

肌腱切断后骨骼肌的退变与再生

唐休发 刘宝林 顾晓明 周树夏

摘要 以纯系BALB/C小白鼠15只为实验动物,切断一侧腓肠肌肌腱。通过光镜、电镜及横纹肌肌动蛋白(MA)、肌红蛋白(MG)免疫组织化学染色等方法,观察切断肌腱后不同时间腓肠肌的形态改变,横纹肌特异蛋白表达的变化。结果发现:切断肌腱后1、2和4周均有肌纤维退变,再生肌细胞移入退变的肌纤维。肌动蛋白和肌红蛋白的分布发生变化,到4周时肌红蛋白染色肌纤维全部为阳性,失去红白肌纤维型别差异。因此,肌腱切断后一方面肌纤维内部结构紊乱,另一方面存在持续的退变和再生反应,再生的肌细胞与原肌纤维融合,但分化不成熟可能影响肌肉最终的功能恢复。

关键词 骨骼肌 失张力 退变 再生

张力状态改变是诸多在肌肉游离移植术中不可避免的影响肌肉最终功能恢复的重要因素之一,尤其是在晚期永久性面瘫的治疗中将原来固定在两骨端的躯干或四肢肌肉移植到面部替代缺失的表情肌。表情肌一端附着于面骨或皮肤,另一端附着于皮肤,移植后的肌肉近乎失去原有张力,特别是手术后的早期阶段。切断肌腱后的肌肉在电生理学、组织化学方面均发生相应的变化,形态学上发生萎缩,脂肪结缔组织增多¹。早期运动终板即发生类似失神经后神经再支配的变化,即运动终板溃变与再生²。骨骼肌肌腱切断以后失去张力,肌细胞本身是否发生退变和再生,关系到移植肌在新的部位的功能,本研究通过动物实验,观察肌细胞形态学变化,肌细胞特异性蛋白表达对其进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

第四军医大学实验动物中心提供健康成年BALB/C纯系小白鼠15只,雌性,体重20g左右,按观察时间1、2和4周随机分为3组,每组5只。

1.2 动物手术

每只动物随机选择一侧后肢腓肠肌为实验肌,对侧为正常对照。按无菌操作原则在双侧后肢踝部背侧皮肤作一切口,暴露腓肠肌肌腱,实验侧切断并去除5mm长一段肌腱,防止肌腱再愈合,缝合皮肤切口,对侧肌腱不作处理。

1.3 实验主要试剂及设备

常规HE染色及透射电镜样品制备试剂。

NOVA超薄切片机及JEM-2000EX透射电镜。

鼠抗骨骼肌肌动蛋白(MA)单抗(克隆号HHF35)(Dako公司产品,工作浓度1:50),兔抗肌红蛋白(MG)多抗(工作浓度1:300,Dako公司产品),ABC试剂盒(抗鼠,Dako公司产品,抗兔,武汉博士德公司产品)。

1.4 实验方法

1.4.1 石蜡切片制备及染色 于手术后1、2和4周处死动物,取实验侧和对照侧腓肠肌原长固定于10%中性福尔马林液中12h,常规脱水,石蜡包埋,切片厚5μm,常规HE染色及ABC免疫组化染色。光镜下观察。

1.4.2 超薄切片的制备 取1周和4周组实验侧和正常对照侧腓肠肌中部肌肉,低温下切成1mm×1mm×1mm小组织块各4块,立即固定于3%戊二醛溶液2~4h,1%锇酸后固定1~2h,逐级丙酮脱水,Epon812包埋。超薄切片,透射电镜观察。

2 结果

2.1 光镜观察结果

正常肌组织肌纤维排列整齐,肌束间有少量结缔组织,肌纤维之间间隙小,纵切片上可见肌纤维横纹清晰,肌核椭圆形,沿肌纤维长轴方向排列,大多在肌纤维边缘。肌浆均匀分布。横切片上肌核位于肌纤维边缘。

切断肌腱后1~4周,均可见肌纤维萎缩和部分退变,较小的细胞增多,其可能为成肌细胞,占据退变的肌纤维位置,光镜下细胞核有圆形、椭圆形

本课题为国家博士后科学基金资助项目

作者单位:710032 第四军医大学口腔医学院(唐休发发现在华西医科大学口腔医学院工作)

及棱角形,大小不均,部分较大的胞核淡染,核结构清楚;部分胞核固缩。时间越长,退变的肌纤维越多,细胞核密集成堆。但即使失张力后 4 周,仍有部分肌纤维可见横纹与正常肌纤维类似。肌束间脂肪结缔组织增多(图 1, 2)。

2.2 电镜观察结果

正常肌肉肌原纤维排列整齐,Z 线清晰,线粒体均匀分布在肌原纤维之间,失张力后部分肌细胞内肌原纤维退变,结构模糊不清,线粒体增多、肿胀,部分线粒体空泡,即退变。肌细胞膜有较深的皱折,胞浆内可见溶酶体(图 3)。有核位于中央的不成熟肌细胞。

2.3 骨骼肌特异蛋白表达的变化

正常骨骼肌 MA 阳性染色,胞浆内黄色颗粒分布均匀,排列有序,可见横纹,各肌纤维显色一致。MG 阳性亦为胞浆内黄色颗粒,横纹及肌膜处分布明显。腓肠肌有显色深浅 2 种纤维,显色深者为含 MG 丰富的红肌纤维;染色浅者为含 MG 少的白肌纤维。正常腓肠肌以白肌纤维为主。

切断肌腱后 1 周,部分肌纤维 MA 阳性染色与正常肌纤维类似,部分肌纤维内 MG 分布呈团块状,无明显横纹。MG 染色仍以白肌纤维为主,但红肌纤维染色变淡。

切断肌腱后 2 周,MA 染色大部分肌纤维阳性颗粒分布不均匀,无横纹状分布,与正常肌纤维显色相近的肌纤维减少。MG 染色红肌纤维增多,但色较淡,阳性颗粒分布较均匀。

切断肌腱后 4 周,MA 阳性染色浓淡不均,分布紊乱,核周明显。MG 阳性细胞增多,阳性颗粒团块状分布,有的呈网状,无正常红白肌纤维之差异(图 4, 5)。

3 讨 论

骨骼肌肌腱切断而失去张力,但神经尚与肌纤维保持结构和功能性联系,当神经冲动发放时肌肉仍可发生收缩,由于失去拮抗肌和骨骼的作用,收缩以后的肌肉难于回复到原来的状态,这种功能状态的改变可能是使肌肉结构发生变化的原因,表现为肌纤维数量减少,肌纤维退变,甚至运动终板亦发生溃变与再生²。但由于腓肠肌属于混合型肌,慢缩 I 型肌纤维较快缩 II 型肌纤维对失张力更敏感³,即红肌纤维较白肌纤维敏感,因此,不同时间

肌纤维的变化不同步。

据形态学观察大致可将失张力后的肌纤维分为两类,一类为较正常的肌纤维,表现为肌浆染色均匀,横纹清楚,细胞核分布均匀、稀疏。线粒体均匀无肿胀,肌原纤维排列整齐。而另一类为胞浆染色浓淡不均,团块状,胞核增多,部分淡染,部分固缩,有向原肌纤维移动的核,形成核堆,排列紊乱。线粒体增多、肿胀,胞浆内出现溶酶体,这类纤维多属肌纤维的退变。并被核位于中央的再生的成肌细胞替代⁴。随观察时间的延长,肌纤维发生退变变化越明显,正常肌纤维逐渐减少。

正常肌纤维内含有许多与细胞长轴平行排列的肌原纤维,肌原纤维是由上千条粗细不同的肌丝有规律地平行排列组成。粗肌丝由肌球蛋白组成,细肌丝由肌动蛋白、原肌球蛋白和肌原蛋白组成,这些蛋白质是肌肉的结构蛋白,其分子排列是很规则的,是肌肉行使收缩功能的结构基础。在切断肌腱失去张力以后,这些结构蛋白发生不规则的分布。随肌纤维的退变而减少。据 DeJong 等研究发现,横纹肌型肌动蛋白出现于肌原纤维合成的开始,是横纹肌早期分化的标记。本实验中发现 MA 虽随切断肌腱后的不同观察时间而阳性染色有所变化,特别是阳性颗粒的分布变化较大,但始终存在阳性表达,如果肌纤维因失张力而完全退变,胞浆内这些蛋白质会消失。因此,这些与正常肌细胞不一致的细胞,有可能是未成熟的再生肌细胞与原肌纤维融合又不具备成熟肌纤维功能的细胞。

肌红蛋白存在于骨骼肌和心机的胞浆中,是一种氧合蛋白,储存和运输氧。是横纹肌的特异性蛋白,在胚胎早期出现⁵。在正常成熟肌肉内因肌纤维的功能不同而含量不同,因此将肌纤维分为红肌纤维和白肌纤维。肌纤维的类型分化是受神经调控的,在运动神经与肌纤维接触形成运动终板之前,肌纤维的结构均似红肌纤维,当神经末梢与之建立联系后,便产生白肌纤维的特征⁶,因此,肌纤维在发育成熟并行使功能之前均为红肌纤维,而成熟以后才产生红白肌纤维差异。肌纤维的再生过程与胚胎发育具有相似性,如果再生肌纤维具有合适的张力,在神经支配下可能发生型别分化。

由于本实验观察时间尚短,还不能肯定这些不断变化的肌细胞的最终去向,但因有神经支配,再

(下转第 19 页)

- 7 Zhao Kun, Qi Daoy, Wang L ming. Functional superficial parotidectomy. *J Oral Maxillofac Surg*, 1994, 52: 1038
- 8 Martinez-Madrigal F. Major salivary glands. *Am J Surg Pathol*, 1989, 13(10): 879
- 9 Gustafsson H, Franzen L, Henriksson R. Regeneration of parotid acinar cells after high radiation doses. A morphological study in rats. *Acta Oncol*, 1995, 34(2): 193 (1997- 12- 08 收稿)

A Stereological Study of the Remaining Parotid Gland of Rat After Duct-Preserved Partial Parotidectomy

Zheng Guangyong, Li Yang, Lu Yong

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

The remaining parotid glands of rats after duct-preserved partial parotidectomy were sectioned and examined randomly by stereological methods which determine acinar area and proportional volumes (PV) of the component tissues. The volume of the remaining glands were measured at the same time. Results showed that: there were no difference of the above quota 1 ~ 3 days after the operation ($P > 0.05$); 1 ~ 2 weeks after the operation, the gland volume decreased ($P < 0.05$) with the PV of acini decreasing ($P < 0.05$); 4 ~ 7 weeks after the operation, the acinar area increased ($P < 0.05$), the PV of acini and gland volume regained ($P > 0.05$). All the results indicate, with the duct preserved, the remaining parotid glands after partial parotidectomy do have the regenerating ability and significant function.

Key words: partial parotidectomy parotid duct regeneration stereology

(上接第16页)

生的肌源性细胞仍位于原肌纤维的位置,且可维持较长时间。如果能恢复张力则有利于肌源性细胞再分化为成熟的肌纤维。

(本文图见中心插页2)

4 参考文献

- 1 Hogenhuis LAH, Engel WK. Histochemistry and denervated guinea pig muscle. I. Histochemistry. *Acta Anat*, 1965, 60: 39
- 2 Pachter BR, Spielholz NI. Tenotomy-induced motor endplate alterations in rat soleus muscle. *Anat Rec*, 1990, 228: 104
- 3 Dias PLR. Effect of tenotomy on the motor end plates of fast and slow twitch muscles of the rabbit. *J Anat*, 1979, 129: 399
- 4 Koshima I, Endo T. Experimental study of vascularized muscle multifactorial analysis of muscle regeneration following denervation. *J Reconstr Microsurg*, 1989, 5(3): 225
- 5 Brooks JJ. Immunohistochemistry of soft tissue tumors myoglobin as a tumor marker for rhabdomyosarcoma. *Cancer*, 1982, 50(1): 1757
- 6 成令忠主编. 组织学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 463~ 464 (1997- 11- 06 收稿)

The Degeneration and Regeneration of Skeletal Muscle After Tenotomy

Tang Xiufa, Liu Baolin, Gu Xiaoming, et al

College of Stomatology, the Fourth Military Medical University

Abstract

In order to investigate the degeneration and regeneration of skeletal muscle fiber after tenotomy, the tenotomy were carried out on gastrocnemius muscles in 15 adult BALB/C mice. The tenotomized muscles were removed on 1, 2 and 4 weeks postoperatively. Specimens were processed for histological study with light microscope and TEM, and skeletal muscle specific protein expression analysis with myoactin (MA) and myoglobin (MG) immunohistochemical staining. The results showed that the regenerating muscle cells and the degenerating muscle fibre coexisted in tenotomized muscle. The internal structure and histochemical pattern of muscle fiber changed after tenotomy. The regenerating muscle cells fused with degenerating fibres.

Key words: skeletal muscle degeneration regeneration tenotomy