

文章编号: 1000-0615(2017)09-1392-08

DOI: 10.11964/jfc.20160710495

## 长牡蛎闭壳肌肌纤维的组织学特性

李绘娟, 于红\*, 李琪

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东青岛 266003)

**摘要:** 分别利用石蜡切片苏木精-伊红染色法、冷冻切片烟酰胺腺嘌呤二核苷酸四唑氧化还原酶(NADH-TR)组化染色法、肌球蛋白ATP酶染色法对长牡蛎闭壳肌平滑肌和横纹肌进行了组织学特性研究, 并比较平滑肌和横纹肌肌纤维组成的差异。石蜡切片结果显示, 闭壳肌中平滑肌和横纹肌肌纤维形态结构不同, 肌纤维直径、肌纤维密度和横截面积存在显著差异, 其中平滑肌肌纤维直径为 $(5.97\pm 0.631)\mu\text{m}$ , 肌纤维密度为 $(25\ 485.65\pm 3917.807)\text{根}/\text{mm}^2$ , 肌纤维横截面积为 $(26.25\pm 5.365)\mu\text{m}^2$ ; 横纹肌肌纤维直径为 $(7.41\pm 0.847)\mu\text{m}$ , 肌纤维密度为 $(16\ 908.25\pm 3917.807)\text{根}/\text{mm}^2$ , 横截面积为 $(40.45\pm 10.083)\mu\text{m}^2$ 。NADH-TR染色结果显示, 平滑肌中富含NADH, 肌纤维染色较深, 呈现深蓝紫色, 主要是I型肌纤维, 为氧化代谢的慢速收缩型肌纤维; 横纹肌染色较浅或者基本不着色, 主要是II型肌纤维, 为糖酵解代谢的快速收缩肌纤维。ATPase酶染色结果显示, 横纹肌ATPase活性强, 染色较深, 呈现黑色, 主要是II型肌纤维; 平滑肌中ATPase活性弱, 着色浅或基本不着色, 主要是I型肌纤维。ATPase酶染色结果与NADH-TR染色结果一致。研究阐明了长牡蛎闭壳肌中平滑肌和横纹肌肌纤维的组织学特性及收缩、代谢特性差异, 为深入研究长牡蛎肌纤维生物学特性提供了重要的基础资料, 为提高我国贝类肉质品质提供理论依据。

**关键词:** 长牡蛎; 闭壳肌; 肌纤维; NADH-TR; ATPase

**中图分类号:** Q 246; S 917.4

**文献标志码:** A

肌肉组织是动物的基本结构组织, 在畜牧业和水产养殖业中, 肌肉是动物肉产品的主要组成部分, 具有重要的经济价值, 是动物遗传育种中重要的选育性状之一<sup>[1]</sup>。肌纤维是肌肉的结构单元, 不同肌纤维类型的肌肉组织会引起肌肉生理与代谢特征上的不同, 根据肌纤维的分子结构、代谢特点和收缩特性, 肌肉可以分为不同的类型。如根据肌纤维结构的不同分为心肌、平滑肌和横纹肌; 根据肌纤维颜色的不同分为红肌与白肌; 根据肌纤维收缩特性分为慢肌与快肌<sup>[2]</sup>, 根据肌纤维代谢特点可以分为有氧代谢型、无氧糖酵解型等类型<sup>[3]</sup>。肌纤维类型的不同会导致肌肉的肉色、嫩度、风味等肉品

质性状的差异。因此, 肌肉的分化及其调控机制一直是养殖动物肌肉生物学和肉品科学研究的热点问题。在水产养殖业中, 认识和了解水产动物肌肉肌纤维类型及其特性对于提高水产养殖动物的肉产量、改善肉品质具有重要的指导意义。

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)又称为太平洋牡蛎, 具有生长快、适应能力强、肉质鲜美等特点, 是世界上养殖产量最高的经济贝类<sup>[4]</sup>。长牡蛎属于单柱类双壳贝类(只有一个闭壳肌), 闭壳肌作为长牡蛎肌肉组织的主要组成部分, 在生长、防御和代谢等重要的生命过程中有着举足轻重的地位。长牡蛎成体为固着型贝类, 通过

收稿日期: 2016-07-27 修回日期: 2017-07-27

资助项目: 泰山学者种业计划专家项目; 国家海洋公益性行业科研专项(201305005); 山东省科技发展计划(2014GHY115002)

通信作者: 于红, E-mail: hongyu@ouc.edu.cn

闭壳肌的收缩和舒张来控制贝壳的运动, 使海水进出体内, 从而进行摄食、呼吸、繁殖和排泄<sup>[5]</sup>。在遇到外界刺激时, 闭壳肌可以保持双壳紧闭抵御刺激、自我保护, 因此有研究者将闭壳肌的收缩力度作为判断牡蛎健康状况的评价标准<sup>[6]</sup>。闭壳肌拉力也可以作为评价贝类强壮程度的一个生理性状指标。有研究报道, 长牡蛎闭壳肌拉力大的家系夏季死亡率较低<sup>[6]</sup>。由于闭壳肌拉力具有可遗传性, 因此闭壳肌拉力可以作为选育高成活率群体的一个参考指标<sup>[7]</sup>。此外, 闭壳肌在秋冬季贮存糖原, 是长牡蛎繁殖过程中重要的能量储存和转化器官, 是配子发生的主要能量来源组织之一<sup>[8]</sup>。长牡蛎闭壳肌由平滑肌和横纹肌两部分组成, 二者存在形状、结构、功能、代谢方式等方面的差异<sup>[9]</sup>。表观上平滑肌和横纹肌紧密结合在一起, 但是界限明显, 平滑肌白色不透明, 呈月牙状, 横纹肌呈半透明状态, 占较大比例<sup>[10]</sup>(图1)。平滑肌收缩缓慢, 主要负责贝壳长时间闭壳状态, 横纹肌收缩迅速, 主要负责快速闭壳<sup>[11]</sup>。此外, 平滑肌产生的乳酸和所含的糖原都要高于横纹肌<sup>[5]</sup>。目前关于长牡蛎闭壳肌研究主要在闭壳肌的收缩特性及生理特性方面, 有关闭壳肌平滑肌和横纹肌组织学特性研究尚未见报道。

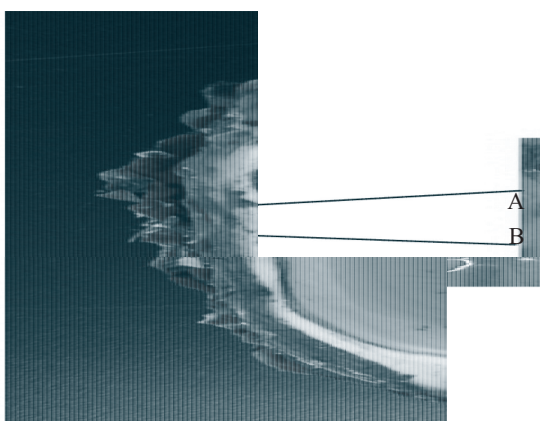


图1 长牡蛎闭壳肌平滑肌和横纹肌表观结构图

A: 平滑肌, B: 横纹肌

Fig. 1 Morphology structure of smooth and striated muscle from *C. gigas* adductor

A: smooth muscle, B: striated muscle

本实验利用石蜡切片技术、冷冻切片烟酰胺腺嘌呤二核苷酸四唑氧化还原酶(NADH-TR)及肌球蛋白ATP酶染色方法研究长牡蛎闭壳肌平滑

肌和横纹肌组织形态学特性, 比较分析两者在形态、代谢和收缩特性的差异, 旨在研究长牡蛎闭壳肌的肌纤维类型组成及肌肉分化特征, 为长牡蛎闭壳肌分化生长的分子机理研究提供基础信息, 同时也为海洋贝类闭壳肌性状的遗传改良提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用长牡蛎来自于青岛市齐东路市场, 挑选30个壳体完整、健康无损伤、活力强的成体长牡蛎, 每个个体壳长3~5 cm, 壳高7~9 cm, 壳宽2~3 cm, 总重50~80 g。

### 1.2 实验方法

**石蜡切片的制备** 取5 mm<sup>3</sup>大小的闭壳肌组织块置于波恩氏液中固定12~24 h。75%酒精置换出波恩氏液, 组织经过75%、80%、85%、90%、95%、100%、100%酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋后用石蜡切片机(LEICA RM2016)切片。切片厚度为5 μm, 常规H.E染色。在光学显微镜(OLYMPUS BX51)下观察并拍照。

**肌纤维直径、横截面积和密度的测定** 在10×40倍镜下, 利用AJ-VERT软件圈出每条肌纤维横切的长径和短径, 每张切片随机选取5个视野, 每个视野测量50条, 长径和短径的几何平均值作为肌纤维的直径, 肌纤维横截面积计算方法参照殷亚杰等<sup>[12]</sup>描述的方法, 横截面积=长径×短径×0.7。利用AJ-VERT软件测出每个视野的面积和肌纤维数量, 换算成每平方毫米的根数, 作为被测样本的肌纤维密度。

**冷冻切片的制备** 选取5 mm<sup>3</sup>大小的闭壳肌组织块, 经过OCT包埋, 室温放置1 min, 转入经液氮预冷的异戊烷中速冻, 组织块速冻完成后放于-20 ℃中保存。冷冻切片机(LEICA CM1900)切片, 切片厚度为8 μm, 在光学显微镜(OLYMPUS BX51)下观察, 挑选平整的切片, 室温干燥后保存于-20 ℃。

**NADH-TR染色流程** 染色所用试剂盒为冰冻切片NADH心肌黄酶(NADH-TR)活性染色试剂盒(上海杰美基因医药科技有限公司), 首先在冰冻切片上加入300 μL清理液, 铺满整个样品表面, 移去切片上的清理液, 加入300 μL NADH-TR

染色工作液(由染色液和反应液1:1混合而成)(阴性对照时染色工作液不含有反应液)铺满整个样品表面,放在37℃培养箱里孵育30 min,避免光照,可以适当增加孵育时间5~10 min;移去染色液,加入清理液(重复两次);加入透亮液,铺满整个样品表面,孵育5 min(重复3次),孵育环境pH为中性,移去清理液进行封片观察。

**ATPase染色流程** 染色所用试剂盒为ATPase染色液(钙钴法)试剂盒(北京雷根生物技术有限公司),首先将冰冻切片直接入蒸馏水中,入钙盐溶液中37℃孵育5 min,ATPase孵育液孵育40 min,蒸馏水洗1 min,硝酸钴溶液5 min,中性甲醛固定2 min,流水冲洗,ALP硫化工作液室温孵育2 min,流水冲洗后中性树脂封片。对照切片用ATPase对照液进行孵育,并与ATPase孵育液孵育的切片进行比较,两者反应相同部位可能有非特异性磷酸(单脂)酶存在,两者不同部位是ATP酶活性所在。对照切片入80℃蒸馏水10 min,再与其他组织切片同时孵育,结果应为阴性。

## 2 结果

### 2.1 长牡蛎闭壳肌肌纤维形态结构观察

石蜡切片结果表明,长牡蛎闭壳肌的平滑肌和横纹肌肌纤维形态存在差异。长牡蛎闭壳肌横纹肌肌纤维横切面呈不规则块状,核位于边缘,肌纤维间有丰富的结缔组织(图版 I -1);肌纤维纵切面呈长条状,排列规则,有多个细胞核;肌纤维沿细胞长轴平行排列,有明显横纹,染色较深的为暗带,较浅而发亮的为明带,但是暗带跟肌纤维并非垂直,而是具有一定的角度(图版 I -2)。平滑肌肌纤维呈长梭形,无横纹,含一个细胞核,呈长椭圆形,位于中央,肌纤维大小不一,收缩时可扭曲呈螺旋形。肌纤维少部分单独存在,大部分成束或成层分布,肌纤维间有丰富的结缔组织(图版 I -3);肌纤维横切面呈不规则形状(图版 I -4)。

对长牡蛎闭壳肌横纹肌和平滑肌的肌纤维直径,肌纤维密度和肌纤维横截面积进行统计分析,平滑肌肌纤维直径为 $(5.97\pm 0.631)\mu\text{m}$ ,横纹肌肌纤维直径为 $(7.41\pm 0.847)\mu\text{m}$ ,二者差异显著( $P<0.01$ );平滑肌肌纤维密度为 $(25\ 485.65\pm 3917.807)\text{根}/\text{mm}^2$ ,横纹肌肌纤维密度为 $(16\ 908.25\pm 3917.807)\text{根}/\text{mm}^2$ ,二者存在显著差异;平滑肌肌

纤维横截面积为 $(26.25\pm 5.365)\mu\text{m}^2$ ,横纹肌肌纤维横截面积为 $(40.45\pm 10.083)\mu\text{m}^2$ ,二者差异显著( $P<0.01$ )。横纹肌肌纤维直径和横截面积均显著大于平滑肌,横纹肌肌纤维密度显著低于平滑肌。

### 2.2 长牡蛎闭壳肌肌纤维代谢特性

NADH-TR在磷酸戊糖通路代谢中被还原产生的 $\text{H}^+$ 能在NADH氧化酶作用下使四唑盐氧化还原为蓝紫色沉淀,在肌纤维上沉积,可将肌纤维内线粒体染成紫色或者深蓝紫色,肌球蛋白和肌动蛋白不着色,因此NADH-TR染色能够区分氧化代谢的慢速收缩型肌纤维和糖酵解代谢的快速收缩肌纤维。本研究NADH-TR染色结果显示长牡蛎闭壳肌平滑肌肌纤维染色深,呈深蓝紫色,表明平滑肌肌纤维NADH含量较高,线粒体丰富,主要进行氧化代谢,具有慢速收缩型(I型肌纤维)的特征(图版 II -3);横纹肌肌纤维染色较浅或基本不着色,主要进行糖酵解代谢,具有快速收缩型(II型肌纤维)的特征(图版 II -4)。

### 2.3 长牡蛎闭壳肌肌纤维收缩特性

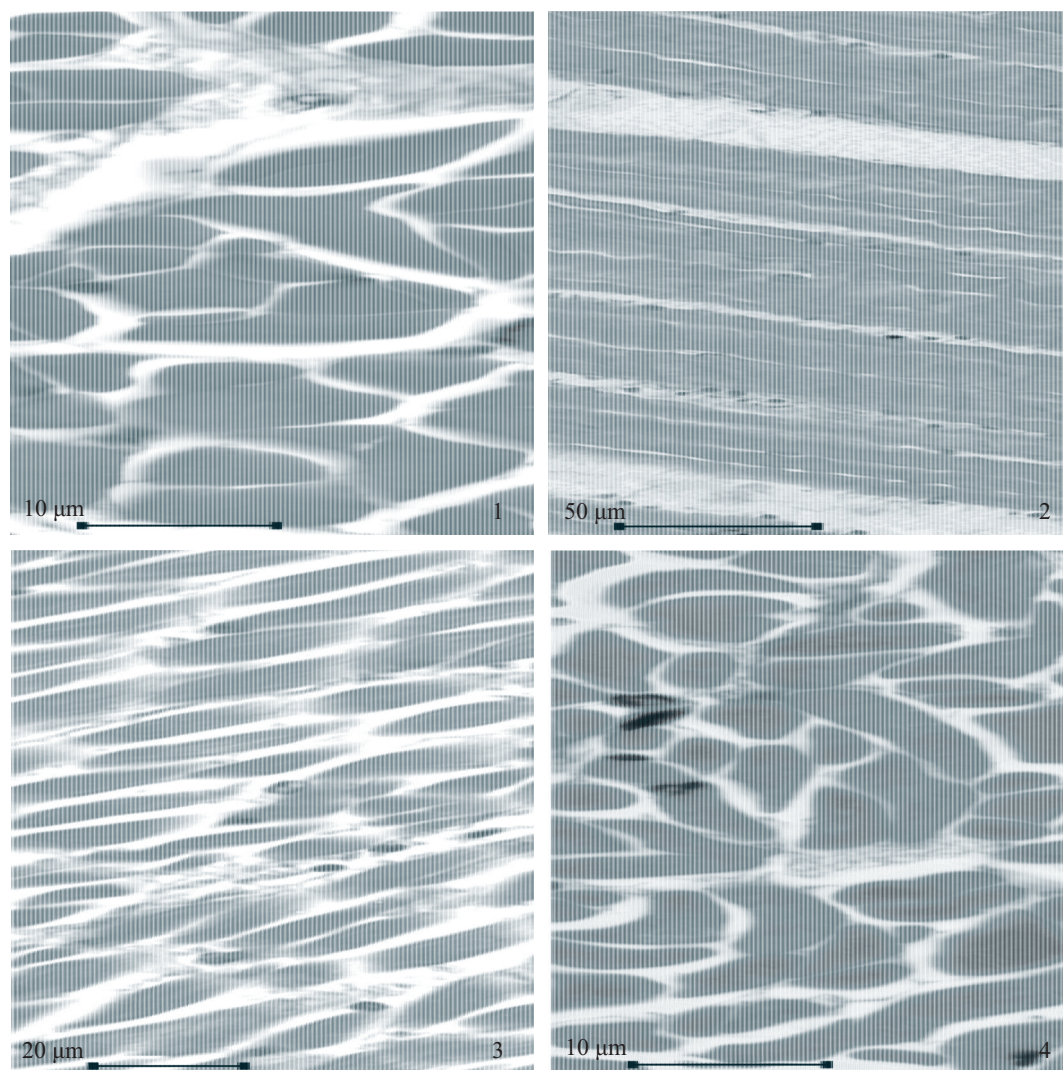
ATPase染色原理为肌球蛋白水解ATP产生磷酸,磷酸根与钙离子结合为磷酸钙沉淀,再依次被置换为磷酸钴和硫化钴,沉淀附着在肌球蛋白头部,染色深浅会由于肌纤维收缩速度以及ATPase活性的差异而不同,因此能够反映肌纤维的收缩特性。本实验中ATPase染色结果显示长牡蛎闭壳肌平滑肌肌纤维染色浅或基本不着色,表明平滑肌中ATPase活性较弱,收缩速度慢,主要是I型肌纤维(图版 III -3);横纹肌肌纤维染色深,呈黑褐色,表明横纹肌ATPase活性强,收缩速度快,主要是II型肌纤维(图版 III -4)。

## 3 讨论

长牡蛎闭壳肌由平滑肌和横纹肌两种肌肉类型组成,平滑肌和横纹肌分别分布在闭壳肌的不同部位,二者存在表观形态、肌纤维结构以及代谢收缩特性等方面的差异。本实验通过石蜡切片H.E染色和冰冻切片酶组织化学染色相结合,研究了长牡蛎闭壳肌肌纤维的组织学特征、代谢和收缩特性。

本实验采用石蜡切片方法观察长牡蛎闭壳





图版 I 长牡蛎闭壳肌平滑肌和横纹肌组织切片

1. 横纹肌横切; 2. 横纹肌纵切; 3. 平滑肌纵切; 4. 平滑肌横切; 黑色箭头表示横纹, 蓝色箭头表示细胞核

**Plate I Histological sections of smooth and striated muscles in *C. gigas* adductor**

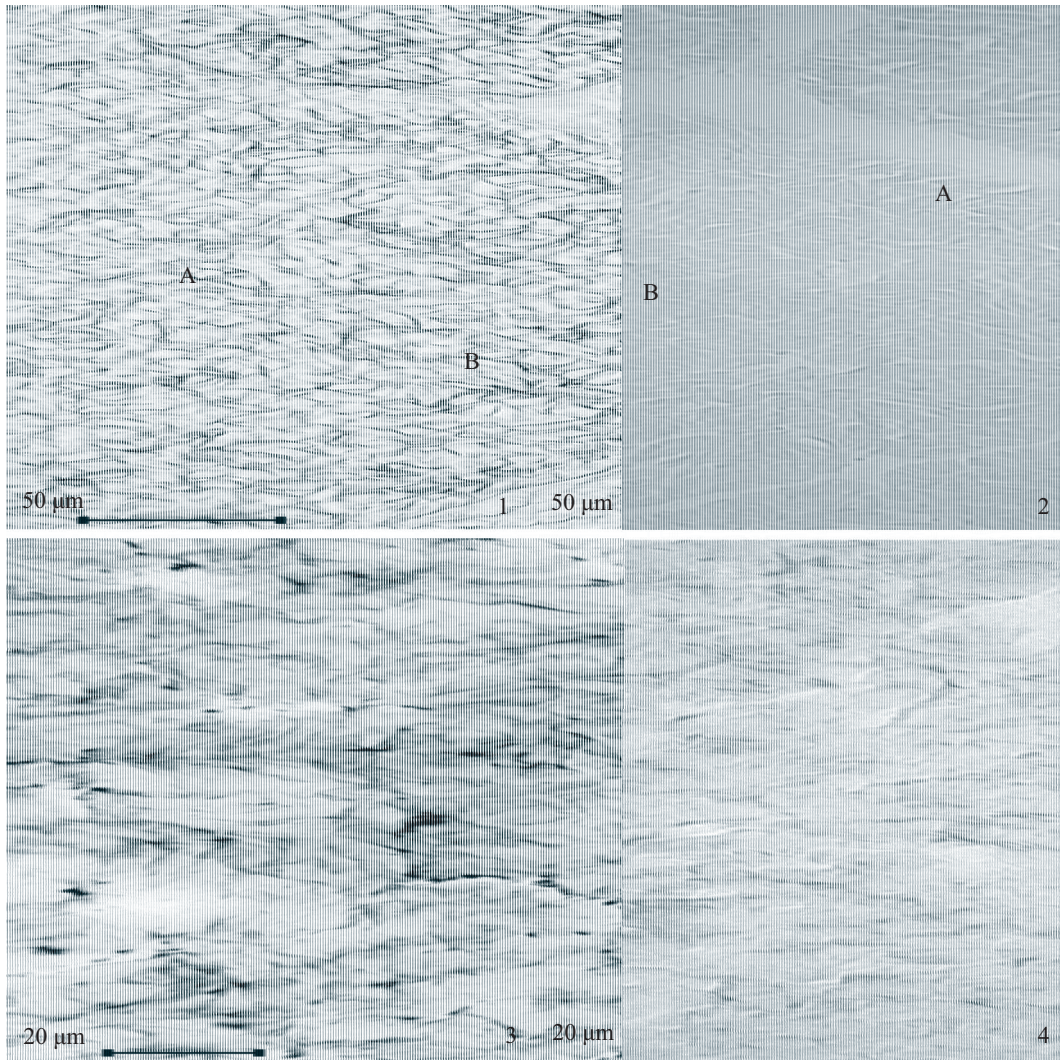
1. transverse sections of striated muscle; 2. longitudinal sections of striated muscle; 3. longitudinal sections of smooth muscle; 4. transverse sections of smooth muscle; black arrows represent the striated structure, blue arrow represents the nucleus

肌纤维形态, 研究结果表明长牡蛎闭壳肌中横纹肌纤维呈现横纹结构, 平滑肌呈长梭形、无横纹、成层或成束分布。这一形态特征与其他贝类肌纤维形态特征类似, 如Audino等<sup>[13]</sup>对狮爪扇贝(*Nodipecten nodosus*)幼虫和成体的肌肉分化发育研究中发现扇贝闭壳肌横纹肌横纹结构明显, 平滑肌成束或成层分布; Twarog等<sup>[14]</sup>研究紫贻贝(*Mytilus edulis*)前闭壳肌组织学特性时发现其平滑肌纤维聚集成束分布。但是与狮爪扇贝闭壳肌横纹肌不同的是, 长牡蛎闭壳肌横纹肌的横纹结构与肌纤维并不是垂直排列, 而是存在一定的角度。Hanson等<sup>[11]</sup>在对葡萄

牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)闭壳肌纤维结构的研究中也发现, 横纹肌中横纹结构与肌纤维呈一定角度排列, 并观察到双斜纹现象。本实验并未在长牡蛎闭壳肌横纹肌中观察到双斜纹现象, 这可能跟肌肉的收缩状态有关。葡萄牙牡蛎横纹肌纤维中明、暗带的产生会随着肌肉收缩或伸展的程度变化而变化<sup>[11]</sup>。

动物肌纤维直径和密度是形态学角度上描述肌肉品质的一个重要特征, 脊椎动物肌纤维直径大小为10~100 μm<sup>[15]</sup>。Ayala等<sup>[16]</sup>研究报道鱼类中肌纤维直径越小, 肌肉硬度越大, 即肌纤维直径与肌肉硬度呈负相关; 林婉玲等<sup>[17]</sup>研究表





图版 II 长牡蛎闭壳肌NADH-TR组织化学染色

1. 平滑肌和横纹肌交联横切, A是平滑肌, B是横纹肌; 2. 阴性对照, A为平滑肌, B为横纹肌; 3. 平滑肌横切; 4. 横纹肌横切

**Plate II NADH-TR histochemical staining of muscle fibers in *C. gigas* adductor**

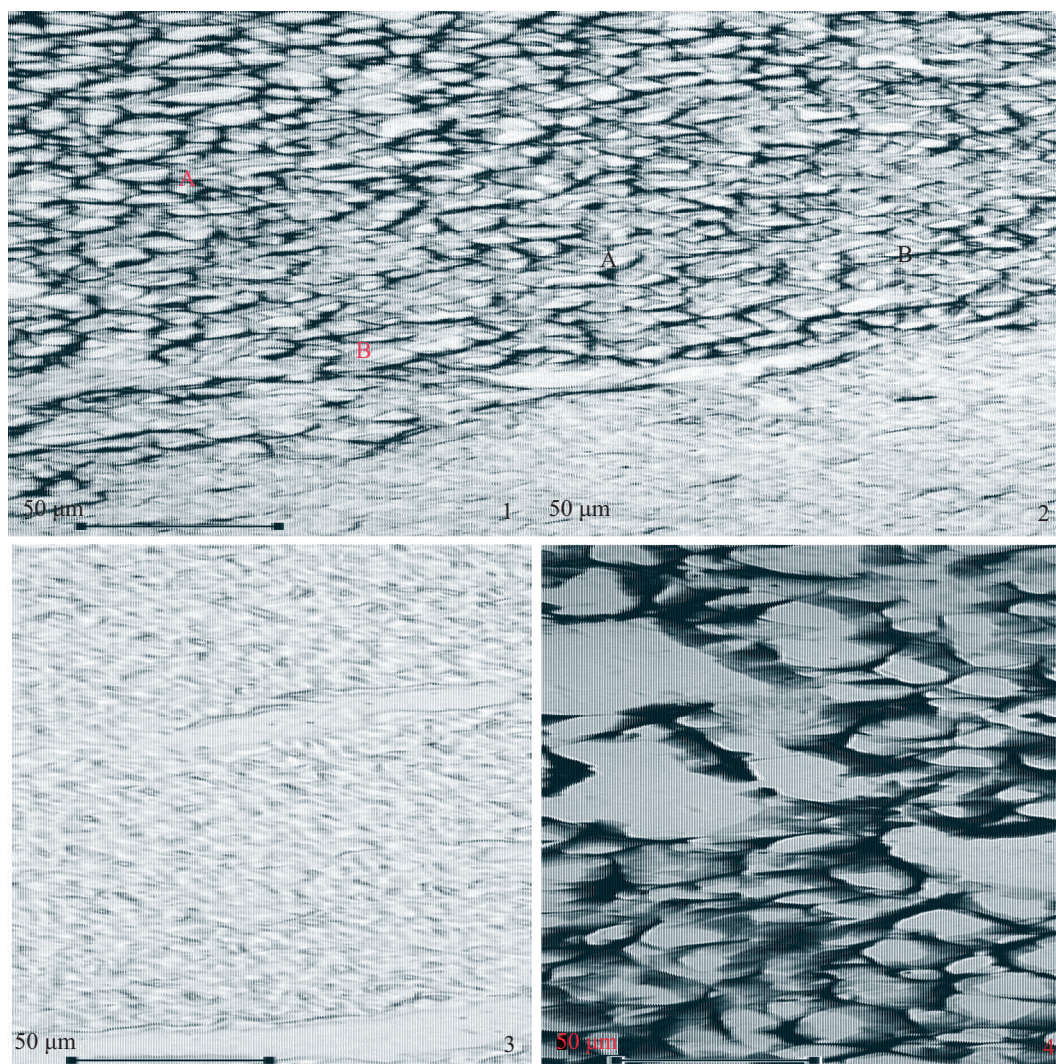
1. transection of adjacent smooth and striated muscle, A indicate smooth muscle, B indicate striated muscle; 2. negative control, A indicate smooth muscle, B indicate striated muscle; 3. transection of smooth muscle; 4. transection of striated muscle

明草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肌纤维密度与直径成负相关, 与肌肉硬度成正相关。本实验中长牡蛎闭壳肌横纹肌肌纤维直径显著大于平滑肌肌纤维直径, 平滑肌肌纤维密度显著低于横纹肌密度, 因此推断长牡蛎闭壳肌中平滑肌的硬度高于横纹肌。这在其他贝类中也有所报道, 如扇贝闭壳肌中平滑肌硬度高于横纹肌<sup>[18]</sup>。

根据肌肉的代谢及收缩特性, 可以将肌纤维分为氧化代谢的慢速收缩型肌纤维和糖酵解代谢的快速收缩肌纤维<sup>[19]</sup>。对代谢途径和收缩过程中发挥重要作用的酶进行组织化学染色, 可以将不同类型肌纤维区分开, 这些酶包括SDH、

NADH、MDH以及ATPase等<sup>[20]</sup>。Brooke等<sup>[21]</sup>利用ATPase染色方法可将肌纤维分成I型(慢速氧化型)、IIA型(快速氧化型)和IIB(快速酵解型)型三种收缩类型。Aguiar等<sup>[22]</sup>利用NADH-TR染色法对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus* GIFT)肌纤维进行分型, 将其分为氧化代谢型和无氧糖酵解型肌纤维。目前关于肌纤维分型研究常将ATPase染色和NADH-TR酶染色两种方法相结合, 从肌纤维的收缩和代谢特性两个方面对肌纤维进行分型, 从而相互验证。Roy等<sup>[23]</sup>采用ATPase和NADH染色对太平洋蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*)肌纤维类型进行研究, 结果表明NADH染色较深





图版 III 长牡蛎闭壳肌ATPase组织化学染色

1. 平滑肌和横纹肌交联横切, A是横纹肌, B是平滑肌; 2. 阴性对照, A为横纹肌, B为平滑肌; 3. 平滑肌横切; 4. 横纹肌横切

**Plate III ATPase histochemical staining of muscle fibers in *C. gigas* adductor**

1. transection of adjacent smooth and striated muscle, A indicate striated muscle, B indicate smooth muscle; 2. negative control, A indicate striated muscle, B indicate smooth muscle; 3. transection of smooth muscle; 4. transection of striated muscle

的肌纤维, 其ATPase染色较浅; ATPase染色较深的肌纤维, 其NADH染色结果较浅。

本实验中长牡蛎闭壳肌NADH-TR染色结果显示平滑肌染色较深, 这与平滑肌主要负责贝壳长时间保持关闭状态<sup>[11]</sup>、主要进行有氧代谢、NADH含量丰富的特性相一致, 表明平滑肌中主要是I型肌纤维; 横纹肌染色较浅, 与横纹肌主要负责贝壳快速开闭<sup>[11]</sup>、主要进行无氧糖酵解代谢的特性相符合的, 说明横纹肌主要是II型肌纤维。脊椎动物中骨骼肌根据收缩速度不同, 可分为快肌和慢肌两种类型, 其中快肌收缩速度快, 通过无氧代谢途径供应能量, 易疲劳; 慢

肌收缩速度慢, 通过有氧代谢途径进行供能, 不易疲劳<sup>[24]</sup>。牡蛎中, 横纹肌未出现收缩功能的分化, 而横纹肌的收缩特性及代谢类型与脊椎动物的快肌类似, 平滑肌的收缩特性及代谢类型与脊椎动物的慢肌类似。

ATPase染色结果反映了长牡蛎闭壳肌平滑肌和横纹肌的收缩速度以及ATPase活性的差异, 横纹肌染色较深, 平滑肌染色较浅, 说明横纹肌中主要是II型肌纤维, 平滑肌中主要是I型肌纤维, 这与横纹肌收缩速度快、平滑肌收缩速度慢相一致<sup>[11]</sup>, 同时也说明长牡蛎闭壳肌横纹肌中肌球蛋白含量及ATPase活性高于平滑肌。Nishita

等<sup>[25]</sup>对虾夷扇贝(*Chlamys nipponensis akazara*)平滑肌和横纹肌中肌球蛋白含量的研究中也得到类似结论。此外, ATPase染色结果受pH影响较大, Guth等<sup>[26]</sup>提出了ATPase酸碱孵育法, 分别在pH为10.4和4.4的溶液中孵育组织, 使遇酸失活的I型肌纤维和遇碱失活的II型肌纤维染上相反的颜色, 从而提高分辨率。但Johnston等<sup>[27]</sup>发现在酸性处理下, 快慢肌会失活, 从而导致染色失败, 而直接孵育(pH为中性)能够区分出斑马鱼(*Danio rerio*)的快慢肌。本实验在对长牡蛎闭壳肌的ATPase染色过程中, 采用直接孵育的方法, 能够成功区分平滑肌和横纹肌。

### 参考文献:

- [1] 邓时铭, 廖伏初, 蒋国民, 等. 影响养殖过程中水产动物肉质的主要因素[J]. 动物营养学报, 2011, 23(1): 15-19. Deng S M, Liao F C, Jiang G M, *et al.* The major factors influencing meat quality of aquatic animals during cultivation[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(1): 15-19(in Chinese).
- [2] Pette D, Staron R S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles[J]. Histochemistry and Cell Biology, 2001, 115(5): 359-372.
- [3] Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance[J]. Physiological Reviews, 1996, 76(2): 371-423.
- [4] 王庆志, 李琪, 刘世凯, 等. 长牡蛎成体生长性状的遗传参数估计[J]. 中国水产科学, 2012, 19(4): 700-706. Wang Q Z, Li Q, Liu S K, *et al.* Estimates of genetic parameters for growth-related traits in adult *Crassostrea gigas*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(4): 700-706(in Chinese).
- [5] 王如才, 王昭萍, 张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1993: 186. Wang R C, Wang Z P, Zhang J Z, Seafish shellfish farming[M]. Qingdao: Qingdao Ocean University Press, 1993: 186 (in Chinese).
- [6] Poulet S A, Lennon J F, Plouvenez F, *et al.* A nondestructive tool for the measurement of muscle strength in juvenile oysters *Crassostrea gigas*[J]. Aquaculture, 2003, 217(1-4): 49-60.
- [7] Fujiwara T, Aoki H, Ishikawa T, *et al.* Simple selection of pearl oysters *Pinctada fucata martensii* with strong shell-closing strength using near-infrared spectroscopy[J]. Aquaculture Science, 2010, 58(2): 253-259.
- [8] Li Q, Liu W G, Shirasu K, *et al.* Reproductive cycle and biochemical composition of the Zhe oyster *Crassostrea plicatula* Gmelin in an eastern coastal bay of China[J]. Aquaculture, 2006, 261(2): 752-759.
- [9] Millman B M. Contraction in the opaque part of the adductor muscle of the oyster (*Crassostrea angulata*)[J]. The Journal of Physiology, 1964, 173(2): 238-262.
- [10] Millman B M. Mechanisms of contraction in molluscan muscle[J]. American Zoologist, 1967, 7(3): 583-591.
- [11] Hanson J, Lowy J. The structure of the muscle fibres in the translucent part of the adductor of the oyster *Crassostrea angulata*[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 1961, 154(955): 173-196.
- [12] 殷亚杰, 聂春雨, 刘伟石, 等. 马鹿肌肉组织学特征与肉质关系的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(35): 51-54. Yin Y J, Nie C Y, Liu W S, *et al.* The study on relationship of muscle histological characteristics to meat quality of red deer[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(35): 51-54(in Chinese).
- [13] Audino J A, Marian J E A R, Kristof A, *et al.* Inferring muscular ground patterns in bivalvia: Myogenesis in the scallop *Nodipecten nodosus*[J]. Frontiers in Zoology, 2015, 12(1): 34.
- [14] Twarog B M, Dewey M M, Hidaka T. The structure of *Mytilus* smooth muscle and the electrical constants of the resting muscle[J]. The Journal of General Physiology, 1973, 61(2): 207-221.
- [15] Choi Y M, Kim B C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality[J]. Livestock Science, 2009, 122(2-3): 105-118.
- [16] Ayala M D, Albors O L, Blanco A, *et al.* Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing[J]. Aquaculture, 2005, 250(1-2): 215-231.
- [17] 林婉玲, 杨贤庆, 李来好, 等. 脆肉鲩质构与感官评价的相关性研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(1): 1-7, 72. Lin W L, Yang X Q, Li L H, *et al.* Research of relationship between texture and sensory evaluation of crisp grass carp[J]. Modern Food Science & Technology, 2013, 29(1): 1-7, 72(in Chinese).
- [18] Chantler P D. Scallop adductor muscles: Structure and function[J]. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, 2006, 35: 229-316.
- [19] Ashmore C R, Doerr L. Comparative aspects of muscle



- fiber types in different species[J]. *Experimental Neurology*, 1971, 31(3): 408-418.
- [20] Peter J B, Barnard R J, Edgerton V R, *et al.* Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits[J]. *Biochemistry*, 1972, 11(14): 2627-2633.
- [21] Brooke M H, Kaiser K K. Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: The nature of their pH lability and sulfhydryl dependence[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1970, 18(9): 670-672.
- [22] Aguiar D H, Barros M M, Padovani C R, *et al.* Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet[J]. *Journal of Fish Biology*, 2005, 67(5): 1287-1298.
- [23] Roy B C, Ando M, Nakatani M, *et al.* Muscle fiber types, growth and development in the whole myotome of cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*[J]. *Fisheries Science*, 2012, 78(2): 471-483.
- [24] Akolkar D B, Kinoshita S, Yasmin L, *et al.* Fibre type-specific expression patterns of myosin heavy chain genes in adult torafugu *Takifugu rubripes* muscles[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2010, 213(1): 137-145.
- [25] Nishita K, Ojima T, Watanabe S. Myosin from striated adductor muscle of *Chlamys nipponensis akazara*[J]. *Journal of Biochemistry*, 1979, 86(3): 663-673.
- [26] Guth L, Samaha F J. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase[J]. *Experimental Neurology*, 1970, 28(2): 365-367.
- [27] Johnston I A, Patterson S, Ward P, *et al.* The histochemical demonstration of myofibrillar adenosine triphosphatase activity in fish muscle[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 1974, 52(7): 871-877.

## Histological studies on the muscle fibers of *Crassostrea gigas* adductor

LI Huijuan, YU Hong\*, LI Qi

(Key Laboratory of Mariculture of Ocean University of China, Ministry of Education, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Paraffin embedded tissue section and hematoxylin-eosin staining were used to investigate the morphological characteristics of smooth and striated adductor muscles in *Crassostrea gigas*. Muscle fibers were stained histochemically for NADH-diaphorase and adenosine triphosphatase activity (ATPase) to identify fiber types in smooth and striated muscles. The morphological characteristics of myofibers within smooth and striated muscles were compared by quantifying muscle diameter and cross-sectional area. Muscle fiber diameter in smooth muscle (5.97  $\mu\text{m}$ ) was significantly smaller than that in striated muscle (7.41  $\mu\text{m}$ ) ( $P < 0.05$ ). Muscle fiber density of smooth muscle (25 485.65 $\pm$ 3917.807 n/mm<sup>2</sup>) was significantly higher than that in striated muscle (16 908.25 $\pm$ 3917.807 n/mm<sup>2</sup>). The cross-sectional area of myofibers in striated muscle (40.45  $\mu\text{m}^2$ ) was significantly greater than that in smooth muscle (26.25  $\mu\text{m}^2$ ,  $P < 0.05$ ). The result of NADH-TR histochemistry showed that the myofibers in smooth muscle were slow oxidative fibers (type I), as indicated by positive blue react unstained by NADH-TR. ATPase histochemistry revealed that fibers in striated muscle were intensively stained and the fibers was type II with a high ATPase activity. The fibers in smooth muscle were lightly stained or unstained, suggesting the fibers were type I. The results of ATPase/NADH-TR staining were consistent. In this study, we firstly illustrated the morphological characteristics of myofibers in smooth and striated adductor muscles of *C. gigas*, and compared the differences in contraction and metabolic profiles between smooth and striated muscles. This research not only provides important information for in-depth studies on biological characteristics of muscle fibers in *C. gigas*, but also provides theoretical basis for improving the meat quality of molluscs.

**Key words:** *Crassostrea gigas*; adductor; muscle fiber; NADH-TR; ATPase

**Corresponding author:** YU Hong. E-mail: hongyu@ouc.edu.cn

**Funding projects:** Taishan Scholar Seed Industry Experts Plan Project; National Marine Public Welfare Research Program (201305005); Shandong Seed Project, and Shandong Province (2014GHY115002)