

## • 基础与实验研究 •

# Intramyocellular lipid concentration of gastrocnemius measured with $^1\text{H}$ -MR spectroscopy for early diagnosis of diabetic peripheral neuropathy in rat models of type 2 diabetes mellitus

LIANG Xiaoying<sup>1</sup>, XIAO Yeyu<sup>2\*</sup>, LIAO Zhongxi<sup>3</sup>, CHEN Jie<sup>1</sup>, LIU Yanfei<sup>2</sup>

(1. Department of Imaging, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China; 2. Department of Imaging, Guangzhou Hospital of Integrated Traditional and West Medicine, Guangzhou 510800, China; 3. Department of Imaging, Yiyang Central Hospital, Yiyang 413000, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the value of intramyocellular lipid (IMCL) concentration of gastrocnemius measured with  $^1\text{H}$ -MR spectroscopy ( $^1\text{H}$ -MRS) for early diagnosis of diabetic peripheral neuropathy (DPN) in rat models of type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** Thirty male SD rats were enrolled and randomly divided into diabetes mellitus (DM) group or normal group (each  $n=15$ ). Rats in DM group were fed with high sugar and high fat for 4 weeks, combined with single intraperitoneal injection of 1% streptozotocin (STZ) solution of 45 mg/kg to establish T2DM models, while rats in normal group were fed with ordinary diet for 4 weeks, combined with injection of 1% STZ citric acid-sodium citrate buffer solution solution in same as controls.  $^1\text{H}$ -MRS of gastrocnemius muscle of the rats' right hind leg were collected at the 4th and the 8th week after success of modeling, and IMCL concentrations were detected. At the 8th week after success of modeling, the rats were sacrificed, then motor nerve conduction velocity (MNCV) and sensory nerve conduction velocity (SNCV) of the right sciatic nerves were measured. HE staining was performed, and the changes of sciatic nerve were observed to evaluate DPN or not. The value of gastrocnemius IMCL concentration for early diagnosis of DPN was analyzed.

**Results** T2DM rat models were successfully established in DM group. After modeling, the weekly fasting blood glucose and body mass of rats in DM group were higher than those in normal group (both  $P<0.05$ ). At the 4th and the 8th week after success of modeling, gastrocnemius IMCL concentration of rats in DM group were higher than those in normal group (both  $P<0.01$ ), and gastrocnemius IMCL concentration at the 8th week after success of modeling in DM and normal groups were both higher than those at the 4th week (both  $P<0.01$ ). At the 8th week after success of modeling, DPN occurred in all rats in DM group, MNCV and SNCV of right sciatic nerve were significantly lower than those in normal group (both  $P<0.001$ ), and pathological results showed abnormal changes of nerve fibers. **Conclusion** IMCL concentration of gastrocnemius measured with  $^1\text{H}$ -MRS had a certain value for early diagnosis of DPN in rat models of T2DM.

**[Keywords]** diabetes mellitus, type 2; muscle, skeletal; adipose tissue; diabetic neuropathies; magnetic resonance spectroscopy; rats

**DOI:**10.13929/j.issn.1672-8475.2022.06.011

[基金项目] 广东省科技创新战略专项(2018A0303070002)、广东省中医药局中医药科研项目(20202141)、广州市科技计划项目(202102080665)。

[第一作者] 梁晓莹(1993—),女,广东肇庆人,硕士,医师。研究方向:磁共振新技术研究与应用。E-mail: 1326201742@qq.com

[通信作者] 肖玉玉,广州市中西医结合医院影像科,510800。E-mail: xyyu73@163.com

[收稿日期] 2021-10-17 [修回日期] 2022-03-03

# <sup>1</sup>H-MR 波谱检测腓肠肌细胞内脂质浓度用于早期诊断 2 型糖尿病模型大鼠周围神经病变

梁晓莹<sup>1</sup>, 肖叶玉<sup>2\*</sup>, 廖中曦<sup>3</sup>, 陈杰<sup>1</sup>, 刘燕飞<sup>2</sup>

(1. 汕头大学医学院第二附属医院影像科, 广东 汕头 515041; 2. 广州市中西医结合医院影像科, 广东 广州 510800; 3. 益阳市中心医院影像科, 湖南 益阳 413000)

**[摘要]** 目的 观察<sup>1</sup>H-MR 波谱(MRS)检测腓肠肌肌细胞内脂质(IMCL)浓度对早期诊断 2 型糖尿病(T2DM)模型大鼠周围神经病变(DPN)的价值。方法 将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为糖尿病(DM)组和正常组, 每组 15 只。对 DM 组以高糖高脂饲养 4 周联合单次腹腔注射 1% 链脲佐菌素(STZ)溶液 45 mg/kg 体质量建立 T2DM 模型, 正常组则以普通饲料饲养 4 周联合注射 1% STZ 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液作为对照。于建模成功后第 4、8 周采集 2 组大鼠右后肢腓肠肌<sup>1</sup>H-MRS, 检测其 IMCL 浓度; 于建模成功后第 8 周处死动物, 检测 2 组右坐骨神经运动神经传导速度(MNCV)和感觉神经传导速度(SNCV), 之后行病理学检查, 观察坐骨神经组织变化, 判断是否发生 DPN; 评估腓肠肌 IMCL 浓度对早期诊断 DPN 的价值。结果 DM 组 15 只均成功建立 T2DM 大鼠模型, 建模成功后每周 DM 组大鼠空腹血糖及体质量均高于正常组( $P$  均 $<0.05$ )。建模成功后第 4、8 周, DM 组大鼠右后肢腓肠肌 IMCL 浓度均显著高于正常组( $P$  均 $<0.01$ ), 且建模成功后第 8 周 DM 组及正常组大鼠 IMCL 浓度均明显高于第 4 周( $P$  均 $<0.01$ )。建模成功后第 8 周, DM 组大鼠均发生 DPN, 其右坐骨神经 MNCV 及 SNCV 均明显低于正常组( $P$  均 $<0.001$ ); 病理结果示神经纤维异常变化。结论 <sup>1</sup>H-MRS 检测腓肠肌 IMCL 对早期诊断 T2DM 大鼠 DPN 具有一定价值。

**[关键词]** 糖尿病, 2 型; 肌, 骨骼; 脂肪组织; 糖尿病神经病变; 磁共振波谱; 大鼠

**[中图分类号]** R-332; R445.2    **[文献标识码]** A    **[文章编号]** 1672-8475(2022)06-0365-05

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)常见慢性并发症之一, 发病隐匿、早期症状不明显, 易被忽视而增加足溃疡及截肢等风险<sup>[1]</sup>。建立能够较好模拟 DPN 发生的稳定动物模型并进行研究对于早期诊断 DPN 具有重要临床意义, 但目前罕见与高血糖及糖基化终末产物等因素有关且适用于实验室的 DPN 动物模型<sup>[2]</sup>。<sup>1</sup>H-MR 波谱(MR spectroscopy, MRS)具有无创、可动态检测活体细胞内代谢变化及在分子水平反映生理功能和病理改变等优势, 为近年研究热点之一<sup>[3]</sup>。本研究建立 2 型 DM(type 2 DM, T2DM)大鼠模型, 通过单体素<sup>1</sup>H-MRS 检测大鼠右后肢腓肠肌肌细胞内脂质(intramyocellular lipid, IMCL)浓度, 观察其用于早期诊断 DPN 的价值。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 30 只 4 周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性 SD 大鼠, 体质量 100~120 g, 由汕头大学医学院动物实验中心[许可证号: SYXK(粤)2012-079]提供。本研究获汕头大学医学院动物伦理委员会批准(SUMC 2017-146)。

1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 购自 Sigma-Aldrich), 高糖高脂饲料(蛋白质:

糖: 脂肪 = 15.4:53.5:31.1, 北京博泰宏达生物技术有限公司), 柠檬酸、柠檬酸钠(西陇科学股份有限公司); 7.0T 小动物 MR 成像仪(美国 Agilent 公司); BL-420 生物信号采集和处理系统(成都泰盟软件有限公司)。

1.3 建立 T2DM 大鼠模型 将 30 只 SD 大鼠随机分为 DM 组( $n=15$ )和正常组( $n=15$ ), 均以普通饲料适应性饲养 1 周; 之后对 DM 组以高糖高脂饲料、正常组以普通饲料饲养 4 周。动物停饲、不禁饮 16 h 后, 经腹腔注射 1% STZ 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 45 mg/kg 体质量。于注射后第 1、3 及 7 天分别检测 2 组大鼠空腹血糖, 以 3 次均 $<7.5$  mmol/L 为正常, DM 组以 3 次均 $\geq16.7$  mmol/L 为建立 T2DM 大鼠模型成功; 期间对 DM 组以高糖高脂饲料继续饲养, 正常组则以普通饲料饲养。建模成功后, 每周测量并记录 2 组大鼠空腹血糖及体质量。

1.4 单体素<sup>1</sup>H-MRS 分别于建模成功后第 4、8 周行 7.0T 单体素<sup>1</sup>H-MRS 扫描。麻醉并俯卧位保定大鼠于扫描槽, 以手术胶带及自制海绵垫固定其右后肢, 将射频线圈置于大鼠右后肢腓肠肌区, 并以手术胶带固定线圈, 采集大鼠右后肢轴位及矢状位 T2WI, 范围包括右后肢全段, 参数: TR 3 000 ms, TE 40 ms, 层厚

2 mm, 层间距 0.1 mm; 之后于轴位 T2WI 显示大鼠右后肢内侧腓肠肌最大面积层面放置波谱感兴趣体积 (volume of interest, VOI), 体素  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ (图 1), 采用点分辨选择波谱 (point resolved selective spectroscopy, PRESS) 序列采集波谱, 扫描范围同上, 参数: TR 2 500 ms, TE 14 ms, Average 300, 手动完成匀场及水抑制扫描。采用频谱定量分析软件 LC-Model 拟合<sup>1</sup>H-MRS 数据, 并检测大鼠右后肢腓肠肌 IMCL 浓度。

### 1.5 电生理检测及病理观察

建模成功后第 8 周处死动物, 分别对 2 组行离体右坐骨神经电生理检测及 HE 染色。电生理检测包括运动神经传导速度 (motor nerve conduction velocity, MNCV) 和感觉神经传导速度 (sensory nerve conduction velocity, SNCV), 均为单刺激, 延时 100 ms, 波宽 1 ms, 波间隔 10 ms, 频率 10 Hz, 强度 1 V。完

成电生理检测后, 取长约 1 cm 右坐骨神经浸泡于 10% 甲醛溶液中, 固定 48 h 后进行洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、烤片及 HE 染色等步骤, 于光镜下观察神经组织变化并拍照记录。以 DM 组电生理检测及镜下均示明显异常为建立 T2DM DPN 大鼠模型成功。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计分析软件。以  $\bar{x} \pm s$  表示符合正态分布的计量资料, 行独立样本 *t* 检验, 比较组间 IMCL 浓度、空腹血糖、体质量、坐骨神经 MNCV 及 SNCV; 采用配对样本 *t* 检验比较组内不同时期 IMCL 浓度。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 空腹血糖及体质量** 对 DM 组大鼠均成功建立 T2DM 模型; 建模成功后第 4 周 3 只大鼠死亡、第 8 周再死亡 5 只。正常组大鼠实验期间均未死亡。

建模后 DM 组大鼠各周空腹血糖均高于正常组

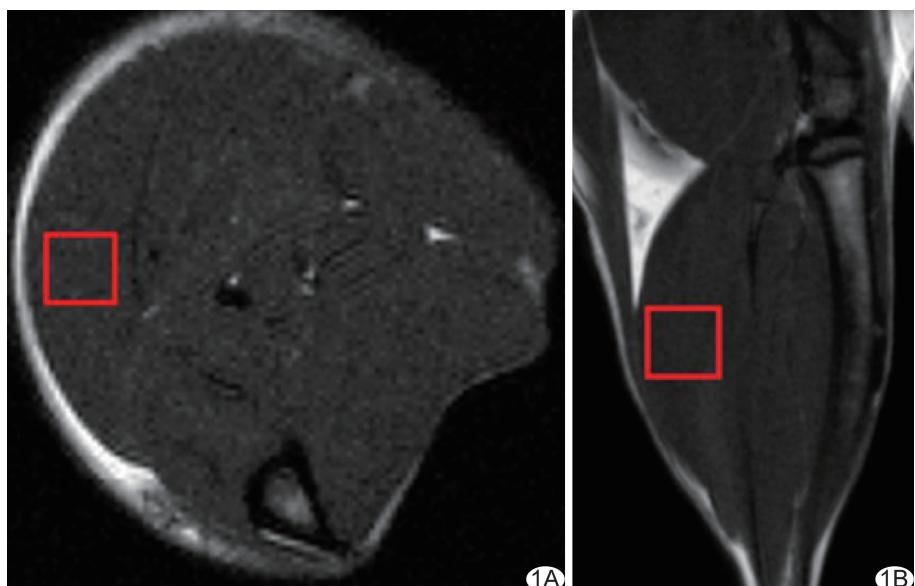


图 1 SD 大鼠右后肢腓肠肌单体素<sup>1</sup>H-MRS 图示 VOI(红框) A. 轴位; B. 矢状位

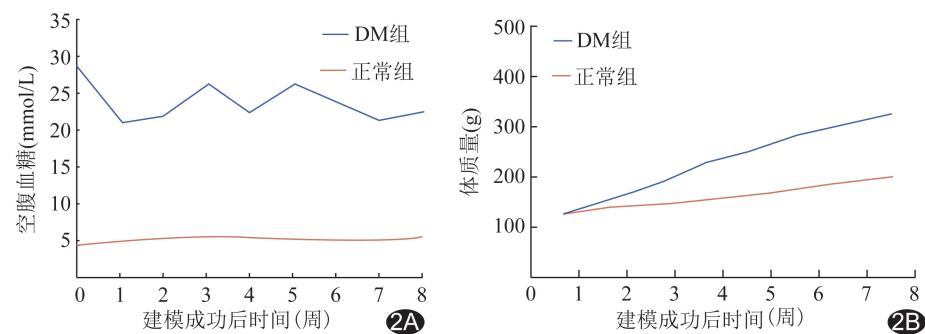


图 2 建模成功后 DM 组与正常组大鼠每周空腹血糖(A)及体质量(B)变化趋势图

( $P$  均  $<0.01$ , 图 2A)。实验期间 2 组大鼠体质量均呈上升趋势, 且 DM 组升高更显著, 各周 DM 组大鼠体质量均高于正常组( $P$  均  $<0.05$ , 图 2B)。

**2.2 右后肢腓肠肌 IMCL 浓度** 建模成功后第 4、8 周, DM 组大鼠右后肢腓肠肌 IMCL 浓度均显著高于正常组( $P$  均  $<0.01$ ), 且建模成功后第 8 周 DM 组及正常组大鼠 IMCL 浓度均明显高于第 4 周( $P$  均  $<0.01$ )。见表 1 及图 3、4。

表 1 建模成功后第 4、8 周 T2DM 与正常大鼠右后肢腓肠肌 IMCL 浓度比较(mmol/L)

组别	IMCL 浓度		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	建模成功后第 4 周*	建模成功后第 8 周#		
DM 组	$143.92 \pm 41.52$	$381.84 \pm 79.34$	-5.647	0.002
正常组	$46.09 \pm 8.56$	$119.20 \pm 15.71$	-11.877	$<0.001$
<i>t</i> 值	5.653	7.914	—	—
<i>P</i> 值	0.002	$<0.001$	—	—

注: \* : DM 组( $n=12$ ), 正常组( $n=15$ ); #: DM 组( $n=7$ ), 正常组( $n=15$ )

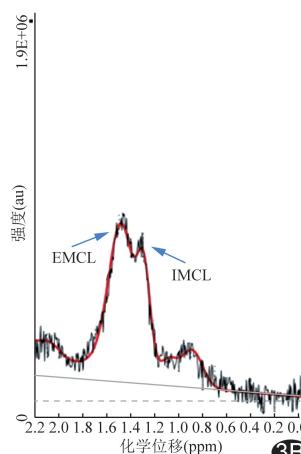
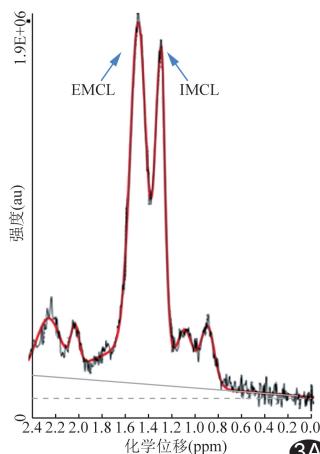


图3 建模成功后第4周大鼠右后肢腓肠肌<sup>1</sup>H-MRS拟合图 A. DM组；B. 正常组 (EMCL: 肌细胞外脂质)

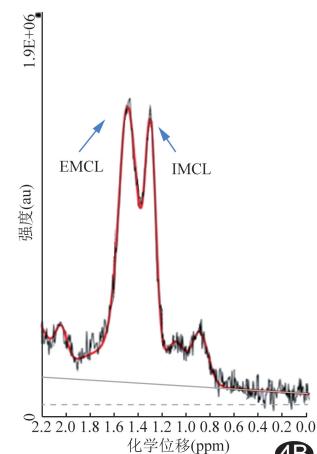


图4 建模成功后

第8周大鼠右后肢腓肠肌<sup>1</sup>H-MRS拟合图 A. DM组；B. 正常组

**2.3 右坐骨神经** 建模成功后第8周,DM组大鼠右坐骨神经MNCV及SNCV均明显小于正常组( $P$ 均 $<0.001$ ),见表2;病理结果显示DM组大鼠右坐骨神经神经纤维基本连续、完整,排列分布尚均匀,部分神经纤维排列略稀疏,髓鞘着色稍浅、欠均匀,轴索形态尚可;同期正常组大鼠均未见明显异常(图5)。

### 3 讨论

近年来,DM发病率逐年上升,其中约50%可发展为DPN,严重影响预后及生存质量<sup>[4-6]</sup>。目前对于建立T2DM向DPN发展的动物模型的具体饲养时间及STZ剂量均无统一标准。本研究以高糖高脂饲养大鼠4周诱导胰岛素抵抗,并单次经腹腔注射1%STZ溶液(45 mg/kg体质量)建立T2DM大鼠模型<sup>[7-8]</sup>,建模成功率100%,且建模成功后第8周可见DPN,但此时DM组存活大鼠少于半数(7/15),提示该模型更适用于诊断及防治DPN早期等研究。

临床主要根据症状及体征诊断DPN,主观性强,且难以实现量化。神经电生理检查及皮肤表皮内神经纤维活检等已用于评估周围神经损伤,但前者成本高、耗时,且多针对有髓大神经纤维,而早期DPN主要累及小神经纤维及神经末梢<sup>[9]</sup>,皮肤表皮内神经纤维活检则因其有创而难以广泛开展。IMCL在肌肉代谢中

表2 建模成功后第8周T2DM与正常大鼠右坐骨神经MNCV及SNCV比较(m/s)

组别	MNCV	SNCV
DM组(n=7)	38.66±3.04	38.36±2.09
正常组(n=15)	57.52±3.88	57.84±3.38
<i>t</i> 值	-8.559	-10.953
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

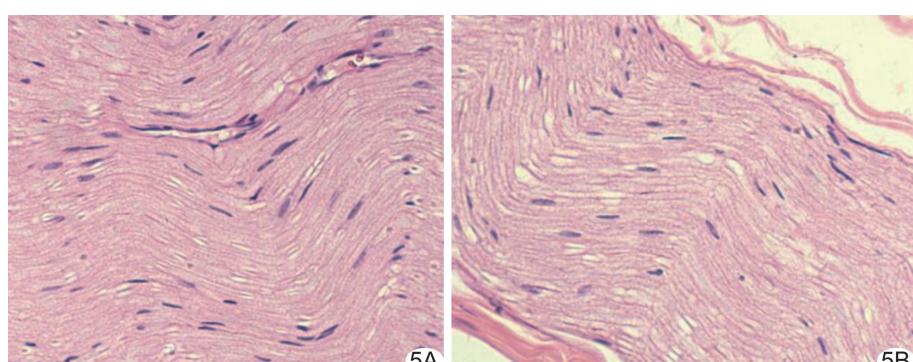


图5 建模成功后第8周大鼠右坐骨神经病理图(HE, ×20) A. DM组；B. 正常组

起重要作用,可反映脂质代谢及多种疾病的病理生理学改变,如糖尿病、肥胖症和胰岛素抵抗等<sup>[10]</sup>。传统方法主要通过肌肉组织活检及生化分析定量检测IMCL,难以实现IMCL与肌细胞外脂质(extramyocellular lipid, EMCL)完全分离,且有创,不适用于重复检测<sup>[11]</sup>。MRS可根据MR化学位移作用分析原子核及其代谢物,在体定量检测生物组织内代谢变化,且无创、无辐射。既往研究<sup>[12-13]</sup>表明,<sup>1</sup>H-MRS可用于肌肉相关研究,且能准确区分IMCL与EMCL。本课题组前期研究<sup>[14]</sup>亦发现<sup>1</sup>H-MRS可用于早期观察DM大鼠腓肠肌代谢物改变。有学者<sup>[15]</sup>指出,腓肠肌IMCL与糖尿病胰岛素抵抗密切相关。

本研究采用<sup>1</sup>H-MRS 观察 T2DM 大鼠右后肢腓肠肌 IMCL 浓度，并分析其对早期诊断 DPN 的价值。建模成功后第 4、8 周，DM 组大鼠右后肢腓肠肌 IMCL 浓度均显著高于正常组，且第 8 周 DM 组及正常组大鼠 IMCL 浓度均明显高于第 4 周，可能与胰岛素抵抗随 DM 进展而加重、脂肪酸氧化减少、线粒体功能障碍有关<sup>[16]</sup>，而正常组大鼠 IMCL 浓度升高可能系因体质量增加引起骨骼肌内异位脂肪堆积，诱导体内胰岛素抵抗，导致 IMCL 增多<sup>[10]</sup>，与既往研究<sup>[16-17]</sup> 所见基本相符。此外，本研究发现，建模成功后第 8 周，DM 组大鼠右坐骨神经 MNCV 及 SNCV 均明显小于正常组，且病理结果显示 DM 组大鼠右坐骨神经神经纤维基本连续、完整，排列分布尚均匀，部分神经纤维排列略稀疏，髓鞘着色稍浅、欠均匀，轴索形态尚可。以上结果为 T2DM DPN 胰岛素抵抗及脂毒性学说等<sup>[18]</sup> 提供了间接支持。

本研究的主要不足：①DM 组大鼠死亡率较高，不适用于研究中晚期 DPN；②IMCL 分析为活体连续检测，而 DPN 为离体检测，未能对二者进行相关性分析。

综上所述，<sup>1</sup>H-MRS 检测腓肠肌 IMCL 对早期诊断 T2DM 大鼠 DPN 具有一定价值。

## 〔参考文献〕

- [1] BONDOR C I, VERESIU I A, FLOREA B, et al. Epidemiology of diabetic foot ulcers and amputations in romania: Results of a cross-sectional quality of life questionnaire based survey[J]. J Diabetes Res, 2016, 2016:5439521.
- [2] 李丹, 陈龙菊. 糖尿病足神经病变动物模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(1):128-132.
- [3] 王春祥, 闫喆. 单纯性肥胖症学龄儿童肝脏脂肪含量的 MRI 研究[J]. 国际医学放射学杂志, 2019, 42(1):45-48.
- [4] BAIG M A, PANCHAL S S. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in neonatal rats: An insight into its applications to induce diabetic complications [J]. Curr Diabetes Rev, 2019, 16 (1): 26-39.
- [5] IQBAL Z, AZMI S, YADAV R, et al. Diabetic peripheral neuropathy: Epidemiology, diagnosis, and pharmacotherapy[J]. Clin Ther, 2018, 40(6):828-849.
- [6] 中国糖尿病足细胞与介入治疗技术联盟. 糖尿病足介入综合诊治临床指南(第 4 版)[J]. 中国介入影像与治疗学, 2018, 15(1): 3-12.
- [7] 季中华, 刘紫庭, 乔瑞冬, 等. 小剂量 STZ 诱导 2 型糖尿病大鼠的周围神经病变特点[J]. 中国医师杂志, 2017, 19(12):1796-1799.
- [8] 何姣, 袁戈桓, 张俊清, 等. 早期糖尿病周围神经病变大鼠模型的建立[J]. 北京大学学报(医学版), 2019, 51(6):1150-1154.
- [9] WANG D, WANG C, DUAN X, et al. MR T2 value of the tibial nerve can be used as a potential non-invasive and quantitative biomarker for the diagnosis of diabetic peripheral neuropathy[J]. Eur Radiol, 2018, 28(3):1234-1241.
- [10] TAMURA Y. Ectopic fat, insulin resistance and metabolic disease in non-obese Asians: Investigating metabolic gradation [J]. Endocr J, 2019, 66(1):1-9.
- [11] DONG Z, ZHANG Y, LIU F, et al. Improving the spectral resolution and spectral fitting of <sup>1</sup>H MRSI data from human calf muscle by the SPREAD technique[J]. NMR Biomed, 2014, 27 (11):1325-1332.
- [12] LINDEBOOM L, de GRAAF R A. Measurement of lipid composition in human skeletal muscle and adipose tissue with <sup>1</sup>H-MRS homonuclear spectral editing[J]. Magn Reson Med, 2018, 79(2):619-627.
- [13] TAKASHIMA H, SHISHIDO H, IMAMURA R, et al. Effect of ankle flexion on the quantification of MRS for intramyocellular lipids of the tibialis anterior and the medial gastrocnemius[J]. Radiol Phys Technol, 2015, 8(2):209-214.
- [14] 陈杰, 肖叶玉, 梁晓莹, 等. <sup>1</sup>H-MRS 定量分析糖尿病大鼠腓肠肌代谢物早期评估糖尿病周围神经病变[J]. 中国医学影像技术, 2020, 36(9):1281-1285.
- [15] GOODPASTER B H. CrossTalk proposal: Intramuscular lipid accumulation causes insulin resistance[J]. J Physiol, 2020, 598 (18):3803-3806
- [16] JANA B A, CHINTAMANENI P K, KRISHNAMURTHY P T, et al. Cytosolic lipid excess-induced mitochondrial dysfunction is the cause or effect of high fat diet-induced skeletal muscle insulin resistance: A molecular insight [J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(1):957-963.
- [17] BERGMAN B C, GOODPASTER B H. Exercise and muscle lipid content, composition, and localization: Influence on muscle insulin sensitivity[J]. Diabetes, 2020, 69(5):848-858.
- [18] AMARA F, HAFEZ S, ORABI A, et al. Review of diabetic polyneuropathy: Pathogenesis, diagnosis and management according to the consensus of Egyptian experts [J]. Curr Diabetes Rev, 2019, 15(4):340-345.