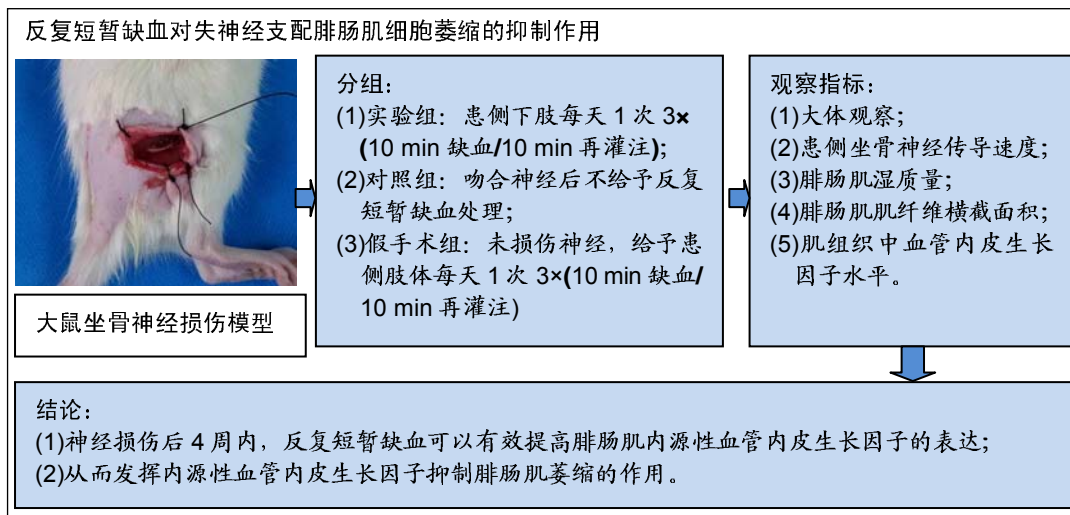


# 反复短暂缺血可抑制坐骨神经损伤模型大鼠失神经支配的腓肠肌萎缩

周晓彬<sup>1</sup>, 王 东<sup>2</sup>, 林朋朝<sup>1</sup>, 高伟静<sup>1</sup>, 姬艳林<sup>1</sup>, 祁 欢<sup>3</sup>, 李 静<sup>4</sup>, 周君琳<sup>2</sup> (石家庄市第三医院, <sup>1</sup>创伤三科, <sup>3</sup>创伤二科, 河北省石家庄市 050000; <sup>2</sup>首都医科大学附属北京朝阳医院创伤骨科, 北京市 100008; <sup>4</sup>河北省老年病医院中医科, 河北省石家庄市 050000)  
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1311 ORCID: 0000-0002-0202-4503(周晓彬)

文章快速阅读:



周晓彬, 女, 1979年生, 河北省石家庄市人, 汉族, 2018年首都医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事周围神经损伤修复, 骨与关节损伤修复的研究。

通讯作者: 周君琳, 博士, 主任医师, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院创伤骨科, 北京市 100008

文献标识码: B

稿件接受: 2019-03-23



## 文题释义:

**反复短暂缺血:** 即短暂的重复缺血后, 可以增强组织、器官对缺血的耐受性, 可将缺血耐受形象的称为“置于死地而后生”。大自然创造了许多天然的缺血适应模型。例如在自然界中, 适应极端恶劣的条件如低氧或无氧的现象本身就是耐受模型, 另外, 冬眠也是一种适应极度低灌注损伤的耐受现象, 因此可以将缺血耐受看作是自然界进化的保守形式。

**血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF):** 是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子, 可在体内诱导血管新生, 由于 mRNA 不同的剪切方式, 产生出分别 VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF185、VEGF206 等至少 5 种蛋白形式, 其中 VEGF121、VEGF145、VEGF165 是分泌型可溶性蛋白, 能直接作用于血管内皮细胞促进血管内皮细胞增殖, 增加血管通透性。

## 摘要

**背景:** 既往实验表明反复短暂缺血可以诱导肌肉的缺血耐受, 达到营养靶器官的作用。

**目的:** 探讨反复短暂缺血对坐骨神经损伤模型大鼠失神经支配腓肠肌细胞萎缩的抑制作用。

**方法:** 60 只 8 周龄 SD 大鼠, 由北京维通利华动物技术有限公司提供, 实验过程得到首都医科大学动物实验伦理委员会批准(伦理号 AEEI-2017-055)。随机将大鼠分为 3 组, 实验组和对照组大鼠均建立坐骨神经损伤模型, 实验组患侧下肢给予每天 1 次 3×(10 min 缺血/10 min 再灌注); 对照组: 吻合神经后不给予反复短暂缺血处理; 假手术组: 未损伤神经, 给予患侧肢体每天 1 次 3×(10 min 缺血/10 min 再灌注)。比较 2 周及 4 周时 3 组间腓肠肌湿质量维持率, 腓肠肌苏木精-伊红染色, 坐骨神经电生理及 ELISA 测定腓肠肌内血管内皮生长因子的含量。

**结果与结论:** ①电生理显示 4 周时实验组与对照组均未检测到腓肠肌的动作电位及潜伏期; ②腓肠肌湿质量维持率检测结果显示实验组较对照组明显增加( $P < 0.05$ ), 假手术组优于实验组和对照组( $P < 0.01$ ); ③腓肠肌纤维横截面积结果显示实验组肌纤维化较对照组明显减轻( $P < 0.05$ ); ④ELISA 检测结果显示实验组及假手术组腓肠肌内血管内皮生长因子含量均显著高于对照组( $P < 0.05$ ); ⑤结果说明, 神经损伤后 4 周内, 反复短暂缺血可以有效提高腓肠肌内源性血管内皮生长因子的表达, 从而发挥内源性血管内皮生长因子抑制腓肠肌萎缩的作用。

## 关键词:

反复短暂缺血; 腓肠肌; 血管内皮生长因子; 电生理; 肌萎缩; 坐骨神经损伤; 大鼠

中图分类号: R446; R318

## 基金资助:

河北省医学科学研究重点课题计划(20181060), 项目负责人: 周晓彬; 北京市科学技术委员会(Z16110000116080), 项目负责人: 周君琳

Zhou Xiaobin, MD, Associate chief physician, Associate professor, Third Department of Traumatology, Shijiazhuang Third Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Corresponding author: Zhou Junlin, MD, Chief physician, Professor, Department of Orthopedic Traumatology, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100008, China

## Repeated transient ischemia inhibits denervated gastrocnemius atrophy in rat models of sciatic nerve injury

Zhou Xiaobin<sup>1</sup>, Wang Dong<sup>2</sup>, Lin Pengzhao<sup>1</sup>, Gao Weijing<sup>1</sup>, Ji Yanlin<sup>1</sup>, Qi Huan<sup>3</sup>, Li Jing<sup>4</sup>, Zhou Junlin<sup>2</sup> (1Third Department of Traumatology, 2Second Department of Traumatology, Shijiazhuang Third Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China; 3Department of Orthopedic Traumatology, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100008, China; 4Department of Traditional Chinese Medicine, Hebei Provincial Geriatric Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Preliminary study has shown that repeated transient ischemia may induce muscle ischemia tolerance to enrich target organs.

**OBJECTIVE:** To investigate the inhibitory effect of repeated transient ischemia on atrophy of denervated gastrocnemius muscle cells in a rat model of sciatic nerve injury.

**METHODS:** Sixty Sprague-Dawley rats aged 8 weeks were provided by Beijing Weitong Lihua Animal Technology Co., Ltd., and the study was approved by the Laboratory Animal Ethics Committee of Capital Medical University, approval number: AEEI-2017-055. The rats were randomly divided into control group (sciatic nerve injury model), experimental group (sciatic nerve injury model plus 3x(10-minute ischemia/10-minute reperfusion) and sham group [3x(10-minute ischemia/10-minute reperfusion)]. The wet mass maintenance rate of gastrocnemius, hematoxylin-eosin staining of gastrocnemius, electrophysiology of sciatic nerve, and content of vascular endothelial growth factor in gastrocnemius detected by ELISA were compared among groups at 2 and 4 weeks.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Electrophysiology showed that neither experimental nor control groups presented action potential or latency at 4 weeks. (2) The wet mass maintenance rate of gastrocnemius in the experimental group was significantly increased compared with the control group ( $P < 0.05$ ), and the sham group was significantly superior to the experimental and control groups ( $P < 0.01$ ). (3) The cross-sectional area of gastrocnemius fibers in the experimental group was significantly decreased compared with the control group ( $P < 0.05$ ). (4) The content of vascular endothelial growth factor in gastrocnemius detected by ELISA in the experimental and sham groups was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). (5) These results suggest that within 4 weeks of nerve injury, the repeated transient ischemia can effectively improve the expression of endogenous vascular endothelial growth factor in gastrocnemius, thus inhibiting its atrophy.

**Key words:** repeated transient ischemia; gastrocnemius; vascular endothelial growth factor; electrophysiology; muscle atrophy; sciatic nerve injury; rats

**Funding:** the Hebei Provincial Key Program of Medical Science Research, No. 20181060 (to ZXB); the Science and Technology Commission of Beijing, No. Z16110000116080 (to ZJL)

## 0 引言 Introduction

周围神经横断损伤是临床上最为常见的一种神经损伤方式。神经的再生速度慢以及远端效应器的失神经退变仍是一个非常棘手的问题,是神经修复欠佳的主要原因。而如何延缓靶器官的萎缩是周围神经损伤修复需要迫切解决的瓶颈问题,目前延缓失神经肌肉萎缩的主要方法包括电刺激<sup>[1-2]</sup>、干细胞移植等<sup>[3]</sup>。

缺血预处理/缺血后处理是近年来提出的一种新的保护脏器方法,指短暂的一次或重复缺血后,可以增强组织、器官对缺血的耐受性。最近有学者报道,反复短暂缺血可以诱导肌肉的缺血耐受,增加肌肉的血流灌注及携氧能力以及促进神经生长因子的释放<sup>[4-5]</sup>,从而达到营养靶器官的作用。但反复短暂缺血是否可有效治疗失神经支配后的肌肉萎缩,尚无相关报道。实验通过建立大鼠坐骨神经横断损伤的动物模型,给予患侧肢体反复短暂缺血观察腓肠肌的萎缩情况及肌肉内相关因子的变化,以探讨其对失神经支配肌肉的保护作用,并进一步推断其可能的机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年11月至2017年5月在首都医科大学附属朝阳医院医学研究中心完成。

1.3 材料 成年8周龄雌性SD大鼠,北京维通利华动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006,共60只(清洁级),体质量在160-220 g,实验过程得到首都医科大学

动物实验伦理委员会批准(伦理号AEEI-2017-055),并遵守国家研究委员会护理和使用实验动物的指南(1996年修改)。实验前2周,将实验动物放置于动物房内,保持房间温度20-25℃,湿度(50±5)%,12 h昼夜更替及水和饲料充分供给。

### 1.4 实验方法

1.4.1 建立坐骨神经损伤模型 实验动物专用1%戊巴比妥钠(40-50 g/kg)行腹腔麻醉,麻醉满意后俯卧位固定大鼠,常规剃毛,消毒,铺无菌巾。全部大鼠均行右侧坐骨神经横断损伤模型,取坐骨结节至大腿外上方连线内1/3处一斜行切口,长约2 cm,于股二头肌和臀大肌之间显露坐骨神经。在坐骨神经盆腔出口与胫、腓总神经分叉之间约中点处以显微剪刀剪断坐骨神经。根据血管走行,在10倍手术显微镜下用10-0无损伤尼龙缝合线端端吻合合法等距离间断缝合神经外膜,均匀吻合8-10针(见图1)。并将显微缝合线留置于该手术区神经外膜作为标记,随后用无菌1-0 Pole线逐层关闭切口。上述所有手术操作均由同一实验员完成。术后于实验动物麻醉清醒后,分笼饲养,勤换垫料以防止足底溃疡发生。

1.4.2 实验分组及缺血后处理干预步骤 采用随机数字表法将大鼠分为3组,每组20只。①实验组:于术后第2天开始,患侧下肢(右)大腿根部给予每天1次(个循环/次),3×10 min缺血/10 min再灌注,共60 min,止血带压力为33.25-37.24 kPa;为保证缺血效果,止血带充气后肢体止血带以远做血管超声检查,示股动脉无血流经过;②对照

组:吻合神经后不给予缺血处理;③假手术组:未损伤神经,于术后第2天开始,给予右侧肢体每天1次(个循环/次), $3 \times 10 \text{ min}$ 缺血/ $10 \text{ min}$ 再灌注。

凡止血带进行缺血处理时大鼠均给予腹腔麻醉。

#### 实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	探讨反复短暂缺血对失神经支配腓肠肌细胞萎缩的抑制作用
借鉴已有标准实验动物造模:	参考文献[6]建立坐骨神经损伤大鼠模型
选择动物的条件:	①SD大鼠;②雌性;③成年8周龄;④体质量160-220g;⑤清洁级
动物来源及品系:	SD大鼠由北京维通利华动物技术有限公司提供
模型与所研究疾病的关系:	通过给予坐骨神经横断损伤模型大鼠患侧肢体反复短暂缺血,观察腓肠肌的萎缩情况及肌肉内相关因子的变化,以探讨其对失神经支配肌肉的保护作用
造模技术描述:	大鼠腹腔麻醉,行右侧坐骨神经横断损伤模型,取坐骨结节至大腿外上方连线内1/3处一斜行切口,显露坐骨神经,剪断坐骨神经,缝合神经外膜,关闭切口
动物数量及分组方法:	SD大鼠60只采用随机数字表法分为3组:实验组 $n=20$ ;对照组 $n=20$ ;假手术组 $n=20$
造模成功评价指标:	坐骨神经损伤模型的建立已经成熟 <sup>[6]</sup> ,实验证明利用坐骨神经离断后再于显微镜下进行吻合修复,能较好的反映出坐骨神经损伤的再生及靶器官失神经支配情况
造模后实验观察指标:	①各组大鼠大体观察;②大鼠患侧坐骨神经传导速度;③腓肠肌湿质量;④腓肠肌肌纤维横截面积;⑤肌组织中血管内皮生长因子水平
造模后动物处理:	造模后4周,麻醉后剥离大鼠双侧腓肠肌内外侧头,去除表面附带的皮下组织
伦理委员会批准:	实验过程得到首都医科大学动物实验伦理委员会批准(伦理号AEEI-2017-055)

## 1.5 主要观察指标

**1.5.1 大体观察** 术后至8周观察3组大鼠在实验过程中的一般情况变化,对术后大鼠的步态、体质量、食欲、伤口恢复,并重点观察术后患肢踝部、足部溃疡发生情况、后肢肌肉萎缩情况及后肢承重情况等。

**1.5.2 电生理检测大鼠患侧坐骨神经传导速度** 术后4周每组取4只大鼠,通过测量同一只大鼠坐骨神经吻合口前及吻合口后的腓肠肌电生理潜伏期,计算潜伏期时间差,通过公式计算再生坐骨神经的传导速度,作为衡量运动神经恢复情况的指标。具体操作如下:麻醉成功后,进行大鼠肢体妥善固定,右侧坐骨神经沿原切口暴露,显露坐骨神经约2.0 cm长,神经端端吻合处包括在内。同心针电极于踝关节上方1 cm处斜行呈45°角插入腓肠肌内,且方向与腓肠肌纤维方向一致,作为记录电极。接地电极置于大鼠尾部,双相钩电极分别放置在吻合神经远、近端,重复刺激3次(见图2),坐骨神经在单一电脉冲(100 ms, 5 mA)下依次通过吻合端,动作电位起点清楚后冻结图形,记录动作电位的潜伏期,并计算平均值。2次刺激电极之间的距离

用游标卡尺测量。再生神经的运动神经传导速度=远近端电极放置距离/远近端潜伏期时间差(mm/s)。

**1.5.3 测量腓肠肌湿质量** 术后2, 4周,每组取6只大鼠,深度麻醉后,自股骨内外侧髁部的腓肠肌肌肉起至止点跟腱处完整剥离双侧腓肠肌内外侧头,仔细去除表面附带的皮下组织,即刻用分析天平称质量并记录。湿质量维持率(%)=患侧腓肠肌湿质量/健侧腓肠肌湿质量。

**1.5.4 靶器官(腓肠肌)组织苏木精-伊红染色测定单位视野下肌纤维横截面积** 术后2, 4周,每组分别取6只大鼠,将其右侧腓肠肌标本于体积分数4%甲醛中固定24 h,乙醇梯度脱水后石蜡包埋,制备石蜡切片(4  $\mu\text{m}$ ),进行苏木精-伊红染色。于400倍光学显微镜下观察结果,选择有意义的组织相片,经登录、编号、采集、分析、读取数据、最后存盘。评估靶器官(腓肠肌组织)萎缩情况。每个样本选取4个随机视野,照相后采用Image J 1.8.0计算单位视野下肌纤维横截面积,取平均值。

**1.5.5 酶联免疫吸附试验测定肌组织中血管内皮生长因子水平** 各组术后2, 4周,每组取4只大鼠,应用血管内皮生长因子试剂盒(Cat#: ERC103欣博盛生物科技有限公司,深圳,中国)通过分光光度法测量患侧腓肠肌内血管内皮生长因子质量浓度,检测缺血后处理方法抑制腓肠肌萎缩的作用机制。取大鼠患侧腓肠肌0.2 g, 0.1 mol/L PBS冲洗后,放于2 mL 0.1 mol/L PBS中,匀浆器上混匀1 min后,配成混悬液,4 °C低温离心机,离心5 000  $\times g$  5 min,收集上清液立即分装后-80 °C冷冻保存。实验前20 min从冰箱中取出试剂盒,平衡至室温,按照指示盒说明书进行操作,最后放置于酶标仪上,于波长450 nm处分光光度计读取吸光度(A值)数据,再通过公式 $Y=kx+B$ 计算出被测样品的浓度。

**1.6 统计学分析** 全部数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据收集采用Excel 2010,处理采用SPSS 20.0统计学软件。统计分析采用单因素方差分析,组间比较采用Dunn's法, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义,柱状图采用GraphPad Prism 7.0处理,图像分析采用Image J 1.8.0图像处理系统。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用大鼠60只,分为3组,实验过程无脱失,全部进入结果分析。

**2.2 大鼠一般情况** 术后各组大鼠的伤口愈合良好,无感染及动物死亡。实验组及对照组大鼠在术后右后肢均跛行,表现为右侧踝关节丧失功能,踝下垂,趾屈曲。行走时表现为膝关节以下触地,且出现不同程度的足部溃疡。术后第3天对照组3只大鼠出现右足部溃疡,实验组4只大鼠右足跟部出现溃疡;实验组术后第3周大鼠足跟处溃疡完全愈合,术后第5周时对照组大鼠足部溃疡处完全愈合。术后实验组及对照组大鼠均出现右侧肢体完全瘫痪,右足足趾完全并拢,跖下垂、趾屈曲,行走时右下肢呈拖地行走状。

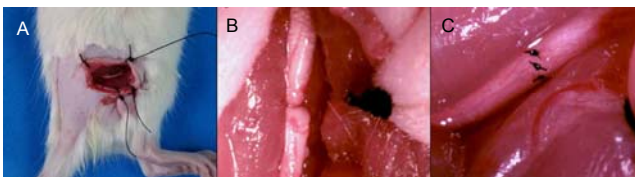
术后4周实验组腓肠肌明显饱满, 有弹性、色泽好; 对照组相对实验组恢复较差, 腓肠肌较瘦小, 肌纤维萎缩变细、色泽苍白。假手术组因为损伤神经, 行走活动及腓肠肌无明显改变。约于8周时2组停止恢复。

**2.3 电生理结果** 术后4周各组肌电图结果(见图3)显示, 于术后4周对患侧坐骨神经进行潜伏期测定, 假手术组神经传导速度为(45.0±3.2)m/s, 实验组及对照组均未测到神经的潜伏期, 说明神经尚未到达靶器官形成回路, 因此该结果并未进行统计学分析, 实验组与对照组无差异。

**2.4 腓肠肌湿质量** 术后2, 4周时, 大体观察可见, 各组患侧腓肠肌均明显萎缩, 色苍白, 弹性差, 对照组较重, 肌肉萎缩明显。称质量结果示腓肠肌对照组较实验

组肌肉质量明显增加, 统计分析显示腓肠肌湿质量维持率在术后2周及4周时实验组较对照组均明显升高( $P < 0.05$ ), 见图4。

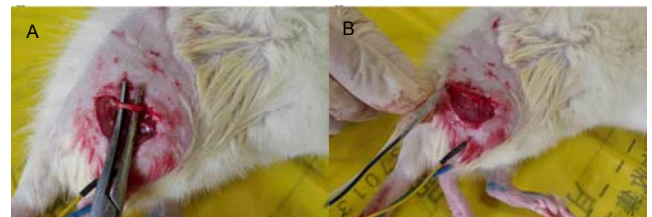
**2.5 腓肠肌苏木精-伊红染色结果** 光镜下观察可见, 随着时间延长, 腓肠肌细胞纤维化程度逐渐减轻, 2周及4周时实验组及对照组肌细胞的直径及截面积均较假手术组明显下降, 对照组腓肠肌细胞萎缩严重, 排列稀疏、不规则, 周围纤维结缔组织增生明显, 可见散在的炎性细胞浸润, 而实验组腓肠肌细胞萎缩较轻, 细胞质相对较饱满, 肌细胞结构排列规则、紧密、完整, 周围可见少量的纤维结缔组织增生。单位视野下平均肌纤维横截面积差异有显著意义( $P < 0.05$ ), 见图5。



图注: 图 A 于右侧切口进入充分暴露坐骨神经; B 显微镜下完全切断坐骨神经; C 延血管走形将坐骨神经进行无张力原位吻合。

图 1 于 4-10 倍体显微镜下吻合大鼠坐骨神经

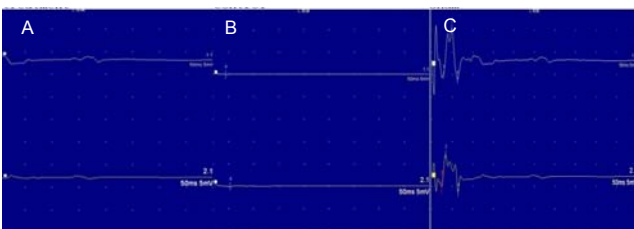
Figure 1 Rat sciatic nerve was anastomosed under microscope ( $\times 4-10$ )



图注: A 延原切口暴露坐骨神经吻合端, 长度大于 2 cm; B 安装电极, 同心电极置入腓肠肌内, 接地电极置于大鼠尾部, 双相钩电极分别放置在吻合神经远、近端, 间距大于 1 cm。

图 2 大鼠患侧坐骨神经电生理检测

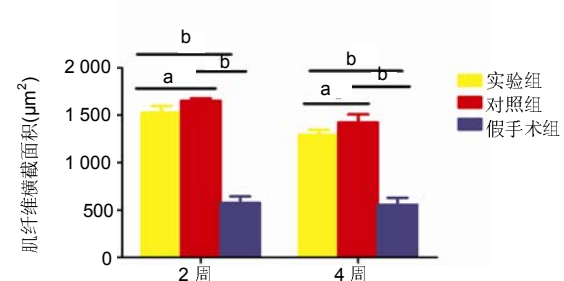
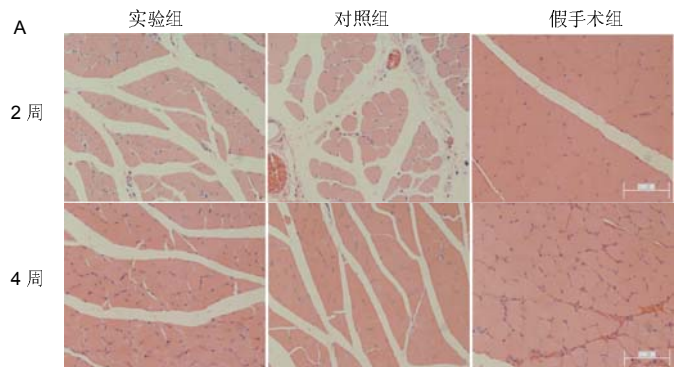
Figure 2 Electrophysiological detection of the rat affected sciatic nerve microscope



图注: 图 A 为实验组; B 为对照组; C 为假手术组。实验组及对照组均未检测到腓肠肌的动作电位及潜伏期, 表明坐骨神经尚未到达靶器官, 形成神经电生理传导回路。

图 3 术后 4 周各组大鼠电生理结果

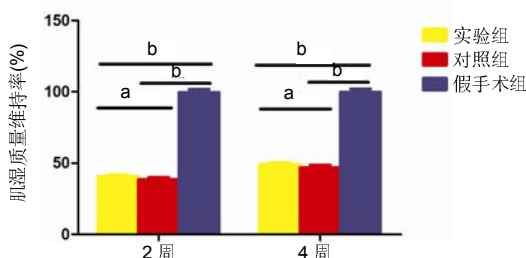
Figure 3 Electrophysiological results of rats in each group 4 weeks after surgery



图注: 图 A 为苏木精-伊红染色( $\times 200$ , 标尺=200  $\mu\text{m}$ ); 对照组肌肉间纤维结缔组织增生明显, 肌细胞萎缩较重, 肌肉失神经后再支配恢复差, 实验组腓肠肌肌纤维横截面积较对照组为优; B 为肌纤维横截面积统计学分析结果。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , 采用单因素方差分析( $n=6$ )。

图 5 术后 2, 4 周大鼠腓肠肌横断面的苏木精-伊红染色分析

Figure 5 Hematoxylin-eosin staining of cross-section of rat gastrocnemius at postoperative 2 and 4 weeks

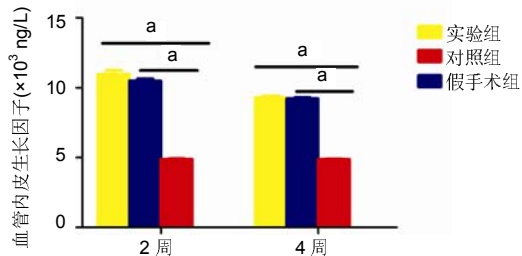


图注: 实验组较对照组肌湿质量维持率明显增加, 表明实验组腓肠肌的恢复优于对照组, 假手术组明显优于实验组及对照组, 因假手术组坐骨神经未受损伤, 其腓肠肌湿质量维持率与患侧相比接近 1。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , 采用单因素方差分析( $n=6$ )。

图 4 术后 2, 4 周大鼠腓肠肌湿质量维持率

Figure 4 Wet mass maintenance rate of rat gastrocnemius at postoperative 2 and 4 weeks

2.6 腓肠肌内血管内皮生长因子水平 实验2周及4周时腓肠肌内血管内皮生长因子含量在实验组中较对照组明显增加,假手术组虽未接受手术,但接受反复短暂缺血后血管内皮生长因子含量亦较对照组明显增高。但实验组与假手术组之间无统计学差异(见图6)。



图注:实验组及假手术组中腓肠肌内的血管内皮生长因子水平较对照组均明显增多,实验组及假手术组中血管内皮生长因子水平并无统计学差异。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , 单因素方差分析( $n=4$ )。

图6 各组术后2、4周大鼠肌组织内血管内皮生长因子水平的ELISA测定

Figure 6 Level of vascular endothelial growth factor in rat gastrocnemius detected by ELISA at postoperative 2 and 4 weeks

### 3 讨论 Discussion

在实验研究中,建立理想且合理的动物模型非常重要,关于坐骨神经损伤模型的建立已经成熟<sup>[6]</sup>,实验证明坐骨神经离断后再于显微镜下进行吻合修复,这一手术操作方法不仅简便易行,手术费用低廉,而且能较好的反映出坐骨神经损伤的程度。另外,反复短暂缺血方案的选择对实验的成功也至关重要。不同强度、持续时间及频率的缺血决定了损伤刺激的反应谱。反应谱即不同的刺激强度产生的机体应答反应,刺激太弱不足以引发缺血耐受反应,刺激太强导致凋亡或坏死,然而在凋亡和细胞坏死之间并没有明确的界限<sup>[7]</sup>,首先,刺激强度必须足够大,可以引起缺血反应,但又不能过于严重,否则将会造成永久性损伤<sup>[8]</sup>。目前大鼠研究中多采用1-5个循环/次,每循环5-10 min的缺血-再灌注模型<sup>[9-10]</sup>,课题前期已进行了反复短暂缺血促进大鼠骨折愈合的实验研究,并取得了肯定的结果<sup>[11]</sup>。该研究采用了3×10 min缺血/10 min再灌注的方法,所以作者继续选用这一方法进行缺血干预。

肌细胞正常形态结构的维持需要神经营养因子的作用,当肌肉失去神经支配后,导致肌肉形态结构、生理生化及新陈代谢等方面的改变<sup>[12]</sup>。在周围神经损伤的实验研究中,神经和肌肉都经历了退变的过程,因此需要寻找到既能促进神经再生又可以保护骨骼肌、减少肌细胞失神经萎缩的因子。有学者用生长激素治疗失神经支配后的肌肉萎缩,并取得了良好的效果<sup>[13]</sup>。血管内皮生长因子是神经营养因子的一种,有学者研究表明血管内皮生长因子与骨骼肌的卫星细胞相互作用,促进创伤后的肌细胞再生<sup>[14-16]</sup>。还有学者报道,血管内皮生长因子还具有抗凋亡和直接的

肌原性作用<sup>[14]</sup>,并且能够提高肌肉的恢复力,减少创伤后结缔组织的再生<sup>[16]</sup>。同时,血管内皮生长因子还可以通过血管生成、改善血供,肌肉内的新生血管又可以改善局部微循环,为肌细胞的增殖提供必须的营养物质,并保持肌细胞微环境的稳态<sup>[17]</sup>。

在此次实验中,2周及4周时腓肠肌湿质量及单位视野下腓肠肌肌纤维横截面积实验组均优于对照组,表明实验组腓肠肌肌纤维化低,肌细胞的恢复优于对照组,这一差异,可能由两方面因素产生,一方面是反复短暂缺血加速神经的再生<sup>[18]</sup>,使神经生长很快到达靶器官,发挥其营养肌肉的作用;另一方面,反复短暂缺血还可能通过上述原理直接作用于腓肠肌。因此进一步检测了腓肠肌内的血管内皮生长因子含量及神经电生理,以推断发挥作用的主要原因。

坐骨神经传导速度是衡量早期周围神经再生及判断神经损伤与功能恢复的可靠指标<sup>[19-20]</sup>,此次实验中,4周时实验组与对照组均未测得神经的潜伏期及动作电位,说明再生的坐骨神经尚未达到终板形成传导回路。因此肌肉仍旧处于失神经支配状态,尚未接受神经释放的神经营养因子的支持作用。同时,血管内皮生长因子检测结果也表明:实验组与假手术组无统计学差异,而两者均与对照组有显著差异,表明通过反复短暂缺血,可以有效提高腓肠肌产生内源性血管内皮生长因子的表达,上述2项结果共同说明伤后4周内,实验组与对照组腓肠肌纤维化程度及血管内皮生长因子水平的差异仅与反复短暂缺血作用于腓肠肌细胞有关,与其加速神经的再生作用无关。从而证明反复短暂缺血可以有效抑制靶器官的萎缩。

通过下肢的反复短暂缺血,在腓肠肌溶浆内实验组及假手术组均较对照组血管内皮生长因子水平增高,而血管内皮生长因子通过上述原理,可以有效加速肌肉的恢复,但在临床工作中,血管内皮生长因子等因子价格昂贵,且不易保存,用物理方法来诱导内源性血管内皮生长因子的产生,使得反复短暂缺血在临床应用更具潜力。

目前对缺血后处理作用机制的研究常是基于推测。有研究报告,其作用机制与血管内皮生长因子有关,研究表明,血管内皮生长因子是低氧诱导因子1靶基因之一,低氧诱导因子1 $\alpha$ 结构中存在氧依赖降解区(ODDD)结构域,在正常的氧浓度下,ODDD内部进行羟基化,促进低氧诱导因子1 $\alpha$ 与泛素连接酶相结合,最终通过泛素化-蛋白酶体途径被降解,而在缺氧或缺血条件下,细胞羟基化率降低,低氧诱导因子1 $\alpha$ 蛋白较为稳定,导致低氧诱导因子1 $\alpha$ 易位并积累到细胞核,在细胞核内,它与缺氧反应元素一起绑定在低氧诱导因子1 $\alpha$ 靶基因启动子或增强子的结合位点上<sup>[1-2]</sup>,当发生轻度缺氧或缺血时,如缺氧或缺血预处理,低氧诱导因子1 $\alpha$ 转录激活促进血管内皮生长因子表达,并通过上述机制发挥其加速神经修复的作用。

此次研究的不足之处在于:①缺少机制性研究:迄今

为止,反复短暂缺血对肌细胞影响的机制仍未能明确,推测可能与以下机制有关,如减轻炎症反应,抑制凋亡,减少氧自由基的形成,哪一个因子发挥的保护性作用还有待研究,今后,将进一步开展相关机制的纵深研究;②并未对腓肠肌内血管再生的情况进行观察,这可能是反复短暂缺血调控靶蛋白血管内皮生长因子上调,最终加速肌细胞再生的重要依据。

**作者贡献:** 周晓彬: 负责建立实验动物模型及撰写文章, 王东: 提取标本进行实验结果的测定, 记录实验结果并进行数据统计, 高伟静、姬艳林、祁欢、李静: 负责实验评估, 周君琳: 负责设计实验。实验采用双盲法评估。

**经费支持:** 该文章接受了“河北省医学科学研究重点课题计划(20181060)”“北京市科学技术委员会(Z16110000116080)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验过程得到首都医科大学动物实验伦理委员会批准(伦理号 AEEI-2017-055)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Bueno CRS, Pereira M, Favaretto IAJ, et al. Electrical stimulation attenuates morphological alterations and prevents atrophy of the denervated cranial tibial muscle. *Einstein*. 2017; 15(1):71-76.
- [2] Pinheiro-Dardis CM, Erbereli BT, Gigo-Benato D, et al. Electrical stimulation delays reinnervation in denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2017;56(6):E108-E118.
- [3] Farjah GH, Fazli F, Karimipour M, et al. The effect of bone marrow mesenchymal stem cells on recovery of skeletal muscle after neurotization surgery in rat. *Iran J Basic Med Sci*. 2018;21(3):236-243.
- [4] Paradis-Deschenes P, Joannis DR, Billaut F. Ischemic preconditioning increases muscle perfusion, oxygen uptake, and force in strength-trained athletes. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2016;41(9):938-944.
- [5] Neumann JT, Thompson JW, Raval AP, et al. Increased bdnf protein expression after ischemic or pkc epsilon preconditioning promotes electrophysiologic changes that lead to neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015 Jan;35(1):121-130.
- [6] Hsu ST, Yao CH, Hsu YM, et al. Effects of taxol on regeneration in a rat sciatic nerve transection model. *Sci Rep*. 2017;7:42280
- [7] Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci*. 2003;26(5): 248-254.
- [8] Zemke D, Smith JL, Reeves MJ, et al. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: An overview. *Neurotoxicology*. 2004; 25(6):895-904.
- [9] Lintz JA, Dalio MB, Joviliano EE, et al. Ischemic pre and postconditioning in skeletal muscle injury produced by ischemia and reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2013;28(6): 441-446.
- [10] Park UJ, Kim HT, Cho WH, et al. Remote ischemic preconditioning enhances the expression of genes encoding antioxidant enzymes and endoplasmic reticulum stress-related proteins in rat skeletal muscle. *Vasc Specialist Int*. 2016 Dec;32(4):141-149.
- [11] Liu Y, Wang D, Zhao Y, et al. Repetitive brief ischemia can promote bone healing in a rat tibia fracture model. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(11):20960-20967.
- [12] Ruven C., Wu W. Muscle atrophy following peripheral nerve injury and strategies to prevent it. In: Andres Costa E.V., editor. *Horizons in Neuroscience Research*. Volume 28 NOVA Science Publishers; Hauppauge, NY, USA: 2017.
- [13] Tuffaha SH, Budihardjo JD, Sarhane KA, et al. Growth hormone therapy accelerates axonal regeneration, promotes motor reinnervation, and reduces muscle atrophy following peripheral nerve injury. *Plast Reconstr Surg*. 2016; 137(6): 1771-1780.
- [14] Arsic N, Zacchigna S, Zentilin L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo. *Mol Ther*. 2004;10(5):844-854.
- [15] Frey SP, Jansen H, Raschke MJ, et al. Vegf improves skeletal muscle regeneration after acute trauma and reconstruction of the limb in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res*. 2012 Dec; 470(12):3607-3614.
- [16] Rissanen TT, Vajanto I, Hiltunen MO, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 (kdr/flk-1) in ischemic skeletal muscle and its regeneration. *m J Pathol*. 2002;160(4): 1393-1403.
- [17] Nishimoto H, Inui A, Ueha T, et al. Transcutaneous carbon dioxide application with hydrogel prevents muscle atrophy in a rat sciatic nerve crush model. *J Orthop Res*. 2018;36(6): 1653-1658.
- [18] Coban YK, Ciralik H, Kurutas EB. Ischemic preconditioning reduces the severity of ischemia-reperfusion injury of peripheral nerve in rats. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2006;1:2.
- [19] Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury*. 2005;36 Suppl 4:S24-29.
- [20] Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg*. 2000;8(4):243-252.