

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.01.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20211020.1511.002.html\(2021-10-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20211020.1511.002.html(2021-10-25))

# 高脂高糖饮食联合 STZ 诱导 C57Bl/6J 品系小鼠构建糖尿病肾病模型的研究\*

李 想<sup>1,2</sup>, 吕 琴<sup>2,3</sup>, 吴秋月<sup>1</sup>, 沈 颖<sup>2,3,Δ</sup>

(1. 昆明理工大学医学院, 昆明 650093; 2. 昆明理工大学附属医院, 昆明 650032;

3. 云南省第一人民医院, 昆明 650032; 4. 云南中医药大学, 昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 探索 C57Bl/6J 品系小鼠能否通过高脂高糖饮食联合链脲佐菌素(STZ)构建糖尿病肾病(DN)动物模型。**方法** 选取 3 周龄(12~15 g)C57Bl/6J 小鼠(3 周龄组)、5 周龄(18~22 g)C57Bl/6J 小鼠(5 周龄组)各 12 只,将两组小鼠分为实验组和对照组,实验组给予高脂高糖饮食,对照组给予普通饮食;实验组采用高脂高糖饲养 8 周,淘汰肥胖耐受小鼠,然后按 50 mg/kg 剂量连续 5 d 腹腔注射 STZ,分析各组小鼠体重、空腹血糖、口服葡萄糖耐量试验(OGTT)、尿蛋白、肾脏病理等指标。**结果** 3 周龄组小鼠高脂高糖 8 周后未诱导出肥胖;5 周龄组小鼠高脂高糖饲养 8 周后 60% 的小鼠出现肥胖,肥胖小鼠 OGTT 与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。注射 STZ 2 周后小鼠血糖进一步升高,并出现多饮、多食、多尿症状;注射 STZ 8 周后小鼠尿蛋白检测为阴性,肾脏病理未出现明显异常。**结论** 5 周龄 C57Bl/6J 小鼠经高脂高糖饮食后能诱导出肥胖并可建立早期糖尿病模型,经 STZ 诱导 2 周后可建立中期糖尿病模型,但该系小鼠难以通过高脂高糖饮食联合 STZ 构建出 DN 模型。

**[关键词]** 糖尿病;糖尿病肾病;高脂高糖饮食;链脲佐菌素;小鼠;动物模型**[中图法分类号]** R335;R587.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)01-0016-04

## Study on establishment of diabetic nephropathy model in C57Bl/6J mice induced by high-fat and high-sugar diet combined with STZ\*

LI Xiang<sup>1,2</sup>, LYU Qin<sup>2,3</sup>, WU Qiuyue<sup>4</sup>, SHEN Ying<sup>2,3,Δ</sup>

(1. School of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650093, China; 2. Affiliated Hospital, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China; 3. Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650032, China; 4. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate whether C57Bl/6J strain mice can constructing the animal model of diabetic nephropathy(DN) by high-fat and high-sugar diet combined with streptozotocin (STZ). **Methods** The 3-week-old (12–15 g) and 5-week-old (18–22 g) C57Bl/6J mice were selected as the 3-week-old group and 5-week-old group respectively, 12 cases in each group. The two groups were divided into the experiment group and control group. The experiment group was fed with high-fat and high-sugar diet, while the control group was given the common diet. The experiment group adopted the high-fat and high-sugar diet for 8 weeks and the obesity-tolerant mice were eliminated. Then STZ was intraperitoneally injected according to a dose of 50 mg/kg for 5 d. Then the indicators such as the body weight, fasting blood glucose, OGTT test, urine protein and renal pathology in each group were analyzed. **Results** Obesity was not induced in the 3-week-old group after feeding by 8-week high fat and high glucose. In the 5-week-old group, 60% of the mice appeared obese after feeding by 8-week high-fat and high-sugar diet, and OGTT had statistical difference between the obese mice and the control group ( $P < 0.01$ ). After 2 weeks of STZ injection, the blood glucose of the mice was further increased and the symptoms of polyuria, polydipsia and hyperphagia appeared. After 8 weeks of STZ injection,

\* 基金项目:云南省万人计划名医专项(云财社[2019]70号)。 作者简介:李想(1995—),在读硕士研究生,住院医师,主要从事糖尿病肾病、慢性肾脏病等基础及临床研究。 Δ 通信作者, E-mail:1402202854@qq.com。

the urine protein of mice was negative and there was no obvious abnormality in renal pathology. **Conclusion** Obesity can be induced and early diabetic model can be established in 5-week-old C57Bl/6J mice after feeding by high-fat and high-sugar diet. After 2 weeks of STZ induction, the medium-term diabetic model can be established, but it is difficult for this strain of mice to establish a DN model through high-fat and high-sugar diet combined with STZ.

[**Key words**] diabetes; diabetic nephropathy; mouse; animal model

国际糖尿病联盟发布的糖尿病地图集显示,2017 年全球约有 4.51 亿糖尿病患者,并估计 2045 年这一数字将达到 6.93 亿人<sup>[1]</sup>。目前,全球糖尿病发病人数的增加主要在发展中国家,尤其是印度和中国,其患病率分别排在第 1、2 位。根据世界卫生组织预测,2025 年我国预计将有 1.4 亿 2 型糖尿病患者<sup>[2]</sup>。随着人们生活水平的提高及人们饮食习惯的改变,肥胖人群逐年上升,肥胖症与 2 型糖尿病并存的肥胖相关的 2 型糖尿病的患病率也逐年上升,并且肥胖相关的 2 型糖尿病的致病机制较常规 2 型糖尿病更加复杂<sup>[3]</sup>。同时糖尿病并发症随糖尿病发生率上升也随之升高,其中糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的微血管并发症,也是最常见的慢性肾脏病,并且是导致终末期肾脏病的主要原因之一<sup>[4]</sup>。糖尿病及其并发症——DN 发病率逐年升高,已成为世界关注的全球公共卫生问题。一项对全国慢性肾脏病住院患者的调查结果显示, DN 住院人数逐年升高,现已成为慢性肾脏病住院患者人数最多的病种<sup>[5]</sup>。近年来, DN 的发病率呈上升趋势,归因于 DN 的社会医疗负担越来越重<sup>[6]</sup>。目前,对 DN 的治疗主要以控制体重、血糖、血压,以及调脂等对症处理<sup>[7]</sup>,然而现有的治疗手段并不能完全阻断 DN 进展,寻找新的发病机制及治疗靶点至关重要。

构建良好的 DN 模型是研究 DN 的基础。目前,对 DN 的模型构建方法有多种,化学诱导法为常用的动物模型构建方法,以化学药物——四氢嘧啶或链脲佐菌素(streptozocin, STZ)破坏动物胰岛细胞,模拟糖尿病胰岛素缺乏及血糖升高的病理表现,以构建糖尿病及糖尿病并发症的动物模型<sup>[8]</sup>。影响模型成功的因素很多,其中小鼠品系及小鼠年龄的选择对造模的影响十分重要<sup>[9-10]</sup>。目前,化学诱导法常用的动物模型为 SD 大鼠和 Wistar 大鼠<sup>[10]</sup>,其造模成本较高,而实验室最常用的 C57 小鼠被认为具有相对的天然 DN 抵抗<sup>[11]</sup>。本研究探索具有相对 DN 抵抗的 C57 小鼠能否通过常规高脂高糖饮食联合化学诱导法构建比较符合肥胖相关的 2 型糖尿病并发症 DN 发病机制的小鼠模型,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

选取无特定病原体级雄性 C57Bl/6J 小鼠,3 周龄

(12~15 g)、5 周龄(18~22 g)各 12 只(昆明理工大学动物中心)。

#### 1.1.2 试剂与仪器

STZ 购自美国 Sigma 公司,高脂高糖饲料(猪油 28%、蔗糖 10%、全脂奶粉 10%,其余均为维持饲料成分)购自江苏协同生物公司,Masson 三色染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,糖原 PAS 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;柠檬酸缓冲液(国产)、无水葡萄糖(国产)、尿蛋白试纸(优利特)、血糖试纸(罗氏)等。包括光学双目显微镜(江南)、石蜡切片机(Leica RM2235)、血糖仪(罗氏)、小鼠灌胃器(国产)等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型的建立

将 3 周龄、5 周龄小鼠分为实验组和对照组,实验组给予高脂高糖饮食,对照组给予普通饮食。实验前对所有小鼠进行空腹血糖测量,入组小鼠要求空腹血糖小于 7 mmol/L,排除先天存在血糖异常小鼠。实验组以高脂高糖饲料饲养 8 周,定期测量小鼠体重,排除体重不达标小鼠,以体重大于或等于对照组为筛选标准,体重未达标者提示对肥胖诱导耐受或不敏感,将其淘汰。高脂高糖饮食喂养 8 周后测量小鼠体重,淘汰肥胖诱导耐受小鼠,测定小鼠空腹血糖,进行口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT),恢复高脂高糖饮食 1 d 后实验组小鼠禁食 16 h,以每天 50 mg/kg 注射 STZ,STZ 为 0.1%柠檬酸缓冲液(pH 4~5)配制的 0.5%STZ 注射液,采用白天禁食,夜晚注射的方式,连续注射 5 d,末次注射 2 周后测量空腹血糖,空腹血糖大于 16 mmol/L 认为中期糖尿病模型构建成功,继续饲养 8 周采用尿蛋白试纸检测小鼠尿蛋白,然后麻醉下灌流处死小鼠,解剖并取小鼠肾脏进行石蜡切片并染色进行肾脏病理学观察,如出现显著蛋白尿及肾脏病理改变认为 DN 模型构建成功。

#### 1.2.2 血糖测量

使用罗氏血糖仪及血糖试纸,将小鼠固定,用采血针扎入小鼠尾静脉,取尾静脉血进行血糖检测。

#### 1.2.3 OGTT

试验前将小鼠夜间空腹 12 h,测量空腹血糖,然后将 20%葡萄糖溶液以 2 g/kg 剂量采用小鼠灌胃器进行灌胃,分别于灌胃后 30 min、2 h 时测量静脉血糖。

### 1.2.4 尿蛋白检测

应用尿蛋白检测试纸采用压迫膀胱方法,在小鼠膀胱充盈时压迫膀胱取小鼠尿液,并滴浸于蛋白测定试纸上,通过标准比色条分析检测结果。

### 1.2.5 病理检查

小鼠在麻醉状态下灌流取肾脏,放入多聚甲醛中固定,经固定组织、脱水、石蜡包埋等步骤,最后用石蜡切片机制作石蜡切片,厚度  $2\ \mu\text{m}$ 。使用过碘酸希夫(PAS)染色及 Masson 三色染色试剂盒,按试剂盒说明书中步骤对切片进行染色,观察肾脏肾小球、基底膜和系膜基质等病理改变。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 Prism8.0 软件进行统计图制作,组间比较采用  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体重变化

#### 2.1.1 3周龄小鼠

实验组小鼠高脂高糖饮食饲养8周后体重与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图1。对照组小鼠体重略大于实验组,实验组小鼠均未达筛选标准,3周龄小鼠未诱导出肥胖。

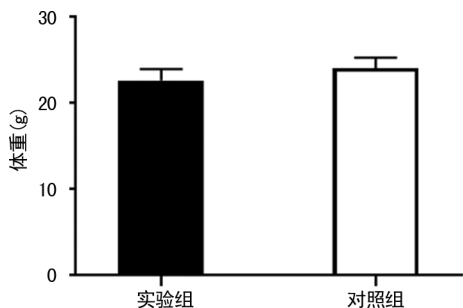


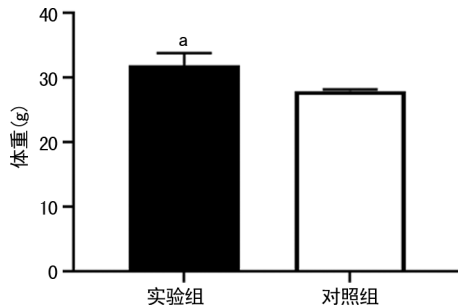
图1 3周龄小鼠实验组与对照组体重比较

#### 2.1.2 5周龄小鼠

实验组小鼠饲养8周后体重未达标2只,未诱导出肥胖,将其淘汰;其余4只小鼠体重增加明显,成功诱导出肥胖。实验组肥胖小鼠体重与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图2。

### 2.2 饲养8周后5周龄小鼠血糖变化

5周龄小鼠实验组高脂高糖饲养8周后空腹血糖明显大于对照组,OGTT在灌胃后30 min时血糖与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),空腹血糖、餐后2 h血糖与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),实验组小鼠出现早期糖尿病表现,见图3。



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

图2 5周龄小鼠实验组与对照组体重比较

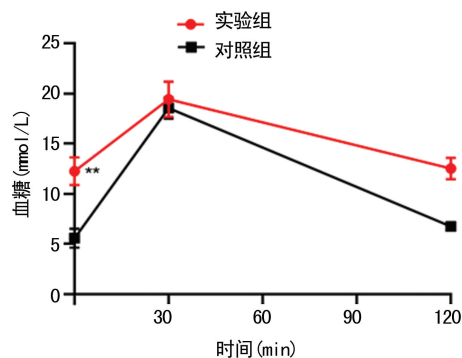


图3 5周龄小鼠实验组饲养8周后OGTT与对照组比较

### 2.3 注射STZ后血糖及症状改变

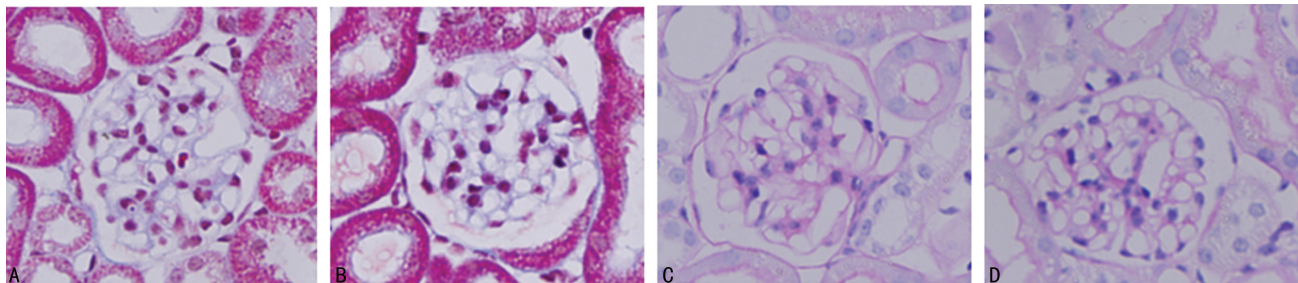
STZ末次注射2周后实验组小鼠空腹血糖大于16 mmol/L,并出现明显多饮、多食、多尿现象,出现进展期及中期糖尿病表现。

### 2.4 尿蛋白测定

末次注射STZ8周后小鼠尿蛋白试纸测定结果为阴性,未出现明显蛋白尿。

### 2.5 肾脏病理学观察

与对照组比较,实验组小鼠肾脏肾小球、基底膜和系膜基质等病理结构无明显改变,见图4。



A、C:实验组;B、D:对照组;A、B:Masson三色染色;C、D:PAS染色。

图4 肾脏病理学观察(400×)

### 3 讨 论

2 型糖尿病为主要的糖尿病类型,其中胰岛素抵抗在 2 型糖尿病的发生、发展中具有重要作用,在肥胖相关的 2 型糖尿病中脂肪过度堆积导致体内代偿性分泌胰岛素,过度的胰岛素分泌从而出现胰岛素抵抗<sup>[12]</sup>;长期高脂高糖饮食、过量高脂高糖食物的摄入损伤胰岛细胞,从而出现糖尿病,长期糖尿病微环境导致肾脏屏障受损及肾脏基底膜增厚并出现肾小球硬化等严重肾脏并发症<sup>[13-14]</sup>;本研究利用以上原理构建了肥胖相关糖尿病及 DN 模型。

本研究结果显示,3 周龄小鼠难以诱导出肥胖,其原因可能为过早给予高脂高糖饮食,此时小鼠对高脂高糖饮食的消化、吸收能力并未健全,难以诱导出肥胖;5 周龄小鼠对高脂高糖饮食敏感,可以较好地诱导出肥胖,并且在高脂高糖饲养 8 周后空腹血糖、OGTT 均与对照组出现了差异,小鼠出现早期糖尿病表现,早期糖尿病模型建立成功,成模率为 60%;STZ 注射 2 周后小鼠血糖升高显著( $>16$  mmol/L),并且出现明显多饮、多食、多尿表现,糖尿病病情进一步加重,中期糖尿病模型建立成功,成模率为 60%。而并发症——DN 模型并未构建成功,STZ 注射 8 周后小鼠尿蛋白阴性,且肾脏未见明显病理改变,提示未诱导出 DN, DN 模型构建失败。

本研究结果提示, C57Bl/6J 品系小鼠对高脂高糖饮食较为敏感,可以通过高脂高糖饮食构建早期 2 型糖尿病模型,并且可以联合 STZ 注射构建进展期及中期 2 型糖尿病模型,但该品系小鼠通过高脂高糖饮食联合 STZ 注射难以诱导出 DN 模型。

### 参考文献

[1] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138: 271-281.

[2] 廖涌. 中国糖尿病的流行病学现状及展望[J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 40(7): 1042-1045.

[3] AMBERY P, PARKER V E, STUMVOLL M, et al. MEDI0382, a GLP-1 and glucagon receptor dual agonist, in obese or overweight patients with type 2 diabetes: a randomised, controlled, double-blind, ascending dose and phase 2a study[J]. *Lancet*, 2018, 391(10140): 2607-2618.

[4] MARTARTÍNEZ-CASTELAO A, NAVARRO-GONZÁLEZ J F, GORRIZ J L, et al. The Concept and the Epidemiology of Diabetic Nephropathy Have Changed in Recent Years[J]. *J Clin Med*, 2015, 4(6): 1207-1216.

[5] ZHANG L, LONG J, JIANG W, et al. Trends in Chronic Kidney Disease in China[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(9): 905-906.

[6] BRENNEMAN J, HILL J, PULLEN S. Emerging therapeutics for the treatment of diabetic nephropathy[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(18): 4394-4402.

[7] 王琴;程颖. 对糖尿病肾病中西医治疗现状的认识[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2020, 18(11): 149-151.

[8] SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas[J]. *Physiol Res*, 2001, 50(6): 537-546.

[9] AZUSHIMA K, GURLEY S B, COFFMAN T M. Modelling diabetic nephropathy in mice[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(1): 48-56.

[10] 田雄, 郑敬民. 糖尿病肾病动物模型研究进展[J]. *实验动物科学*, 2020, 37(2): 73-77.

[11] SCHLÖNDORFF D. Choosing the right mouse model for diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2010, 77(9): 749-750.

[12] FLANAGAN A M, BROWN J L, SANTIAGO C A, et al. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats[J]. *J Nutr Biochem*, 2008, 19(8): 505-513.

[13] ANIL KUMAR P, WWLSH G I, SALEEM M A, et al. Molecular and cellular events mediating glomerular podocyte dysfunction and depletion in diabetes mellitus[J]. *Front Endocrinol(Lausanne)*, 2014, 5: 151.

[14] STARKEY J M, TILTON R G. Proteomics and systems biology for understanding diabetic nephropathy[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2012, 5(4): 479-490.