维普资讯 http://www.cqvip.com

149-152 (12) R587.1

Wistar大鼠的正常血糖－高血浆胰岛素钳夹技术

临床学院内科 李晨钟* 张素华 舒昌达 任 伟

提 要 为准确地在体内评价Wistar大鼠的胰岛素敏感性，我们建立了大鼠的正常血糖－高血浆胰岛素钳夹技术(简称钳夹技术)，并运用该技术初步探讨了年龄，体重、血浆胰岛素及血脂水平对胰岛素敏感性的影响。结果显示，我们建立的钳夹技术所测定的葡萄糖输注率(GIR)、细胞外液变化量及其它指标均接近或优于文献报道。同时发现，年龄、体重大于Ⅰ组大鼠的Ⅱ组大鼠($P<0.01$)，其GIR、血浆高密度脂蛋白组分2水平显著低于Ⅰ组大鼠($P<0.01$)，而血浆胰岛素及血浆甘油三酯水平显著高于Ⅰ组大鼠($P<0.01$和0.05)。本研究的结果提示：(1)我们建立的钳夹技术较准确、可靠。(2)随着年龄、体重的增大，大鼠的胰岛素敏感性逐渐下降。

关键词 正常血糖；高血浆胰岛素钳夹技术；胰岛素敏感性；胰岛素抵抗；大鼠
中图分类号 R3 18.1

胰岛素抵抗(insulin resistance IR)是一种广泛存在的重要病理生理变化，与多种疾病的发生有密切关系[1]。高血浆胰岛素－正常血糖钳夹技术(Hyperinsulinemic euglycemic clamp technique，简称钳夹技术)[2]是目前公认的唯一能准确评价机体胰岛素敏感性的方法。但这一技术在国内迄今尚未见报道。我们根据文献报道的方法建立了wistar大鼠的钳夹技术，并就肥胖及血浆脂质代谢与机体胰岛素敏感性的关系进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 研究动物

健康成年wistar雄性大鼠16只，由重庆医科大学实验动物中心提供。分为两组，每组8只。Ⅰ组大鼠的年龄为60～90天，体重285～340克。Ⅱ组大鼠的所龄为110～200天，体重380～530克。所有大鼠均自由取食和饮水(饲料由重庆医科大学动物实验中心提供)。暗夜周期为12小时(8AM－8PM)，室温控制在22～28℃。实验前适应性饲养至少7天。具体情况参见表1。

1.2 钳夹技术

1.2.1 插管

所有大鼠均禁食12小时过夜，于次晨8时进行实验。用戊巴比妥钠(进口分装产品)进行腹腔内麻醉(60mg/kg体重)。麻醉显效后，剪开双侧腹股沟皮肤，分离了右股动脉和双侧股静脉。然后进行双侧股静脉和右侧股动脉插管。我们采用美国制造的硅橡胶导管(内径为0.6mm，外径为1mm)，将导管前端均匀用力牵拉，使其变得更细。导管的长度一般在15cm左右，以保证实验过程中移动导管不会干扰大鼠。两侧股静脉导管各接一装有生理盐水的注射器，股动脉导管则接一装有肝素生理盐水(浓度为50U/ml)的注射器，均每10分钟推动一次注射器冲洗导管，以保证导管畅通。同时用肝素系统抗凝(首次75U/kg，以后每小时25U/kg)。大鼠体温应控制在37℃左右，注意保温并随时用肛表监测体温。插管完毕后，将大鼠静置30分钟。

1.2.2 输注

将静置30分钟的插管大鼠股动脉导管所接的注射器取下，接上一1ml的皮试注射器(带针头，并用肝素润湿)，取血约1.5ml。并先取血一滴，用One Touch Ⅱ微型血糖仪(美国Johnson公司产品，可于45秒内测出血糖值)测定基础血糖值(BBG)，余下的用于测定基础血浆胰岛素值(BINS)及血脂及血浆脂蛋白测定。然后将两侧股静脉导管所接的注射器取下，右侧股静脉导管改接一装有胰岛素溶液的30ml注射器。胰岛素为基因工程人胰岛素(美国Lilly公司产品，浓度为40mU/ml，用生理盐水加1%的牛血清白蛋白(BSA)稀释，使用前临时配制)。左侧股静脉导管改接一装有10%葡萄糖溶液(由重庆医科大学临床学院药剂科提供)的30ml注射器。将这两个注射器分别安置在两个微电脑数字式电子微量注射泵(digital electronic Syringe pump，上海电子仪器厂产品)上，开始持续输注。先进行持续胰岛素输注，速度为1.67mU.Kg^{-1}.min^{-1}，根据各自的体重换算出具体的值。5分钟后，从股动脉取血一滴(约50μl，如果在此前刚用肝素溶液冲洗过，则弃掉第一滴血)，用血糖仪测定血糖值。如果测出的血糖值超出基础值±0.5mmol/l的范围，即可开始葡萄糖输注，葡萄糖输注速度(葡萄糖输注率 glucose infusion rate GIR)一般从4～6mg.Kg^{-1}.min^{-1}开始。如果血糖值仍在上述范围内，则5分钟后再测血糖，直到超出上述范围可进行葡萄糖输注

* 男，1971－01出生，博士研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

为止。开始葡萄糖输注后仍旧每5分钟测一次血糖，并根据血糖值在最短的时间内调节葡萄糖输注率，使血糖恢复到基础值±0.5mmol。如此反复进行。当连续三次血糖值均在上述范围内(此时即达到的稳定状态，即所谓的"钳夹形成"时，再用皮试注射器取血1ml/kg用于血浆胰岛素(此时的血浆胰岛素即稳态血浆胰岛素，SINS)测定。继续上述过程，直到120分钟时(从开始胰岛素输注计)为止。共采血测定血糖24次。

1.2.3 指标测定和计算

血浆胰岛素采用双抗体放射免疫分析法测定(由上海生物制品中心提供试剂盒)。由于该方法的测定范围为0～160mU/L，故在测定时，应将血清稀释以保证测定准确。

血浆总胆固醇(TC)、甘油三脂(TC)、高密度脂蛋白(HDL)及其组分(HDL_2和HDL_3)采用液相酶学方法测定(由东瓯生物技术公司提供试剂盒)，并按公式计算LDL值，即LDL=TC－TG/2.2－HDL。

60分钟到120分钟的GIR($GIR_{60\sim120}$)计算：将实验的第60分钟到第120分钟的13个GIR值求平均值，即为$GIR_{60\sim120}$，单位同GIR。

60分钟到120分钟的血糖值($BG_{60\sim120}$)计算：将实验的第60分钟到第120分钟的13个血糖值求平均值，即为$BG_{60\sim120}$，单位为mmol/L。

胰岛素敏感性指数(ISI)计算：ISI为BBG与BINS乘积的倒数。因该指标呈偏态分布，故取自然对数，即－Ln(BBG×BINS)[2]。

以上三个指标反映大鼠的胰岛素敏感性。

血糖变异系数(CV_{BG})计算：先求出各鼠的24次血糖值的均数($\bar{x}$)和标准差(s)，再按X/SD计算变异系数，单位为(%)，合并两组大鼠计算的CV_{BG}为平均CV_{BG}。该指标反映钳夹技术的准确性。

$GIR_{60\sim120}$变异系数(CV_{GIR})计算：先求出各组大鼠$GIR_{60\sim120}$的均数和标准差，再按$\bar{x}/s$计算变异系数，单位为(%)，合并两组大鼠计算的CV_{GIR}为平均CV_{GIR}。

批间估计标准差(the estimated standard deviation S_{BST})计算：从Ⅰ组和Ⅱ组大鼠中，各随机选取4只大鼠，在首次钳夹技术进行2天后，重复进行该技术，方法与首次完全相同，并按公式：$S_{BST}=(\Sigma d^2/2n)^{1/2}$计算$S_{BST}$，单位为mg·$Kg^{-1}$。d为前后两次钳夹技术的$GIR_{60\sim120}$之差，n为进行重复试验的大鼠数。

以上两个指标反映钳夹技术的可靠性。

1.2.4 统计学处理

所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示，采用双侧Student t检验，相关分析采用直线相关分析，检验标准α定为0.05。

2 结果

2.1 各鼠的年龄、体重以及其他各项指标参看表1。

由表1可见，Ⅱ组大鼠的$GIR_{60\sim120}$显著低于Ⅰ组大鼠，而年龄、体重及BINS则显著大于Ⅰ组大鼠。但两组大鼠的ISI、BBG、SINS、$BG_{60\sim120}$、CV_{BG}均无显著性差异。此外，两组大鼠的稳态时间均在60～80分钟范围内，二者的平均稳态时间无显著性差异。由表1还可见，Ⅱ组大鼠的TG和HDL_2分别高于和低于Ⅰ组大鼠，但TC、LDL、HDL及HDL_3则无显著性差异。

2.2 钳夹技术的评价指标

表1 Wistar大鼠的正常血糖钳夹技术

	Ⅰ组大鼠	Ⅱ组大鼠
例数	8	8
年龄	75.87±10.60	154.00±25.75**
体重	314.38±33.85	446.88±54.44**
平均稳态时间	65.50±6.20	68.20±6.85
BBG	4.22±0.50	4.01±0.48
$BG_{60\sim120}$	4.19±0.39	3.99±0.45
CV_{BG}	5.80±0.42	6.25±0.49
BINS	14.04±1.66	15.98±1.87*
SINS	46.63±5.66	44.13±7.64
$GIR_{60\sim120}$	10.98±1.02	7.43±1.53**
ISI	－4.19±0.21	－4.01±0.18
TG	1.20±0.36	1.66±0.29**
TC	4.32±0.55	4.44±0.68
HDLc	1.63±0.37	1.49±0.44
HDL_2	0.97±0.32	0.72±0.28
HDL_3	0.66±0.21	0.77±0.24
LDL	2.23±0.71	2.20±0.93

注：*$P<0.05$ **$P<0.01$。年龄(天)，体重(克)，血糖(mmol/L)，血浆胰岛素(mU/L)，变异系数(%)，GIR(mg.kg^{-1}.min^{-1})，ISI为自然对数值，TG，TC，HDL－c，HDL_2，HDL_3及LDL的单位均为mmol/L。

将两组大鼠($n=16$)合并后，计算出该钳夹技术的平均CV_{BG}和平均CV_{GIR}分别为6.025%和

维普资讯 http://www.cqvip.com

15.051%，其中，Ⅰ组和Ⅱ组大鼠的CV_{GIR}分别为15.25%和14.78%。此外，测得该钳夹技术S_{ens}为0.78mg.Kg^{-1}.min^{-1}，平均d值为0.138±0.017mg.Kg^{-1}.min^{-1}。

2.3 相关分析

合并两组大鼠(n=16)进行GIR与其它各项指标的相关分析，结果显示，GIR与年龄、体重、TG及BINS呈显著负相关(r值分别为−0.56，−0.60，−0.75，P值均小于0.05)而与ISI及HDL_2呈显著正相关(r值分别为0.69，0.56，P值分别小于0.01和0.05)。GIR与BBG、$GIR_{60\sim120}$、CV_{BG}、SINS、TC、LDL、HDL及HDL_3无相关性(r值分别为0.17，0.06，0.09，−0.37，−0.29，−0.38，0.47，0.22，P值均大于0.05)。

3 讨 论

IR是指全身性胰岛素感受性下降的一种状态，因此，正常浓度的胰岛素不能正常发挥胰岛素的相应效应[1]。研究标明，IR不仅与肥胖症、非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM)高血压、动脉粥样硬化性心血管疾病以及脂质代谢异常等的发生有非常密切的关系[1,4]，而且存在于妊娠、肿瘤、感染、应激等多种生理或病理状态[5,6]。判断机体有无IR，必须准确地测定胰岛素敏感性。目前已有多种评价胰岛素敏感性的指标，如空复血浆胰岛素(FINS)，FINS的倒数，空腹血糖(FBG)，FINS与FBG乘积的倒数以及口服葡萄糖耐量试验(OGTT)葡萄糖、胰岛素曲线下面积比(SGI)[7]等等。但得到公认的仅有DeFronzo于1979年建立的高血浆胰岛素－正常血糖钳夹技术[1]。多项研究标明，该技术可准确、可靠地在体内评价人体的胰岛素敏感性。1983年Kragen等人[8]又在此基础上建立了大鼠的钳夹技术，该技术已成为判断IR动物模型是否复制成功的黄金标准。

本研究的结果再次证明，正常Wistar大鼠在进行持续胰岛素输注时，通过不断调节GIR，是可以将血糖保持在相对稳定的状态(在基础值±0.5 mmol/L范围内变化)的。此外，本组资料的GIR在7～10mg.Kg^{-1}.min^{-1}范围内，稳态形成时间为60～80分钟，平均CV_{BG}为6.025%，平均CV_{BG}为15.051%左右，Sest为0.78mg.Kg^{-1}.min^{-1}，平均d值为0.138±0.017mg.Kg^{-1}.min^{-1}，均接近或优于文献报道[8]。这提示我们建立的钳夹技术较为可靠、准确、稳定。

在我们建立的钳夹技术中，每只大鼠共采血24次用于血糖测定，约失血1.8ml(包括肝素冲洗后弃掉的一滴)，加上测定BINS及血脂的血样，每只大鼠总失血量为3.5ml左右。而两小时的输液量约为5.5～6ml(胰岛素溶液的输液量约2.5ml，葡萄糖溶液的输液量约为2.5～3.5ml)，因此整个实验中，大鼠的净输入液体量仅为2～2.5ml，细胞外液量的改变仅2～3%左右，低于人体钳夹实验和某些文献报道的细胞外液改变量(1，8)。本组资料显示，年龄较大，体重较重的Ⅱ组大鼠的GIR小于Ⅰ组大鼠，表明前者的胰岛素刺激的葡萄摄取率低于后者。相关分析还表明，GIR与年龄、体重呈显著负相关。这一结果提示，随着年龄，体重的增加，大鼠的胰岛素敏感性逐渐下降，与在人体的研究结果以及其他作者的类似报道相一致[9,10]。本组资料还发现，Ⅱ组大鼠的TG和HDL_2分别显著高于和低于Ⅰ组大鼠，并分别与GIR呈显著负相关和正相关，这提示，胰岛素敏感性的下降可能会导致胰岛素刺激的脂质代谢障碍，并以TG和HKL_2的变化最早、最明显。这与NIDDM、原发性高血压等疾病的血脂变化情况相符(目前认为IR是这些疾病的重要发病机理)[11]。本组资料同时发现，Ⅱ组大鼠的BINS(即FINS)显著高于Ⅰ组大鼠，并发现BINS与GIR有显著负相关，这与在人体的研究结果以及NIDDM等IR相关疾病中的发现相一致，提示高胰岛素血症可以反映机体的胰岛素敏感性下降，FINS作为胰岛素敏感性指标有一定的依据[12,13]。

ISI是目前运用较广的胰岛素敏感性指标之一，但对其可靠性仍有较大争议[8]。本研究发现，ISI与GIR有极显著的相关性(r=0.69)，远高于FINS与GIR的相关性，但在Ⅱ组大鼠的GIR已经显著低于Ⅰ组大鼠时，二者的ISI却无显著性差异。提示该指标反映机体的胰岛素敏感性的可靠性较好，但灵敏度不够高，尚不及FINS。

本研究建立的钳夹技术是通过测定GIR来总

维普资讯 http://www.cqvip.com

体反映机体的胰岛素敏感性。如果要了解骨骼肌、肝脏等胰岛素靶组织的胰岛素敏感性，则需采用测定葡萄糖代谢率(GDR)、肝脏葡萄糖输出量(HGO)等指标的钳夹技术[14]。由于操作过程繁琐、实验时间长以及需要特殊的仪器等原因，这两种钳夹技术目前开展均较少。但随着IR研究的不断深入，这类钳夹技术的使用将会日趋广泛。

参 考 文 献

1.Reaven GW. Diabetes,1988;37:1596
2.Defronzo RA, et al. Am J Physiol,1979;237:E214
3.李光伟，等.中华内科杂志，1993;32.656.
4.Foster DW. N Engl JMed, 1989;320:733
5.川上正舒，早日邦康.内科，1996;78:709.
6.Garvey WT. Diabetes,1993;42:1773
7.石田俊彦，他.内科，1996;78:616.
8.Kragen EW, et al.Am J Physiol.1983;245.E1.
9.DeFronzo RA. Diabetes,1979;28:1095.
10.Kahn RC. Nature,1995;373:384.
11.Howard BV.J Lip Res.1987;28:613.
12.Elbein SC, et al. Diabetes,1991;40:1024.
13.Kahn SE.Diabetes,1993;42:1663.
14.Rao RH. Am J Physiol,1992;262:R1033.

(收稿日期 1997－09－08)

Euglycemic－hyperinsulinemia clamp technique in the wistar rats

Li Chengzhong, et al

Department of Internal Medicine, College of Clinical medicine

To assess in vivo insuin sensitivity of Wistar rats, we developed the euglycemic－hyperinsulinemic clamp(EC)technique and investigated the effect of age, weight, plasma insulin and plasma lipid level on insulin sensitivity with EC technique. The results showed that glucose infusion rate (GIR), the expansion of extra－cellular fluid and other indices of the rats determined by EC technique were similar to those of the references. Moreover,in rats groupⅡ who were older of heavier than rats groupⅠ ($P<0.01$), GIR, plasma high density lipoprotein subclass 2(HDL_2) were lower than those in rats groupⅠ ($P<0.01$), and plasma insulin, plasma triglycerides level were higher than those in rats groupⅠ ($P<0.05$, 0.01, respectively). The study suggests that the EC technique which we developed is relatively reliable and accurate. Besides, insulin sensitivity in Wistar rats declines with age and weight.

KEY WORDS Euglycemic－hyperinsulinemic technique; Insulin sensitivity; Insulin resistance; Rats