

## 大鼠 2 型糖尿病模型制备方法探讨

杜娟, 柯亭羽, 彭嘉睿, 赵玲, 赵黎莉, 李孔龙  
(昆明医科大学第二附属医院老年内分泌科, 云南昆明 650101)

**[摘要]** **目的** 建立大鼠 2 型糖尿病模型. **方法** SD 大鼠高糖高脂饮食饲养 2 月诱导胰岛素抵抗, 检测血脂及胰岛素水平, 并随机选取 20% 的实验动物进行正糖钳夹实验. 予大鼠腹腔注射小剂量链尿菌素 (STZ) 构建 2 型糖尿病大鼠模型. **结果** 高糖高脂饮食饲养 2 月可成功诱导大鼠胰岛素抵抗, 在诱导胰岛素抵抗后小剂量腹腔注射链尿菌素建立 2 型糖尿病模型. **结论** 高糖高脂饮食饲养诱导胰岛素抵抗后腹腔注射小剂量 STZ 可成功诱导 2 型糖尿病模型, 成模率高, 稳定性良好, 可重复性强.

**[关键词]** 大鼠; 胰岛素抵抗; 2 型糖尿病

**[中图分类号]** R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 09-0013-05

## Research on Model Preparation of Rats with T2DM

DU Juan, KE Ting-yu, PENG Jia-ru, ZHAO Ling, ZHAO Li-li, LI Kong-long  
(Dept. of Endocrinology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan  
650101, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish the rat model with T2DM. **Methods** SD rats were fed with high glucose and high fat diet for 2 months to induce insulin resistance, and then the levels of blood lipid and insulin were detected. 20% SD rats were selected randomly for the euglycemic clamp experiments, and the rat models with T2DM were established by intraperitoneally injection of small dose of STZ. **Results** Feeding with high glucose and high fat diet for 2 months could successfully induce the insulin resistance of rats, and the rat models with T2DM could be set up by intraperitoneally injection of small dose of STZ after inducing the insulin resistance. **Conclusion** It was possible to successfully induce the T2DM models through intraperitoneally injection of small dose of STZ after the insulin resistance rats feeding with high glucose and high fat diet, with high success rate of model establishment, well stability and repeatability.

**[Key words]** Rats; Insulin resistance; T2DM

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种受遗传和环境因素影响的多因素内分泌疾病, 其表现为以高血糖、糖尿和负氮平衡为特征的代谢紊乱, 常发生于肥胖、少运动和饮食习惯不良的人群中, 并引起视觉、神经和心血管等系统功能障碍等并发症<sup>[1,2]</sup>. 2 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的发病率占糖尿病发病率的 90%~95%, 胰岛  $\beta$  细胞功能进行性衰竭是该病发病和疾病进展的决定性因素, 其主要表现为胰岛素抵抗或胰岛素分泌不足, 并常伴有动脉粥样硬化、高血压

以及脂代谢异常. 2 型糖尿病已严重威胁人类健康及生命. 因而建立 2 型糖尿病动物模型对于研究该病及其并发症的病因、病机、转归、治疗及预防具有重要意义.

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物与喂养

健康断乳 (大约 3 周龄) SD 大鼠 40 只, 体重 (50.00  $\pm$  2.12) g, 由中国人民解放军军事医学科学

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (31260223, 81260229); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2012FB044)

**[作者简介]** 杜娟 (1964~), 女, 云南曲靖市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事内分泌科临床工作.

**[通讯作者]** 柯亭羽. E-mail: ketingu@hotmail.com

院实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (军) 2007-004. SD 大鼠有专人饲养, 室内通风良好, 室内温度保持在 18℃~22℃, 相对湿度在 40%~70%左右, 明暗周期 12 h, 自由饮水和进食, 每笼 5 只. 基础饲料由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供. 高糖高脂饲料由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供. 配方: 10%猪油, 10%果糖, 10%蛋黄, 5%胆固醇, 0.2%胆酸盐 SD 大鼠运至后先以基础饲料适应性喂养 3 d, 之后以高糖高脂饲料喂养 8 周.

## 1.2 动物模型的建立

**1.2.1 胰岛素抵抗** 予基础饲料适应性喂养 3 d, 再给予高糖高脂饲料喂养 8 周, 自由饮水和摄食, 以饮食诱导胰岛素抵抗. 饲养 8 周后, 实验动物行内眦采血, 检测血脂 (胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白) 及血胰岛素水平等指标检测, 并随机选择 20%的实验动物进行正糖钳夹试验, 以证明其存在胰岛素抵抗. 予小剂量链脲霉素 (streptozotocin, STZ 3%STZ 30 mg/kg 腹腔注射).

**1.2.2 2 型糖尿病** 每日观察动物进食量, 饮水量, 小便量, 1 周后观察动物体重变化, 出现明显“3 多 1 少”症状. 于注射 STZ 后 1 周对大鼠行葡萄糖耐量试验 (OGTT). 实验动物禁食、禁水 10 h, 称重, 以 30%的葡萄糖溶液按 2/3 mL/100 g 剂量予实验大鼠灌胃, 并于灌胃前 (空腹) 及灌胃后 30 min, 60 min, 120 min 测血糖, 从鼠尾采血以 1999 年 WHO 推荐的糖尿病诊断标准: (1) 餐后 2 h 或任何时间的静脉血浆葡萄糖浓度  $\geq 11.1$  mmol/L (200 mg/dL); (2) 空腹静脉血浆葡萄糖浓度  $\geq 7.0$  mmol/L (126 mg/dL), 为糖尿病动物模型标准. 未达到此标准的大鼠予同等剂量补充注射 1 次, 若仍未达标, 则予以剔除. 实验过程中, 如有动物死亡或糖尿病造模不成功则予以弃用, 补充动物再造模, 以保证动物数量相同.

## 1.3 标本的取材及固定

取出试验动物的胰腺、肝脏、肾脏, 常规脱水, 石蜡包埋, 5  $\mu$ m 切片.

## 1.4 观测指标

**1.4.1 血糖** 实验大鼠在建立糖尿病模式时, 腹腔注射小剂量 STZ 后 1 周, 行 OGTT 试验, 根据试验结果判断模型是否建立成功. 血糖值用强生稳豪型血糖仪直接将全血滴于配套的血糖试纸上测得.

**1.4.2 血脂及血胰岛素水平** SD 大鼠以高糖高脂饲料喂养 8 周以后, 实验动物内眦采血, 分别做抗凝和促凝处理, 静置 30 min 后, 低速离心 10 min 取上清, 送昆明医科大学第二附属医院检验科

测定血清高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、甘油三酯、总胆固醇和血胰岛素水平.

## 1.5 统计学分析

数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示应用 SPSS 统计软件, 采用 *t* 检验和方差分析进行统计学分析. 方差分析包括中提方差分析和两两比较的方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 实验动物一般情况

**2.1.1 体重及饮食、饮水量** 正常大鼠予普通饲料喂养, 体重成正常生长趋势, 喂养 8 周后大鼠已为成年鼠, 体重增长较慢; 实验大鼠在腹腔注射小剂量 STZ 后体重较前有所减轻, 5 周时有统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (在实验大鼠注射 STZ 时正常大鼠以同等剂量注射生理盐水). 实验大鼠在腹腔注射小剂量 STZ 后食量及饮水量较前明显增加 ( $P < 0.01$ ), 见表 1.

**2.1.2 血胰岛素水平** 实验动物以高糖高脂饮食饲养 8 周后, 采血测学胰岛素水平, 与普通饮食饲养的同龄大鼠的血胰岛素水平相比较, 两者有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 提示胰岛素抵抗模型成功建立, 见表 2.

**2.1.3 血脂** 实验动物以高糖高脂饮食饲养 8 周后, 采血测血脂水平 (总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白), 与普通饮食饲养的同龄大鼠的血脂水平相比较, 总胆固醇及低密度脂蛋白比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 提示胰岛素抵抗模型成功建立, 见表 3.

**2.1.4 血糖水平** 采用配对 *t* 检验对各组实验动物在建立糖尿病模型前后血糖水平进行比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 4.

### 2.2 显微镜下病理观察结果

**2.2.1 胰腺** 糖尿病模型建立后, 取实验动物胰腺行 HE 染色, 结果提示: 与正常大鼠对比胰腺内胰岛数量减少甚至消失, 提示大鼠胰腺功能受损, 见图 1.

**2.2.2 肝脏** 糖尿病模型建立后, 取实验动物肝脏行 HE 染色, 结果提示: 肝细胞气球样变性, 部分细胞内可见大小不等的空泡, 为脂肪滴, 部分胞质中脂肪滴将细胞核挤到细胞一侧成印戒状, 部分肝细胞完全坏死, 细胞核消失. 符合肝脂肪变表现, 见图 2.

**2.2.3 肾脏** 糖尿病模型建立后, 取实验动物肾脏行 HE 染色, 结果提示: 糖尿病大鼠肾小球球囊

腔消失,肾小管透明样变性(HE×200);糖尿病大鼠肾小球囊腔消失,肾小球有出血(HE×

表1 正常大鼠与2型糖尿病大鼠体重、食量、饮水量比较

Tab. 1 Comparison of weight, appetite and water intake between normal rats and T2DM rats

| 项目    | 体重(g)  |         | 食量(g) |         | 饮水量(mL) |          |
|-------|--------|---------|-------|---------|---------|----------|
|       | 正常大鼠   | T2DM    | 正常大鼠  | T2DM    | 正常大鼠    | T2DM     |
| 2周    | 158.08 | 157.26  | 14.25 | 14.14   | 24.00   | 22.80    |
| 5周    | 251.75 | 216.68* | 20.38 | 20.28   | 34.88   | 35.20    |
| 8周    | 317.35 | 324.36  | 27.50 | 27.24   | 42.38   | 42.88    |
| 注射后1周 | 332.63 | 314.53  | 28.00 | 35.59** | 46.25   | 139.41** |

与正常同龄大鼠比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

表2 正常大鼠与高糖高脂饲养8周大鼠血胰岛素水平比较 [ $\mu\text{IU/mL}$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

Tab. 2 Comparison of the insulin levels between normal rats and rats fed with high glucose and high fat diet [ $\mu\text{IU/mL}$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

| 指标     | 正常大鼠              | 高糖高脂饲养8周大鼠           |
|--------|-------------------|----------------------|
| 血胰岛素水平 | 23.59 $\pm$ 11.89 | 113.99 $\pm$ 32.96** |

与正常同龄大鼠比较, \*\* $P < 0.01$ .

表3 正常大鼠与高糖高脂饲养8周大鼠血脂比较 [ $\text{nmol/L}$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

Tab. 3 Comparison of the blood lipid between normal rats and rats fed with high glucose and high fat diet [ $\text{nmol/L}$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

| 组别         | 总胆固醇              | 甘油三酯            | 高密度脂蛋白          | 低密度脂蛋白            |
|------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| 正常大鼠       | 1.40 $\pm$ 0.22   | 0.39 $\pm$ 0.17 | 0.44 $\pm$ 0.16 | 0.70 $\pm$ 0.21   |
| 高糖高脂饲养8周大鼠 | 5.39 $\pm$ 1.39** | 0.21 $\pm$ 0.19 | 0.36 $\pm$ 0.11 | 4.94 $\pm$ 1.48** |

与正常同龄大鼠比较, \*\* $P < 0.01$ .

表4 大鼠建模前后血糖比较 [ $\text{nmol/L}$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

Tab. 4 Comparison of blood glucose levels before and after the model establishment [ $\text{nmol/L}$ , ( $\bar{x} \pm s$ )]

| 时间  | 空腹血糖             | OGTT 2小时血糖        |
|-----|------------------|-------------------|
| 建模前 | 4.69 $\pm$ 0.61  | 6.60 $\pm$ 0.72   |
| 建模后 | 9.43 $\pm$ 1.85* | 15.15 $\pm$ 1.84* |

与正常同龄大鼠比较, \* $P < 0.05$ .

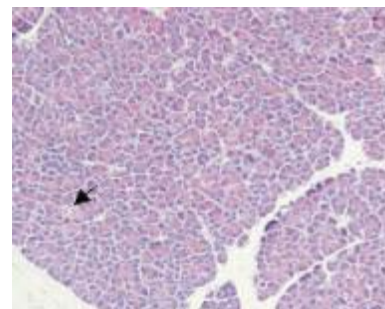
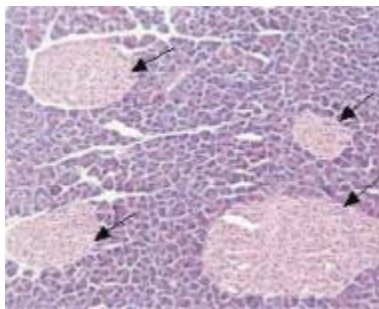


图1 正常大鼠与2型糖尿病模型大鼠胰腺HE病理染色(HE staining, ×100)

Fig. 1 The pancrease HE staining of normal rat and T2DM rat model (HE staining, ×100)

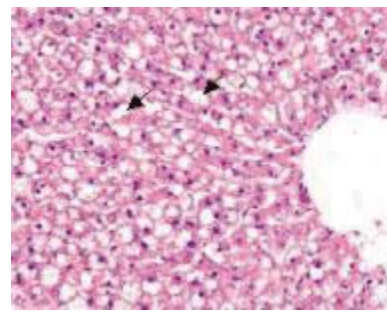
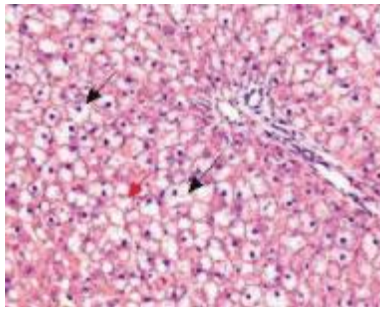
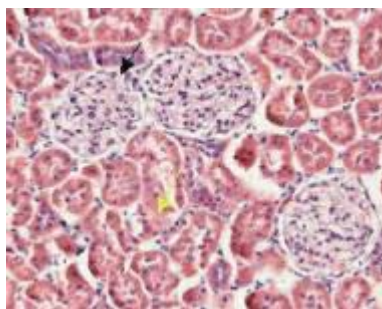
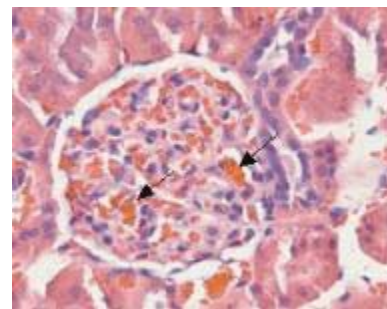


图 2 2 型糖尿病模型大鼠肝脏 HE 病理染色 (HE staining,  $\times 200$ )

Fig. 2 The liver HE staining of T2DM rat model (HE staining,  $\times 200$ )



(HE staining,  $\times 200$ )



(HE staining,  $\times 200$ )

图 3 2 型糖尿病模型大鼠肾脏 HE 病理染色

Fig. 3 The kidney HE staining of T2DM rat model

### 3 讨论

目前,国内外用于建立 2 型糖尿病动物模型的方法很多,大多集中于利用动物的遗传因素、特殊饮食和药物诱导等几种方法.国外学者多采用 db/db 基因小鼠、ob/ob 小鼠、Zucker fa/fa 大鼠、KK 小鼠、GK 大鼠、新西兰肥胖小鼠等动物模型,遗传因素在发病中起主要作用,能较好的较好地模拟 2 型糖尿病,对研究 2 型糖尿病有较大价值,但存在来源困难、价格昂贵、繁殖及饲养条件复杂、严格等问题,不能完全满足 2 型糖尿病的研究需要,应用有限.特殊膳食诱导糖尿病动物模型主要是通过给予动物特殊配比的饮食,使动物出现肥胖、胰岛素抵抗、胰腺  $\beta$  细胞过度分泌负荷过重导致细胞退变,从而引起糖尿病的发生.但此法对某些种属、品系的动物敏感性较差,稳定性及可重复性较低.药物诱导具有方法简便、经济、来源简单、并发症少等优点从而被广泛应用.国内学者多采用四氧嘧啶 (alloxan, ALX) 及链尿佐菌素诱导制备糖尿病动物模型,不同的动物对四氧嘧啶的敏感性不同,饲料和动物的营养状况也影响其致病率.因此该药物诱导糖尿病动物模型存在着组织毒性大、动物死亡率高、稳定性差等问题.链尿佐菌素 (STZ) 是一种广谱抗菌素,具有抗菌、抗肿瘤的药效.其主要副作用之一是对某些种属的胰腺

$\beta$  细胞具有高度选择性的毒性作用,可导致糖尿病. STZ 通过自由基损伤胰岛  $\beta$  细胞细胞,使  $\beta$  细胞功能受损,胰岛素合成减少,进而使动物产生糖尿病.不同的给药途径和给药剂量会导致不同的症状,高剂量引起 1 型糖尿病动物模型,多次小剂量注射诱导 2 型糖尿病.由于其组织毒性小,动物存活率高,诱发动物糖尿病模型成功率高,所以是目前国内外使用较多的一种实验性糖尿病动物模型.

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病发病机制的基本环节和显著特征之一,主要表现为机体对胰岛素的敏感性和反应性降低<sup>[3]</sup>.胰岛素抵抗与动脉粥样硬化性心血管疾病、血脂异常、内脏型肥胖等相关,饮食中高糖高脂成分增加使甘油三酯增加,从而导致游离脂肪酸升高,最终导致血循环中甘油三酯升高、非脂肪组织中甘油三酯的异位沉积<sup>[4]</sup>.过多的甘油三酯还可造成机体对葡萄糖的利用力下降,从而导致血糖上升<sup>[5]</sup>.本实验应用高糖高脂饮食饲养大鼠 2 月诱导胰岛素抵抗,在此基础上以小剂量 STZ 腹腔注射建立 2 型糖尿病模型,相关结果显示:高糖高脂饮食饲养后大鼠血清胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白均较正常大鼠升高,而高密度脂蛋白则较正常大鼠降低,血胰岛素水平

(下转第 35 页)

期的心理压抑和潜在压力会影响 16~22 岁患者的心理健康, 会加重错颌畸形对患者产生的负面社会心理影响, 造成抑郁、焦虑和恐怖。

本研究结果提示, 错颌畸形本身即对患者的心理产生不利影响, 而佩戴矫治器和矫治过程的不适很可能加重这一趋向, 进而对正畸治疗过程、结果以及医患关系产生负面效应。因此, 在临床工作中, 正畸临床医生在治疗前和治疗中了解和掌握患者的心理特征, 对于结合正畸患者自我感知和客观治疗需要因素, 为患者量身设计出适合其自身的治疗方案; 针对共性和个性的心理特征进行心理评估, 为后续临床心理干预相关研究, 减少医患纠纷的发生提供了重要的依据和指导。

#### [参考文献]

- [1] 李心天. 医学心理学[M]. 北京:北京协和医科大学出版社,2001:167-169.
- [2] 郭念锋. 国家职业资格培训教程心理咨询师(三级)[M]. 北京:民族出版社,2009:191-192.
- [3] 曾祥龙. 口腔正畸直丝弓矫治技术[M]. 北京:中国科学技术出版社,1984:84.
- [4] 徐斌,王效道. 心身医学[M]. 北京:中国科学技术出版社,2000:185-193,320.
- [5] 邓益辉,杨艳,孙伟. 口腔错颌畸形患者求治心理[J]. 中国心理卫生杂志,1998,12(4):242.
- [6] 牛百平,叶湘玉,王晓荣,等. 对错颌焦虑伴忧郁患者治疗方法的探讨[J]. 实用口腔医学杂志,1998,14(3):217-219.
- [7] ELIANE S A.Prevalence of malocclusion and the impact on quality of life 18 year old [J]. Oral Health PrevDent, 2005,3(4):217-224.
- [8] MCKIERNAN E X,MCKIERNAN F,JONES M L. Psychological profiles and motives of adults seeking orthodontic treatment [J]. Int J Adult Orthodon Orthognath Surg, 1992,7(3):187-98.
- [9] 李淑云,邵珺,王婕芯. 成人正畸患者心理健康状态的相关因素分析[J]. 现代口腔医学杂志,2007,21(5):479-481.
- [10] 尹璐,陈文静,陆树林. 心理因素对 16~22岁青年错颌畸形的正畸需要的影响[J]. 中国心理卫生杂志,2010,24(7):500-504.

(2014-05-13 收稿)

(上接第 16 页)

较正常大鼠升高。行正糖钳夹实验结果提示:大鼠存在胰岛素抵抗。腹腔注射小剂量 STZ 1 周后行 OGTT 试验,结果提示大鼠空腹及餐后 1、2、3 h 血糖均高于正常,且血糖高峰后移。胰腺切片提示胰岛数量减少,胰腺功能降低;肝脏切片提示肝细胞呈气球样变性,部分胞质内脂滴形成;肾脏切片提示部分肾小球囊腔消失、肾小管透明变性。以上结果均说明实验制备的是 2 型糖尿病大鼠模型,且成模率高,稳定性好。

#### [参考文献]

- [1] SAVAGE D B,PETERSEN K F,SHULMAN G I. Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Possible Links With Inflammation[J]. Hypertension,2005,45(3):828-833.
- [2] WILD S,ROGLIC G,GREEN A,et al. Global Prevalence of diabetes : estimates for the year 2000 and projections for 2030[J]. Diabetes Care,2004,27(5):1 047-1 053.
- [3] BLONDEL O,BAILBE D,PORTHA B. Insulin resistance in rats with noninsulin-dependent diabetes induced by neonatal (5days) streptococin: evidence for reversal following phorizing treatment [J]. Metabolism,1990,29(8):787-789.
- [4] UNGER R H,OREI L. Disease of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders [J]. FASEB J, 2002,12(6):312-315.
- [5] McGanyjdBantinglecture2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2002,51(16):7-18.
- [6] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2009 [J]. Diabetes Care, 2009,32(suppl 1):S13-S61.

(2014-05-10 收稿)