分类号：R5 单位代码：10752

密 级：公 开 学 号：2010186

**宁夏医科大学 硕士专业学位论文**

**高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型的建立 脂代谢特征的研究**

**The study on the establishment of gestational diabetes mouse model induced by high fat and sugar diet and the characteristics of lipid metabolic**

学 位 申 请 人 ： **张 婕** 指 导 教 师 ： **雷 晨 副 教授** 申请学位门类级别： **医 学**

专 业 名 称： **内 科 学**

研 究 方 向： **妊娠糖尿病** 所 在 学 院： **临床医学院** 论 文 完 成 日 期： **二〇一三年四月**

**宁夏医科大学研究生院**

**Ningxia Medical University**

**Thesis for Application of Master’s Specialized Degree**

**The study on the establishment of gestational diabetes mouse model induced by high fat and sugar diet and the characteristics of lipid metabolic**

Student’s Name: Zhangjie

Supervisor： Leichen professor Subject Category: Medicine

Major: Internal Medicine

Specialty: The gestational diabetes

School: Clinical medicine Completion Date: Apr.2013

**宁夏医科大学学位论文独创性声明**

本人郑重声明： 所呈交的学位论文， 是个人在导师的指导下， 独立进行研究工作所取得的成果， 无抄袭及编造行为。除文中已经特别加以注明引用的内容外， 本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体， 均已在文中以明确方式标明并致谢。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名＿ ＿ ＿ ＿ ＿ 论文导师签名＿ ＿ ＿ ＿ ＿年 月 日 年 月 日

**宁夏医科大学关于学位论文使用授权的声明**

宁夏医科大学有权保留使用本人学位论文， 同意学校按规定向国家有关部门机构送交论文的复印件和电子版，允许被查阅和借阅。本人授权宁夏医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索， 可以采用影印、缩印或其他复印手段保存和汇编本学位论文。可以公布（ 包括刊登） 论文的全部或部分内容。

（ 保密论文在解密后应遵守此规定）

论文作者签名＿ ＿ ＿ ＿ ＿ 论文导师签名＿ ＿ ＿ ＿ ＿

年 月 日 年 月 日

高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型的建立及脂代谢特征的研究

第一部分 高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型的建立 **摘要**

**目的** 通过高脂高糖喂养方法建立一种妊娠糖尿病小鼠模型， 探讨一种稳定、可靠、与人类妊娠糖尿病相似的妊娠糖尿病小鼠模型的制备方法。**方法** 将

C57BL/6J 雌鼠随机分为普通饮食组和高脂高糖饮食组，再将每组分成两个亚组，即普通饮食孕鼠组和普通饮食未孕组，高脂高糖饮食孕鼠组和高脂高糖饮食未孕组。确定受孕成功之日起，普通饮食组继续给予普通饲料喂养，高脂高糖饮食组给予高脂高糖饲料喂养。分别于妊娠第 0、10、18 天测空腹血糖与体重，观察饮水量与尿量变化，妊娠第 18 天测量胰岛素水平并计算胰岛素抵抗指数， 比较孕鼠成模情况。**结果** 高脂高糖饮食喂养孕鼠组空腹血糖水平随孕期逐渐升高，高血糖水平较稳定，体重增加，饮水量与尿量增加，妊娠晚期胰岛素水平及胰岛素抵抗指数增加， 成模率 53.3% 。**结论** 高脂高糖饮食诱导

C57BL/6J 孕鼠建立妊娠糖尿病小鼠模型具有较好的稳定性，更接近人类妊娠糖尿病的发病状况。

**关键词** 高脂高糖饮食， 妊娠糖尿病， 动物模型

第二部分 高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型的脂代谢特

征及肝脏病理学特征**摘要**

**目的**通过测定高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠血胆固醇及甘油三酯水平并进行肝脏病理学检测，探讨妊娠期糖尿病小鼠的脂代谢特征和肝脏病理学特征。**方法**实验第一部分结束后，取血清运用酶联免疫分析法测定血胆固醇及甘油三酯含量；取肝脏组织苏木精-伊红染色法观察肝脏组织病理变化。**结果**高脂高糖饮食孕鼠组小鼠血胆固醇及甘油三酯较高脂高糖饮食未孕组、普通饮食未孕组及普通饮食孕鼠组明显增高。肝脏病理显示，高脂高糖饮食孕鼠组肝板排列不整齐，肝细胞胞浆内可见大小不等的脂肪空泡。**结论**高脂高糖饮食诱导GDM小鼠模型在糖代谢异常的同时也存在脂代谢的异常及肝脏组织的病理变化，与对人类GDM的脂代谢研究一致。

**关键词 ：**妊娠糖尿病； 胆固醇； 甘油三酯； 肝脏

**The study on the establishment of gestational diabetes mouse model induced by high fat and sugar diet and the characteristics**

**Of lipid metabolic**

**The study on the establishment of gestational diabetes mouse model induced by high fat and sugar diet**

**Abstract**

**Objective** By intervention high fat and sugar diet to investigate a gestational diabetes mouse model establishing method which is steady, reliable and similar to human being. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into normal diet group and high -fat and sugar feeding group, and then each group is divided into two subgroups, high fat and sugar diet of pregnant group and high-fat and sugar diet non-pregnant group, normal diet of pregnant group and normal diet non-pregnant group. From the date of pregnancy success, the normal control group was given normal diet, high fat and s ugar feeding group was given high fat and sugar feeding. Before pregnancy and pregnancy 10, 18 days measured fasting plasma glucose and body weight, and observe the water intake and urine output change, the third trimester of pregnancy measuring insulin levels and insulin resistance ind ex, the modeling rate of the gestational diabetes mouse were computed. **Results** In the high fat and sugar diet of pregnant group, the blood glucose levels increased gradually over pregnancy, and were more stable. The body weight of the high fat and sugar feeding group was also

Higher than that in the normal diet group. The insulin levels and insulin resistance index were increased in the third trimester of pregnancy. The molded rate of gestational diabetes is 53.3%. **Conclusion** The high fat and sugar feeding C57BL/6J pregnant mouse to establish a mouse model of gestational diabetes has good stability, and are similar to human being of gestational diabetes.

**Key words:** high fat and sugar feeding; Gestational diabetes; Model

**The characteristics of lipid metabolic of gestational diabetes mouse model induced by high fat and sugar diet**

**Abstract**

**Objective**: The aim of this study to measuring the blood cholesterol and triglyceride levels of the high fat and sugar diet-induced mouse model of gestational diabetes expos ed of the characteristics of lipid metabolic. **Methods:** After the end of the first part of the experiment, the serum blood cholesterol and triglyceride content was me asured using enzyme immunoassay. Observed the pathological changes of liver tissue staining HE. **Results**: The cholesterol and triglycerides of the high fat and sugar pregnant group were higher than the high fat and sugar nonpregnant group, the normal diet nonpregnant group and the normal diet pregnant group. Liver pathology shows that in the high fat and sugar pregnant group the mouse hepatic board arranged irregularly, there are fat vacuoles of varying sizes in the cytoplasm of liver cells. **Conclusion**: The GDM mouse model induced by high fat and sugar diet with abnormal glucose metabolism has abnormal lipid metabolism, and the pathological changes of the liver tissue. They are similar to lipid metabolism of human GDM.

**Key words:** gestational diabetes; Cholesterol; Triglyceride; Animal model

**中英文缩略词**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩略词** | **英文全称** | **中文译名** |
| DM | Diabetes mellitus | 糖尿病 |
| GDM | Gestational diabetes mellitus | 妊娠糖尿病 |
| STZ | streptozotocin | 链脲佐菌素 |
| HOMA | Homeostasis model assessment | 稳态模型 |
| FBG | Fasting blood glucose | 空腹血糖 |
| FINS | Fasting plasma insulin | 空腹胰岛素 |
| HE | hematoxylin-eosin | 苏木精-伊红 |
| IR | Insulin resistance | 胰岛素抵抗 |
| Lep | leptin | 瘦素 |
| TC | Total cholesterol | 总胆固醇 |
| TG | triglycerides | 甘油三酯 |
| IR | Insulin resistance | 胰岛素抵抗 |
| APN | Adiponectin | 脂联素 |

目 录

**[Abstract](#_Toc686735779)** 3

**[Abstract](#_Toc686735780)** 3

[前](#_Toc686735781)[言](#_Toc686735781) 5

[引言](#_Toc686735782) 6

[1 实验材料](#_Toc686735783) 6

[2 实验方法：](#_Toc686735784) 7

[3 观察及监测指标](#_Toc686735785) 8

[结](#_Toc686735786)[论](#_Toc686735786) 12

[引言](#_Toc686735787) 12

[结](#_Toc686735788)[论](#_Toc686735788) 16

[总](#_Toc686735789)[结](#_Toc686735789) 16

[参考文献](#_Toc686735790) 17

前 **言**

糖尿病（diabetes mellitus, DM）是一组由于胰岛素分泌和（或）作用缺陷所引起的以慢性血浆葡萄糖水平增高为特征的代谢性疾病[1]。而糖尿病与妊娠并存时有两种情况：一种是孕前已明确诊断糖尿病且产后仍持续存在糖尿病，此类人群称之为妊娠合并糖尿病；另一种为妊娠糖尿病（gestational diabetes mellitus, GDM），系指在妊娠期首次发现或发生的糖代谢异常，占妊娠期血糖异常人群的80%-90%. GDM病因尚不明确，有观点认为，在妊娠早期因胎儿对葡萄糖的需求致机体的排糖量增加，以及妊娠期雌激素、孕激素等分泌的增多，导致胰岛素分泌增加，出现高胰岛素血症。至妊娠中、后期由于胎盘生乳素和孕酮等拮抗胰岛素作用的激素分泌明显增加，致使周围组织对胰岛素的敏感性随着孕周的增加而下降，此时若胰岛β细胞的分泌功能不能补偿胰岛素抵抗所造成的的胰岛素量绝对或相对不足，将导致血糖升高的发生[2]。新近的研究显示GDM的发生除与上述因素有关之外，还与脂肪细胞因子，炎症因子及遗传基因等相关[3、4]。GDM对孕妇、胎儿，甚至新生儿、婴儿等产生许多不良影响，增加了巨大儿，畸形胎儿及死胎的发生率[5]，也增加了具有2型糖尿病家族史的妇女患心血管疾病的风险[6]。在对不同种族人群进行筛查时发现，GDM患病率因不同种族其患病率不同，而黄种人群是GDM的高发人群[7] 。

GDM是2型糖尿病的高危人群，已成为2型糖尿病患病率增加的重要来源之一。因此对于我国而言，对GDM的研究应予以充分的重视。

由于妊娠期的特殊性，使得很多有创性研究无法开展，在一定程度上限制了对GDM病理生理等方面更深入的研究，因此GDM动物实验模型的建立可以为

GDM有创性研究提供一种良好的研究模型，有助于对GDM更进一步的研究。本实验通过借鉴已有的建立糖尿病动物模型的方法，探求一种与GDM的发生与发展近似的动物模型的制备方法。目前已有的糖尿病动物模型的主要是诱发型、自发型以及转基因型糖尿病动物模型。转基因糖尿病动物模型随着转基因技术

的发展处于不断的探索过程中，技术有待成熟；自发性糖尿病动物模型虽可不经任何人为干预自然发展为糖尿病，与人类糖尿病的发病过程相似，是较理想糖尿病动物模型，但此类动物价格昂贵，种属有限，所需要的饲养和繁殖条件严格，易出现变异，后代个体差异大；胰腺切除法诱导糖尿病模型可出现明显的糖尿病症状，血糖水平稳定且维持时间较长，但存在十二指肠坏死，肝，肾组织中毒性损害等并发症，病死率较高；链脲佐菌素（streptozotocin, STZ）诱导糖尿病动物模型可以根据STZ剂量不同选择性损伤胰岛β细胞，影响胰岛

β细胞分泌胰岛素的功能，是研究糖尿病临床特点及慢性并发症时较可行的动物模型，但制模过程中控制STZ的剂量比较困难；高糖高脂饮食诱导糖尿病动物模型可以通过改变实验动物的饮食结构制备近似人类2型糖尿病的发病过程

的动物模型，有助于关于2型糖尿病的进一步研究[8] 。

建立符合人类GDM发病特点的动物模型，首先需要从机制层面明确GDM的发生过程与机制。一般认为妊娠期高血糖为GDM的主要临床特点，而妊娠期葡萄糖，蛋白质及脂类等营养物质的需求与代谢的异常改变，将导致宫内胎儿过度生长或生长受限等生长发育异常情况的出现，即巨大儿，畸形胎儿的出现。大量研究表明，胰岛素抵抗、体脂含量增加，胰岛β细胞分泌缺陷及遗传易感性是GDM发生的基础。胰岛素抵抗被认为是GDM发生的病理生理基础。胰岛素抵抗时，胰岛素作用的靶器官（主要是肝脏、肌肉和脂肪组织）对胰岛素的敏感性降低，此时如果胰岛β细胞能够代偿性增加胰岛素的分泌，则可维持血糖正常；反之，则出现血糖异常。正常妊娠时胰岛素抵抗程度随着孕周的增加而不断加重，但β细胞代偿性分泌作用尚能弥补增加的胰岛素需求，妊娠晚期这种状态达到高峰，产后随着胎盘娩出，很多抗胰岛素激素和酶类撤退，胰岛素抵抗水平很快恢复至孕前正常水平；而GDM患者的胰岛素抵抗程度较正常孕妇为重，且在妊娠晚期胰岛素抵抗达到高峰时胰岛β细胞代偿性分泌作用无法满足机体对胰岛素的需求，最终导致GDM的发生，GDM患者与血糖正常的孕妇相比，其空腹血糖、空腹胰岛素水平和稳态模型评估胰岛素抵抗指数HOMA-IR

（Homeostasis model assessment-insulin resistance index）均明显升高[ 9 ]。而肥胖是GDM与胰岛素抵抗的高危因素之一。肥胖可诱导具有β细胞功能缺陷的人群出现胰岛素抵抗甚至发展为糖尿病，这种慢性的胰岛素抵抗可发生在人生的任何阶段，包括儿童期、青少年期、中老年期，当然在妇女孕前、孕期及产后也可能出现。妊娠期体重过度增加及肥胖主要是由于妊娠期对脂质的需求增加，摄入过多，代谢缓慢，脂肪在体内过度堆蓄积引起的。脂肪组织不仅是机体主要的能量储存组织，它还能分泌许多生物活性物质如脂联素

（Adiponectin, APN）、瘦素（Leptin）、抵抗素（Resistin）等，这些物质统称为脂肪因子。脂肪因子本身的作用以及它们之间的相互作用，直接或间接的参与了肥胖和GDM的发生与发展。在众多影响胰岛素抵抗与肥胖的因素中，高热量食物的摄入过多是重要因素之一。饮食结构中高热量食物的过多摄入增加了体内脂肪的堆积，在引发肥胖的同时又促进了脂肪因子的分泌，从而通过多种相关途径导致胰岛素抵抗的发生。妊娠期对糖类、脂类及蛋白质等摄入增加，若此时的饮食结构中脂类含量过高，在引起妊娠期肥胖的同时也会引发GDM，故饮食结构的改变对GDM的影响不容忽视。

随着GDM的发病率不断升高，国内外学者已开始对建立GDM动物模型的方法进行探索和研究，各种建模方法不尽相同，但均在一定程度上反应了GDM的发病特点及其所造成的不良结局。现有的糖尿病动物模型的制备方法中备受青睐的方法主要是STZ诱导糖尿病动物模型与高糖高脂饮食诱导动物模型[10] 。

STZ药物诱导糖尿病动物模型是由于STZ对实验动物的胰岛β细胞具有高度选择性毒性作用，可通过损伤胰岛β细胞使胰岛素分泌不足，引起血糖升高，为诱导糖尿病动物模型的常用药物之一，实验动物血糖升高的程度与STZ的使用剂量相关[11]。但因考虑到合理控制STZ的毒性作用与使用剂量，排除其对孕鼠及胎鼠身体机能及组织器官的影响相当困难，故本实验未选择STZ药物诱导糖尿病动物模型方法来建立GDM实验物模型。而高脂高糖饮食诱导糖尿病动物模型通过给予实验动物特定的高脂高糖饲料，即改变实验动物的饮食结构，增加

脂质与糖类的摄入，使其血浆胰岛素增加的同时，诱发实验动物出现肥胖、内脏脂肪堆积，分泌较多的脂肪因子，胰岛素生物学作用显著下降，引起了胰岛素作用的靶器官对胰岛素作用的敏感性降低，诱导出胰岛素抵抗，即糖尿病发病特点之一。此法更贴近GDM的发生过程与病理生理特点，故我们选用高脂高糖饮食诱导法建立GDM实验物模型，旨在通过运用高糖高脂饮食诱导GDM实验动物模型的建立的同时观察实验动物脂代谢的变化和肝脏的病理变化状况，获得一种稳定、可靠，与人类妊娠糖尿病相似的GDM制备方法。

**第一部分高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型建立**

引言

近年来随着社会经济条件的改善GDM的发病率不断升高。GDM是妊娠期常见的并发症之一，它不仅影响妊娠结局，增加了巨大儿、畸形胎儿及死胎的发生机率，并且有研究显示妊娠期患GDM的妇女其自身及子代远期患糖尿病及代谢综合征的可能性明显增加。目前关于GDM的发病机制尚未完全明确，但多数研究已证实胰岛素抵抗是其发病的病理生理学基础。然而引起胰岛素抵抗的因素众多，其中肥胖与饮食结构中脂肪含量的增加是相当重要的因素。妊娠期妇女体重会明显增加，正常范围内的体重增加是为了满足妊娠这一特殊生理现象的代谢需求。但妊娠期过度体重增加将导致妊娠期肥胖，继而可能出现糖耐量异常、胰岛素抵抗、乃至GDM的发生。肥胖者体内存在大量肥大的脂肪细胞，其对胰岛素作用的敏感性低，能够引起胰岛素敏感性下降与糖代谢异常，主要表现为糖耐量降低，甚至进一步可发展为糖尿病。肥胖者胰岛素抵抗和高胰岛素血症的高发生率也反过来证明了肥胖是这两种状态发生的主要原因。肥胖能够引起妊娠期妇女代谢机制的诸多变化，而胰岛素抵抗是其中心环节之一[12]。

本实验通过改变实验动物的饮食结构，给予实验动物高脂高糖饲料喂养诱发其体重增加或肥胖的同时出现病理性胰岛素抵抗，从而制备出GDM实验动物模型，为GDM病理生理等方面的研究提供一个良好的近似于人类GDM发生与发展的实验动物模型，该模型的建立有助于更深入的研究GDM，从而不断完善GDM的治疗和预防策略，改善围生期结局。

**实验材料和方法**

# 1 实验材料

## 1.1 实验动物：

健康清洁级C57BL/6J小鼠，雌鼠90只，雄鼠30只，满八周龄，体重20-25g，购于北京维通利华实验动物技术有限公司(SCXK(京) 2012-0001)；普通实验动物饲料（北京科澳协力饲料有限公司）；实验所用小鼠均置于通风良好，温度22-26℃，相对湿度40%-70%的饲养室内。雌雄鼠分笼喂养，自由进水饮食，定期更换垫料。

## 1.2 实验试剂与耗材

|  |  |
| --- | --- |
| 小鼠胰岛素酶联免疫分析试剂盒 | 华美生物科技有限公司/中国 |
| 10%甲醛 | 为民生物科技有限公司/中国 |
| 水合氯醛 | 为民生物科技有限公司/中国 |
| 罗氏血糖试纸 | 罗氏活力型/德国 |
| EP 管 | Eppendorf 公司/德国 |

## 1.3 实验仪器

|  |  |
| --- | --- |
| 海尔超低温保存箱(**-**80℃) | DW-86L486/中国 |
| 海尔低温保存箱(-20℃) | BCD-U32V/中国 |
| 海尔血液保存箱(4℃) | HYC-610/中国 |
| 电子称 | 恒平设备有限公司/中国 |
| 离心机 | Hermle Z323K/德国 |
| 血糖仪 | 罗氏活力型/德国 |
| 包埋机 | 孝感亚光 YB-6LF/中国 |
| 超薄切片机 | Leica/德国 |
| 光学显微镜 | Olympus/日本 |
| 图像采集系统 | Olympus/日本 |
| 超纯水器 | 优普 UPT/中国 |
| 洗板机 | Bio-Rad 1575 型/美国 |

|  |  |
| --- | --- |
| 酶标仪 | Bio-Rad 680 型/美国 |
| 恒温箱 | 上海无相 DHP-9052/中国 |
| 微量加样器 | Eppendorf 公司/德国 |

# 2 实验方法：

## 2.1 实验动物分组与模型制作

### 2.1.1 实验动物分组

所有小鼠普通实验动物饲料适应性喂养两周后，将所有雌鼠按照随机数字表，随机分为两组，普通饮食组和高脂高糖饮食组，再将每组分成两个亚组，即普通饮食孕鼠(NP)组和普通饮食未孕(NV)组，高脂高糖饮食孕鼠（HP）组和高脂高糖饮食未孕(HV)组。

### 2.1.2 模型制作

HP组与NP组，雌鼠与雄鼠按2: 1的比例合笼，次日晨检查阴道栓或阴道分泌物涂片镜检发现精子者记为妊娠0天，标记孕鼠计算孕期。

### 2.1.3 实验动物的喂养

普通饮食组给予普通实验动物饲料喂养，高脂高糖组给予自制高脂高糖饲料喂养，所有小鼠自由进食饮水。普通饲料为全价营养饲料，高脂高糖饲料在普通饲料的基础上添加了猪油，蛋黄，白糖。（高脂高糖饲料自制：包含15%猪油，10%蛋黄，10%白糖,65%普通实验动物饲料）。

### 2.1.4 妊娠糖尿病小鼠成模标准：

孕鼠于妊娠晚期空腹血糖≥5.1mmol/l。根据FPG、胰岛素（FINS）水平及胰岛素抵抗指数，均有明显升高，提示高糖高脂饮食喂养的妊娠期小鼠符合妊娠期糖尿病患者病理性IR的特点。

## 2.2 标本采集

### 2.2.1 血液样本采集及处理

（1）断尾取血：取血前禁食，分别于妊娠第0、10、18天，先将小鼠固定，将鼠尾置于预先准备的热水中浸泡数秒，使其尾部的血管充盈，之后擦干尾部，用75%的医用酒精对尾部进行消毒，剪刀减去尾尖约2mm,让血液滴在血糖试纸上，测量空腹血糖。采血结束，对伤口进行消毒并压迫止血。

（2）眼球取血：禁食12小时后，于妊娠第18天10%水合氯醛（4ml/kg）腹腔注射麻醉小鼠，左手食指与拇指捏住小鼠双耳及颈部皮肤，小指固定尾部，轻压取血侧眼部皮肤，使眼球充血突出，用弯镊快速夹取该侧眼球，根据需要捻动食指与拇指，使血液垂直流入1.5mlEP管中。将血样在室温静置2小时后，以300Or/min离心20分钟，分离血清，将上清移至清洁的1mlEP管中，置于-80℃冰箱保存备用。

### 2.2.2 组织病理标本采集

固定实验动物麻醉后，用75%的医用酒精对腹部进行皮肤消毒，沿腹部正中作T形剪开（至膈肌所在平面），同时将腹部肌肉剪开，暴露肝脏，将肝脏上下与其他组织器官连接的血管、韧带及结缔组织剪断。肝脏组织质地很脆，不要用力撕扯，韧带一般都是透明的，钝性分离即可。翻开胃的背面，贴在胃窦后面与十二指肠关系紧密的白色、较脂肪颜色发暗的部分即为胰腺，将其与周围的组织，韧带钝性分离即可。将取得的肝脏和胰腺组织，置入包埋盒中，放入盛有10%甲醛的瓶中固定。

# 3 观察及监测指标

## 3.1 观察指标

每天观察小鼠尿量及饮水量的变化以及孕18天子鼠的一般情况。

## 3.2 监测指标

### 3.2.1 体重：采用电子秤于妊娠第0、10、18天称重。

### 3.2.2 空腹血糖(fasting blood glucose，FBG)测定:禁食后，隔日血糖仪测空腹血糖。

### 3.2.3 空腹胰岛素(fasting plasma insulin，FINS)测定:运用酶联免疫吸附法进行检测。

①实验原理：

用纯化的抗胰岛素抗体包被固相载体（即酶标板各微孔）表面，依次向各微孔中加

入标准品和待测样本，样本中若含有相应抗原即与固相抗体结合，洗涤去除未结合成分再加入该抗原的特异性的酶标记抗体（辣根过氧化物酶标记的亲和素），固相表面若无抗原结合，加入的酶标记抗体就不能与固相结合，经过彻底洗涤后去除未结合的酶标记抗体，最后加入底物，由于酶的催化而显色。样品中的胰岛素的浓度和显色的深浅呈正相关。

②试剂盒组成及试剂配制：

|  |  |
| --- | --- |
| 酶标板 | 1 块（96 孔） |
| 标准品 | 2 瓶（冻干品） |
| 样品稀释液 | 2\*20ml/瓶 |
| 生物素标记抗体稀释液 | 1\*10ml/瓶 |
| 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液 | 2\*20ml/瓶 |
| 生物素标记抗体 | 1\*120ul/瓶 |
| 辣根过氧化物酶标记亲和素 | 1\*120ul/瓶 |
| 底物溶液 | 1\*10ml/瓶 |
| 浓洗涤液 | 1\*20ml/瓶 |
| 终止液 | 1\*10ml/瓶 |

③样本稀释倍数：

血清样本用样品稀释液进行1: 200倍稀释后进行检测，具体操作如下：

a.取5ul样本加入到45ul的样品稀释液（1:10稀释）中混匀。

b.再从上述稀释液中取15ul加入到285ul样品稀释液（1:20稀释）中混匀。以上二步完成后得到的即为1: 200倍稀释后的样本。

④标准品的稀释原则：

使用前将装有标准品的试剂瓶置于离心机内6000转/分钟，离心1分钟。每瓶标准品用样品稀释液稀释至1ml，盖好瓶盖室温下静置10分钟以上，此时标准品浓度为

1000nIU/ml，依次稀释出浓度分别为1000 nIU /ml, 500 nIU /ml,250 nIU /ml,125nIU

/ml,62.5 nIU /ml,31.2nIU /ml的标准品，样品稀释液直接作为标准浓度0ng/ml，使

用前配制，用完丢弃，现配现用。

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标准品 | S0 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 |
| 浓度(nIU/ml) | 0 | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62.5 | 31.2 |

⑤生物素标记抗体的稀释原则：

打开瓶盖前将生物素标记抗体试剂瓶置于离心机内6000转/分钟，离心1分钟，

收集瓶壁上的溶液。使用前用生物素标记抗体稀释液按1: 100的比例稀释，轻轻混匀，现用现配。

⑥辣根过氧化物酶标记亲和素的稀释原则：

打开瓶盖前将辣根过氧化物酶标记亲和素试剂瓶置于离心机内6000-10000转/分

钟，离心30秒，收集瓶壁上的溶液。使用前以辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液按1: 100的比例稀释，轻轻混匀，现用现配。

⑦操作步骤：

a.准备：将各种试剂移至室温(18-25℃)下静置三十分钟。提前配制好所用的各种试剂，将待测样品依序排列好。配制洗液，将浓洗涤液用蒸馏水1: 25稀释，混匀后备用。

b.加样：分别设空白孔，标准孔及待测样品空。空白孔加样品稀释液100ul,余空分别加标准品或待测样品100ul。加样时尽量将样品加于酶标板孔底部，不触及孔壁，避免产生气泡，晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜，置于恒温箱(37℃)内，温育120分钟。

c.加生物素标记抗体工作液：弃去孔内液体，吸水纸上拍干，切勿洗涤。各孔加入生物素标记抗体工作液100ul，置于恒温箱(37℃)内，温育60分钟。

d.洗板：温浴60分钟后，弃去孔内液体，吸水纸上拍干，洗板机洗板3次，每次

浸泡1-2分钟，200ul/每孔，拍干。

e.加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液：每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液

100ul, 置于恒温箱(37℃)内，温育60分钟。

f.洗板：温浴60分钟后，弃去孔内液体，吸水纸上拍干，洗板5次，每次浸泡1-2分钟，200ul/每孔，拍干。

g.加底物溶液：依序每孔加底物溶液90ul，酶标板覆膜，置于恒温箱(37℃)内，避光显色（15-30分钟内，当肉眼可见前3-4孔的标准品显蓝色，呈明显的梯度变化，后3-4孔未见明显显色，此时终止反应即可。

h.加终止液：依序每孔加终止液液50ul，此时蓝色立即转为黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液e的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，底物溶液的反应时间到后应尽快加入终止液。

i.测光密度：用Bio-Rad酶标仪在450nm波长依序测量各孔的光密度（OD值）。在加终止液后15分钟以内进行检测。

j.计算浓度：利用专业软件“Curve Exert 1.3”，制作标准曲线，计算样品浓度。

### 3.2.4 胰岛素抵抗（IR）判定标准:

运用稳态模型（HOMA）计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)，计算公式为：

HOMA-IR = FBS x FINS /22.5，判断胰岛素抵抗程度。HOMA-IR数值越大表明外周组织对胰岛素敏感越低，胰岛素抵抗越强。

### 3.2.5 组织病理形态学检查

胰腺组织与肝脏组织置于10%甲醛溶液中固定24小时，取组织块厚度0.5cm左右，对组织进行常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片（厚度4μm）和苏木素-伊红(HE)染色。

①蜡块制作步骤：

a．冲水：将10%甲醛固定好的组织块流水冲洗十分钟。

b．脱水：由低浓度的乙醇开始，依次递增乙醇浓度，直至无水酒精对组织进行脱水。具体操作：分别依次将组织放置于70%乙醇30分钟,80%乙醇30分钟,95%乙醇30分钟，无水乙醇Ⅰ30分钟，无水乙醇Ⅱ30分钟，。（脱水是为了有机溶剂更好的渗入，故脱水的程度将影响下一步组织的透明及石蜡的浸入，注意把控脱水的时间及条件。）

c．透明：将脱水后的组织分别依次放入二甲苯（Ⅰ）和二甲苯（Ⅱ），各25分钟，使组织充分透明。

d．浸蜡：将已透明的组织块完全浸入熔化的石蜡内1小时，期间保持熔蜡箱的温度恒定（约65℃），切勿太高或太低。其目的主要在于去除组织中的透明剂，使石蜡充

分渗入组织中，具有一定的硬度和韧度，便于被切成薄片。

e．包埋：将处理好的组织按照一定顺序放入包埋盒内，位置居中，然后将已经熔化的石蜡迅速的加入包埋盒内，贴标签于其反面，然后放于冰箱中加速其冷冻。待石蜡冷冻后，将其修饰成大小适中的蜡块。

f.切片：开始做作连续切片，厚度为4μm，每切5片选一片贴与载玻片上，将切好的玻片放入恒温箱1h后拿出，恢复至室温备用。

②HE染色步骤： a．石蜡切片室温放置5-10分钟。

b．二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ各 10 分钟。c．梯度酒精按顺序：无水乙醇Ⅰ2分钟，无水乙醇Ⅱ1分钟，95%乙醇30秒，80%

乙醇30秒，70%乙醇30秒。

d．水冲洗 3-4 次。e．苏木素染色5-10min. f．水冲洗2-3次。

g．1%盐酸酒精数秒。h．水冲10-15min. i．伊红染色1min. j．水冲洗浮色

k．梯度酒精依次：80%乙醇30秒，95%乙醇30秒，无水乙醇Ⅰ1分钟，无水乙醇Ⅱ

3分钟。

l．二甲苯Ⅰ2分钟、二甲苯Ⅱ各3分钟。m．中性树胶封片上镜观察。

本实验通过宁夏医科大学总医院医学伦理委员会审核。

## 3.3 统计学处理：

采用SPSS11.0软件进行统计分析，所有数据以*x*s表示，两组间的比较采用t检验，多组间比较采用方差分析，P＜0.05差异具有统计学意义。

**结果**

### 1. GDM小鼠模型的成模情况

30只给予高脂高糖饲料喂养的孕鼠中，14只孕鼠血糖水平至孕晚期升高不明显，未

达到成模标准（空腹血糖≥5.1mmol/l）；最终16只孕鼠达到成模标准，纳入高脂高糖孕鼠（HP）组，成模率53.3%。30只给予普通饲料喂养的孕鼠血糖水平正常平稳，但其中5只孕鼠血糖升高（空腹血糖≥5.1mmol/l），故将其排除普通饮食孕鼠(NP)组，现NP组有孕鼠25只。

### 2. 各组小鼠及子鼠一般情况观察

## 2.1 各组小鼠一般情况变化

HP组至妊娠中期（孕10天左右）较对照组饮水量，尿量明显增加，肉眼观察，HP组与NP组、NV组、HV组同时更换垫料，但HP组明显其它组潮湿，HP组较NP组体重增加，差异具有统计学意义(P＜0.05)。普通饮食组及HV组饮水及尿量未见明显异常表现。HV组较NV组体重增加，但差异无统计学意义(P＞0.05)。（见表1）

表 1 不同时期各组小鼠体重变化的比较(g)

| 组别 数量（只） 孕 0 天体重(g) 孕 10 天体重(g) 孕 18 天体重(g) |
| --- |
| NV 组 15 21.70±0.87 22.06±0.22 22.60±0.66  HV 组 15 21.86±0.81 22.43±0.86 23.47±0.89  NP 组 25 21.72±0.88 27.40±1.37 31.83±2.59  HP 组 16 21.73±0.92 28.47±1.78\* 34.47±3.62\*  P 值 0.829 0.000 0.000 |

注：HP组与NP组比较，\*示P＜0.05

## 2.2 子鼠一般情况比较

NP组羊水清亮，胎盘鲜红，未见出血，子鼠基本发育正常. HP组羊水浑浊，胎盘颜色较深，子鼠体质量较 NP 组增大，少数出现流产及死胎等发育异常的胚胎。3.各组小鼠妊娠空腹血糖及胰岛素水平

## 3.1 各组小鼠妊娠不同时期空腹血糖水平

于妊娠中期（约孕10天）起，HP组空腹血糖较NP组、NV组及HV组明显升高，差异具有统计统计学意义(P＜0.05)；HV组血糖有所升高，但较NV组差异无统计学意义（P

＞0.05）。（见表2）

表 2 不同时期各组小鼠空腹血糖变化的比较（mmol/L）

| 组别 数量 孕0 天血糖（mmol/L） 孕10 天血糖（mmol/L） 孕18 天血糖（mmol/L） |
| --- |
| NV 组 15 4.90±0.65 4.78±0.63 5.27±0.45  HV 组 15 4.89±0.60 4.84±0.64 5.38±0.46  NP 组 25 4.97±0.58 4.40±0.45 4.26±0.39  HP 组 16 4.80±0.51 5.48±0.38\*▲ 6.12±0.67\*▲  P 值 0.861 0.000 0.000 |

注：HP组与NP组比较，\*表示P＜0.05；HP组与NV组比较，▲表示P＜0.05。

## 3.2 妊娠晚期空腹胰岛素水平及胰岛素抵抗指数的比较

在妊娠晚期（约孕18天左右）测定各组小鼠空腹胰岛素水平，HP组较NP组、NV组及HV组明显升高，差异具有统计学意义(P＜0.05)；NP组较NV组和HV组升高，但只与NV组的差异具有统计学意义(P＜0.05)；HV组较NV组升高，但差异不具有统计学意义(P＞0.05)。（见表4）

利用稳态模型（HOMA）,计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)，公式为：HOMA-IR = FBG x FINS /22.5，它反映胰岛素抵抗水平，其数值越大，表明外周组织对胰岛素越不敏感，胰岛素抵抗越强。HP组较NP组、NV组及HV组胰岛素抵抗指数明显升高，差异具有统计学意义(P＜0.05)；HV组胰岛素抵抗指数较NV组升高，但差异不具有统计学意义（P

＞0.05）。（见表3）

表 3 孕18天各组小鼠胰岛素水平及胰岛素抵抗指数的比较

| 组别 数量（只） FBG(mmol/L) FINS(mIU/L) HOMA-IR |
| --- |
| NV 组 15 5.27±0.45 15.76±1.24 3.74±0.41  HV 组 15 5.38±0.46 17.52±2.85 4.26±0.84  NP 组 25 4.26±0.39 19.67±1.43△ 3.76±0.33  HP 组 16 6.12±0.67\* 21.57±4.29\*▲ 5.99±1.16\*▲  P 值 0.000 0.000 0.000 |

注：HP组与NP组比较，\*表示P＜0.05；HP组与NV组比较，▲表示P＜0.05；NP组与NV组比较，△表示P＜0.05。

4.胰腺的病理变化

镜下观：HE染色后光镜下观察胰腺组织切片，NV组可见正常胰岛细胞均呈圆形或椭圆形，分布均匀，胰岛结构完整；HV、NP组可见不同程度的胰岛细胞的肥大，胰岛结构完整，边缘规则；HP组，胰岛边缘不规则，胰岛内细胞分布不均匀，有明显增生。（图1）

**讨论**

伴随GDM发病率的不断增长，对它的各方面研究备受关注。但由于妊娠期的特殊性，无法开展一些有创性研究，使人们对GDM的深入认识受到了限制，而理想的GDM动物模型的建立无疑将为深入的研究GDM的病因、发病机制及有效的防治提供了一种良好的研究基础与平台。关于妊娠糖尿病动物模型的建立方法国内学者做了大量的探索与研究，虽然方法不尽相同，但是都一定程度的反应了GDM的临床特点与对子代的远期影响。故本实验借鉴已有的建立糖尿病动物模型的方法，并结合GDM的发病机制进行GDM动物模型建立的探索。目前已有很多建立糖尿病动物模型的方法并日趋成熟，其中主要有自发性糖尿病动物模型，诱发性糖尿病动物模型以及转基因糖尿病动物模型等。自发性动物模型相似性好，但复制难度大，价格昂贵。采用链脉菌佐菌素或四氧嘧啶破坏胰岛β细胞以及部分胰腺切除的方法制备GDM动物模型可能对孕鼠及胎鼠造成损伤。高脂饮食诱导糖尿病动物模型，通过改变饮食结构复制糖尿病的发病过程，比较符合糖尿病的临床特点。基于肥胖是GDM发生的高危因素之一，胰岛素抵抗是GDM发生的病理生理基础，已有很多通过高脂高糖饲料制备糖尿病动物模的成功例子，为我们通过高糖高脂饮食诱导GDM动物模型提供宝贵经验，所以本实验采用了高脂高糖饮食诱导C57BL/6J孕鼠的方法来制备GDM动物模型。

高糖高脂饮食诱导糖尿病动物模型的方法备受青睐，主要由于高糖高脂饮食诱导建立糖尿病动物模型是通过给予实验动物特定的高脂高糖饲料，改变其饮食结构，使其胰岛素分泌明显增加，胰岛素敏感指数明显下降，从而诱导出了胰岛素抵抗，即糖尿病发病特点之一。同时高脂高糖饲料还可以致使实验动物内脏脂肪过度堆积，分泌大量脂肪因子。新近研究显示，增加的内脏脂肪分泌的脂肪因子，如瘦素、脂联素等直接或间接地参与了胰岛素抵抗。高脂高糖饮食本身是诱导肥胖和胰岛素抵抗的危险因素之一，人类或动物长期食用高脂高糖食物均可能出现胰岛素抵抗。此方法更近似于人类患糖尿病的发病过程。高脂高糖饲料是否成功地诱发实验动物产生胰岛素抵抗，与高脂高糖饲料

中脂肪的构成、高脂高糖饲料的不同加工方式、实验动物摄入总热量的变化、实验动物模型形成时间、实验动物品系与性别方面的差异以及有无化学物质辅助诱导等诸多因素相关[13]。本实验中给予的高脂高糖饲料中脂肪以猪油为主，猪油是一种饱和脂肪酸甘油酯，已证实过多摄入饱和脂肪与肥胖及胰岛素抵抗密切相关，饱和脂肪主要被机体所储存，少量被脂解动员用于氧化供能，大量的甘油三酯在肝脏组织、脂肪组织中聚集，引起胰岛素效应的靶器官如肝脏组织、肌肉组织等对胰岛素的敏感性下降，产生胰岛素抵抗。所以通过高脂高糖饮食诱导制备的GDM动物模型与人类GDM的发病过程中产生的胰岛素抵抗的临床特点相类似。本实验特设立HV组和NV组进行比较，是为了排除由妊娠期胎盘分泌的各类具有拮抗胰岛素作用的激素和酶类对胰岛素抵抗产生的作用，进一步证实在妊娠期高脂高糖饮食可以引起胰岛素抵抗，运用高脂高糖饮食诱导C57BL/6J孕鼠能够成功制备与人类GDM发病特点近似的动物模型。

本实验中所选择的实验动物为C57BL/6J小鼠，主要由于它是一种具有ob/ob遗传背景的变异系小鼠，而ob/ob小鼠是瘦素（leptin，Lep，ob基因产物）缺乏小鼠，其肌肉和肝脏组织中存在多种胰岛素信号通路传导系统的损害，从而引起肝脏组织脂肪细胞生成和肝糖原异生增加，血糖升高，进而刺激胰岛β细胞分泌更多胰岛素，加重胰岛素抵抗，形成恶性循环。研究显示C57BL/6J小鼠的代谢缓慢，对高脂高糖饮食诱导下血糖升高的作用比较敏感，与人类代谢性疾病（如糖尿病、代谢综合征等）的代谢特征相似，因此，运用C57BL/6J小鼠加以高脂高糖饲料诱导方法常被用来模拟人类2型糖尿病及胰岛素抵抗综合征的发病特征，制备胰岛素抵抗及糖尿病动物模型[14]。故本试验利用

C57BL/6J小鼠自身代谢特点、妊娠期的特殊病理生理改变以及高脂高糖饮食的诱导制备

GDM动物模型。

本实验结果显示，HP组与NP组相比较，在孕10天，孕18天体重增加，血糖升高，差异具有统计学意义，并且HP组较NP组饮水量，尿量明显增加，肉眼观察，HP组与其它组同时更换垫料，但HP组明显较其它组潮湿，出现典型的多饮、多食、多尿的糖尿病临床特点。HV组较NV组体重有所增高，差异具有统计学意义，血糖亦有所升高，但差异并无统计学意义，说明C57BL/6J小鼠代谢缓慢，高糖高脂饮食诱导可使其在短期

内出现肥胖，但并未出现高血糖症状。血清胰岛素水平测定显示，HP组胰岛素水平明显增高，较其它三组差异有统计学意义；NP组较HP组胰岛素水平低，较NV组胰岛素水平高，差异具有统计学意义，较HV组无明显差异，说明正常妊娠期存在着胰岛素抵抗，但较GDM时轻微。HV组较NV组胰岛素水平有所升高，但差异无统计学意义，说明高脂高糖饮食可诱导C57BL/6J小鼠出现胰岛素水平升高。本实验进一步证实了孕鼠在妊娠期存在着普遍的胰岛素抵抗，致使胰岛素水平升高，即出现生理性胰岛素抵抗，而孕鼠的血胰岛素水平更高，胰岛素抵抗较正常妊娠严重，出现病理性胰岛素抵抗，进而表现出糖尿病的临床特点。本实验通过高糖高脂饮食诱导建立的GDM小鼠模型能够模拟出

GDM病程中的胰岛素抵抗的基本病理生理变化，接近GDM的发病特点。

通过反复多次实验，我们认为需要注意以下几点：1）实验动物的选择。小鼠发育迅速，性成熟早，6-7周龄已性成熟，但最好选择9-10周龄的小鼠进行受孕，保证其发育已成熟，营养状况及身体条件较稳定，具有较强的抵抗力。2）受孕时间的选择。通过观察雌鼠2-3个动情周期，在动情周期进行合笼，可明显提高受孕率。3）造模后的饲养。造模后孕鼠尽量分笼饲养，给予充分的水与食物，避免相互争斗。孕鼠尿量增多，易感染，需勤换垫料，保持动物笼干燥清洁。

结 **论**

高糖高脂饮食诱导C57BL/6J孕鼠建立GDM小鼠模型接近人类妊娠糖尿病的发病特点。

**第二部分高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型脂代谢特征 及肝脏病理学特征**

引言

目前关于GDM的发病机制尚未完全明确，可由多种因素共同作用引起，主要表现为伴随妊娠期的进展，机体对胰岛素敏感性逐渐下降，为了代偿妊娠期胰岛素敏感性下降所造成的胰岛素相对不足，胰岛β细胞代偿性增生肥大从而增加胰岛素的分泌来，但是如果此时大量分泌的胰岛素仍不能满足机体对胰岛素的需求，则会由胰岛素抵抗、高胰岛素血症，发展为GDM，因此胰岛素抵抗(insulin resistanee, IR)和胰岛β细胞分泌降低是GDM发病机制中的重要环节。所谓IR是指机体对一定量的胰岛素的生物学反应低于预计正常水平的一种现象。胰岛素生物学作用除了能够降低血糖以外，它还能够促进[糖原](http://baike.baidu.com/view/455401.htm)、[脂肪](http://baike.baidu.com/view/16.htm)、[蛋白质](http://baike.baidu.com/view/15472.htm)的合成，故胰岛素的分泌与机体的三大代谢（糖、脂和蛋白质代谢）息息相关。在脂肪代谢方面，由于胰岛素能够促进脂肪的合成与贮存，抑制脂肪的分解氧化，使血中游离[脂肪酸](http://baike.baidu.com/view/25233.htm)减少。患糖尿病时由于胰岛素抵抗出现高胰岛素血症，大量的胰岛素可造成脂肪组织摄取葡萄糖及从血浆中移除甘油三酯减少，脂蛋白酶的活性降低，脂肪合成与贮存减少，分解作用加强，血中游离脂肪酸和甘油三酯的浓度升高，血脂升高，出现脂肪代谢紊乱。近年来有动物实验及临床研究表明，大量脂肪在肌肉、肝脏和胰岛β细胞等组织的聚集是糖尿病发病机制中重要的获得性因素，因而认为脂代谢的障碍有可能是糖尿病及其并发症的原发性病理生理变化。血循环中非脂肪细胞（主要是肝细胞、肌细胞、胰岛β细胞）内脂质含量过多可通过各种有关途径导致胰岛素抵抗的发生及引起胰岛β细胞脂性凋亡和分泌胰岛素功能缺陷。

目前的研究表明，GDM的代谢异常与脂肪细胞因子、炎性因子、遗传基因及胰岛素抵抗有一定的相关性，但这些因素之间的相关性和显著性尚未明确。

GDM的代谢异常除表现为糖代谢异常外，还可表现出脂肪代谢异常，脂肪合成

减少，分解增加，血脂升高。本实验旨在通过对高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型的血甘油三酯和胆固醇水平的测定，以及对肝脏组织病理学特征的观察，进一步证实模型存在与人类GDM相一致的脂代谢异常。

**实验材料和方法**

1.主要试剂和耗材

|  |  |
| --- | --- |
| 小鼠甘油三酯（ TG）酶联免疫分析试剂盒 | 华美生物科技有限公司/中国武汉 |
| 小鼠胆固醇（ CH）酶联免疫分析试剂盒 | 华美生物科技有限公司/中国武汉 |

2.监测指标及方法

## 2.1 胆固醇（CH）的测定：

利用之前实验所留取的血清标本，采用酶联免疫吸附法进行测定。

### 2.1.1 实验原理：

用纯化的小鼠胆固醇包被固相载体（即酶标板各微孔）表面，依次向各微孔中加入标准品和待测样本，再加入该抗原的特异性的酶标记抗体（辣根过氧化物酶标记的亲和素），经过彻底洗涤后去除未结合的酶标记抗体，加底物后显色。样品中的胆固醇的浓度和显色的深浅呈负相关。

### 2.1.2 试剂盒组成及试剂配制：

|  |  |
| --- | --- |
| 酶联板 | 一块（ 96 孔） |
| 标准品 | 6\*0.5ml/瓶 |
| 样品稀释液 | 2\*20ml/瓶 |
| 辣根过氧化物酶标记抗体 | 1\*6ml/瓶 |
| 底物溶液 | 1\*10ml/瓶 |
| 浓洗涤液 | 1\*20ml/瓶 |
| 终止液 | 1\*10ml/瓶 |

### 2.1.3 样本稀释倍数：

血清样本用样品稀释液进行1: 10000倍稀释后进行检测，具体操作如下：

①取1ul样本加入到99ul的样品稀释液（1:100稀释）中混匀；

②再从上述稀释液中取3ul加入到297ul样品稀释液（1:100稀释）中混匀。

③以上二步完成后得到的即为1: 10000倍稀释后的标本。

### 2.1.4 操作步骤：

①准备：将各种试剂移至室温(18-25℃)下静置三十分钟。配制洗液，将浓洗涤液用蒸馏水1: 25稀释，混匀后备用。

②加样：在酶标板上分别设标准孔和检测孔，标准孔中加入不同浓度的标准品各50ul；其余每个检测孔分别直接加入待测样本50ul，之后分别在各空立即加入辣根过氧化物酶标记抗体50ul。加样过程中尽量将样品加于酶标板空底部，不触及孔壁，不要有气泡，晃动混匀。酶标板覆膜，置于恒温箱(37℃)内，温育60分钟。

③加底物溶液：温育60分钟后，取出酶标板，弃去板内液体，吸水纸上拍干，用洗板机洗板5次，每次洗涤液200ul/每孔浸泡约1-2分钟，拍干。依序向每孔内加底物溶液90ul。

④显色反应：酶标板覆膜置于恒温箱(37℃)内，避光显色20分钟。可视显色情况适当调整显色时间。当肉眼可见前3-4孔的标准品显蓝色，呈明显的

梯度变化，后3-4孔未见明显显色，此时终止反应即可。

⑤终止反应：依序每孔加终止液50ul，此时蓝色立转黄色。底物液的加入顺序与终止液的加入顺序应相同。底物反应时间到后应尽快加入终止液，可保证实验结果的准确性。

⑥测光密度：用Bio-Rad酶标仪在波长450nm上依序测量酶标板上各孔光密度（OD值）。尽可能在加完终止液后迅速的进行检测。

⑦计算浓度：利用专业软件“Curve Exert 1.3”，制作标准曲线，计算样品浓度。

## 2.2 甘油三酯（TG）测定：

利用之前实验所留取的血清标本，采用酶联免疫吸附法进行测定。

### 2.2.1 实验原理

用纯化的抗甘油三酯抗体包被固相载体（即酶标板各微孔）表面，依次向各微孔中加入标准品和待测样本，样本中若含有相应抗原即与固相抗体结合，洗涤去除未结合成分，加入该抗原的特异性的没标记抗体（辣根过氧化物酶标记的亲和素），固相表面若无抗原结合，加入的酶标记抗体就不能与固相结合，经过彻底洗涤后去除未结合的酶标记抗体，加底物后显色。样品中的胰岛素的浓度和显色的深浅呈正相关。

### 2.2.2 试剂盒组成及试剂配制：

|  |  |
| --- | --- |
| 酶标板 | 1 块（ 96 孔） |
| 标准品 | 2 瓶（冻干品） |
| 样品稀释液 | 2\*20ml/瓶 |
| 生物素标记抗体稀释液 | 1\*10ml/瓶 |
| 辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液 | 2\*20ml/瓶 |
| 生物素标记抗体 | 1\*120ul/瓶 |
| 辣根过氧化物酶标记亲和素 | 1\*120ul/瓶 |
| 底物溶液 | 1\*10ml/瓶 |
| 浓洗涤液 | 1\*20ml/瓶， |
| 终止液 | 1\*10ml/瓶 |

### 2.2.3 样本稀释倍数：

血清样本用样品稀释液进行1: 2000倍稀释后进行检测，具体操作如下：

①取2ul样本加入到98ul的样品稀释液（1: 50）中混匀。

②再从上述稀释液中取6ul加入到234ul样品稀释液（1:40稀释）中混匀。

③二步完成后得到的即为1: 2000倍稀释后的样本。

### 2.2.4 标准品的稀释原则：

使用前将装有标准品的试剂瓶置于离心机内6000转/分钟，离心1分钟。每瓶临用前以样品稀释液稀释至1ml，盖好瓶盖室温下静置10分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解，此时标准品浓度为4000ng/ml，之后做系列倍比稀释，

分别稀释为4000ng/ml, 2000ng/ml, 1000ng/ml, 250ng/ml, 125ng/ml,

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标准品 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 |
| 浓度（ ng/ml） | 4000 | 2000 | 1000 | 250 | 125 | 62.5 |

62.5ng/ml，样品稀释液直接作为标准浓度0ng/ml，用前15分钟内配制完成，用完毕后丢弃，下次检测时使用重新配制的新鲜标准品。

### 2.2.5 生物素标记抗体的稀释原则：

打开瓶盖前将生物素标记抗体试剂瓶置于离心机内6000转/分钟，离心1分钟，收集瓶壁上的溶液。使用前以生物素标记抗体稀释液稀释液按1: 100的比例稀释，轻轻混匀，在使用前现配现用。

### 2.2.6 辣根过氧化物酶标记亲和素的稀释原则：

打开瓶盖前将辣根过氧化物酶标记亲和素试剂瓶置于离心机内6000转/分钟，离心30秒，收集瓶壁上的溶液。临用前以辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液稀释，如10u辣根过氧化物酶标记亲和素加990ul辣根过氧化物酶标记亲和素稀释液的比例配制，轻轻混匀，现配现用。

### 2.2.7 操作步骤

①准备工作：将各种试剂移至室温(18-25℃)下静置三十分钟。提前配制好所用的各种试剂，将待测样品依序排列。试剂或样品稀释时，均需晃动混匀，混匀时尽量避免起泡。加样时，枪头切勿沿孔壁加样，应直接对准液面。

②加样：在酶标板上分别设立空白孔、标准孔、待测样本孔。空白孔加入样品稀释液100ul/每孔，余空分别加标准品或待测样品100ul/每孔，加样过程中注意尽量不要产生气泡，将样品加于酶标板每空底部，尽可能不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板覆膜，置于恒温箱(37℃)内，温育120分钟。

③加生物素标记抗体工作液：弃去孔内液体，吸水纸上拍干。（切记勿洗涤）向各孔依序加入生物素标记抗体工作液100ul（按比例配制：取1ul工作液加99ul生物素标记抗体稀释液，轻轻混匀，尽可能在使用前一小时内配制），

置于恒温箱(37℃)内，温育60分钟。

④洗板：温育60分钟结束后，弃去所有孔内液体，吸水纸上拍干酶标板，使用洗板机洗板3次，每次洗涤液200ul/每孔浸泡约1-2分钟，拍干。

⑤加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液：向已拍干的各孔依序加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液100ul/每孔，置于恒温箱(37℃)内，温育60分钟。

⑥洗板：温育60分钟结束后，弃去所有孔内液体，拍干酶标板，使用洗板机洗板5次，每次洗涤液200ul/每孔浸泡约1-2分钟，拍干。

⑦加底物溶液：各孔依序加入底物溶液90ul，将酶标板覆膜后置于恒温箱

（37℃）内避光显色（15-30分钟），当肉眼可见前3-4孔的标准品显蓝色，呈明显的梯度变化，后3-4孔未见明显显色，此时终止反应即可。

⑧加终止液：依序向各孔加入终止液50ul，此时孔内溶液由蓝色立转为黄色，反应终止。终止液加入的顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。底物反应时间到后应立即加入底物溶液，以保证实验结果的准确性。

⑨测光密度：使用Bio-Rad酶标仪在波长450nm上依序测量酶标板上各孔的光密度（OD值）。需要在加终止液后15分钟以内检测完毕。

⑩计算浓度：利用专业软件“Curve Exert 1.3”，制作标准曲线，计算样品浓度。

## 2.3 组织病理形态学检查

肝脏组织置于10%甲醛溶液中固定24小时，取组织块厚度0.5cm左右，对组织依次进行常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片（厚度4μm）和苏木素-伊红(HE)染色，最后光学显微镜下观察组织病理变化。（见第一部分3.2.5①② ）

### 3. 统计学处理

采用SPSS11.0软件进行统计分析，所有数据以*x*s表示，两组间的比较采用t检验，多组间比较采用方差分析，P＜0.05差异具有统计学意义。

**结 果**

### 1. 血中脂代谢指标的变化

本实验中在妊娠晚期（孕18天），HP组小鼠TG和TC较NP组、NV组及HV组均明显升高，差异具有统计学意义(P＜0.05)；HV组小鼠血较TG和TC 较

NV组及NP组均有升高，差异具有统计学意义(P＜0.05)；NP组TG和TC较NV组有所升高，差异不具有统计学意义(P＞0.05)。（见表4）

表 4 孕18天各组小鼠血甘油三酯及胆固醇的变化（mg/dL）

| 组别 数量（只） TC( mg/dL) TG( mg/dL) |
| --- |
| NV 组 15 41.96±8.86 45.54±4.79  HV 组 15 54.67±6.14△ 60.66±5.84△  NP 组 25 44.70±13.66 47.82±5.28  HP 组 16 58.01±12.18\* ▲ 65.39±7.34\* ▲  P 值 0.000 0.000 |

注：HP组与NP组比较，\*表示P＜0.05；HP组与NV组比较，▲表示P＜0.05；

HV组与NV组比较，△表示P＜0.05.

### 2. 肝脏的病理变化

镜下观：HE染色后光镜下观察, NV组小叶结构清晰，肝细胞板排列较整齐，肝细胞形态正常，大小均匀；HV组肝小叶结构基本正常，肝索呈放射状排列，部分胞浆内可见少量脂肪空泡；NP组肝细胞大小尚均匀，部分胞浆内可见少量脂肪空泡；HP组孕鼠肝板排列不整齐，肝小叶结构不清，小叶内细胞索结构紊乱，肝细胞胞浆内可见大小不等的脂肪空泡。（图2）

**讨 论**

随着对GDM研究不断深入，GDM期间机体代谢的变化不容忽视。GDM患者除存在糖代谢异常以外，还存在着不同程度的脂代谢异常。由于妊娠期的特殊性，母体需要摄入大量的脂类营养物质，以满足母体自身需要和胎儿正常发育需要，正常妊娠者血脂水平也会随孕周增加而升高，至妊娠晚期各项血脂指标，如甘油三酯，胆固醇等都明显高于妊娠早中期，更高于非妊娠期。这与血中具有高度脂介作用的人胎盘泌乳素水平相关，它随孕周增加而升高，与妊娠时血脂升高这一正常生理变化相平行，这些变化都与为了满足胎儿正常发育所需、导致孕妇摄入脂类营养物质增加相一致[15、16 ]。正常妊娠时血脂的升高为生理性的高脂血症并无病理意义，血脂水平随着糖代谢异常程度加重而升高。GDM时由于出现了病理性的胰岛素抵抗，糖代谢明显异常，血脂的升高也将更加明显，脂代谢紊乱也成为GDM的病理生理特点之一。

本实验中NP组小鼠血TG和TC高于NV组，但差异不具有统计学意义。但这与以往研究已证实的孕期存在生理性高血脂表现相一致。既往研究显示，正常妊娠期孕妇TG、vLDL-c、LDL-c和HDL-C均高于健康的未孕妇女，且随着孕周的增加，血脂水平逐步升高，于妊娠晚期血脂水平达到高峰，至产后其逐渐恢复正常，这可能是孕期维持胎儿正常生长发育的适应性变化，也可能是因为妊娠期肠道对脂肪吸收能力增强，以及体内孕激素和人胎盘泌乳素(HPL)和其他引起胰岛素抵抗因素的增强共同作用所导致[ 16 ] 。

高脂高糖饮食诱导后，雌鼠血糖、血脂（甘油三脂和胆固醇）含量明显升高，其中孕鼠甘油三脂和胆固醇水平升高更为明显。在本实验中HP组小鼠TG和TC较NP组、NV组及HV组均明显升高，差异具有统计学意义(P＜0.05)。由于GDM时出现胰岛素抵抗，胰岛β细胞代偿性的分泌大量的胰岛素，机体处于高胰岛素状态，胰岛素可以通过促进肌肉、脂肪组织细胞上的葡萄糖载体将葡萄糖转运至细胞内，提供用于合成甘油三酯的所需的甘油及脂肪酸，促进脂肪的合成

和贮存，降低血游离脂肪酸含量；同时通过抑制脂肪组织内的激素敏感性脂肪酶，抑制脂肪细胞中脂肪的分解氧化，减缓脂肪动员的速率，进一步促使脂肪蓄积。因此机体脂肪代谢旺盛，血脂升高，出现高血脂血症，进而出现一系列的组织器官的病理改变。GDM动物模型模拟出在妊娠晚期处于病理性胰岛素抵抗状态下，机体分泌大量胰岛素，加重了体内脂肪的蓄积，形成了胰岛素抵抗

-高血脂之间的恶性循环的状态。

膳食中的脂肪是机体的重要营养素，脂肪的主要功能是为机体供给能量与储存能量。肝脏组织是脂类代谢的主要部位，血液中的脂肪酸进入肝细胞胞浆后，主要有如下几个途径进行代谢：①将脂肪酸氧化为二氧化碳与酮体；②参与磷脂和胆固醇的合成；③在α-磷酸甘油的参与下合成甘油三酯，甘油三酯通过载脂蛋白的形式进入血液。肝细胞能合成脂肪，但不储存脂肪。肝细胞最常发生脂肪变性的细胞。脂肪变性表现为甘油三酯（中性脂肪）过多的蓄积于细胞胞浆中，这可能由营养障碍、感染、中毒和缺氧的等因素引起。在肝细胞脂肪酸代谢过程中的某一个或多个环节，由于下列因素的作用发生异常时，便可引发脂肪变性：①肝细胞胞浆内脂肪酸过度增多；机体缺氧所致肝细胞糖酵解过程生成的乳酸转化为大量脂肪酸；肝细胞内脂肪酸也可因其氧化过程地低下而相对增多；高脂饮食或皮下、大网膜等处脂肪组织大量分解可致血液中脂肪酸的含量增加；②缺氧、营养不良（蛋白质缺乏、饥饿、糖尿病等）和肝毒物质使载脂蛋白减少、进而脂蛋白减少，甘油三酯无法进入血液，而蓄积于肝细胞胞浆中。在本实验中，HP组孕鼠肝脏组织经HE染色显微镜观察发现肝板排列不整齐，小叶内细胞索结构紊乱，肝细胞胞浆内可见大小不等的脂肪空泡

（因为脂肪被制片时的有机溶剂所溶解），考虑是由于妊娠期肠道吸收脂肪能力增强，脂肪较久较多的积存，脂肪酸含量增加，大量脂肪酸进入肝细胞胞浆，合成甘油三酯及胆固醇等，但GDM时载脂蛋白合成减少，导致甘油三酯不能全部与其结合形成极低密度脂蛋白，由肝细胞分泌入血，剩余未结合的甘油三酯在肝细胞内大量蓄积，形成肝细胞的脂肪变性，进一步可能发展为脂肪肝。加

之高脂高糖饲料的诱导加重了脂肪的蓄积，加速了的代谢异常及脂肪变性的发生。NP组的肝脏组织细胞胞浆内也有少量的脂肪空泡的出现是正常妊娠期脂代谢变化，出现生理性的高脂血症所引起的，肝细胞的脂肪变性通常不引起肝功能的障碍。HV组肝脏细胞增大，胞浆内出现少量空泡，可能是由于小鼠持续食用高脂高糖饲料，加之C57BL/6J小鼠本身代谢缓慢，造成过多的脂质在体内尤其是肝脏组织蓄积，肝细胞胞浆内脂肪酸增多，甘油三酯合成增加，引起肝脏的病理变化。但NP组较HV组，肝细胞包浆出现的空泡多，且肝细胞排列不整齐，肝细胞内脂质的沉积较明显，说明妊娠本身对肝脏脂代谢有显著的影响，甚至可引起明显的肝脏病理变化，故对妊娠期脂代谢的变化对孕妇生理病理方面产生的影响应予以足够的重视，预防其发展为异常的脂代谢，进而出现一系列妊娠期代谢性疾病，如GDM、妊娠期肥胖等。

综上所述，本实验通过高脂高糖饮食诱导法成功建立与人类GDM胰岛素抵抗情况相似的妊娠糖尿病小鼠模型，此模型在出现糖代谢异常的同时还伴有脂代谢的异常，血脂水平的检测均有明显升高，通过对肝脏组织的病理切片进行

HE染色发现肝细胞包浆内出现大小不等的脂肪空泡，较普通饮食孕鼠组组明显，说明两组都存在不同程度的脂肪变性，符合人类妊娠期脂代谢变化特点，故本实验动物模型可以作为研究GDM病理生理变化及机制的理想的动物模型。

结 **论**

高脂高糖饮食诱导GDM小鼠模型在糖代谢异常的同时也存在脂代谢的异常及肝脏组织病理变化，与对人类GDM的脂代谢研究一致。

总 **结**

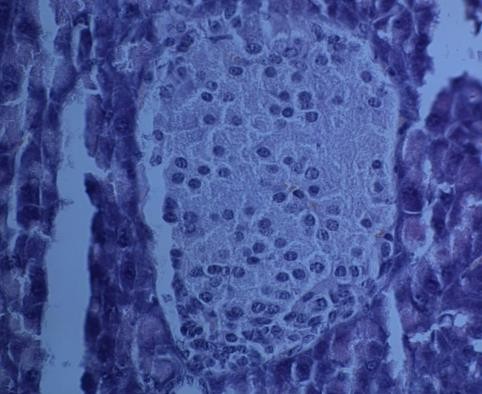
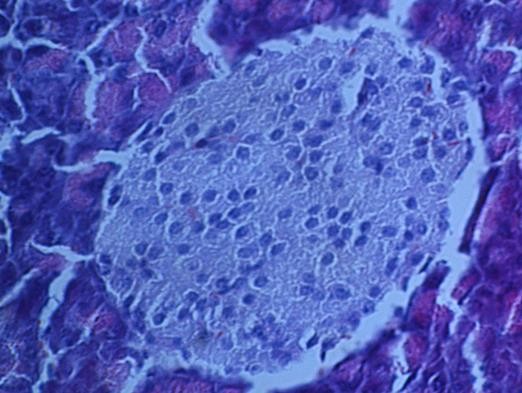
1. 高糖高脂饮食诱导C57BL/6J孕鼠建立GDM小鼠模型接近人类妊娠糖尿病的发病特点。

2.本研究结果表明：高糖高脂饮食诱导C57BL/6J孕鼠建立的GDM小鼠动物模型与普通饮食孕组相比出现体重增加、体内脂肪堆积、胰岛素抵抗程度加重、出现明显的糖代谢与脂代谢异常，符合人类GDM病理性胰岛素抵抗及脂代谢异常的临床特点。

3.病理学特征显示，高糖高脂饮食诱导C57BL/6J孕鼠肝细胞胞浆内出现脂肪空泡，考虑存在脂肪变性。

**附 图**

图1 各组小鼠胰腺组织病理变化



NV组(HE stain×400) HV组(HE stain×400 )



NP组(HE stain×400) HP组(HE stain×400 )

图2 各组小鼠肝脏组织病理变化



NV组(HE stain×400) HV组(HE stain×400 )



NP组(HE stain×400) HP组(HE stain×400 )

参考文献

[1] AmericanDiabetesAssociation. DiagnosisandClassificationof Diabetes. Mellitus Diabetes Care, 2011, 34(S1): 62-69.

[[2] 朱亚莉](http://search.cnki.com.cn/Search.aspx?q=author%3A%E6%9C%B1%E4%BA%9A%E8%8E%89), [邓冰](http://search.cnki.com.cn/Search.aspx?q=author%3A%E9%82%93%E5%86%B0), [孙袁](http://search.cnki.com.cn/Search.aspx?q=author%3A%E5%AD%99%E8%A2%81). 胰岛素分泌异常与胰岛素抵抗在妊娠期糖尿病发病中的作用. 贵阳医学院学报, 2009, 34(3): 294-297.

[3] 赵曼林, 冯玉昆. HLAⅡ类基因与妊娠期糖尿病相关性的研究. 国外医学妇幼保健分册, 2005, 16(3); 150-152.

[4] kuzmick M, Telejko B, Szamatowicz J, et al. High resistin and interleukin-6 levels are associated with gestational diabetes mellitus. Gynecol Endocrinol, 2009, 25(4): 258-263.

[5] Reece EA, Ji I, Wu YK, et al. Characterization of differential gene expression indiabetic embryopathy using DNA microarrysis. AmJ obstet Gynecol, 2006, 16(3): 150-152.

[6] Darcy B. Carr, Kristina M. Utzschneider, Rebecca L. Hull, JennyTong, et al. Gestational Diabetes Mellitus Increasesthe Risk of Cardiovascular Disease in Women With a Family History of Type 2 Diabetes. Diabetes Care, 2006, 29(9): 2078-2083.

[7] Dana Dabelea, Janet K. Snellbergeon, Cynthia L. Hartsfield, et al Increasing Prevalence of Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Over Time and by Birth Cohort. Diabetes Care, 2005, 28(3): 25-27.

[8] 田婷, 马向华, 沈捷. 2型糖尿病动物模型的研究概况. 医学综述, 2011, 17(6): 905-909

[9] 张丽丽. 高脂饮食诱导妊娠期胰岛素抵抗大鼠糖脂代谢特征. 现代妇产科进展, 2009, 20(6): 446-449.

[10] 李聪然, 游雪甫, 蒋建东. 糖尿病动物模型及研究进展. 中国比较医学杂志, 2005, 15（1）: 59-63.

[11] S. Lenz en. The mechanisms of alloxan - and streptozotocin-induced. Diabetes Diabetologia, 2008, 51: 216–226.

[12] Cooksey RC, McClain DA. Increased hexosamine pathway flux and high fat feeding are not additive in inducing insulin resistance: evidence for a shared pathway [J]. Amino Acids, 2011, 40(3): 841-6.

[13] 田爱平, 郭赛珊, 申竹芳． 高脂饲料与胰岛素抵抗动物模. 中国药理学通报, 2006, 22(3): 267-269.

[14] Cedric Asensio, Philippe Cettor-Rose, Claudia Theander-Carrillo, et al. Changes in glycemia by Leptin administration or high -fat feeding in rodent models of Obesity/Type 2 Diabetes suggest a link between resistin expression and control of glucose homeostasis. Endocrinology, 145(5): 2206–2213.

[15] Tiikkainen M, Tamminen M, Hakkinen AM, et al. Liver-fat accumulation and insulin resistance in obese women with previous gestational diabetes [J]. Obes Res, 2002, 10 (9): 859 - 867.

[16] 董科娜, 付艳芹, 张苏河. PI3KP85a在高脂高糖喂养妊娠期大鼠肝脏中的表达及其与胰岛素抵抗的关系[J]. 中国现代医药杂志， 2010, 12(10): 10-13.

**文献综述**

糖尿病动物模型的建立

**摘要：**随着生活水平的提高，生活方式的转变，糖尿病的患病率不断升高，糖尿病动物模型的建立对于研究和预防糖尿病及其并发症有重要意义。目前已知的糖尿病动物模型主要有：自发性动物模型，诱发性动物模型，转基因动物模型等几大类。本文通过对不同种类糖尿病动物模型的介绍和比较，旨在掌握糖尿病动物模型的研究现状，便于在今后的实验研究中合理的对实验动物进行择优选择。

**关键词**： 糖尿病； 动物模型； 实验

糖尿病是一组以慢性血浆葡萄糖水平增高为特征的代谢性疾病，是由于胰岛素分泌和（或）作用缺陷引起的。伴随着经济的快速发展，生活水平的不断提高，生活方式的转变，糖尿病的患病率迅速提高。2008-2009年我国所做的糖尿病患病率调查显示，我国总体人群的9.7%人群为糖尿病患者，对于糖耐量异常的患者而言，其发生比例更高，但糖尿病的病因和发病机制至今尚未完全阐明，现可明确它是由复合病因引起的综合征，包括遗传及环境因素等多种因素共同作用的结果。糖尿病的临床表现常被描述为“三多一少”，即多尿、多饮、多食和体重下降。糖尿病可以降低患者的生活质量，可引起多系统损害，导致多组织器官的慢性进行性病变、功能减退及衰竭。由于受到人体研究和医学伦理学的限制，造成针对糖尿病更深入的研究不能实现，因此建立成熟的糖尿病动物模型尤为重要。本文针对近年来糖尿病及相关研究中常用的动物模型进行综述。

1.自发性糖尿病动物模型

自发性糖尿病动物模型是指实验动物为未经任何人工的处置，在自然情况

下所形成的糖尿病模型，包括人工培育的突变系和近交系的各种模型。这种模型的最大优点是疾病的发生，发展与人类很相似，均是在自然条件下发生的疾病，其应用价值很高，但来源较困难，饲养条件苛刻，价格昂贵，不易于大量应用。其动物模型中主要分为自发性糖尿病小鼠动物模型和自发性糖尿病大鼠模型。

1.1自发性糖尿病小鼠动物模型

1.1.1 ob/ob小鼠

ob/ob小鼠是最早用于糖尿病研究的基因模型之一[1]。从C57/6J品系小鼠中筛选出来的6号常染色体隐性遗传性基因突变小鼠[2,3 ]，为典型的单基因突变型2型糖尿病动物模型之一。1994年证实ob/ob小鼠中ob基因呈突变形式，且为纯合子[4]。ob/ob小鼠基因改变，主要使瘦素（leptin, Lep, ob基因产物）缺乏，并且造成肌肉和肝脏存在多种胰岛素信号通路传导系统受到损害，从而引起肝脂肪生成和肝糖原异生，发生血糖升高，而高血糖可以再次刺激胰岛素分泌，诱发胰岛素抵抗，造成恶性循环。ob/ob小鼠出现糖尿病症状的轻重主要取决于遗传背景，典型的临床表现为肥胖，明显的高血糖及高胰岛素血症。该鼠四周龄时开始出现肥胖、高胰岛素血症、高血糖的表现[5]，十二周龄后被发现存在糖耐量受损，并开始出现肝脏脂肪变性和炎症病变，二十周龄后出现左心室肥厚伴心脏射血功能下降[6 ]。ob/ob小鼠在八周龄出现与人类糖尿病肾病（diabetic nephropathy, DN）早期形态学特征类似的肾脏改变，包括足细胞的丧失和蛋白尿的出现，

蛋白尿出现十周后可检测到系膜增厚，十八周龄后出现典型的DN晚期特征，如严重的系膜增厚，肾小球系膜溶解及持续性足细胞丢失的等。ob/ob小鼠广泛应用于2型糖尿病及糖尿病肾病的研究。

1.1.2 db/db小鼠

db/db小鼠是典型的单基因突变导致的2型糖尿病动物模型，与ob/ob小鼠类似，其也是一种常染色体隐性遗传性突变的小鼠模型。1966年Jackson实验

室发现C57BL/KsJ品系小鼠可以自发出现的瘦素受体基因（db），并呈常染色体隐性遗传[7]。该系小鼠是由于4号常染色体瘦素受体（Lepr）的Janus蛋白酪氨酸激酶基因位点发生突变衍生而来[8]。由于4号染色体的变异，Lepr的转录异常，致db/db小鼠瘦素作用不足，血内胰岛素浓度过高而出现暴食，从而造成小鼠过度肥胖，高血糖。该鼠在八周龄左右出现空腹血糖及血浆甘油三酯浓度升高[9]，十二周后出现糖耐量受损和高胰岛素血症[10]。多年来db/db小鼠被作为预防肥胖、轻度高血糖干预治疗模型。

1.1.3非肥胖糖尿病（Nonobese diabetic, NOD）小鼠

NOD小鼠可以自发地发展为1型糖尿病，是由JCR-ICR品系小鼠衍生出的白内障易感亚系糖尿病小鼠近亲杂交产生的。NOD小鼠发生的糖尿病为多基因遗传病，主要由于T细胞（CD4和CD8）介导引起β细胞损伤导致胰岛素分泌不足

[11]. 其主要发病特征是胰岛炎，大量的白细胞侵润胰岛，使之逐渐受损，继而

导致糖尿病发生，可以出现多尿、体重下降、酮尿等症状。发病鼠以雌性居多，雌雄之比约为9: 1[12]。这些模型的小鼠在近5周龄时自然发生自身免疫性β细胞破坏。NOD小鼠是对1型糖尿病研究最充分的小鼠模型[13]，故目前多用于人类年轻消瘦型糖尿病的药物筛选研究。

1.2自发性糖尿病大鼠模型

1.2.1 OLETF（Otsuka Long-Evans Tokushima fatty）大鼠

OLETF大鼠源于Long-Evans超重大鼠近交而产生[14]。此种鼠能自发地形成长期高血糖以及糖尿病大血管和微血管损伤，与人类的2型糖尿病相似。有研究显示，OLEFT糖尿病大鼠胰腺功能减退一方面与胰岛β细胞变性，胰岛纤维化，炎性细胞浸润，胰腺萎缩，腺体重量减轻有关，另一方面与肥胖，内脏脂肪重量增加，胰岛素敏感性减退，胰岛素抵抗有关[15]。该鼠由于对胆囊收缩素刺激无反应[16]，引起其食欲亢进和肥胖，胰腺内、外分泌功能降低，此鼠可出现2型糖尿病的典型特征，如多食，多饮，多尿和肥胖，能缓慢地自然产生糖尿病肾病，有高糖，高血脂，蛋白尿表现。OLETF大鼠存在性别差异，雌性

较雄性的发病率明显低下，发病更迟[17]。该大鼠可用于2型糖尿病的饮食、运动及药物等干预治疗的研究。

1.2.2 GK大鼠

GK大鼠是非肥胖的自发性糖尿病动物模型[18]，由远交系Wistar大鼠中经过OGTT选出个别轻度糖耐量降低鼠，经10代左右反复交配，形成自发性非肥胖2型糖尿病鼠种，简称GK大鼠(Goto-Kakizaki Rat). GK大鼠β细胞功能受损先于其空腹高血糖和高胰岛素血症的出现，胰岛β细胞形态和功能的缺陷主要受遗传基因决定[19]。该鼠主要表现为糖耐量受损，胰岛β细胞分泌受损，空腹血糖升高、肝糖原合成增加、外周组织出现不同程度的胰岛素抵抗等，随着病程的发展可出现糖尿病的各种并发症[20]。GK大鼠在2型糖尿病的研究中应用广泛，尤其是在并发症研究中的应用备受关注。

1.2.3 zucker糖尿病肥胖(zucker diabetic fatty, ZDF)大鼠

ZDF大鼠由于瘦素受体基因突变从而导致多食，导致肥胖[21],同时伴有高胰岛素血症、高血糖、高脂血症、蛋白尿和中度高血压[ 22 ]。该鼠在十二周龄出现高胰岛素血症和高甘油三酯血症，随后出现高血糖，十三至十五周龄后随着年龄的增长出现收缩压和舒张压功能障碍[23]。该鼠广泛用于糖尿病并发症研究及药物干预实验。

2诱发性糖尿病动物模型

诱发性糖尿病动物模型是指研究者使用物理、化学或生物的治病因素作用于实验动物，造成动物组织，器官或全身一定的损害，出现类似人类糖尿病时的功能，代谢障碍或形态结构方面的病变。该模型的特点是能在短时间内复制出大量的动物模型，并能严格的控制各种条件使复制出的动物模型适合研究目的的需要。现主要制备方法为胰腺切除法、化学药物诱发法和高脂饲料诱导法来制备糖尿病实验动物。

2.1胰腺切除法

Mehring及Minkowski在1890年首先发现切除狗的胰腺后可使其发生糖尿

病。多数动物在切除大部分胰腺（80%~90%）或结扎胰管后，残存的胰岛受到高糖饮食刺激后，会发生胰岛β细胞功能衰竭，进而形成永久性的糖尿病。使用此方法是多选用较大的实验动物，如家兔、狗或猪等，其次是大鼠。此方法中若需获得具有良好的健康状况动物模型，只能做胰腺部分切除。如切除全部胰腺，可制成无胰性糖尿病动物模型，需补充外源性的胰岛素及胰酶等，实验动物才能存活。该方法可用于轻度高血糖而不伴有体重减轻的糖尿病动物模型的制备。

2.2化学药物诱发性糖尿病动物模型

2.2.1四氧嘧啶（Alloxan）

四氧嘧啶进入机体后可被β细胞摄取，产生过量的自由基，诱导β细胞的损伤及坏死，导致胰岛素分泌水平的降低，进而导致高血糖[24]。四氧嘧啶能够选择性破坏多种属动物的胰岛β细胞从而引起糖尿病，但是四氧嘧啶在破坏胰岛β细胞的同时，也可以造成肝、肾组织中毒性损害，大剂量的四氧嘧啶可导致动物酮症酸中毒而死亡。使用四氧嘧啶制备糖尿病动物模型时，部分动物的高血糖状态不稳定，可随时间推移，高血糖症状逐渐缓解，故此类模型已经很少应用。

2.2.2链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)

STZ是从链霉素中提取的一种抗生素，具有抗菌，抗肿瘤的作用，STZ对实验动物的胰岛β细胞具有高度选择性毒性作用，可使胰岛β细胞急性破坏，导致胰岛素分泌不足，血糖升高，是诱导糖尿病动物模型的常用药物之一[25]。链脲霉素致动物模型的成模率和成模效果受给药方式，给药剂量及给药途径等多种因素的影响。关于大鼠、小鼠使用STZ诱导糖尿病动物模型的方法和剂量，在文献中有很多不同的报道[26 - 28]。相对于四氧嘧啶，STZ的优点在于：可以通过控制给药剂量和给药次数选择建立糖尿病动物模型；且STZ具有高度选择性，对实验动物的其他组织损伤性小；STZ诱导的糖尿病动物模型成模率高，成模后高血糖状态稳定性高，成模后动物模型的死亡率低。

2.3高脂饲料喂养模型

高脂饲料诱导糖尿病动物模型是由于高脂饲料影响葡萄糖刺激胰岛细胞的胰岛素分泌[29]；可减弱胰岛素抑制肝糖输出的能力[30]；可导致骨骼肌葡萄糖摄取减少[31]，增加胰岛素抵抗状态。其作用机制可能与胰岛素受体及胰岛素受体底物蛋白表达量及磷酸化减少，葡萄糖运载体表达及转位异常，影响磷脂酰肌醇3激酶、蛋白激酶B和非典型蛋白激酶C的活性改变等胰岛素信号传导中的诸多环节相关，改变胰岛素的作用。影响高脂饲料诱导胰岛素抵抗动物模型的关键因素有：①饲料脂肪构成及摄入热量，②高脂饲料的加工方式，③模型的形成时间，④实验动物的品系及性别差异，⑤是否使用化学药物进行辅助诱导。因此在利用高脂饲料诱导胰岛素抵抗动物模型的过程中，要综合考虑多个因素的影响作用，充分利用有利作用，方可成功建立糖尿病动物模型。目前用此法成功建立的糖尿病动物模型有：（1）沙鼠：给予高能量饮食后，沙鼠最初表现为饮食过量、肥胖、高胰岛素血症、糖耐量受损而胰岛细胞正常，之后逐渐出现胰岛β细胞受损、坏死、导致胰岛素缺乏和明显的2型糖尿病。（2）C57BL/6J小鼠：日本杰克森实验室给予非肥胖、非糖尿病C57BL/6J小鼠高能量来诱导其发生糖尿病，主要表现为肥胖、高胰岛素血症、胰岛素抵抗和糖耐量受损。

3.转基因糖尿病动物模型

转基因糖尿病动物模型是指借助高科技手段控制实验动物的特定基因组分及其表达，如重新指导功能基因表达的水平和/或位点；将外来基因转移到实验动物体内；阻止目标基因的表达；或以特异的基因变异株取代原基因等进行造模。但此类科学研究科学性强，所需技术复杂，普遍开展存在困难，因条件高，只有部分开展。现有情况中主要有KKAy小鼠和Tex101-ICER小鼠两类糖尿病鼠制备方法。

3.1 KKAy小鼠

KKAy小鼠是KK小鼠的同源品系，在携带糖尿病基因的同时，人工转入了黄色肥胖基因（Ay），Ay基因不仅影响小鼠的毛色而且可引起代谢紊乱。其纯合

子均在胚胎期死亡，而杂合子则表现出严重的肥胖、胰岛素抵抗、高胰岛素血症、高血糖和黄色皮毛[32]。KKAy小鼠自16周龄开始出现肥胖、多尿症状，高血糖、高胰岛素血症、高脂血症。高脂饲养的KKAy小鼠腹膜脂肪组织的趋化因子及受体表达上调[ 33 ]；此品系小鼠肾脏和心脏组织的有关氧化酶表达比注射链尿佐菌素的小鼠明显，但血糖和血脂水平没有后者明显[ 34 ]。KKAy小鼠常作为预防肥胖和轻度高血糖的干预治疗研究实验动物模型。

3.2 Tex101-ICER小鼠

Tex101-ICER小鼠是典型的直接抑制胰岛素转录基因而使胰岛素分泌缺失，形成1型糖尿病动物模型。ICER作为一种基因转录因子，可竞争性地与胰岛素编码基因起始位点结合，导致其它激活胰岛素编码基因的转录因子无法与胰岛素编码基因配对，从而终止胰岛素的转录过程，造成胰岛素的合成出现障碍，导致高血糖。

糖尿病是遗传因素和环境因素共同作用而产生的代谢疾病。现有的动物模型制备方式主要针对其基因及模拟环境进行制备。转基因糖尿病动物模型的建立是随着转基因技术的发展在不断的成熟和广泛应用，现有条件下的动物模型多使用自发性糖尿病动物模型和诱发性糖尿病动物模型方法来制备，其中自发性糖尿病动物模型减少了人为因素的干扰，更接近人类糖尿病的发病过程，是较理想的糖尿病动物模型，但此类动物模型制备时，价格昂贵，制备数量有限，所需要的饲养和繁殖条件较高，并且近交系动物易出现变异，繁殖后代个体差异大，而诱发性糖尿病动物模型中的胰腺切除糖尿病模型虽可造成明显的糖尿病症状，血糖比较稳定且维持时间较长，但有十二指肠坏死，肝，肾组织中毒性损害等并发症，死亡率较高。现常用链脲佐菌素致糖尿病动物模型可以根据链脲佐菌素的剂量，选择性损伤胰腺β细胞功能，药物作用时间短，对机体其他组织影响较小，是研究糖尿病发病机理及并发症中较可行的模型，但制模过程中控制STZ的剂量比较困难。队友研究2型糖尿病重要的高糖高脂饲养糖尿病动物模型，可以模拟2型糖尿病的发病机制和发病过程，有助于关于2型糖

尿病的进一步研究。糖尿病是由遗传和环境等多种因素引起的，而在已知糖尿病动物模型的制备过程中并未充分的考虑到很多影响因素，故动物模型与人类糖尿病依然存在一定程度的差距的，在今后的研究仍然需要不断的完善，建立与人类糖尿病不论在发病机制还是发病因素等各个方面更加近似动物模型，以利于进一步的了解掌握并且治疗糖尿病。糖尿病的发生、发展具有较高的异质性，而在现有的糖尿病动物模型的制备过程中很难兼顾所有的因素，造成糖尿病动物模型与实际情况存在一定差别，各种糖尿病动物模型存在各自的特点，因此选取制备糖尿病动物模型方法对于研究糖尿病至关重要。

综述参考文献：

[1] M. Enser, Clearing-factor lipase in obese hyperglycaemic mice (ob-ob). Biochemical Journal, 1972, 129( 2): 447–453.

[2] J. M. Friedman, R. L. Leibel, D. S. Siegel, et al. Molecular mapping of the mouseob mutation. Genomics, 1991,11( 4):1054–1062.

[3] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, et al. Positional cloning of the mouse obese gene anditshumanhomologue. Nature,1994,372(6505): 425–432. [4]William TC. Animal Modeles of Type 2 Diabetes Clinical Presentation and pathophysiological relevance to the human condition. ILMU J, 2006,47

（3）：186-187.

[5] P. U. Dubuc. The development of obesity, hyperinsulinemia and hyperglycemia in ob/ob mice. Metabolism, 1976,25(12):1567–1574. [6]P. Dobrzyn, A. Dobrzyn, M. Miyazaki, et al. Loss of stearoyl-CoA desaturase 1 rescues cardiac function in obese leptin-deficient mice. Lipid Research, 2010,51( 8)：2202–2210.

[7] Colemetologia D L, Hummel K P. Hyperinsulinemia in preweaning diabetes (db) mice. Diabeologia,1974,10:607.

[8] H. Chen, O. Charlat, L. A. Tartaglia et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell, 1996,84(3):491–495.

[9] Y. F. Dong, L. Liu, K. Kataoka, et al. Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in amouse model of obesity and type 2 diabetes. Diabetologia, 2010,53(1):180–191. [10]M. S. Winzell, E. M. Wulff, G. S. Olsen, et al. Improved insulin sensitivity and islet function after PPARδactivation in diabetic db/db mice. European Journal of Pharmacology, 2010,626(2): 297–305.

[11] Bach J. Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune disease. Arthritis Res.2002.4(Suppl 3):1-15.

[12] Rong Hou, Mareki Ohtsuji, Naomi Ohtsuji, et al. A multivalent vaccine for type 1 diabetes skews T cell subsets to Th2 phenotype in NOD mice. Immunologic Research,2011,50(2):213-220.

[13] Breyer M D, Bottinger E, Brosius F C, et al, Mouse models of diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol,2005,16:1-19.

[14] Kawano K. OLEFT rat: a new NIDDM rat strain. Diabet Res Clin Pract,1994,24: s317

[15]刘彦君，许樟荣，张建中，等.糖耐量减低的OLETF大鼠胰腺结构和功能改变及糖脂代谢的关系.中华医学杂志，2000, 80（3）:175-177.

[16] T. H. Moran, S. Bi. Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2006,361( 1471):1211–1218.

[17] Shi K. Sexual difference in the incidence of disbetes mellitus in OLEFT. Metabolism,1994,43:1214.

[18] K. Yasuda, W. Nishikawa, N. Iwanaka, et al. Abnormality in fibre type distribution of soleus and plantaris muscles in non -obese diabetic Goto-Kakizaki rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2002,29( 11):1001–1008.

[19] Hui-Ju Pan. A Polymorphism in New Zealand inbred mouse strain that inactivates phosphate-idylcholine transfer febs. FEBS Lett, 2006, 580(25):5953.

[20]王杰，张世光，郑晓伟，等.慢性氯化钴处理对GK糖尿病大鼠缺氧诱导因子

1的表达及心梗面积的影响.生物化学与生物物理进展.2008,35(6 ):712. [21] A. Scarda, C. Franzin, G. Milan, et al. Increased adipogenic

Conversion of muscle satellite cells in obese Zucker rats. International Journal of Obesity. 2010,34(8):1319–1327.

[22] Schsfer S, Linz W, Bube A, et al. Vasopeptidase inhibition prevents nephropathy in Zucker diabetic fatty rat. Cardiovasc Res,2003,60:447

-454.

[23] C. E. van den Brom, M. C. Huisman, R. Vlasblom, et al. Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography. Cardio-vascular Diabetology. 2009, 8: article 39.

[24] S. Lenz en. The mechanisms of alloxan - and streptozotocin-induced. Diabetes Diabetologia,2008, 51:216–226.

[25] T. Szkudelski. The Mechanism of Alloxan and Streptozot ocin Action in B Cells of the Rat Pancrea. Physiol. Res,2001, 50: 536-546.

[26] A. K. Sharma, B. P. Srinivasan. Triple verses glimepiride plus metformin therapy on cardiovascular risk biomarkers and diabeticcardiomyopathy in insulin resistance type 2 diabetes mellitus rats. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 38(5):433–444.

[27] S. L. M´enard, E. Croteau, O. Sarrhini et al. Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats. American Journal of Physiology, 2010, 298(5):1049–1057.

[28]郭学军，邹移海，吴凌，等.链脲佐菌素诱导SD和Wistar大鼠糖尿病模型的影响因素.中国实验动物学报，2008,16(4)：301-304.

[29]卜石，杨文英，王昕，等.胰岛长期高脂饲养对大鼠葡萄糖刺激的胰岛素分

泌的影响.中华内分泌代谢杂志, 2003, 19: 25-28.

[30] Mithieux G, Guignot L, Bordet J C, et al. Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. Diabetes, 2002,51: 139-43. [31] Fueger P T, Bracy D P, Malabanan C M, et al. HexokinaseⅡoverexpression improves exercise-stimulated but not insulin stimulated muscle glucose uptake in high-fat-fed C57BL/6J mice. Diabetes, 2004,53: 306-314.

[32]陈丽萌，李学旺，黄利伟，等.2型糖尿病小鼠( KK-Ay)动物模型的早期鉴定和早期肾脏病理改变.中国医学科学院学报,2002, 29( 1)：71。

[33] Qing Hua G, The kidney expression of matrix metalloproteinase-9 In the diabetic nephropathy of KK-Ay mice. Diabetes Complication, 2008,22(6):23.

[34] Fujia A. Increased gene expression of antioxidant enzymes in KK-Ay diabetic mice but not in STZ diabetic mice. Diabetes Res Clin Pract,2005, 69(2):113.

致 谢

研究生生涯即将结束了，衷心感谢我的导师雷晨教授的关怀和谆谆教导。导师兢兢业业的工作精神、求真务实的治学态度、严谨缜密的科研思路、开阔的眼界会使我受益终生；导师丰富的临床工作经验和高超的临床技能是我奋斗的目标。导师急病人之所急，一切从患者利益出发的高尚道德时刻鞭策着我，是我学习的榜样。

感谢宁夏医科大学总医院外科学实验室全体老师和同学在实验中给予的帮助和关心。感谢宁夏医科大学总医院病理科老师对我的鼎立支持和关怀

感谢宁夏医科大学医学科研中心的王洁老师、朱佳老师、朱明星老师在实验技术方面给予的耐心指导与帮助。

感谢我的师弟、师妹在我学习、实验方面给予的大力帮助与支持。

感谢研究生学院及临床学院各位老师在我研究生学习阶段的热情帮助和辛勤培养。

感谢我的父母及家人对我无微不至的关怀和无限的支持和鼓励，使我能勇敢的面对困难，并克服困难。

最后，感谢关心我、支持我、帮助我的师长与同学，谢谢大家三年来对我学习生活的帮助，谢谢你们！

攻读学位期间发表的学术论文目录

[1]张婕，王琦，雷晨.高脂高糖饮食诱导妊娠糖尿病小鼠模型的建立.宁夏医科大学学报.（录用待排期刊）

[2]张婕，王琦，雷晨. 不同剂量链脲佐菌素建立妊娠糖尿病小鼠模型稳定性比较.广东医学杂志.（审稿中）

**个人简介**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 姓 | 名：张婕 | 性 | 别：女 |
| 学 | 位：硕士研究生 | 专 | 业：内分泌 |

出生年月：1981.6政治面貌：党员

**学习与工作履历**

2000年9月至2004年6月在宁夏医学院临床医学系就读。

2004年6月至2005年5月在宁夏回族自治区人民医院实习。

2006年1月至2009年7月在银川市第三人民医院工作。

2010年9月至今在宁夏医科大学攻读硕士研究