

实验 15 胰岛素和葡萄糖对小鼠血糖的影响

[实验目的与要求]

1. 掌握小鼠抓取和腹腔注射给药的方法。
2. 掌握测定小鼠血糖的方法。
3. 学习葡萄糖耐量实验和胰岛素耐量实验的基本方法。
4. 了解胰岛素和葡萄糖对小鼠血糖的影响。

[实验原理]

小鼠血糖在一定范围内保持动态平衡,这种平衡一旦被打破,则会刺激机体产生相应的代谢补偿,如,当血糖降低时,可激活体内的升血糖代谢,抑制体内的降血糖代谢,经过一段时间(一般为2 h)后,使血糖恢复到正常平衡状态,在这个过程中,胰高血糖素和肾上腺素发挥重要作用;反之,当血糖突然升高时,机体的降糖代谢会被快速激活,使血糖恢复到正常状态,在这个过程中胰岛素发挥重要作用。

小鼠对血糖变化的调节能力称为糖耐现象。如果出现糖耐失衡,则会导致动物发生低血糖、高血糖或糖尿病等症状。小鼠糖耐量一般通过胰岛素耐量实验或葡萄糖耐量实验来检测,用于评估小鼠对葡萄糖的代谢能力,为糖尿病、肥胖、胰岛素抵抗等代谢性疾病的研究和治疗提供理论指导。

胰岛素(Insulin)是由胰岛中的B细胞分泌的,这种B细胞占胰岛细胞的75%。由于其表面特殊的葡萄糖通道蛋白和胞内受体,使得这种细胞有对葡萄糖的感受作用。当血糖升高时,B细胞分泌胰岛素。胰岛素的主要生理作用是促进肝脏和肌肉对血糖的吸收;促进脂肪的合成;促进蛋白的合成。

实验中,向小鼠腹腔中注射大量胰岛素后,可以使血糖浓度降低,如果血糖浓度过低可使组织细胞内可利用的糖缺乏,特别是脑组织内的贮备减少,因其仅靠血糖来供应能量,故对血糖的变化非常敏感。当血糖浓度不低于2.8 mmol/L时,小鼠可通过激活体内的升血糖代谢在约2 h内使血糖回升到正常状态;当血糖浓度低于2.8 mmol/L时,中枢神经系统可出现先兴奋后抑制以致昏迷的现象,称为“胰岛素休克”,表现为流汗、共济失调、惊厥、死亡。如果在出现惊厥时,立即向腹腔内注射葡萄糖,或静脉注射胰高血糖素和肾上腺素便可以缓解惊厥的症状。

反之,如果向小鼠腹腔中注射大量葡萄糖,则可使血糖浓度升高,在一定范围内,小鼠会在约2 h后将血糖调节到正常水平,如果超过小鼠自我调控范围,则会出现高血糖甚至出现尿糖。

[实验对象与器材]

小鼠、注射器及针头、温度计、烧杯、胰岛素(0.2 IU/ml)、20%葡萄糖

[实验方法与步骤]

模型一 小鼠胰岛素耐量实验(Insulin Tolerance Test, ITT)

1. 实验前小鼠禁食4~6 h,可正常饮水。将动物分为两组,对照组和实验组,每组3只,尾部划线编号,称重。
2. 用右手抓取(或用长柄镊轻夹)鼠尾将小鼠提起,置于实验台上,快速用1 L大量杯罩住小鼠身体,将鼠尾在实验台边缘从量杯的杯嘴(倾液嘴)处拉出。在小鼠尾部末端剪掉约

- 1 mm, 断尾取血, 弃去第 1 滴血, 每次取血约 2 μ L (直径约 2 mm 的血滴), 轻触血糖试纸“进血端口”, 8s 后读取并记录血糖数值, 记为零时血糖。
3. 提起鼠尾, 将小鼠置于鼠笼顶部。用右手向后轻拉鼠尾, 在其向前爬行时, 用左手食指与拇指稍用力压住其腰部, 并不断向前移动手指, 直至小鼠耳部, 紧紧抓住两耳及耳间皮肤, 将小鼠背部置于掌心, 无名指或小指压住鼠尾, 中指置于小鼠背下, 使其身体平直, 头部不能自由转动。注意: 一旦出现抓握不牢固, 应立即全部松开小鼠, 将其置于鼠笼顶部, 重新进行抓取。
4. 将小鼠腹面向上, 头部略低, 沿腹中线与股骨之间的腹部 45° 角插入腹腔, 将药物注入腹腔后, 缓慢退出针头。实验组每只注射 0.2 IU/mL 胰岛素 0.15 mL, 对照组每只注射生理盐水 0.15 mL。在注射后, 将小鼠放在 30 ~ 37 °C 环境中保温并观察小鼠状态, 每隔 30 min 测量并记录一次小鼠血糖浓度 (mmol/L), 至给药后 2 h 结束。
5. 实验过程中如小鼠出现角弓反张、乱滚等惊厥反应, 肌肉抽搐、休克等低血糖症状时, 可通过背部皮下注射 50% 葡萄糖来缓解 (不超过 0.1 mL/10g 体重)。
6. 实验结束后, 采用颈椎脱臼法处死小鼠。右手捏住小鼠尾根部, 将小鼠放在笼盖或粗糙台面上, 左手快速按住其头部。右手提起鼠尾, 使其躯干部与台面成约 45° 夹角, 向后上方拉动, 使得其第一颈椎与肩关节脱位, 小鼠立即死亡。
7. 统计各时间点的小鼠血糖数据, 绘制图表, 推断胰岛素和小鼠血糖的关系, 评估小鼠的胰岛素感应性。

模型二 小鼠葡萄糖耐量实验 (Glucose Tolerance Test, GTT)

小鼠葡萄糖耐量实验包括 OGTT (口服葡萄糖耐量实验)、IPGTT (腹腔注射葡萄糖耐量实验) 和 IVGTT (静脉注射葡萄糖耐量实验), 本实验采用 IPGTT 法。

1. 实验前小鼠禁食 4~6 h, 可正常饮水。将动物分为两组, 对照组和实验组, 每组 3 只, 尾部划线编号, 称重。
2. 用右手抓取 (或用长柄镊轻夹) 鼠尾将小鼠提起, 置于实验台上, 快速用 1 L 大量杯罩住小鼠身体, 将鼠尾在实验台边缘从量杯的杯嘴 (倾液嘴) 处拉出。在小鼠尾部末端剪掉约 1 mm, 断尾取血, 弃去第 1 滴血, 每次取血约 2 μ L (直径约 2 mm 的血滴), 轻触血糖试纸“进血端口”, 8s 后读取并记录血糖数值, 记为零时血糖。
3. 提起鼠尾, 将小鼠置于鼠笼顶部。用右手向后轻拉鼠尾, 在其向前爬行时, 用左手食指与拇指稍用力压住其腰部, 并不断向前移动手指, 直至小鼠耳部, 紧紧抓住两耳及耳间皮肤, 将小鼠背部置于掌心, 无名指或小指压住鼠尾, 中指置于小鼠背下, 使其身体平直, 头部不能自由转动。注意: 一旦出现抓握不牢固, 应立即全部松开小鼠, 将其置于鼠笼顶部, 重新进行抓取。
4. 将小鼠腹面向上, 头部略低, 沿腹中线与股骨之间的腹部 45° 角插入腹腔, 将药物注入腹腔后, 缓慢退出针头。实验组每只注射 20 % 葡萄糖 0.3 mL, 对照组每只注射生理盐水 0.3 mL。在注射后, 将小鼠放在 30 ~ 37 °C 环境中保温并观察小鼠状态, 每隔 30 min 测量并记录一次小鼠血糖浓度 (mmol/L), 至给药后 2 h 结束。
5. 实验结束后, 采用颈椎脱臼法处死小鼠。右手捏住小鼠尾根部, 将小鼠放在笼盖或粗糙台面上, 左手快速按住其头部。右手提起鼠尾, 使其躯干部与台面成约 45° 夹角, 向后上方拉动, 使得其第一颈椎与肩关节脱位, 小鼠立即死亡。
6. 统计小鼠血糖数据, 绘制图表, 推断葡萄糖注射量和小鼠血糖的关系, 评估小鼠的葡萄糖耐受性。

[关键技术]

腹腔注射技术

[注意事项]

1. 小鼠腹腔注射，一般左手持鼠，右手持注射器，注入部位位于小鼠左下腹部，刺入后要回抽，无血或其他液体回流才可注入。
2. 动物手术时动作要轻柔，尽量避免对动物的刺激或伤害。
3. 实验用血糖仪的测定范围为 1.1~33.3mmol/L。

[思考题]

1. 如果在实验中给小鼠注射的胰岛素过多，会观察到小鼠的什么反应？为什么？

[创新与设计]

1. 试设计实验来测定小鼠血糖的糖阈，也就是不使尿液中出现葡萄糖的最高血糖含量。
2. 设计实验，观察高血糖对小鼠的影响。
3. 设计实验，研究胰岛素调节血糖的机制，有哪些组织器官参与到血糖调节中？

[参考文献]

1. Biochemistry, Fifth edition, Stryer, 2001.
2. Human physiology, 7th edition, University of Michigan.
3. 生理学（第二版），姚秦主编，人民卫生出版社，2010, 567-579。
4. 生理学实验与指导，王秋娟，中国医药科技出版社，237-240。
5. 生理学实验，解景田，赵静主编，高等教育出版社，2002，188-189。