

糖尿病胃轻瘫大鼠模型制作的实验研究

柏晓辉¹, 管志敏¹, 潘艳伶^{2*}

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550001; 2. 贵州医科大学 中医科, 贵州 贵阳 550001)

[摘要] 目的: 探讨小剂量链脲佐菌素注射液(STZ)联合高能量饮食法诱导糖尿病胃轻瘫(DGP)大鼠模型。方法: 将24只大鼠随机均分为正常组和模型组, 正常组大鼠予普通饲料喂养, 模型组大鼠予高脂高糖喂养, 模型组大鼠高脂高糖喂养4周后, 予1% STZ溶液腹腔注射3次, 剂量分别为20、25、35 mg/kg, 第3次注射后4周测大鼠空腹血糖、胃内残留率、血清胃动素(MLT)、胃泌素(GAS), 同时取大鼠胃组织, 观察胃窦平滑肌细胞。结果: 模型组大鼠空腹血糖、胃内残留率、MLT、GAS明显高于正常组, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 模型组大鼠胃窦平滑肌细胞形态学改变较正常组大鼠有明显差异。结论: 小剂量STZ联合高能量饮食法可成功复制DGP大鼠模型。

[关键词] 糖尿病; 胃轻瘫; 动物, 模型; 大鼠; 链脲佐菌素, 小剂量; 高脂高糖食物

[中图分类号] R573.9; R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)10-1060-03

Experimental Study on the Model of Diabetic Gastroparesis Rat

BAI Xiaohui¹, GUAN Zhimin¹, PAN Yanling²

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550001, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the establishment of rat model of diabetic gastroparesis (DGP) by low dose of STZ combined with high energy diet. **Methods:** Twenty-four rats were randomly divided into normal group and model group, 12 rats in each group. Rats in normal group were fed with common diet while rats in model group were fed with high energy diet. After four weeks of high energy diet feeding, rats in model group received intraperitoneal injection of low dose of STZ solution three times, 20, 25, 35 mg/kg respectively. Four weeks after the third injection, FBG level, the gastric emptying rate, serum MLT, GAS content of rats were detected. And the gastric tissue of rats was taken out to observe morphological changes of gastric smooth muscle cell. **Results:** The FBG level, gastric emptying rate, serum MLT and GAS content of rats in model group were significantly higher than their counterparts in normal group ($P < 0.01$). The morphological changes of gastric smooth muscle cell in model group were different from those in normal group. **Conclusion:** Low dose of STZ combined with high energy diet can successfully establish the rat model of DGP.

[Key words] diabetes mellitus; diabetic gastroparesis; animals model; rat; streptozotocin, small dose; high energy diet

随着糖尿病发病率的持续上升^[1], 糖尿病胃轻瘫(DGP)发生率也呈现迅猛增长的势头。据国内外相关资料统计, 50%~76%糖尿病患者并发胃轻瘫, 特别在晚期糖尿病患者中高达75%^[2-3]。

为深入研究本病的防治, 建立一种理想的动物模型十分必要。本文对小剂量链脲佐菌素注射液(STZ)联合高能量饮食法建立大鼠DGP模型进行了研究, 报告如下。

*通信作者 E-mail: 1092175568@qq.com

网络出版时间: 2015-09-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150911.2255.020.html>

1 材料与amp;方法

1.1 动物与amp;材料

SPF 级 SD 大鼠,健康雄性 24 只,体重(200 ± 20)g,由贵州医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号 SCXK(黔)2002-0001。本实验所用 STZ 由美国 Sigma 公司生产,大鼠胃动素(motilin, MLT)酶联免疫分析试剂盒、大鼠胃泌素(gastrin, GAS)酶联免疫分析试剂盒,均购于昆明腾昆科技有限公司。普通饲料配方:碳水化合物 50%,脂肪 10%,蛋白质 20%。高能量饲料配方:碳水化合物 61%,脂肪 14%,蛋白质 14%,蔗糖 10%,胆固醇 1%。

1.2 方法

将 24 只大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为正常组(12 只)、模型组(12 只),正常组予普通饲料喂养,模型组大鼠予高能量饲料喂养,连续 4 周;4 周后模型组大鼠经腹腔注射 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液配制 STZ 溶液,剂量为 20 mg/kg,72 h 后尾静脉取血测空腹血糖 > 16.7 mmol/L 为模型组^[4]。首次造模后 12 只大鼠空腹血糖均未达糖尿病标准,未有死亡;第二次予 25 mg/kg 剂量腹腔注射 STZ 溶液,72 h 后测空腹血糖仍未达标(较首次空腹血糖明显升高),未有死亡;第 3 次予 35 mg/kg 剂量腹腔注射 STZ 溶液,72 h 后测空腹血糖有 11 只大鼠血糖达标,1 只死亡。正常组经腹腔注射等量枸橼酸钠缓冲液。实验期间所有大鼠随意饮水。

1.3 检测指标

在实验结束处死大鼠前禁食不禁水 24 h,处死大鼠 30 min 前予半固体糊状物(羟甲基纤维素 5 g、奶粉 8 g、糖 4 g、淀粉 4 g、加水 125 mL 配成约 150 g 糊状物)2 mL/只进行灌胃;30 min 后股动脉采血处死大鼠,每只大鼠取血 5 mL,标本静置 30 min 后,以 3 000 r/min 离心 10 min,分离出血清,用酶联免疫法检测 MLT、GAS 含量,标本处理及操作均严格按照试剂盒说明书进行。处死大鼠后随即剖腹取胃(将贲门和幽门结扎后剪断),拭净,称胃全重,沿胃大弯将其剖开,除去胃内容物、清洗胃后拭干再称其重量,测胃内残留率^[5],胃内残留率=(胃全重-胃净重)/糊重×100%。取胃窦组织约 10 mm×2 mm,放入 10% 福尔马林液固定病理切片,观察胃窦平滑肌细胞形态。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学分析软件进行数据分

析,计算资料数据处理用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后空腹血糖、胃内残留率

模型组大鼠造模后空腹血糖及胃内残留率较正常组明显升高(*P* < 0.01),证明本实验复制 DGP 大鼠成功。见表 1。

表 1 两组大鼠造模后空腹血糖及胃内残留率比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of GER and FBG after modeling between normal group and model group

组别	<i>n</i>	造模后空腹血糖(mmol/L)	胃内残留率(%)
正常组	12	6.087 5 ± 0.461 2	0.218 1 ± 0.039 4
模型组	8	22.112 5 ± 2.797 7 ⁽¹⁾	0.510 0 ± 0.121 1 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与正常组比较,*P* < 0.01

2.2 血清 MLT、GAS 含量

由表 2 可见,模型组大鼠血清 MLT、GAS 含量较正常组显著升高(*P* < 0.01),通过胃肠激素水平进一步证明本实验大鼠 DGP 模型复制成功。

表 2 两组大鼠血清 MLT 及 GAS 含量比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of serum MLT, GAS content between normal group and model after modeling group

组别	<i>n</i>	MLT(ng/g)	GAS(ng/g)
正常组	12	0.251 9 ± 0.088 6	0.422 5 ± 0.035 3
模型组	8	0.461 9 ± 0.022 7 ⁽¹⁾	0.627 5 ± 0.065 3 ⁽¹⁾

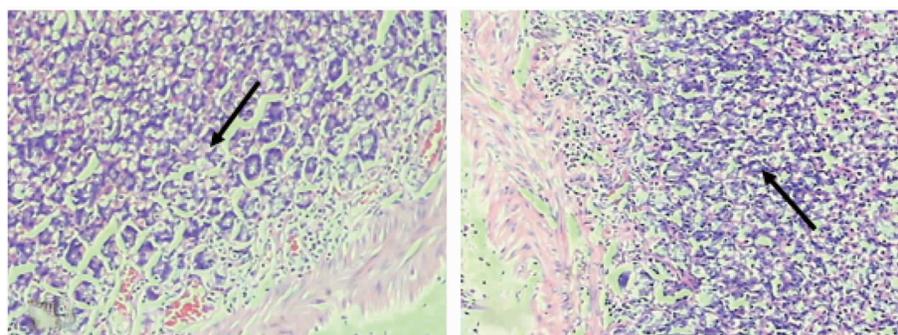
⁽¹⁾与正常组比较,*P* < 0.01

2.3 胃窦平滑肌细胞形态

正常组大鼠胃窦平滑肌细胞多呈梭形,细胞核规则,呈长椭圆形,核膜相对平滑,褶皱少而浅,异染色质分布均匀,胞质内密斑、密体明显,肌丝清晰可见。模型组大鼠胃窦平滑肌细胞变小,细胞核不规则、核膜皱缩明显,染色质呈致密块状,深染、边聚,密体、肌丝减少。见图 1。

3 讨论

2011 年全世界糖尿病患者约 3.66 亿人,比 2010 年增加了 0.8 亿多,提升近 30%,统计当年每 1 min 约有 10 人死于糖尿病并发症^[6]。作为糖尿



正常组

模型组

图1 正常组和模型组大鼠胃窦平滑肌细胞(HE, ×100)

Fig. 1 Comparison of morphological changes of smooth muscle cell of sinuses ventriculi

病常见慢性并发症之一, DGP 不仅能引起病人血糖控制不佳, 还可诱发机体营养不良及内环境紊乱, 导致全身衰竭, 加剧病情恶化^[7]。DGP 的发展将严重影响糖尿病其他并发症的发生与进展, DGP 不仅是患者关注的焦点, 也是医学工作者研究的热点, 复制 DGP 大鼠模型对研究糖尿病引起的 DGP 的发生机制及有效治疗十分重要。

目前, DGP 大鼠造模主要有实验诱导法和自发性糖尿病模型, 因自发性动物模型价格昂贵, 且造模过程时间长, 所需饲养条件及饲料要求严格而难以得到进一步推广, 故在实验研究中, 主要常用实验诱导法。实验诱导法又包含特殊膳食诱导和化学药物诱导两种, 特殊膳食主要以高能量饲料为主。Chalkley 等^[8]发现, 用高能量膳食诱导健康动物一定时间后可出现胰岛素抵抗, 但不能达到高血糖, 即便能诱导出高血糖模型也需要比较长的时间, 大概半年到两年不等。Maria 等^[9]用高脂肪饲料饲养小鼠, 1 年后观察到小鼠葡萄糖耐受试验明显异常, 且发现胰岛素量代偿性增加, 可但空腹血糖变化不大。化学药物诱导 DGP 模型的应用较多的试剂有 STZ 和四氧嘧啶 (ALX), STZ、ALX 均能有目的性的破坏哺乳动物胰岛 β 细胞。ALX 价廉, 造模过程中动物的死亡率较高, 注射后动物对其有依赖性; 而 STZ 虽价格比 ALX 稍高, 但其诱导的模型较稳定, 死亡率低, 故实验研究中用 STZ 较广泛。目前动物实验使用 STZ 造模的主要有两种方式, 一种是单次大剂量注射 STZ^[10-12], 可使动物血糖迅速升高, 适合短时间内需求高血糖动物模型的实验所用, 此种造模方式复制的动物模型更类似 1 型糖尿病, 但单次大剂量注射 STZ 后会使得动物血糖过高, 极易发生酮症死亡, 故此种方法造模的死亡率亦偏高, 且动物模型不稳定; 另一种方法是多

次小剂量腹腔注射 STZ 溶液, 可使血糖水平逐步上升, 但此种方法是通过直接破坏胰岛 β 细胞实现的, 而与人类 DGP 发生过程差距较大。在复制糖尿病胃轻瘫模型的研究中较多使用的有 ALX 联合熟地灌胃以及小剂量 STZ 联合高能量饮食喂养两种。

本实验采用特殊膳食和化学药物联合诱导的造模方式, 共分为两期, 第一期即特殊膳食诱导期, 予大鼠高能量饲料喂养, 4 周后高能量喂养的模型组大鼠体重明显增加, 这一期大鼠的状况接近人类糖尿病前期的脂代谢紊乱期; 第二期为化学药物诱导期, 特殊膳食 4 周后, 给大鼠小剂量链脲佐菌素溶液腹腔注射 3 次, 逐渐破坏大鼠胰岛 β 细胞。运用化学药物加速胰岛 β 细胞的破坏, 使其在病理机制上更接近于人类 DGP 发生发展过程。本实验以空腹血糖和胃内残留率作为检测造模成功的指标, 模型组大鼠空腹血糖明显升高、胃内残留率升高, 组织细胞图片显示胃窦平滑肌细胞的轻微改变, 血清 MLT、GAS 水平升高, 证实复制 DGP 模型成功, 且造模过程中大鼠存活率达 91.67%, 表明本实验造模方法可获得研究糖尿病 DGP 动物模型。

4 参考文献

- [1] Gautam A, Baluch A, Kaye A, et al Modern strategies for the anesthetic management of the patient with diabetes [J]. Middle East J Anesthesiol, 2009(2):187-197.
- [2] 许曼音, 陆广华, 陈明道, 等. 糖尿病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003:50-51.
- [3] 陆英杰, 连至诚. 糖尿病胃轻瘫治疗现状[J]. 实用糖尿病杂志, 2005(6):49-51.

(下转第 1069 页)

度, MRI T₁WI 为等或高信号, T₂WI 呈高低混杂信号, 但 DWI 序列是其非常有价值的诊断、鉴别方法, 因其囊内容物粘稠度高, 水分子扩散受限, 故表皮样囊肿表现为明显高信号, 但部分学者认为这种高信号是由于 T₂ 穿透效应所致^[12]。畸胎瘤发病年龄较小, 常发生于松果体区和鞍区, CT 扫描呈混杂密度, 可见脂肪、软组织和钙化, 对钙化显示敏感, T₁WI 和 T₂WI 均显示信号混杂, 增强 T₁WI 病变呈不规则强化。蛛网膜囊肿好发于中颅窝和桥小脑角区, 囊内成分单一, 为脑脊液, 无脂肪及钙化, CT 为均匀低密度, MRI 信号强度均匀一致, MRI 平扫 T₁WI 为低信号, T₂WI 为高信号, FLAIR 和 DWI 上表现为低信号, 增强 T₁WI 病变不强化。

综上所述, 颅内皮样囊肿自发性破裂的临床表现不具特征性, 但 CT 及 MRI 能够准确显示原发部位的皮样囊肿和破裂后游离于脑脊液内的脂滴, 表现具有特征性, 尤其是 MRI 显示最为敏感, 能够准确显示病灶累及的范围, 对诊断及鉴别诊断具有重要价值, 可为临床制定治疗策略提供客观依据。一旦确定破裂的原发皮样囊肿后应尽早手术治疗, 以防内容物继续溢出。

4 参考文献

- [1] Kabbasch C, Dorn F, Mpotsaris A, et al. Rupture of a spinal dermoid cyst may lead to dissemination and progress of Fatty tissue in the central spinal canal and intracranial subarachnoid space. A case report[J]. *Neuroradiol J*, 2014(6):759-763.
- [2] Garg K, Kumar R. Isolated central canal rupture of spinal dermoid. Report of 3 cases[J]. *J Neurosurg Spine*, 2014(3):361-366.
- [3] Sharma M, Mally R, Velho V. Ruptured conus medullaris dermoid cyst with fat droplets in the central canal[J]. *Asian Spine J*, 2013(1):50-54.
- [4] 孟令惠, 何杰, 崔建岭. 中枢神经系统肿瘤破裂脂滴进入脑脊液三例分析及文献复习[J]. *中华神经医学杂志*, 2014(6):630-632.
- [5] Esquenazi Y, Kerr K, Bhattacharjee MB, et al. Traumatic rupture of an intracranial dermoid cyst: Case report and literature review[J]. *Surg Neurol Int*, 2013(4):80.
- [6] Loumiotis I, Morris JM. Central nervous system epidermoid cyst rupture[J]. *Arch Neurol*, 2012(1):136-137.
- [7] Zimny A, Zińska L, Bladowska J, et al. Intracranial lesions with high signal intensity on T1-weighted MR images-review of pathologies[J]. *Pol J Radiol*, 2013(4):36-46.
- [8] Asil K, Gunduz Y, Ayhan LT, et al. Spontaneous rupture of intracranial dermoid tumor in a patient with vertigo. Computed tomography and magnetic resonance imaging findings[J]. *Pol J Radiol*, 2013(4):79-82.
- [9] Kim KH, Cho JH. Ruptured intracranial dermoid cyst associated with rupture of cerebral aneurysm[J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2011(5):453-456.
- [10] Skovrlj B, Mascitelli JR, Steinberger JM, et al. Progressive visual loss following rupture of an intracranial dermoid cyst[J]. *J Clin Neurosci*, 2014(1):159-161.
- [11] De Maio PN, Mikulis DJ, Kiehl TR, et al. AIRP best cases in radiologic-pathologic correlation: Spinal conus dermoid cyst with lipid dissemination[J]. *Radiographics*, 2012(4):1215-1221.
- [12] 文宝红, 程敬亮, 张勇, 等. 颅内表皮样囊肿破裂的 MRI 诊断[J]. *放射学实践*, 2013(1):34-37.
(2015-06-13 收稿, 2015-08-11 修回)
中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 赵毅
- [1] Kabbasch C, Dorn F, Mpotsaris A, et al. Rupture of a spinal dermoid cyst may lead to dissemination and progress of Fatty tissue in the central spinal canal and intracranial subarachnoid space. A case report[J]. *Neuroradiol J*, 2014(6):759-763.
- [2] Garg K, Kumar R. Isolated central canal rupture of spinal dermoid. Report of 3 cases[J]. *J Neurosurg Spine*, 2014(3):361-366.
- [3] Sharma M, Mally R, Velho V. Ruptured conus medullaris dermoid cyst with fat droplets in the central canal[J]. *Asian Spine J*, 2013(1):50-54.
- [4] 孟令惠, 何杰, 崔建岭. 中枢神经系统肿瘤破裂脂滴进入脑脊液三例分析及文献复习[J]. *中华神经医学杂志*, 2014(6):630-632.
- [5] Esquenazi Y, Kerr K, Bhattacharjee MB, et al. Traumatic rupture of an intracranial dermoid cyst: Case report and literature review[J]. *Surg Neurol Int*, 2013(4):80.
- [6] Loumiotis I, Morris JM. Central nervous system epidermoid cyst rupture[J]. *Arch Neurol*, 2012(1):136-137.
- [7] Zimny A, Zińska L, Bladowska J, et al. Intracranial lesions with high signal intensity on T1-weighted MR images-review of pathologies[J]. *Pol J Radiol*, 2013(4):36-46.
- [8] Asil K, Gunduz Y, Ayhan LT, et al. Spontaneous rupture of intracranial dermoid tumor in a patient with vertigo. Computed tomography and magnetic resonance imaging findings[J]. *Pol J Radiol*, 2013(4):79-82.
- [9] Kim KH, Cho JH. Ruptured intracranial dermoid cyst associated with rupture of cerebral aneurysm[J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2011(5):453-456.
- [10] Skovrlj B, Mascitelli JR, Steinberger JM, et al. Progressive visual loss following rupture of an intracranial dermoid cyst[J]. *J Clin Neurosci*, 2014(1):159-161.
- [11] De Maio PN, Mikulis DJ, Kiehl TR, et al. AIRP best cases in radiologic-pathologic correlation: Spinal conus dermoid cyst with lipid dissemination[J]. *Radiographics*, 2012(4):1215-1221.
- [12] 文宝红, 程敬亮, 张勇, 等. 颅内表皮样囊肿破裂的 MRI 诊断[J]. *放射学实践*, 2013(1):34-37.
(2015-06-13 收稿, 2015-08-11 修回)
中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 赵毅
- (上接第 1062 页)
- [4] 钟毅, 赵自明, 陆英杰, 等. 胃肠舒对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦平滑肌细胞病变的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009(9):71-76.
- [5] 吴春福, 陈多. 小鼠胃排空模型的探讨[J]. *中国药理学通报*, 1997(3):271-272.
- [6] 莫一菲, 周健, 贾伟平. 国际糖尿病联盟 2011-2021 年全球糖尿病计划解读[J]. *浙江医学*, 2013(3):977-979.
- [7] 姚冬英, 刘菲. 糖尿病胃轻瘫发病机制的研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2011(1):16-17.
- [8] Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm D J, et al. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002(282):1231-1238.
- [9] Maria So rhede Winzell and Bo Ahren eta l. A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes[J]. *Diabetes*, 2004(supplement3):215-219.
- [10] 葛海燕, 沈明勤, 李娟. 中医益气健脾与养阴和胃法对糖尿病胃轻瘫大鼠胃动力和胃血流的作用比较[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012(12):238-241.
- [11] 赵宏贤, 陈霞, 杨燕, 等. 糖尿病胃轻瘫大鼠胃平滑肌细胞超微结构变化[J]. *现代预防医学*, 2008(9):1764-1766.
- [12] 李丽霞, 林国华. 电针对糖尿病胃轻瘫大鼠 MLT、GAS 的影响[J]. *河南中医学院学报*, 2006(3):25-27.
(2015-06-01 收稿, 2015-08-11 修回)
中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 刘华