

·基础研究·

电针对小鼠下肢肌萎缩干预效果的研究*

高久翔¹ 张宇纯¹ 于 亮^{1,2}

摘要

目的:为了研究中频率电针刺激对小鼠比目鱼肌肌萎缩恢复的影响。

方法:60只C57BL/6小鼠,其中30只随机分为空白对照组(Con)和萎缩造模组(Atro),1周后验证此模型,将另30只造模致其肌萎缩后随机分为自然恢复组(Rec)、运动干预组(Exer)、电针干预组(Elec)。Atro组对小鼠进行后肢石膏固定1周;Rec组在拆下石膏后自由饲养2周;Exer组采取跑台运动干预2周;Elec组对小鼠后肢进行电针刺激2周。冰冻切片免疫荧光检测肌纤维横截面积、ATPase染色检测肌纤维类型变化、Western Blot检测Troponin I-SS(TNNI1)、Troponin I-FS(TNNI2)蛋白表达。

结果:Atro组肌湿重和肌纤维横截面积明显低于Con组($P<0.01$),TNNI1、TNNI2蛋白表达与Con组相比同样具有显著性差异($P<0.05$)。肌萎缩后Exer组、Elec组的慢肌、快肌的横截面积与Rec组相比均显著增加($P<0.05$)。TNNI1蛋白表达量都有非常显著性升高($P<0.01$),TNNI2蛋白无明显差异($P>0.05$)。

结论:中频率电针干预可有效增加肌纤维横截面积,尤其增加慢肌纤维TNNI1和TNNI2蛋白的表达,与运动干预一样都是一种促使废用性肌萎缩康复的有效方法。

关键词 废用性肌萎缩;骨骼肌纤维类型;肌钙蛋白;电针

中图分类号:R746.4;R245 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-03-0280-06

Electric acupuncture intervention on the effects of disuse muscular atrophy muscle fiber types of mice/
GAO Jiuxiang,ZHANG Yuchun,YU Liang//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(3): 280—
285

Abstract

Objective: To study the frequency of electrical stimulation affect the atrophy recovery of mouse soleus muscle.

Method: Sixty mice, 30 of them were randomly divided into blank control group (Con) and atrophy model group (Atro) and validated this model after 1 week. The other 30 mice were randomly divided into three groups: the natural recovery group (Rec), the exercise intervention group (Exer), the electroacupuncture intervention group (Elec) after making them atrophy. Atrophy model group were plaster fixed one week. Natural recovery group was natural fed two weeks after removing the plaster. Exercise intervention group runs 1 hour at 16m/min speed two weeks. EA intervention group were stimulated 15min daily for 2 weeks on hind limb, with pulse duration 0.35ms, frequency 50Hz, for 2 weeks. Frozen sections and Immunofluorescence were used to measure the cross-sectional area of muscle fibers. ATPase staining was used to detect the muscle fiber type changing, and Western Blot to detect soleus muscle Troponin I-SS (TNNI1) and Troponin I-FS (TNNI2) protein expression.

Result: The soleus muscle in Atro group showed significant change in cross-sectional area and wet weight compared with Con group ($P<0.01$). The expression of TNNI1 and TNNI2 protein was also significantly different from that of Con group ($P<0.05$). Compared with the Rec group, the cross-sectional area of slow muscle and

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.03.006

*基金项目:国家体育总局全民健身课题(2015B046);北京体育大学国家级教学示范中心资助课题

1 北京体育大学运动人体科学学院,北京,100084; 2 通讯作者

作者简介:高久翔,男,硕士研究生; 收稿日期:2016-12-21

fast muscle in the Exer and Elec groups significantly increased ($P<0.05$), TNNI1 protein expression significantly increased ($P<0.01$), TNNI2 protein was no significant difference detected ($P>0.05$).

Conclusion: The middle low frequency electroacupuncture intervention can effectively increase the cross-sectional area of muscle fibers, in particular, increase the TNNI1 and TNNI2 protein expression of slow muscle fibers. It is as effective as exercise intervention to promote recovery of disuse muscular atrophy.

Author's address Sport Science College, Beijing Sport University, Beijing, 100084

Key word disuse muscle atrophy; skeletal muscle fiber types; troponin; electroacupuncture

废用性肌萎缩是肢体在运动减退、制动、失重等状态下,骨骼肌所发生的生理、生化、形态学及功能的变化。不仅会使肌肉力量、体积、横截面积明显下降^[1],还会使慢肌纤维逐渐向快肌纤维类型转化^[2]。除药物治疗外,抗阻训练是公认的较为有效的康复手段^[3],但在运动损伤后初期,运动员卧床不宜进行动力性运动,此时肌肉等长收缩的效果可能达不到肌肉本身对于刺激的需求,这就需要更为有效的康复方法。目前研究已经证实,电针治疗对周围神经损伤后肌萎缩有延缓作用^[4-5]。电针可以改善萎缩肌肉的血液循环,提高肌肉组织氧化能力,增加合成代谢的能量供应,有助于维持肌肉正常的张力和肌紧张,电镜观察显示,电刺激可使肌纤维内的线粒体含量增多,肌肉抗疲劳能力增强,预防肌萎缩的发生^[6],此外,电针可以促进肌卫星细胞增值,加快其成肌分化,缩短损伤修复进程^[7],但目前还没有对电针干预制定明确的频率,并且高频电针刺激和低频电针刺激结果还存在差异^[8],因此,对电针最佳频率的选择还有待进一步的探索。

本研究拟用C57BL/6小鼠探讨2周50Hz电针干预对比目鱼肌湿重、横截面积、肌纤维类型的影响,并通过此研究结果与2周耐力运动进行对比,比较50Hz电针干预与2周耐力运动对小鼠比目鱼肌的差异,从而为废用性肌萎缩的恢复提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8周龄SPF级C57BL/6健康雄性小鼠60只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2012-0001。为避免小鼠厮打等可能影响实验结果的事情发生,对小鼠进行单笼饲养。饲养地点为北京体育大学动物实验室,小鼠自由摄食饮水,维持饲料,温度(21 ± 2)℃,相对湿度45%—

55%,昼夜明暗交替为12h光照12h黑暗。动物实验的处理方法符合中华人民共和国科技部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》以及北京体育大学动物福利伦理委员会的相关规定。

1.2 动物筛选和分组

将30只小鼠随机分为空白对照组和萎缩造模组,对萎缩造模组小鼠进行后肢石膏固定1周,选取另外30只小鼠对其进行称重、编号后每天跑台运动15min,跑速10m/min,预适应3d后以16m/min的速度对小鼠进行水平跑台运动恢复。综合体重和耐力情况,将此30只小鼠,随机分为自然恢复组(Rec)、运动干预组(Exer)、电针干预组(Elec)。

1.3 动物造模

Atro组、Rec组、Exer组、Elec组小鼠参考改良后Booth等的方法建立小鼠后肢制动模型^[9]。用95ml塑料小瓶固定动物,在其双侧后肢的踝关节和膝关节等血管容易受压处,衬一层薄厚适宜的棉垫,后将沾有石膏粉的绷带蘸水,由踝关节向上缠绕至大腿处,固定风干,使动物后肢固定在静息位7天。7天后拆下石膏对小鼠进行不同干预。干预期间单笼喂养,确保小鼠自由活动,自由摄食饮水。

1.4 干预仪器与方法

电针治疗仪(翔宇医疗设备有限公司,型号XYD-I),波形:疏密波,频率:50Hz(误差 $\pm 15\%$),断续周期:3s(允差10%),脉冲宽度:0.35 $\pm$ 0.1ms,萎缩造模后每天电刺激15min,共2周。

小鼠跑台(杭州立泰科技有限公司,型号DSPT-208),萎缩造模后每天运动60min,速度为16m/min,坡度为0,共2周。

1.5 取材及检测方法

1.5.1 主要试剂、仪器: Troponin I-SS(TNNI1)抗体,北京奥维亚生物技术有限公司。No. ARP42117 - P050。Troponin I-FS(TNNI2)抗体,

MyBioSource 公司。No.MBS856275。辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG,北京中杉金桥生物技术有限公司。ZB-2305,101843。辣根酶标记山羊抗兔 IgG,北京中杉金桥生物技术有限公司。ZB-2301。Lai-mini,Abcam 公司, No.ab11575。电泳槽、电源、玻璃板、梳子等, Bio-rad 公司。电转仪、电源等, Bio-rad 公司。冰冻切片机, 激光共聚焦显微镜。醋酸钾、Trizma 碱、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1N 的 HCl、氯化钾、ATP 二钠盐、221(1.5M 2- amino-2-methyl -1-propanol) 缓冲液、氯化钙、甲苯胺蓝、无水乙醇。

1.5.2 取材:按照实验设计时间点,称量造模前后 Con 组、Atro 组小鼠的体重(g)。将小鼠颈椎脱臼处死,分别取 Con 组、Atro 组小鼠比目鱼肌,称量湿肌重量 (mg)后用 OCT 对肌肉进行冰冻包埋于 -80°C 冰箱保存,其余肌肉迅速置于冻存管投入液氮内保存。在3周后对 Rec 组、Exer 组、Elec 组小鼠称量体重(g)。将小鼠颈椎脱臼处死,分别取 Rec 组、Exer 组、Elec 组比目鱼肌,称量湿肌重量 (mg) 后用 OCT 对肌肉进行冰冻包埋于 -80°C 冰箱保存,其余肌肉迅速置于冻存管投入液氮内保存。

1.5.3 冰冻切片制作:提前开启冰冻切片机预冷,将温度调至 -20°C 。用 OCT 浇铸固定组织的底座,固定玻璃盖板及刀片,先用 $50\mu\text{m}$ 粗调,后用 $8\mu\text{m}$ 细调调整组织与刀片间距离;待距离合适后切下组织并固定在防脱载玻片上;显微镜下观察肌细胞形态、结构, -80°C 保存。

1.5.4 免疫荧光:选取在 -80°C 保存带有样本的防脱载玻片,用 PBST 摇床洗 3 次,每次 5min,用含有 0.3% 的 Triton 的 PBS 摇床破膜 30min;用羊血清原液稀释成 5% 的羊血清封闭样本 2h,并用 5% 的羊血清溶液配 Laminin 一抗,抗体浓度为 1:500 混匀后在标识内适量滴加, 4°C 过夜;PBST 摇床洗 3 次,每次 5min,画圈笔巩固标识,在避光条件下,5% 的羊血清溶液配二抗,混匀后在标识内适量滴加二抗。二抗浓度 1:500。二抗 2h;PBST 摇床洗 3 次,每次 10min。准备泡酸清洁后的盖玻片,DAPI 封片, 4°C 避光保存。开启激光共聚焦显微镜,打开软件并设置条件及光的颜色。

1.5.5 ATPase 酶染色:配置预孵育液、Tris 缓冲液、孵育液、0.1% 甲苯胺蓝 (Chroma) 水溶液、1% 的 Ca

$\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液。切片入预孵育液,室温 2min;Tris 缓冲液换洗 3 次,每次 2min;入孵育液,室温 25min;1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 水溶液内换洗 3 次,每次上下提拉切片 4 次;0.1% 甲苯胺蓝水溶液内染色 90s 或 1% 甲苯胺蓝水溶液内染色 10s;流动的蒸馏水冲洗切片,最多 30s;快速脱水:95% 酒精换 1 次,上下提拉切片 3—5 次;再经无水酒精 2 次,每次上下提拉切片 3—5 次;中性树胶封片;显微镜下拍片记录,用 image-pro-plus6.0 软件进行分析。

1.5.6 Western Blot:TNNI1 和 TNNI2 的分离胶浓度为 12%,TNNI1、TNNI2 和 GAPDH 用 5% 的 BSA 对 NC 膜 4°C 封闭过夜;用 5% BSA 配置 TNNI1 和 TNNI2 的一抗,抗体浓度为 1:1000,一抗 2h。内参为 GAPDH,一抗浓度 1:2000。目的条带二抗浓度为 1:1000,内参的二抗浓度为 1:10000,均 4°C 摇床孵育 2h。TBST 洗膜时间为一抗后 10min $\times$ 3,二抗后 15min $\times$ 3。X 射线胶片曝光显影。

1.6 统计学分析

TNNI1、TNNI2、Laminin、ATPase 的实验结果均以平均数 $\pm$ 标准差表示,运用 SPSS 16.0 统计分析相关数据,对 Con 组、Atro 组数据进行独立样本 t 检验检验差异的显著性,对 Rec 组、Exer 组、Elec 组采用 Levene 检验进行方差齐性检验,单因素方差分析处理数据。采用 Graph pad 软件制作图表。

2 结果

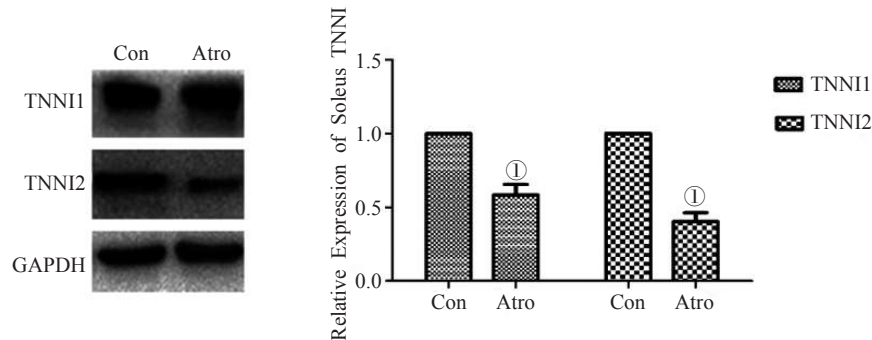
2.1 肌萎缩造模结果

2.1.1 比目鱼肌湿重变化:在 7 天造模后取材称量 Con 组、Atro 组比目鱼肌湿重分别为 $(18.8\pm 3.4)\text{mg}$ 和 $(9.0\pm 2.5)\text{mg}$,发现与 Con 组相比 Atro 组肌肉湿重显著下降,差异有显著性意义($P < 0.01$)。

2.1.2 比目鱼肌横截面积变化:免疫荧光染色 Laminin 检测比目鱼肌横截面积,发现 Atro 组横截面积 $(760\pm 273)\mu\text{m}^2$ 相对于 Con 组 $(933\pm 310)\mu\text{m}^2$ 明显下降,差异有显著性意义($P < 0.01$)。

2.1.3 比目鱼肌肌钙蛋白相对表达:Western Blot 测定比目鱼肌中 TNNI1、TNNI2 蛋白相对表达量,发现 Atro 组 TNNI1、TNNI2 蛋白表达相对于 Con 均出现下降,差异具有显著性意义($P < 0.01$),说明造模成功,见图 1。

图1 比目鱼肌 TNNI1、TNNI2 蛋白相对表达



与Con组相比,Atro组横截面积的显著性差异,① $P < 0.01$;Con:空白对照组;Atro:萎缩造模组

2.2 快慢肌横截面积变化

通过ATPase染色法观察骨骼肌肌纤维类型的关系,发现Atro组中比目鱼肌快、慢肌纤维横截面积分别相对于Con组比目鱼肌快、慢肌横截面积均出现下降,差异具有显著性意义($P < 0.01$)。

Rec组中比目鱼肌快、慢肌纤维横截面积相对于Atro组比目鱼肌快、慢肌纤维横截面积均无显著性意义($P > 0.05$)。Exer组相对于Atro组快、慢肌纤维横截面积均增加,差异具有显著性意义($P < 0.01$);Elec组与Atro组相比,慢肌纤维横截面积增加($P < 0.05$),快肌纤维横截面积明显增加($P < 0.01$),具有显著性意义;Exer组与Elec组之间无显著性意义($P > 0.05$),见图2。

2.3 比目鱼肌 TNNI1 和 TNNI2 变化

本研究发现萎缩造模后比目鱼肌 TNNI1、TNNI2 蛋白相对表达含量与Con组相比均出现下降,

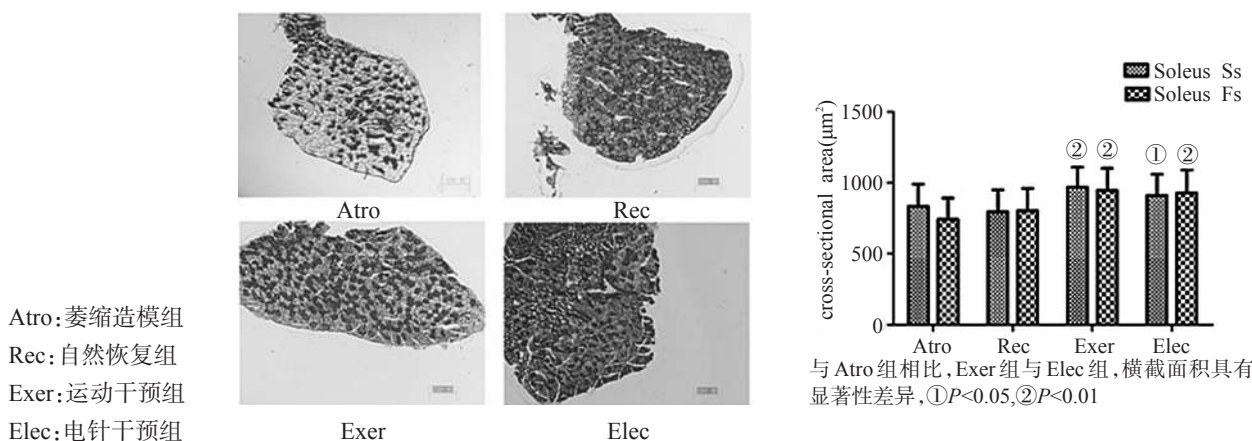
差异具有显著性意义($P < 0.05$),运动、电针干预后,比目鱼肌 TNNI1、TNNI2 蛋白相对表达含量相比Atro组均出现上升,差异具有显著性意义($P < 0.05$),说明运动干预、电针干预有助于骨骼肌萎缩后的恢复。与Rec组相比,Exer组与Elec组 TNNI1 蛋白表达升高,差异具有显著性意义($P < 0.05$),Exer组、Elec组与Rec组相比 TNNI2 蛋白出现升高,但差异无显著性意义。说明运动与电针干预有助于废用性肌萎缩后的恢复,尤其对慢肌纤维恢复更明显,快肌纤维的恢复有可能主要以自然恢复为主。见表1,图3。

表1 TNNI1 和 TNNI2 蛋白相对表达含量

组别	Atro组	Rec组	Exer组	Elec组
TNNI1	1	1.193±0.058	1.431±0.128 ^①	1.434±0.110 ^①
TNNI2	1	1.633±0.262	1.803±0.152	1.831±0.178

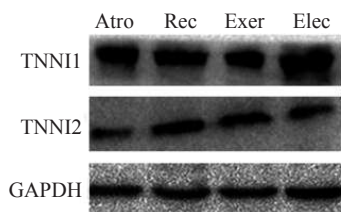
注:①与Rec组相比,Exer组与Elec组 TNNI1、TNNI2 蛋白表达的显著性差异 $P < 0.01$

图2 ATPase染色检测肌纤维类型情况



Atro:萎缩造模组
Rec:自然恢复组
Exer:运动干预组
Elec:电针干预组

图3 小鼠比目鱼肌 TNNI1、TNNI2 蛋白相对表达含量



Atro:萎缩造模组; Rec:自然恢复组; Exer:运动干预组; Elec:电针干预组

3 讨论

骨骼肌萎缩时,肌肉中的蛋白质由于代谢速度放缓而减弱或流失,线粒体数量与体积随之减小,同时无氧酶与氧化酶活性下降,无法保证肌肉的正常能量代谢^[10]。肌萎缩以骨骼肌湿重改变最为显著,并且其下降幅度与肌肉类型等密切相关^[11],比目鱼肌作为典型的慢肌纤维,在废用性肌萎缩后会导致慢肌纤维数目减少,快肌纤维和混合型肌纤维数目增多。对于实验而言,要想探讨康复手段对肌萎缩的影响,首要任务就是造模。目前模拟去负荷肌萎缩的方法主要有浸水、卧床、尾悬吊、制动等^[12],每种方法各有其利弊,并不是每种方法都适用于实验,应该根据实际情况确定符合实际的肌萎缩模型。故本实验通过应用石膏固定小鼠后肢的方法,探讨其能否起到萎缩造模的目的,发现7天后Atro组比目鱼在肌肉湿重、横截面积上相比Con组明显下降,此外比目鱼肌慢肌纤维百分比呈下降趋势,而快肌纤维百分比呈上升趋势,说明出现慢肌纤维向快肌纤维转化的过程。证明本实验的造模过程成功,可供后续实验提供理论基础。

有氧训练中肌肉会依照特定的节奏进行长时间的运动,能够很大程度上增强人体肌肉的有氧呼吸功能,通过有氧运动可以增加其细胞线粒体的体积,提升酶活性,改善骨骼肌蛋白的合成质量,进而提升骨骼肌的功能^[13]。但本研究发现萎缩后的运动干预并未有助于比目鱼肌湿重恢复,运动后比目鱼肌湿重甚至出现下降趋势,可能是由于长时间有氧运动造成骨骼肌中脂肪含量下降,使骨骼肌更纤细化所致,而肌纤维横截面积可以恢复到萎缩之前的水平,

提示耐力性运动进行康复时并不是通过提高肌肉重量,而是通过提高肌纤维横截面积,转化肌纤维类型实现的。TNNI1通过抑制钙介导的肌动蛋白和肌球蛋白复合物的构象变化来抑制肌肉收缩,其表达的高低可以反映骨骼肌内慢肌纤维的含量。TNNI2是肌钙蛋白三元复合物的抑制亚基存在于快速骨骼肌中的一种组织亚型,其表达的高低可以反映骨骼肌内快肌纤维的含量。萎缩后通过运动干预,TNNI1、TNNI2蛋白表达显著升高($P < 0.05$),这与以往研究运动可以增强肌肉的有氧代谢能力,加速肌梭及梭内肌纤维形态和ATP酶含量的恢复,促进肌纤维类型的转变的结论一致^[14],说明运动干预对肌萎缩后的康复有一定促进作用。

电针能够有效治疗各种急慢性骨骼肌损伤,加速骨骼肌的修复^[15],其实质是通过刺激使骨骼肌被动收缩,从而维持肌肉功能,但收缩幅度和强度会受到限制^[16],电刺激对肌萎缩有一定的效果,建议固定后尽早实施^[17],其中100Hz高频电针刺激可以有效对抗因尾悬吊引起的肌纤维横截面积的减小,还能够有效地对抗I型肌纤维向II型肌纤维的转化^[18],而5Hz、25Hz频率的电针振动训练可以使IIa型肌纤维百分比显著增加,而35Hz振动训练组大鼠不同类型肌纤维百分比无明显变化^[8],可见以往研究对于电针刺激的最佳频率还没有明确,因此本研究采用50Hz电针干预,发现对萎缩后肌肉的横截面积起到恢复作用,说明该频率电针干预可有效的缓解肌萎缩,通过肌纤维类型比较发现,电针干预后TNNI1、TNNI2蛋白表达相对于Atro组显著升高,TNNI2蛋白的表达相对于Rec组并未出现明显变化,说明50Hz电针干预可能更有益于慢肌纤维恢复,而对于快肌纤维的恢复可能是自然恢复处于主导地位所致。因此中频电针干预与运动一样,都可以对废用性肌萎缩起到一定的恢复作用,对于骨折患者康复过程中造成的行动不便,可采取先通过电针再运动的康复手段。

4 结论

运动训练、电针治疗作为损伤后的医疗康复手段,具有一定的实践意义。1周对小鼠后肢石膏固定可以有效造成废用性肌萎缩,导致其肌纤维横截

面积减小,慢肌比例下降。2周电针干预可有效改善因后肢固定造成的骨骼肌废用性肌萎缩,增加骨骼肌纤维的横截面积,并且以促进慢肌纤维的恢复为主。电针干预可以有效解决废用性肌萎缩后通过运动恢复的行动不便问题。

参考文献

- [1] Stein TP, Blanc S. Does protein supplementation prevent muscle disuse atrophy and loss of strength[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2011, 51(9): 828—834.
- [2] 王晶. PGC-1 α 在失重性肌萎缩中的作用及其机制研究[D]. 北京:北京体育大学, 2013.
- [3] Urso ML. Disuse atrophy of human skeletal muscle: cell signaling and potential interventions [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2009, 41(10): 1860—1868.
- [4] 吴珍元, 黄英如, 冼华, 等. 电针对失神经骨骼肌萎缩及纤维化的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2016, 31(2): 177—182.
- [5] 张东, 赵斌, 张金海. 经皮神经电刺激预防失神经肌萎缩的实验研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2003, 18(09): 542—545.
- [6] 张楠, 李世昌. 废用性肌萎缩治疗方法综述[J]. *辽宁体育科技*, 2009, 31(2): 46—48.
- [7] 陈欢, 张莉, 崔强, 等. 电针阿是穴对骨骼肌损伤大鼠肌肉再生及碱性成纤维细胞生长因子表达的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2013, 19(4): 334—340.
- [8] Suetta C, Aagaard P, Rosted A, et al. Training-induced changes in muscle CSA, muscle Strength, EMG, and rate of force development in elderly subjects after long-term unilateral disuse[J]. *J Appl Physiol*, 2004, 97(5): 1954—1961.
- [9] Booth FW, Kelso JR. Production of rat muscle atrophy by cast fixation[J]. *Appl Physiol*, 1973, 34(3): 404—406.
- [10] 张燕, 高明泽, 孙玉秀, 等. 用气机升降理论探讨对失重的中医学认识及失重性肌萎缩的中医病机[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2014, 16(4): 749—752.
- [11] Fuglevand AJ, Lester RA, Johns RK. Distinguishing intrinsic from extrinsic factors underlying firing rate saturation in human motor units[J]. *J Neurophysiol*, 2015, 113(5): 1310—1322.
- [12] 杨威. 失重性肌萎缩及其对抗措施研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2003, 23(3): 141—145.
- [13] Yu R, Leung J, Woo J. Incremental predictive value of sarcopenia for incident fracture in an elderly Chinese cohort: results from the Osteoporotic Fractures in Men (MrOs) Study[J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2014, 15(8): 551—558.
- [14] 李冻冻. 改善废用性肌萎缩肌肉功能方法的综述[A]. 中国生理学会运动生理学专业委员会会议暨“运动与骨骼肌”学术研讨会论文集[C]. 北京: 中国生理学会, 2011, 692—694.
- [15] 陈欢, 彭博, 李富运, 等. 基于U0126阻断ERK信号通路的电针阿是穴对兔钝挫伤后肌肉再生影响的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(7): 2304—2308.
- [16] 许淑芬, 方颖. 加味补中益气汤合经皮电刺激干预下肢肌肉萎缩的疗效观察[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(1): 322—323.
- [17] 司富春, 杨晖. 中医诊治肌萎缩症型和用药规律文献分析[J]. *中医杂志*, 2012, 3(17): 1495—1498.
- [18] 邢国刚, 樊小力, 宋新爱. 废用性肌萎缩的研究[J]. *国外医学·物理医学与康复学分册*, 2000, 20(4): 145—150.
- [19] with chronic neuropathic pain[J]. *Clin J Pain*, 2013, 29(7): 621—622.
- [24] Bolzoni F, Bączyk M, Jankowska E. Subcortical effects of transcranial direct current stimulation in the rat[J]. *J Physiol*, 2013, 591(16): 4027—4042.
- [25] Demirtas-Tatlidede A, Vahabzadeh-Hagh AM, Bernabeu M, et al. Noninvasive brain stimulation in traumatic brain injury[J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2012, 27(4): 274—292.
- [26] Podda MV, Cocco S, Mastrodonato A, et al. Anodal transcranial direct current stimulation boosts synaptic plasticity and memory in mice via epigenetic regulation of Bdnf expression[J]. *Sci Rep*, 2016, (6): 22180.
- [27] Grundy PL, Patel N, Harbuz MS, et al. Glucocorticoids modulate BDNF mRNA expression in the rat hippocampus after traumatic brain injury[J]. *Neuroreport*, 2000, 11(15): 3381—3384.
- [28] Hicks RR, Numan S, Dhillon HS, et al. Alterations in BDNF and NT-3 mRNAs in rat hippocampus after experimental brain trauma[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997, 48(2): 401—406.
- [29] Yoon KJ, Lee YT, Chae SW, et al. Effects of anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) on behavioral and spatial memory during the early stage of traumatic brain injury in the rats[J]. *J Neurol Sci*, 2016, (362): 314—320.
- [30] 陈保国, 黄渭清. 脑源性生长因子与神经损伤的修复及再生[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(15): 2805—2809.

(上接第273页)