

吡格列酮对自发性 IGT-OLETF 大鼠胰岛素抵抗的改善作用

丁世英, 申竹芳*, 陈跃腾, 谢明智

(中国医学科学院, 中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 研究胰岛素增敏剂吡格列酮(pioglitazone)对自发性 IGT-OLETF 大鼠胰岛素抵抗的改善作用。方法 血糖测定采用葡糖氧化酶法, 胰岛素测定采用放射免疫法, 游离脂肪酸(FFA)采用铜试剂显色法。结果 IGT-OLETF 大鼠具有明显糖耐量、胰岛素耐量异常, 脂代谢紊乱, 胰岛素敏感指数显著降低等特征。吡格列酮可明显提高 IGT-OLETF 大鼠对外源性胰岛素的反应性, 改善其高胰岛素血症, 降低血甘油三酯(TG)、FFA 水平, 降低肝脂含量及骨骼肌 TG 含量, 使胰岛素敏感指数基本恢复正常。结论 吡格列酮可明显改善 IGT-OLETF 大鼠的胰岛素抵抗。

关键词: 胰岛素抵抗; 胰岛素增敏剂; 吡格列酮

中图分类号: R965; R977.15 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)07-0514-04

Ameliorations of pioglitazone on insulin resistance in spontaneous IGT-OLETF rats

DING Shi-ying, SHEN Zhu-fang*, CHEN Yue-teng, XIE Ming-zhi

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: **Aim** To investigate the ameliorations of pioglitazone, a member of the thiazolidinedione group of antidiabetic agents, on insulin resistance in spontaneous OLETF rats with impaired glucose tolerance (IGT-OLETF). **Methods** One group of IGT-OLETF rats was orally administered pioglitazone at the dose of 20 mg·kg⁻¹ (qd) for 2 weeks. Another group was given the same volume of solvent as control. Glucose tolerance and insulin tolerance were tested, and blood glucose concentrations, insulin levels and lipids in serum, liver and muscle were determined. Insulin sensitive index (ISI) was calculated by the reciprocal of fasting blood glucose times fasting insulin. **Results** Pioglitazone was shown to markedly enhance the glyceimic response to exogenous insulin (0.4 u·kg⁻¹, sc) in the model. The falls of blood glucose at 40 and 90 min in the insulin tolerance test were augmented by 70% and 158% in the treated group than the control. The serum insulin levels were significantly decreased and the ISI nearly normalized after treatment. Pioglitazone also lowered the serum TG and FFA levels and the lipids in liver and muscle. No effect was found on the expression of leptin in epididymal adipose tissues and on the activity of GFAT, a key enzyme in hexosamine biosynthesis pathway (data were not shown). **Conclusion** Pioglitazone can improve the insulin resistance state in IGT-OLETF rats. Correction of lipid disorder may be associated with it.

Key words: insulin resistance; insulin sensitizer; pioglitazone

OLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)大鼠

是1982年日本大冢公司从加拿大购进 Long-Evans 大鼠进行远交系杂交,选择体重大于400g的♂子代与体重大致正常的910周龄♀子代交配,经过20代的传代筛选,于1984年成功建立的一种自发性2

收稿日期: 2003-07-23

* 通讯作者 Tel / Fax: 86-10-83172669,

E-mail: shenzhf@imm.ac.cn

型糖尿病大鼠品系^[1]。该模型早期以胰岛素抵抗以及脂质代谢紊乱为主,之后随着病程发展,逐渐出现胰岛功能减退,合并糖尿病慢性病变^[2],其不同阶段的病理生理变化,与临床 2 型糖尿病患者的病理表现极为相似。本文选用糖耐量异常(impaired glucose tolerance, IGT) OLETF 大鼠模型,旨在研究胰岛素增敏剂吡格列酮对胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)的改善作用。

材料和方法

动物 OLETF 大鼠, ♂, 购自日本大冢制药(株)德岛研究所。Wistar 大鼠购于中国医学科学院动物研究所,均饲养于清洁级动物房。

药品与试剂 吡格列酮(pioglitazone)由中国医学科学院药物研究所黄海虹副教授提供,胰岛素注射剂为美国 Lilly 公司产品。胰岛素含量测定试剂盒购自中国科学院原子能研究所。甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)等试剂盒均购自北京中生高科技技术公司。其他试剂均为进口或国产分析纯。

仪器 μ Quant 酶标仪(美国 BIO-TEK 公司), T25 型组织匀浆器(德国 JANKE-KUNKEL), SCT4BE 离心机(日本 HITACHI), 752Z 光栅分光光度计。

实验分组 根据糖耐量预测试验结果,选出糖耐量异常但空腹血糖仍在正常范围的 OLETF 大鼠,即 IGF OLETF 大鼠,按空腹血糖及体重分为两组,其中一组 ig 吡格列酮 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次,连续给药;一组以等体积水 ig 作为 IGF OLETF 模型组。另设一正常组。

生化测定 血糖测定采用葡糖氧化酶法,血胰岛素测定采用放射免疫法,游离脂肪酸(FFA)采用铜试剂显色法,其他指标均按试剂盒说明测定。

统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行组间均数比较。

结果

1 吡格列酮对 IGF OLETF 大鼠葡萄糖耐量、胰岛素耐量的影响

IGF OLETF 大鼠用吡格列酮治疗 d 7 和 d 10, 禁食 4 h 后,分别进行葡萄糖耐量(葡萄糖 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, *po*)和胰岛素耐量(胰岛素 $0.4 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$, *sc*)试验。于不同间隔时间尾尖采血,测定血糖含量。表 1 显示,IGF OLETF 同正常大鼠相比,糖耐量明显异常;用吡格列酮治疗后糖耐量异常有改善趋势,但无统计学差异。表 2 显示,IGF OLETF 大鼠注射胰岛素后 40 min 血糖下降百分率显著小于正常大鼠($P < 0.01$);吡格列酮治疗后,各时间点血糖下降明显,提示药物改善了机体对胰岛素的反应性。

2 吡格列酮对 IGF OLETF 大鼠胰岛素敏感指数的改善作用

IGF OLETF 大鼠空腹血糖及血胰岛素水平均高于正常动物,胰岛素敏感指数(insulin sensitive index, ISI)明显低于正常动物,表明该模型具有明显的胰岛素抗性。而用吡格列酮治疗 2 周后,空腹血糖虽未见明显降低,但血胰岛素含量显著减少,ISI 基本恢复正常(表 3),提示药物对胰岛素抵抗有明显改善。

Table 1 Effect of pioglitazone (Pio) on glucose tolerance in IGF OLETF rats

Group	Blood glucose/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$			AUC/ $\text{mmol} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$
	0 min	30 min	120 min	
Normal	$5.1 \pm 0.7^{**}$	$7.6 \pm 0.6^{***}$	$5.3 \pm 0.6^*$	$770 \pm 56^{***}$
IGF OLETF	6.6 ± 0.6	12.1 ± 1.3	6.7 ± 1.3	1123 ± 139
IGF OLETF + Pio	6.6 ± 0.8	10.2 ± 1.9	6.1 ± 0.8	986 ± 132

Pioglitazone was administered orally at the dose of $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (qd) for 7 days. $n = 6 - 8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs IGF OLETF group. AUC presents the area under the curve

Table 2 Effect of pioglitazone on insulin tolerance in IGF OLETF rats

Group	Blood glucose/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$			Blood glucose decrease at 40 min / %
	0 min	40 min	90 min	
Normal	5.0 ± 0.6	$2.7 \pm 0.3^{***}$	3.6 ± 1.2	$46 \pm 6^{**}$
IGF OLETF	5.6 ± 0.4	4.1 ± 0.7	4.2 ± 0.8	27 ± 11
IGF OLETF + Pio	$4.8 \pm 0.4^*$	$2.6 \pm 0.4^{**}$	$1.7 \pm 0.3^{***}$	$46 \pm 11^*$

Pioglitazone was given orally at the dose of $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (qd) for 10 days. $n = 6 - 8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs IGF OLETF group

Table 3 Effect of pioglitazone on fasting blood glucose (FBG), insulin and insulin sensitive index (ISI) in IGT OLETF rats

Group	FBG/ mmol·L ⁻¹	Insulin/ μu·L ⁻¹	ISI(× 10 ³)
Normal	3.7 ± 0.4***	34 ± 8*	7.9 ± 0.6**
IGT OLETF	5.7 ± 1.1	47 ± 14	3.7 ± 0.7
IGT OLETF + Pio	5.0 ± 0.6	28 ± 9*	7.0 ± 2.2*

Pioglitazone was administered orally at the dose of 20 mg·kg⁻¹ (qd) for 2 weeks. n = 6 - 8, $\bar{x} \pm s$. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs IGT OLETF group. ISI = 1/ FBG × insulin

3 IGT OLETF 大鼠吡格列酮治疗后脂质代谢变化

IGT OLETF 大鼠用吡格列酮治疗 2 周后断头处死,测定血清、肝脏、红色股四头肌中脂质代谢相关指标的含量变化。结果显示(表 4),IGT OLETF 大鼠血清中 TC, TG, FFA, HDL-C 及 LDL-C, 肝组织中 TG, TC, FFA 和肌肉组织中 TG 均明显高于正常动物,呈明显的脂质代谢紊乱。吡格列酮治疗后可使血清 TG 以及 FFA 水平明显下降,肝脏以及骨骼肌中的脂质成分基本恢复至正常水平。提示吡格列酮可能通过对脂质代谢的改善,增强机体对胰岛素敏感性。

讨论

本文选用的 OLETF 大鼠虽已超过 40 周龄,仅有部分空腹血糖明显升高,多数 OLETF 大鼠的空腹血糖仍处于正常范围,这与 30 周龄时 90% 以上的

OLETF 出现明显高血糖的文献^[1]报道相差较大,其原因可能与动物的个体差异和环境变化有关。IGT OLETF 大鼠是处于早期发病阶段,类似人类 2 型糖尿病发病初期,也是研究胰岛素增敏剂的一个较理想的动物模型。

吡格列酮属于噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,其药理作用研究涉及的糖尿病和胰岛素抵抗动物模型很多,如 Wistar 肥胖大鼠 fa/fa Zucker 大鼠、KKA^y 小鼠和 MSG 肥胖大鼠^[3]等。用 IGT OLETF 大鼠评价其胰岛素增敏作用尚未见报道。本研究结果显示,IGT OLETF 大鼠经吡格列酮 20 mg·kg⁻¹ (qd) 治疗后,对外源性胰岛素的反应性明显增强,胰岛素耐量实验 40 和 90 min 时,血糖下降幅度分别比对照组增加了 70% 和 158% (P < 0.05, P < 0.01)。空腹胰岛素水平比对照组减少了 39.6% (P < 0.05), ISI 升高了 89% (P < 0.05)。说明吡格列酮明显改善 IGT OLETF 大鼠的胰岛素抵抗状态。本实验室曾对评价胰岛素抵抗的血糖钳夹技术指标 GIR(葡萄糖输注速率)与 ISI 进行了相关性分析,两者呈显著正相关^[4]。

严重的脂质代谢异常是 IR 和糖尿病发生发展的主要因素。本研究发现,IGT OLETF 大鼠内脏脂肪蓄积明显,血 TG, TC, FFA 及 LDL-C 水平均明显高于正常动物,肝脏以及骨骼肌中 TG, TC, FFA 含量也明显增加。吡格列酮治疗可明显降低血 TG 及

Table 4 Changes of lipid metabolism in IGT OLETF rats given pioglitazone orally for 2 weeks

Parameter	Normal	IGT OLETF	IGT OLETF + Pio
Serum			
TG/ mg·dL ⁻¹	69 ± 18**	147 ± 56	60 ± 13**
FFA/ mmol·L ⁻¹	1.0 ± 0.2*	1.3 ± 0.2	0.9 ± 0.2**
TC/ mg·dL ⁻¹	50 ± 5***	112 ± 26	92 ± 22
HDL-C/ mg·dL ⁻¹	15.3 ± 1.6***	26 ± 6	21 ± 5
LDL-C/ mg·dL ⁻¹	23.5 ± 2.5**	44 ± 11	40 ± 11
TC/ HDL-C	3.3 ± 0.3**	4.4 ± 0.8	4.4 ± 0.5
Liver			
TG/ mg·g ⁻¹ (tissue)	14 ± 3***	54 ± 10	17 ± 7***
FFA/ μmol·g ⁻¹ (tissue)	60 ± 14*	76 ± 11	53 ± 8**
TC/ mg·g ⁻¹ (tissue)	3.7 ± 0.3***	5.0 ± 0.4	3.7 ± 0.5***
Muscle			
TG/ mg·g ⁻¹ (tissue)	1.3 ± 0.5***	2.5 ± 0.4	1.6 ± 0.3**

n = 6 - 8, $\bar{x} \pm s$. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs IGT OLETF group

FFA 水平($P < 0.01$),减少肝脂(TG, FFA, TC)、肌脂(TG)含量,但对血 TC, LDL-C, HDL-C 无影响。提示 TG 以及 FFA 可能是脂代谢异常引起 IR 发生发展的主要因素。尤其是血 FFA 水平,无论流行病学的调查还是体内外实验研究均证实,它是联系肥胖、IR 以及 2 型糖尿病的重要因素。IR 存在时,在血胰岛素正常或增高的情况下,高血 FFA 可以看作是脂肪组织 IR 后大量分解的后果,而高 FFA 又可以通过葡萄糖-脂肪酸循环干扰肌肉对胰岛素的敏感性^[5]。有研究认为,噻唑烷二酮类调节糖代谢,改善高胰岛素血症,减少肝糖输出和增加肌肉组织胰岛素介导的葡萄糖摄取可能都是该药降低 FFA 的结果^[6]。

有文献^[7,8]报道,主要由白色脂肪组织分泌的瘦素(leptin)含量增加和己糖胺生物合成途径的活跃与 IR 形成有密切关系。作者以免疫组化方法研究了 leptin 在附睾脂肪组织中的表达(结果未列出),发现 IGF-OLETF 大鼠脂肪组织 leptin 含量明显增加,吡格列酮对此无影响。用本实验室建立的谷氨酸脱氢酶(GDH)法,发现 IGF-OLETF 大鼠肝脏己糖胺生物合成途径限速酶 GFAT(glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase)活性与正常动物无差异,吡格列酮也不影响 GFAT 活性(结果未列出)。总之,影响 IR 形成的因素非常复杂,何者是原发,何者是继发,各因素之间如何联系,均是有待进一步深入研究的问题。

References :

- [1] Ishida K, Mizuno A, Min Z, *et al.* Which is the primary etiologic event in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus, insulin resistance, or impaired insulin secretion? [J]. *Metabolism*, 1995, **44**(7) :940 - 945 .
- [2] Man ZW, Zhu M, Noma Y, *et al.* Impaired β -cell function and fat droplets in pancreas as a consequence of hypertriglyceridemia in OLETF rats, a model of spontaneous noninsulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) [J]. *Diabetes*, 1997, **46**(11) :1718 - 1724 .
- [3] Ding SY, Shen ZF, Xie MZ. Preliminary study of insulin resistance induced by neonatal monosodium glutamate treatment in normal Wistar rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, **17**(2) :181 - 185 .
- [4] Ding SY, Shen ZF, Chen YT, *et al.* Evaluation on two insulin resistance rat models by euglycemic clamp technique [J]. *Chin J Diabetes* (中国糖尿病杂志), 2001, **9**(5) :286 - 289 .
- [5] Amery CM, Natrass M. Fatty acids and insulin secretion [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2000, **2**(4) :213 - 221 .
- [6] Oakes ND, Camilleri S, Furler SM, *et al.* The insulin sensitizer, BRL 49653, reduces systemic fatty acid supply and utilization and tissue lipid availability in the rat [J]. *Metabolism*, 1997, **46**(8) :935 - 942 .
- [7] Garaulet M, Perex-Llamas F, Fuente T, *et al.* Anthropometric, computed tomography and fat data in an obese population: relationship with insulin, leptin, tumor necrosis factor alpha, sex hormone-binding globulin and sex hormones [J]. *Eur J Endocrinol*, 2000, **143**(5) :657 - 666 .
- [8] McClain DA, Crook ED. Hexosamines and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 1996, **45**(8) :1003 - 1009 .