

利用不同升糖指数饮食构建 2 型糖尿病大鼠血糖波动模型的实验研究

王景尚 黄 烨 郭春雨 孙明月 陈水龄 殷惠军

摘 要 **目的** 尝试利用不同升糖指数 (GI) 饮食构建 2 型糖尿病大鼠血糖波动模型。**方法** 应用高糖高脂饲料喂食联合一次性腹腔注射链脲佐菌素构建 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠, 根据血糖和体重水平将其分为高 GI 饮食组 (波动组) 和低 GI 饮食组 (稳定组), 然后采用定时投食的方法, 高 GI 组喂以高 GI 饲料, 低 GI 组喂以低 GI 饲料。7 天后经尾静脉采血法测定各组大鼠三餐前及餐后 2h 血糖, 连续测定 5 天后, 观察大鼠一般情况, 应用 ELISA 法检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、胰高血糖素 (glucagon) 和胰岛素 (insulin) 水平并计算胰岛素敏感度指数 (ISI)、最大血糖波动幅度和平均血糖波动幅度。**结果** 与正常组相比, 稳定组和波动组糖尿病大鼠体重、血清 FBG、TC 和 TG 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但两组差异无统计学意义; 波动组和稳定组大鼠胰高血糖素和胰岛素均显著升高, ISI 显著降低 ($P < 0.01$), 而两组间差异无统计学意义; 稳定组和波动组糖尿病大鼠 MAGE 和 LAGE 水平均明显升高 ($P < 0.01$); 与稳定组相比, 波动组 MAGE 和 LAGE 水平明显增加 ($P < 0.01$)。**结论** 在不影响大鼠整体血糖水平的情况下, 高 GI 饮食组糖尿病大鼠比低 GI 饮食组大鼠具有更加明显的血糖波动。运用高 GI 饮食和低 GI 饮食喂养 2 型糖尿病大鼠可以成功构建 2 型糖尿病大鼠血糖波动模型, 且该模型可保证 2 型糖尿病大鼠血糖相对稳定。

关键词 升糖指数 2 型糖尿病 血糖波动 动物模型

中图分类号 R587

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.009

Establishment of Type 2 Diabetes Mellitus Rats Model with High Blood Glucose Fluctuation using Different Glucose Index Diet. Wang Jing-shang, Huang Ye, Guo Chunyu, et al. Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China

Abstract **Objective** To establish type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats model with high blood glucose fluctuation using different glucose index diet. **Methods** The T2DM models were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin plus high fat and high caloric laboratory chow. Then they were divided into high GI diet group and low GI diet group according to glucose level and body weight level fed with the fixed time and fixed location. The fasting blood glucose and postprandial blood glucose were measured for five days. General condition, the level of fasting blood glucose (FBG), serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), glucagon and insulin were measured, insulin sensitivity index (ISI), largest amplitude of glycemic excursions (LAGE) and the mean amplitude of glycemic excursions (MAGE) were calculated. **Results** In comparison with Normal group, levels of body weight, serum FBG, TC and TG in high GI diet group and low GI diet group were all significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), however, there was no significant difference between those two groups. In comparison with Normal group, levels of glucagon and insulin in high GI diet group and low GI diet group were all significantly increased ($P < 0.01$), meanwhile ISI was decreased obviously ($P < 0.01$). However, there was no significant difference between high GI diet group and low GI diet group. In comparison with normal group, levels of MAGE and LAGE in high GI diet group and low GI diet group were all significantly increased ($P < 0.01$), and there was significant difference between high GI diet group and low GI diet group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Without impacting the levels of blood glucose, there appeared more obvious blood glucose fluctuation in high GI diet T2DM rats than low GI diet T2DM rats. We can establish T2DM rat model with high blood glucose fluctuation and relative constant high blood glucose by feeding high GI diet and low GI diet successfully.

Key words Glucose index; Type 2 diabetes mellitus; Blood glucose fluctuation; Animal model

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81202777)

作者单位: 100026 首都医科大学附属北京妇产医院中医科 (王景尚、郭春雨); 100091 北京, 中国中医科学院西苑医院 (黄烨、孙明月、陈水龄、殷惠军); 730000 兰州, 甘肃中医学院 (殷惠军)

通讯作者: 殷惠军, 研究员, 博士生导师, 电子邮箱: huijunyin@yeah.net

糖尿病是严重威胁人类健康的疾病之一, 流行病学研究显示, 相对于血糖控制良好的持续性高血糖, 血糖控制不良的血糖波动对糖尿病患者慢性并发症及全因病死率方面具有更严重的影响^[1]。因此, 血糖波动相关的研究已经成为糖尿病预防和治疗研究

领域的热点之一,而实验模型的建立就成为决定研究成败的关键。近年来,尽管不少研究者对糖尿病血糖波动实验模型进行探讨并取得一定进展,但动物模型仍相对缺乏且往往不能真实反映人体的血糖波动状态^[2]。可靠、公认的实验动物模型的缺乏,使血糖波动作用机制研究受到了极大的限制,其具体作用机制至今仍不十分明确。

本研究尝试通过引入升糖指数的概念,在不影响大鼠进食总热量的前提下,基于大鼠饲料本身升糖指数的不同构建 2 型糖尿病大鼠血糖波动模型,并从血糖总体水平、胰岛素抵抗状况和血糖波动情况对模型大鼠进行评价,尝试建立一种更能反映人体真实血糖波动状态的动物模型,为进一步阐明血糖波动作用机制和进行有效药物筛选奠定实验基础。

材料与方法

1. 材料:(1)实验动物:SPF 雄性 SD 大鼠 30 只,体重 170 ~ 190g,购自中国食品药品检定研究院,实验动物许可证号:SCXK(京)2009-0017。动物室进行基础饲料适应性喂养 3 天后进行实验。(2)实验试剂及耗材:血糖试纸(商品名:卓越型)购自德国 Roche Diagnostics GmbH 公司,大鼠 glucogan、insulin 定量 ELISA 试剂盒均购自上海西唐生物科技有限公司。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)为美国 Sigma-Aldrich 公司产品(批号:SLBB7526V)。(3)动物饲料:购自北京华富康饲料公司,其中高脂饲料含猪油 20%、蔗糖 10%、胆固醇 1.25%、胆酸盐 0.25%,普通饲料 68.5%。高升糖指数(GI)饲料:每千克饲料含糯玉米淀粉(蜡质玉米淀粉)542g、凝胶 20g、酪蛋白 200g、蔗糖 85g、豆油 56g、麦麸 50g、DL-蛋氨酸 2g、维生素混合物 10g、矿物质混合物 35g。低 GI 饲料配方:每千克饲料含高直链玉米淀粉 542g、凝胶 20g、酪蛋白 200g、蔗糖 85g、豆油 56g、麦麸 50g、DL-蛋氨酸 2g、维生素混合物 10g、矿物质混合物 35g。(4)主要仪器:高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司)、Denley Dragon Wellscan MK 3 酶标仪(芬兰 Thermo 公司)、拜安易血糖仪(德国拜耳公司)。

2. 动物分组及模型制备:30 只 SD 大鼠予普通饲料适应性喂养 2 周后,随机抽取 8 只作为正常对照组(正常组)。余下 22 只予以高糖高脂饲料喂食,喂食方式采用定时投食,每日 8:00~9:00、14:00~15:00、20:00~21:00 共计 3 次,每次持续 1h。喂食 4 周后,按剂量 30mg/kg 一次性经腹腔注 STZ(使用柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液配制,pH 4.4),3 天后连续测定空腹和餐后血糖,以空腹血糖>11.1mmol/L 且餐后血糖>33.3mmol/L 作为入组标准,成功纳入符合要求的 2 型糖尿病(T2DM)大鼠 16 只。根据血糖和体重水平将成功纳入的 T2DM 大鼠分为两组:高 GI 饮食组(波动组)和低 GI 饮食组(稳定组)。仍采用定时投食的方法,正常组喂以基础饲料,高 GI 组喂以高 GI 饲料,低 GI 组喂以低 GI 饲料。喂养 7 天后采用尾静脉采血法测定各组大鼠三餐前及餐后 2h 血糖,连续

测定 5 天。实验过程中,一旦出现血糖值>33.3mmol/L 即剔除该鼠,最后完成血糖测定的大鼠:高 GI 组 6 只、低 GI 组 6 只。

3. 取材与标本制备:血糖测定完成后,所有大鼠禁食 12h,麻醉,腹主动脉采血,分离血清进行相关指标检测。

4. 大鼠一般情况观察:观察各组大鼠精神状态、毛色、体重、进食、尿量等。

5. 相关指标检测:空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、胰高血糖素(glucagon)和胰岛素(insulin)水平测定均采用 ELISA 法进行测定,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。胰岛素敏感度指数(ISI)计算按以下公式进行^[3]: $ISI = \ln[1/(FBG \times insulin)]$ 。

6. 最大血糖波动幅度与平均血糖波动幅度的计算:最大血糖波动幅度(largest amplitude of glycemic excursions, LAGE):日内最大与最小血糖值之差,反映大鼠日内单一的最大血糖波动。平均血糖波动幅度(mean amplitude of glycemic excursions, MAGE):根据 30 次血糖计算血糖标准差(SD of blood glucose, SDBG),统计所有幅度超过 1 个 SDBG 的血糖波动,根据第 1 个有效波动的方向计算血糖波动幅度,计算所有血糖波动幅度的平均值为 MAGE。MAGE 被认为是血糖波动评价的金标准。

7. 统计学方法:实验数据均采用 SPSS 17.0 软件进行处理,所有资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般情况:造模后稳定组与波动组大鼠均出现精神萎靡,行动迟缓,对外界反应迟钝,毛色欠光泽,易脏,进食同前,但波动组饮水量和尿量均显著增加,且尿液腥臊味加重等表现。实验过程中,稳定组和波动组有 2 只出现餐后血糖值>33.3mmol/L,故予以剔除,最后完成实验的大鼠每组均为 6 只。

2. 大鼠体重和血清生化指标的比较:与正常组相比,稳定组和波动组糖尿病大鼠体重、血清 FBG、TC 和 TG 水平均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),但两组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果提示糖尿病大鼠建模成功,且稳定组与波动组之间血脂及空腹血糖水平差异无统计学意义(表 1)。

表 1 各组大鼠血清生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	体重(g)	FBG	TC	TG
		(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)
正常组	407.83 ± 46.10	7.82 ± 0.68	3.10 ± 0.23	0.66 ± 0.23
稳定组	487.00 ± 82.28 *	19.75 ± 3.51 **	3.78 ± 0.36 **	1.58 ± 0.16 **
波动组	496.00 ± 90.06 *	21.03 ± 4.15 **	3.93 ± 0.71 **	1.83 ± 0.46 **

与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. 大鼠胰高血糖素、胰岛素和 ISI 水平的比较: 与正常组相比, 波动组(高 GI 饲料)和稳定组(低 GI 饲料组)大鼠胰高血糖素和胰岛素均显著升高, ISI 显著降低($P < 0.01$), 而两组差异无统计学意义。提示 2 型糖尿病大鼠模型建立成功, 稳定组和波动组之间在胰高血糖素、胰岛素、胰岛素抵抗方面差异无统计学意义(表 2)。

表 2 各组大鼠胰高血糖素、胰岛素和 ISI 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	胰高血糖素 (pg/ml)	胰岛素 (mIU/L)	ISI
正常组	497.6 $\pm$ 152.1	23.76 $\pm$ 7.94	-4.93 $\pm$ 0.65
稳定组	1227.7 $\pm$ 154.6 *	32.16 $\pm$ 6.19 *	-6.45 $\pm$ 0.92 *
波动组	1216.3 $\pm$ 65.0 *	33.27 $\pm$ 6.86 *	-6.55 $\pm$ 1.01 *

与正常组相比, * $P < 0.01$

4. 大鼠血糖波动情况的比较: 与正常组相比, 稳定组和波动组糖尿病大鼠 MAGE 和 LAGE 水平均明显升高($P < 0.01$); 与稳定组相比, 波动组 MAGE 和 LAGE 水平明显增加($P < 0.01$), 提示其具有更加显著的血糖波动(表 3)。

表 3 各组大鼠血糖波动情况比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	MAGE	LAGE
正常组	1.61 $\pm$ 0.44	6.28 $\pm$ 1.26
稳定组	6.56 $\pm$ 1.17 **	21.42 $\pm$ 1.66 **
波动组	8.82 $\pm$ 1.76 ** ##	24.46 $\pm$ 1.07 ** ##

与正常组相比, ** $P < 0.01$; 与稳定组相比, ## $P < 0.01$

讨 论

糖尿病血糖波动相关研究是目前糖尿病预防和治疗研究领域的热点, 尽管目前研究已经取得重要进展, 但更多的都是来自于体外实验研究。因此, 建立理想的糖尿病血糖波动实验动物模型成为阐明血糖波动作用机制、进行有效药物筛选的关键环节。

目前血糖波动动物模型研究有限, 现有模型主要是通过喂食麦芽糖或葡萄糖干预造成重复餐后高血糖和胰岛素注射造成大幅度血糖波动而建立的。目前模型主要包括以下几种: (1) Azuma 等^[4]是较早进行血糖波动动物模型探索的研究者。通过每日定时两次喂食(标准饲料)GK 大鼠(非肥胖型的 2 型糖尿病)的方法诱导重复餐后高血糖而构建血糖波动模型。(2) Watada 等^[5]在 STZ 诱导形成 1 型糖尿病大鼠模型基础上, 通过每日定时两次喂食(标准饲料)的方法诱导重复餐后高血糖而建立血糖波动模型。

(3) Mita 等^[6]应用每日定时两次喂食 ApoE^{-/-}小鼠定量麦芽糖的方法诱导反复餐后高血糖制备血糖波动模型。(4) Horváth 等^[7]基于 STZ 成功诱导 1 型糖尿病大鼠模型, 通过隔日一次注射 60U/kg 长效胰岛素造成血糖控制不良(具有大幅度血糖波动)模型(稳定组通过每日 1 次注射 60U/kg 中效甘精胰岛素严格控制血糖)。(5) 涂白青等^[8]在四氧嘧啶诱导形成糖尿病 1 型小鼠模型的基础上, 通过每日 3 次腹腔注射 2g/kg 葡萄糖的方式制备血糖波动模型。(6) 本项研究前期在高脂饮食联合 STZ 注射成功制备 2 型糖尿病大鼠模型基础上, 根据造模成功糖尿病大鼠自身的血糖波动性(主要为 FPG - CV)进行分组, 观察了血糖波动对糖尿病大鼠的影响^[9]。尽管取得了一定的研究进展, 但同时也存在很多缺点, 其中最主要的是人为造成模型组与对照组之间总热量不平衡以及胰岛素作用的问题, 增加了实验的混杂因素。为此, 本研究试图引入了升糖指数的概念, 在不影响大鼠进食总热量的基础上, 通过大鼠饲料本身升糖指数的不同来构建糖尿病大鼠血糖波动模型并对其进行评价^[10]。

升糖指数, 又称葡萄糖指数(glucose index, GI), 最早由 Jenkins 等^[11]在 1981 年提出来。GI 主要是衡量富含碳水化合物食物引起餐后血糖反应的一项指标, 即食用含有 50g 糖类和食用相当数量的葡萄糖或者面包, 在一定时间内体内血糖曲线下面积的百分比值。葡萄糖的 GI 被定义为 100, > 70 的为高 GI 食物, < 50 的被认为是低 GI 食物^[10]。近年来, 研究表明食用高 GI 的食物能够显著增加心血管病、2 型糖尿病、肥胖及老年性视力衰退的风险, 进一步研究发现这与其显著诱发餐后高血糖和高胰岛素血症密切相关^[12-15]。一项系统评价的结果显示, 与高 GI 饮食相比, 低 GI 饮食组患者心血管病、2 型糖尿病、结直肠癌、子宫内膜癌和胆囊疾病的发生风险显著降低^[16,17]。同时, 食用低 GI 食物被认为能够降低肥胖患者体重、2 型糖尿病患者的果糖胺和 HbA1c 水平, 同时对胰岛素敏感度和血脂水平亦有一定的改善作用^[18-20]。对于食用高 GI 所诱发的餐后血糖急剧升高以及由此引发的相关风险早已为大家所公认。基于此, 笔者通过制备总热量相同但 GI 不同的食物, 采用定时定点喂食不同 GI 的食物来诱发 2 型糖尿病大鼠餐后血糖波动幅度的差异, 构建 2 型糖尿病血糖波动和相对稳定模型。

本研究通过高糖、高脂饮食 4 周后一次性腹腔注

射 30mg/kg 链脲佐菌素成功构建了 2 型糖尿病大鼠模型,进一步通过制备具有相同热量但是 GI 不同的高升糖指数饲料和低升糖指数饲料,并进行每日 3 次定时喂养的方法制备了 2 型糖尿病大鼠稳定高糖和波动高糖模型,并通过连续 5 日三餐前后血糖测定和 glucagon、insulin 和 ISI 水平测定评价了 2 型糖尿病大鼠血糖总体水平、胰岛素抵抗状况和血糖波动情况。研究结果表明,与正常组相比,高 GI 饲料和低 GI 饲料组大鼠 FBG、胰高血糖素、胰岛素水平均显著升高,胰岛素敏感度显著降低,且两组差异无统计学意义 ($P < 0.01$)。提示 2 型糖尿病大鼠模型建立成功,高 GI 组和低 GI 组之间的血糖总体水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。进一步对比两组间的 MAGE 和 LAGE 水平,结果发现,高 GI 组大鼠的 MAGE 及 LAGE 水平均显著高于低 GI 组。结果提示,高 GI 饮食组大鼠比低 GI 组饮食组具有更加显著的血糖波动性。本研究结果显示,在不影响大鼠整体血糖水平的情况下,高 GI 饮食糖尿病大鼠较低 GI 饮食糖尿病大鼠出现更加明显的血糖波动。

综上所述,本动物模型在保持总热量平衡的基础上,模拟人三餐进食的方式,利用食物 GI 的不同来制造血糖波动,降低了既往研究由于总热量不平衡所导致的研究差异,与临床相近,基本能反映糖尿病患者饮食相关所造成的血糖波动状态,是未来开展血糖波动作用机制研究一种可供选择的动物模型。但本研究同时也存在样本量较少、观察周期较短等不足,需要在未来工作中进一步改善。此外,在 STZ 剂量以及喂食高/低 GI 饲料剂量和时间点的选择上,如何合理兼顾 2 型糖尿病模型成膜率和血糖波动的幅度、降低超高血糖 ($> 33.3 \text{ mmol/L}$) 出现率、提高血糖波动模型造模成功率,亦是今后模型制备过程中需要进一步探讨的问题。

参考文献

- Oud L, Spellman C. The association of glucose variability and home discharge among survivors of critical illness managed with a computerized decision - support tool for glycemic control [J]. J Diabetes Sci Technol, 2014, 8(2): 277 - 285
- 王景尚, 殷惠军, 陈可冀. 糖尿病血糖波动实验模型研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2014, 43(1): 138 - 142
- 李光伟, 潘素仁, Lillijia S, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指标 [J]. 中华内科杂志, 1993, 32 (10): 656 - 658
- Azuma K, Kawamori R, Toyofuku Y, *et al.* Repetitive fluctuations in blood glucose enhance monocyte adhesion to the endothelium of rat thoracic aorta [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26 (10): 2275 - 2280
- Watada H, Azuma K, Kawamori R. Glucose fluctuation on the progression of diabetic macroangiopathy - new findings from monocyte adhesion to endothelial cells [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 77 (Suppl): 58 - 61
- Mita T, Otsuka A, Azuma K, *et al.* Swings in blood glucose levels accelerate atherogenesis in apolipoprotein E - deficient mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358 (3): 679 - 685
- Horváth EM, Benko R, Kiss L, *et al.* Rapid 'glycaemic swings' induce nitrosative stress, activate poly (ADP - ribose) polymerase and impair endothelial function in a rat model of diabetes mellitus [J]. Diabetologia, 2009, 52 (5): 952 - 961
- 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 [J]. 复旦学报: 自然科学版, 2008, 47 (5): 647 - 651
- Wang J, Yin H, Huang Y, *et al.* Influence of high blood glucose fluctuation on the endothelial function of type 2 diabetes mellitus rats and the effects of panax quinquefolius saponin of stem and leaf [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19 (3): 217 - 222
- Brand - Miller J, Buyken AE. The glycemic index issue [J]. Curr Opin Lipidol, 2012, 23 (1): 62 - 67
- Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, *et al.* Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange [J]. Am J Clin Nutr, 1981, 34 (3): 362 - 366
- Ludwig DDS. The glycemic index - Physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease [J]. JAMA, 2002, 287 (18): 2414 - 2423
- Slyper AH. The influence of carbohydrate quality on cardiovascular disease, the metabolic syndrome, type 2 diabetes, and obesity - an overview [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2013, 26 (7 - 8): 617 - 629
- Chiu CJ, Hubbard LD, Armstrong J, *et al.* Dietary glycemic index and carbohydrate in relation to early age - related macular degeneration [J]. Am J Clin Nutr, 2006, 83 (4): 880 - 886
- Venn BJ, Green TJ. Glycemic index and glycemic load: measurement issues and their effect on diet - disease relationships [J]. Eur J Clin Nutr, 2007, 61 (Suppl 1): 122 - 131
- Schwingshackl L, Hoffmann G. Long - term effects of low glycemic index/load vs. high glycemic index/load diets on parameters of obesity and obesity - associated risks: a systematic review and meta - analysis [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2013, 23 (8): 699 - 706
- Barclay AW, Petocz P, Millan - Price J, *et al.* Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk - a meta - analysis of observational studies [J]. Am J Clin Nutr, 2008, 87 (3): 627 - 637
- Anderson JW, Randles KM, Kendall CW, *et al.* Carbohydrate and fiber recommendations for individuals with diabetes: a quantitative assessment and meta - analysis of the evidence [J]. J Am Coll Nutr, 2004, 23 (1): 5 - 17
- Thomas D, Elliott E, Baur L. Low glycaemic index or low glycaemic load diets for overweight and obesity [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2007, 18 (3): CD005105
- Livesey G, Taylor R, Hulshof T, *et al.* Glycemic response and health - a systematic review and meta - analysis: relations between dietary glycemic properties and health outcomes [J]. Am J Clin Nutr, 2008, 87 (Suppl): 258 - 268

(收稿日期: 2015 - 08 - 12)

(修回日期: 2015 - 08 - 26)