

## 完全弗氏佐剂抑制 NOD 鼠胰岛 $\beta$ 细胞凋亡及其机制

朱琳<sup>1,2</sup>, 周智广<sup>1,2,\*</sup>, 杨文<sup>1,2</sup>, 杨竹林<sup>3</sup>, 张松<sup>1,2</sup>

(中南大学湘雅二医院 1. 代谢内分泌研究所; 2. 糖尿病中心; 3. 肝胆疾病研究室, 长沙 410011)

**[摘要]** 目的: 探讨完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 对非肥胖糖尿病 (nonobese diabetic, NOD) 鼠胰岛  $\beta$  细胞凋亡及凋亡相关基因 *Fas*, *FasL* 和 *Bcl-x* 表达的影响。方法: 将 4 周龄 NOD 雌鼠随机分为 CFA 组 ( $n=5$ ) 和生理盐水 (NS) 对照组 ( $n=5$ ), 给 CFA 组鼠后脚板注射 50  $\mu$ L CFA, 对照者鼠后脚板注射等量 NS。监测血糖, 若血糖连续 2 d  $\geq 11.1$  mmol/L 即诊断为糖尿病。当 NOD 鼠发生糖尿病或至 30 周龄时, 处死动物, 取胰腺组织制成薄切片, HE 染色观察胰岛炎, 采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸缺口末端标记 (TUNEL) 及 ABC 免疫组织化学双标记染色观察并计数凋亡的胰岛  $\beta$  细胞, ABC 免疫组织化学法染色观察并计数 *Fas*, *FasL* 和 *Bcl-x* 表达阳性细胞。结果: 至 NOD 鼠 30 周龄时, CFA 处理组鼠无 1 只发生糖尿病, 对照组鼠有 3 只发生糖尿病; CFA 处理组的胰岛炎积分低于 NS 对照组 ( $1.820 \pm 0.962$  vs.  $3.020 \pm 1.040$ ,  $P < 0.05$ ); CFA 处理组胰岛  $\beta$  细胞凋亡率、*Fas* 阳性细胞率、*FasL* 阳性细胞率均低于 NS 对照组 [ $(10.2 \pm 2.8)\%$  vs.  $(15.9 \pm 6.5)\%$ ,  $(54.9 \pm 14.5)\%$  vs.  $(75.7 \pm 12.9)\%$ ,  $(20.3 \pm 10.4)\%$  vs.  $(27.9 \pm 12.0)\%$ ,  $P < 0.05$ ], *Bcl-x* 阳性细胞率高于 NS 对照组 [ $(74.9 \pm 10.7)\%$  vs.  $(66.0 \pm 18.3)\%$ ,  $P < 0.05$ ]。结论: CFA 能够减轻 NOD 鼠胰岛  $\beta$  细胞凋亡, 其机制与减少促凋亡基因 *Fas* 和 *FasL* 表达及增加抑制凋亡基因 *Bcl-x* 表达有关。

**[关键词]** 完全弗氏佐剂; NOD 鼠; *Fas* 抗原; *Fas* 配体; *Bcl-x*; 凋亡; 胰岛炎; 糖尿病

**[中图分类号]** R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)06-0834-04

## Effect of complete Freund's adjuvant on islet $\beta$ cell apoptosis and its mechanism in non-obese diabetic mice

ZHU Lin<sup>1</sup>, ZHOU Zhi-guang<sup>1,\*</sup>, YANG Wen<sup>1</sup>, YANG Zhu-lin<sup>2</sup>, ZHANG Song<sup>1</sup>

(1. Diabetes Center, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011;

2. Institute of Metabolism and Endocrinology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011;

3. Research Laboratory of Hepatobiliary Disease, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of complete Freund's adjuvant (CFA) on islet  $\beta$  cell apoptosis in preventing diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice, and the influence on apoptotic related-gene expression. **Methods** Four-week-old female NOD mice were randomly divided into Group CFA ( $n=5$ ) and Group saline (NS) control ( $n=5$ ). Mice in Group CFA were injected in the hind footpad with 50  $\mu$ L CFA and mice in Group NS with 50  $\mu$ L NS. Blood sugar was monitored and diabetes was diagnosed if blood sugar was higher than 11.1 mmol/L for 2 continuous days in the NOD mice. The mice were sacrificed when diagnosed as diabetes or at 30 weeks of age. Pancreatic sections were made for: evaluation of insulinitis severity with HE staining; counting of apoptotic  $\beta$  cells with the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) method, and ABC immunohistochemical double labeling; counting of *Fas*, *FasL* and *Bcl-x* positive cells respectively with ABC immunohistochemical method. **Results** By 30 weeks

收稿日期: 2006-06-27 作者简介: 朱琳(1971-), 女, 湖南株州人, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事自身免疫糖尿病研究。

\* 通讯作者, E-mail: zhouzg@hotmail.com

基金项目: 国家自然科学基金(39770352); 湖南省中青年科技基金

of age, none of the 5 CFA-treated mice, compared with 3 of the 5 control mice, had developed diabetes. The insulinitis score was lower ( $1.820 \pm 0.962$  vs.  $3.020 \pm 1.040$ ,  $P < 0.05$ ), the rates of apoptotic  $\beta$  cells, Fas positive cells and FasL positive cells were lower [ $(10.2 \pm 2.8)\%$  vs.  $(15.9 \pm 6.5)\%$ ,  $(54.9 \pm 14.5)\%$  vs.  $(75.7 \pm 12.9)\%$ ,  $(20.3 \pm 10.4)\%$  vs.  $(27.9 \pm 12.0)\%$ ,  $P < 0.05$ ], and the Bcl-x positive cell rate was higher [ $(74.9 \pm 10.7)\%$  vs.  $(66.0 \pm 18.3)\%$ ,  $P < 0.05$ ] in the CFA-treated group than those in the NS-treated group respectively. **Conclusion** CFA may inhibit  $\beta$  cell apoptosis in NOD mice by regulating Fas, FasL and Bcl-x expression on cells within islets.

**Key words:** complete Freund's adjuvant (CFA); NOD mice; Fas; Fas L; Bcl-x; apoptosis; insulinitis; diabetes

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2006, 31(6):0834-04]

1 型糖尿病是由于细胞免疫反应破坏胰腺胰岛  $\beta$  细胞,导致  $\beta$  细胞丢失,胰岛素缺乏和高血糖的一种自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。对 1 型糖尿病  $\beta$  细胞破坏机制的认识大多从非肥胖糖尿病 (nonobese diabetic, NOD) 鼠的研究中获得<sup>[2]</sup>。给 NOD 小鼠单次注射完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 在 4 至 10 周龄间可预防高血糖发生<sup>[3,4]</sup>。用灭活的结核菌或卡介苗 (BCG) 也可提供对疾病的保护,而不完全弗氏佐剂不含真菌产物,故保护性较小<sup>[5]</sup>。CFA 保护  $\beta$  细胞免受自身免疫破坏的机制尚未完全阐明。Fas 系统是一种促凋亡发生的信号转导途径。逐渐增多的证据表明 Fas 介导的凋亡调节受损在 1 型糖尿病发病机制中起重要作用<sup>[6,7]</sup>。CFA 预防 NOD 鼠胰岛炎和糖尿病的发生是否与胰岛细胞凋亡促进基因 Fas, FasL 及凋亡抑制基因 Bcl-x<sup>[8]</sup> 表达有关尚待阐明。本研究试图通过观察 CFA 对 NOD 鼠胰岛  $\beta$  细胞凋亡及相关基因的影响,探讨 CFA 预防 NOD 鼠糖尿病的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验动物 雌性 NOD 小鼠从澳大利亚 WEHI 医学研究中心引进,由山西医学院张志利教授惠赠。所有小鼠在中南大学湘雅二医院实验动物中心的 SPF 环境下饲养。所采用的 NOD 鼠群落在 30 周龄时雌鼠的糖尿病自然发病率约为 70%。

1.1.2 主要试剂 CFA 由美国生命技术公司 (Life Technologies, USA) 提供。细胞凋亡检测试剂盒、抗 Fas、抗 FasL、抗 Bcl-x 抗体、生物素标记羊抗鼠 IgG 和 ABC 试剂均由武汉博士德公司提供。

### 1.2 方 法

1.2.1 动物实验 将 10 只 4 周龄 NOD 雌鼠随机分为 2 组,即 CFA 组 ( $n = 5$ ) 和 NS 组 ( $n = 5$ )。CFA 组小鼠后脚板单次注射 50  $\mu$ L CFA, NS 组小鼠后脚板注射 50  $\mu$ L 生理盐水<sup>[3]</sup>。当发生糖尿病或至 30 周龄时,将小鼠处死,钝性分离胰腺后用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,从胰尾取材制成薄切片备检。

1.2.2 糖尿病的检测 从 10 周龄开始,每周测 NOD 鼠体重 1 次,并观察是否有糖尿病症状。当小鼠出现多饮、多尿、消瘦等症状时测血糖,如血糖连续 2 d  $> 11.0$  mmol/L 诊断为糖尿病<sup>[9]</sup>。血糖测定采用血糖仪 (One Touch II, 美国 Lifescan 公司出品,葡萄糖氧化酶法),用断尾法取小鼠血进行测定。无糖尿病症状的小鼠处死前均测血糖。

1.2.3 胰岛炎的检测 HE 染色切片在光镜下观察胰岛炎。胰岛炎评分标准同前<sup>[10]</sup>,每个胰腺从 2 张不同的切片观察 10 个胰岛。0 分表示没有胰岛炎即胰岛正常,1 分和 2 分表示胰岛周围炎,3 分和 4 分表示胰岛内炎。

1.2.4 胰岛  $\beta$  细胞凋亡计数 用 ABC 免疫组织化学法染色  $\beta$  细胞,用 TUNEL 原位末端标记法染色凋亡细胞。染色结果: $\beta$  细胞胞浆呈淡红色,凋亡细胞核呈棕黄色颗粒。计数方法:低倍镜下随机观察到胰岛后转至高倍镜计数  $\beta$  细胞总数和凋亡的  $\beta$  细胞数。每个胰岛的  $\beta$  细胞凋亡率 = 凋亡的  $\beta$  细胞数/ $\beta$  细胞总数  $\times 100\%$ 。每例鼠胰切片共记数 5 个胰岛,每组共检测 25 个胰岛。对照:用试剂盒中阳性切片作为凋亡细胞的阳性对照,每次染色均用 0.01 mol/L PBS 液 (pH7.4) 替代 TdT 和 Dig-dUTP 作为阴性对照。

1.2.5 Fas, FasL 和 Bcl-x 阳性细胞计数 均为

常规 ABC 免疫组织化学法,显色剂为 DAB。结果观察:阳性细胞淡棕黄色至深棕黄色,细胞核呈兰色。计数方法同凋亡细胞计数。对照:以确知 Fas, FasL 或 Bcl-x 阳性的胰腺癌组织作为每次染色的阳性对照,每次染色均用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 替代一抗作为阴性对照。检测  $\beta$  细胞凋亡、Fas, FasL, Bcl-x 的同时每张切片均检测胰岛炎评分。

1.3 统计学处理 用 SPSS6.0 统计软件包进行统计分析。采用的统计学方法有 *t* 检验、卡方检验、方差分析、直线相关分析等,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 胰岛炎发生程度和糖尿病发生率 CFA 组 50 个胰岛中正常胰岛和胰岛周围炎数为 36 个 (72%), NS 组 50 个鼠胰岛中正常胰岛和胰岛周围炎数为 10 个 (20%), 二者存在统计学差异 ( $P < 0.05$ )。NS 组和 CFA 组鼠胰岛炎评分分别为  $3.020 \pm 1.040$  和  $1.820 \pm 0.962$ , CFA 组鼠胰岛炎评分明显降低 ( $P < 0.05$ )。NS 组 5 只鼠中有 3 只发生糖尿病, CFA 组 5 只鼠中无 1 只发生糖尿病, NS 组鼠糖尿病发生率高于 CFA 组鼠, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 1)。

表 1 2 组 NOD 鼠糖尿病发病数、胰岛炎发生情况的比较

组别	n	糖尿病 (只)	胰岛总 数(个)	胰岛炎 评分	胰岛数		
					正常胰岛	胰岛 周围炎	胰岛内炎
NS	5	3	50	$3.020 \pm 1.040$	0	10	40
CFA	5	0	50	$1.820 \pm 0.962^*$	4	32	14

与 NS 组比较, \*  $P < 0.05$

2.2 胰岛  $\beta$  细胞凋亡率及 Fas, FasL 和 Bcl-x 的表达 胰岛  $\beta$  细胞凋亡率由 NS 组的 15.9% 下降至 CFA 组的 10.2%, 两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。CFA 组 Fas 和 FasL 阳性细胞率明显低于 NS 组 ( $P < 0.05$ ), Bcl-x 阳性细胞率则明显高于 NS 组 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 2 2 组 NOD 鼠胰岛  $\beta$  细胞凋亡率及 Fas, FasL 和 Bcl-x 阳性细胞率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	胰岛 个数	$\beta$ 细胞 凋亡率	Fas 阳性 细胞率	FasL 阳性 细胞率	Bcl-x 阳性 细胞率
NS	25	$15.9 \pm 6.5$	$75.7 \pm 12.9$	$27.9 \pm 12.0$	$66.0 \pm 18.3$
CFA	25	$10.2 \pm 2.8^*$	$54.9 \pm 14.5^*$	$20.3 \pm 10.4^*$	$74.9 \pm 10.7^*$

与 NS 组比较, \*  $P < 0.05$

2.3 胰岛炎评分与  $\beta$  细胞凋亡率及 Fas, FasL 和 Bcl-x 阳性细胞率的相关分析 胰岛炎评分与

胰岛  $\beta$  细胞凋亡率, Fas 和 FasL 阳性细胞率呈密切正相关, 而与 Bcl-x 阳性细胞率呈密切负相关 (表 3)。

表 3 2 组胰岛炎评分与胰岛  $\beta$  细胞凋亡率及 Fas, FasL 和 Bcl-x 阳性细胞率的相关系数

组别	n	$\beta$ 细胞 凋亡率	Fas 阳性 细胞率	FasL 阳性 细胞率	Bcl-x 阳性 细胞率
NS	25	0.487 ( $P = 0.013$ )	0.816 ( $P = 0.000$ )	0.915 ( $P = 0.000$ )	-0.824 ( $P = 0.000$ )
CFA	25	0.657 ( $P = 0.000$ )	0.572 ( $P = 0.003$ )	0.492 ( $P = 0.012$ )	-0.534 ( $P = 0.000$ )

## 3 讨 论

人们采用免疫抑制、免疫刺激、免疫耐受等预防策略来防治 NOD 鼠体内胰岛  $\beta$  细胞特异性的自身免疫性病理过程。除谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD) 可诱导免疫耐受<sup>[11-13]</sup> 外, CFA 也显示出良好的预防效果。1990 年 Sadelain 等<sup>[3]</sup> 给 5 周龄 NOD 小鼠注射单剂量 CFA 预防了糖尿病的发生, 且明显延长了 NOD 鼠的寿命。体外脾淋巴细胞增殖反应和细胞混合试验表明, 早期应用非特异性免疫佐剂 CFA 可激活抗原非特异抑制细胞, 导致对自身抗原的耐受。笔者所在的研究小组以往的研究亦发现早期 (3 周龄) 给予 CFA 能减轻胰岛炎, 预防糖尿病<sup>[14]</sup>。

与神经元相似,  $\beta$  细胞的再生能力很小。尽管不排除在某些情况下  $\beta$  细胞增殖的可能,  $\beta$  细胞数不断减少以致其分泌的胰岛素量不能满足代谢需要即产生了糖尿病的表现。 $\beta$  细胞凋亡在 1 型糖尿病发病过程中的作用近年来已有许多报道<sup>[15-16]</sup>。O'Brien 等<sup>[6]</sup> 通过观察 3 至 18 周龄 NOD 雌鼠胰岛切片, 证明凋亡为  $\beta$  细胞的死亡方式, 且早于胰岛 T 细胞浸润的发生。CFA 对 NOD 鼠  $\beta$  细胞凋亡及凋亡调控基因表达的影响如何, 其预防糖尿病的作用是否与抑制  $\beta$  细胞凋亡有关, 尚待探讨。

本研究运用 TUNEL 原位末端标记和 ABC 免疫组织化学双标记技术证实了 NOD 雌鼠胰岛切片中凋亡  $\beta$  细胞的存在, 且 CFA 处理组 NOD 雌鼠糖尿病发病率降低, 胰岛炎减轻, 同时  $\beta$  细胞凋亡率显著低于 NS 对照组, 提示 CFA 的保护作用可能通过减少  $\beta$  细胞凋亡而实现。胰岛  $\beta$  细胞上表达 Fas 抗原, 且 Fas 表达随糖尿病病程进展上调, 通过与活化 T 细胞表面的 FasL 结合发生凋亡<sup>[17-19]</sup>。Bcl-x 是一种抑制细胞凋亡的基因<sup>[8]</sup>。本研究采

用 ABC 免疫组织化学法证明, CFA 处理组鼠的 Fas 和 FasL 阳性细胞率低于 NS 对照组, 而 Bcl-x 阳性细胞率则高于 NS 对照组, 这提示 CFA 减轻 NOD 鼠胰岛炎和预防糖尿病的作用, 可能是通过抑制促凋亡基因 Fas/FasL 的表达和增加抑凋亡基因 Bcl-x 的表达, 减少胰岛  $\beta$  细胞凋亡而实现的。

#### 参考文献:

- [1] Tish R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus [J]. *Cell*, 1996, 85(3):291-297.
- [2] Delovitch T L, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: Immune dysregulation gets the NOD [J]. *Immunity*, 1997, 7(6):727-386.
- [3] Sadelain M W, Qin H Y, Lauzon J, et al. Prevention of Type 1 diabetes in NOD mice by adjuvant immunotherapy [J]. *Diabetes*, 1990, 39(5):583.
- [4] McInerney M F, Pek S B, Thomas D W. Prevention of insulinitis and diabetes onset by treatment with complete Freund's adjuvant in NOD mice [J]. *Diabetes*, 1991, 40(6):715-725.
- [5] Qin H Y, Sadelain M W, Hitchon C, et al. Complete Freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice [J]. *J Immunol*, 1993, 150(5):2072-2080.
- [6] O'Brien B A, Harmon B V, Cameron D P, et al. Apoptosis is the mode of  $\beta$ -cell death responsible for the development of IDDM in the non-obese diabetic (NOD) mouse [J]. *Diabetes*, 1997, 46(5):750-757.
- [7] Kurrer M O, Pakala S V, Hanson H L, et al. Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(1):213-218.
- [8] Boise L H, Gonzalez-Garcia M, Postema C E, et al. Bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death [J]. *Cell*, 1993, 74(4):579-608.
- [9] Calafiore R, Basta G, Falorni A, et al. Preventive effects of azathioprine (AZA) on the onset of diabetes mellitus in NOD mice [J]. *J Endocrinol Invest*, 1993, 16(11):869-873.
- [10] 杨文, 周智广, 杨竹林, 等. 谷氨酸脱羧酶与完全弗氏佐剂预防鼠胰岛炎及糖尿病的探讨 [J]. *中华医学杂志*, 1998, 78(2):148-149.
- [11] Kaufman D L, Clare-Salzler M, Tian J, et al. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes [J]. *Nature*, 1993, 366(6450):69-72.
- [12] Petersen J S, Karlens A E, Markholst H, et al. Neonatal tolerization with glutamic acid decarboxylase but not with bovine serum albumin delays the onset of diabetes in NOD mice [J]. *Diabetes*, 1994, 43(12):1478-1484.
- [13] 朱琳, 周智广, 杨文, 等. 谷氨酸脱羧酶预防 NOD 小鼠胰岛炎的机制 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2002, 18(3):231-232.
- [14] 牛晓红, 周智广, 蒋铁健, 等. 完全弗氏佐剂预防非肥胖糖尿病鼠胰岛炎和糖尿病的效应 [J]. *中华内科杂志*, 2002, 41(4):229-232.
- [15] Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes [J]. *Nature*, 2001, 414(6865):792-798.
- [16] 牛晓红, 胡敏. 胰岛细胞凋亡与 1 型糖尿病 [J]. *国外医学. 生理. 病理科学与临床分册*, 2001, 21(2):103-104.
- [17] Chervonsky A V, Wang Y, Wong F S, et al. The role of Fas in autoimmune diabetes [J]. *Cell*, 1997, 89(1):17-24.
- [18] 朱琳, 周智广. Fas 系统与 I 型糖尿病 [J]. *国外医学. 生理. 病理科学与临床分册*, 1998, 18(2):164-165.
- [19] 付振虹, 韩仰东, 姬秋和. Fas, FasL 与 1 型糖尿病 [J]. *国外医学. 生理. 病理科学与临床分册*, 2001, 21(2):105-106.

(本文编辑 郭 征)