

糖尿病血糖波动动物模型建立的初探

盖春柳¹, 赵静如², 陈晓隆¹

作者单位:¹(110004)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属盛京医院眼科;²(100700)中国北京市,北京中医药大学东直门医院

作者简介:盖春柳,毕业于中国医科大学,博士,副主任医师,研究方向:眼底病、眼外伤。

通讯作者:盖春柳. 1579840567@qq.com

收稿日期:2014-01-02 修回日期:2014-03-03

Discussion on the establishment of blood glucose fluctuation animal models

Chun-Liu Gai¹, Jing-Ru Zhao², Xiao-Long Chen¹

¹Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China;

²Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Correspondence to: Chun - Liu Gai. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. 1579840567@qq.com

Received:2014-01-02 Accepted:2014-03-03

Abstract

• **AIM:** To provide the experimental basis for the *in vivo* study of blood glucose fluctuation injury mechanism, through intraperitoneal injection of glucose to establish blood glucose fluctuation animal models and to simulate blood glucose fluctuation of patients with diabetes.

• **METHODS:** Rats were randomly divided into four groups: normal control group (NC), normal fluctuation group (NF), diabetes mellitus group (DM) and diabetes fluctuation group (DF). Diabetic models were induced through intraperitoneal injection of STZ. A certain amount of glucose was injected in the rats of group NF and DF intraperitoneally three times a day after the model was established, thereby causing blood glucose fluctuations. Full-day blood glucose monitoring was conducted once every two weeks to observe the blood glucose fluctuation situation, according to blood glucose levels drawing the "time-blood glucose concentration" curve. The stability of blood glucose was evaluated from four different aspects, through calculating mean blood glucose (MBG), standard deviation blood glucose (SDBG), largest amplitude of glycemic excursions (LAGE) and Sclightkrull Mz value.

• **RESULTS:** The full-day blood glucose of rats in the group NC was in a normal range, and it was stable

without fluctuation. The blood glucose of rats in group NF was fluctuated between 5 - 10mmol/L. The blood glucose of rats in group DM were maintained at higher level (>20mmol/L), without great fluctuation extent and DF with significant fluctuation. The blood glucose fluctuation in group DF was significant. The blood glucose changes of rats in the group NF and DF were significant and regular. The curve of blood glucose fluctuations was relatively stable. All values of rats in group NF, DM and DF were significantly increased compared with group NC. Group DF was increased more significantly, and the comparison with group NF and DM had significant difference ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** Significant blood glucose fluctuation can be formed through the method of manual intraperitoneal injection of glucose. The method can be used for simulating the blood glucose fluctuation situation of patients with diabetics. This method has the advantages of simple operation, low injury and good repeatability. It can provide experimental basis for *in vivo* study of blood glucose fluctuation injury mechanism and pathogenesis of diabetic complications.

• **KEYWORDS:** diabetes mellitus; blood glucose fluctuation; animal model

Citation: Gai CL, Zhao JR, Chen XL. Discussion on the establishment of blood glucose fluctuation animal models. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(4):610-613

摘要

目的:通过腹腔注射葡萄糖的方法建立血糖波动动物模型,以模拟糖尿病患者的血糖波动情形,为在体研究血糖波动的损伤机制提供实验基础。

方法:SD大鼠随机分为四组:正常对照组(NC)、正常波动组(NF)、糖尿病模型组(DM)和糖尿病波动组(DF)。首先腹腔注射STZ诱导糖尿病模型,成模后NF和DF两组大鼠每天3次腹腔注射一定量的葡萄糖造成血糖波动,每2wk进行一次全天血糖检测,根据血糖值绘制“时间-血糖浓度”曲线,观察血糖波动的情况。并计算平均血糖水平(MBG)、平均血糖水平标准差(SDBG)、最大血糖波动幅度(LAGE)和Sclightkrull Mz值(M值),从四个不同方面来评价血糖的稳定性。

结果:NC组大鼠全天血糖在正常范围内,平稳无波动,NF组大鼠血糖在5~10mmol/L范围内波动,DM和DF组大鼠血糖维持在较高水平(>20mmol/L),DM组血糖波动不大,DF组血糖波动明显;NF和DF两组大鼠的血糖变化明显而且规律,波动曲线比较稳定。NF、DM与DF三组大鼠评价血糖稳定性的各项指标均较NC组有

明显的增高,DF组升高更显著,多组及两组间比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。

结论:通过人为腹腔注射葡萄糖的方法能形成明显的血糖波动,可用来模拟糖尿病患者的血糖波动情形,此方法操作简单、损伤小、可重复性好,为在体研究血糖波动的损伤机制以及糖尿病并发症的发病机制提供了实验基础。

关键词:糖尿病;血糖波动;动物模型

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.04.09

引用:盖春柳,赵静如,陈晓隆,等.糖尿病血糖波动动物模型建立的初探.国际眼科杂志2014;14(4):610-613

0 引言

糖尿病是以慢性高血糖为特征的代谢紊乱,其对靶器官的损伤主要通过慢性持续高血糖和慢性波动性高血糖(血糖波动)两种方式体现^[1]。以往对糖尿病病因的研究多是注重慢性持续高血糖,但随着临床观察和科学研究的不断深入,慢性波动性高血糖对糖尿病患者的影响越来越受到重视。

目前关于在体血糖波动动物模型尚无经典式报道。本实验通过每天3次腹腔注射葡萄糖的方法达到血糖波动,观察期间每2wk监测一次大鼠全天血糖变化,对大鼠血糖的稳定性进行评估,从而对此种建立血糖波动动物模型的方法进行评价,为在体研究血糖波动的损伤机制及与糖尿病并发症之间的关系提供相关的动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康雄性SD大鼠40只,鼠龄12周,体质量180~220g,无眼疾,由中国医科大学附属盛京医院实验动物中心提供,由专人分笼喂养,严格遵守清洁动物级大鼠喂养条件。大鼠随机分为四组:正常对照组(NC)、正常波动组(NF)、糖尿病模型组(DM)、糖尿病波动组(DF),每组10只作为实验样本。实验动物及实验所用条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素(streptozocin,STZ,美国Sigma公司);50%葡萄糖(glucose,20g/10mL,上海化学试剂公司)。拜安捷2血糖仪和血糖监测试纸(美国拜耳医药保健有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 血糖波动模型的建立 所有大鼠适应性饲养1wk,禁食12h后称重,DM和DF组大鼠用新鲜配置的1%STZ溶液,按60mg/kg剂量一次性腹腔内注射,诱导建立糖尿病大鼠模型,NC和NF组大鼠则腹腔注射等体积的无菌柠檬酸盐缓冲液。注射30min后自由进食进水,72h后尾缘静脉取血,血糖仪测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L者,稳定5d即可作为糖尿病模型建模成功。将糖尿病模型成功的大鼠随机分成DM和DF组。NF和DF组的建立方法是:每天3次腹腔注射50%葡萄糖溶液2g/kg,注射时间分别为8:00、12:00和16:00。NC和DM组按照上述的方法腹腔注射等量的生理盐水。每2wk测量一次体质量,根据体质量的变化调整注射葡萄糖和生理盐水的量,连续观察8wk。

1.2.2 绘制“时间-血糖浓度”曲线 每2wk进行一次大鼠全天血糖的检测:即各组大鼠在每次注射前、注射后30min及夜间取血测血糖,共监测7个时间点的血糖,分别为8:00,8:30,12:00,12:30,16:00,16:30和20:00时。根据第4,8wk的血糖检测值绘制“时间-血糖浓度”曲线,观察血糖波动的情况。

1.2.3 血糖稳定性的评估 根据全天的血糖值计算各组大鼠平均血糖水平(MBG)、平均血糖水平标准差(SDBG)、最大血糖波动幅度(LAGE)和Schlichtkrull Mz值(M值),从四个不同方面来评价血糖的稳定性。LAGE是日内血糖最高值与最低值之差,M值计算方法参照相关文献: $M = \sum |10 \times \text{LOG}_{10}(BG/5)|3/N$,BG为血糖值,N为测量血糖次数。

统计学分析:所有资料采用SPSS 17.0统计软件进行分析。血糖稳定性的评估指标服从正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状况 NC和NF组大鼠无糖尿病症状,精神状态良好,毛皮有光泽,动作自如,反应灵敏。DM和DF组大鼠呈现明显多饮、多食、多尿典型的糖尿病症状,精神逐渐萎靡,毛皮污秽无光泽,体型消瘦、蜷卧拱背,早期多动,后期反应迟钝,部分大鼠开始出现晶状体混浊(图1)。

2.2 大鼠体质量变化 所有大鼠体质量在实验前比较无显著差异($F=0.150, P=0.929$),实验后均使用标准颗粒饲料喂养,NC和NF组大鼠体质量稳步增长,DM和DF组大鼠体质量增长缓慢。根据所测体质量值绘制成曲线见图2。我们对结果进行了分析:在各时间点多组间比较差异均有统计学意义($P<0.01$);第2wk $F=6.13$,第4wk $F=24.77$,第6wk $F=64.85$,第8wk $F=149.04$);两组间比较,NC和NF组无差异($P>0.05$),DM和DF组之间无差异($P>0.05$),DM、DF组分别与NC、NF组比较均有显著差异($P<0.01$)。

2.3“时间-血糖浓度”曲线 根据第4,8wk的血糖检测值绘制“时间-血糖浓度”曲线(图3)。结果显示:(1)NC组大鼠全天血糖在正常范围内,平稳无波动,NF组大鼠血糖在5~10mmol/L范围内波动,DM和DF组大鼠血糖维持在较高水平(>20 mmol/L),DM组波动幅度不大,DF组则出现明显的波动;(2)每次腹腔注射葡萄糖后(NF和DF组)可使血糖出现明显的升高,与没有注射的对应组(NC和DM组)比较均有显著差异($P<0.01$);(3)从绘制的第4,8wk两个“时间-血糖浓度”曲线可以看出,NF、DF组大鼠的血糖浓度变化明显而且规律,即注射葡萄糖后血糖会迅速上升,在下次注射前血糖基本恢复到原先水平,与观察的时间即病程的长短无明显差异,波动曲线比较稳定。

2.4 血糖稳定性的评估 第4,8wk各组大鼠的MBG、SDBG、LAGE及M值详见表1和表2。NF、DM与DF三组大鼠各项指标均较NC组增高,各组间及两组间比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。表明腹腔注射葡萄糖后会导致血糖波动,血糖的不稳定性增加,而且糖尿病大鼠的血糖波动幅度比正常大鼠的波动幅度大。

表1 各组第4wk大鼠血糖稳定性各指标的比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	MBG (mmol/L)	SDBG (mmol/L)	LAGE (mmol/L)	M-Value
NC组	4.93±0.20	0.50±0.14	1.38±0.38	0.16±0.11
NF组	6.94±0.38 ^b	2.82±0.34 ^b	6.07±0.73 ^b	10.66±3.20 ^b
DM组	20.83±1.43 ^b	1.51±0.44 ^b	4.10±1.25 ^b	239.09±34.33 ^b
DF组	26.72±1.27 ^{b,d,f}	5.00±0.76 ^{b,d,f}	10.46±2.27 ^{b,d,f}	387.99±31.81 ^{b,d,f}
F	2336.56	331.77	158.30	1285.56
P	0.000	0.000	0.000	0.000

^bP<0.01 vs NC组; ^dP<0.01 vs DM组; ^fP<0.01 vs NF组。

表2 各组第8wk大鼠血糖稳定性各指标的比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	MBG (mmol/L)	SDBG (mmol/L)	LAGE (mmol/L)	M-Value
NC组	5.10±0.25	0.51±0.11	1.46±0.36	0.18±0.14
NF组	6.92±0.40 ^b	2.65±0.36 ^b	5.92±0.65 ^b	12.00±3.01
DM组	21.51±0.92 ^b	1.39±0.69	4.10±1.92 ^b	255.18±22.43 ^b
DF组	26.91±1.30 ^{b,d,f}	4.89±0.75 ^{b,d,f}	10.99±2.24 ^{b,d,f}	392.59±32.83 ^{b,d,f}
F	3335.17	245.35	139.64	1853.42
P	0.000	0.000	0.000	0.000

^bP<0.01 vs NC组; ^dP<0.01 vs DM组; ^fP<0.01 vs NF组。

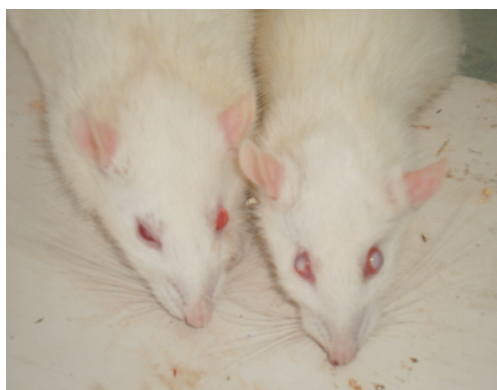


图1 大鼠一般状态的比较。

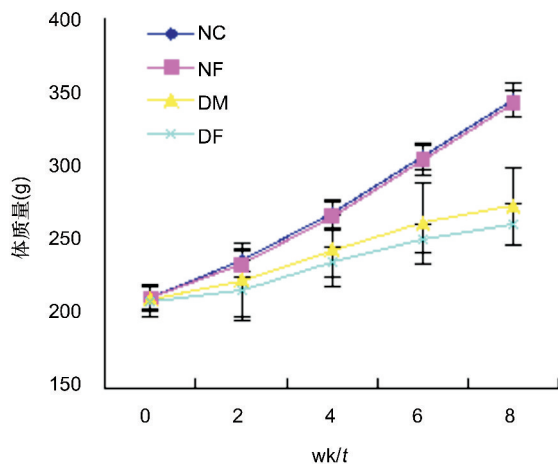


图2 大鼠体质量变化曲线。

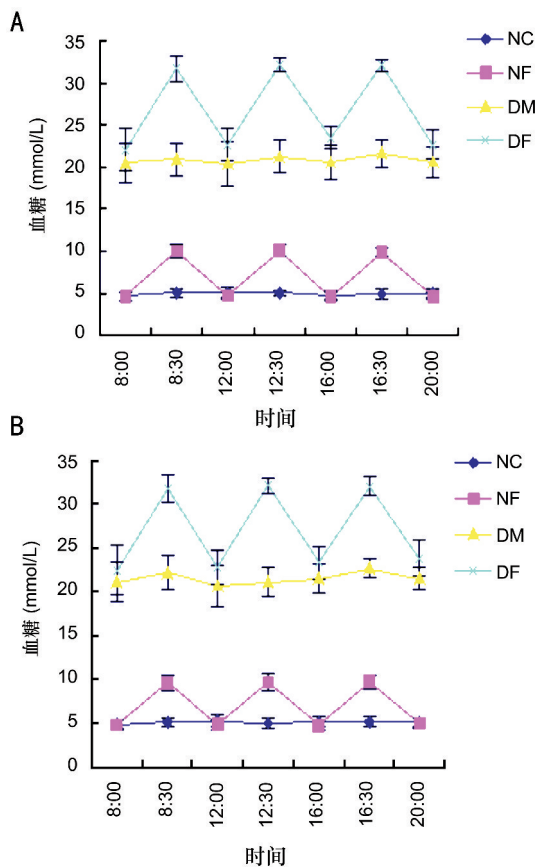


图3 “时间-血糖浓度”曲线 A:第4wk;B:第8wk。

3 讨论

我国糖尿病的发病率正逐年上升,已经成为威胁人们健康、生活质量甚至危及生命的主要原因,它的主要危害在于各种并发症的出现。随着糖尿病患者多项大型临床试验的开展以及对其病理生理机制的深入研究,目前多数研究认为,整体血糖水平和血糖波动情况共同决定了糖尿病

慢性并发症的发生和发展^[2,3],糖尿病患者的血糖波动幅度越大,慢性并发症的发生率越高、预后越差。

目前关于血糖波动的研究多见于临床报道和细胞水平^[4],而在体研究血糖波动的动物模型较少。有学者通过每天定时腹腔注射速效胰岛素类似物门冬胰岛素并错时给予葡萄糖,造成一天中血糖浓度大幅度波动^[5],或通过每日3次腹腔注射葡萄糖造成血糖波动^[6],或每天定时喂

养来造成血糖的波动^[7]。通过阅读大量文献,考虑到我们应用的是一次性注射大剂量 STZ 诱导的 1 型糖尿病模型,STZ 对胰岛 β 细胞有高度选择性,能够引起胰岛 β 细胞的破坏,从而诱发糖尿病,而胰岛素有利于胰岛细胞自身的恢复,在一定程度上对糖尿病起到了治疗的作用,对实验结果可能会产生影响,所以我们也仅采用腹腔注射葡萄糖的方法来构建血糖波动模型。

本实验中,我们对血糖波动模型连续观察 8wk,每 2wk 检测一次全天血糖变化,并将第 4,8wk 的检测结果绘制成曲线,从中我们可以看出:大鼠腹腔注射葡萄糖后血糖会迅速上升,但在下次注射前血糖基本恢复到原先水平,每天注射 3 次,就形成了 3 个明显的尖峰,而没有注射葡萄糖的大鼠血糖基本稳定在一定水平,说明注射葡萄糖后会使血糖出现明显的波动。在实验期间每次监测的大鼠全天血糖都有上述明显的波动,而且有规律,绘制的“时间-血糖浓度”曲线比较稳定,没有随着实验的进程即糖尿病的病程出现明显的差异,说明通过人为腹腔注射葡萄糖的方法建立血糖波动模型是可行的、可靠的。

评估血糖波动的参数有很多,我们选取平均血糖水平(MBG)、平均血糖水平标准差(SDBG)、最大血糖波动幅度(LAGE)和 Schlichtkrull Mz 值(M 值)4 个最常用的参数来评估血糖波动的情况。MBG 反应全天血糖的平均水平;SDBG 代表所有血糖测定值偏离平均血糖的程度,反映血糖的离散特征;LAGE 是日内血糖最高值与最低值之差,反应日内血糖最大波动幅度;M 值是对各血糖值相对于目标血糖水平的偏移大小进行统计转化,包含整体血糖水平和血糖稳定两方面的信息^[8,9],目标血糖通常为正常血糖的平均值 5mmol/L。结果发现 NF、DM 和 DF,3 组上述各项指标与 NC 组比较均明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$),每两组之间比较也有显著差异($P<0.01$),提示通过人为腹腔注射葡萄糖的方法能够造成血糖明显波

动,增加血糖的不稳定性,而且对糖尿病大鼠的影响更大,血糖波动幅度比正常大鼠明显。

综上所述,无论是正常大鼠还是糖尿病大鼠,均能通过人为腹腔注射葡萄糖的方法导致血糖明显的波动,增加血糖的不稳定性,波动幅度大而且稳定,另外此方法操作简单、损伤小、可重复性好,所以本实验构建的血糖波动模型是成功的、可靠的,为在体研究血糖波动的损伤机制及与糖尿病并发症之间的关系提供了相关的动物模型。

参考文献

- 1 Del Prato S. In search of normoglycemia in diabetes: controlling postprandial glucose. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26 (Suppl 3):S9-17
- 2 王先令,陆菊明,潘长玉,等. 糖耐量低减者和新诊断 2 型糖尿病患者动态血糖谱的特点. *中华医学杂志* 2006;86(10):674-677
- 3 张静,叶希韵,王耀发. 血糖波动与糖尿病并发症. *中华中西医杂志* 2005;6(9):1319-1321
- 4 Risso A, Mercuri F, Quagliaro L, et al. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281(5):E924-930
- 5 金可可,林艳红,王万铁,等. 血糖波动对糖尿病大鼠肾小球内皮细胞和肾小管上皮细胞凋亡的影响. *中国病理生理杂志* 2007;23(3):570-573
- 6 涂白青,翁宇静,童智,等. 糖尿病小鼠血糖波动模型的建立及其对脏器损伤的研究. *复旦学报(自然科学版)*2008;47(5):647-651
- 7 Azuma K, Toyofuku Y, Iesaki T, et al. Acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor, improves endothelial dysfunction in Goto-Kakizaki rats exhibiting repetitive blood glucose fluctuation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345(2):688-693
- 8 Guerci B. Asymptomatic glycemic instability: how to measure it and which clinical applications? *Diabetes Metab* 2003;29(2):179-188
- 9 Rodbard D. Interpretation of continuous glucose monitoring data: glycemic variability and quality of glycemic control. *Diabetes Technol Ther* 2009;11(suppl1):S55-67