维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)02－0147－04

青春期胰岛素抵抗及青春期 2 型糖尿病动物模型的特点

倪银星，张素华，吴　静，汪志红，李全民

(重庆医科大学临床学院内分泌科，重庆　400016)

【摘　要】目的：分析高脂饮食诱导的青春期胰岛素抵抗大鼠及青春期 2 型糖尿病大鼠的特点。方法：通过正常血糖－高血浆胰岛素钳夹实验评估两种大鼠模型的胰岛素敏感性；对两种模型大鼠的雄激素与胰岛素敏感性的相关性进行研究；并与高脂饮食的成年期大鼠比较异同。结果：青春期胰岛素抵抗雄性大鼠的睾酮水平显著降低，且与胰岛素敏感性呈相关关系；小剂量链脲佐菌素(STZ)并不明显破坏胰岛细胞，但可使青春期胰岛素抵抗大鼠发生糖尿病(2 型糖尿病)；青春期大鼠高脂饮食后仅仅甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL－c)升高，而成年胰岛素抵抗大鼠血脂代谢已经全面异常。结论：高脂饮食诱导的青春期大鼠胰岛素抵抗及 2 型糖尿病的发生可能与其血浆睾酮水平异常有关。

【关键词】青春期；胰岛素抵抗；2 型糖尿病；正常血糖－高血浆胰岛素钳夹技术；睾酮

【中国图书分类法分类号】R581.4　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－07－19

Characteristics of pubertal rat models with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus

NI Yinxing, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To study the characteristics of pubertal rat models with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Methods*: Euglycemic－hyperinsulinemic clamp technique was performed in evaluation of insulin sensitivity of two models of pubertal rats, and the correlation between androgen of pubertal rat models and insulin sensitivity was investigated. *Results*: The plasma testosterone level was decreased and its concentration was positively correlated with insulin sensitivity in male rats. Islet was not obviously impaired by low－dose streptozotocin(STZ) injection (30mg/kg). But type 2 diabetes was successfully established in pubertal Wistar rats by high－fat feeding plus STZ injection. Both plasma triglycerides (TG) and plasma low－density lipoprotein (LDL－c) were increased in pubertal male rats with insulin resistance, and dyslipidemia was aggravated in adult rats with insulin resistance. *Conclusion*: Our findings suggested that abnormal plasma testosterone level might play an important role in the pubertal rat by high－fat feeding with the occurrence of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus.

【Key words】 Puberty; Insulin resistance; Type 2 diabetes mellitus; Euglycemic－hyperinsulinemic clamp technique; Testosterone

2 型糖尿病不再只是成年人的疾病[1,2]，这已经引起全世界的关注。儿童体内性激素的增加标志着进入了青春发育期。国外有关青春期 2 型糖尿病的研究多以 10～19 岁的未成年人为对象，即青春期 2 型糖尿病研究[3]。美国辛辛拉提地区的调查表明，在 1994 年新诊断 10～19 岁青春期 2 型糖尿病患者为 33%，比 1982 年上升了 10 倍。尽管各国青春期 2 型糖尿病发病率不尽相同，但总的趋势已得到公认，青春期 2 型糖尿病患者在迅速增加[4]。俄亥俄州儿童医院的调查提示[5]，青春期 2 型糖尿病除了与遗传家族史有关外，还与肥胖、胰岛素抵抗、高脂肪饮食、低运动量等因素关系密切。此外由于青春期生长激素分泌增多、雌雄激素的分泌比例失调，也将导致严重的胰岛素抵抗，可能也是促使其发病因素之一。目前大多数是针对青少年 2 型糖尿病流行病学研究等，而对其有别于成年 2 型糖尿病的特点及发病机制的研究报道较少，为此本实验利用 Wistar 大鼠进行青春期胰岛素抵抗和青春期 2 型糖尿病的动物模型制备，排除遗传因素，探讨高脂饮食在青春期 2 型糖尿病发病机制中的作用。

1　材料与方法

作者介绍：倪银星(1963－　)，女，主治医师。

主要研究方向：2 型糖尿病发病机制。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

微电脑数字式电子微量注射泵(Perfusor compact,德国 Braun 公司)、多道生理记录仪(ADI 公司,澳大利亚)、压力换能器(ADI 公司,澳大利亚)、压力定标仪(NIKON,日本)。

1.2 动物模型的建立

1.2.1 动物饲料配制 常规饲料总热能为 14kJ/g;高脂饲料总热能为 19kJ/g,2 周配 1 次饲料(重庆医科大学实验动物中心提供)。其中常规饲料热量组成为脂肪 10%,蛋白质 23%,碳水化合物 67%。高脂饲料热量组成为脂肪 57%,蛋白质 15%,碳水化合物 28%,高脂饲料中脂肪主要成分为熟猪油。

1.2.2 动物模型制备及分组 出生后 3 周断乳 Wistar 雄性大鼠 60 只随机分为 6 组,每组 10 只,大鼠均由重庆医科大学实验动物中心提供,专人单笼饲养,自由进食饮水,室温 25℃左右,相对湿度 50%。加用 STZ 组大鼠于第 5 周腹腔内注射 STZ 30mg/kg(溶于 0.1mmol 枸橼酸中)1 次。

动物分组:正常雄性组(A):饲以常规饲料 4 周。高脂雄性组(B):饲以高脂饲料 4 周。

正常 + STZ 组(C):雄性,饲以常规饲料 6 周。

高脂 + STZ 组(D):雄性,饲以高脂饲料 6 周。

正常成年组(E):雄性,饲以常规饲料 8 周。

高脂成年组(F):雄性,饲以高脂饲料 8 周。

A、B 组于第 5 周、C、D 组于第 7 周、E、F 于第 9 周分别进行葡萄糖耐量试验;各组大鼠禁食 8～10h,称体重后尾静脉测空腹血糖(One Touch Ⅱ 血糖仪和血糖试纸),腹腔注射 1.11mol/L 葡萄糖(按 2g/kg 计算)后 30、60、120min 分别检测血糖。D 组糖负荷后 2h 血糖≥11.1mmol/L 者、其余组糖耐量试验正常者纳入实验。糖耐量试验后恢复 2 天,参照文献[6]稍加修改,行正常血糖 - 高血浆胰岛素钳夹实验,进行胰岛素抵抗动物模型鉴定。Wistar 雌性大鼠 10 只,与 A 组相同条件相同周期饲养并行同样指标检测,其睾酮水平用于鉴定大鼠的青春发育期。

1.3 检测指标

按上述实验终点称体重(W),取空腹血浆测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL - c)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL - c)采用酶法测定,试剂盒购自北京中生生物工程高技术公司。血浆胰岛素(FINS)和血浆睾酮(T)的测定采用放射免疫分析法,试剂盒均购自中国原子能科学研究院。血压测定:每组取 6 只大鼠,戊巴比妥钠腹腔麻醉下,于股动脉插管,平衡 20min 后(钳夹技术前 10min),以多道生理记录仪记录血压,用 Chart 软件分析读取平均动脉压。通过钳夹技术测定 60～120min 的平均葡萄糖输注率(GIR_{60-120})以反映胰岛素敏感性,钳夹实验结束后,分别处死各组大鼠,取部分胰腺用 10% 甲醛溶液固定,逐级脱水,石蜡包埋切片、常规苏木素 - 伊红染色,光镜下观察。

1.4 统计学处理

所有数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较用方差分析,相关分析采用直接相关分析。所有数据用 SPSS 统计软件处理。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 青春期及成年大鼠各项结果

实验终点时,除 D 组 9 只糖耐量试验达到糖尿病标准外,其余组葡萄糖耐量试验异常及意外死亡者均被剔除实验,成模率约为 90%。正常雄性大鼠血浆睾酮水平为 12.16nmol/L ± 3.75nmol/L,雌性为 1.05nmol/L ± 0.23nmol/L,提示大鼠进入青春发育期。

2.1.1 葡萄糖耐量试验结果 A、C 两组证实 STZ 对大鼠葡萄糖耐量没有明显影响。B 组较 A 组餐后血糖显著升高,仍低于 D 组。D 组无论空腹血糖还是餐后血糖均显著高于其它各组。E 组 60min 血糖较 A 组趋于上升,而 F 组餐后血糖较 E 组有明显升高(见表 1)。

2.1.2 各组大鼠生化指标的比较 见表 2。

表 1 各组葡萄糖耐量试验结果

	各时相血糖值(mmol/L)			
	0min	30min	60min	120min
正常雄性组(A)	4.61 ±0.57	6.94 ±0.89	5.23 ±0.94	4.53 ±0.87
高脂雄性组(B)	4.98 ±0.76	9.38 ±1.44*	7.38 ±1.67*	6.52 ±1.56*
正常 + STZ 组(C)	4.95 ±0.79	6.90 ±0.96	5.16 ±0.91	4.67 ±0.91
高脂 + STZ 组(D)	8.03 ±2.67*☆	14.80 ±3.33*☆	14.80 ±2.77*☆	14.52 ±3.74*☆
成年正常雄性组(E)	5.48 ±0.83	7.25 ±1.49	7.21 ±2.21*	4.79 ±0.81
成年高脂雄性组(F)	5.77 ±1.14	10.62 ±3.07*△	9.17 ±2.55*△	7.04 ±1.96*△

注:检验区间 $P < 0.05$,* 与 A 组比较;☆与 G 组比较;△与 E 组比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 青春期大鼠胰腺形态学观察

光镜下可见,与周围胰腺实质比较,胰岛着色较浅。胰岛为椭圆形、圆形细胞团,各组大鼠均未见出血、坏死和淋巴细胞浸润。A、C 组大鼠胰岛形态规则、完整(图 1、3);B、D 组胰岛形态肥大,边界欠清楚,间质轻度充血,胰岛细胞增生,少量胰岛细胞空泡变性(图 2、4)。可见,高脂饮食使胰岛 β 细胞增生肥大,加小剂量 STZ 虽然使间质较单纯高脂饮食组充血明显,但并未对胰岛 β 细胞造成炎性损伤。

表 2 各组大鼠生化指标的比较

指标	正常雄性组(A)	高脂雄性组(B)	正常+STZ 组(C)	高脂+STZ 组(D)	成年正常组(E)	成年高脂组(F)
例数(n)	9	7	8	9	9	8
W(g)	171.8±20.16	193.9±29.39※	223.6±22.20※	285.8±44.59※#△	312.5±66.4※	429.2±50.03※#☆
平均动脉压(mmHg)注	112.23±7.83	126.35±9.91※	112.04±8.17	127.52±9.28※△	115.50±10.42	130.25±11.59※☆
FPG(mmol/L)	4.61±0.57	4.98±0.76	4.95±0.79	8.03±2.67※#△	4.89±0.55	5.73±1.02
FINS(mU/L)	19.91±7.99	40.69±16.37※	20.07±6.32	22.83±8.18#	17.35±8.42	38.94±13.71※☆
ISI	-4.38±0.59	-5.18±0.57※	-4.68±0.40	-5.35±0.46※△	-4.62±0.46	-5.41±0.49※☆
T(nmol/L)	12.16±3.75	7.08±3.22※	13.67±4.42	7.96±3.58※△	13.01±3.91	6.82±2.25※☆
TC(mmol/L)	1.82±0.19	2.04±0.35	1.78±0.38	1.98±0.24	1.70±0.21	2.67±0.12※#☆
TG(mmol/L)	0.63±0.35	1.01±0.38※	0.79±0.32	1.47±0.24※#△	0.86±0.70	1.77±0.53※#☆
HDL-c(mmol/L)	0.67±0.20	0.51±0.22	0.62±0.24	0.49±0.21	0.62±0.27	0.41±0.23※☆
LDL-c(mmol/L)	0.99±0.38	1.38±0.35※	1.08±0.49	1.37±0.45※	1.13±0.19	1.74±1.14※☆
GIR_{60-120}(mg/kg/min)	30.09±4.22	13.68±3.21※	28.01±5.42	9.67±2.89※#△	—	—

注:检验区间 $P<0.05$,※与 A 组比较;#与 B 组比较,△与 C 组比较,☆与 E 组比较,每组测血压例数为 6 只。



图 1 胰腺组织形态学观察显示,常规饮食喂养青春期雄性大鼠胰岛边界清楚,形态完整、规则(HE 染色×400) 正常雄性组胰腺病理



图 2 胰腺组织形态学观察显示,高脂饮食喂养青春期雄性大鼠胰岛有增生和肥大,边界欠清楚,部分胰岛细胞胞浆内有空泡变性,胰岛间质轻度充血(HE 染色×400) 高脂雄性组胰腺病理



图 3 胰腺组织形态学观察显示,常规饮食喂养加用 STZ 后青春期雄性大鼠胰岛边界清楚,形态完整、规则(HE 染色×400) 正常雄性+STZ 组胰腺病理

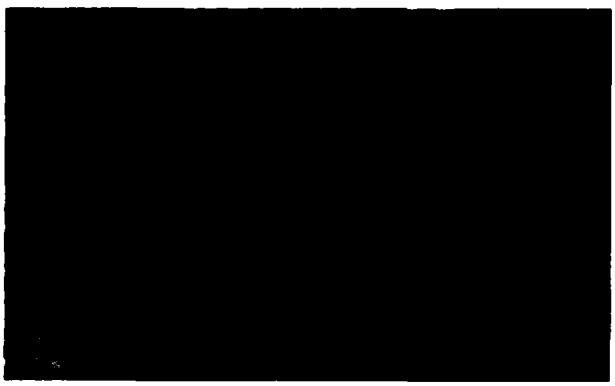


图 4 胰腺组织形态学观察显示,高脂饮食喂养加用STZ后,青春期雄性大鼠胰岛有增生和肥大,边界欠清楚,部分胰岛细胞胞浆内有空泡变性,胰岛间质轻度充血(HE 染色×400) 高脂雄性+STZ 组胰腺病理

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 相关分析

直线相关分析发现，所有大鼠体重、FINS、TG与GIR_{60-120}呈负相关($r=-0.43$, -0.59, -0.33)；雄性大鼠 T 与 GIR_{60-120}则呈正相关($r=0.51$)。GIR_{60-120}与 ISI 的相关性良好($r=0.77$)。

3 讨 论

选用 21 天断乳的雄性 Wistar 大鼠，喂养 4 周时鼠龄为 7 周龄，此为青春期大鼠，其睾酮水平也证实进入青春期。如喂养 8 周鼠龄为 11 周龄，此为成年大鼠[7]。本实验采用高脂饮食饲养 4 周时经钳夹试验证实，大鼠出现明显的胰岛素抵抗，是由高脂饮食诱导的可靠的青春期胰岛素抵抗动物模型，与人类的胰岛素抵抗较接近；再通过注射小剂量 STZ，诱导出中等程度的血糖升高(大剂量的 STZ 严重破坏 β 细胞，导致重度血糖升高，常常≥20mmol/L)。此过程模拟了临床青少年肥胖型 2 型糖尿病的发病过程。病理结果显示，高脂饮食可导致胰岛增生肥大，这可能是胰岛针对外周组织胰岛素抵抗的代偿机制之一。小剂量 STZ 虽然可能导致部分胰岛的破坏，但不足以引起血糖升高，只有 40% 的胰岛遭到损伤，才会导致高血糖症[8]，与青春期胰岛素抵抗大鼠比较，青春期 2 型糖尿病大鼠除了空腹血糖和餐后血糖均明显升高外，空腹胰岛素水平虽然较胰岛素抵抗大鼠明显降低，相对外周组织胰岛素抵抗来说，胰岛分泌功能明显不能代偿。表明青春期胰岛素抵抗大鼠的胰岛分泌功能处于一定程度的代偿状态，一旦 β 细胞功能失代偿，就导致糖尿病的发生。胰岛素抵抗是 2 型糖尿病发生的基础，但并非有胰岛素抵抗必将发生糖尿病。实验初步发现，尽管高脂饮食制备出青春期胰岛素抵抗大鼠模型，但持续高脂饮食直到成年期，大鼠仍然处于胰岛素抵抗状态，并未发展为糖尿病，高脂饮食可能仅为 2 型糖尿病的因素之一。

结果显示，正常雄性大鼠睾酮水平明显高于雌鼠，提示大鼠进入青春期。高脂喂养后青春期雄性大鼠，无论是否注射小剂量 STZ，其血浆睾酮水平明显降低，且与 GTR_{60-120}呈正相关，表明青春期雄性大鼠高脂饮食后，雄激素水平降低，同时出现胰岛素抵抗。有研究报道[9]雄性大鼠阉割后胰岛素敏感性降低。Bjorntorp 等[10]认为，下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)－促肾上腺皮质激素(ACTH)－皮质醇轴活动异常是导致雄性激素降低的原因。睾酮可抑制脂蛋白脂酶的活性，减少脂肪积聚，促进脂解；胰岛素能抑制脂解，并对皮质醇促脂肪合成功能起促进作用。当睾酮水平降低，而胰岛素水平升高时，两类脂肪代谢调节激素功能失调，致使脂肪代谢失衡，造成体脂分布异常，胰岛素抵抗出现。

研究提示从青春期到成年大鼠高脂喂养后，先发生胰岛素抵抗，再出现脂代谢异常，这与 Kraegen 研究结果一致[11]。可能与高脂饮食导致血浆游离脂肪酸水平升高，通过糖脂循环、胰岛素信号转导等多个不同途径抑制糖的储存，降低胰岛素敏感性，导致胰岛素抵抗发生[12]。而胰岛素抵抗又促使血压升高、脂代谢恶化加重。高脂饮食诱导的青春期胰岛素抵抗大鼠、2 型糖尿病大鼠、成年雄性胰岛素抵抗大鼠的血压均明显升高，推测如前所述，高脂肪膳食导致下丘脑－性腺轴功能紊乱，脂代谢异常，血管舒缩功能障碍，引起血压升高。

除了遗传因素外，更多的环境及自身代谢等影响因素使青春期 2 型糖尿病可能具有比成年 2 型糖尿病更为复杂的发生机制，其高度异质性使得对它的研究也更加困难。本研究建立的两种模型具有很多与青少年 2 型糖尿病类似的生化代谢和临床特征，综合了高血糖、高胰岛素血症、高血压及异常血脂等多个致病因素，它将是研究青春期 2 型糖尿病及其并发症的一个理想动物模型，可用于其发病机制及药物干预、药物治疗等方面的研究。

参 考 文 献

[1] Libman I, Arslanian SA. Type Ⅱ diabetes mellitus: no longer just adults [J]. Pediatr Ann, 1999; 28(9): 589－593.

[2] Rowell HA, Evans BJ, Quarry－Horn JL, et al. Type 2 diabetes mellitus in adolescents [J]. Adolesc Med, 2002; 13(1): 1－12.

[3] Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, et al. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth [J]. Diabetes Care, 1999; 22(2): 345－354.

[4] Fagot－Campagna A, Burrows NR, Williamson DF. The public health epidemiology of type 2 diabetes in children and adolescents: a case study of American Indian adolescents in the Southwestern United States [J]. Clin Chim Acta, 1999; 286(1－2): 81－95.

(下转第 201 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

测细胞凋亡的一种敏感性和特异性均较高的方法[6],增殖细胞核抗原(PCNA)则是反映细胞增殖情况的良好指标[7]。实验数据显示,处于增生期的未治疗组血管瘤 VEC 的 PCNA 表达明显高于其他各组,而 TUNEL 阳性率显著低于显效组及正常皮肤组,提示该组血管瘤 VEC 增殖活跃而凋亡水平低下。治疗显效组血管瘤 VEC 的 TUNEL 阳性率显著高于无效组、未治疗组及正常皮肤组,而 PCNA 表达水平低于上述 3 组,显示糖皮质激素注射治疗后,显效组血管瘤 VEC 凋亡水平上升而增殖水平降低,提示糖皮质激素可能诱导显效组血管瘤 VEC 凋亡而抑制其增殖,使 VEC 堆积逐渐减少,从而促使血管瘤消退,至于其诱导 VEC 凋亡的机理,尚有待进一步研究。此外,治疗无效组 TUNEL 阳性率显著低于治疗显效组,而和未治疗组之间无显著性差异;在 VEC 增殖方面,治疗无效组 PCNA 水平显著高于治疗显效组;在 HE 染色中 6 例均以大量增生的毛细血管为主,VEC 增殖活跃。提示对治疗无效组而言,糖皮质激素未能促进其 VEC 凋亡及抑制其增殖,这可能正是该部分血管瘤治疗无效的原因之一。

综上,糖皮质激素可能通过诱导 VEC 凋亡及抑制其增殖而促进血管瘤消退,其具体机制尚待深入研究。

参 考 文 献

[1] 王赞尧,周德凯,王 勇. 糖皮质激素瘤内注射治疗婴幼儿血管瘤[J]. 中华小儿外科杂志,1993;14(3):133 - 135.

[2] Razon MJ, Kraling BM, Mulliken JB, et al. Increased apoptosis coincides with onset of involution in infantile hemangioma[J]. Microcirculation, 1998;5(2 - 3):189 - 202.

[3] Macini AJ, Smoller BR. Proliferation and apoptosis within juvenile capillary hemangioma[J]. Am J Dermatopathol, 1996;18:505 - 507.

[4] 沈 青,陈星琪. 糖皮质激素调节体细胞凋亡研究进展[J]. 国外医学儿科学分册,1997;24(2):67 - 69.

[5] 程尉新,金丽娟. 细胞凋亡与坏死的鉴别及研究方法进展[J]. 细胞生物学杂志,1998;20(2):58 - 63.

[6] 仉红刚. 细胞凋亡 DNA 检测技术概况[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,1997;18(1):12 - 14.

[7] 林晓曦,王 炜,钱文牛等. 增殖细胞核抗原在血管瘤及血管畸形组织中的表达[J]. 中华整形烧伤外科杂志,1998;14(1):19 - 20.

(上接第 150 页)

[5] Pinhas - Hamiel O, Standiford D, Hamiel D, et al. The type 2 family: a setting for development and treatment of adolescent type 2 diabetes mellitus [J]. Arch Pediatr Adolesc Med, 1999;153(10):1063 - 1067.

[6] Niwa H, Harrison LC, DeAizpurua HJ, et al. Identification of pancreatic beta cell - related genes by representational difference analysis [J]. Endocrinology, 1997;138(4):1419 - 1426.

[7] 何新桥,金玫蕾. 实验动物饲养与管理[M]. 科学出版社,1998;66 - 71.

[8] Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, et al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response [J]. J Clin Invest, 1969;48(11):2129 - 2139.

[9] Holmang A, Bjorntorp P. The effects of testosterone on insulin sensitivity in male rats [J]. Acta Physiol Scand, 1992;146(4):505 - 510.

[10] Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution [J]. Diabetes Care, 1991;14(12):1132 - 1143.

[11] Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, et al. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high - fat - fed rats [J]. Diabetes, 1991;40(11):1397 - 1403.

[12] Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat - fed, streptozotocin - treated rat [J]. Metabolism, 2000;49(11):1390 - 1394.