

# 不同时期糖尿病大鼠胰腺神经肽 Y 的变化

傅 茂<sup>1</sup>, 李秀钧<sup>2</sup>

(1. 中山医科大学孙逸仙纪念医院内分泌科, 广东 广州 510120;

2. 华西医科大学附属第一医院内分泌科, 四川 成都 610041)

关键词: 神经肽 Y; 糖尿病; 实验性; 胰腺; 大鼠

中图分类号: R364.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)04S0-封2-03

神经肽 Y 与摄食、血压、心率、呼吸调节、平滑肌舒缩以及下丘脑神经内分泌调节等重要的生理功能有关。广泛分布于中枢神经系统和外周的许多器官。研究发现胰腺中动脉、导管、腺泡及胰岛周围均有神经肽 Y 阳性的神经分布<sup>[1]</sup>, 胰岛内分泌细胞中也有神经肽 Y 阳性的细胞<sup>[2]</sup>, 提示神经肽 Y 即可通过神经支配, 也可通过旁分泌或自分泌来调节胰岛素的分泌。我们用免疫组织化学和原位杂交的方法, 对链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 糖尿病大鼠胰腺中神经肽 Y 的变化情况进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 STZ 糖尿病大鼠模型建立

健康雌性 Wistar 大鼠 (华西医大动物实验中心提供) 30 只, 体质量 180 ~ 250 g, 用随机数字表将其分为 3 组, 每组 10 只。1 组作为正常对照, 另 2 组给予 STZ 50 mg·kg<sup>-1</sup> 腹腔注射, 注射后 3 d 测血糖, 随机血糖达 16.7 mmol·L<sup>-1</sup> 者, 诊断为糖尿病。血糖未达 16.7 mmol·L<sup>-1</sup> 者立即腹腔补注 STZ, 50 mg·kg<sup>-1</sup>, 大多数鼠经第二次注射后成模, 未成模者予以淘汰。成糖尿病 3 周 (第 3 周组) 和 24 周 (第 24 周组) 后, 分别于 8:00 至 12:00 时测血糖、胰岛素及体质量处死动物。

### 1.2 制 片

用戊巴比妥钠 (40 mg·kg<sup>-1</sup>) 腹腔注射麻醉, 迅速取出胰腺, 置甲醛中固定。常规脱水包埋。切成 4 μm 厚切片, 裱于涂防脱片胶处理后的载玻片上,

备用。

### 1.3 免疫组化染色

常规免疫组化程序。NPY 抗体 (Sigma 公司, 1:800)、胰岛素抗体 (中山生物化学公司, 1:100)。空白对照用 PBS 代替一抗进行同样免疫组化染色。替代对照用正常兔血清代替一抗进行同样免疫组化染色。对照试验均为阴性。

### 1.4 原位杂交方法

含 NPY 的重组质粒 PCR<sup>TM</sup> II (由胡应和博士惠赠, Bayer 公司) 经 *Ecoli* DH5α 扩增和检测后, 于 T<sub>7</sub> 和 SP<sub>6</sub> 启动子进行正义和反义地高辛探针标记 (标记药盒购于 Boehringer 公司)。石蜡切片脱蜡, 预处理后, 加入 Dig-cRNA-探针进行杂交, 45 °C 过夜; 然后用 RNA 酶 A 去除残余的 RNA, 加地高辛抗体, 用 NBT/BCIP 染色。杂交反应对照和探针对照均为阴性。

### 1.5 图像分析

在图像分析系统 (Micro Image Analysis System, MIAS-2000 型, 四川联合大学图像测试中心提供) 测定每张胰腺切片中 5 个较完整的胰岛面积, 计其中的阳性细胞数。

### 1.6 统计学处理

《中国医学百科全书·医学统计学》统计软件包进行统计, 两样本均数比较用 *t* 检验, 多个样本均数的比较用方差分析中的 *q* 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结 果

(下转封 3 页)

收稿日期: 2000-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (399770351)

作者简介: 傅 茂 (1963-), 女, 四川内江人; 现中山医科大学孙逸仙纪念医院内分泌科博士后, 1998 年在华西医科大学获博士学位, 讲师。  
?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(上接封2页)

## 2.1 动物的代谢情况

所有糖尿病大鼠均有典型多饮、多食、多尿、血糖增高及体重减轻的特点。糖尿病组血浆胰岛素较对照组明显降低 ( $P < 0.01$ ), 第24周组较第3周组稍高, 但无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。第24周糖尿病组大多出现程度不等的白内障。

## 2.2 STZ糖尿病鼠胰岛面积和胰岛中胰岛素及神经肽Y变情况

注射STZ后, 第3周和第24周组糖尿病组胰岛的面积均较对照组明显缩小, 第24周组虽较第3周组胰岛面积稍小, 但无统计学差异。HE染色见糖尿病组胰岛内细胞数目减少, 细胞间的结缔组织增加, 细胞核异染色质增多, 并有明显靠边现象。糖尿病大鼠胰岛中胰岛素阳性细胞数较对照鼠明显减少, 第24周组与第3周组的阳性细胞数无差异。残存的胰岛素阳性细胞多位于胰岛的中央。

正常鼠神经肽Y阳性细胞(免疫反应阳性物质位于胞浆)多分布于胰岛的周边, 胰岛中央也有一些神经肽Y阳性的细胞分布, 但阳性反应较弱; 在第3周糖尿病组, 神经肽Y的含量较正常对照明显增加, 阳性细胞在胰岛的中央、周边均可见, 阳性细胞的界限欠清楚(图1A)。在第24周糖尿病组, 神经肽Y阳性细胞较正常对照组增多, 较第3周组减少, 其差异均有统计学意义。第24周组神经肽Y阳性细胞中央周边均可见分布, 且细胞界线清楚(图1B)。胰腺外分泌实质内可见神经肽Y阳性神

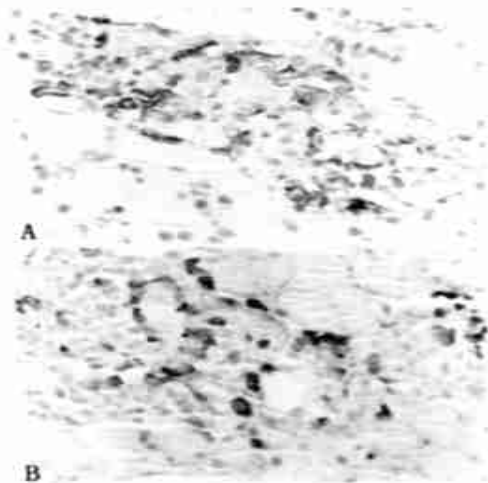


图1 糖尿病大鼠胰岛中 NPY 阳性细胞

Fig. 1 NPY-ir cells in pancreas of diabetic rat is localized by a yellow-orange color

A: 3 weeks diabetic rat, B: 24 weeks diabetic rat (Immunocytochemistry  $\times 400$ )

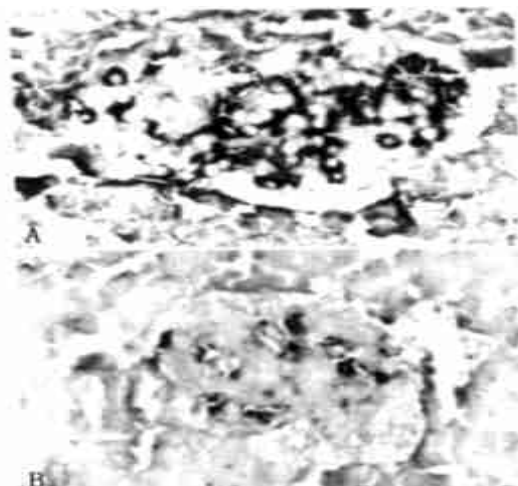


图2 糖尿病大鼠胰岛中 NPY mRNA 阳性细胞

Fig. 2 NPY mRNA cells in pancreas of 3 weeks diabetic rat is localized by a blue color

A: 3 weeks diabetic rat, B: 24 weeks diabetic rat (in situ hybridization  $\times 400$ )

经纤维分布于腺泡间、动脉外膜及胰岛周围。在胰腺的外分泌腺中未发现 NPY 的 mRNA 的表达, 在正常大鼠胰岛中也未观察到神经肽 Y mRNA 的表达。但在糖尿病大鼠第3周时可发现胰岛内较多的细胞表达神经肽 Y 的 mRNA, 在胰岛周边和中央均有分布, 中央分布要密集一些(图2A)。第24周组胰岛中也可见一些表达, 散在分布于胰岛中, 较第3周组明显减少(图2B)。

## 3 讨论

我们的研究证实, 在 Wistar 大鼠的胰腺外分泌实质中可见神经肽 Y 阳性神经纤维分布, 在动脉的外膜及胰岛周围可见神经肽 Y 阳性神经纤维围绕。研究证实刺激内脏自主神经可使胰静脉中神经肽 Y 含量增高 3~7 倍, 神经肽 Y 增高可抑制胰腺的外分泌。神经肽 Y 的脑室灌注, 可引起血中胰岛素水平增高<sup>[3]</sup>。提示神经肽 Y 神经可能参与胰腺外泌及内分泌的调节。

在鼠胚胎发育早期可见神经肽 Y 与胰岛素共存<sup>[4]</sup>, 在培养的  $\beta$  细胞株中也发现有神经肽 Y 的 mRNA 表达<sup>[5]</sup>。故认为神经肽 Y 可能通过神经、旁分泌或自分泌来调节胰岛的内分泌功能。本研究观察到正常鼠胰岛的内分泌细胞中可见神经肽 Y 阳性细胞分布, 神经肽 Y 阳性细胞主要分布于

(下转封4页)

(上接封3页)

胰岛周边,在胰岛中央也可见一些阳性反应较弱的细胞,这和 Louw<sup>[2]</sup>、Teitelman<sup>[6]</sup>等的报道相符合。本实验在正常大鼠胰岛中未观察到神经肽 Y 的 mRNA 表达,可能系正常大鼠胰岛中神经肽 Y 的 mRNA 含量少,用原位杂交方式未能显示出来。糖尿病鼠第 3 周和第 24 周组均发现有的 NPY 表达增加。引起胰岛内神经肽 Y 表达增加原因尚不清楚。

在第 24 周糖尿病组胰岛的神经肽 Y 含量及 mRNA 水平均较第 3 周组低,说明随着糖尿病病程的延长,增高的神经肽 Y 可有所下降。其原因尚不完全清楚,第 3 周组神经肽 Y 含量多,可能与在第 3 周时  $\beta$  细胞破坏后,各种体内平衡受到破坏,胰岛内环境变化更大有关。第 3 周组神经肽 Y 阳性物质细胞界限不清,可能与  $\beta$  细胞破坏,神经肽 Y 的阳性物质释放到细胞间隙有关;也可能与表达神经肽 Y 的细胞将合成的神经肽 Y 释放入细胞间隙较多有关。

#### 参考文献:

[ 1 ] De Giorgio R, Stemini C, Anderson K, *et al*. Tissue distribution and innervation pattern of peptide immunoreactivi-

ties in the rat pancreas [ J ]. *Peptides* 1992, 13(1):91.

[ 2 ] Louw J, Woodroof C W, Wolfe-coote S A. Distribution of endocrine cell displaying immunoreactivity for one or more peptides in the pancreas of adult vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*)[ J ]. *Anat Res* 1997, 247(3):405.

[ 3 ] Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, *et al*. Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y to normal rats has divergent effects on glucose utilization by adipose tissue and skeletal muscle [ J ]. *Diabetes* 1994, 43(6):764.

[ 4 ] Jackerott M, Qster A, Larsson L I. PYY in Developing murinislet Cells: comparisons to development of islet hormones NPY and Brdu incorporation [ J ]. *J Histochem Cytochem*, 1996, 44(2):809.

[ 5 ] Waeber G, Thompson N, Waeber B, *et al*. Neuropeptide Y expression and regulation in differentiated rat insulinsecreting cell line [ J ]. *Endocrinology*, 1993, 133(6):1061.

[ 6 ] Teitelman G, Alpert S, Polak J M, *et al*. Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neural proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide [ J ]. *Development*, 1993, 118(7):1031.

(编辑 黄小延)