论著

文章编号:1000-5404(2010)10-1016-04

罗格列酮对糖尿病大鼠血清炎性介质和早期皮肤改变的影响

张晓菲[1],郝 飞[1],杨 景[2] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:皮肤科[1],病理学研究所[2])

[摘要] **目的** 观察罗格列酮对糖尿病大鼠血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白介素-6(interleukin-6,IL-6)、C-反应蛋白(C-reactive protein,C-RP)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)和对早期皮肤改变的影响。**方法** 将大鼠分为正常对照组(C组,$n=13$)、糖尿病对照组(DC组,$n=13$)、糖尿病胰岛素治疗组(DI组,$n=13$)、糖尿病罗格列酮治疗组(DR组,$n=13$)。建立糖尿病大鼠模型,于第16周末抽取各组大鼠心脏血测定TNF-α、IL-6、C-RP、SOD的水平,并处死取皮肤,进行病理学观察及皮肤全层与真皮厚度测量。**结果** 与C组相比较,DC组IL-6[(135.05±43.39)pg/ml *vs* (99.92±32.36) pg/ml]、TNF-α[(1.45±0.67)ng/ml *vs* (0.86±0.60)ng/ml]、C-RP[(3.51±0.62)mg/L *vs* (2.54±1.31) mg/L]水平均明显增高($P<0.05$)。DI组和DR组则与正常对照组比较无差异;DC组的SOD水平与正常组相比显著降低[(70.71±37.52)U/ml *vs* (137.76±27.6)U/ml,$P<0.01$],DI组[(149.96±13.25) U/ml]和DR组[(128.50±38.27) U/ml]与DC组比较显著增高($P<0.01$)。测微尺测量表明致糖尿病后16周大鼠皮肤明显变薄,与C、DI、DR组比较有统计学差异($P<0.05$,$P<0.01$)。组织学观察,表皮细胞层次欠清晰,真皮层胶原萎缩、退化变性,皮下脂肪进行性萎缩;DI和DR组未出现明显的组织学改变。**结论** 罗格列酮与胰岛素一样能降低糖尿病大鼠血清炎性介质、升高SOD水平,对糖尿病大鼠早期皮肤病变具有防护作用。

[关键词] 糖尿病;罗格列酮;炎症因子;超氧化物歧化酶;病理;皮肤厚度

[中图法分类号] R587.1; R977.15; R392.3 **[文献标志码]** A

Effects of rosiglitazone on serum inflammatory mediators and early skin changes in diabetic rats

Zhang Xiaofei[1], Hao Fei[1], Yang Jing[2] ([1]Department of Dermatology, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of rosiglitazone on serum levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (C-RP) and superoxide dismutase (SOD), and early skin changes in the diabetic rats. **Methods** The rats were divided into normal control group (C group, $n=13$), diabetic control group (DC group, $n=13$), diabetes and insulin treatment group (DI group, $n=13$), diabetes and rosiglitazone treatment group (DR group, $n=13$). The diabetic rat models were established with high-fat diet for 2 weeks followed by intraperitoneal injection of 35 mg/kg streptozotocin injection, the rats were idenfied as diabetic when their fasting blood glucose (FBG) over 7.0 mmol/L. The living rats were given corresponding treatment, subcutaneous injection of 1 to 2 U/d insulin, intragastric injection of 5 mg/(kg·d) rosiglitazone, or sterile water. Heart blood samples of rats from each group were collected to measure TNF-α, IL-6, C-RP and SOD levels in the 16th weekend. Also the skin was taken for pathological observation and full-thickness as well as dermal thickness measurements. **Results** The serum levels of IL-6, TNF-α and C-RP in diabetic group were significantly higher than those in normal group ($P<0.05$), and no difference was found in DI group and DR group compared with the normal control group. The SOD level of diabetic group was significantly lower than normal control group ($P<0.01$), and the SOD levels of insulin and rosiglitazone group were significantly increased compared with the diabetic group ($P<0.01$). Micrometer measurements showed that the skin of diabetic rat was significantly thinner than that of the normal, insulin and rosiglitazone treatment groups after 16 weeks ($P<0.01$, 0.05). The epidermal cell layers were not clear enough, and dermal layer collagen atrophy, degeneration, and progressive subcutaneous fat atrophy were found by histology observation. No obvious histological change were seen in DI and DR groups. **Conclusion** Both rosiglitazone and insulin can reduce serum inflammatory media-

[基金项目] "十一五"国家科技支撑计划(2006BA702B01)

[通信作者] 郝 飞,E-mail:Haofei62@medail.com.cn

tors, increase SOD levels in diabetic rats, and exert a protective effect on early skin lesions.

[**Key words**] diabetes mellitus; rosiglitazone; inflammatory factor; superoxide dismutase; pathology; skin thickness

Supported by the "Eleventh Five-year Plan" of National Key Technology R&D Program (2006BA702B01). Corresponding author: Hao Fei, E-mail: Haofei62@medail.com.cn

皮肤病变是糖尿病的重要并发症之一[1]。多数研究认为包括皮肤病变在内的糖尿病慢性并发症与炎症因子的升高密切相关[2]。近期研究[3]报道胰岛素对糖尿病大鼠潜在皮肤病变具有防护作用,但临床上大部分2型糖尿病患者仍是用口服降糖药物治疗。罗格列酮是治疗2型糖尿病新的口服降糖药,其作用是改善胰岛素抵抗,增强胰岛素敏感性,减少白介素-1β(IL-1β)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor, TNF-α)等的产生,使皮肤角质层细胞的分化趋向正常化;现有临床研究表明它对银屑病、多毛症、类脂质渐进坏死等多种皮肤病治疗有效[4,5]。本研究旨在应用罗格列酮干预糖尿病大鼠模型,以求证新药罗格列酮对糖尿病皮肤并发症的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

52只10周龄雄性Wista大鼠,体质量200~250 g,由第三军医大学实验动物中心提供。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,美国Sigma公司),罗格列酮(rosiglitazone, RSG,葛兰素史克-中国重庆公司赠予),预混诺和30R胰岛素[诺和诺德(中国)公司]。

1.2 试剂与仪器

德国罗氏优越血糖仪监测空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG),糖化血红蛋白(HBALc)免疫法,超敏C-反应蛋白免疫电泳法检测,Beckman's生化自动分析仪(美国Beckman公司)。血清胰岛素(Ins)、IL-6、SOD、TNF-α放免试剂盒均由北京华英生物技术研究所提供,按说明书操作,批内变异系数分别为:CV<10%、7%、10%、5%。

1.3 动物模型的建立和分组

糖尿病模型建立参照文献[6]方法加以改进:52只大鼠按随机数字表法分为4组:①正常对照组(C组,n=13);②糖尿病对照组(DC组,n=13);③糖尿病胰岛素治疗组(DI组,n=13);④糖尿病罗格列酮治疗组(DR组,n=13)。拟作糖尿病大鼠(39只)用高糖高脂半合成高热量饲料适应性喂养2周,诱发出胰岛素抵抗。空腹以链脲佐菌素(用前以0.1 mol/L柠檬酸盐缓冲液,冰浴新鲜配制,pH=4.5)35 mg/kg一次性腹腔注射。1周内尾静脉采血测血糖,随机血糖≥11.1 mmol/L,空腹血糖(FPG)≥7.0 mmol/L,稳定1周,确定为糖尿病模型诱导成功,糖尿病大鼠逐渐出现精神萎靡、活动量减少、多饮、多尿、多食、体质量减轻。喂养中DC组、DI组分别有3只大鼠死亡。

1.4 动物喂养与给药

常规饲料,在学校实验动物中心分笼喂养,自由饮水和进食;DI组每天早、晚分别诺和30R胰岛素1~2 U皮下注射,维持空腹血糖在<11 mmol/L。DR组以给予罗格列酮无菌水混悬液5 mg/kg,1次/d,早灌胃。C、DC组大鼠予等量无菌水灌胃。

1.5 标本收集与病理观察

大鼠在16周末统一处死,处死前大鼠腹腔内注射2.5%戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉,心脏穿刺抽血,用作空腹血糖(FPG)、HBALc、TNF-α、IL-6、C反应蛋白(C-reactive protein, C-RP)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定。用硫化钡脱毛剂脱背部鼠毛,取背部中央的全层皮肤标本。分为若干小块,用10%中性甲醛固定,HE染色,显微镜下观察并测微尺测量表皮及皮肤全层厚度(测量5点,计算平均值)。

1.6 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件,组间差异比较采用独立样本t检验。

2 结果

2.1 不同组别大鼠糖代谢和血清炎性介质及SOD的检测结果

DI组的血糖与正常组比较无差异(P>0.05),而DC组、DR组明显增高(P<0.01)。糖尿病模型3个组的糖化血红蛋白比C组明显增高(P<0.01),DI、DR组与DC组比较明显降低(P<0.05, P<0.01)。DC组和DR组的胰岛素测定比C组明显降低(P<0.01),而DI组却明显增高(P<0.01)(可能有动物注射外源胰岛素的干扰),见表1。DC组的TNF-α、IL-6、C-RP较C组明显增高(P<0.05),DI组和DR组则与正常组比较无统计学差异(P>0.05),但均比DC组明显降低(P<0.05, P<0.01)。DC组的SOD水平与正常组相比明显降低(P<0.01),DI、DR组则无统计学差异(P>0.05);但二者与DC组比较有非常显著的增高(P<0.01)。见表2。

表1 不同组别大鼠的糖代谢指标检测结果($\bar{x}\pm s$)

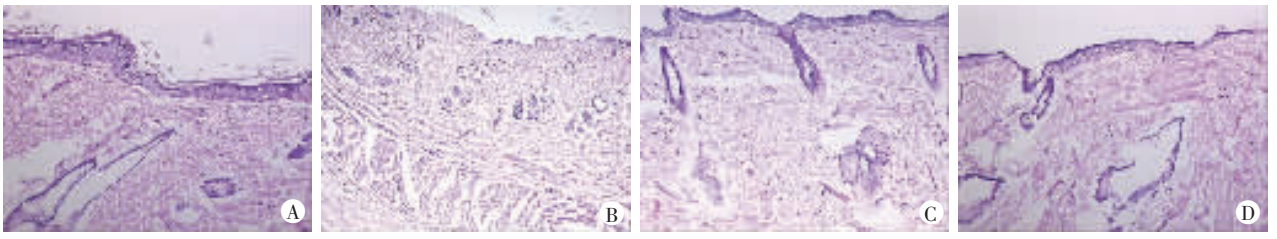
组别	n	FPG (mmol/L)	HBALc(%)	INS(μU/ml)
C组	13	8.67±2.68	4.39±0.38	77.71±40.89
DC组	10	24.30±1.92[a]	15.03±2.00[a]	33.35±19.01[a]
DI组	10	10.30±2.51[bd]	7.04±1.51[ab]	127.12±82.93[bd]
DR组	13	16.70±6.44[ab]	12.33±3.82[ac]	42.01±20.03[a]

a: P<0.01,与C组比较; b: P<0.01, c: P<0.05,与DC组比较; d: P<0.01,与DR组比较

表2 不同组别大鼠血清TNF-α、IL-6、C-RP、SOD的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TNF-α(ng/ml)	IL-6(pg/ml)	C-RP(mg/L)	SOD(U/ml)
C组	13	0.86±0.60	99.92±32.36	2.54±1.31	137.76±27.60
DC组	10	1.45±0.67[b]	135.05±43.39[b]	3.51±0.62[b]	70.71±37.52[a]
DI组	10	1.16±0.87[d]	104.86±18.06[d]	2.25±0.46[c]	149.96±13.25[c]
DR组	13	0.85±0.56[d]	94.21±30.67[d]	2.25±0.95[c]	128.50±38.27[c]

a: P<0.01, b: P<0.05,与C组比较; c: P<0.01, d: P<0.05与DC组比较



A:C组;B:DC组;C:DI组;D:DR组

图1 16周各组大鼠的皮肤组织形态学变化 (HE ×200)

2.2 不同组别大鼠表皮及皮肤全层厚度

DC组大鼠皮肤全层变薄,与C、DI和DR组比较有明显差异($P<0.05$, $P<0.01$);DR组大鼠皮肤全层较正常组薄($P<0.05$),但表皮厚度较DC组厚($P<0.05$);DC组表皮厚度较C组薄,但无统计学差异($P>0.05$)。见表3。

表3 不同组别糖尿病大鼠的表皮和皮肤全层厚度 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	表皮厚度(μm)	皮肤全层厚度(mm)
C组	13	39.15±8.20	1.59±0.26
DC组	10	32.72±9.30^{e}	0.77±0.18^{ad}
DI组	10	36.52±8.94	1.47±0.50^{c}
DR组	13	41.00±10.00	1.22±0.47^{b}

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$ 与C组比较; c: $P<0.01$,与DC组比较; d: $P<0.01$, e: $P<0.05$,与DR组比较

2.3 不同组别大鼠皮肤组织学观察

切片5 μm厚,HE染色后光镜下(×200)观察所见:C组16周:皮肤角质形成细胞复层排列,层次清晰,真皮内胶原丰富。DC组16周:表皮明显变薄,角质形成细胞层次明显减少,局部为单层排列,真皮内胶原减少,脂肪消失(×100)。DI组16周:皮肤表皮角质形成细胞层次较多,排列整齐(接近正常组),真皮内及皮下胶原肿胀不明显。DR组16周:皮肤表皮厚薄不均,较厚区域角质形成细胞层次接近C组,排列整齐,真皮内胶原轻度肿胀(图1)。

3 讨论

本研究DC组的TNF-α、IL-6、C-RP较正常对照组明显增高。发现糖尿病早期皮肤变化为皮肤逐渐变薄,角质形成细胞层次逐渐减少、直至局部为单层排列;真皮内胶原减少、萎缩、肿胀,退化变性;皮下脂肪逐渐进行性萎缩或消失,与已有的报道相一致[7,8]。DM皮肤病变的形成是一个多因素多环节参与的病理过程,涉及表皮与皮下的细胞、细胞外基质、细胞因子及其受体以及信号转导等[7]。TNF-α是一种由活化单核细胞产生的活性作用广泛的细胞因子,能降低胰岛素的作用,导致胰岛素抵抗;IL-6是体内许多细胞产生的一种具有多种生物活性的刺激因子,参与机体的各种病理生理过程[9]。C-RP是急性期反应蛋白,是非特异性炎症标志,主要受循环中IL-6和TNF-α调节,并刺激肝脏合成C-RP[10]。多数学者认为糖尿病慢性并发症与炎症因子的升高密切相关,研究表明炎症因子通过干扰胰岛素信号传导系统,导致细胞内皮功能紊乱,最终导致大血管及微血管的并发症;C-RP通过胰岛素抵抗参与了DM血管病变的发生和发展[2,11]。本研究罗格列酮可有效降低血清TNF-α、IL-6、C-RP浓度减低的原因可能是:①抑制单核/巨噬细胞、淋巴细胞等免疫细胞的活性,减少细胞因子的产生;②增加胰岛素的敏感性,恢复胰岛素对IL-6、TNF-α分泌的抑制作用,减少肝脏合成C-RP[12]。

近来有报道高血糖状态可在体内产生大量自由基,并使体内自由基防御机制受损,两者共同导致氧化应激加重,罗格列酮较强的抗氧化活性有助于防治糖尿病的慢性并发症[13]。SOD是一种重要的自由基清除剂,本研究罗格列酮能提高SOD水平,在防治糖尿病慢性并发症中可能具有一定的意义。

皮下脂肪层不仅仅是被动的能量贮存所,同时还能够分泌多种生物活性物质,本研究糖尿病组大鼠皮肤全层变薄,表皮变化不明显;皮下脂肪进行性萎缩,此可能是糖尿病皮肤损害发展和创面难愈的病理基础之一[14]。

已有研究胰岛素对糖尿病大鼠潜在皮肤病变具有防护作用,其作用机制可能与严格控制血糖、抑制糖基化产物(AGE)的合成、阻断AGE的作用环节等有关[3]。本研究中罗格列酮组的胰岛素测定比正常组明显降低,糖化血红蛋白也比胰岛素组增高,推测罗格列酮的作用并非通过胰岛素所引起;罗格列酮作为胰岛素增敏剂,对重型糖尿病无降糖作用;由此进一步说明罗格列酮的抗炎、抗氧化作用并不依赖于其"降糖"效应。本研究提示罗格列酮对糖尿病大鼠皮肤有明显的保护作用,其机制可能与不依赖于降糖作用的抗炎症因子和抗氧化活性有关。

参考文献:

[1] Wertheimer E. Diabetic skin complications: a need for reorganizing the categories of diabetes-associated complications [J]. Isr Med Assoc J, 2004, 6(5): 287-289.

[2] Leinonen E S, Hiukka A, Hurt-Camejo E, *et al*. Low-grade inflammation, endothelial activation and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes[J]. J Intern Med, 2004,256(2): 119-127.

[3] 陈向芳, 林炜栋, 陆树良, 等. 胰岛素对糖尿病大鼠潜在皮肤病变防护作用的机理研究[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(45): 3176 - 3180.
[4] Cheng S X, Kupper T. A new rexinoid for cutaneous t-cell lymphoma [J]. Arch Dermatol, 2001, 137(5): 649 - 652.
[5] 张晓菲, 郝飞. 噻唑烷二酮类药物在皮肤病临床应用进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2009, 38(4): 267 - 269.
[6] 王晓琳,邱宗荫,夏永鹏. 性别差异对实验性链脲佐菌素糖尿病大鼠造模的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(17): 1668 - 1671.
[7] 林炜栋, 陆树良, 陈向芳, 等. 糖尿病大鼠皮肤的组织化学改变[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(2): 230 - 233.
[8] 张晓菲,郝飞,杨景. 糖尿病大鼠早期皮肤改变与血清炎性介质变化[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(8): 787 - 789.
[9] 刘静, 王青. 糖尿病患者血清一些细胞因子, C 肽和胰岛素变化[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(6): S119 - S121.
[10] 姚辉, 林汉华, 于芳, 等. 2 型糖尿病大鼠血清 C 反应蛋白动态变化及罗格列酮干预后改变[J]. 临床儿科杂志, 2005, 23(8): 516 - 518.
[11] 尤巧英, 李成江, 李红, 等. 炎症因子与胰岛素抵抗和 2 型糖尿病大血管病变的相关性研究[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(10): 804 - 807.
[12] 孔宪如, 董吉祥, 徐志刚, 等. 匹格列酮对 2 型糖尿病炎症标志物的影响研究[J]. 江苏医药, 2004, 30(9): 674 - 675.
[13] Da-Ros R, Assaloni R, Ceriello A. The preventive anti-oxidant action of thiazolidinediones: a new therapeutic prospect in diabetes and insulin resistance[J]. Diabet Med, 2004, 21(11): l249 - l252.
[14] Vicennati V, Vottero A, Friedman C, *et al*. Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes [J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002, 26(7): 905 - 911.

(**收稿**:2009-11-11;**修回**:2009-12-17)
(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2010)10-1019-01

个案与短篇

急性早幼粒细胞性白血病误诊病例的骨髓细胞形态学鉴别诊断分析

彭贤贵,陈幸华,孔佩艳,张 曦,高 蕾,刘思恒,王 平 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院血液科)

[关键词] 急性早幼粒细胞白血病;细胞形态学;误诊;鉴别诊断
[中图法分类号] R733.71 **[文献标志码]** B

我科 2007 年 10 月至 2009 年 8 月收治 4 例与急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocyticleukemia, APL)诊断有关的急性白血病外院骨髓细胞形态学报告均出现误诊情况,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例资料

病例 1:男性,11 岁,因全血细胞减少,在他院就诊,骨髓报告提示 AML-M5。给予柔红霉素联合阿糖胞苷治疗,未缓解,转入我科。

病例 2:女性,4 岁,因全血细胞减少,在他院就诊,骨髓报告提示 AML-M5。给予维 A 酸治疗,未缓解,到我科就诊。

病例 3:男性,45 岁,因发热,全身大量瘀斑,贫血,血小板减少,在他院就诊,骨髓报告提示 APL,遂到我院购买维 A 酸,准备回他院治疗。接诊医生要求在我院重新做骨髓检查,发现诊断有误。随即患者入住我科。

病例 4:男性,20 岁,因发热,肝脾肿大,白细胞、血小板减少,在他院就诊,骨髓报告提示 APL。给予维 A 酸口服治疗 1 个月,未缓解,转到我科治疗。

1.2 方法

骨髓细胞形态学检查:镜检计数 500 个有核细胞。常规做 POX、NAE、NaF 抑制试验和糖元染色。染色体检查:G 带染色分析,计数 10 ~ 15 个分裂象。核型异常按人类细胞遗传学国际命名体制 6(ISCN)进行识别和描述。分子生物学检测:应用 FISH 技术。荧光显微镜下镜检,观察间期细胞的荧光标记,一红一绿两黄为典型融合基因表达。计数 200 个细胞,计算百分比。

2 结果

病例 1:在我院骨髓像细胞分类早幼粒细胞占 74.0%,形态学结论是 AML-M3v;染色体核型为 t(15;17), FISH 提示 PML/RAra 阳性率 92%,临床诊断 AML-M3v,行维 A 酸诱导治疗,1 个月后完全缓解。病例 2:在我院骨髓像细胞分类早幼粒细胞占 78.8%,形态学结论是 AML-M3b;染色体核型为 t(15;17), FISH 提示 PML/RAra 阳性率 71%,临床诊断 AML-M3b,考虑到以前用药史给予加大剂量维 A 酸诱导,并同时给予三氧化二砷治疗,1 个月后部分缓解。病例 3:在我院骨髓像细胞分类原始粒细胞占 60.2%、早幼粒细胞 11.2%,形态学结论是 AML-M2a;染色体核型为 +8,FISH 提示 PML/RAra0%,临床诊断 AML-M2a。行 TA 方案化疗,40 d 部分缓解。病例 4:在我院骨髓像查见大量的胞体大、颗粒增多的原始粒细胞,分类占 50.4%,形态学结论是 AML-M2;染色体为正常核型, FISH 提示 PML/RAra 阳性率 0%,临床诊断 AML-M2。行 TA 方案治疗 40 余天后部分缓解。

3 讨论

FAB 将 APL 分为 M3 和 M3v 两个亚型,M3 为经典的颗粒增多型 APL,M3v 为颗粒减少的变异型 APL。国内教科书仍将 M3 分为 M3a 和 M3b 两个亚型[1]。

M3 的异形早幼粒细胞形态变化主要有外形不规,出现伪足和瘤状突起;细胞质不均,易出现胞质芽,形成“内外浆”;

(下转 1023 页)

[通信作者] 陈幸华,电话:(023)68774668,E-mail:xhchen888@yahoo.com.cn