

# 小尾寒羊胚胎不同时期背最长肌的组织学研究

于维敏<sup>1</sup>, 刘开东<sup>2</sup>, 程明<sup>2</sup>, 曲绪仙<sup>3</sup>, 刘鲁梅<sup>1</sup>, 叶禄林<sup>1</sup>, 刘积凤<sup>1</sup>, 柳楠<sup>1\*</sup>

(1. 青岛农业大学动物科技学院, 山东青岛 266109; 2. 青岛市畜牧兽医研究所, 山东青岛 266100; 3. 山东省畜牧总站, 山东济南 250022)

**摘要** [目的]利用组织生物学方法对不同时期小尾寒羊背最长肌进行研究。[方法]以小尾寒羊为研究对象,利用组织切片技术从微观层面研究胚胎期不同阶段肌纤维生长发育的变化情况。[结果]肌纤维的密度随着时间的增长呈现下降的趋势,而肌纤维直径随着密度的降低而增加。胚胎前期胎儿增重不明显,而胚胎后期及出生后体重迅速增加,差异显著。[结论]该研究可为开展优质肉羊杂交育种工作积累基础性数据。

**关键词** 小尾寒羊;背最长肌;组织切片;H-E染色

**中图分类号** S826.8<sup>+</sup>9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)12-05351-03

## Study on the Histology of Longissimus Dorsi Muscle in Different Embryo Periods of Small Tailed Han Sheep

YU Wei-min et al (Scholl of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the longissimus dorsi muscle in different embryo period of Small Tailed Han sheep by histology biology method. [Method] Using Small Tailed Han sheep as research object, the change situations of the growth and development of muscle fiber in different stages of embryo period were studied at microcosmic level by using tissue section technology. [Result] The density of muscle fiber showed a decreasing trend with the change of time, while the diameter of muscle fiber increased with the decrease of the density. The weight gain of fetus in early embryo stage was not obvious, while the weight in late embryo stage and after birth rapidly increased with significant difference. [Conclusion] The research could provide basic data for the cross breeding of good-quality meat sheep.

**Key words** Small Tailed Han sheep; Longissimus dorsi muscle; Tissue sections; H-E staining

随着人们生活水平的提高,对羊肉的需求更加关注肉的品质<sup>[1]</sup>。肌纤维的粗细以及肌间脂肪含量直接影响肉的品质。评定肉的品质特性主要从肉品的质地、嫩度、风味、多汁性和化学成分含量等方面来考虑,而肌肉肌纤维的组织学特性与肉品质地和嫩度有直接关系,是影响肉质的结构基础。沈元新和王亚鸣等研究发现随着肌纤维直径的增大,肌肉的嫩度相应降低,而肌纤维越细,密度越大,肉质就越细嫩,味美且多汁<sup>[2]</sup>。肌纤维是构成肌肉的基本单位,与肉质性状密切相关。肌纤维特性在某种程度上决定了肌肉的特性<sup>[3]</sup>。

小尾寒羊作为我国优秀的地方绵羊品种,具有常年发情、体型大、生长发育快、肉品质好、产羔多等特点,在我国华东、华北等地区肉羊生产中作为首选的杂交母本品种。笔者以山东省小尾寒羊为研究对象,利用组织切片技术从微观层面研究胚胎期不同阶段肌纤维生长发育的变化情况,以期开展优质肉羊杂交育种工作积累基础性数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验对象。**小尾寒羊 15 只,分别于胚胎期 60 d、90 d、120 d、出生和 2 月龄,宰杀取出胚胎,每个时期保证 3 个胚胎,分离 1 cm×1 cm×1.5 cm 背最长肌置于 10% 中性甲醛溶液中。

**1.1.2 主要试剂。**甲醛(37%~40%)、无水酒精、二甲苯、苏木精、伊红、氧化汞、中性树胶。

**1.1.3 主要仪器。**切片机(LEICA RM2235);电子分析天

平;恒温水浴槽;Olympus CK51 正置荧光显微镜。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品的固定。**采用 10% 中性甲醛溶液固定样品。采集新鲜的背最长肌 1.0 cm×1.0 cm×1.5 cm 置于 10% 的中性甲醛中,甲醛的量为样品体积的 10 倍左右。

**1.2.2 修块水洗、脱水和透明。**将经固定的组织样品修整为 3 mm×5 mm×5 mm 大小的小块,放在流水下冲洗 24 h;采用酒精脱水,二甲苯透明。具体程序见图 1。

50%酒精	→70%酒精	→80%酒精	→95%酒精(1)	→95%酒精(2)
0.5~1 h	2~4 h	2~4 h	2 h	2 h
二甲苯(2)		←二甲苯(1)	←无水酒精(2)	←无水酒精(1)
30 min	10 min	1 h	1 h	

图 1 样品修块水洗、脱水和透明程序

**1.2.3 浸入与包埋。**用石蜡浸入然后包埋于小纸盒内。

石蜡(1)→石蜡(2)→石蜡(3)→包埋

1 h 1 h 0.5 h

**1.2.4 切片、染色和粘片。**包埋好的蜡块修整好固定到切片机上,8 μm 连续切片,切好的片子放于 37~40℃ 水槽里进行展片,展好后用载玻片捞起,于烤箱内 60℃ 烤 72 h,然后按照以下程序进行染色<sup>[4]</sup>。具体程序如图 2 所示。经染色

二甲苯(1)	→二甲苯(2)	→无水酒精(1)	→无水酒精(2)	→95%酒精(1)
5 min	5 min	5 min	5 min	3 min
自来水洗	→苏木精	→蒸馏水	→50%酒精	→70%酒精
12 min	2 min	2 min	2 min	2 min
2 min	2 min	2 min	2 min	3 min
蒸馏水	→1%盐酸酒精	→自来水蓝化	→蒸馏水	→50%酒精
2 min	3~5 s	15 min	2 min	2 min
2 min	2 min	2 min	2 min	2 min
无水酒精(2)	←无水酒精(1)	←95%酒精(2)	←95%酒精(1)	←伊红
5 min	5 min	5 min	5 min	2 min
2 min	2 min	2 min	2 min	2 min
二甲苯(1)	→二甲苯(2)			
5 min	5 min			

图 2 切片、染色和粘片程序

**基金项目** 国家绒毛用羊产业技术体系资助项目(CARS-40-04);山东省良种工程资助项目。

**作者简介** 于维敏(1985-),男,山东济宁人,硕士研究生,研究方向:分子生物学。\*通讯作者,教授,博士,硕士生导师,从事分子遗传育种研究,E-mail:nanliu@sina.com。

**收稿日期** 2013-04-03

的片子再用中性树胶进行封固,48℃下烘烤72h。

**1.2.5 切片的观察。**切片用Olympus CK51正置荧光显微镜进行观察。

**1.3 图像的分析** 借助Image-Pro Plus 5.1软件,对10×20倍视野下图像进行分析,每个片子选取5个视野,测定每根纤维的横截面积、单位面积内纤维数量、纤维横截面的长短轴长。

**1.4 统计学分析** 采用SPSS17.0软件对试验数据进行处理与分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单位面积肌纤维数量 不同时期背最长肌样品切片单

位面积肌纤维数量见表1。

表1 不同时期单位面积肌纤维数量

时期	肌纤维密度//根/mm <sup>2</sup>	单根肌纤维横截面积//μm <sup>2</sup>
60 d	4 901.94 ± 256.63 a	20.51 ± 1.08 a
90 d	3 010.51 ± 265.38 b	33.75 ± 3.04 a
120 d	3 011.05 ± 314.67 b	34.00 ± 3.77 a
出生	1 246.87 ± 195.31 B	85.12 ± 15.72 b
2月龄	879.83 ± 64.25 B	114.98 ± 9.06 b

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

### 2.2 不同时期背最长肌组织切片显微图像 将不同时期背最长肌组织切片显微图像,分别列入图3。

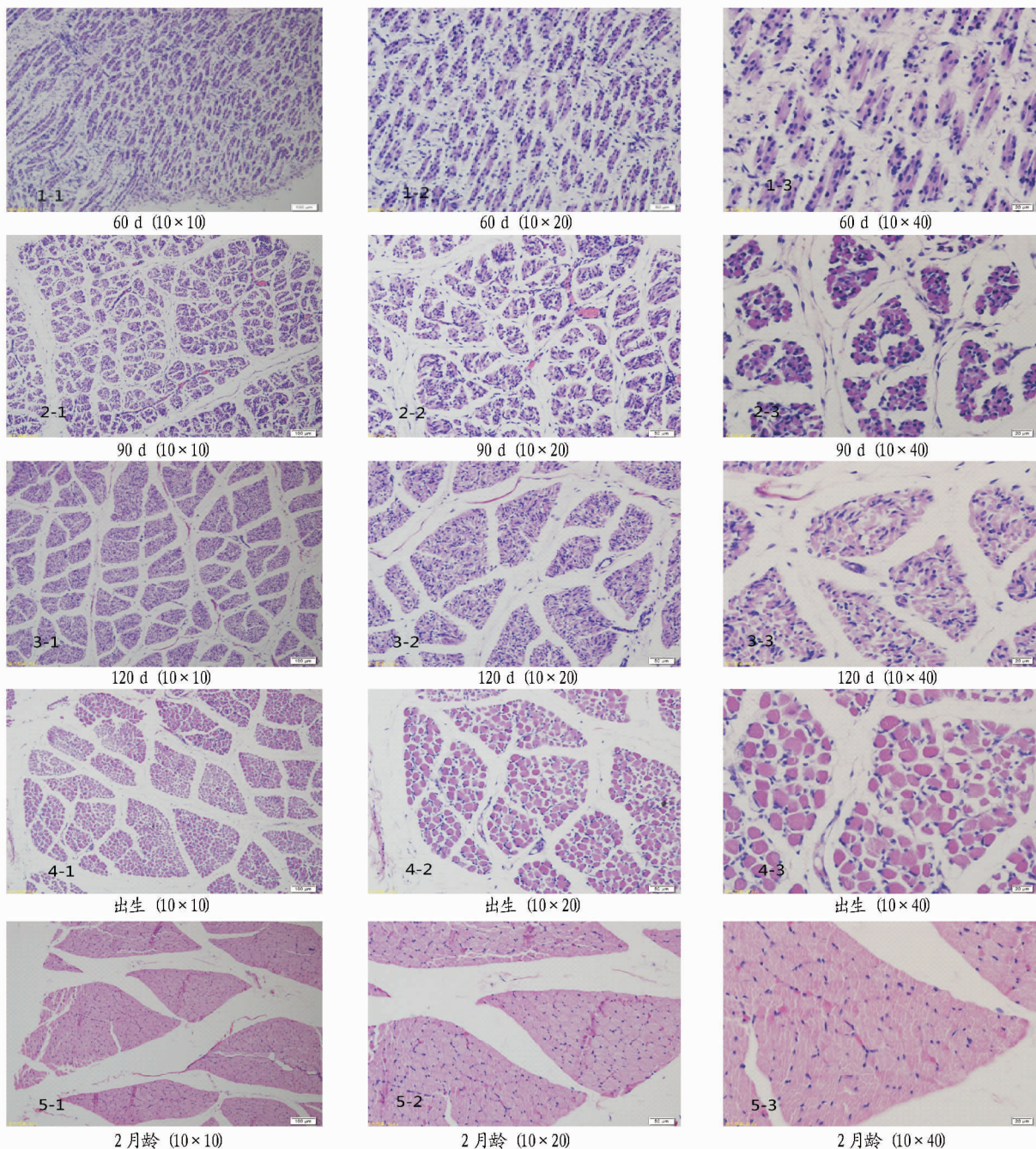


图3 背最长肌不同生长阶段组织切片的显微镜观察结果

由图 1 和表 1 可知,每个时期单位面积纤维数,60 d 与 90 d、120 d 差异显著( $P < 0.05$ ),与出生、2 月龄差异极显著( $P < 0.01$ );90 d 与 120 d 差异不显著( $P > 0.05$ );出生与 2 月龄差异不显著( $P > 0.05$ )。

**2.3 肌纤维形状分析** 肌纤维形状说明肌纤维生长发育情况,分别测定肌纤维长轴长度、短轴长度和直径。由图 1 和表 2 可知,60 d 与 90 d、120 d、出生时肌纤维直径差异显著( $P < 0.05$ ),与 2 月龄差异极显著( $P < 0.01$ );90 d 与 120 d 差异不显著( $P > 0.05$ ),与出生、2 月龄差异显著( $P < 0.05$ );120 d 与出生、2 月龄差异显著( $P < 0.05$ );出生与 2 月龄差异不显著( $P > 0.05$ )。

表 2 不同时期肌纤维的长轴、短轴和直径  $\mu\text{m}$

时期	长轴	短轴	肌纤维直径
60 d	6.13 ± 0.46 a	4.44 ± 0.07 a	4.93 ± 0.14 a
90 d	9.53 ± 0.67 b	4.45 ± 0.21 a	6.00 ± 0.07 a
120 d	9.55 ± 0.98 b	7.29 ± 1.24 b	7.70 ± 1.14 b
出生	12.94 ± 1.66 B	8.71 ± 0.85 b	10.18 ± 0.81 B
2 月龄	14.63 ± 1.25 B	9.99 ± 0.82 b	11.75 ± 0.43 B

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

肌纤维的数量和纤维类型在胚胎的中期就已固定。在

(上接第 5348 页)

特征一般是,每束肌纤维根数多,单肌纤维细,则肉质细嫩,但每平方米面积肌纤维根数要适中,以保持肌肉内所含营养、水分适中,从而构成良好的鲜味和适口性。宋代军等<sup>[9]</sup>研究指出,饲料能量或蛋白质水平增加,肉鸡胸肌纤维密度减小、直径增大( $P < 0.01$ )。Stickland 研究发现,生长速度快的家禽肌纤维根数高于生长速度慢的家禽,在同品系内肌纤维根数与肉料比和日增重呈正相关<sup>[10]</sup>。Nortvedt 等指出营养水平低下会导致快速收缩的肌肉中琥珀酸脱氢酶的持续下降,该种酶活性改变即可引起肌纤维类型的改变<sup>[11]</sup>。该研究表明,不同蛋白质水平对虹鳟肌纤维直径和密度均有影响,即随着蛋白质水平的增加,虹鳟肌纤维直径增大,肌纤维密度减小,这可能是由于蛋白质水平较高的基础日粮饲喂虹鳟后,其日增重较快,生长速度较快,从而导致虹鳟肌纤维增长较快,出现肌纤维直径大、密度小的现象。高水平的营养会使肌肉内蛋白质和脂肪沉积,因此,在水产养殖中要调整鱼类的饲料供给水平,优化肌纤维的特征,提高肉质。

### 参考文献

[1] RIVERO J L, TALMADGE R J, EDGERTON V R. Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain based fibre types in rat skeletal muscle

胚胎后期和产后阶段肌纤维进入快速增长期,后期肌纤维生长主要是肌纤维的增粗和伸长,是由于单核肌肉卫星细胞与多核肌纤维的融合使肌纤维肥大<sup>[5]</sup>所致。肌纤维形成有三级形成波,胚胎的前期是肌纤维分化的时期,差异较大;胚胎期 60 d 左右是三级纤维形成的时期,三级纤维形成后,其数量是固定不变的,90 d 以后主要是肌纤维的增粗,因此 90 d 与 120 d 差异不显著,出生后随着年龄的增长,肌纤维的面积等变化不大<sup>[6]</sup>。肌纤维的密度随着时间的增长呈现下降的趋势,与曾勇庆等<sup>[7]</sup>研究结果相一致,而肌纤维直径随着密度的降低而增加。胚胎前期胎儿增重不明显,因此前期差异不显著,而胚胎后期及出生后体重迅速增加,差异显著。

### 参考文献

- [1] TOLDRÁ F, REIG M. Innovations for healthier processed meats[J]. Trends Food Sci Technol, 2011, 22: 517-522.
- [2] 马月辉, 储明星, 孙伟, 等. 湖羊背最长肌组织学特性分析及其与陶赛特羊的初步比较[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 47(11): 12-14.
- [3] 罗军. 肌肉纤维特性研究进展[J]. 黄牛杂志, 1989(4): 36-40.
- [4] 赵志英, Harris 苏木精配制改良法[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(3): 172-173.
- [5] MACINTOSH R, GARDINER F, MCCOMAS J. Skeletal Muscle Form and Function[M]. Champaign: Human Kinetics, 2006.
- [6] BRIGITTE P, LOUIS L, CÉCILE B, et al. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species[J]. Reprod Nutr Dev, 2002, 42: 415-431.
- [7] 曾勇庆, 王慧, 储明星. 小尾寒羊肉品理化性状及食用品质的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2000, 36(3): 6-8.
- [8] Journal of Muscle Research and Cell Motility, 1998, 19: 733-742.
- [9] 宋代军, 方立超, 董国忠, 等. 营养水平对肉鸡肌肉组织学的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(6): 551-554.
- [10] 杨庆章, 秦鹏春, 郑坚伟. 不同营养水平对杜哈白 F<sub>1</sub> 猪肌组织影响的研究[J]. 东北农学院学报, 1989, 20(2): 154-165.
- [11] 谭丽勤, 欧茶海, 李润泉, 等. 60~90 日龄腾冲雪鸡肌纤维特性研究[J]. 云南农业大学学报, 2000, 15(4): 46-49.
- [12] JOHNSTON I A, ALDERSON D, SANDEHAM C, et al. Patterns of muscle growth in early and latematuring populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Aquaculture, 2000, 189: 307-333.
- [13] JOHNSTON I A, MANTHRI S, ALDERSON R, et al. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Exp Biol, 2003, 206: 1337-1351.
- [14] JOHNSTON I A, ALDERSON R, SANDHAM C, et al. Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Aquaculture, 2000, 189: 335-349.
- [15] 林丽梅, 谷章璧, 张筱英, 等. 矮型肉鸡各杂交组合肉质分析[J]. 新疆畜牧业, 1991, (2): 20-22.
- [16] 宋代军, 方立超, 董国忠, 等. 营养水平对肉鸡肌肉组织学的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(6): 551-554.
- [17] STICKLAND N C. Microstructural aspects of skeletal muscle growth [C]//2<sup>nd</sup> Dummerdorf Muscle Workshop-Muscle Growth and Meat Quality. Rostock, Germany, 1995.
- [18] NORTVEDT R, TUENE S. Body composition and sensory assessment of three weight groups of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* fed three pellet sizes and three dietary fat levels [J]. Aquaculture, 1998, 161: 295-313.