维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)03-0359-04

宫内生长迟缓致大鼠胰岛素抵抗的实验研究

廖 艳, 黎海芪

(重庆医科大学儿科学院儿童保健科,重庆 400014)

【摘 要】目的:了解母鼠孕期营养不良所致宫内生长迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)大鼠成年后胰岛 β 细胞分泌功能及胰岛素敏感性变化。方法:采用妊娠第 1 天 Wistar 孕鼠以对照组孕鼠 50% 的饲料喂养建立 IUGR 模型,以低于对照组新生鼠出生体重均值的 2 个标准差判断为 IUGR。以子代 12~15 周成年雄鼠为实验对象,采有葡萄糖耐量试验和正常血糖高胰岛素钳夹技术,计算胰岛 β 细胞功能数(Modified Beta-Cell function Index, MBCI)、胰岛素介导的稳态葡萄糖输注率(steady-state glucose infusion rate, SSGIR, mg/(kg·min),对胰岛 β 细胞分泌功能及外周组织胰岛素敏感性进行评价。结果:(1)饥饿组新生鼠平均出生体重明显低于对照组均值的 2SD(4.37±0.34g vs 6.42±0.2g, $P<0.001$),为 IUGR。至 12~15 周时 IUGR 组体重仍低于对照组(279.8±30.3 vs 341.3±36.6g, $P<0.01$);到成年期约有 25% IUGR 幼鼠死亡;(2)饥饿组幼鼠成年后(12~15 周)胰岛 β 细胞功能指数与对照组比较差别无显著性(66.52±21.66 vs 57.43±10.82, $P=0.286$);饥饿组幼鼠成年期 SSGIR 明显低于对照组(9.97±2.65mg/(kg·min) vs 22.55±4.05mg/(kg·min), $P<0.001$)。结论:母鼠孕期营养不良导致胎鼠宫内生长迟缓并延续至成年期;IUGR 大鼠代谢综合征的发生与其成年期严重的外周组织胰岛素抵抗有关。

【关键词】宫内生长迟缓;胰岛素抵抗;疾病模型;动物

【中国图书分类法分类号】Q95-33;R335^{+}.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-03-09

Insulin resistance in the intrauterine growth retardation rats

LIAO Yan, et al

(*Department of Child Health Care, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the endocrine functions of the islet β cells and insulin sensitivity in the adult male rats, with intrauterine growth retardation induced by maternal starvation during pregnancy. *Methods*: The foods were available ad libitum throughout the pregnancy to the control group($n=8$) and the rats in the experimental group($n=9$) were fed 50% of the control group. The average birth weight of the offspring in the experimental group were below the mean values of the birth weights of the control group more than 2SD, defined as IUGR. The glucose tolerance test and hyperinsulinemic-euglycemic clamp were done in the adult male offspring($n=9$ for each group). *Results*: (1)Litter size was not affected by maternal undernutrition. The birth weights of the rats in the maternal starvation during the pregnancy were significantly lower(4.37±0.34g)than those in the control group(6.42±0.29g) as defined as IUGR. The postnatal survival rate of the IUGR rats(75.4%) is significantly lower than that of the normal offspring(94.9%). The mean weight of the IUGR male rats was still lower than that of control group (279.8±30.3g vs 341.3±36.6g, $P<0.01$) until week 12 postnatally; (2)There were no significant differences in the values of MBCI between the two groups(66.52±21.66 vs 57.43±10.82, $P=0.286$). The values of SSGIR in the IUGR rats were lower than that in the normal rats(9.97±2.65 mg/(kg·min) vs 22.55±4.05 mg/(kg·min), $P<0.001$). *Conclusion*: Maternal malnutrition during pregnancy caused intrauterine growth retardation in the fetus. The male rats with IUGR did not achieve catch up growth even in the adult life. Though there was no significant difference in the β cell endocrine function, the IUGR rats developed severer insulin resistance in their adult life which is closely related to the metabolic syndrome.

【Key words】Intrauterine growth retardation; Insulin resistance; Disease model; Animal

宫内生长迟缓(intrauterine growth retardation, IUGR)和成年期代谢综合征(包括肥胖、高血压、冠心病、2 型糖尿病等)之间的关系在不同国家不同人群的流行病学研究中得到证实[1]。生命早期的不良刺激所造成的远期影响逐渐引起人们的重视。代

作者介绍:廖 艳(1973-),女,博士,
主要研究方向:宫内生长迟缓与代谢性疾病的机制研究。

基金项目:重庆医科大学优秀博士论文科研基金资助。

维普资讯 http://www.cqvip.com

谢综合征是一组以胰岛素抵抗为特征的疾病。胰岛素抵抗导致机体胰岛素介导的葡萄糖代谢能力下降，而机体对葡萄糖的代谢不仅受靶组织对胰岛素反应敏感程度（胰岛素抵抗）的影响，而且受机体产生胰岛素量（β细胞分泌功能）的影响。本研究采用妊娠期孕鼠饥饿法建立 IUGR 模型[2]，通过糖耐量试验和正常血糖高胰岛素钳夹技术，了解母鼠孕期营养不良所致 IUGR 雄鼠成年后胰岛β细胞分泌功能及外周组织对胰岛素敏感性的变化。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立及实验对象的选择

1.1.1 宫内生长迟缓大鼠模型的建立

健康处女 Wistar 大鼠 17 只（重庆医科大学实验动物中心提供），2.5～3.0 月龄，标准饲料喂养（重庆医科大学实验动物中心购买），随机选取 8 只为对照组，自由进食。从妊娠第 1 天起每日称取进食量。剩余 9 只为饥饿组，妊娠第 1 天起进食量为对照组平均进食量的 50% 至分娩，两组母鼠分娩后自由进食。分别称量记录孕期 1、5、10、15、20 天体重，所有孕鼠自然分娩，平均孕期 21.5 天（20～22 天）。用电子天平 12h 内称量新生仔鼠体重，精确到 0.01g。饥饿组新生鼠平均出生体重低于对照组正常新生鼠平均体重的 2 个标准差为 IUGR 的判断标准。

1.1.2 实验对象的选择

每只母鼠随机保留新生鼠 6～8 只。仔鼠 21 天断奶，所有仔鼠断奶后均以标准饲料喂养至 12～15 周，每组随机选取子代成年雄鼠各 9 只为实验对象。

1.2 实验材料与方法

1.2.1 材料

20% 葡萄糖溶液，肝素，胰岛素放射免疫试剂盒（中国原子能科学研究院同位素研究所提供）。10% 乌拉坦（0.8～1ml/100g 体重），胰岛素（诺和灵 R，诺和诺德公司产品，以生理盐水稀释，用前配制），微电脑数字式电子微量注射泵（上海电子仪器厂产品），One Touch Ⅱ微型血糖仪及血糖试纸（美国 Johnson 公司产品），美国制造硅胶导管（内径为 0.6mm，外径为 1mm）。

1.2.2 方法

（1）糖耐量试验和胰岛β细胞功能指数的计算

两组 12～14 周子代雄鼠，禁食 12h 后，称量体重，尾静脉采血测定空腹血糖及胰岛素。腹腔注射葡萄糖 2g/kg 后，尾静脉采血测定糖负荷后 30min、60min、120min 血糖和胰岛素值。血糖用葡萄糖氧化酶法测定，胰岛素用放射免疫法测定。

MBCI = （FINS × FPG）/（PG2h + PG1h − 2 × FPG）（FINS：空腹血浆胰岛素；FPG：空腹血糖；PG1h 和 PG2h 分别为 1h 和 2h 血糖值）[3]

（2）正常血糖高胰岛素钳夹实验[4]

两组雄鼠于糖耐量试验后 1 周进行正常血糖高胰岛素钳夹实验。禁食 14～16h，麻醉下分别做左颈静脉插管和右颈动脉插管。左颈静脉输注胰岛素，输注速率 10mU/（kg·min）。右颈动脉取血用微型血糖仪测血糖，当血糖值稳定在 5.5～6.0mmol/L 时，可认为达到稳态，取达到稳态后 60min 血糖值计算稳态葡萄糖输注率作为判定胰岛素敏感性的标准。

指标计算：

SSGIR（mg/kg·min）= 稳态葡萄糖平均输注速度（ml/h）/60（min）× 200 ÷ 体重（kg）。

稳态血糖浓度 SSBG（mmol/L）：取达到稳态后 13 个血糖值的均数，该指标反映钳夹试验的稳定性和可比性。

1.3 统计学处理

正态分布资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，均数比较采用 t 检验，数据处理由 SPSS11.0 统计软件包进行。结果以 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 IUGR 动物模型的一般资料

实验组和对照组母鼠平均基础体重分别为 221 ± 5.7g 和 219 ± 7.5g，无显著差别（$P=0.458$），实验组孕鼠第 5 天体重 203 ± 4.3g 明显低于对照组 236 ± 9.7g（$P<0.05$）；第 15 天体重降到最低，第 20 天时体重有所增加（236 ± 8.3g），但仍低于对照组（348 ± 28g），差别有统计学意义（$P<0.05$）。对照组母鼠妊娠期进食量随孕期而增加，与其体重明显增加一致（表 1）。实验组产仔数（9 ± 3）与对照组母鼠产仔数（10 ± 2）无差别。

表 1 母鼠孕期体重及进食量

组别	n	体重（g） 进食量（g）				
		1	5	10	15	20
对照组	8	219 ± 7.5	236 ± 9.7	258 ± 11.9	286 ± 17.4	348 ± 28
		22 ± 2.6	25 ± 3.0	32 ± 5.2	38 ± 6.6	48 ± 4.6
实验组	9	221 ± 5.7	203 ± 4.3*	184 ± 5.5*	173 ± 9.3*	236 ± 8.3*
		11 ± 1.3	13 ± 1.5	16 ± 2.6	19 ± 3.3	24 ± 2.4

* 与相应的对照组比较 $P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

实验组新生鼠平均出生体重 4.37±0.34g 显著低于对照组 6.42±0.29g,两组新生鼠体重差别有极显著性($P<0.001$);实验组所有新生鼠体重均明显低于对照组体重均值的 2 个标准差(5.84g)。实验组仔鼠生后生存能力较低,存活比例为 75.4%(以存活到 12 周的仔鼠占总仔鼠数的比例表示)明显低于对照组(94.9%)。至生后 12 周,实验组子代雄鼠体重 279.8±30.3g 仍然没有追赶上对照组 341.3±36.6g,两者比较差别有统计学意义($P<0.05$)(表 2)。

表 2 仔鼠生后存活比例、新生鼠体重、12 周子代雄鼠体重比较

组别	存活比例 (%)	新生鼠体重 (g)	12 周龄子代雄鼠体重(g)
对照组	94.9	6.42±0.29	341.3±36.6
实验组	75.4*	4.37±0.34**	279.8±30.3**

** 与相应的对照组比较 $P<0.01$,* 与相应的对照组比较 $P<0.05$

2.2 糖耐量试验和胰岛 β 细胞分泌功能

两组 12 周龄子代雄鼠空腹及糖负荷后 30min、60min、120min 血糖及胰岛素值差别无统计学意义($P>0.05$)。糖负荷后实验组子代雄鼠与对照组仔鼠血糖和胰岛素的分泌高峰分别出现在糖负荷后 30min 和 60min。实验组子代雄鼠 MBCI 值为(66.52±21.66)与对照组(57.43±10.82)差别无统计学意义,$P=0.29$(表 3,图 1,图 2)。

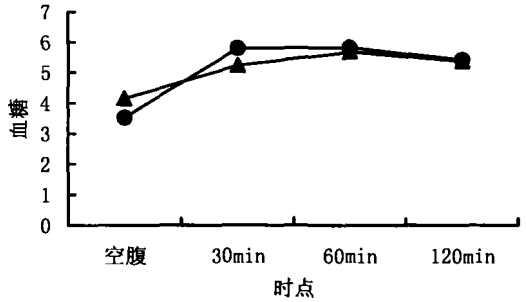


图 1 子代成年雄鼠糖耐量实验各时点血糖值

●正常对照组 ▲IUGR

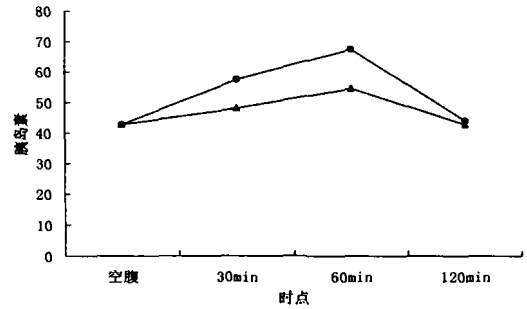


图 2 子代成年雄鼠糖耐量实验各时点胰岛素值

●正常对照组 ▲IUGR

表 3 子代成年雄鼠糖耐量试验血糖/胰岛素测定值及 MBCI

组别	例数	血糖(mmol/L) / 血浆胰岛素(mIU/L) 0min	30min	60min	120min	β 细胞功能指数 (MBCI)
对照组	9	3.52±0.20	5.80±0.31	5.82±0.72	5.43±1.00	57.43±10.82
		42.76±6.06	57.47±8.52	67.65±11.69	44.03±5.96	
实验组	9	4.15±0.53	5.23±0.50	5.68±0.61	5.37±1.13	66.52±21.66
		42.94±9.70	48.12±14.95	54.71±5.55	42.92±11.47	

MBCI(Modified Beta-Cell function Index):胰岛 β 细胞功能指数

2.3 正常血糖高胰岛素钳夹实验和胰岛素敏感性

实验组和对照组 13~15 周龄大小仔鼠钳夹实验 SSBG 分别为为 5.55±0.19mmol/L 和 5.43±0.17mmol/L,差别无显著性($P=0.34$),说明钳夹实验具有稳定性和可比性。

两组子代成年雄鼠胰岛素刺激的 SSGIR 实验组为 9.97±2.65mg/(kg·min)显著低于对照组 22.55±4.05mg/(kg·min),差别有极显著意义($P<0.01$)。

3 讨 论

母鼠孕期营养不良是研究 IUGR 的经典模型[5],同时,本课题组在前期临床试验中观察到孕母营养不良仍然是发生 IUGR 的主要原因之一[6],因此本实验选择母鼠孕期全程半量饥饿的方法建立 IUGR 大鼠模型。结果示孕期饥饿母鼠的幼鼠出生体重明显低于对照组均值的 2 个标准差,IUGR 的发生率 100%,说明成功建立 IUGR 大鼠模型。本研究以 12 周以后的雄性大鼠为研究对象是因为 12 周以后的大鼠性腺与内分泌系统完全发育成熟,肌肉骨骼系统基本定型,能够耐受钳夹实验的多次取血。选择雄鼠则是为了排除性激素对胰岛素敏感性的影响。

母鼠孕期饥饿影响胎鼠宫内发育,产生严重的宫内发育迟缓。实验组幼鼠生后存活比例明显低于对照,至成年时有大约 25% 的 IUGR 大鼠死亡,存

维普资讯 http://www.cqvip.com

活的 IUGR 幼鼠成年后(12～15 周)体重也未达正常对照组幼鼠生长水平。Woodall 等将孕期饥饿母鼠的幼鼠出生后即由孕期正常饮食的母鼠饲养,结果显示孕期饥饿母鼠的幼鼠至成熟期始终未出现生长追赶现象[7],该学者认为孕期母鼠饥饿的仔鼠生后体格发育落后是其仔鼠宫内营养不良的延续。因此母鼠孕期营养不良致胎鼠宫内的发育迟缓作用可延续至生后,使幼鼠的生存能力降低及生长发育迟缓。

近十几年来人们日益重视不良的宫内环境所造成的远期影响。1990 年 Barker 研究显示低出生体重者成年后高血压的患病率显著增加[8]。国内米杰等报道随着出生体重和出生体重指数的降低,中国人成年期冠心病心肌缺血症状、高血压、糖耐量受损(impaired glucosetolerance, IGT)的风险率显著升高[9]。近年来代谢综合征的发生在全球范围内呈逐年上升的趋势,对 IUGR 生后发生代谢综合征的机制成为研究的重要内容之一。以期望通过其机制的研究能对 IUGR 进行早期干预,减少其成年期代谢性疾病的发生。IUGR 发生代谢综合征的机制目前还不清楚。本研究从成熟期 IUGR 大鼠胰岛 β 细胞功能和外周组织胰岛素敏感性两个方面进行了探讨。实验结果显示 IUGR 雄鼠成熟期空腹血糖及血浆胰岛素水平与对照组没有差别,糖负荷后 30min、60min、120min 血糖及血浆胰岛素值与对照组差别无显著性,且各时点血糖水平的变化和胰岛素分泌规律相似。评估胰岛 β 细胞功能的指标 MBCI 两组之间也未见差别,提示成熟期 IUGR 雄鼠胰岛 β 细胞分泌功能尚在正常范围。但在正常血糖高胰岛素钳夹试验中 IUGR 大鼠胰岛素介导的 SSGIR 明显低于对照组大鼠,证实 IUGR 雄鼠在成年早期即存在严重的外周组织胰岛素抵抗。Jaquet 等用正血糖高胰岛素钳夹试验证实 25 岁的低出生体重者胰岛素作用下的葡萄糖摄取减少,并在低出生体重组骨骼肌及脂肪组织中检测到外周组织摄取和利用葡萄糖的主要限速因子葡萄糖转运体 4(glucose transporter 4, Glut4)基因表达障碍[10]。目前研究提示 IUGR 发生胰岛素抵抗可能是由于某些胰岛素信号传导通路上的信号传导分子表达障碍,但其机制尚未探明。

参 考 文 献

[1] Hales CN, Barker DPJ. The thrifty phenotype hypothesis [J]. Br Med Bull, 2001; 60: 5 - 20.

[2] 张 庆,黎海芪,郑惠连. 宫内生长迟缓对新生幼鼠胃肠发育的影响[J]. 中华儿科杂志, 1997; 35(11): 567 - 570.

[3] 李光伟,杨文英,姜亚云,等. 以(FINS × FPG)/(PG2h + PG1h - 2FPG)评估胰岛 β 细胞分泌功能的可行性探讨[J]. 中华内科杂志, 2000; 39(4): 234 - 238.

[4] 李晨钟,张素华. Wistar 大鼠的正常血糖—高血浆胰岛素钳夹技术[J]. 重庆医科大学学报, 1998; 23(2): 149 - 152.

[5] Chow BF, Rider AA. Effect of dietary restrictions of pregnant rats on body weight gain of the offspring[J]. J Nutr, 1964; 82: 10 - 15.

[6] 廖 艳,黎海芪. 母血脐血胰岛素、糖脂水平测定及其意义[J]. 中国儿童保健杂志, 2004; 12(1): 42 - 45.

[7] Woodall S M, Breier B H, Johnston B M, et al. A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rats: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth[J]. Journal of Endocrinology, 1996; 150: 231 - 242.

[8] Barker DPJ, Bull AR, Osmond C, et al. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life[J]. BMJ, 1990; 301: 259 - 262.

[9] 米 杰,张孔来,刘善英,等. 胎儿生长发育与成年期冠心病生物学危险因素的关系[J]. 中国医学科学院学报, 1999; 21(6): 466 - 471.

[10] Jaquet D, Vidal H, Hankard R, et al. Impaired regulation of glucose transporter 4 gene expression in insulin resistance associated with in utero undernutrition [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(7): 3266 - 3271.