

## 研究论文

# 单纯高脂饮食诱导2型糖尿病小鼠模型的构建及病理改变的评价

余晨歌<sup>1</sup>, 黄晶<sup>1</sup>, 席艳<sup>1</sup>, 赖蒨茵<sup>2</sup>, 陈苏<sup>1,\*</sup>, 徐楠<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>河南大学基础医学院, 开封 475000; <sup>2</sup>浙江大学基础医学院, 杭州 310000

**摘要:** 本文旨在研究单纯高脂饮食(high fat diet, HFD)诱导2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)小鼠模型的成模时间以及HFD对糖脂代谢相关器官的病理和功能影响。给予C57BL/6小鼠正常饮食(NC组)或HFD (HFD组) 0、4、8、12、16和20周, 通过检测体重、空腹血糖和葡萄糖耐量, 评估T2DM建模成功的时间; 通过胰岛素耐量、血脂、血管功能检测以及胰腺、肝脏HE染色评估糖脂代谢相关器官的功能和病理改变。结果显示, 与NC组相比, HFD组在HFD 8周后体重开始显著升高; 在HFD 16周时, HFD组出现空腹糖耐量受损; 在HFD 20周时, HFD组小鼠达到糖尿病状态, 出现葡萄糖耐量受损和胰岛素抵抗, 胰岛体积缩小、胰岛发生空泡变性等病理改变, 肝细胞出现大量脂滴, 肝脏组织AMPK磷酸化水平显著升高, 胸主动脉存在内皮依赖性舒张功能障碍; 和NC组相比, HFD组小鼠尿蛋白水平显著增加。上述结果提示, 单纯HFD诱导20周可成功建立T2DM小鼠模型, 该模型的特征为胰岛素抵抗、脂肪肝、高脂血症、血管功能异常、肾功能损害以及胰岛和肝细胞的病理改变等, 与T2DM患者相似, 可作为理想的T2DM动物研究模型。

**关键词:** 2型糖尿病; 高脂饮食; 胰岛素抵抗; 脂肪肝

## Construction of a mouse model of type 2 diabetes induced by high fat diet alone and evaluation of pathological changes

YU Chen-Ge<sup>1</sup>, HUANG Jing<sup>1</sup>, XI Yan<sup>1</sup>, LAI En-Yin<sup>2</sup>, CHEN Su<sup>1,\*</sup>, XU Nan<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Basic Medical Sciences, Henan University, Kaifeng 475000, China; <sup>2</sup>School of Basic Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China

**Abstract:** The purpose of the present study was to investigate the modeling time of type 2 diabetes mellitus (T2DM) mouse model induced by high fat diet (HFD) alone and the effects of HFD on the pathology and function of organs related to glucose and lipid metabolism. C57BL/6 mice were fed with normal diet (NC group) or HFD (HFD group). The time of successful T2DM modeling was evaluated by measuring body weight, fasting blood glucose and glucose tolerance at time points of 0, 4, 8, 12, 16 and 20 weeks. The functional and pathological changes of glucose and lipid metabolism related organs were evaluated by detecting insulin tolerance, plasma lipid levels, vascular function, as well as HE staining of pancreas and liver. The results showed that compared with the NC group, the HFD group had significantly increased body weight after 8 weeks of HFD. After 16 weeks of HFD, the HFD group exhibited impaired fasting glucose tolerance. After 20 weeks of HFD, the HFD group mice reached diabetic state, showing impaired glucose tolerance and insulin resistance, islet volume reduction and vacuolar degeneration; Large number of lipid droplets appeared in liver cells, and the level of AMPK phosphorylation in liver tissue was significantly increased in the HFD groups, compared with the NC group; There was endothelial dependent diastolic dysfunction in the thoracic aorta of the HFD group; Compared with the NC group, the HFD group mice showed a significant increase in urinary protein levels. These results suggest that T2DM mouse model can be successfully established by HFD induction alone for 20 weeks. The model is characterized by insulin resistance, fatty liver, hyperlipidemia, vascular dysfunction, renal dysfunction and pathological changes of islet and liver cells, which are similar to those of T2DM patients. Therefore

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81972650), the Natural Science Youth Foundation of Henan Province, China (No. 222300420120) and the Natural Science Youth Project of Henan Province, China (No. 222300420028).

\*Corresponding authors. XU Nan: E-mail: 981279735@qq.com; CHEN Su: E-mail: chensubio@163.com

it can be used as an ideal animal model for T2DM research.

**Key words:** type 2 diabetes mellitus; high fat diet; insulin resistance; fatty liver

随着人们生活方式及饮食习惯的巨大改变, 全球范围内的糖尿病患者人数与日俱增。据 2021 年国际糖尿病联盟统计, 在全球 20~79 岁的人群中, 约有 5.4 亿例糖尿病患者, 预计到 2030 年将增长至 6.4 亿<sup>[1]</sup>。糖尿病主要分为 1 型糖尿病、2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)、妊娠期糖尿病和特殊类型糖尿病, 临床上最常见的为 T2DM, 占有糖尿病病例的 90% 以上<sup>[2]</sup>。T2DM 是一种慢性、异质性、多因素的进行性疾病, 其病理基础是胰岛  $\beta$  细胞功能障碍和外周胰岛素抵抗<sup>[3,4]</sup>。T2DM 常为肥胖型患者, 多伴有明显的血脂异常、非酒精性脂肪肝、胰岛素抵抗等糖脂代谢紊乱特征。此外, T2DM 的病理特点还主要体现全身血管发生明显损害, 最终促使心脑血管疾病、外周动脉疾病、肾病和视网膜病的发生、发展, 临床数据显示糖尿病血管并发症是糖尿病致残率和死亡率居高不下的主要原因<sup>[5]</sup>。

目前临床上对 T2DM 的治疗主要通过优化降糖、降脂、改善胰岛素抵抗等方法, 但仍旧无法有效地逆转或阻止糖尿病及其并发症的发生、发展<sup>[6]</sup>, 因此积极研究糖尿病及其并发症的发病机制并探索新的干预方向, 显得尤为迫切。而在进行相关科学研究之前, 建立理想、稳定的, 且高度模拟 T2DM 患者症状的动物模型极为重要。

目前 T2DM 小鼠模型主要有自发突变性小鼠、转基因小鼠、链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 联合高脂饮食 (high fat diet, HFD) 诱导小鼠等。自发突变性小鼠, 常见的有 ob/ob 小鼠、db/db 小鼠和 KK/Ta 小鼠, 虽然这些模型重复性好、病变程度高、特异性高, 但是自发突变性小鼠因频繁同系繁殖造成单基因遗传, 其特性与人类糖尿病有所差异<sup>[7]</sup>, 且这类小鼠模型常伴有高度不孕、组间病变程度差异性较大和性别间差异性大等缺点<sup>[8,9]</sup>。转基因小鼠模型也是常用模型之一, 然而转基因小鼠模型受到小鼠和人类之间生理、遗传和代谢差异的限制, 且此模型病情严重程度常偏低<sup>[10,11]</sup>。STZ 诱导的糖尿病模型也被广泛应用, STZ 通过破坏胰岛  $\beta$  细胞, 使胰岛素分泌不足, 从而诱导产生高血糖<sup>[12]</sup>。HFD 联合 STZ 诱导是被广泛应用的诱导 T2DM 的方法

之一<sup>[13]</sup>。虽然该模型成本低、易于操作、血糖容易升高等, 但是 STZ 剂量难以控制, 而且受小鼠个体差异性影响较大, 容易引起大范围的胰岛破坏, 进而引起 1 型糖尿病甚至死亡<sup>[14]</sup>。由于肥胖是诱导 T2DM 发病最重要的危险因素之一, 因此单纯 HFD 诱导动物模型先发展为肥胖, 而后进展为 T2DM, 更符合临床 T2DM 患者的疾病进程<sup>[15,16]</sup>。然而, 目前大家采用 HFD 诱导糖尿病小鼠模型的周期为 8~22 周不等<sup>[17-20]</sup>, HFD 诱导的时间尚没有统一标准。

因此, 本研究采用单纯 HFD 诱导方法来建立 T2DM 小鼠模型, 在正常饮食或 HFD 不同时间点通过检测小鼠的体重、空腹血糖和葡萄糖耐量, 评估 T2DM 建模成功的最佳时间, 并通过糖脂代谢相关器官的病理和功能检测, 分析和评估该模型与临床 T2DM 的相似程度, 为筛选符合临床 T2DM 特点的理想实验动物模型提供实践依据。

## 1 材料和方法

**1.1 主要仪器和试剂** Eppendorf Centrifuge 5430 R 离心机 (德国), 病理切片机 (徕卡, 瑞士), 组织脱水机 (DIAPATH, 意大利), Panoramic MIDI 切片扫描仪 (3DHISTECH, 匈牙利), 体视解剖显微镜 (Olympus, 日本), 离体微血管张力测定系统 (DMT, 丹麦), 全自动生化分析仪 (深圳雷杜生命科技); Bio-Rad ChemiDoc MP 全能型成像系统 (Bio-Rad, 新加坡), SCIENTZ-48L 冷冻型高通量组织研磨器 (宁波新芝生物科技股份有限公司), 力辰科技 YP10002B 电子天平 (上海力辰邦西仪器科技有限公司), 三诺 GA-3 血糖仪及试纸条 (中国三诺生物传感股份有限公司), 葡萄糖注射液 (湖北科伦药业有限公司), 胰岛素 (上海碧云天生物技术有限公司), 饱和油红 O 原液 (武汉塞维尔生物技术有限公司), 抗 AMP 活化蛋白激酶  $\alpha$  (AMP-activated protein kinase  $\alpha$ , AMPK $\alpha$ ) 和抗 p-AMPK $\alpha$  (Thr172) 抗体 (Cell Signaling Technology), FDbio-Dura ECL 发光液 (杭州弗德生物科技有限公司), 小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体 (上海碧云天生物技术有限公司), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠抗体和

辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.2 实验动物及分组** 6~8周龄的SPF级雄性C57BL/6小鼠50只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCX-K(京)2021-0006,饲养于河南大学动物房。每天维持24h周期性光照,饲养环境为恒温25℃左右,相对湿度为55%。每笼3只小鼠,饲养期间自由饮水和进食,垫料每日更换一次。所有动物饲养及实验操作流程均严格遵守河南大学实验动物管理条例,并且通过河南大学伦理委员会的批准(No. HUSOM2023065)。

C57BL/6小鼠适应性饲养一周后,随机分为正常饮食组(NC组,20只)或HFD组(30只),两组其他饲养条件保持一致。高脂饲料购自江苏美迪森生物医药有限公司,型号为MD12033(60% fat kcal%),每克饲料的热量为5.24 kcal,各成分含量见表1。

### 1.3 空腹血糖、葡萄糖耐量和胰岛素耐量检测

**空腹血糖检测:**在正常饮食或HFD 0、4、8、12、16和20周时,小鼠禁食12h过夜,不禁水。用剪刀剪去小鼠尾巴末端约1~2 mm,轻轻挤压尾巴,弃去第一滴血,取第二滴血测空腹血糖浓度。**腹腔注射葡萄糖耐量实验:**在正常饮食或HFD 0、4、8和20周时进行,实验前小鼠禁食4h,不禁水。给予小鼠腹腔注射1 g/kg葡萄糖溶液,在注射葡萄糖完毕后的0、30、60、90 min四个时间点分别取小鼠尾尖血检测血糖浓度。**胰岛素耐量实验:**实验前小鼠禁食6h,不禁水。给予小鼠腹腔注射1 unit/

kg胰岛素,在注射胰岛素后0、30、60、90 min四个时间点分别取小鼠尾尖血,检测血糖浓度。

### 1.4 血脂、糖化血清蛋白、尿素氮和肌酐水平检测

小鼠正常饮食或HFD 20周后,用2%异氟烷气体麻醉小鼠,快速摘除一侧眼球采集血液,血液经室温静置2h后,3 000 r/min离心15 min,取上层血清,-80℃保存备用。使用全自动生化分析仪检测两组小鼠血清甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、糖化血清蛋白、尿素氮和肌酐水平。

**1.5 小鼠尿蛋白检测** 小鼠正常饮食或HFD 20周后,通过代谢笼收集小鼠尿液,使用优利特全自动尿液分析仪进行尿蛋白半定量分析。

**1.6 肝脏和胰腺HE染色** 用2%异氟烷气体麻醉小鼠后,迅速颈椎脱臼处死,立即剖胸取出肝脏和胰腺,进行常规石蜡包埋切片,使用二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,使用HE染色,而后放入梯度乙醇溶液进行脱水,中性树胶封片,使用Pannoramic MIDI数字切片扫描仪进行图像采集分析。

**1.7 主动脉油红O染色** 油红O染色工作液的配制:现配现用,将油红O原液与纯水按3:2比例混合,室温静置10 min,自然冷却后过滤得到油红O工作液,原液及工作液均避光保存。**主动脉采集:**小鼠造模20周后,用2%异氟烷气体醉小鼠,颈椎脱臼处死。将小鼠仰卧位固定于解剖台,立刻打开胸腔,将注射器针头自心尖部注入预冷的PBS,进行全身灌流,待肝脏由红转白时停止灌流。在体式显微镜下去除心脏连接的主动脉弓附近的食管、气管及多余组织,充分暴露主动脉弓及其三大分支,从颈部将三根分支动脉远端剪断,在近心端将升主动脉剪断,向下游离胸主动脉及腹主动脉,至双侧髂动脉分支。使用眼科剪与眼科镊去除血管周围的脂肪组织。**主动脉油红O染色:**将主动脉浸入4%多聚甲醛固定10 min,固定结束后用PBS冲洗2次,每次5 min,洗去表面残留的固定液。自升主动脉断口处伸入眼科剪,沿主动脉弓大弯侧向远端将主动脉弓及其三个分支纵向剖开至降主动脉处,然后沿小弯侧向远端纵向剖开整个主动脉。将剖开的主动脉内膜面朝上展开,用直径为0.25 mm的针灸针固定于黑胶皿上,向黑胶皿中加入油红O工作液,将血管完全浸没,常温置于摇床慢速避光孵育2 h。弃去油红O染液,用60%异丙醇冲洗进行脱色,至正常血管处无色后,用PBS冲洗5 min以去除异

表1. 高脂饲料成分  
Table. 1. Components of high fat diet

Component	Proportion (%)
Casein	25.84
L-cystine	0.39
Corn starch	0
Maltodextrin	16.15
Saccharose	8.89
Cellulose	6.46
Soybean oil	3.23
Lard	31.66
Composite minerals	5.81
Multivitamin	1.29
Choline bitartrate	0.26

丙醇, 拍摄照片。

**1.8 血管内皮舒张功能的检测** 用 2% 异氟烷气体麻醉小鼠后, 处死小鼠, 分离出胸主动脉, 置于含有 4 °C 预冷生理盐溶液的硅胶解剖盘中, 然后在解剖显微镜下截取 2 mm 动脉血管, 将血管置于 DMT 620M 微血管张力测定系统上, 浴槽中持续通入 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的混合气。使用 LabChart 8 软件实时记录血管张力变化。用  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 苯肾上腺素 (phenylephrine, PE) 预收缩主动脉, 待其收缩稳定后,  $1 \times 10^{-9}$ ~ $1 \times 10^{-4}$  mol/L 乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 依次作用于主动脉, 观察并记录 NC 组和 HFD 组小鼠胸主动脉对 ACh 的血管内皮依赖性舒张反应; 同样 PE 预收缩主动脉后,  $1 \times 10^{-9}$ ~ $1 \times 10^{-4}$  mol/L 硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP) 依次作用于主动脉, 观察并记录 NC 组和 HFD 组小鼠胸主动脉对 SNP 的血管内皮非依赖性舒张反应。

**1.9 免疫印迹 (Western blot)** 用 2% 异氟烷气体麻醉小鼠后, 颈椎脱臼处死后迅速取出肝脏组织, 将组织剪碎并立即放入 4 °C 裂解缓冲液中, 经组织匀浆器匀浆, 取上清液, 用 BCA 法测定样品蛋白质浓度。取等量稀释后样品加入电泳槽进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白, 以湿转法电转移至 PVDF 膜上, 室温封闭 1.5 h, 用 TBST 漂洗后, 分别用一抗 (均 1:1 000 稀释) 4 °C 过夜孵育, 二抗 (1:5 000 稀释) 室温孵育 1.5 h, TBST 室温漂洗  $3 \times 10$  min, 用 ECL 试剂盒进行化学发光显影, 用 ImageJ 分析蛋白条带, 用 GAPDH 作为内参蛋白, 计算目的蛋白的相对表达水平。

**1.10 统计学分析** 数据结果表示为 mean  $\pm$  SD, 用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析及作图, 用独立样本 *t* 检验比较两组间的差异性, 用方差分析 (单因素或双因素) 和 Tukey's 多重比较检测多组之间差异。所有检测都是双侧的。P < 0.05 时认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同时间HFD干预对小鼠体重的影响

为了明确 HFD 对小鼠体重的影响, 本研究在给予正常饮食或者 HFD 0、4、8、12、16 和 20 周时分别记录了 NC 组和 HFD 组的体重变化 (表 2)。结果显示, 与 NC 组小鼠相比, HFD 组小鼠在 HFD 4 周时体重有增加趋势, 在 HFD 8~20 周时体

重显著升高 (均 P < 0.000 1)。

### 2.2 不同时间HFD干预对小鼠空腹血糖和葡萄糖耐量的影响

为了明确单纯 HFD 诱导 T2DM 小鼠模型的成模时间, 本研究在给予正常饮食或者 HFD 0、4、8、12、16 和 20 周时分别记录了 NC 组和 HFD 组的空腹血糖变化 (表 3)。结果显示, HFD 组随着 HFD 诱导时间的增加, 空腹血糖值逐步增加。与 NC 组小鼠相比, HFD 组小鼠空腹血糖在 HFD 12 周时有增加趋势, 但是没有统计学差异; 在 HFD 16 周时明显增加 (P < 0.000 1), 且高于 6.1 mmol/L, 提示出现空腹糖耐量受损; 在 HFD 20 周时增加为 (7.6  $\pm$  0.3) mmol/L, 高于 7.0 mmol/L, 表明小鼠达到糖尿病状态。在本研究中, 两组小鼠的生存率均为 100%, 糖尿病小鼠造模成功率为 90%。

为了进一步明确小鼠糖代谢的变化, 本研究在 HFD 0、4、8 和 20 周时, 给小鼠腹腔注射葡萄糖进行葡萄糖耐量实验。结果显示, 与 NC 组相比, HFD 组葡萄糖耐量在 HFD 8 周时有降低的趋势, 但是没有统计学差异; 而在 HFD 20 周时, HFD 组曲线下面积显著升高 (P < 0.001) (图 1), 表明 HFD

表 2. 不同时间高脂饮食(HFD)干预对小鼠体重的影响

Table 2. Effects of high fat diet (HFD) intervention for different time on body weight of mice

Time (week)	NC group (g)	HFD group (g)	P value
0	21.9 $\pm$ 0.7	22.5 $\pm$ 0.9	0.246 2
4	26.1 $\pm$ 0.8	27.6 $\pm$ 1.7	0.075 7
8	28.5 $\pm$ 1.2	33.4 $\pm$ 1.8	0.000 3
12	27.6 $\pm$ 1.4	38.6 $\pm$ 3.3	< 0.000 1
16	29.7 $\pm$ 1.6	41.6 $\pm$ 2.7	< 0.000 1
20	31.5 $\pm$ 1.0	47.4 $\pm$ 3.3	< 0.000 1

The data are expressed as mean  $\pm$  SD. n = 10. NC: normal control.

表 3. 不同时间的高脂饮食(HFD)干预对小鼠空腹血糖的影响

Table 3. Effects of high fat diet (HFD) intervention for different time on fasting blood glucose in mice

Time (week)	NC group (mmol/L)	HFD group (mmol/L)	P value
0	4.1 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 0.3	0.270 9
4	5.1 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.8	0.180 2
8	4.6 $\pm$ 0.6	5.0 $\pm$ 1.3	0.593 3
12	5.0 $\pm$ 0.4	5.7 $\pm$ 0.8	0.180 2
16	3.8 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 0.3	< 0.000 1
20	5.0 $\pm$ 0.4	7.6 $\pm$ 0.3	< 0.000 1

The data are expressed as mean  $\pm$  SD. n = 6. NC: normal control.

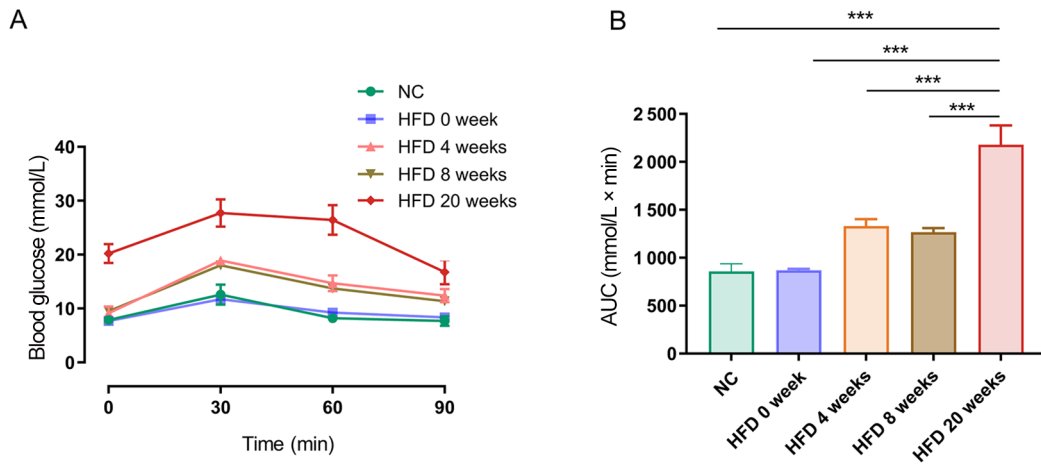


图 1. 不同时间的高脂饮食(HFD)干预对小鼠葡萄糖耐量的影响

Fig. 1. Effects of high fat diet (HFD) intervention for different time on glucose tolerance in mice. A: Blood glucose at different time points in glucose tolerance test. B: Area under curve (AUC). NC: normal control. The data are expressed as mean  $\pm$  SD.  $n = 6$ . \*\*\* $P < 0.001$ .

小鼠糖耐量受损。

综上，在 HFD 20 周时，HFD 组小鼠出现明显的体重增加、空腹血糖大于 7.0 mmol/L 和显著的葡萄糖耐量受损，提示 T2DM 小鼠建模成功。

### 2.3 HFD 20周对小鼠胰岛素抵抗和胰腺病理的影响

为了进一步检测 HFD 20 周建立的 T2DM 小鼠模型胰岛功能是否类似于 T2DM 患者，本研究在 HFD 20 周时进行胰岛素耐受试验和胰腺病理分析。结果显示，与 NC 组相比，HFD 组小鼠在腹腔注射胰岛素后，小鼠血糖相对下降缓慢而上升较快，且在腹腔注射胰岛素后 60、90 min 的血糖水平均高于 NC 组 ( $P < 0.05$ ) (图 2A、B)，表明 HFD 组小鼠出现了显著的胰岛素抵抗。

胰腺组织 HE 染色结果提示，NC 组小鼠胰岛形态完整且规则，胰岛内胞浆粉染丰富，细胞数较多，细胞形态正常，胞核深染。而 HFD 组小鼠胰岛部分被破坏，形态不规则，胰岛细胞呈现部分萎缩，细胞胞浆明显减少，部分胰岛细胞胞浆内有空泡变性 (见图 2C 黑色箭头)，胰岛体积缩小，可见少量细胞凋亡 (图 2C)。

以上结果表明，HFD 20 周诱导的 T2DM 小鼠胰岛病理和功能特点与肥胖型 T2DM 患者相似。

### 2.4 HFD 20周对肝脏和血脂的影响

T2DM 患者多为肥胖体型，常合并代谢综合征表型，尤其是常伴有脂肪肝。为了进一步检测 HFD 20 周建立的糖尿病小鼠模型是否也伴有上述体征，本研究对 NC 组和 HFD 组小鼠进行了血脂检测和

肝脏病理分析。结果显示，与 NC 组相比，HFD 组血清总胆固醇水平、低密度脂蛋白水平和高密度脂蛋白水平均显著升高 (图 3A~D)；肝脏 HE 染色结果显示，NC 组小鼠的肝索清晰且排列有序，肝细胞排列整齐且细胞核清晰；而 HFD 组的肝索紊乱，肝细胞体积变大，胞浆内有明显脂肪空泡，可见大量紧密排列的脂滴 (见图 3E 黑色箭头)，表明 HFD 20 周诱导的糖尿病小鼠出现了高脂血症和脂肪肝，与肥胖型 T2DM 患者体征相似。此外，本研究检测了肝脏组织中 AMPK $\alpha$  Thr172 位点磷酸化水平。AMPK 是一种关键的能量调节蛋白，在糖酵解、糖异生、脂质代谢和胰岛素抵抗中起着重要作用。结果显示，与 NC 组相比，HFD 组肝脏组织中 AMPK $\alpha$  Thr172 位点的磷酸化水平显著升高 ( $P < 0.001$ ) (图 3F、G)。

### 2.5 HFD 20周对血管结构和功能的影响

T2DM 患者常并发血管功能异常，继而诱发心血管、脑血管等血管并发症。为了进一步检测 HFD 20 周建立的糖尿病小鼠模型是否也伴有血管功能异常，本研究对 NC 组和 HFD 组小鼠进行主动脉油红 O 染色，评估动脉粥样硬化程度，并使用体外微血管张力系统检测血管功能的变化。油红 O 染色结果显示，与 NC 组相比，HFD 组的主动脉未出现明显的动脉粥样硬化斑块 (图 4A)。体外微血管张力检测结果提示，与 NC 组相比，HFD 组出现了明显的血管内皮依赖性舒张功能障碍 ( $P < 0.01$ )；两组小鼠血管的非内皮依赖性舒张功能之间没有明显差

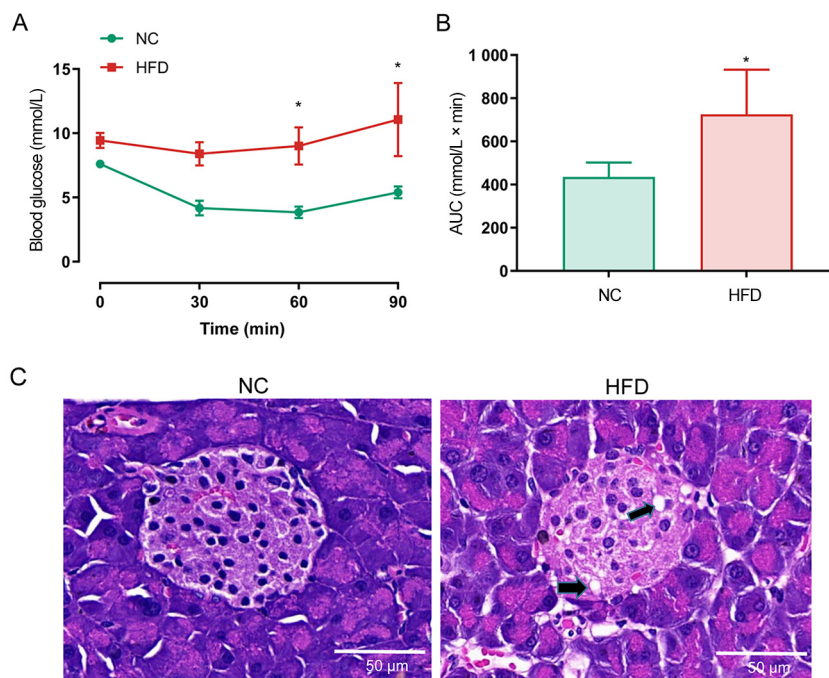


图 2. 高脂饮食(HFD) 20周对小鼠胰岛素抵抗和胰腺病理的影响

Fig. 2. Effects of high fat diet (HFD) for 20 weeks on insulin resistance and pancreatic pathology in mice. *A*: Blood glucose at different time points in insulin tolerance test. *B*: Area under curve (AUC). The data are expressed as mean  $\pm$  SD.  $n = 6$ .  $^*P < 0.05$  vs NC group. *C*: Representative microscopic images of pancreatic tissue detected by HE staining. Black arrows indicate vacuolar degeneration of islet cells. NC: normal control. Scale bar, 50  $\mu$ m.

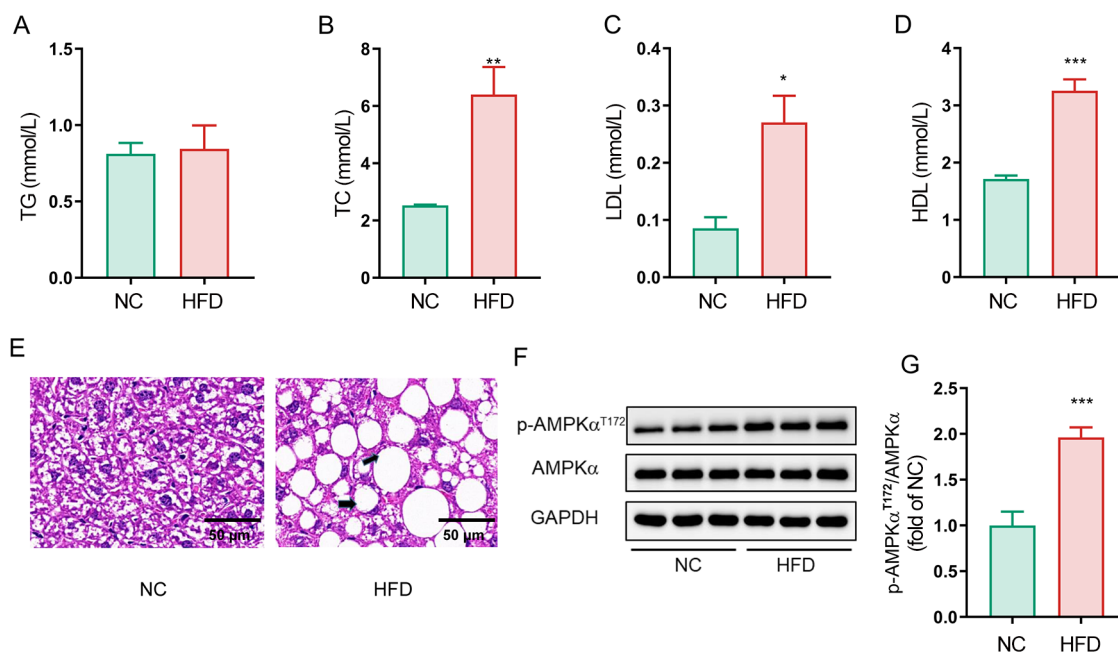


图 3. 高脂饮食(HFD) 20周对小鼠血脂水平、肝脏病理和AMPK磷酸化水平的影响

Fig. 3. Effects of high fat diet (HFD) for 20 weeks on blood lipid levels, liver pathology, and AMPK phosphorylation in mice. *A*: Triglyceride (TG). *B*: Total cholesterol (TC). *C*: Low density lipoprotein (LDL). *D*: High density lipoprotein (HDL). *E*: Representative microscopic images of liver tissue detected by HE staining, and the black arrows indicate the lipid droplets in the liver cells. Scale bar, 50  $\mu$ m. *F*, *G*: Thr172 phosphorylation level of AMPK $\alpha$  in liver tissue detected by Western blot. NC: normal control. The data are expressed as mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ .  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  vs NC group.

异。以上结果表明，HFD 20周诱导的糖尿病小鼠出现血管代谢功能的紊乱，体现在血管内皮依赖性舒张功能明显障碍。

## 2.6 HFD 20周对肾功能的影响

糖尿病患者长期的血糖状态下易导致肾功能损伤，表现为蛋白尿以及肾小球滤过率下降，严重时可导致血尿素氮和血肌酐的升高。为了进一步检测 HFD 20周建立的糖尿病小鼠模型是否也出现肾功能受损，本研究对 NC 组和 HFD 组小鼠进行了血清尿素氮、肌酐和尿蛋白含量的检测。结果显示，与 NC 组相比，HFD 组小鼠尿蛋白含量和糖化血清蛋白均显著升高（均  $P < 0.05$ ）（图 5A、D）；与 NC 组相比，HFD 组小鼠血清中的尿素氮（图 5B）和肌酐水平（图 5C）无明显变化。该结果表明，HFD 20周诱导的糖尿病小鼠模型出现一定的肾功

能受损。

## 3 讨论

糖尿病患者人数与日俱增，不仅严重威胁着人们的身心健康，而且给社会经济和医疗卫生带来了沉重的负担。因此，积极探索糖尿病及其并发症的发病机制显得尤为迫切，建立高度模拟临床 T2DM 体征的动物模型具有重要意义。单纯 HFD 诱导的糖尿病小鼠模型可较好地模拟糖和脂肪过量摄入引发 T2DM 等慢性代谢性疾病的病理生理学过程<sup>[21]</sup>。然而，目前采用 HFD 诱导糖尿病小鼠模型的周期为 8~22 周不等<sup>[17-20]</sup>，这可能和使用的 HFD 的脂肪热量比例<sup>[22]</sup>、小鼠品系<sup>[23]</sup>和小鼠周龄<sup>[24, 25]</sup>等因素有关。而 HFD 诱导糖尿病小鼠模型的时间目前尚没有统一标准。

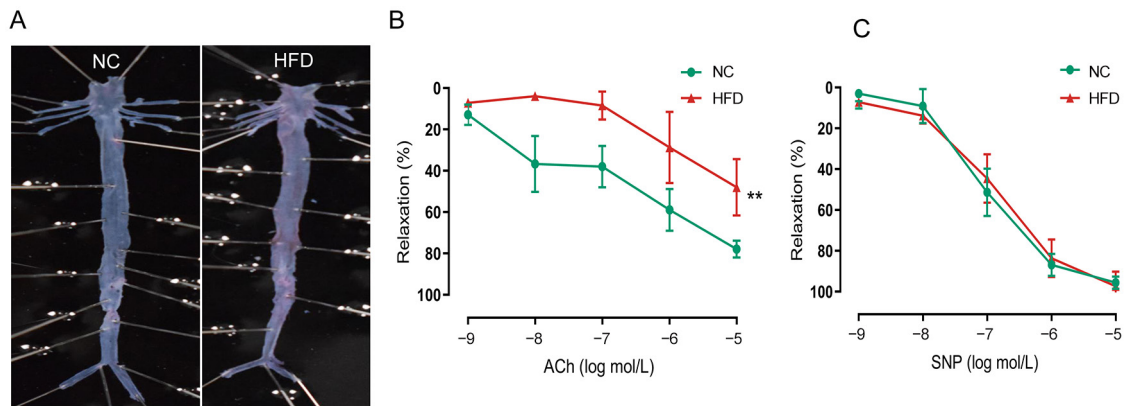


图 4. 高脂饮食(HFD) 20周对小鼠血管结构和血管内皮舒张功能的影响

Fig. 4. Effects of high fat diet (HFD) for 20 weeks on vascular structure and function in mice. A: Aortic oil red O staining staining results. B: Endothelium-dependent diastolic function of the aorta. C: Endothelium-independent diastolic function of the aorta. NC: normal control. The data are expressed as mean  $\pm$  SD.  $n = 5$ . \*\* $P < 0.01$  vs NC group.

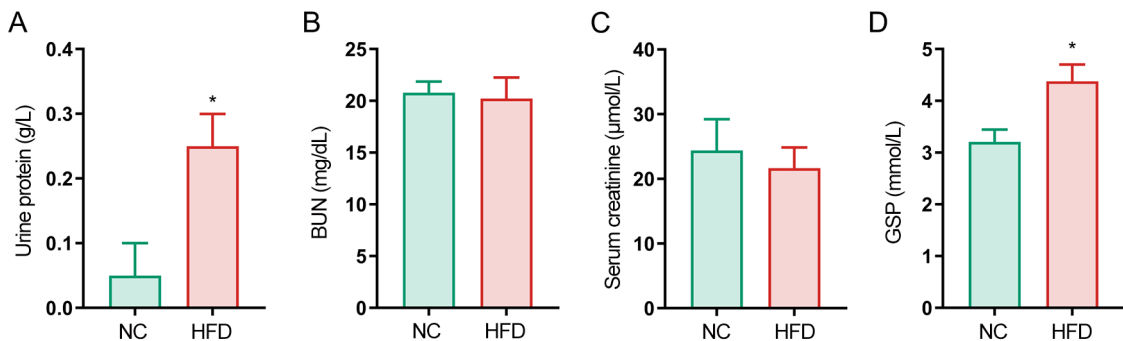


图 5. 高脂饮食(HFD) 20周对小鼠肾功能和糖化血清蛋白的影响

Fig. 5. Effects of high fat diet (HFD) for 20 weeks on renal function and glycosylated serum protein (GSP) in mice. A: Urine protein. B: Serum urea nitrogen (BUN). C: Serum creatinine. D: GSP. NC: normal control. The data are expressed as mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs NC group.

本研究结果显示, 与 NC 组小鼠相比, HFD 组小鼠在 HFD 8 周以后体重显著升高, 而空腹血糖在 HFD 12 周内没有显著增加, 而既往有学者发现在 HFD 诱导 8 周或 12 周时模型动物空腹血糖即显著升高<sup>[24, 26]</sup>, 这可能和 HFD 的种类、小鼠开始喂养的周龄和喂养方式有关。本研究结果显示, HFD 组在 HFD 16 周时空腹糖耐量受损, 表现出 T2DM 早期的特点; 而在 HFD 20 周时达到糖尿病状态。同时, HFD 组小鼠出现了显著的葡萄糖耐量受损, 糖化血清蛋白水平显著升高。总之, 本研究通过不同时期糖代谢指标的过程性评价, 发现单纯 HFD 诱导 20 周可成功建立稳定的 T2DM 小鼠模型。虽然该模型造模时间较长, 但是传统的高脂联合 STZ 诱导的糖尿病小鼠模型, 存活率和成模率均不高于 80%<sup>[27, 28]</sup>, 而本研究中单纯 HFD 诱导的糖尿病小鼠模型的生存率均为 100%, 造模成功率为 90%, 与既往单纯 HFD 诱导方法一致<sup>[29, 30]</sup>。

T2DM 发生基础是胰岛  $\beta$  细胞功能障碍和外周胰岛素抵抗<sup>[4]</sup>, 其病理特点表现为代谢相关器官如肝脏、胰腺、肾脏受到破坏和全身血管明显受累<sup>[31]</sup>, 最终促使心脑血管疾病以及糖尿病相关并发症的发生、发展<sup>[5]</sup>。本研究通过代谢相关器官的病理和功能检测, 发现 HFD 诱导 20 周的小鼠并发胰岛素抵抗、脂肪肝、高脂血症、血管功能异常和肾功能损害, 而且胰岛体积缩小、胰岛细胞内空泡变性, 出现显著的胰岛素抵抗, 这些结果与既往相关研究一致<sup>[22]</sup>。

本研究结果显示, HFD 诱导 20 周的小鼠与肥胖型 T2DM 患者血脂升高和脂肪肝体征相似; 肝脏组织中 AMPK $\alpha$  Thr172 位点磷酸化水平显著升高。研究显示, 使用激活 AMPK 的药物能够减少肝脏糖原生、增加肝脏的胰岛素敏感性、抑制脂质合成和促进脂肪酸氧化, 从而降低肝脏甘油三酯含量<sup>[32]</sup>。而非酒精性脂肪肝中 AMPK 磷酸化水平显著下降<sup>[33]</sup>。本研究结果显示, HFD 诱导 20 周的小鼠肝脏 AMPK 磷酸化水平升高, 这可能是由于 HFD 诱导小鼠产生高脂血症和肝细胞脂肪堆积, 此时肝脏 AMPK 被激活, 发挥自我调节的代偿作用。

本研究结果显示, HFD 组小鼠尿蛋白水平升高, 提示肾功能受损, 但是血清尿素氮和肌酐水平没有明显变化, 本研究组前期研究显示, 糖尿病小鼠血清尿素氮和肌酐水平在持续高血糖 8 周后显著升高<sup>[34]</sup>, 而本研究中 HFD 组小鼠尿素氮和肌酐维持正常水平可能和小鼠高血糖阶段的病程较短和肾功

能的代偿作用有关。此外, 本研究结果显示, HFD 组小鼠主动脉没有出现明显的动脉粥样硬化斑块, 但与 NC 组相比, HFD 组出现明显的血管内皮依赖性舒张功能障碍, 表明 HFD 20 周诱导的糖尿病小鼠由于高血糖、高脂血症等因素的刺激, 出现血管代谢功能紊乱, 主要体现在早期的血管损伤方面, 即血管内皮功能障碍。

综上所述, 本研究结果表明, 单纯 HFD 诱导 20 周可成功建立 T2DM 小鼠模型, 此阶段小鼠模型表现出胰岛素抵抗、脂肪肝、高脂血症、血管功能异常、肾功能损害以及胰岛和肝细胞的病理改变等特征, 与 T2DM 患者相似, 可作为理想的 T2DM 动物研究模型。本研究为筛选符合临床 T2DM 特点的理想实验动物模型提供了实践依据。

### 参考文献

- 1 Ma Y (马越), Kong XJ, Peng W, Sun XM, Wang YN, Cui W, Wang YF. Disease burden and time trends of diabetes in China. *Chin J Prev Med (中国预防医学杂志)* 2023; 24(4): 281–286 (in Chinese).
- 2 Laakso M. Biomarkers for type 2 diabetes. *Mol Metab* 2019; 27S(Suppl): S139–S146.
- 3 Landgraf R, Aberle J, Birkenfeld AL, Gallwitz B, Kellerer M, Klein H, Müller-Wieland D, Nauck MA, Reuter HM, Siegel E. Therapy of type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2019; 127(S 01): S73–S92.
- 4 Tan YD (谭艳丹), Liu JX, Zhao Z. Bioinformatics study on the potential mechanism of obesity developing into type 2 diabetes mellitus. *J Trop Med (热带医学杂志)* 2022; 22(3): 301–305, 448 (in Chinese).
- 5 Mota RI, Morgan SE, Bahnson EM. Diabetic vasculopathy: macro and microvascular injury. *Curr Pathobiol Rep* 2020; 8(1): 1–14.
- 6 Campia U, Tesaro M, Di Daniele N, Cardillo C. The vascular endothelin system in obesity and type 2 diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Life Sci* 2014 Nov 24; 118(2): 149–55.
- 7 Tang YD (唐艺丹), Wang XZ, Zhang JJ. Research progress of animal model construction of type II diabetes mellitus. *Acta Lab Anim Sci Sin (中国实验动物学报)* 2020; 28(6): 870–876 (in Chinese).
- 8 Jian L (简磊), Fu CG, Jie Y. Research progress of type 2 diabetes mouse model construction. *Life Sci Res (生命科学研究)* 2019; 23(3): 237–244 (in Chinese).
- 9 Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* 2009; 23(2): 245–258.
- 10 Bunner AE, Chandrasekera PC, Barnard ND. Knockout

- mouse models of insulin signaling: Relevance past and future. *World J Diabetes* 2014; 5(2): 146–159.
- 11 Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 2001; 409(6821): 729–733.
- 12 Ghasemi A, Jeddi S. Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: a practical guide. *EXCLI J* 2023; 22: 274–294.
- 13 Skovso S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig* 2014; 5(4): 349–358.
- 14 Liu S, Ma L, Ren X, Zhang W, Shi D, Huo Y, Ba Y, Bai Y, Cheng N. A new mouse model of type 2 diabetes mellitus established through combination of high-fat diet, streptozotocin and glucocorticoid. *Life Sci* 2021; 286: 120062.
- 15 Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 1988; 37(9): 1163–1167.
- 16 Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 3: S215–S219.
- 17 Nagy C, Einwallner E. Study of *in vivo* glucose metabolism in high-fat diet-fed mice using oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT). *J Vis Exp* 2018; (131): 56672.
- 18 Zhang Y, Wu Q, Liu J, Zhang Z, Ma X, Zhang Y, Zhu J, Thring RW, Wu M, Gao Y, Tong H. Sulforaphane alleviates high fat diet-induced insulin resistance via AMPK/Nrf2/GPx4 axis. *Biomed Pharmacother* 2022; 152: 113273.
- 19 Hu W, Li M, Sun W, Li Q, Xi H, Qiu Y, Wang R, Ding Q, Wang Z, Yu Y, Lei H, Mao Y, Zhu YZ. Hirsutine ameliorates hepatic and cardiac insulin resistance in high-fat diet-induced diabetic mice and *in vitro* models. *Pharmacol Res* 2022; 177: 105917.
- 20 LLabre JE, Sroga GE, Tice MJL, Vashishth D. Induction and rescue of skeletal fragility in a high-fat diet mouse model of type 2 diabetes: An *in vivo* and *in vitro* approach. *Bone* 2022; 156: 116302.
- 21 Zhao N (赵娜), Li JJ, Yue J, Wei XM, Zhang Y, Xing X, Zheng GS, Zhu XD, Fan JC. Retrospective analysis of diabetes mortality in different regions of China. *Chin Prim Health Care (中国初级卫生保健)* 2020; 34(12): 36–40 (in Chinese).
- 22 Kuo CS, Chen JS, Lin LY, Schmid-Schönbein GW, Chien S, Huang PH, Chen JW, Lin SJ. Inhibition of Serine protease activity protects against high fat diet-induced inflammation and insulin resistance. *Sci Rep* 2020; 10(1): 1725.
- 23 Tan DN (谭丹妮), Yu R, Wu YJ, Liu X, Xiang Q, Liu X, Shi LY. Effect of Baihu plus Ginseng Decoction on white adipose tissue inflammation and liver steatosis in type 2 diabetic MKR mice induced by high fat diet. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharm (中药新药与临床药理)* 2023; 34(5): 571–580 (in Chinese).
- 24 Nishimura M, Nomura Y, Egi M, Obata N, Tsunoda M, Mizobuchi S. Suppression of behavioral activity and hippocampal noradrenaline caused by surgical stress in type 2 diabetes model mice. *BMC Neurosci* 2020; 21(1): 8.
- 25 Wang W, Tanokashira D, Fukui Y, Maruyama M, Kuroiwa C, Saito T, Saido TC, Taguchi A. Serine phosphorylation of IRS1 correlates with A $\beta$ -unrelated memory deficits and elevation in A $\beta$  level prior to the onset of memory decline in AD. *Nutrients* 2019; 11(8): 1942.
- 26 Zhou YF (周云枫), Li S, Su W, Huang SZ, Pu D, Guan YF. Effect of diets with different fat content on metabolic syndrome of rats and mice. *Basic Clin Med (基础医学与临床)* 2012; 32(3): 273–277 (in Chinese).
- 27 Zuo XZ (左心真), Wang MM, Dong X. Establishment of mouse model of type 2 diabetes mellitus. *J Qingdao Agric Univ Nat Sci (青岛农业大学学报自然科学版)* 2022; 39(4): 259–264 (in Chinese).
- 28 Dai ZZ (代振振), Zang YB, Cui WH, Yuan HF, Liu Y, Xu HW. Factors influencing the establishment of mouse model of type 2 diabetes mellitus. *J Qingdao Univ Med Sci (青岛大学学报医学版)* 2022; 58(4): 590–594 (in Chinese).
- 29 Wu TR., Lin CS, Chang CJ, Lin TL, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Lu CC, Young JD, Lai HC. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutella sinensis*. *Gut* 2019; 68(2): 248–262.
- 30 Sikder K, Shukla SK, Patel N, Singh H, Rafiq K. High fat diet upregulates fatty acid oxidation and ketogenesis via intervention of PPAR- $\gamma$ . *Cell Physiol Biochem* 2018; 48(3): 1317–1331.
- 31 Maggio CA, Pi-Sunyer FX. Obesity and type 2 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003; 32(4): 805–822, viii.
- 32 Boudaba N, Marion A, Huet C, Pierre R, Viollet B, Foretz M. AMPK re-activation suppresses hepatic steatosis but its downregulation does not promote fatty liver development. *EBioMedicine* 2018; 28: 194–209.
- 33 Huang R, Guo F, Li Y, Liang Y, Li G, Fu P, Ma L. Activation of AMPK by triptolide alleviates nonalcoholic fatty liver disease by improving hepatic lipid metabolism, inflammation and fibrosis. *Phytomedicine* 2021; 92: 153739.
- 34 Xu N, Wang Q, Jiang S, Wang Q, Hu W, Zhou S, Zhao L, Xie L, Chen J, Wellstein A, Lai EY. Fenofibrate improves vascular endothelial function and contractility in diabetic mice. *Redox Biol* 2019; 20: 87–97.