

# 罗伊氏乳酸杆菌(*Lactobacillus reuteri*) GKD2 改善高脂高糖饮食动物模式之血糖调控

陈雅君<sup>1</sup>, 蔡侑珊<sup>1</sup>, 林诗伟<sup>1</sup>, 林静敏<sup>2</sup>, 陈炎炼<sup>1</sup>, 陈劲初<sup>3,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>葡萄王生技股份有限公司, 台湾 桃园

<sup>2</sup>上海葡萄王企业有限公司, 上海

<sup>3</sup>台湾大学食品科技研究所, 台湾 台北

<sup>4</sup>实践大学食品营养与保健生技系, 台湾 台北

<sup>5</sup>中原大学生物科技学系, 台湾 桃园

收稿日期: 2023年11月24日; 录用日期: 2024年4月11日; 发布日期: 2024年4月22日

## 摘要

葡萄糖耐受不良(impaired glucose tolerance)系指生理对血糖调控能力较差的状态, 虽无明显临床症状, 却为糖尿病(diabetes)或心血管疾病(cardiovascular diseases)的病变前兆。此阶段往往被忽视, 或医疗建议的饮食控制与运动对于此类族群的实施效果有限。益生菌(probiotics)系指对人体机能有益的细菌, 可参与人体的生理代谢、肠道菌相调整等, 广受市场接受, 因此具应用于糖尿病病前期对策的潜能。本实验以高脂、高糖(high fat-high sugar, HF-HS)的饮食方式诱导C57BL/6JNarl小鼠发生葡萄糖耐受不良的状况, 模拟常见之葡萄糖耐受不良成因。HF-HS小鼠分别补充8周低剂量(20.5 mg/kg/day)与高剂量(102.5 mg/kg/day)的罗伊氏乳酸杆菌(*Lactobacillus reuteri*) GKD2菌粉。在口服葡萄糖耐受性试验(oral glucose toerance test)中, 相比单纯HF-HS饮食组, 摄入菌株GKD2的HF-HS小鼠, 其餐后血糖值有较低的趋势。此外, 血糖调节的相关指标瘦体素(leptin)在益生菌组观察到下降的趋势; 非空腹的胰岛素(insulin)浓度以高剂量GKD2组呈显著下降( $p < 0.05$ )。血脂方面, 益生菌GKD2的补充显著降低血液中总胆固醇(total cholesterol)的含量( $p < 0.05$ )。组织病理学上, 观测到较少的脂肪堆积于GKD2组的小鼠肝脏组织。总观以上结果, *L. reuteri* GKD2有助于高脂高糖饮食者的血糖调控与生理代谢。

## 关键词

高脂高糖饮食, 胰岛素, 瘦体素, 血糖调节, 血脂, 益生菌

# *Lactobacillus reuteri* GKD2 Improves Blood Glucose Regulation in High-Fat and High-Sugar Diet Animal Model

\*通讯作者。

文章引用: 陈雅君, 蔡侑珊, 林诗伟, 林静敏, 陈炎炼, 陈劲初. 伊氏乳酸杆菌(*Lactobacillus reuteri*) GKD2 改善高脂高糖饮食动物模式之血糖调控[J]. 生物医学, 2024, 14(2): 212-220. DOI: 10.12677/hjbm.2024.142023

Ya-JunChen<sup>1</sup>, You-ShanTsai<sup>1</sup>, Shih-Wen Lin<sup>1</sup>, Jing-Min Lin<sup>2</sup>, Yen-Lien Chen<sup>1</sup>,  
Chin-Chu Chen<sup>3,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>Grape King Bio Co. Ltd., Taoyuan Taiwan

<sup>2</sup>Shanghai Grape King Enterprise Co., Ltd., Shanghai

<sup>3</sup>Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei Taiwan

<sup>4</sup>Department of Food Science, Nutrition and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei Taiwan

<sup>5</sup>Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taoyuan Taiwan

Received: Nov. 24<sup>th</sup>, 2023; accepted: Apr. 11<sup>th</sup>, 2024; published: Apr. 22<sup>nd</sup>, 2024

## Abstract

Impaired glucose tolerance refers to a state of poor physiological ability to regulate blood sugar. Although there are no obvious clinical symptoms, it is a precursor to diabetes or cardiovascular diseases. This stage is often ignored, or medically recommended diet control and exercise have limited effect on this group of people. Probiotics refer to bacteria that are beneficial to human body functions. They can participate in the body's physiological metabolism and balance the gut microbiota. They are widely accepted by the market and therefore have the potential to be used in early stage countermeasures for diabetes. In this experiment, a high-fat, high-sugar (HF-HS) diet was used to induce glucose intolerance in C57BL/6JNarl mice, simulating the common causes of glucose intolerance. HF-HS mice were supplemented with low-dose (20.5 mg/kg/day) and high-dose (102.5 mg/kg/day) *Lactobacillus reuteri* GKD2 bacterial powder respectively for 8 weeks. In the oral glucose tolerance test, compared with the simple HF-HS diet group, the postprandial blood glucose levels of HF-HS mice consuming strain GKD2 tended to be lower. In addition, leptin, a related marker of blood sugar regulation, showed a downward trend in the probiotic group; non-fasting insulin concentration showed a significant decrease in the high-dose GKD2 group ( $p < 0.05$ ). In terms of blood lipids, probiotic GKD2 supplementation significantly reduced the total cholesterol content in the blood ( $p < 0.05$ ). Histopathologically, less fat accumulation was observed in the liver tissue of mice in the GKD2 group. Taken together, the above results indicated that *L. reuteri* GKD2 contributes to blood sugar regulation and physiological metabolism in those high-fat and high-sugar diets.

## Keywords

High-Fat and High-Sugar Diet, Insulin, Leptin, Blood Sugar Regulation, Blood Lipids, Probiotics

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

一般正常饭后血糖值应小于 140 mg/dL, 若大于 200 mg/dL 则为糖尿病(diabetes), 而介于 140 mg/dL 与 200 mg/dL 之间可称为葡萄糖耐受不良(impaired glucose tolerance) [1]。葡萄糖耐受不良是一种常见的健康问题, 其说明生理对血糖调控的状况, 虽其状况未达到世界卫生组织(WHO)定义的糖尿病标准, 也无明显临床症状, 但可视其为发展至糖尿病的前期警讯[2] [3] [4]。根据香港中文大学糖尿病及肥胖症研究所(Institute of Diabetes and Obesity, Chinese University of Hong Kong, China)整理的的数据指出, 葡萄糖耐受不良者在 5 年内演变成糖尿病病患的几率约有 50% [5]。除外, 若不加以控制, 亦会增加动脉粥样硬化

(atherosclerosis)、冠心病(ischemic heart disease)、中风(stroke)等相关心血管疾病的机率[6] [7] [8]。

葡萄糖耐受不良者,除了先天性基因遗传外,大多数与不正常的饮食习惯有关,尤其是高脂、高糖的摄取[9] [10] [11]。因此本实验以高脂、高糖的饮食方式诱导小鼠发生葡萄糖耐受不良的状况,模拟临床常见之葡萄糖耐受不良成因[12]。透过探讨对人体机能有益的益生菌(probiotics)罗伊氏乳酸杆菌(*Lactobacillus reuteri*) GKD2 作为补充保健品对血糖调控能力的影响,盼能提供葡萄糖耐受不良者更多的健康管理渠道,降低糖尿病、心血管疾病等疾病发生率。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 菌株来源与培养

罗伊氏乳酸杆菌(*Lactobacillus reuteri*, 新名: *Limosilactobacillus reuteri*)菌株 GKD2 分离自健康婴儿的肠道,并寄存于日本生物资源保存及研究中心(Biological Resource Center, NITE, Japan),寄存编号为 NITE BP-03700。将菌株 GKD2 培养于 1 L MRS 培养基(Difco, BD, USA)中,培养温度为 37°C,经 16 小时培养后,以 25°C、5000 rpm (Heraeus Megafuge 40 R, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)离心 10 分钟取得菌泥,混入 10%脱脂奶粉,再冷冻干燥而取得活菌菌粉。每克活菌数约  $10^{10}$  CFU。菌粉保存于-20°C 备用,供后续动物实验使用。

### 2.2. 试验动物

6 周龄之雄性 C57BL/6JNarl 小鼠购自台湾实验研究院实验动物中心(National Laboratory Animal Center, Taiwan Region)。试验动物进入鼠房后,皆经一周适应期后,再开始进行试验。动物饲养室之环境设定为温度  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度  $50\% \pm 10\%$  以及 12 小时的光暗周期。本实验之试验动物经台湾财团法人食品工业发展研究所(Food Industry Research and Development Institute, Taiwan Region)实验动物照护及使用委员(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)审核通过(动管字第 107-8 号)。

### 2.3. 试验设计与分组

动物适应期后,将一般饲料改以高脂高糖饲料(high fat-high sugar diet, HF-HS)进行喂养(表 1)。经 4 周后,以口服葡萄糖耐受性试验(oral glucose tolerance test, OGTT)确认 HF-HS 饮食与正常饮食相比,已造成血糖调控失衡后,将血糖调控失衡的 HF-HS 饮食小鼠取 24 只进行分组,分为 HF-HS 饮食组、HF-HS + 低剂量菌株 GKD2 (GKD2-L)、以及 HF-HS + 高剂量菌株 GKD2 (GKD2-H),每组 8 只。分组后之试验小鼠皆持续以 HF-HS 饮食进行,而益生菌组(GKD2-L、GKD2-H)之小鼠则每日新增菌株 GKD2 的摄入,持续 8 周(图 1)。菌株 GKD2 给予小鼠之低、高剂量分别以成人每天摄取 100、500 mg 做换算。实验动物于第 8 周进行 OGTT 了解血糖调控状况,于第 9 周以剪尾采血进行血糖调控相关指标分析,于第 10 周牺牲采血、保留脏器,并进行血脂与肝脏组织病理学的分析。

**Table 1.** Nutritional differences between normal diet and HF-HS diet  
**表 1.** 正常饲料与高脂高糖饲料之营养差异

| Nutrient     | Normal Diet | HF-HS Diet |
|--------------|-------------|------------|
| Fat          | 16.8%       | 60.3%      |
| Protein      | 22.3%       | 18.3%      |
| Carbohydrate | 60.9%       | 21.4%      |
| Kcal/g       | 3.3         | 5.1        |

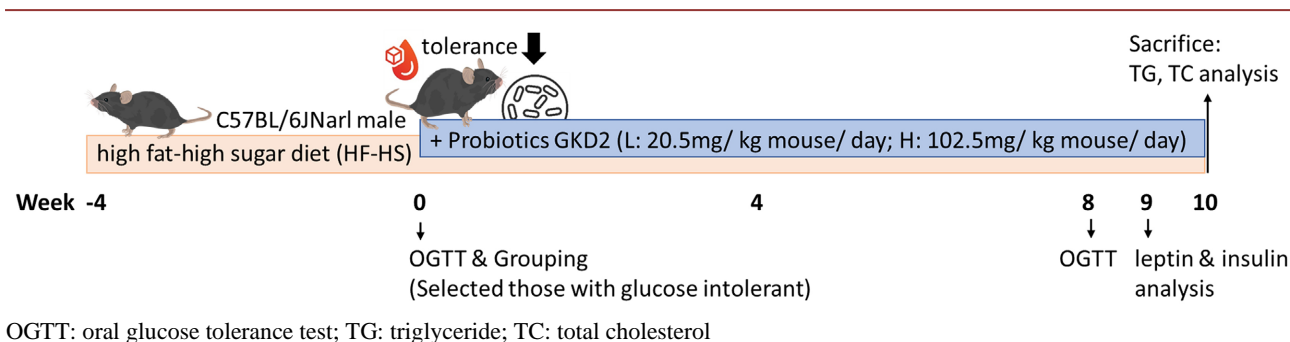


Figure 1. Study design

图 1. 试验设计

## 2.4. 口服葡萄糖耐受性试验(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)

小鼠禁食 16 小时后，自尾端采集空腹(0 分钟)状态之血液样本后，管喂葡萄糖溶液(2 g/kg)，再分别于葡萄糖溶液进入后 30、60 及 120 分钟时采集血液。以 Glucosure II 血糖机(ApexBio Inc., Taiwan Region)搭配血糖测试片(葡萄糖氧化酵素法)检测 0、30、60、以及 120 分钟时之血糖浓度。

## 2.5. 瘦体素与胰岛素分析

于试验第 9 周以剪尾采血方式收集非禁食之血液样品至含有肝素(heparin 20 IU/ml)的采血管中，立刻混和后置于冰上。以 1500 xg，4℃下离心 30 分钟，分离血浆并保存于-20℃冰箱。血浆中的胰岛素使用市售 Mouse Insulin ELISA Kit (KSA448Mu11, Cloud-Clone Corp., USA)搭配分光亮度计进行分析。瘦体素(leptin)分析则使用 DuoSet ELISA for Mouse Leptin (DY498, R&D Systems, USA)的检测套组。

## 2.6. 血脂分析

小鼠禁食 16 小时后牺牲采血，血液中的总胆固醇(Total Cholesterol, TG)及三酸甘油酯(Triglyceride, TC)分析分别以 Abcam (Cambridge, UK)之检测套组 Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantification Assay Kit (ab65359)、Triglyceride Quantification Assay Kit (ab65336)依据原厂操作指南进行分析。

## 2.7. 肝脏组织切片

小鼠牺牲后，取肝脏称重纪录并制作组织切片。肝脏组织以 Hematoxylin & Eosin (H & E)染色，于光学显微镜下观察脂肪肝状况。

## 2.8. 统计分析

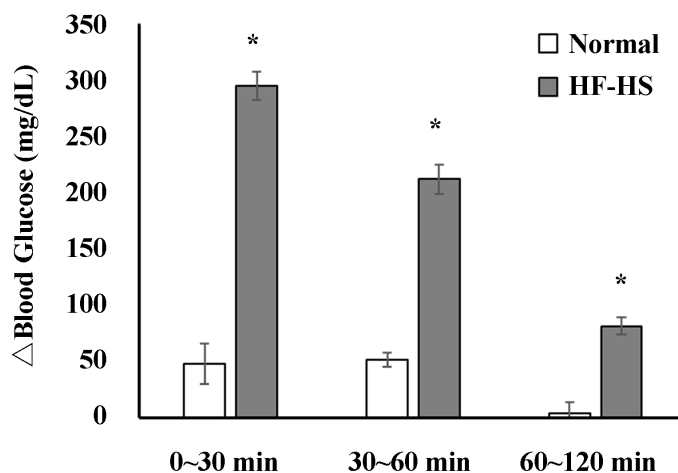
本试验小鼠之体重、摄食量、饮水量以平均值  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)表示，其他分析所得数据则以平均值  $\pm$  平均值标准误差(mean  $\pm$  SEM)表示。统计分析以 Student's *t*-test 比较高脂高糖组(HF-HS)与益生菌组(GKD2)的组间差异，并以  $p < 0.05$  为统计显著。

## 3. 结果

### 3.1. HF-HS 饮食的血糖调控状况

图 2 为 C57BL/6JNarl 小鼠经 4 周高脂高糖饮食后的血糖调节能力。试验期间我们预留 11 只正常饮食之小鼠作为正常饮食对照组，以利挑选因饮食问题引起之血糖调节能力差之 HF-HS 小鼠。以挑选之 24 只 HF-HS 小鼠与正常饮食小鼠( $n = 11$ )相比，在葡萄糖摄入后，其血糖明显于 30 分钟内快速上升，且血

糖上升值(0~30 min)与正常组达显著差异(图 2)。随后, HF-HS 小鼠血糖虽呈现下降趋势, 但不论是在葡萄糖摄入后 30~60 分钟, 或是摄入后 60~120 分钟, 其血糖上升值依然显著高于正常饮食组, 说明本次试验 HF-HS 诱导后所挑选之小鼠已具生理代谢问题, 尤其是具较差的血糖调节能力。



数据以 mean  $\pm$  SEM 呈现。\* $p < 0.05$  表示与正常饮食组相比具显著差异。

**Figure 2.** The oral glucose tolerance after 4 weeks of HF-HS diet  
**图 2.** HF-HS 饮食 4 周后(第 0 周)的口服葡萄糖耐受性

### 3.2. 菌株 GKD2 介入 HF-HS 饮食的血糖调控状况

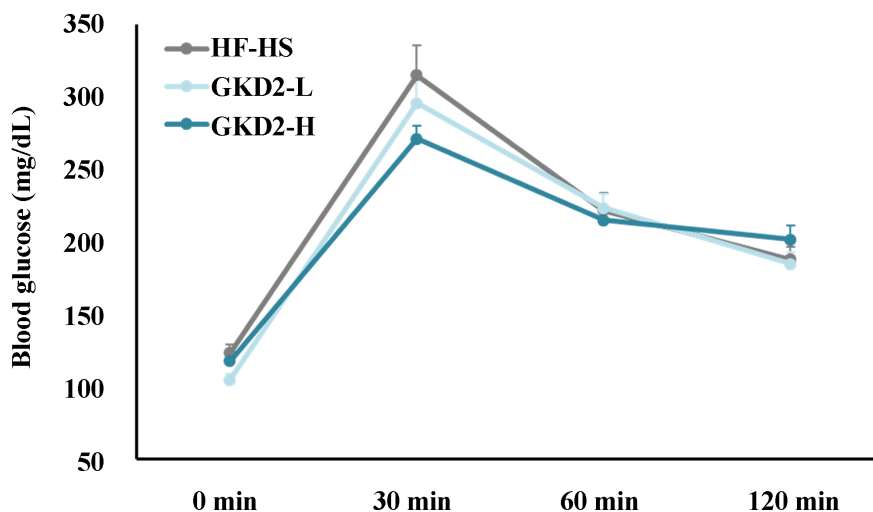
依据图 2 结果, 将 HF-HS 小鼠再随机分成三组( $n = 8$ ), 包含对照的 HF-HS 组、以及 HF-HS 饮食且介入益生菌 GKD2 高(GKD2-H)或低(GKD2-L)剂量两组。分组后的小鼠体重并无显著差异(表 2)。试验结束后, 除了平均摄食量在 GKD2-L 组与 HF-HS 组具统计差异外, 其余组别间的平均摄食量、平均饮水量、以及试验结束后之体重并无显著差异。

**Table 2.** Body weight (g), food intake (g), and water intake (mL) of experimental mice  
**表 2.** 试验小鼠之体重(g)、摄食量(g)、以及饮水量(mL)

| Group  | Body Weight (g) |                | Food Intake (g)  | Water Intake (mL) |
|--------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|
|        | Initial         | Final          |                  |                   |
| HF-HS  | 33.5 $\pm$ 3.1  | 44.6 $\pm$ 5.5 | 2.37 $\pm$ 0.20  | 3.55 $\pm$ 0.25   |
| GKD2-L | 33.1 $\pm$ 3.4  | 43.4 $\pm$ 5.7 | 2.10 $\pm$ 0.12* | 3.23 $\pm$ 0.16   |
| GKD2-H | 33.4 $\pm$ 3.8  | 44.0 $\pm$ 5.4 | 2.43 $\pm$ 0.16  | 3.38 $\pm$ 0.22   |

数据( $n = 8$ )以 mean  $\pm$  SD 呈现。\* $p < 0.05$  表示与 HF-HS 组相比具显著差异。

于试验第 8 周再次进行 OGTT 检测, 结果显示于图 3。HF-HS 组的空腹血糖为 123.4  $\pm$  6.0 mg/dL, 与 GKD2-L 组(104.8  $\pm$  4.5 mg/dL)或 GKD2-H 组(118.1  $\pm$  4.9 mg/dL)的空腹血糖皆无显著差异。然而当葡萄糖摄入后, HF-HS 组在 30 分钟后量测血糖值为 315.4  $\pm$  20.4 mg/dL; 低剂量与高剂量益生菌组的血糖值则有较低的趋势, 分别为 295.9  $\pm$  16.4 mg/dL 与 271.3  $\pm$  9.0 mg/dL。随后 30~120 分钟的血糖值虽无组间显著差异, 菌株 GKD2 的介入, 仍具减少饮食过程中糖分快速进入血液的趋势意义。



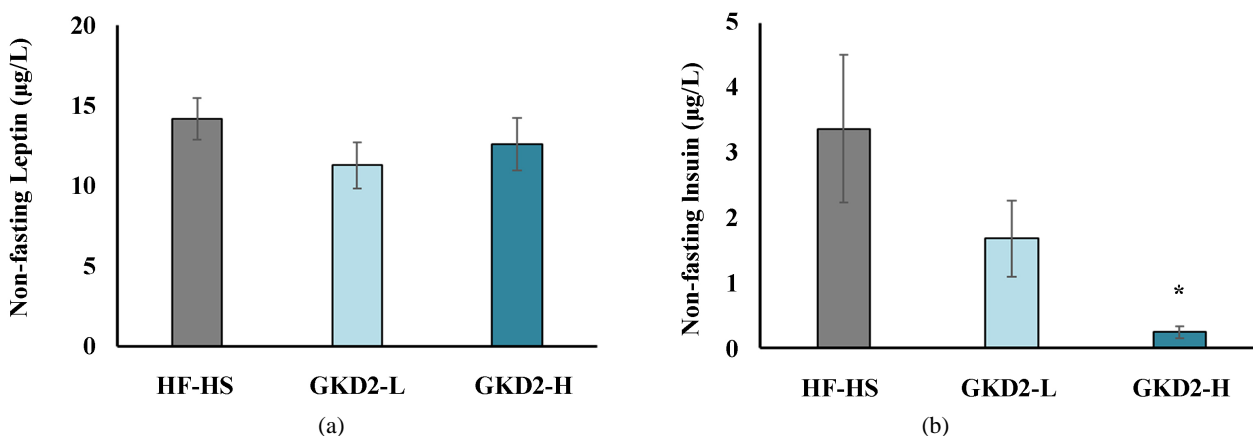
数据(n = 8)以 mean  $\pm$  SEM 呈现。\* $p < 0.05$  表示与 HF-HS 组相比具显著差异。

**Figure 3.** OGTT after 8 weeks of GKD2 consumption

**图 3.** 菌株 GKD2 介入 8 周后的口服葡萄糖耐受性

### 3.3. 血糖调控相关指标分析结果

试验第 9 周小鼠并未进行禁食，故以取得非空腹的血液样品分析 HF-HS 饮食下瘦体素(leptin)与胰岛素(insulin)的浓度(图 4)。在补充益生菌的组别中，非禁食瘦体素皆有低于 HF-HS 组的趋势，即便无统计上差异(图 4(a))。非禁食胰岛素则在 GKD2-L 组中观察到与 HF-HS 组相比较低的趋势，而随着菌株 GKD2 摄入量提高(GKD2-H)，可见其显著降低 HF-HS 饮食下非空腹时期的胰岛素浓度(图 4(b))。



数据(n = 8)以 mean  $\pm$  SEM 呈现。\* $p < 0.05$  表示与 HF-HS 组相比具显著差异。

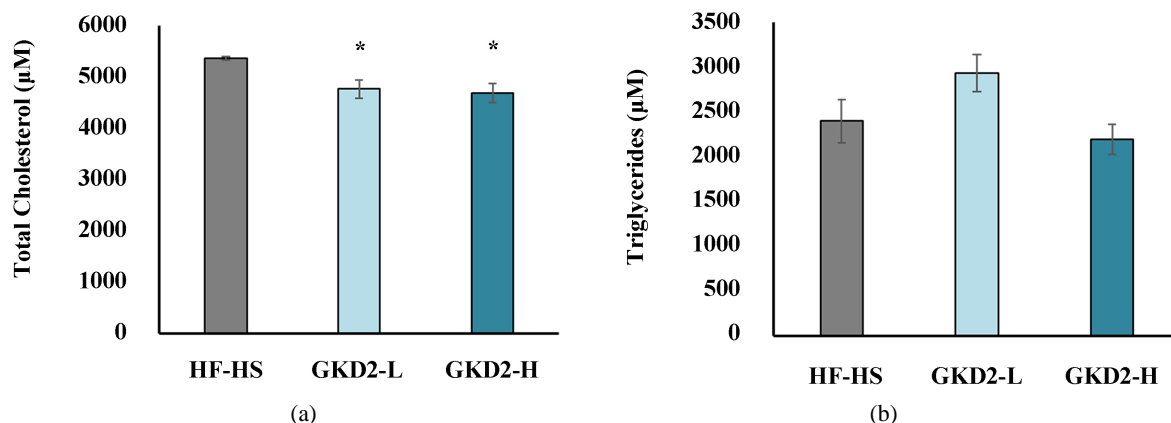
**Figure 4.** Non-fasting leptin (a) and insulin (b) concentration

**图 4.** 非禁食瘦体素(a)与胰岛素(b)浓度

### 3.4. 总胆固醇与三酸甘油酯浓度

试验第 10 周小鼠进行禁食并牺牲，收取之血液进行血脂分析(图 5)。不论摄入高剂量或是低剂量的 GKD2，其总胆固醇(TC)皆显著低于 HF-HS 组(图 5(a))；然而三酸甘油酯(TG)则无组间统计差异，仅高剂量的 GKD2 组有降低的趋势(图 5(b))。





数据(n = 8)以 mean ± SEM 呈现。\* $p < 0.05$  表示与 HF-HS 组相比具显著差异。

Figure 5. TC (a) and TG (b) concentration

图 5. 总胆固醇(a)与三酸甘油酯(b)浓度

### 3.5. 肝脏相对重量与组织病理学

HF-HS、GKD2-L、GKD2-H 组的相对肝脏重分别为  $2.91 \pm 0.16\%$ 、 $2.54 \pm 0.05\%$ 、以及  $2.70 \pm 0.08\%$ 。益生菌 GKD2 补充后，具降低相对肝脏重量的趋势。以肝脏组织切片观察结果可发现，HF-HS 饮食下的肝脏组织具有多处脂肪堆积的现象；而菌株 GKD2 补充下的 HF-HS 饮食组，其观测到的脂肪堆积状况则较少(图 6)。

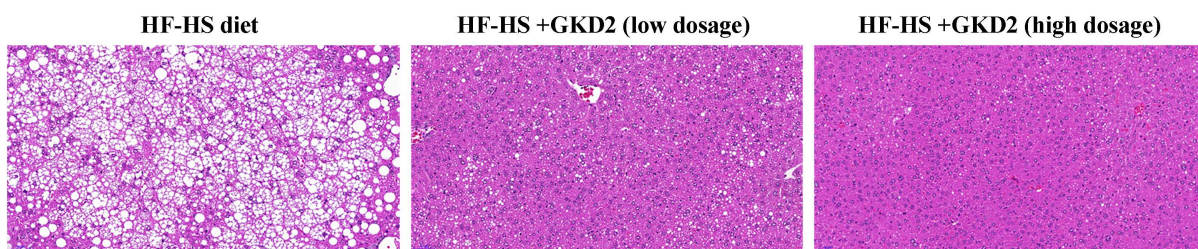


Figure 6. Liver tissue in HF-HS diet mice

图 6. HF-HS 饮食小鼠之肝脏组织

## 4. 讨论

胰岛素(insulin)为一种蛋白质激素，由胰脏  $\beta$  细胞分泌，参与血糖调控，主要作用为增加肝脏和肌肉细胞对葡萄糖的吸收，促进肝糖合成并减少细胞内的葡萄糖释放至血液，达降血糖的作用[13]。在第二型糖尿病(type 2 diabetes)的自然发展史中，胰岛素抗性(insulin resistance)会随之增加，意即细胞对正常浓度的胰岛素反应不佳，这可起因于不正常的饮食、肥胖(obesity)等因子，使体内胰岛素持续处于高浓度的状态[14] [15]。胰脏  $\beta$  细胞接着分泌更多胰岛素以激发细胞对胰岛素的反应，因此在糖尿病诊断前期(餐后血糖值小于 200 mg/dL)会观察到体内胰岛素的增加，随后因胰脏细胞过度分泌而疲乏，导致胰脏细胞数量与功能衰退，胰岛素浓度下降，故长久糖尿病患的胰岛素浓度呈现缺乏状态[16]。在 HF-HS 饮食诱导下类似于糖尿病诊断前期，具有相对高浓度的胰岛素，而菌株 GKD2 的补充有助于体内胰岛素浓度的调节，减少胰脏细胞过度分泌而疲乏(图 4(b))。

瘦体素(leptin)为脂肪细胞(adipocytes)所分泌的一种神经激素(neuroendocrine)，可作用于下视丘(hypothalamus)抑制食欲，且具有促进肌肉代谢、燃烧脂肪、血糖稳定等生理调控功能[17]；然而其特性

与胰岛素相似, 当分泌过多时具有阻抗效应(leptin resistance) [18]。因此, 临床上可观察到肥胖者体内的瘦体素比正常人的浓度高[19]。在台湾高雄医学大学公共卫生学研究所(Department of Public Health, Kaohsiung Medical University, Taiwan Region)的一项研究中指出, 非糖尿病族群中, 瘦体素浓度越高, 其胰岛素阻抗的程度也越高[20]。HF-HS 饮食诱导下的糖尿病前期小鼠试验中, 补充菌株 GKD2 的组别具有降低体内瘦体素的趋势(图 4(a)), 此趋势也与观察到显著降低的体内胰岛素相符, 说明菌株 GKD2 的摄取具有改善生理代谢机能的潜力, 尤其透过影响血糖调控的相关因子, 降低 HF-HS 饮食习惯的餐后血糖不稳定状态(图 3)。

体内维持血糖恒定的机制相当复杂, 上述体内荷尔蒙透过调节细胞对于葡萄糖的生成与利用来维持血糖恒定, 因此血糖调控失调者, 其体内也容易有过多能量摄入、堆积的现象, 造成肥胖[21] [22]。根据研究显示, 约有 80%~90%的第二型糖尿病患者同时具有过重或肥胖的状况, 胰岛素阻抗也与血脂呈正相关[23] [24]。本试验 HF-HS 饮食诱导小鼠模式与糖尿病前期状况类似, 可观察到脂肪堆积于肝脏组织(图 6)。菌株 GKD2 的摄取, 可观察到总胆固醇含量下降(图 5(a)), 但对于三酸甘油脂的减少效果有限(图 5(b))。比对临床常见第二型糖尿病合并血脂异常者, 多为三酸甘油脂异常增加, 以及高密度胆固醇(high density lipoprotein cholesterol)下降, 而低密度胆固醇(low density lipoprotein cholesterol)则与正常人差异不大, 因此关于菌株 GKD2 对于血脂的影响尚需更多的试验确认[25]。

## 5. 结论

本实验以高脂、高糖的饮食方式诱导小鼠发生葡萄糖耐受不良的状况, 模拟临床常见之葡萄糖耐受不良成因。藉由 8 周的益生菌罗伊氏乳酸杆菌(*Lactobacillus reuteri*) GKD2 补充介入, 高脂、高糖饮食下所造成的葡萄糖耐受不良小鼠, 其餐后血糖上升值有下降的趋势。经血糖调节因子分析数据结果, 推论菌株 GKD2 可藉由调节宿主胰岛素分泌量达调节血糖的作用。且菌株 GKD2 的补充可降低体内总胆固醇含量与减少脂肪于肝组织的堆积, 降低心血管的发生率。针对因饮食引起之血糖耐受不良者, 在饮食控制或运动治疗方针外, 补充 *L. reuteri* GKD2 可为改善生理代谢机能之一对策。

## 参考文献

- [1] Rao, S.S., Disraeli, P. and McGregor, T. (2004) Impaired Glucose Tolerance and Impaired Fasting Glucose. *American Family Physician*, **69**, 1961-1968.
- [2] World Health Organization (1999) Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (No. WHO/NCD/NCS/99.2). Geneva.
- [3] Weiss, R., Dufour, S., Taksali, S.E., Tamborlane, W.V., Petersen, K.F., Bonadonna, R.C., Boselli, L., Barbetta, G., Allen, K., Rife, F., Savoye, M., Dziura, J., Sherwin, R., Shulman, G.I. and Caprio, S. (2003) Prediabetes in Obese Youth: A Syndrome of Impaired Glucose Tolerance, Severe Insulin Resistance, and Altered Myocellular and Abdominal Fat Partitioning. *The Lancet*, **362**, 951-957. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14364-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14364-4)
- [4] Bock, G., Dalla Man, C., Campioni, M., Chittilapilly, E., Basu, R., Toffolo, G., Cobelli, C. and Rizza, R. (2006) Pathogenesis of Pre-Diabetes: Mechanisms of Fasting and Postprandial Hyperglycemia in People with Impaired Fasting Glucose and/or Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes*, **55**, 3536-3549. <https://doi.org/10.2337/db06-0319>
- [5] Ko, G.T., Li, J.K., Cheung, A.Y. and Yeung, V.T. (1999) Two-Hour Post-Glucose Loading Plasma Glucose Is the Main Determinant for the Progression from Impaired Glucose Tolerance to Diabetes in Hong Kong Chinese. *Diabetes Care*, **22**, 2096-2097. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.12.2096>
- [6] Gong, Q., Zhang, P., Wang, J., Ma, J., An, Y., Chen, Y., Zhang, B., Feng, X., Li, H., Chen, X., Cheng, Y.J., Gregg, E.W., Hu, Y., Bennett, P.H. and Li, G. (2019) Morbidity and Mortality after Lifestyle Intervention for People with Impaired Glucose Tolerance: 30-Year Results of the Da Qing Diabetes Prevention Outcome Study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, **7**, 452-461. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30093-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30093-2)
- [7] Cai, X., Zhang, Y., Li, M., Wu, J.H., Mai, L., Li, J., Yang, Y., Hu, Y. and Huang, Y. (2020) Association between Pre-diabetes and Risk of All Cause Mortality and Cardiovascular Disease: Updated Meta-Analysis. *BMJ*, **370**, m2297.



- <https://doi.org/10.1136/bmj.m2297>
- [8] Neves, J.S., Newman, C., Bostrom, J.A., Buyschaert, M., Newman, J.D., Medina, J.L., Goldberg, I.J. and Bergman, M. (2022) Management of Dyslipidemia and Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Prediabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **190**, Article 109980. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2022.109980>
- [9] Feskens, E.J., Virtanen, S.M., Räsänen, L., Tuomilehto, J., Stengard, J., Pekkanen, J., Nissinen, A. and Kromhout, D. (1995) Dietary Factors Determining Diabetes and Impaired Glucose Tolerance: A 20-Year Follow-Up of the Finnish and Dutch Cohorts of the Seven Countries Study. *Diabetes Care*, **18**, 1104-1112. <https://doi.org/10.2337/diacare.18.8.1104>
- [10] Saxena, R., Hivert, M.F., Langenberg, C., et al. (2010) Genetic Variation in GIPR Influences the Glucose and Insulin Responses to an Oral Glucose Challenge. *Nature Genetics*, **42**, 142-148. <https://doi.org/10.1038/ng.521>
- [11] Crapo, P.A., Kolterman, O.G. and Olefsky, J.M. (1980) Effects of Oral Fructose in Normal, Diabetic, and Impaired Glucose Tolerance Subjects. *Diabetes Care*, **3**, 575-581. <https://doi.org/10.2337/diacare.3.5.575>
- [12] La Fleur, S., Luijckendijk, M.C.M., Van Rozen, A.J., Kalsbeek, A. and Adan, R.A.H. (2011) A Free-Choice High-Fat High-Sugar Diet Induces Glucose Intolerance and Insulin Unresponsiveness to a Glucose Load Not Explained by Obesity. *International Journal of Obesity*, **35**, 595-604. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.164>
- [13] Rahman, M.S., Hossain, K.S., Das, S., Kundu, S., Adegoke, E.O., Rahman, M.A., Hannan, M.A., Uddin, M.J. and Pang, M.G. (2021) Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article 6403. <https://doi.org/10.3390/ijms22126403>
- [14] Abdul-Ghani, M.A., Tripathy, D. and DeFronzo, R.A. (2006) Contributions of  $\beta$ -Cell Dysfunction and Insulin Resistance to the Pathogenesis of Impaired Glucose Tolerance and Impaired Fasting Glucose. *Diabetes Care*, **29**, 1130-1139. <https://doi.org/10.2337/dc05-2179>
- [15] Cañete, R., Gil-Campos, M., Aguilera, C.M. and Gil, A. (2007) Development of Insulin Resistance and Its Relation to Diet in the Obese Child. *European Journal of Nutrition*, **46**, 181-187. <https://doi.org/10.1007/s00394-007-0648-9>
- [16] Tanenberg, R.J. (2004) Transitioning Pharmacologic Therapy from Oral Agents to Insulin for Type 2 Diabetes. *Current Medical Research and Opinion*, **20**, 541-553. <https://doi.org/10.1185/030079903125003134>
- [17] Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Soskic, S., Essack, M., Arya, S., Stewart, A.J., Gojobori, T. and Isenovic, E.R. (2021) Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Frontiers in Endocrinology*, **12**, Article 585887. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>
- [18] Gruzdeva, O., Borodkina, D., Uchasova, E., Dyleva, Y. and Barbarash, O. (2019) Leptin Resistance: Underlying Mechanisms and Diagnosis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, **12**, 191-198. <https://doi.org/10.2147/dmso.s182406>
- [19] Kumar, R., Mal, K., Razaq, M.K., Magsi, M., Memon, M.K., Memon, S., Afroz, M.N., Siddiqui, H.F. and Rizwan, A. (2020) Association of Leptin with Obesity and Insulin Resistance. *Cureus*, **12**, e12178. <https://doi.org/10.7759/cureus.12178>
- [20] Lee, C.Y. (2007) Relationship between Adipocytokines and Insulin Resistance in Non-Diabetic Women. Master's Thesis, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung.
- [21] Johnson, J.D. (2021) On the Causal Relationships between Hyperinsulinaemia, Insulin Resistance, Obesity and Dysglycaemia in Type 2 Diabetes. *Diabetologia*, **64**, 2138-2146. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05505-4>
- [22] London, E. and Stratakis, C.A. (2022) The Regulation of PKA Signaling in Obesity and in the Maintenance of Metabolic Health. *Pharmacology & Therapeutics*, **237**, Article 108113. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108113>
- [23] Nianogo, R.A. and Arah, O.A. (2022) Forecasting Obesity and Type 2 Diabetes Incidence and Burden: The Vi-LA-Obesity Simulation Model. *Frontiers in Public Health*, **10**, Article 818816. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.818816>
- [24] Cui, J., Sun, J., Wang, W., Xin, H., Qiao, Q., Baloch, Z. and Ma, A. (2017) The Association of Triglycerides and Total Cholesterol Concentrations with Newly Diagnosed Diabetes in Adults in China. *Oncotarget*, **8**, Article 103477. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21969>
- [25] Ren, X., Chen, Z.A., Zheng, S., Han, T., Li, Y., Liu, W. and Hu, Y. (2016) Association between Triglyceride to HDL-C Ratio (TG/HDL-C) and Insulin Resistance in Chinese Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *PLOS ONE*, **11**, e0154345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154345>