

· 基础研究 ·

糖尿病大鼠胰岛 B 细胞损伤的形态定量研究*

文晓红, 郭洋, 向宇, 代小思, 邓世山[△]

(川北医学院基础医学院, 四川南充 637007)

摘要:目的 探讨胰岛 B 细胞损伤后数量能否自行恢复。方法 雄性 SD 大鼠分 2 批进行实验, 2 批均随机分为对照组和实验组。实验组按 60 mg/kg 一次性腹腔内注射链脲佐菌素(STZ), 对照组注射等量的缓冲液; 在注射前和注射后的第 7 天(第 1 批和第 2 批)和第 84 天(第 2 批), 检测空腹血糖; 在第 7 天(第 1 批)和第 84 天(第 2 批)同时检测血清胰岛素, 并取胰腺行胰岛素免疫组织化学染色; 用体视学形态定量研究方法测量胰岛总体积、胰岛总面积和单位面积胰岛内 B 细胞核数量等。结果 与对照组的胰岛总体积、胰岛总面积、单位面积胰岛内 B 细胞核数量、血清胰岛素和空腹血糖比较, 成模大鼠在注射 STZ 后第 7 天和第 84 天差异均有统计学意义。成模大鼠的胰岛总体积、胰岛总面积和单位面积胰岛内 B 细胞核数量在第 7 天和第 84 天差异均无统计学意义; 血清胰岛素在第 84 天比第 7 天减少了 71% ($P < 0.05$); 空腹血糖在第 84 天比第 7 天升高了 30% ($P < 0.05$)。结论 胰岛 B 细胞损伤后, 随着病程的延长, 其数量不能自行恢复。

关键词:链脲佐菌素; 大鼠; 胰岛 B 细胞; 损伤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.22.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)22-2276-02

Study of the damage of pancreas islet B-cell in diabetic rats using morphometry*

Wen Xiaohong, Guo Yang, Xiang Yu, Dai Xiaosi, Deng Shishan[△]

(School of Basic Medical Sciences, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637007, China)

Abstract: **Objective** To explore whether pancreas islet B-cell damaged can reverse spontaneously. **Methods** There were two experiments in which SD rats were divided into control group and experimental group. Rats in the experimental group received intraperitoneal injection of 60 mg/kg STZ and rats in the control group received intraperitoneal injection of equal dose acidified saline. At day before injection, 7 day (the first and the second experiment) and 84 day (the second experiment) after injection, observation on fasting blood glucose was performed. At 7 day (the first experiment) and 84 day (the second experiment), measurement of serum insulin was performed, the pancreata were removed after excision and the insulin immunohistochemistry of pancreas sections was performed. Measure the total volume, the total area of the pancreas islet and the numbers of B-cell nucleus of unit of area in pancreas islet using stereological methods. **Results** There were statistical differences in the total volume, the total area of the pancreas islet, the numbers of B-cell nucleus of unit of area in pancreas islet, serum insulin and fasting blood glucose levels between the control and the diabetic group at 7 day and 84 day after injection. There were no statistical differences in the total volume, the total area of the pancreas islet and the numbers of B-cell nucleus of unit of area in pancreas islet between the diabetic group at 7 day and the diabetic group at 84 day after injection. Compared with the diabetic group at 7 day, serum insulin levels was decreased 71% ($P < 0.05$) and fasting blood glucose levels was increased 30% ($P < 0.05$) in the diabetic group at 84 day. **Conclusion** Pancreas islet B-cell damaged can't reverse spontaneously when diabetes occurring.

Key words: streptozotocin; rats; the pancreas islet B-cell; damage

在糖尿病的防治中, 选择适当的干预措施保护残存的胰岛 B 细胞至关重要。目前, 在运用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)糖尿病动物模型进行胰岛 B 细胞损伤的保护性药物筛选方面的研究中, 有关药物治疗后胰岛 B 细胞数量能否恢复的研究报道较多^[1-2], 但对胰岛 B 细胞损伤后如果不采取任何干预措施, 其数量随着病程的延长能否自行恢复却很少有研究报道。本实验采用体视学形态定量研究方法, 结合血清胰岛素、空腹血糖测量等方法, 探讨胰岛 B 细胞损伤后能否自行恢复, 为胰岛 B 细胞损伤的保护作用方面的研究提供更多的实验依据。

1 材料与方

1.1 材料 雄性 SD 大鼠, 10~12 周龄, 体质量 280~320 g, 由四川省医学科学院实验动物研究所提供。STZ(瑞士 A-LEXIS 公司); ONETOUCH SureStep 微血糖测量仪(中国强

生医疗器材有限公司); 稳步医院用血糖试纸(美国 LifeScan Inc); RAT/MOUSE INSULIN ELISA KIT(美国 LINCO Research); 抗胰岛素抗体(一抗)及 SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); Olympus BX50 型生物显微镜(日本 Olympus 公司); 体视学图像系统(川北医学院与北京驰马特图像技术有限公司及四川大学联合研制)。

1.2 动物分组及药物注射 动物分 2 批进行实验。第 1 批大鼠 38 只, 随机分为对照组 9 只, 实验组 29 只; 第 2 批大鼠 46 只, 随机分为对照组 10 只, 实验组 36 只。自由摄取水和大鼠标准颗粒饲料。将 STZ 临用前以 0.1 mol/L (pH 4.2) 的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液溶解。在不禁食的条件下, 实验组按 60 mg/kg 一次性腹腔内注射 STZ; 对照组一次性腹腔内注射等量的缓冲液。

表 1 对照组与实验组的血糖、血清胰岛素和形态定量结果($\bar{x}\pm s$)

项目	对照 7 d 组	对照 84 d 组	成模 7 d 组	成模 84 d 组
注射前血糖(mmol/L)	5.22±0.38	5.49±0.83	5.30±0.42	5.75±0.46
取材前血糖(mmol/L)	5.72±0.39	4.84±0.43*	16.80±1.85*	21.80±3.52#△
血清胰岛素(ng/mL)	1.07±0.39	1.31±2.05	0.35±0.21*	0.10±0.04#△
胰腺体积(mL ³)	1.81±0.24	2.17±0.17*	1.73±0.36	1.88±0.24#
胰岛总体积(μL^3)	6.06±1.62	10.30±3.47*	1.52±0.93*	1.15±0.59#
胰岛总面积(mm ²)	0.08±0.03	0.15±0.06*	0.04±0.03*	0.04±0.03#
B 细胞核总数(个)	229.00±74.00	350.00±143.00*	22.00±11.00*	20.00±24.00#
N _A (10 ⁶ /cm ²)	0.29±0.04	0.24±0.06	0.08±0.05*	0.05±0.02#

*: $P<0.05$, 与对照 7 d 组比较; #: $P<0.05$, 与对照 84 d 组比较; △: $P<0.05$, 与成模 7 d 组比较。

1.3 检测指标 在注射药物前和注射后的第 7 天(第 1 批和第 2 批)和第 84 天(第 2 批), 给动物禁食、禁水 7 h 后测空腹血糖(剪尾取血, 用微血糖测量仪及配套的血糖试纸, 最大血糖值为 27.8 mmol/L, 更高的血糖值仪器显示为 H, 这种情况血糖值被当作 27.8 mmol/L)。在注射药物后第 7 天(第 1 批)和第 84 天(第 2 批), 取血并分离血清, 检测血清胰岛素(ELISA 法, 操作严格按试剂说明书进行, 用 Anthos2010 酶标仪采用双波长测 OD 值, 根据试剂说明给定的标准曲线计算出相对应的浓度值)。

1.4 取材及标本处理 在注射药物后第 7 天(第 1 批)和第 84 天(第 2 批), 处死大鼠, 取出胰腺置 Bouin 液内浸润固定, 70%乙醇脱水, 分离胰腺并称质量后, 行组织块等距随机抽样, 每个胰腺共抽选 4 个组织块; 将 4 个组织块放入一个包埋盒中用石蜡包埋; 每个石蜡包埋块切取 5 μm 厚的切片 1 张; 进行胰岛素免疫组织化学 SABC 法染色, 操作严格按试剂盒说明书进行。

1.5 形态学观察与形态定量 使用 Olympus BX50 型生物显微镜和体视学图像系统观察切片, 记录胰岛内胰岛素免疫组化阳性细胞(胰岛 B 细胞)核的多少、大小和染色的深浅情况。用体视学方法测量以下指标: (1)胰腺体积: 胰腺的质量除以胰腺密度 1.021(胰腺的密度用已知浓度、比重的乙醇溶液测得); (2)胰岛总体积: 胰腺体积乘以胰岛的体积分数即胰岛的总体积^[3]; (3)胰岛总面积: 每张切片随机抽选胰岛(不超过 20 个), 并利用测试系统软件在图像上随机叠加 12×13 规则排列的 156 个测点(点间距 25 $\mu\text{m}\times 30 \mu\text{m}$), 计数位于胰岛内的总测点数, 胰岛内的总测点数乘以每一测点所关联的测面面积(25 $\mu\text{m}\times 30 \mu\text{m}$), 就是胰岛总面积; (4)单位面积胰岛内 B 细胞核数量(N_A): 计数随机抽选的胰岛内 B 细胞核的总个数, B 细胞核的总个数除以胰岛总面积即得单位面积胰岛内 B 细胞核数量。

1.6 统计学处理 采用 SigmaStat1.0 统计软件进行数据处理, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组之间的均值比较采用 *t* 检验, 个别数据不服从正态分布时采用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 空腹血糖、血清胰岛素 第 1 批大鼠的实验组在注射 STZ 后第 7 天血糖达成模标准(血糖 $>11.1 \text{ mmol/L}$ ^[4])的大鼠(成模 7 d 组)有 7 只; 第 2 批大鼠的实验组在注射 STZ 后第 7 天血糖达成模标准且成活至第 84 天的大鼠(成模 84 d 组)有

8 只。成模 7 d 组、成模 84 d 组及其正常对照组在注射药物前和取材前的血糖以及血清胰岛素见表 1。

2.2 形态学观察与形态定量 对照组所有胰岛内 B 细胞数量多, 占据胰岛的大部分; 胰岛素表达强, 胞质内含大量棕黄色颗粒; 核的大小、形态一致(封 3 图 1)。成模组所有胰岛内 B 细胞数量减少; 胰岛素表达明显减弱, 细胞内胰岛素颗粒染色深浅有较大差异; 有的 B 细胞核直径增大(封 3 图 2)。成模 7 d 组、成模 84 d 组及其正常对照组的胰腺体积、胰岛总体积、胰岛总面积、B 细胞核的总数和单位面积胰岛内 B 细胞核数量(N_A)见表 1。

3 讨 论

胰岛 B 细胞的再生主要包括: (1)B 细胞增生: 主要来自成体干细胞或前体细胞, 胚胎发育晚期及新生期是 B 细胞增生的高峰期, 成年后只有当胰岛受到严重损伤或在大量 GLP-1 刺激下, 干细胞才有可能分化为 B 细胞。(2)B 细胞自我复制: 出生以后 B 细胞数量的维持主要是已有 B 细胞的复制和凋亡之间的平衡^[5]。目前, 人们关心的是药物治疗后糖尿病动物胰岛 B 细胞数量能否恢复, 但对胰岛 B 细胞损伤后如果不采取任何干预措施, 其数量随着病程的延长能否自行恢复的报道少。如有研究表明新生大鼠或胎鼠的胰岛 B 细胞损伤后能够部分恢复^[6-7], 另有研究报道, 成年大鼠注射 STZ 后, 随着糖尿病病程的推进, 通过形态学观察发现胰岛 B 细胞进一步减少, 到 6 个月时许多胰岛内只残留 2~3 个 B 细胞, 有的甚至缺如^[8-9]。

本实验通过体视学形态定量研究表明, 与对照组比较, 糖尿病成模大鼠在注射 STZ 后第 7 天(成模 7 d 组)的胰岛总体积、胰岛总面积、B 细胞核的总数、单位面积胰岛内 B 细胞核数量和血清胰岛素分别减少了 75%、52%、90%、73% 和 67% ($P<0.05$), 空腹血糖升高了 194% ($P<0.05$); 第 84 天(成模 84 d 组)的胰腺体积、胰岛总体积、胰岛总面积、B 细胞核的总数、单位面积胰岛内 B 细胞核数量和血清胰岛素分别减少了 13%、89%、76%、94%、79% 和 92% ($P<0.05$), 空腹血糖升高了 350% ($P<0.05$), 说明成模大鼠的胰岛 B 细胞已受到严重的损伤, 分泌胰岛素的功能明显降低, 空腹血糖明显升高。而成模大鼠的胰腺体积、胰岛总体积、胰岛总面积、B 细胞核的总数和单位面积胰岛内 B 细胞核数量在第 7 天和第 84 天差异均无统计学意义; 形态学观察在第 7 天和第 84 天也无明显区别; 血清胰岛素在第 84 天比第 7 天减少了 71% ($P<0.05$); 空腹血糖在第 84 天比第 7 天升高了 30% ($P<0.05$), 说明成模大鼠的胰岛 B 细胞受到严重的损伤后, 如果不(下转第 2280 页)

大多数都是由男生发起的,他们表现出更强的占有欲和主动性,发生性关系的首要目的是满足生理需要(50.63%),而女生更多处于被动迎合的位置,主要为了发展巩固爱情(50.00%)或是想着以后会结婚(45.24%)而迁就恋人,这种明显的男、女性别差异往往使女性在婚前性行为中更容易受到伤害。在今后的教育中,应重视性别差异,结合男、女生各自的心理生理特点开展教育工作。

在有过性行为的学生中,安全套的使用率偏低,仅14.88%的学生总是使用安全套,有13.22%的人从不使用安全套,说明学生的安全性行为意识比较薄弱,安全隐患较大。虽然76.24%的学生认为正确使用安全套可降低感染性病/艾滋病的风险,但使用避孕套的首要目的是避孕(90.91%),其次才是预防性病、艾滋病(24.79%),并未体现出性别差异。因此,应加强性病、艾滋病易感性教育,培养大学生的自我保护能力。

总之,男、女生在对待婚前性行为态度、婚前性行为现状及安全性行为意向等多个方面差异均有统计学意义($P < 0.05$)。因此,针对正处在社会转型期、受媒体、网络五花八门性观念影响,摇摆于开放与传统之间的大学生,性教育就显得更加重要,学生也期望从正规渠道获得相关知识。今后对大学生群体的艾滋病健康教育、性教育中应充分考虑性别差异,制定更有效、更具有针对性的教育方案,帮助他们树立正确的婚恋观,提高自我保护能力,促进身心的健康发展。

参考文献:

[1] 唐莉.当代大学生婚恋观的审视与思考[J].重庆电子工

程职业学院学报,2011,20(2):89-92.

- [2] 蔡彩云,熊萧.大学生婚恋观的变迁及对策[J].和田师范专科学校学报,2011,30(1):68-69.
- [3] 范舒云,张彩峰.大学生性观念、性态度的调查分析[J].全科护理,2011,9(8):2133-2134.
- [4] 江剑平,黄健,黄浩,等.大学生婚前性行为及性态度调查研究[J].中国性科学,2000,9(2):20-28.
- [5] 李锦,蒋丽娟,王文艺,等.大专生艾滋病相关知识、态度和行为的性别差异[J].现代预防医学,2007,34(8):1529-1531.
- [6] 张国富,张合喜,王桂霞,等.河南驻马店地区大学生艾滋病知识、态度及行为调查[J].新乡医学院学报,2008,25(6):578-580.
- [7] 赵阳,薛玲,吕善辉,等.高校医学新生婚恋观现状调查分析[J].中国健康心理学杂志,2011,19(8):1020-1022.
- [8] 唐慧琳,柳方婷.在校大学生婚姻观调查[J].南京晓庄学院学报,2010,10(5):83-88.
- [9] 郑在激.海南省大学生性行为现状调查[J].医学与社会,2010,23(9):17-19.
- [10] 郭静,张爽.北京市大学生婚前性行为及避孕知识需求调查[J].中国公共卫生,2011,27(7):904-906.

(收稿日期:2012-01-08 修回日期:2012-05-10)

(上接第 2277 页)

采取干预措施,随着病程的延长,虽然有新的 B 细胞形成,但 B 细胞的自我复制不足以补偿其数量的减少,故 B 细胞数量不能自行恢复,空腹血糖也没有出现自发性缓解的现象。

另外,本实验还发现,正常成年雄性大鼠胰岛总体积在 11~13 周龄时为(6.06±1.62) μL^3 ,而到 24~26 周龄时增长为(10.3±3.47) μL^3 ,增长了 70%($P < 0.05$),说明胰岛总体积随着动物的年龄增加而增长;正常成年雄性大鼠 B 细胞核的总数在 11~13 周龄时为(229±74)个,而到 24~26 周龄时增加到(350±143)个,增加了 53%($P < 0.05$),但同时胰岛总面积也增加了 82%($P < 0.05$),故单位面积胰岛内 B 细胞核数量在 11~13 周龄时和 24~26 周龄时差异无统计学意义,说明单位面积胰岛内 B 细胞数量不随动物的年龄而增加,推测可能是在非糖尿病状态下 B 细胞再生与凋亡处于动态平衡所致。

综上所述,给大鼠一次性注射大剂量 STZ(60 mg/kg)后,成模大鼠的胰岛 B 细胞受到严重的损伤,如果不采取干预措施,随着病程的延长,B 细胞数量不能自行恢复,空腹血糖也就一直处于高血糖水平。

参考文献:

- [1] 陈群,陈少强.氨基胍与川芎嗪对糖尿病大鼠胰岛 B 细胞的保护作用[J].实用临床医药杂志,2010,14(23):1-3.
- [2] 孙桂荣,綦玉琴,潘青.粉防己碱预防大鼠胰岛 B 细胞损伤作用的定量分析[J].中华医学杂志,1997,77(4):270-

273.

- [3] 文晓红,张仁东,郭洋,等.胰岛破坏大鼠模型的血糖变化[J].山东医药,2011,51(37):6-9.
- [4] Matteucci E, Giampietro O. Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research[J]. Ethnopharmacol, 2008, 115(2): 163-172.
- [5] 柳洁. GLP-1 对 B 细胞再生的影响[J].药品评价,2009,6(6):232-233.
- [6] Wang RN, Bouwens L, Klöppel G. Beta-cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period[J]. Diabetologia, 1996, 39(5): 548-557.
- [7] Yamamoto M, Kudoh A, Arishima K, et al. Immunocytochemical changes in the fetal pancreatic islet following fetal administration of streptozotocin in the rat[J]. The Anatomical Record, 1999, 247(2): 248-252.
- [8] 刘学政,萧鸿.链脲佐菌素致大鼠糖尿病模型的研究[J].锦州医学院学报,2001,22(4):11-14.
- [9] 张静,吴靖芳,郑慧娥,等.链脲佐菌素致大鼠糖尿病模型的实验研究[J].河北北方学院学报:医学版,2006,23(4):6-8.

(收稿日期:2012-03-02 修回日期:2012-05-11)