

# 糖尿病大鼠下颌下腺内 nNOS 和 NT-3 表达变化及意义

胡惠贞<sup>1,2</sup>, 贾雪梅<sup>1</sup>, 桂 丽<sup>1</sup>, 黄大可<sup>1</sup>, 汪 渊<sup>1</sup>, 王 璐<sup>3</sup>, 周岳堃<sup>3</sup>

**摘要** 目的 观察不同病程糖尿病大鼠下颌下腺内神经型一氧化氮合酶(nNOS)和神经生长因子-3(NT-3)的表达变化,探讨其对糖尿病下颌下腺结构和功能的影响。方法 48只SD大鼠随机分为对照组、糖尿病组和治疗组。糖尿病组和治疗组给予腹腔注射链脲佐菌素复制2型糖尿病模型,治疗组给予胰岛素治疗,于造模后3个月和6个月每组分别处死8只大鼠,测定空腹血糖,并取下颌下腺组织,分别进行HE染色、免疫组织化学染色和计算机图像分析。结果 糖尿病组血糖较同期对照组升高且随着病程的延长显著,治疗

组血糖较同期糖尿病组下降。光镜下,与对照组相比,糖尿病组下颌下腺腺泡萎缩加重,颗粒曲管数目减少,管腔变窄,治疗组无明显变化;免疫组织化学法检测显示 nNOS在糖尿病组表达较同期对照组增强,在造模3个月表达最强,治疗组表达较同期糖尿病组降低;NT-3在糖尿病组表达较同期对照组降低且随病程的延长减少,治疗组较同期糖尿病组增强。结论 糖尿病大鼠下颌下腺内 nNOS 表达升高和 NT-3 表达下降,可能是引起糖尿病下颌下腺结构和功能紊乱的重要原因;胰岛素治疗可能与 nNOS 和 NT-3 的表达改变有关。**关键词** 糖尿病;下颌下腺;神经型一氧化氮合酶;神经生长因子-3

2017-03-10 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012A164)

作者单位:安徽医科大学<sup>1</sup> 基础医学院、<sup>3</sup> 临床医学院,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽人口职业学院解剖学与组织胚胎学教研室,池州 247000

作者简介:胡惠贞,女,讲师,硕士研究生;

贾雪梅,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:jiaxueme@126.com

桂 丽,女,助理研究员,责任作者,E-mail:teguili@163.com

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0796-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.004

下颌下腺不仅能分泌唾液,其导管上皮细胞内还能表达多种生物活性物质,这些物质可通过外分泌、内分泌及旁分泌作用于特定的生理部位,有报道<sup>[1]</sup>在正常大鼠下颌下腺导管内有神经型一氧

cloned into the eukaryotic expression plasmid pEGFP-C1 with green fluorescent protein(GFP) tag, replace the original CMV promoter with the heat shock promoter(pHSP), to construct eukaryotic expression vector pHSP-GFP, secondly, RNAi was used to synthesize the shRNA sequence of *plk1* gene, and it was cloned into the eukaryotic expression vector pHSP-GFP to form the recombinant plasmid pHSP-shPLK1-GFP; in addition, we designed the negative control plasmid pHSP-NC-GFP. Finally, the plasmid was transfected into U2OS cells by Lipo2000, non heat stimulated group were cultured in normal condition, heat shock group and negative control group was heated at 42 °C for 2 hours, The expression of GFP was detected by immunofluorescence staining, so the driving ability of heat shock promoter was determined, The expression of *plk1* in mRNA was detected by Real-time PCR method, Western blot was used to detect the expression level of PLK1 protein and the effect of recombinant plasmid on the proliferation of U2OS cells was detected by MTT method. **Results** The eukaryotic expression plasmid pHSP-shPLK1-GFP driven by heat shock promoter was successfully constructed. Cell immunofluorescence staining showed that the heat shock promoter could drive the expression of GFP. GFP protein is expressed in cytoplasm. The results of Real-time PCR showed that the expression of *plk1* in heat shock group was significantly lower than that in non heat stimulated group and negative control group ( $P < 0.05$ ). The Western blot results showed that the expression of PLK1 protein in heat shock group was lower than that of non heat stimulated group and negative control group ( $P < 0.05$ ); MTT results showed that the cell proliferation activity was significantly inhibited, compared with the non heat stimulated group and negative control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid pHSP-shPLK1-GFP driven by heat shock promoter can be expressed in U2OS cells, the recombinant plasmid showed a stronger down regulation of *plk1* expression and inhibition of proliferation under the heating condition of 42 °C.

**Key words** osteosarcoma; RNA interference; plasmid construction; hyperthermia; heat shock promoter

化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)及神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)的表达。nNOS可以催化L-精氨酸生成NO,参与调节血压和血流,并能和超氧阴离子结合形成过氧亚硝酸盐阴离子,对组织结构造成损伤;NT-3是发育过程中出现最早的一类神经营养因子,可调节早期外周感觉神经元的发生及数量<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3-4]</sup>显示在糖尿病动物体内多个器官中都出现了nNOS和NT-3表达改变,但是其在糖尿病下颌下腺内的表达有无变化目前还未见相关报道,该实验利用高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素<sup>[5]</sup>复制不同病程2型糖尿病大鼠模型,观察其下颌下腺的组织学变化及其内nNOS和NT-3表达变化,为进一步研究糖尿病对下颌下腺生物活性物质分泌的影响及探讨糖尿病并发症的可能机制提供形态学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂** nNOS和NT-3的抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;SP免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.2 方法** 雄性SD大鼠48只,150~180g,由安徽医科大学实验动物中心提供,普通级,随机分为3组:对照组、糖尿病组和治疗组,每组16只。对照组大鼠给予普通饲料喂养,糖尿病组和治疗组大鼠给予高脂饮食(2%胆固醇,10%猪油,88%基础饲料)喂养2个月后,给予腹腔注射链脲佐菌素(25mg/kg)复制2型糖尿病模型,7d后连续2d抽血检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) >7.0mmol/L,提示2型糖尿病大鼠模型造模成功,治疗组大鼠给予皮下注射胰岛素[4IU/(kg·d)]治疗,糖尿病组和治疗组大鼠一直高脂饮食喂养,饮食均不限制。

**1.3 标本制备** 于造模后3个月和6个月每组分别抽取8只大鼠,禁食12h,腹腔注射20%乌拉坦1ml/100g,麻醉后剖开腹腔,从腹腔静脉取血送检FBG,并取出下颌下腺,用10%福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片(厚度为4μm)。

**1.4 HE染色** 石蜡切片常规脱蜡至水;苏木精染

色20min,自来水洗去浮色,伊红染色15s,脱水,透明和封片,烤干,镜下观察。

**1.5 免疫组织化学染色** 石蜡切片常规脱蜡至水;热修复抗原:将切片浸入柠檬酸盐缓冲液,微波炉高火加热8min,断电保持3min,再高火加热3min后自来水冷却;滴加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,室温10min以灭活内源性酶;滴加稀释度为1:100的兔抗鼠nNOS和NT-3的抗体4℃过夜,同时另取一张玻片滴加50μl PBS代替一抗作为阴性对照;室温孵育20min;滴加SABC,室温孵育30min;DAB显色,自来水流水清洗(以上各步骤间均以PBS洗3min×3次);苏木精复染4min,蓝化、脱水、透明和封片。

**1.6 计算机图像分析** 10×40倍光镜下,利用Nikon彩色数码CCD摄像头捕获各组切片中nNOS和NT-3的图像,每张切片随机选取5个视野,再用生物图像软件计算各组免疫阳性反应物的平均光密度值(mean optical density, MOD)。

**1.7 统计学处理** 将各组免疫阳性反应物的MOD采用SPSS 16.0统计软件中的单因素方差分析进行分析,结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用 $q$ 检验,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 血糖检测结果** ①组内比较:对照组大鼠在造模3个月和造模6个月间差异无统计学意义;糖尿病组大鼠随病程的延长显著升高,造模3个月和造模6个月差异有统计学意义( $t = 4.6, P < 0.05$ );治疗组大鼠随着病程的延长升高,造模3个月和造模6个月间差异有统计学意义( $t = 5.713, P < 0.05$ )。②组间比较:造模3个月,糖尿病组显著高于对照组,治疗组较糖尿病组显著降低,但较对照组升高,3组间比较差异均有统计学意义( $F = 1087, P < 0.05$ );造模6个月,糖尿病组显著高于对照组,治疗组较糖尿病组显著降低,但较对照组升高,3组间比较均差异有统计学意义( $F = 415.158, P < 0.05$ ),见表1。

表1 三组大鼠FBG浓度的比较(mmol/L,  $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

造模时间	对照组	糖尿病组	治疗组	F值	P值
造模3个月	4.925 0 ± 0.249 2	16.925 0 ± 0.766 7*	6.475 0 ± 0.539 1*▽	108 7.000	0.000
造模6个月	4.850 0 ± 0.539 4	19.714 3 ± 1.512 6*▽	7.983 3 ± 0.299 4*△▲	415.158	0.000
$t$ 值	0.350	4.600	5.713		

与对照组同一时间比较: \*  $P < 0.05$ ;与糖尿病组造模3个月比较: ▽  $P < 0.05$ ;与糖尿病组造模6个月比较: △  $P < 0.05$ ;与治疗组造模3个月比较: ▲  $P < 0.05$

**2.2 HE 染色结果** 啮齿动物下颌下腺由分泌部和导管部组成,分泌部既有粘液性腺泡,又有浆液性腺泡,导管包括闰管、颗粒曲管、纹状管、小叶间导管和叶间导管。HE 染色结果显示,光镜下,造模 3 个月:对照组大鼠下颌下腺腺泡饱满,结构清晰,颗粒曲管管径较粗,上皮细胞饱满,核圆形位于基底部,顶部胞质含有丰富的嗜酸性分泌颗粒(图 1A1);糖尿病组大鼠下颌下腺腺泡中度萎缩,境界较清楚,腺叶间隙变大,部分核固缩,颗粒曲管数目减少,管径变小,顶部胞质的嗜酸性分泌颗粒减少(图 1B1);治疗组大鼠结构趋于对照组(图 1C1)。造模 6 个月:对照组大鼠较造模 3 个月无变化(图 1A2);糖尿病组大鼠下颌下腺腺泡重度萎缩,境界不清,核固缩明显,颗粒曲管腔狭窄,数目及顶部胞质的嗜酸性分泌颗粒较造模 3 个月进一步减少(图 1B2);治疗组大鼠结构趋于对照组(图 1C2)。

**2.3 免疫组织化学结果**

**2.3.1 nNOS 表达情况** 免疫阳性反应物主要沉积于下颌下腺颗粒曲管和纹状管导管上皮胞质内,腺泡和细胞核呈阴性。造模 3 个月结果显示:对照组免疫反应呈棕色(图 2A1);糖尿病组表达较对照组增强,多呈棕黑色(图 2B1);治疗组表达较糖尿病组减弱,呈棕色(图 2C1);造模 6 个月:对照组免疫反应呈棕黄色(图 2A2);糖尿病组表达较对照组增强,呈棕褐色(图 2B2);治疗组表达较糖尿病组减弱,呈棕黄色(图 2C2)。

**2.3.2 NT-3 表达情况** 免疫阳性反应物主要沉积于下颌下腺颗粒曲管和纹状管等导管细胞的胞质内,腺泡和细胞核呈阴性。造模 3 个月:对照组免疫反应多呈棕褐色(图 3A1);糖尿病组表达较对照组减弱,多呈棕色(图 3B1);治疗组表达较糖尿病组增强,多呈棕褐色(图 3C1)。造模 6 个月:对照组免疫反应多呈棕褐色(图 3A2);糖尿病组表达较对照组减弱,多呈浅棕色(图 3B2);治疗组表达较糖尿病组增强,多呈棕褐色(图 3C2)。

**2.4 计算机图像分析结果**

**2.4.1 nNOS MOD 值分析结果** ① 组内比较:对照组在造模 3 个月和造模 6 个月间差异无统计学意义;糖尿病组在造模 3 个月和造模 6 个月间差异有统计学意义( $t = 10.458, P < 0.05$ );治疗组在造模 3 个月和造模 6 个月间差异无统计学意义。② 组间比较:造模 3 个月,糖尿病组与对照组、治疗组与糖尿病组间均差异有统计学意义( $F = 305.242, P < 0.05$ ),治疗组与对照组间差异无统计学意义;造模 6 个月,糖尿病组与对照组、治疗组与糖尿病组间差异均有统计学意义( $F = 123.202, P < 0.05$ ),治疗组与对照组间差异无统计学意义。见表 2。

**2.4.2 NT-3 MOD 值分析结果** ① 组内比较:对照组在造模 3 个月和造模 6 个月间差异无统计学意义;糖尿病组在造模 3 个月和造模 6 个月间差异有统计学意义( $t = 3.337, P < 0.05$ );治疗组在造模 3 个月和造模 6 个月间差异无统计学意义。② 组间

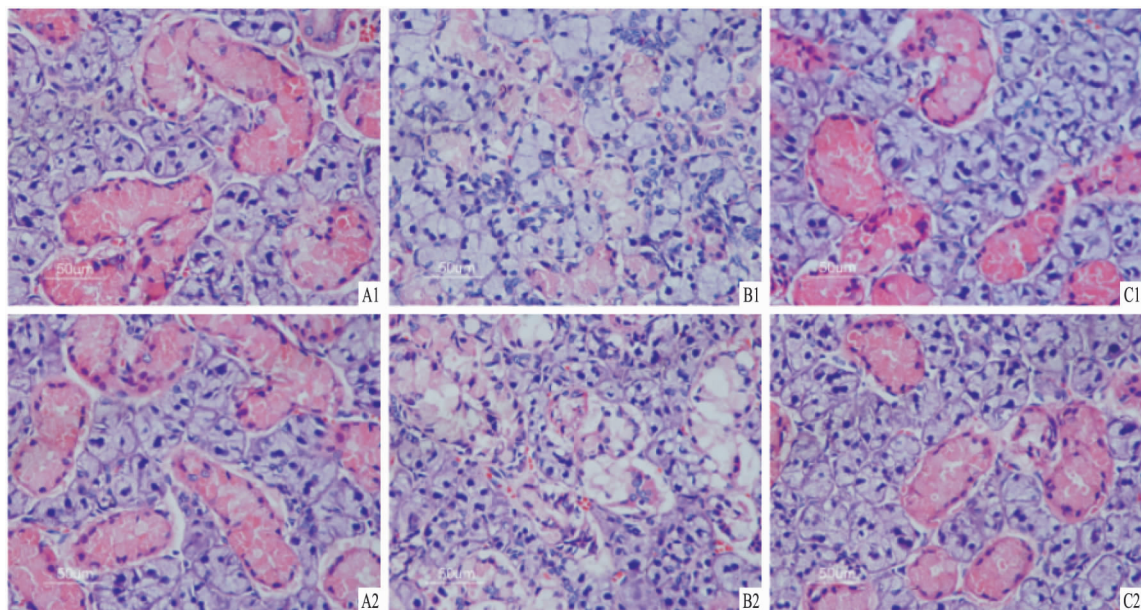


图 1 大鼠下颌下腺组织结构 HE × 400  
A:对照组;B:糖尿病组;C:治疗组;1:造模 3 个月;2:造模 6 个月

比较:造模 3 个月,糖尿病组与对照组、治疗组与糖尿病组间差异均有统计学意义 ( $F = 246.492, P < 0.05$ ), 治疗组与对照组间差异无统计学意义;造模

6 个月,糖尿病组与对照组、治疗组与糖尿病组间差异均有统计学意义 ( $F = 133.363, P < 0.05$ ), 治疗组与对照组间差异无统计学意义。见表 3。

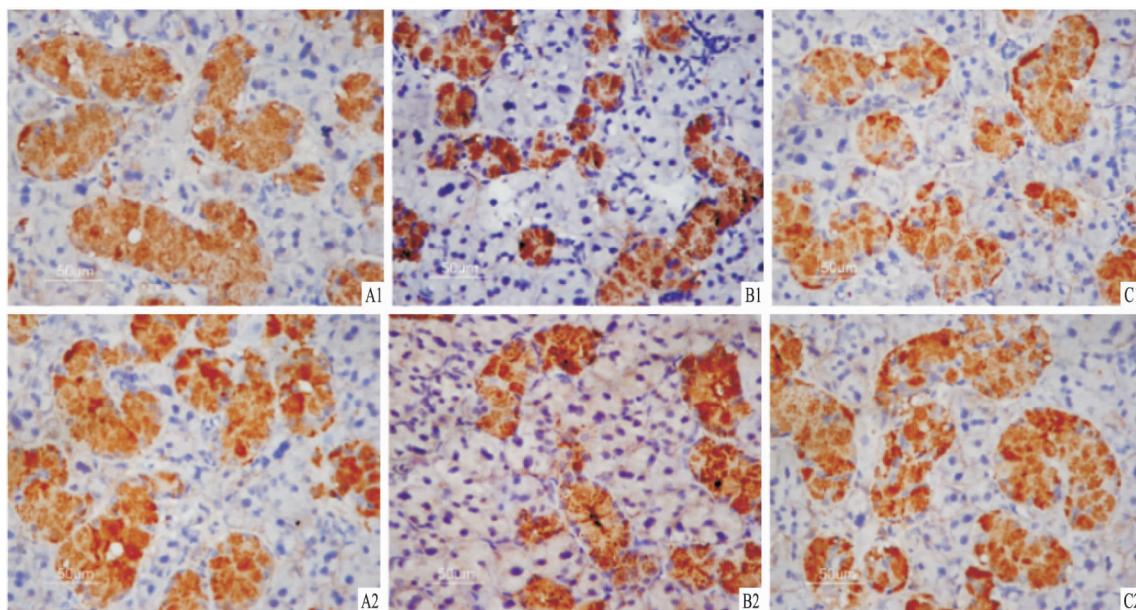


图 2 大鼠下颌下腺 nNOS 表达 SP×400

A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 治疗组; 1: 造模 3 个月; 2: 造模 6 个月

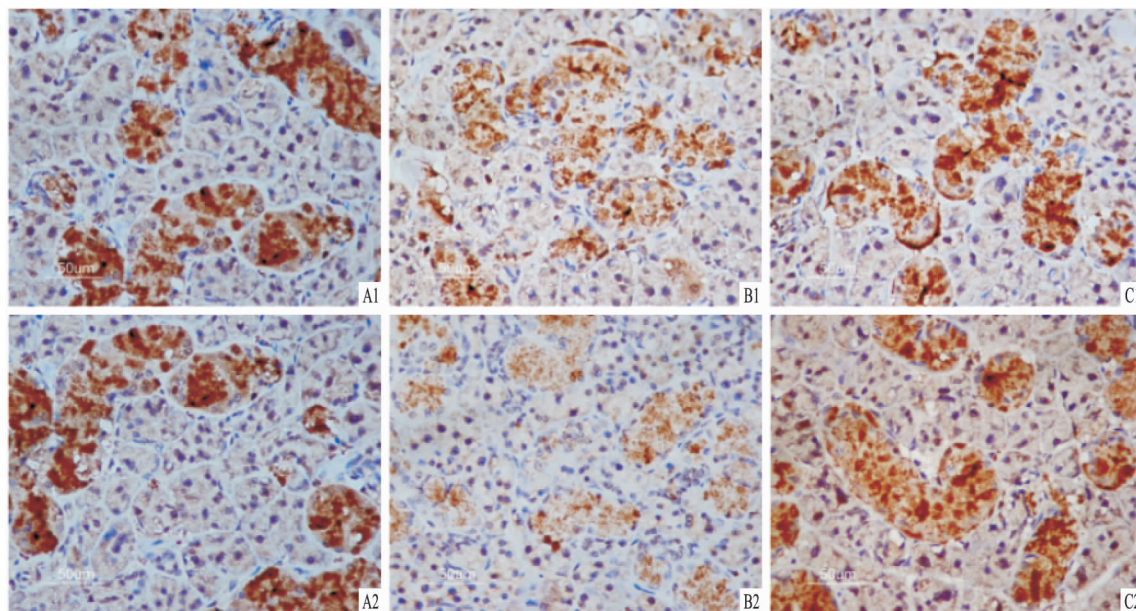


图 3 大鼠下颌下腺 NT-3 表达 SP×400

A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 治疗组; 1: 造模 3 个月; 2: 造模 6 个月

表 2 各组大鼠颌下腺内 nNOS MOD 值的比较 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

造模时间	对照组	糖尿病组	治疗组	F 值	P 值
造模 3 个月	0.437 6 ± 0.028 8	0.709 0 ± 0.023 6*	0.451 0 ± 0.021 2	305.242	0.000
造模 6 个月	0.440 4 ± 0.021 8	0.597 0 ± 0.019 0*	0.451 6 ± 0.025 4 <sup>△</sup>	123.202	0.000
t 值	0.219	10.458	0.047		

与对照组同一时间比较: \*  $P < 0.05$ ; 与糖尿病组造模 3 个月比较:  $P < 0.05$ ; 与糖尿病组造模 6 个月比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$

表3 各组大鼠颌下腺内 NT-3 MOD 值的比较 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

造模时间	对照组	糖尿病组	治疗组	F 值	P 值
造模 3 个月	0.617 5 ± 0.026 3	0.407 4 ± 0.020 8*	0.597 9 ± 0.013 5	246.492	0.000
造模 6 个月	0.619 2 ± 0.027 1	0.333 0 ± 0.059 5*	0.591 7 ± 0.014 4 <sup>△</sup>	133.363	0.000
t 值	1.400	3.337	0.883		

与对照组同一时间比较: \*  $P < 0.05$ ; 与糖尿病组造模 3 个月比较:  $P < 0.05$ ; 与糖尿病组造模 6 个月比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

nNOS 作为一种构成型 NOS,其活性主要受钙离子/钙调蛋白的调控,在生理情况下活性较低,当胞质中钙离子浓度升高时,可迅速被激活合成 NO,参与血管调节、神经传递、炎症、免疫反应等过程。本实验观察到糖尿病大鼠颌下腺导管上皮细胞内 nNOS 表达增强,其原因可能是由于糖尿病微血管病变导致颌下腺缺血缺氧,而在缺血缺氧等病理条件下,钠钙交换体能够介导钙离子内流<sup>[6]</sup>,导致胞质中钙离子浓度升高从而激活 nNOS 表达;糖尿病组在造模 6 个月较造模 3 个月表达下降的原因可能和 NO 的持续高水平反馈抑制了 N-甲基-D-天冬氨酸受体,导致钙离子内流相对减少<sup>[7]</sup>有关。糖尿病颌下腺导管上皮细胞内 nNOS 表达增强,可催化 L-精氨酸产生过多的 NO,高浓度的 NO 可以和高血糖致使体内活性氧簇(ROS)表达上升产生的过量超氧阴离子结合,形成过氧亚硝酸盐阴离子,后者作为一种强氧化剂,可广泛的和 DNA、蛋白质和脂质等大分子物质反应,引起 DNA 链断裂、脂质过氧化、蛋白质羟基化和硝化反应,从而产生细胞毒性,导致颌下腺组织结构和功能发生紊乱,另外,过多的 NO 还具有神经毒性<sup>[8]</sup>作用,喻欢等<sup>[9]</sup>研究发现在糖尿病胃轻瘫小鼠的胃窦内, nNOS 表达升高,而治疗胃轻瘫的同时能降低胃窦内 nNOS 的表达,提示 nNOS 参与了糖尿病神经病变的发生发展,糖尿病颌下腺内 nNOS 表达增多,产生过多的 NO 则会对颌下腺支配神经产生毒性损伤,进一步加剧颌下腺组织萎缩。

NT-3 可以由靶器官产生,能逆行性营养神经元的胞体<sup>[10]</sup>并对损伤神经具有修复作用<sup>[11]</sup>,同时还具有提高细胞维持钙离子平衡及自由基代谢的能力<sup>[12]</sup>。有研究者观察到糖尿病大鼠坐骨神经组织内 NT-3 水平下降,其神经纤维出现排列疏松、变性及断裂,髓鞘皱缩及轴索萎缩等病理改变,而若给予糖尿病大鼠 NT-3 治疗,则可以增加坐骨神经索口径,提高坐骨神经传导速度<sup>[13-14]</sup>。本实验显示糖尿病组大鼠颌下腺内 NT-3 表达减少并随着病程的

延长下降,可能是由于高血糖导致微血管病变及下颌下腺导管内 nNOS 表达增加,引起下颌下腺缺血缺氧,氧化应激增强,导致组织结构损伤和分泌功能下降有关。下颌下腺导管内 NT-3 表达下降,致使下颌下腺导管上皮细胞维持钙离子平衡能力降低,导致细胞内外钙离子失衡,可能是引起钙离子内流, nNOS 表达增加的一个原因,同时,由于 NT-3 表达下降,致使下颌下腺支配神经营养缺乏,对自由基的代谢能力降低,最终导致下颌下腺的结构和功能进一步紊乱。

综上所述,糖尿病大鼠颌下腺内 nNOS 表达增加和 NT-3 表达下降互为因果,互相影响,可能是导致糖尿病大鼠颌下腺结构紊乱、腺径减退,血流量降低,唾液流量减少<sup>[15-16]</sup>,引起糖尿病患者口渴的重要原因。而胰岛素作为目前临床治疗糖尿病的主要药物,在糖尿病早期给予合理规范的治疗,能有效的控制血糖,降低颌下腺内 nNOS 的表达和增加 NT-3 的表达,并且能改善糖尿病大鼠颌下腺的组织结构,提示胰岛素治疗使颌下腺内 nNOS 表达降低及 NT-3 的表达增加可能是其改善颌下腺结构和功能因素之一。除了常规的胰岛素治疗外,可以考虑通过给予糖尿病患者一氧化氮合酶抑制剂和外源性的 NT-3 治疗,从而使患者体内 nNOS 水平降低和 NT-3 水平升高,为糖尿病并发症的治疗提供一个新的靶点。

### 参考文献

- [1] 彭彦霄,柯红林,伍雪芳,等. 大鼠颌下腺内 ncNOS 及 NT-3 的表达[J]. 安徽医科大学学报, 2004, 39(2): 100-2.
- [2] Sheard P W, Bewick G S, Woolley A G, et al. Investigation of neuromuscular abnormalities in neurotrophin-3-deficient mice[J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 31(1): 29-41.
- [3] Dauch J R, Yanik B M, Hsieh W, et al. Neuron-astrocyte signaling network in spinal cord dorsal horn mediates painful neuropathy of type 2 diabetes[J]. *Glia*, 2012, 60(9): 1301-15.
- [4] 秦伟,谢学军,何宇,等. 补肾活血中药复方对实验性糖尿病大鼠视路神经元病理损害的影响及机理探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(8): 1614-6.
- [5] 向雪松,王竹,祝宇铭,等. 链脲佐菌素注射剂量对建立 2 型糖尿病大鼠模型的影响[J]. 卫生研究, 2010, 39(2): 138

- 42.
- [6] Cuomo O, Gala R, Pignataro G, et al. A critical role for the potassium-dependent sodium-calcium exchanger NCKX2 in protection against focal ischemic brain damage [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(9): 2053-63.
- [7] Melnik S, Wright M, Tanner J A, et al. Diadenosine polyphosphate analog controls postsynaptic excitation in CA3-CA1 synapses via a nitric oxide-dependent mechanism [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(2): 579-88.
- [8] 蒋涛, 但炜. 自由基与颅脑损伤的关系研究现状 [J]. *医学综述*, 2013, 19(15): 2728-32.
- [9] 喻欢, 程军平, 张定棋, 等. 针药结合对糖尿病胃轻瘫小鼠胃窦Cajal间质细胞及SP、nNOS表达的影响 [J]. *世界针灸杂志*, 2015, 25(3): 35-42.
- [10] 王晓芹, 李晓辉. 脑源性神经营养因子与糖尿病 [J]. *解放军药学学报*, 2002, 18(3): 170-2.
- [11] Liu S, Blanchard S, Bigou S, et al. Neurotrophin 3 improves delayed reconstruction of sensory pathway after cervical root injury [J]. *Neurosurgery*, 2011, 68(2): 450-61.
- [12] 张志, 李爱民. 神经营养因子-3研究进展 [J]. *临床神经外科杂志*, 2013, 10(3): 191-2.
- [13] 吕翠岩, 张胜容, 蔡肤, 等. 中药复方糖痹康对糖尿病大鼠坐骨神经NGF、BDNF及NT-3蛋白表达的影响 [R]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(12): 3946-9.
- [14] Mizisin A P, Calcutt N A, Tomlinson D R, et al. Neurotrophin-3 reverses nerve conduction velocity deficits in streptozotocin-diabetic rats [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 1999, 4(3-4): 211-21.
- [15] Stewart C R, Obi N, Epane E C, et al. Effects of diabetes on salivary gland protein expression of tetrahydrobiopterin and nitric oxide synthesis and function [J]. *J Periodontol*, 2016, 87(6): 735-41.
- [16] Romero A C, Ibuki F K, Nogueira F N. Sialic acid reduction in the saliva of streptozotocin induced diabetic rats [J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(9): 1189-93.

## Expression of nNOS and NT-3 in the submandibular gland of diabetic rats and its significance

Hu Huizhen<sup>1,2</sup>, Jia Xuemei<sup>1</sup>, Gui Li<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Basic Medical College Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Anatomy and Histoembryology, Anhui Vocational Institute of Population, Chizhou 247000)

**Abstract Objective** To observe the expression changes of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and neurotrophin-3 (NT-3) in the submandibular glands of the diabetes rats in the different courses of disease and to explore the influences of diabetes on the structures and functions of submandibular glands of diabetes rats. **Methods** 48 SD rats were randomly divided into control group, diabetes group and treatment group. Diabetes group and treatment group were injected with Streptozotocin to establish type 2 diabetes model and treatment group were given insulin treatment. Three months and six months after modeling 8 rats in each group were sacrificed for assaying blood glucose, and the submandibular gland tissues were removed and subjected to HE staining, immunohistochemical staining and computer image analysis. **Results** The blood glucose of diabetes group was higher than the control group at the same period and much higher than the control group as the course of disease extends. The blood glucose of treatment group was lower than the diabetes group at the same period. Under the light microscope, compared with the control group, the acinus of submandibular gland of diabetes group were aggravated, its granular convoluted tubereduced, its lumen narrows and the treatment group didn't have obvious differences. Immunohistochemistry shows that the expression of nNOS in diabetes group was stronger than that in the control group at the same period and peaks three months after molding and the expression of nNOS in treatment group was lower than that in the diabetes group at the same period; the expression of NT-3 in diabetes group was lower than that in the control group at the same period and decreased with the extension of course of disease and the expression of NT-3 in treatment group was stronger than that in the diabetes group at the same period. **Conclusion** Increased expression of nNOS and decreased expression of NT-3 in the submandibular gland of diabetic rats may be an important cause of the structure and dysfunction of the submandibular gland in diabetes mellitus rats. Insulin therapy may be related to the changes of nNOS and NT-3.

**Key words** diabetes mellitus; submandibular gland; neuronal nitric oxide synthase; neurotrophic factor-3