标。因此受体特异性高、制备周期短、操作简便、切实可靠的病理机制、且有简单高效的评价标准的原发性头痛动物模型是我们未来探索研究的方向。

参考文献(References)

- [1] 赵永烈, 刘金民, 岳广欣, 等. 芎芷地龙汤不同时间预防给药对偏头痛动物模型痛阈及血管活性物质的影响[J]. 中医药学报, 2016, 44(5): 28-35.
Zhao YL, Liu JM, Yue GX, et al. Effect of xiongzhi dilong decoction preadministration at different time on pain threshold and vasoactive substances on migraine animals[J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2016, 44(5): 28-35.
- [2] García-Azorín D, Farid-Zahran M, Gutiérrez-Sánchez M, et al. Tension-type headache in the emergency department diagnosis and misdiagnosis: the teddi study[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 2446.
- [3] Headache classification committee of the International Headache Society (IHS) the international classification of headache disorders, 3rd edition[J]. Cephalalgia, 2018, 38(1): 1-211.
- [4] 赵昕. 原发性头痛肝火上扰证和焦虑、抑郁的相关性分析[D]. 北京中医药大学, 2019.
Zhao X. Correlation analysis of the correlation between the disturbance and anxiety and depression of primary headache liver fire[D]. Beijing University of Chinese Medicine, 2019.
- [5] Feigin VL, Abajobir AA, Abate KH, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015[J]. Lancet Neurol, 2017, 16(11): 877-897.
- [6] Wen KX, Ikram MA, Franco OH, et al. Association of migraine with calcification in major vessel beds: the rotterdam study[J]. Cephalalgia, 2019, 39(8): 1041-1048.
- [7] Filiz A, Tepe N, Eftekhari S, et al. CGRP receptor antagonist MK-8825 attenuates cortical spreading depression induced pain behavior[J]. Cephalalgia, 2019, 39(3): 354-365.
- [8] Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K, et al. CGRP as the target of new migraine therapies-successful translation from bench to clinic[J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14(6): 338-350.
- [9] Fan C, Wolking S, Lehmann-Horn F, et al. Early-onset familial hemiplegic migraine due to a novel SCN1A mutation[J]. Cephalalgia, 2016, 36(13): 1238-1247.
- [10] Kilinc E, Dagistan Y, Kukner A, et al. Salmon calcitonin ameliorates nitroglycerin-induced migraine pain through inhibition of calcitonin-gene related peptide release from trigeminal neurons and C-Fos expression in trigeminal nucleus caudalis in rats[J]. Acta Physiol, 2017, 221: 72.
- [11] He W, Long T, Pan Q, et al. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 beta release and contributes to central

- sensitization in a recurrent nitroglycerin-induced migraine model [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 78.
- [12] 陈敏, 于生元. 慢性偏头痛动物模型研究进展[J]. 解放军医学院学报, 2016, 37(3): 286-288, 297.
- Chen M, Yu SY. Advances in animal models with chronic migraine[J]. *Acad J Chin PLA Med Sch*, 2016, 37(3): 286-288, 297.
- [13] Wattiez AS, Wang M, Russo AF. CGRP in animal models of migraine[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2019, 255: 85-107.
- [14] 刘燕, 赵永烈, 刘金民. 散偏汤对偏头痛模型大鼠中脑、三叉神经节 CGRP、PENK 基因、蛋白表达的影响[J]. 中国中医急症, 2018, 27(8): 1325-1328, 1336.
- Liu Y, Zhao YL, Liu JM. Effect of sanpian decoction on cgrp, penk gene and protein expression in mesencephalon and trigeminal ganglion of migraine model rats [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2018, 27(8): 1325-1328, 1336.
- [15] Iversen HK, Olesen J, Tfelt-hansen P. Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. Basic characteristics[J]. *Pain*, 1989, 38(1): 17-24.
- [16] Abad N, Rosenberg JT, Roussel T, et al. Metabolic assessment of a migraine model using relaxation-enhanced H-1 spectroscopy at ultrahigh field[J]. *Magn Reson Med*, 2018, 79(3): 1266-1275.
- [17] 宋丹宁, 尚坤, 李娜, 等. 当归川葛颗粒对硝酸甘油致大鼠偏头痛的影响及机制[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(2): 269-270.
- Song DN, Shang K, Li N, et al. Effect and mechanism of angelica chuange granule on nitroglycerin induced migraine in rats [J]. *Chin J Gerontol*, 2017, 37(2): 269-270.
- [18] Pradhan AA, Smith ML, McGuire B, et al. Characterization of a novel model of chronic migraine [J]. *Pain*, 2014, 155(2): 269-274.
- [19] Sufka KJ, Staszko SM, Johnson AP, et al. Clinically relevant behavioral endpoints in a recurrent nitroglycerin migraine model in rats[J]. *J Headache Pain*, 2016, 17: 40.
- [20] 蒲玉婷, 王小强, 杨思进, 等. 颅痛颗粒对偏头痛模型大鼠行为学及 NF- κ B 信号转导通路的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(4): 569-573.
- Pu YT, Wang XQ, Yang SJ, et al. Effects of lutong granules on behaviors and NF- κ B signal transduction pathway in migraine rats [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2019, 36(4): 569-573.
- [21] 赵永烈, 王永丽, 胡坤, 等. 芎芷地龙汤不同时间预防给药对偏头痛动物模型 iNOS mRNA、c-fos mRNA 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2017, 26(4): 568-571.
- Zhao YL, Wang YL, Hu K, et al. Effect of Xiongzi Dilong decoction preadministration at different time on iNOS mRNA, c-fos mRNA expression in migraine animal [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2017, 26(4): 568-571.
- [22] Leao AA. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex [J]. *J Neurophysiol*, 1947, 10(6): 409-414.
- [23] 姜磊, 于生元, 董钊. 实验性偏头痛动物模型研究现状[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(8): 62-64.
- Jiang L, Yu SY, Dong Z. The Status quo of experimental animal models of migraine [J]. *Chin J Comp Med*, 2008, 18(8): 62-64.
- [24] 周莉. 苹果酸阿莫曲坦对偏头痛大鼠行为及中脑导水管周围灰质 Fos 蛋白表达的影响[D]. 苏州大学, 2017.
- Zhou L. The impact of almotriptan malate on the behavior and expression of Fos protein in periaqueductal gray of migraine rats [D]. Soochow University, 2017.
- [25] Kissoon NR, Cutrer FM. Aura and other neurologic dysfunction in or with migraine[J]. *Headache*, 2017, 57(7): 1179-1194.
- [26] 石宏, 李江慧, 吉长福, 等. 电针对偏头痛大鼠的皮层扩展性抑制以及对血浆降钙素基因相关肽、P 物质含量的影响[J]. 针刺研究, 2010, 35(1): 17-21.
- Shi H, Li JH, Ji CF, et al. Effect of electroacupuncture on cortical spreading depression and plasma cgrp and substance P contents in migraine rats [J]. *Acupunct Res*, 2010, 35(1): 17-21.
- [27] Kaufmann D, Bates EA, Yagen B, et al. sec-Butylpropylacetamide (SPD) has antimigraine properties [J]. *Cephalalgia*, 2016, 36(10): 924-935.
- [28] 杨梦丽, 唐闻晶, 于生元. 皮层扩布性抑制与偏头痛的相关研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2019, 25(8): 614-617, 623.
- Yang ML, Tang WJ, Yu SY. Research progress of cortical spreading inhibition and migraine [J]. *Chin J Pain Med*, 2019, 25(8): 614-617, 623.
- [29] Chen SP, Qin T, Seidel JL, et al. Inhibition of the P2X7-PANX1 complex suppresses spreading depolarization and neuroinflammation [J]. *Brain*, 2017, 140(6): 1643-1656.
- [30] Fan PC, Lai TH, Hor CC, et al. The alpha 6 subunit-containing GABA (A) receptor: A novel drug target for inhibition of trigeminal activation [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 140: 1-13.
- [31] Ramachandran R. Neurogenic inflammation and its role in migraine [J]. *Semin Immunopathol*, 2018, 40(3): 301-314.
- [32] 吴蕾. 电刺激矢状窦偏头痛模型大鼠的小直径三叉神经元兴奋性的改变及离子通道机制[D]. 苏州大学, 2017.
- Wu L. Changes of excitability and ion channels in small diameter trigeminal ganglion neurons in migraine model of rats [D]. Soochow University, 2017.
- [33] 黄倩. CGRP 诱导神经源性炎症偏头痛模型大鼠行为学的研究[D]. 吉林大学, 2015.
- Huang Q. Migraine model rat behavior research of neurogenic inflammation induced by CGRP [D]. Jilin University, 2015.
- [34] Moskowitz MA. Basic mechanisms in vascular headache [J]. *Neurol Clin*, 1990, 8(4): 801-815.
- [35] 冉晔. 一种新型药物过量性头痛动物模型的建立[D]. 南开大学, 2015.
- Rang H. Establishment of a new animal model of medication overuse headache [D]. Nankai University, 2015.
- [36] Vuralli D, Wattiez AS, Russo AF, et al. Behavioral and

- cognitive animal models in headache research [J]. *J Headache Pain*, 2019, 20(1): 11.
- [37] Stucky NL, Gregory E, Winter MK, et al. Sex differences in behavior and expression of CGRP-related genes in a rodent model of chronic migraine [J]. *Headache*, 2011, 51(5): 674–692.
- [38] Arulmani U, Gupta S, Maassenvandenbrink A, et al. Experimental migraine models and their relevance in migraine therapy [J]. *Cephalalgia*, 2006, 26(6): 642–459.
- [39] Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene CACNL1A4 [J]. *Cell*, 1996, 87(3): 543–552.
- [40] De VB, Stam AH, Kirkpatrick M, et al. Familial hemiplegic migraine is associated with febrile seizures in an FHM2 family with a novel de novo ATP1A2 mutation [J]. *Epilepsia*, 2009, 50(11): 2503–2504.
- [41] Sutherland HG, Albury CL, Griffiths LR. Advances in genetics of migraine [J]. *J Headache Pain*, 2019, 20(1): 72.
- [42] Eikermann HK, Dilekoz E, Kudo C, et al. Genetic and hormonal factors modulate spreading depression and transient hemiparesis in mouse models of familial hemiplegic migraine type 1 [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(1): 99–109.
- [43] Chan KY, Labastida-Ramirez A, Ramirez-Rosas MB, et al. Trigemino-vascular calcitonin gene-related peptide function in Cacna1a R192Q-mutated knock-in mice [J]. *J Cerebr Blood F Met*, 2019, 39(4): 718–729.
- [44] Chanda ML, Tuttle AH, Baran I, et al. Behavioral evidence for photophobia and stress-related ipsilateral head pain in transgenic Cacna1a mutant mice [J]. *Pain*, 2013, 154(8): 1254–1262.
- [45] Van DMA, Pizzorusso T, Kaja S, et al. High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in Ca (V)2.1 S218L mice [J]. *Ann Neurol*, 2010, 67(1): 85–98.
- [46] van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, et al. A cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression [J]. *Neuron*, 2004, 41(5): 701–710.
- [47] Do TP, Heldarskard GF, Kolding LT, et al. Myofascial trigger points in migraine and tension-type headache [J]. *J Headache Pain*, 2018, 19(1): 84.
- [48] Alonso-blanco C, De-la-llave-rincon AI, Fernandez-de-las-penas C. Muscle trigger point therapy in tension-type headache [J]. *Expert Rev Neurother*, 2012, 12(3): 315–322.
- [49] 王谦, 赵永烈, 王良叶, 等. α , β -meATP 半棘肌注射致紧张性头痛动物模型的建立 [J]. *江西中医药*, 2014, 45(5): 30–32.
- Wang Q, Zhao YL, Wang LY, et al. Establishment of an animal model of tension headache induced by injection of musculus maximus α , β -meATP [J]. *Jiangxi J Tradit Chin Med*, 2014, 45(5): 30–32.
- [50] Ristic D, Ellrich J. P2X7 receptor blockade reverses purinergic facilitation of neck muscle nociception in mice [J]. *Cephalalgia*, 2012, 32(7): 544–553.
- [51] Nobel M, Feistel S, Ellrich J, et al. ATP-sensitive muscle afferents activate spinal trigeminal neurons with meningeal afferent input in rat-pathophysiological implications for tension-type headache [J]. *J Headache Pain*, 2016, 17(1): 75.

[收稿日期] 2020-04-13