

2型糖尿病 db/db 小鼠的生物学特性

邢 玮,王政霖,吕甜甜,王宏亮,袁悦莹,韩 静*,吴 晏*

(北京中医药大学,北京 100029)

【摘要】 目的 观察 db/db 小鼠的生物学特性,为该品系动物的实验研究应用提供基础。**方法** 采用自发性 2 型糖尿病 BKS. Cg-Dock7^{m +/+} Lepr^{db}/JNju 小鼠和野生型小鼠,于 8、12、16、20 和 24 周龄时测定空腹血糖值,10、12、16、20 和 24 周龄时测定体质量,并于 24 周龄时测定血清胰岛素、总胆固醇和甘油三酯水平,检测脏器质量和肝脏系数,并进行组织病理学观察。**结果** db/db 小鼠的空腹血糖值和体质量始终维持着较高的水平;血清胰岛素、总胆固醇和甘油三酯水平,以及肝脏和肾脏质量均明显高于野生型小鼠;24 周龄 db/db 小鼠的胰腺和肝脏组织可见明显病理改变。**结论** db/db 小鼠具有明显的高血糖、高血脂、高胰岛素血症等 2 型糖尿病特征,是进行 2 型糖尿病实验研究的理想的动物模型。

【关键词】 db/db 小鼠;2 型糖尿病;生物学特性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 08-0012-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 08. 003

Biological characteristics of a db/db mouse model of type 2 diabetes

XING Wei, WANG Zheng-lin, LV Tian-tian, WANG Hong-liang, YUAN Yue-ying, HAN Jing*, WU Yan*

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective To observe the biological characteristics of db/db mice, and to provide the basis for application of db/db mice in experimental research. **Methods** Spontaneous type 2 diabetes BKS. Cg-Dock7^{m +/+} Lepr^{db}/JNju mice and wild type mice of the same age were used in this study. Their fasting blood glucose was determined at 8, 12, 16, 20 and 24 weeks of age, the body weight was recorded at 10, 12, 16, 20 and 24 weeks of age, the levels of serum insulin, total cholesterol and triglyceride were measured, the organ weight and liver coefficient were determined, and the liver and pancreas were taken for pathological examination at 24 weeks of age. **Results** The db/db mice maintained a high level of fasting blood glucose and body weight. Levels of serum insulin, total cholesterol, and triglyceride were significantly higher than the wild type mice. Compared with wild type mice, liver weight and kidney weight were also significantly increased. Obvious pathological changes of liver and pancreas were observed in 24-week old db/db mice. **Conclusions** db/db mouse has obvious characteristics of type 2 diabetes, such as hyperglycemia, hyperlipidemia, and hyperinsulinemia, can maintain stable levels of high blood glucose, and is an ideal animal model for experimental study of type 2 diabetes mellitus.

【Key words】 db/db mice; Type 2 diabetes; Biological characteristics

【基金项目】 国家自然科学基金(81303083)。

【作者简介】 邢玮,女,硕士研究生,研究方向:糖尿病的中药药理研究。

【通讯作者】 韩静,副研究员,硕士生导师,研究方向:糖尿病的中药药理研究;吴晏,副研究员,研究方向:糖尿病的中药药理研究, E-mail:

nayattmm@vip. sina. com

糖尿病是严重威胁人类身心健康的慢性代谢性疾病。近年来,糖尿病患者人数不断增加,国际糖尿病联合会估计,到 2035 年预计全球糖尿病患者将达到 5.92 亿^[1]。我国糖尿病患病率呈明显增加趋势,其中大部分为 2 型糖尿病患者^[2]。目前,2 型糖尿病相关药物的研发已经成为热点,选择适合的 2 型糖尿病动物模型对于该疾病的病理机制研究以及新药物的研发都具有非常重要的作用。

db/db 小鼠是美国 Jackson 实验室于 1966 年发现的位于 4 号染色体的 Leptin 受体基因缺陷导致的自发性 2 型糖尿病小鼠,从四周龄即出现贪食、肥胖,随周龄增加而出现明显的高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等特征,其发病过程与 2 型糖尿病患者非常相似^[3,4]。本研究考察了 BKS-DB 小鼠的体质量、空腹血糖、空腹胰岛素等多项指标,并观察了肝脏、胰腺的病理变化特点,旨在为该品系动物的研究应用提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级 7 周龄雄性自发性 2 型糖尿病 BKS. Cg-Dock7^{m+/+} Lepr^{db}/JNju 小鼠 10 只,体重为 30 ~ 40 g,作为模型组;SPF 级 7 周龄雄性 (Lepr^{db}) wt/wt 野生型 (Wild Type) 小鼠 10 只,体重为 17 ~ 23 g,作为对照组。所有动物均购于南京大学—南京生物医药研究院[SCXK(苏)2015-0001]。全部动物饲养于北京中医药大学清洁级动物室[SYXK(京)2016-0038]。自由摄食、饮水,室温 20 ~ 25℃,昼夜明暗交替时间 12 h/12 h。按 3R 原则给予实验动物人道关怀。

1.2 主要仪器与试剂

Abbott Diabetes Care Ltd 生产的 Optium Xceed 血糖仪及其配套使用的 Optium 血糖试纸;酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司);全自动生化分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司);电子显微镜 (美国 Olympus 公司)。

胰岛素 ELISA 试剂盒 (Millipore 公司生产,批号为 EZRMI-13K);总胆固醇试剂盒 (酶法,贝克曼库尔特实验系统有限公司生产,批号 AUZ3694);甘油三酯试剂盒 (GPO-POD 法,贝克曼库尔特实验系统有限公司生产,批号 AUZ3692)。

1.3 实验方法

1.3.1 体质量和血糖值的测定

分别在糖尿病小鼠与野生型小鼠 8、12、16、20 和 24 周龄时测定空腹血糖值。检测前将小鼠禁食

6 ~ 8 h,经尾静脉取血,用血糖仪测定小鼠的血糖值。于 10、12、16、20 和 24 周龄时称取两组小鼠的体质量。

1.3.2 胰岛素、总胆固醇和甘油三酯含量的测定

摘取小鼠眼球取血,3000 r/min 离心 10 min,分离血清,于 -80℃ 冷冻保存,备用。按照试剂盒提供的实验方法,分别检测血清中空腹胰岛素 (FIN),总胆固醇 (CHO) 和甘油三酯 (TG) 的含量。

1.3.3 肝脏、肾脏大体病变观察,脏器质量和肝脏系数的测定

解剖小鼠,对肝脏和肾脏进行病变观察。仔细分离小鼠的肝脏和左侧肾脏,剔除表面脂肪和筋膜后并称重,肝脏系数以肝脏质量/体质量表示。

1.3.4 组织病理学观察

将小鼠的肝脏和胰腺置于 4% 的多聚甲醛溶液中固定,梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色,于显微镜下观察并拍照。

1.4 统计学方法

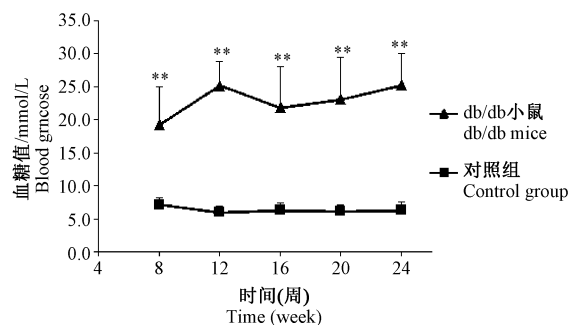
实验数据采用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,两组间使用独立样本 *t* 检验方法进行统计分析,以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 体质量和血糖水平

结果显示,db/db 小鼠在 8 周龄时血糖已经明显高于野生型小鼠,在 8、12、16、20 和 24 周龄,db/db 小鼠的空腹血糖值均明显高于同周龄的对照组小鼠 (*P* < 0.01) (见图 1)。

db/db 小鼠在 10 周龄时体质量明显高于野生型小鼠,在 10、12、16、20 和 24 周龄,db/db 小鼠的体质量均明显高于同周龄的对照组小鼠 (*P* < 0.01) (见图 2)。

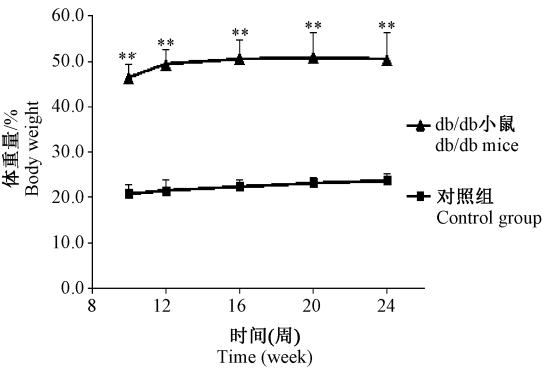


注:与对照组相比,***P* < 0.01。

图 1 血糖值水平

Note. Compared with control group, ***P* < 0.01.

Fig. 1 Levels of blood glucose



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 2 体质量水平

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

Fig. 2 Levels of body weight

2.2 血清 FIN、CHO 和 TG 水平

模型组小鼠的血清胰岛素、总胆固醇和甘油三酯均明显高于对照组小鼠水平($P < 0.01$),提示模型动物存在高胰岛素血症和脂质代谢紊乱(见表 1)。

2.3 肝脏、肾脏大体病变观察,脏器质量和肝脏指数的测定

24 周龄的模型组小鼠可见明显肥胖,体质量明显高于对照组小鼠($P < 0.01$)。

取出脏器后称重,结果显示模型组小鼠的肝脏和肾脏质量明显高于对照组小鼠($P < 0.01$)。模型组小鼠的肝脏系数与对照组相比无明显差异(见表 2)。

2.4 组织病理学观察

2.4.1 大体病变观察

解剖小鼠,可见野生型小鼠肝脏呈红褐色,质软,有弹性;模型组小鼠的肝脏呈黄褐色,体积明显增大,油腻感明显。模型组小鼠的肾脏被大量的脂肪包裹,肾脏体积比野生型小鼠增大。

2.4.2 肝脏组织病理改变

模型组自发性糖尿病小鼠肝脏组织均可见比较明显的Ⅱ带和Ⅲ带肝细胞肥大、细胞浆疏松或空亮,以Ⅲ带肝细胞为主的细胞内较多嗜碱性染斑块状不定形颗粒(见图 3)。

2.4.3 胰腺组织病理改变

模型组自发性糖尿病小鼠胰腺组织可见轻微或轻度的胰岛增生和肥大,胰岛内可见比较明显的胰岛细胞增生、变性或坏死,表现为增生的胰岛细胞胞核偏大、嗜碱性增强,变性的胰岛细胞肥大、核肿胀偏大,坏死的胰岛细胞嗜酸性染增强,核皱缩;胰腺组织的外分泌腺泡均可见明显的腺泡腔扩张(见图 3-B)。

3 讨论

db/db 小鼠是一种自发性 2 型糖尿病啮齿动物模型,目前被广泛应用于 2 型糖尿病的实验研究中^[5]。db/db 小鼠在 10 ~ 14 d 出现高胰岛素血症,在 4 周左右贪食、肥胖,4 ~ 8 周时因 β 细胞障碍开始出现高血糖,在 3 ~ 4 个月达到血糖高峰期。db/db 小鼠具有和人类 2 型糖尿病相似的症状,表现为多饮、多食、多尿、肥胖、高血糖、高胰岛素血症、脂代谢异常等^[6]。

表 1 血清 FIN、CHO 和 TG 水平
Tab. 1 Serum levels of FIN, CHO and TG in the mice

组别 Groups	FIN/ng/mL	CHO/mmol/L	TG/mmol/L
模型组 Model group	1.86 ± 1.24 **	2.45 ± 0.40 **	2.24 ± 0.38 **
对照组 Control group	0.41 ± 0.17	1.91 ± 0.20	0.82 ± 0.21

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

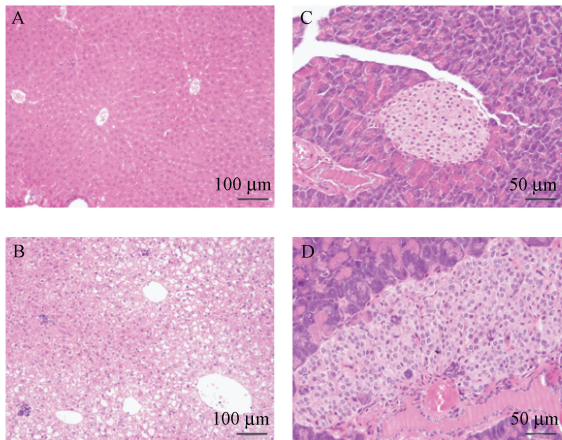
Note. Compared with the the control group, ** $P < 0.01$.

表 2 脏器质量和肝脏系数
Tab. 2 Liver weight, kidney weight, and liver coefficient in the mice

组别 Groups	肝脏质量/g Liver weight	肾脏质量 Kidney weight	肝脏系数 Liver coefficient
模型组 Model group	2.179 ± 0.249 **	0.230 ± 0.028 **	0.0435 ± 0.0059
对照组 Control group	0.962 ± 0.066	0.180 ± 0.021	0.0406 ± 0.0044

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$.



注:(A) 对照组肝脏(×100);(B) 模型组肝
脏(×100);(C) 对照组胰腺(×200);(D) 模型组
胰腺(×200)。

图 3 肝脏和胰腺组织病理变化

Note. (A) Liver of control group(×100);(B)
Liver of model group(×100);(C) Pancreas of
control group(×200);(D) Pancreas of model
group(×200)。

Fig. 3 Pathological changes in the mouse liver and
pancreas

既往研究中对于 db/db 小鼠生物学特点的观察多集中于 20 周龄以下,对于超过 20 周龄的 db/db 小鼠的病症特点的报道较少^[7-9]。本次实验对 24 周龄 db/db 小鼠的血糖、血脂、血胰岛素水平以及脏器病变情况进行观察,以探讨模型动物在此阶段的病变特点。

本次实验通过对于 db/db 小鼠空腹血糖和体质量的连续检测,显示 db/db 小鼠在 8 周龄时血糖已经明显高于野生型小鼠,10 周龄时体质量明显高于野生型小鼠,并始终维持着较高的血糖和体质量水平直至观察结束。db/db 小鼠血清胰岛素、总胆固醇和甘油三酯水平均明显高于对照组小鼠,符合该品系小鼠高胰岛素血症、高脂血症的病变特点。

db/db 小鼠属于肥胖型自发性糖尿病小鼠,解剖取材时可见 db/db 小鼠的腹部脂肪含量明显增加,肝脏和肾脏均明显增大,其肝脏和肾脏质量均明显高于野生型小鼠。HE 染色切片观察肝脏和胰腺的病理变化,提示在 24 周龄时,db/db 小鼠胰腺和肝脏组织可见明显病变,主要表现为胰腺胰岛细

胞增生、变性,肝脏Ⅱ带和Ⅲ带肝细胞肥大、细胞浆疏松或空亮。

本研究的结果显示,db/db 小鼠具有明显的高血糖、高血脂、高胰岛素血症等 2 型糖尿病特征,并且可以维持较为稳定的高血糖状态,符合 2 型糖尿病相关的病理机制以及新药创制研究的需要。同时,在 24 周龄时,db/db 小鼠的肝脏和胰腺已出现明显的病理变化,适合进行相关脏器的病变机制研究。本研究表明 db/db 小鼠是进行 2 型糖尿病实验研究的较为理想的动物模型,并为该品系动物的研究应用提供了实验依据。

参考文献:

[1] Sharma BR, Kim HJ, Rhyu DY. Caulerpa lentillifera extract ameliorates insulin resistance and regulates glucose metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice via PI3K/AKT signaling pathway in myocytes[J]. J Transl Med, 2015, 13(1): 62.
[2] 李枝萍,刘军,徐婷婷,等. 我国 2 型糖尿病的流行病学及危险因素研究现状[J]. 西南军医, 2010, 12(4): 754-756.
[3] Kalai FZ, Han J, Ksouri R, et al. Oral administration of Nitraria retusa ethanolic extract enhances hepatic lipid metabolism in db/db mice model ‘BKS. Cg-Dock7m +/+ Lepr db/J’ through the modulation of lipogenesis-lipolysis balance [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 72: 247-256.
[4] Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity[M]. Curr Protoc Pharmacol, 2012 Sep. Chapter 5: Unit 5. 61.
[5] Lu Y, Long M, Zhou S, et al. Mibefradil reduces blood glucose concentration in db/db mice[J]. Clinics, 2014, 69(1): 61-67.
[6] 田小芸,恽时锋,周森妹,等. C57BL/KsJ 小鼠的繁殖性能及部分生化指标的测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(11): 675-677.
[7] 刘静,陆洁,裴天仙,等. 基因缺陷型 2 型糖尿病模型动物 db/db 小鼠早期生物学特性研究[J]. 药物评价研究, 2013, 36(1): 8-12.
[8] 刘芳,杨华,周文江,等. 诱发性 2 型糖尿病小鼠模型与自发性 db/db 小鼠特性的比较[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 54-59.
[9] 吕晶晶,王彩霞,魏娜,等. 自发性 2 型糖尿病小鼠 db/db 的生物学特性[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(6): 455-459.

[收稿日期] 2016-12-20