



小型猪糖尿病模型研究进展

王月婷, 王宗保

(南华大学药学与生命科学学院, 湖南 衡阳 421001)

【摘要】 小型猪的生理解剖结构、糖脂代谢、血液生化指标和疾病发生机制与人类都很相似,而且价格也相对适中,所以小型猪是诱导糖尿病模型的理想动物,本文就近年来用小型猪来诱导糖尿病模型的研究做一综述。

【关键词】 动物模型; 糖尿病; 小型猪

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)12-0070-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.012.017

Advances in Research on Minipig Models of Diabetes

WANG Yue-ting, WANG Zong-bao

(College of Life Science and Medicine, University of South China, Hengyang 421001, China)

【Abstract】 The anatomy and physiology, glucose-lipid metabolism, blood biochemical parameters and the mechanism of diabetes in minipigs is very similar to that of humans. Its price is also relatively modest. So minipigs are excellent animal models of induced diabetes. This article is a review on the progress in research on minipig models of diabetes in recent years.

【Key words】 Animal model; Diabetes mellitus; Minipig

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是继恶性肿瘤和心血管疾病后,危害人类健康和生命的第三大非传染性疾病,并且会引发多种并发症(包括心血管病变、肾病病变、神经病变、视网膜病变等)。目前全球糖尿病患者每年都在增加,理想的动物模型无疑可以加快对糖尿病发病机制的研究。小型猪作为诱导糖尿病动物模型相比于其他动物有独特的优势,不仅各个脏器系数与人类都很相近,而且价格也相对适中。因此,小型猪是诱发糖尿病模型的理想动物。

1 小型猪简介

小型猪是珍稀猪种,原产地是中国和越南。我国的小型猪主要是在其原产地经过长期近亲交配而形

成的封闭群,具有体型小、遗传稳定性等特点。国外小型猪的培育多采用世界各地小体型猪种或野猪进行多品种杂交选育而成,虽然品种多,但缺乏资源优势。目前国外用小型猪来制备糖尿病模型的有Yucatan小型猪、Yorkshire小型猪、Göttingen小型猪、Sinclair小型猪等,国内有广西巴马小型猪、贵州小型猪、五指山小型猪、版纳微型猪等。

2 小型猪糖尿病模型的制备

2.1 单独高糖高脂饲料喂养制备模型

基础饲料的能量比如下:总能量为16.84 MJ/kg,摄入能量为13.34 MJ/kg,其中蛋白质含量约占15.98%,脂肪为4.71%,碳水化合物为62.19%。高糖高脂饲料是由10%的猪油、37%的蔗糖和

[基金项目]湖南省科技厅重点项目(2010TT1008);湖南省卫生厅科研项目(B2010-040);湖南省高校科技创新团队支持计划资助。

[作者简介]王月婷(1983-),女,硕士研究生,动脉硬化湖南省重点实验室,研究方向:糖尿病的分子机制。

[通讯作者]王宗保(1965-),男,教授,硕士生导师, E-mail: wangzb65@hotmail.com

53% 的基础饲料组成,能量比如下:总能量为 18.46 MJ/kg,摄入能量为 15.95 MJ/kg,蛋白质占 8.48%,脂肪 12.50%,碳水化合物 69.59%。饲料配方及所还有的能量没有统一的标准,都大同小异。陈华等^[1]以高糖高脂饲料同时喂养了 4-5 月龄的巴马小型猪、五指山小型猪、中国农大小型猪。结果巴马小型猪和五指山小型猪对高糖高脂饲料诱导糖尿病比较敏感,实验 5~6 月后出现糖代谢异常,表现为体型肥胖、血清胰岛素升高和胰岛素敏感性下降。而中国农大小型猪对高糖高脂饲料诱导糖尿病相对不敏感,实验过程中血清葡萄糖水平、胰岛素含量、胰岛素敏感性指数和静脉糖耐量实验(IVGTT)都无显著变化,仅在实验后期表现为肥胖、胰岛素敏感性指数下降。Xi 等^[2]和 Liu 等^[3]分别用贵州小型猪和巴马小型猪诱导糖尿病,他们在高糖高脂饲料中添加了胆固醇,其配方如下:51% 的基础饲料、10% 的猪油、37% 的蔗糖和 2% 的胆固醇。结果是贵州小型猪在喂养 6 个月 after 出现了显著的糖尿病症状和血管病变。巴马小型猪在 5 个月 after 出现了高糖血症、高胰岛素血症和脂代谢紊乱,同时有尿糖和肾炎糖尿病肾病等症状。由此可见高糖高脂饲料添加胆固醇可加速糖尿病的形成,同时实验动物也会出现动脉粥样硬化症状。

2.2 链脲佐菌素的应用

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)对一定种属动物的胰岛素细胞有选择性破坏作用,对机体组织毒性相对较小,动物存活率高,目前是国内外使用较多的制备糖尿病动物模型的药物。纯的 STZ 为白色粉末状,在光照下易分解,因此需低温避光保存。STZ 购买后应保存在 -20°C 。现配现用,用时应溶解在缓冲液中。溶解 STZ 的缓冲液有生理盐水、柠檬酸缓冲液等,通过不同溶剂溶解 STZ 后血糖模型比较,最后指出 pH4.5 柠檬酸缓冲液可以作为理想的溶剂^[4],因此推荐用柠檬酸缓冲液溶解 STZ。新鲜配制的柠檬酸缓冲液溶解 STZ 溶液呈现透明的微黄色,如果颜色变深或者有气泡产生,说明该试剂的稳定性受到破坏,将导致 STZ 诱导的糖尿病模型失败。给药前,动物需要彻底空腹禁食,一般都是禁食 12 h 以上。

选择用 STZ 诱导小型猪要考虑实验动物的选择、给药途径及方法、给药剂量等。在实验动物的选择方面,最好用雄性动物造模,雌性除了激素影响外,还要注意在实验时不要混入雄性,雌雄混养,

容易导致妊娠,影响实验。实验动物体重开始建模时不能太低,因为一旦成模,体重几乎是负增长,文献多选用体重为 20~25 kg 的小型猪来诱导建模。给药途径有腹腔注射,静脉注射,皮下注射等。皮下注射很少见,腹腔注射操作简单,方便快捷,但一般多用于鼠类建模中。小型猪一般多主张快速静脉注射,多采用耳缘静脉注射。方法有一次性大剂量,一次性小剂量和多次小剂量等均可造成糖尿病。STZ 的剂量与血糖的高低有关,一般一次性大剂量直接会导致 β 细胞的广泛破坏,造成 1 型糖尿病;小剂量只破坏部分 β 细胞,造成外周组织对胰岛素不敏感,接近于人类 2 型糖尿病的发病机理。由于一次性大剂量药物的毒性太大,可以平均分成多次小剂量的注射,这样减少药物毒性,有助于建模,提高成模率。因 STZ 的水溶液不稳定,注射时要迅速最好在 30 min 内注射完,否则药效会降低。建模时除了把握药物的剂量外,还要参考实验动物的年龄、体重、对药物的承受能力以及不同物种间对药物的敏感程度。Didier Mesangeau 等^[5]用 5 月龄、体重为 (17.8 ± 0.45) kg 的 Yucatan 小型猪,第一次注射 55 mg/kg 剂量的 STZ,8 d 后又按照 50 mg/kg 的剂量再次注射 STZ,如果血糖过高,平均一天 2 次注射 10~20 单位的胰岛素,成功诱导出 1 型糖尿病。成模后糖尿病组血糖与正常组相比显著并且持续升高,体重明显下降。Ross G 等^[6]用年龄为 8~12 周龄体重为 15~20 kg 的 Yorkshire 小型猪按照 50 mg/kg 的剂量通过耳缘静脉连续 3 d 注射 STZ,再用高糖高脂饲料喂养,成功诱导出糖尿病。在注射 STZ 后的 2 d 内空腹血糖达到最高,之后会缓慢降下来。注射 STZ 后的 20 周,胰岛 β 细胞为 43 ± 10 与正常组 221 ± 86 比较减少了 20%。国内 Lu Lin 等^[7]用 4~6 月龄平均体重为 20~30 kg 的雄性贵州小型猪,按照 125 mg/kg 的 STZ 剂量成功诱导出糖尿病模型,糖尿病组的空腹血糖在注射 STZ 后的 2~3 个月 after 急剧上升,之后会逐渐降下来。6 个月 after 空腹血糖糖尿病组 (7.09 ± 4.11) mmol/L 与正常组 (2.19 ± 0.78) mmol/L 相比差异有显著性;胰腺的免疫组织化学实验表明,正常组的胰腺有许多 β 细胞团存在,而糖尿病组的胰腺 β 细胞团几乎没有,仅有残余的小的 β 细胞存在。M Jensen-Waern 等^[8]用 6 月龄平均体重为 (19 ± 1.3) kg 的家猪来诱导糖尿病,一次性注射 STZ 150 mg/kg,成功诱导出高血糖症且氨基酸代谢改变。注射

STZ 9 h 后,血糖由原来的(5.4~7.5) mmol/L 下降到(0.8~2.2) mmol/L,血糖太低注射 0.5 g/kg 的葡萄糖。在 24 h 后所有实验猪出现高血糖,3 d 后空腹血糖值大于 25 mmol/L。C 肽平均值为(0.25 ± 0.16) μg/L,血清支链氨基酸的浓度增加 4 倍,丙氨酸和牛磺酸分别降低了 70% 和 50%。所有实验猪除了生长阻滞和骨骼肌减少外体格检查均正常,最后实验动物消瘦,尸检证明肌肉消耗,腹部肌肉减少和皮下脂肪减少。Von Wilmsky C 等^[9]用家猪注射 90 mg/kg 的 STZ 就可以诱导出具有明显特征的糖尿病模型,其 6 个月后软骨和硬骨的骨组织病理特征发生改变。Lee PY 等^[10]在 STZ 诱导的 1 型糖尿病小型猪中对胰腺蛋白进行双向电泳检测,与对照组相比,糖尿病组发现了 11 个蛋白与正常组有显著区别。此关于胰腺蛋白质组学的研究数据将为研究 1 型糖尿病病理机理过程提供有价值的资源。

尼克酰胺的作用是保护部分 β 细胞,以缓冲 STZ 对 β 细胞造成的损伤。Marianne O. Larsen 等^[11]用 Göttingen 小型猪建立糖尿病模型,他用平均体重为(18 ± 3) kg 的小型猪单独注射不同剂量的 STZ (0.75, 100 和 125 mg/kg) 诱导糖尿病或者用平均体重为(22.5 ± 3.5) kg 的小型猪注射剂量为 125 mg/kg 的 STZ 结合不同剂量的尼克酰胺(0.20, 67, 100, 150 和 230 mg/kg) 进行诱导。结果单独注射不同剂量的 STZ,以 100 和 125 mg/kg 的剂量是最好的,空腹血糖和胰岛素与正常组相比都有显著变化;注射 125 mg/kg 的 STZ 和不同剂量的尼克酰胺,以 67 mg/kg 的尼克酰胺为最佳,此剂量的药物在注射前与注射后相比较都有显著的变化。随后几年他用同样剂量 125 mg/kg 的 STZ 和 67 mg/kg 的尼克酰胺也诱导出糖尿病模型^[12,13]。此种方法建立的模型有利于糖尿病病理生理学的研究,并且为治疗糖尿病筛选新的药物提供帮助。

有文献报道,用 STZ 诱导糖尿病血糖会出现 3 个时期的变化:早期的高血糖时期,大约持续 1~2 h,可能是由于药物抑制了胰岛 β 细胞释放胰岛素所致;低血糖时期,大约持续 6~10 h,可能是因为药物破坏了胰岛 β 细胞,使胰岛素大量释放所致;最后大约 72 h 后就是稳定持续的高血糖时期即糖尿病阶段。在注射 STZ 后实验动物会出现短暂性的饮食减少,饮水增加,多尿,活动反应差,精神不振等症状,大约持续 1 周。所以要保持给予充足的

水源,栖息地垫草料,要保持清洁卫生,温度要适中,此期间要随时检测实验动物的血糖。严重的低血糖是要补充葡萄糖,高血糖时要补充胰岛素。也有文献报道,在注射 STZ 一个月后血糖不但没有升高,反而和之前血糖不相上下甚至低于之前血糖水平,这可能是与 STZ 的剂量有关,STZ 的剂量不够,胰岛 β 细胞发生代偿性反应,胰岛 β 细胞增生,胰岛素分泌增加所致。这种情况下,只有等血糖恢复正常水平后再次注射 STZ。

3 小型猪糖尿病模型的判断标准

小型猪的糖代谢血液生化指标与人类十分相似,血清胰岛素和葡萄糖的正常值接近于人类,糖耐量实验的反应过程也与人类相近,因此,小型猪的判断标准可以参考人类的标准进行。2010 年美国糖尿病协会发布了人类糖尿病诊断的新标准^[14],该标准如下:(1) A1C 6.5%。(2) 空腹血糖(FPG) 7.0 mmol/L,空腹的定义是至少 8 h 未摄入热量。(3) 口服糖耐量(OGTT) 实验中 2 h 的血糖 11.1 mmol/L。实验应按照世界卫生组织(WHO)的标准进行,用 75 g 无水葡萄糖溶于水作为糖负荷。(4) 有高血糖的症状或高血糖危象,随机血糖 11.1 mmol/L。因为小型猪在糖耐量试验中不会像人一样配合,所以可以采用静脉糖耐量(IVGTT) 来代替 OGTT。Berit Chistoffersen 等^[15]比较了几种反应小型猪胰岛素敏感性的实验方法,最后指出 IVGTT 优于其它几种方法。

4 选择小型猪制备糖尿病模型的优势

目前全球糖尿病患者日益增加,病因不清楚,诱发因素很多,对糖尿病研究使用的实验动物也很多,如灵长类的猕猴,用它研究糖尿病更接近于人类,但是价格比较昂贵;也有啮齿类动物,如小鼠、大鼠等,虽然价格适中,但是他们的功能器官与人类还是有一定的差距。现在国内外用小型猪来做糖尿病模型的越来越多,这主要是因为小型猪与人类的功能器官很接近,胰岛素肽链氨基酸的组成和人类最相近,只相差一个氨基酸(β 链第 30 位氨基酸,猪是丙氨酸,人是苏氨酸^[16]);心血管系统的发生发展,形态结构和生理特征与人类相差不大^[17];再者猪与人类一样都是杂食性动物,自身的糖代谢、脂代谢的特点也与人类极为相似^[18]。此模型与鼠等动物模型相比,猪与人在皮下药物管理、胃肠

的结构、胰岛的形态与代谢状态存在相似的药动力学;还可以做糖尿病胰腺移植的相关研究,为糖尿病的治疗提供一种方法;欧洲的 Göttingen 小型猪已被公认为最佳的医用模式动物之一,目前可作为糖尿病、心脏病、高血压等重大疾病的动物模型和新药筛选模型,所以猪是研究糖尿病及其并发症的理想动物。

5 展望

由于小型猪在解剖学、生理学、血液学和血液生化指标值、疾病发生过程等方面都与人极为相似,因此不仅应用于糖尿病模型,还广泛用于心血管系统、消化系统、皮肤系统、骨骼发育和营养代谢等方面。而且应用数量正在逐年增加,有可能会取代实验猴、犬成为被大量使用的实验动物。在心血管系统方面,猪的心脏大小和血液循环与人类很相似,堵塞冠状动脉分支后形成的心肌梗死模型与人类的心肌梗死病变过程有很大的相似,对临床研究心肌梗死的病理生理以及治疗方法有重要意义;小型猪的营养吸收和胃肠道结构与人类相似,所以用小型猪制作消化系统疾病模型与其他同类动物模型相比有独特的优势;在皮肤系统方面,猪皮肤的形态学、生理学与药理学与人类相似,是进行实验烧伤研究的理想动物;随着移植医学和免疫学的深入研究,到现在为止,小型猪已被选为最适合的异种移植供体,小型猪-人异种器官/细胞的移植已经是当今生物医学领域研究的热点;另外小型猪在一些药物的代谢动力学方面比其他动物更能反映药物在体内的情况,因此,小型猪越来越多的被用于药物代谢动力学方面的相关研究。由此可见,小型猪做为实验动物在生物医学研究中具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 陈华,刘亚,李春海,等. 三个品系小型猪 2 型糖尿病模型的比较研究 [J]. 实验动物科学,2007,24(6):49-55.
- [2] Xi S, Yin W, Wang Z, et al. A minipig model of high-fat/high-sucrose diet-induced diabetes and atherosclerosis [J]. Int J Exp Path, 2004, 85: 223-231.
- [3] Liu Y, Wang Z, Yin W, et al. Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in a minipig model induced by high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet [J]. Exp Anim, 2007, 56(1):11-20.
- [4] 末立江,刘长青,郭金铭,等. 不同溶剂在链脲佐菌素血糖模型的作用比较 [J]. 现代预防医学,2008,3454-3455.
- [5] Mesangeau D, Laude D, Elghozi JL. Early detection of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetic pigs using blood pressure and heart rate variability [J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(4):889-899.
- [6] Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JR, et al. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine [J]. Diabetes, 2001, 1654-1655.
- [7] Lu L, ZHANG Q, PU L, et al. Elevation of tumor necrosis factor-, interleukin-1 and interleukin-6 levels in aortic intima of Chinese Guizhou minipigs with streptozotocin-induced diabetes [J]. Chin Medical J, 2007, 120(6):479-484.
- [8] Jensen-Waern M, Andersson M, Kruse R, Nilsson B, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes in domestic pigs with focus on the amino acid metabolism [J]. Lab Anim, 2009, 43(3):249-254.
- [9] Von Wilmowsky C, Stockmann P, Metzler P, et al. Establishment of streptozocin-induced diabetic domestic pig model and a systematic evaluation of pathological changes in the hard and soft tissue over a 12-month period [J]. Clin Oral Implants, 2010, 21(7):709-717.
- [10] Lee PY, Park SG, Kim EY, et al. Proteomics analysis of pancreas from mini-pigs treated with streptozotocin as a type 1 diabetes models [J]. Microbiol Biotechnol, 2010, 20(4):817-820.
- [11] Larsen MO, Wilken M, Gotfredsen CF, et al. Mild streptozotocin diabetes in the Göttingen minipigs: A novel model of moderate insulin deficiency and diabetes [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002, 282: E1342-E1351.
- [12] Larsen MO, Rolin B, Ribel U, et al. Valine pyrrolidide preserves intact glucose-dependent insulinotropic peptide and improves abnormal glucose tolerance in minipigs with reduced β -cell mass [J]. Exp Diab Res, 2003, 4:93-105.
- [13] Larsen MO, Juhl CB, Porksen N, et al. β -cell function and islet morphology in normal, obese, and obese β -cell mass-reduced Göttingen minipigs [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 288: E412-E421.
- [14] American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus [J]. Diabetes Care, 2011, 34: S62-S69.
- [15] Christoffersen B, Ribel U, Raun K, et al. Evaluation of different methods for assessment of insulin sensitivity in Göttingen minipigs: introduction of a new, simpler method [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 297: R1195-R1201.
- [16] Bellinger DA, Merricks EP, Nichols TC. Swine models of type 2 diabetes mellitus: insulin resistance glucose and cardiovascular complications [J]. ILAR J, 2006, 47(3):243-258.
- [17] Liu Y, Wang Z, Yin W, et al. Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in minipig model induced by high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet [J]. Exp Anim, 2007, 56(11):11-20.
- [18] McDonald TO, Gerrity RG, Jen C, et al. Diabetes and arterial extracellular matrix changes in a porcine model of atherosclerosis [J]. Histochem Cytochem, 2007, 55(11):1149-1157.

(修回日期)2011-08-10