

· 论著 ·

糖尿病性脑内微小病变大鼠模型的建立及其病理学研究

张玉倩¹ 刘笑迎² 贾岩辉¹ 王群¹ 陈姝² 王长德² 曲红²

¹山东省滨州市中心医院神经内科 251700; ²上海中医药大学附属上海市中西医结合医院神经内科 200082

通信作者:刘笑迎, Email:liuxiaoying2005@126.com

【摘要】 目的 建立糖尿病性脑内微小病变大鼠模型,进一步进行病理学分析。**方法** 健康雄性 1 月龄 Wistar 大鼠 12 只,采用随机数字表法分为正常对照组($n=6$)和模型组($n=6$),参照赵宝珍改良的 2 型糖尿病模型建立方法先建立糖尿病大鼠模型,采用反复低血糖法诱导大鼠脑内微小病变的发生,饲养至 6 月龄进行大鼠头颅磁共振(MR)检查,筛选脑内微小病变个数 ≥ 6 个、且无梗死病灶或定位体征的大鼠,定义为造模成功。造模成功后对大鼠脑组织进行病理学分析,并计数镜下低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)阳性细胞数目。**结果** 与正常对照组相比,模型组血糖水平以及每 10 g 血红蛋白吸光度明显升高($t=-11.141, -38.392, P$ 均 <0.01);脑内微小病变数目增多($t=-6.104, P<0.01$)。模型组脑内微小病变的病理改变主要为神经元数目减少,神经胶质细胞增生并肿胀,部分有微出血,并且HIF-1 α 阳性表达细胞数多于正常对照组($t=-663.45, P<0.01$)。**结论** 在糖尿病大鼠模型基础上通过反复低血糖法诱导,可建立糖尿病性脑内微小病变大鼠模型,用于探究糖尿病性脑内微小病变的发病机制及治疗靶点。

【关键词】 糖尿病;脑内微小病变;大鼠

基金项目:上海市科学技术委员会中医引导类课题(16401931600);上海市虹口区卫生和计划生育委员会重点课题(虹卫 1702-05);山东省中医药管理局中医药科技发展计划项目(2017-499)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2019.02.003

Establishment and pathological studies of a rat model of intracerebral microlesions associated with diabetes Zhang Yuqian¹, Liu Xiaoying², Jia Yanhui¹, Wang Qun¹, Chen Lai², Wang Changde², Qu Hong². ¹Department of Neurology, Binzhou Central Hospital, Shandong Province, Binzhou 251700, China; ²Department of Neurology, Shanghai Integrated TCM Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China

Corresponding author: Liu Xiaoying, Email: liuxiaoying2005@126.com

【Abstract】 Objective To establish the rat model of intracerebral microlesions associated with diabetes, which was used for further pathological analysis. **Methods** A total of twelve healthy male Wistar rats were randomly divided into normal control group($n=6$) and model group($n=6$) according to random number table method. Initially, the diabetic rat model was established referring to the improved Zhao Baozhen's method. Then the intracerebral microlesions was induced by recurrent hypoglycemia, and the cranial magnetic resonance(MR) examination was performed in rats until the age of 6 months. The rats showed more than six microlesions and no infarctions in the brain were defined as successful models. Pathological analysis of brain tissue from rats was conducted and the number of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) positive cells were counted under the microscope. **Results** Compared with normal control group, blood glucose and absorbance of hemoglobin per 10 g in model group were significantly higher($t=-11.141, -38.392, P<0.01$). Moreover, the microlesions in model group were more than those in normal control group($t=-6.104, P<0.01$). The pathological changes of microlesions in model group included decreasing number of neurons, the proliferation and swelling of glial cells, as well as some microhemorrhage. The HIF-1 α positive cells in model group were more than those in normal control group($t=-663.45, P<0.01$).

Conclusion The rat model of diabetic intracerebral microlesions can be established by using the method of recurrent hypoglycemia, this model can be used to explore the pathogenesis of diabetic microlesions in the brain and potential therapeutic targets.

【Key words】 Diabetes mellitus; Intracerebral microlesion; Rat

Fund program: Science and Technology Commission Shanghai Municipality Guiding Project of TCM (16401931600); Important Project of Shanghai Hongkou District Health Commission (1702-05); Shandong Administration of Traditional Chinese Medicine Science and Technology Development Project (2017-499)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2019.02.003

脑内微小病变作为脑卒中发病的预测因子,对脑卒中中的一级预防起至关重要的作用,也因此受到学者们的广泛关注^[1]。脑内微小病变的提出源于扩大的血管周围间隙(VRS),是指在头颅MRI的T2加权(T2WI)上见到的直径3 mm以下的边缘整齐、境界清楚、不伴有周围信号改变的影像学表现^[2]。其病理改变包括脑梗死灶、陈旧性出血病灶、血管周围间隙、脱髓鞘、神经胶质化、纤维化、细胞浸润等^[3]。糖尿病作为脑卒中的常见危险因素之一,与脑内微小病变的形成关系尤其密切^[4]。糖尿病促进脑内微小病变的发病机制及病理改变暂不清楚。目前尚无脑内微小病变的动物模型,研究主要借鉴脑小血管疾病的动物模型。本研究旨在建立一个糖尿病性脑内微小病变的大鼠模型,并对其病理学改变进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 健康雄性1月龄Wistar大鼠共12只,由上海中医药大学实验动物中心提供,体质量80~90 g。采用随机数字表法分为正常对照组($n=6$)和模型组($n=6$)。

1.2 造模

1.2.1 糖尿病大鼠造模方法 参照赵宝珍等^[5]改良的2型糖尿病模型建立方法,模型组给予高脂、高糖饮食饲养后,禁食12 h(不禁水),应用电子称称取大鼠体质量,根据体质量临时配用所需1%链脲佐菌素(溶于0.1 mol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,冰浴中新鲜配制),并置于冰盒中避光保存,按30 mg/kg腹腔注射。每周断尾取血测定一次非空腹血糖值,连续2次测量血糖值均 >13.5 mmol/L定义为糖尿病模型成功。

1.2.2 糖尿病性脑内微小病变大鼠造模方法 糖尿病大鼠造模成功后每月给予低血糖诱导2次^[6]。采用胰岛素腹腔注射诱导大鼠低血糖的方法,腹腔注射短效胰岛素(生物合成人胰岛素,诺和诺德公司,50 U/kg)。以微型血糖仪断尾法测量血糖,并记录所有大鼠腹腔注射胰岛素后每隔30 min的血糖

值,直至达到目标血糖(2.0~2.64 mmol/L)。达到目标血糖后30 min再次监测血糖,并给予50%葡萄糖溶液5 ml皮下注射来终止低血糖,30 min后再次监测血糖。继续给予高脂、高糖饮食饲养。

1.3 头颅MRI筛查 饲养至6月龄对大鼠进行头颅MRI检查,以大鼠头颅MRI的T2WI上发现脑内微小病变 ≥ 6 个而无脑梗死病灶出现定义为造模成功。MRI机器型号:3T imaging system (MAGNETOM Verio; Siemens Healthcare)。采用4通道相控大鼠线圈(Chenguang Medical Technologies Co, Ltd),线圈型号:CG-MUC18-H300-AS。

1.4 脑组织准备及组织病理学评价 给予大鼠腹腔注射10%水合氯醛,过量麻醉后处死,在无菌条件下取大鼠脑组织。切取厚度为2~3 mm脑组织,置于多聚甲醛中固定48 h,石蜡包埋。冠状面连续切片(片厚4~7 μ m)。

1.4.1 HE染色 石蜡切片脱蜡后梯度乙醇水化,苏木素染色5 min,伊红染色1~2 min,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察脑组织形态。

1.4.2 免疫组化 取石蜡切片进行免疫组化检测,一抗为低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)抗体(1:100, Abcam),4 $^{\circ}$ C孵育16 h,加入广谱二抗,室温放置30 min,随后DAB显色及苏木素染核,65 $^{\circ}$ C烤箱烘干,二甲苯透明,中性树胶封片,镜下观察HIF-1 α 阳性细胞数目。

1.5 统计学处理 采用SPSS21.0统计软件进行处理。大鼠血糖水平、每10 g血红蛋白吸光度水平、脑内微小病变数目、HIF-1 α 阳性表达细胞数符合正态分布则使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐时采用 t 检验进行组间比较。不符合正态分布时采用非参数检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血糖水平比较 糖尿病大鼠模型造模成功后,继续饲养至6月龄。至该时间截点模型组非空腹血糖水平为(20.75 ± 3.42) mmol/L,正常对照组为(5.13 ± 0.32) mmol/L,模型组较正常对照组明显升

高($t = -11.141, P < 0.01$)。

2.2 每 10 g 血红蛋白吸光度 模型组为 5.3585 ± 0.1936 ,正常对照组为 1.2687 ± 0.1749 ,模型组显著高于正常对照组($t = -38.392, P < 0.01$)。

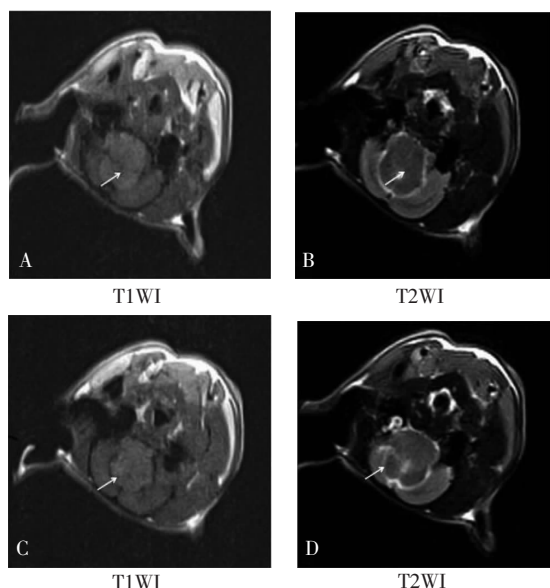
2.3 脑内微小病变数目 正常对照组及模型组均无脑梗死病灶。脑内微小病变较集中的部位为基底节和大脑皮层。

模型组脑内微小病变平均(10.00 ± 2.76)个,最少 6 个,最多 14 个,6 只大鼠脑内微小病变个数均 ≥ 6 个。正常对照组脑内微小病变平均(2.33 ± 1.37)个,最少 0 个,最多 4 个。模型组脑内微小病变数目多于正常组($t = -6.104, P < 0.01$),见图 1。

2.4 病理学改变 与正常对照组相比,模型组脑组织神经元数目减少,神经胶质细胞增生并肿胀,部分有微出血(图 2,封 3)。免疫组化显示,模型组脑组织镜下 HIF-1 α 阳性表达细胞数为(2324.47 ± 255.15)个,正常对照组为(474.94 ± 91.65)个,差异有统计学意义($t = -663.45, P < 0.01$),见图 3。

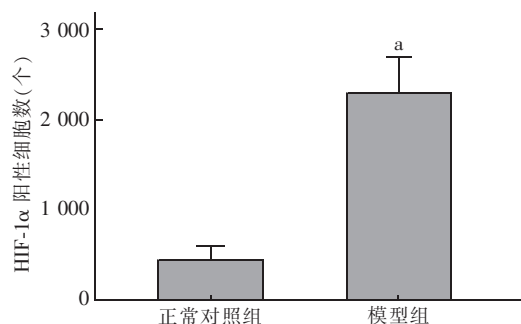
3 讨论

一直以来,糖尿病作为脑卒中的危险因素,以其特殊的卒中特点受到广泛关注。糖尿病伴发或并发脑卒中的发病率是正常人的 2~3 倍,且发病年龄较非糖尿病人群提前 5 年左右。其中以缺血性卒中多见,主要表现为多发的腔隙性脑梗死^[7-9]。



注:两例大鼠糖尿病性脑内微小病变(箭头所示),A、B 为同一例大鼠基底节部位的脑内微小病变,表现为 T1WI 等信号,T2WI 低信号改变;C、D 为同一例大鼠脑内微小病变,同样位于基底节部位,T1WI 等信号,T2WI 低信号

图 1 模型组大鼠糖尿病性脑内微小病变头颅 MRI 结果



注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$;HIF-1 α :低氧诱导因子-1 α

图 3 两组大鼠脑组织免疫组化 HIF-1 α 阳性细胞数

近年来,脑内微小病变作为脑梗死的“预知因子”逐渐受到重视。在无症状的中老年人群及无脑梗死病史的人群中,脑内直径 < 3 mm 的微小病变使其患脑梗死及脑梗死相关死亡的风险增加至少 3 倍^[4]。其中基底节上部和皮质下白质的微小病变与糖尿病相关,糖尿病是脑卒中与脑内微小病变的共同危险因素^[10]。因此,建立一种糖尿病性脑内微小病变的动物模型,为相关的动物实验研究及今后的临床研究打下基础,是十分必要而可行的。

本研究发现,采用每月两次低血糖法诱导,至糖尿病大鼠 6 月龄时可产生适用的糖尿病性脑内微小病变模型,模型组造模后出现脑内微小病变个数均 ≥ 6 个,全部造模成功,提示在高血糖的基础上,反复低血糖损伤,在脑内微小病变的产生过程中起到了至关重要的作用。该过程中无大鼠死亡,是安全适用的造模方法。

造模成功后的病理结果显示大鼠脑组织神经元数目减少,神经胶质细胞增生并肿胀,部分存在微出血。免疫组化结果显示,HIF-1 α 阳性表达细胞数明显高于正常对照组,说明 HIF-1 α 可能在糖尿病并发脑内微小病变的发病过程中起着举足轻重的作用。

既往研究显示,HIF-1 α 是缺氧或某些氧化应激状态下产生的诱导低氧基因表达和修复细胞内环境的调节因子^[11-13]。在低氧环境下,HIF-1 α 诱导多种目的基因的表达,包括血管内皮生长因子、内皮素 1、促红细胞生成素、诱导型一氧化氮合酶、核因子- κ B 等超过 100 个下游基因的表达。这些基因编码的蛋白参与了血管新生与重塑、神经再生、葡萄糖的转运及酵解、红细胞生成、氧化应激和炎症反应等多种病理生理过程。HIF-1 α 在脑微血管内皮细胞的破坏过程中起重要作用,缺血、缺氧后,可见脑微血管内皮细胞肿胀,空泡形成,部分细胞线粒体肿胀或空泡化,自噬体增多,核糖体脱落,甚至细胞核染色质固

缩,最终导致血-脑屏障破坏^[14]。

在高血糖基础上的反复低血糖损伤可诱导 HIF-1 α 表达水平增加,提示糖尿病继发的缺氧和氧化应激机制参与了糖尿病性脑内微小病变的形成,在该基础上进一步发生了血-脑屏障破坏、血管损伤和重塑、神经元死亡、神经胶质细胞增生等改变。

由于目前尚无糖尿病性脑内微小病变大鼠的造模方法,本研究旨在为科研工作提供一种成功率较高的造模方法。本模型既可以用于研究糖尿病性脑内微小病变的病理生理改变,也可以用于探索继发的脑实质病变。HIF-1 α 信号通路为进一步研究糖尿病性脑内微小病变的发病机制及治疗靶点提供了线索。然而,本研究也存在一定的局限性,所需的造模时间较长,可重复性仍需进一步探讨。在此基础上可进一步开展相关靶点的药物治疗,起到预防或治疗脑内微小病变的目的,进而预防脑卒中的发生。

参 考 文 献

- [1] 曲红,西丸雄也.从脑内微小病变探讨中风“治未病”客观依据的研究[J].天津中医药,2008,25(4):292-295.
- [2] 澤田徹,種田二郎,岡本幸市,ほか.無症候性脳血管障害の診断基準に関する研究[J].脳卒中,1997,19(6):489-493.
- [3] Zhu YC, Tzourio C, Soumaré A, et al. Severity of dilated Virchow-Robin spaces is associated with age, blood pressure, and MRI markers of small vessel disease: a population-based study[J]. Stroke, 2010, 41 (11): 2483-2490. DOI: 10. 1161/STROKEAHA. 110. 591586.
- [4] 曲红,周蔓蔓,张玉倩,等. MRI 上血管周围间隙与血管性危险因素及脑梗死发病的相关性[J]. 中国医学影像学杂志, 2012, 20(9): 64-65. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-5185. 2012. 09. 003.
- [5] 赵宝珍,白秀平,荣青峰,等. 实验性 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J]. 中国药物与临床, 2002, 2(6): 383-385. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-2560. 2002. 06. 013.
- [6] Tanne D, Koren-Morag N, Goldbourt U. Fasting plasma glucose and risk of incident ischemic stroke or transient ischemic attacks: a prospective cohort study [J]. Stroke, 2004, 35 (10): 2351-2355. DOI: 10. 1161/01. STR. 0000140738. 94047. 55.
- [7] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310 (9): 948-959. DOI: 10. 1001/jama. 2013. 168118.
- [8] Yang Z, Xing X, Xiao J, et al. Prevalence of cardiovascular disease and risk factors in the Chinese population with impaired glucose regulation: the 2007-2008 China national diabetes and metabolic disorders study [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2013, 121(6): 372-374. DOI: 10. 1055/s-0033-1341520.
- [9] Pinto A, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, et al. A case control study between diabetic and non-diabetic subjects with ischemic stroke [J]. Int Angiol, 2007, 26(1): 26-32.
- [10] Knopman DS, Griswold ME, Lrette ST, et al. Vascular imaging abnormalities and cognition: mediation by cortical volume in non-demented individuals: atherosclerosis risk in communities-neurocognitive study [J]. Stroke, 2015, 46 (2): 433-440. DOI: 10. 1161/STROKEAHA. 114. 007847.
- [11] Bohuslavova R, Kolar F, Sedmera D, et al. Partial deficiency of HIF-1 α stimulates pathological cardiac changes in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. BMC Endocr Disord, 2014, 14: 11. DOI: 10. 1186/1472-6823-14-11.
- [12] Ortega A, Fernández A, Arenas MI, et al. Outcome of acute renal injury in diabetic mice with experimental endotoxemia: role of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. J Diabetes Res, 2013, 2: 254529-254536. DOI: 10. 1155/2013/254529.
- [13] Nakagawa K, Kohara T, Uehata Y, et al. PIAS3 enhances the transcriptional activity of HIF-1 α by increasing its protein stability [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 469 (3): 470-476. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2015. 12. 047.
- [14] Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease [J]. Ann Neurol, 2012, 72(5): 648-672. DOI: 10. 1002/ana. 23648.

(收稿日期:2018-10-08)

(本文编辑:刘欣)

· 消息 ·

《国际内分泌代谢杂志》编辑部网络采编办公系统开通运行及微信公众号开通通知

各位作者您好!为提高稿件处理和办公效率,《国际内分泌代谢杂志》编辑部已从 2015 年 2 月开始使用网络采编办公系统。作者投稿采用新的网络平台(<http://endocrine.paperopen.com>),不再使用纸质投稿,特此公告,望作者们予以支持与配合。请不要轻信虚假投稿网站及广告,在使用网络投稿系统中如您有任何疑问、意见和建议,请您致电 022-83336730, 022-83336731 或者发邮件到 nfmfc@126.com。

本刊微信号:国际内分泌代谢杂志。所有作者可通过用户名及密码在手机上查询稿件的处理状态,检索相关文章。

本刊编辑部