

欧阳辰昕,王城,朱芮樟,等. 妊娠期糖尿病致子代先天性肾脏及尿路畸形大鼠模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (10): 32-39.

Ouyang CX, Wang C, Zhu RZ, et al. Establishment of a rat model of congenital abnormalities of the kidney and urinary tract in offspring due to gestational diabetes mellitus [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 32-39.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.005

妊娠期糖尿病致子代先天性肾脏及尿路畸形 大鼠模型的建立

欧阳辰昕^{1,2}, 王 城^{1,2}, 朱芮樟^{1,2}, 廖君左¹, 敬 鹏¹, 何文飞¹, 赵 丹^{1,2*}

(1. 川北医学院附属医院小儿外科, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院肝胆胰肠研究所, 四川 南充 637000)

【摘要】 目的 探索建立妊娠期糖尿病(GDM)致子代先天性肾脏及尿路畸形(CAKUT)SD大鼠模型的可行性。**方法** 自然合笼受孕的SD大鼠孕鼠30只,于孕1.5 d一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ),据STZ浓度将孕鼠随机分为5组:STZ 30 mg/kg组、STZ 35 mg/kg组、STZ 40 mg/kg组、溶剂对照组(注射同剂量溶剂柠檬酸钠缓冲液)、空白对照组(不注射任何液体),每组6只,孕期监测孕鼠体重、血糖、流产情况。分娩第1天,记录子鼠存活率,解剖子鼠并观察泌尿系统畸形情况;子鼠横截面HE染色,多切面观察肾、输尿管异常情况,测量子鼠肾皮质厚度。**结果** STZ 30、35、40 mg/kg 3组子鼠均观察到输尿管扩张积水(双侧均达单侧3倍以上)及肾发育不良,输尿管总积水率均超70%,HE染色镜下表现为输尿管扩张积水、输尿管壁发育不良、肾实质变薄、肾皮质厚度降低(较空白对照组减少20%以上)。3组孕鼠血糖均达建模标准,其中STZ 30 mg/kg组血糖均值低于40 mg/kg组($P<0.05$);STZ 35 mg/kg组血糖孕早期低于STZ 40 mg/kg组($P<0.05$),在孕中晚期无差异($P>0.05$)。仅STZ 40 mg/kg组孕鼠流产(流产率33.33%),3组子鼠存活率均低于空白对照组($P<0.05$)。**结论** GDM大鼠子代CAKUT模型的建立具备可行性,SD大鼠孕1.5 d一次性腹腔注射STZ 30 mg/kg方案,能安全稳定地使子鼠发生输尿管积水(单侧或双侧)和肾发育不良。

【关键词】 妊娠期糖尿病;先天性肾脏及尿路畸形;链脲佐菌素;子代;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0032-08

Establishment of a rat model of congenital abnormalities of the kidney and urinary tract in offspring due to gestational diabetes mellitus

OUYANG Chenxin^{1,2}, WANG Cheng^{1,2}, ZHU Ruizhang^{1,2}, LIAO Junzuo¹, JING Peng¹, HE Wenfei¹, ZHAO Dan^{1,2*}

(1. Department of Pediatric Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China.

2. Institute of Hepatobiliary and Pancreaticenteric Research, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000)

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of establishing a rat model of congenital abnormalities of the kidney and urinary tract (CAKUT) in offspring due to gestational diabetes mellitus (GDM). **Methods** Thirty naturally conceived SD rats were randomly divided into five groups by the concentration of streptozotocin (STZ) administered through a single intraperitoneal injection on day 1.5 of gestation: 30 mg/kg STZ, 35 mg/kg STZ, 40 mg/kg STZ, solvent control (injected with the same dose of sodium citrate buffer), and blank control (not injected with any liquid) group ($n=6$ in

【基金项目】 四川省卫生健康委员会科研课题(20PJ147);南充市科技项目市校科技战略合作专项(19SXHZ0113)。

【作者简介】 欧阳辰昕(1992—),男,硕士,研究方向:小儿泌尿、小儿普外。E-mail:534452086@qq.com

【通信作者】 赵丹(1982—),男,硕士,研究方向:小儿泌尿、小儿普外。E-mail:zd_5404@163.com

each group). Weight, blood glucose and abortion of pregnant rats were monitored during pregnancy. On the first day of delivery, the survival rates of offspring were calculated. Offspring were dissected and assessed for abnormalities of the urinary tract. HE staining of cross-sections of the offspring was performed, and renal and ureteral abnormalities were observed and recorded in multiple sections. Renal cortical thickness was measured in offspring. **Results** Ureteral dilatation and effusion (bilateral up to more than three times of unilateral) and renal dysplasia were observed in 30, 35 and 40 mg/kg STZ groups, and the total rates of ureteral effusion were >70%. HE staining revealed dilatation and effusion of the ureter, dysplasia of the ureteral wall, thinning of the renal parenchyma, and a reduction in the renal cortical thickness (more than 20% reduction compared with the blank control group). The blood glucose of all three groups reached the modeling standard, among which the mean blood glucose of the 30 mg/kg STZ group was lower than that of the 40 mg/kg STZ group ($P<0.05$). Blood glucose in the 35 mg/kg STZ group was lower than that in the 40 mg/kg STZ group during early pregnancy ($P<0.05$), and there was no difference during middle and late pregnancy ($P>0.05$). Only pregnant rats in the 40 mg/kg STZ group aborted (33.33% abortion rate), and survival rates in all three groups were lower than that in the blank control group ($P<0.05$). **Conclusions** Establishment of a CAKUT model in offspring of GDM rats is feasible, and one intraperitoneal injection of 30 mg/kg STZ on day 1.5 of gestation in SD rats safely and stably causes ureteral effusion (unilateral or bilateral) and renal dysplasia in offspring.

【Keywords】 gestational diabetes mellitus; congenital kidney and urinary tract malformation; streptozotocin; offspring; rat

先天性肾脏及尿路畸形 (Congenital abnormalities of the kidney and urinary tract, CAKUT), 是对一系列先天性泌尿系统畸形的统称, 约占全部先天性畸形的 20%~30%^[1], 主要包括肾发育不良、先天性输尿管积水、多囊肾、肾盂输尿管连接部梗阻、重复肾/肾盂/输尿管、输尿管膀胱连接部梗阻、膀胱输尿管反流以及后尿道瓣膜等, 当前 CAKUT 发生机制研究主要集中在经典遗传学领域, 如基因突变、基因拷贝数变异、染色体变异等^[2-3], 随着表观遗传学理论的普及, 宫内环境因素对子代 CAKUT 的诱发机制, 逐渐成为关注热点, 其中也包括妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM)。

GDM 是孕妇在妊娠期间首次发现的糖耐量异常, 是妊娠期常见的合并症之一^[4-5], 其在发展中及发达国家的发病率均逐年上升^[6-8], 可对母亲及子代产生长远危害, 其导致的畸形包括手足多指畸形、脊柱缺损、消化道畸形、神经系统畸形、先天性心脏病、先天性肾脏及尿路畸形等。国外 meta 分析指出: GDM 母亲子代患 CAKUT 的风险较正常人增加 39%^[9]。因此, 探索建立稳定有效的实验动物模型成为研究 GDM 导致子代 CAKUT 的第一步, 然而国外关于建立此类动物模型的研究报道不多, 国内尚无报道, 故本研究以此出发, 旨在探索并建立 GDM 导致子代 CAKUT 的稳定 SD 大鼠模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 10 周龄 SD 大鼠, 雌鼠 36 只, 雄鼠 18 只, 体重 240~260 g, 均购自川北医学院实验动物中心 [SCXK(川)2018-18], 饲养于川北医学院实验动物中心 [SYXK(川)2018-076], 饲养环境: 温度 20℃~25℃, 湿度约 50%, 12 h 昼夜明暗交替。饲料由动物中心统一供应 (北京科澳协力)。实验经川北医学院动物伦理审查委员批准 (IACUC-2022-03), 实验过程中对动物遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 上海源叶); pH 4.5 柠檬酸钠缓冲液 (北京索莱宝); 亚甲蓝注射液 (江苏济川); 4% 多聚甲醛 (安徽白鲨)。血糖仪及试纸 (湖南三诺, 安准型); 体视显微镜 (深圳奥斯微, T1-HD202); 正置显微镜 (日本尼康, Eclipse 55i); 电子分析天平 (上海良平, D1067428); 石蜡包埋机及冷冻台 (江苏普瑞斯星, PBM-A); 石蜡切片机 (德国莱卡, RM2245)。

1.3 实验方法

1.3.1 GDM 母鼠模型的构建

于晚间 20:00 将雌鼠与雄鼠 1:1 自然合笼, 次日晨 8:00 观察阴栓情况, 发现阴栓, 则记为孕 0.5 d (E 0.5)。按照受孕被检顺序, 选择 30 只孕鼠, 根据随机数字表法分到 5 组中 (STZ 30 mg/kg 组、STZ 35 mg/kg 组、STZ 40 mg/kg 组、溶剂对照组、空白对

照组), 每组 $n=6$ 。于 E 0.5 晚予以禁食(不禁水), 时长 14~16 h, E 1.5 根据 STZ 剂量分组情况, 予孕鼠一次性腹腔内注射柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5)配置的 1% STZ 溶液(1 mL 柠檬酸钠缓冲液溶入 10 mg STZ), 其中溶剂对照组注射等量柠檬酸钠缓冲液, 空白对照组不予注射任何液体。注射后, 5 组孕鼠均禁食 4 h(不禁水), 4 h 后予正常饮水、喂食。E 1.5、E 3.5、E 6.5、E 9.5、E 12.5、E 15.5、E 18.5 孕鼠尾尖采血监测随机血糖并记录孕鼠体重变化情况。成模标准: 孕期 3 次随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L。喂养期间若发现母鼠未孕, 予以剔除出组并补充至 $n=6$ 。

1.3.2 子鼠泌尿系统形态学观察

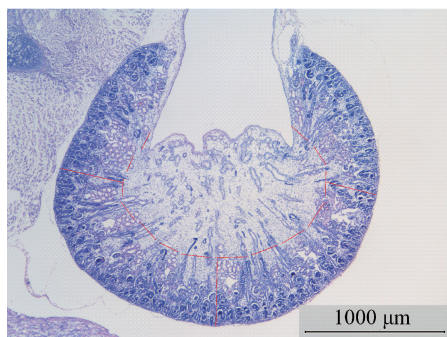
子鼠出生当天, 计算子鼠存活率(活仔数/产仔数), 颈椎脱臼法处死, 体视显微镜下操作, 子鼠仰卧位, 1 mL 针头固定四肢, 行下腹正中切口进入腹腔, 切口向上延伸至胸骨下缘, 棉签将腹腔内肝、胃肠道等脏器上拨, 修剪两侧腹壁及多余组织, 暴露后腹膜及泌尿系统, 记录畸形种类、数量, 亚甲蓝染色 30 s, Image view 软件拍照。

1.3.3 子鼠肾、输尿管 HE 染色及观察

子鼠泌尿系统连同躯干用 4% 多聚甲醛溶液固定, 常规脱水、透明、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色(HE 染色), 显微镜观察, NIS-Elements 软件采集图像。

1.3.4 子鼠肾皮质厚度测量

按等距原则随机抽取子鼠肾门横截面 HE 切片, 每组 3 张, 每张测量一侧肾, 每个肾取点 3 处, 如图 1, 用环状虚线标记肾皮髓质交界, 肾乳头方向记为 0° , 顺时针 90° 、 180° 、 270° 定位 3 处, 从定位点向各自对应肾被膜作垂直线段, 线段长度即为肾皮质厚度, NIS-Elements 软件测量。



注: 环状红线圈外: 肾皮质。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23 对数据进行统计分析, 计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)描述, 多样本计量资料采用单因素方差分析, 对不满足正态性、方差齐性者, 采用非参数检验; 计数资料率的统计采用卡方检验, 对超 1/4 单元格样本量不足 5 的, 采用 Fisher 确切概率法。

2 结果

2.1 各组孕鼠孕期体重变化

随孕期进展, 各组孕鼠体重均逐渐上升, 且 STZ 30、35、40 mg/kg 3 组均有不同程度“多饮、多食、多尿”症状。STZ 40 mg/kg 组 2 只孕鼠在孕中晚期流产, 变化不纳入统计。各时间点组间孕鼠体重无统计学差异($P>0.05$), 见表 1。

2.2 孕鼠血糖值对比

STZ 30、35、40 mg/kg 3 组孕鼠血糖均符合建模浓度, 且血糖均显著高于空白对照组($P<0.05$), 其中 40 mg/kg 组多次测血糖超血糖仪测定范围(>33.3 mmol/L, 表显“H1”), 并有 2 只孕鼠在孕中晚期流产。各组孕鼠随机血糖变化情况见表 2, 溶剂对照组与空白对照组各时间点相比, 无统计学差异($P>0.05$)。STZ 30 mg/kg 组与 35 mg/kg 组各时间点相比, 无统计学差异($P>0.05$)。STZ 40 mg/kg 组各时间点均显著高于 STZ 30 mg/kg 组($P<0.05$)。STZ 35 mg/kg 组与 40 mg/kg 组相比, 在孕中晚期, 有两个时间点(E 12.5 和 E 18.5)血糖值差异无统计学意义($P>0.05$), 这与 STZ 40 mg/kg 组孕鼠超出血糖仪检测范围的血糖值仅以 33.3 mmol/L 统计有关, STZ 40 mg/kg 组孕期血糖值实际可能更高。

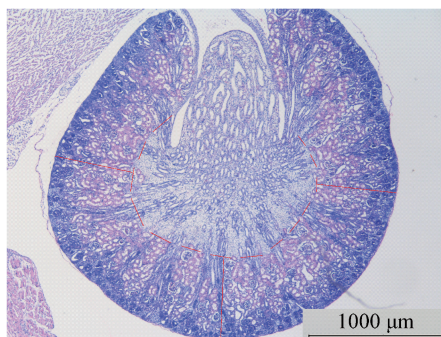


图 1 肾皮质厚度测量方式图解

Note. Outside the circular red line, Renal cortex.

Figure 1 Illustration of renal cortical thickness measurement modality

2.3 孕鼠分娩情况

各组孕鼠分娩情况见表 3、表 4, STZ 40 mg/kg 组 2 只孕鼠于孕中晚期流产, 流产率为 33.3%, 其余各组孕鼠流产率均为 0。STZ 30、35、40 mg/kg 3 组子鼠存活率均低于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。STZ 30、35、40 mg/kg 3 组子鼠存活率无差异 ($\chi^2=0.659, P>0.05$)。

2.4 子鼠泌尿系统畸形情况

体视显微镜下解剖活产子鼠, 溶剂对照组及空

白对照组输尿管均呈正常形态(图 2A), STZ 30、35、40 mg/kg 3 组均观察到输尿管扩张积水(图 2B 为双侧, 图 2C 为单侧)。表 5 为输尿管积水情况, STZ 30、35、40 mg/kg 3 组扩张积水总发生率均高于空白对照组 ($P<0.05$) 且均达 70% 以上; 比较 STZ 30、35、40 mg/kg 3 组间输尿管积水构成比无差异 ($\chi^2=1.384, P>0.05$), 即 3 组单侧积水率无差异、双侧积水率无差异, 且 3 组的双侧输尿管积水发生率均达单侧的 3 倍以上。

表 1 各组孕鼠不同时间点体重情况 ($\bar{x}\pm s, g$)

Table 1 Weight of pregnant rats in each group at different periods

组别 Groups	总只数(n) Total number	孕 1.5 d E 1.5	孕 3.5 d E 3.5	孕 6.5 d E 6.5	孕 9.5 d E 9.5	孕 12.5 d E 12.5	孕 15.5 d E 15.5	孕 18.5 d E 18.5
STZ 30 mg/kg 组 30 mg/kg STZ group	6	241.67±11.69	251.67±16.02	251.67±7.53	261.67±7.53	273.33±5.16	295.00±18.71	336.67±12.11
STZ 35 mg/kg 组 35 mg/kg STZ group	6	240.00±15.49	246.67±17.51	260.00±23.66	278.33±18.35	280.00±20.98	293.33±19.66	338.33±23.17
STZ 40 mg/kg 组 40 mg/kg STZ group	4	240.00±8.16	247.50±5.00	252.50±5.00	258.75±6.29	270.00±8.16	292.5±9.57	322.50±5.00
溶剂对照组 Solvent control group	6	243.33±5.16	251.67±7.53	258.33±7.53	268.33±7.53	276.67±5.16	301.67±7.53	346.67±16.33
空白对照组 Blank control group	6	238.33±4.08	246.67±5.16	253.33±5.16	265.00±8.37	270.00±6.32	293.33±5.16	340.00±10.95

表 2 各组孕鼠随机血糖对比 (mmol/L, $n=6, \bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of random blood glucose in each group of pregnant rats

组别 Groups	孕 1.5 d E 1.5	孕 3.5 d E 3.5	孕 6.5 d E 6.5	孕 9.5 d E 9.5	孕 12.5 d E 12.5	孕 15.5 d E 15.5	孕 18.5 d E 18.5
STZ 30 mg/kg 组 30 mg/kg STZ group	2.82±0.88	19.77±1.23 *	20.82±2.39 *	20.87±2.51 *	21.60±1.49 *	22.48±3.15 *	22.62±2.84 *
STZ 35 mg/kg 组 35 mg/kg STZ group	3.83±1.00	22.68±2.17 *	22.92±2.99 *	22.58±1.17 *	24.88±3.96 *	22.63±3.37 *	27.82±3.55 *
STZ 40 mg/kg 组 40 mg/kg STZ group	3.23±1.45	29.63±2.90 * [△]	29.60±3.17 * [△]	32.30±1.75 * [△]	30.37±2.85 * [△]	30.02±2.81 * [△]	31.17±3.35 * [△]
溶剂对照组 Solvent control group	3.17±0.87	5.67±0.71 [△]	5.88±0.38 [△]	6.17±0.71 [△]	5.90±0.65 [△]	5.57±0.81 [△]	5.37±0.59 [△]
空白对照组 Blank control group	3.45±0.40	5.78±0.67 [△]	5.97±0.80 [△]	5.52±0.60 [△]	5.58±0.55 [△]	5.57±0.63 [△]	4.98±0.37 [△]

注: 与空白对照组相比, * $P<0.05$; 与 STZ 30 mg/kg 组相比, [△] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the blank control group, * $P<0.05$. Compared with the 30 mg/kg STZ group, [△] $P<0.05$.

表 3 孕鼠流产情况 ($n=6$)

Table 3 Abortion of pregnant rats

组别 Groups	流产只数(n) Number of abortions	流产率 Miscarriage rate
STZ 30 mg/kg 组 30 mg/kg STZ group	0	0
STZ 35 mg/kg 组 35 mg/kg STZ group	0	0
STZ 40 mg/kg 组 40 mg/kg STZ group	2	33.33%
溶剂对照组 Solvent control group	0	0
空白对照组 Blank control group	0	0

表 4 各组子鼠存活率

Table 4 Survival rate of offspring rats in each group

组别 Groups	产仔数(n) Number of births	活仔数(n) Number of live births	存活率 Survival rate
STZ 30 mg/kg 组 30 mg/kg STZ group	80	73	91.25%
STZ 35 mg/kg 组 35 mg/kg STZ group	79	71	89.87%
STZ 40 mg/kg 组 40 mg/kg STZ group	45	39	86.67%
溶剂对照组 Solvent control group	77	76	98.70%
空白对照组 Blank control group	72	70	97.22%

2.5 子鼠肾及输尿管 HE 染色组织形态学观察

2.5.1 镜下子鼠肾、输尿管异常

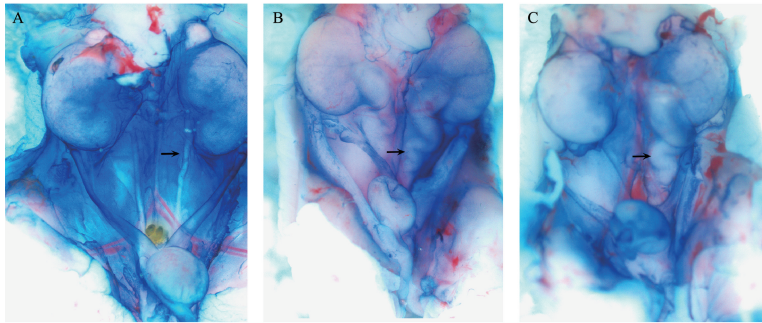
子鼠肾门部横截面 HE 染色全景图见图 3A, STZ 30、35、40 mg/kg 3 组均观察到输尿管扩张积水,肾发育不良(图 3B)。

与溶剂对照组及空白对照组相比,STZ 30、35、40 mg/kg 3 组子鼠肾实质发育不良,皮质变薄(图 4A、图 4B),输尿管结构异常,表现为管壁发育不

良,细胞层数减少(图 4C、图 4D)。

2.5.2 子代肾皮质厚度测定

测量方式见本文 1.3.4。如图 5 所示,STZ 30、35、40 mg/kg 3 组肾皮质厚度两两比较均无差异($P>0.05$);溶剂对照组及空白对照组皮质厚度无差异($P>0.05$)。STZ 30、35、40 mg/kg 3 组分别与空白对照组进行两两比较,肾皮质厚度均小于空白对照组($P<0.05$),厚度减少量均在 20% 以上。

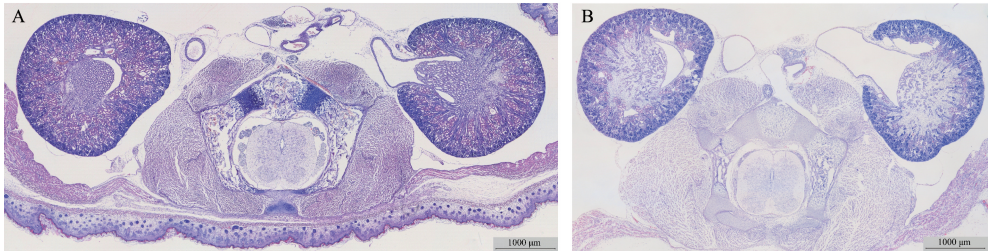


注:A:正常输尿管;B:双侧输尿管积水;C:单侧输尿管积水。→:输尿管。
Figure 2 Illustration of the ureter of the offspring rats
Note. A, Normal ureter. B, Bilateral ureteral effusion. C, Unilateral ureteral effusion. →, Ureter.

表 5 活产子鼠输尿管积水情况
Table 5 Ureteral effusion in surviving offspring rats

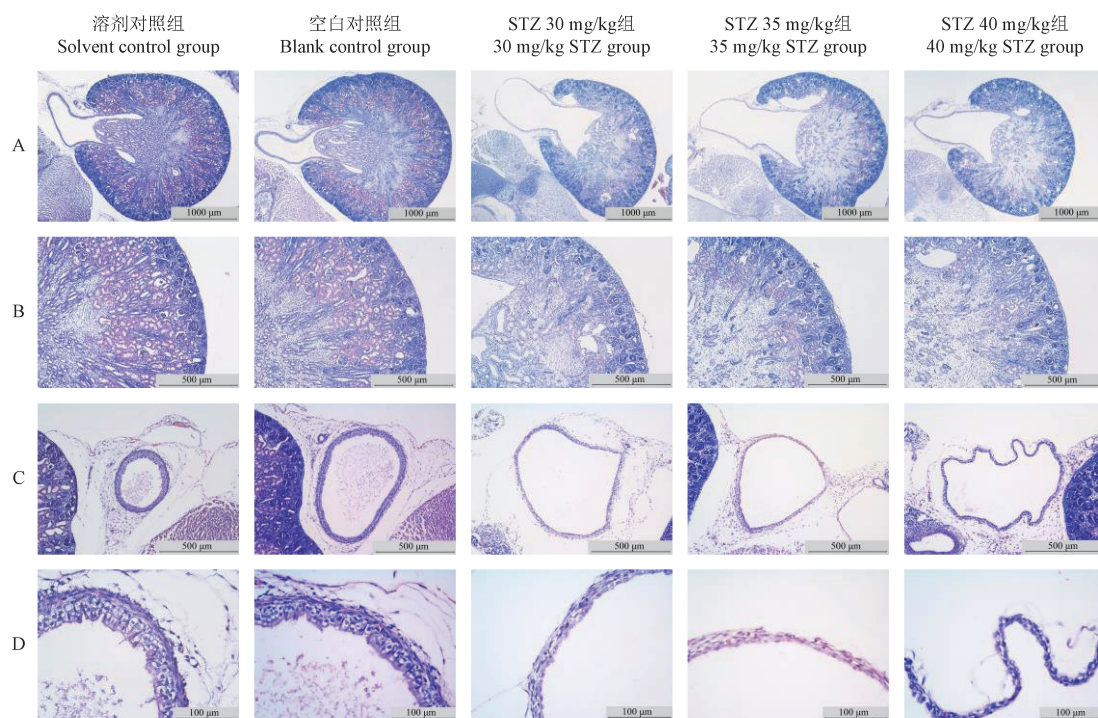
组别 Groups	单侧积水数 Unilateral ureteral effusions number	双侧积水数 Bilateral ureteral effusions number	总积水数 Total ureteral effusion number	正常数 Normal ureteral number
STZ 30 mg/kg 组 30 mg/kg STZ group	13(17.8%)	45(61.6%)	58(79.5%)	15(20.5%)
STZ 35 mg/kg 组 35 mg/kg STZ group	10(14.1%)	44(62.0%)	54(76.1%)	17(23.9%)
STZ 40 mg/kg 组 40 mg/kg STZ group	7(17.9%)	26(66.7%)	39(84.6%)	6(15.4%)
溶剂对照组 Solvent control group	0	0	0	76(100%)
空白对照组 Blank control group	0	0	0	70(100%)

注:():占所在组比例。
Note. (), Proportion in its group.



注:A:正常的肾及输尿管;B:输尿管积水、肾发育不良。
Figure 3 子鼠肾门部横截面全景图(HE 染色)

Note. A, Normal kidney and ureter. B, Ureteral effusion and renal dysplasia.
Figure 3 Cross-sectional panoramic view of the kidney hilum of the offspring rats (HE staining)

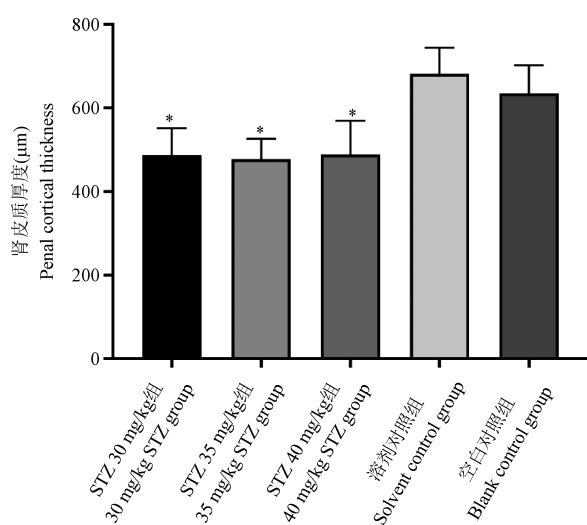


注:A、B:肾门面横截面;C、D:肾外输尿管横截面。

图4 子鼠肾、输尿管横截面(HE 染色)

Note. A/B, Cross-sections of the kidney hilum. C/D, Cross-sections of the extra-renal ureter.

Figure 4 Kidney and ureter cross-sections of offspring rats (HE staining)



注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图5 子鼠肾皮质厚度情况

Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$.

Figure 5 Renal cortical thickness in offspring rats

3 讨论

由于伦理问题和孕检的普及,无法获取孕期高血糖的典型临床病例,故想要深入研究此类问题,寻找微观预警、干预手段,需依赖于实验动物模型,

而 GDM 导致子代 CAKUT 的动物模型,国内外报道不多,Tran 等^[10]采用 Hoxb7-Green 小鼠,在 E 13 时腹腔一次性注射 STZ,发现子代肾发育不良;Hokke 等^[11]采用 C57BL/6J 小鼠,于 E 6.5 开始,连续 3 d 腹腔注射 STZ 建模,在胚胎 E 14.5 和 E 18.5 时剖宫产解剖子鼠,发现子鼠肾发育不良、输尿管积水、双输尿管及双集合管系统,但上述报道均未详述稳定动物模型的建立。

本课题组结合前人经验,选择 SD 大鼠腹腔注射 STZ 建模,需决定注射时间、频次及注射剂量。未选择饮食诱导建模或基因动物模型,是因为饮食诱导是使动物产生肥胖、胰岛素抵抗,在孕引入了干扰因素,时间长、成本高;而基因敲除常为“全或无”,成本高。STZ 为亚硝胺类抗生素,代谢快,对其他组织、器官毒副作用小,诱导成功率高,现已被广泛用于糖尿病动物模型制备^[12-13]。STZ 的注射时间,需尽量早于大鼠泌尿系统发育时间,故于 E 1.5 注射,注射后 STZ 迅速代谢,降低了药物本身对子鼠泌尿系统发育的影响。STZ 的注射剂量,国内外尚无统一标准,注射浓度多介于 20~80 mg/kg,注射频次也分一次或多次^[10-11,14],在预实验中,STZ 25 mg/kg 及以下浓度的孕鼠,随机血糖有转阴可

能;而 STZ 45 mg/kg 及以上浓度孕鼠,随机血糖更易超血糖仪测量范围(>33.3 mmol/L),且孕鼠更易流产、子鼠更不易存活,故 STZ 浓度定为 30、35、40 mg/kg,一次性腹腔注射以减少对孕鼠的刺激。STZ 的溶剂为柠檬酸盐缓冲液(pH 4.2~4.5),故设置溶剂对照组,该组在孕鼠体重、血糖,子鼠存活率、输尿管积水率、肾皮质厚度等均与空白对照组无差异,排除了溶剂的可能干扰。

孕鼠与子鼠变化情况:(1)孕鼠:STZ 30、35、40 mg/kg 3 组孕鼠“三多”症状在孕早中期开始,至孕晚期尤为明显,但同时时间点 5 组孕鼠体重无差异,并无“一少”的出现,这与现有报道相互印证^[15],可能原因为高血糖带来的消耗由多饮多食来代偿,使体重的减少并无统计学意义。对于孕鼠的随机血糖,STZ 30 mg/kg 组低于 40 mg/kg 组,35 mg/kg 组与 40 mg/kg 组在孕中晚期无统计学差异(E 12.5 和 E 18.5 时, $P>0.05$),因此 30 mg/kg 更加安全,且能够满足建模浓度 16.7 mmol/L 并保证子代稳定畸形发生。实验中 40 mg/kg 组部分孕鼠流产,说明较高剂量 STZ 升高了流产率。此外,预实验发现,雌鼠孕前体重 240 g 以上,可为孕期提供充足体质储备以应对孕期高糖的影响,不易流产。(2)子鼠:在 STZ 30、35、40 mg/kg 3 组子鼠中观察到输尿管积水(双侧或单侧)及肾发育不良,体现了 GDM 对子代泌尿系统的致畸作用,STZ 3 剂量组的子鼠存活率降低,再次说明母体妊娠期高血糖的危害巨大。STZ 3 剂量组子鼠输尿管积水构成比、肾皮质厚度无差异,说明实验设置的 STZ 浓度梯度在致畸效果上无明显差异,3 组的输尿管扩张积水总发生率均超 70%,远高于 Hokke 等^[11]报道的子鼠肾和尿路畸形率 26%,故本模型具有较高的致畸稳定性,但子鼠中未发现其报道的重复集合系统、重复输尿管等畸形,可能为样本量不足或建模条件不同所致,因此,探索新的 CAKUT 子病种模型或为后续实验的方向之一。输尿管及肾的畸形由镜下微观结构改变引起,进而将研究思路引向机制,目前该领域机制研究涉及活性氧机制^[16]、NF- κ B 通路、*Pax2* 基因^[17]、SHH 通路等^[18],但研究仍不多,期待后续实验予以探索。

本模型的意义及展望:本实验从 GDM 孕鼠模型建立方法、母鼠孕期及分娩情况、子鼠泌尿系统畸形情况等方面进行了研究,虽然在子鼠中仅观察到 CAKUT 子病种中的输尿管扩张积水及肾发育不

良,但该模型操作简便、周期适中、可重复性强,可为此领域研究奠定基础。在后续的研究中,本课题组将摸索使子代产生重复肾/输尿管、多囊肾等 CAKUT 其他子病种的条件,建立新的稳定动物模型;同时根据现有模型,从 RNA、蛋白、通路等方面进行机制研究;有序地提前子鼠解剖时间,从新生鼠提前到 E 18.5、E 15.5、E 12.5 的胎鼠,进一步探究母体 GDM 导致子代 CAKUT 的发生机制,力争从微观领域对 GDM 导致子代 CAKUT 的预警、干预提供新思路。

综上,SD 大鼠孕 1.5 d 一次性腹腔注射 STZ 30 mg/kg 建模方案,既能使子鼠产生稳定输尿管积水和肾发育不良,又能保证孕期较安全的血糖及较低的流产率,可作为优选建模方案。该模型或可为此类疾病的深入研究提供新思路。

参考文献:

- [1] Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(10): 791-802.
- [2] van der Ven AT, Vivante A, Hildebrandt F. Novel Insights into the pathogenesis of monogenic congenital anomalies of the kidney and urinary tract [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 29(1): 36-50.
- [3] Verbitsky M, Westland R, Perez A, et al. The copy number variation landscape of congenital anomalies of the kidney and urinary tract [J]. Nature Genetics, 2019, 51(1): 117-127.
- [4] Baz B, Riveline JP, Gautier JF. Endocrinology of pregnancy: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects [J]. Eur J Endocrinol, 2016, 174(2): R43-R51.
- [5] 中华医学会妇产科学分会产科学组,中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病诊治指南(2014) [J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(8): 561-569.
- [6] Gao C, Sun X, Lu L, et al. Prevalence of gestational diabetes mellitus in mainland China: A systematic review and meta-analysis [J]. J Diabetes Investig, 2019, 10(1): 154-162.
- [7] Anna V, van der Ploeg HP, Cheung NW, et al. Sociodemographic correlates of the increasing trend in prevalence of gestational diabetes mellitus in a large population of women between 1995 and 2005 [J]. Diabetes Care, 2008, 31(12): 2288-2293.
- [8] Simeoni U, Barker DJ. Offspring of diabetic pregnancy: Long-term outcomes [J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2009, 14(2): 119-124.
- [9] Parimi M, Nitsch D. A systematic review and meta-analysis of diabetes during pregnancy and congenital genitourinary abnormalities [J]. Kidney Int Rep, 2020, 5(5): 678-693.
- [10] Tran S, Chen YW, Chenier I, et al. Maternal diabetes modulates renal morphogenesis in offspring [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(5): 943-952.

- [11] Hokke SN, Armitage JA, Puelles VG, et al. Altered ureteric branching morphogenesis and nephron endowment in offspring of diabetic and insulin-treated pregnancy [J]. PLoS One, 2013, 8 (3): e58243.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 江心泳, 葛莉, 庞书勤, 等. 妊娠糖尿病大鼠造模方法研究进展 [J]. 实验动物科学, 2021, 38(1): 63-68.
- [15] 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.
- [16] Zhang SL, Chen YW, Tran S, et al. Reactive oxygen species in the presence of high glucose alter ureteric bud morphogenesis [J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(7): 2105-2115.
- [17] Chen YW, Liu F, Tran S, et al. Reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B pathway mediate high glucose-induced Pax-2 gene expression in mouse embryonic mesenchymal epithelial cells and kidney explants [J]. Kidney Int, 2006, 70 (9): 1607-1615.
- [18] Zhao XP, Liao MC, Chang SY, et al. Maternal diabetes modulates kidney formation in murine progeny: the role of hedgehog interacting protein (HHIP) [J]. Diabetologia, 2014, 57(9): 1986-1996.

[收稿日期]2022-04-27

(上接第 31 页)

- [15] Cao JY, Wales KM, Cordina R, et al. Pulmonary vasodilator therapies are of no benefit in pulmonary hypertension due to left heart disease: A meta-analysis [J]. Int J Cardiol, 2018, 273: 213-220.
- [16] Wang Y, Hsi DH, Yuan W, et al. New experimental animal model of intracardiac thrombus created with epicardial echocardiographic guidance [J]. Am J Transl Res, 2019, 11 (5): 3092-3100.
- [17] Arrigo M, Huber LC. Pulmonary embolism and heart failure: a reappraisal [J]. Card Fail Rev, 2020, 7: e03.
- [18] Tapon V, Platt D, Xia F, et al. Monitoring for pulmonary hypertension following pulmonary embolism: the INFORM study [J]. Am J Med, 2016, 129(9): 978-985.
- [19] Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) [J]. Eur Heart J, 2016, 37(1): 67-119.
- [20] Palm V, Rengier F, Rajiah P, et al. Acute pulmonary embolism: imaging techniques, findings, endovascular treatment and differential diagnoses [J]. RoFo, 2020, 192(1): 38-49.

[收稿日期]2022-01-28