

# 中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

052006

血流限制訓練在周邊神經損傷後肌肉萎縮復健  
中的應用：專家判讀與人工智慧量化病理分析的  
對比研究

學校名稱：臺中市私立曉明女子高級中學

作者：	指導老師：
高二 楊礎安	蔡玲意

關鍵詞： 血流限制、去神經肌肉萎縮、AI 量化肌肉  
病理切片

## 摘要

本研究旨在探討血流限制法結合游泳訓練對於坐骨神經夾擠損傷後延緩大鼠肌肉萎縮的療效，並比較 AI 判讀技術與傳統人工判讀在肌肉細胞大小測量上的差異，分析兩者間的相關性與精確度。研究採用兩種方法量化肌肉細胞大小：(1)專家病理判讀：由專業人員進行傳統的顯微鏡下肌肉細胞大小測量。(2)人工智慧(artificial intelligence，AI)醫學影像實例分割技術(instance segmentation)：利用 AI 演算法自動識別並計算肌肉細胞的大小。期望藉由提供科學證據，支持血流限制結合游泳訓練在延緩神經損傷後肌肉萎縮方面的應用。同時，引入 AI 醫學影像實例分割技術，提高肌肉細胞大小測量的效率與客觀性，分析 AI 醫學影像分析技術在肌肉組織病理研究中的有效性，可為未來病理切片分析的參考模式。

# 壹、前言

## 一、研究動機

外傷性周邊神經損傷(traumatic peripheral nerve injury)是臨牀上常見且嚴重的問題，不僅造成患者功能障礙與永久性殘疾，也帶來龐大的社會經濟負擔。據統計，周邊神經損傷約占意外傷害的 2.8%，全球每年每十萬人中約有 10 至 23 人受其困擾。以美國為例，每年用於處理外傷性周邊神經損傷相關失能的手術高達 36 萬例，耗費超過 1500 億美元。儘管台灣目前缺乏外傷性周邊神經損傷的確切統計數據，但從每年約 20 萬例急診外傷開放性傷口及 2 萬例骨折案例推估，周邊神經損傷的發生率亦不容忽視。雖醫療技術如此進步，但針對周邊神經修復後的功能恢復的治療方式仍有進步空間，因此，開發新的治療策略以促進神經再生、延緩肌肉萎縮，進而提升患者功能恢復至關重要。現有的非手術治療方法，如藥物、電刺激、細胞療法和雷射療法，雖在促進神經修復方面取得一定成效，但仍未達令人滿意的程度。

低強度運動結合血流限制(blood flow restriction, BFR)訓練，已在骨骼肌訓練中廣泛應用，能有效增加肌力與肌肉量，對無法進行高強度運動的患者尤其有益。因此，BFR 技術已經成為一種安全及有效的肌肉訓練方式，可達到增肌強肌的效果。然而，BFR 在神經損傷及去神經支配肌肉萎縮方面的應用尚未有深入研究。

為解決周邊神經損傷後肌肉萎縮的臨床挑戰，本研究計畫擬採用水中低強度運動結合 BFR 技術，於周邊神經損傷大鼠模型中驗證其維持或延緩去神經支配肌肉萎縮的潛力，旨在預防萎縮的發生。本實驗以水中低強度運動結合 BFR 技術為創新切入點，期能為神經損傷後肌肉功能的維持提供具體的實證依據，並提供一種可行的治療方向。此外，由於過去傳統人工病理肌肉切片判讀的技術較為繁雜且耗時，當資料過多時將耗費研究者極大的心力，因此，研究者也期望能比對傳統人工的醫療判讀方式與使用 AI 判讀技術的數據，並評估 AI 判讀技術在分析肌肉細胞病理型態學的準確性與效率。藉由比較傳統人工判讀和 AI 技術在數據處理與結果分析方面的表現，為臨床診斷提供更加高效且準確的輔助工具，進一步推動神經損傷治療的現代化及智能化發展。

## 二、文獻回顧

### (一) 神經夾擠損傷後的繼發性結果：去神經支配肌肉萎縮

- 1、周邊神經一旦受損，神經再生的過程往往緩慢且不盡理想，這使得原本受其支配的肌肉逐漸失去活力，產生萎縮、退化等現象。同時，脊髓中與這些肌肉相連的神經元也可能因失去下游的連結而發生逆行性變性，進一步加重神經系統的損傷。研究發現，以坐骨神經損傷為例，僅僅數週(7至21天內)，原本強健的前脛肌纖維便開始萎縮，肌肉質量明顯減少。儘管肌纖維尚未完全消失，但其形態已發生顯著改變，顯示肌肉組織正經歷著深刻的結構性變化(Scalabrin, Pollock et al. 2019)。這些現象顯示了神經損傷後，肌肉組織會迅速啟動一系列的退化反應，若不及時治療，將可能導致不可逆的損傷 (Scalabrin, Pollock et al. 2019)。神經損傷初期，肌肉纖維會啟動一連串的生化反應，暫時應付神經損傷帶來的變化，可在短時間內保護肌肉組織。然而，若這種生化保護機制長時間處於高度活化狀態，反而會轉變為促進肌肉退化的驅動力，導致肌肉纖維逐漸萎縮 (Scalabrin, Pollock et al. 2019)。在神經受損的1至3年內，去神經支配的肌肉會逐步發生退化，最終導致肌纖維喪失並被脂肪和纖維結締組織取代 (Shimada, Sakata et al. 2020)。
- 2、對於大多數周邊神經損傷患者來說，神經自然恢復過於緩慢，這使得在促進神經再生的同時，延緩去神經支配肌肉的萎縮成為治療的關鍵目標 (Rochkind, Geuna et al. 2009)。研究顯示：在神經損傷早期進行肌肉復健治療，可有效暫緩去神經支配肌肉的生化變化，將去神經支配肌肉的功能保留到最大 (Salvini, Durigan et al. 2012)。雖然無法完全恢復，但及時介入治療應可延緩肌肉細胞量的流失。

### (二) 對於延緩去神經支配肌肉萎縮的治療

- 1、周邊神經損傷後肌肉恢復不佳的情況並不少見，雖然有些患者的肌力可以恢復到滿意的程度，但大多數的患者的去神經支配肌肉僅能做微弱的收縮 (Isaacs, Mallu et al. 2017)，這雖然顯示有一些軸突已經再生且已經到達肌肉進行重新神經支配，但可能重新支配的再生神經還不足，對於患者功能性恢復沒有實質幫助 (Isaacs, Mallu et al. 2017)。在這種已有部分神經支配的存在情況下，對肌肉是有保護作用

的，應該更積極嘗試利用可維持肌肉數量及促進神經再生及修復的方式去治療。有研究指出，神經損傷八個月後，去神經支配肌肉之肌纖維大多已經無法被保存下來，且即使進行神經損傷修復手術，恢復亦有限；甚至在神經重建後，對有部分神經支配的肌肉而言還可能沒有額外的幫助，甚至反而還降低肌肉功能 (Isaacs, Mallu et al. 2017)。由此可見，為延緩去神經支配肌肉纖維退化與喪失，積極視肌肉能力介入主動收縮之運動訓練，乃為必要的治療處方之一。

2、去神經支配肌肉，因肌力有限，執行主動運動困難，因此，大部分針對去神經支配肌肉的復健治療均以被動復健為主，例如：牽拉、電刺激及被動運動 (Pachter and Eberstein 1989, Peviani, Russo et al. 2010, Russo, Peviani et al. 2010, Salvini, Durigan et al. 2012, Li, Zhang et al. 2014)。有研究顯示，接受幹細胞移植後的動物，利用低強度跑步機運動治療，可以延緩周邊神經損傷後肌萎縮 (Cho and Seo 2021)。臨牀上會使用牽拉(stretching)技術來防止去神經支配肌肉失用造成的關節攣縮，但卻有研究顯示：牽拉去神經支配的肌肉並不能防止萎縮，還會增加纖維化 (Faturi, Franco et al. 2016)。有鑑於此，去神經支配肌肉的復健治療仍需要更深入的探索，以找到最佳的治療方式。

3、研究顯示，在大鼠坐骨神經橫斷和修復後，給予每天一小時被動和主動運動，可增加遠端神經再生軸突的數量，並減少神經損傷後脊髓反射增加的興奮性 (Udina, Puigdemasa et al. 2011)。因此，周邊神經損傷後，透過主動或被動運動主要是維持去神經支配肌肉神經活動的傳入，運動主要以增加神經營養因子的釋放，作用於再生軸突並調節中樞神經元可塑性為主，對於肌肉本身影響不大。

### (三) 低強度運動合併血流限制訓練對於肌肉的影響

1、傳統高強度、低反覆次數的肌肉訓練方式雖能有效提升肌力與肌肉量，但對於某些群體(如運動受傷者、術後患者)而言，高強度訓練可能增加組織損傷風險或難以實施。BFR 訓練因其低強度、易操作的特性，逐漸受到運動醫學和復健領域的關注。BFR 訓練是由 Yoshiaki Sato 博士於 1966 年於日本所開發 (Sato, 2005)。當時被稱為 KAATSU 訓練 (Slysz, Stultz et al. 2016)。BFR 訓練透過在上肢或下肢

近端加壓以限制血流，誘發動脈血流進入和靜脈血流排出受限的狀態，在短時間內便可達到類似高強度訓練的效果 (Patterson, Hughes et al. 2019, Minniti, Statkevich et al. 2020, Sgromolo, Cancio et al. 2020)。

- 2、 BFR 運動訓練已成為一種公認的可行方法，可改善骨骼肌質量和功能，並可增進無法承受重負荷高強度運動訓練個體的心血管功能及訓練量。因此，BFR 除常被臨床用來做為無法執行傳統有氧或阻力運動方案的訓練肌肉替代方法外，BFR 結合傳統的訓練方案亦可作為一種輔助訓練技術，對神經肌肉、有氧和無氧運動表現有正向的效應 (Abe, Fujita et al. 2010, Sudo, Ando et al. 2017, Amani-Shalamzari, Rajabi et al. 2019)，包括：增加肌肉大小和力量(Bjørnsen, Wernbom et al. 2019)、改善身體機能(Abe, Sakamaki et al. 2010)和增強耐力(Held, Behringer et al. 2020)等。
- 3、 低強度有氧運動結合 BFR 或低負荷阻力運動結合 BFR 已成為傳統有氧和阻力訓練計劃的訓練方案，可以取代傳統有氧和阻力訓練或高強度負荷訓練，以達到運動訓練的需求。因此，本實驗利用低強度主動水中運動加上 BFR，可望能維持去神經肌肉的大小，達到預防萎縮的目的，提供一個可行的治療策略。

#### (四) 利用蘇木精-伊紅染色來評估去神經肌肉的形態學

肌肉細胞大小的評估在研究肌肉萎縮、肌肉生長以及各種肌肉相關疾病中扮演著關鍵角色。常見的肌肉細胞大小評估方法，以形態學及組織學方法為主，主要是利用蘇木精-伊紅染色(H&E staining)來顯示肌肉組織的結構(Chan, 2014)。透過 H&E 染色後的肌肉切片，可以利用顯微鏡觀察及測量肌肉纖維的直徑或橫截面積，從而評估肌肉細胞的大小。H&E 染色是病理學中應用最廣泛的染色方法，可以提供組織和細胞的基本形態結構，快速了解組織的整體情況。加上 H&E 染色操作簡便快速、成本較低廉，廣泛應用於臨床診斷和研究領域，成為常規病理檢查的首選方法。但 H&E 染色的量化分析上，仍存在一些問題，主要是進行精確的量化分析，例如：細胞計數或面積測量，需要耗費大量時間和人力。此外，人工計數容易受到主觀因素的影響，可能導致結果存在偏差。因此，H&E 染色仍然是病理學研究中不可或缺的重要工具，可結合影像分析技術，尤其是以透過

機器學習的 AI 分析技術，可以彌補 H&E 染色判讀及量化的不足，提高病理分析的準確性。

### 三、研究目的

- (一) 利用大白鼠坐骨神經夾擠損傷模型，模擬臨床上周邊神經損傷引起的肌肉萎縮。
- (二) 結合血流限制與游泳訓練，探討其對神經損傷後肌肉萎縮的潛在治療效果。
- (三) 比較 AI 判讀技術與傳統人工判讀在肌肉細胞大小測量上的差異，分析兩者間的相關性，驗證 AI 技術在肌肉組織病理分析中的應用價值。
- (四) 引入 AI 醫學影像實例分割技術，提高肌肉細胞大小測量的效率與客觀性。

## 貳、研究設備及器材

### 一、實驗動物

使用30隻體重為250-300公克 (購自樂斯科生物科技股份有限公司) Sprague Dawley大鼠；本實驗所需要的實驗動物數量已經盡量控制到最少，所有動物被飼養於大學動物中心，室溫維持在 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，燈照時間12小時(6:00-18:00)，無限制供應動物飲水及飼料。所有實驗均於白天進行，每隻動物只使用一次。實驗動物的實驗過程遵循國際疼痛實驗動物之研究標準，並已考量「替代(Replace)」、「減量(Reduce)」及「精緻化(Refine)」之3R精神，將實驗設計最佳化，完全符合3R原則。此外，本動物實驗使用已獲得大學實驗動物委員會的許可，因此，本動物實驗在嚴格的倫理規範下進行，確保動物福祉與研究品質。實驗前每兩隻大鼠住一籠，關在動物中心單獨的籠子中適應7-10天後，開始進行實驗。

### 二、研究器材

#### (一) 手術用設備與藥品

- 1、 2.5 %異佛烷(isoflurane)的進行氣體麻醉，手術期間維持劑量(1% isoflurane)
- 2、 血管夾(B-3，壓力  $1.5 \text{ mg/ mm}^2$ ，S&T Marketing LTD，瑞士)
- 3、 9-0 尼龍縫合
- 4、 消炎藥膏(紐約新徽素軟膏，人人化學製藥股份有限公司)

- 5、 鼠籠
- 6、 抗生素(青黴素-普魯卡因，aniMedica GmbH)
- 7、 染色劑(hematoxylin & eosin)

#### (二) 訓練用器材

- 1、 輕彈繩帶(elite 輕型彈性貼布，台灣)
- 2、 大型塑膠泳箱(86cm × 64cm × 69cm)
- 3、 小塊保麗龍浮板
- 4、 毛巾
- 5、 保溫燈

#### (三) 足印測試用器材

- 1、 紅色印泥
- 2、 長 120 公分，寬為 8.5 公分的透明通道
- 3、 棉紙

#### (四) 專家判讀分析用設備

- 1、 光學顯微鏡 (Leica，DM500)
- 2、 Leica Aperio 數位玻片掃描機 (Aperio Versa 200)
- 3、 ImageScope 軟體(v9.1.19.1571, Aperio, Vista, CA, USA)
- 4、 Image J (NIH Image)

#### (五) 分析用軟體及雲端

- 1、 Roboflow
- 2、 Google Colab (GPU)
- 3、 YOLOv8

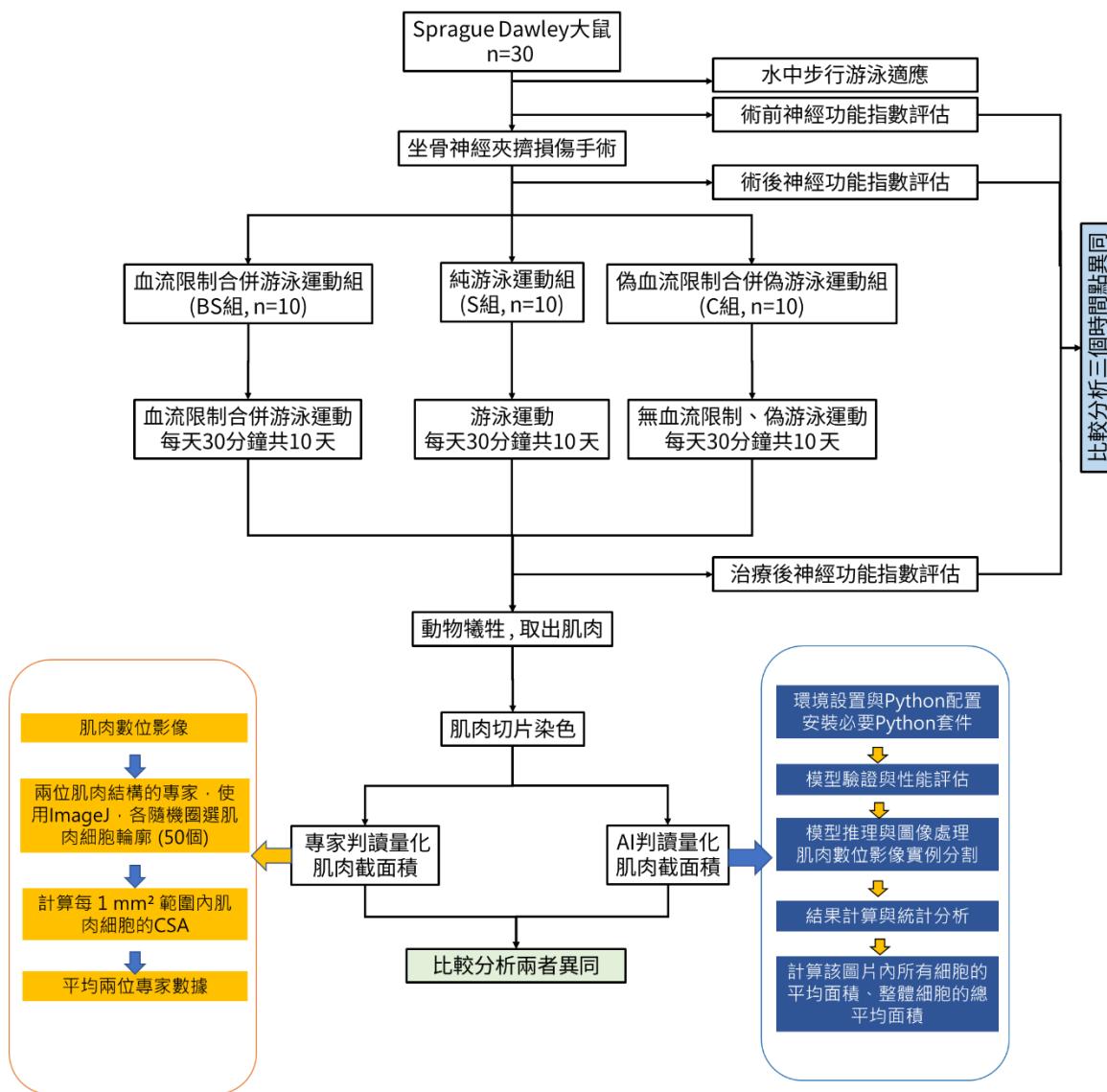
## 參、研究過程與方法

### 一、 實驗程序

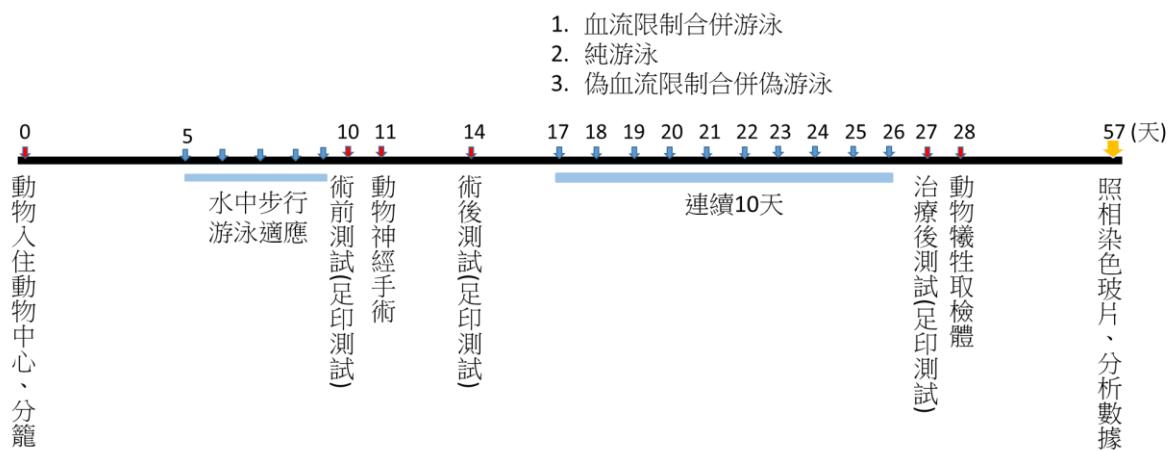
本研究以 30 隻大鼠為對象，進行坐骨神經夾擠損傷手術後，探討血流限制訓練合

併游泳訓練對神經與肌肉功能的影響。治療結束後再次進行神經功能評估，透過專家與AI分別量化肌肉橫截面積，進行分析比較兩者結果的一致性。(圖一)

實驗動物入住動物中心十天後開始進行術前的足印評估。術前測試後，開始進行動物神經損傷手術，術後三天會再進行術後足印評估。將大鼠隨機分為三組後，開始進行10天運動訓練，完成運動訓練後，進行治療後足印評估，隔天將動物犧牲後取出肌肉檢體，進行形態學分析(圖二)。



圖一：研究架構流程圖(研究者自行繪製)



圖二：動物實驗時間表及流程(研究者自行繪製)

## 二、 實驗方法

### (一) 坐骨神經夾擠神經損傷手術

開始進行神經損傷手術前，利用 2.5 %異佛烷的氣體麻醉進行麻醉，隨機選取一側坐骨神經做神經夾擠手術(圖三)。在大腿外側 3-4 mm 處的後外側，縱向直切開皮膚後，暴露整個坐骨神經，然後以血管夾(B-3，壓力  $1.5 \text{ mg/mm}^2$ )在坐骨神經距離內閉孔管 10 mm 處進行夾擠，持續 20 分鐘。20 分鐘後移除血管夾，在夾擠神經部位以 9-0 尼龍縫合在神經外膜上作為標記。完成神經夾擠後，將皮膚縫合並給予消炎藥膏，放置鼠籠中(一隻一籠)等待清醒。術後 3 天內，每天在皮下注射 0.5 cc 抗生素(青黴素-普魯卡因)，預防傷口感染，並密切觀察動物的生命跡象。



圖三：坐骨神經夾擠手術照片(研究者自行拍攝)

## (二) 動物分組

術後第三天，隨機將坐骨神經夾擠神經損傷的大鼠分成三組：游泳運動合併血流限制組(BS 組, n=10)、純游泳運動組(S 組, n=10)及偽游泳運動合併偽血流限制組(C 組, n=10)，進行 10 天的干預。

## (三) 游泳訓練

大鼠游泳的環境為一個大型塑膠桶(240L:長 87.5 cm×寬 65.0 cm×高 67.5 cm)，注水深度為 60 cm，水溫保持在  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，製造適合大鼠進行運動的環境(圖四)。池中亦會放入浮板防止大鼠溺水。塑膠盒內壁會以食用油擦拭，使內壁濕滑，不易被動物攀爬離開水面。在動物神經損傷手術前，會進行五天的水中步行游泳適應訓練，第一天先進行 10 分鐘，在第 2-5 天每天增加 5 分鐘，直到第五天動物可以穩定完成 30 分鐘的水中步行游泳訓練。這個適應期可使動物熟悉水中運動訓練，同時避免身體產生適應壓力，造成負面的生理、行為和心理阻力，影響損傷後組織分子生物因子表現及功能恢復的變化。正式開始治療後，依照動物的能力，可採漸進性及累積低強度訓練方式，運動時間須累積到 30 分鐘。預計第一天至三天可由 10(三次累積為 30 分鐘)、15(兩次累積為 30 分鐘)、30 分鐘(一次)，第三天後，運動介入皆為 30 分鐘、每天一次。



圖四：游泳訓練照片(研究者自行拍攝)

#### (四) 血流限制處理

將大鼠受損側神經之遠端及所支配肌肉部位，綁上寬度 2 公分的彈性繩帶，將彈性繩帶拉到最大張力後進行肢體 BFR。BFR 以間歇性的方式(on 5 分鐘: off 5 分鐘)合併水中運動，共治療 30 分鐘。可採漸進性及累積低強度訓練方式，運動時間須累積到 30 分鐘，整個水中運動為期 10 天。



圖五：血流限制處理(研究者自行拍攝)

#### (五) 足印分析

將大鼠的兩隻後爪壓在紅色印泥上，使其沾滿墨水，讓大鼠行走通過長 120 公分，寬為 8.5 公分的透明通道，獲取其腳印。每隻動物都須至少取得三組連續腳印並利用公式進行坐骨神經、脛神經及腓神經功能分析。測量正常側(N)以及實驗側(E)後爪的三個足印參數，這些參數包含：足底長度(第三腳趾到腳跟的縱向距離；分別為 NPL 及 EPL)、腳趾展開度(第 1 和第 5 腳趾之間的距離；分別為 NTS 及 ETS)和腳趾間展開程度(第二和第四腳趾之間的距離；分別為 NIT 及 EIT)。分別使用以下公式根據這些參數計算出(1)坐骨神經功能指數(sciatic functional index, SFI)、(2)脛神經功能指數(tibial functional index, TFI)及(3)腓神經功能指數( peroneal functional index, PFI)，來評估坐骨神經損傷的大鼠後肢運動功能的功能恢復指標。當算出的

數值為 0 時表示神經功能正常；-100 時則表示功能完全喪失，負值越大，表示神經損傷越嚴重。

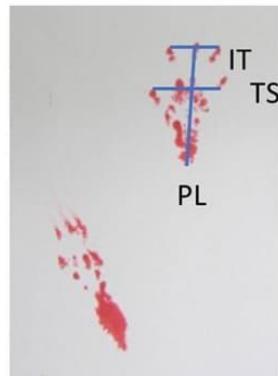
$$(1) \text{SFI(坐骨神經功能指數)} = \left( -38.3 \frac{EPL-NPL}{NPL} + 109.5 \frac{ETS-NTS}{NTS} + 13.3 \frac{EIT-NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

$$(2) \text{TFI(脛神經功能指數)} = \left( -37.3 \frac{EPL-NPL}{NPL} + 104.4 \frac{ETS-NTS}{NTS} + 45.6 \frac{EIT-NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

$$(3) \text{PFI(腓神經功能指數)} = \left( 174.9 \frac{EPL-NPL}{NPL} + 80.3 \frac{ETS-NTS}{NTS} \right) - 13.4$$



圖六：測量足印的大鼠步道裝置(研究者自行拍攝)



IT (腳趾間距)：第二與第四腳趾之間的距離。

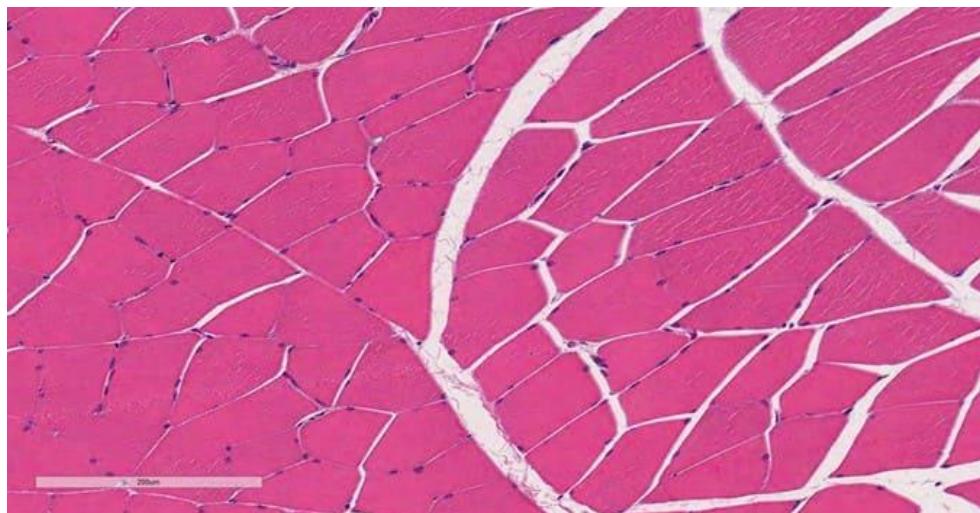
PL (足印長度)：第三腳趾到腳跟的縱向距離。

TS (腳趾展開度)：第一與第五腳趾之間的擴張程度。

圖七：神經功能指數算法示意圖(研究者自行拍攝)

## (六) 肌肉組織形態學評估

動物在完成治療或足印評估後，依照規劃的日程犧牲，進行組織學評估。將大鼠進行安樂死犧牲( $\text{CO}_2$ )，進行組織切片及染色與細胞型態分析。取出健側及患側腓腸肌，以 10% 福馬林固定 7 天後，進行石蠟包埋處理、切片(厚度均為  $5 \mu\text{m}$ )及 H&E 染色。用光學顯微鏡進行病理組織觀察肌肉細胞的形態(圖八)，並利用全玻片掃描儀掃描儲存影像後進行肌肉細胞大小的量化。數位影像透過 ImageScope 軟體進行定量分析。

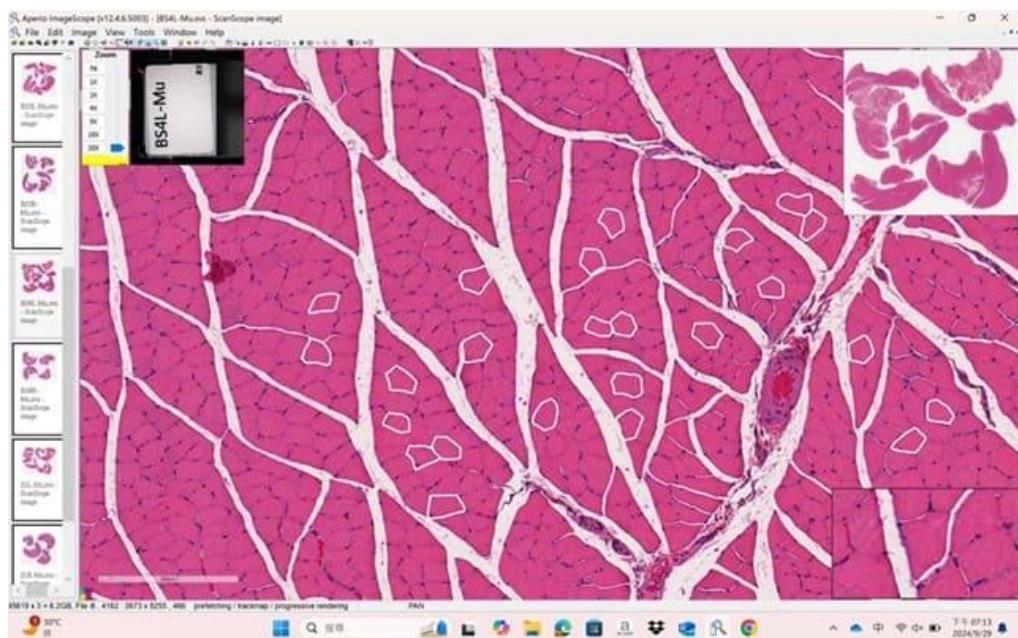


圖八：光學顯微鏡下的肌肉細胞(研究者自行拍攝)

## (七) 肌肉細胞定量分析

### 1、 專家辨識及判讀

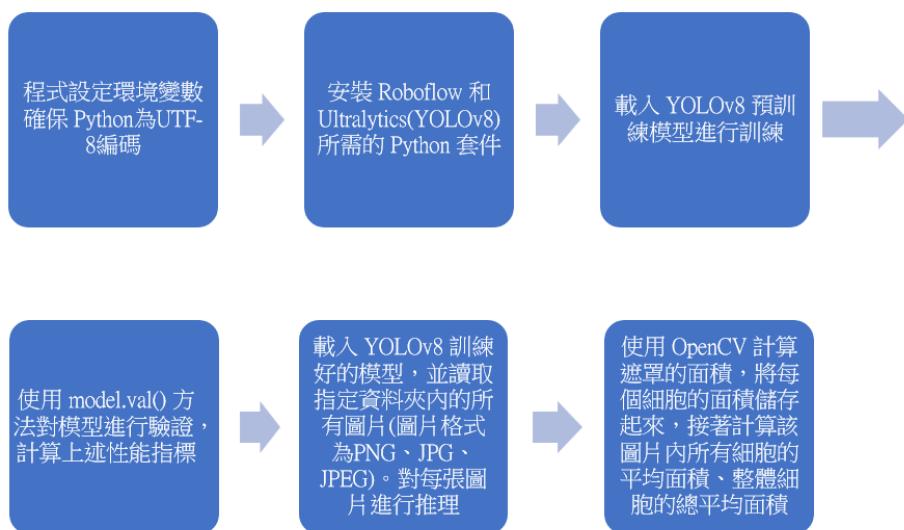
由兩位熟悉肌肉結構的專家針對肌肉數位影像，進行人工隨機圈選方式量化肌肉的細胞大小後，算取肌肉橫截面面積(cross sectional area, CSA)平均值。肌肉橫截面面積乃利用 Image J 軟體，以人工方式隨機圈出肌肉細胞各 25 個的輪廓來測量，並計算每  $1\text{ mm}^2$  範圍內的平均 CSA。整個過程約花費近六個月的時間才完成圈選 60 張樣本。



圖九：肌肉細胞利用專家數位觸控筆圈選完的圖片(研究者自行拍攝)

## 2、AI 辨識模型訓練、判讀

整合 roboflow Universe 肌肉橫截面模型)至 Google Colab，以 YOLOv8 進行實例分割訓練。主要目的是使用 YOLOv8 進行影像辨識與模型訓練，並根據需求調整 epochs(訓練次數)和 imgsz(影像大小)等參數，將結果導出為 ONNX 格式以便部署。AI 訓練流程如(圖十)：首先，程式設定環境變數確保 Python 為 UTF-8 編碼，避免處理多語言文字時出錯。接著安裝 Roboflow 和 Ultralytics (YOLOv8) 所需的 Python 套件。之後，透過 Roboflow API 下載 YOLOv8 格式的數據集，並載入 YOLOv8 預訓練模型進行訓練。訓練過程中，程式會指定數據集、圖片大小、批次大小、訓練回合數及運行設備(GPU)。完成後，使用 model.val() 方法對模型進行驗證，計算上述性能指標。載入 YOLOv8 訓練好的模型，並讀取指定資料夾內的所有圖片，對每張圖片進行推理後，程式會檢查是否有偵測到物件，若未偵測到則記錄該圖片的細胞面積為 0。如果成功偵測(圖十一)，則程式會提取遮罩(masks)資訊，並使用 OpenCV 計算遮罩的面積，將每個細胞的面積儲存起來，接著計算該圖片內所有細胞的平均面積。所有結果會以字典形式儲存(一種內建的資料結構，這種結構類似於現實生活中的字典，可透過唯一的鍵來快速查找對應的值。)包含圖片名稱與對應的平均細胞面積，接著轉換為 Pandas Data Frame，並輸出為 CSV 與 Excel 檔案。最後，程式會列出所有圖片的細胞面積資訊，並計算整體細胞的總平均面積，以便後續分析。



圖十：AI 訓練流程圖(研究者自行繪製)

整個 AI 設定模型及學習如何寫程式過程約花費三個月，設定完成後，AI 可以一次辨識全部動物受傷側與健側的肌肉形態學，時間約 10 分鐘。AI 模型訓練程式如下：

```
import os
# First, set the environment variables:
os.environ['LC_ALL'] = 'C.UTF-8'
os.environ['LANG'] = 'C.UTF-8'
# Instead of get_ipython().system use os.system to execute shell commands.
os.system('pip install roboflow')
os.system('pip install ultralytics')
from roboflow import Roboflow
from ultralytics import YOLO

#
# 設定 UTF-8 環境變數 (適用於某些系統)
os.environ["PYTHONUTF8"] = "1"
os.environ["LC_ALL"] = "C.UTF-8"
os.environ["LANG"] = "C.UTF-8"

#
# 安裝所需的套件 (如果尚未安裝)
try:
    import roboflow
    import ultralytics
except ImportError:
    os.system(f'{sys.executable} -m pip install --upgrade pip')
    os.system(f'{sys.executable} -m pip install ultralytics roboflow')
# 初始化 Roboflow
rf = Roboflow(api_key="IqeVeh707N13SRBnsI8v") # 確保 API Key 正確
project = rf.workspace("maskr").project("tcc-ebvzm")
version = project.version(17)
# 下載 YOLOv8 格式的數據集
dataset = version.download("yolov8")
#
print("數據集下載完成！")

#
# 加載 YOLOv8 預訓練模型
model = YOLO('yolov8n-seg.pt')

#
# 訓練模型
model.train(
    data='/content/tcc-17/data.yaml', # 數據集路徑
    epochs=50, # 訓練 50 週期
    imgsz=640, # 圖片大小
```

```

batch=16,                                # 批次大小
project='runs/detect',                    # 訓練結果存放位置
name='custom_train',                      # 訓練名稱
device=0                                    # 使用 GPU，若沒有則改為 device='cpu'

# 驗證模型性能
model.val(data='/content/tcc-17/data.yaml')

# 使用模型進行推理
results = model.predict(source='tcc-17/test/images', conf=0.25)

# 將模型導出為 ONNX 格式
model.export(format='onnx')

from google.colab import drive
drive.mount('/content/drive')

# 加載訓練好的最佳模型
model = YOLO("runs/detect/custom_train/weights/best.pt")

# 設置資料夾路徑
folder_path = '/boot' # 您的資料夾路徑

# 遍歷資料夾中的所有圖片文件
for image_filename in os.listdir(folder_path):
    # 檢查是否是圖片檔案（根據擴展名篩選）
    if image_filename.lower().endswith('.png', '.jpg', '.jpeg'):
        image_path = os.path.join(folder_path, image_filename)

    # 對每張圖片進行推理
    results = model(image_path)

    # 顯示每張圖片的結果
    for result in results:
        result.show()

import os
import numpy as np
import cv2
import pandas as pd

```

```

from ultralytics import YOLO

def infer_and_calculate(model_path, folder_path):
    model = YOLO(model_path)
    image_files = [f for f in os.listdir(folder_path) if
f.lower().endswith('.png', '.jpg', '.jpeg')]

    if not image_files:
        print("資料夾中沒有找到圖片。")
        return

    real_areas = [] # 儲存每個 result 的細胞集合遮罩面積列表
    image_paths = [] # 儲存每個 result 的影像路徑
    all_mask_areas = [] # 儲存所有細胞的總面積
    image_average_areas = {} # 儲存每張圖片的平均細胞面積，以檔名為鍵

    for image_filename in image_files:
        image_path = os.path.join(folder_path, image_filename)
        results = model.predict(source=image_path, save=False)

        if not results:
            print(f"圖片 {image_filename} 無法判讀，設定為 0。")
            image_average_areas[image_filename] = 0
            continue

        for result in results:
            image = result.orig_img # 原始影像
            image_paths.append(image_path)

            masks = result.masks # 獲取遮罩對象
            real_mask_area = [] # 儲存 result 中每個細胞的遮罩面積列表

            if masks is None:
                print(f"圖片 {image_filename} 無法偵測到遮罩，設定為 0。")
                image_average_areas[image_filename] = 0
                continue

            # 逐一處理每個被辨識的細胞遮罩
            for mask_idx, mask in enumerate(masks):
                polygons = mask.xy # 純絕對座標的多邊形數據

```

```

total_mask_area = 0 # 初始化遮罩總面積

for polygon in polygons:
    polygon = polygon.astype(np.int32) # 確保座標是整數
    mask_area = cv2.contourArea(polygon) # 使用 OpenCV 計算面積
    total_mask_area += mask_area # 累積面積

print(f"圖片 {image_filename} - 遮罩 {mask_idx + 1} 的面積: {total_mask_area:.2f} 像素")

real_area = total_mask_area # 直接使用 OpenCV 計算的遮罩面積
real_mask_area.append(real_area)
all_mask_areas.append(real_area)
real_areas.append(real_mask_area)
average_area = np.mean(real_mask_area) if real_mask_area else 0
image_average_areas[image_filename] = average_area
print(f"圖片 {image_filename} 所有遮罩面積平均為 {average_area:.2f} 像素")

overall_average_area = np.mean(all_mask_areas) if all_mask_areas else 0

df_csv = {
    'img_path': list(image_average_areas.keys()),
    'average_cell_area': list(image_average_areas.values())
}

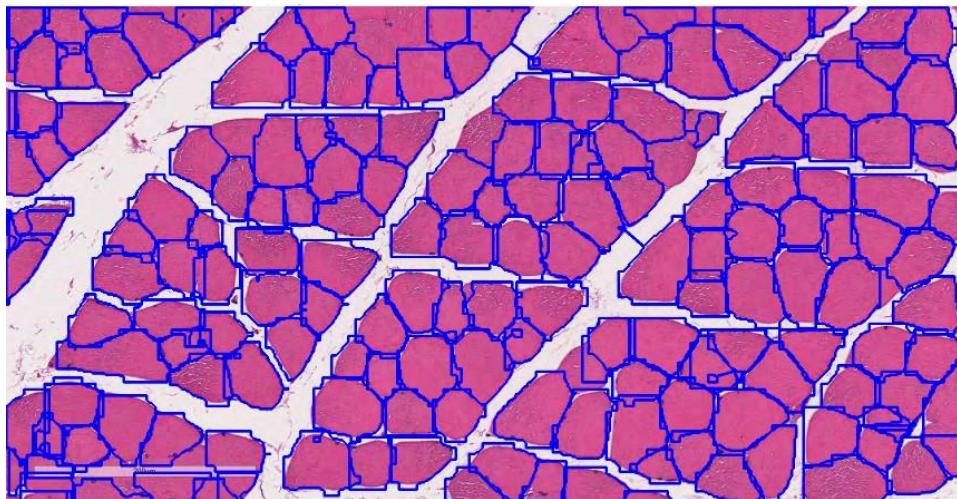
df = pd.DataFrame(df_csv)
df.to_csv('df_csv.csv', index=False)
df.to_excel('df_csv.xlsx', index=False)

print("\n===== 各圖片平均細胞面積總覽 =====")
for image_filename, avg_area in image_average_areas.items():
    print(f"圖片 {image_filename} 的平均細胞面積: {avg_area:.2f} 像素")
print(f"\n所有細胞的總平均面積: {overall_average_area:.2f} 像素")
print(df)

if __name__ == "__main__":
    trained_model_path = "runs/detect/custom_train/weights/best.pt"
    image_folder_path = '/boot/資料夾' # 修改為您的資料夾路徑
    infer_and_calculate(trained_model_path, image_folder_path)

```

圖(十一)為 AI 自動偵測出來的細胞或纖維的邊界，已使用另外程式碼消除邊界框(Bounding Boxes)及類別標籤(Class Labels)，使標示出的影像更為明顯，不被遮蔽，實際跑程式時無消除二者亦可產出相同結果。



圖十一：肌肉細胞利用 AI 圈選完的圖片，圈選出的框限為遮罩。(AI 圈選研究者自行拍攝肌肉細胞圖片)

#### (八) 統計分析

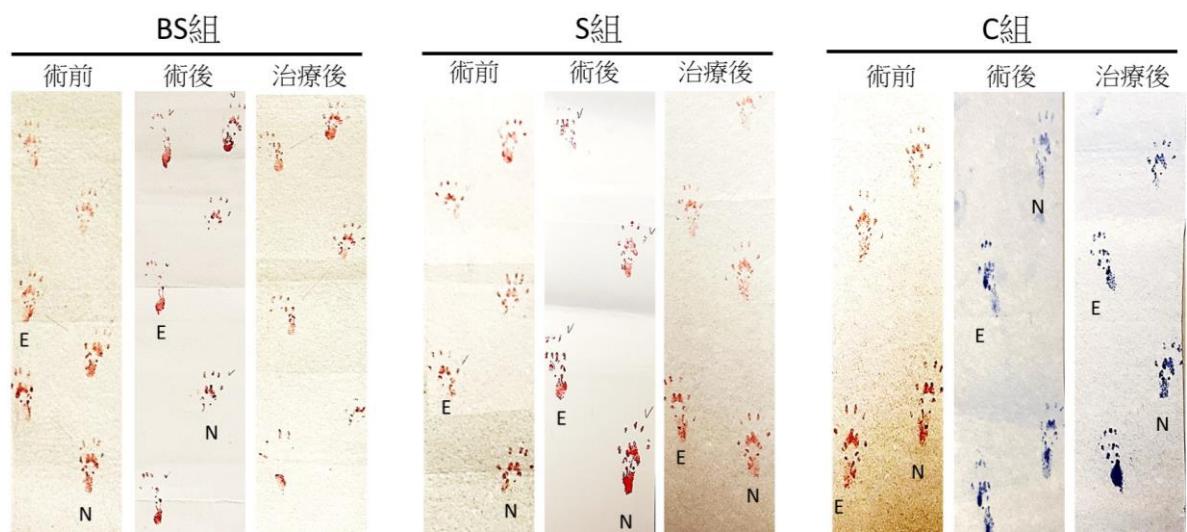
神經運動功能(SFI、TFI及PFI)所得之數據以平均值±標準差(mean  $\pm$  SD)表示。以重複測量變異數分析(repeated measurement ANOVA)方式比較不同時間點的測量數據的差異；肌肉組織形態學量化數據則使用one-way ANOVA比較組別間的差異，事後檢定以Bonferroni test統計方法。利用皮爾森相關分析來分析專家判讀與AI判讀肌肉細胞大小的相關性。所有統計結果均以  $p < 0.05$ 表示具有統計意義。數據均使用SPSS 20.0統計軟體進行計算。

## 肆、實驗結果

### 一、足印測試分析

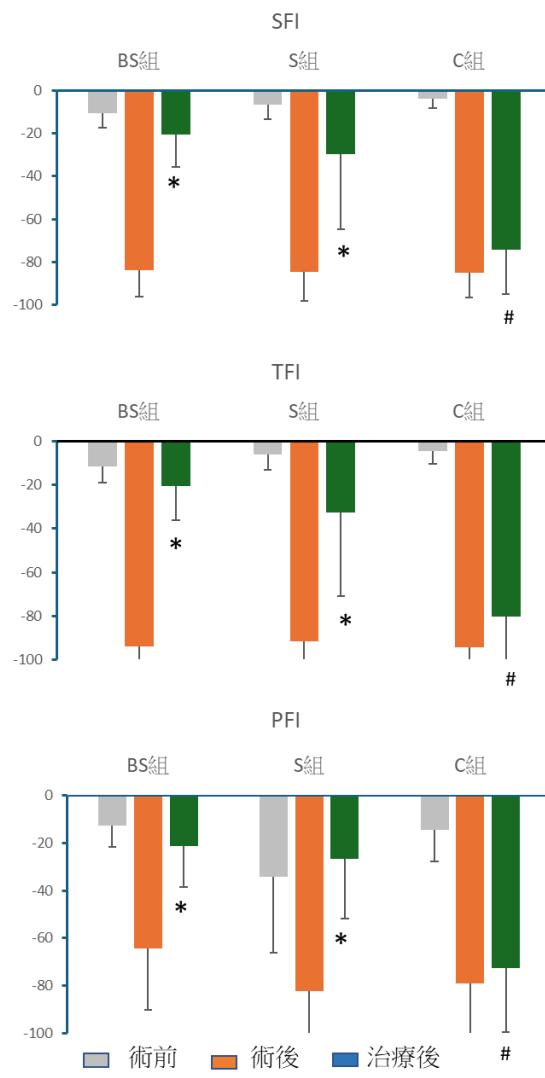
大鼠足印的觀察結果顯示：在 BS 組、S 組、N 組間健側的足印腳掌張開幅度較大，且腳趾向前伸掌，長度較長；反之，受傷側的腳掌因神經受損而腳掌不易張開，

且腳趾蜷曲，向同側彎曲，腳掌長度較短(圖 12)。



圖十二：三組動物在術前、術後以及治療後的足印比較。分別為三組間術前、術後及治療後的比較，左足為受傷側；右足為健側。(研究者自行拍攝、繪製)

於術前、術後及治療後三個時間點，針對三組實驗對象(BS 組、S 組、C 組)進行足印測試，並評估 SFI、TFI 及 PFI 指標(圖十三)。就三組比較而言，在術前，三組 SFI、TFI 及 PFI 指標均無顯著差異( $p > 0.05$ )。術後三組間所有指標(SFI、TFI、PFI)亦皆無顯著差異  $p > 0.05$ )。治療後，SFI、TFI 及 PFI 三組間呈現顯著差異( $p < 0.05$ )。利用事後檢定顯示，BS 組與 S 組分別與 C 組比較起來，皆有顯著差異( $p < 0.001$ )。但 BS 組與 S 組於則無顯著差異 (SFI:  $p = 1.000$ ; TFI:  $p = 0.852$ ; PFL:  $p = 1.000$ )。就三個時間點比較，三組的 SFI、TFI、PFI，術前與術後均明顯不同( $p < 0.001$ )。但 BS 組的術前與治療後則無顯著差異( $p > 0.05$ )；S 組則在 SFI 及 TFI 值術前與治療後仍有顯著差異(SFI:  $p = 0.043$ ; TFI:  $p = 0.029$ )。術後與治療後：BS 組及 S 組的 SFI、TFI、PFI 皆呈現顯著差異( $p < 0.001$ )，但 C 組於所有指標無顯著差異( $p > 0.05$ )

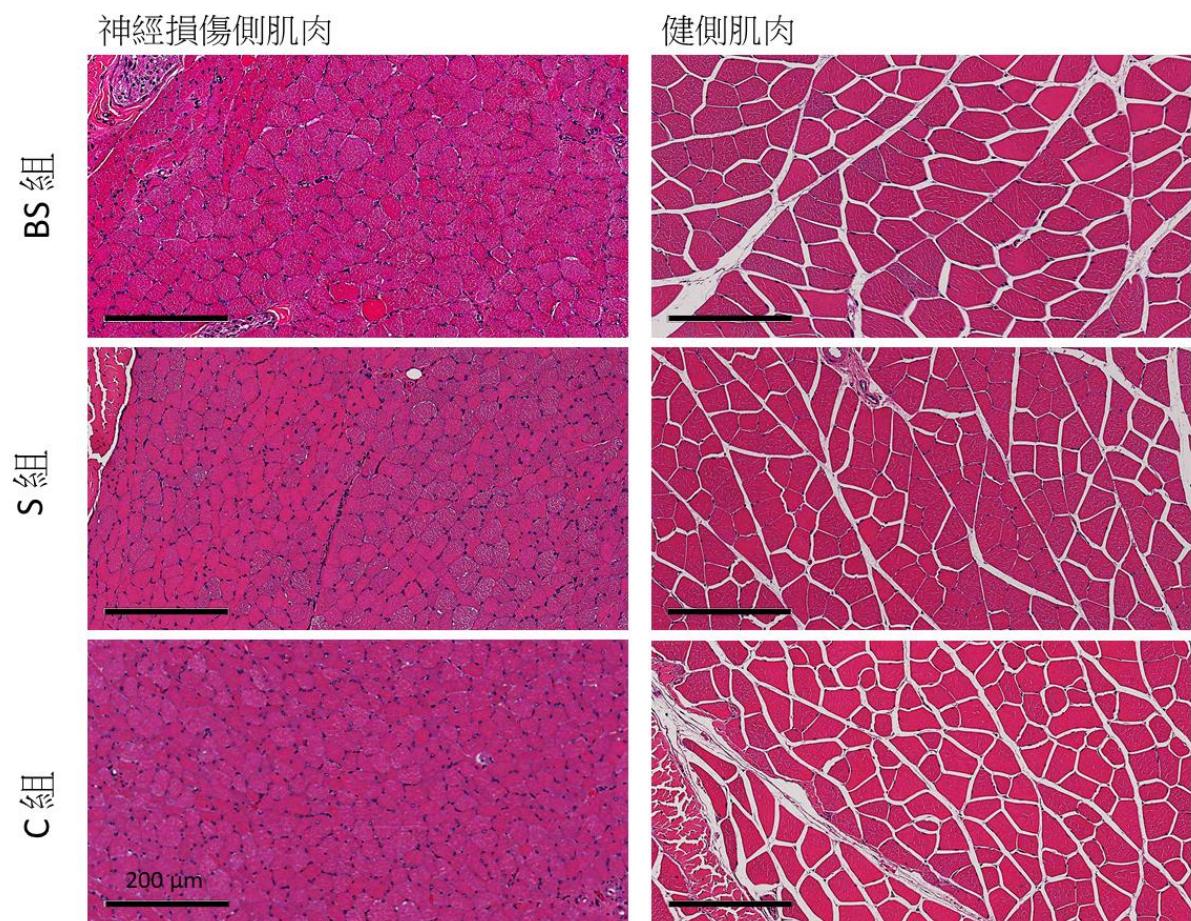


\*: 與術後比較,  $p < 0.05$ ; #: 與術前比較,  $p < 0.05$

圖十三：三組坐骨神經損傷大鼠在術前、術後及治療後，坐骨神經功能指數、脛神經功能指數及腓神經功能指數的變化。(研究者自行繪製)

## 二、肌肉細胞形態學分析

三組動物之健側及受傷側之腓腸肌 H&E 染色結果顯示，受傷側的去神經肌肉 CSA 比較小、肌肉細胞界線不明確、細胞間隙較少及發炎組織明顯較多(圖十四)。



圖十四：各組動物健側與受傷側之 H&E 染色結果代表圖(研究者自行拍攝、繪製)

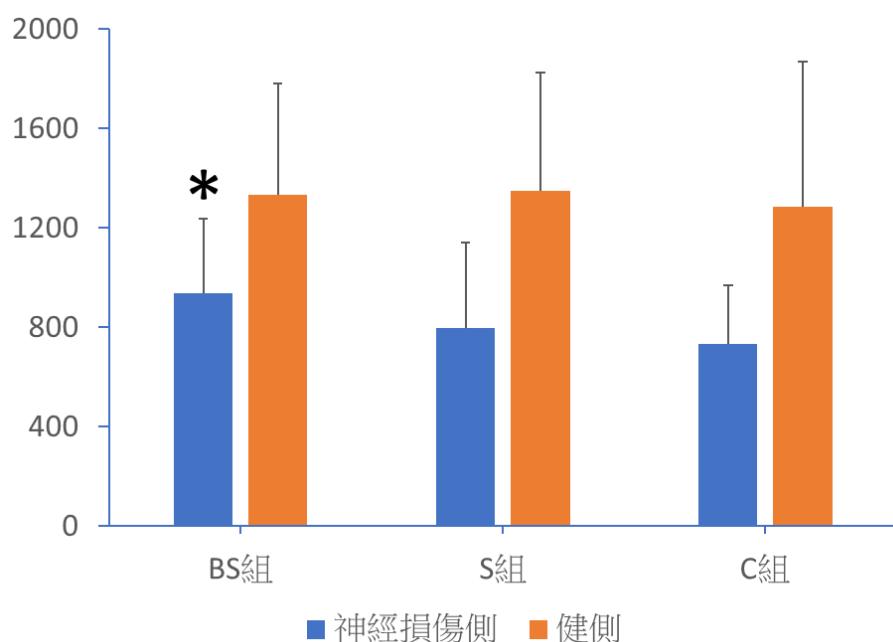
### (一) 專家辨識及判讀結果

專家進行人工圈選肌肉細胞，做形態學定量分析，並計算受損側與健側肌肉細胞截面積之比值。結果顯示(表一、圖十五)，三組間健側的 CSA 無顯著差異( $p > 0.05$ )，但三組間受傷側的 CSA 有顯著差異( $p > 0.05$ )，平均值的大小依序為 BS 組 > S 組 > C 組。BS 組與 C 組間呈現顯著差異 ( $p < 0.05$ )，但 S 組與 C 組間無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

表一：專家計算各組的肌肉細胞截面積(研究者自行繪製)

部位	組別	數量	肌肉細胞截面積 ( $\mu\text{m}^2$ )
			平均數 $\pm$ 標準差
健側	BS	10	1319.80 $\pm$ 279.52
	S	10	1341.28 $\pm$ 297.00
	C	10	1328.90 $\pm$ 361.85
受傷側	BS	10	943.00 $\pm$ 129.55*
	S	10	801.37 $\pm$ 292.23
	C	10	728.15 $\pm$ 128.81

\*:  $p < 0.05$



圖十五：專家辨識肌肉細胞截面積結果(研究者自行繪製)

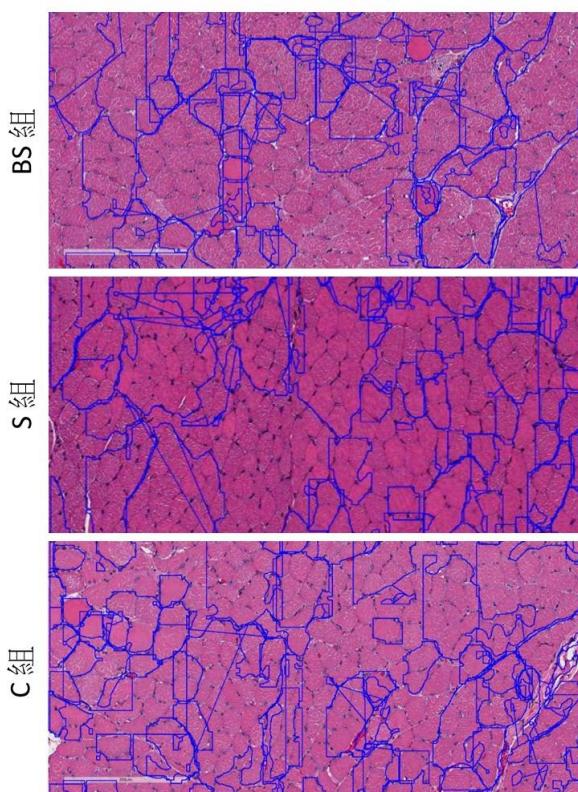
## (二) AI 辨識及判讀結果

利用 roboflow 訓練好肌肉模型進行 AI 圈選肌肉細胞(實例分割)，做形態學定量分析。結果顯示，AI 可以成功辨識三組間健側的肌肉細胞，並計算出細胞面

積(像素)，且三組間 無顯著差異( $p > 0.05$ )。但三組間受傷側的肌肉細胞，AI 則無法精確圈選出萎縮的細胞，CSA 的變異性過大，尤其是 N 組受傷側的數值及標準差非常大，顯示 AI 圈選出的數值有明顯錯誤(表二)。以 AI 對三組受傷側萎縮肌肉的圈選看來，AI 無法辨識出萎縮的肌肉邊界、形狀及紋理(圖十六)。

表二：AI 計算各組的肌肉細胞截面積(研究者自行繪製)

部位	組別	數量	肌肉細胞截面積 (像素)
			平均數 $\pm$ 標準差
健側	BS	10	8671.62 $\pm$ 1833.74
	S	10	8266.98 $\pm$ 1641.23
	C	10	9333.17 $\pm$ 3114.86
受傷側	BS	10	9133.08 $\pm$ 6527.57
	S	10	9210.44 $\pm$ 8433.29
	C	10	19245.86 $\pm$ 19793.2



圖十六：AI 判讀去神經肌肉的明顯錯誤，測量受傷側肌肉細胞截面積時的準確性較低。(AI 圈選研究者自行拍攝肌肉細胞圖片)

### (三) 專家判讀與 AI 判讀在肌肉細胞截面積測量上的相關性

研究結果顯示，在健側肌肉的分析中，專家判讀與 AI 判讀的肌肉細胞截面積具有顯著的正相關性（皮爾森相關係數  $r = 0.433$ ， $p = 0.019$ ， $n = 30$ ）。這表示 AI 在測量健側肌肉細胞截面積時，與專家的判讀結果具有一定程度的一致性。然而，在受傷側肌肉的分析中，專家判讀與 AI 判讀的肌肉細胞截面積之間並未呈現顯著的相關性（皮爾森相關係數  $r = 0.013$ ， $p = 0.948$ ， $n = 30$ ）。這表明 AI 在測量受傷側肌肉細胞截面積時，與專家的判讀結果之間的一致性較低(表三)。

表三：專家計算與 AI 計算各組的肌肉細胞截面積之相關性(研究者自行繪製)

部位	AI 判讀	皮爾森 (Pearson) 相關	專家判讀
健側		皮爾森 (Pearson) 相關 顯著性 (雙尾)	0.433* 0.019
		N	30
受傷側	AI 判讀	皮爾森 (Pearson) 相關 顯著性 (雙尾)	0.013 0.948
		N	30

\* 相關性在  $P < 0.05$  為顯著 (雙尾)。

## 伍、討論

本研究驗證了結合水中運動與血流限制訓練（Blood Flow Restriction, BFR）對坐骨神經損傷後肌肉萎縮的延緩效果。實驗結果顯示，在神經功能評估（SFI、TFI、PFI）與肌肉形態學（CSA）方面，BS 組皆顯著優於 S 組與 C 組，顯示 BFR 能有效促進神經修復並維持肌肉結構。從過去的文獻中，BFR 訓練的效果已獲得證實；而動物研究亦指出，單獨使用 BFR 結合被動性電刺激無法有效增加肌肉量，唯有主動性肌肉收縮配合 BFR 才能達到增肌與增力效果（Ramme, Darcy et al., 2020）。本研究首度將 BFR 與主動性水中游泳運動結合應用於坐骨神經損傷動物模型中，證實其對肌肉量與神經功能恢復均具顯著效益，與過去研究結果相符。

本研究導入 AI 影像分析技術，嘗試以 YOLOv8 模型進行肌肉切片的實例分割，初步成果顯示，AI 在分析健側肌肉具有良好準確性，與專家判讀結果呈正相關；然而在受損側萎縮肌肉的判讀準確性不足，無法正確圈選病變細胞邊界，反映出 AI 在處理複雜病理樣態上的限制。造成此問題的主因包含訓練資料中病變樣本不足、AI 模型演算法對於變異組織特徵識別能力有限及影像紋理複雜。針對上述困難，我們嘗試增加病變影像數據、優化影像前處理流程、調整 YOLOv8 訓練參數，並與專家建立交叉比對流程，提高 AI 判讀準確性與效率。

關於肌肉病理切片的量化判讀，以人工計算方式需要判讀人員有高度的專業性及經驗才能細緻判讀複雜組織，但其耗時繁瑣、主觀性較強及易疲勞 (Papadopoulos et al. 2007; Briguet et al. 2004)。應用 AI 醫學影像實例分割技術可快速處理大量樣本，提高效率、客觀性與量化分析能力 (Lau et al. 2018; Mayeuf-Louchart et al. 2018)，但其對 GPU 硬體設備要求高、事前需大量切片資料做機器學習的資料訓練。AI 在判讀肌肉或其他影像時，主要依據數據特徵，如紋理、形狀、顏色、對比度、邊緣等，判別肌肉是否正常。因此，AI 在判讀病變或受損肌肉組織時可能受到多種因素影響，主要包含：訓練數據偏差、影像品質與變異性、演算法局限性、專家判讀差異性以及缺乏病理資訊 (Mayeuf-Louchart et al. 2018)。為進一步提升 AI 在病變或萎縮肌肉切片上的準確度，未來可於 Roboflow 平台進行優化訓練流程，包括：增加病變影像訓練量、使用實例分割而非邊框框選、套用進階資料擴增技術（如旋轉、模糊、亮度變化等）、引入 AI 錯誤判讀影像進行強化訓練、並與專家標註建立半監督式資料集，以增強模型對異常組織的辨識能力 (Dai et al., 2023; Lau et al., 2018)。肌肉病理切片在臨牀上廣泛應用於診斷如肌營養不良症、多發性肌炎、皮肌炎、神經源性肌萎縮等疾病，主要觀察肌纖維形態、大小與分布異常 (Briguet et al., 2004; Papadopoulos et al., 2007)。本研究所建立的 AI 判讀流程具有高度通用性與擴展性，只要更換標註資料與訓練目標，即可快速應用於其他肌肉病理切片的分析，無需重建演算法架構 (Mayeuf-Louchart et al., 2018; Sluimer & Prokop, 2010)。未來若能整合更多臨床肌肉切片資料庫並持續優化 AI 模型架構，有望應用於早期病變篩檢、自動化分析與個別化診斷，將成為提升醫療效率與準確度的重要助力。

## 陸、結論

本研究結果顯示，游泳結合 BFR 訓練在對於去神經肌肉的恢復展現出顯著的效果，特別是在恢復去神經化肌肉細胞大小方面，有明顯的抗萎縮成效。此發現不僅為神經損傷後的復健治療提供了科學依據，更突顯了 BFR 訓練在延緩肌肉萎縮方面的可行性。本研究更提供另一項創新的意義，及引入 AI 判讀技術證實 AI 影像與專家判讀技術在健側肌肉量化分析中具有效功用，但在受損肌肉判讀上仍有挑戰。專家與 AI 判讀得比較如(表四)所示，整體而言，專家在判讀肌肉病理切片的準確性上仍具明顯優勢，能憑藉經驗辨識細微結構變化，提供更穩定結果。然而，AI 在健側肌肉的判讀中與專家結果呈現正相關，且具備處理速度快、客觀性高、可自動批次分析等優點，可提升研究效率與數據處理能力。

表四：專家判讀與 AI 判讀之比較

項目	專家判讀	AI 判讀
判讀方式	使用 ImageJ 由專家人工圈選肌肉細胞輪廓	使用 YOLOv8 模型進行影像實例分割與自動圈選
所需時間	約需 6 個月完成所有樣本的分析	模型訓練完成後，約 10 分鐘即可分析全部樣本
健側準確性	高，為臨床常規標準，操作穩定	與專家結果具顯著正相關 ( $r = 0.433$ ， $p = 0.019$ )
受傷側準確性	能清楚辨識萎縮肌肉邊界與面積	判讀不一致，無顯著相關性 ( $r = 0.013$ ， $p = 0.948$ )，辨識困難
主觀性/客觀性	主觀性高，易受操作人員經驗影響	客觀性高，依影像特徵辨識，無個人偏差
疲勞與穩定性問題	易受疲勞與視覺判讀差異影響，需高度專注	自動化執行穩定，不受操作員狀態影響
對異常病變反應	可辨識不規則或病變組織	對變異性高的病變細胞識別效果不佳，需優化模型
應用限制	高人力成本、效率較低	初期訓練需大量數據與 GPU 資源，尚未能完全取代專家角色

基於目前的研究結果，本研究體認到 AI 在處理病變或受損肌肉組織時，其判讀能力仍存在局限性，需要輔以專家的病理判讀，始能獲得更精確的量化數據。因此，在現階段，AI 在

肌肉病理分析中仍無法完全取代專家的角色，而是作為一種輔助工具，以提升診斷效率和準確性。未來，若能結合兩者的優勢，同時讓 AI 做病理切片判讀後，輔以專家判讀後的數據，找出兩者之異同，更可精確的做出最佳的診斷。

本研究計畫擬將實驗完成後的 AI 程式碼公開，促進跨領域的合作，讓更多研究者及臨床專家能夠使用、做為改進與拓展相關技術，以推動 AI 肌肉病理分析領域的發展。隨著深度學習技術不斷進步，若能將本研究已經建立好的程式碼公開讓相關病理判讀開發人員持續訓練 AI，使其圖像識別能力提升，AI 便能夠更精準地辨識複雜的病理特徵，更好地理解病理圖像的上下文信息，提高判讀的準確性，便可解決本研究的困境，也可在早期階段檢測到潛在的肌肉病變，識別高風險人群，提供個性化的預防建議，降低疾病發生率。總而言之，AI 在病理判讀領域的應用，將會是醫療領域的重大變革。未來，透過深度學習優化與專家協作，AI 有望實現更精確的肌肉疾病診斷，以輔助專家判讀，提升診斷效率，AI 不會取代病理專家，而是成為醫師的輔助工具及參考資源。

## 柒、文獻

- Abe, T., S. Fujita, T. Nakajima, M. Sakamaki, H. Ozaki, R. Ogasawara, M. Sugaya, M. Kudo, M. Kurano, T. Yasuda, Y. Sato, H. Ohshima, C. Mukai and N. Ishii (2010). Effects of Low-Intensity Cycle Training with Restricted Leg Blood Flow on Thigh Muscle Volume and VO<sub>2</sub>MAX in Young Men. *J Sports Sci Med* 9(3): 452-458.
- Abe, T., M. Sakamaki, S. Fujita, H. Ozaki, M. Sugaya, Y. Sato and T. Nakajima (2010). Effects of low-intensity walk training with restricted leg blood flow on muscle strength and aerobic capacity in older adults. *J Geriatr Phys Ther* 33(1): 34-40.
- Amani-Shalamzari, S., S. Rajabi, H. Rajabi, D. E. Gahreman, C. Paton, M. Bayati, T. Rosemann, P. T. Nikolaidis and B. Knechtle (2019). Effects of Blood Flow Restriction and Exercise Intensity on Aerobic, Anaerobic, and Muscle Strength Adaptations in Physically Active Collegiate Women. *Front Physiol* 10: 810.
- Bjørnsen, T., M. Wernbom, A. Løvstad, G. Paulsen, R. F. D'Souza, D. Cameron-Smith, A. Flesche, J. Hisdal, S. Berntsen and T. Raastad (2019). Delayed myonuclear addition, myofiber hypertrophy, and increases in strength with high-frequency low-load blood flow restricted training to volitional failure. *J Appl Physiol* (1985) 126(3): 578-592.
- Briguet A, Courdier-Fruh I, Foster M, Meier T, Magyar JP. (2004). Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul Disord*. 14(10):675 – 82.

- Chan JKC. The Wonderful Colors of the Hematoxylin – Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. (2014). International Journal of Surgical Pathology. 22(1):12-32.
- Cho, Y. H. and T. B. Seo (2021). Effect of treadmill exercise combined with bone marrow stromal cell transplantation on atrophy-related signaling pathway in the denervated soleus muscle. *J Exerc Rehabil* 17(6): 395-402.
- Dai J, Udupa JK, Torigian DA, Tong Y, Nie P, Zhang J, Li R, Han S, Liu T. A. (2023). Deep Learning Based Geographic Attention Model for Body Composition Tissue Segmentation. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*. 12468:1246804.
- Faturi, F. M., R. C. Franco, D. Gigo-Benato, A. C. Turi, M. A. Silva-Couto, S. P. Messa and T. L. Russo (2016). Intermittent stretching induces fibrosis in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 53(1): 118-126.
- Held, S., M. Behringer and L. Donath (2020). Low intensity rowing with blood flow restriction over 5 weeks increases VO<sub>2</sub>max in elite rowers: A randomized controlled trial. *J Sci Med Sport* 23(3): 304-308.
- Isaacs, J., S. Mallu, M. Shall, G. Patel, P. Shah, S. Shah, M. A. Feger, G. Graham and N. Pasula (2017). Does partial muscle reinnervation preserve future re-innervation potential? *Muscle Nerve* 56(6): 1143-1148.
- Lau YS, Xu L, Gao Y, Han R. (2018). Automated muscle histopathology analysis using CellProfiler. *Skelet Muscle*. 18;8(1):32.
- Li, Q., P. Zhang, X. Yin, N. Han, Y. Kou and B. Jiang (2014). Early sensory protection in reverse end-to-side neurorrhaphy to improve the functional recovery of chronically denervated muscle in rat: a pilot study. *J Neurosurg* 121(2): 415-422.
- Mayeuf-Louchart, A., et al. (2018). Muscle stem cells and regenerative myogenesis: an update on cell intrinsic and extrinsic mechanisms regulating skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Research*, 30, 178 – 191.
- Minniti, M. C., A. P. Statkevich, R. L. Kelly, V. P. Rigsby, M. M. Exline, D. I. Rhon and D. Clewley (2020). The Safety of Blood Flow Restriction Training as a Therapeutic Intervention for Patients With Musculoskeletal Disorders: A Systematic Review. *Am J Sports Med* 48(7): 1773-1785.
- Pachter, B. R. and A. Eberstein (1989). Passive exercise and reinnervation of the rat denervated extensor digitorum longus muscle after nerve crush. *Am J Phys Med Rehabil* 68(4): 179-182.
- Papadopoulos, F., et al. (2007). Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastructural Pathology*, 31(4 – 6), 401 – 407.
- Patterson, S. D., L. Hughes, S. Warmington, J. Burr, B. R. Scott, J. Owens, T. Abe, J. L. Nielsen, C. A. Libardi, G. Laurentino, G. R. Neto, C. Brandner, J. Martin-Hernandez and J. Loenneke (2019). Blood Flow Restriction Exercise: Considerations of Methodology, Application, and Safety. *Front Physiol* 10: 533.
- Peviani, S. M., T. L. Russo, J. L. Durigan, B. S. Vieira, C. M. Pinheiro, M. S. Galassi and T. F. Salvini (2010). Stretching and electrical stimulation regulate the metalloproteinase-2 in rat denervated skeletal muscle. *Neurol Res* 32(8): 891-896.

- Ramme, A. J., R. Darcy, B. J. Rourke, C. Davis, J. F. Markworth, L. Junginger, T. Maerz, S. V. Brooks and A. Bedi (2020). "Local and Systemic Effects of Blood Flow Restriction Therapy in an Animal Model." *Am J Sports Med* 48(13): 3245-3254.
- Russo, T. L., S. M. Peviani, J. L. Durigan, D. Gigo-Benato, G. B. Delfino and T. F. Salvini (2010). Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 31(1): 45-57.
- Salvini, T. F., J. L. Durigan, S. M. Peviani and T. L. Russo (2012). Effects of electrical stimulation and stretching on the adaptation of denervated skeletal muscle: implications for physical therapy. *Rev Bras Fisioter* 16(3): 175-183.
- Sato, Y. (2005). The history and future of KAATSU Training. *International Journal of KAATSU Training Research* 1(1): 1-5.
- Scalabrin, M., N. Pollock, C. A. Staunton, S. V. Brooks, A. McArdle, M. J. Jackson and A. Vasilaki (2019). Redox responses in skeletal muscle following denervation. *Redox Biol* 26: 101294.
- Sgromolo, N. M., J. M. Cancio and P. C. Rhee (2020). Safety and Efficacy of Blood Flow Restriction Therapy after Operative Management of Distal Radius Fractures: A Randomized Controlled Study. *J Wrist Surg* 9(4): 345-352.
- Shimada, N., A. Sakata, T. Igarashi, M. Takeuchi and S. Nishimura (2020). M1 macrophage infiltration exacerbate muscle/bone atrophy after peripheral nerve injury. *BMC Musculoskelet Disord* 21(1): 44.
- Slysz, J., J. Stultz and J. F. Burr (2016). The efficacy of blood flow restricted exercise: A systematic review & meta-analysis. *J Sci Med Sport* 19(8): 669-675.
- Sluimer, I., & Prokop, M. (2010). Challenges in automated analysis of medical images. *Radiology*, 256(2), 364 – 380.
- Sudo, M., S. Ando and Y. Kano (2017). Repeated blood flow restriction induces muscle fiber hypertrophy. *Muscle Nerve* 55(2): 274-276.
- Udina, E., A. Puigdemasa and X. Navarro (2011). Passive and active exercise improve regeneration and muscle reinnervation after peripheral nerve injury in the rat. *Muscle Nerve* 43(4): 500-509.

## 【評語】052006

創新地將「血流限制訓練 (BFR)」結合水中運動，應用於周邊神經損傷後的肌肉萎縮復健，具實證價值。在受損側肌肉萎縮情況下，AI 無法準確圈選細胞邊界，與專家判讀結果缺乏一致性。AI 訓練樣本偏向正常肌肉，導致模型對萎縮肌肉辨識效果不佳，影響整體應用性。實驗僅觀察術後短期 10 天介入效果，無法評估長期復健成效。

本件科展作品以大鼠坐骨神經夾擠損傷模型，探討血流限制訓練 (Blood Flow Restriction, BFR) 結合水中低強度運動對周邊神經損傷後肌肉萎縮的預防效果，並將復健療效以專家人工判讀與 AI 影像 (YOLOv8 實例分割模型) 量化肌肉切片進行客觀數據比較。研究完成三組對照 (BFR+游泳、單純游泳、偽處理)，動物術前、術後與治療後運動功能 (足印分析 SFI/TFI/PFI) 與腓腸肌 H&E 切片分析。以專家及 AI 檢測分析肌肉橫截面積 (CSA)，強調現代 AI 分析與傳統判讀的差異及其應用前景。

1. 題目緊扣臨床周邊神經受傷與去神經肌肉萎縮、復健新策略之應用，具明確醫學價值。本研究主要基於大鼠模型進行，雖然動物實驗是醫學研究的重要環節，但其結果不一定能完

全應用至複雜的人體生理情況。因此，研究成果仍需未來的人體臨床試驗進一步驗證。

2. 將 AI 影像分割方法 (YOLOv8) 導入肌肉病理組織分析，與人工判讀直接比較，是近年醫學影像發展熱點。AI 模型訓練數據局限，AI 對健側正常切片效果佳，但萎縮病變組織因標訓練少、紋理複雜，分割失效。雖有討論，但實驗數據量仍限制模型優化。
3. 未詳細說明血流限制結合游泳訓練的長期效果如何，以及停止訓練後肌肉萎縮的恢復或復發情況，也未深入探討血流限制和游泳訓練如何從分子層面或更詳細的生理機制上具體影響肌肉細胞，從而達到延緩萎縮的效果，這對於臨床應用是重要的考量。
4. 部分統計討論不夠深入：同組三種運動功能指標未見細項呈現與肌肉形態指標直接對照（如個體數據趨勢對應）。
5. AI 部分需有更細的錯誤率分析（如假分割、漏分割類型統計），提升未來優化價值。研究中若能更詳細地討論 AI 的準確性邊界和潛在局限性會更完善。

作品海報



# 血流限制訓練在周邊神經損傷後肌肉萎縮復健中的應用： 專家判讀與人工智慧量化病理分析的對比研究

Application of Blood Flow Restriction Training in the Rehabilitation of Muscle Atrophy after Peripheral Nerve Injury:  
A Comparative Study of Expert Interpretation and Artificial Intelligence Quantitative in Pathological Analysis

## ◎【研究動機】

- 周邊神經損傷導致肌肉萎縮與功能喪失
- 現有非手術療法效果有限，急需新穎復健手段
- BFR 低強度訓練具提升肌力潛力，但尚未應用於神經損傷復健

## ◎【研究目的】

- 本研究擬驗證水中低強度運動結合血流限制技術 (BFR)
- 在延緩周邊神經損傷後的肌肉萎縮之可行性
- 分析 AI 與人工判讀在肌肉細胞大小測量的一致性，探討其在病理分析的可應用性

## ◎【研究方法】

- 動物模型：坐骨神經夾擠大鼠
- 訓練介入：水中低強度運動 + 血流限制
- 評估工具：H&E 染色 + AI 與人工影像分析比對

## ◎【創新點】

- 將 BFR 應用於延緩神經損傷後肌肉的萎縮
- 驗證 AI 技術判讀以輔助病理影像分析，提高效率與客觀性

# 摘要

本研究旨在探討血流限制法結合游泳訓練對於坐骨神經夾擠損傷後延緩大鼠肌肉萎縮的療效，並比較AI判讀技術與傳統人工判讀在肌肉細胞大小測量上的差異，分析兩者間的相關性與精確度。研究採用兩種方法量化肌肉細胞大小：(1)專家病理判讀：由專業人員進行傳統的顯微鏡下肌肉細胞大小測量。(2)人工智慧(artificial intelligence，AI)醫學影像實例分割技術(instance segmentation)：利用AI演算法自動識別並計算肌肉細胞的大小。期望藉由提供科學證據，支持血流限制結合游泳訓練在延緩神經損傷後肌肉萎縮方面的應用。同時，引入AI醫學影像實例分割技術，提高肌肉細胞大小測量的效率與客觀性，分析AI醫學影像分析技術在肌肉組織病理研究中的有效性，可為未來病理切片分析的參考模式。

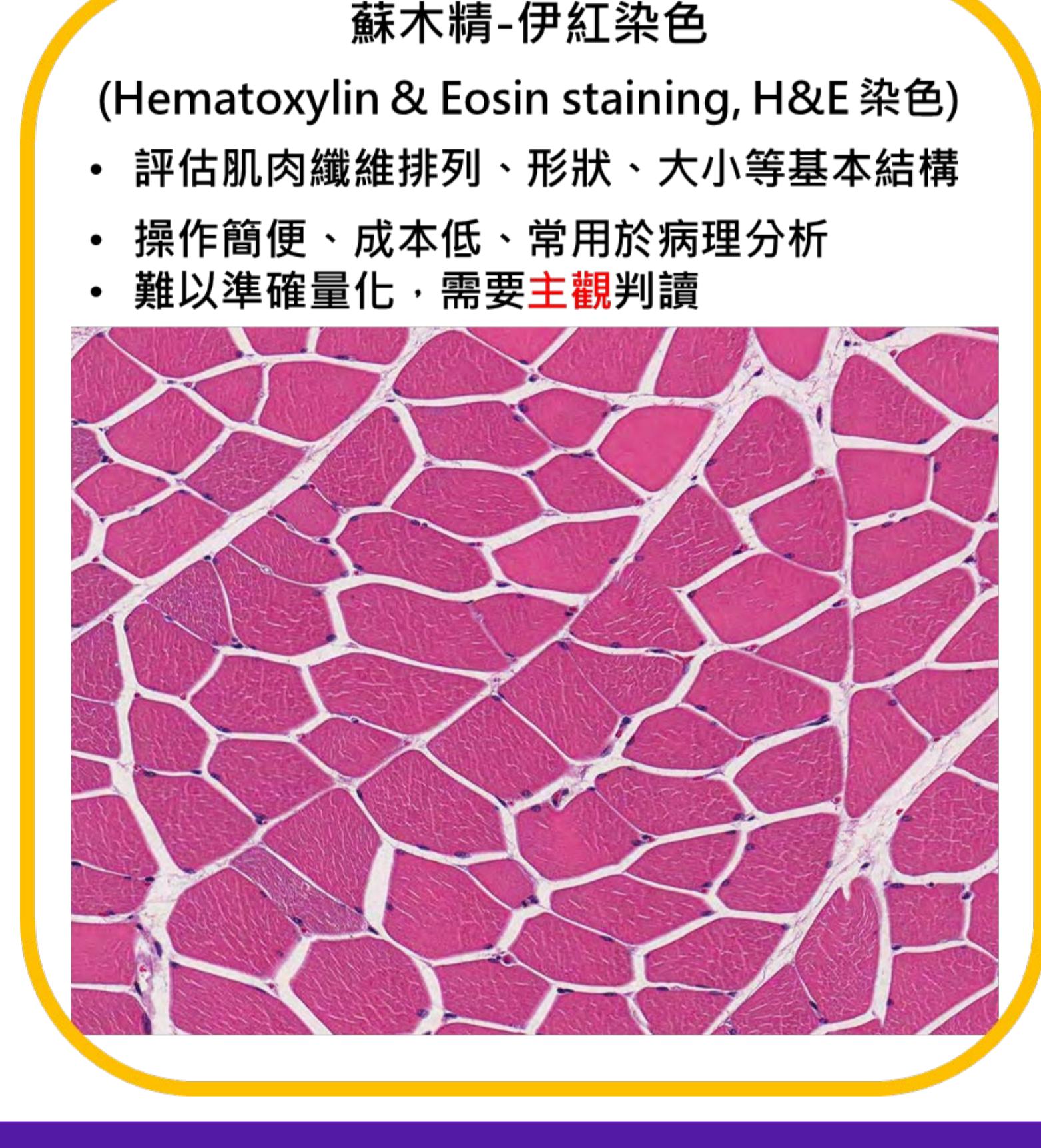
關鍵字：血流限制、去神經肌肉萎縮、AI量化肌肉病理切片

# 前言

## 研究動機



## 常用評估肌肉型態學方法



# 研究目的

- 利用大白鼠坐骨神經夾擠損傷模型，模擬臨床上周邊神經損傷引起的肌肉萎縮。
- 結合血流限制與游泳訓練，探討其對神經損傷後肌肉萎縮的潛在治療效果。
- 比較AI判讀技術與傳統人工判讀在肌肉細胞大小測量上的差異，分析兩者間的相關性，驗證AI技術在肌肉組織病理分析中的應用價值。
- 引入AI醫學影像實例分割技術，提高肌肉細胞大小測量的效率與客觀性。

# 研究方法與材料

## 1. 實驗材料與規劃

### 實驗動物

使用30隻Sprague Dawley大鼠(250-300g)，飼養於中國醫藥大學動物中心，標準環境控制，自由攝食飲水。實驗動物數量已最小化，實驗過程符合3R原則，並經中國醫藥大學實驗動物委員會許可(CMULAB-112-063)。術前適應7-10天，每隻動物僅使用一次。

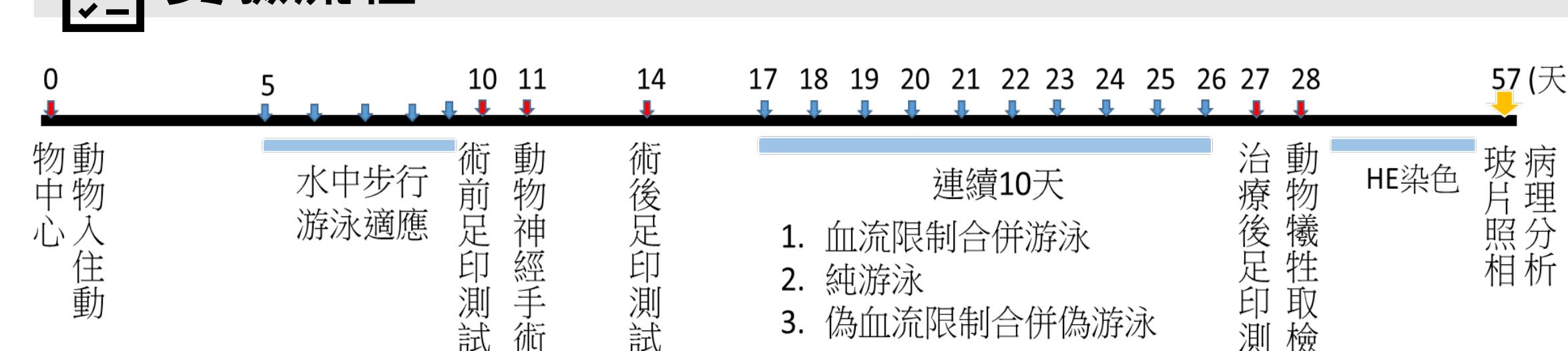
大鼠分組：

- 血流限制合併游泳組 (BS)
- 純游泳組 (S)
- 無血流限制合併偽游泳合併組 (C)

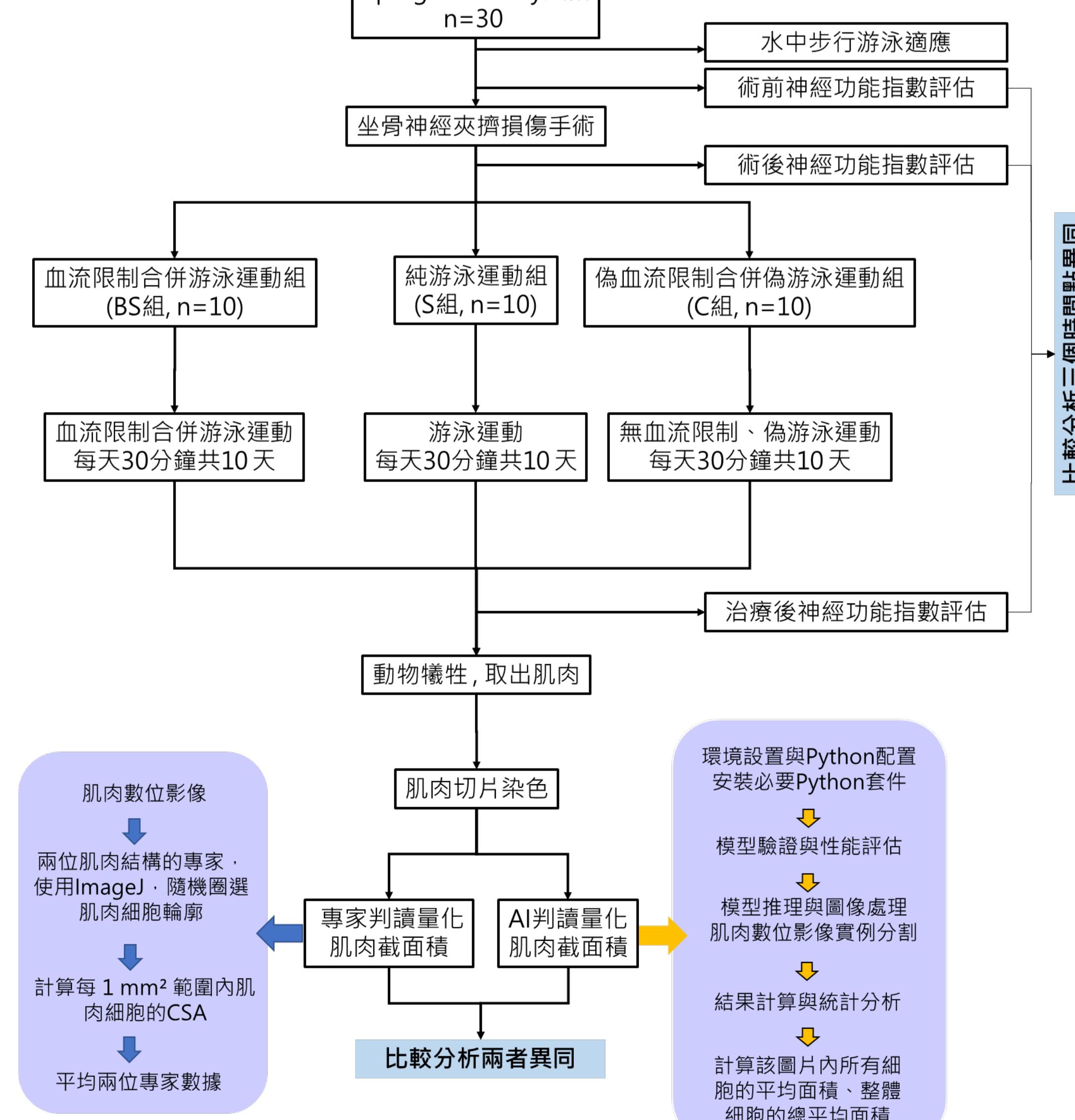
### 研究器材

- 手術用：異佛烷麻醉系統、血管夾(壓力1.5 gm/mm<sup>2</sup>)、9-0尼龍縫合線、消炎藥膏、鼠籠、抗生素。
- 訓練用：輕彈繩帶(寬2公分)、大型塑膠泳箱(86x64x69 cm)、保麗龍浮板、保溫燈。
- 足印測試：紅色印泥、透明通道(120x8.5 cm)、棉紙。
- 專家判讀分析：光學顯微鏡、Leica Aperio 數位玻片掃描機(Aperio Versa 200)。
- AI分析：Roboflow、Google Colab (GPU)、YOLOv8。

### 實驗流程



## 2. 實驗設計



### 3. 實驗方法

#### 坐骨神經夾擠手術

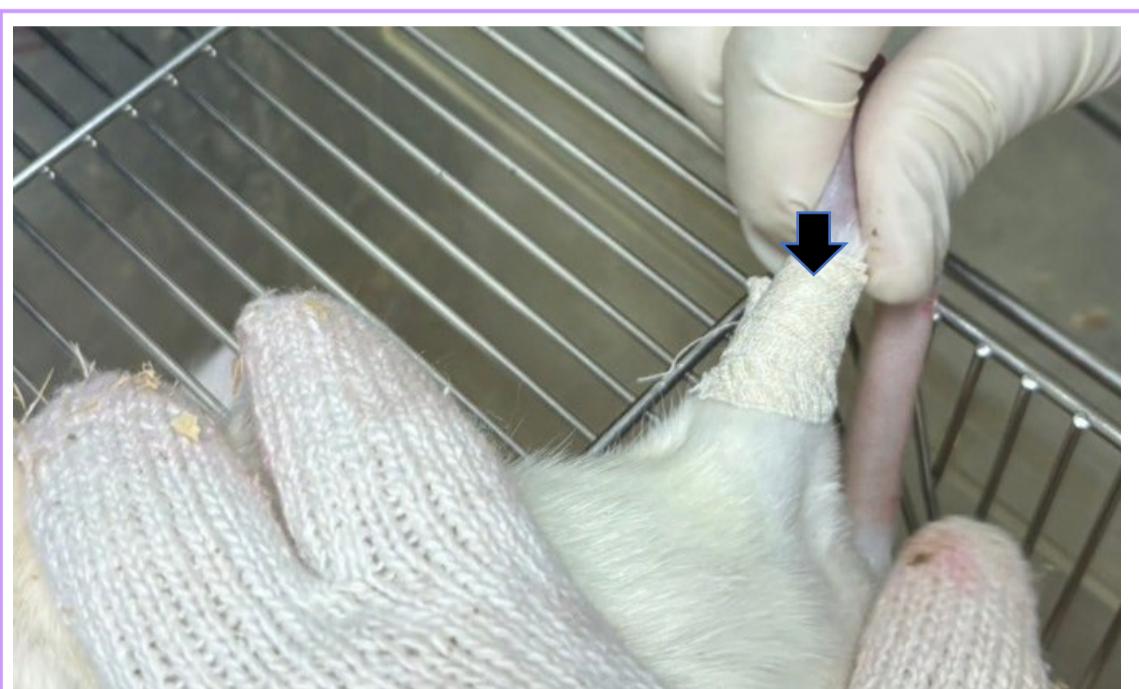


以 2.5% 異佛烷氣體麻醉大鼠，臀部剃毛後，隨機選擇一側坐骨神經進行手術。於大腿外側約 3-4 公分處切開皮膚，暴露坐骨神經後，使用血管夾 (B-3 · 1.5 gm/mm<sup>2</sup>) 於距內閉孔 10 mm 處夾擠 20 分鐘。夾擠處以 9-0 尼龍縫線作標記，術畢縫合皮膚並塗抹消炎藥膏，單籠安置至清醒。術後 3 天內，每日皮下注射 0.5 cc 青黴素預防感染，並觀察生命徵象。



#### 游泳訓練

大型塑膠桶 (240L)，水深60公分，水溫 $32\pm1^{\circ}\text{C}$ ，設有浮板。術前五天進行水中步行游泳適應訓練 (第一天10分鐘，逐日增加5分鐘至30分鐘)。正式治療期間，每日一次30分鐘水中步行游泳。



#### 血流限制處理

於神經受損側肢體近端綁上寬度2公分彈性繩帶，拉至最大張力進行BFR，合併水中運動共30分鐘，持續10天。

#### 足印測試與分析

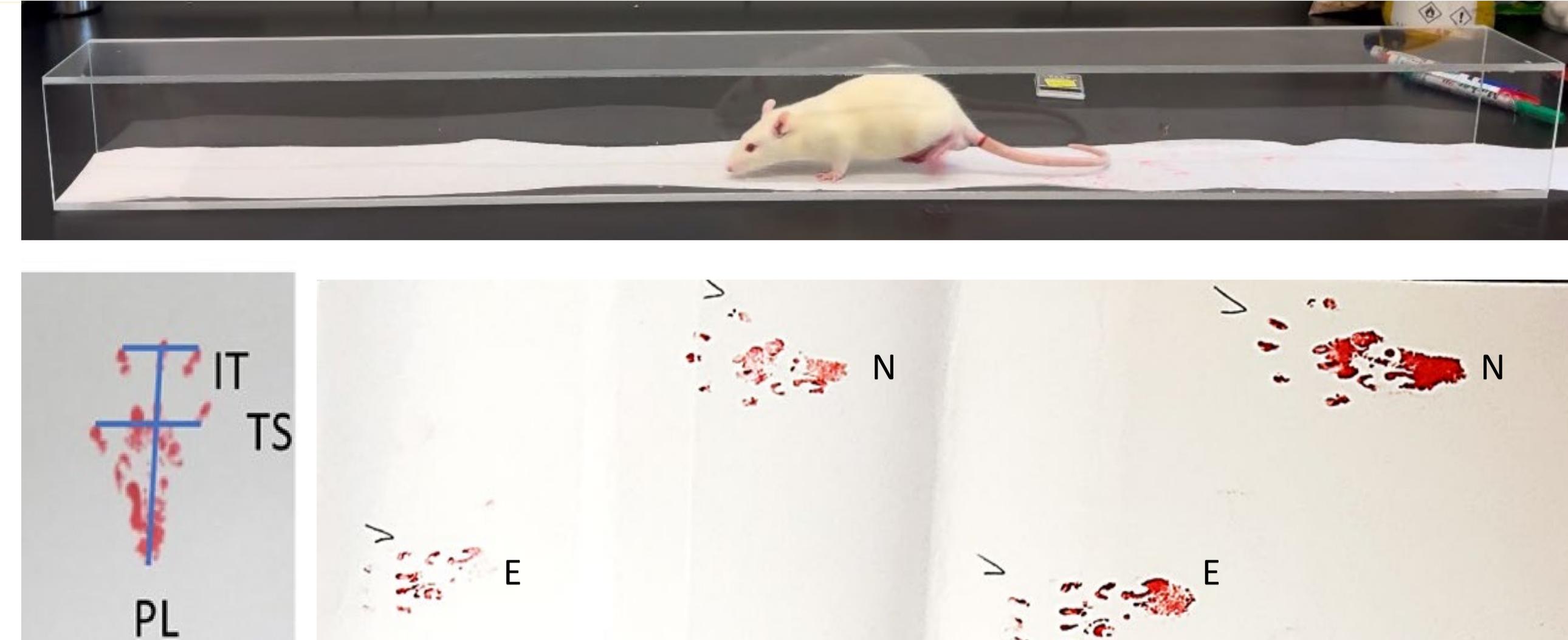
將大鼠後爪沾紅色印泥後行走通過透明通道，取得連續腳印至少三組。測量正常側 (N) 及實驗側 (E) 的足底長度 (NPL/EPL)、腳趾展開度 (NTS/ETS) 和腳趾間展開程度 (NIT/EIT)，並計算坐骨神經功能指數 (SFI)、脛神經功能指數 (TFI) 及腓神經功能指數 (PFI) 評估後肢運動功能恢復。

公式如下：

$$SFI = -38.3([EPL-NPL]/NPL) + 109.5([ETS-NTS]/NTS) + 13.3([EIT-NIT]/NIT) - 8.8$$

$$TFI = -37.3([EPL-NPL]/NPL) + 104.4([ETS-NTS]/NTS) + 45.6([EIT-NIT]/NIT) - 8.8$$

$$PFI = 174.9([EPL-NPL]/NPL) + 80.3([ETS-NTS]/NTS) - 13.4$$

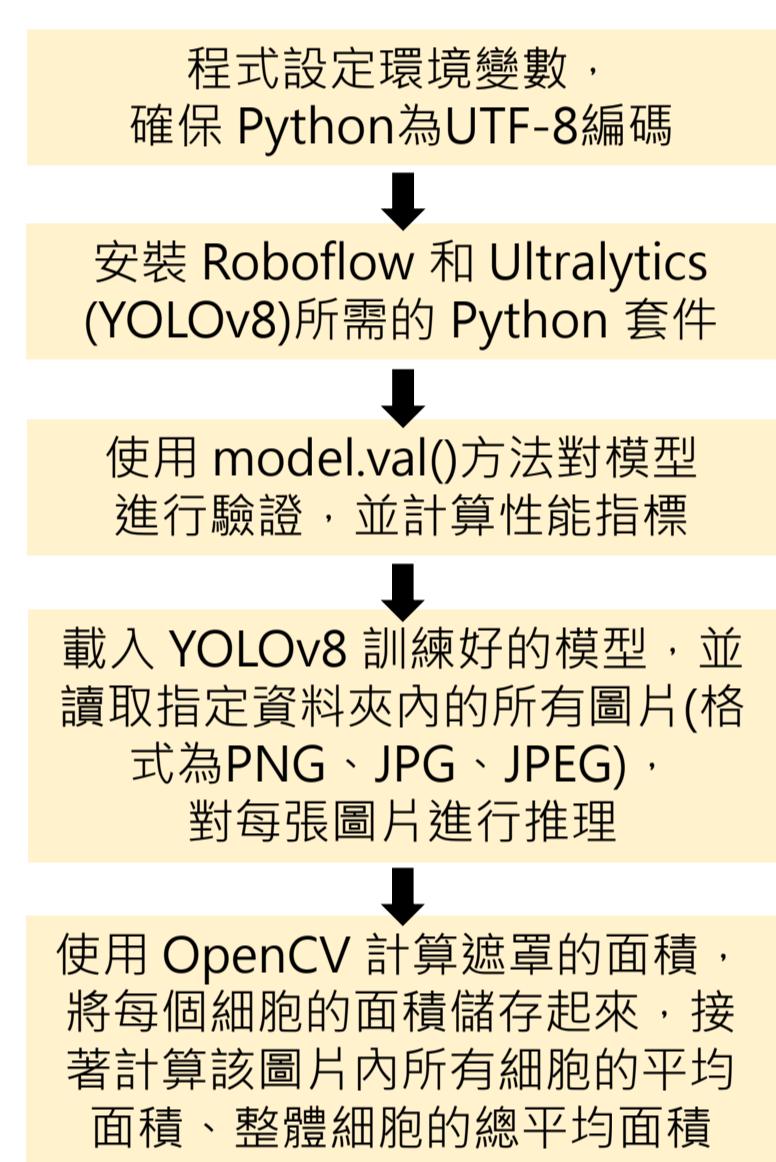
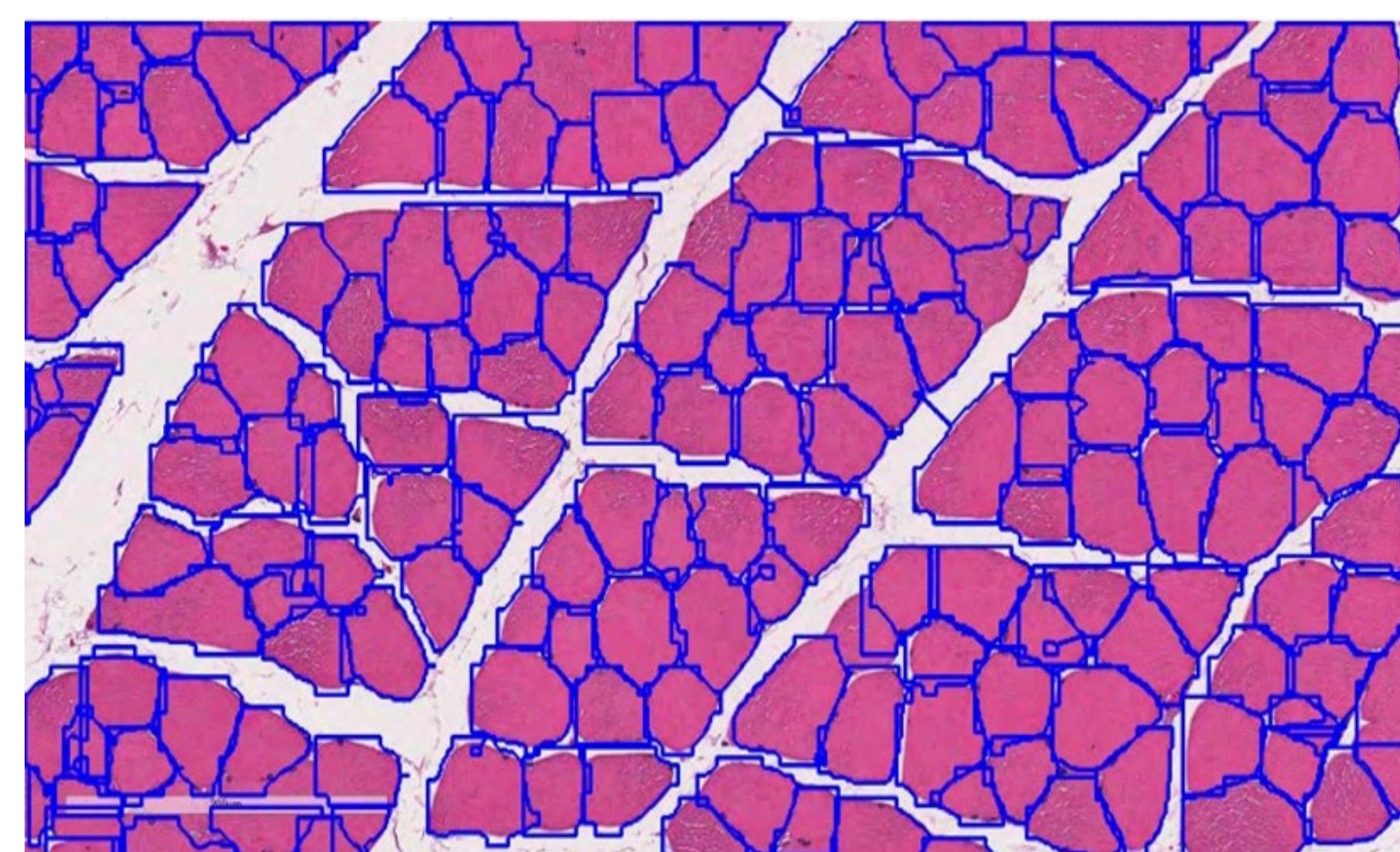


#### 肌肉組織形態學評估

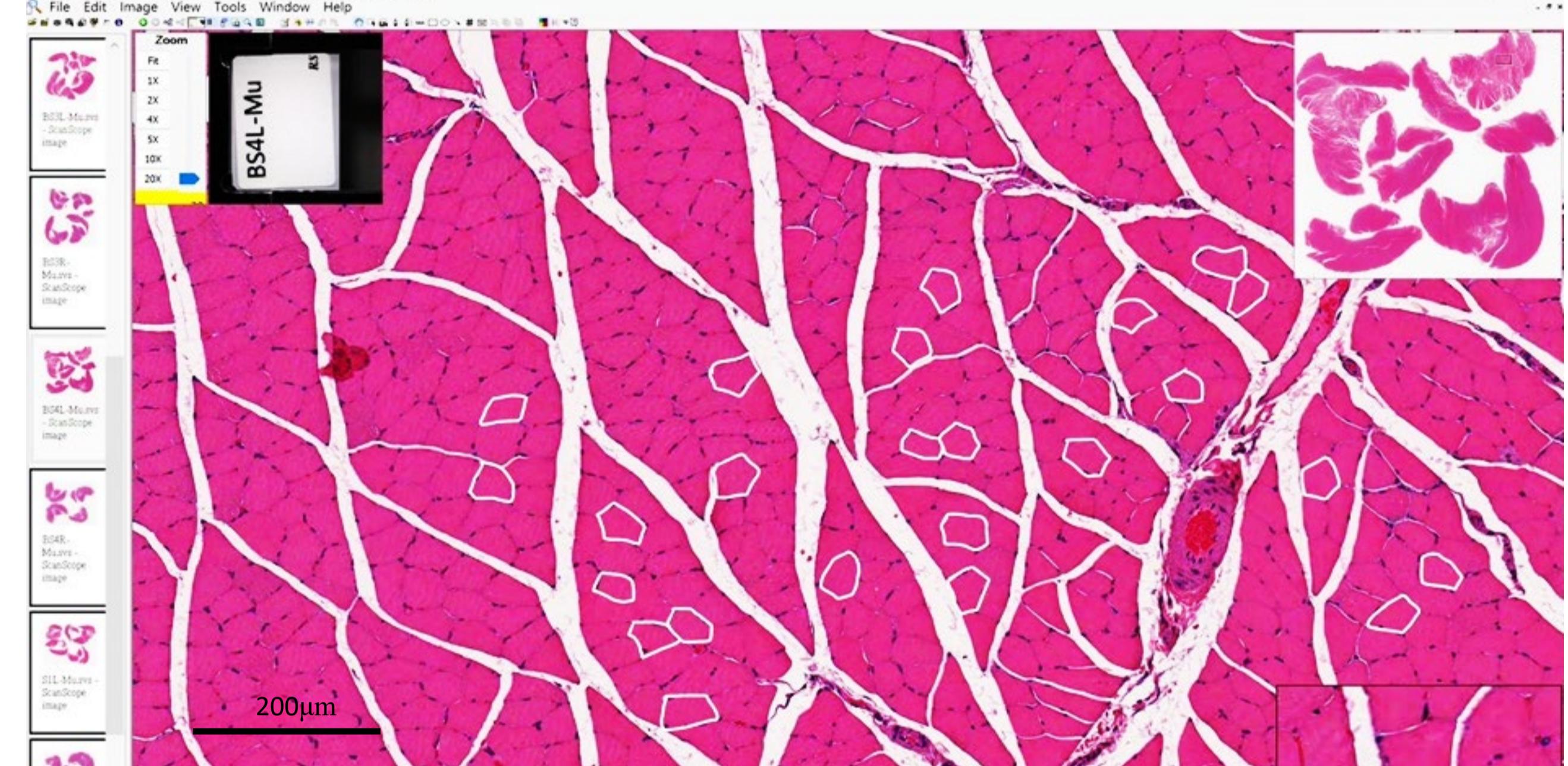
動物犧牲後，取出健側及患側腓腸肌，以 10% 福馬林固定，石蠟包埋，切片 (5  $\mu\text{m}$ ) 並進行 H&E 染色。利用光學顯微鏡觀察肌肉細胞形態，並使用全玻片掃描儀 (Leica Aperio Versa 200) 儲存影像，後續進行肌肉細胞大小量化。

#### 肌肉細胞定量分析

AI辨識模型訓練、辨識與判讀：整合 Roboflow Universe 肌肉橫截面模型至 Google Colab，以 YOLOv8 進行實例分割訓練。調整 epochs 和 imgsz 等參數，導出 ONNX 格式。程式下載 YOLOv8 格式數據集，載入預訓練模型進行訓練，驗證模型準確度。讀取圖片進行推理，提取遮罩資訊，使用 OpenCV 計算遮罩面積，計算每張圖片的平均細胞面積，結果儲存為 CSV 與 Excel 檔案。



專家辨識及判讀：兩位專家人工隨機圈選肌肉數位影像中淺層及深層區域各 50 個肌肉細胞輪廓，使用 ImageJ 軟體測量橫截面面積 (CSA) 並計算平均值。



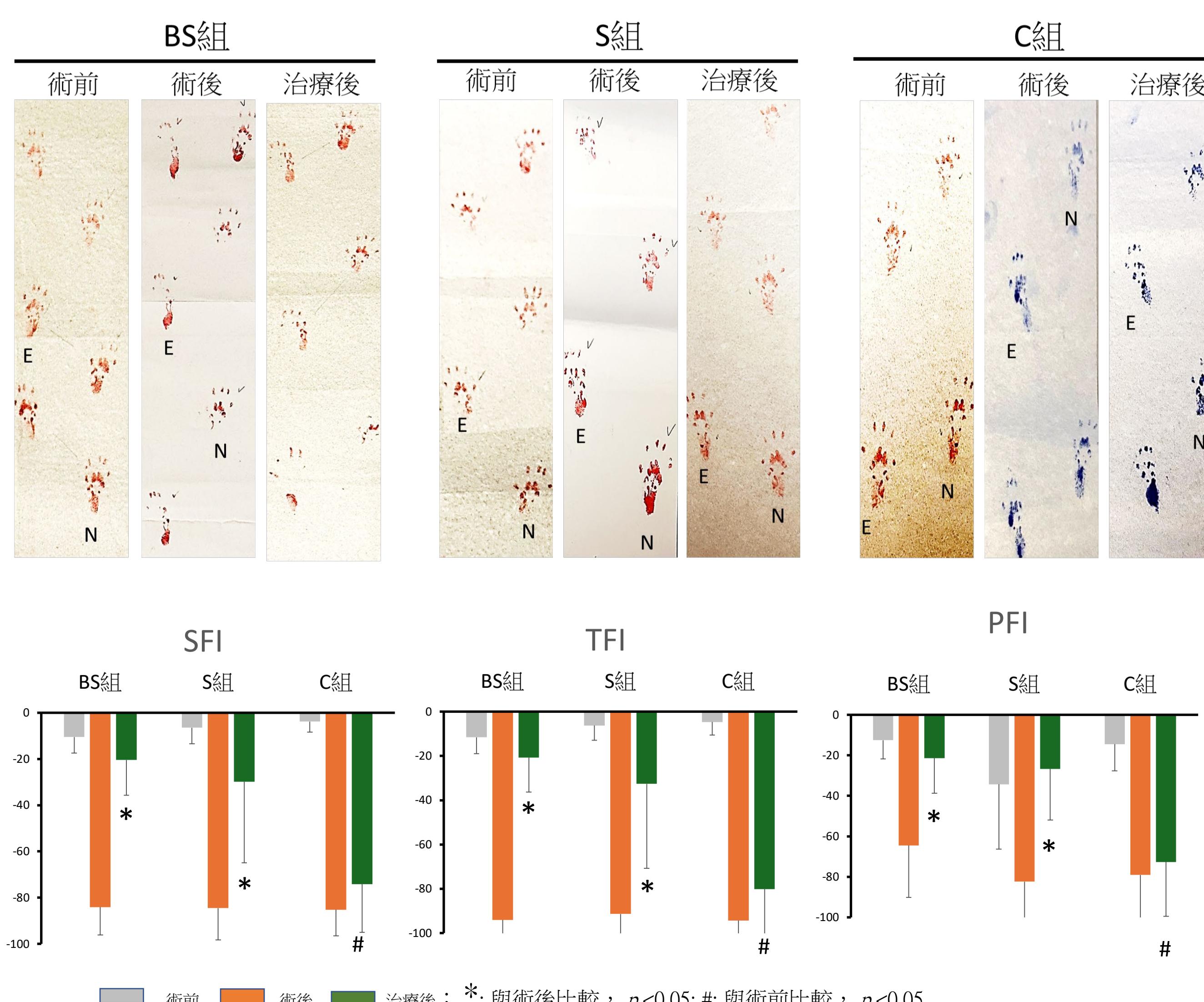
### 4. 統計分析

神經運動功能數據以平均值  $\pm$  標準差表示，組間差異以重複測量變異數分析比較不同時間點數據，肌肉形態學數據以單因子變異數分析比較組間差異，事後檢定採用 Bonferroni test。專家與 AI 判讀相關性以皮爾森相關分析。統計顯著性設定為  $p < 0.05$ ，使用 SPSS 20.0 軟體進行分析。

## 結 果

### 足印測試

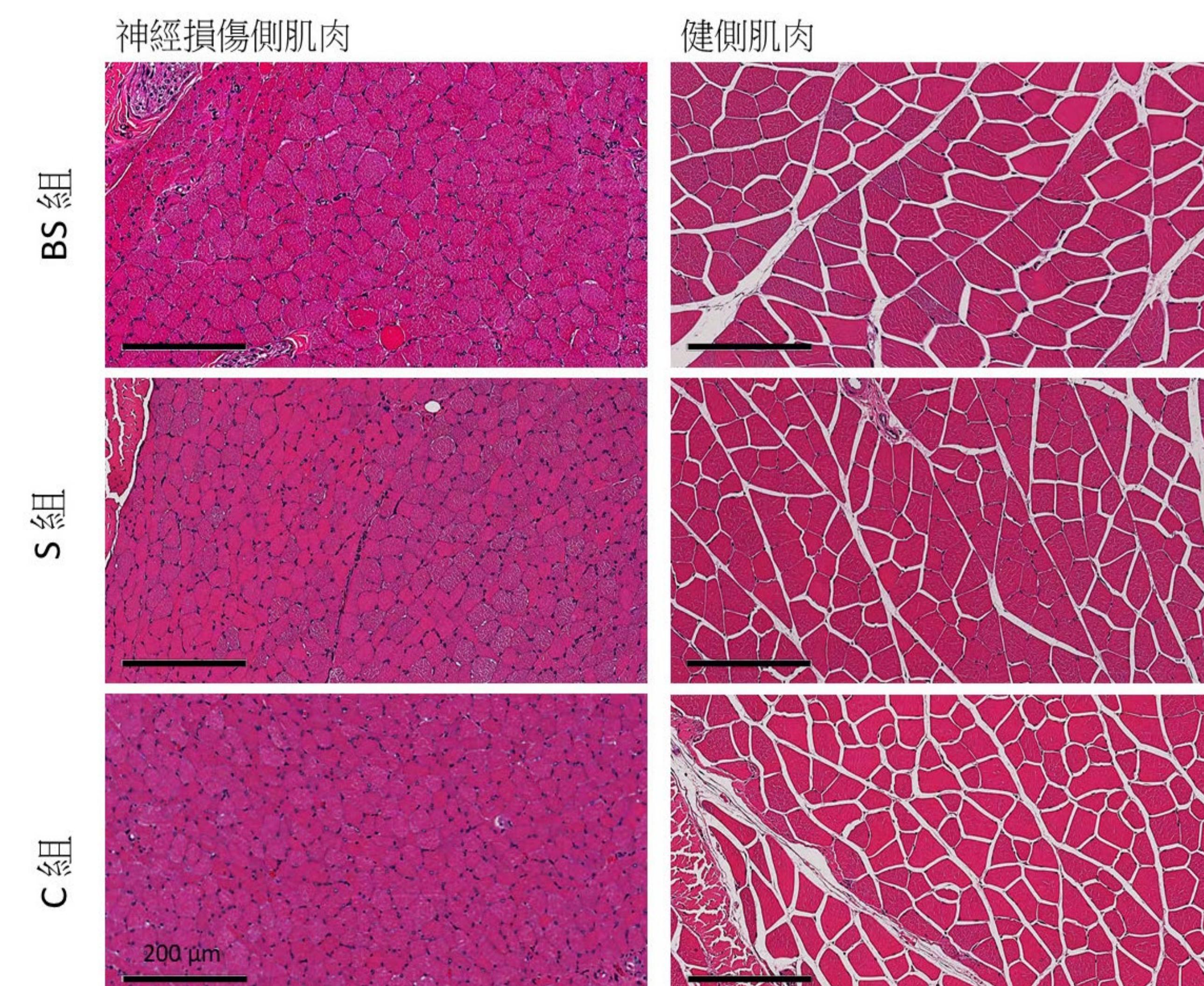
三組坐骨神經損傷大鼠在術前、術後及治療後，坐骨神經功能指數、脛神經功能指數及腓神經功能指數的變化。



各組動物健側與受傷側之足印結果代表圖與神經功能指數結果

### 肌肉細胞形態學分析

H&E 染色結果顯示，相較於健側，三組受傷側腓腸肌的 CSA 較小、肌肉細胞界線較不明確、細胞間隙較少且發炎組織較多。



各組動物健側與受傷側之 H&E 染色結果代表圖



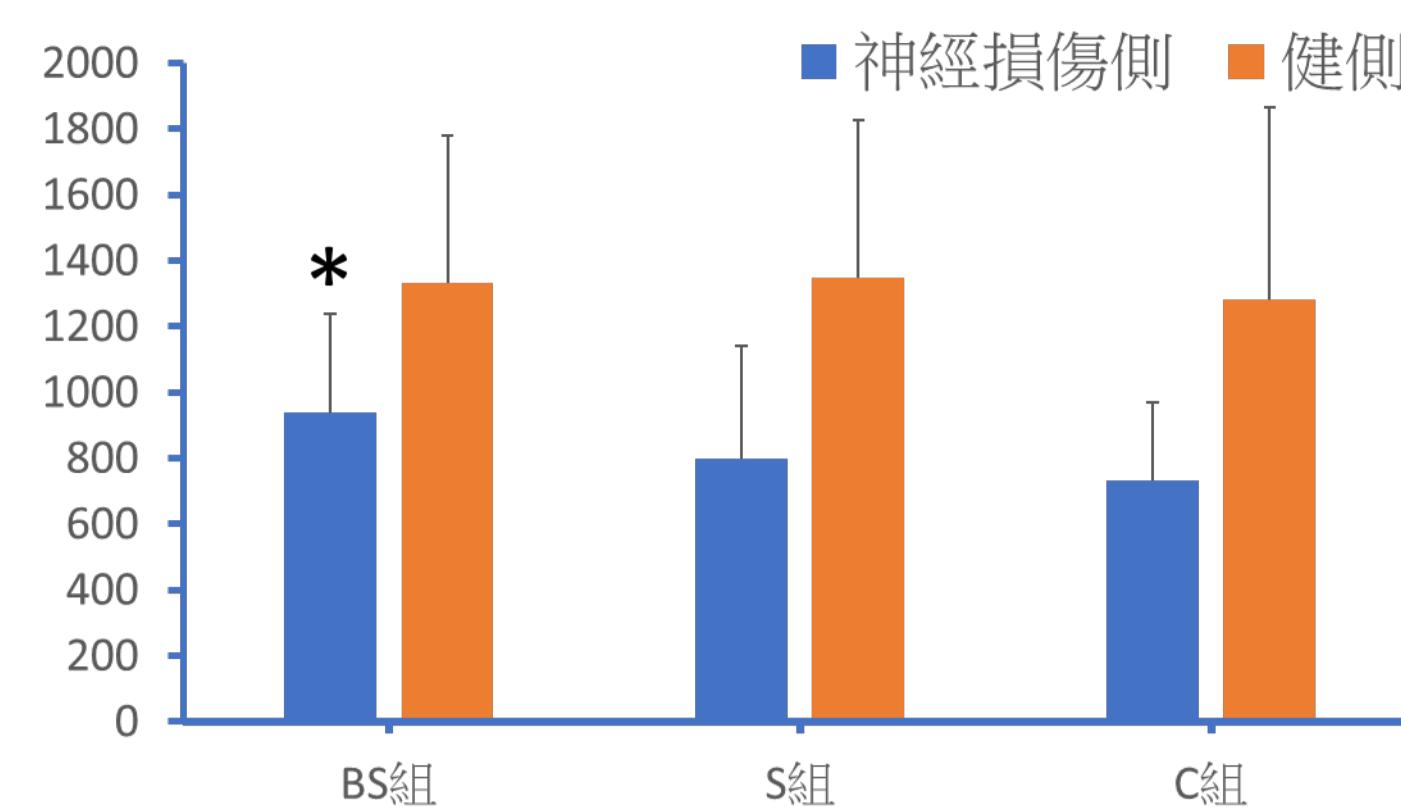
## 專家辨識及判讀結果

三組間健側 CSA 無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，但受傷側 CSA 存在顯著差異 ( $p < 0.05$ )，平均值大小依序為 BS 組 > S 組 > C 組。BS 組與 C 組間呈現顯著差異 ( $p < 0.05$ )，但 S 組與 C 組間無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

表一：專家計算各組的肌肉細胞截面積

部位	組別	數量	肌肉細胞截面積 ( $\mu\text{m}^2$ )
			平均數±標準差
健側	BS	10	1319.80±279.52
	S	10	1341.28±297.00
	C	10	1328.90±361.85
受傷側	BS	10	943.00±129.55*
	S	10	801.37±292.23
	C	10	728.15±128.81

\*:  $p < 0.05$

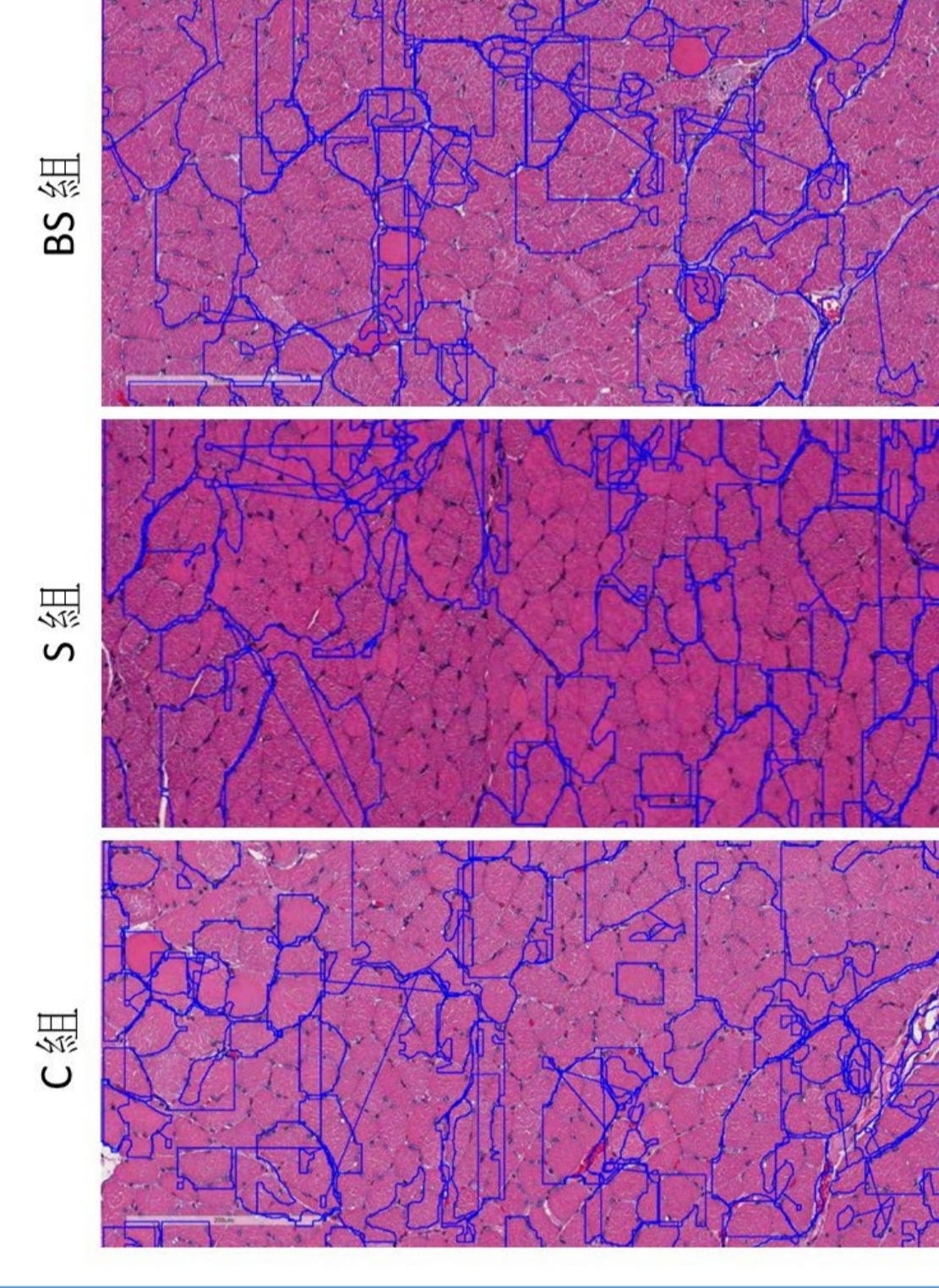


## AI 辨識及判讀結果

AI 能成功辨識三組健側肌肉細胞並計算面積 (像素)，組間無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。然而，AI 無法精確圈選受傷側萎縮的細胞，CSA 變異性過大，尤其 C 組受傷側數值及標準差明顯偏大，顯示 AI 圈選結果存在明顯錯誤。AI 無法有效辨識萎縮肌肉的邊界、形狀及紋理。

表二：AI 計算各組的肌肉細胞截面積

部位	組別	數量	肌肉細胞截面積 (像素)
			平均數±標準差
健側	BS	10	8671.62±1833.74
	S	10	8266.98±1641.23
	C	10	9333.17±3114.86
受傷側	BS	10	9133.08±6527.57
	S	10	9210.44±8433.29
	C	10	19245.86±19793.2



## 專家判讀與AI判讀在肌肉細胞截面積測量結果的相關性

健側肌肉分析中，專家判讀與 AI 判讀的肌肉細胞截面積呈現顯著正相關 ( $r = 0.433$ ， $p = 0.019$ ， $n = 30$ )。但在受傷側肌肉分析中，兩者之間未呈現顯著相關性 ( $r = 0.013$ ， $p = 0.948$ ， $n = 30$ )。這表明 AI 在測量健側肌肉細胞截面積時與專家具有一定一致性，但在測量受傷側肌肉細胞截面積時一致性較低。

表三：專家計算與 AI 計算各組的肌肉細胞截面積之相關性

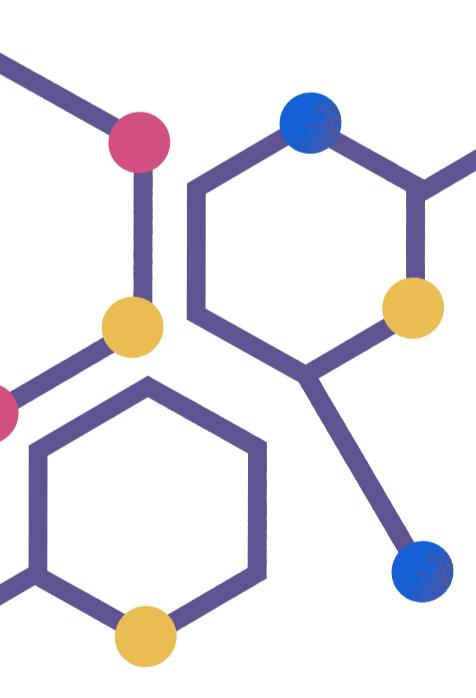
部位	AI 判讀	專家判讀	
		皮爾森 (Pearson) 相關	相關性 (雙尾)
健側	AI 判讀	0.433*	0.019
	顯著性 (雙尾)		
	N	30	
受傷側	AI 判讀	0.013	0.948
	顯著性 (雙尾)		
	N	30	

\* 相關性在  $p < 0.05$  為顯著 (雙尾)。

## 討 論 與 結 論

### 研究創新、提供科學證據

- 游泳結合BFR訓練的效益**：本研究首次將BFR與主動性水中游泳運動應用於坐骨神經損傷動物模型，證實其對恢復肌肉量與神經功能均有顯著效益。
- 結合AI，創新研究**：本研究導入 YOLOv8 模型進行肌肉切片實例分割，結果顯示，AI在分析健康側肌肉時，其判讀結果與專家判讀結果呈顯著一致性。但針對病變肌肉的準確性明顯不足，這突顯了AI在處理複雜病理樣態上的現有技術限制。AI雖對病變樣本辨識能力則較差，但仍可與正常數據比較後，判定正常或異常現象。目前階段，AI在肌肉病理分析中是輔助工具，而非完全取代專家角色，可提升診斷效率和準確性。



### AI影像分析與專家判讀協作的重要性

- 目前階段**：AI在肌肉病理分析中是輔助工具，而非完全取代專家角色，可提升診斷效率和準確性。
  - 人工判讀**：專家判讀仍具明顯優勢，能憑經驗辨識細微結構變化，提供穩定結果。但需高度專業與經驗，耗時、繁瑣、主觀性強且易疲勞。
  - AI判讀**：能快速處理大量健康肌肉樣本，提高效率、客觀性與量化分析能力，提供正常數據。但對病變樣本量化能力則較差，需要進一步利用大量病變切片樣本進行訓練。
- 未來發展**：結合兩者優勢，透過AI初步判讀後再輔以專家判讀數據，可更精確地做出最佳診斷。



Papadopoulos et al. 2007; Briguet et al. 2004; Lau et al. 2018; Mayeuf-Louchart et al. 2018; Dai et al. 2023

### 研究限制與改進

- 研究限制**：本研究中AI影像分析仍存在侷限，主要體現在其對複雜病變樣態的處理能力不足。這歸因於訓練數據中病變樣本的缺乏、AI模型算法在識別變異組織特徵方面的限制，以及影像紋理的複雜性，導致目前AI在病理量化和病變樣本識別能力上仍有待提升。
- 改進策略**：將聚焦於優化Roboflow平台訓練流程，調整YOLOv8實例分割模型參數、增加病變影像訓練量，透過進階資料擴增、強化訓練及並建立與專家交叉比對的協同判讀流程之半監督式資料集建立，來強化AI對異常組織的辨識能力，以顯著提升AI判讀的準確度。
- 未來展望**：擬公開實驗完成後的AI程式碼，促進跨領域合作與技術發展。



參考文獻連結

