



糖尿病足神经病变动物模型研究进展

李丹, 陈龙菊*

(湖北民族学院医学院解剖学教研室, 湖北 恩施 445000)

【摘要】 糖尿病足属于糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN), 是以周围神经功能障碍为其特点。探讨该疾病的有效动物模型, 可以更深入了解其发生和发展规律、发病机制、预防及治疗措施。因此, 在研究疾病的诊断、预防和治疗过程中, 合理构建动物模型至关重要。迄今为止, 大鼠、小鼠、裸鼠、转基因鼠等均被尝试作为糖尿病足神经病变模型研究的实验动物。通过不同的方式, 如缺血再灌注、切除或结扎神经、烫伤等造成神经损伤来建模。本文就糖尿病足神经病变动物模型的研究进展作一综述。

【关键词】 糖尿病足; 动物模型; 神经病变; 发病机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0128-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.020

Advances in research of animal models of diabetic foot neuropathy

LI Dan, CHEN Longju*

(Department of Anatomy, Medical College of Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China)

Corresponding author: CHEN Longju. E-mail: clj1028@163.com

【Abstract】 Diabetic foot with diabetic peripheral neuropathy (DPN) can lead to peripheral nerve dysfunction. Exploring appropriate animal models of the disease can make a better understanding of the occurrence, development, pathogenesis, prevention and treatment of DPN. Therefore, a reasonable construction of animal models is related to the success of experimental research. Up to date, experimental animals used in the research of diabetic foot neuropathy include rats, nude mice, transgenic mice, and so on. Nerve injury models can be generated by different means, such as ischemia reperfusion, resection or ligation of nerves and scalds. This article will review the recent research progress of diabetic foot neuropathy animal models.

【Key words】 diabetic foot; animal model; peripheral neuropathy; pathogenesis

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

糖尿病基础上并发神经病变导致的糖尿病足是糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)中的一种, 受损的神经包括运动神经、感觉神经和自主神经。在排除其他因素的情况下, 糖尿病晚期患者常出现痛觉或温度觉异常、神经传导功能下降等神经功能障碍方面的症状和体征。DPN的临床表现随累及部位不同而表现各异^[1], 累及运动神经时则可造成足部畸形; 累及感觉神经则可造

成如麻木、灼痛或放射性疼痛等感觉异常; 累及自主神经则表现为肢端皮肤少汗或无汗、皮肤皲裂。上述神经受损可导致患者足部对外界感觉迟钝, 进而失去自我保护, 更严重的是产生感染^[1]、神经性溃疡^[2]等病变。糖尿病足神经病变带给患者的危害远远超过糖尿病本身, 尽管糖尿病足神经病变的临床研究已经积累了大量的治疗经验, 但治疗机制尚需进一步明确。基于动物模型的基础研究能够更好

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(No. 81260192)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(No. 81260192)。

【作者简介】 李丹(1992-), 女, 硕士生, 研究方向: 中医药防治糖尿病周围神经损伤。E-mail: ldbetterme@163.com

【通信作者】 陈龙菊, 女, 博士, 硕士生导师, 主要从事中西医结合防治周围神经损伤。Email: clj1028@163.com

的了解疾病的发生和发展规律。因此,在研究疾病的诊断、预防和治疗过程中,合理构建动物模型关乎实验研究的成败。本文将从 DPN 的发病机制、动物模型的构建方法以及造模成功标准三方面进行综述,旨在为 DPN 的实验研究提供参考。

1 DPN 的发病机制

1.1 高血糖

DPN 的发生和发展很大程度上归因于高血糖^[3],高血糖能引起脂质和糖基化修饰蛋白质直接损伤神经细胞,而且,蛋白质的氨基与糖的醛基发生非酶促化反应的终产物即为糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)的受体可激活炎症信号通路,使损伤进一步加重^[4-5]。生理条件下,神经组织中蛋白质的非酶促反应处于正常水平,AGEs 生成的速度极为缓慢,当机体罹患糖尿病时,可导致血糖持续处于高水平状态,大量的 AGEs 迅速产生。AGEs 与糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGEs)结合所导致的副作用,不仅是髓鞘的完整性遭到破坏,神经组织的微管蛋白以及微管系统的结构和功能也会受到影响,进而使得周围神经不能较好地得到细胞内基质蛋白的营养作用而受到损害。此外,AGEs 与 RAGEs 相互作用直接或间接地导致糖尿病慢性微血管内皮细胞功能紊乱和损伤,使神经组织处于缺氧、缺血状态,继而引起一系列不良反应。高血糖状态破坏了神经细胞正常生长所需的微环境,如果这种状态不加以调整,神经功能的恢复只能是空谈。因此,在治疗糖尿病足时,降糖处理尤为重要。

1.2 氧化应激

多元醇信号通路如被激活,则可引起高渗性损伤和氧化应激^[6]。在生理状态下,体内绝大多数葡萄糖通过有氧氧化和糖酵解途径被机体代谢。长期高血糖会激活葡萄糖的多元醇途径^[7](葡萄糖的旁路代谢)。醛糖还原酶(aldose reductase, AR)和山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SDH)是多元醇通路的两个关键酶。葡萄糖经 AR 催化为山梨醇,后者再经 SDH 催化生成果糖,然而果糖激酶不存在于神经组织内,因而果糖不能被进一步分解,进而致山梨醇和果糖大量堆积,使细胞内渗透压升高,导致神经细胞肿胀、变性甚至坏死,最后出现神经节段性脱髓鞘改变,神经传导速率减慢。另一方面,还原型辅酶 II(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,

NADPH)是葡萄糖经 AR 催化生成山梨醇过程中的辅酶,NADPH 的耗损导致谷胱甘肽含量下降或者 NO 合成减少,其结果是产生大量自由基和血管收缩而引起血流量降低。其中氧自由基(oxygen free radical, OFR)通过过氧化损伤破坏细胞膜的结构和功能,破坏线粒体,断绝细胞的能源,毁坏溶酶体,使细胞自溶。而且,糖尿病所致的高血糖状态下,使机体清除自由基的能力降低,OFR 大量增加,可激活 caspase-3 介导的细胞凋亡途径,加速神经元的凋亡。因而氧化应激在 DPN 的进展中发挥着重要作用^[8]。与单纯的高血糖状态相比,不论是多元醇通路的激活还是多元醇途径引起的氧化应激都会直接导致神经元的死亡。

1.3 线粒体功能障碍

线粒体功能障碍^[9-11]产生氧自由基增多、内质网应激^[12]等。线粒体是真核生物直接利用氧气,也是糖类最终氧化释放能量的场所,近 90% 吸入体内的氧气被线粒体消耗掉。若线粒体功能障碍,其消耗氧的能力减退,产生氧自由基增多或大量电子会过早地还原氧气,形成超氧化物等活性氧(superoxide and other reactive oxygen species, ROS),这种高活性分子能引起氧化应激^[13]进一步损害线粒体的功能。内质网损伤和内质网应激损害了细胞的代谢、转录调控和基因表达。线粒体功能障碍^[14]的特点是降低 ATP 合酶活性,减少电子传递链活动,并增加无效原氮循环。能量障碍的特点是减少糖酵解的储备,减少糖酵解能力,并增加非糖酵解酸化。总而言之,线粒体功能障碍会进一步加重糖代谢的异常以及氧化应激反应带给机体的损伤。

1.4 代谢异常

血脂异常^[10]生成的氧化型胆固醇以及氧化和糖基化脂类介质可引起氧化应激,并能激活炎症信号通路。另外,代谢性炎症^[15]、神经炎症^[16]、神经滋养血管病变^[17-18]、胰岛素抵抗^[19]、神经营养因子^[20]均参与 DPN 的发生发展的过程中。

2 模型制作

2.1 缺血再灌注

Muthuraman 等^[21]认为中度缺血再灌注损伤模型可模拟糖尿病严重疼痛障碍的相关症状。造模方法如下:SD 大鼠麻醉后腹腔注射氯胺酮(50 mg/kg)和甲苯噻嗪(5 mg/kg)。行右侧腹股沟切口暴露股血管,在手术显微镜下游离出股神经,找到附近的坐

骨神经,使用 6-0 的丝线运用活结技术结扎股动脉,4 h 后解去结扎,造成坐骨神经的缺血再灌注模型。感觉行为测试显示,爪和尾部的温度觉和痛觉过敏分别表现出外周和中枢神经并发神经病变所致糖尿病足的临床症状。该模型只是对坐骨神经造成暂时缺血的状态,神经的连续性依然完整,这有利于神经保护药物的研究。

2.2 神经切除法

Shu 等^[22]认为失神经支配的皮肤可能会导致糖尿病足溃疡,于是采用神经切除的方法造成皮肤失去神经支配。研究者选择裸小鼠作为实验动物,切断 T9-L1 段神经根。待动物苏醒后,用针头刺激伤口部位。若小鼠无任何响应,指示神经切除成功。该方法使用的裸鼠为 1~3 日龄的小鼠或 6~8 周龄 BALB/c 小鼠,手术造模技术要求较高。该模型适用于糖尿病动物的神经损伤修复和神经再生方面的研究。

2.3 神经结扎法

Kale 等^[23]采取结扎神经的方法建立糖尿病神经病变模型,选择 SD 大鼠,在链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导糖尿病基础上,手术分离坐骨神经后结扎,使后肢发生溃疡坏疽。该模型可评价多层次减压对于 DPN 的治疗效果。该方法使大鼠长时间保持在高血糖状态,是较为理想的研究糖尿病足神经病变的模型。

2.4 神经挤压法

Thipkaew 等^[24]由 STZ 诱发雄性 Wistar 大鼠糖尿病,之后手术分离坐骨神经,用止血钳对其造成挤压伤,从而诱导神经损伤。该模型对大鼠伤害较小且成模时间短,考虑到经济效益可选用此模型。

2.5 烫伤法

Xia 等^[25]由 STZ 诱发雄性 SD 大鼠糖尿病建立糖尿病足溃疡模型,之后在背后足的左侧做了一个 4 cm × 4 cm 烧伤,从而达到损伤神经的目的。该模型采用烫伤的办法,不仅能导致神经病变,还可能导致血管病变或产生感染,因而不好控制。

2.6 单纯 STZ 诱导法

Jolivalt 等^[26]采用注射 STZ 诱导糖尿病的方法,选择 C57BL/6 小鼠。5 个月后,小鼠表现出明显的运动和感觉神经传导速度减慢,热痛觉、触觉异常的神经病变症状。该模型制作方法简单易于操作,虽耗时但在研究糖尿病周围神经病变的长效治疗方面有潜在价值。也有学者^[27]选用产后 3 d 的 ICR

小鼠,通过 STZ 诱导糖尿病,4 周龄时表现出 STZ 诱发糖尿病的神经病。该模型适合 DPN 的早期症状以及药物治疗方面的研究。

2.7 转基因动物模型

研究表明^[28],瘦素缺乏的 ob/ob 小鼠可作为 2 型糖尿病小鼠模型,O'Brien 等^[29]发现 5 周 BTBR ob/ob 小鼠的炎症和免疫反应过强,可能有助于引起神经病变的产生。BTBR ob/ob 小鼠对于探讨疾病发病机制来说是个良好模型。瘦素为基础的模型有助于模拟糖尿病足神经病变,但其扰乱了瘦素信号系统所导致的后果应予以考虑,同时瘦素为基础的模型小鼠往往是不育的,因此实验研究费用相对过高。

3 DPN 造模成功标准

齐一侠^[30]和万江波^[31]认为,腹腔注射 STZ,一周后外周空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 或 16.8 mmol/L,即可认定为该糖尿病模型成功,可进行下一步实验研究。Thipkaew 等^[24]和 Sundaram 等^[32]认为大鼠空腹血糖水平为 250 mg/dL 时为糖尿病大鼠。Sapunar 等^[33]测试冷敏性、热敏性及机械性痛觉的实验研究显示动物的冷痛、热痛和触觉均减退。Muthuraman 等^[21]研究显示 DPN 大鼠的坐骨神经运动神经传导速度(motor nerve conduction velocity, MNCV)、感觉神经传导速度(sensory nerve conduction velocity, SNCV)和坐骨神经血流量(sciatic blood flow, SBF)均降低。以上诊断标准从运动神经、感觉神经及自主神经的功能方面对实验动物造模成功进行评价,与临床诊断类似,是比较理想的诊断标准。

4 结语

DPN 的发生主要由高血糖、糖基化终末产物、多元醇途径、氧化应激、线粒体功能障碍以及血脂异常等多种因素导致而成。然而笔者整理 DPN 动物模型研究进展时发现,很少有学者直接对这些因素进行干预,而是直接瞄准神经,使实验动物产生相应的神经损伤,模拟神经病变。近年来糖尿病的研究成为热点,研究新的动物模型,制定有效的治疗策略仍然是一个关键问题。尽管临床对糖尿病足神经病变的对症治疗上有一定疗效,但药物作用机制尚不清楚。能良好模拟临床病症的动物模型,将为糖尿病足神经病变的发病机制、药物作用机制及临床新

药验证等方面提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] Mandell JC, Khurana B, Smith JT, et al. Osteomyelitis of the lower extremity: pathophysiology, imaging, and classification, with an emphasis on diabetic foot infection [J]. *Emerg Radiol*, 2017 Oct 20. doi: 10.1007/s10140-017-1564-9. [Epub ahead of print]
- [2] Kim NY, Lee KY, Bai SJ, et al. Comparison of the effects of remifentanyl-based general anesthesia and popliteal nerve block on postoperative pain and hemodynamic stability in diabetic patients undergoing distal foot amputation: A retrospective observational study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95 (29): e4302.
- [3] 李玲, 臧莎莎, 宋光耀. 糖尿病足溃疡的危险因素与治疗进展 [J]. *中国全科医学*, 2013, 16(9C): 3159-3163.
Li L, Zang SS, Song GY. Risk factors and treatment of diabetic foot ulcers [J]. *Chin Gen Pract*, 2013, 16(9C): 3159-3163.
- [4] Sun LQ, Chen YY, Wang X, et al. The protective effect of alpha lipoic acid on Schwann cells exposed to constant or intermittent high glucose [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84 (7): 961-973.
- [5] Sorensen CJ, Hastings MK, Lang CE, et al. Relationship of shoulder activity and skin intrinsic fluorescence with low level shoulder pain and disability in people with type 2 diabetes [J]. *J Diab Complicat*, 2017, 31(6): 983-987.
- [6] Dias JP, Talbot S, S  n  cal J, et al. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications [J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12622.
- [7] Yagihashi S. Glucotoxic mechanisms and related therapeutic approaches [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2016:121-149.
- [8] Wu Y, Xu D, Zhu X, et al. MiR-106a is associated with diabetic peripheral neuropathy through the regulation of 12/15-LOX-mediated oxidative/nitrative stress [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2017, 14(2): 117-124(8)
- [9] Alecu I, Tedeschi A, Behler N, et al. Localization of 1-deoxysphingolipids to mitochondria induces mitochondrial dysfunction [J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(1): 42-59.
- [10] Lim TK, Rone MB, Lee S, et al. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in trauma-induced painful peripheral neuropathy [J]. *Mol Pain*. 2015, 11:58.
- [11] Fernyhough P. Mitochondrial dysfunction in diabetic neuropathy: a series of unfortunate metabolic events [J]. *Curr Diab Rep*, 2015, 15(11): 89.
- [12] Lupachyk S, Watcho P, Stavniichuk R, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a key role in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy [J]. *Diabetes*, 2013, 62 (3): 944-952.
- [13] Johar DR, Bernstein LH. Biomarkers of stress-mediated metabolic deregulation in diabetes mellitus [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 126: 222-229.
- [14] Sharafati-Chaleshtori R, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M, et al. Melatonin and human mitochondrial diseases [J]. *J Res Med Sci*, 2017, 22:2.
- [15] Ortmann KL, Chattopadhyay M. Decrease in neuroimmune activation by HSV-mediated gene transfer of TNF-  soluble receptor alleviates pain in rats with diabetic neuropathy [J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 41: 144-151.
- [16] Baum P, Kosacka J, Estrela-Lopis I, et al. The role of nerve inflammation and exogenous iron load in experimental peripheral diabetic neuropathy (PDN) [J]. *Metabolism*, 2016, 65(4): 391-405.
- [17] Duarte JV, Pereira JM, Quendera B, et al. Early disrupted neurovascular coupling and changed event level hemodynamic response function in type 2 diabetes: an fMRI study [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(10): 1671-1680.
- [18] Danigo A, Nasser M, Bessaguet F, et al. Candesartan restores pressure-induced vasodilation and prevents skin pressure ulcer formation in diabetic mice [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2015, 14: 26.
- [19] Qiu Y, Sui X, Cao S, et al. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) overexpression reduces inflammation and insulin resistance in obese mice [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(11): 932-9342
- [20] Zhao Y, Shen Z, Zhang D, et al. Ghrelin ameliorates nerve growth factor dysmetabolism and inflammation in STZ-induced diabetic rats [J]. *Metab Brain Dis*. 2017, 32(3): 903-912.
- [21] Muthuraman A, Ramesh M, Sood S. Development of animal model for vasculatic neuropathy: induction by ischemic-reperfusion in the rat femoral artery [J]. *J Neurosci Methods*, 2010, 186(2): 215-221.
- [22] Shu B, Xie JL, Xu YB, et al. Effects of skin-derived precursors on wound healing of denervated skin in a nude mouse model [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2660-2669.
- [23] Kale B, Y  ksel F, Celikz B, et al. Effect of various nerve decompression procedures on the functions of distal limbs in streptozotocin-induced diabetic rats: further optimism in diabetic neuropathy [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2003, 111 (7): 2265-2272.
- [24] Thipkaew C, Wattanathorn J, Muchimapura S. Electrospun nanofibers loaded with quercetin promote the recovery of focal entrapment neuropathy in a rat model of streptozotocin-induced diabetes[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 2017493.
- [25] Xia N, Xu JM, Zhao N, et al. Human mesenchymal stem cells improve the neurodegeneration of femoral nerve in a diabetic foot ulceration rats [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 597: 84-89.
- [26] Jolivalt CG, Rodriguez M, Wahren J, et al. Efficacy of a long-acting C-peptide analogue against peripheral neuropathy in streptozotocin-diabetic mice [J]. *Diab Obes Metab*, 2015, 17(8): 781-788.
- [27] Ariza L, Pages G, Garcia-Lareu B, et al. Experimental diabetes in neonatal mice induces early peripheral sensorimotor neuropathy [J]. *Neuroscience*, 2014, 274: 250-259.
- [28] O'Brien PD, Sakowski SA, Feldman EL. Mouse models of dia-

- betic neuropathy [J]. ILAR J, 2014, 54(3): 259–272.
- [29] O'Brien PD, Hur J, Hayes JM, et al. BTBR ob/ob mice as a novel diabetic neuropathy model: neurological characterization and gene expression analyses [J]. Neurobiol Dis, 2015, 73: 348–355.
- [30] 齐一侠, 张超, 崔世军, 等. 糖尿病后肢缺血大鼠模型的建立与评估 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 586–590 + 596.
- Qi YX, Zhang C, Cui SJ, et al. Establishment and evaluation of a diabetic rat model of hindlimb ischemia [J]. Acta Lab Anim Scient Sinica, 2015, 23(6): 586–590 + 596.
- [31] 万江波, 蔡黔, 刘毅. 皮下移植骨髓间充质干细胞修复大鼠糖尿病足溃疡 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(10): 1766–1772.
- [31] Wan JB, Cai Q, Liu Y. Subcutaneous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells for repairing diabetic foot ulcers in rats [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2013, 17(10): 1766–1772.
- [32] Sundaram B, Singhal K, Sandhir R. Anti-atherogenic effect of chromium picolinate in streptozotocin-induced experimental diabetes [J]. J Diabet, 2013, 5(1): 43–50.
- [33] Sapunar D, Vukojević K, Kostić S, et al. Attenuation of pain-related behavior evoked by injury through blockade of neuropeptide Y Y2 receptor [J]. Pain, 2011, 152(5): 1173–1181.
- [收稿日期] 2017–06–07

会讯

关于举办“实验用非人灵长类动物专业技术交流会暨非人灵长类实验动物医师岗位培训班”的通知

非人灵长类实验动物资源是推动生命科学发展、攻克人类重大疾病、保障生命健康的重要战略资源。在引领和支撑生命科学研究、生物技术创新和生物医药产业发展中发挥着不可或缺的重要作用,其战略地位受到了世界各国的普遍重视。

为了进一步加强我国非人灵长类实验动物资源培育,开发特色实验动物模型,增强相关工作人员的职业技能。以满足重大科学研究和医药产业发展的需求,提高我国科技创新能力。

中国实验动物学会将于近期举办“实验用非人灵长类动物专业技术交流会暨非人灵长类实验动物医师岗位培训班”。现将有关事项通知如下:

一、培训对象

“实验用非人灵长类动物”相关生产和使用单位的管理人员、实验技术人员和实验动物医师。

二、培训安排:

培训地点:北京京瑞国际酒店(朝阳区东三环南路 17 号)

培训时间:2018 年 4 月 9–12 日(共 4 天)

三、培训内容:

1. 实验用非人灵长类动物进出口管理;2. 实验用非人灵长类动物福利管理;3. 实验用非人灵长类动物质量检测;4. 实验用非人灵长类动物疾病防控;5. 实验用非人灵长类动物使用拓展

四、培训费用:

中国实验动物学会会员每人 1200 元,非会员 1400 元。

五、住宿安排:

北京京瑞国际酒店,协议价 440 元/间,住宿统一安排、费用自理,4 月 1 日前学会秘书处协助预定。

六、报名及联系方式:

请于 2018 年 4 月 1 日前将回执发送至邮箱 calas@cast.org.cn

电话 010–67781534 手机 13581788349 联系人:张淙