文章编号:1000-5404(2010)08-0787-03

论著

糖尿病大鼠早期皮肤改变与血清炎性介质变化

张晓菲[1],郝 飞[1],杨 景[2] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:皮肤科[1],病理学研究所[2])

[摘要] **目的** 观察糖尿病(diabetes mellitus,DM)大鼠早期皮肤损害的组织病理特点与血清炎性介质的变化。**方法** 将50只8~10周龄Wistar大鼠分为正常对照组(C组,$n=25$)、DM组($n=25$);25只建立DM大鼠模型,其中3只死亡。两组于第4、8、12周末各处死4只,取背部皮肤标本,以观察DM大鼠皮肤早期改变;其余大鼠在第16周末抽取心脏血测定TNF-α、IL-6、C-RP的水平,并处死取皮肤,进行病理学观察及测量皮肤全层与真皮厚度。**结果** 第16周末DM组的TNF-α(1.45±0.67)ng/ml、IL-6(135.05±43.39)pg/ml、C-RP(3.51±0.62)mg/L较正常对照组[分别为(0.86±0.60)ng/ml、(99.92±32.36)pg/ml、(2.54±1.31)mg/L]明显增高($P<0.05$)。测微尺测量表明DM组大鼠4、8、12、16周皮肤全层均变薄,与正常对照组比较有明显差异($P<0.05$,$P<0.01$)。DM组各时相点表皮厚度较正常对照组薄,但无统计学差异($P>0.05$)。组织学观察:DM组表皮细胞层次欠清晰,真皮层胶原萎缩、肿胀、退化变性,皮下脂肪进行性萎缩。**结论** 建立成功的DM大鼠动物模型皮肤表现为全层与皮下脂肪变薄、萎缩及血清炎症因子明显增高。

[关键词] 糖尿病;炎症因子;病理;皮肤厚度
[中图法分类号] R587.2;R751.02;R392.3 **[文献标志码]** A

Early skin changes and serum inflammatory mediators in diabetic rats

Zhang Xiaofei[1], Hao Fei[1], Yang Jing[2] ([1]Department of Dermatology, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To observe the histopathological features of early skin lesions and serum inflammatory mediators changes in the diabetes mellitus (DM) rats. **Methods** A total of 50 Wistar rats at 8 to 10 weeks of age were divided into normal control group (C group, $n=25$) and diabetic group (DC group, $n=25$). The rats of DC group were given a high-glucose and high-fat diet for 2 weeks to induce insulin resistance and then an intraperitoneal injection of 35 mg/kg streptozotocin. All 25 rats were identified to be diabetic models with their fasting blood glucose over ≥7.0 mmol/L. Four rats of C group or DC group were killed to take the skin tissues in the 4th, 8th and 12th weekend. In the 16th week, the heart blood samples of the left 13 rats of C group and 10 rats of DC group were collected to measure TNF-α, IL-6 and C-RP levels, and the skin samples were also taken for pathological observation and full-thickness and dermal thickness measurement. **Results** In the 16th week, the TNF-α, IL-6 and C-RP levels of DC group were significantly higher than the normal group ($P<0.05$). Micrometer measurements indicated that the skin full-thickness of diabetic rats became thinner and thinner in the 4th, 8th, 12th and 16th weeks, with significant difference when compared with normal group ($P<0.01$, $P<0.05$). The epidermal thickness of diabetic group were thinner compared with normal skin at all time points, but there was no statistical difference among them. Histological observations of the diabetic group showed that there were lesser clear epidermal cells, shrunk, swelling and degraded dermal layer of collagen, and progressive atrophy of subcutaneous fat. **Conclusion** The successful established diabetic rat models show that their skin full-thickness and subcutaneous fat became thinner and atrophy, with significantly higher serum inflammatory cytokines.

[Key words] diabetes mellitus;inflammatory factor;pathology;skin thickness

Supported by the Tackling Program of "Eleventh Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of China(2006BA702B01);Corresponding author:Hao fei,Tel: 86-23-68754416,E-mail: haofei62@medail.com.cn

[基金项目] 国家"十一五"攻关项目(2006BA702B01)
[通信作者] 郝 飞,电话:(023)68754416,E-mail:Haofei62@medail.com.cn

表1 2组大鼠第16周末的糖代谢指标、炎症因子的变化（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	FPG(mmol/L)	HBALc(%)	INS(μU/ml)	TNF-α(ng/ml)	IL-6(pg/ml)	C-RP(mg/L)
正常对照组	13	8.67±2.68	4.39±0.38	77.71±40.89	0.86±0.60	99.92±32.36	2.54±1.31
DM组	10	24.30±1.92[a]	15.03±2.00[a]	33.35±19.01[a]	1.45±0.67[b]	135.05±43.39[b]	3.51±0.62[b]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与正常对照组比较

皮肤病变是糖尿病（diabetes mellitus，DM）的重要并发症之一[1]。国内外报道，约30%的DM患者合并皮肤损害[2]；如果考虑代谢和微循环障碍及其对皮肤胶原蛋白的影响，几乎所有（100%）DM患者均有皮肤受累[3]。皮肤病变可加重DM的病情，甚至导致十分严重的后果。因此，研究DM早期皮肤病变，予以早期治疗干预，对于防治DM的并发症和提高患者的生活质量有着重要的意义。多数学者认为包括皮肤病变在内的DM慢性并发症与炎症因子的升高密切相关[4]。本研究旨在应用链脲佐菌素诱导的DM大鼠模型观察血清炎症因子变化和皮肤的早期组织学改变，以建立DM皮肤并发症的动物模型，为DM皮肤病变防治的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

50只8～10周龄健康雄性清洁级Wistar大鼠，体质量200～250 g，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 试剂与仪器

链脲佐菌素（streptozotocin，STZ，美国Sigma公司）。德国罗氏优越血糖仪监测空腹血糖（fasting plasma glucose，FPG），糖化血红蛋白（HBALc）免疫法，超敏C-反应蛋白（C-RP）免疫电泳法检测，Beckman's生化自动分析仪（美国Beckman公司）。血清胰岛素（INS）、白细胞介素-6（IL-6）、肿瘤坏死因子（TNF-α）放免试剂盒均由北京华英生物技术研究所提供，批内变异系数（CV）分别为<10%、7%、5%。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的建立和分组 DM模型建立参照文献[5]方法加以改进：50只大鼠分为2组：①正常对照组（C组，$n=25$）；②DM组（$n=25$）；DM组大鼠用高糖高脂半合成高热量饲料适应性喂养2周，诱发出胰岛素抵抗。拟作DM大鼠25只大鼠空腹以链脲佐菌素（用前以0.1 mol/L柠檬酸盐缓冲液，冰浴新鲜配制，pH=4.5）35 mg/kg一次性腹腔注射。3 d至1周内尾静脉采血测血糖，随机血糖≥11.1 mmol/L，空腹血糖（FPG）≥7.0 mmol/L，稳定1周，确定为DM模型诱导成功，DM大鼠造模成功率100%。C组动物等容积缓冲液代替STZ进行注射。成模型DM大鼠逐渐出现多饮、多尿、多食、体质量减轻等表现。2组均饲常规饲料，在动物中心分笼喂养，自由饮水和进食；喂养中DM组有3只大鼠死亡。

1.3.2 标本收集与病理观察 成模后DM大鼠及正常大鼠在第4、8周和12周末正常对照组和DM组分别处死（失血休克死亡）4只大鼠，以观察DM大鼠皮肤早期改变；其余大鼠在16周统一处死。处死前大鼠腹腔内注射2.5%戊巴比妥钠（35 mg/kg）麻醉，心脏穿刺抽血，用作FPG、HBALc、TNF-α、IL-6、C-RP测定。处死后用硫化钡脱毛剂（硫化钡：滑石粉：洗衣粉=2∶2∶1）脱去背部鼠毛，取鼠背部中央的全层皮肤标本。每个标本分为若干小块，用10%中性甲醛固定，应用HE染色，观察皮肤组织学的改变，显微镜下测微尺测量表皮及皮肤全层厚度（测量5点，计算平均值）。

1.4 统计学方法

数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件，行独立样本t检验。

2 结果

2.1 两组大鼠糖代谢和血清炎性介质检测结果

DM组空腹血糖、糖化血红蛋白与正常对照组比较显著增高（$P<0.01$）；DM组的胰岛素测定比正常对照组显著降低（$P<0.01$）；DM组的TNF-α、IL-6、C-RP较正常对照组明显增高（$P<0.05$）。见表1。

2.2 两组大鼠不同时相的皮肤表皮和全层厚度的检测结果

测微尺测量表明，DM组大鼠4、8、12、16周皮肤全层均变薄，与正常对照组比较有明显差异（$P<0.05$，$P<0.01$）。DM组各时相点皮肤表皮厚度较正常对照组薄，但无统计学差异（$P>0.05$）。见表2。

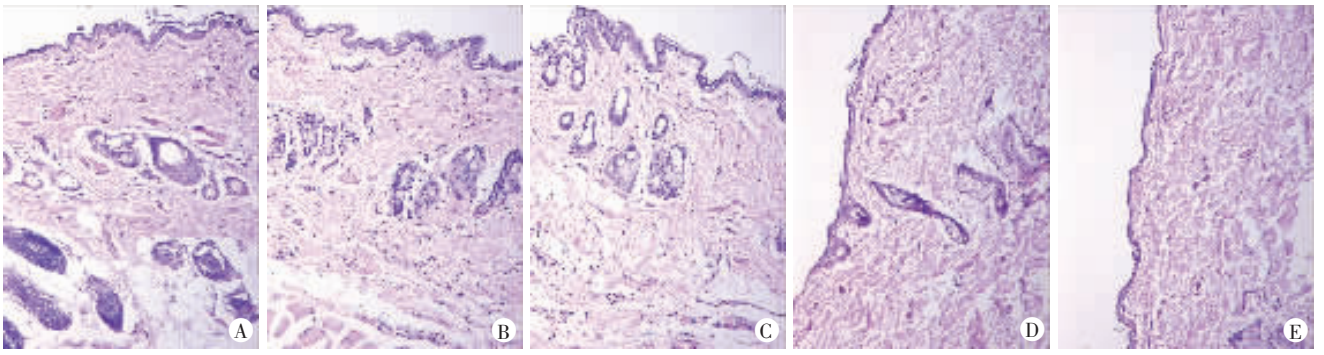
表2 两组大鼠不同时相点的皮肤表皮和全层厚度（$\bar{x} \pm s$）

组别		n	表皮厚度(μm)	皮肤全层厚度(mm)
正常对照组	4周	4	50.06±9.89	1.71±0.27
	8周	4	32.92±9.77	1.66±0.30
	12周	4	38.48±6.73	1.71±0.28
	16周	13	39.15±8.20	1.59±0.26
DM组	4周	4	41.19±15.85	1.07±0.26[b]
	8周	4	32.25±5.05	0.81±0.10[a]
	12周	4	32.52±4.35	0.64±8.69[a]
	16周	10	32.72±9.30	0.77±0.18[a]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$ 与正常对照组比较

2.3 两组大鼠皮肤组织学观察

将皮肤石蜡标本制成5 μm厚的切片，HE染色后光镜下观察：正常对照组4周：皮肤角质形成细胞排列整齐，真皮内及皮下胶原纤维清晰。DM组4周：皮肤角质形成细胞层次明显减少，排列欠整齐，真皮内及皮下胶原纤维较少，皮下脂肪组织明显减少。DM组8周：皮肤角质形成细胞层次少，排列欠整齐，真皮内及皮下胶原纤维轻度肿胀，皮下脂肪组织明显减少。DM组12周：皮肤表皮明显变薄，角质形成细胞层次显著减少，排列不整齐，局部见单层排列，真皮内胶原纤维轻度肿胀。DM组从4～16周的皮肤表皮逐渐变薄，角质形成细胞层次逐渐减少、层次欠清晰，直至局部为单层排列；真皮内胶原减少、萎缩、肿胀、退化变性；皮下脂肪逐渐进行性萎缩或消失。见图1。



A:正常对照组4周;B:DM组4周;C:DM组8周;D:DM组12周;E:DM组16周

图1 两组大鼠不同时相点的皮肤组织形态学变化 (HE ×200)

3 讨论

本研究16周DM组大鼠血清中TNF-α、IL-6、C-RP较正常对照组明显增高。大鼠皮肤经测微尺测量表明DM组大鼠4、8、12、16周时各相点皮肤全层逐渐变薄,表皮厚度较正常对照组薄但变化不显著;病理发现DM早期皮肤逐渐变薄主要是角质形成细胞层次逐渐减少,直至局部为单层排列;真皮内胶原减少、萎缩、肿胀、退化变性;皮下脂肪逐渐进行性萎缩或消失,与已有的报道相一致[6]。

DM皮肤病变的形成是一个多因素多环节参与的病理过程,涉及表皮与皮下的细胞、细胞外基质、细胞因子及其受体以及信号转导等[7,8]。目前研究认为DM是机体的一种低度慢性炎症,具体表现为TNF-α、IL-6、C-RP等炎症因子的升高[4]。TNF-α是一种由活化单核细胞产生的活性作用广泛的细胞因子,能降低胰岛素的作用,导致胰岛素抵抗;IL-6是体内许多细胞产生的一种具有多种生物活性的刺激因子,参与机体的各种病理生理过程[7]。C-RP是急性期反应蛋白,是非特异性炎症标志,主要受循环中IL-6和TNF-α调节,并刺激肝脏合成C-RP[9]。多数学者认为炎症因子通过干扰胰岛素信号转导系统,导致细胞内皮功能紊乱,最终导致大血管及微血管的并发症;C-RP通过胰岛素抵抗参与了DM血管病变的发生和发展[4,10]。

胰岛素受体和胰岛素信号介导通路的所有蛋白质均在皮肤细胞表达,缺乏胰岛素受体时皮肤角质细胞不能诱导分化,而胰岛素生长因子-1(IGF-1)则抑制其分化[11]。胰岛素对皮肤细胞的调节作用包括分化、增殖、凋亡、新陈代谢等,均有各自独立的信号通道,胰岛素的缺乏可导致皮肤病理学损害和影响创伤愈合的过程。DM患者占体质量15%的皮肤组织糖摄取降低也促成了机体血糖的升高,"高糖毒性"时葡萄糖转运降调节,影响皮肤角质化细胞糖摄取,从而抑制角质化细胞的增殖,增强其分化,可直接导致DM慢性皮肤并发症的发生[12]。另外,皮下脂肪层不仅仅是被动的能量贮存所,同时还能够分泌多种生物活性物质,本研究DM组大鼠皮肤全层变薄,表皮变化不明显,而皮下脂肪进行性萎缩或消失为显著,此可能是DM皮肤损害发展和创面难愈的病理基础之一。

参考文献:

[1] Wertheimer E. Diabetic skin complications: a need for reorganizing the categories of diabetes-associated complications[J]. Isr Med Assoc J, 2004, 6(4): 287-289.
[2] Huntley A, Drugge R. Diabetes in Skin Disease[M/OL]// Drugge R, Dunn H A. The Electronic Textbook of Dermatology. The Internet Dermatology Society, 1995-2000. [2010-01-22]. http://www.telemedicine.org/stamford.htm.
[3] Miracle L S, Barreda B F. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus, a clinic manner for identify the disease[J]. Rev Endocrinol Nutr, 2005, 13(2): 75-87.
[4] Leinonen E S, Hiukka A, Hurt-Camejo E, *et al*. Low-grade inflammation, endothelial activation and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes[J]. J Intern Med, 2004, 256(2): 119-127.
[5] 于德民, 吴锐, 尹潍, 等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 1995, 3(2): 105-109.
[6] 林炜栋, 陆树良, 陈向芳, 等. 糖尿病大鼠皮肤的组织化学改变[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(2): 230-233.
[7] 刘静, 王青. 糖尿病患者血清一些细胞因子, C肽和胰岛素变化[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(6): S119-S121.
[8] 流沙, 陈亮, 蔡红卫, 等. 糖尿病大鼠血浆和皮肤中P物质检测及意义[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1038-1039.
[9] 姚辉, 林汉华, 于芳, 等. 2型糖尿病大鼠血清C反应蛋白动态变化及罗格列酮干预后改变[J]. 临床儿科杂志, 2005, 23(8): 516--518.
[10] 尤巧英, 李成江, 李红, 等. 炎症因子与胰岛素抵抗和2型糖尿病大血管病变的相关性研究[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(10): 804-807.
[11] Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, *et al*. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications[J]. Diabetes, 2000, 50(7): 1627-1635.
[12] Wertheimer E, Trebicz M, Eldar T, *et al*. Differential roles of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in differentiation of murine skin keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2000, 115(1): 24-29.

(**收稿**:2009-11-11;**修回**:2009-12-17)
(编辑 栾 嘉)