

黎娅,范培云,马晓雨,等. 长期稳定的SD大鼠2型糖尿病模型制备方法[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 364-369.
Li Y, Fan PY, Ma XY, et al. A long-term and stable method for the preparation of a type 2 diabetes Sprague-Dawley rat model [J].
Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 364-369.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.011

长期稳定的SD大鼠2型糖尿病模型制备方法

黎娅¹, 范培云², 马晓雨³, 常秀君³, 何敏³, 韩蕙竹³, 粟尹⁴, 夏晓晓³, 韦秀萍³,
吴穹^{3*}

(1. 青海大学附属医院, 西宁 810001; 2. 青海省人民医院内分泌2科, 西宁 810007; 3. 青海大学医学院,
西宁 810001; 4. 西华师范大学生命科学学院, 四川 南充 637002)

【摘要】 目的 探讨高脂饮食联合链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导糖尿病大鼠模型的制备方法, 为临床研究提供一种稳定的糖尿病动物模型。方法 30只雄性SD大鼠随机分成2组: 正常对照组(NG, $n=10$)普通饲料喂养; 2型糖尿病组(DM, $n=20$)高脂饮食(high fat diet, HFD)喂养12周+STZ 25 mg/kg尾静脉注射。实验期间每周检测大鼠体重, STZ注射前1周观察大鼠口服糖耐量试验(OGTT)、胰岛素耐量试验(ITT)及血糖曲线下面积变化。STZ注射后观察大鼠一般情况(摄食、饮水量、毛发光泽、垫料潮湿度及精神状况)、随机检测大鼠血糖、果糖胺。结果 与NG组相比, DM组大鼠体重增幅大, 于喂养12周差异显著($P<0.05$)。OGTT实验60、90、120 min血糖明显高于NG组($P<0.05$), 曲线下面积显著增大($P<0.05$); IPITT试验DM组血糖明显高于NG组($P<0.05$), 曲线下面积显著增大($P<0.05$)。STZ干预后, 两组大鼠摄食、饮水、体重显著差异($P<0.05$), DM组随机血糖及果糖胺明显高于NG组($P<0.05$)。结论 高脂喂养大鼠12周后引起了胰岛素抵抗和糖耐量异常, 再联合小剂量STZ诱导的2型糖尿病大鼠模型血糖稳定, 是研究2型糖尿病的理想动物模型。

【关键词】 2型糖尿病; 大鼠模型; 链脲佐菌素; 高脂饮食

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)03-0364-06

A long-term and stable method for the preparation of a type 2 diabetes Sprague-Dawley rat model

LI Ya¹, FAN Peiyun², MA Xiaoyu³, CHANG Xiujun³, HE Min³, HAN Huizhu³, SU Yin⁴, XIA Xiaoxiao³,
WEI Xiuping³, WU Qiong^{3*}

(1. Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810001, China. 2. Qinghai Provincial Peoples Hospital,
Xining 810001 3. Qinghai University Medical College, Xining 810001. 4. College of Life Science,
China West Normal University, Nanchong 637002)

Corresponding author: WU Qiong. E-mail: 13997126828@163.com

【Abstract】 Objective To study a diabetic rat model induced by high-fat diet (HFD) combined with streptozotocin (STZ), and to provide a stable diabetic animal model for clinical research. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into two groups: normal control group (NG, $n=10$) fed a normal diet; type 2 diabetes group (DM, $n=20$) fed a HFD for 12 weeks + 25 mg STZ/kg via tail vein injection. The body weight of rats was measured every week during the experiment. The oral glucose tolerance test, insulin tolerance test and the area change under the blood glucose

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81860762), 青海省2018年科技计划基础研究计划(2018-ZJ-721), 青海省卫生计生科研指导性计划课题(2018-wjzdx-131)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81860762), Qinghai Province 2018 Science and Technology Plan Basic Research Plan (2018-ZJ-721), Qinghai Province Health and Family Planning Research Project (2018-wjzdx-131).

【作者简介】 黎娅(1992—), 女, 在读硕士, 专业: 内分泌与代谢病。Email: 864755431@qq.com

【通信作者】 吴穹(1977—), 男, 在读博士, 教授, 研究方向: 高原神经内分泌病理生理。Email: 13997126828@163.com

curve were observed one week before STZ injection. After STZ injection, the general condition (food intake, water consumption, hair luster, moisture and state of padding), random blood glucose, fructosamine and pancreatic histopathological sections were examined. **Results** The body weight was significantly increased ($P < 0.05$) in the DM group compared with the NG group. The blood glucose was significantly higher in the oral glucose tolerance test group compared with that of the NG group ($P < 0.05$) at 60, 90 and 120 min, and the area under the curve was also significantly increased ($P < 0.05$); blood glucose in the DM group was significantly higher than that of NG group ($P < 0.05$), and the area under the curve was also significantly increased ($P < 0.05$). After STZ intervention, there were significant differences in food intake, diet and body weight between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusions** After 12 weeks of a HFD, insulin resistance and glucose tolerance were abnormal in rats. The model of type 2 diabetes induced by low-dose STZ provides a valuable animal model for the study of type 2 diabetes.

【Keywords】 type 2 diabetes mellitus; rat model; streptozotocin; high fat diet

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病的流行,已成为世界范围内的严重公共卫生问题。国际糖尿病联盟(IDF)预测到2045年全球糖尿病患者将达6.93亿^[1]。2型糖尿病作为糖尿病的一个庞大分支,约占糖尿病总数90%^[2]。因此,临床相关的实验动物模型建立,对2型糖尿病研究具有重要意义。研究表明,高脂饮食(high fat diet, HFD)联合小剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)制备的2型糖尿病大鼠模型能够较好地模拟人类2型糖尿病发病过程^[3-4]。但这一造模方法尚无统一的标准,各研究中所用的高脂饲料种类、喂养时间、STZ剂量及注射方式并不完全一致。本实验通过HFD联合小剂量STZ建立2型糖尿病大鼠模型,并进一步观察模型的稳定性及相关指标变化,旨在构建一种理想的2型糖尿病动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级雄性Sprague Dawley(SD)大鼠30只,4周龄,体重80~100g,购于西安交通大学医学部实验动物中心,许可证号【SCXK(陕)2017-003】。两只每笼喂养,室温(22 ± 2)℃,相对湿度65%~75%,每天12h光照,12h黑暗循环,自由饮水、摄食,动物饲养于青海大学医学院实验动物房【SYXK(青)2019-0001】,并由青海大学伦理委员会开具了小动物实验的伦理证明及允许使用证明。

1.1.2 仪器与试剂

STZ(Sigma公司,美国);柠檬酸钠无菌缓冲液(Solarbio公司,北京);门冬胰岛素注射液(Novo Nordisk,丹麦)、50%葡萄糖溶液(青海省人民医院,青海);卓越金采血糖仪及试纸(Roche公司,美国)。高脂饲料(基础饲料上加10%蔗糖、10%猪

油、1%胆固醇、0.3%胆酸钠)。STZ溶液配制方法:将STZ溶解于0.1mol/L(pH4.5)柠檬酸钠无菌缓冲液,配制成2%的STZ溶液。由于STZ溶液不稳定,需现配现用,配制好的溶液避光冰浴,30min内注射完毕。

1.2 方法

1.2.1 2型糖尿病动物模型建立

大鼠适应环境72h后按体重随机分为2组:正常对照组(NG)10只、2型糖尿病组(DM)20只。NG组给予普通饲料喂养,DM组给予高脂饲料喂养。喂养12周后,DM组给予新鲜配制2%STZ溶液尾静脉注射25mg/kg,正常对照组给予等剂量柠檬酸钠无菌缓冲液尾静脉注射,注射后3d、7d取尾静脉血测血糖,以7d血糖水平 ≥ 16.7 mmol/L为成模标准。

1.2.2 大鼠的一般情况

每天观察大鼠的精神状况、毛发光泽、垫料潮湿程度,记录大鼠的进食量、饮水量。每周称取大鼠体重,于实验开始、高脂第12周、以及造模成功后每周测量血糖。

1.2.3 口服糖耐量(OGTT)及胰岛素耐量试验(IPITT)

各组大鼠喂养第12周,进行OGTT及IPITT试验。在OGTT试验中,大鼠禁食12h后,灌胃给予50%的葡萄糖溶液2g/kg,尾静脉检测0min及葡萄糖灌胃后30、60、90、120min的血糖,并计算曲线下面积(AUC)^[5]。间隔48h后,进行IPITT试验,大鼠禁食6h,于腹腔注射0.5u/kg的门冬胰岛素溶液,尾静脉检测0min及注射后15、30、60、90、120min的血糖,并计算曲线下面积(AUC)^[5]。

1.2.4 果糖胺测定

实验第20周,所有大鼠隔夜禁食12h,称取体

重后,麻醉大鼠,腹主动脉取血送检,于青海省人民医院检测大鼠血清果糖胺(fructosamine, FRA)水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS25.0 和 Prism 7 图像分析统计软件进行统计分析。计量资料以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间两两比较采用独立样本 t 检验,检验水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况观察结果

两组大鼠在 STZ 干预前摄食、饮水、尿量无统计学差异($P>0.05$)。STZ 干预后,NG 组大鼠精神状况良好,反应灵敏,动作自如,双目有神,毛发平伏有光泽,垫料干燥,进食量、饮水量较前无明显变化。DM 组大鼠精神萎靡,反应迟钝,毛竖无光泽,倦怠懒动,垫料潮湿,进食量、饮水量显著增加($P<0.05$),见表 1。

2.2 体重变化

STZ 干预前,两组大鼠体重随周龄增加而增加,

DM 组体重增幅略高于 NG 组,但差异无统计学意义,在 12 周末 DM 组显著高于 NG 组($P<0.05$) (图 1A)。STZ 干预后 DM 组体重呈下降趋势,差异具有显著性($P<0.05$),但从第 6 周开始,下降幅度逐渐减小;而 NG 组体重随着周龄仍然逐渐增加,但增幅较之前有所下降(图 1B)。

2.3 OGTT 及 IPITT

如图 2A 所示,OGTT 试验表明,给予葡萄糖负荷后,NG 组 30 min 后血糖升至最高,而 DM 组血糖高峰延迟至 60 min,且葡萄糖清除率总体上出现延迟,在 60、90、120 min 血糖明显高于 NG 组($P<0.05$);DM 组曲线下面积增大,差异具有显著性($P<0.05$)。相应的,IPITT 试验表明(图 2B),注射胰岛素两组大鼠血糖在 15 min 及 30 min 快速下降,于 60 min 后血糖达到最低点,但 DM 组血糖总体仍高于 NG 组($P<0.05$);DM 组曲线下面积增大,差异具有显著性($P<0.05$),提示 DM 组大鼠的胰岛素敏感性下降。这些结果都反应了 DM 大鼠存在胰岛素抵抗。

表 1 大鼠 24 h 摄食量及饮水量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of 24 h food intake and water consumption of rats($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	注射 STZ 前 Before STZ injection		注射 STZ4 周后 4 weeks after STZ injection		注射 STZ8 周后 8 weeks after STZ injection	
	24 h 摄食量(g) 24 h food-intake(g)	24 h 饮水量(mL) 24 h drinking(mL)	24 h 摄食量(g) 24 h food-intake(g)	24 h 饮水量(mL) 24 h drinking(mL)	24 h 摄食量(g) 24 h food-intake(g)	24 h 饮水量(mL) 24 h drinking(mL)
	正常对照组 NG	25.8 \pm 1.9	50.0 \pm 2.5	27.2 \pm 2.1	50.4 \pm 2.2	26.6 \pm 2.2
2 型糖尿病组 DM	28.2 \pm 2.5	55.5 \pm 2.2	40.2 \pm 3.3*	176.5 \pm 11.0*	40.7 \pm 2.7*	197.5 \pm 13.6*

注:与 NG 组比较,* $P<0.05$ 。(下图同)

Note. Compared with NG group, * $P<0.05$. (The same in the following Figures)

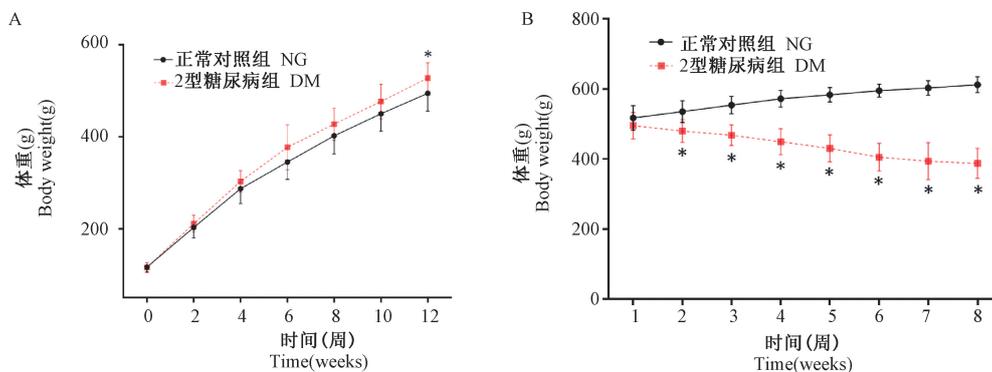


图 1 STZ 干预前(A)与 STZ 干预后(B)两组体重变化比较($\bar{x} \pm s$)

Figure 1 Comparison of changes in body weight between the two groups before STZ intervention (A) and after STZ intervention (B) ($\bar{x} \pm s$)

2.4 随机血糖及果糖胺水平

两组大鼠在 STZ 干预前随机血糖差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。STZ 干预后 1~8 周, DM 组血糖明显高于 NG 组 ($P < 0.05$), 并于 STZ 注射 3 周末逐渐趋于稳定 (图 3A)。如图 3B 所示, 与 NG 组比较, DM 组果糖胺含量明显升高 ($P < 0.05$)。

2.5 成膜率与死亡率

在给予 STZ 第 2 周, DM 组均出现明显的“三多

一少”症状, 随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 成膜率 100%。在给予 STZ 第 8 周, 不给予任何降糖治疗情况下, DM 组死亡 5 只, 死亡率 25%。

3 讨论

2 型糖尿病是一种复杂的慢性代谢性疾病, 以高血糖、胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和胰岛素缺乏为主要特征。IR 是 2 型糖尿病发生发展的

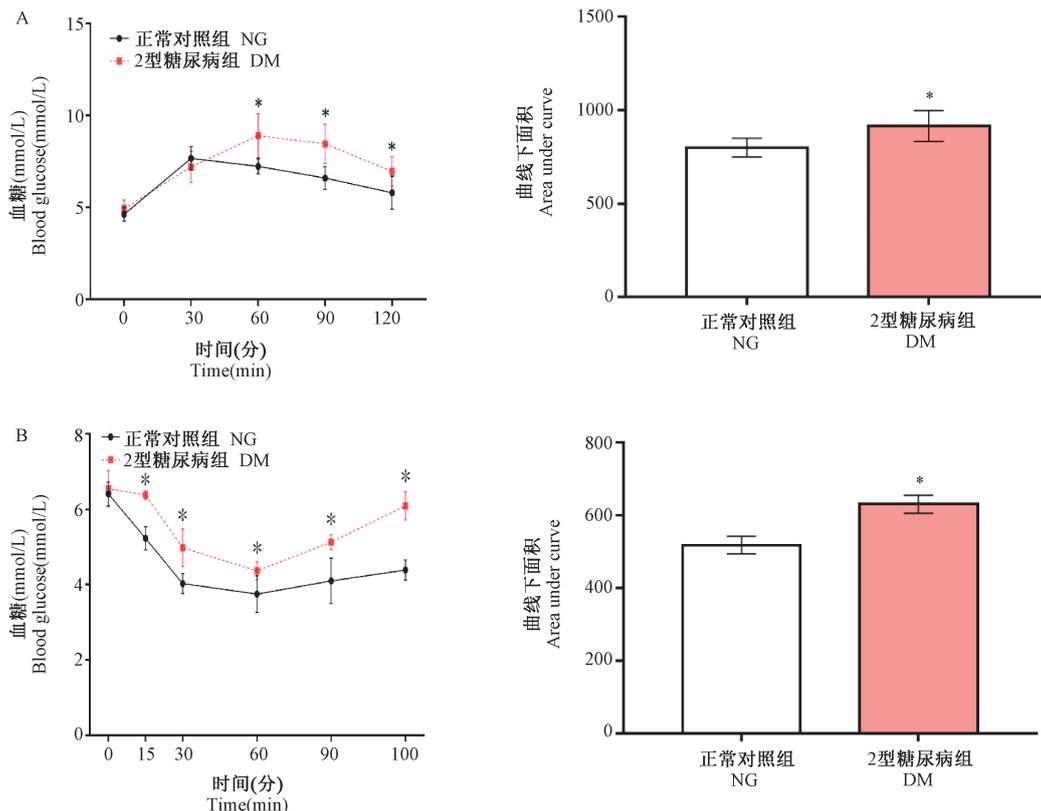


图 2 两组糖耐量试验 (A) 与胰岛素耐量试验 (B) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Figure 2 Comparison of OGTT (A) and IPITT (B) between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

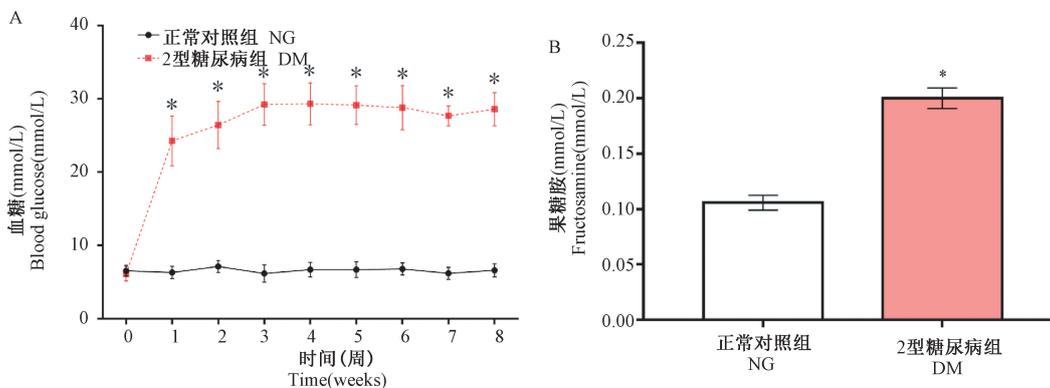


图 3 两组随机血糖 (A) 及果糖胺 (B) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Figure 3 Comparison of random blood glucose and fructosamine between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

重要病理生理基础,存在 IR 的患者往往在患病的初期会经历糖尿病和正常血糖之间的一种特殊代谢状态,包括糖耐量减低和(或)空腹血糖调节受损^[6],临床上称为糖尿病前期。研究表明高脂饮食能够降低实验动物的胰岛素敏感性,诱发胰岛素抵抗^[7-8],是建立 2 型糖尿病模型的重要依据。不足的是,在出现明显的高血糖症状前,这种模型需要长期的高脂喂养方案,增加了实验的耗时及经费。使用 STZ 很好地克服了这一障碍,在 HFD 诱导 IR 之后,注射小剂量 STZ 导致胰岛 β 细胞功能障碍,实现了从 IR 向 2 型糖尿病非常快速和非常自然的过度。在 2 型糖尿病早期患者中, β 细胞功能丧失仅为 24%,而在 2 型糖尿病晚期, β 细胞质量减少了 54%^[2]。STZ 的剂量对大鼠 β 细胞残存功能有较大的影响,大剂量 STZ 诱导更类似于 1 型糖尿病的代谢特征,表现为胰岛素分泌严重不足,低剂量 STZ 可能又无法充分诱导 2 型糖尿病。较低剂量的 STZ 能够更好地模拟 2 型糖尿病中 β 细胞功能的部分丧失^[2]。Mansor 等^[9] 研究表明高脂喂养 2 周联合 STZ 15、25 mg/kg 腹腔注射为诱导 2 型糖尿病的最佳剂量,30 mg/kg 剂量引起明显和严重的心脏代谢改变,更类似于 1 型糖尿病。但该模型仅维持了一周,血糖的稳定性有待进一步研究。刘丹丹等^[10] 以高脂喂养 6 周联合 STZ 30 mg/kg 腹腔注射,成模率 70%,该模型继续维持 2 周血糖稳定。邵俊伟等^[11] 高脂喂养 4 周联合 STZ 35 mg/kg 腹腔注射,成模率 85%,维持 10 d。研究表明,随着高脂喂养时间延长,动物肥胖和胰岛素抵抗更加明显,胰岛素的负荷越重,制备 2 型糖尿病动物模型使用的 STZ 剂量就越少^[12]。在本研究中,HFD 喂养 12 周后,DM 组大鼠葡萄糖清除率总体延迟(图 2A),胰岛素敏感性下降(图 2C),且体重明显增加(图 1A),这些结果都表明 DM 组大鼠存在胰岛素抵抗。尾静脉注射 STZ 25 mg/kg 后,DM 组出现明显的高血糖(表 1)及“三多一少”症状(图 2B),且全部成模。本实验中采用尾静脉注射 STZ 表现出比腹腔注射更好的稳定性,且血糖升高持续 8 周没有回落(图 3A),与 Tay 等^[13] 的研究一致。与腹腔注射 STZ 相比,尾静脉注射更加直观,进针回抽有血再注射药物,避免了腹腔注射时药物进入皮下或肠道,导致死亡率增加或降低糖尿病的原发病作用。但尾静脉注射药物利用率高,对剂量的准确性要求较高,研究者如能在前期进行预实验将大大提高成模率。STZ 之前

高脂饲料喂养 12 周,确保大鼠形成 IR,IR 的持续存在不仅符合 2 型糖尿病的发生发展,降低了葡萄糖的利用率,且有利于高血糖的维持。果糖胺是血浆中各种蛋白质与葡萄糖非酶糖化过程中形成的高分子酮胺结构物质,它的浓度与血糖水平成正相关且相对稳定。由于血浆蛋白的半衰期为 17~20 d,故果糖胺可反映糖尿病患者 2~3 周总体血糖情况。本研究中 DM 组果糖胺明显升高(图 3B),进一步验证了模型的成功。到实验终点时,模型组死亡 5 只,死亡率 25%,对照组全部存活。对死亡大鼠进行解剖发现 2 只大鼠存在明显的肺部感染,由于 DM 组大鼠多尿垫料潮湿,每天两次更换,系更换垫料时吸入碎屑及粉末所致。2 只肾脏明显脓肿,推测垫料潮湿导致泌尿系上行感染所致。另 1 只体重下降明显,弓背倦体,精神萎靡,行动迟缓,系营养不良或酮症酸中毒所致。

综上所述,HFD 喂养 12 周联合 STZ 25 mg/kg 尾静脉注射,成功诱导以胰岛素抵抗为特征的 2 型糖尿病。该模型成模率高、血糖稳定适合 2 型糖尿病相关药物及并发症研究。但本研究在造模成功后,采用普通饲料继续喂养,在实验终点时未能观察到两组血脂差异,且在高脂喂养 12 周时,遗憾未能进行血脂检测,如实验者需进行降脂相关研究,本模型还需进一步探讨。2 型糖尿病大鼠模型在长期的喂养过程中,由于高血糖状态、机体抵抗力差等原因仍存在较高的死亡率。需要研究者在后续实验中保持实验室环境清洁,定期消毒杀菌,保持垫料相对干燥的同时尽量减少更换垫料时大鼠粉尘吸入。

参 考 文 献(References)

- [1] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138: 271-281.
- [2] Khadke SP, Kuvalekar AA, Harsulkar AM, et al. High energy intake induced overexpression of transcription factors and its regulatory genes involved in acceleration of hepatic lipogenesis: a rat model for type 2 diabetes [J]. *Biomedicine*, 2019, 7 (4): 76.
- [3] Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. *Metabolism*, 2000, 49(11): 1390-1394.
- [4] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 52(4): 313-320.
- [5] 罗宏,段翠翠,栾畅,等. 植物乳杆菌 C88 对高脂饲料和链

- 脲佐菌素诱导 2 型糖尿病模型大鼠的降血糖作用[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 190-197.
- Luo H, Duan CC, Luan C, et al. Antidiabetic effect of lactobacillus plantarum C88 in a rat model of high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetes[J]. Food Sci, 2018, 39(13): 190-197.
- [6] 陈珊珊, 梁芳芳, 王泓午, 等. 高脂低糖和高脂高糖饲料建立糖耐量受损大鼠模型[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(8): 1930-1932.
- Chen SS, Liang FF, Wang HW, et al. Establishment of a rat model of impaired glucose tolerance by high-fat, low-sugar and high-fat, high-sugar diet[J]. Chin J Geront, 2018, 38(8): 1930-1932.
- [7] Burgeiro A, Cerqueira MG, Varela-Rodriguez BM, et al. Glucose and lipid dysmetabolism in a rat model of prediabetes induced by a high-sucrose diet[J]. Nutrients, 2017, 9(6): 638.
- [8] 高雪, 安至超, 何其英, 等. 高脂饲料喂养时间对 2 型糖尿病肾病大鼠模型的影响[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(1): 114-119.
- Gao X, An ZC, He QY, et al. Effects of high-fat diet feeding time on the establishment of a rat model of type 2 diabetic nephropathy[J]. Acta Lab Anim Sci Sini, 2018, 26(1): 114-119.
- [9] Mansor LS, Gonzalez ER, Cole MA, 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.
- [10] 刘丹丹, 张伟, 朱浩, 等. II 型糖尿病大鼠动物模型的构建与验证[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(7): 1201-1205.
- Liu DD, Zhang W, Zhu H, et al. Establishing and verification of type II diabetes mellitus rat model[J]. Chin J Vet Sci, 2016, 36(7): 1201-1205.
- [11] 邵俊伟, 蔡逊, 马丹丹, 等. SD 大鼠 2 型糖尿病模型的建立与评价[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2014, 21(10): 1212-1215.
- Shao JW, Cai X, Ma DD, et al. Establishment and evaluation of type 2 diabetes SD rat model[J]. Chin J Bases Clin General Surg, 2014, 21(10): 1212-1215.
- [12] 魏占英, 沈丽, 冯晓慧, 等. 高脂饲料喂养时间和 STZ 剂量对建立 2 型糖尿病大鼠模型的影响[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(2): 42-46.
- Wei ZY, Shen L, Feng XH, et al. Effects of high-fat diet feeding time and streptozotocin dose on establishment of a rat model of type 2 diabetes mellitus[J]. J Med Res, 2014, 43(2): 42-46.
- [13] Tay YC, Wang Y, Kairaitis L, et al. Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? [J]. Kidney Int, 2005, 68(1): 391-398.

[收稿日期] 2019-11-24