

# 糖尿病大鼠肋间肌酶组织化学研究

沈兴平\* 舒昌达<sup>1</sup> 李琼英<sup>2</sup> 何军<sup>1</sup>

(厦门大学附属中山医院内分泌科, 厦门 361004; <sup>1</sup>重庆医科大学附属第一医院内分泌科, 重庆 400016

<sup>2</sup>四川大学华西公共卫生学院毒理学教研室, 成都 610041)

**摘要** 目的 探讨糖尿病早期肋间肌酶组织化学变化。方法 应用酶组织化学方法观察糖尿病 2 周和 4 周大鼠肋间肌组织脱氢酶、水解酶和氧化酶活性变化。结果 糖尿病 2 周大鼠肋间肌组织琥珀酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶和辅酶黄递酶活性较对照组增强, 乳酸脱氢酶活性较对照组减弱, 苹果酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、酸性磷酸酶、酸性- $\alpha$ -萘酸性酯酶和细胞色素氧化酶无变化。糖尿病 4 周大鼠肋间肌组织琥珀酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、辅酶黄递酶、酸性磷酸酶和酸性- $\alpha$ -萘酸性酯酶活性较对照组增强, 乳酸脱氢酶和细胞色素氧化酶活性较对照组减弱, 异柠檬酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶无变化。结论 糖尿病 2 周大鼠肋间肌组织有氧氧化代谢能力增强, 糖酵解能力减弱。糖尿病 4 周大鼠肋间肌组织有氧氧化能力增强、糖酵解能力减弱及能量代谢紊乱。在糖尿病早期呼吸肌存在代谢异常。

**关键词** 糖尿病; 肋间肌; 酶; 组织化学

**中图分类号** R587.1 **文献标识码** A

## AN ENZYME HISTOCHEMICAL STUDY OF INTERCOSTAL MUSCLES IN DIABETIC RATS

Shen Xingping\*, Shu Changda<sup>1</sup>, Li Qiongying<sup>2</sup>, He Jun<sup>1</sup>

(Department of Endocrinology, Affiliated Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, China)

**[Abstract]** Objective To study the enzymic activity changes of intercostal muscles in rats with early-stage diabetes. Methods Enzyme histochemical methods were used to observe changes in the enzymic activities of dehydrogenases, hydrolases and oxidases in 2ed and 4th week diabetic rat intercostal muscles. Results The activities of SDH (succinate dehydrogenase), GDH (glutamate dehydrogenase) and NADHD (NADH diaphorase) were increased in 2ed week diabetic intercostal muscles in comparison with those of the controls. LDH (lactate dehydrogenase) activity was decreased whereas MDH (malate dehydrogenase), ICDH (isocitrate dehydrogenase), G-6-PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase), ACP (acid phosphatase), ANAE (acid  $\alpha$ -naphthyl acid esterase) and CCO (cytochrome oxidase) had no changes in 2ed week diabetic rats. The activities of SDH, MDH, GDH, NADHD, ACP and ANAE in 4th week diabetic rat intercostal muscles were significantly higher than those of control rats. The activities of LDH and CCO were significantly lower. ICDH and G-6-PD showed no apparent alteration. Conclusion The results indicate that the aerobic capacity is higher and the glycolytic capacity is lower in 2ed week diabetic rat intercostal muscles. There are increased aerobic capacity, decreased glycolytic capacity and disturbed lipid and energy metabolism in intercostal muscles of 4th week diabetic rats. Thus the enzymic activities of dehydrogenases, hydrolases and oxidases are changed in early-stage diabetes, which can accelerate the destruction of respiratory muscles.

**[Key words]** Diabetes mellitus; Intercostal muscles; Enzyme; Histochemistry

呼吸肌是肺进行气体交换的机械动力。1型和2型糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 患者均存在不

同程度的肺功能异常, 但其发病机制至今不详。先前研究已证实 DM 可导致呼吸肌功能、结构及代谢等方面的改变, 而对重要呼吸肌之一的肋间肌研究较少<sup>[1-4]</sup>。尽管肋间肌的呼吸功能作用一直都存在一定的争议, 但近年来的研究显示其作为重要的呼

〔收稿日期〕2006-12-28 〔修回日期〕2007-03-12

〔作者简介〕沈兴平, 男 (1963年), 汉族, 主任医师。

\* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed)

吸肌和骨骼肌,在调节呼吸运动,维持肺膨胀,实现气体交换,维持生物体的肺功能仍具有极其重要的作用<sup>[5-6]</sup>。DM 时肋间肌是否存在结构、功能和代谢等方面的变化,目前尚不清楚。本实验采用酶组织化学方法及图像分析等手段对 DM 早期大鼠肋间肌进行定性定量研究,以了解 DM 早期大鼠肋间肌的酶组织化学特性改变,进一步探讨 DM 对肺功能影响的发病机制。

## 材料和方法

### 1. 动物模型复制

雄性 Wistar 大鼠 30 只 (重庆医科大学实验动物中心提供),体重 150-180g,随机分为 DM 1 (DM 模型成立 2 周)和 DM 2 组 (DM 模型成立 4 周)与对照组。DM 组 20 只对照组 10 只大鼠。DM 组大鼠予四氧嘧啶 (按 200mg/kg 体重)一次性腹腔内注射,对照组注射等量生理盐水。注射药物后第 3 d 测空腹血糖 (邻甲苯胺法) > 13.90mmol/L 为 DM 模型成立。所有大鼠均自由饮水、进食。在 DM 模型成立 2 和 4 周时,测空腹血糖,其值仍 > 13.90mmol/L。

### 2. 取材

DM 大鼠病程 2 和 4 周时,DM 1、2 组和对照组各 10 只大鼠同时股动脉放血活杀,剪开胸腔,速取左侧肋间肌组织,去除附着脂肪及结缔组织,用滤纸吸干表面水分,顺纤维方向取 2-3mm 宽肌条,轻微牵拉至原位长度。标本均取横截面,采用多组织标本合包法,液氮内骤冷固定。

### 3. 组织化学方法

#### 3.1 实验药品及仪器

显示各种酶活性的底物均购自 Sigma 公司。孵育液及缓冲液,临用前配制。切片机采用 AO 型恒冷切片机 (美国)。

#### 3.2 方法及染色结果<sup>[7,8]</sup>

将冷冻固定的肋间肌组织在 -15℃ 下恒冷切片,切片厚度 8μm,在统一实验条件下,用酶组织化学染色法显示 10 种酶,其中脱氢酶 7 种,包括琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH)、苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH)、异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, ICDH)、谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH)、乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH)、辅酶黄递酶 (NADH diaphorase, NADHD)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-

6-PD)。水解酶 2 种,即酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP) 和酸性-α-萘酸性酯酶 (Acid α-naphthyl acid esterase, ANAE, 也称非特异性酯酶, nonspecific esterase)。氧化酶 1 种,即细胞色素氧化酶 (cytochrome oxidase, CCO)。脱氢酶显色采用标准脱氢酶法,终产物颜色为蓝色,ACP 和 ANAE 显色采用偶氮偶联法,终产物颜色分别为红色和砖红色,CCO 显色采用 DAB 法,终产物颜色为红棕色。

### 3.3 酶活性观察指标记录方法

一 肌纤维无染色颗粒,不着色,阴性;

a 肌纤维染色颗粒稀少或无,浅着色,弱阳性;

β 肌纤维染色颗粒较多,清晰,着色,阳性;

δ 肌纤维染色颗粒增多、增粗,深着色,强阳性。

3.4 免去底物作阴性对照,以排除假阳性反应的可能性。

### 4. 图像分析

采用 MD20 型彩色图像分析系统 (Leitz),对酶组织化学切片进行图像测量,修正及分析,每张切片随机选择 10 个视野,测量酶染色吸光度 A (着色深度),取其平均值。

### 5 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS 11.5 软件进行 t 检验。

## 结 果

### 1. 酶活性改变

对照组肋间肌:强阳性反应:LDH;阳性反应:SDH、NADHD、CCO;弱阳性反应:MDH、GDH、ICDH、G-6-PD、ANAE;阴性反应:ACP。

DM 2 周肋间肌:强阳性反应:SDH、NADHD;阳性反应:GDH、CCO;弱阳性反应:LDH、MDH、ICDH、G-6-PD、ANAE;阴性反应:ACP。

DM 4 周肋间肌:强阳性反应:SDH、NADHD;阳性反应:LDH、MDH、GDH、ANAE;弱阳性反应:ICDH、G-6-PD、ACP、CCO;阴性反应:无 (表 1 及图 1-6)。

### 2. 图像分析结果

DM 大鼠 2 周肋间肌 SDH、GDH、NADHD 着色深度 (A) 明显高于对照组,而 LDH 明显低于对照组,两组肋间肌 MDH、ICDH、G-6-PD、ACP、

ANAE 和 CCO 无明显变化。

DM 大鼠 4 周肋间肌 SDH、MDH、GDH、NADHD、ACP 和 ANAE 着色深度 (A) 明显高于对照组, 而 LDH 和 CCO 明显低于对照组, 两组肋

间肌 ICDH 和 G-6-PD 无明显变化 (表 2)。

### 3. 阴性对照

免去底物后酶染色结果为阴性。

表 1 DM 组与对照组大鼠肋间肌酶活性的变化

Table 1 Change of the activities of enzymes in control and diabetic intercostal muscles

	对照组 (n= 10) (Control group)			DM 1 组 (n= 10) (Diabetic group 1)			Enzyme activity	DM 2 组 (n= 10) (Diabetic group 2)			Enzyme activity
	-	a	f	-	a	f		-	a	f	
SDH		1	7	2	1	1	8				10
LDH		1	3	7	5	3	2		8	2	
MDH		6	4		6	4	0		2	8	
GDH		10			3	7				10	
ICDH		6	4		9	1	0		7	3	0
NADHD		1	8	1		2	8				10
G-6-PD		10			10		0		6	4	0
ACP	8	2			9	1	0	4	6		
ANAE		10			7	3	0		4	6	
CCO		2	8		3	7	0		8	2	

Note Compared with control group increase decrease, 0 no change

表 2 DM 组与对照组大鼠肋间肌酶染色的图像分析 (A 值) ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Image analysis of the activities of enzymes in control and diabetic intercostal muscles ( $\bar{x} \pm s$ )

	对照组 (n= 10) (Control group)	DM 1 组 (n= 10) (Diabetic group 1)	DM 2 组 (n= 10) (Diabetic group 2)
SDH	752 ± 35	901 ± 72*	986 ± 59*
MDH	741 ± 45	802 ± 61	998 ± 57*
GDH	569 ± 52	779 ± 51*	780 ± 36*
ICDH	826 ± 70	785 ± 59	816 ± 48
NADHD	765 ± 45	952 ± 82*	1012 ± 47*
G-6-PD	581 ± 61	597 ± 71	652 ± 39
ACP	328 ± 25	392 ± 37	553 ± 49*
ANAE	402 ± 39	427 ± 40	696 ± 62*
LDH	1121 ± 29	825 ± 46*	785 ± 65*
CCO	962 ± 68	925 ± 35	698 ± 55*

Note Compared with control group \*  $P < 0.01$ .

## 讨 论

酶是机体进行代谢活动所必须的重要物质。在呼吸肌,包括 SDH、CCO 在内的众多酶类的正常活性,是维持呼吸运动的一个极为重要的物质基础。本文通过脱氢酶、水解酶和氧化酶的酶组织化学显示其活性变化,观察 DM 对肋间肌的损害。

酶组织化学染色,常由于条件不一致,染色强度可发生差异,本研究为避免该缺点,采用不同时间组的动物组织包埋在一起的方法,使其切片厚度,孵育液 pH 值和孵育时间长短均处于同一条件下,以排除人为的干扰。肋间肌作为重要的呼吸肌和骨骼肌,在调节呼吸运动,维持肺膨胀,实现气体交换,维持生物体的肺功能具有极其重要的作用。在呼吸过程中,呼吸肌不断摄取化学能,转变为机械能,机体供应呼吸肌的能量和呼吸肌需求保持平衡。若供求失调,则呼吸肌易发生疲劳。以往我们的研究表明 DM 4 周大鼠膈肌有氧化代谢能力增强,糖酵解能力下降,呼吸链电子传递障碍,提示 DM 早期重要的呼吸肌膈肌已存在结构和代谢功能异常<sup>[1-3]</sup>,而对另一个重要呼吸肌肋间肌研究显示其在 DM 2 周大鼠肋间肌有氧化代谢能力增强,糖酵解能力下降,但没有出现呼吸链电子传递障碍,随着病程延长在 DM 4 周时不仅存在有氧化代谢能力增强,糖酵解能力下降,且发生呼吸链电子传递障碍,提示 DM 早期肋间肌存在代谢功能变化。

脱氢酶参与机体供能的主要反应类型为氧化还原反应。SDH 主要存在于有氧呼吸细胞内,定位于线粒体内膜嵴,与线粒体膜结合牢固,主要以离子键与线粒体内膜结合,而疏水键则起辅助作用,作为三羧酸循环和线粒体的标志酶,其酶活性和含量与线粒体数目平行<sup>[9]</sup>。在 DM 早期 2 周肋间肌 SDH 活性开始升高,提示肋间肌有氧化代谢能力增强,其有利于肋间肌适应各种代谢需要,与膈肌保持一致的持续节律性活动<sup>[5,6,10]</sup>。GDH 是线粒体基质的标志酶,在中间代谢中起重要作用,乃氨基酸和糖代谢的联结点。本实验模型模拟 1 型 DM,其胰岛素缺乏,肌肉中蛋白质合成减少,分解增加<sup>[11]</sup>,使谷氨酸增多,在 DM 早期 2 周肋间肌 GDH 活性增强,形成大量  $\alpha$ -KG 进入三羧酸循环,促进有氧化过程,以适应肌肉收缩。NADHD 主要定位于线粒体,被认为是整个肌纤维氧化能力的标志。NADHD 活性增强,可能与 DM

早期细胞内氧化能力增强有关。MDH 定位于线粒体的基质,生理功能在于参与细胞膜氧化磷酸化、呼吸链电子传递、脂肪酸合成以及在三羧酸循环反应中起关键性的作用。DM 4 周肋间肌出现 MDH 活性增强与 SDH 一致,表明在三羧酸循环的不同环节发生了促进作用,使有氧氧化代谢增强,同时,又使脂肪酸合成增加。LDH 是必需辅酶的脱氢酶,为无氧酵解途径的标志酶。DM 2 周始大鼠肋间肌即显示 LDH 活性减弱,表明肌肉糖酵解能力下降,使其迅速提供肋间肌收缩所需能量减少,因此,DM 早期肋间肌是以有氧氧化代谢提供能量,以适应机体代谢变化,尤其是肌肉收缩。LDH 和 G-6-PD 对照组和 DM 组之间无明显差异,其原因尚不清楚,有待进一步深入研究。

ANAE 定位于内质网和溶酶体,也可能存在于线粒体和胞液,其生理功能与脂质代谢有关。ACP 定位于溶酶体内,作为溶酶体的标志酶,该酶以萘酚 AS-BI 磷酸酯为底物,经酶水解放出萘酚 AS-BI 立即与重氮盐偶联生成红色产物,在正常状态下,骨骼肌细胞内 ACP 阴性表达<sup>[12]</sup>,DM 4 周肋间肌 ACP 活性增强,推测由于 DM 早期氧化应激致退变坏死肌纤维内因溶酶体破坏或膜通透性增加,造成细胞浆内扩散所致。ACP 的具体生理功能尚不明确,但 ACP 常与酯酶活性呈平行关系,这与 ANAE 活性增强相符,在我们的实验中也证实。

呼吸链是细胞生物氧化的装置,而 CCO 是呼吸链的终端,它所催化的细胞色素 C 的氧化在脱氢酶和氧化酶系统之间建立了重要联系,其活性强度可作为细胞氧化代谢程度的可靠指标。CCO 在肌纤维的分布与 SDH 和 NADHD 相似,不同的是 CCO 在骨骼肌活性程度远不如前两种酶强。在 DM 4 周肋间肌 CCO 活性下降,与 DM 氧化应激增加使线粒体肿胀<sup>[4]</sup>,致使 CCO 失去在线粒体嵴和内膜上的正常定位,酶反应产物呈自由扩散状态,反应强度较正常肋间肌减弱,表明 DM 状态干扰了包括肋间肌在内的呼吸链跨膜电子传递,抑制氧化磷酸化的正常进行,导致其能量代谢障碍。

已有的研究显示肋间肌与膈肌在生理功能及代谢上存在明显的差别<sup>[13]</sup>,我们观察到在 DM 早期肋间肌已存在有氧化代谢能力增强、糖酵解能力下降和呼吸链电子传递障碍,提示 DM 早期肋间肌存在病理生理变化,推测在 DM 早期不仅膈肌受到损伤,而且肋间肌同样受到影响,共同参与 DM 患

者的肺功能异常的发病机制, 然而, 在 DM 状态下肋间肌与膈肌的相互关系以及分子发病机制, 尚需今后深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] 沈兴平, 舒昌达, 何军. 早期糖尿病大鼠膈肌超微结构变化的观察. 中华物理医学杂志, 1997, 19 (3): 185-186
- [2] 沈兴平, 舒昌达, 何军. 糖尿病大鼠膈肌功能和形态学变化. 中国病理生理杂志, 2002, 18 (8): 970-973
- [3] 沈兴平, 舒昌达, 李琼英, 等. 糖尿病大鼠膈肌酶组织化学研究. 中国病理生理杂志, 2002, 18 (10): 1276-1279
- [4] McGuire M, Mademott M. The influence of streptozotocin-induced diabetes and the nantihyperglycaemic agent metformin on the contractile characteristics and the membrane potential of the rat diaphragm. *Exp Physiol* 1998 83 (4): 481-487
- [5] Troyer AD, Kirkwood PA, Wilson TA. Respiratory Aetion of the Intercostal Muscles *Physiol Rev*, 2005, 85 (3): 717 - 756
- [6] DiMarco AF, Supinski GS, and Budzinska K. Inspiratory muscle interaction in the generation of changes in airway pressure. *J Appl Physiol* 1989, 66 (14): 2573-2578
- [7] Pearse AGE. *Histochemistry theoretical and applied*, 3rd ed Vol 2. London and New York Churchill Livingstone, Edinburgh, 1972, 1342-1389
- [8] Lofjla Z, Gossrau R, Schiebeler TH. *Enzyme histochemistry. A laboratory manual*, 1st ed. Berlin Heidelberg New York Springer-Verlag 1979, 107-251
- [9] Pollard PJ, Wortham NC, Tomlinson IP. The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase. *Ann Med* 2003, 35 (8): 632-639
- [10] 陈碧芬. 骨骼肌疾病病理学. 福建: 福建科学技术出版社, 1993. 120-138
- [11] Pepato MT, Migliorini RH, Goldberg AL, et al. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol* 1996, 271 (2): E340-E347
- [12] Aderson WA. The ultrastructural localization of cytochrome oxidase via cytochrome c. *J Histochem Cytochem* 1975, 25 (1): 13-15
- [13] DiMarco AF, Connors JAF, Kowalski KE. Gas exchange during separate diaphragm and intercostals muscle breathing. *J Appl Physiol* 2004, 96 (11): 2120 - 2124

### 图 版 说 明

- 图 1 SDH 染色, 正常肋间肌酶染色颗粒稀疏。× 200
- 图 2 SDH 染色, DM 2周肋间肌酶染色颗粒增多、增粗。× 200
- 图 3 SDH 染色, DM 4周肋间肌酶染色颗粒增多、增粗。× 200
- 图 4 CCO 染色, 正常肋间肌酶染色颗粒多, 清晰。× 200
- 图 5 CCO 染色, DM 2周肋间肌酶染色颗粒少, 浅着色。× 200
- 图 6 CCO 染色, DM 4周肋间肌酶染色颗粒少, 浅着色。× 200
- 图 7 ACP 染色, 正常肋间肌酶无染色颗粒, 不着色。× 200
- 图 8 ACP 染色, DM 2周肋间肌酶无染色颗粒, 不着色。× 200
- 图 9 ACP 染色, DM 4周肋间肌酶染色颗粒稀少或无, 浅着色。× 200

### EXPLANATION OF FIGURES

- F ig. 1 The SDH staining is localized in normal intercostal muscles. × 200
- F ig. 2 The SDH staining is localized in 2th week diabetic intercostal muscles. × 200
- F ig. 3 The SDH staining is localized in 4th week diabetic intercostal muscles. × 200
- F ig. 4 The CCO staining is localized in normal intercostal muscles. × 200
- F ig. 5 The CCO staining is localized in 2th week diabetic intercostal muscles. × 200
- F ig. 6 The CCO staining is localized in 4th week diabetic intercostal muscles. × 200
- F ig. 7 The ACP staining is localized in normal intercostal muscles. × 200
- F ig. 8 The ACP staining is localized in 2th week diabetic intercostal muscles. × 200
- F ig. 9 The ACP staining is localized in 4th week diabetic intercostal muscles. × 200

