

高脂饮食结合 STZ 诱导妊娠期糖尿病小鼠模型的建立

陈琳¹, 黄小丽¹, 杨亚旭¹, 周美佳¹, 郝臻凤², 孔桂美¹, 胡荣¹, 卜平¹

(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州 225000; 2. 泰兴市人民医院, 江苏 泰州 225300)

【摘要】目的 探讨稳定、可靠与妊娠期胰岛素抵抗相似的小鼠模型建立方法。**方法** 将 60 只 SPF 级 5 周龄 KM 小鼠随机分为高脂饮食组和普食组, 高脂饮食组高脂饲料喂养 4 周后, 按雌雄 1:1 合笼, 在雌鼠阴道看到阴道栓定位妊娠第一天。妊娠成功后, 按 30 mg/kg 间隔 24 h 腹腔注射, 共注射 3 次, 对照组注射等量的柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L, pH=4.2)。于造模成功后的第 3、7、14 及 19 天记录小鼠的随机血糖, 体重, 以及 24 h 的饮水量和摄食量。ELISA 检测血清中 INS、ADP、LEP 和 CRP 因子的浓度。**结果** 孕鼠在造模成功后出现明显饮水量、摄食量、尿量增多症状, 饮水量、摄食量与对照组相比有显著差异($P < 0.01$), 造模组血糖 > 11.1 mmol/L, 明显高于对照组。GDM 组 INS(1.50 ± 0.25) μ mol/L, ADP(0.65 ± 0.13) μ g/L, LEP(1.60 ± 0.12) μ g/L, CRP(37.54 ± 4.70) μ g/L, 与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。产后, 小鼠血糖恢复到正常水平。**结论** 高脂饮食结合小剂量 STZ 多次诱导的方法能够建立的 GDM 模型且符合人类妊娠期糖尿病病理胰岛素抵抗的特征。

【关键词】 妊娠期糖尿病; 高脂饮食; 链脲佐菌素; 模型; 小鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0015-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.004

High fat diet combined with streptozotocin-induced gestational diabetes mellitus on mice

CHEN Lin¹, HUANG Xiao-li¹, YANG Ya-xu¹, ZHOU Mei-jia¹, HAO Zhen-feng², KONG Gui-mei¹, HU Rong¹, BO Ping¹

(1. School of Medicine, Yangzhou University, Jiangsu Yangzhou 225000, China;

2. Taixing People's Hospital, Jiangsu Taizhou 225300, China)

【Abstract】Objective To explore a gestational insulin resistance mice model establishing method, which is steady, reliable and similar to human being. **Method** Female KM mice at 5 weeks were randomly divided into high fat diet group($n=30$) and normal diet group($n=30$). High fat diet group was exposed to high diet for 4 weeks, and then male and female were mated($n:n=1:1$). Then the pregnancy mice were intraperitoneal injected with 30 mg/kg/d STZ during the first 3 days, the control group was injected with equal dosage of citrate buffer solution(0.1 mol/L, pH=4.2) for 3 days. Their blood glucose, body weight, the amount of food intake and water intake were recorded at 3, 7, 14 and 19 d of the GDM model respectively. The serum INS, ADP, LEP, CRP were measured by ELISA. **Results** We successfully made the GDM mice model, and the pregnant mice showed significant signs of polyuria, polydipsia, hyperphagia and weight loss compared to the control model($P < 0.01$). The blood glucose of GDM mice > 11.1 mmol/L, the serum cytokines (INS(1.50 ± 0.25) μ mol/L, ADP(0.65 ± 0.13) μ g/L, LEP(1.60 ± 0.12) μ g/L, CRP(37.54 ± 4.70) μ g/L

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(81272537;30801497);江苏省高校自然科学基金资助项目(11KJB360010);扬州大学“新世纪人才工程”资助(2012)。

【作者简介】陈琳(1991-),女,硕士,专业:药剂学。E-mail: chenlin910107@163.com。

【通讯作者】孔桂美(1978-),女,副教授,研究方向:肿瘤防治及人类疾病动物模型研究。E-mail: gmkong@yzu.edu.cn; 胡荣(1957-),女,教授,研究方向:药剂学及中药药剂学。E-mail: 398563432@qq.com。

L) of GDM mice were significant difference compared to the control model ($P < 0.01$). Postpartum, the GDM mice blood glucose returned to the normal level. **Conclusion** Gestational diabetes mellitus mice model can be successfully developed by high fat diet with low dose STZ and three times induce, which preferable mimics the characteristic of gestational pathologic insulin resistance in human beings.

【Key words】 Gestational diabetes mellitus; High fat diet; Streptozotocin; Model; Mice

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 系指在妊娠期首次发现或发生的糖代谢异常, 是孕期常见的并发症之一。GDM 对孕妇、胎儿, 甚至新生儿、婴儿等产生许多不良影响, 增加了巨大儿、畸形胎儿及死胎的发生率, 也增加了 II 型糖尿病家族史的妇女患心血管疾病的风险。由于妊娠期的特殊性, 使很多有创性研究无法展开, 在一定程度上限制了对 GDM 病理生理等方面的深入研究, 因此 GDM 动物实验模型的建立有助于对 GDM 更进一步的研究。目前国内外建立糖尿病动物模型已有很多成熟的方法, 但制作 GDM 的动物模型截止今日尚无成熟的办法。胰岛素抵抗 (IR) 被认为是 GDM 发生的病理生理基础^[1], 而在众多影响胰岛素抵抗的众多因素中, 饮食结构中脂肪比例增加是形成肥胖和胰岛素抵抗的重要因素^[2]。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 是目前广泛用于建立糖尿病动物模型的化学诱导剂^[3]。本研究我们结合妊娠期的特殊性, 以及以往建立糖尿病模型的方法, 采用高脂饮食诱导结合小剂量 STZ 多次诱导的方法建立 GDM 的动物模型, 并通过血糖的测定, 血清中与糖尿病相关的炎症因子含量的测定等指标来确定模型建立情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 4 周龄 KM 小鼠 60 只 (雌雄各半), 体重 18 ~ 22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2012 - 0001】。小鼠饲养环境为扬州大学比较医学中心【SYXK (苏) 2012 - 0029】, 按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 实验试剂

链脲佐菌素 STZ (美国 Sigma 公司), 柠檬酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 柠檬酸钠 ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (国药集团), 高脂饲料 (上海普路腾生物科技有限公司), 血糖仪和试纸 (三诺生物传感股份有限公司), 血胰岛素 (insulin, INS)、脂联素 (adiponectin, ADP)、瘦素 (leptin, LEP)、C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 因子的酶联免疫吸附试验盒 (ELISA) (上海丰翔生物科技有限公司)。

1.3 造模方法

KM 小鼠适应性饲养一周后, 随机分为两组高脂饮食组和普通饮食组, 每组 30 只。高脂饲料在普通饲料的基础上添加猪油、蔗糖、酪蛋白和麦芽糊精等, 供能比例分别为脂肪 45%, 粗蛋白 19%, 碳水化合物 36%。喂养 4 周后, 小鼠达 9 周龄, 按雌雄 1 : 1 合笼, 在雌鼠阴道看到阴道栓定为妊娠第 1 天, 取合笼后 3 d 内见栓的定为同一实验批次, 造模组 3 d 内 16 只妊娠成功, 对照组 22 只妊娠成功。妊娠成功后, 给予 STZ 新鲜溶液 (溶于现配制的柠檬酸缓冲溶液中), 根据预实验摸索的条件 30 mg/kg 间隔 24 h 腹腔注射, 共注射 3 次, 对照组注射等量的柠檬酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH = 4.2)。模型成功判定标准: 孕鼠随机血糖 > 11.1 mmol/L。

1.4 检测及观察指标

①观察各组小鼠的一般情况, 分别于高脂饲料喂养前及喂养 4 周后记录小鼠体重, 并分别在造模成功后的第 3、7、14、19 天记录小鼠的体重, 以及 24 h 的饮水量和摄食量。②通过剪尾法用血糖仪检测各组孕鼠造模成功后第 3、7、14 及 19 天的血糖。③血清的采集: 采用内眦取血的方法于妊娠第 18 天采血, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血清。采用酶联免疫吸附试验法 (ELISA) 测定, 酶联免疫吸附试验法应用双抗夹心法测定样本中的因子水平, 实验时按照试剂盒中说明书的步骤分别测定血清中 INS、ADP、LEP、CRP 因子的浓度。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 17.0 版本软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况观察

高脂饲料喂养 4 周后小鼠体重增长较快, 与普食组有显著差异 ($P < 0.01$), 高脂 4 周时, 高脂组与普食组的血糖值无显著差异。30 mg/kg STZ 小剂量多次注射造模成功后 (血糖 > 11.1 mmol/L) 于第 3 天开始出现饮水量、摄食量及尿量增多, 明显消瘦, 毛发渐无光泽, 且摄食量与饮水量与对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1 高脂饮食诱导前后小鼠体重以及成模后 24 h 饮水量、摄食量的变化

Tab. 1 Changes in body weight, 24 h water intake, 24 h food intake of mice with different diets in different groups				
组别 (Group)	高脂前体重 BW before high diets (g)	4 周后体重 BW after high diets for 4 weeks(g)	摄食量 Food intake (g/24h)	饮水量 Water intake (g/24h)
造模组 (GDM)	20. 4 ± 3. 9	38. 9 ± 4. 3 [△]	19. 9 ± 0. 28 [△]	28. 8 ± 0. 74 [△]
对照组 (Control)	22. 6 ± 3. 5	34. 7 ± 2. 8	15. 5 ± 5. 2	19. 2 ± 6. 6

注: $\Delta P < 0. 01_{\text{vs}}$ 对照组。
Note: $\Delta P < 0. 01_{\text{vs}}$ control groups.

表 2 妊娠期糖尿病小鼠与对照组血糖比较 (mmol/L)

Tab. 2 Blood glucose levels in different groups (mmol/L)						
组别 (Group)	高脂前 Before high diets	高脂后 After high diets	3 days	7 days	14 days	妊娠结束 Pregnancy terminations
造模组 (GDM)	6. 2 ± 1. 4	6. 1 ± 0. 7	13. 5 ± 1. 2 [△]	14. 2 ± 5. 8 [△]	13. 6 ± 2. 8 [△]	6. 6 ± 1. 9
对照组 (Control)	6. 6 ± 0. 9	5. 8 ± 0. 9	5. 2 ± 0. 8	6. 2 ± 1. 0	6. 4 ± 0. 6	6. 6 ± 2. 4

注: $\Delta P < 0. 01_{\text{vs}}$ 对照组。
Note: $\Delta P < 0. 01_{\text{vs}}$ control groups.

表 3 造模组和对照组 INS、ADP、LEP 和 CRP 水平比较

Tab. 3 Comparison of levels of INS, ADP, LEP, CRP in different groups					
组别 (Group)	数量 <i>n</i>	INS (Mu/L)	ADP (μg/L)	LEP (μg/L)	CRP (μg/L)
造模组 (GDM)	10	1. 50 ± 0. 25 [△]	0. 65 ± 0. 13 [△]	1. 60 ± 0. 12 [△]	37. 54 ± 4. 70 [△]
对照组 (Control)	10	0. 47 ± 0. 08	1. 53 ± 0. 33	0. 49 ± 0. 28	18. 29 ± 3. 81

注: $\Delta P < 0. 01_{\text{vs}}$ 对照组。
Note: $\Delta P < 0. 01_{\text{vs}}$ control groups.

2.2 KM 小鼠模型稳定性及血糖变化比较

高脂饲料喂养 4 周后,高脂组与普食组血糖并无统计学差异,于是在妊娠成功后,进行 30 mg/kg STZ 小剂量诱导 3 次,每次间隔 24 h,造模组 16 只小鼠 10 只造模成功,成模率约 60%,无死亡,与对照组孕鼠相比血糖值明显升高($P < 0. 01$)(表 2),随着妊娠的进展并无降低,直至妊娠结束血糖恢复正常水平。

2.3 小鼠血清中 INS、ADP、LEP、CRP 因子的浓度

酶联免疫吸附试验法 (ELISA) 结果表明,造模组血清中 INS、ADP、LEP、CRP 因子的含量与对照组相比差异显著(表 3)。

3 讨论

目前建立 II 型糖尿病动物模型的方法有很多种,运用较为广泛的是通过链脲佐菌素或四氧嘧啶破坏胰岛 β 细胞。而肥胖是 GDM 发生的高危因素,胰岛素抵抗是 GDM 发生的病理生理基础。通过高脂饲料诱导复制胰岛素抵抗大鼠模型成功的例子很多^[4-6],为我们建立妊娠期糖尿病动物模型提供了借鉴。张婕等^[7]在确定小鼠受孕成功之日

起采用高糖高脂饮食诱导建立妊娠期模型,但是鉴于小鼠妊娠时间短,只有 19 ~ 21 d,短期高糖高脂饲料诱导并不能达到升高血糖的效果。姜骊^[8]、李强^[9]等分别采用高脂饮食结合一次性注射 STZ 的方法建立 II 型糖尿病小鼠模型,对此我们也在预实验中进行了尝试,但是因为可能外在因素的差异,并没有达到预期的实验效果,所以我们采用高脂饲料诱导结合小剂量多次注射 STZ 的方法建立妊娠期糖尿病小鼠模型。本实验方案是通过预试的,尤其是 STZ 的诱导剂量,剂量过大可以引起明显的胰岛 β 细胞受损,血糖明显升高,建立的是 I 型糖尿病,死亡率也较高。剂量过低,血糖没有变化。因此,预实验是必需的。

GDM 的 IR 程度高于正常妊娠妇女,所以胰岛素分泌能力也代偿性增加,因此 GDM 的胰岛素水平高于正常妇女。诸多证据表明,在 IR 发展至 GDM 的过程中,炎症反应扮演了重要角色,CRP 是导致炎症反应的重要因子,最近研究发现 CRP 作为一种炎症因子与妊娠生理和病理关系较为密切。CRP 为妊娠期糖尿病 (GDM) 早期发现与预防提供了一个新靶点^[10-12]。糖代谢异常的孕妇孕期体重增加和脂肪过度积累,增加的体脂合成了更多的瘦

素,以及更强的 IR 及代偿性胰岛素分泌增加,形成高胰岛素血症,促进瘦素合成^[13-14]。脂联素是脂肪组织产生的对抗 IR 与炎症反应的一种蛋白质,GDM 的脂联素水平是降低的,它与 TNF- α 和瘦素呈负相关^[15-17]。本实验通过高脂饮食诱导结合小剂量 STZ 多次诱导后,小鼠的摄食量、饮水量、尿量明显增多,血糖、胰岛素水平、血清中 C 反应蛋白、瘦素水平明显升高,脂联素水平明显下降,产后血糖恢复正常水平,符合人类妊娠期糖尿病的主要表型特征和相似的发病过程,说明高脂饮食诱导结合小剂量 STZ 多次诱导是一种理想的建立妊娠期糖尿病模型的方法,为研究妊娠期糖尿病提供了可靠的研究媒介,使得产科临床无法开展的操作成为可能。

参考文献:

- [1] 张娅,徐先明. 妊娠期糖尿病病因学研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2013,29(4):299-302.
- [2] Morens C, Sirot V, Scheurink AJ, *et al.* Low carbohydrate diets affect energy balance and fuel homeostasis differentially in lean and obese rats[J]. *Am J PhysiolRegul Integr Comp Physiol*, 2006, 291(1):R1622-R1629.
- [3] MatteucciE, Giampietro O. Proposal open for discussion Defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research[J]. *J E thnopharmacol*, 2008, 118(3):163-172.
- [4] 吴晏,韩静,黄黎明,等. 高脂喂养合并小剂量链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型[J]. 中国实验动物学报,2012,20(2):11-15.
- [5] 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.
- [6] 张丽丽,黄亚娟,葛声,等. 高脂饮食诱导妊娠期胰岛素抵抗大鼠糖代谢特征[J]. 现代妇产科进展,2009,18(6):446-449.
- [7] 张婕,王琦,杨建军,等. 高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型的建立[J],宁夏医科大学学报,2013,35(7):756-758.
- [8] 姜骊,陈辉,何勇,等. 高脂饮食加低剂量链脲毒素建立小鼠 2 型糖尿病模型[J],中国比较医学杂志,2010,20(3):35-38.
- [9] 李强,丁实,周剑宇,等. 高脂饮食合并不同剂量 STZ 建立小鼠 2 型糖尿病模型[J],承德医学院学报,2013,30(1):5-7.
- [10] 韩姪,牛秀敏. C 反应蛋白与妊娠期糖尿病的研究进展[J]. 国外医学妇产科学分册,2006,33(1):20-23.
- [11] Myles W, Kar en H, Laura S, *et al.* First-trimester-reactive protein and subse-quent gestational diaetes[J]. *Diabetes Care*, 2003(6), 26: 819-824.
- [12] Retnakaran R, Hanley A J, Raif N, *et al.* C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity [J]. *Clin End ocrinol Metab*, 2003, 88(8): 3507-3512.
- [13] Qiu C, Will iams M A, Vadachkor ia S, *et al.* Increased maternal plasma leptin in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus[J]. *Obstet Gynecol*, 2004, 103(3):519-525.
- [14] Kautzky W A, Pacini G, Tura A, *et al.* Increased plasma leptin in gestational diabetes[J]. *Diabetol ogia*, 2001, 44(2): 164-172.
- [15] 周桂菊,丛林. 脂联素与妊娠关系的研究进展[J]. 国外医学妇产科学分册,2007,34(3):159-161.
- [16] Ranh eim T, Haugen F, Staf f A C, *et al.* Adiponectin is reduced in gestational diabetes mellitus in normal weight women [J]. *Acta Obstet Gynecology Scand*, 2004, 83(4): 341-347.
- [17] Williams M A, Qiu C, Muy R, *et al.* Plasma adiponectin concent rations in early pregnancy and sub sequent risk of gestational diabetes mellitus[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(7): 2306-2311.

[修回日期]2016-01-13