

2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠模型中医外观表征的变化

刘玥¹, 谢鸣^{2*}, 张业³

(1. 中国中医科学院西苑医院心血管病中心, 北京 100091; 2. 北京中医药大学国家重点方剂学学科, 北京 100029; 3. 河南中医学院方剂学科, 郑州 450008)

[摘要] **目的:** 观察 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠模型的中医外观表征变化的规律及其与中医证候的关系。**方法:** 大鼠随机分为正常组 50 只和模型组 60 只, 采用高脂高热量饮食加小剂量链脲佐菌素 (STZ, 30 mg·kg⁻¹) ip 方式造模, 实验期间连续观察 12 周两组大鼠的外观行为、体重的变化, 并分别于第 0, 6, 8, 10, 12 周末禁食 12 h 后从正常组、模型组各取 10 只大鼠取血测定空腹血糖 (FPG)、胰岛素 (Fins), 并计算出胰岛素敏感指数 (IAI) 和胰岛素抵抗指数 (IRI)。**结果:** 外观行为学观察: 与正常组相比, 模型组大鼠体重从第 4 周开始均呈明显持续增加, 第 9 周出现下降但仍明显高于正常组。模型组大鼠第 6~8 周出现嗜睡、眯眼、倦怠懒动, 被毛脱落, 饮水量增加, 大便干结, 尾巴出汗潮湿等表现; 第 9~10 周出现形体肥胖、拱背扎堆、眯眼、精神萎靡、活动迟缓、背毛油腻等表现; 第 11~12 周继现舌质紫暗、被毛减少, 臀毛枯黄, 尾部瘀斑。糖代谢指标: 与正常组相比, 模型组大鼠空腹血糖 (FPG)、胰岛素水平 (Fins) 及胰岛素抵抗指数 (IRI) 于第 6 周末开始持续不断升高, 至第 12 周末达到高峰; 胰岛素敏感指数 (IAI) 于 6 周末开始不断降低, 至 12 周末降低最为显著。**结论:** 采用高脂饲料喂养 + 小剂量 STZ ip 复制出的 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠模型可能具有中医证候动态变化的特点, 即随造模时间延长表现出由气阴两虚证逐渐发展到气阴两虚证兼痰浊证以及气阴两虚证兼痰浊血瘀证的演变趋势。

[关键词] 2 型糖尿病; 胰岛素抵抗; 大鼠模型; 中医证候

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0127-05

Development in Syndromes of Chinese Medicine for Rat Model of Type 2 Diabetes with Insulin Resistance

LIU Yue¹, XIE Ming^{2*}, ZHANG Ye³

(1. Center of Cardiovascular Disease, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the patterns of changes in syndrome of Chinese medicine for rat model of type 2 diabetes with insulin resistance. **Method:** The rat model was established by feeding with high calories and fat diet together with peritoneal injection of STZ. SD rats were randomly divided into the control group (50 rats) and the model group (60 rats). The changes in appearance, behavior and weight of rats during the process of experiment were observed. At the end of the 0, 6, 8, 10 and 12 week, ten rats each time were killed and blood samples were collected respectively to detect the (FPG) and Fins, and to calculate the insulin resistance index (IRI) and insulin sensitivity index (ISI). **Result:** 1) Appearance and behavior: Compared with the control group, the weight of the model group gained up obviously at 4th week, and lowers continually from the 9th week, higher obviously than that of the control group. During the 6 w to 8 w, the model rats appeared in lethargy with narrowed

[收稿日期] 20110317(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30572299)

[第一作者] 刘玥, 博士在读, 从事中西医结合心血管病研究

[通讯作者] * 谢鸣, 教授, Tel: 010-64286992, E-mail: xieming603@263.net

eyes, accidie, loss of hair, increased drinking volume, dejecta desiccation, sweatiness and wateriness at tail. During the 9 w ~ 10 w, the model rats appeared fatness, extrados, gather together, narrowed eyes, accidie, slow action, fatness in hair which based on syndromes at first phase; during the 11-12 w, the model rats appeared continually loss of hair and turn into yellow color at stern, dark-purple tongue, and ome petechias appeared at the tail from top to root. Glucose metabolism: Compared with the control group, the FPG, Fins, IRI levels of the model group were increased continually from the end of 6th week, reached its top at the end of 12th week. The IAI level was decreased obviously from the end of 6th week, reached its bottom at the end of 12th week. **Conclusion:** The rat model of type 2 diabetes with insulin resistance established by feeding high calories and fat diet together with peritoneal injection of STZ may appear the characters of dynamic evolutionary syndromes in Chinese medicine during different phases. The dynamic progression of syndromes in Chinese medicine is from the simultaneous deficiency of both qi and yin to simultaneous deficiency of both qi and yin with concurrent turbid phlegm, and the lastly to the simultaneous deficiency of both qi and yin with concurrent turbid phlegm and blood stasis.

[**Key words**] type 2 diabetes; insulin resistance; rat model; syndrome in Chinese medicine

“病证结合”的广泛应用,充分体现了中西医两种医学的优势互补,是中西医结合研究的最佳模式^[1]。众所周知,每一种疾病都有其发生发展的演变过程,“证”反映了疾病发展过程中某一阶段的病理生理变化,并因其不同疾病背景表现出随时间在方式、程度和形式等方面发生动态变化的特点,证候这一“动态时空”的特性提示从证候动态演变角度来研究“方证相关”是一个值得实践的思路^[2]。本文在复制 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠模型的过程中,观察到随着该模型造模时间的延长,模型大鼠在外观表征上表现出与中医证候相关的一些变化,提示其有可能作为中医证候演变的一个动态模型。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 110 只,体重(200 ± 10)g,级别 SPF,动物许可证号为 SCXK(京)2007-0008,由北京维通利华实验动物中心提供。所有动物提前 1 周购入,10 只/笼。光照节律 12L: 12D (6:00 ~ 18:00),室温(22 ± 2)℃,保持安静。

1.2 饲料 普通饲料及高脂高热量饲料均由中国医学科学院实验动物研究所加工提供。饲料配方:2%胆固醇,0.5%牛胆酸钠,10%猪油,5%蔗糖,5%蛋黄粉,77.5%基础饲料。

1.3 试剂 柠檬酸(批号 10007192),柠檬酸钠(批号 10019492):购自北京化学试剂公司;链脲佐菌素(STZ, Sigma, S0130):购自北京博爱科贸有限公司;葡萄糖测定试剂盒(批号 G20070652):购自北京康大贝克曼科技有限公司;胰岛素放射免疫分析药盒(批号 F200704231):购自北京福瑞生物工程公司。

1.4 仪器 快速血糖仪及血糖试纸:美国拜耳公司;3K30 低温高速离心机:Sigma 公司;HANGPING FA1004 电子分析天平:上海天平仪器厂;超低温冻存箱:SANYO 公司;SYNCHRON CX4PRO 全自动生化分析仪:美国(BECKMAN COULTER);DWN-90 血液流变分析仪:北京多米诺科学仪器有限公司;GC-911-γ 放射免疫计数器:中国科技大学实业总公司。

2 方法

2.1 STZ 配制 STZ 溶液配制:称取一定量 STZ,用 0.1 mol·L⁻¹柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制成 1%,调 pH 至 4.20,操作均在冰浴中进行。

2.2 造模方法 参考文献报道^[3],以高脂高热量饲料喂养加小剂量链脲佐菌素(STZ)ip 的方法建立 2 型糖尿病 IR 大鼠模型:大鼠给予高脂高热量饲料,连续 5 周。第 6 周,禁食 12 h,造模组给予一次性 ip 1% STZ 溶液 30 mg·kg⁻¹;正常组 ip 同剂量 0.1 mol·L⁻¹柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。注射 STZ 后第 3 天大鼠尾静脉采血检测空腹血糖、空腹胰岛素,计算胰岛素敏感指数。选择空腹血糖 ≥ 11.1 mmol·L⁻¹,空腹胰岛素 20 ~ 40 mU·L⁻¹的大鼠正式纳入模型组。

2.3 分组处理 大鼠 110 只,适应性喂养 1 周后,按体重随机分为正常组 50 只和造模组 60 只。正常组给予基础饲料喂养,模型组按上述造模方法制模筛选后,继续给予高脂饲料喂养。分别于第 0,6,8,10,12 周末禁食 12h 后从正常组、模型组各取 10 只大鼠,以 10% 水合氯醛 ip 麻醉,经颈总动脉采血。

2.4 指标观测

2.4.1 外观指标 观察并记录造模中各组大鼠的

毛发色泽、行为状态、饮食、大便及尿量等外观行为方面的变化:活动程度(迟缓、灵活、多动),精神状态(萎靡、嗜睡、正常、兴奋),皮肤毛发(瘀斑或紫暗、枯乱不泽、一般、顺整润泽),饮食量(减少、正常、增加),饮水量(减少、正常、增加),大便(稀溏、正常、干结)、尿量(减少、正常、增多)、舌色(淡红、紫暗)等。统计各组大鼠不同时间点异常变化只数,以组内变化只数/组内总只数(n/N)表示。每周称体重1次。

2.4.2 糖代谢指标 空腹血糖(FPG)(生化法)、血清胰岛素(Fins)(放免法)、计算胰岛素敏感指数^[4](ISI,因其为非正态分布,故分析时取其自然对数为IAI)和胰岛素抵抗指数(IRI)^[5]。

2.5 数据处理 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0 统计软件处理,同一时间点两组间比较采用 t 检验;不同时间点的比较采用单因素方差分析,用SNK法检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 造模不同时间点大鼠外观行为的变化 实验期间,正常组大鼠的外观行为状态未见明显异常,模型组大鼠出现饮水量增多、尿量增多、拉尾排便等2型糖尿病大鼠共同的特征。与正常组相比,模型组大鼠在第1~6周时间内,出现毛发光泽减退,多动,活跃及易激惹,饮食量、饮水量增加,大便干燥,小便偏少,尾色偏红等表现;在经 ip STZ 后的第7~8周,模型组大鼠出现嗜睡、眯眼、倦怠懒动,被毛脱落,饮水量增加,大便干结,尾巴出汗潮湿等表现;在第9~10周,模型大鼠进一步出现拱背扎堆、眯眼、精神萎靡、活动迟缓、背毛油腻等表现;在第11~12周阶段,模型大鼠出现被毛减少,臀毛枯黄,尾巴尖部至

根部出现不同程度的瘀斑,舌色可见紫暗明显。见表1。

表1 造模不同时间点大鼠外观行为学变化

外观表征	正常组	模型组(n/N)			
	第1~12周	第1~6周	第7~8周	第9~10周	第11~12周
皮肤毛发	顺整润泽	光泽减退 (35/40)	脱毛 (26/30)	脱毛油腻 (20/20)	脱毛油腻 (10/10)
活动状态	灵活	多动 (37/40)	少动眯眼 (28/30)	少动扎堆 (20/20)	少动扎堆 (10/10)
精神状态	正常	兴奋 (38/40)	嗜睡 (30/30)	萎靡 (20/20)	萎靡 (20/20)
饮食量	正常	增加 (40/40)	增加 (26/30)	减少 (18/20)	减少 (10/10)
饮水量	正常	增加 (30/40)	增加 (30/30)	增加 (20/20)	增加 (10/10)
小便量	正常	偏少 (29/40)	偏多 (30/30)	偏多 (20/20)	偏多 (10/10)
大便状态	正常	干结 (37/40)	干结 (30/30)	干结 (20/20)	干结 (10/10)
臀尾状态	正常	色红 (30/40)	出汗潮湿 (24/30)	出汗潮湿 (18/20)	臀毛枯黄 尾巴瘀斑 (10/10)
舌色	淡红	偏暗 (31/40)	偏暗 (23/30)	偏暗略紫 (17/20)	紫暗明显 (10/10)

3.2 造模不同时间点大鼠体重的变化 结果见表2。造模期间,正常组大鼠体重呈缓慢的增加趋势($P < 0.05$),模型组大鼠体重在前8周呈持续增加的趋势($P < 0.05$),第10周开始降低($P < 0.05$)。与正常组相比,除0周外,不同时间点的模型组大鼠体重均显著增加($P < 0.01$)。

3.3 造模不同时间点大鼠糖代谢的变化

3.3.1 血清 FPG 变化 结果见表3。正常组大鼠各不同时间点的血清 FPG 无明显变化;模型组大鼠血清 FPG 从第6周开始不断升高。与正常组相比,

表2 造模不同时间点2组大鼠体重的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体重/g					
	第0周	第4周	第6周	第8周	第10周	第12周
正常	201.8 ± 7.6	250.8 ± 5.4 ¹⁾	282.3 ± 11.3 ¹⁾	309.5 ± 8.1 ¹⁾	317.4 ± 9.2 ¹⁾	330.8 ± 10.7 ¹⁾
模型	202.1 ± 8.4	390.2 ± 9.2 ^{1,2)}	495.5 ± 8.3 ^{1,2)}	575.9 ± 7.5 ^{1,2)}	540.6 ± 6.8 ^{1,2)}	510.1 ± 5.4 ^{1,2)}

注:与同组前一时间点结果比较¹⁾ $P < 0.05$;与正常组比较²⁾ $P < 0.01$ (表3~6同)。

模型组大鼠血清 FPG 在第0周无明显差别,其余各点均呈明显升高,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。

3.3.2 血清 Fins 变化 结果见表4。正常组大鼠血清 Fins 不同时间点无明显变化;模型组大鼠血清 Fins 从第6周开始不断升高,第8,10,12周末的

Fins 均比前一时间点显著升高($P < 0.05$)。与正常组相比,模型组大鼠血清 Fins 在第0周无明显差别,其余各点均明显升高,差异有显著性意义($P < 0.01$)。

3.3.3 IAI 变化 结果见表5。正常组大鼠 IAI 不同时间点无明显变化;模型组大鼠 IAI 从第6周开

始不断降低,第 8,12 周的 IAI 均比前一时间点显著降低($P < 0.05$)。与正常组相比,模型组大鼠 IAI 在第 0 周无明显差别,其余各点均呈明显降低,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。

3.3.4 IRI 变化 结果见表 6。正常组大鼠 IRI 不

同时间点无明显变化;模型组大鼠 IRI 从第 6 周开始不断升高,第 8,10,12 周的 IRI 均比前一时间点显著升高($P < 0.05$)。与正常组相比,模型组大鼠 IRI 在第 0 周无明显差别,其余各点均呈明显升高,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。

表 3 造模不同时间点大鼠血清 FPG 的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	血清 FPG/ mmol·L ⁻¹				
	第 0 周	第 6 周	第 8 周	第 10 周	第 12 周
正常	4.51 ± 0.27	5.21 ± 0.42	5.61 ± 0.21	6.06 ± 0.13	6.62 ± 0.37
模型	4.49 ± 0.74	14.21 ± 1.3 ^{1,2)}	15.29 ± 1.2 ^{1,2)}	15.31 ± 2.1 ²⁾	16.21 ± 1.7 ^{1,2)}

表 4 造模不同时间点 2 组大鼠血清 Fins 的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	血清 Fins/ mU·L ⁻¹				
	第 0 周	第 6 周	第 8 周	第 10 周	第 12 周
正常	13.11 ± 0.14	13.61 ± 0.29	13.67 ± 0.73	13.86 ± 0.83	14.01 ± 1.29
模型	12.99 ± 1.87	24.19 ± 1.9 ²⁾	26.07 ± 2.2 ^{1,2)}	29.47 ± 3.5 ^{1,2)}	33.21 ± 2.9 ^{1,2)}

表 5 不同时间点 2 组大鼠 IAI 的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	IAI				
	第 0 周	第 6 周	第 8 周	第 10 周	第 12 周
正常	-3.53 ± 0.38	-3.44 ± 0.27	-3.58 ± 0.45	-3.86 ± 0.73	-3.38 ± 0.59
模型	-3.62 ± 0.22	-5.99 ± 0.1 ²⁾	-6.63 ± 0.32 ^{1,2)}	-6.99 ± 0.41 ^{1,2)}	-7.26 ± 0.3 ^{1,2)}

表 6 不同时间点 2 组大鼠 IRI 的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	IRI				
	第 0 周	第 6 周	第 8 周	第 10 周	第 12 周
正常	3.51 ± 0.26	3.55 ± 0.17	3.49 ± 0.25	3.54 ± 0.19	3.58 ± 0.37
模型	3.49 ± 0.18	5.61 ± 0.4 ²⁾	6.17 ± 0.46 ^{1,2)}	6.79 ± 0.31 ^{1,2)}	7.26 ± 0.44 ^{1,2)}

4 讨论

越来越多的资料证实,胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是 2 型糖尿病发病机制的基本环节和显著特征,贯穿于 2 型糖尿病发展的始终,并成为导致 2 型糖尿病并发症的主要因素^[6]。目前 IR 已成为 2 型糖尿病研究领域的热点,改善 IR 成为治疗 2 型糖尿病的关键所在,而建立 2 型糖尿病 IR 动物模型是 IR 防治研究的重要基础。之前曾有通过高脂饲料喂养引起大鼠广泛的胰岛素抵抗,再加上小剂量注射链脲佐菌素造成胰岛 β 细胞轻度损伤产生糖耐量异常,再喂以高热量饲料引起动物肥胖制作出糖尿病大鼠模型^[7-8]。之后又有研究发现,大鼠先由高糖高脂饮食诱发出高胰岛素血症和胰岛素抵抗后,再注射小剂量的 STZ 可以诱导出胰腺代偿性分泌胰岛素障碍的高血糖症,此法可在较短时间内诱

导出与人类 2 型糖尿病的发病模式接近的 2 型糖尿病 IR 模型。

本研究即采用上述高脂高热量饲料喂养加 STZ ip 的方法造模。在该法造模中,STZ 剂量选择是一个很重要的因素。本课题组在预实验摸索中发现,所用大鼠一次性 ip STZ 30 mg·kg⁻¹ 具有更高的成模率和低死亡率。实验中的大鼠经高脂高热量饲料喂养 5 周后,经 ip STZ 72 h 后,其体重、FPG, Fins, IRI 均出现显著升高,IAI 显著降低,尿量、饲料消耗量明显增加。根据 2 型糖尿病 IR 模型判断标准^[4-5],该模型大鼠符合 2 型糖尿病胰岛素抵抗的病理生理特点。

现代医学认为 2 型糖尿病 IR 是一个渐进的、不断向多病理发展的一个特别病征^[6]。中医认为,2 型糖尿病多属中医“消渴”范畴,临床上本病患者常

因血糖升高或肥胖而就诊,此时多伴见咽干口燥、多饮多尿、面色潮红、大便干燥、形体肥胖、四肢倦怠、头晕耳鸣、舌质白腻或紫暗等一系列症状。部分2型糖尿病患者疾病发展中可以表现出一定的气阴两虚、兼痰浊及兼痰瘀的中医证候变化规律^[9-10],但有关IR发展与中医证候之间的关系目前了解还很少。本研究观察到,符合2型糖尿病IR模型大鼠自6周末开始出现的少动、喜倦卧,饮水、饲料消耗量显著增多,大便干结等类似中医气阴两虚证的外观表现,且随着病程的延长,气阴两虚的症状程度也不断加重。同时还观察到,第9周时的模型大鼠在之前症状基础上,继现形体肥胖、体重增加、被毛油腻、活动迟缓、大便稀薄症状等类似中医痰浊证的外在表现;第11周时的模型大鼠相继出现不同程度的舌质紫暗、尾部皮下瘀斑等类似中医血瘀证的外在表现。结果表明,该模型大鼠依不同时间而呈现不同的中医外观表征。提示该模型大鼠具有以中医气阴两虚为基本背景,同时随造模时间延长逐渐演变为具有痰浊、痰浊夹瘀的病机特点。

“病证结合模型”通常指具有西医疾病病理同时具有中医证候某些特点的一类动物模型,其中动物外观表征是中医证候辨识的重要参考。但由于证候模型复制中通过四诊获得症征有困难,常需将模拟病因、模拟症状、客观指标及药物反证相结合进行评价^[11]。因此,本文观察到2型糖尿病IR模型大鼠在外观表征上出现与中医证候有关的变化,仍有待于客观指标的验证或药物反证的支持。

[参考文献]

[1] 张京春,陈可冀.病证结合是中西医结合临床的最佳

模式[J].世界中医药,2006,1:14.

- [2] 张业,谢鸣.基于证候演变特性的“方证相关”研究及其思路[J].中医杂志,2008,49(11):968.
- [3] Reed M J, Meszaros K, Entes L J, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [J]. *Metabolism*, 2000, 49(11): 1390.
- [4] 李光伟,潘孝仁,Lillioja,等.检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J].中华内科杂志,1993,32(10):656.
- [5] 贾伟平.中国人群胰岛素抵抗的状况[J].国外医学·内分泌学分册,2002,22(4):264.
- [6] 钱荣立.深入研究胰岛素抵抗的病理生理机制是防治糖尿病心血管并发症的基础[J].中国糖尿病杂志,2005,13(1):2.
- [7] Storlien L H, James D E, Burleigh K M, et al. Fat feeding causes widespread *in vivo* insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats [J]. *Am J Physiol*, 1986, 251:E576.
- [8] 孙焕,陈广,陆付耳.介绍几种诱发型糖尿病动物模型[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(2):65.
- [9] 张延群,和贵章,韩青,等.2080例糖尿病中医流行病学调研报告小结[J].中国中医基础医学杂志,2004,10(12):45.
- [10] 全小林,毕桂芝,甄仲,等.2518例肥胖2型糖尿病中医证型分类研究[J].世界中西医结合杂志,2008,3(1):26.
- [11] 郑小伟.论中医动物模型的造型依据与研制方法[J].浙江中医学院学报,2004,28(6):1.

[责任编辑 聂淑琴]