

糖尿病合并动脉粥样硬化小鼠模型的建立

张彦^{1,2}, 马双陶², 杨永健²

(1. 第三军医大学研究生管理大队, 2. 成都军区总医院心内科, 四川省成都市 610000)

[关键词] 动脉粥样硬化; 糖尿病; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠

[摘要] 目的 探讨糖尿病合并动脉粥样硬化小鼠模型建立的方法。方法 8 周龄雄性载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠 46 只, 随机分为对照组、高脂饮食组、链脲佐菌素低剂量组和高剂量组, 链脲佐菌素低剂量组和高剂量组分别腹腔注射链脲佐菌素 55 mg/kg (连续注射 5 天)、200 mg/kg (单次注射)。2 月后测定空腹血糖、血脂、主动脉根部斑块面积。结果 链脲佐菌素高剂量组出现高死亡率, 链脲佐菌素低剂量组血糖、血脂、粥样斑块面积均高于对照组和高脂组 ($P < 0.01$), 高脂组空腹血糖呈轻度升高 (7.78 ± 0.67 mmol/L)。结论 以 ApoE^{-/-} 小鼠为基础小剂量多次腹腔注射链脲佐菌素是制备糖尿病合并动脉粥样硬化小鼠模型的理想方法, 单纯高脂喂养 ApoE^{-/-} 小鼠可以导致空腹血糖升高, 大剂量单次腹腔内注射链脲佐菌素不宜用于该模型的建立。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Study on Establishing Diabetic Atherosclerosis Mice Model

ZHANG Yan, MA Shuang-Tao, and YANG Yong-Jian

(1. Graduate Management Team of Third Military Medical University, 2. Department of Cardiology of Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610000, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Diabetes; Apolipoprotein E Knockout Mice

[ABSTRACT] **Aim** To develop mouse model of diabetic atherosclerosis. **Methods** 46 male 8-week-old apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mice were randomly divided into control group, high-fat group, streptozotocin (STZ) low-dose group and high-dose group, low-dose group was treated with 5 daily intraperitoneal injections of STZ 55 mg/kg per day, high-dose group was treated with intraperitoneal injection of STZ 200 mg/kg for once. After 2 months, all of the mice were sacrificed and the blood samples were collected, the body weight, fasting blood glucose (FBG), total cholesterol (TG), triglyceride (TC), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), the plaque area of aortic root were detected. **Results** High-dose group had unacceptable mortality, low-dose group got higher FBG, TG, TC, LDL, HDL and more plaque area compared with control group and high-fat group ($P < 0.01$), high-fat group got mildly elevated FBG (7.78 ± 0.67 mmol/L). **Conclusions** ApoE^{-/-} mice treated with 5 daily intraperitoneal injections of STZ is an ideal mouse model of diabetic atherosclerosis, ApoE^{-/-} mice supplied with high-fat diet got elevated fasting glucose, and ApoE^{-/-} mice treated with high-dose of STZ is not proper for the model.

随着人口老龄化及生活方式的改变, 糖尿病患者逐年上升。在糖尿病患者中, 动脉粥样硬化性疾病引起的死亡占总死亡率的 80%, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是糖尿病患者中最常见的并发症^[1,2]。目前糖尿病合并 As 的病因及其各种并发症的发病机制尚未完全阐明, 需深入研究, 理想动物模型的建立是实验研究的基础之一。

国内外文献报道的模型制备方法主要有三大类, 一是将糖尿病模型鼠与 As 模型鼠进行杂交^[3]; 二是以糖尿病模型为基础制备 As 模型^[4,6]; 三是以 As 模型为基础制备糖尿病模型^[3]。第一类方法费用高, 而且受到实验动物繁殖许可的限制, 大多数实验室不宜使用。第二类方法多采用对糖尿病鼠喂养高脂饲料, 其动脉粥样硬化的发生率和程度具

[收稿日期] 2013-06-04

[作者简介] 张彦, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为糖尿病血管硬化, E-mail 为 thiman@163.com。马双陶, 硕士, 住院医师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 shuangtaoma@yahoo.com。通讯作者杨永健, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 354848184@qq.com。

有不确定性,难以把握和筛选。第三类方法相对简单可靠,本研究就第三类方法中包含的几种不同的建模方式进行了观察和对比,以筛选出最佳的造模方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

8 周龄 SPF 级 ApoE^{-/-} 雄性小鼠 46 只,购自北京医科利昊生物科技有限公司,随机分为对照组 10 只、高脂组 8 只、STZ 低剂量组 16 只、STZ 高剂量组 12 只,平均体重 21.3 g。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自 Sigma 公司,血糖仪及血糖试纸购自罗氏公司,血脂测定使用奥林巴斯全自动生化分析仪,基础饲料购自成都达硕生物科技有限公司,柠檬酸缓冲液购自天津百浩生物科技有限公司。

1.2 实验过程及方法

小鼠适应性喂养 1 周后,空腹 8 h,测基础体重及空腹血糖。对照组给予普通饲料;高脂组给予高脂饲料(脂肪 21%、胆固醇 0.15%)^[7]。STZ 用柠檬酸缓冲液配置,冰上操作,现配现用,并注意避光,配置好的液体用 0.2 μm 微孔过滤器过滤,腹腔注射液量为 0.1~0.2 mL,所有配置溶液在 15 min 内注射完毕。STZ 低剂量组空腹 12 h 后按 55 mg/kg 的剂量腹腔内注射 STZ,连续注射 5 天^[8]。STZ 高剂量组空腹 12 h 后按 200 mg/kg 的剂量一次性腹腔注射 STZ^[9]。注射 STZ 后注意补足饲料和水,并短时间内喂 10% 葡萄糖水(1 周内),之后继续喂养高脂饲料,每日更换垫料。

1.3 观察指标检测

STZ 末次注射后于第 10 天、21 天测定空腹血糖。STZ 末次注射 2 月后空腹 8 h 测小鼠血糖,摘眼球取血,全自动生化分析仪测定血脂,包括甘油三酯(triglyceride, TC)、总胆固醇(total cholesterol, TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。取心脏及升主动脉,对主动脉根部进行病理切片,行 HE 染色,使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件对粥样斑块进行面积测量。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用单因素方差分析,采用 LSD 法及 HSD 法等进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后症状

STZ 高剂量组在注射 STZ 后 1 天即出现了多饮多食的症状,STZ 小剂量组在末次注射后 3 天出现多饮多食。STZ 小剂量组在末次注射后 1 周出现多尿,而高脂组一直未出现明显的多尿。成模后小鼠毛色较对照组和高脂组差。STZ 低剂量组在注射后 7 周部分出现血尿、少尿、全身水肿的症状。

2.2 死亡情况

对照组及高脂组无死亡。STZ 高剂量组在注射 STZ 后一周内死亡 8 只(死亡率 67%),20 天死亡 11 只(死亡率 92%),其中有 2 只发生了高血糖(25.6 和 33.3 mmol/L),4 只发生了低血糖(1.8、1.6、1.3 及 2.8 mmol/L),其余 5 只发现时已经死亡,未能检测血糖;最后一只在注射 STZ 后 57 天死亡。STZ 小剂量组共死亡 6 只(总体死亡率 37.5%),1 只在注射期间发生低血糖死亡,3 只在末次注射后 10 天内出现高血糖死亡,2 只在注射后第 7 周出现血尿、少尿、水肿等症状后死亡(图 1)。

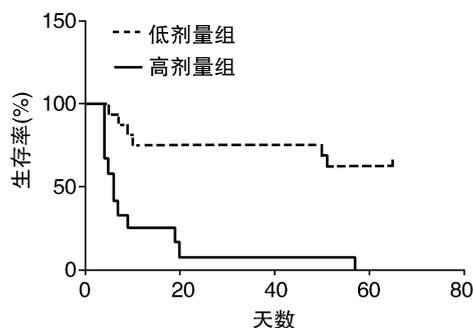


图 1. 不同剂量 STZ 注射后生存曲线

Figure 1. Survival curve of different doses of STZ

2.3 血糖情况

由于 STZ 高剂量组注射后小鼠大量死亡,未列入统计。STZ 低剂量组从第 10 天起,大部分小鼠出现明显的高血糖,从 21 天起,所有小鼠出现明显高血糖,且一直稳定在较高水平。高脂组空腹血糖呈逐渐升高趋势,到 60 天时达到 7.78 mmol/L,按照空腹血糖 >7 mmol/L 的标准,达到成模标准(表 1)。

2.4 体重情况

各组基础体重无统计学差异;造模后 1 月,STZ 低剂量组和高脂组体重较对照组减轻,STZ 低剂量组和高脂组间无差异;造模 2 个月后 STZ 低剂量组体重较对照组和高脂组均明显减轻,高脂组体重较对照组也明显减轻(表 2)。

表 1. 腹腔注射 STZ 后各组空腹血糖 (mmol/L)

Table 1. FBG after intraperitoneal injection of STZ in different groups

分组	0 天	10 天	21 天	60 天
对照组	4.48 ± 0.23	4.58 ± 0.32	4.82 ± 0.21	5.3 ± 0.22
高脂组	5.00 ± 0.19	5.54 ± 0.29	6.10 ± 0.30 ^a	7.78 ± 0.67 ^a
STZ 低剂量组	4.88 ± 0.15	15.42 ± 1.70 ^{bc}	25.74 ± 0.89 ^{bc}	25.04 ± 1.67 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与高脂组比较。

表 2. 各组体重变化 (g)

Table 2. Changes of body weight in different groups

分组	基础体重	1 月体重	2 月体重
对照组	20.86 ± 0.14	23.94 ± 0.24	27.41 ± 0.47
高脂组	20.86 ± 0.16	21.55 ± 0.41 ^a	22.54 ± 0.70 ^a
STZ 低剂量组	21.49 ± 0.19	21 ± 0.29 ^a	19.73 ± 0.57 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与高脂组比较。

2.5 血脂水平

STZ 低剂量组血脂四项指标与对照组及高脂组相比均明显升高, 高脂组与对照组比较 TC、TG、LDL 均有明显升高 (表 3)。

表 3. 各组血脂水平比较 (mmol/L)

Table 3. Comparison of serum lipids in different groups

分组	TC	TG	HDL	LDL
对照组	10.65 ± 0.86	1.17 ± 0.11	1.61 ± 0.18	3.20 ± 0.32
高脂组	19.52 ± 1.96 ^b	5.53 ± 1.47 ^a	2.07 ± 0.18	7.88 ± 1.11 ^b
STZ 低剂量组	38.66 ± 1.39 ^{bc}	19.36 ± 1.63 ^{bc}	17.42 ± 1.52 ^{bc}	25.88 ± 1.88 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与高脂组比较。

2.6 主动脉根部斑块情况

各组小鼠主动脉根部均出现明显的粥样斑块。对照组与高脂组间斑块面积大小无统计学差别。STZ 低剂量组斑块面积明显增多 (表 4 和图 2)。

表 4. 各组主动脉根部粥样斑块面积

Table 4. Aortic root atherosclerotic plaque area in different groups

分组	斑块面积 (mm ²)
对照组	0.24 ± 0.02
高脂组	0.25 ± 0.02
STZ 低剂量组	0.54 ± 0.03 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与高脂组比较。

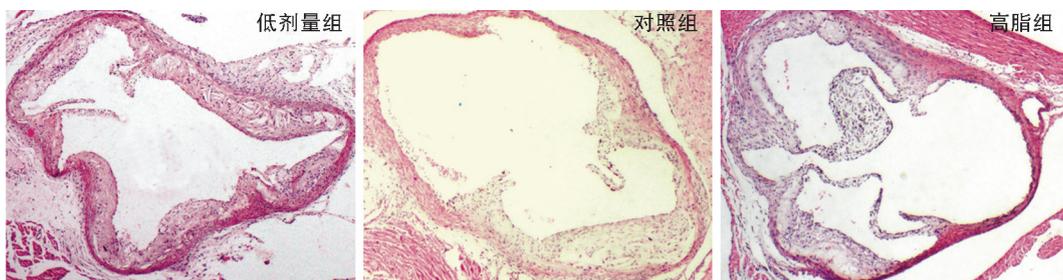


图 2. 主动脉根部 HE 染色 (×40)

Figure 2. The picture of HE staining of the aortic root

3 讨论

制备糖尿病合并 As 的模型国内外文献有所提及, 但并未对各种造模方法的效果、可行性进行过对比, 本研究首次对以 As 模型鼠为基础制备糖尿病模型的几种方法进行了比较。

大剂量 STZ 单次腹腔注射制备糖尿病合并 As 的文献较少, 文献中提到有两种方法: 一是单次注射 200 mg/kg, 二是 100 ~ 125 mg/kg 连续两天注射。为了避免第二次注射前的空腹 8 ~ 12 h 可能出现的低血糖死亡, 本研究采用了单次注射 200 mg/kg 的方法。小鼠在 1 周内死亡 92%, 其中有的发生低血

糖、有的发生高血糖, 这在注射 STZ 后该如何喂养小鼠出现了困难。一般认为注射 STZ 后由于胰岛的大量破坏, 导致血清胰岛素猛增, 小鼠易出现低血糖, 所以需要喂以糖水, 但实验中我们发现有的小鼠是出现了对高血糖的不耐受而死亡的, 如果所有小鼠均喂以糖水, 有可能会导导致一些小鼠更容易出现高血糖而死亡。针对出现低糖和高糖的小鼠而给予的治疗措施 (对于低血糖者给予糖水灌胃、糖水腹腔注射, 对于高血糖者给予盐水、胰岛素皮下/腹腔注射) 在 STZ 高剂量组均未收到效果, 考虑可能存在两点原因: 一是大剂量 STZ 对小鼠打击过大; 二是小鼠体型较小, 相对大鼠而言不易施救。

从死亡的情况看,大剂量单次注射的方法不易用于糖尿病合并 As 模型的建立。

小剂量多次 STZ 腹腔注射制备的模型小鼠其血糖升高明显且稳定,从末次腹腔注射第 10 天,血糖明显升高,且在整个实验中维持在较高水平。死亡主要发生在两个阶段:一是造模期间,死亡主要为低血糖和高血糖;二是成模后 7 周,死亡原因考虑为糖尿病肾病、肾衰。因为想了解造模后的自然病理生理变化,在整个实验期间,我们对小鼠的血糖没有任何的干预,任其升高,这增加了小鼠出现高渗昏迷、酮症酸中毒、糖尿病肾病等严重的并发症而出现死亡的概率。所以,我们认为 37.5% 的死亡率是可以接受的。考虑到 ApoE^{-/-} 小鼠是基因敲除鼠,而且世代居住在 SPF 级的环境中,其生存能力相对于野生型小鼠会有明显下降,这可能是该组小鼠死亡率高于用 STZ 制备单纯糖尿病模型死亡率的原因^[7,8]。高脂组血糖呈缓慢升高趋势,本研究中一直到 60 天才出现符合糖尿病标准的空腹血糖 (>7 mmol/L),与文献^[7]报道有一定差异。该研究中血糖升高不显著,周期长,但方法简便、安全。

有学者指出,高糖饮食干预的 ApoE^{-/-} 小鼠符合代谢综合征的表现而不会出现高血糖,高脂喂养的 ApoE^{-/-} 小鼠则符合 2 型糖尿病的表现^[7]。我们在之前的预实验中,小剂量 STZ 连续腹腔注射后喂以高糖高脂饮食(猪油 18%、蔗糖 20%、蛋黄 3%、基础饲料 59%),小鼠全部死亡,考虑原因为高糖饮食增加了小鼠因高糖而死亡的风险。

ApoE^{-/-} 小鼠作为 As 模型,本身就会发生高脂血症和动脉粥样斑块。本研究中高脂组血脂和斑块面积与对照组无显著差异,而 STZ 低剂量组血脂显著升高,斑块面积也显著增加,是糖尿病合并 As 的理想模型。

糖尿病建模成功并无统一的血糖标准,有以空腹血糖 > 7 mmol/L^[4,5],有以空腹血糖 ≥ 13.5 mmol/L^[10],有以随机血糖 > 11.1 mmol/L^[11],有以随机血糖 > 16.7 mmol/L^[12]。本研究采用的是空腹血糖 > 7 mmol/L 的标准,而事实上,STZ 低剂量组在注射 STZ 10 天后,小鼠空腹血糖均 > 11.1 mmol/L,且稳定地处于较高水平。根据 STZ 小剂量组的数据推测,如果适当减少 STZ 小剂量组每日注射剂量,可能会在保证模型成功的前提下减少死亡率,本研究未对不同的剂量进行尝试,55 mg/kg(连续注射 5 天)这种剂量是不是最小、最

安全的剂量,尚不清楚,我们会在后期的研究中进一步观察。

以 ApoE^{-/-} 小鼠为基础小剂量多次腹腔注射 STZ 是制备糖尿病合并 As 小鼠模型的理想方法;单纯高脂喂养 ApoE^{-/-} 小鼠可以导致空腹血糖的升高,但升高幅度较小,周期长;大剂量单次腹腔内注射 STZ 不宜用于糖尿病合并 As 小鼠模型的建立。

[参考文献]

- [1] 魏富春,戎健,陈玉群,等. 2 型糖尿病患者冠状动脉粥样硬化与视网膜病变的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (8): 732-736.
- [2] 刘惠霞,谭宁. MIF 在糖尿病性冠心病中的作用研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31 (1): 59-63.
- [3] Wu KK, Huan Y. Diabetic atherosclerosis mouse models [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 191 (2): 241-249.
- [4] 徐梓辉,周世文,钱桂生. 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化大鼠模型的建立[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22 (1): 205-208.
- [5] 王先西,赵秀华,王峰,等. 高脂饮食引起大鼠动脉血管内皮细胞衰老[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2010, 30 (2): 118-122.
- [6] 范丹丹,翟桂兰,祝焕林. 牛磺酸对动脉粥样硬化兔 NF-κB 信号转导途径的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23 (17): 30-34.
- [7] Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM, et al. Rosiglitazone reduces the accelerated neointima formation after arterial injury in a mouse injury model of type 2 diabetes[J]. *Circulation*, 2003, 108 (16): 1 994-999.
- [8] Calkin AC, Forbes JM, Smith CM, et al. Rosiglitazone attenuates atherosclerosis in a model of insulin insufficiency independent of its metabolic effects [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (9): 1 903-909.
- [9] Hayek T, Hussein K, Aviram M, et al. Macrophage foam-cell formation in streptozotocin-induced diabetic mice: stimulatory effect of glucose [J]. *Atherosclerosis*, 2005, 183 (1): 25-33.
- [10] 邓琼,郭皖北,张蓉,等. 糖尿病并动脉粥样硬化兔血清中成纤维细胞生长因子表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23 (23): 16-19.
- [11] 章成昌,谢光荣. 链脲菌素制备 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J]. 安徽医药, 2012, 16 (9): 1 241-244.
- [12] 吴杰萍,郭志新,齐伟,等. 艾塞那肽通过下调 p22phox、NOX4 和 TGF-β1 减轻 1 型糖尿病大鼠主动脉的氧化应激损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (8): 711-715.

(此文编辑 文玉珊)