

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

吴 瑛, 张 勇, 姚合斌

[摘要] **目的** 探讨建立具有胰岛素抵抗、近似人2型糖尿病特征的SD大鼠模型。**方法** 将36只SD大鼠随机分为A组(对照组即普通饲料组)6只、B组(高脂饲料组)6只、C组[普通饲料+小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)组]12只、D组(高脂饲料+小剂量STZ组)12只共4组。C组、D组大鼠分别在普通饲料和高脂饲料喂养4周后使用小剂量STZ(30 mg/kg)腹腔注射5 d。随机血糖>16.7 mmol/L且持续2周为建模成功。**结果** C组、D组能建立2型糖尿病SD大鼠模型,成模率分别为66.7%(8/12)、91.7%(11/12)。**结论** 高脂饲料+小剂量STZ发病过程接近自然,成模率更高,模型稳定,是值得推广的2型糖尿病动物模型。

[关键词] 2型糖尿病;血糖;高脂;链脲佐菌素;模型,大鼠

[中图分类号] R587.1-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-3097(2017)06-0355-03

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2017.06.009

Study of streptozotocin and high-fat diet inducing type 2 diabetes in a rat model

WU Ying¹, ZHANG Yong², YAO Hebin³

(1. Department of Nutrition, Navy General Hospital, Beijing 100048, China; 2. Chinese People's Liberation Army 32150, Xinxiang Henan 453000, China; 3. Department of Endocrinology, Navy General Hospital, Beijing 100048, China)

[Abstract] **Objective** To set up a SD rat model similar to human type 2 diabetes mellitus with insulin resistance. **Methods** Thirty-six SD rats were randomized into four groups, normal group (group A, $n = 6$), high-fat diet group (group B, $n = 6$), low-doses streptozotocin group [group C, streptozotocin (STZ), 30 mg/kg, $n = 12$], and high-fat diet and low-doses STZ (30 mg/kg) group (group D, $n = 12$). Group C and D were induced by an injection of low-doses STZ (30 mg/kg) after 4 weeks of normal chow feeding and high-fat chow feeding respectively. Rats with random plasma glucose levels >16.7 mmol/L for 2 weeks were modeling success. **Results** Both normal chow feeding associated with low-doses STZ (30 mg/kg) and high-fat chow feeding associated with low-doses STZ (30 mg/kg) can establish type 2 diabetes animal model. The diabetes morbidity was 66.7% (8/12) in group C, and 91.7% (11/12) in group D. **Conclusion** Group D has moderately high blood sugar, insulin resistance, the success rate is high, and can be used as a good model of type 2 diabetes mellitus in relevant research.

[Key words] Type 2 diabetes mellitus; Blood glucose; High fat; Streptozotocin (STZ); Model, rat

糖尿病(diabetes mellitus, DM)及其慢性并发症已成为严重影响人类健康的全球性公共卫生问题之一。预计到2035年,全球将有近5.92亿人患DM^[1],其中2型DM(type 2 DM, T2DM)占90%以上。目前DM的病因及发病机制并未完全阐明,因此建立可靠的动物模型,对T2DM发病机制的研究、治疗和预防至关重要。目前复制T2DM动物模型的方法有很多种,如膳食诱导、药物诱导、基因敲除、自发性模型等^[2],但存在建模时间长、胰岛损伤重、经费高、不

能完全模拟人类T2DM的发生过程等诸多问题。本研究用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)加高脂饲料诱导建立T2DM大鼠模型,以筛选出更适合建立此模型的STZ剂量和饲料配方,为优化方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SD大鼠36只,无特定病原体级,体重150~180 g,由第三军医大学动物中心[SCXK-(渝)-2016-0004]提供。

1.1.2 饲料 普通饲料由第三军医大学实验动物

[基金项目] 解放军总后勤部保健专项课题(CWS14BJ38)

[作者单位] 100048 北京,海军总医院营养科(吴瑛);453000 河南新乡,中国人民解放军32150部队医院(张勇);100048 北京,海军总医院内分泌科(姚合斌)

中心提供。普通饲料含碳水化合物 53%、脂肪 25%、蛋白质 22%；高脂饲料为普通饲料添加 10%猪油、1%胆固醇混合加工而成，其中含碳水化合物 39%、脂肪 42%、蛋白质 19%。

1.1.3 试剂及仪器 STZ(美国 Sigma 公司)-20℃冻存,柠檬酸、柠檬酸三钠(天津市津宏化工有限公司);微量血糖仪及配套血糖试纸(美国强生公司),BS224S 电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 方法

1.2.1 建模方法

1.2.1.1 用药及制备 使用柠檬酸和柠檬酸三钠配制成 0.01 mol/L、pH 4.5 的柠檬酸缓冲液,4~8℃冷藏保存。使用前用 STZ 配制成 2%的 STZ 溶液。

1.2.1.2 动物饲养及分组 所有 SD 大鼠饲养环境为室温(23±1)℃,明暗周期 12 h,相对湿度 50%~60%,自由进食、水。适应性饲养 1 周后随机分为 A 组(对照组即普通饲料组)6 只、B 组(高脂饲料组)6 只、C 组(普通饲料+小剂量 STZ 注射组)12 只、D 组(高脂饲料+小剂量 STZ 注射组)12 只 4 组。

1.2.1.3 给药途径和剂量 4 组大鼠在分组 4 周后,禁食、不禁水 12 h,测空腹血糖,并同时称体重。A 组、B 组大鼠按 30 mg/kg 注射柠檬酸缓冲液,C 组、D 组大鼠按 30 mg/kg 连续 5 d 腹腔注射 2% STZ 柠檬酸缓冲液。

1.2.1.4 成模标准 随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 且持续 2 周为造模成功。

1.2.2 观察指标

1.2.2.1 一般状况 每日观察各组大鼠进食、饮水、排尿量及死亡情况,每周称重 1 次。

1.2.2.2 血清生化指标 建模后分别于第 3、7、14

天尾静脉测定血糖。实验大鼠于处死前空腹 12 h 禁食、不禁水,测完空腹血糖和体重后乙醚麻醉大鼠,静脉采血,放射免疫分析法测定空腹胰岛素。

1.2.2.3 苏木精-伊红染色 大鼠处死后,立即取出骨骼肌组织,放入甲醛溶液中浸泡;肌肉组织石蜡包埋,切片后行苏木精-伊红染色,观察大鼠骨骼肌组织变化。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成模 C 组成模率为 66.7%(8/12)、D 组成模率为 91.7%(11/12)。建模后,T2DM 大鼠较正常大鼠逐渐出现进食与水量增多、排尿增多、体重下降、精神萎靡、毛色枯黄、形体消瘦等特征。

2.2 体重 建模前各组大鼠体重差异无统计学意义(*P* > 0.05);建模后的 C 组、D 组体重明显低于 A 组,差异均有统计学意义(*t* 分别为 3.257、4.804,*P* 分别为 0.009、0.001),且 D 组体重下降明显。见表 1。

2.3 随机血糖 建模前,各组随机血糖值均在正常范围(4~6 mmol/L)。建模后,A 组、B 组随机血糖值仍维持在正常水平,C 组 8 只、D 组 11 只随机血糖值维持在 16.7 mmol/L 以上且持续 2 周。C 组、D 组在建模后随机血糖值高于 A 组,差异均有统计学意义(*t* 分别为 14.290、21.244,*P* 均为 0.000)。见表 1。

2.4 空腹血糖和胰岛素水平 建模后 C 组、D 组空腹血糖高于 A 组(*t* 分别为 16.023、14.290,*P* 均为 0.000),B 组空腹胰岛素高于 A 组(*t* = 2.999,*P* = 0.013)。见表 1。

表 1 建模前后大鼠体重、随机血糖、空腹血糖、空腹胰岛素($\bar{x} \pm s$)

组别	建模前				建模后			
	体重(g)	随机血糖(mmol/L)	空腹血糖(mmol/L)	空腹胰岛素(mU/L)	体重(g)	随机血糖(mmol/L)	空腹血糖(mmol/L)	空腹胰岛素(mU/L)
A 组(<i>n</i> = 6)	261.86 ± 30.52	4.99 ± 0.22	4.98 ± 0.65	9.85 ± 4.37	342.67 ± 57.77	5.36 ± 2.52	5.10 ± 0.16	12.32 ± 1.66
B 组(<i>n</i> = 6)	295.71 ± 75.25	5.03 ± 0.31	5.33 ± 0.58	11.73 ± 4.16	361.90 ± 25.01	7.42 ± 3.23	5.27 ± 0.21	15.23 ± 3.78*
C 组(<i>n</i> = 12)	259.22 ± 41.06	4.63 ± 0.51	4.92 ± 0.41	10.64 ± 5.32	301.30 ± 40.63*	19.30 ± 2.65*	18.15 ± 2.23*	10.93 ± 4.21
D 组(<i>n</i> = 12)	290.62 ± 56.00	4.18 ± 0.54	5.37 ± 0.80	11.85 ± 5.24	283.80 ± 33.66*	32.30 ± 3.98*	26.27 ± 2.65*	13.12 ± 2.11

注:与 A 组比较,**P* < 0.01,**P* < 0.05

3 讨论

理想的 DM 动物模型应该具有相似的发病诱因、发病过程和临床特征,高血糖动物模型是否能在一定程度上代表临床 T2DM 的病理特征,是评判动物实验模型成功的关键。本研究将高脂饮食与 STZ 干预相结合,采用成年 SD 大鼠高脂喂养 1 个月后,

产生胰岛素抵抗,再给予小剂量 STZ 腹腔注射成功诱导出病理、生理改变接近于人类的 T2DM 模型。

3.1 实验动物的选择 目前国内外对 DM 动物模型的研究很多,常根据不同的实验目的选择不同的动物,国内临床研究采用最多的是 SD、Wistar 大鼠。由于大鼠在建模过程中会出现多饮、多食、多尿及体

重明显减轻等 DM 症状,SD 大鼠与 Wistar 大鼠相比病死率低,抵抗力更强^[3],且少见自发缓解现象^[4-5],因此本实验选用了无特定病原体级的成年 SD 大鼠作为研究对象。

3.2 方法的选择 由于单纯高脂饲料喂养周期长,饲料成本较高,因此许多研究都选择药物联合诱导的方法;然而药物诱导 DM 模型也因药物选择、给药方式、给药剂量的不同,其成模效果也不同。给动物大剂量注射四氧嘧啶或 STZ 后破坏胰岛细胞,导致胰岛素分泌障碍,比较符合 1 型 DM 特征;多次小剂量注射 STZ、高脂饮食+小剂量 STZ 联合使用诱发 DM 模型比较符合 T2DM 特征^[6-7]。本实验采取高脂饮食+小剂量 STZ 腹腔注射,对组织毒性小,动物存活率高,且更好地模拟了人类 DM 的发生过程;实验结果也显示,高脂饮食可使大鼠体重明显增加,形成胰岛素抵抗,再给予小剂量 STZ 血糖明显升高且保持稳定水平,成模率较高。在注射部位选择上本实验采取腹腔注射,方法易于掌握,避免了静脉注射中因用药过量和速度过快导致心力衰竭^[8],注射部位固定也可保证成模后血糖数据的稳定性^[9]。

3.3 注射剂量的确定 关于 STZ 的用量,很多研究报道不一,小剂量一般在 25~40 mg/kg、大剂量一般在 50~70 mg/kg^[10-13],病死率也随着用药剂量的增大而增高^[13]。反复小剂量或大剂量一次性注射易造成胰岛细胞直接损伤,比较了有关文献报道后本实验选择 30 mg/kg 的剂量;实验结果也显示,此剂量条件下成模大鼠血糖值和胰岛素水平明显升高,具有胰岛素抵抗、高血糖、高胰岛素血症的 T2DM 临床特征。

3.4 成模标准的确定 关于 DM 大鼠成模水平的判断,目前国内外的研究对 DM 模型判定标准不一,大多数研究倾向于空腹血糖>7.8 mmol/L 或随机血糖 \geq 16.7 mmol/L^[14-15]。由于空腹时间大于 12 h,易造成低血糖且容易造成 DM 症状较重的大鼠死亡,因此选择随机血糖更为灵活、操作性更强。为了避免病情自发缓解的问题,分别在建模后第 3、7、14 天测定血糖,以建模后 14 d 随机血糖仍维持在 16.7 mmol/L 以上作为模型成功的标志,确保了模型的稳定性。

DM 是一种由代谢系统紊乱引起的内分泌疾病,其主要发病机制为胰岛素相对不足且伴随有胰岛素抵抗。本研究在借鉴前人研究的基础上将高脂饮食与 STZ 干预相结合,采用成年 SD 大鼠高脂喂养联合小剂量 STZ 腹腔注射的方法诱导实验鼠出现多饮、多食、多尿等 DM 症状,体重明显下降,血糖明显升高且出现胰岛素抵抗,其病理、生理改变接近

于人类 T2DM 模型,具有时间短、成模率高、血糖水平稳定的特点,是值得推广的 T2DM 模型。

【参考文献】

- [1] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 948-959.
- [2] 娄伟成, 宣金, 吴赛华, 等. 2 型糖尿病大鼠模型研究概况 [J]. *中国中医药咨讯*, 2011, 3(18): 88-90.
- [3] 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.
- [4] 余娇, 王繁麟, 徐兵, 等. 卡托普利对糖尿病肾病大鼠血浆同型半胱氨酸和肾功能的影响 [J]. *解放军医药杂志*, 2016, 28(5): 28-31.
- [5] 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(5): 737-738, 740.
- [6] 汤球. 2 型糖尿病大鼠模型的制备与评价 [J]. *四川医学*, 2011, 32(4): 463-465.
- [7] 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.
- [8] 殷成坤, 刘燕, 李晓霞, 等. 高脂饮食联合 STZ 建立 2 型糖尿病大鼠模型稳定性观察 [J]. *川北医学院学报*, 2016, 31(2): 178-182.
- [9] 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.
- [10] 蒋朝晖, 吕玉晶, 赵芳, 等. 高脂高糖饮食结合链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型的改良 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(1): 33-35, 44.
- [11] Tian ZH, Miao FT, Zhang X, et al. Therapeutic effect of okra extract on gestational diabetes mellitus rats induced by streptozotocin [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015, 8(12): 1038-1042.
- [12] Fukuoka CY, Torres Schröter G, Nicolau J, et al. Low-power laser irradiation in salivary glands reduces glycemia in streptozotocin-induced diabetic female rats [J]. *J Biophotonics*, 2016, 9(11/12): 1246-1254.
- [13] Afrin R, Arumugam S, Wahed MI, et al. Attenuation of endoplasmic reticulum stress-mediated liver damage by mulberry leaf diet in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(1): 87-101.
- [14] 黄焱, 陈恩玉, 陈雅芬, 等. 链脲佐菌素结合高糖高脂饮食诱导 2 型糖尿病大鼠模型 [J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(13): 2299-2301.
- [15] 王春田, 王莉, 石岩. 糖尿病动物模型制备方法探讨 [J]. *实用中医内科杂志*, 2011, 25(4): 27-30.