

小鼠间断性禁食模型的建立及其对葡萄糖内稳态的影响

马澜婧, 张浩浩, 丁美玲, 张成博, 倪耀宗, 田祖宏, 唐光波, 窦建华, 聂勇战*

(第四军医大学西京医院肿瘤生物学国家重点实验室, 西安 710032)

【摘要】 目的 探寻稳定、可靠替代传统热量限制的小鼠模型建立方法及其对葡萄糖内稳态的影响。**方法** 将 40 只 SPF 级 16 周龄 C57BL/6J 小鼠(雌雄各半)随机按性别及喂养方式分为四组。自由饮食组给予基础饲料自由取食, 间断禁食组正常饮食和禁食各 24 h 交替进行, 禁食日可自由饮水。监测各组小鼠体质量和血糖变化情况, 并与建模前和建模 12 周行经腹腔葡萄糖耐量实验和经腹腔胰岛素耐量实验。**结果** 小鼠间断性禁食 12 周后, 体质量和空腹血糖未见明显变化。腹腔注射葡萄糖后血糖上升幅度减轻, 腹腔注射胰岛素后血糖下降比例增加。与对照组相比, 上述耐量实验曲线下面积均明显减低($P < 0.05$)。结论小鼠间断性禁食后胰岛素敏感性增加, 糖耐量改善, 且该造模方法操作简单, 可作为替代传统热量限制模型的有效选择。

【关键词】 热量限制; 间断性禁食; 葡萄糖内稳态; 胰岛素

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 07-0024-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.07.005

Establishment of a mouse model of intermittent fasting and characterization of its effect on glucose homeostasis

MA Lan-jing, ZHANG Hao-hao, DING Mei-ling, ZHANG Cheng-bo, NI Yao-zong, TIAN Zu-hong,
TANG Guang-bo, DOU Jian-hua, NIE Yong-zhan*

(The State Key Laboratory of Cell Biology, Xi Jing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'An 710032, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable and reliable mouse model as an alternative to the traditional model of impaired glucose tolerance induced by calorie restriction and its effect on glucose homeostasis. **Methods** Forty 16-week-old SPF C57BL/6J mice (half male and half female) were randomly divided into four groups by sex and the way of feeding. The mice in the ad libitum (AL) group had free access to basic diet, while the mice in the intermittent fasting (IF) group had normal diet and fasting on alternate days, with free access to water on the fasting days. The changes of body weight and blood glucose concentration in each group were monitored, and intraperitoneal glucose tolerance test and insulin tolerance test in mice were performed before and after the 12-week IF treatment. **Results** At 12 weeks after IF treatment, the body weight and blood glucose concentration of mice did not show significant difference. After i. p. injection of glucose, the blood glucose concentration of IF mice was less increased than the AL group, and after the insulin injection, the blood glucose concentration was more decreased. Compared to the AL group, the areas under the curve of tolerance test in the IF group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** After IF treatment, the mice show an enhanced sensitivity to insulin and improved glucose tolerance. This establishment method of mouse model of intermittent fasting is easy and simple, therefore, can be used as an effective alternative to traditional calorie restriction model of impaired glucose

【基金项目】 国家自然科学基金重大国际合作项目(编号:81120108005)。

【作者简介】 马澜婧(1987-), 女, 硕士生, 研究方向: 肝脏糖脂代谢。Email: malanjing@sohu.com

【通讯作者】 聂勇战(1970-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 肝脏糖脂代谢。

tolerance.

【Key words】 Caloric restriction; Intermittent fasting; Glucose homeostasis; Insulin

代谢综合征是一组以中心性肥胖、脂质代谢紊乱、高血压、高血糖,胰岛素抵抗为表现的症候群。代谢综合征是导致糖尿病、脂肪肝和心血管病的重要危险因素^[1]。饮食限制被认为可逆转代谢综合征,可有效预防糖尿病及心脑血管疾病。建立饮食限制模型是研究代谢综合征发病机制及治疗靶点的重要基础。传统热量限制(calorie restriction, CR)是指在保证不发生营养不良的基础上,将每日摄取的总热量限制到自由饮食的 60% ~ 70%^[2]。已有大量文献报道 CR 可防治衰老相关慢性疾病。但是其动物模型实施困难,难以精确控制,对其动物模型的探索已成为实验动物学研究的一个重要内容。

间断性禁食(intermittent fasting, IF),指的是通过自由摄食和禁食交替来达到限制热量摄入的作用,通常采用隔日禁食,即正常饮食日和禁食日各 24 h 交替进行^[3]。目前已有多项临床研究表明应用该饮食疗法可使机体胰岛素敏感性增加,糖耐量改善,与 40% 热量限制的保护性作用类似^[4-6]。本实验将对 C57BL/6J 小鼠行间断性禁食,观察间断性禁食对小鼠体质量、空腹血糖、糖耐量和胰岛素敏感性的影响,旨在探索更加简便、操作性高的饮食限制动物模型,作为替代热量限制更为稳定、可靠的选择。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

SPF 级 16 周龄 C57BL/6J 小鼠 40 只,雌雄各半,雄鼠体质量 26.20 ± 1.27 g,雌鼠体质量 21.82 ± 0.94 g,购自第四军医大学动物实验中心【SCXK(军)2012-0007】。小鼠饲养在第四军医大学动物实验中心【SYXK(军)2012-0023】,环境温度:(22 ± 2)℃,相对湿度 50% ~ 60%,光照 12 h/12 h 明暗交替,每笼 5 只饲养,并按实验动物使用的“3R”原则给人以人道主义关怀。

1.2 主要试剂和仪器

50% 高糖注射液(湖北科伦药业有限公司),生理盐水(山东辰欣药业有限公司),胰岛素(优泌林 R,美国礼来公司),血糖仪和试纸(新活力型,瑞士罗氏公司)。

1.3 造模方法

16 周龄 C57BL/6J 小鼠随机按性别及喂养方

式分为四组,每组各 10 只。自由饮食(ad libitum, AL)组给予基础饲料自由取食,间断禁食组正常饮食和禁食各 24 h 交替进行,禁食日可自由饮水。考虑到小鼠昼夜节律的影响,固定于下午 6:00 供应食物。

1.4 检测及观察指标

1.4.1 体质量及血糖

造模前及间断性禁食开始后每周监测空腹体质量(fasting body weight, FBW),每两周通过剪尾法用血糖仪监测空腹血糖(fasted blood glucose, FBG)。

1.4.2 经腹腔葡萄糖耐量实验(intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)

实验前一日下午 6:00 至第二日早上 10:00,小鼠禁食不禁水,一般禁食不超过 16 ~ 18 h。小鼠称重,按 2 g/kg 的剂量,腹腔注射葡萄糖。50% 葡萄糖注射液用无菌去离子水配制成 20% 葡萄糖注射液,小鼠 100 μ L/10 g 腹腔注射。分别检测空腹 16 h 血糖和给葡萄糖后 15、30、60、90、120 min 血糖数值,观察血糖变化趋势。绘制曲线后计算曲线下面积(area under curve, AUC)。

1.4.3 经腹腔胰岛素耐量实验(intraperitoneal insulin tolerance test, IPITT)

实验当天上午 9:00 至 15:00,小鼠禁食不禁水,一般禁食不超过 6 h。按 1 U/kg(雌鼠 0.75 U/kg)剂量腹腔注射短效胰岛素,胰岛素用无菌生理盐水稀释。分别检测禁食 6 h 血糖及腹腔注射胰岛素后 15、30、60、90、120 min 血糖数值,观察和统计胰岛素对血糖变化的影响。部分小鼠注射胰岛素后会出现惊厥现象,出现此现象立即腹腔注射 1 mL 20% 葡萄糖注射液。实验操作终止。将注射胰岛素后血糖下降比例绘制成曲线,计算曲线下面积。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 19.0 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 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 小鼠体质量及血糖变化趋势

每周监测空腹体重,雌雄小鼠均维持在恒定水平,波动小于 5% 体重(图 1A);每两周检测空腹血糖,亦未见明显下降趋势(图 1B)。

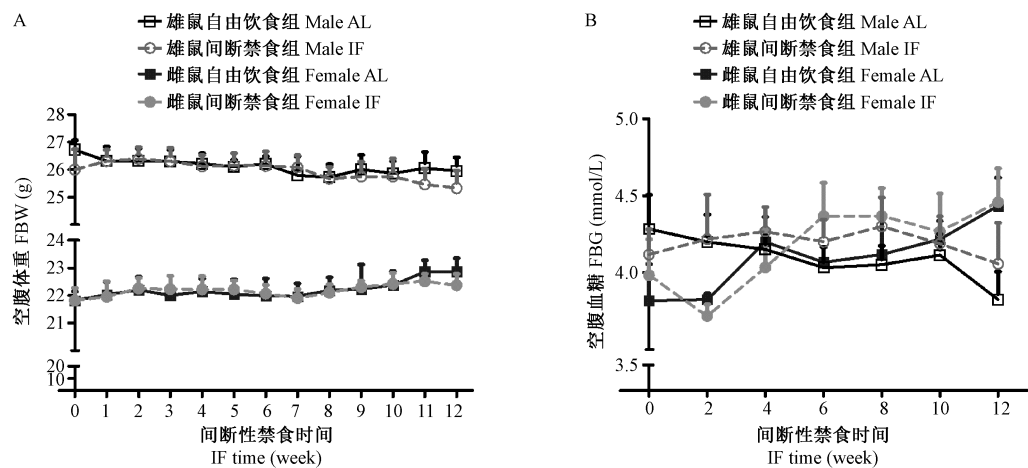
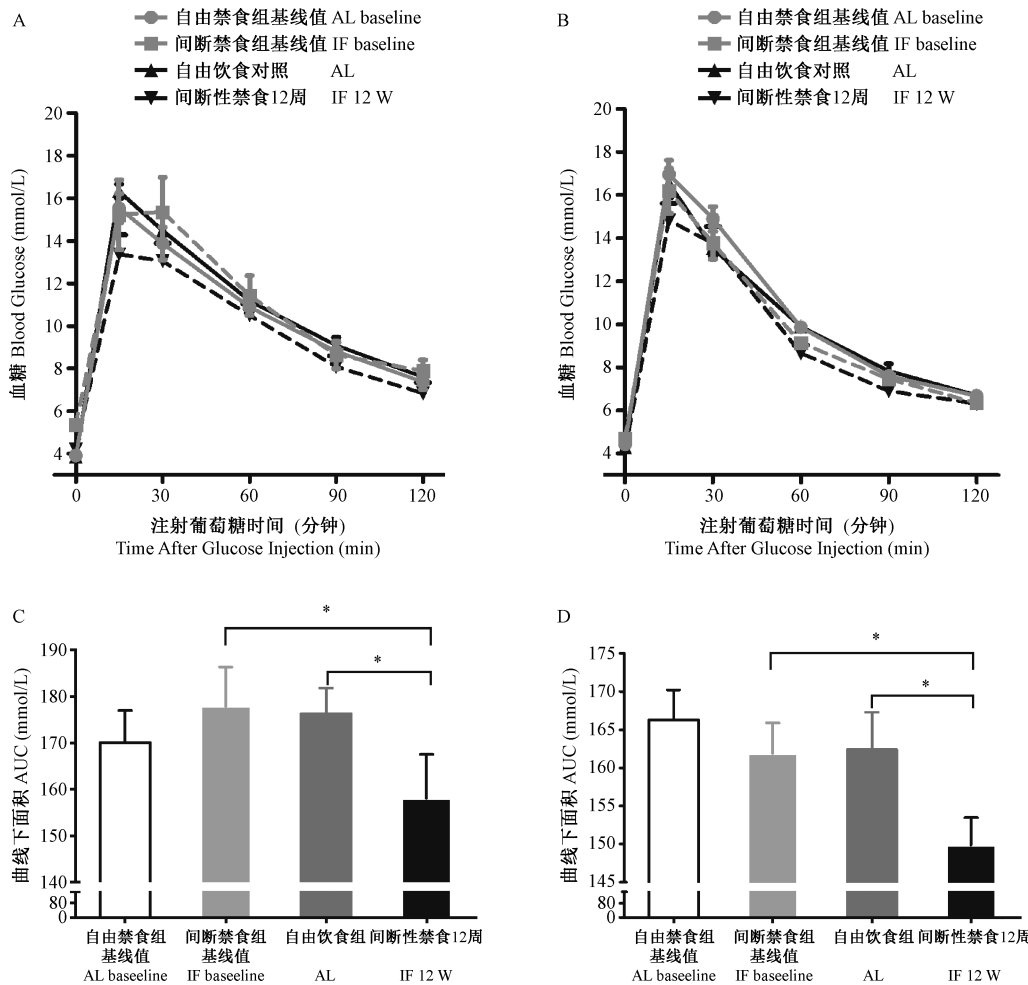


图 1 小鼠体质量和空腹血糖变化趋势

Fig. 1 Changes of fasting body weight and fasting blood glucose in mice of each group



注: A. 雄鼠造模前及禁食 12 周后 AL 组和 IF 组 IPGTT; B. 雌鼠造模前及禁食 12 周后 AL 组和 IF 组 IPGTT; C. 雄鼠各组 IPGTT 对应的 AUC; D. 雌鼠各组 IPGTT 对应的 AUC; * $P < 0.05$ 。

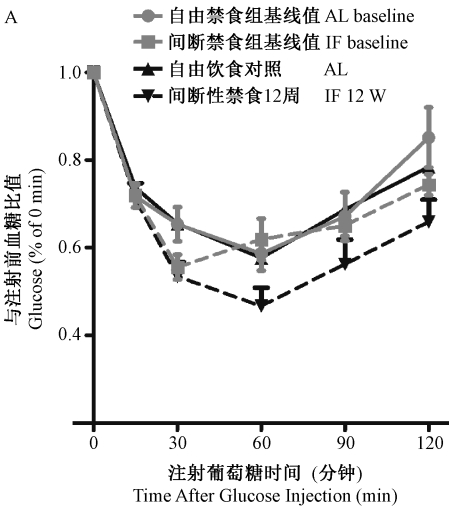
图 2 各组小鼠腹腔葡萄糖耐量实验

Note. A: IPGTT of male mice before and 12 weeks after AL or IF treatment. B: IPGTT of female mice before and 12 weeks after AL or IF treatment. C: AUC of IPGTT for male mice in each group. D: AUC of IPGTT in female mice in each group. * $P < 0.05$.

Fig. 2 Results of intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) in mice of each group

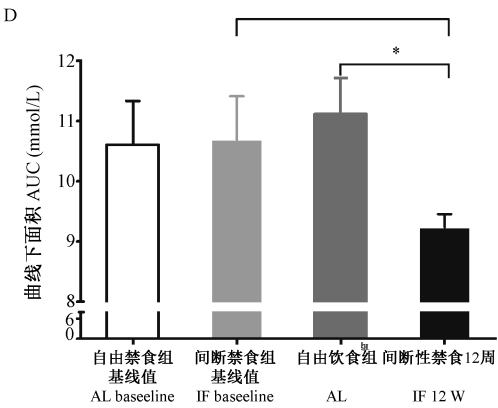
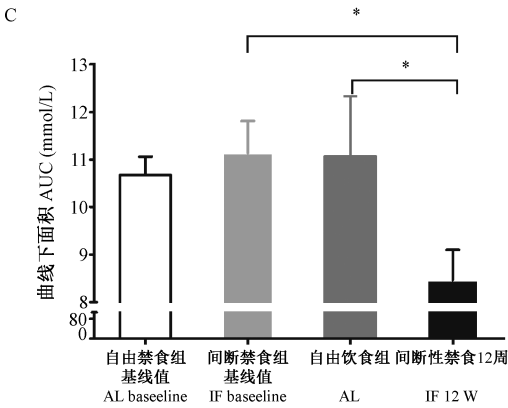
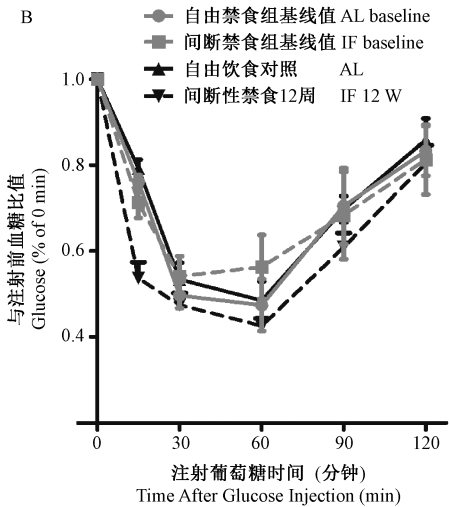
2.2 经腹腔葡萄糖耐量实验

间断性禁食前及造模 12 周后,行经腹腔葡萄糖耐量实验。无论雌雄小鼠,与造模前基线值相比,AL 组注射葡萄糖后血糖上升幅度相同,曲线下面积无明显改变,IF 组血糖上升幅度则明显降低,曲线下面积差距差异有显著性($P < 0.05$);IF 组与同周龄 AL 组相比,曲线下面积亦明显降低,下降程度差异有显著性($P < 0.05$)(图 2)。证明间断性禁食可改善小鼠糖耐量。



2.3 经腹腔胰岛素耐量实验

间断性禁食前及造模 12 周后,行经腹腔胰岛素耐量实验。无论雌雄小鼠,与造模前基线值相比,AL 组注射胰岛素后血糖下降幅度相同,曲线下面积无明显改变,IF 组血糖下降比例明显增加,曲线下面积差距差异有显著性($P < 0.05$);IF 组与同周龄 AL 组相比,注射胰岛素后血糖下降比例显著增加,整体曲线下面积下降程度差异有显著性($P < 0.05$)(图 3)。证明小鼠间断性禁食后胰岛素敏感性增加。



注:A. 雄鼠造模前及禁食 12 周后 AL 组和 IF 组 IPITT;B. 雌鼠造模前及禁食 12 周后 AL 组和 IF 组 IPITT;C. 雄鼠各组 IPITT 对应的 AUC;D. 雌鼠各组 IPITT 对应的 AUC; * $P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠经腹腔注射胰岛素耐量实验

Note. A: IPITT of male mice before and 12 weeks after AL or IF treatment. B: IPITT of female mice before and 12 weeks after AL or IF treatment. C: AUC of IPITT for male mice in each group. D: AUC of IPITT in female mice in each group. * $P < 0.05$.

Fig.3 Results of intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) in mice of each group

3 讨论

本实验中每周监测空腹体重,每两周检测空腹血糖,雌雄小鼠均维持在恒定水平,未见明显下降趋势。回顾文献,IF 可降低糖尿病 SD 大鼠的空腹

血糖^[7]。正常雄性 SD 大鼠 IF 16 周后,体质量无明显变化^[8];另一项研究^[9]发现正常雄性 SD 大鼠 IF 24 周后,体质量下降;两项实验空腹血糖均未见降低。临床试验中,正常体重受试者,虽然糖尿病风险相关因素改善,但是空腹血糖未改变^[4,5];体质量

方面,IF2 周后未见降低^[4];另一项试验中,男性非肥胖受试者 IF 3 周后体质量降低,女性受试者未见改变^[5]。超重或肥胖者 IF 6 月后体质量明显下降^[6]。结合文献分析,本实验小鼠体质量和空腹血糖未下降,一方面是由于选用的正常非肥胖小鼠,另一方面可能是由于 IF 持续时间不够长。同时说明 IF 的保护性作用不依赖体质量的下降。有意思的是,由于 IF 组小鼠在摄食日食量增加,几乎达到自由饮食组小鼠的两倍,所以也说明 IF 保护性作用亦不依赖摄入热量的减少。

本实验中观察到无论雌雄小鼠 IF 12 周后糖耐量和胰岛素敏感性均改善。回顾文献,Heilbronn 等^[5]观察发现正常体质量受试者 IF 3 周后,女性葡萄糖曲线下面积增加,而男性却未见明显变化,表明短期 IF 后,男性可能比女性更受益。笔者分析由于该临床实验进行时间较短,故女性未见明显受益。本动物实验于 IF 12 周后再行 IPGTT,时间较 Heilbronn 等的临床实验大大延长,故雌鼠亦观察到明显糖耐量改善。另一方面,对于 AL 组 IF 前和 3 月后的 IPGTT/IPITT 实验结果,可以看到对于正常体质量 C57BL/6J 小鼠,月龄对于糖耐量和胰岛素敏感性无明显影响。

关于该动物模型对代谢内稳态的保护性作用,尚有其他可完善的实验内容。比如小鼠血压和心率等生命体征;游离脂肪酸、甘油三酯、胆固醇和极低密度脂蛋白水平等生化指标;以及胰岛素、瘦素、脂联素、脑肠肽、胰岛素样生长因子 1^[10]等激素水平。由于实验条件及经费限制未能完成。

本实验小鼠采用隔日禁食的饮食限制方法连续进行 12 周后,小鼠生存状况良好,糖耐量和胰岛素敏感性改善,对于葡萄糖内稳态达到与热量限制类似的保护性作用,与临床实验结论一致,证明该造模方法有效可行。

参考文献:

- [1] Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome [J]. *Dig Liver Dis*, 2015, 47(3): 181–190.
- [2] 黄翠影, 吴雪园, 杨路亭. 隔日禁食对某些慢性疾病防治作用的研究进展[J]. *临床荟萃*, 2013, 28(12): 1432–1435.
- [3] 张俊杰, 柯斌, 秦鉴. 间断性禁食的研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 18(9): 1332–1335.
- [4] Halberg N, Henriksen M, Soderhamn N, et al. Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men [J]. *J Appl Physiol*, 2005, 99(6): 2128–2136.
- [5] Heilbronn LK, Smith SR, Martin CK, et al. Alternate-day fasting in nonobese subjects: effects on body weight, body composition and energy metabolism[J]. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81(1): 69–73.
- [6] Harvie MN, Pegington M, Mattson MP, et al. The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: a randomized trial in young overweight women[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2011, 35(5): 714–727.
- [7] Tikoo K, Tripathi DN, Kabra DG, et al. Intermittent fasting prevents the progression of type I diabetic nephropathy in rats and changes the expression of Sir2 and p53[J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(5): 1071–1078.
- [8] Mager DE, Wan R, Brown M, et al. Calorie restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate and blood pressure variability in rats[J]. *FASEB J*, 2006, 20(6): 631–637.
- [9] Wan R, Camandola S, Mattson MP. Intermittent fasting and dietary supplementation with 2-deoxy-D-glucose improve functional and metabolic cardiovascular risk factors in rats[J]. *FASEB J*, 2003, 17(9): 1133–1134.
- [10] Berrigan D, Perkins SN, Haines DC. Adult-onset calorie restriction and fasting delay spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(5): 817–822.

[修回日期]2016-12-31