

长爪沙鼠糖尿病近交系培育过程中 血液生理生化指标的动态变化

王迎¹, 李迎^{2,3}, 王东平², 郭萌¹, 霍学云⁴, 李长龙⁴, 陈振文⁴, 杜小燕^{1*}

(1. 首都医科大学实验动物科学部, 北京 100069; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071;
3. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 4. 首都医科大学基础医学院, 北京 100069)

【摘要】 目的 探讨长爪沙鼠糖尿病近交系培育过程中血液生理生化指标动态变化及其规律。**方法** 参考前期的研究方法, 应用生化分析仪、血细胞分析仪, 检测糖尿病长爪沙鼠近交系 F₉ ~ F₁₄ 代繁殖动物 17 项血液生理化和 22 项血常规指标, 并绘制其动态曲线。**结果** 从检测结果和动态曲线变化看, F₉ ~ F₁₄ 代动物的尿酸 (URIC)、乳酸脱氢酶 (LD)、肌酸激酶 (CK)、淀粉酶 (AMY)、血糖 (GLU)、单核细胞百分数 (MON%)、平均血红蛋白含量 (MCH)、平均血红蛋白浓度 (MCHC)、平均血小板体积 (MPV) 随代数增加呈现上升趋势; 总胆固醇 (CHOL)、嗜酸性粒细胞直接计数 (EOS)、嗜酸性粒细胞百分数 (EOS%)、红细胞 (RBC)、红细胞压积 (HCT)、血红蛋白 (HGB) 呈现下降趋势; 白蛋白 (ALB)、总蛋白 (TP)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL)、尿素氮 (BUN)、总胆红素 (TBIL)、肌酐 (CRE)、碱性磷酸酶 (ALP)、谷草转氨酶 (AST) 等其余指标总体趋势比较平稳。**结论** 糖尿病近交系动物培育中血液生理生化随着近交代数的增加会发生变化, 尤其是糖代谢和脂代谢相关指标高于其他动物, 提示其糖尿病动物的疾病特征, 也说明定向的近亲繁殖和培育对其血液生理生化指标具有一定的影响。

【关键词】 长爪沙鼠; 近交系; 糖尿病模型; 血液生化指标; 血液生理指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 09-0014-07

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 09. 003

Dynamic changes of biochemical and physiological indexes in breeding a diabetic inbred Mongolian gerbil line

WANG Ying¹, LI Ying^{2,3}, WANG Dongping², GUO Meng¹, HUO Xueyun⁴, LI Changlong⁴, CHEN Zhenwen⁴,
DU Xiaoyan^{1*}

(1. Department of Laboratory Animal Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China.

2. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071.

3. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118.

4. School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069)

【Abstract】 Objective To investigate the variations of blood biochemical and physiological characteristics in the process of breeding inbred diabetic Mongolian gerbils. **Methods** A total of 17 blood biochemical and 22 physiological indexes of blood samples from F₉ to F₁₄ progenies were tested using an automatic biochemical analyzer and automatic blood cell analyzer. **Results** The results showed that uric acid (URIC), lactate dehydrogenase (LD), creatine kinase (CK), amylase (AMY), glucose (GLU), percentage of mononuclear cells (MON%), mean corpuscular hemoglobin content

[基金项目] 国家科技支撑计划课题 (编号: 2015BAI09B01-04); 国家自然科学基金 (编号: 31572341)。

[作者简介] 王迎 (1982—), 男, 本科, 研究方向: 实验动物遗传发育。E-mail: 123864945@qq.com

[通信作者] 杜小燕 (1971—), 女, 副教授, 研究方向: 实验动物遗传发育。E-mail: duduyan@ccmu.edu.cn

(MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and mean platelet volume (MPV) increased with an increasing number of generations. Meanwhile, cholesterol (CHOL), eosinophil direct count (EOS), percentage of eosinophils (EOS%), red blood cells (RBC), hematocrit (HCT), and hemoglobin (HGB) decreased with the generations. The levels of albumin (ALB), total protein (TP), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL), urea nitrogen (BUN), total bilirubin (TBIL), creatinine (CRE), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), and the other indexes remained stable. **Conclusions** The blood biochemical and physiological indexes vary across the generations in the process of inbreeding diabetic gerbils, especially for those indexes related to glucose and lipid metabolism, which are indicators of the pathogenic characteristics of diabetes. The findings also imply that selective inbreeding exerts an influence on the animals' biological characteristics.

[Keywords] Mongolian gerbil; inbred line; diabetic model; blood biochemical index; blood physiological index

长爪沙鼠 (*Meriones unguiculatus* 或 Mongolian gerbil) 是啮齿目、仓鼠科、沙鼠亚科、沙鼠属的动物,国内主要分布于内蒙古及河北、甘肃、宁夏等草原地带^[1],自上世纪 60 年代开始作为实验动物应用于医学实验之中。长爪沙鼠是多功能实验动物,在病毒学、细菌学、寄生虫学等领域都有很广泛的应用^[2-4]。早在 1972 年,Boquist^[5]发现在长爪沙鼠群体中有肥胖伴随血糖较高的动物,虽然比例较低(3/42, 7.14%),但其病理特征和人的糖尿病较相似。近年来,研究者又发现由于繁殖期的长爪沙鼠伴有高血糖和动脉硬化等症状,其体内类脂质比大鼠高 3 倍,可能是研究糖尿病、肥胖病的优良实验动物^[6]。本团队在进行长爪沙鼠近交系的培育中发现一个分支的动物血糖较高,高血糖比例达到 21.33%,因此开始定向培育这一分支,并在培育过程中对动物血液生理生化指标进行了监测。本研究用近亲繁殖兄妹交配的方法定向培育糖尿病长爪沙鼠近交系,对培育过程中从第 9 到第 14 代的动物血液生理生化指标进行了动态检测。本课题组通过研究长爪沙鼠糖尿病动物模型近交系品系培育过程中的这些指标,有效掌握了培育过程中沙鼠特性的变化规律,为这一模型群体的建立和今后的应用提供了基础数据和背景资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级成年糖尿病近交系长爪沙鼠 165 只(6~12 月龄),体重在 50~80 g 之间。F9 代 10 只(雌 6,雄 4);F10 代 30 只(雌 18,雄 15);F11 代 50 只(雌 25,雄 25);F12 代 42 只(雌 21,雄 21);F13 代 20 只(雌 12,雄 8),F14 代 13 只(雌 7,雄 6)。首都医科大学实验动物中心自行培育,环境控制如下:温度为 18℃~26℃,相对湿度 30%~60%,日常饲

喂⁶⁰Co 照射消毒饲料及饮用无菌水,自然光照。本实验通过首都医科大学实验动物和动物实验伦理委员会批准(No.: AEEI-1417-032),在研究过程中按照实验动物使用的 3R 原则给予动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

各项检测和试剂参考前期的研究方法和文献进行,包括检测生理生化指标的各项配套试剂^[7-8]。仪器和器械均和前期的研究相同^[7-8]。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集

采集方法参考相关文献^[7-9],在实验前动物空腹 12~16 h,分两组采集血液,经眼眶静脉取血后生化指标测定组血样静置 30 min 后 5000 r/min 离心 10 min,分离血清备用;生理指标测定组血样用 1% 的肝素抗凝,采血后快速混匀,静置备用。

1.3.2 各项测定指标

17 项血液生化指标以及 22 项血液学指标均和前期研究相同^[7-8]。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计分析。多组均数比较进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血清生化动态变化

2.1.1 血清蛋白的动态变化

糖尿病长爪沙鼠近交系培育过程中 F9~F14 代动物的白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)趋势平稳(见图 1),但多重比较发现,白蛋白在 F10、F11、F12 代与 F13 和 F14 代差异有显著性($P < 0.01$);总蛋白在 F11 代与 F10、F13 代差异有显著性($P < 0.01$),在 F11 代与 F9、F12、F14 代差异有显著性($P < 0.05$)。

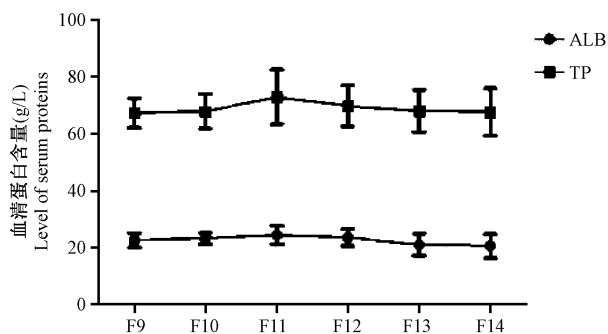


图 1 血清蛋白的动态曲线

Figure 1 The dynamic curves of serum proteins

2.1.2 血清血脂的动态变化

糖尿病模型长爪沙鼠近交系培育过程中 F9 ~ F14 代动物的甘油三酯 (TG) 含量从 F11 代之后趋势平稳, 高密度脂蛋白 (HDL) 含量趋势平稳, 总胆固醇 (CHOL) 含量呈下降趋势。多重比较结果显示, 高密度脂蛋白的含量在 F10 代与 F14 代差异有显著性 ($P < 0.05$), 与 F13 代差异亦有显著性 ($P < 0.01$), 在 F11 代与 F13 代差异有显著性 ($P < 0.05$)。甘油三酯的含量在 F11 代与 F10 ~ F13 代差异有显著性 ($P < 0.01$), 与 F9、F14 代差异亦有显著性 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.1.3 血清代谢产物的动态变化

长爪沙鼠糖尿病近交系培育 F9 ~ F14 代过程中动物血清中尿素氮 (BUN)、总胆红素 (TBIL)、肌酐 (CRE) 含量比较稳定, 变化较小。但是尿酸 (URIC) 含量随代数呈下降趋势, F11 代后呈上升趋势。多重比较发现 (图 3), 尿酸含量 F13、F14 代与 F10 ~ F12 代差异有显著性 ($P < 0.01$), F9 代与 F11 代差异有显著性 ($P < 0.05$); 肌酐含量 F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2.1.4 血清酶的动态变化

糖尿病模型长爪沙鼠近交系动物碱性磷酸酶 (ALP)、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 含量 F9 ~ F14 代趋势平稳; 乳酸脱氢酶 (LD)、肌酸激酶 (CK)、淀粉酶 (AMY) 含量的趋势呈上升趋势。多重比较结果显示, 碱性磷酸酶含量在 F11 代与 F9、F12 代差异有显著性 ($P < 0.05$), 与 F13、F14 代差异亦有显著性 ($P < 0.01$), 在 F13 代与 F10、F12 代差异有显著性 ($P < 0.05$); 谷丙转氨酶含量在 F10 代与 F11、F14 代差异有显著性 ($P < 0.05$), F11 代与 F13 代差异有显著性 ($P < 0.05$); 乳酸脱氢酶含量在 F13、F14 代与 F9 ~ F12 代差异有显著性 ($P < 0.01$), F11 代与 F12 代差异有显著性 ($P < 0.05$);

肌酸激酶含量在 F9 代与 F10、F11 代差异有显著性 ($P < 0.05$), F13、F14 代与 F10 ~ F12 代差异有显著性 ($P < 0.01$); 淀粉酶含量在 F14 代与 F10、F12 代差异有显著性 ($P < 0.05$) (图 4)。

2.1.5 血清葡萄糖和镁离子的动态变化

糖尿病模型长爪沙鼠近交系培育中 F9 ~ F14 代动物的血糖 (GLU) 含量呈上升趋势, 均值从 F9 代的 (5.7 ± 2.54) mmol/L 到 F14 代 (6.63 ± 2.15) mmol/L; 镁离子 (MG) 含量趋势平稳, 镁离子含量 F11 代与 F9、F13、F14 代差异有显著性 ($P < 0.05$), F13 代与 F10、F12 代差异有显著性 ($P < 0.05$) (见图 5)。

2.2 血细胞动态变化

2.2.1 白细胞及分类的动态变化

长爪沙鼠糖尿病近交系培育过程中 F9 ~ F14 代的白细胞 (WBC)、中性粒细胞 (NEUT)、中性粒细胞百分数 (NEUT%)、淋巴细胞 (LYM)、淋巴细胞百分数 (LYM%)、单核细胞 (MON)、嗜碱性粒细胞 (BAS)、嗜碱性粒细胞百分数 (BAS%) 趋势平稳, 单核细胞百分数 (MON%) 呈上升趋势, 嗜酸性粒细胞 (EOS)、嗜酸性粒细胞百分数 (EOS%) 呈下降趋势。多重比较发现, 白细胞计数在 F13 代与 F10 ~ F12 代差异有显著性 ($P < 0.05$); 单核细胞计数在 F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性 ($P < 0.01$); 中性粒细胞计数在 F11 代与 F12 代差异有显著性 ($P < 0.05$), F13 代与 F10、F12 代差异有显著性 ($P < 0.05$); 嗜酸性粒细胞计数在 F11 代与 F10、F14 代差异有显著性 ($P < 0.05$); 嗜碱性粒细胞计数在 F13 代与 F10、F12 代差异有显著性 ($P < 0.05$); 淋巴细胞百分数在 F11 代与 F12 代差异有显著性 ($P < 0.05$); 单核细胞百分数在 F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性 ($P < 0.01$); 中性粒细胞百分数在 F12 代与 F11、F13 代差异有显著性 ($P < 0.05$); 嗜酸性粒细胞百分数在 F11 代与 F14 代差异有显著性 ($P < 0.05$) (图 6 和图 7)。

2.2.2 红细胞及相关指标的动态变化

糖尿病模型长爪沙鼠近交系培育过程中动物的红细胞 (RBC)、红细胞压积 (HCT)、血红蛋白 (HGB) 含量呈下降趋势, 平均血红蛋白含量 (MCH)、平均血红蛋白浓度 (MCHC) 呈上升趋势, 平均红细胞体积 (MCV)、红细胞分布宽度 (RDW) 趋势平稳。多重比较结果显示, 红细胞计数、血红蛋白含量、红细胞压积在 F11 代与 F10、F12、F13 代

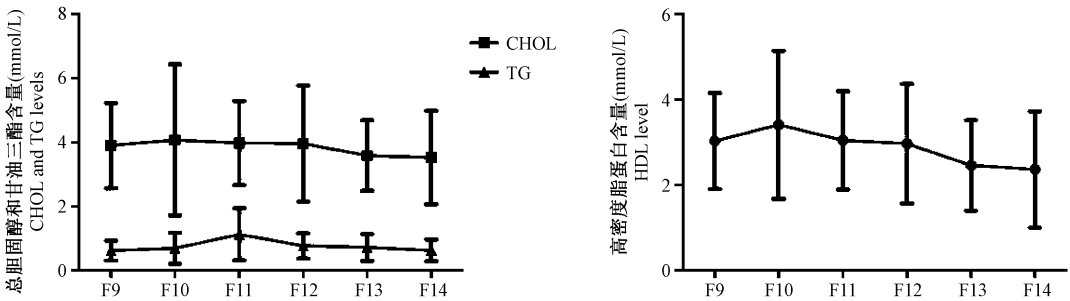


图 2 血清脂类的动态曲线

Figure 2 The dynamic curves of serum lipids

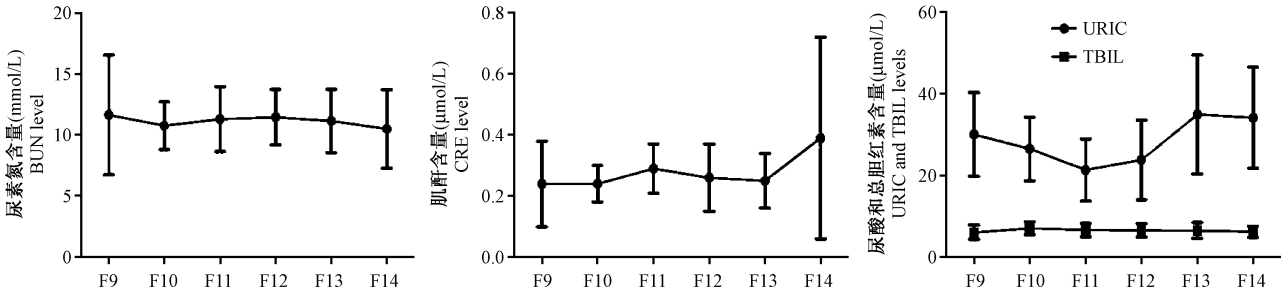


图 3 血清代谢产物的动态曲线

Figure 3 The dynamic curves of serum metabolites

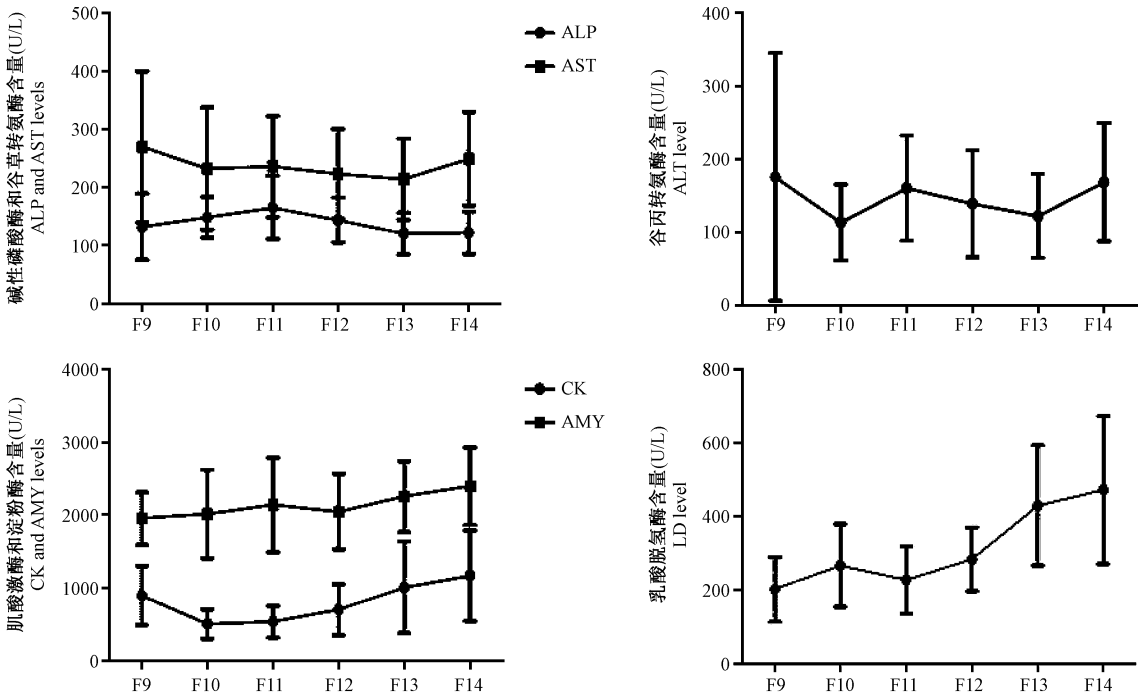


图 4 血清酶的动态曲线

Figure 4 The dynamic curves of serum enzymes

差异有显著性($P < 0.01$), F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$);平均红细胞体积在 F10 代与 F11 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.05$), F14 代与 F11 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$);平均血红蛋白含量在 F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$);平均血红蛋白浓度在 F11 代与 F12 代差异有显著性($P < 0.05$), F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$);红细胞分布宽度在 F9 代与 F13 代差异有显著性($P < 0.05$), F14 代与 F9 ~ F11 代差异有显著性($P < 0.05$)(见图 8)。

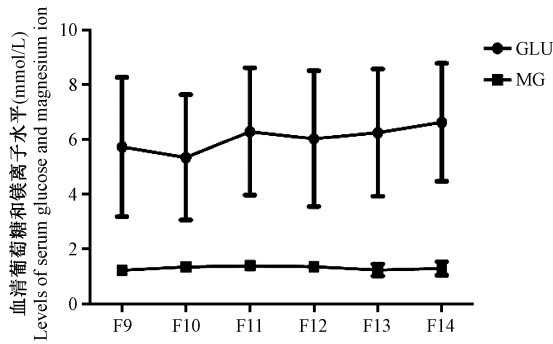


图 5 血清葡萄糖和镁离子动态曲线

Figure 5 The dynamic curves of serum glucose and magnesium ions

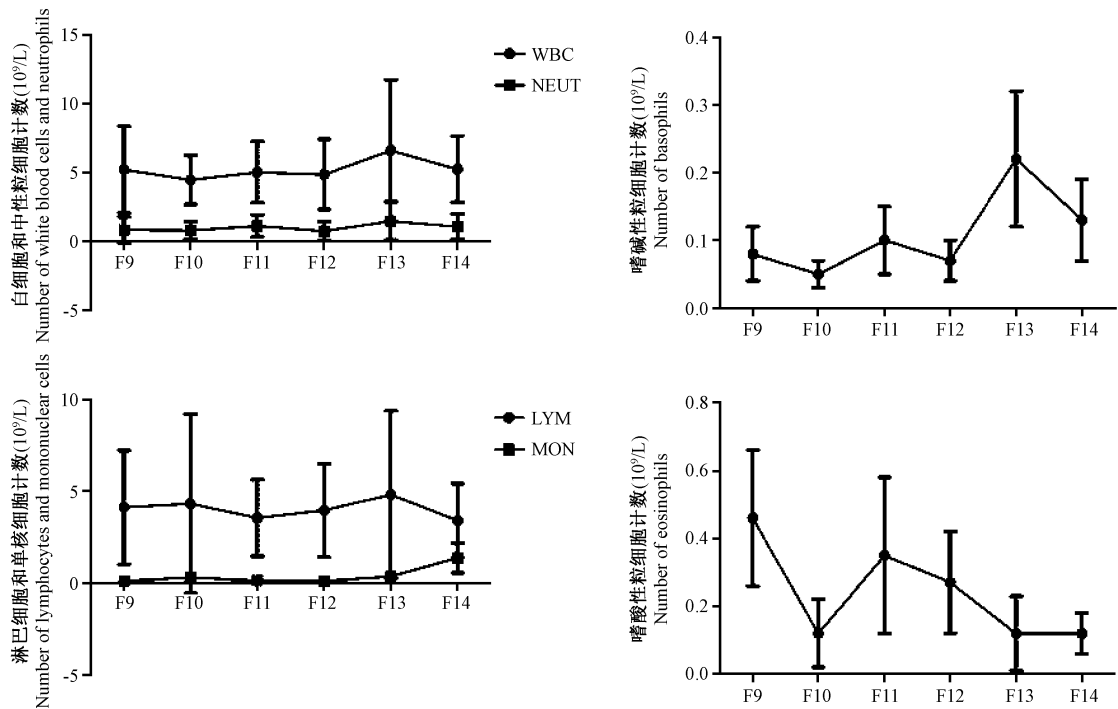


图 6 白细胞相关指标动态曲线

Figure 6 The dynamic curves of white blood cell-related indicators

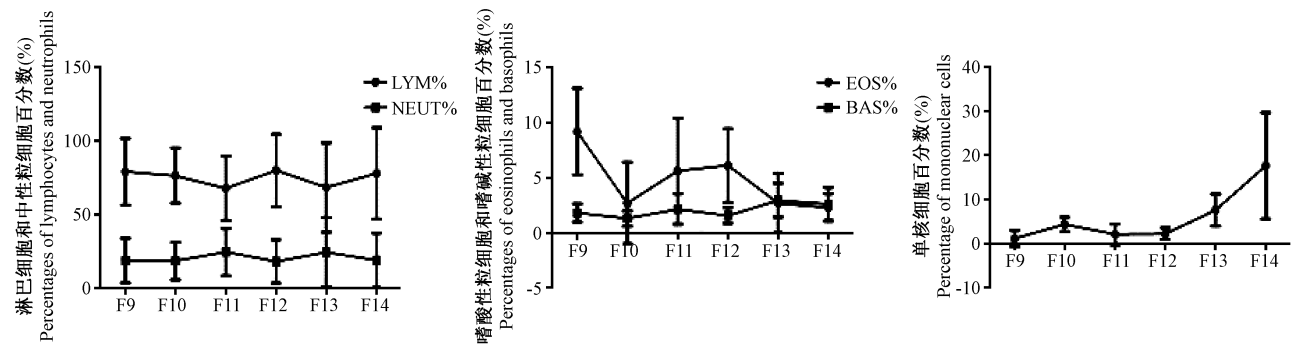


图 7 白细胞分类百分比的动态曲线

Figure 7 The dynamic curves of leukocyte classification percentages

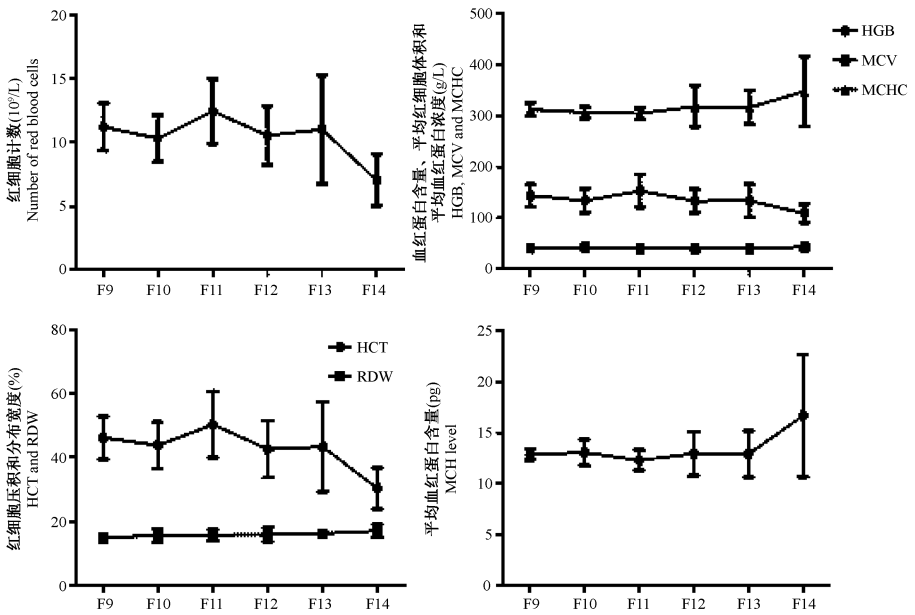


图8 红细胞相关指标动态曲线

Figure 8 The dynamic curves of red blood cell-related indicators

2. 2. 3 血小板及相关指标的动态变化

糖尿病模型长爪沙鼠近交系培育过程中动物的平均血小板体积(MPV)呈上升趋势,血小板分布宽度(PDW)趋势平稳,血小板(PLT)含量、血小板压积(PCT)上升到F11代之后趋于平稳。多重比较发现,血小板含量、血小板压积在F9代与F11、F13代差异有显著性($P < 0.05$);平均血小板体积在F14代与F9~F13代差异有显著性($P < 0.01$)(见图9)。

3 讨论

血液生理生化指标是实验动物重要的生物学特性指标,在近交系动物的培育过程中开展血液生理生化监测和研究,不但能了解该过程中动物生物学特性的变化,还可比较每项生理生化指标的变化规律,及其如何在随着近交繁殖代数的增加趋于一致和稳定。因此,本课题组在长爪沙鼠糖尿病近交系的培育过程中进行生理生化指标的检测具有重要意义。

影响动物的血液生理参数的因素包括两个方面:自身的遗传因素与环境因素^[7]。本研究的结果显示,在17项血液生化指标中,白蛋白、总蛋白、甘油三酯、高密度脂蛋白、尿素氮、总胆红素、肌酐、碱性磷酸酶、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、镁离子含量在F9~F14代中均趋于平稳,而尿酸、乳酸脱氢酶、肌酸激酶、淀粉酶、血糖含量趋势随着代数上升而上升;总胆固醇含量趋势随着代数上升而下降。各项

指标在F9~F14代之间进行多重比较,血糖、总胆固醇、尿素氮、总胆红素、谷草转氨酶这五项血液生化指标差异无显著性,而淀粉酶、高密度脂蛋白、碱性磷酸酶、谷丙转氨酶、镁离子含量差异有显著性($P < 0.05$),尿酸、乳酸脱氢酶、肌酸激酶、白蛋白、总蛋白、甘油三酯、肌酐含量差异亦有显著性($P < 0.01$)。这些数据说明在近交系的培育中不同的代数对大多数生化指标显现出较大影响,而总体而言到F14代时,各项指标均趋于平稳,从本课题组对后面F16代的初步统计结果(本文未展示数据)来看,从F14代后,生理生化指标基本稳定。这也间接反映出接近完成F20代近交系培育后,动物的生物学特性也相对更稳定了。

糖尿病模型长爪沙鼠近交系培育过程F9~F14代的血细胞指标中,单核细胞百分数、平均血红蛋白含量、平均血红蛋白浓度、平均血小板体积呈上升趋势,嗜酸性粒细胞计数、嗜酸性粒细胞百分数、红细胞计数、血红蛋白、红细胞压积呈下降趋势,白细胞计数、中性粒细胞计数、中性粒细胞百分数、淋巴细胞计数、淋巴细胞百分数、单核细胞计数、嗜碱性粒细胞计数、嗜碱性粒细胞百分数、平均红细胞体积、红细胞分布宽度、血小板分布宽度、血小板含量、血小板压积指标趋势平稳。各项指标在F9~F14代之间进行多重比较显示,生理指标嗜酸性粒细胞、嗜酸性粒细胞百分数、中性粒细胞、中性粒细胞百分数、淋巴细胞百分数、嗜碱性粒细胞计数、平均红细胞体积、红细胞分布宽度、血小板含量、血小

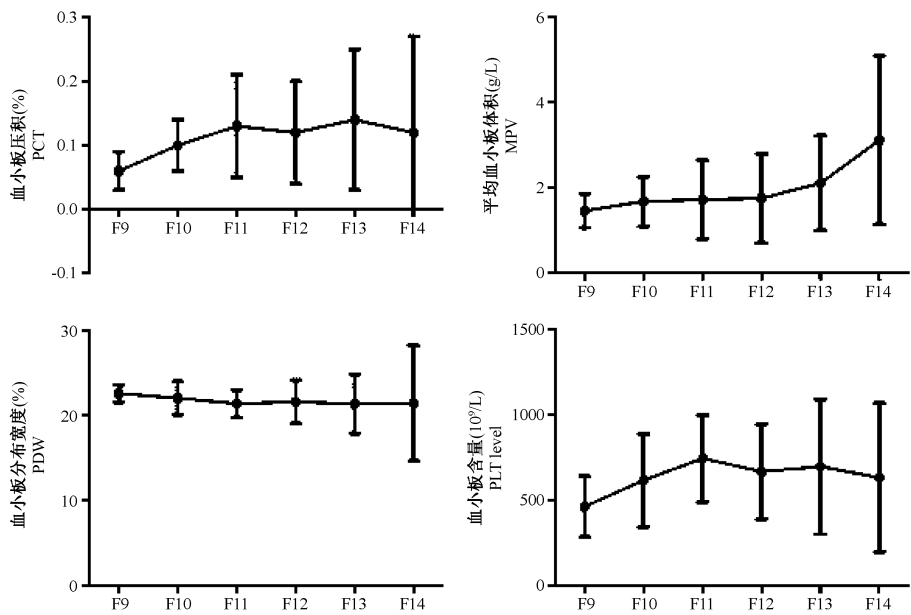


图 9 血小板相关指标动态曲线

Figure 9 The dynamic curves of platelet-related indicators

板压积差异有显著性 ($P < 0.05$); 单核细胞百分数、平均血红蛋白含量、平均血红蛋白浓度、平均血小板体积、红细胞计数、血红蛋白、红细胞压积、白细胞计数差异有显著性 ($P < 0.01$), 其他指标差异无显著性。糖尿病模型动物具有一定的疾病特征, 因此其生理生化指标相比本团队培育的长爪沙鼠近交系, 在多项指标如总蛋白、高密度脂蛋白、总胆固醇、血糖、甘油三酯、淀粉酶、中性粒细胞计数、淋巴细胞计数等都显著升高, 而碱性磷酸酶、谷草转氨酶、乳酸脱氢酶、血小板含量等有所降低^[7-8], 其中总蛋白、高密度脂蛋白、总胆固醇等指标与代谢相关, 说明在定向进行高血糖筛选的过程中, 该模型动物脂代谢和糖代谢受损, 符合糖尿病模型动物特征。但是碱性磷酸酶、谷草转氨酶等肝功能相关指标较普通长爪沙鼠近交系较低, 其原因有待进一步研究。这些都说明虽然同为新培育的长爪沙鼠近交系, 但是本研究中的糖尿病模型群体因其为一个自发性的疾病模型群体, 其血液生化和生理指标特征受其内在遗传因素的影响, 与其他近交系有显著不同。

本研究针对糖尿病近交系长爪沙鼠这一实验动物资源进行血液生理生化指标的研究, 对描绘该模型群体的生物学特征有重要意义。

参考文献:

[1] 李厚达. 实验动物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.

[2] Segatelli TM, França LR, Pinheiro PF, et al. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) [J]. J Androl, 2004, 25(6): 872-880.

[3] Gleich O, Weiss M, Strutz J. Age-dependent changes in the lateral superior olive of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) [J]. Hearing Res, 2004, 194(1-2): 47-59.

[4] Matsubara S, Shibata H, Takahashi M, et al. Cloning of Mongolian gerbil cDNAs encoding inflammatory proteins, and their expression in glandular stomach during *H. pylori* infection [J]. Cancer Sci, 2004, 95(10): 798-802.

[5] Boquist L. Obesity and pancreatic islet hyperplasia in the Mongolian gerbil [J]. Diabetologia, 1972, 8(4): 274-282.

[6] 王钊, 卢静, 陈振文, 等. 长爪沙鼠血液生理生化正常参考值的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(2): 108-111.

[7] 李迎, 崔晓霞, 杜小燕, 等. 近交系 CMU/1 和 CMU/2 长爪沙鼠 Willis 环缺失与生理生化参数比较 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(6): 470-474.

[8] 李迎, 崔晓霞, 杜小燕, 等. 长爪沙鼠脑缺血模型近交系培育中血液生理生化指标的变化 [A]. 2017 年第十五届中国北方实验动物科技年会论文集 [C]. 2017: 154-160.

[9] 王洪, 魏杰, 王吉星, 等. 两种抗凝剂对实验用小型猪血液生理指标的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4): 28-32.

[10] 何建平, 李金钢, 王智, 等. 棕色田鼠血液生理生化指标的测定 [J]. 动物学杂志, 2001, 36(6): 50-53.

[收稿日期]2018-01-26