

# 脾虚大鼠胰岛胰多肽免疫阳性物质分布变化

覃尧,周露云,高月异,刘发强,张挪威,朱晓宇,滕可导\*,许剑琴\*

(中国农业大学动物医学院,北京 100193)

**摘要:**脾虚证的临床表现以消化系统功能障碍为主,其中胰腺外分泌功能减退明显,且伴有食欲与体质量的显著下降。胰多肽(PP)是胰岛周边 F 细胞分泌的主要胃肠激素,对胰腺外分泌功能与食欲的调节有抑制作用,可导致氧化代谢增强,引起体质量下降。本试验旨在揭示大鼠胰岛胰多肽分泌变化与脾虚证发病之间的关系。笔者以利血平脾虚大鼠模型为研究对象,采用 SP 染色进行免疫组织化学研究,观察大鼠胰岛中胰多肽免疫阳性物质的分布情况。脾虚组与对照组的大鼠胰岛中胰多肽免疫阳性物质面积与胰岛面积百分比相比,胰头部分未见明显差异( $P > 0.05$ );但脾虚组胰中、胰尾的 PP 免疫阳性物质所占面积极显著大于对照组( $P < 0.01$ )。结果表明,脾虚证大鼠胰岛中胰多肽总分泌量极显著增加。因此,胰多肽的分泌增加是导致脾虚证动物出现胰腺外分泌功能低下、食欲减退以及体质量下降的主要因素。

**关键词:**脾虚证;胰多肽;胰岛;Wistar 大鼠;免疫阳性物质;SP 染色;免疫组织化学

中图分类号:S853

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2011)06-0865-05

## The Changes of the Immunoreactive Area Distribution and mRNA Expression of Pancreatic Polypeptide in the Pancreas in Spleen Deficiency Rats

QIN Yao,ZHOU Lu-yun,GAO Yue-yi,LIU Fa-qiang,ZHANG Nuo-wei,

ZHU Xiao-yu,TENG Ke-dao\*,XU Jian-qin\*

(College of Veterinary Medicine,China Agricultural University,Beijing 100193,China)

**Abstract:** The spleen deficiency syndrome plays a significant role in the concept of Chinese traditional medicine. Its primary clinical manifestation is the functional impairment of digestive system, showing pancreatic external secretion declined, food intake reduced and weight lose. On the other hand, the pancreatic polypeptide (PP), released principally from released from pancreatic islet F-cells, has well-proved function including the inhibition of pancreatic secretion, relaxation of gallbladder, increase oxygen consumption appetite regulation. In the present study we aim at find out the relationship between the islet PP secretory activity and the syndrome using reserpine-induced spleen deficiency Wistar rats. Immunohistochemical SP method was used to observe the distribution characteristics of PP immune in pancreatic islets. Compared with the controls, both the immunoreactive area distribution of PP in the pancreas of the spleen deficiency rats showed remarkably significant increase ( $P < 0.01$ ). The results suggested that PP is one of the critical factors contributing to spleen deficiency syndrome in rats.

**Key words:** spleen deficiency syndrome; pancreatic polypeptide; islet; Wistar rats; immunoreactive substance; SP-staining; immunohistochemistry

收稿日期:2010-10-11

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(20100008110024);中国农业大学 URP 项目“脾虚大鼠基因芯片中与代谢相关基因差异表达的聚类分析”;国家自然科学基金(30771591);国家“十一五”科技支撑计划(2008BADB4B01;2008BADB4B07)

作者简介:覃尧(1988-),女,汉,广西人,学士,主要从事动物医学研究,E-mail:qyao\_cau@yahoo.cn

\* 通讯作者:许剑琴,E-mail:jianqinxucau@126.com;滕可导,E-mail:kedao@cau.edu.cn

胰多肽(PP)是由 36 个氨基酸残基组成的多肽,其 C 末端均为酪氨酸酰胺。在多种哺乳动物甚至鱼体内均存在相似结构的胰多肽,含有此类结构的多肽构成胰多肽家族。胰多肽的三级结构,在对应的胰多肽家族结合受体和激活 G-蛋白偶联受体过程中发挥重要的作用<sup>[1-2]</sup>。作为胃肠激素的一种,多数报道已证实,胰多肽的生理功能包括:抑制胰酶、胰腺 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和水的分泌;松弛胆囊;增强机体氧化代谢作用;当体内胰多肽超出生理平时引起食欲降低<sup>[2]</sup>。胰多肽主要由胰腺中胰岛周缘的 F 细胞(也称 PP 细胞)分泌,且在胰腺外分泌实质、胰管上皮细胞内也分散存在 F 细胞。此外,胃肠道、脑内也含有胰多肽免疫阳性物质<sup>[1]</sup>。

“脾主运化”是中(兽)医脏腑理论的重要组成部分,其中,“运化”指消化、吸收、运输营养物质、水分等功能。该理论体系中“脾”的功能状态与动物的身体营养机能状态密切相关。脾虚证临床表现以消化系统功能障碍为主,其中,胰腺外分泌功能低下(包括胰液分泌减少,且胰酶活性降低)<sup>[3]</sup>、体质量下降以及食欲减退都十分明显。可见动物出现眯眼、拱背、少动、腹泻且肛周污秽,被毛稀疏无光泽。

作为中(兽)医理论的学术研究热点,“脾虚证”已有大量相关临床研究病理模型构建的基础。其中以利血平致大鼠脾虚模型是早已公认的方法,并广泛用于“脾虚证”的相关研究<sup>[4-5]</sup>。胰多肽对胰腺外分泌功能和食欲的调节均有重要的意义,其生理功能与脾虚证中所描述临床表现相互呼应,显然,胰多肽的分泌变化对脾虚证的研究具有一定价值。但至目前为止,尚未见关于脾虚证与胰多肽的相关研究,因此,胰多肽作为动物脾虚证研究的一个新的切入点。本试验选择分泌胰多肽的主要部位——胰腺胰岛为对象,探讨利血平脾虚模型大鼠胰腺中胰多肽免疫阳性物质分布变化,以反映胰多肽在脾虚模型中的分泌情况,初步揭示胰多肽在脾虚证中的作用,为进一步研究脾虚证发病机制与胰腺分泌机能之间的关系提供有参考意义的信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠 16 只(体质量 300 g±20 g),购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

### 1.2 药品、试剂和仪器

利血平注射液(1 mg·mL<sup>-1</sup>),购自广东邦民

制药有限公司;自配 Bouin 固定液;兔抗人胰多肽多克隆抗体,购自上海博思慧生物技术有限公司;SP 染色试剂盒,购自南京凯基科技发展有限公司。

RM2126 型石蜡切片机,德国 LEICA;BX51 病理图像分析系统,日本 Olympus;显微图像分析系统 MIAS 及 Scion Image 软件等。

### 1.3 动物和模型建立

供试大鼠 16 只适应性饲养 3 d(定时给料,自由饮水)。随机分为对照组和脾虚组,每组 8 只大鼠。

参照姚永莉等<sup>[6]</sup>的造模方法制备利血平脾虚大鼠模型。脾虚组大鼠给予利血平 0.15 mL·只<sup>-1</sup>(0.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),对照组大鼠给予生理盐水 0.15 mL·只<sup>-1</sup>,肌肉注射,1 次·d<sup>-1</sup>,连续 7 d。

### 1.4 观测和采样

每日观察记录对照组和脾虚组大鼠的体质量、采食量、精神状态、活动情况、大便性状、被毛光泽度等。

第 8 天将大鼠断颈处死,取脾脏、肝脏、肾脏、心脏、胸腺称重,计算脏器指数(mg·g<sup>-1</sup>×100%体质量)。迅速取出胰腺,分离胰头、胰中、胰尾,Bouin 液固定。

### 1.5 切片制作

所取组织于 Bouin 液中固定 24 h 后,常规石蜡包埋,制成 5 μm 厚的连续切片,裱贴于涂有中性明胶的载玻片,每张玻片裱贴 2~5 片。

### 1.6 免疫组化 SP 染色

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育切片 16 min。滴加即用型 SP 染色试剂盒 A 液,放入电热恒温箱中,37℃孵育 30 min。即用型兔抗人胰多肽多克隆抗体(一抗),37℃孵育 2 h。滴加 B 液,37℃孵育 50 min。C 液,37℃孵育 30 min。DAB 显色后立即镜检。苏木精染液复染。

### 1.7 胰岛分布

从可观察到 2 个或 2 个以上胰岛的胰腺组织中随机选取视野(无空白部分,放大倍数 200×),BX51 病理图像分析系统取相,应用显微图像分析系统 MIAS 以及 Scion Image 软件,计算各视野中胰岛总面积占视野面积的比例。以该值作为判断胰岛分布变化的标准。

### 1.8 阳性面积计算

从胰头、胰中和胰尾三组切片中,观察最小直径大于或等于 80 μm<sup>[7]</sup>且含免疫阳性物质的胰岛(放大倍数 400×),每组从中随机选取 20 个。BX51 病

理图像分析系统取相,应用显微图像分析系统 MIAS 以及 Scion Image 软件,算出每组所选胰岛总面积及相应 PP 免疫阳性物质总面积,计算每组免疫阳性物质总面积所占对应胰岛总面积的百分比。以该值作为判断免疫阳性物质分布的标准。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行 *t* 检验,结果以平均值±标准差表示。 $P < 0.05$  为差异显著, $P < 0.01$  为差异极显著。

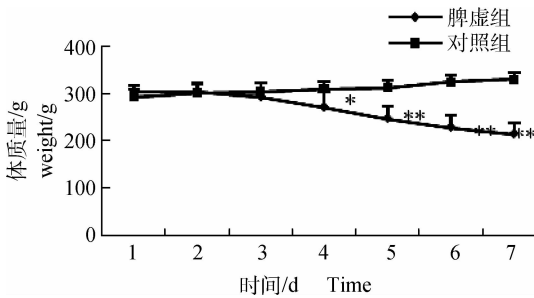
## 2 结果

### 2.1 临床症状

大鼠在注射利血平后第 3 天出现明显腹泻症状,且肛周污秽、四肢无力,活动频度下降、扎堆、拱背、眯眼、内眼角分泌物增多,被毛枯槁无光泽等症状,上述症状从第 3 天开始持续存在。

### 2.2 体质量

在造模的 7 d 内,脾虚组大鼠平均体质量下降,而对照组大鼠平均体质量基本持平。利血平复制脾虚模型的第 4 天开始,脾虚组大鼠平均体质量持续性显著低于对照组平均体质量水平(图 1)。



\*\* 差异极显著( $P < 0.01$ ); \* 差异显著( $P < 0.05$ )。下同  
图 1 脾虚组与对照组大鼠体质量动态比较

Fig. 1 Dynamic comparison of body weight in rats between spleen deficiency group and control group

### 2.3 采食量

造模后第 2 天,脾虚组的大鼠已经出现采食量下降。而相比之下,对照组中大鼠的采食量基本不变。利血平复制脾虚模型的第 3 天后,脾虚组大鼠采食量显著低于初始水平(图 2)。

### 2.4 脏器指数

完成利血平复制脾虚模型,脾虚组大鼠脾脏脏器指数极显著降低;其他脏器指数均未见明显变化(图 3)。

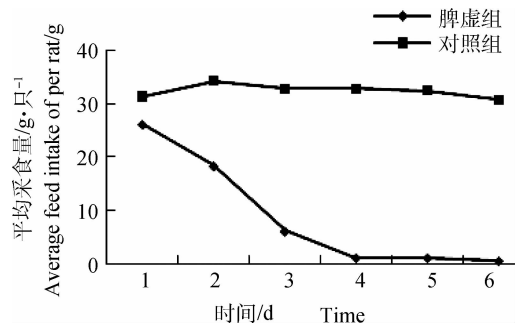


图 2 脾虚组与对照组大鼠采食量动态比较

Fig. 2 Dynamic comparison of the feed intake in rats between spleen deficiency group and control group

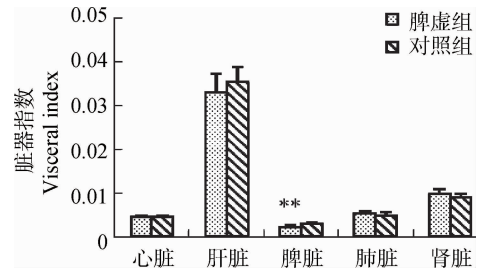


图 3 脾虚组与对照组大鼠脏器指数比较

Fig. 3 Comparison of the visceral index in rats between spleen deficiency group and control group

### 2.5 胰岛分布变化

脾虚组与对照组胰头、胰中、胰尾中胰岛与胰腺面积比未见显著差异( $P > 0.05$ ,图 4),即 2 组中胰岛的分布无明显变化。

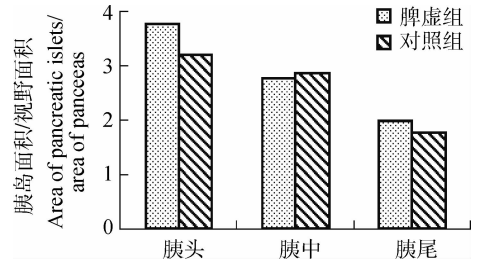
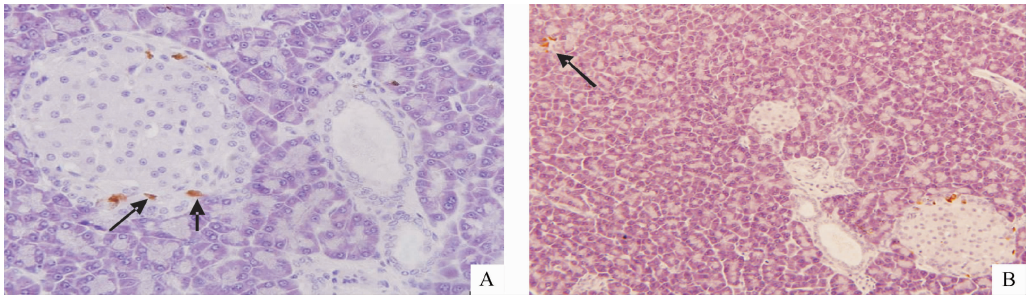


图 4 胰头、中、尾的胰岛分布变化

Fig. 4 Variation of pancreatic islets' distribution

### 2.6 免疫组化 SP 染色

2.6.1 组织学观察 经 SP 染色,苏木精复染后,免疫阳性物质在光镜下呈棕黄色。胰腺中胰多肽(PP)免疫阳性物质主要分布于胰岛周围。部分胰岛周缘所显示的 PP 免疫阳性区内可分辨出细胞形态,即 F 细胞,其形状不规则,有椭圆形,三角形等(图 5A)。偶见 PP 阳性物质于胰腺腺泡细胞间(图 5B)。



A. PP 细胞主要分布于胰岛周缘(箭头,400×) B. PP 免疫阳性物质偶见于胰腺腺泡细胞之间(箭头,200×)

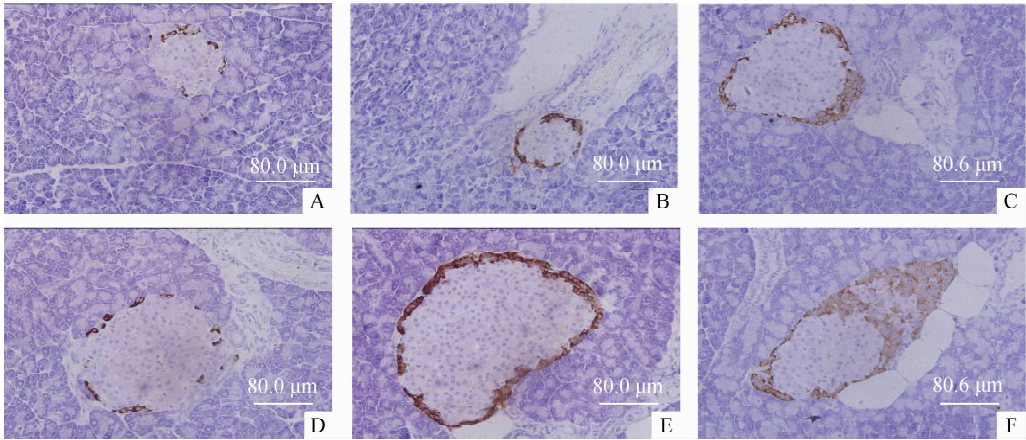
A. The PP cells of rat are mainly located at the rim of the pancreatic islet; B. The positive area can be found in between the acinar cells

图 5 PP 免疫阳性物质在胰岛的分布

Fig. 5 Distribution of PP positive substance in pancreatic islet

2.6.2 胰多肽免疫阳性物质分布 以胰岛周缘分布的 PP 免疫阳性区域作为观察分析对象(图 6)。由表 1 结果可知,胰中、胰尾的 PP 免疫阳性物质总

面积与胰岛总面积的比值差异极显著( $P < 0.01$ ),脾虚组的免疫阳性物质面积所占比例大于对照组;而胰头差异不显著( $P > 0.05$ )。



A、B、C. 对照组大鼠胰头、中、尾处胰岛周缘 PP 免疫阳性物质分布;D、E、F. 脾虚组大鼠胰头、中、尾处胰岛周缘 PP 免疫阳性物质分布

A, B, C. The distribution of PP-IR area in control group; D, E, F. The distribution of PP-IR area in spleen deficiency group

图 6 PP 免疫阳性物质在胰腺不同部位的分布

Fig. 6 Distribution of PP positive substance at different part of pancreas

表 1 胰头、中、尾胰岛中 PP 细胞分布变化

Table 1 Variation of PP-IR cells' distribution in pancreatic islets of the head, body and end of the pancreas

分组 Group	PP 细胞面积/胰岛面积 The area of PP-IR cells/the area of pancreatic islet		
	胰头 Head of pancreas	胰中 Body of pancreas	胰尾 End of pancreas
脾虚组 Spleen deficiency group	3.57 ± 1.37	8.19 ± 1.99**	19.38 ± 3.48**
对照组 Control group	2.78 ± 1.83	4.08 ± 0.93	7.71 ± 3.59

### 3 讨论

#### 3.1 利血平复制脾虚模型

脾虚证动物临床主要表现为食欲减退,眯眼拱

背,精神沉郁,伴有腹泻等症状,消化系统功能紊乱。利血平通过耗竭中枢和外周肾上腺素能神经末梢囊泡内递质而较为持久的抑制交感神经系统功能,使得副交感神经系统作用相对增强,胃肠道等处的类

胆碱功能活性增强,从而造成胃肠道蠕动亢进,出现肠黏膜充血、出血、腹泻等功能紊乱,表现出脾虚证的主要临床症状,这与修宗昌等<sup>[8]</sup>率先建立诊断标准及其后来多人改进确定的脾虚证动物模型判定标准相吻合。而后利血平复制脾虚模型就成为探究“脾虚证”发病机制、病理变化以及其他相关研究公认的常用方法之一<sup>[4-5]</sup>。

Schwartz 等认为,对胰多肽(PP)最敏感的组织是胰腺外分泌部分和胆道<sup>[9]</sup>,而且 PP 主要由胰腺胰岛周缘的 F 细胞(PP 细胞)产生和分泌。因此本试验研究定位于胰腺胰岛。另一方面,影响胰多肽自发性分泌的因素复杂且呈多相性调节——包括进食、昼夜变化与动物年龄等<sup>[8-10]</sup>。为尽可能消除上述 PP 分泌影响因素,选择实验动物为健康成年大鼠,且日龄、性别以及禁食时间、取材时间均相同。在本试验中,动物造模第 3 天时,脾虚组大鼠已开始出现腹泻、眯眼、精神沉郁等症状,随后食欲、体质量持续明显下降;而对照组无明显改变。第 7 天时,脾虚组大鼠的体质量与采食量显著低于对照组;肝、脾脏器指数均小于对照组。由此可见,本试验所建立的动物模型临床表现符合脾虚证的发病特点,即脾虚证大鼠模型复制成功

### 3.2 脾虚大鼠胰腺分泌胰多肽功能增强

胰多肽对胰腺外分泌功能(包括胰酶的分泌、胰腺  $\text{HCO}_3^-$  和水的分泌)具有明显的抑制作用<sup>[1]</sup>,可导致食欲减退,氧化代谢作用增强,体质量下降<sup>[2,10-11]</sup>。在脾虚证与胰腺外分泌功能关系的研究中多次报道了胰腺外分泌酶包括胰淀粉酶、脂肪酶以及其同工酶分泌减少,胰液总量减少<sup>[3,12-14]</sup>,这些现象与 PP 分泌增多所引发的生理效应一致。迷走神经胆碱能兴奋是刺激 PP 分泌最有力的因素<sup>[9]</sup>,利血平通过抑制交感神经功能,从而引起副交感神经系统作用继发性亢进。所以,在利血平复制的脾虚模型中,PP 分泌增强是有合理依据的。

本试验从两个方面表明在脾虚状态下存在 PP 分泌增强的现象。其一,脾虚大鼠胰岛 PP 免疫阳性物质分布面积总体显著性增大;其二,脾虚组和对照组中胰头、胰中和胰尾的胰岛分布无明显变化,排除了局部胰岛中 PP 免疫阳性物质分泌增多在整体胰腺中分泌总量并未增多的可能性。

综上所述,大鼠胰多肽(PP)的分泌增强与脾虚证发病机制中迷走神经功能紊乱密切相关,且脾虚状态下胰腺外分泌功能低下,体质量与食欲减退的原因之一为体内 PP 分泌增强。

大鼠出生后发育期间胰岛中 PP 免疫阳性物质分

泌也有加强<sup>[7]</sup>,但与该试验结果不同的是,前者的变化伴随于大鼠的成长,偏向于说明大鼠出生后 PP 细胞尚未达到完全成熟,而是随着年龄增长逐渐成熟,属于生理正常变化,而后者则发生于成年大鼠由正常生理状态转变为脾虚的病理状态,因此两种变化的性质不同。

## 4 结 论

本试验初步表明,在利血平致脾虚大鼠模型中,胰腺分泌胰多肽功能增强使胰多肽分泌增多,是导致动物消化系统功能紊乱、食欲减退、采食量减少、体质量下降的重要原因之一。

## 参考文献:

- [1] 梅懋华. 消化道生理学与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,1990:26-27.
- [2] CHAUDHRI O B, WYNNE K, BLOOM S R. Can gut hormones control appetite and prevent obesity [J]. *Diabetes Care*, 2008, 31(2): 284-289.
- [3] 杨维益,梁 嵘,陈家旭,等. 脾气虚证与胰腺外分泌功能关系的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1995, 1(4): 41-42.
- [4] 王海明,常 虹. 胃和冲剂(I、II)号对利血平脾虚大鼠模型血液流变学的影响[J]. 内蒙古医学院学报, 2009, 31(2): 149-151.
- [5] 陈玉龙,张海艇,李茹柳,等. 四君子汤对利血平致脾虚大鼠唾液淀粉酶分泌的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(5): 465-467.
- [6] 姚永莉,宋子刚. 大鼠脾虚证模型的胃肠黏膜形态学研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 2000, 8(1): 8-10.
- [7] 崔 铮,石爱荣. 大鼠生后发育期间胰岛胰多肽细胞免疫细胞化学研究[J]. 解剖学报, 1992, 23(4): 391-394.
- [8] 修宗昌,余绍源,黄穗平. 脾虚证临床诊断标准浅谈[J]. 中医药学刊, 2003, 21(2): 219-220.
- [9] SCHWARTZ T W. Pancreatic polypeptide: a hormone under vagal control[J]. *Gastroenterology*, 1983, 85(6): 1411-1425.
- [10] 林从敏. 胰多肽的生理作用[J]. 生理科学, 1986, 6(1): 1-2.
- [11] 康淑云. 胰多肽家族[J]. 首都医学院学报, 1988, 9(1): 70-73.
- [12] 金敬善,王丽华,何俊仁,等. 脾虚患者胰分泌淀粉酶功能的观察[J]. 中西医结合杂志, 1981, 1(1): 28-30.
- [13] 王秀琴,尚宏伟,曾晓蓓,等. 实验性脾虚证大鼠胰岛细胞的免疫组织化学研究[J]. 解剖学报, 1999, 30(3): 1-8.
- [14] 董 虹,张永东,许剑琴,等. 胰腺外分泌功能调节的研究进展[J]. 动物医学进展, 2005, 26(10): 19-22.