• 研究论文 •

基因缺陷型 2 型糖尿病模型动物 db/db 小鼠早期生物学特性研究

刘 静，陆 洁，裴天仙，田兴美，申秀萍

天津药物研究院 天津市新药安全评价研究中心，天津 300193

摘 要：目的 研究基因缺陷型 2 型糖尿病模型动物 db/db 小鼠的早期生物学特性，为 db/db 小鼠应用于降糖药物的研究奠定基础。**方法** 采用 db/db 小鼠为模型组动物，db/m 小鼠为对照组动物，测定两组小鼠的体质量、食量、饮水量、空腹血糖、正常饮食血糖、糖耐量、胰岛素耐量；于第 14 周眼底静脉丛取血，分离血清，测定糖化血清蛋白（GSP）、三酰甘油（TG）、总胆固醇（TC）；取肝、胰腺、腹部脂肪等主要脏器组织进行组织病理学检查。**结果** 与对照组比较，db/db 小鼠体质量、食量、饮水量显著增加；空腹血糖及正常饮食血糖显著升高，整个实验期血糖水平稳定；糖耐量异常、胰岛素耐量异常，对外源胰岛素敏感性显著降低；血清 GSP、TG、TC 含量显著升高，腹部脂肪质量显著增加，肝组织不同程度的空泡变性，脂肪组织中脂肪细胞体积增大，胰腺中胰岛细胞胞浆减少、血管扩张。**结论** db/db 小鼠早期脂质代谢紊乱，血糖、血脂显著升高，糖耐量及胰岛素耐量异常，血糖水平稳定，是研究 2 型糖尿病较为理想的模型。

关键词： db/db 小鼠；2 型糖尿病；基因缺陷；生物学特性

中图分类号： R965.1 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674 - 6376 (2013) 01 - 0008 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.01.003

Research on early biological characteristics of gene defect type 2 diabetes model db/db mice

LIU Jing, LU Jie, PEI Tian-xian, TIAN Xing-mei, SHEN Xiu-ping

Tianjin Centre for Drug Safety Assessment, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the biological characteristics of gene defect type 2 diabetes model C_{57}BL/KsJ db/db mice, and to lay the foundation for the application of db/db mice on hypoglycemic agents. **Methods** With db/db mice as model animals and db/m mice as control animals, the body weight, food intake, water intake, fasting blood glucose, normal diet blood glucose, glucose tolerance, and insulin tolerance of mice were determined. In the 14th week, glycated serum protein (GSP), triacylglycerol (TG), and total cholesterol (TC) of serum were determined. The liver, pancreas, abdominal fat, and other major tissues were taken for histopathological examination. **Results** Compared with the control group, the body weight, food intake, water intake, fasting glucose, and normal diet glucose of db/db mice were significantly increased; The blood sugar level was stable throughout the trial period; The glucose and insulin tolerances were abnormal; The sensitivity to exogenous insulin of db/db mice was significantly reduced. GSP, TG, and TC concentration and abdominal fat weight were all increased. There was vacuolar degeneration in varying degrees in liver tissue, and the volume of fat cells was increased. The cytoplasm of pancreatic islet cell was reduced and the vessels were dilated. **Conclusion** The early lipid metabolism of db/db mice is disordered, the blood sugar and blood lipids are significantly increased, the glucose and insulin tolerances are abnormal, and the blood glucose level is stable. So db/db mouse is an ideal model for the study on type 2 diabetes.

Key words: db/db mice; type 2 diabetes; gene defect; biological characteristics

糖尿病是严重威胁人类身心健康的慢性终身代谢性疾病，而 2 型糖尿病又占本病的 95%，其并发症可累及全身，致残、致死率极高[1]。合适的糖尿病动物模型在糖尿病的发病机制研究及其并发症的治疗、药物的开发过程中都发挥着极其重要的作用[2]。db/db 小鼠是由美国 Jackson 实验室于 1966

收稿日期： 2012-08-05

作者简介： 刘 静，研究方向为糖尿病、抗炎免疫，肝毒性。E-mail: liuj@tjipr.com

***通信作者** 申秀萍，研究员，研究方向为糖尿病、抗炎免疫，毒理学。Tel: (022)84845266 E-mail: shenxp@tjipr.com

年在 Ks 小鼠上发现的带有糖尿病突变基因（db）的动物，这种糖尿病小鼠是目前应用于人类 2 型糖尿病研究适用的动物模型之一。本实验对其体质量、食量、饮水量、血糖、胰岛素、脏器系数以及部分脏器病理学变化等生物学特性进行分析比较，为糖尿病病因及治疗方法的研究提供基础资料。

1 材料

1.1. 试剂及仪器

诺和灵 R 生物合成人胰岛素注射液，诺和诺德（美国）公司生产，批号 XVG0253。葡萄糖，天津市化学试剂一厂，批号 20100325。糖化血清蛋白（GSP）试剂盒，南京建成生物工程研究所提供，批号 20110418。SUNRISE 酶标仪，奥地利日升公司。日立 7080 全自动生化仪，日本日立株式会社。G&G T2000 电子天平，美国双杰兄弟（集团）有限公司常熟双杰测试仪器厂。PL203 型电子天平，梅特勒托利多仪器（上海）有限公司。卓越型（ACCU-CHEK）罗氏血糖仪及检测试纸条，Roche Diagnostics Gmbh。

1.2 实验动物及饲养

db/db 小鼠、db/m 小鼠，苏州工业园爱尔麦特科技有限公司提供，许可证编号 SCXK（苏）2009-0001，合格证编号 2017882，饲养在天津市新药安全评价研究中心实验动物屏障系统（实验动物使用许可证号 SYXK（津）2006-0002）。饲料为 SPF 级大鼠料，由北京科澳协力饲料有限公司生产。使用天成恒业生产的 KFRO—50 纯水机制备的纯净水。设施环境：温度、湿度、换气次数由中央系统自动控制，温度维持在 20～26 ℃，相对湿度维持在 40%～70%，通风次数为 10～15 次/h 全新风，光照为 12 h 明、12 h 暗。动物的日常饲养管理由动物保障部负责。每日为动物提供足够的块料和新鲜的饮用水。饮水瓶每周灭菌处理一次。

2 实验方法

2.1 分组

实验选用 4 周龄左右的基因缺陷型 2 型糖尿病模型动物 db/db 小鼠，雌雄各半、预适应 1 周后尾静脉针刺采血测定 3 次血糖值(禁食 4 h,间隔 1 d)，平均血糖值＞11.0 mmol/L 为血糖合格小鼠，成功率为 90%。选择血糖合格 db/db 小鼠雌雄各 5 只为模型组，选用健康 db/m 小鼠雌雄各 5 只为对照组。小鼠雌雄分笼饲养，每组 2 笼，每笼各 5 只。

2.2 测定指标及方法

2.2.1 动物空腹血糖 分别于第 6、7、8、9、10、11、12、13 周小鼠尾部静脉针刺取血，用血糖仪测定两组动物的血糖值（测定前动物禁食 4 h）。测定第 10 周两组动物的血糖值（动物禁食 3.5～8 h），观察同一天小鼠血糖变化情况。

2.2.2 动物正常饮食血糖 于第 10 周测定 1 d 内小鼠血糖值，并于第 11、13 周测定正常饮食的两组小鼠的血糖值(针刺尾静脉后 2.5 h 尾静脉针刺取血测定，根据第 10 周测定结果避开升血糖相)。

2.2.3 饮水量 每日定时称量每笼小鼠饮水瓶质量，计算每只动物每日饮水量。

饮水量＝（前一天饮水瓶质量－当天饮水瓶质量）/5

2.2.4 食量 每日定时称量每笼小鼠食料质量，计算每只动物每日食量。

食量＝（前一天食料质量－当天食料质量）/5

2.2.5 体质量 每周测定 1 次小鼠体质量。

2.2.6 糖耐量 于第 12 周测定各组小鼠糖耐量。动物禁食 16 h 后，测定两组小鼠造模前血糖，两组小鼠 ig 给予 1 g/kg 10%葡萄糖水溶液 10 mL/kg。测定给予葡萄糖后 0.5、1、2 h 两组小鼠的血糖值，计算血糖曲线下面积。

2.2.7 胰岛素耐量 于连续给药的第 13 周测定两组小鼠胰岛素耐量。动物禁食 4 h 后，测定两组小鼠造模前血糖，两组小鼠 sc 给予 0.5 U/kg 胰岛素溶液，测定给予胰岛素后 0.5、1、2 h 两组小鼠的血糖值，计算血糖曲线下面积和血糖最大变化率。

血糖最大变化率＝（造模前血糖－造模后血糖最小值）/造模前血糖

2.2.8 GSP 测定 于第 14 周眼眶静脉丛取血，分离血清，分装，于−20 ℃冰箱冷冻保存备用。用试剂盒测定血清 GSP。

2.2.9 组织病理学检查 取动物肝脏、胰腺、脂肪、肾脏、脑、胸腺、脾脏、心脏、肺于 12%甲醛溶液中固定，进行组织病理学检查。

3 数据处理

采用 SPSS 11.5 One-way ANOVA（单因素方差分析，LSD）对计量数据进行统计分析，采用 Excel 对时间－血糖、时间－抑制率等作图。组织病理学检查统计方法采用 SPSS 11.5 NPar Tests Mann-Whitney Test。

4 结果

给药期间模型组与对照组比较，体质量、食量及饮水量显著增加（表 1～3）；空腹血糖水平及正

常饮食血糖水平显著升高，在禁食 3.5～8 h 期间空腹血糖稳定，整个实验期亦保持稳定的高血糖状态；第一次针刺测血糖后有一个 0.5 h 左右的升血糖相，表 4 中血糖值均为针刺尾静脉后 0.5 h 后测定值（表 4～7）。给予葡萄糖后，血糖曲线下面积显著增加，糖耐量异常；注射外源胰岛素后，血糖曲线下面积显著增加，血糖变化率显著减少，表明 db/db 小鼠对外源胰岛素敏感性降低，胰岛素耐量异常（表 8、9）。血清 GSP 显著升高；腹部脂肪质量增加、血清三酰甘油（TG）、总胆固醇（TC）显著升高，表明模型组动物脂质代谢紊乱（表 10）。

镜下检查发现，对照组小鼠肝细胞排列有序，形态清晰，模型组小鼠绝大部分肝细胞空泡变性；对照组小鼠脂肪组织中脂肪细胞大小正常，模型组小鼠脂肪细胞体积增大脂肪细胞体积增大；对照组小鼠胰腺中胰岛细胞排列有序，形态清晰，胞浆丰富；模型组小鼠胰岛细胞胞浆减少、血管扩张。其余脏器无显著性病理变化。结果见图 1、表 11。

表 1　db/db 小鼠体质量（$\bar{x} \pm s$, n=10）

Table 1　Body weight of db/db mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组 别	小鼠体质量/ g				
	5 周	7 周	9 周	11 周	13 周
对照	15.2±2.8	19.1±3.1	18.6±2.9	20.4±4.1	21.5±3.8
模型	30.6±5.8$^{\Delta\Delta\Delta}$	35.7±5.3$^{\Delta\Delta\Delta}$	37.8±4.8$^{\Delta\Delta\Delta}$	40.7±5.6$^{\Delta\Delta\Delta}$	40.5±6.5$^{\Delta\Delta\Delta}$

与对照组比较：$^{\Delta}P$＜0.05　$^{\Delta\Delta\Delta}P$＜0.001，下表同

$^{\Delta}P$ < 0.05　$^{\Delta\Delta\Delta}P$ < 0.001 *vs* control group, same as below

表 2　db/db 小鼠摄食量（$\bar{x} \pm s$, n=10）

Table 2　Food intake of db/db mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组 别	小鼠每日摄食量/ g						
	第 7 周	第 8 周	第 9 周	第 10 周	第 11 周	第 12 周	第 13 周
对照	3.3±0.5	3.2±0.7	3.7±0.9	3.8±0.8	4.0±0.8	3.4±1.6	3.8±0.9
模型	6.0±0.5$^{\Delta\Delta\Delta}$	5.4±0.8$^{\Delta\Delta\Delta}$	6.3±0.6$^{\Delta\Delta\Delta}$	6.0±0.8$^{\Delta\Delta\Delta}$	5.6±0.9$^{\Delta\Delta\Delta}$	5.0±2.2$^{\Delta}$	5.6±0.6$^{\Delta\Delta\Delta}$

表 3　db/db 小鼠饮水量（$\bar{x} \pm s$，n=10）

Table 3　Water intake of db/db mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组 别	小鼠每日饮水量/ g						
	第 7 周	第 8 周	第 9 周	第 10 周	第 11 周	第 12 周	第 13 周
对照	4.4±0.7	5.0±1.8	5.2±0.9	4.6±1.2	5.1±0.9	4.7±0.8	5.0±0.9
模型	8.3±1.3$^{\Delta\Delta\Delta}$	9.0±1.3$^{\Delta\Delta\Delta}$	10.3±1.5$^{\Delta\Delta\Delta}$	9.8±1.0$^{\Delta\Delta\Delta}$	11.6±1.8$^{\Delta\Delta\Delta}$	12.0±0.9$^{\Delta\Delta\Delta}$	9.7±2.6$^{\Delta\Delta\Delta}$

表 4　db/db 小鼠禁食 4 h 空腹血糖（$\bar{x} \pm s$, n = 10）

Table 1　Fasting blood glucose levels of db/db mice fasted for 4 h ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组 别	禁食 4 h 小鼠空腹血糖/ (mmol·L^{-1})								
	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周	13 周
对照	7.8±1.7	8.0±1.6	7.4±1.1	8.7±1.8	6.3±2.2	7.3±2.5	8.4±1.1	7.4±1.6	8.0±1.2
模型	22.1±6.2$^{\Delta\Delta\Delta}$	26.0±7.1$^{\Delta\Delta\Delta}$	22.6±3.4$^{\Delta\Delta\Delta}$	22.3±6.9$^{\Delta\Delta\Delta}$	22.0±6.2$^{\Delta\Delta\Delta}$	28.7±6.0$^{\Delta\Delta\Delta}$	30.2±6.7$^{\Delta\Delta\Delta}$	30.2±6.1$^{\Delta\Delta\Delta}$	28.8±6.4$^{\Delta\Delta\Delta}$

表 5　第 10 周 db/db 小鼠禁食 3.5～8 h 空腹血糖（$\bar{x} \pm s$, n = 10）

Table 5　Fasting blood glucose levels on db/db mice fasted for 3.5—8 h in 10th week ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组 别	小鼠空腹血糖/ (mmol·L^{-1})					
	3.5 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
对照	5.3±2.0	7.3±2.5	7.3±2.3	6.6±1.8	6.1±1.4	6.5±2.2
模型	26.5±7.6$^{\Delta\Delta\Delta}$	28.7±6.0$^{\Delta\Delta\Delta}$	26.6±8.5$^{\Delta\Delta\Delta}$	25.6±7.3$^{\Delta\Delta\Delta}$	24.5±9.1$^{\Delta\Delta\Delta}$	23.7±9.0$^{\Delta\Delta\Delta}$

表 6 第 10 周 db/db 小鼠正常饮食血糖（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 6 Normal diet blood glucose levels on db/db mice in 10th week ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组 别	小鼠正常饮食血糖/ (mmol·L^{-1})							
	08:30	09:00	10:00	11:00	12:00	13:00	15:00	17:00
对照	7.5±1.4	8.1±1.3	7.9±1.3	8.6±1.3	9.4±1.8	8.6±1.3	7.8±1.0	8.4±1.6
模型	31.1±5.9$^{\Delta\Delta\Delta}$	34.0±0.0$^{\Delta\Delta\Delta}$	28.5±8.5$^{\Delta\Delta\Delta}$	31.7±6.1$^{\Delta\Delta\Delta}$	30.9±5.1$^{\Delta\Delta\Delta}$	32.5±3.1$^{\Delta\Delta\Delta}$	31.6±4.5$^{\Delta\Delta\Delta}$	29.1±7.0$^{\Delta\Delta\Delta}$

表 7 db/db 小鼠正常饮食血糖（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 7 Normal diet blood glucose levels of db/db mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	小鼠正常饮食血糖/ (mmol·L^{-1})		
	10 周	11 周	13 周
对照	8.6±1.3	8.4±2.1	8.5±1.3
模型	31.7±6.1	31.4±3.6	30.1±5.7

表 8 db/db 小鼠禁食 12 h 糖耐量（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 8 Glucose tolerance of db/db mice fasted for 12 h ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组 别	药前血糖/ (mmol·L^{-1})	给予葡萄糖后血糖值/ (mmol·L^{-1})			曲线下面积
		0.5 h	1 h	2 h	
对照	6.1±2.0	12.3±2.0	9.4±1.6	7.7±2.1	18.6±2.1
模型	20.8±8.2$^{\Delta\Delta\Delta}$	31.7±3.8$^{\Delta\Delta\Delta}$	29.5±6.9$^{\Delta\Delta\Delta}$	26.1±12.8$^{\Delta\Delta\Delta}$	56.2±12.8$^{\Delta\Delta\Delta}$

表 9 db/db 小鼠胰岛素耐量、胰岛素耐量曲线下面积及血糖最大变化率（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 9 Insulin tolerance, AUC of insulin tolerance, and maximum changing rate of blood glucose in db/db mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组 别	造模前血糖 / (mmol·L^{-1})	给予胰岛素后血糖值/ (mmol·L^{-1})			曲线下面积	血糖最大变化率/ %
		0.5 h	1 h	2 h		
对照	8.4±0.9	4.3±0.7	3.8±0.8	6.6±2.8	26.7±3.8	54.9±7.9
模型	29.0±5.8$^{\Delta\Delta\Delta}$	23.8±5.2$^{\Delta\Delta\Delta}$	19.3±4.7$^{\Delta\Delta\Delta}$	22.4±5.2$^{\Delta\Delta\Delta}$	92.0±22.2$^{\Delta\Delta\Delta}$	33.1±11.0$^{\Delta\Delta\Delta}$

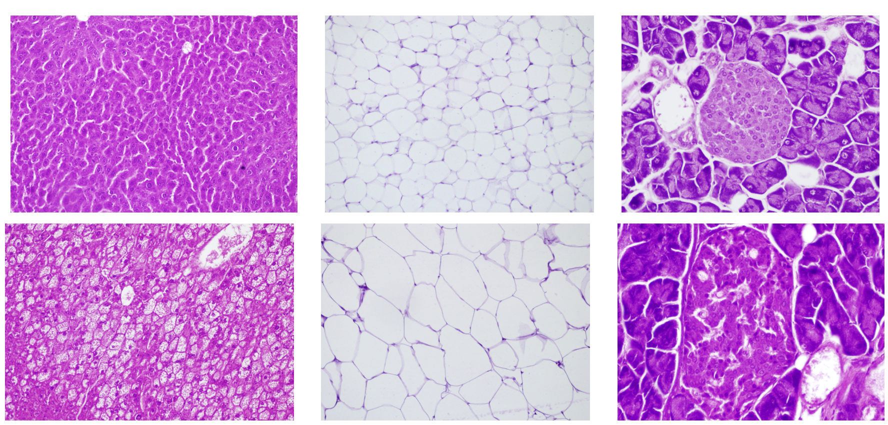
表 10 db/db 小鼠 GSP、TG、TC 量、腹部脂肪质量及脂肪系数（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 11 Contents of GSP, TG, and TC, abdominal fat weight, and fat coefficient in db/db mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组 别	糖化血清蛋白/ (mmol·L^{-1})	TG/ (mmol·L^{-1})	TC/ (mmol·L^{-1})	腹部脂肪质量/ g	脂肪系数/ (mg·g^{-1})
对照	18.52±0.88	1.76±0.67	0.81±0.30	0.217±0.059	10.778±3.031
模型	31.66±5.53$^{\Delta\Delta\Delta}$	3.69±1.11$^{\Delta\Delta\Delta}$	1.42±0.69$^{\Delta}$	3.439±1.684$^{\Delta\Delta\Delta}$	83.167±32.476$^{\Delta\Delta\Delta}$

对照组

模型组



A B C

图 1 db/db 小鼠肝脏（A）、脂肪组织（B）、胰腺（C）的组织病理变化

Fig. 1 Histopathological changes of liver (A), adipose tissue (B), and pancreas (C) in db/db mice

表 11　病变统计结果（n=10）

Table 13　Statistical results of pathological changes (n=10)

组别	病变程度	肝细胞空泡变性	脂肪		胰腺	
			体积增大	新生脂肪细胞	胰岛细胞胞浆减少	胰岛血管扩张
模型	−	1	0	8	0	3
	±	1	1	2	6	3
	+	1	9	0	0	0
	++	0	0	0	0	0
	+++	7	0	0	0	0
对照	−	10	10	9	9	9
	±	0	0	1	0	0
	+	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0

5　结论

C57BL/KsJ（db/db）小鼠是一种基因缺陷型肥胖型 2 型糖尿病动物模型，具有高血糖、高胰岛素血症、高甘油三酯血症、胰岛素抵抗等特征，出生后 4～6 周逐渐出现血糖升高症状并合并肥胖，是研究 2 型糖尿病的良好动物模型[3]。研究中发现 5～13 周的 db/db 小鼠能维持稳定的高血糖状态，糖耐量及胰岛素耐量异常，血脂代谢紊乱。病理组织学检查结果显示，14 周的 db/db 小鼠肝脏、胰腺出现了显著性病理变化，但尚未出现糖尿病肾病及糖尿病脑病等并发症。值得注意的是，db/db 小鼠受针刺等刺激有一个短暂的升血糖相，进行药效学研究时应合理安排血糖测定时间。

参考文献

[1]　王小彦, 王玉丽, 徐为人. 近几年治疗糖尿病热点靶点的研究进展[J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 42-45.

[2]　胡金芳, 刘兆凤, 刘 静, 等. 糖尿病大鼠视网膜血流动力学与视网膜血管形态学关系的研究[J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 167-170.

[3]　贾忠辉, 刘志红, 郑敬民, 等. 大黄酸和辛伐他汀对 db/db 糖尿病小鼠脂代谢紊乱和肾脏保护作用的比较[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2006, 03: 233-239.