

汤琦,施磊,郑璐,等. 禁食时间对昆明小鼠糖耐受和胰岛素分泌的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 61-65.

Tang Q, Shi L, Zheng L, et al. Effect of fasting time on glucose tolerance in KM mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(10): 61-65.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.10.011

禁食时间对昆明小鼠糖耐受和胰岛素分泌的影响

汤琦,施磊,郑璐,代琴芳,陈小川*

(西南大学动物科技学院,重庆 400715)

【摘要】 目的 为了探寻国内使用量最大的昆明小鼠在特定环境下,OGTT中比较稳定、可靠、合理的禁食时间。**方法** 小鼠口服葡萄糖耐受实验(oral glucose tolerance test, OGTT)是研究其胰岛 β 细胞功能和血糖调节能力的方法。实验前禁食是必要步骤,但在不同禁食时间下,小鼠的空腹和葡萄糖刺激的血糖浓度、胰岛素浓度存在一定差异。本实验选择6~7周龄大的清洁级昆明雄性小鼠,随机分为四组,分别禁食4、8、10、12 h后实行OGTT,检测各组小鼠血糖浓度和胰岛素浓度,并分析血糖浓度和胰岛素浓度的变化趋势。**结果** (1)所有小鼠血糖浓度和胰岛素浓度均从空腹基准值升至临界值又降至基准值,与禁食4 h小鼠的空腹血糖浓度相比,其他三组小鼠的空腹血糖浓度均极显著的低于禁食4 h组的血糖浓度($P < 0.01$)。(2)从血糖来看,禁食10 h组血糖浓度从空腹升临界值的上升幅度最大,其血糖曲线下面积与禁食4 h组相比存在显著差异($P < 0.05$)。(3)从胰岛素分泌来看,禁食4 h的空腹胰岛素浓度比禁食8 h高4%,大约是禁食12 h空腹胰岛素的两倍,禁食8 h时的胰岛素曲线下面积最小。**结论** 昆明小鼠在OGTT中禁食8~10 h,血糖浓度和胰岛素浓度差异大、分辨率高以及变化趋势较好;对禁食时间的安排更加合理,实验计划合理、高效,以后采用昆明小鼠建立糖尿病模型时,糖耐受实验的禁食时间可以此作为参考。

【关键词】 昆明小鼠;胰岛素分泌;口服葡萄糖耐受实验;禁食时间

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 10-0061-05

Effect of fasting time on glucose tolerance in KM mice

TANG Qi, SHI Lei, ZHENG Lu, DAI Qingfang, CHEN Xiaochuan*

(College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

【Abstract】 Objective Oral glucose tolerance testing (OGTT) is a method used to study the function of islet β -cells and blood glucose regulation. Fasting is necessary beforehand, but fasting and glucose-stimulated blood glucose concentrations and insulin concentrations differ according to the duration of fasting. This study aimed to identify the optimal fasting time prior to OGTT in the widely used KM mouse strain. **Methods** Clean grade male KM male mice aged 6-7 weeks were randomly allocated to four groups. After fasting for 4, 8, 10, or 12 h, OGTT was performed, blood glucose and insulin concentrations were measured, and the concentration *vs.* time curves for each were compared. **Results** 1) The blood glucose and insulin concentrations of all the mice increased from their fasting values to a peak, and then decreased back to the baseline values. Compared with the fasting blood glucose concentration of mice that were fasted for 4 h, the fasting blood glucose concentrations of the other three groups were significantly lower ($P < 0.01$). (2) The blood glucose concentrations in the 4 h-fasted group were also the highest at each subsequent time point, and the area under the blood glucose curve was significantly different from those in the other groups ($P < 0.05$). (3) The fasting insulin concentration in

【基金项目】 国家自然科学基金(31602021);国家级大学生科研创新创业训练计划项目(201610635044)。

【作者简介】 汤琦(1994—),女,硕士研究生,研究方向:动物生殖与发育调控。E-mail: 402535146@qq.com

【通信作者】 陈小川(1984—),男,副教授,硕士生导师。E-mail: dr.frankthetank@gmail.com

the 4 h-fasted group was 4% higher than that of the 8 h-fasted group, which had a value about twice as high as the 12 h-fasted group. The area under the insulin curve was lowest in the mice fasted for 8 h. **Conclusions** KM mice fasted for 8–10 h prior to OGTT showed large differences in blood glucose and insulin concentrations, higher resolution, and larger changes in values. This made the arrangement of fasting time more reasonable, and the experimental plan is reasonable and efficient. When KM mice are used to establish a diabetes model, the effect of fasting time prior to OGTT should be considered.

【Keywords】 KM mouse; insulin secretion; oral glucose tolerance test; fasting

口服葡萄糖耐受实验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 是目前评价机体糖代谢状态的标准之一,同时也是评价机体胰岛 β 细胞功能的常用方法^[1]。为了使胃充分排空,其中比较关键的一步是禁食,但过长或过短时间禁食对机体存在潜在的影响,使得实验动物的生理状态出现差别^[2–3]。实验动物禁食时间过长会产生强烈的饥饿感,影响正常的糖代谢,胰岛素敏感性下降,出现胰岛素抵抗,在 OGTT 中更容易出现高血糖现象^[4];禁食时间过短,胃内容物对实验结果产生一定影响。因此,值得进一步研究和探讨实验动物在 OGTT 中最佳禁食时间。大鼠的糖耐受实验禁食时间有较系统的研究,为 10~12 h,在小鼠的诸多糖耐量实验中,禁食时间并不统一。有人选择 4、6、8 h 作为禁食^[5],但大部分普遍选择 10~12 h 为禁食时间^[6–10],最长禁食时间也有 14~16 h^[11–12];国外对雄性 C57BL/6J 小鼠有较系统的研究,选择禁食 0、3、6、24 h,在 OGTT 中禁食 6 h 是评估糖耐受的最佳方法^[13]。但 6~24 h 之间跨度较大,实验结果差异大、分辨率不高,实验条件也不统一,没有很强的说服力。所以有必要在小鼠的品种、性别、年龄、体重、胰岛素抵抗、实验环境等多种影响因素同一的条件下对小鼠 OGTT 进行系统、详细的研究,可以更好地优化 OGTT 禁食方案。

小鼠具有各种不同基因背景的近交品系、突变品系和封闭群,为研究提供了多种动物模型选择。已有许多文献表明不同基因背景小鼠的糖代谢、脂代谢能力都有明显差异^[14–16],因此选择合适的品系作为研究对象就显得十分重要。糖尿病模型大部分是采用 C57BL/6J 小鼠^[17],但现有的糖尿病模型新进展显示,C57BL/6J 品系小鼠可能并不是糖尿病模型的理想动物^[18],该品系小鼠对实验环境要求较高,成模率、死亡率和昆明小鼠基本一致^[19],因此昆明小鼠是较 C57BL/6J 小鼠更为经济有效的建立糖尿病模型的小鼠品系^[19]。C57BL/6J 小鼠在 OGTT 中的禁食时间国外有较为系统的研究,但昆明小鼠

没有比较系统的研究。昆明小鼠是我国生产量、使用量最大的远交群小鼠,它在我国生物医学动物实验中约为小鼠总用量的 70%^[20]。因此,研究人员参考了国外 C57 小鼠的案例,在昆明鼠上进行进一步研究和探讨。

一些研究表明,性别差异会影响体重、葡萄糖耐受、空腹血糖和胰岛素水平^[21–22],40 日龄雄性昆明小鼠的血糖和胰岛素水平上升更为显著,生化结果稳定可靠^[23–24]。因此,本实验采用四组 6~7 周龄的雄性昆明小鼠,通过分别禁食 4、8、10、12 h,利用 OGTT 比较每组昆明小鼠血糖浓度、胰岛素浓度、空腹血糖浓度值与胰岛素浓度值比值的差异,分析不同禁食时间后昆明小鼠血糖浓度和胰岛素浓度的变化。初步探讨禁食时间对昆明小鼠糖耐量和葡萄糖刺激胰岛素分泌的影响,探寻比较合理的禁食时间。为昆明小鼠进行 OGTT 时提供科学的禁食时间的参考,也可在采用昆明小鼠建立糖尿病模型时,糖耐量实验的禁食时间提供參考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5~6 周龄清洁级昆明雄性小鼠 16 只,体重 31~34 g,由重庆市中药研究所提供[SCXK(渝)2012-0006],饲养在国家级动物科学实验教学示范中心[SYXK(渝)2012-0003]。小鼠每四只饲养于笼中(30 cm × 15 cm × 20 cm),适应性饲养 2 周,饲以标准鼠料(重庆市中药所,重庆),自由进食和饮水。室内温度为(28 ± 1)℃,光照 16 L:8 D,湿度为 40% ~ 60%。实验当天小鼠随机分为 4 组,每组 4 只,然后分别禁食 4、8、10、12 h,禁食时去除笼中的垫料和鼠料,只留充足的饮水。动物使用的伦理审批号(IACUC)为 No. [2007] 3,实验过程按照实验动物的使用 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

葡萄糖(上海生工生物工程公司),血糖试纸

(美国 Roche 公司),超敏小鼠胰岛素酶免试剂盒(易致生物科技有限公司),血糖仪(罗氏,美国),冷冻离心机(Eppendorf AG,德国),酶标仪(Bio-Rad,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠口服葡萄糖耐量实验

禁食后,称取小鼠体重,然后将小鼠固定于固定器上,再断尾处理(约 2 mm)。弃去两滴血后,采用血糖仪检测血糖浓度;紧接着使用抗凝血枪头(肝素钠处理)的移液枪尾尖采血 70 ~ 100 μ L。将上述采集的血样用离心机在 4℃、3000 r/min 条件下离心 20 min,然后将血浆移至另一灭菌离心管中,放置冷冻盒上,以备随后胰岛素检测。之后葡萄糖按 1.5 mg/g 灌胃(8 号灌胃针),每只小鼠应当灌胃的葡萄糖体积(μ L)=10 $\times$ 小鼠体重(g),灌胃后立即记为 0 min。随后的 15、30、60、90 min 测血糖浓度并尾尖采血。

1.3.2 小鼠血浆胰岛素浓度测定

将上述采集的血样用超敏小鼠胰岛素酶联免疫检测试剂盒检测胰岛素浓度。先用标准品稀释液稀释倍比标准品,接着加样、封板、37℃温育 30 min;随后配洗涤液,洗板后加酶标试剂,37℃温育 30 min;然后洗板后加入显色剂,37℃避光显色 15 min;最后加入终止液,在 15 min 内使用酶标仪 450 nm 波长读出 OD 值。试剂盒批间和批内检测精密密度变异系数均小于 10%。

1.4 统计学方法

体重、血糖、胰岛素数据采用 SPSS 17.0 软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)进行 ANOVA 方差分析并多重比较。血糖浓度和胰岛素浓度曲线下面积用 Prism 7.0 软件制作(GraphPad Software., La Jolla, CA, USA)。结果用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm s\bar{x}$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 小鼠体重

禁食完成后,称量昆明小鼠体重,总体平均体

重在(33.97 $\pm$ 2.61)g 之间,各组小鼠体重没有差异,见表 1。

2.2 不同禁食时间对小鼠血糖的影响

小鼠禁食后,随着禁食时间的延长,各组小鼠空腹血糖值逐渐降低,禁食 8、10、12 h 组小鼠空腹血糖分别低于禁食 4 h 组小鼠空腹血糖 40%、56%、79% ($P < 0.01$) (图 1A)。葡萄糖灌胃后,每组小鼠血糖立即升高,15 min 时禁食 4 h 小鼠血糖比禁食 10 h 小鼠高 5%,比禁食 8、12 h 小鼠血糖均高 23%。30 min 时各组小鼠血糖值均达到最高点,禁食 12 h 小鼠血糖低于其他三组 15% 左右;与 0 min 相比,30 min 时禁食 4、8、10、12 h 小鼠血糖升高 61%、73%、75%、74%,禁食 10 h 血糖上升幅度最大。30 min 后血糖逐渐下降,90 min 时各组小鼠血糖值均恢复到初始水平,各组小鼠血糖无差异(图 1B)。通过曲线下面积分析,禁食 10 h 小鼠血糖曲线下面积最大,比禁食 4 h 小鼠血糖曲线下面积高 31% ($P < 0.05$),比禁食 8、12 h 小鼠分别高 16%、17% (图 1C)。

2.3 不同禁食时间对小鼠胰岛素的影响

随着禁食时间的延长,各组小鼠空腹胰岛素都逐渐降低,禁食 4 h 的空腹胰岛素比禁食 8 h 高 4%,大约是禁食 12 h 空腹胰岛素的两倍(图 2A)。在灌胃之后,小鼠胰岛素含量立即升高,在 15 min 采血点上其含量最高,禁食 4 h 组的 15 min 胰岛素比 0 min 胰岛素高 66%,比禁食 8、10、12 h 小鼠分别高 60%、67%、71%。随后胰岛素下降迅速,大约在 60 min 降至基准值,禁食 10 h 小鼠下降幅度最大,比 15 min 最高点下降了 65%;禁食 12 h 小鼠下降幅度最小,为 46%(图 2B)。禁食 4 h 组的胰岛素曲线下面积比其他三组分别高 30%、34%、31%(图 2C)。

2.4 不同禁食时间的空腹血糖与胰岛素比值

空腹血糖与血浆胰岛素的比值可作为最简便的胰岛素抵抗指标^[25]。通过空腹血糖与血浆胰岛素的比值分析,昆明小鼠在 OGTT 前禁食 4、8、10、12 h,没有改变胰岛素抵抗,总体平均值无显著差异。(图 3)。

表 1 小鼠体重变化
Table 1 The changes of weight of mice

分组 Groups	<i>n</i>	禁食 4 h Fasting 4 h	禁食 8 h Fasting 8 h	禁食 10 h Fasting 10 h	禁食 12 h Fasting 12 h	平均体重 Average weight
体重(g) Weight	20	34.14 $\pm$ 3.57	34.80 $\pm$ 2.71	33.73 $\pm$ 2.39	33.21 $\pm$ 2.23	33.97 $\pm$ 2.61

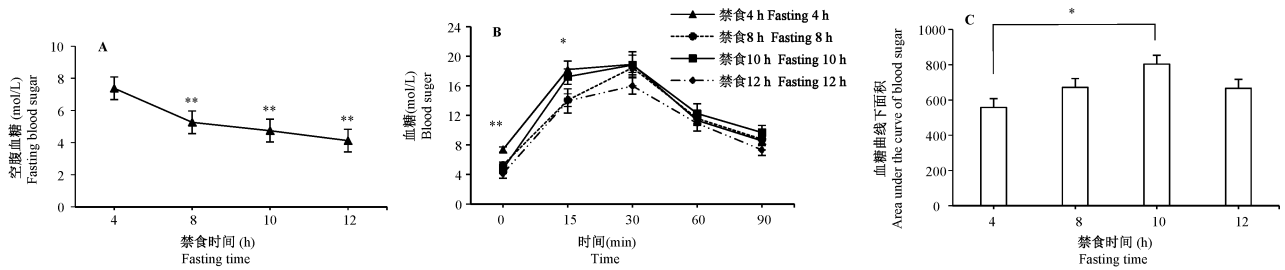


图 1 不同禁食时间对小鼠血糖的影响

Figure 1 Effects of different fasting time on blood glucose in the mice

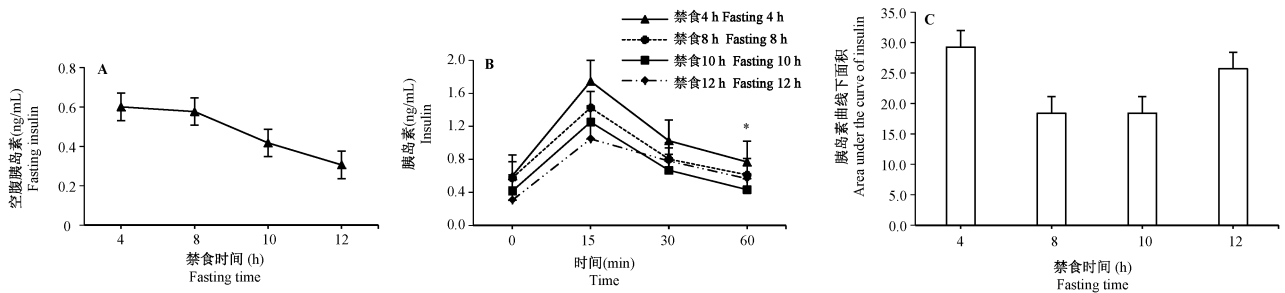


图 2 不同禁食时间对小鼠胰岛素的影响

Figure 2 Effects of different fasting time on the insulin in mice

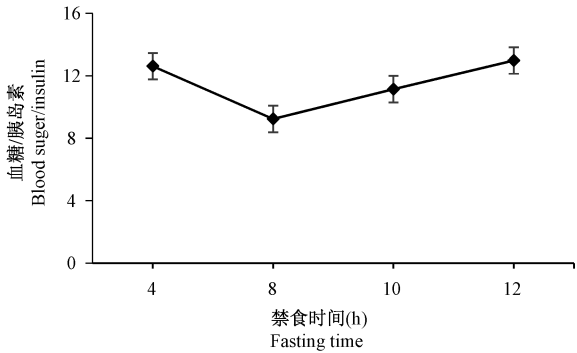


图 3 不同禁食时间的空腹血糖与胰岛素比值

Figure 3 Fasting blood glucose and insulin ratio with different fasting time

3 讨论

糖耐受实验已成为检测血糖耐受和胰岛素分泌最广泛应用的生理测试之一,实验前禁食时间的长短会对实验结果产生一定影响;小鼠作为糖耐受实验的研究对象,其品种、性别、年龄、体重、禁食时间等诸多因素的不同一,得到的实验结果可能会有一定差异。本实验在同一实验条件下,针对禁食时间研究发现,昆明小鼠在 OGTT 中禁食 8~10 h 是比较合理的禁食范围,糖耐受血糖变化差异大,胰岛素分泌较好,为昆明小鼠进行 OGTT 时提供科学的禁食时间的参考。

大量的研究表明外周组织会使胰岛素敏感性

下降,使外周摄取葡萄糖降低,导致胰岛素抵抗^[26]。在本实验中,昆明小鼠的体重为(33.97 ± 2.61) g,符合同年龄段昆明小鼠正常体重(35.26 ± 2.80) g^[27]。禁食 4、8、10、12 h 后,小鼠各组空腹血糖值与空腹胰岛素值的比值无显著差异,总体平均值无显著差异,说明禁食后没有改变昆明小鼠胰岛素敏感性,所有小鼠胰岛素敏感性都保持一致。因此,本实验在同一的条件下,只针对禁食时间对昆明小鼠糖耐受的影响进行研究。

禁食会降低体内糖原和乳酸含量^[25],对糖代谢产生影响。不同禁食时间对小鼠的空腹血糖调节会产生一定影响^[13],禁食 8、10、12 h 小鼠空腹血糖浓度分别低于禁食 4 h 小鼠空腹血糖浓度 40%、56%、79%,与前人研究结果一致^[28]。禁食时间过长会使小鼠可利用能量减少^[25],导致血糖浓度降低。随着禁食时间的延长,小鼠血糖浓度下降缓慢,各个禁食时间段的空腹血糖浓度都有一定的浮动,血糖的这种变化主要与小鼠的禁食时间长短有关,不同的血糖变化趋势可能表明不同禁食时间对昆明小鼠胰岛素的敏感性不同。葡萄糖灌胃后,各组小鼠血糖均升高,30 min 时各组小鼠血糖值均达到最高点。与 0 min 相比,禁食 10 h 血糖上升 75%,上升幅度最大,血糖分辨率高。通过分析血糖曲线下面积发现,禁食 10 h 组的血糖曲线下面积最大。

在禁食状态下血液中胰岛素含量维持在基准

水平^[29],禁食 8 h 小鼠的空腹胰岛素浓度比禁食 4 h 组小鼠低 4%,而比禁食 10 h 组小高 40%,大约是禁食 12 h 空腹胰岛素浓度的两倍。葡萄糖灌胃之后,小鼠胰岛素含量立即升高,禁食 8 h 胰岛素浓度上升幅度最小,其他三个禁食组胰岛素浓度上升幅度基本一致,昆明小鼠禁食 8 h,糖耐量胰岛素处于较低水平。从胰岛素曲线下面积看,禁食 8、10、12 h 小鼠胰岛素曲线下面积基本一致,比禁食 4 h 小鼠分别低 30%、34%、31%,禁食 8 h 小鼠的胰岛素曲线下面积最小。在整个糖耐受中,禁食 8 h 小鼠的胰岛素浓度和禁食 4 h 小鼠的胰岛素浓度较为一致,但禁食 8 h 小鼠胰岛素浓度曲线下面积低于禁食 4 h 小鼠。由此来看,禁食 8 h 左右小鼠胰岛素分泌量较少,对血糖调节效率高。

综上所述,本实验在同一条件下,对四组昆明小鼠分别进行 4、8、10、12 h 的禁食,通过 OGTT 分析血糖浓度、胰岛素浓度、空腹血糖值与空腹胰岛素值的比值发现,禁食 8~10 h 的昆明小鼠,葡萄糖刺激后,血糖变化趋势较好,分辨率高,胰岛素分泌量较好,在 OGTT 中可作为比较合理、有效、可靠的禁食时间。

参考文献:

- [1] 马晓静,周健,贾伟平. 葡萄糖耐量试验的原理及临床应用[J]. 上海医学, 2009, 32(5): 440-443.
- [2] 吴肇汉. 营养支持疗法在外科治疗中的地位和展望[J]. 外科理论与实践, 2001,6(1): 24-25.
- [3] Henry JP, 汤慈美. 目前应激理论的概念[J]. 心理学动态, 1984,2(2): 41-48.
- [4] Van dBG, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients [J]. N Engl J Med, 2001,345(19):1359-1367.
- [5] 陈建国,步文磊. 实验因素对高血糖模型小鼠血糖值影响的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(10): 2240-2242.
- [6] 金晓艳,陈育尧,胡晨,等. 梅连消渴胶囊对实验性Ⅱ型糖尿病大鼠糖代谢的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(2): 167-171.
- [7] 曹旭,童圣灵,赵雷. 柿叶不同有效部位对链脲佐菌素致 2 型糖尿病大鼠糖代谢的影响[J]. 中华灾害救援医学, 2016, 4(10): 569-572.
- [8] 黄志磊,黄晓君,黄小利,等. 双醋瑞因对 2 型糖尿病大鼠炎症因子和脂代谢的影响及脂肪组织 chemerin 的表达变化[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2017, 38(5): 693-697.
- [9] 王彤,周国用,马静,等. 链脲佐菌素诱导 C57BL/6J 小鼠 2 型糖尿病模型研究[J]. 中国实验动物学报, 2000,8(2): 31-36.
- [10] 虞冬辉,程红科,李勇,等. 禁食时间对链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病小鼠模型的影响[J]. 中国临床医学, 2013, 20(4): 472-473.

- [11] 刘长青,宋立江,蒋东升,等. 不同种属和禁食时间对链脲佐菌素诱导糖尿病模型的影响研究[J]. 实用预防医学, 2010, 17(2): 377-378.
- [12] 王俊贤,李小军,刘跃辉,等. 高糖、高脂诱导大鼠肝脏胰岛素抵抗评价[J]. 中国药师, 2012, 15(6): 747-750.
- [13] Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, et al. Evaluating the glucose tolerance test in mice [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008,295(6): E1323-E1332.
- [14] Berglund ED, Li CY, Poffenberger G, et al. Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains [J]. Diabetes, 2008, 57(7): 1790-1799.
- [15] Champy MF, Selloum M, Zeitler V, et al. Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse [J]. Mamm Genome, 2008, 19(5): 318-331.
- [16] Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding [J]. Diabetologia, 2013, 56(5): 1129-1139.
- [17] Dang JK, Wu Y, Cao H, et al. Establishment of a rat model of type II diabetic neuropathic pain [J]. Pain Med, 2014, 15(4): 637-646.
- [18] Betz B, Conway BR. Recent advances in animal models of diabetic nephropathy [J]. Nephron Exp Nephrol, 2014, 126(4): 191-195.
- [19] 郑国亚,张金宝,刘顺梅,等. 链脲佐菌素诱导 C57BL/6J 和昆明小鼠 1 型糖尿病模型的比较[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(1): 20-22.
- [20] 章根木,姚甘火. 中国昆明小鼠(KM 鼠)遗传背景资料调查[J]. 中国实验动物学杂志, 1997, 7(4): 246-251.
- [21] 崔隰,陈爱群,庞婧,等. 高脂饮食影响小鼠体内能量代谢的性别差异[J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(7): 658-664.
- [22] Rodriguez AM, Palou A. Uncoupling proteins: gender dependence and their relation to body weight control [J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004, 28(4): 500-502.
- [23] 李雯雯,黄颖,黄敏慧,等. SPF 级昆明小鼠血液生化值的测定[J]. 广东畜牧兽医科技, 2013, 38(5): 15-18.
- [24] 朱大诚,罗小泉,王艳辉. 40 日龄昆明小鼠主要生物学特性标准化研究[J]. 江西中医学院学报, 2008, 20(2): 63-65.
- [25] 蒋建军,李秀钧. 代谢综合征的定义、诊断及临床防治新概念与再认识[J]. 辽宁实用糖尿病杂志, 2003, 11(4): 2-4.
- [26] DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM [J]. Diabetes, 1988, 37(6): 667-687.
- [27] 刘殿峰,刘淑霞,刘秀霞,等. 昆明小鼠生物学特性标准化研究[J]. 中国生物制品学杂志, 2001(01):56-59.
- [28] 王瑞雪,李伟光,杨柳,等. 不同品系小鼠在禁食和(或)禁水情况下血糖变化特点的比较分析[J]. 军事医学, 2014, 38(7): 532-534.
- [29] 陈丽华,张远强,曹云新,等. 饥饿状态大鼠胰腺腺高血糖素和胰岛素变化的定量分析[J]. 中国应用生理学杂志, 1997, 13(4): 72-73.