



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102895246 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201110212070. X

(22) 申请日 2011. 07. 27

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 赫荣乔 韩婵帅

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

A61K 31/7004 (2006. 01)

A61P 3/10 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

A01K 67/027 (2006. 01)

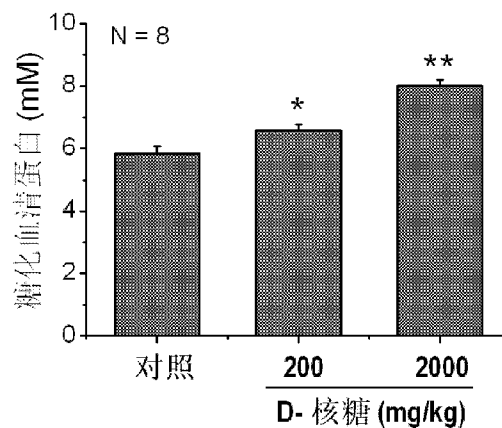
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 8 页

(54) 发明名称

一种提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法。本发明通过向动物给药 D-核糖, 提供了一种提高体内糖化水平痴呆动物模型及其制备方法。本发明的动物模型具有血糖水平正常、糖化水平升高、空间学习记忆能力损伤的特征, 同时本发明的方法简便、易行、易控、性质稳定且重现性好、造模成本低且造模周期短。本发明所提供的造模方法可以用以定性、定量分析, 也可以作病理形态学对比分析, 还可以进行统计学处理、分析; 可用于体内糖化水平增高所导致相关疾病以及神经退行性疾病发病机制的研究以及相关疾病治疗方法的研究和评价。



1. 一种提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,其中包括向所述动物给药 D-核糖的步骤。
2. 根据权利要求 1 所述的提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,其中所述给药包括腹腔注射。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,其中所述动物是哺乳动物。
4. 根据权利要求 1-3 中任意一项所述的提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,其中所述动物是小鼠或大鼠。
5. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,其中所述 D-核糖的量为 100-3500mg/kg/天。
6. 根据权利要求 1-5 中任意一项所述的提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,其中所述给药为连续给药 7-90 天。
7. 根据权利要求 1-6 中任意一项所述的提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,其中所述动物模型的体重在给药前后与对照组无显著差异。
8. 根据权利要求 1-7 中任意一项所述的提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,其中所述动物模型的血糖在给药前后与对照组无显著差异。

一种提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及动物模型及其制备方法。具体而言,本发明涉及一种提高体内糖化水平痴呆动物模型及其制备方法。

背景技术

[0002] 蛋白质的非酶促糖化 (non-enzymatic glycation, 简称蛋白糖化) 是蛋白质化学修饰中的一种重要形式, 即还原糖 (如葡萄糖) 与蛋白质分子的 α -/ ϵ -氨基 (N-末端和赖氨酸侧链氨基) 反应, 通过一系列中间反应步骤 (Schiff's base 及 Amadori 分子重排) 形成蛋白质糖化衍生物。长期以来, 特别在糖尿病并发症的病理机制上, 蛋白质的糖化作用被认为是最重要的原因之一。蛋白质被还原糖糖化后, 出现其结构与功能的改变, 如糖化血红蛋白会使红细胞携带氧分子的能力下降甚或丧失, 导致人体组织和器官缺氧, 影响基本的物质代谢。糖化 3-磷酸甘油醛脱氢酶的活性较其天然状态降低 80%, 同时伴有分子构象的变化。晚期糖 (基) 化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 是蛋白质糖化过程中所形成的一些有害产物, 可对细胞和器官产生损伤, 被认为是糖尿病并发症发生发展的最主要因素之一。近五年来, 蛋白质糖化与糖尿病关系的研究方面还在不断地进展, 如蛋白质糖化与胰岛素抵抗机制、AGEs 受体的抑制调控, 以糖化血红蛋白为靶标的药物设计等。同时, 在神经退行性疾病如老年痴呆症患者和帕金森症患者的脑内发现了蛋白的糖化现象。非酶促糖化作用能够导致蛋白质的错误折叠、分子聚集, 并产生细胞毒性, 可能与神经退行性疾病具有一定的相关性。因此, 蛋白质的非酶促糖化在神经退行性疾病的发病机制研究以及神经退行性疾病药物开发中也开始受到关注。在正常生理条件下, 机体内非酶促糖化水平很低, 而在一些疾病或者衰老时, 机体内的糖化水平明显提高。因此, 建立一种快速、有效的能够提高体内糖化水平的动物模型对于糖尿病及其并发症以及神经退行性疾病等发病机理的研究有重要的理论意义和临床价值, 同时, 也能够用于对抗衰老或糖化相关疾病药物的筛选, 以及糖尿病及其并发症和神经退行性疾病治疗方法的评价。

[0003] 目前常用的非酶促糖化相关实验动物模型制备方法包括: 1、在体外用还原性糖与蛋白质 (如血清白蛋白) 反应制备糖化蛋白产物直接对实验动物进行注射。这种方法能够有效提高体内晚期糖基化终末产物的水平, 并对相关的器官造成损伤。但这类方法由于直接对动物体注射蛋白质, 较易产生免疫反应等副作用, 另外, 这种建模方法无法模拟体内糖化过程以及糖基化终末产物在体内形成过程。2、D-半乳糖注射或饲喂方式建立实验动物模型。通过注射或者饲喂 D-半乳糖能够使实验动物血糖升高同时血液中糖化血红蛋白含量增高, 晚期糖基化终末产物的生成量增加, 给药浓度较高时会出现一定的认知功能损伤。但这种造模方式所需的时间比较长, 一般需要六周以上。这种建模方式使血糖升高, 只能在一定程度上模拟糖尿病患者体内糖化水平升高的状态, 不能够完全模拟自然老化状态以及神经退行性疾病下体内糖化水平升高的状况。3、糖尿病动物模型作为糖化实验动物模型。使用较广泛的方法是采用四氧嘧啶 (alloxan) 静脉注射或链脲佐菌素 (streptozotocin STZ) 腹腔注射来诱发糖尿病。这两种造模方式都能够有效地在体内破坏胰岛 β 细胞, 造成

胰岛素水平降低,从而造成机体血糖浓度的显著升高。但是由于这种造模方式所选用的药物通常具有一定的毒性,对机体可能造成其他损伤尤其是造成肝、肾组织中毒性损害,因此不能够完全代表自然状态下体内糖化水平升高后造成的机体影响,同样这种造模方法也不能够完全模拟自然老化状态以及神经退行性疾病下体内糖化水平升高的状况。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对现有技术存在的缺陷,提供一种的提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,制备具有血糖水平正常、糖化水平升高、空间学习记忆能力损伤三个主要特征的动物模型,该方法简便、易行、易控、性质稳定且重现性好、造模成本低且造模周期短。本发明所提供的造模方法可以用以定性、定量分析,也可以作病理形态学对比分析,还可以进行统计学处理、分析;可用于体内糖化水平增高所导致相关疾病以及神经退行性疾病发病机制的研究以及相关疾病治疗方法的研究和评价。

[0005] 因此,本发明一方面提供一种提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,其中包括向所述动物给药 D-核糖的步骤。

[0006] 在本发明中,可以使用本领域已知的任何方法向动物给药。在一个实施方案中,所述给药为腹腔注射给药。

[0007] 根据本领域技术人员的知识可知,本发明的方法可用于各种动物。在一个实施方案中,所用的动物为哺乳动物。在一个实施方案中,所用的动物为大鼠。在一个实施方案中,所用的动物为小鼠。

[0008] 在本发明的一个实施方案中,所用的 D-核糖的量可以为 100-3500mg/kg/天。

[0009] 在本发明的一个实施方案中,可以使用 D-核糖连续给药 7-90 天。

[0010] 在本发明的一个实施方案中,提供一种提高体内糖化水平痴呆动物模型的制备方法,其中用 D-核糖对所述动物腹腔注射给药 7-90 天,用药量为 100-3500mg/kg/天。

[0011] 在本发明的方法中,所述动物模型的体重在给药前后与对照组无显著差异。

[0012] 在本发明的方法中,所述动物模型的血糖在给药前后与对照组无显著差异。

[0013] 本发明得到的动物模型血糖水平无显著提高,血清糖化蛋白水平显著增高,血清中晚期糖基化终末产物含量显著增加,脑中出现晚期糖基化终末产物的蓄积,同时动物的空间学习记忆能力明显下降。

[0014] 本发明与现有技术相比,具有以下优点:

[0015] 1、本发明制备的动物模型血糖水平没有显著升高;

[0016] 2、能够快速提高机体内糖化水平;

[0017] 3、能够明显损伤动物的空间学习记忆能力;

[0018] 4、药物毒性作用较小,对实验动物的肝、肾、脾等组织无严重损伤;

[0019] 5、造模所需时间短,造价低廉。

附图说明

[0020] 图 1:给药 10 天后小鼠糖化血清蛋白浓度测定结果。

[0021] 图 2:给药 10 天后小鼠血清中晚期糖基化终末产物含量检测。A, B 为晚期糖基化终末产物 (AGEs) 总量检测结果,其中 B 为统计结果。C, D 为戊糖素 (pentosidine, 晚期糖

基化终末产物之一)含量检测结果,其中D为统计结果。

[0022] 图3:给药10天后小鼠Morris水迷宫实验结果。A为训练期各组小鼠逃避潜伏期时间变化,B为测试期各组小鼠在目标象限找寻时间以及找寻路程的百分比。

[0023] 图4:给药30天后小鼠糖化血清蛋白浓度测定结果。

[0024] 图5:给药30天后小鼠血清中晚期糖基化终末产物含量检测。A,B为晚期糖基化终末产物(AGEs)总量检测结果,其中B为统计结果。C,D为戊糖素(pentosidine)含量检测结果,其中D为统计结果。

[0025] 图6:给药30天后小鼠全脑晚期糖基化终末产物含量检测。其中A为Western blot结果,B为统计结果。

[0026] 图7:给药30天后小鼠脑病理切片免疫组化染色结果。其中左列为D-核糖(2000g/kg)组,右列为对照组。A、B、C、D为海马区,E、F、G、H为皮层区。C、D、G、H依次为A、B、E、F中标注区域的放大。

[0027] 图8:给药30天后通过Morris水迷宫实验检测小鼠空间学习记忆能力的结果。其中,A为逃避潜伏期结果;B为小鼠在目标象限找寻时间的结果。

[0028] 表1:给药前以及30天给药后各组小鼠体重值以及30天给药后各组小鼠血糖值。

[0029] 表2:给药30天后,各组小鼠血清中谷丙、谷草转氨酶(ALT、AST)活力,肌苷(Cre)浓度测定。

具体实施方式

[0030] 实施例一

[0031] C57BL/6J小鼠雄鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),体重约20克,适应性饲养一周后,将动物随机分为5组,生理盐水对照组和四个不同浓度D-核糖(购自美国Amresco公司)给药造模组,每组12只。给药组腹腔注射D-核糖浓度分别为:400mg/kg/天,800mg/kg/天,1600mg/kg/天,3200mg/kg/天(生理盐水配制),连续注射10天,对照组腹腔注射等体积的生理盐水。

[0032] 模型测试结果:

[0033] 一、糖化血清蛋白浓度升高

[0034] 给药结束后,对每组小鼠取血,静置离心后取血清,测定各组小鼠血清中糖化血清蛋白浓度(糖化血清蛋白浓度检测试剂盒来自南京建成生物工程研究所)。结果如图1所示,D-核糖给药组小鼠糖化血清蛋白含量比对照组显著升高,并随着D-核糖给药浓度升高,小鼠糖化血清蛋白含量升高。

[0035] 二、血清中晚期糖基化终末产物含量升高

[0036] 给药结束后,取各组小鼠血清,通过Western blot方法检测血清中各种晚期糖基化终末产物含量的变化(抗-AGEs抗体和抗-pentosidine抗体均来自日本TransGenic公司)。结果如图2所示,D-核糖给药组小鼠血清中晚期糖基化终末产物(AGEs)的含量比对照组升高(图2A,2B),血清中戊糖素(pentosidine,晚期糖基化终末产物之一)的含量也明显升高(图2C,2D)。以上结果说明给药组小鼠体内糖化水平明显增高。

[0037] 三、空间学习记忆能力下降

[0038] 给药结束后,通过Morris水迷宫实验检测小鼠空间学习记忆能力。由图3A可以

看出 D-核糖给药组小鼠的逃避潜伏期比对照组长,尤其是在训练的第八天,D-核糖给药组(1600mg/kg,3200mg/kg)小鼠的逃避潜伏期明显长于对照组($P < 0.05$)。由图 3B 所示,在第九天撤去平台后,D-核糖给药组小鼠在目标象限找寻时间以及找寻路程所占百分比短于对照组,其中 D-核糖给药组(1600mg/kg,3200mg/kg)的目标象限找寻路程以及找寻时间百分比与对照组相比有显著差异($P < 0.05$)。以上结果说明 D-核糖给药组小鼠空间学习记忆能力下降。

[0039] 实施例二

[0040] C57BL/6J 小鼠雄鼠,体重约 20 克,适应性饲养一周后,将动物随机分为 3 组,生理盐水对照组和两个不同浓度 D-核糖给药造模组,每组 15 只。给药组腹腔注射 D-核糖浓度分别为:200mg/kg/天,2000mg/kg/天(生理盐水配制),连续注射 30 天,对照组腹腔注射等体积的生理盐水。

[0041] 模型测试结果:

[0042] 一、糖化血清蛋白浓度升高

[0043] 给药结束后,对各组小鼠取血,静置离心后取血清,测定各组小鼠血清中糖化血清蛋白浓度(糖化血清蛋白浓度检测试剂盒来自南京建成生物工程研究所)。结果如图 4 所示,D-核糖给药组小鼠糖化血清蛋白含量比对照组显著升高($P < 0.05$)。

[0044] 二、血清中晚期糖基化终末产物含量升高

[0045] 给药结束后,取各组小鼠血清,通过 Western blot 方法检测血清中各种晚期糖基化终末产物含量的变化(抗-AGEs 抗体和抗-pentosidine 抗体均来自日本 TransGenic 公司)。结果如图 5 所示,D-核糖给药组小鼠血清中晚期糖基化终末产物(AGEs)的含量比对照组显著升高($P < 0.05$)(图 5A,5B),血清中戊糖素(pentosidine,晚期糖基化终末产物之一)的含量也明显升高($P < 0.05$)(图 2C,2D)。以上结果说明 D-核糖给药组小鼠体内糖化水平明显增高。

[0046] 三、脑中晚期糖基化终末产物含量增高

[0047] 给药结束后,取各组小鼠全脑,匀浆后制样,通过 Western blot 方法检测全脑中晚期糖基化终末产物(AGEs)含量的变化。结果如图 6 所示,D-核糖给药组小鼠脑中晚期糖基化终末产物含量与对照组相比显著升高($P < 0.01$)。

[0048] 四、脑中出现明显的晚期糖基化终末产物的沉积

[0049] 给药结束后,取各组小鼠全脑,4%多聚甲醛固定后制成蜡块,5 μ m 厚石蜡切片后脱蜡水化,用抗-AGEs 抗体(购自日本 TransGenic 公司)免疫组化 AEC 染色后进行观察。结果如图 7 所示,D-核糖给药组小鼠脑中海马区和皮层中晚期糖基化终末产物沉积明显,而对照组无明显阳性染色区。说明 D-核糖给药组小鼠脑中糖化水平比对照组升高。

[0050] 五、空间学习记忆能力下降

[0051] 给药结束后,通过 Morris 水迷宫实验检测小鼠空间学习记忆能力。由图 8A 可以看出 D-核糖给药组小鼠的逃避潜伏期比对照组长,尤其是在训练的第八天,D-核糖给药组(2000mg/kg)小鼠的逃避潜伏期明显长于对照组($P < 0.05$)。由图 8B 所示,在第九天撤去平台后,D-核糖(2000mg/kg)给药组小鼠在目标象限找寻时间明显短于对照组($P < 0.05$)。以上结果说明 D-核糖给药组小鼠空间学习记忆能力下降。

[0052] 六、体重无异常变化,血糖无明显增高

[0053] 给药前以及给药结束后,对各组小鼠称体重。给药结束后,取小鼠血清测定其血糖浓度(血糖浓度检测试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司)。结果如表 1 所示,D-核糖给药小鼠给药前后体重与对照组无明显差异,给药后 D-核糖给药小鼠血糖值与对照组相比无明显变化。

[0054] 表 1 :给药前以及 30 天给药后各组小鼠体重值以及 30 天给药后各组小鼠血糖值。

[0055]

组别	体重 (注射前) (g)	体重 (注射后) (g)	血糖浓度 (mM)
对照	18.72±0.62	25.58±1.48	7.11±0.45
0.2g/kg D-核糖	18.35±0.34	25.43±1.41	7.51±0.35
2g/kg D-核糖	18.85±0.72	24.23±1.21	7.36±0.24

[0056] 七、肝、肾组织无严重损伤

[0057] 给药结束后,测定各组小鼠血清中谷丙、谷草转氨酶活力以及血清中肌苷浓度(检测所需试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司)。结果如表 2 所示,D-核糖给药组小鼠给药后血清中谷丙、谷草转氨酶活力以及血清肌酐浓度与对照组相比无明显变化,说明 D-核糖给药组小鼠未出现肝、肾组织的严重损伤。

[0058] 表 2 :给药 30 天后,各组小鼠血清中谷丙、谷草转氨酶 (ALT、AST) 活力,肌苷 (Cre) 浓度测定。

		D-核糖		对照
		0.2g/kg	2g/kg	
[0059]	ALT	47.6±12.84	30.8±4.13	41.2±9.02
	AST	48.1±7.26	38.1±9.36	53.7±8.47
	Cre	41.5±1.28	42.6±0.28	41.9±0.51

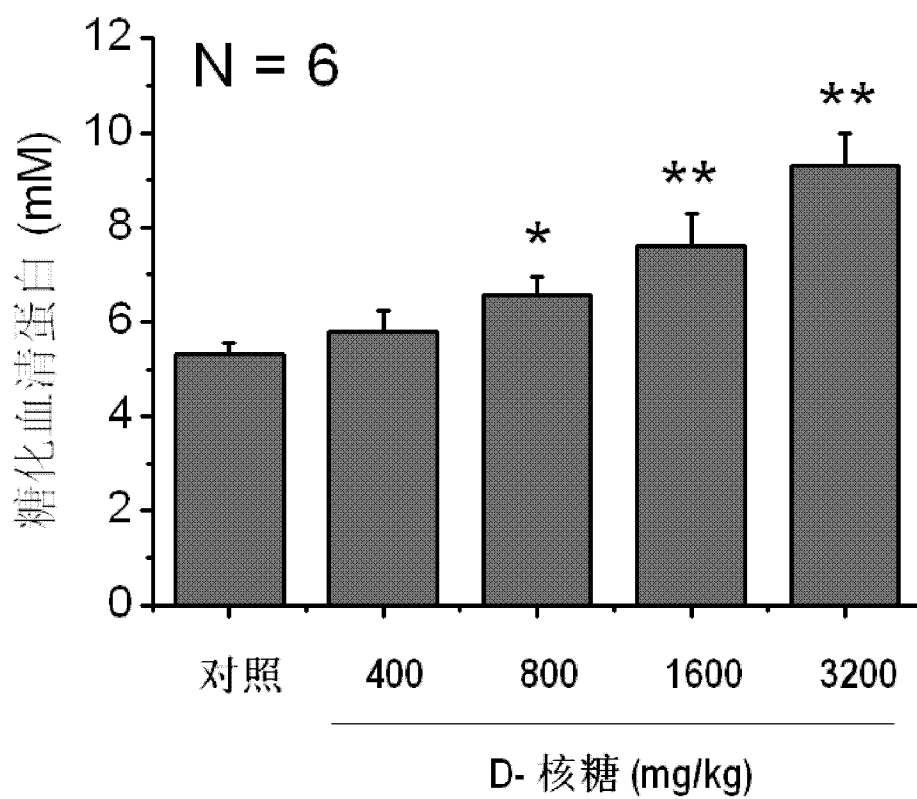


图 1

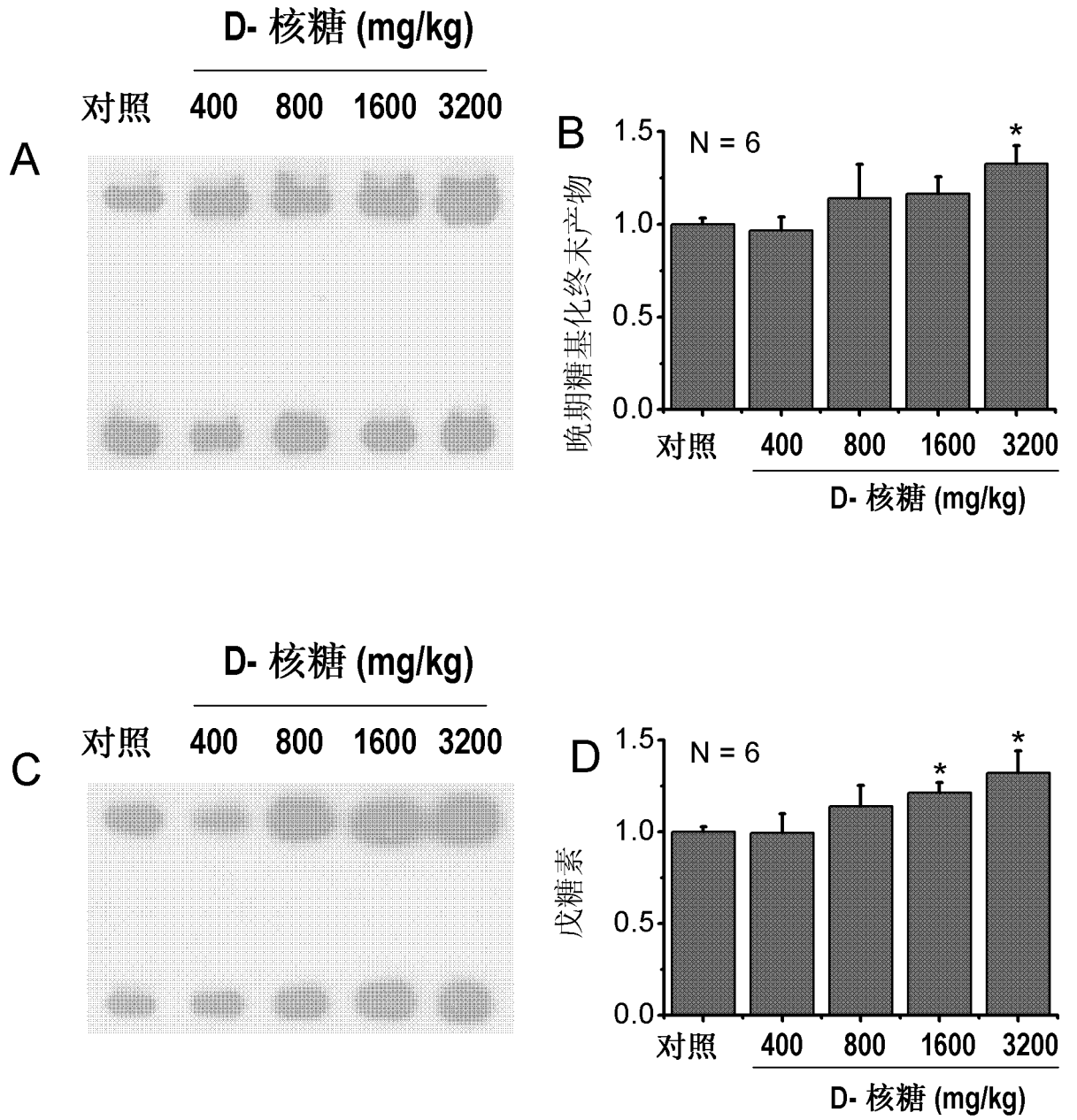


图 2

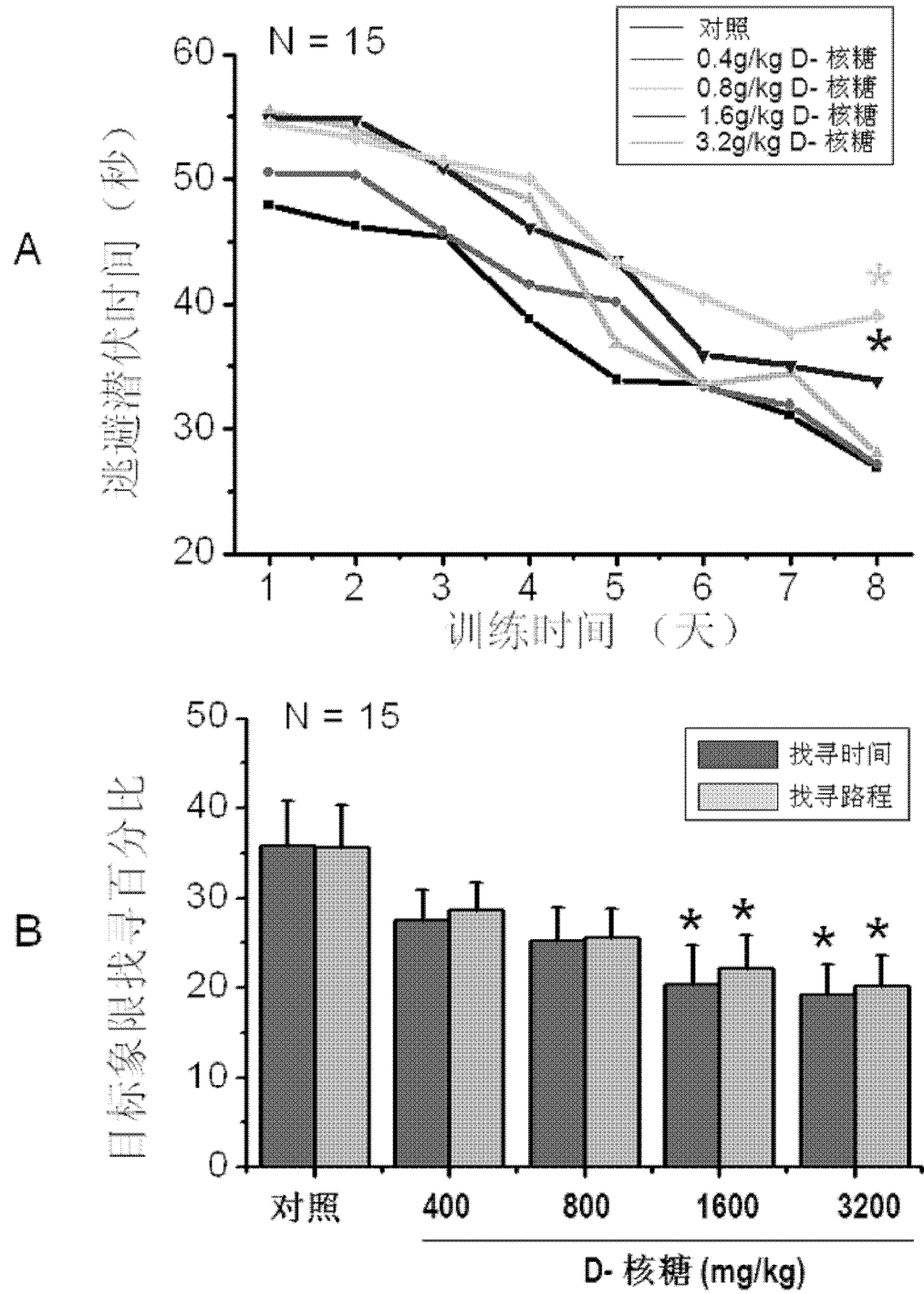


图 3

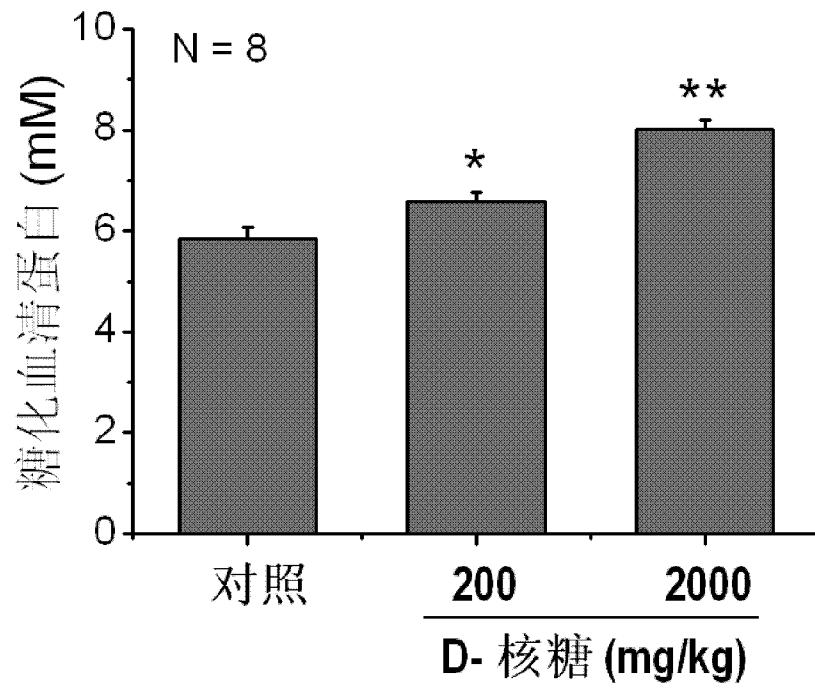


图 4

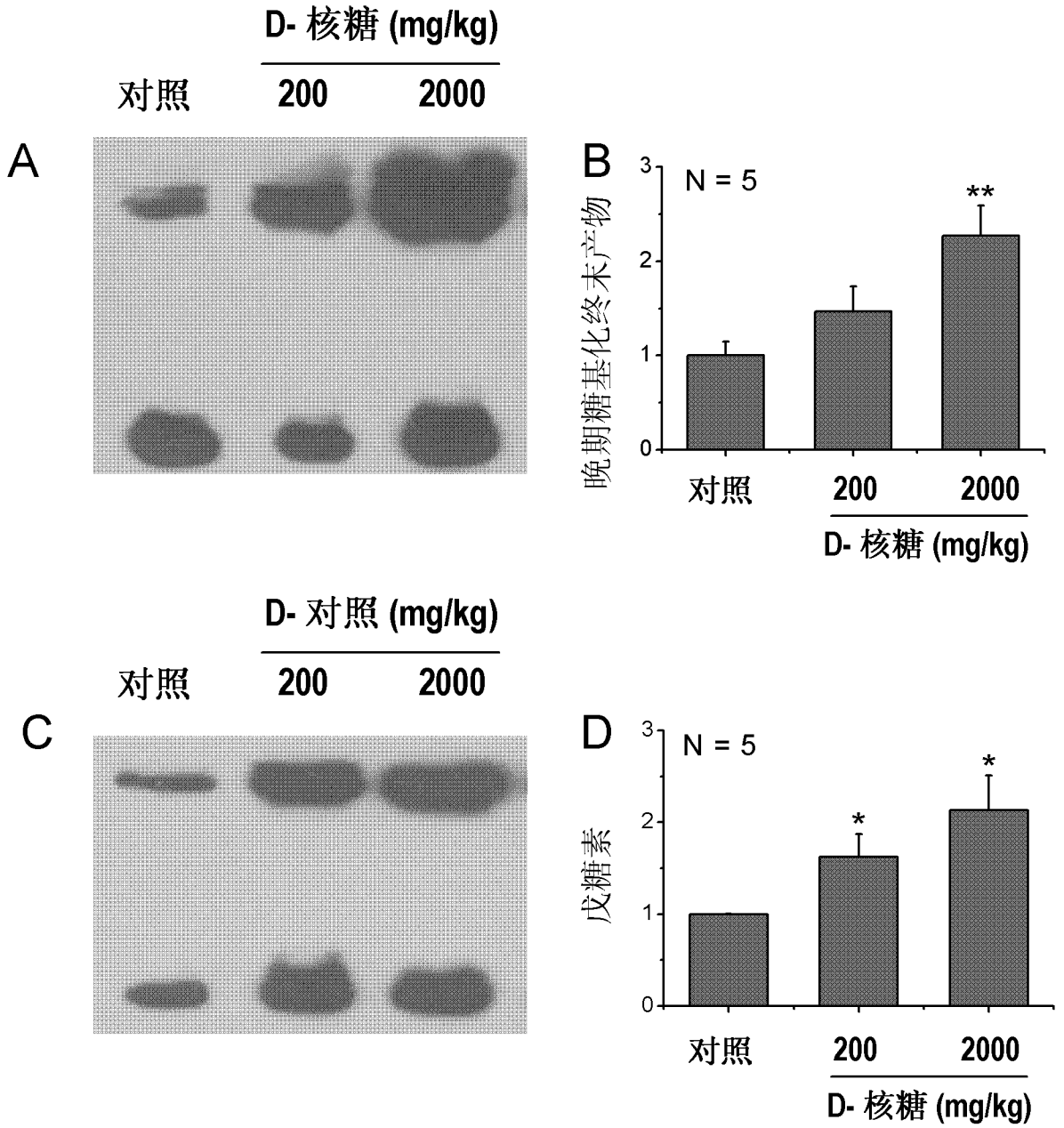


图 5

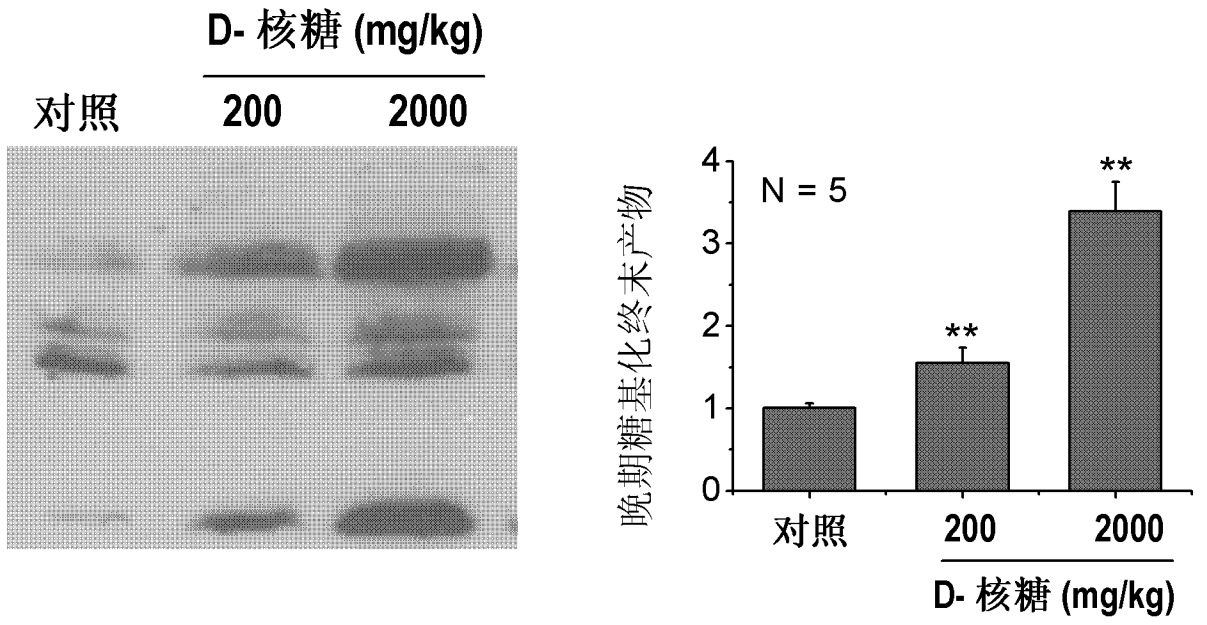


图 6

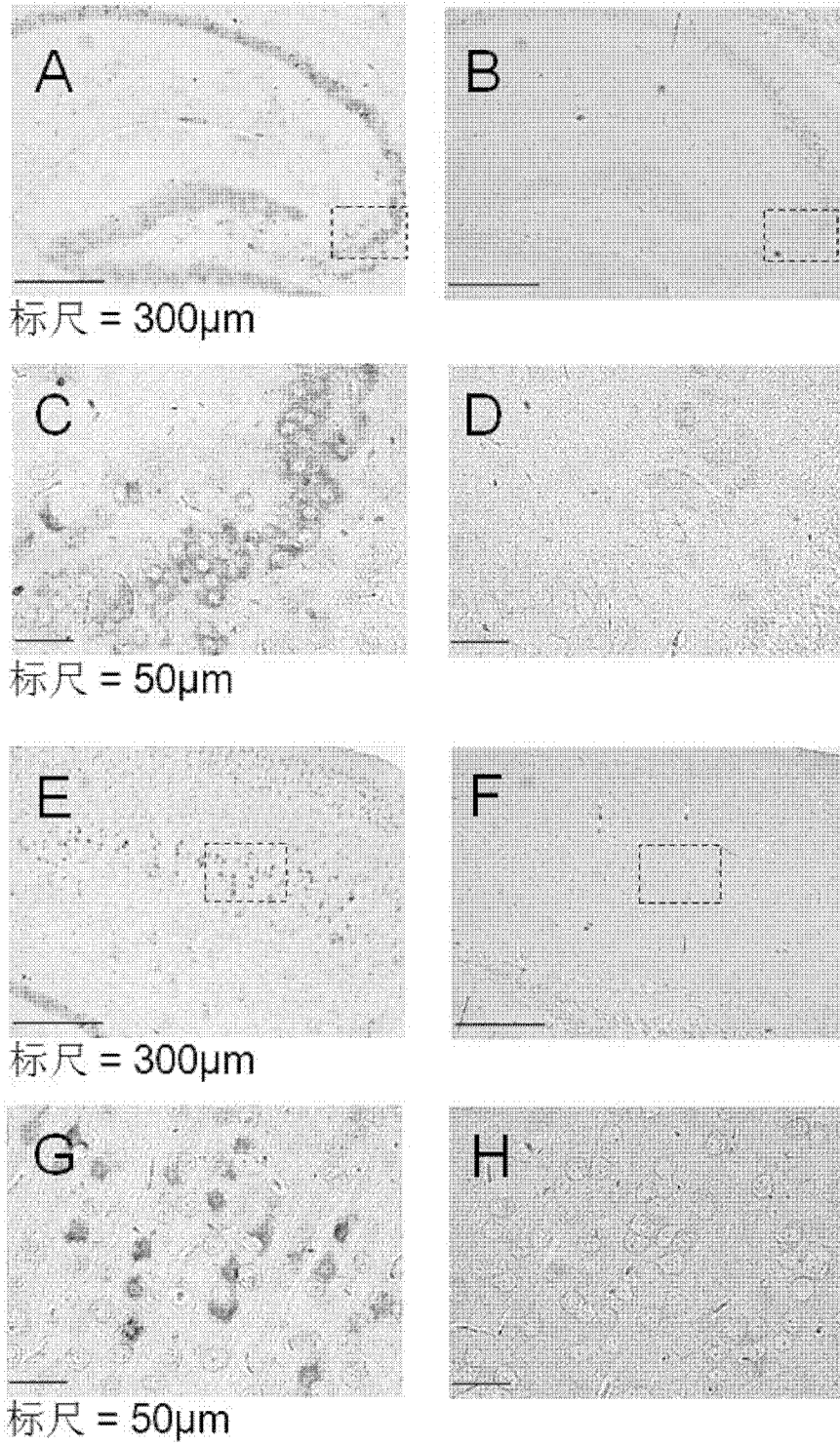


图 7

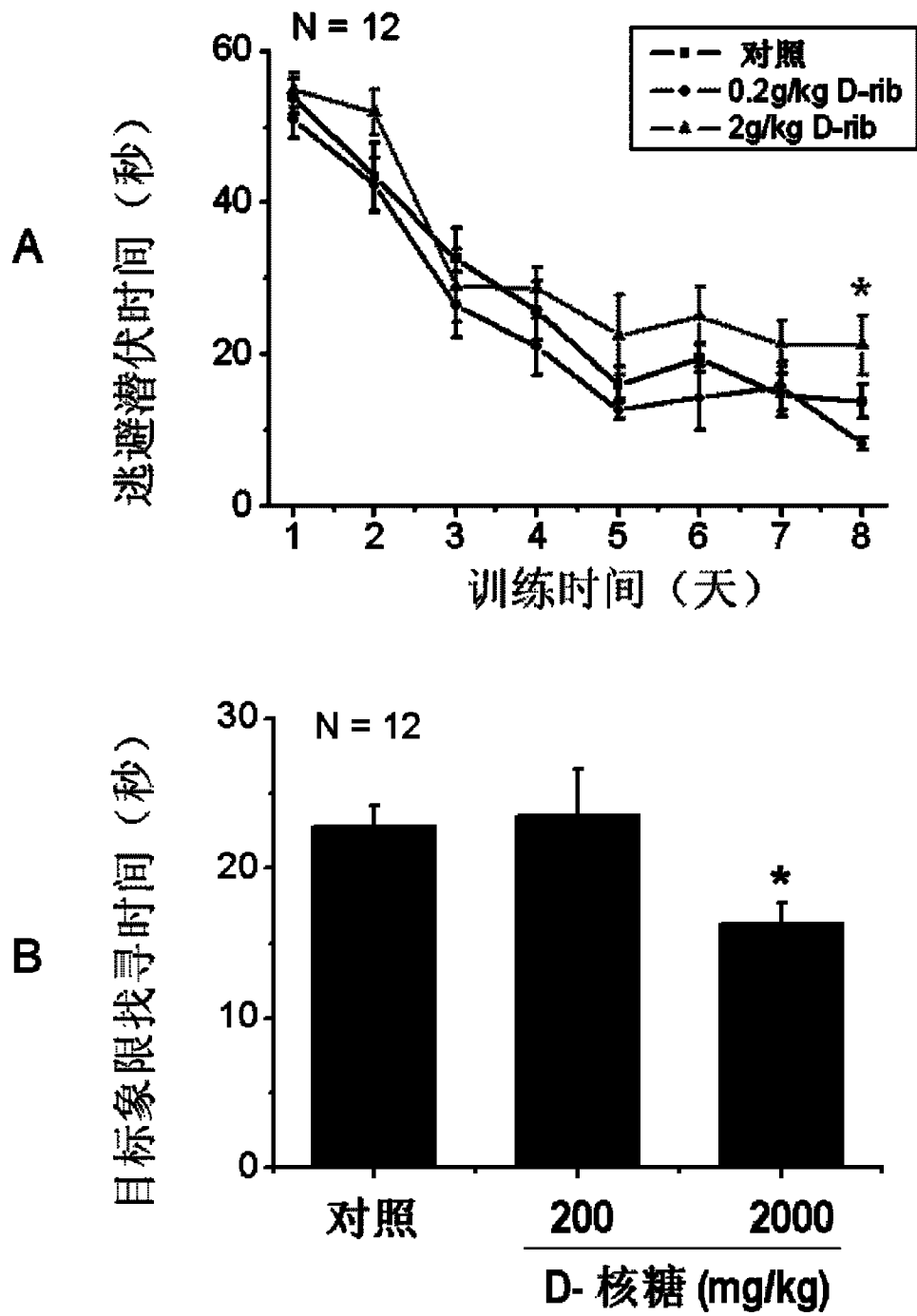


图 8