

# 硒缺乏大鼠胰岛损害的免疫组织 化学图像分析

张桂珍\* 李广生 王 凡 康德仁  
崔亚南<sup>△</sup> 王维忠<sup>△</sup>

(白求恩医科大学地方病研究所, 长春 130021)

**提 要** 应用免疫组织化学与图像分析技术相结合的方法, 较系统地研究了硒缺乏大鼠胰岛的损害。结果表明, 硒缺乏可引起胰岛多项结构参数异常, 其主要改变为胰岛素免疫反应阳性物面积与胰腺组织面积百分比 (Ins<sup>+</sup>/panc) 明显下降; 胰岛素免疫反应阳性物与胰岛组织面积百分比 (Ins<sup>+</sup>/Isl) 亦显著降低; 胰岛平均截面积 (Isl area) 及胰岛素阳性物平均面积 (Ins<sup>+</sup> area) 不同程度地减少; 胰岛形状因子 (SF) 增高; 胰岛截面数密度 (NA) 变化不明显。在胰岛上述结构参数改变的同时, 出现血清胰岛素水平降低, 胰岛素分泌贮备减少。提示硒缺乏引起胰岛损害的主要变化是以B细胞为主体的结构与功能异常。

**关键词:** 硒缺乏 胰岛素 免疫组织化学 图像分析

硒缺乏对胰岛功能的影响已逐渐引起人们的关注, 但对胰岛形态结构影响的资料罕见报道。我们的工作已表明低硒克山病病区粮可引起大鼠血清胰岛素、C肽水平降低, 它们在胰岛的激素分泌贮备减少<sup>[1~4]</sup>。为了探讨硒缺乏引起胰岛机能损害与形态变化之间的联系, 本研究采用免疫组织化学与图像分析方法相结合, 系统观察硒缺乏状态下大鼠胰岛结构的变化, 以及这些变化与胰岛机能的联系, 以为从营养学角度防治糖尿病提供科学依据。

本校实验动物部提供的 Wistar 大鼠60只, 体重90~110g, 雌雄各半, 按体重分成硒缺乏组 (SD, 以我国低硒地区产的粮食组成低硒基础饲料: 玉米89%、大豆10%、食盐1%、鱼肝油50mg/kg、含硒0.007mg/kg、含VE14.26mg/kg)、补硒组 (+ Se, 在低硒组饲料基础上补0.44mg/kg亚硒酸钠, 相当于硒0.2mg/kg)、补VE组 (+ VE, 在饲料内补醋酸VE500mg/kg)、联合补硒和VE组 (+ Se + VE, 在饲料内补亚硒酸钠0.44mg/kg、VE500mg/kg) 及常规食组 (stock

## 1 材 料 与 方 法

### 1.1 动物分组与饲料组成

\* 女, 1955年出生, 医学博士, 副教授, 国家自然科学基金资助项目: 39470612

<sup>△</sup> 中日联谊医院中心实验室, 长春 130031

diet, 饲予本校实验动物部提供的大鼠常规饲料, 其组成(%)为: 玉米48、黄豆20、精盐0.5、高粱7、麸子面15、鱼粉5、骨粉2.5、酵母粉2。含硒0.147mg/kg、含VE 46mg/kg)。

## 1.2 实验方法

大鼠自由摄食、饮自来水, 每周测体重一次。饲养16周后, 经眼眶血管取血, 3000 r/min离心15min, 分离血清, 断头处死动物。立即取大鼠胰腺平均分为两部分, 一部分用于免疫组织化学染色, 另一部分制备组织匀浆。匀浆介质为0.15mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液, 加入大豆胰蛋白酶抑制剂(Soybean Trypsin Inhibitor)1g/L, 以抑制胰酶活性。按1:9(w/v)浓度加入匀浆介质, 在4℃条件下, 以匀浆器最大速度匀浆5min, 4000r/min, 离心15min, 分离上清液。应用中国同位素公司北方免疫试剂研究所生产的放射免疫药盒方法测定血清及胰腺匀浆胰岛素含量。

免疫组织化学染色方法: 石蜡切片厚5μm, 常规脱蜡, 经梯度乙醇后蒸馏水洗; 0.1% pH7.8胰蛋白酶消化37℃、30min, 0.01mol/L pH7.4PBS洗3次, 每次5min; 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭内源性过氧化物酶, 室温15min, PBS洗同前; 滴加含1% BSA的豚鼠抗胰岛素抗体(北京医科大学生理教研组提供, 1:100稀释), 37℃、60min, 置4℃冰箱过夜, PBS洗同前; 滴加辣根过氧化物

酶标葡萄球菌A蛋白(HRP-SPA, 上海生物制品所生产, 1:40稀释), 37℃、60min, PBS洗; 滴加DAB显色剂(含0.1% DAB、0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.05mol/L pH7.6Tris-HCl缓冲液), 镜检控制, 显色完毕经水洗、苏木素复染、脱水、透明、封面。用PBS代替抗胰岛素抗体作为阴性对照, 用正常大鼠胰腺切片作为阳性对照。

图像分析方法: 应用Luzex电子计算机图像分析系统对经免疫组织化学染色的胰腺切片进行测试。测试条件: 目镜10×、物镜10×, 测视框面积23.22mm<sup>2</sup>。每张切片选取胰岛相对比较集中的区域测定3个视野。每一视野首先测Ins<sup>+</sup>/panc, 然后选取3个较大截面之胰岛, 用光标沿胰岛边缘仔细圈定胰岛范围, 测定每一胰岛Isl area、Ins<sup>+</sup> area、Ins<sup>+</sup>/Isl及胰岛形状因子(Shaper Factor, SF=胰岛最大直径的平方与胰岛截面面积比值)。测试结果经计算机进行方差分析(F检验)及参数之间的相关分析。

## 2 实验结果

### 2.1 血清及胰腺组织胰岛素含量的放射免疫测定结果(表1)

SD组血清胰岛素水平显著降低, 胰岛素分泌贮备亦明显减少; 补硒或补VE均不同程度地明显提高了血清胰岛素水平( $P < 0.05 \sim 0.01$ ), 增加胰岛素分泌贮备( $P < 0.001$ ); 联合补硒和VE时, 对升高血清胰岛素水平

Table 1 The insulin contents in serum and pancreas of the rats( $\bar{x} \pm S$ )

Group	n	Serum(mU/L)	Pancreas <sup>△</sup> (mU/L)
SD	12	20.73 ± 9.31	30.94 ± 13.36
+ Se	10	25.06 ± 8.08*	57.28 ± 19.42**
+ VE	12	32.07 ± 12.91**	61.96 ± 20.52**
+ Se + VE	12	43.27 ± 10.44**	64.97 ± 14.99**
Stock diet	12	44.67 ± 20.43**	65.75 ± 12.04**

\* In contrast to SD,  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

<sup>△</sup> Homogenized tissue 1:100

与增加胰岛素分泌储备均显示出最佳效果 ( $P < 0.01$ )。

## 2.2 大鼠胰岛免疫组织化学图像分析的结果 (表 2)

免疫组织化学定量分析结果表明, SD 组大鼠的  $\text{Ins}^+/\text{panc}$  降低,  $\text{Isl area}$  及  $\text{Ins}^+ \text{ area}$  不同程度地明显下降,  $\text{Ins}^+/\text{Isl}$  亦显著降低, SF 值增高, 但 NA 变化不明显。补硒和/或补 VE 组的  $\text{Ins}^+/\text{panc}$ 、 $\text{Isl area}$ 、 $\text{Ins}^+ \text{ area}$  及  $\text{Ins}^+/\text{Isl}$  四项结构参数均明显高于 SD 组 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ), SF 值显著低于 SD 组 ( $P < 0.01$ )。

定量分析结果, 揭示出胰岛结构参数变化的具体意义在于: (1)  $\text{Ins}^+/\text{panc}$  降低, 此参数是大鼠胰岛合成胰岛素能力的综合测试。其降低提示胰岛 B 细胞合成胰岛素能力的总体水平减弱, 是硒缺乏较长时间累及胰岛的结果。该参数变化与定性观察胰岛的病变, 如胰岛萎缩、B 细胞减少及空泡变性等改变密切相关。(2)  $\text{Ins}^+/\text{Isl}$  降低, 此参数进一步反应胰岛素的合成状况。由于参考

系统排除了胰腺外分泌组织的影响, 其判定胰岛的功能状态优于  $\text{Ins}^+/\text{panc}$ , 更明确了硒缺乏对胰岛的结构损害。(3) SF 升高, 提示硒缺乏可引起胰岛形状改变。这种变化在定性观察大鼠胰岛时表现并不明显, 而通过图像分析定量描述胰岛外形时, 各组间表现出明显的统计学差异。正常大鼠的胰岛一般略呈圆形或椭圆形, 故 SF 值相对较小。硒缺乏引起胰岛结构改变使胰岛略呈不规则形, 引起 SF 增高, 并具有较强的规律性, 提示 SF 是硒缺乏状态下胰岛结构变化的敏感指标, 测试 SF 有利于发现胰岛早期的结构变化。(4) 胰岛截面数密度变化不明显。硒缺乏引起胰岛结构变化是个渐进性过程, 喂硒缺乏饲料四个月的大鼠, 尚未出现胰岛数目的增减, 说明此参数不是敏感的指标, 随着硒缺乏时间延长及损害加重可能有胰岛数目的变化。

参数之间相关分析的结果表明,  $\text{Ins}^+/\text{panc}$  与 NA 呈显著正相关 ( $r = 0.59$ ,  $P < 0.01$ ), 说明随着胰岛数目的增加, 可总体

Table 2 The results of histochemical and quantitative analysis of islets in the rats ( $\bar{x} \pm S$ )

Group	n	$\text{Ins}^+/\text{panc}$ (%)	$\text{Isl area}$ ( $\text{mm}^2$ )	$\text{Ins}^+ \text{ area}$ ( $\text{mm}^2$ )	$\text{Ins}^+/\text{Isl}$ (%)	NA ( $\text{mm}^{-2}$ )	SF
SD	11	0.71 ± 0.32	12.14 ± 5.45	8.29 ± 2.91	53.14 ± 6.48	0.0014 ± 0.0004	0.37 ± 0.01
+ Se	11	1.13 ± 0.66**	18.32 ± 7.26*	12.64 ± 5.02**	76.71 ± 4.13**	0.0019 ± 0.0007	0.24 ± 0.004**
+ VE	11	1.14 ± 0.46**	20.14 ± 7.75*	12.33 ± 5.22**	71.36 ± 6.79**	0.0014 ± 0.0005	0.25 ± 0.005**
+ Se + VE	10	1.59 ± 0.55**	22.59 ± 6.58**	15.09 ± 5.44**	74.23 ± 7.39**	0.0015 ± 0.0007	0.24 ± 0.03**
Stock diet	8	2.08 ± 1.01**	23.16 ± 7.09**	17.01 ± 5.67**	74.50 ± 4.45**	0.0018 ± 0.0006	0.26 ± 0.03**

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  compared with SD

$\text{Ins}^+/\text{panc}$ : the ratio of insulin immune active product area to pancreatic tissue area

$\text{Isl area}$ : average islet area;  $\text{Ins}^+ \text{ area}$ : average insulin active product area

$\text{Ins}^+/\text{Isl}$ : the ratio of insulin immune active product area to islet area

NA: islet numbers/mm

SF: the shaper factor of islet

上提高胰岛素的合成水平;  $Ins^+/panc$ 也与  $Ins^+area$  呈显著正相关 ( $r = 0.71$ ,  $P < 0.001$ ), 提示胰岛素总体水平依赖于每个胰岛的机能状态;  $Ins^+/panc$ 与  $Isl\ area$  也具有明显的正相关关系 ( $r = 0.62$ ,  $P < 0.002$ ), 提示胰岛面积也影响胰岛素合成水平。参数之间的相关性对解释胰岛上述结构参数变化的意义有重要的作用。

### 3 讨 论

胰岛正常机能依赖于适量的硒和VE<sup>[6]</sup>, 作为生物体内重要的抗氧化剂, 硒与VE协同作用以维护生物膜系统的完整性, 此功能对胰岛组织有着特殊的意义。人们较早就发现胰腺正常外分泌机能对硒的依赖性<sup>[8~7]</sup>。但硒与胰岛机能的关系近年才开始受到人们的重视。硒缺乏明显损害胰岛机能, 引起血清胰岛素水平降低, 此状态可通过补一定剂量的硒或VE来预防。硒和VE缺乏参与糖尿病的发病机制已引起人们的关注<sup>[8~9]</sup>。但硒缺乏对胰岛形态结构的影响研究得较少, 其原因在于普通H.E病理切片难以显示出胰岛早期结构变化, 探讨硒缺乏与胰岛形态变化的关系需要方法学的更新。

本研究首次应用免疫组织化学与图像分析相结合的方法观察了大鼠硒缺乏状态下胰岛结构的损害, 结果发现其胰岛多项结构参数的异常。硒缺乏大鼠同时伴有血清胰岛素水平降低, 胰岛素分泌贮备减少, 进一步提示了结构与机能损害的并行性, 表明本研究选取的结构参数是定量描述胰岛结构变化客观而可靠的指标。

研究结果提示, 硒缺乏不仅损害胰岛机能, 也损害胰岛形态结构, 说明胰岛对硒缺乏是敏感的。在饲料中补一定剂量硒或VE, 明显改善了硒缺乏所引起的胰岛结构参数的变化, 也显著升高了血清胰岛素水平及胰岛素分泌贮备, 证实硒和VE对胰岛正常结构

与机能有着良好的保护作用。

胰岛是过氧化损害的敏感组织, 这是由于: (1) 在所有组织中, 胰岛总SOD及锌SOD含量最低。(2) 胰岛是富含膜结构的组织, 膜结构的多不饱和脂肪酸在低硒条件下极易受自由基攻击。(3) 胰岛细胞的内质网本身又是产生自由基的场所, 低硒引起GSH-Px活力减退使内质网中自由基清除受阻, 可在原位直接攻击内质网膜。(4) 胰腺组织正常状态下GSH-Px活力及VE含量水平不仅低于肝脏, 也低于心肌。即使是在投与大剂量VE条件下, 胰腺VE含量的增加也仅仅是肝脏和心肌的1/2左右。这些提示胰岛抗氧化损伤系统天然存在着多处薄弱环节, 因而深入研究硒缺乏引起胰岛损害的特点以及硒和VE对胰岛保护作用的机制, 将从营养学角度防治糖尿病提供科学依据。

### 参 考 文 献

- 1 张桂珍, 李广生, 王 凡 等. 硒和VE缺乏对大鼠胰岛B细胞机能的影响. 中国地方病学杂志 1992, 11:164
- 2 张桂珍, 李广生, 王 凡 等. 克山病发病相关因素与胰腺损伤关系. 中国地方病学杂志 1993, 12 (1):46
- 3 张桂珍, 李广生, 王 凡 等. 克山病及其致病因素对胰岛损害的免疫组织化学研究. 中华病理学杂志 1993, 22 (3):137
- 4 张桂珍, 李广生, 王 凡 等. 硒和维生素E对喂克山病病区粮大鼠胰岛素、C肽水平的影响. 营养学报 1993, 15:266
- 5 Asayama K. Effect of vitamin E and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging system in islets; decrease of islet manganosuperoxide dismutase. *J Lab Clin Med* 1986, 107(95):459
- 6 Thompson JN, Scott ML. Role of selenium in the nutrition of chicks.

- J Nutr* 1969, 97:335
- 7 Thompson JN, Scott ML. Impaired lipid and vitamin E absorption related to atrophy of the pancreas in selenium-deficient chicks. *J Nutr* 1970, 110:746
- 8 Bebreńs WA, Madore R. Vitamin C and vitamin E status in the spontaneously diabetic BB rats before the onset of diabetes. *Metabolism* 1991, 40(1):72
- 9 Bebreńs WA. Effect of dietary vitamin E on the vitamin E status in BB rats during development and after onset of diabetes. *Ann Nutr Metab* 1986, 30(3): 157

## IMMUNOHISTOCHEMICAL QUANTITATIVE IMAGE ANALYSIS OF ISLETS LESIONS OF RATS IN SELENIUM DEFICIENCY

Zhang Guizhen, Li Guangsheng, Wang Fan, Kang Deren,  
Cui Yanan, Wang Weizhong

(*Institute of Endermic Disease, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun, 130021*)

Immunohistochemical and quantitative image analysis methods were used to investigate the islets lesions of selenium deficient rats. The results demonstrated that there were morphological lesions in the selenium deficient rats. The main changes were: the ratio of insulin immune active product area to pancreatic tissue area as well as that to islets area obviously reduced; average islet area and insulin immune active product area also diminished; the shape factor of islets increased.

The above structural changes of islet lesions were accompanied with the decrease of insulin concentrations not only in serum but also in islets tissues.

The study suggested that selenium deficiency can cause both the functional and structural lesions of islets.

**Key words:** selenium deficiency insulin immunohistochemistry  
quantitative image analysis

收稿日期: 1995-08-17