

· 基础研究 ·

被动运动和电刺激对尾吊大鼠比目鱼肌肌纤维的影响

李长宏 吴倩

【摘要】目的 观察被动运动、电刺激对尾吊大白鼠比目鱼肌各型肌纤维横截面积及肌纤维构成比的影响。方法 72 只发育期 Wistar 品系雄性大白鼠(体重 68 ~ 76 g),随机分为对照组 3 组,模型组 2 组,被动运动组 2 组,电刺激组 2 组,每组 8 只。采用 SDH 染色,结合微机图像分析技术,对比目鱼肌肌纤维横截面积和肌纤维构成比进行定量分析。结果 被动运动组、电刺激组比目鱼肌各型肌纤维面积与模型组比较有所增加;悬吊 2 周后,模型组比目鱼肌红肌纤维比例下降,中间肌纤维比例上升。结论 被动运动、电刺激具有减缓尾吊大白鼠比目鱼肌废用性肌萎缩的作用。

【关键词】肌萎缩; 比目鱼肌; 被动运动; 电刺激; 大鼠

The effects of passive movement and electrical stimulation on soleus of the rats treated with tail suspension

LI Chang-hong*, WU Qian. *463 Hospital of PLA, Shenyang 110042, China

【Abstract】Objective To study the effects of passive movement (PM) and electric stimulation (ES) on soleus of the tail suspended rats. Methods Seventy-two male Wistar rats (68 ~ 76g) were used in this experiment and divided into a normal control group, a model group (tail suspension), a ES group (tail suspension plus ES) and a PM group (tail suspension plus PM). The cross-sectional area of the muscle fibers and proportion of various types of muscle fibers in soleus were observed by histochemical staining of succinic dehydrogenase (SDH) and image pattern analyzer. Results The results showed that the cross-sectional area of all types of soleus muscle fibers in the PM and ES groups was significantly larger than that in the model group, with the area of the intermediate muscle fibers more significantly larger in particular. The proportion of the red fibers decreased and that of the intermediate fibers increased in the model group after one week of tail-suspension. Conclusion Passive movement and electrical stimulation could slow down the muscle atrophy of soleus of the tail-suspended rats.

【Key words】Muscle atrophy; Soleus; Passive movement; Electrical stimulation; Rats

失重或模拟失重状态可导致人和动物的骨骼肌发生萎缩,特别是下肢抗重力肌萎缩明显,其机理较为复杂^[1,2]。失重或模拟失重条件下,抗重力肌比非抗重力肌萎缩程度大,慢肌比快肌萎缩程度大,随着失重时间的延长,肌肉萎缩更明显。肌肉萎缩表现为肌肉重量和体积的减少、肌纤维直径的缩小和慢肌向快肌纤维的转化,但总的肌纤维数量不变。本实验以大鼠尾部悬吊法模拟失重,观察被动运动、电刺激两种措施对尾吊大白鼠比目鱼肌各型肌纤维横截面积及各型肌纤维构成比的影响,为寻找航天飞行中防护肌肉萎缩的措施及航天员返回地面保持正常运动能力的方法提供实验依据。

材料和方法

一、动物分组

采用 Wistar 雄性大白鼠(由中国医科大学动物中

心提供)72 只,体重 68 ~ 76 g,按体重配对原则随机分成 9 组,其中笼养正常对照组(对照组)3 组,尾吊对照组(模型组)2 组(分笼饲养),尾吊被动运动组(被动运动组)2 组(分笼饲养),尾吊电刺激组(电刺激组)2 组(分笼饲养),每组 8 只。对照组对照时间分别为即刻、1 周、2 周;模型组、被动运动组及电刺激组尾吊时间分别为 1 周、2 周。

二、模拟失重模型的建立

采用陈杰改良式大鼠尾部悬吊法建立模拟失重模型^[3]。动物均单笼饲养,其身体长轴与水平面成 25 ~ 30°,可做 360°的转动,能自由进食、进水,室温保持在 (23 ± 2)℃。

三、被动运动、电刺激措施的实施

1. 被动运动方法:于悬吊的第 1 天起,将大鼠置于自制的网夹内,拉出右后肢,抓住趾部,与脊柱呈 45°向后外方牵拉,直至右后肢完全伸直(膝关节、踝关节均伸直),然后再与牵拉方向相反,将右后肢推向身体,使之完全屈曲紧贴身体(膝关节完全屈曲,踝关节完全背屈),这样往复运动为 1 次,每天被动运动训练

作者单位:110042 沈阳,中国人民解放军第四六三医院神经内科(李长宏),理疗科(吴倩)

1 回, 每回设定完成 300 次。

2. 电刺激方法: 于悬吊的第 1 天起, 将大鼠置于自制的网夹内, 拉出右后肢, 采用上海产直流感应电疗机, 用直流电刺激比目鱼肌中段, 刺激电极用 6 层湿纱布包裹, 厚约 2 mm, 两电极距离 8 mm, 阳极均置近端, 电极紧密接触皮肤, 电流强度 5 mA, 频率 100 次/min, 每次刺激 3 min, 每日 1 次。均用电子计时器计时。

四、实验步骤

1. 光镜标本制备^[4]: 将模型组、被动运动组、电刺激组大白鼠分别于尾吊第 1 周和第 2 周末(对照组则从尾吊即刻、第 1 周和第 2 周末), 用戊巴比妥钠按 40 mg/kg 体重腹腔注射麻醉, 迅速取出大鼠右后肢比目鱼肌, 于滤纸上展平, 入 Holtt's 液 8~12 h, 在 -20℃ 恒冷箱切片机内做厚 15 μm 横切片, 贴于盖玻片上。冰冻切片自然干燥后, 入琥珀酸脱氢酶(succinic dehydrogenase, SDH) 孵育液于 37℃ 温箱内染色 18 min, 常规脱水、透明、封片, 同时进行去底物对照。根据 SDH 活性及细颗粒产物分布, 可将比目鱼肌肌纤维分为红肌肌纤维和中间型肌纤维(比目鱼肌很少能观察到白肌)。

2. 定量分析^[4]: 在 SDH 染色后的切片中, 依据动物分组情况, 从每组 8 例中各取 1 张切片, 在整个比目鱼肌横截面的中央区域随机计数 200 根肌纤维, 故每组计数 1 600 根肌纤维。根据 SDH 所确定的肌纤维分型, 分别计算各型肌纤维所占百分比。在已选出做肌纤维计数的切片中, 每张切片上选取典型肌纤维各 30 根, 总计每组各型肌纤维 240 根, 用日本产 Control IBA200 型图像分析仪, 定量计算肌纤维横截面积。

五、统计学分析

用 SPSS 统计软件对数据进行统计分析, 数据按 $(\bar{x} \pm s)$ 方式表达, 同一时间的各组大鼠比较采用配对样本 t 检验, 尾吊对各组大鼠比目鱼肌纤维构成比的影响用 χ^2 检验。

结 果

一、各型肌纤维平均横截面积的变化

悬吊后各组大鼠比目鱼肌均有不同程度的萎缩, 被动运动组、电刺激组比目鱼肌各型肌纤维横截面积与模型组比较有不同程度的增加。尾吊即刻、1 周、2 周时各组各型肌纤维平均横截面积见表 1。

二、各型肌纤维构成比的变化

尾吊 1 周后模型组比目鱼肌红肌纤维、中间型肌纤维所占比例分别为 18.12% 和 81.88%, 与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 被动运动组、电刺激组各型肌纤维所占比例与模型组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。尾吊 2 周后模型组比目鱼肌红肌纤维、中间型肌纤维所占比例分别为 9.25% 和 90.75%, 与对照组相比, 红肌纤维比例下降($P < 0.01$), 中间型比例上升($P < 0.01$); 被动运动组、电刺激组各型肌纤维所占比例与模型组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。结果见表 2。

讨 论

有研究报道, 用尾吊法研究处于生长期的的大白鼠比目鱼肌废用性萎缩只需 2 周即可看到明显变化, 肌肉萎缩程度不与悬吊时间成正比, 延长悬吊时间应考虑生长等因素对肌肉的影响^[5]。本实验以大鼠尾部悬吊法模拟失重, 选择发育期大白鼠为研究对象, 在较短的周期里即可观察被动运动、电刺激两种措施对其肌萎缩的影响。

一、肌纤维横截面积的变化

肌纤维横截面积的改变是诊断肌萎缩的可靠指标, 因此, 对肌纤维横截面积的测量, 能反映出肌纤维的萎缩程度^[6]。骨骼肌肌纤维分型最常用的酶组织化学法为 ATP 酶和 SDH 酶法^[4,7]。SDH 是肌细胞线粒体的标志酶, 本实验采用 SDH 酶组化染色法将大白

表 1 尾吊对大白鼠比目鱼肌红肌纤维和中间型肌纤维横截面积的影响($\mu\text{m}^2, \bar{x} \pm s$)

组 别	n	尾吊即刻		尾吊 1 周		尾吊 2 周	
		红肌	中间肌	红肌	中间肌	红肌	中间肌
对照组	8	176 ± 48	237 ± 52	298 ± 56	417 ± 80	407 ± 72	575 ± 46
模型组	8	—	—	158 ± 72 *	248 ± 76 *	232 ± 64 *	385 ± 58 *
被动运动组	8	—	—	171 ± 48	307 ± 38 △	280 ± 79 △	517 ± 78 △△
电刺激组	8	—	—	169 ± 39	304 ± 54 △	272 ± 68 △	513 ± 64 △△

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

表 2 尾吊对大白鼠比目鱼肌各型肌纤维构成比的影响(根, %)

组 别	总计数	尾吊 1 周肌纤维数		尾吊 2 周肌纤维数	
		红肌	中间肌	红肌	中间肌
对照组	1 600	320(20.00)	1 380(80.00)	324(20.00)	1 376(80.00)
模型组	1 600	290(18.12)	1 310(81.88)	148(9.25) *	1 452(90.75) *
被动运动组	1 600	273(17.06)	1 327(82.94)	138(8.62)	1 462(91.38)
电刺激组	1 600	278(17.37)	1 322(82.63)	134(8.37)	1 466(91.63)

注: χ^2 检验法, 与对照组比较, * $P < 0.01$

鼠比目鱼肌分型后(分为红肌和中间型肌纤维),对肌纤维横截面积进行测量。从实验中我们发现,被动运动、电刺激可使尾吊 1 周时大白鼠比目鱼肌中间型肌纤维横截面积增加及 2 周时各型肌纤维横截面积增加。电刺激使肌纤维横截面积增大的原因,可能是由于电激发了强有力的收缩,促进了细胞内新陈代谢,保留肌中糖元含量,以及促进肌细胞内的蛋白合成,减轻了蛋白异化,并能增强肌力,延缓萎缩;通过被动运动,可机械地将肌纤维拉长和放松,使肌细胞得到充分伸展,保持运动侧肢体肌肉弹性,减轻因失重所致的肌肉内淤血和淋巴液的淤积,从而改善肢体的血液循环,改善肌肉营养状况,有效地减缓肌萎缩进程。同时,我们发现,大白鼠悬吊后,比目鱼肌各型肌纤维萎缩程度不同。红肌肌纤维较中间型肌纤维萎缩更明显。表明由于不同类型的肌纤维所受神经支配不同,因而大白鼠在悬吊后肢去负荷时,各型肌纤维的变化不同。从表 1 中我们可以看出这样一个特点,即在尾吊 1 周时,红肌纤维和中间型肌纤维均有不同程度的萎缩;被动牵张和电刺激两组与模型组比较,中间型肌纤维萎缩程度明显降低($P < 0.05$),红肌纤维萎缩程度降低不明显($P > 0.05$)。随悬吊时间的延长,被动牵张运动及电刺激减缓大白鼠比目鱼肌肌萎缩的作用明显表现出来,与模型组比较,2 周时红肌萎缩程度有所降低($P < 0.05$),中间肌萎缩程度亦明显降低($P < 0.01$)。表明这与各型肌纤维的代谢类型不同有关。红肌纤维氧化酶活性较高,糖酵解活性低,代谢类型为氧化型;中间型肌纤维氧化酶活性和糖酵解活性均较高,在代谢上为氧化型和酵解型的双重型,相当于生理上的快缩耐疲劳型。因此,每天需有频繁持续的刺激,才能维持红肌纤维的生理活性;而中间型肌纤维仅需数次刺激就能维持其生理功能。另外,在肌纤维生长发育进化的过程中,首先表现为红肌纤维的进程,其次才是中间型肌纤维和白肌纤维。肌萎缩是一种机能与形态上的退化,它们是否有一定的内在联系,还有待于进一步的研究。至于 1 周时被动运动和电刺激两组与模型组比较,红肌肌纤维横截面积没有明显增加($P > 0.05$),这可能与肌纤维的代谢类型不同有关。红肌纤维氧化酶活性较高,糖酵解活性低,代谢类型为氧化型,每天需要频繁持续的刺激才能维持红肌纤维的生理活性。Gibson 等^[8]的研究表明,用电刺激预防人体运动受限所致废用性肌萎缩的机制是由于维持蛋白合成。与模型组比较,2 周时红肌萎缩程度有所降低,应考虑生长因素对肌肉的影响,被动运动、电刺激可能均有降低肌原纤维蛋白分解速度的作用。

二、关于各型肌纤维构成比变化

本实验采用 SDH 酶组化染色法将大白鼠比目鱼

肌分为红肌和中间型肌纤维二型。实验发现,尾吊 2 周后模型组比目鱼肌红肌纤维与对照组相比,红肌纤维比例下降($P < 0.01$),中间型比例上升($P < 0.01$),红肌纤维减少的百分数等于中间型肌纤维增加的百分数。说明失重可引起肌纤维成分改变。国内、外学者的研究观察到大白鼠悬吊后比目鱼肌等长收缩时间与半松弛时间有缩短趋势,可能反映了悬吊引起慢肌向快肌转化^[9]。Desplanches 等^[10]用航天大鼠比目鱼肌作 ATP 酶染色发现,肌纤维的代谢型从慢缩肌的氧化型转化为快缩肌的氧化酵解型。Templeton 等^[11]测定悬吊 2 周大鼠比目鱼肌各型肌纤维比例,发现 I 型(红肌)纤维数目减少,II 型(IIa 型为中间肌)纤维数目增加;但 II 型纤维肌凝蛋白的含量没有增加。我们的研究结果进一步证实了 Tischler 等^[12]提出的失重状态下大鼠比目鱼肌慢肌纤维向快肌纤维转化的时间依赖性。被动运动组及电刺激组大白鼠比目鱼肌各型肌纤维构成比与模型组相比未见明显增加($P > 0.05$)。表明肌纤维型的转变除与该肌原有的构成形式有关外,还与电刺激的电流参数及训练时间、被动运动的训练强度及训练时间有关。被动运动、电刺激对尾吊大白鼠比目鱼肌肌纤维构成比的影响,还有待于进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 马永烈,孙亚志.失重/模拟失重下肌萎缩的研究进展.航天医学与医学工程,1997,10:149.
- 2 费军,刘玉盛,金真,等.模拟失重对人体骨骼肌和肌肉乙酰胆碱/肌酸比值的影响及等张运动对肌萎缩的作用.中华航空航天医学杂志,2002,13:222.
- 3 陈杰,马进,丁兆平,等.一种模拟失重影响的大鼠尾部悬吊模型.空间科学学报,1993,13:159.
- 4 周继斌,樊小力,冯鉴强,等.尾部悬吊对大鼠比目鱼肌梭内外肌纤维 SDH 活性的影响.中山医科大学学报,2000,21:17.
- 5 朱俊铭,崔建,蒋程,等.尾吊大白鼠比目鱼肌特性动态变化过程观察.航天医学与医学工程,1992,5:49.
- 6 Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? Arch Neurol, 1970, 23:369-379.
- 7 苏小娣,樊小力,唐斌.尾部悬吊对大鼠比目鱼肌 mATP 酶活性的影响.西安医科大学学报,2001,22:298.
- 8 Gibson JNA, Smith K, Rennib MJ. Prevention of disuse muscle atrophy by means of electrical stimulation: maintenance of protein synthesis. Lancet, 1988, 2:767-769.
- 9 Fitts RH, Metzger JM, Riley DA, et al. Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. J Appl Physiol, 1986, 60: 1946-1953.
- 10 Desplanches D, Mayet MH, Ilyina-Kakueva EI, et al. Skeletal muscle adaptation in rats flown on Cosmos 1667. J Appl Physiol, 1990, 68:48-52.
- 11 Templeton GH, Padalino M, Manton J, et al. Influence of suspension hypokinesia on rat soleus muscle. J Appl Physiol, 1984, 56:278-286.
- 12 Tischler ME, Henriksen EJ, Munoz KA, et al. Spaceflight on STS-48 and earth-based unweighting produce similar effects on skeletal muscle of young rats. J Appl Physiol, 1993, 74:2161-2165.

(修回日期:2003-09-19)

(本文编辑:熊芝兰)