

老年 db/db 小鼠生存状态的评价研究

樊蕊 郝云涛 徐美虹 李勇

摘要 目的 探讨老年 db/db 小鼠生存特征和生存质量。方法 以 db/db 小鼠作为 2 型糖尿病模型,对老年 db/db 小鼠摄食量、体质量、饮水量和尿量、自主活动次数以及血糖水平进行测定,并且对其生存率进行评价。结果 老年 db/db 小鼠体质量和摄食量随着生命进程呈下降趋势。db/db 小鼠肾周脂肪和肾周脂肪显著高于 db/m 小鼠($P < 0.05$),但其腓肠肌含量显著低于 db/m 小鼠($P < 0.05$)。db/db 小鼠 5min 内自主活动的累计时长和单次最大时长分别为 db/m 小鼠的 1/5 和 1/6。db/db 小鼠血糖显著高于 db/m 小鼠。当 db/db 小鼠 < 81 周,其存活率恒定为 73%, > 84 周,存活率降为 0。结论 老年 db/db 小鼠具备 2 型糖尿病的典型症状,其生存质量较差,并且寿命缩短,本研究对 db/db 小鼠生命进程的深入研究提供了理论依据。

关键词 db/db 小鼠 老年 生存状态 寿命

中图分类号 R587.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.029

Evaluation of Survival Status of db/db Mice in the Old Age. Fan Rui, Hao Yuntao, Xu Meihong, et al. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract Objective To explore the survival characteristics and quality of life of aging db/db mice. **Methods** Db/db mice were used as a type 2 diabetes model. The food intake, body weight, water intake and urine volume, the number of spontaneous activities and blood glucose levels of db/db mice in the old age were measured. And the survival rate of db/db mice was evaluated. **Results** The body weight and food intake of db/db mice showed a downward trend with the progress of life. Subcutaneous fat and perirenal fat in db/db mice were significantly higher than those in db/m mice ($P < 0.05$), but their gastrocnemius content was significantly lower than that in db/m mice ($P < 0.05$). The cumulative duration and single maximum duration of autonomous activity in db/m mice within 5 min were 5 and 6 times that of db/db mice, respectively. The blood glucose levels of db/db mice were still significantly higher than db/m mice ($P < 0.05$). The survival rate of db/db mice from 70 to 81 weeks was constant at 73%, while, its survival rate after 84 weeks was reduced to 0. **Conclusion** The aging db/db mice possess typical symptoms of type 2 diabetes. Db/db mice show the relatively poorer quality of life and shorter lifespan compared with db/m. This paper provides a theoretical basis for the in-depth study of the life process of db/db mice.

Key words db/db mice; Aging; Survival status; Life span

糖尿病是由多种因素引起的代谢性疾病,严重威胁人类的生命健康和生活质量。2 型糖尿病以胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能减退为特征,与遗传因素和环境因素密切相关,在临床上主要表现为多饮、多尿、多食及体重减少。随着社会发展和人们生活水平的提高,2 型糖尿病的发生率呈现逐年上升的趋势,在发达国家糖尿病并发症引起的死亡人数已经跃居继心脑血管疾病、癌症之后的第 3 位^[1]。

动物疾病模型的研究是人类疾病研究的基础,目前 2 型糖尿病小鼠模型主要包括自发性糖尿病小鼠、诱导性糖尿病小鼠、转基因及基因敲除小鼠。自发性糖尿病小鼠模型是指未经任何有意识的人为处置,在自然条件下发生糖尿病的小鼠模型,其优点为模型小

鼠糖尿病的发生、发展进程与人类 T2DM 相似,具有较高的应用价值。其常见的模型有 ob/ob 小鼠、db/db 小鼠、KK - A^y 小鼠、新西兰肥胖小鼠、NSY 小鼠、TSOD 小鼠、M16 小鼠,且各模型均有其优势及局限性^[2]。

db/db 小鼠是从 C57BL/6J 小鼠中筛选出的一株突变系,该小鼠由于常染色体隐性遗传的瘦素受体基因缺陷,导致具有自发糖尿病特性,纯合子(db/db)小鼠表现为肥胖及多饮、多食等症状。这种小鼠的发病过程与人类 2 型糖尿病表现极为相似,是研究人类 2 型糖尿病的理想动物模型^[3]。

目前研究者对于 db/db 小鼠生命特征的研究多集中在 20 周龄以下,而对于老年 db/db 小鼠生命特征和生存质量并未见报道,同时对于该模型小鼠的实际寿命的报道结果不一。在对糖尿病以及糖尿病老年患者的研究中,老年糖尿病患者的生存状态是研究领域中的关键问题和难点问题。本研究对 db/db 小

作者单位:100191 北京大学公共卫生学院营养与食品卫生学系

通讯作者:李勇,研究员,电子信箱:liyong@bjmu.edu.cn

鼠喂养终生,对其老年期间的生存状态以及生存质量予以探析,以期对充分恰当的应用该模型小鼠提供理论依据,同时对如何提高糖尿病患者老年的生存质量提供思路和参考。

材料与amp;方法

1. 实验动物:10 周龄 db/db 型糖尿病小鼠(20 只)及与之周龄、性别匹配的非糖尿病的健康同窝出生仔畜(db/m 小鼠,20 只),体质量 25 ± 2g,饲养终生。由北京大学医学部实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0010,屏障环境动物房[实验动物使用许可证号:SYXK(京)2016-0041],SPF 级动物房,饲养环境温度 21 ~ 23℃,湿度 50% ~ 60%。以美国营养学会(AIN-93G)动物饲料作为基础饲料,所有动物自由饮水进食。待正常饲养至 70 周,进行各项指标的测定。

2. 仪器:安稳血糖仪、安稳血糖试纸购自中国三诺公司;YLS-1A 多功能小鼠自主活动记录仪购自济南益延科技发展有限公司。

3. 动物一般状态观察及体格指标测定:每周观测并记录动物的活动度、毛发光泽、摄食量、饮水量、体质量。

4. 尿液收集:正常饲养 71、75、79、83 周的小鼠置于代谢笼中,收集 24h 尿液,尿液采集后,立即混匀,测定体积。

5. 脏器指数:各组小鼠饲养临近至寿命终点时,小鼠称重后脱颈椎处死,无菌快速分离肾周脂肪、辜周脂肪,剥离腓肠肌,称重;分别称取小鼠的心脏、肝脏、肾脏、脾脏、胸腺,计算脏器指数/脂肪系数。脏器/脂肪指数(%) = 脏器质量(g)/体质量(kg) × 100%

6. 随机空腹血糖检测:每隔 4 周监测随机空腹血糖,测定前禁食 6h,测定时剪尾取血,采用血糖仪测定及记录。

7. 自主活动情况测定:分别将 75 周龄的 db/db 和 db/m 小鼠放入自主活动仪的活动箱内,先适应 15min,再记录小鼠 5min 内活动次数和时间,然后取出小鼠。

8. 统计学方法:应用 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行统计分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 老年 db/db 和 db/m 小鼠体质量和摄食量的变化:(1)老年 db/db 随着生长周龄的增加,其体质量

量呈现持续降低的趋势,从 70 周龄的 79.2g 降至 83 周龄的 73.0g,降幅为 7.8%。而 db/m 小鼠体质量的变化大体恒定,仅从 70 周龄的 44.2g 降低至濒死状态下的 43.0g,但是在整个老年期,db/db 小鼠整体体质量显著高于 db/m 小鼠(图 1)。(2)在老年期间,db/db 小鼠摄食量未呈现规律变化,而 db/m 摄食量呈现曲折下降的趋势,其整体摄入量始终低于 db/db 小鼠(图 2)。

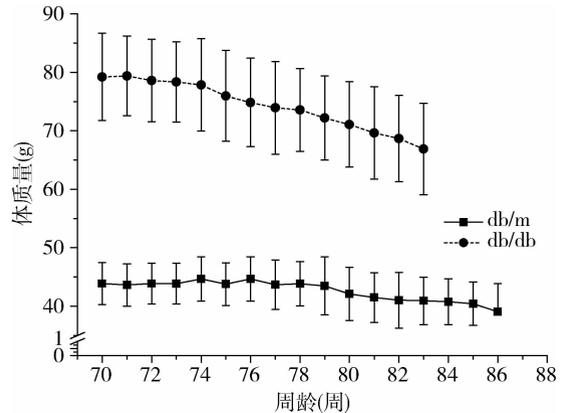


图 1 老年 db/db 和 db/m 小鼠体质量的变化

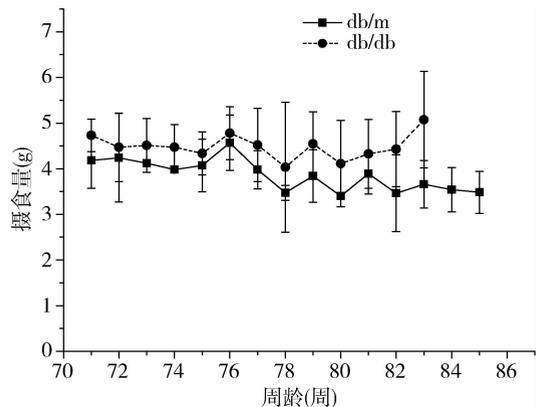


图 2 老年 db/db 和 db/m 小鼠摄食量的变化

2. 老年 db/db 和 db/m 小鼠饮水量、尿量的变化:(1)从整体趋势看,老年期间 db/db 小鼠和 db/m 小鼠饮水量无明显变化,只是 db/db 小鼠饮水量显著高于 db/m 小鼠饮水量(图 3)。(2)两组老鼠尿量的变化情况与饮水量相似,整个老年期间,变化量不明显,但从整体而言,db/db 小鼠尿量显著高于 db/m 小鼠,其尿量为 db/m 小鼠尿量的 4 倍(图 4)。

3. 老年 db/db 和 db/m 小鼠自主活动情况:5min 内 db/m 和 db/db 小鼠的自主活动次数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但 db/m 小鼠单次活动时长和累计活动时长均显著长于 db/db 小鼠($P < 0.05$),分别为 db/db 小鼠的 6 倍和 5 倍(表 1)。

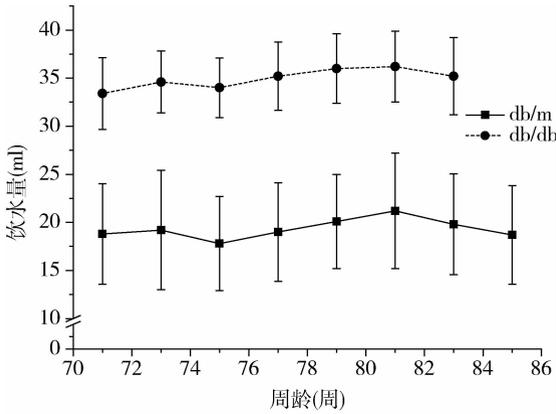


图3 老年 db/db 和 db/m 小鼠饮水量的变化

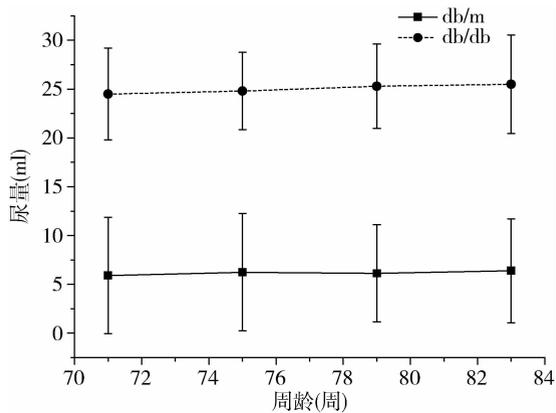


图4 老年 db/db 和 db/m 小鼠尿量的变化

表1 老年 db/db 和 db/m 小鼠自主活动 ($\bar{x} \pm s$)

组别	5min 活动次数	单次最长时长 (s)	累计活动时长 (s)
db/m	3.5 ± 0.7	92.00 ± 27.70	148.15 ± 57.20
db/db	2.2 ± 1.3	14.86 ± 3.64*	28.59 ± 18.90*

与 db/m 比较, * $P < 0.05$

4. db/db 和 db/m 小鼠脏器指数: 临近寿命终点的 db/db 小鼠肝脏质量和胰脏质量 > db/m 小鼠, 而 db/db 肾脏、脾脏以及睾丸质量均 < db/m 小鼠, 其中睾丸质量显著低于 db/m 小鼠 ($P < 0.05$, 表 2)。临近寿命终点的 db/db 小鼠的肝脏指数 > db/m 小鼠, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。db/db 小鼠的肾脏指数、脾脏指数、胰脏指数和睾丸指数均 < db/m 小鼠, 其中肾脏指数和睾丸指数差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 3)。

表2 临近寿命终点 db/db 和 db/m 小鼠脏器质量 ($g, \bar{x} \pm s$)

组别	肝脏	肾脏	脾脏	胰脏	睾丸
db/m	1.61 ± 0.19	0.53 ± 0.07	0.11 ± 0.05	0.19 ± 0.04	0.18 ± 0.03
db/db	2.35 ± 0.84	0.44 ± 0.15	0.05 ± 0.01	0.24 ± 0.04	0.08 ± 0.01*

与 db/m 比较, * $P < 0.05$

表3 临近寿命终点 db/db 和 db/m 小鼠脏器指数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	肝脏	肾脏	脾脏	胰脏	睾丸
db/m	3.79 ± 0.29	1.36 ± 0.13	0.28 ± 0.15	0.48 ± 0.12	0.46 ± 0.08
db/db	3.93 ± 1.07	0.68 ± 0.27*	0.07 ± 0.03	0.35 ± 0.08	0.12 ± 0.02*

与 db/m 比较, * $P < 0.05$

5. db/db 和 db/m 小鼠脂肪和腓肠肌系数: 从小鼠的解剖情况下看, 临近寿命终点的 db/db 小鼠其体型明显 > db/m 小鼠, 而且其皮下脂肪显著多于 db/m 小鼠, db/m 小鼠的肾周脂肪和辜周脂肪的比重均显著 > db/m 小鼠 ($P < 0.05$), 而其腓肠肌比重显著低于 db/m 小鼠 ($P < 0.05$, 图 5)。

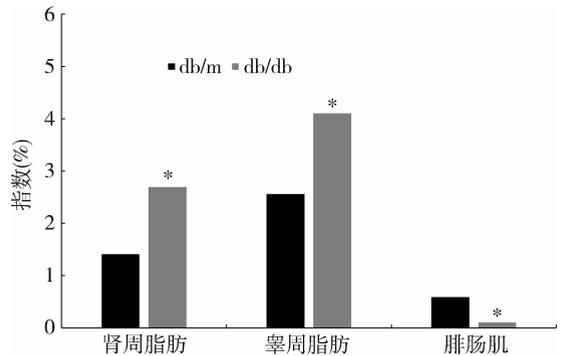


图5 db/db 和 db/m 小鼠临近寿命终点脂肪和腓肠肌指数
与 db/m 比较, * $P < 0.05$

6. 老年 db/db 和 db/m 小鼠血糖变化情况: 老年期间 db/db 小鼠的血糖随着生长周龄的增加呈现降低的趋势, 而 db/m 小鼠血糖则呈现微小增加趋势, 整体来看, db/db 小鼠血糖高于 db/m 小鼠, 其中 71 周龄和 75 周龄 db/db 小鼠血糖显著高于 db/m 小鼠 ($P < 0.05$, 图 6)。

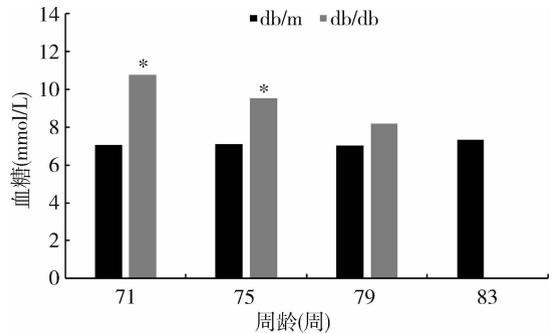


图6 老年 db/db 和 db/m 小鼠的血糖变化情况
与 db/m 比较, * $P < 0.05$

7. db/db 和 db/m 小鼠存活率: 随着小鼠生命的延续, 其存活率呈现下降趋势。 < 81 周龄, db/db 和 db/m 小鼠的存活率恒定, 分别为 100% 和 73%, 但高

于 81 周龄后, db/m 小鼠开始出现死亡现象, 而 db/db 小鼠则出现了大量死亡的现象, 截止 83 周, 其生存率仅为 20%, 84 周其生存率下降至 0 (图 7)。

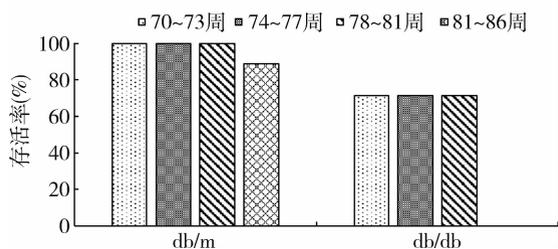


图 7 db/db 和 db/m 小鼠存活率

讨 论

db/db 小鼠主要表现为下丘脑缺陷, 它不能产生饱感, 即对饱感物质(瘦素)缺乏反应, 从而合成代谢大于分解代谢, 引起脂肪的堆积而肥胖, 逐渐发展为严重的糖尿病伴有明显的高糖血症。该小鼠具有和人类 2 型糖尿病相似的临床症状, 多饮、多食、多尿、肥胖、高血糖、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、脂代谢异常等综合征^[3-5]。图 1 显示 db/db 小鼠体质量显著高于对照 db/m 小鼠, 而图 5 也显示, db/db 小鼠其皮下脂肪远远多于 db/m 小鼠, 且肾周脂肪和睾周脂肪含量也显著高于 db/m 小鼠。图 1~图 4 显示, db/db 小鼠的摄食量、饮水量以及尿量显著高于 db/m 小鼠, 可见即使老年 db/db 小鼠仍然具有典型的多饮、多食、多尿、肥胖等症状。

相比于以往对集中在 20 周龄以下的 db/db 小鼠的研究, 本研究更多地反映老年期 db/db 小鼠的生存质量和生命特征, 并且根据以往报道的 db/db 小鼠 10 个月的生存寿命, 研究在正常饲养条件下, 70 周龄以后的 db/db 小鼠的生存状态。

动物衰老时, 由于构成机体的主要物质如蛋白质、核酸、脂肪的代谢率下降, 合成量少于分解量, 结构物质不断损耗, 细胞间及细胞质中的水分失去依托也逐渐丧失, 导致其体质量不断下降。图 1 显示老年 db/db 随着生长周龄的增加, 其体质量呈现持续降低的趋势, 而 db/m 小鼠体质量的变化大体恒定。当步入老年, 体力出现明显下降, 这是由于骨骼肌中蛋白质合成量不足, 细胞结构破坏后氧化磷酸化功能受损, ATP 合成减少所致^[6]。同时, 神经肌肉系统的功能和表现也出现衰退, 其表现为骨骼肌质量的下降和肌力减退。有文献报道, 糖尿病模型鼠, 自主活动明显减少, 行动迟缓, 伴有颤抖现象^[7]。本实验对 db/db 小鼠的自主活动进行了评价, db/m 小鼠单次活动

时长和累计活动时长均显著长于 db/db 小鼠 ($P < 0.05$), 分别为 db/db 小鼠的 6 倍和 5 倍。两者的腓肠肌含量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

衰老的因素很多, 部分研究者认为免疫系统结构老化与功能下降是衰老的主要原因与标志。实验动物脏器质量和脏器系数是鉴定动物遗传品质的重要依据, 动物内脏器官的质量、脏器系数是许多生物医学研究中常用的重要数据^[8]。本研究通过对临近寿命终点的 db/db 和 db/m 小鼠的脏器进行分析发现, 临近寿命终点的 db/db 小鼠的肝脏指数 $>$ db/m 小鼠, 而 db/db 小鼠的肾脏指数、脾脏指数、胰脏指数和睾丸指数均 $<$ db/m 小鼠, 其中两者肾脏指数和睾丸指数比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这与文献报道的 db/db 小鼠的脾脏 $<$ db/m 小鼠一致, 这也符合肥胖糖尿病鼠免疫力低下的原则^[9,10]。

研究表明, 脾脏作为外周免疫器官, 随着年龄增加而逐渐减小, 性质发生改变。其代谢也随之减弱, 这可能导致免疫功能降低。因此, 脾脏的萎缩, 代表机体免疫功能减弱, 可加速衰老进程^[11]。Homo - Delarche 等^[12] 研究报道糖尿病动物模型会出现胰岛增生肥大的病理改变, 7 月龄 db/db 纯合仔小鼠胰腺体积较大, 胰岛中均见淋巴细胞浸润; 12 月龄 db/db 小鼠胰腺部分胰岛内及其周围组织有灶性淋巴细胞浸润, 部分胰岛内见较多小导管样病变, 胰腺小导管病变有增生扩张及滞留, 使得胰岛细胞之间间隙增宽^[13]。本研究也发现 db/db 胰腺质量 $>$ db/m 小鼠。另外, 本研究中 db/db 小鼠睾丸的质量 $<$ db/m 小鼠 ($P < 0.05$), 这与研究报道的该小鼠睾丸的绝对质量和相对质量均比 db/m 轻相一致^[9]。

据文献报道, db/db 小鼠从 4 周龄即出现贪食, 产生可以辨认的肥胖表型。出生后 10~14 天, 血浆胰岛素和血糖开始升高, 并出现多饮、多食、多尿的症状, 其发病过程与 2 型糖尿病患者非常相似^[14]。纯合子 db/db 小鼠在早期发育阶段, 甚至在于 3~4 周龄时即显现糖尿病征兆。 $>$ 8 周龄的 db/db 小鼠, 其血糖值已经持续在 20mmol/L 以上, db/db 小鼠的血糖值随年龄增大而逐步升高, 当 3~6 月龄, 血糖最高可达到 35mmol/L 以上, 随后小鼠的体质量开始逐渐减轻, 7 月龄的 db/db 小鼠其血清血糖水平为 15mmol/L^[15]。本研究中老年 db/db 小鼠的血糖水平显著高于 db/m 小鼠, 但是随着生长周龄的增加, db/db 小鼠的血糖水平呈现微小降低的趋势, 从 70 周龄空腹血糖 11.0mmol/L 下降至 79 周龄的 8.5mmol/L^[16]。目前

虽然未有报道老龄 db/db 血糖变化情况,但其变化趋势与文献预测相似。>6 月龄的 db/db 小鼠随着月龄增加,其血糖随之降低,最后直至发病致死^[15]。

关于 db/db 小鼠寿命的报道显示,纯合子糖尿病小鼠 db/db 于3~8 周龄时开始贪食及发胖,体质量增重加速,继而产生高血糖、高血胰岛素,胰高血糖素也升高,属于肥胖型高血糖糖尿病模型。一般在10 个月内死亡,其平均寿命约6~8 个月,但也有个别报道,其可以活到12 月龄^[13]。本研究发现,<81 周龄,db/db 和 db/m 小鼠的存活率恒定,分别为100% 和73%,但高于81 周龄后,db/m 小鼠开始出现死亡现象,而 db/db 小鼠则出现了大量死亡的现象,截止84 周其生存率急剧下降至0。

目前报道中尚未发现 db/db 小鼠存活时间>60 周龄,本研究发现,即使不经过任何干预,自然生长的 db/db 小鼠70 月龄的生存率为72%,db/db 小鼠寿命远大于相关文献的报道,分析其原因,(1)与目前存在的早期报道的 db/db 小鼠寿命比较,早期实验饲养环境可能会影响其寿命。(2)近年来未有文献专门研究 db/db 小鼠的生存年限,仅有极少数文献有报道,在严格的饲养条件下,饮用水为消毒酸化水,饲养用具严格灭菌,饲养温度20~26℃,湿度为50%~70%,db/db 小鼠可以安全存活至12 月龄。12 月龄的小鼠仅表现为一些组织病理学的改变,如部分胰岛内及其周围组织有灶性淋巴细胞浸润,可见小导管样病变,胰腺小导管病变有增生扩张及潴留。肾脏中肾小球细胞数目、系膜基质增多,系膜细胞增生^[13]。

综上所述,老年 db/db 小鼠的生命体征和生存质量需要深入研究,并且 db/db 小鼠寿命的延长机制值得进一步探讨,将在后续实验中开展进一步延长寿命的营养干预措施研究。

参考文献

- Ogurtsova K, Da RFJD, Huang Y, *et al.* IDF diabetes atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040[J]. *Diabetes Res Clin Prac*, 2017, 128:40-50
- 倪程佩,王婧怡,沈艳华,等. 自发与诱发2型糖尿病小鼠模型比较研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2016,26(9):36-41

- Park MH, Han JS. *Padina arborescens* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in C57BL/KsJ - db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus[J]. *J Med Food*, 2015, 18(10):1088-1094
- Garris DR. Gonadal steroid modulation of the diabetes (db/db) - induced hyperlipometabolic, hypogonadal syndrome: restoration of female reproductive tract cytochemical and structural indices[J]. *Pathophysiology*, 2005, 12:19-20
- Garris DR. Estrogenic stimulation of ovarian follicular maturation in diabetes (db/db) mutant mice: restoration of euglycemia prevents hyperlipidemic cytoatrophy[J]. *Cell Tissue Res*, 2005,318(2):231-242
- 尤莉蓉,赵艳,夏志. 高强度间歇游泳训练对衰老小鼠骨骼肌蛋白质合成的影响研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2019, 34(1):31-37
- 唐庆. 肾安提取液对糖尿病肾病小鼠模型的干预作用及其分子机理研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2010
- 刘科,施赫赫,杨林,等. 9~10 周龄 CB6F1 与 B6CF1 小鼠血生化、主要脏器质量及脏器系数测定[J]. *实验动物科学*, 2018,35(1):26-29
- 田小芸,恽时锋,周森妹,等. C57BL/KsJ - db/db、+/db 小鼠主要脏器重量及脏器系数的测定[J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(4):220-222
- 邢玮,王政霖,吕甜甜,等. 2 型糖尿病 db/db 小鼠的生物学特性[J]. *中国比较医学杂志*, 2017,27(8):12-16
- 陆洁,刘静,裴天仙,等. 自发性2 型糖尿病模型 db/db 小鼠生物学特性研究[J]. *药物评价研究*, 2013, 36(5):341-345
- Homo - Delarche F, Calderari S, Irminger JC, *et al.* Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat[J]. *Diabetes*, 2006, 55(6):1625-1633
- 田小芸,董敏,赵志刚,等. 自发性糖尿病小鼠 C57BL/KsJ - db/db 某些脏器组织病理学观察[J]. *实验动物科学*, 2011, 28(1):22-24
- Zar Kalai F, Han J, Ksouri R, *et al.* Oral administration of *Nitraria retusa* ethanolic extract enhances hepatic lipid metabolism in db/db mice model 'BKS. Cg - Dock7m +/+ Leprdb/J' through the modulation of lipogenesis - lipolysis balance[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 72(10):247-256
- 吕晶晶,王彩霞,魏娜,等. 自发性2 型糖尿病小鼠 db/db 的生物学特性[J]. *沈阳药科大学学报*, 2013,30(6):455-459
- 张猛猛,黄敏,吴晓英,等. 甜菜碱对 db/db 小鼠糖尿病肾病损伤的作用[J]. *现代食品科技*, 2014,30(5):23-27

(收稿日期:2019-07-18)

(修回日期:2019-08-02)