

❖ 实验研究

Quantitative analysis of gastrocnemius metabolites with ^1H -MRS for early evaluation on diabetic peripheral neuropathy in diabetic rat models

CHEN Jie¹, XIAO Yeyu^{1,2*}, LIANG Xiaoying¹, CAO Zhen¹, LI Wenyan²

(1. Department of Medical Imaging, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China; 2. Department of Medical Imaging, Guangzhou Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Guangzhou 510800, China)

[Abstract] **Objective** To explore the value of quantitative analysis of gastrocnemius metabolites with ^1H -MRS for early evaluation on diabetic peripheral neuropathy in diabetic rat models. **Methods** Totally 40 male SD rats were randomly divided into experimental group and normal group (each $n=20$). In experimental group, diabetes models were established by feeding with high sugar and high-fat fed diet and streptozotocin injection. The right gastrocnemius ^1H -MRS of 2 groups were collected before modeling as well as 7 days, 14 days and 21 days after modeling. The concentration values of choline-containing compounds (Cho), creatine compounds (Cr), intra-myocellular lipids (IMCL), Cho/Cr and IMCL/Cr were obtained. The rats in normal group were fed with general diet. Electrophysiological and pathological examinations were performed 21 days after modeling, the motor nerve conduction velocity (MNCV) and sensory nerve conduction velocity (SNCV) of right sciatic nerve were measured. The metabolite concentration values at each time point in experimental group were compared, and MNCV and SNCV were compared between groups. The pathological results of 2 groups were observed. **Results** There were differences of values of Cho, Cho/Cr, Cr, IMCL, IMCL/Cr in experimental group at different time points ($F=6.69, 5.41, 3.65, 3.51, 3.10$, all $P<0.05$). Cho and Cr values 14 days and 21 days after modeling were higher than those before modeling (both $P<0.05$), and IMCL values 7 days after modeling were higher than those before modeling ($P<0.05$). MNCV and SNCV of the right sciatic nerve in experimental group were slower than those in normal group 21 days after modeling ($t=2.74, 4.62$, both $P<0.05$). Compared with normal group, the nerve fibers in experimental group were sparse, loose and disordered, some myelin sheaths were stained lightly and unevenly and axons became thin and atrophic. **Conclusion** ^1H -MRS can be used for noninvasive quantitative analysis of skeletal metabolites, so as for early evaluation of DPN in rat diabetic models.

[Keywords] diabetic foot; diabetic mononeuropathy; rat; magnetic resonance spectroscopy

DOI:10.13929/j.issn.1003-3289.2020.09.001

^1H -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

陈 杰¹, 肖叶玉^{1,2*}, 梁晓莹¹, 曹 震¹, 李文艳²

(1. 汕头大学医学院第二附属医院医学影像科, 广东 汕头 515041;
2. 广州市中西医结合医院医学影像科, 广东 广州 510800)

[摘 要] **目的** 观察氢质子磁共振频谱(^1H -MRS)检测腓肠肌代谢物对早期评估大鼠糖尿病(DM)模型周围神经病变

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(2018A0303070002)、广东省中医药局科研项目(20202141)、汕头市科技计划项目(2016-21, 2018-25)、广州市花都区医疗卫生科研专项项目(19-HDWS-001)。

[第一作者] 陈杰(1993—),男,广东潮州人,硕士,医师。研究方向:磁共振频谱。E-mail: wwwttuu@qq.com

[通信作者] 肖叶玉,广州市中西医结合医院医学影像科,510800。E-mail: xyu73@163.com

[收稿日期] 2020-04-14 **[修回日期]** 2020-09-16

的价值。**方法** 将 40 只 SD 雄性大鼠随机分为实验组($n=20$)与正常组($n=20$)。实验组以高糖高脂饲养+注射链脲菌素法建立 DM 模型。于造模前和造模后 7、14、21 天采集 2 组大鼠右下肢腓肠肌 ^1H -MRS, 获得胆碱复合物(Cho)、肌酸复合物(Cr)、细胞内脂质(IMCL)、Cho/Cr 及 IMCL/Cr 值。正常组大鼠予普通饲料喂养。造模后 21 天行右下肢坐骨神经电生理及病理检查, 测量 2 组坐骨神经运动神经传导速度(MNCV)及感觉神经传导速度(SNCV)。比较实验组内各时间点代谢物浓度值差异及 2 组间 MNCV 和 SNCV 差异, 观察病理结果。**结果** 实验组内不同时间点 Cho、Cr、IMCL、Cho/Cr 及 IMCL/Cr 值差异均有统计学意义($F=6.69, 5.41, 3.65, 3.51, 3.10$, P 均 <0.05); 造模后 14、21 天 Cr 和 Cho 值均高于造模前(P 均 <0.05), 造模后 7 天 IMCL 值高于造模前($P<0.05$)。造模后 21 天实验组右下肢坐骨神经 MNCV 和 SNCV 均低于正常组($t=2.74, 4.62$, P 均 <0.01)。相比正常组, 实验组神经纤维稀疏松散, 排列紊乱, 部分髓鞘着色浅且不均匀, 轴索变细萎缩。**结论** ^1H -MRS 可无创定量分析骨骼肌代谢, 进而早期评估大鼠 DM 模型 DPN。

关键词 糖尿病足; 糖尿病单一神经病变; 大鼠; 磁共振波谱

中图分类号 R-332; R445.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-3289(2020)09-1281-05

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是以高血糖为特征的代谢紊乱疾病^[1], 糖尿病足(diabetic foot, DF)为其常见慢性并发症之一, 全球发病率约达 6%, 且每 30 s 即有 1 例患者需截肢^[2]; 正确的预防措施及合理的治疗方法能大幅度减少截肢率^[3]。DF 的重要病理生理机制之一是糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN), 相关检查方法有神经传导、振动阈值的检测及皮肤表皮内神经纤维活检^[3], 但各有其缺陷。氢质子磁共振频谱(Hydrogen-1 magnetic resonance spectrum, ^1H -MRS)可无创定量检测细胞水平代谢变化, 反映骨骼肌代谢状态^[4]。本研究探讨 ^1H -MRS 定量分析 DM 大鼠模型下肢骨骼肌代谢物变化对早期评估大鼠 DM 模型 DPN 的价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物及建立模型 将 40 只 3 月龄、体质量约 200 g 的 SPF 级 SD 雄性大鼠(由汕头大学医学院实验动物中心提供)随机分为实验组($n=20$)与正常组($n=20$)。参照文献^[5]方法, 采用高糖高脂饲料喂养+腹腔注射链脲菌素法制造大鼠 DM 模型。实验组大鼠予高糖高脂饲料喂养 30 天, 之后停饲 12 h, 按 45 mg/kg 体质量腹腔注射浓度 1% 链脲菌素。以注射后 1、3、7 天剪尾测得随机血糖稳定且均 16.7 mmol/L 表示 DM 大鼠模型造模成功, 造模后仍予高脂饲料喂养。对正常组大鼠予普通饲料喂养 30 天, 后剪尾监测随机血糖均 <16.7 mmol/L。本研究经院动物伦理

委员会批准(批准号: SUMC2017-146)。

1.2 仪器与方法 采用安捷伦 7.0 T MR 小动物成像仪采集图像, 配备 9563 两通道容积线圈。于造模前和造模后 7、14、21 天以浓度 1.5% 异氟烷行气道麻醉大鼠后固定其右下肢, 采集右下肢腓肠肌 MRS。经线圈调谐、3D 梯度回波匀场使水峰半高宽 <30 Hz, 常规 3 平面定位后, 采用单体素波谱 PRESS 序列采集 MRS, 尽量避免骨质、肌间隙及脂肪的干扰, 于右下肢腓肠肌放置 ROI, TR 2 500 ms, TE 15 ms, Average 300, 体素 3 mm $\times$ 3 mm $\times$ 3 mm。见图 1。

1.3 数据分析 扫描结束后将数据导入 LCModel 软件(6.3 version, LCModel), 获得胆碱复合物(choline-containing compounds, Cho)、肌酸复合物(creatine compounds, Cr)及细胞内脂质(intra-myocellular lipids, IMCL)的绝对浓度值和 Cho/Cr、IMCL/Cr 的相对浓度值, 并自动拟合生成 MRS 图。

1.4 测定大鼠坐骨神经电生理传导 于造模后 21 天

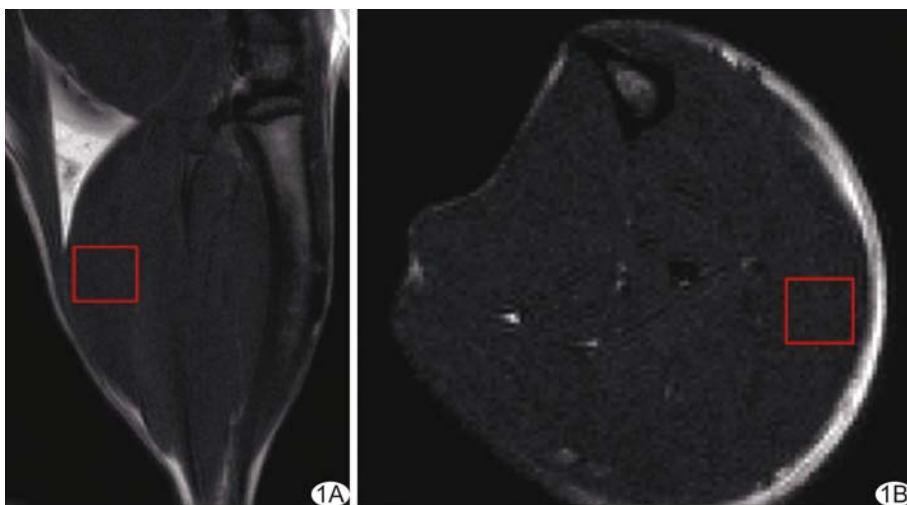


图 1 于大鼠右下肢腓肠肌矢状位(A)及轴位(B)MRI 定位 ROI

扫描结束后,以 1 ml/100 g 体质量腹腔注射浓度 4% 水合氯醛深度麻醉大鼠,剥离右下肢皮肤肌肉,尽可能暴露并分离右下肢坐骨神经。将离体坐骨神经置于 37℃ 任氏液中浸泡 10 min,待其恢复静息状态后置入干燥的神经屏蔽盒内,采用 BL-420 肌肉神经实验测定系统(成都泰盟科技有限公司)检测大鼠坐骨神经电生理传导,以刺激器刺激近心端电极,记录刺激电极与记录电极间的距离 S,测量动作电位的潜伏期 T(自刺激伪迹起始点至动作电位起始点的时间)、运动神经传导速度 (motor nerve conduction velocity, MNCV) = S/T ,重复电刺激 3 次,每次刺激间隔 10 s,以其均值为最后结果;调换 2 个电极位置,以同样方法获得感觉神经传导速度 (sensory nerve conduction velocity, SNCV)。

1.5 大鼠坐骨神经 HE 染色 测定电生理传导后,取 1 cm 坐骨神经浸泡于浓度 10% 甲醛溶液,之后常规进行脱水、石蜡包埋、切片及 HE 染色。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 Levene 检验分析数据的方差齐性。采用单因素方差分析比较实验组内不同时间点代谢物浓度及相对浓度,采用 Bonferroni 检验(方差齐)或 Games-howell 检验(方差不齐)对不同时间点数据进行两两比较;以独立样本 t 检验比较 2 组间 MNCV 及 SNCV 差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

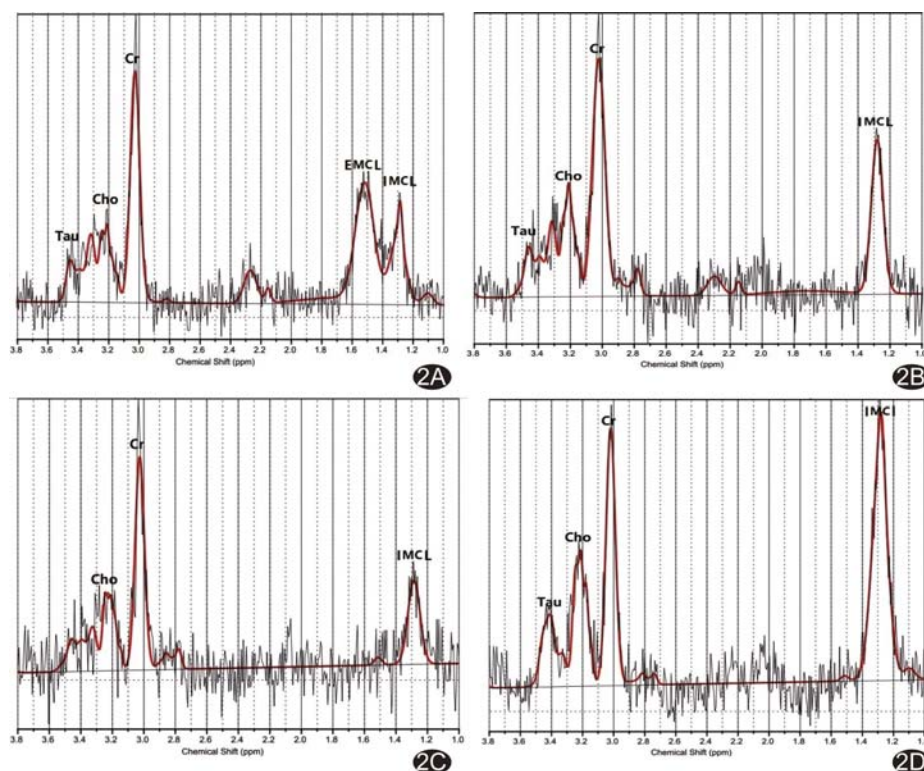


图 2 实验组内不同时间点右下肢腓肠肌 MRS 图 A. 造模前; B. 造模后 7 天; C. 造模后 14 天; D. 造模后 21 天

2 结果

造模过程中实验组 2 只大鼠死亡,2 只大鼠造模未成功,实验组共 16 只大鼠、正常组 20 只大鼠纳入研究。

2.1 实验组内不同时间点右下肢腓肠肌代谢物浓度及相对浓度值比较 不同时间点 Cho、Cr、IMCL、Cho/Cr 及 IMCL/Cr 值差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。造模后 7 天 Cho、IMCL 及 IMCL/Cr 值高于造模前(P 均 < 0.05),造模后 14 天 Cho、Cr 值与造模前差异有统计学意义(P 均 < 0.05),造模后 21 天 Cho、Cr 及 Cho/Cr 值均高于造模前(P 均 < 0.05),余各时间点两两比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1、图 2。

表 1 实验组大鼠不同时间点右下肢腓肠肌代谢物绝对浓度值及相对浓度值比较($\bar{x} \pm s$)

时间点	Cho	Cr	IMCL	Cho/Cr	IMCL/Cr
造模前	51.45±4.03	122.67±11.40	37.10±17.45	0.42±0.10	0.32±0.14
造模后 7 天	78.89±28.60*	140.97±18.14	110.07±52.90*	0.57±0.23	0.81±0.44*
造模后 14 天	86.02±24.16*	146.47±15.34*	89.04±46.06	0.57±0.14	0.58±0.29
造模后 21 天	95.98±21.08*	150.88±23.92*	115.95±61.36	0.67±0.16*	0.76±0.40
F 值	6.69	5.41	3.65	3.51	3.10
P 值	<0.01	<0.01	0.02	0.02	0.04

注: * :与造模前比较, $P < 0.05$

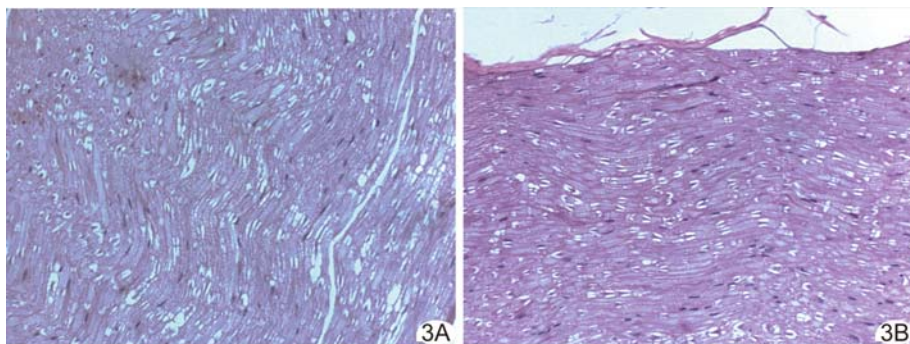


图3 2组大鼠造模后21天右下肢坐骨神经病理图(HE, $\times 20$) A. 实验组; B. 正常组

2.2 2组大鼠右下肢坐骨神经传导速度比较 造模后21天,实验组大鼠右下肢坐骨神经MNCV及SNCV[(47.89 $\pm$ 2.85) m/s、(46.67 $\pm$ 3.87) m/s]均较正常组[(55.52 $\pm$ 3.38) m/s、(53.48 $\pm$ 4.24) m/s]减低($t=2.74, 4.62, P$ 均 <0.01)。

2.3 病理所见 实验组坐骨神经HE染色见神经纤维尚连续,但纤维之间稀疏松散,排列紊乱,部分髓鞘着色浅且不均匀,轴索变细萎缩;正常组坐骨神经HE染色见神经纤维平行排列规整、密集,均匀分布,粗细均一,髓鞘着色均匀,轴索形态正常。见图3。

3 讨论

目前DM动物模型采用多种动物,以链脲菌素诱导大鼠DM模型最为常用且经济、有效^[5]。本研究采用高脂饲料喂养+腹腔注射链脲菌素法制备大鼠DM模型。既往研究^[6]认为造模时链脲菌素用量 <35 mg/kg体质量为低剂量,40~55 mg/kg体质量为中等剂量, >65 mg/kg体质量为高剂量。本研究于停饲12 h后以中等剂量45 mg/kg体质量腹腔一次性注射链脲菌素,成模率约80%,动物死亡率较低,且成模后实验组大鼠随机血糖稳定。DM大鼠模型造模成功后,DONG等^[7]继续予普通饲料喂养8周,发现坐骨神经存在脱髓鞘、轴突萎缩改变。本研究造模成功后继续予高糖高脂饲料喂养21天,发现实验组大鼠右下肢坐骨神经传导速度降低,而病理结果仅发现坐骨神经部分神经纤维之间稀疏,未见明显脱髓鞘及轴索萎缩等表现,证明实验组大鼠处于DPN较早期。

Cho与细胞膜磷脂代谢有关,参与细胞膜合成和转运;正常机体骨骼肌系统中Cho浓度稳定^[8]。肿瘤性病变胆碱峰升高提示细胞膜生物合成增加,反映细胞增殖;恶性肿瘤Cho绝对值、Cho/Cr较良性肿瘤明显升高^[9]。非肿瘤性病变Cho升高为细胞膜崩解标志^[10],脱髓鞘病变早期即出现Cho浓度升高,且持续

数月。缺血性脑卒中急性期缺血半暗带中Cho浓度升高,后逐渐下降^[10]。本研究实验组造模后Cho值及Cho/Cr值较造模前升高,且随造模时间延长Cho绝对值逐渐升高,可能与神经脱髓鞘所致功能障碍有关。施万细胞为周围神经胶质细胞,高糖状态下易致脱髓鞘改变^[11],出现早期DPN症状。本研究中实验组大鼠坐骨神经传导速度减低,病理

检查结果示部分髓鞘着色浅且不均匀,轴索变细萎缩,推测大鼠坐骨神经功能受损可能引起神经营养功能障碍,最终导致肌细胞肿胀、胞膜逐渐崩解。

Cr可由机体内源性产生(约1 g/d),亦可从饮食中主要通过肉类摄取(约1~5 g/d)。约95%的Cr分布于骨骼肌中,是能量利用、储存的重要物质,也是细胞能量代谢的标志^[12]。研究^[13]发现结扎大鼠下肢血管后,其Cr水平远低于未结扎的DM大鼠及正常大鼠,表明Cr水平与下肢毛细血管及小动脉密度减少有关。VARMA等^[14]认为炎症疾病导致Cr水平升高,治疗后可下降。DM导致血管病变的主要机制包括蛋白激酶C激活、氧化应激及炎症反应等引起血管内皮细胞功能障碍,使基底膜增厚,最终血管腔进行性变窄及组织器官供血障碍^[15]。本研究实验组造模后14、21天Cr浓度均高于正常组,可能原因在于DM高血糖导致早期下肢血管、肌肉炎症反应,但未出现血管狭窄、毛细血管及小动脉密度减少,血流灌注受限致Cr水平下降。

骨骼肌中的脂质作为能量来源储存于细胞外肌间质脂肪细胞,或以脂滴形式储存于肌肉细胞内,直接与线粒体接触。IMCL含量与肥胖、胰岛素抵抗、2型DM及动脉硬化等疾病相关,加以定量分析具有重要意义^[16-17]。对活检组织进行生化分析可定量分型IMCL,但有创,不宜重复,且易受肌细胞外脂质(extra-myocellular lipids, EMCL)干扰引起IMCL水平假性升高。IMCL亚甲基群在脂滴内呈球形,¹H-MRS是目前唯一能在体区分IMCL与EMCL的方法^[18]。研究^[19]发现高胰岛素抵抗2型DM患者骨骼肌IMCL水平升高,本研究结果与之一致,可能与DM导致高糖高脂、诱导线粒体活性氧增加,损伤线粒体、引起线粒体功能障碍,降低线粒体脂肪酸氧化能力,增加细胞内脂质含量有关^[20]。

综上所述,¹H-MRS 可无创定量分析骨骼肌代谢,早期评估大鼠 DM 模型 DPN。

[参考文献]

- [1] CHO N H, SHAW J E, KARURA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138:271-281.
- [2] ZHANG P, LU J, JING Y, et al. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: A systematic review and meta-analysis[J]. *Ann Med*, 2016, 49(2):106-116.
- [3] 中华医学会糖尿病学分会, 中华医学会感染病学分会, 中华医学会儿科分会, 中华医学会组织修复与再生分会. 中国糖尿病足防治指南(2019 版)(I)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2019, 11(2):92-108.
- [4] DESHMUKH S, SUBHAWONG T, GARRINO J A, et al. Role of MR spectroscopy in musculoskeletal imaging[J]. *Indian J Radiol Imaging*, 2014, 24(3):210-216.
- [5] CHAO P C, LI Y, CHANG C H, et al. Investigation of insulin resistance in the popularly used four rat models of type-2 diabetes[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101:155-161.
- [6] GHASEMI A, KHALIFI S, JEDI S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review)[J]. *Acta Physiol Hung*, 2014, 101(4):408-420.
- [7] DONG H Y, JIANG X M, NIU C B, et al. Cerebrolysin improves sciatic nerve dysfunction in mouse model of diabetic peripheral neuropathy[J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(1):156-162.
- [8] FAVAD L M, SALIBI N, WANG X, et al. Quantification of muscle choline concentration by proton MR spectroscopy at 3 Tesla: Technical feasibility[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2010, 194(1):W73-W79.
- [9] WIN J M, PAYNE G S, WELLER A, et al. DCE-MRI, DW-MRI, and MRS in cancer: Challenges and advantages of implementing qualitative and quantitative multi-parametric imaging in the clinic[J]. *Top Magn Reson Imaging*, 2016, 25(5):245-254.
- [10] HAQUE M E, GABR R E, GEORGE S D, et al. Serial cerebral metabolic changes in patients with ischemic stroke treated with autologous bone marrow derived mononuclear cells[J]. *Front Neurol*, 2019, 10:141.
- [11] 张世有, 张雯. 糖尿病周围神经病变发病机制及治疗进展[J]. *中国老年保健医学*, 2014, 12(3):67-69.
- [12] YAZIGI S M, de SALLES PAINELLI V, GIANNINI ARTIOLI G, et al. Brain creatine depletion in vegetarians? A cross-sectional ¹H-magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS) study[J]. *Br J Nutr*, 2014, 111(7):1272-1274.
- [13] MADONNA R, DELLI PIZZI S, TARTAOR A, et al. Transplantation of mesenchymal cells improves peripheral limb ischemia in diabetic rats[J]. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(5):438-448.
- [14] VARMA S, BIRD R, ESKIN M, et al. Detection of inflammatory bowel disease by proton magnetic resonance spectroscopy (¹H MRS) using an animal model[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2007, 4:24.
- [15] 邹蕊, 林萍, 韩来福, 等. 血管回声跟踪技术及超声弹性成像评价 2 型糖尿病患者足背动脉弹性功能[J]. *中国医学影像技术*, 2013, 29(3):366-370.
- [16] VARMA V, YAO-BORENGASSER A, RASOULI N, et al. Human visfatin expression: Relationship to insulin sensitivity, intramyocellular lipids, and inflammation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(2):666-672.
- [17] HASEGESHA N, KURIHARA T, SATO K, et al. Intramyocellular and extramyocellular lipids are associated with arterial stiffness[J]. *Am J Hypertens*, 2015, 28(12):1473-1479.
- [18] Guo Z. Novel proton magnetic resonance spectroscopy techniques are needed for studying skeletal muscle lipids[J]. *Magn Reson Imaging*, 2016, 34(7):1041.
- [19] LAURENS C, MORO C. Intramyocellular fat storage in metabolic diseases[J]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2016, 26(1):43-52.
- [20] RAINS J L, JAIN S K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(5):567-575.