

鳊早期发育阶段骨骼肌纤维的增生与肥大生长

朱琼^① 赵金良^{①*} 苒建菊^① Jeerawat THAMMARATSUNTORN^①
钱叶洲^② 吴超^② 钱德^②

① 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室 上海 201306;

② 安徽省池州市特种水产研究所 池州 247100

摘要:骨骼肌是鱼体的主要组成部分,也是衡量鱼体生长发育的重要指标。为了解鳊(*Siniperca chuatsi*)早期发育阶段骨骼肌纤维的生长发育特征,通过制作孵化后1~41日龄个体骨骼肌背右侧第一肌节石蜡切片,利用图像分析软件统计该肌节中肌纤维的数目和面积,分析了鳊骨骼肌纤维的增生和肥大生长特征。结果表明,鳊早期发育阶段骨骼肌生长同时包括数目增加(增生)和面积增大(肥大),背侧第一肌节中肌纤维总数由40个增加到520个,肌纤维总面积由805.30 μm^2 增加到186 422.77 μm^2 。其中,孵化后1~9日龄,肌纤维相对增生数目下降,相对增加面积缓慢上升,相对增加面积中增生生长的贡献率由60.53%降至8.80%,肥大生长则与之相反;9~15日龄,肌纤维相对增生数目呈现上升,相对增加面积相对平缓,相对增加面积中增生生长的贡献率略呈上升(由8.80%上升至20.26%),肥大生长贡献率略有下降;15~41日龄,相对增生数目和相对增加面积均呈上升趋势,相对增加面积中增生生长的贡献率下降并趋于平稳,肥大生长贡献率由79.79%上升到87.41%,成为优势生长。

关键词:鳊;骨骼肌纤维;增生生长;肥大生长;贡献率

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)06-96-07

Hyperplastic and Hypertrophic Growth of Skeletal Muscle Fibers of Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*) at Early Developmental Stage

ZHU Qiong^① ZHAO Jin-Liang^{①*} CHANG Jian-Ju^① Jeerawat THAMMARATSUNTORN^①
QIAN Ye-Zhou^② WU Chao^② QIAN De^②

① Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ② Chizhou Institute of Special Aquaculture, Chizhou 247100, China

Abstract: Skeletal muscle is the main composition to body weight in fish, which provides an important indicator for somatic growth. To fully understand skeletal muscle development of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) at the early stage, paraffin sections of the first dorsal myomere of skeletal muscle at 1–41 days after hatching were carried out; fiber numbers and total fibre area were measured to describe hyperplastic and hypertrophic growth of skeletal muscle. The results showed that skeletal muscle growth of mandarin fish included increasing of both fibre numbers (hyperplasia) and fibre area (hypertrophy) at the early development stage, the total fiber

基金项目 上海市科委重点基础项目(No. 09JC1406900),上海市重点学科建设项目(No. Y1101);

* 通讯作者, E-mail: jljzhao@shou.edu.cn;

第一作者介绍 朱琼,女,硕士研究生;研究方向:水产动物遗传育种;E-mail: zhuq412@126.com。

收稿日期:2011-05-24,修回日期:2011-09-07

numbers in the right first dorsal myomere increased from 40 to 520, and the total fiber area increased from 805.30 μm^2 to 186 422.77 μm^2 . During the 1–9 days after hatching, the relative increased fiber numbers decreased and the relative increased fibre area raised slowly, the contribution rate of hyperplastic growth dropped dramatically from 60.53% to 8.80%, as opposite to hypertrophic growth. At the period of 9–15 days after hatching, the relative increased fiber numbers raised and relative increased area was on a steady phase, the contribution rate of hyperplastic growth increased from 8.80% to 20.26%, while hypertrophic growth contribution ratio decreased slightly. At the 15–41 days after hatching, both the relative increased fiber numbers and area were on the rise, the contribution rate of hyperplastic growth decreased to a steady phase and hypertrophic growth (from 79.76% to 87.41%) gradually became the dominant contributor of skeletal muscle growth.

Key words: *Siniperca chuatsi*; Skeletal muscle fiber; Hyperplasia; Hypertrophy; Contribution rate

鱼类骨骼肌约占活体重量的 30%~80%，是衡量鱼体生长发育的重要指标^[1]。骨骼肌的生长主要依靠肌纤维增生(hyperplasia, 即数目增加)和肥大(hypertrophy, 即尺寸增大)。在哺乳动物中, 肌纤维增生主要发生在出生前期, 个体出生后肌纤维的数目不再改变, 骨骼肌的生长只依赖于卫星细胞的增殖分化而导致肌纤维长度及直径的增加^[2]。而对于终生生长的鱼类来说, 肌纤维的增生和肥大可持续到性成熟后, 在不同发育阶段, 肌纤维增生和肥大生长所占的比重也不相同^[3]。

鱼类骨骼肌增生分为两个发育阶段: 一是胚胎期肌纤维发生的延续, 形成特定类型的肌层(红肌、粉肌和白肌), 又称分层增生; 二是各肌层中肌纤维的数目增加, 特别是白肌层, 导致肌节中出现马赛克现象, 称为马赛克增生^[4]。分层增生主要发生在仔鱼早期阶段, 仔鱼后期马赛克增生逐渐加强, 并持续数月, 促使鱼体快速生长^[5-7]。肥大生长在孵化后早期不显著, 当内源性营养转化为外源性营养后, 肥大生长逐渐增强并贯穿整个稚鱼至成鱼阶段^[3, 8-10]。此外, 鱼类肌纤维增生和肥大生长还受环境、饵料、个体极限大小等因素影响^[11-13]。

鳊(*Siniperca chuatsi*)是我国传统淡水名贵经济鱼类, 其肉质细嫩、营养丰富、生长速度快。为从肌细胞发育角度深入解析鱼体表型的生长特征, 本研究通过分析鳊早期发育阶段骨骼肌肌纤维的数目和面积变化, 查明骨骼肌的早期发育模式特征, 为鳊骨骼肌的生长发育研究提

供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验鱼苗于 2010 年 5~6 月取自安徽省池州市特种水产养殖研究所。鳊受精卵在孵化环道内流水孵化, 孵化后鱼苗在水泥池(5.0 m×4.0 m×1.5 m)中培育, 开口仔鱼投喂刚出膜的团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)鱼苗, 后期仔鱼投喂适口鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)鱼苗, 实验期间水温为 20.0~25.0℃。共取样 13 次, 分别为孵化后第 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、31、41 天(day after hatching, DAH), 前期仔鱼发育变化快, 隔日取样, 后期为每隔 10 日取样一次。每次取 30 尾, 其中 20 尾在解剖镜下观察其形态特征, 并测量全长, 计算绝对生长率(absolute rate of growth, ARG)和比生长率(specific rate of growth, SGR)^[14], 计算公式分别为: $ARG = (TL_f - TL_i) / \Delta t$, $SGR = (\ln TL_f - \ln TL_i) / \Delta t$, TL_f 和 TL_i 分别为最终和初始全长, Δt 为时间间隔。另 10 尾用 Bouin 液固定, 70% 酒精清洗与保存。

1.2 实验方法

1.2.1 石蜡切片的制作 随机取不同日龄仔鱼 3~5 尾制作石蜡切片, 其中, 1~11 DAH 为仔鱼整体, 11 DAH 后的仔鱼去除头部。经酒精脱水、二甲苯透明、石蜡透蜡、包埋、修块、Leica RM 2016 型切片连续横切, 切片厚度为 5~7 μm (包埋、切片、粘片按同一方向)。切片

经 H. E 染色,中性树胶封片。

1.2.2 观察、统计与数据处理 由于骨骼肌在体轴前后、背腹不同区段间存在发育差异,而且随着鱼体发育,难以完整观察整体背部切面,统一选取背鳍起点下右背侧第一肌节进行观察统计。这是因为孵化后第 1 天的仔鱼背鳍褶出现微突^[15],以背鳍起点为参考点,在切片观察中容易统一定位;背鳍起点下方第一肌节分隔清晰,肌纤维含量丰富,具有代表性。在 Olympus 显微镜下观察切片,用 Image-Pro Plus 图像分析软件统计的肌纤维数目和纤维大小,利用 SPSS 软件分析处理数据。

由于肌纤维截面形状不规则,统计数据为肌纤维面积。通过肌纤维的数目和面积增加来反映骨骼肌增生和肥大生长。相对增加面积中,包括新增生的肌纤维面积和原肌纤维面积增大两个部分,将面积数据中排序数值较小的部分判定为新增生肌纤维,结合增生肌纤维的数目,求和得到增生生长的面积,再利用差法求得肥大生长的面积。

2 结果

2.1 鱼体生长特征 孵化后第 1 天仔鱼的全长为(3.67 ± 0.18) mm (n = 20),孵化后第 41 天稚鱼的全长为(39.54 ± 0.53) mm (n = 20),这一发育阶段内,仔、稚鱼的绝对生长率和比生

长率分别为 0.87 mm/d、0.058/d。鳊体全长随着发育天数增加而增大,全长(L)与孵化后发育天数(D)呈显著线性关系: $L = 0.933D - 0.289$ (n = 260,线性 $R^2 = 0.965, P < 0.01$) (图 1)。

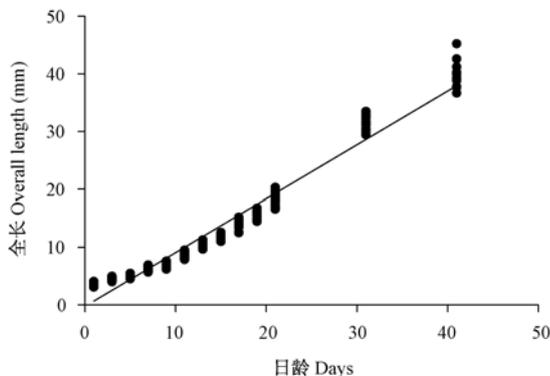


图 1 鳊全长与孵化后日龄的关系

Fig. 1 Relationship between the overall length of mandarin fish and days after hatching

2.2 骨骼肌生长特征 鳊不同日龄仔、稚鱼背右侧第一肌节肌纤维的发育情况见表 1,肌纤维数目和面积均随着发育天数的增加而增大。孵化后第 11 天在肌节中央部分出现直径较小的纤维(平均面积 40.02 μm²),随后肌节中的小纤维分布逐渐增多(图 2)。

表 1 鳊不同孵化日龄背侧第一肌节中肌纤维数目、总面积和相对增加面积 (Mean ± SD)

Table 1 Fiber numbers and areas in the first dorsal myomere of mandarin fish at the different days after hatching

孵化日龄 (d) Day after hatching	肌纤维总数目 Total fiber numbers	肌纤维总面积 (μm ²) Total fiber area	增生面积 (μm ²) Hyperplastic area	肥大面积 (μm ²) Hypertrophic area
1	40 ± 3	805.30 ± 34.29		
3	58 ± 1	1 255.32 ± 328.10	272.40	177.60
5	76 ± 3	2 324.08 ± 160.83	257.79	810.97
7	92 ± 5	4 343.80 ± 455.45	210.48	1 808.25
9	103 ± 6	9 807.19 ± 1 943.00	480.87	4 722.51
11	118 ± 6	15 108.60 ± 5 230.00	630.32	4 671.09
13	140 ± 8	19 356.59 ± 2 324.91	840.86	3 373.80
15	163 ± 9	21 750.64 ± 3 419.77	1 138.41	4 423.14
17	202 ± 5	36 001.91 ± 4 061.06	2 182.73	12 068.54
19	247 ± 5	55 372.69 ± 4 133.80	2 485.34	16 885.44
21	299 ± 4	85 568.86 ± 10 256.43	2 927.81	27 268.36
31	391 ± 10	127 428.53 ± 5 522.46	5 257.72	36 601.92
41	520 ± 12	186 422.77 ± 24 371.35	7 429.40	51 564.83

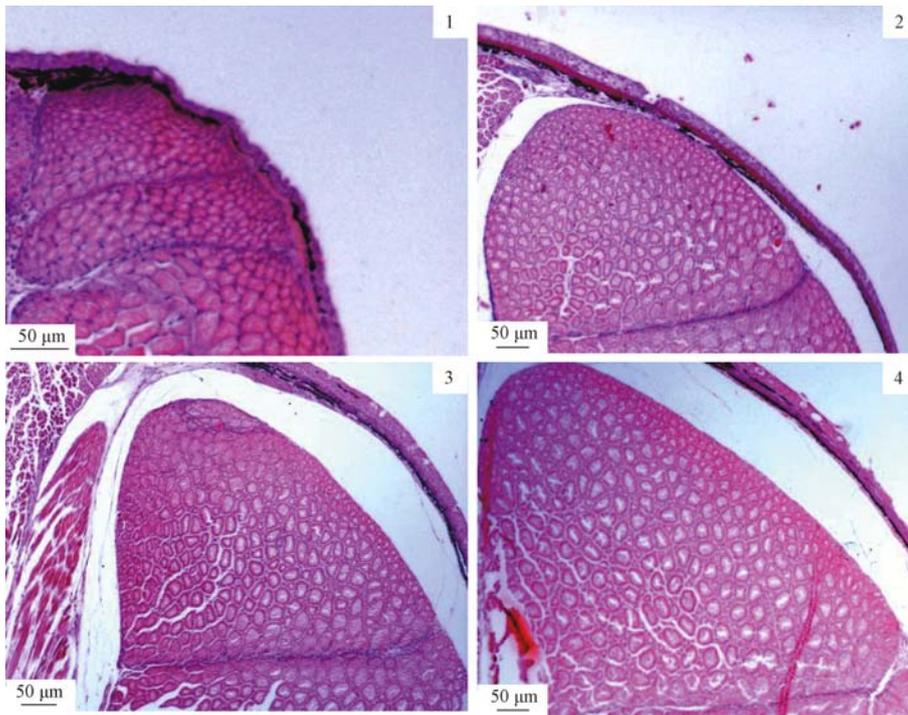


图 2 孵化后第 11、21、31、41 日龄鳊背侧第一肌节的石蜡切片 (×10)

Fig. 2 Paraffin sections of the first dorsal myomere of mandarin fish at the 11th, 21st, 31st, 41st days after hatching

1~4 依次代表第 11、21、31、41 日龄鳊。

1 - 4 represent fish at the 11th, 21st, 31st, 41st days after hatching.

2.2.1 肌纤维数目增生 孵化后第 1 天背侧第一肌节中的肌纤维总数为 40 个,第 41 日龄时增生至 520 个,肌节中肌纤维的总数目随着发育天数不断增多(图 3)。孵化后早期(9 日龄前)肌纤维相对增生数目呈下降趋势,9~41 日龄,肌纤维相对增生数目呈明显上升趋势(图 4)。

2.2.2 肌纤维面积增大 孵化后第 1 天背侧第一肌节中的肌纤维总面积为 (805.30 ± 34.29) μm²,41 天时增大至 (186 422.77 ± 24 371.35) μm²,肌节中肌纤维的总面积随发育天数呈上升趋势(图 5)。孵化后前 9 天,相对增加面积呈缓慢上升趋势;第 9~15 天,相对增加面积为平缓期;15 天后,相对增加面积持续上升(图 6)。

2.2.3 增生生长和肥大生长的相对贡献率 增生生长、肥大生长在面积增长中的所占比例

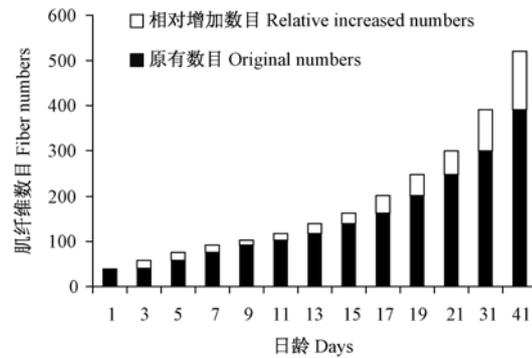


图 3 鳊不同日龄背侧第一肌节肌纤维总数目

Fig. 3 Total fiber numbers in the first dorsal myomere of mandarin fish at the different days after hatching

在不同阶段表现不同(图 6)。第 1~9 天由增生引起的面积增加占总增加面积的比例呈下降趋势,由 60.53% 降至 8.80%;9~15 天,由增生引起的面积增加占总增加面积的比例上升至

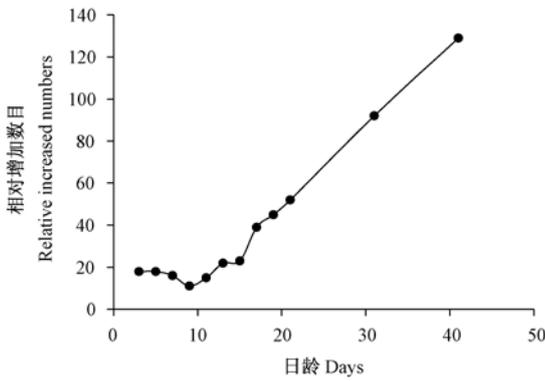


图4 鳊不同日龄背侧第一肌节肌纤维相对增生数目
Fig. 4 Increased fiber numbers in the first dorsal myomere of mandarin fish at the different days after hatching

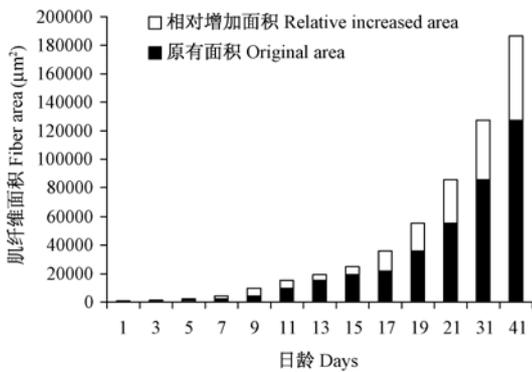


图5 鳊不同日龄背侧第一肌节肌纤维总面积
Fig. 5 Total fiber area in the first dorsal myomere of mandarin fish at the different days after hatching

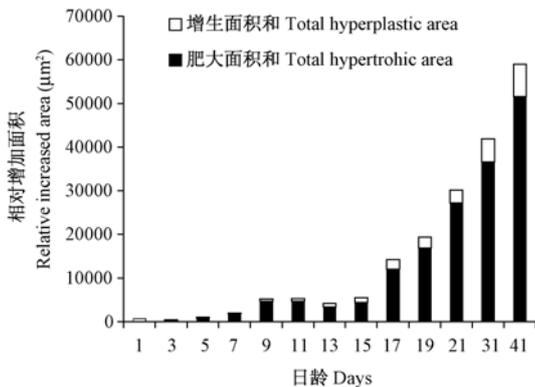


图6 鳊不同日龄背侧第一肌节肌纤维相对增加的面积
Fig. 6 Relative increased fiber area in the first dorsal myomere of mandarin fish at different days after hatching

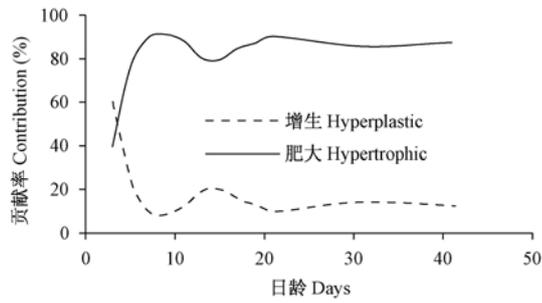


图7 鳊不同日龄骨骼肌增生生长、肥大生长贡献率比例

Fig. 7 Relative contribution of hyperplastic growth and hypertrophic growth at the different days after hatching

20.46% ;第15天以后由增生引起的面积增加总占增加面积的比例呈下降趋势,至第41天,由20.46%降至12.59%,并趋于平稳。与之相反,肥大生长贡献率则逐渐成为生长的优势部分,由39.41%上升到87.41%(图7)。

3 讨论

以往有关鱼类生长研究多用体重、体维(全长、体长、体宽、体高)等参数描述,这些参数容易测定,但只能间接反映骨骼肌生长特征。相比而言,肌纤维数目、肌纤维大小(长度、直径、面积)可直接定量描述不同年龄、规格、条件下鱼体的骨骼肌生长特征,肌纤维长度测定由于需要较复杂的取样分析而较少采用,因而,肌纤维直径、面积大小成为肥大生长分析的重要指标^[4]。本研究结果表明,鳊早期发育阶段鱼体全长增加与孵化后发育日龄之间呈显著线性关系,同时,骨骼肌发育也随着孵化后发育日龄增加呈现持续增长,骨骼肌生长中包含了肌纤维数目增生(增生生长)和肌纤维面积增大(肥大生长),因此,鳊早期发育阶段的表型(全长)生长与骨骼肌纤维生长具有一致性。

增生是指形成新的肌纤维,鱼类增生一般包括分层增生和马赛克增生两个阶段,分层增生出现在仔鱼期,稚鱼阶段马赛克增生较明显^[5]。研究表明,狼鲈(*Dicentrarchus labrax*)分层增生发生在仔鱼期前半阶段并贯穿于整个仔

鱼阶段,仔鱼末期马赛克增生开始形成^[3]。有名锤形石首鱼(*Atractoscion nobilis*)孵化初期新生的肌纤维达到 93%,此后,随着体长的增加而减少^[9]。虹鳟(*Salmo gairdneri*)肌纤维增生在体长 2.2 cm 时占主导,随体长增加而减弱^[16]。金头鲷(*Sparus aurata*)15 日龄肌纤维的增生数目占 57%,46 日龄降至 27%^[5]。本研究中,鳊背侧第一肌节中肌纤维的数目在孵化后 1~41 d 的生长发育过程中随着日龄增大而增加,表明这一阶段骨骼肌肌纤维增生明显,特别是 21 日龄前。由于本实验中未使用更有效的染色或标记方法区分骨骼肌中的红肌、白肌肌纤维^[5,17],有关鳊骨骼肌的分层增生未能深入分析。在孵化后第 11 天的肌节中已经观察到直径较小的肌纤维,主要分布于肌节顶端靠近皮肤位置和肌节底面水平肌膈处,第 31、41 天的肌节中分布更多,这些直径较小的新生肌纤维与直径较大的原有肌纤维呈相间排列,推测鳊骨骼肌的马赛克增生可能自孵化后 11 天左右开始。

鳊骨骼肌纤维相对增生数目在 9 日龄前下降,9 日龄后持续上升,这一变化可能与鳊消化系统的发育、营养获取密切相关。鳊仔鱼前期主要靠卵黄囊和油球提供能量,为内源性营养阶段;后卵黄阶段,开口摄食,为混合营养阶段(内源性营养向外源性营养转变);胃腺出现后,进入稚鱼期,转变为外源性营养阶段^[18]。根据对本研究采样期间个体的观察,鳊孵化后第 4 天开口摄食,即 1~3 日龄仔鱼为卵黄阶段;随后卵黄囊逐渐缩小,至第 9 天完全消失,4~9 日龄处于向外源性营养转变的阶段,这一阶段营养供应能力下降,同时,还要消耗一部分能量去摄取食物,故导致肌纤维相对增生数目减少;9 日龄后,营养方式完全转化为外源性营养阶段,饵料供给充足,营养供应能力增强,鱼体生长加快,肌纤维数目增加呈上升趋势。

肥大生长是指肌纤维尺寸的增大,贯穿胚胎后期直至肌纤维达到最大直径,是稚鱼和成鱼阶段肌肉生长的主要机制^[16,19]。在金头鲷孵化后第一周的肌纤维中已经能观察到肥大过

程,2~3 周转化为外源性营养后,肥大生长增加迅速,并持续到成鱼阶段^[4]。在有名锤形石首鱼、虹鳟中,肥大生长也是后期的主要生长机制^[9,16]。本研究中,鳊骨骼肌肌纤维面积随日龄增加而增大,早期面积增加缓慢,后期迅速上升。其中,肌纤维相对增加面积在第 1~9 天呈缓慢上升趋势;第 9~15 天,趋于平缓;第 15~41 天,相对增加面积呈明显上升趋势。据前期研究表明,鳊成鱼骨骼肌白肌纤维的直径约为 50~100 μm ^[20],在 41 日龄稚鱼中,观察到成熟肌纤维数目仅占总数 0.22%。

鳊骨骼肌肌纤维增长过程中,增生生长和肥大生长的相对贡献率不同。孵化后 1~9 日龄,增生生长面积占总增加面积的比例由 60.53% 骤降至 8.80%,而肥大生长面积比例快速上升。该阶段肌纤维数目增加了 2.58 倍(由 40 个增至 103 个),而肌纤维平均面积增加了 4.73 倍(由 20.13 μm^2 增至 95.21 μm^2)。9~15 日龄阶段,增生生长面积占总增加面积的比例略有上升,增至 20.46%。该阶段面积增加趋于平缓,平均面积增加了 1.33 倍,而肌纤维数目呈上升趋势,数目增加了 1.58 倍,致使增生生长比例表现上升,肥大生长比例表现下降。15~41 日龄,增生生长面积比例又降至 12.59%,后趋于平稳,而肥大生长面积比例上升。该阶段肌纤维数目增加了 3.19 倍,而平均面积增加了 8.57 倍,肥大生长成为后期骨骼肌生长的主要优势。

参 考 文 献

- [1] Weatherley A H, Gill H S. The Biology of Fish Growth. London: Academic Press, 1987: 37-42.
- [2] Moss F P, Leblond C P. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. The Anatomical Record, 1971, 170(4): 421-435.
- [3] Veggetti A, Mascarello F, Scapolo P A, et al. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.): an ultrastructural and morphometric study. Anatomy and Embryology, 1990, 182(1): 1-10.
- [4] Johnston I A. Muscle Development and Growth. San Diego: Academic Press, 2001: 103-140.
- [5] Rowlerson A, Mascarello F, Radaelli G, et al. Differentiation

- and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L.): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 1995, 16(3): 223 – 236.
- [6] Johnston I A, Cole N J, Abercromby M, et al. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *The Journal of Experimental Biology*, 1998, 201(12): 623 – 646.
- [7] Silva P, Valente L M P, Olmedo M, et al. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in blackspot seabream *Pagellus bogaraveo* from hatching to juvenile. *Journal of Fish Biology*, 2009, 74(1): 37 – 53.
- [8] Alami-Durante H, Fauconneau B, Rouel M, et al. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to somatic growth rate. *Journal of Fish Biology*, 1997, 50(6): 1285 – 1302.
- [9] Zimmerman A M, Lowery M S. Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). *Journal of Experimental Zoology*, 1999, 284(3): 299 – 308.
- [10] Galloway T F, Kjørsvik E, Kryvi H. Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.), related to different somatic growth rates. *The Journal of Experimental Biology*, 1999, 202(15): 2111 – 2120.
- [11] Johnston I A, Manthri S, Alderson R, et al. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *The Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(8): 1337 – 1351.
- [12] Sawatari E, Seki R, Adachi T, et al. Overexpression of the dominant-negative form of myostatin results in doubling of muscle-fiber number in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2010, 155(2): 183 – 189.
- [13] Koumans J T M, Akster H A, Booms G H R, et al. Growth of carp (*Cyprinus carpio*) white axial muscle; hyperplasia and hypertrophy in relation to the myonucleus/sarcoplasm ratio and the occurrence of different subclasses of myogenic cells. *Journal of Fish Biology*, 1993, 43(1): 69-80.
- [14] Hopkins K D. Reporting fish growth: a review of the basics. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1992, 23(3): 173 – 179.
- [15] 蒲德永, 王志坚, 周传江, 等. 大眼鳊幼鱼的发育和生长. *西南大学学报: 自然科学版*, 2007, 29(8): 118 – 122.
- [16] Stickland N C. Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Anatomy*, 1983, 137(2): 323 – 333.
- [17] Kiessling A, Ruohonen K, Bjørnevik M. Muscle fibre growth and quality in fish. *Achieves of Animal Breeding*, 2006, 49(Suppl 1): 137 – 146.
- [18] 吴雪峰, 赵金良, 钱叶洲, 等. 鳊消化系统器官发生的组织学. *动物学研究*, 2007, 28(5): 511 – 518.
- [19] Higgins P J, Thorpe J E. Hyperplasia and hypertrophy in the growth of skeletal muscle in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Biology*, 1990, 37(4): 505 – 519.
- [20] 朱琼, 赵金良, 裴建菊, 等. 鳊骨骼肌快肌和慢肌的组成特征比较. *上海海洋大学学报*, 2011, 20(4): 488 – 493.