

链脲佐菌素小鼠糖尿病胰岛结构改变的定量病理学测试及分析

陈春雅¹, 李春艳¹, 安建虹¹, 申洪^{1,2}

1. 华南理工大学医学院, 广东 广州 510006; 2. 南方医科大学基础医学院病理学系/南方医院病理科, 广东 广州 510515

【摘要】目的:定量揭示链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)诱发的小鼠糖尿病胰岛结构改变的特点,为分析胰岛功能改变补充定量病理学基础。**方法:**腹腔注射STZ,诱发Balb/c小鼠糖尿病;过量CO₂处死小鼠并取胰腺,常规病理制样、胰岛素免疫组化染色、图像测试及定量分析。**结果:**造模第8周,糖尿病组(DM组)小鼠血糖显著高于正常对照组(NC组)小鼠,DM组小鼠血糖均值为19.3 mmol/L;相比NC组小鼠,DM组小鼠胰岛数目、β细胞数目及面积显著减少($P<0.05$),计算出β细胞数量丧失约62.7%,胰岛β细胞面积丧失约27.0%,胰岛素阳性单位(PU值)表达减少约53.8%。DM组小鼠胰岛β细胞面积密度($A_{A\beta,PI}$)、面数密度($N_{A\beta,PI}$)、数量百分比(β_{Per})均显著降低($P<0.05$),其中PU值、 $A_{A\beta,PI}$ 、 β_{Per} 与血糖升高呈负相关,皮尔森相关系数(R 值)分别为-0.653、-0.736和-0.899(显著性均 <0.05);建立造模时间(t)与胰岛β细胞数量百分比改变的函数: $\beta_{Per}(\%) = 79.68 - 9.74t + 0.38t^2 + 0.06t^3 - 4.66 \times 10^{-3}t^4 + 2.86 \times 10^{-5}t^5 + 1.68 \times 10^{-5}t^6$ 。**结论:**通过定量病理学技术测量糖尿病小鼠模型胰岛和β细胞形态学改变的相关指标,能够帮助准确评估胰岛的损伤情况,并建立血糖变化和所测量数值的相关数学模型,用以预测血糖升高导致胰岛损伤的具体情况。

【关键词】糖尿病;胰岛;定量病理学;阳性单位;链脲佐菌素

【中图分类号】R365

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2023)05-0622-07

Quantitative pathological test and analysis of structural changes of islets in streptozotocin-induced diabetic mice

CHEN Chunya¹, LI Chunyan¹, AN Jianhong¹, SHEN Hong^{1,2}

1. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Department of Pathology, School of Basic Medicine (Department of Pathology, Nanfang Hospital), Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To quantitatively reveal the structural changes of pancreatic islets in mice with streptozotocin-induced diabetes, and to provide a pathological basis for the analysis of changes in islet function. **Methods** Intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) induced diabetes in Balb/c mice. After the mice were sacrificed by excessive CO₂, the pancreas tissues were taken for routine pathological sample preparation, insulin immunohistochemical staining, image test and quantitative analysis. **Results** At the 8th week of modeling, the blood glucose of diabetic group (DM group) was significantly higher than that of normal group (NC group), and the mean blood glucose of DM group was 19.3 mmol/L. Compared with NC group, DM group had less islets, fewer β cells and reduced β cell area ($P<0.05$), and it was calculated that β cell count, β cell area, and the expression of positive unit of insulin were decreased by 62.7%, 27.0%, and 53.8%, respectively. The area density ($A_{A\beta,PI}$), numerical density ($N_{A\beta,PI}$) and number percentage (β_{Per}) of pancreatic β cells in DM group were significantly decreased ($P<0.05$). PU, $A_{A\beta,PI}$ and β_{Per} were negatively correlated with the rise of blood glucose, with Pearson correlation coefficients (R value) of -0.653, -0.736 and -0.899, respectively ($P<0.05$). Moreover, a function of modeling time (t) and the percentage change of pancreatic β cell count was established: $\beta_{Per}(\%) = 79.68 - 9.74t + 0.38t^2 + 0.06t^3 - 4.66 \times 10^{-3}t^4 + 2.86 \times 10^{-5}t^5 + 1.68 \times 10^{-5}t^6$. **Conclusion** Measuring the indicators related to the morphological changes of β cells and the pancreatic islets and in diabetic mice models using quantitative pathological technique can help accurately evaluate the damage of pancreatic islets, and establish the mathematical model of blood glucose and the measured values for predicting the damage of pancreatic islets caused by the rise of blood glucose.

Keywords: diabetes; islet; quantitative pathology; positive unit; streptozotocin

【收稿日期】2022-12-10

【基金项目】国家自然科学基金(81271792)

【作者简介】陈春雅, 硕士, 医师, 研究方向: 病理学, E-mail: 947900584@qq.com

【通信作者】申洪, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 病理学, E-mail: shenhong2010168@163.com

前言

利用动物模型研究糖尿病的历史由来已久,其中啮齿动物的运用甚为广泛^[1]。无论是手术或者化学药物诱导的模型,还是非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠和转基因小鼠,给糖尿病的研究带来了许多突破性的进展^[2-5]。化学诱导由于操作便利、周期短受到了许多研究者的欢迎^[6],链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)是运用最多的化学诱导剂^[7-8],其原理是通过STZ与葡萄糖转运蛋白的高亲和力和竞争性地与它结合并进入β细胞。大剂量的STZ能够在短时间内特异性损伤β细胞,这与1型糖尿病(T1DM)的胰岛改变一致^[9-10],因而常用作T1DM的研究^[11-13]。但目前针对糖尿病小鼠胰腺的病理学研究主要建立在定性观察和分子机制研究之上,缺乏对形态学改变的定量研究,且未建立起胰岛损伤情况和血糖变化的具体联系^[14-15]。本研究通过STZ建立T1DM小鼠模型,然后通过定性和定量方法分析T1DM小鼠胰腺的形态变化,并系统收集形态学变化数据,旨在为了解STZ诱导小鼠胰腺的特征提供依据,为糖尿病动物模型的研究提供参考。了解胰岛结构变化与血糖之间的联系将有助于糖尿病的临床和实验研究。

1 材料与方法

1.1 STZ糖尿病小鼠模型的构建

4周龄、雄性Balb/c小鼠(购于南京模式生物研究所)16只,饲养至周龄5~8周进行实验,随机分成糖尿病组(DM组)和正常对照组(NC组),每组各8只。禁食12 h后,DM组腹腔注射0.1 mol/L柠檬酸缓冲液配置的1%浓度的STZ(Sigma),注射剂量为150 mg/kg^[16];NC组腹腔注射0.1 mol/L柠檬酸缓冲液,注射剂量为250 μL。注射结束后1 h恢复进食。每周记录小鼠体重并采用血糖仪(罗氏)尾部采血检测小鼠空腹血糖。

1.2 胰腺组织常规病理学制片及免疫组化染色

常规病理学制片:造模第8周将小鼠置于过量CO₂中安乐死。将胰腺活检材料的单个叶置入4%多聚甲醛中固定8 h。然后转移到70%乙醇中,通过连续酒精梯度脱水、二甲苯透明、充分浸蜡后包埋成石蜡块。切成4 μm厚的组织切片,通过脱蜡-梯度酒精水化后,进行苏木精和伊红(H&E)染色。最终通过梯度酒精脱水-二甲苯透明-中性树胶密封,制成HE切片观察并保存。

免疫组化染色:石蜡切片脱蜡和水化,3% H₂O₂灭活内源性过氧化物酶;PBS冲洗后置0.01 mol/L枸

橐酸钠缓冲液(pH=6)中100 °C作用20 min,修复抗原;山羊血清37 °C封闭10 min;滴加一抗Insulin B antibody(Santa Cruz),4 °C孵育过夜;洗涤后滴加生物素标记二抗,37 °C孵育30 min;PBS洗涤后DAB显色3~10 min,洗去DAB终止显色反应,苏木素复染30~60 s,常规脱水、透明、封片。

1.3 定量测试及分析方法

(1)胰岛形态测试分析方法:观察比较DM组和NC组小鼠胰腺和胰岛形态结构改变,计算两组胰岛素免疫组化染色切片中标记出的胰岛数量,于20倍物镜下拍摄胰岛图像,并用Image J图像分析软件测试胰岛面积,结合小鼠血糖水平进行定量分析。

(2)胰岛内胰岛素表达水平定量测试方法:用Image J软件将所采集的胰岛图像转化为8bit灰度图像,并将灰度设定为黑=0,白=最大灰度级($G_{\max}=255$)。将图像转换为RGB stark格式,选择Image-Adjust-Threshold,阳性区域标记为红色,测试阳性反应产物的灰度 G_{α} ;随机圈定30个背景区域,测试背景区域的灰度 G_{β} 。按下式计算胰岛素免疫组化染色阳性单位(Positive Unit, PU)^[17-18]:

$$PU = \frac{|G_{\alpha} - G_{\beta}|}{G_{\max}} \times 100 \quad (1)$$

再按下式计算DM组小鼠胰岛内胰岛素表达减少的程度(Reduction Degree of Insulin of β Cell Area, $RD_{Insulin, PI}$):

$$RD_{Insulin, PI} = \frac{PU_{Insulin, PI(NC)} - PU_{Insulin, PI(DM)}}{PU_{Insulin, PI(NC)}} \times 100\% \quad (2)$$

式中, $PU_{Insulin, PI(NC)}$ 和 $PU_{Insulin, PI(DM)}$ 分别为NC组和DM组胰岛内胰岛素表达的PU。

(3)胰岛内β细胞面积密度改变测试方法:在上述阳性区域标记为红色的基础上,圈定胰岛范围,所测阳性区域占胰岛面积的百分比即为胰岛β细胞占整个胰岛的面积密度(Area Density of β Cells, $A_{A\beta, PI}$),公式如下:

$$A_{A\beta, PI} = \frac{A_{\beta}}{A_{PI}} \times 100\% \quad (3)$$

式中, A_{β} 为胰岛β细胞的面积, A_{PI} 为胰岛的面积。分析比较DM和NC两组β细胞面积密度的改变。按下式计算DM组小鼠胰岛β细胞面积减少程度(Reduction Degree of β Cell Area, $RD_{\beta area}$):

$$RD_{\beta area} = \frac{A_{A\beta, PI(NC)} - A_{A\beta, PI(DM)}}{A_{A\beta, PI(NC)}} \times 100\% \quad (4)$$

式中, $A_{A\beta, PI(NC)}$ 和 $A_{A\beta, PI(DM)}$ 分别为NC组和DM组β细胞的面积密度。

(4)胰岛内β细胞面数密度测试方法:在上述阳性区域标记为红色的基础上,选择Analyze Particles,

显示细胞轮廓,点击 count 计数胰岛内 β 细胞数量,结合细胞分割情况辅以 β 细胞计数人工校正,得切片平面上胰岛内的 β 细胞数,按下式计算胰岛 β 细胞的面数密度(Numerical Densit in Unit Test Area of Pancreas Islet, $N_{A\beta,PI}$)^[19]:

$$N_{A\beta,PI}(\text{个}/\text{mm}^2) = \frac{N_{\beta,PI}}{A_{PI}} \quad (5)$$

式中, $N_{\beta,PI}$ 为胰岛内 β 细胞数量, A_{PI} 为胰岛面积。比较两组 β 细胞面数密度,按下式计算DM组小鼠胰岛 β 细胞面数密度减少程度[Reduction Degree of $N_{A\beta,PI}$, $RD(N_{A\beta,PI})$]:

$$RD(N_{A\beta,PI}) = \frac{N_{A\beta,PI(NC)} - N_{A\beta,PI(DM)}}{N_{A\beta,PI(NC)}} \times 100\% \quad (6)$$

式中, $N_{A\beta,PI(NC)}$ 和 $N_{A\beta,PI(DM)}$ 分别为NC组和DM组胰岛内 β 细胞的面数密度。

(5)胰岛细胞中 β 细胞百分比测试方法:计算胰岛内细胞总数($N_{C,PI}$)和 β 细胞数($N_{\beta,PI}$),按下式计算 β 细胞数在胰岛细胞总数中所占的百分比(Percentage of β Cells, β_{Per}):

$$\beta_{Per} = \frac{N_{\beta,PI}}{N_{C,PI}} \times 100\% \quad (7)$$

比较两组 β 细胞数在胰岛细胞总数中所占百分比的改变,按下式计算DM组小鼠胰岛 β 细胞数量减

少程度($RD_{\beta count}$):

$$RD_{\beta count} = \frac{N_{\beta,PI(NC)} - N_{\beta,PI(DM)}}{N_{\beta,PI(NC)}} \times 100\% \quad (8)$$

式中, $N_{\beta,PI(NC)}$ 和 $N_{\beta,PI(DM)}$ 分别为NC组和DM组胰岛内的 β 细胞个数。

1.4 统计学方法

采用SPSS软件进行数据分析,定量测试数据符合正态性分布采用均数 \pm 标准差表示,采用独立样本 t 检验进行两组间统计学比较分析,采用配对样本 t 检验进行实验前后的统计学比较分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义;采用皮尔森(Person)系数(R)进行血糖变化与定量数据的相关性分析。

2 结果

2.1 造模前后小鼠体质量和血糖改变

2.1.1 体质量的改变 造模前两组小鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$);DM组小鼠前2周体质量随时间增加而增加,从造模第5周开始,DM组小鼠体质量显著低于NC组并维持在一个稳定的水平;NC组小鼠体质量从第1周到第8周保持稳定增长的模式(图1a)。造模第8周,无论是NC组还是DM组,小鼠体质量都较造模前明显增加,且DM组体质量明显低于NC组($P<0.05$,图1b)。

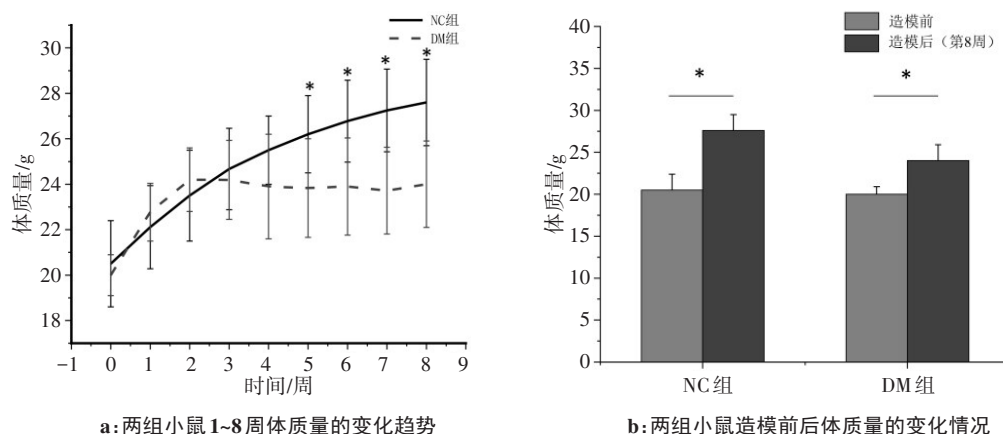


图1 NC组和DM组小鼠不同时期体质量的变化(* $P<0.05$)

Figure 1 Changes of weight of the mice in NC and DM groups at different periods (* $P<0.05$)

2.1.2 空腹血糖的改变 造模前两组小鼠空腹血糖水平较接近且处于正常范围内,差异无统计学意义($P>0.05$);DM组小鼠造模后第2周空腹血糖水平开始升高,造模第3周DM组血糖平均水平已显著高于NC组小鼠($P<0.05$)。造模第4周血糖全部达到造模标准并在此后稳定维持在高水平(图2a)。造模后第8周,DM组空腹血糖均值达到19.3 mmol/L,

较造模前明显升高,且明显高于同期NC组,差异有统计学意义($P<0.05$);NC组血糖造模前后差异无统计学意义($P>0.05$,图2b),始终保持在正常水平。

以 t 为时间变量,Glu为血糖因变量,通过曲线回归分析,得到造模时间增加与血糖水平升高的动力学方程为:

$$Glu = 3.944 + 3.765t - 0.023t^2 - 0.027t^3 \quad (9)$$

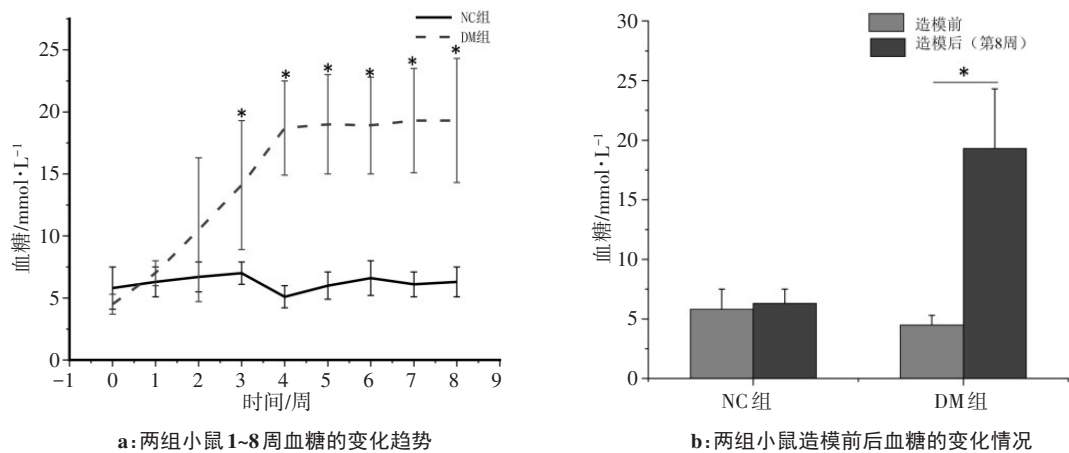


图 2 DM组和NC组小鼠不同时期血糖水平的变化(**P*<0.05)
Figure 2 Changes of blood glucose of the mice in NC and DM groups at different periods (**P*<0.05)

2.2 胰腺病理学改变及定量测试分析

2.2.1 胰腺形态学改变 HE染色切片下NC组小鼠胰岛呈圆形、散在岛状均匀分布于胰腺中,轮廓清晰;胰岛细胞呈圆形或多边形,大小较一致,形态规则,胞浆丰富;胰岛素免疫组化检测呈强阳性(+++),胰岛内β细胞丰富且占绝大部分。DM组小鼠胰岛散在岛状分布,整体数量减少,部分胰岛形态不规则,胰岛细胞数量减少、胞浆淡染;胰岛素免疫组化检测呈阳性(+),表达强度弱于NC组,胰岛β细胞数量减少(图3)。

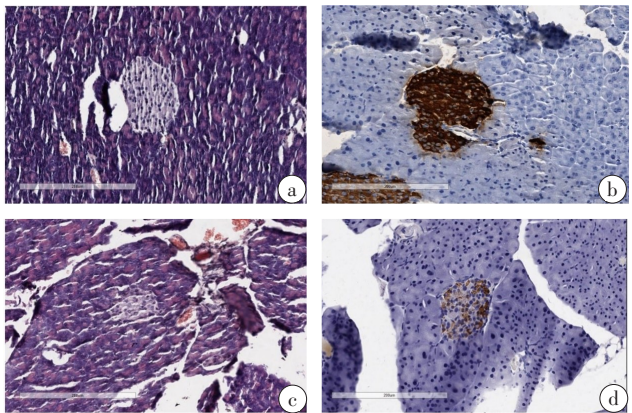


图3 胰岛HE染色及胰岛素免疫组化染色结果(HE×200)
Figure 3 Results of islet HE staining and insulin immunohistochemical staining (HE×200)

图3a、b为NC组小鼠胰岛HE染色及胰岛素免疫组化染色表现,可见胰岛形态规整,细胞数量较多,胞浆丰富,胰岛素免疫组化呈弥漫强阳性(+++);图3c、d为DM组小鼠胰岛HE染色及胰岛素免疫组化染色表现,可见胰岛形态稍不规则,细胞数量有所减少,部分胞浆轻度嗜酸性,核缩小,部分核染色较淡,胰岛素免疫组化呈弥漫阳性(+),阳性细胞减少。

2.2.2 胰岛及胰岛细胞数量、面积、胰岛素表达阳性单位测算结果 造模第8周,DM组小鼠血糖水平的平均值为19.3 mmol/L,DM组小鼠胰岛的数量、面积、胰岛细胞总数、β细胞数量和PU_{Insulin, PI}均明显低于NC组(*P*<0.05,表1)。与NC组相比,计算[式(2)]得出DM组胰岛内胰岛素表达减少的程度RD_{Insulin, PI}为53.8%。

2.2.3 胰岛β细胞面积密度、面数密度和数量百分比测试结果及其与血糖改变的相关关系 (1)β细胞面积密度测试结果:DM组小鼠胰岛内β细胞的面积密度(A_{Aβ,PI})明显低于NC组(*P*<0.05,表2);与NC组相比,计算[式(4)]得出DM组胰岛β细胞面积密度减少程度(RD_{βarea})为27%。

(2)β细胞面数密度测试结果:胰岛单位面积中的胰岛β细胞数量测试结果显示,DM组胰岛β细胞面数密度(N_{Aβ,PI})明显低于NC组(*P*<0.05,表2);与NC组相比,计算[式(6)]得出DM组胰岛β细胞面数

表1 造模第8周胰岛个数、面积和阳性单位
Table 1 Number and area of islets and PU at the 8th week of modeling

| 组别 | 胰岛数量/个 | 胰岛面积/μm ² | 胰岛细胞总数/个 | β细胞数/个 | PU |
|------------|----------|----------------------|-----------|-----------|----------|
| NC | 10.0±3.6 | 12 400.2±14 411.0 | 71.0±72.1 | 59.0±67.4 | 26.0±9.1 |
| DM | 4.0±2.3 | 7 506.7±7 811.5 | 45.0±40.4 | 22.0±22.1 | 12.0±5.5 |
| <i>t</i> 值 | 4.308 | 2.306 | 2.394 | 4.389 | 3.785 |
| <i>P</i> 值 | 0.001 | 0.023 | 0.019 | 0.000 | 0.002 |

密度减少程度[RD ($N_{A\beta,PI}$)]为18.9%。

(3) β 细胞数量百分比测试结果:胰岛中 β 细胞数量占胰岛细胞数量的百分比显示,DM组胰岛 β 细胞数量在胰岛细胞总数中所占的百分比(β_{Per})明显低于NC组($P<0.05$,表2),与NC组相比,计算[式(8)]得出DM组胰岛 β 细胞数量百分比减少程度($RD_{\beta count}$)为62.7%。

表2 造模第8周血糖及胰岛内 β 细胞面积密度、面数密度和数量百分比测试结果

Table 2 Test results of blood glucose, and the area density, numerical density and number percentage of β cells in pancreatic islets at the 8th week of modeling

| 组别 | 血糖/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ | $A_{A\beta,PI}/\%$ | $N_{A\beta,PI}/\text{个}\cdot\text{mm}^{-2}$ | $\beta_{Per}/\%$ |
|-------|-------------------------------------|--------------------|---|------------------|
| NC | 6.3 ± 1.2 | 66.2 ± 9.2 | $5\,031\pm1\,736$ | 77.2 ± 12.2 |
| DM | 19.3 ± 5.0 | 48.3 ± 15.8 | $4\,002\pm2\,283$ | 49.3 ± 13.7 |
| t 值 | -8.285 | 7.666 | 2.575 | 10.564 |
| P 值 | 0.000 | 0.001 | 0.011 | 0.000 |

(4)血糖变化与 β 细胞面积密度、 β 细胞面数密度及 β 细胞数量百分比的相关关系:分别将DM组和NC组小鼠的血糖水平和胰岛 β 细胞面积密度、 β 细胞面数密度及 β 细胞数量百分比绘制成折线图(图4),可见DM组血糖水平的变化趋势与其 β 细胞面积密度、 β 细胞面数密度及 β 细胞数量百分比变化趋势均相反,即 β 细胞面积密度、 β 细胞面数密度及 β 细胞数量百分比降低的小鼠,其血糖水平均处于较高的水平。而NC组小鼠血糖水平的变化趋势与 β 细胞面积密度、 β 细胞面数密度及 β 细胞数量百分比变化趋势基本相同。

通过皮尔森相关性分析证实,小鼠血糖水平与胰岛素表达的PU值、 β 细胞面积密度、 β 细胞面数密度及 β 细胞数量百分比均呈负相关,其中 β 细胞数量百分比(β_{Per})相关系数的绝对值最高,且显著性 <0.05 (表3)。基于对以上相关系数的计算分析,以血糖为自变量(Glu),以 β_{Per} 为因变量,分析血糖水平与 β_{Per} 的函数关系,通过曲线回归分析,得血糖改变与 β_{Per} 关系

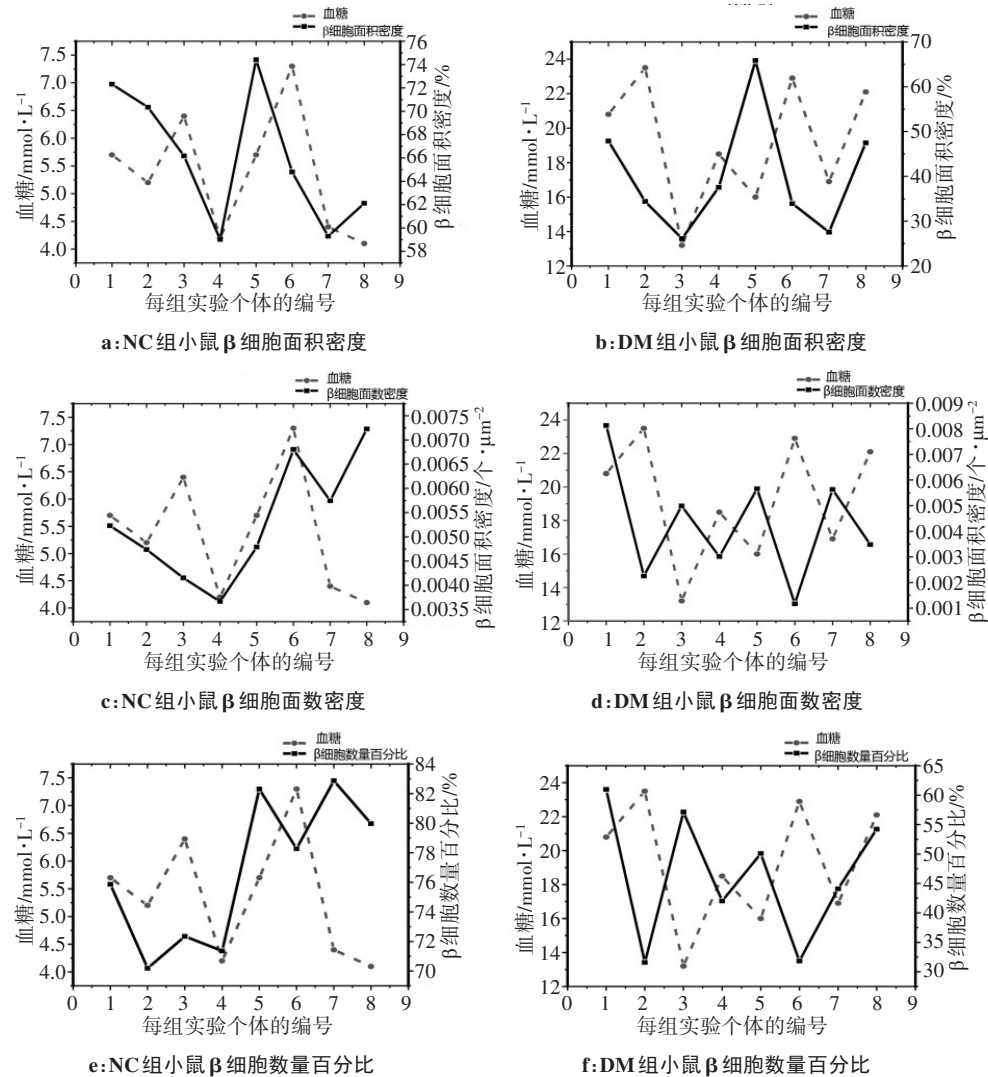


图4 小鼠血糖和 β 细胞面积密度、 β 细胞面数密度及 β 细胞百分比的折线分布图

Figure 4 Line distributions of blood glucose with the area density, numerical density and number percentage of β cells in pancreatic islets

表3 血糖与胰岛内β细胞面积密度、面数密度及数量百分比相关关系分析结果

Table 3 Analysis results of the correlation of blood glucose with the area density, numerical density and number percentage of β cells in pancreatic islets

| 小鼠 | 血糖(第8周)/mmol·L ⁻¹ | PU | A _{Aβ,PI} /% | N _{Aβ,PI} /个·mm ⁻² | β _{Per} /% |
|-----------|------------------------------|--------|-----------------------|--|---------------------|
| NC1 | 5.7 | 18 | 72.32 | 5 231 | 75.86 |
| NC2 | 5.2 | 18 | 70.35 | 4 738 | 70.19 |
| NC3 | 6.4 | 35 | 66.17 | 4 154 | 72.35 |
| NC4 | 4.2 | 26 | 59.02 | 3 666 | 71.36 |
| NC5 | 5.7 | 37 | 74.41 | 4 791 | 82.31 |
| NC6 | 7.3 | 34 | 64.80 | 6 805 | 78.28 |
| NC7 | 4.4 | 12 | 59.30 | 5 746 | 82.87 |
| NC8 | 4.1 | 30 | 62.11 | 7 230 | 79.97 |
| DM1 | 20.8 | 11 | 47.88 | 8 129 | 60.98 |
| DM2 | 23.5 | 2 | 34.42 | 2 257 | 31.58 |
| DM3 | 13.2 | 12 | 26.10 | 4 986 | 57.14 |
| DM4 | 18.5 | 13 | 37.55 | 3 015 | 42.01 |
| DM5 | 16.0 | 14 | 65.85 | 5 660 | 50.10 |
| DM6 | 22.9 | 11 | 33.95 | 1 174 | 31.81 |
| DM7 | 16.9 | 12 | 27.56 | 5 635 | 44.09 |
| DM8 | 22.1 | 22 | 47.47 | 3 485 | 54.22 |
| 与血糖的相关系数R | - | -0.653 | -0.736 | -0.394 | -0.899 |
| 显著性 | - | 0.006 | 0.001 | 0.130 | 0.000 |

的回归方程为:

$$\beta_{Per} = 89.961 - 2.697Glu + 0.023Glu^2$$

(10)

3 讨论

3.1 定量病理学对于形态学的分析具有独特的优势和重要意义

定量病理学是用各种定量手段和分析方法在定性研究的基础上进一步从量化角度阐明疾病的病因、发病机理、发生和发展规律及病变的形态、机能和代谢特征的一门学科,是传统病理学学科的进一步发展、完善和补充^[20]。此前的研究已经注意到了定量研究对于病理学的重要作用。在本研究中,当胰岛出现损伤时,其形态学上的变化会表现为细胞数量、面积等的改变,通过定量病理学中的面数密度、面积密度、β细胞数量百分比等参数,对胰岛的损伤程度进行一个较为全面的评估^[21-22]。面数密度是指单位测试面积中粒子截面的数量,常用来反映特定区域内所观测细胞数量的多少;面积密度是指单位参照组织或区域中待测结构所占面积的多少,用于反映所研究结构面积的相对改变。通过以上指标的计算,不仅得到胰岛损伤的具体情况,还建立了相应的数学模型来反映对应指标的关系,并关联到血

糖水平的变化中。

胰岛素的生成情况也从另一层面反映胰岛的功能情况,在本研究中引入PU这一概念,对胰岛中胰岛素的表达情况进行更加精准的评估。PU是指排除切片或涂片本底因素,将纯免疫组化反应程度按灰度图像分为0(白)到100(黑)个等级,每一等级定义为1个PU。PU值大小与免疫组化反应强度成正比,相较于传统的评分模式能够更加精确地反映对应指标的表达式^[23]。通过统计学分析,胰岛素的表达与血糖水平呈负相关,从数据层面佐证了胰岛素对于血糖调节的重要作用。

3.2 STZ 诱导的小鼠 DM 胰岛的病变特点及其与血糖改变的关系

(1)血糖和体质量改变特点:按照文献^[24-25]标准,腹腔注射72 h后监测到空腹血糖>12 mmol/L即为造模成功。在本研究中,STZ诱导的小鼠在第3周即达到了DM诊断要求。造模前期两组小鼠的体质量差异无统计学意义($P>0.05$),当出现高血糖症状后,糖尿病小鼠的体质量前期增长慢于正常小鼠,到后期体质量不再增长,这反映了STZ诱导的小鼠糖尿病可影响小鼠生长发育。

(2)胰岛的病变特点:糖尿病小鼠的胰岛β细胞

面数密度、面积密度、 β 细胞百分比和胰岛素表达的阳性单位在实验结束时相比正常小鼠均显著降低,这些都表明胰岛发生较严重的损伤,这与血糖升高、胰岛素水平减少是相对应的。血糖水平与胰岛 β 细胞的面积密度、面数密度、 β 细胞百分比和胰岛素阳性单位均有较高的相关系数,提示这4项指标是1型糖尿病的重要病理学参数,能从形态和功能方面定量表达胰岛结构和功能的改变,其中 β 细胞数量百分比与血糖改变的相关程度最高,因此本研究用其构建胰岛病理性变化与血糖变化的数学模型[式(10)]。本研究胰岛 β 细胞的面数密度其与血糖的相关系数缺乏统计学意义,考虑与样本量少有关。

本研究在细胞数量测试时软件会标出序号及计数轮廓,如果存在细胞粘连或者叠加严重,就在软件技术的基础上进行人工校正,以保证实际计数结果的准确性。

3.3 血糖动力学改变方程的意义

通过前面各项数据的定量分析,已经确定了跟血糖水平改变的相关指标,并确定血糖升高分别与造模时间和胰岛 β 细胞损伤程度有关。通过上述数据,采用相关回归方程,借助造模时间 t (周)与血糖(Glu,mmol/L)水平改变的动力方程,可根据小鼠所位于的实验阶段(周),预测其血糖水平: $Glu=3.944+3.765t-0.023t^2-0.027t^3$;这一分析方法对于临床上探讨血糖与患者病程关系的研究或许有一定参考价值。

借助胰岛 β 细胞数量百分比(β_{per} ,%)与血糖水平改变(Glu, mmol/L)的动力方程(式10),可根据血糖水平推测小鼠体内胰岛 β 细胞数量百分比: $\beta_{\text{per}}=89.961-2.697Glu+0.023Glu^2$ 。这一分析方法对于临床上根据血糖改变判断患者胰岛 β 细胞损伤程度的研究或许有一定参考价值。此外,根据上述造模时间与血糖改变的函数及血糖水平与胰岛 β 细胞数量百分比改变的上述关系,可进一步得到造模时间(t)与胰岛 β 细胞数量百分比改变的以下函数关系: $\beta_{\text{per}}(\%)=79.68-9.74t+0.38t^2+0.06t^3-4.66\times 10^{-3}t^4+2.86\times 10^{-5}t^5+1.68\times 10^{-5}t^6$ 。

综上所述,可以得到以下结论:(1)STZ诱导的小鼠糖尿病为典型的1型糖尿病,其核心病变在胰岛 β 细胞数量和面积明显减少,导致胰岛素分泌不足,致使血糖升高;(2)当小鼠血糖水平稳定在19.3 mmol/L时,小鼠胰岛已经形成病理性损伤, β 细胞平均面积约丧失27%, β 细胞平均数量约丧失62.7%,胰岛素表达减少约为53.8%;(3)胰岛 β 细胞面积密度、胰岛素表达阳性单位和 β 细胞百分比与血糖水平密切相关,可用于准确反映胰岛病理改变,借助血糖水平与胰岛 β 细胞所占百分比改变的动力模型可推测出胰岛的损伤程度。

【参考文献】

- [1] Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(3): 140-162.
- [2] Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, et al. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation[J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 256707.
- [3] Mullen Y. Development of the nonobese diabetic mouse and contribution of animal models for understanding type 1 diabetes[J]. Pancreas, 2017, 46(4): 455-466.
- [4] Acharjee S, Ghosh B, Al-Dhubiab BE, et al. Understanding type 1 diabetes: etiology and models[J]. Can J Diabetes, 2013, 37(4): 269-276.
- [5] Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes: a clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics[J]. Chem Biol Interact, 2016, 244: 49-63.
- [6] Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes[J]. Diabetologia, 2008, 51(2): 216-226.
- [7] Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models[J]. Lab Anim, 2011, 45(3): 131-140.
- [8] Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats[J]. Curr Protoc Pharmacol, 2015, 70: 1-20.
- [9] King AJ, Estil Les E, Montanya E. Use of streptozotocin in rodent models of islet transplantation[J]. Methods Mol Biol, 2020, 2128: 135-147.
- [10] Yuan W, Fukuda S, Inoue T, et al. Establishment of a diabetes mellitus type 1 model in the common marmoset[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 14546.
- [11] 谭潇, 肖建华. 1型糖尿病小鼠模型的构建[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(14): 1589-1591.
Tan X, Xiao JH. Construction of mouse model of type 1 diabetes[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2011, 32(14): 1589-1591.
- [12] 黄昕, 崔磊, 曹谊林. STZ诱导裸鼠糖尿病模型的建立及观察[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2007, 3(4): 186-188.
Hu X, Cui L, Cao YL. Establishment and observation of STZ induced diabetes model in nude mice[J]. Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery, 2007, 3(4): 186-188.
- [13] Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2012, 237(5): 481-490.
- [14] Göke B. Implications of blood glucose, insulin resistance and beta-cell function in impaired glucose tolerance[J]. Diabetes Res Clin Pract, 1998, 40(Suppl): S15-S20.
- [15] Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Metabolic programming of insulin action and secretion[J]. Diabetes Obes Metab, 2012, 14(Suppl 3): 29-39.
- [16] 王涵, 薛彬, 史建峰, 等. STZ诱导糖尿病裸鼠模型的剂量探讨[J]. 中国医疗器械信息, 2018, 24(23): 33-35.
Wang H, Xue B, Shi JF, et al. Dose of STZ induced diabetes in nude mice[J]. China Medical Device Information, 2018, 24(23): 33-35.
- [17] 申洪, 陆药丹. 免疫组织化学染色的定量方法研究[J]. 生物医学工程学杂志, 1993, 10(4): 281-284.
Shen H, Lu YD. Study on the quantitative method of immunohistochemical staining[J]. Journal of Biomedical Engineering, 1993, 10(4): 281-284.
- [18] 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(III)[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4(1): 89-92.
Shen H. Study on the quantitative method of immunohistochemical staining (III)[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1995, 4(1): 89-92.
- [19] 申洪. 实用生物体视学技术[M]. 广州: 中山大学出版社, 1991: 44-48.
Shen H. Practical biological visual technology[M]. Guangzhou: Sun Yat-sen University Press, 1991: 44-48.
- [20] 申洪. 论定量病理学[J]. 临床与病理杂志, 1994, 14(4): 199-201.
Shen H. Study on quantitative pathology[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 1994, 14(4): 199-201.
- [21] Baak JP. The principles and advances of quantitative pathology[J]. Anal Quant Cytol Histol, 1987, 9(2): 89-95.
- [22] Kayser G, Kayser K. Quantitative pathology in virtual microscopy: history, applications, perspectives[J]. Acta Histochem, 2013, 115(6): 527-532.
- [23] 申洪. 免疫组织化学显色反应强度定量方法研究(II)[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1994, 10(4): 33-35.
Shen H. Study on quantitative method of intensity of immunohistochemical chromogenic reaction(II)[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 1994, 10(4): 33-35.
- [24] Jarrar YB, Al-Essa L, Kilani A, et al. Alterations in the gene expression of drug and arachidonic acid-metabolizing Cyp450 in the livers of controlled and uncontrolled insulin-dependent diabetic mice[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2018, 11: 483-492.
- [25] Oliveira WH, Nunes AK, França ME, et al. Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Brain Res, 2016, 1644: 149-160.

(编辑:陈丽霞)