

抽样计数肌横切面内肌纤维数量的研究*

朱道立

(江苏省南通师专生物系 南通 226007)

摘要 在5例家兔胫骨前肌的前、后亚体肌横切面内,应用直接计数和抽样计数方法计算I型、II型肌纤维的构成比例和肌纤维总数。结果明显,方法切实易行。

关键词 胫骨前肌 肌纤维 直接计数 抽样计数 家兔

肌横切面的肌纤维数量,能够通过两种方法进行计数,即直接计数和抽样计数。直接计数是将整个肌横切面内的肌纤维全部予以计数统计;而抽样计数则是以肌横切面内进行若干抽样,再经过总的肌横切面加以推算出来。本文在家兔胫骨前肌的两个亚体,即前亚体和后亚体^[1-5]的肌横切面作直接计数,目的是与抽样计数的结果进行对照,以便对抽样计数肌纤维数量的应用能有足够的认识和正确的评价,做到既省时省力,又有提高其准确率。

1 材料和方法

实验是用20%氨基甲酸乙酯耳廓静脉麻醉(1g/kg体重),5例成年家兔(*China oryctolagus cuniculus*)(体重2-4kg)右侧胫骨前肌的前、后肌亚体(见图1)从肌腹中央分别横切下长约2cm的肌条,共计10块,迅速置入液氮(-196℃)5min,取出后依次置入冰箱内(-40℃, -20℃)复温。接着,分别作恒冷箱切片,厚度10μm,于常温下干燥后按照Guth-Brooke改良的肌动球蛋白-ATP酶预孵法染色(Actomyosin ATP ase pH 10.3)^[6-7],将肌纤维分成浅染的I型和深染的II型两种,并用肌动球蛋白-ATP酶预孵法染色(pH4.3),作酸碱对照加以证实(图2、3,见封4)。再采用以下两种方法分别进行两型肌纤维构成比例与肌纤维总数的计数。

1.1 直接肌纤维计数法 将肌横切面作一系

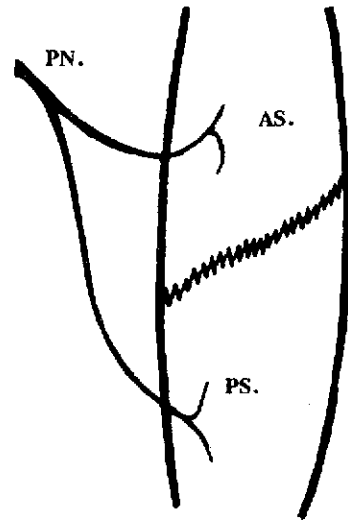


图1 胫骨前肌各亚体分布示意图
AS.:前亚体;PS.:后亚体;PN.:腓神经。

列的连续重叠显微照相。直到整个肌亚体横切面全部摄完(约需10-40张显微照相),选择适当的放大倍数($\times 65$),使肌纤维能用于肉眼直视计数。再将照片拼接得到完整的综合放大图。每个肌横切片的肌纤维总数通过手动计数器计算,并以点墨水法标以记号,以免重复计数。运用立体学方法^[8-9],分别使用已知面积为50mm \times 50mm, 25mm \times 25mm, 10mm \times

* 校级科研基金资助项目;

第一作者介绍:朱道立,男,46岁,副教授;

收稿日期:1995-05-03,修回日期:1996-10-01

10mm, 5mm × 5mm 的正方块测量板铺在综合放大图上, 顺序移动与划线计算, 将该数平方得到假设综合放大图为正方形面积的边长, 除以 65 倍放大倍数, 得到假设切片为正方形的边长后, 再将该数平方求得其每张切片的实际面积。

1.2 抽样肌纤维计数法 在肌横切面内, 在切片上按显微镜台的纵、横测距仪有顺序地在水平座标轴和垂直座标轴上移动, 分别在每张切片上作机械性均衡随机抽样 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 个样本点, 作显微摄影, 然后计数每张照片内的肌纤维数, 数过的肌纤维均点上墨水以避免重复计数。照片四周的不完全肌纤维横切面仅计数其左边与上边压线的肌纤维, 右边与下边压线的肌纤维摒弃不计。照相底片的长 36mm, 宽 24mm, 显微照相放大 65 倍。实际摄取切片面积是 $(36 \div 65) \times (24 \div 65) = 0.2045\text{mm}^2$ 。

1.3 计算符号和公式 a) 每张显微照相面积 A_m (Area of micrograph); b) 每张显微照相的肌纤维数 N_m (Number of micrograph); c) 总的肌横切面积 A_T (Area of cross section); d) 随机抽样估算肌纤维计数 N_s (Number of random sampling); e) 直接计数肌纤维数 N_T (Number of cross section)。

(1) 抽样计数估算的肌纤维总数 (N_s) = 抽样肌纤维总和 ($\sum N_m$) \div 总的肌横切面积 (A_T) / 抽样面积 [$n(A_m)$]; (2) 抽样计数所含的肌纤维数 (肌纤维数/ mm^2) = 估算肌纤维总数 (N_s) / 总的肌横切面积 (A_T); (3) 抽样计数的肌纤维数占实际总数百分比 ($\% N_T$) = 抽样肌纤维总数 ($\sum N_m$) / 直接计数肌纤维数 (N_T) \times 100; (4) 抽样面积占肌横切面积百分比 ($\% MTA$) = 抽样面积 [$n(A_m)$] / 总的肌横切面积 (A_T) \times 100; (5) 估算肌纤维总数百分率误差 ($\% E$) = 直接计数肌纤维数 (N_T) - 抽样肌纤维数 (N_s) / 直接计数肌纤维数 (N_T) \times 100。

2 结果

2.1 胫骨前肌前、后亚体两型肌纤维构成比

家兔右侧胫骨前肌的前亚体和后亚体所包含的 I 型纤维 (慢缩纤维) 和 II 型纤维 (快缩纤维) 构

表 1 家兔胫骨前肌直接计数的两型肌纤维构成比率 (%)

编号	前亚体		后亚体	
	I型	II型	I型	II型
1	10.9	89.1	24.4	75.6
2	13.6	86.4	25.6	74.4
3	13.8	86.2	22.8	77.2
4	13.5	86.5	22.3	77.7
5	11.4	88.6	26.1	73.9
均数	12.6 ± 1.38	87.4 ± 1.38	24.2 ± 1.67	75.8 ± 1.67
(\bar{X}) ± S.D.				

成比例 (见表 1), 前、后亚体均以 II 型纤维居多, 后亚体的 I 型纤维多于前亚体。

2.2 胫骨前肌随机抽样 II 型肌纤维构成比例 随机抽样 II 型肌纤维构成比例趋于过高 (见表 2)。随着抽样点数增多, 胫骨前肌前、后亚体 II 型纤维构成比才逐渐趋于稳定, 接近直接计数的结果, 抽样误差也减小。

2.3 胫骨前肌前、后亚体肌纤维数、肌横切面积与肌纤维平均值 直接计数肌纤维法确定胫骨前肌 10 个肌亚体的每个肌横切面内肌纤维总数在 32, 758 - 70, 831 条之间; 平均横切面积在 32.90 - 47.32 之间; 平均肌纤维数/ mm^2 位于 996 - 1568 条肌纤维之间 (见表 3)。

2.4 胫骨前肌随机抽样各项数据 尽管肌横切面的抽样计数与直接计数在精确度上有所差异。抽样计数趋向于在肌亚体实测肌纤维计数值的上下波动 (见表 4)。我们将 20 个和 40 个抽样点的 $\% E$ 分别与 $\% N_T$ 、 $\% MTA$ 、 N_s 与估算肌纤维数/ mm^2 进行相关和回归分析^[10]。结果在 20 个取样点实测计数 5, 648 条肌纤维, 占肌纤维总数达 9.40%, 占肌横切面积达 8.99% 时, $\% E$ 与 $\% N_T$ 之间具有相关关系 ($r = 0.9991, P < 0.001$; 其回归方程 $\hat{Y} = 0.4075x + 3.4291, P < 0.001$)。 $\% E$ 与 $\% MTA$ 之间也具有相关关系 ($r = 0.9989, P = 0.001$; 其回归方程 $\hat{Y} = 0.4225x + 3.4681, P < 0.002$)。

表2 家兔胫骨前肌随机取样Ⅱ型肌纤维构成比统计表

随机抽样点数	前亚体	标准差	标准误	后亚体	标准差	标准误
5	91.8	0.2744	0.1227	81.9	0.3851	0.1722
10	91.3	0.2818	0.0891	81.5	0.3883	0.1228
15	91.1	0.2847	0.0735	80.8	0.3939	0.1017
20	90.6	0.2920	0.0653	80.4	0.3971	0.0888
25	90.8	0.2890	0.0578	79.9	0.4005	0.0801
30	90.4	0.2947	0.0538	79.6	0.4031	0.0736
35	90.1	0.2988	0.0505	79.1	0.4064	0.0687
40	89.8	0.3029	0.0479	78.9	0.4076	0.0645

表3 直接计数家兔胫骨前肌前、后亚体的肌纤维数与肌横切面积

编号	肌亚体	肌纤维总数(条)	肌横切面积(mm ²)	肌纤维平均值(肌纤维数/mm ²)
1	前亚体	32,758	32.90	996
	后亚体	34,934	36.70	952
2	前亚体	43,298	39.26	1103
	后亚体	46,972	43.65	1076
3	前亚体	60,115	45.48	1322
	后亚体	63,725	46.34	1375
4	前亚体	54,876	40.21	1365
	后亚体	59,324	42.19	1406
5	前亚体	69,713	44.45	1568
	后亚体	70,831	47.32	1497
均数±标准差 (\bar{X})±S.D.		53655±13617	41.85±13.43	1167±217

表4 家兔胫骨前肌随机抽样各项指标统计表

随机抽样点数	肌纤维数(条)	占肌纤维总数百分比(%NT)	占肌横切总面积百分比(%MTA)	估算肌纤维总数(Ns)	肌纤维数/mm ²	估算肌纤维总数百分率误差(%E)	百分率误差标准误(S.E.)
5	1583	2.63	2.24	70411	1548	-20.75	0.1814
10	3051	5.08	4.50	67853	1492	-12.97	0.1170
15	4363	8.13	7.33	59525	1422	-10.94	0.0806
20	5852	10.91	9.77	59879	1430	-11.60	0.0716
25	7373	13.74	12.22	60354	1442	-12.49	0.0661
30	8793	16.39	14.66	59995	1434	-11.81	0.0589
35	10278	19.16	17.10	60096	1436	-12.00	0.0549
40	11856	22.10	19.55	60169	1438	-12.14	0.0516

随着抽样点%MTA增加,%E趋向于恒定,S.E.持续降低。在20个取样点时,%E与估算纤维总数Ns($r=0.9999, P<0.001$;其回归方程 $\hat{Y}=0.0017x-102.3247, P<0.001$),以及%E

与估算肌纤维数/mm²($r=0.9999, P<0.001$;其回归方程 $\hat{Y}=0.0766x-101.2446, P<0.001$)均有相关关系。而在40个取样点,%E分别与%NT($r=0.9762, P<0.001$; $\hat{Y} =$

$0.4575x - 0.9798, P < 0.001$)、% MTA ($r = 0.9749, P < 0.001$; $\hat{Y} = 0.4416x - 0.7691, P < 0.001$)、Ns ($r = 0.9243, P < 0.002$; $\hat{Y} = 0.001046x - 60.8880, P < 0.002$)、估算肌纤维数/ mm^2 ($r = 0.9237, P < 0.002$; $\hat{Y} = 0.0474x - 60.6283, P < 0.002$)。均有相关关系, 样本回归系数也有直线回归关系。

3 讨论

直接计数胫骨前肌在前亚体有 52, 152 条肌纤维, 后亚体有 55, 157 条肌纤维(见表 3)。肌动球蛋白-ATP 酶预解法染色(pH10.3)深染 II 型纤维^[2]分别在前亚体占 87.4%, 后亚体仅占 75.8%(见表 1)。而抽样计数肌纤维由于随机取样的不同而稍有变化。随机抽样 5、10、15 个抽样点均估算肌纤维总数过多, 而以 20 和 25 个抽样点(见表 4)最为接近直接计数的肌纤维总数即 60, 115 条, 估算肌纤维总数百分率误差 \pm 标准误分别为 $-4.47\% \pm 0.0462$ 和 $-2.28\% \pm 0.0299$ 。随机抽样 20 个点后, %E 明显有所变化, 当取样点数逐渐增加时, 百分率误差标准误(S.E.)趋向于逐渐降低。然而, 在随机抽样 20 个样本点后, 占肌纤维总数百分比 %N_T 和占肌横切面积百分比 %MTA 均达 10% 左右, 此时估算肌纤维总数(N_S)趋于恒定, %E 和 S.E. 均相对变化较小。那么影响每张切片过高或过低估算肌纤维总数和肌纤维密度^[9]的道理何在呢? 一则可能是抽样计数肌纤维法将肌横切面裂缝处无肌纤维区域、肌束膜及血管神经所占据的区域也计算面积在内造成的误差。二则可能是与应用组化法制作切片过程中, 使肌横切面内相邻肌纤维的移位造成松紧不同引起的误差。

从表 4 可见到肌纤维数量、面积与估算的肌纤维总数百分率误差及标准误之间成反比关系, 随着抽样计数占肌纤维数量和肌横切面积的增加, 估算的肌纤维总数、百分率误差逐渐在实测肌纤维数值上下波动, 平均起来接近实测值。由此可见, 尽可能多地抽样无疑是有益的, 但耗时费力, 每人利用直接计数肌纤维法需要

化费时间为 30-70h/每张肌横切片; 而抽样计数肌纤维法则需要耗费 3-8h/每张肌横切片, 所耗费时间仅占直接计数的 9%-10%。科学合理的抽样计数随机抽样点至少为 20 个。同时, 所占肌横切面积和肌纤维总数均应达到 10% 左右, 才能使估算肌纤维数的平均值接近实际测定的肌纤维数值, 误差稳定在 5% 以内。以保证抽样结果的准确性。这与 Jimenez^[10]认为间接计数至少任意选择 20 个点, 并占肌横切面积 5% 的结论稍有不同。

毫无疑问的是抽样计数肌纤维, 不仅能够用于检测家兔胫骨前肌的抽样计数, 显然也能应用于其它各种骨骼肌横切面, 以及心肌横切面或平滑肌横切面的计数。

参 考 文 献

- 1 Pullen, A. H. The distribution and relative sizes of three histochemical fiber types in the rat tibialis anterior muscle. *J. Anat.*, 1977, 123(1): 1-19
- 2 English, A. W. and W. D. Letbetter. Anatomy and innervation patterns of cat lateral gastrocnemius and plantaris muscles. *Am. J. Anat.*, 1982, 164: 67-77.
- 3 Iliya, A. R. and R. P. Dum. Somatotopic relations between the motor nucleus and the innervated muscle fibers in the cat tibialis anterior muscle. *Exp. Neurol.*, 1984, 86: 272-293.
- 4 Zenker, W. The distribution of anterogradely labeled I-IV primary afferents in histochemically compartments of the rat's sternomastoid muscle. *anat. Embryol.*, 1988, 177: 234-235
- 5 Brooke, M. H. and K. K. Kaiser. Muscle fiber types: How many and what kind? *Arch. Neurol.*, 1970, 23: 369-379.
- 6 Elias, H. and D. M. Hyole. An elementary introduction to stereology. *Am. J. Anat.*, 1980, 159: 411-446.
- 7 Davis, H. L. Compatibility of different histochemical techniques for the demonstration of ATPase for muscle fiber typing: A review. *J. Histochem.*, 1986, 9: 187-188.
- 8 Schmitt, J. L. and D. Pette. Fiber type-specific distribution of parvalbumin in rabbit skeletal muscle: A quantitative microbiochemical and immunohistochemical study. *Histochemistry.*, 1991, 96(6): 459-466.
- 9 Aherne, W. A method for determining the cross-sectional area of muscle fibers. *J. Neurol. Sci.*, 1968, 7: 519-528.
- 10 Jimenez, A. S. Evaluation of an indirect method for estimating myo-fiber number in transverse section of skeletal muscle. *Am. J. Vet. Res.*, 1975, 36(4): 375-378.

《抽样计数肌横切面内肌纤维数量的研究》一文之附图

(正文见第 31 页)

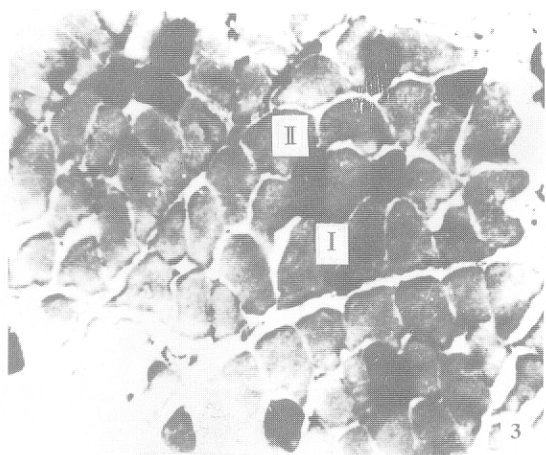
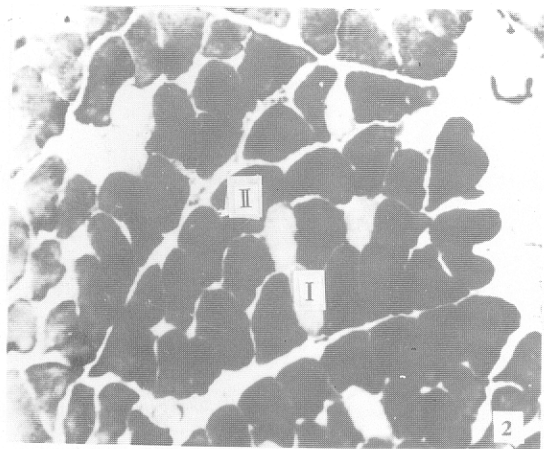


图 2 肌动球蛋白-ATP 酶碱预孵法染色 ($\times 65$, pH 10.3)

I 型线染, II 型深染。

图 3 肌动球蛋白-ATP 酶酸预孵法染色对照 ($\times 65$, pH 4.3)

I 型深染, II 型浅染。