

基于老龄大鼠的 II 型糖尿病模型 制备方法研究

黄剑平^{1,2} 周 慧^{1,2} 张 裕³ 杨子健^{1,2} 汪圆圆^{1,2} 李光林^{1,2}

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

²(中国科学院人机智能协同系统重点实验室 深圳 518055)

³(遵义医学院珠海校区 珠海 519041)

摘 要 为探索基于老龄大鼠建立“II 型”糖尿病模型的方法。该研究纳入 12 只 12 月龄雄性 Wistar 大鼠, 在大鼠连续 4 个月自由采食高脂饲料后, 给予 3 次腹腔注射低剂量链脲佐菌素溶液(剂量为 20 mg/kg, 浓度为 10 mg/mL), 并检测给药前后大鼠空腹血糖浓度数据, 将空腹血糖浓度高于 11.1 mmol/L 的大鼠定为“II 型”糖尿病模型。实验结果显示, 大鼠自由采食高脂饲料 4 个月后, 体重由 604.8 ± 13.7 g 增加为 760.6 ± 31.6 g ($P < 0.01$); 连续 3 次注射低剂量链脲佐菌素溶液后, 空腹血糖浓度由 5.6 ± 0.7 mmol/L 增加为 22.9 ± 2.7 mmol/L ($P < 0.01$); 继续观察 2 周后, 大鼠空腹平均血糖浓度为 17.4 mmol/L, 仍显著高于糖尿病诊断标准的空腹血糖最低值 11.1 mmol/L ($P < 0.01$), 糖尿病模型制备的成功率为 83.3%。结果表明, 连续注射 3 次低剂量链脲佐菌素溶液并结合高脂饲料饲养, 可成功将老年 Wistar 大鼠诱导为“II 型”糖尿病模型。

关键词 糖尿病模型; 老龄大鼠; 链脲佐菌素; 高脂摄食

中图分类号 Q 331 **文献标志码** A

The Study of Developing Type II Diabetic animal Models Based on Aged Rats

HUANG Jianping^{1,2} ZHOU Hui^{1,2} ZHANG Yu³ YANG Zijian^{1,2}

WANG Yuanyuan^{1,2} LI Guanglin^{1,2}

¹(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(CAS Key Laboratory of Human-Machine Intelligence-Synergy Systems, Shenzhen 518055, China)

³(Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, China)

Abstract To investigate the methods of developing type II diabetic rat models, 12 male Wistar rats aged 12 months were adopted in the experiment. Firstly, the rats were naturally fed with high-fat food for four months, then the rats were weighted and their fasting blood glucose (FBG) levels were measured. Then, each

收稿日期: 2017-08-02 修回日期: 2017-08-30

基金项目: 深圳市基础研究布局项目(JCYJ20150529150715499)

作者简介: 黄剑平, 助理工程师, 研究方向为基于动物模型研究神经再生及功能重建; 周慧, 副研究员, 研究方向为神经接口与康复技术、可穿戴传感器; 张裕, 硕士研究生, 研究方向为人体组织与解剖; 杨子健, 技术员, 研究方向为电子工程; 汪圆圆, 实习研究员, 研究方向为动物模型、神经再生及功能重建; 李光林(通讯作者), 研究员, 博士生导师, 研究方向为人机智能、神经康复工程、神经机器接口技术、生物医学信息处理与仪器、生物医学模型与计算研究, E-mail: gl.li@siat.ac.cn.

rat was injected with a small dose of streptozotocin (STZ) solution (dose: 20 mg/kg, density: 10 mg/mL) for three times and their FBG levels were measured again within one week after each injection. Subsequently, the rats were considered as type II diabetic models when their FBG values were higher than 11.1 mmol/L. The results show that the weights of Wistar rats increase significantly after feeding with high fat diet for four months. Besides, the FBG levels of the rats increase from 5.6 ± 0.7 mmol/L to 22.9 ± 2.7 mmol/L with a significant difference ($P < 0.01$). Furthermore, the averaged FBG level of the rats is significantly higher than the standard FBG level of 11.1 mmol/L and with a successful rate of 83.3%. In conclusion, the proposed method can develop type II diabetic models with Wistar rats.

Keywords diabetic model; aged-rat; streptozotocin; high-fat food

1 引言

自 1999 年以来,我国人口结构就开始出现老龄化的现象^[1]。现如今,我国已成为全世界老龄人口最多的国家,也是人口老龄化发展速度最快的国家之一。据统计,到 2050 年我国将有近 5 亿老龄人口^[2]。人口老龄化的加剧,将产生一系列具有老龄属性的社会问题,尤其是老年人的健康问题。其中之一就是 II 型糖尿病(Type II Diabetes)以及由该慢性疾病导致的严重并发症^[3],如视网膜病变^[4]和糖尿病足^[5-6]。II 型糖尿病已经成为继心脑血管疾病、恶性肿瘤之后的第三类危害人类健康的慢性非传染性疾病,其病理特征是患者肥胖^[7]、年迈体衰^[8],存在胰岛素功能障碍^[9]。虽然,药物与合理的饮食、运动可以有效地控制 II 型糖尿病的高血糖问题,但对于一系列的严重并发症,临床上已有的多种治疗方法却难以取得满意的治疗效果。

长期以来,动物模型被视为是研究疾病病理、疾病治疗的重要实验材料。因此,基于动物模型研究潜在的用于治疗 II 型糖尿病并发症的方案是可行的做法。而这首先要求探索一种能高效建立稳定的符合 II 型糖尿病特征的动物模型的方法,且该方法经济、简单易行。

目前,主要用于构建 II 型糖尿病模型的实验动物是啮齿类的大鼠与小鼠。构建模型的方法

有多种:(1)转基因法,即利用基因技术改变实验动物的特定基因,使其表现出高血糖的特征,如进行 GK/IRS-1 双基因剔除的小鼠^[10]、MODY 小鼠^[11]。该动物模型可以有效模拟糖尿病的肥胖、高血糖现象,但不能模拟 II 型糖尿病的老龄特性,且模型制备成功率较低、价格昂贵。(2)自发性糖尿病品种,即利用杂交培育技术,逐渐筛选出高血糖特征的亲代,直至最后可以繁育出符合糖尿病特征的子代,如中国地鼠^[12]、OLETF 大鼠^[13]。该动物模型可以有效模拟糖尿病的肥胖、高血糖现象,但不能模拟 II 型糖尿病的老龄特性,且模型制备周期较长、成功率较低、价格昂贵。(3)药物诱导法,即注射链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)或其他药物,如四氧嘧啶破坏实验动物的胰岛 B 细胞,达到糖代谢异常(胰岛 B 细胞功能障碍、胰岛素抵抗及血糖升高)的目的^[14]。该方法建立的模型可以有效模拟糖尿病的肥胖、高血糖现象,模型制备周期较短、成功率高、成本低且易推广,也是目前最常用的建立糖尿病动物模型的方法。但药物诱导法建立糖尿病模型多选用成年动物,少有文献提及利用老龄大鼠作为实验对象建立 II 型糖尿病模型。本研究以老龄雄性 Wistar 大鼠为实验对象,探索建立一种稳定有效且与人类 II 型糖尿病特征相似的老年糖尿病动物模型,为糖尿病及其并发症相关研究提供动物建模的参考方法。

2 材料和方法

2.1 材料

本文实验动物采用无特定病原体 (Specific Pathogen Free, SPF) 雄性 Wistar 大鼠 12 只, 12 月龄, 体重 586~634 g, 由广东省医学实验动物中心提供 (生产许可证号: SCXY(粤)2013-0002)。实验动物的饲养与实验操作均于中国科学院深圳先进技术研究院 SPF 级房进行 (使用许可证号: SYXK(粤)2012-0119, 动物伦理批准号: SIAT-IRB-131017-YGS-LGL-ZHUI-A0011)。

实验所采用的饲料为高脂饲料, 其配方为 2.5% 的蛋黄、10% 的猪油、20% 的糖以及 67.5% 的基础饲料, 由广东省医学实验动物中心加工制作并进行 SPF 级包装。

采用链脲佐菌素 (购自美国 Sigma 公司) 对大鼠血糖进行诱导。使用前以一定质量体积比溶于临时配制的柠檬酸钠缓冲溶液 (浓度为 0.1 mol/L, pH 值为 4.5), 配置好的链脲佐菌素浓度为 10 mg/mL。采用拜安康血糖仪及配套血糖试纸 (购自德国拜耳医药保健有限公司) 进行血糖测试。

2.2 方法

首先, 将于 SPF 级动物房检疫间接受适应性饲养后无异常表现的大鼠转至 SPF 级饲养室进行饲养, 并进行称重与测定空腹血糖。所有 Wistar 大鼠均自由采食高脂饲料与饮水, 为期 4 个月。每次测定大鼠空腹血糖与注射 STZ 前, 均须对大鼠进行禁食、禁水 8 h。其次, 对所有 Wistar 大鼠空腹腹腔注射剂量为 20 mg/kg、浓度为 10 mg/mL 的 STZ 溶液, 连续注射 3 次。其中, 第二次与第一次注射间隔 7 天, 第三次与第二次注射间隔 3 天。

实验过程共对大鼠进行 3 次体重称量, 第一次于检疫合格后进行, 记为 mass_0; 第二次于高脂饲料饲养周期结束后进行, 记为 mass_1; 第三次于注射完 3 次 STZ 且观察 2 周后进行, 记为

mass_2。其中, mass_0、mass_1 和 mass_2 均为 12 只大鼠体重的平均值。

实验过程共对大鼠进行 6 次空腹血糖浓度测定, 分别为: 检疫合格后测定, 记为 FBG_0; 高脂饲料饲养周期结束后测定, 记为 FBG_1; 第一次给药后 7 天测定, 记为 FBG_2; 第二次给药后 3 天测定, 记为 FBG_3; 第三次给药后 3 天测定, 记为 FBG_4; FBG_4 后再观察 2 周测定, 记为 FBG_5。其中, FBG_0、FBG_1、FBG_2、FBG_3、FBG_4 和 FBG_5 均为 12 只大鼠空腹血糖的平均值。当最后一次测得的 FBG_5 空腹血糖浓度 ≥ 11.1 mmol/L, 即可视为 II 型糖尿病模型制备成功^[15-16], 并统计模型成功率。

2.3 数据处理

本文采用大鼠自身前后变化的数据作为统计数据来源。实验所得数据均以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 形式来表示, 并于 SPSS21.0 统计软件中使用配对样本 T 检验方法来对数据进行统计学意义分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

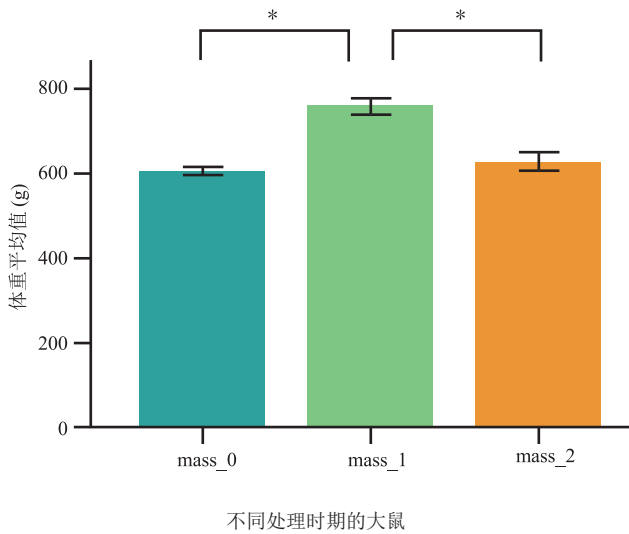
3 结果

3.1 大鼠变化概括

自由摄食高脂饲料与饮水后, 大鼠的体重明显增加。当注射 STZ 后, 大鼠空腹血糖浓度明显上升、体重下降, 还出现了活动减少、对外界刺激反应迟钝、毛发乱而发黄以及尿多等直观的现象; 实验过程均未出现大鼠死亡的情况。

3.2 大鼠体重变化

高脂摄食前, 大鼠体重均值为 604.8 ± 13.7 g, 高脂摄食后到在注射 STZ 前, 大鼠体重增加到 760.0 ± 31.6 g, 较高脂摄食前的体重均值明显增高 ($P < 0.05$)。注射 STZ 后, 大鼠的体重逐次降低, 直至最后一次测定空腹血糖时的 627 ± 33.5 g, 较注射 STZ 前的体重均值明显降低 ($P < 0.05$), 结果如图 1 所示。



“*”表示在 $P=0.05$ 的水平，两者比较存在显著性差异

图1 Wistar大鼠三次体重比较

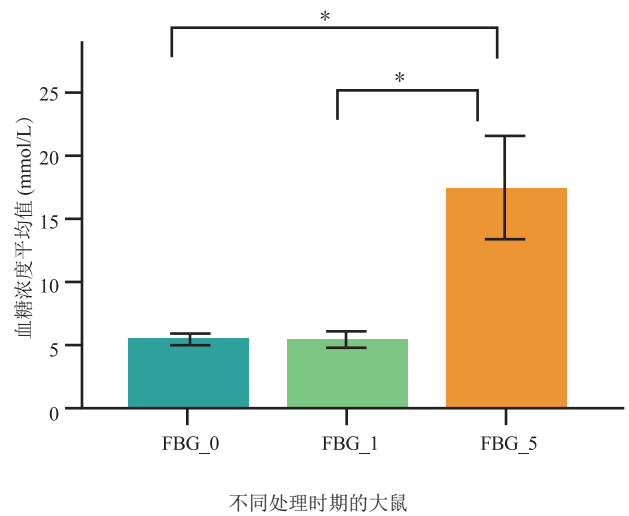
Fig.1 The weight changes of Wistar rats

3.3 大鼠空腹血糖浓度变化

Wistar大鼠自由采食高脂饲料前空腹血糖浓度 $FBG_0=5.6\pm 0.7$ mmol/L，与摄食高脂饲料后的空腹血糖 $FBG_1=5.5\pm 0.8$ mmol/L 间无明显差异(见图2)。第一次注射STZ后，测得 $FBG_2=23.9\pm 4.3$ mmol/L，且每只大鼠的空腹血糖浓度均高于糖尿病诊断标准的空腹血糖最低值 11.1 mmol/L，也显著高于 FBG_1 ($P<0.05$)。第二次、第三次注射STZ后，分别测得 $FBG_3=17.3\pm 3.8$ mmol/L、 $FBG_4=22.9\pm 2.7$ mmol/L，均未出现大鼠空腹血糖浓度小于 11.1 mmol/L 的情况。完成连续3次注射STZ后，继续观察2周测得空腹血糖浓度 $FBG_5=17.4\pm 6.4$ mmol/L，仍显著高于 11.1 mmol/L(见图2)，但发现其中两只大鼠血糖值低于糖尿病诊断标准的空腹血糖最低值 11.1 mmol/L。

4 讨论

人类II型糖尿病的患者人群一般以免疫力较低、行动迟缓、肥胖的老龄人为主，患者容易



“*”表示在 $P=0.05$ 的水平，两者比较存在显著性差异

图2 Wistar大鼠空腹血糖浓度变化

Fig.2 The changes of blood fasting glucose of Wistar rats

出现手脚麻木、感觉迟钝等不良病症，而且容易因浅表伤口感染而发展成糖尿病溃疡。糖尿病溃疡是II型糖尿病的并发症之一，该并发症多发于下肢、足部，且发病率高达15%^[17]。目前，临床上尚缺乏稳定有效的康复治疗方法。

一直以来，利用实验动物制备成的动物模型被视为研究疾病病理、疾病治疗的重要实验材料。因此，在稳定有效的康复治疗方法问世之前，建立II型糖尿病动物模型，可为深入探索II型糖尿病发病机理、攻克II型糖尿病并发症的新理论、新方法提供便利条件，进而为临床上该病症治疗方法的进步与出新提供可能。而在制备糖尿病动物模型方面，多数研究者以成年鼠为实验对象制备II型糖尿病动物模型：通过利用高脂饲料饲养大鼠一定时间，单次或多次腹腔注射低剂量STZ，均可成功构建II型糖尿病模型^[18-21]。由于这些研究中所用动物均为成年大鼠，所建模型并不能有效地模拟人类II型糖尿病中的“老龄化”特征。而在人类身体素质发展过程中，青少年或成年人的代谢能力与自主修复能力，均超过老年人的。这种规律同样适用于科

学研究用的实验动物。所以, 在制备与老龄属性相关的疾病模型时, 考虑使用哪种鼠龄阶段的大鼠作为实验对象显得较为重要。

为此, 本研究选取“老龄”雄性 Wistar 大鼠(免疫力降低、行动迟缓)为实验对象, 以仿效 II 型糖尿病的“老龄”特征; 其次, 给食高脂高糖饲料饲养时间长达 4 个月可诱导 Wistar 大鼠变得肥胖, 以仿效 II 型糖尿病的“肥胖”特征; 最后, 3 次注射低剂量的 STZ 溶液(剂量为 20 mg/kg, 浓度为 10 mg/mL)以逐渐破坏 Wistar 大鼠胰岛 B 细胞功能并且降低胰岛素代谢糖类的效率, 以仿效 II 型糖尿病的“高血糖”特征。

结果显示, 与摄食高脂饲料之前相比, 老龄大鼠自由采食高脂饲料后体重增加了 25.8%。这说明高脂饲料的给食显著促进了老龄大鼠体重的增加, 以致达到肥胖的程度。这符合人类 II 型糖尿病患者的特点之二——老龄、肥胖。在老龄与肥胖的基础上, 第一次注射 STZ 后, 测得的 FBG₂ 显著高于糖尿病诊断空腹血糖最低值 11.1 mmol/L, 且所有大鼠的空腹血糖浓度均高于这个标准。这说明 Wistar 大鼠对 STZ 敏感, 且大鼠体内平衡血糖的胰岛 B 细胞受到破坏。第二次注射 STZ 后, FBG₃ 比 FBG₂ 有所降低, 但仍然显著高于 11.1 mmol/L, 且没有出现低于该标准的情况。第三次注射 STZ 后, FBG₄ 比 FBG₃ 有所升高, 显著高于 11.1 mmol/L, 且没有出现低于该标准的情况。

在注射完 3 次 STZ 后, 使大鼠继续存活 2 周, 测得大鼠空腹血糖浓度 FBG₅ 为 17.4 ± 6.4 mmol/L, 显著高于 11.1 mmol/L, 但有两只大鼠空腹血糖浓度降到正常范围内, 即不符合糖尿病诊断标准。此外, 最后测得的大鼠体重 mass₂ 为 627.5 g, 较 mass₁ 降低了 17.5%, 但仍具有显著性差异, 而与采食高脂饲料前的 mass₀ 相比则无显著性差异。同时, 可观察到大鼠行动迟缓、活动减少、对外界刺激反应慢、尿

多。至观察期结束时, 未出现利用中高剂量诱导糖尿病模型时大鼠死亡的情况, 这说明低剂量的 STZ 在诱导大鼠 II 型糖尿病时更安全。

利用本文中的实验方案, 可以有效诱导出模拟人类 II 型糖尿病的动物模型。但值得注意的是, 血糖值的不稳定、波动幅度过大的话, 将会引起严重的问题, 甚至猝死。鉴于此, 在后续实验中, 可增设观察利用本方法制备的 II 型糖尿病模型的日常血糖值变化情况, 如一天多次测量血糖值, 进行糖耐量测试或确切地检测胰岛素代谢糖的效率, 以进一步验证该模型的有效性。同时, 严格增加注射生理盐水的组别, 而非仅采用大鼠自身前后变化的数据作为统计数据来源, 以获得更加严谨的实验结果。

5 结 论

本研究采用以高脂饲料增重的老龄雄性 Wistar 大鼠为实验对象, 在对老龄大鼠增重直至肥胖的基础上, 通过连续 3 次注射低剂量 STZ 溶液, 可成功诱导出稳定的“稳定型”糖尿病动物模型, 成功率为 83.3%。

参 考 文 献

- [1] 赵军. 老龄社会下中国养老保障问题及破解 [J]. 地方财政研究, 2014(6): 70-74.
- [2] 吴玉韶, 党俊武. 老龄蓝皮书——中国老龄产业发展报告(2014) [M]. 北京: 社科文献出版社, 2014.
- [3] 李伟芳, 王鹏, 李华, 等. 老年 2 型糖尿病慢性并发症发病时间及危险因素分析 [J]. 中国全科医学, 2015(14): 1632-1636.
- [4] Ruta LM, Magliano DJ, Lemesurier R, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in type 2 diabetes in developing and developed countries [J]. Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association, 2013, 30(4): 387-398.

- [5] Bashmakov YK, Assaad-Khalil SH, AbouSeif M, et al. Resveratrol promotes foot ulcer size reduction in type 2 diabetes patients [J]. *ISRN Endocrinology*, 2014, 2014: 816307.
- [6] Mineoka Y, Ishii M, Tsuji A, et al. Relationship between limited joint mobility of the hand and diabetic foot risk in patients with type 2 diabetes [J]. *Journal of Diabetes*, 2017, 9(6): 628-633.
- [7] Barry Gumbiner MD, Meher Battiwalla MD. 肥胖与 2 型糖尿病: 治疗的新挑战 [J]. *世界医学杂志*, 2002, 6(11): 10-12.
- [8] Morley JE, Malmstrom TK, Rodriguez-Mañas L, et al. Frailty, sarcopenia and diabetes [J]. *Journal of the American Medical Directors Association*, 2014, 15(12): 853-859.
- [9] Association AD. American diabetes association diagnosis and classification of diabetes mellitus [J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(Supplement 1): S81-S90.
- [10] Terauchi Y, Iwamoto K, Tamemoto H, et al. Development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the double knockout mice with disruption of insulin receptor substrate-1 and β cell glucokinase genes. genetic reconstitution of diabetes as a polygenic disease [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1997, 99(5): 861-866.
- [11] Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, et al. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic β -cell dysfunction in the *mody* mouse [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1999, 103(1): 27-37.
- [12] 姬秋和, 苏慧慈, 胡绍文, 等. 中国地鼠糖尿病模型胰岛 A、B 细胞数量及分布改变 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 1996, 12(1): 31-33.
- [13] Kawano K, Hirashima T, Mori S, et al. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain [J]. *Diabetes*, 1992, 41(11): 1422-1428.
- [14] Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin [J]. *Journal of Diabetes Investigation*, 2014, 5(4): 349-358.
- [15] 金勇, 朱勇, 吴南翔. 实验性链脲佐菌素诱导的大、小鼠糖尿病动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(3): 80-82.
- [16] Matteucci E, Giamaietro O. Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 115(2): 163-172.
- [17] 中国医师协会外科医师分会肥胖和糖尿病外科医师委员会. 中国肥胖和 2 型糖尿病外科治疗指南(2014) [J]. *糖尿病临床*, 2014, 8(11): 499-504.
- [18] 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]. *Experimental Diabetes Research*, 2008, 2008: 704045.
- [19] Islam MS, Wilson RD. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 933: 161-174.
- [20] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. *Pharmacological Research*, 2005, 52(4): 313-320.
- [21] Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. *Metabolism Clinical & Experimental*, 2000, 49(11): 1390-1394.