维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0334－03

清醒状态大鼠高胰岛素－正常血糖钳夹术的建立及其意义

罗四川，李启富，刘红梅

(重庆医科大学临床学院内分泌科，重庆 400016)

【摘 要】目的：建立清醒状态下大鼠高胰岛素－正常血糖钳夹术，并探讨短期输注乳化脂肪和手术后麻醉状态对大鼠胰岛素敏感性的影响。方法：采用颈动、静脉插管术。大鼠按有无输注乳化脂肪随机分为两组，先后进行麻醉状态和清醒状态高胰岛素－正常血糖钳夹术。结果：短期输注乳化脂肪使胰岛素敏感性降低 30%($P<0.001$)；手术后麻醉状态使胰岛素敏感性降低 58%($P<0.001$)；以上二因素对胰岛素敏感性的影响存在相减效应($P<0.001$)。结论：给大鼠短期输注乳化脂肪会导致胰岛素抵抗。大鼠高胰岛素正常血糖钳夹术宜在清醒状态下进行。

【关键词】高胰岛素－正常血糖钳夹术；胰岛素敏感性；乳化脂肪；麻醉

【中国图书分类法分类号】Q95－33；R335$^+$.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－09－29

Establishment of a hyperinsulinemic－euglycemic clamp technique in conscious rats

LUO Sichuan, et al

(*Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a hyperinsulinemic euglycemic clamp technique in conscious rat, and to explore the effect of anesthesia and acute infusion of lipid on insulin sensitivity of rats. *Methods*: Rats divided into two groups were catheterized in the right jugular vein and left carotid artery and underwent a hyperinsulinemic－euglycemic clamp with or without infusion of lipid (Intralipid) and in unconscious and conscious state. *Results*: Infusion of lipid resulted in a decrease of insulin sensitivity by 30% ($P<0.001$ vs. control). In unconscious rats, the insulin sensitivity was decreased by 58% ($P<0.001$ vs. conscious). There was an antagonistic effect between infusion of lipid and anesthesia on insulin sensitivity of rats ($P<0.001$). *Conclusion*: The increase of plasma free fatty acids induces insulin resistance. It would be better to carry out the hyperinsulinemic－euglycemic clamp under conscious state in rats.

【Key words】Hyperinsulinemic－euglycemic clamp; Insulin sensitivity; Lipid; Anesthesia

高胰岛素正常血糖钳夹术(Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp，简称钳夹术)是目前评价胰岛素敏感性的金标准[1]。近年来，国内已将钳夹术用于人体观察[2]，而对动物(实验大鼠)应用钳夹术多限于在手术后麻醉状态下进行[3]，也有在手术后第二天清醒状态下进行钳夹术的报道[4]，但是手术应激反应往往不能在手术后第二天即解除[5]。本研究根据国外文献报道的方法结合国内实际情况建立了清醒状态下大鼠钳夹术，并初步探讨了短期输注乳化脂肪和手术后麻醉状态对大鼠胰岛素敏感性的影响。

1 材料与方法

作者介绍：罗四川(1969－)，男，主治医师，硕士，
主要研究方向：胎儿营养不良与 2 型糖尿病的关系。

1.1 设计与对象

对短期输注乳化脂肪和钳夹术所处状态做重复测量二因素试验设计。200～250g 的健康成年 Wistar 雌性大鼠 10 只(由重庆医科大学实验动物中心提供)，适应性喂养两周，明暗周期为 12h(8am 至 8pm)，室温控制在 22 至 28℃。随机分为对照组和输注乳化脂肪组。两组大鼠实验前一晚禁食 12h，次晨 8 时行颈动、静脉插管术。先静置 30min，随即进行麻醉状态下钳夹术，之后 5～7 天，大鼠活动如初，体重恢复。再次将大鼠禁食 12h 后进行清醒状态下钳夹术。输注乳化脂肪组大鼠微量泵入乳化脂肪(30% Intralipid，6.7ml/kg/h)5h[6]，钳夹术在输注乳化脂肪过程中第 3～5h 进行。

1.2 插管

所有大鼠用 5% 异戊巴比妥进行皮下注射麻醉(100mg/kg)。麻醉显效后，在无菌状态下切开颈部皮肤，钝性分离皮下组织及肌肉，显露、分离右侧颈静脉和左侧颈动脉，进行右侧颈静脉和左侧颈动脉插管，并将导管固定于肩胛部皮肤。用无菌锥型金属帽封堵导管口，缝合颈部皮肤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 高胰岛素－正常血糖钳夹术

将准备好的大鼠颈静脉导管接上三通管的一端，三通管的另两端分别接上输注胰岛素或葡萄糖的输液管。颈动脉导管接上一细管，其后接三通管一端。三通管的另两端，一端用于取血，另一端再接一细管，后接 5ml 空针（内有 50mU/ml 的肝素溶液）。首先从颈动脉抽取血液，用 One Touch Ⅱ微型血糖仪（美国 Johnson 公司产品）测定基础血糖（Basal blood glucose，BBG）。然后，以恒定的速率（10mU/kg/min）输注胰岛素。以后每 5min 测定血糖 1 次，当血糖值低于 5.0mmol/L 时开始输注 20% 葡萄糖。调整葡萄糖输注速率（Glucose infusion rate，GIR）使血糖控制在 5.5mmol/L（5.0 至 6.0mmol/L）左右。60min 后，当连续 3 次血糖值均在上述范围时，即认为达到了稳定状态。取稳定状态及以后血糖值的均数为稳态血糖浓度（Steady－state blood glucose，SSBG）。相应 GIR 值均数为稳态葡萄糖输注速率（Steady－state glucose infusion rate，SSGIR）。

1.4 统计学处理

数据以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。胰岛素敏感性指标 SSGIR，采用重复测量二因素试验设计方差分析。稳态血糖浓度采用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 各组稳态血糖浓度的比较

如表 1 所示，两组间和组内状态间 SSBG 值波动在 5.5mmol/L 左右，无显著性差异（$P = 0.198$），提示钳夹试验结果具有稳定性、可比的。

表 1 稳态血糖浓度（mmol/L，$\bar{x} \pm s$）

分组	麻醉状态	清醒状态
对照组	5.50±10.04	5.53±0.06
输注乳化脂肪组	5.44±0.12	5.54±0.06

$P = 0.198$，各组间比较。

表 2 短期乳化脂肪输注和钳夹术不同状态对大鼠 SSGIR 的影响（mg/kg/min，$\bar{x} \pm s$）

分组	麻醉状态	清醒状态
对照组	19.79±2.20	45.72±2.33
输注乳化脂肪组	13.10±1.32	32.90±2.00

$P<0.001$，组间比较。$P<0.001$，组内状态间比较。$P<0.001$，输注乳化脂肪与钳夹所处状态间交互效应。

2.2 手术和麻醉对胰岛素敏感性的影响

未输注乳化脂肪时，SSGIR 值由清醒状态的（45.72±2.33）mg/（kg·min）减少到手术后麻醉状态的（19.79±2.20）mg/（kg·min）；输注乳化脂肪时，SSGIR 值由清醒状态的（32.90±2.00）mg/（kg·min）减少到手术后麻醉状态的（13.10±1.32）mg/（kg·min）；有非常显著性意义（$P<0.001$）。提示无论是否输注乳化脂肪，手术后麻醉状态均引起大鼠胰岛素敏感性降低（见表 2）。

2.3 短期输注乳化脂肪对胰岛素敏感性的影响

麻醉状态下，短期输注乳化脂肪使 SSGIR 值由未输注乳化脂肪的（19.79±2.20）mg/（kg·min）降低到（13.10±1.32）mg/（kg·min）；清醒状态下，短期输注乳化脂肪使 SSGIR 值由未输注乳化脂肪的（45.72±2.33）mg/（kg·min）降低到（32.90±2.00）mg/（kg·min），有非常显著性意义（$P<0.001$），提示短期输注乳化脂肪会导致明显胰岛素抵抗（见表 2）。

2.4 输注乳化脂肪与手术后麻醉状态间相互关系

以清醒状态下未输注乳化脂肪为基础值，手术后麻醉状态单独作用使 SSGIR 值降低了 56.71%，单纯乳化脂肪输注使 SSGIR 值下降了 28.04%。手术后麻醉状态与输注乳化脂肪二因素共同作用预计降低 SSGIR 值为 84.75%（即二因素单独作用时之和），但是实际仅降低了 71.34%。经统计学处理有非常显著意义（$P<0.001$），表明手术后麻醉状态和输注乳化脂肪两因素对胰岛素敏感性的影响存在相减效应（见图 1）。

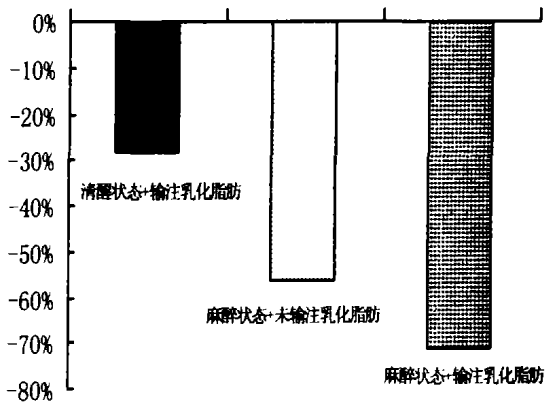


图 1 手术后麻醉状态与输注乳化脂肪间相互关系（与基础值比较，SSGIR 下降百分比）

3 讨 论

在清醒状态进行钳夹术，可以避免手术后麻醉状态时大鼠应激对胰岛素敏感性的影响，使钳夹术测定的胰岛素敏感性更接近生理状态。由于大鼠个体差异，3h 甚至更长时间的麻醉，使麻醉程度不易控制，麻醉状态下进行钳夹术十分困难。麻醉剂量偏大，部分大鼠会因呼吸抑制而死亡；麻醉剂量偏小，大鼠会在试验过程中苏醒过来，表现为挣扎，这时血糖会迅速升高，使试验数据的稳定性受影响，甚至造成数据不可用。清醒状态下进行钳夹术，虽然操作上要求更多，但是山于避免了手术应激和麻醉程度

维普资讯 http://www.cqvip.com

的影响,使整个试验更容易把握,因而结果更可靠。

清醒状态下钳夹术,大致分为手术插管和钳夹试验两个阶段。清醒与麻醉两种状态钳夹试验方法大致相同。手术操作及术后处理有两点需要注意。一是在手术操作中注意对组织的损伤要尽可能小,否则,会出现颈部渗血过多或严重水肿,大鼠会失血过多死亡,或者因术后不能进食,2~3 天后死亡。二是避免感染,严格无菌操作的基础上,可预防性皮下注射青霉素(50 万单位/千克体重)防止感染。

手术会造成短期应激状态。研究表明,手术导致交感神经释放去甲肾上腺素增加,肾上腺髓质释放肾上腺素增加;下丘脑垂体分泌 ACTH、生长激素、泌乳素、血管加压素增多;同时出现胰升糖素、皮质醇、醛固酮和血管紧张素分泌增多。从而导致手术应激期间血糖升高,这是手术应激导致胰岛素抵抗的主要原因。另一些研究提示,较大手术后 24h,在胃肠外营养期间,维持正常血糖较非手术时需 8 倍的胰岛素需要量;腹腔镜胆囊切除术后 24 h,胰岛素敏感性降低 50%;甚至在腹股沟疝修补术后胰岛素敏感性也减小了 1/3;并且胰岛素抵抗在腹部手术后持续达 5 天之久[5]。本实验结果也显示手术后麻醉状态使胰岛素敏感性较清醒状态降低 58%,这与国外的研究近似。本组在手术后 5~7 天,大鼠活动如初、体重恢复,清醒状态下进行钳夹术,其优点就是最大限度地避免了麻醉、手术等应激因素导致的胰岛素抵抗,从而更为准确地反映大鼠胰岛素敏感性。

国外研究表明,短期 5h 输注乳化脂肪使血浆游离脂肪酸浓度迅速升高,发现胰岛素介导的葡萄糖利用(胰岛素敏感性)减少 35%[6]。本实验结果也显示短期 5h 输注乳化脂肪导致 SSGIR 值降低 30%。短期输注乳化脂肪引起胰岛素抵抗的原因目前尚不完全清楚。有文献报道,短期输注乳化脂肪后骨骼肌 PI3K 活性下降 40%~50%,葡萄糖氧化和糖原合成下降 40%~50%[6],糖原合成酶活性显著降低[7]。进一步研究表明,血浆游离脂肪酸浓度升高引起胰岛素抵抗可能是由于骨骼肌细胞内脂肪(甘油三酯,TG)的形成和堆积所致[8],Boden 等利用磁共振波谱分析技术(^{1}H - NMR)证实了这一点[9]。高脂饲养的大鼠胰岛素刺激下骨骼肌 GLUT4 由细胞内转位至细胞浆膜和 T 管减少,并且这种转位异常与胰岛素信号通道上的 P13K、PKB 受抑制有关[10]。这些研究提示高游离脂肪酸血症可能通过抑制骨骼肌糖原合成、葡萄糖氧化和葡萄糖向细胞内转运,引起胰岛素抵抗。

本实验不仅提示手术后麻醉状态和短期输注乳化脂肪导致胰岛素抵抗,而且还提示应激导致的胰岛素抵抗(如手术后麻醉)与其它实验处理因素(如输注乳化脂肪)导致的胰岛素抵抗不是相互独立,而是相互影响的。应激因素会显著减少处理因素导致的作用。手术后麻醉状态下进行钳夹术,可能因为麻醉尤其是手术应激导致的胰岛素抵抗而影响实验处理因素的效应。因此,大鼠高胰岛素 - 正常血糖钳夹术宜在清醒状态下进行。

参 考 文 献

[1] Scheen AJ, Paquot N, Letiexhe MR, et al. How to explore insulin sensitivity in man[J]? Ann Endocrinol (Paris), 1995; 56 (5): 523 - 530.

[2] 贾伟平,陈 蕾,项坤三,等. 扩展高胰岛素 - 正葡萄糖钳夹技术的建立[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2001; 17(5): 268 - 271.

[3] 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.

[4] 于丽萍,张 雪,王玉芝. 单剂卷柏对 FFR 胰岛素敏感性的影响[J]. 中成药, 2001; 23(4): 291 - 292.

[5] Thorell A, Efendic S, Gutniak M, et al. Insulin resistance after abdominal surgery[J]. Br J Surg, 1994; 81: 59 - 63.

[6] Margarer E. Griffin, Melissa J. Marcucce, Gary W. Cline, et al. Free fatty acid - induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C and alterations in the insulin signaling cascade[J]. Diabetes, 1999; 48: 1270 - 1274.

[7] Park, Joong - Yeol, Chul - Hee Kim, et al. Effects of FFA on insulin - stimulated glucose fluxes and muscle glycogen synthase activity in rats[J]. Am. J. Physlol, 1998; 275: 338 - 344.

[8] Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, et al. Skeletal muscle triglyceride levels are reversely related to insulin action[J]. Diabetes, 1997; 46: 983 - 988.

[9] Boden G, Lebed B, Schatz M, et al: Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocelullar fat content and insulin resistance in healthy subjects[J]. Diabetes, 2001; 50: 1612 - 1617.

[10] Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, et al. Defective insulin - induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat - fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C activities[J]. Diabetes, 2001; 50: 1901 - 1910.