

• 基础研究论著 •

2 型糖尿病大鼠周围神经病变模型的建立及相关指标检测

殷娟¹, 张明红², 杨红英³

(1. 攀枝花市中心医院检验科, 四川攀枝花 617067; 2. 攀枝花市仁和区人民医院检验科, 四川攀枝花 617061; 3. 昆明医科大学第二附属医院检验科, 云南昆明 650001)

摘要:目的 建立 2 型糖尿病(T2DM)大鼠糖尿病周围神经病变模型, 观察坐骨神经形态和功能变化。方法 雄性 SD 大鼠 44 只, 分为普通饲料对照(NC)组、高脂饲料对照(HC)组和糖尿病(DM)组。高脂饲料喂养加小剂量链脲佐菌素(STZ)注射诱导 2 型糖尿病 8 周后神经电生理检测坐骨神经动作电位传导速度, 电镜检测坐骨神经形态学变化。结果 诱导糖尿病 8 周后, 部分大鼠出现神经病变, 坐骨神经动作电位传导速度显著降低($P < 0.05$), 并出现明显的脱髓鞘等病理变化。结论 高脂饮食结合小剂量 STZ 注射可复制发病过程近似人类 T2DM, 伴周围神经病变的大鼠模型, 可用于相关病理研究。

关键词:糖尿病, 2 型; 周围神经; 神经电生理; 显微镜检查, 电子; 大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.01.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)01-0001-02

Establishment of type 2 diabetes model in rat with peripheral neuropathy and detection of indicators

Yin Juan¹, Zhang Minghong², Yang Hongying³

(1. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital, Panzhihua, Sichuan 617067, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Renhe People's Hospital, Panzhihua, Sichuan 617061, China; 3. Department of Clinical Laboratory, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yun'nan 650001, China)

Abstract: Objective To establish a rat model featured peripheral neuropathy associated with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Methods 44 male SD rats were divided into normal diet control (NC) group, high fat diet control (HC) group and diabetes mellitus (DM) group. High fat diet plus small dose streptozotocin (STZ) were used to induce T2DM. 8 weeks after inducing, nerve conduction velocity was detected by neuroelectrophysiology testing and morphology changes in sciatic nerve were detected by electron microscopy. **Results** 8 weeks after inducing, part of rats were coincidence with diabetic neuropathy, with lower sciatic nerve conduction velocity ($P < 0.05$), and with apparent pathological changes such as demyelination. **Conclusion** High fat diet combined with small dose STZ could replicate the rat model with progress similar to T2DM of human. The model could be conducive to causing peripheral neuropathy, and could be used to study the pathology mechanisms.

Key words: diabetes mellitus, type 2; peripheral nerves; neuroelectrophysiology; microscopy, electron; rats

糖尿病(DM)是胰岛素分泌缺陷和(或)胰岛素作用缺陷所引起以慢性高血糖伴碳水化合物、脂肪和蛋白质代谢障碍为特征的代谢性疾病, 发病率日趋升高^[1-4]。2 型糖尿病(T2DM)是最常见 DM 类型之一, 发病与胰岛 β 细胞分泌胰岛素过多造成体内高胰岛素血症, 进而引起胰岛素抵抗有关。糖尿病周围神经病变(DPN)是 DM 常见慢性并发症之一, 可导致足部溃疡、坏疽, 甚至截肢, 是非创伤性截肢的最常见病因。早期诊断、治疗 DPN 可降低溃疡和截肢发生率, 提高患者生存率, 改善患者生活质量。然而在 DM 早期, 周围神经病变症状多不明显, 但患者神经功能可能已受损而出现异常的神经电生理表现。建立理想的动物模型对深入研究 DPN 具有十分重要的意义, 目前多采用 DM 模型^[5-6]。本实验采用链脲佐菌素(STZ)两步法联合高脂饲料诱导 T2DM 及周围神经病变大鼠模型, 观察其坐骨神经动作电位传导功能缺陷及形态改变。

1 材料与方 法

1.1 材料 清洁级雄性 SD 大鼠 44 只, 7 周龄, 体质量(186 ± 39)g, 随机分为 3 组: 正常对照(NC)组 6 只, 普通饲料喂养; 高脂对照(HC)组 8 只, 高脂饲料喂养; DM 组 30 只, 高脂饲料喂养。SD 大鼠、普通饲料和高脂饲料均由四川大学华西医学院实验动物中心提供。

1.2 仪器与试剂 罗康全活力型血糖试纸和血糖仪(德国罗

氏), STZ(美国 Sigma), bL-420F 生物机能实验系统(成都泰盟), H-600 IV 型射透电镜(日本日立)。

1.3 方 法

1.3.1 T2DM 动物模型的制作 饮食诱导 IR 和 STZ 两步法制作 DM 模型^[7-8]。适应性喂养 2 周, 高脂饲料喂养 4 周后 STZ 腹腔注射, 剂量为 25 mg/kg, 2 周后再次腹腔注射 STZ, 剂量为 40 mg/kg; HC、NC 组注射同等体积柠檬酸缓冲液。72 h 后检测血糖, 血糖不低于 16.7 mmol/L 为成模标准。

1.3.2 坐骨神经动作电位传导速度检测 造模成功 8 周后, 3.6%水合氯醛 2 mL/kg 腹腔注射麻醉, 剪开大鼠右后肢股二头肌与半膜肌之间的皮肤, 并沿两肌之间行钝性分离, 暴露坐骨神经, 采用 BL-420F 生物机能实验系统软件“肌肉神经实验”中“神经干兴奋传导速度测定”模块检测坐骨神经干动作电位传导速度。控制参数: 波形软放大 5 mV, 时间 0.01 s, F: 5 kHz。刺激参数包括模式: 细电压, 方式: 单刺激, 延时 100 ms, 波宽 1.00 ms, 波间隔 10, 频率 10.0 Hz, 强度 1.000 V。

1.3.3 坐骨神经形态学检测 大鼠麻醉处死, 分离左侧坐骨神经, 3%戊二醛预固定, 1%四氧化锇再固定, 丙酮逐级脱水, Epon812 包埋, 半薄切片光学定位, 制超薄切片后醋酸铀及枸橼酸铅双重染色, H-600 IV 型透射电镜观察, 摄片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件分析数据。计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组均数比较采用单因素方差分析, 均数间两两比较方差齐采用 SNK 方法, 方差不齐采用 Dunnett T3 方法; 显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般状况 NC、HC 组大鼠生长良好, 体质量稳定增长, 与 NC 组相比, HC 组大鼠体质量增长更快 ($P < 0.05$)。DM 组大鼠在注射 STZ 前(第 6 周)体质量亦增长较快, 注射 STZ 后增长速度减慢, 体质量接近 NC 组 ($P > 0.05$), 见表 1。成模大鼠摄食量、饮水量和尿量增加, 尿臊味加重, 逐渐出现毛失去光泽、脱毛、活动减少等 DM 相关症状。

表 1 各组大鼠体质量变化 (g, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 第 1 周 | 第 6 周 | 第 16 周 |
|------|--------|---------|---------|
| NC 组 | 183±40 | 329±52 | 418±40 |
| HC 组 | 214±32 | 404±50* | 498±66* |
| DM 组 | 198±40 | 319±49* | 452±44 |

*: 与 NC 组相同时间点比较, $P < 0.05$ 。

2.2 血糖测定结果 各组大鼠基础血糖水平(第 1 周)无统计学差异 ($P > 0.05$), 注射 STZ 后 72 h(第 6 周)直至实验结束(第 16 周), DM 组血糖水平高于 NC、HC 组 ($P < 0.05$), NC、HC 组间无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠血糖测定结果 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 第 1 周 | 第 6 周 | 第 16 周 |
|------|-----------|-------------|-------------|
| NC 组 | 6.75±0.37 | 6.50±0.54 | 6.55±1.19 |
| HC 组 | 6.68±0.73 | 6.66±1.05 | 6.58±0.65 |
| DM 组 | 6.48±0.86 | 19.95±6.80* | 19.64±6.05* |

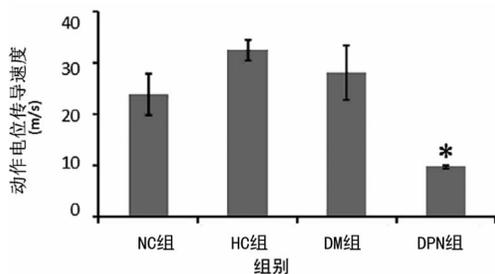
*: 与 NC 组相同时间点比较, $P < 0.05$ 。

2.3 DM、DPN 组大鼠成模率及死亡率 DM 组大鼠 30 只, 因其他原因死亡 2 只, 实际注射 STZ 大鼠 28 只。注射 STZ 后死亡 4 只, 成模 14 只, 并发 DPN 大鼠 4 只, DM 和 DPN 成模率及死亡率见表 3。

表 3 DM、DPN 大鼠成模率及死亡率

| 组别 | <i>n</i> | 注射 STZ (<i>n</i>) | 死亡 (<i>n</i>) | 成模 (<i>n</i>) | 成模率 (%) | 死亡率 (%) |
|-------|----------|------------------------|--------------------|--------------------|------------|------------|
| DM 组 | 30 | 28 | 4 | 14 | 58.3 | 14.3 |
| DPN 组 | 14 | 14 | 0 | 4 | 28.6 | 0.0 |

2.4 坐骨神经动作电位传导速度检测结果 诱导 8 周后, DPN 组大鼠坐骨神经干动作电位传导速度低于 NC 组 ($P < 0.05$), 而 HC 组、DM 组与 NC 组间无统计学差异(见图 1)。

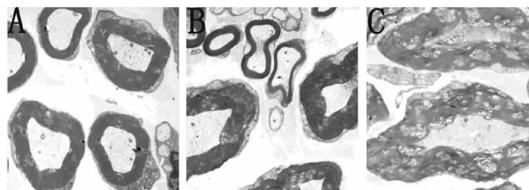


*: 与其他各组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠坐骨神经干动作电位传导速度

2.5 电镜检查结果 NC 组大鼠有髓神经纤维横断面可见神

经内膜毛血管管腔规则, 管壁较光滑, 髓鞘结构完整, 呈明暗相间、同心圆的板层状结构, 神经元轴索内电子密度均匀, 有大量神经丝、微管、微丝、线粒体、滑面内质网及小泡。DM、NC 组电镜下变化相似。DPN 组毛血管内皮肿胀增生, 有髓神经纤维髓鞘高度增厚, 板层分离、脱落, 厚薄不一, 呈波浪状或梅花状, 神经丝增多(见图 2)。



A: NC 组; B: DM 组; C: DPN 组。

图 2 各组大鼠坐骨神经电镜观察 (×5 000)

3 讨论

DM 发病率逐年递增, 已成为仅次于肿瘤和心血管疾病的第三大健康杀手^[9]。2010 年 3 月 25 日杨文英教授等^[10]发表在《新英格兰杂志》的流行病学调查结果表明, 中国 20 岁以上人群 DM 总患病率为 9.7%, DM 前期患病率为 15.5%。T2DM 是最常见的 DM 类型, T2DM 研究是攻克 DM 的必然途径, 而复制与人类疾病过程相似的 T2DM 实验动物模型则是进行 T2DM 研究的关键环节之一。

DM 复制模型通常分为实验性、自发性、转基因和基因剔除 DM 动物模型^[11]。转基因和基因剔除动物模型构建方法仍处于摸索阶段^[12]。自发性动物模型与人类病变特征比较相似, 应用价值较高, 但因来源较少、价格昂贵、饲养及繁殖条件要求严格而无法广泛应用^[13-14]。实验性糖尿病模型构建方法包括胰腺切除术和化学诱导剂损伤胰岛细胞等, 其中后者因操作简单、快速, 同时具有发病时间整齐及发病程度较一致的优点而得到广泛应用^[15]。

STZ 是目前常用化学诱导剂之一。本实验采用 STZ 两步法配合高脂饲料诱导 T2DM 模型, 72 h 后检测空腹血糖均值为 19.95 mmol/L, 大于 16.7 mmol/L, 成模率 58.8%, 至实验结束时平均血糖 19.64 mmol/L, 高于 NC、HC 组 ($P < 0.05$)。经此方法诱导的 DM 大鼠症状典型, 死亡率仅为 14.3%, 说明由该方法诱导的 DM 大鼠具有成模稳定、存活率高的特点, 与类似研究结果一致^[16-19]。

DPN 发病机制尚不清楚, 普遍认为与高血糖密切相关。本实验采用 STZ 诱导的部分 T2DM 大鼠在 8 周时出现神经传导速度降低伴严重的脱髓鞘病理变化, 与类似研究结果一致^[20-22], 说明 STZ 诱导的 DM 大鼠模型可进展为 DPN, 可用于 DPN 相关实验研究。

参考文献

- [1] 潘长玉. Joslin 糖尿病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 338.
- [2] 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 770.
- [3] 张远梅. 糖尿病患者血清糖化低密度脂蛋白水平研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(10): 1177-1178.
- [4] 任舒晔. 血清 UA、IL-6、hs-CRP、Lp(a) 水平与 2 型糖尿病及其并发症的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(14): 1760-1761.
- [5] Cotter MA, Jack AM, Cameron NE. Effects of the protein kinase C beta inhibitor LY333531 on neural and vascular function in rats with streptozocin-induced diabetes[J]. Clin Sci (Lond), 2002, 103(3): 311-321.

(下转第 5 页)

生^[2-4]。在本研究结果亦证实了该结论。洛汀新组与未处理组 TGF- β_1 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明洛汀新有抑制肾组织表达 TGF- β_1 的作用, 但洛汀新组 BMP-7 水平低于未处理组和肾衰康组 ($P < 0.05$), 提示洛汀新不能促进 BMP-7 表达。

BMP-7 是具有肾脏保护功能的细胞因子, 能降低肾小球滤过率、减轻尿蛋白、保护肾单位^[5]。BMP-7 表达减少也是 TGF- β_1 引起肾纤维化的一种重要机制^[6]。BMP-7 主要通过拮抗 TGF- β_1 而避免肾组织纤维化, 发挥保护肾脏的作用。BMP-7 在肾脏发生、发育及维持正常上皮功能中发挥重要作用, 肾组织 BMP-7 减少与肾小管间质纤维化的发生有关^[7-11]。本研究中未处理组肾 BMP-7 水平低于对照组 ($P < 0.05$), 亦说明慢性肾衰竭导致 BMP-7 水平降低。肾衰康组 BMP-7 水平虽低于对照组, 但明显高于未处理组及洛汀新组, 提示肾衰康可促进 BMP-7 表达。本研究结果显示洛汀新及肾衰康均可降低肾衰竭模型小鼠 BUN、Cr 及尿蛋白水平, 但洛汀新作用比肾衰康稍强, 然而洛汀新仅可抑制 TGF- β_1 表达, 而肾衰康则不仅可抑制 TGF- β_1 表达, 更可促进 BMP-7 表达。笔者既往研究已证实肾衰康具有抗纤维化作用^[12]。本次研究进一步证实肾衰康抗纤维化作用的机制与其抑制肾组织表达 TGF- β_1 和增强 BMP-7 表达有关。

致谢: 本研究中的 PCR 系列操作由江苏大学钱晖教授协助完成, 特此致谢!

参考文献

[1] 陈孝文, 吴东, 刘华锋. 慢性肾衰竭[M]. 北京: 中国中医药科技出版社, 2006: 160-162.

[2] Sato F, Narita I, Goto S, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphism modifies the histological and clinical manifestations in Japanese patients with IgA nephropathy[J]. Tissue Antigens, 2001, 64(1): 35-40.

[3] 陈香美, 李岩, 李文歌, 等. 血管紧张素转化酶抑制剂减轻肾小球硬化机制的探讨[J]. 中华肾脏病杂志, 1998, 14(3): 139-142.

[4] 张翥, 苏克亮, 黄颂敏, 等. 肾小管间质纤维化的发生机理[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2005, 25(3): 419-422.

[5] Wang S, Chen Q, Simon TC, et al. Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) a novel therapy for diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2003, 63(6): 2037-2049.

[6] Wang SN, Lapage J, Hirschberg R. Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(11): 2392-2399.

[7] 杨林, 段惠军. 骨形成蛋白-7 在肾纤维化中的作用[J]. 河北医科大学学报, 2006, 27(3): 225-227.

[8] Brabcova I, Tesar V, Honsova E, et al. Association of advanced vasculopathy and transforming growth factor-beta1 gene expression with immunoglobulin A nephropathy progression[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(2): 573-579.

[9] Boor P, Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38(7): 441-450.

[10] Tossidou I, Schiffer M. TGF- β /BMP pathways and the podocyte[J]. Semin Nephrol, 2012, 32(4): 368-376.

[11] Veerasamy M, Nguyen TQ, Motazed R, et al. Differential regulation of E-cadherin and alpha-smooth muscle actin by BMP 7 in human renal proximal tubule epithelial cells and its implication in renal fibrosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(5): 1238-1248.

[12] 朱辟疆, 韦先进, 周逊, 等. 肾衰康抗肾间质纤维化的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(6): 344-349.

[13] 李娜, 曲卉, 曹宇立, 等. II 型糖尿病动物模型的研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(1): 66-70.

[14] 孙晓芳, 赵长勇, 陈晖, 等. 高糖高脂饮食加链脲佐菌素建立实验性大鼠 2 型糖尿病模型[J]. 南京医科大学学报, 2009, 29(6): 797-806.

[15] 燕蕪, 郭巍伟, 梁执群, 等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其验证[J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(4): 5-6.

[16] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998: 348-349.

[17] 刘科宇, 王春华. 链脲佐菌素致大鼠高血糖模型的实验研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2006, 40(4): 272-274.

[18] Wu Z, Mata M, Fink DJ. Prevention of diabetic neuropathy by regulatable expression of HSV-mediated erythropoietin[J]. Mol Ther, 2011, 19(2): 310-317.

[19] Himeno T, Kamiya H, Naruse K, et al. Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice[J]. Diabetes, 2011, 61(9): 2397-2406.

[20] 廖永锋, 朋立超. 糖尿病病性周围神经病变大鼠脊髓小胶质细胞 Toll 样受体 3 的变化[J]. 中国临床医学, 2011, 18(3): 284-286.

[21] 煤炭医学院学报, 2009, 11(6): 783-785.

[22] 高秀娟, 马会霞, 江春花. 2 型糖尿病动物模型研究概况[J]. 华北

(上接第 2 页)

[6] Brussee V, Guo G, Dong Y, et al. Distal degenerative sensory neuropathy in a long-term type 2 diabetes rat model[J]. Diabetes, 2008, 57(6): 1664-1673.

[7] Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat; a model for type 2 diabetes and pharmacological screening[J]. Pharmacol Res, 2005, 52(4): 313-320.

[8] 杨红英, 王娴默, 王卓, 等. 2 型糖尿病鼠脑梗死模型的建立及相关指标分析[J]. 临床神经电生理学杂志, 2009, 18(5): 270-274.

[9] 南征, 高彦彬, 钱秋海, 等. 糖尿病中西医结合治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1-7.

[10] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.

[11] 田婷, 马向华, 沈捷. 2 型糖尿病动物模型研究概况[J]. 医学综述, 2011, 17(6): 905-908.

[12] 刘德慧, 刑翔飞. 2 型糖尿病大鼠模型的特点及评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 212-214.

[13] 李娟娥, 王磊, 秦灵灵, 等. 自发性 2 型糖尿病啮齿类动物模型研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 267-271.

[14] 高秀娟, 马会霞, 江春花. 2 型糖尿病动物模型研究概况[J]. 华北

(收稿日期: 2012-07-18)

(收稿日期: 2012-07-28)