

自发性2型糖尿病 db/db 小鼠肝病理损伤特点

康佳丽¹, 梁伟时¹, 孟徐兵¹, 张丹丹¹, 高庆瑶¹, 薛宁¹, 韩淑英¹,
王建行^{2*}, 曹福源³

(华北理工大学 1. 临床医学院; 2. 冀唐学院; 3. 实验动物中心, 河北 唐山 063200)

【摘要】 目的 动态观察自发性2型糖尿病 db/db 小鼠肝产生的病理变化及特点, 为将 db/db 小鼠肝作为2型糖尿病肝损伤模型的实验研究提供基础理论和实验依据。**方法** 7~8 周龄, 雄性, SPF 级 db/m 小鼠作为对照组, 糖尿病 db/db 小鼠作为模型组, 各 16 只。动态观察其体重、空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性, 计算肝指数, 光镜与电镜下观察肝的病理学改变。**结果** db/db 小鼠空腹血糖、血清 ALT、AST 活性均明显高于 db/m 小鼠, 组织学检查发现 db/db 小鼠肝在 16 周龄时就出现严重损伤, 主要表现为肝细胞脂肪变性、炎细胞浸润等; 到 32 周龄时病变加剧, 镜下可见肝组织内有大量的胶原纤维; 电镜下可见线粒体、内质网等结构被破坏甚至消失, 出现明显的脂滴、炎细胞, 组织内含有大量的胶原纤维。**结论** db/db 小鼠 16 周龄时肝出现明显的脂肪变性以及炎细胞浸润等, 32 周龄时表现为明显的纤维化, 因此 db/db 小鼠的肝可作为实验研究时良好的 2 型糖尿病肝损伤模型。

【关键词】 2 型糖尿病; db/db 小鼠; 肝损伤; 电子显微镜

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0027-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.005

Pathological characteristics of liver injury in spontaneous type 2 diabetic db/db mice

KANG Jiali¹, LIANG Weishi¹, MENG Xubing¹, ZHANG Dandan¹, GAO Qingyao¹, XUE Ning¹, HAN Shuying¹,
WANG Jianxing^{2*}, CAO Fuyuan³

(1. Clinical Medical College; 2. Jitang College; 3. Experimental Animal Center, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China)

【Abstract】 Objective To dynamically observe the pathological changes and characteristics of the liver injury in spontaneous type 2 diabetic db/db mice, and to provide a theoretical and experimental basis for studies taking the liver of db/db mice as a model of type 2 diabetic liver injury. **Methods** db/m mice were used as the control group and diabetic db/db mice were used as the model group (male, 7-8 weeks old, SPF grade) with 16 mice in each group. Weight, fasting blood glucose (FBG), serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity were dynamically observed, and the liver index was calculated. Pathological changes in the liver tissues were observed by light and electron microscopies. **Results** FBG, serum ALT and AST activity in the db/db mice were significantly higher than those in the db/m mice. Histological examination revealed that the liver of db/db mice was damaged severely at 16 weeks

[基金项目] 2017 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (201710081009); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2017083)。

[作者简介] 康佳丽 (1997—), 女, 本科在读学生, 研究方向: 糖尿病药物防治。E-mail: jialikang95@126.com

[通信作者] 王建行 (1983—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 中药防治糖尿病和心血管疾病。E-mail: wangjianxing83@163.com

of age, including mainly hepatocyte steatosis and infiltration of inflammatory cells. By 32 weeks of age, the disease was intensified and there were massive deposit of collagen fibers in the liver tissue. Electron microscopy showed that mitochondria, endoplasmic reticulum, and other structures were destructed or even absent, and there were significant infiltration of inflammatory cells as well as fat droplets and massive deposit of collagen fibers in liver tissue. **Conclusions** The liver of db/db mice can be used as a good liver injury model of type 2 diabetes, displaying obvious steatosis and infiltration of inflammatory cells in 16-week-old mice and obvious fibrosis in 32-week-old mice.

[Keywords] type 2 diabetes; db/db mice; liver injury; electron microscopy

2 型糖尿病可对肝造成慢性进行性损伤,其肝并发症已成为研究热度较高的一类糖尿病并发症^[1]。但糖尿病肝病机制、具体病理改变等方面的研究还不够完善,防治仍有欠缺。db/db 小鼠具有早期血糖升高、肝肾病变、胰岛功能缺陷等特点^[2],本文主要将不同时期 db/db 小鼠的肝与同源 db/m 小鼠的进行比较,为进一步以 db/db 小鼠肝作为 2 型糖尿病肝损伤模型的实验研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 db/db 小鼠,体重 33 ~ 38 g,7 ~ 8 周龄,雄性;SPF 级 db/m 小鼠,体重 18 ~ 22 g,7 ~ 8 周龄,雄性,购自常州卡文斯实验动物有限公司[SCXK(苏)2016-0010],于华北理工大学动物实验中心 SPF 级屏障实验室[SYXK(冀)2015-0038]进行饲养,饲喂 SPF 级实验动物饲料(常州卡文斯实验动物有限公司),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。该实验已通过华北理工大学动物实验伦理审查(编号:2017062)。

1.2 主要试剂与仪器

丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);Masson 三色法染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);苏木精染色剂(南京奥多福尼生物科技有限公司);伊红生物染色剂(上海展云化工有限公司)。罗氏血糖仪及试纸(德国罗氏诊断有限公司);真彩病理图像分析系统(高腾科技有限公司);高倍显微镜(日本奥林巴斯有限公司);透射电镜(日本日立公司)。

1.3 实验方法

将购来的小鼠适应性饲养一周,剔除不合格小鼠,随机选取 16 只 db/m 小鼠作为对照组,16 只 db/db 小鼠作为模型组,观察小鼠一般状态,饲养至

32 周龄。

1.3.1 体重及空腹血糖的测定

分别在实验开始第一周(小鼠 8 周龄)、小鼠 16 周龄、32 周龄时检测体重,并在禁食 8 h 后尾静脉取血测血糖。

1.3.2 血液肝功指标以及肝指数测定

在小鼠 16、32 周龄时禁食 12 h,麻醉后腹主动脉取血,全自动生化分析仪测定血清 ALT、AST 活性。于小鼠 16、32 周龄时,将 db/m 和 db/db 小鼠各处死 8 只,并分离肝组织。肝指数(liver index, LI) = [肝重量(g)/体重(g)] × 100%。

1.3.3 光镜下观察肝组织学结构

将称重后的肝迅速固定,常规石蜡包埋、切片、烤片,然后分别进行 HE 染色和 Masson 染色。所有染片在光镜下观察并拍片。

1.3.4 电镜下观察肝组织超微结构

小鼠肝组织切块,常规双重固定,梯度酒精脱水,100%酒精:丙酮(1:1)浸透,纯丙酮浸透,丙酮:树脂(1:1)混合液 37℃ 温箱过夜,纯树脂(815/812 混合液)浸透,Epon 812 包埋,半薄切片甲苯胺蓝染色,超薄切片厚度为 50 nm,经醋酸铀和柠檬酸铅电子染色后,电镜下观察并拍片。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件,各组数据均用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两对比, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 db/db 小鼠体重及空腹血糖动态变化

如表 1 所示,饲养期间 db/db 小鼠体重一直高于 db/m 小鼠($P < 0.01$)。db/db 小鼠的空腹血糖从 8 周龄时开始,便显著高于 db/m 小鼠($P < 0.01$),而且一直保持较高的水平。随着饲养时间的延长,db/db 小鼠的体重及空腹血糖也逐渐升高。

2.2 db/db 小鼠血清 ALT、AST 活性的动态变化

如表 2 所示,16 周龄时 db/db 小鼠血清 ALT、AST 活性均明显高于 db/m 小鼠 ($P < 0.01, P < 0.05$)。32 周龄时 db/db 小鼠血清 ALT、AST 活性均有降低,相较 db/m 小鼠差异无显著性 ($P > 0.05$),但与 16 周龄的 db/db 小鼠相比,血清 ALT 活性降低且差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.3 db/db 小鼠肝指数动态变化

如表 3 所示,db/db 小鼠的肝指数(LI)在 16 和 32 周龄时均高于 db/m 小鼠 ($P < 0.01$),16 周龄时升高更为显著,到 32 周龄时 db/db 小鼠的肝指数较 16 周龄时有所降低 ($P < 0.05$)。

2.4 肝组织在光镜下观察到的组织学结构改变

HE 染色(图 1):光镜下 db/m 小鼠(图 A1、B1) 16 周龄和 32 周龄时均表现正常,肝板围绕着中央静脉规则排列,细胞边界清晰,胞质内含细胞核一个或两个;db/db 小鼠 16 周龄时(图 A2)肝组织中细胞排列紊乱,胞核消失,细胞坏死,炎症细胞浸润,可见大小不等的脂滴空泡,肝细胞体积增大,细胞核大小不一;32 周龄时(图 B2)脂滴空泡明显减少,炎细胞浸润明显,肝细胞大量坏死,肝板、肝血窦等结构已无法辨认。

Masson 染色(图 2):db/m 小鼠(图 A1、B1)仅

在中央静脉周围可见极少量的蓝染胶原纤维;db/db 小鼠 16 周龄时(图 A2)可见大量脂滴空泡,中央静脉周围和组织内均有少量蓝染的胶原纤维,纤维化程度较正常组严重;32 周龄时(图 B2)大量的胶原纤维分布于肝组织内,纤维化明显。

2.5 肝组织在电镜下观察到的超微结构改变

电镜(图 3):db/m 小鼠(图 A1、B1)肝细胞内细胞核边界明显、核仁清晰,胞浆中线粒体数量多且形状规则,可见内质网等结构;db/db 小鼠胞质内线粒体、内质网等结构被破坏,16 周龄时(图 A2)胞浆中出现大量脂滴空泡;32 周龄时(图 B2)肝细胞正常结构几乎消失,肝组织内代之以大量的胶原纤维。

3 讨论

本实验动态观察了 db/db 小鼠肝功能及其组织病理形态结构的变化。结果表明,随着时间的推移,db/db 小鼠体重、空腹血糖逐渐升高,并显著高于 db/m 小鼠;解剖见腹腔有大量脂肪蓄积,表明 db/db 小鼠糖脂代谢明显紊乱,这点与文献报道一致^[3];db/db 小鼠 16 周龄时,血清 ALT、AST 水平均高于 db/m 小鼠 ($P < 0.05$);db/db 小鼠 32 周龄时仍相对 db/m 小鼠较高,但差异无显著性,而与 db/db 小鼠 16 周龄时相比较,ALT 活性降低且差异有

表 1 db/db 与 db/m 小鼠体重与空腹血糖 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Body weight and fasting blood glucose of the db/db and db/m mice

组别 Groups	体重(g) Body weight			空腹血糖(mmol/L) Fasting blood glucose (FBG)		
	8 周龄 8-week-old	16 周龄 16-week-old	32 周龄 32-week-old	8 周龄 8-week-old	16 周龄 16-week-old	32 周龄 32-week-old
	db/m 小鼠 db/m mice	18.81 ± 0.84	24.34 ± 1.43 *	28.22 ± 1.74 ***	4.55 ± 0.47	4.78 ± 0.58
db/db 小鼠 db/db mice	41.26 ± 1.37 ^{△△}	59.37 ± 2.28 ^{△△*}	70.51 ± 5.16 ^{△△***}	10.53 ± 2.58 ^{△△}	11.36 ± 2.64 ^{△△}	12.85 ± 2.73 ^{△△}

注:与 db/m 小鼠比较,^{△△} $P < 0.01$;与 8 周龄小鼠比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 16 周龄小鼠比较,[#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the db/m mice,^{△△} $P < 0.01$. Compared with the 8-week-old mice,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. Compared with the 16-week-old mice,[#] $P < 0.05$.

表 2 db/db 与 db/m 小鼠血清 ALT、AST 活性 ($\bar{x} \pm s, n = 8, U/L$)

Table 2 Serum ALT and AST activities of db/db and db/m mice

组别 Groups	16 周龄 16-week-old		32 周龄 32-week-old	
	ALT	AST	ALT	AST
	db/m 小鼠 db/m mice	74.53 ± 26.24	121.27 ± 23.74	85.37 ± 30.12
db/db 小鼠 db/db mice	125.74 ± 35.25 ^{△△}	158.69 ± 30.48 [△]	97.73 ± 34.25 *	134.47 ± 25.48

注:与 db/m 小鼠比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与 16 周龄小鼠比较,* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the db/m mice,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$. Compared with the 16-week-old mice,* $P < 0.05$.

表 3 db/db 与 db/m 小鼠的肝指数($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)**Table 3** Liver indexes of the db/db and db/m mice

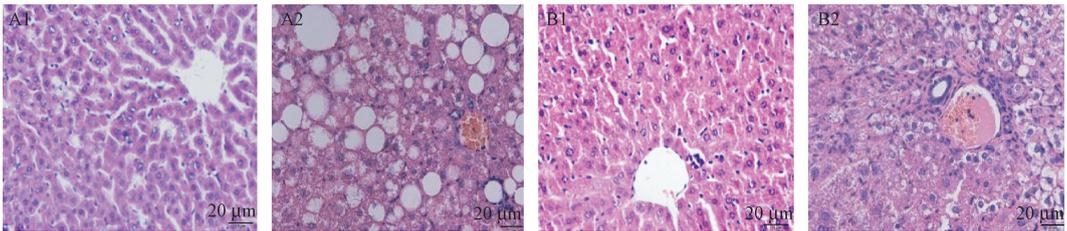
组别 Groups	16 周龄 16-week-old	32 周龄 32-week-old
db/m 小鼠 db/m mice	4.66 ± 0.53	4.75 ± 0.68
db/db 小鼠 db/db mice	7.63 ± 0.70 ^{△△}	6.57 ± 0.64 ^{△△*}

注:与 db/m 小鼠比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与 16 周龄小鼠比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the db/m mice, ^{△△} $P < 0.01$. Compared with the 16-week-old mice, ^{*} $P < 0.05$.

显著性($P < 0.05$)。ALT 大多存在于肝细胞浆内, AST 则多在肝细胞线粒体中, 肝细胞坏死使 ALT、AST 进入血清^[4-5], 血清中 ALT 与 AST 水平

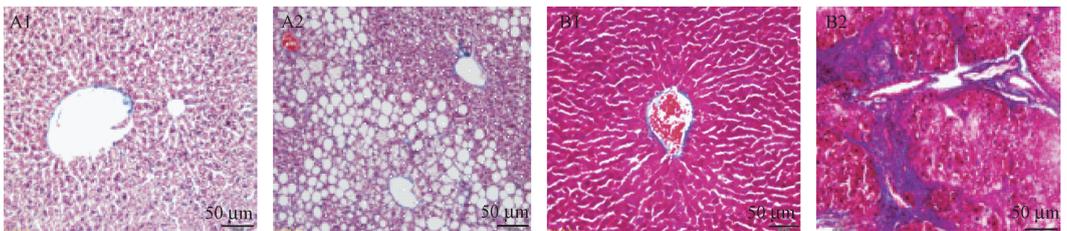
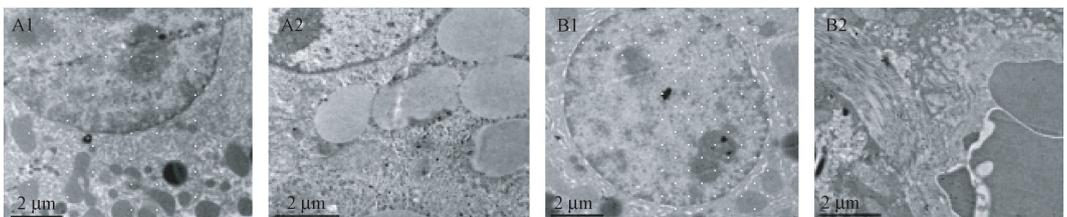
的升高提示肝具有明显病变。db/db 小鼠的肝指数均高于对照组($P < 0.01$), 而 32 周龄时 db/db 小鼠的肝指数小于 16 周龄($P < 0.05$), 这可能是随着实验的进展 db/db 小鼠体重增加所致。肝的病理学观察发现, db/db 小鼠在 16 周龄时的明显病变为脂肪病变, 伴有小部分细胞坏死, 炎细胞浸润等, 与相关报道相符^[6], 这提示我们在实验研究中获取糖尿病脂肪肝模型时, 应在小鼠成长至 16 周龄左右时较为合适; 而到 32 周龄时肝脂肪变性已不明显而代之以肝纤维化和肝硬化, 此病理变化过程与糖尿病患者的肝损伤的发展过程基本一致。



注: A1: 16 周龄 db/m 小鼠肝组织; A2: 16 周龄 db/db 小鼠肝组织; B1: 32 周龄 db/m 小鼠肝组织; B2: 32 周龄 db/db 小鼠肝组织。下同。

图 1 肝组织在小鼠 16 周龄和 32 周龄时的 HE 染色光镜图片($\times 400$)

Note. A1: Liver tissue of a 16-week-old db/m mouse; A2: Liver tissue of a 16-week-old db/db mouse; B1: Liver tissue of a 32-week-old db/m mouse; B2: Liver tissue of a 32-week-old db/db mouse. The same in the following figures.

Figure 1 Representative images of liver tissue stained with hematoxylin and eosin in the mice at 16 and 32 weeks of age**图 2** 肝组织在小鼠 16 周龄和 32 周龄时的 Masson 染色光镜图片($\times 200$)**Figure 2** Representative images of liver tissue stained with Masson's trichrome staining in the mice at 16 and 32 weeks of age**图 3** 肝组织在小鼠 16 周龄和 32 周龄的电镜图片($\times 6000$)**Figure 3** Representative transmission electron micrographs of liver tissue in the mice at 16 and 32 weeks of age