文章编号:1000-5404(2005)21-2131-04

论著

# PPARγ配体对1型糖尿病大鼠的治疗作用探讨

何扬涛,马千里,孙 榆,李成仁,周德山 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

**提 要:目的** 探讨PPARγ配体罗格列酮对STZ诱导的1型糖尿病大鼠胰腺β细胞的保护作用及其机制。**方法** 实验用STZ诱导1型糖尿病大鼠动物模型,以罗格列酮5 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$连续给药30 d。记录体质量和禁食血糖的变化。治疗第31天(停药后第1天)及治疗第61天取材观察胰腺形态学变化,应用免疫组织化学染色显示胰岛β细胞和nNOS的表达情况。**结果** 与未治疗糖尿病动物相比,罗格列酮治疗组大鼠的糖尿病体征显著减轻,胰腺未见明显的病理改变,胰岛内胰岛素阳性细胞数量增多、接近正常水平,与此同时,胰腺内一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活性降低,而nNOS表达增强。**结论** 罗格列酮对STZ诱导的1型糖尿病大鼠胰岛有一定的保护作用,其机制可能是通过抑制巨噬细胞内iNOS的活性,减轻胰岛的炎症反应,避免β细胞损害,促进胰岛功能的恢复。

**关键词**:PPARγ配体;1型糖尿病;NO
**中图法分类号**:R392.11;R587.1;R977.15 **文献标识码**:A

# Therapeutic effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands on streptozotocin-induced diabetic rats

HE Yang-tao, MA Qian-li, SUN Yu, LI Cheng-ren, ZHOU De-shan (Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: **Objective** To investigate the protective effects and mechanism of rosiglitazone on streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. **Methods** The healthy Wistar rats were fasted for 12 h, then injected peritoneally 60 mg/kg STZ solution to establish type 1 diabetic models and randomly assigned to receive 5 mg/kg rosiglitazone for treatment or not once a day for 30 d ($n$ = 10 in each group). Another five normal Wistar rats were injected with citrate buffer solution as normal controls. Plasma glucose concentration and weight of the rats were measured and recorded every three days. Rats were sacrificed on day 31 and 61 after the treatment began respectively. HE immunohistochemical staining were performed to observe the beta cells of pancreatic islet and the expression of nNOS. **Results** As compared with the untreated group, the diabetic symptoms of the treated rats relieved significantly, and no obvious pathologic changes were observed in pancreatic islets. The amount of beta cells of pancreatic islet increased obviously, and the expression of nNOS was much stronger on day 61. **Conclusion** Rosiglitazone might play a protective role on the islets of STZ-induced diabetic rats and be helpful for the recovery of pancreatic function by inhibiting the activity of iNOS in macrophages at early phase, promoting the expression of nNOS at the late phase, reducing the inflammation of the pancreatic islets and preventing the pancreatic beta cell from being impaired.

**Key words**: PPAR γ ligand; type 1 diabetes mellitus; NO

1型糖尿病的发病机制尚不完全清楚,目前认为,它的发生和发展不仅与遗传因素有关,而且,自身免疫反应也起着重要作用。研究表明:由T淋巴细胞和激活的巨噬细胞释放的细胞因子,包括NO、TNF-α、IL-1、干扰素等,参与了胰岛的炎性细胞浸润和对β细胞的破坏,其中高浓度的NO被认为是损伤β细胞的终末因子。NO可以通过参与自由基的级联反应,诱导β细胞凋亡;同时亦能抑制线粒体功能,降低β细胞代谢,减少胰岛素的分泌等。

链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)可以选择性地直接损伤胰岛β细胞,使β细胞抗原释出,引起机体自身免疫应答反应;致敏的T淋巴细胞能够进一步活化巨噬细胞,后者可释放NO、TNF-α、IL-1等细胞因子,对胰岛产生毒性作用。同时活化的巨噬细胞亦可直接或间接地诱导胰腺细胞内的诱生型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, iNOS)活性升高,增加NO合成[1]。过量的NO进一步加重胰岛自身炎症,损伤β细胞,造成胰岛素的绝对缺乏,导致动物发生糖尿病。

过氧化物酶体增殖激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPARγ)属于核受体超家族中PPARs家族成员,为配体依赖性转录因子。PPARγ

**基金项目**:第三军医大学科研基金资助项目(2003)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2003)
**作者简介**:何扬涛(1976-),男,重庆市人,硕士研究生,助教,主要从事糖尿病发病机制方面的研究。电话:(023)68752229
**收稿日期**:2005-05-10;**修回日期**:2005-06-26

与配体结合后，与9-顺式-维甲酸受体形成异二聚体，然后与所调节基因的启动子上游的过氧化物酶体增殖物反应元件(PPRE)结合而发挥转录调控作用。目前已知PPARγ存在多种配体和激活物，可分为合成型配体和天然型配体两大类。其中合成型配体噻唑烷二酮(thiazolidinediones，TZD)类药物可选择性的与PPARγ结合，能增强胰岛素的作用，改善糖代谢，俗称胰岛素增敏剂[2,3]。因此，临床主要用于2型糖尿病的治疗。而近来研究表明，PPARγ的表达与单核/巨噬细胞的分化和激活有关，其配体可抑制巨噬细胞炎症反应，减少多种炎症介质的分泌(包括TNF-α、IL-1、IL-6等)，也能降低iNOS的表达和活性[4]；此外，TZD可在体外抑制T淋巴细胞增生反应和炎性细胞因子产物，且在体内减轻多种炎症疾病，包括动脉粥样硬化、关节炎、肾间质纤维化、炎症性肠病和实验性自身免疫性脑脊髓炎[4-8]。这些研究提示PPARγ是炎症和免疫反应的重要调节因素，所以，推测其配体对1型糖尿病可能亦有一定的治疗作用。为此，本研究从以下三个方面探讨PPARγ配体治疗糖尿病的机制：首先利用STZ诱导大鼠1型糖尿病；再以TZD类药物罗格列酮(rosiglitazone)进行实验治疗；并对其作用机制进行初步探讨，期望为1型糖尿病的临床治疗开辟新的思路和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和试剂

健康Wistar大鼠40只，雄性，3月龄，体质量200～250 g，由第三军医大学实验动物中心提供。马来酸罗格列酮，葛兰素史克有限公司，批号：国药准字H20020475；链脲佐菌素(STZ)，ALEXIS公司；血糖测试仪及血糖试纸，美国强生公司；兔抗鼠insulin多克隆抗体，SANTA CRUC；兔抗鼠nNOS多克隆抗体，博士德公司；HRP标记羊抗兔IgG抗体，DAKO。

### 1.2 糖尿病模型的建立

用0.1 mol/L、pH 4.5的柠檬酸缓冲液配制2% STZ溶液(用前新鲜配制)，大鼠禁食12 h后按60 mg/kg体重剂量腹腔一次性注射，3 d后用血糖仪测尾部空腹血糖，大于16.7 mmol/L并可持续3 d者被认为糖尿病模型复制成功[9,10]。模型成功后，对模型大鼠进行编号，抄取随机数字，从任一位置开始往任一方向取20个数字，按奇数和偶数分为糖尿病组和治疗组，每组10只。另取5只大鼠注射柠檬酸缓冲液作为正常组。

### 1.3 实验步骤

注射STZ当天记为第1天。治疗组于第6天开始罗格列酮5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$连续给药30 d，之后停药常规喂养。各组大鼠每3天称量体重，并检测禁食血糖。第36天、第66天，处死大鼠，根据实验目的取材。

### 1.4 HE染色

胰腺新鲜取材固定后，以树脂包埋半薄切片，进行HE染色。

### 1.5 NADPH-d酶组织化学

胰腺新鲜取材后，置OCT包埋经液氮速冻，恒冷箱冰冻切片机连续切片，片厚10 μm，贴于铬矾明胶处理的载玻片上，冷气吹干，将切片浸入NADPH-d孵育液(含1 mmol/L NADPHd，0.4 mmol/L氯化硝基四氮唑蓝，0.5% TritonX-100 pH 7.4)，37 ℃，30 min，弃反应液，双蒸水冲洗，风干封片，光镜观察、记录。

### 1.6 免疫细胞化学

胰腺经生理盐水冲洗后，Bouin液固定，30%蔗糖过夜，OCT包埋，恒冷箱冰冻切片机连续切片，每5张间隔贴片1张，厚10 μm，胰头、胰体、胰尾各取20张，风干。染色方法为间接酶标抗体法。以抗胰岛素多克隆抗体(1∶200)或nNOS多克隆抗体(1∶200)为一抗72 h(4 ℃)，HRP标记羊抗兔IgG抗体(1∶100)为二抗，60 min(25 ℃)，DAB显色，苏木精复染细胞核，水溶性封片剂封片。对照实验以正常兔血清代替一抗，或羊血清代替二抗，结果均为阴性。各步骤间用0.01 mol/L PBS漂洗3次。

### 1.7 半定量分析

Insulin免疫组化结果用Image-Pro Plus 5.0软件进行处理，计算胰岛素阳性面积与胰岛面积比；并测量NADPH-d组化染色结果的灰度值。

### 1.8 统计学处理

计量资料用$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS10.0统计软件包进行方差分析及均数间的多重比较。

## 2 结果

### 2.1 血糖、体重变化

注射STZ后，糖尿病组活动减少，精神萎靡，反应迟钝，毛发污秽竖立；进食量及饮水量为正常组的2～3倍，尿量相应增多；体质量进行性下降，第36天体质量平均下降约15%，到第66天体质量平均下降超过22%。糖尿病组血糖自第3天起明显升高，高于16.7 mmol/L，可持续至第66天。经罗格列酮治疗后的动物外观与正常组无明显差异，无多饮、多食、多尿；体质量较稳定，血糖于第9天恢复至正常范围，停药30 d后仍维持正常水平；与糖尿病组相比，体质量和血糖的变化均有显著差异($P<0.05$)，见表1。

### 2.2 组织学观察

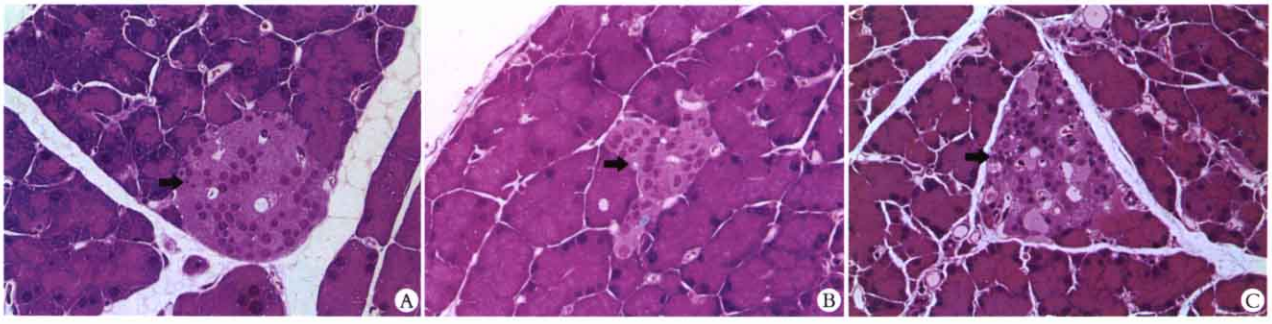
正常组大鼠胰岛呈团索状，境界清楚。胰岛数及胰岛内细胞数均较多。糖尿病组大鼠胰腺组织间质轻微水肿，淋巴细胞浸润明显；胰岛周围外分泌腺腺泡细胞肿胀显著，部分呈类空泡样改变；胰岛体积缩小，胰岛细胞的数量减少，胰岛部分细胞体积增大，胞浆疏松淡染。治疗组大鼠胰腺组织未见胰腺间质充血、水肿、炎性细胞浸润；胰岛大小及细胞形态与正常组相比无明显差异，见图1。

**表1 各组大鼠体重、血糖浓度比较($\bar{x} \pm s$)**

**Tab 1 Comparisons of weight and blood glucose concentration of rats($\bar{x} \pm s$)**

| Groups | n | 6 d | | 9 d | | 36 d | | 66 d | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | W(g) | BC(mmol/L) | W(g) | BC(mmol/L) | W(g) | BC(mmol/L) | W(g) | BC(mmol/L) |
| Control | 5 | 227.6±5.5 | 5.16±0.23 | 227.8±4.3 | 5.66±0.19 | 231.8±6.4 | 5.82±0.22 | 233.2±3.9 | 5.3±0.20 |
| Untreated | 10 | 201.4±2.6 | 23.04±4.5 | 195.4±1.7 | 24.88±3.62 | 189±1.9 | 22.3±3.87 | 173.8±2.0 | 21.34±4.0 |
| Treated | 10 | 205±2.1 | 22.88±4.2 | 214.8±3.6 | 7.24±0.24 | 221.4±1.8* | 5.96±0.17* | 226.2±2.5* | 5.74±0.15* |

*：$P<0.05$，*vs* diabetic；W：Weight；BC：Blood glucose concentration



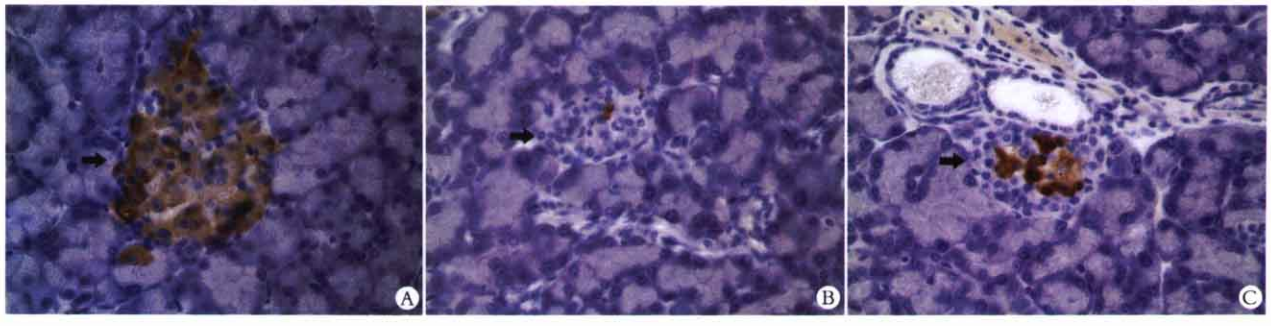
A：Control；B：Untreated；C：Treated；➡：Islets

**图 1　治疗后胰腺形态学比较**（HE×400）

**Fig 1　Pancreatic morphology after treatment**（HE×400）

## 2.3　免疫细胞化学

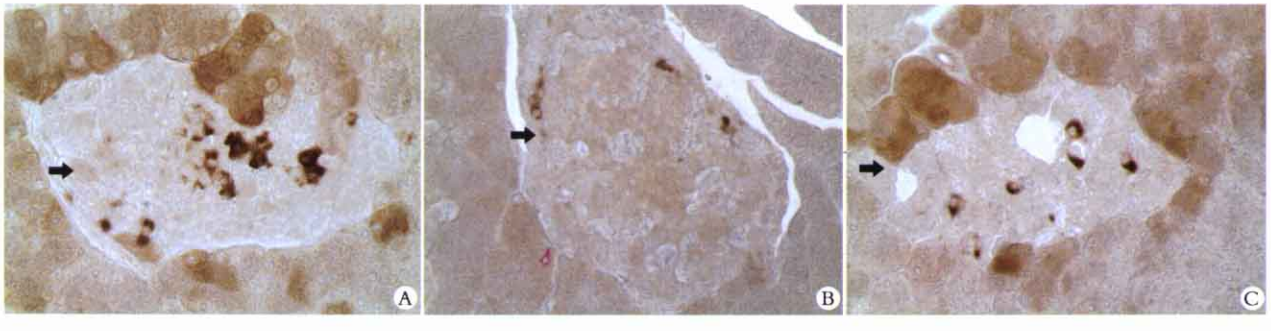
与正常组相比，糖尿病组胰腺中胰岛素阳性细胞减少，一些胰岛内可见散在残留的胰岛素阳性细胞，呈色反应深浅不一，而部分胰岛内胰岛素阳性细胞缺如。治疗组胰岛素阳性细胞较糖尿病组多，但仍较正常组少，见图 2。而各组的胰头、胰体和胰尾胰岛素阳性细胞数量相近。统计显示治疗组胰岛素阳性细胞与胰岛面积比为 25.27%，低于正常组 38.93%（$P<0.05$），显著高于糖尿病组 10.12%（$P<0.05$）。第 66 天，正常组和治疗组胰腺 nNOS 免疫细胞化学染色主要在胰岛内分泌细胞胞质内，外分泌部的腺泡周围和小叶间也可见棕黄色的阳性产物。糖尿病组胰岛内和腺泡间均有棕黄色 nNOS 阳性产物，但与正常组和治疗组相比，其分布范围小，显色弱，见图 3。



A：Control；B：Untreated；C：Treated；➡：Islets

**图 2　治疗后 insulin 阳性细胞数量比较**（IHC×400）

**Fig 2　Insulin positive cells after treatment**（IHC×400）



A：Control；B：Untreated；C：Treated；➡：Islets

**图 3　治疗后胰岛 nNOS 阳性细胞数量比较**（IHC×400）

**Fig 3　nNOS positive cells after treatment**（IHC×400）

## 2.4　NADPH-d 酶组织化学

各组胰腺外分泌部可见显色为蓝色的 NOS 阳性产物分布在腺泡周围、小叶间结缔组织及血管；而在内分泌部的胰岛则呈弥漫性分布。第 36 天糖尿病组胰岛呈弥漫性蓝黑色 NOS 阳性；第 66 天，阳性产物减少，呈灰蓝色。正常组和治疗组胰岛第 36 天和第 66 天阳性产物的数量和分布未见改变，呈蓝色。

平均灰度值统计结果显示：糖尿病组 NOS 活性具有一定的时间差异，即第 36 天 NOS 呈强阳性表达，高于正常组；而第 66 天表达明显减弱，略低于正常组。治疗组与正常组平均灰度值无显著差异（$P>0.05$），见表 2。

表2 平均灰度比较（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2 Comparison of average gray scale（$\bar{x} \pm s$）

| Group | $n$ | Average gray scale | |
|---|---|---|---|
| | | 36 d | 66 d |
| Control | 5 | 197.24 ± 0.848 | 191.28 ± 0.988 |
| Untreated | 10 | 236.95 ± 1.095 | 158.20 ± 2.214 |
| Treated | 10 | 196.73 ± 1.721 * | 187.69 ± 2.351 * |

*：$P<0.05$，*vs* Untreated

## 3 讨论

本研究结果表明STZ可以引起大鼠1型糖尿病，主要表现为多饮、多食、多尿、体重进行性下降、血糖水平明显升高等临床症状；并可见胰岛β细胞数量减少，胰岛周围呈炎性改变等病理学改变，符合1型糖尿病的临床特点。罗格列酮治疗后，大鼠“三多一少”症状明显改善，血糖恢复，接近正常水平；胰腺病理改变消失，胰岛β细胞数量增多，提示罗格列酮对STZ诱导的大鼠1型糖尿病有一定的疗效。

TZD通过高选择性地活化PPARγ，调控一系列靶基因的表达，发挥生物效应。本研究观察到在第66天，即停药后30 d，治疗组胰腺病理改变恢复，胰岛素阳性细胞的数量虽低于正常组，但明显多于糖尿病组，血糖水平接近正常，提示治疗组大鼠胰腺炎症被抑制，胰岛β细胞数量和功能得到一定程度的恢复。这一结果表明TZD可能通过激活PPARγ途径，增加机体对胰岛残存β细胞分泌的胰岛素的敏感性，促进全身组织对血糖的摄取和肝糖的合成，发挥降低血糖的作用，同时，PPARγ与其配体结合后抑制核内炎性介质基因转录的启动，在基因水平抑制NO、IL-6、IL-8、TNF-α等炎症分子表达[11]，抑制STZ导致的NO等炎性因子的生成，去除NO对β细胞的损害；而且，血糖的控制，炎症的抑制，使胰岛的微环境得以恢复，有利于胰岛β细胞功能的恢复。

近年许多研究证实，NO等一些细胞因子对胰岛细胞有细胞毒作用，据报道，1型糖尿病患者外周血液中NO水平显著升高，可能与iNOS表达增加有关。也有研究表明STZ诱导的1型糖尿病大鼠胰腺的NOS活力和NO水平明显升高，与本研究中治疗第36天NADPH-d酶组织化学染色NOS强阳性表达的结果基本一致，提示胰岛细胞的损伤可能与NO有一定的关系。第66天NADPH-d酶组织化学染色显示糖尿病组NOS表达较正常组和治疗组弱，说明NO水平有降低的趋势，可能随着病程的延长作为NO底物的左旋精氨酸产生减少，NO合成不足有关。

胰腺内的分泌细胞和腺泡周围神经纤维内均可见nNOS分布，在生理状态下可通过旁分泌NO舒张血管平滑肌，调节胰岛内微循环，使血流量增加，从而调节胰腺内外分泌功能。本实验中免疫组化染色结果显示第66天，治疗组nNOS表达较糖尿病组高，提示胰腺内的nNOS可能有利于促进内外分泌功能的恢复。结论 本研究表明，PPARγ配体对STZ诱导的1型糖尿病大鼠胰腺有一定的保护作用，能减轻胰腺的炎性损伤，促进胰岛功能的恢复。

## 参考文献：


[1] Gunnett C A, Heistad D D, Faraci F M. Gene-targeted mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes[J]. Stroke, 2003, 34(12): 2970-2974.

[2] Smith S A, Porter L E, Biswas N, *et al*. Rosiglitazone, but not glyburide, reduces circulating proinsulin and the proinsulin: insulin ratio in type 2 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(12): 6048-6053.

[3] Srinivasan K, Patole P S, Kaul C L, *et al*. Reversal of glucose intolerance by by pioglitazone in high fat diet-fed rats[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2004, 26(5): 327-333.

[4] Ye P, Fang H, Zhou X, *et al*. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor activators on tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes[J]. Chin Med Sci J, 2004, 19(4): 243-247.

[5] Onozaki A, Midorikawa S, Sanada H, *et al*. Rapid change of glucose concentration promotes mesangial cell proliferation via VEGF: inhibitory effects of thiazolidinedione[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 317(1): 24-29.

[6] Toriumi Y, Hiraoka M, Watanabe M, *et al*. Pioglitazone reduces monocyte adhesion to vascular endothelium under flow by modulating RhoA GTPase and focal adhesion kinase[J]. FEBS Lett, 2003, 553(3): 419-422.

[7] Hornung D, Chao V A, Vigne J L, *et al*. Thiazolidinedione inhibition of peritoneal inflammation[J]. Gynecol Obstet Invest, 2003, 55(1): 20-24.

[8] Panzer U, Schneider A, Guan Y, *et al*. Effects of different PPARgamma-agonists on MCP-1 expression and monocyte recruitment in experimental glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 2002, 62(2): 455-464.

[9] Furudoi S, Yoshii T, Komori T. Balance of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in a buccal infection in a streptozotocin-induced diabetic rat model[J]. Cytokine, 2003, 24(4): 143-149.

[10] Oya M, Hosokawa M, Tsukada H, *et al*. Effects of an aldose reductase inhibitor on gastroenteropathy in streptozotocin-diabetic rats[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2003, 62(2): 69-77.

[11] Beauregard C, Brandt P C. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists inhibit interleukin-1beta-mediated nitric oxide production in cultured lacrimal gland acinar cells[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2003, 19(6): 579-587.


（编辑 薛国文）