

# 先天性糖尿病鼠血漿胃抑素及胰島素 對口服葡萄糖刺激之反應

## PLASMA CONCENTRATIONS OF GASTRIC INHIBITORY POLYPEPTIDE(GIP) AND INSULIN IN RESPONSE TO ORAL GLUCOSE IN DIABETIC BB RATS

沈賈堯

### 中文摘要

本文旨在研究先天性糖尿病鼠於口服葡萄糖刺激後，對胃抑素及胰島素分泌的影響。BB種系之先天性糖尿病鼠以雌雄分組，各配合BB，Wistar(WS)及Sprague-Dawley(SD)三種系之正常鼠作為對照。所有實驗動物經右頸靜脈插管手術後，休息一夜；隔天清晨禁食2~4小時後開始餵實驗動物口服葡萄糖液(40%，3.2g/kg BW)。口服葡萄糖前10分鐘及口服葡萄糖後0,10,20,30,45,60及90分鐘各進行每次0.5毫升的採血；其中血糖濃度由葡萄糖分析儀(YSI, Model 23A)測定，血漿胃抑素及胰島素濃度則由放射免疫分析法測定。先天性糖尿病鼠的血糖濃度於口服葡萄糖前後皆明顯高於正常鼠，而血漿胰島素濃度於口服葡萄糖前後則明顯低於正常鼠。雄性糖尿病鼠血漿胃抑素濃度於口服葡萄糖後20分鐘時高於正常之BB雄鼠，雌性糖尿病鼠血漿胃抑素濃度於口服葡萄糖後10到20分鐘時高於正常BB雌鼠；各種系之正常雄鼠間血漿胃抑素濃度的變化並無明顯差異。SD雌鼠口服葡萄糖後血漿胃抑素濃度分別高於正常BB雌鼠，WS雌鼠及雌性糖尿病鼠，而WS雌鼠者又高於正常BB雌鼠。以上實驗結果顯示，BB種系糖尿病鼠血漿胃抑素對口服葡萄糖刺激之反應比BB種系正常鼠強，而且血漿胃抑素濃度的變化並具有種系及性別上之差異。



## ABSTRACT

Effects of diabetes on the glucose stimulated secretion of insulin and gastric inhibitory polypeptide (GIP) in rats were investigated. Male and female diabetic BB rats were catheterized via right jugular vein. Normal male and female BB, Wistar (WS) and Sprague-Dawley (SD) rats were used as control. Twenty hours latter, all rats were fasted for 2-4 hours and then ingested with glucose (40%, 3.2 g/kg BW). Blood samples were collected at -10, 0, 10, 20, 30, 45, 60 and 90 minute after oral glucose load. The concentration of blood glucose was measured by a YSI (model 23A) glucose analyzer. The concentration of plasma GIP and plasma insulin was measured by radioimmunoassay. The concentration of blood glucose was higher and plasma insulin was lower during fast and following oral glucose load in diabetic BB rats than in normal BB, WS and SD rats. Concentration of plasma GIP at 20 minute post-oral glucose was higher ( $P < 0.05$ ) in male diabetic rats than in normal male BB rats and at 10 and 20 minute post-oral glucose was higher ( $P < 0.05$ ) in female diabetic rats than in normal BB rats. In females, concentration of plasma GIP after oral glucose load was higher in SD than in diabetic, normal BB and WS rats, and was also higher in WS than in normal BB rats. The results suggest that (1) GIP secretion is increased in diabetic BB rats when compared with normal BB rats after oral glucose ingestion, (2) the change of plasma GIP concentration is dependent upon sex and species.



## 一、緒言

胃抑素(Gastric Inhibitory Polypeptide; GIP)是一種具有42個胺基酸的胃腸多肽激素〔5〕(圖1)，主要由十二指腸前段之K-細胞分泌〔6〕。1971年，Brown〔5〕首先由豬腸所萃取出膽囊收縮素(Cholecystokinin-Pancreozymin; CCK-PZ)中分離純化出胃抑素。最初分析其胺基酸組成爲一具有43個胺基酸的直鏈狀多肽(圖1)，而後於1981年〔23〕再行修訂胃抑素之組成，確定豬胃抑素實含42個胺基酸。目前已知人與豬的胃抑素胺基酸組成數目相同，唯一的差別在於第18及第34個胺基酸成分不同〔30〕；另外，胃抑素分泌時，會以兩種不同分子量的型式出現(5 KDa and 8 KDa)，分子量較大者，可能是胃抑素的先質。1974年，Brown等人再以豬胃抑素產製抗體，建立了胃抑素的放射免疫測定系統，可用以檢測人〔26〕及大鼠〔45〕的血漿胃抑素濃度。胃抑素最初被發現對Pentagastrin所引起的胃酸分泌具有抑制功能〔36〕，因此才命名爲“胃抑素”。後來的研究中，進一步發現胃抑素在葡萄糖存在的狀況下具有促進胰島素分泌的功能〔10,13,35,37〕，於是胃抑素更有了新的別名：“Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide; GIP”〔24〕。

正常人於用餐後皆會引起胃抑素的分泌〔4〕。Kuzio〔26〕首先觀察經過一夜禁食的正常人，吃過混合食物後，血漿胃抑素濃度立即上升持續四個小時的高濃度。Pederson〔38〕及Crockett〔11〕在分別給予狗及人口服不同劑量的葡萄糖後，也發現血漿胃抑素濃度均隨葡萄糖劑量的增加而上升(圖2)。除了葡萄糖以外，蔗糖、乳糖及脂肪皆可刺激胃抑素的分泌上升〔4,31,45〕(圖3)；不過仍以葡萄糖促進胃抑素分泌的效果最好。值得注意的是：蔗糖對胃抑素分泌的刺激效果與葡萄糖相似，只是作用時效較爲遲緩，此一現象可能是因爲蔗糖必須先經分解作用，析出葡萄糖後才有刺激效用；這同時亦顯示葡萄糖之所以能刺激胃抑素分泌，可能是經由小腸的吸收過程中，葡萄糖分子對腸壁細胞造成刺激所致。上述推論也



可說明由靜脈直接注射葡萄糖，即因缺少了小腸的吸收過程而無法刺激胃抑素分泌〔7〕。另外，如果食種類不同，分泌胃抑素的部位也有不同；如葡萄糖刺激時，胃抑素多由十二指腸分泌；脂肪刺激時，則多由空腸分泌〔43〕。而胃抑素在人體的代謝清除，多在腎臟及肝臟中進行，而且由腎臟擔負大部分的工作；所以，胃抑素在體內存在半生期的長短並與腎臟之腎絲球濾過率(Glomerular Filtration Rate)有關〔34〕。

1964年，Erick〔18〕發現正常人口服葡萄糖後，血漿胰島素濃度比由靜脈注射葡萄糖的反應來得高，顯示葡萄糖經由胃腸的吸收過程可能影響分泌胰島素的功能；1981年，Jorde〔22〕及1983年，McCullough〔29〕則嚐試直接在正常人的小腸中以葡萄糖液灌流，發現灌流後的血糖變化雖比口服葡萄糖的方式來得小，但血漿胰島素濃度卻高出很多。Elahi〔17〕則在葡萄糖液中加入胃抑素作靜脈注射，果然發現胰島素的分泌比注射純葡萄糖液者更明顯增加，證明胃抑素可能即是在口服葡萄糖時促進胰島素分泌的因素之一。1976年，Pederson與Brown〔35〕利用大鼠胰臟體外培養灌流法，以含有不同濃度胃抑素的葡萄糖液及含有生理劑量胃抑素的多種濃度葡萄糖液分別灌流大鼠胰臟，發現胰島素的分泌量可隨胃抑素濃度或葡萄糖濃度的增加而增加，直接證明了胃抑素的促胰島素分泌作用(Insulinotropic Effect)。Ebert〔14〕則在為大鼠注射胃抑素抗血清後，發現胃抑素的生理功能被抗血清抑制，使其血漿胰島素濃度對口服葡萄糖刺激的反應明顯變差；此一結果也提供了胃抑素促胰島素作用的間接證據。進一步的研究顯示，灌流大鼠胰臟的葡萄糖液濃度必須大於5.5mM以上，胃抑素才有促胰島素分泌的作用，若葡萄糖液濃度小於5.5mM時，胃抑素則有促升糖激素分泌的作用(Glucagonotropic Effect)〔37〕，此現象說明胃抑素對胰臟的內分泌細胞扮演具促泌素(Incretin)功能的角色。至於經由脂肪刺激所分泌之胃抑素，或是沒有葡萄糖存在的情況下，均無法刺激胰島素分泌〔37〕。1984年，Amiranoff〔1〕在倉鼠胰臟 $\beta$ —細胞上發現胃抑素的接受體，更證明胃



抑素對 $\beta$ —細胞的分泌功能有直接的影響。1980年，Creutzfeldt〔9〕發現胰島素能夠抑制由脂肪刺激的胃抑素分泌，顯示胰島素對胃抑素的分泌也具有調節的功能；Verdonk〔46〕亦曾證實了些一作用，但對於口服葡萄糖刺激的胃抑素分泌效果並不大；其原因可能是由不同種刺激物所刺激分泌的胃抑素，除了分泌部位不同之外，在分子結構上也有差異，因而影響了胰島素抑制胃抑素分泌的負回饋機制。

至此，我們可以瞭解過去已有許多研究成果說明胃抑素在對胰島素分泌及血糖變化調節功能上之重要性，然而胃抑素與胰島素之間的關係並不如想像中的單純，甚且還曾發現有些其他已知或未知的激素參與其中〔27〕，有待日後更進一步的研究澄清。令我們感到興趣的是，在特殊的生理狀況下，對胃抑素的分泌也有不同的影響；由於胃抑素已有被證明與胰島素分泌及血糖調節有關，於是許多報告開始針對糖尿病，肥胖及老化等伴有血糖失調的生理狀態分別進行研究〔11,15,16,25,40,44〕。有關糖尿病患者胃抑素分泌的研究結果並不十分一致；有的研究發現糖尿病患者與正常人的胃抑素分泌對葡萄糖刺激的反應並無不同〔44〕，但大多數的報告則顯示，第一型或第二型糖尿病患者的血漿胃抑素在葡萄糖刺激後的分泌量均比正常人高，其原因可能皆來自於胰島素抑制胃抑素分泌的負回饋機制在病患身上失效所致。第一型糖尿病患，因胰島素分泌能力低落或完全喪失，因而無法抑制胃抑素的分泌；第二型糖尿病人雖仍具有胰島素分泌的能力，甚至有比正常人都要高的血漿胰島素濃度，但由於分泌胃抑素的細胞已發生胰島素阻抗現象〔8〕，也使得胰島素抑制胃抑素分泌的作用失效，因此才導致糖尿病患者胃抑素的分泌比正常人高。

從這些研究結果來看，糖尿病患在葡萄糖代謝異常的情況下，其血漿胃抑素濃度的變化對於葡萄糖的刺激也有異於常人的反應；為瞭解胃抑素在此異常的生理狀況下，與胰島素分泌及血糖變化的關係，我們以先天性糖尿病鼠為對象，探討下列主題：



(1)口服葡萄糖的刺激對雌性與雄性先天性糖尿病鼠胃抑素分泌的影響，並觀察血漿胃抑素的變化是否有性別上的差異。

(2)配合不同種系的正常鼠與糖尿病鼠對照觀察，並探討胃抑素的分泌狀況是否有種系或性別上的差異。

## 二、材料與方法

### (一)實驗動物

由日本引進繁殖Wistar(WS)種系及具有先天性糖尿病之BB種系大白鼠，飼養於每日14小時(0600~2000)人工光照及具空調設備( $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ )之動物室中，飲水及飼料不設限量。WS大鼠係4~5個月齡；雄鼠體重約350~400公克，雌鼠體重約200~230公克。BB大鼠係4~6個月齡；正常雄鼠體重約400~500公克，患糖尿病之雄鼠約300~350公克；正常雌鼠體重約250~300公克，患糖尿病之雌鼠體重約200~250公克。另由陽明醫學院動物中心購得Sprague-Dawley(SD)種系大白鼠，係4~5個月齡；雄鼠體重約350~450公克，雌鼠體重約230~280公克；飼養於每日14小時(0600~2000)人工光照及具空調設備( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ )之動物室中，飲水及飼料不設限量。

### (二)動物處理

BB種系大白鼠成長到3~5個齡時，即可能漸漸出現糖尿病之症狀。(繁殖先天性糖尿病鼠採用近親交配的方式，後代幼鼠成長到3~5個月齡，一般罹病機率約45~50%)若發現動物之飲水量及排尿量有增大的趨勢，飼料的消耗又特別快，甚且外觀上出現毛色泛黃及日漸消瘦的現象，則立即採取該動物之新鮮尿液，以尿糖檢測試紙(DIASTIX-II, Reagent Strips)檢測尿液中之尿糖濃度。若試紙呈現“+++”之比色反應(此時尿糖濃度已達1%以上)，則確認該動物已患糖尿病；並記錄試紙檢測日期及比色結果。而後再配合年齡相近及相同性別之BB, WS及SD種系的正常大白鼠作為對照組，進行活體實驗。

### (三)活體實驗



實驗動物以乙醚麻醉後，進行右頸靜脈插管手術 (Right Jugular Vein Catheterization)。右頸靜脈插管技術，係仿自Harm及ojeda〔20〕之方法改良而成。插管之製備係以3.5公分長之矽質軟管 (Silastic Tube; Dow Corning, #602-135)接上8公分長之聚乙烯管 (Poly-ethylene Tube; PE-50) 管內須先充以含肝素(Heparin; 100IU/ml)之生理食鹽水，預防手術後插管內凝血阻塞；另於聚乙烯管端套上一小段熱縮管，以方便手指捏取操作，而後再塞上一小段不銹鋼絲(Stopper)以防止插管內的液體外漏。手術時先將矽質軟管之管口斜切，以利埋入靜脈血管之切開口，再將大白鼠由頸部腹面右側之鎖骨上方皮層剪開，撐開皮下組織及肌肉，以小止血鉗及鑷子游離出一小段右頸靜脈，於靜脈上開一切口埋入插管；插管慢慢沿靜脈管伸入，順利通過靜脈竇，使矽質軟管之管口停留於右心房中；而留在靜脈管外之聚乙烯管，則以羊腸線結紮固定於靜脈管之游離段上。最後將大白鼠由頭部背側雙耳之間的皮層剪開，插管則穿過頸部皮下組織由此開口穿出並固定於頭頂上，可以避免動物清醒後之咬嚙而毀損插管；傷口縫合後，以75%之酒精消毒。

插管手術後次日，先以充滿肝素生理食鹽水 (Heparin Saline) 之40公分PE-50延長管，如一不銹鋼之連通細管，與頸靜脈插管連接延伸至動物籠外，在動物清醒並隔絕驚擾的狀況下，安靜地進行採血。採血當天清晨，先取走飼料，留下飲水，開始2~4小時的禁食。禁食後，即進行口服葡萄糖的耐糖測試(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)。動物口服葡萄糖的方式係以PE~90聚乙烯管接上10毫升之注射器，利用開口木棒之中央孔隙將聚乙烯管由口腔伸入，通過食道至胃中直接灌入40%之葡萄糖液。分別在口服葡萄糖前10分鐘和口服葡萄糖後0,10,20,30,45,60及90分鐘進行八次採血，每次採血0.5毫升；採血時間約在當天早上9時開始，進行到中午時分結束。所取得之血樣，立即以專用之定量注射器抽取25微升(ul)之全血，送入葡萄糖分析儀(Glucose Analyzer; YSI, Model 23A)測定血糖濃度；餘下之血樣，



於10000rpm下離心1分鐘，析出血漿，保存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 之冷凍庫中，待日後再以放射的免疫分析法(Radioimmunoassay; RIA)檢測血漿中激素的濃度。

#### 四實驗設計

先天性糖尿病對大鼠口服葡萄糖刺激胃抑素及胰島素分泌之影響(實驗方法流程見圖4)

BB種系之糖尿病鼠以雌雄分組，各配合一組年齡相近之BB種系正常鼠，一組WS種系正常鼠及一組SD種系正常鼠作為對照。於右頸靜脈插管手術後並記錄體重，經一夜休息，隔天清晨取走飼料禁食2~4小時後開始令動物口服葡萄糖，每隻約口服2~2.5毫升之40%葡萄糖液(3.2g/kg BW)。分別在口服葡萄糖前10分鐘和口服葡萄糖後0,10,20,30,45,60及90分鐘進行採血，每次採血0.5毫升。採血後，立即以專用之定量注射器抽取25ul之全血，以葡萄糖分析儀測定血糖濃度；餘下之血液樣本經離心後，析出血漿再以放射免疫分析法檢測血漿胃抑素(GIP)及胰島素(Insulin)之濃度。

#### 五) 激素之檢測

血漿胃抑素及胰島素之濃度均以放射免疫分析法檢測。

##### 1. 胃抑素之放射免疫測定

##### A. 碘化反應(Iodination)

大鼠胃抑素碘化反應之材料包括(1)高純度之豬胃抑素(Porcine GIP)，購自Quadra Logic Tech.(2)放射性胃抑素，係藉氯氨-T(Chloramine-T)法製得。大致過程如下：將裝有4ug胃抑素之小瓶依序加入10ul之0.4M磷酸緩液(PH7.4)，0.5毫居里(mCi)之碘-125(購自Amerson, 1mCi/10ul, Cat #IMS 30)及0.02毫克之氯氨-T(20mg 10ml dist H<sub>2</sub>O)，再輕輕振搖30秒，以終止反應；然後加入含0.5%人類血清蛋白之0.2M醋酸溶液(0.2M A.A.—0.5% HSA) 100ul，作為轉移溶液(Transfer Solution)，將小瓶內之混合液全部移入裝有0.9×20公分分離劑(Sephadex G-15)之管柱內，並以含0.5%牛血清蛋白(BSA)及Aprotinin(200KIU/ml)之0.2M醋酸溶液(0.2M, A.A.—0.5% BSA-Aprotinin)沖洗管柱



，同時陸續收集由管柱滴出之溶液樣本。收集樣本之試管中預先裝以0.2毫升之醋酸沖洗液(0.2M A.A.—0.5% BSA-Aprotinin)；每支試管再收集約1毫升之樣本，混合均勻後，各取20ul之樣本，以自動伽瑪計數儀檢測其輻射量。檢測結果一般可得2個放射活性高峰(圖5)；以胃抑素抗體進行放射免疫活性測定，可確知第一高峰為碘-125所標示上去之胃抑素，第二高峰則為未與胃抑素反應之游離碘。

#### B.放射免疫測定之操作程序

胃抑素之放射免疫測定係採雙抗體法〔26〕，大致過程如下：第一天於各試管中依序加入分析稀釋液(Assay Diluent)，標準激素或待測之血漿樣本，合計0.3毫升；再加入0.2毫升之胃抑素抗體(稀釋2,000倍)及碘-125標示之胃抑素，至總容積達0.55毫升。另有三支試管不加抗體，改加稀釋400倍之正常兔血清作為背景值之對照。所有試管置於4℃下培養24小時，使抗原與抗體達到最大結合量，再加入0.1毫升稀釋40倍之第二抗體(Anti-Rabbit-Gamma-Globulin; ARGG)，繼續培養36至48小時，之後再加入2毫升之磷酸鹽緩衝液，終止結合反應，並於4℃下以1000g(2200rpm)之速度離心30分鐘。傾掉上層液後，再以自動伽瑪計數器檢測管內沈澱物之輻射量；全部測定耗時約60至72小時。最後待測血漿樣本胃抑素之濃度，藉Log-Logit轉換之標準曲線，以直線迴歸法求出(圖6，圖7)。

#### 2.胰島素之放射免疫測定(係由榮總新陳代謝科代為測定)

##### A.材料製備

大鼠血漿胰島素濃度亦採雙抗體放射免疫測定法檢測。需用之材料包括(1)豬之胰島素(Sigma # I 3505)(2)放射性碘所標示之人一胰島素(Amersham IM 38)(3)胰島素抗體，產自天竺鼠，係由榮民總醫院內科部新陳代謝科主任何橋通大夫產製。(4)人類伽瑪球蛋白(Human-Gamma-Globulin; HGG, 1%) (5)Polyethyleneglycol(PEG 6000,20%)

##### B.測定方法



採用何氏方法 (Ho et al.; 1983) [21]，所得結果，亦以一般放射免疫測定法分析待測血漿樣本中胰島素之濃度。

#### (六)統計分析

##### 1.放射免疫測定結果之分析

血漿樣本之胃抑素及胰島素，以放射免疫測定所得數據，利用 IBM-PC-AT 相容性電腦，將 Log -Logit 轉換公式及簡單迴歸公式輸入，計出其濃度值。

##### 2.實驗結果之分析

先天性糖尿病對大鼠血糖、血漿胃抑素或胰島素之效應以變方分析法 (Analysis of Variance; ANOVA) 分析，若呈顯著性，則繼以 Scheffe 氏多變域測驗作兩組間平均值差異之顯著性分析。口服葡萄糖之效應則以駢對學生氏 t-值測定法 (Paired Student's t-test) 分析。p 值小於 0.05 者為差異顯著，p 值小於 0.01 者為差異極顯著。

### 三、結果

#### (一)先天性糖尿病對雄鼠口服葡萄糖刺激胃抑素及胰島素分泌之影響

##### 1.血糖濃度 (圖 8)

BB 種系之雄性糖尿病鼠禁食後血糖濃度，分別比正常的 BB, WS 及 SD 三種系之雄鼠高出約 2.7, 2.5 及 2.2 倍。口服葡萄糖刺激後第 45 及 90 分鐘時，糖尿病鼠之血糖濃度比基礎值增加約 50%，此時與三種系之正常雄鼠比較，更高出約 2.8 至 3.4 倍，先天性糖尿病鼠之血糖濃度在刺激前後與雄鼠間之差異皆極顯著 ( $P < 0.01$ )。BB 種系正常雄鼠在刺激後 45 分及 90 分鐘時，血糖濃度比基礎值增加約 50% 及 30%。而 WS 及 SD 種系雄鼠在相同時間之血糖濃度則比基礎值增加約 20% 及 10%，顯示 BB 種系之雄性糖尿病鼠與正常雄鼠比較，血糖濃度對口服葡萄糖之刺激有較強的反應。三種正常雄鼠間，除了刺激後第 60 分鐘時，BB 雄鼠血糖濃度比 WS 雄鼠高 ( $P < 0.05$ ) 之外，其餘並無顯著差異。



## 2. 血漿胃抑素濃度 (圖 9)

雄性糖尿病鼠禁食後之血漿胃抑素濃度與正常雄鼠間並無顯著差異。口服葡萄糖刺激後之血漿胃抑素濃度以駢對 t 一測驗與基礎值比較均明顯增加 ( $P < 0.01$ )，在第 20 分鐘之高峰期，糖尿病鼠比 BB 及 WS 正常雄鼠略高 ( $P < 0.05$ )，第 10 分鐘時則比 WS 雄鼠低 ( $P < 0.05$ )，第 90 分鐘時亦比 SD 雄鼠低 ( $P < 0.01$ )。三種正常雄鼠間，除了禁食後 SD 雄鼠之血漿胃抑素濃度比其他正常雄鼠略高之外，刺激後則無顯著差異。

## 3. 血漿胰島素濃度 (圖 10)

雄性糖尿病鼠禁食後之血漿胰島素濃度明顯地低於其他正常雄鼠 ( $P < 0.01$ )。口服葡萄糖刺激後，三種正常雄鼠之血漿胰島素濃度，皆比基礎值增加了約 1 倍；而糖尿病鼠於刺激後，血漿胰島素濃度並無顯著變化，此時與其他正常雄鼠比較，則有極顯著之差異 ( $P < 0.01$ )。而三種正常雄鼠間，刺激前後之血漿胰島素濃度並無顯著差異。

## 4. 體重之比較 (表 1)

就體重而言，雄性糖尿病鼠比正常雄鼠輕許多 ( $P < 0.01$ )，而且外觀上亦十分瘦弱。

(二) 先天性糖尿病對雌鼠口服葡萄糖刺激胃抑素及胰島素分泌之影響。

## 1. 血糖濃度 (圖 11)

BB 種系之雌性糖尿病鼠禁食後之血糖濃度，比正常的 BB，WS 及 SD 三種系之雌鼠高出約 1.8 到 2 倍。口服葡萄糖刺激後第 30 及 90 分鐘時，糖尿病鼠之血糖濃度比基礎值增加約 47% 到 50%，此時與三種系之正常雌鼠比較，亦高出約 1.5 到 2 倍，可見糖尿病鼠之血糖濃度在刺激前後與正常鼠之差異均極為顯著 ( $P < 0.01$ )。BB 種系正常雌鼠在刺激後第 30 及 90 分鐘時，血糖濃度比基礎值增加約 90% 及 50%，而 WS 及 SD 種系雌鼠在相同時間之血糖濃度則比基礎值增加約 60% 及 30%，此亦顯示 BB 種系正常雌鼠之血糖濃度變化對口服葡萄糖之刺激有比較強的顯著反應 ( $P < 0.05$ )。三種正常雌鼠間，



除了刺激後第30分鐘時，BB雌鼠比SD雌鼠高( $P < 0.01$ )之外，並無其他顯著差異。

### 2. 血漿胃抑素濃度 (圖12)

雌性糖尿病鼠禁食後之血漿胃抑素濃度與正常的BB雌鼠及WS雌鼠間並無顯著差異，但比SD種系之雌鼠低( $P < 0.01$ )。口服葡萄糖刺激後之血漿胃抑素濃度以駢對  $t$  一測驗與基礎值比較皆明顯增加( $P < 0.01$ )，在第10至20分鐘時，糖尿病鼠比BB種系正常雌鼠高( $P < 0.05$ )，第30至60分鐘時亦比SD雌鼠低( $P < 0.05$ )，而糖尿病與WS雌鼠間並無顯著差異，三種正常雌鼠間，禁食後之血漿胃抑素濃度，SD雌鼠比BB及WS雌鼠高( $P < 0.01$ )，而WS雌鼠又比BB雌鼠高( $P < 0.05$ )；刺激後，SD雌鼠之血漿胃抑素濃度比BB雌鼠高( $P < 0.05$ )，在第10到90分鐘皆有 $P < 0.01$ 之極顯著差異；WS雌鼠刺激後第10，20及45分鐘時比BB雌鼠高( $P < 0.05$ )；SD雌鼠則在第30，60及90分鐘時比WS雌鼠高( $P < 0.01$ )。

### 3. 血漿胰島素濃度(圖13)

雌性糖尿病鼠禁食後之血漿胰島素濃度明顯地低於其他正常雌鼠( $P < 0.01$ )。口服葡萄糖刺激後，三種正常雌鼠之血漿胰島素濃度，皆比基礎值增加約0.8到1.2倍，而糖尿病鼠於刺激後，血漿胰島素濃度並無顯著變化，此時與其他正常雌鼠比較，則有極顯著之差異( $P < 0.01$ )。三種正常雌鼠間，刺激後第30到60分鐘時，SD雌鼠之血漿胰島素濃度比BB及WS雌鼠低( $P < 0.01$ )。

### 4. 體重之比較(表2.)

就體重而言，雌性糖尿病鼠比正常之BB種系雌鼠輕 ( $P < 0.01$ )，與其他雌鼠比較，則無顯著差異。外觀上，雌性糖尿病鼠仍較瘦弱。

## 四五、討論

本研究結果顯示，BB種系之先天性糖尿病鼠於口服葡萄糖刺激前後，其血糖濃度皆遠高於三種正常大鼠，屬於典型的高糖症(Hyperglycemia)動物



。三種正常大鼠於葡萄糖刺激後之血漿胰島素濃度皆有立即而明顯的升高；至於糖尿病鼠則幾乎沒有反應，其血漿胰島素濃度在刺激前後皆遠低於三種正常大鼠；此種高血糖及低胰島素的現象，乃屬於第一型；即胰島素依賴型糖尿病 (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus; IDDM) [33]；此型糖尿病之成因並不單純，除了遺傳因素，尚且還有後天環境因子的影響 [41]，但遺傳因素仍是比較重要的原因；而且，在發病過程中所造成的不正常自體免疫現象 (Autoimmunity) 也是重要病因之一 [41]；此型病患在發病早期常可在其體內發現抗胰臟蘭氏小島 (Islets of Langerhans)  $\beta$  一細胞之抗體。至於BB種系之先天性糖尿病鼠發病過程則是由於巨噬細胞 (Macrophage) 先侵入蘭氏小島  $\beta$  一細胞，繼之與T一淋巴球及殺手細胞 (NK Cell) 的聯合作用，產生自體免疫反應，使  $\beta$  一細胞受到破壞、發炎以致死亡 [28,32]；糖尿病鼠血漿胰島素濃度之基礎值特別低而且對葡萄糖之刺激沒有顯著反應，即緣由於  $\beta$  一細胞逐漸死亡，蘭氏小島分泌胰島素之能力漸漸喪失之故。此種現象在雌雄糖尿病鼠身上皆相同。第一型糖尿病患者由於胰島素的缺乏，組織細胞無法利用葡萄糖，致使體內調控葡萄糖代謝的能力變差 [39]，而且肝臟進行肝醣分解產生葡萄糖的速率又比正常人快 [12]，這些原因便可說明何以糖尿病鼠之血糖濃度特別高，而且血糖對刺激之反應又比正常鼠來得強。

實驗的結果亦顯示，雄性糖尿病鼠口服葡萄糖後，血漿胃抑素濃度有立即而明顯的升高，並於刺激後之分泌高峰期比正常的BB及WS雄鼠略高，而與SD雄鼠之間並無差異。口服葡萄糖能刺激胃抑素分泌，分別在人 [7]，狗 [38] 及大鼠 [45] 的實驗結果中，皆獲得證實。1977年, Ebert [15] 曾觀察第一型糖尿病患者口服葡萄糖前後，血漿胃抑素濃度之變化，發現與正常人之反應並無差異，而Ross(1978) [40] 及Elahi(1984) [16] 則分別在第一型及第二型糖尿病 (Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus; NIDDM) 患者身上作相同的觀察，結果發現第一型糖尿病患在口服葡萄糖刺激後，血漿胃



抑素濃度比正常人高，第二型糖尿病患之胃抑素分泌反應則在口服葡萄糖前後皆比正常人高，且強度亦較強。Ross所觀察到的結果與糖尿病鼠的反應比較相似，對此一結果的可能解釋可源於胰島素抑制胃抑素分泌的負回饋機制〔3，4，42〕；第一型糖尿病患因為缺乏胰島素，才使此一負回饋作用消失，也失去對胃抑素分泌的抑制效果，因而導致胃抑素的分泌比正常人高。Creutzfeldt〔8〕也發現第二型糖尿病患在口服葡萄糖後，其血糖及血漿胰島素濃度皆明顯升高，而且其血漿胃抑素濃度也比正常人高。但是另有研究證據顯示，注射胰島素治療之中的糖尿病患口服葡萄糖後，胃抑素之分泌與正常人無異〔19〕；Anderson〔2〕也發現在患有高糖症及高胰島素症(Hyperinsulinemia)的病患身上，胰島素並未發揮抑制胃抑素分泌的功能。1980年，Verdonk〔46〕發現胰島素可以抑制由脂肪食物刺激的胃抑素分泌，但對葡萄糖所刺激的胃抑素分泌，效果並不大，可見胰島素抑制胃抑素分泌的負回饋機制，是因刺激物不同而異；所以仍可以解釋糖尿病鼠因胰島素缺乏而致胃抑素分泌比正常鼠略高。另外，Elahi〔17〕也發現給患有高糖症及高胰島素症的病患注射胃抑素後，其體內胃抑素之半生期比正常人明顯縮短；他再以狗為實驗動物，分成高血糖、高胰島素及高血糖兼高胰島素三組，觀察注射胃抑素後的代謝情形，結果發現高濃度的血糖可以促進胃抑素之代謝清除率(Metabolic Clearance)，胰島素則無此種效果。所以糖尿病鼠的高濃度血糖也可能影響胃抑素在體內之循環代謝，因而在過了分泌高峰期後，隨即快速下降。至於雌性糖尿病鼠口服葡萄糖後，血漿胃抑素濃度亦有立即而明顯的升高，並於刺激後之分泌高峰期比正常BB雌鼠高；但是在同一時間的反應，WS及SD雌鼠卻比雌性糖尿病鼠及WS、SD雄鼠都高；我們推測此一結果表示在胃抑素的分泌機能上，可能具有種系及性別的差異，而BB種系大鼠之血糖濃度對於葡萄糖刺激的反應又比WS及SD種系大鼠強，也可能因此BB種系大鼠在胃抑素對葡萄糖之刺激的反應上比WS及SD種系大鼠差。另外，雌性糖尿病鼠之血漿胃抑素變化也



和雄性糖尿病鼠一般，在過了分泌高峰期後，隨即快速下降，顯示其高濃度的血糖也加速了胃抑素在其體內的代謝清除率。

總結來說，先天性糖尿病鼠由於體內胰島素的缺乏而使其抑制胃抑素分泌的負回饋機制失效，可能是造成其血漿胃抑素濃度比正常鼠高的原因；糖尿病鼠的高濃度血糖亦由於胰島素的缺乏而喪失對血糖的調控能力並使胃抑素代謝加快而造成胃抑素濃度的快速下降。至於血糖及胃抑素濃度對葡萄糖刺激反應上的種別性差異，可分別對不同種系的大鼠注射 Streptozocin 以引發動物的糖尿病症狀，再進行比較完整的對照比較，值得進一步研究。

綜合實驗結果，結論如下：

(1) 先天性雌雄糖尿病鼠口服葡萄糖後，血漿胃抑素濃度皆比正常 BB 大鼠高，但消失得也比較快。

(2) 胃抑素的分泌因種系與性別而有所不同；正常雄鼠間並無差異，而 SD 雌鼠則比 WS 雌鼠分泌量多，WS 雌鼠又比正常 BB 雌鼠分泌量多。

(3) 本研究對先天性糖尿病鼠及正常 BB 種系大鼠所建立之實驗用動物模式，可供日後研究的參考；而胃抑素分泌的變化，也可提供日後對其胃酸分泌研究的參考。

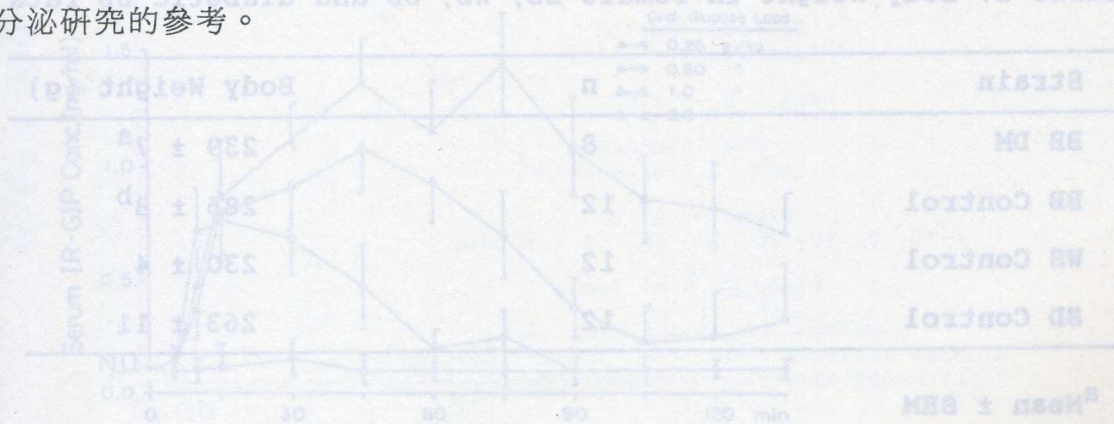


圖 2 不同種系大鼠口服葡萄糖後，血清胃抑素濃度對不同劑量口服葡萄糖刺激之反應  
 Fig. 2. Effect of variable dose of oral glucose loading on the concentration of serum GIP in human.



五、圖表及說明：

Table 1. Body weight in male BB, WS, SD and diabetic BB rats

Strain	n	Body Weight (g)
BB DM	8	314 ± 16 <sup>a</sup>
BB Control	10	441 ± 11 <sup>b</sup>
WS Control	11	384 ± 12 <sup>b</sup>
SD Control	12	398 ± 16 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Mean ± SEM

<sup>b</sup>p < 0.01 compared with BB DM

表1 雄性糖尿病鼠及正常BB·WS·SD雄鼠體重的比較

Table 2. Body weight in female BB, WS, SD and diabetic BB rats

Strain	n	Body Weight (g)
BB DM	8	239 ± 7 <sup>a</sup>
BB Control	12	285 ± 8 <sup>b</sup>
WS Control	12	230 ± 4
SD Control	12	263 ± 11

<sup>a</sup>Mean ± SEM

<sup>b</sup>p < 0.01 compared with BB DM

表2 雌性糖尿病鼠及正常BB·WS·SD雌鼠體重的比較







Morgan, Diabetologia 16:235, 1979.

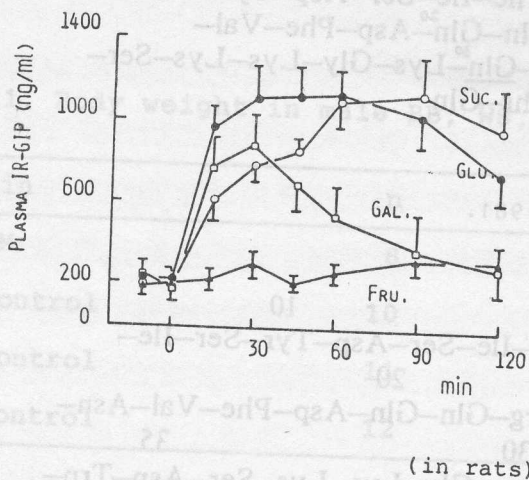


圖3 大鼠血漿胃抑素濃度對不同刺激物之反應

Fig. 3. Effect of different stimuli on the concentration of plasma GIP in rats

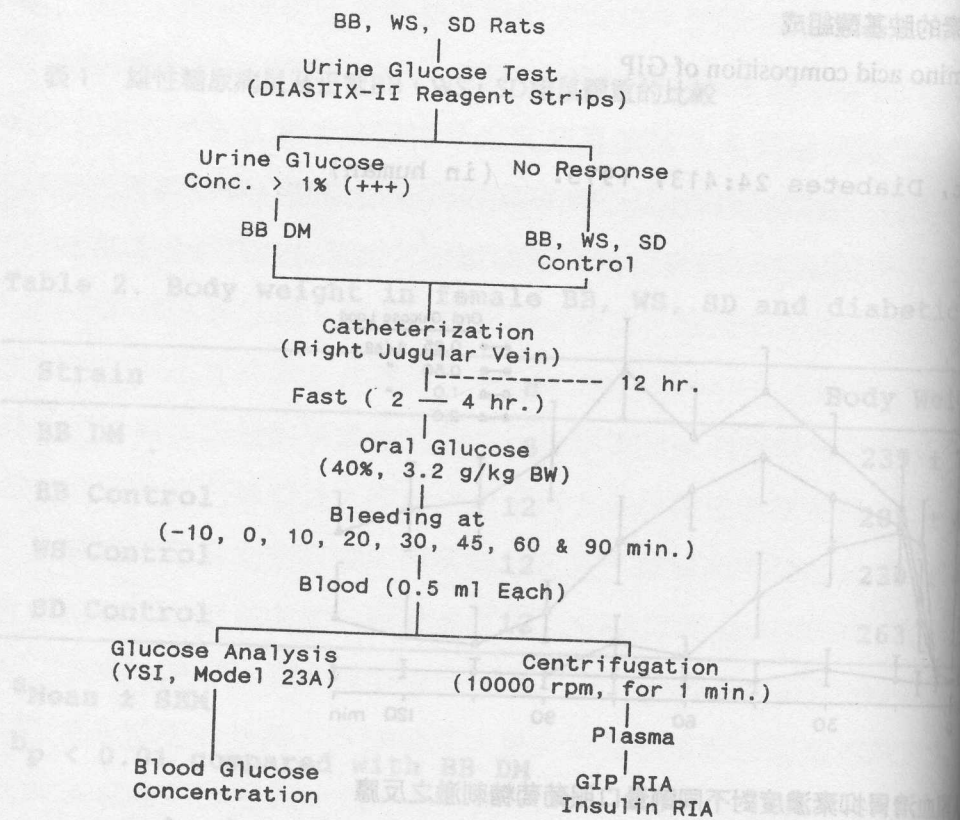


圖4 實驗設計之方法流程圖

Fig. 4. A flow chart for the experiment.



### Iodination of GIP

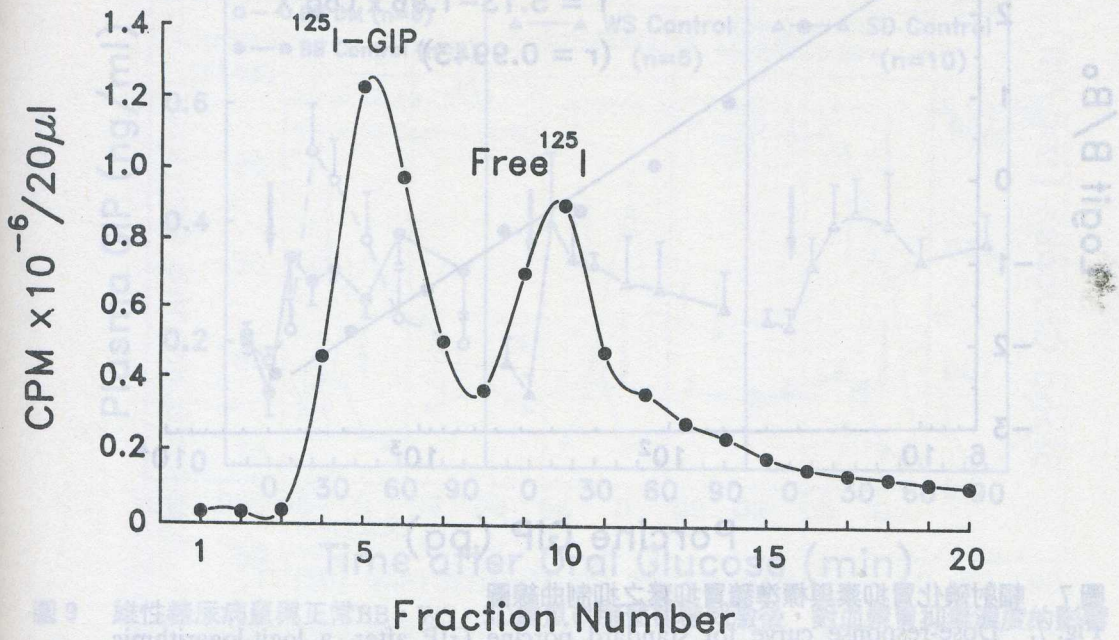


圖 5 輻射碘化胃抑素之純化圖

Fig. 5. Elution pattern for the purification of <sup>125</sup>I-GIP.

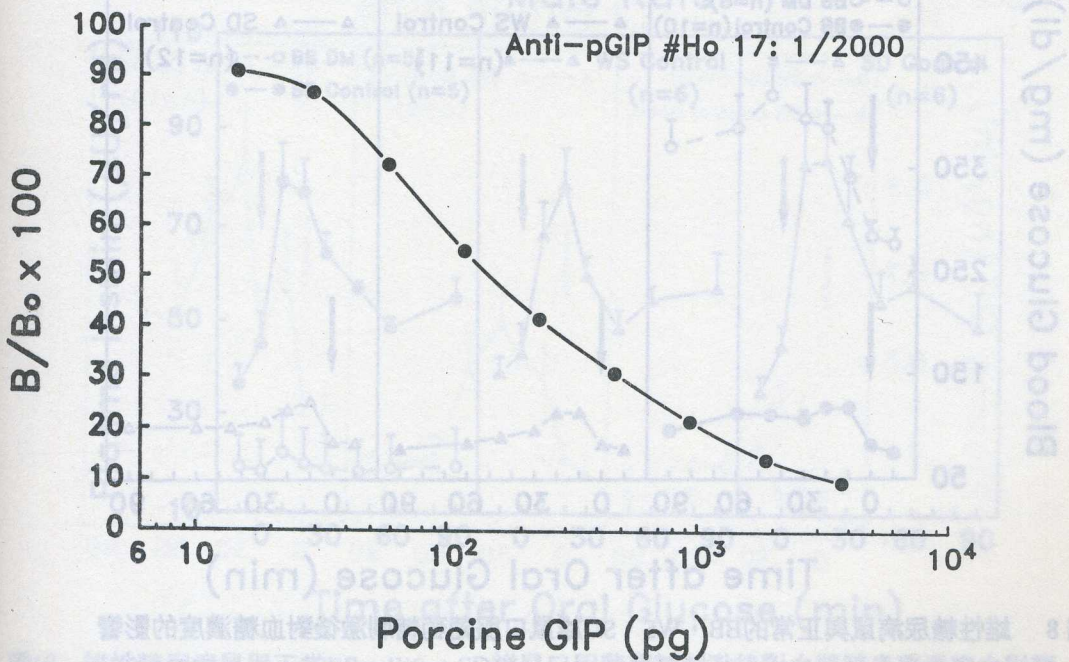


圖 6 豬胃抑素之標準曲線圖

Fig. 6. Standard curve of porcine GIP.



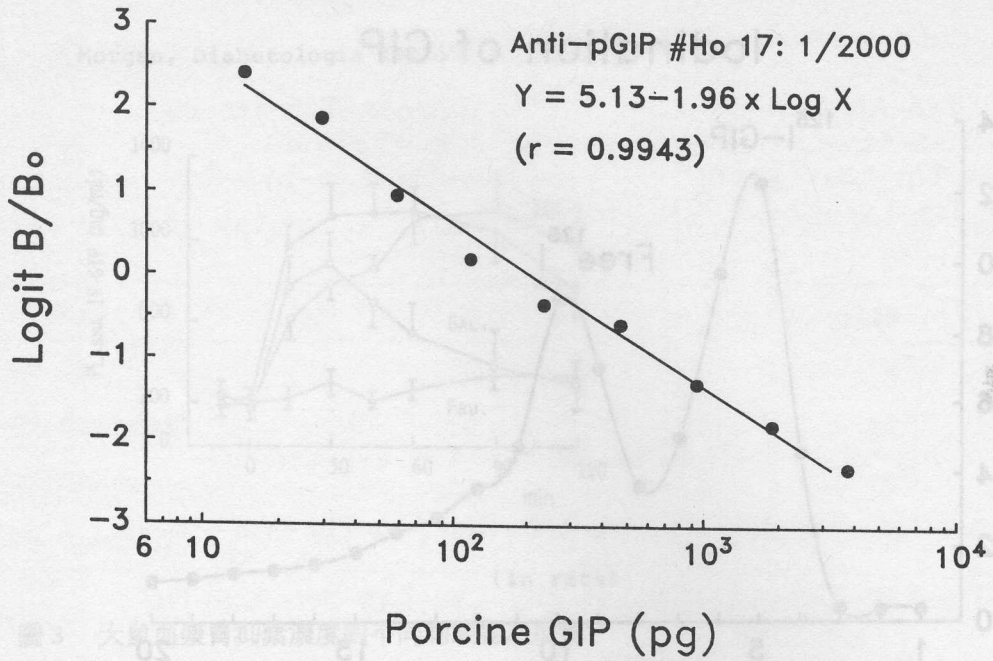


圖 7 輻射碘化胃抑素與標準豬胃抑素之抑制曲線圖

Fig. 7. Dose-response curve for standard porcine GIP after a logit-logarithmic transformation.

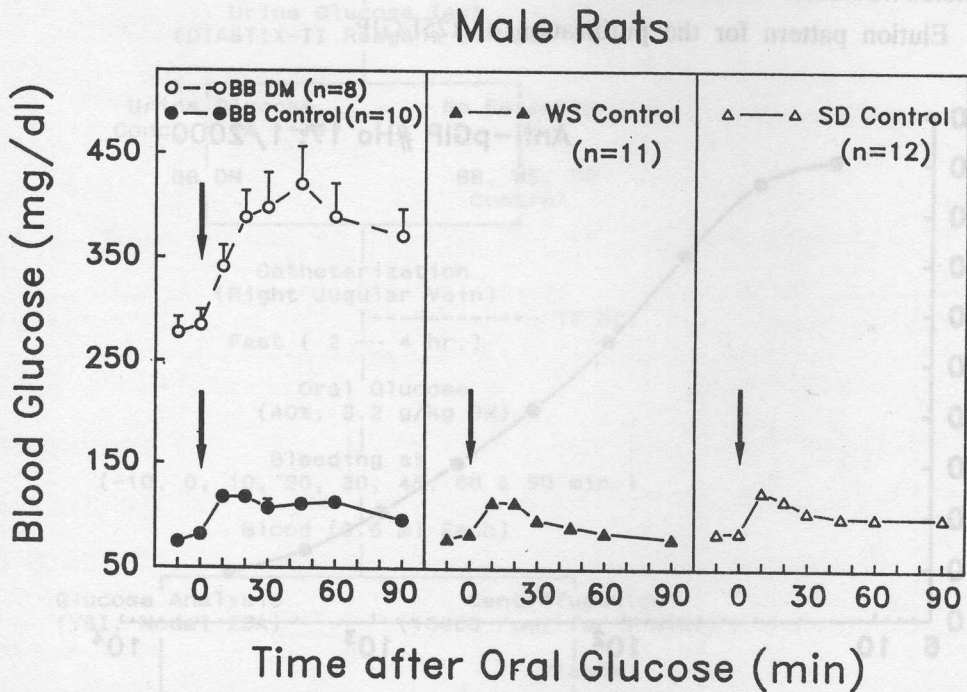


圖 8 雄性糖尿病鼠與正常的BB·WS·SD雄鼠口服葡萄糖刺激後對血糖濃度的影響

Fig. 8. Effect of oral glucose loading on the concentration of blood glucose in male BB, WS, SD and diabetic BB rats.



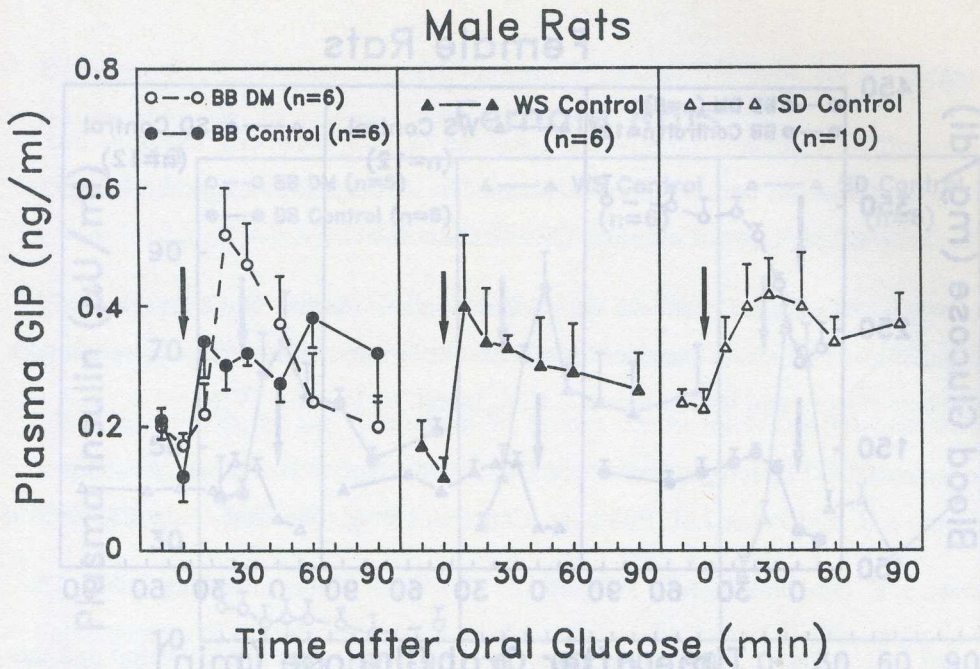


圖 9 雄性糖尿病鼠與正常BB, WS, SD雄鼠口服葡萄糖刺激後, 對血漿胃抑素濃度的影響  
 Fig. 9. Effect of oral glucose loading on the concentration of plasma GIP in male BB, WS, SD and diabetic BB rats.

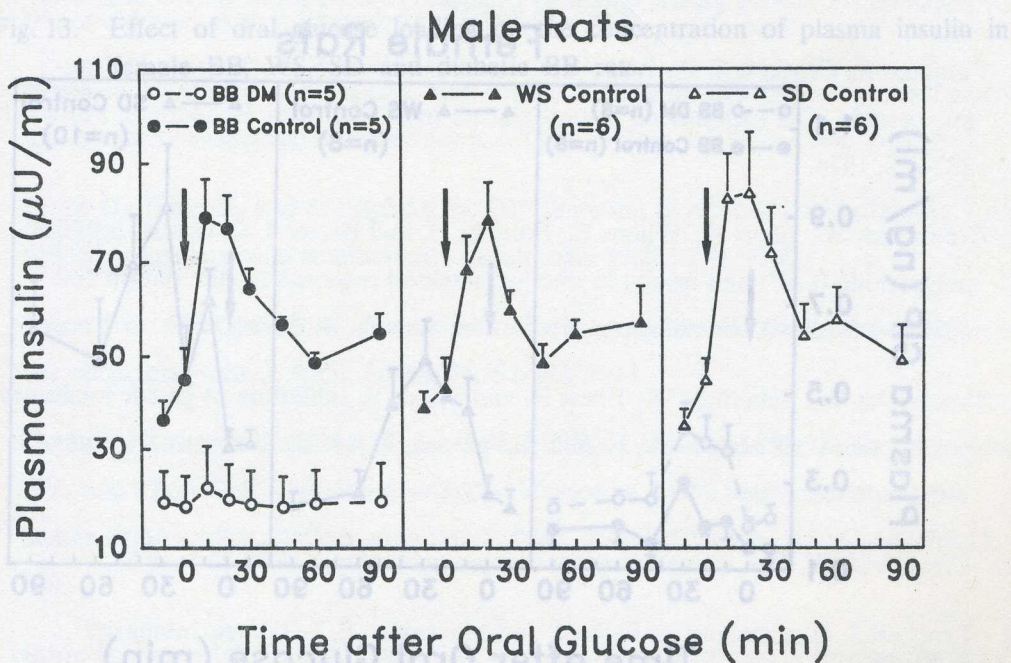


圖10 雄性糖尿病鼠與正常BB, WS, SD雄鼠口服葡萄糖刺激後對血漿胰島素濃度之影響  
 Fig. 10. Effect of oral glucose loading on the concentration of plasma insulin in male BB, WS, SD and diabetic BB rats.



### Female Rats

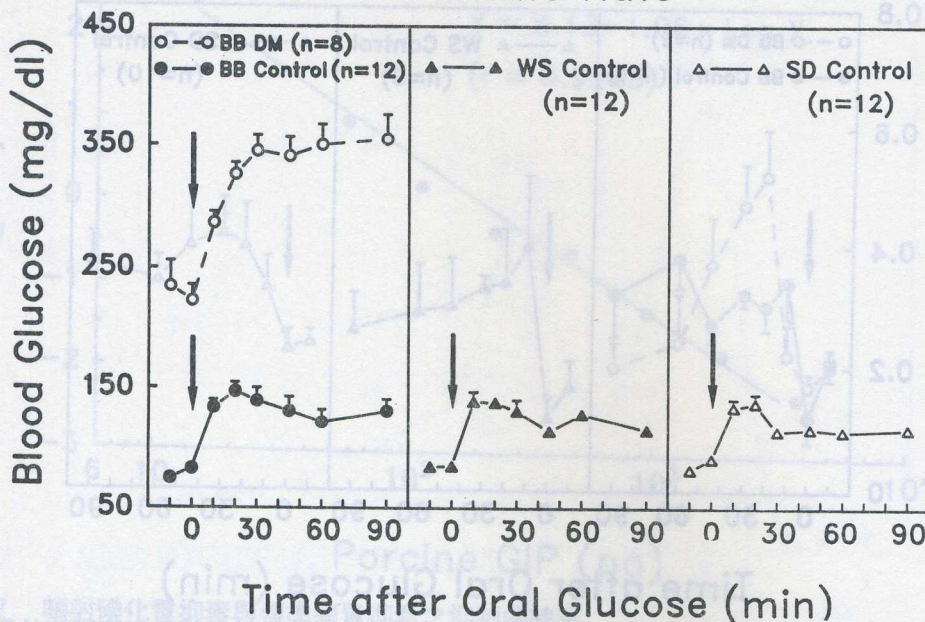


圖11 雌性糖尿病鼠與正常BB、WS、SD雌鼠口服葡萄糖刺激後對血糖濃度之影響

Fig. 11. Effect of oral glucose loading on the concentration of blood glucose in female BB, WS, SD and diabetic BB rats.

### Female Rats

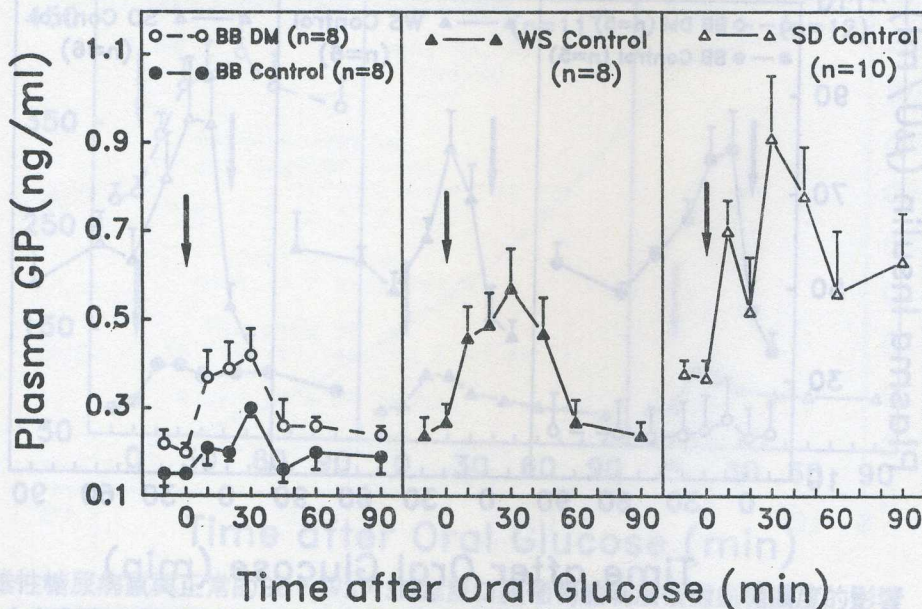


圖12 雌性糖尿病鼠與正常BB、WS、SD雌鼠口服葡萄糖刺激後對血漿胃抑素濃度之影響

Fig. 12. Effect of oral glucose loading on the concentration of plasma GIP in female BB, WS, SD and diabetic BB rats.



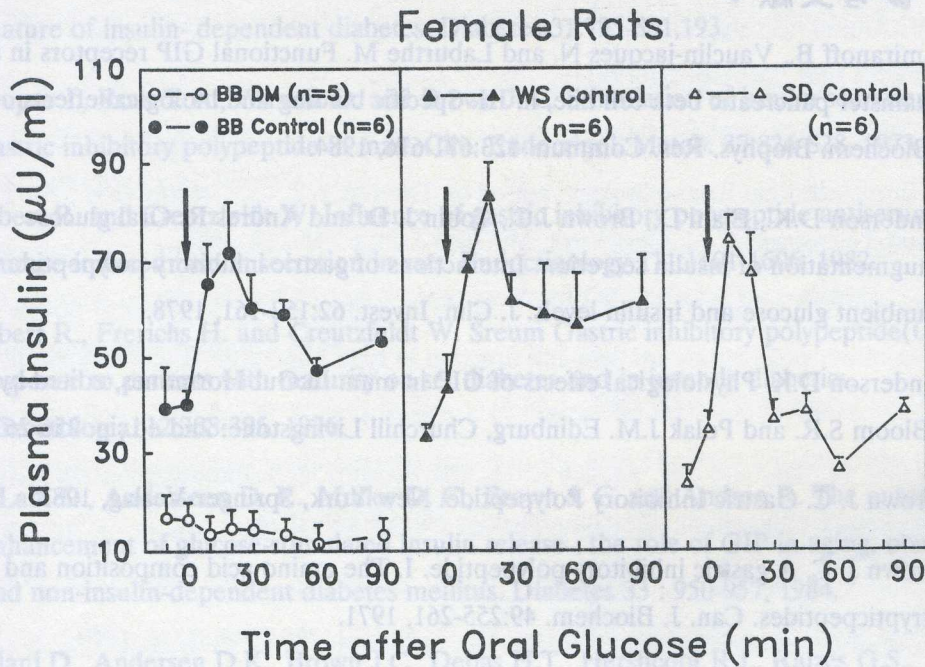


圖13 雌性糖尿病鼠與正常BB、WS、SD雌鼠口服葡萄糖刺激後對血漿胰島素濃度之影響  
 Fig. 13. Effect of oral glucose loading on the concentration of plasma insulin in female BB, WS, SD and diabetic BB rats.



## 六、參考文獻：

1. Amiranoff B., Vauclin-jacques N. and Laburthe M. Functional GIP receptors in a hamster pancreatic beta cell line, in III: Specific binding and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123:671-676, 1984.
2. Anderson D.K., Elahi D., Brown J.C., Tobin J. D. and Andres R. Oral glucose augmentation of insulin secretion. Interactions of gastric inhibitory polypeptide with ambient glucose and insulin levels. *J. Clin. Invest.* 62:152-161, 1978.
3. Anderson D.K. Physiological effects of GIP in man. In: *Gut Hormones*, edited by Bloom S.R. and Polak J.M. Edinburg, Churchill Livingstone: 2nd ed., p. 256-263, 1981.
4. Brown J. C. *Gastric Inhibitory Polypeptide*. New York, Springer-Verlag, 1982.
5. Brown J. C. A gastric inhibitory polypeptide. I. The amino acid composition and the tryptic peptides. *Can. J. Biochem.* 49:255-261, 1971.
6. Buffa R., Polak J. M., Pearse A. G. E., Solcia E. and Grimelius L. Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. *Histochemistry* 43: 249-255, 1975.
7. Cataland S., Crockett S. E., Brown J. C. and Mazzaferri E. L. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulated by oral glucose in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39: 223-228, 1974.
8. Creutzfeldt W., Ebert R., Willms B., Frerichs H. and Brown J. C. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin in obesity: increased response to stimulation and defective feedback control serum levels. *Diabetologia* 14: 15-24, 1978.
9. Creutzfeldt W., Talaulicar M., Ebert R. and willms B. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide (GIP) release by insulin and glucose in javenile diabetes. *Diabetes* 29: 140-145, 1980.
10. Creutzfeldt W, The incretin concept today. *Diabetologia* 16:75-85 , 1979.
11. Crockett S. E., Cataland S., Falko J. and Mazzaferri E. L. Gastric inhibitory polypeptide: response in variable dose of glucose in normal subjects and abnormal responses to oral glucose inpatients with adult onset diabetes mellitus. *Diabetes* 24: 413-417, 1975.



12. DeFronzo R. A., Hendler R. and Simonson D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin- dependent diabetes. *Diabetes* 31:795-801,193.
13. Dupre J., Ross S. A., Watson D. and Brown J. C. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *Clin. Endocrinol. Metab.* 37:826-828, 1973.
14. Ebert R. and Creutzfeldt W. Influence of gastric inhibitory polypeptide antiserum on glucose-induced insulin secretion in rats. *Endocrinology* 111:1601-1606, 1982.
15. Ebert R., Frerichs H. and Creutzfeldt W. Serum Gastric inhibitory polypeptide(GIP) response to patients with maturity on set diabetes and in juvenile diabetics. *Diabetologia.* 12:388-395, 1976.
16. ELahi D., Anderseen D. K., Muller D. C., Brown J. C. and Andree R. The enteric enhancement of glucose-stimulated insulin release : the role of GIP in aging, obesity, and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33 : 950-957, 1984.
17. Elani D., Andersen D.K., Brown J.C., Debas H.T., Hershcopt R.J., Raizes G.S., Tobin J. D. and Andree R. Pancreatic alpha and beta cell responses to GIP infusion in normal man. *Am. J. Physiol.* 237 : E185-191, 1979.
18. Elrick H., Stimmler L., Hlad C. J. and Arai Y. Plasma insulin response to oral glucose and intravenous glucose administration. *J. Clin. Endocr.* 24: 1076-1082, 1964.
19. Finke U., Ebert R. and Creutzfeldt W. GIP secretion in juvenile onset diabetes following maximal oral stimulation. *Diadetologia* 19:273-274, 1980.
20. Harm P.G. and Ojeda S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J. Appl. Phsiol.* 36.391-392, 1974.
21. Ho L. T., Chang B. Y., Lin S.H., Lu Z.A., Lin W.H., Huang M.H., Hsiao L.L., Hung S.H. and Chou C. K. Development and validation of a new radioimmunoassay of insulin using semisynthetic human tracer. *Proc. Natl. Sci. Counc. R.O.C. (A)* 7:9-15, 1983.
22. Jorde R., Burhol P. G. and Schulz T.B. Glucose-induced releasd of immunoactive gastric inhibitory polypeptide(IR-GIP) into the duodenal lumen in man. *Scan. J. Gastroent.* 16:653-656, 1981.



23. Jornvall H., Carlquist M., Kwauk S., Otte S. C., McIntosh C.H.S., Brown J.C. and Mutt V. Amino acid sequence and heterogeneity of gastric inhibitory polypeptide(GIP). *FEBS Lett.* 123:205-210,1981.
24. Khalil T., Alinder G. and Rayford P.L. Gastric inhibitory polypeptide. In: *Gastrointestinal Endocrinology*, edited by Thompson J. C., Greeley G.H., Rayford P.L. and Townsened C.M. New York, McGraw-Hill: p.248-259, 1987.
25. Krarup T. Saurbrey N., Moody A. J., Kuhl C. and Madsbad S. Effect of porcine gastric inhibitory polypeptide on beta-cell function in type I and type II diabetes mellitus. *Metabolism* 36:677-682, 1987..
26. Kuzio M., Dryburg J.R., Malloy K. M. and Brown J. C. Radioimmunoassay for gastric inhibitory polypeptide. *Gastroenterology* 66:357-364, 1974.
27. Levin S.R., Pehlevanian M. Z. and Lavee A. E. Secretion of an insulinotropic factor from isolated perfused rat intestine. *Am. J. Physiol.* 236:E710-E716, 1979.
28. Mackay P., Boulton A. and Rabinovitch A. Lymphoid cells of BB/W diabetic rats are cytotoxic to islet beta cells in vitro. *Diabetes* 34:706-709, 1985.
29. McCullough A. J., Miller L. J. and Service F. J. Effect of graded intraduodenal glucose infusions on the release and physiological cation of gastric inhibitory polypeptide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:234-239, 1983.
30. Moody A. J., Thim L. and Valverde I. The isolation and sequencing of human gastric inhibitory polypeptide(GIP). *FEBS Lett.* 172:142-148,1984.
31. Morgan L. M., Wright J. W. and Marks V. The effect of oral galactose on GIP and insulin secretion in man. *Diabetologia* 16:235-239, 1979.
32. Nagy M. V., Chan E. K., Teruya M., Forrest L.E., Likhite V. and Charles M. A. Macrophage-mediated islet cell cytotoxicity in BB rats. *Diabetes* 38:1329-1331, 1989.
33. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28:1039-1057, 1979.
34. O'Dorisio T. M., Sirinek K. R., Mazzaferria E. L. and Cataland S. Renal effect on serum gastric inhibitory polypeptide (GIP). *Metabolism* 26:651-656,1977.



35. Pederson R.A. and Brown J.C. The insulinotropic action of gastric inhibitory polypeptide in the perfused isolated rat pancreas. *Endocrinology* 99:780-785,1976.
36. Pederson R.A. and Brown J. C. Inhibition of histamine-, Pentagastrin-, and insulin-stimulated canine gastric secretion by pure "gastric inhibitory polypeptide". *Gastroenterology* 62:393-400, 1972.
37. Pederson R. A. and Brown J. C. Interaction of gastric inhibitory polypeptide, glucose and arginine on insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 103:610-615,1978.
38. Pederson R.A., Schuber H. E. and Brown J. C. Gastric inhibitory polypeptide. It's physiological release and insulinotropic action in the dog. *Diabetes* 24:1050-1056,1975.
39. Pfeifer M. A., Halter J. B. and Porte D. J. Insulin secretion in diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 70:579-588, 1981.
40. Ross S. A., Brown J. C. and Dupre J. Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide following oral glucose in diabetes mellitus. *Diabetes* 26:525-529, 1977.
41. Rotter J. I. and Rimoin D. L. Heterogeneity in diabetes mellitus—update. *Diabetes* 27:599-603, 1978.
42. Sarson D. L. and Bloom S. R. GIP and the enteroinsular axis. In: *Gut Hormones*, edited by Bloom S. R. and Polak J. M. Edinburg, Churchill Livingstone:2nd ed., p. 264-268, 1981.
43. Schattenman G., Ebert R., Siewert R. Creutzfeldt W. Different response of gastric inhibitory polypeptide to glucose and fat from duodenum and jejunum. *Sand. J. Gastroenterol.* 19:260-266, 1984.
44. Service F. J., Rizza R.A., Westland R. E., Hall L. D., Gerich J. E. and Go V. L. W. Gastric inhibitory polypeptide in obesity and diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58:1133-1140, 1984.
45. Sykes S., Morgan L. M., English J. and Marks V. Evidence for preferential stimulation of gastric inhibitory polypeptide secretion in rat by actively transported carbohydrates and their analogues. *J. Endocrinol.* 85: 201-207, 1980.



46. Verdonk C. A., Rizza R. A., Nelson R. L., Go V.L.W., Gerich J. and Service F. J.  
Interaction of fat-stimulated gastric inhibitory polypeptide on pancreatic alpha and  
beta-cell function. *J. Clin. Invest.* 65: 1119-1125, 1980.