

私立台北醫學大學口腔醫學院

牙醫學系碩士班碩士論文

Graduate institute of School of Dentistry

College of Oral Medicine

Taipei Medical University

指導教授：蔡吉陽 **Chi-Yang Tsai**

共同指導教授：楊良友 **Liang-Yo Yang**

成鼠咬肌注射肉毒桿菌神經毒素後的肌功能變化

研究生：雷詠堯 **Yung-Yao Lei** 撰

中華民國 98 年 06 月

Jun , 2009

碩士論文繕印同意書

雷詠堯 研究生之論文 經口試委員審查通過，並按各委員之意見修訂完稿，本人同意該研究生將論文繕印成冊。

指導教授 蔡吉昌

中華民國 年 月 日

中華民國 98 年 7 月

論 文 中 文 題 目

成鼠咬肌注射肉毒桿菌神經毒素後的肌功能變化

論 文 英 文 題 目

Changes of masseter muscle function following injection of
botulium toxin in adult rats

本論文係雷詠堯在私立台北醫學大學口腔醫學院牙醫學系

碩士班碩士學位論文，經考試委員審查合格，並口試通過。

考試委員：蕭裕源 博士

簽 名：蕭裕源

服務機關、職稱：台灣大學教授

考試委員：蔡吉陽 博士

簽 名：蔡吉陽

服務機關、職稱：台北醫學大學副教授

考試委員：楊良友 博士

簽 名：楊良友

服務機關、職稱：台北醫學大學副教授

中 華 民 國 98 年 7 月

致謝

時光荏苒，在這三年研究所生涯裡得到許多人的支持與照顧。這一路來，首先要感謝一路上引領我的指導教授 蔡吉陽老師，不論在矯正臨床訓練或學術論文研究，都給與我充分的支持與耐心的教導，使學生在這三年間有著充實的成長與收穫。在實驗的操作上，要感謝北醫醫學系生理科的楊良友教授和陽明大學腦科所的郭博昭教授，謝謝您提供給學生一個良好的研究環境，耐心的實驗指導。另外，感謝台大牙醫系的蕭裕源教授，及北醫公衛系葉錦瑩副教授，在研究的設計及統計的方法上給與學生很多啟發和指導。

此外，還要謝謝北醫研究所的琬棋、怡君、若怡學姐、嫻茹、瓊文、光榮、陽明大學腦科所的賴俊廷學長，謝謝你們在實驗操作上給與我的幫助。除了學術研究之外，在齒顎矯正臨床訓練方面，感謝北醫附醫鄭信忠副院長，也是我的臨床指導老師之一，謝謝您在這段期間的鼓勵及教導。還有北醫附醫矯正科可愛的同事們，在這三年來互相扶持。

最後，要特別對我的父母家人表達我的感激，謝謝你們一路的關懷與栽培，讓詠堯能無後顧之憂在學業與工作上努力的耕耘。

私立台北醫學大學口腔醫學院
牙醫學系碩士班/口腔科學研究所
碩 士 論 文

成鼠咬肌注射肉毒桿菌神經毒素後的肌功能變化



指導教授：蔡吉陽

研究生：雷詠堯 撰

中華民國 98 年 06 月

中文論文摘要

論文名稱：

成鼠咬肌注射肉毒桿菌神經毒素後的肌功能變化

私立台北醫學大學

口腔醫學院牙醫學系碩士班

研究生姓名：雷詠堯

畢業時間：97 學年度第 2 學期

指導教授：蔡吉陽（台北醫學大學口腔醫學院牙醫學系碩士班副教授）

<研究目的>：近幾年已有許多研究將肉毒桿菌神經毒素運用在美容醫學的範疇，其中與齒顎矯正學科相關的，就是利用肉毒桿菌素治療咬肌肥大的病例。咬肌發達的患者常伴隨著方臉型以及前牙齒列深咬的發生，現今可經由注射肉毒桿菌素，造成咬肌萎縮，藉以影響下顎骨型態及深咬的改正。然而，施打肉毒桿菌素於咬肌，是否會造成咬肌功能實質的影響與變化則少見於以往的研究。因此，本實驗將藉由肌電圖的測量，實際量化比較肉毒桿菌素注射前後，成鼠咬肌功能之變化，以及肉毒桿菌神經毒素不同劑量對於咬肌功能之影響程度。**<材料和方法>**：本實驗以肉毒桿菌素 A 型（Botox[®], Allergan Inc., Irvine, OCA, USA）（簡稱：BTXA）注射大白鼠成鼠之咬肌，造成咬肌型態

萎縮，藉肌電圖觀察肉毒桿菌神經毒素對成鼠咬肌肌肉功能之實際影響。實驗所採取的研究方式為：選取 52 隻十週大的大鼠 (Wistar)，隨機分成四組，其中三組為實驗組，另外一組為控制組。首先，對四組成鼠進行雙側咬肌電極線包埋手術，待手術復原一週後，固定每日餵食時間，並於每日餵食時間內頭一個小時測量咬肌之肌電圖訊號。記錄咬肌肌電訊號兩週後，依據不同實驗組別注射不同劑量之肉毒桿菌神經毒素 (實驗組) 及生理食鹽水 (控制組)：Group I：右側咬肌注射 BTXA 7.5 u (0.3ml)，左側咬肌注射入等量 NaCl 0.3ml。Group II：右側咬肌注射 BTXA 5.0 u (0.3ml)，左側咬肌注射入等量 NaCl 0.3ml。Group III：右側咬肌注射 BTXA 2.5 u (0.3ml)，左側咬肌注射入等量 NaCl 0.3ml。Group IV (對照組)：雙側咬肌注射等量 NaCl 0.3ml。待藥劑注射一週後，於每日餵食時間內，頭一個小時測量咬肌之肌電圖訊號。連續記錄肌電活動約 3 個月後，將大鼠麻醉犧牲，比較四組之間咬肌重量之差異，並分析咬肌肌電圖之變化。**<實驗結果>**：(1)總體而言，Group I, II, III 右側咬肌活動各項變數在 BTXA 注射後一週時，均下降超過 90%(平均頻率除外)，且為咬肌活動記錄其間的最低狀態 (2)Group I 和 Group II 右側咬肌活動約從注射 BTXA 後第 4~6 週開始有回復現象，Group III 則約從注射 BTXA 後第 3~4 週開始有回復現象，開始回復後至注射 BTXA 後第 12 週，咬肌活動呈現平緩而線性增加。(3)注射後第 12 週，Group I 和 Group II 咬肌最大咬力振幅(RMS amplitude)回復至注射前的 28%~33%；而 Group III 則回

復至注射前的 55 % (4)控制組 Group IV，各項咬肌活動變數在生理食鹽水注射前後沒有顯著的差異。〈實驗結論〉：(1)藉由將 BTXA 注射於大鼠成鼠之咬肌，咬肌的重量 以及進食時活動程度會明顯地降低。(2) 隨著注射 BTXA 劑量的增加，BTXA 側咬肌肌肉活動被抑制的情形也會越顯著；然而當 BTXA 劑量超過 5.0 u 時，則影響的程度並沒有顯著的差異。(3) 在 Group I，Group II 和 Group III，即使到了注射後第十二週，BTXA 側咬肌肌肉活動被抑制的情形仍舊存在。即使是實驗組的最低劑量 (Group III：2.5 u BTXA)，注射後第十二週時 BTXA 側咬肌的活動程度仍舊未回到注射前的狀態，且與注射前仍然存在著顯著差異。

Abstract

Title of Thesis:

Changes of masseter muscle function following injection of botulium toxin in adult rats

Author : Lei Yung-Yao

Thesis directed by : Chi-Yang Tsai, DDS, PhD (Graduate Institute of Oral Science, College of Oral Medicine, Taipei Medical University)

<Objectives> This study was designed to investigate the changes of masseter muscle function before and after intramuscular injection of botulium toxin type A (BTXA), and to compare the different extent of resultant changes as different dosage was used. **<Materials and methods>** Fifty-two male Wistar rats, 70-days old, were randomly divided into 4 groups. First of all, a wire-electrodes device was implanted for recording masseter muscle activity. One week after surgery, the rats were limited their oral feeding time within 2 hours daily, and EMG signals from masseter muscles were recorded when rats ingested pellets during the first hour. After EMG recording for 2 weeks, different dosage of BTXA was injected into R' t masseter muscle according to different

groups : Group I-injection of 7.5u BTXA(0.3ml) into R' t masseter muscles and 0.9% normal saline (0.3ml) into L' t masseter muscles. Group II-injection of 5.0u BTXA(0.3ml) into R' t masseter muscles and 0.9% normal saline (0.3ml) into L' t masseter muscles. Group III-injection of 2.5u BTXA(0.3ml) into R' t masseter muscles and 0.9% normal saline (0.3ml) into L' t masseter muscles. Group IV- injection of 0.9% normal saline (0.3ml) into R' t masseter and L' t masseter muscles. Thereafter , rats were constantly feeded within 2 hours daily, and EMG signals were recorded for 12 weeks. After 12 weeks of EMG recording, the rats were perfused and sacrificed. The EMG data were analyzed for statistic calculation, and the weights of masseter muscles were measured. <Results> The results showed that :(1)In general, masseter muscle activity variables decreased over 90% during the first week after injection of BTXA on the experimental side of Group I, II, III. (2)In Group III, muscle activity variables gradually recovered from 3rd~4th week after injection ; in Group I and Group II, the muscle activity recovered from 4th~6th week after injection. (3) On the 12th week, in Group I and Group II, the muscle RMS amplitude recovered to 28%~33% ; in Group III , the RMS amplitude recovered to 55 % compared

to the preinjection activity levels. (4) In Group IV, there was no significant change of muscle activity before and after normal saline injection. <Conclusion> (1) With the injection of BTXA, the activity of masseter muscle and the muscle weight were significantly decreased. (2) With the BTXA doses increasing, the greater muscle activity depression was noticed. Compared with Group III, there were greater decreases of muscle activity in Group I and II. (3) Among all the three experimental groups (Group I, II, and III), muscle activity was remained depressed and never returned to preinjection levels even after 12 weeks investigation period starting from BTXA injection.

Key words: masseter muscle , Botulinum toxin A , EMG

目錄

致謝

| | |
|------------------------|-----|
| 中文摘要 | I |
| 英文摘要 | IV |
| 目錄 | VII |
| | |
| 第一章 緒論 | 1 |
| 第一節 研究動機 | 2 |
| 第二節 研究目的 | 5 |
| 第三節 研究假設 | 5 |
| | |
| 第二章 文獻查證 | 6 |
| 第一節 功能性基質理論 | 7 |
| 第二節 骨骼肌功能改變後肌肉組織的變化 | 9 |
| 第三節 咀嚼功能改變後咀嚼肌肌肉組織的變化 | 10 |
| 第四節 咀嚼肌對顱顏發育及結構的影響 | 11 |
| 第五節 肉毒桿菌神經毒素作用之機轉 | 14 |
| 第六節 肉毒桿菌素作用於肌肉後肌肉組織的變化 | 20 |
| 第七節 肌電圖的基本原理 | 22 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 第八節 肉毒桿菌素作用於肌肉後肌電圖訊號的變化 | 26 |
| 第九節 咀嚼肌功能改變後肌電圖訊號的變化..... | 30 |
| 第三章 研究材料與方法..... | 31 |
| 第一節 研究對象..... | 32 |
| 第二節 研究材料..... | 33 |
| 第三節 研究設計及步驟..... | 34 |
| 第四節 統計方式..... | 43 |
| 第四章 分析與結果..... | 44 |
| 第一節 實驗大鼠的體重變化..... | 45 |
| 第二節 咬肌重量之比較..... | 46 |
| 第三節 咬肌活動表現比較..... | 47 |
| 第五章 討論..... | 56 |
| 第一節 實驗大鼠的體重變化..... | 57 |
| 第二節 咬肌重量之比較..... | 59 |
| 第三節 咬肌活動表現之比較 | 61 |
| 第六章 結論與建議..... | 71 |
| 第七章 參考資料..... | 74 |
| 第八章 附表..... | 80 |
| 第九章 附圖..... | 90 |

第一章

緒論

第一節 研究動機

根據 Moss 所提出的功能性基質理論 (functional matrix theory) (Moss 1968)，若肌肉功能改變，則其組織結構也會隨之產生變化，並進一步影響骨骼的結構及形態。而上下顎骨型態的變化對於咬合有相當程度的影響。

以往很多學者專家在探討有關咀嚼肌功能對顱骨生長發育的動物實驗中，為達到降低肌肉功能的目的所採取的方式，包括了：改變飼料軟硬度 (Bouvier and Hylander 1984; Kiliaridis, Engstrom et al. 1992; Ulgen, Baran et al. 1997)、肌切開術 (Maxwell, Carlson et al. 1981)、肌切除術 (Navarro, Delgado et al. 1995) 或去運動神經 (Phillips, Shapiro et al. 1982; Behrents and Johnston 1984) 等方法。但是後三者方式較具侵入性且可能造成不可逆性的傷害，無法排除組織傷害對生長發育的影響 (Gardner, Luschei et al. 1980)。

例如，切除肌肉則會影響血流供應及造成組織結痂，使骨骼型態改變 (Zucman 1960; Gardner, Luschei et al. 1980)；切除神經會造成感覺喪失 (Gardner, Luschei et al. 1980)；刺激神經核使其病變，可能導致神經破壞 (Gardner, Luschei et al. 1980) 等情形。因而無法明確觀察咀嚼肌萎縮後對顱骨生長發育的真正影響。

而另一種降低肌肉功能的方式，也是近來應用較為廣泛的是改變飼料的硬度，將餵食較軟飼料的組別視為肌肉功能較為低落的組別。但此種實驗設計較為間接，且我們所用來實驗的對象多為齧齒類動物，如老鼠、兔子……等，這類的齧齒類動物除食用飼料的時間外，尚有許多時間進行咬嚙磨牙的行為，這些行為依然會促進咀嚼肌的活動。如此一來，便無法明確觀察咀嚼肌萎縮後對肌肉功能以及顱骨生長發育的真正影響。

近年來肉毒桿菌神經毒素於醫療中已被廣泛的運用在不同疾病的治療，例如：肌張力異常疾病（Dystonic spasms）、眼皮痙攣症、肌肉強直性痙攣、顫抖症、抽搐症、運動傷害、下顎關節病變之肌肉痙攣（Temporomandibular joint associated muscle spasm）；而在醫學美容的領域中更是大量的被使用，其中與齒顎矯正學科相關的，就是利用肉毒桿菌素治療咬肌肥大的病例。咬肌發達的患者常伴隨著方臉型以及前牙齒列深咬的發生，現今可經由注射肉毒桿菌素，造成咬肌萎縮，藉以影響下顎骨型態及深咬的改正，以造成臉型的改變(von Lindern, Niederhagen et al. 2001; Castro, Gomez et al. 2005)……等。

肉毒桿菌素注射入肌肉後，與肌肉中許多微小神經纖維末梢相互結合，抑制神經纖維末梢膽鹼性神經終端(cholinergic nerve terminal)釋放乙醯膽鹼(acetylcholine)至神經肌肉交接處(neuromuscular junction)，抑制肌肉收縮，造成局部肌肉無力與萎縮，而達到降低肌肉活性的效果(Porter,

Strebeck et al. 1991; Brin 1997; Ahn and Kim 2007)。因此，若我們將其使用於降低肌肉的收縮力，便可於實驗動物上，觀察到咀嚼肌萎縮後對顱顏部生長發育的影響。更進一步於臨床應用上，使用於因為肌肉收縮頻率過度以及肌肉收縮強度過大所產生的種種病症。

近年來將肉毒桿菌神經毒素注射於咬肌的例症十分常見，也開始有文獻探討肌肉、骨骼隨之發生的變化。2005 年及 2007 年蔡吉陽等研究中顯示肉毒桿菌神經毒素 A 型施打於生長中大鼠的咬肌，會造成咬肌型態的萎縮與上下顎骨發育型態上的改變，同時顯示出上下顎骨骨質密度的降低，合併皮質骨厚度的減少。而在 2008 年的研究當中顯示肉毒桿菌神經毒素 A 型會使肌肉重量減低，並使肌纖維變細、使肌纖維亞型發生轉換，即使氧化能力較高的 type IIa fibers 轉換為氧化能力較低的 type IIb fibers。

因此在此系列的實驗中，從型態學而言，已證實了肉毒桿菌可造成：發育過程中咬肌型態的萎縮，上下顎骨發育型態上的改變；而從組織學而言，可以觀察到肉毒桿菌神經毒素會使上下顎骨骨質密度的降低，合併皮質骨厚度的減少，以及肌纖維變細，肌纖維亞型發生轉換。

然而在此系列的實驗模組中並未探討咀嚼肌受到肉毒桿菌素作用後，肌肉功能實質的影響與變化。因此，本實驗將藉由肌電圖的測量，分析肌電訊號後，實際量化並比較肉毒桿菌神經毒素注射前後，成鼠咬肌功能之變化，以及肉毒桿菌神經毒素不同劑量對於咬肌功能之影響程度。

第二節 研究目的

藉由將肉毒桿菌神經毒素 A 型(BTXA)注射於大鼠成鼠之咬肌，造成肌肉型態萎縮後，進一步藉由肌電圖訊號的測量，研究肉毒桿菌神經毒素 A 型對於咬肌功能上造成的變化，並探討其劑量的不同對於咬肌功能的影響程度。

第三節 研究假設

肉毒桿菌神經毒素 A 型(BTXA)注射入成鼠咬肌後，會影響並降低其咬肌功能。並且以肌電圖的形式，分析肌電訊號後實際量化出咬肌肌肉活動下降的結果。而隨著施打的肉毒桿菌神經毒素劑量越高，其咬肌功能下降的程度也越大，而肌肉功能需復原的時間也越長。

第二章

文獻查證

第一節 功能性基質理論

功能性基質假說(functional matrix hypothesis)是 Melvin Moss 在 1962 年所提出(Moss 1968)。Moss 的功能性基質理論中，指出顱顏骨骼的大小、形狀、位置並不是受到基因直接的影響，基因所扮演的角色僅在於骨骼鈣化作用的啟始。骨骼會發育成何種型態(在三度空間中的方向、位置、尺寸、型態)皆是受到外在軟組織的影響。

功能性基質理論由功能性基質(functional matrix)和骨骼單位(skeletal unit)所組成。功能性基質(functional matrix)是指提供特定功能之軟組織如肌肉與空間，其可以完整表現出某一功能；骨骼單位(skeletal unit)則是指與此功能相關的骨骼結構，可以支撐或保護這個功能性基質。而骨骼單元的發育是受功能基質的引導。

以「咀嚼」這個口腔的功能來說，其功能性基質指的是提供咀嚼功能的所有軟組織，其骨骼單位則是上、下顎骨。所以上、下顎骨發育的大小、形態及方向是靠整個軟組織所構成的功能性基質來引導，使其能夠讓咀嚼功能表現到最佳的狀態。和基因並無完全絕對的關聯。

依功能性基質如何影響骨骼在型態與大小上發育的方式不同，可分為兩種不同的功能性基質與兩種不同的骨骼單元。第一種稱為「骨膜功能性基質」(periosteal functional matrix)：意指此功能性基質藉由骨膜來影響骨骼的發育，例如說肌肉附著在骨膜上，其肌肉活動可透過骨膜影響骨骼的發育。

「骨膜功能性基質」影響的骨骼範圍通常較小，可能只有一塊骨頭的某一部分，例如顛肌附著在下顎骨的冠狀突，所以顛肌對於下顎骨的影響只限於冠狀突這一部份的發育。

第二種功能性基質稱為「被膜功能性基質」(capsular functional matrix)，例如腦被頭骨、腦膜所包覆成囊狀，而視覺系統則是被整個眼窩附近的骨骼包圍，皆是形成囊狀的型態。不同於「骨膜功能性基質」，此「囊狀功能性基質」通常會影響數塊不同的骨骼發育。

簡言之，骨膜功能性基質影響局部骨組織沉積與吸收，控制骨頭的重塑、尺寸及形狀；被膜功能性基質使骨骼生長以維持所需之生理空間

Dr. Moss 認為骨骼生長發育不全由基因決定，而是受外在功能影響較大。其後 Dr. Van Limborg 對於顛顏部的生長發育做了一些新定義：

1. 顛顏部軟骨發育是被內在的基因所控制。
2. Desmocranium (calvarium) 的發育則主要是被 epigenetic factor 所影響，如顛顏部的一些軟組織，如肌肉、神經、血管或軟骨。
3. Desmocranium 的發育亦可被 local environmental factor 影響，例如為了行使功能所產生的張力或壓力。
4. General epigenetic and general environmental factor 則對於顛顏部的骨骼生長發育影響極小。

第二節 骨骼肌功能改變後肌肉組織的變化

骨骼肌按肌纖維的生理特點可分為慢縮肌 (slow twitch 或 Type I) (fatigue-resistant)及快縮肌 (fast twitch 或 Type II) (fatigable); 更有人把快縮肌再分為快縮紅肌 (Type IIa) 和快縮白肌 (Type IIb)。

人體大部分肌肉都混有三種肌纖維，但在每一塊肌肉中兩者的比例並不相同。在功能上，以維持姿勢緊張為主的肌肉中，慢肌纖維百分比較高；而以動力性為主的肌肉，快肌纖維百分比較高。

大部分學者都認為，每塊肌肉內 Type I 及 Type II的比例是遺傳的，訓練並不會改變其百分比組成，而 Type IIa 與 Type IIb 的比例則可隨著訓練而改變。例如，耐力訓練可使原本氧化能力較低的 Type IIb 轉化為氧化能力較高的 Type IIa(Green, Klug et al. 1984; Slivka, Raue et al. 2008)，使肌肉的特性轉變為收縮速度較快、收縮力量較大、抗疲勞性較強；而相對的，年老、肥胖或限制運動會造成type IIb muscle fibers的比例增加(Kriketos, Baur et al. 1997)。

第三節 咀嚼功能改變後咀嚼肌肌肉組織的變化

一、動物研究觀察咀嚼功能改變後肌肉組織的變化

1988年，S. Kiliaridis 等人發現，若以軟食餵養老鼠，其 deep masseter muscle 的肌纖維大小較餵食正常硬度飼料之老鼠來的小；且其 type IIa fibers 所佔比例會較小，type IIb fiber 所佔比例會較大(Kiliaridis, Engstrom et al. 1988)。

Vilman 在 1990 年的實驗中也發現軟食餵食的老鼠，masseter muscle 及 digastric muscle 之大小較控制組為細(Vilman, Kirkeby et al. 1990)。

2004年，Y. Kitagawa 等人以兔子為研究對象，研究結果顯示：軟食組其 deep masseter muscle 的肌纖維大小和餵食正常硬度飼料之控制組相同；但其 type I fibers 所佔比例會較少，type IIa fibers 所佔比例會較多，type IIb fiber 所佔比例會較少(Kitagawa, Mitera et al. 2004)。

以上的文獻回顧發現，以往的實驗對於降低咀嚼肌咬力後所得到的結論並不一致。

二、人體的臨床研究觀察咀嚼功能改變後肌肉組織的變化

肌肉纖維的總橫切面與肌肉力量的大小有關。研究發現短臉型對象，其咀嚼肌與內翼肌的肌橫切面較長臉型者大，解釋短臉型者其肌咬力相對也比較強大(Weijs and Hillen 1984; Newton, Abel et al. 1987)。顯示肌肉組織確實和咬力及臉型有一定的相關性。

第四節 咀嚼肌對顱顏發育及結構的影響

一、咀嚼肌對於顱顏發育的影響

肌肉在軟組織基質中佔有重要地位，可引導顎骨向下向前生長。在肌肉附著處，肌肉藉由腱膜（aponeurosis）與骨膜或肌腱相連，藉此對骨骼施力。此時骨骼的發育與肌肉的活動力有關。

骨頭表面受到力量時會塑型以達最佳抵抗機械負荷之外形。機械負荷的增加會加大皮質骨的厚度(Goodship, Lanyon et al. 1979)。力量的大小與骨質量的增加呈線性關係(Rubin and Lanyon 1985)，因此負荷過多也會造成骨小梁(trabecular bone)質量的增加(Jee and Li 1990)。持續性地施力會導致骨沉積速率加速、骨礦物化程度減少、造成骨骼結構上的改變(Meade, Cowin et al. 1984)。

由咀嚼肌所產生的壓力，以兩種層面影響齒顎顏面的發育：

1. 對顎骨發育大小的影響

咬合力量越大，使用顎骨頻率越多，會增加顎骨及牙弓尺寸的大小；使用顎骨頻率越少，可能造成牙弓發育不足，讓牙齒排列擁擠不整齊(Kiliaridis, Bresin et al. 1996)。

2. 對顎骨發育方向的影響

咬合力量減小，會影響牙齒的萌發程度，因而影響下臉部高度(lower facial height)及深咬或開咬的關係(Proffit and Fields 1983)。

二、動物研究觀察咀嚼肌對顱顏發育的影響

過去的動物實驗中，用許多方式降低咀嚼功能，觀察頭顱顏面生長發育的差異。例如改變飼料的軟硬質地，或切除、切斷肌肉，以及破壞運動神經等等。可以歸納出：以軟食飼養降低了咀嚼功能後，大鼠下顎骨骨枝大小下降(Watt and Williams 1951)；大鼠的髁頭(condyle)尺寸較小(Bouvier and Hylander 1984)；肌肉纖維直徑降低(Bouvier and Hylander 1984; Kiliaridis, Engstrom et al. 1988)；下顎骨的不同部位骨密度與皮質骨厚度都下降(Kiliaridis, Bresin et al. 1996)；且其顎骨之齒槽脊突(dentoalveolar process)皮質骨與骨小樑的量皆降低(Bresin, Kiliaridis et al. 1999)；在鄰近肌肉附著處的上顎骨橫向發育不良；其顱顏部位的骨縫(suture)發育受到咀嚼功能降低極大的影響(Bresin, Kiliaridis et al. 1999; Katsaros 2001)。

而在咬肌被切開的猴子中，其咬肌與顱肌的肌纖維截面積較小(Maxwell, Carlson et al. 1981)；而雙側咬肌切除的大鼠，下顎骨往下旋轉，髁頭的生長方向也改變(Maxwell, Carlson et al. 1981; Navarro, Delgado et al. 1995; Katsaros 2001)。

由此可知，將咀嚼功能降低，除了造成肌肉、骨骼本身上的差異外，也會造成顱顏與下顎部位的生長發育在型態上有所改變；這符合 Moss 所提出的 functional matrix 的理論概念。

三、人體的臨床研究觀察咀嚼肌對顱顏發育的影響

人類學的研究中指出，與中古世紀的人類頭骨相較，現代人類的下顎骨有較大的角點角(gonial angle)與較窄的下顎骨。這可能是因為現代人的食物質地較軟，使咀嚼功能下降而造成如此的改變(Wedel, Carlsson et al. 1978)。人類在食物質地上的改變，也可能造成上下顎變短、變窄，而使齒列擁擠、咬合不正的機率增加(Corruccini 1984)。

咀嚼肌活動力較大的人，如磨牙者，較少發生咬合不正之情形，且發現其下臉部較短，上下顎間角度較小，下顎角較小(Kiliaridis, Engstrom et al. 1985; Waltimo, Nystrom et al. 1994)。顎骨發育不正常的成年人，其咬肌厚度較正常人小，且與長臉型有相關(Yamada and Kimmel 1991)。下顎提肌(elevator muscle)較強或較厚者，其頭顱在橫向之大小較寬，下顎角較小，下臉部較短，臉部較方正(Kiliaridis, Engstrom et al. 1985; Waltimo, Nystrom et al. 1994)。

第五節 肉毒桿菌神經毒素作用之機轉

肉毒桿菌神經毒素(Botulinum Neurotoxin)是由肉毒桿菌(Clostridium Botulinum)此菌種所分離出的一種神經毒素，依血清特性分類為七種亞型：A、B、C、D、E、F、G(Hatheway 1995)。每一種有其不同的分子大小、結構、以及不同的強度。其中類型A 及類型B 在臨床實驗上已證實其毒性達到安全而有效的可使用範圍(Naumann, Albanese et al. 2006)。

肉毒桿菌最早用於醫學治療是在 1977 年。美國眼科醫師 Alan B. Scott，首次用 A 型毒素來治療斜眼(Strabismus)病人，此後也逐漸運用在臨床上，如：肌張力異常疾病 (Dystonic spasms)、肌纖維顫動(Myokymia)、下顎關節病變之肌肉痙攣 (Temporomandibular joint associated muscle spasm)、顫抖症(Tremor)、眼瞼痙攣、半面痙攣、斜視、小兒腦性麻痺及美容醫學、除皺的治療。臨床上使用肉毒桿菌治療的優點包括：不需手術麻醉風險、副作用低且為暫時可回復的、肌肉活動度約數週至 3~4 月即可恢復。在美國及歐洲各國已在公元一九八九年經過 FDA 的認可獲准上市(Brin 1997)。

當肉毒桿菌經由口內服用時，體內某些蛋白質會保護肉毒桿菌免於腸胃內酵素的破壞，並增強其對人體的毒性；而當肉毒桿菌經由非口服或肌肉注射的方式給予時，體內某些蛋白質（如紅血球凝集素 Hemagglutinin），不但不會增強其對人體的毒性，反而會增加其穩定性，減少擴散，並提供臨床治療的可控制性(Brin 1997)。

一、肉毒桿菌神經毒素之藥理作用

在七種肉毒桿菌神經毒素的血清型中，A型為結晶狀且最為安定的一種。目前臨床中最常以A及B型做為臨床用途，但是B型之作用時間短，作用效果亦不如A型穩定可預期。肉毒桿菌神經毒A型對於人類的肌肉有強烈的麻痺作用。肉毒桿菌素A型之分子量為90萬 dalton，且其純度越高(分子量為15萬 dalton)，其作用強度可提高三至五倍。A型的分子結構為單純的晶格狀胺基酸，在其大分子的型態也沒有其他的官能基與之相連，故作用效果較好，亦較穩定。

肉毒桿菌素作用時，其分子結構會形成一個雙鏈的多肽形式：為重鏈 heavy chain (100KDa) (amino acids 449-1280)藉由一個雙硫鍵(disulfide)接著一條輕鏈 light chain (50KDa) (amino acids 1-448)的結構，此輕鏈 light chain 上會連接有一鋅原子 (zinc atom)。(Turton, Chaddock et al. 2002)(參見圖 1)。

重鏈扮演的角色則是負責去附著在神經細胞膜上，讓輕鏈可以經「胞飲作用」進入細胞內。輕鏈具有蛋白質酶(protease)的功能(zinc endopeptidase)，其功能為連接並分解一種接合蛋白SNARE(soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptor) complex。其中，B、D、F、G型肉毒桿菌素會去連接並分解VAMP (vesicle-associated membrane protein) synaptobrevin 蛋白質；而A、C、E型肉毒桿菌素則會分解SNAP-25 (25 kDa

synaptosome-associated protein) 蛋白質；此外C型肉毒桿菌素還可以分解 syntaxin蛋白質。這些蛋白質均會參與乙醯膽鹼囊泡 (acetylcholine containing vesicles) 和突觸前神經細胞膜融合的過程。(Turton, Chaddock et al. 2002) (參見圖2)。

其中，VAMP蛋白質是直接附著在突觸前乙醯膽鹼囊泡上，會幫助乙醯膽鹼囊泡去附著在神經細胞膜上；而SNAP-25蛋白質則是位於突觸前神經細胞膜上，是讓乙醯膽鹼等神經傳導物質釋放出神經細胞膜外的必要蛋白質，可以視為釋放乙醯膽鹼囊泡的一個發射台。而肉毒桿菌素會將這些蛋白質分解。因此，若這些蛋白質被分解，將使乙醯膽鹼囊泡無法附著在神經細胞膜上與細胞膜融合，如此乙醯膽鹼便無法被釋放到細胞膜外繼續傳達神經訊號 (Hay 2001; Setler 2002) (Billante, Zeale et al. 2002)。

二、肉毒桿菌神經毒素的作用機轉

肉毒桿菌作用時會有三個階段：(1) internalization (2) disulfide reduction and translocation (3) inhibition of neurotransmitter release

要了解肉毒桿菌素的作用原理，則必須先了解神經肌肉接合處 (neuromuscular junction) 的生理作用。神經終板藉由動作電位的傳導形成電位差而造成突觸前細胞膜上的鈣離子通道開啟，釋放出儲存在膜內囊泡內 (presynaptic plasma vesicle) 的神經傳導物質—乙醯膽鹼，造成肌肉收縮。

Internalization 需藉由receptor-mediated endocytotic/lysosomal

vesicle pathway。肉毒桿菌神經毒素附著在神經突觸終端的細胞膜上，可藉由胞飲作用(endocytosis)將雙鏈的多肽形式(重鏈+輕鏈)帶入神經細胞膜內。接著雙硫鍵結會瓦解，重鏈中的N-terminal half會幫助輕鏈結構穿過endosomal membrane進入細胞液(cytosol)中，然後輕鏈會去連接VAMP (vesicle-associated membrane protein)蛋白質(B、D、F、G型肉毒桿菌)、SNAP-25 (25 kDa synaptosome-associated protein)蛋白質(A、C、E型肉毒桿菌)，以及syntaxin蛋白質(C型肉毒桿菌)。並藉由zinc endopeptidase將蛋白質分解，使乙醯膽鹼囊泡無法附著在神經細胞膜上與細胞膜融合進行exocytosis，進而阻斷末梢神經中的膽鹼性神經終端(cholinergic nerve ending)鈣離子通道的正常釋放與回收作用，造成突觸前神經之乙醯膽鹼素(acetylcholine)無法釋放出神經細胞膜外，使之無法啟動肌肉的收縮，造成局部肌肉麻痺無力現象(Brin 1997)。

肉毒桿菌神經毒素是作用於神經-肌肉交接處(neuromuscular junction)。也可作用於自律神經系統中的交感與副交感神經節細胞，與節後副交感神經、膽鹼性交感神經元。此外，肉毒桿菌神經毒素無法通過血腦屏障(blood-brain barrier)影響中樞。其治療原理，基本上是藉由與神經傳導相關的蛋白質結合，一旦結合後，將使神經傳導受阻，進而阻斷神經及肌肉間聯繫，使肌肉放鬆無法收縮，導致肌肉久而不用自然地萎縮(Setler 2002)。

三、肉毒桿菌素的作用時間

肉毒桿菌神經毒素所造成麻痺效果的作用時間長短，與神經末端類型及肉毒桿菌神經毒素的種類有關。在人體肌肉神經交接處的作用，恢復期約需 2 至 4 個月；自律神經系統的恢復期則較長(Naumann, Jost et al. 1999)。而肉毒桿菌神經毒素 A 型在動物實驗中的作用時間是最長。

肉毒桿菌神經毒素並不會造成神經元死亡，只是對膽鹼性神經的傳導造成短暫性且可逆性的抑制。受肉毒桿菌神經毒素影響處，仍有自發性的突觸活動，但功效降低，神經傳導物質釋放較少，傳導過程緩慢。神經終端功能的復原速度與毒素經由神經末端代謝的速度，及神經細胞替換受傷害的 SNARE 蛋白質的速度有關。而復原的機制則包括了：神經軸索終端出芽生長 (axon sprouting)、神經終板 (additional motor endplate) 的生長，以及被分解的 SNARE 蛋白質的再生。(Jurasinski, Lieth et al. 2001)。

四、神經軸索終端的修復

施打肉毒桿菌後，肌肉功能的復原需要神經出芽生長(nerve sprouting)。新的運動神經軸索終端在肉毒桿菌神經毒素施打後約2至4天開始出芽生長noncollateral sprouting，1至2周內形成新的突觸，5至10周達到高峰。4周後，出芽生長的神經終端可使肌肉產生活動力。8周後，母體神經終端開始復原，出芽生長的神經終端活動慢慢降低。3個月後，母體神經終端即可恢復正常功能。



第六節 肉毒桿菌神經毒素作用於肌肉後肌肉組織的變化

將肉毒桿菌神經毒素施打於猴子眼瞼肌肉後發現，第 7 至第 28 天內為麻痺作用的急性期，此期間肌原纖維(myofibril)瓦解，溶酶體(lysosome)堆積，肌原纖維結構變稠密；肌肉纖維的氧化酵素活動力亦有改變。在電子顯微鏡的觀察下，施打肉毒桿菌神經毒素的肌肉，有肌纖維膜下管狀物(subsarcolemmic tubular)聚集的情形，但有髓鞘的軸索外觀並未改變(Porter, Strebeck et al. 1991)。

施打肉毒桿菌神經毒素於兔子肌肉的實驗中發現，肌纖維直徑變小，乙醯膽鹼酶(acetylcholinesterase)的染色強度增加(Borodic 1994)。神經元及神經束的大小及數目並未改變，亦無發炎現象產生(Langer, Birnbaum et al. 1997)。

注射肉毒桿菌神經毒素 A 型於大白鼠腓腸肌的實驗發現，肌肉之濕量(muscle wet mass)顯著低於未施打側肌肉之濕量。施打肉毒桿菌神經毒素之肌肉有明顯萎縮情形，且平均肌肉纖維橫斷面積(mean fiber cross-sectional area)較小 (Chen, Stott et al. 2002)。

注射肉毒桿菌神經毒素 A 型與 F 型於大白鼠腓腸肌的實驗發現：注射肉毒桿菌經過 22 週後，F 型注射側肌肉重量和控制組無顯著差異；而 A 型注射側肌肉之重量則顯著低於未施打側肌肉之重量。施打 A 型肉毒桿菌 10u 之肌肉有明顯萎縮情形，肌纖維直徑、密度均明顯變小；其中，type II fiber 肌纖維直徑減小的情形尤為明顯(Billante, Zeale et al. 2002)。

在施打肉毒桿菌神經毒素於猴子眼外肌肉 42 至 56 天後的觀察則發現肌纖維的形態趨於正常(Spencer and McNeer 1987)。施打肉毒桿菌神經毒素於猴子眼瞼肌肉後 63 天的觀察中則發現，肌纖維的大小有顯著的恢復，但仍比未施打肉毒桿菌神經毒素的肌纖維小(Porter, Strebeck et al. 1991)。

第七節 肌電圖的基本原理

肌電圖 (electromyograph, 簡稱 EMG) 可用在肌肉動作的研究, 透過顯示肌電訊號可用來描述與分析肌肉的狀況。

肌電訊號的產生: 每一大塊的肌肉是由許多小束的肌肉構成, 每一束肌肉組織若再之細分, 則是由許多肌細胞構成。當希望某塊肌肉運動時, 身體會發出膜電位訊號來刺激肌肉的收縮。肌肉刺激電位的產生, 是由神經本體位於腦幹或是脊髓的運動神經元 (motor neuron), 其軸突在肌肉細胞接合端產生許多分支, 每一分支與一細胞形成單一連結。單一運動神經元支配了許多肌細胞稱為一個運動單位 (motor unit) (參見圖 3)。位於軸突末端接觸的肌肉細胞膜具有特化的性質, 稱為運動終板 (motor endplate), 而軸突末端與運動終板的連結稱為神經肌肉連結 (neuromuscular junction)。

當刺激電位抵達軸突的末鞘造成運動終板的去極化, 引發可被電極偵測到的肌肉細胞動作電位 (muscle fiber action potential), 進而產生肌肉的收縮 (參見圖 4)。假設在時間等於 0 的時候產生一動作電位刺激肌肉, 電位發出刺激與肌肉產生收縮之間會有一段時間差, 大約是 10ms。骨骼肌細胞上的刺激電位持續時間在 1-2ms, 在還沒有機械活性開始前就已經結束。一旦啟動, 接在電位後產生的機械活性可持續 100ms 或更長的時間。

收縮的肌肉施加於外界的力量俗稱--張力 (tension)。運動神經元所產生肌肉刺激電位稱為一運動單元動作電位 (motor unit action potential)。固定單元的肌肉細胞在張力活性進行中，對接踵而來的電位刺激會增加其張力反應，此現象稱為「加乘 (summation)」，此時肌肉的單位動作電位強度會增加，頻率會上升。

一般在量測肌肉動作電位，都是偵測一整群的運動單元動作電位訊號，稱為肌電訊號 (electromyography signal)，一般在臨床或研究上俗稱所測量到的肌電訊號為肌電圖 (electromyography) 訊號。其量測的流程：由神經發出刺激電位促使肌肉收縮產生動作電位→經由電極接收一整束肌肉產生的動作電位→將此動作電位經過系統呈現出來。藉由肌電圖電位訊號的大小可以判定肌肉的活性：若電位訊號越大，代表同時有許多肌纖維收縮，則肌肉的活性就越大。

肌電訊號量測的模組主要包括四個部分，即：

電極收集訊號→前端訊號擷取→訊號擷取模組→訊號分析部份。

而 EMG 訊號處理方法主要分為時域與頻域兩大部分。

1. 時域分析 (Time domain analysis)

時域分析的評估方法包括均方根值 (Root Mean Square, RMS) 與全波整流 (full-wave rectification) 的肌電活動 (electrical activity, EA)。這兩種方法主要都是在運算一段時間內訊號的強度 (amplitude)；在相對條件下肌電訊號強度越強代表肌肉施力越多。使用 RMS 計算肌電訊號強度，多是將肌電訊號輸入電腦中再進行軟體分析。EA 分析則是搭配於硬體中，擷取 EMG 訊號後經過全波整流與低通濾波所獲得的結果。

2. 頻域分析 (Frequency domain analysis)

將時域的 EMG 訊號經過快速傅利葉方法 (Fast Fourier Transform, FFT) 所得到全部時間的頻譜圖形，稱為功率頻譜密度 (power spectral density, PSD)。在肌電訊號頻譜分析中，最常被使用的是中位頻率 (Median Frequency, MDF) 以及平均頻率 (Mean Power Frequency, MPF)，此兩參數代表其功率頻譜的平均頻率值。

由於肌電分析的一部份，是要獲得 EMG 訊號在時間上的變化，因此當擷取下來一長串的 EMG 訊號後，多會將訊號以相同的訊號點數，分割成許多小片段 (window)，並且計算每個片段訊號的 EA、RMS、MDF、MPF 等等數值。如此便可知道在不同時間片段中肌肉的收縮強度與頻率的表現。

(Peter Konrad 2005)

肌肉在持續收縮過程中，隨著時間的進行，肌肉會出現疲乏的現象，動作電位傳導速率會下降，其功率頻率（power spectral）會向低頻位移；也就是肌電訊號低頻部分功率密度（power spectral density）提高而高頻部分降低。以往的研究已指出，在一些疲勞或癱瘓的肌肉，中位頻率及平均頻率會出現向低頻位移的現象(Lee, Fu et al. 1994; Finsterer 2001; Toffola, Sparpaglione et al. 2001; Lin, Liang et al. 2004) (Roberto Merletti, Philip Parker 2004)。



第八節 肉毒桿菌神經毒素作用後肌電圖訊號的變化

注射不同劑量的肉毒桿菌神經毒素 A 型於大白鼠 tibialis anterior muscle (0.02 ~ 20.0 units)，並於腓神經 (peroneal nerve) 包埋電極給予電刺激，之後觀察肌肉切片 glycogen 含量：若肉毒桿菌神經毒素阻斷神經肌肉訊息的效果越佳，則肌肉對電刺激的反應會越差，且肌肉切片 glycogen 含量也會越高。實驗結果顯示：1. 最有效的注射位置：注射點越接近肌肉 motor endplate 區域，其效果越好。2. 隨著注射的劑量越高，肌肉癱瘓的程度越大；但是當劑量超過 5.0 units 時，肌肉癱瘓的程度就沒有再顯著的增加 (Shaari and Sanders 1993)。

注射肉毒桿菌神經毒素 A 型於大白鼠後肢屈肌，並連續記錄肌電訊號 28 週，結果顯示：注射 botox 後 5~7 天，電位振幅 CMAP (compound muscle action potential amplitude) 和肌肉力量 (muscle force) 均顯著下降；接著逐漸以線性的關係逐漸地復原。電位振幅和肌肉力量下降的程度和復原的速度和 botox 注射劑量有關；且電位振幅的恢復會優先於肌肉力量的回復。對側控制組的後肢屈肌則沒有顯著的變化發生 (Cichon, McCaffrey et al. 1995)。

注射肉毒桿菌神經毒素 A 型於大白鼠咽部肌肉，並於注射前及注射後三天測量大鼠咽部聲帶肌肉運動及肌電圖變化。其結果顯示：隨著肉毒桿菌神經毒素的施打，大鼠咽部聲帶運動角度、thyroarytenoid m. 肌電圖訊號皆顯

著地下降。劑量越高（0.0007~0.7 U），聲帶運動及肌電訊號下降情形越顯著；而當劑量超過 0.7 U（0.7 ~7U）將造成大鼠窒息死亡。肉毒桿菌神經毒素劑量大於 0.07 U 時，藥劑也會滲透至對側咽部肌肉，並影響對側控制組肌肉的活動(Inagi, Connor et al. 1998)。

注射肉毒桿菌神經毒素 A 型與 F 型於大白鼠腓腸肌的實驗發現：在相同劑量的條件下，A 型肉毒桿菌對於神經訊息傳遞阻斷的程度（neuromuscular blockade）與作用時間(time course)均優於 F 型肉毒桿菌。其中，A 型肉毒桿菌對於抑制肌電訊號的作用期間平均約為 90~110 天；且劑量越高，阻斷肌電訊號的功效越好，藥效也越長。在劑量方面：0.625~1.25 u 的 A 型肉毒桿菌最大可造成 80%肌電訊號的阻斷；而 2.5u~10u 的劑量，最大可阻斷 90%~99% 的肌電訊號(Billante, Zealear et al. 2002)。

以每公斤體重施打 6 units Botox 之注射劑量，注射 A 型肉毒桿菌神經毒素於青春期大鼠腓腸肌的實驗發現：注射後 1~2 週，肌肉重量、肌電訊號、肌肉強直力強度均顯著大幅降低；注射後六個月，肌肉重量、肌電訊號、肌肉強直力強度則回復至控制組大小。其中，肌電訊號（電位振幅及積分面積）注射後三天下降至最低值（約控制組的 28%）；注射後 2~4 週開始有回復現象；注射後三個月恢復至控制組的 82%；注射後六個月恢復至控制組 97% (Ma, Elsaidi et al. 2004)。

注射肉毒桿菌毒素於中風患者上肢肘關節、腕關節、指關節。結果顯示注射肉毒桿菌毒素後四週及十二週時，肌電圖檢查發現靜止時平均動作電位、自主最大收縮時動作電位、每秒轉折數皆較注射前有明顯的降低。注射四週後，肘關節與腕關節的快速活動度與慢速活動度皆有顯著的增加，但在十二週時此效應便減弱。而手指關節及掌指關節的快速活動度與慢速活動度不論是在四週時及十二週時增加並不明顯(Chiao-Wen Hwang et al., 2004)。

注射肉毒桿菌神經毒素 A 型於五位咬肌肥大患者，共九塊咬肌，評估肉毒桿菌素注射前後咬肌超音波圖像肌肉厚度及咬肌肌電活動變化。實驗結果顯示：咬肌體積於注射後三個月時有最大減少量，約減少了 31%。其中六塊咬肌在經過一年後臨床成效仍穩定良好；而三塊咬肌則有顯著的回復且需第二次注射。咬肌肌電圖訊號在肉毒桿菌素注射前後則無顯著差異(To, Ahuja et al. 2001)。

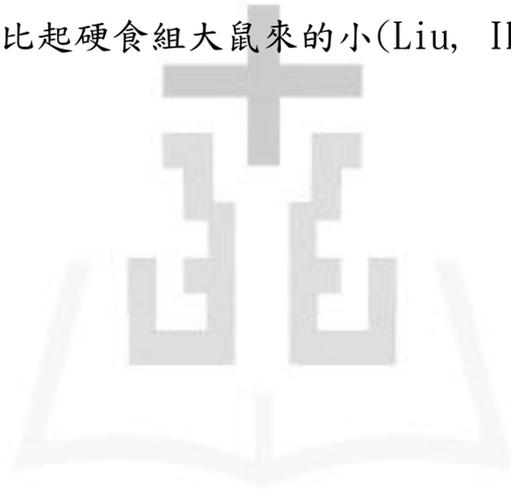
注射肉毒桿菌神經毒素 A 型於十位咬肌肥大方臉型患者咬肌，評估注射前後臨床臉部外觀及咬肌顛肌肌電活動變化。實驗結果顯示：下臉部下顎骨輪廓於注射後三個月時有最大減少量；而咬肌肌電最大振幅於注射後一個月時降到最低，之後逐漸上升恢復。顛肌並沒有產生代償性的型態增厚及肌電振幅上升現象(Lee, Kim et al. 2007)。

2007年，國立成功大學陳家進教授指導，注射肉毒桿菌毒素於脊柱膨出青少年尿道外括約肌，評估注射前後的骨盆底肌肉活動變化，實驗結果顯示：正中頻率與正中能量頻率均往低頻飄移。平均功率與振幅均方根會減低而最大尿流速有明顯的改善。外尿道括約肌肉毒桿菌素的注射不只會改善尿流速，減少餘尿量，根據肌電圖的變化，更發現可以改變排尿的模式。



第九節 咀嚼肌功能改變後肌電圖訊號的變化

將 36 隻大鼠於斷奶後平均分成兩個組別：一組餵以軟食，另一組餵以硬食，直到生長至 50 天。接著測量兩組大鼠進食時咀嚼肌群的肌電訊號，並分析比較。結果顯示：(1)軟食組大鼠有較不規則的咬合節律(chewing rhythm)、較長的咬合週期(chewing cycle) (2)進食時，軟食組大鼠提顎肌群(咬肌、內翼肌和顛肌)的肌肉活動度(mean and integrated activities)明顯大於硬食組。(3)軟食組大鼠，從吃軟食轉換到吃硬食時，提顎肌群肌肉活動度的提升程度，比起硬食組大鼠來的小(Liu, Ikeda et al. 1998)。



第三章

研究材料與方法

第一節 研究對象

實驗選取 52 隻 Wistar 品系雄性成鼠，實驗動物由樂斯科生物科技公司提供。實驗成鼠十週年齡大，體重約為 250~350 公克重。

實驗動物飼養於台北醫學大學實驗動物中心，實驗鼠房維持每日12:12小時 light-dark cycle (06:00AM to 06:00 PM lights on)，維持恆定溫度溫 ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) 和空氣濕度(40%-70%)。

實驗成鼠隨機分成四組(Groups I~IV)，每組 13 隻實驗成鼠，其中第一至第三組為實驗組，第四組為控制組。



第二節 研究材料

本實驗是使用肉毒桿菌神經毒素 A 型(BOTOX[®], Allergan Pharmaceuticals, Ireland)，每一小瓶 100 u，添加無菌 0.9%生理食鹽水作為稀釋劑。

Group I：

每一小瓶 BOTOX 100 u，添加無菌 0.9%生理食鹽水 4ml 作為稀釋劑，調配成 25 u/ml 濃度的製劑。故注射肉毒桿菌神經毒素 7.5 u → 需 0.3ml

Group II：

每一小瓶 BOTOX 100 u，添加無菌 0.9%生理食鹽水 6ml 作為稀釋劑，調配成 16.666 u/ml 濃度的製劑。故注射肉毒桿菌神經毒素 5.0 u → 需 0.3ml

Group III：

每一小瓶 BOTOX 100 u，添加無菌 0.9%生理食鹽水調配成 8.333 u/ml 濃度的製劑。故注射肉毒桿菌神經毒素 2.5 u → 需 0.3ml

(Group II 組別施打完畢後，剩餘 16.666 u/ml 濃度製劑 3ml。此時再添加無菌 0.9%生理食鹽水 3ml，調配成 8.333 u/ml 濃度的製劑)

Group IV (對照組)：

雙側咬肌注射等量無菌 0.9%生理食鹽水 0.3ml

第三節 研究設計及步驟

本實驗計畫經過台北醫學大學動物實驗倫理委員會審核批准，並遵守實驗動物照顧及實驗準則。

Connection module and electrodes

實驗使用Tefloncoated 7-strand stainless steel microwire (O.D. 0.23 mm ; A-M Systems, #7935) (Outer diameter 0.23 mm ; A-M Systems, #7935)製作而成的微電極線 (microwires)。預先將四條微電極線焊接在miniature connector 短端的排針 (2 x 5 pin) 上 (參見圖5)。

手術時會將事先製作好的 miniature connector 包埋在老鼠的頭顱骨頂部，並將四條微電極線從頭顱骨頂部經過皮下 (subcutaneous tunnel)，穿出兩側 submandibular 區域皮膚切線，並包埋在左右兩側的咬肌。(手術過程詳述於後方篇幅。)

記錄肌電訊號時，使用一條socket-matched miniature headstage with FETs傳輸肌電訊號。傳輸線一端連接到實驗老鼠頭顱頂部的miniature connector長端的雙排pin；而另一端則連接到amplifier (參見圖6)。

Recording apparatus

使用一個4-channel amplifier 放置在一標準籠子外側，接收傳送而來的肌電訊號。並且放置一個金屬板 (grounded metal plate) 在紀錄籠子的底部，當作接地使用 (參見圖7)。

實驗動物的準備 Preparation of Animals

一、咬肌電極線包埋 (Electrode installation)

於實驗成鼠十週大時，利用腹腔注射(intraperitoneal, IP)方式，以 Zoletil (1mg/kg) 麻醉劑和 Rompun (0.5mg/kg)肌肉鬆弛劑兩種藥劑將大鼠麻醉，而後手術包埋步驟如下：

1. 剔除實驗手術區域毛髮(頭頂及兩側臉頰部位)
2. 將老鼠固於實驗動物立體定位儀(stereotaxic apparatus)
3. 頭蓋骨上方矢狀方向中線，由兩眼間至兩耳間，縱向切開頭部皮膚，剝離骨膜並暴露出頭顱骨頂部 frontal、parietal、occipital 區域
4. 利用直徑 0.8mm 慢速直機鑽針，垂直頭顱骨表面皮質骨，於 frontal、parietal、occipital 區域，對稱正中線共鑽出 6 個小孔。鑽入深度約 2/3 bur diameter。
5. 在小孔上鎖上直徑 1.0mm，長度 4mm 的不鏽鋼迷你骨釘 (stainless steel screws) 共六支。作為固定 miniature connector 的基底部。
6. 將 miniature connector 焊接電極線端，固定於頭顱骨上 screws。
7. 利用牙科用樹脂材流入 screws 與 miniature connector 之間，待樹脂硬化後即予以固定。
8. 將 miniature connector 上，預先焊接的兩對 bipolar electrode microwires 電極線 (teflon-coated 7-strand stainless steel

microwires) ，從頭顱骨頂部經過皮下 (subcutaneous tunnel) ，穿出兩側 submandibular 區域皮膚切線，並包埋在左右兩側的咬肌。

9. 兩對 bipolar electrode microwires 尾端，去除掉 teflon 薄膜 3mm ，並且彎折出一倒勾。其中 channel 1 兩條 bipolar microwires 包埋在右側咬肌；而 channel 2 兩條 bipolar microwires 包埋在左側咬肌。同側咬肌包埋之成對 microwires ，裸露之尾端間距約 5.0 mm 。
10. 將 microwires 縫合固定於鄰近結締組織表面，防止 microwires 移位脫落。縫合兩側頰側區域皮膚切線傷口。

電極線定位方式：

下顎骨角至眼眶下緣做一連線，此連線通過 superficial masseter m. 部分定為線段 a。線段 a 中點前上方 2.5mm 為前方電極線定位點，線段 a 中點後下方 2.5mm 為後方電極線定位點。兩條 bipolar microwires 尾端定位點盡可能平行 superficial masseter m. fiber 走向(參見圖 8)。

二、固定每日餵食時間並記錄進食時雙側咬肌肌電活動

每一隻實驗鼠置放於一標準籠子內部(45 cm x 22 cm x 18 cm)，並且維持每日 12:12 小時 day-night rhythm。待手術復原期一週後，每日給予相同飲水與飼料，並固定每日餵食時間。於每日餵食時間，紀錄雙側咬肌之肌電活動，記錄期間為兩週。

咬肌活動的測量方式如下：

首先會限制每日實驗老鼠進食的時間於每日兩個小時。每日飼料的供給僅限於此段進食時間。在實驗期間每隻大鼠，每週會記錄一次進食時的肌電訊號。而記錄的時間長度，則是取每日進食時間內的前一個小時。

三、全身麻醉與肉毒桿菌素注射

本實驗劑量所用的單位是unit：根據以往的文獻顯示，1 unit的肉毒桿菌神經毒素劑量，可致死 50%的18-22 g Swiss-Webster小鼠(Jankovic and Brin 1991)。

記錄實驗鼠進食時雙側咬肌肌電訊號兩週後，進行第二次麻醉，並依據不同實驗組別注射不同劑量之肉毒桿菌神經毒素 A 型 (BOTOX®, Allergan Pharmaceuticals, Ireland) (實驗組) 及生理食鹽水 (控制組) 於成鼠咬肌。

Group I：右側咬肌注射肉毒桿菌神經毒素 A 型 7.5 u (0.3ml)

左側咬肌注射入等量生理食鹽水 0.3ml

Group II：右側咬肌注射肉毒桿菌神經毒素 A 型 5.0 u (0.3ml)

左側咬肌注射入等量生理食鹽水 0.3ml

Group III：右側咬肌注射肉毒桿菌神經毒素 A 型 2.5 u (0.3ml)

左側咬肌注射入等量生理食鹽水 0.3ml

Group IV (對照組)：雙側咬肌注射等量生理食鹽水 0.3ml

咬肌(masseter muscle)注射肉毒桿菌素之步驟如下

1. 大鼠兩側臉頰剃除毛髮。
2. 兩側臉頰皮膚表面使用 75%酒精消毒
3. 下顎骨角至眼眶下緣做一連線，此連線通過 superficial masseter m. 部分定為線段 a。線段 a 中點為肉毒桿菌注射點(參見圖 9)。
4. 於針頭上裝置 plastic stopper，針頭露出 2.0 mm，使進針量固定。
進針時，斜面朝下，施打藥劑。

四、記錄注射藥劑後進食時雙側咬肌活動

待麻醉注射復原一週後，每日給予相同飲水與飼料，固定每日餵食時間。並於每日餵食時間內頭一個小時紀錄雙側咬肌之肌電活動。

五、大鼠的犧牲與灌流手術

注射實驗藥劑後，連續紀錄 12 週，將大鼠用 Zoletil 麻醉劑和 Rompun 肌肉鬆弛劑兩種藥劑利用腹腔注射將大鼠麻醉犧牲，進行灌流手術。

手術確認左右咬肌電極線位置是否移位。接著取下大鼠咬肌，用電子天秤(Denver, USA)量取雙側咬肌重量，比較四組之間咬肌重量之差異。

肌電資料的取得與儲存 Data Acquisition and Storage

1. 訊號放大器線路：

由實驗動物取得的 EMG 訊號會經過 amplifier 進行訊號放大(amplified) 1000 倍。並且經過帶通濾波電路 (bandpass filter) filtered with 32~128 Hz，完成初級的雜訊濾除動作，去除訊號中不屬於 EMG 訊號的雜訊。

2. 訊號處理設備：

將放大處理過後的電流訊號，傳送到一個12-bit analog-digital converter (PCL-818L, Advantech, Taiwan)，進行EMG訊號類比/數位轉換，轉換成相對應的數位訊號。其取樣頻率 (sampling rates) 為500 Hz。再經由傳輸到後端，進行訊號的顯示、分析及儲存。取得的訊號資料會同步無線傳輸至微處理器之後，並且將資料即時儲存在快閃記憶體中。

3. 訊號顯示及分析：

使用個人電腦及軟體來進行，主要對擷取到的訊號做處理、分析及儲存。

資料分析 Data Analysis

收集而來的肌電訊號，經過類比/數位轉換技術，轉換成相對應的數位訊號後，會接著進行時域分析 Time domain analysis (Root Mean Square) 以及頻域分析 Frequency domain analysis (Power Spectral Analysis)。

將待分析的數位訊號分割成許多 small time segments (windows)，對於每一片段 (window)。分析軟體會根據快速傅利葉轉換法 (fast

Fourier transform) (FFT)，將時域的EMG訊號轉換得到全部時間的頻譜圖形，稱為“功率頻譜密度” (power spectral density)。

藉著演算出均方根值 (Root Mean Square) (RMS) 來定量EMG活動的強度 (magnitude)；並且藉由計算平均頻率 (Mean Power Frequency) (MPF) 來評估EMG訊號的頻域 (frequency domain)。均方根值 (Root Mean Square) (RMS) 代表active motor units的數目；而平均頻率 (Mean Power Frequency) (MPF)則是表示肌肉收縮時，active motor units同步化的程度 (the degree of their synchronization) (參見圖10，圖11，圖12)。其中，均方根值 (Root Mean Square) (RMS) 和平均頻率 (Mean Power Frequency) (MPF) 的運算公式如下：

均方根值 (Root Mean Square) (RMS)：

$$\text{RMS} = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^n (\text{Amp}(t))^2}{n}}$$

n: the total number of data points during a specified time segment

t : the individual time point (1 to n) with an increment of
1/sampling rate

Amp(t): the amplitude of the data point at a given time point

平均頻率 (Mean Power Frequency) (MPF):

$$\text{MPF} = \frac{\sum_{f=f_0}^{f_c} f \cdot \text{PSD}(f)}{\sum_{f=f_0}^{f_c} \text{PSD}(f)}$$

f : a given frequency

f₀: the lower cutoff frequency

f_c:the upper cutoff frequency

PSD(f): the power spectral density of a given frequency

因此，我們可以得到以下肌電訊號的變數，包括：

- Root Mean Square 均方根值
- Total numbers of burst 總咬合次數
- Total burst durations (sec) 總咬合時間
- Maximum burst discharge (μV) 最大咬力電位
- Intergrated activity (Area) (μV *S) 咬力電位對時間積分面積
- Mean Power Frequency (MPF) (Hz) 平均功率頻率

第四節 統計方式

1. 使用 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test :

比較 Group I~Group IV 四組之間，藥劑注射後第十二週咬肌重量的差異。

使用 Paired t-Test :

比較藥劑注射後第十二週，同組內左右側咬肌重量。

2. 使用 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test :

比較 Group I~Group IV 四組間，實驗前後大鼠體重的差異。

3. 使用 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test :

分析 Group I~IV 四組間，注射藥劑後每週右側咬肌肌電訊號是否有顯著差異。其中，為了去除各組大鼠間，電極線包埋所造成的肌電訊號差異，因此會將每隻大鼠藥劑注射前咬合活動紀錄的平均值訂為 100%，注射後每日咬合活動紀錄數值除以注射前平均值來比較，並以百分比形式呈現。

4. 使用 Repeat ANOVA:

比較同組組內肉毒桿菌神經毒素注射前後右側咬肌肌電訊號之變化是否有差異性。

第四章

分析與結果

第一節 實驗大鼠的體重變化

實驗期間，飼養之大鼠隨年齡增加而其體重(overall body weight)也隨之增加。整個飼養期間，每週固定測量體重觀察其生長情況，至飼養終止。實驗期間，除了注射藥劑後第一週，Group I、II、III 三組大鼠體重有暫時下降的情形外，四組別的體重-年齡曲線走向均相似（參見圖 13）。

使用 ANOVA 方法，分析實驗前及實驗後各組大鼠之平均體重：顯示實驗前及實驗後各組大鼠之平均體重無統計差異（參見表 3 及圖 14）。大鼠之生長發育(overall growth)並未因施打肉毒桿菌神經毒素而產生影響。



第二節 咬肌重量之比較

各組咬肌的濕量(muscle wet mass)如(表 4)所示。

Group I 右側咬肌重量為 1.0177 g，左側咬肌重量為 1.8639 g

Group II 右側咬肌重量為 1.0268 g，左側咬肌重量為 1.8802 g

Group III 右側咬肌重量為 1.3178 g，左側咬肌重量為 1.9067 g

Group IV 右側咬肌重量為 2.0495 g，左側咬肌重量為 1.9717 g

以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析，四組之間右側咬肌做比較(參見圖 15)，

具統計意義的是：

Group IV > Group III > Group II ≠ Group I (P < 0.05)

左側咬肌重量：四組之間並沒有統計學上顯著差異。

以 Paired t-Test 分析，同組內左右側比較(參見圖 16)，

具統計意義的是：

Group I：左側 > 右側 (P < 0.05)

Group II：左側 > 右側 (P < 0.05)

Group III：左側 > 右側 (P < 0.05)

第三節 咬肌活動表現之比較

實驗之初，四組共有 52 隻大鼠接受咬肌電極線包埋手術。在實驗第 12 週時，尚有 31 隻大鼠有清晰的肌電訊號。而在實驗第 16 週大鼠灌流犧牲時，去除掉電極線脫落移位的樣本，剩餘 24 隻大鼠有清晰的肌電訊號(參見表 2)。

為了去除每隻實驗大鼠個體差異，以及咬肌電極線包埋誤差所造成的個體間肌電訊號差異，因此會將每一隻大鼠每對電極線包埋點的注射前每日咬合活動項目紀錄的平均值訂為 100% (注射前兩週內取平均值)，然後將注射後每日咬合活動肌電訊號測量數值，除以注射前平均值來比較，並以百分比形式呈現，亦即：

$$\left(\frac{\text{post-inj. EMG value}}{\text{pre-inj. EMG average value}} \right) \times 100$$

如此一來，即可將每隻大鼠的咬肌活動情形，在注射藥劑前後，自身作為比較，並去除掉個體以及電極線包埋誤差所造成的肌電訊號的差異。

每段肌電訊號的紀錄，會去除掉最頂端 0.001% 的 EMG amplitudes，視為非自然的肌肉活動。而 peak EMG 則定義為其餘 99.999% 訊號樣本中的 EMG amplitudes 的最大值(Kawai, Tanaka et al. 2007)。

根據以往大鼠咀嚼肌肌電活動的實驗顯示，5% 的 peak EMG level 一般均會超過 noise level(Kawai, Tanaka et al. 2007)。因此將每隻大鼠注射藥劑前，兩週之間紀錄的 peak EMG 取平均值，再以此 peak EMG 平均值的 5% level，作為該大鼠肌電訊號軟體分析的門檻(threshold level)。會將 peak

EMG 5% level 以下的訊號濾除掉，不納入訊號分析樣本。

藥劑注射後，咬肌活動復原起始的標準的制訂：與前一次肌電訊號紀錄作比較，該次記錄有大於 2.5% 以上肌肉活動量的提升，並且在接下來的幾週肌肉活動，都有穩定而向上提升的趨勢，則該次紀錄的週數視為復原開始的起始週(Billante, Zealear et al. 2002)。



1. 咬合次數 (Bursts number) (參見表 5, 圖 17, 圖 18)

藥劑注射前, 四組大鼠咬肌平均咬合次數為:

Group I 右側咬肌 8509.7 次, 左側咬肌 8845.0 次

Group II 右側咬肌 8648.3 次, 左側咬肌 8943.8 次

Group III 右側咬肌 9046.7 次, 左側咬肌 8915.7 次

Group IV 右側咬肌 8193.4 次, 左側咬肌 8066.6 次

BTXA 注射後第一週時, Group I、II、III 右側咬肌咬合次數降為注射前的 0.22%~0.63%, 此為實驗期間右側咬肌咬合次數最低的一週。即使是最低劑量的 2.5u, 右側咬肌也降為注射前的 0.63%。而 Group IV 右側咬肌, 在 NaCl 注射後第一週時, 咬合次數降為注射前的 89.96%。而注射後第十二週時, Group I、II、III 右側咬肌咬合次數分別回復到注射前的 40.40%、42.71%、55.69%; Group IV 右側咬肌則維持約 101.50%。

以 Repeated ANOVA 分析, 第十二週時右側咬肌咬合次數: Group I、II、III 和注射前仍有顯著差異($p < 0.05$), Group IV 則無顯著差異。而以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析, 第十二週時咬合次數: Group IV $>$ III $>$ II、I 具顯著差異($p < 0.05$); Group I 和 II 間無顯著差異。

由實驗週數對咬合次數的曲線觀察, Group III 右側咬肌咬合次數約從注射 BTXA 後第三週開始有回復現象 (10.35%); Group I、II 則是從注射 BTXA 後第四週開始有回復現象 (分別為 8.11%, 10.26%)。

2. 總咬合時間 (Total duration of bursts) (參見表 6，圖 19，圖 20)

藥劑注射前，大鼠咬肌平均咬合總時間為：

Group I 右側咬肌 338.21 秒，左側咬肌 366.33 秒

Group II 右側咬肌 356.01 秒，左側咬肌 368.57 秒

Group III 右側咬肌 310.41 秒，左側咬肌 332.52 秒

Group IV 右側咬肌 289.86 秒，左側咬肌 300.22 秒

BTXA 注射後第一週時，Group I、II、III 右側咬肌咬合總時間降為注射前的 0.19%~0.51%，此為實驗期間右側咬肌咬合總時間最低的一週。而 Group IV 右側咬肌，在 NaCl 注射後第一週時，咬合總時間降為注射前的 91.28%。

注射後第十二週時，Group I、II、III 右側咬肌咬合總時間分別回復到注射前的 41.15%、43.47%、64.30%；Group IV 右側咬肌咬合總時間則增加到注射前的 110.83%。

以 Repeated ANOVA 分析，第十二週時右側咬肌咬合總時間 Group I、II、III 和注射前仍有顯著差異($p < 0.05$)，Group IV 則無顯著差異。而以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析，第十二週時 Group IV > III > II、I 具顯著差異($p < 0.05$)，Group I 和 II 間無顯著差異。

由實驗週數對咬合總時間的曲線觀察，Group III 右側咬肌咬合總時間約從注射 BTXA 後第三週開始有回復現象 (8.22%)；Group I、II 則是從注射 BTXA 後第四週開始有回復現象 (分別為 6.30%，6.19%)。

3. 最大咬力電位 (Maximum burst discharge) (參見表 7, 圖 21, 圖 22)

藥劑注射前, 大鼠咬肌最大咬力電位平均值為:

Group I 右側咬肌 1018.65 μV , 左側咬肌 1003.55 μV

Group II 右側咬肌 981.00 μV , 左側咬肌 949.83 μV

Group III 右側咬肌 978.41 μV , 左側咬肌 973.56 μV

Group IV 右側咬肌 856.35 μV , 左側咬肌 862.91 μV

BTXA 注射後第一週時, Group I、II、III 右側咬肌最大咬力電位降為注射前的 8.10%、7.82%、8.41%, 此為實驗期間右側咬肌最大咬力最低的一週。而 Group IV 右側咬肌, 在 NaCl 注射後第一週時, 咬合最大咬力略降為注射前的 95.86%。在統計學上顯示, 注射後第一週時右側咬肌咬力: Group IV > Group III \approx Group II \approx Group I。Group I、II、III 三組間, 雖然劑量不同, 但在實驗期間對於咬力抑制的最大程度卻是相近的, 沒有明顯差異。

注射後第十二週時, Group I、II、III 右側咬肌咬合最大咬力分別回復到注射前的 28.25%、33.02%、54.71%; Group IV 右側咬肌最大咬力則增加到注射前的 104.95%。以 Repeated ANOVA 分析, 第十二週時右側咬肌最大咬力電位 Group I、II、III 和注射前仍有顯著差異 ($p < 0.05$), Group IV 則無顯著差異。而以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析, 第十二週時 Group IV > III > II、I 具顯著差異 ($p < 0.05$), Group I 和 II 間無顯著差異。由此可知在注射後第 12 週時, 2.5u BTXA 組, 右側咬肌咬力的恢復程度較 7.5u

和 5.0u BTXA 組別佳，但 Group I、II、III 卻都沒有恢復到注射前的程度。

由時間對最大咬力電位的曲線觀察，Group I、Group III 右側咬肌最大咬力電位約從注射 BTXA 後第四週開始有回復現象（分別為 13.79%，19.52%）；Group II 約從注射 BTXA 後第五週開始有回復現象（14.65%）。開始回復後，接著最大咬力會呈現緩慢而線性增加。Group IV 右側咬肌，除了 NaCl 注射後第 1 週有短暫而些微的下降至 95.84%，注射後第 2 週開始便回復至注射前的咬力電位。



4. 咬力電位對時間圖形積分面積 (Total area) (參見表 8, 圖 23, 圖 24)

藥劑注射前, 大鼠咬肌咬力電位對時間圖形積分面積平均值為:

Group I 右側咬肌 65299.43 $\mu\text{V}\cdot\text{S}$, 左側咬肌 66224.31 $\mu\text{V}\cdot\text{S}$

Group II 右側咬肌 80596.12 $\mu\text{V}\cdot\text{S}$, 左側咬肌 82572.81 $\mu\text{V}\cdot\text{S}$

Group III 右側咬肌 75672.96 $\mu\text{V}\cdot\text{S}$, 左側咬肌 76818.04 $\mu\text{V}\cdot\text{S}$

Group IV 右側咬肌 73044.10 $\mu\text{V}\cdot\text{S}$, 左側咬肌 71739.22 $\mu\text{V}\cdot\text{S}$

BTXA 注射後第一週時, Group I、II、III 右側咬肌積分面積降為注射前的 0.12%、0.04%、0.11%, 此為實驗期間右側咬肌咬力電位對時間圖形積分面積最低的一週。而 Group IV 右側咬肌, 在 NaCl 注射後第一週時, 略降為注射前的 94.98%。在統計學上顯示, 注射後第一週時右側咬肌咬合活動積分面積: Group IV > Group III \approx Group II \approx Group I。Group I、II、III 三組間, 雖然劑量不同卻沒有明顯差異。

注射後第十二週時, Group I、II、III 右側咬肌積分面積分別回復到注射前的 16.87%、18.54%、33.03%; Group IV 右側咬肌積分面積則增加到注射前的 107.97%。由此可知在注射後第 12 週時, 2.5u 組, 咬力電位對時間積分面積的恢復程度較 7.5u 和 5.0u 組別佳, 但 Group I、II、III 卻都沒有恢復到注射前的程度。

以 Repeated ANOVA 分析，第十二週時右側咬肌積分面積 Group I、II、III 和注射前仍有顯著差異($p < 0.05$)，Group IV 則無顯著差異。而以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析，第十二週時 Group IV $> III > II、I$ 具顯著差異($p < 0.05$)，Group I、II 間無顯著差異。

由實驗週數對積分面積的曲線觀察，Group III 右側咬肌積分面積約從注射 BTXA 後第四週開始有回復現象（回復到注射前的 8.85%）；Group I、II 則從注射 BTXA 後第六週開始有回復現象（分別回復到注射前 5.29%，5.17%）。



5. 平均頻率 (Mean Power Frequency) (參見表 9, 圖 25, 圖 26)

藥劑注射前，大鼠咬肌進食活動平均頻率平均值為：

Group I 右側咬肌 90.31 Hz，左側咬肌 88.35 Hz

Group II 右側咬肌 90.50 Hz，左側咬肌 89.77 Hz

Group III 右側咬肌 90.53 Hz，左側咬肌 88.33 Hz

Group IV 右側咬肌 88.73 Hz，左側咬肌 88.23 Hz

BTXA 注射後第一週時，Group I、II、III 右側咬肌平均頻率降為注射前的 92.61%、91.62%、93.14%；而 Group IV 右側咬肌，在 NaCl 注射後第一週時，略升為注射前的 101.79%。

注射後第十二週時，Group I、II、III 右側咬肌平均頻率分別回復到注射前的 95.72%、95.70%、96.40%；Group IV 右側咬肌積分面積則增加到注射前的 102.11%。

以 Repeated ANOVA 分析，第十二週時右側咬肌平均頻率 Group I、II、III 和注射前比較仍有顯著差異($p < 0.05$)，Group IV 和注射前比較則無顯著差異。而以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析，第十二週時 Group IV $>$ I、II、III 具顯著差異($p < 0.05$)，Group I、II、III 間無顯著差異。

由時間對咬肌平均頻率的曲線觀察，Group I、II、III 右側咬肌平均頻率，自注射後一週略微下降，此後漸漸平緩的提升復原。

第五章

討論

第一節 實驗大鼠的體重變化

本實驗所使用的實驗動物為十週大的Wistar品種大鼠，其青春期为30-60天左右，為生長發育最快速的時期，60天之後則進入成年期，其生長發育趨緩。實驗期間定期每週量測各組大鼠之體重增加情況，發現除了注射BTXA後一週時，Group I, II, III三組大鼠體重和前一週比較有略微下降的情形，注射後第二週開始至注射後第12週，四組大鼠的體重變化皆穩定成長。而在實驗前後分別測量比較四組之間大鼠體重，顯示實驗前及實驗後四組間體重情形並無統計差異。這說明局部施打肉毒桿菌神經毒素於咬肌等咀嚼肌，對於發育中大鼠全身性正常的生長發育，並未造成影響。而Group I, II, III三組大鼠在注射BTXA一週後，體重略微下降的情形，推測原因為：1. 注射時藥劑針頭對咬肌肌肉組織造成之傷害。2. BTXA作用後，右側咬肌癱瘓造成之進食活動受到影響。

Matic 在其兔子咬肌實驗中也得到相同的結果，即全身性生長發育並不因局部施打肉毒桿菌神經毒素受到影響(Matic, Yazdani et al. 2007)。

以往的實驗模式中，如：改變飼料軟硬度(Bouvier and Hylander 1984; Kiliaridis, Engstrom et al. 1992; Ulgen, Baran et al. 1997)、肌切開術(Maxwell, Carlson et al. 1981)、肌切除術(Navarro, Delgado et al. 1995)或去運動神經(Phillips, Shapiro et al. 1982; Behrents and Johnston 1984)等方法，皆有造成組織傷害而影響實驗結果的疑慮(Gardner, Luschei et al.

1980)。但由本實驗所記錄之大鼠階段性生長可知，施打肉毒桿菌素之大鼠，其生長發育，長期而言並未受到實驗之干擾。2005 及 2008 年蔡吉陽等研究中亦顯示肉毒桿菌素 A 型施打於生長中大鼠的咬肌及顳肌，並不會影響全身性生長發育。



第二節 咬肌重量之比較

咬肌是咀嚼肌群中體積最大、收縮力最強的肌肉。本實驗以肉毒桿菌毒素 A 型，使咬肌確實萎縮，並以此探討肉毒桿菌毒素 A 型對進食時咬肌運動的影響。

在咬肌的濕量(muscle wet mass)方面，若由四組之間同側做比較：

右側咬肌重量平均：Group IV > Group III > Group II \doteq Group I。

左側咬肌重量平均：四組之間並沒有統計學上顯著差異。

若由同組內左右側比較：

Group I、II、III：左側 > 右側（具統計學上顯著差異）。

Group IV：左側 \doteq 右側。

實驗結果顯示，注射 BTXA 確實會造成咬肌萎縮，重量減輕；且注射劑量越大，造成萎縮的情形會越明顯（右側：Group III > Group II \doteq Group I）。然而 Group II 和 Group I 右側咬肌重量相近的結果，可能的原因是：BTXA 劑量已經超過某一 critical dose level，因此即使劑量再向上提升，其結果卻沒有顯著的改變。

本實驗顯示注射肉毒桿菌神經毒素 A 型，確實會造成肌肉重量減輕，其結果與以往許多研究的結果相似，如：Cheryl R. 在 2002 年所做的研究顯示，大白鼠腓腸肌於注射 A 型肉毒桿菌神經毒素後 22 週後，其肌肉重量和控制組比較，減少了 38%(Billante, Zeale et al. 2002)。Chen

et al 在 2002 年所做的研究顯示，注射 A 型肉毒桿菌神經毒素於大白鼠腓腸肌的實驗發現，肌肉有明顯萎縮情形，肌肉之濕量(muscle wet mass)顯著低於未施打側肌肉之濕量 (Chen, Stott et al. 2002)。2008 年蔡吉陽等研究中亦顯示，肉毒桿菌素 A 型施打於生長中大鼠的咬肌及顳肌後，肌肉之濕量(muscle wet mass)顯著低於未施打側肌肉之濕量。



第三節 咬肌活動表現之比較

本實驗對於咬肌活動表現的評量，是紀錄進食時間內頭一個小時之中，咬肌的肌電圖訊號，並使用以下幾個測量項目來評估咬肌進食時活動程度：

1. 咬合次數 (Bursts number)
2. 總咬合時間 (Total duration of bursts)
3. 最大咬力電位 (Maximum burst discharge)
4. 咬力電位對時間圖形積分面積 (Total area)
5. 平均頻率 (Mean Power Frequency)

總體而言，在注射後一週時，Group I、II、III 右側咬肌，各項評估項目均顯著下降，且均為實驗期間最低的一週；而 Group IV 右側咬肌，在注射後一週時，除了平均頻率外，其餘項目也均有些許的下降。

注射後第十二週時，Group I、II、III 右側咬肌各評估項目均有所恢復，但和注射前數值相比，仍舊存在著顯著的差異；Group IV 右側咬肌，在注射後十二週時，各評估項目和注射前均無顯著差異。在統計學上顯示，注射後第 12 週右側咬肌整體活動表現：Group IV > Group III > Group II \approx Group I。由此可知在注射後第 12 週時：Group I、II 組，BTXA 對咬肌活動抑制的程度雖較 Group III 組佳，但 Group I、II、III 右側咬肌卻都沒有恢復到 BTXA 注射前的狀態。

由實驗週數對咬肌活動的曲線觀察，Group I、II 右側咬肌活動約從注射

BTXA 後第 4~6 週開始有回復現象，Group III 則約從注射 BTXA 後第 3~4 週開始有回復現象。開始回復後至注射 BTXA 後第 12 週，咬肌活動呈現平緩而線性增加。Group I、II 組右側咬肌活動回復的速度很相似，且顯著地比 Group III 組慢；Group III 組咬肌活動回復曲線大至均介於 Group I、II 組和 Group IV 組之間。此結果顯示：7.5u 和 5.0u BTXA 對大鼠咬肌肌肉活動抑制的效果優於 2.5u 組；然而 7.5u BTXA 對咬肌活動抑制的效果卻沒有明顯大於 5.0u BTXA。

Group IV 右側咬肌，除了 NaCl 注射後第 1 週有短暫而些微的下降，注射後第 2 週開始便回復到注射前的咬肌活動表現。而 Group IV 在 NaCl 注射後第 1 週，咬肌活動短暫下降的原因，可能是因為注射時針頭對肌肉組織所造成的創傷所致，也有可能是生理食鹽水對肌肉組織造成的短暫影響，因此 NaCl 注射後 1 週後，咬肌活動即恢復到注射前的狀態。

本實驗顯示注射 A 型肉毒桿菌神經毒素，確實會抑制肌肉活動，其結果與以往研究的結果相似，如：

Cichon 在 1995 所發表的實驗顯示：大白鼠後肢屈肌注射 botox 後 5~7 天，CMAP 振幅 (compound muscle action potential amplitude) 和肌肉力量 (muscle force) 均顯著下降；接著逐漸以線性的關係逐漸地復原。CMAP 振幅和肌肉力量下降的程度和復原的速度和 botox 注射劑量有關。Inagi, 1998 的實驗顯示：注射肉毒桿菌神經毒素 A 型於大白鼠咽部肌肉，隨著肉毒桿菌

神經毒素的施打，大鼠咽部聲帶運動及肌電圖皆顯著地下降。劑量越高（0.0007~0.7 U），聲帶運動及肌電訊號下降情形越顯著。Billante 在 2002 所發表的實驗顯示：A 型肉毒桿菌對於大白鼠腓腸肌抑制肌電訊號的作用期間平均約為 90~110 天；且劑量越高，阻斷肌電訊號的功效越好，藥效也越長。在劑量方面：0.625~1.25 u 的 A 型肉毒桿菌最大可造成 80% 肌電訊號的阻斷；而 2.5u~10u 的劑量，最大可阻斷 90%~99% 的肌電訊號。而 recovery onset 的時間：0.625 u→25 天；2.5 u→4 週；10 u→5~6 週。Jianjun Ma et al.，2004 所發表的實驗顯示：以每公斤 6units 的劑量，注射 A 型肉毒桿菌於大鼠腓腸肌後 1~2 週，肌電訊號、肌肉強直力強度均顯著大幅降低。其中，肌電訊號（電位振幅及積分面積）注射後三天下降至最低值（約控制組的 28%）；注射後 2~4 週開始有回復現象；注射後 3 個月恢復至控制組的 82%；注射後 6 個月至控制組 97%；注射後 12 個月至控制組 107%。（Cichon, McCaffrey et al. 1995; Inagi, Connor et al. 1998; Billante, Zealear et al. 2002; Ma, Elsaidi et al. 2004）

由以往施打肉毒桿菌神經毒素降低肌肉功能的動物實驗中，觀測標的多為腓腸肌、後肢屈肌，甚至是咽喉部肌肉，如（Cichon, McCaffrey et al. 1995; Inagi, Connor et al. 1998; Billante, Zealear et al. 2002; Ma, Elsaidi et al. 2004），但缺乏對咀嚼肌活動之探討。因此，本篇研究建立了一個實驗模型基礎，提供肉毒桿菌素 A 型不同劑量對於大鼠咬肌功能影響的參考。

此外，與以往的實驗比較，肌電圖訊號測量方式也存在著差異。如，Billante 在 2002 所發表肉毒桿菌素抑制大鼠腓腸肌肌電訊號的實驗，採取的方式是記錄 evoked EMG potentials(電流刺激誘發電位)：在坐骨神經先包埋刺激電流電極，而在坐骨神經下游的腓腸肌包埋誘發電位記錄電極。而本實驗記錄肌電訊號的方式是 Spontaneous activity (自主功能活動電位)，記錄大鼠進食時自主運動的肌電活動。因此兩種不同的訊號測量方式也會造成實驗結果的不同。

而在 Jianjun Ma ,2004 的實驗顯示，大鼠腓腸肌肌電訊號 (電位振幅) 在注射 botox 後六個月方可恢復至控制組 97%，可印證本實驗於 BTXA 注射後三個月時，最大咬力電位振幅並未完全回復到藥劑注射前狀態。而 Billante 2002 的實驗顯示，在注射 botox 三個月後，大鼠腓腸肌肌電訊號傳遞程度，依據注射的劑量不同 (0.625u~10u)，可回復到 20%~80%，且劑量越高，則回復的程度越低，此結果和本實驗咬力電位最大振幅恢復的情形類似。而儘管注射 BTXA 的劑量不同，Group I 和 Group II 右側咬肌活動被抑制的情形卻相似，可能的原因是：BTXA 劑量已經超過大鼠咬肌的 critical dose level，因此即使劑量超過 5.0u 而再向上提升，其實驗的結果卻沒有顯著改變。此結果和 Shaari and Sanders 在 1993 的實驗結果相似，其結果顯示：注射不同劑量的 BTXA 於大白鼠 tibialis anterior muscle (0.02 ~ 20.0 u)，隨注射劑量提升，肌肉癱瘓程度越大；但當劑量 >5.0 u，肌肉癱瘓程度卻沒有再

顯著增加(Shaari and Sanders 1993)。

從組織的角度討論，以往施打肉毒桿菌毒素降低肌肉收縮力的實驗中，有許多觀測肌纖維大小的變化。其結果顯示，在施打施打肉毒桿菌素後，肌肉有明顯萎縮情形，平均肌肉纖維橫斷面積(mean fiber cross-sectional area)較小、肌纖維直徑變小(Porter, Strebeck et al. 1991; Borodic 1994)。1997年 Ansved 等研究顯示，肉毒桿菌神經毒素 A 型會使人體 type IIb fibers 肌纖維 size 減小 (Ansved T, 1997)。以往的實驗亦顯示，經運動訓練後，骨骼肌會有肌纖維亞型之間的轉換：使原本氧化能力較低的 type IIb fibers 轉化為氧化能力較高的 type IIa fibers(Green, Klug et al. 1984; Slivka, Raue et al. 2008)；而年老、肥胖或限制運動會造成 type IIb muscle fibers 的比例增加(Kriketos, Baur et al. 1997)。

而關於大鼠咬肌的肌纖維成分，Sano 在 2007 的實驗顯示，在大鼠成鼠的咬肌中，幾乎沒有發現 type I fibers；而在咬肌不同的區域，包含不同比例的 type IIa、IIb、IIx fibers(Sano, Tanaka et al. 2007)。在 2008 年蔡吉陽等研究中顯示：肉毒桿菌神經毒素 A 型施打於生長中大鼠的咀嚼肌，會造成肌肉重量減低，並使肌纖維變細、使肌纖維亞型發生轉換，即使氧化能力較高的 type IIa fibers 有轉換為無氧代謝為主的 type IIb fibers 傾向。因此依此推論，若降低咀嚼肌的咬力，應該會發生咬肌肌纖維亞型發生轉換，由 type IIa fibers 轉換為 type IIb fibers 的情形。

由本實驗的結果可以更進一步驗證以上的推論，即：施打肉毒桿菌神經毒素 A 型於大鼠咬肌後，肉毒桿菌素與神經傳導相關蛋白質 SNAP-25 結合，一旦結合後，將使神經傳導受阻，進而阻斷神經及肌肉間聯繫，使肌肉放鬆無法收縮，導致肌肉久而不用自然地萎縮；而此肌肉收縮運動被抑制的結果，可能會進一步造成組織內部肌纖維萎縮、肌纖維橫截面積縮小，以及肌纖維亞型發生代償性的轉換。對照在肌電圖訊號的表現上，除了咬肌肌電最大振幅及積分面積大幅下降外，肌纖維萎縮、橫截面積縮小和肌纖維亞型發生代償性的轉換可能會造成肌電頻率的改變。以往的研究已指出：肌肉收縮時的肌電頻率和肌纖維橫截面積有關；肌纖維橫截面積越小，肌電中位頻率也會越小(Kupa, Roy et al. 1995)。而在一些疲勞或癱瘓的肌肉，中位頻率及平均頻率會出現向低頻位移的現象(Finsterer 2001; Toffola, Sparpaglione et al. 2001)。此外，也有研究指出：頻譜密度中的平均頻率 (Mean Power Frequency) 和肌肉組織中肌纖維亞型的組成可能存在著某些關係(Hakkinen and Komi 1983; Westbury and Shaughnessy 1987; Yuen, Hwang et al. 1989)。

由本實驗結果得知，注射肉毒桿菌後，咬肌平均頻率有向下位移的情形，但下降的程度不若其他肌電活動測量項目來的顯著。推測咬肌平均頻率下降的原因為：肉毒桿菌素阻斷神經－肌肉交接處(neuromuscular junction)訊息傳遞後，導致肌肉收縮被抑制，進而造成肌纖維萎縮、橫截面積縮小和肌纖維亞型發生代償性。進而產生咬肌平均頻率向下位移的現象。

而Group I~III，雖然和控制組Group IV比較而言其平均頻率均有顯著下降，但是彼此之間並沒有因為注射BTXA劑量的不同，產生平均頻率下降的顯著差異，其結果推測原因為：不同劑量的效應對平均頻率的影響不大。

此平均頻率下降的結果也和2007年成功大學陳家進教授的實驗結果類似：即注射肉毒桿菌毒素於脊柱膨出青少年尿道外括約肌，評估注射前後的骨盆底肌肉活動變化，其結果顯示：肌電圖正中頻率與正中能量頻率均往低頻飄移。

從分子的角度討論，A型肉毒桿菌會分解SNAP-25 (25 kDa synaptosome-associated protein) 蛋白質，SNAP-25蛋白質是位於突觸前神經細胞膜上，讓乙醯膽鹼等神經傳導物質釋放出神經細胞膜外的必要蛋白質，可以視為釋放乙醯膽鹼囊泡的一個發射台。以往有些研究已經提出兩種假設來解釋A型肉毒桿菌注射後，肌肉功能需時3~6個月復原過程。第一種假設：A型肉毒桿菌毒素會被劃分至各區，並且持續存在神經軸突末梢，因此能維持它的蛋白質水解能力長達一段時間，可以持續分解新形成的SNAP-25蛋白質(Adler, Keller et al. 2001) (de Paiva, Meunier et al. 1999)。第二種假設：被A型肉毒桿菌毒素破壞的SNAP-25蛋白質，不易自突觸前神經細胞膜上降解，因而阻礙新合成的SNAP-25蛋白質嵌入神經細胞膜(de Paiva, Meunier et al. 1999) (Raciborska and Charlton 1999)。但截至目前為止，尚沒有一致的定論來解釋肉毒桿菌神經毒素A型如此長的藥效。

本篇實驗在注射肉毒桿菌素12週後，肌電圖訊號顯示咬肌功能仍舊沒有百分之百完全的復原。此結果顯示，A型肉毒桿菌對於肌肉活動的抑制會超過3個月，因此本實驗在注射肉毒桿菌素後12週時仍無法觀察到肌肉活動及最大咬力電位振幅完全的回復。

往後的實驗，若希望能觀察到注射肉毒桿菌素後咀嚼肌功能完全的恢復，可能必須將注射肉毒桿菌素後的紀錄時間拉長至6個月以上(Ma, Elsaidi et al. 2004)；然而，以目前本實驗的設計，拉長記錄時間會面臨到以下的問題：(1)肌電訊號微電極線會被大鼠拉扯斷裂 (2)隨大鼠體重變化、肌肉生長或萎縮造成咬肌微電極線移位脫落 (3)頭顱頂部訊號傳輸裝置miniature connector剝落 (4)長時間包埋肌電裝置於大鼠體內所造成的組織排斥發炎反應……等等問題。針對以上的問題，在最近幾年的研究顯示，已有使用於小型動物的無線肌電記錄系統發展問世(Langenbach, van Wessel et al. 2004; van Wessel, Langenbach et al. 2005)，此技術可以將電極線和訊號接收器微小化，並能完全包埋於實驗動物的體內，使動物體外完全沒有肌電裝置暴露的問題。如此便可克服電極線被拉扯斷裂、頭顱骨頂部有線訊號傳輸裝置miniature connector剝落等的問題。此外，也可以拉長每次記錄肌肉運動的時間，不必擔心訊號傳輸線路在記錄時間內被剝落，因此便可以測量到實驗動物一整日的肌肉運動變化，如duty time, daily bursts number等(Kawai, Tanaka et al. 2007)，可以更完整而詳細的紀錄到整日肌肉的活動。

近幾年已有許多研究將肉毒桿菌神經毒素運用在美容醫學的範疇，其中與齒顎矯正學科最相關的，就是利用肉毒桿菌神經毒素治療咬肌肥大的病例 (To, Ahuja et al. 2001; von Lindern, Niederhagen et al. 2001; Al-Ahmad and Al-Qudah 2006)。咬肌發達的矯正患者往往伴隨著短臉型以及前牙齒列深咬的發生，而此類病患在矯正的治療過程中，往往需耗費許多心力在應付前牙深咬的改正。而根據 Moss 所提出的功能性基質理論 (functional matrix theory) (Moss 1968)，進一步探究其短臉型以及前牙齒列深咬的原因，可推論功能發達型態厚實的咬肌，可能就是造成此類患者臉型發育及齒列排列的因素之一。因此在將來矯正臨床的運用上，可將肉毒桿菌神經毒素適當的使用在此類深咬，甚至是深咬且需拔牙的患者：利用肉毒桿菌神經毒素阻斷神經肌肉訊號的傳遞，進一步將咬肌功能降低。如此便可提高矯正的效率，更進一步達成患者整體外觀的改善，實為臨床上矯正治療的一大福音。然而在運用肉毒桿菌於臨床治療的同時，也必須謹記肉毒桿菌素所可能帶來的副作用。因此，除了劑量調控需小心謹慎，施打的週期間隔、注射的位置、技術，甚至是施打藥劑後肌肉功能的定期監測評估都是成功的要件。而本研究所使用的肌電圖分析方式不只可以用來評估注射肉毒桿菌素後咀嚼肌的活動，也可以用來預測肌肉功能復原的程度以及接受第二次肉毒桿菌素注射的時機。

往後的研究方向，可以進一步與臨床搭軌，結合X光攝影、電腦斷層掃描以及人體可攜帶式肌電圖訊號儀器，實際量化肉毒桿菌神經毒素對於人體咀

嚼肌群型態與功能的影響。以期能提高矯正治療的效率，並且為患者創造一個更和諧的外觀。





第六章

結論

本篇實驗建立了一個實驗模型基礎，提供肉毒桿菌神經毒素 A 型不同劑量對於大鼠咬肌功能影響的參考。本篇實驗得到的結論是：

1. 藉由將肉毒桿菌神經毒素 A 型 (BTXA) 注射於大鼠成鼠之咬肌，並不會影響其全身性發育；而咬肌的重量以及進食時活動表現會明顯地降低。隨著注射 BTXA 劑量的增加，BTXA 側咬肌肌肉活動被抑制的情形也會越顯著；然而當 BTXA 劑量超過某一 critical dose level 時(實驗結果為 5.0u)，則劑量的影響程度沒有顯著的差異。
2. Group I 和 Group II 右側咬肌活動約從注射 BTXA 後第 4~6 週開始有回復現象，Group III 則約從注射 BTXA 後第 3~4 週開始有回復現象，開始回復後至注射 BTXA 後第 12 週，咬肌活動呈現平緩而線性增加。而在此三組實驗組，即使在注射後第 12 週，BTXA 側咬肌肌肉活動被抑制的情形仍舊存在，亦即 BTXA 側咬肌活動程度仍舊未回到注射前的狀態。因此，注射 BTXA 後是否會造成肌肉的永久萎縮，則有待進一步實驗的證明。
3. 此實驗對於肉毒桿菌神經毒素對於咬肌功能影響的探討，對照以往本實驗室的一系列研究，可進一步更完整印證 Dr. Moss 的功能性基質假說。亦即：肉毒桿菌素與神經傳導蛋白質 SNAP-25 結合後，進而阻斷神經及肌肉間聯繫，使肌肉收縮能力顯著下降；對照在肌功能的表現上：肌電最大振幅及積分面積大幅下降，肌電平均頻率向下位移。而此肌肉收縮活動被抑制的結果，進一步造成組織內部肌纖維萎縮、肌纖維橫截面積縮小，以及肌纖

維亞型發生代償性的轉換。而若是發生在生長發育中的大鼠，則將會造成
型態學上顱顏顎骨發育型態上的改變。



第七章

參考資料



- Adler, M., J. E. Keller, et al. (2001). "Persistence of botulinum neurotoxin A demonstrated by sequential administration of serotypes A and E in rat EDL muscle." Toxicon **39**(2-3): 233-43.
- Ahn, K. Y. and S. T. Kim (2007). "The change of maximum bite force after botulinum toxin type A injection for treating masseteric hypertrophy." Plast Reconstr Surg **120**(6): 1662-6.
- Al-Ahmad, H. T. and M. A. Al-Qudah (2006). "The treatment of masseter hypertrophy with botulinum toxin type A." Saudi Med J **27**(3): 397-400.
- Behrents, R. G. and L. E. Johnston, Jr. (1984). "The influence of the trigeminal nerve on facial growth and development." Am J Orthod **85**(3): 199-206.
- Billante, C. R., D. L. Zealear, et al. (2002). "Comparison of neuromuscular blockade and recovery with botulinum toxins A and F." Muscle Nerve **26**(3): 395-403.
- Borodic, G. (1994). "Therapeutic botulinum toxin." Lancet **344**(8933): 1370.
- Bouvier, M. and W. L. Hylander (1984). "The effect of dietary consistency on gross and histologic morphology in the craniofacial region of young rats." Am J Anat **170**(1): 117-26.
- Bresin, A., S. Kiliaridis, et al. (1999). "Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat." Eur J Oral Sci **107**(1): 35-44.
- Brin, M. F. (1997). "Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology." Muscle Nerve Suppl **6**: S146-68.
- Castro, W. H., R. S. Gomez, et al. (2005). "Botulinum toxin type A in the management of masseter muscle hypertrophy." J Oral Maxillofac Surg **63**(1): 20-4.
- Chen, C. M., N. S. Stott, et al. (2002). "Effects of botulinum toxin A injection and exercise on the growth of juvenile rat gastrocnemius muscle." J Appl Physiol **93**(4): 1437-47.
- Cichon, J. V., Jr., T. V. McCaffrey, et al. (1995). "The effect of botulinum toxin type A injection on compound muscle action potential in an in vivo rat model." Laryngoscope **105**(2): 144-8.
- Corruccini, R. S. (1984). "An epidemiologic transition in dental occlusion in world populations." Am J Orthod **86**(5): 419-26.
- de Paiva, A., F. A. Meunier, et al. (1999). "Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3200-5.
- Finsterer, J. (2001). "EMG-interference pattern analysis." J Electromyogr Kinesiol **11**(4): 231-46.
- Gardner, D. E., E. S. Luschei, et al. (1980). "Alterations in the facial skeleton of the guinea pig following a lesion of the trigeminal motor nucleus." Am J Orthod **78**(1): 66-80.
- Goodship, A. E., L. E. Lanyon, et al. (1979). "Functional adaptation of bone to increased stress. An experimental study." J Bone Joint Surg Am **61**(4): 539-46.

- Green, H. J., G. A. Klug, et al. (1984). "Exercise-induced fibre type transitions with regard to myosin, parvalbumin, and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat." Pflugers Arch **400**(4): 432-8.
- Hakkinen, K. and P. V. Komi (1983). "Electromyographic and mechanical characteristics of human skeletal muscle during fatigue under voluntary and reflex conditions." Electroencephalogr Clin Neurophysiol **55**(4): 436-44.
- Hatheway, C. L. (1995). "Botulism: the present status of the disease." Curr Top Microbiol Immunol **195**: 55-75.
- Hay, J. C. (2001). "SNARE complex structure and function." Exp Cell Res **271**(1): 10-21.
- Inagi, K., N. P. Connor, et al. (1998). "Increased acute and chronic mitotic activity in rat laryngeal muscles after botulinum toxin injection." Laryngoscope **108**(7): 1055-61.
- Jankovic, J. and M. F. Brin (1991). "Therapeutic uses of botulinum toxin." N Engl J Med **324**(17): 1186-94.
- Jee, W. S. and X. J. Li (1990). "Adaptation of cancellous bone to overloading in the adult rat: a single photon absorptiometry and histomorphometry study." Anat Rec **227**(4): 418-26.
- Jurasinski, C. V., E. Lieth, et al. (2001). "Correlation of cleavage of SNAP-25 with muscle function in a rat model of Botulinum neurotoxin type A induced paralysis." Toxicon **39**(9): 1309-15.
- Katsaros, C. (2001). "Masticatory muscle function and transverse dentofacial growth." Swed Dent J Suppl(151): 1-47.
- Kawai, N., E. Tanaka, et al. (2007). "Daily jaw muscle activity in freely moving rats measured with radio-telemetry." Eur J Oral Sci **115**(1): 15-20.
- Kiliaridis, S., A. Bresin, et al. (1996). "Effects of masticatory muscle function on bone mass in the mandible of the growing rat." Acta Anat (Basel) **155**(3): 200-5.
- Kiliaridis, S., C. Engstrom, et al. (1992). "Influence of masticatory muscle function on craniofacial growth in hypocalcemic rats." Scand J Dent Res **100**(6): 330-6.
- Kiliaridis, S., C. Engstrom, et al. (1985). "The relationship between masticatory function and craniofacial morphology. I. A cephalometric longitudinal analysis in the growing rat fed a soft diet." Eur J Orthod **7**(4): 273-83.
- Kiliaridis, S., C. Engstrom, et al. (1988). "Histochemical analysis of masticatory muscle in the growing rat after prolonged alteration in the consistency of the diet." Arch Oral Biol **33**(3): 187-93.
- Kitagawa, Y., K. Mitera, et al. (2004). "Alterations in enzyme histochemical characteristics of the masseter muscle caused by long-term soft diet in growing rabbits." Oral Dis **10**(5): 271-6.
- Kriketos, A. D., L. A. Baur, et al. (1997). "Muscle fibre type composition in infant and adult populations and relationships with obesity." Int J Obes Relat Metab Disord **21**(9): 796-801.

- Kupa, E. J., S. H. Roy, et al. (1995). "Effects of muscle fiber type and size on EMG median frequency and conduction velocity." J Appl Physiol **79**(1): 23-32.
- Langenbach, G. E., T. van Wessel, et al. (2004). "Variation in daily masticatory muscle activity in the rabbit." J Dent Res **83**(1): 55-9.
- Langer, J. C., E. E. Birnbaum, et al. (1997). "Histology and function of the internal anal sphincter after injection of botulinum toxin." J Surg Res **73**(2): 113-6.
- Lee, C. J., S. G. Kim, et al. (2007). "Electrophysiologic change and facial contour following botulinum toxin A injection in square faces." Plast Reconstr Surg **120**(3): 769-78.
- Lee, T. Y., M. J. Fu, et al. (1994). "Power spectral analysis of electromyographic and systemic arterial pressure signals during fentanyl-induced muscular rigidity in the rat." Br J Anaesth **72**(3): 328-34.
- Lin, M. I., H. W. Liang, et al. (2004). "Electromyographical assessment on muscular fatigue--an elaboration upon repetitive typing activity." J Electromyogr Kinesiol **14**(6): 661-9.
- Liu, Z. J., K. Ikeda, et al. (1998). "Functional properties of jaw and tongue muscles in rats fed a liquid diet after being weaned." J Dent Res **77**(2): 366-76.
- Ma, J., G. A. Elsaidi, et al. (2004). "Time course of recovery of juvenile skeletal muscle after botulinum toxin A injection: an animal model study." Am J Phys Med Rehabil **83**(10): 774-80; quiz 781-3.
- Matic, D. B., A. Yazdani, et al. (2007). "The effects of masseter muscle paralysis on facial bone growth." J Surg Res **139**(2): 243-52.
- Maxwell, L. C., D. S. Carlson, et al. (1981). "Adaptation of the masseter and temporalis muscles following alteration in length, with or without surgical detachment." Anat Rec **200**(2): 127-37.
- Meade, J. B., S. C. Cowin, et al. (1984). "Bone remodeling due to continuously applied loads." Calcif Tissue Int **36 Suppl 1**: S25-30.
- Moss, M. (1968). "The primacy of functional matrices in orofacial growth." Dent.Pract.Dent.Rec. **19**: 65-73.
- Naumann, M., A. Albanese, et al. (2006). "Safety and efficacy of botulinum toxin type A following long-term use." Eur J Neurol **13 Suppl 4**: 35-40.
- Naumann, M., W. H. Jost, et al. (1999). "Botulinum toxin in the treatment of neurological disorders of the autonomic nervous system." Arch Neurol **56**(8): 914-6.
- Navarro, M., E. Delgado, et al. (1995). "Changes in mandibular rotation after muscular resection. Experimental study in rats." Am J Orthod Dentofacial Orthop **108**(4): 367-79.
- Newton, J. P., E. W. Abel, et al. (1987). "Changes in human masseter and medial pterygoid muscles with age: a study by computed tomography." Gerodontology **3**(4): 151-4.
- Phillips, C., P. A. Shapiro, et al. (1982). "Morphologic alterations in Macaca mulatta following destruction of the motor nucleus of the trigeminal nerve." Am J Orthod **81**(4): 292-8.
- Porter, J. D., S. Strebeck, et al. (1991). "Botulinum-induced changes in monkey eyelid muscle.

- Comparison with changes seen in extraocular muscle." Arch Ophthalmol **109**(3): 396-404.
- Proffit, W. R. and H. W. Fields (1983). "Occlusal forces in normal- and long-face children." J Dent Res **62**(5): 571-4.
- Raciborska, D. A. and M. P. Charlton (1999). "Retention of cleaved synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) in neuromuscular junctions: a new hypothesis to explain persistence of botulinum A poisoning." Can J Physiol Pharmacol **77**(9): 679-88.
- Rubin, C. T. and L. E. Lanyon (1985). "Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude." Calcif Tissue Int **37**(4): 411-7.
- Sano, R., E. Tanaka, et al. (2007). "Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles." J Anat **211**(4): 464-70.
- Setler, P. E. (2002). "Therapeutic use of botulinum toxins: background and history." Clin J Pain **18**(6 Suppl): S119-24.
- Shaari, C. M. and I. Sanders (1993). "Quantifying how location and dose of botulinum toxin injections affect muscle paralysis." Muscle Nerve **16**(9): 964-9.
- Slivka, D., U. Raue, et al. (2008). "Single Muscle Fiber Adaptations to Resistance Training in Old (>80 y) Men: Evidence for Limited Skeletal Muscle Plasticity." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.
- Spencer, R. F. and K. W. McNeer (1987). "Botulinum toxin paralysis of adult monkey extraocular muscle. Structural alterations in orbital, singly innervated muscle fibers." Arch Ophthalmol **105**(12): 1703-11.
- To, E. W., A. T. Ahuja, et al. (2001). "A prospective study of the effect of botulinum toxin A on masseteric muscle hypertrophy with ultrasonographic and electromyographic measurement." Br J Plast Surg **54**(3): 197-200.
- Toffola, E. D., D. Spargaglione, et al. (2001). "Myoelectric manifestations of muscle changes in stroke patients." Arch Phys Med Rehabil **82**(5): 661-5.
- Turton, K., J. A. Chaddock, et al. (2002). "Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility." Trends Biochem Sci **27**(11): 552-8.
- Ulgen, M., S. Baran, et al. (1997). "The influence of the masticatory hypofunction on the craniofacial growth and development in rats." Am J Orthod Dentofacial Orthop **111**(2): 189-98.
- van Wessel, T., G. E. Langenbach, et al. (2005). "Daily number and lengths of activity bursts in rabbit jaw muscles." Eur J Neurosci **21**(8): 2209-16.
- Vilmann, H., S. Kirkeby, et al. (1990). "Histomorphometrical analysis of the influence of soft diet on masticatory muscle development in the muscular dystrophic mouse." Arch Oral Biol **35**(1): 37-42.
- von Lindern, J. J., B. Niederhagen, et al. (2001). "Type A botulinum toxin for the treatment of hypertrophy of the masseter and temporal muscles: an alternative treatment." Plast

- Reconstr Surg **107**(2): 327-32.
- Waltimo, A., M. Nystrom, et al. (1994). "Bite force and dentofacial morphology in men with severe dental attrition." Scand J Dent Res **102**(2): 92-6.
- Watt, D. G. and C. H. Williams (1951). "The effects of the physical consistency of food on the growth and development of the mandible and the maxilla of the rat." Am J Orthod **37**(12): 895-928.
- Wedel, A., G. E. Carlsson, et al. (1978). "Temporomandibular joint morphology in a medieval skull material." Swed Dent J **2**(6): 177-87.
- Weijs, W. A. and B. Hillen (1984). "Relationships between masticatory muscle cross-section and skull shape." J Dent Res **63**(9): 1154-7.
- Westbury, J. R. and T. G. Shaughnessy (1987). "Associations between spectral representation of the surface electromyogram and fiber type distribution and size in human masseter muscle." Electromyogr Clin Neurophysiol **27**(6-7): 427-35.
- Yamada, K. and D. B. Kimmel (1991). "The effect of dietary consistency on bone mass and turnover in the growing rat mandible." Arch Oral Biol **36**(2): 129-38.
- Yuen, S. W., J. C. Hwang, et al. (1989). "EMG power spectrum patterns of anterior temporal and masseter muscles in children and adults." J Dent Res **68**(5): 800-4.
- Zucman, J. (1960). "Studies on the vascular connexions between periosteum, bone, and muscle." Br J Surg **48**: 324-8.



第八章

附表

(表 1) 實驗分組。

| | 右側咬肌 | 左側咬肌 |
|-----------|-------------|-------------|
| Group I | BTXA 7.5 u | 0.9 % 生理食鹽水 |
| Group II | BTXA 5.0 u | 0.9 % 生理食鹽水 |
| Group III | BTXA 2.5 u | 0.9 % 生理食鹽水 |
| Group IV | 0.9 % 生理食鹽水 | 0.9 % 生理食鹽水 |

(表 2) 實驗週數---訊號紀錄大鼠隻數

| | 實驗第 1 週 (藥劑注射前 4 週) | 實驗第 12 週 (藥劑注射後第 8 週) | 實驗第 16 週 (藥劑注射後第 12 週) |
|-----------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Group I | 13 | 8 | 6 |
| Group II | 13 | 7 | 6 |
| Group III | 13 | 9 | 6 |
| Group IV | 13 | 7 | 6 |

說明： 實驗之初，四組共有 52 隻大鼠接受咬肌電極線包埋手術。

在實驗第 12 週時，尚有 31 隻大鼠有清晰的肌電圖訊號。

而在實驗第 16 週大鼠灌流犧牲時，去除掉電極線脫落移位的樣本，

剩餘 24 隻大鼠有清晰可靠的肌電圖訊號。

(表 3) 各組大鼠之平均體重

實驗前四組大鼠體重及 ANOVA 統計表

Descriptives

實驗前

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| 1 | 8 | 265.38 | 7.671 | 2.712 | 258.96 | 271.79 | 250 | 274 |
| 2 | 7 | 264.86 | 7.967 | 3.011 | 257.49 | 272.23 | 253 | 274 |
| 3 | 9 | 267.33 | 3.606 | 1.202 | 264.56 | 270.10 | 262 | 275 |
| 4 | 7 | 269.14 | 2.795 | 1.056 | 266.56 | 271.73 | 264 | 273 |
| Total | 31 | 266.68 | 5.850 | 1.051 | 264.53 | 268.82 | 250 | 275 |

ANOVA

實驗前

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|------|------|
| Between Groups | 83.185 | 3 | 27.728 | .793 | .508 |
| Within Groups | 943.589 | 27 | 34.948 | | |
| Total | 1026.774 | 30 | | | |

實驗後四組大鼠體重及 ANOVA 統計表

Descriptives

實驗後

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| 1 | 8 | 545.12 | 14.525 | 5.135 | 532.98 | 557.27 | 530 | 566 |
| 2 | 7 | 544.14 | 9.564 | 3.615 | 535.30 | 552.99 | 533 | 558 |
| 3 | 9 | 547.33 | 7.089 | 2.363 | 541.88 | 552.78 | 534 | 559 |
| 4 | 7 | 546.00 | 9.018 | 3.409 | 537.66 | 554.34 | 534 | 556 |
| Total | 31 | 545.74 | 9.933 | 1.784 | 542.10 | 549.39 | 530 | 566 |

ANOVA

實驗後

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|------|------|
| Between Groups | 44.203 | 3 | 14.734 | .136 | .937 |
| Within Groups | 2915.732 | 27 | 107.990 | | |
| Total | 2959.935 | 30 | | | |

(表 4) 各組大鼠實驗結束時咬肌重量

實驗後四組大鼠右側咬肌重量統計表

Descriptives

| Right | | | | | | | | |
|-------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| 1 | 8 | 1.017712 | .0534185 | .0188863 | .973053 | 1.062372 | .9263 | 1.0854 |
| 2 | 7 | 1.026814 | .1206488 | .0456009 | .915233 | 1.138396 | .8634 | 1.2436 |
| 3 | 9 | 1.317844 | .0957377 | .0319126 | 1.244254 | 1.391435 | 1.1564 | 1.4653 |
| 4 | 7 | 2.049514 | .1133212 | .0428314 | 1.944710 | 2.154319 | 1.9318 | 2.2478 |
| Total | 31 | 1.339890 | .4204573 | .0755164 | 1.185665 | 1.494115 | .8634 | 2.2478 |

實驗後四組大鼠右側咬肌 ANOVA & S-N-K 事後檢定表

ANOVA

| Right | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 5.046 | 3 | 1.682 | 176.231 | .000 |
| Within Groups | .258 | 27 | .010 | | |
| Total | 5.304 | 30 | | | |

Right

| | Group | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|-----------------------------------|-------|---|-------------------------|----------|----------|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| Student-Newman-Keuls ^a | 1 | 8 | 1.017712 | | |
| | 2 | 7 | 1.026814 | | |
| | 3 | 9 | | 1.317844 | |
| | 4 | 7 | | | 2.049514 |
| | Sig. | | | .857 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.665.

實驗後四組大鼠左側咬肌重量統計表

Descriptives

| Left | | | | | | | | |
|-------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| 1 | 8 | 1.863875 | .0613435 | .0216882 | 1.812591 | 1.915159 | 1.7929 | 1.9896 |
| 2 | 7 | 1.880214 | .1181094 | .0446412 | 1.770981 | 1.989447 | 1.7490 | 2.0818 |
| 3 | 9 | 1.906722 | .1005751 | .0335250 | 1.829413 | 1.984031 | 1.7489 | 2.0735 |
| 4 | 7 | 1.975957 | .0756262 | .0285840 | 1.906015 | 2.045900 | 1.8965 | 2.0918 |
| Total | 31 | 1.905313 | .0963288 | .0173012 | 1.869979 | 1.940647 | 1.7489 | 2.0918 |

實驗後四組大鼠左側咬肌 ANOVA & S-N-K 事後檢定表

ANOVA

| Left | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | .053 | 3 | .018 | 2.121 | .121 |
| Within Groups | .225 | 27 | .008 | | |
| Total | .278 | 30 | | | |

Left

| | Group | N | Subset for alpha = 0.05 |
|-----------------------------------|-------|---|-------------------------|
| | | | 1 |
| Student-Newman-Keuls ^a | 1 | 8 | 1.863875 |
| | 2 | 7 | 1.880214 |
| | 3 | 9 | 1.906722 |
| | 4 | 7 | 1.975957 |
| | Sig. | | |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.665.

(表 5) 咬合次數 (Bursts number) 統計表

| Bursts number (Counts) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | pre 2w | pre 1w | pre-inj | average | post 1w | post 2w | post 3w | post 4w | post 5w | post 6w | post 7w | post 8w | post 9w | post 10w | post 11w | post 12w |
| Group I | 9116.50 | 8126.38 | 8286.25 | 8509.71 | 36.50 | 74.00 | 172.88 | 690.75 | 961.88 | 1098.88 | 1384.13 | 2040.25 | 2569.33 | 3018.33 | 3150.00 | 3438.17 |
| Group II | 8448.71 | 9063.71 | 8432.57 | 8648.33 | 19.29 | 107.14 | 343.00 | 888.14 | 1255.43 | 1534.71 | 1852.00 | 2330.29 | 2959.50 | 3035.83 | 3353.17 | 3694.00 |
| Group III | 8299.44 | 9371.56 | 9469.11 | 9046.70 | 57.67 | 280.89 | 936.89 | 2559.00 | 3079.44 | 3508.89 | 3766.00 | 4148.00 | 4249.17 | 4603.17 | 5024.17 | 5039.00 |
| Group IV | 8014.00 | 8077.00 | 8489.29 | 8193.43 | 7371.14 | 8599.43 | 8287.71 | 8583.86 | 8357.00 | 7702.71 | 7631.86 | 8292.00 | 8318.83 | 8333.33 | 7637.00 | 8317.00 |
| Bursts number (Percentage to pre-inj average) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | average | post 1w | post 2w | post 3w | post 4w | post 5w | post 6w | post 7w | post 8w | post 9w | post 10w | post 11w | post 12w | | | |
| Group I | 100.00 | 0.43 | 0.87 | 2.03 | 8.12 | 11.30 | 12.91 | 16.27 | 23.98 | 30.19 | 35.47 | 37.02 | 40.40 | | | |
| Group II | 100.00 | 0.22 | 1.24 | 3.97 | 10.27 | 14.52 | 17.75 | 21.41 | 26.94 | 34.22 | 35.10 | 38.77 | 42.71 | | | |
| Group III | 100.00 | 0.64 | 3.10 | 10.36 | 28.29 | 34.04 | 38.79 | 41.63 | 45.85 | 46.97 | 50.88 | 55.54 | 55.70 | | | |
| Group IV | 100.00 | 89.96 | 104.96 | 101.15 | 104.77 | 102.00 | 94.01 | 93.15 | 101.20 | 101.53 | 101.71 | 93.21 | 101.51 | | | |

以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析，比較注射後 1,4,8,12 週，四組大鼠右側咬肌咬合次數，具顯著差異如下：

注射後 1 週：Group IV > Group I、Group II、Group III

注射後 4 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後 8 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後 12 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後第 12 週 ANOVA & S-N-K 事後檢定表

ANOVA

注射後12

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 14797.871 | 3 | 4932.624 | 64.476 | .000 |
| Within Groups | 1530.075 | 20 | 76.504 | | |
| Total | 16327.946 | 23 | | | |

注射後12

| | GRO UP | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|-----------------------------------|--------|---|-------------------------|----------|----------|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| Student-Newman-Keuls ^a | 1 | 6 | 4.1050E1 | | |
| | 2 | 6 | 4.2998E1 | | |
| | 3 | 6 | | 5.6273E1 | |
| | 4 | 6 | | | 1.0250E2 |
| | Sig. | | | .704 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

(表 6) 總咬合時間 (Total duration of bursts) 統計表

Total duration of bursts (S)

| | pre 2w | pre 1w | pre-inj | average | post 1w | post 2w | post 3w | post 4w | post 5w | post 6w | post 7w | post 8w | post 9w | post 10w | post 11w | post 12w |
|-----------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
| Group I | 362.30 | 334.50 | 317.84 | 338.21 | 1.16 | 3.76 | 7.50 | 21.33 | 32.03 | 40.55 | 49.56 | 71.97 | 92.62 | 104.22 | 117.66 | 139.18 |
| Group II | 342.10 | 372.17 | 353.78 | 356.02 | 0.69 | 2.56 | 7.17 | 22.06 | 34.20 | 50.59 | 65.32 | 86.50 | 100.09 | 104.50 | 130.19 | 154.79 |
| Group III | 317.06 | 299.17 | 315.02 | 310.42 | 1.60 | 7.00 | 25.53 | 75.97 | 97.37 | 102.45 | 123.80 | 143.03 | 160.25 | 173.40 | 190.95 | 199.60 |
| Group IV | 298.93 | 277.68 | 292.98 | 289.86 | 264.61 | 303.54 | 306.51 | 318.74 | 305.38 | 312.66 | 294.38 | 315.56 | 312.39 | 312.68 | 315.04 | 321.27 |

Total duration of bursts (Percentage to pre-inj average)

| | average | post 1w | post 2w | post 3w | post 4w | post 5w | post 6w | post 7w | post 8w | post 9w | post 10w | post 11w | post 12w |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
| Group I | 100.00 | 0.34 | 1.11 | 2.22 | 6.31 | 9.47 | 11.99 | 14.65 | 21.28 | 27.38 | 30.82 | 34.79 | 41.15 |
| Group II | 100.00 | 0.19 | 0.72 | 2.01 | 6.20 | 9.61 | 14.21 | 18.35 | 24.30 | 28.11 | 29.35 | 36.57 | 43.48 |
| Group III | 100.00 | 0.51 | 2.26 | 8.22 | 24.47 | 31.37 | 33.00 | 39.88 | 46.08 | 51.62 | 55.86 | 61.51 | 64.30 |
| Group IV | 100.00 | 91.29 | 104.72 | 105.74 | 109.96 | 105.35 | 107.87 | 101.56 | 108.86 | 107.77 | 107.87 | 108.69 | 110.83 |

以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析，比較注射後 1,4,8,12 週，

各組大鼠右側咬肌總咬合時間，具顯著差異如下：

注射後 1 週：Group IV > Group I、Group II、Group III

注射後 4 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後 8 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後 12 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後第 12 週 ANOVA & S-N-K 事後檢定表

ANOVA

注射後12

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 18729.826 | 3 | 6243.275 | 42.491 | .000 |
| Within Groups | 2938.639 | 20 | 146.932 | | |
| Total | 21668.465 | 23 | | | |

注射後12

| | GRO UP | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|-----------------------------------|--------|---|-------------------------|----------|----------|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| Student-Newman-Keuls ^a | 1 | 6 | 4.2658E1 | | |
| | 2 | 6 | 4.4923E1 | | |
| | 3 | 6 | | 6.3545E1 | |
| | 4 | 6 | | | 1.1211E2 |
| | Sig. | | | .750 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

(表 7) 最大咬力電位 (Maximum burst discharge) 統計表

| Maximum burst discharge (uV) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | pre 2w | pre 1w | pre-inj | average | post 1w | post 2w | post 3w | post 4w | post 5w | post 6w | post 7w | post 8w | post 9w | post 10w | post 11w | post 12w |
| Group I | 950.86 | 1066.49 | 1038.63 | 1018.66 | 82.53 | 90.97 | 95.97 | 140.57 | 149.04 | 156.24 | 170.18 | 205.23 | 212.20 | 230.59 | 257.63 | 287.83 |
| Group II | 940.76 | 992.13 | 1010.13 | 981.00 | 76.72 | 88.78 | 95.63 | 109.79 | 143.74 | 159.53 | 185.12 | 185.79 | 195.35 | 256.43 | 274.30 | 323.98 |
| Group III | 943.68 | 988.28 | 1003.30 | 978.42 | 82.37 | 100.68 | 109.61 | 191.03 | 218.61 | 250.37 | 277.17 | 321.00 | 383.80 | 434.73 | 464.43 | 535.37 |
| Group IV | 906.07 | 922.41 | 854.86 | 856.35 | 820.93 | 903.77 | 889.06 | 862.79 | 889.63 | 885.00 | 889.29 | 876.83 | 874.81 | 888.83 | 888.14 | 898.79 |
| Maximum burst discharge (Percentage to pre-inj average) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | average | post 1w | post 2w | post 3w | post 4w | post 5w | post 6w | post 7w | post 8w | post 9w | post 10w | post 11w | post 12w | | | |
| Group I | 100.00 | 8.10 | 8.93 | 9.42 | 13.80 | 14.63 | 15.34 | 16.71 | 20.15 | 20.83 | 22.64 | 25.29 | 28.26 | | | |
| Group II | 100.00 | 7.82 | 9.05 | 9.75 | 11.19 | 14.65 | 16.26 | 18.87 | 18.94 | 19.91 | 26.14 | 27.96 | 33.03 | | | |
| Group III | 100.00 | 8.42 | 10.29 | 11.20 | 19.52 | 22.34 | 25.59 | 28.33 | 32.81 | 39.23 | 44.43 | 47.47 | 54.72 | | | |
| Group IV | 100.00 | 95.86 | 105.54 | 103.82 | 100.75 | 103.89 | 103.35 | 103.85 | 102.39 | 102.16 | 103.79 | 103.71 | 104.96 | | | |

以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析，比較注射後 1,4,8,12 週，

各組大鼠右側咬肌最大咬力電位，具顯著差異如下：

注射後 1 週：Group IV > Group I、Group II、Group III

注射後 4 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後 8 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後 12 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後第 12 週 ANOVA & S-N-K 事後檢定表

ANOVA

注射後12

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 19290.207 | 3 | 6430.069 | 147.106 | .000 |
| Within Groups | 874.208 | 20 | 43.710 | | |
| Total | 20164.415 | 23 | | | |

注射後12

| | GRO UP | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|-----------------------------------|--------|---|-------------------------|----------|----------|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| Student-Newman-Keuls ^a | 1 | 6 | 2.8585E1 | | |
| | 2 | 6 | 3.3173E1 | | |
| | 3 | 6 | | 5.4870E1 | |
| | 4 | 6 | | | 1.0020E2 |
| | Sig. | | | .243 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

(表 8) 咬力電位對時間圖形積分面積 (Total area) 統計表

| Total area (uV*s) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | pre 2w | pre 1w | pre-inj | average | post 1w | post 2w | post 3w | post 4w | post 5w | post 6w | post 7w | post 8w | post 9w | post 10w | post 11w | post 12w |
| Group I | 71615.88 | 62539.15 | 61743.27 | 65299.43 | 78.57 | 269.41 | 544.30 | 1556.03 | 1780.24 | 3458.10 | 4177.40 | 6378.52 | 7536.23 | 8834.63 | 8923.56 | 11020.31 |
| Group II | 77760.79 | 85260.46 | 78767.12 | 80596.12 | 39.03 | 165.82 | 497.02 | 1566.07 | 1854.87 | 4171.72 | 4841.10 | 7368.74 | 8867.80 | 9643.02 | 11011.79 | 14943.68 |
| Group III | 71464.45 | 76000.58 | 79553.86 | 75672.96 | 86.19 | 466.51 | 1876.29 | 6700.59 | 8765.19 | 9239.94 | 12486.06 | 16111.50 | 18165.89 | 20356.96 | 20654.72 | 24997.75 |
| Group IV | 73809.62 | 71297.50 | 74025.18 | 73044.10 | 69382.52 | 74633.99 | 75824.48 | 80742.24 | 81949.92 | 74424.80 | 78081.25 | 78160.58 | 74399.86 | 77457.88 | 78515.43 | 78868.84 |
| Total area (Percentage to pre-inj average) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | average | post 1w | post 2w | post 3w | post 4w | post 5w | post 6w | post 7w | post 8w | post 9w | post 10w | post 11w | post 12w | | | |
| Group I | 100.00 | 0.12 | 0.41 | 0.83 | 2.38 | 2.73 | 5.30 | 6.40 | 9.77 | 11.54 | 13.53 | 13.67 | 16.88 | | | |
| Group II | 100.00 | 0.05 | 0.21 | 0.62 | 1.94 | 2.30 | 5.18 | 6.01 | 9.14 | 11.00 | 11.96 | 13.66 | 18.54 | | | |
| Group III | 100.00 | 0.11 | 0.62 | 2.48 | 8.85 | 11.58 | 12.21 | 16.50 | 21.29 | 24.01 | 26.90 | 27.29 | 33.03 | | | |
| Group IV | 100.00 | 94.99 | 102.18 | 103.81 | 110.54 | 112.19 | 101.89 | 106.90 | 107.00 | 101.86 | 106.04 | 107.49 | 107.97 | | | |

以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析，比較注射後 1,4,8,12 週，

各組大鼠右側咬肌 RMS 積分面積，具顯著差異如下：

注射後 1 週：Group IV > Group I、Group II、Group III

注射後 4 週：Group IV > Group I、Group II、Group III

注射後 8 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後 12 週：Group IV > Group III > Group I、Group II

注射後第 12 週 ANOVA & S-N-K 事後檢定表

ANOVA

注射後12

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 32215.731 | 3 | 10738.577 | 97.286 | .000 |
| Within Groups | 2207.622 | 20 | 110.381 | | |
| Total | 34423.352 | 23 | | | |

注射後12

| | GRO UP | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|-----------------------------------|--------|---|-------------------------|----------|----------|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| Student-Newman-Keuls ^a | 1 | 6 | 1.7723E1 | | |
| | 2 | 6 | 2.0169E1 | | |
| | 3 | 6 | | 3.3577E1 | |
| | 4 | 6 | | | 1.0727E2 |
| Sig. | | | .691 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

(表 9) 平均頻率 (Mean Power Frequency) 統計表

| Mean Power Frequency (Hz) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
| | pre 2w | pre 1w | pre-inj | average | post 1w | post 2w | post 3w | post 4w | post 5w | post 6w | post 7w | post 8w | post 9w | post 10w | post 11w | post 12w |
| Group I | 90.66 | 89.79 | 90.51 | 90.32 | 83.65 | 83.79 | 83.45 | 83.59 | 85.51 | 85.17 | 85.63 | 84.70 | 85.72 | 85.31 | 85.77 | 86.46 |
| Group II | 89.74 | 91.10 | 90.66 | 90.50 | 82.92 | 83.50 | 83.70 | 84.37 | 84.66 | 85.85 | 85.21 | 85.65 | 85.95 | 85.42 | 85.36 | 86.62 |
| Group III | 90.99 | 89.64 | 90.98 | 90.54 | 84.33 | 84.54 | 84.60 | 84.57 | 84.89 | 85.22 | 86.37 | 86.30 | 86.15 | 85.94 | 86.44 | 87.29 |
| Group IV | 89.15 | 87.74 | 89.31 | 88.73 | 90.32 | 90.35 | 90.77 | 90.13 | 90.80 | 89.00 | 89.83 | 90.87 | 91.08 | 90.81 | 89.54 | 90.61 |

| Mean Power Frequency (Percentage to pre-inj average) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|--|--|--|
| | average | post 1w | post 2w | post 3w | post 4w | post 5w | post 6w | post 7w | post 8w | post 9w | post 10w | post 11w | post 12w | | | |
| Group I | 100.00 | 92.62 | 92.77 | 92.40 | 92.55 | 94.67 | 94.30 | 94.82 | 93.78 | 94.91 | 94.46 | 94.96 | 95.73 | | | |
| Group II | 100.00 | 91.63 | 92.26 | 92.48 | 93.22 | 93.55 | 94.86 | 94.16 | 94.64 | 94.97 | 94.38 | 94.32 | 95.71 | | | |
| Group III | 100.00 | 93.14 | 93.37 | 93.44 | 93.41 | 93.76 | 94.13 | 95.40 | 95.32 | 95.15 | 94.92 | 95.48 | 96.41 | | | |
| Group IV | 100.00 | 101.79 | 101.82 | 102.29 | 101.57 | 102.33 | 100.30 | 101.24 | 102.41 | 102.64 | 102.35 | 100.91 | 102.11 | | | |

以 ANOVA 及 Student-Newman-Keuls Post Test 分析，比較注射後 1,4,8,12 週，各組大鼠右側咬肌平均頻率，具顯著差異如下：

注射後 1 週：Group IV > Group I、Group II、Group III

注射後 4 週：Group IV > Group I、Group II、Group III

注射後 8 週：Group IV > Group I、Group II、Group III

注射後 12 週：Group IV > Group I、Group II、Group III

注射後第 12 週 ANOVA & S-N-K 事後檢定表

ANOVA

注射後12

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 171.438 | 3 | 57.146 | 6.807 | .002 |
| Within Groups | 167.907 | 20 | 8.395 | | |
| Total | 339.345 | 23 | | | |

注射後12

| | GRO UP | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-----------------------------------|--------|---|-------------------------|-----------|
| | | | 1 | 2 |
| Student-Newman-Keuls ^a | 2 | 6 | 9.57573E1 | |
| | 1 | 6 | 9.59068E1 | |
| | 3 | 6 | 9.63812E1 | |
| | 4 | 6 | | 1.02164E2 |
| | Sig. | | .926 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

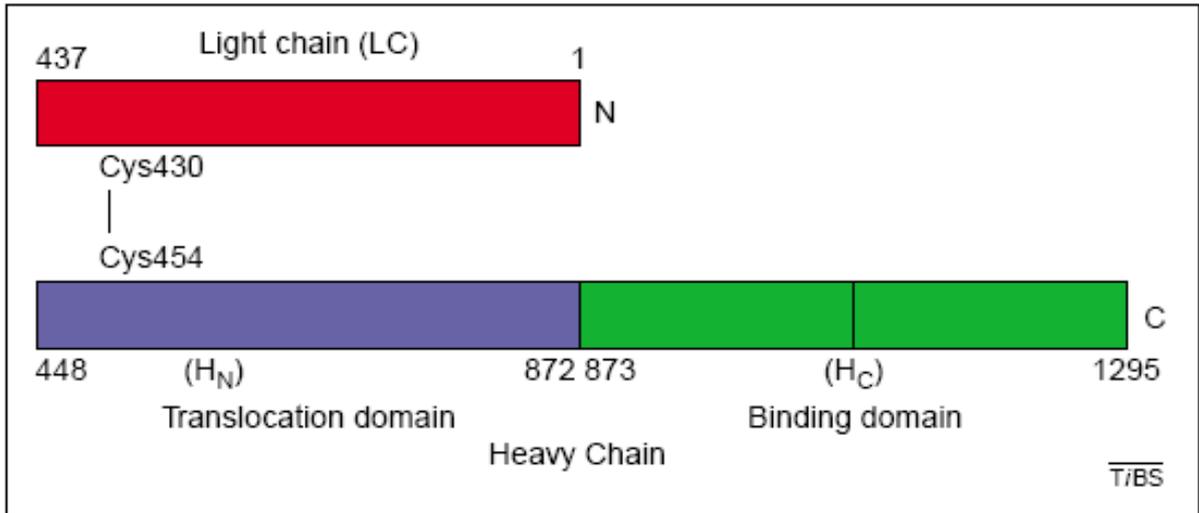
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.



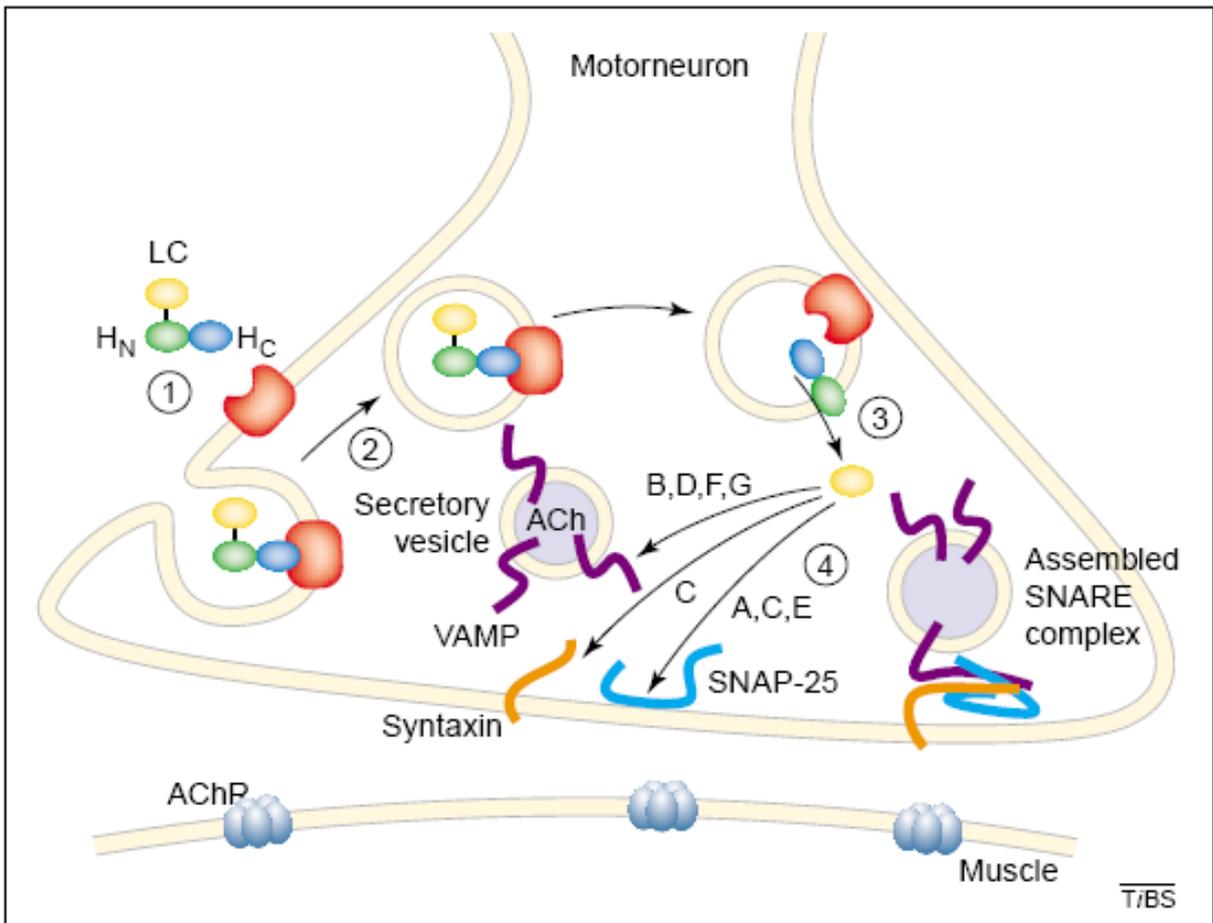
第九章

附圖

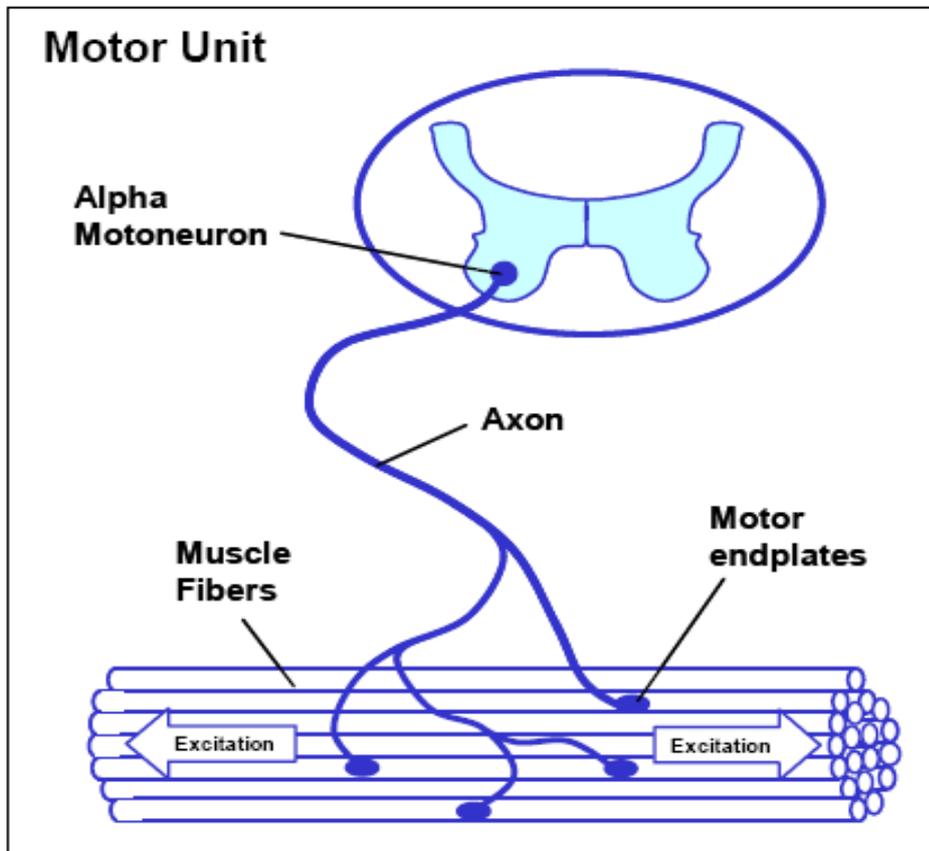
(圖 1) 肉毒桿菌神經毒素結構圖 (Turton, Chaddock et al. 2002)



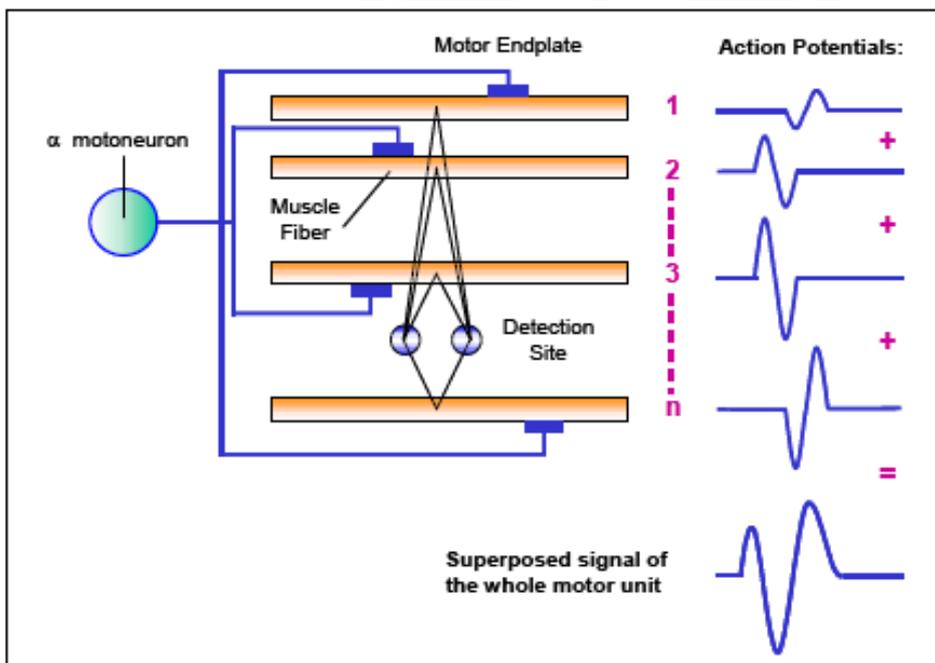
(圖 2) 肉毒桿菌神經毒素作用機轉圖 (Turton, Chaddock et al. 2002)



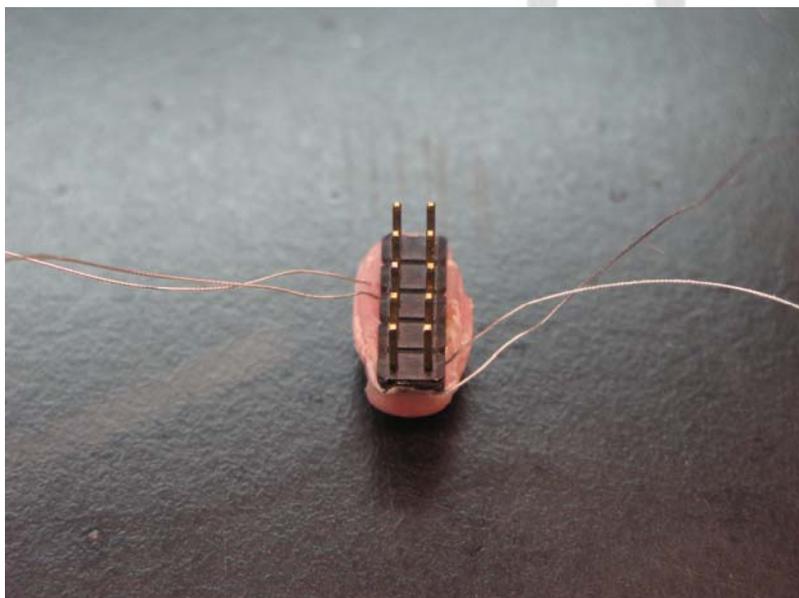
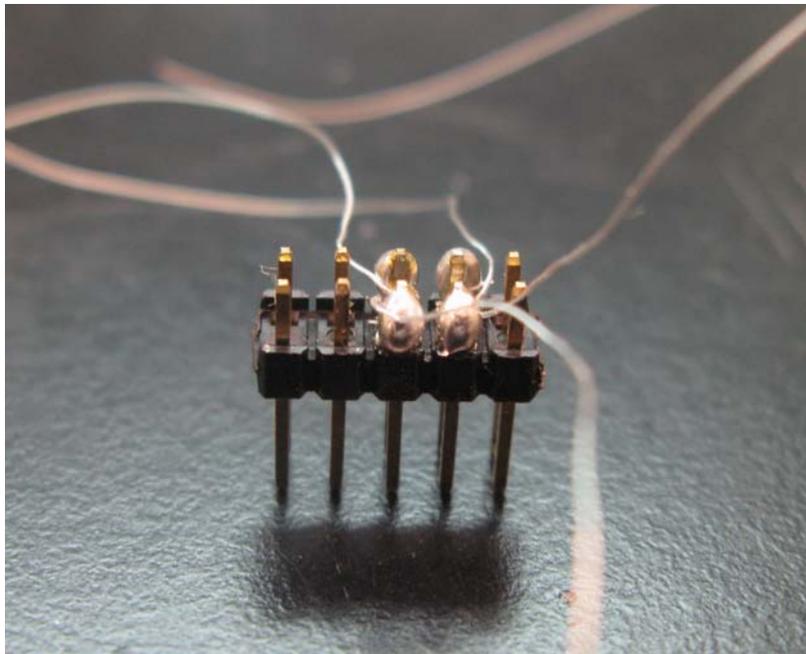
(圖3) 運動單位(Motor Unit)示意圖 (Peter Konrad 2005)



(圖4) Motor unit action potential的產生 (Peter Konrad 2005)



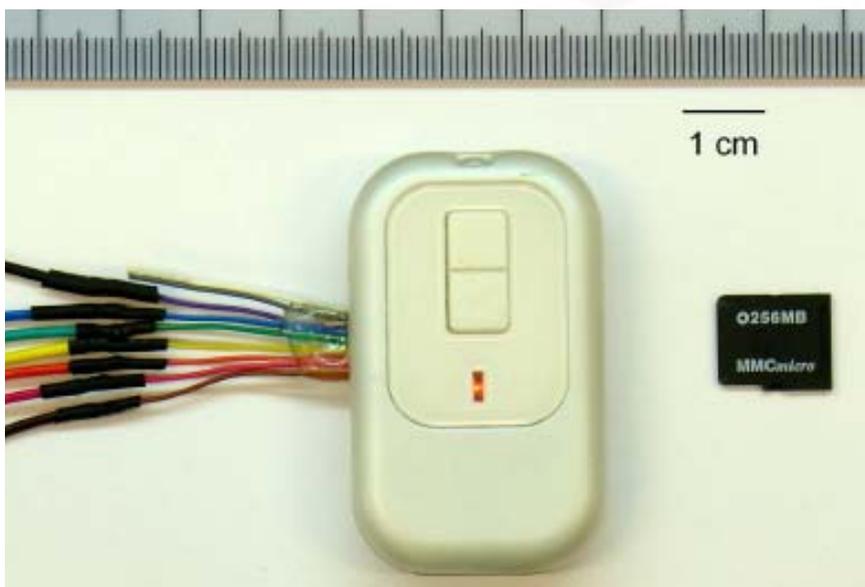
(圖 5) 預先將四條微電極線 (microwires) 焊接在 miniature connector ,
並且用牙科用樹脂包埋



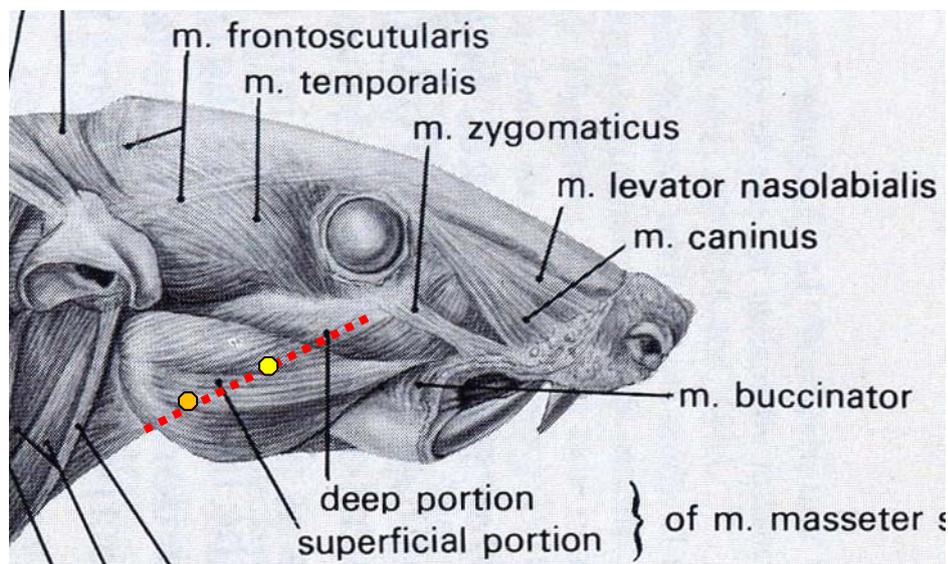
(圖 6) 記錄肌電訊號時,使用一條 socket-matched miniature headstage with FETs 傳輸肌電訊號。傳輸線一端連接到實驗老鼠頭顱頂部的 miniature connector 長端的雙排 pin;而另一端則連接到 amplifier。



(圖 7) 4-channel amplifier



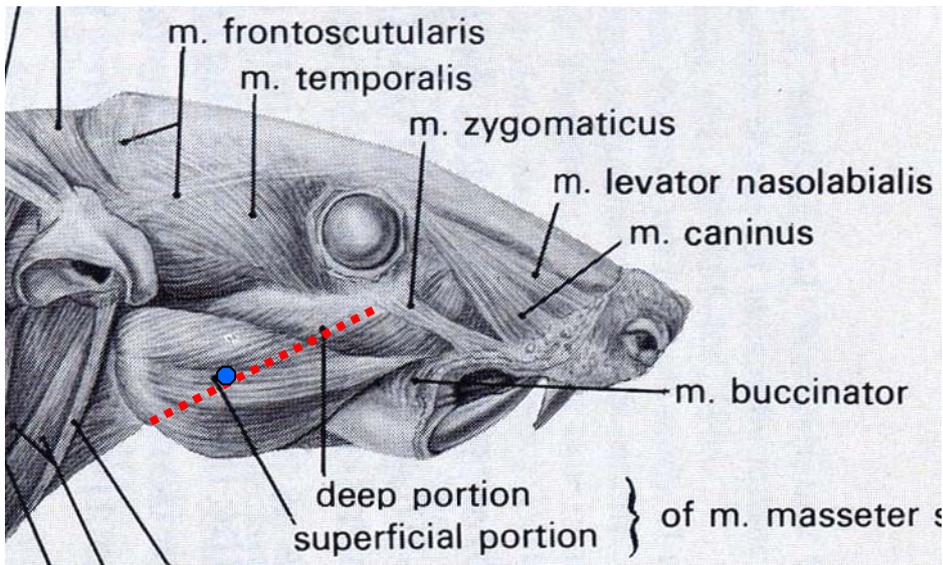
(圖 8) 電極線包埋位置



電極線包埋位置：

下顎骨角至眼眶下緣做一連線，此連線通過 superficial masseter m. 部分定為線段 a。線段 a 中點前上方 2.5mm 為前方電極線定位點，線段 a 中點後下方 2.5mm 為後方電極線定位點。兩條 bipolar microwires 尾端定位點盡可能平行 superficial masseter m. fiber 走向。

(圖 9) 咬肌藥物注射點



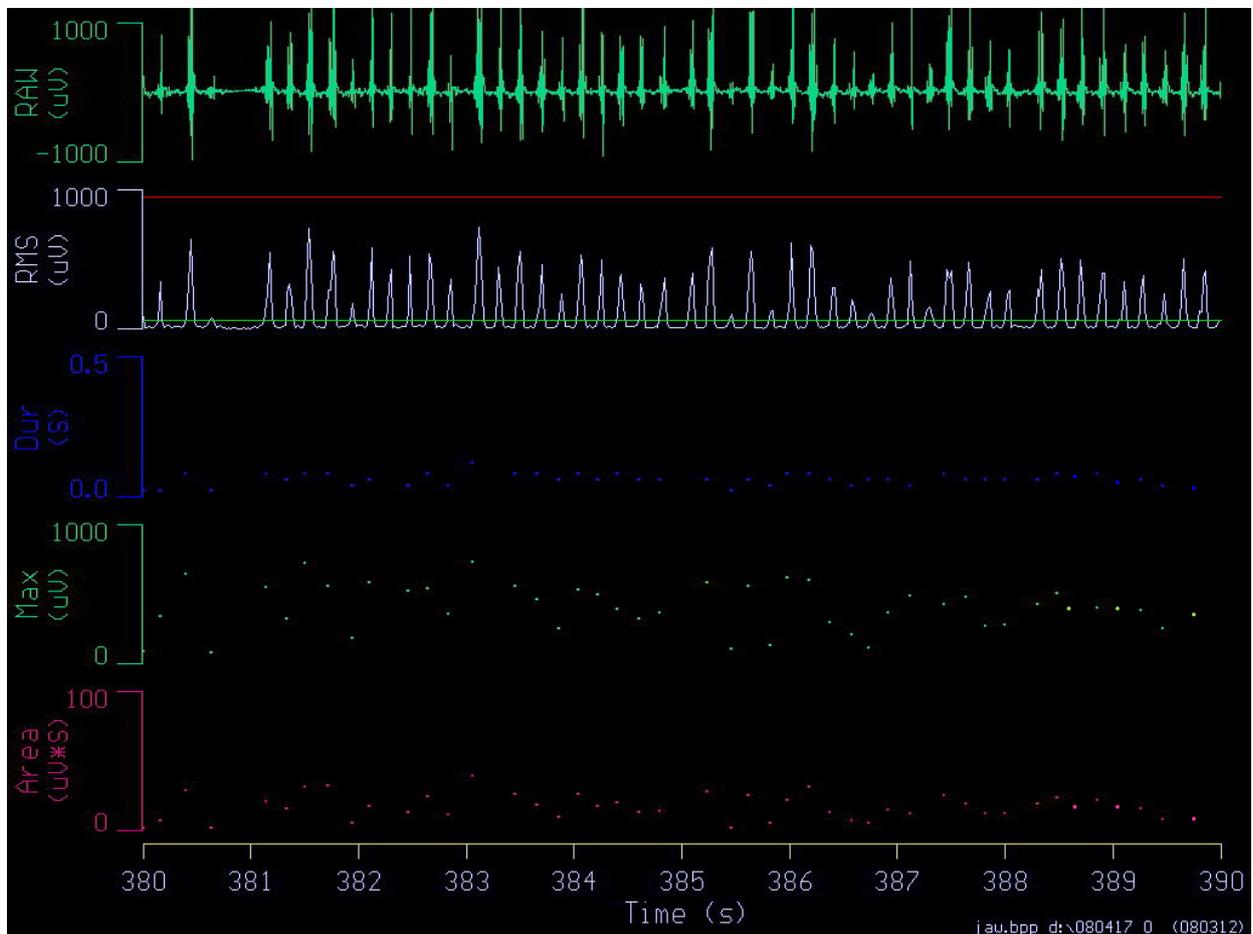
藥物注射位置：

下顎骨角至眼眶下緣做一連線，此連線通過 superficial masseter m. 部分定為線段 a。線段 a 中點為藥物注射點。

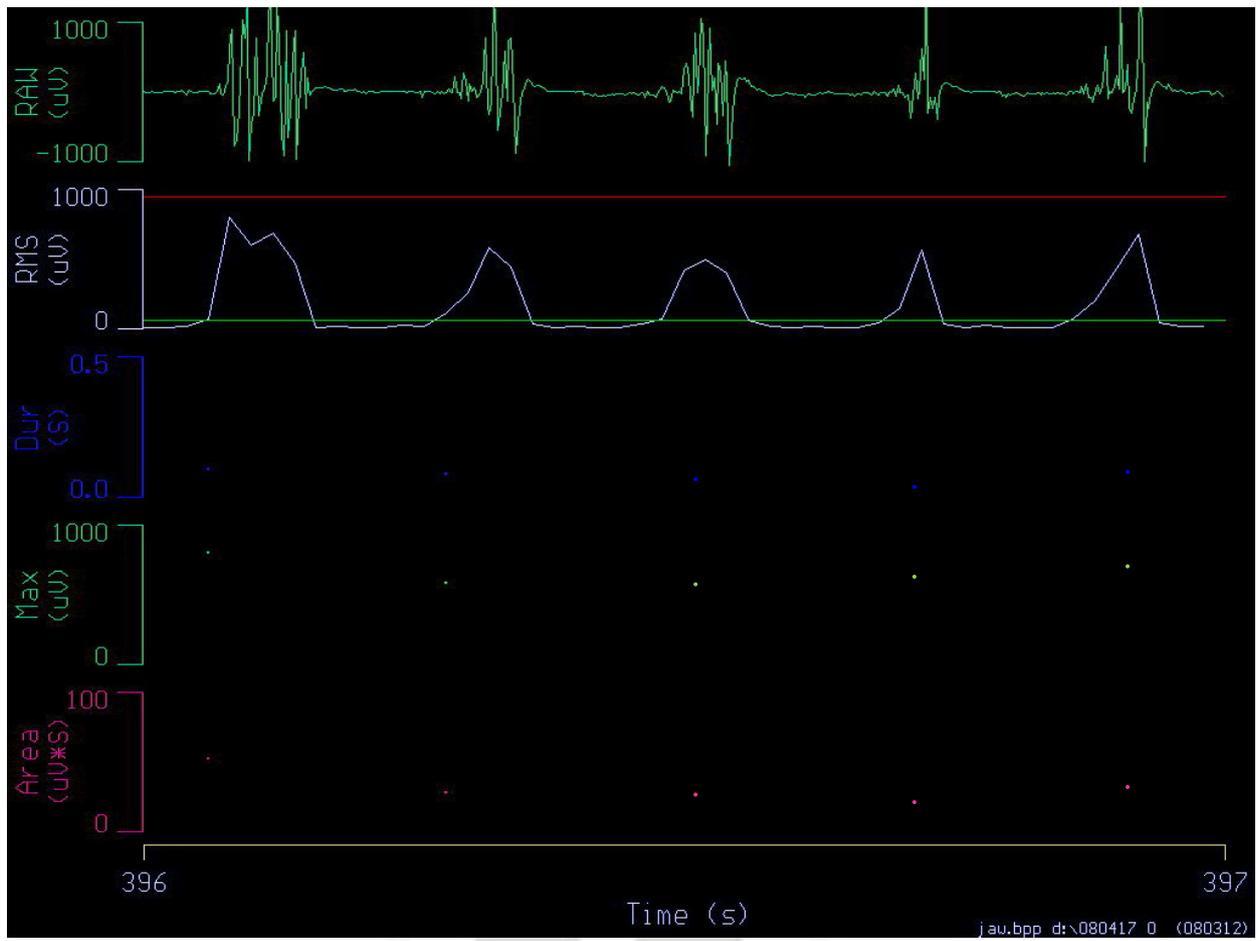
(圖 10) 均方根值 (Root Mean Square) (RMS) 可以定量 EMG 活動，包括：

- Total numbers of burst 總咬合次數
- Total burst durations (sec) 總咬合時間
- Maximum burst discharge (μV) 最大咬力電位
- Intergrated activity (Area) ($\mu V * S$) 咬力電位對時間積分面積

圖為大鼠進食時，咬肌活動十秒內 RMS 圖形記錄



(圖 11) 圖為大鼠進食時，咬肌活動一秒內 RMS 圖形記錄

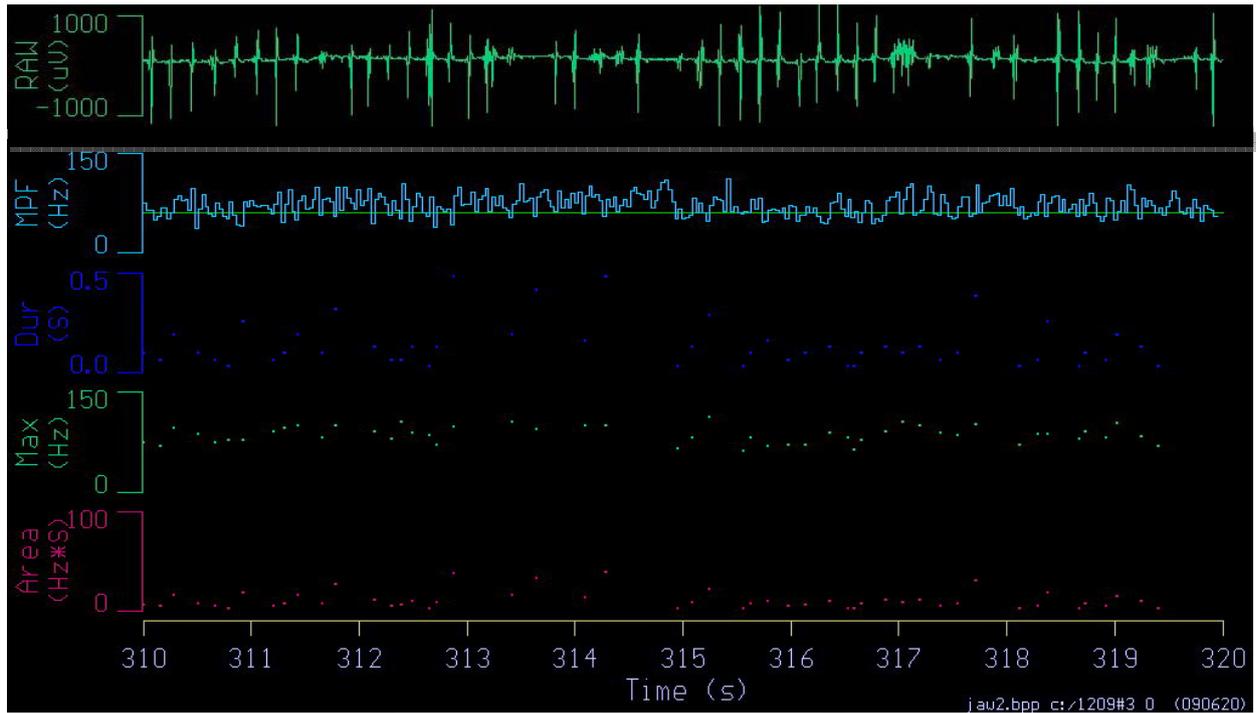


(圖 12) 圖為大鼠進食時，咬肌活動十秒內功率頻譜密度

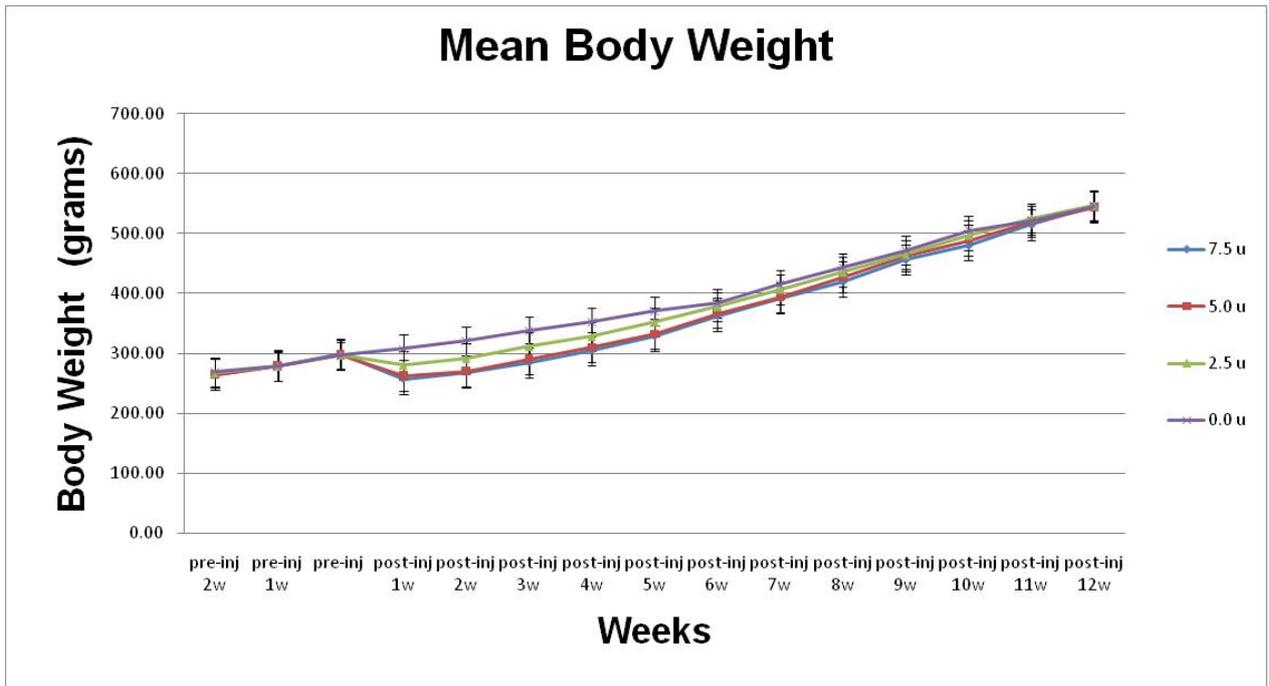
(power spectral density) 圖形記錄。

可分析出平均頻率 (Mean Power Frequency) (MPF) 來評估

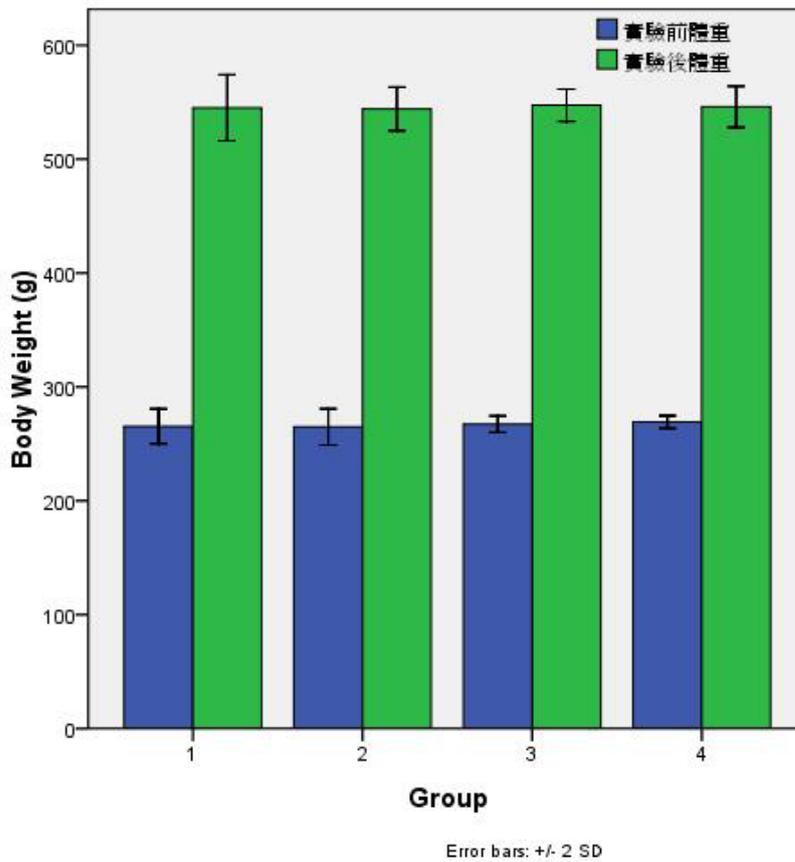
咬肌活動時 EMG 訊號頻域 (frequency domain) 。



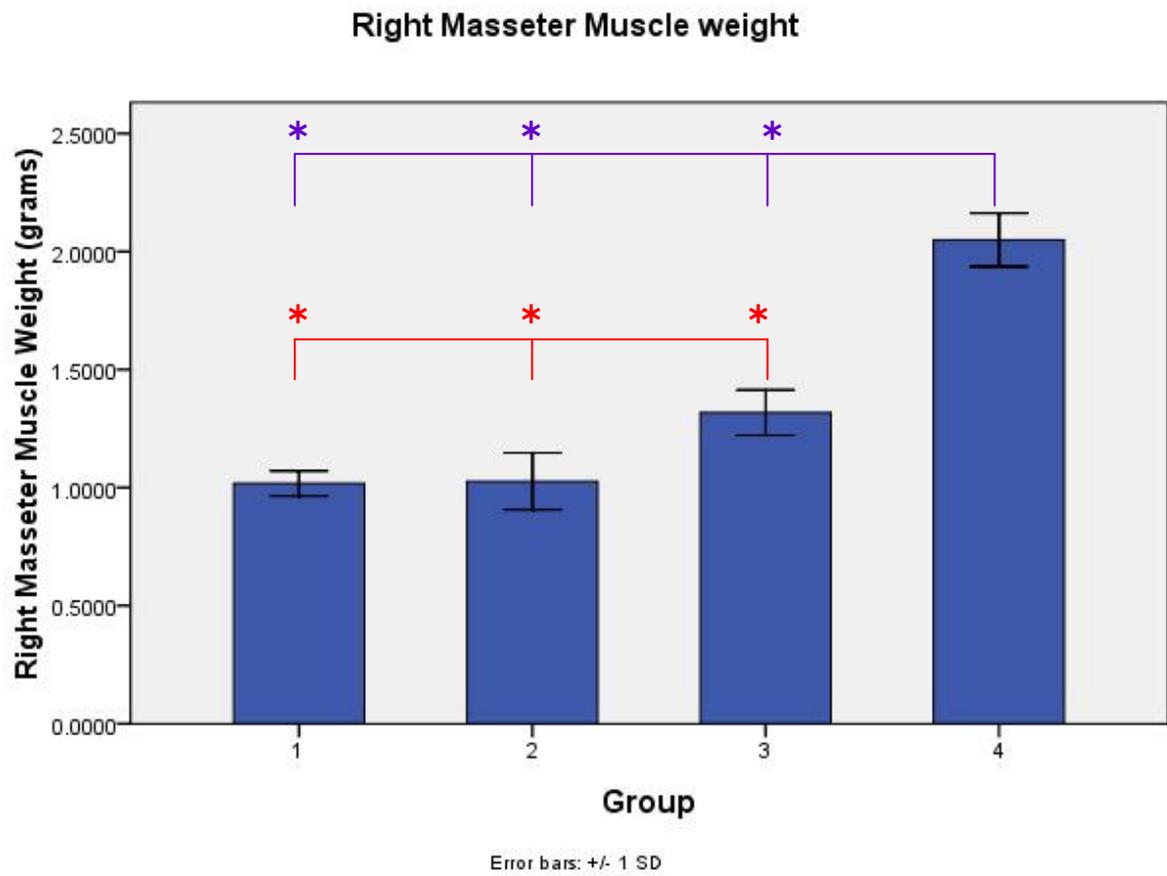
(圖 13) 大鼠體重(g)-時間(weeks)關係曲線圖



(圖 14) 實驗前後各組大鼠體重(g)關係圖

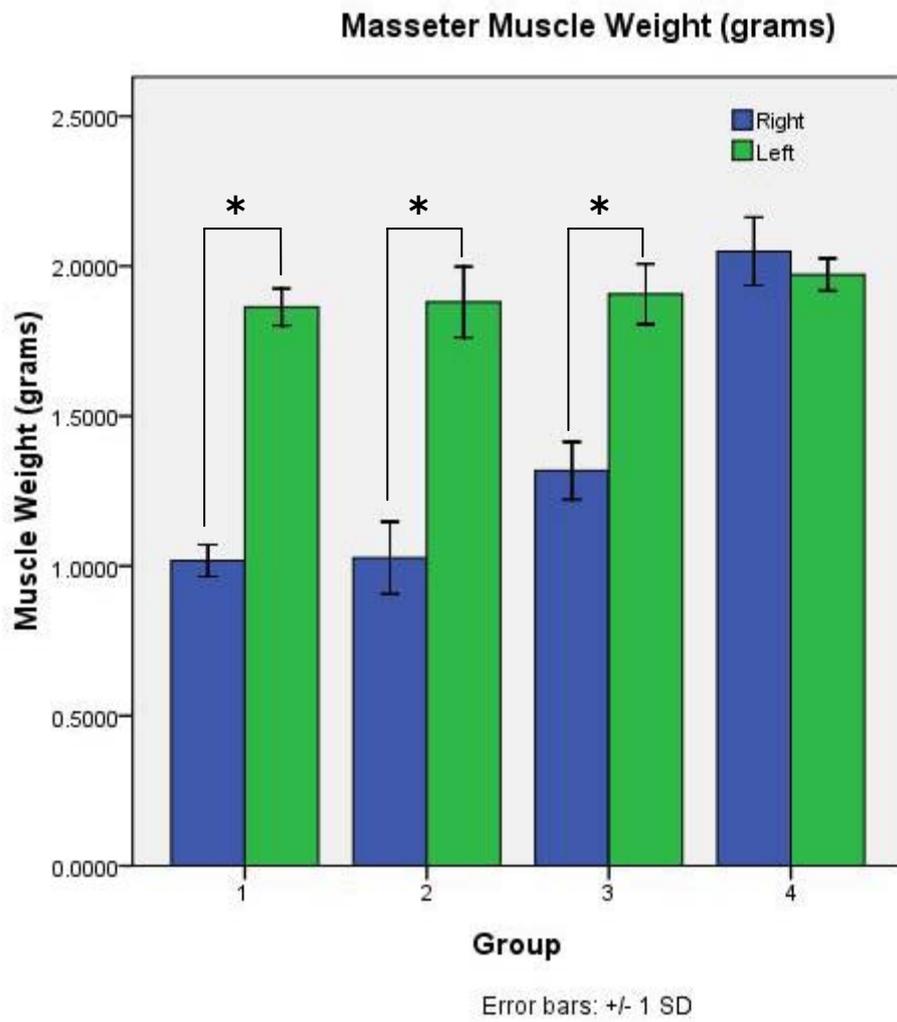


(圖 15) 各組大鼠右側咬肌重量比較圖



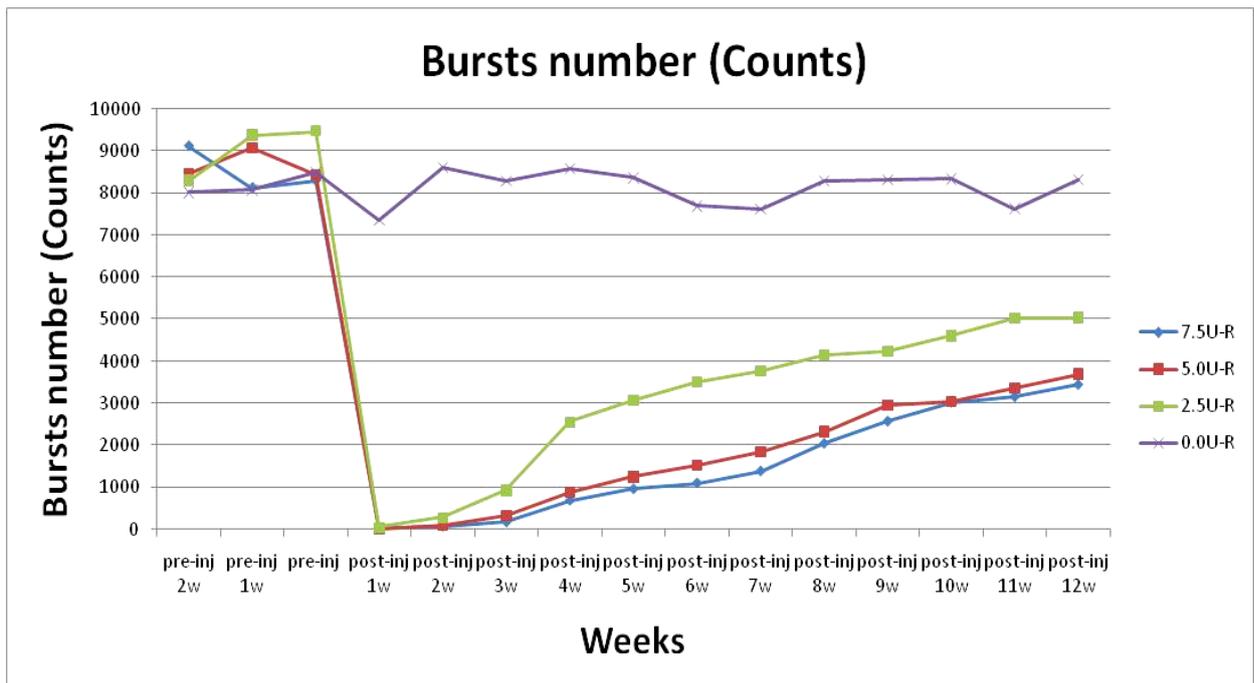
* : $P < 0.05$

(圖 16) 各組大鼠雙側咬肌重量比較圖

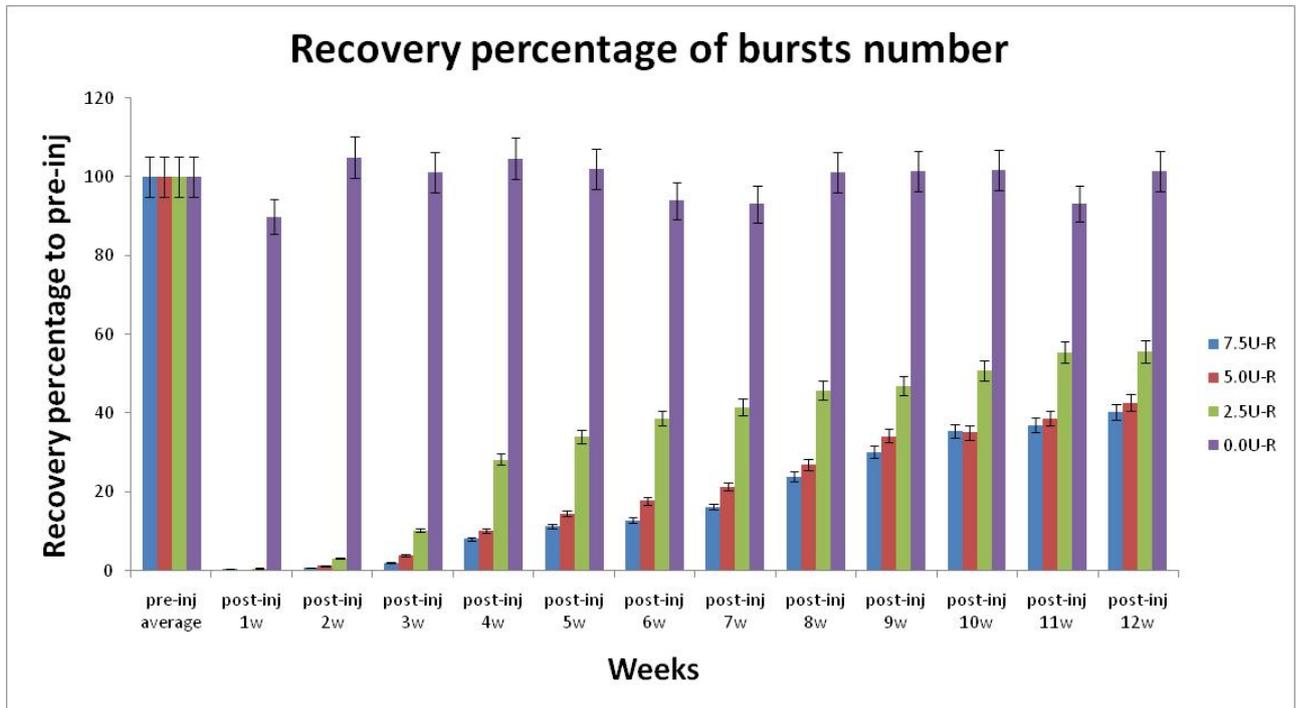


* : $P < 0.05$

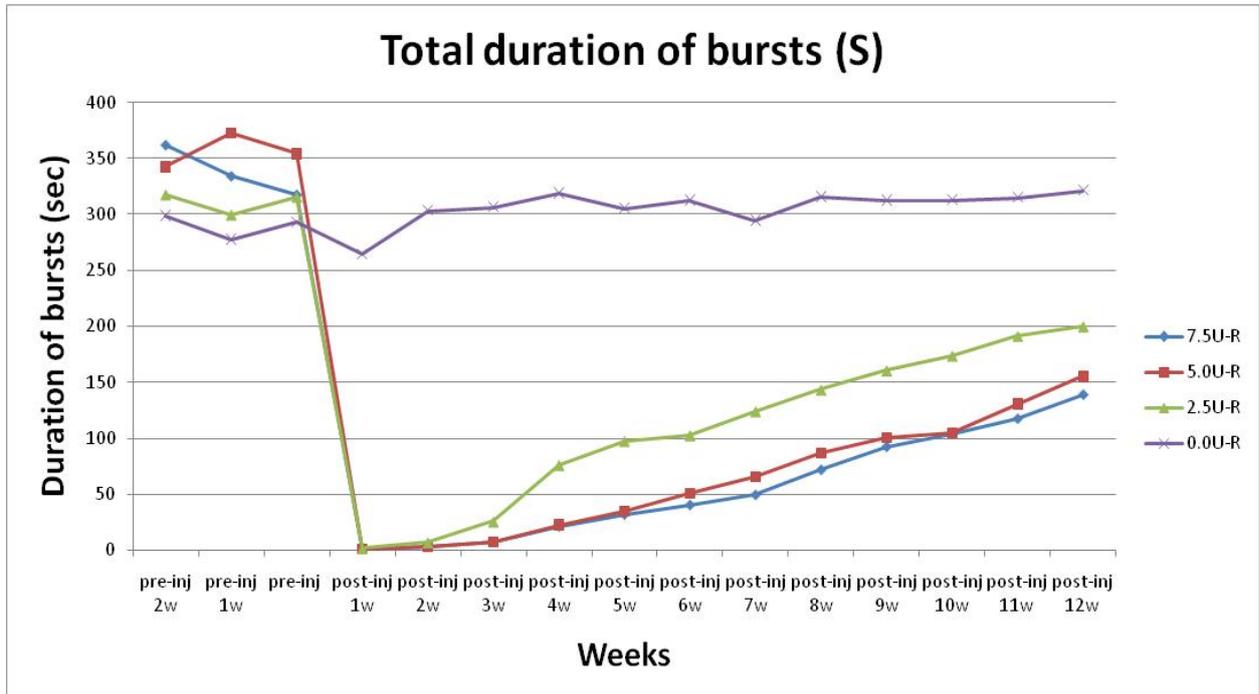
(圖 17) 大鼠咬肌(咬合次數)對(實驗週數)關係圖



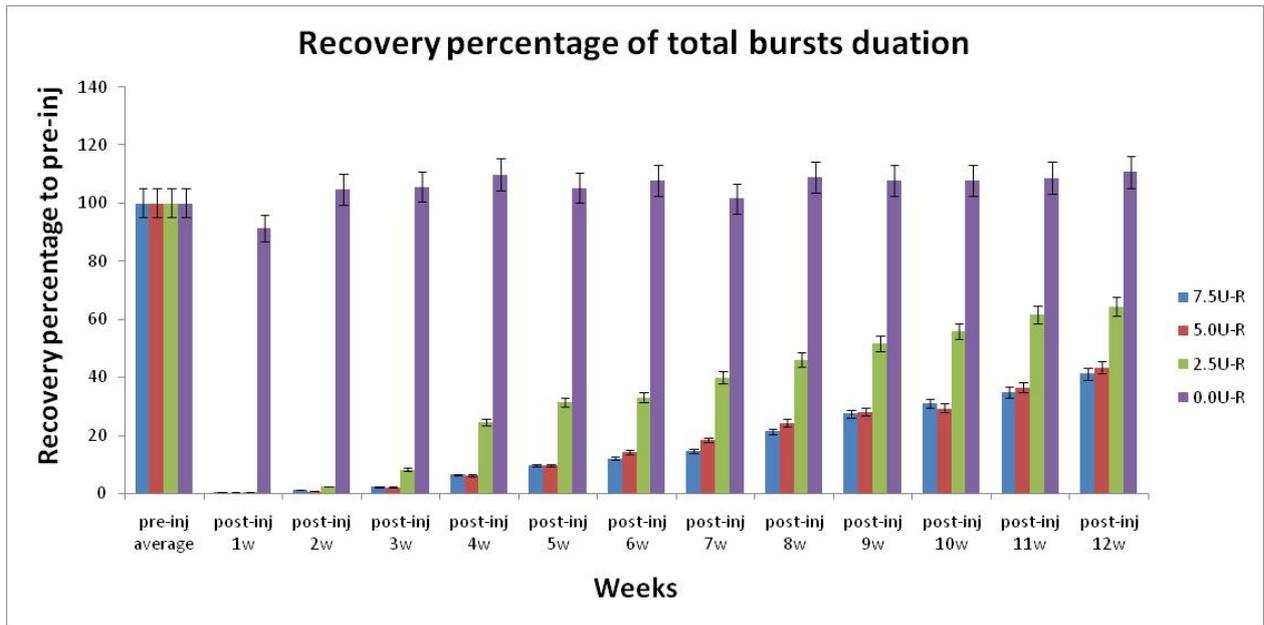
(圖 18) 大鼠咬肌藥物注射前後咬合次數恢復程度百分比



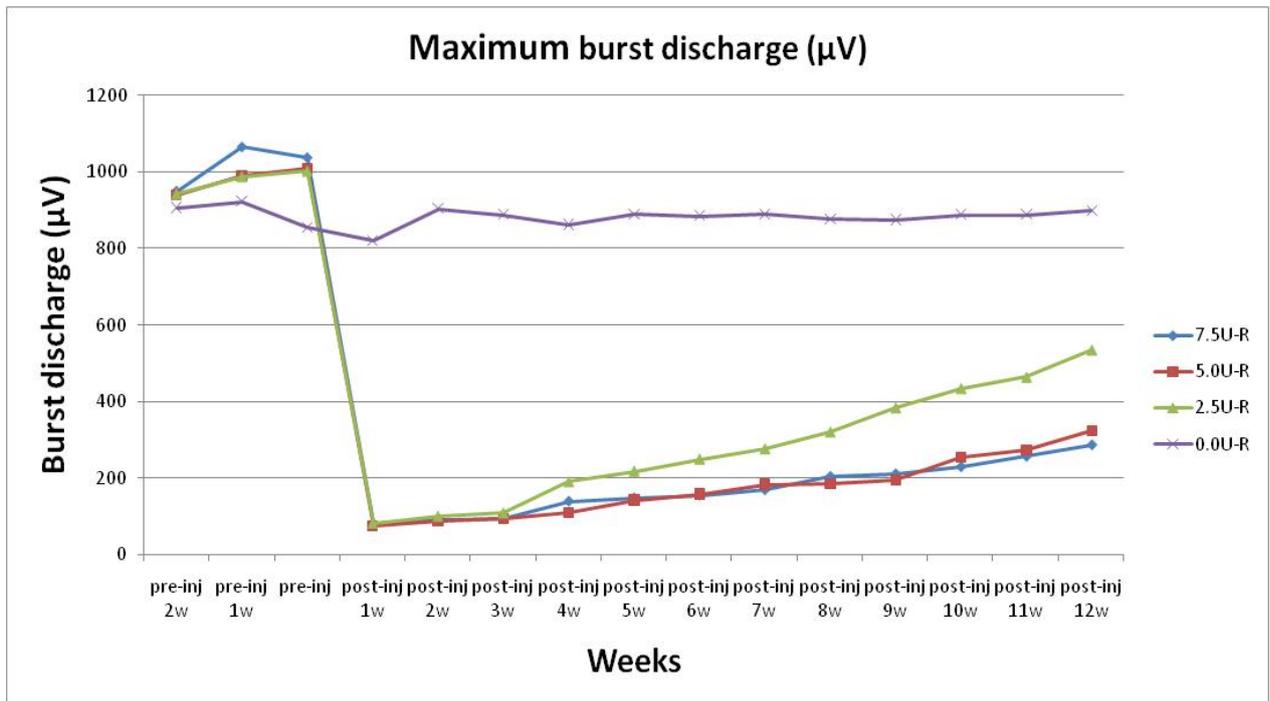
(圖 19) 大鼠咬肌(咬合時間)對(實驗週數)關係圖



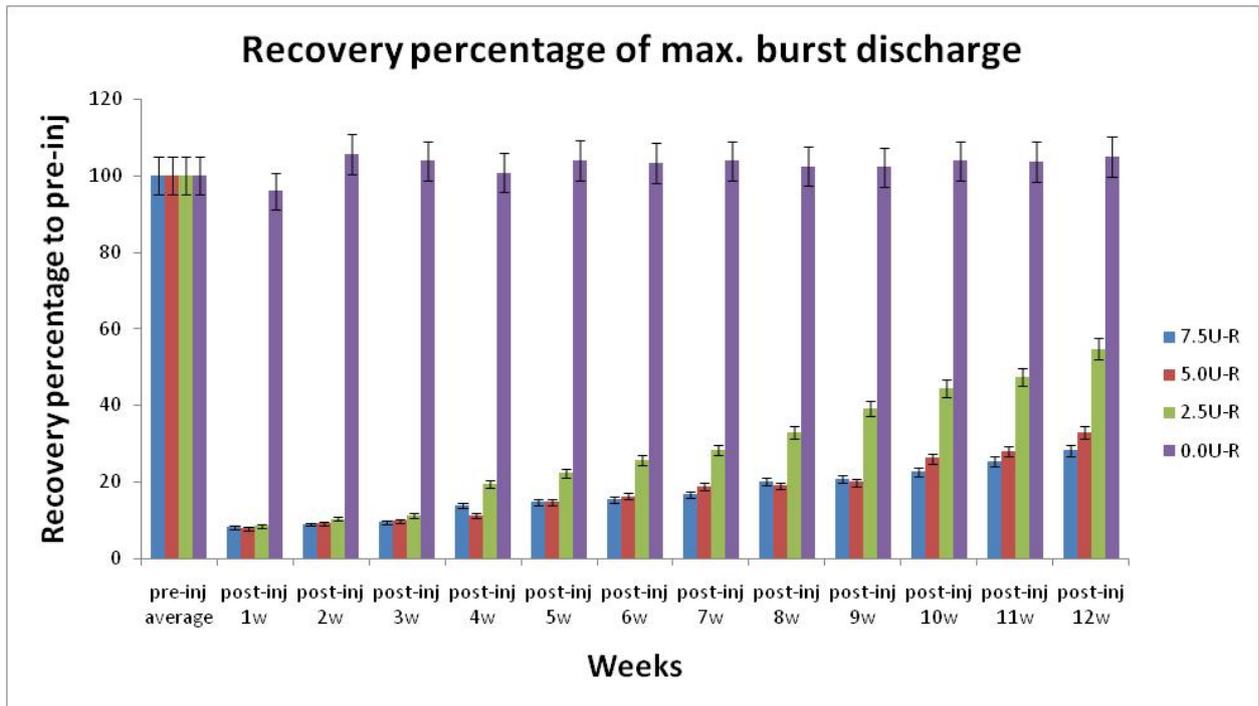
(圖 20) 大鼠咬肌藥物注射前後咬合時間恢復程度百分比



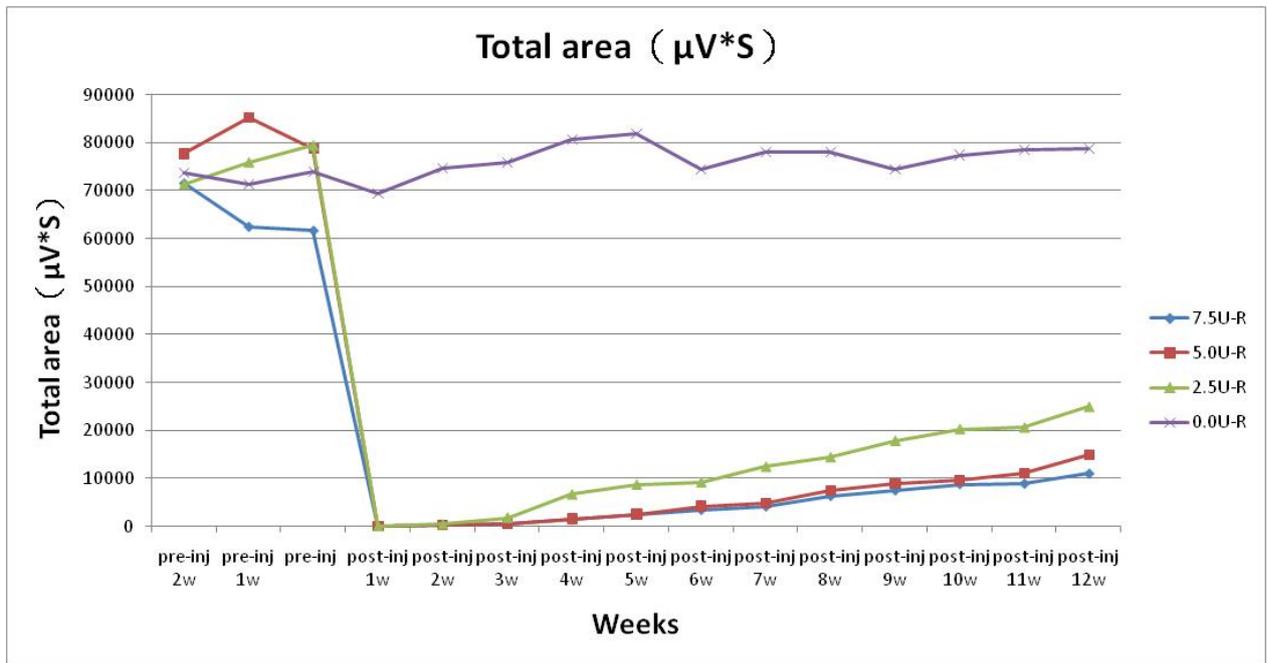
(圖 21) 大鼠咬肌(最大咬力電位)對(實驗週數)關係圖



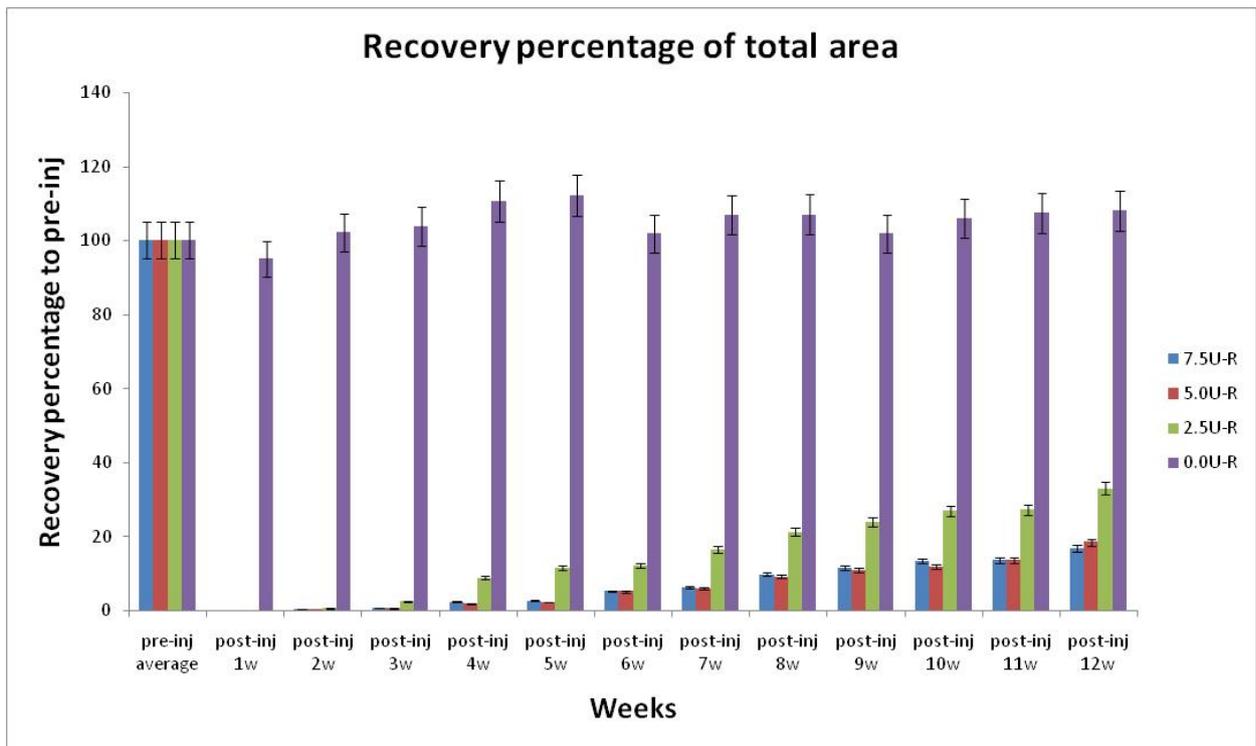
(圖 22) 大鼠咬肌藥物注射前後最大咬力電位恢復程度百分比



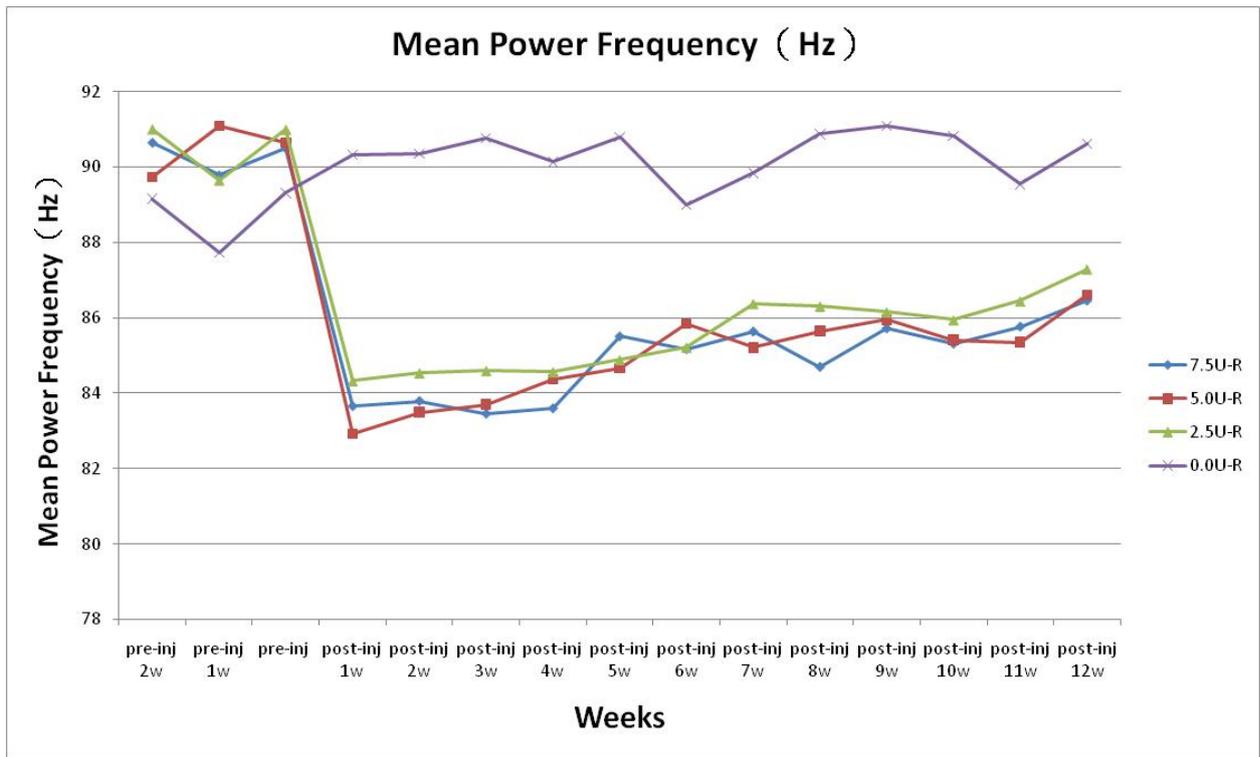
(圖 23) 大鼠咬肌(咬力-時間積分面積)對(實驗週數)關係圖



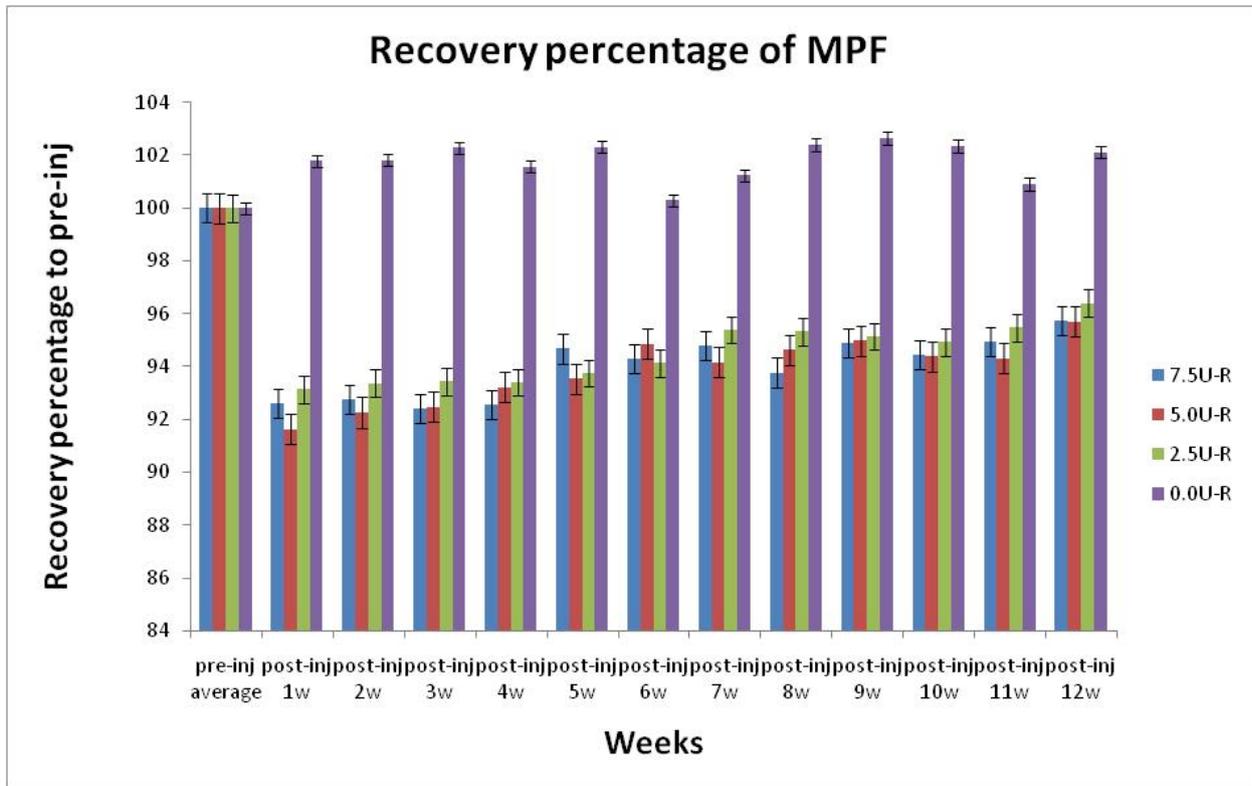
(圖 24) 大鼠咬肌藥物注射前後咬力-時間積分面積恢復程度百分比



(圖 25) 大鼠咬肌(平均頻率)對(實驗週數)關係圖



(圖 26) 大鼠咬肌藥物注射前後平均頻率恢復程度百分比



著作權授權利用同意書

本人所(擬)撰(著)97學年度第2學期之臺北醫學大學

口腔醫學院牙醫學系所/生醫材料暨工程研究所碩士學位論文

(論文題目：成鼠咬肌注射肉毒桿菌神經毒素後的肌功能變化)，為接受指導教授與各方先進在智慧財產與各項資源之協助下所完成，爰是，本論文之著作權應屬所有對本論文之完成有貢獻者所共有。

本人同意本論文之部份或全部內容，基於學術研究、教學、評論或非營利目的，得以文字、圖片或其他格式，為重製、改作、編輯或公開發表於任何媒體、會議或期刊等一切適當之利用，其作者與單位之列名與排序，應由指導教授依實際貢獻度與參予度調整排之。

此致

臺北醫學大學口腔醫學院牙醫學系所/口腔科學研究所碩士班

姓名：雷詠堯

立書人： 地點：台北醫學大學

身份證統一編號：F124543508

聯絡電話：0935014815

中華民國

98 年 6 月