文章编号:1000-5404(2007)02-0147-04

论著

咬肌去神经动物模型的建立及其动态观察

杜本军[1],苏 冰[2],朱灼新[3],刘晓军[1] (南方医科大学南方医院:[1]整形科,[2]检验科,[3]统计室,广州 510515)

提 要:目的 建立去神经咬肌动物模型,观察咬肌变化,为临床外科提供实验资料和理论依据。**方法** 选择性切断咬肌神经建立动物模型,并进行咬肌厚度超声及肌细胞组织化学检测。**结果** 与正常咬肌相比,离断神经咬肌厚度减小($P<0.05$),肌纤维截面积减小($P<0.05$),而且切断不同的神经减小的幅度不同;肌纤维类型及肌细胞结构无明显变化。**结论** 咬肌失神经动物模型有效、可信,有助于咬肌肥大畸形的治疗的基础研究。

关键词:去神经;咬肌;动物模型;超声检测;组织化学
中图法分类号:R-332;R62;R745.12 **文献标识码**:A

Establishment and dynamic observation of selected denervated masseter animal model

DU Ben-jun[1], SU Bing[2], ZHU Zhuo-xin[3], LIU Xiao-jun[1] ([1]Department of Plastic Surgery, [2]Department of Laboratory Medicine, [3]Department of Statistics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To establish the animal model of denervated masseter and observe the changes of denervated masseter. Methods The model of denervated masseter was established by abscising selectively masseteric nerve, its superior division or inferior division of the right in 75 New Zealand rabbits and the left served as negative control. Another 25 rabbits were used as normal control. The thickness of experimental masseter was compared with that of negative controls and normal controls by type B ultrasound examination, and the histochemistry for the masseter changes was done at the 2nd, 4th, 8th, 12th, 24th week after masseter was cut off. Results The thickness of experimental masseteric muscle got thinner, and the section area of muscle fiber got smaller, but the type of musle fiber was of no obvious changes, as compared with that of normal controls. Conclusion The model is available and credible, and useful in researching masseter of denervated nerve in rabbit.

Key words: denervate; masseter; ultrasound examination; histochemistry; animal model

咬肌肥大畸形,虽不影响功能,但由于面部不协调,影响美观。目前国内外咬肌整形手术创伤较大,另外去除咬肌的多少也没有明确的标准,全凭术者的经验,而且还缺少对咬肌术后生物学变化的观察。本实验在已建立的失神经咬肌的兔子动物模型基础上,继续以正常咬肌为对照,检测术后咬肌的各项变化指标,为临床咬肌整形提供实验资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康成年新西兰大白兔105只(南方医科大学南方医院实验动物中心提供),均为白色,雌雄各半,体质量(3.52±0.56) kg。常规饲养3 d,选出5只,作咬肌解剖。再将其余动物分为4组,1个正常对照组(N组),3个实验组(A、B和C组),每组25只动物。实验组A组为离断咬肌神经干组;B组为离断咬肌神经上分支组;C组为离断咬肌神经下分支组,每只动物做自身对照,均以右侧咬肌为实验侧,左侧咬肌为对照侧。正常对照组及每个实验组又按观察时间分为2、4、8、12、24周实验组,每组5只。

1.2 造模

N组动物不作处理;其余动物用氯氨酮(0.2 ml/kg)静脉麻醉,于右侧面部常规碘酒、乙醇消毒。A组,取颧弓下缘切口,长约1.0 cm,手术显露咬肌,并将支配咬肌的神经分离出来,在其神经入肌点0.5 cm处将咬肌神经干切掉0.5 cm。分离出咬肌神经干后,继续在咬肌浅层和深层间向下分离,分出咬肌神经的上下两分支。B组,在咬肌浅深两层间钝性分开,分离出咬肌神经的上分支并切掉0.5 cm。C组,继续分离出咬肌神经的下分支并切掉0.5 cm。缝合肌肉与切口。再于左侧面部常规碘酒消毒,作颧弓下缘切口,暴露咬肌剥离显露神经,并将咬肌浅深两层间钝性分开后缝合切口。

1.3 观察指标

1.3.1 超声检测 根据超声测量可以比较活体间皮下脂

作者简介:杜本军(1975-),男,黑龙江省哈尔滨市人,博士研究生,主治医师,主要从事咬肌整形方面的研究。电话:(020)33008919,E-mail:hgddhp@163.com

收稿日期:2006-03-30;修回日期:2006-05-26

肪、肌肉的差异，活体肌肉的厚度和收缩长度，通过观察肌肉厚度的变化，可判断其萎缩的情况[1-3]。本实验采用7～10 MHz变频探头，误差报告为1.03%[4]。测量时将探头置于咬肌表面，调整角度，使之垂直于咬肌平面，在咬肌安静松弛状态下冻结图像，并通过内置电子尺测量，精确度为0.1 mm[5]。分别于造模后对自身对照侧、实验侧咬肌及正常对照组兔咬肌厚度进行测量。

1.3.2 常规组织学检查 取咬肌中下部肌腹组织1.0 cm×0.5 cm×0.5 cm一块，用10%福尔马林固定后常规脱水包埋处理HE染色，光镜下观察测量肌纤维直径和面积。

1.3.3 酶组织化学观察 迅速切取咬肌中下部肌腹组织1.0 cm×0.5 cm×0.5 cm一块，立即置入液氮(－160 ℃)中保存备用，待材料收齐后，用低温切片机在－25 ℃条件下连续切片，厚约0.6 μm，分别行烟酰胺腺嘌呤二核苷四唑还原酶(NADH-TR)和ATP酶(孵育液pH值分别为3.45和10.4)染色。染色后用IBAS2000图像分析仪进行定量分析，每个切片各取3个视野，20倍光镜下采集图像，分别得出各型肌纤维的数量、直径、横截面积及光密度等测量值。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 12.0统计软件进行析因方差分析。

2 结果

2.1 超声检测结果

根据析因分析结果，正常组与A、B、C 3组的阴性对照侧差异不显著($P>0.05$)，认为单纯暴露咬肌不会造成咬肌厚度改变。A、B、C 3组阴性对照侧与各自手术侧有显著性差异($P<0.01$)，证明离断咬肌神经干、咬肌神经上分支、咬肌神经下分支均可对咬肌厚度造成显著的影响。用各组阴性对照侧与手术侧作方差分析，检验结果显示3种实验方法在改变咬肌厚度效果上是有显著差别的。从析因方差分析交互效应图可以看出，离断咬肌神经干，咬肌在第24周缩减最显著，共缩减2.45 mm，咬肌厚度为术前的50.80%；离断咬肌神经上分支，咬肌在第24周共缩减1.44 mm，咬肌厚度为术前的75.83%；离断咬肌神经下分支，咬肌在第24周共缩减1.06 mm，咬肌厚度为术前的79.22%(表1)。

表1 术后A、B、C 3组B超检测咬肌厚度变化(d/mm，$n=5$)

术后时间	正常对照组	A组			B组			C组		
		对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)	对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)	对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)
2周	5.15±0.29	5.29±0.54	4.28±0.21[a]	80.91	5.24±0.22	4.55±0.22[a]	86.83	5.30±0.36	4.71±0.30[a]	88.87
4周	5.09±0.21	5.07±0.28	3.84±0.23[a]	75.74	5.00±0.26	4.04±0.23[a]	80.80	5.08±0.64	4.23±0.20[a]	83.27
8周	5.29±0.31	5.11±0.36	3.53±0.24[a]	69.08	5.34±0.35	3.84±0.34[a]	71.91	5.19±0.21	3.79±0.34[a]	73.03
12周	5.00±0.27	5.15±0.22	2.72±0.33[a]	52.82	4.96±0.30	3.78±0.28[a]	76.21	4.99±0.31	3.94±0.21[a]	78.96
24周	5.20±0.19	4.98±0.31	2.53±0.25[a]	50.80	5.13±0.44	3.89±0.13[a]	75.83	5.10±0.29	4.04±0.23[a]	79.22

a：$P<0.05$，与对照侧比较

从实验测咬肌厚度变化的时间看，A组咬肌厚度呈进行性下降，其中8～12周下降最显著，从原咬肌厚度的69.08%下降到52.82%，12～24周无显著变化。B组咬肌厚度从第2周开始下降，在第8周达到最小值，为原来咬肌厚度的71.91%，12周时反而比8周时略大，从12～24周无显著变化，随后稳定在24周的75.83%水平。C组咬肌厚度从第2周开始呈平稳下降，在第8周达到最小值，为原来咬肌厚度的73.03%，12周时反而比8周时略大，12～24周无显著变化，随后稳定在24周的79.22%水平。

2.2 HE染色组织学观察结果

正常咬肌组织冷冻切片经HE染色后在光镜下观察，细胞核染显蓝色，肌细胞细胞质和肌原纤维染显红色，细胞核位于细胞周边，肌细胞形态规则，排列整齐；阴性对照侧肌纤维形状、大小在实验过程中无明显改变，与正常对照组肌纤维相似，未见坏死、玻璃样变等病理改变。在光镜下观察各实验侧咬肌细胞基本组织结构各组间未见明显差别，只见个别细胞有轻度改变。

2.3 酶组织化学研究

在光镜下观察依酶组织化学染色深浅不同分为Ⅰ型和Ⅱ型(Ⅱa和Ⅱb)的肌纤维。在孵育液pH值为4.35条件下，ATP酶染色Ⅰ型肌纤维为深色，Ⅱ型肌纤维为浅色；pH值为10.4条件下，ATP酶染色Ⅰ型肌纤维为浅色，Ⅱb型肌纤维为深色，Ⅱa型肌纤维介于Ⅰ型和Ⅱb型之间；NADH-TR染色Ⅰ型肌纤维为深色，而Ⅱb型肌纤维为浅色，Ⅱa型介于二者之间呈浅灰色。

2.3.1 ATP酶染色分析结果 光镜下可见正常兔咬肌组织中含Ⅰ型和Ⅱ型肌纤维，两种肌纤维混合交织在一起。正常对照组兔咬肌和各组对照侧咬肌各型肌纤维直径和面积大小及比例相似，Ⅱ型肌纤维大于Ⅰ型肌纤维，其中Ⅱb型肌纤维大于Ⅱa型肌纤维，Ⅱa型肌纤维又略大于Ⅰ型肌纤维。与各组对照侧咬肌相比，各实验组咬肌酶组织化学染色光镜下主要表现为Ⅱ型肌纤维直径和横截面积减小，其中以Ⅱb型肌纤维变化更加明显，Ⅰ型肌纤维直径和横截面积轻度减小，而且实验后期在A组还见到少数Ⅰ型肌纤维增生变大，Ⅰ/Ⅱ型肌纤维面积比增加。

根据析因分析结果显示：与正常组比较，A、B、C 3组的对照侧Ⅰ型肌纤维的截面积变化不显著($P>0.05$)；A、B、C 3组实验侧与各自对照侧比较无显著性差异($P>0.05$)(表2)。与正常组比较，A、B、C 3组的对照侧Ⅱa型肌纤维的截面积变化不显著($P>0.05$)；A、B、C 3组实验侧与各自对照侧比较有显著性差异($P<0.05$)，肌纤维的截面积分别缩小118.00、120.80、121.68 μm^2(表3)。与正常组比较，A、B、C 3组的对照侧Ⅱb型肌纤维的截面积变化不显著($P>0.05$)；A、B、C 3组实验侧与各自对照侧比较有显著性差异($P<0.05$)，肌纤维的截面积分别缩小1 238.6、1 006.8、930.0 μm^2(表4)。

表 2　失神经支配咬肌 I 型肌纤维平均横截面积的变化（$s/\mu m^2$，$n=5$）

术后时间	正常对照组	A 组			B 组			C 组		
		对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)	对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)	对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)
2 周	1 275 ± 171	1 276 ± 161	1 241 ± 164	97.26	1 282 ± 174	1 176 ± 179	91.73	1 318 ± 179	1 266 ± 117	96.05
4 周	1 260 ± 166	1 271 ± 162	1 209 ± 145	95.12	1 304 ± 161	1 291 ± 154	99.00	1 291 ± 151	1 229 ± 107	95.20
8 周	1 284 ± 153	1 283 ± 156	1 194 ± 163	93.06	1 286 ± 178	1 224 ± 176	95.18	1 309 ± 176	1 214 ± 147	92.74
12 周	1 266 ± 173	1 245 ± 154	1 134 ± 144	91.08	1 292 ± 181	1 227 ± 162	94.97	1 282 ± 168	1 213 ± 103	94.62
24 周	1 272 ± 163	1 269 ± 142	1 156 ± 135	91.10	1 295 ± 162	1 235 ± 142	95.37	1 317 ± 149	1 220 ± 108	92.63

表 3　失神经支配咬肌 II a 型肌纤维平均横截面积的变化（$s/\mu m^2$，$n=5$）

术后时间	正常对照组	A 组			B 组			C 组		
		对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)	对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)	对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)
2 周	1 572 ± 179	1 574 ± 174	1 514 ± 183[a]	96.19	1 569 ± 161	1 503 ± 179[a]	95.79	1 563 ± 162	1 492 ± 185[a]	95.46
4 周	1 556 ± 157	1 567 ± 163	1 475 ± 179[a]	94.13	1 563 ± 174	1 443 ± 175[a]	92.32	1 576 ± 167	1 465 ± 179[a]	92.96
8 周	1 568 ± 174	1 583 ± 151	1 456 ± 156[a]	91.98	1 565 ± 171	1 423 ± 157[a]	90.93	1 583 ± 157	1 425 ± 159[a]	90.02
12 周	1 549 ± 168	1 556 ± 152	1 400 ± 142[a]	89.97	1 571 ± 163	1 435 ± 143[a]	91.34	1 563 ± 174	1 431 ± 143[a]	91.55
24 周	1 557 ± 165	1 548 ± 164	1 393 ± 158[a]	89.99	1 583 ± 167	1 443 ± 151[a]	91.16	1 573 ± 175	1 435 ± 154[a]	91.23

a：$P<0.05$，与对照侧比较

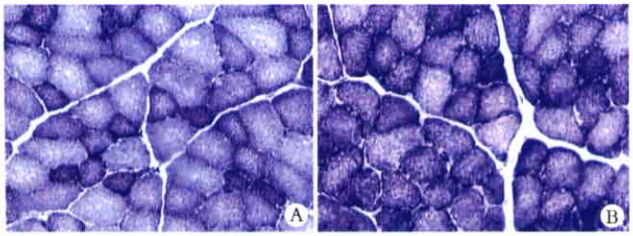
表 4　失神经支配咬肌 II b 型肌纤维平均横截面积的变化（$s/\mu m^2$，$n=5$）

术后时间	正常对照组	A 组			B 组			C 组		
		对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)	对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)	对照侧	实验侧	实验侧/对照侧(%)
2 周	2686 ± 223	2674 ± 245	1 951 ± 181[a]	72.96	2674 ± 249	2231 ± 176[a]	83.43	2681 ± 234	2301 ± 176[a]	85.83
4 周	2664 ± 248	2681 ± 238	1 686 ± 154[a]	62.87	2635 ± 241	1 741 ± 153[a]	66.07	2684 ± 255	1 852 ± 153[a]	69.01
8 周	2697 ± 247	2703 ± 265	1 352 ± 162[a]	50.02	2681 ± 240	1 394 ± 161[a]	51.99	2703 ± 266	1 487 ± 168[a]	55.01
12 周	2661 ± 226	2664 ± 241	1 119 ± 177[a]	42.01	2674 ± 241	1 481 ± 176[a]	55.39	2697 ± 247	1 582 ± 176[a]	58.66
24 周	2658 237	2677 232	1 098 162[a]	41.02	2703 264	1 486 164[a]	54.98	2680 247	1 572 163[a]	58.66

a：$P<0.05$，与对照侧比较

应用 IBAS 图像分析系统对实验各组肌纤维直径和横截面积测量分析，与光镜下肉眼观察结果相同，II 型肌纤维大于 I 型肌纤维，其中 II b 型肌纤维又大于 II a 型肌纤维。与对照组比较，各组实验侧 II a 及 II b 型肌纤维直径和横截面积明显减小（$P<0.05$），其中以II b 型肌纤维变化更加明显（$P<0.01$）；I 型肌纤维直径和横截面积轻度减小，但无统计学意义（$P>0.05$）。

2.3.2　NADH 染色分析结果　　NADH-TR 染色肌纤维内线粒体和肌质网显紫色或紫蓝色，肌原纤维中的肌动蛋白和肌球蛋白不着色，I 型肌纤维呈深蓝色，II 型肌纤维呈淡蓝色（图 1）。光学显微镜下各组实验侧咬肌主要表现为 II 型肌纤维萎缩，肌纤维直径与横截面积减小，I 型肌纤维直径和横截面积轻度减小，实验后期 A 组见少数 I 型肌纤维增生变粗，I / II 型肌纤维数目比例无明显变化。



A：正常咬肌，B：术后 4 周

图 1　咬肌酶组织化学观察　（NADH-TR ×400）

3　讨论

本研究显示，离断神经后，会出现咬肌的厚度逐渐变小；离断不同的神经，咬肌的变化也不相同；萎缩幅度在失神经 15 d 内最大，与许多研究结果一致[6,7]。

酶染色图像分析实验结果表明，A、B、C 3 组咬肌 I 型及 II 型肌纤维比例与对照侧比较无明显变化，I 型及 II 型肌纤维直径与横截面积均缩小，与 Horn 等[8]研究结果相似，切断面神经颧支，豚鼠眶肌萎缩，各型肌纤维均出现萎缩。以 II 型肌纤维直径与横截面积缩小明显，II 型肌纤维肌又以 II b 型肌纤维直径与横截面积缩小为主，而且选择离断的神经不同，咬肌纤维的直径及面积变化也不相同。

根据报道，失神经腓肠肌纤维横截面积在第 2 周萎缩 60%，第 12 周萎缩 32%[6]，与本实验结果相比，可见失神经咬肌萎缩的幅度小于失神经的腓肠肌。这与咬肌为闭口肌群中的一组肌肉，在失神经状态下，也会不停的被动运动有关。咬肌被动运动产生对血液回流的“泵样”挤压作用，促进了肌肉血液循环，加速了

静脉及淋巴回流,减轻组织间水肿,缩短血液中氧及营养物质与肌细胞之间的弥散距离,有利于肌肉内氧及代谢产物交换,提高了肌细胞的供能水平[9],减少 Na,K-ATP 酶及 Ca-ATP 酶活性逐渐下降的程度[10];肌纤维被动地拉长与缩短,使肌肉保持一定的弹性。这与徐建广等[9]研究结果相似,被动活动对失神经支配骨骼肌纤维横截面积下降有延缓作用。

神经细胞对它的效应器肌肉细胞通过产生肌肉营养物质(营养因子)而发生作用,各因子互相依赖、互相影响[11]。失神经支配骨骼肌的感觉神经营养活性不是一种神经营养因子决定的,是多种神经营养因子共同作用的结果[12]。所以,在 B 组和 C 组中只游离切断咬肌神经的一个分支,出现咬肌厚度、肌纤维直径及截面积在第 8 周最小,在 12 周增大,原因不十分清楚,分析可能是由于咬肌内分支都有吻合[13],在离断分支神经支配区域还有其他神经的小分支存在,而引起离断分支神经支配区域咬肌细胞微环境变化,使萎缩的咬肌有所恢复。而且即使离断咬肌主干,咬肌的变化与其他部位的骨骼肌不同,可能与咬肌的营养因子不同于其他骨骼肌有关,这些都有待于进一步研究。

新西兰兔正常咬肌Ⅱ型肌纤维大于Ⅰ型肌纤维,且Ⅱb 型肌纤维大于Ⅱa 型肌纤维。本实验图像分析显示各型肌纤维的改变主要表现在实验侧咬肌Ⅱ型肌纤维直径和面积减小,Ⅱ型肌纤维中又以Ⅱb 型肌纤维更加明显,分析兔子Ⅱ型肌纤维更容易受去神经的影响,这与其他学者观察的结果一致[14]。由于Ⅰ型肌纤维属于红肌,以有氧代谢为供能方式,在维持身体姿势方面起重要作用。而Ⅱ型肌纤维以磷酸化代谢为主要供能方式,收缩速度快而有力,但不能持久。上述Ⅱ型肌纤维萎缩,Ⅱ型肌纤维直径和横截面积减小,Ⅱ型肌纤维在咬肌横截面中的面积比减小,分析会出现肌肉耐力减小,抗疲劳性降低。

根据 3 组Ⅰ型肌纤维均无明显变化,分析切断咬肌神经或其分支神经对下颌姿势的维持和稳定颞下颌关节的正常位置影响不大[15,16]。通过实验观察,切断咬肌神经,咬肌明显缩小,一般在 12 周后变化稳定,而且切断不同的神经可以引起咬肌厚度及肌纤维面积的不同变化,但并不影响动物的进食活动和咀嚼功能,也不会引起咬肌纤维的比例变化。

综合实验结果,兔子咬肌在失神经支配状态下,出现肌纤维萎缩,但未见咬肌细胞明显变化。

参考文献:

[1] Oguri K, Zhao L, Du N, *et al*. Association of habitual long-distance running with the thickness of skeletal muscles and subcutaneous fat in the body extremities and trunk in middle-aged men [J]. J Sports Med Phys Fitness, 2004, 44(4): 417 - 423.

[2] Stafilidis S, Karamanidis K, Morey-Klapsing G, *et al*. Strain and elongation of the vastus lateralis aponeurosis and tendon in vivo during maximal isometric contraction [J]. Eur J Appl Physiol, 2005, 94(3): 317 - 322.

[3] Tonseth K A, Gunther A, Brabrand K, *et al*. Ultrasonographic evaluation of the rectus abdominis muscle after breast reconstruction with the DIEP flap[J]. Ann Plast Surg, 2005, 54(5): 483 - 486.

[4] Kubota M, Nakano H, Sanjo I, *et al*. Maxillofacial morphology and masseter muscle thickness in adults[J]. Eur J Orthod, 1998, 20(5): 535 - 542.

[5] 赵继志, 戴 晴, 赖钦声. 50 例正常青年人咬肌厚度及其与面型关系的 B 型超声测量分析[J]. 中国医学科学院学报, 2001, 23(1): 60 - 62.

[6] 田 涛, 吴朝晖, 金惠铭, 等. 大鼠臂丛神经损伤后骨骼肌萎缩时肌细胞凋亡的研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(7): 530 - 533.

[7] 杜本军,柳大烈,梁 莉,等. 下颌角磨削去骨术前后咬肌变化[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(23): 2376 - 2378.

[8] Horn A K, Porter J D, Evinger C. Botulinum toxin paralysis of the orbicularis oculi muscle. Types and time course of alterations in muscle structure, physiology and lid kinematics[J]. Exp Brain Res, 1993, 96(1): 39 - 53.

[9] 徐建广, 顾玉东, 李继峰. 被动活动对失神经支配骨骼肌超微结构及酶组织化学影响[J]. 骨与关节损伤杂志, 2003, 18(1): 27 - 29.

[10] 徐建广, 顾玉东. 失神经支配骨骼肌退变形态学及酶组织化学研究[J]. 中华显微外科杂志, 2000, 23(3): 213 - 214.

[11] Stein T P, Wade C E. Protein turnover in atrophying muscle: from nutritional intervention to microarray expression analysis[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003, 6(1): 95 - 102.

[12] 王敬博, 罗永湘, 宋卫东. 失神经支配红白肌肉早期运动神经营养活性研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2004, 18(4): 250 - 253.

[13] 崔益群, 梅光东, 韩 洵, 等. 咀嚼肌的应用解剖学研究 I. 咬肌的动脉与神经[J]. 解剖学杂志, 1995, 18(1): 8 - 10.

[14] 骆泉丰, 祁佐良, 王 炜, 等. 不同神经损伤方式对面瘫后肌纤维亚型病变影响的实验研究[J]. 中华整形外科杂志, 2006, 22(1): 12 - 15.

[15] 廖进民, 李忠华, 钟世镇. 咬肌的基础与临床研究现状[J]. 解剖科学进展, 2003, 9(2): 186 - 188.

[16] 张跃蓉, 刘 静. 人咬肌肌内神经的分布及临床意义[J]. 遵义医学院学报, 2004, 27(2): 106 - 108.

(编辑 汪勤俭)