

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

生長中大鼠施打肉毒桿菌神經毒素降低咀嚼肌功能後對肌肉組織的
影響

Effects of Reduced Masticatory Muscle Activity on the Muscular Tissue
of Growing Rats

研究生：林怡君 Yi-Chun Lin 撰

中華民國 97 年 6 月 27 日

Jun, 2008

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

生長中大鼠施打肉毒桿菌神經毒素降低咀嚼肌功能後對肌肉組織的
影響

Effects of Reduced Masticatory Muscle Activity on the Muscular Tissue
of Growing Rats

指導教授：蔡吉陽

研究生：林怡君 撰

中華民國 97 年 6 月

致謝

三年的研究所時光匆匆而過，這期間得到許多人的支持與鼓勵。要感謝的人有許多許多：我的論文指導教授蔡吉陽博士，不論在矯正臨床訓練上或研究上都給我莫大的幫助，讓我在這三年間有非常充實的收穫。在研究的操作上，要感謝輔仁大學醫學系的蘇柏誠副教授，不但提供給我一個很好的研究環境，在實驗技巧上也耐心地指導我。另外，北醫醫學系生理科的楊良友教授及陽明大學許必靈副教授，在研究設計及方法上給了我很多意見。此外，還要謝謝研究所的學長姐琬棋、逸民，北醫生理科研究助理圓圓、學弟陳光榮、輔大博士班研究生蔡宗晏、輔大醫學系研究助理盧心倫，感謝你們在實驗上給我的幫助。

除了研究之外，在臨床訓練方面，很感激北醫附醫鄭信忠副院長，也是我的臨床指導老師之一，謝謝你在這段期間的鼓勵及教導。還有北醫附醫矯正科的同事們，在這三年來互相切磋及幫忙。

另外，要特別對我的家人及威佐表達我的感激，謝謝你們的關心及體貼讓我安心的把碩士班唸完。

論文摘要

論文名稱：生長中大鼠施打肉毒桿菌神經毒素降低咀嚼肌功能後對肌肉組織的影響

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：林怡君

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）

本實驗以肉毒桿菌神經毒素 A 型（Botox[®], Allergan Inc., Irvine, OCA, USA）注射生長中大白鼠之咬肌與顳肌，造成咬肌與顳肌萎縮，降低咬合功能，藉此觀察其對於老鼠咬肌肌肉組織之影響。此實驗中所採取的研究方式為：選取 60 隻 30 天大的大鼠（Long-Evens），隨機分成四組，其中三組為實驗組、另外一組為控制組，依部位注射入大鼠。Group I：雙側咬肌注射肉毒桿菌神經毒素（顳肌注射入等量生理食鹽水）；Group II：雙側顳肌注射肉毒桿菌神經毒素（咬肌注射入等量生理食鹽水）；Group III：雙側咬肌和顳肌注射肉毒桿菌神經毒素；Group IV（control group）：雙側咬肌和顳肌注射生理食鹽水。給予相同飲水與飼料，飼養 45 天後犧牲，取下

咬肌及顛肌測量其重量，咬肌進行組織切片觀察肌纖維大小及肌纖維亞型 (Type IIa, IIb, IIx) 分布比例。本實驗得到的結論是，降低咀嚼肌的咬力，會使肌肉重量減低，並使肌纖維變細、並使肌纖維亞型發生轉換，則是使氧化能力較高的 type IIa fibers 轉換為氧化能力較低的 type IIb fibers。



Abstract

Title of Thesis : Effect of Reduced Masticatory Muscle Activity on the Muscular Tissue of Growing Rats

Author : Lin Yi-Chun

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

<Objectives>In recent years, more and more patients receive Botulinum toxin A (BTXA) injection of masseter muscles to change their facial contour. The change is due to the reduction of masticatory function. Many past animal researches indicated that reduced masticatory function caused atrophy of muscle and morphological change in the growing period. But we still don't understand exactly what happen on masseter muscle fiber after injection of BTXA. The purpose of this study is to clarify the changes of muscle fibers on histological level. <Materials and methods> 60 30-day-old rats were randomly divided into 4 groups. Each injection consists of using 25U/ml of BTXA divided

according to : Group I-injection of masseter muscles. Group II-injection of temporalis muscles. Group III-injection of masseter and temporalis muscles. Group IV (control) - both muscles received 0.9% normal saline. After 45 days, the rats were perfused and sacrificed. The weight of masseter muscles were measured, and immunohistochemistry analysis of superficial masseter muscles was done. <Results and discussion> The size of muscle fibers were smaller in group 1,2, and 3 than control group. And there were a small percentage of type IIa fibers in study groups. <Conclusion> The reducing masticatory function may result in reduction of size of masseter muscle fibers and transition from type IIa fibers to type IIx or IIb fibers.

Key words: masticatory muscle, Botulinum toxin A, muscle fiber type

目錄

致謝	I
中文摘要	II
英文摘要	IV
目錄	VI
第一章 緒論	1
第一節 研究動機	2
第二節 研究目的	4
第三節 研究假設	4
第二章 文獻查證	5
第一節 功能性基質理論	6
第二節 肌肉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 肉毒桿菌神經毒素作用於肌肉後肌肉組織的變化	18

第三章 研究材料與方法	23
第一節 研究對象	24
第二節 研究材料	24
第三節 研究設計及步驟	25
第四節 統計方式	31
第四章 分析與結果	32
第一節 LE 大鼠體重變化	33
第二節 咬肌與顛肌重量之比較	35
第三節 淺層咬肌肌纖維大小之比較	32
第四節 淺層咬肌肌纖維亞型分布比例之比較	36
第五章 討論	39
第一節 LE 大鼠體重變化	41
第二節 咬肌與顛肌重量之比較	42
第三節 淺層咬肌肌纖維大小之比較	44
第四節 淺層咬肌肌纖維亞型分布比例之比較	45
第六章 結論與建議	49

第七章 參考資料.....51

第八章 附表.....57

第九章 附圖.....68



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，不外乎改變飼料軟硬度 (Bouvier and Hylander, 1984; Kiliaridis et al., 1992; Ulgen et al., 1997)、肌切開術 (Maxwell et al., 1981)、肌切除術 (Navarro et al., 1995) 或去運動神經 (Behrents and Johnston, 1984; Phillips et al., 1982) 等方法。但是這些方式都無法排除組織傷害對生長發育的影響 (Gardner 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 (Gardner et al., 1980; Zucman, 1960)；切除神經會造成感覺喪失 (Gardner et al., 1980)；刺激神經核使其病變，可能導致神經破壞 (Gardner 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的行為，這些行為依然會促進咀嚼肌的活動。如此一來，我們便無法明確觀察咀嚼肌萎縮後對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，在醫學美容的領域中更是大量的被使用，如除皺、或施打於咬肌造成肌肉萎縮，以造成臉型的改變(Castro 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)，壓抑肌肉收縮，造成局部肌肉無力與萎縮，而達到降低肌肉活性的效果(Ahn and Kim, 2007; Brin, 1997; Porter et al., 1991)。因此，若我們將其應用於降低肌肉的功能，即可明確觀察到咀嚼肌萎縮後對顱骨生長發育的真正影響。

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。然其實驗模組中並未探討肌肉受到的直接影響與組織學上的變化。



第二節 研究目的

藉由將肉毒桿菌神經毒素注射於生長中大鼠之咬肌及顳肌，造成肌肉萎縮，探討咀嚼肌功能降低後其咬肌肌肉組織學上的變化。

第三節 研究假設

咬肌及顳肌功能降低後咬肌肌纖維變細、肌纖維亞型發生轉換(部分 type IIa muscle fibers 轉變成 type IIb muscle fibers)，並進而造成骨骼結構及型態的變化。



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)就是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、下顎骨發育的大小與形狀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。和基因並無絕對關聯。

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份，例如顳肌附著在下顎骨的冠狀突，所以顳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 (M, 1980; Moss, 1968)。

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 對於顱顏部的生長發育做了一些新定義：

1. 顱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，如顱顏部的一些軟組織，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 則對於顱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) 及快縮肌 (fast twitch 或 Type II)；更有人把快縮肌再分為快縮紅肌 (Type IIa) 和快縮白肌 (Type IIb)。各類肌纖維的生理機能特點見 (表一)。

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 et al., 1984; Slivka 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；而年老、肥胖或限制運動會造成 type IIb muscle fibers 的比例增加 (Kriketos 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 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 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 et al., 2004)。

以上的文獻回顧發現，以往的實驗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(Newton et al., 1987; Weijs and Hillen, 1984)。顯示肌肉組織的

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 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 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 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(deep bite)或開咬(open bite)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 et al., 1988)；下顎骨的不同部位骨密度與皮質骨厚度都下降(Kiliaridis 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 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 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 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(Katsaros, 2001; Maxwell et al., 1981; Navarro et al., 1995)。

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 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 et al., 1985; Waltimo 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 et al., 1985; Waltimo et al., 1994)。

第五節 肉毒桿菌神經毒素作用之機轉

肉毒桿菌是神經毒素(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 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型毒素來治療斜視(Strabismus)病人，此後也逐漸運用在眼瞼痙攣、半面痙攣、斜視、小兒腦性麻痺及除皺的治療。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。

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，其分子是一個雙鏈的多肽形式，為重鏈 heavy chain(100KDa) 上接著一條輕鏈 light chain(50KDa)的結構，此輕鏈具有蛋白質酶(protease)的功能，其功能為阻斷一種接合蛋白(binding protein) SNAP-25，使乙醯膽鹼無法附著在神經細胞膜上與細胞膜融合，如此便無法被釋放到細胞膜外繼續傳達神經訊號。而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。SNAP-25 這種蛋白質是讓神經傳導物質釋放出神經細胞膜外的必要蛋白質，屬於一種 SNARE 蛋白質，而肉毒桿菌素 A 型會將此蛋白質分解，SNAP-25 一旦被肉毒桿菌素分解，神經傳導物質囊泡(neurotransmitter vesicles)便無法正常的與細胞膜融合及釋放(Setler, 2002)。

二、肉毒桿菌神經毒素的作用機轉

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。

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)被帶入神經細胞膜內，與末梢神經中的膽鹼性神經終端(cholinergic nerve ending)，阻斷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。

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，基本上是靠著一種與神經傳導相關的蛋白質SNAP-25（一種SNARE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 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(Jurasinski et al., 2001)。

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，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 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 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 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 et al., 1991)。



第三章

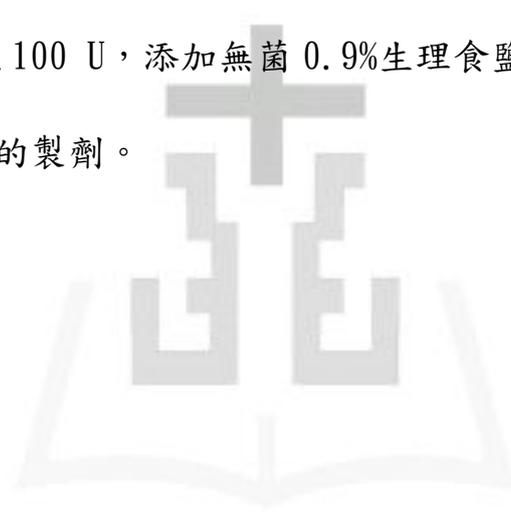
研究材料與方法

第一節 研究對象

本實驗是選取 60 隻發育中 Long-evans 品種雄性大鼠，30 天年齡大，體重約為 120 公克重。隨機分成四組(Groups I~IV)、每組 15 隻，其中三組為實驗組、另外一組為控制組。

第二節 研究材料

本實驗是使用肉毒桿菌素 A 型(BOTOX®, Allergan Pharmaceuticals, Ireland)，每一小瓶 100 U，添加無菌 0.9%生理食鹽水 4.0ml 作為稀釋劑，調配成 25U/ml 濃度的製劑。



第三節 研究設計及步驟

一、全身麻醉與肉毒桿菌素注射

利用腹腔注射(intraperitoneal, IP)方式，以 Zoletil (50mg/kg) 麻醉劑和 Rompun (10mg/kg)肌肉鬆弛劑兩種藥劑將大鼠麻醉，而後將 25U/ml (9U/kg body mass, by Ulgen M. (Ulgen et al., 1997))之肉毒桿菌素 A 型，依部位隨機分成四組，其中三組為實驗組、另外一組為控制組，依部位注射入大鼠 (表二)：

◎ Group I

⇒ 雙側咬肌 (顳肌則注射入等量生理食鹽水)。

◎ Group II

⇒ 雙側顳肌 (咬肌則注射入等量生理食鹽水)。

◎ Group III

⇒ 雙側咬肌和顳肌。

◎ Group IV (Control)

⇒ 雙側咬和顳肌注射入等量生理食鹽水。

1. 顳肌(temporalis muscle)注射肉毒桿菌素之步驟:

- ① 大鼠兩側眼眶至耳朵間剃除毛髮。
- ② 在眼眶與外耳道連線之 1/3 與 2/3 處，作上記號，此為施打顳肌之進針點。
- ③ 於針頭上裝置 plastic stopper，針頭露出 3.5 mm，使進針量固定。進針時，斜面朝下，碰到骨頭後停止，接著施打藥劑，每注射點施打 0.5U 之藥劑。（圖一）

2. 咬肌(masseter muscle)注射肉毒桿菌素之步驟:

- ① 大鼠兩側臉頰剃除毛髮。
- ② 在眼眶與外耳道連線之中點處、垂直於口裂與下顎骨角連線處，作上記號，此為 superficial masseter muscle 之進針點。
- ③ 在眼眶與外耳道連線之眼眶後緣、垂直於口裂與下顎骨角連線處，作上記號，此為 deep masseter muscle 之進針點。
- ④ 於針頭上裝置 plastic stopper，針頭露出 3.5 mm，使進針量固定。進針時，斜面朝下，碰到骨頭後停止，接著施打藥劑，每注射點施打 0.5U 之藥劑。（圖二）

二、大鼠的飼養

麻醉清醒後，大鼠將飼養於台北醫學大學動物實驗中心，飼養環境維持室溫 23°C，溼度 55%，自由飲水飲食。食物成分為… 飼養天數為 45 天。

三、大鼠的犧牲與灌流手術

45 天後，將 75 天年齡大的大鼠用 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。

四、肌肉重量之量取

手術取下大鼠咬肌與顳肌，用電子天秤(Denver, USA)量取雙側咬肌與顳肌的重量，比較四組之間咬肌和顳肌重量之差異。

五、肌肉組織切片觀察

1. 切片位置

取大鼠右側之咬肌，將之區分為淺層咬肌(superficial masseter muscle)及深層咬肌(deep masseter muscle)。切片位置為淺層咬肌的中心點，垂直肌纖維走向。(圖三)

2. 切片製作：Immunohistochemistry

① 大鼠犧牲後，手術取下大鼠咬肌，以 4%福馬林液固定 7 天。接著將標本放置 20% sucrose 溶液中保存。

② 切片位置為淺層咬肌的中心點，切片方向垂直肌纖維走向。

③ 以單株抗體染 MyHC-IIA、MyHC-IIX。

- 以 Monoclonal Antibody to Myosin(A4.74)(ALX-805-503, Alexis[®], North America) 染 type Iia muscle fibers

- 以 Monoclonal Antibody to Myosin (MyH1) (LS-C11612, Alexis[®], North America) 染 type Iia muscle fibers

因為大鼠咬肌只含 type II muscle fibers(Sano et al., 2007)，

所以本實驗先染出

type Iia fibers 及 type Iix fibers 之後再算出 type Iib fibers 的比例。

④ 切片製作過程

- ① 將標本包埋於蠟塊中，以切片機切出 $15\mu\text{m}$ 的厚度，置於載玻片上。
- ② 以 Xylene 及酒精脫蠟後，置於 citric buffer (PH=6.0) 溶液中，在 121°C 、20 psi 條件下煮 15 分鐘。此步驟之目的在加熱破壞 protein 使 antigen protein 片段顯露出來。
- ③ 切片浸潤於 3% H₂O₂ 溶液，去除織細胞內 peroxidase 酵素活力。
- ④ 0.05% saponin 溶液，將組織蛋白抗原顯露出來，將組織蛋白抗原顯露出來。
- ⑤ 1% bovine serum albumin 阻斷非特異性抗原 (non-specific antigen)，降低背景染色。
- ⑥ 加 2 滴 Biotinylated goat ant-rat IgG 為第 2 抗體，與第 1 抗體結合。
- ⑦ 加 2 滴鏈黴菌卵白素-過氧化氫複合 (streptavidin-peroxidase conjugate)，與生物素第 2 抗體結合。
- ⑧ 加入 DAB (染色劑) 呈色。

3. 切片觀測

以影像軟體 (Image-Pro Plus[®], Media Cybernetics, Inc., USA) 計算四組標本中肌纖維大小、及肌纖維亞型 (Type IIa, IIb, IIx) 分布比例。



第四節 統計方式

利用 ANOVA 及 Post-Hoc 方法中的 Tukey Test 比較實驗組與控制組之間咬肌及顛肌重量、淺層咬肌肌纖維大小、肌纖維亞型 (Type IIa, IIb, IIx) 分布比例的差異。



第四章

分析與結果

第一節 Long-Evan 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。最終各組大鼠之平均體重增加各組間無統計差異(表三)，如表。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 咬肌與顳肌重量之比較

1. 咬肌

各組咬肌的重量如（表四、圖四）所示。Group I 之咬肌重量為 1.384 g；Group II 之咬肌重量為 1.367 g；Group III 之咬肌重量為 1.029 g；Group IV 之咬肌重量為 1.497 g。

以 ANOVA 及事後比較方法中的 Tukey test 得知，具統計意義的是 Group I > Group III ($P < 0.001$)、II > Group III ($P < 0.001$)、IV > Group III ($P < 0.001$)、Group IV > Group II ($P = 0.042$)。

2. 顳肌

各組顳肌的重量如（表五、圖五）所示。Group I 之顳肌重量為 0.633 g；Group II 之顳肌重量為 0.381 g；Group III 之顳肌重量為 0.332 g；Group IV 之顳肌重量為 0.625 g。

以 ANOVA 統計得知，以 ANOVA 及事後比較方法中的 Tukey test 得知，具統計意義的是 Group I > Group II ($P < 0.001$)、Group I > Group III ($P < 0.001$)、Group IV > Group II ($P < 0.001$)、IV > Group III ($P < 0.001$)。

若就其平均值來觀測，則表現出 Group I \approx Group IV > Group II > Group III 的結果。

第三節 淺層咬肌肌纖維大小之比較

各組淺層咬肌肌纖維的大小如（表六、圖六）所示。Group I 之肌纖維大小平均為 $965 \mu\text{m}^2$ ；Group II 之肌纖維大小平均為 $958 \mu\text{m}^2$ ；Group III 之肌纖維大小平均為 $686 \mu\text{m}^2$ ；Group IV 之肌纖維大小平均為 $1122 \mu\text{m}^2$ 。

以 ANOVA 之事後檢定（Tukey test）得知：Group I 之肌纖維大小顯著大於 Group III（ $p=0.039$ ）；Group II 之肌纖維大小顯著大於 Group III（ $p=0.046$ ）；Group IV 之肌纖維大小顯著大於 Group III（ $p=0.001$ ）。Group I、Group II、Group IV 之間則並無統計上的差異。但若就其值來觀測，仍表現出 $\text{Group IV} > \text{Group I} \approx \text{Group II}$ 的結果。

第四節 淺層咬肌肌纖維亞型分布比例之比較

各組所含肌纖維的比例如（表七、圖七）所示。以 ANOVA 及事後檢定之 Tukey test 來看，具統計意義的只有 type IIa muscle fibers 的比例 Group II > Group III。

1. Type IIa muscle fibers（表八、圖八）

Group I 之 type IIa muscle fibers 所佔全部 muscle fibers 的比例為 19.0 %；Group II 之 type IIa muscle fibers 所佔比例為 35.8 %；Group III 之 type IIa muscle fibers 所佔比例為 12.9 %；Group IV 之 type IIa muscle fibers 所佔比例為 31.5 %。

以 ANOVA 之事後檢定（Tukey test）得知 type IIa fibers 在 Group II 中所佔的比例，顯著的高於 Group III（ $p=0.014$ ）。（表八、圖九）

Group I 中 type IIa fibers 佔了 19 % 和 Group IV 的 31.5 % 雖未達到統計上的差距，但 Group IV 中的 type IIa fibers 明顯高於 Group I。

若就其平均值來觀測，仍表現出 Group II \approx Group IV > Group I > Group III 的結果。

2. Type Iix muscle fibers (表九、圖十、圖十一)

Group I 之 type Iix muscle fibers 所佔全部 muscle fibers 的比例為 22.4 %; Group II 之 type Iix muscle fibers 所佔比例為 21.2 %; Group III 之 type Iix muscle fibers 所佔比例為 23.3 %; Group II 之 type Iix muscle fibers 所佔比例為 26.9 %。

以 ANOVA 檢定得知，type Iix fibers 所佔的比例在四組中並無統計上的顯著差異。(表九、圖十一)



3. Type IIb muscle fibers (表十、圖十二)

Group I 之 type IIb muscle fibers 所佔全部 muscle fibers 的比例為 58.6 %; Group II 之 type IIb muscle fibers 所佔比例為 43.0 %; Group III 之 type IIb muscle fibers 所佔比例為 63.9 %; Group IV 之 type IIb muscle fibers 所佔比例為 41.6 %。

以 ANOVA 檢定得知， type IIb fibers 佔的比例在四組中並無統計上的顯著差異。(圖十二)



第五章

討論

在矯正的臨床工作中，下顎骨的生長預測一直是一重要但難解的課題，許多學者不斷致力於找出下顎骨發育的規律性及影響因子。對於下顎骨的發育來說，咬肌扮演了重要的角色。因此本實驗主要觀察咬肌的變化，在實驗設計中以咬肌施打 BTXA 為主要的實驗組別 (Group I)。但顛肌對咬肌的影響也不容忽視，因為顛肌也是一重要且強力的閉口肌。所以在實驗的分組中，為了探討顛肌對咬肌造成的影響，也設計了在顛肌施打 BTXA (Group II) 及咬肌、顛肌皆施打 BTXA 的組別 (Group III)。希望這樣的實驗分組設計能使我們對咬肌的功能及影響有更深入的了解。



第一節 Long-Evan 大鼠的體重變化

本實驗所使用的實驗動物為 L-E 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。本實驗定期每週量測各組每隻大鼠之體重增加情況，發現四組大鼠的測量值皆穩定成長，每週的成長趨勢，各組之間也並無明顯差異。而在 75 天所測得之體重減去 30 天大時所測得之原始體重，四組間全身體重增加情形並無統計差異。這說明局部施打肉毒桿菌神經毒素於咬肌與顳肌等咀嚼肌，對於發育中大鼠全身性正常的生長發育，並未造成影響。Matic 在其兔子咬肌實驗中也得到相同的結果，即全身性之生長發育並不因局部施打肉毒桿菌神經毒素受到影響(Matic et al., 2007)。

在以往的實驗模式中，如：改變飼料軟硬度(Bouvier and Hylander, 1984; Kiliaridis et al., 1992; Ulgen et al., 1997)、肌切開術(Maxwell et al., 1981)、肌切除術(Navarro et al., 1995)或去運動神經(Behrents and Johnston, 1984; Phillips et al., 1982)等方法，皆有造成組織傷害而影響實驗結果的疑慮(Gardner et al., 1980)。但由本實驗所記錄之大鼠階段性生長可知，施打肉毒桿菌毒素之大鼠，其生長發育並未受到實驗之干擾。

2005年及2007年蔡吉陽等研究中亦顯示肉毒桿菌神經毒素A型施打於生長中大鼠的咬肌及顳肌，並不會影響全身性的生長發育。

第二節 咬肌與顳肌重量之比較

分析以往的實驗時發現，實驗動物多使用老鼠、兔子等齧齒類動物。此種動物有咬嚙磨牙的特性，縱使非進食之期間，動物也有咬嚙的行為，所以單靠飼料硬度的改變是否能完全影響咀嚼肌的活性，這點仍未可知。這也就造成了以往實驗準確性的極大疑慮。

咬肌及顳肌是咀嚼肌群中體積最大、收縮力最強的兩塊肌肉。本實驗以肉毒桿菌毒素 A 型，使咬肌或顳肌確實萎縮，如此，本實驗所得到之實驗數據方可獲得較大的準確性。

在咬肌的重量方面，Group I、II、IV > Group III；Group IV > Group II。但 Group I（平均值為 1.384 g）與 Group II（平均值為 1.367 g）的差距不具統計上的意義。

在顳肌的重量方面，Group I ≐ Group IV > Group II > Group III。但 Group I 與 Group IV 的差距不具統計上的意義。

由本實驗的結果得知，不管是顳肌或咬肌其重量的比較皆出現一致的結論，即表現出 Group I ≐ Group IV > Group II > Group III 的結果。

由以上結果也可看出，若 BTXA 只施打咬肌（Group I），則咬肌與顳肌與未施打組（Group IV）皆沒有統計上的意義。因此我們推論：咬肌與顳肌之間可能存在有相互的代償作用，以補咬合力的不足。若 BTXA 只施打顳肌（Group I），則咬肌與顳肌與未施打組（Group IV）之間的統計數值的相

對關係並不一致。我們的推論是：顛肌的體積較小，等量的 BTXA 對其影響較為明顯。

所以將來的實驗中若欲降低咬合力，建議同時施打 BTXA 於咬肌與顛肌以消除代償作用造成的不準確性。



第三節 淺層咬肌肌纖維大小之比較

由以往的實驗結果得知，在降低咀嚼力後，肌纖維大小的變化不一。在 S. Kiliaridis 的實驗中，以軟食餵養的老鼠，其 deep masseter muscle 的肌纖維大小較餵食正常硬度飼料之老鼠為小(Kiliaridis et al., 1988)。但 Y. Kitagawa 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(Kitagawa et al., 2004)。但由於其實驗方式不能確知咀嚼肌活性是否真正降低，所以以上實驗之結論皆失去其可信度。

而以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，但觀測標的多為腓腸肌或眼輪匝肌(Borodic, 1994; Porter et al., 1991)……等，缺乏對咀嚼肌肌纖維大小之探討。

由本實驗結果得知，Group I、Group II、Group IV 之肌纖維大小顯著大於 Group III。而 Group I、Group II、Group IV 之間則並無統計上的差異。但若就其值來觀測，仍表現出 $\text{Group IV} > \text{Group I} \approx \text{Group II}$ 的結果。可能表示出，咬肌及顳肌在咀嚼功能上扮演相當的重要性，當只有其中一者有萎縮的現象，則另一者可代償性的補償咀嚼功能的不足。因此，Group I、Group II 之肌纖維大小和 Group IV 並無顯著差異。但若咬肌和顳肌同時萎縮，則咀嚼功能將受到極大的影響，所以 Group III 之肌纖維大小就會顯著小於 Group IV。

第四節 淺層咬肌肌纖維亞型分布比例之比較

骨骼肌按肌纖維的生理特點可分為慢縮肌 (slow twitch 或 type I) 及快縮肌 (fast twitch 或 Type II) ; 更有人把快縮肌再分為三種肌纖維亞型: 快縮紅肌 (type IIa) 和快縮白肌 (type IIb), 及生理特性介於 type IIa 與 type IIb 之間的 type IIx。各類肌纖維的生理機能特點見 (表一)。

以往的實驗顯示, 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 et al., 1984; Slivka 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 et al., 1997)。因此依照推論, 降低咀嚼肌的咬力, 應該會發生由 type IIa fibers 轉換為 type IIb fibers 的情形。在以往的實驗模式中, 如: 餵食方式的改變 (Bouvier and Hylander, 1984; Kiliaridis et al., 1992; Ulgen et al., 1997)、肌切開術 (Maxwell et al., 1981)、肌切除術 (Navarro et al., 1995) 或去運動神經 (Behrents and Johnston, 1984; Phillips et al., 1982) 等方法, 雖已發現降低咀嚼肌的咬力, 會出現由 type IIa fibers 轉換為 type IIb fibers 的現象。在 S. Kiliaridis 的實驗中, 以軟食餵養的老鼠, 其 type IIa fibers 所佔比例會較小, type IIb fiber 所佔比例會較大 (Kiliaridis et al., 1988)。但也另有實驗顯示相反的結論。Y. Kitagawa 以兔子為研究對象, 研究結果顯示: 軟食組其 deep masseter muscle 的 type I fibers 所佔比例會

較少，type IIa fibers 所佔比例會較多，type IIb fibers 所佔比例會較少 (Kitagawa et al., 2004)。並且以上實驗方式是以較間接之方式達到咀嚼肌咬力的降低，並不能確認咀嚼肌是否確實萎縮。而以施打肉毒桿菌毒素降低肌肉收縮力的實驗中，大多只觀測肌纖維大小的變化，缺乏對肌纖維亞型之探討(Chen et al., 2002; Porter et al., 1991)。

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。然其實驗模組中並未探討肌肉受到的直接影響與組織學上的變化 (Chih-Mong Tsai, 2005)。因過去以肉毒桿菌毒素來降低肌力的實驗中，甚少探討肌纖維亞型的改變，其中探討咀嚼肌的更少。2003 年 Kim, H. J. 利用 CT scan 探討病患雙側咬肌注射 BTXA 之後咬肌體積的改變，發現咬肌體積顯著變小(Kim et al., 2003)。2005 年 Kim, N. H. 則利用超音波觀察病患雙側咬肌注射 BTXA 之後咬肌體積的改變，發現咬肌厚度顯著變小(Kim et al., 2005)。而 Park 也同時運用 CT 及超音波觀察病患雙側咬肌注射 BTXA 之後咬肌體積的改變，同樣也得到咬肌厚度減小的結果(Park et al., 2003)。以上研究皆為臨床實驗，觀測的目標皆為咬肌體積或厚度的變化，並無肌肉組織學上的探討。所以本實驗特以肉毒桿菌毒素直接降低咀嚼肌的咬力，以觀測

肌纖維大小及亞型之變化。

由實驗結果得知，降低咀嚼肌的咬力，咬肌確實會有由 type IIa fibers 轉換為 type IIb fibers 的現象。

以 type IIa fibers 的含量來看，Group II、Group IV 顯著高於 Group III。就平均值而言，type IIa fibers 之含量為 Group II \approx Group IV > Group I > Group III，顯示萎縮癱瘓的肌肉愈多，肌纖維亞型的轉換愈明顯。但 masseter muscle 若處於受 temporalis muscle 間接影響的狀態(Group II)，則 masseter muscle 肌纖維亞型轉換的現象就不明顯（Group II 與 Group IV 的 type IIa fibers 含量並無顯著差異）。因此，以傳統方式間接降低咀嚼肌咬力的實驗才會出現結論不一的情況。

並且 Group I 之 type IIa fibers 含量和 Group II、Group IV 雖有差異（Group II \approx Group IV > Group I），但此差異並不具統計上的意義。由此再次印證，咬肌及顳肌當只有其中一者有萎縮的現象，則另一者可代償性的補償咀嚼功能的不足。因此，Group I、Group II 之 type IIa fibers 含量和 Group IV 並無顯著差異。但若咬肌和顳肌同時萎縮，則咀嚼功能將受到極大的影響，所以 Group III 之 type IIa fibers 就會顯著小於 Group IV。

因此，施打 BTXA 降低咀嚼肌的咬力，咬肌確實會由 type IIa fibers 轉換為無氧代謝為主的 type IIb fibers。這樣的肌纖維亞型的轉換，會使肌肉的特性偏向收縮速度快、收縮力量強，但抗疲勞性低的狀態。所以，咬力若

降低，則肌肉的耐力（抗疲勞性）也會顯著變低。



第六章

結論與建議

本實驗得到的結論是，降低咀嚼肌的咬力，會使肌肉整體重量減低，並使肌纖維變細、並使肌纖維亞型發生轉換，則是使氧化能力較高的 type IIa fibers 轉換為氧化能力較低的 type IIb fibers。在接下來的實驗中，若能以肌電圖的方式檢測施打肉毒桿菌毒素的實效，如此一來，不但可把咀嚼肌功能的改變量化，且可把功能改變量和組織變化的結果做數據上的比對，這樣對於兩者關聯性的探討將更具可信度，實驗結果將更臻確實。另外，建議將來的實驗中，若需藉降低咀嚼肌的咬力來觀測其他現象，最好能以施打肉毒桿菌毒素為實驗方法，並且建議同時施打 BTXA 於咬肌與顳肌以消除代償作用造成的不準確性，如此方可避免咀嚼肌咬力降低效果不確實的疑慮，並大大增進實驗的可信度。

第七章

參考資料



Ahn KY, Kim ST (2007). The change of maximum bite force after botulinum toxin type a injection for treating masseteric hypertrophy. *Plast Reconstr Surg* 120(6):1662-6.

Behrents RG, Johnston LE, Jr. (1984). The influence of the trigeminal nerve on facial growth and development. *Am J Orthod* 85(3):199-206.

Borodic G (1994). Therapeutic botulinum toxin. *Lancet* 344(8933):1370.

Bouvier M, Hylander WL (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, Kiliaridis S, Strid KG (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 MF (1997). Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity, and immunology. *Muscle Nerve Suppl* 6(S146-68).

Castro WH, Gomez RS, Da Silva Oliveira J, Moura MD (2005). Botulinum toxin type A in the management of masseter muscle hypertrophy. *J Oral Maxillofac Surg* 63(1):20-4.

Chen CM, Stott NS, Smith HK (2002). Effects of botulinum toxin A injection and exercise on the growth of juvenile rat gastrocnemius muscle. *J Appl Physiol* 93(4):1437-47.

Chih-Mong Tsai Y-HL, Liang-Yo Yang, Chi-Yang Tsai (2005). Effects of an injection of botulinum neuotoxin into the masseter muscle on craniofacial growth and development in rats. *Clin J Dent* 24(4):231-239.

Corruccini RS (1984). An epidemiologic transition in dental occlusion in world populations. *Am J Orthod* 86(5):419-26.

Gardner DE, Luschei ES, Joondeph DR (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 AE, Lanyon LE, McFie H (1979). Functional adaptation of bone to increased stress. An experimental study. *J Bone Joint Surg Am* 61(4):539-46.

Green HJ, Klug GA, Reichmann H, Seedorf U, Wiehrer W, Pette D (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.

Hatheway CL (1995). Botulism: the present status of the disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 195(55-75).

Jee WS, Li XJ (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 CV, Lieth E, Dang Do AN, Schengrund CL (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.

Kiliaridis S, Engstrom C, Thilander B (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, Engstrom C, Thilander B (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.

Kiliaridis S, Engstrom C, Chavez LM (1992). Influence of masticatory muscle function on craniofacial growth in hypocalcemic rats. *Scand J Dent Res* 100(6):330-6.

Kiliaridis S, Bresin A, Holm J, Strid KG (1996). Effects of masticatory muscle function on bone mass in the mandible of the growing rat. *Acta Anat (Basel)* 155(3):200-5.

Kim HJ, Yum KW, Lee SS, Heo MS, Seo K (2003). Effects of botulinum toxin type A on bilateral masseteric hypertrophy evaluated with computed tomographic measurement. *Dermatol Surg* 29(5):484-9.

Kim NH, Chung JH, Park RH, Park JB (2005). The use of botulinum toxin type A in aesthetic mandibular contouring. *Plast Reconstr Surg* 115(3):919-30.

Kitagawa Y, Mitera K, Ogasawara T, Nojyo Y, Miyauchi K, Sano K (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 AD, Baur LA, O'Connor J, Carey D, King S, Caterson ID, 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.

Langer JC, Birnbaum EE, Schmidt RE (1997). Histology and function of the internal anal sphincter after injection of botulinum toxin. *J Surg Res* 73(2):113-6.

M RD (1980). A synopsis of craniofacial growth. *Prentice-Hall International editions San Antonio Texas* 2nd ed.(pp.142-158).

Matic DB, Yazdani A, Wells RG, Lee TY, Gan BS (2007). The effects of masseter muscle paralysis on facial bone growth. *J Surg Res* 139(2):243-52.

Maxwell LC, Carlson DS, McNamara JA, Jr., Faulkner JA (1981). Adaptation of the masseter and temporalis muscles following alteration in length, with or without surgical detachment. *Anat Rec* 200(2):127-37.

Meade JB, Cowin SC, Klawitter JJ, Van Buskirk WC, Skinner HB (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, Jost WH, Toyka KV (1999). Botulinum toxin in the treatment of neurological disorders of the autonomic nervous system. *Arch Neurol* 56(8):914-6.

Naumann M, Albanese A, Heinen F, Molenaers G, Relja M (2006). Safety and efficacy of botulinum toxin type A following long-term use. *Eur J Neurol* 13 Suppl 4(35-40).

Navarro M, Delgado E, Monje F (1995). Changes in mandibular rotation after muscular resection. Experimental study in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 108(4):367-79.

Newton JP, Abel EW, Robertson EM, Yemm R (1987). Changes in human masseter and medial pterygoid muscles with age: a study by computed tomography. *Gerodontics* 3(4):151-4.

Park MY, Ahn KY, Jung DS (2003). Botulinum toxin type A treatment for contouring of the

lower face. *Dermatol Surg* 29(5):477-83; discussion 483.

Phillips C, Shapiro PA, Luschei ES (1982). Morphologic alterations in *Macaca mulatta* following destruction of the motor nucleus of the trigeminal nerve. *Am J Orthod* 81(4):292-8.

Porter JD, Strebeck S, Capra NF (1991). Botulinum-induced changes in monkey eyelid muscle. Comparison with changes seen in extraocular muscle. *Arch Ophthalmol* 109(3):396-404.

Proffit WR, Fields HW (1983). Occlusal forces in normal- and long-face children. *J Dent Res* 62(5):571-4.

Rubin CT, Lanyon LE (1985). Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int* 37(4):411-7.

Sano R, Tanaka E, Korfage JA, Langenbach GE, Kawai N, van Eijden TM, et al. (2007). Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles. *J Anat* 211(4):464-70.

Setler PE (2002). Therapeutic use of botulinum toxins: background and history. *Clin J Pain* 18(6 Suppl):S119-24.

Slivka D, Raue U, Hollon C, Minchev K, Trappe SW (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 RF, McNeer KW (1987). Botulinum toxin paralysis of adult monkey extraocular muscle. Structural alterations in orbital, singly innervated muscle fibers. *Arch Ophthalmol* 105(12):1703-11.

Ulgen M, Baran S, Kaya H, Karadede I (1997). The influence of the masticatory hypofunction on the craniofacial growth and development in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 111(2):189-98.

Vilmann H, Kirkeby S, Kronborg D (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.

Waltimo A, Nystrom M, Kononen M (1994). Bite force and dentofacial morphology in men with

severe dental attrition. *Scand J Dent Res* 102(2):92-6.

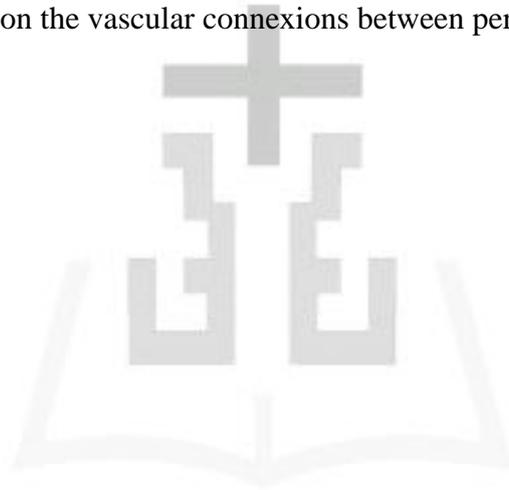
Watt DG, Williams CH (1951). The effects of the physical consistency of food on the growth and development of the mandible and the maxilla of the rat. *Am J Orthod* 37(12):895-928.

Wedel A, Carlsson GE, Sagne S (1978). Temporomandibular joint morphology in a medieval skull material. *Swed Dent J* 2(6):177-87.

Weijs WA, Hillen B (1984). Relationships between masticatory muscle cross-section and skull shape. *J Dent Res* 63(9):1154-7.

Yamada K, Kimmel DB (1991). The effect of dietary consistency on bone mass and turnover in the growing rat mandible. *Arch Oral Biol* 36(2):129-38.

Zucman J (1960). Studies on the vascular connexions between periosteum, bone, and muscle. *Br J Surg* 48(324-8).



第八章

附表



(表一) 骨骼肌肌纖維的生理機能特點。

	慢肌	快肌	
	Type I	Type IIa	Type IIb
	Slow oxidative 慢縮有氧肌	Fast oxidative glycolytic 快縮有氧糖解肌	Fast glycolytic 快縮糖解肌
肌纖維的大小	小	中	大
ATP主要來源	有氧代謝	有氧代謝	無氧代謝
收縮速度	慢	中	快
收縮力量	小	中	大
抗疲勞性	強	中	弱



(表二) 實驗分組。

	咬肌	顳肌
Group I	BTXA	0.9 % 生理食鹽水
Group II	0.9 % 生理食鹽水	BTXA
Group III	BTXA	BTXA
Group IV	0.9 % 生理食鹽水	0.9 % 生理食鹽水



(表三) 各組大鼠之平均體重增加。

	Group I	Group II	Group III	Group IV	ANOVA
平均體重	276.47±	265.13±	263.67±	265.12±	N.S.
增加(g)	44.58	28.08	36.48	27.05	

N.S. : no significant difference



(表四) 各組大鼠咬肌重量。

	Group I	Group II	Group III	Group IV
咬肌重量(g)	1.384 ± 0.257	1.367 ± 0.153	1.029 ± 0.155	1.497 ± 0.155



(表五) 各組大鼠顳肌重量。

	Group I	Group II	Group III	Group IV
顳肌重量(g)	0.633 ± 0.1	0.381 ± 0.091	0.332 ± 0.099	0.625 ± 0.071



(表六) 各組大鼠淺層咬肌肌纖維的大小

	Group I	Group II	Group III	Group IV
肌纖維的大小 (μm^2)	965 ± 187	958 ± 145	686 ± 124	1122 ± 197



(表七) 各組大鼠所含肌纖維的比例。

	IIa %	IIx %	IIb %
I	19.0 ± 16.2	22.4 ± 19.6	58.6 ± 26.0
II	35.8 ± 10.7	21.2 ± 08.1	43.0 ± 9.0
III	12.9 ± 8.4	23.3 ± 10.7	63.9 ± 12.7
IV	31.5 ± 9.7	26.9 ± 9.5	41.6 ± 9.8

* P<0.05



(表八) 各組大鼠所含 type IIa 肌纖維的比例。

	Group I	Group II	Group III	Group IV
type IIa (%)	19.0 ± 16.2	35.8 ± 10.7	12.9 ± 8.4	31.5 ± 9.7



(表九) 各組大鼠所含 type IIx 肌纖維的比例。

	Group I	Group II	Group III	Group IV
type IIx (%)	22.4 ± 19.6	21.2 ± 08.1	23.3 ± 10.7	26.9 ± 9.5



(表十) 各組大鼠所含 type IIb 肌纖維的比例。

	Group I	Group II	Group III	Group IV
type IIb (%)	58.6 ± 26.0	43.0 ± 9.0	63.9 ± 12.7	41.6 ± 9.8

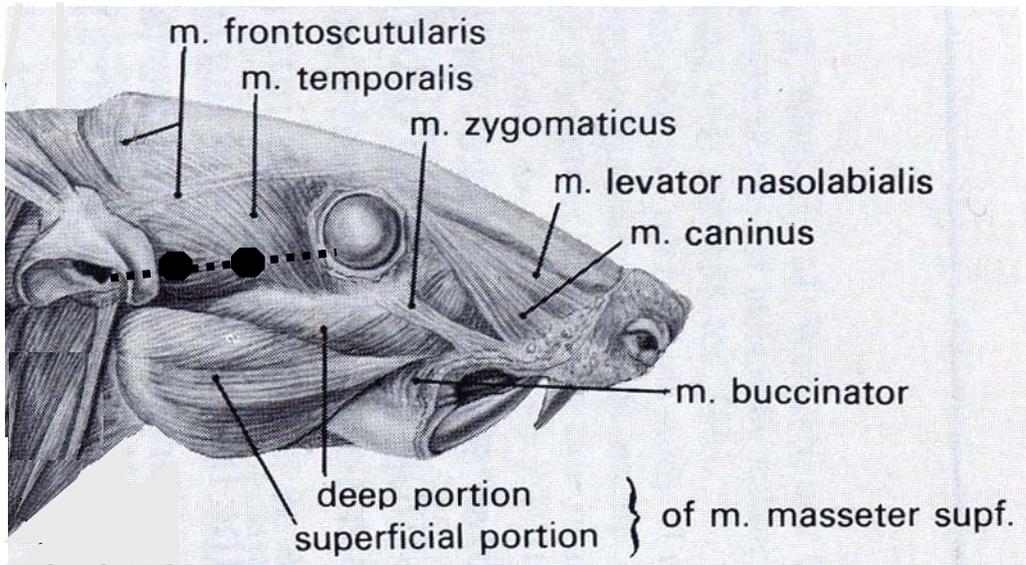


第九章

附圖



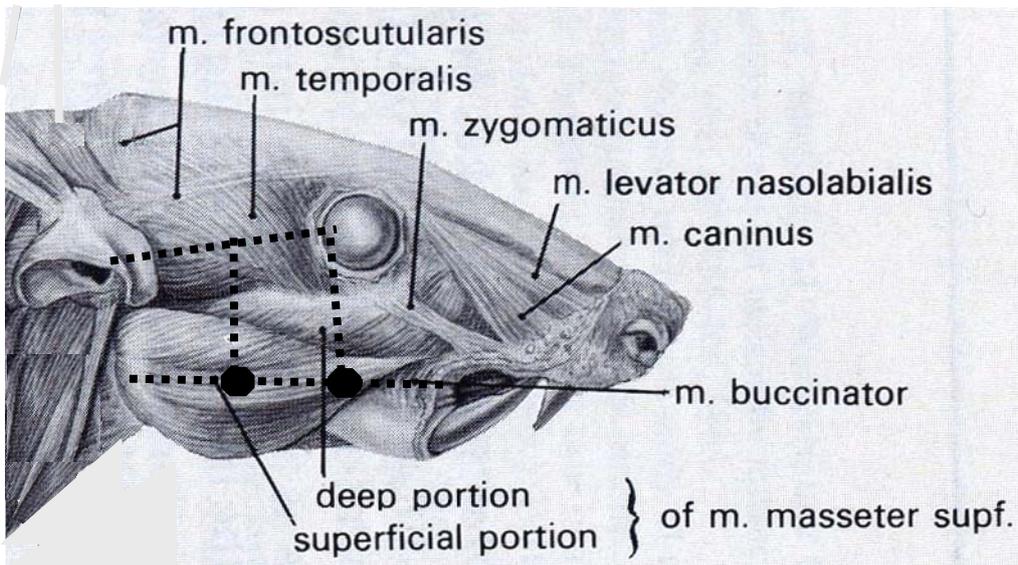
(圖一) 顛肌藥物注射點。



● 藥物注射點

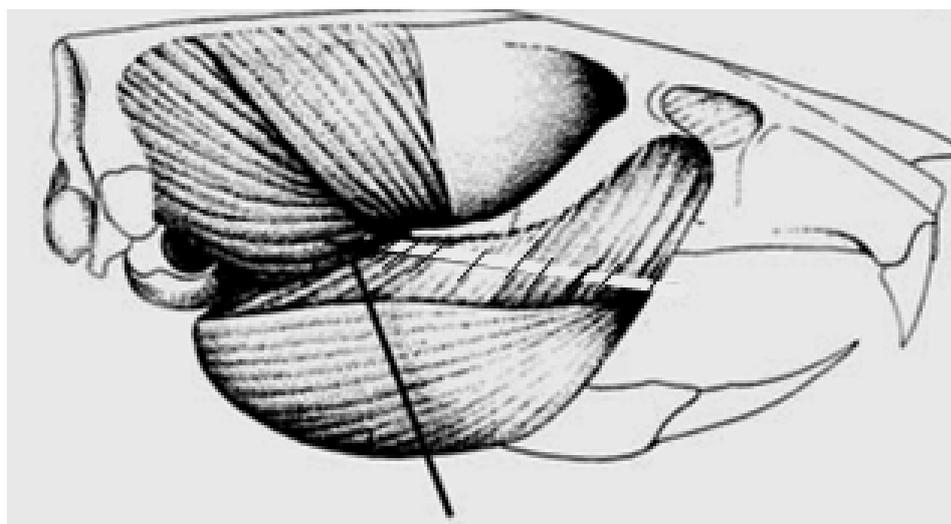


(圖二) 咬肌藥物注射點。

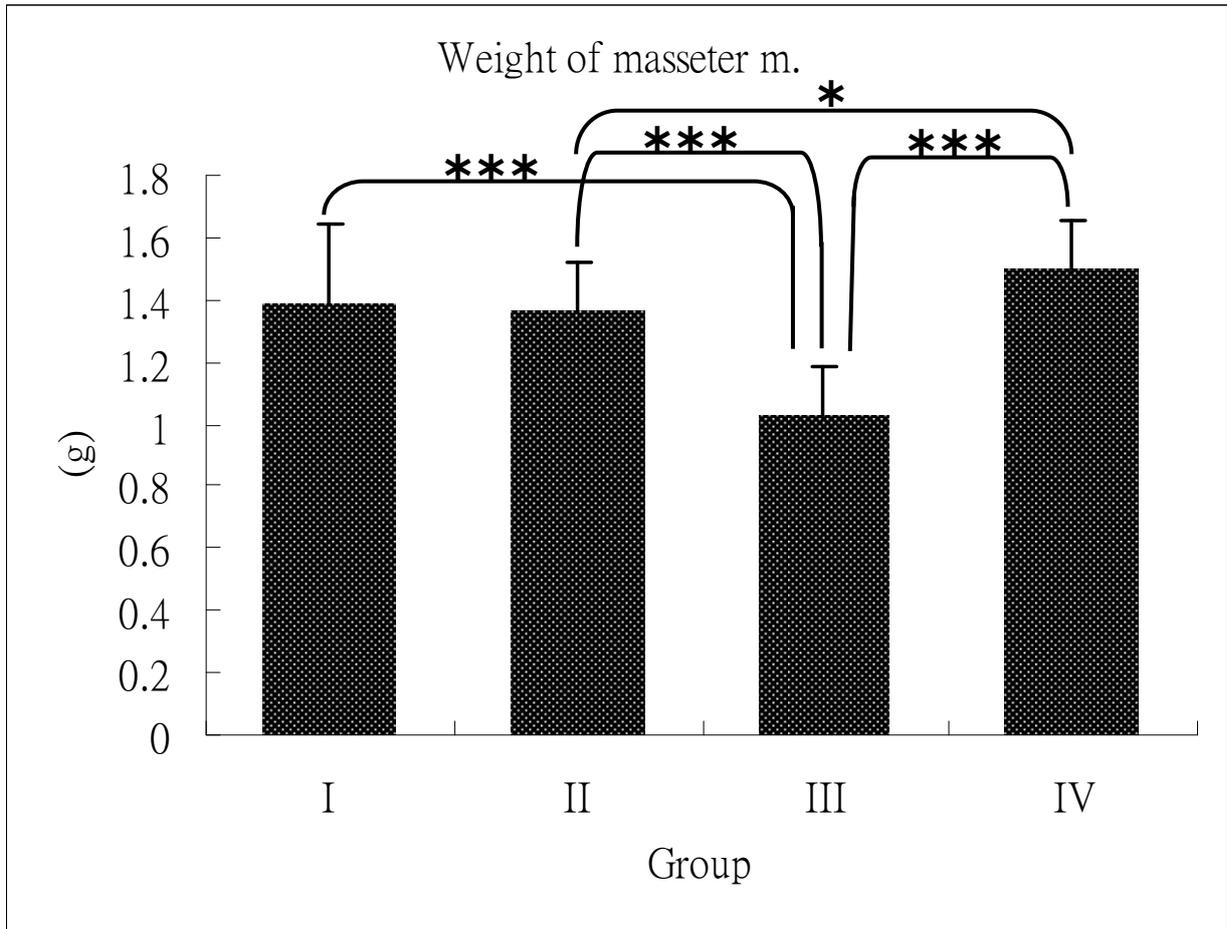


● 藥物注射點

(圖三) 切片位置。



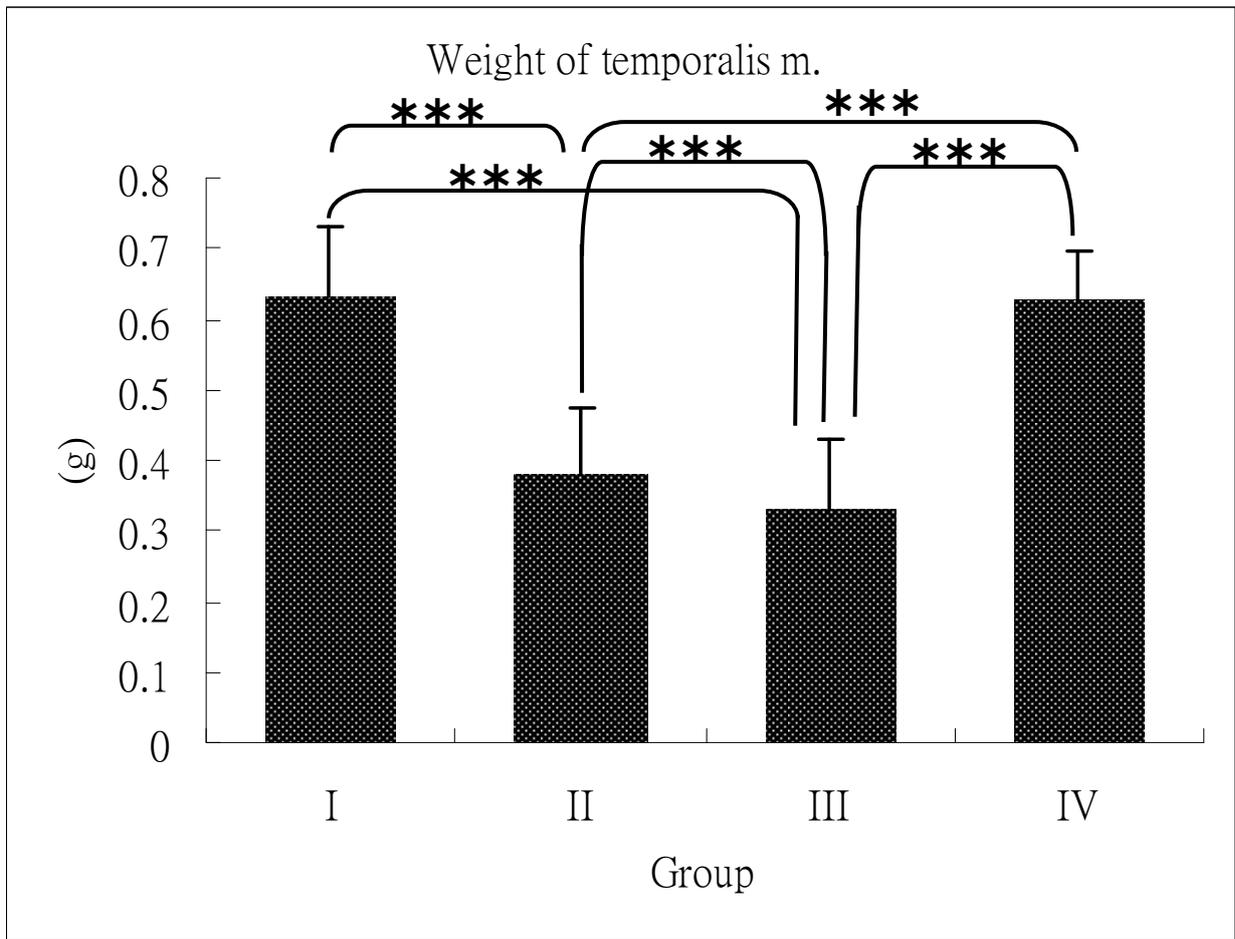
(圖四) 各組大鼠咬肌重量。



* : $P < 0.05$

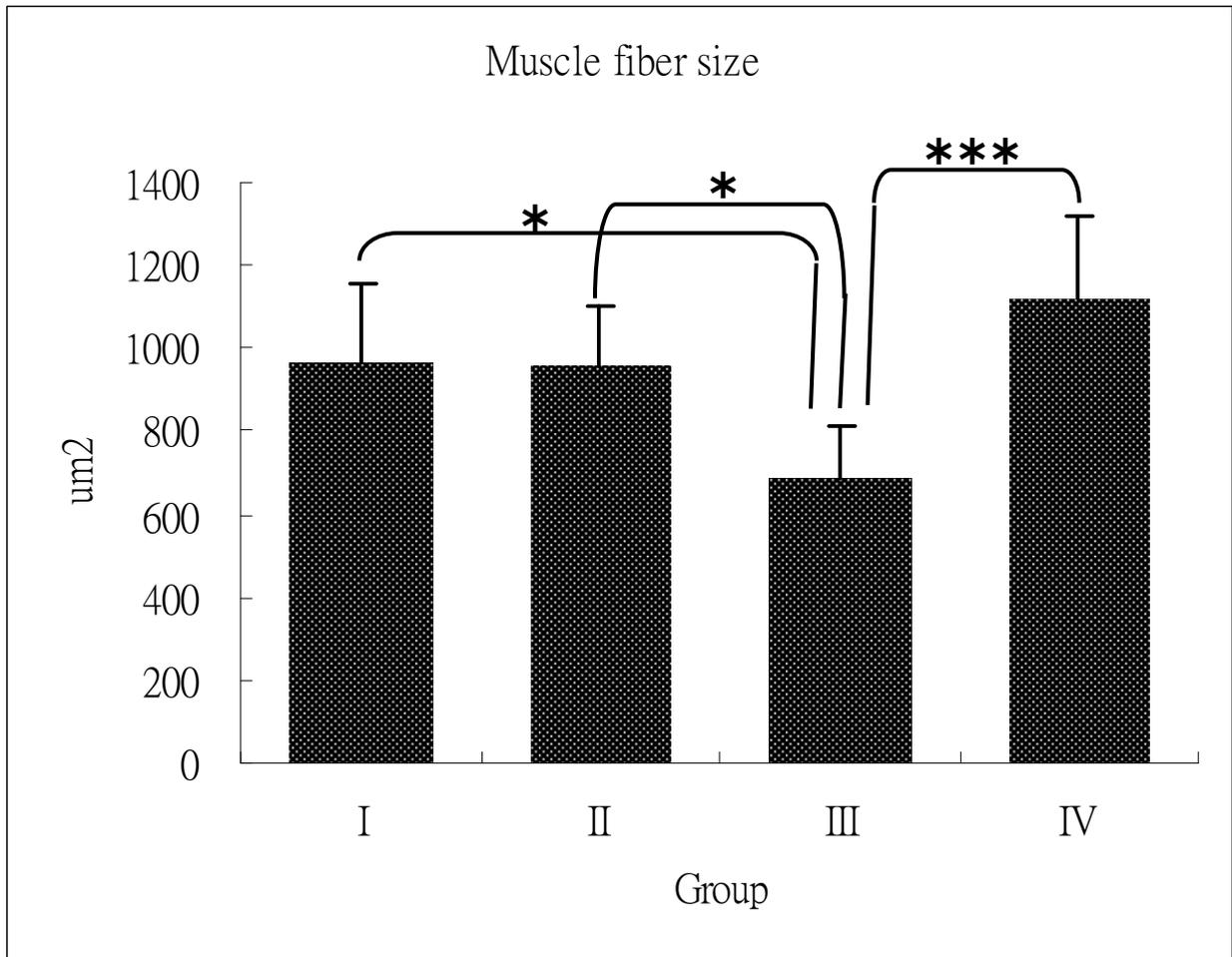
*** : $P < 0.001$

(圖五) 各組大鼠顳肌重量。



*** : $P < 0.001$

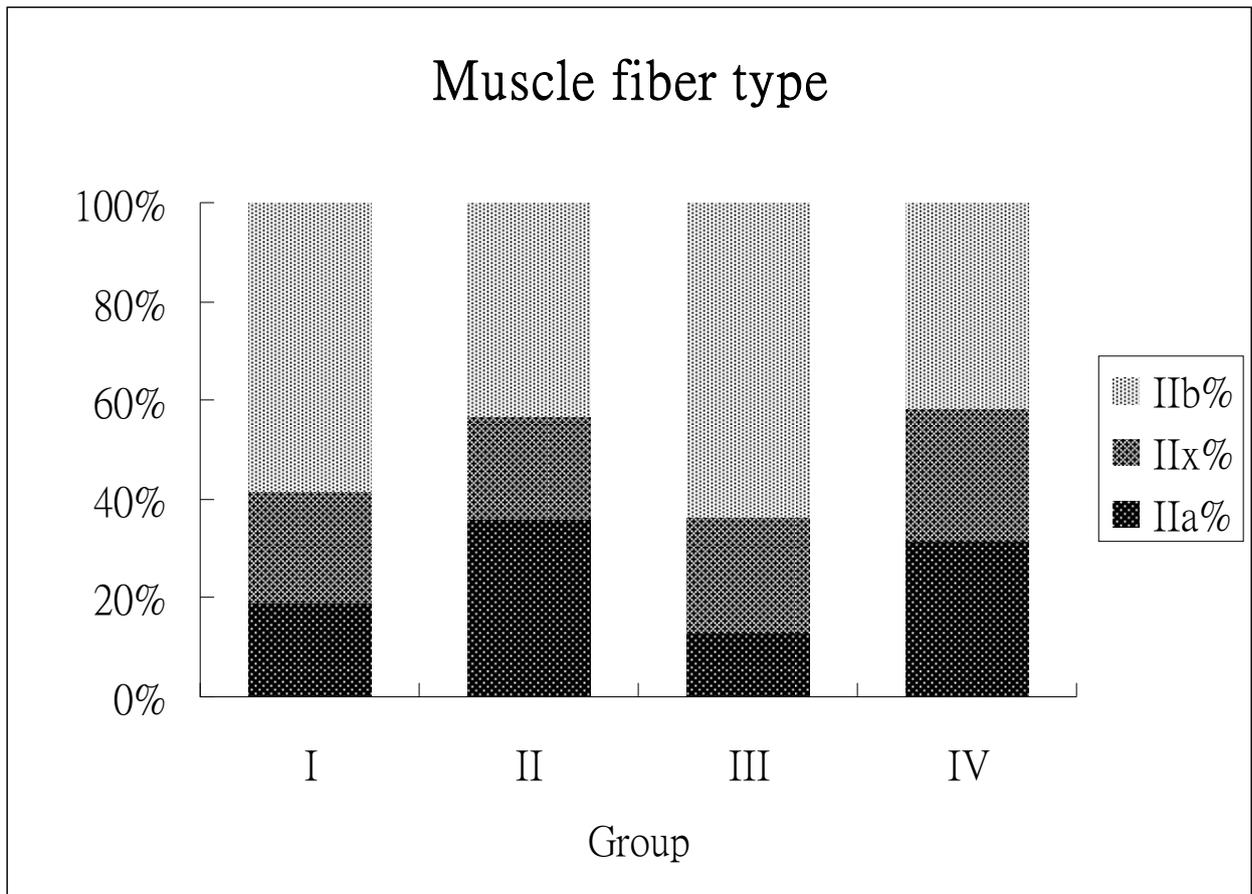
(圖六) 各組大鼠淺層咬肌肌纖維的大小



* : P < 0.05

*** : P < 0.001

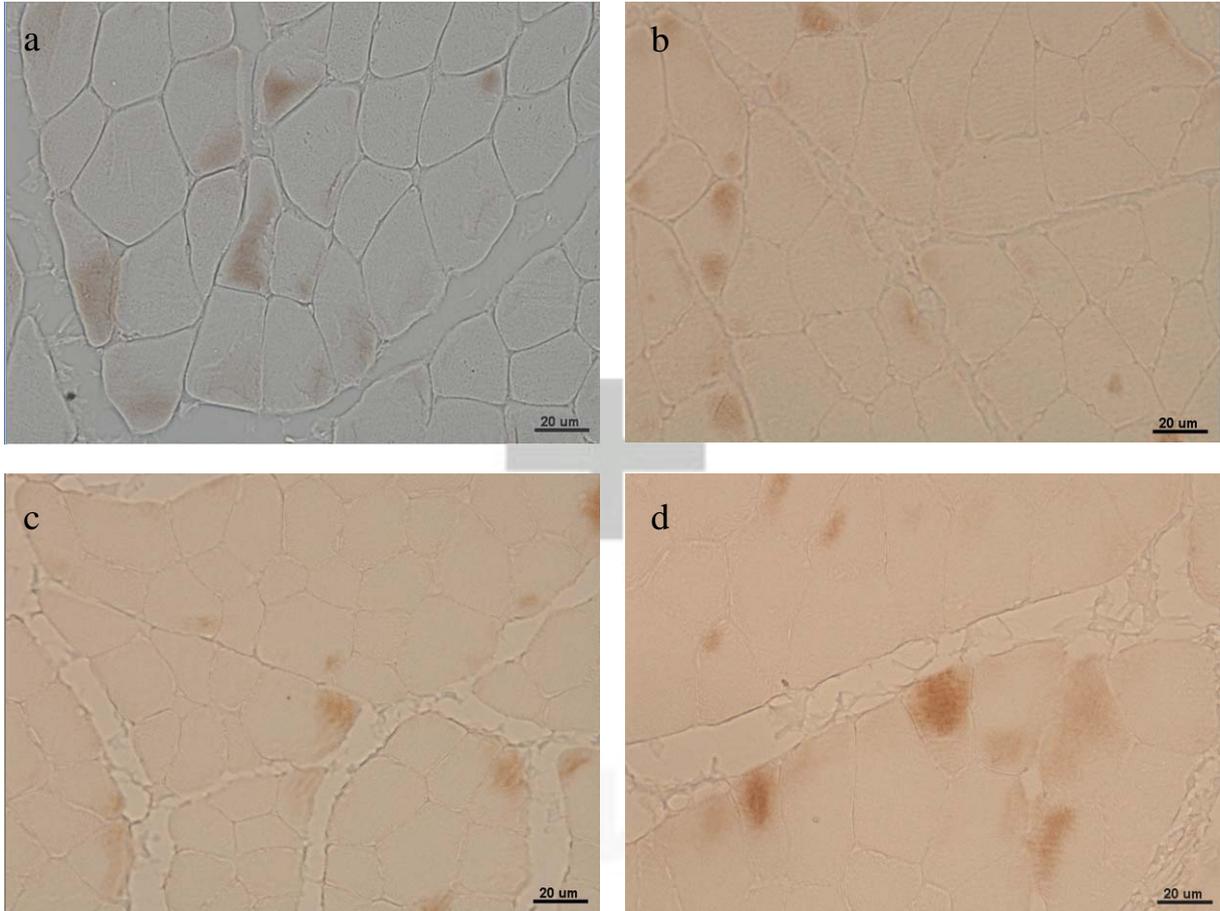
(圖七) 各組大鼠所含肌纖維的比例。



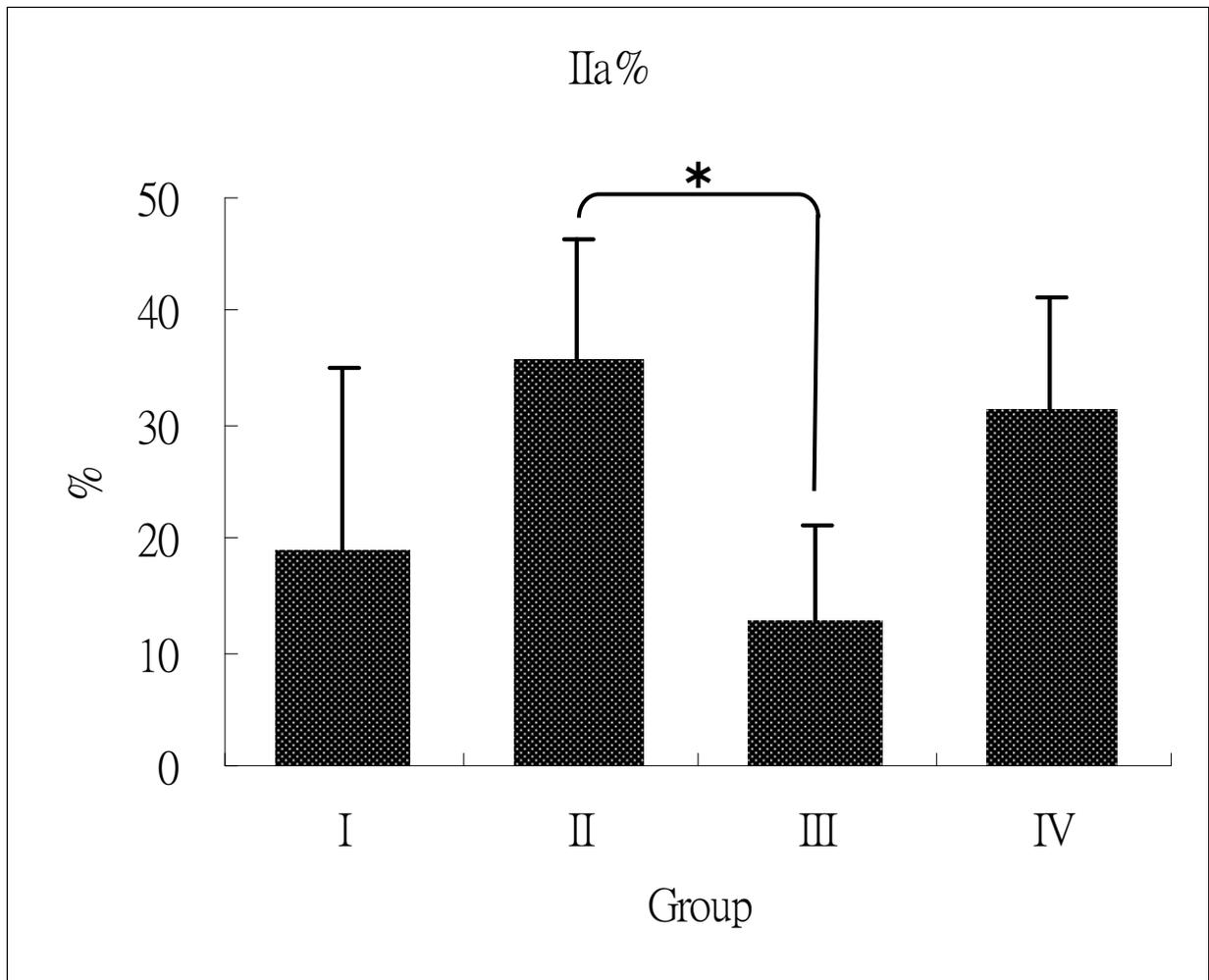
(圖八) 各組大鼠所含 type IIa 肌纖維。

(a) Group I (b) Group II (c) Group III (d) Group IV

染色方式為免疫染色法。放大倍率 400 倍。



(圖九) 各組大鼠所含 type IIa 肌纖維的比例。

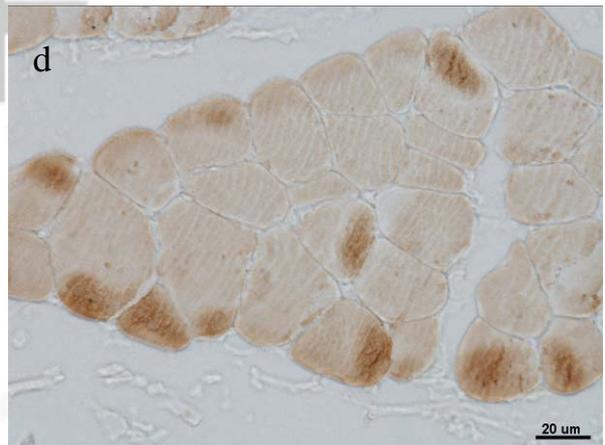
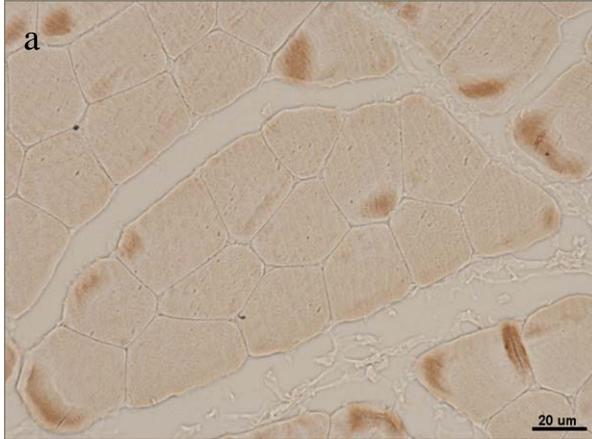


* : $P < 0.05$

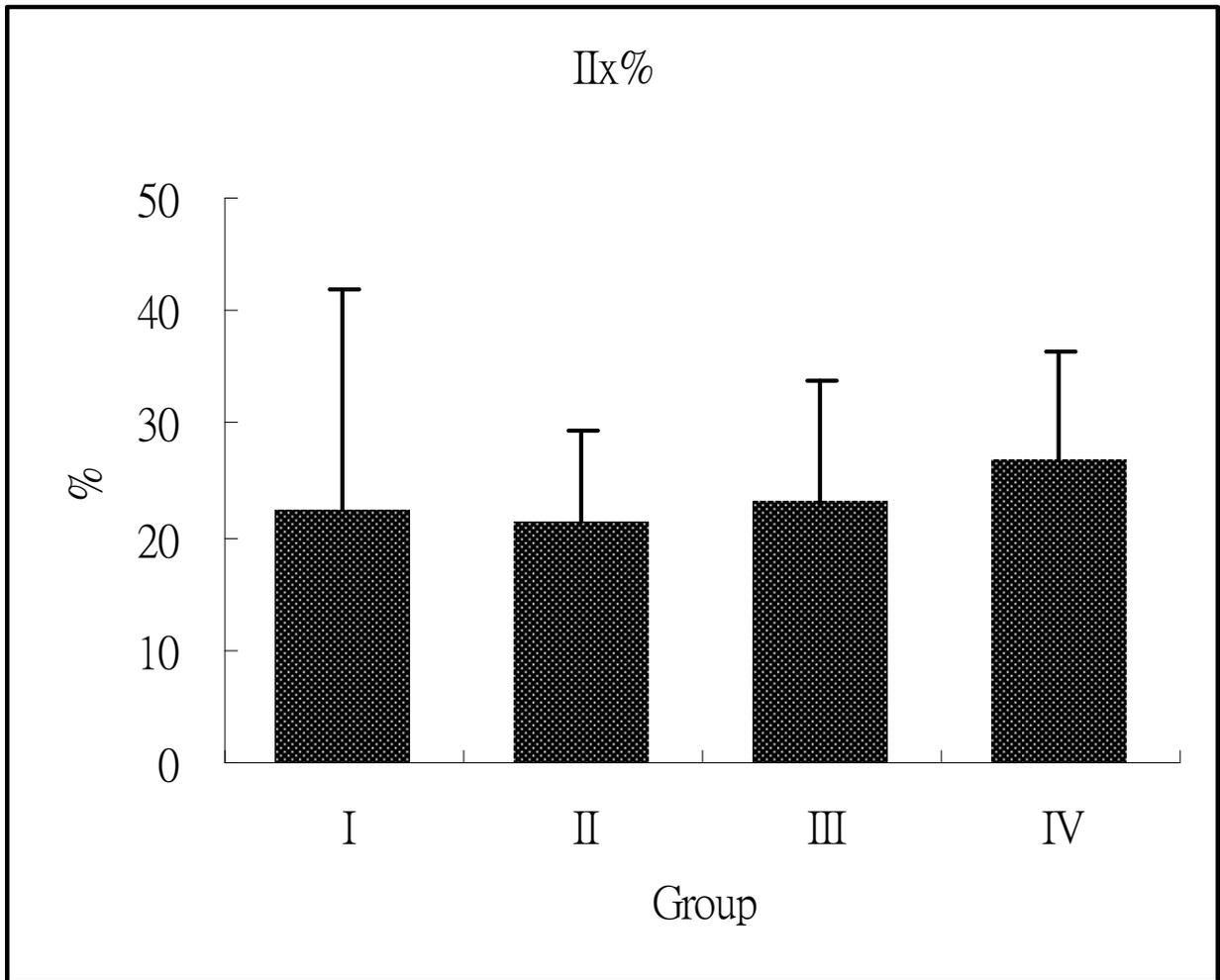
(圖十) 各組大鼠所含 type IIx 肌纖維。

(a) Group I (b) Group II (c) Group III (d) Group IV

染色方式為免疫染色法。放大倍率 400 倍。



(圖十一) 各組大鼠所含 type IIx 肌纖維的比例。



(圖十二) 各組大鼠所含 type IIx 肌纖維的比例。

