

跖肌肌球蛋白腺苷三磷酸酶与琥珀酸脱氢酶染色的相关性探讨*

朱道立

(南通师范学院生命科学与技术系 南通 226007)

摘要: 研究大鼠、家兔和人跖肌的肌纤维型构成比例与分布。应用肌球蛋白腺苷三磷酸酶(ATP酶)和琥珀酸脱氢酶(SDH酶)染色法,观察比较各型肌纤维的组织化学特性。结果表明:肌球蛋白ATP酶染色,大鼠、家兔和人跖肌的肌纤维可分成I型、II_A型、II_B型肌纤维,横切面呈多边形或椭圆形,分别约占25%、35%和40%;琥珀酸脱氢酶染色,肌纤维呈蔚蓝色,以镶嵌交叉排列,可分为中染SO、深染FOG和浅染FG三型,分别约占25%、30%和45%,种系间无显著性差异。ATP酶活性反应肌纤维收缩的生理特性,而SDH活性反应肌纤维的代谢特征,两种分型的方法有所差异。

关键词: 跖肌;肌球蛋白ATP酶;琥珀酸脱氢酶;大鼠;家兔;人

中图分类号: Q954, Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)02-32-04

A Correlative Approach in the Investigation of Myosin Adenosine Triphosphatase and Succinate Dehydrogenase in Plantaris Muscles

ZHU Dao-Li

(Department of Life and Science, Nantong Teachers College, Nantong 226007, China)

Abstract: In order to observe the proportion of fiber types and the distribution of fiber types in the plantaris muscles of rats, rabbits and humans, histochemical characteristics of plantaris muscle fibers from these species were observed by both myosin adenosine triphosphatase (ATPase) and succinate dehydrogenase (SDHase) staining. Myosin adenosine triphosphatase staining in rats, rabbits and humans revealed that plantaris muscle fibers were multi-sided or ellipsoid and divided into type I, II_A and II_B, accounting for 25%, 35% and 40% of the total amount of fibres respectively. After succinate dehydrogenase staining fibres were blue and divided into mediate, dark and light types, which were mosaic and interweaved. The proportion of mediate, dark and light fibers was about 25%, 30% and 45% in rats, rabbits and humans respectively. The activity of ATPase and SDHase showed the contractive physiology and metabolic features of the muscle fibers.

Key words: Plantaris muscle; ATPase; SDHase; Rat; Rabbit; Human

* 江苏省教委自然科学基金(No. 98 KJB 180005),南通市跨世纪学术、技术培养对象第一次资助项目(NC1 199912);

第一作者介绍 朱道立,51岁,男,教授;主要从事动物解剖生理学教学与研究工作。

收稿日期:2002-08-02,修回日期:2003-01-03

哺乳动物骨骼肌的肌纤维可依据肌球蛋白腺苷三磷酸酶(ATP酶)染色,分成I型为红肌纤维又称慢缩纤维,II_A型为浅红肌纤维、II_B型为白肌纤维又称快缩纤维,分别适应其不同的生理功能^[1]。Peter^[2]根据肌纤维的代谢特征将其分别归属于慢缩氧化型(SO型)、快缩氧化糖酵解型(FOG)和快缩糖酵解型(FG),并认为两种分型方法是相互对应的。Fuentes^[3]也采用琥珀酸脱氢酶反应以区分肌纤维类型。但是,ATP酶活性的高低能够表明肌纤维的收缩速度,而各种氧化酶,磷酸化酶的活性显示出肌纤维的代谢特征,对于这两者之间是否能视为同样的分型方法尚有待于深入研究^[4]。尽管肌纤维的分型根据生理功能、组织化学和组织结构而确定,不同动物肌纤维分型的形态标准也不尽相同,但为了科学合理地对肌纤维的大小、分布、构成比等做定量与定性分析。本文试图应用肌球蛋白腺苷三磷酸酶即ATP酶法与琥珀酸脱氢酶即SDH酶法染色,研究常用动物模型大鼠、家兔和正常人小腿深部肌肉的组织化学特征,比较三种肌纤维分型是否一致,以期寻求其规律性。

1 材料与方 法

1.1 材料 成年健康SD大鼠(*Rattus norvegicus*)6只,体重180~220g,成年健康家兔(*Oryctolagus cuniculus domestica*)6只,体重2500~3000g,雌雄兼用。以20%氨基甲酸乙酯腹腔麻醉(1g/kg体重),于小腿各取两侧的跖肌,以木块两端固定成正常状态下的肌肉长度,立即置液氮内冷冻备用。再取成人(Chinese)新鲜尸体6例,男女各3例,年龄6~30岁不等,生前均无神经肌肉疾病,死亡后20h内取材,于小腿两侧各取跖肌后即以体内正常长度固定于木块上,置入液氮保存备用。

1.2 制片和染色 标本做恒温冷冻在Leica恒冷切片箱(德国产)内达-20℃,制作切片,厚10μm,室温下空气干燥后做腺苷三磷酸酶和琥珀酸脱氢酶组织化学染色。采用改良的肌球蛋白ATP酶法^[5],分别在37℃(pH 10.4)与37

℃(pH 4.5)孵育40min,硫化铵黑色沉淀为阳性反应。琥珀酸脱氢酶按Nachlas等方法^[6],37℃孵育30min,出现蓝色颗粒沉淀为阳性反应,根据反应强弱可分为浅染FG、中染SO和深染FOG三型纤维。

1.3 观察计数 在Olympus光学显微镜(日本产)下观察肌纤维的类型、形态和结构。每张切片随机抽样20个点,放大100~200倍显微摄像,经冲洗扩印照片后计数肌纤维,每张照片含50~100条肌纤维,即每张切片或每个标本共计数1000~2000条肌纤维。然后计算各型肌纤维的构成比例。并做统计学t-检验处理。

2 结 果

比较大鼠、家兔和人的跖肌各型肌纤维形态结构和所占的比例,左右两侧均无显著性差异,故将每侧标本作为一个独立的标本予以统计,大鼠、家兔和正常人肌肉标本各有12侧。

2.1 跖肌ATP酶染色特征 在ATP酶碱法(pH 10.4)染色切片上,跖肌的肌纤维可分为I型、II_A型及II_B型,I型肌纤维最粗,染色浅;II_A型肌纤维最细,染色深;II_B型纤维居其其间,染色中等。而经ATP酶酸法(pH 4.5)染色切片上能分出深染呈黑色的直径大的I型纤维、浅染而直径小的II_A型纤维及呈褐色的直径较大的II_B型纤维(图版I:1~3,见封4)。在大鼠、家兔和人肌纤维构成比例是II_B型>II_A型>I型纤维,有极显著差异, $P < 0.01$;从种系进化角度加以比较,大鼠、家兔和人I型、II_A型及II_B型纤维所占的比例均无显著性差异($P > 0.05$,见表1)。

2.2 跖肌琥珀酸脱氢酶染色特征 在琥珀酸脱氢酶染色切片上,肌纤维显蔚蓝色,可分为浅染FG、中染SO和深染FOG三型。浅染FG型纤维颗粒细小、染色较淡,分布均匀;中染SO型纤维染色颗粒大小不等,横切面上呈现周边染色较深,中央区染色较浅;深染FOG型纤维染色颗粒较大,染色较深,也呈现周边深、中间浅的特点。三型肌纤维呈现镶嵌交叉排列,横

切面呈现多边形或椭圆形(图版 I: 4~6)。在大鼠、家兔和正常人,浅染 FG 型、中染 SO 型和深染 FOG 型纤维分别约占 45%、25% 和 30%;横切面深染 FOG 型纤维较小,中染 SO 型纤维

最大,浅染 FG 型纤维居中。从种系角度予以比较,大鼠、家兔和人各型肌纤维所占的比例均无显著性差异($P > 0.05$,表 1)。

表 1 跖肌 ATP 酶和 SDH 酶染色特征与构成比例($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	ATP 酶(%)			SDH 酶(%)		
		I 型纤维	II _A 型纤维	II _B 型纤维	中染纤维 SO 型	深染纤维 FOG 型	浅染纤维 FG 型
大鼠	12	21.8±3.2	32.3±3.2	45.9±3.2	25.1±2.9	30.6±2.9	44.3±2.9
家兔	12	23.5±3.6	34.9±3.6	41.6±3.6	25.6±2.7	28.3±2.7	46.1±2.7
正常人	12	25.0±3.8	34.6±3.8	40.4±3.8	24.5±2.4	30.7±2.4	44.8±2.4

* 三型纤维的比例作 t -检验, $P < 0.01$, 有极显著差异

3 讨论

Füchtbauer^[7]根据骨骼肌纤维收缩速度、糖酵解能力和氧化能力将啮齿动物的肢体肌纤维分成 I 型、II_A 型和 II_B 型,分别归为慢缩氧化型(SO 型)即肌球蛋白 ATP 酶染色下碱易变,酸稳定,有大量氧化酶、少量糖原酶;快缩氧化糖酵解型(FOG 型)即含有氧化酶和糖原酶;快缩糖酵解型(FG 型)即肌球蛋白 ATP 酶有丰富的碱稳定,酸易变,有大量糖原酶、少量氧化酶,由此试将 I 型、II_A 型和 II_B 型纤维分别相当于琥珀酸脱氢酶染色的中染 SO 型(琥珀酸脱氢酶活性呈中等)、深染 FOG 型(琥珀酸脱氢酶活性强)、浅染 FG 型(琥珀酸脱氢酶活性弱)肌纤维。作者的实验材料表明,ATP 酶染色大鼠、家兔和人的 II_B 型纤维均多于 II_A 型纤维,而 II_A 型纤维则多于 I 型纤维。I 型、II_A 型和 II_B 型分别占 25%、35% 和 40%;琥珀酸脱氢酶染色,大鼠、家兔和人中染 SO 型、深染 FOG 型和浅染 FG 型纤维分别约占 25%、30% 和 45%。比较两种染色方法,I 型纤维(25%)与中染 SO 型纤维(25%)相似,而 II_A 型纤维(35%)与深染 FOG 型纤维(30%)和 II_B 型纤维(40%)与浅染 FG 型纤维(45%)所占的比例有所差异。就种系和各型肌纤维相比较发现相差幅度值在 0.5%~6.6% 范围之内,其中 I 型纤维相差值达 0.5%~3.3%,II_A 型纤维相差值达 1.7%~6.6%,II_B 型纤维相差值达 1.6%~4.5%。

Reichmann 和 Pette^[8]用显微分光光度计测定肌纤维琥珀酸脱氢酶反应的相应强度,证实在大鼠、豚鼠、兔和猫四种动物,用 ATP 酶反应分类的 II_A 型和 II_B 型纤维其琥珀酸脱氢酶染色相互重叠,II_A 型纤维由弱到强的分布幅度较 II_B 型纤维更宽,故造成 II 型纤维采用 ATP 酶法与 SDH 酶法的差异。

肌球蛋白 ATP 酶碱法和酸法是在酶组化孵育前分别对冰冻切片用碱性溶液(pH 10.4)或酸性溶液(pH 4.5)进行预处理,根据其 I 型纤维在 pH 3.9~10.4 范围之内是易变的,II_A 型纤维在 pH 4.9~10.8 范围之内是易变的,II_B 型纤维在 pH 4.5~10.8 范围之内是易变的^[5],可以应用 ATP 酶碱法和酸法分出 II 型肌纤维的亚型。琥珀酸脱氢酶是位于骨骼肌细胞浆的细胞能量供应中心线粒体内,是三羧酸循环中的重要酶,测定 SDH 酶可测知骨骼肌细胞内的呼吸机能状况。因此,根据实验研究的目的与要求,ATP 酶与 SDH 酶为世界各国学者用作对骨骼肌纤维分型测定的常用酶,经常互为补充和验证^[1,2,9]。作者结合实验用琥珀酸脱氢酶(SDH 酶)染色后,对深染、中染和浅染的判断标准在使用显微分光光度计定量测定跖肌对 SDH 酶的最大吸收光谱差异分析,SDH 酶染色反应强度依次为 FOG > SO > FG,三者之间差异显著。如大鼠 FOG 型相对含量为 65.5~77.7,SO 型 52.1~58.6,FG 型 17.5~19.9。染色深浅的定性分析与其定量分析是密切相关

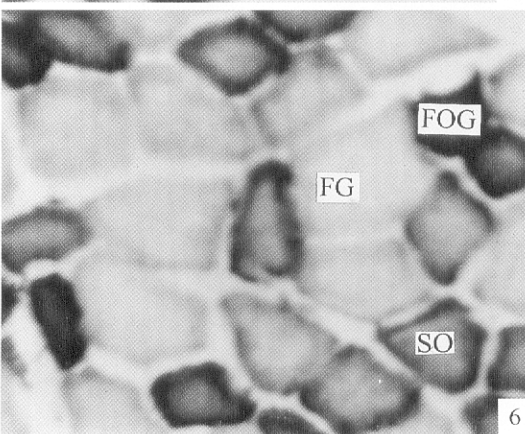
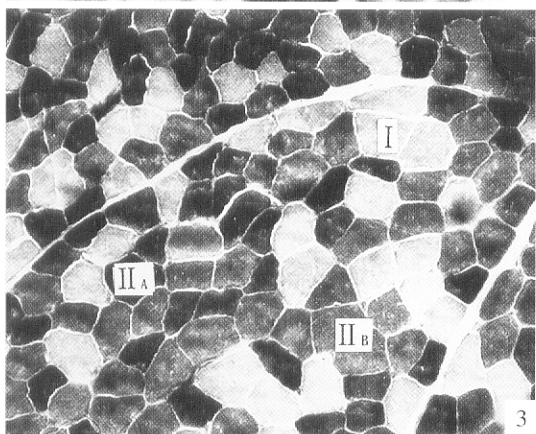
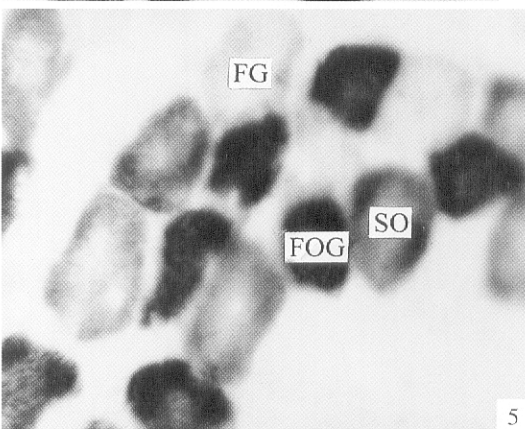
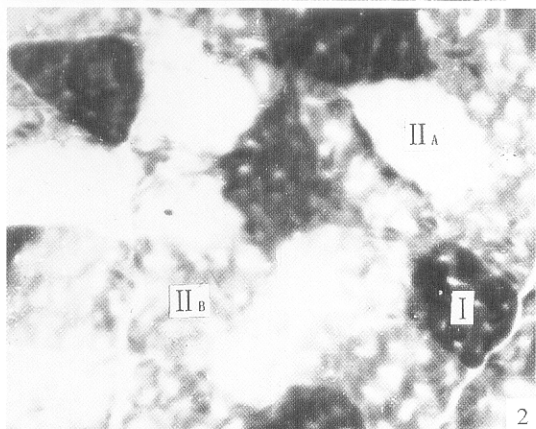
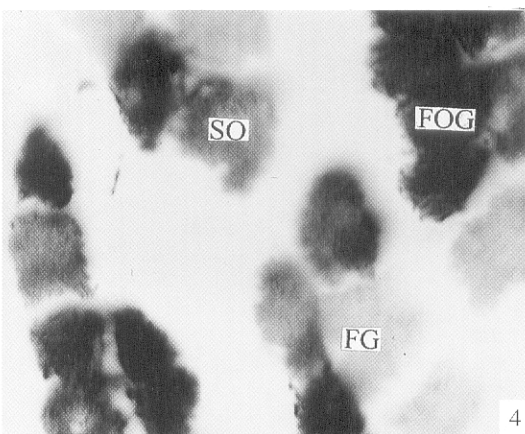
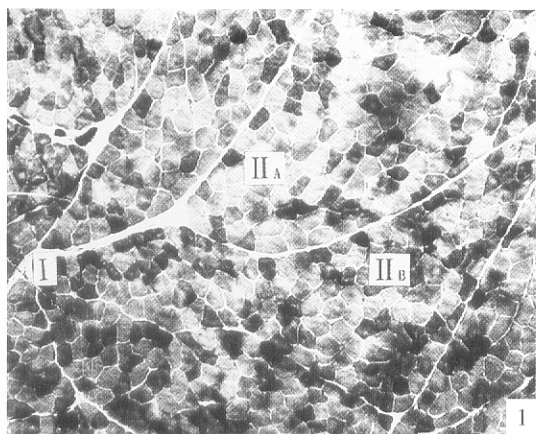
的,由于肌纤维酶组化制作过程中受到动物种系与肌肉取材、孵育、染色、脱水等多种因素的影响,致使结果差别各异。在本文研究中发现用 ATP 酶和 SDH 酶对骨骼肌纤维分型的重叠现象,可以在统计学上进行各型肌纤维 95% 的可信限计算或给出各型肌纤维的百分率构成比的范围。

1971 年, Buke 用电刺激脊髓内单个 α 运动神经元研究每一个运动单位内肌纤维的收缩特性,发现由这条最后公路所产生的运动实际上存在三种性质,除了慢缩运动单位(S 型)外,快缩运动单位又有耐疲劳(FR 型)与易疲劳(FF 型)两种;再经过糖原消耗法和 ATP 酶反应法确认这三种不同电生理特性的肌纤维与组织化学反应 ATP 酶和 SDH 酶所分三型即 I 型、II_A 型、II_B 型正相符合^[10]。脊髓前角大 α 运动神经元支配 II_A 型与 II_B 型肌纤维,小 α 运动神经元支配 I 型肌纤维。尽管肌纤维适应神经支配的需要,能够发生肌纤维构成比例的变化,不同强度耐力训练可使骨骼肌纤维的线粒体膜和嵴发生变化,毛细血管腔增大与毛细血管数目增多,从而导致 SDH 酶的活性随运动大小而发生相应改变^[11]。况且,还有 I 型和 II_A 型之间, II_A 型与 II_B 型之间的部分重叠^[12]。我们依然不能忽视 ATP 酶染色分型的误差。国内外众多学者结合研究对象与研究工作实际的需要,至今还在运用 ATP 酶与 SDH 酶探索研讨肌纤维型的变化规律,从而在蛋白质水平、mRNA 及基因结构水平深入探讨其生理生化机制。

参 考 文 献

- [1] 朱道立,张艳红,程量. 家兔胫骨前肌肌纤维型分布的研究. 中国实验动物学报, 1995, 3:70~76.
- [2] Peter J B, Barnard R J, Edgerton V R, et al. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, 1972, 11:2 627~2 633.
- [3] Fuentes I, Cobos A R, Segade L A G. Muscle fibre types and their distribution in the biceps and triceps brachii of the rat and rabbit. *Journal of Anatomy*, 1998, 192:203~210.
- [4] Spurway N C, Murray M G, Gilmour W H, et al. Quantitative skeletal muscle histochemistry of four East African ruminants. *Journal of Anatomy*, 1996, 188:455~472.
- [5] 朱道立,张艳红. 家兔胫前肌肌球蛋白酸碱性组化研究. 中国兽医学杂志, 1994, 20:7~9.
- [6] Nachlas M M. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new method. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1957, 5:420~425.
- [7] Fuchtbauer E, Rowlerson A M, Kordula G, et al. Direct correlation of parvalbumin levels with myosin isoforms and succinate dehydrogenase activity on frozen sections of rodent muscle. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1991, 39:355~361.
- [8] Reichmann H, Pette D. A comparative micro-photo-metric study succinate dehydrogenase activity levels in type I, II_A and II_B fibers of mammalian and human muscles. *Histochemistry*, 1982, 74:24~30.
- [9] Latorre R, Gil F, Vazquez J M, et al. Skeletal muscle fiber types in the dog. *Journal of Anatomy*, 1993, 182:329~337.
- [10] Burke R E, Levine D N, Zajec F E, et al. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three fiber types in cat gastrocnemius. *Science*, 1971, 174:709~712.
- [11] Torrella J R, Fouces V, Palomeque J, et al. Comparative skeletal muscle fibre morphometry among wild birds with different locomotor behaviour. *Journal of Anatomy*, 1998, 192:211~222.
- [12] Pette D, Tyler K R. Response of succinate dehydrogenase activity in fibers of rabbit tibialis anterior muscle to chronic never stimulation. *Journal of Physiology*, 1983, 338:1~9.

[1] 朱道立,张艳红,程量. 家兔胫骨前肌肌纤维型分布的



1. 大鼠跖肌的肌纤维 ATPase(pH 4.5) × 40; 4. 大鼠跖肌的肌纤维, SDHase × 200;

2. 家兔跖肌的肌纤维. ATPase(pH 4.5) × 200; 5. 家兔跖肌的肌纤维, SDHase × 200;

3. 人跖肌的肌纤维, ATPase(pH 10.4) × 100; 6. 人跖肌的肌纤维, SDHase × 200;

I 型染色深或浅; II_A 型染色浅或深; II_B 型染色中等; SO 型染色中等; FOG 型染色深; FG 型染色浅