

· 实验研究 ·

2 型糖尿病小鼠周围神经病变模型的建立及皮下神经纤维密度的检测

浦江畔 唐佳雯 朱涛

【摘要】 目的 建立 2 型糖尿病小鼠周围神经病变模型, 并对该模型的皮下神经纤维密度 (intra-epidermal nerve fiber density, IENFD) 进行检测。**方法** C57BL/6 雄性小鼠 24 只, 随机分为四组, 每组 6 只: HS 组采用高脂饲料喂养 24 周 + 链脲佐菌素 STZ (120 mg/kg) 单次注射; H 组采用高脂饲料喂养 24 周 + 缓冲液注射; S 组普通饲料喂养 24 周 + STZ (120 mg/kg) 单次注射; C 组普通饲料喂养 24 周 + 缓冲液注射。四组小鼠均以 24 周为实验终点, 测定随机血糖、胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)、机械痛阈和 IENFD。**结果** 第 24 周时 HS 组随机血糖、HOMA-IR 明显高于 H、S、C 组 ($P < 0.01$), 机械痛阈明显低于 H、S、C 组 ($P < 0.05$), IENFD 明显低于 S 组和 C 组 ($P < 0.05$); H 组随机血糖、HOMA-IR 明显高于 C 组 ($P < 0.01$), 机械痛阈与 S 组、C 组差异无统计学意义, IENFD 与 HS 组差异无统计学意义。**结论** 高脂饲料喂养联合中等剂量 STZ 成功建立了 2 型糖尿病小鼠周围神经病变模型, 小鼠皮下神经纤维密度明显下降。

【关键词】 2 型糖尿病; 糖尿病周围神经病变; 小鼠模型; 皮下神经纤维密度检测

Establishing mouse model of type 2 diabetes peripheral neuropathy and measuring its intra-epidermal nerve fiber density PU Jiangpan, TANG Jiawen, ZHU Tao. Shanghai Songjiang district center hospital affiliated to Nanjing Medical University, Shanghai 201600, China

Corresponding author: ZHU Tao, Email: zt19192003@163.com

【Abstract】 Objective To establish mouse model of type 2 diabetes peripheral neuropathy and measure its intra-epidermal nerve fiber density (IENFD). **Methods** Male C57BL/6 mouse were randomly divided into four groups: group HS ($n=6$): high-fat diet + single streptozotocin intraperitoneal injection (120 mg/kg); group H ($n=6$): high fat diet + buffer injection; group S ($n=6$): standard chow diet + single streptozotocin intraperitoneal injection (120 mg/kg); group C ($n=6$): standard chow diet + buffer injection. The 24th week was the end point of the experiment, and random glucose, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), mechanical threshold, and IENFD were measured. **Results** Group HS had significantly higher random glucose and HOMA-IR than other groups ($P < 0.01$), had significantly lower mechanical threshold than other groups ($P < 0.05$), had significantly lower IENFD than groups S and C at 24th week ($P < 0.05$); group H had significantly higher random glucose and HOMA-IR than group C at 24th week ($P < 0.01$), had no significant difference in mechanical threshold compared with group S and group C, and had no significant difference in IENFD compared with group HS. **Conclusion** A mouse model of type 2 diabetes peripheral neuropathy was successfully established, and the IENFD was found to be decreased significantly.

【Key words】 Type 2 diabetes; Diabetic peripheral neuropathy; Mouse model; Intra-epidermal nerve fiber density

2 型糖尿病是一种长期的代谢紊乱, 主要表现为高血糖, 胰岛素抵抗以及胰岛 β 细胞的损伤, 约占糖尿病发病总人数的 90%^[1]。糖尿病患者中周围神经病变的发病率约为 30%~50%^[2]。糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是由长期高血糖、相关代谢紊乱以及心血管

因素共同作用而导致的一种对称的、好发于远端肢体的神经病变, 可影响感觉、运动及自主神经。

已有多篇文献报道糖尿病模型动物可出现 DPN 症状, 当前 2 型糖尿病小鼠并发 DPN 的造模方式主要有高脂饲料喂养联合链脲佐菌素诱导法, 单纯高脂饲料喂养法, 以及转基因小鼠^[3, 4]。高脂饲料联合低剂量 (40~50 mg/kg) 链脲佐菌素 STZ 连续诱导可导致胰腺 β 细胞缓慢丧失功能, 更加接近于人类 2 型糖尿病的发病过程, 而且成本较低, 应用广泛。然而多项研究表明, 低剂量 STZ 连续诱

基金项目: 上海市科委医学引导项目基金资助 (134119b2700)
作者单位: 201600 南京医科大学附属上海市松江区中心医院
麻醉科

通信作者: 朱涛, Email: zt19192003@163.com

导不易诱发出周围神经病变^[5~8]。

本研究对高脂饲料喂养联合中等剂量 STZ 诱导的 2 型糖尿病小鼠的相关指标进行了分析,旨在为研究人员提供一种有效的 DPN 模型。

材料与方法

实验动物与分组 本实验采用 C57BL6 雄性小鼠(上海市第一人民医院实验动物中心)24 只,8 周龄,体重 22~24 g,分为四组,每组 6 只。

DPN 模型 HS 组:高脂饲料(D12492,含 60% 脂肪,20% 碳水化合物,20% 蛋白质,Research Diet,美国)喂养 24 周,并在第 5 周腹腔单次注射 STZ(Sigma,美国),剂量 120 mg/kg。H 组:高脂饲料持续喂养 24 周,并在第 5 周腹腔单次注射与 STZ 等公斤体重的 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液。S 组:普通饲料喂养 24 周,并在第 5 周腹腔注射 STZ,剂量 120 mg/kg。C 组:普通饲料喂养 24 周,并在第 5 周腹腔单次注射等公斤体重的 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液。四组小鼠均以 24 周为实验终点^[7,9,10]。

记录四组小鼠第 4、8、12、16、20、24 周的体重、随机血糖浓度、血浆胰岛素浓度变化情况,口服葡萄糖耐量试验(OGTT)后 15、30、45、60、75、90、105、120 min 的血糖浓度,以及第 24 周血甘油三酯、胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL)浓度。C57BL6 小鼠糖尿病诊断标准为随机血糖>16.9 mmol/L。

机械痛阈检测 将小鼠置于无底亚力克盒中,盒下垫铁丝网。采用刺激强度为 0.07~6 g 的纤毛刺激针(North Coast,美国)从低到高依次对小鼠后足底进行刺激,每个强度刺激 5 次,每次 2~3 s,刺激间隔 5 min。5 次中有 3 次以上引起疼痛反应的最小刺激强度为该小鼠的机械痛阈。

胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)的检测 所有小鼠于第 24 周末处死,摘除眼球取血,测空腹血糖和胰岛素浓度。采用 ELISA 法测血浆胰岛素浓度。HOMA-IR 公式:空腹血糖(mmol/L)×胰岛素(μ U/ml)/22.5。

免疫组织化学 小鼠脱颈处死后,用直径 3 mm 皮肤活检器钻取小鼠后足底皮肤,眼科剪剪下包含表皮、真皮层的足底皮肤。将取下的标本浸入 2% 碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛溶液 16 h 后,再将其浸入含 30% 蔗糖的 PBS 溶液脱水 48 h 直至标本沉底,脱水完毕后行冰冻切片。

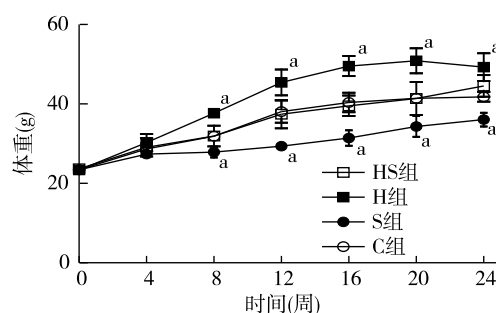
标本通过 OCT 包埋后,使用冷冻切片机(Leica,德国)进行切片,切片时刀片垂直于表皮,切片厚度为 30 μ m。根据生物素免疫组化试剂盒(中山金桥,国产)说明书上步骤进行 PGP9.5(abcam,英国)染色,显微镜下 DAB(碧云天,国产)显色 3~5 min,苏木精复染,中性树胶封片。

皮下神经纤维密度(intra-epidermal nerve fiber density, IENFD)的检测 将制作好的 PGP 9.5 免疫组化皮肤冰冻切片置于光学显微镜下观察。在 40× 镜下通过软件(Motic,中国)计算出切片表皮长度。400 倍镜下计数由真皮发出穿过基底膜至表皮层的神经纤维。穿过基底膜至表皮层分叉的神经纤维计为 1 根;未穿过基底膜的神经纤维不作计数。IENFD=切片的神经纤维数目/切片的表皮长度(根/mm)。

统计分析 采用 SPSS 19.0 软件处理,正态分布计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

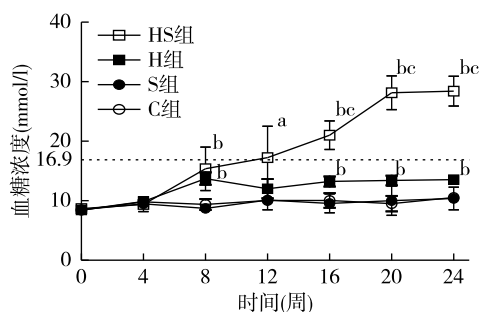
小鼠体重 8~24 周 H 组体重明显大于 C 组($P < 0.01$);S 组体重明显小于 C 组($P < 0.01$);HS 组与 C 组体重呈同步上升趋势,两组体重差异无统计学意义(图 1)。



注:与 C 组比较, $^a P < 0.01$

图 1 四组小鼠体重变化的比较

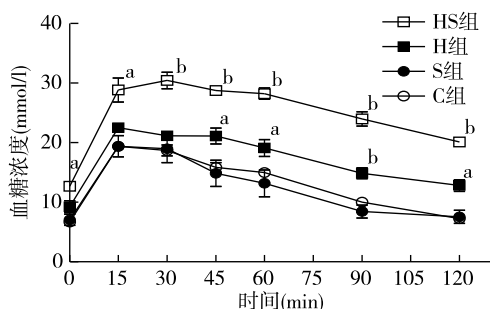
随机血糖浓度 第 0 周及第 4 周四组随机血糖浓度差异无统计学意义。HS 组在第 4 周注射 STZ 后血糖浓度逐步上升,第 8~24 周 HS 组血糖浓度明显高于 C 组($P < 0.05$)。第 8 周及第 16~24 周 H 组血糖浓度明显高于 S 组、C 组($P < 0.01$),但 H 组随机血糖浓度均<16.9 mmol/L。第 16~24 周 HS 组血糖浓度明显高于 H 组($P < 0.01$)。S 组与 C 组血糖浓度差异无统计学意义(图 2)。



注:与 C 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$;与 H 组比较, ^c $P < 0.01$

图 2 四组小鼠随机血糖浓度变化的比较

OGTT HS 组血糖浓度明显高于 C 组 ($P < 0.05$)。H 组血糖浓度在 OGTT 后 45、60、90、120 min 明显高于 C 组 ($P < 0.05$)。HS 组和 H 组血糖浓度在 OGTT 后 120 min 明显高于 0 min ($P < 0.05$) (图 3)。



注:与 C 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 3 四组小鼠 OGTT 后血糖浓度的比较

血甘油三酯、胆固醇、HDL 和 LDL 第 24 周四组血甘油三酯、LDL 浓度差异无统计学意义;H 组血总胆固醇、HDL 浓度明显高于 HS、S、C ($P < 0.05$) (表 1)。

HOMA-IR 第 4 周 H 组血浆胰岛素浓度明显高于 C 组 ($P < 0.01$), 两组空腹血糖浓度差异无统计学意义, H 组 HOMA-IR 明显高于 C 组 ($P < 0.01$);第 24 周 HS 组与 H 组血浆胰岛素、空腹血

糖浓度和 HOMA-IR 均明显高于 C 组 ($P < 0.05$); HS 组空腹血糖浓度、HOMA-IR 明显高于 H 组 ($P < 0.01$) (表 2, 3)。

机械痛阈 自第 16 周起 HS 组机械痛阈明显低于 C 组 ($P < 0.05$), H、S、C 组差异无统计学意义 (图 4)。

IENFD 用 MOTIC 软件沿着表皮长度画线测量表皮长度, 可见表皮真皮分界明显, 真皮层有汗腺分布 (图 5)。PGP 9.5 标记下可见小鼠足底受到丰富的神经纤维支配, 其中 C 组、S 组皮下神经纤维走行清晰, 粗细均匀; H 组、HS 组皮下神经纤维缩短, 粗细不均 (图 6)。HS 组与 H 组 IENFD 差异无统计学意义。HS 组 IENFD 明显低于 S 组和 C 组 ($P < 0.05$)。S 组与 C 组 IENFD 差异无统计学意义 (图 7)。

讨 论

目前广泛使用的 2 型糖尿病小鼠模型主要分 3 类。第 1 类是瘦素信号通路受损的转基因小鼠如 db/db, ob/ob 型, 这些小鼠第 1 个月即出现贪食发胖, 继而产生高血糖和高胰岛素的表现, 也倾向于发生神经损害, 应用价值很高, 但成本也较高^[11, 12]。第 2 类是单纯高脂饲料喂养, 这种造模方式可模拟长期的代谢紊乱, 更侧重于 2 型糖尿病前期的研究^[11]。第 3 类通过高脂饲料喂养+链脲佐菌素注射诱导糖尿病, 通常采用高脂饲料喂养产生胰岛素抵抗, 继之连续腹腔注射小剂量 STZ 以升高血糖, 成本相对转基因小鼠较低^[13]。小剂量 STZ 虽可导致血糖逐步上升, Sullivan 等^[7]和 Vincent 等^[8]的研究却均未发现小剂量 STZ 腹腔注射的糖尿病小鼠出现周围神经病变, 而 Gong 等^[14]采用大剂量 STZ (200 mg/kg) 腹腔注射的实验当中则出现了机械痛阈的明显下降, 这些结果提示周围神经病变的发生可能与血糖升高的速度有关。本实验结果显示, 单纯给予小鼠高脂饲料并不能诱导出

表 1 四组小鼠第 24 周甘油三酯、总胆固醇、HDL 和 LDL 的比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	甘油三酯	总胆固醇	HDL	LDL
HS 组	6	1.15 ± 0.84	2.93 ± 0.93 ^a	2.16 ± 0.92 ^b	0.24 ± 0.32
H 组	6	0.92 ± 0.43	4.47 ± 0.42	3.85 ± 0.63	0.57 ± 0.34
S 组	6	1.08 ± 0.60	3.20 ± 0.44 ^a	2.10 ± 0.50 ^b	0.29 ± 0.34
C 组	6	1.28 ± 0.95	3.10 ± 0.37 ^a	2.57 ± 0.30 ^b	0.31 ± 0.19

注:与 H 组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

DPN 模型,而是更偏向于 Coppey 等^[10]报道的早期糖尿病模型;高脂饲料联合 STZ 腹腔注射则成功诱导出 DPN 模型,这种差别可能是由于注射 STZ 可加速血糖上升,加速了周围神经病变的产生。

表 2 H 组和 C 组小鼠第 4 周血浆胰岛素、空腹血糖和 HOMA-IR 的比较

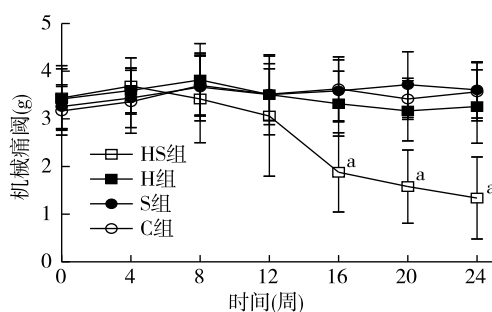
组别	只数	血浆胰岛素 (μ IU/ml)	空腹血糖 (mmol/L)	HOMA-IR
H 组	12	9.79 $\pm$ 1.00 ^a	8.42 $\pm$ 1.78	3.68 $\pm$ 1.00 ^a
C 组	12	7.83 $\pm$ 0.85	7.68 $\pm$ 1.06	2.68 $\pm$ 0.55

注:与 C 组比较,^a P <0.01

表 3 四组小鼠第 24 周血浆胰岛素、空腹血糖浓度和 HOMA-IR 的比较

组别	只数	血浆胰岛素 (μ IU/ml)	空腹血糖 (mmol/L)	HOMA-IR
HS 组	6	9.23 $\pm$ 1.11 ^a	19.25 $\pm$ 2.44 ^{bc}	7.82 $\pm$ 0.68 ^{bc}
H 组	6	10.35 $\pm$ 1.23 ^b	12.7 $\pm$ 0.82 ^b	5.83 $\pm$ 0.72 ^b
S 组	6	7.88 $\pm$ 0.35	7.15 $\pm$ 1.15	2.51 $\pm$ 0.44
C 组	6	7.12 $\pm$ 1.03	7.75 $\pm$ 0.91	2.44 $\pm$ 0.37

注:与 C 组比较,^a P <0.05,^b P <0.01,与 H 组比较,^c P <0.01



注:与 C 组比较,^a P <0.05

图 4 四组小鼠 0~24 周机械痛阈变化的比较

皮下神经纤维是背根神经节小神经元的末端,在穿越表皮-真皮屏障的同时失去了施旺细胞的包绕,可通过对远端肢体的皮下神经纤维进行蛋白基因产物 9.5 免疫组织化学染色观察并计算 IENFD,从而在早期诊断 DPN^[15]。Yorek 等^[16]发现,HFD+低剂量 STZ 连续注射可导致 IENFD 出现下降;本实验结果显示,高脂饲料联合中等剂量 STZ 单次腹腔注射的小鼠出现了 DPN 症状的同时也可合并 IENFD 下降,该方法与连续 STZ 注射相比更加

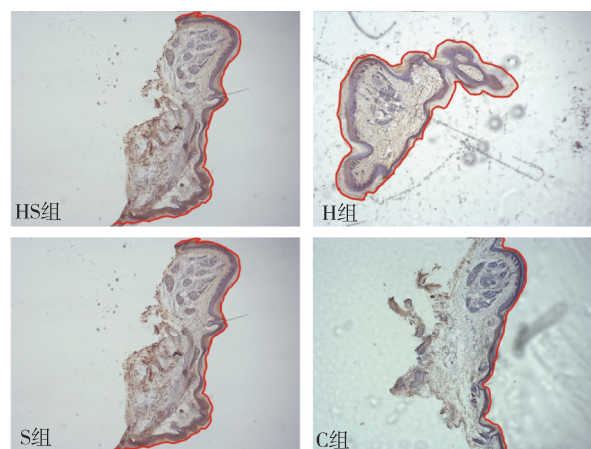
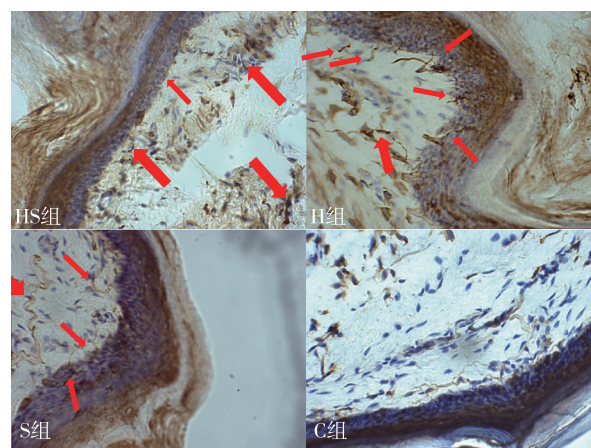
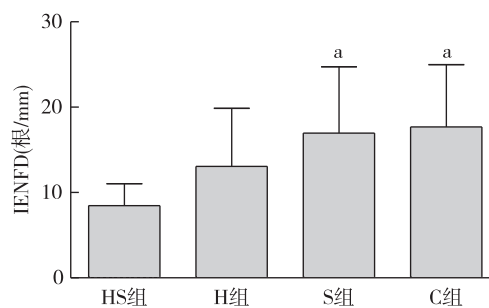


图 5 四组小鼠足底皮肤 PGP9.5 免疫组织化学染色 ($\times 40$)



注:细箭头示皮下神经纤维分布,粗箭头示真皮层神经丛分布

图 6 四组小鼠足底皮肤 PGP9.5 免疫组织化学染色 ($\times 400$)



注:与 HS 组比较,^a P <0.05

图 7 第 24 周四组小鼠 IENFD 的比较

简便。国内研究表明,IENFD 可在糖尿病早期患者当中出现下降^[17,18],而本实验 H 组 IENFD 的下降程度与其余三组相比均无统计学意义,其在不同的

糖尿病动物模型当中的变化还有待进一步探讨,一种可能的解释为 IENFD 与 DPN 的严重程度相关^[15]。本实验中 H 组机械痛阈下降并不显著,并未表现出严重的 DPN 症状,因此 IENFD 并未降低。另外,虽然 HS 组与 H 组形态学均发生了改变,但目前尚无一个统一的标准能够将描述性质的形态学转化为定量指标,有待进一步探索。

本研究中小鼠模型仍有一定的局限性:(1)不适用于需要收集大量血液样本的情况。(2)使用 STZ 加速血糖浓度上升,跳过了 2 型糖尿病前期。研究者应根据自身研究情况选择合适的动物模型。

综上所述,本实验通过高脂饲料喂养联合中等剂量 STZ 成功建立了 2 型糖尿病周围神经病变小鼠模型并且发现该模型中 IENFD 出现明显下降。单纯高脂饲料喂养 24 周可制成早期糖尿病模型,而在该模型中 IENFD 并未下降,可能与该组并未表现出严重的 DPN 症状有关,具体原因有待进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103(2): 137-149.
- [2] Lee CM, Chang CC, Pan MY, et al. Insufficient early detection of peripheral neurovasculopathy and associated factors in rural diabetes residents of Taiwan: a cross-sectional study. *BMC Endocr Disord*, 2014, 14: 89.
- [3] Davidson EP, Coppey LJ, Kardon RH, et al. Differences and similarities in development of corneal nerve damage and peripheral neuropathy and in diet-induced obesity and type 2 diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(3): 1222-1230.
- [4] Yorek MS, Coppey LJ, Shevalye H, et al. Effect of treatment with salsalate, menhaden oil, combination of salsalate and menhaden oil, or resolvin D1 of C57Bl/6J type 1 diabetic mouse on neuropathic endpoints. *J Nutr Metab*, 2016, 2016: 5905891.
- [5] Ventura-Sobrevilla J, Boone-Villa VD, Aguilar CN, et al. Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proc West Pharmacol Soc*, 2011, 54: 5-9.
- [6] Korngut L, Ma CH, Martinez JA, et al. Overexpression of human HSP27 protects sensory neurons from diabetes. *Neurobiol Dis*, 2012, 47(3): 436-443.
- [7] Sullivan KA, Hayes JM, Wiggin TD, et al. Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis*, 2007, 28(3): 276-285.
- [8] Vincent AM, Russell JW, Sullivan KA, et al. SOD2 protects neurons from injury in cell culture and animal models of diabetic neuropathy. *Exp Neurol*, 2007, 208(2): 216-227.
- [9] Watcho P, Stavnichuk R, Ribnick DM, et al. High-fat diet-induced neuropathy of prediabetes and obesity: effect of PMI-5011, an ethanolic extract of *Artemisia dracuncululus* L. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 268547.
- [10] Coppey L, Davidson E, Lu B, et al. Vasoepitidase inhibitor ilepatril (AVE7688) prevents obesity-and diabetes-induced neuropathy in C57Bl/6J mice. *Neuropharmacology*, 2011, 60(2-3): 259-266.
- [11] O'brien PD, Sakowski SA, Feldman EL. Mouse models of diabetic neuropathy. *ILAR J*, 2014, 54(3): 259-272.
- [12] 田婷. 2 型糖尿病动物模型研究概况. *医学综述*, 2011, 17(6): 905-908.
- [13] 刘芳, 杨华, 周文江, 等. 诱发性 2 型糖尿病小鼠模型与自发性 db/db 小鼠特性的比较. *中国实验动物学报*, 2014, (6): 54-59, 74.
- [14] Gong Q, Lu Z, Huang Q, et al. Altered microRNAs expression profiling in mice with diabetic neuropathic pain. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(2): 615-620.
- [15] Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care*, 2010, 33(10): 2285-2293.
- [16] Yorek MS, Obrosova A, Shevalye H, et al. Early vs. late intervention of high fat/low dose streptozotocin treated C57Bl/6J mice with enalapril, alpha-lipoic acid, menhaden oil or their combination: Effect on diabetic neuropathy related endpoints. *Neuropharmacology*, 2017, 116: 122-131.
- [17] 刘泽洪, 刘向红, 王海丽. 糖尿病皮肤小纤维神经病变 30 例临床分析. *中国老年学杂志*, 2012, 32(12): 2587-2588.
- [18] 戚秋藤, 宋雷凤. 表皮神经纤维密度在糖尿病无神经性周围神经病中的应用价值. *黑龙江医学*, 2012, 36(5): 321-323.

(收稿日期:2016-11-12)