

# 大鼠胸深肌 GLUT4 表达的肌纤维型特异性

张潜<sup>1</sup>, 章涛<sup>2</sup>, 陈代雄<sup>2</sup>, 柏树令<sup>3</sup>

(1. 遵义医学院解剖学教研室, 贵州 遵义 563003; 2. 遵义医学院附属医院贵州省细胞工程重点实验室; 3. 中国医科大学基础医学院解剖学教研室)

**[摘要]** 目的: 研究大鼠胸深肌不同肌纤维型的组成分布及其葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 表达差异, 借以了解胸深肌功能。方法: 采用 GUTH-SAMAHHA 肌球蛋白 ATP 酶染色法并稍做改良, 对成年 SD 大鼠胸深肌冰冻切片进行肌纤维分型研究, 并用免疫组织化学方法对肌纤维分型后的切片进行 GLUT4 表达分析。结果: 2 种骨骼肌纤维在大鼠胸深肌内呈棋盘样均匀分布; II 型肌纤维比例为 (64.8±6.3)%, 而 I 型肌纤维仅占 (35.2±4.6)%, 前者明显高于后者 ( $P < 0.01$ )。GLUT4 主要存在于 I 型肌纤维膜及包裹肌束的肌膜上, 而 II 型肌纤维膜表达不明显。结论: 大鼠胸深肌以 II 型肌纤维为主, 偏重于力量和速度型肌; I 型肌纤维膜的 GLUT4 表达高于 II 型肌纤维, 表明前者葡萄糖摄取能力高于后者。

**[关键词]** 胸深肌; 肌纤维型; 葡萄糖转运蛋白 4; 大鼠

**[中图分类号]** Q445      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 0258-4646(2007)06-0638-03

## Fiber type specificity of GLUT4 expression in the rat deep pectoral muscle

ZHANG Qian<sup>1</sup>, ZHANG Tao<sup>2</sup>, CHEN Dai-xiong<sup>1</sup>, BAI Shu-Ling<sup>3</sup>

(1. Department of Anatomy, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 2. Key Laboratory of Cell Engineering of Guizhou Province, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College; 3. Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, China Medical University)

**[Abstract]** **Objective:** To study the composition and distribution of two muscle fiber types and their differences in glucose transporter 4 (GLUT4) expression of SD rat deep pectoral muscle in order to learn its functions. **Methods:** Deep pectoral muscles of both sides were collected from 10 adult SD rats. 8- $\mu$ m-thick cryostat sections were transected and then stained with the method of Guth-Samaha myosin-ATPase followed by a partially modified procedure to determine the muscle fiber types. Then, the GLUT4 expression profiles within different muscle fiber types were analyzed by immunohistochemistry. **Results:** Deep pectoral muscle from SD rats can be clearly identified as two different fiber types which are type I and type II, the distribution pattern of which in deep pectoral muscle is uniform and chessboard-like. The proportion of type II muscle fibers in Deep pectoral muscle was (64.8±6.3)%, much higher than that of type I fibers which was (35.2±4.6)% ( $P < 0.01$ ). Immunohistochemistry assay showed that GLUT4 expressed mainly on the membranes of type I fibers and muscle bundles, and little on those of type II fibers. **Conclusion:** Type II fibers are dominant in rat deep pectoral muscle, implying that the muscle participates more in the movement of strength and speed. Higher expression of GLUT4 in type I fibers suggests that the type I fibers have a higher ability in glucose uptake than type II fibers.

**[Key words]** deep pectoral muscle; muscle fiber types; glucose transporter 4; rats

骨骼肌纤维型组成及分布是阐明骨骼肌功能的重要依据之一<sup>[1]</sup>。胸深肌(deep pectoral muscle)是胸壁的主要组成部分,除对胸壁起加固保护作用外,还参与呼吸和其他身体的复杂运动。骨骼肌是机体利用葡萄糖的主要组织,研究表明,其葡萄糖的跨膜转运主要依赖膜上的葡萄糖转运蛋白 4(glucose transporter 4, GLUT4)。截止目前,有关大鼠胸深肌纤维型组成及其 GLUT4 表达分布还未见国内外研究报道。本文采用肌球蛋白 ATP 酶染色法研究大鼠胸深肌的肌纤维型组成与分布,并对不同肌纤维的 GLUT4 表达进行免疫组织化学染色分析,以帮助

阐明此肌功能特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与试剂

成年 SD 大鼠 10 只,雌雄不拘,体质量 250~300 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。Tris-Base、二甲胍酸钠为进口分装产品;兔源 GLUT4 多克隆抗体为 Chemicon 公司产品;免疫组化试剂盒购自晶美公司。

### 1.2 组织冰冻切片

戊巴比妥钠麻醉大鼠。取 10 例 SD 大鼠 2 侧共 20 块胸深肌,在其中部肌腹切取约 5 mm 长组织块, -20℃下切片,厚度 8  $\mu$ m,切片于室温下干燥后,及时进入下述肌球蛋白 ATP 酶组织化学染色流程。多

**[基金项目]** 贵州省科学技术基金资助项目(20052058)

**[作者简介]** 张潜(1969 -),女,副教授,硕士。

E-mail: zmczq@163.com

余切片-20℃冰箱密封冻存,1个月内使用。

### 1.3 肌球蛋白 ATP 酶组织化学染色肌纤维分型

以 GUTH-SAMAHARA<sup>[2]</sup>方案为基础稍经改良后进行。试剂配制及大致实验流程为:取上述干燥的冰冻切片于固定液中(多聚甲醛 10 g,二甲胍酸钠 8 g,无水 CaCl<sub>2</sub> 2.5 g,蔗糖 28.8 g,加水 250 ml)固定 5 min;Tris 洗液 (Tris-base 12.1 g, 0.18 mol/L CaCl<sub>2</sub> 100 ml,加水 900 ml)漂洗 1 次;预孵育液中(Tris-base 6.150 g, 0.18 mol/L CaCl<sub>2</sub> 25 ml,加水 225 ml,调 pH 至 10.4)孵育 15min;再经 Tris 洗液中漂洗 2 次,用滤纸将多余液体沾干;37℃下孵育液中(Tris-base 7.420 g, 0.18 mol/L CaCl<sub>2</sub> 30 ml, KCl 1.110 g, 18 mmol/L ATP Disodium 46 ml,加水 225 ml,调 pH 至 9.4)孵育 60 min;1%CaCl<sub>2</sub> 洗液洗 3 次,沾干后置 2%氯化钴(CoCl<sub>2</sub>)中 3 min;蒸馏水漂洗 4 次,置 1%硫化铵[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S]液中 3 min;自来水冲洗 3 min,镜检后选取其中的部分切片进行常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,图像分析仪计数两型骨骼肌纤维组成比例。余切片进一步采用下述 GLUT4

免疫组化染色 2 次标记,观察 GLUT4 表达的肌纤维型特异性。

### 1.4 免疫组化染色肌纤维 GLUT4 表达

取上述经 ATP 酶染色后的肌纤维分型切片,按照免疫组化检测试剂盒说明要求进行 GLUT4 表达分析。GLUT4 一抗按 1:300 比例用 PBS 稀释后使用。大致步骤为:取肌纤维分型后的切片,PBS 洗 3 次,滴加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37℃下作用 10 min;PBS 洗 3 次,于 37℃山羊血清封闭 20 min;加 GLUT4 一抗,4℃孵育过夜;PBS 洗 3 次,37℃下生物素标记二抗作用 30 min,继而抗生物素过氧化物酶孵育 30 min;经 DAB 显色、苏木素复染后置光镜下观察。

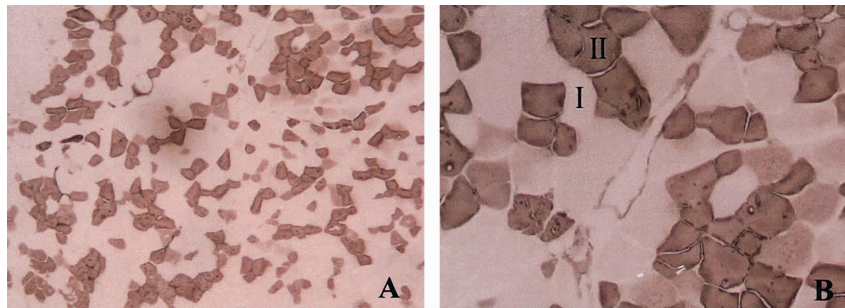
### 1.5 统计学分析

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 软件包对实验数据进行 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 大鼠胸深肌肌纤维型的组成及分布

大鼠胸深肌可明确区分两型肌纤维, I 型肌纤



A:大鼠胸深肌肌球蛋白 ATP 酶染色全景 ×40;B:胸深肌肌纤维型分布 ×200

图1 大鼠胸深肌肌纤维型分布

Fig.1 Fiber types distribution of rat deep pectoral muscle

维(氧化型纤维)明亮色白, II 型肌纤维(酵解型纤维)则呈深褐色,并且,两型肌纤维在肌内呈棋盘样均匀分布,但环绕肌束周边的肌纤维以 I 型肌纤维为主(图 1)。图像分析仪计数结果表明,大鼠胸深肌 II 型肌纤维占(64.8±6.3)%,而 I 型肌纤维比例仅为(35.2±4.6)%,二者比较差异十分显著( $P < 0.01$ )。

### 2.2 大鼠胸深肌两型肌纤维 GLUT4 的表达

经免疫组化染色标记后的图片仍较好的保留了原两型肌纤维的色泽对比,并可清楚的反映两型肌纤维 GLUT4 表达的差异;GLUT4 的表达主要见于 I 型肌纤维膜及包裹肌束的肌膜(图 2)。

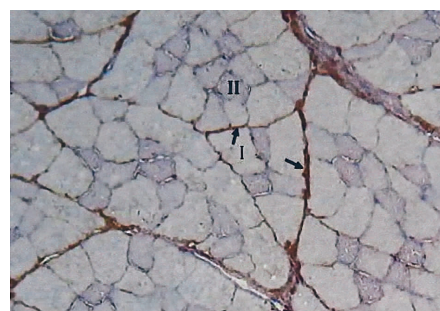


图2 大鼠胸深肌 GLUT4 表达的肌纤维型特异性, I 型肌纤维和肌束膜表达呈阳性反应(↑) ×200

Fig.2 Expression of GLUT4 with fiber types specificity in the rat deep pectoral muscle showing that the GLUT4 expressed mainly on the membranes of type I fibers and muscle bundles(↑) ×200

### 3 讨论

用于鉴定肌纤维型的方法主要包括肌球蛋白 ATP 酶染色法<sup>[3]</sup>和肌球蛋白重链免疫组织化学亚型分类法<sup>[4]</sup>2 种。肌球蛋白 ATP 酶染色方法因无需专用抗体,肌纤维染色清晰直观,因而一直被广泛采用。研究表明,个体内不同骨骼肌的肌纤维型构成比例不同。I 型肌纤维以有氧代谢为主要获能方式,主要参与耐力运动和肢体姿势的维持;II 型肌纤维主要依赖无氧酵解提供能量,为快速而有力的运动提供保障。本研究对大鼠胸深肌的肌纤维型组成和分布研究结果显示,两型肌纤维在大鼠胸深肌内呈棋盘样均匀分布,II 型肌纤维所占比例高于 I 型肌纤维,表明大鼠胸深肌偏重于速度型,其功能上除了呼吸运动外,还参与机体的快速、爆发性运动。本研究对 GUTH-SAMAHA 肌球蛋白 ATP 酶染色方法中涉及的液体配制及实验步骤作了适当的调整,使其更加简洁、实用,且肌纤维分型效果满意。

骨骼肌收缩的能量源自葡萄糖,骨骼肌是调节机体糖代谢最重要的外周组织,基础状态和胰岛素刺激下的骨骼肌对糖的摄取利用量分别约占全身组织的 20%和 85%左右。葡萄糖转运入骨骼肌细胞的过程是糖利用的主要限速步骤。胰岛素和肌肉收缩是生理状态下骨骼肌细胞葡萄糖转运的主要调节因素,而它们的调节作用又与骨骼肌细胞的 GLUT4 密切相关<sup>[5]</sup>。大鼠和人的 GLUT4 均由 509 个氨基酸组成,包含 12 个跨膜结构域和一个位于 N 端的胞外环状结构域,二者氨基酸序列同源性高达 95%以上,表明在生物进化过程中,GLUT4 始终保持转运葡萄糖的功能<sup>[6,7]</sup>。GLUT4 表达主要见于骨骼肌和脂肪细胞中,属于胰岛素反应性葡萄糖转运蛋白,在胰岛素和肌肉收缩等刺激因素作用下,GLUT4 囊体向细胞膜转位,并与之融合,融合后的 GLUT4 成为葡萄糖转运的载体,介导细胞外的葡萄糖进入细胞<sup>[8]</sup>。研究骨骼肌细胞 GLUT4 在生理或病理状态下的表达和分布,将有助于阐明 GLUT4 在调节机体糖代谢中的重要作用,并有助于揭示相关疾病的发病机制。ROSENBLATT-VELIN 等<sup>[9]</sup>的研究证实,2 型糖尿病患者骨骼肌细胞 GLUT4 的总量与正常人基本相同,但细胞膜上 GLUT4 的含量却明显低于正常人,其葡萄糖摄取能力必然下降,这或许是糖尿病

患者胰岛素抵抗的重要原因。

本研究大鼠胸深肌 GLUT4 表达主要见于 I 型肌纤维膜和包裹肌纤维的肌束膜上,表明大鼠骨骼肌 I 型肌纤维的葡萄糖摄取能力强于 II 型纤维,与人骨骼肌 I 型肌纤维 GLUT4 表达高于 II 型肌纤维的研究结果一致<sup>[10]</sup>。本实验每个肌束周边均以 I 型纤维为主,这是否是肌束膜 GLUT4 高表达的原因,有待进一步研究证实。本实验建立在肌球蛋白 ATP 酶染色肌纤维分型切片上进行免疫组织化学的 2 次标记方法,可在同一切片上显示骨骼肌纤维分型和目的蛋白表达情况,这为骨骼肌相关研究探索出了一条新的有价值的方法途径。

#### 参考文献:

- [1] 张潜, 薛黔. 家兔小腿三头肌亚部化研究 [J]. 解剖学杂志, 2003, 26(4): 377-380.
- [2] GUTH L, SAMAHA FJ. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase [J]. *Exp Neurol*, 1970, 28(2): 365-367.
- [3] GOLLNICK PD, PARSONS D, OAKLEY CR. Differentiation of fiber types in skeletal muscle from the sequential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation [J]. *Histochemistry*, 1983, 77(4): 543-555.
- [4] KORFAGE JA, VAN WESSEL T, LANGENBACH GE, et al. Heterogeneous postnatal transitions in myosin heavy chain isoforms within the rabbit temporalis muscle [J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2006, 288(10): 1095-1104.
- [5] 李显, 李斌, 艾华. 骨骼肌葡萄糖转运蛋白 4 及运动 / 训练对它的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2004, 23(3): 329-335.
- [6] FUKUMOTO H, KAYANO T, BUSE JB, et al. Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(14): 7776-7779.
- [7] ZANQUETTA MM, NASCIMENTO ME, MORI RC, et al. Participation of beta-adrenergic activity in modulation of GLUT4 expression during fasting and refeeding in rats [J]. *Metabolism*, 2006, 55(11): 1538-1545.
- [8] RUDICH A, KLIP A. Push/pull mechanisms of GLUT4 traffic in muscle cells [J]. *Acta Physiol Scand*, 2003, 178(4): 297-308.
- [9] ROSENBLATT-VELIN N, LERCH R, PAPAGEORGIOU I, et al. Insulin resistance in adult cardiomyocytes undergoing dedifferentiation: role of GLUT4 expression and translocation [J]. *FASEB J*, 2004, 18(7): 872-874.
- [10] DAUGAARD JR, NIELSEN JN, KRISTIANSEN S, et al. Fiber type-specific expression of GLUT4 in human skeletal muscle: influence of exercise training [J]. *Diabetes*, 2000, 49(7): 1092-1095.

[收稿日期] 2007-04-30

(编辑 孙宪民)