

# 静注卡介苗建立免疫性胰岛素抵抗模型

郭欲晓, 罗谋伦, 林志彬\*

(北京大学基础医学院药理学系, 北京 100083)

**摘要:** 目的 建立并考察卡介苗诱导的胰岛素抵抗动物模型。方法 用正糖钳实验方法及其他生化检验方法测定卡介苗每鼠 10 mg iv 后大鼠血糖、葡萄糖耐量、血清 TNF- $\alpha$ 、胰岛素刺激的葡萄糖代谢速率及其他生化指标的变化。结果 卡介苗 iv 后第 2、4 及 8 周, 动物的葡萄糖耐量均受到损伤, 胰岛素刺激的葡萄糖代谢速率显著下降, 血清 TNF- $\alpha$  含量升高。结论 卡介苗 iv 可造成稳定的胰岛素抵抗模型, 其造模机理可能与升高大鼠血清 TNF- $\alpha$  含量有关。

**关键词:** 卡介苗; 胰岛素抵抗; 正糖钳; 糖尿病

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2002)05-0321-05

胰岛素抵抗不仅是 2 型糖尿病的一个重要特征<sup>[1,5]</sup>, 也是人类其他几种疾病, 如肥胖、高血压、葡萄糖耐量损伤及多囊卵巢综合症的重要特征<sup>[2,3]</sup>。实验室研究胰岛素抵抗动物模型有两种: 一是遗传胰岛素抵抗动物模型, 如 kk 小鼠、ob/ob 小鼠、Zuck 大鼠等; 二是人工胰岛素抵抗模型, 已有高脂高糖饲料喂饲并用 TNF- $\alpha$  iv 造模型<sup>[5]</sup>, 或链佐菌素加高脂高糖饲料喂饲造模型<sup>[7]</sup>。链佐菌素及纯品 TNF- $\alpha$  价格昂贵, 为降低研究费用也为了验证一种理论假设 (BCG iv 可诱导免疫性损伤及体内 TNF- $\alpha$  分泌增加, 体内 TNF- $\alpha$  分泌增加又可诱导胰岛素抵抗), 本研究用 BCG 尾静脉注射大鼠, 制备免疫性胰岛素抵抗模型<sup>[9]</sup>, 用正糖钳实验技术及其他生化检验方法进一步考察了卡介苗造成胰岛素抵抗模型及其稳定性。

## 材 料 和 方 法

**药品与试剂** 卡介苗 (Bacille Calmette-Guérin vaccine, BCG, 批号 990001) 由中国药品生物制品检定所提供; 戊巴比妥钠: 佛山市化工实验厂产品; 盐酸氯氨酮注射液: 上海第一制药厂出品; 肝素钠注射液: 上海生物化学制药厂产品; 胰岛素冻干粉: 邦定生物制品有限公司产品; 牛血清白蛋白: 帝道生物工

程公司出品; 10% 葡萄糖注射液: 石家庄四药股份有限公司产品。血糖试剂盒: 北京中生生物技术公司产品; 甘油三酯测定试剂盒及丙氨酸氨基转移酶试剂盒: 北京北化精细化学品有限责任公司产品; 总胆固醇测定试剂盒: 德国 CENTRONIC 公司产品; <sup>125</sup>I 胰岛素放射免疫分析试剂盒: 购自中国原子能科学研究院, 批号 200110; 大鼠 TNF- $\alpha$  ELISA KIT 购自精美生物工程有限公司, 批号 20011120。

**实验仪器** 血糖仪: One touch II, Lifescan Inc, USA; 血糖试纸: One touch II strips Code 6, Lifescan Inc, USA; 752 紫外分光光度计: 北京光学仪器厂产品; 微量注射仪: Injection apparatus, Palmer, England; 蠕动泵: Peristaltic pump P-1, Pharmacia Biotech, Sweden; 550 型全自动酶标仪, 美国 BIO-RAD 公司产品。

**实验动物** Wistar 大鼠,  $\delta$ , 体重 200 ~ 230 g, 由北京医科大学实验动物部提供, 合格证号: 01-3158。

**方法** 将大鼠随机分为两组, 一组每鼠尾 iv 10 mL 生理盐水作为对照, 另一组每鼠尾 iv BCG 生理盐水溶液 10 mg 造模型。实验从注射 BCG 开始计时, 定期记录动物体重。第 1 批实验时间为 2 周, 实验结束时大鼠尾静脉取血测定葡萄糖耐量, 然后用正糖钳实验方法<sup>[10,11]</sup>检测胰岛素抵抗(用葡萄糖处置速率 GDR 表示); 股动脉取血, 测定血清胰岛素、血清甘油三酯、总胆固醇、游离脂肪酸 (FFAs)、TNF- $\alpha$  及丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平; 取肝、脾称重, 制备肝、脾、胰及颈淋巴结病理切片。第 2 批实验周期为 4 周, 第 3 批为 8 周, 测定葡萄糖耐量及用正糖钳

收稿日期: 2001-01-05

作者简介: 郭欲晓(1970-), 女, 硕士研究生, 主管药师;

林志彬(1937-), 男, 教授, 博士生导师。

\* 通讯作者 Tel/Fax: (010) 62091686,

E-mail: lizhb@public3.bta.net.cn

技术测胰岛素对葡萄糖的代谢速率。

血清葡萄糖测定用血糖试剂盒及血糖仪,胰岛素测定用放射免疫法, TNF- $\alpha$  测定用 ELISA 试剂盒, 甘油三酯、总胆固醇及丙氨酸氨基转移酶用试剂盒测定, 血清游离脂肪酸按临床生化检验二次提取比色法测定<sup>[12]</sup>。

## 结 果

### 1 葡萄糖耐量试验

各组动物于禁食 6 h 后, ip 葡萄糖  $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 测定 0, 0.5, 1 及 2 h 血糖水平。结果显示, 模型组动物在实验第 2, 4 及 8 周均表现出葡萄糖耐量损伤, 在 ip 高糖溶液 2 h 后, 血糖值仍高于基础值。而对照组动物在 ip 高糖溶液 2 h 后血糖值已恢复至基础

值, 即葡萄糖耐量表现正常(图 1)。

### 2 正糖钳试验

大鼠禁食 6 h 后, ip  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  戊巴比妥钠溶液  $2.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; 然后 im  $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  盐酸氯氨酮生理盐水溶液  $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 麻醉固定, 右颈静脉插管以供输注胰岛素和葡萄糖, 左颈总动脉插管以供取血样测血糖。首先测定基础血糖值, 然后从静脉以  $8 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  恒速输注胰岛素输液, 测定 GDR。模型组 3 批, 试验周期分别为 2, 4 和 8 周, 其葡萄糖代谢速率均显著低于对照组, 模型组与对照组分别为  $(13 \pm 7)$  和  $(29 \pm 6) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $(11 \pm 7)$  和  $(29 \pm 6) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $(16 \pm 3)$  和  $(23 \pm 3) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结果表明, BCG( $10 \text{ mg}/\text{rat}$ ) 可造成大鼠胰岛素抵抗, 胰岛素对葡萄糖的代谢速率明显下降(表 1 及图 2)。

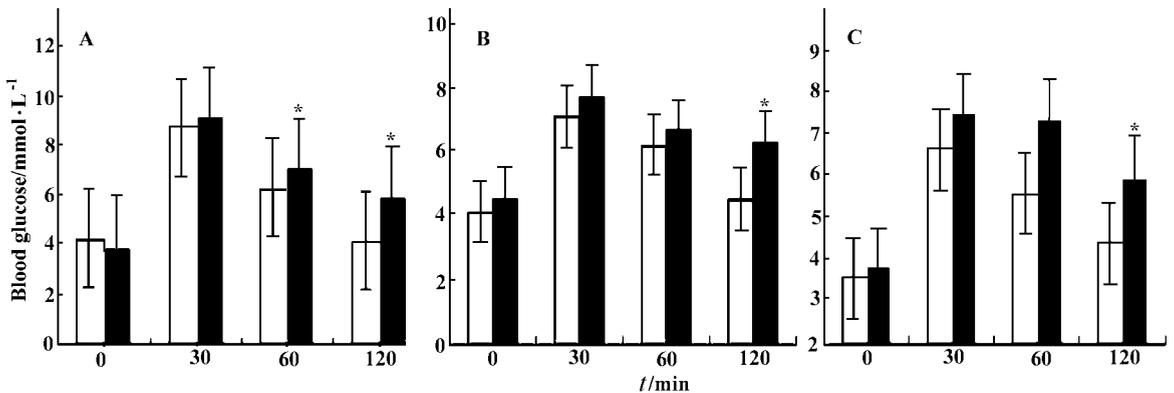


Figure 1 Effect of BCG on glucose tolerance test in rats. BCG ( $10 \text{ mg}/\text{rat}$ ) was given iv to male rats. After 2 weeks (A), 4 weeks (B) and 8 weeks (C), the rats were fasted for 6 h and subjected to a glucose tolerance test respectively.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*  $P < 0.05$  vs control. □ Control; ■ Model

Table 1 Time of euglycemic clamp test in rats after injection of BCG ( $10 \text{ mg}/\text{rat}$ )

Group	Time/weeks	CBG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	ABG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	A - C/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	SBG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	GDR/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
Control	2	$3.3 \pm 0.5$	$4.6 \pm 0.9$	$1.60 \pm 0.20$	$5.0 \pm 0.2$	$29 \pm 6$
Model	2	$4.3 \pm 0.9^*$	$6.3 \pm 1.6^{**}$	$2.3 \pm 1.0$	$5.0 \pm 0.2$	$13 \pm 7^{**}$
Control	4	$4.0 \pm 0.3$	$6.3 \pm 0.8$	$2.3 \pm 0.6$	$5.0 \pm 0.2$	$29 \pm 6$
Model	4	$4.2 \pm 0.3$	$7.1 \pm 0.9^*$	$2.9 \pm 0.6$	$5.0 \pm 0.2$	$11 \pm 7^{**}$
Control	8	$3.9 \pm 0.4$	$5.9 \pm 1.0$	$2.1 \pm 1.0$	$5.0 \pm 0.2$	$23 \pm 3$
Model	8	$3.6 \pm 0.4$	$6.1 \pm 1.5$	$2.5 \pm 1.5$	$5.0 \pm 0.2$	$16 \pm 3^{**}$

CBG: Consciousness state blood glucose; ABG: Anesthetic state blood glucose; SBG: Steady state blood glucose; (A - C): ABG - CBG.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control

### 3 生化学指标

动物禁食 6 h 后取血, 分离血清, 测定各项生化指标。结果表明尾 iv BCG 2 周后大鼠体重、血糖及血清胰岛素并无显著变化。模型组 ALT 酶高于对照组, 分别为  $(31 \pm 5) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $(15 \pm 7) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P <$

$0.05$ ), 表明 BCG 造模型会引起动物肝损伤。模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$  测定的 A 值明显高于对照组, 即 TNF- $\alpha$  含量高于对照组大鼠 ( $P < 0.05$ )。BCG 尾 iv 2 周对大鼠血清的甘油三酯和 FFAs 无影响, 组间无显著性差异。模型组动物总胆固醇略高于对照组动

物。结果见表 2。

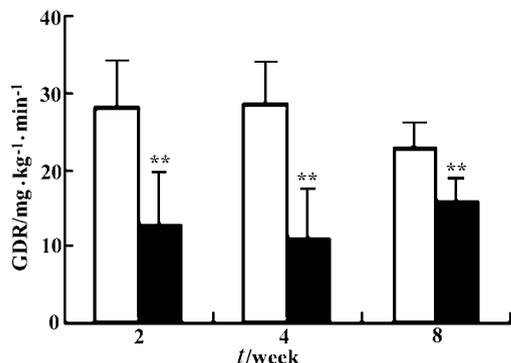


Figure 2 Studies on insulin resistance model induced by BCG with the euglycemic-clamp. Insulin was infused at the rate of  $8 \mu\text{u} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Results of rats after given BCG iv for 2, 4 and 8 weeks.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . □ Control; ■ Model

Table 2 Effect of BCG on body weight, liver and spleen weight, serum glucose, serum insulin, serum ALT, serum FFAs, serum TG and serum CHL in rats

Group	Control	Model
Body weight/g	326 ± 17	304 ± 28
Serum glucose/ mmol·L <sup>-1</sup>	4.2 ± 0.5	3.9 ± 0.3
Serum insulin/ μ·L <sup>-1</sup>	31 ± 5	36 ± 5
Serum free fatty acid/ μmol·L <sup>-1</sup>	677 ± 55	795 ± 150
Serum cholesterol/ mg·dL <sup>-1</sup>	53 ± 3	74 ± 14**
Serum triglyceride/ mg·dL <sup>-1</sup>	96 ± 22	96 ± 15
Serum TNF-α/ pg·mL <sup>-1</sup>	543 ± 60	759 ± 137*
ALT/ U·L <sup>-1</sup>	15 ± 7	31 ± 5*
Liver weight/g	6.2 ± 0.9	8.2 ± 1.3*
Liver Wt/100 g B. Wt	2.9 ± 0.3	3.4 ± 0.4**
Spleen weight/g	0.51 ± 0.11	1.4 ± 0.4**
Spleen Wt/100 g B. Wt	0.23 ± 0.04	0.57 ± 0.13**

$n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control

#### 4 BCG对肝脾重量、肝体比及脾体比的影响

模型组大鼠肝重量(8.2 ± 1.3) g 明显高于对照组(6.2 ± 0.9) g;模型组肝体比(3.4 ± 0.4) 高于对照组(2.9 ± 0.3), 增加 19.16%。模型组大鼠脾重为(1.4 ± 0.4) g, 明显高于对照组(0.51 ± 0.11) g, 增加 168.7%;模型组脾体比(0.57 ± 0.13), 高于对照组(0.23 ± 0.04), 增加 147.83%。结果提示 BCG 可致大鼠的肝、脾肿胀(表 2)。

#### 5 免疫性胰岛素抵抗模型肝脏、脾脏、胰腺及颈淋巴结病理组织学观察结果

BCG 模型组病理组织学显示:肝脏汇管区可见炎症细胞浸润,以淋巴细胞、单核细胞为主;肝组织

内可见散在肉芽肿性反应,偶见多核巨细胞;脾脏淋巴滤泡增生,可见肉芽肿形成;颈淋巴结囊泡组织增生;胰腺 β/α 比值增加(1.6 ± 0.7 vs 2.0 ± 0.7,  $n = 5$ ),胰岛 β 细胞数相对增多,而胰岛数减少(每 2 个胰小叶胰岛数:12 vs 6),提示机体胰岛素敏感性降低,体内糖平衡要靠 β 细胞增生以增加胰岛素的分泌来维持。结果显示,BCG 造成胰岛素抵抗模型大鼠的肝脏、脾脏及淋巴结均见免疫性炎症变化,胰岛 β 细胞相对增生。

### 讨 论

胰岛素抵抗不仅是 2 型糖尿病的一个重要特征<sup>[1,5]</sup>,也是人类其他多种代谢性疾病的重要特征<sup>[2,3]</sup>。细胞因子 TNF-α 制备胰岛素抵抗已有报道,但纯品 TNF-α 价格昂贵;文献报道用卡介苗 iv 能诱导实验动物血清 TNF-α 显著升高<sup>[13-15]</sup>。受此启发本室用卡介苗 iv 造成胰岛素抵抗动物模型。

研究结果显示,每只大鼠尾 iv BCG 10 mg 能够造成稳定的胰岛素抵抗模型。注射 2 周后,模型组动物血浆葡萄糖、胰岛素、甘油三酯、游离脂肪酸 (FFAs) 与对照组相比虽无异常变化,但肝体比、脾体比均显著高于对照组,特别是脾体比高出对照组 148.73%;病理组织学显示,模型组动物有严重的肝、脾及淋巴结炎症反应;BCG 造成胰岛素抵抗模型血清 TNF-α 显著升高,与其他已有模型不同。通常 2 型糖尿病及胰岛素抵抗常与肥胖、血清高甘油三酯、高胆固醇、高 FFAs 等联系在一起,而本模型血糖并无显著变化,却出现 2 型糖尿病重要特征——葡萄糖耐量损伤及胰岛素抵抗,其造模机理可能与 BCG 诱导大鼠 TNF-α 升高有关。

胰腺病理组织学显示,模型动物胰岛 β/α 细胞比值升高。结合机体血清胰岛素略微升高并产生胰岛素抵抗现象分析,试验第 2 周时,组织对胰岛素的敏感性降低,血糖仍维持平衡。这可能是通过刺激 β 细胞增生,释放更多胰岛素来抵消因胰岛素抵抗而造成的血糖代谢速率降低,达到体内糖平衡。试验结果也显示,模型动物的血清胰岛素略高于对照组(但无统计学显著性)。模型动物的肝脏、脾脏及淋巴结组织有炎症反应,脾脏损伤比肝脏损伤严重,加之血清 TNF-α 水平显著升高,故推测此模型可能与免疫-内分泌系统调节障碍有关。此外,本室还观察到,胰岛素增敏剂罗格列酮对链佐菌素加高糖高脂饲料喂饲造成的 2 型糖尿病大鼠模型的胰岛素抵

抗具明显的改善作用,也观察到其对 BCG 造成胰岛素诱导的葡萄糖代谢速率降低有明显改善作用,以上结果均提示卡介苗 iv 可造成胰岛素抵抗<sup>[9]</sup>。

一系列文献均指出卡介苗造成的损伤是免疫性的,BCG iv 能诱导体内 TNF- $\alpha$  分泌增多<sup>[13~15]</sup>,至于免疫过强引起胰岛素抵抗的确切机制尚有待于进一步研究。近年来,“TNF- $\alpha$  与胰岛素抵抗”是研究胰岛素抵抗的热点之一。Miles 等<sup>[5]</sup>曾用 TNF- $\alpha$  诱导造成胰岛素抵抗模型,该模型 GDR、胰岛素受体酪氨酸激酶(IR-TKA)下降,血中游离脂肪酸及胰岛素升高,甘油三酯及血糖保持正常,体重没有增加,相反有所减轻,与本模型极为相似。据推测其模型形成机理可能为:(1) TNF- $\alpha$  通过改变胰岛素受体固有活性而抑制受体磷酸化作用,降低 IR-TKA。但也有人根据曲格列酮(TRG)能对抗此模型的胰岛素抵抗而不改变升高的 IR-TKA 活性对此提出异议<sup>[3,6]</sup>。(2) TNF- $\alpha$  可能通过提高血浆 FFAs 浓度而造成胰岛素抵抗,但血浆 FFAs 浓度升高也可能是胰岛素抵抗产生的结果<sup>[5]</sup>。人体在胰岛素抵抗 6 个月后出现 FFAs 升高。本试验 2 周时模型血清 FFAs 水平并无显著变化,是否是由于试验时间较短,模型病变病程还未达到引起血清 FFAs 水平发生变化的阶段尚须探讨。(3) TNF- $\alpha$  能下调培养脂肪及肌细胞 GLUT4 的 mRNA 水平,诱导胰岛素抵抗<sup>[5]</sup>。

由 BCG 造成胰岛素抵抗模型的实验结果显示,其造模机理可能与肥胖、高血脂、高 FFAs 无关,其确切机理是否与其对免疫内分泌系统的作用而间接引发有关有待进一步考察。

## REFERENCES:

- [1] Chen JL. Insulin resistance and metabolic complications, cardiology [J]. *Chin J Endocrinol Metab* (中华内分泌代谢杂志), 1993, 9(4) : 238 - 239.
- [2] Elkind-Hirsch Ke, McWilliams RB. Pregnancy after treatment with the insulin-sensitizing agent troglitazone in an obese woman with hyperandrogenic, insulin-resistant acanthosis nigricans syndrome [J]. *Fertil Steril*, 1999, 71(5) : 943 - 947.
- [3] Oshida Y, Kako M, Nakai N, et al. Troglitazone improves insulin-stimulated glucose utilization associated with an increased muscle glycogen content in obese Zucker rats [J]. *Endocrine J*, 1999, 46(5) : 723 - 730.
- [4] Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits signaling from insulin receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 : 4854 - 4858.
- [5] Miles PDG, Rome OM, Higo K, et al. TNF- $\alpha$  — induced insulin resistance *in vivo* and its prevention by troglitazone [J]. *Diabetes*, 1997, 46 : 1678 - 1683.
- [6] Burant CF, Sreenan S, Hirano K, et al. Troglitazone action is independent of adipose tissue [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(11) : 2900 - 2908.
- [7] Xie MZ, Liu HF, Zhang LY, et al. An animal model of experimental obese and diabetic rats [J]. *Acta Pharm Bull*, 1985, 20(11) : 801 - 806.
- [8] Lu ZQ, Chen JL. TNF produced by adipose tissue and insulin resistance [J]. *Foreign Med Sci Endocrinology*, 1997, 17(1) : 1 - 3.
- [9] Luo ML, Guo YX, Hu YH, et al. Insulin sensitizing and insulin resistance ameliorating effect of rosiglitazone [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2000, 16(4) : 425 - 428.
- [10] Kraegen EW, James DE, Bennet SP, et al. *In vivo* insulin sensitivity in the rat determined by euglycemic clamp [J]. *Am J Physiol*, 1983, 245 : E1.
- [11] Luo ML, Guo YX, Lin ZB. Euglycemic clamp technique in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 3(4) : 255 - 259.
- [12] Li YL. *China Book of Medical Test* (中华医学检验全书) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996, 740 - 741.
- [13] Matthews N. Tumour necrosis factor from the rabbit. V. Synthesis *in vitro* by mononuclear phagocytes from various tissues of normal and BCG-injected rabbits [J]. *Br J Cancer*, 1981, 44(3) : 418 - 424.
- [14] Mendez-Samperio P, Hernandez-Garay M, Vazquez AN. Cellular activation induced by BCG is a PTK-dependent event [J]. *Cell Immunol*, 1996, 171(1) : 147 - 152.
- [15] Oliveira MM, Charlab R, Pessolani MC. Mycobacterium bovis BCG but not mycobacterium leprae induces TNF- $\alpha$  secretion in human monocytic THP-1 cells [J]. *Mem Inst Osvaldo Cruz*, 2001, 96(7) : 973 - 978.

## ESTABLISHMENT OF IMMUNE INSULIN RESISTANCE MODEL IN THE RATS BY IV INJECTION OF BCG

GUO Yu-xiao, LUO Mou-lun, LIN Zhi-bin

( Department of Pharmacology , School of Basic Medical Science , Peking University , Beijing 100083 , China )

**ABSTRACT:** **AIM** To observe the stability of BCG induced insulin resistance model. **METHODS** The glucose tolerance, serum glucose, FFA, insulin, triglycerides, cholesterol, TNF- $\alpha$  and ALT level were measured. The change of GDR was measured by euglycemic clamp in model rats after given iv BCG 2, 4 and 8 weeks. **RESULTS** After 2, 4 and 8 weeks, the GIR and glucose tolerance of the animals decreased significantly. After 2, 4 and 8 weeks, BCG infusion resulted in a pronounced reduction in glucose tolerance and insulin-stimulated glucose disposal rate [ GDR = GDR: (29  $\pm$  6)  $\bar{x}$  (13  $\pm$  7) mg $\cdot$ kg $^{-1}$  $\cdot$ min $^{-1}$  2 weeks; (29  $\pm$  6)  $\bar{x}$  (11  $\pm$  7) mg $\cdot$ kg $^{-1}$  $\cdot$ min $^{-1}$  4 weeks and (23  $\pm$  3)  $\bar{x}$  (16  $\pm$  3) mg $\cdot$ kg $^{-1}$  $\cdot$ min $^{-1}$  8 weeks, respectively,  $P < 0.01$  ]. BCG infusion resulted in a pronounced increase in the weights of the liver [ (6.2  $\pm$  0.9)  $\bar{x}$  (8.2  $\pm$  1.3) g,  $P < 0.05$  ] and spleens [ (0.51  $\pm$  0.11)  $\bar{x}$  (1.4  $\pm$  0.4) g,  $P < 0.01$  ]. The histo-pathological results showed that BCG infusion resulted severe inflammation in the livers and spleens and the ratio of  $\beta/\alpha$  in pancreas increased. The serum levels of triglyceride, FFA and glucose were unchanged, but the level of serum TNF- $\alpha$  [ (543  $\pm$  60)  $\bar{x}$  (759  $\pm$  137) pg $\cdot$ mL $^{-1}$ ,  $P < 0.05$  ] and insulin [ (31  $\pm$  5)  $\bar{x}$  (36  $\pm$  5)  $\mu$  $\cdot$ L $^{-1}$ ,  $P > 0.05$  ] increased. **CONCLUSION** This novel model of immune insulin resistance is completely and constantly established.

**KEY WORDS:** BCG; insulin resistance; euglycemic clamp; diabetes