

## 颈部肌力失衡对年青大鼠髁突生长发育的影响

李旭华<sup>1)</sup>, 赵青<sup>2)</sup>, 陈建中<sup>3)</sup>, 王维琦<sup>3)</sup>, 代自超<sup>3)</sup>

(1) 云南省第三人民医院口腔科; 2) 雅博口腔诊所, 云南昆明 650000, 3) 昆明医科大学口腔医学院, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 探讨颈部肌力失衡是否会影响髁突的发育. **方法** 18只4周龄SD大鼠, 分为手术侧组(去除部分胸锁乳突肌)、对侧组及空白对照组. 术后1, 3, 5周处死, 组织学观察髁突形态变化, 免疫组化及TUNEL观察软骨细胞增殖与凋亡情况. **结果** PCNA阳性细胞术后3周, 肥大层阳性细胞数手术侧与非手术侧及空白组有差异. 凋亡细胞数不同时间点及不同组数未见显著性差异. **结论** 颈部肌力失衡在一定程度上对髁突软骨细胞增殖有影响, 但对髁突的发育影响不明显.

**[关键词]** 颈部; 肌力失衡; 髁突; 发育

**[中图分类号]** R782.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2014)05-0049-03

## Effect of Cervical Muscle Imbalance on the Growth and Development of Rat Condyle

LI Xu-hua<sup>1)</sup>, ZHAO Qing<sup>2)</sup>, CHEN Jian-zhong<sup>3)</sup>, WANG Wei-qi<sup>3)</sup>, DAI Zi-chao<sup>3)</sup>

(1) Dept. of Stomatology, The 3rd People's Hospital of Yunnan Province; 2) Yabo Dental Clinic, Kunming Yunnan 650000; 3) School of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** The aim was to explore whether the cervical muscle imbalance affect the growth and development of condyle or not. **Methods** Eighteen 4-week-old male rats were randomly divided into three groups: the experimental group (surgically induced unilateral sternocleidomastoid removal), the contralateral sides group, and the blank control group (nooperation). The rats were killed at intervals up to 5 weeks after surgery, then the morphological changes of condyle were observed by histological observation, and the proliferation and apoptosis of cartilage cells were observed using immunohistochemistry and TUNEL. **Results** There were significant differences in PCNA positive cell count among three groups in three weeks after operation. However, there was no significant difference in apoptotic cell count among groups. **Conclusion** Cervical muscle imbalance had effects on condylar cartilage cell proliferation in some degree, while no effects on the growth of condyle.

**[Key words]** Cervical part; Muscle imbalance; Condyle; Development

造成颈部肌力失衡的原因有许多, 除了有先天的原因, 如先天性斜颈, 还有其它原因, 如颈部姿势不正确等会引起颈部肌力失衡. 国内外研究发现颈部姿势不正会引起颞下颌关节疾病的相关症状, 但是否会影响髁突的生长发育还未深入研究. 本实验希望通过建立颈部肌力失衡的实验动物模型, 观察髁突生长发育情况, 为研究颈部肌力变化

与颌面部发育的关系提供实验依据.

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

选择4周龄雄性SD大鼠18只(昆明医科大学动物试验中心), 要求体重相近.

**[基金项目]** 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2011Y198)

**[作者简介]** 李旭华(1974~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 主治医师, 主要从事口腔临床与科研工作.

**[通讯作者]** 陈建中. E-mail:247293494@qq.com

## 1.2 分组与手术方法

1.2.1 随机分组分为 3 组 第 1 组 (6 只): 胸锁乳突肌手术侧组 (右侧); 第 2 组 (6 只): 对侧组 (左侧); 第 3 组 (6 只): 空白对照组。

1.2.2 手术方法 取左侧卧位固定大鼠, 常规消毒, 从右侧下颌角处皮肤切开直至颈部, 分离皮下组织, 暴露胸锁乳突肌, 将胸锁乳突肌去除部分肌束后将断端缝合, 造成右侧肌束紧张。空白对照组不做任何处理。

1.2.3 切片制作 术后 1、3、5 周时分别处死大鼠, 取出手术侧 (右侧)、非手术侧 (左侧)、空白对照组 (右侧) 的髌突软骨, 多聚甲醛溶液固定, 10% EDTA 溶液脱钙 2 周。梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 行 4  $\mu\text{m}$  厚的连续矢状切片。

1.2.4 HE 染色切片脱蜡及水化 将石蜡切片浸于二甲苯 I (10 min), 二甲苯 II (5 min) 脱蜡。取出切片依次置入 100%、95%、90%、80%、70% 各级酒精各 5 min, 取出置于蒸馏水 I、II 中 (各 5 min) 脱水。

HE 染色: 苏木素 (3 min)  $\rightarrow$  流水冲洗 (10 min)  $\rightarrow$  伊红 (1 min)  $\rightarrow$  70%、80% 乙醇 (各 1 min)  $\rightarrow$  95% (5 min)  $\rightarrow$  二甲苯 I、II (各 5 min)。

1.2.5 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 免疫组织化学染色检测增殖细胞石蜡切片常规脱蜡至水; 枸橼酸盐缓冲液微波炉抗原修复; 3% 过氧化氢处理, 以消除内源性过氧化物酶活性; 非免疫性动物血清孵育 10 min, 甩去; 滴加一抗 (PCNA 抗体, 工作浓度 1:100), 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, PBS 冲洗 3  $\times$  3 min/次; 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min, PBS 冲洗 3  $\times$  3 min/次; 滴加 SABC 复合液, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min, PBS 冲洗 3  $\times$  3 min/次; 滴加 DAB 显色液, 显微镜下观察呈色, 呈色约 1 min, 见到明显棕黄色颗粒为止; 蒸馏水漂洗, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。对照组: 采用空白对照, 以 PBS 代替一抗, 其余程序与正常染色相同。

1.2.6 原位末端标记法 (TUNEL 法) 检测凋亡细胞检测凋亡细胞切片脱蜡至水; 蛋白酶 K 孵育 37  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min; PBS 洗 2  $\times$  3 min/次; TUNEL 反应液孵育, 50  $\mu\text{L}$ /片, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 60 min; PBS 洗 3  $\times$  3 min/次; 辣根过氧化酶孵育, 50  $\mu\text{L}$ /片, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min, PBS 洗 3  $\times$  3 min/次, DAB 显色剂室温孵育 5 ~ 10 min, PBS 洗 3  $\times$  3 min/次, 苏木素复染, 酒精脱水, 干燥, 中性树胶封片。对照组: 采用空白对照, 以 TUNEL 染色试剂盒中的标记液代替反

应液, 其余程序与正常染色相同。

## 1.3 结果判定

光学显微镜下, PCNA 免疫组化染色阳性细胞的棕黄色阳性反应颗粒位于细胞核内。各样本在 40  $\times$  10 高倍镜下, 在髌突软骨的增殖层和肥大层, 连续计数 3 个视野中的 PCNA 阳性细胞数, 取均值。光学显微镜下, TUNEL 染色阳性细胞的细胞核呈蓝黑色。各样本于 40  $\times$  10 高倍镜下, 在髌突软骨的肥大层, 连续计数 3 个视野中的阳性细胞数, 取均值。

## 1.4 统计学处理

应用 SPSS 统计分析软件对实验数据进行双因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 HE 染色观察

大鼠髌突软骨分为 4 层, 依次为纤维层、增殖层、成软骨细胞层及肥大细胞层。对手术侧、非手术侧及空白对照组的切片 HE 染色进行观察, 发现各组在形态上差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 PCNA 阳性细胞表达

PCNA 阳性细胞主要分布于髌状突软骨的增殖层和肥大层。术后 3 周, 手术侧与非手术侧及空白对照组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。手术侧, 术后 3 周与术后 1 周差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

### 2.3 TUNEL 阳性细胞表达

TUNEL 阳性细胞核主要见于肥大层。各组在不同时间点凋亡细胞数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 1 各组术后不同时间点的 PCNA 阳性细胞数  
[个, ( $\bar{x} \pm s$ )]

Tab. 1 The PCNA positive cell counts in three groups at different times [number, ( $\bar{x} \pm s$ )]

组别	处死时间		
	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
手术侧	50.99 $\pm$ 6.60	25.86 $\pm$ 1.40 <sup>△</sup>	41.92 $\pm$ 3.77
非手术侧	53.49 $\pm$ 8.72	63.71 $\pm$ 7.03 <sup>▲</sup>	51.82 $\pm$ 1.09
空白对照组	55.46 $\pm$ 1.58	43.03 $\pm$ 5.03 <sup>▲</sup>	54.84 $\pm$ 0.90

与术后 1 周比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与同一时间点手术侧比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ 。

表 2 各组术后不同时间点的细胞凋亡数 [个, ( $\bar{x} \pm s$ )]  
 Tab. 2 The apoptosis cell counts in three groups at different times [number, ( $\bar{x} \pm s$ )]

组 别	处死时间		
	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
手术侧	10.0 ± 0.1	14.1 ± 1.2	13.5 ± 0.2
非手术侧	11.1 ± 0.1	12.6 ± 0.3	13.2 ± 1.7
空白对照组	12.0 ± 0.2	13.3 ± 1.5	12.3 ± 1.3

### 3 讨论

国外一些学者<sup>[1,2]</sup>认为咀嚼肌群和头颈肩肌群是一个统一的功能性整体, 并已有研究表明, 下颌感觉系统、运动系统与颈部感觉系统、运动系统存在神经生理方面的联系<sup>[3]</sup>. 国内张震康<sup>[4]</sup>认为姿势肌链是由头部背侧的颈后部肌肉通过帽状筋膜绕过头顶, 连接颞肌、咬肌和舌骨上、下肌群组成. 这个肌链和胸锁乳突肌等支持头的垂直位置. 因车祸致颈部扭伤的患者, 往往在下颌作开闭口运动后, 头部才随之产生轻微运动, 而正常人则在下颌作开闭口运动之前或同时, 头部产生轻微运动, 并认为这是由于颈部扭伤扰乱了咀嚼肌群与头颈肌群之间正常的功能性联系, 从而使正常的功能性下颌——头颈联合运动受到影响<sup>[5]</sup>. 颈部肌群除了对咀嚼肌群有影响外, 还与下颌运动有着密切的关系. 姜婷<sup>[6]</sup>等通过调查 10 名健康成人的下颌息止位和各种运动时颞肌前后腹、胸锁乳突肌和斜方肌的肌电活动发现颞肌前后腹、胸锁乳突肌和斜方肌均参与维持下颌息止位及下颌运动. 研究结果提示颈部肌力异常可导致头面部肌群及下颌运动功能发生异常.

髁突是颞下颌关节的主要组成部分, 也是下颌骨的重要生长中心, 早期髁突发育除受遗传调控外, 还受到应力、血供及相关生长因子的影响, 其中力学因素的作用尤为重要. 而髁突所受到的力学因素主要是咀嚼力及咀嚼肌的作用. 咀嚼肌及下颌运动的异常会带来咀嚼力的异常, 而咀嚼力的变化又会进一步影响到髁突的生长发育. 国内学者<sup>[7]</sup>通过软喂食喂食新生小鼠, 发现咀嚼力降低会导致下颌骨髁突生长减慢和髁突软骨厚度的变化. 黄洋等<sup>[8]</sup>选用 40 只 4 周龄大鼠, 造成偏侧咀嚼模型, 8 周后处死动物, 取两侧髁突软骨和嚼肌, 分别用光镜和透射电镜观察髁突软骨的形态和嚼肌的超微结构, 发现偏侧咀嚼侧髁突软骨增殖层、过渡层变薄, 且非咀嚼侧重于咀嚼侧. 偏侧咀嚼侧嚼肌肌膜不清, 线粒体排列紊乱, 非咀嚼侧线粒体肿胀, 两侧嚼肌线粒体都出现空泡化. 国外学者发现颈部肌

肉功能异常可引起颞下颌关节疾病的症状<sup>[9]</sup>. 提示颈部肌张力与颞下颌关节发育有着一定的联系.

本课题通过截除 SD 大鼠部分胸锁乳突肌造成颈部肌力失衡, 从组织学和分子生物学进行观察. 组织学上未见到明显差异. 从髁突软骨细胞增殖情况看, 术后 3 周, 手术侧与非手术侧及空白对照组差异有统计学意义. 而软骨细胞凋亡情况, 各组未见到显著性差异. 提示虽然髁突软骨细胞增殖情况有变化, 但截除大鼠部分胸锁乳突肌造成的颈部肌力失衡对咀嚼肌影响有限, 施加到髁突上的力不足以使髁突软骨细胞产生明显的凋亡进而影响到髁突的生长发育. 当然, 颈部肌力失衡是有个范围和过程的, 超过这个度的, 则会引起颌面部及颞下颌关节发育异常. 因此, 临床上凡是会造成颈部及颌面部肌力失衡的因素都应引起重视, 并及早处理, 使颌面及颞下颌关节能正常的生长.

### [参考文献]

- [1] KOHNO S, KOHNO T, MEDINA R U. Rotational head motion concurrent to rhythmical mandibular opening movements[J]. J Oral Rehabil, 2001, 28(8): 740 - 747.
- [2] PALLEGAMA R W, RANASINGHE A W, WEERASINGHE V S, et al. Influence of masticatory muscle pain on electromyographic activities of cervical muscles in patients with myogenous temporomandibular disorders [J]. J Oral Rehabil, 2004, 31(5): 423 - 429.
- [3] BROWNE PA, CLARK G T, KUBOKI T, et al. Concurrent cervical and craniofacial pain. A review of empiric and basic science evidence[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998, 86(6): 633 - 640.
- [4] 张震康. 口腔解剖生理学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 96 - 98.
- [5] ERIKSSON P O, ZAFAR H. Haggman-Henrikson B. De-ranged jaw-neck motor control in whiplash-associated disorders[J]. Eur J Oral Sci, 2004, 112(1): 25 - 32.
- [6] 姜婷, 杨朝晖. 健康人下颌运动时头颈肩部肌电活动的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(6): 431 - 434.
- [7] 王冠超, 刘洪臣, 马军利, 等. 咀嚼力降低对发育期大鼠髁突发育的组织学影响 [J]. 口腔颌面修复学杂志, 2007, 8(2): 81 - 86.
- [8] 黄洋, 陈远萍, 倪雪岩, 等. 偏侧咀嚼大鼠髁突组织学及嚼肌超微结构的研究 [J]. 口腔医学研究, 2003, 19(4): 277 - 279.
- [9] KONDO E, AOBA T J. Case report of malocclusion with abnormal head posture and TMJ symptoms [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1999, 116(5): 481 - 493.

(2014 - 02 - 16 收稿)