

链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠轮廓状乳头中味蕾特征变化

段 晖, 秦玉梅, 熊艺姣, 郭会林, 邓少平*

(浙江工商大学 食品学院, 浙江 杭州 310012)

摘要: 以 ICR 小鼠为实验对象, 注射 180 mg/kg 剂量链脲佐菌素构建糖尿病小鼠模型, 利用苏木精-伊红染色法及免疫组织化学方法分析了糖尿病小鼠味蕾形态变化和味觉信号转导相关蛋白表达变化。结果表明, 对照组小鼠与糖尿病组小鼠轮廓状乳头大小及数量无显著差异; 但糖尿病小鼠单个味蕾中味觉信号转导蛋白 α -gustducin 及磷酸脂酶 C β 2 的阳性细胞数显著增加 ($P < 0.05$), 而 synaptobrevin-25 (SNAP-25) 阳性细胞显著减少 ($P < 0.05$)。综上所述, 糖尿病引起的味觉变化可能来自于味觉信号转导蛋白表达的变化, 而这些变化导致外周味觉感受信号无法有效地传导到味觉传入神经。

关键词: 糖尿病; 链脲佐菌素; 味觉; 小鼠

中图分类号: Q 28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)06—0628—05

Character Changes of Taste Buds in Mice Circumvallate Papillae of Streptozotocin-Induced Diabetes

DUAN Hui, QIN Yu-mei, XIONG Yi-jiao, GUO Hui-lin, DENG Shao-ping*

(School of Food science and Technology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Diabetes mellitus (DM) are induced in ICR mice with the dose of 180 mg/kg of streptozotocin(STZ) and then the morphological changes and the expression related with taste signal transduction of taste buds in vallate papillae are evaluated by hematoxylin-eosin staining and immune-histochemical methods. The results show that the number and the size of taste buds have no significant difference between control and DM mice. Whereas, compared with control mice, the DM mice have more number of α -gustducin and phospholipase C β 2 positive cells per taste bud ($P < 0.05/P < 0.01$). By contrast, the DM mouse have less number of SNAP-25 cells per taste bud than that of control mice ($P < 0.01$). In a word, taste changes caused by DM maybe result from the expressed change of the taste signal transduction proteins, which block the peripheral taste signal to transmit to the gustatory afferent nerve.

Keywords: diabetes mellitus, Streptozotocin, taste, mice

收稿日期: 2012-09-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271820)。

* 通信作者: 邓少平(1956—), 男, 浙江杭州人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事智能感官和原细胞方面的研究。

E-mail: spdeng@zjgsu.edu.cn

味觉作为人类食物辨别、选择及接受决定因素之一,用于食物及饮品中营养及有害物质的检测,引起应急反应,导致食物的接受与回避,是人类不可或缺的生理功能。一旦味觉的感知能力显著下降,将会导致人类的饮食偏好及食物摄入变化,从而最终影响人类的代谢并引发健康问题。近年来,糖尿病的发病率及患病率逐年升高,成为威胁人类健康的重大问题之一。糖尿病危害主要来自其并发症,分为急性并发症和慢性并发症,其中慢性并发症会引起神经病变,临床表现为四肢自发性疼痛、麻木感、感觉减退。味觉紊乱和味觉损伤是其慢性并发症的表现之一,在口腔中表现为味觉感知能力的下降^[1]。但糖尿病病人味觉感知能力改变的机制目前尚不清楚。味蕾是味觉感受的外周器官,所以作者通过 STZ 诱导建立糖尿病模型小鼠^[2];利用苏木精-伊红染色法及免疫组织化学方法分析糖尿病小鼠味蕾形态变化和味觉信号转导相关蛋白表达变化,为糖尿病人味觉感知能力的改变机制提供味觉方面的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 8 周大雄性 ICR 小鼠,购自浙江省动物医学研究院,恒温动物房中饲养(温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~60%),采用 12:12 h 的白天/黑夜循环人工照明,自由进食和饮水。

1.1.2 主要试剂 链脲佐菌素 STZ:购自 Sigma 公司;柠檬酸,柠檬酸钠,多聚甲醛:均购自上海生物工程有限公司;多克隆兔抗 α -gustducin、PLC β 2 及鼠抗 SNAP25 抗体:购自 Santa Cruz 公司;即用型 SABC 免疫组化试剂盒:购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 STZ 诱导糖尿病小鼠模型建立 8 周大雄性 ICR 小鼠,动物房适应一周后(平均体重 25 g),称重分组^[3-4](实验组与对照组,每组 40 只小鼠),禁食 16~17 h,实验组小鼠腹腔注射 STZ 溶液(0.1 mol/L 的柠檬酸盐缓冲液中溶解,pH 4.4,灭菌,剂量 180 mg/kg^[5-6]);对照组注射同等体积的柠檬酸盐缓冲液。78 h 后,使用 One Touch Basic 血糖仪(Lifescan, Milpitas, CA)测定小鼠血糖水平^[7],确定模型构建成功率(血糖水平 ≥ 11.1 mmol/L 为建模成功)。

1.2.2 舌组织取材及轮廓状乳头中味蕾形态分析 小鼠 CO₂ 致死,取舌,舌剪至轮廓状乳头边缘处,4%的多聚甲醛中固定 24~48 h。取 1 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 含轮廓状乳头的舌组织进行流水冲洗,常规石蜡包埋,10 μm 连续冠状切片,贴于蛋清包被的载玻片上,常规 HE 染色,实体显微镜记录连续切片图像,定量轮廓状乳头中味蕾数量;同一样品连续数字图像中随机选取 5 张切片,每张切片随机选取 3~5 个具有味孔味蕾,利用实体显微镜自带软件测量味蕾高度及宽度,通过以下公式计算味蕾横截面积:

$$\text{面积} = \frac{\pi \times \text{高} \times \text{宽}}{4}$$

1.2.3 免疫组化和免疫荧光定量 α -gustducin、PLC β 2 及 SNAP25 表达 小鼠 CO₂ 致死,取舌,4%的多聚甲醛中固定 24~48 h 后常规石蜡包埋,15 μm 连续冠状切片贴于蛋清包被的玻璃载玻片上,4 $^{\circ}\text{C}$ 短时间保存备用。切片脱蜡后柠檬酸盐缓冲液中煮沸抗原修复,30% H₂O₂ 和甲醇(1:50)溶液中 30 min 室温孵育,PBS 清洗后 10%正常动物血清及 5%的牛血清白蛋白溶液封闭,室温下孵育 20 min,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(α -gustducin, 1:100;PLC β 2, 1:200;SNAP25, 1:200),PBS 清洗,PLC β 2 及 SNAP25 操作按照博士德即用型 SABC 试剂盒说明书,DAB 显色缓冲甘油封片后,Leica 实体显微镜及 CCD 记录结果; α -gustducin 加入 Cy3 偶联 IgG,缓冲甘油封片后 Leica SP2 激光共聚焦显微镜下观察记录结果。省略一抗或用 PBS 代替作为对照实验。定量研究小鼠轮廓状乳头中味蕾中阳性反应味蕾细胞数量,从小鼠舌面连续切片中随机选取 5 张切片,每张切片选取 3 个最大横截面积味蕾,10 只小鼠共 150 个味蕾。

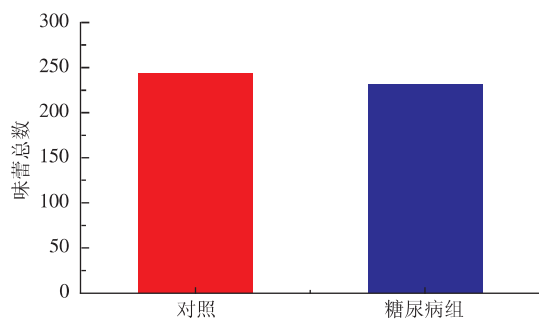
1.2.4 数据分析 采用 Origin 8.0 对测定数据进行统计,数据用平均值 $\pm$ 标准差表示,以 $P < 0.05$ 表示差异显著性。

2 结果与讨论

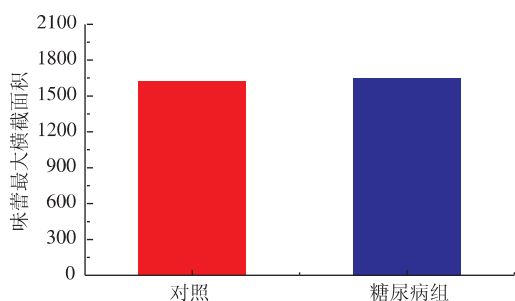
2.1 轮廓状乳头中味蕾数量及形态变化

HE 染色结果见图 1。对照组与糖尿病小鼠轮廓状乳头中味蕾总数及味蕾最大横截面及之间无显著差异,分别为 243.83 ± 12.56 vs. 231 ± 7.78 ($P = 0.734$ 52); $1\ 621.79 \pm 232.78$ vs. $1\ 659 \pm 129.87$ ($P =$

0.899 45)。



(a)对照组和糖尿病组小鼠轮廓状乳头中味蕾总数;



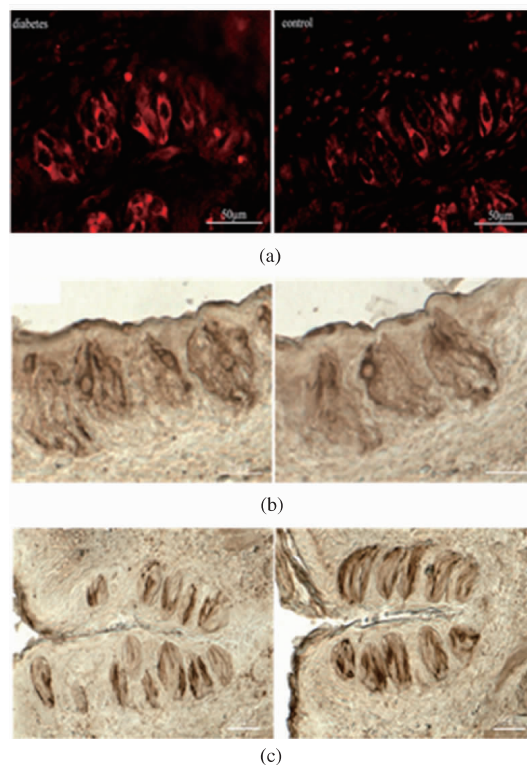
(b)对照组和患糖尿病组小鼠轮廓状乳头中味蕾最大横截面积

图1 轮廓状乳头中味蕾数量及形态

Fig.1 Number and Morphology of circumvallate taste buds

2.2 α -gustducin、PLC β 2 及 SANP25 表达

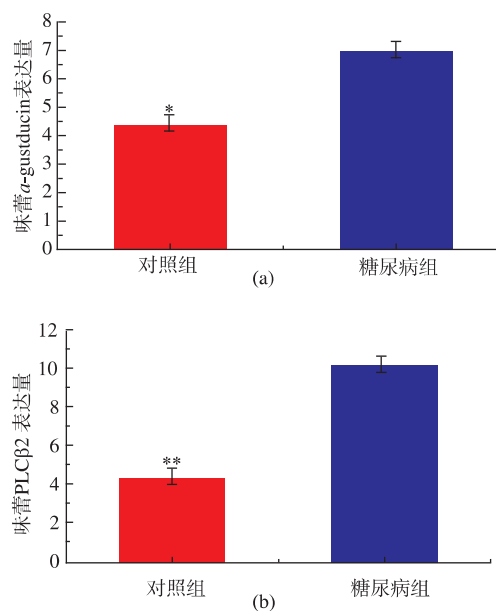
α -gustducin、PLC β 2 被认为是味觉信号转导的关键蛋白(主要包括甜味、鲜味及苦味),而 SNAP25 是调节神经突触小泡释放神经递质的重要蛋白^[8],与味觉信息传递息息相关,通过免疫组化技术分析了糖尿病小鼠与正常小鼠之间 α -gustducin、PLC β 2 及 SANP25 表达差异。结果表明: α -gustducin、PLC β 2 及 SANP25 在小鼠轮廓状乳头中味蕾中呈强阳性表达,见图 2。而且糖尿病小鼠单个轮廓状乳头中味蕾中 α -gustducin、PLC β 2 免疫反应性阳性味细胞数分别为 6.95 ± 0.37 和 10.24 ± 0.48 ,显著高于对照组小鼠单个味蕾中 α -gustducin、PLC β 2 免疫阳性细胞数 ($P=0.015\ 47 < 0.05$ 和 $P=0.000\ 43 < 0.01$),对照组小鼠单个味蕾中 α -gustducin、PLC β 2 免疫阳性细胞数均为 4.38 ± 0.23 (图 3a 和 b)。与上述两种蛋白质的表达相反,糖尿病小鼠单个轮廓状乳头中味蕾中 SNAP-25 免疫阳性细胞数显著少于对照组小鼠 ($P < 0.01$),分别为 8.47 ± 0.37 vs. 11.57 ± 0.53 (图 3c)。

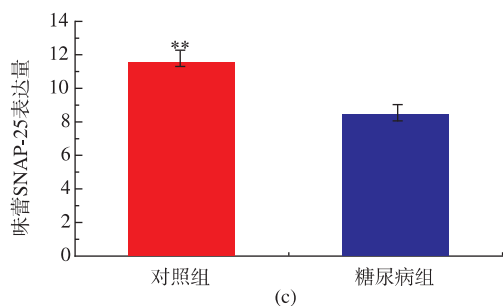


a-c分别为轮廓状乳头中味蕾细胞 α -gustducin、PLC β 2 和 SNAP-25 轮廓状乳头中味蕾中表达免疫反应图片(左侧糖尿病小鼠,右侧对照组小鼠),图像标尺分别 $50\mu\text{m}$ 、 $25\mu\text{m}$ 、 $25\mu\text{m}$ 。

图2 α -gustducin、PLC β 2 及 SNAP-25 轮廓状乳头中味蕾中表达

Fig.2 α -gustducin、PLC β 2 and SNAP-25 immunoreactivity in circumvallate taste buds from diabetic mice





* $P < 0.05$, ** $P < 0.05$ 代表对照组和糖尿病组小鼠之间差异显著

图3 糖尿病小鼠及正常小鼠轮廓状乳头中味蕾中 α -gustducin、PLC β 2与SNAP-25表达差异

Fig. 3 Quantitative comparison of taste cells displaying different immunoreactive to marker in diabetes and control mouse circumvallate taste buds

3 结 语

味觉是呈味物质溶解于口腔唾液后与味感受体作用,引起下游味觉信号传导及释放神经递质,通过味觉传入神经将外周味觉信息传递到大脑,最终经大脑分析后产生的感觉。味蕾(Taste bud, TB)是味觉感受的末端器官,主要分布于舌面上的各种味乳头中(包括菌状乳头FF、叶状乳头FL和轮廓乳头CV),一般由50~150个味觉细胞组成,而用于各种味觉感受的受体位于各种味细胞顶端的微绒毛上^[9]。甜味、鲜味及苦味因为其受体均为GPCRs,具有相似的味觉信号转导特性及相似的下游味觉信号转导因子包括G蛋白 α 亚基(α -gustducin),磷酸脂酶C β 2(Phospho-lipase C β 2, PLC β 2),瞬时受体离子通道(Transient receptor potential iron channel, TRMP5),而这些蛋白质的基因敲除小鼠的行为及神经反应结果,充分证明了其在三种味觉信号转导中的作用^[10-12]。所以糖尿病病人味觉感知能力的下降可能来自于味觉感受基础的改变,包括味蕾解剖形态及味觉感受关键蛋白表达的变化。而本研究通过STZ诱导建立糖尿病模型小鼠,利用苏木精-伊红染色法及免疫组织化学方法分析糖尿病小鼠味蕾形态变化和味觉信号转导相关蛋白表达变化结果表明,糖尿病小鼠与正常小鼠之间轮廓状乳头中味蕾数量及形态无显著差异,表明味蕾解剖形态不是糖尿病小鼠味觉改变的主

要原因。

α -gustducin、PLC β 2及SNAP25定量表达结果表明,与正常组小鼠相比,糖尿病小鼠轮廓状乳头中味蕾中上述味觉感受信号转导蛋白显著改变,用于味觉信号转导的 α -gustducin及PLC β 2表达量显著增加。这一结果与Pai(2008)^[13]和Zhou(2009)^[14]等以大鼠为实验对象的研究结果一致的,但似乎与糖尿病病人的味觉感知能力下降相悖,至于上述变化的产生尚无合理解释。与代表味觉信号转导的关键蛋白 α -gustducin及PLC β 2的结果相反,用于味觉信息传递控制神经递质释放的重要调节蛋白SNAP-25,同时也是味蕾信号传递前神经突触细胞的标志蛋白,在糖尿病小鼠中表达显著减少,而这种蛋白表达量降低可能导致外周味觉信息无法正常传递到味觉传入神经,进而导致味觉感知能力下降及味觉损伤。而大量研究也表明糖尿病引起神经系统退化和损伤^[15],这种作用在外周味觉感受上可能表现为味觉感受前神经突触神经细胞数量的减少及与支配味觉细胞的味觉神经退化,我们研究中SNAP-25免疫结果支持了上述观点,同时Pai等^[16]研究结果也证实了糖尿病大鼠支配味蕾的蕾内神经及蕾外神经显著退化。而这些神经的退化可能是导致味蕾中不同类型细胞数量变化的重要原因^[17]。而各种味蕾细胞的异常生长致使正常味蕾内部各种类型细胞比例结构失调,从而最终导致味觉感知能力的下降。

综上所述,利用STZ诱导构建糖尿病小鼠模型及简单组织学免疫学方法,证明了糖尿病小鼠和正常小鼠之间轮廓状乳头中味蕾形态变化和味觉信号转导相关蛋白质表达变化异常可能是导致糖尿病小鼠味蕾异常的重要原因,主要表现在确定了味蕾解剖形态不是糖尿病小鼠味觉改变的主要原因;糖尿病小鼠 α -gustducin、PLC β 2表达量增加,这似乎与味觉损伤相悖。而用于味觉信息传递控制神经递质释放的重要调节蛋白SNAP-25却减少,SNAP-25减少表明用于味觉信号传递体系的破坏,主要是神经信息的传递,从而导致味觉信号无法正常传递形成味觉异常或损伤。总之,本研究从一定程度上揭示了糖尿病引起味觉损伤的味觉方面基础,这些可能为糖尿病病人食物设计提供一定理论依据。

参考文献:

- [1] Claude Messier. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging [J]. **Neurobiology of Aging**, 2005, 26: 26–30.
- [2] Koji Hayashi, Rhyoji Kojima, Mikio Ito. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice [J]. **Biol Pharm Bull**, 2006, 29(6): 1110–1119.
- [3] 刘建华, 王勇, 黄丹菲, 等. 泰和乌骨鸡活性肽对小鼠骨髓有核细胞的增殖作用[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(2): 172–177.
- LIU Jian-hua, WANG Yong, HUANG Dan-fei, et al. Effect of taihe black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) active peptides on proliferation of bone marrow nucleated cells from mice [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(2): 172–177. (in Chinese)
- [4] 蒋栋磊, 孙秀兰, 张银志, 等. 小鼠过敏模型在食品过敏原分析中的研究与应用[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(5): 499–504.
- JIANG Dong-lei, SUN Xiu-lan, ZHANG Yin-zhi, et al. Construction and application of allergic models with ICR mice in vitro for analysis of food allergens[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(5): 499–504. (in Chinese)
- [5] 邵伟娟, 陶凌云, 赵茹茜, 等. 不同剂量 STZ 诱导小鼠糖尿病模型及生殖能力的研究[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2007, 25(6): 541–546.
- SHAO Wei-juan, TAO Lin-yun, ZHAO Ru-qiang, et al. Mating ability of mouse diabetes mellitus models induced by different doses of streptozotocin[J]. **Journal of Shanghai Jiaotong University: Agricultural Science**, 2007, 25(6): 541–546. (in Chinese)
- [6] 李聪然, 游雪甫, 蒋建东. 糖尿病动物模型及研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(1): 59–63.
- LI Cong-ran, YOU Xue-pu, JIANG Jian-dong. Advance in diabetes animal models[J]. **Chinese Journal of Comparative Medicine**, 2005, 15(1): 59–63. (in Chinese)
- [7] Takashi Okamoto, Naohide Kanemoto, Yutaka Ohbuchi, et al. Characterization of STZ-induced type 2 diabetes in Zucker fatty rats [J]. **Exp Anim**, 2008, 57(4): 335–45.
- [8] Timothy A Gilbertson, Sami Damak, Robert F Margolskee. The molecular physiology of taste transduction [J]. **Current Opinion in Neurobiology**, 2000, 10(4): 519–527.
- [9] Max M, Meyerhof W. Taste receptors[J]. **The Senses: A Comprehensive Reference**, 2008, 4: 197–217.
- [10] Damark S, Rong M, Yasumatsu K, et al. Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds [J]. **Chem Senses**, 2006, 31: 253–264.
- [11] Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, et al. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways[J]. **Cell**, 2003, 112: 293–301.
- [12] Dotson C D, Roper S D, Spector A C. PLC β 2-independent behavioral avoidance of prototypical bitter-tasting ligands [J]. **Chem Senses**, 2005, 30: 593–600.
- [13] PAI Man-hui. Effects of streptozotocin-induced diabetes on taste buds in rat vallate papillae [J]. **Acta histochemica**, 2007, 109: 200–207.
- [14] ZHOU Li-hong, LIU Xiao-min, FENG Xiao-hong, et al. Expression of α -gustducin in the circumvallate papillae of taste buds of diabetic rats[J]. **Acta histochemica**, 2008, 111(2): 145–149.
- [15] Ikuo Ohara, D Agr D M S, Ritsuko Tabuchi, et al. Effects of modified rice bran on serum lipids and taste preference in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. **Nutrition Research**, 2000, 20(1): 59–68.
- [16] Man-Hui Pai, Kuan-Hsun Huang, Ching-Hsiang Wu, et al. Effects of dietary arginine on inflammatory mediator and receptor of advanced glycation endproducts (RAGE) expression in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes [J]. **British Journal of Nutrition**, 2010, 104(5): 686–692.
- [17] Mistretta, C M. Aging effects on anatomy and neurophysiology of taste and smell[J]. **Gerodontology**, 1984, 3: 131–136.