

## 2 型糖尿病 Kkay 小鼠大血管病变模型的建立

李海东<sup>1</sup>, 庄晓明<sup>2</sup>, 王泳<sup>1</sup>

(首都医科大学附属复兴医院 1. 高压氧科, 2. 内分泌科, 北京市 100038)

[关键词] 2 型糖尿病; 大血管病变; Kkay 小鼠

[摘要] **目的** 建立一种与人类发病过程类似的 2 型糖尿病大血管病变动物模型。**方法** 选取 24 只 12 周龄 2 型糖尿病 Kkay 小鼠(尾尖取血测随机血糖 $\geq 11.1$  mmol/L)作为模型组和 12 只 C57BL/6J 纯系小鼠作为正常对照组, 两组小鼠都饲以高糖高脂饲料, 模型组分别于 16、20、24 及 28 周各处死 4 只, 模型组剩余小鼠和正常对照组小鼠于 28 周后处死, 取腹主动脉于光镜下观察血管病变情况。每组实验动物在处死前测随机血糖。**结果** 与正常对照组相比, 模型组随机血糖均明显升高( $P < 0.01$ ); 模型组 28 周后出现大血管病变, 表现为腹主动脉内皮细胞结构不清晰, 质膜破裂, 内弹力膜薄, 内皮下层增厚, 平滑肌细胞和成纤维细胞大量增殖, 可见泡沫细胞。**结论** 2 型糖尿病 Kkay 小鼠经高脂高糖饲养 28 周后可诱发大血管病变。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

### Establishment of Macroangiopathy Model of Kkay Mice with Type 2 Diabetes Mellitus

LI Hai-Dong<sup>1</sup>, ZHUANG Xiao-Ming<sup>2</sup>, and WANG Yong<sup>1</sup>

(1. Department of Hyperbaric Oxygen, 2. Department of Endocrinology, Fuxing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China)

[KEY WORDS] Type 2 Diabetes Mellitus; Macroangiopathy; Kkay Mice

[ABSTRACT] **Aim** To establish animal models similar to human disease process of type 2 diabetes mellitus with macroangiopathy. **Methods** Twenty-four 12 week old Kkay mice with type 2 diabetes mellitus were selected (random blood sugar $\geq 11.1$  mmol/L) as model group and twelve C57BL/6J mice as normal control group, experimental animals of the two groups were fed with high sugar and high fat diet, four mice were killed in the model group at the 16 th, 20 th, 24 th and 28 th week. Remaining mice in the model group and normal control group were killed after 28 weeks, and abdominal aorta were observed under light vascular lesions. **Results** Compared with normal control group, random blood sugar in model group were significantly higher ( $P < 0.01$ ). Macroangiopathy in the model group was found after 28 weeks, it's shown as that abdominal aortic endothelial cell structure was not clear, plasma membrane rupture, internal elastic membrane was thin, subendothelial layer thickening, smooth muscle cells and fibroblasts proliferation in great quantities, foam cells cloud be found. **Conclusion** Kkay mice with type 2 diabetes mellitus by feeding high fat and high sugar after 28 weeks may induce macroangiopathy.

至今 2 型糖尿病大血管病变的发病机制仍未完全阐明, 建立与人类发病过程类似的动物模型是研究其发病机制及治疗措施的首要条件。国内外多采取化学试剂链脲佐菌素 + 高糖高脂饲养的方法诱发糖尿病大血管病变模型, 但这种动物模型并不完全与人类的 2 型糖尿病相似, 而且不易形成大血管病变<sup>[1]</sup>。本研究采用多基因遗传性 2 型糖尿病

动物模型鼠(Kkay 小鼠)<sup>[2]</sup>, 通过给予高糖高脂饲料喂养成功诱导 2 型糖尿病大血管病变模型, 为进一步研究该病的发病机制和治疗方法提供帮助。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物及分组

24 只 12 周龄雌性 Kkay 小鼠, 体重 40 ~ 80 g,

[收稿日期] 2014-06-03

[基金项目] 北京市西城区科技计划项目(2008QKJ1024)

[作者简介] 李海东, 硕士, 主治医师, 主要从事高压氧医学研究。庄晓明, 硕士, 主任医师, 主要从事内分泌与代谢病研究。通讯作者王泳, 硕士, 副主任医师, 主要从事高压氧医学研究, E-mail 为 fxyhbo@163.com。

随机血糖  $\geq 11.1$  mmol/L; 12 只 12 周龄雌性 C57BL/6J 纯系正常小鼠, 体重 20~30 g。动物许可证号为 SYXK(京)2008-0010, 均由中国医学科学院实验动物研究所提供, 以上动物均放在首都医科大学动物实验室。将 24 只 Kkay 小鼠作为模型组, 12 只 C57BL/6J 纯系正常小鼠为正常对照组。

1.2 高糖高脂饲料组成

蔗糖 20.0%、粗蛋白 15.5%、粗脂肪 10%、粗纤维 3.0%、钙 1.4%、总磷 0.9%, 由中国医学科学院实验动物研究所提供。

1.3 模型制作

模型组和正常对照组都给予高糖高脂饲料饲养, 模型组小鼠分别于 16、20、24 及 28 周随机选取 4 只小鼠采用眼眶动、静脉取血急性大失血法处死, 并取腹主动脉于光镜下行组织形态学检查, 发现大血管病变模型成型时间在 28 周。28 周后, 将剩余的模型组小鼠和正常对照组小鼠处死提取腹主动脉。

1.4 随机血糖测定

小鼠尾间静脉取血, 血糖仪为 Accu-Chek performa。于 16、20 及 24 周分别随机测模型组 4 只小鼠随机血糖及体重, 并于 28 周测正常对照组及模型组剩余小鼠随机血糖及体重。

1.5 组织形态学观察

腹主动脉在 10% 中性福尔马林溶液中固定 > 24 h, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 在  $\times 10$ 、 $\times 20$  光镜下观察腹主动脉血管壁结构变化。

1.6 统计学方法

所有随机血糖数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 对符合正态分布的各组数据进行  $t$  检验, 不符合正态分布的进行秩和检验。

2 结 果

2.1 随机血糖水平比较

模型组 16、20、24 及 28 周间随机血糖水平、体重比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但与正常对照组比较明显升高 ( $P < 0.01$ ; 表 1)。

表 1. 正常对照组、模型组随机血糖水平 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1. Levels of random blood sugar in normal control group and model group ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	随机血糖 (mmol/L)	体重 (g)
正常对照组	12	8.73 $\pm$ 1.02	19.14 $\pm$ 2.54
模型组			
16 周	4	26.05 $\pm$ 2.17 <sup>a</sup>	44.43 $\pm$ 4.42 <sup>a</sup>
20 周	4	27.43 $\pm$ 2.23 <sup>a</sup>	46.21 $\pm$ 4.70 <sup>a</sup>
24 周	4	28.38 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>	47.41 $\pm$ 5.43 <sup>a</sup>
28 周	12	28.54 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>	50.48 $\pm$ 4.46 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较。

2.2 组织形态学改变

正常对照组小鼠腹主动脉内膜光滑, 染色均匀, 内膜下细胞排列整齐。16 周、20 周时, 模型组小鼠腹主动脉内膜光滑, 染色均匀, 内膜下细胞排列整齐; 24 周时, 模型组小鼠腹主动脉内膜轻度增厚, 染色均匀, 内膜下细胞排列整齐, 平滑肌细胞和成纤维细胞少量增殖; 28 周时, 模型组小鼠腹主动脉内皮细胞结构不清晰, 质膜破裂, 内弹力膜薄, 内皮下层增厚, 平滑肌细胞和成纤维细胞大量增殖, 排列紊乱, 垂直于内膜生长, 并杂有脂质和细胞成分, 但仍可见部分排列规则的细胞 (图 1)。

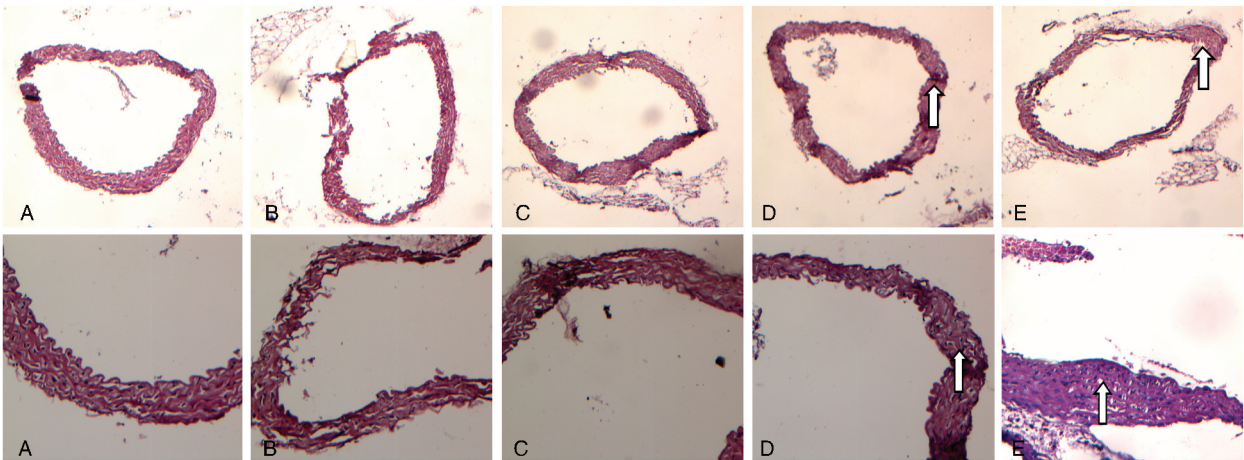


图 1. HE 染色 上图放大倍数为  $\times 10$ , 下图放大倍数为  $\times 20$ ; A 为正常对照组, B 为模型组 16 周, C 为模型组 20 周, D 为模型组 24 周, E 模型组 28 周。

Figure 1. HE staining

### 3 讨 论

2 型糖尿病大血管病变是目前糖尿病患者死亡和致残的首要原因。目前研究表明 2 型糖尿病大血管病变是多基因调控与环境相互作用的结果<sup>[3]</sup>。目前国内外实验研究多采取注射链脲佐菌素诱发大鼠或小鼠的药物性糖尿病模型,但是这种糖尿病动物模型并不完全与人类的糖尿病相似,至少在模型建立的初期它既没有明显体重的增加也不存在胰岛素抵抗<sup>[4-6]</sup>。GK 大鼠是一种自发性 2 型糖尿病模型,具有血糖轻度升高、葡萄糖刺激的胰岛素分泌能力受损、胰腺  $\beta$  细胞团块量减少等特点,但由于大鼠没有胆囊,喂养高热量饮食只可以使动物产生高脂血症、外周胰岛素抵抗,但不易形成大血管病变<sup>[7-9]</sup>。Kkay 小鼠是一种多基因遗传性 2 型糖尿病动物模型鼠,由于这种遗传因素的作用,再通过高能量饮食喂养使 Kkay 在 8 周以后开始出现高血糖、肥胖等糖尿病症状<sup>[2]</sup>。所以本研究采用更具人类 2 型糖尿病特征的 Kkay 小鼠作为诱发糖尿病大血管病变的实验对象。

Kkay 小鼠经高脂高糖饲养后何时能够出现大血管病变尚不明确。本研究分别观察了制模后 16、20、24 和 28 周 Kkay 小鼠腹主动脉的组织形态学变化后发现,与正常对照组相比,16 周、20 周没有出现血管病变,24 周开始出现腹主动脉内膜轻度增厚,内膜下可见平滑肌细胞和成纤维细胞少量增殖,而 28 周后出现了典型的动脉粥样硬化表现:腹主动脉内皮细胞质膜破裂,内弹力膜薄,内皮下层增厚,平滑肌细胞和成纤维细胞大量增殖,排列紊乱,并杂有脂质和细胞成分。

本研究通过连续监测各时间点随机血糖、体重发现,模型组随机血糖、体重明显高于正常对照组,并且血糖、体重随着时间延长呈逐渐升高趋势,28 周时达到最高,这也符合 2 型糖尿病患者出现动脉粥样硬化与长期高血糖伴随体重增加密切相关这一事实<sup>[3,10]</sup>。另外本研究还发现,Kkay 小鼠一般寿命为 1 年左右,28 周龄相当于中年小鼠,同 2 型糖

尿病大血管病变多发生于中老年患者所处的年龄段相似。

综上所述,2 型糖尿病 Kkay 小鼠通过高脂高糖饲养 28 周可成功诱导与人类发病过程类似的糖尿病大血管病变动物模型,该方法简单、稳定可靠以及重复性好,可为研究 2 型糖尿病大血管病变的发病机制和治疗方法等方面提供帮助。

#### [参考文献]

- [1] 温进坤, 韩梅, 杜玮南, 等. 一种快速建立大鼠动脉粥样硬化模型的实验方法[J]. 中国老年学杂志, 2001, 21 (1): 51-52.
- [2] 郭清华, 陆菊明, 潘长玉, 等. 饮食能量对 Kkay 及 Kk 小鼠 2 型糖尿病发病的影响[J]. 军医进修学院学报, 2005, 26 (2): 140-142.
- [3] 张亚光, 詹晓蓉. 2 型糖尿病合并下肢动脉粥样硬化的危险因素[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14 (5): 986-988.
- [4] 庞宗然, 李晓军, 刘祖涵, 等. 2 型糖尿病合并大血管病变动物模型的建立和评价[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15 (9): 656-658.
- [5] 徐梓辉, 周世文, 钱桂生, 等. 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.
- [6] 张彦, 马双陶, 杨永健, 等. 糖尿病合并动脉粥样硬化小鼠模型的建立[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (2): 186-189.
- [7] 张芳林, 李果, 刘优萍, 等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其糖代谢特征分析[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10 (1): 16-20.
- [8] 沈丽卢, 维晟, 姚俊宇, 等. 不同方法建立动脉粥样硬化大鼠模型的比较[J]. 心脏杂志, 2005, 17 (1): 18-20.
- [9] 顾迁, 高鑫, 徐平, 等. GK 糖尿病大鼠生物学特性观察[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17 (12): 689-692.
- [10] 王贻坤, 叶成松, 叶山东, 等. 晚期糖基化终末产物的特性及其检测[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33 (2): 175-178.

(此文编辑 文玉珊)