

좌골신경 손상 후 스트렙토조토신 유도성 당뇨병에 의한 축사재생의 지연 효과

황진연¹ · 김기중¹ · 남궁욱^{1*}

¹대전대학교 한의학과

Retardation of axonal regeneration in the sciatic nerve after injury in streptozotocin-induced diabetes

Jinyeon Hwang¹, Ki-Joong Kim¹, Uk Namgung^{1*}

¹College of Korean medicine, Daejeon University.

Objective: The goal of this study is to investigate whether peripheral axonal regeneration is affected by diabetes in experimental animals. **Method:** Sprague Dawley rat was injected with 45~50 mg/kg of streptozotocin (STZ) to generate an animal model of diabetes. Three months after STZ injection, sciatic nerve (2 cm length) was removed and the same length of nerve segments from STZ-injected animal or from control animal (CTL) was transplanted into STZ-injected animals (STZ-STZ and STZ-CTL respectively). Similarly, sciatic nerve segments from STZ-injected animal or from control animal were grafted into the control animals (CTL-STZ and CTL-CTL respectively). All animals were sacrificed 2 weeks after transplantation. Sciatic nerve sections were prepared and subjected to immunofluorescence staining analysis. **Results:** Immunofluorescence staining for NF-200 showed that distal elongation of regenerating axons reached 40~80% of proximal nerve in both CTL-STZ and CTL-CTL groups. However, distal elongation in both STZ-STZ and STZ-CTL groups were 20~60% of proximal nerve. Furthermore, measurement of axonal regeneration after immuno-staining with SCG10 showed that the scores of distal elongation relative to proximal nerve were 50~90% in CTL-CTL and CTL-STZ groups and 10~60% in STZ-CTL and STZ-STZ. **Conclusions:** Our data showed that the levels of axonal regeneration were not affected irrespective of whether they were from STZ- or CTL graft, but were greatly reduced when the nerves were transplanted into the STZ host.

Key words: Diabetes, Axonal regeneration, transplantation, Streptozotocin

서론

당뇨병성 말초신경병증(Diabetic Peripheral Neuropathy; DPN)은 당뇨병 제 1형과 제 2형에서 모두 발생하는 당뇨병의 합병증 중 하나이다^{1,2}. DPN은 일반적으로 하반신의 긴 축삭돌기에서 양측으로 발생하며 발에서 근위부로 진행되며 감각, 운동 및 자율 신경 섬유에 영향을 미친다^{3,4,5}. 또한 DPN

의 만성 단계에서는 말초신경계의 축삭돌기가 퇴화하는 것을 관찰할 수 있었다^{6,7,8,9}. 당뇨병으로 인해 세포 내 증가한 포도당은 glycolysis¹⁰, hexosamine¹¹ pathway, 폴리올 경로(polyol pathway)¹¹ 중 하나에 의해 대사과정이 진행된다. 이러한 경로의 활성화는 염증성 캐스케이드(inflammatory cascades)의 개시와 산화 스트레스를 유도하고 신경 에너지 공급을 방해할 수 있는 반응성 산소 종의 형성을 초래한다. 만성 고혈당은 또

Received Sep 20, 2019, Revised Oct 01, 2019, Accepted Oct 07, 2019, Published online Oct 07, 2019.

Corresponding Author: Uk Namgung

Department of Korean Medicine, Daejeon University, Daejeon 34520, Republic of Korea

Tel : 042-280-2614, E-mail: unamgung@dju.kr

연구비 지원기관 : 한국연구재단

This work was supported by the Basic Science Research Programs through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2016R1D1A1B01014190).

한 신경세포와 슈반세포에서 당쇄화(혹은 당화반응; glycation)을 진행시키며, 이로 인한 최종 산물은 단백질과 세포 기능을 손상시키고 염증성 캐스케이드(inflammatory cascades)를 유발하며 추가적인 산화 스트레스를 초래한다^{12,13}. 추가적으로 만성 당뇨병으로 인해 증가한 유리 지방산은 슈반세포(Schwann cell)를 직접적으로 손상시키고 인슐린 저항성을 촉진할 수 있으며, 지단백질과 콜레스테롤의 산화는 산화 스트레스를 더욱 증가시키고 신경세포 사멸을 유도할 수 있다고 보고되었다^{14,15,16}. 또한, 이전의 연구에서 폴리올 경로의 활성화는 축삭돌기에서 Na^+/K^+ -ATPase 활성을 감소시키고 Na^+ 를 축적시켜 신경 흥분성을 저하시키고 신경전도 속도를 늦춘다고 보고되었다^{17,18,19}. 이러한 Na^+ 축적은 축삭돌기를 팽창시키고 슈반세포와 축삭돌기 사이의 연결 접합(myelination)을 방해한다고 보고되었다²⁰. 위와 같은 구조적 손상에 의한 신경 손상은 지속적인 나트륨 채널의 과발현과 통증으로 인식되는 이소성 발화(Ectopic firing)를 일으킬 수 있는 신경펩타이드(Neuropeptide)를 방출함으로써 자가회복을 시도하지만, 결과적으로 재생은 내재적인 신경 결손, 슈반세포 기능 장애 및 불리한 세포 외 환경으로 인해 실패한다^{3,4}.

본 연구는 만성 당뇨병으로 인한 신경재생의 결핍을 확인하고 일반 신경의 재생과의 차이를 확인하기 위해 진행되었다. 과거 보고된 연구에 따르면 신경 이식을 진행했을 때, 숙주 동물의 나이에 따른 재생의 차이를 확인 할 수 있었다²¹. 다른 동물의 좌골신경을 어린 쥐와 늙은 쥐를 숙주로 나누어 이식을 진행 했을 때, 숙주가 어린 쥐의 경우 축삭 재생의 비율이 더 높게 측정되었다. 이러한 결과를 토대로 본 연구에서는 당뇨병 유발 쥐와 일반 쥐를 숙주로 사용하여 신경 재생의 비율을 비교하기 위하여 실험을 진행하였다. 또한 이식되는 신경의 상태가 재생에 미치는 영향을 확인하기 위해, 이식하는 신경 또한 두 개의 그룹(일반 쥐 혹은 당뇨병 유발 쥐)으로 나누어 실험을 진행하였다. 그 결과 숙주 동물이 당뇨병 유발 쥐인 경우, 일반 쥐보다 신경 재생이 원활히 일어나지 않는 것을 관찰하였고, 이식되는 신경의 종류는 크게 영향을 미치지 않는 것을 보였다.

방법

1. 실험동물 및 당뇨병 유발

7주령 수컷 Sprague Dawley (SD) rat (220g)을 샘타코 (Osan, Korea)에서 구입하여 동물 사육실에서 24°C, 12:12h 밤낮 주기로 1주일간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다. 1주일 후 당뇨병 유발을 위해 절식 6시간 후 45-50 mg/kg 농도의 streptozotocin (STZ; Sigma-Aldich, St. Louis, MO, USA)를 용매 (0.1 M citrate buffer, pH 4.5)에 녹여 동물에게 주사하였다. 1주일 후 glucose meter (Accu-Chek, Roche Diagnostic, GmbH, Germany)를 사용하여 혈당측정을 진행하였다. 측정 후 혈당값이 300 mg/dl 초과한 쥐를 선발하여 3달 동안 당뇨 증상을 진행시킨 후 실험을 진행하였다. 동물실험에 관련된 사항들은 대전대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다. (DJUAR2019-029)

2. 좌골신경 이식수술 (Sciatic Nerve Transplantation Surgery)

좌골신경을 이식하기 위해 쥐를 2% 이소플루란 (HANA PHARM CO, Seoul, Korea)으로 마취하였다. 마취 후 숙주로 사용되는 쥐의 좌골신경을 20 mm 절단하였다. 신경의 손상을 유지하기 위해 근위부 신경을 근처의 근육에 10-0 nylon실을 사용하여 묶어두었고, 1주일 뒤 이식을 진행하였다. 이식할 좌골신경의 20 mm를 절단하여 숙주 동물의 좌골신경과 10-0 nylon실을 이용하여 이식하였다. 이식 후 2주 동안의 회복기간을 준 후 동물을 처치하였다.

3. 면역형광염색법(Immunofluorescence staining)

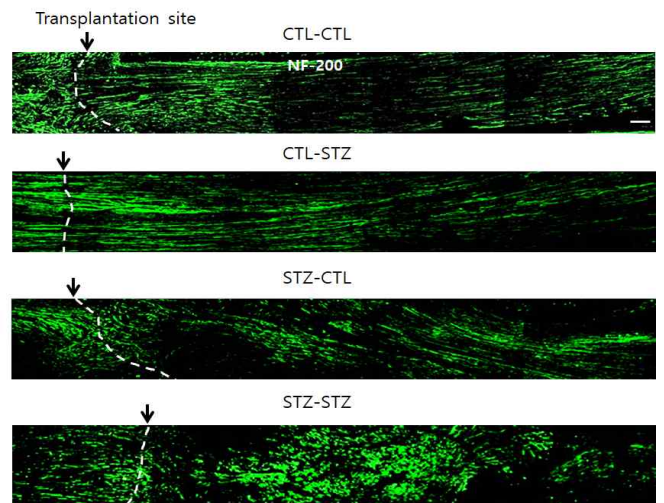
좌골 신경 조직을 적출한 뒤 냉동 절편기를 이용하여 20 μm 의 두께로 절단하여 슬라이드에 부착시켰다. 조직을 고정시키기 위하여 4% paraformaldehyde(Sigma-Aldrich) 와 4% sucrose를 섞은 용액을 사용하여 실온에 45분 동안 반응시켰다. PBST(phosphate buffered saline + 0.1% triton X-100) 용액에 10 mM Glycine을 첨가하여 5분씩 3회 세척하였다. PBS에 0.5% Nonidet P-40 Substitute를 첨가하여 상온에서 30분간 permeabilization 하였다. 조직을 PBST용액으로 10

분간 1회 세척하였다. 조직의 blocking을 위하여 PBST 용액에 2.5% horse serum 과 2.5% Bovine Serum Albumin(BSA)를 섞은 blocking buffer용액으로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Blocking buffer에 1차 antibody를 섞어 조직과 O/N으로 반응시켰다. 반응 후 조직을 PBST용액으로 10분간 3회 세척하였다. Blocking buffer에 2차 antibody를 섞어 조직과 1시간 동안 암실에서 반응시켰다. PBST용액으로 10분간 1회 세척하였다. 핵 염색을 위해 PBST에 Hoechst를 처리해 10분간 1회 암실에서 반응시켰다. PBST용액으로 10분간 1회 세척 후 mounting용액을 사용해 cover glass를 덮고 상온에서 말려주었다. 1차 antibody는 anti-NF200(Sigma-Aldrich)와 anti-SCG10(Novus, St. Louis, USA)가 염색에 사용되었다. 2차 antibody는 fluorescein goat anti-mouse IgG antibody와 rhodamine goat anti-rabbit antibody가 사용되었다. 염색된 시료는 형광현미경을 사용하여 이미지가 촬영되었다. 모든 이미지는 Adobe Photoshop software를 사용하여 분석되었다.

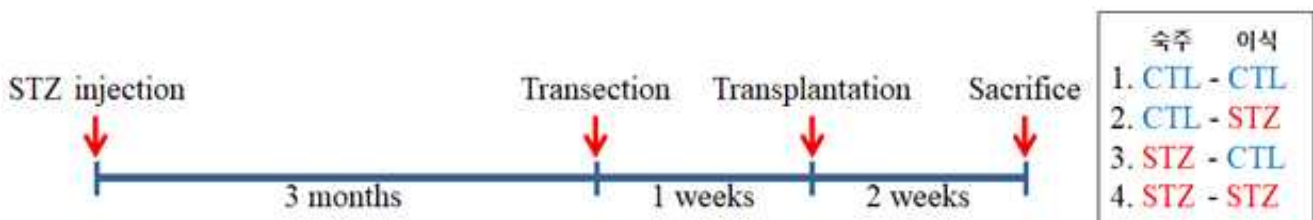
결과

당뇨병성 신경 병증으로 인한 신경 손상과 신경 재생을 연구하기 위해 당뇨병을 유발시킨 쥐의 좌골신경을 사용해 실험을 진행하였다. 당뇨병성 모델의 신경 재생 약화를 일반 쥐의 재생과 비교하기 위하여 당뇨병 유발 쥐와 대조군으로 일반 쥐를 숙주로 사용하였다. 좌골 신경을 절단한 뒤 1주일 후 다른 개체의 당뇨병 쥐와 일반 쥐에서 신경을 잘라 숙주의 신경에 이식하였다 (Fig 1). 이식 후 2주 뒤 좌골 신경을 냉동 절편기로 절단하여 신경 재생 측정을 위하여 면역형광염색을 진행하였다.

먼저 NF-200 염색을 통해 신경 재생을 측정하였다. 재생 정도를 비교하기 위해 손상 부분으로부터 0.1 mm 단위로 총 1 mm 범위 내로 NF-200 signal 축삭의 개수를 측정하였다 (Fig 2, 4A). 일반 쥐를 숙주로 사용한 경우(CTL-CTL and CTL-STZ), 0.2 mm 범위에서 약 80%의 축삭이 재생되었다. 0.3 mm ~ 0.7 mm 범위에서는 60 ~ 70%의 축삭이 재생되었으며 0.8 mm 이상의 범위에서는 재생 비율이 50%로 줄어들었다. 당뇨병 유발 쥐가 숙주인 경우, 재생된 축삭의 수는 이식한 개체의 신경에 따른 차이를 보였다. 일반 쥐의 신경을 이식하였을 때(CTL-CTL), 0.1 mm 까지 재생된 축삭은 약 60% 정도로 측정되었고 0.2 mm 이상의 구간에서는 40% 이하로 측정되었다. 당뇨병 유발 쥐의 신경을 이식했을 경우(CTL-STZ), 0.1 mm ~ 0.7 mm 사이에서는 일반 쥐의 신경을 이식했을 때 보다 재생 비율이 낮은 값으로 측정되었다. 0.8 mm 이상



[Figure.2]. Representative image of NF-200 staining of sciatic nerve section. Nerve was sectioned at 14 μ m thickness. The number of regenerated axons were determined per 0.1 mm from graft site to distal portion. Vertical line : Transplantation site, scale bar; 100 μ m.

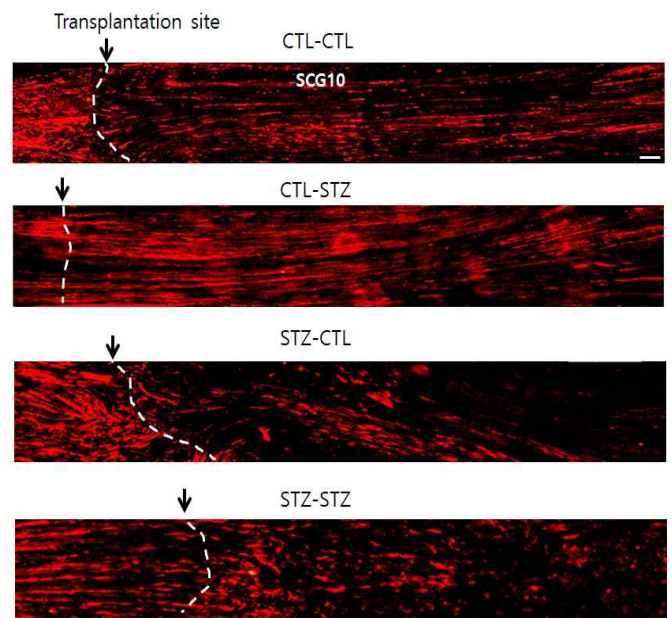


[Figure.1]. Diagram of experimental plan. STZ (streptozotocin) was injected at 45~50mg/kg to induce diabetes. Diabetes was maintained for three months and sciatic nerve was removed at 2 mm length. After 1 week, sciatic nerve was graft and recovered for 2 weeks. After 2 weeks, animals were sacrificed.

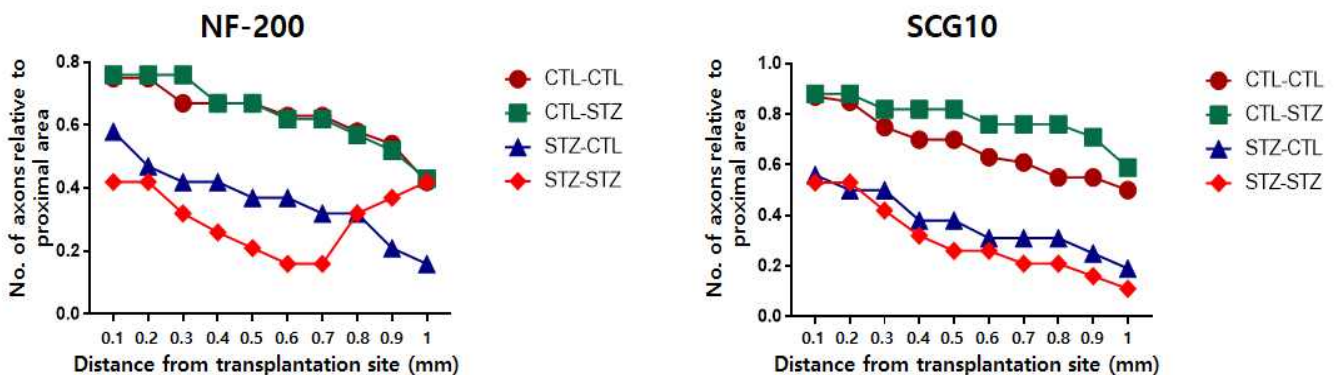
에서는 염색된 축삭의 개수가 다시 증가하였다. NF-200 항체는 재생된 축삭뿐 아니라 퇴화된 축삭에도 반응을 하기 때문에 수치 값이 증가한 것으로 생각된다.

위에서 언급된 것처럼, NF-200 항체는 신경잔섬유(neurofilament)를 표적으로 하며 죽은 신경 세포에서도 신경잔섬유가 존재할 수 있어 재생되는 축삭과 퇴화된 축삭에도 반응한다. 이와 달리 Superior cervical ganglion 10 (SCG10)은 STMN2 (stathmin 2)로도 알려져 있으며, microtubule dynamics와 protein trafficking^{22,23,24}을 조절하는 신경세포로 발현되는 stathmin family protein이다. SCG10은 발달 중에 발현이 매우 높고 미세소관 안정성을 조절함으로써 축삭돌기 성장에 중요한 역할을 한다^{25,26,27}. 흥미롭게도, 축삭돌기 손상은 성인 감각 뉴런에서 SCG10 발현의 증가를 초래한다. 대조적으로, 우리는 최근에 축삭돌기 손상 후 몇 시간 이내에 SCG10이 원위부 축삭돌기에서 빠르게 손실된다는 것을 증명하였다²⁸). 이로써 세포의 재생과 원위부 축삭돌기의 분화 조절은 평가하는데 있어 축삭돌기 재생의 초기단계에 SCG10이 효율적이고 선택적인 표지자로 활용될 수 있다는 가설을 검증할 수 있었다. 본 연구에서 축삭돌기 재생 과정에서 발현되는 SCG10을 분석한 결과, NF-200 항체를 사용한 분석과는 확연히 다른 결과를 얻을 수 있었다. 먼저, 일반 쥐가 숙주인 경우, 당뇨병 쥐(CTL-STZ)와 일반 쥐(CTL-CTL)의 신경을 이식했을 때 0.3 mm 구간까지는 비슷한 값(약 80%)으로 측정되었다 (Fig 3, 4B). 하지만 접합 부위로부터 거리가 멀어질수록 당뇨병 쥐의 신경을 이식한 그룹(CTL-STZ)에서 재생이 된 축삭이 더 많이 관찰되었다(CTL-STZ; 약 60~80%, CTL-CTL; 약 30~70%). 당뇨병 쥐가 숙

주인 경우, 0.1 mm 구간에서부터 일반 쥐 숙주와 약 1.8배의 차이를 보였다(일반 쥐 숙주 : 약 90%, 당뇨병 쥐 숙주 : 약 50%). 또한 NF-200 염색과는 다르게 당뇨병 쥐와 일반 쥐의 신경 이식 결과는 비슷한 값으로 측정되었다. 위와 같은 값을 토대로 당뇨병 쥐를 숙주로 실험한 경우(STZ-CTL and STZ-STZ) 일반 쥐의 경우(CTL-CTL and CTL-STZ)보다 손상된 신경의 재생이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 이식된 신경의 쥐가 일반 쥐 또는 당뇨병 쥐인지는 신경 재생에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 관찰되었다.



[Figure.3]. Representative image of SCG10 staining. The number of regenerated axons were determined per 0.1 mm from graft site to distal portion. Vertical line : Transplantation site, scale bar; 100 μ m.



[Figure.4]. Quantification of NF-200 and SCG10 labeled axons. Mean the number of axons was determined by analyzing selected tissue per 5 section (n=1).

고찰

당뇨병성 말초신경병증은 당뇨병 환자 중 절반 이상에게 유발되는 당뇨병의 합병증 중 하나이며, 그로 인한 신경의 퇴화와 재생과 관련된 연구²⁹⁾는 현재에도 진행되고 있다. 본 연구에서는 당뇨병에 의한 신경병증의 진행으로 신경 재생에 미치는 영향을 알아보기 위해 진행되었다. 당뇨병으로 인해 생긴 신경 결손으로 인한 신경 재생의 차이를 연구하기 위해 당뇨병 유발 쥐와 일반 쥐를 숙주로 사용하여 다른 동물에서 신경 이식을 한 후 실험을 진행하였다. 이식 후 2주간의 회복기간을 둔 후 좌골신경을 적출하여 분석하였다. 신경세포의 지표로 알려진 NF-200 항체 (anti-neurofilament-200)를 사용하여 염색을 진행한 결과, 일반 쥐와 당뇨병 유발 쥐의 재생 차이가 확연히 관찰되었다. 원위부의 축삭의 수로 근위부의 축삭에 수를 나누어 보정된 결과 값을 도출하였다. 접합부분으로부터 근위부 방향으로 0.1 mm 단위로 염색된 축삭의 수를 세어 측정하였을 때, 0.1 mm 지점부터 차이를 보였다. SCG10 항체 (anti-SCG10)로 실험을 진행했을 때도 비슷한 결과 값이 도출되었다. 하지만 숙주의 상태에 의한 재생 차이는 보였지만, 이식된 신경의 상태는 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 다른 나이의 동물을 숙주로 사용하여 연구했을 때와 유사한 결과를 보였다.¹⁹⁾ 숙주의 나이가 많을수록 신경 재생이 감소하는 결과가 보고되었지만 이식되는 신경의 동물의 나이는 재생과 큰 연관이 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 토대로 신경 재생은 이식되는 신경의 종류보다는 숙주의 상태 (질병 혹은 나이)가 결정하며 신경 재생인자를 생성하는 후근신경절의 신경세포체의 상태와 역할이 중요하다고 판단된다.

좌골신경 손상 후 재생과정 중 손상 부위를 중심으로 말단 부위의 슈반세포(Schwann cell)는 탈분화(dedifferentiation), 재분화(redifferentiation), 분열(proliferation) 과정을 거치게 되며 축삭의 재생을 보조한다³⁰⁾. 기존의 연구에서, 당뇨병 모델의 쥐를 숙주로 사용하여 좌골신경의 슈반세포에 관한 보고가 있었다³¹⁾. 해당 연구에 따르면 뉴로트로핀수용체 중 하나인 p75^{NTR} 단백질이 당뇨병 모델의 쥐를 숙주로 사용한 경우 그 수가 증가한 것으로 측정되었다. 또한 본 연구와는 다르게 신경 이식 쥐의 차이에 따라 다른 결과 값을 보임을 보고하였다. 당뇨병

모델 쥐의 신경을 숙주(당뇨병 모델 쥐 혹은 일반 쥐)에게 이식한 경우 p75^{NTR} 단백질이 일반 쥐의 신경을 이식한 그룹보다 높게 발현되었으며, 증가한 p75^{NTR} 단백질은 세포 사멸을 유도하여 슈반세포의 생존을 낮추며 축삭 재생을 감소시킨다고 보고되었다³²⁾. 이러한 결과는 본 연구의 결과와 차이가 있었다. 본 실험에서는 이식하는 신경의 상태에 따른 차이는 보이지 않았다 (Fig 4). 또한, 슈반세포에서 p75^{NTR} 단백질은 신경 절단(axotomy)이 되면 증가한다고 보고되었다³³⁾. 즉 신경 이식을 위한 일반 쥐의 신경 절단 과정에서 슈반세포 내의 p75^{NTR} 단백질은 증가할 것이며 당뇨병 모델 쥐에서 p75^{NTR} 단백질 증가와 유사 할 것이라 생각된다. 본 연구에서는 슈반세포와 관련된 실험을 진행하지 못하여 위 내용에 대한 정확한 분석은 불가능했지만, 위의 연구에서도 당뇨병 모델 쥐의 슈반세포에서 p75^{NTR} 단백질의 증가가 신경 재생³¹⁾과 관련되어 있다는 직접적인 증거를 제시하지는 못했다. 이러한 논제는 추후의 추가적인 실험을 진행하여 당뇨병성 신경병증에 대한 연구에 새로운 발견 가능성을 제시 할 수 있을 것이라고 생각된다.

기존의 연구에서 당뇨병 모델 동물의 좌골신경에서 염증지표인 IL-1 β , IL-6 그리고 TNF- α 단백질이 증가하는 것으로 보고되었다³⁴⁾. 이전 연구에 의하면, 고농도의 포도당이 TLR4 (Toll Like Receptor4)/NF κ B signal pathway를 통해 산화스트레스를 유도하여 염증 물질들을 일으킨다³⁵⁾. 또한 폴리올 경로(polyol pathway)를 통해 고농도의 포도당이 소르비톨(sorbitol)로 환원된다. 환원된 소르비톨은 삼투압 충격(osmotic shock or osmotic stress)과 에이티피아제(ATPase)의 활성을 감소시켜 신경병증을 유도한다고 보고되었다³⁶⁾. 위와 같은 결과들이 종합적으로 신경병증을 유도하고 신경 재생에 부정적으로 적용되어 당뇨병 쥐가 숙주일 때 재생이 약화된 것으로 보인다.

최근 연구에서 당뇨병 모델에서 신경 재생 인자와 관련된 보고는 많았지만³⁷⁾ 재생의 차이를 보고한 연구는 많지 않았다. 또한 STZ-유도성 당뇨병 모델의 후근신경절의 감각 신경 세포를 배양하였을 때, 신경 돌기(neurite)의 길이가 일반 쥐의 신경 돌기에 길이보다 낮게 측정되었다고 보고되었다³⁸⁾. 위 연구에서는 비록 세포 실험이긴 하지만 감각 신경 세포에 한약재를 첨가했을 때, 성장하는 신경 돌기의 길이가 더 길어진 것을 보였다. 본 연구에서는 추가적

으로 약재 실험을 통해 당뇨병 모델 쥐의 재생을 촉진시키는 것을 연구하지는 못했지만 차후 이와 관련된 실험을 추가적으로 진행함으로써 당뇨병성 신경병증의 치료의 대한 연구를 위한 발판이 될 수 있을 것이다. 기존 신경 재생 효과가 있다고 보고된 바 있는 한약재인인 보양환오탕이나 보기계통탕 등을 활용하여^{38,39)}. 향후 신경 재생과 연관된 보다 심화된 연구를 수행할 수 있을 것으로 기대한다.

결론

STZ-유도성 당뇨병 모델을 통해 신경 재생을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 당뇨병 모델의 쥐를 숙주인 경우 일반 쥐 숙주보다 약 1.5배 재생이 악화되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 이식되는 신경은 당뇨병 모델 쥐와 일반 쥐의 재생 차이를 보이지는 않았다. 향후 신경 재생 촉진 효능이 있는 한약물을 활용하여 보다 심화된 기전 연구 진행이 필요할 것이다.

감사의 글

이 연구는 한국연구재단의 기본연구지원사업에 의해 이루어짐 (NRF-2016R1D1A1B01014190).

References

1. Litwak L, Goh SY, Hussein Z, Malek R, Prusty V, Khamseh ME. Prevalence of diabetes complications in people with type 2 diabetes mellitus and its association with baseline characteristics in the multinational Alchieve study. *Diabetol Metab Syndr.* 2013 Oct 24;5(1):57.
2. Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience.

- Diabetes. 2006 May;55(5):1463-9.
3. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol.* 2012 Jun;11(6):521-34.
4. Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat Rev Neurol.* 2011 Sep 13;7(10):573-83.
5. Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, Sosenko JM, Ziegler D. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2017 Jan;40(1):136-154.
6. Biessels GJ, Bril V, Calcutt NA, Cameron NE, Cotter MA, Dobrowsky R, et al. animal models of diabetic neuropathy: a consensus statement of the diabetic neuropathy study group of the EASD (Neurodiab). *J Peripher Nerv Syst.* 2014 Jun;19(2):77-87.
7. Malik RA, Tesfaye S, Newrick PG, Walker D, Rajbhandari SM, Siddique I et al. Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy. *Diabetologia.* 2005 Mar;48(3):578-85.
8. Lindberger M, Schröder HD, Schultzberg M, Kristensson K, Persson A, Ostman J et al. Nerve fibre studies in skin biopsies in peripheral neuropathies. I. Immunohistochemical analysis of neuropeptides in diabetes mellitus. *J Neurol Sci.* 1989 Nov;93(2-3):289-96.
9. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P et al. Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care.* 2010 Oct;33(10):2285-93.
10. Kumar S, Dikshit M. Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease. *Front Immunol.* 2019 Sep 20;10:2099.

11. Laddha AP, Kulkarni YA. Tannins and vascular complications of Diabetes: An update. *Phytomedicine*. 2019 Mar 15;56:229–245.
12. Vincent AM, Perrone L, Sullivan KA, Backus C, Sastry AM, Lastoskie C, et al. Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress. *Endocrinology*. 2007 Feb;148(2):548–58.
13. Duran-Jimenez B, Dobler D, Moffatt S, Rabbani N, Streuli CH, Thornalley PJ, Tomlinson DR, Gardiner NJ. Advanced glycation end products in extracellular matrix proteins contribute to the failure of sensory nerve regeneration in diabetes. *Diabetes*. 2009 Dec;58(12):2893–903.
14. Almaguel FG, Liu JW, Pacheco FJ, De Leon D, Casiano CA, De Leon M. Lipotoxicity-mediated cell dysfunction and death involve lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L activity. *Brain Res*. 2010 Mar 8;1318:133–43.
15. Tsintzas K, Chokkalingam K, Jewell K, Norton L, Macdonald IA, Constantin-Teodosiu D. Elevated free fatty acids attenuate the insulin-induced suppression of PDK4 gene expression in human skeletal muscle: potential role of intramuscular long-chain acyl-coenzyme A. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Oct;92(10):3967–72.
16. Vincent AM, Hayes JM, McLean LL, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Feldman EL. Dyslipidemia-induced neuropathy in mice: the role of oxLDL/LOX-1. *Diabetes*. 2009 Oct;58(10):2376–85.
17. Arnold R, Kwai N, Lin CS, Poynten AM, Kiernan MC, Krishnan AV. Axonal dysfunction prior to neuropathy onset in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013 Jan;29(1):53–9.
18. Sung JY, Tani J, Chang TS, Lin CS., Uncovering sensory axonal dysfunction in asymptomatic type 2 diabetic neuropathy. *PLoS One*. 2017 Feb 9;12(2):e0171223.
19. Misawa S, Sakurai K, Shibuya K, Iose S, Kanai K, Ogino J et al., Neuropathic pain is associated with increased nodal persistent Na(+) currents in human diabetic neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2009 Dec;14(4):279–84.
20. Sima AA, Nathaniel V, Bril V, McEwen TA, Greene DA. Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of axo-glia dysjunction in human diabetic neuropathy. *J Clin Invest*. 1988 Feb;81(2):349–64.
21. Painter MW, Brosius Lutz A, Cheng YC, Latremoliere A, Duong K, Miller CM, et al. Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. *Neuron*. 2014 Jul 16;83(2):331–343.
22. Ozon S, Maucuer A, Sobel A. The stathmin family -- molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system. *Eur J Biochem*. 1997 Sep 15;248(3):794–806.
23. Riederer BM, Pellier V, Antonsson B, Di Paolo G, Stimpson SA, Lütjens R et al. Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21;94(2):741–5.
24. Wang J, Shan C, Cao W, Zhang C, Teng J, Chen J. SCG10 promotes non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein by facilitating its trafficking to the cell surface. *Hum Mol Genet*. 2013 Dec 15;22(24):4888–900.
25. Morii H, Shiraishi-Yamaguchi Y, Mori N. SCG10, a microtubule destabilizing factor, stimulates the neurite outgrowth by modulating microtubule dynamics in rat hippocampal primary cultured neurons. *J Neurobiol*. 2006 Sep 1;66(10):1101–14.

26. Sugiura Y, Mori N. SCG10 expresses growth-associated manner in developing rat brain, but shows a different pattern to p19/stathmin or GAP-43. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995 Dec 21;90(1-2):73-91.
27. Tararuk T, Ostman N, Li W, Björkblom B, Padzik A, Zdrojewska J et al. JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J Cell Biol.* 2006 Apr 24;173(2):265-77.
28. Shin JE, Miller BR, Babetto E, Cho Y, Sasaki Y, Qayum S et al. SCG10 is a JNK target in the axonal degeneration pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Dec 26;109(52):E3696-705.
29. Beeve AT, Brazill JM, Scheller EL. Peripheral Neuropathy as a Component of Skeletal Disease in Diabetes. *Curr Osteoporos Rep.* 2019 Aug 7.
30. Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 2007;30:209-33.
31. Eckersley L, Ansselin AD, Tomlinson DR. Effects of experimental diabetes on axonal and Schwann cell changes in sciatic nerve isografts. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001 Aug 15;92(1-2):128-37.
32. Gonçalves NP, Mohseni S, El Soury M, Ulrichsen M, Richner M, Xiao J et al. Peripheral Nerve Regeneration Is Independent From Schwann Cell p75(NTR) Expression. *Front Cell Neurosci.* 2019 May 29;13:235.
33. Petratos S, Butzkueven H, Shipham K, Cooper H, Bucci T, Reid K et al. Schwann cell apoptosis in the postnatal axotomized sciatic nerve is mediated via NGF through the low-affinity neurotrophin receptor. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 Apr;62(4):398-411.
34. Saika F, Kiguchi N, Matsuzaki S, Kobayashi D, Kishioka S. Inflammatory Macrophages in the Sciatic Nerves Facilitate Neuropathic Pain Associated with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019 Mar;368(3):535-544.
35. Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol.* 2006 Oct 30;72(9):1102-13.
36. Dodda D, Ciddi V. Plants used in the management of diabetic complications. *Indian J Pharm Sci.* 2014;76(2):97-106.
37. Tang W, Chen X, Liu H, Lv Q, Zou J, Shi Y et al. Expression of Nrf2 Promotes Schwann Cell-Mediated Sciatic Nerve Recovery in Diabetic Peripheral Neuropathy. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(5):1879-1894.
38. Kim KJ, Namgung U, Cho CS. Protective Effects of Bogijetong Decoction and Its Selected Formula on Neuropathic Insults in Streptozotocin-Induced Diabetic Animals. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017;2017:4296318.
39. Kim KJ, Namgung U. Facilitating effects of Buyang Huanwu decoction on axonal regeneration after peripheral nerve transection. *J Ethnopharmacol.* 2018 Mar 1;213:56-64.