论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1790-04

以自发性大鼠模型评价胰岛素增敏剂药效时的初步探讨

王晓琳[1],邱宗荫[1],夏永鹏[2] ([1]重庆医科大学药学院药理学教研室,重庆 400016;[2]重庆市食品药品监督管理局,重庆 400042)

摘 要:目的 研究自发性Zucker fa/fa(ZF)大鼠评价胰岛素增敏剂药效时需要注意的问题,确定入组标准、检测指标、评价标准。**方法** 20只雄性ZF大鼠按照体质量均一原则分为模型对照组和罗格列酮组(每组10只),10只Zucker fa/?大鼠设为正常对照组。罗格列酮组以胰岛素增敏剂罗格列酮作为阳性药物,6 mg/kg灌胃给药;模型对照组和正常对照组给予水。**结果** 罗格列酮能明显降低大鼠的血清胰岛素、甘油三酯及游离脂肪酸水平($P<0.05$);高胰岛素-正常血糖钳夹实验结果表明,能明显提高罗格列酮组大鼠的葡萄糖输注率与胰岛素敏感指数($P<0.05$)。胰腺病理组织学检查表明罗格列酮能缓解大鼠胰岛细胞的增生肥大。**结论** 以ZF大鼠模型评价胰岛素增敏剂药效时,选用7~8周龄自发性ZF雄性大鼠,以空腹胰岛素水平高于4 ng/ml为纳入标准,以甘油三酯、游离脂肪酸及血清胰岛素水平与高胰岛素-正常血糖钳夹实验结果为评价指标,由此方法建立的动物模型可用于评价胰岛素增敏剂的药效作用。

关键词: Zucker fa/fa大鼠;罗格列酮;高胰岛素-正常血糖钳夹实验;胰岛素敏感性

中图法分类号: R-332;R969.4;R977.15 **文献标识码:** A

Evaluation of insulin sensitizer based on non-insulin-dependent diabetes mellitus Zucker fa/fa rat model

WANG Xiao-lin[1], QIU Zong-yin[1], XIA Yong-peng[2] ([1]Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medicinal University, Chongqing 400016; [2]Chongqing Food and Drug Administration, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate some points in evaluating the effects of insulin sensitizer on obesity-associated non-insulin-dependent diabetes mellitus Zucker fa/fa rat model. **Methods** Total 20 male Zucker fa/fa rats were divided into model group and rosiglitazone groups. Another 10 male Zucker fa/? rats served as normal control. Rosiglitazone at 6 mg/kg was given intragastrically once per day for 4 weeks, and the rats of the other 2 groups were fed with same solvent at same volume. **Results** Rosiglitazone reduced the levels of fasting insulin, triglyceride (TG) and free fatty acid (FFA) of Zucker fa/fa rats ($P<0.05$), increased glucose infusion rate (GIR) and insulin sensitive index (ISI) of Zucker fa/fa rats in hyperinsulinemic-euglycemic clamps ($P<0.05$). HE staining demonstrated that rosiglitazone had significantly improved the hypertrophy and hyperplasia of the islets of Langerhans. **Conclusion** Zucker fa/fa rat model (7- to 8-week-old and level of fasting insulin over 4 ng/ml) can be used to evaluate the effects of insulin sensitizer by inspecting the levels of fasting insulin, TG and FFA, through hyperinsulinemic-euglycemic clamps.

Key words: Zucker fa/fa rat; rosiglitazone; hyperinsulinemic-euglycemic clamps; insulin sensitivity

研究发现胰岛素抵抗可能早在糖尿病发病前10~20年就存在,并且可能是2型糖尿病的发病主要因素之一,因此近年来对纠正胰岛素抵抗药物的研究成为了糖尿病研究的热点[1-3]。本研究以符合统计学样本数量的胰岛素抵抗动物模型Zucker fa/fa(简称ZF)大鼠,采用已知胰岛素增敏剂罗格列酮作为阳性药物,考查其对模型大鼠脂代谢与胰岛素敏感性的影响,在建立可控的ZF大鼠模型、选择合适的判断药物疗效的测定指标等方面积累经验,为国内研究评价胰岛素增敏剂药效提供了有效的实验工具。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级Zucker fa/fa (Crl:ZUC-Lepr^{fa})大鼠20只,正常对照

作者简介: 王晓琳,女,重庆市人,博士研究生,主要从事糖尿病动物模型方面的研究。电话:(023)68889827,E-mail:sabrina3@tom.com

通信作者: 邱宗荫,电话:(023)68485727,E-mail:zongyin141@126.com

收稿日期: 2009-03-31;**修回日期:** 2009-06-10

Zucker fa/? 大鼠 10 只,雄性,5 ~ 6 周龄,体质量 160 ~ 180 g,Charles River Inc. 提供。大鼠饲养于 SPF 动物房,饲养条件符合 GB 14925-2001,设定温度范围:20 ~ 25 ℃,设定湿度范围:(55 ± 15)%,设定照明时间:12 h/12 h。辐照鼠用灭菌标准饲料喂养,高压灭菌自来水自由饮用。

1.2　实验方法

1.2.1　实验动物分组　　检疫期结束后,大鼠眼眶静脉丛取血(采血前禁食不禁水 2 ~ 3 h),离心后分离血清,酶联免疫法测定空腹血清胰岛素水平。以空腹胰岛素水平高于 4 ng/ml 为纳入标准,将符合纳入标准的 Zucker fa/fa 大鼠按照体质量均一原则分为模型对照组与罗格列酮组各 10 只,10 只 Zucker fa/? 大鼠为正常对照组。罗格列酮组大鼠经口灌胃给予 6 mg/kg 罗格列酮,模型对照组与正常对照组灌胃给予等体积溶剂,每天 1 次,连续 4 周。给药前及给药期间每周监测 1 次体质量、摄食量及胰岛素水平;给药前及给药 4 周后全自动血液生化分析仪测定血脂(总胆固醇、甘油三酯、游离脂肪酸)。

1.2.2　高胰岛素-正常血糖钳夹实验　　给药结束 24 h,所有动物禁食(不禁水)12 h 后,进行高胰岛素-正常血糖钳夹实验。戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉,右颈静脉(滴注胰岛素及葡萄糖的通道)及左颈动脉插管(取血的通道)。首先取颈动脉血样,用血糖仪测定基础血糖,之后持续以 100 mU · kg^{-1} · min^{-1} 的速度输注胰岛素(2 U/ml),每隔 10 min 从股动脉取血测血糖,当血糖浓度达到正常血糖水平,即 5 ~ 6 mmol/L 时,静脉输注 20% 葡萄糖,每隔 10 min 从股动脉取血测血糖,并适当调整葡萄糖速度使血糖保持在正常水平。当连续 3 次血糖值均在上述范围时,则达到了稳定状态。继续上述过程,持续 2.5 h。在 0、45、150 min 颈动脉取血测胰岛素水平[4]。

检测指标:血糖值、血清胰岛素浓度、葡萄糖输注速率(glucose infusion rate, GIR)。其中,将达到稳态后 0 ~ 120 min 的 13 个 GIR 值求平均值,即为 GIR_{0-120},单位为 mg · kg^{-1} · min^{-1}。150 min 时间点胰岛素敏感指数(insulin sensitive index, ISI_{150}) = 葡萄糖输注速率/稳态胰岛素浓度。ISI_{150} 及 GIR_{0-120} 反映大鼠的胰岛素敏感性。

1.2.3　组织病理学观察　　实验结束后,颈椎脱臼处死法处死大鼠,取胰腺,用冰冷的生理盐水灌洗,液氮冻存待检。切片后进行苏木精-伊红染色,10% 甲醛溶液固定,100 倍光镜下观察。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,方差分析有意义时采用 LSD 法进行组间两两比较。

2　结果

2.1　大鼠一般状况

5 ~ 6 周龄的 ZF 大鼠经过检验检疫期后,为 7 ~ 8 周龄,经检测空腹胰岛素水平,发现由于在 8 周龄阶段模型动物胰岛素快速升高,导致胰岛素水平差异大。因此实验设计为以空腹胰岛素水平高于 4 ng/ml 为纳入标准,动物根据发病情况分 2 批纳入实验。

给药期间各组大鼠基本状态也较好,被毛清洁,活动正常。罗格列酮组与模型对照组大鼠尿量较正常对照组大鼠增多,至给药结束,此症状无明显缓解。各组大鼠体质量在实验期间均逐步增加。模型对照组与罗格列酮组大鼠的体质量给药后增加显著($P < 0.05$);2 组大鼠同期组间比较,体质量差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠平均摄食量给药前后比较均保持基本一致。模型对照组与罗格列酮组大鼠同期组间比较,平均摄食量水平也基本一致,但 2 组均有高于正常对照组的趋势。

2.2　各组大鼠空腹胰岛素水平的变化

模型对照组大鼠给药后 2、3、4 周与给药前比较,胰岛素水平显著升高($P < 0.05$)。罗格列酮组大鼠给药后 1、3、4 周与给药前比较,胰岛素水平显著降低($P < 0.05$)。给药前后,罗格列酮组及模型对照组大鼠胰岛素水平均显著高于同期正常对照组大鼠($P < 0.05$)。给药 1、2、3、4 周,罗格列酮组大鼠血清胰岛素水平明显低于同期模型对照组($P < 0.05$)。见表 1。

2.3　各组大鼠血脂及游离脂肪酸水平的变化

模型对照组大鼠给药 4 周后与给药前比较,总胆固醇水平无显著变化($P > 0.05$);甘油三酯与游离脂肪酸水平显著升高($P < 0.05$)。正常对照组、罗格列酮组大鼠给药 4 周后与给药前比较,总胆固醇、甘油三酯与游离脂肪酸水平均无显著变化($P > 0.05$)。给药前后,各组同期总胆固醇水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。给药前后,罗格列酮组及模型对照组大鼠甘油三酯与游离脂肪酸水平均显著高于同期正常对照组大鼠($P < 0.05$)。给药后,罗格列酮组大鼠甘油三酯、游离脂肪酸水平显著低于同期模型对照组($P < 0.05$)。见表 2。

表 1　罗格列酮对 Zucker fa/fa 大鼠空腹胰岛素水平的影响　(ng/ml, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

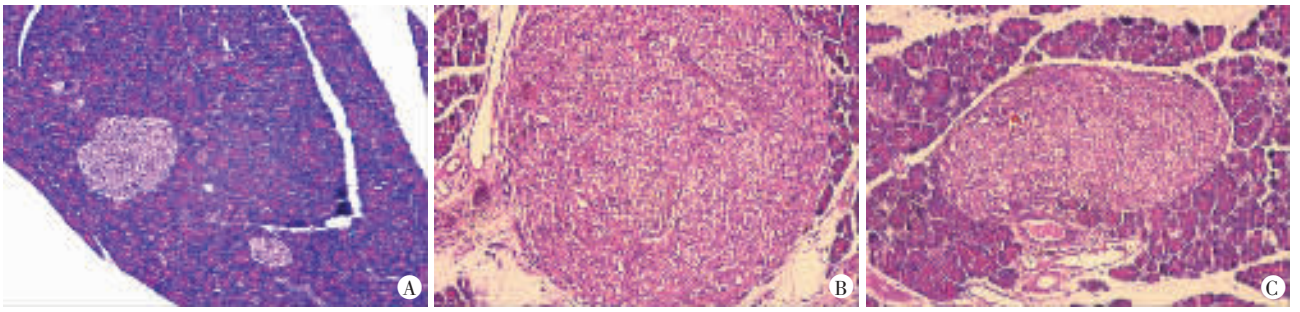
组别	给药前	给药 1 周	给药 2 周	给药 3 周	给药 4 周
正常对照组	0.898 ± 0.375	0.547 ± 0.394	0.443 ± 0.193	0.956 ± 0.689	1.311 ± 0.499
模型对照组	5.106 ± 2.805^{c}	6.172 ± 2.002^{c}	8.261 ± 2.580^{bc}	7.172 ± 2.423^{bc}	9.405 ± 2.673^{bc}
罗格列酮组	5.032 ± 1.853^{c}	2.390 ± 1.495^{abc}	5.179 ± 3.537^{ac}	2.751 ± 1.029^{abc}	3.029 ± 2.149^{abc}

a:$P < 0.05$,与模型对照组比较;b:$P < 0.05$,与给药前比较;c:$P < 0.05$,与正常对照组比较

表 2　罗格列酮对 Zucker fa/fa 大鼠血脂及游离脂肪酸水平的影响　(mmol/L, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	总胆固醇		甘油三酯		游离脂肪酸	
	给药前	给药 4 周	给药前	给药 4 周	给药前	给药 4 周
正常对照组	2.172 ± 0.222	2.445 ± 0.247	1.376 ± 0.187	2.180 ± 0.226	1.229 ± 0.597	1.988 ± 1.297
模型对照组	3.145 ± 1.216	3.370 ± 0.312	7.685 ± 3.591^{c}	16.060 ± 2.162^{bc}	3.353 ± 0.617^{c}	8.245 ± 1.259^{bc}
罗格列酮组	3.508 ± 1.417	3.390 ± 0.523	8.068 ± 2.552^{c}	7.425 ± 1.379^{ac}	3.515 ± 0.971^{c}	4.458 ± 3.062^{ac}

a:$P < 0.05$,与模型对照组比较;b:$P < 0.05$,与给药前比较;c:$P < 0.05$,与正常对照组比较



A:正常对照组; B:模型对照组; C:罗格列酮组

图1 各组大鼠胰腺组织病理学观察(HE×100)

2.4 高胰岛素-正常血糖钳夹实验结果

正常对照组 GIR_{0-120}[(13.12±3.04)mg·kg^{-1}·min^{-1}]与罗格列酮组大鼠 GIR_{0-120}[(9.68±0.66)mg·kg^{-1}·min^{-1}]显著高于模型对照组大鼠 GIR_{0-120}[(4.82±0.98)mg·kg^{-1}·min^{-1}](*P*<0.05)。正常对照组 ISI_{150}(0.020 6±0.000 6)与罗格列酮组大鼠 ISI_{150}(0.021 2±0.000 6)显著高于模型对照组大鼠 ISI_{150}(0.002 9±0.000 5)(*P*<0.05)。

2.5 HE 染色胰腺组织的病理学观察

通过对各组大鼠胰腺组织切片的观察,罗格列酮组与模型对照组大鼠胰腺脂肪浸润均正常,但胰腺胰岛细胞有增生肥大病变:其中罗格列酮组 7 只轻微病变,3 只轻度病变;模型对照组 5 只轻度病变,5 只中度病变。可见罗格列酮组大鼠比模型对照组大鼠胰腺胰岛细胞的病变程度有一定缓解。

如图 1 所示,光镜下,胰腺组织 HE 染色显示,在相同放大倍数的光镜下,与正常对照组大鼠比较,罗格列酮组与模型对照组大鼠均有胰岛细胞的增生肥大现象,罗格列酮组比模型对照组胰岛细胞的增生肥大现象有一定缓解。

3 讨论

ZF 肥胖大鼠是首个 FDA 认可的自发性胰岛素抵抗动物模型,其隐性基因名称为 fa。fa 为瘦素受体相关基因,fa 基因突变引起瘦素受体缺损,损伤迷走神经介导的胰腺胰岛素分泌控制,出现高胰岛素血症,最后形成胰岛素抵抗[5,6]。该动物模型有轻度糖耐量异常,高胰岛素血症和外周胰岛素抵抗,无酮症表现,一般只肥胖,无糖尿病症状,血糖正常或轻度升高,血脂胆固醇过多,表现为代谢综合征[7-9]。因此可作为理想的人类糖尿病早期肥胖模型或胰岛素抵抗模型。虽然 ZF 大鼠模型已在胰岛素抵抗的研究中有了一定的运用,但在如何建立可控的动物模型、选择合适的判断胰岛素增敏药物疗效的测定指标等方面所积累的经验并不完整。因此本研究采用 ZF 大鼠,以已知胰岛素增敏剂罗格列酮作为阳性药物,通过验证建立稳定的胰岛素抵抗模型适用的包括动物周龄、纳入标准及评价指标等关键要素,对以 ZF 大鼠模型评价胰岛素增敏剂药效研究进行了初步探讨。

6~14 周龄为 ZF 大鼠典型的早期出现胰岛素抵抗的病理阶段,利用此周龄段的动物可客观评价胰岛素增敏剂对血清胰岛素水平与胰岛素敏感性的影响[10]。本实验中 ZF 大鼠完成检验检疫(即 7~8 周龄阶段)时就已经显现明显的发病症状,体质量、胰岛素水平明显高于正常对照组大鼠,并且发现该模型动物发病的个体差异较大,其中部分 ZF 大鼠胰岛素水平上升尤其迅速,超过了 4 ng/ml。血清胰岛素水平的变化是 ZF 大鼠病程变化的主要指标,同时也是本实验考察的重点指标之一。因此为保证入组模型大鼠发病程度保持一致,本实验设计选择了 7~8 周龄 ZF 大鼠,以空腹胰岛素水平高于 4 ng/ml 为纳入标准,根据动物发病情况分批纳入实验。经实验验证,这样的入组方法能基本保证动物关键指标的基数一致,符合统计学要求。

作为评价胰岛素增敏剂药效的动物模型,观察药物对胰岛素敏感性的影响进而代偿性引起胰岛素水平的变化是主要评价依据。高胰岛素-正常葡萄糖钳夹实验是评价胰岛素敏感性的金标准,因此空腹胰岛素水平、葡萄糖输注速率(GIR)、胰岛素敏感指数(ISI)是作为评价标准必不可少的指标。另外肥胖与胰岛素抵抗的关系密不可分,近年来认为,瘦素(leptin)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α, TNF-α)可促进脂肪组织的分解,释放游离脂肪酸,抑制外周葡萄糖的利用并促进糖异生和引起高胰岛素血症的发生,在胰岛素的病理生理过程中,起着极其重要的作用[11,12]。因此考察脂代谢也是评价胰岛素增敏剂作用的重要指标之一。

因此,在上述设计的入组周龄、纳入标准及评价指标等实验条件下,罗格列酮组与模型对照组大鼠均符合胰岛素抵抗动物模型特征,实验期间随病程发展,甘油三酯、游离脂肪酸与空腹胰岛素水平迅速升高,而总胆固醇保持相对稳定水平。与模型对照组大鼠比较,罗格列酮能显著降低大鼠的空腹胰岛素、甘油三酯及游离脂肪酸水平(*P*<0.05);通过评价胰岛素敏感性

的“金指标”——高胰岛素-正常血糖钳夹实验,验证了罗格列酮能改善ZF模型动物的胰岛素抵抗,增加胰岛素敏感性($P<0.05$);经胰腺组织病理学观察,罗格列酮组对模型动物胰岛细胞的增生肥大也有一定缓解。以上结果均验证了在本实验确定的关键要素条件下的ZF大鼠可用于胰岛素增敏剂的药效评价。

由于人类糖尿病的发病机制复杂,只有做到建立的动物模型可控、重复率高、观察指标选择合理时,才能正确判断药物疗效。通过本研究,我们制定了完整的胰岛素增敏剂的药效评价动物模型实验方法,确定了模型动物入组周龄、纳入标准及评价指标等关键要素,对开展胰岛素增敏剂的药效评价研究具有指导意义。

参考文献:

[1] Denys K, Cankurtaran M, Janssens W, *et al*. Metabolic syndrome in the elderly: an overview of the evidence [J]. Acta Clin Belg, 2009, 64(1): 23-34.
[2] Polyzos S A, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines [J]. Curr Mol Med, 2009, 9(3): 299-314.
[3] 祝之明. 代谢综合征的临床特征与发病机制 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 17-20.
[4] Gedulin B R, Nikoulina S E, Smith P A, *et al*. Exenatide (Exendin-4) improves insulin sensitivity and beta-cell mass in insulin-resistant obese fa/fa Zucker rats independent of glycemia and body weight [J]. Endocrinology, 2005, 146(4): 2069-2076.
[5] Ohnuma H, Yamatani K, Daimon M, *et al*. Impaired neural regulation of insulin secretion related to the leptin receptor gene mutation in Wistar fatty rats[J]. Physiol Behav, 2000, 70(5): 527-532.
[6] Canals I, Carmona M C, Amigo M, *et al*. A functional leptin system is essential for sodium tungstate antiobesity action[J]. Endocrinology, 2009, 150(2): 642-650.
[7] Frisbee J C. Hypertension-independent microvascular rarefaction in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome [J]. Microcirculation, 2005, 12(5): 383-392.
[8] Sun G. Application of DNA microarrays in the study of human obesity and type 2 diabetes [J]. OMICS, 2007, 11(1): 25-40.
[9] Shirouchi B, Nagao K, Furuya K, *et al*. Effect of dietary phosphatidylinositol on cholesterol metabolism in Zucker (fa/fa) rats [J]. J Oleo Sci, 2009, 58(3): 111-115.
[10] Muller S, Cleary M P. Glucose metabolism in isolated adipocytes from ad Libitum- and restricted-fed lean and obese Zucker rats at two different ages [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1988, 187(4): 398-407.
[11] Bastard J P, Maachi M, Lagathu C, *et al*. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance [J]. Eur Cytokine Netw, 2006, 17(1): 4-12.
[12] Steinberg G R. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance [J]. Cell Cycle, 2007, 6(8): 888-894.

(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2009)18-1793-01

个案与短篇

瑞格列奈联合二甲双胍治疗2型糖尿病疗效观察

李 玉,彭颜晖 (新疆医科大学第六附属医院内分泌科,乌鲁木齐 830002)

瑞格列奈为新型降糖药,作用于胰岛β细胞而发挥作用,不同于磺脲类降糖药。我们于2006年3月至2008年12月用瑞格列奈联合二甲双胍治疗2型糖尿病患者,收到了良好的疗效,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 一般资料

2006年3月至2008年12月我院门诊或住院糖尿病患者72例,均符合1999年WHO推荐的糖尿病诊断标准[1]。病例均为初次治疗者,其中男性45例,女性27例;年龄(55±15)岁,病程(3.0±1.3)年。入组观察前检查空腹血糖(FBG)≥8 mmol/L,餐后血糖(PBG)≥12 mmol/L,糖化血红蛋白(HbAic)≥8%。排除1型糖尿病、糖尿病酮症酸中毒、糖尿病高渗性昏迷、急性感染、肝肾功能损害、妊娠和哺乳期妇女、有二甲双胍及瑞格列奈使用禁忌证者。分为治疗组和对照组,每组36例。2组性别、年龄、病程、治疗前各指标差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 治疗方法

在严格的饮食控制和运动条件之下,治疗组给予瑞格列奈(商品名:诺和龙)0.5~1.0 mg,3次/d,餐前口服;二甲双胍0.5 g,3次/d,餐前口服。对照组单用瑞格列奈,剂量为1~2 mg,每天3次。2组治疗期间不加用其他降糖药和胰岛素,共治疗12周,观察2组治疗前后FBG、PBG、HbAic的变化。

1.3 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行分析,治疗组与对照组治疗前后各指标比较行t检验,2组治疗后各指标比较行u检验。

(下转1797页)

作者简介:李 玉,女,山东省青岛市人,主治医师,主要从事内分泌方面的研究。电话:(0991)8022202

收稿日期:2009-06-01;修回日期:2009-06-18