论著

文章编号:1000-5404(2010)07-0692-04

糖尿病大鼠胰腺泡组织中 ERK5 的表达及意义

沈文拥, 陈伟庆, 唐 鹏 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院消化内科)

[摘要] **目的** 研究大丝裂酶原激活蛋白激酶(big MAP kinase 1,BMK1/ERK5)在糖尿病大鼠胰腺泡组织血管上的表达水平及意义。**方法** 20 只 SD 大鼠按随机数字表法分成对照组($n=10$)和糖尿病组($n=10$),采静脉血测其空腹血糖、胰岛素及血脂;取胰腺组织行 HE 染色病理学观察。糖原染色(PAS)观察血管病变。免疫组化检测胰腺泡组织Ⅰ、Ⅳ型胶原的表达。原位杂交检测血管上 ERK5 mRNA 表达。**结果** ①糖尿病组血管壁明显增厚,血管周围明显炎症细胞浸润,局灶腺泡萎缩,炎症细胞浸润。②糖尿病组血管壁 PAS 阳性物质沉积。③Ⅳ型胶原主要表达血管基底膜,Ⅰ型胶原主要表达于糖尿病大鼠有腺泡萎缩、炎症浸润的组织部位,糖尿病组较对照组表达增高($P<0.01$)。④ERK5 mRNA 主要在胰腺血管上表达,其表达水平糖尿病组较对照组明显增高($P<0.01$)。**结论** 伴有脂代谢障碍的糖尿病大鼠胰腺泡组织中的微循环障碍,可能为 ERK5 的高表达所致。ERK5 的高表达可能是高脂血症患者易发胰腺炎的重要发病基础之一。

[关键词] 糖尿病;高脂血症;胰腺;大丝裂酶原激活蛋白激酶;血管病变;大鼠

[中图法分类号] R576.02; R587.2; R394.2 **[文献标志码]** A

High expression of ERK5 in pancreatic acinus of diabetic rats and its significance

Shen Wenyong, Chen Weiqing, Tang Peng (Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1 or ERK5) in the pancreatic acinus of diabetic rats. **Methods** Twenty SD rats were randomly divided into normal control group ($n=10$) and streptozotocin (STZ)-induced diabetic group ($n=10$). At the end of 14 weeks inducement, all rats were sacrificed and venous blood and pancreatic tissues were collected. The levels of fasting blood glucose, insulin and blood fat were determined to identify the establishment of diabetic rat model. The specimens of pancreas were fixed and embedded. Hematoxylin-eosin staining was performed to observe the morphological changes. Periodic acid-Schiff (PAS) staining was carried out for the vascular changes. The expressions of type Ⅰ and Ⅳ collagen were determined by inmmunohistochemical method. BMK1/ERK5-mRNA was detected by *in situ* hybridization. **Results** Compared with the control, in diabetic group the vascular wall was thickening, inflammatory cells were infiltrated in perivascular area, local acinus was atrophy and the expression of type Ⅳ collagen was mainly expressed in vascular basement membrane, while type Ⅰ collagen was in local atrophy acinus tissue with inflammation ($P<0.05$). ERK5 mRNA was expressed in the vascular endothelial cells, and significantly increased in diabetic rats ($P<0.01$). PAS-positive substances were deposited in the vascular wall in diabetic group but were not observed in the control group. **Conclusion** ERK5 may contribute to the microcirculation disturbance in the pancreas of diabetic rats with dyslipidemia, moreover, ERK5 may be one reason for pathogenesis of acute pancreatitis due to hyperlipidemia.

[Key words] diabetes mellitus; hyperlipemia; pancreas; big mitogen-activated protein kinase 1; vascular lesion; rate

Corresponding author: Chen Weiqing, E-mail: chenweiqing506@yahoo.com

临床上糖尿病患者通常伴有的脂代谢障碍、高糖和高脂血症均可导致胰腺微循环损害。微循环障碍是胰腺炎的重要发病机制之一[1],高脂血症患者胰腺炎的发病率为 1% ~4%[2]。美国胆固醇教育计划成人治疗组Ⅲ(NCEP ATP Ⅲ)提出对于甘油三酯 > 5.65 mmol/L 的糖尿病患者应首先控制高甘油三酯血症,以防急性胰腺炎的发生[3]。但对高血糖,尤伴高脂血症胰腺腺泡和微循环损害的研究较少且机制不清楚。ERK5 是最近发现的丝裂酶原激活蛋白激酶家族成员之一,研究发现 ERK5 与血管发育、增殖等功能密切相关[4]。本实验旨在探讨糖尿病大鼠模型中 ERK5 的表达水平,是否参与胰腺外分泌部微小血管和腺泡

[通信作者] 陈伟庆,E-mail:chenweiqing506@yahoo.com

损害及其损害机制。为高糖和高脂血症时胰腺的相关损害,尤其是胰腺炎的发生提供进一步的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备

20只SD雄性大鼠(重庆医科大学实验动物中心提供)4月龄,体质量200~230 g,清洁级,采用随机数字表分为正常对照组和糖尿病组,每组10只。糖尿病组腹腔注射链脲佐菌素(Merck公司)50 mg/kg[5],72 h后尾静脉血糖≥16.7 mmol/L的大鼠为糖尿病大鼠,正常组注射同等剂量的柠檬酸盐缓冲液。造模成功后,重庆医科大学实验动物中心喂养,14周末取材,取材前一晚禁食12 h,水合氯醛3 ml/kg腹腔注射麻醉下打开腹腔,右心室采血4 ml,其中1 ml放入抗凝试管内,4 ℃保存待检,其余部分血液装入普通试管,经2 500 r/min离心分离出血清,-20 ℃分装保存。采血后,留取胰腺组织标本,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋。

1.2 材料

血清胰岛素试剂盒购自南方建成生物工程研究所。过碘酸氧化液和Schiff试剂由重庆医科大学附属第二院病理科提供。Ⅰ、Ⅳ型胶原兔抗大鼠多克隆抗体购自北京博奥森生物科技有限公司。S-P试剂盒和地高辛标记的原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。GenBank和Oligo 6软件,设计大鼠ERK5 mRNA寡核苷酸探针序列:5′-AGCACCAGCAC-CAGCACCAGCACCAACACCAACACCAACA-3′,5′端地高辛标记,由上海生工合成。

1.3 方法

1.3.1 生化检测 采静脉血进行检测,血糖(BG)用Gohnson公司便携式血糖检测仪测定;甘油三酯、总胆固醇用酶法由日立607020型分析仪测定;空腹胰岛素(FINS)检测按其试剂盒具体操作说明进行检测。

1.3.2 病理学观察 标本切片,HE染色,光镜下观察胰腺泡组织改变。并计数血管周围的炎性细胞,在高倍镜下随机计数含至少1个血管的4个视野,取均值为该切片计数值。每切片在10倍光镜下随机选取直径小于200 μm的4个胰腺血管,对血管壁厚度进行分析,在高倍镜下血管横截面均分5段测其管壁厚度,均值为该血管的血管壁厚度,取其每张切片均值进行比较。病理学观察由病理科老师指导下完成,细胞计数和血管壁厚度测量均用IPP 6.0软件,血管壁厚度用未作长度单位转换的像素表示。

1.3.3 糖原染色 碘酸-Schiff(periodic acid-Schiff,PAS)反应观察胰腺泡组织微小血管病变。切片脱蜡至水,1%过碘酸水溶液氧化5~10 min,流水洗5 min,蒸馏水洗,置入Schiff液10~30 min,水洗1~3 min,苏木精作对比染色,脱水、透明、封固。光学显微镜观察PAS阳性物质呈樱桃红色。

1.3.4 免疫组化S-P法检测胰腺泡组织中Ⅰ、Ⅳ型胶原的表达

S-P法步骤按试剂盒说明书进行,用pH 6.0的枸橼酸钠缓冲液进行煮沸热修复抗原,并以PBS代替一抗作阴性对照,光学显微镜观察着色反应。高倍镜下选取,糖尿病组炎症部位表达的Ⅰ型胶原与对照组比较;在含有血管的4个高倍镜下,糖尿病组血管上表达的Ⅳ型胶原与对照组血管上表达的Ⅳ型胶原比较,取平均光密度均值进行分析。

1.3.5 原位杂交 胰腺泡组织ERK5 mRNA原位杂交按检测试剂盒要求进行。其中胃蛋白酶消化时间为20 min,38%水浴,预杂交2.5 h(38 ℃),杂交时间约24 h(38 ℃),BCIP/NBT显色20 min(38 ℃),核固红复染,阴性对照以杂交用磷酸缓冲液(PBS)代替杂交液。光镜下观察细胞细胞质呈深紫蓝色者为阳性表达,否则为阴性。每张切片随机取含血管的4个高倍视野,IPP 6.0软件选取血管壁,取平均光密度均值进行分析。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 2组大鼠糖、胰岛素、脂代谢指标的比较

糖尿病组空腹血糖水平显著高于对照组($P<0.01$),空腹血清胰岛素水平糖尿病组较对照组低($P<0.05$),糖尿病组血清甘油三酯、胆固醇较对照组高($P<0.05$),见表1。提示糖尿病大鼠模型造模成功。

表1 2组空腹血糖、血清胰岛素、血脂比较($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	空腹血糖(mmol/L)	血清胰岛素(μU/ml)	甘油三酯(mmol/L)	胆固醇(mmol/L)
对照组	5.19±0.56	7.92±1.28	0.77±0.52	1.53±0.15
糖尿病组	25.79±4.29[a]	6.55±1.06[b]	0.86±0.09[b]	1.73±0.16[b]

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

2.2 组织病理学表现

糖尿病组胰腺泡组织中可见多处局灶性病变,表现为腺泡萎缩,体积缩小,染色加深,核固缩,腺泡细胞排列松散,有淋巴细胞和单核细胞浸润。病灶血管周围炎性细胞浸润,主要为淋巴细胞和单核细胞。病灶周围胰腺微小血管壁增厚。对照组腺泡的光镜结构,腺泡结构完整饱满,由一层锥体形腺泡细胞构成,无局灶腺泡萎缩,血管周围无炎症细胞浸润,血管壁无增厚。

2.3 血管周围炎性细胞计数、血管壁厚度比较

胰腺血管周围为淋巴细胞和单核细胞浸润,糖尿病组炎性细胞计数值明显高于对照组($P<0.01$)。糖尿病组微小动脉管壁增厚,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),见表2。

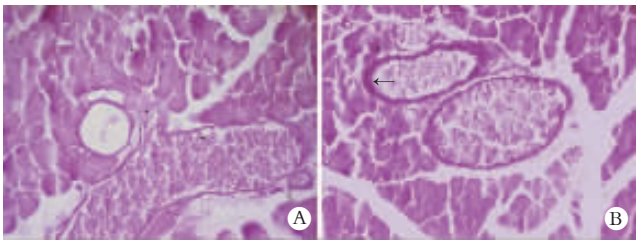
表2 2组炎性细胞计数,血管壁厚度,Ⅰ、Ⅳ型胶原,ERK5 mRNA比较($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	炎性细胞计数(个)	血管壁厚度(像素)	Ⅰ型胶原	Ⅳ型胶原	ERK5 mRNA
对照组	4.95±2.77	27.94±4.53	34.89±7.48	5.35±0.96	6.44±0.97
糖尿病组	30.50±12.07[a]	44.55±4.00[a]	87.83±9.50[a]	17.00±3.43[a]	14.17±0.73[a]

a:$P<0.01$,与对照组比较

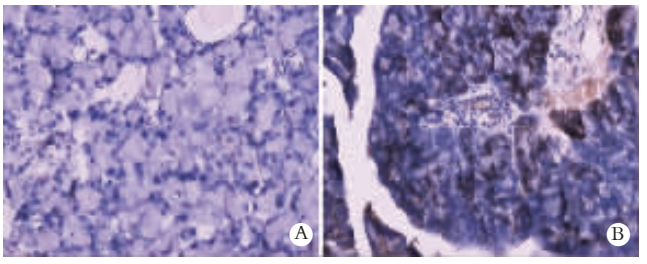
2.4 糖原染色、免疫组化、原位杂交检测结果

糖原染色:糖尿病组血管壁上均有PAS阳性物质表达,而正常组血管壁上则无PAS阳性物质表达(图1)。免疫组化:Ⅰ型胶原主要表达与炎症相关的腺泡组织中(图2),Ⅳ型胶原主要表达于血管基底膜(图3),与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$,表2)。原位杂交:ERK5 mRNA在胰腺泡组织中表达,并主要表达于血管内皮细胞(图4),与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$,表2)。



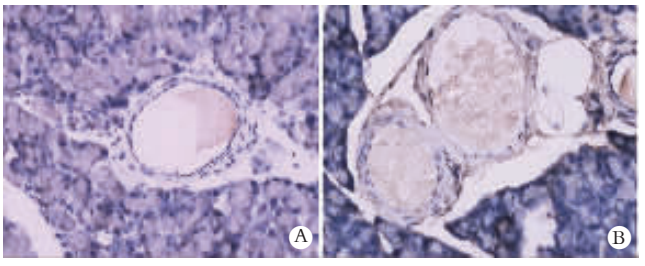
A:对照组;B:糖尿病组 ↑:胰腺血管上PAS阳性物质的表达

图1 2组大鼠胰腺血管组织学观察 (PAS ×400)



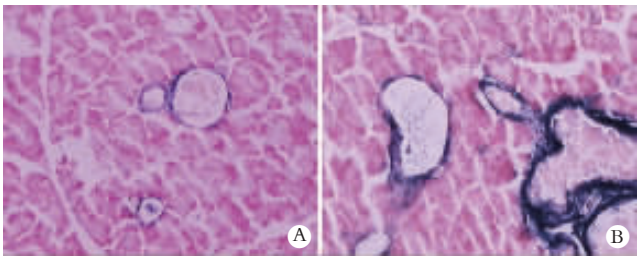
A:对照组;B:糖尿病组

图2 免疫组化观察2组大鼠胰腺组织Ⅰ型胶原的表达 (S-P ×200)



A:对照组;B:糖尿病组

图3 免疫组化观察2组大鼠胰腺血管Ⅳ型胶原的表达 (S-P ×200)



A:对照组;B:糖尿病组

图4 对照组和糖尿病组胰腺血管ERK5 mRNA的表达
(原位杂交 ×200)

3 讨论

过去认为胰酶激活是急性胰腺炎的始动因素,近年研究发现胰腺局限性炎症进展为重症胰腺炎主要是由于白细胞过度激活所产生的大量炎症介质的作用和微循环障碍[6]。微循环障碍在急性胰腺炎的发生、发展过程中起重要作用。糖尿病是一种血管性疾病,可导致全身性血管损伤,尤伴高脂血症存在胰腺血管损伤,因此,研究其对胰腺的血管损伤机制尤为重要,对胰腺炎的发生及预防提供理论基础。近年来研究示脂质过氧化、活性氧族增加,炎症因子,NAD(P)H氧化酶激活,内皮素受体途径等参与了糖尿病的胰腺血管损伤机制。本实验发现ERK5可能参与了糖尿病伴脂代谢障碍大鼠的胰腺血管及腺泡损伤。

根据文献[5],本实验大鼠腹腔注射STZ(50 mg/kg),血糖、胰岛素水平、血脂等结果示糖尿病大鼠造模成功。本结果示糖尿病组胰岛素水平较对照组降低,血清甘油三酯、总胆固醇水平较对照组升高,存在血脂异常。造模成功后,在14周末光镜下观察示糖尿病组大鼠胰腺腺泡局灶萎缩,部分炎症细胞浸润,与文献[7]报道相符合。免疫组化Ⅰ型胶原在有炎症的腺泡组织中表达增加,研究显示Ⅰ型胶原与腺泡组织的慢性炎症过程相关,可导致胰腺组织纤维化[8]。我们在光镜下观察胰腺血管发现,糖尿病组微小血管壁增厚,胰腺微小血管周围炎症细胞浸润,主要为淋巴细胞和少数单核细胞,PAS阳性物质沉积于血管内皮下,免疫组化Ⅳ型胶原在糖尿病组胰腺血管上表达增加,Ⅳ型胶原是血管基底膜的主要组成成分,Ⅳ型胶原增加导致血管基底膜增厚,血管纤维化。本研究证实糖尿病组大鼠胰腺血管存在增殖性病变,引起微循环障碍,进而导致血管周围及局灶腺泡慢性炎症反应。目前研究发现高血糖和高血脂均可造成胰腺微小血管及腺泡损伤,机制仍然不清楚。

丝裂原激活蛋白激酶是一个双磷酸化激活的丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶,由4个成员组成:细胞外信号调节激酶1/2(extracellular-signal regulated kinase 1/2,ERK1/2)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase)、P38丝裂原激活蛋白激酶(P38MAPK)和ERK5。ERK5通过对转录因子心肌细胞增强子(myocyte enhancer factor,MEF2)磷酸化而调节其转录活性[4,9]。研究显示,ERK5激活可导致多种细胞增殖和分化,ERK5缺陷裸鼠模型出现心血管发育障碍,证明ERK5信号通路是血管分化发育必需的,ERK5对保护内皮细胞功能和维持血管的完整性起关键性作用[9],ERK5在血管的增殖性病变中也起重要作用。但目前少见ERK5与糖尿病伴高脂血症时在胰腺中的研究报道。

本实验结果显示,ERK5在胰腺泡组织中表达,主要表达于胰腺的血管内皮细胞,提示ERK5与胰腺血管功能也密切有关。并且发现糖尿病组比对照组明显高表达,在糖尿病大鼠模型高糖和/或高脂血脂症可激活胰腺血管内皮细胞上的ERK5高表达。Liu等[10]用培养牛肺动脉内皮细胞研究也证明高糖能激活ERK5。血脂异常也可能参与激活血管内皮ERK5,但目前少见相关文献报道。

ERK5可导致细胞外基质增加，Ⅰ型胶原表达增加[11]，MMP-9高表达[12]，而MMP-9是水解Ⅳ型胶原的特异性酶，ERK5也可能导致Ⅳ型胶原表达增加。糖尿病组存在血管增殖性病变，慢性炎症反应，Ⅳ、Ⅰ型胶原高表达。因此我们认为，糖尿病伴脂代谢异常的ERK5高表达可能是导致胰腺血管的增殖性病变及胰腺腺泡病变的因素之一。

综上所述，糖尿病伴脂代谢异常的胰腺泡组织血管壁上有ERK5 mRNA表达，ERK5导致胰腺血管增殖病变，造成胰腺循环障碍，缺血、缺氧，从而导致胰腺腺泡损害，甚至胰腺炎的发生。

参考文献：

[1] Panek J, Zasada J, Pozniczek M. Microcirculatory disturbance in the course of acute pancreatitis[J]. Przegl Lek, 2007, 64(6): 435 - 437.
[2] Tsuang W, Navaneethan U, Ruiz L, *et al*. Hypertriglyceridemic pancreatitis: presentation and management[J]. Am J Gastroenterol, 2009, 104(4): 984 - 991.
[3] 崔丽娟. 高脂血症对糖尿病酮症酸中毒并发急性胰腺炎的影响[J]. 中国基层医药, 2007, 14(3): 409 - 410.
[4] Zhao Z, Geng J, Ge Z, *et al*. Activation of ERK5 in angiotensin II-induced hypertrophy of human aortic smooth muscle cells[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 322(1/2): 171 - 178.
[5] 李想，王湘英. 急性胰腺炎微循环障碍的治疗进展[J]. 医学临床研究, 2009, 26(2): 352 - 355.
[6] 艾智华，蔡红卫，张忠辉. 大黄酸治疗大鼠糖尿病肾病的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(4): 304 - 306.
[7] Attia A A. Histological and electron microscopic studies of the effect of beta-carotene on the pancreas of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats[J]. Pak J Biol Sci, 2009, 12(4): 301 - 314.
[8] Masamune A, Shimosegawa T. Signal transduction in pancreatic stellate cells[J]. J Gastroenterol, 2009, 44(4): 249 - 260.
[9] Spiering D, Schmolke M, Ohnesorge N, *et al*. MEK5/ERK5 signaling modulates endothelial cell migration and focal contact turnover[J]. J Biol Chem, 2009, 284(37): 24972 - 24980.
[10] Liu W, Schoenkerman A, Lowe W L Jr. Activation of members of the mitogen-activated protein kinase family by glucose in endothelial cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000, 279(4): E782 - E790.
[11] Dorado F, Velasco S, Esparis-Ogando A, *et al*. The mitogen-activated protein kinase Erk5 mediates human mesangial cell activation[J]. Nephrol Dial Transplant, 2008, 23(11): 3403 - 3411.
[12] Mehta P B, Jenkins B L, McCarthy L, *et al*. MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion[J]. Oncogene, 2003, 22(9): 1381 - 1389.

（**收稿**:2009-09-01；**修回**:2009-10-10）
（编辑　王小寒）

（上接687页）

3　讨论

教师是一个庞大的职业用嗓群体，其用嗓程度大大超过其他职业用嗓者[2]。嗓音病作为教师的一种职业病，给患病教师的工作带来极大困扰。疾病治疗的要求与患者的工作和生活习惯相互矛盾，大多嗓音病教师在工作的同时采取自行用药或门诊治疗，由于局部用药后，对声嘶症状缓解较明显，因此多数教师病情稍有好转即不再继续治疗和复查，这直接造成疾病的反复发作和迁延不愈。因此，寻求好的临床干预对策对提高教师嗓音病疗效起着至关重要的作用。

本研究结果显示，D组有效率仅为46.0%，说明单一药物治疗，虽短期内对嗓音病的声嘶症状缓解明显，但易复发和迁延不愈。A组有效率为73.4%，说明配合控声，尤其在急性发作期，可大大减轻声带的疲劳。声带小结、息肉等声带疾病多因近期用声过度而致声带过劳，发声过程中的反复机械损伤出现炎症反应，引起声带质量和弹性的改变[3-5]，出现讲话费力、声音嘶哑等嗓音病常见症状，严重者可失声，所以控声（必要时禁声）是治疗的重要手段之一。B组有效率为66.7%，说明配合临床行为干预可帮助患病教师认识嗓音病的性质、特点、发展规律，认识到只有严格遵医嘱治疗[6]，摒弃不良生活方式，避免诱发因素，才会对嗓音病的康复起到良性促进作用。C组采取控声＋行为干预＋药物干预，有效率高达92.9%，表明临床综合干预治疗的痊愈率明显高于单一干预。4组干预疗效经行×列表χ^2检验显示差异有统计学意义。多组间两两比较结果可见C组与A、B、D间差异均有统计学意义，说明嗓音病患者进行临床综合干预治疗的有效率明显高于单一药物干预及任何2种组合方式的干预。

对嗓音病教师采取临床综合干预措施，是防止疾病复发，提高教师嗓音质量的关键。控声可缓解用声器官机械损伤出现的炎症反应，而良好的生活和行为习惯对声带的保护起着重要的作用，再加上遵医嘱规律用药等临床综合治疗，可显著提高教师嗓音病的治疗疗效。本研究提示相关呼吸道疾病也应注意防范，只有了解嗓音病的相关知识，纠正发音方法进行科学合理用嗓，才是减少教师嗓音病发生的关键。

参考文献：

[1] 周继福. 实用嗓音病治疗学全书[M]. 北京：学术期刊出版社, 1990: 1 - 4.
[2] 鹿道温，丁宝君，谢娟，等. 162名大学教师嗓音调查分析[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2000, 8(3): 125 - 127.
[3] 李福军. 声带小结、声带息肉的临床与病理分析[J]. 徐州医学院学报, 1998, 18(6): 487 - 489.
[4] Jacobson B H, Johnson A, Crywalski C, *et al*. The Voice Handicap Index(VHI): development and validation[J]. Am J Speech Lang Pathol, 1997, 6(3): 66 - 70.
[5] 肖晓莲，钟诚. 歌唱嗓音疾病发声训练的临床分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(8): 746 - 747.
[6] 姜晓丽，刘玮琳，张慧燕. 健康教育量化管理对嗓音病患者遵医行为及疗效的影响[J]. 护理管理杂志, 2007, 7(10): 4 - 7.

（**收稿**:2009-12-01；**修回**:2010-01-04）
（编辑　王小寒）