

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.06.003

脂多糖诱导 2 型糖尿病大鼠模型的建立*

刘砾砾¹, 夏 宁^{2△}, 梁瑜祯¹

(1. 广西医科大学第一附属医院营养科, 南宁 530021; 2. 广西壮族自治区卫生厅, 南宁 530021)

摘要:目的 探讨通过单一皮下注射脂多糖(LPS)诱导产生慢性炎症的方法建立 2 型糖尿病(T2DM)大鼠模型的可行性。方法 将 30 只雄性 Wistar 大鼠分成对照组($n=10$)和造模组($n=20$)。造模组以 LPS($300 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)皮下注射 8 周,对照组予以皮下注射等容量生理盐水。每周对大鼠一般情况、体质量、空腹血糖进行监测,8 周后对两组大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及空腹胰岛素(FINS)进行测定,另外进行口服糖耐量试验(OGTT)和胰岛素释放试验(IRT)。以空腹血糖大于或等于 1.1 mmol/L 为造模成功。结果 第 6 周开始 T2DM 造模组大鼠血糖显著高于对照组($P<0.05$),达到 T2DM 大鼠模型的成模标准。与对照组比较,造模组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1、IL-6、MCP-1、FINS 水平均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);OGTT 试验,造模组血糖水平高于对照组,胰岛素峰值低于对照组, ($P<0.05$)。结论 通过皮下注射小剂量 LPS 成功地建立了 T2DM 大鼠模型,为糖尿病的病因研究提供了一定的帮助。

关键词:脂多糖类;糖尿病,2 型;大鼠模型

中图分类号:R574

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)06-0727-03

Establishing a type 2 diabetes model in rats by lipopolysaccharide*

Liu Xidi¹, Xia Ning^{2△}, Liang Yuzhen¹

(1. Department of Nutrition, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. the Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To establish rat model of type 2 diabetes through a single subcutaneous injection of lipopolysaccharide which induced chronic inflammation. **Methods** The male Wistar rats ($n=30$) were randomly divided control group ($n=10$) and model group ($n=20$). Model group with LPS ($300 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) subcutaneous injection of eight weeks, rats in control group received isometric stroke-physiological saline solution injection in the same way. The changes in appearance, weight and fasting blood glucose (FBG) of rats were observed every week. At the end of the 8th week, the levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and fasting insulin (FINS) were measured. Oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin release test (IRT) were also performed. The successful rat model was determined by the standards that FBG was $\geq 11.1 \text{ mmol/L}$. **Results** Model group rats reached the standard of type 2 diabetes after six weeks of LPS injection. Model group blood sugar is significantly higher than the control group ($P<0.05$). In addition, model group's expression level of inflammatory cytokines in serum TNF- α , IL-1, IL-6, MCP-1 and FINS were significantly higher than control group ($P<0.05$). Oral glucose tolerance test, blood glucose levels higher than normal in model group, the insulin peak is lower than the normal group ($P<0.05$). **Conclusion** The success of establishing the animal model of type 2 diabetic rats which were injected of low dose of LPS by subcutaneous may be provide certain help for the etiology of diabetes research.

Key words: lipopolysaccharide; diabetes mellitus, type 2; rat model

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是以胰岛素抵抗和低度慢性炎症为特征的代谢性疾病,随着人们生活模式的改变,T2DM 在人群中的发病率呈逐年上升趋势,严重危害着人们的健康与生命。到 2050 年,全球范围内糖尿病的患病率将增加 3 倍,给社会和家庭带来沉重的经济负担^[1]。通过近年来的研究认识到,机体长期的低度炎症状态在肥胖、胰岛素抵抗、T2DM 等代谢性疾病的发生、发展中扮演重要角色。本研究通过单一皮下注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导产生慢性炎症的方法研究长期低度炎症刺激对大鼠血糖的影响,并对其可能的机制进行研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只(80~100 g),购于广西医科大学实验动物中心。所有大鼠入组前经过体检

及血液分析,健康状况良好。LPS 购自美国 Sigma 公司生产;肿瘤坏死因子- α (TNF- α),大鼠单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、IL-1、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;检测血清胰岛素 rat-ELISA 试剂盒购自苏州卡尔文生物科技有限公司。全自动酶标仪为美国 Bio-Rad 产品。罗氏血糖仪及试纸;紫外可见分光光度计为日本东芝公司生产;上海安亭 TGL-16C 台式高速普通离心机等。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只(80~100 g)均自由饮水,室温控制在 18~22 °C,相对湿度 30%~70%。各组大鼠每天自用同一种饲料,同组大鼠体质量相差小于 10%。自购入起适应一周后分为 2 组:造模组($n=20$)和对照

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(8160070);广西自然科学基金资助项目(2012GXNSFAA053083)。作者简介:刘砾砾(1984-),在读博士,主要从事糖尿病及其并发症的研究工作。△ 通讯作者, E-mail: xianing12@aliyun.com。

组($n=10$)。LPS(血清型 0127:B8,批号 L-3129)临用前以无菌生理盐水溶解, $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。T2DM 造模组以 LPS $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ 行颈背部皮下注射。对照组在同一时间予以皮下注射等容量盐水(9 g/L 氯化钠注射液)。动物共饲养 8 周。

1.2.2 取材及指标检测 每周称取各组大鼠体质量,比较体质量增加差异,测定尾静脉空腹血糖进行分析。8 周后,大鼠经内眦于眶后静脉丛采静脉血,离心后取上清,分别检测 TNF- α 、IL-1、IL-6、MCP-1、FINS。测定方法按说明书进行。

1.2.3 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)和胰岛素释放试验(IRT) 8 周末,对照组和造模组大鼠均禁食 12 h 后,用 50% 葡萄糖以 2 g/kg 体质量剂量灌胃,分别在灌胃前和灌胃后 30、60、120 min 4 个时间点经内眦于眶后静脉丛采静脉血,血糖用罗氏血糖仪测定,胰岛素经 ELISA 测定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两个样本均数比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况 对照组大鼠体态活泼,皮毛干净,有光泽,生长良好。模型组大鼠逐渐出现活动减少、皮毛发黄、晦暗、反应迟钝,观察发现有多饮、多尿、多食等 DM 症状。

2.2 大鼠体质量变化 每周称取大鼠体质量,并绘制柱形图。随着喂养周期的延长,两组大鼠体质量均有不同程度的增长。第 5 周开始造模组大鼠体质量增长较对照组明显,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

2.3 两组大鼠空腹血糖动态变化 模型组大鼠给药后,血糖呈先升高后下降趋势。经 t 检验比较,差异有统计学意义($P<$

0.05),见图 2。以空腹血糖大于或等于 11.1 mmol/L 为造模成功。

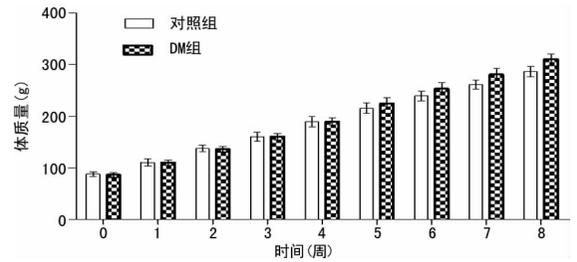


图 1 两组大鼠体质量变化图

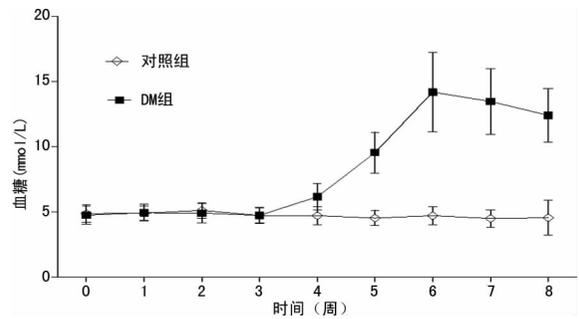


图 2 两组大鼠血糖变化图

2.4 8 周后两组大鼠血清中炎症因子及空腹胰岛素变化 与对照组比较,造模组大鼠血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6、MCP-1、FINS 水平均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 大鼠血清 TNF- α 、IL-1、IL-6、MCP-1、FINS 变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n	炎症因子(pg/mL)				FINS(mIU/L)
		TNF- α	IL-1	IL-6	MCP-1	
对照组	10	4.31 \pm 0.53	10.65 \pm 1.73	6.64 \pm 0.11	20.13 \pm 2.17	14.0 \pm 4.2
DM 组	20	17.4 \pm 3.17 ^a	20.04 \pm 2.58 ^a	24.62 \pm 2.70 ^a	110.59 \pm 13.46 ^a	27.6 \pm 11.3 ^a

^a: $P<0.05$,与对照组比较。

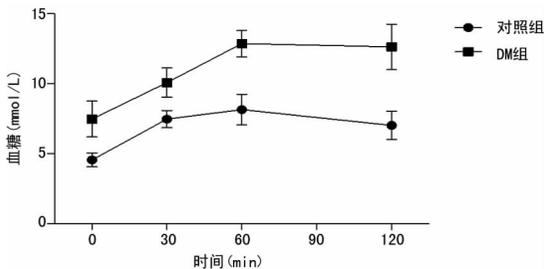


图 3 两组大鼠 OGTT 变化图

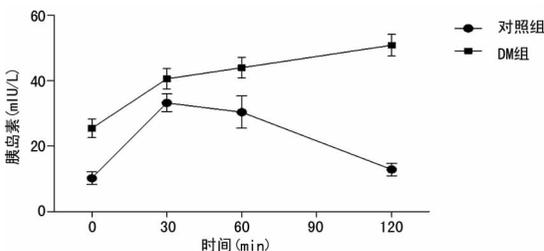


图 4 两组大鼠各时间点胰岛素水平比较图

2.5 OGTT 8 周末禁食 12 h,OGTT 显示,以 50% 葡萄糖 2 g/kg 灌胃后,对照组和造模组血糖均在 60 min 达到高峰。但

造模组血糖在各时间点均高于对照组,达到 T2DM 造模标准,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

2.6 IRT 8 周末,行 OGTT 时胰岛素结果显示,造模组各时间点胰岛素水平均高于对照组,且高峰出现在 120 min,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

3 讨论

建立 T2DM 动物模型的目的在于模拟 T2DM 的发病因素、病理生理过程和临床特征,从而为 T2DM 的防治提供合理、有效的方法。近年来,从基础研究、临床试验以及流行病学研究都显示机体长期的低度炎症状态是胰岛素抵抗、糖尿病等代谢性疾病的一个重要的发病机制,炎症过程产生的炎症因子影响胰岛素的信号通路,引起胰岛素抵抗,进而引发 T2DM。无论是动物模型还是人体实验中都证实了肥胖、T2DM 个体中存在着肠道菌群数量和组成的变化,同时伴随着 LPS 含量升高^[2-5]。LPS 是存在于革兰阴性细菌外膜的一种内毒素,细菌破解后被释放,是革兰阴性菌感染时激活机体固有免疫系统,启动炎症反应的主要成分。许多代谢性疾病的发生、发展都与 LPS 有着密切的关系^[6-7]。

LPS 进入机体后首先与血浆中的 LPS 结合蛋白(LBP) 结合,再结合于细胞表面的 CD14 分子,以 LPS-LBP-CD14 复合

物的形式与单核巨噬细胞膜上的 Toll 样受体 4(TLR4)结合导致 TLR4 的聚合而活化。LPS 还可激活丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK) 通路,二者均可导致炎症细胞因子的大量表达^[8]。本研究证实,通过皮下注射小剂量 LPS 8 周后,与对照组比较,造模组血清中炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6、MCP-1 的表达显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

本研究通过单一皮下注射小剂量 LPS 诱导产生慢性炎症的方法研究长期、低度炎症刺激对大鼠血糖的影响,结果如图 2 所示,与 Cani 等^[9]的研究一致,模型组大鼠的血糖显著高于对照组,达到 T2DM 大鼠的成模标准。目前有关炎症因子引起胰岛素抵抗的途径及机制已较为清楚,主要通过作用于胰岛素信号传导通路,抑制胰岛素信号转导来调节胰岛素^[10-11]。如 TNF- α 、MCP-1 水平的上升能促进胰岛素受体底物 1(IRS-1)的丝氨酸磷酸化。IRS-1 是胰岛素信号转导通路中的重要信号蛋白,丝氨酸/酪氨酸磷酸化是信号转导的主要环节。IRS-1 的丝氨酸磷酸化减弱胰岛素信号转导的同时干扰正常酪氨酸的磷酸化,从而导致 IRS-1 对胰岛素敏感性下降,产生胰岛素抵抗。胰岛素抵抗发生是 T2DM 的发病基础。但 Cani 等^[9]的研究表明血清胰岛素与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),而本研究发现模型组大鼠与对照组比较空腹胰岛素显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。其原因可能是 Cani 等^[9]研究中持续注射 LPS 4 周,而本研究持续注射了 8 周。表明通过持续皮下注射 LPS,长期的低度炎症刺激可诱导大鼠出现胰岛素抵抗并引起糖代谢异常。与此同时,与 Dandona 等^[12]通过高脂饮食诱导胰岛素抵抗及 T2DM 的结果一致,第 5 周开始模型组大鼠体质量增长较对照明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明经过 LPS 刺激产生慢性低度炎症干扰了机体正常的能量代谢,进而产生肥胖、胰岛素抵抗。通过 OGTT 实验发现:8 周末造模组各时间点血糖均高于对照组,在 120 min 血糖水平仍然较高,达到 T2DM 造模标准。同时检测胰岛素水平发现造模组高峰后延至 120 min。与以往研究中发现的 T2DM 胰岛素分泌往往存在早期相受损,晚期相延迟这个理论相符。从而进一步说明该模型符合 T2DM 的特点。

本研究采用持续皮下注射小剂量 LPS 成功地建立了大鼠 T2DM 模型,模拟临床慢性低度炎症和胰岛素抵抗引发糖尿病的发生、发展过程,为进一步阐明慢性炎症和胰岛素抵抗与 T2DM 等代谢性疾病关系的分子机制提供了一定的帮助。采用本方法建立动物模型,无一只大鼠死亡,成功率高,方法比较简单,对其他器官组织影响小。可作为针对慢性低度炎症导致胰岛素抵抗、T2DM 的信号通路中的关键环节进行靶向药物的研发,当然,这只是小样本的实验,要想得到更为肯定的结果,还需要进一步扩大样本量来证实。

参考文献:

[1] Krispel C, Rodrigues M, Xin XB, et al. Ranibizumab in di-

abetic macular edema[J]. World J Diabetes, 2013, 4(6): 310-318.

[2] Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia[J]. Diabetologia, 2007, 50(11): 2374-2383.

[3] Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice[J]. Diabetes, 2008, 57(6): 1470-1481.

[4] Gordon JI, Backhed F, Ding H, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 15718-15723.

[5] Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans [J]. Am J Clin Nutr, 2011, 94(1): 58-65.

[6] Liu CJ, Cheng YC, Lee KW, et al. Lipopolysaccharide induces cellular hypertrophy through calcineurin/NFAT-3 signaling pathway in H9c2 myocardial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 313(1/2): 167-178.

[7] Ohta H, Wada H, Niwa T, et al. Disruption of tumor necrosis factor α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice[J]. Atherosclerosis, 2005, 180(1): 10-11.

[8] McAleer JP, Vella AT. Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity[J]. Crit Rev Immunol, 2008, 28(4): 281-299.

[9] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1761.

[10] Osto M, Zini E, Franchini M, et al. Subacute endotoxemia induce adipose inflammation and changes in lipid and lipoprotein metabolism in cats [J]. Endocrinology, 2011, 152(3): 804-815.

[11] Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B [J]. Nat Med, 2005, 11(2): 183-190.

[12] Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A, et al. Inflammation; the link between insulin resistance, obesity and diabetes[J]. Trends Immunol, 2004, 25(1): 4-7.

(收稿日期:2014-08-15 修回日期:2014-11-15)

(上接第 726 页)

mine and arginine improve permeability and tight junction protein expression in methotrexate-treated Caco-2 cells [J]. Clin Nutr, 2013, 32(5): 863-869.

[15] Kiroglu OE, Aydinoglu F, Ogulener N. The effects of thiol modulators on nitrergic nerve- and S-nitrosothiols-induced relaxation in duodenum [J]. J Basic Clin Physiol

Pharmacol, 2013, 24(2): 143-150.

[16] Corti A, Franzini M, Scatagliani I, et al. Mechanisms and targets of the modulatory action of S-nitrosoglutathione (GSNO) on inflammatory cytokines expression [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 562: 80-91.

(收稿日期:2014-09-15 修回日期:2014-11-28)