

唐艺丹,王鲜忠,张姣姣. II型糖尿病动物模型构建的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 870-876.

Tang YD, Wang XZ, Zhang JJ. Research progress in the construction of type II diabetes animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 870-876.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.020

II型糖尿病动物模型构建的研究进展

唐艺丹,王鲜忠,张姣姣*

(西南大学动物医学院,重庆 400715)

【摘要】 糖尿病是以高血糖为特征的多因素引发的代谢性疾病,对人类的健康造成了严重威胁。构建相应的糖尿病动物模型对研究其发病机制、预防、诊断及新治疗药物的筛选具有十分重要的意义。本文在概述自发性和诱导性II型糖尿病动物模型构建的基础上,重点阐述了利用基因工程技术构建II型糖尿病动物模型的方法,并探讨了各种构建方法的优缺点,旨在为揭示糖尿病的发病机制及治疗提供合适的动物模型。

【关键词】 II型糖尿病;动物模型;STZ;基因编辑

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0870-07

Research progress in the construction of type II diabetes animal models

TANG Yidan, WANG Xianzhong, ZHANG Jiaojiao*

(College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Corresponding author: ZHANG Jiaojiao. E-mail: zhangjiff@126.com

【Abstract】 Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycemia and caused by many factors. Diabetes poses a serious threat to human health. It is of great significance to construct a corresponding animal model of diabetes to study its pathogenesis, prevention, and diagnosis and to screen new drugs. On the basis of summarizing the construction of animal models of spontaneous and induced type II diabetes, this paper focused on the construction of animal models of type II diabetes using genetic engineering technology and discussed the advantages and disadvantages of various construction method to provide appropriate animal models for unraveling the pathogenesis and treatment of diabetes.

【Keywords】 type II diabetes; animal model; STZ; gene editing

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

近年来糖尿病患病率和死亡率明显增加,在我国已成为了继心血管疾病和肿瘤之后位列第三位的多发病和慢性非传染性疾病。在糖尿病患者中,II型糖尿病约占90%以上^[1]。II型糖尿病主要由胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足引起^[2],构建糖尿病动物模型能够较好地模拟糖尿病的发生与发展过程,有利于揭示糖尿病的发病机制以及治疗药物的筛选^[3],在生物医学和转化医学等领域具有广泛的

应用价值。构建不同的糖尿病动物模型有利于进行不同领域的糖尿病研究,如糖尿病引起的心血管病变、肾病、神经病变及糖尿病足等。传统构建II型糖尿病动物模型的方法主要包括自发性和诱导性建模,其方法较成熟,操作简单,能更好地模拟II型糖尿病的发生与发展过程。啮齿类动物(如大鼠、小鼠)的基因组与人类基因组具有较高的同源性,并且关于啮齿类动物基因图谱的研究较为成

【基金项目】 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0056),重庆市高等教育教学改革研究项目(203259),西南大学科技论文写作课程思政项目。

Funded by General Project of Chongqing Natural Science Foundation (cstc2019jcyj-msxmX0056), Chongqing Higher Education Teaching Reform Research Project (203259), Scientific Paper Writing Curriculum Ideological and Political Project of Southwest University.

【作者简介】 唐艺丹(1998—),女,本科,研究方向:动物医学。Email:1411764133@qq.com

【通信作者】 张姣姣(1988—),女,硕士生导师,研究方向:动物生殖生理与生物技术。Email:zhangjiff@126.com

熟,因此,啮齿类动物常用作动物模型来进行病理机制的研究和药物研发。利用基因工程技术构建相关基因型的 II 型糖尿病动物模型,有利于从基因和分子水平上阐述人类糖尿病的发病机制。本文在概述自发性和诱导性 II 型糖尿病动物模型构建的基础上,着重阐述了利用基因工程技术构建 II 型糖尿病动物模型的方法及其造模机制,分析了不同 II 型糖尿病动物模型的优点、缺点和适用范围,为揭示糖尿病的发病机制及治疗奠定理论基础。

1 自发性 II 型糖尿病动物模型

自发性 II 型糖尿病动物模型是指在自然条件下,未经过人工处理而发生 II 型糖尿病的实验动物,利用自发性 II 型糖尿病的动物进行育种,其后代仍患 II 型糖尿病。目前筛选成功并能作为种系保存下来的自发性糖尿病动物模型主要是啮齿类动物^[4]。自发性 II 型糖尿病模型动物的糖尿病发生和发展过程及表现与人类的 II 型糖尿病相似,尤其是在多基因模型中,适合于构建糖尿病及其他代谢性疾病等多因素疾病模型以及糖代谢缺陷模型^[5]。主要缺点是来源相对较少,价格昂贵,繁殖和饲养条件严格,而且频繁的同系繁殖造成的单基因遗传使模型动物糖尿病的发生和发展特性与人类糖尿病有所差异^[6]。

1.1 近远杂交系

1.1.1 GK(Goto-Kakizaki)大鼠

GK 大鼠是 Wistar 大鼠经过口服糖耐量实验后筛选出轻度糖耐量减退的大鼠,经过 10 代左右反复选择高血糖鼠进行交配,最后形成与人类 II 型糖尿病近似的自发性非肥胖 II 型糖尿病的鼠种^[7]。GK 大鼠主要表现为葡萄糖耐受不良, β 细胞分泌受损,空腹高血糖和高脂血症,肝糖原生成增多,肝、肌肉和脂肪组织出现中度胰岛素抵抗等,长期患病后出现肾、心脏并发症和神经元衰退及认知障碍^[8]。因此,GK 大鼠已广泛应用于 II 型糖尿病研究的各个方面,不仅包括糖尿病的胰岛素分泌缺陷以及 β 细胞形态、结构和功能紊乱等研究,还涉及糖尿病各种并发症的研究。因此利用 GK 大鼠模型有利于从组织学、病因学、病理学等多个角度揭示 II 型糖尿病及其并发症的致病机理。

1.1.2 OLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)大鼠

OLETF 大鼠是利用 Long-Evans 大鼠进行远系

杂交后,选择体重 > 400 g 的雄性后代与体重在正常范围的 9~10 周的雌性后代进行交配,然后经过 20 代的传代筛选得到体形肥胖的 II 型糖尿病大鼠模型。OLETF 大鼠除了表现胰岛素抵抗和糖脂代谢紊乱外,还表现出肥胖,因此该动物模型适合于研究由肥胖引起的 II 型糖尿病^[9]。由于 OLETF 大鼠的胆囊收缩素 A 型受体(cholecystokinin type A receptor, CCKAR)的基因表达完全缺失,因此 OLETF 大鼠常表现为出现食欲亢进和肥胖,此外,OLETF 大鼠 X 染色体上的 ODB1 基因和 14 号染色体上的 ODB2 基因与 II 型糖尿病的发病密切相关^[10]。因此,OLETF 大鼠模型可作为 CCKAR、ODB1、ODB2 基因研究的动物材料。

1.2 基因缺陷型

1.2.1 db/db 小鼠

db/db 小鼠 4 号染色体的瘦素受体基因发生缺陷,从而导致自发性 II 型糖尿病。db/db 小鼠的主要表现为肥胖、高血糖、高血脂和糖尿等症状,其生理与行为特征与人类 II 型糖尿病的表现极为相似^[11]。

1.2.2 KKay 小鼠

KKay 小鼠是将黄色肥胖基因转入 KK 小鼠而形成的 II 型糖尿病动物模型。KKay 小鼠的主要表现为肥胖、葡萄糖不耐受和胰岛素抵抗等,与人类 II 型糖尿病相似,尤其是肾小球的病理变化与人类糖尿病肾病早期观察到的病理变化一致,并且 KKay 小鼠由糖尿病并发的肾组织病变比 KK 小鼠严重^[12]。

2 诱导性 II 型糖尿病动物模型

诱导性 II 型糖尿病动物模型是指通过物理、生物和化学等致病因素,损伤动物胰或胰岛细胞进而导致胰岛素缺乏,或运用各种拮抗剂对抗胰岛素的作用,人工诱导具有 II 型糖尿病特征性的动物模型。构建诱导性 II 型糖尿病动物模型应从致病原因的角度来模拟人类 II 型糖尿病,避免只从病态反应进行模拟。构建诱导性 II 型糖尿病模型的方法比较简单,造模率较高,目前广泛应用于 II 型糖尿病的研究,但缺点是造模时间较长。

2.1 胰腺切除法

胰腺切除法是最早的糖尿病动物模型的构建方法。狗的胰腺被切除后,出现多尿、多饮、多食和严重的糖尿现象^[5]。切除胰腺的猪的葡萄糖耐量

低于正常,从而可构建糖尿病模型^[13]。但胰腺切除法单独使用一般是构建 II 型糖尿病模型,要构建 II 型糖尿病模型还需要联合其他化学药物,如链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、四氧嘧啶等^[14]。

2.2 膳食诱导法

膳食诱导法是目前较为简单方便的糖尿病动物模型的构建方法,一般利用高糖高脂的饲料连续饲喂实验动物,其原理为糖在体内直接可导致高血糖,在长期高糖膳食诱导下引起糖代谢异常,继而导致 II 型糖尿病,此外,高脂引起的脂代谢异常,进而导致 II 型糖尿病。沙鼠在饲喂高能膳食后表现出糖尿病症状,出现肌胰岛素抵抗、 β 细胞功能失常、胰岛素前体分泌增加、胰岛素信号通路失活^[15]。在广西巴马小型猪^[16]以及非人灵长类动物如食蟹猴^[17]上使用膳食诱导法都成功诱导出了糖尿病症状。膳食诱导法目前主要用于构建糖尿病大动物模型,有利于糖尿病血管并发症等疾病的相关研究。

2.3 化学药物诱导法

2.3.1 STZ

STZ 是目前使用最广泛的糖尿病动物模型化学诱导剂,它能对哺乳动物胰岛 β 细胞产生特异性毒性,STZ 主要通过产生自由基损伤 β 细胞的功能,引起胰岛素合成减少,从而诱发糖尿病^[18]。为了取得良好的 II 型糖尿病造模效果,STZ 常与胰腺切除法联合使用。通过手术切除实验动物的胰腺钩突及体尾部,然后局部或全身注射 STZ,进而构建胰岛素分泌不足的 II 型糖尿病动物模型^[19]。这种方法的优点是克服了切除全部胰所致的其他器官的严重创伤,且避免了大剂量使用 STZ 对其他组织器官的严重损伤。此外,STZ 还可以联合高脂饮食诱导 II 型糖尿病。高脂饲料诱导大鼠 6 ~ 8 周后出现胰岛素抵抗,然后腹腔注射小剂量的 STZ, II 型糖尿病的造模成功率可达 79%^[20]。STZ 的剂量受高能饮食喂养时间的影响,高能饮食诱导的时间越长,动物的胰岛素抵抗表现越明显,所需的 STZ 剂量就相应减少^[21],STZ 给药途径或者模型建立的标准不同也会造成所需 STZ 的剂量出现差异。

2.3.2 四氧嘧啶

四氧嘧啶的机理与 STZ 相似,主要通过产生超氧自由基破坏 β 细胞,导致胰岛素合成减少,但与 STZ 相比,四氧嘧啶引起的高血糖症具有不稳定性和可逆性。因此,由四氧嘧啶引起的糖尿病模型不足以恰当地评估抗糖尿病药物的降血糖作用^[22]。

一次性腹腔注射四氧嘧啶的剂量在 100 ~ 250 mg/kg 范围内,造模成功率与注射剂量呈正相关,死亡率与注射剂量呈负相关。研究表明腹膜内给药 170 mg/kg 和 200 mg/kg 的四氧嘧啶的致糖尿病作用在两个剂量之间没有显示出显著($P < 0.05$)差异,造模成功率高达 90%。但在死亡率上,170 mg/kg 剂量组的死亡率较低^[23]。

3 基因工程糖尿病动物模型

基因工程糖尿病动物模型是利用基因修饰技术对特定 DNA 片段进行定点敲除、敲入以及替换来实现基因表达的上调或下调,从而构建相关基因型的 II 型糖尿病动物模型。利用基因工程技术构建的 II 型糖尿病动物模型可以稳定遗传,有利于研究 II 型糖尿病及其并发症的发病机制和潜在的新疗法^[24]。II 型糖尿病是由多个基因表达改变联合环境和遗传因素等共同引起的,而基因工程构建的 II 型糖尿病动物模型具有较高的单基因模拟,因此很难完全模拟临床实际中的 II 型糖尿病的发生与发展过程。相信随着基因工程技术的进步,稳定遗传的基因工程动物将会成为研究 II 型糖尿病的主要模型。

3.1 II 型糖尿病相关基因

外周组织器官的胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌功能障碍是 II 型糖尿病发病过程中的两个重要环节,胰岛素信号转导缺陷是产生胰岛素抵抗和影响胰岛素分泌的重要机制^[25]。胰岛素、胰岛素受体(insulin receptor, IR)、胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)、胰岛素样生长因子 1 受体(insulin like growth factor 1 R, IGF1R)是常见的糖尿病相关基因^[26]。胰岛素与 IR 结合后可以激活酪氨酸激酶,使 IRS 发生磷酸化,磷酸化的 IRS 可以激活磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)信号通路。PKB 一方面可以直接激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR),另一方面还可以通过结节性硬化复合体(tuberous sclerosis complex, TSC)间接调控 mTOR 的表达^[27],进而影响糖转运蛋白的合成和降低血糖水平^[28-29]。研究发现,IR 基因缺失纯合子(IR^{-/-})小鼠在出生不久后会出现代谢紊乱、生长迟缓、轻度胰岛素抵抗、 β 细胞增生和高胰岛素血症^[21];IRS-1 基因缺失纯合子(IRS-1^{-/-})小鼠在成年后出现胰岛素抵抗

与 β 细胞增生^[21]。类胰岛素生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1) 与 IR 具有相似的结构, 可通过与 IGF1R 结合来介导类胰岛素效应, IGF1 基因缺失患者表现出严重的胰岛素抵抗与高血糖水平^[30]。

瘦素与 II 型糖尿病的发生也有密切关系。瘦素与瘦素受体相结合后, 通过两条途径发挥其生理功能。一是作用于下丘脑的代谢调节中枢, 抑制食欲、减少能量摄入, 即中枢途径。二是影响胰岛素的释放、葡萄糖的吸收及代谢等方面, 即外周途径^[31]。在外周途径中, 瘦素通过 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) 依赖性途径激活肝细胞中 AMP 激活的蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)^[32], 并影响 mTOR 信号通路, 进而调节葡萄糖转运蛋白的易位和细胞表面水平。瘦素缺乏或瘦素抵抗能够影响机体脂代谢和糖代谢的过程, 从而诱发 II 型糖尿病^[33]。此外, 转录因子 7 类似物 2 (transcription factor 7 like 2, TCF7L2) 基因是迄今为止发现的与 II 型糖尿病相关性最强的基因之一, 有调节胰岛素分泌、外周胰岛素抵抗以及维持血糖水平稳定的功能^[34], TCF7L2 基因变异型患者的胰岛素分泌水平降低, 更易患 II 型糖尿病^[35]。葡萄糖激酶 (glucokinase, GCK) 是肝细胞和胰岛 β 细胞中葡萄糖代谢途径中的第一个关键酶, 对于血糖稳态的维持具有重要的调节作用。肿瘤坏死因子受体超家族成员 9 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, TNFRSF9) 基因可以通过编码 CD137 影响非肥胖糖尿病 (no obesity diabetes, NOD) 小鼠的糖尿病进程, T 细胞在敲除 TNFRSF9 基因后可促进 II 型糖尿病的发展^[36]。胰十二指肠同源盒 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1) 在胰腺发育及 β 细胞功能维持中起重要调控作用, PDX1 基因纯合缺失会导致胰腺发育不全, 胰岛素分泌障碍, 从而导致糖尿病^[37]。ATP 敏感性钾 (ATP-sensitive potassium channel, K-ATP) 通道的亚基内向整流钾通道 (Kir6.2) 也能够调节胰岛素分泌, 当血糖浓度升高时, β 细胞代谢活跃, 产生大量 ATP, ATP 与 Kir6.2 结合后使 K-ATP 通道关闭, 引起细胞膜去极化, 使电压依赖性的钙离子通道开放, 钙离子内流引起胰岛素释放^[38]。因此, 这些与糖尿病相关的基因常被选择作为基因工程改造的对象, 以模拟糖尿病的发生。

3.2 基因工程技术在 II 型糖尿病动物模型中的应用

3.2.1 胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) 打靶

ES 细胞打靶是通过同源重组技术对特定位点的基因进行改造, 使两个同源区域之间发生基因组重排, 然后通过显微注射或者胚胎融合的方法将 ES 细胞引入受体胚胎内, 最后获得能稳定遗传的基因修饰的动物模型^[39]。目前已有使用 ES 打靶技术获得的相关 II 型糖尿病动物模型。利用 ES 打靶技术敲除小鼠的 TCF7L2 基因后, 在高脂饮食的诱导下, 小鼠的葡萄糖耐量降低、胰岛素敏感性受损、胰岛素分泌减少、体重增加和脂肪组织增加^[40]; 利用 ES 打靶技术敲除小鼠 GCK 基因的 C57BL6J 位点, 其后代小鼠的空腹血糖水平显著增加, 葡萄糖耐量降低^[41]; 利用 ES 打靶技术敲除小鼠 Kir6.2 基因后, K-ATP 通道被激活, 使 β 细胞对高糖刺激失去反应, 钙离子不能内流, 进而降低了胰岛素的分泌^[42]。因此, 通过 ES 打靶技术可构建胰岛素分泌不足的 II 型糖尿病动物模型。

3.2.2 基因编辑技术

基因编辑是利用核酸酶对 DNA 片段进行靶向修饰的一种基因工程技术。常用的核酸工具酶包括锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs)、成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及 CRISPR 相关核酸酶 (CRISPR associated, Cas) 系统。相比于传统的细胞打靶技术, 基因编辑技术更易操作^[43], 建模效率更高, 并且可以同时实现单个基因或多个基因的改变^[44]。

(1) ZFNs 由重复的锌指蛋白 (zinc finger protein, ZFP) 和 FokI 核酸内切酶组成, 锌指蛋白用于识别和结合特定的基因序列, FokI 核酸内切酶可以特异性切割目的基因^[45-46], 然后 DNA 双链发生断裂, 细胞通过同源重组或非同源末端连接进行 DNA 修复。因此, 通过人为设计引入碱基突变、片段替换、插入或缺失可以实现基因的定点修饰。利用 ZFNs 技术, 通过胚胎显微注射直接有效地敲除 NOD 小鼠的 TNFRSF9 基因, 已成功构建出 II 型糖尿病小鼠模型^[47]。由于各个 ZFP 之间能相互干扰, 易产生脱靶效应, 在使用上有局限性, 因此 Nishio 等^[48]对 ZFNs 进行了优化, 通过 DNA 适体将 ZFNs

与绿色荧光蛋白基因进行结合,然后转染到 HEK293 细胞内,这样 ZFP 之间的相互干扰就会明显降低,ZFNs 的基因编辑建模效率显著提高。

(2)TALENs 由激活因子样效应物和 FokI 核酸酶组成,激活因子样效应物能特异性识别和结合 DNA 碱基对,FokI 核酸酶能在特定位点切断 DNA 双链^[49-50],进而激活 DNA 双链的修复机制。与 ZFNs 技术相比,TALENs 设计更简单,特异性更高,但模块组装过程较繁琐,具有一定的细胞毒性^[51]。TALENs 技术已被广泛应用于多种模式动物的基因组修饰。利用 TALENs 技术对 PDX1 基因进行编辑后,获得了 PDX1 缺陷猪,表现为胰腺缺乏,但胃肠道和其他内脏器官显示正常^[39]。由于胰腺切除术较难完全切除胰腺,或者在充分切除胰腺时可能损伤到其他组织^[52],因此,利用 TALENs 技术构建的先天性胰腺缺乏的糖尿病动物模型要优于胰腺切除术构建的模型。

(3)CRISPR/Cas 是一种 RNA-蛋白质的复合体,由成簇的规律性间隔的短回文重复序列 CRISPR 和 Cas 核酸酶组成。CRISPR/Cas9 复合物能在一段小 RNA 指导下,通过 PAM 序列定向寻找目标 DNA,然后对 DNA 双链进行切割,从而启动 DNA 双链的修复。

目前 CRISPR/Cas9 基因编辑技术广泛用于胚胎水平的基因编辑,从而获得基因修饰的动物模型^[53]。利用 CRISPR/Cas9 敲除胰岛素基因后,仔猪的胰腺中胰岛素不表达,出现血糖升高和糖尿等症^[54]。利用 CRISPR/Cas9 敲除 β 细胞的 IR,高脂饮食小鼠的 PI3K-AKT 信号转导减少,葡萄糖转运蛋白表达量下降,导致葡萄糖耐受不良,进而出现 II 型糖尿病症状^[55]。利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠 IRS 基因,大鼠表现出糖耐受损伤,并伴有胰岛素抵抗和高胰岛素血症等 II 型糖尿病症状^[56]。利用 CRISPR/Cas9 同时敲除 IRS 和瘦素受体基因后,大鼠模型出现肥胖、血脂异常、轻度血糖升高等糖尿病症状^[57]。此外,利用 CRISPR/Cas9 技术敲除刺鼠相关神经元中的瘦素受体基因后,小鼠模型出现体重增加、脂肪含量增加、高血糖症等糖尿病症状^[58]。因此,利用 CRISPR/Cas9 系统可以有效地构建基因缺失的糖尿病动物模型。

4 结语

构建糖尿病的动物模型是研究糖尿病发病机

制及研发新型治疗药物的关键,但目前尚没有能够完全模拟人类糖尿病发生发展过程的动物模型。本文总结了常用的构建 II 型糖尿病动物模型的方法,并比较了各种构建方法的优缺点。由于自发性糖尿病动物模型的血糖升高不显著,化学诱导的动物模型成模率较低和死亡率较高,基因工程糖尿病动物模型耗时较长以及对技术设备和饲养环境要求较高等缺点,因此,在研究 II 型糖尿病发病机制的过程中,要尽量选择最合适的糖尿病动物模型,如何利用较低的成本在短时间内成功构建 II 型糖尿病动物模型也是以后的研究需要解决的难题。

参 考 文 献 (References)

- [1] Ma Q, Li Y, Li P, et al. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109-138.
- [2] Bosun-Arije FS, Ling J, Graham Y, et al. A systematic review of factors influencing type 2 diabetes mellitus management in nigerian public hospitals [J]. *Int J Africa Nurs Sci*, 2019, 11:100151.
- [3] Dennis JM, Shields BM, Henley WE, et al. Disease progression and treatment response in data-driven subgroups of type 2 diabetes compared with models based on simple clinical features: an analysis using clinical trial data [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(6): 442-451.
- [4] Asrafuzzaman M, Cao Y, Afroz R, et al. Animal models for assessing the impact of natural products on the aetiology and metabolic pathophysiology of type 2 diabetes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1242-1251.
- [5] Brito CY, Meliún C, Wägner AM. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models [J]. *Endocrinol Nutr*, 2016, 63(7): 345-353.
- [6] Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview[J]. *Indian J Med Res*, 2007, 125(3): 451-472.
- [7] Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, et al. The use of animal models in the study of diabetes mellitus [J]. *In Vivo*, 2009, 23(2): 245-258.
- [8] Bihoreau MT, Dumas ME, Lathrop M, et al. Genomic regulation of type 2 diabetes endophenotypes: contribution from genetic studies in the Goto-Kakizaki rat[J]. *Biochimie*, 2017, 143: 56-65.
- [9] Fukaya N, Mochizuki K, Tanaka Y, et al. The α -glucosidase inhibitor miglitol delays the development of diabetes and dysfunctional insulin secretion in pancreatic β -cells in OLETF rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 624(1): 51-57.
- [10] Hirashima T, Kawano K, Mori S, et al. A diabetogenic gene, ODB2, identified on chromosome 14 of the oletf rat and its synergistic action with ODB1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224(2): 420-425.

- [11] Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, et al. Animal models of metabolic syndrome: a review[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2016, 13: 65.
- [12] Omote K, Gohda T, Murakoshi M, et al. Role of the TNF pathway in the progression of diabetic nephropathy in KK-A(y) mice[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(11): 1335–1347.
- [13] Davis SS, Goldblatt MI, Roy S, et al. Laparoscopic total pancreatectomy in domestic swine: a novel technique to provide a large animal model of insulin dependant diabetes[J]. *J Surg Res*, 2006, 130(2): 304.
- [14] Graham ML, Schuurman HJ. Validity of animal models of type 1 diabetes, and strategies to enhance their utility in translational research[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 759: 221–230.
- [15] Shafirir E, Ziv E, Kalman R. Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: *acomys cahirinus* (spiny mice) and *psammomys obesus* (desert gerbil)[J]. *ILAR J*, 2006, 47(3): 212–224.
- [16] Wu Y, Zhang L, Liang J, et al. Comparative analysis on liver transcriptome profiles of different methods to establish type 2 diabetes mellitus models in Guangxi Bama mini-pig[J]. *Gene*, 2018, 673: 194–200.
- [17] Li X, Lin Z, Zhan X, et al. RNA-seq analysis of the transcriptome of the liver of cynomolgus monkeys with type 2 diabetes[J]. *Gene*, 2018, 651: 118–125.
- [18] Lin M, Ai J, Harden SW, et al. Impairment of baroreflex control of heart rate and structural changes of cardiac ganglia in conscious streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice[J]. *Auton Neurosci*, 2010, 155(1–2): 39–48.
- [19] Kurup S, Bhonde RR. Combined effect of nicotinamide and streptozotocin on diabetic status in partially pancreatectomized adult BALB/c mice[J]. *Horm Metab Res*, 2000, 32(8): 330–334.
- [20] 汪悦, 杨阳, 邬颖华. 高能量饮食联合 STZ 诱导 2 型糖尿病肾病动物模型研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(92): 84–86.
Wang Y, Yang Y, Wu Y. High-energy diet joint STZ induced animal models of type 2 diabetic nephropathy: a review [J]. *World Latest Med Inform*, 2018, 18(92): 84–86.
- [21] Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: incorporating a high-fat diet and streptozotocin[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 605–613.
- [22] Ighodaro OM, Adeosun AM, Akinloye OA. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies[J]. *Medicina*, 2017, 53(6): 365–374.
- [23] Ighodaro OM, Adeosun AM, Asejeje FO, et al. Time course effects of 5,5-dihydroxyl pyrimidine-2,4,6-trione (alloxan) as a diabetogenic agent in animal model[J]. *Alex J Med*, 2018, 54(4): 705–710.
- [24] 刘雪静, 王欢, 严放, 等. 大中型动物基因敲除技术的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2015, 46(1): 11–16.
- Liu XJ, Wang H, Yan F, et al. The development of gene knockout technologies in large and medium animal models[J]. *Prog Physiol Sci*, 2015, 46(1): 11–16.
- [25] Yin C, Liu WH, Liu Y, et al. Correction: PID1 alters the antilipolytic action of insulin and increases lipolysis via inhibition of AKT/PKA pathway activation [J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218721.
- [26] Tian Y, Xu J, Du X, et al. The interplay between noncoding RNAs and insulin in diabetes[J]. *Cancer Lett*, 2018, 419: 53–63.
- [27] Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(9): 545–555.
- [28] Ardestani A, Lupse B, Kido Y, et al. mTORC1 signaling: a double-edged sword in diabetic β cells[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2): 314–331.
- [29] Ho CK, Sriram G, Dipple KM. Insulin sensitivity predictions in individuals with obesity and type II diabetes mellitus using mathematical model of the insulin signal transduction pathway [J]. *Mol Genet Metab*, 2016, 119(3): 288–292.
- [30] Aguirre GA, de Ita JR, de la Garza RG, et al. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 3.
- [31] D' souza AM, Neumann UH, Glavas MM, et al. The glucoregulatory actions of leptin[J]. *Mol Metab*, 2017, 6(9): 1052–1065.
- [32] Uotani S, Abe T, Yamaguchi Y. Leptin activates AMP-activated protein kinase in hepatic cells via a JAK2-dependent pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(1): 171–175.
- [33] 张新颖, 毛景东, 杨晓燕, 等. AMPK/mTOR 信号通路的研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(3): 109–116.
Zhang XY, Mao JD, Yang XY, et al. Advances in AMPK/mTOR signaling[J]. *J Microbiol*, 2019, 39(3): 109–116.
- [34] Wang J, Zhao J, Zhang J, et al. Association of canonical wnt/ β -catenin pathway and type 2 diabetes: genetic epidemiological study in han chinese[J]. *Nutrients*, 2015, 7(6): 4763–4777.
- [35] Katsoulis K, Paschou SA, Hatzi E, et al. TCF7L2 gene variants predispose to the development of type 2 diabetes mellitus among individuals with metabolic syndrome[J]. *Hormones (Athens)*, 2018, 17(3): 359–365.
- [36] Forsberg MH, Ciecko AE, Bednar KJ, et al. CD₁₃₇ Plays both pathogenic and protective roles in type 1 diabetes development in NOD mice[J]. *J Immunol*, 2017, 198(10): 3857–3868.
- [37] Wang X, Sterr M, Ansarullah, et al. Point mutations in the PDX1 transactivation domain impair human β -cell development and function[J]. *Mol Metab*, 2019, 24: 80–97.
- [38] Jacobson DA, Shyng SL. Ion channels of the islets in type 2 diabetes[J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(5): 1326–1346.
- [39] Kang JD, Kim H, Jin L, et al. Apancreatic pigs cloned using Pdx1-disrupted fibroblasts created via TALEN-mediated mutagenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 115480–115489.
- [40] Geoghegan G, Simcox J, Seldin MM, et al. Targeted deletion of Tef712 in adipocytes promotes adipocyte hypertrophy and

- impaired glucose metabolism[J]. *Mol Metab*, 2019, 24: 44–63.
- [41] Zhang YL, Tan XH, Xiao MF, et al. Establishment of liver specific glucokinase gene knockout mice; a new animal model for screening anti-diabetic drugs[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(12): 1659–1665.
- [42] Miki T, Nagashima K, Tashiro F, et al. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(18): 10402–10406.
- [43] Song J, Yang D, Xu J, et al. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10548.
- [44] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720–723.
- [45] Carroll, Dana. Genome engineering with zinc-finger nucleases [J]. *Genetics*, 2011, 188(4): 773–782.
- [46] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(3): 1156–1160.
- [47] Chen YG, Forsberg MH, Khaja S, et al. Gene targeting in NOD mouse embryos using zinc-finger nucleases[J]. *Diabetes*, 2014, 63(1): 68–74.
- [48] Nishio M, Matsumoto D, Kato Y, et al. DNA aptamers against FokI nuclease domain for genome editing applications [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 93: 26–31.
- [49] Tan WS, Carlson DF, Walton MW, et al. Precision editing of large animal genomes[J]. *Adv Genet*, 2012, 80: 37–97.
- [50] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 49–55.
- [51] Li HL, Nakano T, Hotta A. Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications [J]. *Dev Growth Differ*, 2014, 56(1): 63–77.
- [52] Li T, D’Cruz RT, Lim SY, et al. Somatostatin analogues and the risk of post-operative pancreatic fistulas after pancreatic resection - a systematic review & meta-analysis [J]. *Pancreatology*, 2020, 20(2): 158–168.
- [53] Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system; a new-fangled dawn in gene editing [J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116636.
- [54] Cho B, Kim SJ, Lee EJ, et al. Generation of insulin-deficient piglets by disrupting INS gene using CRISPR/Cas9 system [J]. *Transgenic Res*, 2018, 27(3): 289–300.
- [55] Oakie A, Zhou L, Rivers S, et al. Postnatal knockout of beta cell insulin receptor impaired insulin secretion in male mice exposed to high-fat diet stress [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 499: 110588.
- [56] 马元武, 马婧, 路迎冬, 等. 利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠胰岛素受体底物 1 (Irs1) 基因 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(3): 55–60.
- Ma YW, Ma J, Lu YD, et al. Generating insulin receptor substrate 1 (Irs1) knockout rat using CRISPR/Cas9 [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24(3): 55–60.
- [57] Bao D, Ma Y, Zhang X, et al. Preliminary characterization of a leptin receptor knockout rat created by CRISPR/Cas9 system [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15942.
- [58] Xu J, Bartolome CL, Low CS, et al. Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases [J]. *Nature*, 2018, 556(7702): 505–509.

[收稿日期] 2020-06-15