

正交试验优化大鼠糖尿病胃轻瘫模型

吴国泰^{1,2}, 杜丽东^{1,2}, 景琪¹, 高云娟¹, 刘五州¹, 李应东², 任远^{1,2*}

1. 甘肃中医学院 药理学教研室, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要: **目的** 通过正交试验优化糖尿病胃轻瘫大鼠模型的制备方法。**方法** 采用四氧嘧啶(ALX)法复制大鼠糖尿病胃轻瘫模型;采用4因素3水平的正交试验设计,以空腹血糖、胃内残留率和血浆胃动素(MOT)水平综合评分为评价指标,观察不同影响因素对大鼠糖尿病胃轻瘫模型形成的影响。**结果** 饲料类型对大鼠糖尿病胃轻瘫模型的影响不明显,造模时间、ALX剂量对大鼠糖尿病胃轻瘫的形成有决定性影响,3个影响因素重要性依次为造模时间>ALX剂量>饲料类型。**结论** 通过优化试验方法,可有效提高糖尿病胃轻瘫大鼠模型的造模效果,为科学评价糖尿病胃轻瘫的药物研究提供技术平台。

关键词: 四氧嘧啶;糖尿病胃轻瘫;正交试验;胃动素;动物模型

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)14-2047-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.14.017

Optimization of diabetic gastroparesis rat model by orthogonal design

WU Guo-tai^{1,2}, DU Li-dong^{1,2}, JING Qi¹, GAO Yun-juan¹, LIU Wu-zhou¹, LI Ying-dong², REN Yuan^{1,2}

1. Department of Pharmacology, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of TCM of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To optimize the preparation methods of diabetic gastroparesis rat model by orthogonal test. **Methods** The diabetes gastroparesis rat model was duplicated with alloxan (ALX) by using four factors and three levels of orthogonal design. The fasting blood glucose, gastric emptying rate, and plasma motilin level were scored as evaluation indexes, and the influence of different factors on diabetic gastroparesis model rats was observed. **Results** The effect of feed type on the diabetic gastroparesis rat model was not obvious, but the effects of modeling time and modeling agent ALX dose on diabetic gastroparesis rat model were decisive. The order of the importance was as follows: modeling time > dose of ALX > feed types. **Conclusion** The optimized test method can effectively improve the diabetic gastroparesis rat model and provide a technical platform for the study on drug evaluation of diabetic gastroparesis.

Key words: alloxan; diabetic gastroparesis; orthogonal test; motilin; model

糖尿病胃轻瘫是指由于胃肠运动功能障碍所致胃排空延迟,是糖尿病常见的一种慢性并发症,国内报道其发病率在30%左右,临床表现为胃张力下降,蠕动减慢,收缩力下降及胃排空延迟^[1-2]。目前制备糖尿病胃轻瘫动物模型采用最多的方法是使用四氧嘧啶或链脲霉素破坏胰岛β细胞诱导出现糖尿病,再检测胃动力和胃肠激素的变化,与正常动物进行比较确定模型是否成功,但在造模剂用量、造模时间等方面差异较大,模型不稳定,不利于模型的标准化。本研究利用数理方法设计实验,进行筛

选优化,旨在发现一种稳定性高、评价准确性好,与临床症状拟合度高的糖尿病胃轻瘫动物模型复制方法,为实验研究和新药开发提供技术平台。

1 材料

1.1 动物

SD大鼠140只,SPF级,雌雄兼用,体质量200~220 g,由甘肃中医学院实验动物中心提供,合格证号SCXK(甘)2011-0004。

1.2 药品与试剂

四氧嘧啶(ALX),Sigma公司;胃动素试剂盒,

收稿日期: 2013-09-07

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目子课题(2011BAI05B0206); 甘肃省自然科学基金项目(1212RJZA079); 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室开放基金项目(ZDSYS-KJ-2012-004)

作者简介: 吴国泰(1978—),男,博士生,讲师,研究方向为中药药理与毒理。Tel: 13919102724 E-mail: lzwuguotai@163.com

*通信作者 任远(1963—),男,教授,博士生导师,研究方向为中药药理与毒理。Tel: (0931)8762653 E-mail: Leyuan816@163.com

上海锐聪科技发展有限公司; SPF 级大鼠生长发育标准饲料, 北京科澳协力饲料有限公司。

2 方法

2.1 正交试验设计

在动物种属、体质量、饲养条件、给药途径和指标检测方法相同的情况下, 确定考察的主要因素及水平, 设计 3 因素 3 水平正交试验方案, 见表 1, 选用正交表 $L_9(3^4)$ 安排试验。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	造模时间 (A)/ 月	ALX 剂量 (B)/(mg·kg ⁻¹)	饲料类型
1	0.5	150	标准饲料
2	1.0	200	高脂饲料
3	2.0	250	高糖饲料

2.2 分组与造模

健康 SPF 级 SD 大鼠 140 只, 60~80 日龄, 体质量 200~220 g, 室内温度 (22±2) °C、相对湿度 40%~50%、标准饲料和双蒸水适应性饲养 7 d。禁食不禁水 12 h 后测定空腹血糖 (FBG), 将 FBG 介于 4.0~6.0 mmol/L 的 120 只大鼠, 随机分成 10 组, 每组 12 只, 随机抽取 1 组设为对照组, 标准饲料喂养, 其余各组大鼠按表 2 进行实验, 造模剂 ALX 采用一次性 ip 给药, 造模 5 h 后各大鼠分别 ig 10%葡萄糖溶液 10 mL/kg, 各组大鼠足量饲喂、自由饮水, 造模 72 h 后, 禁食不禁水 16 h 尾端取血测定 FBG, 将 FBG 低于 11.1 mmol/L 者剔除。高脂饲料按大鼠标准饲料-猪油-玉米面粉 (50:20:30) 比例制成, 高糖饲料按大鼠标准饲料-白砂糖-小麦

面粉 (50:20:30) 比例制成。

2.3 检测指标及方法

FBG 测定: 大鼠禁食不禁水 12 h, 尾静脉针刺取血, 血糖仪测定血糖值。胃内残留率测定: 大鼠禁食不禁水 20 h 后 ig 半固体糊 (由 1 mL 双蒸水与 0.5 g 标准粉配制而成) 0.8 mL/只, 30 min 后股动脉采血, 脱颈椎处死动物, 立即剖开腹腔, 结扎胃贲门和幽门, 取出胃, 用滤纸拭干后称胃全质量, 沿胃大弯剪开胃体, 洗去胃内容物后拭干, 称胃净质量, 计算胃内残留率 [胃内残留率=(胃全质量-胃净质量)/半固体糊质量]。血浆胃动素 (MOT) 水平: 大鼠股动脉采血 2 mL, 置于预冷的含抑肽酶 (500 U/L) 和乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na₂, 10 g/L) 的塑料指型管中, 充分混匀后, 4 °C、3 000 r/min, 离心 10 min, 留取血浆-80 °C 保存, 采用放免法测定 MOT 水平, 各步骤严格按照说明书操作, 对照组大鼠的指标检测于 2 个月实验结束时进行。

2.4 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 组间差异采用 *t* 检验, 对各模型组进行直观分析和方差分析。

3 结果

3.1 各组造模后相关指标测定结果

造模 72 h 后各组大鼠 FBG 均大于 11.1 mmol/L, 糖尿病模型复制成功; 造模期间, 大部分糖尿病大鼠出现明显的多饮、多尿和体质量下降, 活动度减少, 少部分动物死亡; 与对照组比较, 各模型组大鼠 FBG 明显升高, 胃内残留率增加, 血浆 MOT 水平升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 见表 2。

表 2 各组大鼠 FBG、胃内残留率和血浆 MOT 水平测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Determination of fasting blood glucose, intragastric residual rate, and plasma motilin level of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

试验号	动物 / 只	A	B	C	空白	FBG / (mmol·L ⁻¹)	胃内残留率 / %	MOT / (ng·L ⁻¹)
1	12	1	1	1	1	16.26±4.35**	43.45±8.56*	266.84±56.35**
2	12	1	2	2	2	20.50±3.97**	52.38±12.23**	205.60±47.84*
3	10	1	3	3	3	18.81±5.06**	50.87±11.60**	295.71±87.30**
4	12	2	1	2	3	19.90±4.22**	38.60±9.47	246.42±55.26**
5	11	2	2	3	1	22.50±3.67**	63.24±11.05**	208.28±63.22
6	10	2	3	1	2	25.25±4.62**	58.50±7.75**	220.91±46.07*
7	11	3	1	3	2	15.06±3.56**	42.85±8.36	182.50±59.82
8	11	3	2	1	3	17.43±2.87**	35.07±11.10	237.12±40.33**
9	9	3	3	2	1	14.62±3.30**	40.54±10.34	251.64±52.60**
对照	12					5.03±1.22	36.64±5.38	179.37±33.96

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

3.2 结果的处理分析

将各组大鼠 FBG、胃内残留率和血浆 MOT 水平数据进行标准化处理, 计算各指标标准化值 (各组平均值/指标最大值), 根据各评价指标在条件筛选中的主次确定相应的加权系数: FBG、胃内残留率和血浆 MOT 水平的权重系数分别设定为 0.3、0.3、0.4, 计算综合评价指标 (Y) 值, $Y = \text{FBG} \times 0.3 + \text{胃内残留率} \times 0.3 + \text{血浆 MOT} \times 0.4$, 结果见表 3。正交试验直观分析结果见表 3。6 号实验结果最好, 故大鼠糖尿病胃轻瘫造模的优选条件是 $A_2B_3C_1$; 方差分析结果见表 4。方差分析中, 取 $\alpha = 0.05$ 时, 3 因素中饲料类型对大鼠糖尿病胃轻瘫模型的影响不显著 ($P > 0.05$); 而造模时间、ALX 剂量对大鼠糖尿病胃轻瘫的形成有显著影响 ($P < 0.01$ 、 0.05), 分析结果与直观分析结果一致。

表 3 正交试验综合评分及直观分析结果

Table 3 Comprehensive score of orthogonal test and direct analysis result

试验号	A	B	C	空白	Y 值
1	1	1	1	1	76.03
2	1	2	2	2	77.02
3	1	3	3	3	86.48
4	2	1	2	3	75.29
5	2	2	3	1	84.91
6	2	3	1	2	87.63
7	3	1	3	2	62.91
8	3	2	1	3	69.42
9	3	3	2	1	70.64
K_1	239.522	214.220	233.079	231.572	
K_2	247.827	231.342	222.944	227.556	
K_3	202.967	244.754	234.293	231.188	
R	14.953	10.178	3.783	1.339	

4 讨论

糖尿病胃轻瘫是由糖尿病性自主神经病变等因素所导致的胃动力障碍性疾病, 包括胃排空的极度延缓及与胃排空延迟有关的胃动力紊乱和胃肠激素水平异常等^[3]。目前糖尿病胃轻瘫动物模型的复制首先以成功复制糖尿病动物模型为基础, 其中 I 型糖尿病动物模型制备最常用的方法之一是使用 ALX 对胰岛细胞进行化学损伤, 操作简单, 成本较低, 模型大鼠有明显的糖尿病症状。ALX 通过产生超氧自由基与富含-SH 的胰岛 β 细胞特异性结合,

表 4 正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal test

方差来源	平方和	自由度	均值	F 值	显著性
A	379.729	2	189.865	115.955	$P < 0.01$
B	156.158	2	78.079	47.685	$P < 0.05$
C	25.891	2	12.946	7.906	$P > 0.05$
误差	3.275	2	1.637		
总和	565.054	8			

使细胞内 DNA 损伤, 并激活多聚 ADP 核糖体合成酶的活性, 导致 mRNA 功能受损, β 细胞合成前胰岛素减少, 最终导致胰岛素缺乏^[4-5]。ALX 复制糖尿病大鼠模型本身具有不稳定性, 给药剂量、给药方式、动物体质量、动物性别、禁食时间、个体差异和饲养环境等是主要的影响因素, 单次血管内给药剂量以 40~70 mg/kg 为主, 单次 ip 剂量以 100~250 mg/kg 为主, 还有分次每日 ip 的给药方法, 总剂量不超过 250 mg/kg, 动物体质量 180~250 g, 以雄性或雌雄不拘 SD 种或 Wistar 种大鼠多见, 通常以禁食不禁水 12 h 以上给予造模剂, 模型成功率 70%~95%, 光照时间对成模亦有影响^[6-7]。

目前糖尿病胃轻瘫大鼠模型以 ALX 或链脲霉素首先复制糖尿病大鼠, 有关胃肠动力障碍的成模标准并不具体, 多数以试验药物的给药周期为参照, 与正常对照组进行组间比较, 发现差异具有统计学意义界定为造模成功。通过前期实验发现, 按照目前的文献报道的方法制备糖尿病胃轻瘫大鼠模型^[8-9], 效果并不理想, 模型重现性差, 可能的主要原因是造模条件不够规范, 制备模型时各种影响因素尚未得到很好的优化。

本研究中, 在动物种属、体质量、饲养条件、给药途径和指标检测方法相同的情况下, 确定影响成模的关键因素, 并设定与文献报道相接近的 3 个水平, 探索不同剂量 ALX 在喂养饲料复合作用下不同时间形成糖尿病胃轻瘫模型的最优方案。本研究正交试验考察的 3 个因素重要性依次为造模时间、ALX 剂量和饲料类型。造模时间对糖尿病大鼠胃动力有显著影响, 可能与大鼠糖尿病的发病时间规律有关, 发病初期被破坏的 β 细胞数量较少, 从血糖的变化可以看出, 模型大鼠 2 个月 after 出现糖尿病转阴或者自愈的趋势; ALX 剂量影响糖尿病大鼠胃动力与胰岛 β 细胞损伤程度直接相关, 亦与血糖水平呈正相关; 根据文献报道^[10-11], 高糖饲料长期

饲喂可诱发大鼠出现实验性糖尿病模型, 本研究发现, 饲料类型对糖尿病胃轻瘫的形成不一定起关键作用, 对实验结果的影响无显著意义。

在实验中大鼠死亡时间比较分散, 多为长期饮食较少, 体质衰弱, 最后死亡, 造模后 6~8 h 补充葡萄糖, 预防一过性低血糖导致动物死亡具有重要意义。本研究建立了大鼠糖尿病胃轻瘫动物模型规范化方法, 为研究药物对糖尿病胃轻瘫的治疗作用提供了参考。

参考文献

- [1] 罗金燕. 功能性胃肠病与胃肠动力疾病的新概念 [J]. 中华消化杂志, 2002, 22(9): 554-557.
- [2] 李明贤, 贾林. 糖尿病胃轻瘫的流行病学及其促动力治疗进展 [J]. 广州医药, 2004, 35(6): 25-28.
- [3] Asnaghi V, Gerhardinger C, Hoehn T, *et al.* A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat [J]. *Diabetes*, 2003, 52: 506-511.
- [4] 叶燕丽, 王辉云, 王莲桂, 等. 四氧嘧啶制作大鼠糖尿病模型剂量探讨与方法改进 [J]. 实验动物科学与管理, 2001, 18(2): 53-55.
- [5] 徐梓辉, 周世文, 黄林清. 薏苡仁多糖对四氧嘧啶致大鼠胰岛 β 细胞损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2000, 16(6): 639-642.
- [6] 何学令, 尹海林. 四氧嘧啶剂量和给药途径对制作大鼠糖尿病模型的影响 [J]. 四川动物, 2003, 22(4): 255-257.
- [7] 杨明华, 柴可夫, 杨苏蓓. 四氧嘧啶致糖尿病大鼠模型血糖稳定性考察 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(8): 482-485.
- [8] 傅珍春, 黄妙珍. 枳实消痞颗粒治疗大鼠糖尿病性胃肠病作用机制的实验研究 [J]. 杭州师范学院学报: 医学版, 2007, 27(6): 396-399.
- [9] Talpur N, Echard B, Ingrain C, *et al.* Effects of a novel formulation of essential oils on glucose insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study [J]. *Diabetes Obese Metab*, 2005, 7(2): 193-197.
- [10] Winzell M S, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2004, 53(3): S215-S219.
- [11] Shafrir E, Ziv E, Mosthaf L. Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to β cell failure in animal models [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1999, 892: 223-246.