

被动训练促进失神经肌萎缩模型大鼠骨骼肌结构和功能的恢复

王世杨^{1,2}, 孙慧哲¹, 颜南¹, 王效杰¹, 张红心³, 关莉莉¹, 李汾杰¹, 王正东¹ (沈阳医学院基础医学院, 辽宁省沈阳市 110034; ²沈阳市红十字会医院, 辽宁省沈阳市 110034; ³沈阳医学院附属二院, 辽宁省沈阳市 110034)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2862 ORCID: 0000-0002-9303-8651(王世杨)

文章快速阅读:

文章特点一	文章描述了被动康复训练有助于失神经萎缩肌肉结构和功能的部分恢复, 降低炎症因子的水平, 可能防止肌肉的进一步萎缩, 提高骨骼肌的肌力。
SD 大鼠分组:	假手术组 模型组: 剪断坐骨神经制备失神经肌肉萎缩模型; 训练组: 造模+被动康复训练 2 个月。
检测指标:	(1)肌肉湿质量比; (2)BBB 评分; (3)肌纤维微细结构及横截面积; (4)腓肠肌肌动蛋白、肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 及白细胞介素 1β 表达。

王世杨, 男, 1992 年生, 河北省衡水市人, 汉族, 2017 年沈阳医学院毕业, 医师, 主要从事神经损伤机制的研究。

通讯作者: 王正东, 博士, 副教授, 沈阳医学院解剖学教研室, 辽宁省沈阳市 110034

文献标识码:A
投稿日期: 2020-02-25
送审日期: 2020-03-03
采用日期: 2020-03-30
在线日期: 2020-05-30



文题释义:

肌肉萎缩: 是指横纹肌营养不良, 肌肉纤维变细甚至消失等导致的肌肉体积缩小。多由肌肉本身疾患或神经系统功能障碍所致, 病因主要有: 神经源性肌萎缩、肌源性肌萎缩、失用性肌萎缩和其他原因性肌萎缩。肌肉营养状况除肌肉组织本身的病理变化外, 更与神经系统有密切关系。脊髓疾病常导致肌肉营养不良而发生肌肉萎缩。

肌卫星细胞: 是一类存在于肌细胞基底膜与肌膜之间的成体干细胞, 作为肌源性干细胞在肌肉组织损伤后, 能够在激活后发挥良好的增殖、分化能力, 在骨骼肌损伤的修复和再生过程中发挥重要作用。

摘要

背景: 炎症细胞或炎性因子参与失神经损伤后骨骼肌肌卫星细胞的增殖和分化, 在失神经骨骼肌肌组织病理过程中起着重要的作用。

目的: 研究被动康复训练对失神经萎缩大鼠骨骼肌结构、功能以及肌动蛋白和炎症因子表达的影响。

方法: 将 30 只 SD 大鼠平均分为假手术组、模型组和训练组, 模型组及训练组大鼠暴露坐骨神经并剪断, 假手术组只暴露而不剪断坐骨神经。造模后 2 个月始用自制滚筒对训练组大鼠进行被动康复训练 2 个月, 用肌肉湿质量比和 BBB 评分评估肌肉萎缩的程度及运动功能, 苏木精-伊红染色观察肌纤维微细结构及横截面积, 免疫组化染色检测各组腓肠肌肌动蛋白及肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 及白细胞介素 1β 表达。实验经沈阳医学院实验动物福利伦理委员会的审批, 批准文号为 SYYXY2015010601。

结果与结论: ①训练组 BBB 评分高于模型组; ②训练组腓肠肌湿质量高于模型组但肌纤维的横截面积却低于模型组($P < 0.001$, $P < 0.05$), 训练组腓肠肌肌动蛋白表达高于模型组($P < 0.001$); ③训练组炎症因子肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6 及白细胞介素 1β 的表达水平低于模型组($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$); ④结果说明, 被动训练有助于失神经萎缩肌肉结构和功能的恢复, 降低炎症因子的水平防止肌肉的进一步萎缩, 提高骨骼肌的肌力。

关键词:

被动训练; 神经; 失神经; 骨骼肌; 肌萎缩; 因子; 实验; 鼠

中图分类号: R446; R496; R318

基金资助:

2017 年辽宁省自然科学基金指导计划立项项目(20170540886), 项目负责人: 孙慧哲; 沈阳医学院大学生科研项目(20141032), 项目负责人: 王世杨

Wang Shiyang, Physician, School of Basic Medicine, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China; Shenyang Red Cross Hospital, Shenyang 110034, Liaoning Province, China

Corresponding author: Wang Zhengdong, MD, Associate professor, School of Basic Medicine, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China

Passive training improves the recovery of skeletal muscle structure and function in rats with denervated muscle atrophy

Wang Shiyang^{1,2}, Sun Huizhe¹, Yan Nan¹, Wang Xiaojie¹, Zhang Hongxin³, Guan Lili¹, Li Fenjie¹, Wang Zhengdong¹ (¹School of Basic Medicine, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China; ²Shenyang Red Cross Hospital, Shenyang 110034, Liaoning Province, China; ³Second Affiliated Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Inflammatory cells or inflammatory factors participate in the proliferation and differentiation of skeletal muscle satellite cells after denervation injury, and play an important role in the pathological process of skeletal muscle denervation.

OBJECTIVE: To study the effects of passive training on skeletal muscle structure, function and expression of Actin and inflammatory factors in rats with denervated muscle atrophy.

METHODS: Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group and training group. In the model group and the training group, the sciatic nerve was exposed and cut off the sciatic nerve, while the sciatic nerve in the sham operation group was exposed but not cut off. Two months after modeling, rats in the training group underwent passive rehabilitation training with self-made drum for 2 months, and then the degree of muscle atrophy and motor function were evaluated by muscle wet weight ratio and Basso, Beattie and Bresnahan score. The muscle fiber fine structure and cross-sectional area were observed by hematoxylin-eosin staining, and the expression of Actin, tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-1 β in each group was detected by immunohistochemical staining. The study protocol was approved by the Laboratory Animal Welfare Ethics Committee of Shenyang Medical College with the approval No. SYXY2015010601.

RESULTS AND CONCLUSION: The Basso, Beattie and Bresnahan score of the training group was higher than that of the model group. The wet weight ratio of the training group was higher than that of the model group; however, the cross-sectional area of the muscle fibers was lower than that of the model group ($P < 0.001$, $P < 0.05$). The expression of Actin in the training group was higher than that in the model group ($P < 0.001$), and the expression levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-1 β in the training group were lower than those in the model group ($P < 0.001$ or $P < 0.05$). To conclude, passive training can help to recover the muscle structure and function of denervated muscles, reduce the levels of inflammatory factors, prevent further muscle atrophy, and improve skeletal muscle strength.

Key words: passive training; nerve; denervated; skeletal muscle; muscle atrophy; factor; experiment; rat

Funding: the Natural Science Foundation of Liaoning Province in 2017, No. 20170540886 (to SHZ); Student Research Project of Shenyang Medical College, No. 20141032 (to WSY)

0 引言 Introduction

周围神经损伤的患者会显现出受损神经控制区域的感觉与运动功能障碍,同时骨骼肌失去神经的支配后发生相关蛋白及代谢酶活性的改变,逐渐萎缩并出现进行性纤维化,最终导致患者生活质量明显下降^[1-3]。目前认为失神经肌肉萎缩发生的原因主要有两点:一是肌营养不良导致肌组织蛋白变异引起萎缩;二是运动量突然减少导致肌肉组织退化。临床治疗上即使对周围神经进行修复,萎缩的骨骼肌仍很难恢复正常,而在萎缩肌肉恢复过程中,肌肉卫星细胞起着必不可少的作用^[4],其主要位于肌肉纤维基膜下,被激活后进行增殖分化,最终对损伤的肌肉进行修复。但是,在持续的慢性骨骼肌损伤过程中,骨骼肌中的肌肉卫星细胞很难继续通过增殖来修复损伤。

在真核细胞中,肌动蛋白含量非常丰富,作为肌肉细胞骨架的重要组成成分,有着极其重要的结构和功能。一般在体内肌动蛋白以球形肌动蛋白和纤维性肌动蛋白2种形式存在,它是骨骼肌参与肌肉收缩过程肌丝滑行功能中细肌丝构成的主要蛋白,参与完成机体的多种运动功能^[5]。炎症细胞或炎性因子参与失神经损伤后骨骼肌卫星细胞的增殖和分化,其中白细胞介素6作为一种经典的炎性因子,在失神经骨骼肌肌组织病理过程中起着重要的作用^[6-7]。实验首先制作失神经萎缩骨骼肌模型,然后进行被动康复训练,通过肌肉收缩关键蛋白以及重要的炎症因子等来研究康复训练对失神经萎缩骨骼肌结构和功能的影响,试图在分子水平上寻找肌肉萎缩的致病机制及提供治疗肌肉萎缩的理论支撑。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物模型实验。

1.2 时间及地点 2015年4月至2018年5月在沈阳医学院实验动物中心和中心实验室完成。

1.3 材料 30只雄性SD大鼠,四五周龄,体质量50-60 g,动物生产许可证SCXK(辽)2015-0001。实验经沈阳医学院实验动物福利伦理委员会的审批,批准文号为SYXY2015010601。将30只健康SD大鼠随机分成3组,每组10只,即假手术组、模型组和训练组。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠失神经肌肉萎缩模型的制作 按照3 mL/kg腹腔注射10%水合氯醛对大鼠进行麻醉,大鼠采取俯卧位固定,然后对手术区域进行剪毛和常规消毒,用消毒手术剪沿坐骨神经走行剪开大约1 cm的皮肤切口,用消毒止血钳钝性分离各层肌肉,直到暴露梨状肌下缘处白色坐骨神经。在距梨状肌下缘5 mm处剪去5 mm的坐骨神经,然后逐层缝合各层肌肉和皮肤,最后碘伏消毒^[7]。术后大鼠放入有加垫的笼中待苏醒。大鼠苏醒后分笼饲养,而假手术组进行处理时只显露坐骨神经,不剪切神经。术后七八周时模型组及训练组大鼠左侧肌群与正常侧相比出现明显萎缩,说明慢性失神经骨骼肌萎缩模型构建成功。

1.4.2 自制训练仪及康复训练 网状机械滚筒训练仪是由网格状铁丝构成的圆形滚筒,滚筒两头中央有伸出的轴承,轴承安装在支架上,滚筒可以自由地在支架上滚动,滚筒一侧开一个网格门,允许小动物进出,滚筒转动时侧门可以锁死。滚筒的底部可以同时容纳15只成年大鼠并列运动。在底部偏左后上悬空伸出一个金属电极,电极两侧都绝缘地固定在滚筒侧面网格上,其中一侧通过导线连接在12 V电池的正极,整个滚筒的铁丝连接12 V电池的负极,一旦大鼠停在底部不向前转动滚筒,就会被电刺激。

训练组大鼠在术后2个月开始进行康复训练,为期2个月。将大鼠放于网状机械滚筒式训练仪中,在电击刺激下,大鼠被动向电极相反的方向跑笼,跑笼的速度取决于训练组的整体速度,通过跑笼锻炼大鼠抓握、旋转及行走能力,

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	研究被动康复训练对失神经萎缩大鼠骨骼肌结构、功能以及肌动蛋白和炎症因子表达的影响
借鉴已有标准实施动物造模:	参考文献[7]制作大鼠失神经肌肉萎缩模型
动物来源及品系:	SD 大鼠由辽宁长生生物技术股份有限公司提供
模型与所研究疾病的关系:	首先制作失神经萎缩骨骼肌模型, 然后进行被动康复训练, 通过肌肉收缩关键蛋白以及重要的炎症因子等来研究康复训练对失神经萎缩骨骼肌结构和功能的影响, 试图在分子水平上寻找肌肉萎缩的致病机制及提供治疗肌肉萎缩的理论支撑
造模技术描述:	麻醉大鼠后, 沿坐骨神经走行剪开大约 1 cm 的皮肤切口, 分离各层肌肉, 暴露梨状肌下缘处白色坐骨神经。在距梨状肌下缘 5 mm 处剪去 5 mm 的坐骨神经, 然后逐层缝合各层肌肉和皮肤
动物数量及分组方法:	30 只 SD 大鼠随机分成 3 组, 每组 10 只: 假手术组、模型组和训练组
造模成功评价指标:	术后模型组及训练组肌肉瘫痪、BBB 运动功能评分差异明显, 七八周时大鼠左侧肌群与正常侧相比出现明显萎缩, 说明慢性失神经骨骼肌萎缩模型构建成功
造模后实验观察指标:	①大鼠后肢运动功能大鼠 BBB 运动功能评分; ②肌肉湿质量比; ③腓肠肌镜下结构; ④肌纤维横截面积; ⑤大鼠腓肠肌免疫组化染色结果
造模后动物处理:	康复训练 2 个月后, 麻醉各组大鼠, 采取心脏灌流生理盐水和多聚甲醛的方式处死, 并取大鼠两侧后肢腓肠肌, 待检测
伦理委员会批准:	实验经沈阳医学院实验动物福利伦理委员会的审批, 批准文号为 SYYXY2015010601

以上训练每周 5 d, 每天 30 min, 随着训练大鼠的康复, 该组整体运动速度日渐增加。

1.4.3 检测指标

(1)行为学BBB评分: 康复训练前以及训练后每隔2周采用Basso Beattie & Bresnahan (BBB)评分评价各组大鼠左后肢的运动功能^[8]。BBB评分共分为22级, 左后肢完全瘫痪无功能评为0分, 功能正常与健侧相同评为21分, 两者之间根据相应等级标准, 逐渐分别评定为1-20分。2名独立观察者按照BBB运动评定量表观察关节活动的次数和范围、运动负荷及范围, 以及左后肢的协调性。2名观察者采用双盲法对大鼠左后肢的运动功能进行评分和记录, 观察时间为4 min, 得分范围是从无肢体运动或体质量支持的0分到正常运动的21分, 取2名观察者评分的平均值进行统计学处理。

(2)取材及肌肉湿质量比检测: 康复训练2个月后, 各组大鼠腹腔注射3 mL/kg的体积分数10%水合氯醛麻醉, 采取心脏灌流生理盐水和多聚甲醛的方式处死并取各组大鼠两侧后肢腓肠肌。取材时大体观察双侧腓肠肌饱满度和萎缩度。观察后将其置于电子天平上称取肌湿质量, 以各自非手术侧作为对照, 计算各组大鼠的腓肠肌湿质量比。肌湿质量比=术侧腓肠肌湿质量/非术侧腓肠肌湿质量^[9]。

(3)腓肠肌苏木精-伊红染色及肌纤维横截面积检测:

40 g/L多聚甲醛固定腓肠肌标本, 放入30%蔗糖溶液中脱水直至沉底; 冰冻切片机速冻后按肌纤维的横、纵两个方向切片, 每片8-15 μm厚, 加适量体积分数95%乙醇脱水, 20 min后用PBS冲洗2次, 冲洗时间共2 min; 苏木精染液染色两三分钟, 自来水冲洗; 镜下观察苏木精染核的效果, 如细胞核颜色过深, 可用1%盐酸乙醇溶液分色几秒后, 用自来水充分冲洗; 放入伊红染液染色1 min, 自来水冲洗, 系列梯度乙醇脱水以及二甲苯透明, 中性树脂封固; 每组选取8张切片用100倍光学显微镜观察, 每张切片随机选取4个视野拍照, 经Image J图像分析软件扫描计算各组大鼠腓肠肌纤维的横截面积。

(4)免疫组织化学染色: 40 g/L多聚甲醛固定腓肠肌标本, 放入30%蔗糖溶液中脱水直至沉底; 常规冰冻切片制作肌组织横、纵切片, 链霉菌抗生素蛋白-过氧化酶免疫组织化学染色方法检测各组相关蛋白的表达, 按试剂盒说明书操作如下: ①PBS洗3次, 5 min/次; ②加过氧化物酶阻断液A灭活内源性酶, 室温下孵育10 min, PBS洗3次, 3 min/次; ③加非免疫性动物血清封闭液B, 室温下孵育10 min, 甩去血清, PBS洗3次, 3 min/次; ④加一抗Actin和肿瘤坏死因子α、白细胞介素6及白细胞介素1β)4 ℃过夜, PBS洗3次; ⑤加生物素标记的二抗, 在室温下孵育10 min, PBS洗3次; ⑥加链亲和素-过氧化物酶溶液D, 室温下孵育10 min, PBS洗3次, 3 min/次; ⑦加DAB显色1-5 min, 镜下观察待显色后自来水冲洗, 苏木精复染后镜下观察, 染色过深可用1%的盐酸乙醇分色, 系列浓度乙醇脱水, 中性树脂封固; ⑧免疫组化染色分析, 棕褐色为阳性染色区域, 不加一抗的阴性对照无棕褐色染色; ⑨各组选取8张切片, 每个切片在100倍视野中随机取4个视野, 然后采用Image J软件进行平均灰度值扫描, 各组结果分别与假手术组进行相对比较, 以(%)表示。

1.5 主要观察指标 ①大鼠后肢运动功能大鼠脊髓损伤评分; ②肌肉湿质量; ③腓肠肌镜下结构; ④肌纤维横截面积; ⑤腓肠肌免疫组化染色结果。

1.6 统计学分析 各组计量数据均采用SPSS 20.0软件进行统计学处理, 数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析进行组间数据比较, 方差齐时多组间两两比较均采用Bonferroni检验进行显著性分析, 方差不齐时采用Dunnett's T3检验进行显著性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。用GraphPad Prism 6.0软件绘制统计图。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠30只, 分为3组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 各组大鼠后肢运动功能大鼠脊髓损伤评分 实验成功造模后大鼠表现为左下肢立即瘫痪, BBB评分为0分。术后8周时以及康复训练后每隔2周, 采用BBB评分评价各组大鼠左后肢运动功能, 各组大鼠后肢关节活动次数、运动

负荷、伸展范围以及前后肢的协调度均有不同程度恢复，模型组和训练组大鼠BBB评分均有不同程度提高。4周时训练组和模型组两组BBB评分间差异无显著性意义($P > 0.05$)，但这两组BBB评分与假手术组相比，差异均有显著性意义($P < 0.001$)，之后各检测时间点训练组BBB评分较模型组明显改善提高($P < 0.001$)，两组BBB评分与假手术组相比差异有显著性意义($P < 0.001$)，见表1。

表1 各组大鼠BBB评分 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 1 Basso, Beattie and Bresnahan score in each group

术后时间(周)	假手术组	模型组	训练组
8	20.45±0.510	14.70±0.657 ^a	14.85±0.587 ^a
10	20.55±0.510	15.10±0.641 ^a	16.50±0.607 ^{ab}
12	20.40±0.503	15.45±0.605 ^a	16.80±0.616 ^{ab}
14	20.50±0.513	16.00±0.725 ^a	17.10±0.718 ^{ab}
16	20.55±0.510	16.20±0.768 ^a	17.80±0.523 ^{ab}

表注：与假手术组比较，^a $P < 0.001$ ；与模型组比较，^b $P < 0.001$

2.3 肌肉湿质量测量 模型组大鼠左侧腓肠肌与假手术组相比，饱满度明显降低，弹性减弱，色泽欠佳，呈肌萎缩。模型组大鼠腓肠肌湿质量比明显低于假手术组($P < 0.001$)，而训练组与模型组相比腓肠肌湿质量比增加($P < 0.001$)，也明显低于假手术组($P < 0.001$)，见图1。

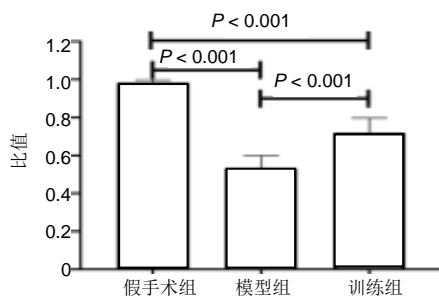
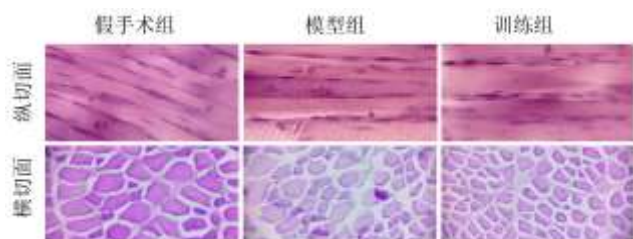


图1 各组腓肠肌湿质量比($\bar{x} \pm s, n=10$)

Figure 1 Wet weight ratio of the rat's gastrocnemius muscle in each group

2.4 各组大鼠腓肠肌镜下结构 各组腓肠肌横、纵截面结构清晰，颜色及形态均正常。与假手术组相比，模型组大鼠术侧腓肠肌纤维萎缩变小，也有少量融合变大，肌纤维粗细不均匀，肌纤维间隙扩大，且肌细胞趋向变圆。训练组肌细胞排列较模型组规整，肌纤维增粗变大的多于变细的，见图2。



图注：训练组肌细胞排列较模型组规整，肌纤维增粗变大的多于变细的
图2 各组腓肠肌镜下结构(苏木精-伊红染色，×100)

Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of the rat's gastrocnemius muscle in each group under microscopy (×100)

2.5 肌纤维横截面积测量结果 采用Image J图像分析系统对肌纤维横截面积进行测量，模型组大鼠术侧腓肠肌纤维横截面积明显低于假手术组($P < 0.05$)。训练组腓肠肌纤维横截面积低于模型组($P < 0.05$)，训练组肌纤维横截面积显著小于假手术组($P < 0.001$)，见图3。

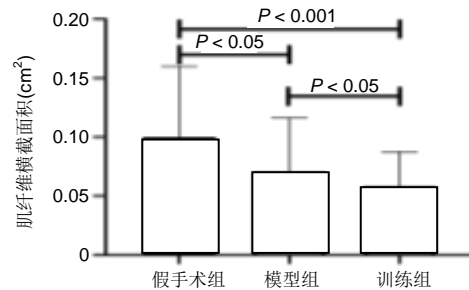
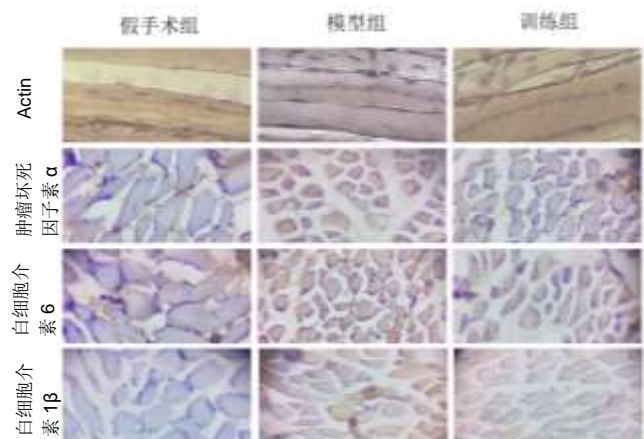


图3 各组大鼠腓肠肌横截面积相对比较

Figure 3 Comparison of the cross-sectional area of the rat's gastrocnemius muscle among groups

2.6 免疫组织化学染色结果 纵切面上看，各组均有肌动蛋白表达，肌动蛋白为结构蛋白，因此在整个肌纤维上均有表达，从图片和统计图上可以看出，模型组的肌动蛋白表达低于假手术组和训练组($P < 0.001$)。炎症因子在模型组肌纤维细胞中均有表达，而且表达水平均高于假手术组和训练组，在模型组和训练组肌纤维细胞及周边也有少量炎症因子表达。见图4、5。



图注：模型组的肌动蛋白表达低于假手术组和训练组；模型组炎症因子表达均高于假手术组和训练组

图4 各组大鼠腓肠肌免疫组化染色(×100)

Figure 4 Immunohistochemical staining of the rat's gastrocnemius muscle (×100)

3 讨论 Discussion

周围神经损伤后，运动神经再生非常缓慢，神经元胞体的再生轴突不能及时刺激距离较远的失神经骨骼肌，肌肉将发生严重萎缩，肌肉的结构和功能难以恢复^[10]。骨骼肌失神经损伤后，会出现体积缩小、收缩功能减弱甚至消失等现象，肌纤维萎缩及广泛的纤维化，弱化肌肉的收缩功能，进而引起不可逆性肌萎缩^[11-13]。李枚原等^[14]在电镜下观察坐骨神经离断术后大鼠比目鱼肌和趾长伸肌的超微

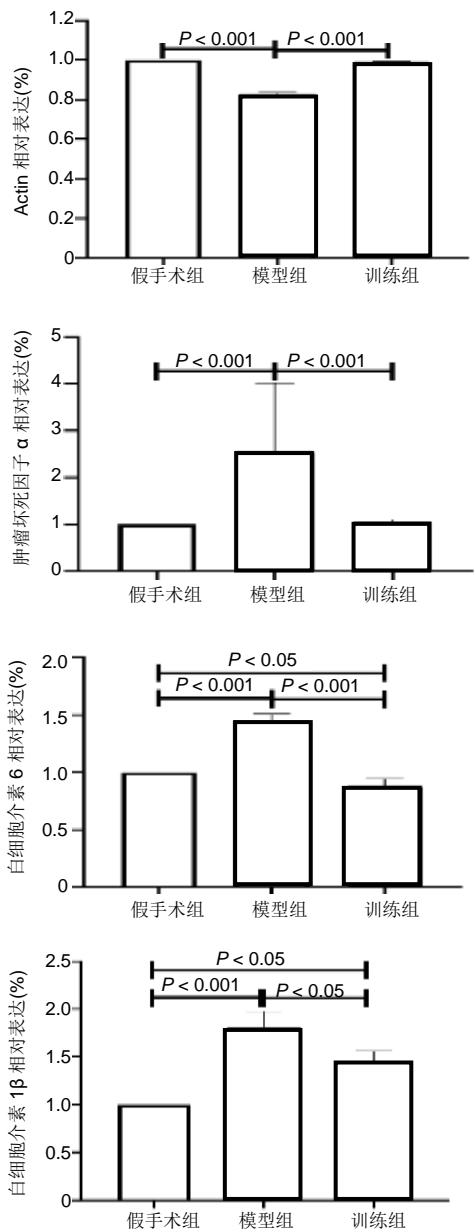


图5 各组大鼠腓肠肌组织免疫组化染色相对吸光度比较
Figure 5 Relative absorbance value of the rat's gastrocnemius muscle detected by immunohistochemical staining

结构逐渐发生变化, 趾长伸肌和比目鱼肌随着失神经支配时间延长, 肌纤维萎缩变细, 肌间隙增宽, 结构逐渐模糊, 线粒体肿胀、空泡化, 且快肌纤维比慢肌纤维超微结构变化更早更明显, 提示失神经支配后骨骼肌的超微结构也会发生一系列变化。目前大多数研究均通过检测靶肌肉的湿质量比以及肌纤维的截面积来了解肌肉的萎缩程度, 湿质量比越小, 肌纤维截面积越小, 肌萎缩越明显^[14-15]。

此次实验通过对各组大鼠失神经萎缩腓肠肌的形态学观察发现, 康复训练后大鼠肌肉湿质量比增大, 虽然肌纤维截面积较小, 但肌纤维形态趋向规整, 胶原纤维组织增生不明显, 肌力较模型组明显增高。实验表明, 失神经对骨骼肌失用性萎缩的影响很大。SZCZEPANOWSKA等^[16]对大鼠去神经实验中肌肉质量发生大比例下降, 其中肌动蛋

白量在肌肉中下降高达45%。肌纤维蛋白的数量和体积决定了肌肉的力量, 而肌动蛋白是肌纤维的重要组成部分。RILEY等^[17]观测到卧床2周以上的患者出现比目鱼肌萎缩、细丝密度下降16%-23%, 而肌细胞中粗丝密度未变, 减少的细丝导致肌丝滑动的空间增大, 横桥分离加速。由于肌萎缩后力量减弱, 为提供特定的输出功率, 肌肉需要代偿性提升收缩速度, 这又加大了萎缩肌肉发生损伤的概率^[18]。此次实验中, 训练组失神经大鼠经过被动训练后, 腓肠肌肌动蛋白含量增多, 可能是被动训练能被动地缩短拉伸肌纤维的长度, 促使肌细胞中肌动蛋白与其结合蛋白不断进行结合解聚, 功能性促进了肌细胞中肌动蛋白的表达^[5]。此次实验提示被动训练能有效提升失神经大鼠骨骼肌中肌动蛋白的表达, BBB评分显示训练改善了失神经大鼠的运动功能, 可能是由于训练促进萎缩肌肉的血液循环, 增加了萎缩的部分肌肉营养, 一定程度上阻止了肌肉萎缩的病理进程, 有助于肢体运动功能的逐渐恢复^[19]。每根肌纤维正常连接3-5条毛细血管提供营养, 失神经骨骼肌毛细血管退化速度高于纤维丧失速度, 毛细血管数与肌纤维数相对比例减少, 而胶原纤维逐渐增多。长期失神经肌纤维只有1条毛细血管供血, 肌纤维间还有密集的胶原阻隔, 有的肌纤维区域甚至形成血管完全缺失区^[20]。肌纤维营养不足可能是失神经骨骼肌萎缩的一个重要病因, 增多聚集的胶原纤维阻挡失神经肌肉神经再支配进程^[21]。

一般而言, 当机体受到损伤就会在受损部位发生炎症反应, 经典的医学理论发现炎症反应在机体受到入侵微生物的侵害时起到了保护作用^[12]。损伤组织的炎症反应吸引了周围的炎症细胞向受损部位聚集, 同时与产生炎症因子一起来参与反应, 进而受损组织会发生变性坏死, 最终清除这些坏死的组织碎片^[22]。此次实验模型组失神经萎缩的骨骼肌炎症因子表达增高可能是与炎症细胞清除萎缩坏死的组织碎片有关。在骨骼肌中静息的肥大细胞是促炎症因子(如肿瘤坏死因子α、白细胞介素6和白细胞介素1β等)的直接来源^[23-24]。在损伤或病理条件下, 肥大细胞分泌的这些促炎症因子可以大量募集免疫细胞浸润损伤位点, 包括肥大细胞、中性粒细胞和其他淋巴细胞在内的免疫细胞会产生更多的促炎症因子, 尤其是肿瘤坏死因子α^[25], 推进失神经肌萎缩进程。炎症因子可能会激活肌萎缩相关基因的表达, 如核转录因子κB、肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)^[26]、肌肉环状指基因1(MuRF1)和肌肉萎缩盒F基因(3MAFbx)等^[27]。

白细胞介素6是由巨噬细胞、内皮细胞等分泌的一种多能细胞因子, 主要以自分泌和旁分泌方式为主。研究发现在炎症反应中白细胞介素6主要通过激活或调节免疫细胞来发挥作用, 学者还发现白细胞介素6还有其他重要的生物学功能。研究表明机体的白细胞介素6长期处于过量的状态, 可能会促进骨骼肌萎缩^[28], 据此有学者建议通过阻断白细胞介素6分泌来对杜氏肌营养不良进行治疗^[29]。也有文

献证明,在骨骼肌增粗过程中,白细胞介素6也发挥非常重要的功能;阻断白细胞介素6后骨骼肌的变粗大作用则明显受损。另外对有些长期坚持锻炼人群的骨骼肌检测发现,肌肉中白细胞介素6的含量显著高于普通人群^[30]。此次实验中训练组也有少量炎症因子表达,尤其是白细胞介素6的含量较高,可能与康复运动有关。白细胞介素6可以激活巨噬细胞中的JAK-STAT信号通路以促进其他细胞因子的产生,而这些细胞因子的产生又可以反过来刺激肌肉干细胞的增殖^[31]。在肌肉损伤或病变的情况下,炎症反应中所涉及的一些免疫细胞也可通过分泌细胞因子如肿瘤坏死因子 α 等来促进肌肉干细胞的分化和增殖^[32]。炎症因子白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 可能通过肌肉干细胞增殖分化来进一步促进失神经萎缩骨骼肌结构和功能的恢复。

实验也存在一些局限性,首先实验大鼠的数量较少,每组只有10只,无法再继续分组,从而不能动态检测观察不同时间点的各个蛋白表达变化;另外,多聚甲醛灌注的取材方式限制只能用免疫组化方法半定量观察蛋白的表达部位和相对表达量,而无法应用Western blot准确测定蛋白的含量。被动训练器械不能准确地控制和测定训练的一些指标,如运动速度及消耗的能量等指标,装置中的电极刺激还可能对康复训练大鼠萎缩肌肉恢复有一定促进作用^[33]。

目前,临床上缺乏能有效延缓甚至逆转失神经肌肉萎缩的治疗方法,虽然有外科修复^[34-35]、神经移植技术^[36]、组织工程技术和基因治疗等医疗手段^[37-40],但康复训练治疗具有经济实惠、简单安全的优势,是更适合广大人民群众采用的治疗方法^[41-43]。康复训练治疗还有具体什么时间开始训练,用什么方式训练、训练时间多长对患者恢复更有利以及见效慢等课题,被动训练促进失神经肌萎缩模型大鼠骨骼肌结构和功能恢复的研究,进一步丰富了康复训练治疗失神经肌萎缩的组织学机制和治疗效果依据,取得了通过组织结构和功能变化的研究、探索改善康复训练治疗失神经肌萎缩效果的显著结果。

作者贡献: 参与设计:王正东、王世杨;实施者:王世杨、张红心、关莉莉、李汾杰;评估者:孙慧哲、顾南、王效杰。盲法评估。

经费支持: 该文章接受了“2017年辽宁省自然科学基金指导计划立项项目(20170540886)”“沈阳医学院大学生科研项目(20141032)”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: 实验经沈阳医学院实验动物福利伦理委员会的审批,批准文号为SYXY2015010601。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] BOSKOVSKI MT, THOMSON JG. Carpal tunnel syndrome, syndrome of partial thenar atrophy, and W. Russell Brain: a historical perspective. *J Hand Surg Am*. 2014;39(9):1822-1829 e1.
- [2] JUNQUERA L, GALLEGO L. Images in clinical medicine. Denervation atrophy of the tongue after hypoglossal-nerve injury. *N Engl J Med*. 2012;367(2):156.
- [3] NADERI J, BERNREUTHER C, GRABINSKI N. Plasminogen activator inhibitor type 1 up-regulation is associated with skeletal muscle atrophy and associated fibrosis. *Am J Pathol*. 2009;175(2):763-771.
- [4] AGUERA E, CASTILLA S, LUQUE E. Denervated muscle extract promotes recovery of muscle atrophy through activation of satellite cells. An experimental study. *J Sport Health Sci*. 2019;8(1):23-31.
- [5] GIGER JM, BODELL PW, ZENG M. Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(4):1204-1212.
- [6] WADA E, TANIHATA J, IWAMURA A. Treatment with the anti-IL-6 receptor antibody attenuates muscular dystrophy via promoting skeletal muscle regeneration in dystrophin-/utrophin-deficient mice. *Skelet Muscle*. 2017;7(1):23.
- [7] WEI J, LIANG BS. PPM1B and P-IKKbeta expression levels correlated inversely with rat gastrocnemius atrophy after denervation. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(8):711-715.
- [8] HILLEN BK, YAMAGUCHI GT, ABBAS JJ, et al. Joint-specific changes in locomotor complexity in the absence of muscle atrophy following incomplete spinal cord injury. *J Neuroeng Rehabil*. 2013;10:97.
- [9] MA W, ZHANG R, HUANG Z, et al. PQQ ameliorates skeletal muscle atrophy, mitophagy and fiber type transition induced by denervation via inhibition of the inflammatory signaling pathways. *Ann Transl Med*. 2019;7(18):440.
- [10] JIANG GL, GU YD, ZHANG LY. Randomized, double-blind, and placebo-controlled trial of clenbuterol in denervated muscle atrophy. *ISRN Pharm*. 2011;2011:981254.
- [11] HORII N, UCHIDA M, HASEGAWA N. Resistance training prevents muscle fibrosis and atrophy via down-regulation of C1q-induced Wnt signaling in senescent mice. *FASEB J*. 2018;32(7):3547-3559.
- [12] HUANG Z, FANG Q, MA W. Skeletal Muscle Atrophy Was Alleviated by Salidroside Through Suppressing Oxidative Stress and Inflammation During Denervation. *Front Pharmacol*. 2019;10:997.
- [13] WENG J, WANG YH, LI M, et al. GSK3 β inhibitor promotes myelination and mitigates muscle atrophy after peripheral nerve injury. *Neural Regen Res*. 2018;13(2):324-330.
- [14] 李枚原,薛成斌,韦中亚.大鼠失神经支配后比目鱼肌和趾长伸肌超微结构变化的实验研究[J].交通医学,2011,25(2):107-109.

- [15] 董进,柯崇山,刘坤祥.大鼠失神经不同时相的骨骼肌形态和MyoD表达变化[J].现代医药卫生. 2015,36(8):1124-6+30.
- [16] SZCZEPANOWSKA J, BOROVNIKOV YS, JAKUBIEC-PUKA A. Effects of denervation and muscle inactivity on the organization of F-actin. *Muscle Nerve*. 1998;21(3):309-317.
- [17] RILEY DA, BAIN JL, THOMPSON JL. Disproportionate loss of thin filaments in human soleus muscle after 17-day bed rest. *Muscle Nerve*. 1998;21(10):1280-1289.
- [18] TAMAKI H, YOTANI K, OGITA F. Electrical Stimulation of Denervated Rat Skeletal Muscle Ameliorates Bone Fragility and Muscle Loss in Early-Stage Disuse Musculoskeletal Atrophy. *Calcif Tissue Int*. 2017;100(4):420-430.
- [19] THEILEN NT, JEREMIC N, WEBER GJ. Exercise preconditioning diminishes skeletal muscle atrophy after hindlimb suspension in mice. *J Appl Physiol* (1985). 2018; 125(4):999-1010.
- [20] NAKAGAWA K, TAMAKI H, HAYAO K. Electrical Stimulation of Denervated Rat Skeletal Muscle Retards Capillary and Muscle Loss in Early Stages of Disuse Atrophy. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5695217.
- [21] FINNI T, HODGSON JA, LAI AM. Mapping of movement in the isometrically contracting human soleus muscle reveals details of its structural and functional complexity. *J Appl Physiol* (1985). 2003;95(5):2128-2133.
- [22] HADDAD F, ZALDIVAR F, COOPER DM. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* (1985). 2005;98(3): 911-917.
- [23] MA W, ZHANG R, HUANG Z. PQQ ameliorates skeletal muscle atrophy, mitophagy and fiber type transition induced by denervation via inhibition of the inflammatory signaling pathways. *Ann Transl Med*. 2019;7(18):440.
- [24] WU C, TANG L, NI X. Salidroside Attenuates Denervation-Induced Skeletal Muscle Atrophy Through Negative Regulation of Pro-inflammatory Cytokine. *Front Physiol*. 2019;10:665.
- [25] AL-NASSAN S, FUJITA N, KONDO H. Chronic Exercise Training Down-Regulates TNF-alpha and Atrogin-1/MAFbx in Mouse Gastrocnemius Muscle Atrophy Induced by Hindlimb Unloading. *Acta Histochem Cytochem*. 2012;45(6):343-349.
- [26] HE Q, QIU J, DAI M. MicroRNA-351 inhibits denervation-induced muscle atrophy by targeting TRAF6. *Exp Ther Med*. 2016;12(6):4029-4034.
- [27] ZHOU L, HUANG Y, XIE H. Buyang Huanwu Tang improves denervation-dependent muscle atrophy by increasing ANGPTL4, and increases NF-kappaB and MURF1 levels. *Mol Med Rep*. 2018;17(3):3674-3680.
- [28] OBERBACH A, LEHMANN S, KIRSCH K. Long-term exercise training decreases interleukin-6 (IL-6) serum levels in subjects with impaired glucose tolerance: effect of the -174G/C variant in IL-6 gene. *Eur J Endocrinol*. 2008;159(2): 129-136.
- [29] MAMMEN AL, SARTORELLI V. IL-6 Blockade as a Therapeutic Approach for Duchenne Muscular Dystrophy. *EBioMedicine*. 2015;2(4):274-275.
- [30] MIYAGI MY, SEELAENDER M, CASTOLDI A. Long-term aerobic exercise protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by modulating the expression of IL-6 and HO-1. *PLoS One*. 2014;9(10):e108543.
- [31] MADARO L, PASSAFARO M, SALA D. Denervation-activated STAT3-IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat Cell Biol*. 2018; 20(8):917-927.
- [32] SISHI BJ, ENGELBRECHT AM. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces atrophy and apoptosis in L6 myotubes. *Cytokine*. 2011;54(2):173-184.
- [33] KERN H, HOFER C, LOEFLER S. Atrophy, ultra-structural disorders, severe atrophy and degeneration of denervated human muscle in SCI and Aging. Implications for their recovery by Functional Electrical Stimulation, updated 2017. *Neurol Res*. 2017;39(7):660-666.
- [34] IMASAKA K I, TOMITA Y, NISHIJIMA T, et al. Pectoral Muscle Atrophy After Axillary Artery Cannulation for Aortic Arch Surgery . *Semin Thorac Cardiovasc Surg*.2019; 31(3): 414-21.
- [35] HAMANO N, YAMAMOTO A, SHITARA H, et al. Does successful rotator cuff repair improve muscle atrophy and fatty infiltration of the rotator cuff? A retrospective magnetic resonance imaging study performed shortly after surgery as a reference. *J Shoulder Elbow Surg*.2017;26(6): 967-974.
- [36] RUVEN C, LI W, LI H, et al. Transplantation of Embryonic Spinal Cord Derived Cells Helps to Prevent Muscle Atrophy after Peripheral Nerve Injury. *Int J Mol Sci*.2017;18(3):
- [37] GU S, SHEN Y, XU W, et al. Application of fetal neural stem cells transplantation in delaying denervated muscle atrophy in rats with peripheral nerve injury. *Microsurgery*.2010;30(4): 266-274.
- [38] ZHANG PX, HAN N, KOU YH, et al. Tissue engineering for the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regen Res*. 2019; 14(1):51-58.
- [39] MOIMAS S, NOVATI F, RONCHI G, et al. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. *Gene Ther*.2013; 20(10): 1014-1021.
- [40] SCHAKMAN O, THISSEN J P. Gene therapy with anabolic growth factors to prevent muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.2006; 9(3): 207-13.
- [41] ITOH Y, MURAKAMI T, MORI T, et al. Training at non-damaging intensities facilitates recovery from muscle atrophy. *Muscle Nerve*.2017; 55(2): 243-253.
- [42] PANISSET M G, GALEA M P, EL-ANSARY D. Does early exercise attenuate muscle atrophy or bone loss after spinal cord injury?. *Spinal Cord*.2016;54(2): 84-92.
- [43] RABELO M, DE MOURA JUCA R V B, LIMA L A O, et al. Overview of FES-Assisted Cycling Approaches and Their Benefits on Functional Rehabilitation and Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol*.2018;1088:561-583.