

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.07.002
文章编号: 1005-8982 (2018) 07-0007-05

2 型糖尿病小鼠不同时间点的病理生理变化*

齐艳萍¹, 田孝祥², 刘丹², 吴鹏¹, 闫承慧², 韩雅玲²

(1. 锦州医科大学 研究生院, 辽宁 锦州 121001; 2. 沈阳军区总医院 心内科, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 检测不同时间点 2 型糖尿病 (T2DM) 小鼠模型代谢指标、血清胰岛素、心功能等指标, 明确 T2DM 小鼠模型发生病理改变的时间。**方法** 雄性 8 周 C57BL/6 小鼠采用高脂联合链脲佐菌素 (STZ) 方法复制 T2DM 动物模型, 在 STZ 注射不同时间点, 罗氏血糖仪测量小鼠空腹血糖。用 Elisa 试剂盒检测小鼠血清胰岛素, 应用小动物超声检测小鼠左心室功能。苏木素-伊红染色及 Masson 染色观察心脏大小形态及心肌纤维化情况。**结果** STZ 注射 1 周后实验组小鼠空腹血糖升高, 2 周后出现糖耐量和胰岛素耐量异常; 8 周时, 血清胰岛素异常及左心室舒张功能障碍, 并出现左心室肥厚和纤维化; 12 周时出现左心室扩张, 纤维化加重。**结论** STZ 注射 2 周小鼠空腹血糖升高, 8 周时血清胰岛素降低, 并发生左心室肥厚及舒张功能下降, 12 周时左心室收缩功能下降, 为研究 T2DM 的发病机制及干预治疗提供了实验依据。

关键词: 链脲佐菌素; 高脂喂养; 2 型糖尿病; 小鼠

中图分类号: R541.8

文献标识码: A

Pathological and physiological changes of type 2 diabetic mice at different time points*

Yan-ping Qi¹, Xiao-xiang Tian², Dan Liu², Peng Wu¹, Cheng-hui Yan², Ya-ling Han²

(1. Graduate School, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang, Liaoning 110016, China)

Abstract: Objective To determine the time of pathological changes of type 2 diabetes mellitus mouse model by detecting serum insulin and the indexes of metabolism and cardiac function in type 2 diabetic mice at different time points. **Methods** Male 8-week C57BL/6 mice were used to establish the animal model of type 2 diabetes mellitus by high fat and low-dosage Streptozocin (STZ). At different time points after STZ injection, the fasting blood glucose in mouse tail artery was measured using the Roche glucometer. Serum insulin concentration was tested using mouse insulin ELISA kit. Small animal ultrasound was applied for detection of left ventricular function in the mice. Hematoxylin-eosin staining and Masson staining were used to observe the shape and size of the heart and myocardial fibrosis. **Results** In the experimental group, fasting blood glucose was significantly increased 1 week after STZ injection; glucose tolerance and insulin tolerance were impaired 2 weeks after STZ injection; at the 8th week, abnormal serum insulin and left ventricular diastolic dysfunction appeared and left ventricular hypertrophy and fibrosis were observed; at the 12th week, left ventricle was dilated, fibrosis was aggravated. **Conclusions** In the 2nd week after STZ injection, fasting blood glucose significantly increases; in the 8th week, serum insulin decreases, left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction appear; at the 12th week, there is left ventricular systolic dysfunction. This study provides an experimental basis for the study of the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus.

Keywords: Streptozocin; high-fat feeding; type 2 diabetes mellitus; mouse

收稿日期: 2017-06-03

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81670276); 辽宁省自然科学基金 (No: 20170540965, 20170540929)

[通信作者] 韩雅玲, E-mail: yalinghan@gmail.com

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是由胰岛 β 细胞分泌障碍或者胰岛素抵抗引起的代谢性疾病, 主要分为 1 型和 2 型, 其中 2 型糖尿病 (T2DM) 常见^[1]。流行病学调查结果显示, 2016 年我国 T2DM 患者已有 1.1 亿, 还有 5 亿以上成年人处于糖尿病前期, 位居世界首位。T2DM 病理改变主要是胰岛素抵抗及胰岛素分泌不足^[2], 而高脂饮食和肥胖是引起胰岛素抵抗的主要诱因^[3]。本研究采用高脂饮食联合链脲佐菌素 (Streptozocin, STZ) 方法复制动物模型用来模拟人类 T2DM 病理改变^[4]。既往研究中^[5], 虽采用高脂饮食联合 STZ 诱导来复制 T2DM 动物模型, 但是没有对动物模型进行连续动态检测。本研究在 STZ 注射的不同时间点, 对代谢指标及心功能等指标进行连续动态检测, 明确了各种病理改变发生的具体时间, 为 T2DM 干预治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

STZ (货号: S0130)、柠檬酸 (货号: 791725)、柠檬酸钠 (货号: S4641) 购买于美国 Sigma 公司。柠檬酸 2.1 g, 溶于 100 ml 蒸馏水中配成 A 液, 柠檬酸钠 2.94 g 溶于 100 ml 蒸馏水中配成 B 液, 将 A、B 液按 1:1 比例配成 100 ml 柠檬酸缓冲液, pH \approx 4.5。高脂鼠粮购于美国 Research diets Ins 公司, 血糖仪和罗氏卓越血糖试纸购于罗氏中国公司, 胰岛素 ELISA 试剂盒购买于英国 Abcam 公司, Masson 染色试剂盒购买于美国 Sigma 公司。苏木素、伊红染液、盐酸乙醇分化液、二甲苯、浓度梯度酒精, 小动物超声机器、麻醉机、电子秤等由沈阳军区总医院心血管研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 8 周龄, 75 只, 体重 (28.89 ± 0.86) g, 购买于北京维通利华公司。饲养于实验动物室 [实验动物室注册批文号: SYXK (军) 2012-0003], 温度、湿度适宜。小鼠自由摄食, 饮水, 12 h 昼夜交替光照。

1.2.2 复制 T2DM 动物模型 随机将 C57BL/6 小鼠分为 3 组, 分别为正常饮食对照组 (normal diet, ND)、高脂饮食对照组 (high fat, HF)、HF+STZ 组。每组 25 只, 每组小鼠体重平均 28.89 g, 空腹血糖平均 8.5 mmol/L。HF+STZ 组和 HF 组小鼠高脂鼠粮 (脂含量 60%) 喂养 4 周。4 周后, 实验组小鼠给予 STZ

(25 mg/kg) 腹腔注射, 连续注射 4 d, 对照组小鼠腹腔注射等体积的柠檬酸缓冲液^[2]。

1.2.3 血糖检测 复制模型前 (-4 周)、STZ 注射时 (0 周)、STZ 注射后不同时间点 (1、2、3、4、6、8 及 12 周) 检测小鼠空腹血糖。上午 9 时禁食, 禁食 4 h 后麻醉, 尾静脉采血检测空腹血糖。

1.2.4 糖耐量和胰岛素耐量测定 葡萄糖耐量测定: 小鼠禁食 4 h, 以 2 g/kg 剂量向小鼠腹腔注射总体积 0.1 ml 的葡萄糖水溶液, 测定注射后 15、30、60 及 120 min 鼠尾静脉血的血糖水平。胰岛素耐量测定: 小鼠禁食 4 h, 以 0.75 u/kg 剂量腹腔注射总体积 0.1 ml 胰岛素溶液, 在注射后的 15、30、60 及 120 min 测定空腹血糖水平。采用曲线下面积 (AUC) 评价各组葡萄糖耐量及胰岛素耐量改变。AUC 计算公式: 相邻时间点空腹血糖相加 \times 时间间隔 / 2。

1.2.5 血清胰岛素测定 STZ 注射后 4、8 及 12 周时, 小鼠禁食 4 h, 麻醉, 颈动脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, ELISA 试剂盒检测血清胰岛素含量。

1.2.6 心功能测定 在 STZ 注射后 4、6、8 及 12 周时, 应用小动物超声检测左心室舒张功能及收缩功能。

1.2.7 心肌组织学检测 STZ 注射 4、8 及 12 周, 麻醉小鼠, 取心脏组织, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红染色, 显微镜下观察心脏大体情况, Masson 染色观察心肌纤维化程度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件进行数据分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不同时间比较采用重复测量设计的方差分析, 若方差齐则组间两两比较用 LSD-*t* 检验。所有 *P* 值均为双侧检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 代谢水平比较

3 组在 STZ 注射不同时间点体重比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的体重有差异 ($F=5.189, P=0.000$), ②3 组体重有差异 ($F=20.279, P=0.000$), HF+STZ 组小鼠体重低于 HF 组, 高于 ND 组, HF 组小鼠体重高于 ND 组, ③3 组体重变化趋势有差异 ($F=5.723, P=0.000$)。见图 1A。

3 组在 STZ 注射不同时间点空腹血糖比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的空腹血糖有差异 ($F=46.047, P=0.000$), ②3 组空腹血

糖有差异 ($F=14.700, P=0.000$), HF+STZ 组小鼠空腹血糖高于 HF 组及 ND 组, HF 组小鼠空腹血糖略高于 ND 组, ③ 3 组空腹血糖变化趋势有差异 ($F=20.126, P=0.000$)。见图 1B。

STZ 注射 2 周后, HF+STZ 组小鼠糖耐量出现异常, 曲线下面积 (AUC) 高于 HF 组和 ND 组 ($P=0.000$ 和 0.012), HF 组 AUC 高于 ND 组 ($P=0.038$) (见图 1C、1D)。同时发现, STZ 注射 2 周后, HF+STZ 组小鼠胰岛素耐量出现异常, AUC 低于 HF 组和 ND 组 (均 $P=0.000$), HF 组胰岛素耐量较 ND 组出现异常 ($P=0.000$) (见图 1E、1F)。

2.2 血清胰岛素含量比较

STZ 注射后的 4、8 及 12 周时, 小鼠禁食 4 h, 颈动脉取血, 离心, 取上清, 用 ELISA 胰岛素检测试剂盒检测血清胰岛素含量。ND 组、HF 组与 HF+STZ 3 组血清胰岛素含量比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ① 不同时间点血清胰岛素无差异 ($F=0.680, P=0.470$), ② 3 组血清胰岛素有差异 ($F=46.445, P=0.006$), HF+STZ 组小鼠血清含量低于 HF 组, HF 组胰岛素含量高于 ND 组, ③ 3 组血清胰岛素变化趋势差异无统计学意义 ($F=1.813, P=0.242$), 见图 2。

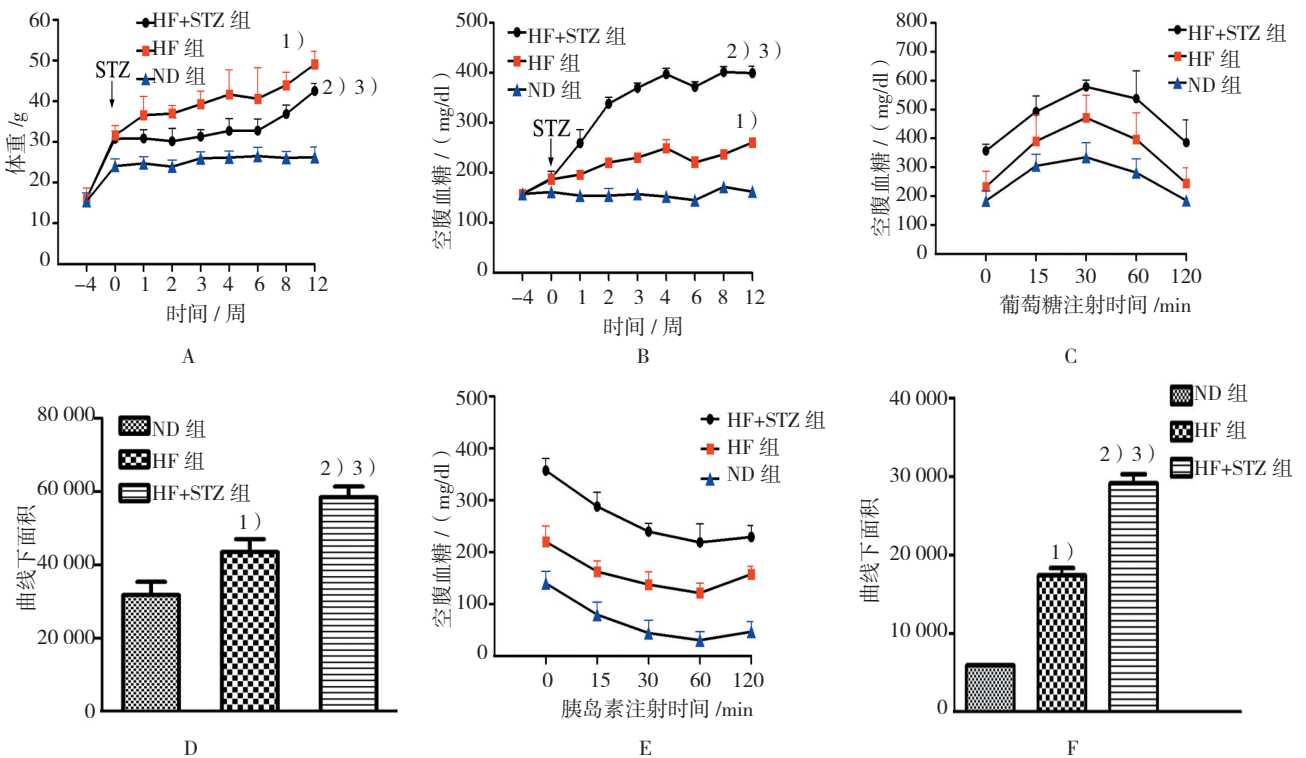
2.3 心肌组织学改变

STZ 注射 8 周时, 心肌组织 HE 染色, 发现 HF+STZ 组小鼠左心室室壁较 HF 组及 ND 组肥厚, 心腔减小。STZ 注射 12 周时, 心肌组织 Masson 染色结果显示 HF+STZ 小鼠心脏较 HF 组及 ND 组发生纤维化改变。见图 3。

2.4 左心室功能比较

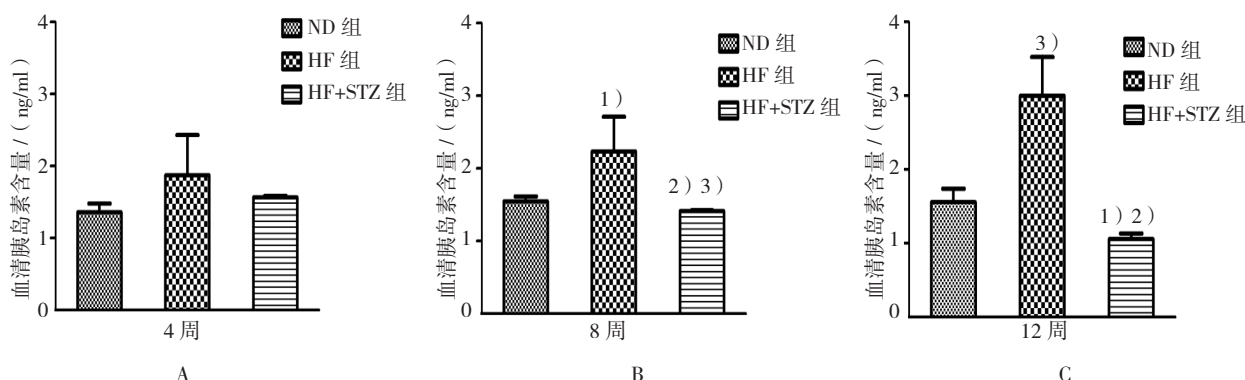
STZ 注射后 4、6、8 周, 应用小动物超声检测小鼠左心室功能。3 组小鼠左心室 E/A, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ① 不同时间点 3 组小鼠左心室 E/A 有差异 ($F=28.888, P=0.002$), ② 3 组小鼠左心室 E/A 有差异 ($F=11.283, P=0.009$), HF+STZ 组小鼠左心室 E/A 低于 HF 组及 ND 组, HF 组小鼠左心室 E/A 低于 ND 组, ③ 3 组小鼠左心室 E/A 变化趋势有差异 ($F=5.885, P=0.002$)。见图 4A。

STZ 注射 8 周后, HF+STZ 组小鼠左心室 E/A 降低, 较 ND 组差异有统计学意义 ($P=0.002$), 虽然低于 HF 组, 但差异无统计学意义; STZ 注射 12 周后, HF+STZ 组左心室舒张功能障碍明显, E/A 比值低于 HF 组和 ND 组 ($P=0.024$ 和 0.001), HF 组 E/A 低于 ND 组 ($P=0.026$), 见图 4A。



A: STZ 注射不同时间点体重变化; B: STZ 注射不同时间点空腹血糖变化; C: STZ 注射 2 周后葡萄糖耐量实验; D: STZ 注射 2 周后胰岛素耐量曲线下面积; E: STZ 注射 2 周后胰岛素耐量实验; F: STZ 注射 2 周后葡萄糖耐量曲线下面积。1) HF 组与 ND 组比较, $P<0.05$; 2) HF+STZ 组与 ND 组比较, $P<0.05$; 3) HF+STZ 组与 HF 组比较, $P<0.05$

图 1 STZ 注射不同时间点 3 组小鼠体重、空腹血糖、葡萄糖耐量及胰岛素耐量比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

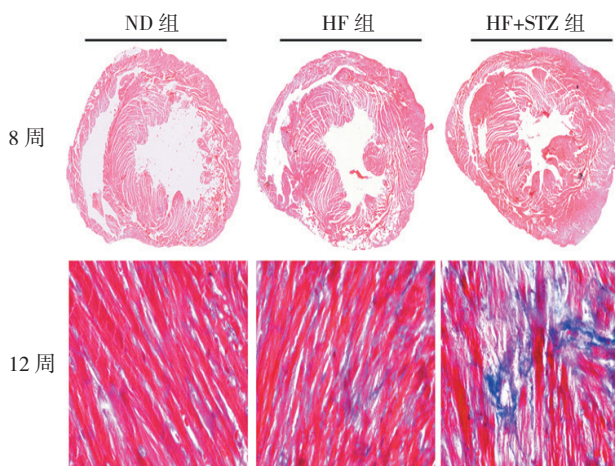


A: STZ 注射 4 周胰岛素含量; B: STZ 注射 8 周胰岛素含量; C: STZ 注射 12 周胰岛素含量。1) HF 组与 ND 组比较, $P < 0.05$; 2) HF+STZ 组与 ND 组比较, $P < 0.05$; 3) HF+STZ 组与 HF 组比较, $P < 0.05$

图 2 STZ 注射后不同时间点 3 组小鼠血清胰岛素含量 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

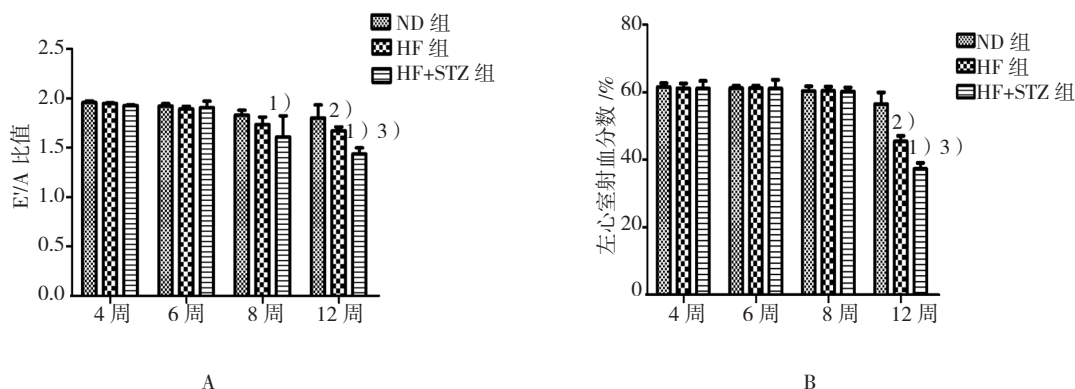
3 组小鼠左心室射血分数, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点左心室射血分数有差异 ($F=52.300, P=0.000$), ② 3 组小鼠左心室射血分数有差异 ($F=6.171, P=0.035$), HF+STZ 组小鼠左心室射血分数低于 HF 组及 ND 组, HF 组小鼠左心室射血分数低于 ND 组, ③ 3 组左心室射血分数变化趋势有差异 ($F=7.453, P=0.024$)。见图 4B。

STZ 注射 12 周时, HF+STZ 组小鼠左心室射血分数低于 HF 组及 ND 组 ($P=0.038$ 和 0.001), HF 组小鼠左心室射血分数低于 ND 组 ($P=0.016$)。HF+STZ 组及 HF 组小鼠在 STZ 注射 12 周时较 STZ 注射 8 周时左心室射血分数降低 ($t=8.657$ 和 $18.041, P=0.013$ 和 0.003), 上述结果提示 HF+STZ 组小鼠在 STZ 注射 8 周时出现左心室舒张功能障碍, 12 周时出现左心室收缩功能障碍。



STZ 注射 8 周小鼠心肌组织 HE 染色 ($\times 2.5$) 和 STZ 注射 12 周小鼠心肌组织 Masson 染色 ($\times 40$)

图 3 STZ 注射 8 和 12 周心肌组织 HE 和 Masson 染色 ($n=3$)



A: STZ 注射 4、6、8、12 周时左心室舒张功能; B: STZ 注射 4、6、8、12 周时左心室收缩功能。1) HF+STZ 组与 ND 组比较, $P < 0.05$; 2) HF 组与 ND 组比较, $P < 0.05$; 3) HF+STZ 组与 HF 组比较, $P < 0.05$

图 4 STZ 注射后不同时间点 3 组心功能情况 ($n=8$)

3 讨论

T2DM 主要表现为胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能障碍^[6]。研究证实^[7-8] 高脂饮食和肥胖是引胰岛素抵

抗的主要诱因。高脂可导致细胞膜上葡萄糖转运体和脂转运体分布异常, 细胞膜上葡萄糖转运体减少, 脂转运体增多, 从而引起糖摄取障碍, 导致机体内长期

慢性炎症反应,使胰岛功能受损,并产生胰岛素抵抗^[9]。

既往糖尿病研究中,多采用高脂饮食联合 STZ 方法诱导糖尿病动物模型。STZ 剂量可以决定复制的糖尿病动物模型分型。一次性大剂量 STZ 注射,可以破坏大量胰岛 β 细胞,引起胰岛素分泌不足,复制 1 型糖尿病动物模型^[10]。小剂量 STZ 多次注射,对胰岛 β 细胞的破坏作用较小,可复制 T2DM 动物模型^[11]。为研究 T2DM 动物模型的病理改变,本实验采用 25 mg/kg 的小剂量 STZ 连续腹腔注射 4 d 方法复制 T2DM 动物模型。单纯高脂喂养,虽会导致胰岛素抵抗及糖耐量异常^[12],但是空腹血糖仍低于糖尿病临界值 16.7 mmol/L。提示单纯高脂喂养不能复制 T2DM 模型,因此,在 4 周时,给予腹腔注射 25 mg/kg 的 STZ,连续注射 4 d。本研究发现,在 STZ 注射 1 周后,小鼠空腹血糖增加,随着时间的延长,血糖水平逐渐增加。在 STZ 注射 2 周后,小鼠出现胰岛素抵抗及糖耐量异常。同时为充分证实模型复制是否成功,本研究还监测不同时间点各组小鼠血清胰岛素水平。结果显示,与 HF 组和 ND 组相比,HF+STZ 组血清胰岛素水平下降。上述结果均提示,本研究中高脂饮食联合 STZ 成功复制 T2DM 小鼠模型。

研究发现^[13-15],糖尿病小鼠氧化应激反应增加,线粒体功能障碍,心肌细胞损伤,导致心功能异常。长期高糖高脂病理刺激,可导致心肌中胶原纤维 I 和胶原纤维 III 堆积,纤维化通路重要因子 TGF- β 表达增加,引起心肌重塑,功能障碍,影响收缩功能^[16]。本研究发现,与 HF 组和 ND 组比较,在 STZ 注射 8 周时,HF+STZ 组小鼠左心室明显肥厚并左心室舒张障碍。在 STZ 注射 12 周时,HF+STZ 组小鼠心肌出现纤维化,收缩功能明显障碍。然而,在本研究中,高脂联合 STZ 导致哪条信号通路异常进而导致心肌收缩功能和舒张功能出现严重障碍还尚不清楚,有待于进一步的深入研究。

本实验在 STZ 注射的不同时间点,连续检测 T2DM 病理改变,明确了各种病理改变出现的时间,提示 T2DM 早期主要表现为糖代谢异常及左心室舒张功能障碍,晚期出现心肌纤维化,左心室收缩功能障碍。因此,为预防 T2DM 引起心脏功能改变,应尽早进行干预治疗。

参 考 文 献:

- [1] YANG J, ZHAO P, WAN D, et al. Antidiabetic effect of methanolic extract from berberis julianae schneid. via activation of AMP-activated protein kinase in type 2 diabetic mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 106206.
- [2] KERNER W, BR CKEL J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014, 122(07): 384-386.
- [3] ZHAO L, FU Z, WU J, et al. Inflammation-induced microvascular insulin resistance is an early event in diet-induced obesity[J]. Clin Sci (Lond), 2015, 129(12): 1025-1036.
- [4] ISLAM M S, WILSON R D. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes[J]. Methods Mol Biol, 2012, 933: 161-174.
- [5] LIU X Y, LIU F C, DENG C Y, et al. Left ventricular deformation associated with cardiomyocyte Ca^{2+} transients delay in early stage of low-dose of STZ and high-fat diet induced type 2 diabetic rats[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2016, 16(1): 41.
- [6] KIM C H, KIM H K, KIM E H, et al. Relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the development of type 2 diabetes in Koreans[J]. Diabet Med, 2013, 30(9): 1075-1079.
- [7] SHIRAI T, SHICHI Y, SATO M, et al. High dietary fat-induced obesity in Wistar rats and type 2 diabetes in nonobese Goto-Kakizaki rats differentially affect retinol binding protein 4 expression and vitamin A metabolism[J]. Nutr Res, 2016, 36(3): 262-270.
- [8] DAVID M A, JONES K H, INZANA J A, et al. Tendon repair is compromised in a high fat diet-induced mouse model of obesity and type 2 diabetes[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91234.
- [9] CHEN Y P, TSAI C W, SHEN C Y, et al. Palmitic acid interferes with energy metabolism balance by adversely switching the SIRT1-CD36-fatty acid pathway to the PKC zeta-GLUT4-glucose pathway in cardiomyoblasts[J]. J Nutr Biochem, 2016, 31: 137-149.
- [10] SAKATA N, YOSHIMATSU G, TSUCHIYA H, et al. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation[J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 256707.
- [11] MANSOR L S, GONZALEZ E R, COLE M A, et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin[J]. Cardiovasc Diabetol, 2013, 12: 136.
- [12] DU J, FAN L M, MAI A, et al. Crucial roles of Nox2-derived oxidative stress in deteriorating the function of insulin receptors and endothelium in dietary obesity of middle-aged mice[J]. Br J Pharmacol, 2013, 170(5): 1064-1077.
- [13] NOWOTNY K, JUNG T, HOHN A, et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus[J]. Biomolecules, 2015, 5(1): 194-222.
- [14] REICHEL T M E, MELLOR K M, CURL C L, et al. Myocardial glycophagy - a specific glycogen handling response to metabolic stress is accentuated in the female heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 65: 67-75.
- [15] YILMAZ S, CANPOLAT U, AYDOGDU S, et al. Diabetic cardiomyopathy; summary of 41 years[J]. Korean Circ J, 2015, 45(4): 266-272.
- [16] LI S, HONG Y, JIN X, et al. A new agkistrodon halys venom-purified protein C activator prevents myocardial fibrosis in diabetic rats[J]. Croatian Medical Journal, 2015, 56(5): 439-446.

(张蕾 编辑)