

饲予克山病病区粮对大鼠胰岛 β 细胞分泌功能及胰岛素、C肽分泌贮备的影响

白求恩医科大学地方病研究所 张桂珍 李广生 王凡 康德仁

摘要 应用免疫组织化学及放免分析方法,对饲予克山病病区粮大鼠胰岛的形态与机能研究结果表明:低硒的克山病病区粮可引起大鼠血清胰岛素、C肽水平明显下降,胰岛内C肽和胰岛素分泌贮备显著减少,并出现胰岛 β 细胞萎缩、变性等形态学损害。在病区粮内补一定剂量硒或维生素E(VE)可明显提高血清胰岛素、C肽水平,增加 β 细胞分泌贮备,提示硒和VE缺乏引起的过氧化损害可能是胰岛受损的主要机制。本研究结果提示克山病基本病因可引起胰岛的原发性损害,其作为克山病发病过程中的重要环节,可能对心肌坏死的发生发展起一定作用。

关键词 克山病 胰岛素 C肽 硒和维生素E缺乏

最近研究表明,硒和维生素E(VE)的共同缺乏可能是克山病的基本病因^[1]。克山病是在我国被首先认识的人类硒和VE缺乏病。已经发现克山病时有较高的胰腺损伤率^[2,3]。国外学者也报道胰腺是动物硒和VE缺乏病最常受累的器官之一。但目前有关克山病及动物硒和VE缺乏病的胰腺损害研究主要限于胰外分泌部的改变,还不清楚其对胰岛的影响。在以往克山病患者尸检材料的普通病理切片上,可清楚观察到胰腺腺泡的病变,胰岛的变化往往不甚明显。因而只能从胰腺外分泌部病变的角度探讨其与克山病心肌坏死的联系。近年来,发现胰腺外分泌组织的血液供应主要来自胰岛,胰腺腺泡接受高浓度胰岛素的血液供应^[4],从而提示了胰腺内、外分泌组织生理上的密切联系及病理上的相互影响。鉴于胰岛机能对心肌细胞代谢重要影响,本研究用低硒的克山病病区粮喂饲大鼠,观察其对胰岛形态与机能的影响,探讨克山病基本病因对胰岛的损害及其表现特点,揭示克山病、胰岛损害、硒和VE缺乏、心肌坏死之间的内在联系。

1 材料与方法

1.1 动物、饲料及分组

选用本校实验动物部提供的幼年Wistar大鼠60只,体重90~120g,雌雄各半。分为克山病病区粮组:病区粮购于内蒙古自治区呼伦贝尔盟莫力达瓦达斡尔自治旗宝山乡腰小泉村,为1990~1991年产生的粮食。饲料组成为玉米89%、大豆10%、食盐

1%,浓缩鱼肝油0.05g/kg,含硒量0.007mg/kg。病区粮加硒组:在上述饲料配方基础上加入亚硒酸钠0.44mg/kg,相当于0.2mg硒。病区粮加VE组:加入醋酸VE500mg/kg。病区粮加硒、VE组:加入亚硒酸钠0.44mg/kg、醋酸VE500mg/kg。常规食组:本校实验动物部提供的大鼠常规饲料,硒含量为0.152mg/kg、VE为66mg/kg。

1.2 实验方法

动物自由摄食饮水。饲养16周后经眼眶动、静脉取血分离血清,断头处死,立即取出胰腺分为两部分。一部分固定于Bouin液中制备免疫组化切片,另一部分制作组织匀浆供生化及放免分析。匀浆介质为0.15M pH7.4磷酸盐缓冲液,其中含大豆胰蛋白酶抑制剂1mg/ml,以1:9浓度(W:V=1g:9ml)在4℃下制备匀浆,3000转离心10min,取上清液保存-20℃冰箱内。测定全血及胰腺组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力^[5]、血清与胰腺水溶性脂质过氧化物(LPO)含量^[6]。用北方试剂研究所及海军总院放免中心提供的放免药盒测定大鼠空腹血清胰岛素、C肽浓度以及胰岛内C肽和胰岛素的分泌贮备。免疫组化染色应用酶联葡萄球菌A蛋白(SPA)方法检测胰岛 β 细胞。胰岛素抗体由北京医科大学生理教研组提供。酶联SPA购于上海生物制品所。染色程序:石蜡切片厚度5 μ m,脱蜡至水。0.1%胰蛋白酶消化,37℃,30min;0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)洗5min,3次;滴加含1%牛血清白蛋白胰岛素抗血清(1:80稀释),37℃

60min, 4℃冰箱过夜; PBS洗同前, 滴加酶联 SPA (1:40), 37℃ 60min, PBS洗, DAB显色, 镜检控制. 脱水、透明、封片。

2 结果

2.1 病区粮大鼠胰岛形态结构的变化

免疫细胞化学方法显示的胰岛结构一般为圆形、椭圆形或长椭圆形。β细胞排列成片状或索状。细胞为圆形, 大小较均匀, 核居中央, 胞浆内充满粗大的胰岛素分泌颗粒。病区粮组大鼠胰岛的病变主要表现为个别胰岛β细胞索萎缩变细, 细胞索间空隙变大, 外观呈空虚状态。胞浆中胰岛素颗粒大部脱失而染色变淡, 仅在靠近细胞膜边缘保存少许胰岛素颗粒(图1、2)。上述病变累及胰岛的数目及程度不等。其余各组未见胰岛明显异常。

2.2 大鼠空腹血清胰岛素含量及胰岛内胰岛素分泌贮备的测定结果(表1)。

表1 空腹血清胰岛素含量及胰岛素分泌贮备 ($\bar{x} \pm Sx$)

组别	血清胰岛素 (ug/L)	胰岛匀浆胰岛素 (ug/L)
病区粮	12 9.57±5.42	30.93±13.15
病区粮+硒	12 17.98±6.21*	57.86±20.97*
病区粮+VE	12 20.27±10.69*	58.95±22.24*
病区粮+硒、VE	12 33.37±12.05**	64.97±14.99*
常规食	12 38.78±12.97**	65.75±12.04*

△: 1:100匀浆。* 与病区粮组比较, P<0.05, **P<0.01, F检验以下相同。

病区粮组大鼠空腹血清胰岛素含量及胰岛素分泌贮备明显下降。补一定剂量硒或VE可不同程度提高血清胰岛素水平, 增加胰岛素分泌贮备, 其中以联合补充硒和VE的效果最佳。

2.3 大鼠空腹血清C肽含量及胰岛C肽分泌贮备的检测结果(表2)。

表2 血清C肽含量及胰岛C肽分泌贮备 ($\bar{x} \pm Sx$)

组别	血清C肽水平 (ug/L)	胰岛组织C肽含量 (ug/g. Wet. weight)
病区粮	12 1.34±0.47	70.80±26.36
病区粮+硒	12 2.33±1.35*	118.76±57.57*
病区粮+VE	12 2.54±1.56*	156.23±75.05*
病区粮+硒、VE	12 2.83±1.18**	192.10±88.23**
常规食	12 3.67±1.95**	138.37±51.58*

病区粮组大鼠空腹血清C肽含量及胰岛C肽分泌贮备均明显减少。补一定剂量硒或VE可显著升高血清C肽含量, 增加胰岛C肽分泌贮备, 其中以联合补硒和VE的效果最好。

2.4 全血及胰腺GSH-Px活力的测定(表3)。

表3 全血及胰腺GSH-Px活力 ($\bar{x} \pm Sx$)

组别	n	全血GSH-Px (u/ml)	胰腺GSH-Px (u/g. wet. weight)
病区粮	12	7.20±2.01	4.56±1.36
病区粮+硒	12	31.35±5.91**	13.94±3.42**
病区粮+VE	12	9.07±2.71	5.90±3.72
病区粮+硒、VE	12	39.93±3.89**	14.96±2.62**
常规食	12	38.03±7.99**	15.96±5.51**

病区粮组大鼠全血及胰腺GSH-Px活力显著减退。补硒或VE可不同程度增高此酶活性, 硒明显优于VE。

2.5 血清及胰腺LPO含量检测结果(表4)。

病区粮组血清及胰腺LPO含量升高, 补硒或VE可明显降低LPO含量, 并以联合补硒和VE降低的效果最明显。

表4 血清及胰腺LPO含量 ($\bar{x} \pm Sx$)

组别	n	血清LPO (nmol/ml)	胰腺LPO (nmol/mg. protein)
病区粮	12	12.00±2.23	3.97±1.30
病区粮+硒	12	10.59±1.24	1.43±0.97**
病区粮+VE	12	10.77±1.20	1.45±0.73**
病区粮+硒、VE	12	10.64±1.68	1.40±0.73**
常规食	12	9.74±0.87**	1.25±0.77**

3 讨论

早期的研究工作曾提示过克山病病因有损害胰岛倾向^[7,8]。但在克山病¹病例的H、E病理切片上, 胰岛的变化往往不明显。本研究中用低硒的病区粮喂饲大鼠16周, 引起血清胰岛素、C肽水平显著降低, 胰岛C肽及胰岛素的分泌贮备明显减少, 表明β细胞合成与分泌激素能力均明显减弱, 提示病区粮中的致病因素可引起β细胞机能障碍。应用免疫细胞化学方法进一步显示出大鼠胰岛的形态变化, 尽管此种病变仅限于胰岛的β细胞萎缩与变性, 与克山病患者胰岛损害^[9]的程度比较要轻微, 但说明上述胰岛机能改变存在一定的形态学基础, 并且随着喂饲病区的粮时间的延长, 胰岛的形态损害可能进一步加重。由此看来, 克山病病因不仅损害胰腺外分泌部, 亦可损害胰岛。此种损害属于原发性的, 是由病区粮中的致病因素直接作用于胰岛的结果。

研究表明, 硒和VE的共同缺乏可能是克山病发病的基本原因。本研究中在病区粮中补一定剂量的硒或VE, 可明显提高血清胰岛素、C肽水平, 增加胰岛素及C肽分泌贮备, 提示硒和VE缺乏可能是胰岛损害的主要原因。为了探讨胰岛受损的机制,

检测了血液及胰腺 GSH-Px 活力与 LPO 含量。结果表明病区粮组 GSH-Px 活力明显减退, LPO 含量明显升高, 而补一定剂量硒或 VE 可提高 GSH-Px 活力, 降低 LPO 含量, 表明硒和 VE 的共同缺乏引起的过氧化损害可能是胰岛受损的主要机制。胰岛是对过氧化损害敏感的组织之一, 其原因有三: (1) 胰岛内含铜 SOD 及总 SOD 在所有组织中含量是最低的, 说明胰岛自由基清除系统存在薄弱环节。(2) 胰岛内分泌细胞富含内质网, 由大量不饱和脂肪酸构成的内质网膜在低硒时易成为自由基攻击的主要目标。(3) 内质网本身又是自由基产生的场所, GSH-Px 活力减低使自由基清除受阻, 可在原位直接攻击损害内质网膜。胰岛的内质网系统是合成多肽类激素的场所, 始发于内质网的损害可直接减少激素产量。本研究中大鼠血清胰岛素、C 肽水平降低及分泌贮备减少是胰岛 β 细胞过氧化损害的结果。

VE 是体内存在的脂溶性抗氧化剂。硒缺乏条件下机体对 VE 需要成倍增加。本实验中在低硒的病区粮内补充 500mg/kg VE 可保护胰岛机能。因此, 将 VE 作为低硒外的营养因素来研究在克山病发病中的意义是十分重要的。

胰岛素的主要功能是促进细胞对葡萄糖的摄取, 及其在心肌细胞内的氧化利用。葡萄糖氧化供能是心肌细胞能量代谢的中心环节。如果硒和 VE 缺乏严重损害胰岛机能, 使胰岛素合成与分泌明显不足时, 可影响心肌细胞对葡萄糖的氧化利用而发生能

量代谢障碍。因此, 深入研究克山病及其相关因素对胰岛的损害可能有助于进一步阐明克山病心肌坏死机理。

(图片刊于封三)

4 参考文献

- 1 王凡, 等. 克山病因研究新进展. 中国地方病学杂志, 1989, 8 (1): 52.
- 2 康德仁, 等. 克山病胰腺腺泡的病理改变及其意义. 中国地方病防治杂志, 1987, 2 (5): 275.
- 3 Wallach JD, Maian, Wei Han Yu, et al. Common denominators in the etiology and pathology of visceral lesions of cystic fibrosis and Keshan Disease. Biological Trace Element Research 1989, 24 (5): 189.
- 4 张中超. 胰腺内外分泌间关系的研究进展. 哈尔滨医科大学学报, 1991, 25 (4): 299.
- 5 夏奕明, 等. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法——I. DTNB 直接法. 卫生研究, 1987, 16 (1): 257.
- 6 陈一玲. 血清水溶性脂质过氧化物的荧光光谱法测定. 中华医学检验杂志, 1988, 11 (3): 144.
- 7 屈斌, 等. 43 例克山病人的黑耐量试验. 吉林医科大学学报, 1960, 5: 247.
- 8 于维汉, 王凡主编. 楚雄克山病综合性科学考察文集. 北京: 人民卫生出版社, 1988.
- 9 张桂珍, 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.

[编辑 刘广盛]

全国布氏菌病临床及治疗专题研讨会 在河南省郑州市召开

卫生部布氏菌病专家咨询组、中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所, 于 1993 年 11 月 3~6 日在河南省郑州市主持召开了“全国布病临床及治疗专题研讨会”。会议代表来自中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所, 全国鼠疫布氏菌病防治基地, 中国药品生物制品检定所和 17 个省(市、区)或市(县)地方病或职业病防治研究专业机构和医院, 与会 46 人, 收到学术论文 96 篇, 其中 32 篇论文在大会上进行了交流。邀请部分专家在会上作了“布病发病机理研究概况”、“80 年代我国布病临床特点分析”、“布病治疗进展”、“慢性布病中医药治疗研究进展”和“布病的鉴别诊断”等专题报

告。

卫生部地病司代表张苇同志、河南省卫生厅张泽书副厅长、郑州市卫生局林则田局长到会并作了重要讲话。这次会议为加深对当前布病临床特点的认识和提高布病治疗水平将起到积极作用。

会议期间布病专家咨询组成员, 研究讨论了进一步加强和开拓布病防治工作的意见。专家们认为在布病防治科研工作中需要做的工作很多, 但因受经济力量和客观条件的制约, 目前应抓住主要问题重点解决。同时专家组向卫生部地病司起草了第 16 次咨询报告。

(张士义 报道)

PATHOGENETIC STUDIES ON THE EARLY AGING CHANCES AND EARLY OSSIFICATION IN KASCHIN-BECK DISEASE

Li Fangsheng, et al

Liaoning Institute of Basic Medicine

The cartilage necrosis, early ossification were the core of pathogenic mechanism in Kaschin-Beck disease (KBD). Study on membrane composition of erythrocytes and cartilage of KBD children have showed that, decrease in content of phospholipid (PL), especially the phosphatidylcholine (PC), and increase in sphingomyelin (SM). The molar ratio of Ch (cholesterol)/PL and SM/PC as an aging index of biomembrane and membrane fragility increased, and fallings in DNA. The mechanism of early ossification of KBD has been discussed combined with their low level of selenium and GSH-Px, oxidative damage and vesiculation of membrane.

(Original article on page 3)

EFFECTS ON INSULIN AND C PEPTIDE CONCENTRATION IN SERUM AND ISLETS OF RATS FED GRAINS FROM A KESHAN DISEASE ENDEMIC AREA

Zhang Guizhen, et al

Institute of Endemic Disease, Norman Bethune University of Medical Sciences

The islets function and morphology of rats fed grains from a Keshan Disease Endemic area were studied by immunohistochemistry and RIA methods. The results demonstrated insulin and C peptide concentration reduced and insulin, C peptide secretory reserve in islets also decreased in endemic grains group, simultaneously the LPO contents and GSH-Px activity in serum and pancreas respectively increased and decreased in the rats. There were lesions of islets on morphology in the rats. The diets that supplemented the grains with either selenium (0.2 mg/kg diet) or vitamin E (500 mg/kg) caused the increase of concentration of insulin and C peptide in serum and pancreas, the GSH-Px activity increased and the LPO contents decreased in serum and pancreas of the rats. The study suggested the Keshan Disease and its related factors may cause the lesion of islets, which may aggravate myocardium lesions in Keshan Disease.

(Original article on page 7)

STUDIES ON THE RELATION OF IODINE LEVEL IN BREAST MILK AND IODINE NUTRITION OF NEWBORN

Feng Runjin, et al

Hebei Institute of Endemic Disease Prevention and Treatment

The study showed that the concentration of breast milk iodine in iodine prophylaxis area was 9.7 times higher than that in non-endemic goiter area at 24h postpartum, 2.7 times at 20~30 days postpartum. The urinary iodine concentration of breast fed neonate was 153.71 μg/L in iodine prophylaxis area at 20~30 days after birth, compared with 33.88 μg/L ($P < 0.001$) in non-endemic goiter area, while T_4 values of newborns in the former area were 1.5 times higher than those in the latter area at that time. The study showed a significant positive correlation between the breast milk iodine content and neonatal urinary iodine. We recommend that the supplementation amount of iodine would be 60 μg per day for newborn, 210 μg for lactating mother. Because the T_3 , T_4 levels in breast milk were very low, we believe that the breast milk iodine would play an important part in thyroid function for newborn.

(Original article on page 13)

《饲予克山病病区粮对大鼠胰岛β细胞分泌功能及胰岛素、C肽分泌贮备的影响》(正文刊于第7页)

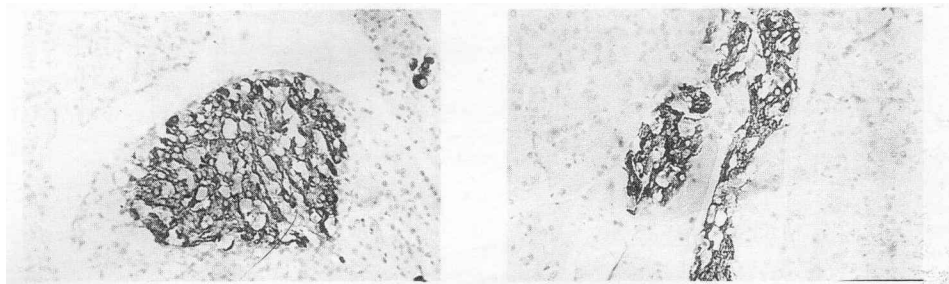


图1 病区粮组大鼠之胰岛,部分β细胞萎缩变细,细胞之间出现较大空隙。(抗胰岛素抗体,SPA法×200)

图2 病区粮组大鼠之胰岛,形状不规则,β细胞排列紊乱。(抗胰岛素抗体,SPA法×200)

《应用布氏菌单克隆抗体快速检定布氏菌方法的研究》(正文刊于第17页)

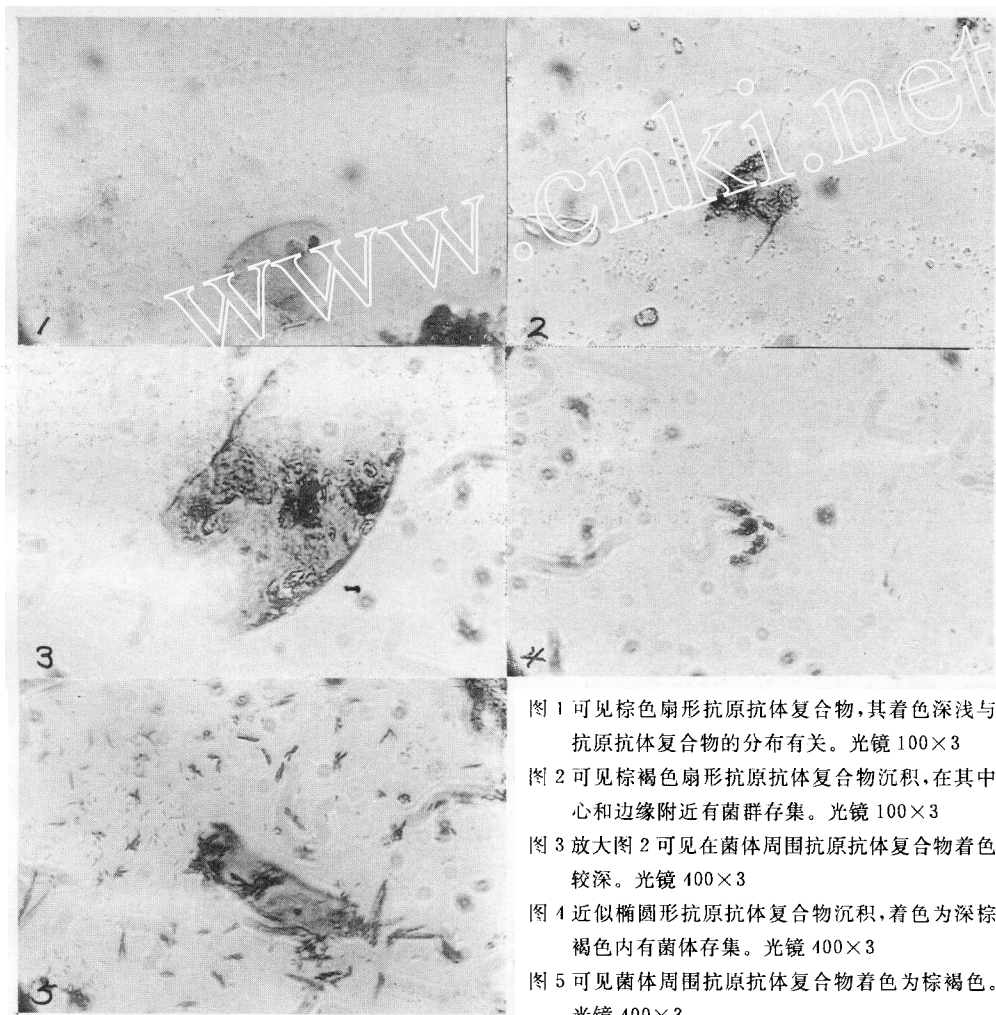


图1 可见棕色扇形抗原抗体复合物,其着色深浅与抗原抗体复合物的分布有关。光镜 100×3

图2 可见棕褐色扇形抗原抗体复合物沉积,在其中心和边缘附近有菌群存集。光镜 100×3

图3 放大图2 可见在菌体周围抗原抗体复合物着色较深。光镜 400×3

图4 近似椭圆形抗原抗体复合物沉积,着色为深棕褐色内有菌体存集。光镜 400×3

图5 可见菌体周围抗原抗体复合物着色为棕褐色。光镜 400×3