

# 模拟失重影响大鼠比目鱼肌梭内外肌纤维肌球蛋白重链的表达

周继斌<sup>1</sup>, 邢东琦<sup>2</sup>, 冯鉴强<sup>1</sup>, 樊小力<sup>2</sup>

(1. 中山医科大学生理学教研室, 广东 广州 510089; 2. 西安交通大学医学院, 陕西 西安 710061)

**摘要:**【目的】探讨模拟失重条件下大鼠比目鱼肌梭外肌纤维和梭内肌纤维肌球蛋白重链表达的变化。【方法】采用免疫组织化学技术, 检测模拟失重条件下大鼠比目鱼肌梭内肌纤维及梭外外肌纤维对单克隆抗体 NOQ7.5.4.D 和 MY32 的免疫反应性。【结果】经历模拟失重的大鼠比目鱼肌 I 型纤维(对 NOQ7.5.4.D 呈阳性反应)的构成比减少, II 型纤维(对抗体 MY32 呈阳性反应)的构成比增加。模拟失重 3 d、7 d、14 d、30 d 组 I 型肌纤维分别占 86.96%、84.91% ( $P < 0.01$ )、69.14% ( $P < 0.01$ )、66.07% ( $P < 0.01$ ); II 型纤维分别占 16.14%、18.21% ( $P < 0.01$ )、31.08% ( $P < 0.01$ )、32.15% ( $P < 0.01$ )。核袋纤维对 NOQ7.5.4.D 的免疫反应性增强, 核链纤维无改变, 呈阴性反应; 核袋纤维对 MY32 的免疫反应性减弱, 核链纤维对 MY32 的反应增强。【结论】模拟失重除影响肌梭外肌纤维 MHC 的表达, 引起肌纤维类型转换外, 还导致梭内肌纤维 MHC 表达表型发生改变。

**关键词:** 模拟失重; 比目鱼肌; 梭内肌纤维; 肌球蛋白重链; 大鼠

中图分类号: R852.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)01-0033-04

**The Effect of Simulated Weightlessness on Expression of Myosin Heavy Chain in Intrafusal and Extrafusal Fibers of Rat Soleus Muscle** ZHOU Ji-bin<sup>1</sup>, XING Dong-qi<sup>2</sup>, FENG Jian-qiang<sup>1</sup>, FAN Xiao-li<sup>2</sup>. (1. Department of Physiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China; 2. Department of Physiology, Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**Abstract:** 【Objective】To explore the effects of simulated weightlessness on the expression of myosin heavy chain (MHC) in intrafusal and extrafusal fibers of rat soleus muscle. 【Methods】Using immunohistochemical technique, immunoreactivities to two monoclonal antibodies (NOQ7.5.4.D and MY32) in intrafusal and extrafusal fibers were detected in rat undergoing the simulated weightlessness. 【Results】Constituent ratios of type I fiber (fiber positively reacted with NOQ7.5.4.D) of rat soleus muscle after simulated weightlessness decreased, while constituent ratios of type II fiber (fiber positively reacted with MY32) increased. The constituent ratios of type I fiber in the soleus muscle were respectively 86.96%, 84.91% ( $P < 0.01$ ), 69.14% ( $P < 0.01$ ), 66.07% ( $P < 0.01$ ) and the type II fiber's were respectively 16.14%, 18.21% ( $P < 0.01$ ), 31.08% ( $P < 0.01$ ), 32.15% ( $P < 0.01$ ) after simulated weightlessness for 3 d, 7 d, 14 d and 30 d respectively. The nuclear bag intrafusal fibers exhibited higher immunoreactivities to NOQ7.5.4.D, while the nuclear chain intrafusal fibers showed negative reaction to NOQ7.5.4.D. Nuclear bag fibers stained with less intensity in sections reacting with MY32, whereas nuclear chain fibers showed more intensity. 【Conclusion】The simulated weightlessness not only results in changes in expression of MHC in extrafusal fibers and transformation of myofiber type, but also changes in expression of MHC in intrafusal fibers.

**Key words:** simulated weightlessness; soleus muscle; intrafusal fibre; myosin heavy chains; rat

失重(weightlessness)或微重力(microgravity)对机体而言是一种特殊环境。在此环境下, 机会发生一系列涉及全身各个系统的生理变化, 甚至影响生殖、生长与发育。失重或模拟失重对骨骼肌的影响广泛而显著, 主要引起肌肉萎缩; 收缩蛋白, 尤其是肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)表型的变化; 肌纤维类型转换; 对伤害的敏感性增加和易疲劳等改变。相关的研究报道已甚多见, Fitts

等<sup>[1]</sup>作过较详尽的综述。虽然失重或模拟失重对骨骼肌的损害为航天医学和空间科学工作者广为关注, 但研究的着眼点似乎仅集中于梭外肌, 肌梭有否改变, 迄今为止鲜有报道。NOQ7.5.4.D 和 MY32 分别为检测慢肌纤维和快肌纤维 MHC 的两种单克隆抗体。我们曾观察到模拟失重影响大鼠比目鱼肌梭内肌纤维琥珀酸脱氢酶的活性<sup>[2]</sup>。本文汇报采用免疫组化技术, 以 NOQ7.5.4.D 和

收稿日期: 2001-10-21

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目(98sm55); 广东省自然科学基金资助项目(001322)

作者简介: 周继斌(1962-), 男, 湖北汉川人, 医学博士, 讲师

MY32 作为单克隆抗体, 研究模拟失重条件下比目鱼肌梭内肌纤维 MHC 的表达, 旨在阐明模拟失重对肌梭的影响, 以探讨失重条件下肌萎缩和肌纤维类型转换发生的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 模拟失重大鼠模型

雌性 Sprague-Dawley 大鼠 72 只, 体质量 220 ~ 260 g, 按体质量配对原则随机分成 8 组 ( $n = 9$ ): 4 个模拟失重组(分别为 3 d、7 d、14 d 和 30 d) 以及同步饲养的 4 个对照组。按陈杰等<sup>[3]</sup> 方法以尾部悬吊模型模拟失重对后肢骨骼肌的影响。即悬吊大鼠尾部, 使后肢悬空, 大鼠保持头低位倾斜状态, 身体长轴与水平成  $25^\circ \sim 30^\circ$  角, 前肢着地可自由活动, 自由进食饮水。室温控制在  $25^\circ\text{C}$  左右, 12 h 循环光照。

### 1.2 标本制备

在实验方案规定时间用戊巴比妥钠(45 mg/kg, 腹腔注射)麻醉动物。经升主动脉灌流固定, 先注入温生理盐水至右心耳流出液变为淡红, 迅速改用 40 g/L 多聚甲醛(0.1 mol/L PB 配制, pH7.4)。多聚甲醛用量约 1 000 mL/kg, 其前一半快速注入, 后一半则缓慢滴注, 维持半小时以上。取出左侧比目鱼肌, 横截为 0.5 ~ 1 cm 长的组织块, 常规石蜡包埋。切片时调整蜡块方向, 以获得与比目鱼肌长轴垂直的组织切片。收集三套相邻切片, 中间一套用作 H-E 染色, 另两套分别以 NOQ7.5.4.D 和 MY-32 作免疫组织化学染色。切片厚度  $5\ \mu\text{m}$ 。

### 1.3 免疫组织化学程序

免疫组织化学染色采用 ABC 法。具体步骤如下: 蜡切片脱蜡、进水; 0.05 mol/L TBS, 5 ~ 10 min, 3 次; 体积分数 0.3% Triton-X100(0.05 mol/L TBS 配制)30 min; 0.05 mol/L TBS, 5 ~ 10 min, 3 次; 体积分数 3% 正常羊血清,  $37^\circ\text{C}$ , 30 min; 一抗(NOQ7.5.4.D 购自 Sigma 公司, 1:2 000; MY32 购自 Sigma 公司, 1:1 000) $37^\circ\text{C}$  孵浴 1 h, 置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱 72 h; 0.05 mol/L TBS, 5 ~ 10 min, 3 次; 二抗(抗小鼠 IgG, 1:200, 购自 Vector 公司) $37^\circ\text{C}$  孵育 30 ~ 45 min; 体积分数 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10 min; 0.05 mol/L TBS, 5 ~ 10 min, 3 次; ABC 复合物(1:100, 临用前 30 min 配制; 购自 Vector 公司) $37^\circ\text{C}$  孵育 45 min; 0.05 mol/L TBS, 5 ~ 10 min, 3 次; 在含二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine DAB)(购自 Sigma

公司, 终质量/体积分数为 0.05%) 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  (终体积分数为 0.05%) 的 0.05 mol/L TB (pH 7.6) 中显色 15 min; 0.05 mol/L TBS 浸洗、自来水冲洗; 脱水、透明、封固。

### 1.4 免疫组织化学染色的特异性

本实验的阴性对照分别设针对一抗和二抗的替代实验, 未设置吸收试验。

### 1.5 数据采集与统计分析

每只动物选取一张肌腹中部的免疫组织化学染色的切片。组织切片置于 Poly var 多功能显微镜(奥地利产)下观察, 组织图像用 KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统(德国)处理。对切片内所有肌纤维进行计数; 并根据肌纤维是否同单克隆抗体 NOQ7.5.4.D 或 MY32 发生特异性结合分阳性纤维和阴性纤维进行分类统计。计算组内各个体纤维总数、不同类别纤维数的平均数及其构成比。悬吊组与其同步饲养的对照组间作  $\chi^2$  检验, 显著性界值取  $P = 0.05$ 。每组选择能鉴别核袋 1 纤维、核袋 2 纤维和核链纤维的肌梭约 30 个, 对比观察梭内肌纤维对单克隆抗体 NOQ7.5.4.D 和 MY32 的免疫反应性。

## 2 结果

### 2.1 梭外肌纤维对 NOQ7.5.4.D 的免疫反应性

镜下可见切片内大部分肌纤维呈阳性反应, 少部分为呈阴性(图 1a)。呈阳性反应的肌纤维内有深棕色颗粒, 呈片状; 阴性肌纤维与背景颜色相近, 无沉淀(图 1b)。表 1 为各组对 NOQ7.5.4.D 呈阳性反应的平均纤维数、呈阴性反应的平均纤维数及其占纤维总数的百分比。

### 2.2 梭外肌纤维对 MY32 的免疫反应性

镜下可见切片内少部分肌纤维呈阳性反应, 大部分为呈阴性(图 2a)。呈阳性反应的肌纤维内有深棕色颗粒, 并有深褐色波纹状沉淀; 阴性肌纤维与背景颜色相近, 无沉淀(图 2b)。表 2 为各组对 MY32 呈阳性反应的平均纤维数、呈阴性反应的平均纤维数及其占纤维总数的百分比。

### 2.3 梭内肌纤维对 NOQ7.5.4.D 的免疫反应性

肌梭由结缔组织囊包裹数条梭内肌纤维而成, 梭内肌纤维一般为 4 ~ 6 条, 包括 2 条核袋纤维, 核链纤维多为 2 ~ 3 条。梭内肌纤维聚集存在, 与囊状结构之间有一定间隙。肌梭一般位于肌束之间的间隙内, 正常情况下辨认并不十分困难。尾部悬

表 1 模拟失重对大鼠比目鱼肌纤维 NOQ7.5.4.D 免疫反应性的影响

Table 1 Effect of the simulated weightlessness on immunoreactivity to NOQ7.5.4.D in extrafusal fibers of rat soleus muscle

 $n_f^{1)} (\%)$ 

t/ d	Group	Positive	Negative	Total
3	Control	2228(87.68)	313(12.32)	2541(100)
	Suspension	2275(86.96)	341(13.04)	2616(100)
7	Control	2101(88.09)	284(11.91)	2385(100)
	Suspension	2268(84.91) <sup>2)</sup>	403(15.09)	2671(100)
14	Control	1871(86.14)	301(13.86)	2172(100)
	Suspension	1389(69.14) <sup>2)</sup>	620(30.86)	2009(100)
30	Control	2285(87.41)	392(12.59)	2614(100)
	Suspension	1513(66.07) <sup>2)</sup>	777(33.39)	2290(100)

1)  $n_f$ : the numbers of fibers; 2) compared with its own control by  $\chi^2$  test,  $P < 0.01$ 

表 2 尾部悬吊对大鼠比目鱼肌纤维 MY32 免疫反应性的影响

Table 2 Effect of the simulated weightlessness on immunoreactivity to MY32 in extrafusal fibers of rat soleus

 $n_f^{1)} (\%)$ 

t/ d	Group	Positive	Negative	Total
3	Control	436(17.33)	2081(82.67)	2517(100)
	Suspension	419(16.14)	2175(83.86)	2594(100)
7	Control	354(14.65)	2062(85.35)	2416(100)
	Suspension	474(18.21) <sup>2)</sup>	2129(81.79)	2603(100)
14	Control	351(15.16)	1965(84.84)	2316(100)
	Suspension	676(31.08) <sup>2)</sup>	1499(68.92)	2175(100)
30	Control	370(15.36)	2039(84.64)	2409(100)
	Suspension	671(32.15) <sup>2)</sup>	1416(67.85)	2087(100)

1)  $n_f$ : the numbers of fibers; 2) compared with its own control by  $\chi^2$  test,  $P < 0.01$ 

吊由于引起梭外肌的萎缩, 肌纤维面积变小, 结缔组织增生, 肌肉的束状结构紊乱, 肌梭的辨认不及对照组容易, 悬吊 30 d 组尤为显著。免疫组织化学切片下辨认肌梭的主要标志是囊状结构包裹数条直径明显比骨骼肌(梭外肌)纤维细的肌纤维(即梭内肌纤维)。相对核袋纤维而言, 核链纤维的直径明显细一些; 两条核袋纤维中相对粗的一条是核袋 2 纤维, 相对细的一条是核袋 1 纤维。

对照组核袋纤维和核链纤维与 NOQ7.5.4.D 均呈阴性反应(图 3)。悬吊 14 d 和悬吊 30 d 组大鼠比目鱼肌梭中的核袋 1 纤维和核袋 2 纤维对 NOQ7.5.4.D 呈阳性或中等程度阳性反应; 未见悬吊组中有对 NOQ7.5.4.D 呈阳性反应的核链纤维(图 4), 模拟失重似乎不引起核链纤维对 NOQ7.5.4.D 免疫反应性的变化。

#### 2.4 梭内肌纤维对 MY32 的免疫反应性

肌梭的辨认参见上节。对照组核袋纤维呈深褐色, 表明对 MY32 反应性较强。模拟失重 14 d、30 d 组核袋纤维染色减弱, 核袋 1 纤维呈阴性反

应, 核袋 2 纤维呈弱阳性或阴性反应变化。每个肌梭一般有 2~4 条核链纤维, 对照组仅有一条核链纤维对 MY32 呈阳性反应, 其它核链纤维呈阴性反应。有趣的是模拟失重似乎引起所有核链纤维对 MY32 的反应性增强, 模拟失重 14 d、30 d 组肌梭内的所有核链纤维对 MY32 均呈强阳性反应(图 5, 图 6)。

#### 2.5 替代实验结果

本实验所设阴性对照, 即经替代实验程序的比目鱼肌组织切片, 未见有骨骼肌纤维或梭内肌纤维呈阳性反应征象。

### 3 讨论

肌梭与骨骼肌(梭外肌)在发生学上有着相同的起源, 相同的血供来源, 可能受着相似的环境因素作用。肌梭位于肌纤维的深部, 在功能上, 肌梭是牵张反射的感受器, 梭外肌是其效应器, 肌梭、梭外肌为同一反射弧的不同部分。既然失重和模拟失重对梭外肌纤维有着显著的影响, 研究失重条件

下肌梭的变化及其对骨骼肌、乃至机体的影响也就十分必要。

尽管骨骼肌纤维至少表达 6 种表型的肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MHC)<sup>[4]</sup>: MHC I / beta cardiac MHC; MHC IIa; MHC IIb; MHC II d/x; MHC embryonic; MHC fetal/neonatal, 但梭内肌纤维表达 MHC 的表型仅包括 MHC embryonic、MHC fetal/neonatal、slow-tonic MHC 和 alpha cardiac MHC<sup>[5]</sup>。

NOQ7.5.4.D、MY32 为单克隆抗体的克隆号。前者是人的肌原纤维分离纯化的 MHC 免疫小鼠得到的 IgG 1, 能检测多种哺乳类动物的慢肌纤维, 而不同其他类型的纤维发生免疫反应。MY32 是以快的快肌纤维作为免疫源而得到的抗体, 仅检测快肌 MHC 的一个表位, 所以能同多种哺乳类动物快肌纤维的所有亚型发生免疫反应, 但不能区别快肌纤维的亚型, 同慢肌则不发生反应。本文采用免疫组化方法, 以 NOQ7.5.4.D、MY32 研究模拟失重状态下梭内外肌纤维 MHC 的表达。

文献报道比目鱼肌是以 I 型肌纤维构成为主的慢肌, 正常雌性 Sprague-Dawley 大鼠比目鱼肌的 I 型肌纤维其构成占 85%<sup>[6]</sup>; 本文为 87.91%, 与文献报道接近, 这表明免疫组化分型与通用的组织化学分型之间有较好的一致性。本研究表明, 模拟失重导致与 NOQ7.5.4.D 和 MY32 发生阳性反应的纤维的构成比发生变化, 即慢肌纤维的构成比减少, 快肌纤维增高, 模拟失重 7 d、14 d、30 d 组同其各自的对照组比较, 差异具显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。提示模拟失重导致骨骼肌纤维 MHC 的表型发生变化, 纤维类型发生转换。

免疫组化方法目前仍然是研究肌梭 MHC 的表达和表型、肌梭发育常用方法之一, 所使用的抗体有 ALD19、ALD58 / ATO、NOQ7.5.4.D / MST、MF30 / ANT、WBMHC-f / MFT 等。Kucera 等<sup>[7]</sup>曾使用 NOQ7.5.4.D 研究过大鼠肌梭的发育, 他们认为发育成熟的梭内肌(核袋和核链)纤维不同于 NOQ7.5.4.D 发生免疫反应。但是国内外文献中未见有关失重或模拟失重对梭内肌纤维 MHC 表达影响的研究报道。本研究观察到对照组中核袋纤维或和核链纤维对 NOQ7.5.4.D 均呈阴性

反应, 如图 3 可见呈阳性的梭外肌纤维, 而所有梭内肌纤维为阴性。这同上述 Kucera 的研究结果是一致的。经历模拟失重的大鼠比目鱼肌中尽管核链纤维对 NOQ7.5.4.D 的反应性似乎没有变化, 但核袋 1 纤维和核袋 2 纤维均呈现不同程度的阳性(图 4), 表明模拟失重状态下核袋纤维的 MHC 表达发生了改变。查文献未见使用单克隆 MY32 研究肌梭报道, 我们观察到对照组核袋 1 和核袋 2 均对 MY32 呈强阳性, 其中一条核链纤维呈阳性, 其余所有核链纤维(可以是一条或二条以上)呈阴性(图 5)。模拟失重 14 d 后, 核袋 1 纤维呈阴性, 核袋 2 纤维呈弱阳性或阴性反应; 所有核链纤维均呈强阳性(图 6)。进一步说明在模拟失重条件下梭内肌纤维 MHC 表达表型发生了变化。

MHC 的表型是不同类型骨骼肌纤维异质性的诸多表现之一<sup>[8]</sup>。此外, MHC 的表型同其收缩速度也是相关联的<sup>[9]</sup>。因此, 模拟失重导致 MHC 表达发生改变, 可能影响梭内肌纤维的收缩速度, 从而影响肌梭的敏感性和功能。这些方面变化有待于进一步研究。

(本文图 1~6 见插页 3. Fig. 1~6 shown in back coloured page 3)

#### 参考文献:

- [1] Fitts R H, Riley D R, Widrick J J. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle [J]. *J Appl Physiol* 2000, 89(2): 823.
- [2] 周继斌, 樊小力, 冯鉴强, 等. 尾部悬吊对大鼠比目鱼肌梭内外肌纤维 SDH 活性的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(4S): 17.
- [3] 陈杰, 马进, 丁兆平, 等. 一种模拟长期失重影响的大鼠尾部悬吊模型 [J]. *空间科学学报*, 1993, 13(2): 159.
- [4] Weiss A, Leinwand L A. The mammalian myosin heavy chain gene family [J]. *Ann Rev Dev Cell Biol*, 1996, 12: 417.
- [5] Walro J M, Kucera J. Why adult mammalian intrafusal and extrafusal fibers contain different myosin heavy-chain isoforms [J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22(4): 180.
- [6] Luginbuhl A J, Dudley G A, Staron R S. Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training [J]. *Histochemistry*, 1984, 81(1): 55.
- [7] Kucera J, Walro J. Myosin heavy chain expression in developing rat intrafusal muscle fibers [J]. *Neurosci Lett*, 1990, 109(1): 18.
- [8] 周继斌, 吴苏娣, 樊小力. 骨骼肌纤维异质性 [J]. *解剖学研究*, 1999, 21(2): 123.

(编辑 张敏瑞)

模拟失重影响大鼠比目鱼肌梭内外肌纤维肌球蛋白重链的表达 (正文见第 33 页)

The Effect of Simulated Weightlessness on Expression of Myosin Heavy Chain in Intrafusal and Extrafusal Fibers of Rat Soleus Muscle (Text in page 33)

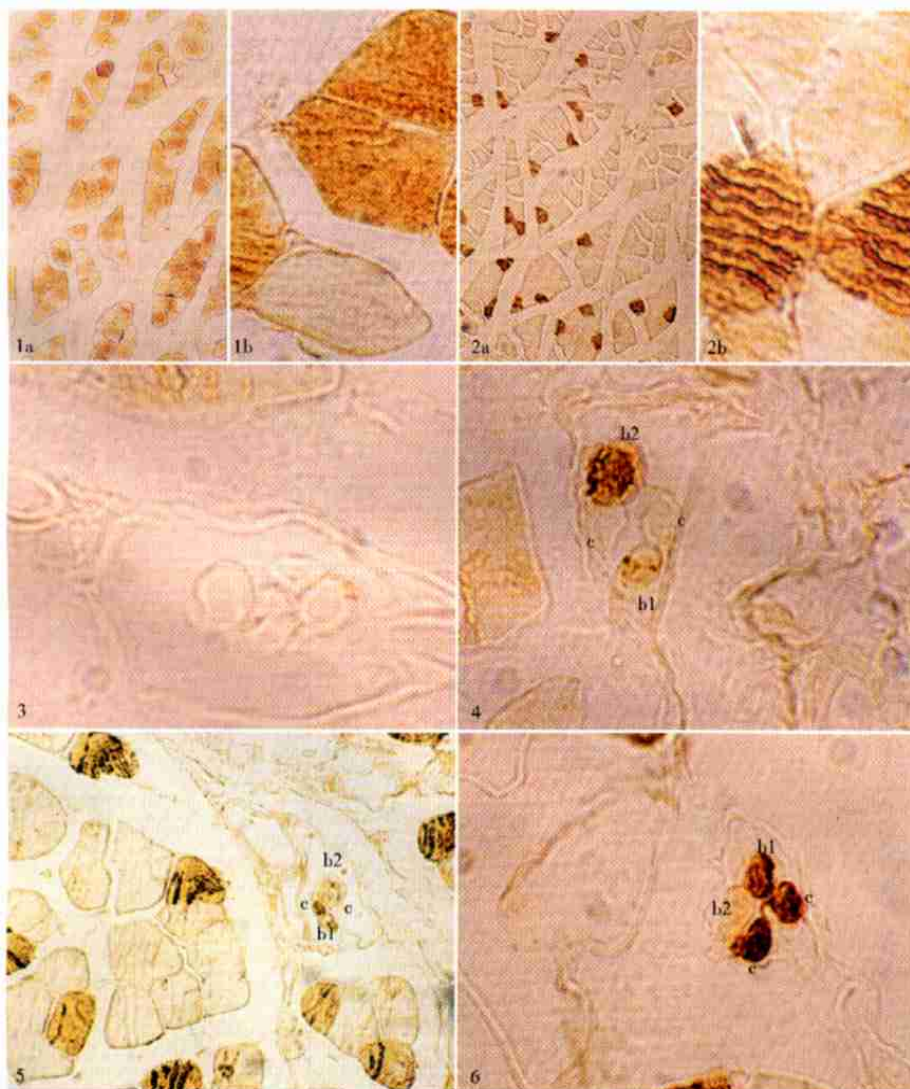


图 1 对照组比目鱼肌纤维对 NOQ7.5.4.D 的免疫反应性

图 2 对照组比目鱼肌纤维对抗体 MY32 的免疫反应性

图 3 对照组比目鱼肌梭内肌纤维对抗体 NOQ7.5.4.D 的免疫反应性

图 4 模拟失重 14 d 大鼠比目鱼肌梭内肌纤维对抗体 NOQ7.5.4.D 的免疫反应性

图 5 对照组比目鱼肌梭内肌纤维对抗体 MY32 的免疫反应性

图 6 模拟失重 30 d 大鼠比目鱼肌梭内肌纤维对抗体 MY32 的免疫反应性

Fig. 1 Transverse sections of extrafusal fibers from a matched control soleus muscle immunoreacted with NOQ7.5.4.D antibody

Note that most extrafusal myofibers bind the slow-twitch antibody NOQ7.5.4.D. 1a:  $10 \times 20$ ; 1b:  $10 \times 100$

Fig. 2 Transverse section of extrafusal fibers from a matched control soleus muscle immunoreacted with MY32 antibody

Note that minority of extrafusal myofibers bind the fast-twitch antibody MY32. 2a:  $10 \times 20$ ; 2b:  $10 \times 100$

Fig. 3 Transverse section of intrafusal fibers from a matched control soleus muscle immunoreacted with NOQ7.5.4.D antibody

Note that all intrafusal fibers appear negatively reactive with NOQ7.5.4.D, but an extrafusal myofiber binds the antibody.  $10 \times 100$

Fig. 4 Transverse section of intrafusal fibers in the soleus muscle from a 14-day tail suspended rat immunoreacted with NOQ7.5.4.D antibody

Note that one nuclear bag2 fiber(b2) and one nuclear bag1 fiber(b1) bind NOQ7.5.4.D, but all two nuclear chain fibers(c) are not reactive with the antibody.  $10 \times 100$

Fig. 5 Transverse section of intrafusal fibers from a matched control soleus muscle immunoreacted with MY32 antibody

Note the one nuclear bag2 fiber(b2) and one nuclear bag1 fiber(b1) bind MY32; One of the rest, two nuclear chain fibers(c), binds the antibody, and another is not reactive with it.  $10 \times 40$

Fig. 6 Transverse section of intrafusal fibers in the soleus muscle from a 30-day tail suspended rat immunoreacted with MY32 antibody

Note that all intrafusal fibers bind MY32, and that all nuclear chain fibers(c) are coloured especial deeply.  $10 \times 100$