

# 诱发性2型糖尿病小鼠模型与自发性db/db小鼠特性的比较

刘芳<sup>1</sup>, 杨华<sup>1</sup>, 周文江<sup>1,2</sup>, 周晓辉<sup>1</sup>

(1. 上海市公共卫生临床中心, 上海 201508; 2. 复旦大学药学院, 上海 201203)

**【摘要】** 目的 建立诱发性2型糖尿病小鼠模型,并将其与自发性2型糖尿病小鼠db/db进行比较分析。客观评价两种2型糖尿病小鼠模型,为糖尿病研究中动物模型的选择与实际应用提供实验依据。**方法** 高脂饲料喂养C57BL/6J小鼠4周,腹腔连续3次注射STZ,建立诱发性2型糖尿病小鼠模型。感染后4周,大体肉眼观察小鼠的肝脏、肾脏,测定糖耐量,血清生化指标及血清细胞因子IL-2、IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-10表达量,将其与同龄的自发性2型糖尿病小鼠db/db进行比较分析。**结果** 肉眼观察发现,两组模型小鼠的肝脏、肾脏与对照组均具有明显差异。糖耐量分析中,两组模型小鼠与对照组小鼠各时间点的血糖值均具有统计学差异( $P < 0.05$ ),耐糖功能低下,两组模型小鼠间血糖值无统计学差异。血液生化指标中,与对照组小鼠相比,两组模型小鼠GLU、CHOL、LDLC明显升高( $P < 0.05$ );两组模型小鼠相互比较,诱发性2型糖尿病小鼠血脂水平较高( $P < 0.05$ )。免疫指标比较显示:除IL-2外,两组模型小鼠血清中细胞因子水平均较对照组小鼠明显升高( $P < 0.05$ ),而db/db小鼠血清中细胞因子表达较诱发性糖尿病小鼠高,其中IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 具有显著性差异( $P < 0.05$ )。**结论** 两组2型糖尿病模型小鼠均在一定程度上模拟了人类糖尿病患者症状,但由于糖尿病产生的原因不同而存在着一定的差异,研究者可根据实际需要参照相关数据进行选择。

**【关键词】** 2型糖尿病;诱发性小鼠模型;db/db小鼠;细胞因子

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0054-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.010

## Comparison of the characteristics of induced and spontaneous db/db mouse models of type 2 diabetes mellitus

LIU Fang<sup>1</sup>, YANG Hua<sup>1</sup>, ZHOU Wen-jiang<sup>1,2</sup>, ZHOU Xiao-hui<sup>1</sup>

(1. Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China;  
2. School of Pharmacy of Fudan University, Shanghai 201203)

**【Abstract】** **Object** To establish an induced mouse model of type 2 diabetes mellitus, and compare it with db/db mouse model of spontaneous type 2 diabetes. To evaluate the two mouse models objectively, and provide an experimental basis for the choice of animal model and its practical application in diabetes studies. **Methods** A mouse model of induced type 2 diabetes was established by feeding C57BL/6J mice with high-fat and high-sugar diet for four weeks and taking daily intraperitoneal injections of streptozotocin (STZ) for consecutive 3 days. Four weeks after infection, the gross appearance of kidney and liver of the mice was assessed, glucose tolerance was tested, serum biochemical indices and expression of serum IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, and IL-10 were assayed, and were compared with those of the db/db mouse models of spontaneous type 2 diabetes. **Results** Obvious differences were found in the kidneys and liver gross appearance of the two types of mouse models and the control group. Both the two groups showed significant differences in the blood glucose levels at each time point ( $P < 0.05$ ) and low glucose tolerance function, but there were no significant differences in

[基金项目]上海市科委资助项目(11140903001)。

[作者简介]刘芳(1983-),女,硕士,主要从事动物实验研究及实验动物研究。E-mail: liufang20080@163.com

[通讯作者]周文江,(1965-),主要从事实验动物研究。E-mail: wjzhou@shmu.edu.cn

blood glucose levels of the two types of mouse models. Compared with the control group, the serum biochemical indices GLU, GHOL and LDLC of the two types of mouse models were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, the blood lipid level of the mouse model of induced type 2 diabetes was higher than that of the db/db mouse models of spontaneous type 2 diabetes. In comparison of immune indices, except IL-2, the serum cytokine levels of the two types of mouse models were significantly higher than those of the control group ( $P < 0.05$ ). Moreover, the serum cytokine levels of db/db mice were higher than those in the mouse models of induced type 2 diabetes, and the IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  also had obvious differences. **Conclusions** Both the two types of mouse models of type 2 diabetes successfully simulate the human diabetes to some extent, but there are still certain differences according to different etiology of diabetes. We would suggest that people may take our data as reference and chose appropriate mouse models according to the requirement of their research.

**【Key words】** Type 2 diabetes mellitus; Induced mouse model; db/db mice; Cytokines

糖尿病已成为全球性的公共健康问题,是由于胰岛素分泌和/或作用缺陷而引起的以慢性血葡萄糖水平增高为特征的代谢紊乱性疾病,预计至 2030 年全球发病人数将达 4.39 亿,其中 2 型糖尿病约占 90%<sup>[1]</sup>。国内外对糖尿病进行了大量的研究工作,但进展相对缓慢,主要原因是 2 型糖尿病病因多,发病机制复杂,具有高度的异质性,兼具有遗传免疫因素及环境因素的作用。

动物疾病模型的研究是人类疾病研究的基础,而至今没有一种公认的理想动物模型与人类 2 型糖尿病特征完全吻合,不同类型的动物模型各有其特征和局限性,对于模型的选择应根据研究目的、实验条件和经费等具体情况而定<sup>[2]</sup>。

诱发性动物模型是通过物理、生物或化学等方式的作用,人为诱发出具有类似人类疾病特征的动物模型,该类模型是通过人为限定方式而产生的,多数情况下与临床所见自然发生的疾病有一定差异。自发性动物模型是取自自然发生疾病的动物个体,或由于基因突变的异常表现通过定向培育而保留下来的疾病模型,该类模型在一定程度上减少了人为因素,其症状更接近于人类疾病。然而,对于同一种疾病的动物模型,究竟是用诱发性模型还是自发性模型来进行实验,相关比较研究的报道较少。

目前 2 型糖尿病小鼠模型主要包括自发性糖尿病小鼠、诱发性糖尿病小鼠、转基因及基因敲除小鼠<sup>[3]</sup>。db/db 小鼠及高脂饲料加 STZ 小剂量诱导建立的糖尿病小鼠模型是目前广泛被认可的应用于研究人类 2 型糖尿病较好的动物模型。本文将诱发的 2 型糖尿病小鼠与自发的糖尿病小鼠的相关指标进行比较分析,并着重对两种小鼠的免疫指标进行分析,旨在为糖尿病研究工作者在如何选择动物模型方面提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 40 只,3 周龄,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2013-0016】。小鼠随机分为 2 组,正常组 16 只,糖尿病组 24 只。SPF 级 C57BL/KsJ(db/db)小鼠 15 只,4 周龄,购于常州卡文斯实验动物有限公司【SCXK(苏)2011-0003】。动物实验在上海市公共卫生临床中心实验动物部进行【SYXK(沪)2010-0098】。

#### 1.1.2 主要试剂、实验材料及仪器

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国 Sigma 公司。CBA 试剂盒购于美国 BD 公司。血糖仪及试纸条使用德国罗氏的罗康全活力型血糖检测系统(检测范围 0.6 ~ 33.3 mmol/L 即 10 - 600 mg/dL),超过检测上限的记录为 33.3 mmol/L。罗氏 MODULE P800 全自动生化仪,罗氏公司。流式细胞仪 BD FACS Aria I,美国 BD 公司。

高脂饲料由上海仕林生物科技有限公司【沪饲审(2008)04031】提供,配方为:基础料 71.8%、猪油 18%、蛋黄粉 8%、胆固醇 2%、胆盐 0.2%。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 诱发性 II 型糖尿病小鼠模型的建立

糖尿病组小鼠喂以高脂饲料,正常组小鼠喂以基础饲料,持续 4 周。糖尿病组小鼠腹腔注射 STZ 50 mg/kg 体重,连续注射 3 d<sup>[2,4,5]</sup>,继续饲喂高脂饲料;正常组小鼠腹腔注射柠檬酸缓冲液,连续注射 3 d,饲喂普通饲料。STZ 注射 7 d 后,禁食不禁水 12 h,小鼠割尾采血测量空腹血糖,血糖值大于 11.1 mmol/L 的个体被认定为 II 型糖尿病小鼠。

#### 1.2.2 自发性 II 型糖尿病小鼠模型

购买的 4 周龄的 db/db 小鼠,普通饲料正常喂

养,至 13 周龄,解剖。在第 4、7、9、13 周检测小鼠空腹血糖值。

### 1.2.3 糖耐量实验

诱发性 II 型糖尿病小鼠成模后第 4 周(13 周龄),db/db 小鼠第 13 周时,禁食不禁水 12 h,腹腔注射 2 g/kg 体重葡萄糖溶液<sup>[6]</sup>,分别于 15、30、60 及 120 min 时小鼠割尾取血测量血糖值。

### 1.2.4 模型指标的测定

将 13 周龄的诱发性 II 型糖尿病小鼠、db/db 小鼠及正常组小鼠眼眶静脉丛采血,分离血清。颈椎脱臼处死,解剖,取肝脏及肾脏。

(1)肉眼病变观察:肉眼观察小鼠腹腔脂肪情况、肝脏及肾脏病变情况。

(2)生化指标的测定:分离的小鼠血清,利用罗氏 MODULE P800 全自动生化仪测定葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(CHOL)、高密度脂蛋白胆固醇(HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇(LD-LC)含量。

(3)细胞因子的测定:分离的小鼠血清,采用 CBA 方法检测细胞因子白介素-2(IL-2)、白介素-4(IL-4)、白介素-6(IL-6)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-17(IL-17)、白介素-10(IL-10)的表达水平。

### 1.3 统计学方法

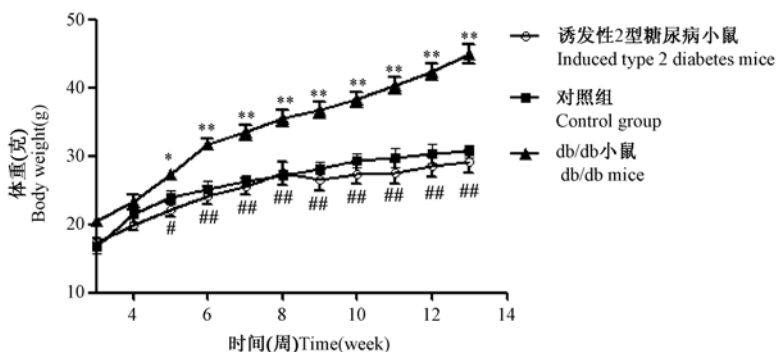
实验数据利用 GraphPad Prism 5 统计软件进行分析,组间比较采用 *t*-检验方法, $P < 0.05$  时具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体重与空腹血糖变化情况

#### 2.1.1 体重变化

从第 3 周开始测量小鼠体重,诱发性 2 型糖尿病小鼠组体重增长趋势与对照组小鼠增长趋势基本一致,且差异无显著性。db/db 小鼠体重与其他组相比差异有显著性(图 1)。



注: db/db 小鼠与诱发性 2 型糖尿病小鼠比较 \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ ; db/db 小鼠与对照组比较 <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , <sup>#</sup>  $P < 0.05$ 。

图 1 小鼠体重变化

Note. Compared the db/db mice with induced type 2 diabetes mice, \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ ; Compared with the control group, <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , <sup>#</sup>  $P < 0.05$ .

Fig. 1 Changes of body weight of the mice

#### 2.1.2 血糖变化

分别在 4 周(喂高脂饲料前)、7 周(注射 STZ 前)、9 周(注射 STZ 1 周后)和 13 周(注射 STZ 4 周后)时,对各组小鼠进行空腹血糖检测。结果显示:在第 4 周时,各组小鼠血糖值均处于正常水平,组间差异无显著性。第 7 周时,诱发性 2 型糖尿病小鼠血糖值升高,个别小鼠血糖值达到 11.1 mmol/L; db/db 小鼠血糖值( $14.9 \pm 2.5$ ) mmol/L,与诱发性 2 型糖尿病小鼠相比差异有显著性。第 9 周时,两组糖尿病小鼠血糖值稳定维持在高血糖水平,至第 13

周时,两组间差异无显著性(图 2)。

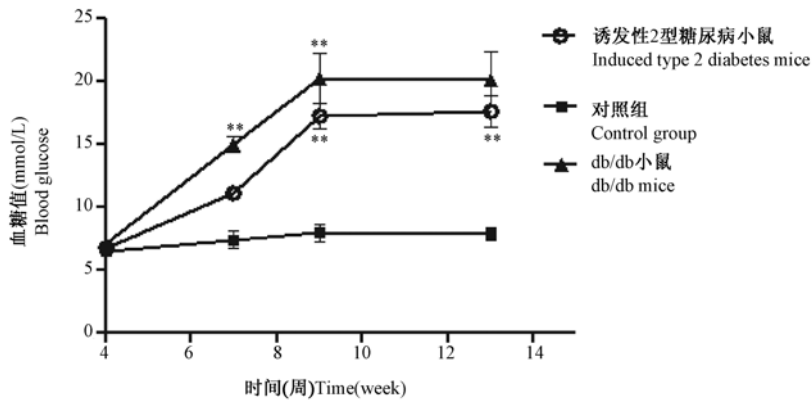
### 2.2 大体病变情况

#### 2.1.1 腹腔内脂肪情况

解剖各组小鼠,打开腹腔发现:对照组小鼠腹腔内部无脂肪堆积现象;诱发性 2 型糖尿病小鼠腹腔内部出现肉眼可见的脂肪;db/db 小鼠腹腔内脏器被大量脂肪包被(图 3,彩插 6)。

#### 2.1.2 肝脏、肾脏大体病变情况

无菌解剖各组小鼠取肝脏,肾脏,肉眼观察发现:①对照组小鼠肝脏外观呈红褐色,质地软而富有



注: db/db 小鼠与诱发性 2 型糖尿病小鼠比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 2 小鼠血糖变化

Note. Compared the db/db mice with induced type 2 diabetes mice, \*\*  $P < 0.01$ .

Fig. 2 Changes of blood glucose of the mice

弹性,边缘锐利。两组模型小鼠肝脏体积明显增大,外观呈灰黄色,边缘圆钝,质地较软脆,无弹性,切面油腻感,典型肝脂肪变现象。其中 db/db 小鼠属肥胖型小鼠,个体较大,肝脏体积比诱发性糖尿病小鼠更大,表面更具油腻感,且表面呈现点状(图 4,彩插 6)。②诱发性糖尿病小鼠的肾脏与对照组小鼠相比,肉眼观察无明显变化,基本一致;自发性糖尿病小鼠 db/db 的肾脏较大,个别小鼠肾脏坏死,剖开发现内部无实质,均是水样内容物(图 5,彩插 6)。

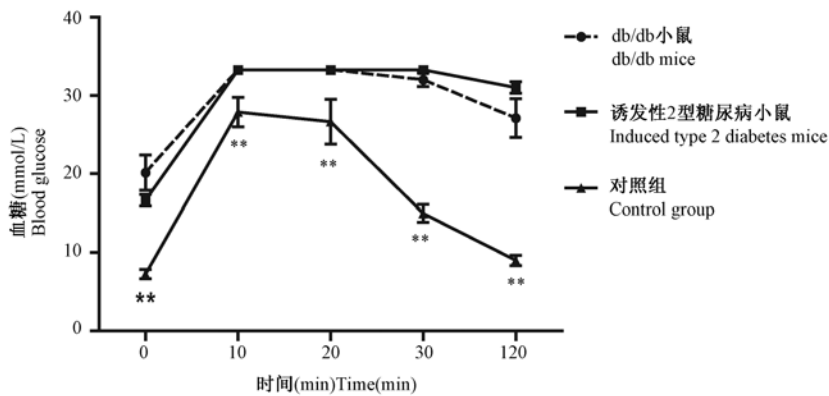
### 2.2 糖耐量测定结果

高脂饮食加 STZ 诱导的小鼠空腹血糖值大于 11.1 mmol/L 的个体被认为是成功建立的 2 型糖尿病模型小鼠。对诱发性 2 型糖尿病小鼠、db/db 小鼠及对照组小鼠进行糖耐量测试,结果显示与对

照组小鼠相比,注射葡萄糖后 15、30、60 min 和 120 min 糖尿病小鼠血糖值均有显著性提高,具有统计学意义( $P < 0.01$ ),而两组模型小鼠间血糖值差异无显著性( $P > 0.05$ )。糖尿病小鼠耐糖功能低下,血糖值一直处于高水平,至 120 min 时仍然较高,未能回到正常水平(图 6)。

### 2.3 血脂分析

检测血清显示:与对照组小鼠比较,诱发性 2 型糖尿病小鼠和 db/db 小鼠 GLU、TG、CHOL、HDLC、LDLC 均有升高,其中 GLU、CHOL、LDLC 具有统计学意义( $P < 0.05$ );诱发性 2 型糖尿病小鼠 TG、CHOL、HDLC、LDLC 水平较 db/db 小鼠高,其中血清 TG、HDLC、LDLC 水平差异有显著性( $P < 0.05$ )(图 7)。



注: db/db 小鼠和诱发性 2 型糖尿病小鼠分别与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 6 小鼠糖耐量结果

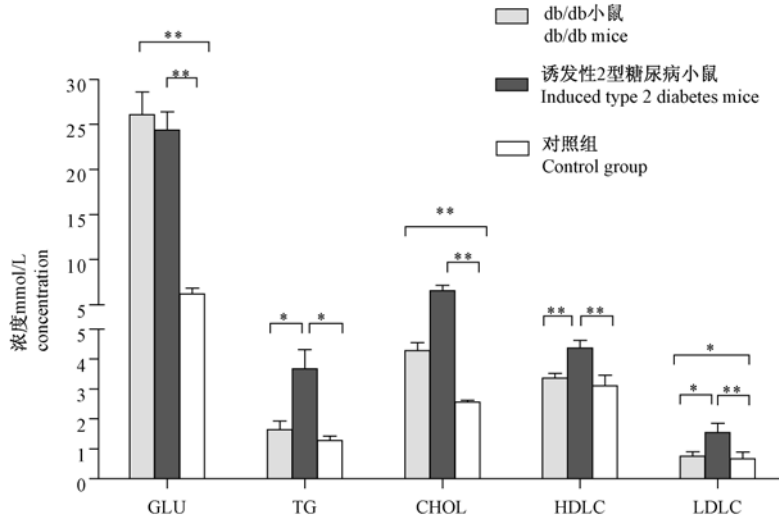
Note. Respectively compared the db/db mice and induced type 2 diabetes mice of the control group, \*\*  $P < 0.01$ .

Fig. 6 Results of oral glucose tolerance test of the mice

### 2.4 细胞因子变化

CBA 法检测血清细胞因子表达情况,结果显示:两组模型小鼠相互比较,db/db 小鼠血清中 IL-2、IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-10 的浓度均高

于诱发性 2 型糖尿病小鼠,其中 IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  差异有显著性( $P < 0.05$ );与对照组相比,除了 IL-2 以外,两组模型小鼠 IL-4、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17、IL-10 的水平均显著增高( $P < 0.05$ )(图 8)。

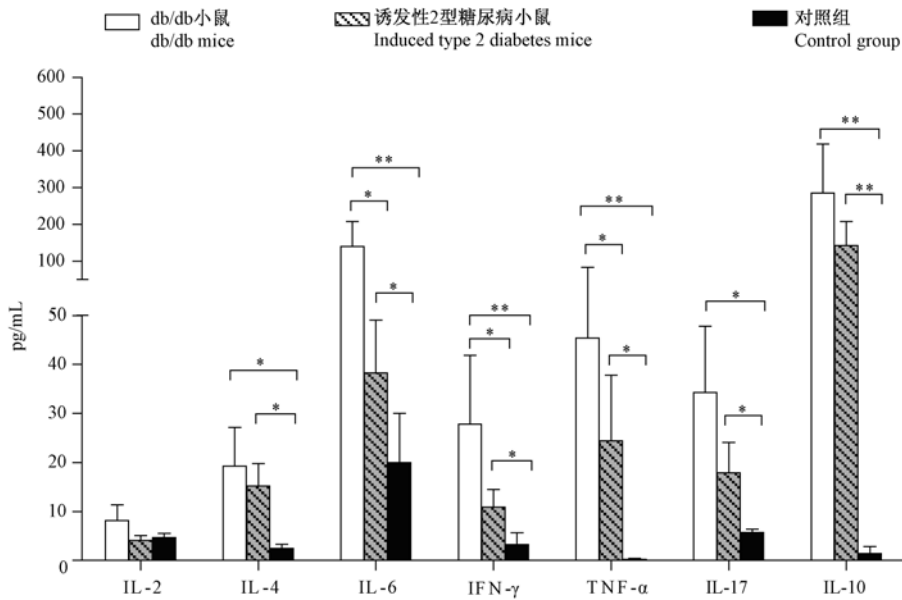


注:分别比较 db/db、诱发性 2 型糖尿病和对照组小鼠,\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ 。

图 7 小鼠血清生化指标

Note. Respectively compared the db/db mouse, induced type 2 diabetes and control group mice, \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ .

Fig. 7 The serum biochemical indices of the mice



注:分别比较 db/db、诱发性 2 型糖尿病和对照组小鼠,\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ 。

图 8 小鼠血清中细胞因子水平

Note. Respectively compared the db/db mice, induced type 2 diabetes mice and control group mice, \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ .

Fig. 8 Serum cytokine levels in the mice

综上所述,将两种糖尿病小鼠模型进行比较,结果显示:①两组模型小鼠的肝脏均存在病变,但差异

不大;与对照组小鼠相比肝脏体积明显增大,呈现典型的脂肪肝变现象,其中 db/db 小鼠的肝脏更油腻。

db/db 小鼠的肾脏体积较大,肾脏被大量白色脂肪包被,部分个体肾脏出现坏死,剖开后内部有大量水样液体;诱发性糖尿病模型小鼠的肾脏与对照组小鼠比较,则无肉眼可见的区别。②糖耐量分析中,两组模型小鼠与对照组小鼠各时间点的血糖值均具有统计学差异( $P < 0.05$ ),耐糖功能低下;两组模型小鼠之间相比,血糖值无统计学差异。③血液生化指标中,与对照组小鼠相比,两组模型小鼠 GLU、CHOL、LDLC 水平明显升高( $P < 0.05$ );两组模型小鼠相互比较,诱发性 2 型糖尿病小鼠血脂水平较高( $P < 0.05$ )。④免疫指标比较显示:除 IL-2 外,两组模型小鼠血清中细胞因子水平均较对照组小鼠明显升高( $P < 0.05$ );db/db 小鼠血清中细胞因子表达较诱发性糖尿病小鼠高,其中 IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  差异有显著性( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

高脂饲料喂养加上小剂量多次腹腔注射 STZ 是目前最常用的诱发性 2 型糖尿病小鼠模型的建立方法,其机制是通过高脂饮食诱导小鼠产生胰岛素抵抗,通过注射 STZ 引起  $\beta$  细胞受损<sup>[7]</sup>。本研究结果显示:该小鼠模型虽然产生了血糖升高等类似 2 型糖尿病的症状,但其体型与正常小鼠体型差异无显著性,未出现肥胖现象。db/db 小鼠是由于瘦素(leptin)受体基因缺陷导致的先天肥胖性 T2DM 小鼠,其瘦素受体基因失去功能,在出生后 2 周内就发生高胰岛素血症,3~4 周发展为肥胖,8 周后就发展为非常严重的高血糖症,期间伴有胰岛素抵抗, $\beta$  细胞功能衰竭<sup>[8-9]</sup>,一般在 8~10 个月内死亡,可发生明显的肾病。两种模型小鼠均在一定程度上模拟了临床糖尿病的症状,包括高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等,但两种模型的应用价值以及各自的优缺点却少有比较研究的报道。

2 型糖尿病是一种自身免疫和低度炎症性疾病,且 2 型糖尿病存在着细胞因子介导的急性反应。细胞因子可通过多种机制引起炎症反应,最终引起或加速糖尿病及其并发症的发生。本研究对几个细胞因子进行了检测,结果显示不论是诱发性糖尿病模型小鼠还是自发性糖尿病模型小鼠其血清中细胞因子水平均较对照组小鼠升高,除了 IL-10 之外,与糖尿病临床患者的表现基本一致。两种模型小鼠中,db/db 小鼠血清中细胞因子的升高更明显。

IL-10 是一个主要的细胞因子合成抑制物,具有

免疫抑制和免疫刺激双重作用<sup>[10-12]</sup>。IL-10 作为一种抑炎因子,通过 T 辅助细胞下调宿主反应,抑制促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等过度表达,并且能够控制由促炎因子引发的过度的炎症瀑布反应,并控制由此所造成的机体损害。糖尿病早期无肾病等并发症时,IL-10 在炎症因素的刺激下水平升高,而随着糖尿病并发症的出现,IL-10 水平下降,说明 IL-10 在糖尿病并发症发展过程中起保护性作用。本研究中 IL-10 的表达水平与临床患者结果相反,与朱英<sup>[8]</sup>等对恒河猴糖尿病模型血清中 IL-10 的表达情况也相反。可能是因为诱发性糖尿病模型小鼠的实验数据均采集于成模后的 4 周,还处于早期,未出现并发症现象。

此外,本研究发现两种糖尿病模型小鼠的肾脏有明显区别,部分 db/db 小鼠肾脏出现坏死,剖开后内部有大量水样液体,而诱发性糖尿病小鼠肾脏则无肉眼可见的变化,推测至糖尿病晚期也可能出现肾脏并发症,所有肉眼观察的结果还需要进一步进行病理切片来检测分析。本文中的研究还有待于进一步完善,应长期观察至小鼠死亡。

目前 2 型糖尿病的相关研究较多。在动物模型方面,对诱发性糖尿病小鼠模型的研究多侧重于造模方法的探讨及血脂血糖等糖尿病症状的分析<sup>[13-14]</sup>,对自发性糖尿病小鼠则侧重于生物学特性研究<sup>[15]</sup>,或不同自发性糖尿病小鼠之间的比较<sup>[16]</sup>,但对诱发性模型小鼠和自发性模型小鼠之间的比较研究较少。刘倩等<sup>[17]</sup>虽然对 db/db 小鼠与 BALB/C 诱发性 2 型糖尿病小鼠进行了比较,但未做细胞因子方面的研究。

无论是 db/db 小鼠还是诱发的 2 型糖尿病模型小鼠亦或是其他小鼠模型,与临床患者均存在一定的差异。与诱发性糖尿病小鼠模型相比,db/db 小鼠由于其不存在人为诱导因素的干扰,糖尿病的产生与临床患者更为相似,应用价值更高。两种小鼠模型都存在一定的优点与缺陷,研究者可根据实际需要参照相关数据进行选择。

(本文图 3~5 见彩插 6。)

#### 参 考 文 献

- [1] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87(1): 4-14.
- [2] 田婷, 马向华, 沈捷. 2 型糖尿病动物模型研究概况 [J]. 医学综述, 2011, 17(6): 905-908.

(下转第 74 页)

