

中老年食蟹猴群体自发型糖尿病的筛选

万玉玲^{1, #}, 张艳春^{2, #}, 彭白露¹, 李学家², 季芳², 靳丽莎², 饶军华¹, 刘晓明^{1, 2, *}

(1. 广东蓝岛生物技术有限公司, 广东 广州 510555; 2. 广东省昆虫研究所, 广东 广州 510260)

摘要: 筛选 440 只中老年偏胖食蟹猴群体中自发糖尿病个体, 并探讨食蟹猴群体中糖尿病粗筛的方法。以调查基础血糖值为基础, 推断疑似糖尿病血糖值, 后经 OGTT(口服糖耐量)和尿检结果验证该血糖值是否准确。结果显示中老年偏胖食蟹猴群体血糖值为 (3.88 ± 0.98) mmol/L, 其中 56 只食蟹猴血糖值大于 5.0 mmol/L, 被初步定为糖尿病个体。这些个体全部糖耐量异常, 且 36 只(69.23%)出现尿糖阳性, 证明血糖值大于 5.0 mmol/L 可作为本群体食蟹猴糖尿病的粗筛标准。由于针对中老年偏胖食蟹猴群体, 患病率为 12.72% (56/440), 高于我国糖尿病患病率(9.7%)。虽然该实验的糖尿病血糖指标并不适用于所有食蟹猴群体, 但是该筛选的流程简单快捷, 对动物损伤小, 可适用于大群体糖尿病的筛选。

关键词: 自发性糖尿病; 筛选; 血糖; 食蟹猴

中图分类号: Q959.848; R587.2; R-332 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)03-0307-04

Screening of spontaneous diabetes mellitus in middle- and old-aged cynomolgus monkey

WAN Yu-Ling^{1, #}, ZHANG Yan-Chun^{2, #}, PENG Bai-Lu¹, LI Xue-Jia², JI Fang²,
JIN Li-Sha², RAO Jun-Hua¹, LIU Xiao-Ming^{1, 2, *}

(1. Guangdong Landau Biotechnology Co. Ltd, Guangzhou 510555, China; 2. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China)

Abstract: To screen spontaneous diabetic mellitus and explore methods for its rapid identification, the basal and inferred levels of blood glucose of 440 overweight, middle- and old-aged cynomolgus monkeys were analyzed. Diagnostic diabetes was further validated by the oral glucose tolerance test (OGTT) and urine glucose. The average level of blood glucose of these cynomolgus monkeys was (3.88 ± 0.98) mmol/L, which was lower than the level for suspected diabetes (5.0 mmol/L). Of them, 56 (12.72%) monkeys were identified with levels of blood glucose greater than 5.0 mmol/L and diagnosed as the diabetic subjects. This population showed impaired glucose tolerance using the OGTT and 39 of the 56 (69.23%) had glucose positive urine. The methods for screening diabetic mellitus used in this study were simple, quick, and limited the harm to animals. However, the incidence of diabetes was higher in these tested monkeys than in the regular human population in China (9.7%), suggesting that these methods are useful for screening diabetic disease in a large population but not suitable for all cynomolgus monkeys.

Key words: Spontaneous diabetes mellitus; Screening; Blood glucose; Cynomolgus monkey

随着生活水平提高, 糖尿病成为全球性的重大疾病, 世界卫生组织预计, 到 2025 年, 全球糖尿病患者人数将增至 3 亿, 《新英格兰医学杂志》2010 年研究数据表明, 我国总体患病率已达 9.7%, 糖尿

病前期的患病率高达 15.5%(Yang et al, 2010)。因此, 糖尿病药物的研究开发已成为目前生物医药研究重点, 而适宜的糖尿病动物模型是深入研究糖尿病及其并发症的基础。

收稿日期: 2010-12-23; 接受日期: 2011-03-02

基金项目: 广州市科技计划项目 (2009A1-E051, 2010U1-E00811); 广东省林业局项目 (2009KJCX016); 国家“十二五”项目 (2011ZX09307-03-303)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: xemoonliu@hotmail.com

#并列第一作者(Authors contribute equally to the work)

第一作者简介: 万玉玲(1979—), 女, 硕士, 研究方向: 灵长类实验动物学; 张艳春(1984—), 女, 硕士, 研究方向: 实验动物分子生物学

食蟹猴体型小巧，性情温和，与人类的遗传物质具有高度的同源性，在组织结构、生理和代谢功能等方面显示了许多与人类相似的特征，成为目前应用最为广泛的非人灵长类实验动物(Wang et al, 2007)。同时，食蟹猴自发性糖尿病的发生情况也类似于人类，发病前经历胰岛素抵抗、糖代谢异常、高胰岛素血症等阶段，并在其后代中也发现糖耐量异常等症(Ramsey et al, 2000; Hotta et al, 2001; Wagner et al, 2001; Wagner et al, 2006)。此外，食蟹猴与啮齿类动物比，其生命周期长，能够充分地观察和研究糖尿病动物的糖代谢、脂代谢、蛋白质代谢的异常和胰腺、肝脏、肾脏等组织的病理学改变以及由糖尿病引发的其他各种并发症(Cefalu et al, 2004; Slynkova et al, 2006)，因而，它在研究糖尿病的发生、发展及防治等方面具有独特的优越性，是进行糖尿病生物医药研究理想的模型。

本研究采用便携式血糖仪对 440 只食蟹猴进行血糖值的调查基础上，结合 OGTT 及尿糖检测结果确定糖尿病粗筛的指标，对食蟹猴群糖尿病进行筛选，筛选出的个体可应用于糖尿病的相关研究，并通过本次研究，建立一套食蟹猴群体糖尿病的快速筛选方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8~24 岁偏胖中老年食蟹猴共有 440 只，其中雄性 271 只和雌性 169 只，由广东省昆虫研究所华南灵长类动物研究开发中心提供。

1.1.2 试剂与仪器 氯胺酮，购自沈阳市兽药厂；便携式血糖检测仪，美国强生，稳豪型血糖试纸；全自动生化检测仪，日立 7020；拜耳尿液分析仪 Clinitek Status，德国 BAYER，滴宝干化学试尿液试纸条。

1.2 方法

1.2.1 实验前动物预处理 将食蟹猴放置单笼静止一周，饮食、饮水照常供应，记录其日常饮食情况。于采血，采尿检测前一天开始禁食，禁食时间保证在 14~16 h 之间。

1.2.2 血糖检测及血清，尿液采集 于凌晨 6 点左右，采集食蟹猴尿液；氯胺酮 5~10 mg/kg 剂量对食蟹猴进行肌肉注射麻醉约 10 min，待实验猴到完全丧失意识，立即针刺后肢静脉取血，并用快速血糖仪检测其血糖值。其中部分个体还需要后股静脉

取血 3 ml，样本室温静置 30 min 后 4℃，4 000 g/min 离心 10 min，取上层血清用于生化检测，指标有丙氨酸氨基转移酶(Alt)、谷草转氨酶(Ast)、甘油三脂(TG)、胆固醇(CHO)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。

1.2.3 OGTT 实验 按 4 g/kg 体重的剂量(50%葡萄糖溶液)在 2 min 内鼻饲灌胃后，分别在 0、30、60 和 120 min 共 4 个时间点针刺后肢静脉取血，用快速血糖仪测定血糖。

1.2.4 数据处理方法 采用 Excel 和 SPSS 软件进行统计学分析，数据以 $\bar{x} \pm S$ 表示，各组间差异比较采用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 表示差异显著， $P<0.01$ 为差异极显著。

2 实验结果

2.1 中老年食蟹猴群体血糖值调查

中老年偏胖食蟹猴群基础血糖值为(3.88±0.98) mmol/L，其中雄性食蟹猴的血糖值为(3.72±0.86) mmol/L，雌性食蟹猴的血糖值为(4.14±1.11) mmol/L，雌性血糖值是显著高于雄性(表 1)。

表 1 中老年食蟹猴基础血糖值($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Basal blood glucose of middle- and old-aged cynomolgus monkeys

组别 Group	数量 Number	血糖(mmol/L) Blood glucose
雄性 Male	269	3.72±0.86
雌性 Female	165	4.14±1.11**
总体 Total	434	3.88±0.98

血糖大于 10 mmol/L 会严重影响群体正常血糖值的准确性，予以去除；相对于总体血糖值，**代表差异显著($P<0.01$)。

Blood glucose of more than 10 mmol/L was removed for data accuracy; Compared with the total blood glucoses, the ** over bar indicates significantly different with $P<0.01$.

根据中老年食蟹猴血糖值分布表 2 显示，87% 以上个体的血糖值分布低于 5.0 mmol/L；在血糖值大于 5.0 mmol/L 个体中，雄性 20 只，占雄性群体的 7.38%，雌性 36 只，占雌性群体的 21.30%；大于 10 mmol/L 个体中，雄性 2 只，占雄性群体的 0.74%，雌性为 4 只，占雌性群体的 2.37%，雌性高血糖出现的比例明显高于雄性。通过血糖值的调查，初步假定血糖值大于 5.0 mmol/L 为糖尿病疑似个体，共有 56 只食蟹猴为疑似糖尿病个体。

2.2 OGTT 和尿糖实验结果

对血糖值不同的 31 只食蟹猴(血糖水平分

表 2 中老年食蟹猴血糖值调查表
Tab. 2 Survey of blood glucose in middle- and old-aged cynomolgus monkeys

血糖值 Blood glucose(mmol/L)	频数/频率(%) Frequency number/ Frequency (%)		
	雄性 Male	雌性 Female	总计 Total
2.0 ~	44/16.24	19/11.24	63/14.32
3.0 ~	154/56.83	71/42.01	225/51.14
4.0 ~	53/19.56	43/25.44	96/21.82
5.0 ~	12/4.43	22/13.02	34/7.73
6.0 ~	4/1.48	7/4.14	11/2.50
7.0 ~	1/0.37	2/1.18	3/0.68
8.0 ~	1/0.37	1/0.59	2/0.44
9.0 ~	0/0	0/0	0/0
10.0 ~	2/0.74	4/2.37	6/1.36
合计 Total	271/100	169/100	440/100

布见表3)进行OGTT。图1显示不同血糖值的OGTT差异,只有初始血糖值大于5.0 mmol/L组,OGTT的2 h后血糖值仍然没有下降的趋势,其余三组都存在不同程度的下降,且初始血糖值最低组别(<4.0 mmol/L),下降最为明显。结合尿检结果(如表3)所示,当初始血糖值小于4.0 mmol/L时,不存在糖耐量异常,且尿糖为阴性。当初始值位于4.0~4.5 mmol/L之间时,3/7个体糖耐量正常,所有个体尿糖为阴性。当初始值位于4.5~5.0 mmol/L之间时,4/6个体糖尿异常,所有个体尿糖值仍为阴性。当初始值大于5.0 mmol/L以后,所有的个体糖耐量都异常,69.2%个体出现尿糖阳性。综合OGTT,尿检和血糖值的调查结果,可以定义血糖值大于5.0

mmol/L为糖尿病个体,确定疑似的56只食蟹猴为糖尿病个体。

表 3 不同血糖值对应的 OGTT 异常及尿糖阳性情况
Tab. 3 Impaired glucose tolerance and positive urine-glucose in different levels of blood glucose

血糖值 Blood glucose(mmol/L)	数量 Number	糖耐量异常数量 Number of impaired glucose tolerance	尿糖阳性数量 Number of positive urine-glucose
~ 4.0	5	0	0
~ 4.5	7	3	0
~ 5.0	6	4	0
~ 11	13	13	9

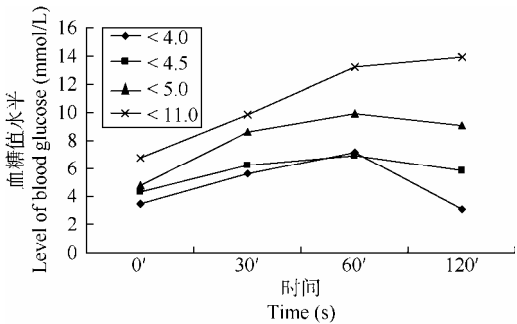


图 1 不同血糖值的水平 OGTT
Fig. 1 The OGTT corresponding to the different levels of blood glucose

2.3 生理生化值

根据上述结果,把中老年食蟹猴群体分为糖尿病组和正常组,对两者常规生理生化值进行比较。从表4中可以看出,只有TG和GLU存在差异,其余各指标差异并不显著。

表 4 食蟹猴糖尿病组和正常组的基础生理生化值的比较

Tab. 4 Comparative analysis of basal blood physiology and biochemical values in the diabetes and normal cynomolgus monkeys

组别 Group	体重 Weight (kg)	Alt (IU/L)	Ast (IU/L)	Glu (mmol/L)	TG (mmol/L)	CHO (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
正常 Normal	7.73±2.34	26.13±14.06	32.19±11.67	4.22±0.44	0.69±0.36	2.43±0.31	1.24±0.45	0.89±0.47
糖尿病 Diabetes	8.01±2.28	34.03±26.52	39.23±23.92	7.20±2.40**	1.08±0.90*	2.37±0.57	1.13±0.29	0.88±0.45

与正常组相比,* $P<0.05$,差异显著;** $P<0.01$,差异极显著。
Relative to the normal group; the * and ** over bars indicate significantly different with $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively.

3 分 析

Wang et al (2007)测得食蟹猴空腹血糖值为(5.56 ± 1.92) mmol/L,雄性为(5.21 ± 1.96) mmol/L,雌性为(5.94 ± 1.85) mmol/L,雌性血糖值高于雄性。Zhang et al (2005)测得食蟹猴血糖值为(3.67 ± 1.5) mmol/L。Xu et al (2009)测得食蟹猴空腹血糖为(5.10 ± 1.89) mmol/L。本实验排除极大值的影响外,检测得到中老年偏胖食蟹猴群体基础血糖值范围是(3.88 ± 0.98) mmol/L,雌性食蟹猴血糖值高于雄性。

食蟹猴的基础血糖值调查由于会受到种群的年龄(Wang et al, 2004)、检测方法(Wen and Sun, 2003)、饲养方式,甚至取样的时间(Zeng et al, 2010)等多种因素的影响,因而还缺少统一的结论。因此,不同食蟹猴群体进行糖尿病筛查的过程中,应该以本群体的基础血糖值作为背景参考,推断出适用于本群体糖尿病筛选的血糖值。本实验的食蟹猴的基础血糖值也只适合采用便携式血糖仪检测,同时,针对中老年偏胖食蟹猴群体或具有类似特征群体。

2010 年美国糖尿病协会制定的人类糖尿病诊

断标准: HBA1C(糖化血红蛋白) $\geq 6.5\%$ 或空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L(126 mg/dL) 或 OGTT 试验 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L(200 mg/dL) 或有高血糖的症状或高血糖危象, 且随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L(200 mg/dL)。对于非人灵长类动物糖尿病诊断标准, 尚缺少统一的结论。Leroith et al (2004) 定义猕猴糖尿病血糖值为 ≥ 5.6 mmol/L, Xu et al (2009) 参照猴的正常空腹血糖值(5.10 ± 1.89) mmol/L, 定义 ≥ 8.0 mmol/L 为糖尿病诊断标准, Wanger et al (2006) 根据食蟹猴的基础血糖值低于人基础血糖值 $1 \sim 1.7$ mmol/L, 推断当食蟹猴的血糖值在 $5.5 \sim 7$ mmol/L 则极其可能为糖尿病, 同时也提出, 往往在血糖值还未达到这个值的时候, 就已出现了临床症状。本研究在人工饲养条件下筛查中老年偏胖食蟹猴的糖尿病个体, 根据群体基础血糖值推断当血糖值大于 5.0 mmol/L 为疑似糖尿病个体, 后经 OGTT 和尿糖结果进一步验证该推断可作为本群体食蟹猴糖尿病筛选标准。该血糖值诊断标准较其他研究偏低, 原因除群体基础血糖偏低影响外, 还由于本实验室采用便携式血

参考文献:

- Cefalu WT, Wang ZQ, Bel1-Farrow AD, Collins J, Morgan T, Wagner JD. 2004. Caloric restriction and cardiovascular aging in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): Metabolic, physiologic, and atherosclerotic measures from a 4-year intervention trial [J]. *J Gerontol*, **59**(10): 1007-1014.
- Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y. 2001. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys[J]. *Diabetes*, **50**: 1126-1133.
- Kavanagh K, Fairbanks LA, Bailey JN, Jorgensen MJ, Wilson M, Zhang L, Rudle LL, Wagner JD. 2007. Characterization and heritability of obesity and associated risk factors in vervet monkeys[J]. *Obesity*, **15**: 1666-1674.
- Leroith D, Taylor SI, Olefsky JM. 2004. Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text[M]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1060-1066.
- Ramsey JJ, Laatsch JL, Kemnitz JW. 2000. Age and gender differences in body composition, energy expenditure, and glucoregulation of adult rhesus monkeys[J]. *J Med Primatol* **29**: 11-19.
- Slynkova K, Mannino DM, Martin GS, Morehead RS, Doherty DE. 2006. The role of body mass index and diabetes in the development of acute organ failure and subsequent mortality in an observational cohort[J]. *Crit Care*, **10**(5): R137.
- Tigno XT, Gerzanich G, Hansen BC. 2004. Age-related changes in metabolic parameters of nonhuman primates[J]. *J Gerontol Ser A: Biol Sci Med Sci*, **59**: 1081-1088.
- Wagner JD, Cline JM, Shadoan MK, Bullock BC, Rankin SE, Cefalu WT. 2001. Naturally occurring and experimental diabetes in cynomolgus monkeys: A comparison of carbohydrate and lipid metabolism and islet pathology[J]. *Toxicol Pathol*, **29**: 142-148.
- Wagner JE, Kavanagh K, Ward GM, Auerbach BJ, Harwood HJ Jr, Kaplan JR. 2006. Old world nonhuman primate model of type 2 diabetes mellitus[J]. *ILAR J*, **47**(3): 259-71.
- Wang DP, Sui LH, Hong BQ, Sun YS, Li M, Li GJ, Fan X. 2007.

糖仪测得的食蟹猴血糖值较全自动生化分析仪测得结果低 0.5 mmol/L 左右(本实验室待发表的资料)。最终在群体中粗筛出糖尿病食蟹猴 56 只, 比例为 12.72% , 高于我国糖尿病患病率 9.7% (Yang et al, 2010), 也高于食蟹猴的糖尿病患病率 3% (Wang et al, 2004), 主要是由于本研究针对中老年偏胖的群体, 该群体本身就是糖尿病的高危群体(Tigno et al, 2004; Kavanagh et al, 2007)。

通过本研究, 粗筛的糖尿病食蟹猴可应用于医学研究, 食蟹猴糖尿病的血糖值诊断标准可适用于具有相似特征的群体。除此之外, 本研究针对中老年的偏胖群体, 利用群体基础血糖值推断疑似的糖尿病血糖值, 后经 OGTT 和尿糖结果验证, 确定该群体糖尿病血糖值诊断标准, 粗筛糖尿病个体。该流程简单快捷, 对动物损伤小, 可以应用到大规模群体筛查中。

致谢: 本实验在一线作业过程中, 得到了蓝岛公司生产一线同志们的大力帮助, 在此特别致谢!

- Comparative study on values of blood physiol biochem between rhesus macaque and long-tailed macaque[J]. *Chn J Comp Med*, **17**(7): 400-402, 434. [王冬平, 隋丽华, 洪宝庆, 孙岩松, 李慕, 李桂军, 凡秀. 2007. 食蟹猴与猕猴血液生理和生化指标的比较. 中国比较医学杂志, **17**(7): 400-402, 434.]
- Wang YJ, Ye HH, Shao JS. 2004. Discussion of rhesus monkey model of the spontaneous diabetes[J]. *Chn J Comp Med*, **4**(1): 13-15. [王艳静, 叶华虎, 邵军石. 2004. 猕猴自发性糖尿病动物模型的初步探讨. 中国比较医学杂志, **4**(1): 13-15.]
- Wen XL, Sun Y. 2003. Compare the capillary and venous blood glucose measured by blood glucose monitor[J]. *Liaoning Pharm Clin Remed*, **6**(1): 38-39. [文秀丽, 孙莹. 2003. 血糖仪测定毛细血管和静脉血糖的结果比较. 辽宁药物与临床, **6**(1): 38-39.]
- Xu CL, Chen YM, Xu ZY, Lu Q, Xu Q, Shen YP, Su JF, Long Y. 2009. Establishment of cynomolgus monkeys diabetic models[J]. *J Guangzhou Univ Trad Chn Med*, **26**(1): 91-94. [徐传磊, 陈艳明, 徐志勇, 卢奇, 徐勤, 沈逸萍, 苏俊芳, 龙艳. 2009. 建立食蟹猴糖尿病模型的研究. 广州中医药大学学报, **26**(1): 91-94.]
- Yang WY, Lu JM, Weng JP, Jia WP, Ji LN, Xiao JZ, Shan ZY, Liu J, Tian HM, Ji QH, Zhu DL, Ge JP, Lin LX, Chen L, Guo XH, Zhao ZG, Li Q, Zhou ZG, Shan GL, He J. 2010. Prevalence of Diabetes among Men and Women in China[J]. *N Engl J Med*, **362**: 1090-1101.
- Zeng XC, Ma J, Yan CM, Yao YS, Pan Y, Pan W, Zhou C, Jiang ZR, Pan XY. 2010. Diurnal variations of hematological and biochemical parameters in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)[J]. *Chn J Comp Med*, **20**(6): 43-48. [曾宪成, 马璟, 杨琛懋, 姚味舒, 潘严, 潘雯, 周超, 姜子睿, 潘学营. 2010. 食蟹猴血液学及血清生化指标日间节律变化. 中国比较医学杂志, **20**(6): 43-48.]
- Zhang LY, Zang L, Wang ZY, Song N. 2005. The establishment of hematology and biochemistry background information in Cynomolgus monkeys[J]. *Sichuan J Physiol Sci*, **27** (1): 39-40. [张六一, 张玲, 王振宇, 宋宁. 2005. 食蟹猴血液学和生化指标数据背景资料的建立. 四川生理科学杂志, **27** (1): 39-40.]