论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1020-04

慢性低频复合生理频率电刺激对肺气肿兔膈肌肌球蛋白重链及酶活性的影响

李军梅,刘 刚,邓永红,李香彭 (第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

提 要:目的 研究不同频率慢性电刺激(chronic electrical stimulation,CES)后肺气肿兔膈肌肌球蛋白重链(MHC)亚型及酶活性的适应性变化,以了解间断低频复合生理频率电刺激对肺气肿兔膈肌结构及代谢的影响。**方法** 采用木瓜蛋白酶雾化吸入法建立肺气肿模型,测定正常对照组、肺气肿组和肺气肿CES组膈肌MHC亚型的适应性变化及肌浆网(SR)Ca^{2+}-ATP酶、膈肌琥珀酸脱氢酶(SDH)、乳酸脱氢酶(LDH)的酶活性。**结果** ①40、10、(10+40) Hz慢性电刺激后肺气肿兔膈肌MHC的相对含量都有所增加($P<0.05$)。10 Hz组MHC-Ⅰ型比例明显增加,(10+40) Hz组MHC-$Ⅱ_a$型比例增加($P<0.05$)。②(10+40)、40 Hz慢性电刺激后,膈肌SRCa^{2+}-ATP酶活性增高($P<0.05$)。40 Hz较(10+40) Hz Ca^{2+}-ATP酶活性增高更明显($P<0.05$),10 Hz组Ca^{2+}-ATP酶活性降低($P<0.05$)。③间断低频复合生理频率电刺激(40+10 Hz)同肺气肿组比较,SDH酶活性明显升高($P<0.05$);与40 Hz组和10 Hz组比较,SDH亦明显升高($P<0.05$),40 Hz组和10 Hz组之间无显著性差异($P>0.05$)。5组之间LDH酶活性均无差别($P>0.05$)。**结论** 不同频率的CES可导致膈肌MHC亚型及酶活性产生不同的适应性变化,低频复合生理频率慢性电刺激可能是体外膈肌起搏对COPD患者膈肌康复治疗较好的频率模式。

关键词: 肺气肿;膈肌;慢性电刺激;频率;肌球蛋白重链;酶活性

中图法分类号: R329.25; R454.1; R563.3 **文献标识码:** A

Effect of chronic low frequency electrical stimulation and chronic physiological frequency electrical stimulation on diaphragmatic muscle myosin heavy chain and enzyme activity in emphysema rabbits

LI Jun-mei, LIU Gang, DENG Yong-hong, LI Xiang-peng (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of chronic low-frequency electrical stimulation on the structural and metabolic changes of diaphragm of emphysema rabbits. **Methods** The rabbit model of emphysema was made by papain-inhaling of ultrasonic atomization once a week for 3 weeks in 30 adult Japanese rabbits, 6 receiving 10 Hz chronic low frequency electrical stimulation, 6 receiving 40 Hz, and 6 receiving(10+40) Hz. Other 6 emphysema rabbits and 6 normal rabbits served as control. An enzyme chemical method was used to observe the changes in the enzyme activities of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase, succinate dehydrogenase (SDH) and the lactate dehydrogenase (LDH) and changes in MHC in control group, emphysema group, and emphysema + chronic low frequency electrical stimulation group. **Results** Following chronic electrical stimulation using 40 Hz, 10 Hz, and (10+40) Hz, the relative contents of MHC were increased in the diaphragmatic muscle of rabbits with emphysema. The percentage of MHC-Ⅰ was significantly increased in the 10 Hz group, while that of MHC-$Ⅱ_a$ was significantly increased in the (10+40) Hz group. Following chronic electrical stimulation using 40 Hz and (10+40) Hz, diaphragmatic muscle SR Ca^{2+}-ATPase activity was increased in rabbits with emphysema ($P<0.05$). In the 10 Hz group, Ca^{2+}-ATPase activity was lower ($P<0.01$). As compared with the control rabbits, SDH activity was increased in diaphragmatic muscle of rabbits with emphysema

基金项目: 重庆市科技攻关项目(CSJL,2005AC5060);第三军医大学第一附属医院临床研究专项基金(SW2004009)

Supported by the Sci & Tech Research Project of Chongqing (CSJL,2005AC5060) and the Clinical Research Foundation of Southwest Hospital of Third Military Medical University (SW2004009)

作者简介: 李军梅(1972-),女,河南省扶沟县人,硕士研究生,主治医师,主要从事COPD的基础与临床方面的研究。电话:13228683239

通讯作者: 刘 刚,电话:(023)68754115,E-mail:liugang6399@sohu.com

收稿日期: 2007-01-05;**修回日期:** 2007-01-24

($P<0.05$), while LDH activity did not change significantly. SDH activity was increased more significantly in the (10 + 40) Hz group than in the single 40 Hz or 10 Hz group ($P<0.05$). **Conclusion** Different frequency electrical stimulation induces different adaptative changes in diaphragmatic muscle MHC and enzyme activity. It indicates that chronic electrical stimulation at a low and physiologic frequency may be the optimal frequency mode for the rehabilitation of diaphragmatic muscle of COPD patients undergoing external diaphragm pacing.

Key words: emphysema; diaphragm muscle; chronic electrical stimulation; frequency; myosin heavy chain; enzyme activity

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是呼吸系统常见病、多发病。据统计,COPD 居当前死亡原因的第 4 位,我国 15 岁以上人群 COPD 患病率高达 3%,全国约有 2 500 万 COPD 患者[1]。迄今国内外对本病的治疗还缺乏有效的方法。目前研究表明通过改善膈肌功能可以延缓 COPD 的发生发展[2],膈肌慢性电刺激(chronic electrical stimulation,CES)通过增强膈肌收缩力,改善膈肌的耐力和强度,从而在 COPD 的膈肌康复治疗中起着越来越重要的作用。现临床上采用生理频率慢性电刺激(40 Hz)对 COPD 患者进行膈肌康复治疗,取得了一定的疗效,但 40 Hz 是否为膈肌治疗的最佳频率尚不十分明确。本研究拟观察不同频率 CES 后肺气肿兔模型膈肌肌球蛋白重链(MHC)亚型、肌浆网(SR)Ca^{2+}-ATP 酶、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)活性的变化,从膈肌结构及酶代谢两个方面为 CES 对 COPD 患者膈肌康复治疗的最佳频率选择提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物　　普通级成年日本大白兔 30 只,雌雄不拘,体质量(2.6 ± 0.2)kg,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。

1.1.2　实验器材　　超声波雾化器(型号:PARI 德国),自制雾化箱,自制变频便携式体外膈肌起搏器,冷冻高速离心机(型号:BECKMAN Avanti J-20XP 美国),台式水平离心机(型号:BECKMAN CS-15R 美国),紫外-可见分光光度计(型号:Ultrospec 4300 pro 美国)。南京建成生物工程研究所提供的 LDH、SDH 和 SR-Ca^{2+}-ATP 酶测试盒。化学试剂均为国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　肺气肿兔模型的制作　　取成年日本大白兔 24 只,制作方法详见文献[3]。剩余 6 只为正常对照组。

1.2.2　肺气肿模型兔病理检查　　抽取肺气肿模型兔 1 只,麻醉后断头处死,开胸游离气管,取出肺脏,固定 24 h 后送病理科,镜下观察肺组织病理变化。

1.2.3　动物分组和 CES 兔模型的制备　　肺气肿模型兔用随机数字表随机分为 4 组,分别为肺气肿组、10 Hz 慢性低频电刺激组、40 Hz 慢性生理频率电刺激组和(10 + 40) Hz 慢性电刺激组,每组 6 只。手术方法详见文献[4]。术后 1 周采用自行研制的变频便携式体外膈肌起搏器进行 CES。各 CES 组选择相应的刺激频率[40、10、(10 + 40) Hz],45 次/min,波宽 0.3 ms;输出电压 10 ~ 20 V,调节到胸腹最佳运动为标准。刺激时间为:2 × 2 h/d,上下午各 1 次,每周 6 d,共 5 周。对照组不刺激。

1.2.4　待测酶液的制备　　将 25% 乌拉坦沿兔耳缘静脉注入麻醉后,切开颈部皮肤,暴露气管,气管切开,插管。切开腹部,取出完整膈肌,立即置预冷的标准 D-Hanks 液中备用(以下操作均在 0 ~ 4 ℃条件下进行)。

1.2.5　MHC 样品的制备　　取少量肋膈肌,在 1∶9(质量比)预冷液中剪碎匀浆,30 s × 2 次,期间间歇 30 s,置冰上 15 min 后,离心 10 000 × g 15 min;取上清,弃沉淀,考马斯亮蓝 G-250 法蛋白定量后,加等量甘油,以 1 mg/ml 置 -70 ℃保存备用。

1.2.6　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳　　配置 8% 分离胶和 5% 浓缩胶。取 MHC 提取液 15 μl 加入等量加样缓冲液混匀,95 ℃ 变性 2 ~ 3 min 后点样。恒压 75 V,恒流 6 mA,持续 16 h。电泳结束后取出凝胶,用 0.125% 考马斯亮蓝 R-250 染色,染色 4 ~ 8 h,染色后脱色 4 ~ 8 h,其间换液 3 ~ 4 次,直至背景为轻度蓝色,色带显示清楚,对比良好时终止。

1.2.7　肌浆网标本的提取　　基本参照 Carl[5] 法,并有所改进。

1.2.8　膈肌 SDH 和 LDH 酶液的制备　　取新鲜肋膈肌立即置预冷的标准 D-Hanks 液中备用。(以下操作均在 0 ~ 4 ℃下进行)。取小块膈肌,秤重剪碎,以 1∶10(质量比)比例加入生理盐水,匀浆,以 400 × g 离心 10 min,取上清 200 μl,稀释成 5 倍体积浓度,测酶活力。

1.2.9　光密度分布曲线下面积测定　　用 Quantity One 软件对 SDS 电泳照片进行电泳条带光密度分布曲线下面积测定,其值表示 MHC 各亚型的相对含量。

1.2.10　酶活性测定　　应用南京建成生物工程研究所提供的 LDH、SDH 和 $SRCa^{2+}$-ATP 酶测试盒测试酶活性。

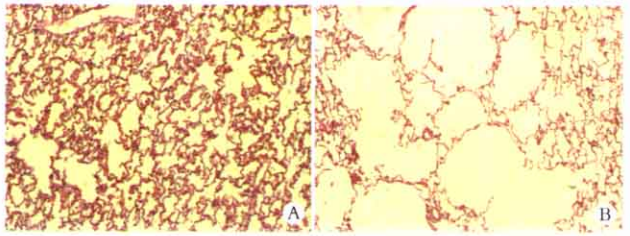
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　肺气肿模型兔病理检查结果

肺组织大体观:肺的体积显著膨大,边缘钝圆,肺组织柔软而缺少原有弹性,指压后留有压痕。低倍镜下:肺组织肺泡隔数量明显减少,所存留肺泡隔变窄,部分肺泡隔断裂、消失,有若干肺泡融合形成大圆囊,甚至肺泡管扩张,遍布于肺小叶内,见图 1。结果表明:雾化吸入木瓜蛋白酶成功复制了兔的实验性肺气肿模型。



A：正常肺组织；B：模型兔肺组织

图1 兔肺组织的光镜观察 （HE×40）

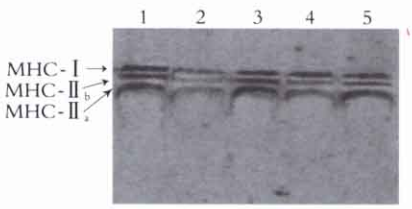
2.2 MHC 各亚型比例的变化

与正常对照组比较，肺气肿组 MHC-Ⅰ比例增高，MHC-$Ⅱ_b$ 比例降低（$P<0.01$）。与肺气肿组比较，（10+40）Hz 组 MHC-$Ⅱ_a$ 比例明显增高（$P<0.01$），MHC-$Ⅱ_b$ 比例明显降低（$P<0.01$）；10 Hz 组 MHC-Ⅰ比例增高（$P<0.01$），MHC-$Ⅱ_b$ 比例明显降低（$P<0.01$）。与（10+40）Hz 组比较，40 Hz 组 MHC-Ⅰ、MHC-$Ⅱ_a$ 比例降低（$P<0.01$），MHC-$Ⅱ_b$ 比例增高（$P<0.01$）（表1，图2）。

表1 不同频率慢性电刺激后肺气肿兔膈肌 MHC 亚型比例的变化（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	MHC-Ⅰ	MHC-$Ⅱ_a$	MHC-$Ⅱ_b$
正常对照组	29.92±1.46	46.10±1.16	23.88±1.18
肺气肿组	37.70±0.86[a]	46.20±2.49	16.02±2.47[a]
肺气肿 CES 组			
40 Hz	27.35±1.36[abc]	47.70±0.94[c]	24.87±0.94[bc]
10 Hz	41.38±0.64[ab]	46.53±1.53[c]	11.97±1.52[ab]
（10+40）Hz	32.70±1.62[ab]	53.76±2.54[ab]	13.40±1.07[ab]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与肺气肿组比较；c：$P<0.01$，与（10+40）Hz 组比较



1：正常对照组；2：肺气肿组；3：40 Hz 组；4：10 Hz 组；5：（10+40）Hz 组

图2 正常对照组、肺气肿组和各电刺激组 MHC 亚型 SDS-PAGE 凝胶电泳图

2.3 不同频率慢性电刺激肺气肿模型兔后 Ca^{2+}-ATP 酶活性变化

间断低频复合生理频率电刺激（10+40）Hz 同肺气肿对照组和 10 Hz 组比较，Ca^{2+}-ATP 酶活性明显升高［分别为（1.996±0.118）、（1.721±0.104）、（1.507±0.089）μmol/（mg·h），$P<0.05$］；与 40 Hz 组［（2.242±0.076）μmol/（mg·h）］比较，Ca^{2+}-ATP 酶明显降低（$P<0.05$），40 Hz 组同肺气肿对照组和 10 Hz 组比较，Ca^{2+}-ATP 酶酶活性升高（$P<0.05$）；肺气肿对照组和 10 Hz 组之间无显著性差别（$P>0.05$）。

2.4 不同频率慢性电刺激肺气肿模型兔后 SDH 酶活性变化

间断低频复合生理频率电刺激（10+40）Hz 同肺气肿对照组比较，SDH 酶活性明显升高［分别为（12.320±0.802）、（8.358±0.680）U/mg，$P<0.05$］；与 40 Hz 组和 10 Hz 组比较，SDH 亦明显升高［分别为（10.316±0.647）、（10.488±0.974）U/mg，$P<0.05$］，40 Hz 组和 10 Hz 组之间无显著性差异（$P>0.05$）。

2.5 不同频率慢性电刺激肺气肿模型兔后 LDH 酶活性变化

正常对照组、肺气肿组、40、10、（10+40）Hz LDH 酶活性均无差别［分别为（1 586.37±257.00）、（1 634.89±306.56）、（1 633.11±317.04）、（1 609.02±262.52）、（1 632.53±224.12）U/g，$P>0.05$］。

3 讨论

3.1 不同频率慢性电刺激对肺气肿兔膈肌 MHC 的影响

肌球蛋白由 Kuehne 于 1864 年在研究骨骼肌收缩时发现并命名[6]。因为 MHC 在肌球蛋白中含量最丰富，因此通常用 MHC 亚型来决定肌纤维的类型。近年研究表明[7]，膈肌至少含有4种肌球蛋白异构体，即 MHC 分为Ⅰ、$Ⅱ_a$、$Ⅱ_x$、$Ⅱ_b$4 种亚型。由于普通的 6% SDS-聚丙烯酰胺电泳无法将 $Ⅱ_x$ 从 $Ⅱ_a$ 中分离出，通常将 $Ⅱ_x$ 归于 $Ⅱ_a$。MHC-Ⅰ、MHC-$Ⅱ_a$、MHC-$Ⅱ_b$ 分别对应于 mATP 酶组化染色的Ⅰ、$Ⅱ_a$、$Ⅱ_b$ 型纤维，MHC 亚型的转化反映了 MHC 基因表达的特定路线：Ⅰ⇆$Ⅱ_a$⇆$Ⅱ_x$⇆$Ⅱ_b$，活动方式和甲状腺激素水平等条件的改变使纤维表现型沿此路线进行向左或向右的转化。

COPD 患者膈肌 MHC 含量和亚型随着病情进展出现相应的转换。Ottenheijm 等[8]观察发现 MHC 含量的下降是导致轻中度 COPD 患者膈肌萎缩、收缩功能下降的重要原因。Orozco-Levi 等[9]研究也发现，COPD 患者在轻、中度时其膈肌Ⅰ、Ⅱ型纤维萎缩，重度者则表现为Ⅰ型纤维比例增加。国内白冲等[10]研究发现，膈肌中的肌球蛋白存在一定的可塑性，为适应慢性过度负荷情况下呼吸功能需要，COPD 患者膈肌快 MHC 表达减少，慢 MHC 表达增加。本实验 MHC 电泳结果显示肺气肿组 MHC 含量降低，MHC-Ⅰ比例有所增加，与上述研究结果相一致。

不同频率的慢性电刺激可以引起肺气肿兔膈肌 MHC 含量的增加，MHC 亚型发生适应性转化，低频复合生理频率慢性电刺激后膈肌 MHC-$Ⅱ_a$ 比例增高，低频慢性电刺激后膈肌 MHC-Ⅰ比例增高，生理频率慢性电刺激后膈肌 MHC 各亚型比例相对维持正常，上述结果提示不同频率慢性电刺激后肺气肿兔膈肌的耐疲劳能力可得到一定的提高，尤以低频复合生理频率慢性电刺激引起的 MHC 亚型的转换最为理想。

3.2 不同频率慢性电刺激对肺气肿兔 Ca^{2+}-ATP 酶活性的影响

SR 是骨骼肌中调节细胞 Ca^{2+} 浓度的最重要的细

胞器之一，在肌肉兴奋-收缩偶联过程中起关键作用。Ca^{2+}-ATP 酶在细胞 Ca^{2+} 浓度的调节中扮演重要角色。肌浆网 Ca^{2+}-ATP 酶(SERCA)属于 1 个多基因家族，包含 3 类基因(SERCA1，SERCA2，SERCA3)[11]。

研究表明，相同重量下，快肌纤维中 Ca^{2+}-ATP 酶含量远大于慢肌纤维中的含量，同时快肌 Ⅱ_b 型纤维的 Ca^{2+}-ATP 酶含量高于 Ⅱ_a 型纤维。各型肌纤维中 Ca^{2+}-ATP 酶活性的大小顺序依次为 $\text{Ⅱ}_b > \text{Ⅱ}_a > \text{Ⅰ}$[12]。Nguyen 等[13]研究发现，严重 COPD 膈肌快肌 SERCA 亚型向慢肌 SERCA 亚型转化，Ca^{2+}-ATP 酶活性下降，对 Ca^{2+} 再吸收能力降低，膈肌伸缩张力减弱，收缩速率减慢。目前有关电刺激后膈肌 Ca^{2+}-ATP 酶适应性变化的研究极少。本研究显示：肺气肿兔膈肌 Ca^{2+}-ATP 酶活性降低；与肺气肿组比较，低频慢性电刺激组兔膈肌 Ca^{2+}-ATP 酶降低，低频复合生理频率慢性电刺激组和生理频率慢性电刺激组兔膈肌 Ca^{2+}-ATP 酶活性增高，生理频率慢性电刺激组 Ca^{2+}-ATP 酶活性增高更加显著。这种 Ca^{2+}-ATP 酶活性的改变结果表现出与肌纤维类型、MHC 亚型及膈肌力学模式[14]适应性转化的一致性。由于 Ⅱ_b 型纤维易发生疲劳，在呼吸负荷加重情况下，Ⅱ_b 型纤维中 Ca^{2+}-ATP 酶活性会显著降低，此时主要依靠耐疲劳能力强的 Ⅱ_a 型纤维和Ⅰ型纤维的收缩以维持呼吸活动，其相应的肌纤维 Ca^{2+}-ATP 酶活性会升高。因此，对于 COPD 患者，如膈肌中含有较高 Ca^{2+}-ATP 酶活性的 Ⅱ_a 型纤维比例增加，则可更好的维持膈肌收缩运动。因此，低频复合生理频率慢性电刺激对 COPD 的康复治疗可能较生理频率慢性电刺激临床意义更大。

3.3　不同频率慢性电刺激对肺气肿兔琥珀酸脱氢酶和乳酸脱氢酶的影响

SDH 反映肌肉的有氧氧化能力。LDH 是糖酵解代谢途径中的关键酶，反映肌肉的无氧代谢水平，代谢酶的活性又随着肌肉适应性变化而变化。

研究已证实[15]，慢性电刺激可改善肌肉收缩和氧化代谢能力，低频电刺激可以使骨骼肌 SDH 活性增高，氧化能力增强。本实验中，各电刺激组膈肌 SDH 活性均有提高，间断低频复合生理频率慢性电刺激组膈肌 SDH 活性增高较生理频率慢性电刺激组和低频慢性电刺激组最为显著，而后二者膈肌 SDH 活性无明显差异。这种结果的出现可能与不同频率电刺激对不同膈肌运动单位募集有关。慢性低频电刺激后快收缩纤维向慢收缩纤维转化，间断低频慢性电刺激后膈肌Ⅰ型纤维比例增高，生理频率慢性电刺激可以改善萎缩的膈肌功能，各类型纤维功能增强，而膈肌中Ⅰ型、Ⅱ_a 型纤维的 SDH 活性要高于 Ⅱ_b 型纤维。间断低频复合生理频率慢性电刺激综合了两种刺激模式的优势，更有利于募集膈肌中含氧化酶活性高的运动单位，提高膈肌 SDH 活性。本实验各组膈肌 LDH 活性未见有明显差异。表明慢性电刺激对无氧代谢能力没有影响。

低频复合生理频率慢性电刺激可使肺气肿兔膈肌结构及酶代谢发生较适宜的适应性改变，这种改变既可增强膈肌的收缩力又增强膈肌的耐力。因此，低频复合生理频率慢性电刺激可能是体外膈肌起搏对 COPD 患者膈肌康复治疗更佳的频率模式。

参考文献：

[1] 郝伟欣. 慢性阻塞性肺疾病[J]. 实用心脑肺血管病杂志，2006，14(3)：172－174.

[2] Mador M J, Deniz O, Aggarwal A, *et al*. Effect of respiratory muscle endurance training in patients with COPD undergoing pulmonary rehabilitation [J]. Chest, 2005, 128(3): 1216－1224.

[3] 魏　泓，孙敬方，李双良，等. 医学实验动物学[M]. 成都：四川科学技术出版社，2004：439－440.

[4] 张睢扬，刘　刚，王东林，等. 不同频率慢性电刺激膈神经对兔膈肌骨骼肌型二氢吡啶受体 α_1 亚单位、ryanodine 受体 mRNA 和蛋白表达的影响[J]. 生理学报，2004，56(2)：198－203.

[5] Carl S L, Felix K, Caswell A H, *et al*. Immunolocalization of triadin, DHP receptors and ryanodine receptors in adult and developing skeletal muscle of rats[J]. Muscle Nerve, 1995, 18(11): 1232－1243.

[6] Sellers J R, Goodson H V, Wang F. A myosin family reunion[J]. J Muscle Res Cell Motil, 1996, 17(1): 7－22.

[7] Mercadier J J, Schwartz K, Schiaffino S, *et al*. Myosin heavy chain gene expression changes in the diaphragm of patients with chronic lung hyperinflation[J]. Am J Physiol, 1998, 274 (4 Pt 1): L527－L534.

[8] Ottenheijm C A, Heunks L M, Sieck G C, *et al*. Diaphragm dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(2): 200－205.

[9] Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta J L, *et al*. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Eur Respir J, 1999, 13(2): 371－378.

[10] 白　冲，陈若华，陆方林，等. 慢性阻塞性肺病患者膈肌肌凝蛋白重链表型的变化[J]. 第二军医大学学报，2004，25(7)：733－736.

[11] Zarain-Herzberg A, MacLennan D H, Periasamy M. Characterization of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase gene [J]. J Biol Chem, 1990, 265(8): 4670－4677.

[12] Nguyen L T, Stephenson G M. Myosin heavy chain isoform expression and Ca^{2+}－stimulated ATPase activity in single fibres of toad rectus abdominis muscle[J]. J Muacle Res Cell Motil, 2002, 23(2): 147－156.

[13] Nguyen T, Rubinstein N A, Vijayasarathy C, *et al*. Effect of chronic obstructive pulmonary disease on calcium pump ATPase expression in human diaphragm[J]. J Appl Physiol, 2005, 98(6): 2004－2010.

[14] 李香彭，李军梅，刘　刚. 肺气肿兔膈肌力学模式对慢性超低频复合生理频率电刺激的适应性改变[J]. 第三军医大学学报，2006，28(6)：573－576.

[15] Gerrits H L, Hopman M T, Offringa C, *et al*. Variability in fibre properties in paralysed human quadriceps muscles and effects of training[J]. Pflugers Arch, 2003, 445(6): 734－740.

（编辑　王小寒）