

糖尿病周围神经病变大鼠模型制作的实验研究^{*}

屈 璐¹, 侯胜开¹, 高楠楠¹, 潘艳伶^{2*}

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 建立 2 型糖尿病周围神经病变(DPN)大鼠模型。方法: SD 大鼠 40 只分为对照组(10 只)和模型组(30 只),模型组予高脂高糖饲料喂养及 2~3 次小剂量腹腔注射 1% 的链脲佐菌素(STZ)建立糖尿病(DM)动物模型,对照组给予普通饲料喂养并注射同等剂量生理盐水,模型组中 DPN 造模成功的作为 DPN 组,DPN 造模不成功但 DM 造模成功的作为 DM 组;于实验第 14 周后,检测大鼠坐骨神经动作电位传导速度、血清神经生长因子(NGF)水平及坐骨神经病理形态学变化。结果: 30 只大鼠中 DM 成模 24 只,其中 15 只大鼠并发 DPN,DPN 成模率 62.5%;与对照组相比,DPN 组大鼠坐骨神经动作电位传导速度、血清 NGF 含量均明显降低($P < 0.05$);与 DM 组相比,DPN 组大鼠血清 NGF 含量明显降低($P < 0.05$)。结论: 高脂高糖饮食联合腹腔注射 STZ 可成功制作 DPN 大鼠模型,其机制与大鼠血清 NGF 水平降低有关。

[关键词] 糖尿病,非胰岛素依赖型;周围神经病;坐骨神经;模型,动物;大鼠,Sprague-Dawley

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)01-0060-04

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.01.013

Experimental Study on Production of Diabetic Peripheral Neuropathy Model Rats

QU Lu¹, HOU Shengkai¹, GAO Nannan¹, PAN Yanling²

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To establish Type II diabetic peripheral neuropathy model of rats. **Methods:** 40 SD rats were divided into normal control group (Group A, 10) and model group (Group B, 30); Group B fed with high fat and sugar diet. Giving Group B 2 to 3 times of small dose of intraperitoneal injection of 1% STZ concentration and use self-made mold to form the diabetes model. Group A fed with normal diet and equal amount of saline water. Group B DPN model was established successfully and then used as DPN group; DPN modeling failed ones but DM modeling succeed ones were used as DM group. 14 weeks later, rats' sciatic potential conduction velocity, NGF and sciatic pathomorphology was tested. **Results:** Out of 30 rats, 24 succeeded in DM modeling, 15 rats were complicated by DPN, DPN modeling success rate was 62.5%; comparing with control group, rats' sciatic potential conduction velocity and NGF of DPN group decreased significantly ($P < 0.05$); comparing with DM group, NGF content of DPN group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** The method can successfully induce the establishment of type 2 diabetic peripheral neuropathy model, the mechanism is correlated with rats' serum NGF level decrease.

[Key words] diabetes mellitus, non-insulin dependent; peripheral neuropathy; sciatic nerve; model, animal; rats, Sprague-Dawley

*[基金项目] 贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字(2009)2192 号]

* * 通信作者 E-mail:1092175568@qq.com

网络出版时间:2017-01-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170117.1807.001.html>

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是指排除其他原因后,糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者存在因为周围神经功能障碍引起的肢体远端及躯干部分麻木、疼痛、异样感,呈袜子样或手套样,甚至肌肉萎缩^[1]。DPN 是糖尿病最常见的并发症之一,具有病情多变、发病率高等特点^[2],对患者生存质量和寿命构成严重威胁,并造成巨大经济和社会负担。目前,DPN 的发病机制仍不十分明确,关于 DPN 的防治仍需要进行大量深入研究,建立与人类 DPN 疾病过程相似的动物模型是研究的基础。本实验组从中医学角度出发,采用化学诱导法诱导建立 DPN 大鼠模型,并探讨其可行性及安全性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 40 只,体重(200 ± 20)g,由贵州医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCKK(黔)2012-0001。

1.2 主要仪器与试剂

稳豪型血糖仪和血糖试纸(德国罗氏),链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma),BL-420F 生理记录仪(成都泰盟),大鼠神经生长因子(NGF)ELISA 检测试剂盒(货号 CK-E30643R)等。

1.3 方法

1.3.1 分组 10 只大鼠为对照组,模型组 30 只;将模型组的 30 只大鼠用于 DM 模型及 DPN 模型制备,DPN 造模成功大鼠作为 DPN 组,DPN 造模不成功但 DM 造模成功大鼠作为 DM 组,剔除 DM 模型失败大鼠。

1.3.2 DM 模型制备 普通饲料适应性喂养 1 周后,予模型组大鼠高脂高糖饲料喂养 1 周(饲料配方为普通饲料 64.9%、炼猪油 10%、蔗糖 20%、蛋黄 5%、食盐 0.1%,于第 3 周开始使用 STZ 造模。用 0.1 mmol/L 无菌柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5, 4℃),将 STZ 配成 0.1% 的溶液,第 1 次按 20 mg/kg 予腹腔注射,第 2、3 次均按 30 mg/kg 予腹腔注射,每次注射间隔 4~5 d,第 4 周末完成全部 STZ 注射。每次注射 72 h 后取尾静脉血检测空腹血糖,大鼠血糖值 ≥ 16.7 mmol/L^[3],且连续 3 d 血糖值稳定,则判定为 DM 模型成功,血糖值未达标者进行下一次注射,3 次注射后血糖值均未达标者,

判定模型失败,予以剔除。DM 模型成功后,模型组大鼠改为普通饲料喂养;对照组大鼠一直普通饲料喂养,同期腹腔注射等量生理盐水。

1.3.3 DPN 模型制备 将模型组大鼠放入自制模具内俯卧位固定,充分暴露腰背部及双下肢,将冷冻好的干冰袋(规格 400 mL,12 × 20 cm)沿大鼠坐骨神经解剖位置,分别放置于大鼠腰骶部及双侧下肢进行冰敷,30 min/次,1 次/d,连续放置两周后,改为隔天冰敷 1 次至实验结束,第 12 周末,检测大鼠坐骨神经动作电位传导速度及病理形态学改变,出现坐骨神经功能减退及病理改变,则判定 DPN 模型成功^[4]。

1.4 指标采集及检测

1.4.1 坐骨神经动作电位传导速度 第 12 周末,10%水合氯醛 2 mL/kg 腹腔注射麻醉大鼠,俯卧位固定,钝性分离并暴露左侧坐骨神经,采用 BL-420F 生理记录仪记录坐骨神经干动作电位传导速度。

1.4.2 血清 NGF 检测 麻醉大鼠,取大鼠股动脉血 2 mL 离心(3 000 r/min,4℃)后取血清,ELISA 试剂盒检测 NGF。

1.4.3 坐骨神经形态学观察 麻醉处死大鼠,分离大鼠右侧坐骨神经,迅速放入 20% 福尔马林液中固定 72 h 后,石蜡包埋切片,HE 染色后光镜观察。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学分析软件进行数据分析,定量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DM、DPN 大鼠成模率及死亡率

模型组大鼠 30 只,注射 STZ 后大鼠死亡 3 只,死亡率 10%,DM 成模 24 只,成模率 80%,经检测,15 只大鼠并发 DPN 纳入 DPN 组,成模率 62.5%,其余 9 只 DM 成模大鼠作为 DM 组。

2.2 血糖

各组大鼠第 1 周空腹血糖检测结果差异无统计学意义($P > 0.05$),造模成功后,DM 组、DPN 组空腹血糖值均明显高于对照组($P < 0.05$),见表 2。

表 1 各组大鼠血糖水平 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Blood glucose level of all the groups

组别	n	第 1 周	第 4 周	第 12 周
对照组	10	5.61 ± 0.59	5.72 ± 0.43	5.68 ± 0.57
DM 组	9	5.89 ± 0.63	17.76 ± 6.32 ⁽¹⁾	22.87 ± 5.31 ⁽¹⁾
DPN 组	15	5.96 ± 0.78	26.16 ± 3.73 ⁽¹⁾⁽²⁾	31.14 ± 2.3 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 DM 组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 坐骨神经动作电位传导速度及血清 NGF

第 12 周末,与对照组相比,DPN 组大鼠坐骨神经动作电位传导速度、血清 NGF 含量均明显降低 ($P < 0.05$);与 DM 组相比,DPN 组大鼠血清 NGF 含量明显降低 ($P < 0.05$);DM 组与对照组两指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

2.4 坐骨神经显微镜观察

对照组坐骨神经切面可见神经组织结构正常,神经纤维排列规则整齐,雪旺细胞、髓鞘、轴索结构完整清晰,神经束膜组织结构正常;显微镜下 DM

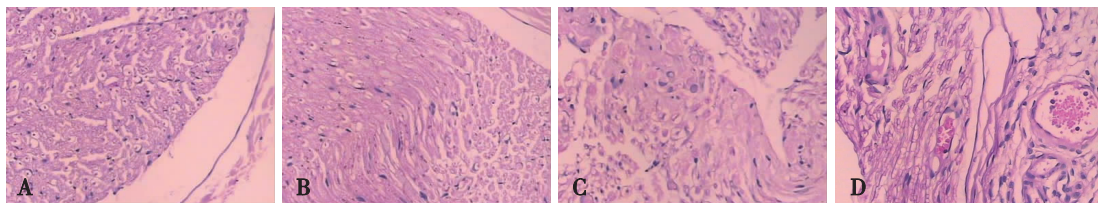
表 2 各组大鼠神经动作电位传导速度、血清 NGF 测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Sciatic potential conduction velocity and serum NGF test result of all the groups

组别	n	动作电位传导速度 (m/s)	血清 NGF (ng/L)
对照组	10	29.8 ± 28.32	219.99 ± 24.00
DM 组	9	23.89 ± 16.18	181.92 ± 17.04
DPN 组	15	10.4 ± 2.46 ⁽¹⁾	97.88 ± 7.43 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 DM 组比较, $P < 0.05$

组大鼠坐骨神经结构与对照组形态学检测结果相似。DPN 组大鼠坐骨神经纤维排列紊乱,雪旺细胞减少、形态不规则、部分退变、排列紊乱;髓鞘形态不规则且有不同程度增宽(水肿),郎飞结组织结构不清;轴突形态不规则,粗细不等及连续性中断,神经束膜血管扩张充血,并伴有炎细胞浸润,见图 1。



注:A 为对照组,B 为 DM 组,C、D 为 DPN 组

图 1 各组大鼠坐骨神经光镜下观察 (HE, ×200)

Fig. 1 Sciatic observation under light microscope of all the groups

3 讨论

DPN 在祖国医学中并未明确归类,但相关病例可见于诸多文献记载。《灵枢·五变第四十六》有“血脉不行…故为消瘴”的精辟论述。元代朱丹溪的《丹溪心法》云:“肾虚受之,腿膝枯细,骨节烦疼”。清代《王旭高医案》曰:“消渴日久,但见手足麻木,肢冷如冰”。这些记载都描述了 DPN 具有凉、麻、痛、痿等特点,可将其归入中医学“消渴痹症”范畴^[5]。其基本病机特征为本虚标实,是在糖尿病气阴虚损的基础上,或因阴津耗损,气血不足,筋脉失养,“不荣”而致;或因阴损及阳,寒凝血瘀,经脉痹阻,“不通”而发^[6]。

基于以上认识,本实验先采用高能量饮食配合小剂量多次腹腔 STZ 溶液诱导建立糖尿病大鼠模型,再配合自制模具使糖尿病大鼠以固定姿势进行冰敷。当糖尿病大鼠双下肢长时间处于低温刺激

时,血管将发生痉挛,血液流量因此减少,导致局部细胞组织缺血缺氧而受损,即为“不荣”;保持固定姿势并使用冰袋压迫,则可能造成局部静脉血管受压,血液回流受阻,致使局部组织血管内血液淤积,经脉痹阻,即为“不通”。

实验结果显示,在 DM 造模成功 8 周后,模型组已有 62.5% 的大鼠出现神经动作电位传导速度、血 NGF 含量明显降低 ($P < 0.05$),并伴有坐骨神经病理形态学变化。这说明本实验造模方法诱导的 DM 大鼠模型可进展为 DPN,与类似研究结果相比较,本实验在一定程度上,减少了造模成本及成模周期,可以建立成模率较高、死亡率低的稳定动物模型^[3-4,7-12]。但进行大批量实验模型制作时可能耗费较多人力,而且,实验人员在冰敷时需要做好自身防护措施,防止大鼠挣脱伤人。

此外,在实验过程中发现,与对照组、DM 组相比,DPN 组大鼠空腹血糖值较高 ($P < 0.05$),说明 DPN 大鼠的血糖异常度较高。在外观上,DPN 大

鼠普遍体型较瘦小、毛色杂乱发黄、脱毛严重,四肢及尾部可见多处程度不一溃瘍面,并表现出同等刺激下(针刺尾尖)对外界反应较迟钝,抓拿时体表及四肢末梢温度较低等现象,部分大鼠出现跛行。这说明,DPN 大鼠较其他大鼠可能存在外观、反应、行动等方面的区别,但因本实验样本量较小,不能予以明确结论,尚需进一步研究证实。

4 参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 [M]. 北京:北京医科大学出版社, 2007:33.
- [2] 陆祖谦,丁维. 糖尿病周围神经病变诊治进展[J]. 药品评价杂志, 2013(17):35-45.
- [3] 郑全喜,王昆,刘超. 白薇煎对糖尿病神经病变大鼠脊神经致痛通道蛋白的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014(14):145-149.
- [4] 殷娟,张明红,杨红英. 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[J]. 国际检验医学杂志, 2013(1):1-5.
- [5] 庞国明,闫镛,朱璞,等. 糖尿病周围神经病变中医诊疗规范初稿[J]. 中华中医药杂志, 2010(2):260-264.
- [6] 潘艳伶,凌湘力. 糖通饮治疗糖尿病周围神经病变临床观察[J]. 时珍国医国药杂志, 2009(11):2828-2829.
- [7] 戴红,邹小娟,赵厚睿,等. 不同 STZ 剂量造模对 2 型糖尿病动物模型证候属性影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2015(3):751-755.
- [8] Nikooie R, Rajabi H, Gharakhanlu R, et al. PPAR's and Diosgenin a chiemico biological insinght in NIDDM[J]. Chiemico Biological Inetactions, 2013 (2):403-410.
- [9] 管志敏,柏晓辉,屈璐,等. 小剂量多次腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病肾病大鼠模型[J]. 贵阳医学院学报, 2016(1):54-55.
- [10] 吴庆秋,杜贞,何兰杰. 2 型糖尿病大鼠周围神经病变的观察[J]. 宁夏医学杂志, 2011 (4):294-297.
- [11] 杨薇,吴江,孙世博,等. 实验性糖尿病大鼠坐骨神经病理形态学的动态变化[J]. 中风与神经病杂志, 2010 (10):304-306.
- [12] 高志峰,冯艺,糊辉,等. 神经生长因子在糖尿病神经病理疼痛大鼠脊髓和背根神经节中的表达[J]. 临床麻醉学杂志, 2009(2):147-150.
- (2016-10-26 收稿,2016-12-04 修回)
- 中文编辑:周 凌;英文编辑:赵 毅

- (上接第 55 页)
- [10] 王敏,姚钧兰,熊安秀,等. 褪黑素对哮喘小鼠 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 淋巴细胞的影响及抗感染作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2008(4):298-300.
- [11] 王敏,李蓓,王雅琴. 褪黑素对哮喘小鼠转化生长因子- β 的影响及其对气道重构的作用[J]. 现代免疫学, 2015(15):418-420.
- [12] Huang SH, Cao XJ, Wei W. Melatonin decreases TLR3-mediated inflammatory factor expression via inhibition of NF-kappa B activation in respiratory syncytial virus-infected RAW264. 7 macrophages [J]. J Pineal Res, 2008 (1):93-100.
- [13] Oh H, Ghosh S. NF- κ B roles and regulation in different CD4⁺ T cell subsets[J]. Immunol Rev, 2013 (1):41-51.
- (2016-10-30 收稿,2016-12-07 修回)
- 中文编辑:周 凌;英文编辑:苏晓庆

- (上接第 59 页)
- [10] Rivaid CH, Chaput C, Rhalmi S, et al. Bio-absorbable synthetic polyesters and tissue Regeneration: A study of three dimensional proliferation of ovine chond-rocytes and osteoblastes[J]. Ann Chir, 1998 (8):651-653.
- [11] Speechia N, Pagnotta A, Greco E. Can porosity influence the ostroconductive properties ofsynthetic hydroxyapatite [J]. Bioceramics, 2000(3):355-358.
- [12] Bacsich P, Whbum GM. The significance of the mucopro-tein content on the Survival of homografts of cartilage and cotnea[J]. Proc Roy Soc Edinb B, 1997 (62):321-329.
- [13] Chung C, Mesa J, Miller GJ, et al. Effects of auricular chondrocyte expansion on neocartilage formation in photocrosslinked hyaluronic acid networks[J]. Tissue Engineering, 2006(12):2665-2673.
- (2016-11-02 收稿,2016-12-21 修回)
- 中文编辑:周 凌;英文编辑:周 凌