

尾部悬吊对大鼠比目鱼肌梭内外肌纤维 SDH 活性的影响

周继斌¹, 樊小力², 冯鉴强¹, 吴苏娣²

(1. 中山医科大学生理学教研室, 广东 广州 510089; 2. 西安医科大学生理学教研室, 陕西 西安 710061)

摘要:【目的】研究尾部悬吊对大鼠比目鱼肌梭内、外肌纤维琥珀酸脱氢酶(succinic dehydrogenase, SDH)活性的影响,旨在探讨失重或模拟失重状态下肌梭的代谢和功能变化。【方法】用尾部悬吊法模拟失重,雌性 Sprague-Dawley 大鼠按体质量配对原则,随机分为尾部悬吊 3、7、14、30 d 组及同步饲养的对照组。以氯化硝基四氮唑蓝盐(nitroblue tetrazolium, Nitro-BT)法检测比目鱼肌梭内、外肌纤维 SDH 的活性。【结果】尾部悬吊导致 I 型肌纤维的构成比减少, II 型肌纤维各亚型的构成比增加,以 II b 型增加最显著。尾部悬吊 3、7、14、30 d 组的 I 型肌纤维构成比分别为 87.92%, 84.00% ($P < 0.05$), 69.90% ($P < 0.01$), 67.90% ($P < 0.01$); II b 型肌纤维的构成比分别是 3.75%, 5.63% ($P < 0.05$), 15.35% ($P < 0.01$), 18.33% ($P < 0.01$)。梭内肌纤维 SDH 活性增强,核袋 1 纤维 SDH 染色由阳性转变为强阳性,核袋 2 纤维由阴性转变为中等以上阳性,核链纤维由仅有一条呈弱阳性转变为均呈强阳性。【结论】模拟失重导致梭内、外肌纤维代谢改变,骨骼肌发生肌纤维类型转换,肌梭的功能活动可能受影响。

关键词: 模拟失重; 比目鱼肌; 梭内肌纤维; 梭外肌纤维; 琥珀酸脱氢酶; 大鼠

中图分类号: R852.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0017-05

Changes of Activities of Succinic Dehydrogenase in Intrafusal and Extrafusal Fibres of the Soleus Muscle in Tail Suspended Rats

ZHOU Ji-bin¹, FAN Xiao-li², FENG Jian-qiang¹, WU Su-di²

(1. Department of Physiology, Sun Yat-sen University of Medicine Sciences Guangzhou 510089, China;

2. Department of Physiology, Xi'an Medical University, Xi'an 710061, China)

Abstract: 【Objective】To explore changes of the histochemical activities of myofibrillar succinic dehydrogenase(SDH) in intrafusal and extrafusal fibres of the rat soleus muscle under condition of the simulated weightlessness. 【Methods】The condition of weightlessness was simulated by suspension of rat's tail. The histochemical activities of myofibrillar SDH in intrafusal and extrafusal fibres of the soleus muscles were studied from 3-days (SUS-3), 7-days(SUS-7), 14-days(SUS-14), 30-days(SUS-30) tail suspended rats and control rats with nitroblue tetrazolium (Nitro-BT) method. 【Results】The constituent ratios of type I muscle fibre became less, while the type II's turned higher after tail suspension. The constituent ratios of type I muscle fibre in the soleus muscle from SUS-3, SUS-7, SUS-14 and SUS-30 were 87.92%, 84.00% ($P < 0.05$), 69.90% ($P < 0.01$), 67.90% ($P < 0.01$), and type II b were 3.75%, 5.63% ($P < 0.05$), 15.35% ($P < 0.01$), 18.33% ($P < 0.01$) respectively. The bag1, chain intrafusal fibers exhibited higher histochemical activities of myofibrillar SDH, and bag2 intrafusal fibres appeared medium or higher activity instead of negative reaction compared with their own control. 【Conclusion】The simulated weightlessness changes histochemical activities of myofibrillar SDH and metabolism in intrafusal and extrafusal fibres, and possible due to transformation of type

收稿日期: 2000-03-22

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目(98sm55)

作者简介: 周继斌(1962-), 男, 湖北汉川人, 医学博士, 讲师。 Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

I to type II muscle fibres.

Key words: simulated weightlessness; soleus muscle; intrafusal fibre; extrafusal fibre; succinic dehydrogenase; 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,机体会发生一系列的生理变化,涉及全身各个系统,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^[1]。然而,迄今为止未见关于失重或模拟失重对肌梭是否有影响的研究报道。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。肌梭位于肌纤维的深部,可能受着相似的环境因素作用。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。因此,研究失重状态下肌梭的变化及其对骨骼肌、乃至机体的影响是十分必要的。模拟失重的方法有头低位卧床、浸水、全身悬吊和尾部悬吊等。本文以尾部悬吊模拟失重,观察大鼠比目鱼肌梭内、外肌纤维的琥珀酸脱氢酶(succinic dehydrogenase, SDH)的活性,旨在探讨失重对肌梭代谢和功能的影响,并对肌萎缩和肌纤维类型转换的机制进行讨论。

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、7、14 和 30 d)以及同步饲养的 4 个对照组。按陈杰等^[2]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°C 左右,12 h 循环光照。

1.2 标本制备与组织化学染色

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,迅速取出右侧比目鱼肌,选取肌腹中段处约 1 cm 的组织块,每个标本取材部位尽量一致。立即投入液氮预冷的异戊烷内 30 s,取出后转入 -70°C 低温冰箱中保存。组织块在恒冷箱用 OCT 包埋剂垂直包埋,IEC MINOTOME 低温恒冷切片机(IBM 公司,美国)切片,切片时调

整组织块方向以获取与肌肉长轴垂直的横断面的组织切片,切片厚度为 $16\ \mu\text{m}$ 。切片裱于涂有 10 g/L 铬矾明胶的载玻片上,室温干燥后进入组织化学 SDH 染色程序。

SDH 染色采用氯化硝基四氮唑蓝盐(nitroblue tetrazolium, Nitro-BT)法^[3]。具体步骤如下:切片入 0.2 mol/L PB (pH 7.6) 5 min 3 次,洗去 OCT 包埋剂;入孵浴液(含 12 mL 的 0.2 mol/L PB, pH 7.6; 2.5 mL 的 4 g/L Nitro-BT; 12 mL 的 0.2 mol/L 琥珀酸钠)室温,15~60 min;生理盐水洗 3 min 3 次;10% FCa 后固定 10 min,水洗;80%酒精 5 min;切片脱水、透明、封固。

1.3 数据采集与统计分析

每只动物选择尽量接近肌腹中部、染色效果较好的一张组织切片进行肌纤维计数。根据 SDH 活性强弱对肌纤维进行分类, KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统(德国)对切片内所有肌纤维按类别进行标记,然后分类统计,组内同类肌纤维合计,并计算各类肌纤维占组内纤维总数的构成比,悬吊组各类肌纤维构成百分比与其同步饲养的对照组间作 χ^2 检验,显著性界值取 $P=0.05$ 。每组选择 30 个肌梭,对比观察肌梭内核袋 1 纤维、核袋 2 纤维和核链纤维 SDH 活性,作定性描述。

1.4 组织化学的特异性

SDH 染色的阴性对照实验是孵浴液去底物,即用丙二酸钠(3.7 g/L)替换琥珀酸钠,其它步骤与 SDH 染色相同。

2 结果

2.1 比目鱼肌肌纤维构成比

骨骼肌纤维 SDH 活性可分为强阳性(+++)、阳性(++)、弱阳性(+)和阴性(-)4 个等级,可对应 I、IIa、IIb 和 IIc 型肌纤维^[4]。I 型肌纤维染成蓝黑色,颗粒密集,界限不清(+++); IIa 型纤维染成蓝色,颗粒较细小稀疏(++); IIb 型纤维染成淡蓝色,颗粒分散,多位于肌膜下(+); IIc 型肌纤维呈阴性(-)。分类统计结果及各类纤维占组内纤维数的构成百分比见表 1,对照组 I 型肌纤维构

表 1 不同时间尾部悬吊大鼠比目鱼肌各型肌纤维数及构成比

Table 1 Number and ratio of each myofibrillar type in the rat soleus muscles after different periods of tail-suspension

<i>t</i> / d	Type I	Type II a	Type II b	Type II c	<i>n</i> fibre (%)	
3	Control	17 875 (89. 90)	1 013 (4. 98)	757 (3. 72)	691 (3. 40)	20 336 (100)
	Suspension	16 871 (87. 92)	1 001 (5. 22)	719 (3. 75)	597 (3. 10)	19 188 (100)
7	Control	17 409 (87. 94)	981 (4. 96)	752 (3. 80)	655 (3. 31)	19 797 (100)
	Suspension	17 683 (84. 00) ¹⁾	1 473 (7. 00) ¹⁾	1 185 (5. 63) ¹⁾	715 (3. 37)	21 051 (100)
14	Control	17 319 (87. 90)	988 (5. 01)	741 (3. 76)	655 (3. 32)	19 703 (100)
	Suspension	14 046 (69. 90) ²⁾	2 384 (11. 86) ²⁾	3 083 (15. 35) ²⁾	582 (2. 9)	20 095 (100)
30	Control	18 417 (87. 93)	1 043 (4. 98)	784 (3. 74)	705 (3. 37)	20 944 (100)
	Suspension	14 043 (67. 90) ²⁾	2 290 (11. 07) ²⁾	3 791 (18. 33) ²⁾	558 (2. 7)	20 682 (100)

1) Compared with its own control by χ^2 test, $P < 0. 05$; 2) Compared with its own control by χ^2 test, $P < 0. 01$

成占绝大部分(87.9%以上),表明比目鱼肌是以 I 型肌纤维为主的慢肌(slow twitch muscle)。

尾部悬吊使得 I 型肌纤维的百分比减少, II 型肌纤维中各亚型的百分比均增加, 尤以 II b 型肌纤维的增加为显著。7 d 悬吊大鼠纤维构成比即有变化($P < 0. 05$), 14 d 悬吊的变化已近峰值。尾部悬吊对大鼠比目鱼肌各型肌纤维构成比的影响见表 1。

2.2 比目鱼肌梭内肌纤维 SDH 活性

镜下可见对照组肌梭位于囊状结构之中, 囊内一般有 4~6 条梭内肌纤维聚集。其中 2 条为核袋纤维, 直径相对较细的是核袋 1 纤维, 较粗的是核袋 2 纤维; 核链纤维多为 2~3 条。在梭内肌纤维与囊状结构之间有明显的间隙存在(图 1)。依据梭内肌纤维的直径基本上可对核袋 1 纤维、核袋 2

纤维和核链纤维进行鉴别, 鉴别困难时选择接近肌梭赤道部的相邻切片, 参照 H-E 染色切片上核的位置和数目对梭内肌纤维进行鉴别。

尾部悬吊导致肌肉萎缩, 肌纤维面积变小, 结缔组织增生, 肌束结构紊乱^[3], 使得肌梭的辨认较对照组困难。悬吊组大鼠比目鱼肌各梭内肌纤维 SDH 活性总体来讲比对照组增强, 但以核链纤维的改变最显著。各对照组的核袋 1 纤维 SDH 染色一般为阳性(++) (图 1)。3 d 悬吊和 7 d 悬吊未见明显改变, 14 d 悬吊和 30 d 悬吊组则为强阳性(+++) (2, 3, 4); 对照组核袋 2 一般为阴性(-) (图 1), 14 d 悬吊及 30 d 悬吊组则为中等程度阳性或弱阳性(++ 或 +) (图 2. 1, 2. 2, 3)。核袋纤维的变化在吊尾 14d 达高峰。对照组 2~3 条核链纤维

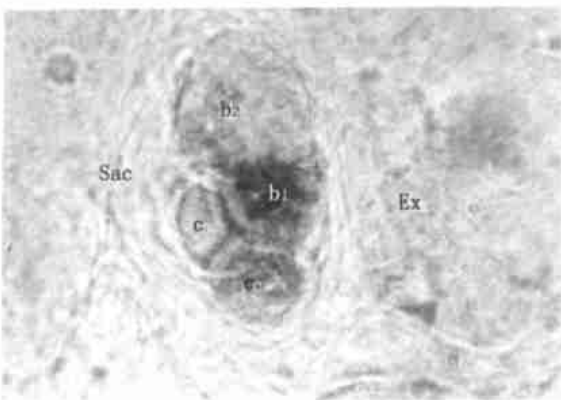


图 1 14 d 对照大鼠比目鱼肌肌梭

Fig. 1 A muscle spindle in the soleus muscle of a 14 d control rat

Showing connective tissue sac (sac) surrounding 4 intrafusal fibers; a bag 1 fiber (b1) exhibiting positive reactivity; a bag 2 fiber (b2) appearing negative; a chain fiber (c) appearing positive and another appearing negative. Some extrafusal fibers (Ex) are located outside the sac. 10×100

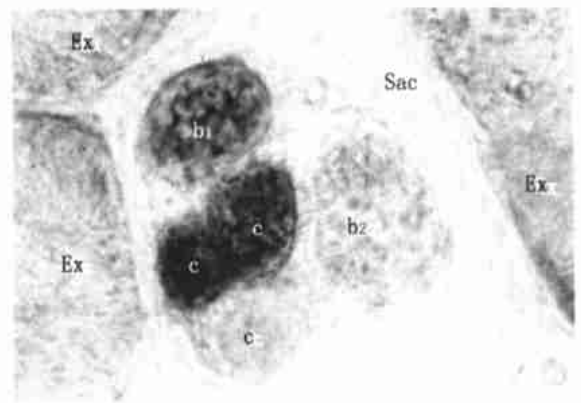


图 2. 1 14 d 悬吊大鼠比目鱼肌肌梭

Fig. 2. 1 A muscle spindle in the soleus muscle of a 14 d tail suspended rat

Showing 5 intrafusal fibers, that is, one bag 1 fiber (b1) exhibiting high positive reactivity, one bag 2 fiber (b2) exhibiting faint positive reactivity, two of three chain fibers exhibiting middle positive reactivity and another chain fiber exhibiting faint positive reactivity. Some extrafusal fibers (Ex) are located outside the spindle. 10×100

中一般只仅有 1 条呈弱阳性(+) (图 1), 悬吊使核链纤维的染色增强, 14 d 悬吊组的变化即相当显著(图 2.1, 2.2), 30 d 悬吊组表现为所有核链纤维都呈很强阳性(+++) (图 4), 核链纤维的变化在 30 d 悬吊组达高峰。

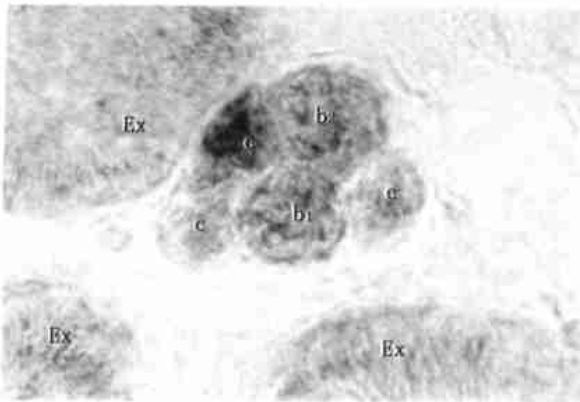


图 2.2 14 d 悬吊大鼠比目鱼肌肌梭

Fig. 2.2 A muscle spindle in the soleus muscle of a 14 d tail suspended rat

Showing six intrafusal fibers, that is, one bag 1 fiber (b1), one bag 2 fiber (b2) and four chain fibers (c) all exhibiting positive reactivity. Some extrafusal fibers are located outside the muscle spindle. 10 × 100

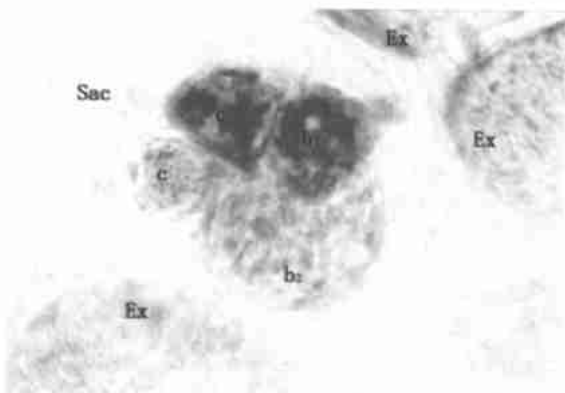


图 3 30 d 悬吊大鼠比目鱼肌肌梭

Fig. 3 A muscle spindle in the soleus muscle of a 30 d tail suspended rat

Showing four intrafusal fibers, that is, one bag 1 fiber (b1), one bag 2 fiber (b2), two chain fibers (c) all exhibiting positive reactivity. Bag 1 and one of two chain fibers exhibits especially high positive reactivity. Some extrafusal fibers (Ex) are located outside the spindle. 10 × 100

2.3 SDH 染色的特异性

所设 SDH 染色替代对照实验结果为阴性。

3 讨论

谢水平, 也可视为氧化代谢水平, 肌纤维内的线粒体数目多, 且代谢旺盛, SDH 染色则强; 反之, 染色则弱。骨骼肌纤维可分 I、IIa、IIb 和 IIc 四种类型。不同类型肌纤维有不同 SDH 活性: I 型肌纤维能量代谢为氧化型, 有丰富的线粒体, SDH 染色呈强阳性(+++); IIa 型肌纤维能量代谢为氧化和酵解双重型, 既能进行有氧氧化, 又能进行糖酵解, SDH 染色呈阳性(++); IIb 型肌纤维属于生理学上的快缩疲劳敏感肌, 能量代谢为酵解型, SDH 染色呈弱阳性(+); IIc 型为未分化成熟的肌纤维, 线粒体数量虽多但功能不成熟, 故 SDH 染色呈阴性(-)。由此可见, 骨骼肌纤维 SDH 活性与其代谢的型的特异性有着密切联系。

Soukup^[6] 和 Khan^[7] 研究过梭内肌纤维 SDH 活性, 观察到核袋 1 纤维有中等程度活性, 核袋 2 纤维的 SDH 活性低, 核链纤维有较高的活性。本实验在对照组观察到核袋 1 纤维、核袋 2 纤维的染色结果与两作者的结果基本一致。但本研究对照组核链纤维中仅有一条呈阳性, 其余核链纤维呈阴性, 即使有的肌梭多达 4 条以上核链纤维, 其差异的原因有待进一步研究。

失重对骨骼肌的损害尽管为包括航天医学在内的空间科学工作者所广泛关注, 但研究的着眼点似乎仅集中于梭外肌。迄今为止, 失重或模拟失重对肌梭是否有影响, 国内外文献中未见报道。本文观察到, 模拟失重使得梭内肌纤维 SDH 活性增强。这表明模拟失重影响肌梭的代谢。代谢与其功能是相适应的, 梭外肌 SDH 活性高, 则慢缩肌纤维的特性明显, 即收缩缓慢、不易疲劳; 梭内肌 SDH 活性增高, 是否表明梭内肌的收缩变得缓慢了? 肌梭是感受肌肉长度变化和牵拉刺激的特殊感受器, 如果收缩特性有变化是否会进而影响肌梭感受刺激的敏感性, 有何继发效应? 这些应该也是航天医学所需阐明的新问题。此外, 尽管核袋纤维和核链纤维都是感受牵拉刺激, 但是两者的适宜刺激还是有所不同。核袋纤维对快速的牵拉, 即所谓动力性牵拉敏感; 核链纤维对缓慢持续的牵拉, 即所谓静力性牵拉敏感。模拟失重对核链纤维 SDH 活性的影响比核袋纤维显著, 是否提示模拟失重对感受静力性牵拉刺激的影响比感受动力型牵拉刺激的影响更大。

失重对骨骼肌的影响是相当广泛的, 但归纳起来为两个方面, 一是肌肉尤其是抗重力肌萎缩, 一

SDH 染色反映的是线粒体内三羧酸循环的代

是慢缩肌纤维(slow twitch muscle fibre)向快缩肌纤维(fast-twitch muscle fibre)的转化(不同类型肌纤维有着不同的形态学特征、代谢特点、收缩蛋白表型、内含物的种类与浓度及功能特性^[8])。目前认为失重引起骨骼肌萎缩是由于肌肉废用、微循环障碍及宇航者进食减少所致,但伴随肌肉萎缩所发生的肌纤维类型的转化得不到解释。我们认为失重使得肌梭失去正常的重力牵引直接导致或通过其它因素如体液的头向分布、微循环障碍等间接引起肌梭变化为骨骼肌萎缩和肌纤维类型转化的始动因素。本研究表明模拟失重影响肌梭的代谢,我们在另外的研究中观察到,模拟失重状态下梭内肌纤维收缩蛋白的表型表达发生改变,以及肌梭的传入放电活动受到影响(另文报道);其他研究者的工作表明,失重或模拟失重时脊髓前角运动神经元的输出减少^[9];脊髓前角运动神经元的电活动控制着骨骼肌基因的表达^[10];肌膜上动作电位数目影响肌浆内钙离子的浓度,而后者又影响蛋白磷酸酶 2B(钙神经素)介导的转录通道的水平,进而影响功能蛋白和酶蛋白的表型或表达^[11]等。综上所述,失重引起骨骼肌损害的可能机制是:失重引起肌梭结构和功能变化,其结果导致肌梭传入冲动减少,进而脊髓前角运动神经元输出减少、骨骼肌肌膜上产生的动作电位数目减少、肌浆内 Ca^{2+} 浓度降低、蛋白磷酸酶 2B(钙神经素)转录通道活性下调。后者导致慢肌纤维特异性启动子活性下调,使得蛋白质合成减少,即发生肌肉萎缩;同时快肌纤维特异性启动子活性上调,合成快肌特异性代谢酶和收缩蛋白,即发生骨骼肌纤维类型转化。当然,该假说尚需要更多的、更有力的研究结果支持,尤

其是对肌梭的机械特性以及各个环节间的相互关系和影响进行深入研究。

参考文献:

- [1] 马永烈,孙亚志.失重/模拟失重下肌肉萎缩的研究进展[J].航天医学与医学工程,1997,10(2):149.
- [2] 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.
- [3] 陈啸梅.实用组织化学技术[M].北京:人民卫生出版社,1982.309~311.
- [4] 王彤华.诊断病理学[M].北京:人民卫生出版社,1994.766~776.
- [5] 周继斌,樊小力,吴苏娣等.模拟失重对大鼠比目鱼肌肌重和形态结构的影响[J].解剖学研究,1999,21(2):13.
- [6] Soukup T. Intrafusal fibre types in rat limb muscle spindles: morphological and histochemical characteristics[J]. Histochemistry, 1976, 47(1): 43.
- [7] Khan M A, Soukup T. A histochemical study of rat intrafusal muscle fibre[J]. Histochemistry 1979, 62: 179.
- [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.
- [9] Krasnov I B. Gravitational neuromorphology[J]. Adv Space Biol Med 1994, 4: 85.
- [10] Hughes S M. Muscle development: electrical control of gene expression[J]. Curr Biol, 1998, 8(24): R892.
- [11] Chin E R, Olson E N, Richardson J A, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type [J]. Genes Dev, 1998, 12(16): 2499.

(编辑 关淡庄)

·简讯·

糖尿病合并症研究有新进展

糖尿病已成为继癌症,心血管疾病后的第三大威胁人类健康的疾病,患者越来越年轻化,死亡于与合并症有关的疾病。中山医科大学博士后朱邦豪在合作导师关永源教授指导下开展了“糖尿病合并症的产生机制及其预防的研究”,发现糖尿病大鼠患病第 2 周主动脉平滑肌肾上腺素受体敏感性增加,随后出现对苯肾上腺素和 KCl 收缩反应的异常变化。研究表明糖尿病对血管内膜功能的损害在病程的第 2 周就可出现,随病程发展逐渐加重;细胞内钙池以及由其耗竭后所引起的充电性钙内流在糖尿病产生过程中扮演重要角色;中药单体灯盏花素可有效预防糖尿病对血管内膜的功能性损害,但对平滑肌的功能性损害未见显著性改善,揭示祖国医学中的传统中药在糖尿病合并症的防治方面有很大的开发价值。

(冯世容)