

·基础研究·

## 霍乱毒素对视神经扎断后视网膜节细胞轴突再生的作用

李 飞, 李海标

(中山大学组织学胚胎学教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨霍乱毒素(CTx)对成年金黄地鼠视神经扎断(microcrush, MC)后视网膜节细胞(RGCs)轴突再生的促进作用。【方法】扎断成年金黄地鼠视神经近端,玻璃体内注射 CTx,或插入小段坐骨神经分支(SN)。动物随机分为实验组和对照组:对照组分为单纯扎断视神经组(MC)和 MC+溶剂组;实验组包括 MC+CTx组、MC+CTx+SN组、量效关系组。量效关系组动物存活4周,其余各组动物存活3~5周。用荧光金逆行标记再生的RGCs,在荧光镜下观察视网膜平铺片再生RGCs的数量变化。【结果】CTx不同剂量组125、250、500和1 000 ng视网膜再生RGCs平均数分别为(130±46)、(189±91)、(358±84)、(94±34)个/视网膜,比MC组或MC+溶剂组显著增加,具有统计学意义( $P < 0.01$ ),以500 ng/眼的剂量最佳。在3、4和5 W时MC+CTx组的视网膜再生RGCs平均数分别为(503±123)、(345±98)、(57±25)个/视网膜;MC+CTx+SN组为(771±199)、(432±105)、(160±76)个/视网膜,均比MC组或MC+溶剂组明显增加( $P < 0.01$ )。【结论】提示霍乱毒素或联合玻璃体内植入坐骨神经具有显著促进视神经扎断后视网膜节细胞轴突再生的作用。

**关键词:** 霍乱毒素; 坐骨神经; 视网膜节细胞; 再生, 轴突; 金黄地鼠

**中图分类号:** R774      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-257X(2003)01-0007-04

## The Effects of Cholera Toxin on the Axonal Regeneration of the Retinal Ganglion Cells After Microcrush of Optic Nerve

LI Fei, LI Hai-biao

(Department of Histology and Embryology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effects of cholera toxin (CTx) on promoting the axonal regeneration of retinal ganglion cells (RGCs) of optic nerve after microcrush in adult hamster retina. 【Methods】 After microcrush of optic nerve. CTx was injected or (and) a small segment of autologous sciatic nerve branch (SN) was inserted intravitreally. Animals were randomly divided into regenerating control groups (MC group and MC+ solution group) and experimental groups (MC+CTx, MC+CTx+SN, Effect and Dosage). Animals in each group were allowed to survive for 3~5 weeks except for the Effect and Dosage group for 4 weeks. The regenerated RGCs were labeled retrogradely with fluorogold, and the number of regenerating RGCs in each retina were observed under fluorescent microscope. 【Results】 The mean numbers of regenerating RGCs in CTx different dose groups (125, 250, 500 and 1 000 ng) were (130±46), (189±91), (358±84), (94±34) respectively. All increased and were significantly higher than those in MC group and solution group ( $P < 0.01$ ). The best does was 500 ng each eye. At 3, 4 and 5 weeks, the mean numbers of regenerating RGCs in MC+CTx were (503±123), (345±98), (57±25) respectively, and in MC+CTx+SN group were (771±199), (432±105), (160±76) respectively. All increased and significantly higher than those in MC group and MC+ solution group at each time point ( $P < 0.01$ ). 【Conclusion】 Our results indicate that injec-

收稿日期:2002-04-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570241,39870266)

作者简介:李 飞(1970-),男,安徽安庆人,在读博士生;李海标,教授,博士生导师,课题主持人。

tion of CTx in combination with insertion of SN intravitreally can remarkably enhance the axonal regeneration of RGCs of optic nerve after microcrush.

**Key words:** cholera toxin; sciatic nerve; retinal ganglion cells; regeneration, axonal; golden hamster

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003,24(1):7~10,15]

中枢神经系统(center nerve system, CNS)损伤的修复是人们长期关注的重要问题。在适当的条件下,受损的中枢神经元具有修复和再生潜能,如把外周神经植入 CNS 各部分,可诱导其中某些神经元包括视网膜节细胞(retina ganglion cells, RGCs)的轴突再生<sup>[1]</sup>。近年的研究表明,中枢神经再生困难可能与中枢神经内在的再生能力低下、强大的抑制因子、胶质疤痕形成有关<sup>[2]</sup>。霍乱毒素(cholera toxin, CTx)是兴奋性 G 蛋白(Gs)的特异性激动剂,Gs 与腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)偶联,激活 Gs 可作用于 AC,使环磷腺苷(cAMP)生成增多,体外培养的研究表明提高胞内 cAMP 水平能促进中枢神经元的存活和突起的生长<sup>[3]</sup>。我们先前的研究表明,在有外周神经缝接的 RGCs 再生模型中 CTx 能促进视神经远、近端切断后 RGCs 的存活与再生<sup>[4,5]</sup>。在此基础上我们进一步探讨视神经扎断(microcrush, MC)后在不接外周神经情况下,CTx 能否促进 RGCs 的轴突再生。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组

取成年雄性金黄地鼠,体质量 90~110 g,随机分为对照组与实验组。对照组包括 2 组:MC 组,在球后 1 mm 处扎断视神经;MC+溶剂组,在 MC 组的基础上于玻璃体内注射 2  $\mu$ L 配制 CTx 的溶剂(EDTA/NaCl 混合液:10 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠加 200 mmol/L 的氯化钠)。实验组共 3 组:CTx 量效关系组:在 MC 组的基础上+玻璃体内注射不同剂量的 CTx(RBI 公司产品,溶于 EDTA/NaCl 混合液)溶液 2  $\mu$ L,分别含 CTx 125, 250, 500, 1 000 ng,每个剂量取 5 只动物,动物存活 4 周。4 周后观察玻璃体内给予不同剂量 CTx 和 RGCs 再生数的关系,统计分析找出最佳剂量。MC+CTx 组:在 MC 组的基础上+玻璃体内注射最佳剂量的 CTx;MC+CTx+坐骨神经分支(SN)组:在 MC 组的基础上+玻璃体内插入 SN 2 mm+玻璃体内注射最佳剂量的 CTx。后两组动物分别

存活 3、4 和 5 周,每时间点 5 只动物。

### 1.2 实验方法

即以 20 g/L 戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉,经眶上方式暴露左侧视神经,沿长轴方向剔破神经鞘,分离出视神经,距离球后 1 mm 处以 10-0 丝线结扎 60 s,避免损伤视网膜中央动脉,眼球复位,局部滴环丙沙星眼药水,以 3-0 丝线缝合头皮(图 1.1)。在温暖的环境中待清醒后放入笼中继续饲养。需要玻璃体内注溶剂或 CTx 者,则在动物手术当天及第 7 天,在手术眼角巩缘以 4 号半针头刺一小孔,避免损伤晶状体,分别以玻璃微管抽吸 CTx 溶剂或不同浓度 CTx 各 2  $\mu$ L,小心注入玻璃体囊,留针 1 min,防止液体外溢。MC+CTx+SN 组则在上述孔中先塞入 SN 后注入 CTx,并以 11-0 线缝合针孔。

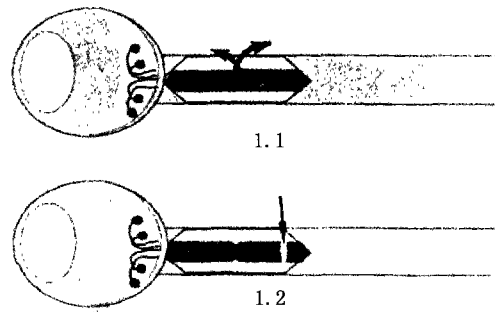


图 1 手术示意图

Fig.1 Illustration of operation

1.1 The optic nerve was removed from the sheath before crushing with 10.0 sutures; 1.2 The optic nerve was transected behind the microcrush lesion, then labeled with FG retrogradely

取材前 2 d,在结扎点后 1 mm 处剔破神经鞘,以微剪切断视神经,塞入黏有 6% 荧光金(fluorogold, FG. Fluorochrome, Englewood, CO.)的小块明胶海绵(图 1.2),动物存活 2 天后摘除眼球,并切取视神经,立即浸入 40 g/L 多聚甲醛 PB 溶液(100 mmol/L, pH7.4),剥离视网膜,并在 4  $^{\circ}$ C 固定 1 h,漂洗后将视网膜裱于载玻片上,制作平铺片,甘油封片。铺片在荧光显微镜激发光为 400 nm 滤片下逐个数视网膜内所有荧光金标记的节细胞数。

为检测视神经是否完全扎断,采用霍乱毒素 B 亚基(CTB)进行顺行标记及 FG 逆行标记,各取 3 只动物。CTB 顺行标记:如上述结扎左侧视神经后,立即在左玻璃体囊内注入 10 g/L 的 CTB 3  $\mu$ L,顺行标记 RGCs 的轴突,48 h 后麻醉动物经心脏作灌注固定,取出视神经在 40 g/L 的多聚甲醛 PB 液中,4  $^{\circ}$ C 固定过夜,300 g/L 蔗糖过夜,制作 10  $\mu$ m 厚的经过结扎处的纵行冰冻切片,磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS)洗涤 2 次。50 mL/L 正常兔血清(含 10 g/L Triton-X100 PBS),孵育 0.5 h,加入羊抗 CTB(1:2 000,含 10 g/L Triton-X100 及 3 g/L  $\text{NaN}_3$ )4  $^{\circ}$ C 孵育 2 d。PBS 洗 3 次,加生物素结合的兔抗羊 IgG 1:200 (含 100 mmol/L PBS)孵育 2 h。PBS 洗 3 次,抗生物素蛋白结合的异硫氰酸荧光素(FITC)1:100 孵育 2 h,PBS 清洗后甘油封片。FG 逆行标记:距球后 2 mm 切断视神经以 FG 标记,2 h 后在距球后 1 mm 处结扎,并取下视神经,固定后切片荧光镜下观察。

实验数据进行方差分析,以统计软件 SPSS 10 处理。

## 2 结 果

### 2.1 鉴定视神经损伤点

FG 逆行标记:观察切片发现视神经远近端已被 FG 逆行标记,结扎处形成空隙约 30~50  $\mu$ m,只有神经鞘相连(图 2.1),表明视神经已完全结扎断。CTB 顺行标记:切片上视神经损伤点较易辨认,损伤点不甚规则,损伤处近端可见大量 CTB 阳性的神经纤维聚集,损伤处远端未见阳性标记的神经纤维(图 2.2),表明视神经已完全扎断。

### 2.2 CTx 的剂量与 RGCs 再生数量关系

实验动物存活 4 周。对照组可见再生 RGCs,数量稀少(表 1),不同剂量 CTx 对 RGCs 的再生数均有明显影响:MC + CTx 各剂量组与 MC 组或 MC + 溶剂组差异均有显著性( $P < 0.01$ )。当 CTx 剂量从 125 ng/眼增至 500 ng/眼,再生 RGCs 逐渐增多,达 500 ng/眼时,再生数已达最多为(358  $\pm$  91)个/视网膜,与其它各剂量组差别有显著性( $P < 0.01$ ),至 1 000 ng/眼时再生数又下降至(94  $\pm$  34)个/视网膜,再增加剂量则视网膜局部粘连,难以剥离。故取 500 ng/眼为最佳剂量。

### 2.3 最佳剂量 CTx 和或 SN 对 RGCs 再生数量与存活时间关系

表 1 不同剂量 CTx 在视神经扎断 4 周后再生的 RGCs 均数  
Table 1 The mean numbers of regenerated RGCs in different dose of CTx groups 4 weeks after optic nerve micro-crushed (cells,  $\bar{x} \pm s$ )

| CTx<br>(ng/retina) | " | Regenerated RGCs/retina<br>(FG labeled) |
|--------------------|---|---|
| 0(control)         | 5 | 11 $\pm$ 9                              |
| 125                | 5 | 130 $\pm$ 46 <sup>1)</sup>              |
| 250                | 5 | 189 $\pm$ 91 <sup>1)</sup>              |
| 500                | 5 | 358 $\pm$ 84 <sup>1),2)</sup>           |
| 1 000              | 5 | 94 $\pm$ 34 <sup>1)</sup>               |

1) Compared with the control group,  $P < 0.01$ ; 2) Compared with the other 3 groups,  $P < 0.01$

实验动物均存活 3~5 周,再生均数见表 2。方差分析结果表明 CTx、SN 和时间对再生 RGCs 均数的影响均有显著意义( $P < 0.01$ )。MC + CTx 及 MC + CTx + SN 组均以 3 周时再生 RGCs 数最多,分别为(503  $\pm$  123)、(771  $\pm$  199)个/视网膜,随存活时间延长再生数反而减少,各时间点间点差别均有显著性( $P < 0.01$ )。MC 组与 MC + 溶剂组在相同或不同的时间点均无显著差异( $P > 0.5$ ),实验组与对照组在相同或不同的时间点相比有极显著差别( $P < 0.01$ ),在第 3、4 周时,MC + CTx + SN 组较 MC + CTx 组再生 RGCs 数目亦有明显增多,差异有显著性( $P < 0.05$ );并且两组再生 RGCs 的形态亦有区别,MC + CTx 组均为小细胞(图 3.1),MC + CTx + SN 组可见大小混杂的细胞(图 3.2)。

## 3 讨 论

本实验结果表明,在没有外周神经缝接视神经的条件下,玻璃体内注入 CTx 可促进成年哺乳动物视神经扎断后 RGCs 的再生,联合玻璃体内插入 SN 可进一步促进 RGCs 的再生。已有的研究表明中枢神经系统小而局限的损伤可减少胶质疤痕的产生,如移植神经元生长出的轴突能穿过损伤点进入白质中。为了减少损伤后胶质疤痕的产生,本研究采用了视神经扎断模型。结果表明对照组术后 3~5 周,视网膜上有 22~0 个不等的荧光标记的节细胞,表明成年 RGCs 内在的再生能力很弱。视神经扎断后单纯予 CTx 可促使 RGCs 再生,其最佳剂量在 3 周时再生数量为对照组近 100 倍;而玻璃

表 2 术后存活 3~5 周各实验组和对照组动物再生 RGCs 均数的比较

Table 2 The mean numbers of regenerating RGCs of experimental groups compared with control groups in 3-5 weeks survival (cells,  $\bar{x} \pm s$ )

| Survival (weeks) | <i>n</i> | MC    | MC+ solution      | MC+ CTx               | MC+ CTx+ SN              |
|------------------|----------|-------|-------------------|-----------------------|--------------------------|
| 3                | 5        | 5±4   | 6±4 <sup>1)</sup> | 503±123 <sup>2)</sup> | 771±199 <sup>2),3)</sup> |
| 4                | 5        | 11±9  | 8±7 <sup>1)</sup> | 345±98 <sup>2)</sup>  | 432±105 <sup>2),3)</sup> |
| 5                | 5        | 11±10 | 9±9 <sup>1)</sup> | 57±25 <sup>2)</sup>   | 160±76 <sup>2)</sup>     |

1) Compared with the MC group at the same survival time, the mean number of regenerating RGCs in MC+ solution group  $P > 0.5$ ; in this group at different survival time  $P > 0.5$ ; 2) The mean number of regenerating RGCs in each experimental group at different survival time,  $P < 0.01$ ; compared with control groups,  $P < 0.01$ ; 3) Compared with the MC+ CTx group at the same survival time,  $P < 0.05$

体内植入 SN 可进一步促进 RGCs 再生,在 3、4 周时再生的 RGCs 数较单纯予 CTx 组有极显著差异,说明二者有协同作用。两实验组再生 RGCs 数均于 3 周最多,而 4、5 周时再生 RGCs 不增加反而减少,原因仍不清楚,可能与靶源性或植入外周神经的雪旺细胞分泌的神经营养因子(NTFs)中断或减少等因素有关,也有可能再生后期 RGCs 对 CTx 的敏感性下降或受损神经内抑制因子作用增强等因素有关。

霍乱毒素显著地促进 RGCs 的再生,其作用机制目前还不清楚,可能与升高胞内 cAMP 水平有关,CTx 是 G 蛋白家族中刺激性 G 蛋白(Gs)持续性激动剂,通过激活腺苷酸环化酶可使细胞内的 cAMP 水平持续升高,我们以前的研究表明玻璃体内注入 CTx 可明显升高视网膜内 cAMP 水平。cAMP 是细胞内重要的第二信使,对调控细胞的多种功能和对细胞的增殖都具有重要作用,cAMP 能够快速地将脑源性神经营养因子(BDNF)等受体如 TrkB 由胞内转移至胞膜表面,从而增加了对 NTFs 的敏感性<sup>[6]</sup>。有研究提示,中枢神经元的再生失败可能与其受损后胞内 cAMP 水平下降,导致它们对多种 NTFs 的反应性下降而使 NTFs 的生物效应大受影响有密切关系<sup>[7]</sup>。此外最近有研究发现升高内源性 cAMP 可有效阻断髓磷脂和髓磷脂相关糖蛋白(MAP)对轴突再生的抑制<sup>[8]</sup>。已知髓磷脂和 MAP 抑制成年 RGCs 的轴突生长,但可促进未成年 RGCs 的轴突生长,分析其原因发现未成年 RGCs 胞内 cAMP 水平要高于后者,抑制 cAMP 的作用底物蛋白激酶 A(PKA),可阻碍这种作用;相反,升高 cAMP 可阻碍它们对成年 RGCs 轴突生长的抑制作用<sup>[9]</sup>。

cAMP 可通过激活蛋白激酶 A(PKA)而使某

些特异的转录因子如 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)磷酸化,从而调控某些与生长及凋亡相关的基因表达<sup>[10]</sup>。已有的研究表明,NTFs 如 NGF、BDNF、CNTF、GDNF 等对某些中枢神经元的存活和再生具有重要的作用,它们分别通过 Ras-MAPK、PI-3K、Jak-STAT 以及 Ret 等信号传导途径调控某些基因的表达而起作用。PKA 还能激活 MAPK 和转录子 EIK-1,诱导 PC12 细胞分化,突起生长<sup>[11]</sup>。至于 CTx 是否通过激活 RGCs 的 Gs,提高其胞内 cAMP 水平,后者再作用于 PKA、MAPK 或 PI-3K 等信号传递通路,调控生长相关基因表达,促进 RGCs 的再生仍有待深入探讨。

(本文图 2, 3 见插页 1. Fig. 2, 3 shown in back coloured page 1)

#### 参考文献:

- [1] So K F, Aguayo A J. Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats[J]. *Brain Res*, 1985, 328 (2):349.
- [2] Schnell L, Schwab M E. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors[J]. *Nature*, 1990, 343 (6255):269.
- [3] Franke A M, Kaplan M R, Pfrieger F W, et al. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture[J]. *Neuron*, 1995, 15(4):805.
- [4] 李 雯,李海标. 霍乱毒素对金黄色地鼠视网膜神经肽 Y 免疫反应节细胞再生的影响[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(1):5.
- [5] 朱永红,李海标. IBMX 对成年金黄色地鼠视网膜节细胞存活的影响[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(2): 96.

(下转第 15 页 to page 15)

富的糖原和核糖体。随着体外传代纯化,细胞表型趋于一致,呈“梭形纤维样”,并形成许多细胞集落(克隆);超微结构显示细胞间存在胞膜局部紧密连接(TJ),部分连接处胞膜融合消失;还可见成纤维样细胞胞质突起(CP)向外延伸,并与另一相邻细胞发出的类似突起接合。细胞生物学研究认为,细胞间连接是细胞的一种重要通讯结构,连接结构的存在有利于细胞间的信息传递,是产生细胞调控、影响细胞生长发育和相应组织结构形成的重要基础。

对体外培养诱导分化的 Desmin 和 Myoglobin 染色阳性的肌样细胞超微结构研究发现,细胞呈“成纤维样”,胞浆靠胞膜边缘可见无细胞器的条状肌丝(Mf)区带,部分细胞两侧胞膜缘均有分布,说明这是发育较幼稚的成肌样细胞结构。另外,在对用高糖和含高浓度血清(200~250 mL/L)培养基培养的 MSC 超微结构研究发现,成纤维样细胞容易脂化,胞浆脂滴丰富,细胞核与其它细胞结构发育尚正常,未见细胞变性坏死改变。提示在培养条件改变后,MSC 有向肌肉和脂肪组织分化的潜能,至于 MSC 中是否成纤维样细胞更有向多种细胞组

织类型分化发育的能力,值得进一步研究。

(本文图 1 见插页 1. Fig. 1 shown in back coloured page 1)

#### 参考文献:

- [1] Friedenstien A J, Chailakhyan R K, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. *Cell Tissue Kinet*, 1987, 20(3): 263.
- [2] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 71.
- [3] Pittenger M F, Mackay A M, Jaiswal S C, *et al.* Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2000. 78.
- [5] 项 鹏, 夏文杰, 王连荣, 等. 丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(5): 321.
- [6] Yamazaki K. Isolated cilia and crystalloid inclusions in murine bone marrow stromal cells[J]. *Blood Cells*, 1988, 13(3): 407.

(编辑 刘清海)

(上接第 10 页 from page 10)

- [6] Meyer-Franke A, Kaplan M R, Pfrieger F W, *et al.* Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture[J]. *Neuron*, 1995, 15(4): 805.
- [7] Shen S L, Wiemelt A P, Mc Morris F A, *et al.* Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy [J]. *Neuron*, 1999, 23(2): 285.
- [8] Cai D, Shen Y, De Bellard M, *et al.* Related Articles Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a camp-dependent mechanism[J]. *Neuron*, 1999, 22(1): 89.
- [9] Cai D, Qiu J, Cao Z, *et al.* Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(13): 4731.
- [10] Finkbeiner S, Tavazoie S F, Maloratsky A, *et al.* CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses[J]. *Neuron*, 1997, 19(5): 1031.
- [11] Vossler M R, Yao H, York R D, *et al.* Camp activates mapkinase and Elk-1 through a B-Raf and Rap1-dependent pathway[J]. *Cell*, 1997, 89(1): 73.

(编辑 张恩健)

霍乱毒素对视神经扎断后视网膜节细胞轴突再生的作用 (正文见第7页)

The Effectc of Cholera Toxin on the Axonal Regeneration of the Retinal Ganglion Cells After Optic Nerve Microcrushed (Text in page 7)

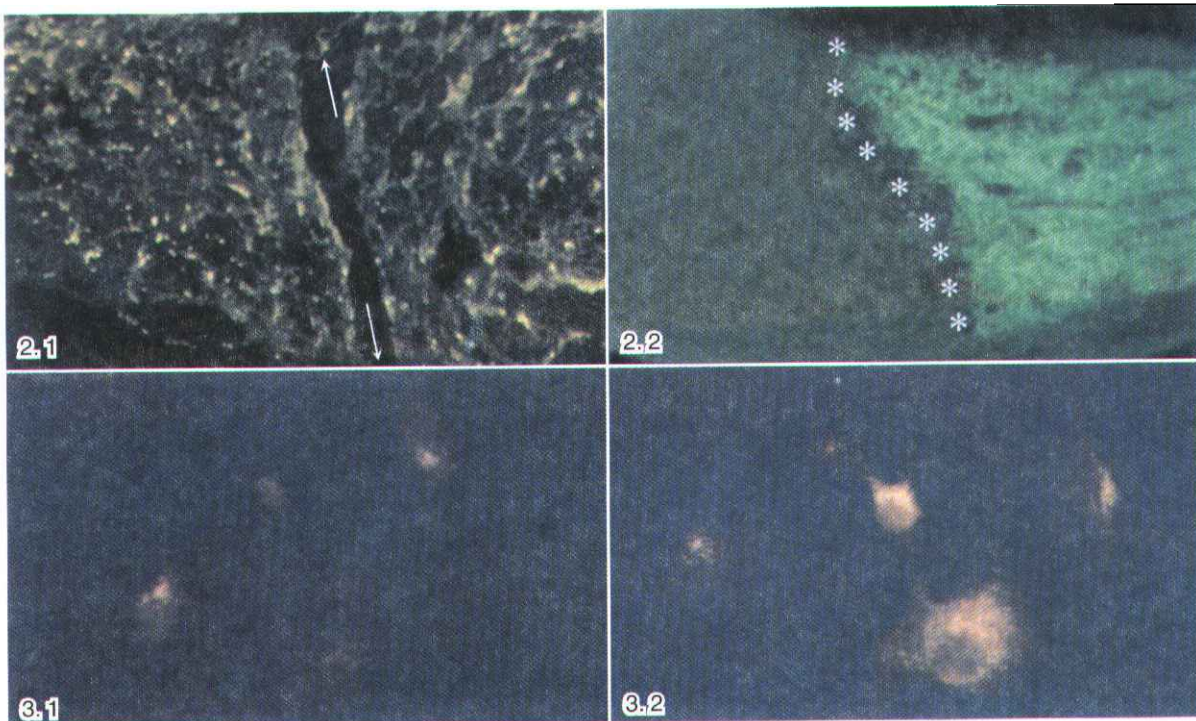


图2 ON切片、逆、顺行标记观察扎断点

图3 两实验组再生的RGCs(FG标记)

Fig.2 Retrogradely and anterogradely labeled RGC axons detected past the crush in longitudinal sections of optic nerve

2. 1: Retrogradely labeled RGC axons with FG, show that no xon extend past a microcrushed lesion. Just connected with sheath (arrowhead); 2. 2: Anterogradely labeled RGC axons with CTB, shows the crush site (asterisks), no axons extend past the crush site. Scale bar 100µm

Fig.3 Regeneratig RGCs in experment groups (labled with FG)

3. 1: Only small regenerating RGCs in MC + CTx group; 3. 2: Show that small and big regenerating RGCs exited in MC + CTx + SN group. Scale bar: 50µm

体外培养大鼠骨髓间质干细胞的超微结构 (正文见第11页)

Ultrastructure of Rat Marrow – Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured *in vitro* (Text in page 11)

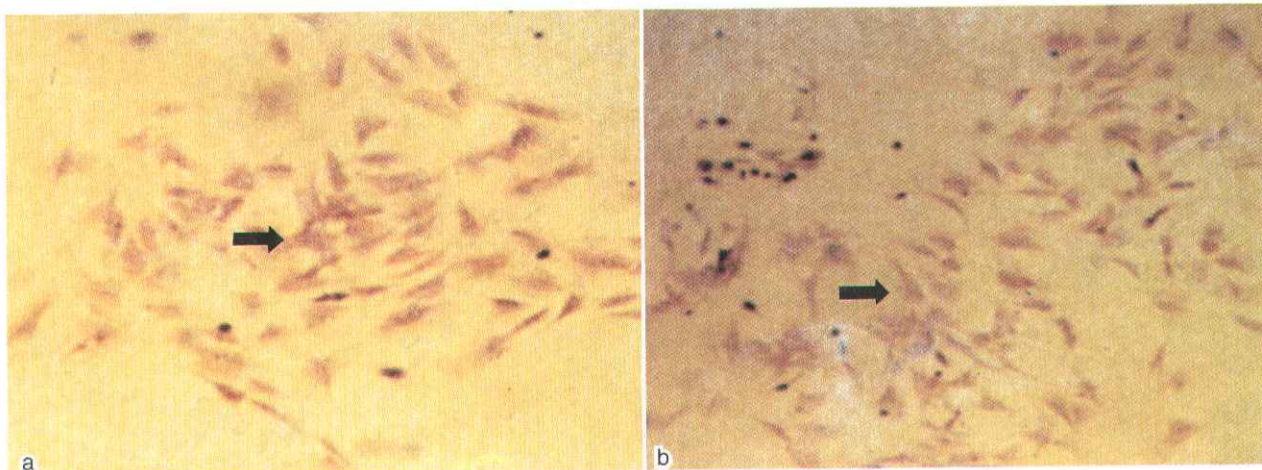


图1 体外培养诱导分化后大鼠骨髓间质干细胞的免疫组化染色

Fig.1 The results of immunohistochemistry of rat marrow – derived mesenchymal stem cells(MSC) cultured, induced and differentiated *in vitro*

a: Stained with Desmin( × 100); b: Stained with Myoglobin( × 100)