

# 高脂肪饮食诱导糖尿病小鼠模型

毛旭东<sup>1,2</sup>, 朱建国<sup>1\*</sup>

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 201203; 2. 上海药明康德新药研发有限公司, 上海 200240)

**摘要** [目的]探讨以高脂肪纯化饲料诱导的遗传背景和环境因素共同起作用的 C57BL/6J 小鼠用于糖尿病药物早期筛选的最短诱导周期。[方法]雄性 4 周龄 C57BL/6J 小鼠 20 只适应性喂养 7 d 后随机分为 2 组, 同时饲喂高脂肪饲料。葡萄糖耐受性试验(OGTT)中 1 组 C57BL/6J 小鼠口服生理盐水(对照组), 另 1 组口服磷酸西他列汀(阳性药组)。喂养期间对禁食后血糖(FBG)和体重(BW)进行连续监测, 同时进行 OGTT 试验并监测血浆胰岛素(PINS)水平。[结果]高脂喂养 1 周后小鼠体重升高迅速, 并表现为中心型肥胖。第 4 周 FBG 和 PINS 较前 3 周显著性升高, 2 周 OGTT 给糖 15 min 阳性药组血浆胰岛素水平较对照组有显著性升高。[结论]仅饲喂高脂肪饲料 4 周的 C57BL/6J 可用于糖尿病药物药效试验的筛选。该模型方法简单易行, 周期短, 稳定性好, 与人类自然发病过程相似, 是较为理想的降血糖药物筛选模型。

**关键词** 高脂饮食; 模型; 诱导周期

中图分类号 S853 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)26-10661-03

## Establishment of High Fat Diet Induced Diabetes Mouse Model

MAO Xu-dong et al (Shanghai Municipality Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao-tong University, Shanghai 201203)

**Abstract** [Objective] To establish C57BL/6J diabetes mouse model induced with high-fat purified ingredient diets, which may reflect the interaction of genetic background and environmental challenges. [Method] After acclimation of the facility for 7 days, 20 males aged 4 weeks were randomly divided into two groups. One of them (10 mice) will be dosed with saline vehicle in the following OGTT test. And the other groups will be dosed with Sitagliptin as negative control. The body weight (BW), fasting blood glucose (FBG) and plasma insulin level in the OGTT test will serially measured. [Result] The body weight of the 2 groups increased fast and demonstrated central obesity after 1-week high-fat diet. After 4 weeks the FBG and PINS level was significantly higher than previous weeks. The 15 min PINS level of negative control groups was significantly higher than vehicle group after 2 weeks. [Conclusion] Just fed on high fat diet for 4 weeks, C57BL/6J can be used for diabetes early drug screening. With reproducible, simple and period-brief, this model is a very useful animal model in human diabetes drug screening.

**Key words** High fat diet; Model; Induced period

饮食诱导模型是指以具有肥胖、糖尿病遗传易感性的动物品系为模式生物, 以高能量饲料作为诱发因素制作的动物模型。这与人类的发病机制相似, 且重复性高, 操作也简单。雄性的 C57BL/6J 是最广泛应用的肥胖 2 型糖尿病背景动物<sup>[1]</sup>。该品系小鼠具有在肥胖以后发展为糖尿病的遗传基因<sup>[2]</sup>。但是在模型建立时人们通常用代谢综合症的诊断指标来判断模型是否成功, 如餐后血糖、体重指数、血浆胰岛素、血浆甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、糖耐受力、脏器系数、脂肪重量、肝胰的病理分析等<sup>[3]</sup>。这方面的研究也有很多, 通常单纯喂养高脂饲料 10 周后各项指标均有升高, 肝脏显示中度的脂肪变性。因此, 通常认为 10 周的饲喂即可建立代谢综合症小鼠模型<sup>[4]</sup>。但是对于药物研发企业, 成本和效率是需要考虑的重要方面, 在前期筛选降血糖化合物时, 能否降低血糖、是否提高胰岛素的分泌以及糖耐受力是否增强是最先考虑的指标, 至少 10 周的高脂饲养无论从效率还是成本上对公司都是不小的压力, 如果单纯从上述 3 项指标来考虑是否可以诱导较短的时间就可以用于降糖药物的筛选具有重要意义。

## 1 材料与与方法

### 1.1 实验动物和材料 4 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄鼠 20 只,

**作者简介** 毛旭东(1985 - ), 男, 江苏镇江人, 在读硕士, 从事兽医学研究, E-mail: browningme@163.com。\* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事预防兽医学方面的研究, E-mail: zhu\_jg@sjtu.edu.cn。

**收稿日期** 2013-07-04

购自北京维通利华(Vital River)实验动物技术有限公司; 监测血糖采用尾尖采血法, 使用强生稳豪型血糖仪; 小鼠胰岛素试剂盒, 购自 Merck Millipore; 磷酸西他列汀原料药, 购自湖北康宝泰精细化工有限公司。

**1.2 动物模型的建立和分组** 动物建模的方法参考国内外学者的造模方法并加以改良<sup>[5-8]</sup>。4 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄鼠 20 只, 平均体重为(18.1 ± 1.83 g), 适应性喂养 7 d 后随机分为 2 组。同时给予高脂纯化饲料。动物房温度为 21 ~ 24 °C, 相对湿度为 40%, 自由摄食饮水, 每天换新鲜饲料, 并测定进食量。高脂饲料, 购自 Research Diets 公司。高脂饲料成分见表 1。

**1.3 测定指标** 测定纯化饲料饲养后体重变化, 每隔 1 周进行 1 次口服葡萄糖耐受性试验 OGTT: 早上 8:30 禁食, 禁食 6 h 测定 FBG, 对照组灌胃给予生理盐水 5 ml/kg, 试验组给予磷酸西他列汀 10 mg/kg, 给药半小时后灌胃给予葡萄糖水溶液 2 g/kg, 于负荷后 15、30、60、120 min 测定尾静脉血糖值。15 min 后同时尾静脉挤血 30 μl, EDTA 抗凝, 7 000 r/min, 离心 5 min 分离血浆, 检测血浆胰岛素水平。

**1.4 数据统计与分析** 试验结果均以平均值 ± 标准差表示, 使用 JMP 软件进行数据统计与分析, 再进行正态性检验和方差齐性检验后, 采用单因素方差进行组件比较。

## 2 结果与分析

从图 1 可以看出, 随着高脂饮食时间的增加, 2 组小鼠体重升高迅速, 表现为腹部肥胖, 特点是腰围增粗明显。研究

表明,高脂饮食 10 周以上模型鼠内脏脂肪会显著增多<sup>[4-5]</sup>,说明高脂饮食能够快速有效的诱导 C57BL/6J 出现肥胖表型,并且其肥胖特征与人类相似,表现为腹部肥胖<sup>[4,9]</sup>。大量研究证实腹部内脏脂肪堆积与心血管疾病及其死亡率的增加和胰岛素抵抗密切相关,是胰岛素非依赖型糖尿病的危险因子。

表 1 高脂纯化饲料成分

饲料成分	重量	热量	营养成分	重量比	热量比
	g	kJ		%	%
酪蛋白(30 目)	200.00	3 349	蛋白质	26.2	20
L-胱氨酸	3.00	50	碳水化合物	26.3	20
麦芽糊精	0	0	脂肪	34.9	60
麦芽糖糊精	125.00	2 093			
蔗糖	68.80	1 152			
纤维素	50.00	0			
豆油	25.00	942			
猪油	245.00	9 230			
矿物质复合物	10.00	0			
磷酸氢钙	13.00	0			
碳酸钙	5.50	0			
柠檬酸钾	16.50	0			
维生素复合物	10.00	167			
重酒石酸胆碱	2.00	0			
食用蓝染料	0.05	0			

注:表中数据来自 Research Diets 公司产品说明书。

禁食 6 h(早上 8:30 至下午 14:30)后采尾静脉血测定 FBG。从图 2 可以看出,在高脂饮食 4 周时 FBG 开始升高,

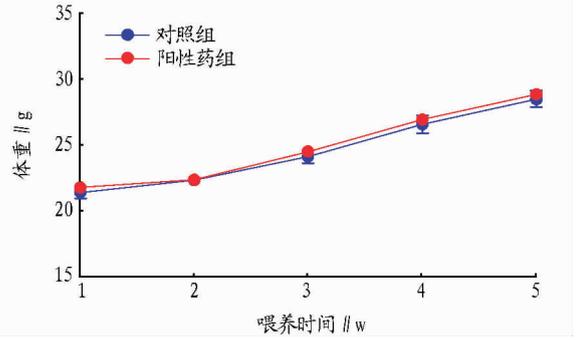


图 1 对照组及阳性药组小鼠的体重生长曲线

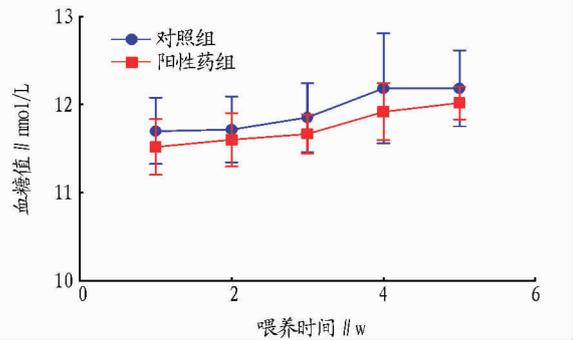
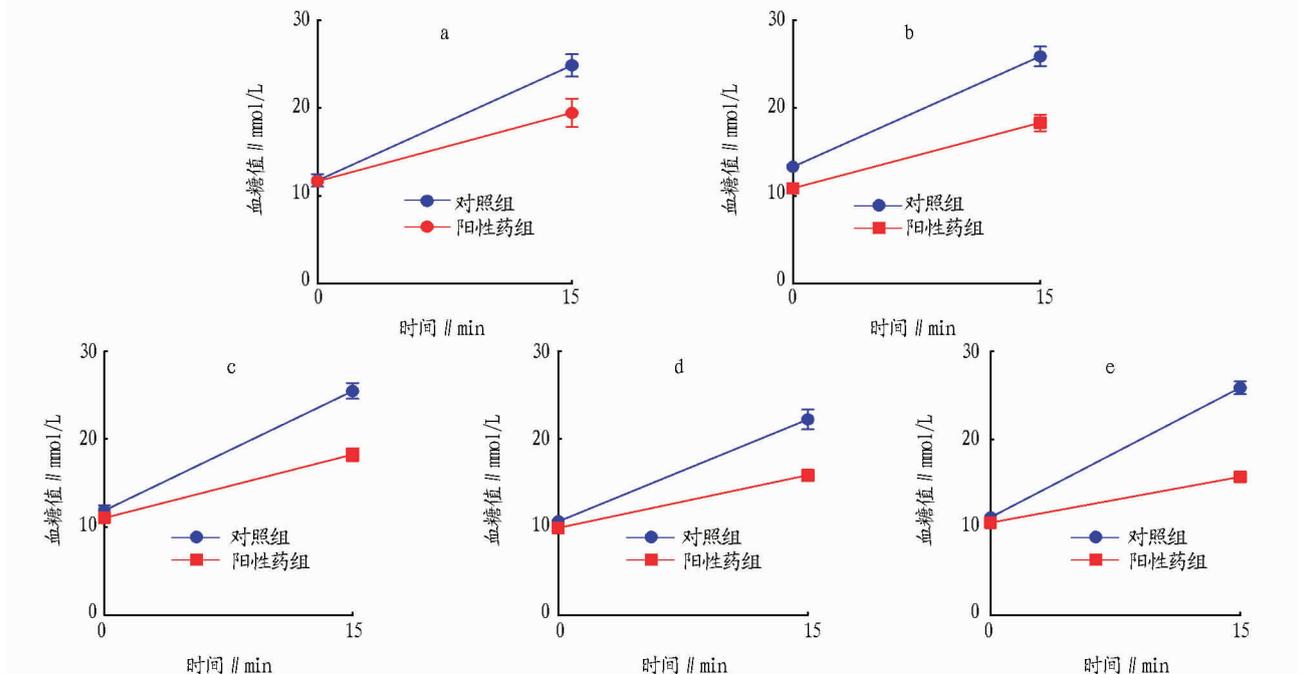


图 2 对照组与阳性药组小鼠的 FBG 变化曲线

并且 5 周后继续升高。

从图 3 可以看出,OGTT 试验中高脂饮食 2 周就使试验组在 15 min 血糖峰值较对照组显著性降低( $P < 0.01$ )。



注:a.1 周;b.2 周;c.3 周;d.4 周;e.5 周。

图 3 对照组和阳性药组小鼠 OGTT 曲线

从图 4 可以看出,对照组 PINS 水平在第 4 周显著升高,5 周后继续升高。第 2 周,试验组 PINS 较对照组显著升高( $P < 0.05$ ),4 周后升高更为显著( $P < 0.01$ )。

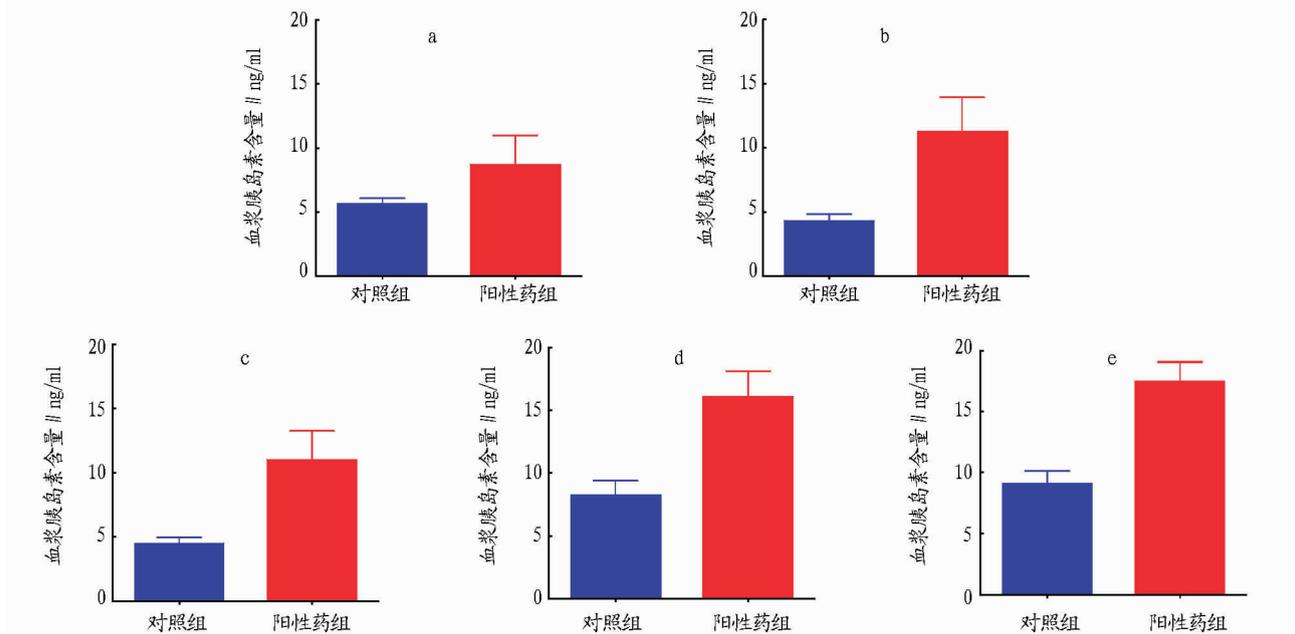
### 3 讨论

2 型糖尿病发病率呈逐年上升的趋势,已严重威胁到人类健康,但其预防治疗仍不完善。因此,建立理想的糖尿病模型对于深入研究糖尿病的发生、治疗、预防及并发症的转

归具有重要意义。理想的动物模型需要尽可能准确地模拟临床病人发病过程和致病机制。糖尿病的发病原因目前公认是环境和遗传多因素共同作用的结果<sup>[3]</sup>。近年来,人类基因改变甚微,但糖尿病却以前所未有的速度席卷全球,因此学者将其发病原因除了多基因遗传易感性外更多地归因于久坐生活方式和密集的高热量饮食摄入。

近年来人们对脂毒性的认识逐步深入,高脂饮食作为 2 型糖尿病及胰岛素抵抗综合症发病的重要环境因素已得到公认。因此,模拟人类 2 型糖尿病的发病特征,以高脂饲料

诱导实验动物产生胰岛素抵抗,建立稳定可靠且经济实用的动物模型,成为 2 型糖尿病病相关研究的重要内容<sup>[10]</sup>。C57BL/6J 是近交系小鼠,肿瘤的发病率低,具有饮食诱导的肥胖、T2DM、动脉粥样硬化遗传易感性。因此,此类小鼠常作为研发糖尿病药物的模式动物。笔者通过高脂高热量的纯化饲料喂食制作该模型。纯化饲料是指配制饲料时不用天然原料,所有成分都是由纯的营养素组成,如合成的氨基酸、纯化淀粉、蔗糖等。纯化的饲料配方清楚,成分公开,变动小。这使得不同研究可以进行比较,有利于全球研究成果



注:a. 1 周;b. 2 周;c. 3 周;d. 4 周;e. 5 周。

图 4 对照和阳性药组血浆胰岛素水平的比较

的整合,这在药效评价方面有着重要的意义<sup>[9]</sup>。

在糖尿病药物研发初期化合物筛选时,血糖水平、胰岛素水平和改善糖耐受能力的水平是最重要且最先考虑的方面,所以选取这 3 个指标作为评判模型的核心考察指标。二肽基肽酶 4 (DPP4) 抑制剂是近年来上市的治疗 2 型糖尿病的新型药物,具有增加 GLP-1 活性、改善糖脂代谢、减少  $\beta$  细胞凋亡和促进  $\beta$  细胞增殖的作用,且副作用小,是目前糖尿病药物研究的焦点。因此,选用 2006 年 10 月获得美国 FDA 批准并成为第一个上市的 DPP4 抑制剂药物——磷酸西他列汀作为实验组药物。

该试验结果表明,在高脂饲养 2 周以后,OGTT 试验 15 min 试验组血糖较对照组显著降低,说明糖耐受能力显著提高,15 min 后试验组 PINS 水平显著升高。从 4 周开始,对照组 FBG 和 PINS 绝对值都开始升高,这说明 4 周后高脂诱导的模型小鼠糖代谢出现了早期的紊乱。综上所述,高脂饲料饲喂 C57BL/6J 小鼠 4 周后就可以用于糖尿病药物的早期药效筛选。这与前人研究的以代谢综合征各项指标判定至少需要 10 周以上诱导周期缩短近 2 个月的时间,这无论从成

本还是效率上对于药物研发企业都有着一定的意义。

#### 参考文献

- [1] SRINIVASAN K, RAMARAO P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview [J]. Indian J Med Res, 2007, 125: 451–472.
- [2] SURWIT R S, KUHN C M, COCHRANE C. Diet-induced type 2 diabetes in C57BL/6J mice [J]. Diabetes, 1988, 37: 1163–1167.
- [3] ALBERTI K G, ZIMMET P, SHAW J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition [J]. Lancet, 2006, 366: 1059–1062.
- [4] 胡健萍, 闫照, 杨志伟, 等. 饮食诱导代谢综合征小鼠模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2009(6): 34–38.
- [5] 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: 215–219.
- [6] GALLOU-KABANI C, VIGE A, GROSS M S, et al. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome [J]. Obesity, 2007, 15(8): 1996–2005.
- [7] GAIDA A M, PELLIZZON M A, RICCI M R, et al. Diet-induced metabolic syndrome in rodent models [R]. Animal Lab News, 2007.
- [8] BREYER M D, BOTTINGER E, BROSIUS F C, et al. Mouse Models of diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16: 27–45.
- [9] REE D A, ALCOLADO J C. Animal models of diabetes mellitus [J]. Diabetic Medicine, 2005, 22: 359–370.
- [10] 田爱平, 郭赛珊, 申竹芳. 高脂饲料与胰岛素抵抗动物模型 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(3): 267–269.