

[文章编号] 1000-1182(2008)04-0365-03

# 青春期大鼠前伸下颌后浅层嚼肌细胞膜乙酰胆碱受体研究

黄宁<sup>1</sup>, 陈开云<sup>2</sup>, 罗颂椒<sup>2</sup>

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学; 2.四川大学华西口腔医院 正畸科, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 研究功能矫形前伸青春期大鼠下颌后, 前伸下颌的浅层嚼肌细胞膜乙酰胆碱受体最大结合容量和亲和性的变化, 探讨功能矫形的神经肌肉调控机制。方法 选用40只5周龄SD雄性大鼠, 随机分为实验组和对照组各20只。实验组大鼠戴自制上颌功能矫治器, 引导下颌前伸, 对照组不戴。采用放射受体分析法测定2组大鼠浅层嚼肌细胞膜上乙酰胆碱受体的最大结合容量和亲和性值。结果 实验组大鼠浅层嚼肌细胞膜上乙酰胆碱受体最大结合容量明显增加, 具有高度亲和力, 大于对照组。结论 功能矫形可增加浅层嚼肌细胞膜上乙酰胆碱受体与乙酰胆碱的结合量及亲和力, 导致肌肉的结构与功能发生适应性改建。

**[关键词]** 功能矫形; 浅层嚼肌; 乙酰胆碱受体

**[中图分类号]** R783.5 **[文献标识码]** A

Changes of the acetylcholine receptor on rat s superficial masseter muscles after functional mandibular advancement HUANG Ning<sup>1</sup>, CHEN Kai-yun<sup>2</sup>, LUO Song-jiao<sup>2</sup>. ( 1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** Objective The purpose of this study was to evaluate the maximum binding( $B_{max}$ ) and affinity  $K_d$  value changes of acetylcholine receptor(n-AchR) on rat s superficial masseter muscles after functional mandibular advancement. Methods Forty 5-week-old male SD rats were randomly divided into experimental and control groups. The mimic functional appliances were only used in experimental groups, and the rats of two groups were killed after 1, 3, 7, 14 days. Radio-ligand binding assay(RBA) was applied to determine the  $B_{max}$  and  $K_d$  value of n-AchR on the superficial masseter muscles. Results The  $B_{max}$  of n-AchR in experimental groups was higher than that in the control groups at all time points, and the differences had statistical significance. The  $K_d$  value of n-AchR was higher in experimental group than that in control groups in 1, 3, 7 days, while  $K_d$  value in experimental group of n-AchR was lower than that in control groups in 14 days. The differences had statistical significance in 7 and 14 days, but the differences had no statistical significance in 1 and 3 days. Conclusion The functional orthopedics can increase the  $B_{max}$  and affinity of n-AchR on rapid growing rat s superficial masseter muscles.

**[Key words]** functional orthopedics; superficial masseter muscles; acetylcholine receptor

功能矫形是口腔正畸学中早期治疗儿童骨性或功能性下颌后缩畸形的最主要方法, 浅层嚼肌是前伸下颌的主要肌肉之一。近年来, 很多学者已对激素及生长因子在功能矫形中的调控机制进行了较为深入的研究, 但是功能矫形的另一重要调控机制——神经肌肉变化的研究, 目前报道较少。本研究采用功能矫形方法前伸青春期大鼠下颌, 观察浅层嚼肌

细胞膜乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, n-AchR)最大结合容量(maximum binding,  $B_{max}$ )和亲和性(affinity)( $K_d$ )值的变化, 以进一步探讨功能矫形的神经肌肉调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

选用40只SD大白鼠, 雄性, 5周龄, 平均体重95 g, 随机分为实验组和对照组各20只。实验组大鼠戴自制上颌功能矫治器, 引导下颌前伸, 每日白天戴矫治器12 h<sup>[1]</sup>, 对照组不戴。分别在实验第1、

[收稿日期] 2007-10-15; [修回日期] 2008-03-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30171024)

[作者简介] 黄宁(1968-), 男, 湖北人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 陈开云, Tel: 028-85501425

3、7、14天，采用断颈法处死动物，立即切取大鼠双侧浅层嚼肌进行放射受体分析。

1.2 放射受体分析法

肌组织剪成1 mm×1 mm×1 mm小块，用改良的Monnier法<sup>[2]</sup>，加4倍体积预冷的0.05 mol/L TrisHCl缓冲液(pH=7.4)，用高速组织匀浆机制成组织匀浆，800 g离心15 min，去沉淀；悬液加入含1% Tritonx- 100上述TrisHCl缓冲液，48 000 g离心20 min，弃上清，膜沉淀溶于2 mL的TrisHCl中。将所得膜蛋白按每管300 μg分装7管，依次加入<sup>125</sup>I标记银环蛇神经毒素 Bgt(Sigma公司，美国)，每管毒素的浓度分别为0.06、0.3、0.6、3、6、12、30 nmol/L，同时设非特异管，加入非标记 Bgt(终浓度120 nmol/L)。分析缓冲液补足体积至400 μL。25 ℃恒温水浴振荡30 min。离心沉淀法提取沉淀，用HX- 6010 放射免疫计数器(西安二六二厂)测定放射性强度。

将测定结果输入计算机，Scatchard法分析后计算出乙酰胆碱受体的最大结合容量(B<sub>max</sub>)和亲和性(K<sub>d</sub>)值。

1.3 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行统计分析，对实验组和对照组数据进行配对资料的t检验，P<0.05为具有统计学意义。

2 结果

实验组和对照组大鼠浅层嚼肌细胞膜n- AchR与<sup>125</sup>I- Bgt的特异性结合量随着<sup>125</sup>I- Bgt加入量的增加而逐渐上升，并最终趋于平衡，表明n- AchR与<sup>125</sup>I- Bgt的结合具有可饱和性；另外，实验组<sup>125</sup>I- Bgt与n- AchR结合的饱和曲线明显高于对照组(图1)。

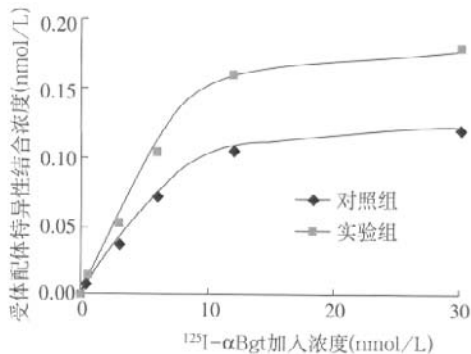


图 1 <sup>125</sup>I-αBgt与浅层嚼肌细胞膜n-AchR结合的饱和曲线

Fig 1 Saturation curve of <sup>125</sup>I-αBgt and the superficial masseter muscle's n-AchR binding

实验组和对照组浅层嚼肌细胞膜n- AchR的B<sub>max</sub>值见表1。统计分析表明，实验组大鼠浅层嚼肌细胞膜上乙酰胆碱受体最大结合容量大于对照组，其差异具有统计学意义(P<0.01)。

表 1 实验组和对照组浅层嚼肌细胞膜n- AchR的B<sub>max</sub>值 fmol/mg Pro)

Tab 1 B<sub>max</sub> of the superficial masseter muscle s n- AchR in two group\$ fmol/mg Pro)

时间	n- AchR的B <sub>max</sub> 值			
	实验组	对照组	差值	P值
第1天	83.330 ±5.561	30.450 ±6.614	52.878 ±9.775	P<0.01
第3天	125.598 ±0.801	83.084 ±0.760	42.514 ±1.714	P<0.01
第7天	281.560 ±46.862	97.282 ±9.379	184.278 ±45.836	P<0.01
第14天	415.486 ±47.216	231.164 ±17.816	184.322 ±47.306	P<0.01

实验组和对照组浅层嚼肌细胞膜n- AchR的亲和性(K<sub>d</sub>)值见表2。统计分析表明，实验组大鼠浅层嚼肌细胞膜上乙酰胆碱受体亲和力在实验的第1天和第3天虽大于对照组，但差别无统计学意义(P>0.05)；实验组在实验第7天仍大于对照组(P<0.05)，第14天小于对照组，其差异具有统计学意义(P<0.01)。

表 2 实验组和对照组浅层嚼肌细胞膜n- AchR的亲和性 K<sub>d</sub>值 nmol/L)

Tab 2 K<sub>d</sub> values of the superficial masseter muscle s n- AchR in two group\$ nmol/L)

时间	n- AchR的亲和性(K <sub>d</sub> )值			
	实验组	对照组	差值	P值
第1天	6.973 ±3.454	5.417 ±1.476	1.558 ±3.351	P>0.05
第3天	12.328 ±1.595	7.279 ±2.476	5.050 ±3.607	P>0.05
第7天	12.361 ±1.959	7.541 ±1.801	4.820 ±3.748	P<0.05
第14天	54.724 ±2.389	61.971 ±1.208	- 7.247 ±1.886	P<0.01

3 讨论

功能矫形通过矫治器将口周肌和咀嚼肌收缩产生的力学信号传递到牙、牙弓及颌骨等需要矫治的部位，同时使功能过度或功能不足的肌肉恢复正常，利用肌能力引导口颌系统正常生长发育。浅层嚼肌是面部主要的前伸提升下颌的肌肉之一，其功能的加强有利于引导下颌前伸，改正儿童下颌后缩畸形。

三叉神经是支配浅层嚼肌的主要脑神经，乙酰胆碱是存在于三叉神经外周运动支中最主要的化学性神经递质。在神经肌肉接头处乙酰胆碱与肌细胞膜上的乙酰胆碱受体结合后，触发突触后细胞的电反应和化学反应，引起细胞收缩，介导三叉神经对肌肉的调控作用。n- AchR是浅层嚼肌细胞膜上最主要的神经递质受体。银环蛇神经毒素能特异性与n- AchR结合。

国内外学者研究发现,运动疲劳后,大鼠腓肠肌中乙酰胆碱的含量增加;野生鼠过度活动时,神经肌肉接头处乙酰胆碱受体亚单位的基因呈多形性改变<sup>[3-4]</sup>。王昕等<sup>[5-6]</sup>研究发现,功能矫形下颌前伸后,实验2周大鼠浅层嚼肌肌电活动高于对照组;线粒体数量增多,体积代偿性增大。浅层嚼肌结构和功能均发生了相应变化。

放射受体分析法评价是否具有真正的受体结合反应的标准有:结合必须具有可饱和性;结合具有适度的亲和力。 $B_{max}$ 代表受体的最大结合容量,数值越大,代表细胞膜表面可供结合的活性受体数量越多;亲和性( $K_d$ )值为平衡离解常数,反映受体结合的亲和力,其值越小,表明亲和力越高,亲和性( $K_d$ )值在 $10^{-10}$ ~ $10^{-9}$  mol/L为高亲和力,在 $10^{-5}$  mol/L时为低亲和力。

本研究结果显示, n-AchR与 $^{125}$ I-Bgt的结合具有可饱和性,2组亲和性( $K_d$ )值均为 $10^{-9}$ ~ $10^{-8}$  mol/L,显示大鼠浅层嚼肌细胞膜n-AchR具有高亲和力。实验第1、3、7天时,实验组亲和性( $K_d$ )值大于对照组(第7天2组的差异具有统计学意义),说明在矫形治疗开始及初期阶段,实验组大鼠浅层嚼肌还没有接受足够的生物力学刺激,因此实验组大鼠嚼肌细胞膜n-AchR的亲和力小于对照组;第14天时,实验组的亲和性( $K_d$ )值小于对照组,且差异具有统计学意义,说明随着矫形治疗时间的增加,实验组大鼠浅层嚼肌细胞膜n-AchR的亲和力开始增强,并大于对照组大鼠。本研究也发现,实验组大鼠浅层嚼肌细胞膜n-AchR的 $B_{max}$ 值随时间延长而增加,且始终大于对照组,说明浅层嚼肌细胞膜上n-AchR数量随生长发育和矫形治疗的进行而增加。这与陈开云等<sup>[7]</sup>在青春期大鼠翼外肌细胞膜上n-AchR数量变化的研究一致。

功能矫形前伸下颌后,青春期大鼠浅层嚼肌细胞膜上n-AchR最大结合容量 $B_{max}$ 明显增加,而亲和性( $K_d$ )值晚期(第14天时)减小。说明功能矫形力作用在青春期大鼠浅层嚼肌细胞膜上,使细胞膜n-AchR的结合位点增加,受体亲和力增大,更多的乙

酰胆碱可以与细胞膜上n-AchR结合,从而触发更强的突触后细胞电反应和化学反应。这从神经肌肉调控机制上,初步解释了功能矫形可以改变浅层嚼肌结构和增强浅层嚼肌功能的结论。

## 【参考文献】

- [1] 罗颂椒, 饶跃, 王大章, 等. 功能矫形前伸下颌对幼年大鼠颅颌生长发育影响的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1992, 10(3): 205-209.  
LUO Song-jiao, RAO Yue, WANG Da-zhang, et al. Craniofacial adaptation after mandibular functional protrusion in young rat[J]. West China J Stomatol, 1992, 10(3): 205-209.
- [2] Monnier VM, Fulpius BW. A radioimmunoassay for the quantitative evaluation of anti-human acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis[J]. Clin Exp Immunol, 1977, 29(1): 16-22.
- [3] 殷劲, 杨范昌, 樊开明. 疲劳时肌肉中的Ach量变[J]. 中国运动医学杂志, 1987, 6(1): 11-15.  
YIN Jin, YANG Fan-chang, FAN Kai-ming. Quantitative variation of Ach in the muscle when fatigued[J]. Chinese J Sports Medicine, 1987, 6(1): 11-15.
- [4] Degli-Esposti MA, Dallas PB, Dawkins RL. Neuromuscular function and polymorphism of the acetylcholine receptor gamma gene[J]. Muscle Nerve, 1992, 15(5): 543-549.
- [5] 王昕, 罗颂椒, 周秀坤, 等. 功能矫形前伸下颌后幼年大鼠下颌前伸肌的组织化学研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1992, 10(3): 220-223.  
WANG Xin, LUO Song-jiao, ZHOU Xiu-kun, et al. Histochemical changes of LPM and SMM to mandibular functional protrusion in growing rats[J]. West China J Stomatol, 1992, 10(3): 220-223.
- [6] 王昕, 罗颂椒, 杨俊业, 等. 功能矫形前伸大鼠下颌后翼外肌和浅层嚼肌活动的实验研究[J]. 口腔正畸学, 1995, 2(3): 100-102.  
WANG Xin, LUO Song-jiao, YANG Jun-ye, et al. Effect of mandibular functional protrusion on the myoelectric activity of the lateral pterygoid muscles and superficial masseter muscles in growing rats[J]. Chin J Orthodont, 1995, 2(3): 100-102.
- [7] 陈开云, 罗颂椒. 前伸青春期大鼠下颌后翼外肌细胞膜乙酰胆碱受体特性变化的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2003, 21(5): 400-402.  
CHEN Kai-yun, LUO Song-jiao. Characteristic changes of acetylcholine receptor in rat lateral pterygoid muscles after functional mandibule advancement[J]. West China J Stomatol, 2003, 21(5): 400-402.

(本文编辑 汤亚玲)

## 《国际口腔医学杂志》被“中国科技论文统计源期刊”收录

中国科技论文统计源期刊即中国科技核心期刊,由中华人民共和国科技部中国科学技术信息研究所评选,是经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐的各个学科的重要科技期刊。《国际口腔医学杂志》2008年起被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊),大量刊登原创性论文,欢迎投稿。

《国际口腔医学杂志》编辑部