

何志仙,高云芳*,胡琳琳

(西北大学 生命科学学院,陕西 西安 710069)

摘要:选取大、小白鼠各 32 只,雌雄各半,按年龄和性别分成 8 组。采用 Ca^2 + -ATPase 法测定比目鱼肌 (SOL)的 mATPase 活性,计算 I 型和 [[型肌纤维比例;并称量大、小白鼠的脏器,计算脏器指数。结果显示:SOL 中 [[型肌纤维比例,①大白鼠和小白鼠幼龄组均极显著高于成年组;成年雌性均显著低于成年雄性;②成年大白鼠极显著低于成年小白鼠。大白鼠和小白鼠的胸腺指数、脾脏指数均幼龄组极显著高于成年组,肝脏指数则均极其显著低于成年组;大白鼠幼龄组与成年组的肝脏指数、脾脏指数均极显著低于相应的小白鼠。提示在发育过程中大白鼠和小白鼠 SOL 中的 mATPase 活性均逐渐降低,因而其 [[型肌纤维比例逐渐减小,且 mATPase 活性具有种间和性别差异。

关键词:大白鼠;小白鼠;比目鱼肌;肌球蛋白 ATP 酶;脏器指数

中图分类号: Q954.66 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 5853 (2005) 03 - 0322 - 06

Comparisons on the Proportion of Type I and I Fibers in Soleus Muscle and the Visceral Indexes in Rats and Mice

HE Zhi-xian, GAO Yun-fang*, HU Lin-lin

(College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: According to age and sex, 32 rats and 32 mice were divided into 8 groups. The activities of mATPase of soleus muscle were detected by the mATPase method. Then the percentage of type I and II fibres were determined. The viscera weight and viscera index were measured and calculated. The result revealed: As far as the proportion of type II fibres in soleus was concerned, ①the young's was notably higher than that of the adult in both rat and mouse; the female adult's was lower than that of in male adult; ②the adult rat's was markedly lower than that of in adult mouse. The thymus indexes and the splenic indexes (SI) in young rat and mouse were both markedly higher than that of in adult, whereas the hepatic indexes (HI) were both distinctly lower than that of in adult. The HI and the SI in young and adult rat were prominently lower than those of the corresponding group of mouse. The above results suggested that the activities of mATPase declined during development both in rat and mouse. So the proportion of type II fibres gradually decreased. And the activities of mATPase show obvious sex disparities and interspecific diversity.

Key words: Rat; Mouse; Soleus; Myosine ATPase; Visceral index

及耐疲劳程度, \parallel 型肌纤维又可大致分为 3 种: \parallel a(氧化酵解型纤维、耐疲劳) \parallel b(酵解型纤维、易疲劳)及位于二者之间的 \parallel x(氧化酵解型纤维、耐疲劳)(Wang et al, 2004)。在比目鱼肌中,除了上述纤维,还存在少量(小于 5%)的 \parallel c、 \parallel c

^{*} 收稿日期: 2004 - 11 - 30;接受日期: 2005 - 03 - 10

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(DH98273);陕西省教育厅重点科研基金资助项目(00JK009)

^{*} 通讯作者 (Corresponding author), E-mail:gaoyunf@nwu.edu.cn

等混合型纤维(Hämäläinen & Pette, 1993; Delp & Pette, 1994), [c-般被归为 I 型纤维, [c则计 算在 [a内(Michael et al, 1997)。

有关大白鼠比目鱼肌(soleus, SOL)肌纤维类型与衰老关系的研究表明,随着衰老的发生, I型肌纤维比例逐渐升高, II型肌纤维比例逐渐降低(Alnaqeeb & Goldspink, 1987; Fujimoto et al, 1994)。也有研究认为, I型肌纤维比例逐渐降低, I c和 II c型肌纤维比例逐渐增加(Yarovaya et al, 2002)。虽然对肌纤维类型与衰老关系的某些细节尚未达成共识,但随着衰老的发生, I、 II型肌纤维比例会发生改变是可以肯定的。

在幼年至成年的发育过程中,哺乳动物骨骼肌的 I 、 II 型肌纤维比例是否也会发生改变、存在性别差异等问题尚无人涉及,作为发育生物学中的重

要问题值得我们探索与研究。

在生物医学研究中,脏器重量、脏器指数是衡量动物功能状态及发育进程的重要指标(Hu et al, 1997)。因此,本实验对各组的脏器指数进行了同步检测。为研究骨骼肌的增龄性变化和免疫机能的可能关系提供实验资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

实验用 Sprague-Dawley 大白鼠(动物号:陕动字第 08 - 005 号)及 ICR (Institute for Cancer Research)种小白鼠(动物号:陕动字第 08 - 004 号)由西安交通大学医学院实验动物中心提供。按年龄和性别将大白鼠和小白鼠各分为 4 组,每组均为 8 只。各组年龄和体重见表 1。

表 1 本实验大白鼠和小白鼠的年龄和体重

Tab. 1	l A	Age and	weight	of	the	rat	and	mouse	in	this	work	
--------	-----	---------	--------	----	-----	-----	-----	-------	----	------	------	--

	大白鼠 Rai	t	小白鼠 mouse			
分组 Group		体重 Weight (g)	分组 Group		体重 Weight (g)	
幼龄(12日龄)		20.8 ± 1.4	幼龄(12日龄)	우	11.3 ± 1.2	
Young (12 d)	3	24.4 ± 2.0	Young (12 d)	3	11.6 ± 1.7	
成年组(3~4月龄)	4	304.6 ± 13.4	成年组(1.5~2月龄)	2	19.7 ± 0.9	
Adult (3 – 4 month)	3	320.5 ± 13.7	Adult ($1.5-2$ month)	3	21.6 ± 2.0	

1.2 标本制备

用 3% 戊巴比妥钠(45~mg/kg 体重)麻醉动物,从动物后肢取出 SOL,并在其中部迅速切取长约 5~mm 的一个组织块;剔除肌膜,放入预冷的 30% 蔗糖溶液中;待组织块沉底后,立即取出,并用 OCT 包埋剂垂直包埋,放入低温恒冷切片机内;待温度回升至 -25~℃时切片,厚度为 10~µm。切片时需调整组织块方向,以获得肌肉横断面组织切片。用涂有 10~g/L 多聚赖氨酸的载玻片裱片,室温晾干。

1.3 组织化学染色

pH 9.4 条件下的肌球蛋白腺苷三磷酸酶 (myosin adenosine triphosphatase, mATPase)是糖酵解的标志酶,因而 mATPase 法是肌纤维分型的主要方法之一(Nemeth et al, 1979; Havenith et al, 1990)。 mATPase 染色呈阴性的为 I 型肌纤维,呈阳性的则为 II 型肌纤维。本实验以 Ca²⁺-ATPase 法测定 SOL 中的 mATPase 活性。

组织化学染色根据 Du (1998)的钙 – 钴法并稍作改良。取 2 片冰冻切片于 4 ℃固定液 [多聚甲醛 4 g , 蔗糖 8 g , 加 0.1 mol/L 的 PB (pH 7.2)至 100 mL , 重新调节 pH 至 7.2]中固定 10 min , 冷双蒸水冲洗后放入 pH 10.4 的预孵育液 [0.1 mol/L 巴比妥钠溶液 2 mL , 0.18 mol/L 氯化钙溶液 2 mL , 加双蒸水 6 mL , 调节 pH 至 10.4],37 ℃预孵育 15 min , 切片依次经 pH 9.4 的 ATPase 作用液 [0.1 mol/L 巴比妥钠溶液 2 mL , 0.18 mol/L 氯化钙溶液 1 mL , ATP 二钠盐 30 mg , 2 , 4 — 二硝基苯酚 6 mg , 加双蒸水 7 mL 调节 pH 至 9.4] 孵育 45 min , 1%氯化钙作用 3 min (3次),2%氯化钴作用 3 min ,蒸馏水冲洗干净和 1%硫化铵 1 min 呈色,最后经冲洗、脱水、透明后,树胶封固。

1.4 脏器指数的测定

动物称重麻醉后,分别摘取胸腺、肝脏、脾脏并称重。根据 Li et al (2000) 脏器指数的计算方法:脏器指数 = 脏器重量(g)/体重 $(g) \times 10$,计算

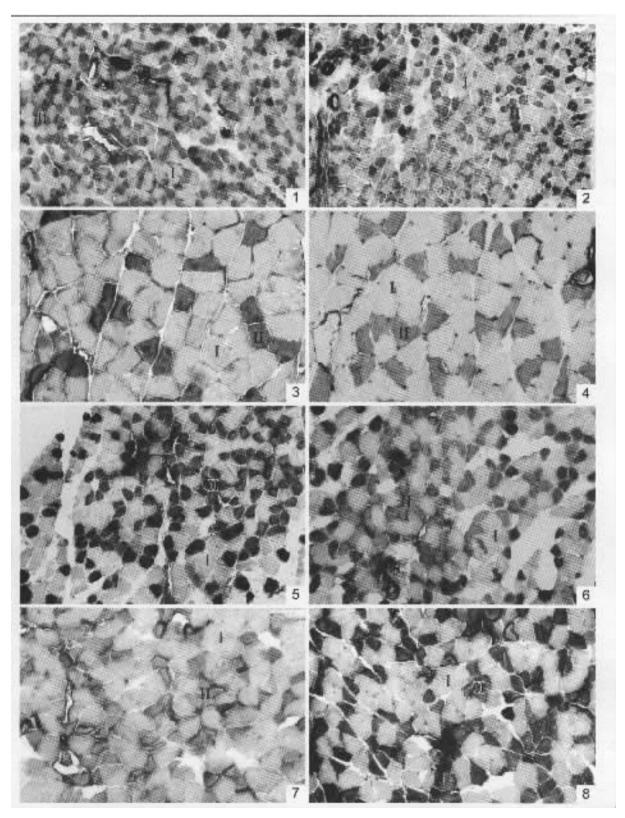


图 1—8 幼、成年大、小白鼠 SOL 中 mATPase 活性显示图(×200)

Figs. 1 - 8 Activities of mATPase of extrafusal fibres in rat and mouse soleus of each group (×200) I: I型肌纤维(Type I fibres); II: II型肌纤维(Type II fibres).

1-4. 大白鼠 (Rat): 1. 幼龄♀组 (Female young group); 2. 幼龄♂组 (Male young group); 3. 成年♀组 (Female adult group); 4. 成年♂组 (Male adult group)。

5-8. 小白鼠 (Mouse): 5. 幼龄♀组 (Female young group); 6. 幼龄♂组 (Male young group); 7. 成年♀组 (Female adult group); 8. 成年♂组 (Male adult group).

大、小白鼠的胸腺、肝脏和脾脏指数。

1.5 数据与统计分析

切片在 Olympus 显微照相系统(BH-2)下观察并照相记录,根据 mATPase 染色强度确认 Ⅰ型和 Ⅱ型肌纤维并计数,计算出各类纤维的构成比。

采用 SPSS10.0 软件中的单因素方差分析法 (ANOVA)进行统计分析检验。所得实验数据先用 Kolmogorov-Smirnov 和 F-max 分别检验数据正态性 和方差齐性。经检验全部数据符合参数分析的条件。实验结果以均数 \pm 标准差表示,取 P < 0.05 作为差异显著性的界值。

2 结 果

2.1 幼、成年大、小白鼠 **SOL** 中 **mATPase** 的活性差异

大、小白鼠 SOL 中 mATPase 活性成年组均低于幼龄组;成年大白鼠 mATPase 活性低于成年小白鼠(图 1—8)。

2.2 幼、成年大、小白鼠 SOL 中 I 、 II 型肌纤维 比例的差异

随年龄增长,大、小白鼠 SOL 中 \mathbb{I} 型、 \mathbb{I} 型 肌 纤维比例有极显著变化 ANOVA : $F_{3.60} = 64.029$,

P < 0.01 》 幼龄组大、小白鼠 SOL 中 I 型肌纤维比例均极显著低于成年组,II 型肌纤维比例均极显著地高于成年组(LSD:P < 0.01 》 幼龄组小白鼠 I 型、II 型肌纤维比例与幼龄组大白鼠无显著差异(P > 0.05 》 成年组小白鼠 I 型肌纤维比例极显著低于成年组大白鼠,II 型肌纤维比例极显著高于成年组大白鼠(P < 0.01)(表 2 及图 1—8 》

小白鼠幼、成年 I 型、 I 型肌纤维比例均有显著的性别差异。幼龄雌性组的 I 型肌纤维比例显著高于雄性, I 型肌纤维比例显著低于雄性(P < 0.05); 成年雌性组的 I 型肌纤维比例极其显著高于雄性, I 型肌纤维比例极其显著低于雄性(P < 0.01)(表 2 及图 1—4)。

2.3 幼、成年大、小白鼠脏器指数的差异

大、小白鼠的脏器指数幼龄组与成年组均有极显著差异(表3)。幼龄组胸腺指数、脾脏指数均极显著高于成年组(P < 0.01),肝脏指数均极显著低

表 2 幼、成年大、小白鼠 SOL 中 I 型、 II 型肌纤维的比例
Tab. 2 Proportion of type I and II fibers in rat and mouse soleus

	rab. 2	1ab. 2 Proportion of type 1 and 11 fibers in rat and mouse soleus				
	组别 Group	样本数 Sample size	Ⅰ型肌纤维 Type Ⅰ(%) (X ± SD)	型肌纤维 Type (%) (X ± SD)	差异 Difference(F,P)	
大白鼠 Rat	幼龄 Young	16	47.40 ± 5.51	52.60 ± 5.51		
	成年 Adult	16	74.98 ± 5.23 **	25.02 ± 5.23 **	$F_{3,60} = 64.029$	
小白鼠 Mouse	幼龄 Young	16	47.90 ± 6.39	52.10 ± 6.39	P < 0.01	
	成年 Adult	16	58.45 ± 8.25 ** d##	41.55 ± 8.25 ** ^{Al ##}		
大白鼠 Rat	幼龄 Young ♀	8	46.35 ± 7.08	53.65 ± 7.08		
	8	8	48.44 ± 3.53	51.56 ± 3.53	$F_{3\ 28} = 80.847$	
	成年 Adult ♀	8	77.82 ± 2.92	22.18 ± 2.92	P < 0.05	
	8	8	72.15 ± 5.63▲	27.85 ± 5.63 [▲]		
小白鼠 Mouse	幼龄 Young ♀	8	51.72 ± 5.07	48.28 ± 5.07		
	8	8	44.07 ± 5.34 [▲]	55.93 ± 5.34▲	$F_{3\ 28} = 12.802$	
	成年 Adult ♀	8	63.03 ± 6.19	36.97 ± 6.19	P < 0.01	
	8	8	53.87 ± 7.72	46.13 ± 7.72▲▲		

 $^{^{\}blacktriangle}$ P < 0.05,**, *#, $^{\blacktriangle \blacktriangle}$ P < 0.01 (ANOVA-LSD).

^{*} 幼、成年组比较 (Comparison of young with adult);#同年龄组比较 (Comparison of the same age);↑雌雄组比较 (Comparison of female with male); 大白鼠与小白鼠比较 (Comparison of rat with mouse)。

m. 1.	•				+ CD) of young and adult rat and mous
		表 3	幼、	成年大、	小白鼠的脏器指数($X \pm SD$)

	组别 Group	胸腺指数 Thymus index	肝脏指数 Hepatic index	脾脏指数 Splenic index
大白鼠 Rat	幼龄 Young	0.0476 ± 0.0028	$0.2642 \pm 0.0023^{d * *}$	$0.0368 \pm 0.0008^{d**}$
	成年 Adult	0.0194 ± 0.0021 **	0.3956 ± 0.0144 ** d##	$0.0272 \pm 0.0018^{**}$ d ##
小白鼠 Mouse	幼龄 Young	0.0531 ± 0.0038	0.3085 ± 0.0150	0.0631 ± 0.0077
	成年 Adult	0.0222 ± 0.0104 **	0.5451 ± 0.0903 **	0.0402 ± 0.0053 **
差异 Difference (F, P)		$F_{3.60} = 150.536$, $P < 0.01$	$F_{3.60} = 122.496$, $P < 0.01$	$F_{3.60} = 173.799$, $P < 0.01$

n = 16. ** , ## P < 0.01 (ANOVA-LSD).

于成年组(P<0.01)(表3)。

大白鼠幼龄组与成年组的肝脏指数、脾脏指数 均极显著低于相应的小白鼠 (P < 0.01), 而胸腺指数则无显著差异 (P > 0.05)(表 3)。

3 讨论

3.1 幼、成年大、小白鼠 SOL 中肌纤维的比例变化

本文实验结果表明,大白鼠SOL中 II 型肌纤维比例幼龄组显著高于成年组,提示在幼年至成年的发育过程中,SOL的 mATPase 活性在逐渐降低。小白鼠 SOL 的变化趋势与大白鼠完全一致。大白鼠和小白鼠 SOL 中 I 型肌纤维比例随生长显著增加,与Zhu et al(2004)对大白鼠和家兔生后发育各阶段SOL 纤维的比较研究结果中, I 型肌纤维比例随生长过程发生改变的结论相同。推测这种变化可能是动物发育过程中的一种普遍现象。

当一个运动神经元被来自高级中枢的下行突触前神经成分所激活而发生肌肉收缩时, I 型肌纤维总是首先被募集,当需要产生较大收缩张力时才募集 II 型肌纤维(Deng et al, 1999)。 SOL 位于哺乳动物小腿三头肌的深部,是以 I 型肌纤维为主的慢肌,从事有氧耐力型活动的能力相对较强。当肌肉收缩时,总是首先参与运动单位的募集。而无氧酵解速度型的活动主要由浅层的、以 II 型肌纤维为主的腓肠肌所承担。据此推论,与幼龄鼠相比,成年大、小白鼠从事速度型活动的能力相对降低,而从事耐力型活动的能力相对升高。

以往的研究认为, mATPase 活性的下降 (Alnaqeeb & Goldspink, 1987; Fujimoto et al, 1994).

神经元类型的改变(即由阈值高的位相型运动神经 元转变为阈值低的紧张型运动神经元)及 II 型肌纤 维萎缩或退化的速度高于 [型肌纤维(Deng et al, 1999) 甲状腺激素水平的改变(Kraus & Pette, 1997; Martin et al, 2000) 外界刺激(Jarvis et al, 1996)等均可能是骨骼肌纤维类型转变的原因。从 我们的实验结果看,mATPase 活性下降可能是大、 小白鼠在发育过程中Ⅱ型肌纤维比例降低的主要原 因。这与 Fujimoto (et al, 1994) 对大白鼠衰老过 程中肌纤维类型转变机制的研究结果一致。但 mATPase 活性下降与肌纤维类型转变的因果关系尚 不能确定。发育过程中↑、Ⅱ型肌纤维比例的变化 可能是 mATPase 活性下降的结果,也可能是部分 II 型肌纤维转变为「型肌纤维的结果。当然,发育过 程中Ⅱ型肌纤维比例的降低可能与多种因素及基因 表达有关,因此,确切的机制尚待进一步研究。

3.2 幼、成年大、小白鼠 SOL 中肌纤维比例的雌雄差异

大白鼠成年雌性组 SOL 的 II 型肌纤维比例显著低于雄性组;小白鼠的 II 型肌纤维比例幼龄和成年均雌性组显著低于雄性组。说明雄性利用糖酵解获得能量的能力高于雌性,与运动中雄性动物所呈现的高速度和雌性动物所呈现的高耐力相吻合。大白鼠幼龄组雌雄性则无显著差异,可能是因为 12d 的大白鼠尚未发生性别分化,而 12 d 的小白鼠已有性别分化的趋势。这一结果与对人的骨骼肌研究结果不同:人类骨骼肌中, I、 II 型肌纤维的比例是遗传度较高的表型,且无性别差异(Deng et al , 1999)。

^{*} 幼、成年组比较 (Comparison of young with adult); #同年龄组比较 (Comparison of the same age); 大白鼠与小白鼠比较 (Comparison of rat with mouse).

参考文献:

- Alnaqeeb MA, Goldspink G. 1987. Changes in fibre type, number and diameter in developing and ageing skeletal muscle [J]. J. Anat., 153:31-45.
- Delp MD , Pette D. 1994. Morphological changes during fiber type transitions in low-frequency-stimulated rat fast-twitch muscle [J]. *Cell Tissue Res* . , 277 (2):363 371.
- Deng SX, Hong TT, Cao ZF. 1999. Athletic Physiology [M]. Beijing: Higher Education Press. 53 75. [邓树勋,洪泰田,曹志发. 1999. 运动生理学.北京:高等教育出版社.53 75.]
- Du ZM. 1998. Technique of Practical Histology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House. 132 134. [杜卓民. 1998. 实用组织学技术. 北京: 人民卫生出版社. 132 134.]
- Fujimoto S , Watanabe J , Ogawa R , Kanamura S. 1994. Age-related changes in fibre number , fibre size , fibre type composition and adenosine triphosphatase activity in rat soleus muscle [J]. Anat. Anz., 176 (5):429 – 435.
- Hämäläinen N, Pette D. 1993. The histochemical profiles of fast fiber types [] B, [] D, and [] A in skeletal muscle of mouse, rat, and rabbit [J]. J. Histochem. Cytochem., 41 (5): 733-743.
- Havenith MG, Visser R, Schrijvers-van SJ. 1990. Muscle fiber typing in routinely processed skeletal muscle with monoclonal antibodies [J]. Histochemistry, 93 (5):497 – 499.
- Hu YJ, Li H, Liu HY, Yang XP. 1997. The comparison on main organ's weight and length in three different varieties of mice [J]. Chinese Journal of Laboratory Animal Science, 7(2):100-101. [胡一江,李辉,刘海燕,杨锡平.1997. 三种不同品种小白鼠主要器官重量及长度的比较.中国实验动物学杂志,7(2):100-101.]
- Jarvis JC, Mokrusch T, Kwende MM, Sutherland H, Salmons S. 1996.
 Fast-to-slow transformation in stimulated rat muscle [J]. Muscle Nerve, 19 (11):1469-1475.

- Kraus B , Pette D. 1997. Quantification of MyoD , myogenin , MRF4 and Id-1 by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in rat muscles: Effects of hypothyroidism and chronic low-frequency stimulation [J]. Eur. J. Biochem., 247 (1):98 106.
- Li R , Tong XY , Pan HZ , Zhang SM , Zhao X , He W . 2000. The effect of dietary nucleic acid on immune function in mice at different ages [J]. Acta Nutrimenta Sinica , 22 (1):36 39. [李 蓉,佟晓永,潘宏志,张素梅,赵 鑫,何 维. 2000. 饮食核酸对不同龄小白鼠免疫功能的影响。营养学报,22 (1):36 39.]
- Michael DD, Duan CP, John PM, Timothy IM. 1997. Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure [J]. J. Appl. Physiol., 83 (4):1291-1299.
- Martin W , Berchtold , Heinrich B , Markus M. 2000. Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function , plasticity , and disease [J]. Physiol. Rev. , 80 (3):1215-1265.
- Nemeth P , Hofer HW , Pette D. 1979. Metabolic heterogeneity of muscle fibers classified by myosin ATPase [J]. *Histochemistry* , **63** (2): 191 201.
- Wang YX, Zhang CL, Ruth T, Helen K, Michael C, Corinne R, Jun H, Heo K, Ronald ME. 2004. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARô [J]. PloS. Biol., 2 (10): e294.
- Yarovaya NO, Kramarova L, Borg J, Kovalenko SA, Caragounis A, Linnane AW. 2002. Age-related atrophy of rat soleus muscle is accompanied by changes in fibre type composition, bioenergy decline and mtDNA rearrangements [J]. Biogerontology, 3 (1-2): 25-27.
- Zhu DL, Wang KL, Chen PL. 2004. Comparison of soleus muscle fibers in rats and rabbits at different stages of postnatal development [J]. Zool. Res., 25(6):543-550. [朱道立,王康乐,陈佩林. 2004. 大鼠和家兔生后发育各阶段比目鱼肌纤维的比较. 动物学研究, 25(6):543-550.]