

瘦素基因敲除肥胖大鼠的血糖及病理长期观察

张丽, 关菲菲, 张旭, 陈炜, 孙彩显, 张连峰

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 **目的** 对 Leptin 基因敲除 SD 大鼠血糖变化及病理表型进行长期分析, 为使用该大鼠作为糖尿病和脂代谢模型积累数据。**方法** western blot 检测 Leptin +/+ 大鼠和 Leptin -/- 大鼠肝脏中 Leptin 的表达。利用称量方法测定 Leptin 基因敲除的 SD 大鼠 (Leptin -/-) 1, 3, 6, 8 月龄的体重变化, 利用稳豪血糖仪采尾血测定 1, 3, 6, 8 月龄 Leptin -/- 大鼠空腹血糖值。HE 染色和免疫组织化学观察 Leptin -/- 大鼠胰腺及肝脏的病理学变化。**结果** Leptin -/- 大鼠肝脏中表达变短的功能异常的 Leptin 蛋白。Leptin -/- 大鼠从 1 月龄开始出现显著的体重增加, 8 月龄时雌性体重为 884 g, 雄性体重可以达到 1200 g, 是野生 SD 大鼠的 2 倍。自 1 月龄起, Leptin -/- 雌鼠的空腹血糖值显著高于野生大鼠, 在 1 月龄到 6 月龄之间差别明显 (40% ~ 26%), 到 8 月龄和野生大鼠恢复到近正常水平。8 月龄 Leptin -/- 大鼠肝脏肝小叶中出现大量脂肪空泡, 胰腺内较多脂肪细胞浸润、胰岛数量明显增多, 体积增大, 胰岛素阳性 β 细胞增多。**结论** Leptin -/- 大鼠表型表现为肥胖, 脂肪肝, 胰岛增生和早期高血糖。

【关键词】 瘦素; 基因敲除; 空腹血糖; 肥胖; 大鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 03-0045-05

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856.2014.003.010

Long-time observation of blood glucose and pathological phenotype of leptin knockout obese rats

ZHANG Li, GUAN Fei-fei, ZHANG Xu, CHEN Wei, SUN Cai-xian, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Centre, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective** To obtain more physiological data of Leptin knockout SD rats available for the user, the long-term observation of fasting blood glucose and pathological phenotypes were performed. **Methods** The protein expression levels in liver tissues were determined by western blot. Body weight of Leptin knockout rats (Leptin -/-) and littermate lean rats (Leptin +/+) were weighed up at 1, 3, 6, 8 months of age. Fasting blood glucose of Leptin +/+ rats and Leptin -/- rats at 1, 3, 6, 8 months of age were measured using One Touch® brand blood glucose monitoring systems. Pathological changes of pancreas and livers of Leptin -/- rats were observed by the method of HE staining and Immunohistochemistry (IHC). **Results** Short null Lepin proteins were expressed in liver tissues from Leptin -/- rats. Leptin -/- rats become heavier than Leptin +/+ rats since they were one month old. The body weight of Leptin -/-

【基金项目】 国家“重大新药创制”科技重大专项课题“啮齿类研发平台创新药物研究开发技术平台建设”(2011ZX09307-302); 国家科技支撑计划课题“神经和代谢疾病基因工程模型的建立”(2012BAI39B02)。

【作者简介】 张丽, 女, 博士, E-mail: zhangliqq2004@126.com。

【通讯作者】 张连峰, E-mail: Zhanglf@cnilas.org。

rats at 8 months of age was twice as heavy as Leptin +/+ rats, female Leptin -/- rats weighing 884g, and male Leptin -/- rats weighing 1200g. Overt hyperglycemia was observed during the first month after birth. Compared with Leptin +/+ female rats, the fasting blood glucose of Leptin -/- female rats was increased by 40% - 26% from 1 to 6 months old. After that, blood glucose values decreased and eventually become nearly normal at 8 months of age. Pathological examination indicated that Leptin -/- rats at 8 months of age had a fatty liver, more pancreas islets with larger volume and more beta cells with increased insulin secretion. **Conclusion** Leptin -/- rat were characterized by obesity, fatty liver, islet cell hyperplasia and early hyperglycemia.

【Key words】 Leptin; Knock out; Fasting blood glucose; Obesity; Rat

瘦素 (Leptin) 是一个主要由白色脂肪组织分泌的蛋白质类激素^[1], 其与中枢神经系统的瘦素受体结合能够启动调节摄食和机体能量平衡, 当瘦素缺失或者受体缺失, 会导致肥胖发生^[2]。

美国杰克逊实验室发现的一种隐性遗传的 Leptin 自发突变小鼠 (ob/ob)^[3], 表现为摄食过度、肥胖、葡萄糖耐受、高血浆胰岛素水平、不孕不育, 因此被广泛地应用于糖尿病、肥胖、心血管和代谢类疾病研究^[4]。

尽管大鼠是使用量仅次于小鼠的实验动物, 而且相对于小鼠, 大鼠与人类的关系近了大约 400 ~ 500 万年^[5], 其在生理、代谢、神经系统疾病等方面比小鼠有更好的表现^[6]。然而, 传统基因打靶技术受到大鼠的 ES 细胞全能性局限, 而一度未能实现 Leptin 敲除大鼠的建立。随着锌指酶 (ZFN) 和类转录激活因子效应因子核酸酶 (TALENs) 等技术的不断完善, 使大鼠基因敲除实用化^[7-9]。2012 年, Sergio Valra 等^[10]利用 ZFN 技术获得了一种 Leptin 敲除大鼠, 是在该基因外显子 1 和内含子上发生了 151 个碱基片断的缺失, Leptin 蛋白无法正常表达。该纯合子大鼠出现摄食增加, 肥胖, 血清中总胆固醇、高密度和低密度胆固醇显著增加, 有明显的高胰岛素血和糖耐受受损。

我们利用 TALENs 技术建立了 Leptin 基因敲除的 SD 大鼠品系 (Leptin -/-), 并对年轻 Leptin -/- 大鼠的体重、脂肪含量、糖代谢等进行了初步分析, 发现 4 月龄的 Leptin -/- 大鼠已经表现出肥胖、高胰岛素血、高脂血和糖代谢异常^[11]。虽然目前世界上几个实验室建立了 Leptin -/- 大鼠, 但是一方面敲除的区域不同^[10-11], 另一方面, 缺少对 Leptin -/- 大鼠长期病理生理变化的分析数据, 影响了 Leptin -/- 大鼠的作为肥胖、糖尿病等疾病模型的使用。本文对 1~8 月龄 Leptin -/- 大鼠及同窝瘦大鼠 (Leptin +/+) 的血糖变化及病理表型进行了对比分析, 为 Leptin -/- 大鼠作为肥胖、糖

尿病等模型提供了基础数据。

1 材料和方法

1.1 动物

Leptin -/- 大鼠背景品系为 SD, 在本实验室繁育 (SCXK(京)2013-002), 选择基因敲除纯合子 Leptin -/- 大鼠和同窝阴性大鼠 (Leptin +/+)。雌鼠: Leptin +/+ (n=5) 和 Leptin -/- (n=5) 各 5 只; 雄鼠: Leptin +/+ 4 只 (n=4) 和 Leptin -/- 2 只 (n=2)。本实验方案得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准, 批准号为 ILAS-GC-2012-001。

1.2 western blot 检测 Leptin 的表达

提取 Leptin -/- 大鼠和同窝阴性 Leptin +/+ 大鼠肝组织总蛋白, BCA 法测定浓度, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白条带转移到 0.45 μm 硝酸纤维素膜上, 置于 5% 的脱脂奶粉封闭液中, 室温 1 h, 加入 TBST 稀释的兔抗 Leptin 多克隆抗体 (1:500) (ab117751, Abcam, 美国), 4°C 孵育过夜, 用 TBST 洗膜三次, 每次 10 min。然后加入 1:15000 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG, 室温杂交 1 h。采用 HRP-GAPDH (康成生物, 中国) 作为内参, 将膜置于化学发光剂中, 用 X 光胶片曝光、显影及定影。

1.3 体重测定

从 1 月龄开始, 分别于 1、3、6、8 月龄给待测大鼠称重。

1.4 空腹血糖测定

分别于 1、3、6、8 月龄, 待测大鼠禁食过夜 (不禁水), 次日上午八点采尾血稳豪血糖仪测定血糖值。

1.5 组织学观察

2% 戊巴比妥钠麻醉牺牲大鼠, 打开腹腔取出胰腺及肝脏固定于 10% 中性福尔马林中 24 h, 脱水, 石蜡包埋及切片 HE 染色, 抗胰岛素 (insulin) 多克隆抗体行免疫组织化学 (4590s, 1:100, Cell

signaling), 切片用 Scanscope 病理切片扫描器(美国 Aperio 公司)扫描后观察病理学变化。

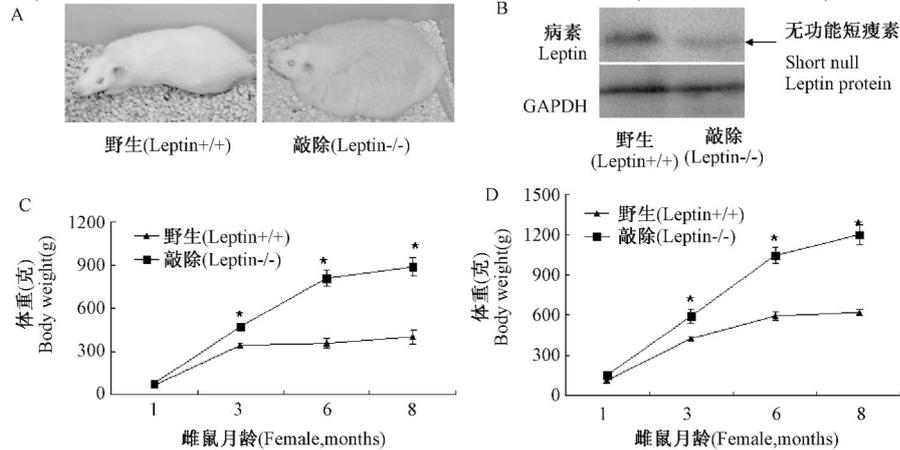
1.6 统计分析

实验数据以平均数 ± 标准差表示,用 Student's t-tests 分析处理数据, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 Leptin -/- 大鼠表现肥胖表型

为了对 Leptin -/- 大鼠的肥胖水平进行检测,从出生后 1 月龄始至 8 月龄,测定 Leptin +/+ 和 Leptin -/- 大鼠的体重,6 月龄 Leptin +/+ 大鼠和 Leptin -/- 大鼠体型比较(图 1A)。Western blot 结果显示,8 月龄 Leptin -/- 大鼠肝脏中不表达正常的 Leptin 蛋白,Leptin 由于 C 末端缺失了 28 个氨基酸^[11]分子量变小(图 1B)。从 1 月龄开始出现显著的体重增加,1 月龄 Leptin -/- 雌、雄鼠体重比同窝瘦大鼠(Leptin +/+)分别增加了 27% 和 37%,到 3 月龄时 Leptin -/- 雌、雄鼠体重比同窝瘦大鼠(Leptin +/+)增加了 38% 和 39%,6 月龄、8 月龄时 Leptin -/- 雌鼠体重是同窝瘦大鼠(Leptin +/+)的 2.3 倍,6 月龄、8 月龄时 Leptin -/- 雄鼠的体重是同窝瘦大鼠(Leptin +/+)的 1.8 倍和 2.0 倍(图 1C 和图 1D)。



注: A: 6 月龄 Leptin +/+ 大鼠(左)和 Leptin -/- 大鼠(右)。B: western blot 检测 8 月龄 Leptin +/+ 大鼠和 Leptin -/- 大鼠肝脏中 leptin 的表达。C: 1-8 月龄的雌性 Leptin +/+ (n=5) 及 Leptin -/- 大鼠(n=5)的体重变化。D: 1-8 月龄的雄性 Leptin +/+ (n=4) 及 Leptin -/- 大鼠(n=2)的体重变化。*, $P < 0.05$ 。

图 1 Leptin -/- 大鼠表现肥胖

Note: A, Pictures of a Leptin +/+ (left) and a Leptin -/- (right) rat at 6 months of age. B, The protein expression levels in liver tissues were determined by western blot. C, Body weight was measured over 8 months for Leptin +/+ (n=5) and Leptin -/- (n=5) females. D, Body weight was measured over 8 months for Leptin +/+ (n=4), Leptin -/- (n=2) males. *, $P < 0.05$ vs. controls.

Fig. 1 Leptin -/- rats are obese

2.2 Leptin -/- 大鼠空腹血糖值增高

从出生后 1 月龄始至 8 月龄,测定 Leptin +/+ 雌鼠和 Leptin -/- 雌鼠的空腹血糖值。Leptin -/- 大鼠空腹血糖表现出随月龄的变化(图 2),雌鼠自 1 月龄起,Leptin -/- 大鼠的空腹血糖值就显著高于 Leptin +/+ 大鼠(40%),3 月龄比 Leptin +/+ 大鼠高 33%,6 月龄血糖降低但仍然比 Leptin +/+ 大鼠高 26%,8 月龄时比野生大鼠高出 11%,高血糖表型可以维持 5 个月以上。

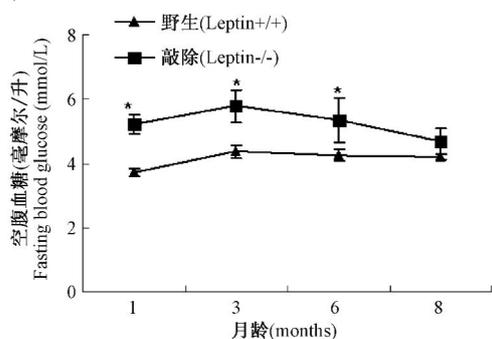
2.3 Leptin -/- 大鼠肝脏病理

取材 4、8 月龄雌性 Leptin -/- 大鼠及 Leptin +/+ 大鼠肝脏固定,石蜡包埋及切片,HE 染色观察 Leptin -/- 大鼠肝脏病理学变化(彩插 7 图 3)。结果显示,4 月龄 Leptin -/- 大鼠与 Leptin +/+ 大鼠相比,没有明显的病理变化,8 月龄 Leptin -/- 大鼠肝脏肝小叶中出现大量脂肪空泡,提示肝细胞脂肪变性。

2.4 Leptin -/- 大鼠胰岛增生

取材 4、8 月龄雌性 Leptin -/- 大鼠及 Leptin +/+ 大鼠的胰腺组织固定,石蜡包埋及切片,HE 染色观察基因敲除大鼠胰腺病理学变化(彩插 7 图 4)。结果显示,6 月龄 Leptin -/- 大鼠与 Leptin +/+ 大鼠相比,胰岛体积增大,但是数量增多不明显,

且胰腺也没有脂肪细胞浸润,而 8 月龄 Leptin -/- 大鼠胰岛数量明显增多,体积增大更显著,胰腺内较多脂肪细胞浸润,胰岛形态由于快速扩张而极不规则。胰岛素抗体免疫组化显示,4、8 月龄 Leptin -/- 大鼠 β 细胞增多,胰岛素分泌大大增加(彩插 7 图 4)。



注:1,3,6,8 月龄的雌性 Leptin -/- 大鼠(n=5)及 Leptin +/+ 大鼠(n=5)的空腹血糖变化。*, $P < 0.05$ 。

图 2 Leptin -/- 基因敲除大鼠空腹血糖受损
Note: Fasting blood glucose of female Leptin +/+ (n=5) and Leptin -/- rats (n=5) at 1,3,6,8 months of age.

*, $P < 0.05$ vs. controls.

Fig. 2 Leptin deficiency-induced impaired fasting blood glucose

3 讨论

相对小鼠而言,大鼠在营养和代谢等方面更接近人类,而且积累的生理学数据更多^[12]。大鼠的内分泌腺容易手术摘除,常用于研究各种腺体对全身生理生化功能的调节;激素腺体和靶器官的相互作用;激素对生殖生理功能的影响,如发情、排卵、胚胎着床等的调控作用。还有自发或诱发性内分泌功能失调造成的疾病模型,如:糖尿病、甲状腺功能低下、甲状旁腺功能低下、尿崩症等的大鼠模型。大鼠还是营养学研究的重要动物,大量维生素 A、B、C 和蛋白质缺乏等营养代谢研究,还常作氨基酸和钙、磷代谢研究。基于大鼠在内分泌、代谢等疾病模型方面的研究优势,建立 Leptin 基因敲除大鼠模型,可以为营养、代谢类疾病研究提供更优良的动物模型。

糖尿病前期是介于糖尿病和正常血糖之间的一种状态,被认为是糖尿病的必经阶段,是糖尿病的预警信号^[13-16]。糖尿病前期时,糖调节已受损,包括空腹血糖受损(IFG)和葡萄糖耐量减退(IGT)。对人类而言,其中空腹血糖受损是指空腹血糖高于正常且又低于糖尿病诊断标准(在 6.1 ~ 7.0 mmol/

L 之间)^[17]。Sighild Westman^[18-20]报道 ob/ob 小鼠自 1 月龄血糖高于野生瘦小鼠,2~3 月龄期间持续升高,4~7 月龄之间血糖下降,7 月龄时和野生组没有差异。因此,ob/ob 小鼠可以作为一种糖尿病前期模型^[4,18]。本研究中 Leptin -/- 大鼠空腹血糖值从 1 月龄起就高于野生大鼠,2~3 月龄期间血糖持续升高,4~8 月龄时血糖下降,8 月龄时仍然比野生大鼠高出 11%,因此 Leptin -/- 大鼠也可以作为一种前期糖尿病模型,而且由于大鼠 Leptin -/- 的高血糖维持时间要比 ob/ob 小鼠更长,在作为糖尿病模型方面将更具优势。

Westman^[21]发现 ob/ob 小鼠存活期间,胰岛 β 细胞不断增殖,胰岛素释放能力居高不下,并不发展成不可代偿的 β 细胞损伤。但也跟遗传背景相关,如 KsJ ob 小鼠有胰岛功能损伤和脂毒性胰岛损伤^[22],而在 6J 背景下却没有^[23]。本研究中 Leptin -/- 大鼠超背景为 SD,胰岛病理观察发现,4 月龄 Leptin -/- 大鼠胰岛体积增大,数量增多不明显,而 8 月龄 Leptin -/- 大鼠胰腺内胰岛数量明显增多,体积增大,胰岛素阳性 β 细胞增多。结果提示,Leptin -/- 大鼠胰岛增生,胰岛素分泌不断增加以应答血糖升高。因此,Leptin -/- 大鼠可以作为一种胰岛 β 细胞增殖与功能研究模型。

Mathur 等^[24]发现瘦素抵抗的肥胖小鼠的胰腺脂肪浸润程度高于对照组,说明肥胖与胰腺脂肪浸润存在相关性。另一方面,脂肪胰还与代谢综合征相关,Tushuizen 等^[25]测量了脂肪胰患者空腹和餐后的血糖及血清胰岛素水平,发现脂肪胰患者的胰岛 β 细胞功能较健康对照者显著下降。推测胰岛周围的脂肪细胞可能会影响胰腺内胰岛素的信号转导,随后诱发胰岛细胞的坏死和脂肪组织替代。Leptin -/- 大鼠具有脂肪肝和脂肪胰表型,可以作为一个模型系统用于脂肪肝和脂肪胰疾病研究。

综上所述,本研究中 Leptin -/- 大鼠 1 月龄起表现肥胖,8 月龄时体重可以达到野生鼠的 2 倍左右,8 月龄时肝脏可发展为脂肪肝,胰腺内胰岛增生、 β 细胞增多,胰岛素分泌增加。大鼠寿命比小鼠长,且发病慢,持续时间长,因此该基因敲除大鼠可以成为肝脏脂肪毒性、胰岛 β 细胞功能、早期糖尿病和肥胖等研究的更好的工具动物模型。

参考文献:

- [1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature, 1994,

- 372 (6505): 425 - 432.
- [2] Tritos NA, Mantzoros CS. Leptin; its role in obesity and beyond [J]. *Diabetologia*, 1997, 40(12): 1371 - 1379.
- [3] Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse[J]. *J Hered*, 1950, 41 (12): 317 - 318.
- [4] Lindström P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice] [J]. *Scientific World Journal*, 2007, 29 (7): 666 - 685.
- [5] Yang S, Smit AF, Schwartz S, *et al.* Patterns of insertions and their covariation with substitutions in the rat, mouse, and human genomes[J]. *Genome Res*, 2004, 14(4):517 - 527.
- [6] 王贵利, 张连峰. 基因工程大鼠研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(3): 71 - 76.
- [7] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, *et al.* Knockout Rats via Embryo Microinjection of Zinc-Finger Nucleases [J]. *Science*, 2009, 325(5939): 433.
- [8] Andrew J. Wood, Te-Wen Lo, Bryan Zeitler, *et al.* Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs [J]. *Science Magazine*. 2011, 333(6060): 307.
- [9] Laurent T, Claire U, Severine M, *et al.* Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29:695 - 696.
- [10] Serglo V, Chang Y, Aaron M, *et al.* Creation and preliminary characterization of a leptin knockout Rat [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(11): 5622 - 5628.
- [11] 关菲菲, 张旭, 陈炜, 等. 利用 TALENs 技术制备瘦素基因敲除的大鼠 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23 (8): 38 - 43.
- [12] Jacob HJ. Functional genomics and rat models [J]. *Genome Res*, 1999, 9(11): 1013 - 1016.
- [13] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*[J], 2010, 33 Suppl 1: S62 - 69.
- [14] Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus[J]. *Diabetes Care*, 1997, 20 (7): 1183 - 1197.
- [15] Genuth S, Alberti KG, Bennett P, *et al.* Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26 (11): 3160 - 3167.
- [16] Tabak AG, Herder C, Rathmann W, *et al.* Prediabetes: a high-risk state for diabetes development [J]. *Lancet*, 2012, 379 (9833): 2279 - 2290.
- [17] The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (Committee Report) [J]. *Diabetes Care*, 1998, 21 (Suppl. 1): S5 - S19.
- [18] Westman, S. Development of the obese-hyperglycemic syndrome in mice[J]. *Diabetologia*, 1968, 4(3): 141 - 149.
- [19] Edvell, A. and Lindström, P. Development of insulin secretory function in young obese hyperglycemic mice (Umeå ob/ob) [J]. *Metabolism*, 1995, 44(7): 906 - 913.
- [20] Edvell, A. and Lindström, P. Initiation of increased pancreatic growth in young normoglycemic mice (Umeå ob/ob) [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(2): 778 - 783.
- [21] Westman, S. The endocrine pancreas of old obese-hyperglycemic mice[J]. *Acta Med. Upsal*, 1968, 73(1): 81 - 89.
- [22] Coleman, D.L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice[J]. *Diabetologia*, 1978, 14 (3): 141 - 148.
- [23] Garris, D. R. and Garris, B. L. Cytochemical analysis of pancreatic islet hypercytolipidemia following diabetes (db/db) and obese (ob/ob) mutation expression: influence of genomic background[J]. *Pathobiology*, 2004, 71(5): 231 - 240.
- [24] Mathur A, Marine M, Lu D, *et al.* Nonalcoholic fatty pancreas disease[J]. *HPB (Oxford)*, 2007, 9(4): 312 - 318.
- [25] Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, *et al.* Pancreatic fatcontent and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(11): 2916 - 2921.

[修回日期] 2014-02-14