

# 链脲佐菌素诱导糖尿病恒河猴胰岛细胞数量的变化

朱 华, 徐艳峰, 刘 颖, 黄 澜, 秦 川

(卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,  
中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

**【摘要】 目的** 观察链脲佐菌素(STZ)诱导恒河猴糖尿病动物模型胰岛细胞数量变化和激素表达情况。**方法** 健康恒河猴5只,小剂量(30 mg/kg)多次静脉注射STZ,濒死状态时将动物安乐死。取胰腺制成石蜡切片,用免疫组化染色法显示胰岛A、B、D和PP细胞,并对结果进行图像分析和统计学处理。**结果** 与对照组比较,模型组B细胞数量减少,胰岛素表达降低( $P < 0.01$ )。A细胞增生,胰高血糖素表达增加( $P < 0.01$ )。PP细胞增生,胰多肽表达增加( $P < 0.05$ )。D细胞数量与对照组比较无显著性差异。**结论** 恒河猴糖尿病动物模型胰岛各种细胞的数量和激素表达情况与人类糖尿病类似。

**【关键词】** 动物模型; 胰岛; 链脲佐菌素; 免疫组织化学

**【中图分类号】** R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)12-0001-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.012.001

## Immunohistochemical Changes of Pancreatic Islet Cells in Diabetic Models of Macaca Mulatta

ZHU Hua, XU Yan-feng, LIU Ying, HUANG Lan, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

**【Abstract】 Objective** To observe the changes of pancreatic islet cells in experimental macaques diabetes models. **Methods** We used streptozotocin (STZ) (30 mg/kg body weight, intravenously, 3 days) to five macaques. The animal was sacrificed when it was going to die. The changes of A, B, D, PP cells in the pancreatic islets were observed with immunohistochemistry staining. Image analysis and statistical analysis of the histological changes were carried out. **Results** The quantity of A cells was significantly decreased than that in the control group ( $P < 0.01$ ). The positive immunohistochemical reaction of A cells was significantly increased compared with that of the control group ( $P < 0.01$ ). The positive PP cells were increased than that in the control group ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in D cells between the model and control groups. **Conclusion** The number of pancreatic islet cells and changes of hormonal expression in experimental macaques models of diabetes mellitus is similar to that in diabetic human subjects.

**【Key words】** Animal model; Pancreatic islets; Streptozotocin; Immunohistochemistry; Macaca Mulatta; Diabetes mellitus

[基金项目] 863 课题, 项目编号: 2009ZX09503-025。

[作者简介] 朱华, 副主任技师, 研究方向: 病理与病理生理学。E-mail: zhuh@cnilas.org。

[通讯作者] 秦川, 教授, 博士生导师。研究方向: 病理与病理生理学。E-mail: chuanqin@vip.sina.com。

胰腺分为外分泌腺和内分泌腺两部分。外分泌腺分泌胰液,内分泌腺由大小不同的细胞团—胰岛所组成,主要分泌胰岛素,调节糖代谢。人和大、小鼠等实验动物的胰岛细胞按其染色和形态学特点,主要分为 A 细胞、B 细胞、D 细胞及 PP 细胞,但各种细胞的比例不同。链脲佐菌素 (STZ) 能选择性破坏 B 细胞而诱导不可逆糖尿病。本文在小剂量多次注射 STZ 成功诱导恒河猴糖尿病动物模型的基础上,用免疫组化方法显示各种胰岛细胞的形态和数量变化,结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 模型制备

成年恒河猴 5 只,购自军事医学科学院实验动物中心,年龄 4~6 岁,体重 (5.5~6.5) kg。动物合格证号:SCXK-(军)2007-001。动物使用许可证号:SYXK(京)2010-0030。模型制作方法见参考文献 [1]。

### 1.2 标本制备

模型动物中的 3 只在给予 STZ 19 个月,1 只动物在给予 STZ 20 个月时处于濒死状态。动物经戊巴比妥麻醉后股动脉放血处死。取胰腺在 10% 中性甲醛固定,组织经常规脱水,石蜡包埋。樱花 IVS410 切片机进行连续切片,厚度 4  $\mu\text{m}$ ,每隔 5 片取连续的 4 片贴在防脱载玻片上,50 $^{\circ}\text{C}$  烤箱内烘烤过夜。取毒性试验正常对照组动物胰腺作为对照,切片处理与模型动物相同。

### 1.3 免疫组化染色

切片经脱蜡、水化、蒸馏水洗,进行 SP 法免疫组化染色。步骤:(1)3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  消除内源性过氧化物酶,室温 10 min, PBS 洗。(2)正常血清封闭 15 min,滴加第一抗体 (rabbit anti-insulin, Santa 公司产品,货号 SC-9618,稀释度 1:300; mouse anti-glucagon, 福建迈新,货号 BM1621,稀释度 1:200; rabbit anti-somatostatin, 北京中杉金桥,货号 ZA-0232,稀释度 1:150; rabbit anti-polypeptide, 北京中杉金桥,货号 ZA-0211,稀释度 1:100), 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, PBS 洗。(3)滴加第二抗体 (辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠、山羊抗兔 IgG 聚合物,北京中杉金桥,货号 PV-9001, PV-9002), 室温孵育 30 min, PBS 洗。(4)DAB 显色 1~5 min (北京中杉金桥,货号 ZLI-0001), 显微镜下控制显色程度,蒸馏水终止显色。(5)苏木素衬染后脱水、透明、中性树胶封片。

### 1.4 细胞计数与统计学方法

切片光镜下观察后用 Aperio 切片扫描系统对

切片进行扫描,随机截取 5 个高倍视野 (400 $\times$ ),采用 Image-Pro PLUS 图像分析系统对阳性细胞数和光密度值 (IOD) 进行分析。每只动物计数 3 张切片,取平均值。数据用 SPSS16.0 统计软件处理,两组间比较使用 *t* 检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各种细胞的比例

对照组组 A、B、D、PP 四种细胞的比例约为 21%、73%、5%、1%。模型组四种细胞的比例为 58%、32%、8%、2% (图 1)。

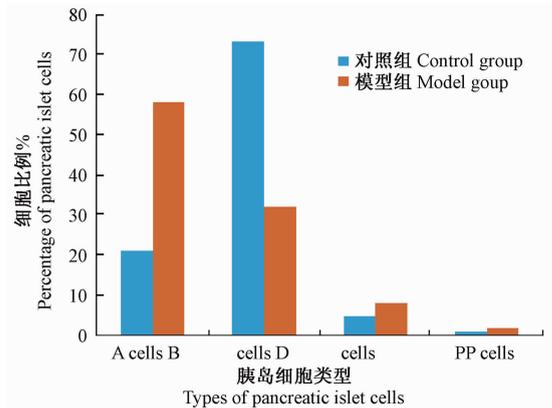


图 1 胰岛各细胞比例

Fig. 1 Percentage composition of the pancreas islet cells in the control and model groups.

### 2.2 免疫组化

结果可见 B 细胞胞质在对照组中呈深棕色,分布在胰岛中央区。模型组中 B 细胞胞质着色变浅 (图 2A, C), 胰岛素表达减少。细胞核蓝色。剩余细胞肥大,分布杂乱。模型组 A 细胞增生,细胞变密集,分布于胰岛周边部位,在模型组与对照组中均呈现为较深的棕色颗粒 (图 2B, D, 见彩插 1)。对照组 D 细胞数量较少,分布在胰岛 A、B 细胞中间。模型组 D 细胞增生,生长抑素表达增多 (图 3A, C)。对照组 PP 细胞体积较小,数量极少,分布在胰岛周边部位。模型组 PP 细胞增生,胰多肽表达增多 (图 3B, D, 见彩插 2)。

### 2.3 阳性细胞数及光密度值

模型组 B 细胞阳性细胞数及光密度值较对照组显著减少 ( $P < 0.01$ )。模型组 A 细胞阳性细胞数量及光密度值比对照组显著增高 ( $P < 0.01$ )。D 细胞阳性细胞数量及光密度值比对照组增高,但差异无显著性。模型组动物 PP 细胞显著增生,阳性细胞数量及光密度值较对照组显著增加 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 胰岛细胞表达情况及细胞光密度值

Tab. 1 The expression of pancreatic islet cells and IOD of the two groups ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

细胞类别 Cell types 组别 Groups	A 细胞(A cell)		B 细胞(B cell)		D 细胞(D cell)		PP 细胞(PP cell)	
	对照组 Control group	模型组 Model group	对照组 Control group	模型组 Model group	对照组 Control group	模型组 Model group	对照组 Control group	模型组 Model group
阳性细胞数 Number of positive cells	21.32 ± 5.73	57.46 ± 3.78**	73.24 ± 7.62	31.57 ± 8.88**	5.16 ± 2.13	7.87 ± 1.96	0.87 ± 0.24	1.57 ± 0.34*
光密度值 值 IOD	9987.64 ± 879.62	8864.37 ± 98.45**	34716.71 ± 1597.71	15431.62 ± 1032.11**	3742.51 ± 551.23	4032.58 ± 598.22	946.22 ± 151.21	1654.32 ± 256.33*

注: \*\* $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

note: \*\* $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ , compared with the control group.

### 3 讨论

自 80 年代以来 1 型糖尿病的自身免疫学说已确立<sup>[2]</sup>。根据多方面的综合研究,已知它是由 T 淋巴细胞介导的自身免疫性疾病。胰岛 B 细胞受到自身免疫攻击而选择性地被破坏,胰岛 B 细胞功能受损,胰岛素分泌绝对或相对不足<sup>[3-5]</sup>。STZ 是一种广谱抗菌素,对大小鼠的胰腺 B 细胞具有选择性毒性作用,可引起血糖升高及胰岛萎缩等改变,但其发病机制及病理生理改变与人类糖尿病差别较大<sup>[6]</sup>。小剂量多次注射 STZ 通过激活自身免疫过程导致 B 细胞损伤<sup>[7]</sup>,与 I 型糖尿病的发病机理学说类似。本实验的结果显示,小剂量 STZ 作用于恒河猴胰腺 18 个月后,胰岛 B 细胞数量明显减少( $P < 0.01$ ),胰岛素表达降低,合成和分泌胰岛素的功能减弱较正常动物明显减弱。从组织学上证实此模型与人类糖尿病的相似性。

啮齿类动物的胰腺中,A 细胞占 15% ~ 20%,B 细胞占 60% ~ 80%,D 细胞少于 10%,PP 细胞不足 1%<sup>[8]</sup>。而在人类胰岛中,A、B、D、PP 四种细胞比例分别为 20% ~ 25%,60% ~ 75%,5% 和少于 1%<sup>[9]</sup>。本实验中,恒河猴胰岛 D 细胞、PP 细胞比例与啮齿类相差不大,而 B 细胞比例减少,A 细胞比例增多,其细胞比例与人类更接近。

生理情况下,A 细胞分泌的高血糖素与 B 细胞分泌的胰岛素相互拮抗和协调维持了血糖的稳定。正常情况下胰岛素作用占优势。胰岛素绝对或相对不足时,胰高血糖素作用加强而且可以直接作用于 B 细胞。反映在组织学上即表现为 A 细胞的增生和胰高血糖素的表达增加。胰岛 D 细胞分泌的生长抑素是一种含 14 个氨基酸的肽类激素,可通过旁分泌发挥抑制糖吸收,调节糖代谢的作用。有文献报道给予外源性生长抑素可预防 STZ 引起的胰岛素分泌障碍<sup>[10]</sup>。胰岛素分泌不足时,D 细胞代偿性增生。本实验结果显示恒河猴胰岛 A 细胞数量显著增加,胰高血糖素表达增多( $P < 0.01$ )。D 细

胞的数量级表达情况虽然没有统计学意义,但与对照组相比仍有上升趋势。与文献报道相符。

本文在使用 STZ 成功诱导恒河猴糖尿病动物模型后,利用免疫组化方法显示恒河猴动物模型胰岛各种细胞的数量和激素表达情况,证实其数量及表达与人类糖尿病类似,为模型的应用提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 朱华,刘颖,马春梅,等. STZ 诱导恒河猴糖尿病动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(6):53-56.
- [2] Roland T. Insulin dependent diabetes mellitus [J]. Cell, 1996, 5:291-297.
- [3] Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and B-cell loss in type-I diabetes [J]. Nat Rev Endocrinol, 2009, 5(4):219-226.
- [4] Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus [J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 928:200-211.
- [5] Mandrup-Poulsen T, Zumsteg U, Reimer J, et al. Involvement of interleukin-1 and interleukin-1 antagonist in pancreatic B-cell destruction in insulin-dependent diabetes mellitus [J]. Cytokine, 1993, 5(3):185-191.
- [6] Litwak KN, Cefalu WT, Wagner JD. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in cynomolgus monkeys: changes in carbohydrate metabolism, skin glycation, and pancreatic islets [J]. Lab Anim Sci. 1998, 48(2):172-178.
- [7] El-Mahmoudy A, Shimjzu Y, Shiim T, et al. Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism [J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(1):195-291.
- [8] Brissova M, Fowler MJ, Nicolson, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture composition by laser scanning confocal microscopy [J]. J Histo Cytol, 2005, 53:1083-1097.
- [9] Cabrea O, Berman DM, Kenyon NS, et al. The unique cytoarchitecture human pancreatic islet has implications for islet cell function [J]. PNAS, 2006, 103:2334-2339.
- [10] 张芳林,张闯珍. 生长抑素和糖尿病 [J]. 国外医学内分泌分册, 2001, 21(1):1-3.